รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การประเมินผลกระทบของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านในโครงการป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด มูลนิธิชัยพัฒนา จังหวัดจันทบุรีต่อการย่อยสลายยาแผนปัจจุบัน ผ่านการยับยั้งเอนไซม์ CYP2C9

Evaluation the Herb – drug interaction of some medicinal plants in Ban-Ang-ed Officail Community Forest Project (The Chaipattana Foundation) mediated by Inhibition of Cytochrome P4502C9 enzyme

โดย

ผศ.ดร.ทรงกลด สารภูษิต

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

รศ.ดร. พรพิมล รงค์นพรัตน์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

อ. ดร. ปณิดา ดวงแก้ว

คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๘

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2558A10802363
สัญญาเลขที่ 36/2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การประเมินผลกระทบของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านในโครงการป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด มูลนิธิชัยพัฒนา จังหวัดจันทบุรีต่อการย่อยสลายยาแผนปัจจุบัน ผ่านการยับยั้งเอนไซม์ CYP2C9

Evaluation the Herb – drug interaction of some medicinal plants in Ban-Ang-ed Officail Community Forest Project (The Chaipattana Foundation) mediated by Inhibition of Cytochrome P4502C9 enzyme

โดย
ผศ.ดร.ทรงกลด สารภูษิต
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
รศ.ดร. พรพิมล รงค์นพรัตน์
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
อ. ดร. ปณิดา ดวงแก้ว
คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี

กันยายน พ.ศ. ๒๕๕๙

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง “การประเมินผลกระทบของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านในโครงการป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด มูลนิธิชัยพัฒนา จังหวัดจันทบุรีต่อการย่อยสลายยาแผนปัจจุบัน ผ่านการยับยั้งเอนไซม์ CYP2C9” สามารถมีผลการทดลองที่ก้าวหน้ามาจนได้เสร็จสมบูรณ์เป็นรายงานฉบับนี้ ต้องขอขอบคุณการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๘ มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 36/2558 ซึ่งผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ นอกจากนี้ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณ Prof. Dr. Jung-Ja P.Kim จาก Medical College of Wisconsin และ Prof. Dr. Joyce D. Goldstein จาก National Institute of Health ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ให้ความกรุณามอบยีน rat CPR และ CYP2C9 ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ นอกจากนี้แล้วผู้วิจัยขอขอบคุณนิสิต-นักศึกษาทุกคนที่ช่วยทำการทดลอง รวมถึงคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาและคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลที่ให้ความสนับสนุนด้านสถานที่และเครื่องมือต่างๆในการทำการทดลอง

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ การประเมินผลกระทบของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านในโครงการป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด มูลนิธิชัยพัฒนา จังหวัดจันทบุรีต่อการย่อยสลายยาแผนปัจจุบัน ผ่านการยับยั้งเอนไซม์ CYP2C9

ชื่อผู้วิจัย ทรงกลด สารภูษิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
พรพิมล รงค์นพรัตน์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ปณิดา ดวงแก้ว คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี

เอนไซม์ Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Cytochrome P450 พบมากในตับ ทำงานร่วมกับเอนไซม์ Cytochrom P450 reductase (CPR) ในกระบวนการย่อยสลายยารักษาโรคในร่างกาย ดังนั้นเอนไซม์ CYP2C9 จึงมีความสำคัญต่อการรักษาโรคต่างๆด้วยการรับประทานยาแผนปัจจุบัน อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันพบว่าผู้ป่วยนิยมรับประทานยาสมุนไพรควบคู่กับการรักษาด้วยยาแผนปัจจุบันซึ่งอาจส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 และส่งผลต่อยาที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ CYP2C9 วัตถุประสงค์ของงานนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพืชสมุนไพรพื้นบ้านจากโครงการป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด ต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 โดยเหนี่ยวนำการแสดงออกและทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ CYP2C9 และ CPR จากนั้นผู้วิจัยพัฒนาวิธีตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ในหลอดทดลอง โดยใช้ยา Tolbutamine เป็นตัวตรวจสอบ ผลการศึกษาฤทธิ์ของพืชสมุนไพรพบว่า พบว่าเหง้าหัวเดียวมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ใบดีงูต้น เหง้าค้างคาวดำ ใบค้างคาวดำและรากเข็มไอเดีย ตามลำดับ ในขณะเดียวกัน รากพนมสวรรค์และเหง้าเอื้องหมายนา มีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 จากผลการศึกษาที่ได้ทำให้เห็นว่าการรับประทานพืชสมุนไพรพื้นบ้านจากป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดควบคู่กับยาแผนปัจจุบันควรระมัดระวังในการรับประทานยา

Abstract

Project Title Evaluation the Herb – drug interaction of some medicinal plants in Ban-Ang-ed Officail Community Forest Project (The Chaipattana Foundation) mediated by Inhibition of Cytochrome P4502C9 enzyme

Investigators

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

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

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

The liver specific cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) is a heme-containing enzyme that belongs to cytochrome P450 super-family and is responsible for metabolizing various pharmaceutical drugs, suggesting an important role of CYP2C9 enzyme in health care treatment. In order to metabolize chemical compounds, both endobiotic and xenobiotic compounds, the P450 enzymes require electron transfer from NADPH through the cytochrome P450 reductase (CPR) enzyme system. In Thailand, healthcare treatment of herbal product along with pharmaceutical drugs is becoming popular; however, this situation could lead to various side effects because of herb-drug interaction. In this study, we aim to investigate the effect of herbs from Ban-Ang-Ed official community forest project on CYP2C9 enzyme. The CYP2C9 and CPR enzymes were successfully expressed and purified. In addition, the in vitro reconstitution system for accessing the CYP2C9 enzyme was developed. The results showed that medicinal folk plants from Ban-Ang-Ed affected CYP2C9-mediated tolbutamide 4-hydroxylation activity *in vitro*. Among tested plant extracts, *Aglaonema nitidum* rhizome extract showed highest inhibitory activity against the human CYP2C9, followed by *Picrasma javanica* leaves extract, leaves and rhizome of *Tacca chantrieri* and rhizome of *Aidia wallichiana sensu*, respectively. In contrast, rhizome of *Clerodendrum paniculatum* and *Costus speciosus* could activated the CYP2C9 activity. According to the results, care must be taken for co-treatment of diseases by using medicinal folk plants in Ban-Ang-Ed with CYP2C9 – metabolizing pharmaceutical drugs.

บทที่ 1
บทนำ

1.1ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันประชากรโลกมีแนวโน้มที่จะป่วยและเสียชีวิตจากโรคเรื้อรังเช่น โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง โรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจและหลอดเลือดมากขึ้น โดยองค์การอนามัยโลกระบุว่าในปี พ.ศ. 2548 มีผู้เสียชีวิตจากโรคกลุ่มนี้มากถึง 35 ล้านคนทั่วโลกหรือร้อยละ 60 ของผู้เสียชีวิตทั้งหมด และคาดว่าในปี พ.ศ. 2558 ผู้เสียชีวิตจะเพิ่มขึ้นเป็น 41 ล้านคน สำหรับประเทศไทยสำนักโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค รายงานว่าในปี พ.ศ. 2550 คนไทยเสียชีวิตจากโรคมะเร็ง 53,575 คน จากผู้ป่วย 75,033 คน โรคความดันโลหิตสูงเสียชีวิต 2,293 คน จากผู้ป่วย 446,506 คน โรคหัวใจและหลอดเลือดเสียชีวิต 34,833 คนจากผู้ป่วย 567,825 คน (วิทยา แก้วภาราดัย อ้างถึงใน ข่าวประชาสัมพันธ์ โรงพยาบาลหัวหิน, 2552) เนื่องจากโรคเรื้อรังเหล่านี้เป็นโรคที่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาด้วยยาต่างๆสูง ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีผู้นิยมบริโภคอาหารเสริมสุขภาพชนิดต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารเสริมที่ทำมาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทั้งพืชสมุนไพรและผลไม้ต่างๆมากขึ้น เห็นได้จากผลิตภัณฑ์อาหารเสริมต่างๆมากมายที่มีมูลค่าของตลาดมากกว่า 2,900 ล้านบาทต่อปี อย่างไรก็ตามการใช้ผลิตภัณฑ์ในกลุ่มนี้อาจมีปัญหาเกี่ยวกับความปลอดภัยที่อาจเกิดขึ้นเมื่อรับประทานก่อนหรือหลังรับประทานยารักษาโรคเรื้อรังต่างๆ (Food-drug interaction ; FDI หรือ Herb-drug interaction; HDI)

เมื่อรับประทานยารักษาโรคเรื้อรัง โดยเฉพาะยาในกลุ่ม ยากันชัก (Antiepilectic) ยาต้านการแข็งตัวของเกร็ดเลือด (Anticoagulant) ยาต้านการอักเสบแบบไม่ใช่ steroid (NSAIDs) ยาลดน้ำตาลสำหรับผู้ป่วยเบาหวานยาลดความดันโลหิตสูงและยารักษาโรคมะเร็งเต้านม ยาเหล่านี้จะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายและถูกย่อยสลายเพื่อกำจัดยาทิ้งหรือกระตุ้นให้ยามีประสิทธิภาพการทำงานได้มากขึ้นด้วยเอนไซม์ Cytochrome 2C9 ที่ตับเป็นกลไกหลัก แต่จากการศึกษาพบว่าน้ำผลไม้หลายชนิด เช่น grape fruit (ไม่พบในประเทศไทย) ทับทิม และมะเฟืองสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ได้ในหลอดทดลอง แม้ว่าไม่ได้ทำการศึกษาผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นจาก CYP2C9 แต่พบว่าผู้ป่วยที่รับประทานน้ำส้ม grape fruit ร่วมกับยาที่ทำปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ CYP3A4 (เอนไซม์ในกลุ่ม P450 ที่ทำหน้าที่หลักในการย่อยสลายยาในร่างกาย) จะเกิดอาการข้างเคียงจากยา (adverse drug effects) ทำให้อาการโรคเรื้อรังนั้นๆรุนแรงมากขึ้น ทั้งนี้เพราะสารประกอบทางธรรมชาติในน้ำส้ม grape fruit ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 ที่ทำปฏิกิริยากับยาที่รับประทานเข้าไปเพื่อรักษาโรค ทำให้ยาที่รับประทานเข้าไปถูกย่อยสลาย (กำจัดทิ้งออกจากร่างกาย) ช้าลง ส่งผลให้ยาออกฤทธิ์นานขึ้นก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพตามมา

ด้วยเหตุนี้การที่ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรและผลไม้ไทย กำลังเป็นที่นิยมสำหรับผู้บริโภคที่รักในสุขภาพในรูปของอาหารเสริมสำหรับรับประทานทั้งในผู้ที่สุขภาพดีหรือผู้ป่วยเรื้อรังที่อยู่ในช่วงระหว่างรับการรักษาด้วยยาต่างๆโดยเฉพาะยารักษาโรคดังกล่าวข้างต้น อาจส่งผลให้ร่างกายได้รับสารประกอบต่างๆจากสมุนไพรเหล่านี้ที่อาจออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 และก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่างๆตามมาได้ ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ของพืชสมุนไพรที่ประชาชนในเขตพื้นที่รอบๆโครงการป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดในมูลนิธิชัยพัฒนา จังหวัดจันทบุรีนิยมรับประทานตามคำแนะนำของหมอชาวบ้าน จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญเพื่อนำไปใช้เพื่อลดอัตราการเกิดผลกระทบต่างๆ (FDI และ HDI) ที่อาจเกิดขึ้นจากการรับประทานพืชสมุนไพรในโครงการป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดในมูลนิธิชัยพัฒนา จังหวัดจันทบุรีร่วมกับยาแผนปัจจุบันได้อย่างปลอดภัยต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

๑. ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ที่มีบทบาทในย่อยสลายยาที่ใช้ในการรักษาโรคเรื้อรังต่างๆ เพื่อป้องกันการเกิดผลข้างเคียงจากการใช้รักษาโรคร่วมกับการรับประทานสมุนไพรเพื่อสุขภาพต่างๆ

๒. พัฒนาระบบตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ที่มีบทบาทหลักในการย่อยสลายยาในคน เพื่อความรวดเร็วในการพัฒนาเป็นระบบตรวจสอบสารสกัดพืชสมุนไพรอื่นๆต่อไป

1.3 สมมุติฐานทางการศึกษา

สารสกัดจากพืชสมุนไพรที่ชาวบ้านใช้ในการรักษาโรคจาก โครงการป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดในมูลนิธิชัยพัฒนา จังหวัดจันทบุรี สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ได้

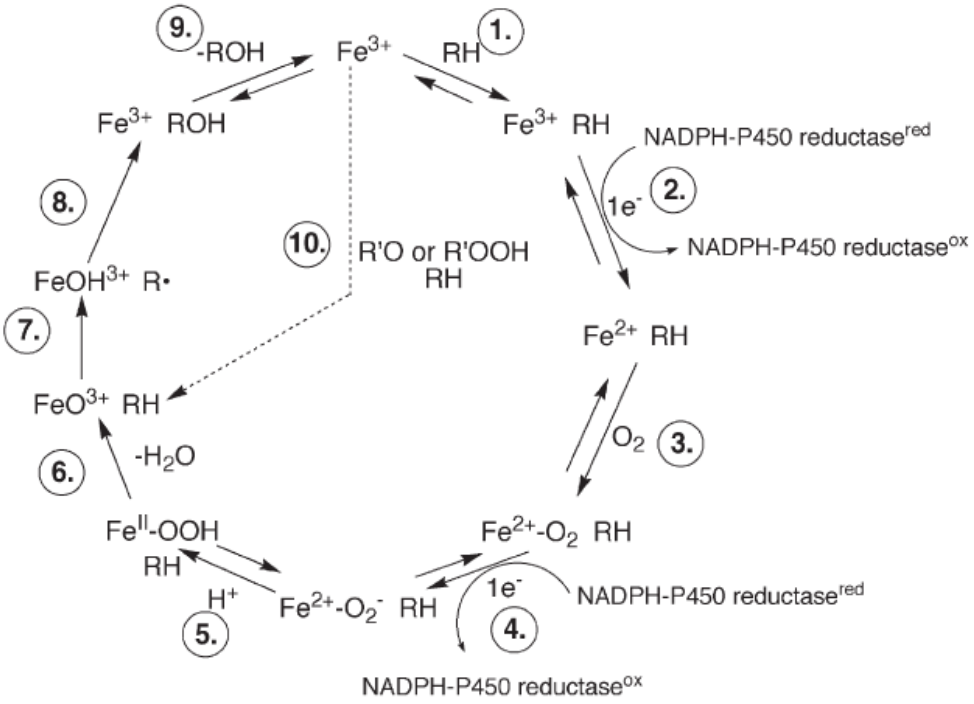
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ทำให้ทราบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ของสารสกัดจากพืชโครงการป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดในมูลนิธิชัยพัฒนา จังหวัดจันทบุรี

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ทฤษฎีพื้นฐานที่เกี่ยวข้อง

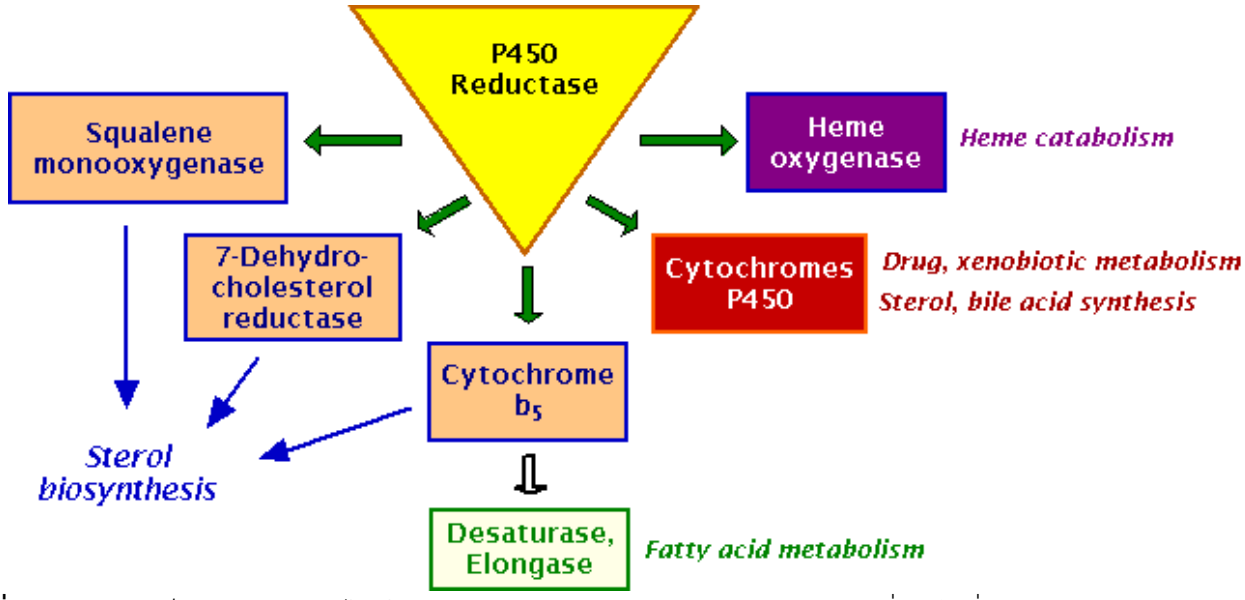
เอนไซม์ Cytochrome P450 (CYPs หรือ P450s) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการการเมแทบอลิซึมของสารเคมีทั้งสารที่มีอยู่ในร่างกายเช่น ฮอร์โมนและกรดไขมันต่างๆ และสารที่ร่างกายได้รับจากภายนอกเช่น ยาและสิ่งปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมต่างๆ เนื่องจากเอนไซม์ P450s พบเป็นจำนวนมากในร่างกายและในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด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



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

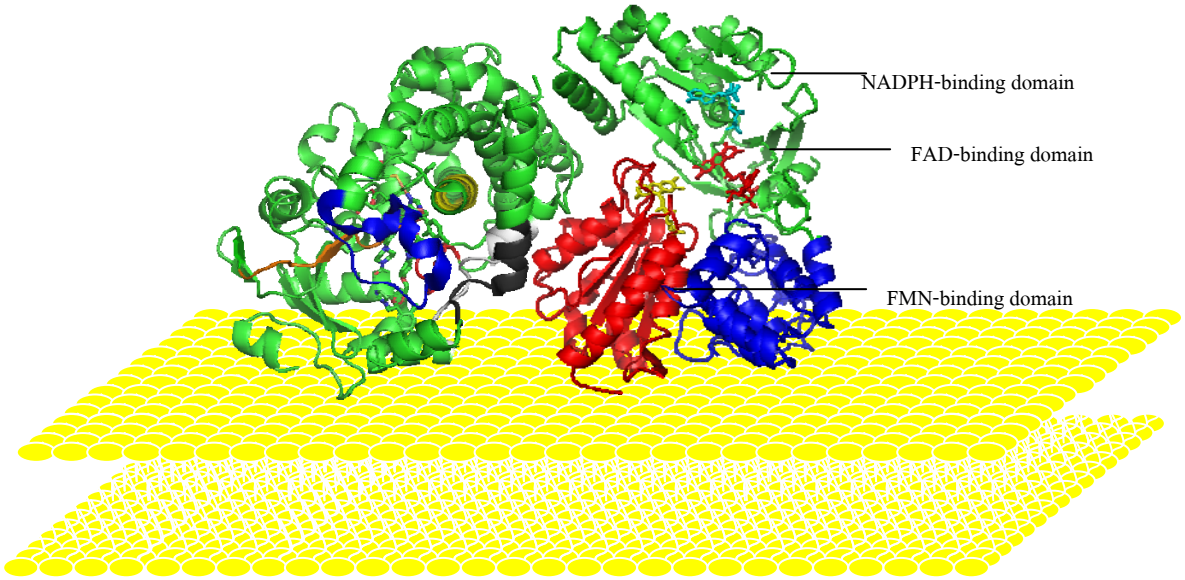
ในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ P450s นั้น (ภาพที่ 2-1) เอนไซม์ P450s จะต้องได้รับอิเล็กตรอนที่ส่งผ่านมาจาก เอนไซม์ NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR) โดยที่อิเล็กตรอนตัวแรกจะรีดิวซ์เหล็ก

(Fe^{3+} เป็น Fe^{2+}) ที่เป็นส่วนประกอบหนึ่งของเอนไซม์ P450s เพื่อให้เอนไซม์ P450s สามารถจับกับออกซิเจนได้ ส่วนตัวอิเล็กตรอนตัวที่สองจะกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในโมเลกุลของออกซิเจนให้เกิดเป็นสารประกอบไอรอนไฮดรอกซิล (iron-hydroxy complex) และเร่งการเกิดปฏิกิริยาต่อไปโดยเอนไซม์ทั้งสองจะทำงานร่วมกันใน Endoplasmic reticulum ของเซลล์ในการเร่งปฏิกิริยาต่างเช่น 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 ด้วยเช่นกัน (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 ไปยังตัวรับอิเล็กตรอนดังที่กล่าวในเบื้องต้น 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) โดยจากการศึกษาโครงสร้างสามมิติของ 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 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันปัญหาโรคเรื้อรังต่างๆจัดเป็นภัยคุกคามทางสุขภาพที่สำคัญของประชากรไทย เพราะเป็นโรคที่ไม่หายขาดและต้องการการดูแลรักษาอย่างต่อเนื่อง เพื่อไม่ให้อาการของโรคลุกลามจนเกิดภาวะแทรกซ้อนหรือเป็นอันตรายรุนแรงถึงแก่ชีวิต จากสถิติของกระทรวงสาธารณสุข พบว่าประชาชนไทยเจ็บป่วยด้วยโรคเรื้อรังเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยโรคเรื้อรังที่พบมากในคนไทยได้แก่ โรคหัวใจ โรคมะเร็ง (ตับ ปอด เต้านมและมดลูก) โรคเบาหวานโรคความดันโลหิตสูง และอาจรวมถึงโรคเรื้อรังอื่นๆเช่น โรคเบาหวาน โรคภูมิแพ้ที่ผิวหนัง โรคปวดเมื่อยหลังหรือเอว โรคกระดูกงอกทับเส้นประสาท โรคปวดข้อ ปวดเข่า โรคมวลกระดูกต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน โรคไตวายเรื้อรัง และ โรคซึมเศร้า เป็นต้น (สถาบันวิจัยโรคเรื้อรัง, 2550) ทั้งหมดอาจเกิดเนื่องมาจากสภาวะเครียดจากการทำงานหรือการแข่งขันต่างๆ รวมถึงปัญหาทางเศรษฐกิจและการเมือง ปัญหาสังคมต่างๆที่มีเพิ่มสูงขึ้นทุกวัน และจากการเปิดเผยของนพ.เรวัต วิศรุตเวช อธิบดีกรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (สธ.) ยังชี้ให้เห็นว่าในปัจจุบันประเทศไทยมีผู้สูงอายุมีจำนวนสูงถึง 7.2 ล้านคน หรือร้อยละ 11.47 ของประชากรทั้งหมด ซึ่งในจำนวนนี้เป็นโรคความดันโลหิต ร้อยละ 31.7 โรคเบาหวาน ร้อยละ 13.3 โรคหัวใจ ร้อยละ 7.0 โรคอัมพาตอัมพฤกษ์ ร้อยละ 2.5 โรคหลอดเลือดในสมองตีบ ร้อยละ 1.6 และโรคมะเร็ง ร้อยละ 0.5 (สำนักงานสถิติแห่งชาติ, 2550) โดยยังไม่รวมถึงโรคที่ยังพบบ่อยๆในผู้สูงอายุ ได้แก่ เบาหวาน ภาวะหกล้ม การสูญเสียความสามารถในการเดิน สติปัญญาเสื่อมถอย เบื่ออาหาร ปัสสาวะอุจจาระราด และโรคแทรกซ้อนอื่นๆ โรคเรื้อรังต่างๆเหล่านี้จำเป็นต้องใช้การรักษาทางอายุรกรรมทางยาต่างๆเพื่อบรรเทาอาการของโรคให้ทุเลาลง อย่างไรก็ตามเนื่องจากผู้ป่วยจากโรคเรื้อรังทั้งวัยทำงานและผู้สูงอายุมักจะเป็นโรคเรื้อรังต่างๆมากกว่าหนึ่งโรคและต้องรับประทานยามากมายหลายขนานเพื่อบำบัดหรือป้องกันอาการของโรคแต่ละโรค ทำให้ในปัจจุบันพบว่ามีรายงานของผู้เสียชีวิตอันเนื่องมาจากอันตกิริยาระหว่างยาแต่ละชนิดที่รับประทานเข้าไป (drug-drug interaction; DDI) เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ และจัดเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเสียชีวิตเป็นลำดับที่หกในประเทศสหรัฐอเมริกา (Yuan et al., 1999) โดยอุบัติการณ์ที่พบส่วนใหญ่พบในกรณีที่ยานั้นถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในกลุ่ม Cytochrome P450 ในตับของมนุษย์ (Badyal, 2001; Bibi, 2008; Genser, 2008; Kirchheiner, 2007; Ogu, 2000; Yuan 1999)

เอนไซม์ในกลุ่ม cytochrome P450 (CYP,P450) คือกลุ่มของเอนไซม์ที่มีหมู่ heme เป็นองค์ประกอบ และมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาย่อยสลายสารต่างๆทั้งภายในและภายนอกร่างกาย เช่นฮอร์โมน หรือสารแปลกปลอมที่ปนเปื้อนในอาหารและสิ่งแวดล้อม ในคนมีเอนไซม์ P450 ถึง 18 กลุ่มและ 43 กลุ่มย่อย (http://drnelson.utmen.edu/CytochromeP450.html) แต่เอนไซม์ที่พบว่ามีบทบาทในการย่อยสลายยา (ประมาณ 90% ของยาที่ใช้รับประทานในปัจจุบัน) มีอยู่เพียง 6 กลุ่ม ได้แก่เอนไซม์ CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 และ CYP3A4 (Bibi, 2008; Ortiz, 2005; Lynch, 2007; Zenger, 2008) และในจำนวนนี้พบว่านอกจากเอนไซม์ CYP3A4 ซึ่งเป็นเอนไซม์ P450 ที่พบมากที่สุดในตับประมาณ 30% (Shimada, 1994) ที่สามารถย่อยสลายยาต่างๆอย่างไม่จำเพาะได้มากกว่า 150 ชนิดแล้ว เอนไซม์ CYP2C9 ที่ทำหน้าที่สำคัญในการย่อยสลายยาประมาณ 10-15% ของยาที่วางขายในปัจจุบัน เช่น ยากันชัก (Antiepilectic เช่น phenytoin) ยาต้านการแข็งตัวของเกร็ดเลือด (Anticoagulant เช่น S-warfarin) ยาต้านการอักเสบแบบไม่ใช่ steroid (NSAIDs เช่น aceclofenac, celecoxib, flurbiprofen, diclofenac, ibuprofen, ndo-methacin, mefenamic acid, meloxicam, naproxen, piroxicam, suprofen, tenoxicam) ยารักษาโรคไมเกรนและอาการทางจิตเวช (Psychotropics เช่น fluoxetinevalproic acid และ valproic acid) ยาลดระดับน้ำตาลในเลือด (chlorpropamide, glipizide, glimepiride, glyburide, nateglinide, tolbutamide) ยาลดความดันโลหิตสูง Angiotension II receptor blocker (losartan, irbesartan, bosentan) และยารักษาโรคมะเร็งเต้านม (tamoxyfen)

อุบัติการณ์ DDI ที่พบคือยาหลายชนิดที่รับประทานเข้าไปเพื่อรักษาโรคต่างๆนั้น นอกจากจะทำหน้าที่ในการเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ P450 หนึ่งๆแล้ว ยังสามารถทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง (Inhibitor) การทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายเอง (เช่น ยาปฏิชีวนะ isoniazid ที่ถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ CYP2E1 และสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ได้นอกจากนี้ยาปฏิชีวนะ Sulfamethoxazole ที่ถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ CYP2C9 และสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ได้ด้วย) หรือเอนไซม์ P450 อื่นๆ (เช่น omeprazole ที่เป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ CYP2C19 เป็นตัวยับยั้งของเอนไซม์ CYP3A4) ทำให้มีการทำงานที่ลดลง หรือยานั้นๆสามารถทำหน้าที่ตัวเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ P450 อื่นๆให้เพิ่มสูงขึ้นได้เช่น ยาปฏิชีวนะ rifampicin ที่ใช้รักษาวัณโรคสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2C9 และ CYP3A4 (Bibi, 2008; Genser, 2008; Kirchheiner, 2007; Ogu, 2000; Pelkonen, 2008)

อันตกิริยาของยากับยานั้นสามารถส่งผลกระทบได้หลายประการ โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลายยาจะขึ้นอยู่กับกลไกการออกฤทธิ์ของยานั้นๆ 1) ในกรณีที่ยาที่รับประทานเป็นยาที่ออกฤทธิ์ทันทีที่เข้าสู่ร่างกาย การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่จะย่อยสลายยานั้นๆจะส่งผลให้อัตราเร็วในการกำจัดยาออกจากร่างกายลดลง ยาคงอยู่ในร่างกายนานขึ้นส่งผลให้เกิดผลข้างเคียงอันเนื่องจากยานั้นๆ เช่น การรับประทานยาลดการสร้างคอเลสเตอรอล simvastatin (Zocor) ร่วมกับยา verapamil ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 จะส่งผลให้เกิดอาการข้างเคียงเช่นกล้ามเนื้ออ่อนแรง (myopathy) หรือการย่อยสลายของกล้ามเนื้อลาย (rhabdomyolysis) ได้ 2) ในทางตรงข้ามสำหรับยาที่ต้องถูกเร่งปฏิกิริยาก่อนจึงจะออกฤทธิ์ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จะส่งผลให้ยาออกฤทธิ์ช้าลงทำให้การรักษาได้ผลช้า หรือช้าว่าที่ควรจะเป็น (Badyal, 2001; Hollenberg; 2008) ในขณะที่การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วยตัวยับยั้งจะส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์นั้นๆลดลง การเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์จะให้ผลในทิศทางตรงกันข้าม ซึ่งยานั้นๆอาจเกิดการเหนี่ยวนำเอนไซม์ที่ย่อยสลายยานั้นเอง (autoinduction) เช่นยา carbamazepine หรือไปออกฤทธิ์กระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์อื่นๆ (foreign-induction) เช่นยา rifampicin 3) ในกรณีที่ยาที่รับประทานเป็นยาที่ออกฤทธิ์ทันทีที่เข้าสู่ร่างกาย การเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ที่จะย่อยสลายยานั้นๆจะส่งผลให้อัตราเร็วในการกำจัดยาออกจากร่างกายเพิ่มขึ้น ลดช่วงเวลาที่ยาจะออกฤทธิ์ 4) ในทางตรงข้ามสำหรับยาที่ต้องถูกเร่งปฏิกิริยาก่อนจึงจะออกฤทธิ์ การเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์จะส่งผลให้

ยาถูกย่อยสลายเร็วอาจส่งผลให้เกิดผลข้างเคียงขึ้นได้ (Badyal, 2001; Kirchheiner, 2007) อย่างไรก็ตามการเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ P450 นั้นจะใช้เวลาในการเพิ่มปริมาณโปรตีนและกิจกรรมเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น เช่นยา rifampicin ที่สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2C9 ได้ในเวลาเพียง 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับยา phenobarbital ที่ใช้เวลาเหนี่ยวนำประมาณ 7 วัน (Michalets, 1998) ซึ่งแตกต่างจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นภายในระยะเวลาไม่ถึงชั่วโมง (Amacher, 2010; Genser, 2008; Hu 2005; Hollenberg; 2008; Kirchheiner, 2007; Lynch, 2007; Ogu, 2000; Pelkonen, 2008)

เมื่อเปรียบเทียบอันตกิริยาระหว่างยาและยาที่เกิดขึ้นกับเอนไซม์ P450 ต่างๆที่เกี่ยวข้องในการสลายยานั้น การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 จัดเป็นการยับยั้งการทำงานที่มีผลกระทบที่รุนแรงมาก เพราะยารักษาโรคที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ CYP2C9 เป็นยารักษาโรคเรื้อรังที่มักพบในผู้ป่วยทั่วไป เช่นโรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง โรคไขมันอุดตันในเส้นเลือดและโรคอันเกิดจากการอักเสบต่าง ซึ่งมักพบอาการของโรคร่วมกันได้มากกว่าหนึ่งโรคในผู้ป่วยเพียงคนเดียว ซึ่งจะส่งผลให้การรักษาโรคเรื้อรังต่างๆเหล่านี้เป็นไปอย่างไม่มีประสิทธิภาพ เสียค่าใช้จ่ายในการรักษาในราคาแพงมากขึ้นและอาจส่งผลให้เกิดอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ ทั้งนี้เนื่องจากผลกระทบมากมายที่เกิดขึ้น ในปัจจุบันจึงมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทั้งจากพืชสมุนไพรและผลไม้ต่างๆ ในรูปอาหารเสริมเพื่อสุขภาพชนิดต่างๆเพิ่มมากขึ้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันหรือบรรเทาอาการของโรคเรื้อรังต่างๆเหล่านี้โดยเฉพาะผู้ที่อยู่ในวัยทำงานหรือผู้สูงอายุต่างๆ อย่างไรก็ตามการใช้ผลิตภัณฑ์ในกลุ่มนี้อาจมีปัญหาเกี่ยวกับความปลอดภัยที่อาจเกิดขึ้นเมื่อรับประทานก่อนหรือหลังรับประทานยารักษาโรคเรื้อรังต่างๆ (Food-drug interaction ; FDI หรือ Herb-drug interaction; HDI) เกิดขึ้นได้ (Hu, 2005; Izzot, 2009)

อุบัติการณ์การเกิด FDI และ HDI สามารถเกิดขึ้นได้ในชีวิตประจำวันทั่วๆไป แต่หลักฐานที่เด่นชัดเกิดจากการศึกษาในน้ำส้ม grapefruit ที่พบว่าส่งผลต่อยาที่รับประทานหลายชนิด (Arayne, 2005) เริ่มจากการค้นพบในปี 1989 ที่มีรายงานว่าการดื่ม grapefruit juice กับยา calcium channel antagonist felodipine จะส่งผลให้ระดับของยา felodipine ในน้ำเลือดเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้ยาออกฤทธิ์ดีขึ้น (Bailey, 1993) และจากการศึกษายังพบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 ของ grapefruit เกิดจากสารในกลุ่ม Flavonoids (เช่น quercetin, naringenin, kaempferol) ที่พบปริมาณมากในผลไม้จำพวกส้ม ส้มโอ (Ameer, 1997; Runkel, 1997) โดยเฉพาะสาร naringin ที่มีอยู่ถึง 10% ของน้ำหนักแห้งใน grapefruit ซึ่งพบว่ามีผลต่อการออกฤทธิ์ของยา benzodiazepines (เช่น midazolam, triazolam), antihistamines (เช่น terfenadine), immunosuppressive drugs (เช่น cyclosporin) (Ameer, 1997) จากการศึกษาของ Hukkinen และคณะพบว่าอาสาสมัครที่แข็งแรง 10 คนที่ได้รับยา triazolam 0.25 mg ร่วมกับ 250 ml grapefruit juice จะมีระดับของยาสูงกว่ากรณีที่ได้รับยาร่วมกับน้ำเปล่าธรรมดาถึง 9 คนจาก 10 คนที่ทดสอบ และยังส่งผลให้เกิดอาการวิงเวียน หน้ามืดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญ (Hukkinen, 1995) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาเพิ่มเติมยังพบว่าสารประกอบ flavonoids อื่นๆใน grapefruit เช่น quercetin หรือ nootake ออกฤทธิ์เป็นตัวยับยั้งเช่นเดียวกัน (Bailey, 1989; Tassaneeyakul et al, 2000) สอดคล้องกับผลการศึกษาที่พบน้ำgrapefruit เพียงหนึ่งแก้วมีฤทธิ์ที่จะสามารถส่งผลต่อยาที่ได้รับประทานต่างๆมากมายแม้ว่าจะดื่มล่วงหน้าก่อนทานยาเป็นเวลามากกว่าหนึ่งชั่วโมง (Song, 1996) เพราะเป็นการยับยั้งแบบ mechanism-based inhibition โดยกลไกการยับยั้งแบบ mechanism-based นี้เป็นกลไกที่สำคัญในการยับยังการทำงานของเอนไซม์เพราะทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อย่างถาวร (enzyme inactive) และต้องมีการสร้างเอนไซม์ใหม่ขึ้นมาแทนที่เอนไซม์ที่มีอยู่และเสียสมบัติการทำงานไป ซึ่งจะต่างจากการยับยั้งการทำงานแบบ competitive inhibition ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ด้อยกว่า (Hollenberg; 2008; Izzo 2009; Pelkonen, 2008)

สำหรับเอนไซม์ CYP2C9 ยังไม่พบรายงานการศึกษา FDI ในพืชสมุนไพรมากเช่นเดียวกับเอนไซม์ CYP3A4 แม้จะมีการพบว่าน้ำผลไม้หลายชนิด เช่น grape fruit (ไม่พบในประเทศไทย) ทับทิมและมะเฟือง

สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ได้ในหลอดทดลอง แต่ยังไม่ได้ทำการศึกษาผลกระทบที่อาจเกิดขึ้น อย่างไรก็ตามผลการศึกษาพบว่า สารประกอบในกลุ่ม flavonoids flavone และ alkaloid หลายชนิดสามารถยับยั้งเอนไซม์ CYP2C9 ได้ในสัดส่วนที่แตกต่างกันไป (Kimura, 2010; Salminena, 2010) เนื่องด้วยสารประกอบ ในกลุ่ม flavonoids flavone และ alkaloid เป็นสารประกอบที่พบได้ทั่วไปในผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติต่างๆทั้งพืชสมุนไพรและผลไม้ไทยในปริมาณที่แตกต่างกันออกไป และเนื่องจากในปัจจุบันคนไทยนิยมรับประทานผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติในลักษณะของแพทย์ทางเลือก ร่วมกับการรักษาแผนปัจจุบัน ดังนั้นการรับประทานอาหารเสริมจากพืชสมุนไพรหรือผลไม้ที่มีสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ที่ย่อยสลายยารักษาโรคต่างๆ อาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพในระยะยาวหรืออาจส่งผลกระทบในกรณีผู้ป่วยโรคมะเร็งและผู้สูงอายุที่ร่างกายอ่อนแอ และสามารถเกิดผลกระทบข้างเคียงจากอันตรกิริยาของยาที่เกิดขึ้นอย่างรุนแรงกว่าคนปกติที่ร่างกายแข็งแรง ดังนั้นศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานเอนไซม์ CYP2C9 ของสมุนไพรจึงเป็นองค์ความรู้ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพและน่าจะเป็นหนึ่งในแนวทางเลือกที่สำคัญในการป้องกันผลกระทบข้างเคียงที่อาจจะเกิดขึ้นในระหว่างการดูแล ป้องกัน ไม่ให้อาการของโรครุนแรงขึ้นได้ (Izzo 2009; Sikka 2005; Yuan 1999)

ในการทดลองนี้ผู้วิจัยศึกษาฤทธิ์ต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ของพืชสมุนไพรจากโครงการป่าชุมชน บ้านอ่างเอ็ด ฯลฯ โดยมุ่งศึกษาพืชสมุนไพรที่ชาวบ้านนำมารับประทานเป็นยารักษาโรค เพื่อใช้ในการป้องกันอันตรายจากการรับประทานพืชสมุนไพรที่อาจเกิดขึ้นเมื่อรับประทานก่อนหรือหลังรับประทานยารักษาโรคเรื้อรังต่างๆ อันเนื่องจากสารสำคัญจากสมุนไพรออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ส่งผลให้เกิดผลข้างเคียงจากการรับประทานยาแผนปัจจุบันเพิ่มขึ้น

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

3.1 พลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 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)

3.3.2 พลาสมิด pCW^{+} ori - 2C9

พลาสมิด pCW^{+} ori ที่บรรจุยีนCYP2C9 ของคน (ได้รับมาจาก Prot.Dr. Joyce D. Goldstem , National Institute of Health USA)

3.2วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมสารสกัดจากพืนสมุนไพรพื้นบ้านจากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด

นำพืชสมุนไพรพื้นบ้านจากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดทั้งหมด 24 ชนิด มาทำความสะอาด สับเป็นชิ้นเล็กๆและนำไปอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จากนั้นนำพืชสมุนไพรมาบดให้ละเอียดแบ่งพืชสมุนไพรใส่ถุงผ้าดิบ ถุงละ 50 กรัม นำไปแช่ใน 95% เอทานอลในสัดส่วน 1 กรัม : 10 มิลลิลิตร แล้วทำการสกัด นำส่วนสกัดเอทานอลที่ได้ไปทำการระเหยตัวทำละลายเอทานอลด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน

3.3.1 การเหนี่ยวนำการแสดงออก การทำบริสุทธิ์และกิจกรรมของเอนไซม์ 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

3.3.2 การเหนี่ยวนำการแสดงออก การทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ CYP2C9

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL-1 blue ที่ได้รับการส่งผ่าน cDNA ที่มียีน *cyp2c9* (pCW^{+} ori - 2C9) จากนั้นเหนี่ยวนำการแสดงออกโปรตีนด้วย IPTG และ 5-aminolevulinic acid hydrochloride (δ-ALA) ทำบริสุทธิ์โปรตีนโดยผ่านนิกเกิลคอลัมน์และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE

3.3.3 การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

เตรียมปฏิกิริยาโดยบ่มเอนไซม์ CYP2C9 ร่วมกับเอนไซม์ rat CPR และ DLPC ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเติมสารละลาย 100 µM Tolbutamide และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็นปริมาตร 200 ไมโครลิตร ด้วย100 mMKpi buffer pH 7.4 บ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที

จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาด้วย NADPH และแบ่งออกมาหยุดปฏิกิริยาทันทีด้วย HCl เป็นT_0และบ่มต่ออีก20นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย HClเป็น T_{20} แล้วนำปฏิกิริยาที่ถูกหยุดแล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที(rpm)เป็นเวลา 5 นาทีนำส่วนใสที่ได้ฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC UV detector โดยมีสารละลายเคลื่อนที่คือ สารละลาย 65% sodium acetate pH 4.3 และ 35%Acetonitrile ด้วยอัตราการไหล 1.4 ml/min แบบ isocratic โดยตรวจสอบด้วยความยาวคลื่น 229 นาโนเมตรด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Chromatography column C18) ขนาด 3.9×300 mm เป็นเวลา 20 นาที

3.3.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์

3.3.4.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ cytochrome P450 reductase จากหนู (rat CPR)

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

3.3.4.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2C9

เตรียมปฏิกิริยาโดยทำการบ่มเอนไซม์ CYP2C9 ร่วมกับเอนไซม์ rat CPR และ DLPC เตรียมปฏิกิริยาโดยบ่มเอนไซม์ CYP2C9 ร่วมกับเอนไซม์ rat CPR และ DLPC ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเติมสารละลาย 100 μM Tolbutamide เติมสารสกัดสมุนไพรที่ทำการศึกษาและปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็นปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาด้วย NADPH และแบ่งออกมาหยุดปฏิกิริยาทันทีด้วยHClเป็นT_0 และบ่มต่ออีก20นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย HCl เป็น T_{20} แล้วนำปฏิกิริยาที่ถูกหยุดแล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที(rpm)เป็นเวลา 5 นาทีนำส่วนใสที่ได้ฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC UV detector โดยมีสารละลายเคลื่อนที่คือ 65% sodium acetate pH 4.3 และ 35%Acetonitrile ด้วยอัตราการไหล 1.4 ml/min แบบ isocratic โดยตรวจสอบด้วยความยาวคลื่น 229 นาโนเมตรด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Chromatography column C18) ขนาด 3.9×300 mm เป็นเวลา 20 นาที

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การเก็บตัวอย่างพืชและการสกัดสาร

กลุ่มผู้วิจัยได้มีการค้นคว้าหาข้อมูลพืชสมุนไพรจากรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์เรื่อง “แพทย์พื้นบ้านกับการใช้พืชสมุนไพร ในจังหวัดจันทบุรี” และได้ลงพื้นที่สำรวจที่โครงการป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด มูลนิธิชัยพัฒนา ขอคำแนะนำจากปราชญ์ชุมชน จากนั้นทำการเก็บพืชตัวอย่างที่ปราชญ์ชุมชนนำไปใช้ รวมทั้งสิ้น 15 ชนิด 24 ตัวอย่าง ที่นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ตารางที่ 4-1) โดยพืชที่เก็บจากพื้นที่จะถูกพิสูจน์ชนิดโดย อ. เบญจวรรณ ชิวปรีชา ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา

ตารางที่ 4-1 ชนิดของพืชที่ทำการเก็บตัวอย่าง

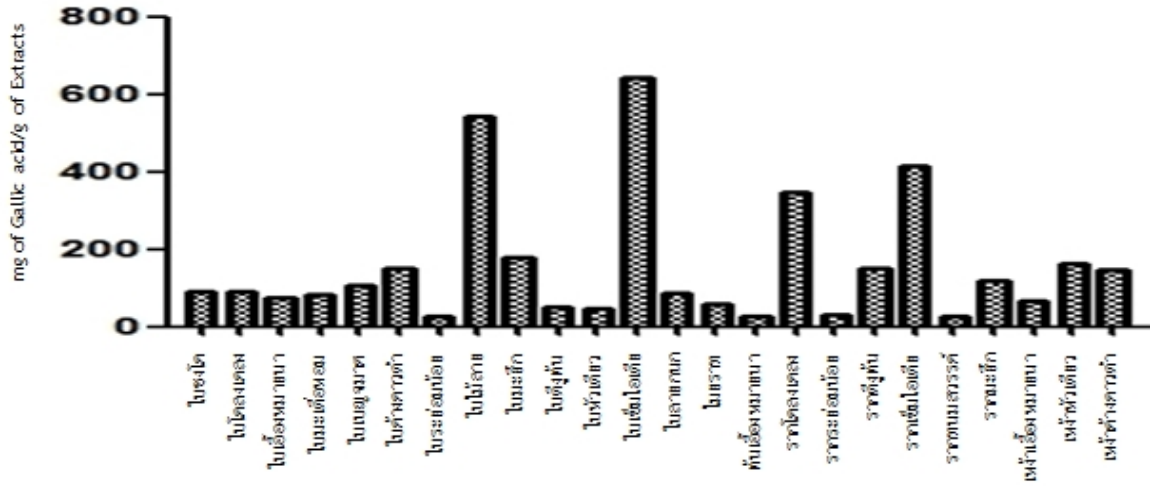
พืชสมุนไพรที่เก็บตัวอย่าง	
เหง้าเอื้องหมายนา (*Costus speciosus (Koen)* Smith.)	ใบโคลงเคลง (*Melastoma saigonense* (Kuntze) Merr.)
ใบเอื้องหมายนา (*Costus speciosus* (Koen.) Smith)	รากโคลงเคลง (*Melastoma saigonense* (Kuntze) Merr.)
ต้นเอื้องหมายนา (*Costus speciosus* (Koen.) Smith)	รากพนมสวรรค์ (*Clerodendrum paniculatum* L.)
ใบค้างคาวดำ (*Tacca chantrieri* Andr.)	ใบดีงูต้น (*Picrasma javanica* Blume)
เหง้าค้างคาวดำ (*Tacca chantrieri* Andr.)	รากดีงูต้น (*Picrasma javanica* Blume)
ใบมะฮึก (รอพิสูจน์สายพันธุ์)	ใบหัวเดียว (*Aglaonema nitidum* (Jack) Kunth)
รากมะฮึก (รอพิสูจน์สายพันธุ์)	เหง้าหัวเดียว (*Aglaonema nitidum* (Jack) Kunth)
ใบเข็มไอเดีย (*Aidia wallichiana sensu* Tirveng)	ใบระย่อมน้อยดอกขาว (*Rauvolfia* sp.)
รากเข็มไอเดีย (*Aidia wallichiana sensu* Tirveng)	รากระย่อมน้อยดอกขาว (*Rauvolfia* sp.)
ใบเบญจมาศแมว (*Ageratum conyzoides* Linn.)	ใบลายกนก (รอพิสูจน์สายพันธุ์)
ใบชงโค (*Bauhinia* sp.)	ไมยราบ (*Mimosa diplotricha* C. Wright ex Sauvalle)
ใบมะเดื่อหอม (*Ficus hirta Vahl*)	ใบไม้ลาย (*Microcos tomentosa* Sm.)

4.2 การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

4.2.1 สารประกอบฟีนอลิกรวม

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมดในพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่เท่ากัน (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่าสารสกัดจากใบไม้ลาย, ใบเข็มไอเดีย, ราก

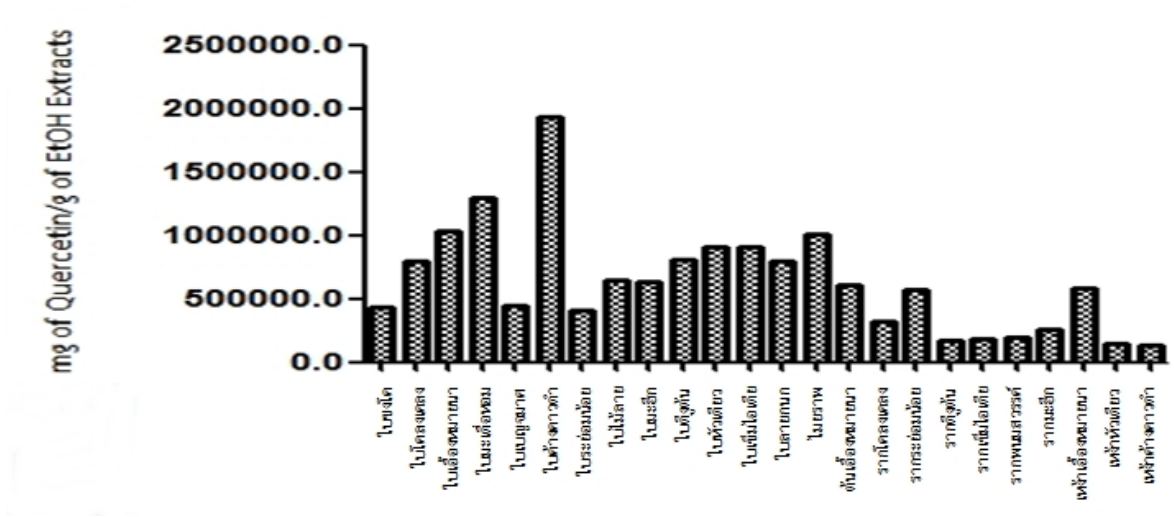
โคลงเคลง และรากเข็มไอเดีย มีสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกสูงกว่าสารสกัดจากพืชชนิดอื่น คำนวณจากค่าสมการของกราฟมาตรฐานสารละลาย Gallic acid (ภาพที่ 4-1)



ภาพที่ 4-1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมจากส่วนสกัดหยาบของพืชสมุนไพร

4.2.2 สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมทั้งหมดในพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่เท่ากัน (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่าส่วนสกัดหยาบของ ใบค้างคาวดำ มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด ในขณะที่ส่วนสกัดหยาบของ เหง้าค้างคาวดำ, เหง้าหัวเดียว, รากดีงูต้น, รากเข็มไปเดีย, รากพนมสวรรค์, และรากมะฮึก มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมต่ำเมื่อเทียบกับส่วนสกัดจากพืชอื่นๆ คำนวณจากค่าสมการของกราฟมาตรฐานสารละลาย Quercetin (ภาพที่ 4-2)

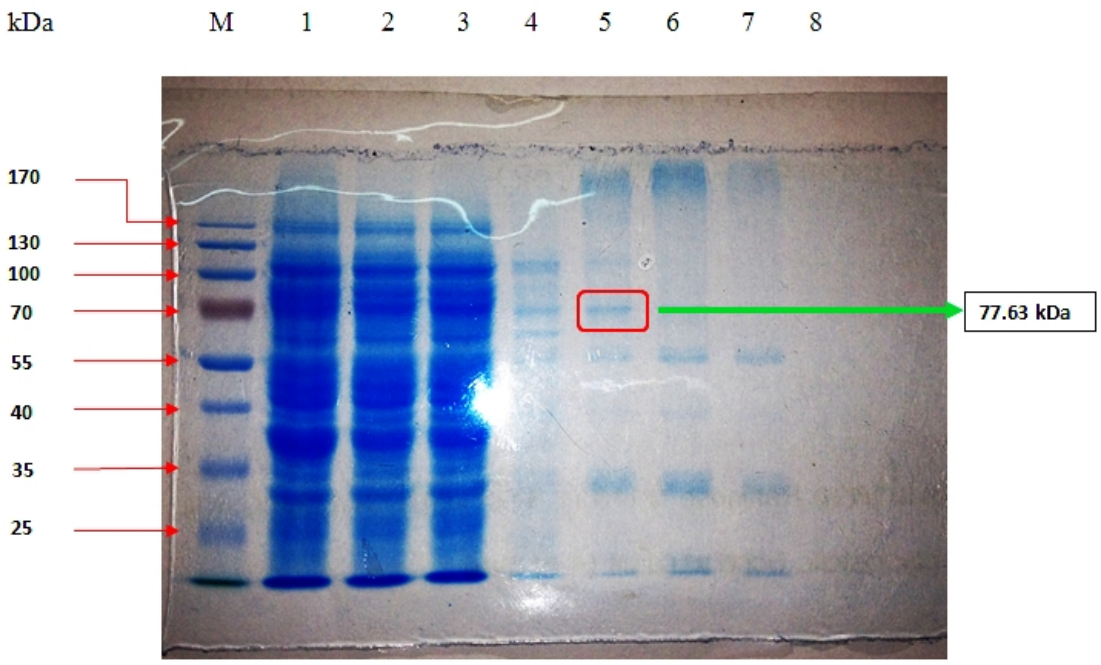


ภาพที่ 4-2 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมจากส่วนสกัดหยาบของพืชสมุนไพร

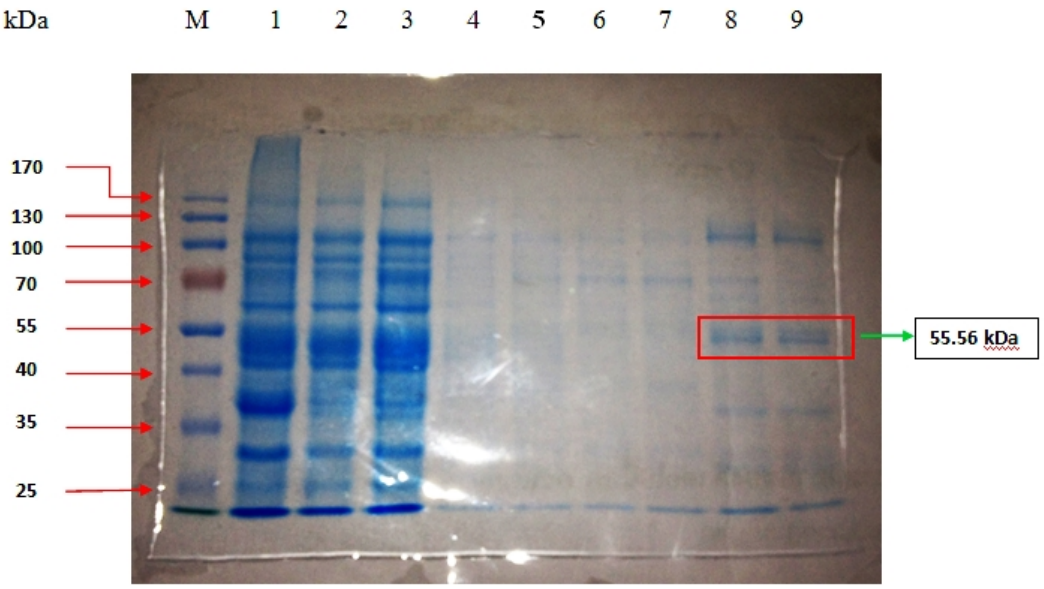
4.3 การเหนี่ยวนำการแสดงออกและการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ Cytochrome P450 reductase จากหนู (rat CPR) และเอนไซม์ CYP2C9

เหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ CPR และเอนไซม์ CYP2C9 จากนั้นทำบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะโดยใช้ Ni^{2+}-NTA (Ni^{2+}-Affinity chromatography) และตรวจสอบความบริสุทธิ์

โดยใช้ SDS-PAGE โดยเอนไซม์ rat CPR บริสุทธิ์ มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 78 kDa (ภาพที่ 4-3) ในขณะที่เอนไซม์ CYP2C9 มีมวลโมเลกุลของเอนไซม์ประมาณ 56 kDa (ภาพที่ 4-4)



ภาพที่ 4-3 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ rat CPR โดยที่ Lane M : Marker, Lane1: crude extract, Lane 2: cell lysate, Lane 3: flow throught, Lane 4: wash1 (5mM Imidazole) , Lane 5: wash2 (20mM Imidazole) ,Lane 6: wash3 (50mM Imidazole) , Lane 7: elute1 (100mM Imidazole) และ Lane 8: elute2 (200mM Imidazole)

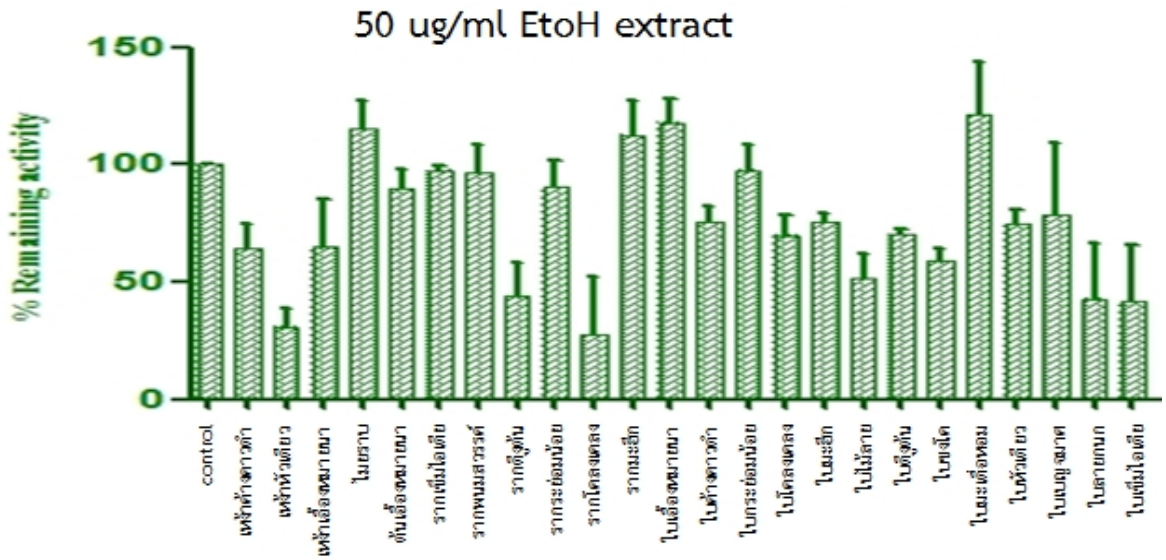


ภาพที่ 4-4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ CYP2C9 โดย SDS-PAGE โดยที่ Lane M : Marker , Lane 1 crude extract :, Lane2: cell lysate , Lane 3: flow throught , Lane 4: wash1 (1 mM Imidazole) , Lane 5: wash 2 (5 mM Imidazole) , Lane 6: wash 3 (10 mM Imidazole) , Lane 7: elute1 (20 mM Imidazole) , Lane 8: elute2 (50 mM Imidazole) , Lane 9: elute 3 (100 mM Imidazole)

4.4 การตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ rat CPR และ CYP2C9

4.4.1 การตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ rat CPR กับสารสกัดจากพืชสมุนไพร

นำเอนไซม์ rat CPR ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์มาบ่มกับสารละลายบัฟเฟอร์ Tris – HCl pH 7.5 จากนั้นเติม Cytochrome C และสารสกัดพืชสมุนไพร ผสมสารให้เข้ากันจากนั้นนำไปวัดกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ที่ค่าการดูดกลืนแสง 550 นาโนเมตร ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เมื่อมีสารสกัดที่ทำการทดสอบจะถูกนำมาเทียบกับปฏิกิริยาควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัด (มีตัวทำละลาย) ที่ถือว่ามีกิจกรรมเอนไซม์ร้อยละ 100 พบการเปรียบเทียบพบว่าส่วนสกัดหยาบของ เหง้าค้างคาวดำ, เหง้าหัวเดียว, เหง้าเอื้องหมายนา, รากดีงูต้น, รากโคลงเคลง, ใบค้างคาวดำ, ใบโคลงเคลง, ใบมะฮึก, ใบไม้ลาย, ใบดีงูต้น, ใบชงโค, ใบหัวเดียว, ใบเบญจมาศ, ใบลายกนก และใบเข็มไอเดีย มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ rat CPR และขณะเดียวกันส่วนสกัดหยาบของ ไมยราบ, รากมะฮึก, ใบเอื้องหมายนา และใบมะเดื่อหอม มีฤทธิ์ในการกระตุ้นกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ rat CPR แต่ส่วนสกัดหยาบของ ต้นเอื้องหมายนา, รากเข็มไอเดีย, รากพนมสวรรค์, รากระย่อมน้อย และใบระย่อมน้อยไม่เกิดปฏิกิริยาการกระตุ้นหรือยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ rat CPR (t-test, p-value < 0.05) (ภาพที่ 4-5)



ภาพที่ 4-5 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ CPR หลังทดสอบร่วมกับสารสกัดต่างๆที่ความเข้มข้นเดียวกัน

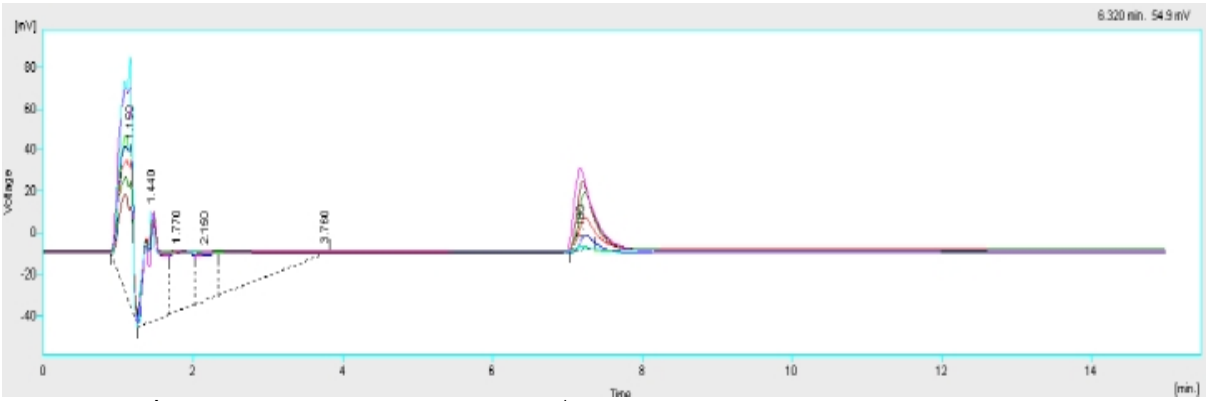
4.4.2 การตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของ CYP2C9 โดยวิธี HPLC

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 โดยใช้ Tolbutamide เป็นสารตั้งต้น และ 4-hydroxy Tolbutamide เป็นผลิตภัณฑ์เพื่อตรวจสอบปฏิกิริยา tolbutamide 4-hydroxylation จึงต้องทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาสาร Tolbutamide และ 4-hydroxy Tolbutamide โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ (5, 10, 20, 40, 80, 100 และ 120uM) ทดสอบภายใต้สภาวะต่างๆ (Jan Jurˇica et al.,2010; Ashish Sharma et al.,2004; A. B. PHARNE et al.,2012) ดังนี้ (ตารางที่ 4-2)

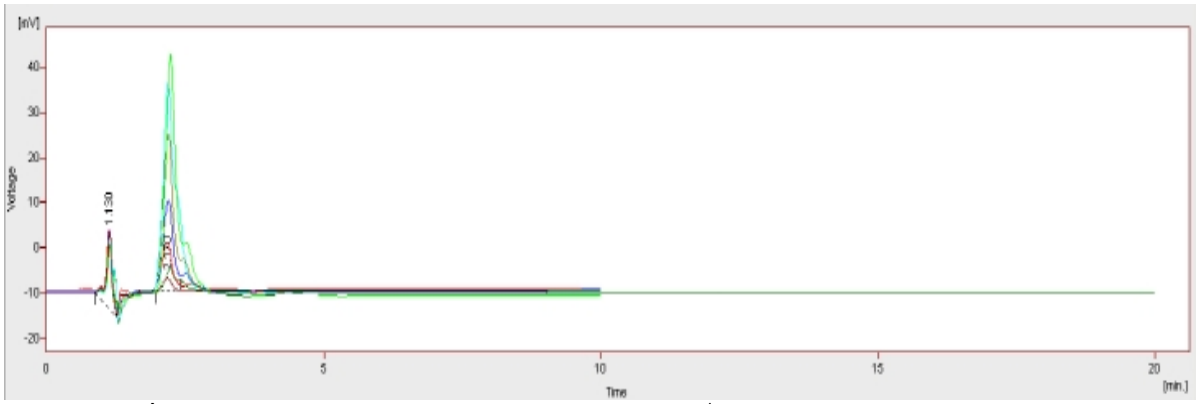
ตารางที่ 4-2 สภาวะในการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9

	Sample	Mobile phase (A:B)	Flow rate (ml/min)	Wavelength (nm)	Analysis method
1	Tolbutamide, 4-hydroxy Tolbutamide	Acetonitrile : water (60 : 40)	1	230	UV/Vis
2	Tolbutamide, 4-hydroxy Tolbutamide	Acetonitrile : Methanol (60 : 40)	1	230	UV/Vis
3	Tolbutamide, 4-hydroxy Tolbutamide	10mM monobasic potassium phosphate pH 4.5: Acetonitrile (65 : 35)	1	229	UV/Vis
4	Tolbutamide, 4-hydroxy Tolbutamide	sodium acetate pH 4.3 : Acetonitrile (65 : 35)	1.8	229	UV/Vis

จากการตรวจสอบพบว่าสภาวะที่ 4 มีความเหมาะสมมากที่สุด เนื่องจากในสภาวะที่ทำการศึกษาสามารถตรวจพบสาร Tolbutamide (ภาพที่ 4-6) และ 4-hydroxy Tolbutamide (ภาพที่ 4-7) ได้และแยกสารทั้งสองออกจากกันได้ โดยใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 15 นาที



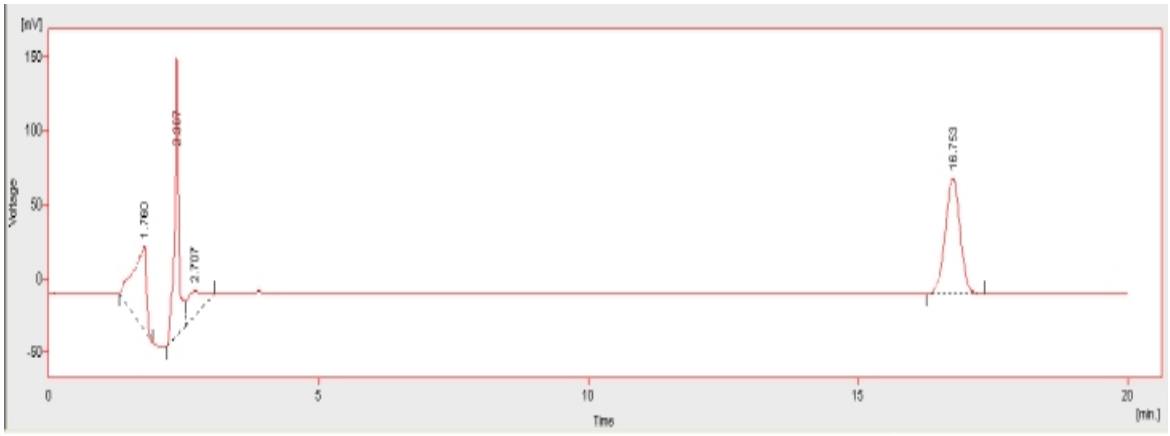
ภาพที่ 4-6 แสดงพีคของ Tolbutamide ที่ความเข้มข้นต่างๆ (5, 10, 20, 40, 80, 100 และ 120uM) ที่ถูกชะออกมาโดยเฉลี่ยในนาทีที่ 7.21 ภายใต้สภาวะที่มี mobile phase เป็น sodium acetate pH 4.3 : Acetonitrile (65 : 35) อัตราการไหล 1.8 ml/min ที่ความยาวคลื่น 229 nm



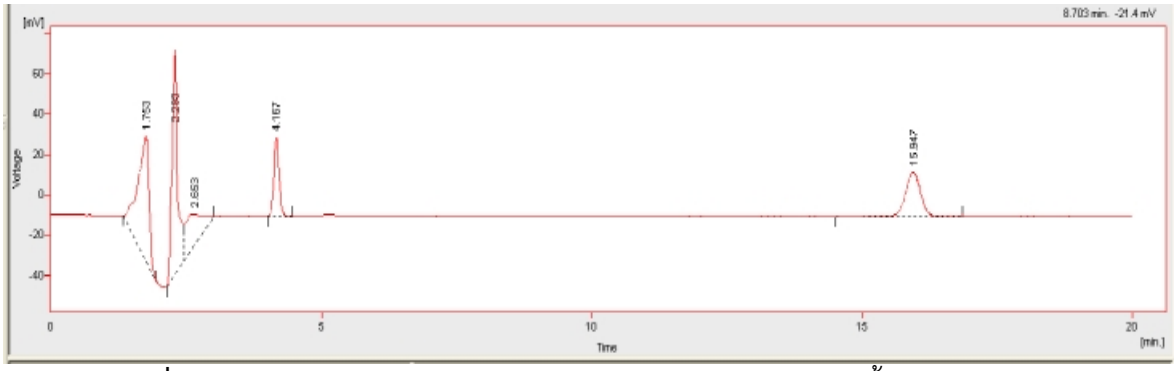
ภาพที่ 4-7 แสดงพีคของ 4-hydroxy Tolbutamide ที่ความเข้มข้นต่างๆ (5, 10, 20, 40, 80, 100 และ 120uM) ที่ถูกชะออกมาโดยเฉลี่ยในนาทีที่ 2.20 ภายใต้สภาวะที่มี mobile phase เป็น sodium acetate pH 4.3 : Acetonitrile (65 : 35) อัตราการไหล 1.8 ml/min ที่ความยาวคลื่น 229 nm

4.4.3 การตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 กับสารตั้งต้น Tolbutamide

นำเอนไซม์ CYP2C9 บ่มร่วมกับเอนไซม์ rat CPR และ DLPC ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเติมสารละลาย 100 μM Tolbutamide และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็นปริมาตร 200 ไมโครลิตร ด้วย100 mM Kpi buffer pH 7.4 บ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาด้วย NADPH และแบ่งออกมาหยุดปฏิกิริยาทันทีด้วย 1 M HCl เป็นเวลาที่ปฏิกิริยาเริ่มต้นหรือ T_0 (ภาพที่ 4-8) ส่วนที่เหลืออยู่จะถูกบ่มต่ออีก20นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 1 M HCl เป็นเวลาที่ปฏิกิริยาสิ้นสุดหรือ T_{20} (ภาพที่ 4-9) แล้วนำปฏิกิริยาที่ถูกหยุดแล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที(rpm)เป็นเวลา 5 นาทีนำส่วนใสที่ได้ฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC UV detector โดยมีสารละลายเคลื่อนที่คือ สารละลาย 65% sodium acetate pH 4.3 และ 35%Acetonitrile ด้วยอัตราการไหล 1.4 ml/min (เพื่อลดความดันของระบบ HPLC) แบบ isocratic โดยตรวจสอบด้วยความยาวคลื่น 229 นาโนเมตรด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Chromatography column C18) ขนาด 3.9×300 mm เป็นเวลา 20 นาที การศึกษาในเบื้องต้นพบว่าในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ CYP2C9 และ rat CPR เมื่อมีตัวให้อิเล็กตรอน NADPH จะเกิดปฏิกิริยา ในขณะที่ปฏิกิริยาที่ไม่มี NADPH หรือ เอนไซม์ CYP2C9 หรือ เอนไซม์ CPR อย่างใดอย่างหนึ่งจะไม่เกิดปฏิกิริยา



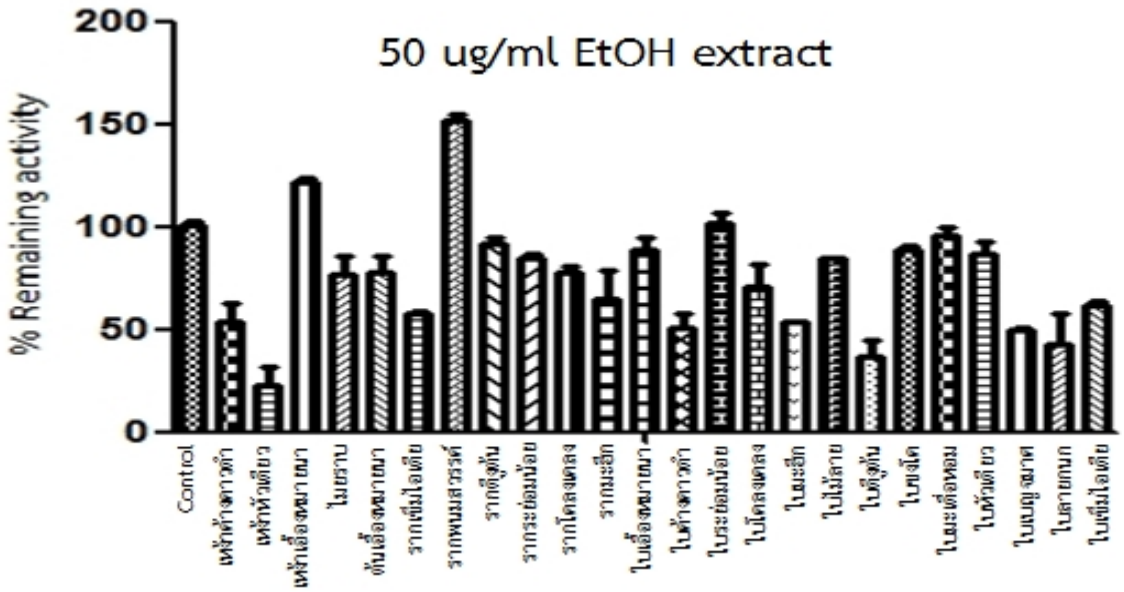
ภาพที่ 4-8 ภาพแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ CYP2C9 กับสารตั้งต้น Tolbutamide ที่เวลาที่ปฏิกิริยาเริ่มต้นหรือ (T_0) ซึ่งจะไม่มีพีคของผลิตภัณฑ์ 4-hydroxy Tolbutamide เกิดขึ้นแสดงให้เห็นว่าไม่เกิดปฏิกิริยา



ภาพที่ 4-9 ภาพแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ CYP2C9 กับสารตั้งต้น Tolbutamide (T_{20}) มีพีคของ 4-hydroxy Tolbutamide เกิดขึ้นแสดงให้เห็นว่าเกิดปฏิกิริยา

4.4.4 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2C9 ของสารสกัดสมุนไพร

ทำการศึกษาเบื้องต้นพบว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่ทำการทดลองจากป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดที่ 50 µg/ml ออกฤทธิ์ต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 แตกต่างกันโดยมีค่า p-value คือ <0.0001 (Anova, p-value <0.05) โดยพืชกลุ่มที่ออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ได้แก่ เหง้าเอื้องหมายนาและรากพนมสวรรค์ ส่วนพืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ได้แก่ เหง้าค้างคาวดำ, เหง้าหัวเดียว, ไมยราบ, ต้นเอื้องหมายนา, รากเข็มไอเดีย, รากมะฮึก, ใบค้างคาวดำ, ใบโคลงเคลง, ใบมะฮึก, ใบดีงูต้น, ใบเบญจมาศ, ใบลายกนก, ใบเข็มไอเดีย และพืชที่ไม่เกิดปฏิกิริยาการกระตุ้นหรือยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ รากดีงูต้น, รากระย่อมน้อย, รากโคลงเคลง, ใบเอื้องหมายนา, ใบระย่อมน้อย, ใบไม้ลาย, ใบชงโค, ไม่มะเดื่อหอม, ใบหัวเดียว (t-test, p-value <0.05) (ภาพที่ 4-10) เมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมพบว่าสมุนไพรหลายชนิดสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดี โดยเหง้าหัวเดียวออกฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุดด้วยค่า IC_{50} 15.25 µg/ml รองลงมาคือใบดีงูต้น (IC_{50} 22.18 µg/ml) ในขณะที่พืชหลายชนิดไม่ออกฤทธิ์ยับยั้ง (ตารางที่ 4-3)



ภาพที่ 4-10 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ CYP2C9 หลังทดสอบร่วมกับสารสกัดต่างๆที่ความเข้มข้นเดียวกัน

ตารางที่ 4-3 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2C9

พืชสมุนไพรที่ทำการศึกษา	ค่า IC50 (μg/ml)
เหง้าหัวเดียว (*Aglaonema nitidum* (Jack) Kunth)	15.25
ใบดีงูต้น (*Picrasma javanica* Blume)	22.18
เหง้าค้างคาวดำ (*Tacca chantrieri* Andr.)	48.58
ใบค้างคาวดำ (*Tacca chantrieri* Andr.)	49.74
รากเข็มไอเดีย (*Aidia wallichiana sensu* Tirveng)	51.64
ใบมะฮึก (รอพิสูจน์สายพันธุ์)	53.62
ใบลายกนก (รอพิสูจน์สายพันธุ์)	59.11
ใบเบญจมาศแมว (*Ageratum conyzoides* Linn.)	62.87
ใบเข็มไอเดีย (*Aidia wallichiana sensu* Tirveng)	63.56
รากมะฮึก (รอพิสูจน์สายพันธุ์)	68.22
ใบโคลงเคลง (*Melastoma saigonense* (Kuntze) Merr.)	74.51
ต้นเอื้องหมายนา (*Costus speciosus* (Koen.) Smith)	77.52
ไมยราบ (*Mimosa diplotricha* C. Wright ex Sauvalle)	79.44
ใบชงโค (*Bauhinia* sp.)	> 100
ใบมะเดื่อหอม (*Ficus hirta Vahl*)	> 100
รากโคลงเคลง (*Melastoma saigonense* (Kuntze) Merr.)	> 100
ใบเอื้องหมายนา (*Costus speciosus* (Koen.) Smith)	> 100
รากดีงูต้น (*Picrasma javanica* Blume)	> 100
ใบหัวเดียว (*Aglaonema nitidum* (Jack) Kunth)	> 100
ใบระย่อมน้อยดอกขาว (*Rauvolfia* sp.)	> 100
รากระย่อมน้อยดอกขาว (*Rauvolfia* sp.)	> 100
ใบไม้ลาย (*Microcos tomentosa* Sm.)	> 100
รากพนมสวรรค์ (*Clerodendrum paniculatum* L.)	> 200
เหง้าเอื้องหมายนา (*Costus speciosus (Koen)* Smith.)	> 200

บทที่ 5
อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อฤทธิ์ของพืชสมุนไพรในโครงการป่าชุมชน บ้านอ่างเอ็ด โครงการชัยพัฒนา ต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ที่มีบทบาทในการย่อยสลายยารักษาโรคประมาณ 10-15% ของยาที่วางขายในปัจจุบัน เช่น ยากันชัก (Antiepilectic เช่นphenytoin) ยาต้านการแข็งตัวของเกร็ดเลือด (Anticoagulant เช่น S-warfarin) ยาต้านการอักเสบแบบไม่ใช่ steroid (NSAIDs เช่น celecoxib, diclofenac, ibuprofen, mefenamic acid, meloxicam, naproxen, piroxicam) ยาลดน้ำตาลและยาลดความดันโลหิตสูง Angiotension II receptor blocker เพื่อเป็นข้อมูลว่าพืชสมุนไพรพื้นบ้านในป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด ที่ชาวบ้านนิยมรับประทานเพื่อรักษาโรคชนิดใดบ้างที่ออกฤทธิ์ยับยั้งหรือกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 เพื่อที่จะได้นำพืชสมุนไพรพื้นบ้านชนิดนั้นๆมาพัฒนาต่อทางด้านการแพทย์ และทางเภสัชกร เพื่อช่วยรักษาโรคต่างๆหรือระมัดระวังในการนำมาใช่รักษาโรคควบคู่กับยาแผนปัจจุบัน โดยเหนี่ยวนำการแสดงออกและทำบริสุทธิ์เอนไซม์ CYP2C9 และเอนไซม์ CPR ที่ทำหน้าที่ร่วมกัน จากนั้นศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ CYP2C9 ในการเร่งปฏิกิริยาTolbutamide 4-hydroxylation ที่เป็นปฏิกิริยาที่เกิด hydroxylation ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของสารตั้งต้น Tolbutamide และวัดปฏิกิริยาการเพิ่มขึ้นของสารผลิตภัณฑ์ 4-hydroxy Tolbutamide โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC UV detector โดยมีสารละลายเคลื่อนที่คือ สารละลาย 65% sodium acetate pH 4.3 และ 35%Acetonitrile ด้วยอัตราการไหล 1.4 ml/min แบบ isocratic โดยตรวจสอบด้วยความยาวคลื่น 229 นาโนเมตรด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Chromatography column C18) ขนาด 3.9×300 mm เป็นเวลา 20 นาทีพบว่าเอนไซม์ CYP2C9 ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มีค่า specific activity เท่ากับ 0.2948 umol/4-hydroxy Tolbutamide/min/µg protein ซึ่งมีค่ามากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ Specific activity ของเอนไซม์ CYP2C9 ที่มีการศึกษาในปี พ.ศ. 2550 คือ 30.4 pmol/4-hydroxy Tolbutamide/min/µg protein (Ariyaoshi et al., 2007)

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) ซึ่งเป็นพืชที่พบได้จำนวนมากในบริเวณป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดและชาวบ้านนิยมนำมาใช้เป็นยารักษาโรค มาทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ความเข้มข้น50 µg/ml เพราะฤทธิ์ในการยับยั้งหรือกระตุ้นกิจกรรมการทำงานเอนไซม์ rat CPR จะทำให้ส่งผลต่อการส่งอิเล็กตรอนให้แก่เอนไซม์ CYP2C9 และเอนไซม์อื่นๆในกลุ่ม cytochrome P450 ที่ทำหน้าที่สำคัญในการย่อยสลายยาต่างๆ พบว่าส่วนสกัดหยาบของเหง้าค้างคาวดำ, เหง้าหัวเดียว, เหง้าเอื้องหมายนา, รากดีงูต้น, รากโคลงเคลง, ใบไม้ลาย, ใบลายกนก และใบเข็มไอเดีย มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ rat CPR และขณะเดียวกันส่วนสกัดหยาบของไมยราบ, รากมะฮึก, ใบเอื้องหมายนา และใบมะเดื่อหอม มีฤทธิ์ในการกระตุ้นกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ได้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพรจากป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดที่ชาวบ้านนิยมรับประทานที่ความเข้มข้น 50 ug/ml หรือพืชอบแห้งน้อยกว่า 0.1 กรัม อาจส่งผลต่อการกิจกรรมของของเอนไซม์ CYP2C9 และ cytochrome P450 อื่นๆในหลอดทดลองได้

เมื่อนำพืชสมุนไพรพื้นบ้านป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดทั้ง 24 ชนิดที่ความเข้มข้น 50 µg/ml มาทำการทดสอบฤทธิ์การกระตุ้นและยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 พบว่าพืชกลุ่มที่ออกฤทธิ์กระตุ้นการ

ทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ได้แก่ เหง้าเอื้องหมายนา, รากพนมสวรรค์ ส่วนพืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ได้แก่ เหง้าค้างคาวดำ, เหง้าหัวเดียว, ไมยราบ, ต้นเอื้องหมายนา, รากเข็มไอเดีย, รากมะฮึก, ใบค้างคาวดำ, ใบโคลงเคลง, ใบมะฮึก, ใบดีงูต้น, ใบเบญจมาศ, ใบลายกนก, ใบเข็มไอเดีย และพืชที่ไม่เกิดปฏิกิริยาการกระตุ้นหรือยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ได้แก่ รากดีงูต้น, รากระย่อมน้อย, รากโคลงเคลง, ใบเอื้องหมายนา, ใบระย่อมน้อย, ใบไม้ลาย, ใบชงโค, ใบมะเดื่อหอม, ใบหัวเดียว (Anova, p-value <0.05) เมื่อทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมพบว่าพืชที่ออกฤทธิ์ยังยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ได้แก่ เหง้าค้างคาวดำ, เหง้าหัวเดียว, ใบค้างคาวดำ, ใบโคลงเคลง, ใบมะฮึก, ใบดีงูต้น, ใบเบญจมาศ, ใบลายกนก, ใบเข็มไอเดีย ออกฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ด้วยเช่นกันสามารถบอกได้ว่าในการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่กล่าวมาอาจเป็นผลมาจากสารสกัดที่ยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ทำให้ความสามารถในการส่งอิเล็กตรอนของเอนไซม์ rat CPR ให้แก่เอนไซม์ CYP2C9 น้อยลงส่วนหนึ่ง เมื่อทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมพบว่าพืชที่ออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ได้แก่เหง้าเอื้องหมายนา แต่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ rat CPR แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ของเหง้าเอื้องหมายนาไม่ได้เป็นผลมาจากสารสกัดเหง้าเอื้องหมายนาที่กระตุ้นกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ rat CPR แม้ความสามารถในการส่งอิเล็กตรอนของเอนไซม์ rat CPR ให้แก่เอนไซม์ CYP2C9 น้อยลงแต่เหง้าเอื้องหมายนาก็สามารถออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9ได้ดี

ดังนั้นการรับประทานพืชสมุนไพรพื้นบ้านป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดที่มีความสามารถในการกระตุ้นและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ควบคู่กับยาแผนปัจจุบันจึงต้องระมัดระวังในการรับประทานเพราะอาจส่งผลข้างเคียงต่อการย่อยสลายยาแผนปัจจุบันที่ถูกย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ CYP2C9 เช่น ยากันชัก (Antiepilectic เช่นphenytoin) ยาต้านการแข็งตัวของเกร็ดเลือด(Anticoagulant เช่น S-warfarin) ยาต้านการอักเสบแบบไม่ใช่ steroid (NSAIDs เช่น celecoxib, diclofenac, ibuprofen, mefenamic acid, meloxicam, naproxen, piroxicam) ยาลดน้ำตาลและยาลดความดันโลหิตสูง Angiotension II receptor blocker เช่น การรับประทานเหง้าค้างคาวดำซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9เพื่อรักษาโรคความดันเลือดต่ำจะส่งผลต่อการย่อยสลายยาลดน้ำตาลและยาลดความดันโลหิตสูง Angiotension II receptor blocker เป็นต้น

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 จากพืชสมุนไพรพื้นบ้านโดยใช้วิธีการสกัดพืชสมุนไพรแบบอื่นๆเช่น การสกัดด้วยน้ำ เป็นต้น
2. ควรศึกษาเพิ่มเติมว่าสารสำคัญใดที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9 ได้

บรรณานุกรม

กัญจนา ดีวิเศษและคณะ (2545) น้ำสมุนไพร 108 สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข 224 หน้า

คมสัน หุตะแพทย์และกำพล กาหลง (2549) น้ำผักผลไม้ น้ำสมุนไพร คู่มืออาหารปลอดพิษ พิมพ์ครั้งที่ 2 กองบรรณาธิการวารสารเกษตรกรรมธรรมชาติ 84 หน้า

วัชรีพร คงวิลาดและคมสัน หุตาแพทย์ (2551) ปรุงยาสมุนไพรไว้ใช้เอง คู่มือพึ่งตนเอง พิมพ์ครั้งที่ 6 กองบรรณาธิการวารสารเกษตรกรรมธรรมชาติ 84 หน้า

สถาบันวิจัยโรคเรื้อรัง, 2550

สำนักงานสถิติแห่งชาติ, 2550

Amacher DE. (2010) The effects of cytochrome P450 induction by xenobiotics on endobiotic metabolism in pre-clinical safety studies. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 20(4), 159–166

Ameer B, Weintraub RA (1997) Drug interactions with grapefruit juice. *Clinical Pharmacokinetics.* 33, 103-121.

Arayne MS, Sultana N, Bibi Z. (2005) Grape Fruit Juice and Drug Interactions. *Pak J Pharm Sci.* 18(4), 45-57.

Badyal DK, Dadhich AP. (2001) Cytochrome P450 and drug interactions. *Indian Journal of Pharmacology* 33, 239-51.

Bailey DG, Spence JD, Edgar B, Bayliff CD. (1989) Ethanol enhances the hemodynamic effects of felodipine. *Clin Invest Med.* 12(6), 357-362.

Bailey DG, Arnold JM, Munoz C, Spence JD (1993) Grapefruit juice –felodipine interaction: mechanism, predictability and effect of naringin. *Clin Pharmacol Ther.* 53, 637-642.

Bibi Z. (2008) Role of cytochrome P450 in drug interactions. *Nutr Metab*. 5, 27.

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

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

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

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

Hu Z, Yang X, Ho PCL, Chan SY, Heng PWS, Chan E, Duan W, Koh1 HL and Zhou S. (2005) Herb-Drug Interactions: A Literature Review. *Drugs.* 65 (9): 1239-1282

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

Hukkinen SK, Varhe A, Olkkola KT, Neuvonen PJ. (1995) Plasma concentrations of triazolam are increased by concomitant ingestion of grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther.* 58(2), 127-131.

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

Izzo A and Ernst E. (2009) Interactions Between Herbal Medicines and Prescribed DrugsAn Updated Systematic Review. *Drugs* 69 (13): 1777-1798

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

Kimura Y, Ito H, Ohnishi R, Hatano T. (2010) Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity. *Food and Chemical Toxicology* 48, 429–435

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.

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

Michalets EL. (1998) Update: clinically significant cytochrome P450 drug interactions. *Pharmacotherapy* 18, 84-112.

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

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

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

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.

Salminena KA, Meyerb A, Jerabkovaa L, Korhonena LE. Rahnastoa M, Juvonena RO, Immingb P, Raunioa H. (2010) Inhibition of human drug metabolizing cytochrome P450 enzymes by plant isoquinoline alkaloids *Phytomedicine*

Sikka R, Magauran B, Ulrich A, Shannon M, (2005) Bench to Bedside: Pharmacogenomics, Adverse Drug Interactions, and the Cytochrome P450 System. *ACAD EMERG MED* 12(12), 1227-35.

Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 270, 414–423

Song BJ (1996) Ethanol-inducible cytochrome P450: (CYP2E1): biochemistry, molecular biology and clinical relevance Up-Date. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 20(Suppl8):138A-146A.

Shui GH, Leong LP (2006) Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chem* 97:277-284.

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.

Yamazaki H, Nakamura m, Komatsu T, Ohyama K, Hatanaka N, Asahi S, Shimada N, Guengerich FP, Shimada T, Nakajima M, and Yokoi T. (2002). Roles of NADPH-P450 Reductase and Apo- and Holo-Cytochrome *b*5 on Xenobiotic Oxidations Catalyzed by 12 Recombinant Human Cytochrome P450s Expressed in Membranes of *Escherichia coli. Protein Expr Purif* 24, 329–337

Yuan R, Parmelee T, Balian JD, Uppoor RS *et al* (1999). *In vitro* metabolic interaction studies: experience of the Food and Drug Administration. *Clin Pharmacol Ther* 66, 9–15.

Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M. (2008) Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem.* 392(6), 1093-108.

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. หัวหน้าโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทรงกลด สารภูษิต

Songklod Sarapusit, Ph.D

หน่วยงาน ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ที่อยู่ 169 ถ. ลงหาดบางแสน ต. แสนสุข อ. เมืองฯ จ. ชลบุรี 20131

โทรศัพท์ 038-103-058 ต่อ 15

โทรสาร 038-393-495

อีเมลล์ songklod@buu.ac.th

สาขาวิชาการที่ชำนาญ การศึกษาสมบัติของโปรตีน และชีวเคมีของเอนไซม์ cytochrome P450 ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายยาในคน

ผลงานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (5 ปีย้อนหลัง)

1. Prasopthum, A., Pouyfung, P., Sarapusit, S., Srisook, E., & Rongnoparut, P. (2015). Inhibition effects of *Vernonia cinerea* active compounds against cytochrome P4502A6 and human monoamine oxidases, possible targets for reduction of tobacco dependence. *Drug Metabolisms and Pharmacokinetics*, *30*, 174-181
2. Kotewong, R., Duangkaew, P., Srisook, E., Sarapusit, S., Rongnoparut, P. (2014) Structure-function relationships of inhibition of mosquito cytochrome P450 enzymes by flavonoids of *Andrographispaniculata. Parasitology Research.* 113(9), 3381-3392
3. Pouyfung, P., Prasopthum, A., Sarapusit, S., Srisook, E., Rongnoparut, P. (2014). Mechanism-based-Inactivation of Cytochrome P450 2A6 and 2A13 by Rhinacanthus nasutus Constituents. *Drug Metab Pharmacokinet.* 29(1): 75-82
4. Wongsri, T., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. (2014) Inhibition of cytochrome P450 3A4 by Thai herbal teas and fruit juices. *Burapha Science Journal*. *19(3):* 6-12. (T-JIF = 0.069/2554)
5. Anantakul, J., Thongjam, S., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. (2014) Effect of medicinal folk plants from Ban-Ang-Ed official Community Forest Project (The Chaipattana Foundation) on the cytochrome P450 2A6 enzyme. *Burapha Science Journal*. *19(3):* 185-190.
6. Insee, A., Rongnoparut, P., Duangkaew, P., Sarapusit, S. (2014) Inhibition of the tobacco-specific nitrosamine metabolizing cytochrome P450 2A13 by some plants from Eastern Thailand. In Proceeding of the 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty 2014, (pp. 338-342) Phuket, Thailand
7. Anantakul, J., Wongsri, T., Thongjam, S., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. (2014) Inhibitory effects of medicinal folk plants from Ban-Ang-Ed Official Community Forest Project (The Chaipattana Foundation) on drug-metabolizing cytochrome P450 3A4 and 2C9 enzymes. In Proceeding of the 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty 2014, (pp. 348-352) Phuket, Thailand
8. Wongsri, T., Thongjam, S., Rongnoparut, P., Duangkaew, P., Sarapusit, S. (2014) *Inhibition studies of Cytochrome P450 2A by Vernonia cinerea Less and Carthamas tinctorius L. extracts. In Proceeding of the 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty 2014,* (pp. 343-347) Phuket, Thailand
9. Insee, A., Thongjam, S., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. *Effect of medicinal folk plants from Ban-Ang-Ed official Community Forest Project (The Chaipattana Foundation) on the*

cytochrome P450 2A13 enzyme. In Proceeding of the 6th Science Research Conference 2014 (pp. BI328-333) Chon Buri, Burapha University

10. Sarapusit S, Lertkeitmongkol P, Duangkeaw P, and Rongnoparut P (2013) Modeling of *Anopheles minimus* mosquito NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase (CYPOR) and mutagenesis analysis: Insight into unique enzymatic properties. *Int. J. Mol. Sci. 14*(1), 1788-1801
11. Prasopthum, A., Sarapusit, S., Rongnoparut, P (2013) *Carthamus tinctorius* as a source of potent inhibitors of Human Cytochrome P450 2A13. *In Proceeding of the 6th Thailand-Japan International Academic Conference 2013* (pp. 70-74) Ozaka, Japan.
12. Pouyfung, P., **Sarapusit, S.,** Rongnoparut P. (2013) Time- and NADPH-dependent inactivation of human CYP2A6 by *Averrhoa carambola* fruit. *In Proceeding of the 6th Thailand-Japan International Academic Conference 2013* (pp. 151-155) Ozaka, Japan.
13. Thongjam, S., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. (2013). Inhibition of The Human Cytochrome P450 2A6, The Nicotine Metabolising Enzyme by *Pluchea indica* Extract. *In Proceedings of the 5th Science ResearchConference* (pp.BIO214-217) Payao: University of Payao, Thailand
14. Kornathorn, C., Photon, P., Printawrangkul, C., Sootanun, P., Sarapusit, S (2013). Genetic Relatedness of Lamp Shell (*Lingula ungunis*) in Thailand. *In Proceedings of the 5th Science Research Conference* (pp.BIO54-58) Payao: University of Payao, Thailand
15. Sarapusit S, Rongnoparut P, Thongjam S. (2012) " *Vernonia cinerrea* tea is strongly inhibit the human cytochrome P4502A6, the nicotine metabolizing enzyme": The 5th Thailand-Japan International Academic Conference 2012, Tokyo, Japan
16. Pouyfung P, Sarapusit S, Rongnoparut P. (2012) Inhibition of Human cytochrome P4502A6 by star fruit (*Averrhoa carambola* L.) In Proceeding of The 38th Congress on Science and Technology of Thailand, ChiangMai, Thailand
17. Prasopthum A, Sarapusit S, Rongnoparut P. (2012) Inhibition screening of Human cytochrome P4502A13 by Thai herbs and fruits. The 38th Congress on Science and Technology of Thailand**,** ChiangMai, Thailand
18. Pet-huan S, Duangkaew P, Sarapusit S, Srisook E, Rongnoparut P (2012) Inhibition against Mosquito Cytochrome P450 enzymes by Rhinacanthin-A, -B, and -C elicits synergism on Cypermethrin cytoxicity in *Spodoptera frugiperda* Cells. Journal of Medical Entomology. 49 (5): 993-1000.
19. Sarapusit S**.** Thongjam S. (2012) The mosquito NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase (CYPOR): Structure and implement for safety insecticidal synergistic application. Burapha University International Conference 2012, Pattya, Thailand

1.2 ผู้ร่วมงานวิจัย

	รองศาสตราจารย์ ดร. พรพิมล รงค์นพรัตน์
	Pornpimol Rongnoparut, Ph.D.
สถานที่ติดต่อ	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
	272 ถ. พระรามที่ 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์	02-201-5453
โทรสาร	02-354-7174
อีเมลล์	scprn@mahidol.ac.th
สาขาวิชาการที่ชำนาญ	อณูชีววิทยาและชีวเคมีของเอนไซม์ cytochrome P450

ผลงานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (5 ปีย้อนหลัง)

1. Prasopthum, A., Pouyfung, P., Sarapusit, S., Srisook, E., & Rongnoparut, P. (2015). Inhibition effects of *Vernonia cinerea* active compounds against cytochrome P4502A6 and human monoamine oxidases, possible targets for reduction of tobacco dependence. *Drug Metabolisms and Pharmacokinetics*, *30*, 174-181
2. Kotewong, R., Duangkaew, P., Srisook, E., Sarapusit, S., Rongnoparut, P. (2014) Structure-function relationships of inhibition of mosquito cytochrome P450 enzymes by flavonoids of *Andrographispaniculata. Parasitology Research.* 113(9), 3381-3392
3. Pouyfung, P., Prasopthum, A., Sarapusit, S., Srisook, E., Rongnoparut, P. (2014). Mechanism-based-Inactivation of Cytochrome P450 2A6 and 2A13 by Rhinacanthus nasutus Constituents. *Drug Metab Pharmacokinet.* 29(1): 75-82
4. Wongsri, T., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. (2014) Inhibition of cytochrome P450 3A4 by Thai herbal teas and fruit juices. *Burapha Science Journal*. *19(3):* 6-12. (T-JIF = 0.069/2554)
5. Anantakul, J., Thongjam, S., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. (2014) Effect of medicinal folk plants from Ban-Ang-Ed official Community Forest Project (The Chaipattana Foundation) on the cytochrome P450 2A6 enzyme. *Burapha Science Journal*. *19(3):* 185-190.
6. Insee, A., Rongnoparut, P., Duangkaew, P., Sarapusit, S. (2014) Inhibition of the tobacco-specific nitrosamine metabolizing cytochrome P450 2A13 by some plants from Eastern Thailand. In Proceeding of the 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty 2014, (pp. 338-342) Phuket, Thailand
7. Anantakul, J., Wongsri, T., Thongjam, S., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. (2014) Inhibitory effects of medicinal folk plants from Ban-Ang-Ed Official Community Forest Project (The Chaipattana Foundation) on drug-metabolizing cytochrome P450 3A4 and 2C9 enzymes. In Proceeding of the 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty 2014, (pp. 348-352) Phuket, Thailand
8. Wongsri, T., Thongjam, S., Rongnoparut, P., Duangkaew, P., Sarapusit, S. (2014) *Inhibition studies of Cytochrome P450 2A by Vernonia cinerea Less and Carthamas tinctorius L. extracts. In Proceeding of the 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty 2014,* (pp. 343-347) Phuket, Thailand
9. Insee, A., Thongjam, S., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. *Effect of medicinal folk plants from Ban-Ang-Ed official Community Forest Project (The Chaipattana Foundation) on the cytochrome P450 2A13 enzyme. In Proceeding of the 6th Science Research Conference 2014* (pp. BI328-333) Chon Buri, Burapha University

10. Sarapusit S, Lertkeitmongkol P, Duangkeaw P, and Rongnoparut P (2013) Modeling of *Anopheles minimus* mosquito NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase (CYPOR) and mutagenesis analysis: Insight into unique enzymatic properties. *Int. J. Mol. Sci. 14*(1), 1788-1801
11. Prasopthum, A., Sarapusit, S., Rongnoparut, P (2013) *Carthamus tinctorius* as a source of potent inhibitors of Human Cytochrome P450 2A13. *In Proceeding of the 6th Thailand-Japan International Academic Conference 2013* (pp. 70-74) Ozaka, Japan.
12. Pouyfung, P., **Sarapusit, S.,** Rongnoparut P. (2013) Time- and NADPH-dependent inactivation of human CYP2A6 by *Averrhoa carambola* fruit. *In Proceeding of the 6th Thailand-Japan International Academic Conference 2013* (pp. 151-155) Ozaka, Japan.
13. Thongjam, S., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. (2013). Inhibition of The Human Cytochrome P450 2A6, The Nicotine Metabolising Enzyme by *Pluchea indica* Extract. *In Proceedings of the 5th Science ResearchConference* (pp.BIO214-217) Payao: University of Payao, Thailand.
14. Kornathorn, C., Photon, P., Printawrangkul, C., Sootanun, P., Sarapusit, S (2013). Genetic Relatedness of Lamp Shell (*Lingula ungunis*) in Thailand. *In Proceedings of the 5th Science Research Conference* (pp.BIO54-58) Payao: University of Payao, Thailand
15. Sarapusit S, Rongnoparut P, Thongjam S. (2012) " *Vernonia cinerrea* tea is strongly inhibit the human cytochrome P4502A6, the nicotine metabolizing enzyme": The 5th Thailand-Japan International Academic Conference 2012, Tokyo, Japan
16. Pouyfung P, Sarapusit S, Rongnoparut P. (2012) Inhibition of Human cytochrome P4502A6 by star fruit (*Averrhoa carambola* L.) In Proceeding of The 38th Congress on Science and Technology of Thailand, ChiangMai, Thailand
17. Prasopthum A, Sarapusit S, Rongnoparut P. (2012) Inhibition screening of Human cytochrome P4502A13 by Thai herbs and fruits. The 38th Congress on Science and Technology of Thailand, ChiangMai, Thailand
18. Pet-huan S, Duangkaew P, Sarapusit S, Srisook E, Rongnoparut P (2012) Inhibition against Mosquito Cytochrome P450 enzymes by Rhinacanthin-A, -B, and -C elicits synergism on Cypermethrin cytoxicity in *Spodoptera frugiperda* Cells. Journal of Medical Entomology. 49 (5): 993-1000.
19. Sarapusit S, Thongjam S. (2012) The mosquito NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase (CYPOR): Structure and implement for safety insecticidal synergistic application. Burapha University International Conference 2012, Pattya, Thailand

1.3 ผู้ร่วมโครงงานวิจัย อ. ดร. ปณิดา ดวงแก้ว
Panida Duangkaew, Ph.D.
สถานที่ติดต่อ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร
วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี
อีเมลล์ panida.d@su.ac.th
สาขาวิชาการที่ชำนาญ อณูชีววิทยาและชีวเคมีของเอนไซม์ cytochrome P450

ผลงานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (5 ปีย้อนหลัง)

1. Kotewong, R., Duangkaew, P., Srisook, E., Sarapusit, S., Rongnoparut, P. (2014) Structure-function relationships of inhibition of mosquito cytochrome P450 enzymes by flavonoids of *Andrographispaniculata. Parasitology Research.* 113(9), 3381-3392
2. Insee, A., Rongnoparut, P., Duangkaew, P., Sarapusit, S. (2014) Inhibition of the tobacco-specific nitrosamine metabolizing cytochrome P450 2A13 by some plants from Eastern Thailand. In Proceeding of the 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty 2014, (pp. 338-342) Phuket, Thailand
3. Wongsri, T., Thongjam, S., Rongnoparut, P., Duangkaew, P., Sarapusit, S. (2014) *Inhibition studies of Cytochrome P450 2A by Vernonia cinerea Less and Carthamas tinctorius L. extracts. In Proceeding of the 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty 2014,* (pp. 343-347) Phuket, Thailand
4. Sarapusit S, Lertkeitmongkol P, Duangkeaw P, and Rongnoparut P (2013) Modeling of *Anopheles minimus* mosquito NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase (CYPOR) and mutagenesis analysis: Insight into unique enzymatic properties. *Int. J. Mol. Sci. 14*(1), 1788-1801
5. Pet-huan S, Duangkaew P, Sarapusit S, Srisook E, Rongnoparut P (2012) Inhibition against Mosquito Cytochrome P450 enzymes by Rhinacanthin-A, -B, and -C elicits synergism on Cypermethrin cytoxicity in *Spodoptera frugiperda* Cells. Journal of Medical Entomology. 49 (5): 993-1000.