

หัวข้อโครงการ

การใช้ระบบคัดกรองฐานยีสต์เพื่อคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของ
เอนไซม์คาร์บอนิกแอนไฮเดรสไอโซไซม์ II ของมนุษย์ (hCA II) และศึกษา
ลักษณะสมบัติบางประการของสารออกฤทธิ์

โดย

นางสาวสรัญญา ชัยพรชลศร รหัสนิสิต 5832350023

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. ชุติ ยมภักดี


ปีการศึกษา


2561

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นำโครงการฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์

 หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวานิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงการ

 อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชุติ ยมภักดี)

 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาติติ-สิริศรัทธา)

 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัครวลาภสกุล)

 กรรมการ
(อาจารย์ ดร. สริสา ณ ป้อมเพ็ชร)

โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

การใช้ระบบคัดกรองฐานยีสต์เพื่อคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของ
เอนไซม์คาร์บอนิกแอนไฮเดรสไอโซไซม์ II ของมนุษย์ (hCA II)
และศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของสารออกฤทธิ์

อาจารย์ที่ปรึกษาในโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.ชูลี ยมภักดี

นิสิตในโครงการ

นางสาวสร้อยญา ชัยพรชลศร

รหัสประจำตัวนิสิต 583 23500 23

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์เป็นส่วนหนึ่งของ

การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2561

ชื่อโครงการ การใช้ระบบคัดกรองฐานยีสต์เพื่อคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของ เอนไซม์คาร์บอนิกแอนไฮเดรสไอโซไซม์ II ของมนุษย์ (hCA II) และศึกษา ลักษณะสมบัติบางประการของสารออกฤทธิ์

ชื่อนิสิต นางสาวสร้อยญา ชัยพรชลศร

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร.ชูลี ยมภักดี

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

โรคต้อหิน (Glaucoma) เป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของการตาบอดในทุกช่วงอายุของผู้คน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มผู้สูงอายุ โรคนี้มักเกิดขึ้นเมื่อน้ำหล่อเลี้ยงภายในดวงตา (Aqueous humor) ถูกปิดกั้น ทำให้ไม่สามารถไหลเวียนได้ตามปกติและเกิดความดันภายในลูกตา (Intraocular pressure : IOP) เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้เส้นประสาทตาถูกทำลายและอาจส่งผลให้สูญเสียการมองเห็นหรือตาบอด เอนไซม์คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (Carbonic anhydrase : CAs) ช่วยเร่งปฏิกิริยา CO_2 hydration โดยการเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และน้ำ (H_2O) ให้กลายเป็นไบคาร์บอเนตแอนไอออน (HCO_3^-) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในการสังเคราะห์น้ำหล่อเลี้ยงภายในดวงตา มีการรายงานเกี่ยวกับการพัฒนาของสารยับยั้ง CA (CA inhibitor : CAI) โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอนิกแอนไฮเดรสไอโซไซม์ II ของมนุษย์ (hCA II) เพื่อลดความดันในดวงตาและนำไปสู่การรักษาโรคต้อหิน ปัจจุบันยาที่ใช้ในการรักษาโรคต้อหินเป็นยาในกลุ่มซัลโฟนาไมด์ (Sulfonamide) ซึ่งพบว่ายาในกลุ่มนี้ทำให้เกิดผลข้างเคียงกับผู้ป่วยที่มีอาการแพ้ซัลฟา การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นในการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II จากสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทย รวมทั้งสารสังเคราะห์ จำนวนรวมทั้งสิ้น 48 ตัวอย่าง โดยใช้ระบบคัดกรองฐานยีสต์ที่ถูกพัฒนาขึ้นที่มียีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์กลายเป็นเซลล์บ่งชี้ร่วมกับใช้รีซาซูรินเป็นสารสีบ่งชี้การมีชีวิตรอดของเซลล์ยีสต์ ผลการทดลองพบสารบริสุทธิ์จากพืชสมุนไพรไทยและสารสังเคราะห์ จำนวน 5 และ 2 ตัวอย่างตามลำดับ มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ hCA II จึงได้ศึกษาลักษณะสมบัติของสารออกฤทธิ์ ดังนี้ ค่า Minimum effective concentration (MEC) และ Minimum toxic concentration (MTC) และตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ในหลอดทดลองของสารที่ให้ผลบวกอีกด้วย

Project title	The use of a developed yeast-based assay for screening of compounds with inhibitory activity against human carbonic anhydrase isozyme II (hCA II) and some characterizations on the bioactive compounds
Investigator	Miss Saranya Chaiyapornchollasorn
Advisor	Assoc. Prof. Chulee Yompakdee, Ph.D.
Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University	

Abstract

Glaucoma is one of the leading causes of blindness for any age of people, especially aged population. It usually happens when aqueous humor in the eyes gets blocked, this causes increased in intraocular pressure (IOP) resulting in damaging of the optic nerve and can result in vision loss or blindness. Carbonic anhydrase (CAs) catalyzes the CO₂ hydration by change carbon dioxide (CO₂) and water (H₂O) into bicarbonate ion (HCO₃⁻), which is an important component in the synthesis of aqueous humor. The development of CA inhibitors (CAI), especially human carbonic anhydrase isozyme II (hCA II), has been reported to reduce pressure in the eye and lead to the treatment of glaucoma. Currently, the drug used to treat glaucoma is a sulfonamide inhibitor. However, it causes side effects to patients with allergy to sulfa. This study focused on screening a bioactive compound(s) with inhibitory activity against hCA II from 48 samples of pure compounds from Thai medicinal plants and synthetic compounds using a developed yeast-based assay having a mutant yeast *Saccharomyces cerevisiae* as indicator strain combining with resazurin as indicator dye to reveal the survival of yeast cells. The results showed 5 and 2 samples of pure compounds from Thai medicinal plants and synthetic compounds respectively, containing the inhibitory activity of hCA II. The positive candidates were determined for the Minimum effective concentration (MEC), Minimum toxic concentration (MTC) and the *in vitro* inhibitory activity against hCA II.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร. ชูลี ยมภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่เสนอหัวข้องานวิจัยนี้ และยังได้กรุณาอบความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่างๆมากมาย ตลอดจนอบรมสั่งสอน ให้ความหวังใยและเป็นกำลังใจที่ตลอดการทำวิจัยในครั้งนี้ อีกทั้งได้ปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ทำให้รายงานฉบับนี้สมบูรณ์ และสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ที่ได้ตั้งไว้

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรินทร์ ขวศิริ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทยจำนวน 33 ตัวอย่าง และสารสังเคราะห์จำนวน 15 ตัวอย่าง ตามลำดับ เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำ ตลอดจนความช่วยเหลือด้านต่างๆเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณนางสาว อัญพร แสงแก้ว นางสาวอรรรัตน์ แสงแก้วและเพื่อนๆในห้องปฏิบัติการ 2017 อาคารมหาชิรณหิต สำหรับความหวังใย ความช่วยเหลือ คำปรึกษาแนะนำ อีกทั้งกำลังใจในการทำวิจัยจนกระทั่งสำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อสร้างเสริมประสบการณ์ ฝ่ายวิชาการ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้เงินสนับสนุนโครงการวิจัยชิ้นนี้

และสุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ตลอดจนพี่น้อง และญาติทุกท่าน ที่คอยให้ความช่วยเหลือ การสนับสนุน และให้กำลังใจเมื่อผู้วิจัยประสบกับปัญหาต่างๆเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

ด้วยความเคารพอย่างสูง

นางสาวสร้อยญา ชัยพรชลสร

เมษายน 2562

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญรูป.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์.....	8
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	8
บทที่ 2 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	9
2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	9
2.2 เคมีภัณฑ์.....	10
2.3 สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง.....	11
2.4 สารที่ใช้ในการทดลอง.....	11
2.5 วิธีการดำเนินการทดลอง.....	15
บทที่ 3 ผลการทดลอง.....	18
3.1 การคัดกรองขั้นปฐมภูมิ (Primary Screening).....	18
3.2 การศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของสารที่ให้ผลบวกจากการคัดกรองขั้นปฐมภูมิ.....	21
3.2.1 การหาค่า MEC ของสารทดสอบในกลุ่มสารบริสุทธิ์รหัส AS-CY.....	21
3.2.2 การหาค่า MEC ของสารทดสอบในกลุ่มสารสังเคราะห์รหัส TP.....	25
3.2.3 การหาค่า MTC ของสารทดสอบในกลุ่มสารบริสุทธิ์รหัส AS-CY.....	27

3.2.4 การหาค่า MTC ของสารทดสอบในกลุ่มสารสังเคราะห์รหัส TP.....	31
3.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ที่ในหลอดทดลอง (<i>In vitro</i>) ด้วยวิธีวัด กิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอเรส (Esterase activity assay).....	34
บทที่ 4 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	35
เอกสารอ้างอิง.....	37
ภาคผนวก ก.....	40
ภาคผนวก ข.....	41
ภาคผนวก ค.....	42

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 แสดงเส้นทางการไหลเวียนของน้ำหล่อเลี้ยงลูกตาจากซีเลียรีบอดี ซึ่งเป็นแหล่งผลิตน้ำหล่อเลี้ยง ลูกตาผ่านโครงสร้างต่างๆ และระบายออกทาง Trabecular meshwork.....	2
1.2 แสดงโครงสร้างของเอนไซม์ human carbonic anhydrase isozyme II (hCA II).....	4
1.3 แสดงตัวอย่างของสารกลุ่มอนุพันธ์ซัลโฟนาไมด์ (Sulfonamide) ที่ได้นำไปพัฒนาเป็นยาเพื่อใช้ในการ รักษาโรคต้อหิน.....	5
1.4 แสดงปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสีของ Resazurin ไปเป็น Resorufin ภายในเซลล์ที่มีชีวิต.....	7
1.5 ยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
3.1 ผลของการทดสอบของสารทดสอบชนิดสารบริสุทธิ์ที่ให้ผลบวกต่อฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของ เอนไซม์ hCA II โดยวิธี Yeast-based high throughput screening.....	22
3.2 ผลของการทดสอบของสารทดสอบชนิดสารสังเคราะห์ที่ให้ผลบวกต่อฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II โดยวิธี Yeast-based high throughput screening.....	26
3.3 ผลของการทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบชนิดสารบริสุทธิ์ที่ให้ผลบวกต่อฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรม ของเอนไซม์ hCA II โดยวิธี Yeast-based high throughput screening.....	28
3.4 ผลของการทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบชนิดสารสังเคราะห์ที่ให้ผลบวกต่อฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรม ของเอนไซม์ hCA II โดยวิธี Yeast-based high throughput screening.....	32

สารบัญตาราง

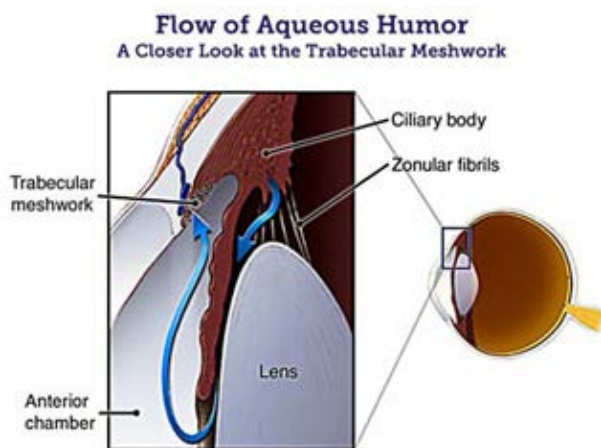
ตารางที่	หน้า
1.1 แสดงตำแหน่งของ α -CA ทั้ง 16 ไอโซไซม์ ที่พบภายในเซลล์และบริเวณที่พบภายในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆของมนุษย์.....	3
2.1 แสดงสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทยชนิดต่างๆที่ใช้ในการทดสอบ.....	12
2.2 แสดงสารสังเคราะห์ที่ใช้ในการทดสอบ.....	14
3.1 แสดงผลการคัดกรองขั้นปฐมภูมิเพื่อหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II จากสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทยชนิดต่างๆที่ทดสอบ AS-CY จำนวน 33 ตัวอย่าง โดยวิธี Yeast-based high throughput screening.....	18
3.2 แสดงผลการคัดกรองขั้นปฐมภูมิเพื่อหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II จากสารสังเคราะห์ที่ทดสอบ TP จำนวน 15 ตัวอย่าง โดยวิธี Yeast-based high throughput screening.....	20
3.3 แสดงค่า MEC ของสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ของกลุ่มสารบริสุทธิ์ที่ให้ผลบวก โดยวิธี Yeast-based high throughput screening ในเซลล์ยีสต์บ่งชี้.....	25
3.4 แสดงค่า MEC ของสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ของกลุ่มสารสังเคราะห์ที่ให้ผลบวก โดยวิธี Yeast-based high throughput screening ในเซลล์ยีสต์บ่งชี้.....	27
3.5 แสดงค่า MTC ของสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ของกลุ่มสารบริสุทธิ์ที่ให้ผลบวก โดยวิธี Yeast-based high throughput screening ในเซลล์ยีสต์บ่งชี้.....	31
3.6 แสดงค่า MEC และ MTC ของสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ของกลุ่มสารบริสุทธิ์ที่ให้ผลบวกโดยวิธี Yeast-based high throughput screening ในเซลล์ยีสต์บ่งชี้.....	31
3.7 แสดงค่า MTC ของสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ของกลุ่มสารสังเคราะห์ที่ให้ผลบวกโดยวิธี Yeast-based high throughput screening ในเซลล์ยีสต์บ่งชี้.....	33
3.8 แสดงค่า MEC และ MTC ของสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ของกลุ่มสารสังเคราะห์ที่ให้ผลบวกโดยวิธี Yeast-based high throughput screening ในเซลล์ยีสต์บ่งชี้.....	33
3.9 แสดงค่า MEC MTC และ IC ₅₀ ของสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II รหัส AS-CY 107 และ AS-CY 133.....	34

บทที่ 1

บทนำ

ในสังคมโลกปัจจุบัน สถานการณ์โครงสร้างประชากรที่กำลังมีการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องเข้าสู่ "สังคมผู้สูงอายุ" (Aging Society) องค์การสหประชาชาติ (United Nations : UN) ได้ให้คำจำกัดความของสังคมผู้สูงอายุไว้ว่า เป็นสังคมหรือประเทศที่มีประชากรอายุ 60 หรือ 65 ปีขึ้นไปที่อยู่จริงในพื้นที่ต่อประชากรทุกช่วงอายุในพื้นที่เดียวกัน ในอัตราเท่ากับหรือมากกว่าร้อยละ 10 หรือ 7 ตามลำดับ ของประชากรทั้งประเทศ หากพิจารณาจากคำจำกัดความดังกล่าว ประเทศไทยถือเป็นสังคมผู้สูงอายุแล้วตั้งแต่ปี 2548 เนื่องจากในปีนั้น ประเทศไทยมีประชากรตั้งแต่ 60 ปีขึ้นไปคิดเป็นร้อยละ 10.4 และยังคงคาดการณ์ว่าในปี 2571 ประเทศไทยจะมีผู้สูงอายุเกิน 60 ปีถึงร้อยละ 23.5 กล่าวโดยรวมคือประเทศไทยจะก้าวจากสังคมผู้สูงอายุเป็นสังคมผู้สูงอายุโดยสมบูรณ์ (Aged Society) ในเวลาเพียง 20 กว่าปีเท่านั้น (พรหมภักดี, 2013) โดยยังพบอีกว่าร้อยละ 50 ของผู้สูงอายุส่วนใหญ่จะมีโรคประจำตัว ซึ่งเกิดจากการทำงานและโครงสร้างของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆเสื่อมถอยลงไป ซึ่งแปรผกผันกับอายุขัยที่เพิ่มมากขึ้น โดยหนึ่งในโรคที่มักพบในผู้สูงอายุคือโรคต้อหิน (Glaucoma) ซึ่งมีการศึกษาแล้วพบว่าอายุขัยที่เพิ่มขึ้นเป็นปัจจัยหลักของการเกิดโรคต้อหิน (Guedes และคณะ, 2011)

โดยปกติภายในดวงตาจะมีการหลั่งของเหลวที่เรียกว่าน้ำหล่อเลี้ยงลูกตา (Aqueous humor) โดยซีเลียริบอดี (Ciliary body) ซึ่งน้ำหล่อเลี้ยงลูกตาจะไหลเวียนสู่ช่องว่างระหว่างกระจกตาและม่านตาหรือช่องว่างหน้าลูกตา (Anterior Chamber) เพื่อทำหน้าที่นำสารอาหาร เช่น น้ำตาล และกรดอะมิโน มาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนหน้าของลูกตา อันได้แก่ แก้วตาและกระจกตา และในขณะเดียวกันก็นำของเสีย เช่น กรดแลคติกและกรดไพรูวิก ออกจากเนื้อเยื่อเหล่านั้น โดยมีการระบายออกของน้ำหล่อเลี้ยงลูกตาผ่านเนื้อเยื่อที่มีลักษณะโครงสร้างคล้ายท่อตะแกรงเป็นตัวกรองเรียกว่า Trabecular meshwork (รูปที่ 1.1) นอกจากนี้ น้ำหล่อเลี้ยงลูกตายังทำให้ความดัน (Intraocular pressure : IOP) ลูกตาอยู่ในเกณฑ์ปกติ หากเปรียบเทียบกับระหว่างดวงตาของผู้ที่มีสุขภาพดีและผู้ป่วยโรคต้อหิน จะพบว่าในดวงตาของผู้ที่มีสุขภาพดีจะมีความดันตาปกติ (10-21 มิลลิเมตรปรอท) และมีการหลั่งและระบายออกของน้ำเลี้ยงลูกตาในอัตราที่คงที่ แต่ในผู้ป่วยที่เป็นโรคต้อหินจะพบว่า มีการไหลเวียนของน้ำหล่อเลี้ยงลูกตาที่ผิดปกติ เนื่องจากการอุดตันของ Trabecular meshwork ซึ่งเป็นช่องทางการไหลผ่าน ส่งผลให้ความดันภายในดวงตาเพิ่มสูงขึ้นกว่าปกติ นำไปสู่การกดทับที่บริเวณเส้นประสาทดวงตาที่ส่งผลต่อการมองเห็น จนท้ายที่สุดอาจนำไปสู่การเกิดภาวะต้อหินได้ (Wang และคณะ, 2016)



รูปที่ 1.1 แสดงเส้นทางการไหลเวียนของน้ำหล่อเลี้ยงลูกตา (ลูกตาสีฟ้า) จากซีเลียรีบอดี ซึ่งเป็นแหล่งผลิตน้ำหล่อเลี้ยงลูกตาผ่านโครงสร้างต่างๆ และระบายออกทาง Trabecular meshwork (ที่มา: <https://www.brightfocus.org/glaucoma/infographic/aqueous-humor-flow-and-function>)

นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาที่พบว่าโรคต้อหินมีความความสัมพันธ์กับเอนไซม์คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (Carbonic anhydrase : CAs) (Maciej และคณะ, 2018) เนื่องจาก CAs เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา CO_2 hydration โดยการเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และน้ำ (H_2O) ให้กลายเป็นไบคาร์บอเนตแอนไอออน (HCO_3^-) และโปรตอน (H^+) ดังสมการ $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ ซึ่งไบคาร์บอเนตแอนไอออนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในการสังเคราะห์น้ำหล่อเลี้ยงลูกตา (Scozzafava และ Supuran, 2014) เอนไซม์ CAs ยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพที่สำคัญต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ ได้แก่ การรักษาสมดุลของความเป็นกรด-ด่าง กระบวนการสลายตัวของกระดูก กระบวนการแลกเปลี่ยนไอออน กระบวนการหายใจระดับเซลล์ เป็นต้น (Arabaci และคณะ, 2014) โดยปฏิกิริยา CO_2 hydration นี้ เกิดขึ้นเมื่อมีไอออนโลหะ (Metalloenzyme) เข้ามาจับที่บริเวณ active site ของเอนไซม์ CAs เพื่อช่วยในการขับเคลื่อนการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีสมบัติเป็นนิวคลีโอไฟล์ที่สูงกับไอออนของโลหะจำพวกไฮดรอกไซด์ (Nucleophilic metal hydroxide species) เช่น ซิงค์ (II) ไฮดรอกไซด์ ($\text{Zn}(\text{OH})_2$ หรือ Zn^{2+}) แคดเมียม (II) ไฮดรอกไซด์ ($\text{Cd}(\text{OH})_2$ หรือ Cd^{2+}) หรือไอรอน (II) ไฮดรอกไซด์ ($\text{Fe}(\text{OH})_2$ หรือ Fe^{2+}) (Karioti และคณะ, 2015)

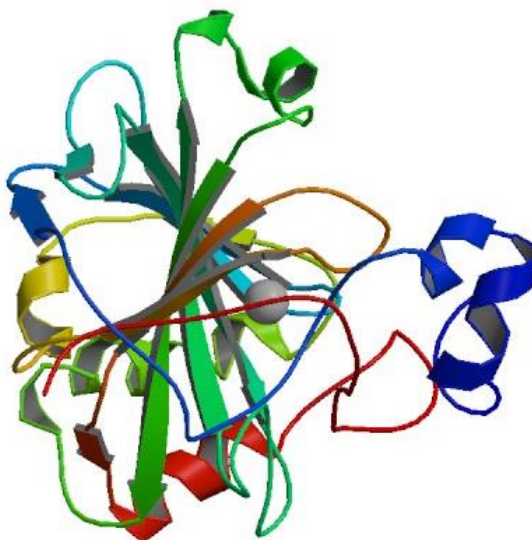
ในปัจจุบันได้มีการจัดจำแนกเอนไซม์ CAs ออกเป็น 7 Genetic Families ได้แก่ α -CA β -CA γ -CA δ -CA ζ -CA θ -CA และ η -CA ซึ่งเอนไซม์ CAs ส่วนใหญ่มีพบในแบคทีเรีย อาเคียร์ ฟังไจ ไดอะตอมสาหร่าย หรือพืชบางชนิด (McKenna และ Supuran 2014) มีเพียงชนิด α -CA เท่านั้นที่สามารถพบได้ในกลุ่มสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังทุกชนิดรวมไปถึงในมนุษย์ เรียกว่า human CAs (hCAs) ซึ่ง hCAs ถูกแบ่งออกเป็นทั้งหมด 16 ไอโซไซม์ ตามความสามารถในการแสดงออกของแต่ละไอโซไซม์ที่บริเวณเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะอย่างจำเพาะ (Subcellular localization) (ตารางที่ 1.1) และตามความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 1.1 แสดงตำแหน่งของ α -CA ทั้ง 16 ไอโซไซม์ ที่พบภายในเซลล์และบริเวณที่พบภายในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆของมนุษย์

ไอโซฟอร์ม (Isoform)	ตำแหน่งภายในเซลล์ (Subcellular localization)	บริเวณที่พบภายในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะ
CA I	ไซโตซอล	ช่องทางเดินอาหารส่วนลำไส้ (GI Tract) เซลล์เม็ดเลือดแดง
CA II	ไซโตซอล	เซลล์เม็ดเลือดแดง ตา กระดูก GI tract ไต ปอด อวัยวะ สมอง
CA III	ไซโตซอล	เซลล์สะสมไขมัน (Adipose Tissue) กล้ามเนื้อลาย
CA IV	บนเยื่อหุ้มเซลล์แบบ Membrane-bound	ตับอ่อน หลอดเลือดฝอย กล้ามเนื้อหัวใจ ลำไส้ส่วนโคลอน ไต ปอด
CA VA	ไมโทคอนเดรีย	ตับ
CA VB	ไมโทคอนเดรีย	กล้ามเนื้อลายและหัวใจ ไต ไขมันหลัง ตับอ่อน GI tract
CA VI	สารคัดหลั่งของเซลล์	ต่อมน้ำลาย ต่อมน้ำนม
CA VII	ไซโตซอล	ระบบประสาทส่วนกลาง
CA VIII	ไซโตซอล	ระบบประสาทส่วนกลาง
CA IX	บนเยื่อหุ้มเซลล์แบบ Membrane-bound	เนื้อเยื่อ เยื่อเมือกบริเวณ GI tract
CA X	ไซโตซอล	ระบบประสาทส่วนกลาง
CA XI	ไซโตซอล	ระบบประสาทส่วนกลาง
CA XII	บนเยื่อหุ้มเซลล์แบบ Membrane-bound	เนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ เนื้อเยื่อ ไต ลำไส้ ตา
CA XIII	ไซโตซอล	สมอง ปอด ช่องทางเดินอาหาร ไต ระบบสืบพันธุ์
CA XIV	บนเยื่อหุ้มเซลล์แบบ Membrane-bound	ไต สมอง ตับ
mCA XV	บนเยื่อหุ้มเซลล์แบบ Membrane-bound	ไต

ที่มา: Supuran 2008

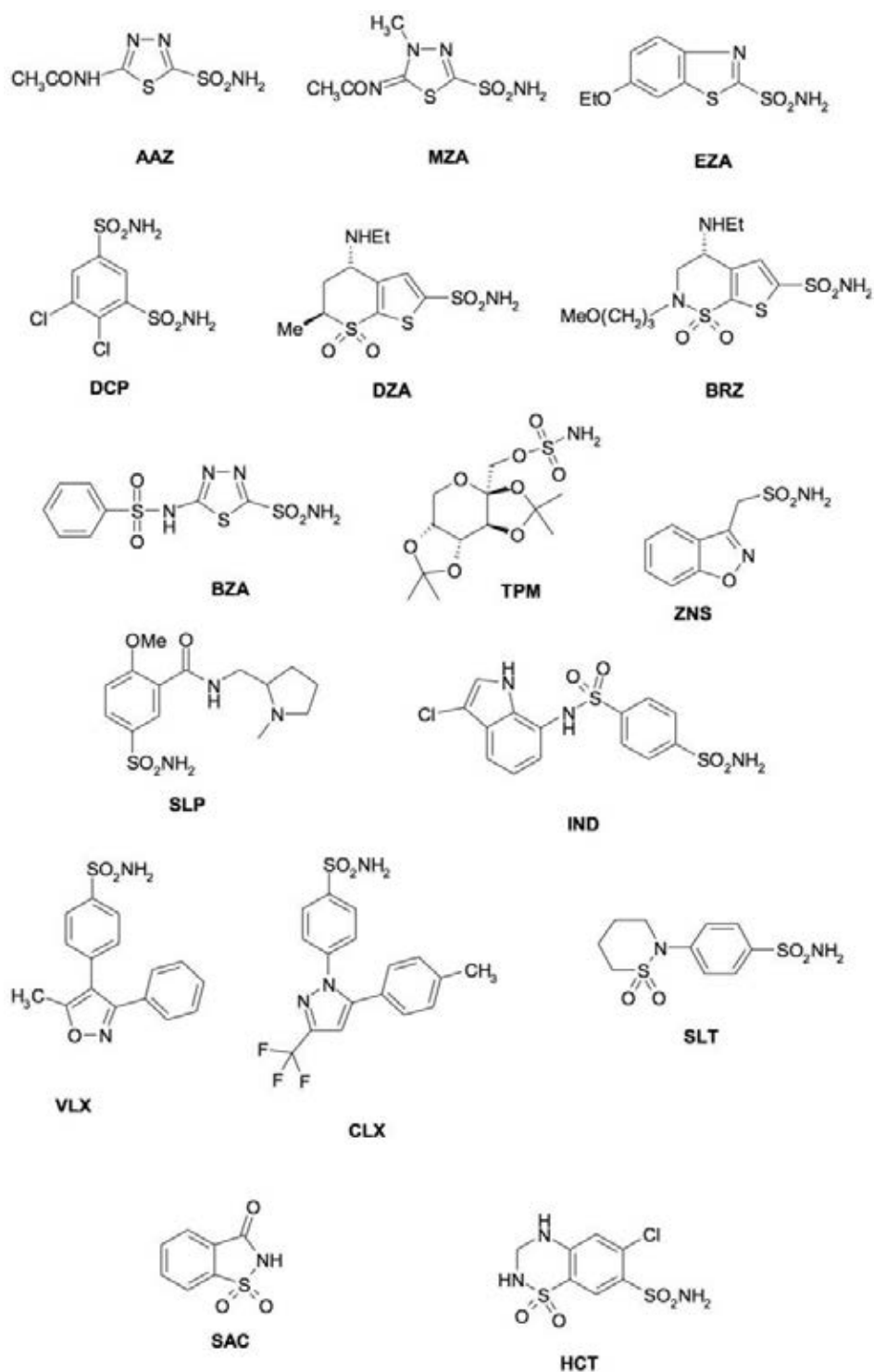
Human carbonic anhydrase isozyme II (hCA II) (รูปที่ 1.2) เป็นเอนไซม์ที่ถูกศึกษาอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเอนไซม์ hCA II มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮเดรชัน (Hydration) ของคาร์บอนไดออกไซด์ที่สูง มีการแสดงออกที่หลากหลายบริเวณ อีกทั้งยังมีความเกี่ยวข้องกับโรคและอาการหลายชนิด เช่น อาการบวม น้ำ โรคมะเร็ง และโรคลมชัก เป็นต้น (Şentürk และคณะ, 2011)



รูปที่ 1.2 แสดงโครงสร้างของเอนไซม์ human carbonic anhydrase isozyme II (hCA II)

(ที่มา: <http://www.rcsb.org/structure/2ILI>)

ด้วยเหตุนี้ แนวทางในการรักษาโรคต้อหินด้วยยา คือการลดกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II เพื่อลดการสร้างน้ำหล่อเลี้ยงลูกตาที่จะส่งผลให้ความดันลูกตาลดลง การพัฒนาสารออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ hCA II (CA inhibitor : CAI) ที่บริเวณซีเลียรีบอดีจึงเป็นเป้าหมายสำคัญเพื่อลดความดันในลูกตาซึ่งนำไปสู่การรักษาโรคต้อหิน โดยพบว่าสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ (Sulfonamide) (รูปที่ 1.3) มีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ซึ่งมีความจำเพาะสูงในการจับกับสารดังกล่าว (Affinity for sulfonamides) (Karioti และ Supuran, 2015) ได้แตกต่างกัน และยังพบว่าปัจจุบันยาที่ใช้รักษาโรคต้อหินมีผลข้างเคียงกับผู้ป่วย เนื่องจากมีการแพ้ CAI ซึ่งมีข้อจำกัดจากความสามารถในการจับกับบริเวณที่ไม่ต้องการได้อย่างไม่จำเพาะ ทำให้เกิดอาการข้างเคียง ได้แก่ ซึมเศร้า ความดันโลหิตต่ำ วิงเวียน เมื่อยล้า และน้ำหนักรีด เป็นต้น (Karioti และคณะ, 2015)

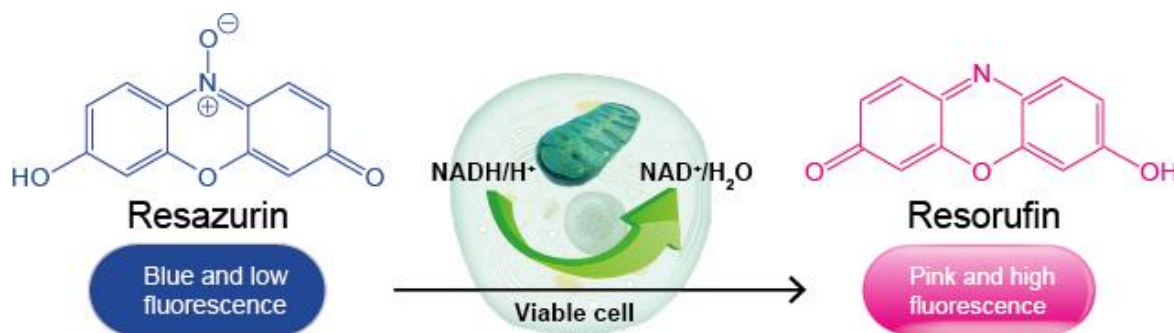


รูปที่ 1.3 แสดงตัวอย่างของสารกลุ่มอนุพันธ์ซัลโฟนาไมด์ (Sulfonamide) ที่ได้นำไปพัฒนาเป็นยาเพื่อใช้ในการรักษาโรคต้อหิน สารเหล่านี้ได้แก่ Acetazolamide (AAZ), Methazolamide (MZA), Ethoxzolamide (EZA), Dichlorophenamide (DCP), Dorzolamide (DZA), Brinzolamide (BRZ), Benzamide (BZA), Sulthiame (SLT), Topiramate (TPM), Sulpiride (SLP), Indisulam (IND), Celecoxib (CLX), Valdecoxib (VLX), Saccharin (SAC) และ Hydrochlorothiazide (HCT) (Supuran และ Capasso 2017)

จากผลข้างเคียงดังกล่าว ปัจจุบันการศึกษาวิจัยเพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติเป็น CAI ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ผ่านกลไกแบบใหม่และมีความแตกต่างกับ CAI ดั้งเดิม (สารอนุพันธ์ Sulfonamide) จึงเป็นแนวทางที่จะนำไปสู่การค้นพบและการพัฒนายารูปแบบใหม่เพื่อใช้ในการรักษาโรคที่มีความเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ CAs อย่างมีประสิทธิภาพ (Rohan และคณะ, 2013) วิธีการหนึ่งที่ยอมรับสำหรับการตรวจสอบฤทธิ์ของสารทดสอบต่อกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ภายในหลอดทดลอง (*In vitro* assay) คือ การวัดกิจกรรมเอสเทอเรส (Esterase activity) โดยจะตรวจสอบการดำเนินปฏิกิริยาของสารตั้งต้นที่มีชื่อทางเคมีว่า 4-Nitrophenylacetate (NPA) จนเกิดเป็น 4-Nitrophenylate ion ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 348 นาโนเมตร และทำให้ทราบผลของการเกิดกิจกรรมของ hCA II ได้อย่างจำเพาะ (Uda และคณะ, 2015) แต่อย่างไรก็ตามยังพบว่ามีข้อจำกัดที่สำคัญหลายประการ เช่น ไม่สามารถทราบถึงความเป็นพิษหรือความสามารถในการแพร่ผ่านเข้าสู่เซลล์ของสารทดสอบต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้ เป็นต้น (Sentürk และคณะ, 2011) ดังนั้นการทดสอบสารที่มีคุณสมบัติเป็น CAI ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (*In vivo* assay) จึงเป็นสิ่งสำคัญต่อการพัฒนายาเพื่อมาใช้ในมนุษย์

ในงานวิจัยนี้ ได้ใช้ระบบคัดกรองฐานยีสต์ (Yeast-cell based) ที่พัฒนาขึ้นโดย Sangkaew และคณะ ในปี 2018 ซึ่งเป็นระบบคัดกรองที่ให้ผลสัมฤทธิ์สูง (High throughput screening : HTS) โดยสามารถคัดกรองสารทดสอบได้คราวละมาก ๆ ใน 96-well microtiter plate ข้อดีของวิธีคัดกรองที่ให้ผลสัมฤทธิ์สูง (High throughput screening) คือ เป็นวิธีที่ใช้สารทดสอบในปริมาณน้อย และให้ผลทดสอบรวดเร็ว โดยระบบนี้ ทำการวัดกิจกรรมเมตาบอลิซึม (Metabolic activity) ของเซลล์โดยใช้ Resazurin Microtiter plate assay (REMA) ที่ใช้เรซาซูริน (Resazurin หรือ 7-hydroxy-3Hphenoxazin-3-one 10-oxide) เป็นสิ่งชี้วัดความมีชีวิตของเซลล์และเป็นตัวบ่งชี้ถึงการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์หรือออกซิเดชัน-รีดักชัน (Redox หรือ Oxidation-reduction indicator) ภายในเซลล์ที่มีชีวิต

Resazurin มีลักษณะทางกายภาพเป็นผงซึ่งต้องนำไปละลายในบัฟเฟอร์หรือน้ำกลั่นเพื่อเตรียมเป็นสารละลายก่อนการนำไปใช้ (Pace และ Burg, 2015) โดยหลังจากละลายผง Resazurin ด้วยบัฟเฟอร์แล้ว Resazurin อยู่ในลักษณะของสารละลายสีน้ำเงินเข้มซึ่งเป็นลักษณะที่สามารถรับอิเล็กตรอนและอะตอมไฮโดรเจนจาก Nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen (NADH) ซึ่งเกิดจากกระบวนการออกซิเดชัน-รีดักชันภายในเซลล์ได้ Resazurin จะเปลี่ยนจากสารละลายสีน้ำเงิน เป็นสารละลายสีชมพูที่มีความสามารถในการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence) สูงที่เรียกว่า เรโซรูฟิโน (Resorufin) (รูปที่ 1.4) ซึ่งการเปลี่ยนสีนี้แปรผันโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีการเจริญเพิ่มมากขึ้นภายในระบบ ดังนั้น การเปลี่ยนสีของสิ่งชี้วัดดังกล่าวสามารถบ่งบอกถึงระดับของ Metabolic activity การมีชีวิตรอดของเซลล์ (Cell viability) การเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cell viability) และความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์ (Cytotoxicity) ได้ (Terry และคณะ, 2013)



รูปที่ 1.4 แสดงปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของ Resazurin (สีน้ำเงิน มีความสามารถในการเรืองแสงต่ำ) ไปเป็น Resorufin (สีชมพู มีความสามารถในการเรืองแสงสูง) ภายในเซลล์ที่มีชีวิต (ที่มา: <http://www.abpbio.com/product/cell-viability-assay-based-on-metabolic-activity>)

ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (รูปที่ 1.5) เป็นเซลล์ยูคาริโอตเซลล์เดียวที่มีความคล้ายกับเซลล์ของมนุษย์ นิยมใช้เป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบ (Model Organism) ในการศึกษากลไกการทำงานของกระบวนการสำคัญต่างๆทางชีวภาพ เนื่องจากเป็นสิ่งมีชีวิตชั้นสูงเซลล์เดียว (Unicellular eukaryote) สามารถเพิ่มจำนวนได้รวดเร็ว จัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (Generally recognized as safe : GRAS) และลำดับในจีโนมได้ถูกศึกษาทั้งหมดแล้ว กว่า 31% ของยีนทั้งหมดในยีสต์มีความใกล้เคียงกับยีนที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ แสดงให้เห็นถึงการอนุรักษ์ของกระบวนการทางชีวภาพต่างๆที่สำคัญจากยีสต์สู่มนุษย์ (Barberis และคณะ, 2007) การใช้ระบบคัดกรองฐานยีสต์ (Yeast-based assay) มีค่าใช้จ่ายในการคัดกรองที่มีราคาถูกลงกว่าการใช้เซลล์มนุษย์ในการคัดกรอง และให้ผลการทดสอบที่ไวกว่าการใช้เซลล์มนุษย์มาก (Petrovic และคณะ, 2017)



ภาพที่ 1.5 ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (ที่มา: www.allposters.co.uk)

Sangkaew และคณะ ในปี 2018 ได้ทำการดัดแปลงพันธุกรรมยีสต์ *S. cerevisiae* ด้วยการถ่ายยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์คาร์บอนิกแอนไฮเดรส *NCE103* ส่งผลให้ยีสต์ไม่สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีความเข้มข้นของ CO_2 ต่ำ (0.035%) เมื่อนำพลาสมิดที่บรรจุยีนประมวลรหัสเอนไซม์ hCA II เข้าไปแสดงออกในเซลล์ยีสต์ได้เป็นยีสต์สายพันธุ์กลาย AS03 (*GAL1.1_hCA II*) ส่งผลให้ยีสต์สายพันธุ์นี้มีการแสดงออกของเอนไซม์ hCA II และสามารถเจริญได้ในภาวะที่มี CO_2 ต่ำ ดังนั้นจึงสามารถนำยีสต์สายพันธุ์กลายนี้มาใช้เป็นเซลล์ยีสต์บ่งชี้เพื่อใช้ในการคัดกรองแบบ High-throughput screening สำหรับค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ hCA II สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ hCA II จะส่งผลให้ยีสต์บ่งชี้ไม่สามารถเจริญได้ในภาวะที่มี CO_2 ต่ำ เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ในเซลล์ถูกยับยั้งการทำงาน นอกจากนี้ยังใช้ Resazurin เป็นสารบ่งชี้ถึงการมีชีวิตของเซลล์ซึ่งทำให้ทราบถึงผลการตอบสนองของเซลล์ที่มีต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่นำมาทดสอบได้แบบ High-throughput

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอนิกแอนไฮเดรสไอโซไซม์ II ของมนุษย์ (hCA II) จากสารบริสุทธิ์ซึ่งแยกได้จากพืชสมุนไพรไทยชนิดต่างๆและสารสังเคราะห์ โดยการใช้ระบบคัดกรองฐานยีสต์ที่ได้มีการพัฒนาขึ้นก่อนหน้า (Sangkaew และคณะ, 2018) จากนั้นศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของสารออกฤทธิ์ที่ให้ผลบวก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้รับสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ที่ได้มาจากพืชสมุนไพรไทยชนิดต่างๆ ซึ่งสารที่ได้รับนี้อาจนำมาพัฒนาเป็นยาสำหรับโรคต่อหินได้ต่อไป
2. สามารถวางแผนการทดลองและแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการทดลองอย่างเป็นระบบ
3. เป็นประสบการณ์สู่การทำงานและงานวิจัยในอนาคต

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

<u>รายชื่อ</u>	<u>บริษัท</u>
กระบอกฉีดยา (Syringe)	NIPRO, Thailand
กระบอกตวง (Cylinder)	WITEG, Germany
กล่องสร้างภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobe box)	MGC, Japan
ขวดรูปชมพู่	Corning, USA
จานเพาะเชื้อ	Corning, USA
ช้อนตักสาร	
ตู้อบเชื้อ (Incubator) รุ่น BE 600	Memmert, Germany
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) รุ่น Clean model V4	LAB Service, Thailand
ตู้อบฆ่าเชื้อชนิดความร้อนแห้ง (Hot air oven) รุ่น UE 600	Memmert, Germany
ตัวกรองสารละลาย (Membrane filter) รูกรองขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 μm	Whatman, Germany
ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4 °C รุ่น Tiara	Mitsubishi, Japan
ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิต่ำ -20 °C รุ่น MDF-U332	SANYO Electric, Japan
ตะเกียงแอลกอฮอล์	
ปิ๊กเกอร์	PYREX, Germany
หลอดทดลองก้นกลม (Test tube)	PYREX, Germany
หลอดเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge tube)	Corning, USA
หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (Microcentrifuge tube)	Corning, USA
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น NST2000	EYELA, Japan

<u>รายชื่อ</u>	<u>บริษัท</u>
เครื่องกำเนิดคลื่นความถี่สูง (Ultrasonic bath)	SONOREX, Germany
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น MLS 3020	Tony, USA
เครื่องชั่งหยاب รุ่น AG285 PG2002-S	Mettler Toledo, Switzerland
เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG285 PG3002	Mettler Toledo, Switzerland
เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น Genielle G-560E	Scientific Industries, USA
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงชนิดคลื่นแสงเหนือม่วง (Ultra violet -Visible Spectrophotometer)	ThermoFisher, USA
เครื่องวัดปฏิกิริยาของสารบนไมโครเพลท (Microplate reader)	Biotek, USA
เครื่องอุ่นสารด้วยความร้อนแห้ง (Dry Bath) รุ่น D1301	Labnet, USA
เครื่องเขย่าสารแนวราบ (Orbital shaker) รุ่น MS-NOR-30	GIBTHAI, Thailand
ไมโครปิเปตต์ (Micropipette)	Gilson, France
ไมโครปิเปตต์แบบหลายช่องดูด (Multichannel micropipette)	BioHit, Finland
ไมโครปิเปตต์ทีป (Micropipette tip)	Corning, USA
ไมโครเพลท 96 หลุม (96-well microtiter plate)	Corning, USA
AnaeroPack-Anaero	MGC, Japan

2.2 เคมีภัณฑ์

<u>รายชื่อ</u>	<u>บริษัท</u>
Acetazolamide	Sigma, USA
Adenine hemisulfate salt, minimum 99%	Sigma, USA
D-galactose	Difco Laboratories, USA
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Merck, Germany

รายชื่อ	บริษัท
Histidine, minimum 99%	Sigma, USA
Leucine, minimum 99%	Sigma, USA
Raffinose	Difco Laboratories, USA
Recombinant Human Carbonic Anhydrase II (rhCA2)	R&D systems, USA
Resazurin	Sigma, USA
Sodium Hydroxide	Merck, Germany
Yeast nitrogen base without amino acids	Difco Laboratories, USA
4-Nitrophenyl Acetate (4-NPA)	Sigma, USA

2.3 สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง

Saccharomyces cerevisiae สายพันธุ์ ASO3 ซึ่งมีลักษณะจีโนมไทป์คือ *MAT α ade2-1 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 yrs1::HIS3 yrr1::trp1::loxP pdr1::hisG pdr3::hisG erg3::loxP nce103::loxP-URA3-loxP* และถูกทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิด pRS414 (*GAL1.1_hCA II*) ได้เป็นยีสต์สายพันธุ์ ASO3 (*GAL1.1_hCA II*) หรือ Δ *nce103* (p*GAL1_hCA II*) (Sangkaew และคณะ, 2018)

2.4 สารที่ใช้ในการทดลอง

สารที่ใช้ในการทดสอบเป็นสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทยชนิดต่างๆจำนวน 33 ตัวอย่าง และเป็นสารสังเคราะห์จำนวน 15 ตัวอย่าง ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรินทร์ ชวศิริ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตามลำดับ

ตารางที่ 2.1 แสดงสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทยชนิดต่างๆที่ใช้ในการทดสอบ

ลำดับ ที่	รหัสของ สารทดสอบ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ความเข้มข้นเริ่มต้น ของสารทดสอบ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	AS-CY 101	<i>Anaxagorea luzonensis</i> A. Gray	กำลังวัวเถลิง	1.40	50
2	AS-CY 102	<i>Excoecaria agallocha</i> L.	ตาตุ่มทะเล	1.34	50
3	AS-CY 103			1.40	50
4	AS-CY 104			1.11	50
5	AS-CY 105	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.	บัวหลวง	1.38	50
6	AS-CY 106			2.26	50
7	AS-CY 107	<i>Crinum asiaticum</i> L.	พลับพลึงขาว	1.00	50
8	AS-CY 108	<i>Stephania Pierrei</i> Diels	สบู่เลือด	1.28	50
9	AS-CY 109			1.40	50
10	AS-CY 110	<i>Maclura cochinchinensis</i> (Lour.) Corner	แกแล	1.27	50
11	AS-CY 111			1.91	50
12	AS-CY 112			1.50	50
13	AS-CY 113			1.21	50
14	AS-CY 114			1.01	50
15	AS-CY 115			1.76	50
16	AS-CY 116			1.12	50
17	AS-CY 117			1.12	50
18	AS-CY 118	<i>Garcinia hanburyi</i> Hook. f.	รงทอง	1.14	50
19	AS-CY 119			1.25	50
20	AS-CY 120			1.12	50
21	AS-CY 121			1.04	50
22	AS-CY 122	<i>Derris scandens</i> (Roxb.) Benth.	เถาว์วัลย์เปรียง	1.29	50
23	AS-CY 123			1.46	50
24	AS-CY 124			1.33	50
25	AS-CY 125	<i>Trichosanthes</i> <i>cucumerina</i> L.	บวบขม	1.30	50

ลำดับ ที่	รหัสของ สารทดสอบ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ความเข้มข้นเริ่มต้น ของสารทดสอบ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
26	AS-CY 126	<i>Stephania suberosa</i> Forman	บระเพ็ด พุงช้าง	1.08	50
27	AS-CY 127			1.47	50
28	AS-CY 128	<i>Rheum palmatum</i> L.	โกฐน้ำเต้า	1.46	50
29	AS-CY 129			1.26	50
30	AS-CY 130			1.77	50
31	AS-CY 131	<i>Curcuma comosa</i> Roxb.	ว่านชักมดลูก	1.78	50
32	AS-CY 132			1.30	50
33	AS-CY 133			1.46	50

ตารางที่ 2.2 แสดงสารสังเคราะห์ที่ใช้ในการทดสอบ

ลำดับ ที่	รหัสของ สารทดสอบ	ชื่อ IUPAC	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ความเข้มข้นเริ่มต้น ของสารทดสอบ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	TP 005	3-bromo-7-methoxy-2H-chromen- 2-one	2.00	50
2	TP 006	3-bromo-7-ethoxy-2H-chromen-2-one	2.00	50
3	TP 014	2-oxo-2H-chromen-7-yl octanoate	2.00	50
4	TP 015	2-oxo-2H-chromen-7-yl dodecanoate	2.00	50
5	TP 018	2-oxo-2H-chromen-7-yl acetate	2.00	50
6	TP 020	7-(3-bromopropoxy)-2H-chromen- 2-one	2.00	50
7	TP 021	2-oxo-2H-chromen-7-yl decanoate	1.90	50
8	TP 022	4,7-dihydroxy-2H-chromen-2-one	2.30	50
9	TP 023	2-oxo-2H-chromen-7-yl(2E,4E)-5- (benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)penta-2,4- dienoate	2.00	50
10	TP 024	7-butoxy-2H-chromen-2-one	2.10	50
11	TP 025	7-(octyloxy)-2H-chromen-2-one	2.00	50
12	TP 026	7-(dodecyloxy)-2H-chromen-2-one	2.00	50
13	TP 027	3-bromo-7-butoxy-2H-chromen- 2-one	1.90	50
14	TP 028	3-bromo-7-(octyloxy)-2H-chromen- 2-one	1.90	50
15	TP 029	3-bromo-7-(dodecyloxy)-2H-chromen- 2-one	1.90	50

2.5 วิธีการดำเนินการทดลอง

1) รวบรวมสารทดสอบ

สารทดสอบในงานวิจัยนี้ เป็นสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทยชนิดต่างๆจำนวน 33 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2.1) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการของศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง และเป็นสารสังเคราะห์จำนวน 15 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2.2) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรินทร์ ขวศิริ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2) เตรียมการทดสอบสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของ hCA II

2.1) เตรียมสารทดสอบในรูปสารละลายเพื่อใช้ทดสอบ

นำสารทดสอบมาละลายด้วย 100% Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck, Germany) ให้มีความเข้มข้นที่ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส โดยหลีกเลี่ยงแสง

2.2) เตรียมสารละลาย Resazurin

เตรียมสารละลาย Resazurin (Sigma, USA) ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งผง Resazurin 0.003 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วย Membrane filter ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยหลีกเลี่ยงแสงและใช้ให้หมดภายใน 1 สัปดาห์

3) เตรียมเซลล์ยีสต์บ่งชี้

นำเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ ASO3 (pRS414 GAL1.1_hCA II) ซึ่งได้รับจากงานวิจัยของนางสาว อัญญาพร แสงแก้ว นิสิตระดับปริญญาเอก หลักสูตรจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว synthetic uracil and tryptophan dropout medium +1% Raffinose (SR-Ura-Trp) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะที่มีความเข้มข้น CO₂ สูง (5%) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าความขุ่นของเซลล์ยีสต์บ่งชี้ที่อยู่ในอาหารเหลว SR-Ura-Trp ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงชนิดคลื่นแสงเหนือม่วง (Ultra violet -Visible Spectrophotometer) โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD₆₆₀) จากนั้นปรับค่าความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยด้วยการทำเจือจางให้ได้เท่ากับ 10⁶ เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำเซลล์ยีสต์แขวนลอยที่ผ่านการปรับความเข้มข้นแล้วหยดลงในหลุมของ 96-well microtiter plate โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์อยู่ในช่วง 5x10⁴ ถึง 10⁵ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

4) คัดกรองสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของ hCA II โดยวิธี Yeast-based high throughput screening ขั้นปฐมภูมิ (Primary Screening)

นำสารทดสอบที่ละลายใน 100% DMSO มาทำการเจือจางด้วยอาหารเหลว SR-Ura-Trp เพื่อให้ได้ค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารทดสอบอยู่ในช่วง 0.50 - 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ DMSO เท่ากับ 0.5% จากนั้นนำมาเจือจางแบบอนุกรมสิบเท่า (10-fold dilution) ด้วยอาหารเหลว SR-Ura-Trp จากนั้นเติมสารทดสอบที่แปรผันความเข้มข้นลงใน 96-well microtiter plate ที่มีเซลล์ยีสต์แขวนลอยตั้งข้อ 3 โดยแต่ละสารทดสอบมีการทำทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยแต่ละซ้ำมีอิสระจากกัน (Independent sample) ในช่วงเวลาและภาวะเดียวกัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที

ภายหลังการบ่ม ทำการเติมสารละลายน้ำตาลกลูโคสลงไปในแต่ละหลุม โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 2% จากนั้นบ่มต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสภายใต้ภาวะความดันบรรยากาศซึ่งมีความเข้มข้น CO₂ ต่ำ (0.035%) ในสภาวะเขย่าที่ 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากนั้นทำการวัดผลการคัดกรองสาร โดยการเติมสารละลาย Resazurin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากข้อ 2.2 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มต่ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืด ภายใต้ภาวะที่มีความเข้มข้น CO₂ ต่ำเป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย Resazurin โดยพิจารณาเทียบกับชุดควบคุมผลลบ (ไม่มีสารทดสอบ) พร้อมกับอ่านค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเปลี่ยนสีของสารละลาย Resazurin ได้

5) ศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของสารทดสอบที่ให้ผลบวก

5.1) หาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารทดสอบที่ให้ผลบวกที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II (Minimum effective concentration : MEC)

นำสารทดสอบที่ให้ผลบวกจากการคัดกรองในขั้นปฐมภูมิในข้อ 4 มาทำการเจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า โดยเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กระทั่งได้ความเข้มข้นของสารทดสอบเท่ากับ 0.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วจึงทำการทดลองเช่นเดียวกันกับในข้อ 4 จากนั้นจึงนำสารทดสอบดังกล่าวไปทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II (MEC) โดยการเติมและพิจารณาการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย Resazurin เทียบกับหลุมควบคุมผลลบ (ไม่มีสารทดสอบ) ด้วยตา หลังจากทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืด ภายใต้ภาวะที่มีความเข้มข้น CO₂ ต่ำเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ควบคู่ไปกับการวัดค่าการเจริญของเซลล์ยีสต์บ่งชี้ด้วยเครื่องวัดปฏิกิริยาของสารบนไมโครเพลท (Microplate reader) โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD₆₆₀)

จากนั้นจึงนำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธี One-way analysis of variance ในการวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism (Version 5.01)

5.2) ทดสอบความเป็นพิษของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของ hCA II (Minimum toxic concentration : MTC) ต่อเซลล์ยีสต์บ่งชี้

นำสารทดสอบที่ให้ผลบวกจากการคัดกรองในขั้นปฐมภูมิมาดำเนินการทดลอง เช่นเดียวกันกับในข้อ 5.1 แต่เปลี่ยนภาวะที่ใช้ในการบ่มเซลล์ยีสต์บ่งชี้กับสารทดสอบโดยใช้กล่องสร้างสภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobe box) กับ AnaeroPack-Anaero เพื่อสร้างภาวะความดันบรรยากาศที่มีความเข้มข้น CO₂ สูง (5%) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสีสารละลาย Resazurin โดยพิจารณาเทียบสีกับหลุมควบคุมผลลบ (ไม่มีสารทดสอบ) ด้วยตา อ่านค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย Resazurin (MTC) ได้ และวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD₆₆₀) ด้วยเครื่องวัดปฏิกิริยาของสารบนไมโครเพลท (Microplate reader) จากนั้นนำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธี One-way analysis of variance ในการวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism (Version 5.01)

6) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของ hCA II ในหลอดทดลอง (*In vitro*) โดยวิธีวัดกิจกรรมเอนไซม์เอสเทอร์เอส (Esterase activity assay)

นำสารทดสอบที่ให้ผลบวกจากข้อ 5 มาทำการเจือจางด้วย 100% DMSO เพื่อให้ได้ค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารทดสอบเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติม Assay buffer (50 มิลลิโมลาร์, pH 7.5 MOPS, 33 มิลลิโมลาร์ Na₂SO₄, 1.0 มิลลิโมลาร์ EDTA) ลงในหลุมของ 96-well microtiter plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วนำมาเจือจางแบบอนุกรมสองเท่า (2-fold dilution) ด้วย 100% DMSO ตามด้วยเติมสารทดสอบที่แปรผันความเข้มข้นลงในหลุมของ 96-well microtiter plate หลุมละ 1 ไมโครลิตร

เตรียมสารละลาย Recombinant hCA II (R&D systems, USA) โดยการเจือจางใน Assay buffer ให้มีความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 1 ไมโครโมลาร์ จากนั้นเติมเอนไซม์ที่เจือจางแล้วปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติม 5.5 มิลลิโมลาร์ 4-Nitrophenyl Acetate (4-NPA) ซึ่งเป็นสารตั้งต้น ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของ 96-well microtiter plate ที่มีสารทดสอบและ Recombinant hCA II ตามลำดับเพื่อเริ่มต้นปฏิกิริยา นำไปบ่มเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และ 4-NPA โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (OD₄₀₅) 4-nitrophenolate anion แล้วคำนวณหาค่า Half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) ของสารทดสอบจาก dose-response curve ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism (Version 5.01)

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1) การคัดกรองขั้นปฐมภูมิ (Primary Screening) เพื่อหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II โดยใช้วิธี Yeast-based high throughput screening

จากผลการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ในขั้นปฐมภูมิ โดยการนำสารทดสอบที่ถูกเตรียมให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำมาเจือจางแบบอนุกรม 10 เท่า กระทั่งได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทยชนิดต่างๆ รหัสสารทดสอบ AS-CY จำนวน 33 ตัวอย่าง และสารสังเคราะห์รหัสสารทดสอบ TP จำนวน 15 ตัวอย่าง มาบ่มร่วมกับยีสต์บ่งชี้ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ AS03 ($\Delta nce10$ + pGAL1.1_hCA II) ที่ความเข้มข้น 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน 96-well microtiter plate และเติมสารละลายน้ำตาลกลูโคสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2% ลงไปในแต่ละหลุมเพื่อเหนี่ยวนำ *GAL1* โปรโมเตอร์ในยีสต์บ่งชี้ให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ hCA II จากนั้นนำ 96 well microtiter plate ไปบ่มโดยการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารละลาย Resazurin นำไปบ่มที่มีดเป็นเวลา 5 ชั่วโมง พิจารณาการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย Resazurin หากเป็นสีน้ำเงินคือไม่มีการเปลี่ยนสี แสดงว่ายีสต์ไม่มีการเจริญเติบโต แต่ถ้าหากปรากฏเป็นสีชมพูนั้นหมายความว่ามีความถึงการมีชีวิตของยีสต์ จากการทดลองพบว่าสารทดสอบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของยีสต์บ่งชี้ ประกอบด้วย กลุ่มสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทยชนิดต่างๆ รหัสสารทดสอบ AS-CY จำนวน 5 ตัวอย่าง และกลุ่มสารสังเคราะห์รหัสสารทดสอบ TP จำนวน 2 ตัวอย่าง โดยผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 3.1 และ 3.2

ตารางที่ 3.1 แสดงผลการคัดกรองขั้นปฐมภูมิเพื่อหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II จากสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทยชนิดต่างๆ รหัสสารทดสอบ AS-CY จำนวน 33 ตัวอย่าง โดยใช้วิธี Yeast-based high throughput screening

ลำดับที่	รหัสของสารทดสอบ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ความเข้มข้นที่สารทดสอบออกฤทธิ์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	AS-CY 101	<i>Anaxagorea luzonensis</i> A. Gray	กำลังวัวเถลิง	>50
2	AS-CY 102	<i>Excoecaria agallocha</i> L.	ตาตุ่มทะเล	>50
3	AS-CY 103			>50
4	AS-CY 104			>50

ลำดับที่	รหัสของสารทดสอบ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ความเข้มข้นที่สารทดสอบออกฤทธิ์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
5	AS-CY 105	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.	บัวหลวง	>50
6	AS-CY 106			>50
7	AS-CY 107	<i>Crinum asiaticum</i> L.	พลับพลึงขาว	5
8	AS-CY 108	<i>Stephania Pierrei</i> Diels	สับเลือด	>50
9	AS-CY 109			>50
10	AS-CY 110	<i>Maclura cochinchinensis</i> (Lour.) Corner	แกแล	>50
11	AS-CY 111			>50
12	AS-CY 112			>50
13	AS-CY 113			>50
14	AS-CY 114			50
15	AS-CY 115			>50
16	AS-CY 116			>50
17	AS-CY 117			>50
18	AS-CY 118	<i>Garcinia hanburyi</i> Hook. f.	รงทอง	>50
19	AS-CY 119			>50
20	AS-CY 120			>50
21	AS-CY 121			>50
22	AS-CY 122	<i>Derris scandens</i> (Roxb.) Benth.	เถาว์วัลย์เปรียง	>50
23	AS-CY 123			>50
24	AS-CY 124			>50
25	AS-CY 125	<i>Trichosanthes cucumerina</i> L.	บวบขม	>50
26	AS-CY 126	<i>Stephania suberosa</i> Forman	ประเพ็ด	>50
27	AS-CY 127		พุงช้าง	>50
28	AS-CY 128	<i>Rheum palmatum</i> L.	โกฐน้ำเต้า	>50
29	AS-CY 129			>50
30	AS-CY 130			>50
31	AS-CY 131	<i>Curcuma comosa</i> Roxb.	ว่านขมิ้นดลูก	50
32	AS-CY 132			50
33	AS-CY 133			50

ตารางที่ 3.2 แสดงผลการคัดกรองขั้นปฐมภูมิเพื่อหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II จากสารสังเคราะห์ที่สารทดสอบ TP จำนวน 15 ตัวอย่าง โดยวิธี Yeast-based high throughput screening

ลำดับที่	รหัสของสารทดสอบ	ชื่อ IUPAC	ความเข้มข้นที่สารทดสอบออกฤทธิ์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	TP 005	3-bromo-7-methoxy-2H-chromen-2-one	>50
2	TP 006	3-bromo-7-ethoxy-2H-chromen-2-one	50
3	TP 014	2-oxo-2H-chromen-7-yl octanoate	>50
4	TP 015	2-oxo-2H-chromen-7-yl dodecanoate	>50
5	TP 018	2-oxo-2H-chromen-7-yl acetate	>50
6	TP 020	7-(3-bromopropoxy)-2H-chromen-2-one	50
7	TP 021	2-oxo-2H-chromen-7-yl decanoate	>50
8	TP 022	4,7-dihydroxy-2H-chromen-2-one	>50
9	TP 023	2-oxo-2H-chromen-7-yl(2E,4E)-5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)penta-2,4-dienoate	>50
10	TP 024	7-butoxy-2H-chromen-2-one	>50
11	TP 025	7-(octyloxy)-2H-chromen-2-one	>50
12	TP 026	7-(dodecyloxy)-2H-chromen-2-one	>50
13	TP 027	3-bromo-7-butoxy-2H-chromen-2-one	>50
14	TP 028	3-bromo-7-(octyloxy)-2H-chromen-2-one	>50
15	TP 029	3-bromo-7-(dodecyloxy)-2H-chromen-2-one	>50

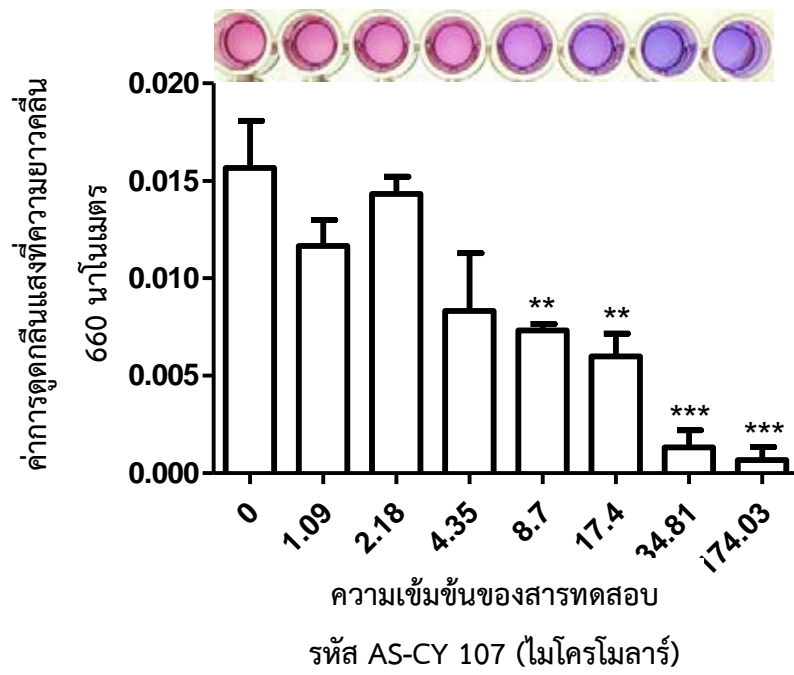
หมายเหตุ สารทดสอบที่มีค่า MEC มากกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หมายความว่าผลการทดสอบของสารทดสอบนั้นเป็นลบ (Negative result)

3.2) การศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของสารที่ให้ผลบวกจากการคัดกรองชั้นปฐมภูมิ

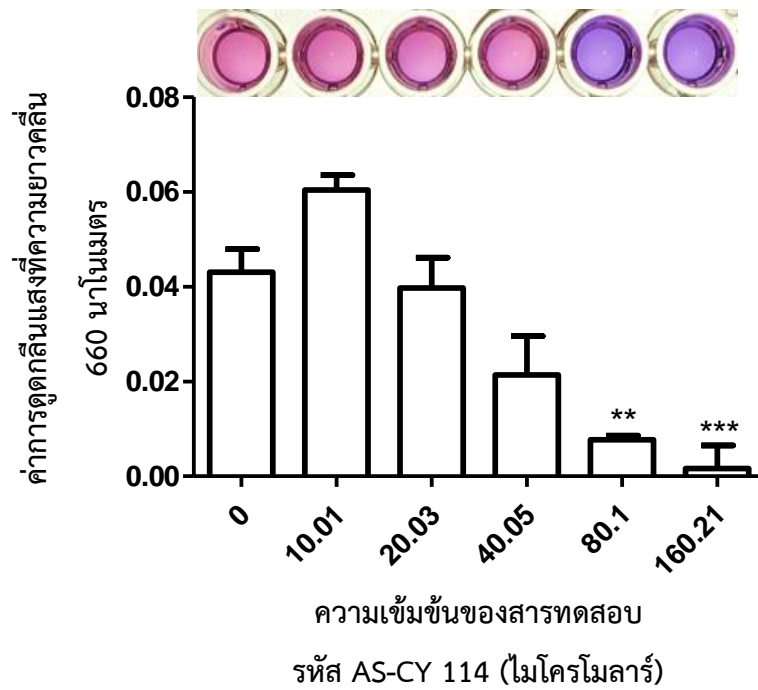
3.2.1) การหาค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II (Minimum effective concentration : MEC) ของสารทดสอบในกลุ่มสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทยรหัส AS-CY

จากผลการคัดกรองชั้นทุติยภูมิหาค่า Minimum effective concentration (MEC) ของสารออกฤทธิ์ในกลุ่มสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทยรหัส AS-CY โดยการนำสารทดสอบที่ให้ผลบวกจากการคัดกรองชั้นปฐมภูมิจำลองแบบอนุกรม 2 เท่า โดยเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กระทั่งได้ความเข้มข้นของสารทดสอบเท่ากับ 3.13 หรือ 0.31 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อสารทดสอบที่ให้ผลบวกในชั้นปฐมภูมิมิฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของยีสต์บ่งชี้ที่ความเข้มข้น 50 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับจำนวน 8 ตัวอย่าง บ่มร่วมกับเซลล์แขวนลอยของยีสต์สายพันธุ์กลายที่ความเข้มข้น 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน 96-well microtiter plate บ่มภายใต้ภาวะที่มีความเข้มข้น CO_2 ต่ำ (0.035%) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงวัดการเจริญของยีสต์บ่งชี้ที่บ่มร่วมกับสารทดสอบด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD_{660}) เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสารทดสอบที่มีต่อเซลล์ยีสต์บ่งชี้ ควบคู่ไปกับการพิจารณาสีของสารละลาย Resazurin พบว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทยชนิดต่างๆ จำนวน 5 ตัวอย่างมีความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของ hCA II ได้อยู่ในช่วงระหว่าง 2.5 – 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 3.1 และตารางที่ 3.3) โดยสารทดสอบที่มีค่า MEC ต่ำที่สุดคือ สารทดสอบรหัส AS-CY 107 (ตารางที่ 3.3)

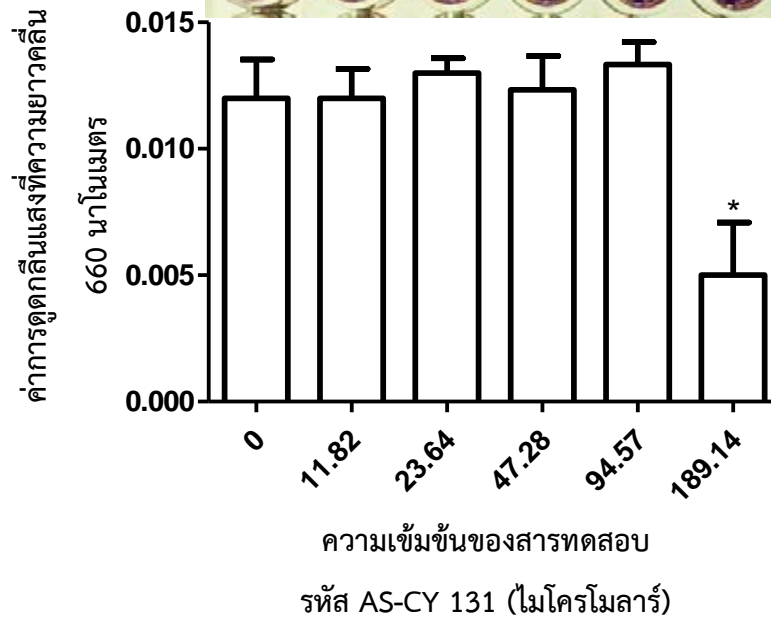
A)



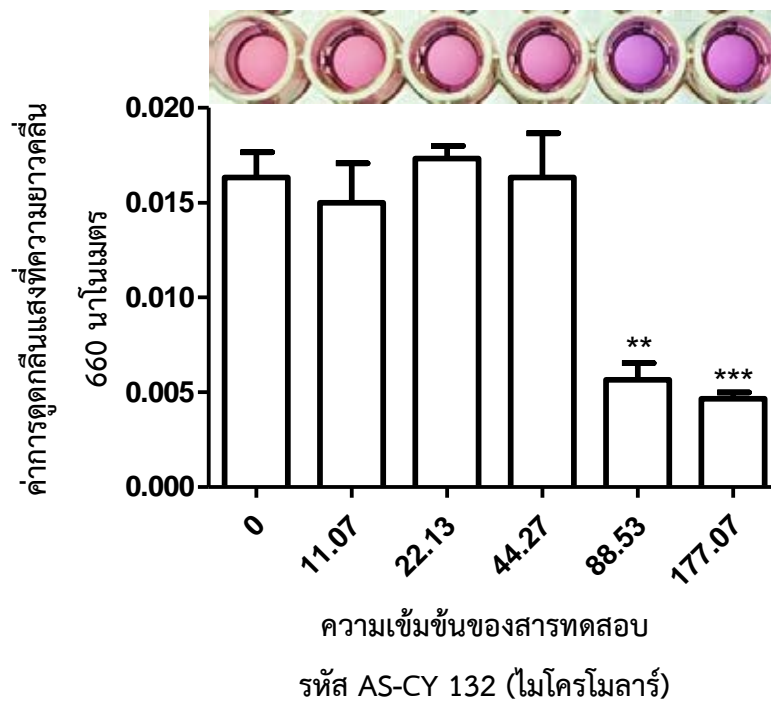
B)

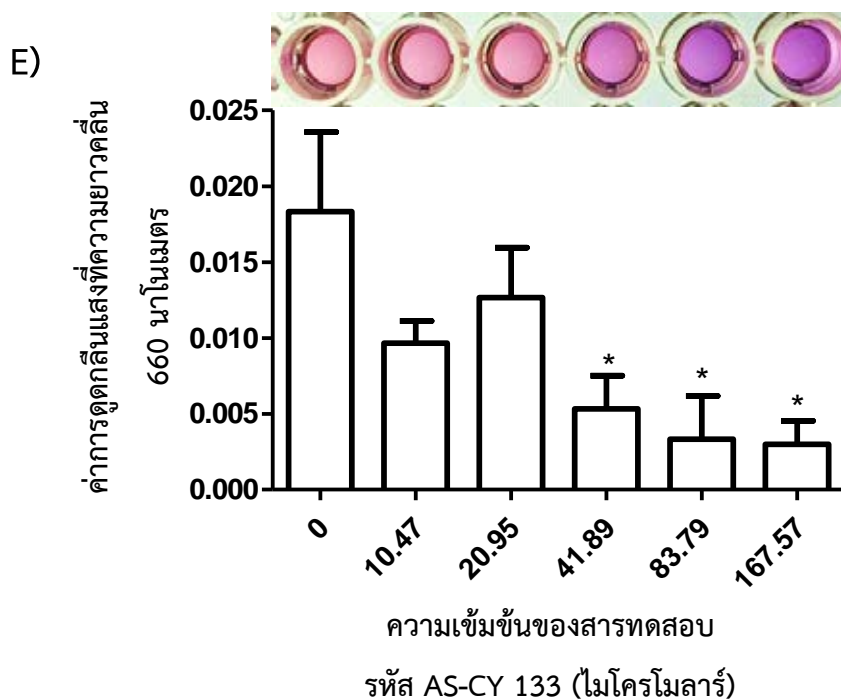


C)



D)





รูปที่ 3.1 ผลของการทดสอบของสารทดสอบชนิดสารบริสุทธิ์ที่ให้ผลบวกต่อฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II โดยวิธี Yeast-based high throughput screening

ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ $\Delta nce103$ (pGAL1_hCAII) ถูกเพาะเลี้ยงใน 96-well microtiter plate ร่วมกับสารทดสอบรหัส AS-CY 107 (A) 114 (B) 131 (C) 132 (D) และ 133 (E) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะความดันบรรยากาศ (มีความเข้มข้น CO_2 ต่ำ, 0.035%) โดยการเจริญของยีสต์บ่งชี้จะวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD_{660}) พิจารณาควบคู่กับการเปลี่ยนสีของ Resazurin ของสารทดสอบเทียบกับชุดควบคุมผลลบ (ไม่มีสารทดสอบ)

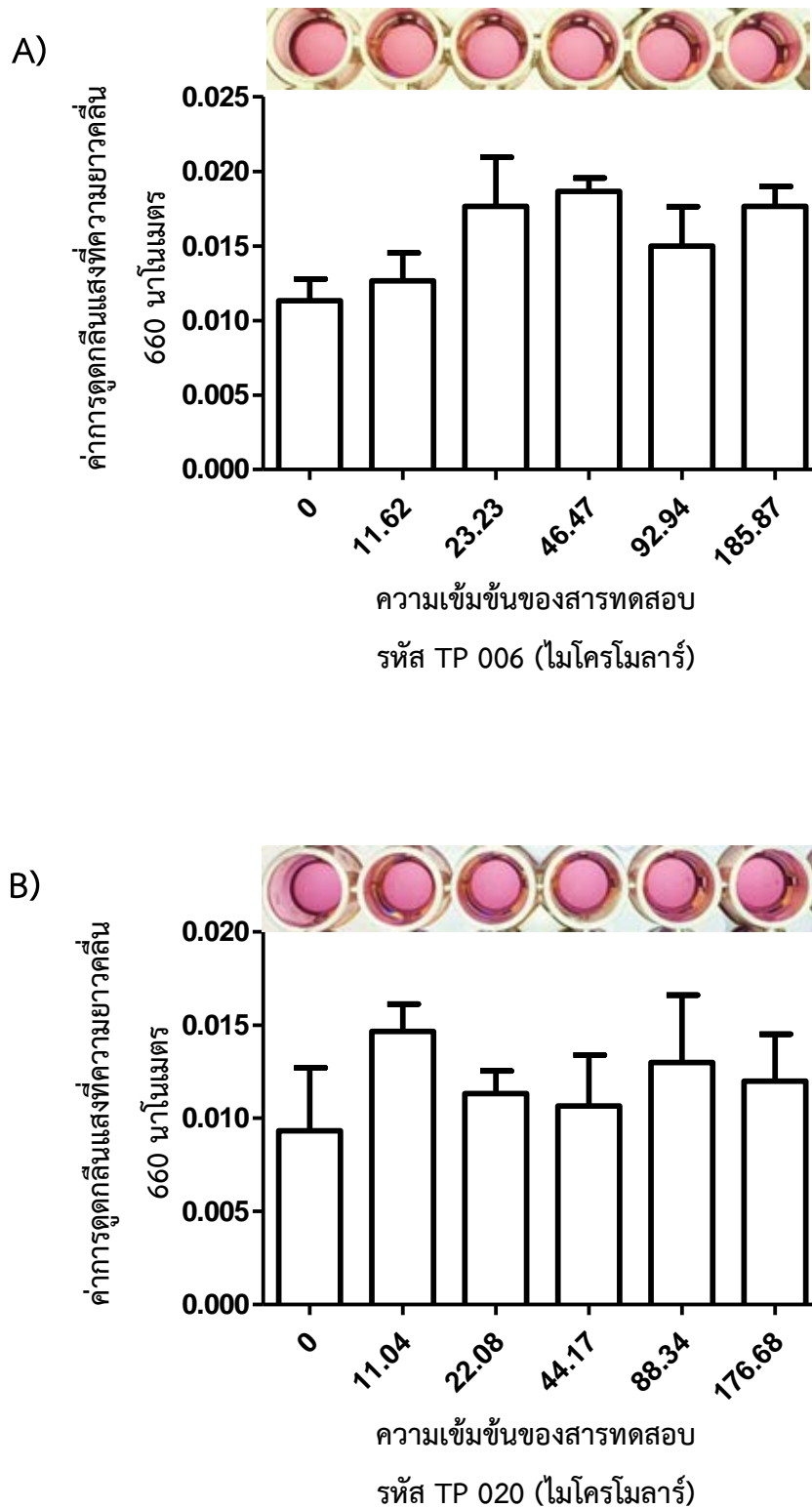
***, ** และ * หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.001$, $P \leq 0.05$ และ $P \leq 0.5$ ตามลำดับ

ตารางที่ 3.3 แสดงค่า MEC ของสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ของกลุ่มสารบริสุทธิ์ที่ให้ผลบวกโดยวิธี Yeast-based high throughput screening ในเซลล์บ่งชี้

ลำดับที่	รหัสของสารทดสอบ	MEC (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	AS-CY 107	2.5
2	AS-CY 114	25
3	AS-CY 131	50
4	AS-CY 132	25
5	AS-CY 133	12.5

3.2.2) การหาค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II (Minimum effective concentration : MEC) ของสารทดสอบในกลุ่มสารสังเคราะห์รหัส TP

จากการทดสอบหาค่า Minimal effective concentration (MEC) ของสารทดสอบที่เป็นชนิดสารสังเคราะห์รหัส TP จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้ใช้วิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 ผลการทดสอบพบว่าสารทดสอบทั้ง 2 ตัวอย่างไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของยีสต์บ่งชี้ การหาค่า MEC ทำได้โดยการพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ยีสต์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD_{660}) (ตารางที่ 3.4) ควบคู่กับการพิจารณาสีของสารละลาย Resazurin เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารทดสอบ (รูปที่ 3.2)



รูปที่ 3.2 ผลของการทดสอบของสารทดสอบชนิดสารสังเคราะห์ที่ให้ผลบวกต่อฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของ เอนไซม์ hCA II โดยวิธี Yeast-based high throughput screening

ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ $\Delta nce103$ (pGAL1_hCAII) ถูกเพาะเลี้ยงใน 96-well microtiter plate ร่วมกับสารทดสอบรหัส TP 006 (A) และ TP 020 (B) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะความดันบรรยากาศ (มีความเข้มข้น CO₂ ต่ำ, 0.035%) โดยการเจริญของยีสต์บ่งชี้จะวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD₆₆₀) พิจารณาควบคู่กับการเปลี่ยนสีของ Resazurin ของสารทดสอบ เทียบกับชุดควบคุมผลลบ (ไม่มีสารทดสอบ)

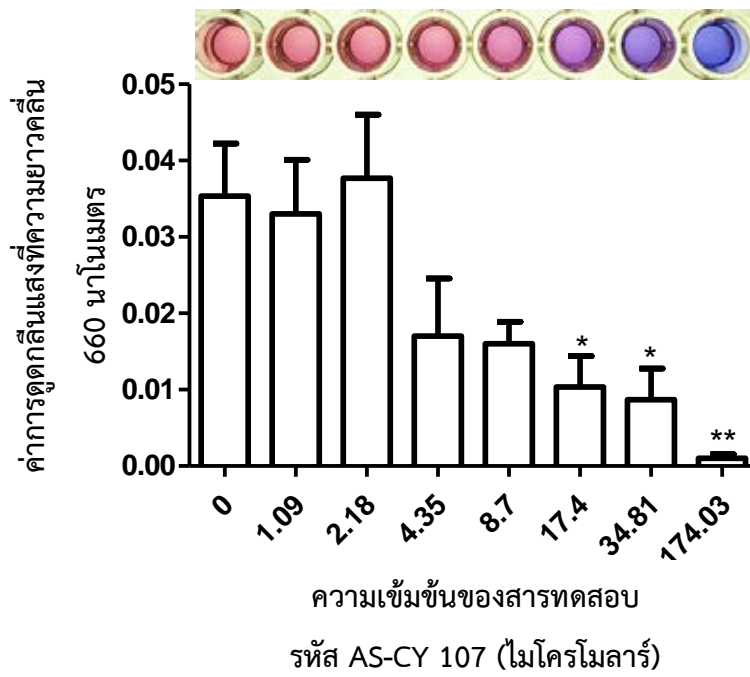
ตารางที่ 3.4 แสดงค่า MEC ของสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ของกลุ่มสารสังเคราะห์ที่ให้ผลบวกโดยวิธี Yeast-based high throughput screening ในเซลล์ยีสต์บ่งชี้

ลำดับที่	รหัสของสารทดสอบ	MEC (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	TP 006	>185.87
2	TP 020	>176.68

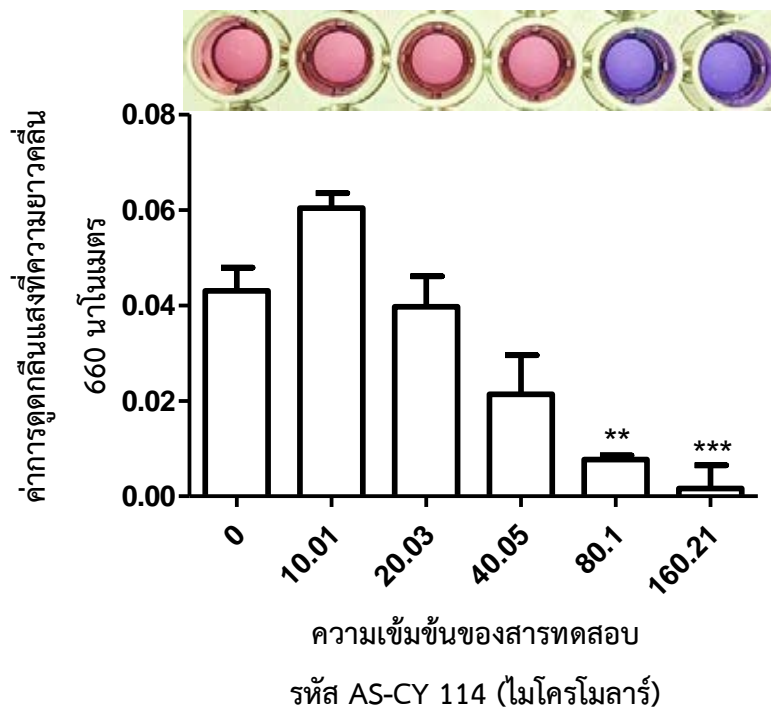
3.2.3) การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่เป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์บ่งชี้ (Minimum toxic concentration : MTC) ของสารทดสอบในกลุ่มสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทย รหัส AS-CY

การทดสอบความเป็นพิษของสารที่ให้ผลบวกต่อฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II จากสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทยชนิดต่างๆจำนวนทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ใช้วิธีทดสอบเดียวกันกับข้อ 3.2.1 แต่บ่มที่ภายใต้ภาวะที่มีความเข้มข้น CO₂ สูง (5%) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นอ่านผลด้วยการเติมสารละลาย Resazurin แล้วนำไปบ่มในที่มืด ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีของ Resazurin หลังบ่มในที่มืดเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ผลการทดสอบพบว่าช่วงความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารทดสอบรหัส AS-CY จำนวน 5 ตัวอย่าง ที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์บ่งชี้จะอยู่ในช่วงระหว่าง 5 - 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3.4) โดยการวัดการเจริญของยีสต์บ่งชี้ที่บ่มร่วมกับสารทดสอบที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD₆₆₀) ควบคู่กับการพิจารณาสีของสารละลาย Resazurin ซึ่งหากเป็นสีน้ำเงินไม่เปลี่ยนแปลง แสดงถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์ หากสารทดสอบไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์บ่งชี้ Resazurin จะเปลี่ยนเป็นสีชมพู จากสารทดสอบที่มีค่า MEC ต่ำที่สุด (ตารางที่ 3.6) เมื่อเปรียบเทียบกับสารทดสอบอื่นๆที่ให้ผลบวกในกลุ่มสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทยชนิดต่างๆ ได้แก่ สารทดสอบรหัส AS-CY 107 พบว่ามีค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์บ่งชี้เท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3.5)

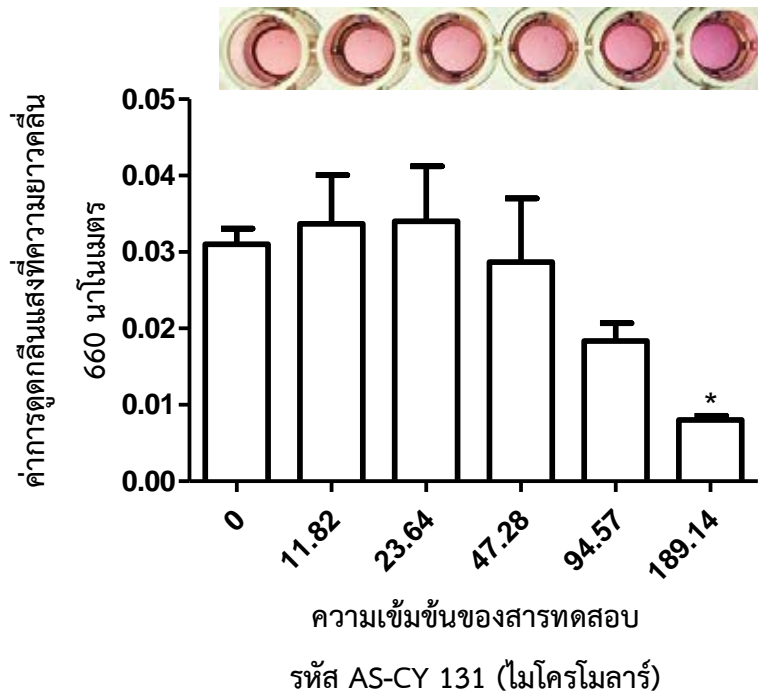
A)



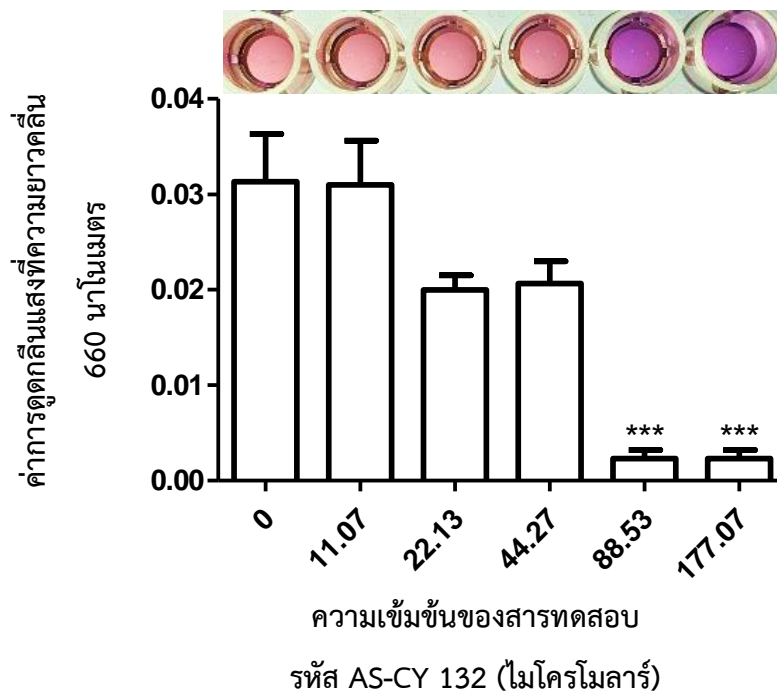
B)

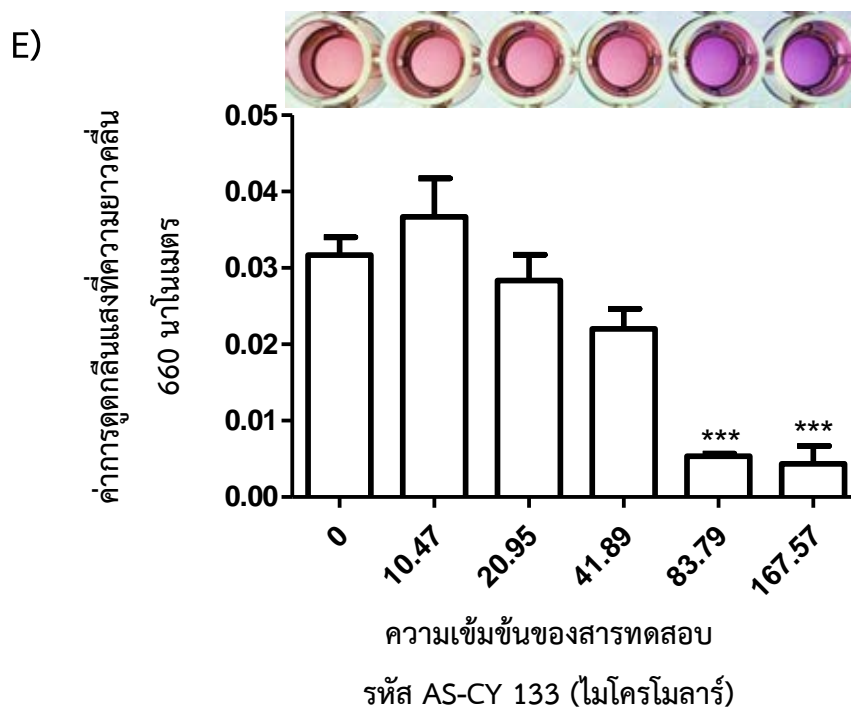


C)



D)





รูปที่ 3.3 ผลของการทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบชนิดสารบริสุทธิ์ที่ให้ผลบวกต่อฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II โดยวิธี Yeast-based high throughput screening

ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ $\Delta nce103$ (pGAL1_hCAII) ถูกเพาะเลี้ยงใน 96-well microtiter plate ร่วมกับสารทดสอบรหัส AS-CY 107 (A) 114 (B) 131 (C) 132 (D) และ 133 (E) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะความดันบรรยากาศ (มีความเข้มข้น CO_2 สูง, 5%) โดยการเจริญของยีสต์บ่งชี้จะวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD_{660}) พิจารณาควบคู่กับการเปลี่ยนสีของ Resazurin ของสารทดสอบ เทียบกับชุดควบคุมผลลบ (ไม่มีสารทดสอบ)

***, ** และ * หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.001$, $P \leq 0.05$ และ $P \leq 0.5$ ตามลำดับ

ตารางที่ 3.5 แสดงค่า MTC ของสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ของกลุ่มสารบริสุทธิ์ที่ให้ผลบวกโดยวิธี Yeast-based high throughput screening ในเซลล์ยีสต์บ่งชี้

ลำดับที่	รหัสของสารทดสอบ	MTC (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	AS-CY 107	5
2	AS-CY 114	25
3	AS-CY 131	50
4	AS-CY 132	25
5	AS-CY 133	25

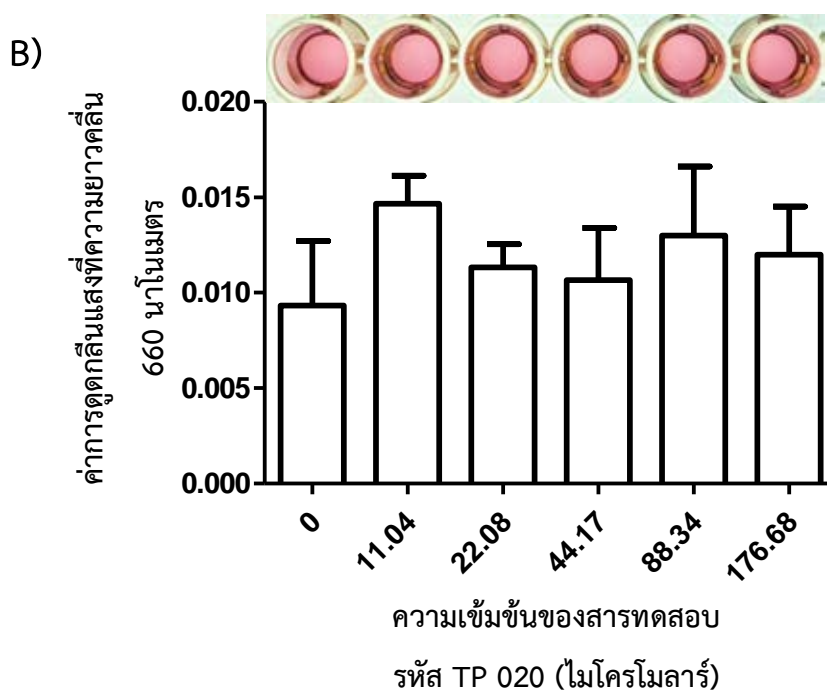
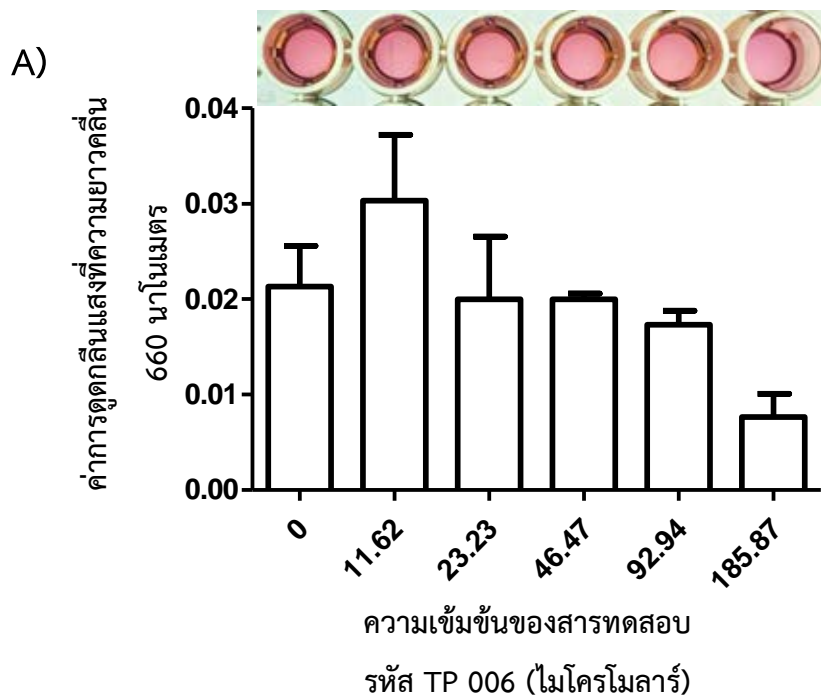
ตารางที่ 3.6 เปรียบเทียบค่า MEC และ MTC ของสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ของกลุ่มสารบริสุทธิ์ที่ให้ผลบวกโดยวิธี Yeast-based high throughput screening ในเซลล์ยีสต์บ่งชี้

ลำดับที่	รหัสของสารทดสอบ	MEC (ไมโครโมลาร์)	MTC (ไมโครโมลาร์)
1	AS-CY 107	8.7	17.4
2	AS-CY 114	80.1	80.1
3	AS-CY 131	189.14	189.14
4	AS-CY 132	88.53	88.53
5	AS-CY 133	41.89	83.79

3.2.4) การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่เป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์บ่งชี้ (Minimum toxic concentration : MTC) ของสารทดสอบในกลุ่มสารสังเคราะห์รหัส TP

จากการทดสอบหาค่า Minimal toxic concentration (MTC) ของสารออกฤทธิ์ในกลุ่มสารสังเคราะห์รหัส TP จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้ใช้วิธีการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.2.3 การหาค่า MTC ทำได้จากการพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ยีสต์บ่งชี้ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD_{660}) ควบคู่กับการพิจารณาสีของสารละลาย Resazurin (รูปที่ 3.4)

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของ hCA II ของสารสังเคราะห์ที่ให้ผลบวกจากการคัดกรองขั้นปฐมภูมิ เมื่อนำมาทดสอบขั้นทุติยภูมิกลับไม่พบว่าฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของ hCA II ในเซลล์ยีสต์บ่งชี้ (รูปที่ 3.2, ตารางที่ 3.4) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบทั้ง 2 ตัวอย่าง (TP 006 และ TP 020) ซึ่งพบว่าสารทั้งสองไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์บ่งชี้ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบ (รูปที่ 3.4, ตารางที่ 3.7)



รูปที่ 3.4 ผลของการทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบชนิดสารสังเคราะห์ที่ให้ผลบวกต่อฤทธิ์ยับยั้ง
กิจกรรมของเอนไซม์ hCA II โดยวิธี Yeast-based high throughput screening

ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ $\Delta nce103$ (pGAL1_hCAII) ถูกเพาะเลี้ยงใน 96-well microtiter plate ร่วมกับสารทดสอบรหัส TP 006 (A) และ 020 (B) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะความดันบรรยากาศ (มีความเข้มข้น CO₂ สูง, 5%) โดยการเจริญของยีสต์บ่งชี้จะวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD₆₆₀) พิจารณาควบคู่กับการเปลี่ยนสีของ Resazurin ของสารทดสอบ เทียบกับชุดควบคุมผลลบ (ไม่มีสารทดสอบ)

ตารางที่ 3.7 แสดงค่า MTC ของสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ของกลุ่มสารสังเคราะห์ที่ให้ผลบวกโดยวิธี Yeast-based high throughput screening ในเซลล์ยีสต์บ่งชี้

ลำดับที่	รหัสสารทดสอบ	MTC (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	TP 006	>185.87
2	TP 020	>176.68

ตารางที่ 3.8 แสดงค่า MEC และ MTC ของสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ของกลุ่มสารสังเคราะห์ที่ให้ผลบวกโดยวิธี Yeast-based high throughput screening ในเซลล์ยีสต์บ่งชี้

ลำดับที่	รหัสของ สารทดสอบ	MEC (ไมโครโมลาร์)	MTC (ไมโครโมลาร์)
1	TP 006	>185.87	>185.87
2	TP 020	>176.68	>176.68

3.3) การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ที่ในหลอดทดลอง (*In vitro*) ด้วยวิธีวัดกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอเรส (Esterase activity assay)

การวัดกิจกรรมเอสเทอเรส (Esterase activity) เป็นการตรวจสอบการดำเนินไปของปฏิกิริยาของสารตั้งต้นที่มีชื่อว่า 4-Nitrophenylacetate (NPA) จนเกิดเป็น 4-Nitrophenylate ion ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร Esterase activity assay สามารถนำมาใช้ในการทดสอบสารที่มีคุณสมบัติเป็น CAI ในหลอดทดลอง (*In vitro* assay) ได้ (Uda และคณะ, 2015) โดยในงานวิจัยนี้ได้ใช้วิธีดังกล่าวในการทดสอบฤทธิ์ของสารที่ให้ค่า MEC ต่ำกว่า MTC ได้แก่ ตัวอย่างรหัส AS-CY 107 และ 133 จากการทดสอบด้วย Yeast-based assay เพื่อศึกษาว่าสารที่ให้ผลบวกดังกล่าวจะมีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ในหลอดทดลองด้วยหรือไม่ จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารและกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II (Dose response curve) (ภาคผนวก ค) พบว่าสารทดสอบรหัส AS-CY 107 และ 133 มีค่าความเข้มข้นสูงสุดของสารออกฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ที่ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 19.41 ไมโครโมลาร์ และ 162 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3.9)

ตารางที่ 3.9 แสดงค่า MEC MTC และ IC_{50} ของสารออกฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II รหัส AS-CY 107 และ AS-CY 133

ลำดับที่	รหัสของสารทดสอบ	MEC (ไมโครโมลาร์)	MTC (ไมโครโมลาร์)	IC_{50} (ไมโครโมลาร์)
1	AS-CY 107	8.7	17.4	19.41
2	AS-CY 133	41.89	83.79	162

บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

ระบบคัดกรองฐานยีสต์ที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้รับการพัฒนามาจาก Sangkaew และคณะ ในปี 2018 ซึ่งมีการใช้ยีสต์ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรม สายพันธุ์ AS03 เป็นเซลล์บ่งชี้ที่ถูกทำลายยีน *NCE103* ($\Delta nce103$) ที่มีพลาสมิด *pGAL1.1_hCAII* โดยยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าว เมื่อถูกเลี้ยงภายใต้ภาวะที่ชักนำให้มีการแสดงออกของ เอนไซม์ hCA II จะสามารถมีชีวิตรอดได้ ทั้งนี้เนื่องจากการแสดงออกของเอนไซม์ hCA II สามารถช่วยทดแทน กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (*NCE103*) ของยีสต์ที่ขาดไปได้

งานวิจัยนี้จึงต่อยอดงานวิจัยของ Sangkaew และคณะ ในปี 2018 โดยการนำระบบคัดกรองดังกล่าว มาใช้คัดกรองสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทยชนิดต่างๆ (รหัสสารทดสอบ AS-CY) จำนวน 33 ตัวอย่าง และสารสังเคราะห์ (รหัสสารทดสอบ TP) จำนวน 15 ตัวอย่าง

ระบบคัดกรองฐานยีสต์นี้ ถูกนำมาใช้ในการคัดกรองขั้นปฐมภูมิ เพื่อให้ทราบโดยคร่าวถึงฤทธิ์ยับยั้ง กิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ในเซลล์ยีสต์บ่งชี้ของสารทดสอบจำนวนทั้งสิ้น 48 ตัวอย่าง จากนั้นจึงใช้ระบบคัด กรองฐานยีสต์ในการศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของสารที่ให้ผลบวก ได้แก่ การหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ สารทดสอบมีประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II (Minimum effective concentration : MEC) โดยบ่ม 96-well microtiter plate ภายใต้ภาวะความดันบรรยากาศที่มีความเข้มข้น CO₂ ต่ำ (0.035%) ควบคู่ไปกับหาความเข้มข้นที่เป็นพิษของสารที่ให้ผลบวกต่อเซลล์ยีสต์บ่งชี้ (Minimum toxic concentration : MTC) โดยบ่ม 96-well microtiter plate ภายใต้ภาวะความดันบรรยากาศที่มีความเข้มข้น CO₂ สูง (5%) เพื่อยืนยันฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ของสารทดสอบที่พบจากการคัดกรองขั้นปฐมภูมิ

ผลการคัดกรองสารทดสอบในกลุ่มสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทยจำนวน 33 ตัวอย่าง โดยใช้ ระบบคัดกรองฐานยีสต์ พบสารทดสอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ยีสต์บ่งชี้จำนวน 5 ตัวอย่าง โดยสาร ทดสอบรหัส AS-CY 107 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ hCA II ได้ดีที่สุดในแง่ของค่า MEC เท่ากับ 8.7 ไมโครโมลาร์ และค่า MTC เท่ากับ 17.4 ไมโครโมลาร์ ซึ่งต่ำกว่าค่า MEC และ MTC ของสารทดสอบรหัส AS-CY 133 ถึง 5 เท่า ในขณะที่สารทดสอบรหัส AS-CY 114 131 และ 132 มีค่า MEC เท่ากับค่า MTC ซึ่ง หมายความว่าสารเหล่านี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์บ่งชี้

ส่วนสารทดสอบในกลุ่มสารสังเคราะห์จำนวน 15 ตัวอย่าง ในขั้นปฐมภูมิพบผลบวกจำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ TP 006 และ TP 020 แต่เมื่อนำมาศึกษาลักษณะสมบัติของสารออกฤทธิ์ กลับไม่พบผลบวกของสาร ทดสอบทั้งสองตัวอย่าง ทั้งนี้สาร TP 006 และ TP 020 ก็ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์บ่งชี้ในความเข้มข้น สูงสุดที่ทดสอบเช่นกัน จากผลที่ได้นี้ ผู้วิจัยคาดว่าสารทดสอบในกลุ่มสารสังเคราะห์รหัส TP 006 และ TP 020 อาจไม่เสถียรภายหลังการละลาย อย่างไรก็ตาม ข้อมูลที่ได้จะช่วยเป็นแนวทางในการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ ต่อไป

เพื่อยืนยันผลการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ในเซลล์ยีสต์บ่งชี้ จึงตรวจสอบความสามารถของสารทดสอบที่ให้ผลบวกจากการทดสอบฐานยีสต์ โดยทดสอบความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ Esterase ในหลอดทดลอง (*In vitro* assay) ในการทดสอบได้คัดเลือกสารออกฤทธิ์รหัส AS-CY 107 และ 133 เพื่อมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นสูงสุดของสารออกฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ที่ 50% (IC_{50}) จาก Dose response curve พบว่าสารทดสอบรหัส AS-CY 107 และ 133 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 19.41 ไมโครโมลาร์ และ 162 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารทดสอบรหัส AS-CY 107 มีศักยภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II ได้ดีกว่าสารทดสอบรหัส AS-CY 133 และเมื่อพิจารณาค่า MEC เปรียบเทียบกับค่า IC_{50} ของสารทดสอบที่ให้ผลบวก พบว่าทั้งสารทดสอบรหัส AS-CY 107 และ AS-CY 133 มีค่า MEC และ IC_{50} ที่ใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นถึงควมมีประสิทธิภาพของระบบคัดกรองฐานยีสต์ที่ใช้ในการทดสอบ เนื่องจากเซลล์ยีสต์บ่งชี้ที่ใช้ในการทดลองถูกดัดแปลงพันธุกรรมโดยการถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการดีออกซา อาทิจีน ยีนที่เกี่ยวข้องกับการนำสารออกจากภายในเซลล์ และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์องค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น ส่งผลให้สารทดสอบสามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ในปริมาณมากได้

ผลจากงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นองค์ความรู้เพื่อพัฒนากลุ่มอนุพันธ์ของสารทดสอบเพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

นางสาวชมพูนุท พรหมภักดี, บทความวิชาการเรื่อง การเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุของประเทศไทย (Aging society in Thailand). สิงหาคม 2556. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:
http://library.senate.go.th/document/Ext6078/6078440_0002.PDF [19 เมษายน 2562]

ภาษาอังกฤษ

- Arabaci, B., Gulcin, I., and Alwasel, S. (2014). Capsaicin: A Potent Inhibitor of Carbonic Anhydrase Isoenzymes. *Molecules*, 19(7), 10103-10114. doi: 10.3390/molecules190710103.
- Barberis, A., Gunde, T., Berset, C., Audetat, S., and Luthi, U. (2005). Yeast as a screening tool. *Drug Discovery Today: Technologies*, 2(2), 187-192. doi: 10.1016/j.ddtec.2005.05.022.
- Clark, D., Rowlett, R. S., Coleman, J. R., and Klessig, D. F. (2004). Complementation of the yeast deletion mutant Delta NCE103 by members of the beta class of carbonic anhydrases is dependent on carbonic anhydrase activity rather than on antioxidant activity. *Biochem Journal*, 379(3), 609-615. doi: 10.1042/BJ20031711.
- Guedes, G., Tsai, J. C., and Loewen, N. A. (2011). Glaucoma and aging. *Current Aging Science*, 4(2), 110-117. doi: 10.2174/1874609811104020110.
- Jakubowski, M., Szahidewicz-Krupska, E., and Doroszko, A. (2018). The Human Carbonic Anhydrase II in Platelets: An Underestimated Field of Its Activity. *BioMed Research International*, 213, 50-556. doi: 10.1155/2018/4548353.
- Karioti, A., Ceruso, M., Carta, F., Bilia, A. R., and Supuran, C. T. (2015). New natural product carbonic anhydrase inhibitors incorporating phenol moieties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(22), 7219-7225. doi: 10.1016/j.bmc.2015.10.018.
- Mckenna, R., and Supuran, C. T. (2014). Carbonic anhydrase inhibitors drug design. *Subcellular Biochemistry*, 75, 291-323. doi: 10.1007/978-94-007-7359-2_15.
- Petrovic, K., Pfeifer, M., Parker C. N., Schuierer, S., Tallarico, J., Hoepfner, D., Movva, N. R., Scheel, G., and Helliwell, S. B. (2017). Two low complexity ultra-high throughput methods to identify diverse chemically bioactive molecules using *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Research*, 199, 10-18. doi: 10.1016/j.micres.2017.02.004.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., et al. (2013). Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual*, 357-387. Retrieved April 20, 2019, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196>

- Sangkaew, A., Krungkrai, J., and Yompakdee, C. (2018). Development of a high throughput yeast-based screening assay for human carbonic anhydrase isozyme II inhibitors. *SpringerOpen*, 8(1), 124. doi: 10.1186/s13568-018-0653-9.
- Scozzafava, A., and Supuran, C.T. (2014). Glaucoma and the Applications of Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Subcellular Biochemistry*, 75, 349-359. doi: 10.1007/978-94-007-7359-2_17.
- Sentürk, M., Gülçin, I., Beydemir, S., Küfrevioğlu, O. I., and Supuran, C. T. (2011). *In Vitro* inhibition of human carbonic anhydrase I and II isozymes with natural phenolic compounds. *Chemical Biology & Drug Design*, 77(6), 494-499. doi: 10.1111/j.1747-0285.2011.01104.
- Supuran, C. T. (2008). Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature review Drug discovery*, 7(2), 168-181. doi: 10.1038/nrd2467.
- Uda, N. R., Seibert, V., Stenner-Liewen, F., Müller, P., Herzig, P., Gondi, G., Zeidler, R., Dijk, M. V., Zippelius, A., and Renner C. (2015). Esterase activity of carbonic anhydrases serves as surrogate for selecting antibodies blocking hydratase activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30(6), 955-960. doi: 10.3109/14756366.2014.1001754.
- Wang, W., Qian, X., Song, H., Zhang, M., and Liu, Z. (2016). Fluid and structure coupling analysis of the interaction between aqueous humor and iris. *Biomedical Engineering Online*, 15(2), 133. doi: 10.1186/s12938-016-0261-3.

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Yeast synthetic uracil and tryptophan dropout medium +1% Raffinose (SR-Ura-Trp)

Yeast nitrogen base without amino acid	6.7 กรัม
Raffinose	10 กรัม
Adenine	2 กรัม
Leucine	10 กรัม
Histidine	10 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Yeast peptone dextrose (YPD) medium

Yeast extract	6.7 กรัม
Peptone	20 กรัม
Glucose	20 กรัม
Agar	20 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลาย Na_2SO_4 เข้มข้น 1 M

ละลายผง Na_2SO_4 น้ำหนัก 7.1 กรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2. สารละลาย 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) เข้มข้น 1 M pH 7.5

ละลายผง MOPS น้ำหนัก 10.463 กรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่า pH ของสารละลายให้ได้เท่ากับ 7.5

3. สารละลาย Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) เข้มข้น 1 M

ละลายผง EDTA น้ำหนัก 14.61 กรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 50 มิลลิลิตร

4. Assay buffer

สารละลาย Na_2SO_4 เข้มข้น 1 M 1 มิลลิลิตร

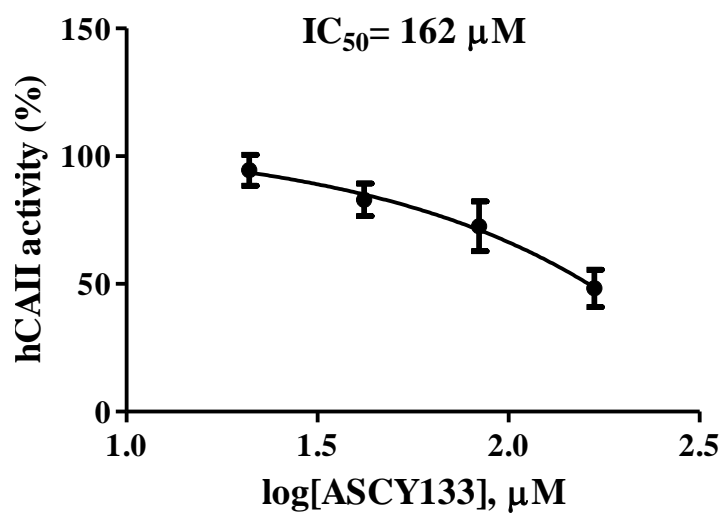
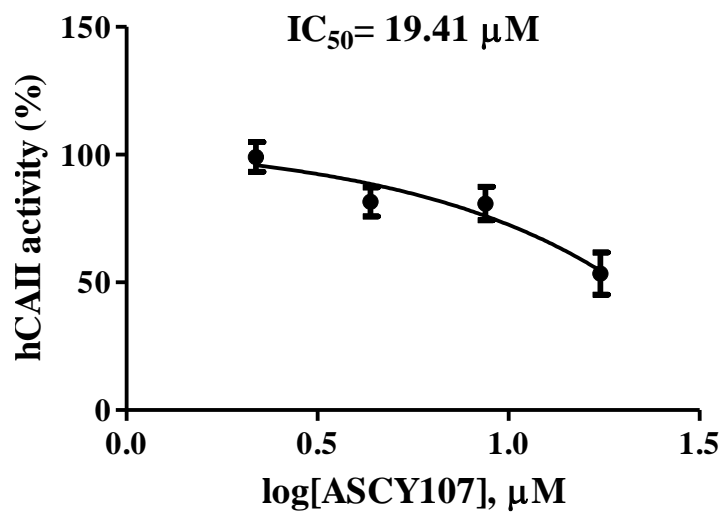
สารละลาย MOPs เข้มข้น 1 M, pH 7.5 1.5 มิลลิลิตร

สารละลาย EDTA เข้มข้น 1 M 60 ไมโครลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตรกรองด้วย Membrane filter ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 μm

ภาคผนวก ค

Dose response curve



แสดงค่าความเข้มข้นสูงสุดของสารออกฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hCA II
ที่ 50% (IC_{50}) ของสารทดสอบรหัส AS-CY 107 และ AS-CY 133