



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ผลของการเปลี่ยนแปลงเอ็นไซม์
ที่ใช้ทำลาย xenobiotic ในต้นโดยผลไม้มัธยม”
(RDG5220053)

โดย

ดำรงศักดิ์ เป็กทอง และ คณะ

1 สิงหาคม 2552-31 กรกฎาคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ผลของการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์
ที่ใช้ทำลาย xenobiotic ในตับโดยผลไม้ไทย”

คณะผู้วิจัย สังกัด

1. ดำรงค์ดี เป็กทอง คณะเภสัชศาสตร์ ม.นเรศวร
2. ภักวดี เสริมสรรพสุข คณะเภสัชศาสตร์ ม.นเรศวร

ชุดโครงการ ‘Thai Fruits-Functional Fruits’

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Since the inhibition of “bioactivating” Phase-I xenobiotic metabolizing enzymes (XMEs) (predominantly Cytochrome P450; CYP) and /or induction of “detoxifying” Phase-II XMEs have been long considered important cancer chemopreventive strategies. Many carcinogens are metabolized by CYP to chemically reactive electrophilic metabolites that bind to cell membrane, protein, DNA or RNA producing carcinogenicity. In the current study, the effect of 6 Thai fruit extracts (Mango;MG, Pomelo;PM, Papaya;PY, Mangosteen;MT, Orange;OR and Pineapple;PA) on rat cytochrome P450 (CYP) activities was examined in *in vitro* system. The potential for inhibition of CYP1A2, CYP2B1, CYP2E1 and CYP3A1 by Thai fruit extracts (0.001-50 mg/mL) was evaluated with pooled rat liver microsomes and rat hepatocyte cultures. Furthermore, the potential for induction of UGT1A1 and SULT2A1 was also evaluated with rat hepatocyte cultures. Fruit extracts exhibited minimal capacity to inhibit any CYP enzyme, compare to the reference inhibitors. PY, PM, MT and OR inhibited the O-deethylation of 7-ethoxyresorufin, a marker substrate for CYP1A2 with IC_{50} value of 1.8, 7.9, 25.7 and 28.5 mg/mL in rat liver microsomes, respectively. PY, PM, MT, MG and PA also inhibited the O-deethylation of benzyloxyresorufin (CYP2B1) in rat microsomes with IC_{50} value between 1.4 to 15.7 mg/mL. PM, PY, PA, OR and MT also strongly inhibited the hydroxylation of p-nitrophenol (CYP2E1) with IC_{50} value between 0.0012 to 2.1 mg/mL. PA and PY were found to be a weak inhibitor of CYP3A1 with IC_{50} value of 0.25 and 0.93 mg/mL, respectively.

The potential for inhibition/induction of CYP activity was evaluated by exposing primary cultured of rat hepatocytes to Thai fruit extracts (0.1-2.0 mg/mL). Enzymatic activities were performed by the direct incubation of hepatocyte suspension with the specific substrates of each CYP. The mean activities of CYP1A2, CYP2B1, CYP2E1, CYP3A1, UGT1A1 and SULT2A1 from fruit extract-treated hepatocytes were slightly lower than those in the solvent-treated controls but were less than those produced by reference inhibitors of these enzymes. In summary, PM and PY has been demonstrated *in vitro* to be a low potent of CYP1A2, both in rat liver microsomes and *in vitro* in rat hepatocytes. Most of all fruit extract (at the dose of 1-2 mg/mL) inhibited the activity of CYP2B1. At 1-2 mg/mL of PY, the activity of CYP2E1 was decreased relative to the control. CYP3A1, UGT1A1 and SULT2A1 activities were unchanging except PY at the dose of 1-2 mg/mL was slightly increase in activity of UGT1A1. These data indicate that XMEs are altering by some Thai fruit extracts in *in vitro* system (by using liver microsomes and rat hepatocytes) and resulting in the decreased carcinogenicity of xenobiotics. Further study is ongoing to assess the alteration of Thai fruit extract on XMEs after *in vivo* administration to rats.

List of Abbreviations

BROD	Benzyloxyresorufin-O-Deethylase
CYP	Cytochrome P450
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
EROD	Ethoxyresorufin-O-Deethylase
HEPES	N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ITS	Insulin Transferrin Selenium Supplement Premix
MG	Mango (<i>Mangifera indica</i>)
MT	Mangosteen (<i>Garcinia mangostana</i>)
OD	Optical Density
OR	Orange (<i>Citrus reticulata</i>)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PA	Pineapple (<i>Ananas comosus</i>)
PM	Pomelo (<i>Citrus maxima</i>)
PY	Papaya (<i>Carica papaya</i>)
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-Aminomethane
S.D.	Standard Deviation
SEM	Standard Error of Means
SULT	Sulfotransferase
UGTs	UDP-glucuronosyltransferase
XMEs	Xenobiotic Metabolizing Enzymes

บทคัดย่อ

การยับยั้งขบวนการ bioactivating ของเอนไซม์ในกลุ่มที่เรียกว่า xenobiotic metabolizing enzymes (XMEs) ในขั้นตอนที่ 1 ซึ่งส่วนใหญ่คือเอนไซม์ไซโตโครม (Cytochrome P450; CYP) และ/หรือ การเหนี่ยวนำการกำจัดออกของสารในขั้นตอนที่ 2 หรือที่เรียกว่า detoxifying เป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลายว่ามีความสำคัญในแง่การป้องกันการเกิดมะเร็ง เนื่องจากการยับยั้งหรือการเหนี่ยวนำดังกล่าวจะไปช่วยลดการสร้างสารตัวกลางที่ชอบอิเล็กตรอน (electrophilic intermediates) ซึ่งสามารถทำอันตรายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ โปรตีน สารพันธุกรรมดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอ จนนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติเป็นเซลล์มะเร็งได้ การศึกษาผลของสารสกัดผลไม้ไทย 6 ชนิด ได้แก่ มะม่วง ส้มโอ มะละกอ มังคุด ส้ม และสับปะรด ต่อความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมในตับ (CYP1A2, 2B1, 2E1 และ 3A1) วัดโดยใช้การ incubate กับสารตั้งต้นที่จำเพาะในแต่ละกลุ่มย่อยของเอนไซม์โดยมีไมโครโซมและเซลล์ตับเพาะเลี้ยงเป็นแหล่งของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังทำการทดลองเพื่อวัดผลของสารสกัดผลไม้ต่อความสามารถในการเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์ใน phase II ได้แก่ เอนไซม์ UGT1A1 และ SULT2A1 อีกด้วย สารสกัดผลไม้มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครม โดยเฉพาะสารสกัดมะละกอและสับปะรด อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับสารยับยั้งมาตรฐาน พบว่าสารสกัดผลไม้จัดเป็นสารยับยั้งอ่อน ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงหนูพบว่า สารสกัดผลไม้บางชนิดเท่านั้นที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เช่น ส้มโอ มะละกอ มะม่วงและส้มลดการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2 ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 1.8, 7.9, 25.7 และ 28.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดผลไม้เกือบทุกชนิดมีผลลดการทำงานของ CYP2E1 ในขณะที่สารสกัดผลไม้ส่วนใหญ่ไม่มีผลต่อ CYP3A1 ยกเว้นสับปะรดและมะละกอแสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 0.25 และ 0.93 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

ในการทดลองเพื่อประเมินความสามารถในการยับยั้งหรือเหนี่ยวนำเอนไซม์โดยใช้เซลล์ตับเพาะเลี้ยงหนูทำโดยการ incubate สารตั้งต้นกับสารสกัดผลไม้ในขนาด 0.1 ถึง 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัด พบว่าสารสกัดผลไม้มีผลต่อเอนไซม์ค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานโดยสรุปพบว่า ส้มโอและมะละกอลดการทำงานของ CYP1A2 สารสกัดผลไม้เกือบทุกชนิดมีผลลดการทำงานของ CYP2B1 มะละกอลดการทำงานของ CYP2E1 สารสกัดผลไม้ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ CYP3A1, UGT1A1 และ SULT2A1 ยกเว้นมะละกอที่ขนาด 1-2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถเพิ่มการทำงานของ UGT1A1 ได้

จากผลดังกล่าวบ่งชี้ว่า สารสกัดผลไม้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ตับในบางเอนไซม์ ทำให้มีโอกาสลดการเกิดสารก่อมะเร็ง (carcinogenicity) ที่อาศัยเอนไซม์ดังกล่าวในปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงจาก procarcinogen เป็น carcinogen อย่างไรก็ตามเพื่อยืนยันผลของสารสกัดผลไม้ต่อการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว การทำการทดลองในหนู (in vivo study) โดยการป้อนสารสกัดผลไม้ทางปากจะช่วยให้ได้คำตอบที่กระจ่างชัดขึ้น

บทที่ 1

บทนำและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

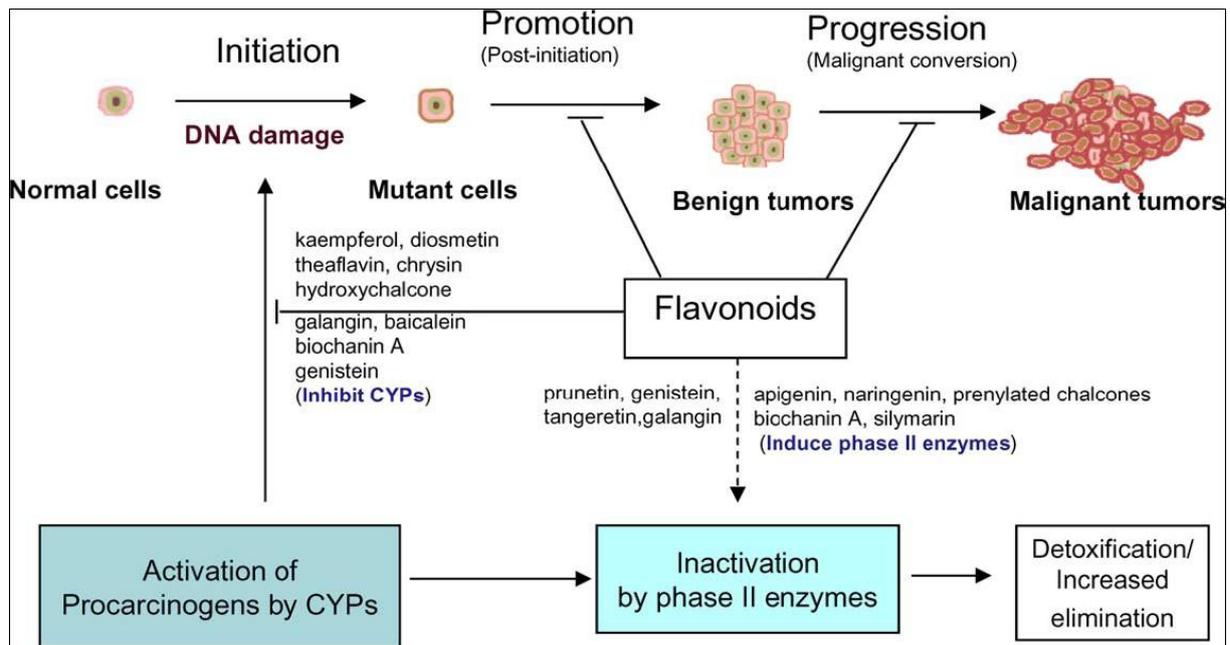
1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหา

สารที่มีคุณสมบัติความเป็น chemoprevention นั้นเป็นความหวังอย่างหนึ่งในการควบคุมการเกิดโรคมะเร็งโดยมุ่งหวังว่าสารจากธรรมชาติหรือสารสังเคราะห์เหล่านี้จะมีความสามารถยับยั้งขบวนการการเกิดสารก่อมะเร็งในร่างกาย (carcinogenic processes) ได้ ตัวอย่างสารที่มีคุณสมบัติเช่นสารในกลุ่ม polyphenol, flavonoids เป็นต้นซึ่งพบได้ทั่วไปในผักและผลไม้ โดยสารเหล่านี้มีทั้งฤทธิ์ antioxidant และ anticarcinogenic เมื่อทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) และผลในสัตว์ทดลอง (*in vivo studies*) (Greenwald P และคณะ ค.ศ.2001; Breinholt VM และคณะ ค.ศ.2002; Chen C และ Kong AN ค.ศ.2004; Gurey BJ และคณะ ค.ศ.2004; Canistro D และคณะ ค.ศ. 2009)

ในขบวนการการเกิดสารก่อมะเร็งในร่างกายนั้นร่างกายอาศัยเอนไซม์สำคัญในขบวนการการเปลี่ยนแปลงสารที่เข้าสู่ร่างกายในขั้นตอนแรก (Phase I metabolism) คือกลุ่มเอนไซม์ในตับที่ชื่อ ไซโตโครมพี 450 (Cytochrome P450; CYP) จากนั้นสารที่ถูกเปลี่ยนในร่างกายจะมีความสามารถสูงในการจับกับโมเลกุลขนาดใหญ่ในร่างกายเช่นสารพันธุกรรม DNA RNA หรือ โปรตีน (Melendez-Colon VJ และคณะ ค.ศ.1999) ยกตัวอย่างเช่น benzo [a] pyrene ถูกเปลี่ยนเป็นสารตัวกลาง benzo (a)pyrene-7,8-diol, 9, 10-epoxide [BPDB] โดยอาศัย CYP1A (Kang ZC และคณะ ค.ศ.1999) สาร Olefins และ halogenated hydrocarbons อาศัยการ activate โดยใช้เอนไซม์ CYP2B1 หรือ AflatoxinB1 เปลี่ยนแปลงโมเลกุลโดยอาศัย CYP3A เป็นต้น (Lee SK และคณะ ค.ศ.1999) ส่วนเอนไซม์ที่ใช้ในขั้นตอนที่สองของการขจัดสาร (Phase II metabolism) จะทำหน้าที่เชื่อมต่อ (conjugate) กับสารอื่นๆในร่างกาย เช่น glucuronide, sulphate, amino acid, glutathione เป็นต้น โดยมีเอนไซม์ที่สำคัญคือ UDP-glucuronosyltransferase (UGTs) (Galijatovic A และคณะ ค.ศ.2001) และ sulfotransferase (SULT) ทั้งนี้เพื่อให้ละลายน้ำได้ง่ายขึ้นและขจัดออกจากร่างกายได้เร็วขึ้นนั่นเอง ดังนั้นสารธรรมชาติที่จะถูกพิจารณาให้มีคุณสมบัติเป็น chemopreventive จะต้องมีความสามารถในการจับสารพิษทิ้ง (detoxification) โดยเป็น phase II induction (Talalay P และคณะ ค.ศ.1988; Marchetti F และคณะ ค.ศ.2001; Fukao T และคณะ ค.ศ.2004) และมีฤทธิ์ยับยั้งการเปลี่ยนสารจาก procarcinogen เป็น carcinogen นั่นคือมีคุณสมบัติเป็น CYP inhibitor นั่นเอง (Murakami A และคณะ ค.ศ.1999)

อย่างที่ทราบกันดีว่า การเกิดเซลล์มะเร็ง (Carcinogenesis) เริ่มจากเซลล์ปกติที่เปลี่ยนรูปร่างกลายเป็น mutant cells ซึ่งเซลล์เหล่านี้ถ้าเข้าสู่กระบวนการ tumor promotion จะกลายเป็น benign tumor cells และพัฒนาต่อจนเป็น malignant cells มีผลการทดลองมากมายที่สนับสนุนว่า สารสำคัญในผัก ผลไม้ ธัญพืช กากใยอาหาร สารอาหารโมเลกุลขนาดเล็ก (micro-nutrients) และกรดไขมัน มีส่วนป้องกันการเกิดมะเร็ง (Kim Y และคณะ ค.ศ.2007) ยกตัวอย่างสารจำพวก flavonoids, phenolic acids, oleanolic acids, ursolic acids ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activities) และมีส่วนเกี่ยวข้องยับยั้งขบวนการการเกิดเซลล์มะเร็ง ยกตัวอย่างเช่น flavonoids บางชนิด (kaempferol, diosmetin, theaflavin, and biochanin A)

สามารถยับยั้งกระบวนการการเปลี่ยน procarcinogen เป็น carcinogen ที่ phase I enzymes (โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณสมบัติการยับยั้งที่ cytochrome P450) (Guengerich FP และ Shimada T ค.ศ.1991; Seiss MH และคณะ ค.ศ.1995; Obermeier MT และคณะ ค.ศ.1995 Foster BC และคณะ ค.ศ.2003) หรือ flavonoids จากอาหาร เช่น naringenin, quercetin, biochanin A, and prenylchalcones สามารถกระตุ้นกระบวนการกำจัดสารพิษหรือสารก่อมะเร็ง (detoxification) โดยกระตุ้นที่ phase II enzymes (Eaton EA และคณะ ค.ศ.1996; Conney AH ค.ศ.2003 Machala M และคณะ ค.ศ.2001) (ดังแผนภาพด้านล่าง)



แผนภาพที่ 1 แสดงความสามารถของสารกลุ่ม Flavonoids ที่มีผลยับยั้งหรือกุดกระบวนการเกิดเซลล์มะเร็งได้ในหลายขั้นตอน (รวบรวมจาก Lee SK และคณะ ค.ศ.1999; Machala M และคณะ ค.ศ.2001; Hodek P และคณะ ค.ศ.2002)

โดยทั่วไปผลไม้ในธรรมชาติมีประโยชน์ต่อสุขภาพในแง่ที่ป้องกันการเสื่อมของอวัยวะต่างๆของร่างกาย ซึ่งเป็นผลมาจากสารอาหาร วิตามิน หรือสารสำคัญอื่นๆในผลไม้ ที่มีฤทธิ์ antioxidant, (Vinson JA และคณะ ค.ศ.2001, Kaur C และ Kapoor HC ค.ศ.2001) antimutagenic และ anticarcinogenic (Murakami A และคณะ ค.ศ.1999) เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานที่ชัดเจนถึงผลของผลไม้ไทยที่มีการบริโภคอย่างแพร่หลายเช่น มะม่วง ส้มโอ มะละกอ มังคุด ส้ม และสับปะรด ต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครม 450 (Cytochrome P450; CYP) ในตับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ในกลุ่มย่อย CYP1A, CYP2B, CYP2E และ CYP3A ที่มีความสำคัญต่อการเปลี่ยนสารก่อมะเร็งในร่างกาย ทั้งนี้ยังศึกษาผลต่อเอนไซม์ใน Phase II metabolism ควบคู่กันด้วย เพื่อหาว่าสารสำคัญในผลไม้ไทยนั้นมีคุณสมบัติเป็น chemopreventive ได้หรือไม่นั่นเอง

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่า การบริโภคผลไม้ไทยซึ่งมีส่วนประกอบสำคัญเป็น กากใยอาหาร สารอาหารโมเลกุลขนาดเล็ก (micro-nutrients) กรดไขมัน flavonoids, phenolic acids จะสามารถมีผลยับยั้ง phase I enzymes นั่นคือมีคุณสมบัติเป็น CYP inhibitor และ/หรือกระตุ้นการทำงานของ phase II enzymes ทำให้เร่งการขจัดออกของสารที่มีฤทธิ์ก่อเซลล์มะเร็งซึ่งอาจส่งผลโดยรวมในการป้องกันการเกิดมะเร็งได้ นั่นเอง

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อประเมินความสามารถของสั้กัดมะม่วง (Mango; *Mangifera indica*) สั้กไอ (Pomelo; *Citrus maxima*) มะละกอ (Papaya; *Carica papaya*) มังคุด (Mangosteen; *Garcinia mangostana*) สั้ก (Tangerine; *Citrus reticulata*) และสั้กประด (Pineapple; *Ananas comosus*) ในการยับยั้งเอนไซม์ Cytochrome P450 ในกลุ่มย่อย CYP1A, CYP2B, CYP2E และ CYP3A โดยวัดจากค่า IC_{50} (The half maximal Inhibitory Concentration) ที่ได้จากการทำการทดลองใน microsome จากหนู

1.2.2 เพื่อหาค่าการเปลี่ยนแปลงทางเภสัชจลนศาสตร์ของเอนไซม์ Cytochrome P450 เช่น binding efficiency (K_m), maximum velocity (V_{max}) ซึ่งสามารถนำไปคำนวณค่า inhibition constant (K_i) และหา type of inhibition ที่เกิดจากสารสั้กัดมะม่วง สั้กไอ มะละกอ มังคุด สั้ก และสั้กประด

1.2.3 เพื่อวัดความสามารถในการยับยั้งหรือเหนี่ยวนำเอนไซม์ใน phase II metabolism ของสารสั้กัดมะม่วง สั้กไอ มะละกอ มังคุด สั้ก และสั้กประด

1.2.4 ผลดังกล่าวสามารถนำมาอธิบายฤทธิ์ต้านมะเร็งในแง่ของการเป็น chemoprevention ของสั้กัดมะม่วง สั้กไอ มะละกอ มังคุด สั้ก และสั้กประดได้

บทที่ 2

ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 การเตรียมสารมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานโดยละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยสารละลายมาตรฐานดังกล่าวใช้เป็นสารตั้งต้น (substrates) หรือสารผลิตภัณฑ์ (products or metabolites) เพื่อสร้าง standard curve รวมถึงสารยับยั้งมาตรฐาน (Reference inhibitors) ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นสารผลิตภัณฑ์โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Cytochrome P450 (CYP activities) ใน 4 เอนไซม์ย่อยคือ CYP1A, 2B, 2E และ 3A ทั้งนี้สารตั้งต้น สารผลิตภัณฑ์หรือสารยับยั้งมาตรฐานที่เลือกใช้จัดเป็นสารที่มีความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ต่อเอนไซม์ดังกล่าวข้างต้น (Rendic S และ Di Carlo FJ ค.ศ.1997)

2.2 การเตรียมสารสกัดผลไม้

นำผลไม้แต่ละชนิดมาล้างทำความสะอาด เอาส่วนเปลือกออก นำส่วนเนื้อที่รับประทานมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งน้ำหนัก บดแล้วละลายด้วยน้ำจากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง ชั่งน้ำหนักกากที่เหลือ นำเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำผลไม้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง (Freeze dryer) ยี่ห้อ Heto[®] รุ่น PowerDry LL3000 เป็นเวลา 5 วัน (120 ชั่วโมง) จากนั้นชั่งน้ำหนักผงผลไม้แห้งเพื่อหาค่า % yield

2.3 ทำ Finger print เพื่อหาคุณลักษณะ (Characteristic) ของสารสกัดผลไม้ที่ใช้ในการวิจัย (ภาคผนวก ก.)

ละลายผงสารสกัดผลไม้แต่ละชนิดให้มีความเข้มข้น 5 mg/mL กรองผ่าน filter syringe ขนาด 0.45 micron จากนั้นฉีดสารละลายปริมาตร 100 μ L เข้าสู่ระบบ HPLC (Kelebek H และคณะ ค.ศ.2009)

2.4 วิเคราะห์ค่า Total Polyphenol โดยวิธีของ Folin Ciocalteu ในสารสกัดผลไม้ (ภาคผนวก ข)

ทำการวัดปริมาณ total polyphenols โดยวิธี Folin-Ciocalteu reagent method (ค.ศ.1912) และปริมาณ condense tannin โดยวิธี Julkunen-Tiitto's method (ค.ศ.1996)

2.5 ผลของสารสกัดผลไม้ต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP ในหนู

ทดสอบความสามารถในการยับยั้ง CYP โดยวัดค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ของเอนไซม์ เช่น IC_{50} , K_m , V_{max} , K_i , type of inhibition เป็นต้น ทำการทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยใช้ pool liver microsome ทำการเตรียม liver microsome โดยการปั่นขึ้นต้นใน homogenization buffer (50mM Tris-HCl, 150mM KCl, 2mM EDTA, pH 7.4) นำ homogenate ที่ได้ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูง (100,000g นาน 1 ชั่วโมง) เพื่อแยก microsomes นำมาละลายใน phosphate buffer pH 7.4 เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้ทำการทดลอง

การวัด Cytochrome P450 activities

CYP1A2 ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity

วัด Microsomal ethoxyresorufin-O-deethylation (EROD) โดยอ้างอิงจากวิธีการของ Burke MD และคณะ (ค.ศ.1985) ดังนี้ ใช้ microsomes จากตับ (0.04 mg protein) incubated กับสารตั้งต้น 7-ethoxyresorufin (6.5 μ M) นาน 5 นาที ที่ 37 °C โดยที่ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 μ L เริ่มต้นปฏิกิริยาโดยการเติม NADPH (2mM) และหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม $ZnSO_4$ (87mM) และ $Ba(OH)_2$ (79 mM) จากนั้นปั่นเหวี่ยง ที่ 800g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดโปรตีนที่ตกตะกอน สาร fluorescent metabolite ที่ได้จากปฏิกิริยา คือ resorufin สามารถวัดการดูดกลืนแสง fluorescent ที่ความยาวคลื่น excitation 530 และ emission 580 nm ผลการทดลองที่ได้จะแสดงเป็น pmol resorufin formed/min/mg microsomal proteins

CYP2B benzyloxyresorufin-O-deethylase (BROD) activity

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้างต้นเพียงเปลี่ยนใช้สารตั้งต้นเป็น benzyloxyresorufin (20.5 μ M)

CYP2E1 paranitrophenol hydroxylation (PNP-OH) activity

อ้างอิงตามวิธีของ Allis JW และ Robinson BL (ค.ศ.1994) โดยวัดอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ (metabolite) คือ 4-nitrocatechol ภายใน 30 นาที เมื่อทำการ incubate microsomes (0.1 mg protein) กับสารตั้งต้น *p*-nitrophenol (0.5 mM) และ NADPH (1 mM) ที่ 37 °C โดยที่ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 500 μ L หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 50% trichloroacetic acid จากนั้นปั่นเหวี่ยง ที่ 800g เป็นเวลา 5 นาที นำเอาเฉพาะส่วนสารละลาย (supernatant) เติม NaOH (10 M, 20 μ L) ก่อนทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ 530 nm ผลการทดลองที่ได้จะแสดงเป็น pmol ของ 4-nitrocatechol formed/min/mg microsomal proteins

CYP3A-dependent testosterone 6 β -hydroxylase activity (6- β Testo-OH)

อ้างอิงตามที่รายงานโดย Pearce RE และคณะ (ค.ศ.1996) โดยการ incubate microsomes (0.1 mg protein) กับ testosterone (0.25 mM) และ NADPH (2 mM) เป็นเวลา 8 นาที ที่ 37 °C โดยที่ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 250 μ L หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม acetonitrile (แช่เย็นจัด) จากนั้นปั่นเหวี่ยง ที่ 800g เป็นเวลา 5 นาที วิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ HPLC กับ UV spectrophotometric detection ที่ 230 nm ผลการทดลองที่ได้จะแสดงเป็น pmol ของ 6 β -hydroxy testosterone formed/min/mg microsomal proteins

การหาค่า The half maximal Inhibitory Concentration (IC₅₀)

ในการหาค่า IC₅₀ ในเบื้องต้นทำได้โดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารตั้งต้น (ความเข้มข้นที่ Km ของแต่ละปฏิกิริยา) ดังนี้ ethoxyresorufin (1 μM), benzyloxyresorufin (4μM), testosterone (100μM) และ *p*-nitrophenol (100 μM) จากนั้นเลือกสารสกัดของผลไม้แต่ละชนิดที่ high capacity/low affinity components (ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเท่ากับ 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 mg/mL) ใช้สาร α -naphthoflavone, proadifen, disulfiram และ ketoconazole เป็นสารยับยั้งมาตรฐาน (selective inhibitors) ของ CYP1A, CYP2B, CYP2E และ CYP3A activity ตามลำดับ (Rendic S และ Di Carlo FJ ค.ศ.1997) ค่า IC₅₀ ของสารยับยั้งมาตรฐาน และของสารสกัดผลไม้วัดจากกราฟโดยวิธี nonlinear regression analysis โดยพลอตระหว่างค่าความเข้มข้นของสารสกัดในหน่วยลอการิทึม (logarithm of inhibitor concentration) กับร้อยละของความสามารถของเอนไซม์ในการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นที่เหลืออยู่ (percentage of remaining activity) โดยใช้โปรแกรม GrapPadPrism3 (GrapPad Co.Ltd., USA) ความสามารถของเอนไซม์ในการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นเมื่อไม่ได้เติมสารสกัดผลไม้ (กลุ่มควบคุม) จะคิดเป็นร้อยละร้อย ผลการทดลองในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดผลไม้จะทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง

การวัดค่า enzyme kinetics

เพื่อหาค่า binding efficiency (K_m), maximum velocity (V_{max}), inhibition constant (Ki) และหา type of inhibition ทำได้โดยการเพิ่มและลดความเข้มข้นของสารตั้งต้นในแต่ละเอนไซม์ 4–5 ความเข้มข้น โดยมีความเข้มข้นเท่ากับ Km/4, Km/2, Km, 2Km และ 4Km เป็นต้นจากนั้น incubated กับสารยับยั้งมาตรฐาน และของสารสกัดผลไม้หลายๆความเข้มข้น วาดกราฟเพื่อหาค่า binding efficiency (K_m), maximum velocity (V_{max}) โดยใช้วิธี best-fit least-squares linear regression พลอตระหว่างความเร็วในการเปลี่ยนสารตั้งต้นกับความเข้มข้นของสารสกัดผลไม้ (Lineweaver–Burk plots) ส่วน inhibition constant (Ki) และ type of inhibition หาจาก second plot ของความชันจากกราฟ Lineweaver–Burk plots กับ ความเข้มข้นของสารสกัดผลไม้

Statistics

ความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองทำได้โดยวิธี one-way analysis of variance และ the student Newman–Keuls multiple range test (SigmaStatTM, SPSS Science, Chicaco, IL, USA). The level of significance พิจารณาที่ $p < 0.05$

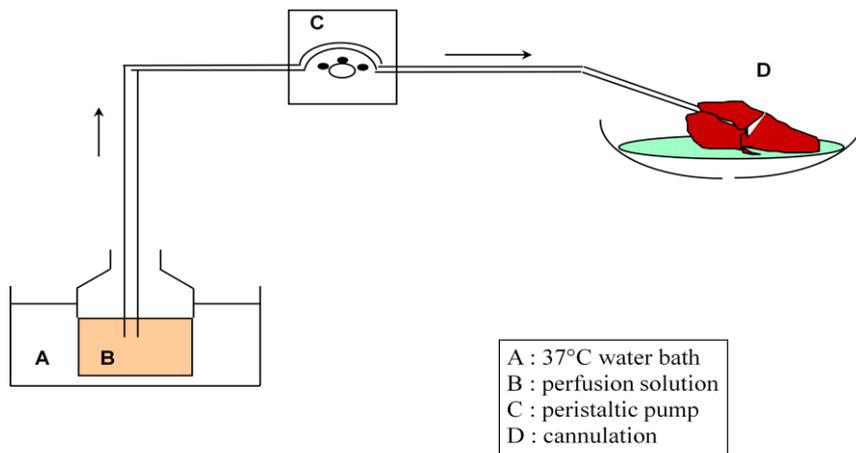
2.6 ผลของสารสกัดผลไม้ต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของหนู

ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ CYP ใน phase I metabolism ของสารสกัดผลไม้ไทยทำการทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยใช้ rat hepatocyte suspension culture

การแยกเซลล์ตับหนูและเพาะเลี้ยงเซลล์

ทำการดมยาสลบหนูขาวสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ ผ่าตัดเพื่อเปิดหน้าท้อง จากนั้นทำการ cannulate ผ่าน hepatic vein ทำการ clamp จากนั้น pump perfusion buffer (ประกอบด้วย EGTA, NaCl,

KCl, Na₂HPO₄, HEPES) ที่ความเร็ว 20 มิลลิลิตรต่อนาที ขณะเปิด pump on ทำการตัดเส้นเลือด superior vena cava เพื่อให้สารละลายที่ผ่านตับไหลออก จากนั้นแยกเซลล์โดยใช้การ perfuse เอนไซม์ collagenase ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ตัดชิ้นตับที่ย่อยแล้วด้วยกรรไกร ชะด้วยสารละลาย HBSS ทำการกรองเพื่อคัดแยกเฉพาะ hepatocyte suspension ด้วยตะแกรงขนาด 400-500, และ 100 ไมครอน นำเซลล์ที่ได้ปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 100 g, 25 องศาเซลเซียส เพื่อตกตะกอน hepatocyte suspension เจือจางด้วย Williams'E culture medium ที่มีส่วนผสมของ fetal calf serum 10%, insulin 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, dexamethasone 0.1 ไมโครโมล และ Penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร Streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ hepatocyte suspension (20 ไมโครลิตร) ย้อมสีด้วย trypan blue (20 ไมโครลิตร) เพื่อนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต หา % viability โดยต้องมีค่ามากกว่า 80% ถ้า % viability น้อยกว่า 80% ทำการแยกเซลล์ตับที่ตายออก (ย้อมติดสี trypan blue) โดยใช้สารละลาย 90% Percoll แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 170 g นาน 20 นาที นำเซลล์ตับหนูที่แยกได้ไปเพาะเลี้ยงใน plate ขนาด 96 หลุมๆละ 100,000 เซลล์ เพื่อทดสอบการทำงานของเอนไซม์ CYPs ร่วมกับสารสกัดผลไม้



ทำการทดสอบผลของสารสกัดผลไม้ต่อการทำงานของเอนไซม์ cytochrome P450 โดยแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น กลุ่มควบคุม (control) กลุ่มทดลองโดยละลายสารสกัดผลไม้ที่ 3 ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 2 mg/mL หรือกลุ่มสารยับยั้งมาตรฐาน (Reference CYP inhibitor) เช่น α -naphthoflaven (10 ไมโครโมลสำหรับ CYP1A2) metyrapone (50 ไมโครโมลสำหรับ CYP2B1) disulfiram (10 ไมโครโมลสำหรับ CYP2E1) ketoconazole (1 ไมโครโมลสำหรับ CYP3A) ลงใน Williams'E culture medium โดยให้มีปริมาณตัวทำละลาย dimethylsulfoxide เท่ากับ 0.1% (ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

การวัดการทำงานของเอนไซม์ cytochrome P450

ทำการ incubate สารตั้งต้นในแต่ละปฏิกิริยา เพื่อวัดการทำงานของเอนไซม์ CYP ในตับ เช่น 7-Ethoxyresorufin 6.5 ไมโครโมลสำหรับ CYP1A2, Benzyloxyresorufin 20.5 ไมโครโมลสำหรับ CYP2B, testosterone 250 ไมโครโมลสำหรับ CYP3A, และ p-nitrophenol 500 ไมโครโมลสำหรับ CYP2E1 นำ 96 well-plate เข้าสู่ incubator ที่ควบคุมความชื้นและปริมาณอากาศต่อก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 95% ต่อ 5% ตามลำดับ นาน 30 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม Methanol แข็งเย็น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่

1500 g 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นนำส่วนสารละลายไปวิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ (metabolite) ที่ได้จากปฏิกิริยา

2.7 ผลของสารสกัดผลไม้ต่อการทำงานของเอนไซม์ UGT และ SULT ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของหนู

ทดสอบความสามารถในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ใน phase II metabolism ของสารสกัดผลไม้ไทยทำการทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยใช้ rat hepatocyte monolayer culture

จากเซลล์ตับหนูที่แยกได้ดังกล่าวที่ละลายใน Williams'E culture medium ที่มีส่วนผสมของ fetal calf serum 10%, insulin 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, dexamethasone 0.1 ไมโครโมล และ Penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร Streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เซลล์เรียงตัวเป็นชั้นเดียว (monolayer) นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนใส่ Williams'E culture medium ที่ไม่มีส่วนผสมของ fetal calf serum ทำการทดสอบผลของสารสกัดผลไม้ต่อการทำงานของเอนไซม์ใน phase II metabolism คือ UGT1A1 และ SULT2A1 โดยแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น กลุ่มควบคุม (control) กลุ่มทดลองโดยละลายสารสกัดผลไม้ที่ 3 ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 2 mg/mL หรือกลุ่มสารกระตุ้นมาตรฐาน (Reference inducer) คือ phenobarbital (1000 ไมโครโมลหรือ 0.23 mg/mL) นาน 72 ชั่วโมงในตู้ incubator ที่ควบคุมความชื้นและปริมาณอากาศต่อก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 95% ต่อ 5% ตามลำดับ โดยทำการเปลี่ยน medium ที่มีสารสกัดผลไม้หรือ inducer ทุก 24 ชั่วโมง ทำการ incubate สารตั้งต้นในแต่ละปฏิกิริยา เพื่อวัดการทำงานของเอนไซม์สำคัญใน phase II metabolism ดังนี้ Estradiol (100 ไมโครโมล) สำหรับ UGT1A1 และ Ethynylestradiol (5 ไมโครโมล) สำหรับ SULT2A1 นาน 30 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม Methanol แข็งเย็น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 g 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นนำส่วนสารละลายไปวิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ (metabolite) ที่ได้จากปฏิกิริยา

บทที่ 3

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

3.1 สารสกัดผลไม้

จากการเตรียมสารสกัดผลไม้โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง (Freeze dryer) ได้ผงแห้งของผลไม้แต่ละชนิดดังแสดงในตารางที่ 1 โดยมีค่า % yield อยู่ระหว่าง 7.13-16.23 % พบว่ามะม่วงให้ % yield สูงสุด (16.23 %) รองลงมาคือ มะละกอ (14.18 %) ส่วนสับปะรดและมังคุดมีค่าปานกลาง (12.78 และ 12.34% ตามลำดับ) โดยผลไม้ที่มีส่วนประกอบของน้ำมากคือส้มและส้มโอ ได้ % yield ที่มีค่าค่อนข้างต่ำ (8.82 และ 7.13% ตามลำดับ)

ตารางที่ 1 แสดงผลการเตรียมสารสกัดผลไม้โดยวิธี freeze dry

ผลไม้ ;ตัวย่อ (ชื่อวิทยาศาสตร์)	น้ำหนัก เนื้อผลไม้ (g)	น้ำหนัก กากผลไม้ (g)	น้ำหนัก น้ำผลไม้ (g)	น้ำหนักผงผลไม้ หลัง freeze dry (g)	% yield
มะม่วง Mango ;MG (<i>Mangifera indica</i>)	119.35	57.30	62.05	10.07	16.23
มังคุด Mangosteen ;MT (<i>Garcinia mangostana</i>)	151.47	89.06	62.41	7.70	12.34
ส้ม Orange ;OR (<i>Citrus reticulata</i>)	160.92	102.65	58.27	5.14	8.82
สับปะรด Pineapple; PA (<i>Ananas comosus</i>)	113.35	47.29	66.06	8.44	12.78
ส้มโอ Pomelo ;PM (<i>Citrus maxima</i>)	128.15	70.61	57.54	4.10	7.13
มะละกอ Papaya ;PY (<i>Carica papaya</i>)	113.74	56.91	56.83	8.06	14.18

3.2 ค่า Total Polyphenol โดยวิธีของ Folin Ciocalteu ในสารสกัดผลไม้

จากผลการทดลองในตารางที่ 2 แสดงค่า total polyphenol เทียบกับ gallic acid (g/kg) แตกต่างกันในผลไม้แต่ละชนิด โดยในมังคุดพบ total polyphenol ปริมาณน้อย ใน มะม่วง สับปะรด ส้ม พบ total polyphenol ปริมาณปานกลาง ส่วน มะละกอและส้มโอ พบ total polyphenol ในปริมาณค่อนข้างสูง

ตารางที่ 2 แสดงค่า Total Polyphenol โดยวิธีของ Folin Ciocalteu ในผลไม้

Fruit extract (5 mg/mL)	ค่าเฉลี่ย ปริมาณ Total polyphenol เทียบกับ Gallic acid (g/kg)*
มะม่วง Mango;MG (<i>Mangifera indica</i>)	2.21±0.12
มังคุด Mangosteen;MT (<i>Garcinia mangostana</i>)	0.74±0.04
ส้ม Tangerine;OR (<i>Citrus reticulata</i>)	2.91±0.10
สับปะรด Pineapple;PA (<i>Ananas comosus</i>)	2.37±0.08
ส้มโอ Pomelo;PM (<i>Citrus maxima</i>)	6.24±0.09
มะละกอ Papaya;PY (<i>Carica papaya</i>)	5.38±0.14

* ค่าเฉลี่ยเกิดจากการวัดปริมาณ Total polyphenol จากตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง (ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความผิดพลาดปกติของค่าเฉลี่ย)

3.3 ผลของสารสกัดผลไม้ต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP ในหนู

ผลของสารยับยั้งมาตรฐานและสารสกัดผลไม้ต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2, 2B, 2E และ 3A ในตับแสดงดังตารางที่ 3–6 โดยสารยับยั้งมาตรฐานทั้ง 4 สาร คือ ANF, metyrapone, disulfiram และ ketoconazole มีค่า IC₅₀ ที่ต่ำ ดังต่อไปนี้ 0.00231, 0.000182, 0.299 และ 0.0154 mg/mL ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้อย่างจำเพาะเจาะจงแม้ที่ความเข้มข้นต่ำ อย่างไรก็ตาม สารสกัดผลไม้ก็มีความสามารถยับยั้งเอนไซม์แตกต่างกันไปในแต่ละ isoform ดังนี้ ผลการทำงานของเอนไซม์ CYP1A (ตาราง 3) พบว่า PY และ PM ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดีด้วยค่า IC₅₀ เท่ากับ 1.85 และ 7.95 mg/mL อย่างไรก็ตาม ค่า IC₅₀ ยังคงสูงเมื่อเทียบกับค่า IC₅₀ ของ ANF นั่นเอง (ต่างกันประมาณ 80 เท่า) ส่วน MT และ OR มีผลยับยั้งปานกลางที่ค่า IC₅₀ เท่ากับ 25.67 และ 28.50 mg/mL ตามลำดับ ส่วน MG และ PA มีผลต่อเอนไซม์น้อยมาก (IC₅₀ > 50 mg/mL) ส่วนผลต่อเอนไซม์ CYP2B แสดงดังในตารางที่ 4 พบว่า MT มีความสามารถในการยับยั้งสูงสุดด้วยค่า IC₅₀ เท่ากับ 1.41 mg/mL รองลงมาคือ MG (IC₅₀ = 4.25 mg/mL) ส่วน PM, PY และ PA มีผลยับยั้งได้ปานกลางด้วยค่า IC₅₀ เท่ากับ 6.5, 6.82 และ 15.68 mg/mL ตามลำดับ โดยที่ OR มีผลต่อ CYP2B น้อยมาก และพบว่า MT มีความสามารถในการยับยั้งต่างจาก metyrapone ถึง 7700 เท่าโดยประมาณ ผลต่อเอนไซม์ 2E1 แสดงดังตารางที่ 5 พบว่า สารสกัดผลไม้เกือบทุกชนิดมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว ไม่ต่างจากสารมาตรฐาน disulfiram ยกเว้น MG ที่ไม่มีผลต่อเอนไซม์ 2E1 ส่วนผลต่อ CYP3A แสดงในตารางที่ 6 โดยพบว่า PA และ PY ยับยั้ง CYP3A อย่างมีนัยสำคัญด้วยค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.246 และ 0.926 mg/mL ตามลำดับ (โดย IC₅₀ ของ PA ต่างจาก ketoconazole 16 เท่า) และ PM มีผลยับยั้งปานกลาง (IC₅₀ = 8.47 mg/mL) ส่วน OR, MG, MT มีผลน้อยมากต่อเอนไซม์ดังกล่าว

ตารางที่ 3 แสดงค่า IC₅₀ values ของ 7-ethoxyresorufin-O-deethylation (EROD) สำหรับ CYP1A2 ใน rat liver microsomes

สารสกัดผลไม้/reference inhibitor	IC ₅₀ (mg/mL)*
มะม่วง Mango (<i>Mangifera indica</i>)	>50
มังคุด Mangosteen (<i>Garcinia mangostana</i>)	25.67
ส้ม Tangerine (<i>Citrus reticulata</i>)	28.50
สับปะรด Pineapple (<i>Ananas comosus</i>)	>50
ส้มโอ Pomelo (<i>Citrus maxima</i>)	7.95
มะละกอ Papaya (<i>Carica papaya</i>)	1.856
α-naphthoflavone (ANF)	0.00231

* ค่า IC₅₀ เกิดจากการ plot graph ระหว่าง enzyme activity คิดเป็นร้อยละเทียบกับกลุ่มควบคุมกับความเข้มข้นของสารสกัดผลไม้ที่ใช้ (8 ความเข้มข้นคือ 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 50 mg/mL) โดยค่า enzyme activity แต่ละจุดเกิดจากการวัดตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง (triplicate)

ตารางที่ 4 แสดงค่า IC₅₀ values ของ Benzyloxyresorufin-O-deethylation (BROD) สำหรับ CYP2B1 ใน rat liver microsomes

สารสกัดผลไม้/reference inhibitor	IC ₅₀ (mg/mL)*
มะม่วง Mango (<i>Mangifera indica</i>)	4.258
มังคุด Mangosteen (<i>Garcinia mangostana</i>)	1.413
ส้ม Tangerine (<i>Citrus reticulata</i>)	>50
สับปะรด Pineapple (<i>Ananas comosus</i>)	15.68
ส้มโอ Pomelo (<i>Citrus maxima</i>)	6.507
มะละกอ Papaya (<i>Carica papaya</i>)	6.824
Metyrapone	0.000182

* ค่า IC₅₀ เกิดจากการ plot graph ระหว่าง enzyme activity คิดเป็นร้อยละเทียบกับกลุ่มควบคุมกับความเข้มข้นของสารสกัดผลไม้ที่ใช้ (8 ความเข้มข้นคือ 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 50 mg/mL) โดยค่า enzyme activity แต่ละจุดเกิดจากการวัดตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง (triplicate)

ตารางที่ 5 แสดงค่า IC₅₀ values ของ p-nitrophenol hydroxylation สำหรับ CYP2E1 ใน rat liver microsomes

สารสกัดผลไม้/reference inhibitor	IC ₅₀ (mg/mL)*
มะม่วง Mango (<i>Mangifera indica</i>)	>50
มังคุด Mangosteen (<i>Garcinia mangostana</i>)	2.102
ส้ม Tangerine (<i>Citrus reticulata</i>)	0.2552
สับปะรด Pineapple (<i>Ananas comosus</i>)	0.06223
ส้มโอ Pomelo (<i>Citrus maxima</i>)	0.0012
มะละกอ Papaya (<i>Carica papaya</i>)	0.03495
Disulfiram	0.299

* ค่า IC₅₀ เกิดจากการ plot graph ระหว่าง enzyme activity คิดเป็นร้อยละเทียบกับกลุ่มควบคุมกับความเข้มข้นของสารสกัดผลไม้ที่ใช้ (8 ความเข้มข้นคือ 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 50 mg/mL) โดยค่า enzyme activity แต่ละจุดเกิดจากการวัดตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง (triplicate)

ตารางที่ 6 แสดงค่า IC₅₀ values ของ Testosterone 6β-hydroxylation สำหรับ CYP3A1 ใน rat microsomes

สารสกัดผลไม้/reference inhibitor	IC ₅₀ (mg/mL)*
มะม่วง Mango (<i>Mangifera indica</i>)	>50
มังคุด Mangosteen (<i>Garcinia mangostana</i>)	>50
ส้ม Tangerine (<i>Citrus reticulata</i>)	37.81
สับปะรด Pineapple (<i>Ananas comosus</i>)	0.246
ส้มโอ Pomelo (<i>Citrus maxima</i>)	8.47
มะละกอ Papaya (<i>Carica papaya</i>)	0.926
Ketoconazole	0.0154

* ค่า IC₅₀ เกิดจากการ plot graph ระหว่าง enzyme activity คิดเป็นร้อยละเทียบกับกลุ่มควบคุมกับความเข้มข้นของสารสกัดผลไม้ที่ใช้ (8 ความเข้มข้นคือ 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 50 mg/mL) โดยค่า enzyme activity แต่ละจุดเกิดจากการวัดตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง (triplicate)

ตารางที่ 7 แสดงผลของสารสกัดผลไม้ต่อการเปลี่ยนแปลงค่าทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ cytochrome (แสดงเฉพาะสารสกัดผลไม้ที่มีค่า $IC_{50} \leq 10$ mg/mL) โดยพบว่า ส่วนใหญ่สารสกัดผลไม้ไม่มีผลเปลี่ยนแปลง K_m แต่ลดค่า V_{max} นั่นคือ มีการยับยั้งชนิด non-competitive ยกเว้น OR ที่มีผลเพิ่มค่า K_m และลด V_{max} ของเอนไซม์ 2E1 และ PY ที่มีผลเช่นเดียวกันต่อเอนไซม์ 1A2 และ 3A1 บ่งบอกว่าเป็นการยับยั้งแบบ mixed-type inhibition ค่า K_i ดังแสดง พบว่า PY มีค่า K_i ต่ำต่อ CYP1A2 และ 3A1 เท่ากับ 0.97 และ 0.34 mg/mL ตามลำดับ PA มีค่า K_i ต่อเอนไซม์ 3A1 เท่ากับ 0.70 mg/mL และ MT แสดงค่า K_i เท่ากับ 4.56 ต่อเอนไซม์ 2B1 ส่วน isoform อื่นๆ สารสกัดผลไม้ไม่มีค่า K_i ที่ค่อนข้างสูง

ตารางที่ 7 แสดงค่าการเปลี่ยนแปลงทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ Cytochrome P450 ที่เกิดจากสารสกัดผลไม้

CYP isoforms	สารสกัดผลไม้	K_m	V_{max}	K_i	Mode of inhibition
1A2	PM	\leftrightarrow	\downarrow	12.56	Non-competitive
	PY	\uparrow	\downarrow	0.97	Mixed-type
2B1	MG	\leftrightarrow	\downarrow	8.96	Non-competitive
	MT	\leftrightarrow	\downarrow	4.56	Non-competitive
	PM	\leftrightarrow	\downarrow	23.65	Non-competitive
	PY	\leftrightarrow	\downarrow	11.67	Non-competitive
2E1	MT	\leftrightarrow	\downarrow	12.45	Non-competitive
	OR	\uparrow	\downarrow	25.44	Mixed-type
	PA	\leftrightarrow	\downarrow	18.46	Non-competitive
	PM	\leftrightarrow	\downarrow	15.67	Non-competitive
	PY	\leftrightarrow	\downarrow	9.67	Non-competitive
3A1	PA	\leftrightarrow	\downarrow	0.70	Non-competitive
	PM	\leftrightarrow	\downarrow	10.57	Non-competitive
	PY	\uparrow	\downarrow	0.34	Mixed-type

3.4 ผลของสารสกัดผลไม้ต่อการทำงานของ CYP ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของหนู

แสดงผังแผนภาพที่ 3 ทำการทดสอบผลของสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 2 mg/mL เมื่อ incubate ร่วมกับสารตั้งต้นของปฏิกิริยา โดยเปรียบเทียบกับสารยับยั้งมาตรฐาน คือ α -naphthoflavone (ANF) 0.01 mg/mL พบว่า ANF สามารถยับยั้งการทำงานของ CYP1A2 ได้อย่างสมบูรณ์มากกว่าร้อยละ 90 ส่วนสารสกัดผลไม้ที่ทุกความเข้มข้นมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์น้อย (ความสามารถในการยับยั้งน้อยกว่าร้อยละ 10) ยกเว้นสารสกัดจากส้มโอ (PM) และมะละกอ (PY) ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยส้มโอยับยั้งการทำงานของ CYP1A2 ได้ระหว่างร้อยละ 21-33 ส่วนมะละกอมีผลยับยั้งได้ร้อยละ 49-62 ตามลำดับ

แผนภาพที่ 4 แสดงผลของสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2B1 พบว่า สารยับยั้งมาตรฐาน metyrapone ที่ความเข้มข้น 0.001 mg/mL มีผลยับยั้ง CYP2B1 ได้เกินร้อยละ 90 ส่วนสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้นต่ำ (0.1 mg/mL) ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์นี้ ยกเว้นสารสกัดจากสับปะรด อย่างไรก็ตาม สารสกัดที่ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/mL มีผลยับยั้ง CYP2B1 ได้ระหว่าง 14-90% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและการยับยั้งนี้ขึ้นกับขนาด (dose-dependent)

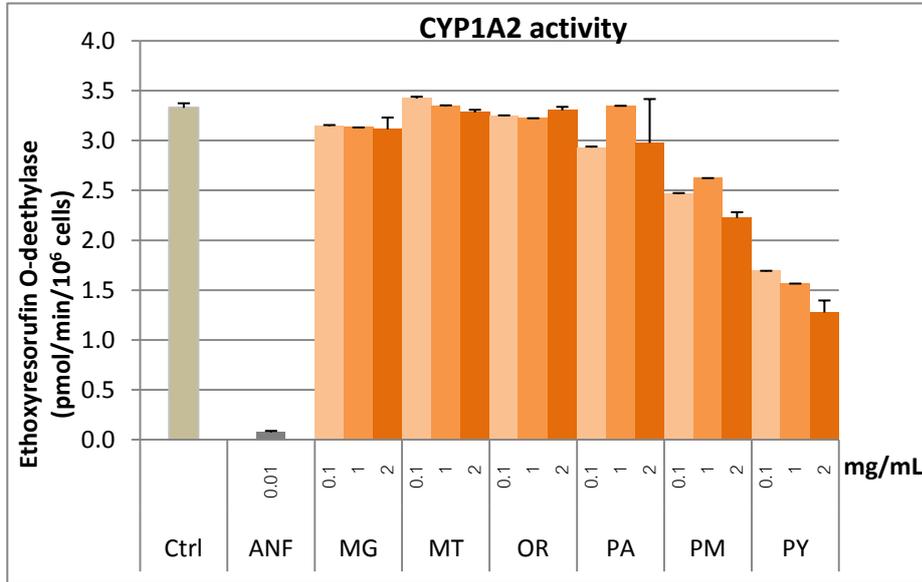
แผนภาพที่ 5 แสดงผลของสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 พบว่า disulfiram ซึ่งเป็นสารยับยั้งมาตรฐานของ CYP2E1 ที่ขนาด 0.5mg/mL สามารถยับยั้งการทำงานของ CYP2E1 ได้ร้อยละ 50 โดยที่สารสกัดผลไม้มะม่วง (MG), ส้ม (OR), สับปะรด (PA) และส้มโอ (PM) ที่ขนาด 0.1-2 mg/mL มีผลต่อเอนไซม์น้อยมาก (น้อยกว่าร้อยละ 10) ส่วนมังคุด (MT) ลดการทำงานของเอนไซม์ได้ระหว่างร้อยละ 8-17 โดยที่ มะละกอ (PY) 1 และ 2 mg/mL ลดการทำงานของเอนไซม์ได้ร้อยละ 17 และ 35 ตามลำดับ สารสกัดผลไม้ทั้ง 6 ชนิดที่ขนาด 0.1, 1 และ 2 mg/mL ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ที่ทำการทดลองในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงหนู (น้อยกว่าร้อยละ 15) ดังแผนในภาพที่ 6

3.5 ผลของสารสกัดผลไม้ต่อการทำงานของ UGT และ SULT ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของหนู

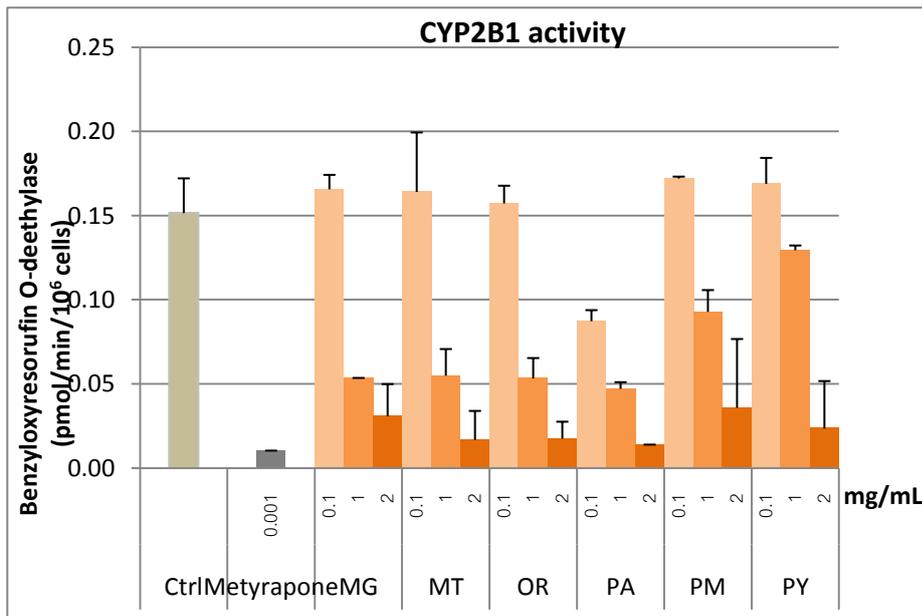
แผนภาพที่ 7 แสดงผลของสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อการทำงานของเอนไซม์ UGT1A1 พบว่า phenobarbital ซึ่งเป็นสารเหนี่ยวนำมาตรฐานของ UGT1A1 ที่ขนาด 0.23 mg/mL สามารถเหนี่ยวนำการทำงานของ UGT1A1 เพิ่มขึ้นได้ร้อยละ 25 ส่วนสารสกัดผลไม้ทั้ง 6 ชนิดที่ขนาด 0.1, 1 และ 2 mg/mL ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ UGT1A1 ที่ทำการทดลองในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงหนู (น้อยกว่าร้อยละ 15) ยกเว้น PY ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/mL สามารถเหนี่ยวนำ UGT1A1 ได้เพิ่มขึ้นร้อยละ 66 และร้อยละ 58 ตามลำดับ

สารสกัดผลไม้ทั้ง 6 ชนิดที่ขนาด 0.1, 1 และ 2 mg/mL ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ SULT2A1 ที่ทำการทดลองในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงหนู (น้อยกว่าร้อยละ 15) ดังแสดงในแผนภาพที่ 8

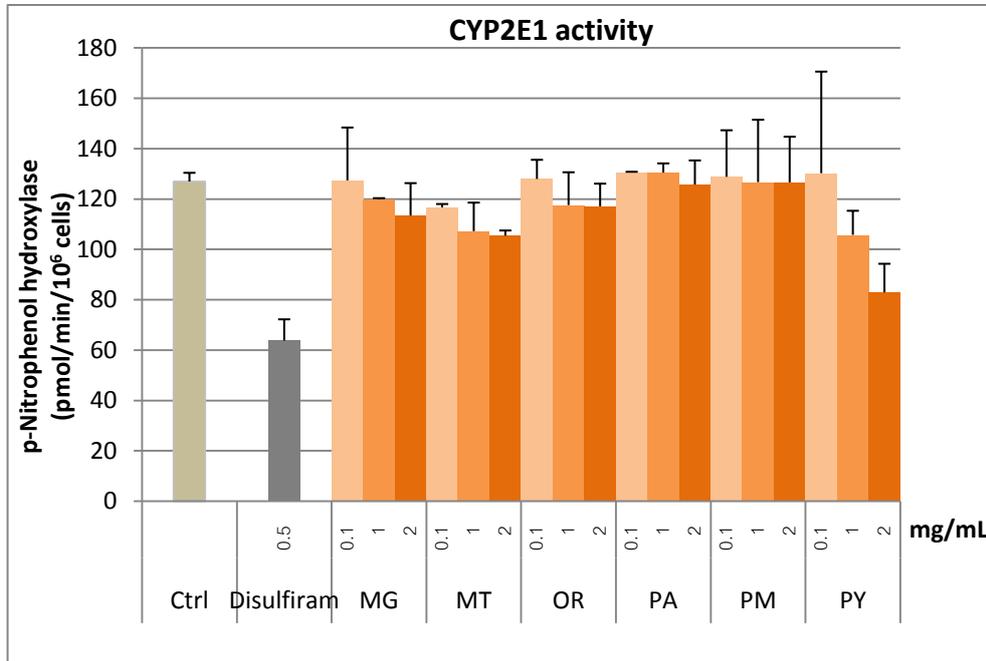
แผนภาพที่ 3 แสดงผลของสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2 ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงหนู ค่า enzyme activity แต่ละจุดเกิดจากการวัดตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง (triplicate)



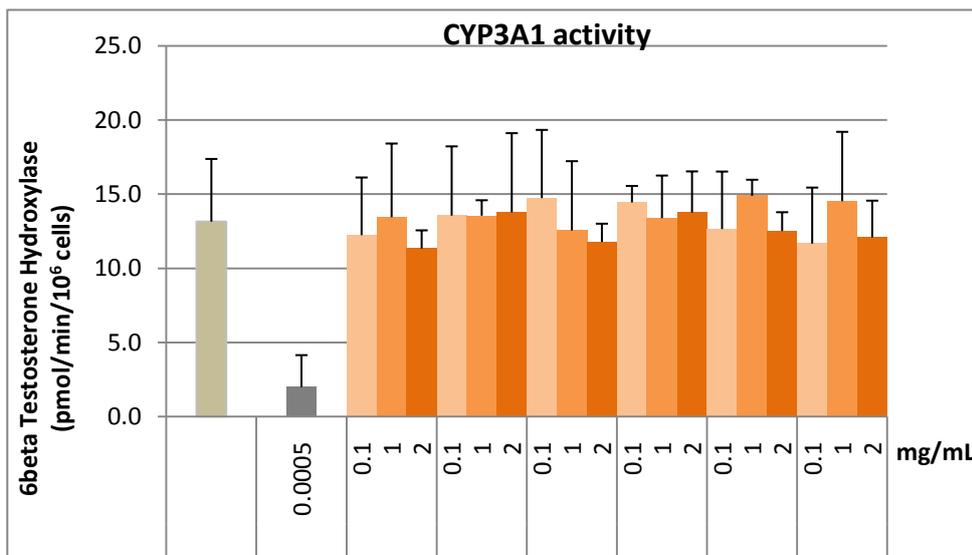
แผนภาพที่ 4 แสดงผลของสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2B1 ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงหนู ค่า enzyme activity แต่ละจุดเกิดจากการวัดตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง (triplicate)



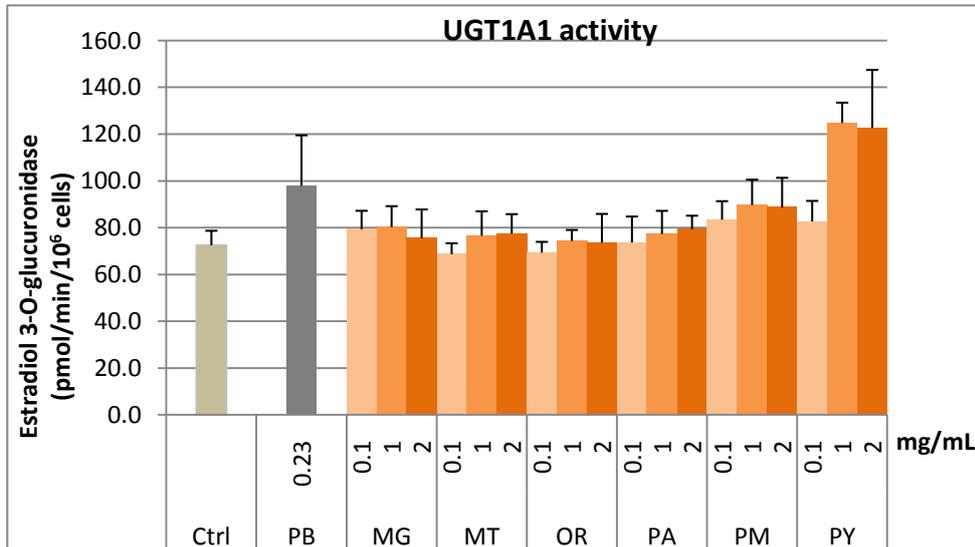
แผนภาพที่ 5 แสดงผลของสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงหนูค่า enzyme activity แต่ละจุดเกิดจากการวัดตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง (triplicate)



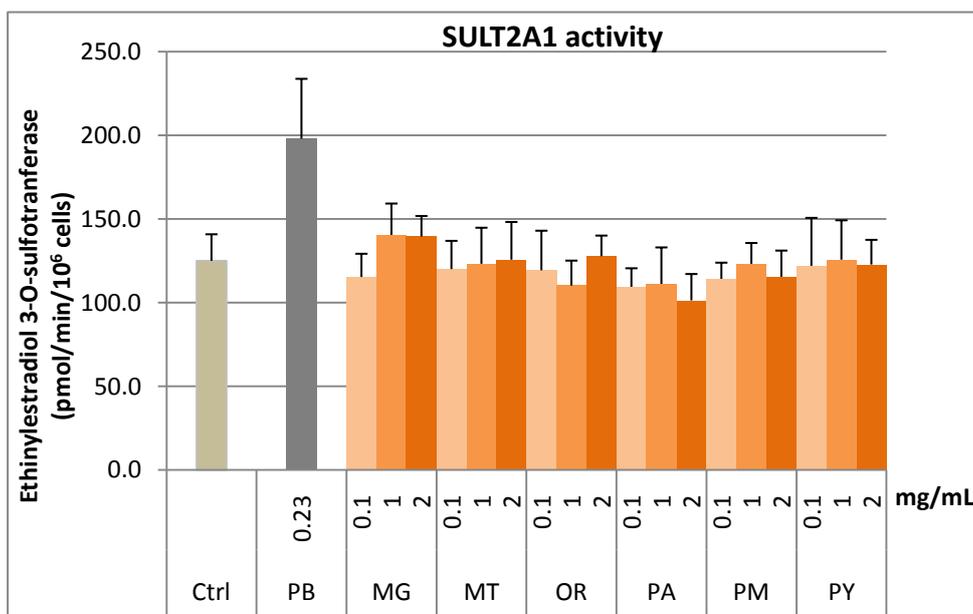
แผนภาพที่ 6 แสดงผลของสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A1 ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงหนูค่า enzyme activity แต่ละจุดเกิดจากการวัดตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง (triplicate)



แผนภาพที่ 7 แสดงผลของสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อการทำงานของเอนไซม์ UGT1A1 ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงหนูค่า enzyme activity แต่ละจุดเกิดจากการวัดตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง (triplicate)



แผนภาพที่ 8 แสดงผลของสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อการทำงานของเอนไซม์ SULT2A1 ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงหนูค่า enzyme activity แต่ละจุดเกิดจากการวัดตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง (triplicate)



บทที่ 4

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

คุณสมบัติการเป็น chemoprevention นั้นเป็นความหวังอย่างหนึ่งในการควบคุมการเกิดโรคมะเร็ง โดยมุ่งหวังว่าสารจากธรรมชาติหรือสารสังเคราะห์มีความสามารถยับยั้งขบวนการการเกิดสารก่อมะเร็งในร่างกาย (carcinogenic processes) ได้ ตัวอย่างเช่นสารในกลุ่ม polyphenol, flavonoids ซึ่งพบได้ทั่วไปในผักและผลไม้ โดยสารเหล่านี้มีทั้งฤทธิ์ antioxidant และ anticarcinogenic เมื่อทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) และผลในสัตว์ทดลอง (*in vivo* studies) การเกิดมะเร็ง (carcinogenesis) ของสารก่อมะเร็ง (carcinogens) หลายชนิด ต้องการการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลให้อยู่ในรูป active (metabolic activation) เพื่อสร้างสารตัวกลางที่ชอบอิเล็กตรอน (electrophilic intermediates) ซึ่งสามารถทำอันตรายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ โปรตีน สารพันธุกรรมดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอ และก่อให้เกิดความเสียหาย หรือทำให้การทำงานของเซลล์บกพร่องตามมา ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลนี้ส่วนใหญ่อาศัยการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครม (Cytochrome P450; CYP) ยกตัวอย่างเช่น benzo [a] pyrene ถูกเปลี่ยนเป็นสารตัวกลาง benzo (a)pyrene-7,8-diol, 9, 10-epoxide [BPDE] โดยอาศัย CYP1A สาร Olefins และ halogenated hydrocarbons อาศัยการ activate โดยใช้เอนไซม์ CYP2B1 หรือ AflatoxinB1 เปลี่ยนแปลงโมเลกุลโดยอาศัย CYP3A เป็นต้น ดังนั้น สารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของสารก่อมะเร็งดังกล่าว จึงเชื่อว่าจะช่วยลดการสร้าง reactive metabolites และลดผลต่อเนื่องต่อการจับที่ DNA หรือ macromolecule อื่นซึ่งอาจลดความเสี่ยงในการก่อให้เกิดมะเร็งได้นั่นเอง

ผู้วิจัยเลือกใช้สารสกัดผลไม้จากส่วนเนื้อที่รับประทานจริง มาทำการทดลองโดยการคั้นแล้วทำให้เป็นผงแห้งโดยใช้วิธี freeze dry ทั้งนี้เพื่อรักษาส่วนประกอบต่างๆ ให้ได้มากที่สุด เมื่อใช้ทำการทดลองจึงทำให้มีความคงตัว (stability), ความสามารถในการละลาย (solubility) การเกิด metabolism ใกล้เคียงกับที่เกิดจริงในร่างกาย แต่อย่างไรก็ตาม ไม่มีรายงานส่วนประกอบทั้งหมดของผลไม้ทั้ง 6 ชนิดและค่าการซึมผ่าน (bioavailability) เข้าสู่ร่างกายของแต่ละส่วนประกอบในสารสกัดผลไม้ ผลไม้ไทย 6 ชนิด ได้แก่ มะม่วง ส้มโอ มะละกอ มังคุด ส้ม และสับปะรด มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมในไมโครโซมตับ (CYP1A2, 2B1, 2E1 และ 3A1) โดยเฉพาะสารสกัดมะละกอและสับปะรด อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับสารยับยั้งมาตรฐาน พบว่าสารสกัดผลไม้จัดเป็นสารยับยั้งอย่างอ่อน ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง หนูพบว่า สารสกัดผลไม้บางชนิดเท่านั้นที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เช่น ส้มโอ และมะละกอ ลดการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2 และ 2E1 สารสกัดผลไม้เกือบทุกชนิดมีผลลดการทำงานของ CYP2B1 ในขณะที่สารสกัดผลไม้ส่วนใหญ่ไม่มีผลต่อ CYP3A1 รวมถึง เอนไซม์ใน phase II metabolism UGT1A1 และ SULT2A1 ผลที่แตกต่างกันระหว่างการทำการทดลองในไมโครโซมและในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง หนูเกิดจากความสามารถในการซึมผ่านที่แตกต่างกันของส่วนประกอบที่อยู่ในสารสกัดเข้าสู่ภายในเซลล์เทียบกับการที่สารสกัดสัมผัสกับเอนไซม์โดยตรงเมื่อทำการทดลองในไมโครโซม

ในสารสกัดผลไม้ นอกจากประกอบด้วย สารอาหาร วิตามิน แร่ธาตุ เส้นใยอาหาร แล้วยังมี ส่วนประกอบของสารต่างๆ เช่น polyphenol, flavonoid, tannin ซึ่งมีคุณสมบัติการเป็น antioxidant โดยจะไปช่วยลด DNA damage และลด lipid peroxidation ยับยั้ง malignant transformation หรือ cell proliferation เป็นที่แน่ชัดว่า ผลของสารต่างๆที่อยู่ในสารสกัดผลไม้ เช่น flavonoids, tannin เป็นต้น ที่ทำการทดลองใน *in vitro* ก่อนหน้านี้ไม่สามารถทำนายผลใน *in vivo* ได้อย่างแม่นยำ 100% เนื่องจาก โดยทั่วไปสารธรรมชาติต่างๆในสารสกัดมักมีค่าชีวประสิทธิผลต่ำ (low oral bioavailability) หรือสามารถถูกทำลายโดยแบคทีเรียในทางเดินอาหาร ดังนั้น ความเข้มข้นของสารสกัดที่เกิดขึ้นจริงในร่างกายจึงไม่สามารถคาดเดาได้ เมื่อเทียบกับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลอง *in vitro* การทำการทดลองใน *in vivo* ในขั้นตอนต่อไป จึงเป็นประโยชน์มากในการคาดเดาผลและหาความสัมพันธ์ของผลต่อเอนไซม์ของสารสกัดผลไม้ระหว่าง *in vitro* กับ *in vivo* โดยทั่วไปผลไม้ในธรรมชาติมีประโยชน์ต่อสุขภาพในแง่ที่ป้องกันการเสื่อมของอวัยวะต่างๆของร่างกาย ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสารอาหาร วิตามิน หรือสารสำคัญอื่นๆในผลไม้ ที่มีฤทธิ์ antioxidant, antimutagenic และ anticarcinogenic เป็นต้น จากการศึกษาที่ ยืนยันว่าสารสกัดผลไม้ไทยทั้ง 6 ชนิดมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมในตับทำให้สามารถนำไปอธิบายในแง่ลดการเปลี่ยนแปลงสารก่อมะเร็งให้อยู่ในรูป active อย่างไรก็ดีตามเพื่อยืนยันผลของสารสกัดผลไม้ต่อการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว การทำการทดลองในหนู (*in vivo study*) โดยการป้อนสารสกัดผลไม้ทางปากจะช่วยให้ได้คำตอบที่กระจ่างชัดขึ้น

บรรณานุกรม

- Allis, J.W., Robinson, B.L., 1994. A kinetic assay for *p*-nitrophenol hydroxylase in rat liver microsomes, *Anal. Biochem.* 219, 49–52.
- Breinholt, V.M., Offord, E.A., Brouwer, C., Nielsen, S.E., Brosen, K., Friedberg, T., 2002. *In vitro* investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids. *Food Chem. Toxicol.* 40, 609–616.
- Burke, M.D., Thomson, S., Elcombe, C.R., Halpert, J., Haaparanta, T., Mayer, R.T., 1985. Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxy-phenoxasones and homologues: a series of substrate to distinguish between different induced cytochrome P450, *Biochem. Pharmacol.* 34, 3337–3345.
- Canistro, D., Bonamassa, B., Pozzetti, L., Sapone, A., Abdel-Rahman, S.Z., Biagi, G.L., Paolini, M., 2009. Alteration of xenobiotic metabolizing enzymes by resveratrol in liver and lung of CD1 mice. *Food Chem. Tox.* 47, 454-461.
- Chen, C., Kong, A.N., 2004. Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1505–1516.
- Conney, A.H., 2003. Enzyme induction and dietary chemicals as approaches to cancer chemoprevention: the Seventh DeWitt S. Goodman Lecture. *Cancer Res.* 63, 7005–7031.
- Dai, R., Zhai, S., Wei, X., Pincus, M.R., Vestal, R.E., Friedman, F.K., 1998. Inhibition of human cytochrome P450 1A2 by flavones: a molecular modeling study. *J. Protein Chem.* 17, 643–650.
- Doostdar, H., Burke, M.D., Mayer, R.T., 2000. Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. *Toxicology* 144, 31–38.
- Eaton, E.A., Walle, U.K., Lewis, A.J., Hudson, T., Wilson, A.A., Walle, T., 1996. Flavonoids, potent inhibitors of the human P-form phenolsulfotransferase. Potential role in drug metabolism and chemoprevention. *Drug Metab. Dispos.* 24, 232–237.

Foster, B.C., Vandenhoeck, S., Hana, J., Krantis, A., Akhtar, M.H., Bryan, M., Budzinski, J.W., Ramputh, A., Arnason, J.T., 2003. *In vitro* inhibition of human cytochrome P450-mediated metabolism of marker substrates by natural products. *Phytomed.* 10, 334–342.

Fukao, T., Hosono, T., Misawa, S., Seki, T., Ariga, T., 2004. The effects of allyl sulfides on the induction of phase II detoxification enzymes and liver injury by carbontetrachloride. *Food Chem. Tox.* 42, 743–749.

Galijatovic, A., Otake, Y., Walle, U.K., Walle, T., 2001. Induction of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by the flavonoid chrysin in Caco-2 cells potential role in carcinogen bioinactivation. *Pharm. Res.* 18, 374–379.

Greenwald, P., Clifford, C.K., Milner, J.A., 2001. Diet and cancer prevention. *Eur J Cancer.* 37, 948-965.

Guengerich, F.P., Shimada, T., 1991. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* 4, 391–407.

Gurley, B.J., Gardner, S.F., Hubbard, M.A., Williams, D.K., Gentry, W.B., Carrier, J., Khan, I.A., Edwards, D.J., Shah, A., 2004. *In vivo* assessment of botanical supplementation on human cytochrome P450 phenotypes: *Citrus aurantium*, *Echinacea purpurea*, milk thistle, and saw palmetto. *Clin. Pharmacol. Ther.* 76, 428–440.

Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M., 2002. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem. Biol. Interact.* 139, 1–21.

Kaur, C., Kapoor, H. C. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables – The millennium’s health. *International Journal of Food Science Technology*, 36, 703–725.

Kelebek H., Selli S., Canbas A., Cabaroglu T. 2009. HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal*, 91, 187-192.

Kang, Z.C., Tsai, S.J., Lee, H., 1999. Quercetin inhibits benzo[a]pyrene-induced DNA adducts in human Hep G2 cells by altering cytochrome P-450 1A1 gene expression. *Nutr. Cancer* 35, 175–179.

Kim, Y., Giraud, D. W., & Driskell, J. A. 2007. Tocopherol and carotenoid contents of selected Korean fruits and vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 458–465.

Lee, S.K., Song, L., Mata-Greenwood, E., Kelloff, G.J., Steele, V.E., Pezzuto, J.M., 1999. Modulation of *in vitro* biomarkers of the carcinogenic process by chemopreventive agents. *Anticancer Res.* 19, 35–44.

Lin, J.H., Lu, A.Y., 1998. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin. Pharmacokinet.* 35, 361–390.

Machala, M., Kubinova, R., Horavova, P., Suchy, V., 2001. Chemoprotective potentials of homoisoflavonoids and chalcones of *Dracaena cinnabari*: modulations of drug-metabolizing enzymes and antioxidant activity. *Phytother. Res.* 15, 114–118.

Marchetti, F., De Santi, C., Vietri, M., Pietrabissa, A., Spisni, R., Mosca, F., Pacifici, G.M., 2001. Differential inhibition of human liver and duodenum sulphotransferase activities by quercetin, a flavonoid present in vegetables, fruit and wine. *Xenobiotica* 31, 841–847.

Melendez-Colon, V.J., Luch, A., Seidel, A., Baird, W.M., 1999. Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites. *Carcinogenesis* 20, 1885–1891.

Murakami, A., Ohigashi, H., Koshimuzu, K., 1999. Chemoprevention: insights into biological mechanisms and promising food factors. *Food Rev. Internat.* 15, 335–395.

Obermeier, M.T., White, R.E., Yang, C.S., 1995. Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities. *Xenobiotica* 25, 575–584.

Pearce, R.E., McIntyre, C.J., Madan, A., Sanzgiri, U., Draper, A.J., Bullock, P.L., Cook, D.C., Burton, L.A., Latham, J., Nevins, C., Parkinson, A. 1996. Effect of freezing, thawing and storing human liver microsome on cytochrome P450 activity, *Arch. Biochem. Biophys.* 331, 145–169.

Rendic, S., Di Carlo, F.J., 1997. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab. Rev.* 29, 413–580.

Siess, M.H., Leclerc, J., Canivenc-Lavier, M.C., Rat, P., Suschetet, M., 1995. Heterogenous effects of natural flavonoids on monooxygenase activities in human and rat liver microsomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 130, 73–78.

Talalay, P., De Long, M.J., Prochaska, H.J., 1988. Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 8261–8265.

Vinson, J.A., Xuehui, S., Ligia, Z., Bose, P., 2001. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J. Agri Food Chem.* 49, 5315–5321.

Wen, X., Walle, U.K., Walle, T., 2005. 5,7-Dimethoxyflavone downregulates CYP1A1 expression and benzo[a]pyrene-induced DNA binding in Hep G2 cells. *Carcinogenesis* 26, 803–809.

Zhai, S., Dai, R., Friedman, F.K., Vestal, R.E., 1998. Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids. *Drug Metab. Dispos.* 26, 989–992.

ภาคผนวก ก
Finger print เพื่อหาคุณลักษณะ (Characteristic)
ของสารสกัดผลไม้ที่ใช้ในการวิจัย

1.3 ทำ Finger print เพื่อหาคุณลักษณะ (Characteristic) ของสารสกัดผลไม้ที่ใช้ในการวิจัย
 ละลายผงผลไม้แต่ละชนิดให้มีความเข้มข้น 5 mg/mL กรองผ่าน filter syringe ขนาด 0.45 micron จากนั้น
 ฉีดสารละลาย 100 μ L เข้าสู่ระบบ HPLC รายละเอียดดังนี้ (อ้างอิงตามวิธีของ Kelebek H และคณะ ใน
 Microchemical journal ปี ค.ศ.2009 ฉบับที่ 91 หน้า 187-192)

Column: Supelcosil LC-18, 250x4.6 mm, 5 μ m particle size (Supelco, Bellefonte, PA)

Mobile phase A : H₂O:formic acid 95:5 v/v

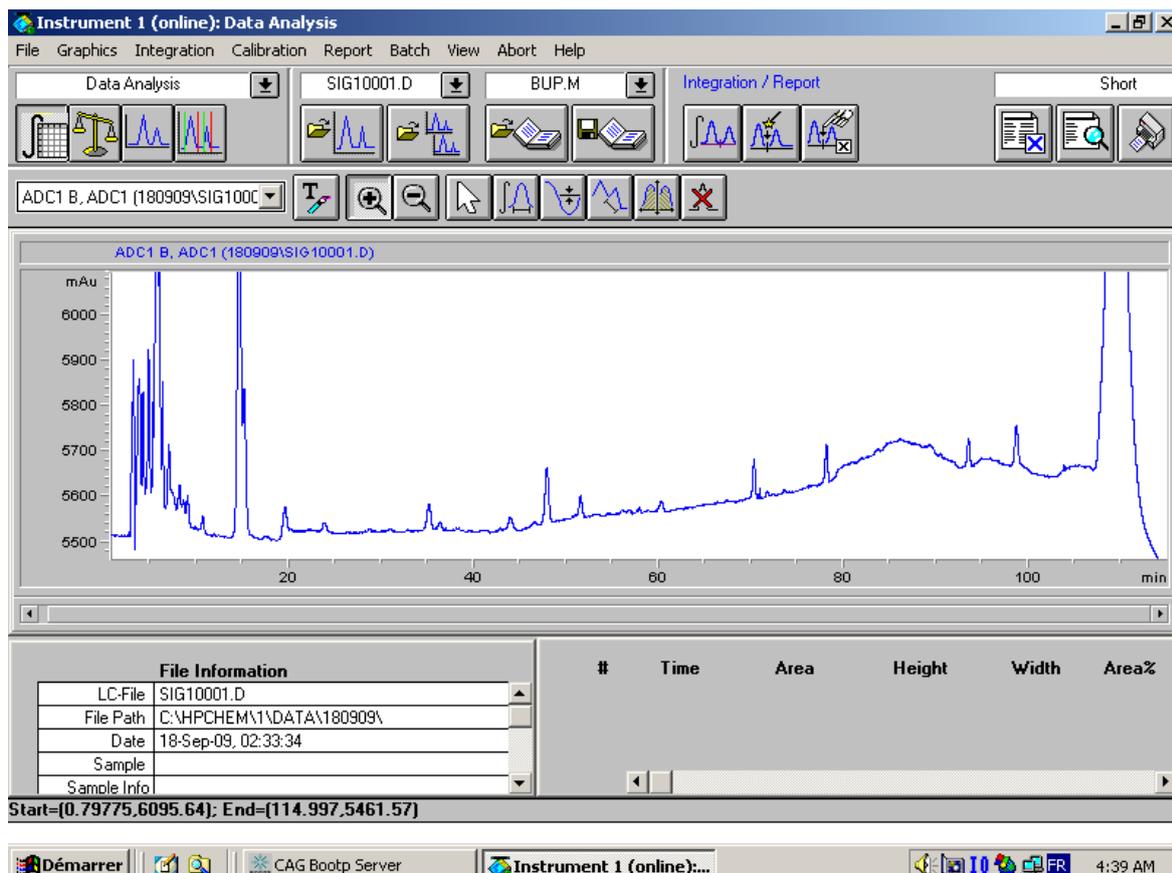
Mobile phase B : Acetonitrile :Mobile phase A 60:40 v/v

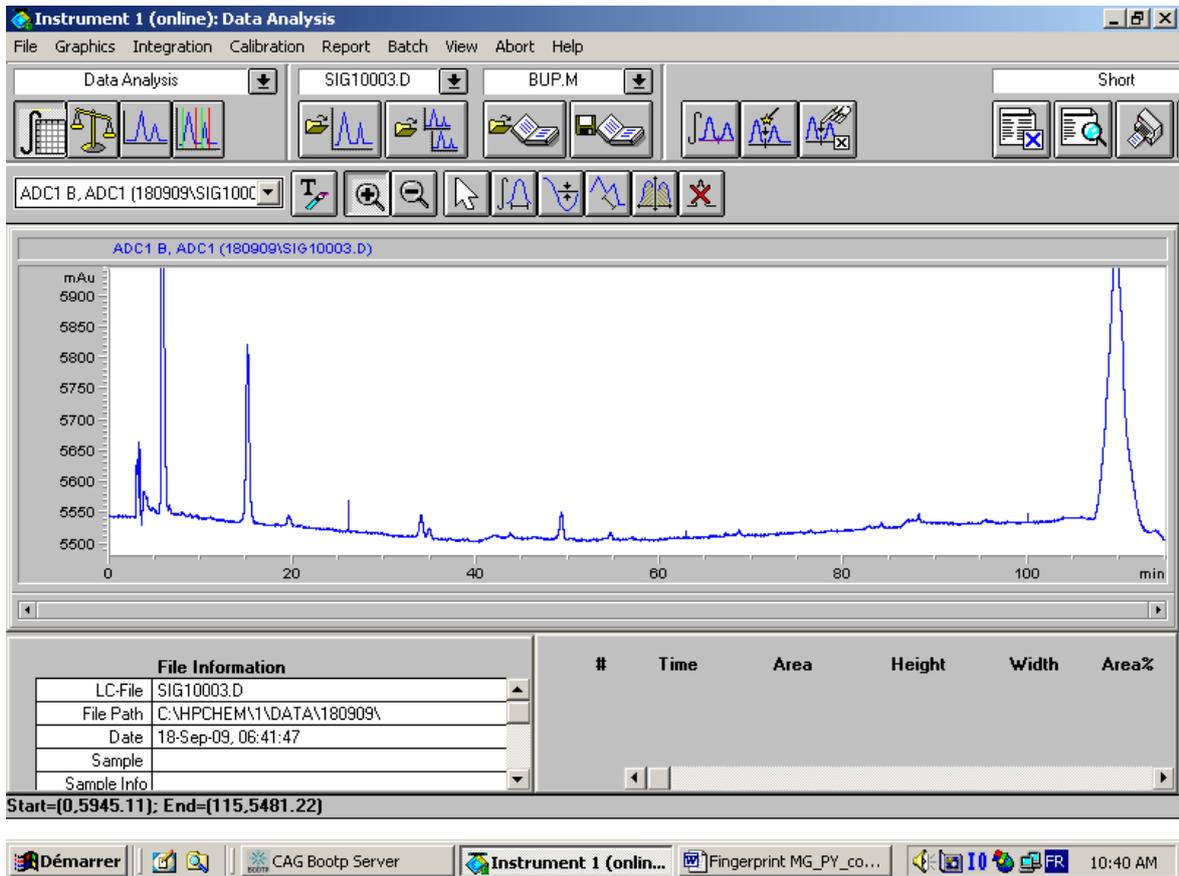
Flow rate : 1mL/min Injection volume:100 μ L

Run time : 110 min (gradient)

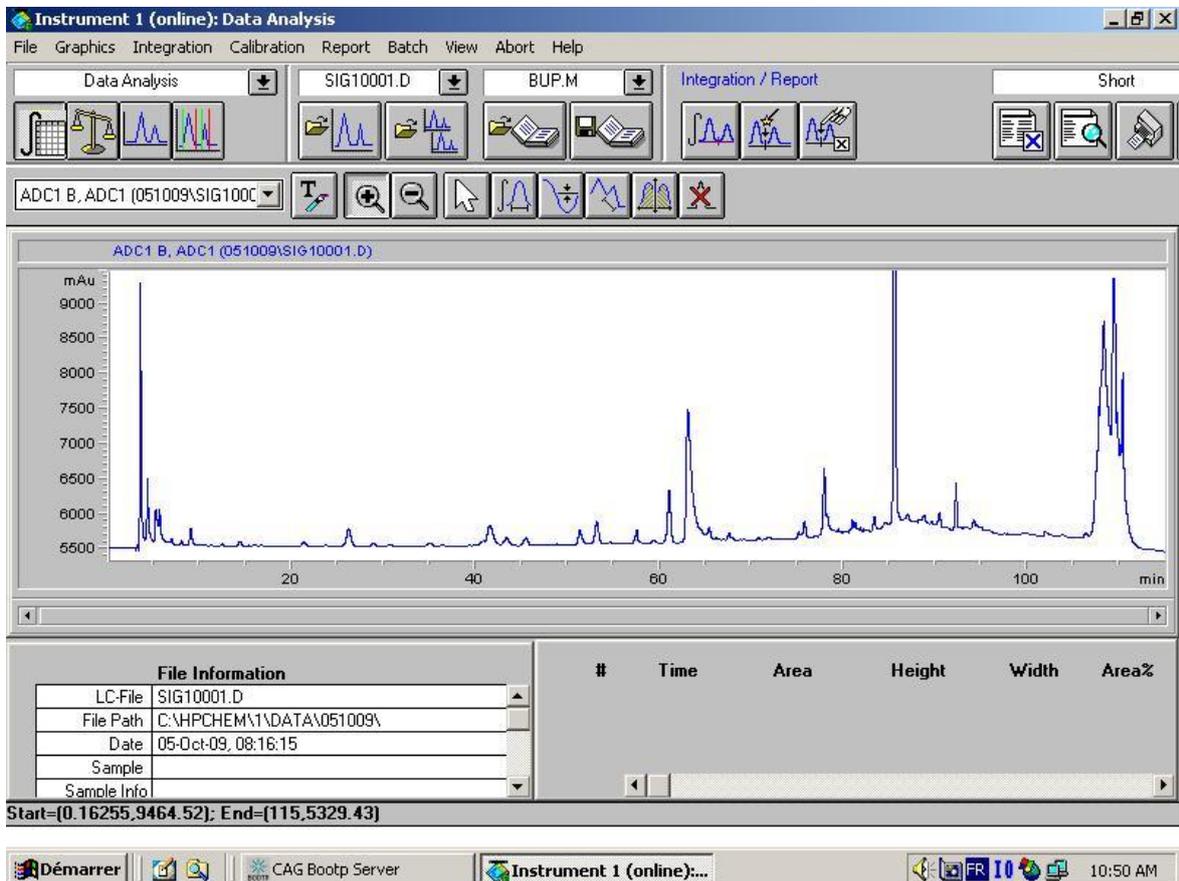
Detector : Ultraviolet/Visible 280 และ 320 nm

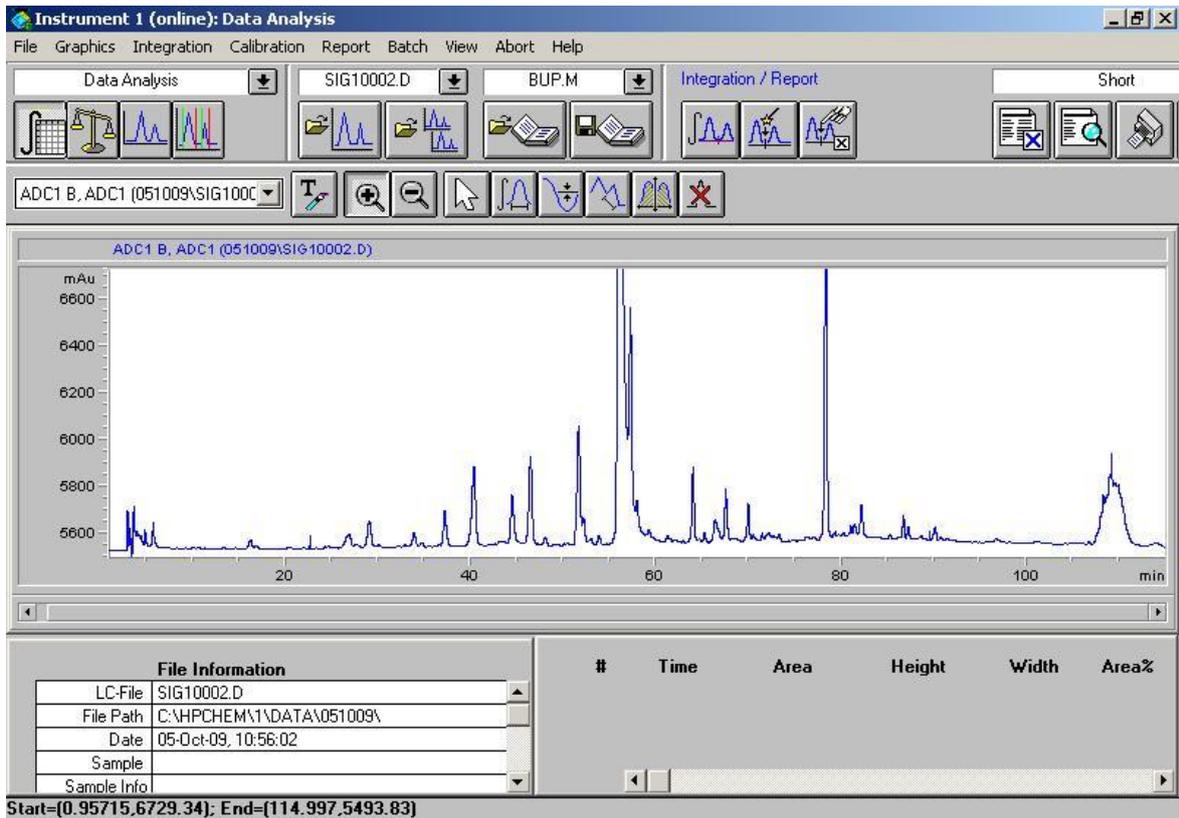
รูปที่ 1 แสดง Chromatogram ของสารละลายมะม่วง (Mango ;MG 5mg/mL) วัดการดูดกลืนแสงที่ 280 nm และ 320 nm ตามลำดับ



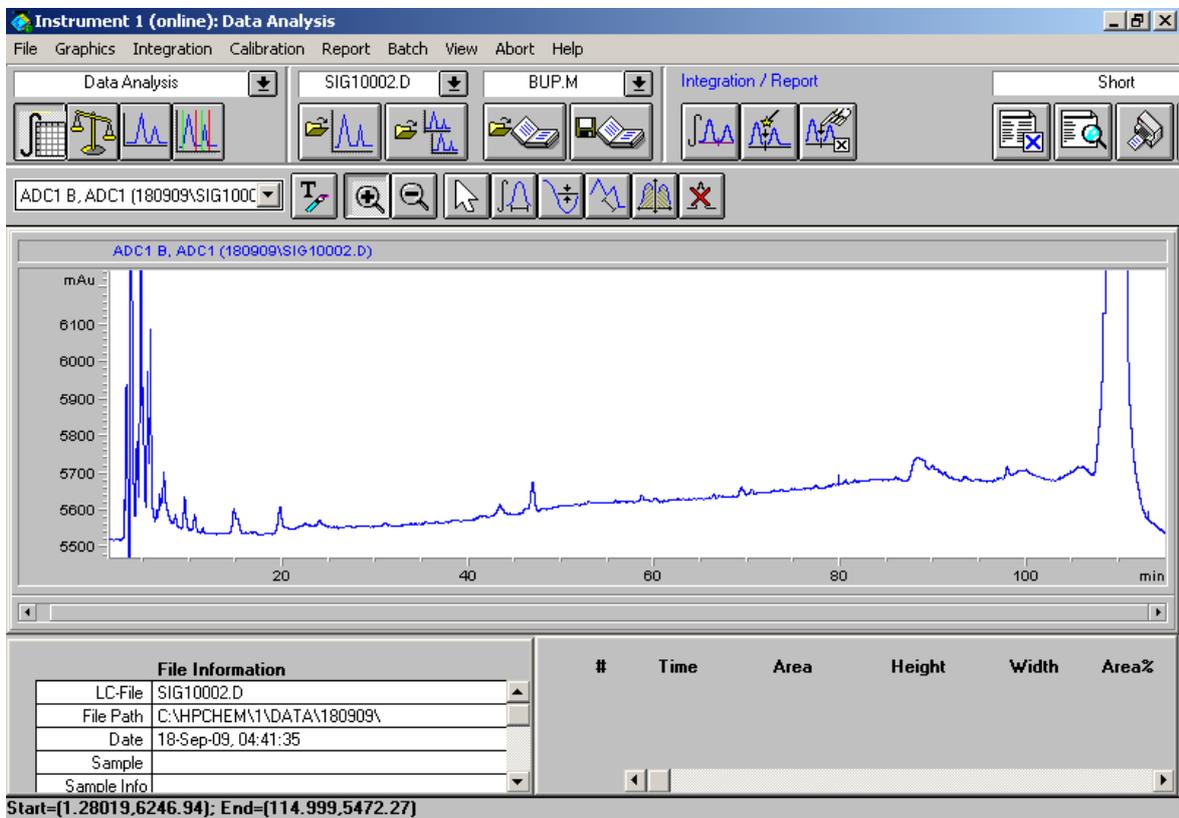


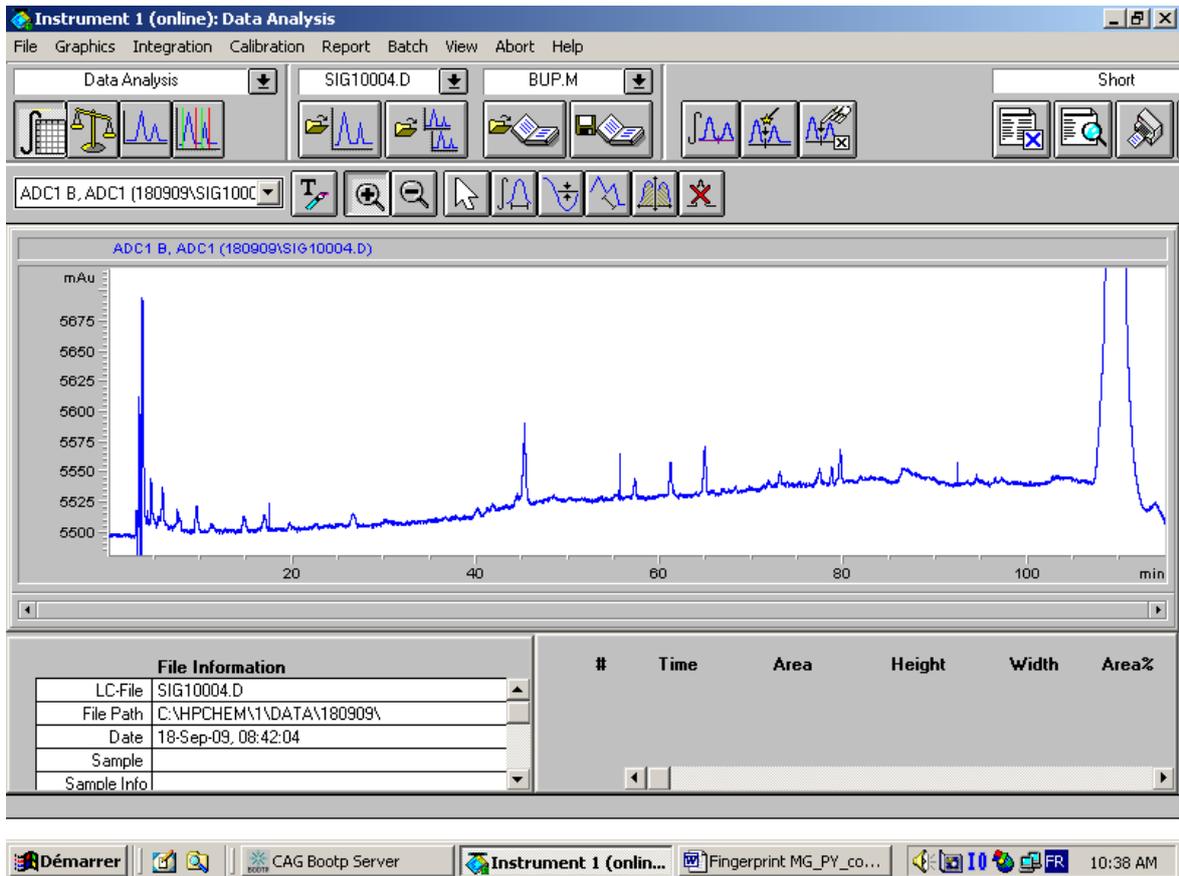
รูปที่ 2 แสดง Chromatogram ของสารละลายส้มโอ (Pomelo ;PM 5mg/mL) วัดการดูดกลืนแสงที่ 280 nm และ 320 nm ตามลำดับ



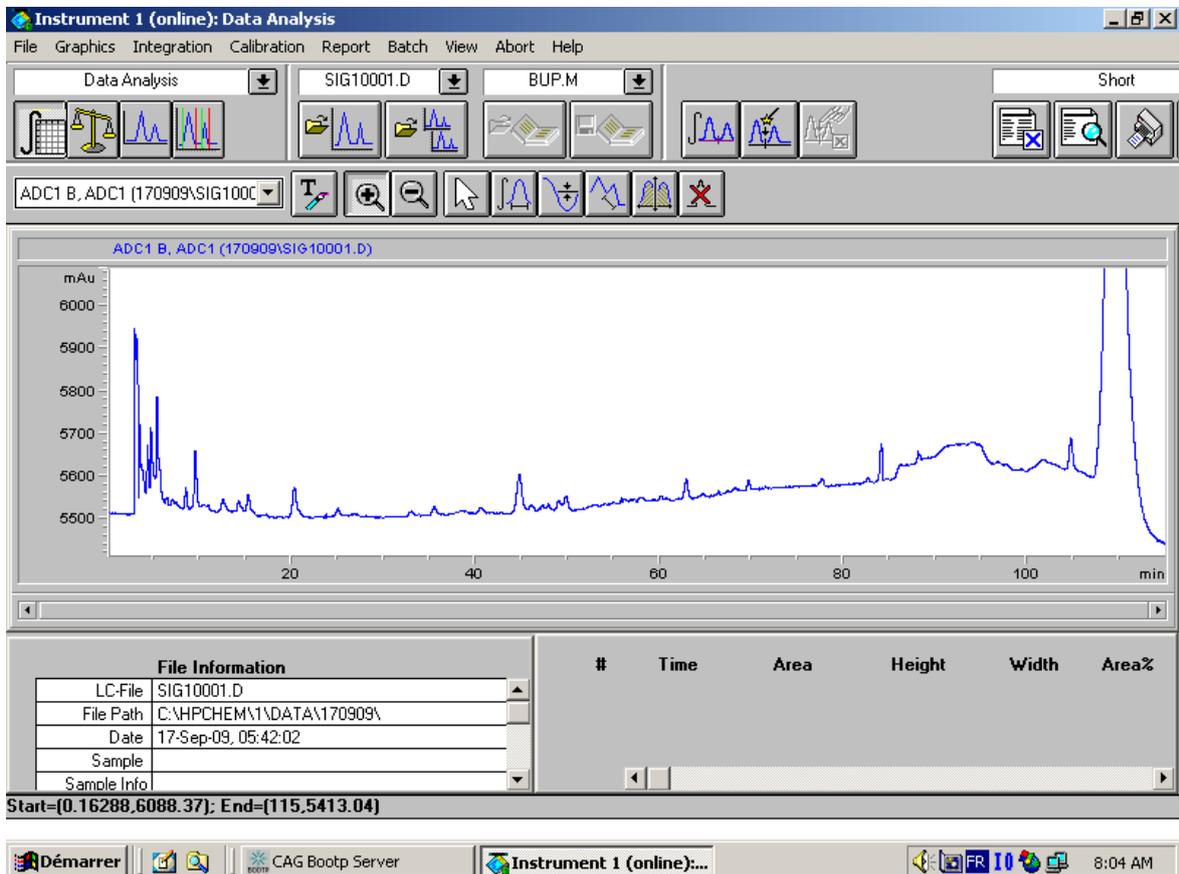


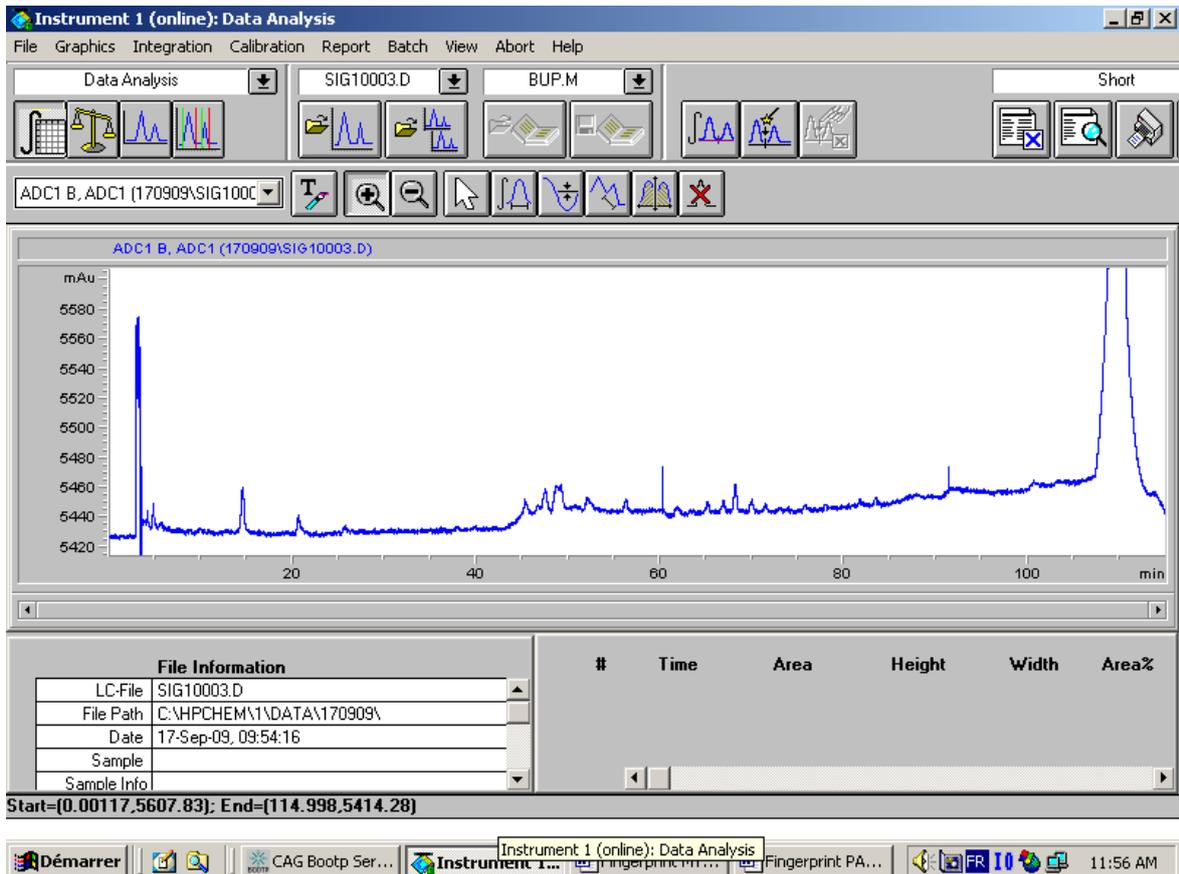
รูปที่ 3 แสดง Chromatogram ของสารละลายมะละกอ (Papaya ;PY 5 mg/mL) วัดการดูดกลืนแสงที่ 280 nm และ 320 nm ตามลำดับ



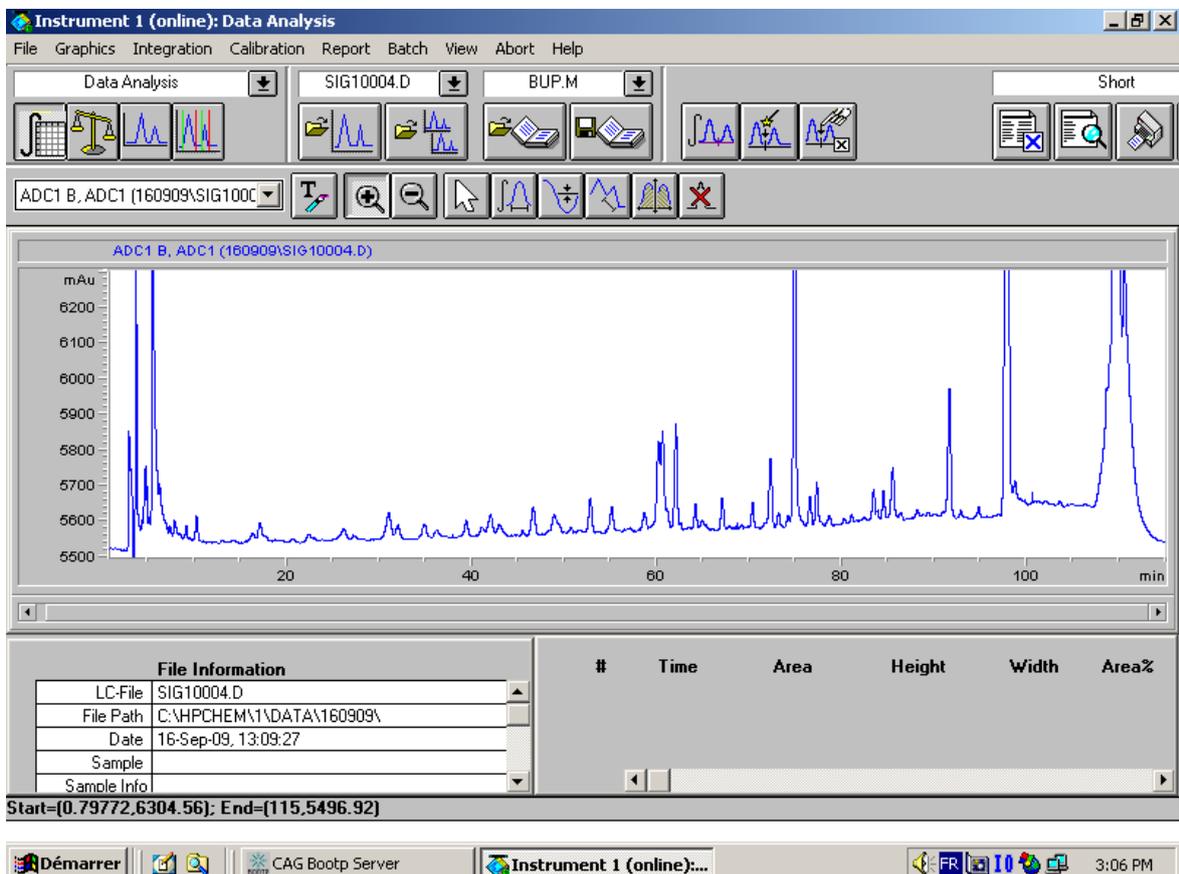


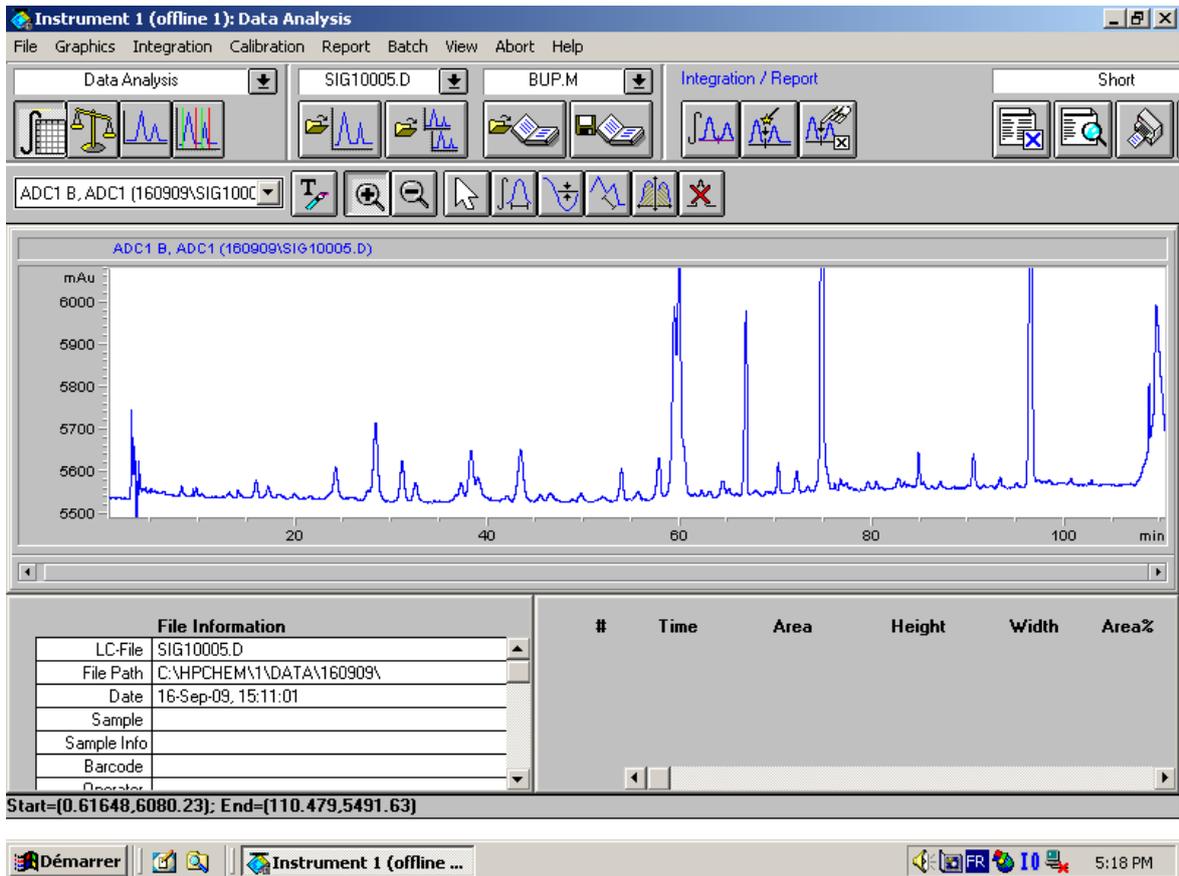
รูปที่ 4 แสดง Chromatogram ของสารละลายมังคุด (Mangosteen ;MT 5mg/mL) วัดการดูดกลืนแสงที่ 280 nm และ 320 nm ตามลำดับ



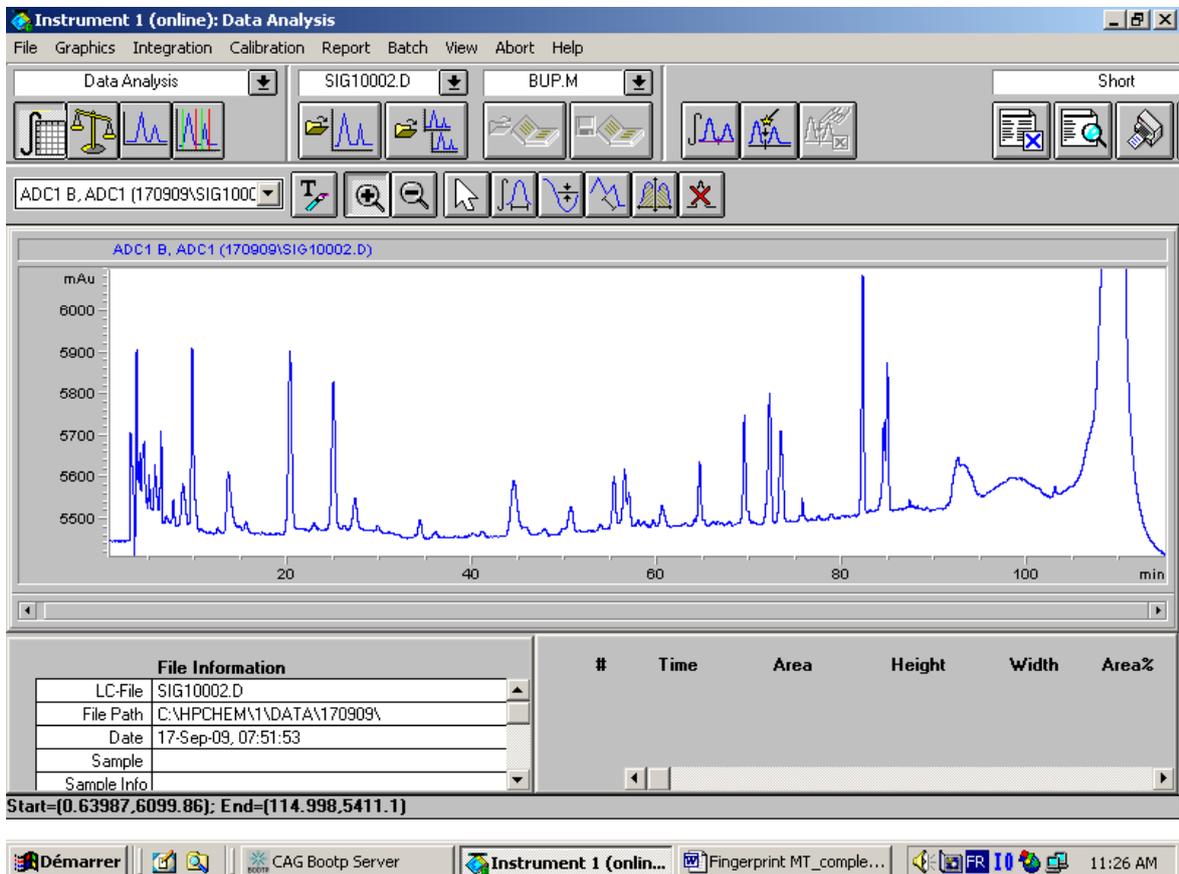


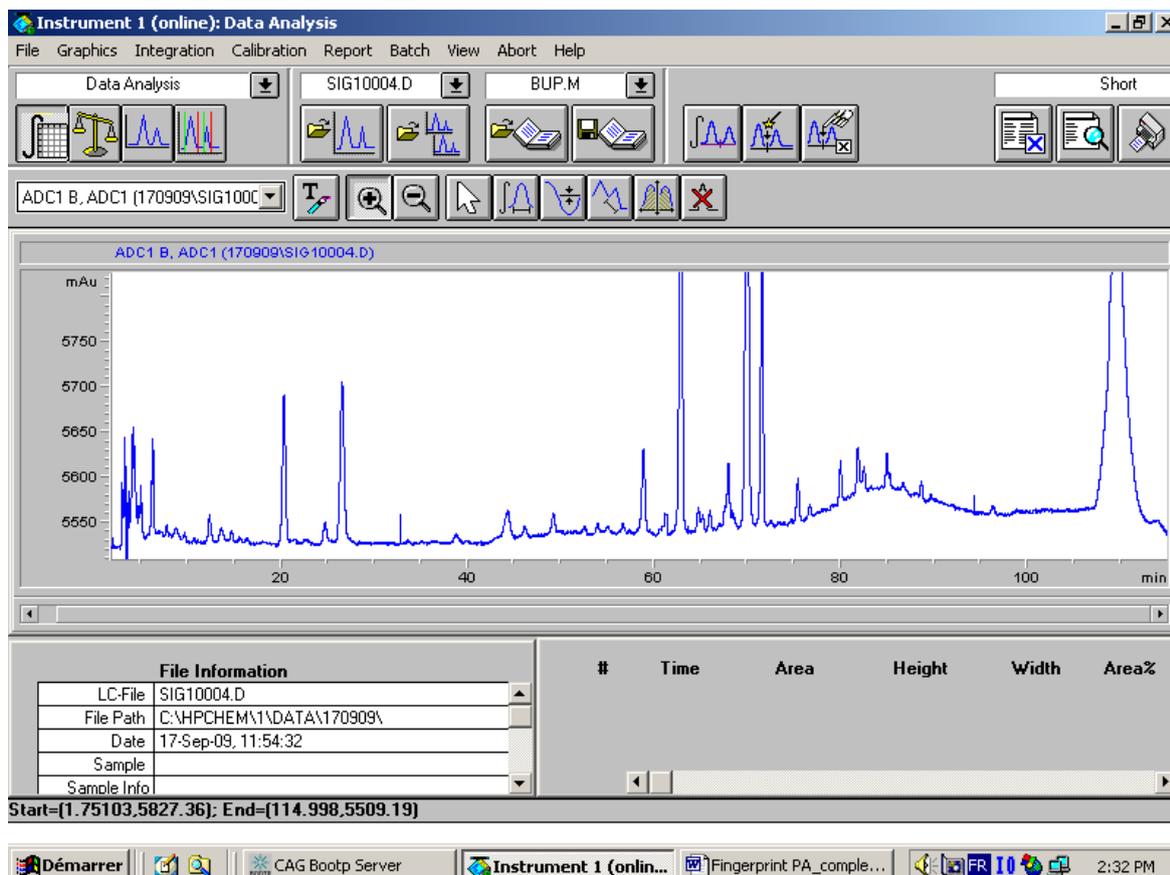
รูปที่ 5 แสดง Chromatogram ของสารละลายส้ม (Orange ; OR 5mg/mL) วัดการดูดกลืนแสงที่ 280 nm และ 320 nm ตามลำดับ





รูปที่ 6 แสดง Chromatogram ของสารละลายสับประด (Pineapple; PA 5mg/mL) วัดการดูดกลืนแสงที่ 280 nm และ 320 nm ตามลำดับ





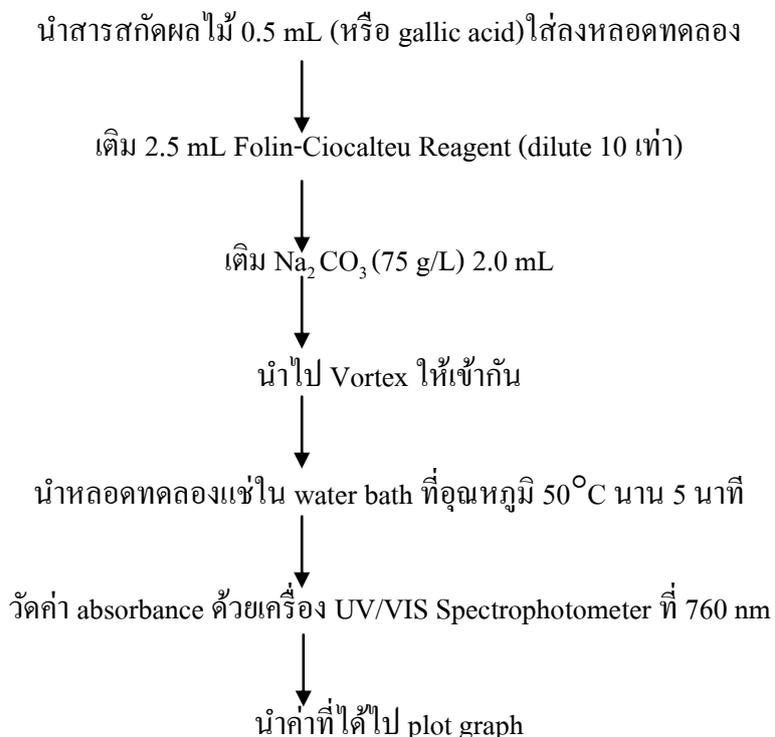
โดยสรุปอ้างอิงตามวิธีของ Kelebek H และคณะ ใน Microchemical journal ปี ค.ศ.2009 ฉบับที่ 91 หน้า 187-192 peak ต่างๆ ใน chromatogram วัดโดย HPLC ที่ 280 nm และ 320 nm ตามลำดับ เป็นสารในกลุ่ม Flavanone, Hydroxybenzoic acid, และกลุ่ม Hydroxycinnamic acid ซึ่งมีปริมาณเล็กน้อยแตกต่างกันในผลไม้แต่ละชนิด

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์หาค่า Total Polyphenol โดยวิธีของ Folin Ciocalteu

การวิเคราะห์หาค่า Total Polyphenol โดยวิธีของ Folin Ciocalteu ในสารสกัดผลไม้

วิธีการทดลอง



แสดงวิธีการคำนวณ

ผลการทดลองที่แสดงได้เป็น

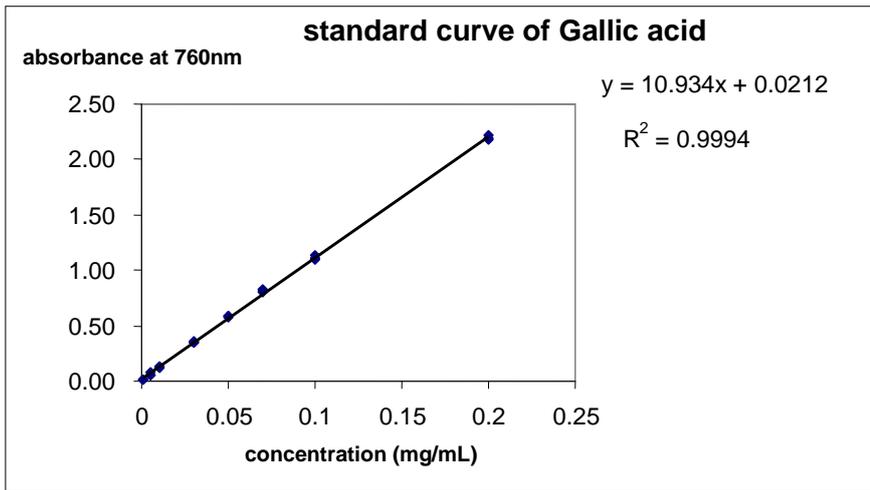
ค่า Total polyphenol เปรียบเทียบกับ Gallic acid (gGA/kg) โดยคำนวณจากสมการ

$$\text{Total polyphenol eq. Gallic acid (gGA/kg)} = \frac{y - 0.0212}{10.934 \times a} \times 1000$$

เมื่อ y = ค่า absorbance ที่วัดได้

a = ความเข้มข้นของสารสกัดผลไม้ (mg/mL)

**หมายเหตุ blank = 0.5 ml DI water + 2.5 mL Folin Ciocalteu reagent + 2.0 mL Na₂CO₃



แผนภาพแสดง calibration curve ของ Gallic acid

ตัวอย่างการคำนวณ

ยอดหม่อน	absorbance	ปริมาณ Total polyphenol เทียบกับ Gallic acid (gGA/kg)
PA 1	0.287	2.43
PA 2	0.274	2.31

ผลการทดลองที่แสดงได้เป็นค่า Total polyphenol เปรียบเทียบกับ Gallic acid (gGA/kg) โดยคำนวณจากสมการ

$$\text{Total polyphenol eq. Gallic acid (gGA/kg)} = \frac{y - 0.0212}{10.934 \times a} \times 1000$$

เมื่อ y = ค่า absorbance ที่วัดได้

a = ความเข้มข้นของสารสกัด(mg/ml)

**หมายเหตุ control = 0.5 mL DI water + 2.5 mL Folin reagent + 2.0 mL Na₂CO₃

PA 1 ความเข้มข้น 10 mg/ml วัดค่า absorbance ได้ เท่ากับ 0.287

จากนั้นนำไปแทนค่าในสมการเพื่อแสดงค่า Total polyphenol โดยเทียบกับ Gallic acid (gGA/kg) ได้ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{Total polyphenol eq. Gallic acid (gGA/kg)} &= ((0.287 - 0.0212) / 10.934 \times 10) \times 1000 \\ &= 2.43 \text{ (gGA/kg)} \end{aligned}$$

ดังนั้น PA 1 มีปริมาณ Total polyphenol โดยเทียบกับ Gallic acid เท่ากับ 2.43 g ในสารสกัด 1 kg

ผลการทดลอง แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณ Total polyphenol เทียบกับ Gallic acid ในผลไม้ 6 ชนิด และในใบชาเขียว

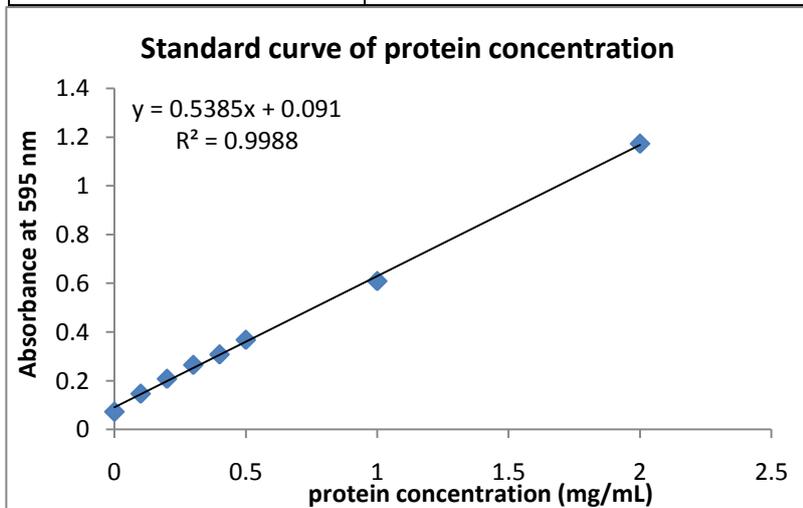
สารสกัดผลไม้	ค่าเฉลี่ย ปริมาณ Total polyphenol เทียบกับ Gallic acid (g/kg)*
PA	2.37±0.08
PM	6.24±0.09
MT	0.74±0.04
OR	2.91±0.10
PY	5.38±0.14
MG	2.21±0.12
ชาเขียว	218.65

* ค่าเฉลี่ยเกิดจากการวัดปริมาณ Total polyphenol จากตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง

ภาคผนวก ค
การปั่นแยก **microsomes** จากตับ

เตรียม liver subcellular fraction จากชิ้นตับ โดยใช้เทคนิคปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Ultra-centrifugation) ล้างชิ้นตับด้วย Normal saline จากนั้นทำการปั่นชิ้นตับด้วยเครื่องบด ในสารละลาย homogenizing buffer โดยใช้สารละลาย 3 mL ต่อตับ 1 g นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 g ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เก็บส่วนที่เป็นสารละลายเพื่อนำไปปั่นเหวี่ยงต่อที่ความเร็ว 100,000g ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงจนได้ microsomal pellets จากนั้นละลายในสารละลาย sucrose (0.5 M) เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดของ rat liver microsomes โดยใช้วิธีของ Pierce เทียบปริมาณโปรตีนกับ bovine serum albumin ที่ความเข้มข้น 0.1-2 mg/mL นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

ความเข้มข้น (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (n=2)
0	0.073
0.1	0.147
0.2	0.208
0.3	0.265
0.4	0.308
0.5	0.368
1	0.609
2	1.173



การวัดการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครม P450 ในตับ

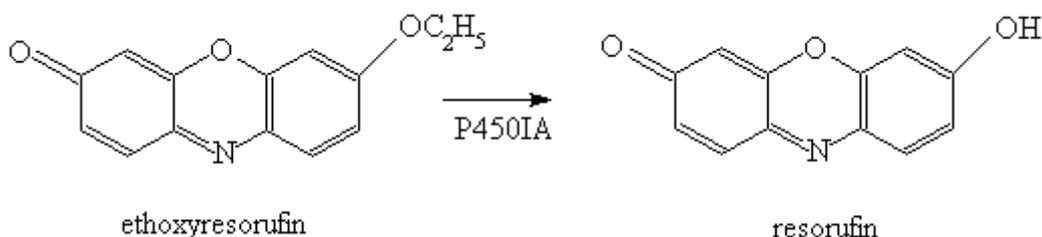
ทำการวัดการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครม P450 (isoform 1A2, 2B1, 2E1 และ 3A1) ใน rat liver microsomes โดย incubate ร่วมกับสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับ control (เติมเฉพาะสารละลายที่ใช้ในการละลาย extract ของผลไม้) เทคนิคการวิเคราะห์ดูรายละเอียดในภาคผนวก ง.

ภาคผนวก ง
การวิเคราะห์ผลของสารสกัดผลไม้ต่อการทำงานของเอนไซม์
Cytochrome P450 ในตับ

CYP1A2 Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD)

Burke และ Mayer (ปีค.ศ. 1975) แสดงให้เห็นว่า อนุพันธ์ของสาร alkylphenoxazine เช่น 7-ethoxyresorufin เป็นสารตั้งต้นที่จำเพาะเจาะจงกับไซโตโครม P450 1A ได้ผลิตภัณฑ์เป็น resorufin ที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้โดยตรง โดยวิธี Fluorimetric ซึ่งสารผลิตภัณฑ์นี้สามารถดูดซับคลื่นความยาวแสงที่ 530 นาโนเมตร และกระจายแสงที่ความยาวคลื่นสูงกว่าคือ 580 นาโนเมตร

ปฏิกิริยาการเปลี่ยน 7-ethoxyresorufin โดย ไซโตโครม P450 1A ได้ผลิตภัณฑ์เป็น resorufin ตามแสดง



สารเคมี (Reagents)

0.1M Tris buffer pH 7.8 (in water bath at 37°C)

0.53mM Ethoxyresorufin (253µg/2mL DMSO)

50µM NADPH (41.7mg/mL)

0.1mM Resorufin

เครื่องมือ (Instrument)

Multilabel plate reader ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Enspire

วิธีการทดลอง (Method)

เตรียมสารละลายที่มีส่วนผสมดังต่อไปนี้ (ปริมาตร ต่อ 1 well plate)

100 มิลลิโมล tris buffer, pH 7.6 65 ไมโครลิตร

Liver microsome (ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตร

Ethoxyresorufin (ความเข้มข้น 130 ไมโครโมล) 5 ไมโครลิตร

เริ่มต้นปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย NADPH ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล จากนั้น incubate ใน shake incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม Methanol แซ่เย็นปริมาตร 50 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ Excitation wavelength 530 นาโนเมตร และ Emission wavelength 580 นาโนเมตร หาปริมาณ resorufin ที่ได้จากปฏิกิริยาเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน นำไปคำนวณความสามารถในการเปลี่ยนสารตั้งต้นของ ไซโตโครม P450 1A2

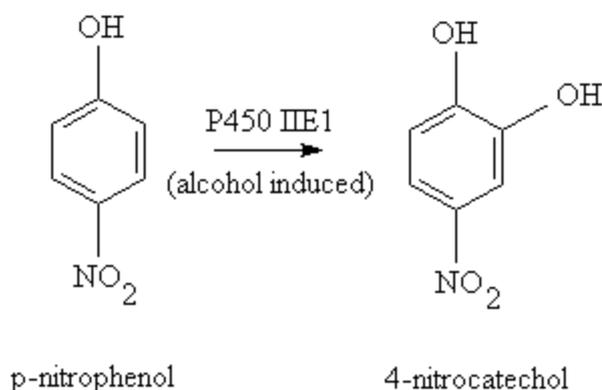
(enzyme activity) ในหน่วย pmol/min/mg protein เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่เติมสารสกัดผลไม้ หรือ สารยับยั้งมาตรฐาน (reference inhibitor)

CYP2B1 Benzyloxyresorufin O-deethylase assay (BROD)

เป็นปฏิกิริยาการหาค่าการทำงานของ ไซโตโครม P450 2B โดยมีหลักการเหมือน EROD ทุกประการ ยกเว้นเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็น Benzyloxyresorufin ความเข้มข้น 410 ไมโครโมล

CYP2E1 p-nitrophenol hydroxylase

การวัดการทำงานของเอนไซม์ Cytochrome P450 2E1 ทำได้โดยวัดจากปฏิกิริยา Hydroxylation ของสารตั้งต้น คือ para-nitrophenol โดยอาศัยเอนไซม์ Cytochrome 2E1 ในตับ และ co-factors คือ NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate reduced form) ได้ผลิตภัณฑ์ คือ 4-nitrocatechol ดังแสดง



ผลิตภัณฑ์ที่ได้ (4-nitrocatechol) ในสถานะสารละลายเป็นด่าง สามารถวัดการดูดกลืนแสงได้ที่ค่าความยาวคลื่น 536 นาโนเมตร (Reinke และ Mayer, 1985)

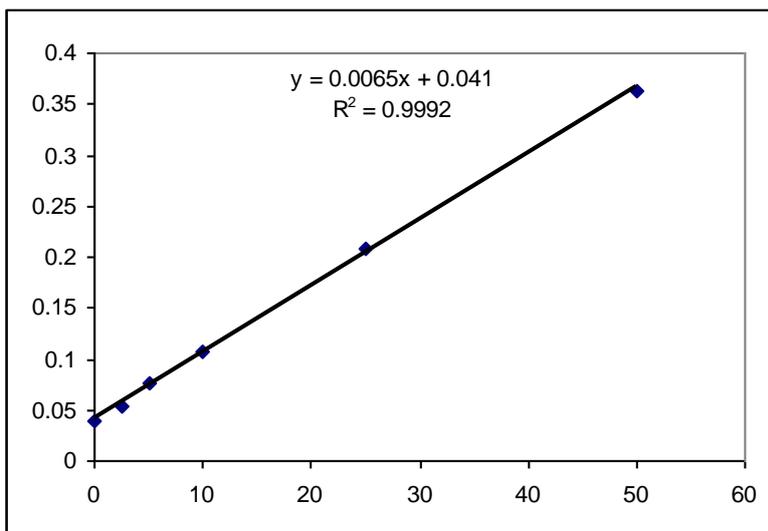
สารเคมี (Reagents)

- 0.2M Potassium phosphate buffer, pH 6.8
- 1mM Ascorbate (17.6mg/100mL)
- 1mM p-nitrophenol (13.9mg/100mL)
- 0.5mM nitrocatechol (7.8mg/100mL)
- 10mM NADPH (8mg/ml in 1% NaHCO₃)
- 10M NaOH
- 0.6N ice-cold perchloric acid

วิธีการทดลอง (Method)

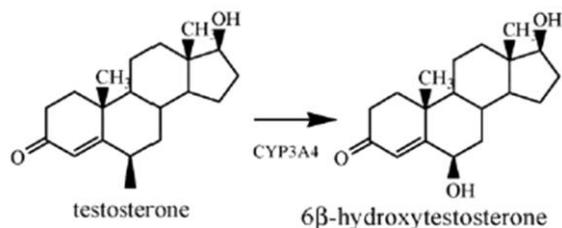
ปฏิกิริยา Hydroxylation ของ p-nitrophenol อ้างอิงตามวิธีของ Reinke และ Mayer (ปีค.ศ. 1985) โดยเปลี่ยนแปลงบางรายละเอียดตาม KcCoy และ Koop (ปีค.ศ. 1988) สารละลายมาตรฐาน (Standard solution) และสารละลายตัวอย่าง (Sample solutions) ทำการทดลองใน potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 6.8, สารตั้งต้น p-nitrophenol และ ascorbic acid ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ โดยทั้งหมดมีปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร อุณหภูมิใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ร่วมกับ liver microsomal protein ความเข้มข้น 2 mg/mL จากนั้นเติมสารละลาย NADPH ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เพื่อเริ่มต้นปฏิกิริยาใน water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมกรด perchloric แข็งแรงที่มีความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ในปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ที่สภาวะกรด สีของสารละลายจะหายไป จากนั้นตกตะกอนโปรตีนโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใส 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย NaOH เข้มข้น 10 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร วัดการดูดกลืนแสงที่ 536 นาโนเมตร เทียบกับสารละลายมาตรฐานของ 4-nitrocatechol คำนวณ enzyme activity แสดงค่าเป็น pmol ของ 4-nitrocatechol ต่อนาทีต่อมิลลิกรัม microsomal protein (pmol/mg/min) Ascorbate ที่เติมลงในปฏิกิริยาเพื่อป้องกันไม่ให้ p-nitrophenol เปลี่ยนเป็น quinone

4-nitrocatechol (pmol/tube)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (n=3)
50	0.3633
25	0.2086
10	0.1078
5	0.0758
2.5	0.0536
0	0.0386



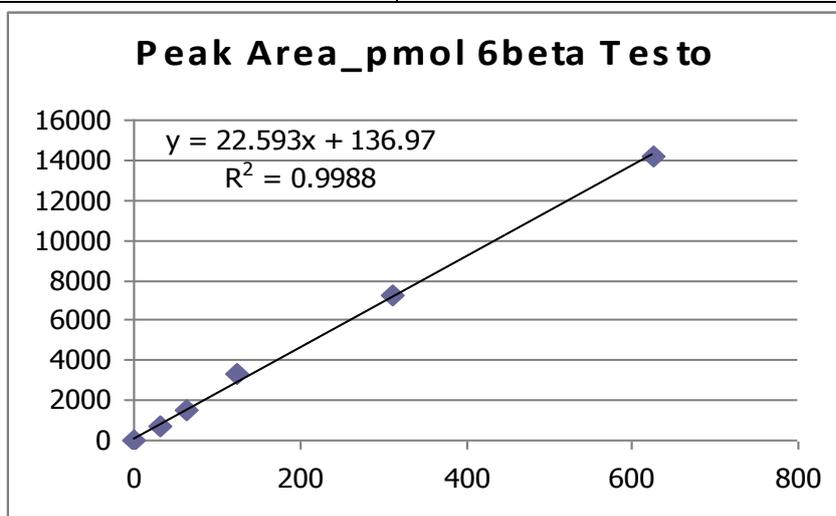
CYP3A1 testosterone 6β-hydroxylase assay

ปฏิกิริยา Testosterone 6 β – Hydroxylation เป็นการวัดการทำงานของ ไซโตโครม P450 3A อ้างอิงตามวิธีการของ Pearce และคณะ (ค.ศ. 1996) ดังสมการ



ทำการ incubate liver microsome (0.2 มิลลิกรัมโปรตีน) กับสารตั้งต้น คือ Testosterone ความเข้มข้น 250 มิลลิโมล ในสารละลาย Phosphate buffer pH 7.4 ที่มี MgCl₂ และ EDTA อยู่ ปริมาตรรวม 200 ไมโครลิตร เริ่มต้นปฏิกิริยาด้วยการเติม NADPH 25 ไมโครลิตร incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติม Acetonitrile แห้งเย็น 125 ไมโครลิตร ตกตะกอนโปรตีนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูง 8000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นนำสารละลายไปวัดหาปริมาณ 6-β hydroxyTestosterone เทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน กำหนดหาความสามารถของการเปลี่ยนสารตั้งต้น (enzyme activity) โดยมีหน่วยเป็น pmol/min/mg protein

6βOH-Testosterone (pmol/tube)	Peak Area of 6βOH-Testosterone
625	14164
312.5	7271.9
125	3299.1
62.5	1503.9
31.25	706
0	0



ตาราง แสดงตัวอย่างผลการทดสอบวิธีการวิเคราะห์ (method validation) โดยใช้เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ในการวัดการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรโทโครม P450 3A
Accuracy and precision study of 6 β -testosterone hydroxylase assay

	Calculated amount ^b	Accuracy (%) ^c	Precision (%) ^d
<i>Intra-day (n=4)</i>			
Calibration standards ^a			
75	67.13±5.83	-10.49	8.68
150	137.70±13.65	-8.20	9.92
300	311.50±14.73	3.83	4.73
600	548.65±26.00	-8.56	4.74
1500	1526.86±36.34	1.79	2.38
3000	2974.40±76.52	-0.85	2.57
Quality control samples ^a			
200	207.95±24.62	3.98	11.84
500	523.55±32.72	4.71	6.25
2000	2065.21±58.91	3.26	2.85
<i>Inter-day (n=4)</i>			
Calibration standards ^a			
75	72.99±8.34	-2.67	11.43
150	143.35±12.23	-4.43	8.53
300	320.37±28.69	6.79	8.95
600	556.39±24.27	-7.27	4.36
1500	1490.35±35.65	-0.64	2.39
3000	3019.82±15.08	0.66	0.50
Quality control samples ^a			
200	188.33±18.51	-5.83	9.83
500	493.29±27.94	-1.34	5.66
2000	2005.61±41.06	0.28	2.05

a Amounts of 6 β -hydroxytestosterone added per 0.5 ml sample in pmol.

b Mean±SD in pmol.

c Defined as: [(measured conc.-target conc.) / target conc.]x100%.

d Assessed by expressing the standard deviation of the measurement as a percentage of the mean value.

Reference

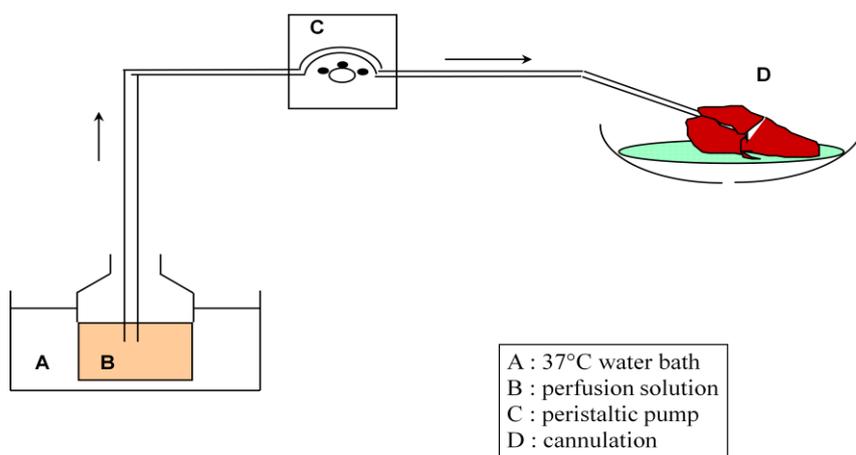
1. Burke, M.D., Thomson, S., Elcombe, C.R., Halpert, J., Haaparanta, T., Mayer, R.T., 1985. Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxones and homologues; a series of substrate to distinguish between different induced cytochrome P450. *Biochemical Pharmacology* 34, 3337–3345.
2. Allis, J.W., Robinson, B.L., 1994. A kinetic assay for *p*-nitrophenol hydroxylase in rat liver microsomes. *Analytical Biochemistry* 219, 49–52.
3. Pearce, R.E., McIntyre, C.J., Madan, A., Sanzgiri, U., Draper, A.J., Bullock, P.L., Cook, D.C., Burton, L.A., Latham, J., Nevins, C., Parkinson, A., 1996. Effect of freezing, thawing and storing human liver microsome on cytochrome P450 activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 331, 145–169.

ภาคผนวก จ
การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ CYPs
ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง (Primary hepatocyte culture)

การทดสอบการเกิดอันตรกิริยาของสารสกัดผลไม้ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของหนู

- การแยกเซลล์ตับหนูและเพาะเลี้ยงเซลล์

ทำการดมยาสลบหนูขาวสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ ผ่าตัดเพื่อเปิดหน้าท้อง จากนั้นทำการ cannulate ผ่าน hepatic vein ทำการ clamp จากนั้น pump perfusion buffer (ประกอบด้วย EGTA, NaCl, KCl, Na_2HPO_4 , HEPES) ที่ความเร็ว 20 มิลลิลิตรต่อนาที ขณะเปิด pump on ทำการตัดเส้นเลือด superior vena cava เพื่อให้สารละลายที่ผ่านตับไหลออก จากนั้นแยกเซลล์โดยใช้การ perfuse เอนไซม์ collagenase ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ตัดชิ้นตับที่ข้อยแล้วด้วยกรรไกร สะด้วยสารละลาย HBSS ทำการกรองเพื่อคัดแยกเฉพาะ hepatocyte suspension ด้วยตะแกรงขนาด 400-500, และ 100 ไมครอน นำเซลล์ที่ได้ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 100 g, 25 องศาเซลเซียส เพื่อตกตะกอนเซลล์ตับ เจือจางเซลล์ตับด้วย Williams'E culture medium ที่มีส่วนผสมของ fetal calf serum 10%, insulin 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, dexamethasone 0.1 ไมโครโมล และ Penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร Streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้เซลล์ที่ย้อมสีด้วย trypan blue เพื่อนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต หา % viability โดยต้องมีค่ามากกว่า 80% ถ้า % viability น้อยกว่า 80% ทำการแยกเซลล์ตับที่ตายออก (ย้อมติดสี trypan blue) โดยใช้สารละลาย 90% Percoll แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 170 g นาน 20 นาที นำเซลล์ตับหนูที่แยกได้ไปเพาะเลี้ยงใน plate ขนาด 96 หลุมๆละ 100,000 เซลล์ เพื่อทดสอบการทำงานของเอนไซม์ CYPs ร่วมกับสารสกัดผลไม้



ทำการทดสอบผลของสารสกัดผลไม้ต่อการทำงานของเอนไซม์ cytochrome P450 โดยการละลายสารสกัดผลไม้ที่ 3 ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 2 mg/mL (โดยทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง) หรือสารยับยั้งมาตรฐาน (positive CYP inhibitor) เช่น α -naphthoflaven (10 ไมโครโมลสำหรับ CYP1A2) metyrapone (50 ไมโครโมลสำหรับ CYP2B1) disulfiram (10 ไมโครโมลสำหรับ CYP2E1) ketoconazole (1 ไมโครโมลสำหรับ CYP3A) ลงใน Williams'E culture medium โดยให้มีปริมาณตัวทำละลาย dimethylsulfoxide เท่ากับ 0.1%

- การวัดการทำงานของเอนไซม์

ทำการ incubate สารตั้งต้นในแต่ละปฏิกิริยา เพื่อวัดการทำงานของเอนไซม์ CYP เช่น 7-Ethoxyresorufin สำหรับ CYP1A2, Benzyloxyresorufin สำหรับ CYP2B, testosterone สำหรับ CYP3A, และ p-nitrophenol สำหรับ CYP2E1 นำ plate เข้าสู่ incubator ที่ควบคุมความชื้นและปริมาณอากาศต่อก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 95% ต่อ 5% ตามลำดับ นาน 30 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม Methanol

แช่เย็น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 g 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นนำส่วนสารละลายใส่ไป
วิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ (metabolite) ที่ได้จากปฏิกิริยา ตามภาคผนวก ง