การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5α-Reductase

ชื่อตัวอย่าง	: Vitralplus และ Zaminzyme และสารสกัด Kerra
รูปแบบผลิตภัณฑ์	: แคปซูล ในกระปุกพลาสติก
ลักษณะทางกายภาพ	: ผง และ สารสกัดของเหลว
วันที่รับตัวอย่าง	: 9 พฤษภาคม 2567
วันที่ทดสอบ	: 3 กรกฎาคม 2567
ผู้ทำการทดลอง	: ณัฐนรี คุ้มศิริ

ขั้นตอนการทดสอบ

1. เตรียม stock สารตัวอย่าง ชั่ง 0.1g ละลายด้วยตัวทำละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO) จนมีความเข้มข้น 100 mg/mL แล้วเตรียมสารละลายของตัวอย่าง (Vitalplus, Zaminzyme และสารสกัด Kerra) และยา Finasteride ที่ความเข้มข้น 50 µg/mL และ 5 µg/mL โดยเจือจางด้วย 1X buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM KCl และ 1 mM EDTA) จนในสารละลายมีความเข้มข้นของเปอร์เซ็นต์ DMSO ต่ำกว่า 10%
2. ทดสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 5α- Reductase เริ่มจากปฏิกิริยาของ Sample เติมสารละลายของตัวอย่าง ปริมาตร 2 µL ลงในหลุมของ 96 well plate transparent ตามด้วย 1X buffer ปริมาตร 83 µL และต่อด้วยเอนไซม์ 1.5 mg/mL 5α- Reductase ปริมาตร 10 µL เติมฮอร์โมน 5µM Testosterone ปริมาตร 10 µL และสารละลาย 1 mM β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Tetrasodium Salt reduced form (β-NADPH) ปริมาตร 5 µL

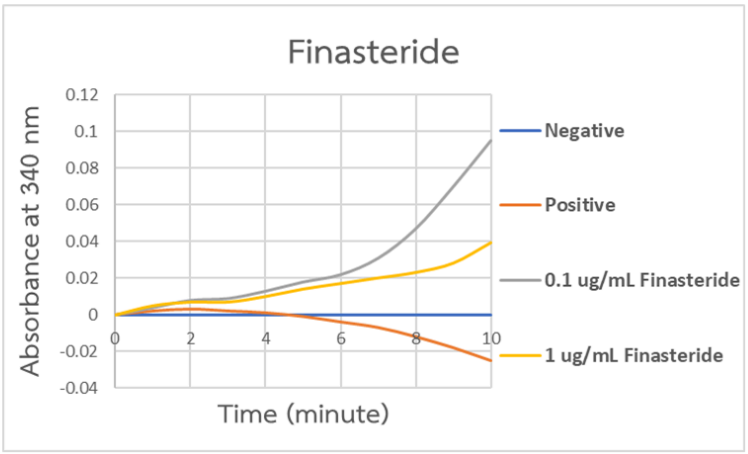
3. ปฏิกิริยาของ Positive จะคล้ายกับข้อ 3 แต่ต่างกันที่เติม 1X buffer ปริมาตร 2µL แทนสารละลายของตัวอย่าง และปฏิกิริยาของ Negative จะเติม 1X buffer อีก 10 µL แทนเอนไซม์ 5α- Reductase
4. เมื่อหยอดสารครบแล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader เป็นเวลา 20 นาที ทุก 1 นาที
5. สร้างกราฟเส้น และหาค่า %Relative inhibition

ผลการทดลอง

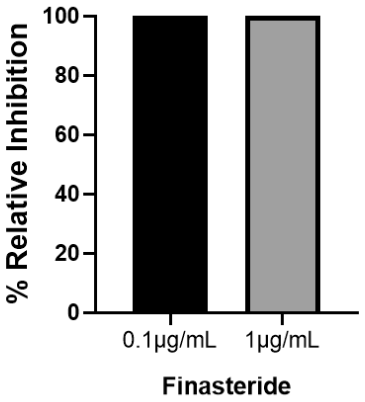
การหาฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5α- Reductase ของสารละลาย Vitralplus, สารละลาย Zaminzyme และสารละลายของสารสกัด Kerra ที่ช่วยลดการนำ NADPH ไปใช้เพื่อเปลี่ยนฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (testosterone) กลายเป็นฮอร์โมนไดไฮโดรเทสโทสเตอโรน (dihydrotestosterone หรือ DHT) ซึ่งฮอร์โมน DHT เป็นฮอร์โมนที่ทำให้รูขุมขน บริเวณหนังศีรษะเล็กลงและเส้นผมที่ผลิตขึ้นมีลักษณะบางและสั้น จึงเกิดอาการผมบางและหลุดร่วงได้

การทดลองพบว่ากราฟของ Positive บ่งบอกถึงการที่เอนไซม์ 5α-Reductase นำ NADPH ไปใช้ ทำให้ปริมาณของ NADPH ที่วัดได้ลดลงทำให้ความชันของเส้นลง คิดเป็น 0% relative inhibition ส่วนกราฟของ Negative บ่งบอกถึงการที่สภาวะที่ใช้ทดสอบไม่ส่งผลต่อ NADPH ทำให้ความชันไม่เปลี่ยนแปลง คิดเป็น 100% relative inhibition และกราฟของสารละลายยา Finasteride (ภาพที่ 1) และสารละลาย Vitalplus (ภาพที่ 3) และสารละลายของสารสกัด Kerra (ภาพที่ 4) ที่ความเข้มข้น 0.1 μg/mL และ 1 μg/mL ในปฏิกิริยา พบว่าทุกกราฟที่กล่าวมามีความชันสูงกว่าเส้นของ Positive และเส้นของ Negative แสดงว่าสารละลายยา Finasteride สารละลาย Vitalplus และสารละลายของสารสกัด Kerra มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5α- Reductase สูงกว่า 100% relative inhibition แต่สารละลาย Zaminzyme (ภาพที่ 2) ความเข้มข้น 0.1 μg/mL และ 1 μg/mL ในปฏิกิริยา พบว่าทั้ง 2 กราฟมีความชันสูงกว่าเส้นของ Positive และต่ำกว่าเส้นของ Negative คิดเป็น 48% และ16% relative inhibition ตามลำดับ

A

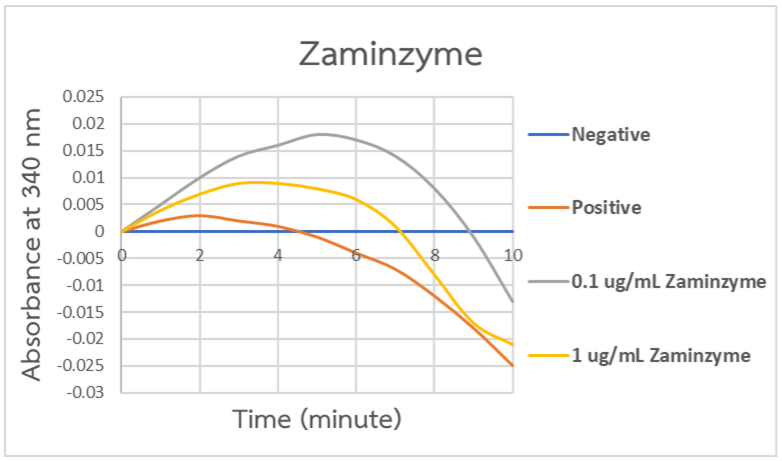


B

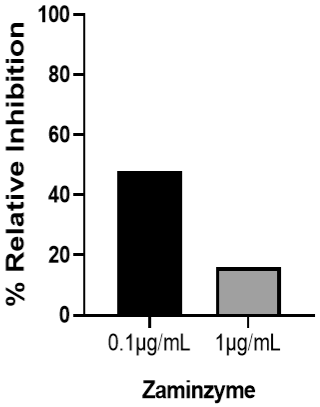


ภาพที่ 1 A: กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ NADPH ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ระยะเวลา 10 นาที ของการเกิดการทำงานของเอนไซม์5α- Reductase ของยา Finasteride, **B**: กราฟแสดงความความสัมพันธ์ระหว่าง %relative inhibition กับความเข้มข้นของยา Finasteride ที่ 0.1µg/mL และ 1µg/mL

A

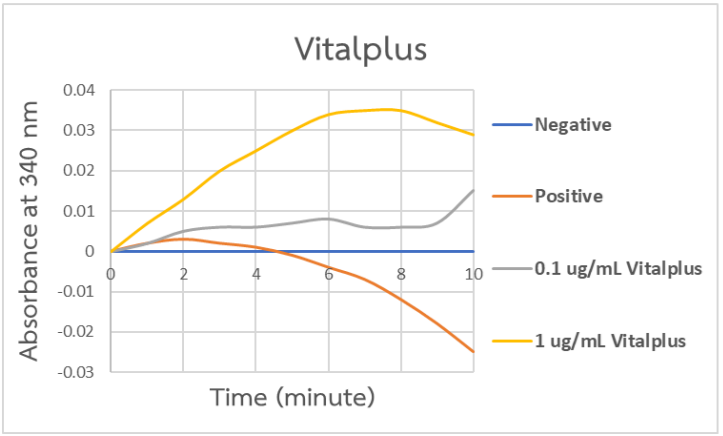


B

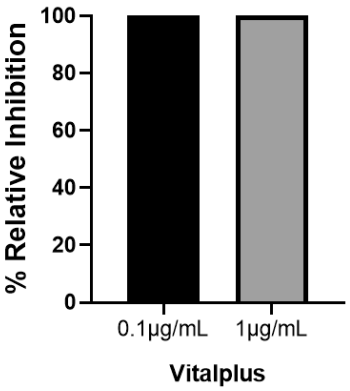


ภาพที่ 2 A: กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ NADPH ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ระยะเวลา 10 นาที ของการเกิดการทำงานของเอนไซม์5α- Reductase ของ Zaminzyme, **B**: กราฟแสดงความความสัมพันธ์ระหว่าง %relative inhibition กับความเข้มข้นของ Zaminzyme ที่ 0.1µg/mL และ 1µg/mL

A

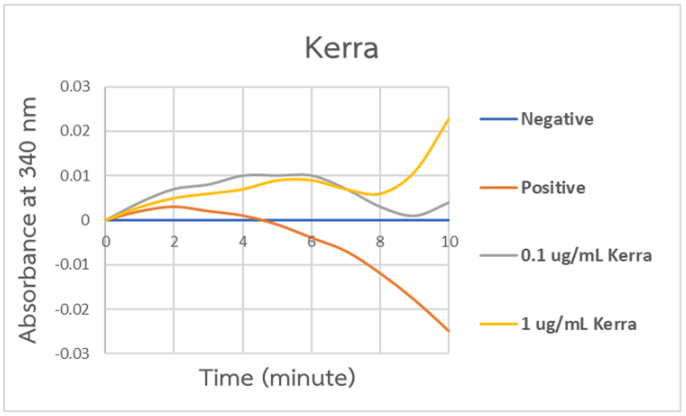


B

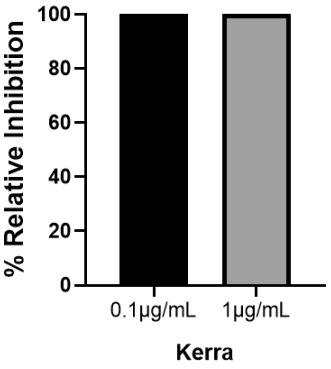


ภาพที่ 3 A: กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ NADPH ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ระยะเวลา 10 นาที ของการเกิดการทำงานของเอนไซม์5α- Reductase ของ Vitalplus, **B**: กราฟแสดงความความสัมพันธ์ระหว่าง %relative inhibition กับความเข้มข้นของ Vitalplus ที่ 0.1µg/mL และ 1µg/mL

A



B



ภาพที่ 4 A: กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ NADPH ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ระยะเวลา 10 นาที ของการเกิดการทำงานของเอนไซม์5α- Reductase ของ Kerra, **B**: กราฟแสดงความความสัมพันธ์ระหว่าง %relative inhibition กับความเข้มข้นของ Kerra ที่ 0.1µg/mL และ 1µg/mL

สรุปผลการทดลอง

Vitalplus และสารสกัด Kerra มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์5α- Reductase ที่ความเข้มข้น 0.1µg/mL และ 1µg/mL เทียบเท่ากับยา Finasteride และ Zaminzyme มีความสามารถในยับยั้งน้อยที่สุด

หมายเหตุ ยา Finasteride กับ type II 5α- Reductase มีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.2 nM (เทียบเท่า 1.56 ng/mL) (https://fnkprddata.blob.core.windows.net/domestic/data/datasheet/CAY/14938.pdf)