

## หน้าสรุปรายงานการวิจัย (Executive summary)

สัญญาเลขที่ MRG5080105

โครงการ: การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส และบิวทิลโคลีนเอสเตอเรส  
สายพันธุ์มนุษย์ของสารอนุพันธ์คูมาริน

หัวหน้าโครงการ : ดร. ขวัญชัย รัตนมณี  
หน่วยงาน : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร  
ระยะเวลาการดำเนินงาน : 24 เดือน  
งบประมาณ : 418,000 บาท

### 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) เป็นโรคที่เกิดเนื่องจากการเสื่อมสลายของเส้นประสาทในระบบประสาทส่วนกลางส่งผลให้เกิดภาวะความจำเสื่อม ซึ่งมีรายงานการศึกษาว่าปัจจัยที่เป็นสาเหตุหลักที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคอัลไซเมอร์คือการที่ระดับของสารสื่อประสาทที่ชื่อว่าอะเซทิลโคลีน (acetylcholine) ลดลง ดังนั้นการรักษาโรคอัลไซเมอร์จึงมีการมุ่งเน้นเพื่อเพิ่มระดับของสารสื่อประสาทดังกล่าว ทั้งนี้ในธรรมชาติ อะเซทิลโคลีนถูกสังเคราะห์ขึ้นมาจากปฏิกิริยาอะเซทิลเลชัน (acetylation) ของโคลีน (choline) โดยหลังจากที่อะเซทิลโคลีนถูกปลดปล่อยออกมาจาก presynaptic neurons สารสื่อประสาทดังกล่าวจะจับเข้ากับโปรตีนเป้าหมายได้แก่ muscarinic และ nicotinic receptors และในขณะเดียวกัน acetylcholine บางส่วนก็จะถูกกำจัดโดยเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกี่ยวข้องกับเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (acetylcholinesterase) และบิวทิลโคลีนเอสเตอเรส (butyrylcholinesterase) ดังนั้นวิธีเพิ่มระดับของอะเซทิลโคลีนจึงถูกมุ่งเน้นไปที่การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ในปัจจุบันคณะกรรมการอาหารและยา (food and drug administration) ของอเมริกาได้ยอมรับให้มีการนำยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ได้แก่ tacrine, donepezil, rivastigmine และ galantamine มาใช้รักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า tacrine ก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อตับและมีฤทธิ์ยับยั้งการรวมตัวของเกล็ดเลือด ดังนั้นในปัจจุบันนี้การพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส จึงยังคงเป็นที่สนใจ

การศึกษาเบื้องต้นพบว่าอนุพันธ์คูมารินมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสสายพันธุ์ปลาไหลไฟฟ้า (*Torpedo Californica*) โดยสามารถยับยั้งฤทธิ์การทำงานของเอนไซม์ที่ 50% ( $IC_{50}$ ) ที่ความเข้มข้นระดับไมโครโมลาร์ แม้ว่ามีการศึกษาว่าสารหลายชนิดที่มีคูมารินเป็นองค์ประกอบหลักมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส แต่โครงสร้างเคมีของอนุพันธ์กลุ่มที่ศึกษามีเอกลักษณ์ และแตกต่างจากกลุ่มที่มีรายงานมาก่อน เพื่อให้สารที่มีฤทธิ์สูงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และมีความปลอดภัยในการพัฒนาต่อไปเพื่อนำมาใช้ในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ แผนงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนาอนุพันธ์คูมารินกลุ่มใหม่นี้ต่อไป โดยใช้ความรู้ทางเคมี การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส และบิวทิลโคลีนเอสเตอเรสของมนุษย์ โดยจะทำการทดสอบฤทธิ์และพิษในเซลล์สมองเพาะเลี้ยง (primary neuronal cultures) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) ก่อนที่จะนำไปทดสอบฤทธิ์ในระดับสูงขึ้นต่อไป

## 2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์ใหม่คูมาริน เพื่อให้มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส และ/หรือ เอนไซม์บิวโทรลโคลีนเอสเตอเรส
2. ทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในเซลล์สมองเพาะเลี้ยง (primary neuronal cultures) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*)

## 3. ผลการวิจัย

ในการศึกษานี้สารอนุพันธ์ใหม่คูมารินถูกออกแบบขึ้นด้วยการเชื่อมองค์ความรู้ระหว่างการเลือกใช้โครงสร้างคูมารินที่เหมาะสม และการเลือก spacer lengths ของ methylene unit ที่เหมาะสม ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสาร 2f และ 2g ที่มี spacer lengths เป็น 7 และ 8 methylene unit แสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE ได้แรงมาก ในขณะที่สาร 2h ที่มี spacer lengths เป็น 9 methylene unit ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองแบบ non selective ผลการศึกษายังแสดงให้เห็นอีกว่าโครงสร้างคูมาริน และหมู่ amine ของสาร 2f และ 2g สามารถเกิดปฏิกิริยาที่ PAS และ MGS binding site ของเอนไซม์ทั้งสอง อันเป็นผลสืบเนื่องจากการมีระยะห่างระหว่างโครงสร้างคูมาริน และ basic nitrogen ประมาณ 16-17 Å ซึ่งเป็นระยะห่างพอกับระยะห่างระหว่าง amino acids ของ PAS และ MGS binding site ของเอนไซม์ AChE และ BuChE

สาร 2f-2h ถูกเลือกเป็นสารต้นแบบในการออกแบบอนุพันธ์ใหม่คูมาริน โดยผู้วิจัยได้แทนที่โครงสร้าง piperidine ด้วยหมู่ amines ต่างๆ เช่น pyrrolidine (3a-c), diethylamine (4a-c), morpholine (5a-c), N-methylpiperazine (6a-c), 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (7a-c), และ 6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (8a-c) ซึ่งพบว่า pyrrolidine derivative 3a มีความแรงสูงที่สุดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE โดยมีค่า IC<sub>50</sub> ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองเป็น 0.3 µM และ 8.4 µM ตามลำดับ ผลของการแทนที่ด้วยหมู่ amines ต่างๆยังแสดงให้เห็นว่า binding pocket site ที่ MGS ของเอนไซม์ AChE และ BuChE น่าจะมีลักษณะเป็น shallow- broad และ deep-narrow shape ดังแสดงในรูปที่ 3-9 ดังนั้นหมู่ amines เช่น pyrrolidine และ piperidine น่าจะสามารถใช้ในการพัฒนาต่อเพื่อให้ได้สารที่มีความแรงและออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE แบบ non selective ได้ และถึงแม้ว่าอนุพันธ์ของ tetrahydroisoquinoline และ dimethoxy tetrahydroisoquinoline จะออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE แบบ non selective แต่กลับพบว่ามีความแรงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองต่ำ

ในการศึกษานี้พบว่าความแรงของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE ของสาร 2g (IC<sub>50</sub> = 0.7 µM สำหรับ AChE และ 6.8 µM สำหรับ BuChE) และสาร 3a (IC<sub>50</sub> = 0.3 µM สำหรับ AChE และ 8.4 µM สำหรับ BuChE) สูงกว่าความแรงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองของยา 2 ตัวที่มีใช้ในทางคลินิก คือ neostigmine (IC<sub>50</sub> = 0.8 µM สำหรับ AChE และ 35.1 µM สำหรับ BuChE) และ galantamine (IC<sub>50</sub> = 0.4 µM สำหรับ AChE และ 18.6 µM สำหรับ BuChE) ดังแสดงในตารางที่ 3-1 ดังนั้นสาร 2g และ 3a จึงเป็นสารอนุพันธ์ใหม่ที่มีฤทธิ์แรงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และ BuChE และเกิดปฏิกิริยากับ PAS binding site

นอกจากนี้การแทนที่ที่ตำแหน่ง 3 ของ 7-hydroxycoumarin ด้วยโครงสร้าง ester หรือ amide 10 และ 11 ตามลำดับ ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองได้มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับสาร 7-hydroxycoumarin แสดงดังตารางที่ 7-2 ซึ่งผลการศึกษาทั้งหมดนำไปสู่แนวคิดในการพัฒนาต่อโดยการ

โคลีนเอสเตอเรสสายพันธุ์มนุษย์ของสารอนุพันธ์คูมาริน

แทนที่ 7-hydroxycoumarin core structure ด้วย ethyl 7-hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (10) หรือ 7-hydroxy-3-(4-methylpiperazine-1-carbonyl)-2H-chromen-2-one (11) ต่อไป

### 3. Output จากงานวิจัย

ผลงานวิจัยที่ได้จากการดำเนิน โครงการวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้เผยแพร่ผลงานวิจัยสู่วงการวิชาการและสาธารณชนทั้งในและต่างประเทศ ในรูปแบบต่างๆดังนี้

1. การประชุมวิชาการในประเทศ(ระดับชาติ) 1 ครั้ง
2. ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้รับรางวัลชนะเลิศ CGI Award for Young Scientists 2008 ในระดับปริญญาตรี
3. อยู่ระหว่างการเตรียมต้นฉบับที่จะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ 1 ฉบับ

ผลงานวิจัยที่ได้ยังมีประโยชน์ต่อการเรียนการสอนวิชาเภสัชวิทยา เภสัชเคมี ทั้งในระดับปริญญาบัณฑิตและบัณฑิตศึกษา นอกจากนี้ยังมีแนวโน้มที่จะสามารถพัฒนายาใหม่สำหรับการรักษาโรคอัลไซเมอร์ได้