รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 2A6 ที่ย่อยสลายนิโคตินในคนและเอนไซม์ CYP2A13 ที่ย่อยสลายสารก่อมะเร็ง 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) ของพืชสมุนไพรที่สำคัญในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา)

Inhibition of the human cytochrome P450, CYP2A6, the nicotine metabolizing enzyme and CYP2A13, the 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) metabolizing enzyme by folk medicine in Ban-Ang-ed Officail Community Forest Project (The Chaipattana Foundation)

โดย

ผศ.ดร.ทรงกลด สารภูษิต

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

รศ.ดร. พรพิมล รงค์นพรัตน์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผศ.ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๗

มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง “การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 2A6 ที่ย่อยสลายนิโคตินในคนและเอนไซม์ CYP2A13 ที่ย่อยสลายสารก่อมะเร็ง 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) ของพืชสมุนไพรที่สำคัญในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา)” สามารถมีผลการทดลองที่ก้าวหน้ามาจนได้เสร็จสมบูรณ์เป็นรายงานฉบับนี้ ต้องขอขอบคุณการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยบูรพา เป็นเวลา 2 ปี 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 Kansus ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ให้ความกรุณามอบยีน rat CPR CYP2A6 และ CYP2A13 ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ รวมถึง Prof. Dr. Joyce A. Goldstein จาก National Institute of Health (NIH) ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ให้ความกรุณาแนะนำและให้คำปรึกษาในเรื่องการศึกษาเอนไซม์ P450 นอกจากนี้แล้วผู้วิจัยขอขอบคุณนิสิต-นักศึกษาทุกคนที่ช่วยทำการทดลอง รวมถึงคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาและคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลที่ให้ความสนับสนุนด้านสถานที่และเครื่องมือต่างๆในการทำการทดลอง

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 2A6 ที่ย่อยสลายนิโคตินในคนและเอนไซม์ CYP2A13 ที่ย่อยสลายสารก่อมะเร็ง 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) ของพืชสมุนไพรที่สำคัญในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา)

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

โรคเรื้อรังทางระบบทางเดินหายใจ จัดเป็นหนึ่งในปัญหาสำคัญของประเทศไทย โดยเกิดจากการย่อยสลายสารนิโคตินในบุหรี่ของเอนไซม์ CYP2A6 ในตับ ส่งผลให้ระดับนิโคตินในเลือดที่ไปกระตุ้นการหลั่งสารสื่อประสาทโดปามีนที่สมองลดลง ทำให้ผู้สูบบุหรี่มีความต้องการสูบบุหรี่เพิ่มมากขึ้นในขณะที่เอนไซม์ CYP2A13 ที่ปอดและระบบทางเดินหายใจกระตุ้นสารก่อมะเร็งกลุ่มสารประกอบไนโตรซามีน NNK ส่งผลให้เกิดโรคมะเร็งปอดเพิ่มขึ้น ด้วยเหตุนี้การลดการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองน่าจะช่วยลดการสูบบุหรี่และอัตราการเกิดโรคมะเร็งปอดได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาและทดสอบฤทธิ์ของพืชสมุนไพรพื้นบ้านจากโครงการป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) ที่ปราชญ์ชาวบ้านใช้ให้การรักษาชาวบ้านที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ในหลอดทดลอง ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดพืชสมุนไพรออกฤทธิ์ต่อเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 แตกต่างกัน โดยสารสกัดพืชสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง CYP2A6 และ CYP2A13 ได้ดี โดยสารสกัดจากรากต้นเข็มไอเดียและใบลายกนกออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ได้ด้วยกลไกการยับยั้งผันกลับไม่ได้แบบ Mechanism Based Inhibition (MBI) การค้นหาสารสำคัญโดยการใช้ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 เป็นตัวนำ (Bio-assay guide isolation) พบว่าที่ความเข้มข้น 10 μg/mlส่วนสกัดย่อยเอกเซนและเอทิล อะซิเทตของใบลายกนก (LKH และ LKE) ที่ LKH3.3 - LKH3.5, LKH4.4, LKH4.5, LKH7.1-7.2, LKE3.1 - LKE3.4, และ LKE7.1-LKE7.4 รวมถึงส่วนสกัดย่อยเอกเซนและเอทิล อะซิเทตของรากเข็มไอเดีย (AWH และ AWE) ที่ AWHF3, AWHF4, AWHF8, AWEF5, AWEF7, AWEF12 ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีมาก อย่างไรก็ตาม จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารเบื้องต้นด้วยเทคนิค NMR จะพบว่าสารในส่วนสกัดย่อยเหล่านี้ยังคงมีสารเจือปนอยู่เล็กน้อย ทำให้ต้องทำบริสุทธิ์เพิ่มเติมเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำมาศึกษากลไกการยับยั้งต่อไป

Abstract

Project Title Inhibition of the human cytochrome P450, CYP2A6, the nicotine metabolizing enzyme and CYP2A13, the 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) metabolizing enzyme by folk medicine in Ban-Ang-ed Officail Community Forest Project (The Chaipattana Foundation)

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

Chronic respiratory diseases arise from cigarette smoking is one of the important problems in Thailand. It has been report that the smoking behavior is associated with liver specific CYP2A6-mediated nicotine metabolism that resulting in low blood-nicotine level as well as brain-dopamine level resulting in nicotine craving and continue smoking. Inaddition, the metabolic activation of tobacco-specific NNK by lung-specific CYP2A13 enzyme has been report to activated Adenocarimona lung cancer in smokers. Thus, specific inhibition of these two enzymes could an aid in smoking cession and lung cancer prevention. This study aims to investigate the inhibitory activity of local herbs collected from Ban-Ang-Ed official community forest project (The Chaipattana Foundation) according to the suggestion of the local intellectual person on CYP2A6 and CYP2A13 enzymatic activity *in vitro*. According to the screening results, the root of Khem-I-dea (*Aidia wallichiana sensu* Tirveng) extract and leave of Lai-Kanok extract were selected for further chareaterization of candidate compounds that could inhibit CYP2A6 and CYP2A13 *in vitro*. Interestingly, both *A wallichiana* (AW) and Lai-Kanok (LK) extracts could irreversibly inhibited CYP2A6 and CYP2A13 in Mechainism Based Inhibition (MBI) mode. The CYP2A6 inhibitory-assay guide isolation indicated that hexane subfraction of LK (LKH3.3 - LKH3.5, LKH4.4, LKH4.5, LKH7.1-7.2) and AW (AWHF3, AWHF4, AWHF8) as well as the Ethyl Acetate subfraction of LK (LKE3.1 - LKE3.4, LKE7.1-LKE7.4) and AW (AWEF5, AWEF7, AWEF12) could potently inhibited CYP2A6 enzyme. Accroding to the NMR study, further chemical purification are crucial need for further detail determination of inhibition mechnisim of purified active compounds in these two herbs.

บทที่ 1
บทนำ

1.1ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคระบบทางเดินหายใจ อันเนื่องจากการสูบบุหรี่ทั้งในผู้สูบบุหรี่และบุคคลใกล้ชิดผู้สูบบุหรี่ เช่น โรคมะเร็งปอดและโรคถุงลมปอดโป่งพอง จัดเป็นภัยเงียบที่เป็นหนึ่งในปัญหาสำคัญของประเทศไทย จากการประมาณการพบว่าคนไทยทั้งผู้เสพบุหรี่และบุคคลใกล้ชิดผู้เสพบุหรี่เสียชีวิตจากโรคที่เกี่ยวข้องกับการสูบบุหรี่ปีละ ประมาณ 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) นอกจากนี้ยังพบว่าผู้สูบบุหรี่เหล่านี้ราว 6.4 ล้านคนยังสูบบุหรี่ขณะอยู่ในที่ทำงาน หรือบ้านที่มีบุคคลในครอบครัวอาศัยอยู่เป็นประจำ (passive smoker) ทำให้ประชากรในวัยทำงานประมาณ 3.3 ล้านคนได้รับควันบุหรี่ในที่ทำงานและประมาณ 20.5 ล้านคนได้รับควันบุหรี่ในบ้าน โดยในกลุ่มผู้สูบบุหรี่นี้มีเพียง 1.77 ล้านคนเท่านั้นที่เคยและพยายามเลิกบุหรี่แต่ไม่ประสบความสำเร็จ (ศิริวรรณ และคณะ 2555) เนื่องด้วยการสูบบุหรี่ส่งผลกระทบทั้งสุขภาพของประชากร การพัฒนาทรัพยากรมนุษย์และด้านเศรษฐกิจของประเทศ ดังนั้นการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อช่วยในการลด ละ เลิกการสูบบุหรี่ จึงจำเป็นต่อการลดภาวะการเกิดโรค และเพิ่มคุณภาพชีวิตของประชาชนทั้งในระยะสั้นและระยะยาว

นิโคติน (Nicotine) เป็นสารที่เป็นส่วนประกอบหลักของบุหรี่ ออกฤทธิ์ที่ระบบประสาทส่วนกลางมีผลทำให้ผู้สูบบุหรี่มีพฤติกรรมติดการสูบบุหรี่ (เสพติดบุหรี่) ทำให้ร่างกายได้รับสารพิษต่างๆจากบุหรี่ ส่งผลให้เกิดโรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจต่างๆ ทั้งนี้เมื่อเข้าสู่ร่างกายนิโคตินส่วนใหญ่จะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ CYP2A6 ในตับหรือเอนไซม์ CYP2A13 ในปอดและในเยื่อบุทางเดินหายใจได้เป็นสารประกอบโคทินีน (cotinine) ที่จะถูกย่อยสลายต่อไปก่อนถูกกำจัดออกจากร่างกายทางปัสสาวะ (ทรงกลด สารภูษิต, 2554) ในขณะที่สารประกอบ 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) ในบุหรี่จะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ CYP2A13 ที่ปอดก็นำไปสู่การกระตุ้นสารก่อมะเร็ง ส่งผลให้เสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งปอดเพิ่มขึ้น (Patten et al., 1996) โดยคนที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ลดลงเพราะเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นกับเอนไซม์ CYP2A6 ทั้งการแทนที่กรดอะมิโนหรือการเปลี่ยนแปลงกลับด้านหรือการขาดหายไปของยีน จะมีการย่อยสลายนิโคตินน้อยลง ส่งผลให้ลดปริมาณการสูบบุหรี่ลงและสามารถหยุดการสูบบุหรี่ได้ง่ายขึ้น เช่นเดียวกับเอนไซม์ CYP2A13 ที่เกี่ยวพันกับการลดลงของการเกิดโรคมะเร็งปอด ดังนั้นการลดการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ด้วยตัวยับยั้งจำเพาะ จะส่งผลให้มีการย่อยสลายนิโคตินน้อยลง รักษาระดับนิโคตินในกระแสเลือดไว้ให้คงอยู่ในกระแสเลือดนานขึ้น ส่งผลให้สูบบุหรี่ลดลง ซึ่งเป็นการลดโอกาสที่ร่างกายจะได้สัมผัสกับสารประกอบเป็นพิษต่างๆในยาสูบ จึงลดผลร้ายต่างๆที่จะเกิดขึ้นกับร่างกายเมื่อสูบบุหรี่ในตัวผู้สูบบุหรี่และบุคคลใกล้ชิดได้

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกของสารสกัดจากพืชในโครงการป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) ตำบลตกพรม อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และเอนไซม์ CYP2A13 ทั้งนี้เพราะโครงการฯมีพืชสมุนไพรพื้นบ้านต่างๆที่มีสรรพคุณในการใช้รักษาโรคต่างๆ และที่ใช้รับประทานในชีวิตประจำวันเป็นจำนวนมากตามคำแนะนำของปราชญ์ชาวบ้าน จากนั้นพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 จะถูกนำมาศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ P450 อื่น ที่มีบทบาทในการย่อยสลายยาในคน ซึ่งผลการทดลองที่ได้จะมีประโยชน์ในการให้ความรู้เกี่ยวกับผลจากสารสกัดจากพืชที่มีต่อการย่อยสลายยาในคน (Herb-drug interaction) ที่สามารถนำมาถ่ายทอดความรู้ให้กับชุมชนและประชาชนทั่วไปได้

1.2วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ศึกษาค้นคว้าหาสารสกัดจากพืชสมุนไพรพื้นบ้านในพื้นที่โครงการป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13

1.3สมมุติฐานทางการศึกษา

สารสกัดจากพืชสมุนไพรพื้นบ้านในพื้นที่โครงการป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดมีสารประกอบที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้

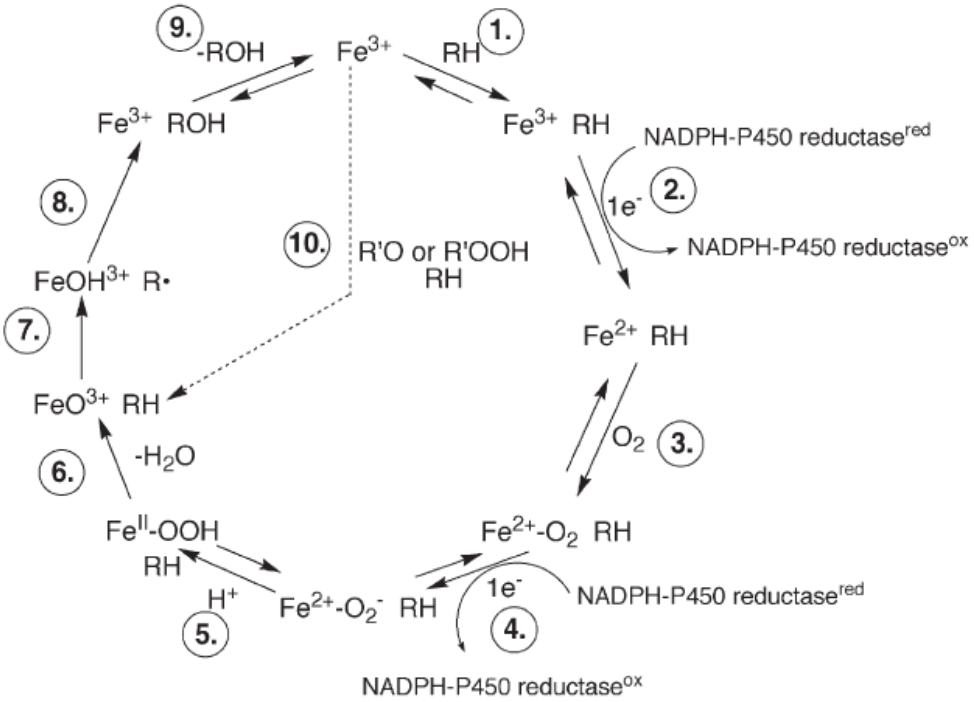
1.4ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ทำให้ทราบชนิดของพืชสมุนไพรพื้นบ้านในพื้นที่โครงการป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

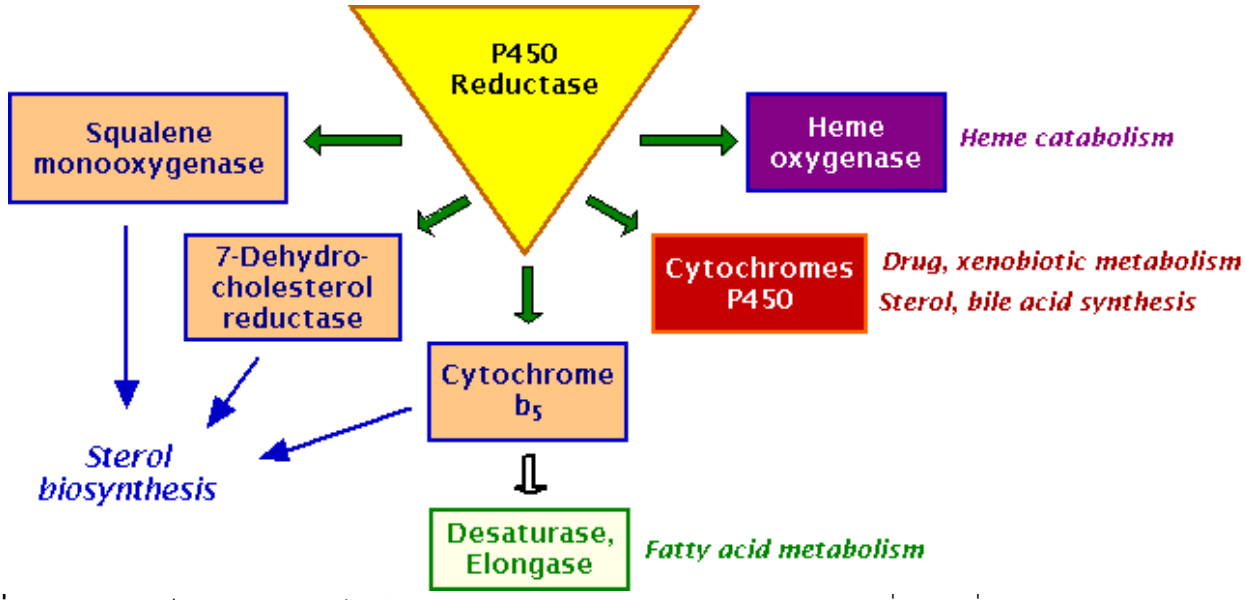
2.1 ทฤษฎีพื้นฐานที่เกี่ยวข้อง

เอนไซม์ Cytochrome P450 (CYPs หรือ P450s) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการการเมแทบอลิซึมของสารที่มีอยู่ในร่างกายเช่น ฮอร์โมนและกรดไขมันต่างๆ และสารที่ร่างกายได้รับจากภายนอกเช่น ยาและสิ่งปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมต่างๆ เนื่องจากเอนไซม์ P450s พบเป็นจำนวนมากในร่างกายและในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด 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)



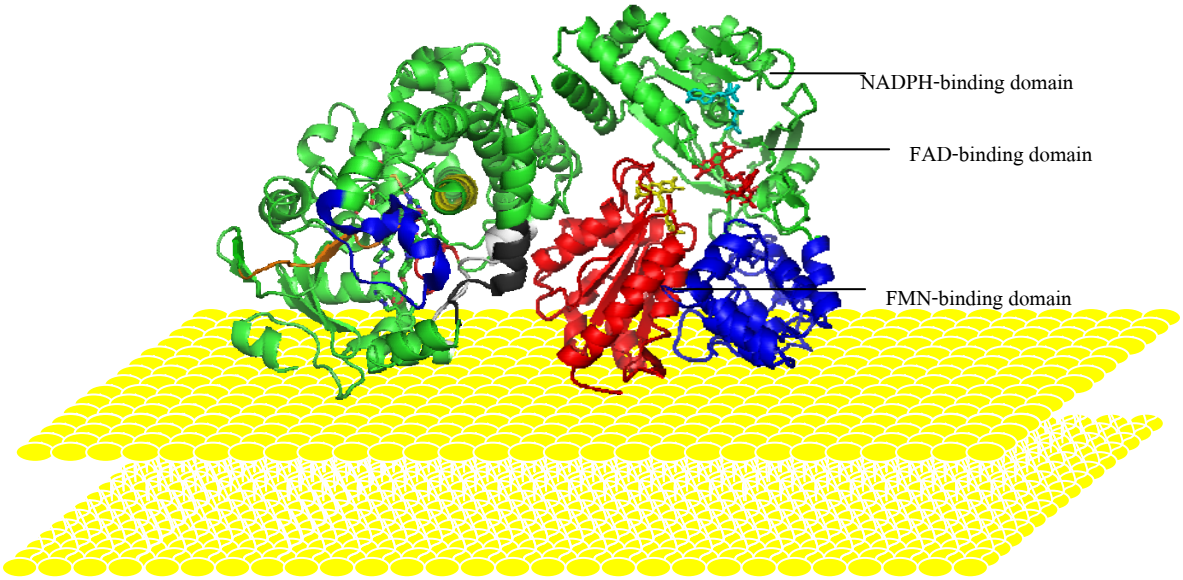
ภาพที่ 2-1 ปฏิกิริยาของเอนไซม์ P450s โดยแบ่งออกเป็นขั้นตอนการกระตุ้นโมเลกุลของออกซิเจน (ขั้นตอนที่ 1-6) การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (ขั้นตอนที่ 7 และ 8) และการปล่อยผลิตภัณฑ์ (ขั้นตอนที่ 9) ที่มา Guengerich FG, 2001

ในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ P450s นั้น (ภาพที่ 2-1) เอนไซม์ P450s จะต้องได้รับอิเล็กตรอนที่ส่งผ่านมาจาก เอนไซม์ NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR) โดยที่อิเล็กตรอนตัวแรกจะรีดิวซ์เหล็ก (Fe^{3+} เป็น Fe^{2+}) ที่เป็นส่วนประกอบหนึ่งของเอนไซม์ P450s เพื่อให้เอนไซม์ P450s สามารถจับกับออกซิเจนได้ ส่วนตัวอิเล็กตรอนตัวที่สอง จะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในโมเลกุลของออกซิเจนให้เกิดเป็นสารประกอบไอรอนไฮดรอกซิล (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 reducatse ที่มีหน้าที่การทำงานต่างๆ ที่มา *www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR.htm*

เอนไซม์ CPR เป็นเอนไซม์ที่มีส่วนจับกับเยื่อหุ้มเมมเบรนและประกอบด้วยโมเลกุลของ FAD และ FMN ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ช่วยในการขนส่งอิเล็กตรอน โดยอิเล็กตรอนจะถูกขนส่งจาก NADPH ผ่านโมเลกุลของ FAD และ FMN ไปยังตัวรับอิเล็กตรอนซึ่งก็คือเอนไซม์ต่างๆ เนื่องด้วย เอนไซม์ CPR เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สำคัญในการทำงานของเอนไซม์ P450s ที่มีความสำคัญอย่างมากต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาเอนไซม์ CPR ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเช่น CPR ของคน, หนูและแมลงวัน อย่างกว้างขวาง (Shen et al., 1989; Dohr et al., 2001; Murataliev et al, 1999) และโครงสร้างสามมิติของ CPR ในหนูพบว่า CPR ประกอบด้วย 4 โดเมน คือ NH_2-terminal, FMN-binding domain, FAD-binding domain, และNADPH-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 Oxoidoreductase (ขวา) ซึ่งเรียงตัวกันอยู่ใน Endoplasmic reticulum

2.2 สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

2.2.1 ชื่อทั่วไป : โคลงเคลง

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Melastoma malabathricum* L. subsp.malabathricum

วงศ์ : Melastomataceae

ส่วนที่ใช้ : รากและใบ

สรรพคุณทางยา : เป็นยาพื้นบ้าน แก้คอพอก แก้อาเจียนเป็นเลือด ถ่ายเป็นเลือด แก้ร้อนในกระหายน้ำ

ภาพที่ 2-4 โคลงเคลง (ที่มา: ผศ.ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

2.2.2 ชื่อทั่วไป : ค้างคาวดำ

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Tacca chantrieri* Andre.

วงศ์ : Taccaceae

ส่วนที่ใช้ : เหง้าและใบ

สรรพคุณทางยา : กินแก้ซาง เป็นยาอายุวัฒนะ แก้โรคความดันเลือดต่ำ บำรุงกำลังทางเพศ บำรุงกำลังสตรีระหว่างการตั้งครรภ์

ภาพที่ 2-5 ค้างคาวดำ (ที่มา: ผศ.ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข)

2.2.3 ชื่อทั่วไป : ชงโคป่า

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Bauhinia purpurea*

วงศ์ : Caesalpiniaceae

ส่วนที่ใช้ : ใบ

สรรพคุณทางยา : ใช้เป็นยาขับลม ยาแก้ท้องร่วง

ภาพที่ 2-6 ชงโค (ที่มา: ผศ.ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข)

2.2.4 ชื่อทั่วไป : ดีงูต้น

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Picrasma javanica* Blume.

วงศ์ : Simarubaceae

ส่วนที่ใช้ : รากและใบ

สรรพคุณทางยา : แก้ไข้จับสั่น บำรุงเลือด บำรุงน้ำดี แก้พิษไข้ ใช้พอกแผล แก้ไข้ตัวร้อน

ภาพที่ 2-7 ดีงูต้น (ที่มา: ผศ.ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข)

2.2.5 ชื่อทั่วไป : เบญจมาศแมว

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Ageratum conyzoides Linn.*

. **วงศ์** : Asteraceae (compositae)

ส่วนที่ใช้ : ใบ

สรรพคุณทางยา : ใช้เป็นยาระงับประสาท

ภาพที่ 2-8 เบญจมาศแมว (ที่มา: ผศ.ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข)

2.2.6 ชื่อทั่วไป : พนมสวรรค์

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Clerodendrum paniculatum* L.

วงศ์ : Verbenaceae

ส่วนที่ใช้ : ราก

สรรพคุณทางยา : แก้ไข้ แก้ไขเหนือ ขับลม แก้พิษแมลงกัดต่อย

ภาพที่ 2-9 พนมสวรรค์ (ที่มา: ผศ.ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข)

2.2.7 ชื่อทั่วไป : มะเดื่อหอม

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Ficus hirta* Vahl.

วงศ์ : Moraceae

ส่วนที่ใช้ : ใบ

สรรพคุณทางยา : แก้พิษงู พิษฝี แก้ตับพิการ หัวใจพิการ ขับลมในลำไส้ บำรุงหัวใจ บำรุงกำลัง แก้พิษอักเสบ

ภาพที่ 2-10 มะเดื่อหอม (ที่มา: ผศ.ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข)

2.2.8 ชื่อทั่วไป : เข็มไอเดีย

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Aidia wallichiana sensu* Tirveng

วงศ์ : Rubiaceae

ส่วนที่ใช้ : ใบ และราก

สรรพคุณทางยา : แก้ฝี และแก้อักเสบ

ภาพที่ 2-11 เข็มไอเดีย (แหล่งที่มา: ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

2.2.9 ชื่อทั่วไป : มะฮึก

ส่วนที่ใช้ : รากและใบ

สรรพคุณทางยา : เป็นยาพอก แก้คัน แก้ปวด แก้ไข้

ภาพที่ 2-12 มะฮึก (ที่มา: ผศ.ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข)

2.2.10 ชื่อทั่วไป : ไมยราบ

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Mimosa pudica* L. hispidabrenan.

วงศ์ : Fabaceae

ส่วนที่ใช้ ต้น

สรรพคุณทางยา : ขับปัสสาวะ แก้ไตพิการ แก้ทางเดิน นปัส
ปัสสาวะอักเสบ ขับระดูขาว ขับโลหิต

ภาพที่ 2-13 ไมยราบ
(ที่มา: ผศ.ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข)

2.2.11 ชื่อทั่วไป : หัวเดียว

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Aglaonema nitidum* (Jack) Kunth

วงศ์ : Araceae

ส่วนที่ใช้ : เหง้า และใบ

สรรพคุณทางยา : แก้ริดสีดวงทวาร

ภาพที่ 2-14 หัวเดียว (แหล่งที่มา: ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

2.2.12 ชื่อทั่วไป : ระย่อมน้อย

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz.

วงศ์ : Apocynaceae

ส่วนที่ใช้ : รากและใบ

สรรพคุณทางยา : เป็นยาลดความดันโลหิตสูง เป็นยากล่อมประสาท ทำให้ง่วงนอน อยากอาหาร แก้ตามัว

ภาพที่ 2-15 ระย่อมน้อย
(ที่มา:ผศ.ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข)

2.2.13 ชื่อทั่วไป : เอื้องหมายนา

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Costus speciosus,* หรือ *Cheilocostus speciosus*

วงศ์ : Costaceae

ส่วนที่ใช้ : เหง้า ต้น และใบ

สรรพคุณทางยา : มีรสฉุน เย็นจัด รักษาโรคท้องมาน ขับปัสสาวะ เป็นยาถ่าย แก้บวมน้ำ ฆ่าพยาธิ รักษาโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ แผลอักเสบบวมมีหนอง ฆ่าพยาธิ เป็นยาขม ขับเสมหะ แก้ไอ แก้โรคผิวหนัง แก้ไข้

ภาพที่ 2-16 เอื้องหมายนา
(ที่มา:ผศ.ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข)

2.2.14 ชื่อทั่วไป : ไม้ลาย

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Microcos tomentosa* Sm.

วงศ์ : Tiliaceae

ส่วนที่ใช้ : ใบ

สรรพคุณทางยา : เปลือกไม้ต้มน้ำแก้หืด ผลสุก รับประทานได้

ภาพที่ 2-17 ไม้ลาย
(แหล่งที่มา: ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

2.2.15 ชื่อทั่วไป : ลายกนก

ส่วนที่ใช้ : ใบ

สรรพคุณทางยา : แก้ฝี

ภาพที่ 2-18 ลายกนก (แหล่งที่มา: ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

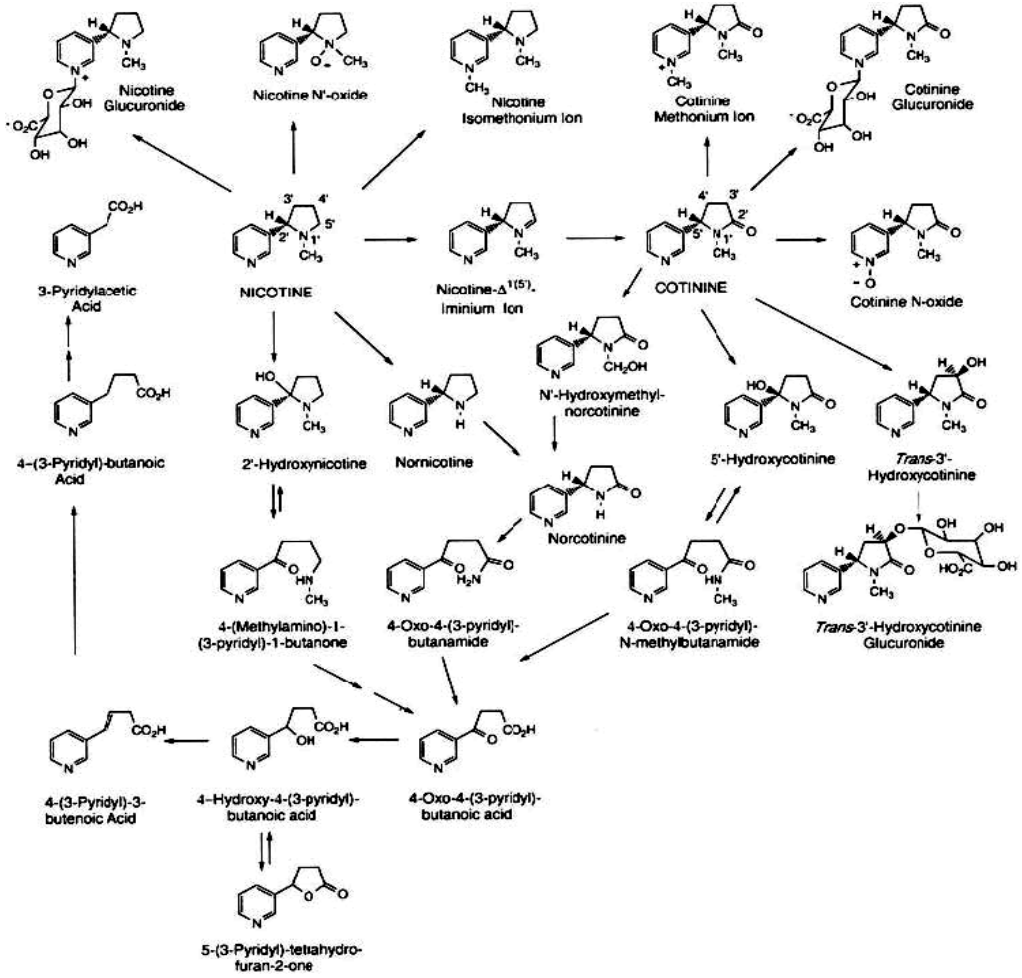
โรคระบบทางเดินหายใจ อันเนื่องจากการสูบบุหรี่ทั้งในผู้สูบบุหรี่และบุคคลใกล้ชิดผู้สูบบุหรี่ (passive smoker) เช่น โรคมะเร็งปอด และโรคถุงลมปอดโป่งพอง จัดเป็นภัยเงียบที่เป็นหนึ่งในปัญหาสำคัญของประเทศไทย จากการคาดการณ์ขององค์กรอนามัยโลก (WHO) คาดว่าในปี พ.ศ. 2573 จะมีผู้เสียชีวิตด้วยโรคดังกล่าวถึง 8 ล้านคน (WHO, 2008) สำหรับประเทศไทยในปี 2552 พบว่า มีคนเสียชีวิตจากโรคที่เกิดจากการสูบบุหรี่ในกลุ่มคนอายุ 30 ปีขึ้นไป 48,338 คนหรือประมาณ 12% ของการเสียชีวิตทั้งหมด โดยโรคมะเร็งปอดและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตถึง ร้อยละ 23.4 (11,303 คน) และพบในผู้ป่วยที่สูบบุหรี่ถึงร้อย 75 ทำให้มีการสูญเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาอย่างน้อยเป็นเงิน 43.6 พันล้านบาท คิดเป็น 0.5% ของ GDP (Bundhamcharoen, 2012) ล่าสุดจากผลการสำรวจในปี พ.ศ. 2554 พบว่ามีคนไทยสูบบุหรี่ถึง 11.5 ล้านคนหรือเกือบ 20 % ของประชากรทั้งประเทศ โดยผู้เสพบุหรี่ส่วนใหญ่อยู่ในวัยรุ่นและวัยทำงาน (อายุ 19-40 ปี) ถึงร้อยละ 46.4 โดยที่อัตราการสูบบุหรี่เพิ่มขึ้นในกลุ่มเยาวชน กลุ่มผู้มีการศึกษาน้อย และผู้อาศัยอยู่นอกเขตเทศบาล รวมถึงผู้มีฐานะในระดับปานกลางทั่วไป ที่สำคัญที่สุดผู้สูบบุหรี่เหล่านี้ราว 6.4 ล้านคน ยังสูบบุหรี่ขณะอยู่ในที่ทำงานหรือบ้านที่มีบุคคลในครอบครัวอาศัยอยู่เป็นประจำ 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 แสดงให้เห็นว่าการเสพติดบุหรี่เพียงหนึ่งครั้งส่งผลให้ต้องเสพติดบุหรี่และสามารถเลิกการเสพบุหรี่ได้ยาก (ศิริวรรณ และคณะ 2555)

จากการศึกษาพบว่า บุหรี่ประกอบไปด้วยสารประกอบต่างๆมากมายกว่า 4,000 ชนิด ที่หลายชนิดเป็นสารพิษและสารก่อมะเร็งที่ได้รับการสูดเข้าไปในปอด ดังนั้นโรคมะเร็งปอดจึงเป็นโรคมะเร็งที่พบมาก

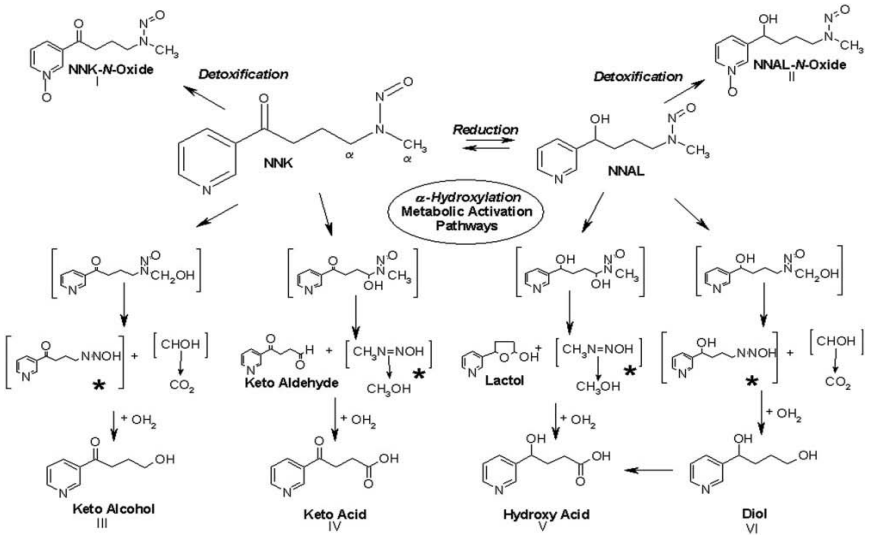
ที่สุดในกลุ่มผู้สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิด เช่นเดียวกับการเกิดการโรคทางเดินหายใจอื่นๆเช่น โรคถุงลมปอดโป่งพอง (WHO, 2008) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในกลุ่มผู้สูบบุหรี่ยังเป็นกลุ่มเสี่ยงที่จะมีอาการของโรคหัวใจขาดเลือด โรคหัวใจวาย และโรคที่เกี่ยวข้องต่างๆอีกด้วย (WHO, 2008) อุบัติการณ์การเกิดโรคต่างๆเหล่านี้เกิดขึ้นเนื่องจากสารนิโคตินในบุหรี่ไปออกฤทธิ์โดยตรงที่ระบบการตอบสนองต่อความยินดีในระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้มีการหลั่งสารโดปามีนออกมามากขึ้น ผู้สูบบุหรี่จึงมีความรู้สึกสุขใจสบายใจ ปราศจากความเครียดต่างๆ ดังนั้นผู้สูบบุหรี่จึงต้องสูบบุหรี่ตลอดเวลาเพื่อคงระดับของนิโคตินในกระแสเลือดและในสมองให้เกิดความรู้สึกดังกล่าวต่อไป ส่งผลให้ผู้สูบบุหรี่และบุคคลใกล้เคียงได้รับสารพิษต่างๆในบุหรี่ไปด้วย นอกจากนี้นิโคตินยังมีผลเพิ่มความดันโลหิตและทำให้หัวใจเต้นเร็วขึ้นอีกด้วย (Benowitz, 2008; Hukkanen et al, 2005)

เมื่อสูบบุหรี่นิโคตินจะเข้าสู่ร่างกายผ่านทางการดูดซึมที่เนื้อเยื่อคัดหลั่งที่ปาก (Oral mucosa) เข้าสู่ระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหาร โดยที่ประมาณ 80-90% ของนิโคตินที่เข้าสู่รางกายจะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ CYP2A6 ในตับเกิดเป็นสารประกอบ nicotine $\Delta^{1(5)}$- iminium และเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นไปเป็นสารประกอบโคทินิน หลังจากนั้นโคทินินที่เกิดขึ้นจะเกิดปฏิกิริยา hydroxylation ได้เป็นสารประกอบต่างๆ เช่น *trans*-3'-hydroxycotinine, 5'-hydroxycotinine และ nornicotine (ภาพที่ 2-19) ซึ่งสุดท้ายแล้วทั้งโคทินินและสารประกอบที่ได้จากโคทินินต่างๆ จะถูกเติมหมู่น้ำตาล (glucoronation) และขับออกทางปัสสาวะ (Benowitz, 2008; Flammang et al, 1992; Hukkanen et al, 2005) และนิโคตินอีกส่วนหนึ่งจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ CYP2A13 ในระบบทางเดินหายใจ ที่ไม่ได้ไประบบหลักที่ร่างกายใช้ในการกำจัดนิโคตินออกจากร่างกาย (Hukkanen et al, 2002; Su et al, 2000)

สำหรับ NNK นั้นเมื่อเข้าสู่ร่างกาย ส่วนใหญ่จะทำถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ CYP2A13 ที่แสดงออกในปริมาณมากที่ปอดและที่เซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจ (NNK-detoxification) ได้เป็นสารประกอบ NNK-N-oxide และ NNAL ซึ่งจะถูกออกซิไดส์อีกครั้งด้วย CYP2A13 เกิดเป็นสารประกอบ NNAL-N-Oxide (ภาพที่ 2-20) หรือถูกเติมหมู่น้ำตาลกลายเป็น NNAL-glucoronide ซึ่งจะถูกกำจัดออกจากร่างกายทางปัสสาวะ 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 (ภาพที่ 2-20) 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 ในบุหรี่ ในการทำให้เกิดมะเร็ง (carcinogenesis) โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคมะเร็งต่างๆในระบบทางเดินหายใจ เช่นโรคมะเร็งปอด ชนิด adenocarcinoma และ squamous cell carcinoma ที่เป็นมะเร็งปอดที่มีความสามารถในการแพร่กระจายสูง (malignant pulmonary tumor) ไปสู่บริเวณต่างๆของปอด หรือแม้แต่อวัยวะอื่นๆได้ง่าย (Brown, 2007; Hecht et al, 1998; 1999a; 1999b; Hoffmann et al, 1996; Fukami et al, 2010) และมะเร็งกล่องเสียง (Chiang et al., 2011; Hecht, 1998; Hecht, 1999a, 1999b)



ภาพที่ 2-19 กลไกในการกำจัดนิโคติน (Hukkanen et al, 2005)



ภาพที่ 2-20 กลไกในการกระตุ้นสารก่อมะเร็งของเอนไซม์ CYP2A13 (Brown PJ, 2007)

เอนไซม์ในกลุ่ม cytochrome P450 (CYP,P450) คือกลุ่มของเอนไซม์ที่มีหมู่ heme เป็นองค์ประกอบและมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาย่อยสลายสารต่างๆทั้งภายในและภายนอกร่างกาย เช่น ฮอร์โมน หรือสารแปลกปลอมที่ปนเปื้อนในอาหารและสิ่งแวดล้อม ในคนมีเอนไซม์ P450 ถึง 18 กลุ่มและ 43 กลุ่มย่อย (http://drnelson.utmen.edu/CytochromeP450.html) โดยเอนไซม์ P450 ที่พบว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย 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) ต่อ NNK ที่ต่ำและอัตราการเร่งปฏิกิริยา (V_{max}) ที่สูง และยังเหนี่ยวนำให้เกิดโครงสร้างซับซ้อนของ O^6-MeG และ N^7-MeG ได้ ด้วยเหตุนี้ปฏิกิริยา NNK-hydroxylation ของ CYP2A13 จึงถูกสันนิษฐานว่าเกี่ยวพันกับการเกิดโรคมะเร็งต่างๆในระบบทางเดินหายใจในผู้สูบบุหรี่ (Chiang et al., 2011; He et al, 2004; Peterson et al, 1990; Su et al, 2000) นอกเหนือไปจากความสามารถในการย่อยสลาย NNK แล้ว เอนไซม์ CYP2A13 ยังถูกพบว่าสามารถย่อยสลายสารประกอบอื่นๆได้ เช่น สารนิโคตินในบุหรี่เช่นเดียวกับเอนไซม์ CYP2A6 (Hukkanen et al, 2005) หรือสาร coumarin ไปเป็นผลิตภัณฑ์ 7-hydroxycoumarin (ปฏิกิริยา coumarin-7-hydroxylase) ที่นิยมนำมาใช้เป็นตัวตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ในหลอดทดลอง (Miles et al, 1990)

จากการศึกษาในประชากรพบว่ายีน CYP2A6 มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) ถึง 38 อัลลีลที่แตกต่างกัน (http://www.imm.ki.se/cypalleles และ Koudsi et al, 2009) ซึ่งมีทั้งอัลลีลที่ทำงานผิดปกติหรือไม่สามารถย่อยนิโคตินได้และที่สามารถย่อยนิโคตินได้ดีเกินไป (Kamataki et al, 2005) โดยที่ความหลากหลายในการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ส่งผลต่อการย่อยสลายนิโคตินและมีบทบาทที่สำคัญในการกำหนดพฤติกรรมการสูบบุหรี่ เช่นผู้สูบบุหรี่ที่ย่อยสลายนิโคตินน้อยจะสูบบุหรี่ต่อวันน้อยกว่าคนที่ย่อยสลายนิโคตินได้ดีและมีความเสี่ยงในการเสพติดนิโคตินน้อย ในทางตรงกันข้ามผู้สูบบุหรี่ที่มีการเพิ่มจำนวนยีน CYP2A6 หรือมีการย่อยสลายนิโคตินได้ดีมากจะมีการสูบบุหรี่มากกว่าคนปกติและมีโอกาสที่เป็นมะเร็งเนื่องจากการสูบบุหรี่มากกว่าปกติ (Schoedel et al, 2004; Sellers et al 2000; Tyndale & Sellers 2002) ที่น่าสนใจเป็นอย่างมากคือในผู้สูบบุหรี่ที่มีการขาดหายไปของยีน CYP2A6 จะมีอัตราเสี่ยงในการเป็นมะเร็งปอดน้อยมาก อย่างไรก็ตามไม่มีความสัมพันธ์ในกรณีผู้ไม่สูบบุหรี่ (Kamatiki et al, 2005; Miyamoto et al, 1999) 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 (Kamataki et al, 2005; Yoshida et al, 2002; Kwon et al, 2001) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่ได้ศึกษาในรายละเอียด

ความสัมพันธ์ในการกระจายของความหลากหลายทางพันธุกรรมของ CYP2A6 อัลลีลต่างๆกับความสามารถในการย่อยสลายนิโคตินในผู้สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่

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* 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 ซึ่งอาจจะสามารถนำมาใช้พยากรณ์อัตราเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งปอดจากบุหรี่ของคนไทยได้

เนื่องด้วยการเสพติดบุหรี่จากนิโคตินและโรคมะเร็งปอดที่เกิดจากสูบบุหรี่เป็นโรคอันตรายร้ายแรงที่พบทั้งในผู้สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิด ในปัจจุบันจึงมียาที่เป็นนิโคตินทดแทน (NRT) ต่างๆ ทั้งในรูปของนิโคตินหมากฝั่ง ชนิดเคี้ยว นิโคตินชนิดแผ่นติดผิวหนังที่มีประสิทธิภาพสูงมาใช้ร่วมกับการบำบัดพฤติกรรมของผู้สูบบุหรี่ เพื่อช่วยในการบำบัดและช่วยให้ผู้สูบบุหรี่เลิกจากการสูบบุหรี่ อย่างไรก็ตามการบำบัดด้วยวิธีนี้ยังไม่ได้รับความนิยมเนื่องจากความไม่สะดวกในการใช้ ไม่มีประสิทธิภาพที่รวดเร็ว และมีผลข้างเคียงต่างๆ (Sellers et al, 2003a; 2003b) อีกหนึ่งวิธีที่ใช้ในการบำบัดคือการใช้ยาที่ไปลดการทำงานของตัวรับนิโคตินในสมองซึ่งจะส่งผลให้ลดอาการเสพติดนิโคตินลง เช่น ยาในกลุ่ม bupropion HCl และ varenicline ซึ่งเป็นยาในกลุ่มที่ใช้ก่อน (first-line drug) และยา nortriptyline และ clonidine ซึ่งเป็นยาในกลุ่มถัดไป (second-line drug) แต่ยาต่างๆ เหล่านี้ให้ผลข้างเคียงกับผู้ใช้ยา โดย bupropion HCl ทำให้เกิดอาการนอนไม่หลับ ปากแห้ง มื่อสั่นและปวดศรีษะ (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) เนื่องจากเอนไซม์ CYP2A6 มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายนิโคตินในคน 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 (สารยับยั้ง

ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์แต่ผลิตภัณฑ์หรือตัวกลางที่เกิดขึ้นจับแน่นกับเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์หมดสภาพในการทำงาน) (Siu and Tyndale, 2007; von Weymarn et al, 2005) และเนื่องจากกลไกการยับยั้งแบบ mechanism-based นี้มีการสร้างพันธะโควาเลนท์ขึ้นระหว่างสารยับยั้งกับกรดอะมิโนบริเวณแอคทีฟของเอนไซม์ (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 โดยเพิ่มระยะเวลาก่อนที่จะสูบบุหรี่มวนต่อไปให้ยาวนานขึ้น (sellers et al, 2000) แม้ในที่สุดจะพบว่าทั้ง 8-MOP หรือ tranylcypromine ส่งผลกระทบข้างเคียงต่อผู้ใช้ทำให้ต้องระงับการใช้สารทั้งสองตัวนี้ แต่ผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ในการย่อยสลายนิโคตินสามารถลดทำให้ผู้สูบบุหรี่สูบบุหรี่น้อยลงได้ (Sellers et al, 2003; Siu and Tyndale, 2007) จึงได้มีการศึกษาโดยใช้สร้างสารสังเคราะห์ต่างๆขึ้น (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-caboxamide ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยเช่นกัน (Rahnasto et al, 2008)

เนื่องด้วยแนวโน้มในการรักษาโรคที่ย้อนกลับไปใช้สารจากธรรมชาติ เพื่อลดความเป็นพิษและผลข้างเคียง จึงมีการศึกษาโดยใช้ menthol ซึ่งเป็นสารแต่งกลิ่นในอาหาร ผสมลงในบุหรี่และพบว่าสามารถเพิ่มครึ่งชีวิตของสารโคทินินในกระแสเลือดในผู้เสพบุหรี่ผู้หญิงได้ (Ahijevych et al, 2002) เพราะ menthol มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ (MacDougall et al, 2003) อย่างไรก็ตามผลจากการใช้ menthol เพียงอย่างเดียวในการลดการสูบบุหรี่ยังไม่มีการศึกษาเพิ่มเติม นอกจากนี้น้ำส้มโอ (grapefruit juice) ก็สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในการย่อยสลายสาร coumarin ได้เช่นเดียวกันแต่ไม่ดีเท่ากับการยับยั้งเอนไซม์ CYP3A4 ในขณะที่สารสกัด nootkatone บริสุทธิ์ที่สกัดจากส้มโอสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีแต่ไม่มีรายงานถึงความจำเพาะในการยับยั้ง (Merket et al, 1994; Runkel et al, 1997; Tassaneeyakul et al, 2000) ในขณะที่สารสกัดจาก Kava และสารในกลุ่ม kavalactone สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 และ CYP2C9 ที่เกี่ยวกับการย่อยสลายสารแปลกปลอมภายนอกอื่นๆได้ดีกว่าเอนไซม์ CYP2A6 (Mathews et al, 2002) สารประกอบ isothiocyannate ในกลุ่มผักกะหล่ำก็มีประสิทธิภาพที่ต่ำในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 และต้องถูกดัดแปลงในหลอดทดลองก่อนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งให้เพิ่มขึ้น (von Weymarn et al, 2007) เมื่อเปรียบเทียบกับ

สาร decursinol angelate ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม pyranocoumarin ที่สกัดได้จากรากของ *Angellica 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 จึงเป็นหนึ่งในแนวทางเลือกที่สำคัญในการป้องกันการเสพติดบุหรี่ รวมถึงลดระดับการเป็นมะเร็งปอดทั้งในผู้สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิดต่อไป

โครงการป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) ต. ตกพรม อ. ขลุง จ. จันทบุรี เป็นโครงการภายใต้พันธกิจด้านการจัดการทรัพยากรธรรมชาติอย่างยั่งยืน ของมูลนิธิชัยพัฒนา เพื่อจัดทำเป็นพื้นที่ให้เป็นป่าชุมชนที่ประชาชนในพื้นที่สามารถเข้ามามีส่วนร่วมในการอนุรักษ์และดูแลป่า ให้คนสามารถอยู่ร่วมกับป่าได้อย่างยั่งยืน อย่างไรก็ตามเนื่องจากโครงการฯมีพืชพันธุ์ต่างๆที่หลากหลายและสมบูรณ์ แต่ยังขาดองค์ความรู้เรื่องฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ทำให้สมเด็จพระเทพรัตน์ราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี ที่ได้เสด็จพระราชดำเนินมายังโครงการในปี พ.ศ. 2553 ได้มีพระราชดำริจัดตั้งศูนย์การเรียนรู้บ้านอ่างเอ็ดขึ้นเพื่อศึกษาความหลากหลายและฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ของพรรณพืชในโครงการฯ ทั้งนี้เป็นกุศโลบายสนับสนุนให้ประชาชนในพื้นที่มีความรู้ความเข้าใจในความสำคัญของป่าชุมชน และเข้ามามีส่วนร่วมในการอนุรักษ์และดูแลป่าชุมชนอย่างแท้จริง เพื่อตอบสนองต่อแนวพระราชดำริดังกล่าว จึงเกิดความร่วมมือของโครงการฯกับกลุ่มผู้วิจัยขึ้นเพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชต่างๆในโครงการ โดยในการศึกษาครั้งนี้กลุมผู้วิจัยจะมุ่งเน้นทำการศึกษาพืชสมุนไพรในวงศ์บางวงศ์ เช่นวงค์ Asteraceae (Compositae) Rutaceae และ Rubieceae เป็นต้น ที่เป็นพืชในวงค์ที่มีสารประกอบในกลุ่ม pyranocoumarin (กลุ่มหนึ่งของ phenolic และ flvonoids) ที่มีความสามารถในการเป็นทั้งสารตั้งต้น (coumarin) และตัวยับยั้ง (เช่น 8-MOP และ decursinol angelate ที่สกัดได้จากรากของ *A.gigas* เป็นต้น) ของเอนไซม์ CYP2A6 (ทรงกลด สารภูษิต 2554) และ CYP2A13 เพื่อจะนำมาใช้ในการบำบัดอาการการติดบุหรี่ของผู้เสพบุหรี่ ซึ่งจะเป็นทั้งการค้นพบแนวทางการรักษา ป้องกัน บำบัดผู้เสพติดบุหรี่ รวมถึงบุคคลใกล้ชิด และเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์จากพืชสมุนไพร รวมถึงเป็นองค์ความรู้ที่สำคัญในศูนย์การเรียนรูของโครงการสืบต่อไป

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. กระบอกตวง (Graduated cylinder) ขนาด 10, 50, 100, 1000 และ 2000 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Diffico ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
2. ขวดดูแรน (Duran) ขนาด 50, 100, 500 และ1000 มิลลิลิตร ยี่ห้อ SCHOTT ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
3. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร ยี่ห้อ SCHOTT ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
4. ขาตั้ง
5. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Sonicator) รุ่น VCX 500 บริษัท Sonics and materials ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
6. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น PG 2002-S บริษัท Mettler Toledo ประเทศสมาพันธรัฐสวิส
7. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น AB 204-S บริษัท Mettler Toledo ประเทศสมาพันธรัฐสวิส
8. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น AMA 240s บริษัท Astell Scientific ประเทศอังกฤษ
9. เครื่องปั่นแยกสารแบบควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Sigma 3K18 ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
10. เครื่องปั่นแยกสารแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น SORVALL RC 26 PLUS ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ KUBOTA 112 ประเทศญี่ปุ่น
12. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Evaporator) ยื่อห้อ N-N SERIES ประเทศญี่ปุ่น
13. เครื่องวัดกรดเบส (pH meter) รุ่น 713 pH meter บริษัท Metrolm ประเทศสมาพันธรัฐสวิส
14. เครื่องสเปกโตรฟลูออโรโฟโตมิเตอร์ (Spectrofluorometer) ยี่ห้อ Jasco รุ่น FP-6200 บริษัท Jasco ประเทศญี่ปุ่น
15. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ยี่ห้อ Jasco V-530 UV-VIS Spectrophotometer บริษัท Jasco ประเทศญี่ปุ่น
16. ชุดอิเล็กโตรโฟริซิส (SDS-PAGE) ยี่ห้อ บริษัท Bio-rad ประเทศสหรัฐอเมริกา
17. ช้อนตักสาร
18. ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Shaking incubator) รุ่น Innova 4320 บริษัท DAIHANLABTECH ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี
19. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Incubator) รุ่น BE 500 บริษัท Memmert ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

20. ที่วางหลอดทดลอง (Test tube rack)
21. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50, 100, 250, 600 และ 1000 มิลลิลิตร ยี่ห้อ ISOLAB ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
22. ผ้าดิบ
23. พาราฟิล์ม (parafilm) บริษัท PECHINEY ประเทศสหรัฐอเมริกา
24. ไมโครทิวป์ (Microtube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
25. ไมโครปิเปต (Micropipette) 1-10, 2-20, 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร บริษัท Lio lab ประเทศสหรัฐอเมริกา
26. ไมโครปิเปตทิป (Micropipette tip) ขนาด 10, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
27. หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
28. หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
29. หลอดสำหรับหมุนเหวี่ยงแยก cell ขนาด 50 มิลลิลิตร บริษัท BIOLOGIX RCSEARCH ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน
30. หลอดหยด (Dropper)
31. อะลูมิเนียมฟอยด์ (Aluminium foil) ยี่ห้อ TOPS บริษัท MMP คอร์ปอเรชั่น จำกัด ประเทศไทย
32. โหลแก้ว

3.2 สารเคมี

1. Acetic acid glacial (CH_3COOH) MW 60.053 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. Acrylamide (C_3H_5NO) MW 71.80 บริษัท ACROS ORANIC ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. Albumin บริษัท ACROS ORANIC ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. Alcohol MW 32.042 บริษัท Carlo erba analytical ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. 5-Aminolevulinic acid hydrochloride (δ-ALA) MW 167.59 บริษัท SIGMA-ALDRICH ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
6. Ammonium persulfate (APS) ($(NH_4)S_2O_8$) MW 228.20 บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
7. Ampicilin ($C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$) 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. 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^{tm}, 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) ($C_6H5CH_2SO_2F$) 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. Trytone 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 ของคนที่ขาดส่วนจับกับเมมเบรน (Δ23human CYP2A6) (ได้รับมาจาก Assoc. Prof. Dr. Emily E. Scott, Dept. of Medicinal Chemistry, Kansus University, http://www.medchem.ku.edu/faculty_scott.shtml)

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

3.3.3 พลาสมิด pINIIIompA3 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)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเหนี่ยวนำการแสดงออกและการทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ Cytochrome P450 reductase จากหนู (rat CPR)

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

3.4.2 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) จากนั้นเหนี่ยวนำการแสดงออกโปรตีนด้วย IPTG และ 5-aminolevulinic acid hydrochloride (δ-ALA) ทำบริสุทธิ์โปรตีนโดยผ่านนิกเกิลคอลัมน์และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี 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)

3.4.3 การเตรียมสารสกัดจากพืชสมุนไพรพื้นบ้านจากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด

นำพืชสมุนไพรพื้นบ้านจากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดทั้งหมด 24 ชนิด มาทำความสะอาด สับเป็นชิ้นเล็กๆและนำไปอบที่อุณหภูมิ 55 องสาเซลเซียส จากนั้นนำพืชสมุนไพรมาบดให้ละเอียดแบ่งพืชสมุนไพรใส่ถุงผ้าดิบ ถุงละ 50 กรัม นำไปแช่ใน 95% เอทานอล นำส่วนสกัดเอทานอลที่ได้ไปทำการระเหยตัวทำละลายเอทานอลด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน จากนั้นเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะทำการทดลอง จากนั้นทำการแยก fraction โดยใช้สารสะลายเฮกเซนและเอทิล อะซิเทตตามลำดับ ทำบริสุทธิ์

สาระสำคัญด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟี และตรวจสอบความบริสุทธิ์และโครงสร้างของสารสำคัญด้วยเทคนิค High Perfomance Liquid Chromatography (HPLC) Nuclear Megnetic Resonance (NMR) และ Liquid Chromatography-Mass spectrometry (LC-MS) ในส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองได้ดี

3.4.4 การทดสอบหาปริมาณฟีนอลทั้งหมด (Total phenolic content)

ชั่งสารสกัดจากพืชสมุนไพร 0.004 กรัม ละลายใน DMSO ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปิเปตสารลงหลอดทดลอง 125 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลายโฟลิน 150 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 6 นาที เติม 7% w/v Na_2CO_3 ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 3 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 90 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร

3.4.5 การทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid content)

ชั่งสารสกัดจากพืชสมุนไพร 0.004 กรัม ละลายใน DMSO ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปิเปตสารลงหลอดทดลอง 500 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติม 5% w/v $NaNO_2$ 150 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 6 นาที เติม 10% w/v $AlCl_3$ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 5 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร

3.4.6 การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 จากพืนสมุนไพรพื้นบ้านจากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด

ทำการบ่มเอนไซม์ CYP2A6 หรือ CYP2A13 ที่บริสุทธิ์ (100 ไมโครกรัมโปรตีน) ร่วมกับเอนไซม์ rat CPR ในสารละลาย 50 mM Tris-HCl pH 7.5 ที่มี Dilaurolphatidylcholine (DLPC) ตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาที่กำหนดเติม 20 μM Coumarin และสารสกัดพืชสมุนไพร จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาโดย NADPH ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศา นำค่าการตรวจสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 หรือ CYP2A13 มาเปรียบเทียบค่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 หรือ CYP2A13 ที่ปราศจากสารสกัด (ปฏิกิริยาควบคุม) โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำที่เป็นอิสระต่อกันแล้ววิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม prism5

3.4.7 การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ rat CPR จากพืชสมุนไพรพื้นบ้านจากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด

ทำการบ่มเอนไซม์ rat CPR ที่บริสุทธิ์โดยบ่มเอนไซม์ร่วมกับสารละลาย 50 μM Cytochrome c และสารสกัดพืชสมุนไพร แล้วจึงเติมสารละลาย NADPH ลงไปเพื่อเริ่มปฏิกิริยา ติดตามการทำงานของเอนไซม์ rat CPR กับสารสกัดพืชสมุนไพร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ค่าความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (ค่า ε = 21.4 $mM^{-1}cm^{-1}$) เป็นเวลา 5 นาที นำค่าการตรวจสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ rat CPR มาเปรียบเทียบค่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ rat CPR (ปฏิกิริยาควบคุม) โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำที่เป็นอิสระต่อกัน

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างพืชเพื่อทำการศึกษา

กลุ่มผู้วิจัยมีการไปสำรวจและเก็บพืชตัวอย่างที่โครงการป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด โดยได้ข้อมูลจากปราชญ์ชุมชน ร่วมกับเจ้าหน้าที่ของโครงการฯ ทั้งนี้พืชสมุนไพรตัวอย่างเป็นพืชที่ปราชญ์ชุมชนนำไปใช้ เพราะมีฤทธิ์ทางยา และ/หรือพืชในวงค์ของพืชที่มีรายงานว่ามีสารในกลุ่ม coumarin ที่มีรายงานว่าสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และเอนไซม์ CYP2A13 ได้ รวมทั้งสิ้น ๑๕ ชนิด และได้ทำการพิสูจน์สายพันธ์และเก็บตัวอย่างแห้งโดย อาจารย์เบญจวรรณ ชิวปรีชา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยในพืชบางชนิดมีมากกว่าหนึ่งส่วนที่มีฤทธิ์ทางยา ทำให้มีจำนวนตัวอย่าง ๒๔ ตัวอย่าง ที่นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ตารางที่ 4-1)

ตารางที่ 4-1 น้ำหนักอบแห้งและน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบของพืชสมุนไพร

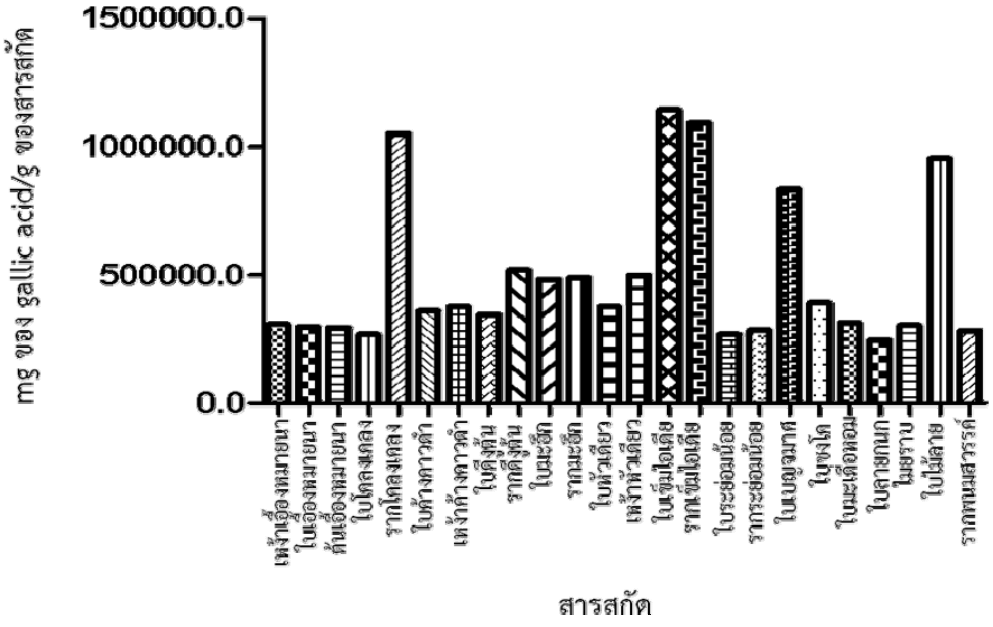
สารสกัดหยาบ	น้ำหนักอบแห้ง (กรัม)	น้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบ(กรัม)	% yield
เหง้าเอื้องหมายนา (*Costus speciosus (Koen)* Smith.)	49.63	2.25	4.53
ใบเอื้องหมายนา (*Costus speciosus* (Koen.) Smith)	54.96	2.4	4.37
ต้นเอื้องหมายนา (*Costus speciosus* (Koen.) Smith)	50.00	1.25	2.50
ใบโคลงเคลง (*Melastoma saigonense* (Kuntze) Merr.)	50.02	2.60	5.20
รากโคลงเคลง (*Melastoma saigonense* (Kuntze) Merr)	80.02	2.33	2.91
ใบค้างคาวดำ (*Tacca chantrieri* Andr.)	55.44	5.81	10.48
เหง้าค้างคาวดำ (*Tacca chantrieri* Andr.)	31.99	4.75	14.85
ใบดีงูต้น (*Picrasma javanica* Blume)	80.00	4.26	5.33
รากดีงูต้น (*Picrasma javanica* Blume)	80.01	1.85	2.31
ใบมะฮึก (รอพิสูจน์สายพันธุ์)	44.27	5.43	12.26
รากมะฮึก (รอพิสูจน์สายพันธุ์)	80.02	2.04	2.55
ใบหัวเดียว (*Aglaonema nitidum* (Jack) Kunth)	30.80	2.53	8.21

สารสกัดหยาบ	น้ำหนักอบแห้ง (กรัม)	น้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบ(กรัม)	% yield
เหง้าหัวเดียว (*Aglaonema nitidum* (Jack) Kunth)	57.78	6.30	10.90
ใบเข็มไอเดีย (*Aidia wallichiana sensu* Tirveng)	80.00	9.65	12.06
รากเข็มไอเดีย (*Aidia wallichiana sensu* Tirveng)	80.02	3.96	4.95
ใบระย่อมน้อยดอกขาว (*Rauvolfia* sp.)	44.76	3.13	7.00
รากระย่อมน้อยดอกขาว (*Rauvolfia* sp.)	50.01	1.05	2.10
ใบเบญจมาศแมว (*Ageratum conyzoides* Linn.)	50.02	6.97	13.93
ใบชงโค (*Bauhinia* sp.)	37.18	2.92	7.85
ใบมะเดื่อหอม (*Ficus hirta Vahl*)	41.84	2.79	6.67
ใบลายกนก (รอพิสูจน์สายพันธุ์)	66.16	2.60	3.93
ไมยราบ (*Mimosa diplotricha* C. Wright ex Sauvalle)	50.00	1.73	3.46
ใบไม้ลาย (*Microcos tomentosa* Sm.)	80.02	4.78	5.97
รากพนมสวรรค์ (*Clerodendrum paniculatum* L.)	80.00	2.35	2.94

4.2 การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

4.2.1 สารประกอบฟีนอลิกรวม

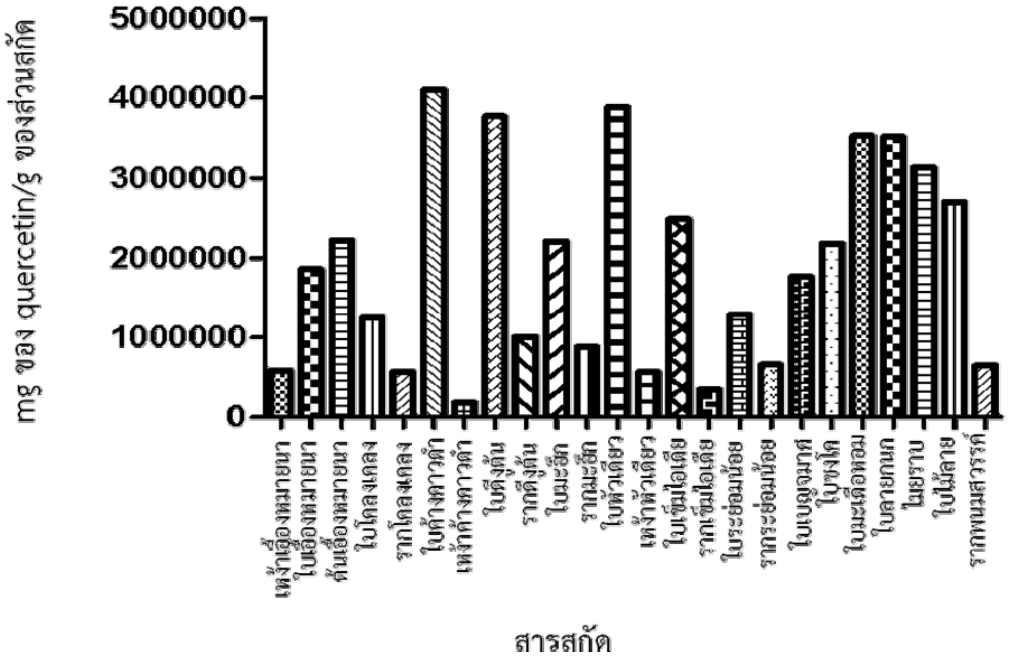
ทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมดในพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ โดยพบว่าสารสกัดจากรากโคลงเคลง, ใบเข็มไอเดีย, รากเข็มไอเดีย, ใบเบญจมาศ และใบไม้ลาย มีสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกสูงกว่าสารสกัดจากพืชชนิดอื่นอย่างมีนัยยะสำคัญ (ภาพที่ 4-1: ANOVA, p-value < 0.05)



ภาพที่ 4-1 กราฟแสดงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่พบในการทดลอง

4.2.2 สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมทั้งหมดในพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ โดยพบว่าสารสกัดจาก ใบค้างคาวดำ, ใบดีงูต้น, ใบหัวเดียว, ใบชงโค, ใบมะเดื่อหอม และใบลายกนก มีสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์สูงกว่าสารสกัดจากพืชชนิดอื่น และพบว่าสารสกัดจาก เหง้าเอื้องหมายนา, รากโคลงเคลง, เหง้าค้างคาวดำ, เหง้าหัวเดียว, รากเข็มไอเดีย, รากระย่อมน้อย และรากพนมสวรรค์ มีสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์น้อยกว่าสารสกัดจากพืชชนิดอื่นอย่างมีนัยยะสำคัญ (ภาพที่ 4-2: ANOVA, p-value < 0.05)



ภาพที่ 4-2 กราฟแสดงปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่พบในการทดลอง

4.3 การแสดงออกและการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ CYP2A6 CYP2A13 และ Cytochrome P450 reductase

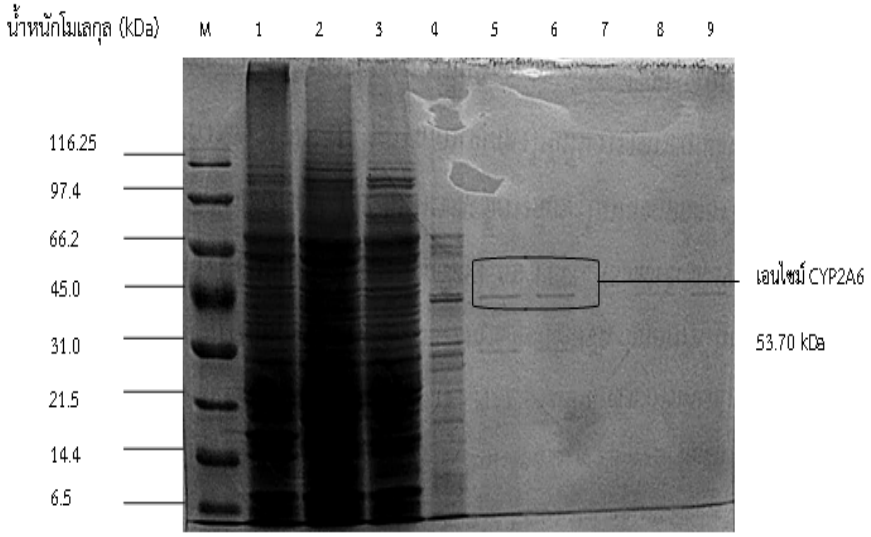
ทำการเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ทั้งสาม (CYP2A6 CYP2A13 และ CPR) จากนั้นทำบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะโดยใช้ Ni^{2+}-NTA (Ni^{2+}-Affinity chromatography) และตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยใช้ SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 บริสุทธิ์ที่ได้มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 55 kDa (ภาพที่ 4-3 และ 4-4) และเอนไซม์ CPR ที่ได้มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 78 kDa (ภาพที่ 4-5)

4.4 การตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ rat CPR CYP2A13 และ CYP2A6 ของสารสกัด

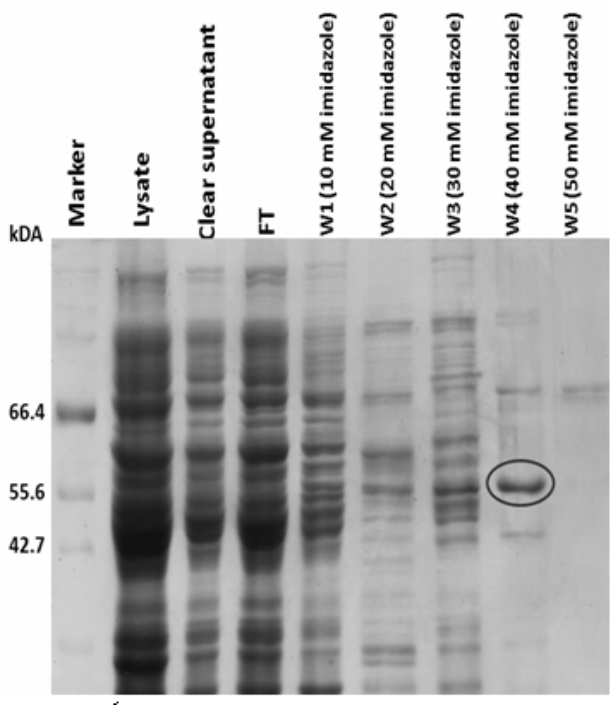
4.4.1 การตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ rat CPR กับสารสกัดจากพืชสมุนไพร

เอนไซม์ rat CPR ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์มีค่าความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา Cytochrome C reduction เท่ากับ 47.13 ± 4.80 umol/Cytc reduction/min/mg protein จากนั้นศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของสารสกัดต่อเอนไซม์ CPR ที่ทำหน้าที่ส่งอิเล็กตรอนให้กับเอนไซม์ในกลุ่ม P450 พบว่าสารสกัด

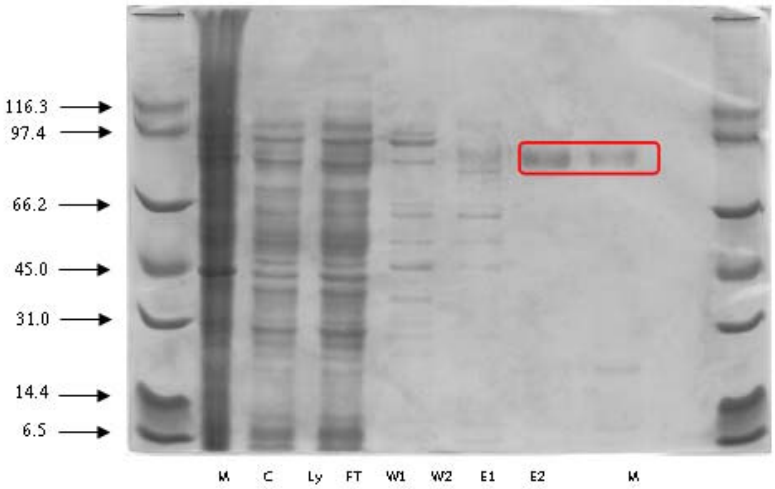
จากพืชสมุนไพรที่ทำการทดลองจากป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดที่ 10 µg/ml ออกฤทธิ์ต่อการทำงานของเอนไซม์ rat CPR แตกต่างกัน (ภาพที่ 4-6) โดยพืชในกลุ่มที่ออกฤทธิ์การกระตุ้นการทำงานของ rat CPR ได้แก่ เหง้าเอื้องหมายนา, ใบเอื้องหมายนา, ต้นเอื้องหมายนา, ใบโคลงเคลง, ใบค้างคาวดำ, เหง้าค้างคาวดำ, ใบดีงูต้น,ใบมะฮึก, รากมะฮึก, ใบหัวเดียว, ใบเข็มไอเดีย, รากระย่อมน้อย, ใยระย่อมน้อย, ใบเบญจมาศแมว, ใบชงโค, ใบมะเดื่อหอม, ใบลายกนก, ไมยราบ, ใบไม้ลาย และรากพนมสวรรค์ และพืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ rat CPR ได้แก่ รากโคลงเคลง, รากดีงูต้น และรากเข็มไอเดีย (t-test, p-value < 0.05)



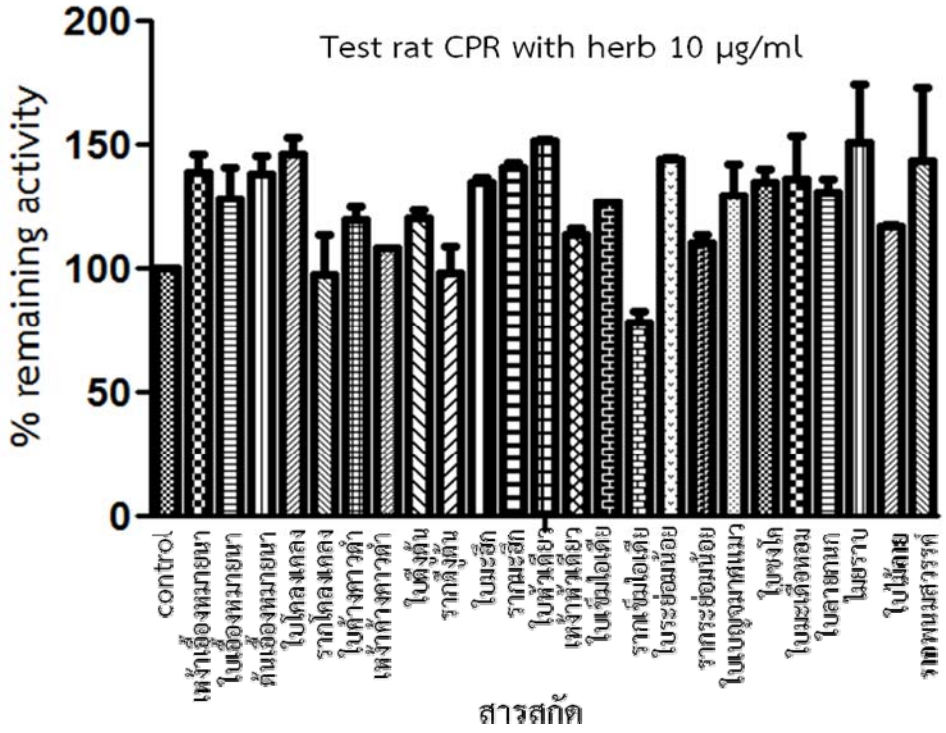
ภาพที่ 4-3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ CYP2A6 โดย SDS-PAGE



ภาพที่ 4-4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ CYP2A13 โดย SDS-PAGE



ภาพที่ 4-5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ CPR โดย SDS-PAGE



ภาพที่ 4-6 ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ rat CPR เมื่อบ่มรวมกับสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่ความเข้มข้น 10 µg/ml เปรียบเทียบกับสารสะลายเอทานอล99.5% (Anova, p-value < 0.05) การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้งและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5

4.4.2 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของสารสกัดสมุนไพรต่อเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13

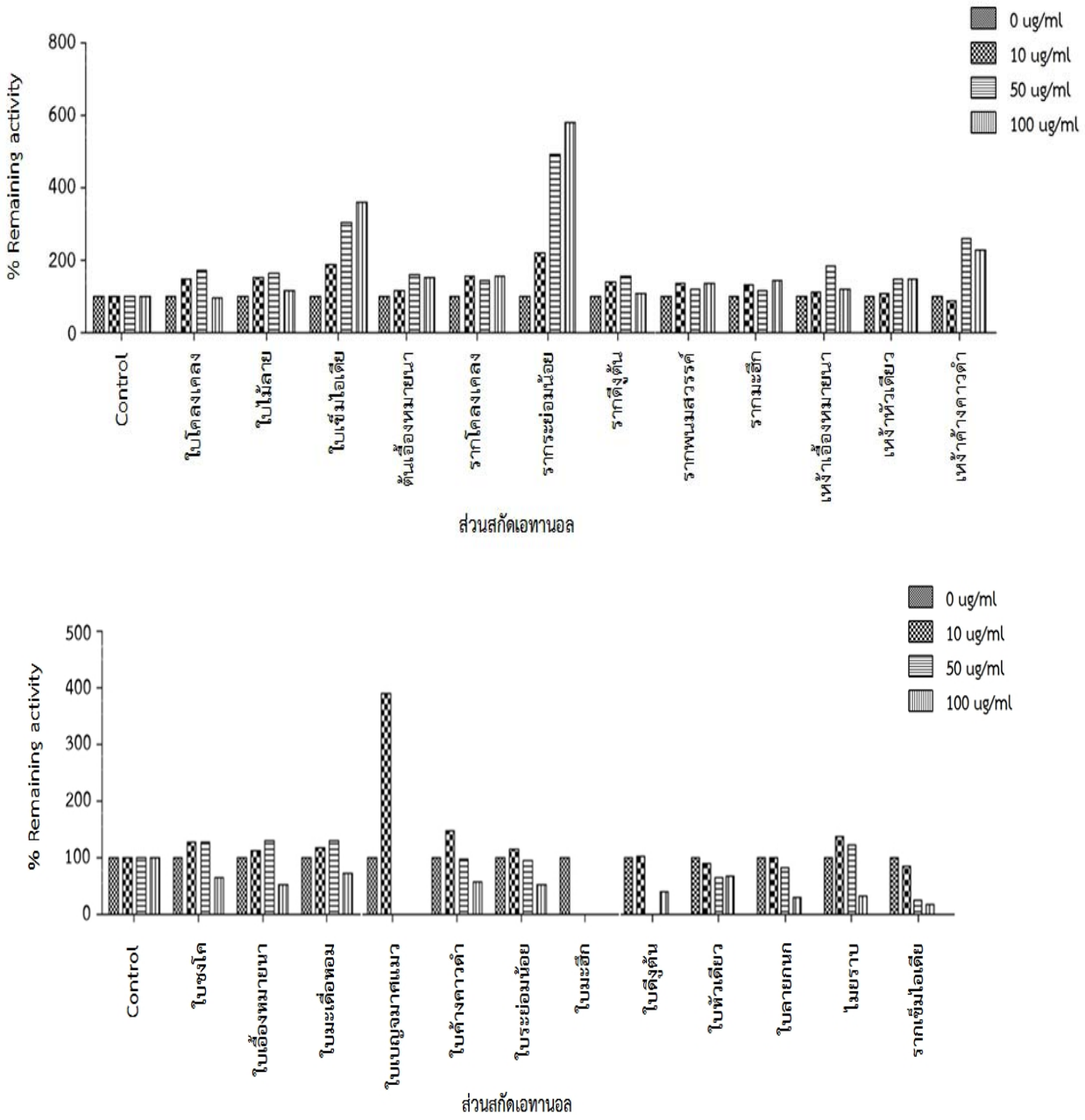
เอนไซม์ CYP 2A6 และเอนไซม์ CYP2A13 มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 0.32 ±0.0007 และ 0.10 ± 0.001 umol 7-hydroxycoumarin /min/mg protein ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาระลาย 7-hydroxycoumarin

4.4.2.1 การตรวจสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP 2A6 ด้วยสารสกัดจากพืชสมุนไพร

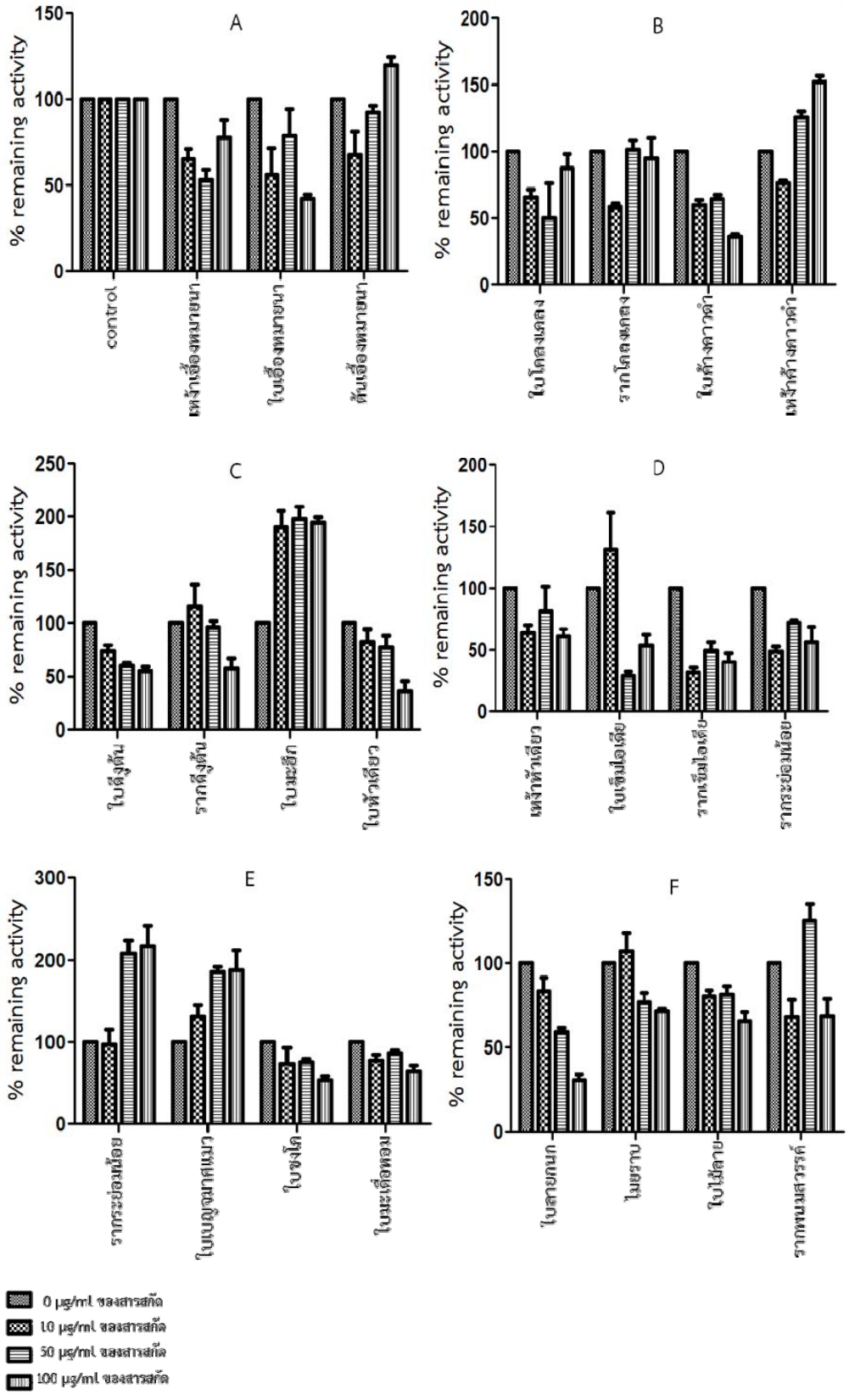
ทำการวัดการกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ที่ความเข้มข้นของสารสกัดแตกต่างกัน (10, 50, และ 100 µg/ml) นำค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้เปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ในสภาวะที่ปราศจากพืชสมุนไพร (ภาพที่ 4-7) พบว่าพืชในกลุ่มที่ออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของ CYP2A6 ได้แก่ สารสกัดใบเข็มไอเดีย รากระย่อมน้อย เหง้าค้างคาวดำ รากมะฮึก เหง้าเอื้องหมายนา เหง้าหัวเดียว ใบไม้ลาย ต้นเอื้องหมายนา รากโคลงเคลง รากดีงูต้น รากพนมสวรรค์ และใบโคลงเคลงตามลำดับ ในขณะที่พืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง CYP2A6 ได้เมื่อเรียงลำดับพืชที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งได้ดีที่สุดไปยังพืชที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งได้ต่ำที่สุดเมื่อพิจารณาจากค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลดลงเป็นครึ่งหนึ่ง) ได้แก่ ใบมะฮึก (ยับยั้ง 100%) และใบเบญจมาศแมว (ยับยั้ง 100% เมื่อเพิ่มความเข้มข้น) ที่ไม่สามารถหาค่า IC_{50} ได้ รองลงมาคือ รากเข็มไอเดีย (IC_{50} = 24.72 ug/ml), ใบดีงูต้น (IC_{50} = 28.25 ug/ml), ใบลายกนก (IC_{50} = 76.63 ug/ml), ไมยราบ (IC_{50} = 96.44 ug/ml), ใบเอื้องหมายนา (IC_{50} = 100.2 ug/ml), ใบระย่อมน้อย (IC_{50} = 101 ug/ml), ใบชงโค (IC_{50} = 102.8 ug/ml), ใบมะเดื่อหอม (IC_{50} = 103.4 ug/ml), ใบค้างคาวดำ (IC_{50} = 105.4 ug/ml) และใบหัวเดียว (IC_{50} = 140.5 ug/ml) ตามลำดับ (t-test, p-value <0.05)

4.4.2.2 การตรวจสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP 2A13 ด้วยสารสกัดจากพืชสมุนไพร

ทำการวัดการกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ที่ความเข้มข้นของสารสกัดแตกต่างกัน (10, 50, และ 100 µg/ml) นำค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้เปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ในสภาวะที่ปราศจากพืชสมุนไพร (ภาพ 4-8A ถึง 4-8F) พบว่าพืชในกลุ่มที่ออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของ CYP2A13 ได้แก่ ต้นเอื้องหมายนา, รากโคลงเคลง, เหง้าค้างคาวดำ, ใบมะฮึก, รากระย่อมน้อย และใบเบญจมาศแมว ในขณะที่พืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง CYP2A13 เรียงลำดับพืชที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งได้ดีที่สุดไปยังพืชที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งได้ต่ำที่สุดเมื่อพิจารณาจากค่า IC_{50} ได้แก่ รากเข็มไอเดีย (IC_{50} = 19.56 µg/ml), ใบค้างคาวดำ (IC_{50} = 55.1 µg/ml), ใบลายกนก (IC_{50} = 57.28 µg/ml), ใบเข็มไอเดีย (IC_{50} = 74.16 µg/ml), ใบเอื้องหมายนา (IC_{50} = 82.13 µg/ml), ใบหัวเดียว (IC_{50} = 86.35 µg/ml), ใบดีงูต้น (IC_{50} = 87.53 µg/ml), ใบระย่อมน้อย (IC_{50} = 94.4 µg/ml), ใบชงโค (IC_{50} = 111.6 µg/ml), เหง้าเอื้องหมายนา (IC_{50} = 123.2 µg/ml), เหง้าหัวเดียว (IC_{50} = 145.4 µg/ml),ใบโคลงเคลง (IC_{50} = 157.6 µg/ml), ใบไม้ลาย (IC_{50} = 186.5 µg/ml), ใบมะเดื่อหอม (IC_{50} = 194.6 µg/ml) ไมยราบ (IC_{50} = 236.2 µg/ml), รากดีงูต้น (IC_{50} = 239.5 µg/ml) และรากพนมสวรรค์ (IC_{50} = 558.5 µg/ml), (t-test, p-value <0.05)



ภาพที่ 4-7 ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรจากป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดที่ความเข้มข้น 0 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml และ 100 µg/ml ต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 เปรียบเทียบกับสารละลาย1 ไมโครลิตร ของเอทานอล 99.5% (control) เมื่อทำการศึกษาที่อุณหภูมิห้อง 37 องศาเซลเซียส การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้ง และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5

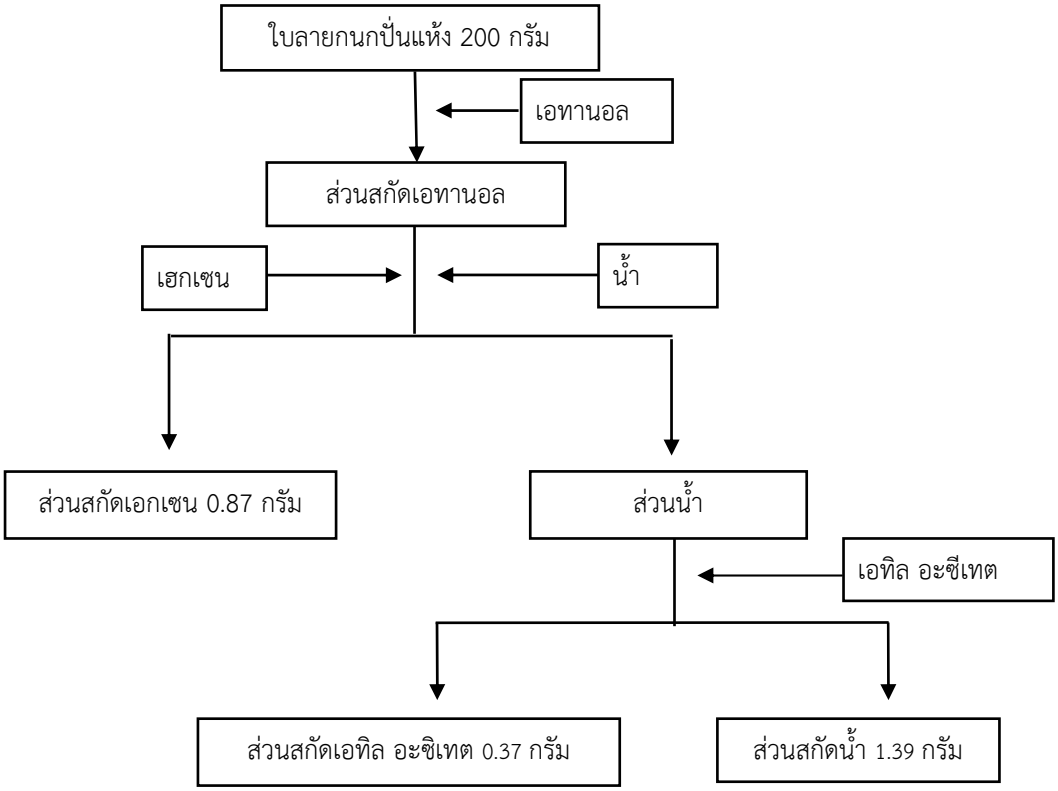


ภาพที่ 4-8 (A ถึง F) ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรจากป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดที่ความเข้มข้น 0 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml และ 100 µg/ml ต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 เปรียบเทียบกับสารละลาย1 ไมโครลิตร ของเอทานอล 99.5% (control) เมื่อทำการศึกษาที่อุณหภูมิห้อง 37 องศาเซลเซียส การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้งและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5

4.5.ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CPR CYP2A6 และ CYP2A13 ของสารสกัดใบลายกนก

4.5.1 การสกัดสารสำคัญจากใบลายกนก

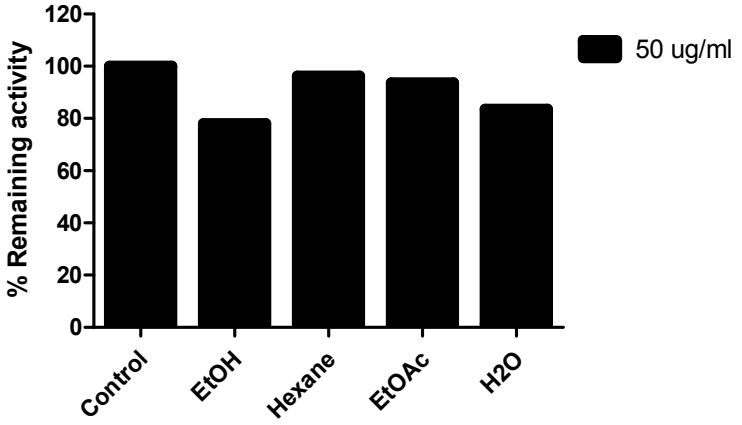
เก็บส่วนใบของสมุนไพรลายกนกนารี จากโครงการป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดฯ ล้างทำความสะอาด อบแห้ง และปั่นให้ละเอียด นำมาสกัดด้วย 95% เอทานอล (Ethanal: EtOH) และระเหยตัวทำละลายออก ได้ปริมาณสารสกัดเอทานอลสุทธิ 2.63 กรัม เมื่อทำการแยกสารสกัดแบบลำดับส่วน ทำการกลั่นระเหย ได้ส่วนสกัดเฮกเซน (Hexane) เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate: EtOAc) และน้ำ (Water) ปริมาณสุทธิ 0.87 กรัม 0.37 กรัม และ 1.39 กรัม ตามลำดับ (ภาพที่ 4-9)



ภาพที่ 4-9 ลำดับขั้นตอนสารสกัดพืชตัวอย่าง

4.5.2 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

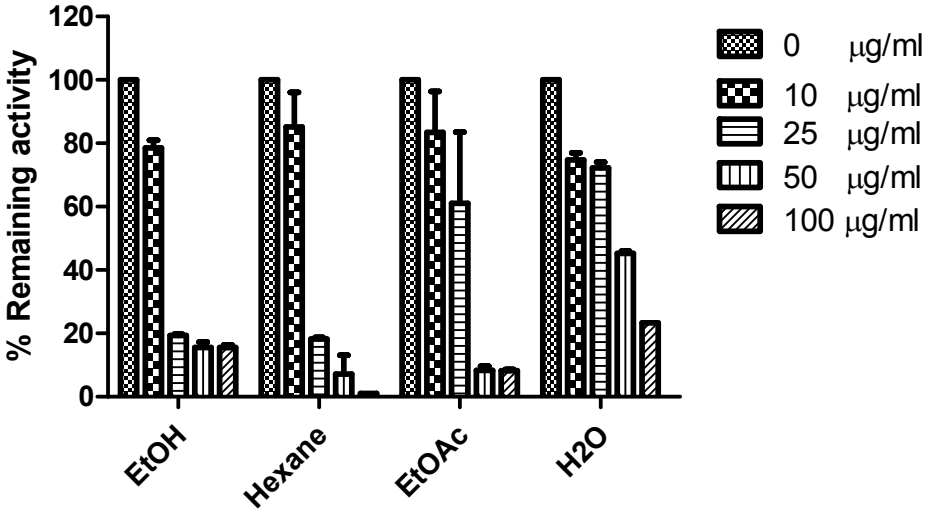
วัดกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CPR เมื่อมีสารสกัดความเข้มข้น 50 μg/ml เปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CPR กับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CPR ปกติ (มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 100%) ผลการศึกษาพบว่า ส่วนสกัดพืชสมุนไพรใบลายกนกที่ 50 μg/ml ในส่วนสกัด EtOH, Hexane, EtOAcและน้ำส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ CPR เพียงเล็กน้อย โดยส่วนสกัด EtOH ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CPR ได้ 21.99 % ส่วนสกัด Hexane ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CPR ได้ 3.75% ส่วนสกัด EtOAc ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ได้ 6.39% และส่วนสกัดน้ำยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ได้ 16.42% (ภาพที่ 4-10)



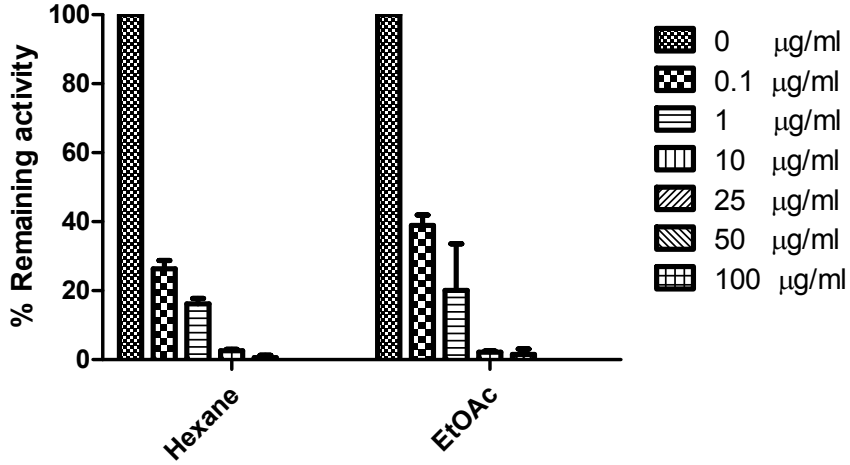
รูปที่ 4-10 ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CPR ในสภาวะที่มีสารสกัดจากพืชที่ความเข้มข้น % 50 µg/ml วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5

ตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในการเร่งปฏิกิริยาสร้างสารผลิตภัณฑ์ 7-hydroxycoumarin โดยบ่มเอนไซม์ CPR เอนไซม์ CYP2A6 และสาร DLPC เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารตั้งต้น Coumarin ที่ค่า Km (3mM) และสารสกัดพืชสมุนไพรที่ได้ในแต่ละส่วนสกัด ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไปพร้อมกันเพื่อให้เกิดการแข่งขันในการจับกับเอนไซม์ระหว่างสารตั้งต้นกับสารยับยั้งจากสารสกัดใบลายกนก หลังจากนั้นเติม NADPH เพื่อเริ่มปฏิกิริยา (ปฏิกิริยา Co-incubation) ผลการศึกษาพบว่าส่วนสกัด Hexane และส่วนสกัด EtOAc ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีกว่าส่วนสกัดน้ำ โดยมีค่าการยับยั้ง IC_{50} เท่ากับ 13.35 ug/ml 21.98 ug/ml และ 35.49 ug/ml ตามลำดับ (ภาพที่ 4-11) เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัด EtOH ที่มีค่าการยับยั้ง IC_{50} เท่ากับ 13.88 ug/ml

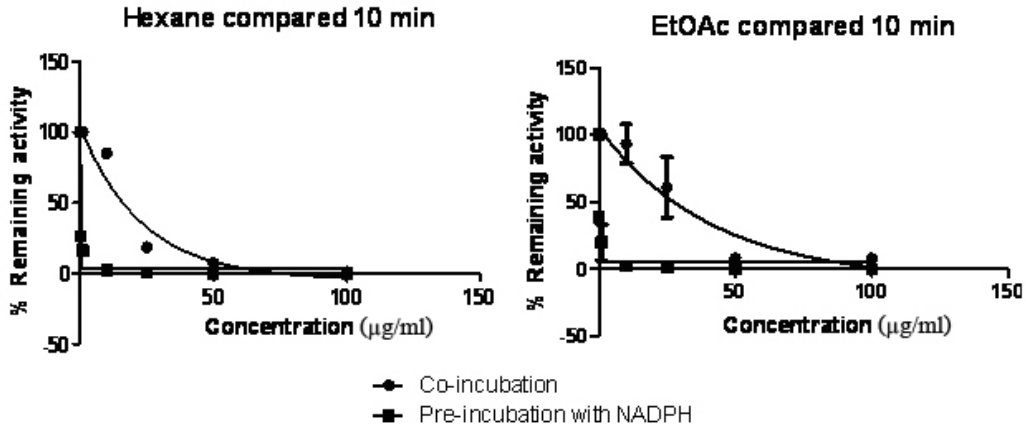
ทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 ทำโดยการบ่มเอนไซม์ CPR เอนไซม์ CYP2A6 และ DLPC เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารสกัดพืชสมุนไพรใบลายกนกที่ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับNADPH เพื่อเริ่มปฏิกิริยาจากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่เวลาต่างๆ เมื่อครบเวลาเติมสารตั้งต้น Coumarin และ NADPH เพื่อเริ่มปฏิกิริยาเป็นครั้งที่ 2 (ปฏิกิริยา Pre-incubation) พบว่าการทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างชัดเจน (ภาพที่ 4-12) เมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 ในปฏิกิริยาที่ปราศจากสารสกัดใบลายกนก เมื่อทำการเปรียบเทียบผลการยับยั้งการทำงานของส่วนสกัดระหว่างปฏิกิริยา Co-incubation และ Pre-incubation จะเห็นได้ว่าปฏิกิริยา Pre-incubation สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีกว่าปฏิกิริยา Co-incubation หรือเป็นการยับยั้งแบบ NADPH-dependent inhibition (ภาพที่ 4-13) เมื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของส่วนสกัด Hexane และ EtOAc ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในช่วงเวลาการ pre-incubation ต่างๆ (ภาพที่ 4-14) พบว่าฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ของส่วนสกัด Hexane และ EtOAc ขึ้นอยู่กับเวลาของการบ่มส่วนสกัดกับเอนไซม์ (Pre-incubation time dependent inhibition) และขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสกัด (Concentration dependent inhibition) จึงสรุปเบื้องต้นได้ว่า สมุนไพรใบลายกนก ส่วน Hexane และ EtOAc สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้แบบผันกลับโดยกลไกการยับยั้งแบบ Meachanism-based inhibition



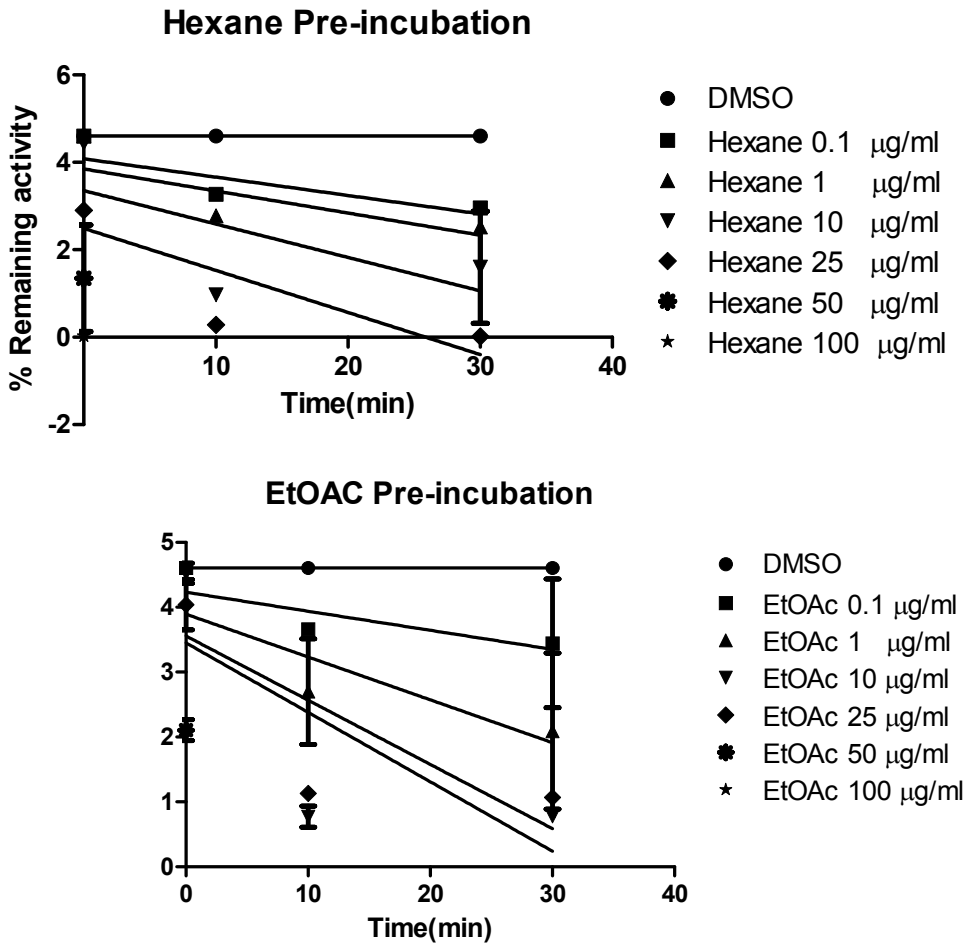
ภาพที่ 4-11 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในการเร่งปฏิกิริยา Coumarin 7-hydroxylase โดยส่วนสกัดพืชสมุนไพรใบลายกนกแบบ Co-incubation การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้งและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5



ภาพที่ 4-12 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในการเร่งปฏิกิริยา Coumarin 7-hydroxylase โดยส่วนสกัดพืชสมุนไพรใบลายกนกแบบ Pre-incubation ที่เวลา 10 นาที การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้งและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5



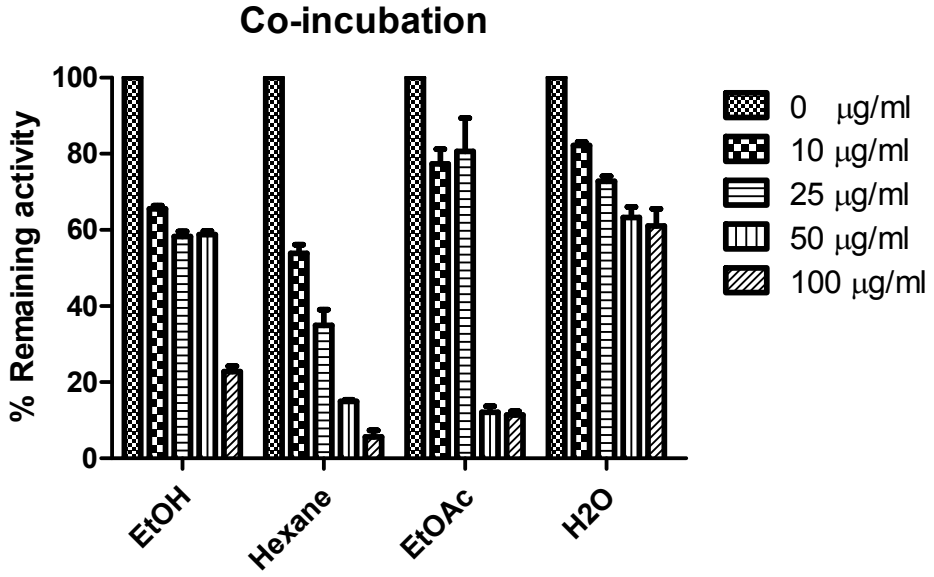
ภาพที่ 4-13 เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของส่วนสกัด Hexane และ EtOAc ของใบลายนกนารีระหว่างปฏิกิริยา Co-incubation กับ Pre-incubation ที่เวลา 10 นาที การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้งและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5



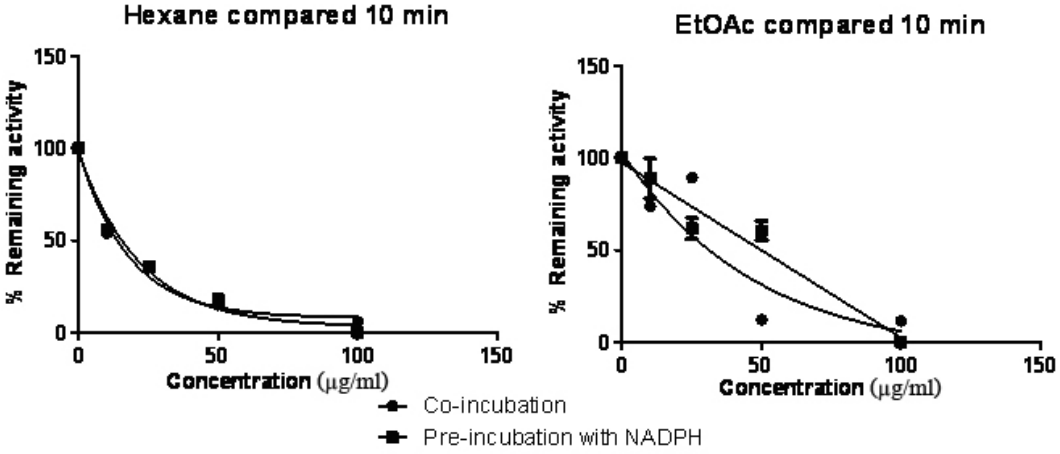
ภาพที่ 4-14 การทดสอบการยับยั้งแบบ Concentration-Dependent และ Time-Dependent ของเอนไซม์ CYP2A6 ในปฏิกิริยา Pre-incubation ที่เวลา 10 และ 30 นาทีและความเข้มข้นต่างๆ การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้งและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5

ตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 โดยบ่มเอนไซม์ CPR เอนไซม์ CYP2A13 ร่วมกับ DLPC เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารตั้งต้น Coumarin ที่ค่า Km (3mM) และสารสกัดพืชสมุนไพรที่ได้ในแต่ละส่วนสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไปพร้อมกันเพื่อให้เกิดการแข่งขันในการจับกับเอนไซม์ระหว่างสารตั้งต้น Coumarin กับตัวยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 หลังจากนั้นจึงเติม NADPH เพื่อเริ่มปฏิกิริยา (ปฏิกิริยา Co-incubation) ผลการศึกษาพบว่าส่วนสัดที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ได้ดีที่สุดคือส่วนของชั้นสารสกัด Hexane เป็นโดยมีค่าการยับยั้ง IC_{50} เท่ากับ 10.13 ug/ml และรองลงมาคือส่วนของชั้น EtOAc และ H_2O มีค่าการยับยั้ง IC_{50} เท่ากับ 26.58 ug/ml และ 118.9 ug/ml ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัด EtOH ที่มีค่าการยับยั้ง IC_{50} เท่ากับ 37.42 ug/ml (ภาพที่ 4-15)

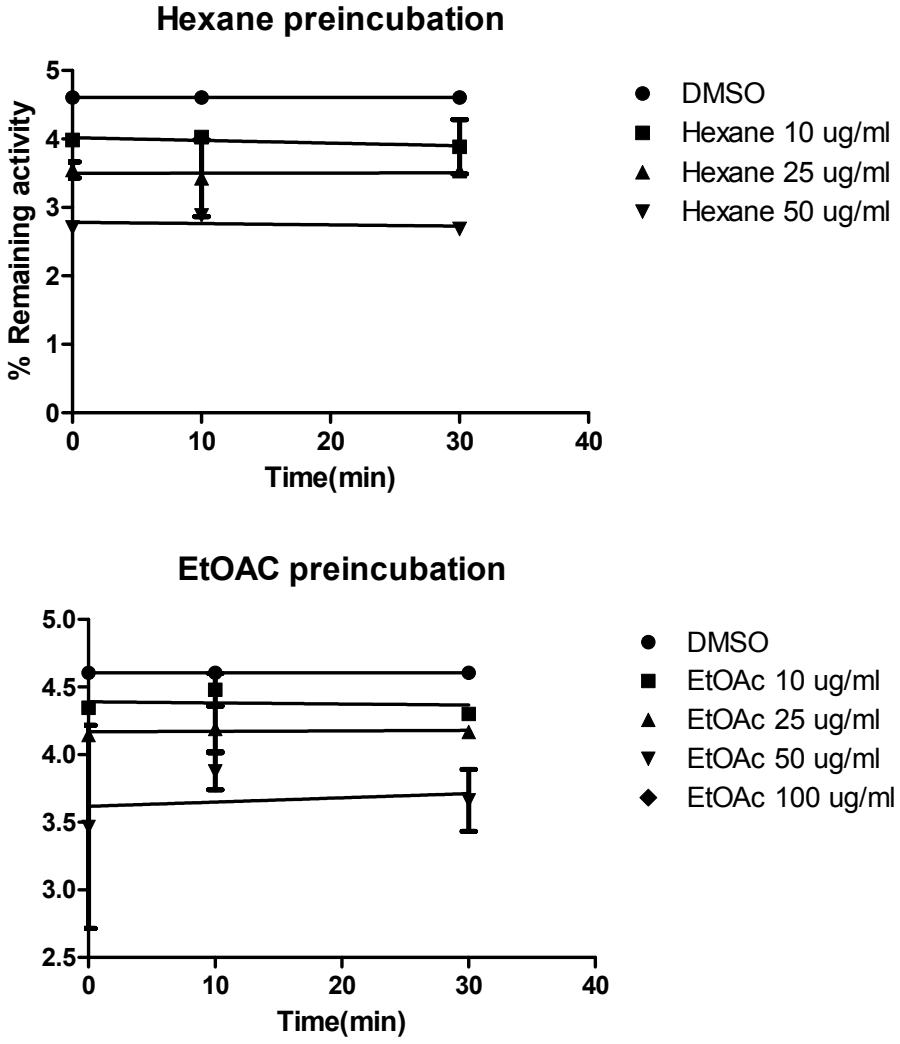
ทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A13 โดยปฏิกิริยา Pre-incubation พบว่าฤทธิ์ยับยั้งใกล้เคียงกับการทำปฏิกิริยาแบบ Co-incubation โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบผลการยับยั้งการทำงานของส่วนสกัด Hexane และ EtOAc พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของฤทธิ์การยับยั้งการทำงานเอนไซม์ CYP2A13 ระหว่างปฏิกิริยา Co-incubation และ Pre-incubation (ภาพที่ 4-16) แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ของทั้งสองส่วนสกัดอาจไม่ได้มีกลไกการยับยั้งแบบ NADPH-dependent inhibition จากนั้นศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ของส่วนสกัด Hexane และ EtOAc ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในช่วงเวลาการ pre-incubation ระหว่างเอนไซม์กับส่วนสกัดที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 4-17) พบว่าฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของส่วนสกัด Hexane และ EtOAc ไม่ขึ้นอยู่กับเวลาของการบ่ม แต่ขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสกัด (Concentration dependence) ดังนั้นสรุปได้ว่า พืชสมุนไพรใบลายกนกส่วน Hexane และ EtOAc ไม่ได้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ผันกลับไม่ได้โดยกลไกการยับยั้งแบบ Meachanism-based inhibition



ภาพที่ 4-15 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 บริสุทธิ์ ในการเร่งปฏิกิริยา Coumarin 7-hydroxylase โดยส่วนสกัดพืชสมุนไพรใบลายกนก การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้งและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5



ภาพที่ 4-16 เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ของสารสกัดใบลายนกนารี ระหว่างปฏิกิริยา Co-incubation กับ Pre-incubation ที่เวลา 10 นาที ในส่วนสกัด Hexane และ EtOAc การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้งและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5

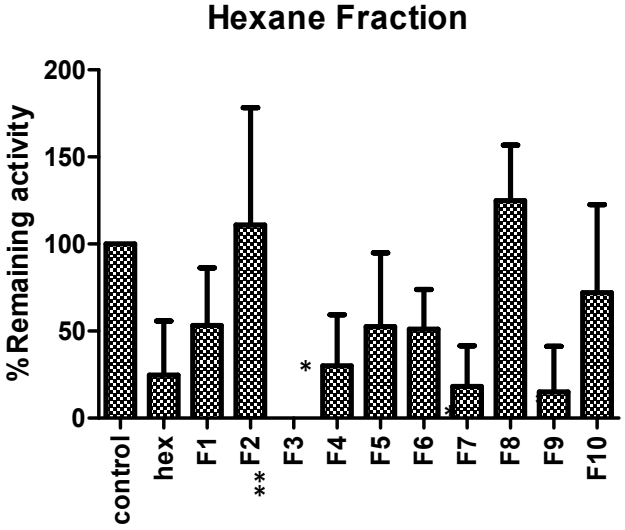


ภาพที่ 4-17 การทดสอบการยับยั้งแบบ Concentration-Dependent และ Time-Dependent ของเอนไซม์ CYP2A13 ในปฏิกิริยา Pre-incubation ที่เวลา 10 และ 30 นาทีและความเข้มข้นต่างๆ

4.5.3 การสกัดสารจากใบลายกนกควบคู่กับการทดสอบการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 (Bioassay guide isolation)

4.5.3.1 การแยกส่วนสกัดส่วนเฮกเซน และทดสอบการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยสารสกัดใบลายกนกส่วนเฮกเซน

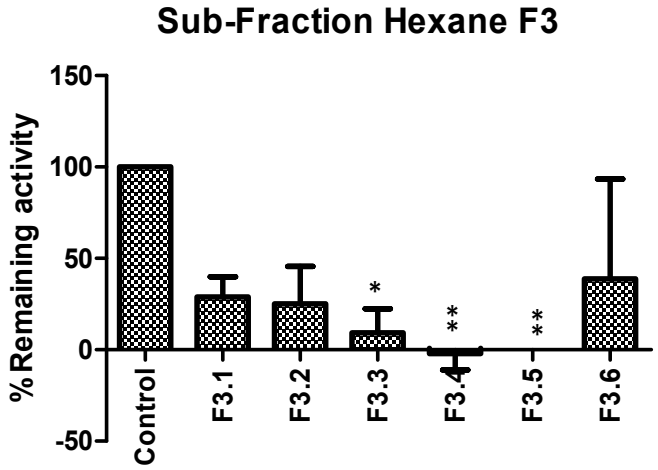
ทำการแยกส่วนสกัด Hexane ด้วยวิธีโครมาโทรกราฟีโดยไล่อัตราส่วนตั้งแต่ 50% EtOAC จนถึง 100% เอทิลอะซิเตตได้สิบส่วนสกัด (ส่วนสกัด LKHF1-LKHF10) จากนั้นทำการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ที่ความเข้มข้นสารสกัด 10 µg/ml พบว่า LKHF3 ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ดีที่สุดที่ 100% รองลงมาคือ LKHF9 (84.87%), LKHF7 (81.73%), LKHF4 (69.89%), LKHF6 (49.00%), LKHF5 (47.33%), LKHF1 (46.73%) และ LKHF10 (27.99%) ตามลำดับ โดยที่ LKHF2 กับ LKHF 8 ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 (ภาพที่ 4-18)



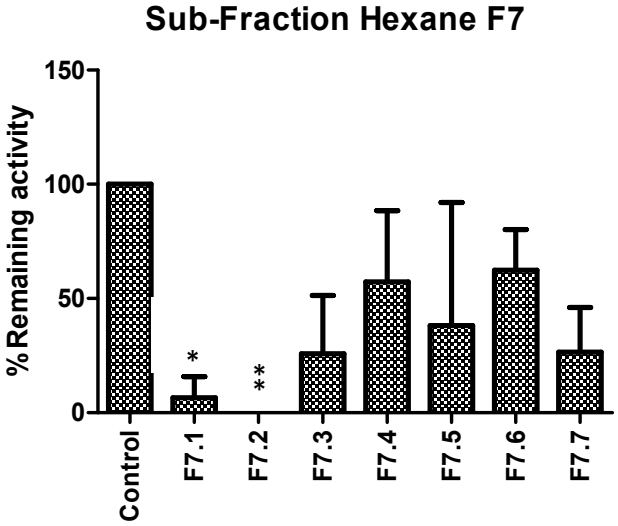
ภาพที่ 4-18 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 โดยส่วนสกัดใบลายกนกส่วนเฮกเซน โดยมีสารละลายเอทานอลเป็นตัวควบคุม (มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 100%) (* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$ และ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\leq0.0001$)

ยกเว้น LKHF9 ที่สารมีปริมาณน้อย ผู้วิจัยนำส่วนสกัด LKHF3, LKHF4 และ LKHF7 ที่มีผลการยับยั้งที่ดีลงคอลัมน์ทำการแยกส่วนสกัดและทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6อีกครั้งพบว่า ส่วนสกัดย่อย LKHF3.4 และ LKHF3.5 ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุดที่ 100% รองลงมาคือ LKHF3.3 (90.71%), LKHF 3.2 (74.94%), LKHF3.1 (71.13%) และ LKHF3.6 (61.33%) (ภาพที่ 4-19 (ก)) นอกจากนี้ยังพบว่า LKHF 7.2 ยับยั้งได้ดีที่สุดที่ 100% รองลงมาคือ LKHF7.1 (93.45%), LKHF7.3 (74.23%), LKHF7.7 (73.48%), LKHF7.5 (61.84%) และ LKHF7.4 (42.73%) (ภาพที่ 4-8 (ข)) และ LKHF4.4 ยับยั้งได้ดีที่สุดที่ 81.34% รองลงมาคือ LKHF4.5 (74.01%), LKHF4.3 (56.32%), LKHF4.1 (48.79%) และ LKHF 4.7 (22.44%) ตามลำดับ (ภาพที่ 4-8 (ค))

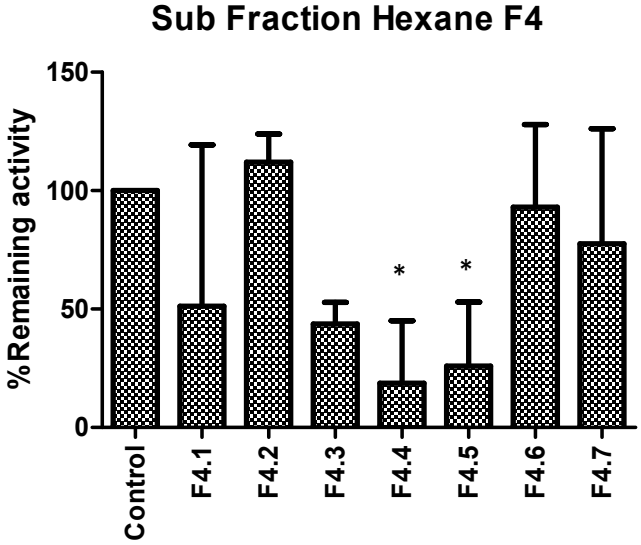
(ก)



(ข)



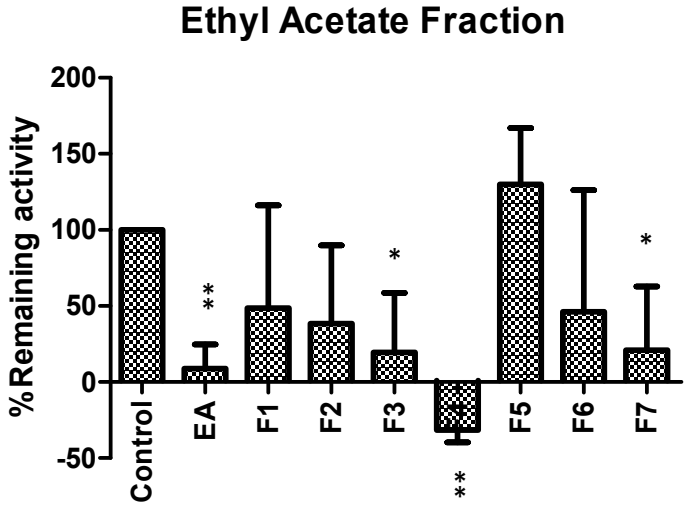
(ค)



ภาพที่ 4-19 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ของส่วนสกัดย่อยของ LKEF3.1- LKEF3.6(ก) ส่วนสกัดที่ LKEF7.1- LKEF7.7 (ข) และส่วนสกัดที่ LKEF4.1- LKEF4.7 (ค) (* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$ และ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\leq0.0001$)

4.5.3.2 การแยกส่วนสกัดส่วนเอทิลอะซิเตต และทดสอบการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยสารสกัดใบลายกนกส่วนเอทิลอะซิเตต

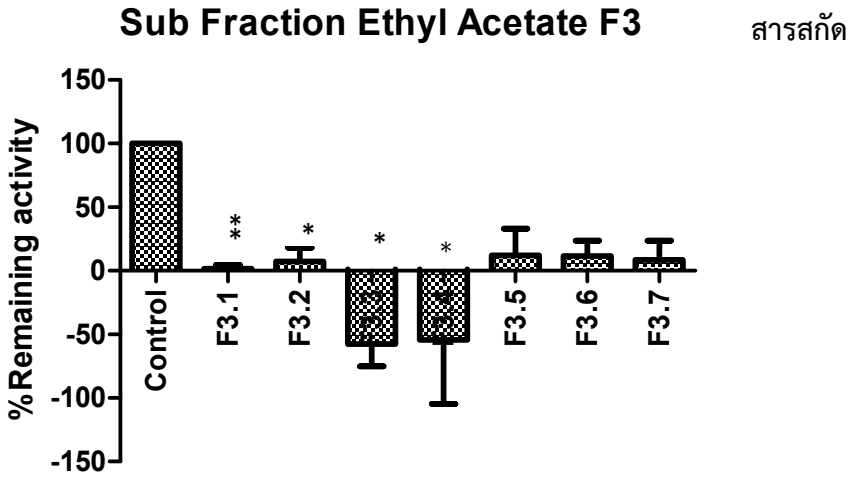
ทำการแยกส่วนสกัด Hexane ด้วยวิธีโครมาโทรกราฟีโดยไล่อัตราส่วนตั้งแต่ 50% EtOAC จนถึง 100% เอทิลอะซิเตตได้เจ็ดส่วนสกัด (ส่วนสกัด LKEF1-LKEF7) จากนั้นทำการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ที่ความเข้มข้นสารสกัด 10 µg/ml พบว่า LKEF4 ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ดีที่สุดที่ 100%, รองลงมาคือ LKEF3 (80.48%), LKEF7 (79.10%), LKEF2 (61.63%), LKEF6 (53.86%)และ LKEF1 (51.49%) ตามลำดับ โดยที่ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตตที่ 5 ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 (ภาพที่ 4-20)



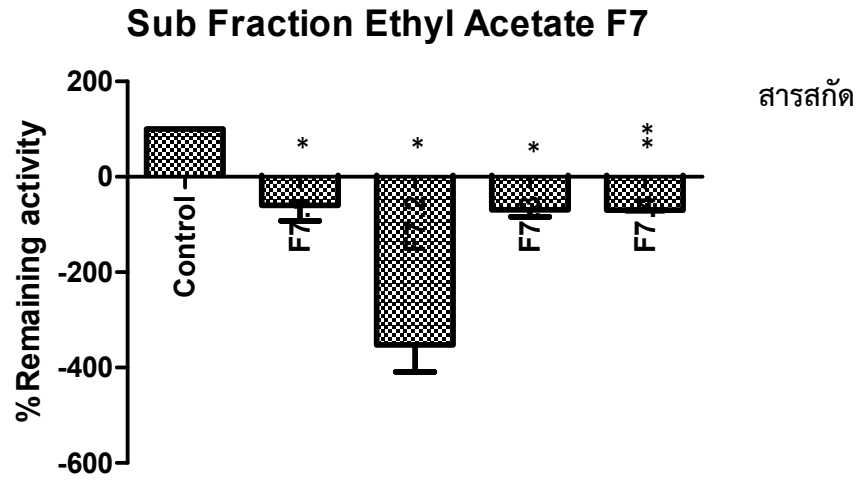
ภาพที่ 4-20 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 จากสารสกัดใบลายกนกส่วน เอทิลอะซิเตต (* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$ และ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\leq0.0001$)

จากนั้นนำ LKEF3 และ LKEF7 ที่มีผลการยับยั้งที่ดี (LKEF4 ไม่ได้ทำการศึกษาต่อเนื่องจากสารหมด) ลงคอลัมน์ทำการแยกส่วนสกัดและทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 อีกครั้งพบว่า ส่วนสกัดย่อย LKEF3.3 และ LKEF 3.4 ยับยั้งได้ดีที่สุดที่ 100% รองลงมาคือ LKEF 3.1 (98.27%), LKEF3.2 (92.52%), LKEF3.6 (88.42%) และ LKEF3.5 (87.90%) (ภาพที่ 4-21 (ก)) และยังพบว่าส่วนสกัดย่อย LKEF7.1 – LKEF7.4 ยับยั้งได้ดีที่สุดที่ 100% (ภาพที่ 4-21 (ข))

(ก)



(ข)

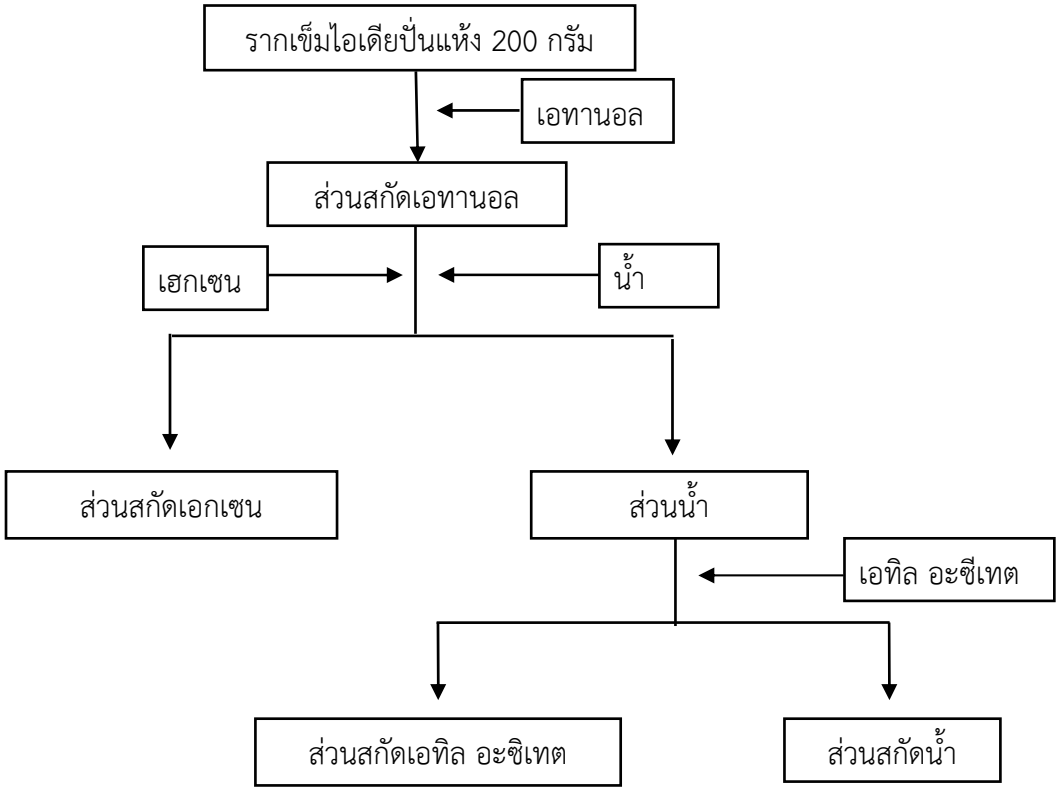


ภาพที่ 4-21 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ของส่วนสกัดย่อย LKEF3.1-3.7 (ก) และ LKEF7.1-7.4 (ข) (* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$ และ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\leq0.0001$)

4.6.ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CPR CYP2A6 และ CYP2A13 ของสารสกัดรากเข็มไอเดีย

4.6.1 การสกัดสารสำคัญจากรากเข็มไอเดีย

ทำการเก็บรากเข็มไอเดีย จากโครงการป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดฯ ล้างทำความสะอาด อบแห้งและปั่นให้ละเอียด ได้ปริมาณสุทธิ 200 กรัม นำมาสกัดด้วย 95% เอทานอล (Ethanol) และระเหยตัวทำละลายออก ได้ปริมาณสารสกัดเอทานอลสุทธิ 6.45 กรัม ทำการแยกสารสกัดแบบลำดับส่วน ได้ส่วนสกัดเฮกเซน (Hexane) เอทิลอะซิเตต (EtOAc) และน้ำตามลำดับ (ภาพที่ 4-22)



ภาพที่ 4-22 ขั้นตอนสารสกัดรากเข็มไอเดีย

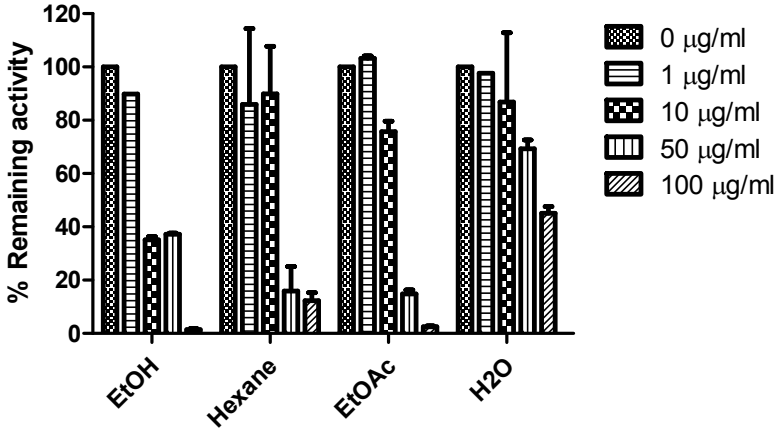
4.6.2 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

วัดกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CPR เมื่อมีสารสกัดความเข้มข้น 50 µg/ml เปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CPR กับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CPR ปกติ (มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 100%) ผลการศึกษาพบว่า ส่วนสกัดพืชสมุนไพรรากเข็มไอเดียที่ 50 µg/ml ในส่วนสกัด EtOH, Hexane, EtOAcและน้ำส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ CPR เพียงเล็กน้อย

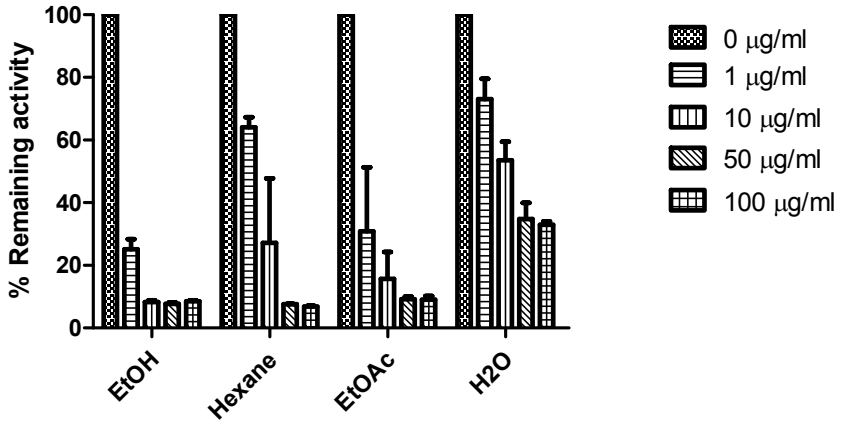
เมื่อตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในการเร่งปฏิกิริยาสร้างสารผลิตภัณฑ์ 7-hydroxycoumarin ด้วยปฏิกิริยาแบบ Co-incubation (เช่นเดียวกับ 4.5.2) พบว่าส่วนสกัด Hexane และส่วนสกัด EtOAc ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีกว่าส่วนสกัดน้ำ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 19.73 16.21 ug/ml และ 92.91 ug/ml ตามลำดับ (ภาพที่ 4-23) เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัด EtOH ที่มีค่าการยับยั้ง IC_{50} เท่ากับ 8.61 ug/ml จากนั้นตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยปฏิกิริยาแบบ Pre-

incubation เป็นเวลา 10 นาที พบว่าส่วนสกัดน้ำสามารถลดการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 (ภาพที่ 4-24)

เมื่อทำการเปรียบเทียบผลการยับยั้งการทำงานของส่วนสกัด Hexane และ EtOAc ระหว่างปฏิกิริยา Co-incubation และ Pre-incubation จะเห็นได้ว่าสารสกัดทั้งสองส่วนออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้มากขึ้น (ภาพที่ 4-25) มีค่าการยับยั้ง IC_{50} เท่ากับ 2.15 ug/ml, และ 0.51 ug/ml ตามลำดับแสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของทั้งสองส่วนสกัดขึ้นอยู่กับตัวให้อิเล็กตรอน NADPH (NADPH-Dependent inhibition) ซึ่งเป็นคุณสมบัติเบื้องต้นที่จะบอกได้ว่าสารยับยั้งในรากเข็มไอเดียมีกลไกการยับยั้งเอนไซม์แบบ Meachanism-based inhibition



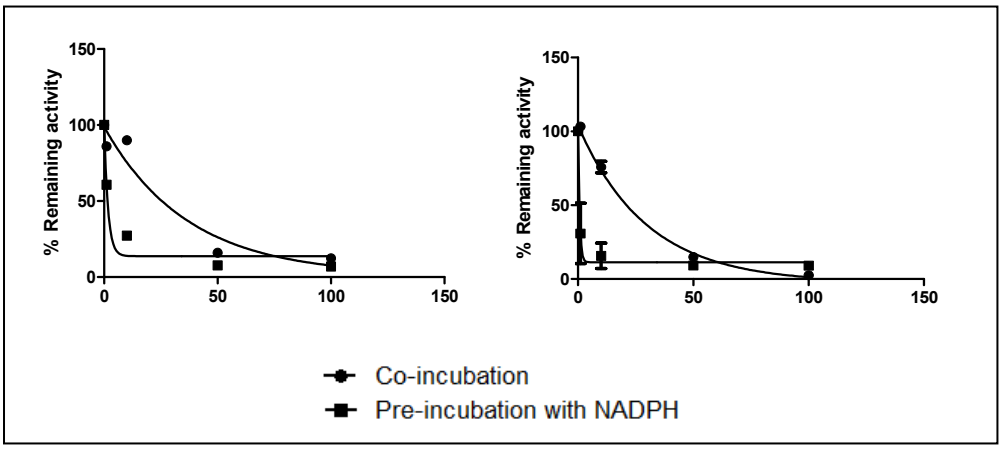
ภาพที่ 4-23 ฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของสารสกัดจากรากเข็มไอเดียแบบ Co-incubation การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้งและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5



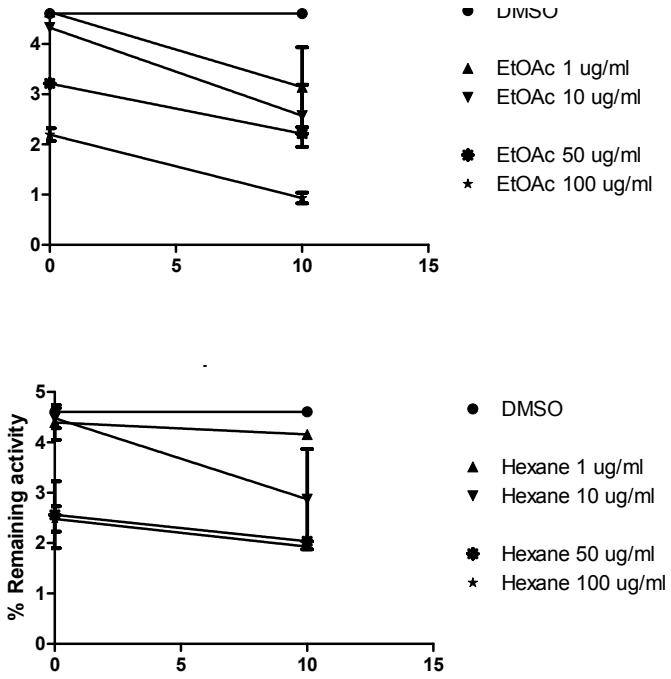
ภาพที่ 4-24 ฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของสารสกัดจากรากเข็มไอเดียแบบ Pre-incubation การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้งและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5

จากนั้นศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของส่วนสกัด Hexane และ EtOAc ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในช่วงเวลาการ pre-incubation ระหว่างเอนไซม์กับส่วนสกัดที่แตกต่างกัน พบว่าฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของส่วนสกัด Hexane และ EtOAc ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานที่ขึ้นอยู่กับเวลา

ของการบ่มส่วนสกัดกับเอนไซม์ (Time depencent inhibition) `แต่ขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสกัด (Concentration dependent inhibition) (ภาพที่ 4-26) จึงสรุปเบื้องต้นได้ว่า สารสกัดจากรากเข็มไอเดียส่วน Hexane และ EtOAc ของรากเข็มไอเดียสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ โดยกลไกการยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้ Meachanism-based inhibition

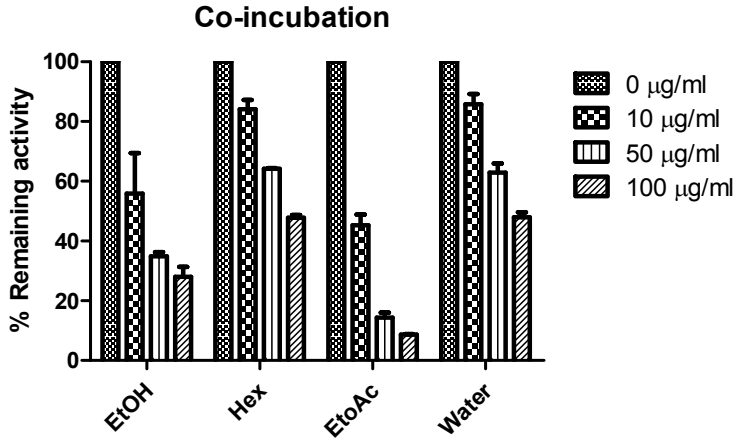


ภาพที่ 4-25 เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของส่วนสกัด Hexane (ซ้าย) และEtOAc (ขวา) จากรากเข็มไอเดียระหว่างปฏิกิริยา Co-incubation กับ Pre-incubation ที่เวลา 10 นาที การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้งและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5

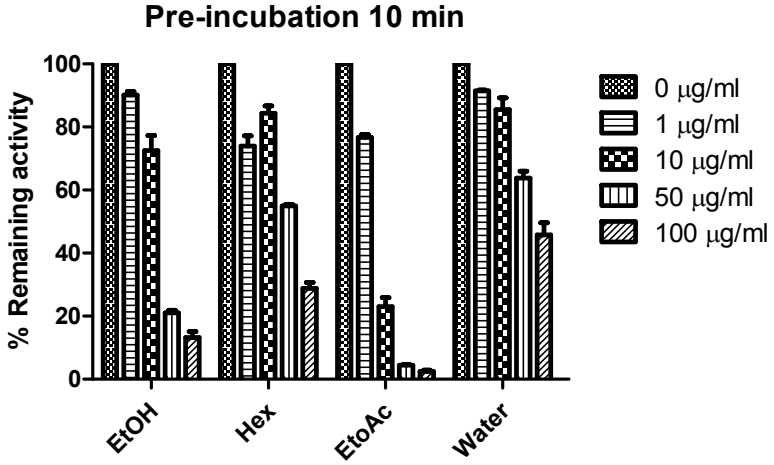


ภาพที่ 4-26 ฤทธิ์ยับยั้งแบบ Concentration-Dependent และ Time-Dependent ของเอนไซม์ CYP2A6 ในปฏิกิริยา Pre-incubation การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้งและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5

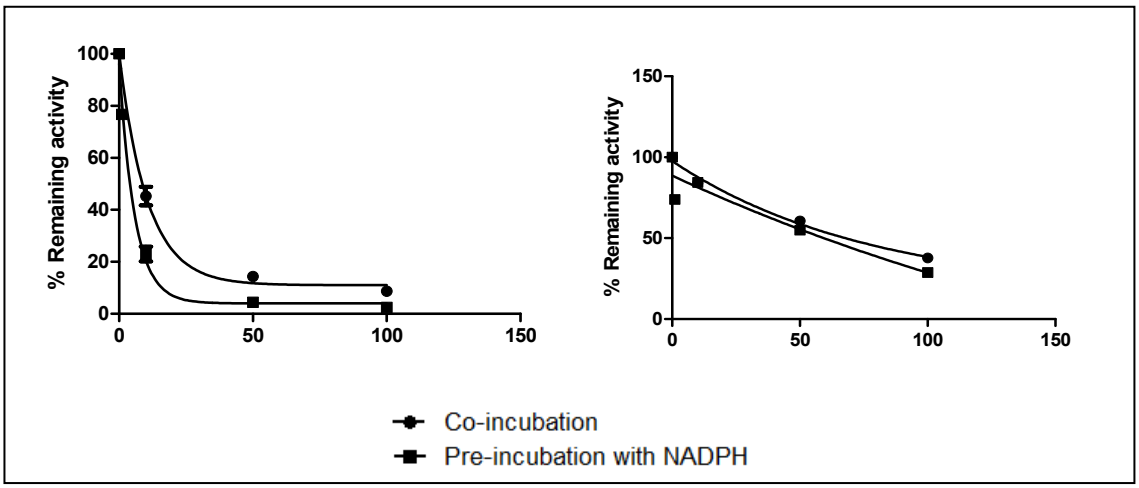
ทำการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 เมื่อถูกยับยั้งด้วยสารสกัดจากรากเข็มไอเดียด้วยปฏิกิริยาแบบ Co-incubation พบว่าส่วนสกัดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ได้ดีที่สุดคือส่วนสกัด EtOAc (IC_{50} 8.365 ug/ml) รองลงมาคือส่วนสกัด Hexane และน้ำที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 66.72 และ 85.97ug/ml ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนสกัด EtOH มีค่าการยับยั้ง IC_{50} เท่ากับ 21.16 ug/ml (ภาพที่ 4-27) จากนั้นตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 เมื่อถูกยับยั้งด้วยสารสกัดจากรากเข็มไอเดียด้วยปฏิกิริยาแบบ Pre-incubation เป็นเวลา 10 นาที พบว่าส่วนสกัด EtOAc สามารถยับยั้งได้ดีที่สุดโดยมีค่าการยับยั้งเท่ากับ 97.51% รองลงมาคือส่วนสกัด EtOH มีค่าการยับยั้งเท่ากับ 86.82% ส่วนสารสกัดที่สามารถยับยั้งได้น้อยที่สุดคือส่วนสกัดน้ำโดยมีค่าการยับยั้งเท่ากับ 54.20% (ภาพที่ 4-28) เมื่อทำการเปรียบเทียบผลการยับยั้งการทำงานเอนไซม์ CYP2A13 ของส่วนสกัด Hexane และ EtOAc พบว่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ของทั้งสองส่วนสกัดอาจจะขึ้นอยู่กับสารให้อิเล็กตรอน NADPH (ภาพที่ 4-29)



ภาพที่ 4-27 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 โดยส่วนสกัดพืชสมุนไพรรากเข็มไอเดีย การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้งและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5

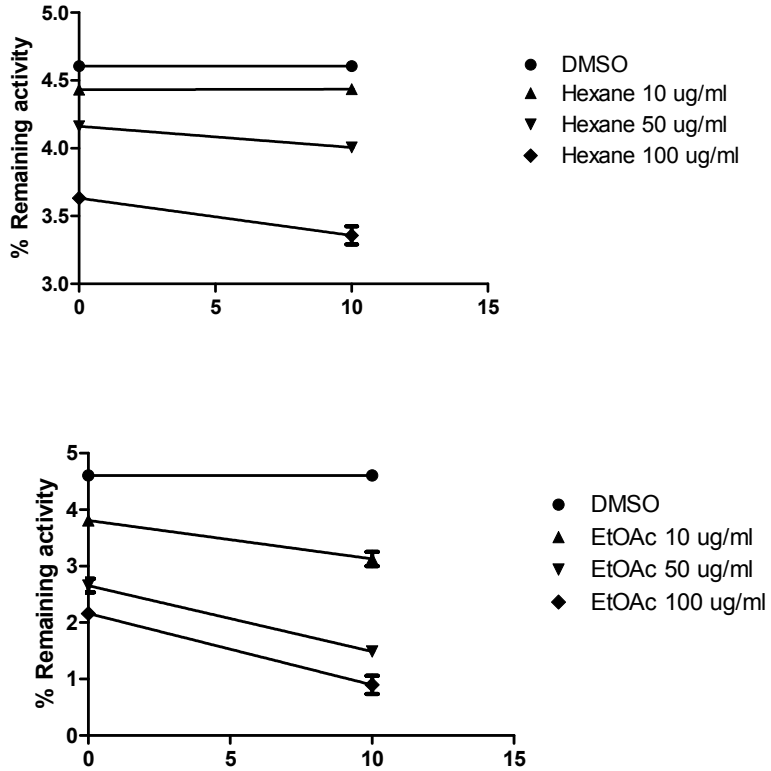


ภาพที่ 4-28 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 โดยส่วนสกัดพืชสมุนไพรรากเข็มไอเดียแบบ Pre-incubated ที่เวลา 10 นาที การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้งและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5



ภาพที่ 4-29 เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ของส่วนสกัดรากเข็มไอเดียระหว่างปฏิกิริยา Co-incubation กับ Pre-incubation ที่เวลา 10 นาที การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้งและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5

และพบว่าฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของสารสกัด Hexane และ EtOAc ของรากเข็มไอเดีย ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสกัดและเวลาของการบ่มส่วนสกัดกับเอนไซม์ (Concentration and Time dependent inhibition) (ภาพที่ 4-30)

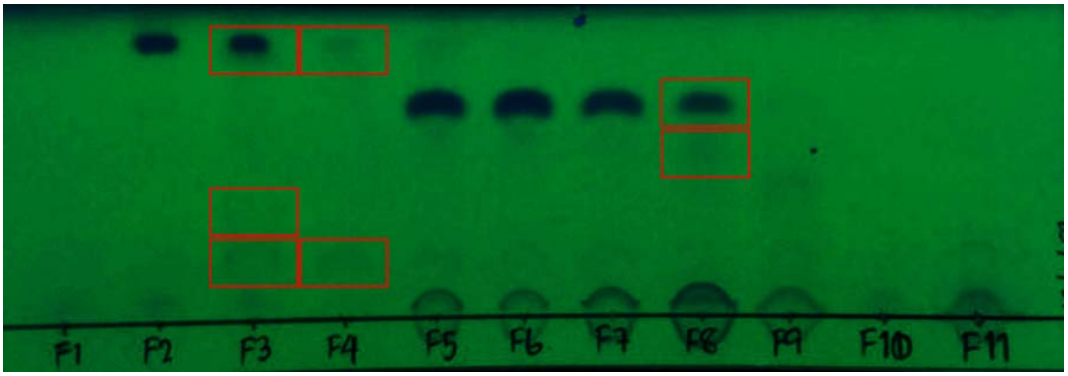


ภาพที่ 4-30 การทดสอบการยับยั้งแบบ Concentration-Dependent และ Time-Dependent ของเอนไซม์ CYP2A13 ในปฏิกิริยา Pre-incubation การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้งและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5

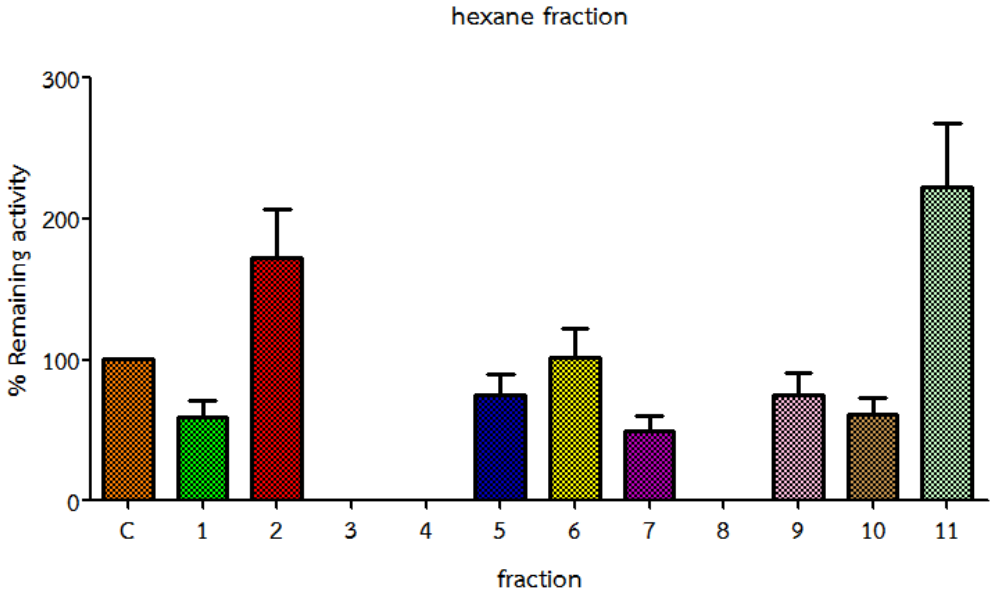
4.6.3 การสกัดสารจากรากเข็มไอเดียควบคู่กับการทดสอบการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 (Bioassay guide isolation)

4.6.3.1 การแยกส่วนสกัดส่วนเฮกเซน และทดสอบการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยสารสกัดรากเข็มไอเดียส่วนเฮกเซน

ทำการสกัดสารสำคัญจากส่วนสกัดเฮกเซนของรากเข็มไอเดีย ด้วยวิธีโครมาโทรกราฟฟีเริ่มจากสัดส่วนของ Hexane:EtOAc ตั้งแต่ 20 : 80 จนถึง 100 : 0 จากนั้นผู้วิจัยจึงทำการรวมสารที่มีสถานะของสารเหมือนกันได้ทั้งหมด สิบเอ็ดส่วนสกัด (AWHF1-AWHF11) (ภาพที่ 4-31) จากนั้นทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าที่ความเข้มข้น 10 µg/ml สาร AWHF3, AWHF4 และ AWHF8 ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีที่สุด (ภาพที่ 4-32) โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 100% เมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมพบว่า AWHF8 มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ดีที่สุด ด้วยค่า IC_{50} = 0.71 µg/ml รองลงมาคือAEHส่วนสกัด F4 (IC_{50} = 2.08 µg/ml) และส่วนสกัด F3 (IC_{50} = 6.21 µg/ml) ตามลำดับ (ภาพที่ 4-10)

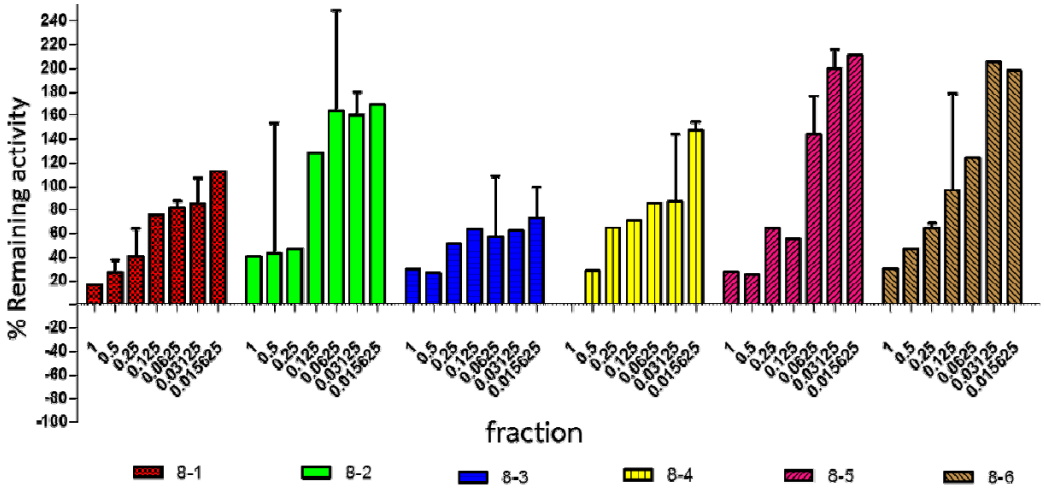


ภาพที่ 4-31 ผลจากการทำ TLC ของสารสกัดรากต้นเข็มไอเดียส่วนเฮกเซน



ภาพที่ 4-32 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 จากสารสกัดรากต้นเข็มไอเดียส่วนเฮกเซน (AWH) ทำการทดลองสองซ้ำและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5

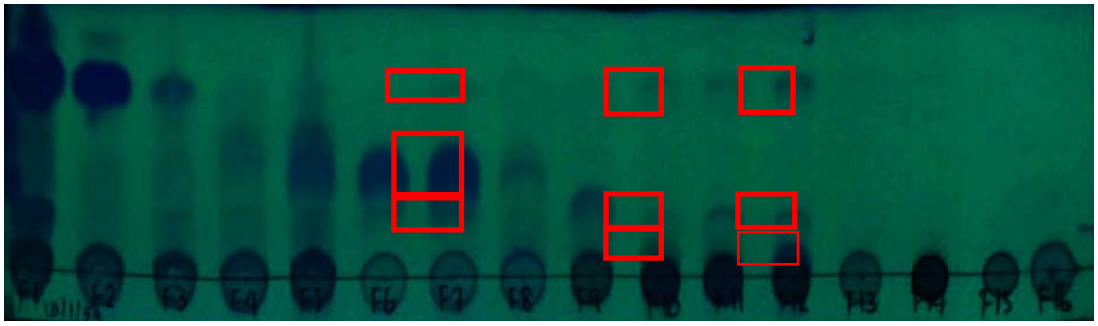
จากนั้นนำ AWHF8 ที่มีผลการยับยั้งที่ดี ลงคอลัมน์ทำการแยกส่วนสกัดและทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 อีกครั้งพบว่า ส่วนสกัดย่อยออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีด้วยค่า IC_{50} ที่ใกล้เคียงกันโดย AWHF8.3 ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุด (IC_{50} = 0.12 µg/ml) รองลงมาคือ AWHF8.1, AWHF8.4, AWHF8.5, AWHF8.6 และ AWHF8.2 ตามลำดับ (IC_{50} = 0.22, 0.26, 0.74, 0.77 และ 0.94 µg/ml ตามลำดับ (ภาพที่ 4-33)



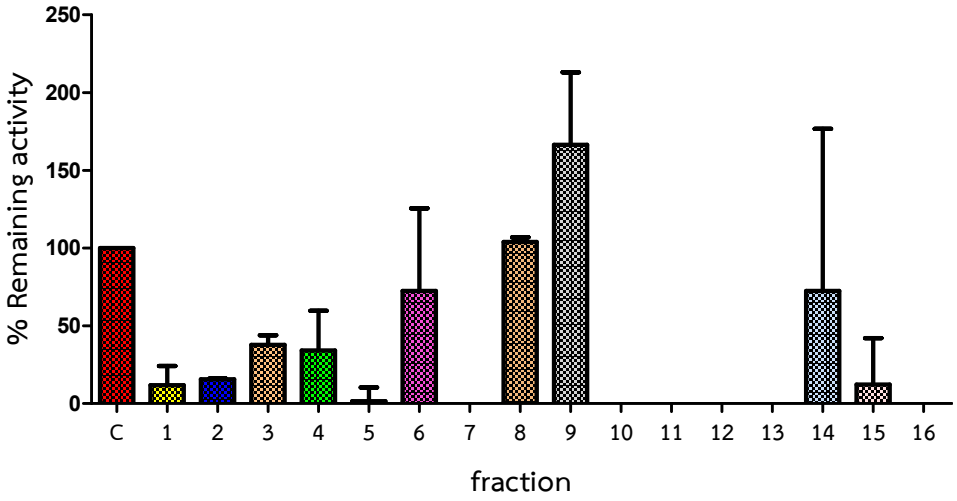
ภาพที่ 4-33 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของ AWHF8.1-AWHF8.6 ทำการทดลองสองซ้ำและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5

4.6.3.2 การแยกส่วนสกัดส่วนเฮกเซน และทดสอบการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยสารสกัดรากเข็มไอเดียส่วนเอทิล อะซิเทต

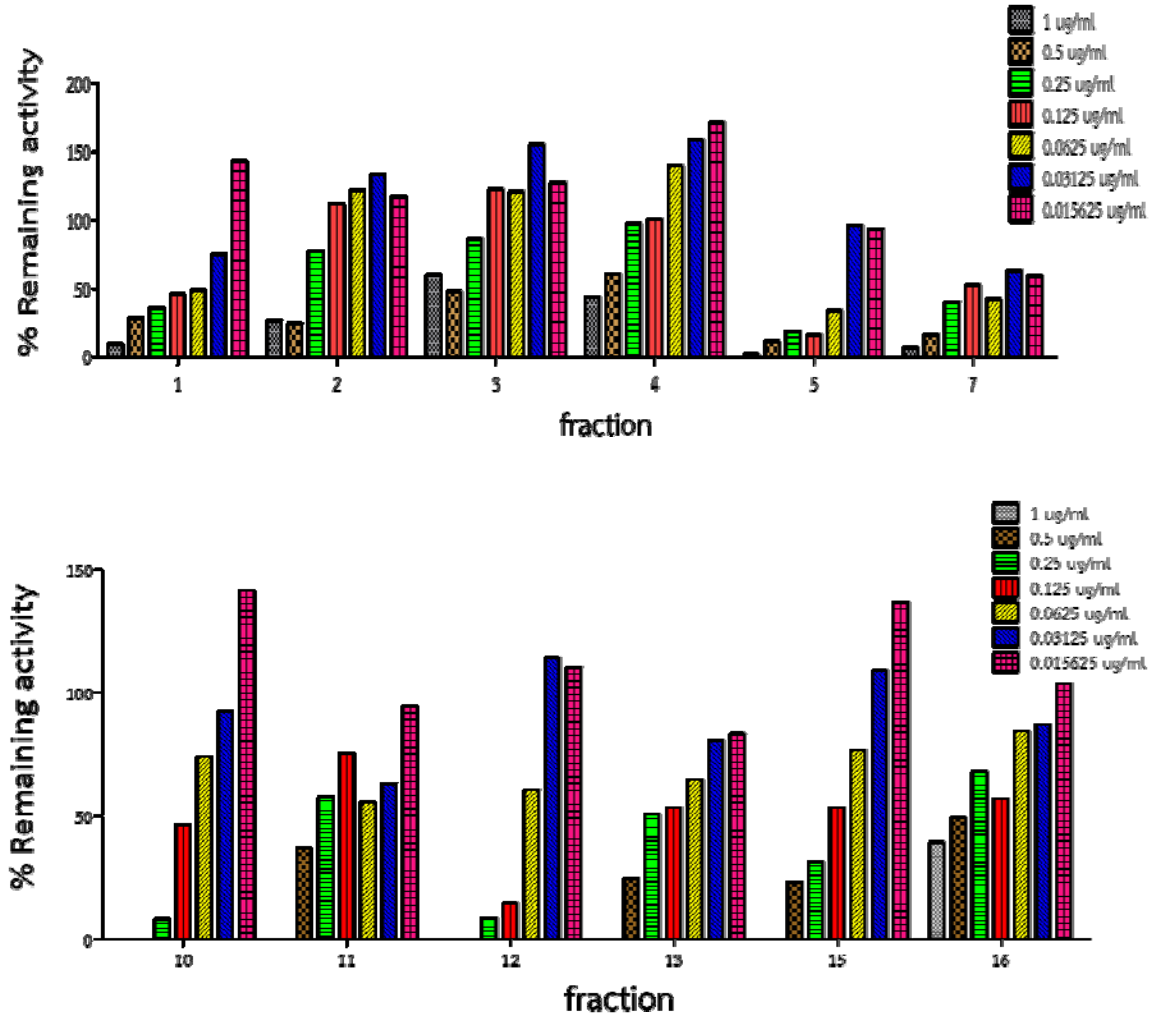
ทำการสกัดสารสำคัญจากส่วนสกัดเอทิล อะซิเทตของรากเข็มไอเดีย ด้วยวิธีโครมาโทรกราฟฟีเริ่มจากสัดส่วนของ Hexane:EtOAc ตั้งแต่ 20 : 80 จนถึง 100 : 0 จากนั้นผู้วิจัยจึงทำการรวมสารที่มีสถานะของสารเหมือนกันได้ทั้งหมด สิบหกส่วนสกัด (AWEF1-AWEF16) (ภาพที่ 4-34) จากนั้นทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าที่ความเข้มข้น 10 µg/ml สาร AWEF7, AWEF10, AWEF11, AWEF12, AWEF13 และ AWEF16 ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีที่สุด (100%) (ภาพที่ 4-35) จึงทำการทดสอบ AWEF ดังกล่าวเพิ่มขึ้น พบว่า AWEF5 มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ดีที่สุด ด้วยค่า IC_{50} = 1.17 µg/ml รองลงมาคือ AWEF7 (IC_{50} = 1.20 µg/ml) และ AWEF12 (IC_{50} = 1.91 µg/ml) ตามลำดับ (ภาพที่ 4-36)



ภาพที่ 4-34 ผลจากการทำ TLC ของสารสกัดรากต้นเข็มไอเดียส่วนเอทิลอะซิเทต



ภาพที่ 4-35 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 จากสารสกัด AWEF1 – AWEF16 ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml ทำการทดลองสองซ้ำและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5



ภาพที่ 4-36 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ของ AWEF1 – AWEF16 ทำการทดลองสองซ้ำและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5

บทที่ 5
สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

เอนไซม์ CYP2A6 เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม cytochrome P450 ที่พบมากในตับและมีบทบาทที่สำคัญในการย่อยสลายยาและสารแปลกปลอมภายนอก เช่น สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายยารักษาอาหารชัก (Valproic acid หรือ Losigamone) ยารักษาโรคเอดส์ (Efavirenz) ยารักษาโรคมะเร็ง (Cyclophosphamine) และมีส่วนช่วยในการย่อยสลายสารในร่างกายเช่น Retinoic acid, Testosterone และ Estradiol ร่วมกับเอนไซม์ P450 อื่นๆ แต่บทบาทที่สำคัญของเอนไซม์ CYP2A6 คือการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายร้อยละ 80-90 ของสารนิโคตินในบุหรี่ที่ออกฤทธิ์ให้เกิดการเสพติดการสูบบุหรี่ที่เข้าสู่ร่างกาย โดยเอนไซม์ CYP2A6 ย่อยสลายนิโคตินได้ดีด้วยค่า K_m ต่อนิโคตินที่ต่ำและ V_{max} ที่สูง จากการศึกษาพบว่าการย่อยสลายนิโคตินโดยเอนไซม์ CYP2A6 ที่ตับที่ทำให้ระดับนิโคตินในเลือดลดลงนั้น เป็นกลไกหลักในการกำจัดนิโคตินออกจากร่างกายมากกว่าการย่อยสลายที่อวัยวะอื่นๆ (Di *et al*, 2009; Hukkanen et al., 2002; Ortiz de Montellano, 2005; Patten et al., 1996) อย่างไรก็ดีการกำจัดนิโคตินออกจากร่างกายนี้ ส่งผลให้นิโคตินไปกระตุ้นระบบตอบสนองต่อความยินดีในสมองลดลง ดังนั้นผู้สูบบุหรี่จึงต้องสูบบุหรี่มากขึ้นเพื่อรักษาระดับนิโคตินในเลือดให้ไปกระตุ้นระบบตอบสนองต่อความยินดีให้คงความรู้สึกที่ดีมีความสุขไว้ ทำให้สูบบุหรี่อย่างต่อเนื่อง (Di et al., 2009; Hukkanen et al., 2002; Patten et al., 1996) และยังมีรายงานว่าการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 เกี่ยวพันกับพฤติกรรมการสูบบุหรี่ โดยผู้สูบบุหรี่ที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน CYP2A6 ที่ทำให้เอนไซม์ CYP2A6 ย่อยสลาย Coumarin และนิโคตินลดลงนั้น จะสูบบุหรี่น้อยและเลิกสูบบุหรี่ง่ายกว่าผู้สูบบุหรี่ที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ปกติ ด้วยเหตุนี้การลดการย่อยสลายนิโคตินของเอนไซม์ CYP2A6 เพื่อคงระดับของนิโคตินในเลือด จึงเป็นอีกหนึ่งในแนวทางที่สามารถนำมาใช้เพื่อช่วยในการรักษาการเสพติดบุหรี่ในผู้สูบบุหรี่ร่วมกับการได้รับยานิโคตินทดแทนต่างๆ เพื่อให้เกิดการลด ละ เลิกการสูบบุหรี่อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

เอนไซม์ CYP2A13 เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม cytochrome P450 ที่พบมากในปอดและเนื้อเยื่อบุทางเดินหายใจ แม้ว่ามีความคล้ายคลึงกันในลำดับกรดอะมิโนมากกว่าร้อยละ 90 กับเอนไซม์ CYP2A6 แต่ยังไม่ทราบบทบาทที่แน่ชัดในการย่อยสลายสารในร่างกายต่างๆหรือยา อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะไม่พบว่าเป็นกลไกหลักในการกำจัดนิโคติน เช่นเอนไซม์ CYP2A6 และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของเอนไซม์ CYP2A13 กับพฤติกรรมการสูบบุหรี่เช่นเดียวกับเอนไซม์ CYP2A6 แต่เอนไซม์ CYP2A13 สามารถย่อยสลายสารนิโคตินได้ดี (Di *et al*, 2009; Hukkanen et al., 2002; Ortiz de Montellano, 2005; Patten et al., 1996) และการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมพบว่าเอนไซม์ CYP2A13 เกี่ยวพันกับการย่อยสลายสารก่อมะเร็ง 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-bytanol (NNAL) และ 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)) ซึ่งเป็นสารพิษที่พบได้ในบุหรี่และเป็นสารเกี่ยวข้องกับกับการเกิดโรคมะเร็ง เช่น โรคมะเร็งกล่องเสียง โรคมะเร็งปอด เป็นต้น (Patten et al., 1996) โดยสารก่อมะเร็ง NNK จะถูกย่อยสลายและกระตุ้นโดยเอนไซม์ CYP2A13 ได้เป็นสารที่ก่อมะเร็งมากขึ้นและไปมีผลต่อสารพันธุกรรมของเนื้อเยื่อระบบ

ทางเดินหายใจจนก่อให้เกิดโรคมะเร็งปอดในที่สุด จึงได้มีการศึกษาการหาสารที่สามารถยังยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 เพื่อลดอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งปอดได้อย่างปลอดภัย โดยพบว่าสาร 8-MOP ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้สามารถยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 ได้ อย่างไรก็ดีสารนี้ก่อให้เกิดผลข้างเคียงกับผู้ใช้ในขณะที่ต้องการลดการสูบบุหรี่ (Di et al., 2009; Xi et al., 2009)

เมื่อนำพืชสมุนไพรพื้นบ้านชุมชนบ้านอ่างเอ็ดทั้ง 24 ชนิด (ใบชงโค, ใบโคลงเคลง, ใบเอื้องหมายนา, ใบมะเดื่อหอม, ใบเบญจมาศ, ใบค้างคาวดำ, ใบระย่อมน้อย, ใบไม้ลาย, ใบมะฮึก, ใบดีงูต้น, ใบหัวเดียว, ใบเข็มไอเดีย, ใบลายกนก, ไมยราบ, ต้นเอื้องหมายนา, รากโคลงเคลง, รากระย่อมน้อย, รากดีงูต้น, รากเข็มไอเดีย, รากพนมสวรรค์, รากมะฮึก, เหง้าเอื้องหมายนา, เหง้าหัวเดียว และเหง้าค้างคาวดำ) ที่พบได้จำนวนมากในบริเวณป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดฯและชาวบ้านนำมาใช้เป็นยารักษาโรค มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ความเข้มข้น 10 µg/ml เพราะฤทธิ์ในการยับยั้งหรือกระตุ้นกิจกรรมการทำงานเอนไซม์ rat CPR จะทำให้ส่งผลต่อการส่งอิเล็กตรอนให้แก่เอนไซม์ CYP2A6 หรือ CYP2A13 ได้ โดยจากผลการศึกษาพบว่า พบว่าพืชสมุนไพรออกฤทธิ์ต่อการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ที่แตกต่างกัน โดยพืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ได้แก่ รากเข็มไอเดีย, รากดีงูต้น, และรากโคลงเคลง ส่วนพืชชนิดอื่นออกฤทธิ์ในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ rat CPR

เมื่อนำพืชสมุนไพรพื้นบ้านป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดทั้ง 24 ชนิด มาทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 โดยมี 8-MOP ซึ่งเป็นตัวยับยั้งจำเพาะของเอนไซม์ CYP2A6 เป็นตัวเปรียบเทียบพบว่า ใบมะฮึกสามารถยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้มากที่สุด รองลงมาคือ ใบเบญจมาศ รากเข็มไอเดีย ใบดีงูต้น ใบลายกนก ไมยราบใบเอื้องหมายนาใบระย่อมน้อยใบชงโคใบมะเดื่อหอม ใบค้างคาวดำและใบหัวเดียวตามลำดับ ในขณะที่พืชบางชนิดอย่างเช่น ใบค้างคาวดำ, ใบดีงูต้น, ใบหัวเดียว, ใบลายกนก, เหง้าเอื้องหมายนา และเหง้าหัวเดียวที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 นั้นอาจเกิดจากสมุนไพรเหล่านี้ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CPR ด้วยเช่นกัน ทำให้ความสามารถในการส่งอิเล็กตรอนของเอนไซม์ CPR ให้แก่เอนไซม์ CYP2A6 น้อยลง โดยสรุปพืชสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ลดการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในหลอดทดลองได้สูงสุดคือ ใบมะฮึกและใบเบญจมาศแมว รองลงมาคือ รากเข็มไอเดีย, ใบดีงูต้น, ใบลายกนก, ไมยราบ, ใบเอื้องหมายนา, ใบระย่อมน้อย, ใบชงโค, ใบมะเดื่อหอม, ใบค้างคาวดำ และใบหัวเดียว ในขณะที่พืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ได้แก่ เหง้าเอื้องหมายนา, ใบเอื้องหมายนา, ใบโคลงเคลง, ใบค้างคาวดำ, ใบดีงูต้น, รากดีงูต้น, ใบหัวเดียว, เหง้าหัวเดียว, ใบเข็มไอเดีย, รากเข็มไอเดีย, รากระย่อมน้อย, ใบชงโค, ใบมะเดื่อหอม, ใบลายกนก, ไมยราบ, ไม้ลาย, และรากพนมสวรรค์ เบื้องต้น สามารถแบ่งพืชสมุนไพรและผลไม้ไทยที่ศึกษาได้ดังตารางที่ 5-1 จากนั้นผู้วิจัยได้นำพืชสมุนไพรสองชนิดคือใบลายกนกและรากเข็มไอเดียมาทำการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมเพื่อค้นหาสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13

ตารางที่ 5-1 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรบ้านอ่างเอ็ด

กลุ่มและชนิดของพืชสมุนไพร	การยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 IC_{50} (µg/ml)	การยับยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 IC_{50} (µg/ml)	การยับยับยั้งเอนไซม์ CPR	ความเหมาะสมในการนำไปใช้
1. กลุ่มที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้ดีมาก				
1.1 รากเข็มไอเดีย	24.72	19.56	10-20%	ดี
1.2 ใบลายกนก	76.63	57.28	กระตุ้น	ดี
1.3 ใบดีงูต้น	28.25	87.53	กระตุ้น	ดี
2. กลุ่มที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้ดี				
2.1 ใบค้างคาวดำ	105.4	55.1	ไม่ส่งผล	ปานกลาง
2.2 ใบเอื้องหมายนา	100.2	82.13	กระตุ้น	ดี
2.3 ใบหัวเดียว	140.5	86.35	กระตุ้น	ดี
2.4 ใบระย่อมน้อย	101	94.4	กระตุ้น	ปานกลาง
2.5 ใบชงโค	102.8	111.6	กระตุ้น	ปานกลาง
2.6 ไมยราบ	96.44	236.2	กระตุ้น	ปานกลาง
2.7 ใบมะเดื่อหอม	103.4	194.6	กระตุ้น	ปานกลาง
3. กลุ่มที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดี แต่กระตุ้นการทำงานของ CYP2A13				
3.1 ใบมะฮึก	ยับยั้ง 100%	กระตุ้น	กระตุ้น	ไม่สมควร
3.2 ใบเบญจมาศแมว	ยับยั้ง 100%	กระตุ้น	กระตุ้น	ไม่สมควร
4. กลุ่มที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 ได้ดี แต่กระตุ้นการทำงานของ CYP2A6				
4.1 ใบเข็มไอเดีย	กระตุ้น	74.16	กระตุ้น	
4.2 เหง้าเอื้องหมายนา	กระตุ้น	123.2	กระตุ้น	
4.3 เหง้าหัวเดียว	กระตุ้น	145.4	กระตุ้น	
4.4 ใบโคลงเคลง	กระตุ้น	157.6	กระตุ้น	ไม่สมควร
4.5 ใบไม้ลาย	กระตุ้น	186.5	กระตุ้น	
4.6 รากดีงูต้น	กระตุ้น	239.5	กระตุ้น	
4.7 รากพนมสวรรค์	กระตุ้น	558.5	กระตุ้น	
5. กลุ่มที่สามารถระตุ้นเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้ดี				

กลุ่มและชนิดของพืชสมุนไพร	การยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 IC_{50} (µg/ml)	การยับยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 IC_{50} (µg/ml)	การยับยับยั้งเอนไซม์ CPR	ความเหมาะสมในการนำไปใช้
ได้แก่ ต้นเอื้องหมายนา, รากโคลงเคลง, เหง้าค้างคาวดำ, รากระย่อมน้อย รากมะฮึกและรากระย่อมน้อย	กระตุ้น	กระตุ้น	กระตุ้น	ไม่สมควร

โดยสารสกัดส่วนเฮกเซนของใบลายกนก (LKH) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 13.35 µg/ml ในขณะที่สารสกัดส่วนเอทิล อะซิเทตของใบลายกนก (LKE) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 21.98 µg/ml และกลไกการยับยั้งของทั้งสองส่วนสกัดเป็นแบบ MBI (การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบผันกลับไม่ได้ โดยสารยับยั้งถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ จากนั้นผลิตภัณฑ์จับแน่นกับเอนไซม์ จนเกิดสารประกอบเชิงซ้อนเอนไซม์ที่เสียสภาพ (dead-end complex)) ที่ฤทธิ์การยับยั้งขึ้นอยู่กับสารให้อิเล็กตรอน NADPH เวลาที่บ่มสารและความเข้มข้นของสารยับยั้ง (Hukkunen, 2005, Di et al., 2009, Grime et al., 2009) ในขณะที่ผลการศึกษากับเอนไซม์ CYP2A13 พบว่า LKH และ LKE สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ได้ดีด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 10.13 µg/ml และ 26.58 µg/ml ตามลำดับ แต่การออกฤทธิ์ยับยั้งไม่ได้ใช้กลไกการยับยั้งแบบ MBI ซึ่งโดยปกติสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 เพื่อช่วยลดการเสพติดบุหรี่ จะสามารถยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 ได้ในทิศทางเดียวกัน เนื่องด้วยเอนไซม์ CYP2A6 ที่เป็นเอนไซม์หลักในกระบวนการย่อยสลายนิโคตินในร่างกายมีความคล้ายกันของลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างสามมิติกับเอนไซม์ CYP2A13 ถึง 90% นอกจากนี้แม้ว่าเอนไซม์ทั้งสอง (CYP2A13 และ CYP2A6) จะมีความแตกต่างในค่าคงที่จลน์ศาสตร์ของเอนไซม์แต่ทั้งสองเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยากับสารตั้งต้นนิโคติน NNK และ coumarin ได้ดีเช่นเดียวกัน (Hecth, 1998; Smith et al., 2007) ดังนั้นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีจึงน่าที่จะสามารถยับยั้งการทำงานของ CYP2A13 ได้ด้วยเช่นเดียวกัน ตัวอย่างสารยับยั้ง เช่นสาร Methoxsalen (8methoxypsoralen หรือ 8-MOP) ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ผ่านกลไกการแบบ Mechanism-based inhibition (Damaj et al, 2007; Miyazaki, Maeda และMorita, 2005) นอกจากนี้ยังพบว่าสารจากธรรมชาติ เช่น สารสกัดจากทองพันชั่ง (rhinacanthus nasutus) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้แบบ Mechanism-based (Pouyfung P. *et al*., 2014) และจากการศึกษาเบื้องต้นถึงความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 โดยสารสกัดจากขลู่ พบว่าสามารถยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ได้แบบ Mechanism-based เช่นเดียวกัน (Thongjam, 2013 และ Insee et al., 2014) ซึ่งจากการศึกษาถึงกลไกในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 โดยสารสกัดจากใบลายกนกพบว่า สามารถยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 แบบ Mechanism-based และยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 แบบผันกลับได้ ซึ่งไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน อาจเนื่องมากจากโครงสร้างของสารสกัดในใบลายกนกที่แตกต่างจากสารสำคัญจากพืชชนิดอื่นๆที่กล่าวมา

จากนั้นมุ่งทำบริสุทธิ์สารสกัดใบลายกนกที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในส่วนสกัด Hexane (LKH) และ EtOAc (LKE) ที่ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีได้แก่ส่วนสกัด LKH3 (100%), LKH9 (84.87%), LKH7 (81.73%), LKH4 (69.89%), LKE4 (100%), LKE3 (80.48%) และ LKE7 (79.1%) โดยได้สารสกัดที่บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นและออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดี ดังนี้ LKH3.4, LKH3.5, LKH7.2, LKE3.3, LKE3.4, LKE7.1-LKE7.4 ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ 100% และ LKE3.1(98.27%), LKH7.1(93.45%), LKE3.2 (92.52%), LKH3.3 (90.71%), LKH4.4 (81.34%), และ LKH4.5 (74.01%) ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งรองลงมาตามลำดับ สารกึ่งบริสุทธิ์จากส่วนสกัดย่อยต่างๆที่ผ่านการตรวจสอบด้วยเทคนิค NMR เหล่านี้ยังต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์และนำมากลไกการยับยั้งของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ต่อไป

ในขณะที่สารสกัดส่วนเฮกเซนของรากเข็มไอเดีย (AWH) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 19.73 µg/ml ในขณะที่สารสกัดส่วนเอทิล อะซิเทตของรากเข็มไอเดีย (AWE) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 16.21 µg/ml และกลไกการยับยั้งของทั้งสองส่วนสกัดเป็นแบบ MBI (Hukkunen, 2005, Di et al., 2009, Grime et al., 2009) ในขณะที่ผลการศึกษากับเอนไซม์ CYP2A13 พบว่า AWH และ AWE สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ได้ดีด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 66.72 µg/ml และ 8.365 ug/ml ตามลำดับ ด้วยกลไก MBI เช่นเดียวกัน เช่นเดียวกับสาร 8-MOP หรือโดยสารสกัดจากขลู่และสารสกัดจากทองพันชั่ง ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้แบบ Mechanism-based (Damaj et al, 2007; Insee et al., 2014; Miyazaki, Maeda และ Morita, 2005; Pouyfung P. *et al*., 2014; Thongjam, 2013) จากนั้นผู้วิจัยจึงนำส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีมาทำบริสุทธิ์ ได้แก่ AWHF8 (IC_{50} = 0.71 µg/ml), AWEF5 (IC_{50} = 1.17 µg/ml), AWEF7 (IC_{50} = 1.20 µg/ml), AWEF12 (IC_{50} = 1.49 µg/ml), AWHF4 (IC_{50} = 2.08 µg/ml), และ AWHF3 (IC_{50} = 6.21 µg/ml) ตามลำดับ จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารเบื้องต้นด้วยเทคนิค NMR จะพบว่าสารในส่วนสกัดย่อยเหล่านี้ยังคงมีสารเจือปนอยู่เล็กน้อย ทำให้ต้องทำบริสุทธิ์เพิ่มเติมเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำมาศึกษากลไกการยับยั้งต่อไป

5.2 สรุปผลการทดลอง

ได้สารกึ่งบริสุทธิ์จากพืชสมุนไพรพื้นบ้านจากรากต้นเข็มไอเดียและใบลายกนกจากส่วนสกัดเฮกเซนและเอทิล อะซิเทต หลายส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งที่ดีและน่าจะมีกลไกการยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้แบบ Mechainsm Based Inhibition ที่ฤทธิ์ยับยั้งดีกว่าการยับยั้งแบบผันกลับได้ เพื่อนำมาศึกษาเพิ่มเติมนำมาใช้ในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ต่อไป

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, PJ., 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) Enginerring 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 Journa.* 10 (2): 410-424

Fukami, T., Nakajima, M., Matsumoto, I., Zen, Y, Oda, M., Yokoi, T. (2010) Immunoshistochmical 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 resides of human CYP2A13 for the metabolic activation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a tobacco-specific carcinogen. *Drug Metabolism Disposition,* 32, 1516-1521.

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

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

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

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

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

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

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

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 alpha4beta2 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-(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.

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.

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.

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

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

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

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

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 PharmacolTher* 68:35–43.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

von Weymarn 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-dimentional 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 *Carthamas tinctorius* L. extracts. *Proceedings of the 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO5)* (pp. 343-347). Phuket: Natural Product Research Center of Excellence, Prince of Songkla University.

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

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

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 byTherapeutic Drugs. *Clin Pharmacokinet*. 44 (3): 279-304

ทรงกลด สารภูษิต (2554) การยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6ที่ย่อยสลายนิโคตินในคน: ทางเลือกใหม่ในการลดการสูบบุหรี่. บทความวิชาการ วารสารวิทยาศาสตร์ ม. บูรพา ปีที่ 16 ฉบับที่ 2

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