



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 อัลลีลต่างๆและเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดสของสมุนไพรเพื่อ
การลดการสูบบุหรี่และป้องกันโรคทางสมอง

Inhibitory activity of *Pluchia indica*.L against Monoamine Oxidase enzyme and
polymorphic CYP2A6 enzymes, pharmacotherapeutic target enzymes for
smoking cessation and neurological disorders

โดย

ผศ.ดร.ทรงกลด สารภูษิต

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

รศ.ดร. พรพิมล รงศ์นพรัตน์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผศ. ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ฉันทยาภรณ์ วงษ์ศรี

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชลบุรี

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒

มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 อัลลีลต่างๆและเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดสของสมุนไพรเพื่อ
การลดการสูบบุหรี่และป้องกันโรคทางสมอง

Inhibitory activity of *Pluchia indica*.L against Monoamine Oxidase enzyme and
polymorphic CYP2A6 enzymes, pharmacotherapeutic target enzymes for
smoking cessation and neurological disorders

โดย

ผศ.ดร.ทรงกลด สารภูษิต

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

รศ.ดร. พรพิมล รงศ์นพรัตน์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผศ. ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ฉันทยาภรณ์ วงษ์ศรี

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชลบุรี

กันยายน พ.ศ. ๒๕๖๓

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง “ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 อัลลีลต่างๆและเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดสของสมุนไพร
กลุ่มเพื่อการลดการสูบบุหรี่และป้องกันโรคทางสมอง” สามารถมีผลการทดลองที่ก้าวหน้ามาจนได้เสร็จสมบูรณ์
เป็นรายงานฉบับนี้ ต้องขอขอบคุณการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล
(งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒ มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการ
วิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา ๓๗.๔/๒๕๖๒ ซึ่งผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ นอกจากนี้แล้วผู้วิจัย
ขอขอบคุณนิสิต-นักศึกษาทุกคนที่ช่วยทำการทดลอง รวมถึงคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาและคณะ
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลที่ให้ความสนับสนุนด้านสถานที่และเครื่องมือต่างๆในการทำการทดลอง

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 อัลลีลต่างๆและเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดสของสมุนไพรมะขามเทศเพื่อการลดการสูบบุหรี่และป้องกันโรคทางสมอง

ชื่อผู้วิจัย ทรงกลด สารภูษิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

พรพิมล รงค์พันธ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

เอกรัฐ ศรีสุข ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ฉันทยาภรณ์ วงษ์ศรี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชลบุรี

เอนไซม์ไซโตโครม P4502A6 (CYP2A6) เป็นเอนไซม์สำคัญในระดับทำหน้าที่ย่อยสลายสารนิโคตินใน บุหรี่ ทำให้ระดับนิโคตินในเลือดลดลง ส่งผลให้ผู้สูบบุหรี่จำเป็นต้องสูบบุหรี่เข้าไปใหม่อย่างต่อเนื่องเพื่อคงระดับ นิโคตินในเลือด ให้ยังคงกระตุ้นการหลั่งสารโดปามีนในสมอง และเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดส (Monoamine oxidase: MAO) เป็นเอนไซม์สำคัญในสมอง ทำหน้าที่ย่อยสลายสารโดปามีน ทำให้ระดับโดปามีนในสมอง ลดลง ทำให้ผู้สูบบุหรี่เกิดความอยากสูบบุหรี่ ดังนั้นการลดการสูบบุหรี่โดยการลดการทำงานของเอนไซม์ทั้งสอง จึงเป็นกระบวนการทางเลือกในการลดการสูบบุหรี่อย่างปลอดภัย นอกจากนี้การยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ MAO ยังเป็นหนึ่งในกลไกสำคัญในการรักษาโรคเรื้อรังทางสมองเช่น โรคอัลไซเมอร์อีกด้วย จาก การศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสำคัญในกลุ่ม Thiophene 1-3 ที่ทำบริสุทธิ์ได้จากสมุนไพรมะขามเทศที่พบได้ทั่วไปในภาค ตะวันออก สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยกลไกที่ผันกลับไม่ได้และยับยั้งเอนไซม์ MAO ด้วย กลไกแบบผันกลับได้ โดย Thiophene-3 ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองได้ดีที่สุด โดยยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ MAO-B ด้วยค่า IC_{50} $3.48 \pm 0.73 \mu M$ และยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยค่า IC_{50} $3.90 \pm 0.20 \mu M$ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการศึกษากิจกรรมยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 อัลลีลที่พบในประชากรไทยได้แก่ CYP2A6*5, CYP2A6*7, CYP2A6*8 และ CYP2A6*10 พบว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ CYP2A6 ยังส่งผลการถูกยับยั้งด้วยสารยับยั้ง CYP2A6 มาตรฐาน (8-MOP) และสารสำคัญ Thiophene-3 โดยไม่เปลี่ยน กลไกในการยับยั้ง โดยเอนไซม์ CYP2A6*5 มีการเพิ่มขึ้นของค่า IC_{50} สูงที่สุด ($19.45 \pm 2.11 \mu M$) ผล การศึกษาแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสมุนไพรมะขามเทศในการจะนำไปพัฒนาเป็นสมุนไพรมะขามเทศเพื่อป้องกันโรคเรื้อรัง ทางสมอง และการนำมาพัฒนาเพื่อใช้ลดการสูบบุหรี่ เพราะสามารถยับยั้งการเสพติดบุหรี่ได้ทั้งกลไกการคง ระดับนิโคตินและการคงระดับโดปามีน ในรูปแบบของการใช้ปริมาณสารสำคัญที่แตกต่างกันไปตามความ หลากหลายทางพันธุกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 ในผู้ต้องการเลิกสูบบุหรี่

Abstract

Project Title Inhibitory activity of *Pluchia indica*.L against Monoamine Oxidase enzyme and polymorphic CYP2A6 enzymes, pharmacotherapeutic target enzymes for smoking cessation and neurological disorders

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

Thunyaporn Wonsri, Reginal Medical Science Center 6, Chonburi

The liver specific cytochrome P4502A6 (CYP2A6) is an important enzyme responsible for nicotine clearance while the brain-specific Monoamine Oxidase (MAO) is responsible for dopamine metabolism. The nicotine-mediated activity of CYP2A6 resulting to reduction of blood nicotine levels and subsequently reduce the level of dopamine in brain by MAO activity. To maintain the pleasure allttude, smokers keep smoking to maintain both blood nicotine and brain dopamine levels, resulting in addiction. Inhibition of both CYP2A6 and MAO enzymes has been proposed as a safety alternative approach for smoking cessation. In addition, inhibition of MAO has been recogined as a drug target for various brain chronic disease such as Alzheimer's disease. This study showed that three isolated constituents (Thiophene 1-3) from Pluchea indica that wildly distribute in the Eastern part of Thialand could potently inhibited CYP2A6 enzyme and MAO enzyme with an irreversible and reversible mechanisim, respectively. Thiophene-3 is the most potent inhibitor with and IC_{50} values of $.90 \pm 0.20 \mu\text{M}$ for CYP2A6 and $3.48 \pm 0.73 \mu\text{M}$ for MAO-B enzyme. Interestingly, the genetic polymorphism of CYP2A6 enzyme that has been report in Thailand (CYP2A6*5, CYP2A6*7, CYP2A6*8 and CYP2A6*10) affects nicotine metabolism and inhibition potency by the standard CYP2A6 inhibitor and Thiophene -3, but not the inhibition mechanism. The results demonstrated that thiophene-3 exhibited less inhibition activity against CYP2A6*5 enzyme ($IC_{50} 19.45 \pm 2.11 \mu\text{M}$). In summary, the results suggested the potential usage of *P. indica* as a target for preventing neurological disorders and for smoking cessation approach.

บทที่ 1

บทนำ

1.1ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

นิโคตินเป็นสารที่เป็นส่วนประกอบหลักของบุหรี่ย ออกฤทธิ์ที่ระบบประสาทส่วนกลางให้หลังสารสื่อประสาทโดปามีนซึ่งมีผลทำให้ผู้สูบบุหรี่มีพฤติกรรมติดการสูบบุหรี่ ทำให้ร่างกายได้รับสารพิษต่างๆส่งผลให้เกิดโรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจต่างๆ เมื่อเข้าสู่ร่างกายนิโคตินส่วนใหญ่จะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ CYP2A6 ในตับได้เป็นสารประกอบโคทีนินที่จะถูกย่อยสลายต่อไปก่อนถูกกำจัดออกจากร่างกายทางปัสสาวะ นอกจากนี้ยังพบว่าสารในกลุ่มไนโตรซามีนที่บรรจุในบุหรี่ยสามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ CYP2A13 ในปอดเกิดเป็นสารประกอบที่ก่อมะเร็งรุนแรงและเหนี่ยวนำให้เกิดโรคมะเร็งปอดในผู้สูบบุหรี่ได้ จากการศึกษาพบว่าในคนที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ลดลงเพราะเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นกับเอนไซม์ CYP2A6 ทั้งการแทนที่กรดอะมิโน หรือการเปลี่ยนแปลงกลับด้าน หรือการขาดหายไปของยีน จะมีการย่อยสลายนิโคตินน้อยลง ส่งผลให้ลดปริมาณการสูบบุหรี่ลงและสามารถหยุดการสูบบุหรี่ได้ง่ายขึ้น ด้วยเหตุนี้การลดการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ที่ตับจะส่งผลให้คงระดับนิโคตินในกระแสเลือดและคงระดับการหลังสารสื่อประสาทโดปามีน ทำให้ผู้สูบบุหรี่ยังมีความสุขและสูบบุหรี่น้อยลง ในขณะที่การยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 จะลดการกระตุ้นสารก่อมะเร็งในบุหรี่ย ส่งผลให้ลดช่วยอัตราการเกิดโรคมะเร็งปอดจากสารก่อมะเร็งรุนแรงจากบุหรี่ยได้ เช่นสาร 8-Methoxysalen หรือสารสำคัญจากทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) ที่กลุ่มผู้วิจัยได้เคยรายงานฤทธิ์ในการยับยั้งทั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบว่าอีกหนึ่งกลไกที่เกี่ยวข้องกับการสูบบุหรี่คือการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดส (MAO) ในสมองที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารสื่อประสาทโดปามีน โดยในผู้อยากเลิกสูบบุหรี่ที่ทานยา seligeline ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ MAO พร้อมกัน จะคงระดับนิโคตินและโดปามีนได้นานและส่งผลให้สูบบุหรี่ลดลง เช่นเดียวกับผลงานวิจัยในปี 2015 กลุ่มของผู้วิจัยได้ตีพิมพ์รายงานการวิจัยถึงสารสำคัญในหญ้าดอกขาว (*Centropogon cinereus*) ที่กระทรวงสาธารณสุขสนับสนุนให้ใช้ลดการสูบบุหรี่ในประเทศไทยในปัจจุบัน สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งทั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ MAO ได้ดี แสดงให้เห็นว่าสารสำคัญจากสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 สามารถยับยั้งเอนไซม์ MAO และสามารถนำมาช่วยลดการสูบบุหรี่ได้

ล่าสุดในปี 2017 กลุ่มผู้วิจัยได้รายงานฤทธิ์ยับยั้งเพิ่มเติมของสารสำคัญจากหญ้าดอกขาวว่า นอกจากจะสามารถยับยั้งทั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ MAO พร้อมกัน ซึ่งมีส่วนช่วยในการลดการสูบบุหรี่เพราะไปคงระดับนิโคตินและโดปามีนได้นานซึ่งจะส่งผลให้สูบบุหรี่ลดลงได้นั้น สารสำคัญในหญ้าดอกขาวสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 ที่กระตุ้นสารก่อมะเร็งในบุหรี่ยได้ด้วย แสดงให้เห็นว่าหญ้าดอกขาวที่มียาสูบให้ใช้เพื่อลดการสูบบุหรี่ได้นั้นสามารถช่วยลดโอกาสการเกิดโรคมะเร็งปอดไปด้วยพร้อมกัน (Boonroung et al., 2017) ในงานวิจัยเดียวกันกลุ่มผู้วิจัยยังค้นพบสารสำคัญใหม่อีกจากพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่ชื่อว่าพลู (*Pluchia indica*.L) ซึ่งเป็นพืชป่าชายเลนที่พบมากมีการนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์ชาสมุนไพรอย่างแพร่หลายในภาคตะวันออกเพราะมีสรรพคุณในการใช้รักษาโรคต่างๆ

โดยพบว่าผลิตภัณฑ์ชาสมุนไพรของกลุ่มของวิสาหกิจชุมชน ต. บ่อ อ. ชลุม จ. จันทบุรี ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ในหลอดทดลองได้ดียิ่งกว่าสารสำคัญจากหน้าดอกขาว (Boonroung et al., 2017) อย่างไรก็ตามผลการศึกษาสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ทั้งหมดของผู้วิจัยนั้นคือเอนไซม์ CYP2A6 จาก *cyp2a6* อัลลีลปกติ (*cyp2a6*1*) แต่เนื่องด้วยยีน *cyp2a6* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมและส่งผลต่อฟีโนไทป์ในการเสพติดบุหรี่ที่แตกต่างกัน แต่การศึกษาส่วนมากมุ่งเน้นไปที่การยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 จากอัลลีลปกติ (*cyp2a6*1*) เท่านั้น

ผู้วิจัยมุ่งหวังที่จะศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ที่เกิดขึ้นจากยีน *cyp2a6* อัลลีลต่างๆ ที่เคยมีรายงานพบว่าพบในคนไทยของสารสำคัญจากกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดี โดยผู้วิจัยจะทำการแสดงออกและทำบริสุทธิ์เอนไซม์ CYP2A6 จากอัลลีลต่างๆที่เคยมีรายงานพบว่าพบในประเทศไทย ซึ่งได้จัดทำขึ้นไว้แล้ว ร่วมกับทำบริสุทธิ์สารสกัดจากกลุ่มที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และศึกษากลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 จากอัลลีลต่างๆในหลอดทดลอง รวมถึงผู้วิจัยจะค้นคว้าเพิ่มเติมถึงฤทธิ์ของสารสำคัญจากกลุ่มในการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO ในสมอง ซึ่งนอกจากจะเกี่ยวข้องกับกลไกการเสพติดการสูบบุหรี่แล้วยังเกี่ยวข้องกับการป้องกันเกิดโรคทางสมองต่างๆเช่น อัลไซเมอร์หรือพาร์กินสันอีกด้วย ผลการศึกษาที่ได้จะช่วยพัฒนาในการนำผลิตภัณฑ์พื้นบ้านในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมาช่วยลดการสูบบุหรี่ เพิ่มมูลค่าของสินค้าจากชุมชนเพราะพืชชนิดเดียวสามารถออกฤทธิ์ทั้งลดการสูบบุหรี่ได้ทั้งยับยั้งการย่อยสลายนิโคตินที่ตับและการย่อยสารสื่อประสาทโดปามีนที่สมอง รวมถึงช่วยลดภาวะการเกิดโรคทางระบบประสาทจากการทำงานที่มากเกินไปของเอนไซม์ MAO ได้ด้วยอีกหนึ่งทาง

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. แสดงออกและทำบริสุทธิ์เอนไซม์ CYP2A6 จากอัลลีลต่างๆ
2. ศึกษาสมบัติเอนไซม์ CYP2A6 ของอัลลีลต่างๆนั้น
3. ทำบริสุทธิ์สารสำคัญจากกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13
4. ศึกษากลไกในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของสารสกัดจากกลุ่มต่อเอนไซม์ CYP2A6 อัลลีลต่างๆ
5. ศึกษาฤทธิ์และกลไกการยับยั้งเอนไซม์ MAO ของสารสกัดจากกลุ่มเพื่อการใช้ลดการสูบบุหรี่และโรคทางสมอง

1.3 สมมติฐานของการทดลอง

สารสำคัญจากสมุนไพรสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 จากอัลลีลต่างๆ และสามารถยับยั้งเอนไซม์ MAO ได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทดลอง

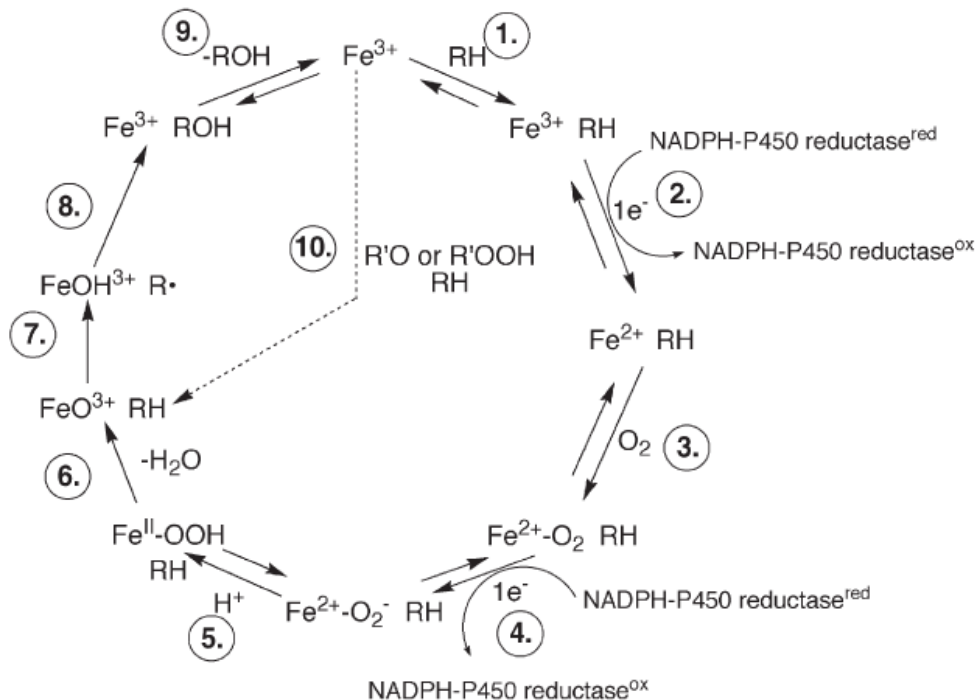
1. ฤทธิ์ของสารสำคัญจากสมุนไพรที่สามารถใช้ยับยั้งเอนไซม์ที่แตกต่างกันได้

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ทฤษฎีพื้นฐานที่เกี่ยวข้อง

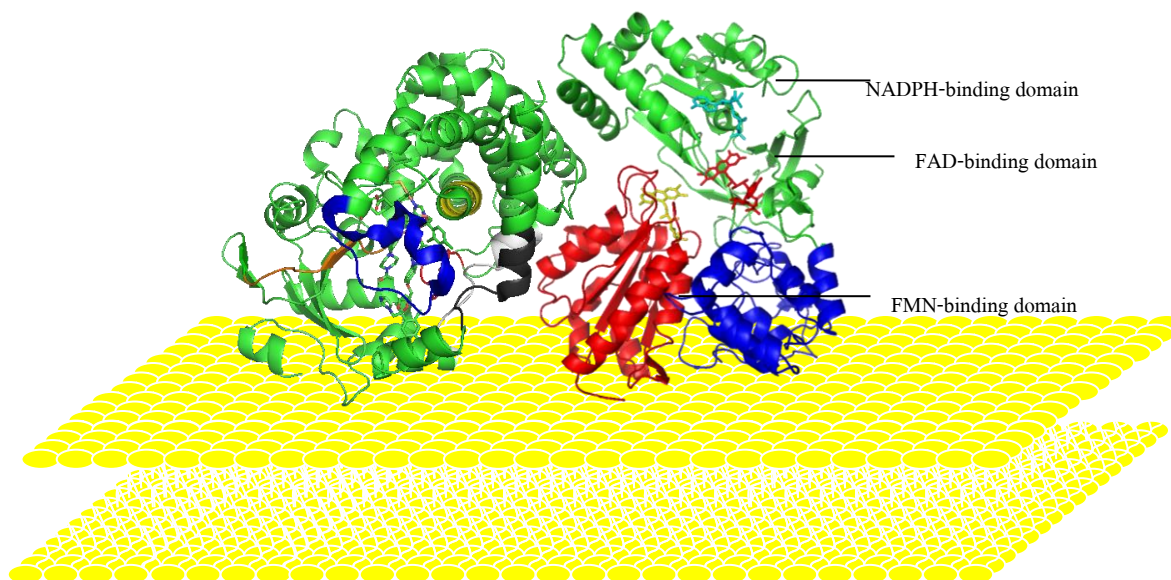
เอนไซม์ Cytochrome P450 (CYPs หรือ P450s) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการการเมแทบอลิซึมของสารเคมีที่มีอยู่ในร่างกายเช่น ฮอร์โมนและกรดไขมันต่างๆ และสารที่ร่างกายได้รับจากภายนอกเช่น ยาและสิ่งปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมต่างๆ เนื่องจากเอนไซม์ P450s พบเป็นจำนวนมากในร่างกายและในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด 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 ส่วนตัวอิเล็กตรอนตัวที่สองจะกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในโมเลกุลของออกซิเจนให้เกิดเป็นสารประกอบไอออนไฮดรอกซิล (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) รวมถึงตัวรับอิเล็กตรอนอื่นๆ เช่น 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 โดเมนคือ 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)

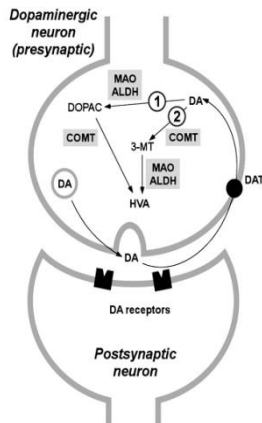


ภาพที่ 2-2 แบบจำลองของ Cytochrome P450s (ซ้าย) และ P450s Oxidoreductase (ขวา) ซึ่งเรียงตัวกันอยู่ใน Endoplasmic reticulum

2.2 เอนไซม์ Mono Amine Oxidase

เอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดส (MAO; EC 1.4.3.4.) หรือเอนไซม์ tyramine oxidase (Hare, 1928) เป็นเอนไซม์ที่พบที่บริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย มีหมู่ฟลาวิน (Flavin) เป็นองค์ประกอบ พบได้ในเซลล์ในเนื้อเยื่อหลายชนิดโดยเฉพาะที่สมองและตับในมนุษย์ ทำหน้าที่ย่อยสลายสารประกอบเอมีนหนึ่งหมู่ทั้งแบบไพรมารี เซคันดารี และเทอร์นารีเอมีน (Edmondson et al., 2009; review in Hamon et al., 2013; review in Patil et al., 2013) MAO มีสองรูปแบบ (isoform) ในมนุษย์ ได้แก่ รูปแบบ A และ B (MAO-A และ MAO-B) (Lan et al., 1989) และเอนไซม์ทั้งสองแม้จะพบที่บริเวณเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียชั้นนอกเหมือนกัน เเร่งปฏิกิริยาแบบเดียวกันรวมถึงมีโครงสร้างของเอนไซม์ใกล้เคียงกัน แต่ความแตกต่างที่บริเวณเร่ง (active site) ทั้งที่บริเวณทางเข้าและบริเวณจับสารตั้งต้น ส่งผลให้เอนไซม์ทั้งสองมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นและตัวยับยั้งที่แตกต่างกัน ส่งผลให้เอนไซม์ MAO-A และ MAO-B มีบทบาทหน้าที่ที่ต่างกันในร่างกาย โดยเฉพาะที่สมองซึ่ง MAO-A ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารสื่อประสาท serotonin ที่ Serotonergic neuron และ Norepinephrin ที่ Noradrenergic neuron ในขณะที่ MAO-B เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารสื่อประสาท Dopamine ที่ Dopaminergic

ปฏิกิริยาของเอนไซม์ MAO จะให้สารผลิตภัณฑ์คืออัลดีไฮด์และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นพิษกับเซลล์ ในกรณีของไพรมารีเอมีนจะได้สารแอมโมเนียแต่ในกรณีการย่อยสลายเซคันดารีหรือเทอร์นารีจะได้สารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ อัลดีไฮด์ที่ได้จะถูกเร่งปฏิกิริยาอีกครั้งโดยเอนไซม์ Aldehyde dehydrogenase (ALDH) ในขณะที่ H_2O_2 จะถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) หรือ catalase หรือเกิดปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่าในสภาวะที่เกิดพยาธิสภาพความผิดปกติเกิดขึ้น เช่นในผู้ป่วยโรคพาร์กินสันจะมีความผิดปกติในการทำงานของเอนไซม์ในการลดอนุมูลอิสระเหล่านี้ แต่จะมีการทำงานของ MAO ปกติหรือเพิ่มขึ้น (ซึ่งมักจะเพิ่มขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น) ทำให้เกิดการย่อยสลาย MNTs มากขึ้น เกิด H_2O_2 มากขึ้น ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อเซลล์โดยเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะ oxidative stress และสภาวะเซลล์ประสาทตายได้ (neuronal apoptosis) (Vaya et al., 2012) ทำให้เกิดการศึกษาค้นคว้าผลผลิตต่างๆที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO (MAO inhibitor; MAOI) ในสมองเพื่อคงระดับของสารสื่อประสาทและลดอาการพยาธิสภาพของโรคทางสมองดังกล่าวมากมาย นอกจากนี้ยังได้มีการนำมาใช้ยับยั้งเอนไซม์ MAO เพื่อให้คงระดับสารสื่อประสาทโดปามีนในสมองเพื่อลดการสับสนหรืออีกด้วย (Tranlylcypromine และ Selegiline)



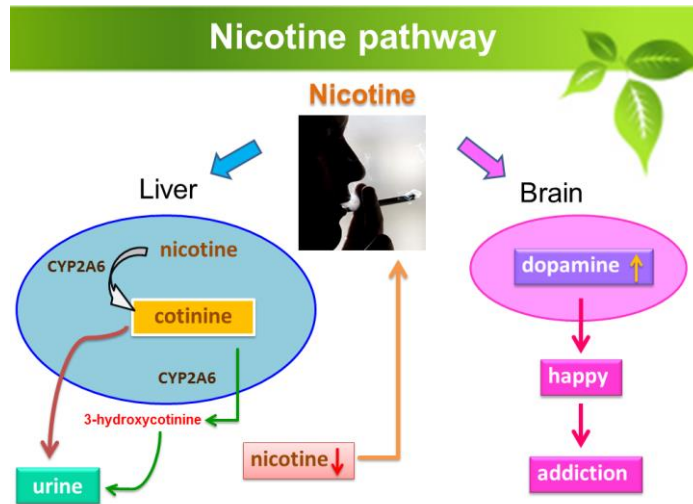
ภาพที่ 2-3 กลไกการย่อยสลายสารสื่อประสาท Dopamine ที่ Dopaminergic neuron ซึ่งมีสองกลไกสำคัญ โดยกลไกแรก DA จะถูกย่อยสลายโดย MAO และ ALDH ได้ 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) ที่จะถูกเร่งปฏิกิริยาต่อโดย catechol-O-methyltransferase (COMT) ไปเป็น homovanillic acid (HVA) และกลไกที่สองที่ COMT จะเปลี่ยน DA ไปเป็น 3-methoxytyramine (3-MT) ที่จะเร่งปฏิกิริยาต่อด้วย MAO และ ALDH ได้ HVA (Bortolato et al., 2008)

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคอันเนื่องมาจากการสูบบุหรี่จัดเป็นปัญหาสำคัญในหลายประเทศทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย จากการศึกษาการคาดการณ์ขององค์การอนามัยโลก (WHO) คาดว่าในปี พ.ศ. 2573 จะมีผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งถึง 8 ล้านคน (WHO, 2008) สำหรับประเทศไทยในปี 2549 มีการประมาณการว่าโรกระบบทางเดินหายใจจากการติดบุหรี่ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจถึง 9.86 ล้านบาท (Leartsakulpanich et al, 2007) ล่าสุดจากผลการสำรวจในปี พ.ศ. 2554 พบว่ามีคนไทยสูบบุหรี่ถึง 10.90 ล้านคนหรือเกือบ 20.87 % ของประชากรทั้งประเทศ โดยผู้เสพบุหรี่ส่วนใหญ่อยู่ในวัยทำงาน (อายุ 25-59 ปี) โดยที่อัตราการสูบบุหรี่เพิ่มขึ้นในกลุ่มเยาวชน กลุ่มผู้ไม่เคยเรียนหนังสือ และผู้อาศัยอยู่นอกเขตเทศบาล รวมถึงผู้มีฐานะในระดับปานกลางทั่วไป โดยมีเพียง 1.77 ล้านคนเท่านั้นที่เคยและพยายามเลิกบุหรี่แต่ไม่สำเร็จโดยมีค่าเฉลี่ยของการเลิกบุหรี่ได้ก่อนกลับมาสูบบุหรี่ซ้ำคือ 11.44 เดือน โดยสาเหตุเกิดจากการหงุดหงิด/ฉุนเฉียว/โกรธง่าย ถึงร้อยละ 38.61 และเพราะความเครียดร้อยละ 27.42 และพบว่าถึงแม้เลิกบุหรี่ไปแล้วถึง 20 ปีก็สามารถกลับมาสูบบุหรี่ได้อีก แสดงให้เห็นว่าการเสพติดบุหรี่เพียงหนึ่งครั้งส่งผลให้ต้องเสพติดบุหรี่และสามารถเลิกการเสพติดได้ยาก (ศรีนยาและคณะ 2551; ศิริวรรณ และคณะ 2552; 2555)

บุหรี่ประกอบไปด้วยสารประกอบต่างๆมากกว่า 4,000 ชนิด โดยที่มากกว่า 40 ชนิดเป็นสารพิษและสารก่อมะเร็ง ดังนั้นโรคทางเดินหายใจเช่น โรคมะเร็งปอด โรคถุงลมโป่งพอง จึงเป็นโรคที่พบมากในกลุ่มผู้สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิด นอกจากนี้กลุ่มผู้สูบบุหรี่ยังเป็นกลุ่มเสี่ยงที่จะมีอาการของโรคหัวใจขาดเลือด โรคหัวใจวาย และโรคที่เกี่ยวข้องต่างๆ อุบัติการณ์การเกิดโรคต่างๆเหล่านี้เกิดขึ้นเนื่องจากนิโคตินที่เป็นสารประกอบหลักในบุหรี่มีผลทำให้หัวใจเต้นเร็วขึ้นและเพิ่มความดันโลหิตขึ้น โดยนิโคตินซึ่งเป็นสารประกอบสำคัญที่มีผลให้เสพติดการสูบบุหรี่ไปออกฤทธิ์กระตุ้นระบบการตอบสนองต่อความยินดี ผ่านการจับกับตัวรับนิโคตินที่บริเวณปลายประสาทของสมองส่วน VTA ทำให้เกิดการหลั่งสารสื่อประสาทโดปามีนออกมามากขึ้น มีผลทำให้ผู้สูบบุหรี่มีความรู้สึกสุขสบายใจ ลดความเครียดต่างๆ ผู้สูบบุหรี่จึงต้องสูบบุหรี่ตลอดเวลาเพื่อคงระดับของนิโคตินในกระแสเลือดและในสมองให้เกิดความรู้สึกดังกล่าวต่อไป ส่งผลให้ผู้สูบบุหรี่และบุคคลใกล้เคียงได้รับสารพิษต่างๆ ในบุหรี่ไปด้วย (Benowitz, 2008; Hukkanen et al, 2005) ทั้งนี้ประมาณ 80-90% ของนิโคตินที่เข้าสู่ร่างกายผ่านทาง การดูดซึมที่เนื้อเยื่อคัดหลังที่ปาก (oral mucosa) ระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหาร จะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในตับแล้วจึงถูกกำจัดออกทางปัสสาวะ (Benowitz, 2008; Flammang et al, 1992) โดยกลไกหลักในการกำจัดนิโคตินออกจากร่างกายคือการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของนิโคตินไปเป็นสารประกอบโคทีนินซึ่งสามารถตรวจพบได้ในน้ำเลือดและปัสสาวะของผู้สูบบุหรี่ โดยนิโคตินจะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ CYP2A6 ในตับเกิดเป็นสารประกอบ nicotine $\Delta^{1(5)}$ -iminium ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นโคทีนินโดยเอนไซม์ aldehyde oxidase ซึ่งปฏิกิริยานี้สามารถเร่งโดยเอนไซม์ CYP2A13 ที่อยู่ในระบบทางเดินหายใจได้ด้วยเช่นเดียวกันแต่ในปริมาณที่น้อยกว่ามาก (Hukkanen et al, 2005) หลังจากนั้นโคทีนินที่เกิดขึ้นจะเกิดปฏิกิริยา hydroxylation ได้เป็นสารประกอบต่างๆ เช่น *trans*-3'-hydroxycotinine, 5'-hydroxycotinine และ normicotine ซึ่งสุดท้ายทั้งโคทีนินและสารประกอบที่ได้จากโคทีนินต่างๆ จะถูกเติมหมู่น้ำตาล (glucuronation) และขับออกทางปัสสาวะ (ภาพที่ 2-4) นอกเหนือไปจากความสามารถในการย่อยสลายนิโคตินแล้ว เอนไซม์ CYP2A6 ยังถูกพบว่าสามารถย่อยสลายสารประกอบอื่นๆได้ เช่นสาร coumarin ไปเป็นผลิตภัณฑ์ 7-hydroxycoumarin (ปฏิกิริยา

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



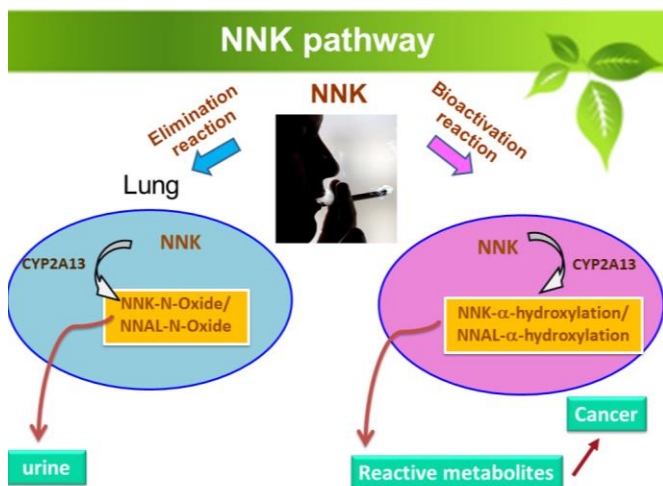
ภาพที่ 2-4 กลไกการกำจัดนิโคตินของร่างกาย

สำหรับที่สมองนั้นเมื่อนิโคตินไปออกฤทธิ์ให้เกิดการหลั่งสารสื่อประสาทโดปามีน สารสื่อประสาทนี้จะไปกระตุ้นให้เกิดความตื่นตัวและมีความสุข อย่างไรก็ตามสารสื่อประสาทโดปามีนจะถูกดูดซึมกลับและถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Monoamine Oxidase ชนิด B (MAO-B) ที่ปลายประสาทในระบบ Dopaminergic ซึ่งการย่อยสลายนี้จะส่งผลให้ระดับโดปามีนในสมองลดลง จึงต้องการนิโคตินมากระตุ้นให้มีการหลั่งสารสื่อประสาทนี้ออกมาอย่างต่อเนื่อง เป็น reinforcement effect ของการเสพติดการสูบบุหรี่ของผู้สูบบุหรี่ โดยเอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดส (MAO; EC 1.4.3.4.) หรือเอนไซม์ tyramine oxidase (Hare, 1928) เป็นเอนไซม์ที่พบที่บริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย มีหมู่ฟลาวิน (Flavin) เป็นองค์ประกอบ พบได้ในเซลล์เนื้อเยื่อหลายชนิดโดยเฉพาะที่สมองและตับในมนุษย์ มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบเอมีนหนึ่งหมู่ทั้งแบบไพรมารี เซคันดารี และเทอร์นารีเอมีน (Edmondson et al., 2009; review in Hamon et al., 2013; review in Patil et al., 2013) จากการศึกษาพบว่า MAO มีสองรูปแบบ (isoform) ในมนุษย์ ได้แก่ รูปแบบ A และ B (MAO-A และ MAO-B) (Lan et al., 1989) และเอนไซม์ทั้งสองแม้จะพบที่บริเวณเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียชั้นนอกเหมือนกัน แรงปฏิกิริยาแบบเดียวกันรวมถึงมีโครงสร้างของเอนไซม์ใกล้เคียงกัน แต่ความแตกต่างที่บริเวณเร่ง (active site) ทั้งที่บริเวณทางเข้าและบริเวณจับสารตั้งต้น ส่งผลให้เอนไซม์ทั้งสองมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นและตัวยับยั้งที่แตกต่างกัน ส่งผลให้เอนไซม์ MAO-A และ MAO-B มีบทบาทหน้าที่แตกต่างกันในร่างกาย โดยเฉพาะที่สมองซึ่ง MAO-A ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารสื่อประสาท serotonin ที่ Serotonergic neuron และ Norepinephrin ที่ Noradrenergic neuron ในขณะที่ MAO-B เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารสื่อประสาท Dopamine ที่ Dopaminergic

ปฏิกิริยาของเอนไซม์ MAO จะให้สารผลิตภัณฑ์คืออัลดีไฮด์และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นพิษกับเซลล์ ในกรณีของไพรมารีเอมีนจะได้สารแอมโมเนียแต่ในกรณีการย่อยสลายเซคันดารีหรือเทอร์นารีจะได้

สารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ อัลดีไฮด์ที่ได้จะถูกเร่งปฏิกิริยาอีกครั้งโดยเอนไซม์ Aldehyde dehydrogenase (ALDH) ในขณะที่ H_2O_2 จะถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) หรือ catalase หรือเกิดปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่าในสภาวะที่เกิดพยาธิสภาพความผิดปกติเกิดขึ้น เช่นในผู้ป่วยโรคพาร์กินสันจะมีความผิดปกติในการทำงานของเอนไซม์ในการลดอนุมูลอิสระเหล่านี้ แต่จะมีการทำงานของ MAO ปกติหรือเพิ่มขึ้น (ซึ่งมักจะเพิ่มขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น) ทำให้เกิดการย่อยสลาย MNTs มากขึ้นเกิด H_2O_2 มากขึ้น ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อเซลล์โดยเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะ oxidative stress และสภาวะเซลล์ประสาทตายได้ (neuronal apoptosis) (Vaya et al., 2012) ทำให้เกิดการศึกษาค้นคว้าผลิตยาต่างๆที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO (MAO inhibitor; MAOI) ในสมองเพื่อคงระดับของสารสื่อประสาทและลดอาการพยาธิสภาพของโรคทางสมองดังกล่าวมากมาย นอกจากนี้ยังได้มีการนำมาใช้ยับยั้งเอนไซม์ MAO เพื่อให้คงระดับสารสื่อประสาทโดปามีนในสมองเพื่อลดการสับสนหรืออีกด้วย (Tranylcypromine และ Selegiline)

นอกจากสารนิโคตินแล้วยังพบว่าในบุหรี่ยังมีสารสำคัญคือ NNK [4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone] หรือ NNAL [4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol] และ NNN [N9-nitrosornicotine] (Patten et al, 1996; Pelkonen et al, 2000) ที่เหนี่ยวนำทำให้เกิดมะเร็งในหนูทดลองและสัตว์ทดลองทุกชนิดที่ทำการทดสอบ (Hecht, 1998; Hecht, 1999a, 1999b) เมื่อถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์ CYP2A13 ในเยื่อบุทางเดินหายใจและปอดที่เป็นเอนไซม์ที่มีความใกล้เคียงในลำดับกรดอะมิโนกับ CYP2A6 ถึง 93.5% (Su et al, 2000) โดย CYP2A13 สามารถย่อยสลายสารก่อมะเร็ง NNK จากบุหรี่ยังมีประสิทธิภาพด้วยค่า K_m ที่ต่ำและ V_{max} ที่สูง (Su et al, 2000) ส่งผลให้เกิดโรคมะเร็งปอดชนิด adenocarcinoma ซึ่งเป็นโรคมะเร็งปอดที่พบมากในในผู้สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิดผู้สูบบุหรี่ (Hecht et al, 1998) โดยปกติเมื่อเข้าสู่ร่างกาย NNK ส่วนใหญ่จะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ CYP2A13 ที่แสดงออกในปริมาณมากที่ปอดและที่เซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจได้เป็นสารประกอบ NNK-N-oxide และ NNAL ซึ่งจะถูกออกซิไดส์อีกครั้งด้วย CYP2A13 เกิดเป็นสารประกอบ NNAL-N-Oxide หรือถูกเติมหมู่น้ำตาลกลายเป็น NNAL-glucoronide จากนั้นสารประกอบทั้งหมดจะถูกกำจัดออกจากร่างกายทางปัสสาวะ ซึ่งเป็นบทบาทที่สำคัญของ CYP2A13 ในการกำจัดสารพิษ (NNK-detoxification) ออกจากร่างกาย อย่างไรก็ตาม CYP2A13 สามารถเกิดปฏิกิริยา 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) ที่มีฤทธิ์เป็นสารก่อมะเร็งที่รุนแรงขึ้นได้ด้วยเช่นกัน (NNK-metabolic activation) สารประกอบที่สร้างขึ้นจากปฏิกิริยาข้างเคียงเหล่านี้จะสร้างเป็นสารประกอบซับซ้อนกับสารพันธุกรรมดีเอ็นเอเกิดเป็น DNA-pyridyloxobutylating และ DNA-pyridylhydroxybutylating complexes ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นกลไกที่สำคัญในการทำให้เกิดมะเร็ง (carcinogenesis) โดยสารประกอบ NNK ในบุหรี่ยังมีเฉพาะอย่างยิ่งโรคมะเร็งต่างๆในระบบทางเดินหายใจ เช่นโรคมะเร็งปอด มะเร็งกล่องเสียง (Hecht, 1998; Hecht, 1999a, 1999b) (ภาพที่ 2-5)



ภาพที่ 2-5 กลไกในการกระตุ้นสารก่อมะเร็ง

เนื่องด้วยการเสพติดบุหรี่จากนิโคตินเป็นสิ่งที่จะต้องได้รับการรักษาและโรคมะเร็งปอดที่เกิดจากสูบบุหรี่เป็นโรคอันตรายร้ายแรงที่พบทั้งในผู้สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิด ในปัจจุบันจึงมียาที่เป็นนิโคตินทดแทน (NRT) ต่างๆ ทั้งในรูปของนิโคตินหมากฝรั่งชนิดเคี้ยวหรือชนิดติดผิวหนัง มาใช้ร่วมกับการบำบัดพฤติกรรมของผู้สูบบุหรี่ เพื่อช่วยในการบำบัดและช่วยให้ผู้สูบบุหรี่เลิกจากการสูบบุหรี่ อย่างไรก็ตามการบำบัดด้วยวิธีนี้ยังไม่ได้รับความนิยมเนื่องจากความไม่สะดวก ไม่มีประสิทธิภาพที่รวดเร็วและมีผลข้างเคียงต่างๆ (Sellers et al, 2003b) อีกหนึ่งวิธีที่ใช้ในการบำบัดคือการใช้ยาที่ไปลดการทำงานของตัวรับนิโคตินในสมองซึ่งจะส่งผลให้ลดอาการเสพติดนิโคตินลง เช่น ยาในกลุ่ม bupropion HCl และ varenicline ซึ่งเป็นยาในกลุ่มที่ใช้ก่อน (first-line drug) และยา nortriptyline และ clonidine ซึ่งเป็นยาในกลุ่มถัดไป (second-line drug) แต่ยาต่างๆเหล่านี้ให้ผลข้างเคียงกับผู้รับยา โดย bupropion HCl ทำให้เกิดอาการนอนไม่หลับ ปากแห้ง มือสั่นและปวดศีรษะ (Carrozzi et al, 2008) ในขณะที่ varenicline ทำให้เกิดอาการอาเจียนและปวดหัว (Gonzalez et al, 2006; Jorenyh et al, 2006) ส่วนยา second-line drug จะทำให้เกิดอาการง่วงนอน อ่อนเพลีย มึนงง ความดันโลหิตสูง ตาพร่า หน้ามืด มือสั่น (Carrozzi et al, 2008) และเนื่องจากเอนไซม์ CYP2A6 มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายนิโคตินในคน และพบว่าลักษณะทางพันธุกรรมมีผลต่อพฤติกรรมการสูบบุหรี่ 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) และการลดการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 น่าจะมีผลลดอัตราการเกิดโรคมะเร็งปอดได้ ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 จึงเป็นอีกหนึ่งวิธีทางเลือกในการช่วยบำบัดอาการเสพติดบุหรี่และลดอัตราการเกิดโรคมะเร็งปอดได้ (Sellers et al, 2003a) เช่นสาร methoxsalen (8-methoxypsoralen) ที่เป็นสารในกลุ่ม pyranocoumarin ที่สามารถยับยั้งการย่อยสลายนิโคตินและ

ยับยั้งการกระตุ้นการเกิดมะเร็งในหนูได้ (Damaj et al, 2007; Miyazaki et al, 2005) โดยเมื่อใช้ coumarin เป็นตัวตรวจสอบพบว่า 8-MOP มีกลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ทั้งแบบแข่งขันที่ผันกลับได้ (competitive inhibition) และการยับยั้งกลไกการย่อยสลายแบบ mechanism-based inhibition (สารยับยั้งถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์แต่ผลิตภัณฑ์หรือตัวกลางที่เกิดขึ้นจับแน่นกับเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์หมดสภาพในการทำงาน เพราะมีการสร้างพันธะโควาเลนต์ขึ้นระหว่างสารยับยั้งกับกรดอะมิโนบริเวณแอคทีฟของเอนไซม์ (active site) ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อย่างถาวร (enzyme inactive) และทำให้ต้องมีการสร้างเอนไซม์ใหม่ขึ้นมาแทนที่เอนไซม์ที่สูญเสียการทำงานไป) (Siu and Tyndale, 2007; von Weymarn et al, 2005; ทรงกลด สารภูษิต; 2554) นอกจากนี้ยังมียาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งทั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ MAO เช่นยา Tranylcypromine และ Selegiline สามารถไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ที่ย่อยสลายนิโคตินในตับและการทำงานของเอนไซม์ MAO ในสมอง ทำให้คงระดับนิโคตินและโดปามีนได้นานและส่งผลให้สูบบุหรี่ลดลง (Siu and Tyndale, 2008) ทำให้คงความรู้สึกที่มีความสุขให้นานขึ้น จึงช่วยลดการสูบบุหรี่ได้ แต่ยาทั้งสองส่งผลกระทบต่อผู้ใช้ (review in Di et al., 2009 และ Xi et al., 2009)

เนื่องด้วยแนวโน้มในการรักษาโรคที่ย้อนกลับไปใช้สารจากธรรมชาติ (natural products) เพื่อลดความเป็นพิษและผลข้างเคียงเช่น การใช้ menthol ซึ่งเป็นสารแต่งกลิ่นในอาหาร ผสมลงในบุหรี่และพบว่าสามารถเพิ่มครึ่งชีวิตของสารโคตินินในกระแสเลือดในผู้สูบบุหรี่ผู้หญิงได้ (Ahijevych et al, 2002) เพราะ menthol มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ในระดับหนึ่ง (MacDougall et al, 2003) นอกจากนี้ น้ำส้มโอ (grapefruit juice) ก็สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในการย่อยสลายสาร coumarin ได้เช่นเดียวกันแต่ไม่ดีเท่ากับการยับยั้งเอนไซม์ CYP3A4 ในขณะที่สารสกัด nootkatone บริสุทธิ์ที่สกัดจากส้มโอสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีแต่ไม่มีรายงานถึงความจำเพาะในการยับยั้ง (Merket et al, 1994; Runkel et al, 1997; Tassaneeyakul et al, 2000) ในขณะที่สารสกัดจาก Kava และสารในกลุ่ม kavalactone สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 และ CYP2C9 ที่เกี่ยวกับการย่อยสลายสารแปลกปลอมภายนอกอื่น ๆ ได้ดีกว่าเอนไซม์ CYP2A6 (Mathews et al, 2002) สารประกอบ isothiocyanate ในกลุ่มผักกะหล่ำก็มีประสิทธิภาพที่ต่ำในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 และต้องถูกดัดแปลงในหลอดทดลองก่อนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งให้เพิ่มขึ้น (von Weymarn et al, 2007) เมื่อเปรียบเทียบกับสาร decursinolangelate ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม pyrano-coumarin ที่สกัดได้จากรากของ *Angellica gigas* (มีโครงสร้างคล้ายกับ coumarin ที่เป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ CYP2A6) ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้แบบ mechanism-based inhibition (Yoo et al, 2007) แสดงให้เห็นว่าสารจากสมุนไพรธรรมชาติที่มีสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดี น่าจะส่งผลให้ลดการย่อยสลายนิโคตินรักษาระดับนิโคตินในกระแสเลือดไว้ให้คงอยู่ในกระแสเลือดนานขึ้นส่งผลให้สูบบุหรี่ลดลงโดยไม่มีผลข้างเคียงและไม่เป็นพิษต่อร่างกาย จึงเป็นหนึ่งในแนวทางเลือกที่สำคัญในการป้องกันการเสพติดบุหรี่ รวมถึงลดระดับการเป็นมะเร็งปอดทั้งในผู้สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิดได้ต่อไป (ทรงกลด สารภูษิต 2554)

ในการนี้กลุ่มผู้วิจัยได้ประสบความสำเร็จในการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ที่ย่อยสลายนิโคตินในตับของมนุษย์ในหลอดโดยใช้เอนไซม์ CYP2A6 อัลลีลปกติ (*cyp2a6*1*) พบว่าพืชสมุนไพรไทยหลายชนิดมีฤทธิ์ในการการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 บริสุทธิ์ในหลอดทดลองได้ (Boonruang et al., 2017;

Pouyfung P et al, 2012; 2013; 2014; Prasopthum et al., 2013; Sarapusit et al, 2012; Thongjam S et al, 2012;2013; Wongsri et al., 2014) และสามารถทำปฏิกิริยาและศึกษากลไกการยับยั้งของสารกลุ่มดังกล่าวได้จากพืช 3 ชนิด ดังนี้ ๑) สารกลุ่ม Rhinacanthin-A,B,C จากต้นทองพันชั่ง (1-3) ที่ยับยั้งทั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้ ๒) สารในกลุ่มกลุ่มพลาโวนอยด์จากหญ้าดอกขาว (*Venonea cenerea*) ที่กระทรวงสาธารณสุข สนับสนุนให้ใช้ลดการสูบบุหรี่ในประเทศไทยในปัจจุบัน ได้แก่ apigenin, chrysoeriol, luteolin และ quercetin (4-7) ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งด้วยกลไกแบบผันกลับได้ (Boonruang et al., 2017; Pouyfung et al., 2014; Prasopthum et al., 2015) ในขณะที่ในกลุ่ม hirsutinolide-type sesquiterpene lactones (8 α -(2-methylacryloyloxy)-hirsutinolide-13-O-acetate, 8 α -(4-hydroxymethacryloyloxy)-hirsutinolide-13-O-acetate, 8 α -tigloyloxyhirsutinolide-13-O-acetate, และ 8 α -(4-hydroxytigloyloxy)-hirsutinolide-13-O-acetate) (8-12) ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ *cyp2a6**1 ด้วยกลไกการยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้แบบ Mechanism Based Inhibition (MBI) นอกจากนี้สารทั้งสองกลุ่ม (4-12) สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งทั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ MAO ได้ดี (Pouyfung P et al, 2014; Prasopthum et al., 2015) แสดงให้เห็นว่าสารสำคัญจากสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 สามารถยับยั้งเอนไซม์ MAO ซึ่งจะไปคงระดับนิโคตินและโดปามีนได้นานซึ่งจะส่งผลให้สูบบุหรี่ลดลงและสามารถนำมาช่วยลดการสูบบุหรี่ได้ ล่าสุดในปี 2017 กลุ่มผู้วิจัยได้รายงานฤทธิ์ยับยั้งเพิ่มเติมของสารสำคัญจากหญ้าดอกขาวว่า สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 ที่กระตุ้นสารก่อมะเร็งในบุหรี่ได้ด้วย แสดงให้เห็นว่าหญ้าดอกขาวที่มีนโยบายให้ใช้เพื่อลดการสูบบุหรี่ได้นั้น สามารถช่วยลดโอกาสการเกิดโรคมะเร็งปอดไปด้วยพร้อมกัน (Boonroung et al., 2017) ในงานวิจัยเดียวกันกลุ่มผู้วิจัยยังค้นพบสารสำคัญใหม่อีกได้แก่ สารในกลุ่มพลาโวนอยด์ 4, 6 และ 7 และ สารในกลุ่ม thiophene ได้แก่ thiophene 2-(penta-1,3-dien-1-yl)-5-(4-acetoxy-3-hydroxybuta-1-yn-1-yl) thiophene, 2-(prop-1-ynyl)-5-(6-acetoxy-5-hydroxyhexa-1, 3-diinyl) thiophene, 2-(prop-1-ynyl)-5-(5, 6-dihydroxyhexa-1,3-diinyl) thiophene (13-15) จากพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่ชื่อว่าขลุ้ (*Pluchia indica*.L) ซึ่งเป็นพืชป่าชายเลนที่พบมาก มีการนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์ชาสมุนไพรอย่างแพร่หลายในภาคตะวันออก เพราะมีสรรพคุณในการใช้รักษาโรคต่างๆ จากผลิตภัณฑ์ชาสมุนไพรขลุ้ของวิสาหกิจชุมชน ต. บ่อ อ. ชลุม จ. จันทบุรี ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ด้วยกลไกการยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้แบบ Mechanism Based Inhibition (MBI) ในหลอดทดลองได้ดียิ่งกว่าสารสำคัญจากหญ้าดอกขาว (Boonroung et al., 2017) อย่างไรก็ตามการศึกษาสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ทั้งหมดของผู้วิจัยนั้นคือเอนไซม์ CYP2A6 จาก *cyp2a6* อัลลีลปกติ (*cyp2a6**1) แต่เนื่องด้วยยีน *cyp2a6* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมและส่งผลต่อฟีโนไทป์ในการเสพติดบุหรี่ที่แตกต่างกัน แต่การศึกษาส่วนมากมุ่งเน้นไปที่การยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 จากอัลลีลปกติ (*cyp2a6**1) เท่านั้น

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

สำคัญในการกำหนดพฤติกรรมเภสัชกรรมของยาสูบ บุหรี่ ทั้งนี้สามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้ดังนี้ 1) กลุ่มคนที่มีอัลลีลของ *cyp2a6* ปกติ มากกว่าสองชุด (*cyp2a6**1X2A หรือ *cyp2a6**1X2B) ที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ดีกว่า ปกติมาก (Ultrarapid Metabolizer; UM) 2) กลุ่มคนที่มีอัลลีลของ *cyp2a6* ปกติ สองชุด (*cyp2a6**1A/*1A หรือ *cyp2a6**1A/*1B หรือ *cyp2a6**1B/*1B) ที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ปกติ (Extensive Metabolizer; EM) ซึ่งคนในทั้งสองกลุ่มนี้พบว่าจะย่อยสลายนิโคตินได้เร็วและสูบบุหรี่ยิ่งมากกว่าคนปกติ 3) คนที่มีอัลลีลของ *cyp2a6* ปกติ หนึ่งชุดและอัลลีลอื่นๆ 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 มีอัตราการสูบ บุหรี่ต่อวัน ความเสี่ยงในการเสพติดนิโคตินและการเป็นมะเร็งปอดน้อยกว่าผู้สูบ บุหรี่ทั่วไป รวมถึงเลิกสูบ บุหรี่ได้ง่ายกว่าผู้สูบ บุหรี่ที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ปกติหรือดีกว่าปกติ (Miyamoto et al., 1999; Tyndale & Sellers., 2001, 2002) จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน CYP2A6

ประเทศไทยมีประชากรที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ปกติ (EM) น้อยกว่าปกติ (IM) และต่ำกว่าปกติ มาก (PM) ร้อยละ 45.4 ร้อยละ 47.9 และร้อยละ 6.7 ตามลำดับ เมื่อศึกษาความถี่ในการกระจายตัวของอัลลีลในกลุ่ม ประชากรพบว่าประชากรไทยมีความถี่ในการกระจายตัวของอัลลีลปกติ (*cyp2a6**1A และ *cyp2a6**1B) รวมกันถึง ร้อยละ 69.3 และมีความถี่ในการกระจายตัวของ *cyp2a6**4C ที่เป็นการขาดหายไปของยีน *cyp2a6* เพียงร้อยละ 9.3 เท่านั้น (Mahavorasirikul et al., 2009; Peamkrasatam et al., 2006) ในขณะที่ร้อยละ 21.4 คือ *cyp2a6* อัลลีล อื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าผู้สูบ บุหรี่ร้อยละ 37.5 จะมีอัลลีลที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ปกติ (EM) และคน กลุ่มนี้จะสูบ บุหรี่ต่อวันมากกว่ากลุ่มคนที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 น้อย (IM) และต่ำกว่าปกติ (PM) (Apinanet al., 2010; Mahavorasirikul et al., 2009) ด้วยเหตุที่ประชากรส่วนใหญ่ของประชากรไทยเป็นคนที่มีการ ทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 แบบปกติ (EM) และน้อยกว่าปกติ (IM) ทำให้ผู้สูบ บุหรี่คนไทยมีแนวโน้มจะเสพติด บุหรี่ได้ ง่ายเพราะระดับนิโคตินในเลือดลดลงอย่างรวดเร็ว จึงต้องสูบ บุหรี่เพิ่มขึ้นเพื่อคงระดับนิโคตินในเลือดไว้ ทำให้ส่งผลเสีย ต่อสุขภาพทั้งผู้สูบ บุหรี่และผู้ใกล้ชิด แม้ว่าจะยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความเกี่ยวข้องหรือบทบาทของความ หลากหลายทางพันธุกรรมของ *cyp2a6* อัลลีลต่างๆกับความสามารถในการย่อยสลายนิโคตินและพฤติกรรม การเสพติด บุหรี่ในผู้สูบ บุหรี่และไม่สูบ บุหรี่ในประเทศไทยต่อไป แต่การลดการสูบ บุหรี่โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 เพื่อคงระดับของนิโคตินในเลือด น่าที่จะเป็นอีกหนึ่งกลไกที่สำคัญที่น่าจะช่วยลดการสูบ บุหรี่ในผู้สูบ บุหรี่ได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ทั้งหมดข้างต้นมุ่งเน้นไปที่การยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 จาก อัลลีล ปกติเท่านั้น ไม่ได้ศึกษาถึงผลอันเนื่องมาจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน *cyp2a6* ที่อาจส่งผลกระทบต่อกิจกรรม ของเอนไซม์ CYP2A6 ที่อาจจะแตกต่างกันไปได้ ทั้งนี้ผลการค้นคว้าล่าสุดพบว่าเอนไซม์ CYP2A6 ที่ได้จากอัลลีลที่

แตกต่างกันมีสมบัติของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน และยังพบว่า 8-MOP ซึ่งเป็นตัวยับยั้งมาตรฐานของเอนไซม์ CYP2A6 ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ CYP2A6 จากอัลลีลต่างๆได้แตกต่างจากเอนไซม์ CYP2A6 จากอัลลีลปกติ (Tiong et al., 2014)

ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงมุ่งหวังที่จะศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ที่เกิดขึ้นจากยีน *cyp2a6* อัลลีลต่างๆที่เคยมีรายงานว่าพบในคนไทยของสารสำคัญจากขลุ่ยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดี โดยแสดงออกและทำปฏิกิริยาเอนไซม์ CYP2A6 จากอัลลีลต่างๆที่เคยมีรายงานว่าพบในประชากรไทย ซึ่งได้จัดทำขึ้นไว้แล้ว ร่วมกับการทำปฏิกิริยาสารสกัดจากขลุ่ยที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และศึกษากลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 จากอัลลีลต่างๆในหลอดทดลอง และค้นคว้าเพิ่มเติมถึงฤทธิ์ของสารสำคัญจากขลุ่ยในการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MAO ในสมองเพื่อให้ครบวงจรในการคงทั้งระดับนิโคตินในกระแสเลือดและคงระดับสารสื่อประสาทโดปามีนในสมอง และยังอาจได้ประโยชน์ข้างเคียงของการยับยั้งเอนไซม์ MAO ที่สามารถนำมาประยุกต์ในการลดการทำงานของเอนไซม์ MAO ในผู้ป่วยที่มีการทำงานของเอนไซม์ MAO ในสมองสูงและเหนี่ยวนำให้เกิด neurological disorder และโรคทางระบบประสาทเช่นโรคอัลไซเมอร์หรือโรคพาร์กินสันตามมา เพื่อเพิ่มมูลค่าของสินค้าจากชุมชนเพราะพืชชนิดเดียวสามารถออกฤทธิ์ทั้งลดการสูบบุหรี่ได้สองกลไกและลดการเกิดโรคมะเร็งปอดได้หนึ่งกลไก เป็นการพัฒนาความเข้มแข็งของชุมชนต่อไป

บทที่ 3

สารเคมีและวิธีการทดลอง

3.1 สารเคมี

1. Acrylamide (C_3H_5NO) MW 71.80 บริษัท ACROS ORGANIC ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. Agar บริษัท Criterion ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. Ammonium persulfate บริษัท Carlo erba ประเทศฝรั่งเศส
4. 5-Aminolevulinic acid hydrochloride (δ -ALA) MW 167.59 บริษัท SIGMA-ALDRICH,CO ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
5. Ampicilin ($C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$) MW.371.39 บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
6. Bisacrylamide MW 154.20 บริษัท Promega Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. Bardford ยี่ห้อ Bio-rad บริษัท Bio-rad Laboratories, Inc ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. Coomassie Brilliant Blue G-250
9. Coumarin ($C_9H_6O_2$) MW 146.15 บริษัท Fluka Analytical ประเทศฝรั่งเศส
10. Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) MW 174.16 บริษัท Carlo erba analytical ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) MW 141.96 บริษัท Fisher scientific analytical grade ประเทศอังกฤษ
12. Ethyl alcohol absolute (C_2H_5OH) MW 46.070 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. Glycerol ($CH_2OHCHOHCH_2OH$) MW 92.095 ยี่ห้อ Carlo erba บริษัท Bio Basic INC. ประเทศแคนาดา
14. Glycine MW 75.10 ยี่ห้อ UPS Grade บริษัท RESEARCH ORGANICS ประเทศสหรัฐอเมริกา
15. Imidazole MW 68.08 บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
16. Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) MW 238.31 บริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา
17. LB agar, Difcotm, บริษัท Dickinson company ประเทศสหรัฐอเมริกา
18. N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) MW 116.20 บริษัท RESEARCH ORGANICS ประเทศสหรัฐอเมริกา
19. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ในรูปรีดิวซ์ (NADPH) บริษัท Fluka HPLC grade ประเทศสหรัฐอเมริกา
20. Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ($C_6H_5CH_2SO_2F$) บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา

21. Potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄) MW 136.09 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
22. Sodium chloride (NaCl) MW 58.443 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
23. Sodium dodecyl sulfate (SDS) (C₁₂H₂₅OSO₃Na) MW 288.83 บริษัท BIO BASIC INC. ประเทศแคนาดา
24. Sodium hydroxide (NaOH) MW 39.997 บริษัท Carlo erba ประเทศสหรัฐอเมริกา
25. Trytone Power ยี่ห้อ Biotech บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
26. Tris-Hydrochloride ยี่ห้อ Promega บริษัท Promega Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา
27. Triton X-100
28. Yeast extract บริษัท Bio Basic INC. ประเทศแคนาดา
29. 1,2-dilauryl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DLPC) MW 621.83 บริษัท Bio Basic INC ประเทศแคนาดา
30. น้ำกลั่น

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 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 เมื่อครบกำหนดเวลาจึงเก็บตะกอนเซลล์ที่ได้เก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาทำการทดลองต่อไป

3.3.2 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 เมื่อครบกำหนดเวลาจึงเก็บตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและนำตะกอนเซลล์ที่ได้เก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทำการทดลองต่อไป

3.3.3 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 และทำบริสุทธิ์โดยผ่านนิกเกิลคอลลัมน์ที่ปรับสภาพคอลลัมน์ด้วยสารละลาย 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

3.3.4 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

3.3.5 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์

3.3.5.1 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

3.3.5.2 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 ที่ความเข้มข้นบ่ม 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

3.3.5.3 การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B

เอนไซม์ MAO ทั้งสองไอโซฟอร์ม (MAO-A และ MAO-B) จะถูกซื้อจากบริษัท Sigma Aldrich จากนั้นทำการวัดปฏิกิริยาของเอนไซม์ MAO ในสารละลายโปรตีนของไมโทคอนเดรียโดยวัดปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารตั้งต้น tyramine ไปเป็น H_2O_2 ในหลอดทดลองและตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ MAO โดยใช้ peroxidase-link assay และตรวจสอบโดยใช้เครื่อง Fluorescence spectroscopy (Holt et al., 1997; Prasopthum et al., 2016) จากนั้นวัด

การยับยั้งการทำงานของสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการลดความสามารถของเอนไซม์ MAO ในการทำปฏิกิริยา (Jager et al., 2013; Kong et al., 2004; Lin et al., 2003; Prasopthum et al., 2015; Stafford et al., 2007)

3.3.6 การเตรียมสารสกัดจากพืช

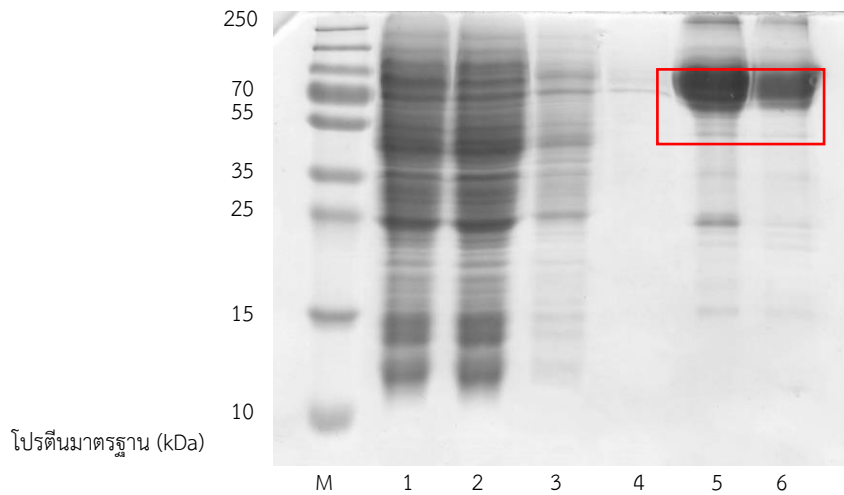
ทำการเตรียมสารสกัดจากพืชสมุนไพร โดยวิธี marceration จากนั้นเตรียมสารสำคัญจากขลุ่ย ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีต่างๆ และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสำคัญด้วยวิธี NMR และ LC-MS ตามที่เคยรายงานไว้โดยกลุ่มผู้วิจัยก่อนหน้านี้ เพื่อให้ได้สารสำคัญ thiophene 2-(penta-1,3-diyne-1-yl)-5-(4-acetoxy-3-hydroxybuta-1-yn-1-yl) thiophene, 2-(prop-1-ynyl)-5-(6-acetoxy-5-hydroxyhexa-1, 3-diynyl) thiophene, 2-(prop-1-ynyl)-5-(5, 6-dihydroxyhexa-1,3-diynyl) thiophene (**13-15**) (Boonruang et al., 2017)

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การเหนี่ยวนำการแสดงออกและการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ Cytochrome P450 Reductase (CPR)

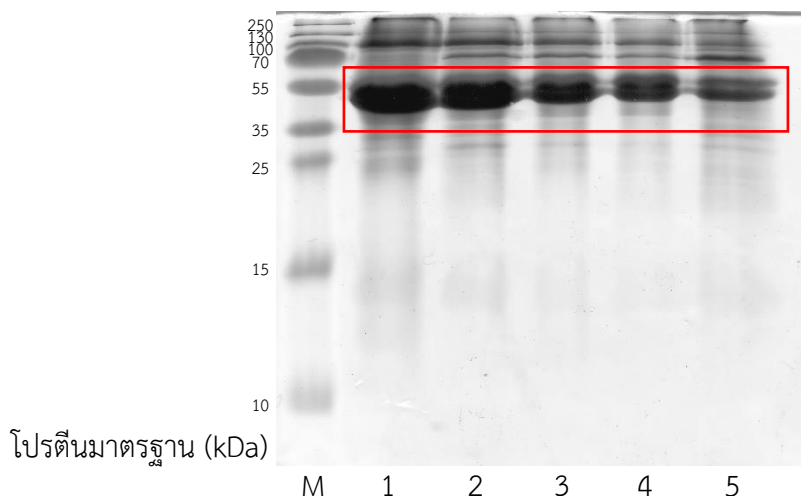
ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ C41 (DE3) ที่ได้รับการส่งผ่านพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน CPR จากนั้นทำการเหนี่ยวนำการแสดงออกและทำบริสุทธิ์ โดยเอนไซม์ CPR จะถูกชะออกที่ความเข้มข้น 50 mM imidazole และบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 100 mM imidazole (ภาพที่ 4-1)



ภาพที่ 4-1 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)

4.2 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) และทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านนิกเกิลคอลัมน์ที่ปรับสภาพคอลัมน์ด้วยสารละลาย 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 4-2) พบว่าเอนไซม์ CYP2A6 ทั้งชนิด wild-type และ mutant ต่าง ๆ มีความบริสุทธิ์บางส่วน และมีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 56.99 kDa



ภาพที่ 4-2 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

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

ทำการตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 (ศึกษาจลนศาสตร์) 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 พบว่า การกลายพันธุ์ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 ที่ต่างกัน โดยพบว่า การกลายพันธุ์ที่พบใน 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)

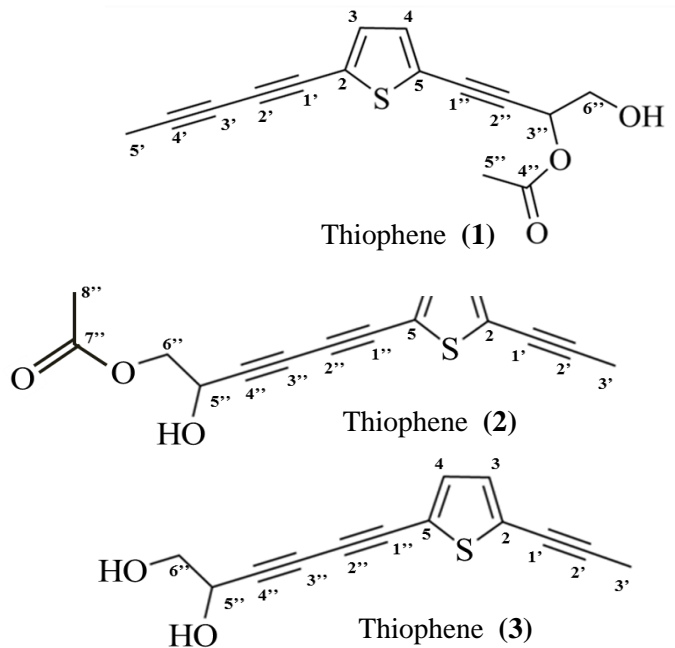
เมื่อศึกษาการยับยั้งของเอนไซม์ CYP2A6 อัลลีลต่างๆด้วยสารยับยั้งมาตรฐาน 8-MOP พบว่า การกลายพันธุ์ส่งผลให้ต้องเพิ่มปริมาณสารยับยั้งมากขึ้น โดยอัลลีล CYP2A6*5 ที่มีการเปลี่ยนแปลงค่า K_m มากที่สุด จะลดประสิทธิภาพของการยับยั้งมากที่สุด (ตารางที่ 4-1) แสดงให้เห็นว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมส่งผลให้เอนไซม์มีสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาและถูกยับยั้งได้แตกต่างกัน เช่นเดียวกับที่เคยมีรายงานว่า เอนไซม์ CYP2A6 ที่ได้จากอัลลีลที่แตกต่างกันมีสมบัติของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน และถูกยับยั้งด้วย 8-MOP ซึ่งเป็นตัวยับยั้งมาตรฐานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้แตกต่างกัน (Tiong et al., 2014)

ตารางที่ 4-1 ค่าจลนศาสตร์เอนไซม์ (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	จลศาสตร์เอนไซม์			
	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

4.4 การสกัดสารจากขลุ้

ทำการเตรียมสารสกัดจากพืชสมุนไพร โดยวิธี marceration จากนั้นเตรียมสารสำคัญจากสมุนไพรขลุ้ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีต่างๆ และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสำคัญด้วยวิธี NMR และ LC-MS ตามที่เคยรายงานไว้โดยกลุ่มผู้วิจัยก่อนหน้านี้ และได้สารสำคัญ 2-(penta-1,3-diyne-1-yl)-5-(4-acetoxy-3-hydroxybuta-1-yn-1-yl) thiophene, 2-(prop-1-ynyl)-5-(6-acetoxy-5-hydroxyhexa-1, 3-diynyl) thiophene, 2-(prop-1-ynyl)-5-(5, 6-dihydroxyhexa-1,3-diynyl) thiophene



ภาพที่ 4-3 โครงสร้างของสารที่ได้จากขลุ้ 2-(penta-1,3-diyne-1-yl)-5-(4-acetoxy-3-hydroxybuta-1-yn-1-yl) thiophene (1) , 2-(prop-1-ynyl)-5-(6-acetoxy-5-hydroxyhexa-1, 3-diynyl) thiophene (2), 2-(prop-1-ynyl)-5-(5, 6-dihydroxyhexa 1,3-diynyl) thiophene (3).

4.6 การตรวจสอบฤทธิ์และกลไกยับยั้งเอนไซม์ MAO ของสารสำคัญจากขลุ้

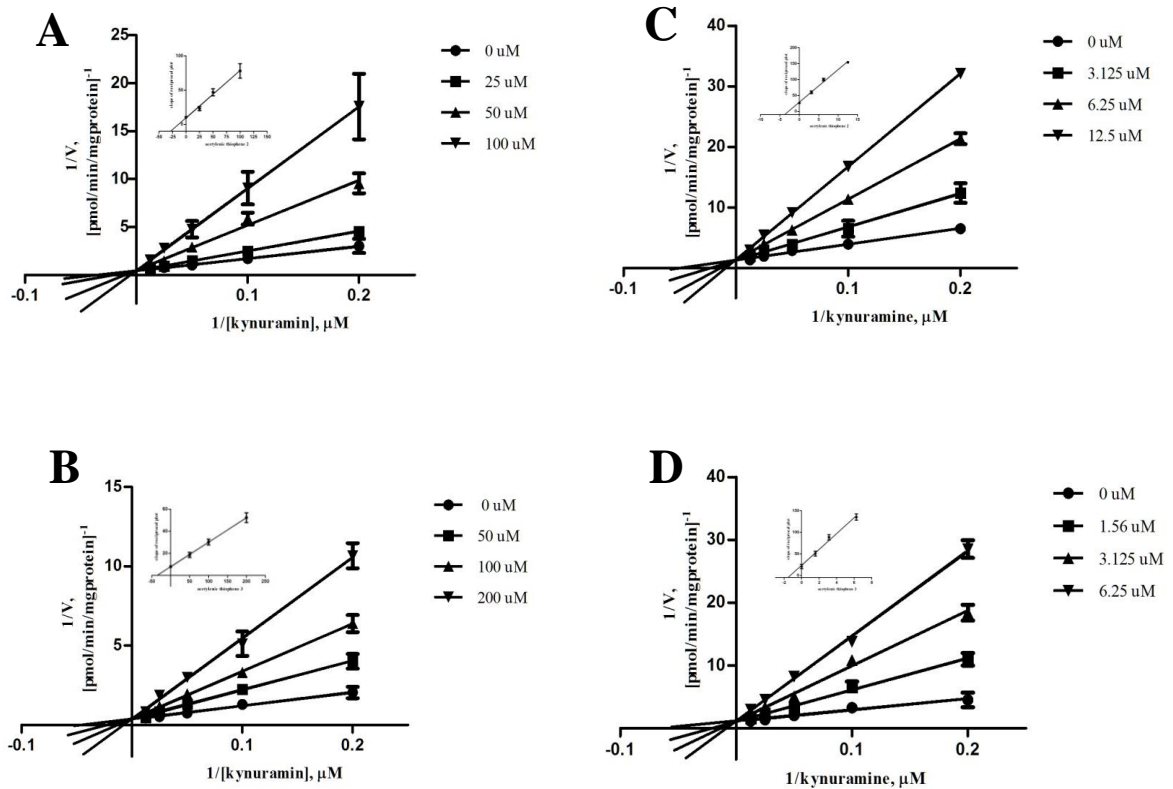
จากการศึกษาพบว่าสารสำคัญจากขลุ้ สามารถยับยั้งเอนไซม์ MAOs ได้ โดยยับยั้ง MAO-B ได้ดีกว่า MAO-A (ตารางที่ 4-2) โดยสารสำคัญ Thiophene 2 ยับยั้งเอนไซม์ MAO-A ได้ดีที่สุด และ Thiophene 2 และ 3 สามารถยับยั้งเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B ได้ดีที่สุด โดยสาร Thiophene 2 และ 3 มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ MAO-B ได้ดีกว่า เมื่อทำการศึกษาพบว่าสาร Thiophene 2 และ 3 มีกลไกการยับยั้งการทำงานของ MAOs ด้วยกลไก competitive inhibition

ตารางที่ 4-2. ค่า IC₅₀ ในการยับยั้งเอนไซม์ MAOs ของสารสกัดและสารสำคัญจากขลุ้ (*P. indica*)

samples	MAO-A		MAO-B	
	Co-inhibition	Pre-inhibition	Co-inhibition	Pre-inhibition
Ethanol (µg/ml)	60.89 ± 2.43	59.75 ± 3.95	31.01 ± 2.35	33.23 ± 1.16
Hexane (µg/ml)	22.12 ± 0.88	22.78 ± 1.93	19.30 ± 0.59	17.86 ± 0.87
Ethyl acetate (µg/ml)	13.19 ± 3.25	10.69 ± 2.44	13.55 ± 1.39	13.58 ± 0.72
Aqueous (µg/ml)	>100	>100	>100	>100
Thiophene 1 (µM)	143.4 ± 3.11	116.60 ± 1.41	90.37 ± 11.55	89.31 ± 1.88
Thiophene 2 (µM)	44.58 ± 4.22	36.28 ± 0.53	4.74 ± 0.19	4.35 ± 0.34
Thiophene 3 (µM)	89.37 ± 2.28	73.28 ± 3.64	3.48 ± 0.73	3.55 ± 0.18
Clogyline (nM)	2.75 ± 0.21	0.93 ± 0.09	-	-
Pargeline (µM)	-	-	0.24 ± 0.08	0.059 ± 0.01

ตารางที่ 4-3 . ค่า K_i ในการยับยั้งเอนไซม์ MAOs ของสารสกัดและสารสำคัญจากขลุ้ (*P. indica*)

compounds	MAO-A		MAO-B	
	K _i	mode	K _i	mode
Thiophene 2 (µM)	13.31 ± 1.42	competitive	2.85 ± 0.73	competitive
Thiophene 3 (µM)	34.77 ± 3.71	competitive	1.23 ± 0.23	competitive



ภาพที่ 4-4 กลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAOs (A) การยับยั้งเอนไซม์ MAO-A โดย Thiophene 2 (B) การยับยั้งเอนไซม์ MAO-A โดย Thiophene 3 (C) การยับยั้งเอนไซม์ MAO-B โดย Thiophene 2 (D) การยับยั้งเอนไซม์ MAO-B โดย Thiophene 3

4.7 การตรวจสอบฤทธิ์และกลไกยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 จากอัลลีลต่างๆ ของสารสำคัญจากขลุ่

เพื่อศึกษากลไกการทำงานของสารสำคัญ ผู้วิจัยได้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งในสองสภาวะคือสภาวะปกติที่บ่มสารยับยั้งพร้อมสารตั้งต้นของเอนไซม์ทั้งสองที่ทำการตรวจสอบ (Co-incubation) และสภาวะที่บ่มสารยับยั้งก่อนเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงตามด้วยสารตั้งต้น (Pre-incubation หรือ NADPH-dependence inhibition) พบว่าค่า IC_{50} ของการยับยั้งของสารทุกตัวมีค่าลดลง หรือมีค่าประสิทธิภาพในการยับยั้งที่เพิ่มขึ้นกับทุกอัลลีลที่ทำการศึกษา แสดงถึงแนวโน้มของการยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้แบบ Mechanism-base (MBI) (ตารางที่ 4-4)

เมื่อพิจารณาจากค่า IC_{50} ของการยับยั้งของสาร Thiophene-1,-2, และ -3 ที่มีต่อ CYP2A6 อัลลีลต่างๆ พบว่า Thiophene-3 สามารถยับยั้ง CYP2A6 ทุกอัลลีลได้ดีที่สุด รองลงมาคือ Thiophene-2 และ -1 ตามลำดับ เช่นเดียวกับกับ wildtype CYP2A6 และความหลากหลายทางพันธุกรรมส่งผลต่อความสามารถในการถูกยับยั้งได้ด้วยสารสำคัญที่น้อยลงกว่าอัลลีลปกติ โดยเอนไซม์ CYP2A6*5 เป็นเอนไซม์ที่ถูกยับยั้งได้ด้วยสารมาตรฐาน 8-MOP และสารสำคัญในกลุ่ม Thiophene ได้น้อยที่สุด (ค่า IC_{50} ของการยับยั้งประมาณ 5-15 เท่าของค่า IC_{50} ของ wildtype)

ตารางที่ 4-4 ค่า IC₅₀ ของสารสำคัญจากขลุ่ยต่อเอนไซม์ CYP2A6 อัลลีลต่างๆ

CYP2A6	Thiophene 1		Thiophene 2		Thiophene 3		8-MOP	
	Co-incubation	Pre-incubation	Co-incubation	Pre-incubation	Co-incubation	Pre-incubation	Co-incubation	Pre-incubation
Wild-type#	6.43 ± 1.29	2.12 ± 0.19	4.44 ± 0.14	2.97 ± 0.01	3.90 ± 0.20	0.18 ± 0.01	1.53 ± 0.01	0.39 ± 0.11
CYP2A6*5	43.83 ± 2.14	30.15 ± 0.68	21.40 ± 1.43	15.13 ± 0.82	19.45 ± 2.11	7.07 ± 0.12	5.24 ± 0.51	3.76 ± 0.01
CYP2A6*7	9.14 ± 0.59	6.63 ± 0.12	6.91 ± 1.14	4.76 ± 0.57	5.11 ± 1.07	2.64 ± 0.03	2.31 ± 0.08	1.63 ± 0.14
CYP2A6*8	10.01 ± 0.31	7.02 ± 0.08	8.92 ± 1.01	5.41 ± 0.26	6.07 ± 0.74	3.59 ± 0.09	2.62 ± 0.04	0.79 ± 0.09
CYP2A6*10	14.09 ± 0.08	10.71 ± 0.07	9.41 ± 0.09	6.08 ± 0.09	8.53 ± 0.37	5.45 ± 0.12	4.95 ± 0.17	3.29 ± 0.07

#Boonruang et al, 2017

4.8 สรุปผลการทดลอง

ผลจากการศึกษาพบว่า สารสำคัญในกลุ่ม Thiophene จากสมุนไพรขมิ้นชันมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B ได้ โดยกลไกการยับยั้งแบบผันกลับได้ และยังพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B ได้ดีกว่า โดยเฉพาะ Thiophene - 3 และ -2 (มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.48 ± 0.73 และ 4.74 ± 0.19 ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าสารสำคัญจากพืชขมิ้นชันสามารถลดการสับบุหรือได้ผ่านทั้งกลไกในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ MAO

จากการศึกษาวิจัยพบว่า ความแตกต่างทางพันธุกรรมของ CYP2A6 อัลลีล *5, *7,*8 และ *10 ที่เคยมีรายงานว่าพบในประเทศไทย ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 โดยสารยับยั้งมาตรฐาน โดยต้องใช้สารยับยั้งมากขึ้น เมื่อทำการศึกษากายยับยั้งด้วยสารสำคัญจากกลุ่มพบว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งของสารสำคัญ ทำให้ถูกยับยั้งโดยสารสำคัญได้ลดลง (ค่า IC_{50} เพิ่มขึ้น) โดยไม่ส่งผลกระทบต่อกลไกในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ทุกอัลลีลแบบผันกลับไม่ได้ โดย Thiophene-3 เป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในทุกอัลลีลที่ทำการศึกษาคือ Thiophene-2 เช่นเดียวกับที่พบใน wildtype CYP2A6 โดยเอนไซม์ CYP2A6*5 เป็นเอนไซม์ที่ถูกยับยั้งได้ด้วยสารมาตรฐาน 8-MOP และสารสำคัญในกลุ่ม Thiophene ได้น้อยที่สุด แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลง G479V ของ CYP2A6*5 ส่งผลกระทบต่อความสามารถในการถูกยับยั้งของสารสำคัญจากสมุนไพรขมิ้นชันมากที่สุด

แสดงให้เห็นว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 ส่งผลกระทบต่อความสามารถเอนไซม์ในการถูกยับยั้งด้วยสารสำคัญจากสมุนไพรขมิ้นชัน ด้วยเหตุนี้ในการนำสารยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 มาใช้ในผู้ต้องการลดการสับบุหรืออาจต้องพิจารณาประสิทธิภาพของผู้สับบุหรือที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากอัลลีล wildtype

4.7 ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาวิจัยในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 ในผู้ต้องการเลิกสับบุหรือ เพื่อนำข้อมูลมาประกอบในการให้สารยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ในผู้ต้องการลดการสับบุหรือ เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการช่วยลดการสับบุหรือ

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., & Saraputit, 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-(methylnitrodiamino)-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 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., & Saraputit, 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 สารภูษิตและพรทิมล รงค์นพรัตน์ (2554) การศึกษาการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ที่ย่อยสลายนิโคตินในคนของน้ำสมุนไพรและน้ำผลไม้ไทย รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ศูนย์วิจัยและจัดการความรู้เพื่อการควบคุมยาสูบ

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

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

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

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

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

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. หัวหน้าโครงการ	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทรงกลด สารภูษิต Songklod Sarapusit, Ph.D
หน่วยงาน	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ที่อยู่	169 ถ. ลงหาดบางแสน ต. แสนสุข อ. เมืองฯ จ. ชลบุรี 20131
โทรศัพท์	038-103-058 ต่อ 15
โทรสาร	038-393-495
อีเมลล์	songklod@buu.ac.th
สาขาวิชาการที่ชำนาญ	การศึกษาระบบยีนของโปรตีน และชีวเคมีของเอนไซม์ cytochrome P450 ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายยาในคน

ผลงานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (5 ปีย้อนหลัง)

1. Boonruang, S., Prakobsri, K., Pouyfung, P., Prasopthum, A., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. (2020). Structure-activity relationship and *in vitro* inhibition of human CYP2A6 and CYP2A13 by flavonoids. *Xenobiotica*. Jun;50(6):630-639
2. Pouyfung, P., Sarapusit, S., Rongnoparut, P. (2017). Modulatory effect of hirsutinolides and flavonoids from *Vernonia cinerea* on human liver drug metabolizing cytochrome P450s. *Phytotherapy Research*. 31: 1916-1925
3. 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.
4. Rattanapun, N., Bupphanhasamai, N., Kangkan, S., Sarapusit, S. (2017). Inhibitory of the human Cytochrome P450 2A6 and Cytochrome P450 2A13 by ginger extracts and starfruits extracts. *Burapha Science Journal*, 22 (Special issue on 9th Science research conference), 163-172.
5. Ninted, S., Pulasaka, W., Duangkaew, P., Srisook, E., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. (2017). Inhibition of pig (*Sus domesticus*) brain monoamine oxidase enzymes by some Thai plant extracts. *Burapha Science Journal*, 22 (Special issue on 9th Science research conference), 153-162.
6. 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

1.2 ผู้ร่วมงานวิจัย

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

ผลงานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (5 ปีย้อนหลัง)

1. Boonruang, S., Prakobsri, K., Pouyfung, P., Prasopthum, A., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. (2020). Structure-activity relationship and *in vitro* inhibition of human CYP2A6 and CYP2A13 by flavonoids. *Xenobiotica*. Jun;50(6):630-639
2. Pouyfung, P., Sarapusit, S., Rongnoparut, P. (2017). Modulatory effect of hirsutinolides and flavonoids from *Vernonia cinerea* on human liver drug metabolizing cytochrome P450s. *Phytotherapy Research*. 31: 1916-1925
3. 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.
4. Ninted, S., Pulasaka, W., Duangkaew, P., Srisook, E., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. (2017). Inhibition of pig (*Sus domesticus*) brain monoamine oxidase enzymes by some Thai plant extracts. *Burapha Science Journal*, 22 (Special issue on 9th Science research conference), 153-162.
5. 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

1.3 ผู้ร่วมงานวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข
Ekaruth Srisook

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง ชลบุรี 20131
โทรศัพท์ 038-745900 ต่อ 3053
E: mail ekaruth@buu.ac.th

สาขาที่ชำนาญพิเศษ Organic synthesis, Medicinal chemistry, Natural product

ผลงานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (5 ปีย้อนหลัง)

1. Boonruang, S., Prakobsri, K., Pouyfung, P., Prasopthum, A., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. (2020). Structure-activity relationship and *in vitro* inhibition of human CYP2A6 and CYP2A13 by flavonoids. *Xenobiotica*. Jun;50(6):630-639
2. Srisook, K., Potiprasart, K., Sarapusit, S., Park, CS., Srisook, E (2019) Etlingera pavieana extract attenuates TNF- α induced vascular adhesion molecule expression in human endothelial cells through NF- κ B and Akt/JNK pathways. *Inflammopharmacology*. 2019 Dec 12. doi: 10.1007/s10787-019-00676-4
3. 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.
4. Ninted, S., Pulasaka, W., Duangkaew, P., Srisook, E., Rongnoparut, P., Sarapusit, S. (2017). Inhibition of pig (*Sus domesticus*) brain monoamine oxidase enzymes by some Thai plant extracts. *Burapha Science Journal*, 22 (Special issue on 9th Science research conference), 153-162.
5. 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

1.4 ผู้ร่วมงานวิจัย ฉันทยาภรณ์ วงษ์ศรี
Thunyaporn Wonsri

หน่วยงานที่สังกัด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชลบุรี
โทรศัพท์ 038-8784006-7

สาขาที่ชำนาญพิเศษ การตรวจวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ Cytochrome P450

ผลงานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- Wongsri, T., Rongnoparut, P., & Sarapusit, S. (2014). Inhibition of cytochrome P450 3A4 by Thai herbal teas and fruit juices. *Burapha Science Journal*, 19 (Special issue on 6th Science research conference), 6-12.