



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชต่อเอนไซม์ Cytochrome P450 2A6 ที่ย่อยสลายนิโคติน
และผลกระทบต่อเอนไซม์ cytochrome P450 ในตับ

Study of compounds from Thai medicinal plants in inhibition against
the human cytochrome P450 2A6, nicotine-metabolizing enzyme, and their
effects toward human hepatic cytochrome P450 monooxygenases

โดย

ผศ.ดร.ทรงกลด สารภูษิต

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

รศ.ดร. พรพิมล รงคินพรัตน์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผศ. ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ดร. ปณิดา ดวงแก้ว

คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี

วันวิสาข เนตรเรืองแสง

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐

มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชต่อเอนไซม์ Cytochrome P450 2A6 ที่ย่อยสลายนิโคติน
และผลกระทบต่อเอนไซม์ cytochrome P450 ในตับ

Study of compounds from Thai medicinal plants in inhibition against
the human cytochrome P450 2A6, nicotine-metabolizing enzyme, and their
effects toward human hepatic cytochrome P450 monooxygenases

โดย

ผศ.ดร.ทรงกลด สารภูษิต

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

รศ.ดร. พรพิมล รงค์นพรัตน์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผศ. ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

อ. ดร. ปณิตา ดวงแก้ว

คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี

วันวิสาขี เนตรเรืองแสง

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง “การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชต่อเอนไซม์ Cytochrome P450 2A6 ที่ย่อยสลายนิโคตินและผลกระทบต่อเอนไซม์ cytochrome P450 ในตับ” สามารถมีผลการทดลองที่ก้าวหน้ามาจนได้เสร็จสมบูรณ์เป็นรายงานฉบับนี้ ต้องขอขอบคุณการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐ มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา ๑๓/๒๕๖๐ ซึ่งผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ นอกจากนี้แล้วผู้วิจัยขอขอบคุณนิสิต-นักศึกษาทุกคนที่ช่วยทำการทดลอง รวมถึงคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลที่ให้ความสนับสนุนด้านสถานที่และเครื่องมือต่างๆในการทำการทดลอง

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชต่อเอนไซม์ Cytochrome P450 2A6 ที่ย่อยสลายนิโคตินและผลกระทบต่อเอนไซม์ cytochrome P450 ในตับ

ชื่อผู้วิจัย ทรงกลด สารภูษิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
พรพิมล รงค์นพรัตน์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
เอกรัฐ ศรีสุข ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ปณิดา ดวงแก้ว คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร
วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี
วันวิสาข์ เนตรเรืองแสง ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี

ปัญหาโรคระบบทางเดินหายใจอันเนื่องมาจากการสูบบุหรี่ โดยเฉพาะโรคมะเร็งปอด ถือเป็นหนึ่งในปัญหาที่สำคัญของประเทศไทย โดยเอนไซม์ CYP2A6 ในตับที่ย่อยสลายนิโคตินก่อให้เกิดการเสพติดการสูบบุหรี่ ดังนั้นการลดการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 จึงเป็นเป้าหมายในการรักษาอาการเสพติดบุหรี่และลดโอกาสเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งปอด โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความจำเพาะในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของสารสกัดจากสมุนไพรรักชุนดอกขาว ที่เคยมีรายงานว่าออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีในหลอดทดลอง โดยใช้ human liver microsome (HLM) และตรวจสอบการยับยั้งของเอนไซม์ทั้งหมดในครั้งเดียว ผลการศึกษาพบว่าสารสำคัญในกลุ่มฟลาโวนอยด์ชื่อ chrysoeriol จากรักชุนดอกขาว ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP1A2 ที่กระตุ้นสารก่อมะเร็งได้ดีด้วยกลไกแบบผันกลับได้ (IC_{50} 4.56 ± 0.72 และ $6.12 \pm 1.61 \mu M$ ตามลำดับ) แต่สามารถยับยั้งเอนไซม์ cytochrome P450 อื่นๆได้ด้วย ในขณะที่ hirsutinolide-type sesquiterpene lactones (5-7) ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2D6 ด้วยกลไกแบบผันกลับไม่ได้และผันกลับได้ (IC_{50} 10-23 และ 20-40 μM ตามลำดับ) แต่ไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ cytochrome P450 อื่นๆ น่าจะเหมาะสมในการนำมาใช้ช่วยลดการสูบบุหรี่โดยไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ cytochrome P450 ในการย่อยสลายยารักษาโรคชนิดต่างๆได้อย่างยั่งยืน

Abstract

Project Title Study of compounds from Thai medicinal plants in inhibition against the human cytochrome P450 2A6, nicotine-metabolizing enzyme, and their effects toward human hepatic cytochrome P450 monooxygenases

Investigators

Songklod Sarapusit, Ph.D, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Burapha University
Pornpimol Rongnoparut, Ph.D, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University
Ekaruth Srisook, Ph.D, Department of Chemistry, Faculty of Science, Burapha University
Panida Duangkaew, Ph.D, Silpakorn University Phetchaburi IT campus
Wanvisa Neadruengsang, M.Sc, Regional Medical Center, Chon Buri

Cigarette smoking is one of the major causes of various tobacco-associated respiratory diseases including lung cancer. The human cytochrome P450 CYP2A6 are responsible for nicotine metabolisms and smoking addiction. Therefore, inhibition of these enzymes is an important therapeutic target in smoking cessation and lung cancer prevention. This study aims to characterize the specificity of inhibition of the active constituents from *Vernonia cinerea* that have been reported to potentially inhibit CYP2A6 enzyme *in vitro*. The P450 cocktail assay was developed to measure the inhibition of all cytochrome P450 enzymes in human liver microsome (HLM). The results showed that the active flavonoids, chrysoeriol, could potentially inhibit both CYP2A6 and the carcinogenic activation CYP1A2 enzymes with reversible mode of inhibition (IC_{50} values of 4.56 ± 0.72 and $6.12 \pm 1.61 \mu\text{M}$, respectively). However, this compound could efficiently inhibit other CYPs enzymes. In contrast, hirsutinolide-type sesquiterpene lactones (5-7) could irreversibly inhibit CYP2A6 and reversibly inhibit CYP2D6 enzymes (IC_{50} values of 10 - 23 and 20 - 40 μM , respectively) with high specificity. Thus, hirsutinolide-type sesquiterpene lactones (5-7) could be a promising therapeutic target for smoking cessation with less herb-drug interaction side effects.

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันประชากรทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย มีแนวโน้มที่จะป่วยและเสียชีวิตจากโรคเรื้อรังเช่น โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจและหลอดเลือด และโรคต่างๆ อันเนื่องมาจากการสูบบุหรี่มากขึ้น ซึ่งเป็นปัญหาเร่งด่วนที่ควรได้รับการแก้ไขและหาแนวทางป้องกัน เพราะเป็นโรคอันตรายที่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาด้วยยาต่างๆสูง ทำให้ในปัจจุบันจึงมีผู้นิยมบริโภคอาหารเสริมสุขภาพชนิดต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารเสริมที่ทำมาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่เป็นพืชสมุนไพรต่างๆมากขึ้น โดยมีความเชื่อว่าสามารถป้องกัน ช่วยลดหรือชะลออาการเจ็บป่วยและช่วยในการลดการสูบบุหรี่ได้ อย่างไรก็ตามเมื่อรับประทานยารักษาโรคเรื้อรังต่างๆ ยาจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายและถูกย่อยสลายหรือกระตุ้นด้วยเอนไซม์ในกลุ่ม Cytochrome P450 (P450s) ที่ดับเป็นกลไกหลัก โดยเฉพาะเอนไซม์ CYP3A4 CYP2C9 CYP2D6 และ CYP1A2 ที่เป็นเอนไซม์ P450s ที่พบมาก (รวมประมาณ 82%) ของปริมาณเอนไซม์ P450s ทั้งหมดในตับที่ทำหน้าที่หลักในการย่อยสลายยารักษาโรคต่างๆ ในทางเดียวกัน ในผู้ที่สูบบุหรี่สารนิโคตินจากบุหรี่จะเข้าสู่กระแสเลือดและถูกย่อยสลายเพื่อกำจัดออกจากร่างกายโดยเอนไซม์ cytochrome P4502A6 (CYP2A6) ในตับที่ทำหน้าที่หลักในการย่อยสลายนิโคตินในบุหรี่ และเกี่ยวข้องกับพฤติกรรมกรรมการติดการสูบบุหรี่ของผู้สูบบุหรี่

เนื่องจากสารสำคัญในพืชสมุนไพรหลายชนิด เมื่อรับประทานร่วมกับยารักษาโรคที่ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ในกลุ่ม P450s ในตับที่ทำหน้าที่หลักในการย่อยสลายยา มักก่อให้เกิดอาการข้างเคียงจากยา (adverse drug effects) ทำให้อาการโรคเรื้อรังนั้นๆรุนแรงมากขึ้น เพราะเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Cytochrome P450 ต่างๆที่ทำปฏิกิริยากับยาที่รับประทานเข้าไปเพื่อรักษาโรค ทำให้ยาที่รับประทานเข้าไปถูกย่อยสลาย (กำจัดทิ้งออกจากร่างกาย) ช้าลงและเกิดผลข้างเคียงได้ ในทางตรงกันข้ามการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ที่ย่อยสลายนิโคติน ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลายนิโคตินลดลง คงระดับนิโคตินในเลือดให้อยู่ยาวนานขึ้น จึงช่วยยืดระยะเวลาที่จะสูบบุหรี่มวนถัดไปให้นานขึ้นและเลิกบุหรี่ได้ง่ายขึ้น ด้วยเหตุนี้การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งของเอนไซม์ CYP2A6 CYP3A4 CYP2C9 CYP2D6 และ CYP1A2 ของพืชสมุนไพรไทยต่างๆที่นิยมรับประทานในปัจจุบัน จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญเพื่อนำไปใช้เพื่อลดอัตราการเกิดผลกระทบบางๆ ที่อาจเกิดขึ้นในขณะรับประทานยาและสามารถนำไปใช้ในการช่วยลดการสูบบุหรี่ได้อย่างปลอดภัย ป้องกันผลข้างเคียงต่างๆ อันอาจเกิดขึ้นจากการใช้สมุนไพรไทยในการลดการสูบบุหรี่ ที่ไปส่งผลต่อเอนไซม์ P450s อื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายยาได้อย่างปลอดภัย

ในการศึกษาครั้งนี้ในขั้นต้นผู้วิจัยนำสารสำคัญจากหญ้าดอกขาวที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ที่ได้จากการศึกษาในปีที่ 1 (ปีงบประมาณ 2559) มาทำการศึกษาความจำเพาะในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cytochrome P450 อื่นๆในเซลล์ตับ เพื่อเป็นข้อมูลถึงความปลอดภัยในการนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 มาใช้ช่วยลดการสูบบุหรี่โดยไม่มีผลกระทบบางเคียงต่อการทำงานของเอนไซม์ cytochrome P450 ในการย่อยสลายยารักษาโรคชนิดต่างๆได้อย่างยั่งยืน นอกจากนี้กระบวนการและเทคนิคต่างๆที่ได้จากผลการศึกษาจะถูกนำมาใช้ในการศึกษาผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์อื่นต่อการย่อยสลายยาที่ใช้ในการรักษาโรคเรื้อรังต่างๆ และจะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการเฝ้าระวังผลกระทบบางเคียงจากยารักษาโรค (Herb-drug interaction; HDI) ต่อไปได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย (ในปีที่สอง)

ศึกษาความจำเพาะและกลไกในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทย

1.3 สมมติฐานของการทดลอง

มีสารสำคัญจากสมุนไพรห้าดอกขาวออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้อย่างจำเพาะ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทดลอง

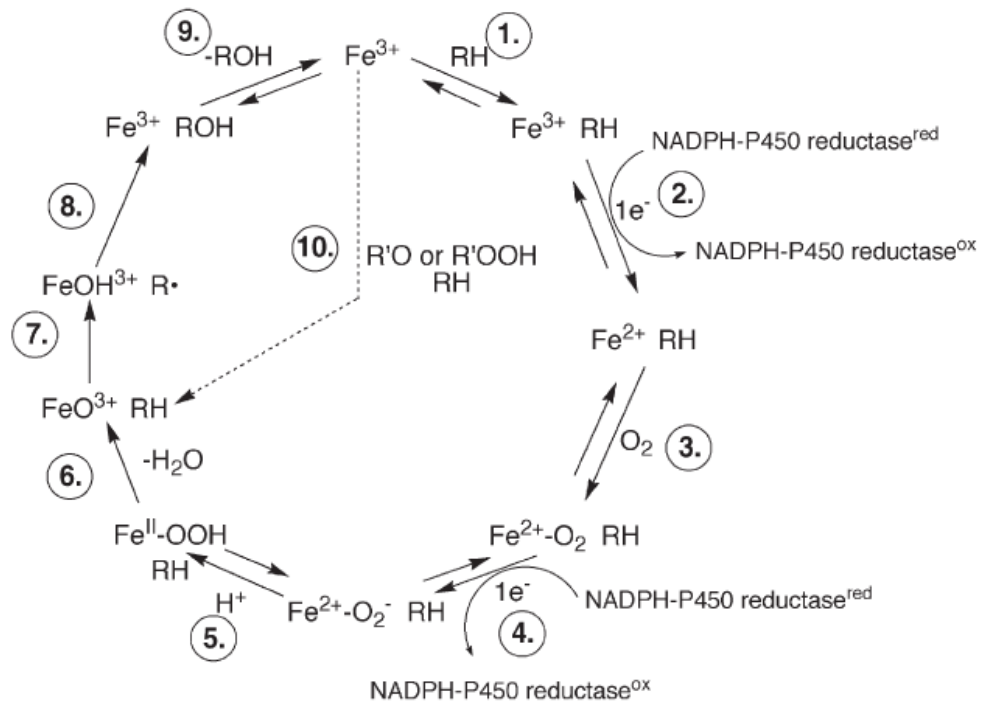
ได้ทราบกลไกในการยับยั้งของสารสำคัญจากสมุนไพรห้าดอกขาวและสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมเพื่อลดการสูบบุหรี่ต่อไปได้

บทที่ 2

บททวนวรรณกรรม

2.1 ทฤษฎีพื้นฐานที่เกี่ยวข้อง

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

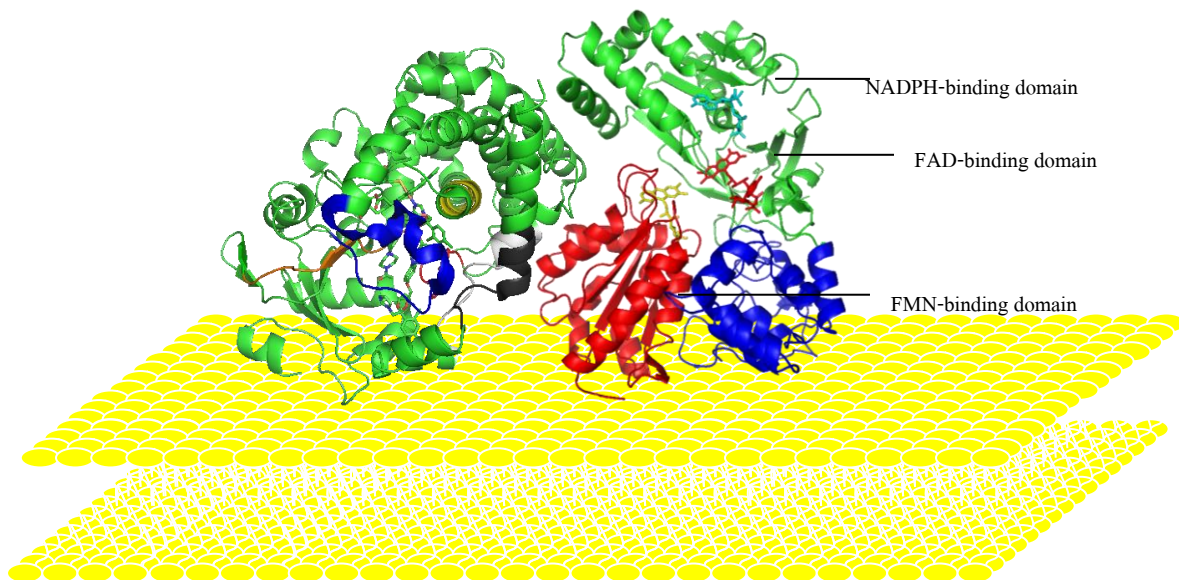


ภาพที่ 2-1 ปฏิกิริยาของเอนไซม์ P450s โดยแบ่งออกเป็นขั้นตอนการกระตุ้นโมเลกุลของออกซิเจน (ขั้นตอนที่ 1-6) การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (ขั้นตอนที่ 7 และ 8) และการปล่อยผลิตภัณฑ์ (ขั้นตอนที่ 9) ที่มา Guengerich FG, 2001

ในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ P450s นั้น (ภาพที่ 2-1) เอนไซม์ P450s จะต้องได้รับอิเล็กตรอนที่ส่งผ่านมาจาก เอนไซม์ NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR) โดยที่อิเล็กตรอนตัวแรกจะรีดิวซ์เหล็ก (Fe^{3+} เป็น Fe^{2+}) ที่เป็นส่วนประกอบหนึ่งของเอนไซม์ P450s เพื่อให้เอนไซม์ P450s สามารถจับกับออกซิเจนได้ ส่วนตัวอิเล็กตรอนตัวที่สองจะกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในโมเลกุลของออกซิเจนให้เกิดเป็นสารประกอบ

ไอออนไฮดรอกซิล (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

เอนไซม์ CPR เป็นเอนไซม์ที่มีส่วนจับกับเยื่อหุ้มเมมเบรนและประกอบด้วยโมเลกุลของ FAD และ FMN ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ช่วยในการขนส่งอิเล็กตรอน โดยอิเล็กตรอนจะถูกขนส่งจาก NADPH ผ่านโมเลกุลของ FAD และ FMN ไปยังตัวรับอิเล็กตรอนดังที่กล่าวในเบื้องต้น เนื่องจากเอนไซม์ 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 NH₂-terminal, FMN-binding domain, FAD-binding domain, และ NADPH-binding domain (Wang et al., 1997) โดยส่วน FMN domain จะแยกออกมาให้เห็นเด่นชัด ในขณะที่ส่วน FAD-binding domain และ NADPH-binding domain จะอยู่รวมกัน (ภาพที่ 2-2)



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

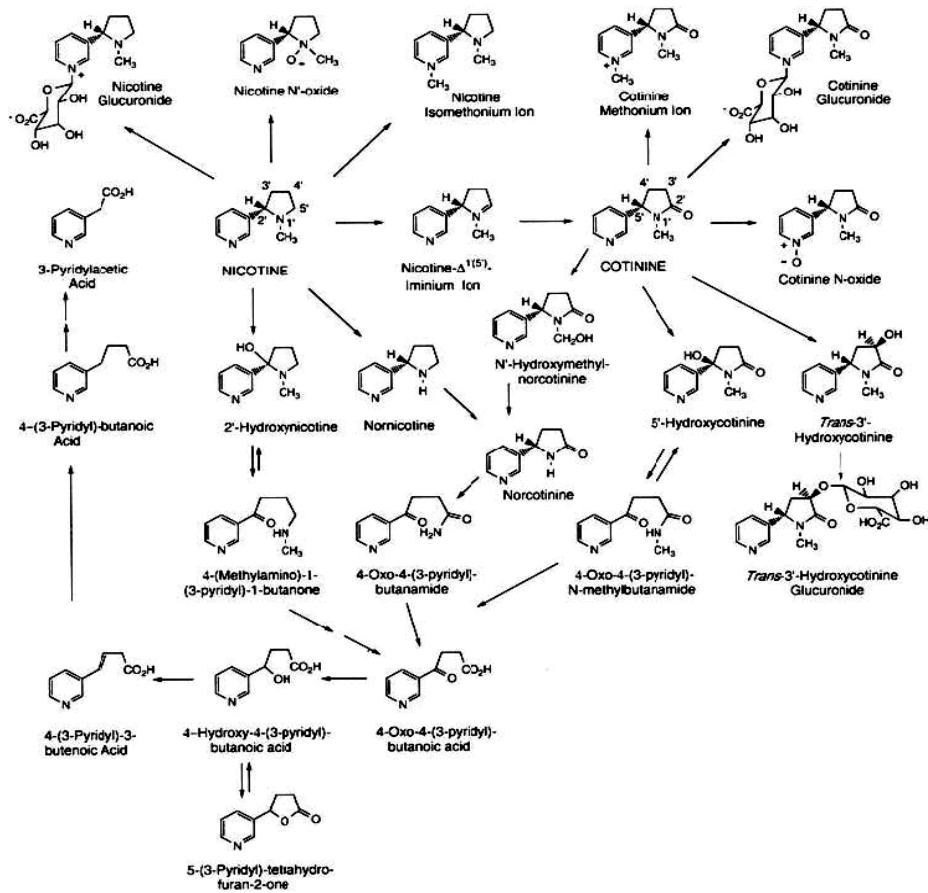
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคในระบบทางเดินหายใจจากการสูบบุหรี่ โดยเฉพาะโรคมะเร็งปอดและโรคถุงลมโป่งพองจัดเป็นปัญหาสำคัญในหลายประเทศทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย จากการคาดการณ์ขององค์การอนามัยโลก (WHO) คาดว่าในปี พ.ศ. 2573 จะมีผู้เสียชีวิตด้วยโรครดังกล่าวถึง 8 ล้านคน (WHO, 2008) สำหรับประเทศไทย ในปี 2549 มีการประมาณการว่าโรกระบบทางเดินหายใจจากการติดบุหรี่ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจถึง 9.86 ล้านบาท (Bundhamcharoen, 2012) ล่าสุดจากผลการสำรวจในปี พ.ศ. 2554 พบว่ามีคนไทยสูบบุหรี่มากกว่า 11 ล้านคนหรือมากกว่า 21 % ของประชากรทั้งประเทศ โดยผู้สูบบุหรี่ส่วนใหญ่อยู่ในวัยทำงาน โดยที่อัตราการสูบบุหรี่เพิ่มขึ้นในกลุ่มเยาวชน กลุ่มผู้ไม่เคยเรียนหนังสือและผู้อาศัยอยู่นอกเขตเทศบาล รวมถึงผู้มีฐานะในระดับปานกลางทั่วไป โดยที่อัตราดังกล่าวยังคงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยมีเพียง 1.77 ล้านคนเท่านั้นที่

เคยและพยายามเลิกบุหรี่แต่ไม่สำเร็จโดยมีค่าเฉลี่ยของการเลิกบุหรี่ได้ก่อนกลับมาสูบบุหรี่ซ้ำคือ 11.44 เดือน ทั้งนี้สาเหตุเกิดจากการหงุดหงิด/ฉุนเฉียว/โกรธง่าย ถึงร้อยละ 38.61 และเพราะความเครียดร้อยละ 27.42 และพบว่าถึงแม้เลิกบุหรี่ไปแล้วถึง 20 ปีก็สามารถกลับมาสูบบุหรี่ได้อีก แสดงให้เห็นว่าการเสพติดบุหรี่เพียงหนึ่งครั้งส่งผลให้ต้องเสพติดบุหรี่และสามารถเลิกการเสพติดได้ยาก (ศิริวรรณ และคณะ 2555)

จากการศึกษาพบว่าบุหรี่ประกอบไปด้วยสารประกอบต่างๆมากมาย โดยที่มากกว่า 40 ชนิดเป็นสารพิษและสารก่อมะเร็ง ดังนั้นโรคทางเดินหายใจเช่น โรคหอบหืดและโรคถุงลมปอดโป่งพอง จึงเป็นโรคที่พบมากในกลุ่มผู้สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิด นอกจากนี้กลุ่มผู้สูบบุหรี่ยังเป็นกลุ่มเสี่ยงที่จะมีอาการของโรคหัวใจขาดเลือด โรคหัวใจวาย และโรคที่เกี่ยวข้องต่างๆ (WHO, 2008) อุบัติการณ์การเกิดโรคต่างๆเหล่านี้เกิดขึ้นเนื่องจากนิโคตินที่เป็นสารประกอบหลักในบุหรี่ ที่มีผลทำให้หัวใจเต้นเร็วขึ้นและเพิ่มความดันโลหิตขึ้น (Benowitz, 2008) นอกจากนี้นิโคตินยังเป็นสารประกอบสำคัญที่มีผลให้เสพติดการสูบบุหรี่โดยไปออกฤทธิ์กระตุ้นระบบการตอบสนองต่อความยินดี ผ่านการจับกับตัวรับนิโคตินที่บริเวณปลายประสาทของสมองส่วน VTA ทำให้เกิดการหลั่งสารสื่อประสาทโดปามีนออกมามากขึ้น มีผลทำให้ผู้สูบบุหรี่มีความรู้สึกสุขสบายใจและลดความเครียดต่างๆ ผู้สูบบุหรี่จึงสูบบุหรี่เพื่อคงระดับนิโคตินในกระแสเลือดและในสมองให้เกิดความรู้สึกมีความสุขต่อไป ส่งผลให้ผู้สูบบุหรี่และบุคคลใกล้เคียงได้รับสารพิษต่างๆ ในบุหรี่ไปด้วย (Hukkanen et al, 2005) โดยประมาณ 80-90% ของนิโคตินที่เข้าสู่ร่างกายผ่านทาง การดูดซึมที่เนื้อเยื่อคัตหลังที่ปาก ระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหาร จะถูกย่อยสลายโดยกลไกหลักด้วยเอนไซม์ CYP2A6 ในตับเกิดเป็นสารประกอบ nicotine $\Delta^{1(5)}$ -iminium ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นโคทีนินโดยเอนไซม์ aldehyde oxidase (Hukkanen et al, 2005) หลังจากนั้นโคทีนินที่เกิดขึ้นจะเกิดปฏิกิริยา hydroxylation ได้เป็นสารประกอบต่างๆ เช่น *trans*-3'-hydroxycotinine, 5'-hydroxycotinine และ nornicotine (ภาพที่ 2-3) ซึ่งสุดท้ายทั้งโคทีนินและสารประกอบที่ได้จากโคทีนินต่างๆ จะถูกเติมหมู่น้ำตาล (glucuronation) และขับออกทางปัสสาวะ (Benowitz, 2008; Flammang et al, 1992)

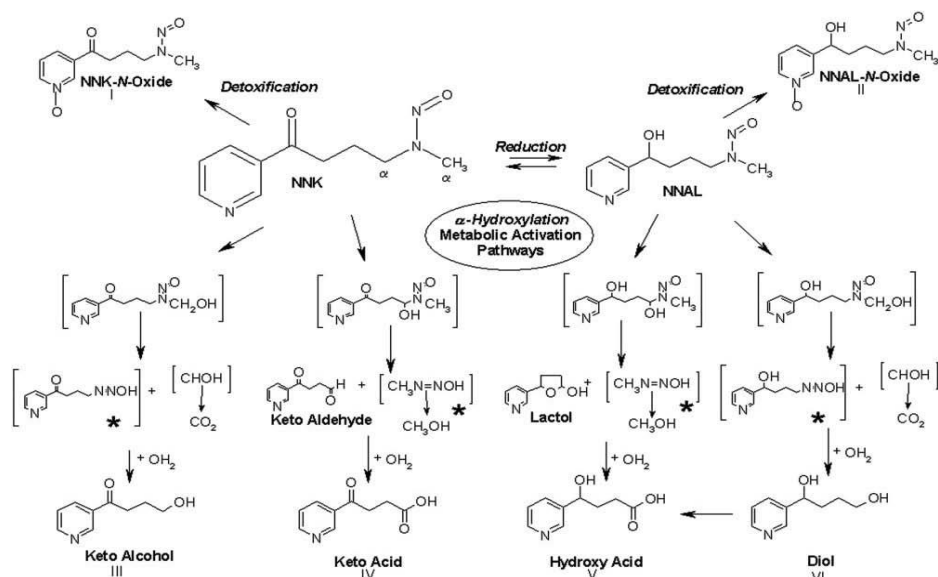
ในคนพบว่ามีเอนไซม์ P450 ถึง 18 กลุ่มและ 43 กลุ่ม โดยเอนไซม์ CYP2A6 ในตับที่สามารถย่อยสลายนิโคตินได้ดีด้วยค่าความสามารถในการจับกับสารตั้งต้น (K_m) ต่อนิโคตินที่ต่ำและอัตราการเร่งปฏิกิริยา (V_{max}) ที่สูง (Patten et al, 1996) CYP2A13 ที่พบในระบบทางเดินหายใจ CYP2B6 ที่พบในสมอง ลำไส้เล็กและไต CYP2D6 ที่พบในสมองและ CYP2E1 ที่พบในปอดและสมอง ถูกรายงานว่าสามารถย่อยสลายนิโคตินในคน (Hukkanen et al, 2002; Miksys et al, 2002; Su et al, 2000) อย่างไรก็ตามบทบาทของเอนไซม์ CYP2A13 ในระบบทางเดินหายใจต่อการย่อยสลายนิโคตินยังไม่ชัดเจน เพราะในผู้เสพติดบุหรี่ที่มีการทำงานของ CYP2A13 น้อย ยังคงมีโอกาสเกิดมะเร็งในระบบทางเดินหายใจสูง (Jiang et al, 2004) สำหรับเอนไซม์ CYP2B6 และ CYP2D6 ไม่ได้เป็นเอนไซม์หลักในการย่อยสลายนิโคติน เพราะคนที่มีการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองน้อย (poor metabolizer, PM) และดีมาก (extensive metabolizer, EM) มีอัตราการสลายนิโคตินและโคทีนินไม่ต่างกัน (Benowitz et al, 1996) ในขณะที่เอนไซม์ CYP2E1 เกี่ยวข้องกับการได้รับแอลกอฮอล์มากกว่านิโคติน แสดงให้เห็นว่า การย่อยสลายของนิโคตินที่ตับโดยเอนไซม์ CYP2A6 เป็นกระบวนการหลักของร่างกายในการกำจัดนิโคตินและการกระตุ้นการสูบบุหรี่ ซึ่งส่งผลเกี่ยวพันกับการเกิดโรคหอบหืดต่างๆในระบบทางเดินหายใจในผู้สูบบุหรี่



ภาพที่ 2-3 กลไกในการกำจัดนิโคติน (Hukkanen et al, 2005)

ในขณะที่เมื่อ NNK เข้าสู่ร่างกายจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ CYP2A13 ที่แสดงออกในปริมาณมากที่เนื้อเยื่อปอดและเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจได้เป็นสารประกอบ NNK-N-oxide และ NNAL ซึ่งจะถูกรีดออกซิไดส์อีกครั้งด้วย CYP2A13 เกิดเป็นสารประกอบ NNAL-N-Oxide (ภาพที่ 2-5) หรือถูกเติมหมู่น้ำตาลกลายเป็น NNAL-glucuronide จากนั้นสารประกอบทั้งหมดจะถูกกำจัดออกจากร่างกายทางปัสสาวะ อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ CYP2A13 สามารถเร่งปฏิกิริยา hydroxylation ที่หมู่ α -methyl carbon หรือ α -methylene carbon ของ NNK หรือ NNAL ได้เป็นสารประกอบ NNK-keto alcohol, NNK-Keto acid, NNAL-diol และ NNAL-Hydroxy acid (รูปที่ 2-4) ที่มีฤทธิ์เป็นสารก่อมะเร็งที่รุนแรงขึ้น (NNK-metabolic activation) จากนั้นสารประกอบที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยานี้จะสร้างเป็นสารประกอบซับซ้อนกับสารพันธุกรรมดีเอ็นเอเกิดเป็น 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) โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคมะเร็งต่างๆ ในระบบทางเดินหายใจ เช่นโรคมะเร็งปอด ชนิด adenocarcinoma และ squamous cell carcinoma ที่เป็นมะเร็งปอดที่มีความสามารถในการแพร่กระจายสูง (malignant pulmonary tumor) ไปสู่บริเวณต่างๆ ของปอดหรือแม้แต่วัยระอื่นๆ ได้ง่าย (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) นอกเหนือไปจากความสามารถในการย่อยสลายนิโคตินแล้ว เอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ยังถูกพบว่าสามารถย่อยสลายสารประกอบอื่นๆ ได้ เช่นสาร coumarin ไปเป็นผลิตภัณฑ์ 7-hydroxycoumarin (ปฏิกิริยา

coumarin-7-hydroxylase) ที่นิยมนำมาใช้เป็นตัวตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในหลอดทดลอง (Miles et al, 1990)



ภาพที่ 2-4 กลไกในการกระตุ้นสารก่อมะเร็งของเอนไซม์ CYP2A13 (Brown PJ, 2007)

จากการศึกษาในประชากรพบว่าเอนไซม์ CYP2A6 มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) ถึง 38 อัลลีลที่แตกต่างกัน (Koudsi et al, 2009) ซึ่งมีทั้งอัลลีลที่ทำงานผิดปกติหรือไม่สามารถย่อยนิโคตินได้และที่สามารถย่อยนิโคตินได้ดีเกินไป (Kamatiki et al, 2005) โดยที่ความหลากหลายในการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ส่งผลต่อการย่อยสลายนิโคตินและมีบทบาทที่สำคัญในการกำหนดพฤติกรรมการสูบบุหรี่ เช่นผู้สูบบุหรี่ที่ย่อยสลายนิโคตินน้อยจะสูบบุหรี่ต่อวันน้อยกว่าคนที่ย่อยสลายนิโคตินได้ดีและมีความเสี่ยงในการเสพติดนิโคตินน้อย ในทางตรงกันข้ามผู้สูบบุหรี่ที่มีการเพิ่มจำนวนยีน CYP2A6 หรือมีการย่อยสลายนิโคตินได้ดีมากจะมีการสูบบุหรี่มากกว่าคนปกติและมีโอกาสที่เป็นมะเร็งเนื่องจากการสูบบุหรี่มากกว่าปกติ (Schoedel et al, 2004; Sellers et al 2000; Tyndale & Sellers 2002) ที่น่าสนใจเป็นอย่างมากคือในผู้สูบบุหรี่ที่มีการขาดหายไปของยีน CYP2A6 จะมีอัตราเสี่ยงในการเป็นมะเร็งปอดน้อยมาก อย่างไรก็ตามไม่มีความสัมพันธ์ในกรณีผู้ไม่สูบบุหรี่ (Kamatiki et al, 2005; Miyamoto et al, 1999) สำหรับประเทศไทยพบว่าประชากรส่วนใหญ่เป็นบุคคลที่มีการทำงานของเอนไซม์ 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; Ujijin et al, 2002) ใกล้เคียงกับที่พบในประชากรของประเทศเกาหลีและญี่ปุ่น (Kamatiki et al, 2005; Yoshida et al, 2002; Kwon et al, 2001) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่ได้ศึกษาในรายละเอียดความสัมพันธ์ในการกระจายของความหลากหลายทางพันธุกรรมของ CYP2A6 อัลลีลต่างๆกับความสามารถในการย่อยสลายนิโคตินในผู้สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่

ในขณะที่เอนไซม์ CYP2A13 มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) อยู่ถึง 10 อัลลีลที่แตกต่างกัน โดยอัลลีล CYP2A13*4 ที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากอาร์จินีนเป็นกลูตามีนที่ตำแหน่ง 101 จะไม่เกิดปฏิกิริยาต่อสารตั้งต้น NNK เลย (Wang et al, 2006) เช่นเดียวกับอัลลีล CYP2A13*2 ที่มีการ

เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากอาร์จินีนเป็นซิสเตอีนที่ตำแหน่ง 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) สอดคล้องกับผลการศึกษาที่พบว่าการทำงานของ CYP2A13 ในการทำปฏิกิริยากับ NNK จะเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งปอดให้มากขึ้น (Chiang et al., 2011; Hecht, 1998; Zhang et al, 2002) แสดงให้เห็นว่าการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 มีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคมะเร็งปอดที่พบมากในผู้สูบบุหรี่และบุคคลใกล้ชิด

เนื่องด้วยการเสพติดบุหรี่จากนิโคตินเป็นสิ่งที่จำเป็นต้องได้รับการรักษาและโรคมะเร็งปอดที่เกิดจากสูบบุหรี่เป็นโรคอันตรายร้ายแรง ในปัจจุบันจึงมียาที่เป็นนิโคตินทดแทน (NRT) ต่างๆ ทั้งในรูปของนิโคตินหมากฝรั่งชนิดเคี้ยวหรือชนิดแผ่นติดผิวหน้ามาใช้ร่วมกับการบำบัดพฤติกรรมของผู้สูบบุหรี่ เพื่อช่วยในการบำบัดและช่วยให้ผู้สูบบุหรี่เลิกจากการสูบบุหรี่ อย่างไรก็ตามการบำบัดด้วยวิธีนี้ยังไม่ได้รับความนิยมเนื่องจากความไม่สะดวกในการใช้ ไม่มีประสิทธิภาพที่รวดเร็วและมีผลข้างเคียงต่างๆ (Sellers et al, 2003) อีกหนึ่งวิธีที่ใช้ในการบำบัดคือการใช้ยาที่ปลดการทำงานของตัวรับนิโคตินในสมองซึ่งจะส่งผลให้ลดอาการเสพติดนิโคตินลง เช่น ยาในกลุ่ม bupropion HCl และ varenicline ซึ่งเป็นยาในกลุ่มที่ใช้ก่อน (first-line drug) และยา nortriptyline และ clonidine ซึ่งเป็นยาในกลุ่มถัดไป (second-line drug) แต่ยาต่างๆเหล่านี้ให้ผลข้างเคียงกับผู้ใช้งาน โดย bupropion HCl ทำให้เกิดอาการนอนไม่หลับ ปากแห้ง มือสั่นและปวดศีรษะ (Carrozzi et al, 2008) ในขณะที่ varenicline ทำให้เกิดอาการอาเจียนและปวดหัว (Gonzalez et al, 2006; Jorenhy et al, 2006) ส่วนยา second-line drug จะทำให้เกิดอาการง่วงนอน อ่อนเพลีย มึนงง ความดันโลหิตสูง ตาพร่า หน้ามืด มือสั่น (Carrozzi et al, 2008) และเนื่องจากเอนไซม์ CYP2A6 มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายนิโคตินในคนและอัตราการเกิดโรคมะเร็งที่สืบเนื่องกับการสูบบุหรี่ ดังที่พบความสัมพันธ์ในผู้ที่มีการขาดหายของยีน CYP2A6 ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 จึงเป็นอีกหนึ่งวิธีทางเลือกในการช่วยบำบัดอาการเสพติดบุหรี่และลดอัตราการเกิดโรคมะเร็งทางเดินหายใจและโรคมะเร็งต่างๆได้ (Sellers et al, 2003)

แม้จะยังไม่มีการศึกษาสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 มากนัก แต่ในปัจจุบันมีสารหลายตัวที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้เช่น สาร methoxsalen (8-methoxypsoralen) ที่สามารถยับยั้งการย่อยสลายนิโคตินและยับยั้งการกระตุ้นการเกิดมะเร็งในหนู (Damaj et al, 2007; Miyazaki et al, 2005) เมื่อใช้ coumarin เป็นตัวตรวจสอบพบว่า 8-MOP ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยกลไกทั้งแบบแข่งขันที่ผันกลับได้ (competitive inhibition) และการยับยั้งกลไกการย่อยสลายแบบ mechanism-based inhibition (MBI-สารยับยั้งถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์แต่ผลิตภัณฑ์หรือตัวกลางที่เกิดขึ้นจับแน่นกับเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์หมดสภาพในการทำงาน) (Siu and Tyndale, 2007; von Weymarn et al, 2005) และเนื่องจากกลไกการยับยั้งแบบ MBI มีการสร้างพันธะโควาเลนต์ขึ้นระหว่างสารยับยั้งกับกรดอะมิโนบริเวณแอคทีฟของเอนไซม์ (active site) ทำให้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อย่างถาวรและต้องมีการสร้างเอนไซม์ใหม่ขึ้นมาแทนที่เอนไซม์ที่สูญเสียการทำงานไป ดังนั้นยา tranlycypromine และยา tryptamine ซึ่งมีกลไกการยับยั้งการทำงานแบบ competitive inhibition จึงมีประสิทธิภาพการทำงานที่ดีกว่า 8-MOP เนื่องจากประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ของยา tranlycypromine และยา tryptamine จะลดลงเมื่อได้รับสารตั้งต้นทั้ง coumarin และนิโคตินเพิ่ม นอกจากนี้การศึกษาเบื้องต้นในคนพบว่า 8-MOP สามารถลดการย่อยสลายนิโคตินและพบว่าสามารถลดการกำจัดนิโคตินออกจากร่างกายได้ (Sellers et al, 2000, 2003) โดยผู้สูบบุหรี่ที่ได้รับ 8-MOP หรือ tranlycypromine ร่วมกับการได้รับนิโคตินจะมีระดับของนิโคตินในกระแสเลือดเพิ่มขึ้นและลดการสูบบุหรี่ลง โดยเพิ่มระยะเวลาก่อนที่จะสูบบุหรี่มวนต่อไปให้ยาวนานขึ้น (sellers et al, 2000) แม้ในที่สุดจะพบว่าทั้ง 8-MOP หรือ tranlycypromine ส่งผลกระทบ

ข้างเคียงต่อผู้ใช้ทำให้ต้องระงับการใช้สารทั้งสอง แต่ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ในการย่อยสลายนิโคตินสามารถทำให้สูบบุหรี่น้อยลงได้ (Sellers et al, 2003; Siu and Tyndale, 2007) จึงได้มีการสร้างสารสังเคราะห์ต่างๆขึ้น (synthetic compounds) เพื่อนำมาใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 เช่นสารที่มีโครงสร้าง 3-heteroaromatic และ 3-aliphatic pyridine เป็นโครงสร้างหลักที่พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้อย่างจำเพาะเจาะจง (Yano et al, 2006) หรือสาร selegiline ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase ที่พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ด้วย (Siu and Tyndale, 2008) และสารสังเคราะห์ N1-(4-fluorophenyl) cyclopropane-1-carboxamide ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยเช่นกัน (Rahnasto et al, 2008)

เนื่องด้วยแนวโน้มในการรักษาโรครักษาที่นิยมใช้สารจากธรรมชาติ จึงได้มีการศึกษาโดยใช้ menthol ซึ่งเป็นสารแต่งกลิ่นในอาหาร ผสมลงในบุหรี่และพบว่าสามารถเพิ่มครึ่งชีวิตของสารโคตินินในกระแสเลือดในผู้สูบบุหรี่ผู้หญิงได้ (Ahijevych et al, 2002) เพราะ menthol มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ (MacDougall et al, 2003) นอกจากนี้ grapefruit ก็สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในการย่อยสลายสาร coumarin ได้เช่นเดียวกันแต่ไม่ดีเท่ากับการยับยั้งเอนไซม์ CYP3A4 ในขณะที่สารสกัด nootkatone บริสุทธิ์ที่สกัดจากส้มโอสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีแต่ไม่มีรายงานถึงความจำเพาะในการยับยั้ง (Merket et al, 1994; Runkel et al, 1997; Tassaneeyakul et al, 2000) รวมถึงสารสกัดจาก Kava และสารในกลุ่ม kavalactone สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 และ CYP2C9 ที่เกี่ยวกับการย่อยสลายสารแปลกปลอมภายนอกอื่นๆได้ดีกว่าเอนไซม์ CYP2A6 (Mathews et al, 2002) สารประกอบ isothiocyanate ในกลุ่มผักกะหล่ำก็มีประสิทธิภาพที่ต่ำในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และต้องถูกตัดแปลงในหลอดทดลองก่อนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งให้เพิ่มขึ้น (von Weymarn et al, 2007) เมื่อเปรียบเทียบกับ สาร decursinol angelate ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม pyranocoumarin ที่สกัดได้จากรากของ *Angelica gigas* ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้แบบ MBI (Yoo et al, 2007) แสดงให้เห็นว่าสารจากธรรมชาติมีสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ที่ดี ด้วยเหตุนี้สารสกัดจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานและจำเพาะต่อเอนไซม์ CYP2A6 โดยไม่มีผลข้างเคียงและไม่เป็นพิษต่างร่างกาย จึงเป็นหนึ่งในแนวทางเลือกที่สำคัญในการป้องกันการเสพติดบุหรี่ รวมถึงลดระดับการเป็นมะเร็งปอดทั้งในผู้สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิดต่อไป

จากผลการศึกษาผู้วิจัยพบว่า สมุนไพรและผลไม้ที่นิยมรับประทานเพื่อรักษาสุขภาพหลายชนิดในประเทศไทยสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในหลอดทดลองได้ โดยนอกเหนือจากน้ำมะเฟืองซึ่งเป็นน้ำผลไม้ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ที่ดีที่สุดด้วยกลไก MBI (Pouyfung et al., 2012; 2013) ผลการศึกษายังพบอีกว่าพืชสมุนไพรและน้ำผลไม้ในวงศ์ Asteraceae และ Acanthaceae หลายชนิดเช่นหญ้าดอกขาว เก๊กฮวยและทองพันชั่ง สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีเช่นกัน (ทรงกลด สารภูษิตและพรพิมล รงค์นพรัตน์, 2554; Prasopthum et al., 2013) โดยพบว่าพืชทุกชนิดที่นำมาศึกษาสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีโดยสารสกัดส่วนเอทานอลของพืช ขลุ่ ดอกคำฝอย ทองพันชั่งและหญ้าดอกขาว ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีใกล้เคียงกัน เมื่อทำการศึกษาต่อเนื่องผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการได้สารสำคัญจากพืชสมุนไพร 2 ชนิดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้ดี คือสมุนไพรทองพันชั่งและสมุนไพรหญ้าดอกขาว โดยได้สารสำคัญจำนวน 3 ชนิดจากสมุนไพรทองพันชั่ง ได้แก่ Rhinacanthin-A, B, และ -C ที่มีรายงานการออกฤทธิ์ช่วยฆ่าเชื้อไวรัส ลดการอักเสบและนำมาใช้ประโยชน์ต่างๆมากมายสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งทั้งเอนไซม์ CYP2A6 และเอนไซม์ CYP2A13 ได้ดี เช่นเดียวกับสารสำคัญอื่นๆเช่น 8-MOP หรือ Seligiline ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งทั้งสองเอนไซม์ได้ (Hukkunen, 2005; Xi et al., 2009) แต่ไม่สามารถทดสอบฤทธิ์ของสาร Rhinacanthin -I และ-H ได้เพราะไม่สามารถแยกสารทั้งสองที่เป็นไอโซเมอร์กันออกจากกันได้ โดยกลไกการ

ยับยั้งของสารสำคัญทั้งสามเป็นแบบผันกลับไม่ได้แบบ mechanism base inhibition และสาร Rhinacanthin-B ออกฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด และผู้วิจัยได้สารสำคัญทั้งหมด 8 ชนิด จากหลอดดอกขาวโดยสารสำคัญ ใน กลุ่ม Hirsutinolides 8a-(2-methylacryloyloxy)-hirsutinolide-13-O-acetate, 8a-(4-hydroxymethacryloyloxy)-hirsutinolide-13-O-acetate, 8a-tigloyloxyhirsutinolide-13-O-acetate และ 8a-(4-hydroxytigloyloxy)-hirsutinolide-13-O-acetate ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 แบบผันกลับไม่ได้แบบ mechanism base inhibition ซึ่งเป็นการยับยั้งที่มีประสิทธิภาพมากกว่าการยับยั้งแบบผันกลับได้ของสารในกลุ่ม Flavonoid ได้แก่ Apigenin, Chrysoeriol, Luteolin และ Quercetin ซึ่งแม้จะยังไม่มีรายงานการยับยั้งการทำงานของสารสำคัญทั้ง 8 ชนิดจากหลอดดอกขาวต่อเอนไซม์ CYP2A13 แต่ผู้วิจัยพบว่า สารสำคัญ 7 ชนิด ยกเว้นเพียง 8a-(4-hydroxymethacryloyloxy)-hirsutinolide-13-O-acetate ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Monoamine oxidase ทั้งรูปแบบ A และ B (MAO-A & MAO-B) ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารสื่อประสาทโดปามีนในสมองได้ และเกี่ยวข้องกับกับการเสพติโคตินในสมองได้ เช่นเดียวกับยา Seligeline ที่ยับยั้งทั้ง CYP2A6 และ MAO ที่นำมาใช้เพื่อลดการสูบบุหรี่ในปัจจุบัน (Fowler et al., 2008; Grime et al., 2009; Xi et al., 2009; Zhou et al., 2005) การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความจำเพาะในการยับยั้งของสารสำคัญในหลอดดอกขาวที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 และศึกษากลไกการยับยั้งเพื่อช่วยลดอัตราการเกิดโรกระบบทางเดินหายใจและโรคมะเร็งอันเนื่องมาจากการสูบบุหรี่ได้

บทที่ 3

สารเคมีและวิธีการทดลอง

3.1 สารเคมี

1. Acetic acid glacial (CH_3COOH) MW 60.053 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. Acrylamide ($\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$) MW 71.80 บริษัท ACROS ORGANIC ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. Albumin บริษัท ACROS ORGANIC ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. Alcohol MW 32.042 บริษัท Carlo erba analytical ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. 5-Aminolevulinic acid hydrochloride (δ -ALA) MW 167.59 บริษัท SIGMA-ALDRIC ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
6. Ammonium persulfate (APS) ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) MW 228.20 บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
7. Amodiaquine บริษัท Sigma Aldrich ประเทศเยอรมัน
8. Ampicilin ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{NaO}_4\text{S}$) MW.371.39 บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
9. Bardford ยี่ห้อ Bio-rad บริษัท Bio-rad Laboratories, Inc ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. Bupropion บริษัท Sigma Aldrich ประเทศเยอรมัน
11. Coumarin ($\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_2$) MW 146.15 บริษัท Fluka Analytical ประเทศฝรั่งเศส
12. Chlorzoxazone บริษัท Sigma Aldrich ประเทศเยอรมัน
13. Dextromethorphan บริษัท Sigma Aldrich ประเทศเยอรมัน
14. Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) MW 174.16 บริษัท Carlo erba analytical ประเทศสหรัฐอเมริกา
15. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) MW 141.96 บริษัท Fisher scientific analytical grade ประเทศอังกฤษ
16. Ethyl alcohol absolute ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) MW 46.070 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
17. Glycerol ($\text{CH}_2\text{OHCHOHCH}_2\text{OH}$) MW 92.095 ยี่ห้อ Carlo erba บริษัท Bio Basic INC. ประเทศแคนาดา
18. Glycine MW 75.10 ยี่ห้อ UPS Grade บริษัท RESEARCH ORGANICS ประเทศสหรัฐอเมริกา
19. Human Liver Microsome บริษัท Sigma Aldrich ประเทศเยอรมัน
20. Ketoconazole บริษัท Sigma Aldrich ประเทศเยอรมัน
21. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ในรูปรีดิวซ์ (NADPH) บริษัท Fluka HPLC grade ประเทศสหรัฐอเมริกา
22. Omeprazole บริษัท Sigma Aldrich ประเทศเยอรมัน
23. Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{SO}_2\text{F}$) บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
24. Phenacetin บริษัท Sigma Aldrich ประเทศเยอรมัน
25. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) MW 136.09 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
26. Quinidine บริษัท Sigma Aldrich ประเทศเยอรมัน
27. Sodium chloride (NaCl) MW 58.443 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา

28. Sodium dodecyl sulfate (SDS) ($C_{12}H_{25}OSO_3Na$) MW 288.83 บริษัท BIO BASIC INC.ประเทศแคนาดา
29. Testosterone บริษัท Sigma Aldrich ประเทศเยอรมัน
30. Tolbutamide บริษัท Sigma Aldrich ประเทศเยอรมัน
31. Tris-Hydrochloride ยี่ห้อ Promega บริษัท Promega Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา
32. Tris(Hydroxymethyl)aminomethane ($NH_2C(CH_2OH)_3$) MW 121.14 บริษัท USB Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา
33. 1,2-dilauryl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DLPC) MW 621.83 บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมสารสกัดจากพืช

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยใช้หญ้าดอกโดยนำพืชมาล้างทำความสะอาดและปั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ จึงนำแช่ในสารละลายเอทานอล จากนั้นทำการกรอง จากนั้นทำการแยก fraction โดยใช้สารละลายเฮกเซนและเอทิล อะซิเตตตามลำดับ ทำบริสุทธิ์สารสำคัญด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี และตรวจสอบความบริสุทธิ์และโครงสร้างของสารสำคัญด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) และ Liquid Chromatography-Mass spectrometry (LC-MS) ดังที่อธิบายใน Prasobthum et al., 2015

3.3.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ด้วยวิธี CYP cocktail inhibition assay

ทำการศึกษาปฏิกิริยาการยับยั้งของเอนไซม์ cytochrome P450 ทั้ง 9 ชนิด โดยใช้ Human liver microsome (HLM) ที่พัฒนาจาก Dierks *et al.*, 2001; Spaggiari *et al.*, 2014, 2016; Tolonen *et al.*, 2007 โดยใช้ HLM จากบริษัท Sigma- Aldrich (M0317-1VL, lot SLBL1294V) และความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่ประมาณค่า K_m ที่ความเข้มข้นสุดท้าย ($1 \mu M$ phenacetin, $2 \mu M$ coumarin, $1 \mu M$ bupropion, $2 \mu M$ amodiaquine, $1 \mu M$ tolbutamide, $1 \mu M$ omeprazole, $0.5 \mu M$ dextromethorphan, $6 \mu M$ chlorzoxazone และ $25 \mu M$ testosterone) สำหรับเอนไซม์ CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, และ 3A4 ตามลำดับ โดยมี melatonin เป็นตัวควบคุมภายใน (internal standard) และสารละลายทั้งหมดใช้สารละลายเอทานอลเป็นตัวทำละลาย

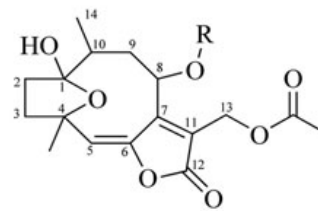
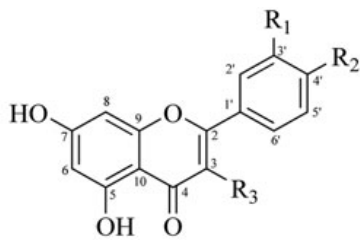
ศึกษาการยับยั้งโดยใช้ความเข้มข้นของสารตั้งต้นตั้งแต่ 0 ถึง $100 \mu M$.ในปริมาตรสุดท้าย $200 \mu L$ ซึ่งประกอบไปด้วย 0.2 mg/mL ของ HLMs ใน 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) ทำการบ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ $37^\circ C$ และเริ่มปฏิกิริยาด้วย NADPH และทำปฏิกิริยาต่อเนื่องอีก 20 นาที จึงหยุดปฏิกิริยาด้วย $200 \mu L$ ice-cold acetonitrile ที่มีสารควบคุมภายใน melatonin ($10 \mu M$) ทำการปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 15 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีนและนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วย liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ตามวิธีของ Dierks *et al.*, 2001; Spaggiari *et al.*, 2014; Tolonen *et al.*, 2007 ดังที่อธิบายรายละเอียดใน Pouyfung *et al.*, 2017 กิจกรรมของเอนไซม์ CYP CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, และ 3A4 ในสภาวะที่มีตัวยับยั้งจะถูกเปรียบเทียบกับสภาวะที่ปราศจากตัวยับยั้ง และหาค่า IC_{50} โดยใช้ GRAPHPAD PRISM 5 software (GraphPad software Inc., San Diego, CA).

บทที่ 4

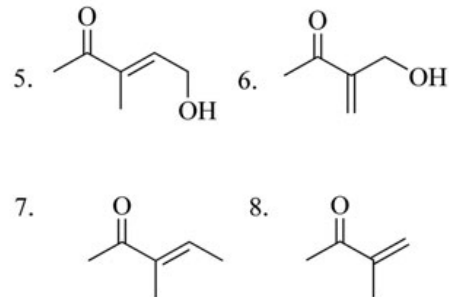
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การเตรียมสารสำคัญจากหลอดดอกขาว

ทำการสกัดพืชสมุนไพรหลอดดอกขาวที่มาทำความสะอาด สับให้ละเอียด อบให้แห้งและสกัดในสารละลายเอทานอล ได้ปริมาณสุทธิ 60 กรัมจากนั้นแยกสารสกัดแบบลำดับส่วน ได้ส่วนสกัดเฮกเซน (Hexane) เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate) และน้ำ (Water) จากนั้นนำทั้งส่วนสกัดเฮกเซนและเอทิล อะซิเตตไปผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วยเทคนิค NMR และ LC-MS พบว่าได้สารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดรวม 8 ชนิด ดังภาพที่ 4-1



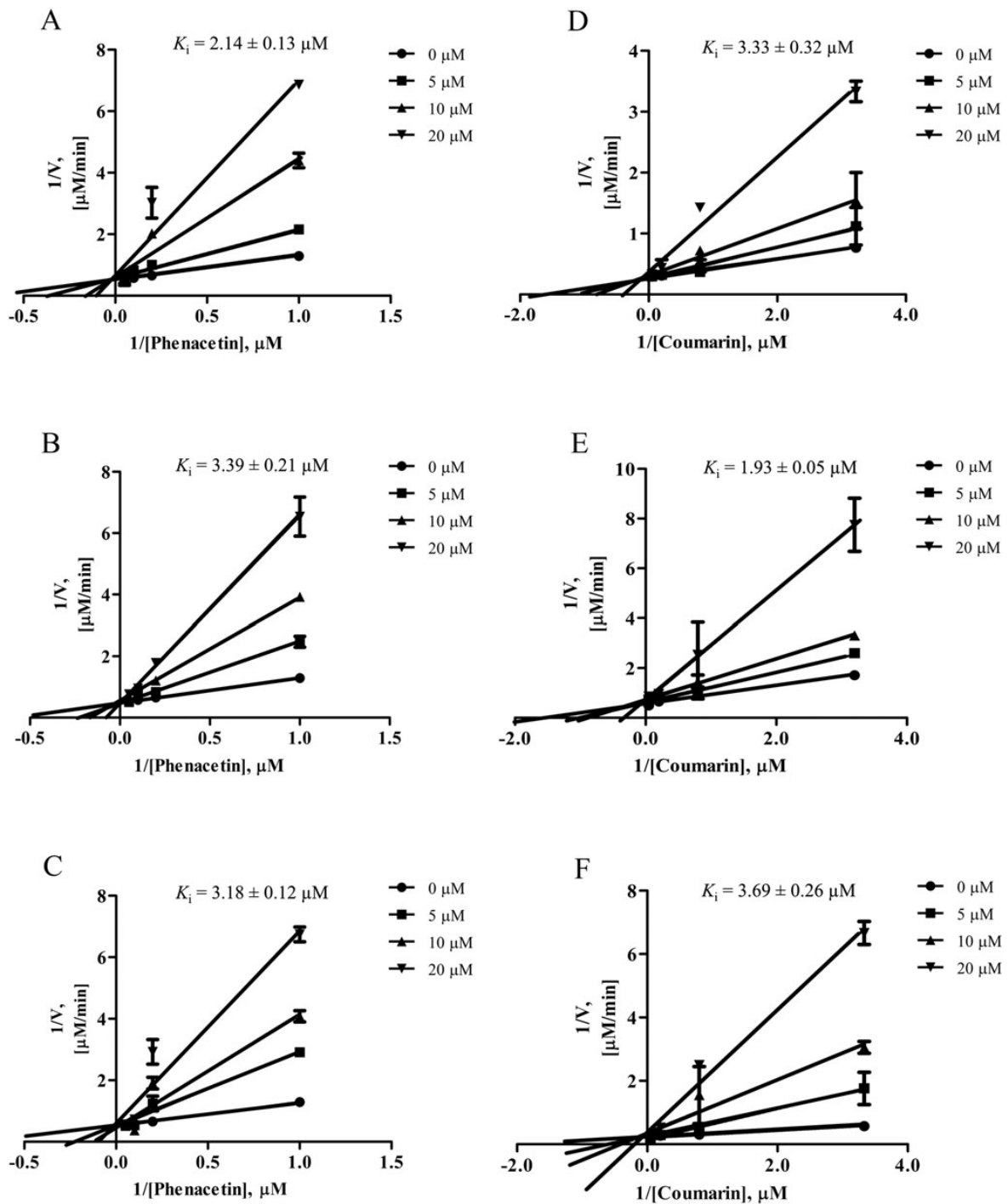
	R ₁	R ₂	R ₃
1.	H	OH	H
2.	OCH ₃	OH	H
3.	OH	OH	H
4.	OH	OH	OH



ภาพที่ 4-1 โครงสร้างสารสำคัญจากหลอดดอกขาวที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้แก่ apigenin (1), luteolin (2), chrysoeriol (3), quercetin (4), 8 α -(2-methylacryloyloxy)-hirsutinolide-13-O-acetate (5), 8 α -tigloyloxyhirsutinolide-13-O-acetate (6), 8 α -(4-hydroxymethacryloyloxy)-hirsutinolide-13-O-acetate (7), 8 α -(4-hydroxytigloyloxy)-hirsutinolide -13-O-acetate (8) (Pouyfung et al., 2017)

4.2 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ของสารสำคัญกลุ่ม Flavonoids จากหญ้าดอกขาว

ผลการศึกษาพบว่าสาร flavonoids ที่พบในหญ้าดอกขาวออกฤทธิ์ยับยั้งต่อเอนไซม์ CYP1A2, 2A6, 2C8, 2C9, 2D6, และ 3A4 ด้วยค่า IC_{50} ตั้งแต่ 0.58 ± 0.03 to $85 \pm 6.37 \mu M$ แต่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2B6, 2C19, และ 2E1 น้อยมาก (ต้องใช้มากกว่า $100 \mu M$) (ตาราง 4-1). สาร quercetin และ luteolin ยับยั้งเอนไซม์ CYP2C8 ได้ดี (IC_{50} 0.58 ± 0.03 และ $4.03 \pm 0.02 \mu M$ ตามลำดับ) ในขณะที่ apigenin ยับยั้งเอนไซม์ CYP2C9 ได้ดี (IC_{50} $3.37 \pm 0.52 \mu M$) เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งในกลุ่ม flavonoids พบว่า chrysoeriol สามารถยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีที่สุด ตามมาด้วย apigenin และ luteolin (IC_{50} 4.56 ± 0.72 , 6.39 ± 0.51 และ $7.19 \pm 1.82 \mu M$ ตามลำดับ) และพบแนวโน้มเดียวกันในเอนไซม์ CYP1A2 (IC_{50} 6.12 ± 1.61 , 5.64 ± 0.42 , และ $6.09 \pm 0.19 \mu M$ ตามลำดับ) เมื่อทำการศึกษากลไกการยับยั้งพบว่า chrysoeriol, apigenin และ luteolin ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP1A2 และ CYP2A6 ด้วยกลไกการยับยั้งแบบแข่งขัน (รูปที่ 4-1) จากผลการศึกษาสามารถระบุได้ว่า Chrysoeriol เป็นสารในกลุ่ม flavonoids ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 มากกว่าเอนไซม์ Cytochrome P450 อื่นๆ ที่ทำการทดสอบด้วย HLM แสดงให้เห็นว่าสารสำคัญ Chrysoeriol นอกจากจะเป็นสารสำคัญที่เหมาะสมจะใช้ยับยั้งการย่อยสลายนิโคติน (เอนไซม์ CYP2A6) แล้วยังเหมาะสมที่จะใช้ช่วยลดการกระตุ้นสารก่อมะเร็งที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2 หรือ CYP1B1 และ CYP1A1 ที่เคยมีรายงานว่าถูกยับยั้งได้ดีด้วย chrysoeriol (Takemura *et al.*, 2010). ทั้งนี้เพราะหมู่ methoxy ที่ B-ring ส่งผลให้ลดความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2C9 และ CYP3A4 ที่ย่อยสลายยารักษาโรคมามากมาย และส่งผลให้ลดโอกาสในการเกิด Herb -drug interaction



ภาพที่ 4-2 การยับยั้งการทำงานของสารสำคัญ Flavonoids ต่อเอนไซม์ CYP1A2 ในการเร่งปฏิกิริยา phenacetin *O*-deethylation (0–20 μM) (A–C) และต่อเอนไซม์ CYP2A6 ในการเร่งปฏิกิริยา coumarin-7-hydroxylation (0–20 μM) (D–F) โดยใช้ความเข้มข้นของ flavonoids ที่ 0–20 μM สำหรับ apigenin (A, D), chrysoeriol (B, E), และ luteolin (C, F) และแสดงค่าเฉลี่ยของการศึกษาทั้งสามซ้ำ

ตารางที่ 4-1 ค่า IC₅₀ ของสารสำคัญกลุ่ม Flavonoids จากหญ้าหมอน้อย เมื่อทำการศึกษาใน Human Liver microsome (HLM)

Samples	Apigenin (μM)		Chrysoeriol (μM)		Luteolin (μM)		Quercetin (μM)	
	Co-incubation	Pre-incubation	Co-incubation	Pre-incubation	Co-incubation	Pre-incubation	Co-incubation	Pre-incubation
CYP1A2	5.64 ± 0.42	5.53 ± 0.79	6.12 ± 1.61	6.33 ± 1.56	6.09 ± 0.19	5.72 ± 1.21	6.57 ± 0.61	6.54 ± 0.94
CYP2A6	6.39 ± 0.51	6.16 ± 0.82	4.56 ± 0.72	4.95 ± 0.98	7.19 ± 1.82	7.59 ± 1.48	11.59 ± 1.18	10.82 ± 1.27
CYP2B6	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CYP2C8	6.42 ± 0.70	6.90 ± 0.64	16.27 ± 2.28	15.65 ± 2.77	4.03 ± 0.02	3.75 ± 0.80	0.58 ± 0.03	0.56 ± 0.07
CYP2C9	3.37 ± 0.52	3.21 ± 0.64	32.36 ± 2.28	35.41 ± 2.13	15.80 ± 3.54	14.56 ± 1.59	5.02 ± 1.10	5.22 ± 0.59
CYP2C19	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CYP2D6	>100	>100	21.00 ± 2.74	22.31 ± 1.58	33.75 ± 1.39	31.34 ± 1.12	25.37 ± 0.93	25.35 ± 0.66
CYP2E1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CYP3A4	21.53 ± 5.28	20.08 ± 2.99	28.32 ± 0.08	31.04 ± 3.58	45.99 ± 3.59	47.62 ± 4.27	84.57 ± 6.37	83.52 ± 2.02

4.3ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ของสารสำคัญกลุ่ม Hirsutinolides จากหญ้าดอกขาว

ผลการศึกษาพบว่า hirsutinolides (5-8) ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2D6 ได้ดี รวมถึงออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP3A4 ได้ค่า IC_{50} ที่สูง อย่างไรก็ตามสารสำคัญในกลุ่มไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, และ 2E1 เมื่อทำการศึกษาโดยใช้ความเข้มข้นสารจนถึง 100 μM concentrations (ตารางที่ 4-2) โดยผลการศึกษาพบว่า hirsutinolides (5-7) ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีกว่าเอนไซม์ CYP2D6 (ค่าของ IC_{50} ประมาณ 12-23 μM เปรียบเทียบกับ 20-41 μM) นอกจากนี้ยังพบว่า hirsutinolides (5-7) ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยกลไก mixed type inhibition ในขณะที่ยับยั้งเอนไซม์ CYP2D6 ด้วยกลไกแบบแข่งขัน โดย hirsutinolides (5-7) จับกับเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีกว่า CYP2D6 (ภาพที่ 4-3) โดยมีค่า K_i ต่อ hirsutinolides (5-7) สำหรับ CYP2A6 เท่ากับ 6.48 ± 1.22 , 7.77 ± 1.73 และ $14.37 \pm 1.56 \mu M$ ตามลำดับ ในขณะที่มีค่า K_i ต่อ hirsutinolides (5-7) สำหรับ CYP2D6 เท่ากับ 11.50 ± 1.42 , 14.38 ± 0.57 และ $31.98 \pm 3.42 \mu M$ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม hirsutinolide (8) สามารถยับยั้งเอนไซม์ CYP2D6 ได้ดีกว่าเอนไซม์ CYP2A6 (ค่า K_i สำหรับ CYP2A6 และ CYP2D6 เท่ากับ 10.32 ± 1.32 และ $8.24 \pm 0.88 \mu M$ ตามลำดับ)

นอกจากนี้การศึกษาค้นคว้าสารในกลุ่ม Hirsutinolides ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยกลไกการยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้ ที่สารตั้งต้นถูกเร่งปฏิกิริยาจากนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จับแน่นกับเอนไซม์ ส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาต่อไปได้ หรือที่เรียกว่า กลไก mechanism based inhibition (MBI) ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้จากการลดลงของค่า IC_{50} ในสภาวะการทำปฏิกิริยาแบบ pre-incubation ซึ่งไม่พบในสารกลุ่ม flavonoids (ตารางที่ 4-1 และ 4-2) เช่นเดียวกับที่ได้รายงานก่อนหน้านี้เมื่อทำการศึกษาโดยใช้เอนไซม์ CYP2A6บริสุทธิ์ (Prasobthum at al., 2015)

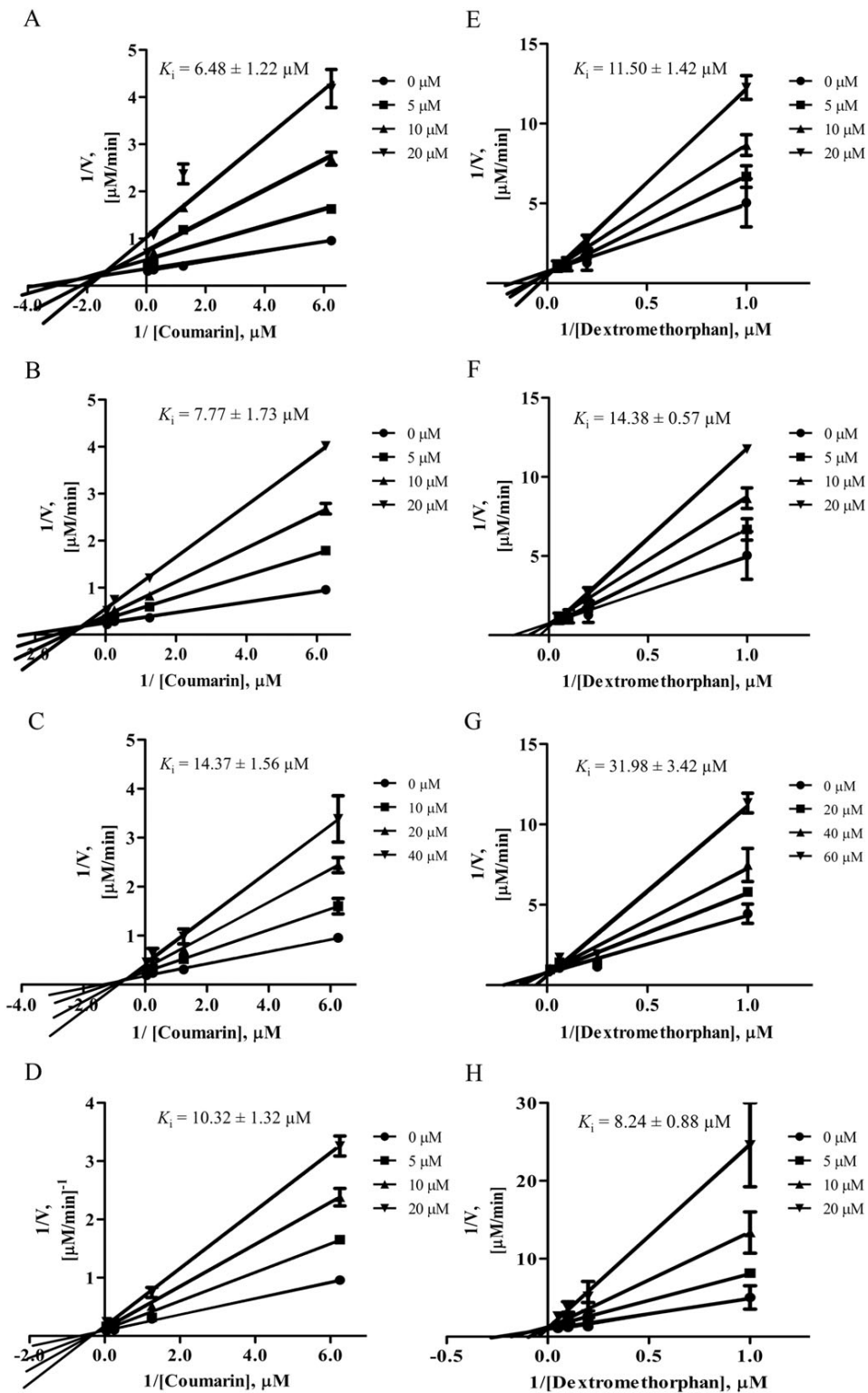
เมื่อทำการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งจะพบว่า สารสำคัญ chrysoeriol แม้จะมีค่าการยับยั้งต่อเอนไซม์ CYP2A6 ที่ดี (IC_{50} 4.56 ± 0.72 และ K_i $1.93 \pm 0.05 \mu M$) เมื่อเปรียบเทียบกับ hirsutinolides (5-7) แต่มีความจำเพาะในการยับยั้งที่น้อยกว่า เพราะสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP1A2 CYP2C8 CYP2C9 CYP2D6 และ CYP3A4 ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ Cytochrome P450 อื่นๆในร่างกายได้มากกว่า hirsutinolides (5-7) ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งกับ CYP2A6 ด้วยกลไกที่จำเพาะมากกว่า

4.4สรุปผลการทดลอง

ผลจากการศึกษาพบว่า สามารถใช้ Human liver microsome ทำการศึกษาผลการยับยั้งของสารสำคัญในหญ้าดอกขาวต่อเอนไซม์ cytochrome P450 ที่มีในเซลล์ตับได้ในครั้งเดียวกันโดยใช้เทคนิค liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) ผลการศึกษาพบว่าสารสำคัญ hirsutinolides (5-7) ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยกลไกการยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้ที่จำเพาะต่อเอนไซม์ CYP2A6 มากกว่าเอนไซม์ cytochrome P450 อื่นๆ

4.5 ปัญหาและอุปสรรค

มีการเปลี่ยนแปลงแนวทางการดำเนินการจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งในเซลล์ตับ (Hepa RG) มาเป็น Human Liver microsome (HLM) เนื่องจากเซลล์ Hepa RG ของผู้วิจัยเสียหายไม่สามารถดำเนินการต่อได้ ผู้วิจัยจึงต้องเปลี่ยนแนวทางในการทำวิจัย



ภาพที่ 4-3 การยับยั้งการทำงานของสารสำคัญ Hirsutinolides ต่อเอนไซม์ CYP2A6 ในการเร่งปฏิกิริยา coumarin-7-hydroxylation (0–20 μM) (A-D) และเอนไซม์ CYP2D6 ในการเร่งปฏิกิริยา dextromethorphan O-demethylation (0–20 μM) (E–H) โดยใช้ความเข้มข้นของ hirsutinolide ที่ 0–60 μM สำหรับ hirsutinolide (5) (A, E), hirsutinolide (6) (B, F), hirsutinolide (7) (C,G) และ hirsutinolide (8) (D, H) และแสดงค่าเฉลี่ยของการศึกษาทั้งสี่ซ้ำ

ตารางที่ 4-2 ค่า IC₅₀ ของสารสำคัญกลุ่ม Hirsutinolides จากหญ้าหมอน้อย เมื่อทำการศึกษาใน Human Liver microsome (HLM)

Samples	Hersutinolide 5(μM)		Hersutinolide 6 (μM)		Hersutinolide 7 (μM)		Hersutinolide 8 (μM)	
	Co-incubation	Pre-incubation	Co-incubation	Pre-incubation	Co-incubation	Pre-incubation	Co-incubation	Pre-incubation
CYP1A2	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CYP2A6	12.25 ± 0.31	2.74 ± 0.50	13.14 ± 1.76	2.94 ± 0.38	22.98 ± 4.50	4.08 ± 0.48	18.59 ± 1.76	2.68 ± 0.23
CYP2B6	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CYP2C8	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CYP2C9	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CYP2C19	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CYP2D6	20.29 ± 0.39	31.12 ± 3.52	21.28 ± 0.84	17.01 ± 3.61	40.92 ± 2.69	58.42 ± 5.96	15.28 ± 0.37	12.75 ± 1.25
CYP2E1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CYP3A4	89.01 ± 2.32	>100	50.50 ± 1.58	77.04 ± 4.25	80.58 ± 2.03	>100	68.06 ± 5.74	78.88 ± 3.75

บรรณานุกรม

- ทรงกลด สารภูษิต (2554) การยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ที่ย่อยสลายนิโคตินในคน: ทางเลือกใหม่ในการลดการสูบบุหรี่. บทความวิชาการ วารสารวิทยาศาสตร์ ม. บูรพา ปีที่ 16 ฉบับที่ 2
- ทรงกลด สารภูษิตและพรพิมล รงค์นพรัตน์ (2554) การศึกษาการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ที่ย่อยสลายนิโคตินในคนของน้ำสมุนไพรและน้ำผลไม้ไทย รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ศูนย์วิจัยและจัดการความรู้เพื่อการควบคุมยาสูบ ศิริวรรณ พิทยรังสฤษฏ์ และประภาพรรณ เอี่ยมอนันต์ (2555). สรุปสถานการณ์การควบคุมการบริโภคยาสูบของประชากรไทย พ.ศ. 2555. กรุงเทพฯ ศูนย์วิจัยและจัดการความรู้เพื่อการควบคุมยาสูบ
- 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.
- Boonruang, S., Prakobsri, K., Pouyfung, P., Srisook, E., Prasopthum, A., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. (2017). Inhibition of human cytochromes P450 2A6 and 2A13 by flavonoids, acetylenic thiophenes and sesquiterpene lactones from *Pluchea indica* and *Vernonia cinerea*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 32(1), 1136-1142
- 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 in Respiratory 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.
- Dierks EA, Stams KR, Lim H-K, Cornelius G, Zhang H, Ball SE. 2001. A method for the simultaneous evaluation of the activities of seven major human drug-metabolizing cytochrome P450s using an *in vitro* cocktail of probe substrates and fast gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* 29(1): 23-29.

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

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

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

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

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

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.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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 Metabolism and Pharmacokinetics*, 29(1), 75-82.

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

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

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

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

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

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 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.

Spaggiari D, Geiser L, Daali Y, Rudaz S. 2014. A cocktail approach for assessing the *in vitro* activity of human cytochrome P450s: an overview of current methodologies. *J Pharm Biomed Anal* 101: 221-237.

Spaggiari D, Daali Y, Rudaz S. 2016. An extensive cocktail approach for rapid risk assessment of *in vitro* CYP450 direct reversible inhibition by xenobiotic exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 302: 41-51.

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

Takemura H, Itoh T, Yamamoto K, Sakakibara H, Shimoi K. 2010. Selective inhibition of methoxyflavonoids on human CYP1B1 activity. *Bioorg Med Chem* 18(17): 6310-6315.

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.

Tolonen A, Petsalo A, Turpeinen M, Uusitalo J, Pelkonen O. 2007. *In vitro* interaction cocktail assay for nine major cytochrome P450 enzymes with 13 probe reactions and a single LC/MSMS run: analytical validation and testing with monoclonal anti-CYP antibodies. *J Mass Spectrom* 42(7): 960-966.

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.

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

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

von 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-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 94: 8411-8416.

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

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

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

Wongsri, T., Thongjam, S., Rongnoparut, P., Duangkaew, P., & Sarapusit, S. (2014). Inhibition studies of Cytochrome P450 2A6 by *Vernonia cinerea* Less. and *Carthamus tinctorius* L. extracts. *Proceedings of the 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.

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

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

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

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