

## บทคัดย่อ

เอนไซม์สเตอรอยด์ไฟว์แอลฟารีดักเตสมีความสำคัญในการเมตาโบไลซ์ฮอร์โมนเพศโทสเทอโรนไปเป็นแอนโดรเจนที่มีฤทธิ์มากขึ้นคือ ไดไฮโดรเทสโทสเทอโรน (DHT) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องในการเกิดโรคหลายชนิดได้แก่ ต่อมลูกหมากโต ศีรษะล้านจากฮอร์โมนเพศชาย และสิว วิธีในการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไฟว์แอลฟารีดักเตสจึงเป็นกุญแจสำคัญในการค้นพบสารใหม่ๆเพื่อพัฒนาต่อไปเป็นยา ในการศึกษานี้ทางทีมวิจัยได้พัฒนาวิธีในการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไฟว์แอลฟารีดักเตสโดยไม่ใช้สารรังสีและใช้เครื่องมือ LC-MS แหล่งของเอนไซม์ไฟว์แอลฟารีดักเตสนั้นได้มาจาก LNCaP (human prostate cancer cells) ซึ่งมีเอนไซม์ไอโซฟอร์มที่ 1 ในการพัฒนาวิธีการทดสอบฤทธิ์นั้น ระบบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเอนไซม์ได้ถูกพัฒนาและปรับให้เหมาะสมดังนี้ การปริมาณเอนไซม์กับสารตั้งต้นเทสโทสเทอโรนทำปฏิกิริยากันอย่างเหมาะสม การใช้ความเข้มข้นของ NADPH-cofactor และระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มปฏิกิริยาเอนไซม์ ความสามารถในการทนตัวทำละลายชนิด DMSO ของปฏิกิริยาเอนไซม์ วิธีการทดสอบประสิทธิภาพที่พัฒนาขึ้นนี้ได้ทำการตรวจสอบความถูกต้องตามไกด์ไลน์โดยใช้ตัวแปลดังต่อไปนี้ 1) signal to background ratio (S/B) 2) signal to noise ratio (S/N), 3) the signal window (SW) และ 4) zeta factor  $Z'$ . ในการทดสอบฤทธิ์นั้นได้ทำปฏิกิริยาใน 96-well plates และตรวจวัด DHT ที่สร้างขึ้นหลังจากปฏิกิริยาด้วย LC-MS จากการทดลองพบว่า S/B, S/N, SW และ  $Z'$  factor มีค่าที่ยอมรับได้ตามไกด์ไลน์และยังพบว่าความสามารถในการทำการทดลองซ้ำ (reproducibility) ในการศึกษาระหว่างวัน นั้นมีค่าผันแปรที่ต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนดไว้ และยามาตรฐาน dutasteride และ finasteride มีการยับยั้งและแสดงค่าที่สอดคล้องกับรายงานวิจัยที่ผ่านมาในการศึกษานี้ได้ประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นกับสมุนไพรไทยจำนวน 11 ชนิด พบว่าสารสกัดสมุนไพร 2 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งที่ดีได้แก่ *Impatiens balsamina* L. และ *Curcuma longa* L. ซึ่งมีค่า  $IC_{50}$  ที่  $5.4 \pm 0.2$  และ  $9.0 \pm 1.2$   $\mu\text{g mL}^{-1}$  ตามลำดับ จากการศึกษาได้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาวิธีใหม่ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไฟว์แอลฟารีดักเตสที่มีความจำเพาะเจาะจง (selectability) ความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) และมีความน่าเชื่อถือและเป็นเครื่องมือที่มีค่าในการหาสารใหม่ๆเพื่อพัฒนาเป็นยาต่อไป

## Abstract

Steroid 5 $\alpha$ -reductase (S5 $\alpha$ R) plays an important role in metabolizing testosterone into active androgen dihydrotestosterone (DHT) which is involved in many androgen dependent disorders, such as androgenic alopecia, benign prostatic hyperplasia and acne. The method for screening for S5 $\alpha$ R inhibition is key in finding new antagonists. In this study, the label-free S5 $\alpha$ R inhibitory assay using LC-MS was developed. S5 $\alpha$ R type 1 enzyme was obtained from LNCaP prostate cancer cells. The enzymatic assay was optimized for enzyme-substrate (testosterone) concentration, NADPH-cofactor concentration, solvent tolerance, enzyme activity stability and incubation time. The developed assay was validated by measuring the signal to background ratio (S/B), the signal to noise ratio (S/N), the signal window (SW) and the zeta factor  $Z'$  in accordance with published bioassay guidelines. The enzymatic reaction was performed in 96-well plates and DHT formation was determined by LC-MS. S/B, S/N, SW and  $Z'$  factor were well above acceptable criteria and the reproducibility was good using  $Z'$  factor over 3 days and further validated by dutasteride and finasteride inhibition. The method was successfully applied to quantify S5 $\alpha$ R inhibitory activity of some Thai herbal extracts. Two plant extracts, *Impatiens balsamina* L. and *Curcuma longa* L. showed IC<sub>50</sub> at 5.4 $\pm$ 0.2 and 9.0 $\pm$ 1.2  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> and are therefore promising sources of new S5 $\alpha$ R inhibitors. The assay has high selectability and reproducibility and suited to medium throughput screening required by phytochemistry.