



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของความแตกต่างทางพันธุกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 ที่มีต่อฤทธิ์ยับยั้งของ
สารสำคัญจากสมุนไพรทองพันชั่งและหน้าดอกขาว
Effect of polymorphic CYP2A6 enzyme variants on inhibitory activity
of plant constituents from *Rhinacanthus nasutus* and *Venonia
cinerea*

โดย

ผศ.ดร.ทรงกลด สารภูษิต

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

รศ.ดร. พรพิมล รงค์นพรัตน์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผศ. ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๑

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 256106A1080019

สัญญาเลขที่ ๖๙/๒๕๖๑

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของความแตกต่างทางพันธุกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 ที่มีต่อฤทธิ์ยับยั้งของ
สารสำคัญจากสมุนไพรทองพันชั่งและหญ้าดอกขาว
Effect of polymorphic CYP2A6 enzyme variants on inhibitory activity
of plant constituents from *Rhinacanthus nasutus* and *Venonia
cinerea*

โดย

ผศ.ดร.ทรงกลด สารภูษิต

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

รศ.ดร. พรพิมล รงค์นพรัตน์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผศ. ดร. เอกวิฐ ศรีสุข

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง “ผลของความแตกต่างทางพันธุกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 ที่มีต่อฤทธิ์ยับยั้งของสารสำคัญจากสมุนไพรทองพันชั่งและหญ้าดอกขาว” สามารถมีผลการทดลองที่ก้าวหน้าจนได้เสร็จสมบูรณ์เป็นรายงานฉบับนี้ ต้องขอขอบคุณการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๑ มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา ๖๙/๒๕๖๑ ซึ่งผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ นอกจากนี้แล้วผู้วิจัยขอขอบคุณนิสิต-นักศึกษาทุกคนที่ช่วยทำการทดลอง รวมถึงคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาและคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลที่ให้ความสนับสนุนด้านสถานที่และเครื่องมือต่างๆในการทำการทดลอง

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ ผลของความแตกต่างทางพันธุกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 ที่มีต่อฤทธิ์ยับยั้งของสารสำคัญจากสมุนไพรทองพันชั่งและหญ้าดอกขาว

ชื่อผู้วิจัย ทรงกลด สารภูษิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

พรพิมล รงค์นพรัตน์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

เอกรัฐ ศรีสุข ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ไซโตโครม P450 2A6 (CYP2A6) เป็นเอนไซม์สำคัญที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารนิโคตินในบุหรี่ย ทำให้ระดับนิโคตินในเลือดลดต่ำลง ส่งผลให้ผู้สูบบุหรี่จำเป็นต้องสูบบุหรี่เข้าไปใหม่อย่างต่อเนื่องเพื่อคงระดับนิโคตินในเลือด ทำให้เกิดการเสพติดบุหรี่ยในที่สุด จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า เอนไซม์ CYP2A6 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมซึ่งส่งผลต่อพฤติกรรมการสูบบุหรี่ โดยผู้สูบบุหรี่ที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 น้อยจะย่อยสลายนิโคตินช้าและสูบบุหรี่ยน้อยลง แสดงให้เห็นว่าสมบัติของเอนไซม์ CYP2A6 อาจเกี่ยวกับสมบัติการย่อยสลายนิโคติน ด้วยเหตุนี้ในการศึกษาคั้งนี้จึงศึกษาถึงคุณสมบัติของเอนไซม์ CYP2A6 ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยเลือกศึกษาจากอัลลีลที่พบในประชากรไทยได้แก่ wild-type CYP2A6, CYP2A6*5, CYP2A6*7, CYP2A6*8 และ CYP2A6*10 ซึ่งในการทดลองได้ทำการกลายพันธุ์ยีน wild-type CYP2A6 ให้ได้เป็นอัลลีลที่สนใจศึกษา นำมาแสดงออกในระบบแบคทีเรีย ทำบริสุทธิ์เอนไซม์ รวมทั้งตรวจวัดกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ เทียบกับ CYP2A6*1 (K_m $1.54 \pm 0.49 \mu\text{M}$ และ V_{max} $1.02 \pm 0.06 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$) ผลการศึกษาพบว่า เอนไซม์ที่ทำกรกลายพันธุ์ทุกตัว ได้แก่ CYP2A6*5, CYP2A6*7, CYP2A6*8 และ CYP2A6*10 มีประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ลดลง โดย CYP2A6*5 มีการเปลี่ยนแปลงค่า K_m สูงที่สุด ($13.24 \pm 3.51 \mu\text{M}$) ในขณะที่ CYP2A6*10 มีการลดลงของค่า V_{max} มากที่สุด ($0.14 \pm 0.02 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$) นอกจากนี้ยังพบว่ากรกลายพันธุ์ของ CYP2A6 ยังส่งผลต่อประสิทธิภาพการถูกยับยั้งด้วยสารยับยั้ง CYP2A6 มาตรฐาน (8-MOP) โดย CYP2A6*5 มีการเพิ่มขึ้นของค่า IC_{50} สูงที่สุด ($3.24 \pm 0.51 \mu\text{M}$) เมื่อเปรียบเทียบกับ CYP2A6*1 ($0.20 \pm 0.09 \mu\text{M}$)

Abstract

Project Title Effect of polymorphic CYP2A6 enzyme variants on inhibitory activity of plant constituents from *Rhinacanthus nasutus* and *Venonia cinerea*

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

Cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) is an important enzyme responsible for nicotine clearance and tobacco addiction. Metabolism of nicotine, however, could reduce blood nicotine levels and subsequently leads to continue smoking to maintain blood nicotine level. Previous studies have been shown that the CYP2A6 polymorphisms associated with smoking behavior. Smokers with less CYP2A6 enzymes activity showed low nicotine clearance rate and resulted in smoke fewer cigarettes per day. Thus, enzymatic properties of allelic variants of CYP2A6 enzyme could affects nicotine metabolism. Therefore, this study aims to investigate the properties of allelic variants of CYP2A6 enzyme that had been found in Thai population, including CYP2A6*1 (wild-type), CYP2A6*5, CYP2A6*7, CYP2A6*8 and CYP2A6*10. Upon site-direct mutagenesis, all mutated CYP2A6 enzymes were construct and subsequently expressed, purified and the coumarin 7-hydroxylation assay was performed. The results showed that CYP2A6*5, CYP2A6*7, CYP2A6*8 and CYP2A6*10 exhibited low enzymatic efficiency comparing with CYP2A6*1 enzyme (K_m $1.54 \pm 0.49 \mu\text{M}$ and V_{max} $1.02 \pm 0.06 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$). The mutation in CYP2A6*5 enzyme caused lowest substrate binding affinity (K_m $13.24 \pm 3.51 \mu\text{M}$) while mutation in CYP2A6*10 enzyme results in lowest catalytic efficiency (V_{max} $0.14 \pm 0.02 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$). Subsequently, these mutations effect the inhibitory activity of standard CYP2A6 inhibitor, 8-MOP, especially the CYP2A6*5 enzyme with an IC_{50} value of $3.24 \pm 0.51 \mu\text{M}$ ($0.20 \pm 0.09 \mu\text{M}$ for CYP2A6*1).

บทที่ 1

บทนำ

1.1ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันประชากรทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย มีแนวโน้มที่จะป่วยและเสียชีวิตจากโรคเรื้อรังต่างๆ เช่น โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง โรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจและหลอดเลือดและโรคต่างๆอันเนื่องมาจากการสูบบุหรี่มากขึ้น ซึ่งเป็นปัญหาเร่งด่วนที่ควรได้รับการแก้ไขและป้องกันเพราะต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาสูง โดยสารนิโคติน (Nicotine) ที่เป็นส่วนประกอบหลักของบุหรี่ ออกฤทธิ์ที่ระบบประสาทส่วนกลางมีผลทำให้ผู้สูบบุหรี่มีพฤติกรรมติดการสูบบุหรี่ (เสพติดบุหรี่) ทำให้ร่างกายได้รับสารพิษและส่งผลให้เกิดโรคต่างๆ ทั้งนี้เมื่อเข้าสู่ร่างกายนิโคตินส่วนใหญ่จะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ CYP2A6 ในตับได้เป็นสารประกอบโคทีนิน (cotinine) ที่ถูกย่อยสลายต่อไปก่อนถูกกำจัดออกจากร่างกายทางปัสสาวะ นอกจากนี้การย่อยสลายนิโคตินโดยเอนไซม์ CYP2A6 สามารถเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงได้เป็นสารก่อมะเร็ง nitrosamine ขึ้นมาใหม่ส่งผลให้เกิดโรคมะเร็งได้ จากการศึกษาพบว่าในคนที่มียาลลีลของ *cyp2a6* ที่การทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ลดลง เพราะเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นกับเอนไซม์ CYP2A6 ทั้งการแทนที่กรดอะมิโน หรือการเปลี่ยนแปลงกลับด้าน หรือการขาดหายไปของยีน จะมีการย่อยสลายนิโคตินน้อยลง ส่งผลให้ลดปริมาณการสูบบุหรี่ สามารถหยุดการสูบบุหรี่ได้ง่ายขึ้นและลดอัตราการเกิดโรคมะเร็งปอด ดังนั้นการลดการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยตัวยับยั้งจำเพาะ จะส่งผลให้มีการย่อยสลายนิโคตินน้อยลง รักษาระดับนิโคตินในกระแสเลือดไว้ให้คงอยู่ในกระแสเลือดนานขึ้น ส่งผลให้สูบบุหรี่ลดลง ซึ่งเป็นการลดโอกาสที่ร่างกายจะได้สัมผัสกับสารประกอบเป็นพิษต่างๆในยาสูบ จึงลดผลร้ายต่างๆที่จะเกิดขึ้นกับร่างกายในตัวผู้สูบบุหรี่และบุคคลใกล้ชิดได้

จากผลการศึกษาเบื้องต้นของกลุ่มผู้วิจัยที่กำลังศึกษาสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพรไทยในการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ที่ย่อยสลายนิโคตินในระดับของมนุษย์ในหลอดทดลอง (*in vitro* reconstitution system) พบว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพรหลายชนิดออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 จาก *cyp2a6* อัลลีลปกติ (*cyp2a6**1) ในหลอดทดลองได้ และได้สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งจากสมุนไพรทองพันชั่งและหน้าดอกขาวที่ทำการศึกษา รวมถึงทราบกลไกในการยับยั้งของสารสำคัญเหล่านั้นในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6อย่างไรก็ตามเนื่องด้วยยีน *cyp2a6* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมและส่งผลต่อฟีโนไทป์ในการเสพติดบุหรี่ที่แตกต่างกัน แต่การศึกษาส่วนมากมุ่งเน้นไปที่การยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 จากอัลลีลปกติเท่านั้น ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงมุ่งหวังที่จะศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ที่เกิดขึ้นจากยีน *cyp2a6* อัลลีลต่างๆที่เคยมีรายงานว่าพบในคนไทยของสารสำคัญจากทองพันชั่งและหน้าดอกขาว โดยผู้วิจัยจะทำการกลายพันธุ์ยีน *cyp2a6* อัลลีลปกติในหลอดทดลองให้ได้เป็นอัลลีลต่างๆที่เคยมีรายงานว่าพบในประเทศไทย จากนั้นทำการแสดงออกและทำบริสุทธิ์เอนไซม์ CYP2A6 จากอัลลีลต่างๆ ร่วมกับทำบริสุทธิ์สารสกัดจากทองพันชั่งและหน้าดอกขาวที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง CYP2A6 และศึกษากลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 อัลลีลต่างๆในหลอดทดลอง เพื่อเป็นการยืนยันประสิทธิผลในการนำสารสำคัญจากพืชทองพันชั่งและหน้าดอกขาวที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

CYP2A6 มาใช้ช่วยลดการสูบบุหรี่ได้ในกลุ่มประชากรไทย ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของเอนไซม์
CYP2A6 ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย (ในปีแรก)

1. กลายพันธุ์ยีน *cyp2a6* อัลลีลปกติที่อยู่ในพลาสมิดดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ให้เป็นอัลลีลต่างๆที่เคยมีรายงานในประเทศไทย
2. แสดงออกและทำปฏิกิริยาเอ็นไซม์ CYP2A6 จากอัลลีลต่างๆ และศึกษาสมบัติเอ็นไซม์ CYP2A6 ของอัลลีลต่าง ๆ นั้น
3. ทำปฏิกิริยาสารสำคัญจากทองพันชั่งที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ CYP2A6

1.3 สมมติฐานของการทดลอง

สารสำคัญจากสมุนไพรออกฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ CYP2A6 จากอัลลีลต่างกันด้วยประสิทธิภาพที่ต่างกัน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทดลอง

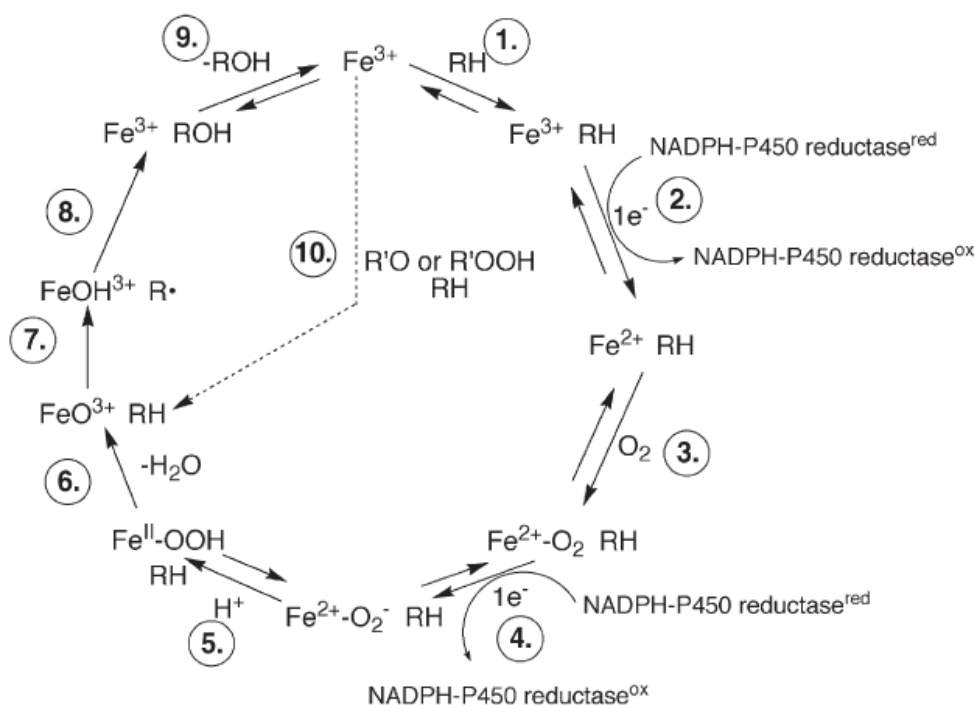
1. ได้เอ็นไซม์ CYP2A6 อัลลีลต่างๆที่เคยรายงานว่าพบในประเทศไทย
2. ทราบสมบัติการทำงานของเอ็นไซม์ CYP2A6 อัลลีลต่างๆที่เคยรายงานว่าพบในประเทศไทย

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ทฤษฎีพื้นฐานที่เกี่ยวข้อง

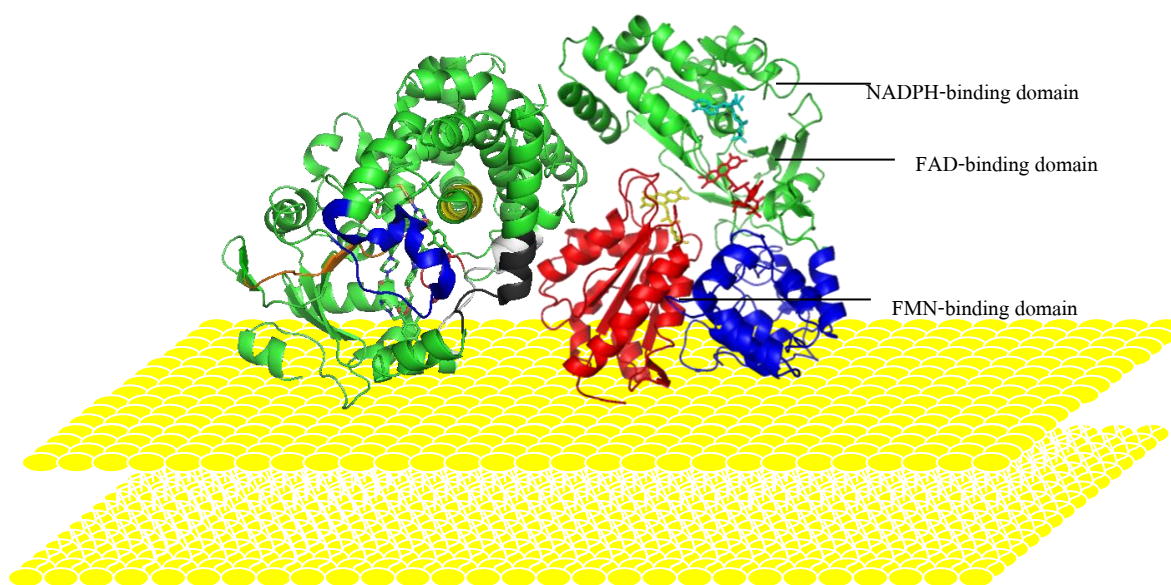
เอนไซม์ Cytochrome P450 (CYPs หรือ P450s) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารเคมีทั้งสารที่มีอยู่ในร่างกายเช่น ฮอร์โมนและกรดไขมันต่างๆ และสารที่ร่างกายได้รับจากภายนอกเช่น ยาและสิ่งปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมต่างๆ เนื่องจากเอนไซม์ P450s พบเป็นจำนวนมากในร่างกายและในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด ดังนั้นเอนไซม์ P450 จึงถูกแยกย่อยและแบ่งออกเป็นกลุ่มๆตามลำดับความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของยีนนั้นๆ โดยยีนที่อยู่ในตระกูล (Family) เดียวกันต้องมีความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนมากกว่าร้อยละ 40 และยีนในตระกูลย่อย (Subfamily) เดียวกันต้องมีความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนมากกว่าร้อยละ 55 ทั้งนี้เนื่องจาก P450s ไม่ได้ถูกจัดจำแนกตามกลุ่มของสารตั้งต้นที่ทำให้ปฏิกิริยาหรือชนิดของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น 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 ส่วนตัวอิเล็กตรอนตัวที่สองจะกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในโมเลกุลของออกซิเจนให้เกิดเป็นสารประกอบไฮดรอกซิล (iron-hydroxy complex) และเร่งการเกิดปฏิกิริยาต่อไปโดยเอนไซม์ทั้งสองจะทำงานร่วมกันใน Endoplasmic reticulum ของเซลล์ในการเร่งปฏิกิริยาต่างเช่น Squalene monooxygenase, Heme oxygenase และโดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ในกลุ่ม Cytochrome P450 ที่เกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมที่สำคัญต่างๆ (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 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, และ NADPH-binding domain (Wang et al., 1997) โดยส่วน FMN domain จะแยกออกมาให้เห็นเด่นชัด ในขณะที่ส่วน FAD-binding domain และ NADPH-binding domain จะอยู่รวมกัน (ภาพที่ 2-2)



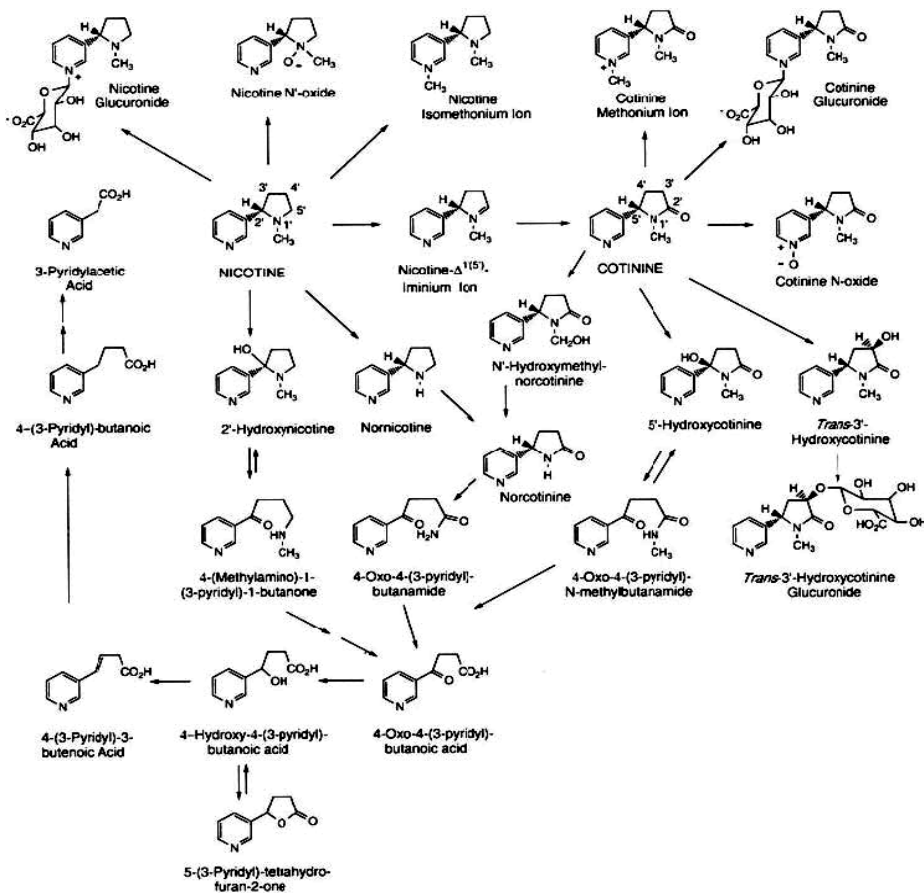
ภาพที่ 2-2 แบบจำลองของ Cytochrome P450s (ซ้าย) และ P450s Oxidoreductase (ขวา) ซึ่งเรียงตัว

กันอยู่ใน Endoplasmic reticulum

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคระบบทางเดินหายใจจากการสูบบุหรี่ โดยเฉพาะโรคมะเร็งปอดและโรคถุงลมโป่งพอง จัดเป็นปัญหาสำคัญในหลายประเทศทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย จากการคาดการณ์ขององค์การอนามัยโลก (WHO) คาดว่าในปี พ.ศ. 2573 จะมีผู้เสียชีวิตด้วยโรคดังกล่าวถึง 8 ล้านคน (WHO, 2008) สำหรับประเทศไทยในปี 2549 มีการประมาณการว่าโรคระบบทางเดินหายใจจากการติดยาสูบทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจถึง 9.86 ล้านบาท (Bundhamcharoen, 2012) ล่าสุดจากผลการสำรวจในปี พ.ศ. 2554 พบว่ามีคนไทยสูบบุหรี่มากกว่า 11 ล้านคนหรือมากกว่า 21 % ของประชากรทั้งประเทศ โดยผู้สูบบุหรี่ส่วนใหญ่อยู่ในวัยทำงาน โดยที่อัตราการสูบบุหรี่เพิ่มขึ้นในกลุ่มเยาวชน กลุ่มผู้ไม่เคยเรียนหนังสือและผู้อาศัยอยู่นอกเขตเทศบาล รวมถึงผู้มีฐานะในระดับปานกลางทั่วไป โดยที่อัตราดังกล่าวยังคงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องอันเนื่องมาจากการรुकคืบของธุรกิจยาสูบผ่านทางสื่อโฆษณา การปรับปรุงรูปลักษณ์ภายนอกของหีบห่อบรรจุและการปรับราคาให้ถูกลง รวมถึงการสูบบุหรี่ในรูปแบบอื่นๆ เช่น ยาเส้นที่มีราคาถูกในกลุ่มผู้มีรายได้น้อย และบารากูในหมู่วัยรุ่นและวัยทำงาน โดยเฉพาะในวัยรุ่นผู้หญิง จากการศึกษาค้นคว้าพบว่ามีเพียง 1.77 ล้านคนเท่านั้นที่เคยและพยายามเลิกบุหรี่แต่ไม่สำเร็จโดยมีค่าเฉลี่ยของการเลิกบุหรี่ได้ก่อนกลับมาสูบบุหรี่ซ้ำคือ 11.44 เดือน โดยสาเหตุเกิดจากการหงุดหงิด/ฉุนเฉียว/โกรธง่าย ถึงร้อยละ 38.61 และเพราะความเครียดร้อยละ 27.42 และพบว่าถึงแม้เลิกบุหรี่ไปแล้วถึง 20 ปีก็สามารถกลับมาสูบบุหรี่ได้อีก แสดงให้เห็นว่าการเสพติดบุหรี่เพียงหนึ่งครั้งส่งผลให้ต้องเสพติดบุหรี่และสามารถเลิกการเสพติดได้ยาก (ศรีนยาและคณะ 2551; ศิริวรรณ และคณะ 2552; 2554; 2555)

จากการศึกษาพบว่าบุหรี่ประกอบไปด้วยสารประกอบต่างๆมากกว่า 4,000 ชนิด โดยที่มากกว่า 40 ชนิดเป็นสารพิษและสารก่อมะเร็งซึ่งเมื่อเกิดการเผาไหม้ขึ้นและได้รับการสูดเข้าไปในปอด ดังนั้นโรคทางเดินหายใจเช่น โรคมะเร็งปอดและโรคถุงลมโป่งพอง จึงเป็นโรคที่พบบ่อยในกลุ่มผู้สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิด นอกจากนี้กลุ่มผู้สูบบุหรี่ยังเป็นกลุ่มเสี่ยงที่จะมีอาการของโรคหัวใจขาดเลือด โรคหัวใจวาย และโรคที่เกี่ยวข้องต่างๆ (ศิริวรรณ และคณะ 2555) โดยอุบัติการณ์การเกิดโรคต่างๆเหล่านี้เกิดขึ้นเนื่องจากนิโคตินที่เป็นสารประกอบหลักในบุหรี่ที่มีผลทำให้ หัวใจเต้นเร็วขึ้นและเพิ่มความดันโลหิต (Benowitz, 2008) นอกจากนี้นิโคตินยังมีผลให้เสพติดการสูบบุหรี่โดยไปออกฤทธิ์กระตุ้นระบบการตอบสนองต่อความยินดี ผ่านการจับกับตัวรับนิโคตินที่บริเวณปลายประสาทของสมองส่วน VTA ทำให้เกิดการหลั่งสารสื่อประสาทโดปามีนออกมามากขึ้น มีผลทำให้ผู้สูบบุหรี่มีความรู้สึกสุขใจสบายใจและลดความเครียดต่างๆ ผู้สูบบุหรี่จึงสูบบุหรี่เพื่อคงระดับนิโคตินในกระแสเลือดและในสมองให้เกิดความรู้สึกมีความสุขต่อไป ส่งผลให้ผู้สูบบุหรี่และบุคคลใกล้เคียงได้รับสารพิษต่างๆ ในบุหรี่ไปด้วย (Hukkanen et al, 2005) ทั้งนี้ประมาณ 80-90% ของนิโคตินที่เข้าสู่ร่างกายผ่านทาง การดูดซึมที่เนื้อเยื่อคัดหลังที่ปาก ระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหาร จะถูกย่อยสลายโดยกลไกหลักด้วยเอนไซม์ CYP2A6 ในตับเกิดเป็นสารประกอบ nicotine $\Delta^{1(5)}$ -iminium ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นโคตินินโดยเอนไซม์ aldehyde oxidase (Hukkanen et al, 2005) หลังจากนั้นโคตินินที่เกิดขึ้นจะเกิดปฏิกิริยา hydroxylation ได้เป็นสารประกอบต่างๆ เช่น *trans*-3'-hydroxycotinine, 5'-hydroxycotinine และ nornicotine (ภาพที่ 1) ซึ่งสุดท้ายทั้งโคตินินและสารประกอบที่ได้จากโคตินินต่างๆ



จะถูกเติมหมู่น้ำตาล (glucuronation) และขับออกทางปัสสาวะ (Benowitz, 2008; Flammang et al, 1992)

ภาพที่ 2-1 กลไกในการกำจัดนิโคติน (Hukkanen et al, 2005)

ในคนพบว่าเอนไซม์ P450 ถึง 18 กลุ่ม และ 43 กลุ่มย่อย (<http://dnelson.utmen.edu/Cytochrome P450.html>) โดยเอนไซม์ CYP2A6 ในตับที่สามารถย่อยสลายนิโคตินได้ดีด้วยความสามารถในการจับกับสารตั้งต้น (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 เพราะในผู้เสพยาสูบที่มีการทำงานของ CYP2A13 น้อย ยังคงมีโอกาสเกิดมะเร็งในระบบทางเดินหายใจสูง (Jiang et al, 2004) สำหรับเอนไซม์ CYP2B6 และ CYP2D6 ไม่ได้เป็นเอนไซม์หลักในการย่อยสลายนิโคติน เพราะคนที่มีการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองน้อย (poor metabolizer, PM) และดีมาก (extensive metabolizer, EM) มีอัตราการสลายนิโคตินและโคตินินไม่ต่างกัน (Benowitz et al, 1996) ในขณะที่เอนไซม์ CYP2E1 เกี่ยวข้องกับการได้รับแอลกอฮอล์มากกว่านิโคติน แสดงให้เห็นว่า การย่อยสลายของนิโคตินที่ตับโดยเอนไซม์ CYP2A6 เป็นกระบวนการหลักของร่างกายในการกำจัดนิโคตินและการกระตุ้นการสูบบุหรี่ ซึ่งส่งผลเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งต่างๆในระบบทางเดินหายใจใน

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

จากการศึกษาในประชากรพบว่ายีน *cyp2a6* มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) ถึง 38 อัลลีลที่แตกต่างกัน (<http://www.imm.ki.se/cypalleles> และ Koudsi et al, 2009) ซึ่งมีทั้งอัลลีลที่ทำงานผิดปกติหรือไม่สามารถย่อยนิโคตินได้และที่สามารถย่อยนิโคตินได้ดีเกินไป (Kamatiki et al, 2005) โดยที่ความหลากหลายในการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ส่งผลต่อการย่อยสลายนิโคตินและมีบทบาทที่สำคัญในการกำหนดพฤติกรรมกรรมการสูบบุหรี่ 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)

ทั้งนี้สามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้ดังนี้ 1) กลุ่มคนที่มีอัลลีลของ *cyp2a6* ปกติมากกว่าสองชุด (*cyp2a6**1X2A หรือ *cyp2a6**1X2B) ที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ดีกว่า ปกติมาก (Ultrarapid Metabolizer; UM) 2) กลุ่มคนที่มีอัลลีลของ *cyp2a6* ปกติสองชุด (*cyp2a6**1A/*1A หรือ *cyp2a6**1A/*1B หรือ *cyp2a6**1B/*1B) ที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ปกติ (Extensive Metabolizer; EM) ซึ่งคนในทั้งสองกลุ่มนี้พบว่าจะย่อยสลายนิโคตินได้เร็วและสูบบุหรี่มากกว่าคนปกติ 3) คนที่มีอัลลีลของ *cyp2a6* ปกติหนึ่งชุดและอัลลีลอื่นๆ ที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ลดลงหนึ่งชุด (*cyp2a6**1A/*4C หรือ *cyp2a6**1B/*4C หรือ *cyp2a6**1A/*7 หรือ *cyp2a6**1A/*8 หรือ *cyp2a6**1A/*9 หรือ *cyp2a6**1A/*10 หรือ *cyp2a6**1B/*7 หรือ *cyp2a6**1B/*8 หรือ *cyp2a6**1B/*9 หรือ *cyp2a6**1B/*10) ซึ่งจะมีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 น้อยกว่าปกติ (Intermediate Metabolizer; IM) และ 4) กลุ่มคนที่มีกลุ่มคนที่มีอัลลีลของ *cyp2a6* อื่นๆ ที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ลดลงสองชุดหรือหนึ่งชุดร่วมกับอัลลีล *cyp2a6**4C ที่ยีนของ *cyp2a6* หายไป (*cyp2a6**7/*9 หรือ *cyp2a6**7/*10 หรือ *cyp2a6**9/*10 หรือ *cyp2a6**4C/*9) หรือมีอัลลีล *cyp2a6**4C ที่ยีนของ *cyp2a6* หายไปสองชุด (*cyp2a6**4C/*4C) ทำให้มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ต่ำกว่าปกติมากหรือไม่มีเลย (Poor Metabolizer; PM) (Di et al ., 2009; Lynch & Price., 2007) โดยคนกลุ่ม PM นี้พบว่าจะย่อยสลายนิโคตินช้า มีอัตราการสูบบุหรี่ต่อวัน ความเสี่ยงในการเสพติดนิโคตินและการเป็นมะเร็งปอดน้อยกว่าผู้สูบบุหรี่ทั่วไป รวมถึงเลิกสูบบุหรี่ได้ง่ายกว่าผู้สูบบุหรี่ที่มีการทำงานของ เอนไซม์ CYP2A6 ปกติหรือดีกว่าปกติ (Miyamoto et al., 1999; Tyndale & Sellers., 2001, 2002)

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน CYP2A6 ในประเทศไทยพบว่าประเทศไทยมีประชากรที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ปกติ (EM) น้อยกว่าปกติ (IM) และต่ำกว่าปกติมาก (PM) ร้อยละ 45.4 ร้อยละ 47.9 และร้อยละ 6.7 ตามลำดับ เมื่อศึกษาความถี่ในการกระจายตัวของอัลลีลในกลุ่มประชากรพบว่าประชากรไทยมีความถี่ในการกระจายตัวของอัลลีลปกติ (*cyp2a6**1A และ *cyp2a6**1B) รวมกันถึงร้อยละ 69.3 และมีความถี่ในการกระจายตัวของ *cyp2a6**4C ที่เป็นการขาดหายไปของยีน *cyp2a6* เพียงร้อยละ 9.3 เท่านั้น (Mahavorasirikul et al., 2009; Peamkrasatam et al., 2006) ในขณะที่ร้อยละ 21.4 คือ *cyp2a6* อัลลีลอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าผู้สูบบุหรี่ร้อยละ 37.5 จะมีอัลลีลที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ปกติ (EM) และคนกลุ่มนี้จะสูบบุหรี่ต่อวันมากกว่ากลุ่มคนที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 น้อย

(IM) และต่ำกว่าปกติ (PM) (Apinanet al., 2010; Mahavorasirikul et al., 2009) ด้วยเหตุที่ประชากรส่วนใหญ่ของประเทศไทยเป็นคนที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 แบบปกติ (EM) และน้อยกว่าปกติ (IM) ทำให้ผู้สูบบุหรี่คนไทยมีแนวโน้มจะเสพติดบุหรี่ได้ง่ายเพราะระดับนิโคตินในเลือดลดลงอย่างรวดเร็ว จึงต้องสูบบุหรี่เพิ่มขึ้นเพื่อคงระดับนิโคตินในเลือดไว้ ทำให้ส่งผลเสียต่อสุขภาพทั้งผู้สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิด แม้ว่าจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความเกี่ยวข้องหรือบทบาทของความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *cyp2a6* อัลลีลต่างๆ กับความสามารถในการย่อยสลายนิโคตินและพฤติกรรมกรรมการเสพติดบุหรี่ในผู้สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่ในประเทศไทยต่อไป แต่การลดการสูบบุหรี่โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 เพื่อคงระดับของนิโคตินในเลือด นำที่จะเป็นอีกหนึ่งกลไกที่สำคัญที่น่าจะช่วยลดการสูบบุหรี่ในผู้สูบบุหรี่ได้ (ทรงกลด สารภูษิต 2554)

เนื่องด้วยการเสพติดบุหรี่จากนิโคตินเป็นสิ่งที่จะต้องได้รับการรักษาและโรคมะเร็งปอดที่เกิดจากสูบบุหรี่เป็นโรคอันตรายร้ายแรงที่พบทั้งในผู้สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิด ในปัจจุบันจึงมียาที่เป็นนิโคตินทดแทน (NRT) ต่างๆ ทั้งในรูปของนิโคตินหมากฝรั่งชนิดเคี้ยว นิโคตินชนิดแผ่นติดผิวหนังที่มีประสิทธิภาพสูงมาใช้ร่วมกับการบำบัดพฤติกรรมของผู้สูบบุหรี่ เพื่อช่วยให้ผู้สูบบุหรี่เลิกจากการสูบบุหรี่แต่การบำบัดด้วยวิธีนี้ยังไม่ได้รับความนิยมเนื่องจากความไม่สะดวกในการใช้ ไม่มีประสิทธิภาพที่รวดเร็วและมีผลข้างเคียงต่างๆ (Sellers et al, 2003) อีกหนึ่งวิธีที่ใช้ในการบำบัดคือการใช้ยาที่ไปลดการทำงานของตัวรับนิโคตินในสมองซึ่งจะส่งผลให้ลดอาการเสพติดนิโคตินลง เช่น ยาในกลุ่ม bupropion HCl และ varenicline ซึ่งเป็นยาในกลุ่มที่ใช้ก่อน (first-line drug) และยา nortriptyline และ clonidine ซึ่งเป็นยาในกลุ่มถัดไป (second-line drug) แต่ยาต่างๆ เหล่านี้ให้ผลข้างเคียงกับผู้ช้ยา โดย bupropion HCl ทำให้เกิดอาการนอนไม่หลับ ปากแห้ง มือสั่นและปวดศีรษะ (Carrozzi et al, 2008) ในขณะที่ varenicline ทำให้เกิดอาการอาเจียนและปวดหัว (Gonzalez et al, 2006; Jorenhy et al, 2006) ส่วนยา second-line drug จะทำให้เกิดอาการง่วงนอน อ่อนเพลีย มึนงง ความดันโลหิตสูง ตาพร่า หน้ามืด มือสั่น (Carrozzi et al, 2008) และเนื่องจากเอนไซม์ CYP2A6 มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายนิโคตินในคน ดังที่พบความสัมพันธ์ในผู้ที่มีการขาดหายของยีน CYP2A6 ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 จึงเป็นอีกหนึ่งวิธีทางเลือกในการช่วยบำบัดอาการเสพติดบุหรี่ได้ (Sellers et al, 2003)

ในปัจจุบันมีสารหลายตัวที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้เช่นสาร methoxsalen (8-methoxypsoralen) ที่เป็นสารในกลุ่ม pyranocoumarin ที่สามารถยับยั้งการย่อยสลายนิโคตินและยับยั้งการกระตุ้นการเกิดมะเร็งในหนูได้ (Damaj et al, 2007; Miyazaki et al, 2005) เมื่อใช้ coumarin เป็นตัวตรวจสอบพบว่า 8-MOP มีกลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ทั้งแบบแข่งขันที่ผันกลับได้ (competitive inhibition) และการยับยั้งกลไกการย่อยสลายแบบ mechanism-based inhibition (MBI-สารยับยั้งถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์แต่ผลิตภัณฑ์หรือตัวกลางที่เกิดขึ้นจับแน่นกับเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์หมดสภาพในการทำงาน) (Siu and Tyndale, 2007; von Weyarn et al, 2005) และเนื่องจากกลไกการยับยั้งแบบ MBI นี้มีการสร้างพันธะโควาเลนต์ขึ้นระหว่างสารยับยั้งกับกรดอะมิโนบริเวณเร่ง (active site) ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อย่างถาวร (enzyme inactive) และทำให้ต้องมีการสร้างเอนไซม์ใหม่ขึ้นมาแทนที่เอนไซม์ที่สูญเสียการทำงานไป ดังนั้นยา tranlycypromine และยา tryptamine ซึ่งมีกลไกการยับยั้งการทำงานแบบ competitive inhibition จึงมีประสิทธิภาพการทำงานที่ดีกว่า 8-MOP เนื่องจากประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ของยา tranlycypromine และยา tryptamine จะลดลงเมื่อได้รับสารตั้งต้นทั้ง

coumarin และนิโคตินเพิ่ม นอกจากนี้การศึกษาเบื้องต้นในคนพบว่า 8-MOP สามารถลดการย่อยสลายนิโคติน และพบว่าสามารถลดการกำจัดนิโคตินออกจากร่างกายได้ (Sellers et al, 2000, 2003a) โดยผู้สูบบุหรี่ที่ได้รับ 8-MOP หรือ tranylcypromine ร่วมกับการได้รับนิโคตินจะมีการเพิ่มระดับของนิโคตินในกระแสเลือดและลดการสูบบุหรี่ลง โดยเพิ่มระยะเวลาก่อนที่จะสูบบุหรี่จำนวนต่อไปให้ยาวนานขึ้น (Sellers et al, 2000) แม้ในที่สุดจะพบว่าทั้ง 8-MOP หรือ tranylcypromine ส่งผลกระทบต่อผู้ใช้ทำให้ต้องระงับการใช้สารทั้งสองตัวนี้ แต่ผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ในการย่อยสลายนิโคตินสามารถลดทำให้ผู้สูบบุหรี่สูบบุหรี่น้อยลงได้ (Sellers et al, 2003; Siu and Tyndale, 2007) จึงได้มีการศึกษาโดยใช้สร้างสารสังเคราะห์ต่างๆขึ้น (synthetic compounds) เพื่อนำมาใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 เช่น สารที่มีโครงสร้าง 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) เช่นเดียวกับการรักษาโรคเรื้อรังต่างๆ แนวโน้มในการรักษาการเสพติดการสูบบุหรี่ก็มีการนำสารจากธรรมชาติ (natural products) มาใช้เพื่อลดความเป็นพิษและผลข้างเคียงเช่น การใช้ menthol ซึ่งเป็นสารแต่งกลิ่นในอาหาร ผสมลงในบุหรี่และพบว่าสามารถเพิ่มครึ่งชีวิตของสารโคทีนินในกระแสเลือดในผู้สูบบุหรี่ผู้หญิงได้ (Ahijevych et al, 2002) เพราะ menthol มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ในระดับหนึ่ง (MacDougall et al, 2003) นอกจากนี้ น้ำส้มโอ (grapefruit juice) ก็สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในการย่อยสลายสาร coumarin ได้เช่นเดียวกันแต่ไม่ดีเท่ากับการยับยั้งเอนไซม์ CYP3A4 ในขณะที่สารสกัด nootkatoneบริสุทธิ์ที่สกัดจากส้มโอสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีแต่ไม่มีรายงานถึงความจำเพาะในการยับยั้ง (Merket et al, 1994; Runkel et al, 1997; Tassaneeyakul et al, 2000) ในขณะที่สารสกัดจาก Kava และสารในกลุ่ม kavalactone สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 และ CYP2C9 ที่เกี่ยวกับการย่อยสลายสารแปลกปลอมภายนอกอื่นๆได้ดีกว่าเอนไซม์ CYP2A6 (Mathews et al, 2002) สารประกอบ isothiocyanate ในกลุ่มผักกะหล่ำก็มีประสิทธิภาพที่ต่ำในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 และต้องถูกดัดแปลงในหลอดทดลองก่อนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งให้เพิ่มขึ้น (von Weymarn et al, 2007) เมื่อเปรียบเทียบกับสาร decursinolangelate ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม pyrano-coumarin ที่สกัดได้จากรากของ *Angelica gigas* (มีโครงสร้างคล้ายกับ coumarin ที่เป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ CYP2A6) ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้แบบ mechanism-based inhibition (Yoo et al, 2007) แสดงให้เห็นว่าสารจากสมุนไพรธรรมชาติที่มีสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดี น่าจะส่งผลให้ลดการย่อยสลายนิโคตินรักษาระดับนิโคตินในกระแสเลือดไว้ให้คงอยู่ในกระแสเลือดนานขึ้นส่งผลให้สูบบุหรี่ลดลงโดยไม่มีผลข้างเคียงและไม่เป็นพิษต่างร่างกาย จึงเป็นหนึ่งในแนวทางเลือกที่สำคัญในการป้องกันการเสพติดบุหรี่ รวมถึงลดระดับการเป็นมะเร็งปอดทั้งในผู้สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิดได้ต่อไป (ทรงกลด สารภูษิต 2554)

อย่างไรก็ตามการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ทั้งหมดข้างต้นมุ่งเน้นไปที่การยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 จาก อัลลีลปกติเท่านั้น ไม่ได้ศึกษาถึงผลอันเนื่องมาจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน

cyp2a6 ที่อาจส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 ที่อาจจะแตกต่างกันไปได้ ทั้งนี้ผลการค้นคว้าล่าสุดพบว่าเอนไซม์ CYP2A6 ที่ได้จากอัลลีลที่แตกต่างกันมีสมบัติของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน และยังพบว่า 8-MOP ซึ่งเป็นตัวยับยั้งมาตรฐานของเอนไซม์ CYP2A6 ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ CYP2A6 จากอัลลีลต่างๆได้แตกต่างจากเอนไซม์ CYP2A6 จากอัลลีลปกติ (Tiong et al., 2014) ด้วยเหตุนี้การวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการสร้างเอนไซม์ CYP2A6 อัลลีลต่างๆที่เคยรายงานว่าพบในประเทศไทย เพื่อเป็นตัวตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ที่สำคัญในการศึกษาการยับยั้งด้วยเอนไซม์ CYP2A6 ต่อไป

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. Agar บริษัท Criterion ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. Ammonium persulfate บริษัท Carlo erba ประเทศฝรั่งเศส
5. Albumin บริษัท ACROS ORGANIC ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. 5-Aminolevulinic acid hydrochloride (δ -ALA) MW 167.59 บริษัท SIGMA-ALDRICH,CO ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
7. Ammonium persulfate (APS) ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) MW 228.20 บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
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. Bisacrylamide MW 154.20 บริษัท Promega Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. Bardford ยี่ห้อ Bio-rad บริษัท Bio-rad Laboratories, Inc ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. Coomassie Brilliant Blue G-250
12. Coumarin ($\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_2$) MW 146.15 บริษัท Fluka Analytical ประเทศฝรั่งเศส
13. Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) MW 174.16 บริษัท Carlo erba analytical ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) MW 141.96 บริษัท Fisher scientific analytical grade ประเทศอังกฤษ
15. Ethyl alcohol absolute ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) MW 46.070 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
16. Glycerol ($\text{CH}_2\text{OHCHOHCH}_2\text{OH}$) MW 92.095 ยี่ห้อ Carlo erba บริษัท Bio Basic INC. ประเทศแคนาดา
17. Glycine MW 75.10 ยี่ห้อ UPS Grade บริษัท RESEARCH ORGANICS ประเทศสหรัฐอเมริกา
18. Hydrochloric acid (HCl) MW 36.46 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
19. Imidazole MW 68.08 บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
20. Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) MW 238.31 บริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา
21. LB agar, Difcotm, บริษัท Dickinson company ประเทศสหรัฐอเมริกา
22. N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) MW 116.20 บริษัท RESEARCH ORGANICS ประเทศสหรัฐอเมริกา

23. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ในรูปรีดิวซ์ (NADPH) บริษัท Fluka HPLC grade ประเทศสหรัฐอเมริกา
24. Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (C₆H₅CH₂SO₂F) บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
25. Potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄) MW 136.09 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
26. Sodium chloride (NaCl) MW 58.443 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
27. Sodium dodecyl sulfate (SDS) (C₁₂H₂₅OSO₃Na) MW 288.83 บริษัท BIO BASIC INC. ประเทศแคนาดา
28. Sodium hydroxide (NaOH) MW 39.997 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
29. Triton Power ยี่ห้อ Biotech บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
30. Tris-Hydrochloride ยี่ห้อ Promega บริษัท Promega Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา
31. Tris(Hydroxymethyl) - aminomethane(NH₂C(CH₂OH)₃) MW 121.14 บริษัท USB Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา
32. Triton X-100
33. Yeast extract บริษัท Bio Basic INC. ประเทศแคนาดา
34. 1,2-dilauryl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DLPC) MW 621.83 บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
35. น้ำกลั่น

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ที่ได้รับการส่งผ่านพลาสมิด DNA ที่บรรจุยีน pETΔ-23-2A6

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL-1 Blue ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน Cytochrome P450 2A6 (*cyp2a6*) (pET-Δ-23-2A6) ที่สังเคราะห์ขึ้นสำหรับงานวิจัยนี้ นำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทำการทดลองต่อไป

3.3.2 การเพิ่มปริมาณ DNA และการกลายพันธุ์พลาสมิด DNA ในหลอดทดลอง ด้วยเทคนิค site-directed mutagenesis

ทำการเตรียมสารละลายในหลอด PCR โดยมีสารละลายในหลอดดังรายละเอียดต่อไปนี้ สารละลาย บัฟเฟอร์, สารละลาย dNTPs, สารละลาย DNA template, Taq Polymerase, น้ำกลั่นที่ผ่านการอบนิ่งฆ่าเชื้อ และ forward-reward primer ที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งที่ต้องการดัดแปลง (allele5 (1436G>T), allele7(1412T>C), allele8(1454G>T), allele10(1412T>C; 1454G>T)) จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วต่ำเพื่อให้สารละลายผสมเข้ากัน นำหลอด PCR ใส่ลงในช่องของเครื่อง PCR จากนั้น

นำ PCR product ที่ได้มาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์, น้ำกลั่นที่ผ่านการอบนึ่งฆ่าเชื้อ และเอนไซม์ตัดจำเพาะ DpnI เพื่อนำ DNA template สายเก่าออก โดยนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 15 นาที ทำการตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย agarose gel และเก็บดีเอ็นเอส่วนที่เหลือไว้ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาทำการทดลองต่อไป

ตารางที่ 3-1 Sequence ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์

<i>cyp2a6</i>	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์	Sequence	
<i>cyp2a6*5</i>	1436G>T	Forward	5'-CCCAAACACGTGGICTTTGCCACGATCC-3'
		Reward	5'-GATCGTGGCAAAGACCACGTGTTTGGG-3'
<i>cyp2a6*7</i>	1412T>C	Forward	5'-CACCTAAGGACACTGACGTGTCCCC-3'
		Reward	5'-GGGGACACGTCACTGTCCTTAGGTG-3'
<i>cyp2a6*8</i>	1454G>T	Forward	5'-CTTTGCCACGATCCCACIAAACTACACCATGAGC-3'
		Reward	5'-GTCATGGTGTAGTTTAGTGGGATCGTGGCAAAG-3'
<i>cyp2a6*10</i>	1412T>C	Forward	5'-CACCTAAGGACACTGACGTGTCCCC-3'
		Reward	5'-GGGGACACGTCACTGTCCTTAGGTG-3'
	1454G>T	Forward	5'-CTTTGCCACGATCCCACIAAACTACACCATGAGC-3'
		Reward	5'-GTCATGGTGTAGTTTAGTGGGATCGTGGCAAAG-3'

3.3.3 การส่งผ่าน DNA ที่บรรจุยีน pET-Δ-23-2A6 ทั้งชนิด wild-type และ mutant ต่าง ๆ เข้าสู่เซลล์ คอมพีเทนต์ *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1-Blue

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ XL-1 Blue ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB media ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ ทำการเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการเตรียม competent cells โดยใช้สารละลาย CaCl₂ จากนั้น transform พลาสมิดดีเอ็นเอทั้งชนิด wild-type และ mutant (allele5, allele7, allele8, allele10) ด้วยวิธี heat shock เซลล์ที่ 42 องศาเซลเซียส และคัดเลือกโคโลนี ด้วยยาปฏิชีวนะ ampicillin

3.3.4 การเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ Cytochrome P450 Reductase (CPR)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ C41 (DE3) ที่ได้รับการส่งผ่านพลาสมิด DNA ที่มียีน Cytochrome P450 Reductase (CPR) (pINIII-fl rat CPR) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB media ผสมยาปฏิชีวนะ ampicillin จากนั้นเหนี่ยวนำการแสดงออกโปรตีนด้วย 0.6 mM IPTG เมื่อครบกำหนดเวลาจึงเก็บตะกอนเซลล์ที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาทำการทดลองต่อไป

3.3.5 การเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ Cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) ทั้งชนิด wild-type และ mutant ต่าง ๆ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL-1 Blue ที่มีพลาสมิด DNA ที่มียีน cytochrome P450 2A6 ทั้งชนิด wild-type และ mutant ต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB media ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin จากนั้นเหนี่ยวนำการแสดงออกโปรตีน ด้วย 0.5 mM IPTG, 0.005 mg/ml 5-aminolevulinic acid hydrochloride (δ -ALA) และ 5 mM imidazole เมื่อครบกำหนดเวลาจึงเก็บตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและนำตะกอนเซลล์ที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทำการทดลองต่อไป

3.3.6 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ NADPH-Cytochrome P450 Reductase (CPR)

นำตะกอนเซลล์ NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR) ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียส มาละลายใน bracking buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1% Triton X-100 และ 0.2 mM PMSF, 20 mM NaCl, 10% Glycerol) จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยวิธี ultra-sonication และทำบริสุทธิ์โดยผ่านนิกเกิลคอลัมน์ที่ปรับสภาพคอลัมน์ด้วยสารละลาย buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.2 mM PMSF, 0.1% Triton-X, 10% glycerol, 3 mM imidazole) นำโปรตีนที่แยกได้ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และเก็บไว้ที่อุณหภูมิที่ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาทดลอง

3.3.7 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ Cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) ทั้งชนิด wild-type และ mutant ต่าง ๆ

นำตะกอนเซลล์ Cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) ทั้งชนิด wild-type และ mutant ต่าง ๆ ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียสมาละลายใน bracking buffer B (100 mM Kpi pH 7.4, 0.1% Triton X-100, 200 mM NaCl, 10% glycerol และ 0.2 mM PMSF) จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยวิธี ultra-sonication จากนั้นทำบริสุทธิ์โดยผ่านนิกเกิลคอลัมน์ที่ปรับสภาพคอลัมน์ด้วยสารละลาย buffer B (100 mM Kpi pH 7.4, 200 mM NaCl, 3 mM Imidazole, 0.1% Triton-X, 10% glycerol, 0.2 mM PMSF) นำโปรตีนที่ได้ใส่ไมโครทิวบ์โดยมี 20% glycerol ซึ่งเป็นสารที่ช่วยรักษาสภาพของโปรตีนเก็บไว้ที่อุณหภูมิที่ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาทำการทดลอง

3.3.8 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์

3.3.8.1 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ NADPH-Cytochrome P450 Reductase (CPR)

ทำการตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CPR บริสุทธิ์โดยบ่มเอนไซม์ร่วมกับสารละลาย cytochrome c (50 μ M) แล้วจึงเติมสารละลาย NADPH (50 μ M) ลงไปเพื่อเริ่มปฏิกิริยา ติดตามผลการทำงานของเอนไซม์ในการส่งอิเล็กตรอนให้ cytochrome c เปลี่ยนเป็นรูปรีดิวซ์ (สีชมพู) ที่ค่าการดูดกลืนแสง 550 นาโนเมตร นำค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาคำนวณหาค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะในปฏิกิริยา (specific activity) ของเอนไซม์โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำที่เป็นอิสระต่อกัน

3.3.8.2 การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ Cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) ทั้งชนิด wild-type และ mutant ต่างๆ

ศึกษาปฏิกิริยาการออกซิเดชันของเอนไซม์ CYP2A6 ในการเร่งสารประกอบเรืองแสง Coumarin ไปเป็น 7-hydroxycoumarin ในหลอดทดลอง (*in vitro* reconstitution assay system) โดยบ่มเอนไซม์ CYP2A6 บริสุทธิ์ทั้งชนิด wild-type และ mutant ต่างๆ ร่วมกับเอนไซม์ CPR ในสารละลาย buffer 50 mM Tris-HCl pH 7.5 ที่มี dilaurolphatidylcholine (DLPC) เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เติมสารตั้งต้น Coumarin ที่ความเข้มข้น บ่ม 2 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมตัวให้อิเล็กตรอน 50 μ M NADPH เพื่อเริ่มปฏิกิริยา วัดการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ (7-hydroxycoumarin) โดยใช้เครื่อง fluorescence spectroscopy ที่ค่าความยาวคลื่นปลดปล่อย (emission wavelength) 460 นาโนเมตร ความยาวคลื่นกระตุ้น (excitation wavelength) 355 นาโนเมตร เป็นเวลา 3 นาที โดยทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

3.3.9 การเตรียมสารสกัดจากพืช

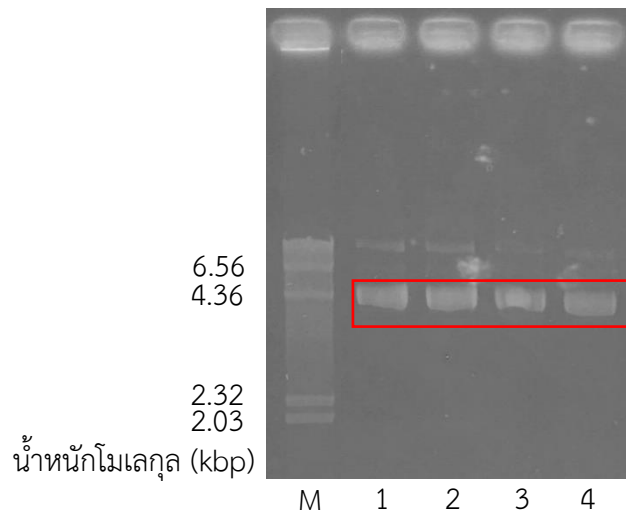
ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยมุ่งทำบริสุทธิ์สารสำคัญ Rhinacanthin-A, -B และ -C จากทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) ที่ผลการศึกษาว่าออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดี โดยทำการสกัดและยืนยันเอกลักษณ์ของสาร ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี และตรวจสอบความบริสุทธิ์และโครงสร้างของสารสำคัญด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) และ Liquid Chromatography-Mass spectrometry (LC-MS) ดังที่รายงานใน Pouyfung et al., 2014

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การเพิ่มปริมาณ DNA และการกลายพันธุ์พลาสมิดดีเอ็นเอในหลอดทดลองของยีน Cytochrome P450 2A6 (*cyp2a6*)

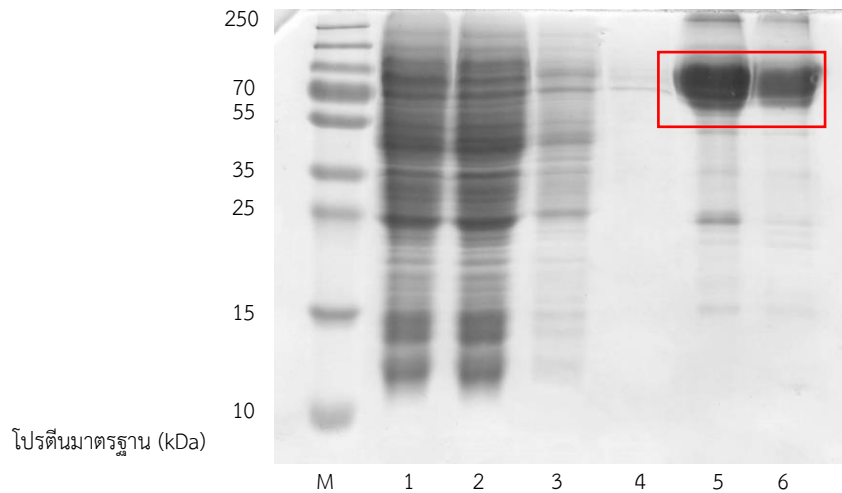
ทำการเลี้ยงเชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ XL-1 Blue ที่ได้รับการส่งผ่าน cDNA ที่มียีน *cyp2a6* (wild type) จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ และทำการกลายพันธุ์ให้ได้เป็นยีน *cyp2a6**5 (1436G>T), *cyp2a6**7 (1412T>C), *cyp2a6**8 (1454G>T) และ *cyp2a6**10 (1412T>C; 1454G>T) (หัวข้อ 3.5.2) ตรวจสอบโดยใช้ agarose gel electrophoresis (ภาพที่ 4-1) จากนั้นทำการส่งหาลำดับเบสเพื่อทำการยืนยันการกลายพันธุ์



ภาพที่ 4-1 การตรวจสอบการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีการกลายพันธุ์ โดย agarose gel electrophoresis โดยที่ M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, แถบที่ 1 = พลาสมิดดีเอ็นเอยีน *cyp2a6**5, แถบที่ 2 = พลาสมิดดีเอ็นเอยีน *cyp2a6**7, แถบที่ 3 = พลาสมิดดีเอ็นเอยีน *cyp2a6**8 และแถบที่ 4 = พลาสมิดดีเอ็นเอยีน *cyp2a6**10

4.2 การเหนี่ยวนำการแสดงออกและการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ Cytochrome P450 Reductase (CPR)

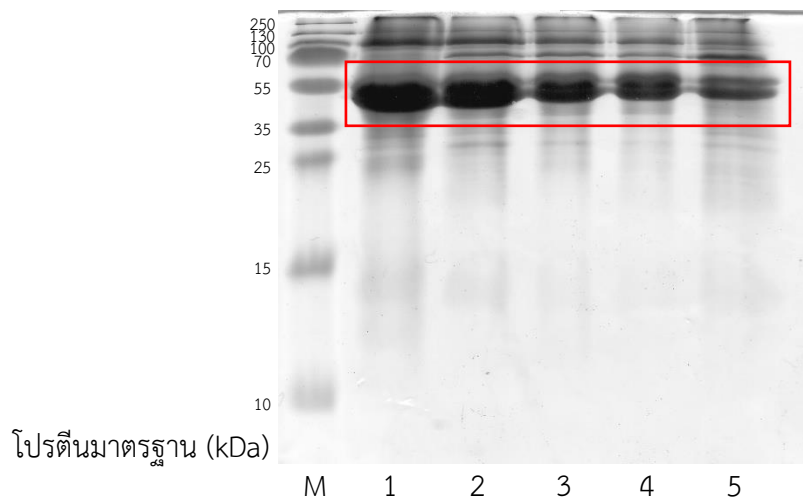
ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ C41 (DE3) ที่ได้รับการส่งผ่านพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน CPR จากนั้นทำการเหนี่ยวนำการแสดงออกและทำบริสุทธิ์ โดยเอนไซม์ CPR จะถูกชะออกที่ความเข้มข้น 50 mM imidazole และบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 100 mM imidazole (ภาพที่ 4-2)



ภาพที่ 4-2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ CPR โดย SDS-PAGE โดยที่ M = แถบโปรตีนมาตรฐาน, แถบที่ 1 = cell lysate (สารละลายส่วนใส), แถบที่ 2 = flow through (สารละลายส่วนใสที่ผ่านคอลัมน์), แถบที่ 3 = wash 1 (10 mM imidazole), แถบที่ 4 = wash 2 (20 mM imidazole), แถบที่ 5 = wash 3 (50 mM imidazole), แถบที่ 6 = elute 1 (100 mM imidazole)

4.3 การเหนี่ยวนำการแสดงออกและการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ Cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) ทั้งชนิด wild-type และ mutant ต่าง ๆ

ทำการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2A6 ทั้งชนิด wild-type และ mutant ต่าง ๆ ในเชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB media โดยการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ทำให้ได้ตะกอนเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นนำตะกอนเซลล์ *E.coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ที่มีการแสดงออกของ CYP2A6 ทั้งชนิด wild-type และ mutant ต่าง ๆ จะถูกนำไปทำให้เซลล์แตกเพื่อให้ได้ crude extract และปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ให้ได้ cell lysate (สารละลายส่วนใส) และทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านนิกเกิลคอลลัมน์ที่ปรับสภาพคอลลัมน์ด้วยสารละลาย buffer B ทำการชะเอนไซม์ CYP2A6 ทั้งชนิด wild-type และ mutant ต่าง ๆ ด้วยสารละลาย buffer B ที่มีความเข้มข้นต่างๆ โดยทำบริสุทธิ์เอนไซม์ CYP2A6 ทั้งชนิด wild-type และ mutant ต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 50 mM imidazole เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ได้ด้วย 12% (w/v) SDS-PAGE (ภาพที่ 4-3) พบว่าเอนไซม์ CYP2A6 ทั้งชนิด wild-type และ mutant ต่าง ๆ มีความบริสุทธิ์บางส่วน และมีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 56.99 kDa



ภาพที่ 4-3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ CYP2A6 โดย SDS-PAGE โดยที่ M = แถบโปรตีนมาตรฐานแถบที่ 1 = CYP2A6 (wild-type), แถบที่ 2 = CYP2A6*5, แถบที่ 3 = CYP2A6*7, แถบที่ 4 = CYP2A6*8, แถบที่ 5 = CYP2A6*10

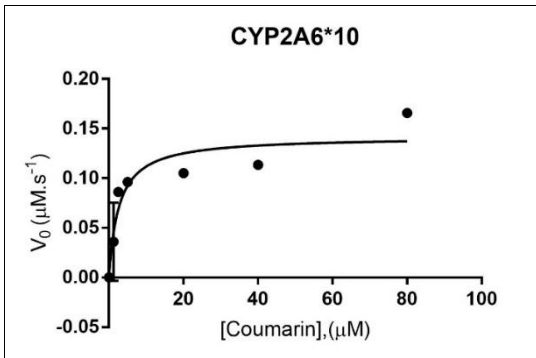
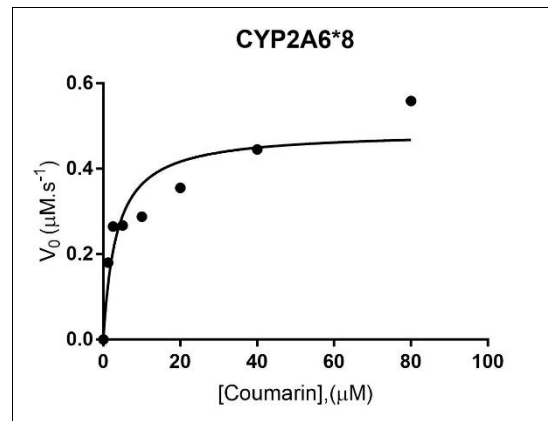
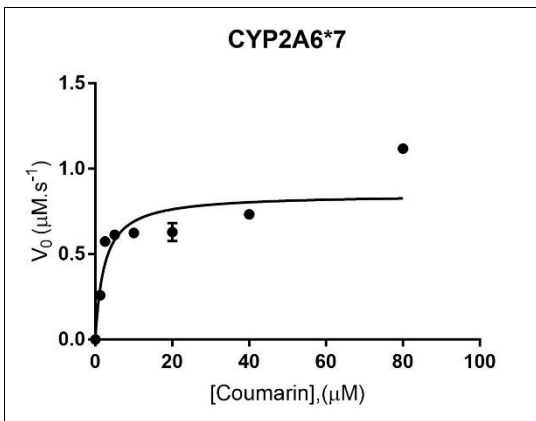
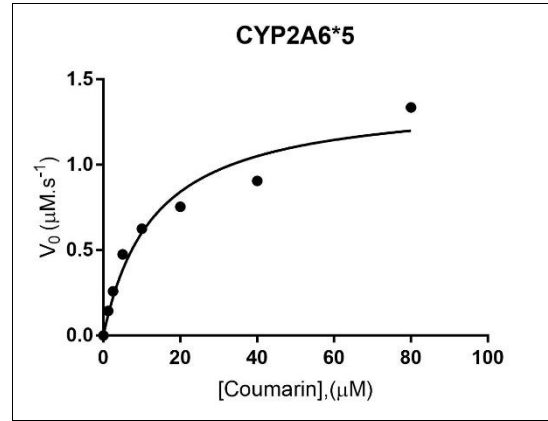
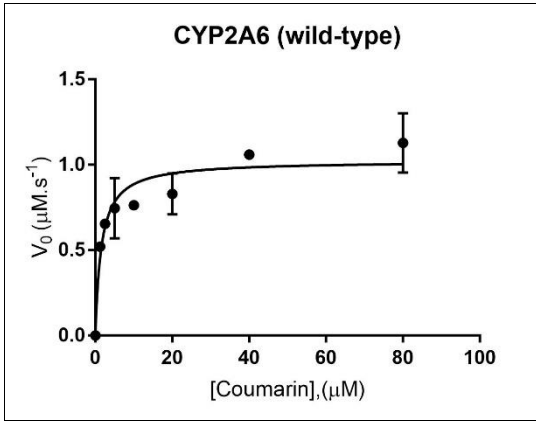
4.4 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) ทั้งชนิด wild-type และ mutant ต่าง ๆ

ทำการตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 (ศึกษาจนศาสตร์) แต่ละชนิด ในการเร่งปฏิกิริยาการสร้างสารผลิตภัณฑ์ 7-hydroxycoumarin โดยใช้สารเรืองแสง Coumarin ที่ความเข้มข้นต่างกัน โดยนำเอนไซม์ CPR, CYP2A6 ทั้งชนิด wild-type และ mutant ต่าง ๆ และสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl บ่มร่วมกับ DLPC เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นใส่สารตั้งต้น Coumarin บ่มต่ออีก 2 นาที และเริ่มปฏิกิริยาโดยการเติมสาร 50 μM NADPH ตรวจสอบติดตามด้วยเครื่อง fluorescence spectroscopy ทำการศึกษาหาค่า K_m และ V_{max} ของ CYP2A6 ทั้งชนิด Wild-type และ mutant ต่าง ๆ ที่มีต่อสารตั้งต้น Coumarin พบว่าการกลายพันธุ์ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 ที่ต่างกัน โดยพบว่าการกลายพันธุ์ที่พบใน CYP2A6*5 ส่งผลกระทบต่อการจับสารตั้งต้น coumarin โดยเพิ่มค่า K_m ถึง 8.8 เท่า ในขณะที่การกลายพันธุ์ที่พบใน CYP2A6*7 CYP2A6*8 และ CYP2A6*10 ส่งผลต่ออัตราเร่งปฏิกิริยา โดยลดอัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็น 0.8 0.5 และ 0.1 เท่าของ CYP2A6 อัลลีลปกติ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์พบว่า เอนไซม์ CYP2A6*10 มีประสิทธิภาพการทำงานที่ต่ำที่สุด รองลงมาคือ CYP2A6*5 และ CYP2A6*8 (ตารางที่ 4-1)

เมื่อศึกษาการยับยั้งของเอนไซม์ CYP2A6 อัลลีลต่างๆด้วยสารยับยั้งมาตรฐาน 8-MOP พบว่า การกลายพันธุ์ส่งผลให้ต้องเพิ่มปริมาณสารยับยั้งมากขึ้น โดยอัลลีล CYP2A6*5 ที่มีการเปลี่ยนแปลงค่า K_m มากที่สุด จะลดประสิทธิภาพของการยับยั้งมากที่สุด (ตารางที่ 4-3) จากผลการทดลองที่ได้เบื้องต้นแสดงให้เห็นว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมส่งผลให้เอนไซม์มีสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาและถูกยับยั้งได้แตกต่างกัน เช่นเดียวกับที่เคยมีรายงานว่า เอนไซม์ CYP2A6 ที่ได้จากอัลลีลที่แตกต่างกันมีสมบัติของเอนไซม์ที่ต่างกัน และยังพบว่า 8-MOP ซึ่งเป็นตัวยับยั้งมาตรฐานของเอนไซม์ CYP2A6 ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ CYP2A6 จากอัลลีลต่างๆได้แตกต่างจากเอนไซม์ CYP2A6 จากอัลลีลปกติ (Tiong et al., 2014)

ตารางที่ 4-1 ค่าจนศาสตร์เอนไซม์ (K_m (μM), V_{max} ($\mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$) และ k_{cat} ($\mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$)/($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) และค่า IC_{50} ของเอนไซม์ CYP2A6 ทั้งชนิด Wild-type และ mutant ต่าง ๆ

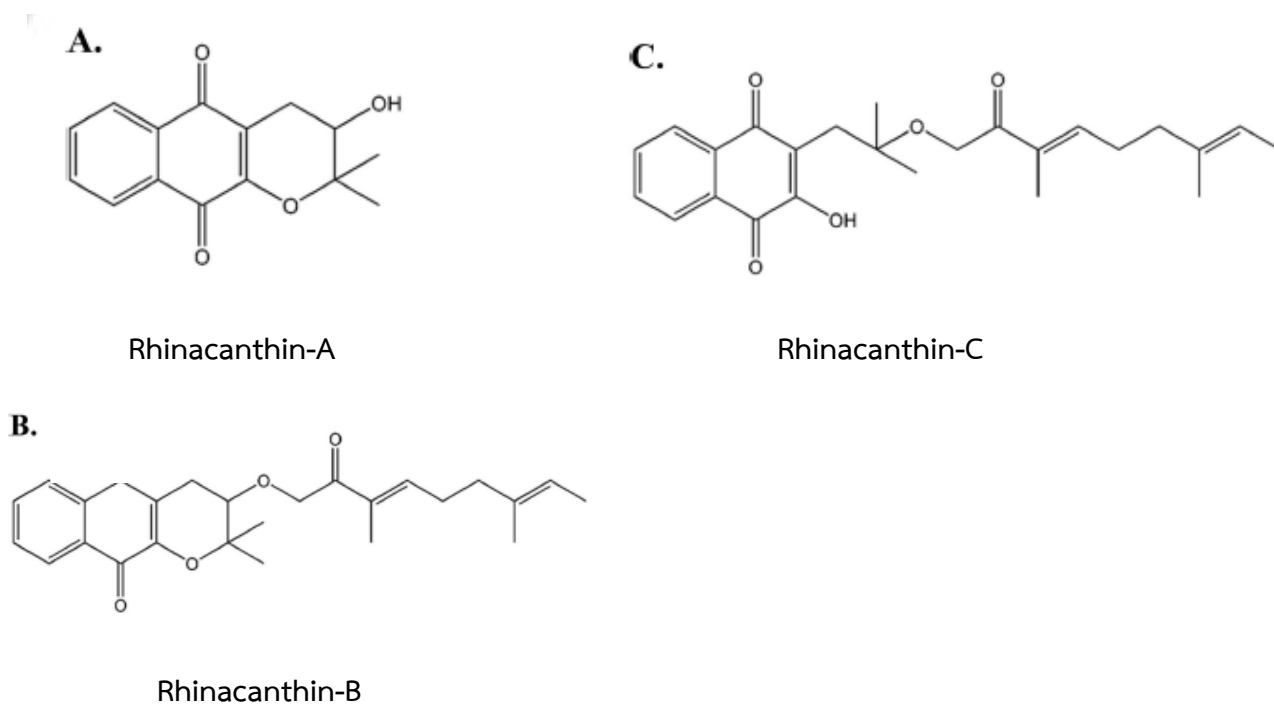
CYP2A6	จนศาสตร์เอนไซม์			
	K_m (μM)	V_{max} ($\mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$)	k_{cat} / K_m	8-MOP IC_{50} (μM)
Wild-type	1.54 \pm 0.49	1.02 \pm 0.06	0.66	0.20 \pm 0.09
CYP2A6*5	13.24 \pm 3.51	1.40 \pm 0.13	0.11	3.24 \pm 0.51
CYP2A6*7	2.31 \pm 1.19	0.85 \pm 0.09	0.37	0.31 \pm 0.08
CYP2A6*8	3.42 \pm 1.42	0.49 \pm 0.05	0.14	0.62 \pm 0.04
CYP2A6*10	2.69 \pm 1.17	0.14 \pm 0.02	0.05	0.95 \pm 0.17



ภาพที่ 4-4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยากับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารตั้งต้น Coumarin ในปฏิกิริยาของ CYP2A6 ทั้งชนิด wild-type และ mutant ต่าง ๆ

4.5 การสกัดสารจากทองพันชั่งและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B

ทำการสกัดพืชสมุนไพรทองพันชั่งด้วยสารละลายเอทานอล จากนั้นแยกสารสกัดแบบลำดับส่วน ได้ส่วนสกัดเฮกเซน (Hexane) เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate) และน้ำ (Water) สกัดและยืนยันเอกลักษณ์ของสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี และตรวจสอบความบริสุทธิ์และโครงสร้างของสารสำคัญด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) และ Liquid Chromatography-Mass spectrometry (LC-MS) ดังที่รายงานใน Pouyfung et al., 2014 ได้สารสำคัญ Rhinacanthin-A, -B และ -C (ภาพที่ 4-4)



ภาพที่ 4-4 โครงสร้างสาร Rhinacanthin-A,-B และ -C จากสมุนไพรทองพันชั่ง

4.6 สรุปผลการทดลอง

ผลจากการศึกษาพบว่า ผู้วิจัยสามารถทำการกลายพันธุ์เอนไซม์ CYP2A6 จากอัลลีลปกติให้กลายเป็นอัลลีล *5, *7,*8 และ *10 ที่เคยมีรายงานว่าพบในประเทศไทยได้ และการกลายพันธุ์ดังกล่าวส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยา coumarin 7-hydroxylation ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 โดยสารยับยั้งมาตรฐาน โดยต้องใช้สารยับยั้งมากขึ้น แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมอาจส่งผลต่อประสิทธิภาพในการนำสารยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ไปใช้

4.7 ข้อเสนอแนะ

ยังต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกในการยับยั้งการทำงานของสารยับยั้งมาตรฐานและสารสำคัญจากสมุนไพรที่เคยรายงานว่าออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีต่อเอนไซม์ CYP2A6 อัลลีลต่างๆ

บรรณานุกรม

- Ahijevych KL, Tyndale RF, Dhatt RK, Weed HG, and Browning KK (2002) Factors influencing cotinine half-life during smoking abstinence in African American and Caucasian women. *Nicotine Tob Res* 4:423–431.
- Benowitz,NL (2008) Clinical pharmacology of nicotine: implications for understanding, preventing and treating tobacco addiction. *Clin Pharmacol Ther* 83:531-541.
- Bernhardt R. (2006). Cytochrome P450 as versatile biocatalysts. *Biotechnology*. 124: 28-145.
- Brown, P.J., Bedard, LL., Reid, KR., Petsikas, D., Massey TE. (2007) Analysis of CYP2A contributions to metabolism of 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in human peripheral lung microsomes. *Drug Metabolism Disposition*, 35, 2086-2094.
- Bundhamcharoen K (2012). Economic Burden from Smoking Related Diseases in Thailand in 2009. National burden of disease program, International Health Policy Program.
- Carrozzi L, Pistelli F, Viegi G. (2008). Pharmacotherapy for smoking cessation. *Therapeutic Advances 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.
- Flammang AM, Gelboin HV, Aoyama T, Gonzalez FJ & McCoy GD (1992) Nicotine metabolism by cDNA-expressed human cytochrome P-450s. *Biochem Arch* 8: 1-8.
- Fowler S and Zhang H. (2008) *In Vitro* Evaluation of Reversible and Irreversible Cytochrome P450 Inhibition: Current Status on Methodologies and their Utility for Predicting Drug–Drug Interactions. *The AAPS Journal*. 10 (2): 410-424
- Gonzales D, Rennard SI, Nides M, Oncken C, Azoulay S, Billing CB (2006) Varenicline, an alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, vs sustained-release bupropion and placebo for smoking cessation: a randomized controlled trial. *JAMA* 296: 47–55.
- Grime KH, Bird J, Ferguson D, and Riley RJ. (2009) Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 enzymes: An evaluation of early decision making in vitro approaches and drug–drug interaction prediction methods. *European journal of pharmaceutical sciences*. 36: 175–191
- Guengerich FP. (2001). Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. *Chemical Research in Toxicology*. 14(6): 611–650.
- Hecht SS (1998) Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobaccospecific N-nitrosamines. *Chem Res Toxicol* 11: 559-603.
- Hecht SS (1999a) DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutat. Res*. 424:

127–142.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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.

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

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

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.

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

Smith GBJ, 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.

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

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

Tiong KH., Mohammed Yunas NA., Yiap BC., Tan EL., Ismail R., Ong CE (2014) Inhibitory potency of 8-methoxypsoralen on cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) allelic variants CYP2A6 15, CYP2A6 16, CYP2A6 21 and CYP2A6 22: differential susceptibility due to different sequence locations of the mutations. *PLoS One.* 27;9(1):e86230. doi: 10.1371/journal.pone.0086230. eCollection 2014.

Thongjam, S., Rongnoparut, P., & Saraputit, 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 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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ทรงกลด สารภูษิตและพรพิมล รงค์นพรัตน์ (2554) การศึกษาการศึกษากฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ที่ย่อยสลายนิโคตินในคนของน้ำสมุนไพรและน้ำผลไม้ไทย รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ศูนย์วิจัยและจัดการความรู้เพื่อการควบคุมยาสูบ

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

รัตนา อินทรานุกกรณ์ (2550) การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร พืชมคั้งที่ 2 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ 215 หน้า

ศรัณญา เบญจกุล และคณะ (2551) สถานการณ์การบริโภคยาสูบของประชากรไทย พ.ศ. 2534 – 2550 ศูนย์วิจัยและจัดการความรู้เพื่อการควบคุมยาสูบ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 228 หน้า

ศิริวรรณ พิทยรังสฤษฏ์และคณะ (2552) สรุปลงานการณการควบคุมการบริโภคยาสูบของประชากรไทย พ.ศ. 2552 ศูนย์วิจัยและจัดการความรู้เพื่อการควบคุมยาสูบ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 66 หน้า

ศิริวรรณ พิทยรังสฤษฏ์และคณะ (2554) สรุปลงานการณการควบคุมการบริโภคยาสูบของประชากรไทย พ.ศ. 2552 ศูนย์วิจัยและจัดการความรู้เพื่อการควบคุมยาสูบ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล