

# อภิธานการ

สัญญาเลขที่ R2556B022



สำนักหอสมุด

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาสารอนุพันธ์ของเคอร์คูมิน  
ในการเป็นสารฤทธิ์ต้านฟอสโฟไดเอสเทอร์เอสไฟว์

Investigation of curcumin analogs  
as leads for phosphodiesterase V inhibitors

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยรามคำแหง
วันลงทะเบียน..... 2 ส.ย. 2558
เลขทะเบียน..... 16764435
เลขเรียกหนังสือ.....

คณะผู้วิจัยพร้อมหน่วยงานที่สังกัด

1. รศ. ดร. กรกนก อิงคินันท์ ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง
2. ผศ. ดร. กรองกาญจน์ ชูทิพย์ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง
3. รศ. ดร. นันทกา โกรานา ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง
4. ศ. ดร. อภิชาติ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง
5. นส. อรยา เกร็งทิพย์ ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

สนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยรามคำแหง ปี 2556

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอพระคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง, ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร รวมทั้ง Dr. Norman Scholfield สมาชิกหน่วย bioscreening unitsซึ่งมีส่วนให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลงด้วยดี

การศึกษาครั้งนี้ ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปี 2556 จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ด้วย



## บทคัดย่อ

สารต้านฟอสโฟไดเอสเทอร์เอสไฟว์ (Phosphodiesterase-5, PDE5) เป็นกลุ่มของยาที่ใช้รักษาความดันปอดสูงได้ เนื่องจากมีคุณสมบัติทำให้หลอดเลือดปอด (pulmonary arteries) คลายตัว วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้ เพื่อศึกษาสาร curcumin และอนุพันธ์ ในฤทธิ์ต้าน PDE5 และฤทธิ์ที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัวในหนู ผู้วิจัยได้ทดสอบสารกลุ่ม curcuminoids จากธรรมชาติ 3 ตัว (1-3) และสารอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้นอีก 6 ตัว (4-9) ต่อฤทธิ์ต้านเอนไซม์ PDE5 และ PDE6 โดยใช้ radioassay และวัดฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารกลุ่มนี้ โดยใช้หลอดเลือดที่แยกมาจากปอดหนู และหัวใจ (aorta) จากการทดลองพบว่า curcuminoids (1-3) ยับยั้ง PDE5 อย่างอ่อน ( $IC_{50}=18\mu M$ ) กลุ่ม *meta*-methoxyl ของ curcumin มีความสำคัญต่อฤทธิ์ต้าน PDE5 การย้ายกลุ่ม hydroxyl ลดกลุ่ม methoxyls และ ketomethylene ทำให้ได้สารที่ออกฤทธิ์ดีขึ้นคือ 7 และ 9 ( $IC_{50}=4\mu M$ ) ในขณะที่ sildenafil มี  $IC_{50}=0.03\mu M$  สาร 1, 3, และ 4 แสดง selectivity ที่ดีต่อ PDE5 มากกว่า PDE6 การเติมหมู่ triazole-carboxylic ในสาร 7 ทำให้ได้สาร 9 ที่ละลายน้ำดีขึ้น และมีฤทธิ์ต่อ PDE คงเดิม สารทุกตัวที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์คลายตัวหลอดเลือดปอด ( $EC_{40}=29-90\mu M$ , maximum response=60-90% ที่ความเข้มข้น  $300\mu M$ ) และสารส่วนใหญ่ (1-8) มีผลต่อ aorta น้อยมาก (maximum response<40%) endothelium มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ของสาร demethoxycurcumin (2) และอนุพันธ์ 5, 8, 9 สารมาตรฐาน sildenafil มีฤทธิ์คลายตัวหลอดเลือดปอดสูงมาก ( $EC_{40}=0.04\mu M$ ) และฤทธิ์ขึ้นอยู่กับ endothelium ในขณะที่มีผลต่อ aorta น้อยกว่าหลอดเลือดปอดมาก ( $EC_{40}=1.8\mu M$ ) เมื่อพิจารณาผลการวิจัยแล้ว ฤทธิ์ขยายหลอดเลือดปอดของสารอนุพันธ์ curcumin น่าจะมีการผ่านกลไกทางอื่นเสริมจากการที่มีฤทธิ์ต้าน PDE5 ด้วย การศึกษาในโครงการนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของอนุพันธ์ของ curcumin เพื่อใช้ในการรักษาความดันปอดสูง โดยน่าจะต้องพัฒนาสูตรโครงสร้างเพื่อเพิ่มความแรง และ selectivity ในการออกฤทธิ์ต่อไป

**Keywords** PDE5, curcumin analogues, pulmonary artery, pulmonary artery hypertension

## Abstract

Phosphodiesterase-5 (PDE5) inhibitors are useful treatments for pulmonary arterial hypertension as pulmonary vasodilators. We aimed to study curcumin analogues for PDE5 inhibitory activity and vasorelaxation of rat pulmonary arteries. Three natural curcuminoids (1-3) and six synthetic analogues (4-9) were tested for PDE5 and PDE6 inhibitory activities using enzymatic radioassay. Their vasorelaxation was measured using freshly-isolated segments of rat pulmonary artery and aorta. The results showed that curcuminoids (1-3) mildly inhibited PDE5 ( $IC_{50}=18\mu M$ ): the *meta*-methoxyl of curcumin was important to these for PDE5 inhibition. But hydroxyl rearrangements, removing both methoxyls and one ketomethylene yielded the potent 7 and 9 ( $IC_{50}=4\mu M$ ) (compared to sildenafil,  $IC_{50}=0.03\mu M$ ). Only 1, 3, and 4 were PDE5 selective over PDE6. Triazole-carboxylic addition provided water-solubility while preserving potency. All analogues possessed concentration-dependent vasorelaxants of pulmonary arteries ( $EC_{40}=29-90\mu M$ , maximum response=60-90% at 300  $\mu M$ ), while compounds (1-8) were weakly acting in aorta (maximum response<40%). Only demethoxycurcumin (2) and analogues 5, 8, 9 had endothelium-dependent actions. Sildenafil was highly potent ( $EC_{40}=0.04\mu M$ ) and highly endothelium-dependent in pulmonary artery but weak on intact aorta ( $EC_{40}=1.8\mu M$ ). Activity profiles suggest actions through additional cell pathways for promoting vasorelaxation. These studies suggest that curcumin analogues are potential leads for developing efficacious and selective PDE5 inhibitors and other pathologies of pulmonary hypertension.

**Keywords** PDE5, curcumin analogues, pulmonary artery, pulmonary artery hypertension

# สารบัญเรื่อง

	หน้า
ปกใน	i
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อ	iii
Abstract	iv
สารบัญเรื่อง	v
สารบัญตาราง	vi
สารบัญรูป	vii
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วิธีทดลอง	9
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผล	17
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	23
บทที่ 5 เอกสารอ้างอิง - ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการ	24 28

## สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง PDE5 ของสารสกัดแอลกอฮอล์ของ Curcuma (10 $\mu$ M)	2
ตารางที่ 2	Human cyclic nucleotide PDE families และ selectivity ของ sildenafil ต่อ PDEs	5
ตารางที่ 3	สูตรโครงสร้างของเคอร์คูมินและสารอนุพันธ์	10
ตารางที่ 4	ค่า IC <sub>50</sub> ของ curcumin อนุพันธ์และ sildenafil ในการยับยั้ง PDE5 และ PDE6 ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M (n=3)	17
ตารางที่ 5	EC40 ในการขยายหลอดเลือด pulmonary arteries ที่มี (intact) และ ไม่มี endothelium (denuded) รวมทั้ง aorta ของ curcumin (n=5-6)	22

## สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1	กลไกการยับยั้ง PDE5 enzyme ใน nitric oxide pathway	3
รูปที่ 2	cGMP pathway ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการคลายตัวของหลอดเลือด	6
รูปที่ 3	การเตรียมสาร 5-7	11
รูปที่ 4	การเตรียมสาร 8 และ 9	11
รูปที่ 5	ปฏิกิริยาการสลาย cGMP ด้วยเอนไซม์ PDEs ตามวิธีของ Sonnenburg และคณะ	12
รูปที่ 6	เทคนิคการเอา endothelium ออก	14
รูปที่ 7	ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์การคลายตัวของ pulmonary artery หรือ aorta ของหนู	16
รูปที่ 8	ตัวอย่างผลที่ได้จากการทดลองการศึกษามผลของสาร 3 ต่อการขยายตัวของ pulmonary artery	20

## บทที่ 1

### บทนำ

#### หลักการและเหตุผลที่มาของปัญหาการวิจัย

โรคความดันหลอดเลือดแดงปอดสูง (Pulmonary arterial hypertension: PAH) เป็นโรคที่เกิดขึ้นที่ปอด โดยมีสาเหตุจากการตีบแคบของหลอดเลือดแดงปอดทำให้เกิดภาวะความดันสูง ส่งผลต่อหัวใจห้องล่างขวาทำให้หัวใจทำงานหนัก และเกิดภาวะหัวใจล้มเหลวในที่สุด โรคความดันหลอดเลือดแดงปอดสูงนี้มีอุบัติการณ์ 15-50 คน/ประชากรล้าน ถือว่าเป็นอุบัติการณ์ที่พบน้อยแต่เป็นสาเหตุของการตายได้สูง และในปัจจุบันมีสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง คือ curcumin ซึ่งเป็นสารสีเหลืองที่ได้จากขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ซึ่งสารประกอบนี้มีในเบื้องต้น มีการรายงานพบความหลากหลายของฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ประกอบด้วย antioxidative, anti-inflammatory, anticarcinogenic และ antidiabetic นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ของ curcumin ต่อหลอดเลือด coronary artery ที่ไม่มี endothelium โดยพบว่าฤทธิ์การขยายหลอดเลือดขึ้นกับขนาดของ curcumin ที่ให้โดยมีกลไกเกี่ยวกับ NO, cGMP และ adrenergic beta receptor แต่ไม่ได้เกี่ยวกับการสังเคราะห์ prostaglandin (Xu, 2006) ทั้งยังมีการศึกษาพบว่า curcumin สามารถยับยั้ง phospholipase, lipooxygenase, cyclooxygenase 2 (COX-2), leukotrienes, thromboxane, prostaglandins, NO, collagenase, elastase, hyaluronidase, MCP-1, interferon-inducible protein, tumor necrosis factor, and interleukin-12 ซึ่งการทดลองในมนุษย์โดยมีการให้สารสกัด curcumin มากถึง 8,000 มิลลิกรัมต่อวัน ระยะเวลา 3 เดือน ซึ่งผลการทดลองพบว่าไม่พบความเป็นพิษของสารสกัด curcumin (Wu, 2003) และมีฤทธิ์ในทางชีวภาพ เช่น curcumin เป็น inducer ของ hemeoxygenase enzyme-1 (HO-1) ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการเกิด erectile signaling ในการเพิ่มระดับ cGMP (Abdel Aziz *et al*, 2010) และยังมีการศึกษาสารสกัด curcumin ต่อ pulmonary artery พบว่าสารสกัด curcumin สามารถลดความดันโลหิตในปอดได้ พร้อมทั้งสามารถยับยั้งการสะสมของคอลลาเจนในหลอดเลือดในปอดได้ (Lin *et al*, 2006) พบว่า curcumin มีผลลดความดันโลหิตในปอด จึงเป็นไปได้ว่า curcumin น่าจะมีฤทธิ์ในการทำให้หลอดเลือดปอดขยายตัว นอกจากนี้มีรายงานของ Prapapan Temkitthawon ได้ทดสอบพืชสมุนไพรไทยต่อการยับยั้ง PDE5 พบว่า *Curcuma longa* L. สามารถยับยั้ง PDE5 ได้ (ตารางที่ 1) ผู้วิจัยจึงมีความสนใจเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาผลของ curcumin และอนุพันธ์ต่อหลอดเลือดแดงปอดของหนู การวิจัยนี้อาจเป็นจุดเริ่มต้นในการพัฒนาการรักษา pulmonary hypertension ต่อไป



ตารางที่ 1 เปรูชันการยับยั้ง PDE5 ของสารสกัดแอลกอฮอล์ยอต์ *Curcuma* (10  $\mu$ M)

No.	Scientific Name	%PDE-5 inhibition
1	<i>Curcuma aeruginosa</i> Roxb.	20.74 $\pm$ 1.18
2	<i>Curcuma longa</i> L.	84.01 $\pm$ 1.29
3	<i>Curcuma zedoaria</i> (Berg) Roscoe	88.27 $\pm$ 4.12
4	<i>Curcuma petiolata</i> Roxb.	81.92 $\pm$ 3.53
5	<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb.	49.57 $\pm$ 4.12
6	<i>Curcuma</i> sp. (นางคำ)	81.73 $\pm$ 4.71
7	<i>Curcuma</i> sp. (หัวใหญ่)	41.78 $\pm$ 2.35
8	<i>Curcuma</i> sp. (เพชรม้า)	19.56 $\pm$ 1.76
9	<i>Curcuma</i> sp. (ม้าเหลือง)	52.10 $\pm$ 3.53
10	<i>Curcuma</i> sp. (ม้าขาว)	14.82 $\pm$ 2.24
11	<i>Curcuma</i> sp. (ม้าหือ)	27.08 $\pm$ 3.29
12	<i>Curcuma</i> sp. (มหากำตั้ง)	18.69 $\pm$ 2.00
13	<i>Curcuma</i> sp. (หนูมานขกทัพ)	21.88 $\pm$ 1.76

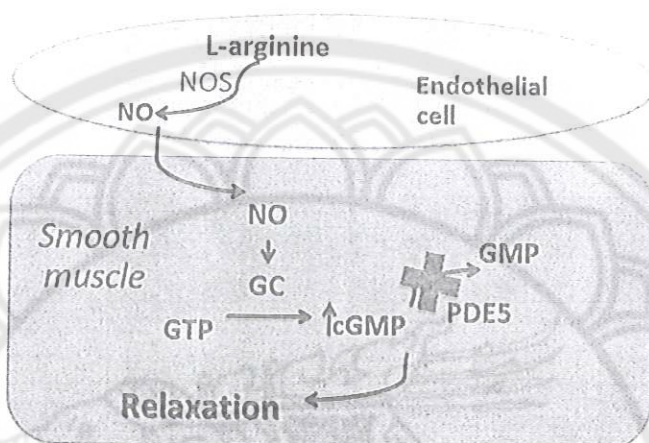
กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้ง PDE5

ในการยับยั้ง PDE5 เพื่อให้ระดับ cGMP เพิ่มมากขึ้นซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิด การคลายตัวของหลอดเลือดนั้น เกิด จาก Nitric oxide (NO) ใน endothelium cell ถูกสร้างและหลั่งมาที่ smooth muscle cell ทำให้ Gaunlyl

PDE มีหลาย isoform ดังแสดงในตารางที่ 2 (Esayan, 1999) ในแต่ละ isoform มีความจำเพาะเจาะจงต่อ cAMP หรือ cGMP ต่างกัน กระจายอยู่ในอวัยวะที่ต่างกัน และสารต้าน PDE ใน isoform ต่างกันก็มีความจำเพาะเจาะจงกับการทำงานของร่างกายแตกต่างกัน สารต้าน PDE ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในทางยา เช่น สารต้าน PDE5 ซึ่งมีการใช้เป็นยาในการรักษาอาการเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ (Feldman และคณะ, 2000) และรักษาโรคความดันปอดสูง (Corbin, 2005)

การเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ (erectile dysfunction หรือ ED ) หรือการที่อวัยวะเพศชายไม่เกิดการแข็งตัว เป็นปัญหาซึ่งมีผลกระทบต่อคุณภาพชีวิต จากการวิจัยในสหรัฐอเมริกาพบว่าร้อยละ 50 ของผู้ชายอายุ 40 ปีขึ้นไป มีปัญหา ED ตั้งแต่ในระดับไม่รุนแรงจนถึงรุนแรง (Feldman และคณะ, 2000) ในการศึกษาชายไทย อายุระหว่าง 40-70 ปีจำนวน 1,250 คน จาก 8 จังหวัดและกรุงเทพฯ พบว่าชายไทยกลุ่มนี้มีปัญหา ED ร้อยละ 37.5 โดยที่ยิ่งอายุมากขึ้น ปัญหา ED ก็พบบ่อยขึ้น (ร้อยละ 73 ในชายไทยอายุ 60-70 ปี) โดยรวมแล้วส่วนใหญ่ ED อยู่ในขั้นไม่รุนแรง มีเพียงร้อยละ 4.7 ที่รุนแรงคือเสียการแข็งตัวอย่างสิ้นเชิง (ระพีพล กุญชร ณ อยุธยา, 2004) กลุ่มที่มีปัญหา ED มากที่สุดคือกลุ่มที่มีโรคประจำตัว เช่น ความดันโลหิตสูง เบาหวาน โรคหัวใจ ผู้ป่วยที่ไซสัสนหลังได้รับการกระทบกระเทือนและผู้ป่วยภายหลังการผ่าตัดต่อมลูกหมาก (โดยเฉพาะอย่างยิ่ง หลังการผ่าตัดมะเร็งต่อมลูกหมาก) ก็มักประสบปัญหา ED (Feldman และคณะ, 2000; ระพีพล กุญชร ณ อยุธยา, 2004) สำหรับอาการไม่พึงประสงค์ที่พบได้บ่อย เช่น ปวดหัว หน้าแดง ร้อนวูบวาบ นอกจากนี้อาจพบความผิดปกติของการมองเห็นได้บ้างจากการที่ยาไปมีผลยับยั้งการทำงานของ PDE6 (Galie และคณะ, 2004)

cyclase(GC) กระตุ้น NO โดยเปลี่ยน GTP ไปเป็น cGMP จากนั้น PDE5 enzyme เปลี่ยน cGMP เป็น GMP เป็นผลทำให้ ปริมาณ cGMP มีปริมาณน้อยลงที่ถูกสลายโดย PDE5 enzyme แต่เมื่อมีตัวยับยั้งหรืออินฮิบิเตอร์ (inhibitor) เข้ามายับยั้ง PDE5 enzyme ส่งผลให้ระดับ cGMP เพิ่มมากขึ้นทำให้กล้ามเนื้อเรียบคลายตัวและเป็นผลต่อเนื่องให้เกิดภาวะความดันที่ต่ำลง ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 กลไกการยับยั้ง PDE5 enzyme ใน nitric oxide pathway

#### วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของ curcumin และสารอนุพันธ์ในการยับยั้ง PDE5 และ PDE6
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับการออกฤทธิ์ของสาร
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของ curcumin และสารอนุพันธ์ในการคลายตัวของหลอดเลือดแดงในปอดหนู (pulmonary artery)
4. ศึกษาหาตำแหน่งการออกฤทธิ์ของเคอร์คูมินและสารอนุพันธ์ (tissue target) ได้แก่ endothelium หรือ vascular smooth muscle ที่มีผลต่อการคลายตัว
5. เปรียบเทียบผลของ curcumin และสารอนุพันธ์ในหลอดเลือด pulmonary artery และ aorta

#### การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

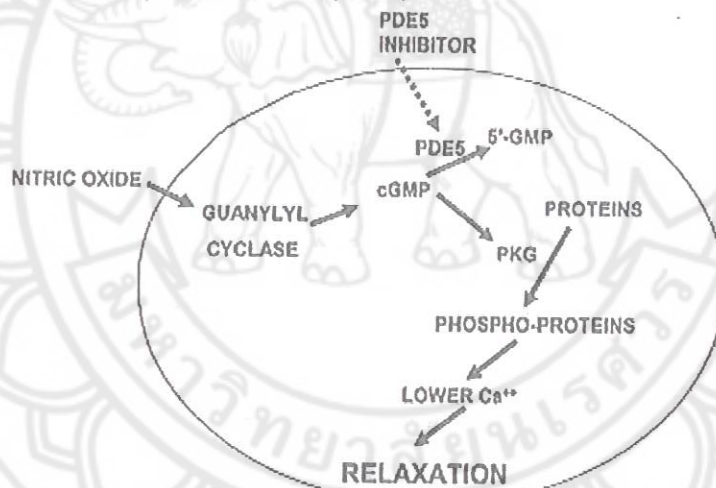
เอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (phosphodiesterase, PDE) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบต่างๆ หลายระบบในร่างกาย เนื่องจากเอนไซม์นี้ เกี่ยวข้องกับการสลาย cAMP และ cGMP ซึ่งเป็น cyclic nucleotide second messenger ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของเซลล์ (Esayan, 1999)

ตารางที่ 2 Human cyclic nucleotide PDE families และ selectivity ของ sildenafil ต่อ PDEs

Family	No. of gene	Characteristics	Km ( $\mu$ M) (cAMP; cGMP)	Primary tissue distribution	Examples of inhibitors
PDE-1	3	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-stimulated	1:30; 3	Heart, Brain, Lung, Smooth muscle	Vinpocetine , Ks-505a, SCH-51866
PDE-2	1	cGMP-stimulated	50; 50	Adrenal cortex, Heart, Brain, Lung,Liver, Platelets	EHNA
PDE-3	2	cGMP-inhibited cAMP>cGMP specific	0.2: 0.3	Heart, Lung, Liver, Platelets, Adipose tissue, Immunocytes	Milrinone, Enoximone, Imazodan, Trequinsin
PDE-4	4	cAMP-specific cGMP-insensitive	4; > 3000	Sertoli cells, Kidney, Brain, Liver, Lung, Immunocytes	Rolipram, Etazolate
PDE-5	1	cGMP-specific	150; 1	Lung, Platelets, Smooth muscle	Sildenafil, Zaprinast, Dipyridamo le
PDE-6	2	cGMP-specific	2000; 60	Rod and cone photoreceptor	Zaprinast, Dipyridamo le
PDE-7	2	cAMP-specific High affinity	0.2; > 1000	Skeletal muscle, T-cells, Heart, Kidney, Brain, Liver	None

\* แหล่งที่มา Esayan, 1999

อวัยวะเพศชายประกอบไปด้วย เนื้อเยื่อซึ่งภายในมีหลอดเลือดเล็กๆอยู่เป็นจำนวนมาก เมื่อถูกกระตุ้นให้เกิดอารมณ์ทางเพศ ระบบประสาท จากไขสันหลังจะส่งสัญญาณมายังปลายประสาทบริเวณอวัยวะเพศ ต่อมา จะเกิดการกระตุ้นให้หลั่งสาร nitric oxide ขึ้น จากนั้นเกิดสารชื่อ cyclic GMP ตามมา สารนี้มีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดแดงภายในอวัยวะเพศเกิดการขยายตัว (รูปที่ 2) และทำให้มีเลือดไหลเข้าสู่อวัยวะเพศมากขึ้น เมื่อมีเลือดไหลเข้ามามาก จะเกิดแรงดันขึ้น เบียดหลอดเลือดดำบริเวณนั้น ทำให้เลือดไหลกลับได้น้อยลงจึงทำให้อวัยวะเพศแข็ง จนกว่าจะหมดการกระตุ้นทางเพศ หรือ cyclic GMP ลดลง หลอดเลือดแดงจึงเริ่มหดตัว เลือดไหลเข้า น้อยลง แต่ไหลออกมากขึ้น อวัยวะเพศจึงอ่อนตัวลง จะเห็นว่ามีหลายส่วนที่ควบคุมการแข็งตัวของอวัยวะเพศ ได้แก่ ระบบประสาท หลอดเลือดแดง nitric oxide และ cyclic GMP การเสื่อมสมรรถภาพทางเพศจึงไม่ได้มี สาเหตุมาจากจิตใจและความชราเท่านั้น จริงๆแล้วสาเหตุส่วนใหญ่มาจากโรคที่ทำให้เกิดความผิดปกติของ หลอดเลือดที่ไปเลี้ยงอวัยวะเพศ เช่น เบาหวาน ไขมันในเลือดสูง ความดัน โลหิตสูง โรคหัวใจ สูบบุหรี่จัด เมื่อ หลอดเลือดเสื่อม จะไม่เกิดการหลั่งสาร nitric oxide และ cyclic GMP หรือ หลั่งออกมาน้อยมาก ไม่เพียงพอที่จะทำให้อวัยวะเพศแข็งพอที่จะทำให้เกิดการมีเพศสัมพันธ์ได้อย่างพอใจ (Feldmanและคณะ, 2000; ระพี พล กุญชร ณ อยุธยา, 2004; Rybalkin และคณะ, 2003)



รูปที่ 2 cGMP pathway ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการคลายตัวของหลอดเลือด

เมื่อปี 1998 มีการวางตลาดยาที่ใช้รักษา ED ตัวแรกคือ sildenafil citrate (Viagra) นับเป็นปรากฏการณ์ของวงการยาที่ยากลุ่มใหม่ที่ได้รับ ความสนใจจากผู้ป่วยที่มีปัญหาได้อย่างท่วมท้น ในขณะนี้ มียาที่ใช้ในการรักษา ED ที่ได้รับขึ้นทะเบียนในสหรัฐอเมริกาแล้วอีก 2 ชนิด คือ vardenafil (Levitra) และ tadalafil (Cialis) ยาเหล่านี้ มีกลไกการออกฤทธิ์คือการยับยั้งเอนไซม์ PDE5 ซึ่งมีอยู่มากบริเวณอวัยวะเพศชาย เอนไซม์นี้ทำหน้าที่

ทำลาย cyclic GMP เมื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ ผลตามมาก็คือ cyclic GMP มีปริมาณมากขึ้น (เพราะถูกทำลายลดลง) และมากพอที่จะทำให้หัวใจวะเพศแข็งตามปกติ (Brock, 2002; Moreland และคณะ, 1999) อย่างไรก็ตามยาต้าน PDE5 เหล่านี้ ยังไปยับยั้ง PDE isozyme อื่นๆอีกด้วย จึงมีผลข้างเคียงเช่น เกิดความผิดปกติของการมองเห็น เนื่องจากยาไปมีผลยับยั้งการทำงานของ PDE6

Pulmonary hypertension เป็นโรคที่พบได้น้อยแต่มีความรุนแรงมากที่สามารถนำไปสู่ภาวะหัวใจล้มเหลวได้ ซึ่งมีอุบัติการณ์การเกิดประมาณ 2-3 คนต่อหนึ่งล้านคนต่อปี และมีความชุกประมาณ 15 คนต่อหนึ่งล้านคน ลักษณะของผู้ป่วย pulmonary hypertension คือ มีการตีบแคบลงของหลอดเลือดแดงปอด ทำให้ความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูงขึ้น ส่งผลให้หัวใจห้องล่างขวาทำงานหนักขึ้นในการบีบตัวสู้กับแรงดันที่สูงอยู่ตลอดเวลา สุดท้ายทำให้เกิดภาวะหัวใจล้มเหลวตามมา ดังนั้นอาการแสดงส่วนใหญ่ในผู้ป่วยกลุ่มนี้ จึงเป็นอาการของภาวะหัวใจล้มเหลว (Rudarakanchana และคณะ, 2001)

สำหรับการรักษามาตรฐานแต่เดิมที่ให้กับผู้ป่วยนั้น ได้แก่ oral anticoagulants, diuretics, oxygen therapy และ digoxin แต่ในปัจจุบัน พบการเปลี่ยนแปลงของ vasoactive agents ของหลอดเลือดปอด ทำให้ทราบว่ามียาอย่างน้อย 3 pathways ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรค นั่นคือ prostacyclin pathway, endothelin pathway และ nitric oxide (NO) pathway ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการนำยากลับมาใหม่ที่มีฤทธิ์เป็น selective pulmonary vasodilators เช่น prostacyclin analogues, endothelin-1 receptor antagonists และ PDE5 inhibitors มาใช้ในการรักษาผู้ป่วย pulmonary hypertension ในส่วนของ PDE5 inhibitors พบว่าระดับของ PDE5 จะเพิ่มขึ้นในผู้ป่วย pulmonary hypertension (Corbin, 2005) โดยยาในกลุ่มนี้มีกลไกการออกฤทธิ์ผ่าน NO pathway ซึ่ง NO นั้นเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการขยายตัวของหลอดเลือดคั่งที่กล่าวมาแล้ว ในผู้ป่วย pulmonary hypertension ที่มีความผิดปกติของ endothelial cells นั้น พบว่ามีภาวะ overactivity ของ PDE5 ซึ่งส่งผลให้มีการทำลายฤทธิ์ของ NO มากกว่าปกติ ดังนั้นการให้ยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PDE5 จึงมีประโยชน์ในการแก้ไขพยาธิสภาพนี้ และอาจช่วยเสริมฤทธิ์ยาที่เป็น vasodilators ชนิดอื่นๆ ได้ (Galie และคณะ, 2004)

ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเป็นแหล่งกำเนิดของสารที่มีความหลากหลายทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ มีรายงานว่าสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหลายชนิด มีฤทธิ์ต้าน PDE เช่น สารกลุ่ม flavonoids (Shin และคณะ, 2002; Ko และคณะ, 2004; Roengsamran และคณะ, 2000) coumarins (Hoult และคณะ, 1996), alkaloids (Watanabe และคณะ, 1981)

curcumin เป็นสารสีเหลืองที่พบได้มากในขมิ้นชัน curcumin มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย เช่น antioxidation (Priyadarsini และคณะ, 2003), anti-inflammatory (Chainitiwong และคณะ, 2003), anticarcinogenic (Shukla และคณะ, 2002) และ antidiabetic (Babu และ Srinivasan, 1997)

นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า curcumin มีผลต่อกระบวนการทำงานของ NO และ cGMP โดย Xu (2006) รายงานว่า curcumin มีฤทธิ์ขยายหลอดเลือด coronary artery ที่ไม่มี endothelium โดยพบว่าฤทธิ์การขยายหลอดเลือดขึ้นกับขนาดของ curcumin ที่ให้ โดยมีกลไกเกี่ยวกับ NO, cGMP และ adrenergic beta receptor แต่ไม่ได้เกี่ยวกับการสังเคราะห์ prostaglandin และยังมีรายงานว่าถึงฤทธิ์ของ curcumin ต่อในการลดความดันหลอดเลือดปอด (pulmonary arterial pressure) ของหนูที่มีภาวะความดันของหลอดเลือดในปอดสูงจากการเหนี่ยวนำโดยภาวะขาดออกซิเจนเรื้อรัง (chronic hypoxia) และภาวะ hypercapnia (Lin และคณะ, 2006) Abdel Aziz และคณะ (2010) รายงานฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับ การเกิด erectile signaling ในการเพิ่มระดับ cGMP ฤทธิ์ต้าน PDE5 ของ curcumin ถูกรายงานครั้งแรกโดย Abusnina และคณะ (2009) โดยพบว่า curcumin มีผลต่อ PDE activities ของ 5 isozymes คือ PDE-1 – PDE-5 ที่สกัดจาก vascular tissue พบว่า curcumin สามารถยับยั้ง PDE-1, PDE-2, PDE-3 และ PDE-4 ที่ IC<sub>50</sub> ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 10 μm – 20 μm และ PDE-5 ที่ IC<sub>50</sub> ที่ความเข้มข้น 35 μm

จากการทบทวนวรรณกรรม จะเห็นได้ว่า curcumin เป็นสารที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ในฤทธิ์ต้าน PDE5 โดยถ้านำ curcumin มาเปลี่ยนแปลงโครงสร้างให้ออกฤทธิ์ดีขึ้น ก็อาจจะทำให้ได้สารที่มีศักยภาพจะใช้ประโยชน์ในการเป็นยารักษา ED หรือ pulmonary hypertension ได้ ที่ผ่านมา กลุ่มวิจัยของ ศ. ดร. อภิชาติ สุขสำราญ ได้ทำการสังเคราะห์ curcumin analog ในหลายรูปแบบ (Changtam และคณะ, 2010) จึงนำที่จะนำสารเหล่านี้มาศึกษาฤทธิ์ต่อ PDE5 ซึ่งจะนำไปสู่ความรู้ความเข้าใจด้าน SAR ของสารกลุ่มนี้ ต่อ PDE5 และอาจมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ curcumin เพื่อให้ได้สารต้าน PDE5 ที่มีฤทธิ์ที่ดีหรือมี selectivity ที่ดีขึ้น

## บทที่ 2

### วิธีการทดลอง

#### 1. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

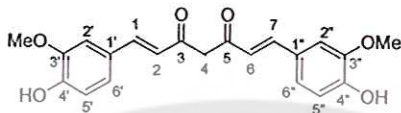
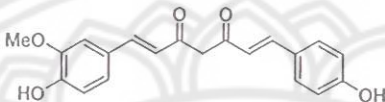
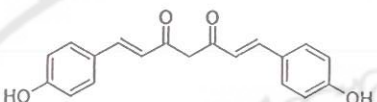
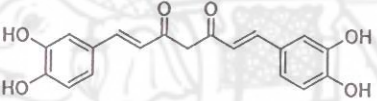
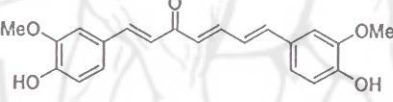
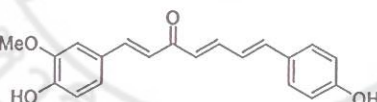
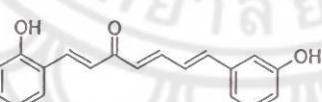
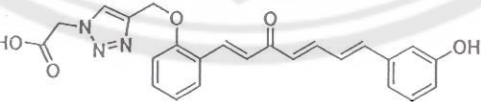
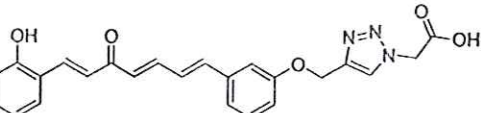
Krebs' solution(mM): (NaCl 122; KCl 5; [N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethane-sulfonic acid)] (HEPES) 10;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.5;  $\text{MgCl}_2$  1; glucose 11 และ  $\text{CaCl}_2$  1.8; ปรับให้ได้ pH 7.3 ด้วย 1N NaOH), acetylcholine (ACh), phenylephrine (PE), CV Buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.5; 100 mM imidazole; 15 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1.0 mg/ml BSA and 2.5 mg/ml snake venom), CH Buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.5 100 mM imidazole, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.0 mg/ml BSA และ 0.5 mg/ml histone ได้จาก Sigma (St. Louis, MO, USA). Pentobarbital sodium solution (Nembutal®) ได้จาก Ceva Animal Health (Bangkok, Thailand). QAE resin (QAE Sephadex™ A-25) ซึ่งจาก GE Healthcare (Sweden) เอนไซม์ PDE5 เตรียมจากปอดหนู และ PDE6 เตรียมจาก retinas ของไก่

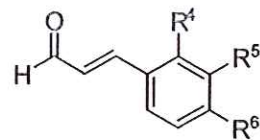
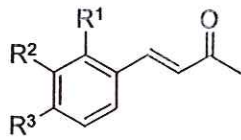
#### 2. การแยกและสังเคราะห์ curcumin และอนุพันธ์

โครงสร้างของสาร curcumin และอนุพันธ์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3 สาร curcumin (1), demethoxycurcumin (2) และ bisdemethoxycurcumin (3) ได้มาจากการสกัดแยกจากส่วนเหง้าของขมิ้นชัน. (Changtam et al. 2010) สารที่ 4 สังเคราะห์ได้จากสารที่ 1 ตามกระบวนการที่ Changtam และคณะได้รายงานไว้ (2010) สาร trienones 5-7 (รูปที่ 3) เกิดจาก Aldol condensation ของ substituted cinnamones (10a และ 10b) และ substituted cinnamaldehydes (11a, 11b และ 11c) ภายใต้ base-catalyzed condition สาร 8 และ 9 ซึ่งเป็น acid group-containing analogues ของ 7 ถูกสังเคราะห์โดยการ coupling สาร alkyne analogues (12 และ 13) ด้วย azide (2-azidoacetic acid) (14) โดยใช้ Click chemistry approach ดังแสดงในรูปที่ 4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ สารที่ 4-9 ทำโดยวิธีทาง spectroscopy เก็บสารไว้ที่  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ก่อนนำไปใช้



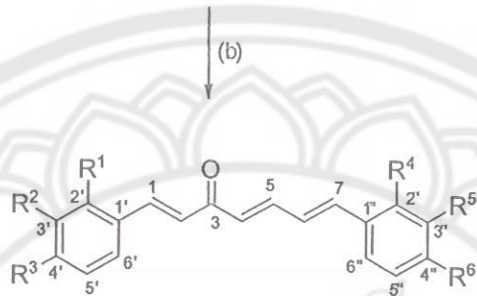
ตารางที่ 3 สูตร โครงสร้างของเคอร์คูมินและสารอนุพันธ์

Sample	Structure	Formula, M.W.
1 (curcumin)		$C_{21}H_{20}O_6$ , 368.38
2		$C_{20}H_{18}O_5$ , 338.35
3		$C_{19}H_{16}O_4$ , 308.33
4		$C_{19}H_{16}O_6$ , 340.33
5		$C_{21}H_{20}O_5$ , 352.38
6		$C_{20}H_{18}O_4$ , 322.35
7		$C_{19}H_{16}O_3$ , 292.33
8		$C_{24}H_{21}N_3O_5$ , 431.44
9		$C_{24}H_{21}N_3O_5$ , 431.44



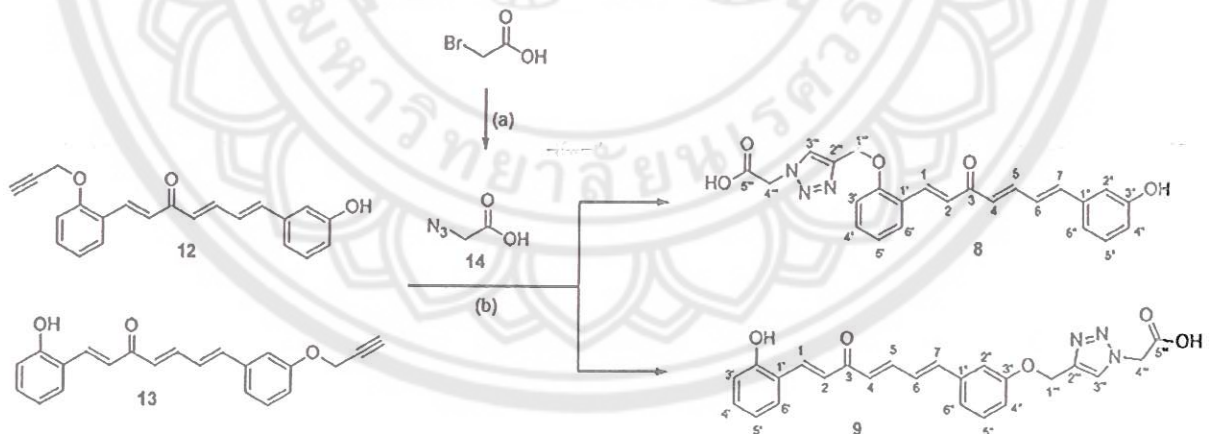
- 10a:  $R^1 = H, R^2 = OMe, R^3 = OH$   
 10b:  $R^1 = OH, R^2 = R^3 = H$   
 10c:  $R^1 = OCH_2C\equiv CH, R^2 = R^3 = H$

- 11a:  $R^4 = H, R^5 = OMe, R^6 = OH$   
 11b:  $R^4 = R^5 = H, R^6 = OH$   
 11c:  $R^4 = R^6 = H, R^5 = OH$   
 11d:  $R^4 = R^6 = H, R^5 = OCH_2C\equiv CH$



- 10a + 11a → 5:  $R^1 = R^4 = H, R^2 = R^5 = OMe, R^3 = R^6 = OH$   
 10a + 11b → 6:  $R^1 = R^4 = R^5 = H, R^2 = OMe, R^3 = R^6 = OH$   
 10b + 11c → 7:  $R^1 = R^5 = OH, R^2 = R^3 = R^4 = R^6 = H$   
 10c + 11c → 12:  $R^1 = OCH_2C\equiv CH, R^2 = R^3 = R^4 = R^6 = H, R^5 = OH$   
 10b + 11d → 13:  $R^1 = OH, R^2 = R^3 = R^4 = R^6 = H, R^5 = OCH_2C\equiv CH$

รูปที่ 3 การเตรียมสาร 5-7 โดยใช้ reagents และ conditions ต่อไปนี้ (a) propargyl bromide,  $K_2CO_3$ , acetone, room temperature; (b) 20% aq. NaOH, EtOH,  $0^\circ C$ – room temperature



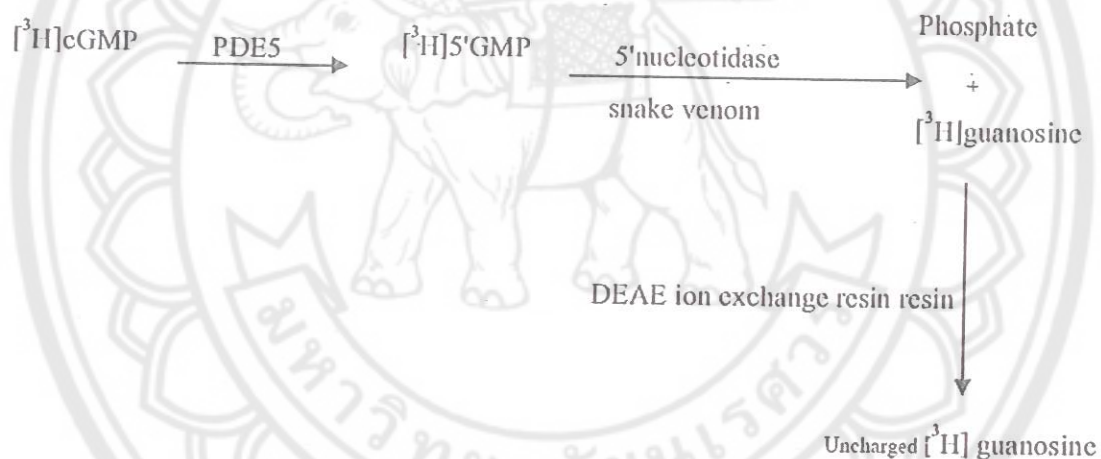
รูปที่ 4 การเตรียมสาร 8 และ 9 โดยใช้ reagents และ conditions ต่อไปนี้ (a)  $NaN_3, H_2O$ , room temperature; (b)  $CuSO_4$ , sodium ascorbate, THF:H $_2O$  (9:1)

### 3. การศึกษาฤทธิ์ต้าน PDE-5 และ PDE6 ของ curcumin และ อนุพันธ์

#### 3.1 การศึกษาฤทธิ์ต้าน PDE5

การเตรียมเอนไซม์ PDE5 จากปอดหนู ทำโดยวิธีการที่รายงานโดย Temkitthawon และคณะ (2011) สารตัวอย่างถูกละลายใน DMSO และเจือจางโดยน้ำ โดยกำหนดให้ที่ความเข้มข้นสุดท้าย มี DMSO อยู่ในสารละลายตัวอย่าง 5%

การตรวจวัด activity ของ PDE5 ใช้การวัดปริมาณรังสี [<sup>3</sup>H] guanosine ที่เป็นสารสุดท้ายที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาของสารตั้งต้น คือ [<sup>3</sup>H]cGMP ผ่านเอนไซม์ PDE5 จากนั้นเอนไซม์ 5'nucleotidase ที่อยู่ในปียุงเพื่อให้เกิดการตัดหมู่ฟอสเฟตออกจาก [<sup>3</sup>H]5'GMP จะได้ ฟอสเฟตและ [<sup>3</sup>H] guanosine แล้วจึงใช้ DEAE ion exchange resin ดูดซับเอาฟอสเฟตออกจากปฏิกิริยา ดังรูปที่ 5 การทดสอบสารตัวอย่างนี้จะทำการทดสอบที่ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 10 μM



รูปที่ 5 ปฏิกิริยาการสลาย cGMP ด้วยเอนไซม์ PDE5 ตามวิธีของ Sonnenburg และคณะ (Sonnenburgetet al, 1998)

ขั้นตอนการทดลองซึ่งวิธีการทดสอบที่ดัดแปลงจากวิธีของ Sonnenburg และคณะ (Sonnenburgetet al, 1998) ดังนี้ใส่สารละลายตัวอย่าง 20 μl ลงในงานหลุมที่มีสารละลายเอนไซม์ 60 μl ซึ่งประกอบด้วย human recombinant PDE5 ที่ความเข้มข้นที่แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ในปฏิกิริยา

% hydrolysis ประมาณ 20-30%, 10 mM EGTA, 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 2.5 mg/ml snake venom จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาโดยใส่สารตั้งต้น 5  $\mu$ l [ $^3$ H] guanosine 50,000 cpm ปริมาณ 20  $\mu$ l แล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 30  $^{\circ}$ C นาน 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม DEAE anion resin ปริมาณ 100  $\mu$ l เขย่านาน 10 นาที แล้วตั้งรอกทิ้งไว้ให้ resin ตกตะกอนประมาณ 10 นาที จากนั้นดูดเฉพาะส่วนใสด้านบนปริมาณ 100  $\mu$ l ใส่ลงในจานหลุมที่มี DEAE anion resin ปริมาณ 100  $\mu$ l เขย่านาน 10 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ดูดเฉพาะส่วนใสด้านบนปริมาณ 100  $\mu$ l ลงใน optiplate แล้วเติม microscint 20<sup>TM</sup> ปริมาณ 200  $\mu$ l เขย่านาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปวัดค่า radioactivity ด้วยเครื่อง TopCount NXT (beta counter ชนิดจานหลุม) ต่อไป โดยค่าที่อ่านได้จะถูกนำมาคำนวณหา %inhibition ดังสมการที่แสดงข้างล่าง

$$\%PDE \text{ inhibition} = \left( \frac{1 - \%hydrolysis_{\text{sample}}}{\%hydrolysis_{\text{control}}} \right) \times 100 \text{ ----- (1)}$$

โดย  $\%hydrolysis_{\text{sample}}$  คือ ความสามารถของเอนไซม์ของสารตัวอย่าง

$\%hydrolysis_{\text{control}}$  คือ ความสามารถของเอนไซม์ของ 1% DMSO ซึ่งเป็น solvent

$$\%hydrolysis_{\text{sample}} = \left( \frac{CPM_{\text{sample}} - CPM_{\text{background}}}{CPM_{\text{total count}} - CPM_{\text{background}}} \right) \times 100 \text{ ----- (2)}$$

โดย  $CPM_{\text{sample}}$  คือ ค่าปริมาณรังสีที่วัดได้ในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ PDE-5 กับ 1% DMSO

$CPM_{\text{background}}$  คือ ค่าปริมาณรังสีที่วัดได้ในปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์ PDE-5 กับ 1% DMSO

$CPM_{\text{total count}}$  คือ ปริมาณรังสีของสารตั้งต้นก่อนทำปฏิกิริยา

### 3.2 การศึกษาฤทธิ์ต้าน PDE6

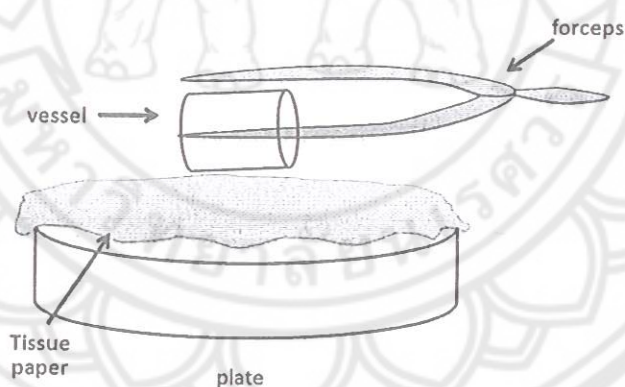
การวัดค่า activity ของ PDE6 ทำตามรายงานของ Temkitthawon และคณะ (2011) ซึ่งปรับปรุงมาจากขั้นตอนของ Huang et al. และกิมะ (2014) โดยใช้ CH buffer, EGTA, PDE6 solution และสารละลายตัวอย่างหรือ control (5% DMSO ใน buffer) อย่างละ 25  $\mu$ l จากนั้นเติม 5  $\mu$ M [ $^3$ H]cGMP ปริมาณ 25  $\mu$ l และ incubated ที่ 30 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการนำหลอดทดลองไปวางในน้ำเค็ดเป็นเวลา 1

นาที่ แล้วทำให้เย็น โดยใช้เวลา 5 นาที จากนั้น ขั้นตอนที่สองในการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ทำโดยใส่ 2.5 mg/ml snake venom ปริมาณ 25  $\mu$ l ลงในหลอดทดลอง แล้วอุ่นที่ 30°C นาน 5 นาที จากนั้น เติม 20 mM Tris-HCl, pH 6.8 (buffer I) ปริมาณ 250  $\mu$ l ลงไป นำไปผ่าน QAE resin column แล้วชะด้วย buffer I (500  $\mu$ l 4 ครั้ง) นำสารละลายที่ถูกชะออกมาไปผสมใน scintillant cocktail แล้ววัด radioactivity โดยใช้  $\beta$ -counter %hydrolysis ของ PDE6 จำนวนแบบเดียวกับของ PDE5

#### 4. วิธีการศึกษาฤทธิ์การคลายตัวของหลอดเลือดแดงในปอดหนู

##### 4.1 สัตว์ทดลองและการเตรียมหลอดเลือด

สัตว์ทดลองที่ใช้ คือหนู Wistar Rat เพศผู้หนัก 200-250 กรัม สั่งซื้อจากสถานสัตว์ทดลองเพื่อการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก หนูทุกตัวจะถูกนำมาเลี้ยง อย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง ณ ห้องสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยถูกเลี้ยงอย่างอิสระภายใต้การควบคุมแสงสว่าง 12:12 ชั่วโมง Light:Dark cycle และปรับอุณหภูมิให้เหมาะสม (25±2 °C) สัตว์ทดลองจะถูกสลบด้วย pentobarbitalsodium (intraperitoneal injection) ขนาด 65mg/kg หลังจากสลบแล้วสัตว์ทดลองจะถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบโดยการตัดชั่วหัวใจ แล้วแยกเอาหลอดเลือด aorta และ pulmonary artery ออกมาจากปอด ถ้าต้องการจะเอา endothelium cell ออกจากหลอดเลือดแดงปอดเพื่อทดสอบการตำแหน่งการออกฤทธิ์ของสาร curcumin และ analogs นั้น มีวิธีการ โดยนำเอา forceps ขูดไปมากับผนังหลอดเลือด ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 เทคนิคการเอา endothelium ออก

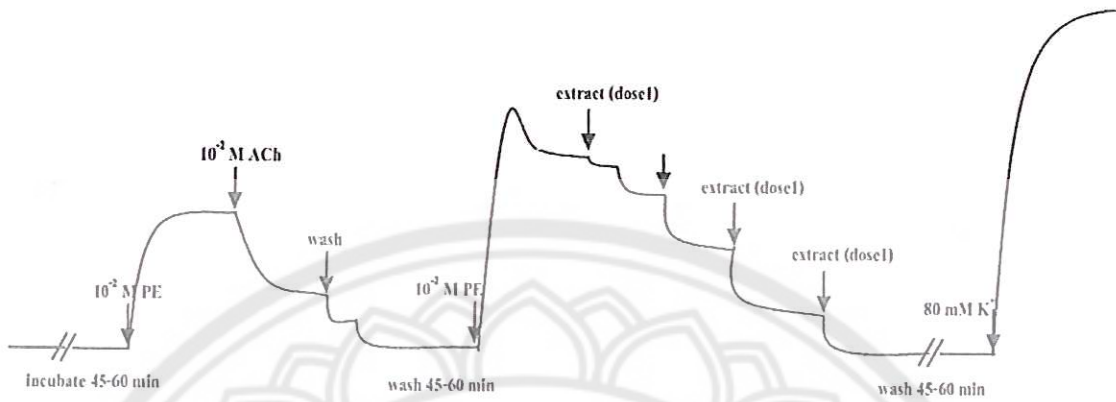
การตอบสนองของหลอดเลือดจะถูกวัดในรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของแรงตึงตัวของหลอดเลือดที่เกิดขึ้นเมื่อหยดสารสกัด curcumin และสารอนุพันธ์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันลงไป ใน organ bath ที่มีหลอดเลือด aorta หรือ pulmonary artery แขนงอยู่ แรงที่เกิดขึ้นจะถูกแปลงสัญญาณความแรง (force transducer) และกราฟการตอบสนองที่ได้จะถูกบันทึกโดยชุดอุปกรณ์แมคแลบคอมพิวเตอร์ (MacLab, ADInstrument, Sydney Australia)

ซากสัตว์ทดลองที่เสียชีวิตแล้วจะถูกเก็บไว้ในที่เย็นประมาณ  $-20^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะนำไปทำลายอย่างถูกวิธี โดยผู้ที่ผ่านการอบรมจากสถาบันสัตวทดลองมหาวิทยาลัยนเรศวร กระบวนการในการทดลองที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ทดลองผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการจริยธรรมการทำการวิจัยในสัตว์ทดลอง (NU-AE540416) แล้ว

#### 4.2 การทดสอบสารต่อฤทธิ์การคลายตัวของหลอดเลือดแดงในปอดหนู

ทำการทดสอบสารต่อฤทธิ์การคลายตัวของหลอดเลือดแดงในปอดหนูของสาร curcumin และอนุพันธ์ มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PDE-5 โดยใช้วิธีเทคนิค organ bath ซึ่งมีวิธีการวิจัยดังนี้

นำหลอดเลือดที่แยกแล้วได้ไปแขวนในหลอดทดลองที่มีสารละลาย KREBS solution ที่มีส่วนประกอบคือ NaCl 122 mM; KCL 5 mM; N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethane-sulfonic acid] (HEPES) 10 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 mM;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.5mM;  $\text{MgCl}_2$  1 mM; Glucose 11 mM และ  $\text{CaCl}_2$  1.8 mM ปรับ pH=7.3 ด้วย NaOH ตลอกจนควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 37 องศาเซลเซียสและให้ออกซิเจนตลอดเวลา หลอดเลือดจะถูกแขวนด้วยแรงดึงที่ระดับเหมาะสม (optimal tension) ประมาณ 1 กรัม และทิ้งไว้ให้เข้าสู่สมดุลประมาณ 45-60 นาที ก่อนทำการทดลอง โดยทำการเปลี่ยน KREBS Solution ทุกๆ 15 นาที จากนั้นเติม  $2\ \mu\text{l}$  ของ  $10^{-7}\text{M}$  phenyleprine, PE (ความเข้มข้นสุดท้าย =  $10^{-5}\text{M}$ ) ซึ่ง PE มีคุณสมบัติเป็น  $\alpha_1$ -receptor agonist รองนหลอดเลือดหดตัวในระดับที่คงที่ แล้วเติม  $10^{-7}\text{M}$  acetylcholine, Ach (ความเข้มข้นสุดท้าย =  $10^{-5}\text{M}$ ) เพื่อทำการทดสอบว่าหลอดเลือดยังมี endothelium cell อยู่โดยจะพบว่าหลอดเลือดเกิดการคลายตัวเมื่อเติม Ach(80% -100 % ของการคลายตัวของหลอดเลือดจึงถือเป็นหลอดเลือดที่มี endothelium , endothelium intact) จากนั้นล้างหลอดเลือดโดยการเปลี่ยน KREBS solution ทุกๆ 15 นาที และรอหลอดเลือดเข้าสู่สมดุลจากนั้นเติม PE ที่ความเข้มข้นเดิม เพื่อให้หลอดเลือดหดตัว (Kamkaewet al, 2011) ก่อนเติม curcumin และอนุพันธ์ AS-KI 021, AS-KI 022, AS-KI 033, AS-KI 064, AS-KI 086 และ AS-KI 087 ที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ เมื่อหลอดเลือดหดตัวจนสมดุลแล้วทำการเติมสารตัวอย่าง โดยจะเป็นการเติมสารแบบค่อย ๆ เพิ่มความเข้มข้น (cumulative concentration) สำหรับในการทดสอบฤทธิ์การคลายตัวของหลอดเลือดจะหยดสารละลายของสารสกัด curcuminและอนุพันธ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน หลังจากนั้นทำการล้างหลอดเลือดอีกครั้งจนแรงดึงของหลอดเลือดลงไปสู่สภาวะพัก (resting tone, 1g) ประมาณ 45 – 60 นาที ก่อนทำการเติม 80 mM KCl เพื่อทดสอบว่าหลอดเลือดยังมีประสิทธิภาพคืออยู่ โดยจะพบว่าหลอดเลือดเกิดการหดตัวสูงเมื่อเติม 80 mM KCl ลงไป การเปลี่ยนแปลงของแรงที่เกิดขึ้นจะถูกบันทึกโดยตัวแปลงสัญญาณความแรง (force transducer) และกราฟการตอบสนองที่ได้จะถูกบันทึกโดยชุดอุปกรณ์แมคแลบคอมพิวเตอร์ (MacLab, ADInstrument, Sydney Australia)



รูปที่ 7 ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์การคลายตัวของ pulmonary artery หรือ aorta ของหนู โดยสามารถคำนวณ %PDE inhibition ดังสมการข้างล่าง

$$\% \text{ Relaxation} = \left[ 1 - \frac{\text{force of contraction (g)}}{\text{Baseline force (g)}} \right] \times 100$$

โดย Force of contraction (g) คือ แรงที่เกิดจากการหดตัวของหลอดเลือดหลังจากให้สารที่ความเข้มข้นต่างๆ  
 Baseline force (g) คือ แรงที่เกิดจากการหดตัวของหลอดเลือดในระดับคงที่หลังจากที่ให้ phenyleprine (PE) ที่ความเข้มข้น =  $10^{-2}$  M

##### 5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติใช้ Student's t-test: unpaired และ one-way ANOVA โดยใช้ Tukey's post hoc test ร่วมด้วย ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดูจาก  $p$ -values  $< 0.05$

### บทที่ 3

#### ผลการทดลองและอภิปรายผล

##### ผลของ curcumins และอนุพันธ์ในการยับยั้ง PDE5 และ PDE6

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้าน PDE5 และ PDE6 ของ curcumin และอนุพันธ์ แสดงในตารางที่ 4 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง PDE5 และ PDE6 ดีที่สุดคือ สาร 7 และ 9 ซึ่งมีค่า  $IC_{50}$  อยู่ประมาณ 4  $\mu$ M แม้ว่าสารสองชนิดนี้ จะยังมีฤทธิ์ต่ำกว่า sildenafil ถึงกว่า 100 เท่า แต่ก็มีฤทธิ์ดีกว่าสารต้นแบบ คือ สาร 1 และสารอื่นๆซึ่งมีค่า  $IC_{50}$  อยู่ในช่วง 10-100  $\mu$ M มาก สำหรับฤทธิ์ต้าน PDE6 สาร 2, 5, 6, 7, 8 และ 9 มีค่า  $IC_{50}$  อยู่ในช่วง 3-20  $\mu$ M ในขณะที่สาร 1, 3 และ 4 มีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 100  $\mu$ M (ตารางที่ 4) ดังนั้น สารที่ 1, 3 และ 4 จึงมีความน่าสนใจในเรื่องของ selectivity ต่อ PDE6

##### ความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างและฤทธิ์ต้าน PDE ของ curcumin และอนุพันธ์

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสูตร โครงสร้างและฤทธิ์ต้าน PDE5 ของ curcumin และอนุพันธ์ (Structure-activity relationship –SAR-) จากตารางที่ 4 จะเห็นว่าสาร curcumin และอนุพันธ์ทุกตัวที่มาทดสอบมีฤทธิ์ต้าน PDE5 ในระดับปานกลาง เมื่อ meta-methoxyl group ของสาร 1 ขาดหายไป อย่างที่เห็นในสารที่ 2 และ 3 พบว่าฤทธิ์ต้าน PDE5 ลดลง แสดงว่า meta-methoxyl group มีความสำคัญกับการออกฤทธิ์ เมื่อสาร 1 ถูก demethylation ได้สารที่มีขั้วสูงขึ้นคือ 4 และพบว่ามีฤทธิ์ต้าน PDE5 ต่ำลงสองเท่า และถ้านำ methoxyl groups ออกไปทั้งสองตัวดังที่แสดงในสาร 3 พบว่าฤทธิ์ลดลง 4 เท่า เป็นไปได้ที่กลุ่มแทนที่ขนาดใหญ่ เช่น methoxyl groups ที่ตำแหน่ง meta-positions มีความสำคัญในการเกาะกับ active site ของเอนไซม์ (Cahill และคณะ, 2012)

เมื่อสาร 5 ขาดกลุ่ม ketomethylene group ไป 1 กลุ่มเมื่อเทียบกับสาร 1 พบว่า มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ น้อยลงเล็กน้อย ในขณะที่ เมื่อเปลี่ยนกลุ่มแทนที่ในลักษณะเดียวกันในสาร 2 ได้เป็นสาร 6 ฤทธิ์ต้าน PDE5 กลับเพิ่มขึ้น และเมื่อนำสาร 6 มาพลิก และย้ายกลุ่ม hydroxyl groups จากตำแหน่ง 4' ไปยัง 2' และ 4'' ไปยัง 3'' รวมทั้งเอา methoxyl group ออก ได้สารที่มีฤทธิ์สูงคือสารที่ 7

สาร curcumin และ อนุพันธ์ (1-7) ละลายน้ำได้ไม่ดี ผู้วิจัยจึงได้เติมกลุ่ม a triazole carboxylic group ลงไปที่ 2' hydroxyl group ในสาร 7 ได้เป็นสาร 8 แต่ยังไม่ส่งผลต่อฤทธิ์ต้าน PDE5 แต่เมื่อเติมสารกลุ่มนี้ที่ตำแหน่ง 3''-hydroxyl group ของ 7 ได้สาร 9 ซึ่งมีฤทธิ์ต้าน PDE5 ดีพอๆกับสาร 7 แต่สามารถละลายน้ำได้ดีกว่า

สารต้าน PDE5 ที่ดีควรมีฤทธิ์ต่อ PDE6 น้อยเพื่อหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงต่อตา เช่น tadalafil เป็นตัวอย่างของความสำเร็จในการออกฤทธิ์เฉพาะเจาะจง (Cahill และคณะ 2012) จากผลการทดสอบฤทธิ์ของ curcumin



analogue ต่อ PDE6 พบว่า สาร 1, 3 และ 4 มีฤทธิ์ต้าน PDE6 ต่ำกว่า PDE5 ซึ่งแสดงถึง selectivity ที่ดี ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการปรับปรุงโครงสร้างของอนุพันธ์ curcumin ต่อไป อาจทำให้ได้สารฤทธิ์ต้าน PDE5 ที่ดีขึ้น และมี specificity ที่ดีด้วย

ตารางที่ 4 ค่า IC<sub>50</sub> ของ curcumin อนุพันธ์และ sildenafil ในการยับยั้ง PDE5 และ PDE6 ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± S.E.M (n=3)

Compounds	Chemical structures	IC <sub>50</sub>	
		PDE5 (μM)	PDE6 (μM)
1		18.8 ± 2.1 <sup>a</sup>	113.9±20.9 <sup>b</sup>
2		50.6 ± 3.3 <sup>c</sup>	12.6±2.8 <sup>a</sup>
3		94.4 ± 5.2 <sup>d</sup>	>500 <sup>c</sup>
4		44.5 ± 1.5 <sup>c</sup>	>700 <sup>d</sup>
5		30.5 ± 5.1 <sup>b</sup>	18.1±9.7 <sup>a</sup>
6		27.6 ± 5.7 <sup>b</sup>	7.6±1.8 <sup>a</sup>
7		4.4 ± 1.6 <sup>a</sup>	4.0±2.1 <sup>a</sup>
8		17.1 ± 2.0 <sup>a</sup>	5.1±2.0 <sup>a</sup>
9		3.9 ± 0.6 <sup>a</sup>	2.8±2.3 <sup>a</sup>
Sildenafil		0.03 ± 0.01 <sup>c</sup>	ND

<sup>a-c</sup> ตัวอักษรที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างกับค่าอื่นๆใน column อย่างมีนัยสำคัญ ที่  $p < 0.05$

### ผลจากการทดสอบการคลายตัวของหลอดเลือดในปอดและหลอดเลือดแดงของ curcumin และอนุพันธ์

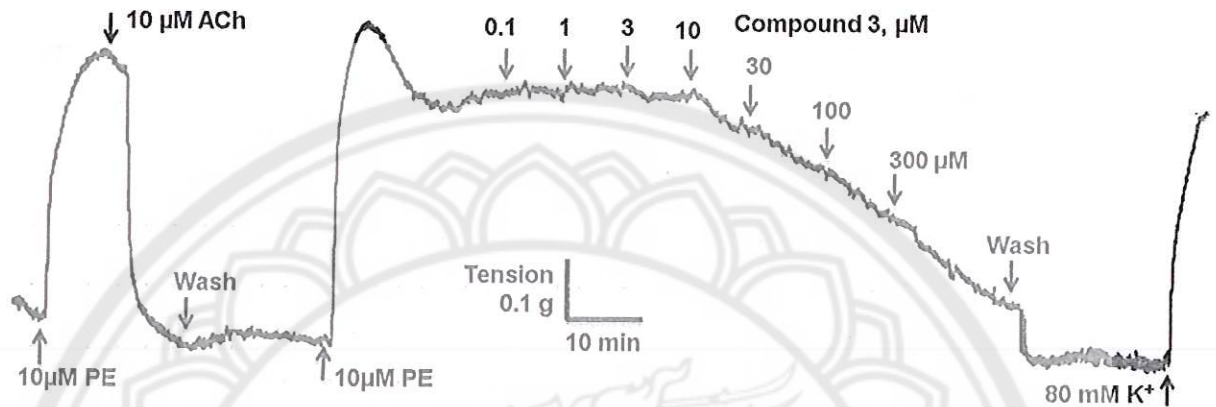
ผลของ curcumin ต่อการคลายตัวของหลอดเลือด pulmonary artery ที่มี endothelium พบว่าสาร curcuminoids (1-3) และสารอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้นมา (4-9) สามารถทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้ โดยฤทธิ์แปรผันโดยตรงกับความเข้มข้น (รูปที่ 8 และ 9) ในขณะที่สารมาตรฐาน PDE5 inhibitor, sildenafil, แสดงฤทธิ์ขยายหลอดเลือด pulmonary ได้ดีมาก โดยเกิด supramaximal relaxation เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น แต่ curcumin และอนุพันธ์ไม่สามารถเกิด supramaximal relaxation ได้ เนื่องจากมีข้อจำกัดเรื่องการละลาย และมีฤทธิ์ต่ำกว่า sildenafil มาก ดังนั้น ในรายงานฉบับนี้ จะรายงานฤทธิ์ขยายหลอดเลือดเป็นค่าความเข้มข้นที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัว 40% (EC40) ยกเว้นสำหรับ sildenafil ที่จะรายงานทั้ง EC50 และ EC40 จากผลการทดลอง พบว่าสารทุกตัว (1-9) แสดงฤทธิ์ในการขยาย pulmonary artery ที่มี endothelium ในช่วงใกล้เคียงกัน (ค่าเฉลี่ย EC40s = 58-111  $\mu$ M) (ตารางที่ 5) ส่วน sildenafil มีค่า EC40 เท่ากับ 0.04  $\mu$ M และมีค่า EC50 เท่ากับ 0.074+0.016  $\mu$ M ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา (Teixeira และคณะ, 2006; Pauvert และคณะ, 2003)

เมื่อเปรียบเทียบผลของสาร curcumin และอนุพันธ์ต่อ pulmonary artery ที่มี endothelium และที่เลาะ endothelium ออก (denuded pulmonary artery) พบว่า เมื่อเอา endothelium ออก สารที่ 2, 5, 8 and 9 จะมีฤทธิ์ลดลง (ตารางที่ 5) (รูป 9b, e, h, i) เช่นเดียวกับที่สังเกตเห็นในกรณีการให้ sildenafil (รูป 9j) (Teixeira และคณะ, 2006) แสดงว่า กลไกการออกฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดคลายตัวของสารเหล่านี้ อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับ endothelium ด้วย แต่สำหรับสาร 1, 3, 4, 6, และ 7 (รูป 9a, c, d, f, g) ฤทธิ์ขยายหลอดเลือดยังคงอยู่ในระดับเดิม แม้จะลอกเอา endothelium ออก แสดงว่าการออกฤทธิ์ของสารเหล่านี้ เกี่ยวข้องกับกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดงเท่านั้น ซึ่งนอกจากจะเกี่ยวข้องกับ PDE5 แล้ว ยังอาจจะเกี่ยวข้องกับ guanylyl cyclase บน  $\beta$ -receptors (Dash และ Parija, 2013) หรือ cytosolic  $Ca^{2+}$  handling (Xu และคณะ, 2007)

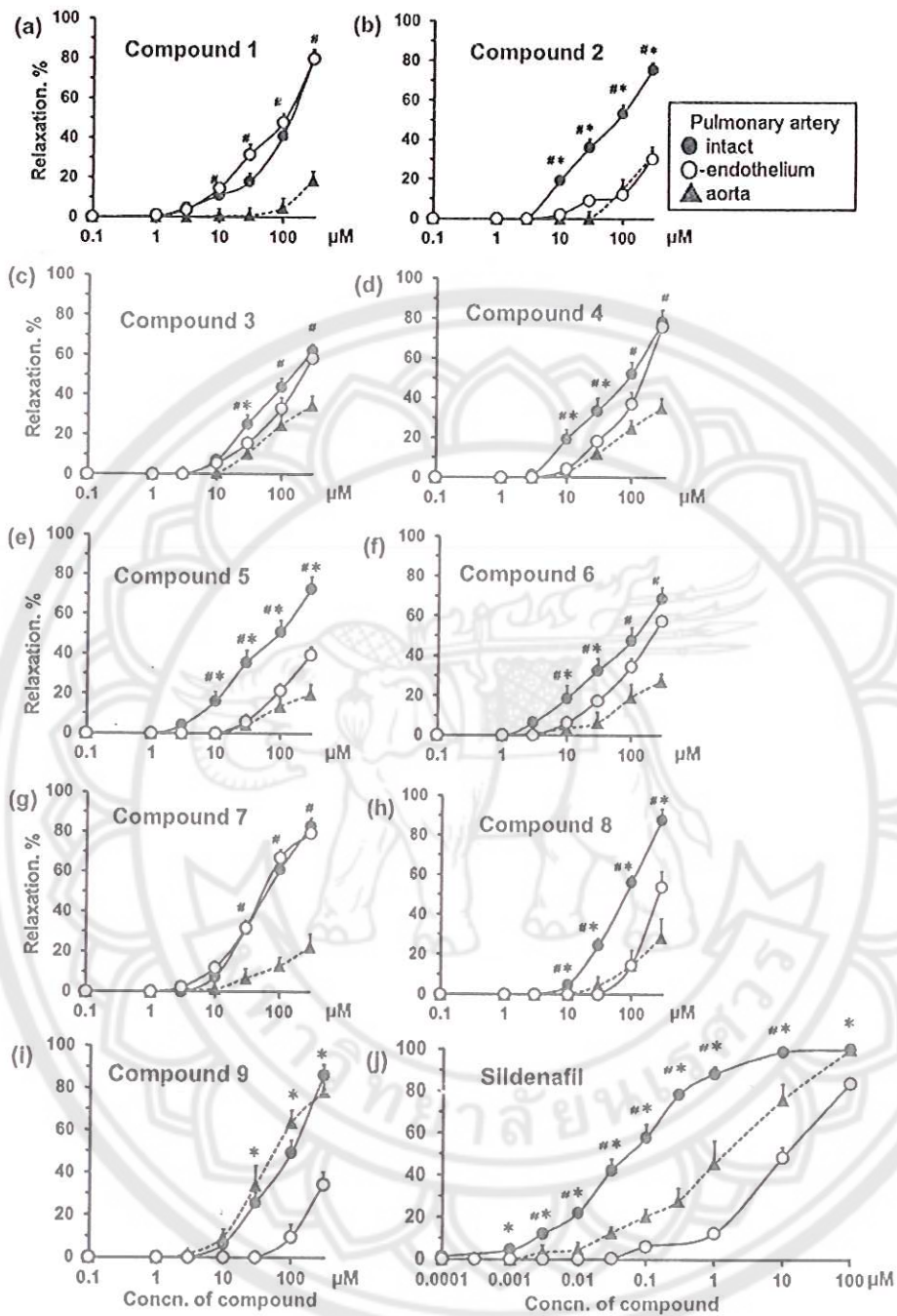
เป็นที่น่าสนใจว่า สาร curcumin และอนุพันธ์ ยกเว้นสาร 9 มีผลต่อ aorta น้อยมากเมื่อเทียบกับ pulmonary artery (รูป 9) เช่นเดียวกับ sildenafil ที่แสดงความจำเพาะต่อ pulmonary artery โดยมีฤทธิ์ต่อ aorta น้อยกว่า pulmonary artery ประมาณ 40 เท่า

จากการศึกษาพบว่า แม้สาร 7 และ 9 จะมีฤทธิ์ต้าน PDE5 ที่ดีกว่าสารตัวอื่นในกลุ่มนี้ แต่เมื่อทดลองกับหลอดเลือดปอดแล้ว ฤทธิ์ในการขยายหลอดเลือดปอดกลับไม่ได้แตกต่างจากสารอื่น ซึ่งอาจจะเป็นจากหลายสาเหตุเช่น curcumin และอนุพันธ์ มีความสามารถในการดูดซึมเข้าเซลล์ได้ต่ำ การเมตาบอลิซึมของสาร หรืออาจเกิดจากสาร mediator หรือสารอื่นๆ ใน cell มีความเกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ของสารที่ทดสอบ (Wahlang และคณะ, 2011, Shishodia, 2013; Metzler, 2013) อย่างไรก็ตาม การแสดงฤทธิ์ขยายหลอดเลือดปอดของสาร curcumin และอนุพันธ์ แม้จะอยู่ในระดับไม่สูงนัก แต่ก็ยังมี selectivity ที่ดี คือมีผลต่อ aorta น้อย และยัง

อาจมีกลไกอื่นที่ช่วยให้อาการของโรคดีขึ้น เช่นฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น จึงทำให้อุณหภูมิของ curcumin ยังมีความน่าสนใจในการศึกษาเป็นสารที่ใช้ในการขยายหลอดเลือดปอด



รูปที่ 8 ตัวอย่างผลที่ได้จากการทดลองการศึกษาผลของสาร 3 ต่อการขยายตัวของ pulmonary artery โดยเริ่มจากการทำให้ให้เส้นเลือดหดตัวด้วย phenylephrine (PE) และให้สาร acetylcholine (ACh) เพื่อแสดงว่าหลอดเลือดมีการขยายตัวได้ตามปกติ จากนั้นจึงให้สาร 3 ที่ความเข้มข้น 0.1 - 300  $\mu\text{M}$  แล้วบันทึกการขยายตัวของหลอดเลือด เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ใส่ high potassium solution (K) เพื่อแสดงให้เห็นว่าหลอดเลือดยังสามารถหดตัวได้เหมือนเดิม



รูปที่ 9 กราฟเปรียบเทียบผลของ curcumin และ AS-KI021 ต่อคลายตัวของหลอดเลือด pulmonary artery ที่มีและไม่มี endothelium และ Aorta ที่ความเข้มข้นต่างๆ ค่าที่รายงานคือค่าเฉลี่ย + SEM (n=5-6) \*  $p < 0.05$  ในการเปรียบเทียบระหว่างการคลายตัวของ pulmonary arteries ที่มีและไม่มี endothelium #  $p < 0.05$  ในการเปรียบเทียบระหว่างการคลายตัวของ pulmonary arteries (ที่มี endothelium) กับ aortas

ตารางที่ 5 EC<sub>40</sub> ในการขยายหลอดเลือด pulmonary arteries ที่มี (*intact*) และไม่มี endothelium (*denuded*) รวมทั้ง aorta ของ curcumin (n=5-6), *p*-values แสดงความแตกต่างของ EC<sub>40</sub> ระหว่าง endothelium-intact กับ endothelium-denuded pulmonary arteries. # *p*<0.0001 สำหรับ endothelium-intact กับ intact aorta.

Compounds	EC <sub>40</sub> (μM)		
	pulmonary artery <i>intact</i>	pulmonary artery <i>denuded</i>	aorta- <i>intact</i>
1	109 ± 23	93 ± 30 ( <i>p</i> =0.82)	>300±0 <sup>#</sup>
2	58 ± 10	>300 ± 0 ( <i>p</i> <0.0001)	>300±0 <sup>#</sup>
3	111 ± 29	184 ± 31 ( <i>p</i> =0.14)	>300±0 <sup>#</sup>
4	58 ± 20	121 ± 20 ( <i>p</i> =0.058)	>300±0 <sup>#</sup>
5	76 ± 24	>300 ± 0 ( <i>p</i> <0.0001)	>300±0 <sup>#</sup>
6	98 ± 28	147 ± 21 ( <i>p</i> =0.17)	>300±0 <sup>#</sup>
7	59 ± 8	52 ± 6 ( <i>p</i> =0.74)	>300±0 <sup>#</sup>
8	59 ± 8	208 ± 17 ( <i>p</i> <0.0001)	>300±0 <sup>#</sup>
9	71 ± 15	>300 ± 0 ( <i>p</i> <0.0001)	46±11
Sildenafil	0.042 ± 0.009	8.4 ± 0.8 ( <i>p</i> <0.0001)	1.8±1.0 <sup>#</sup>

## บทที่ 4

### สรุปผลการทดลอง

คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาศักยภาพของ curcumin (1) และสารอนุพันธ์ที่ได้จากธรรมชาติ (2-3) และการสังเคราะห์ (4-9) ในการพัฒนาเป็นยาเพื่อรักษาความดันปอดสูง โดยพบว่าสาร curcumin และสารอนุพันธ์สามารถยับยั้ง PDE5 ได้ในระดับ micromolar โดยอนุพันธ์ที่ออกฤทธิ์ดีที่สุดคือ 7 และ 9 แต่เมื่อทดสอบสารกับ PDE6 พบว่าสารดังกล่าวไปยับยั้ง PDE6 ด้วย ซึ่งอาจมีผลให้เกิดผลข้างเคียงต่อตา เมื่อนำสารไปใช้จริง สารที่มี selectivity ที่ดีต่อ PDE5 คือสาร สาร 1, 3 และ 4

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับการออกฤทธิ์ต้าน PDE5 ของสาร 1-9 พบว่า *meta*-methoxyl group และ ketomethylene group มีความสำคัญกับการออกฤทธิ์ สาร curcumin และอนุพันธ์มีปัญหาเรื่องการละลาย ผู้วิจัยจึงทดลองเติม triazole carboxylic group ลงไปที่ 3''-hydroxyl group ของ 7 ได้สาร 9 ซึ่งมีฤทธิ์ต้าน PDE5 ดีพอๆกับสาร 7 แต่สามารถละลายน้ำได้ดีกว่า

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาสาร 1-9 ต่อการขยาย pulmonary artery ที่แยกมาจากหนู พบว่าสารทุกตัวสามารถทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้ โดยฤทธิ์แปรผันโดยตรงกับความเข้มข้น มีค่า EC<sub>40</sub> ระหว่าง 58-111  $\mu$ M โดยสารที่ 7 และ 9 ที่ออกฤทธิ์ต้าน PDE5 ได้ดีที่สุด ใน enzymatic assay นั้น กลับแสดงฤทธิ์ต่อการขยาย pulmonary artery ไม่แตกต่างจากอนุพันธ์อื่นๆ จึงเป็นไปได้ว่าการออกฤทธิ์ขยาย pulmonary artery ที่แยกมาจากหนูนี้อาจเกี่ยวข้องกับกลไกหลายอย่าง ไม่ได้มีแค่การยับยั้ง PDE5 อย่างเดียว นอกจากนี้ ผู้ทำการวิจัยยังได้ทำการศึกษา ผลของสาร curcumin และอนุพันธ์ต่อ pulmonary artery ที่มี endothelium และที่ไล่ endothelium ออก พบว่า เมื่อเอา endothelium ออก สารที่ 2, 5, 8 and 9 จะมีฤทธิ์ลดลง แสดงว่า กลไกการออกฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดคลายตัวของสารเหล่านี้ อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับ endothelium ด้วย แต่สำหรับสาร 1, 3, 4, 6, และ 7 แม้จะลอกเอา endothelium ออก ฤทธิ์ขยายหลอดเลือดยังคงอยู่ในระดับเดิม แสดงว่าการออกฤทธิ์ของสารเหล่านี้ เกี่ยวข้องกับกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดงเท่านั้น

เมื่อทำการศึกษาฤทธิ์ของสาร 1-9 ต่อการขยายตัวของ aorta พบว่า สาร curcumin และอนุพันธ์ทุกตัว ยกเว้นสาร 9 มีผลต่อ aorta น้อยมากเมื่อเทียบกับ pulmonary artery จึงทำให้สารกลุ่มนี้ มียังมีความน่าสนใจในการพัฒนาต่อเพื่อใช้ในผู้มีความดันปอดสูง โดยการที่ curcumin และอนุพันธ์มีผลทางเภสัชวิทยาอย่างกว้างขวาง เช่น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านอักเสบ อาจทำให้เป็นผลดีต่อการนำไปใช้ในผู้มีความดันปอดสูงด้วย การวิจัยในขั้นตอนต่อไป อาจทำการพัฒนาอนุพันธ์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ PDE5 มากขึ้น มีฤทธิ์ขยายหลอดเลือดในปอดได้ดีขึ้น รวมทั้งควรศึกษาถึงความสามารถในการดูดซึมเข้าสู่ร่างกายของสารด้วย

## บทที่ 5

### เอกสารอ้างอิง

- Abdel Aziz MT, El Asmer MF, Rezaq A, Kumosani TA, Mostafa S, Mostafa T, et al. Novel water-soluble curcumin derivative mediating erectile signaling. *Journal of Sexual Medicine*. 2010;7(8):2714-22.
- Abusnina A, Keravis T, Lugnier C. D020 The polyphenol curcumin inhibits in vitro angiogenesis and cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) activities similarly to PDE inhibitors. *Archives of Cardiovascular Diseases*. 2009;102(Supplement 1):S43-S.
- Babu PS, Srinivasan K. Hypolipidemic action of curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*) in streptozotocin induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem*. 1997 Jan;166(1-2):169-75.
- Brock, G. (2002) Oral agent: First-line therapy for erectile dysfunction. *Eur. Urol. Supplements*. 12-18.
- Cahill K.B. et al. (2012) Identification of amino acid residues responsible for the selectivity of tadalafil binding to two closely related phosphodiesterases, PDE5 and PDE6. *J Biol Chem*. 287(49): 41406–41416.
- Chainani-Wu N. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). *J Altern Complement Med*. 2003 Feb;9(1):161-8.
- Changtam C, de Koning HP, Ibrahim H, Sajid MS, Gould MK, Suksamram A. Curcuminoid analogs with potent activity against *Trypanosoma* and *Leishmania* species. *Eur J Med Chem*. 2010 Mar;45(3):941-56.
- Changtam C. et al. (2010) Curcuminoid analogues with potent activity against *Trypanosoma* and *Leishmania* species. *Eur J Med Chem*. 45: 941-956.
- Corbin JD, Beasley A, Blount MA, Francis SH. High lung PDE5: a strong basis for treating pulmonary hypertension with PDE5 inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Sep 2;334(3):930-8.
- Corbin JD. Mechanisms of action of PDE5 inhibition in erectile dysfunction. *Int J Impot Res*. 2004;16(S1):S4-S7.

1 6964435

- 2 ส.ย. 2558



สำนักหอสมุด

- Dash J.R., Parija S.C.(2013) Spasmolytic effect of curcumin on goat ruminal artery is endothelium independent and by activation of sGC. *Res Vet Sci.* 95(2): 588–593..
- Dell'Agli, M., Galli, G.V., Dal Cero, E., Belluti, F., Matera, R., Zironi, E., Pagliuca, G., Bosisio, E. (2008) Potent inhibition of human phosphodiesterase-5 by icariin derivatives. *J Nat Prod.* 71:1513-7.
- Esayan, D.M. (1999) Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) inhibitors and immunomodulation *Biochem. Pharmacol.* 57: 965-973.
- Feldman, H.A., Johannes, C. B., Derby, C.A., Kleinman, K.P., Mohr, B.A., Araujo, A.B., and McKinlay, J.B. (2000) Erectile dysfunction and coronary risk factors: Prospective results from the Massachusetts male aging study. *Preventive Medicine.* 30: 328-338.
- Galie N, Torbicki A, Barst R, Darteville P, Haworth S, Higenbottam T, *et al.* Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 2004 Dec;25(24):2243-78.
- Hoult, J.R.S., and Paya, M. (1996) Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen. Pharmac.* 27: 713-722.
- Ko, W., Shih, C., lai, Y., Chen, J., Huang, H. (2004) Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure activity relationships. *Biochem. Pharmacol.* 68: 2087-2094.
- Lin CS, Lin G, Lue TF. Isolation of two isoforms of phosphodiesterase 5 from rat penis. *Int J Impot Res.* 2003 Apr;15(2):129-36.
- Lin Q, Wang LX, Chen SX, Zhou XF, Huang XY, Fan XF. [Effect of curcumin on pulmonary hypertension and wall collagen of pulmonary arterioles of chronic hypoxic hypercapnic rats]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi.* 2006 Aug;22(3):257-61.
- Metzler M *et al.* (2013) Curcumin uptake and metabolism. *BioFactors.* 39(1): 14–20.
- Moreland, R.B., Goldstein, I, Kim, N.N., and Traish, A.(1999) Sildenafil citrate, a selective phosphodiesterase type 5 inhibitor: Research and clinical implications in erectile dysfunction. *TEM.* 10: 97-104.



- Pauvert O. *et al.* (2003) Effect of sildenafil on cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, vascular tone and calcium signaling in rat pulmonary artery. *Br J Pharmacol.* 139(3): 513–522.
- Priyadarsini KI, Maity DK, Naik GH, Kumar MS, Unnikrishnan MK, Satav JG, *et al.* Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. *Free Radic Biol Med.* 2003 Sep 1;35(5):475-84.
- Roengsamran, S., Petsom, A., Ngamrojanavamich, N., Rungsilp, T., Sittiwicheanwong, P., Khorphueng, P., Cherdshewasart, W., and Chaichantipyuth, C. (2000) Flavonoid and flavonoid glycoside from *Butea superba* Roxb. and their cAMP phosphodiesterase inhibitory activity. *J. Sci. Res. Chula. Univ.* 25: 169-176.
- Rossi R, Nuzzo A, Lattanzi A, Coppi F, Modena MG. Sildenafil improves endothelial function in patients with pulmonary hypertension. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics.* 2008;21(1):172-7.
- Rudarakanchana N, Trembath RC, Morrell NW. New insights into the pathogenesis and treatment of primary pulmonary hypertension. *Thorax.* 2001 Nov;56(11):888-90.
- Rybalkin, S.D., Rybalkina, I.G., Shimizu-Albergine, M., Tang, X., and Beavo, J.A. (2003) PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain. *The EMBO journal.* 23: 469-478.
- Shin, J.H., Kim, H.J., Kwak, J.H., Chun, H.O., Kim, J. H., Park, H., Kim, D.H. and Lee, Y.S. (2002) A prenylated flavonol, sophoflavescenol: a potent and selective inhibitor of cGMP phosphodiesterase 5. *Bioorg. Med. Chem.Lett.* 12: 2313-2316.
- Shishodia S. (2013) Molecular mechanisms of curcumin action: gene expression. *BioFactors.* 39(1): 37–55.
- Shukla Y, Arora A, Taneja P. Antimutagenic potential of curcumin on chromosomal aberrations in Wistar rats. *Mutat Res.* 2002 Mar 25;515(1-2):197-202.
- Sonnenburg WK, Rybalkin SD, Bornfeldt KE, Kwak KS, Rybalkina IG, Beavo JA. Identification, quantitation, and cellular localization of PDE1 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Methods.* 1998 Jan;14(1):3-19.
- Teixeira C.E. *et al.* (2006) Differential effects of the phosphodiesterase type 5 inhibitors sildenafil, vardenafil, and tadalafil in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 316(2): 654–661.

- Temkitthawon, P., Viyoch, J., Limpeanchob, N., Pongamornkul, W., Sirikul, C., Kumpila, A., Suwanborirux, K., Ingkaninan K. (2008) Screening for phosphodiesterase inhibitory activity of Thai medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 119: 214-217.
- Wahlang B. *et al.* (2011) Identification of permeability-related hurdles in oral delivery of curcumin using the Caco-2 cell model. *Eur J Pharm Biopharm.* 77(2): 275–282.
- Watanabe, K., Williams, E.F., Law, J.S. and West, W.L.(1981) Effects of vinca alkaloids on calcium-calmodulin regulated cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase activity from brain *Biochem. Pharmacol.* 30: 335-340.
- Xu P.H., Long Y., Dai F., Liu Z.L. (2007) The relaxant effect of curcumin on porcine coronary arterial ring segments. *Vascul Pharmacol.* Jul;47(1):25-30.
- Xu P-H. *et al.* (2007) The relaxant effect of curcumin on porcine coronary arterial ring segments. *Vascul Pharmacol.* 47(1): 25–30.
- ระพีพล ฤกษ์ธร ณ อรุณยา (2004) <http://www.thaiheartweb.com/erectiledysfunction.htm> (27 พฤศจิกายน 2547)

## ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการ

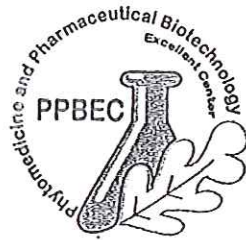
### 1. การนำเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติที่มี proceeding

Konokwan Changwichit, Prapapan Temkitthawon, Nantaka Khorana, Apichart Suksamram and Kornkanok Ingkaninan. 2014 “PDE5 vs PDE6 inhibition of curcumin and its analogues” The 3rd Current Drug Development International Conference (CDD 2014) 1–3 May 2014 Pavillion Queen’s Bay, Krabi

### 2. ส่งบทความเพื่อตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ (กำลังรอการพิจารณา)

Oraya Kruangtipa, Krongkarn Chootipb\*, Prapapan Temkitthawona, Kanokwan Changwichita, Thippawan Chuprajoc, Chatchawan Changtamd, Apichart Suksamrarn, Nantaka Khoranaa, C. Norman Scholfielda, Kornkanok Ingkaninan. Curcumin analogues inhibit phosphodiesterase-5 and dilate rat pulmonary arteries. Journal of Pharmacy and Pharmacology. Submitted.

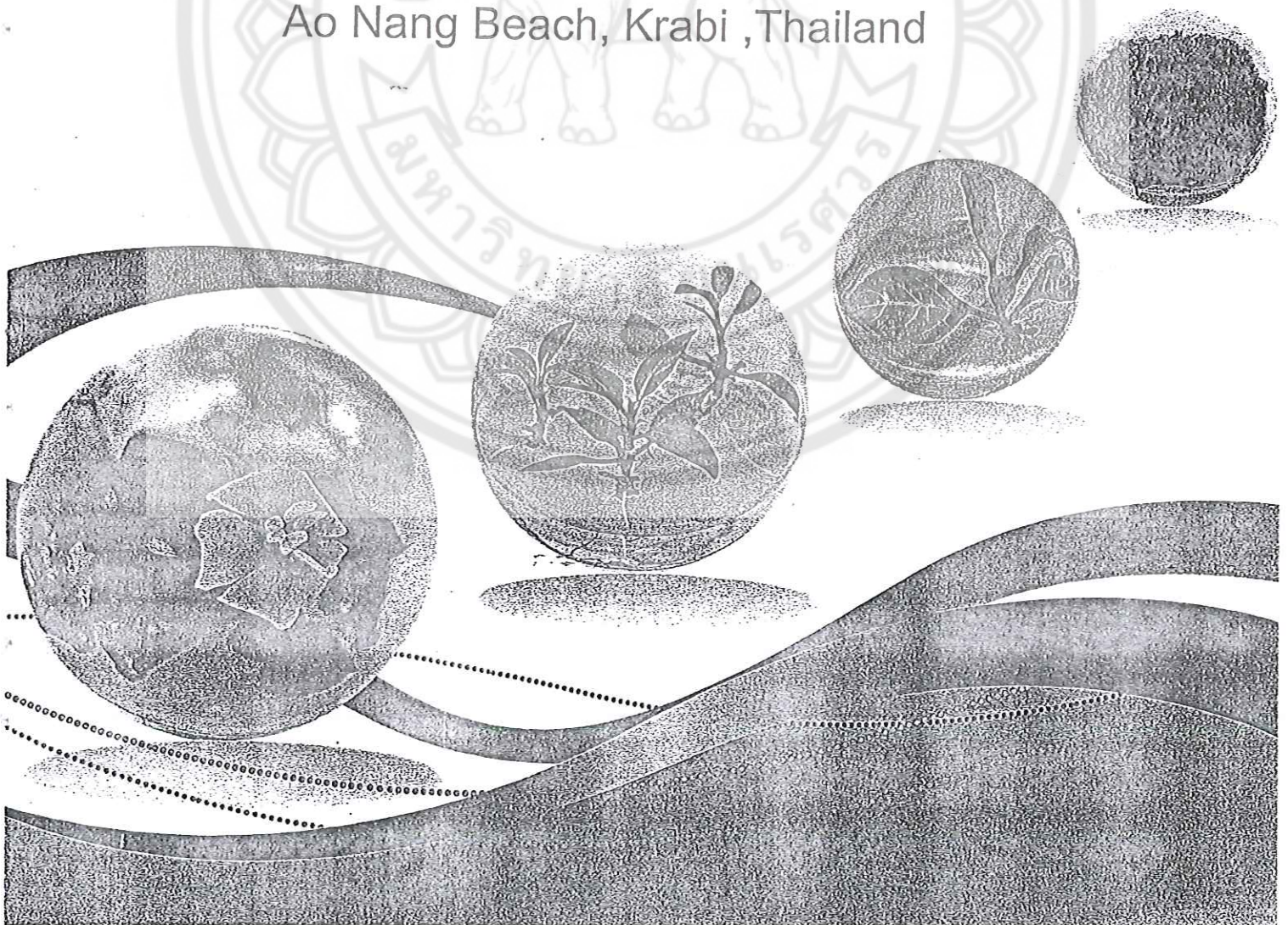




CDD 2014

The **3**<sup>rd</sup> Current Drug Development  
International Conference

May 1-3, 2014  
Ao Nang Beach, Krabi, Thailand



## PDE5 Vs PDE6 Inhibition of Curcumin and Its Analogues

Kanokwan Changwichit<sup>1</sup>, Oraya Khruangthip<sup>1</sup>, Prapapan Temkitthawon<sup>1</sup>, Nantaka Khorana<sup>1</sup>,  
Apichart Suksamrarn<sup>2</sup> and Kornkanok Ingkaninan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bioscreening Unit, Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Naresuan University, 65000 Phitsanulok, Thailand

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, 10240 Bangkok, Thailand

E-mail address: k.changwichit@gmail.com

### Introduction

Erectile Dysfunction (ED) is a common health problem affecting millions of men worldwide. Phosphodiesterase5 (PDE5) inhibitors can be used for the treatment of ED and more recently, for Pulmonary Artery Hypertension (PAH). However, most of PDE5 inhibitors show some undesirable side effects. The aim of the study is to search for new PDE5 inhibitors from synthesis and natural sources.

### Materials and Methods

Three naturally occurring curcumins (1-3) isolated from *Curcuma longa* L and six synthetic analogues (6-9) were tested for PDE5 and PDE6 inhibitory activities using a radio assay [1]. The PDE5 was obtained from rats' lungs while PDE6 was isolated from chicken's retinas [1].

### Results and Discussion

We found that curcumin together with its analogues showed inhibition effect on PDE5. Compounds 7 and 9 showed greatest PDE5 inhibitory activity with IC<sub>50</sub> values of ~4 μM. The other compounds showed IC<sub>50</sub> values in the range of 10-100 μM. Interestingly, curcumin (1), 3, and 4 showed very low effect (IC<sub>50</sub> >100 μM) on PDE6 which is the isozyme that can be found in rod and cone cells within the eye. However, the rest of the analogues i.e. 2, 5, 6, 7, 8 and 9 still showed inhibition effect on PDE6 with IC<sub>50</sub> values of 2.76 - 18.14 μM. The curcuminoid structure could be a promising lead for PDE5 inhibitors but some structure modification to increase potency and selectivity on PDE5 is necessary.

### Acknowledgement

The study was supported by Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH CIC) and Faculty of Pharmaceutical Sciences Naresuan University, Phitsanulok, Thailand.

### References

- [1] Temkitthawon P (2012) *Ph.D Thesis; Naresuan University*: 21-36.

## Curcumin analogues inhibit phosphodiesterase-5 and dilate rat pulmonary arteries

Oraya Kruangtip<sup>a</sup>, Krongkarn Chootip<sup>b\*</sup>, Prapapan Temkitthawon<sup>a</sup>, Kanokwan Changwichit<sup>a</sup>, Thippawan Chuprajob<sup>c</sup>, Chatchawan Changtam<sup>d</sup>, Apichart Suksamrarn<sup>c</sup>, Nantaka Khorana<sup>a</sup>, C. Norman Scholfield<sup>a</sup>, Kornkanok Ingkaninan<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand, <sup>b</sup>Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand, <sup>c</sup>Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand, <sup>d</sup>Division of Physical Sciences, Faculty of Science and Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samutprakarn 10540, Thailand

### Corresponding authors:

*Kornkanok Ingkaninan*, Faculty of Pharmaceutical Sciences and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand. E-mail: [k\\_ingkaninan@yahoo.com](mailto:k_ingkaninan@yahoo.com)

*Krongkarn Chootip*, Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand. E-mail: [krongkarnc@gmail.com](mailto:krongkarnc@gmail.com)

## Abstract

**Objectives** Phosphodiesterase-5 (PDE5) inhibitors are useful treatments for pulmonary arterial hypertension as pulmonary vasodilators. We aimed to study curcumin analogues for PDE5 inhibitory activity and vasorelaxation of rat pulmonary arteries.

**Methods** Three natural curcuminoids (1-3) and six synthetic analogues (4-9) were tested for PDE5 and PDE6 inhibitory activities using enzymatic radioassay. Their vasorelaxation was measured using freshly-isolated segments of rat pulmonary artery and aorta.

**Key findings** Curcuminoids (1-3) mildly inhibited PDE5 ( $IC_{50}=18\mu M$ ): the *meta*-methoxyl of curcumin was important to these for PDE5 inhibition. But hydroxyl rearrangements, removing both methoxyls and one ketomethylene yielded the potent 7 and 9 ( $IC_{50}=4\mu M$ ) (compared to sildenafil,  $IC_{50}=0.03\mu M$ ). Only 1, 3, and 4 were PDE5 selective over PDE6. Triazole-carboxylic addition provided water-solubility while preserving potency. All analogues possessed concentration-dependent vasorelaxants of pulmonary arteries ( $EC_{40}=29-90\mu M$ , maximum response=60-90% at 300  $\mu M$ ), while compounds (1-8) were weakly acting in aorta (maximum response<40%). Only demethoxycurcumin (2) and analogues 5, 8, 9 had endothelium-dependent actions. Sildenafil was highly potent ( $EC_{40}=0.04\mu M$ ) and highly endothelium-dependent in pulmonary artery but weak on intact aorta ( $EC_{40}=1.8\mu M$ ). Activity profiles suggest actions through additional cell pathways for promoting vasorelaxation.

**Conclusions** Curcumin analogues are potential leads for developing efficacious and selective PDE5 inhibitors and other pathologies of pulmonary hypertension.

**Keywords** PDE5, curcumin analogues, pulmonary artery, pulmonary artery hypertension

Abbreviations: PAH: pulmonary artery hypertension, NO: nitric oxide, PDE<sub>x</sub>: Phosphodiesterase-x, cGMP: guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate, sGC: soluble guanylyl cyclase; ACh: acetylcholine; PE: phenylephrine; DMSO: dimethylsulphoxide; EGTA: ethylene glycol tetraacetate; SAR: structure activity relationship; QAE: quaternary aminoethyl anion exchanger

## Introduction

Idiopathic pulmonary arterial hypertension (PAH) is a relatively rare lung disorder (prevalence ~6 cases/million people<sup>[1]</sup>) with a poor prognosis. Pulmonary arteries become constricted, thus reducing blood flow to the lungs and increasing pulmonary arterial pressure. This PAH increases the load on the right ventricle, leading to right heart failure and death.<sup>[2]</sup> Several mechanisms for the disease have been proposed and shown to produce PAH in animal models, but none appear to reflect the human condition. Because of this unclear etiology, current drug treatments have focused on symptomatic treatment in the form of vasodilators. Of these, sildenafil, tadalafil, vardenafil and similar drugs have received the most widespread application. These compounds are inhibitors of phosphodiesterase-5 (PDE5) found in many cells including the smooth muscle cells of pulmonary vascular tree expressed as PDE5A.<sup>[3]</sup> This enzyme is upregulated in pulmonary hypoxia and PAH<sup>[4]</sup> making it an attractive drug target for these pathologies. The substrate for this enzyme is guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cGMP) which activates in particular, ATP- and BK-channels<sup>[5]</sup> and the resulting increased K-permeability hence causing vasorelaxation. Thus inhibiting PDE5 will favour cGMP accumulation and promote vasodilatation.<sup>[6, 7]</sup> Sildenafil was initially registered as an oral drug for erectile dysfunction, then later approved for PAH treatment<sup>[6]</sup>, and is now licenced for Raynaud's disease.<sup>[7]</sup> There is a growing list of successful clinical trials with PDE5 inhibitors<sup>[8]</sup> which may lead to future licencing by regulatory bodies.<sup>[7]</sup> Clearly, these also cause vasodilatation in other tissues<sup>[8]</sup> and more especially have retinal-related complications most commonly associated with additional PDE6 blockade.<sup>[9]</sup> Therefore, the hunt continues for drugs that are specific for diseased targets including the pulmonary arterial circulation and especially erectile dysfunction.

Several *Curcuma* species are known to be vasorelaxant including *Curcuma longa*<sup>[10]</sup>, while curcumin reduces pulmonary arterial pressure.<sup>[11]</sup> We have shown that extracts of these plants exhibit PDE5 inhibitory activity.<sup>[12]</sup> This suggests that curcuminoids might provide leads for the development of a new generation of selective PDE5 inhibitors. Therefore, here we aimed to explore the activities of both natural and synthetic curcumin analogues on the inhibition of PDE5 in cell-free assay and on the vasorelaxation of freshly isolated rat pulmonary arteries *in vitro*.



## Materials and Methods

### Materials

Krebs' solution (mM): (NaCl 122; KCl 5; [N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethane-sulfonic acid)] (HEPES) 10; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5; MgCl<sub>2</sub> 1; glucose 11 and CaCl<sub>2</sub> 1.8; adjusted to pH 7.3 with 1N NaOH), acetylcholine (ACh), phenylephrine (PE), CV Buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.5; 100 mM imidazole; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 1.0 mg/ml BSA and 2.5 mg/ml snake venom), CH Buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.5 100 mM imidazole, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.0 mg/ml BSA and 0.5 mg/ml histone were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Pentobarbital sodium solution (Nembutal<sup>®</sup>) was obtained from Ceva Animal Health (Bangkok, Thailand). QAE resin (QAE Sephadex<sup>™</sup> A-25) was purchased from GE Healthcare (Sweden). The PDE5 and PDE6 were prepared from rat lung tissues and chicken retinas, respectively.

### Preparations of compounds

The natural compounds, curcumin (1), demethoxycurcumin (2) and bisdemethoxycurcumin (3), were obtained from the rhizomes of *C. longa* as described previously.<sup>[13]</sup> Compound 4 was synthesized from compound 1 as described previously.<sup>[13]</sup> Aldol condensation of substituted cinnamones (10a and 10b) and substituted cinnamaldehydes (11a, 11b and 11c) under base-catalyzed condition gave the trienones 5-7 (Figure 1). For compounds 8 and 9, the acid group-containing analogues of 7, were synthesized by coupling the alkyne analogues 12 and 13 with the azide (2-azidoacetic acid) 14 via a Click chemistry approach as shown in Figure 2 to produce 8 and 9. All the tested compounds 4-9 were characterized by spectroscopic methods and the results are consistent with their structures. The samples were kept at -20 °C until use.

### Determination of PDE5 inhibitory activity

All samples were dissolved in DMSO and diluted with water giving a final DMSO concentration of 5%. PDE5 was extracted from rat lung tissue as described previously.<sup>[14]</sup> The PDE5 assay was conducted using the two-step radioactive procedure which has been modified from Sonnenburg *et al.*, 1998.<sup>[15]</sup> 20 µl of the following reagents were added to 96-well plates: CV buffer, EGTA, PDE5 solution and test samples or control (5% DMSO in buffer). The reaction was started by adding 20 µl of 5 µM [<sup>3</sup>H]cGMP (~50,000 cpm) to the reaction mixture and incubated at 30°C for 40 min. Then, 100 µl of 50% QAE resin in water was added to the wells

to purify the hydrolysate. The plate was shaken for 10 min and left for 20 min to allow the resin to sediment. The supernatants (100  $\mu$ l) were transferred to new microplate wells containing 100  $\mu$ l of fresh 50% QAE resin. The plate was again shaken and left to permit sedimentation. Then, 100  $\mu$ l supernatant was mixed and shaken with 200  $\mu$ l of Microscint<sup>®</sup> 20 for 2 h. The radioactivity was counted by a TopCount NXT (PerkinElmer, USA), each well for 1 min. The PDE5 activity in the study was standardized to have a hydrolysis activity of 20-25% of the total substrate counts. The calculation of hydrolysis is shown in equation (1). The PDE5 inhibitory activity was calculated from equation (2).

$$\% \text{hydrolysis}_{\text{sample}} = \left[ \frac{(\text{CPM}_{\text{sample}} - \text{CPM}_{\text{background}})}{(\text{CPM}_{\text{total count}} - \text{CPM}_{\text{background}})} \right] \times 100 \text{-----(1)}$$

where  $\text{CPM}_{\text{sample}}$  is the radioactive count rate of the assay with enzyme and  $\text{CPM}_{\text{background}}$  is the count rate without enzyme.  $\text{CPM}_{\text{total count}}$  is the count rate of 20  $\mu$ l of substrate plus 100 ml of buffer 1.

$$\% \text{PDE5 inhibition} = \left[ 1 - \left( \frac{\% \text{hydrolysis}_{\text{sample}}}{\% \text{hydrolysis}_{\text{control}}} \right) \right] \times 100 \text{-----(2)}$$

where  $\% \text{hydrolysis}_{\text{sample}}$  and  $\% \text{hydrolysis}_{\text{control}}$  were the enzyme activities of the sample and solvent (1% DMSO) used in the assay, respectively. The  $\text{IC}_{50}$  values were determined using the test samples at >80% PDE5 inhibition.

#### Determination of PDE6 inhibitory activity

PDE6 activity was conducted using the procedure previously reported<sup>[14]</sup> which has been modified from Huang *et al.*, 1998.<sup>[16]</sup> 25 ml of the following reagents were added to tube: CH buffer, EGTA, PDE6 solution and test samples or control (5% DMSO in buffer). The reaction was started by adding 25  $\mu$ l of 5  $\mu$ M [<sup>3</sup>H]cGMP and incubated at 30°C for 10 min. Then, the reaction was stopped by placing the tube in boiling water for 1 min and cooled for 5 min. The second step of reaction used 25  $\mu$ l of 2.5 mg/ml snake venom added to the reaction, incubated at 30°C for 5 min. After that, 250  $\mu$ l of 20 mM Tris-HCl, pH 6.8 (buffer I) was added. The reaction was transferred to a QAE resin column and eluted 4 times with 500  $\mu$ l of buffer I. The eluent was mixed with a scintillant cocktail and the radioactivity was measured using a  $\beta$ -counter. The  $\% \text{hydrolysis}$  of PDE6 was similarly calculated as for PDE5.

#### Animals

Male Wistar rats (200-250 g) were obtained from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakhornpathom, Thailand. The study was approved by the Animal Ethics Committee, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand (NU-AE540416). Animals were housed under standard environmental conditions at  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 12 h-light and dark cycle, fed with standard rodent diet and tap water in the Center for Animal Research, Naresuan University, Thailand.

### **Tissue preparation and vascular protocols**

Rats were anesthetized by pentobarbital (65 mg/kg, intraperitoneal injection) and the lungs and aorta were isolated. Intra-pulmonary artery was removed from lung and soaked in Krebs' solution to wash off the surrounding loose connective tissue. The vessel was cut into rings 2-3 mm in length and mounted in tissue chambers via a pair of intraluminal wires. The chambers contained Krebs' solution at  $37^{\circ}\text{C}$  and bubbled with air. The rings were incubated for 45-60 min at an optimum tension of 1 g during which the solution was replaced every 15 min. The wires were connected to force transducers to measure isometric tension via a MacLab A/D converter (Chart V5, A.D. Instruments, Castle Hill, Australia), stored and displayed on personal computer. The arterial contraction and relaxation was tested by sequential application of  $10\ \mu\text{M}$  PE and  $10\ \mu\text{M}$  ACh. Only vessels showing 80-100% relaxation to ACh were considered as endothelium-intact, while in some experiments the endothelium was predenuded mechanically, and relaxations of  $<20\%$  were considered as successfully denuded. After washing for 45-60 min, vessels were precontracted by adding  $10\ \mu\text{M}$  PE again. When stable contractions were obtained, the samples (containing compounds 1-9) at concentrations of 0.1-100  $\mu\text{M}$  were cumulatively added (Figure 3). The samples were dissolved in DMSO and then diluted with water to obtain the final concentrations of 300, 100, 30, 10, 3, 1, 0.1  $\mu\text{M}$  in 2 ml tissue baths (final solutions contained  $<0.1\%$  DMSO). Sildenafil was similarly diluted to working concentrations of 0.0001-100 $\mu\text{M}$ .

### **Statistical analysis**

Data were expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M). Statistical analysis was conducted using Student's *t*-test: unpaired and one-way ANOVA, followed by Tukey's *post hoc* test. *p*-values of  $<0.05$  were considered significant.

## Results

### Inhibition of PDE5 and PDE6 by curcumin analogues

Three naturally occurring curcuminoids (1-3) and six synthetic analogues (4-9) were tested using the PDE5 and PDE6 inhibition assays. The highest potency on PDE5 was for 7 and 9 with  $IC_{50}$ s of  $\sim 4 \mu\text{M}$ . Nevertheless, compounds 7 and 9 were  $\sim 100$ -fold less potent than sildenafil but more effective than the naturally occurring 1-3 (Table 1). The other compounds showed  $IC_{50}$  values that varied between 10 and 100  $\mu\text{M}$ . For PDE6, the  $IC_{50}$ s for compounds 2, 5, 6, 7, 8 and 9 were in the range of 3-20  $\mu\text{M}$ . Only 1, 3 and 4 showed  $IC_{50}$ s  $> 100 \mu\text{M}$  (Table 1).

### Vasorelaxation of pulmonary artery and aorta by curcumin analogues

In isolated pulmonary arteries with intact endothelium, the natural curcuminoids (1-3) and synthetic analogues (4-9) demonstrated concentration-dependent vasodilatation (Figures 3, 4). Sildenafil achieved a supramaximal relaxation, but limited solubility and lower potency prevented us from determining the supramaximal effect for any of the test analogues while some of maximal responses did not even reach 50% of the maximal sildenafil response. Therefore, all potencies were expressed as an  $EC_{40}$  (for sildenafil both  $EC_{50}$  and  $EC_{40}$  were determined). Every test analogue showed similar potencies (mean  $EC_{40}$ s were 58-111  $\mu\text{M}$ ) on intact pulmonary arteries (Table 2).

Endothelial denudation of pulmonary arteries showed smaller relaxations with compounds 2, 5, 8 and 9 (Table 2) (Figure 4b, e, h, i). Similarly, sildenafil potency was substantially lower in endothelium denuded pulmonary arteries (Figure 4j). For the remaining compounds 1, 3, 4, 6, and 7 (Figure 4a, c, d, f, g), there was no change in potency with denudation.

In contrast, most of the test compounds produced weaker actions on aorta compared to intact pulmonary artery except compound 9 which was equally potent on both aorta and pulmonary artery (Figure 4i). Sildenafil was  $\sim 40$ -fold less effective on the aorta than intact pulmonary artery, i.e., only  $\sim 5$ -fold more potent than denuded pulmonary artery (Figure 4j). This could be a consequence of more PDE5 in pulmonary artery but we are unaware of any direct comparison of PDE5 in vascular smooth muscle on different arteries.

## Discussion

*Structure-activity relationship (SAR) of curcumin analogues on PDEs:* Cell-free experiments showed that all curcumin analogues were moderately active PDE5 inhibitors (Table 1). When the *meta*-methoxyl group was missing from **1**, the activities of **2** and **3** were reduced suggesting that this group is important for PDE5 inhibitory activity. Demethylation of **1** gave the more polar analogue **4** resulting in a 2-fold lower inhibitory activity while removing both methoxyl groups yielded compound **3** which produced a 4-fold reduction in activity. It might be possible that these *meta*-positions need these bulky substituents for binding to the active site.<sup>[17]</sup>

Replacement of the ketomethylene group in **1** giving **5** slightly decreased the inhibitory activity whereas a similar structural modification of **2** to **6** increased the activity. Taking compound **6** and transposing the two hydroxyl groups from positions 4' to 2' and 4'' to 3'' and removing the aromatic methoxyl group yielded the highly potent compound **7**.

Water solubility was a major challenge for curcumin analogues (**1-7**) and solubility was improved by adding a triazole carboxylic group to the 2' hydroxyl group in **7** to give **8** but this compromised PDE5 potency. In contrast, a similar substitution on the opposite 3''-hydroxyl group of **7** yielding **9** preserved the inhibitory activity as well as offering superior water-solubility.

The inhibitory activity on PDE6 is another concern because it disrupts the cGMP signaling pathway used in retinal transduction and this is avoided in the highly selective PDE5 inhibitor, tadalafil.<sup>[17]</sup> The inhibition by these compounds on PDE6 suggests that **1**, **3** and **4** had weak actions compared to the corresponding actions on PDE5 and accords with the 10-fold selectivity of sildenafil.<sup>[18]</sup> These results suggest that further modification of curcuminoid analogues could achieve the required specificity and high activity needed to realize clinical usefulness.

*Vasorelaxant effects of curcumin analogues:* In these experiments, sildenafil potency on intact pulmonary arteries expressed as EC<sub>40</sub> was 0.04 μM (0.074±0.016 μM calculated as EC<sub>50</sub>) which accords with previous work in rat pulmonary artery<sup>[19]</sup> and aorta.<sup>[18]</sup> Furthermore, the potency of sildenafil here was similar to the cell-free action on PDE5 protein. Endothelial removal caused a dramatic decrease in sildenafil potency (200-fold less) both here and in previous work on aorta.<sup>[18]</sup> This confirms that the vascular smooth muscle relaxation was largely mediated through

the endothelium releasing vasodilator factors even though sildenafil is acting on vascular smooth muscle.<sup>[20]</sup>

All the curcuminoids were vasorelaxant using endothelium intact pulmonary artery and all had similar potencies (Table 2). Compounds 2, 5, 8, 9 and possibly 4 had actions which indicate that the endothelium was necessary. But, these four compounds had similar potencies which did not reflect those variations seen in the cell-free assays on either PDE5 or PDE6. Thus for compounds 2, 5, 8 and 9, there was clearly endothelium-dependency, but the poor potency correlation with the cell-free studies does not clearly indicate that they are acting on PDE5. Compounds 1 and 7 were unaffected by endothelial denudation suggesting that they acted directly on vascular smooth muscle through a mechanism probably not directly on PDE5. These might include actions on soluble guanylyl cyclase<sup>[21]</sup> on  $\beta$ -receptors, or cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  handling.<sup>[22]</sup>

There are two important differences between the cell-free and vascular relaxation studies which might affect potency of our compounds (i) the compounds have to gain access to the cell interior and numerous bioavailability studies have shown that the membrane permeability of at least curcumin itself is very poor<sup>[23]</sup>, (ii) a vast number of cellular effects for curcuminoids have been described.<sup>[24]</sup>

However, the very high concentrations needed to have any effect on the aorta suggest that these compounds have some selectivity for the pulmonary artery. This alone indicates that the compounds may form the basis for the development of drugs that selectively target the pulmonary circulation. Finally, the multiple cellular actions of curcuminoids<sup>[24, 25]</sup> may be an asset in the treatment of a disease such as PAH where there are multiple pathologies including inflammation, PDE5 upregulation, ionchannelopathies, vasoconstriction, endothelial dysfunction and vascular hyperplasia.

## Conclusions

Curcumin analogues showed PDE5 inhibitory activity with varying potencies and some showed selectivity for PDE5 over PDE6. There were clear endothelium-dependent vasorelaxant effects to which the pulmonary artery was more sensitive compared to the aorta. These results suggest that these curcuminoids could underpin the further development of highly selective and potent compounds which could discriminate the pulmonary arterial circulation by targeting several coincident pathologies of PAH including PDE5 upregulation.

## Declarations

The authors declare that they have no conflicts of interest to disclose.

## Funding

The financial supports from Naresuan University and the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Office of the Higher Education Commission, Ministry of Education, Thailand are acknowledged.

## References

1. Ling Y *et al.* Changing demographics, epidemiology, and survival of incident pulmonary arterial hypertension: results from the pulmonary hypertension registry of the United Kingdom and Ireland. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186(8): 790–796. doi:10.1164/rccm.201203-0383OC.
2. Barst RJ *et al.* Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43(12 Suppl S): 40S–47S. doi:10.1016/j.jacc.2004.02.032.
3. Sebkhi A *et al.* Phosphodiesterase type 5 as a target for the treatment of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2003; 107(25): 3230–3235. doi:10.1161/01.CIR.0000074226.20466.B1.
4. Scipioni A *et al.* Immunohistochemical localisation of PDE5 in rat lung during pre- and postnatal development. *J Biomed Biotechnol* 2009; 2009. doi:10.1155/2009/932961.
5. Schoeffter P *et al.* Role of cyclic AMP- and cyclic GMP-phosphodiesterases in the control of cyclic nucleotide levels and smooth muscle tone in rat isolated aorta. A study with selective inhibitors. *Biochem Pharmacol* 1987; 36(22): 3965–3972.
6. Galiè N *et al.* Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the

15. Sonnenburg WK *et al.* Identification, quantitation, and cellular localization of PDE1 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Methods San Diego Calif* 1998; 14(1): 3–19. doi:10.1006/meth.1997.0561.
16. Huang D *et al.* Molecular determinants of cGMP binding to chicken cone photoreceptor phosphodiesterase. *J Biol Chem* 2004; 279(46): 48143–48151. doi:10.1074/jbc.M404338200.
17. Cahill KB *et al.* Identification of amino acid residues responsible for the selectivity of tadalafil binding to two closely related phosphodiesterases, PDE5 and PDE6. *J Biol Chem* 2012; 287(49): 41406–41416. doi:10.1074/jbc.M112.389189.
18. Teixeira CE *et al.* Differential effects of the phosphodiesterase type 5 inhibitors sildenafil, vardenafil, and tadalafil in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316(2): 654–661. doi:10.1124/jpet.105.092544.
19. Pauvert O *et al.* Effect of sildenafil on cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, vascular tone and calcium signaling in rat pulmonary artery. *Br J Pharmacol* 2003; 139(3): 513–522. doi:10.1038/sj.bjp.0705277.
20. Mochida H *et al.* Sildenafil and T-1032, phosphodiesterase type 5 inhibitors, showed a different vasorelaxant property in the isolated rat aorta. *Eur J Pharmacol* 2002; 440(1): 45–52. doi:10.1016/S0014-2999(02)01339-0.
21. Dash JR, Parija SC. Spasmolytic effect of curcumin on goat ruminal artery is endothelium independent and by activation of sGC. *Res Vet Sci* 2013; 95(2): 588–593. doi:10.1016/j.rvsc.2013.04.029.
22. Xu P-H *et al.* The relaxant effect of curcumin on porcine coronary arterial ring segments. *Vascul Pharmacol* 2007; 47(1): 25–30. doi:10.1016/j.vph.2007.03.003.
23. Wahlang B *et al.* Identification of permeability-related hurdles in oral delivery of curcumin using the Caco-2 cell model. *Eur J Pharm Biopharm* 2011; 77(2): 275–282. doi:10.1016/j.ejpb.2010.12.006.



24. Shishodia S. Molecular mechanisms of curcumin action: gene expression. *BioFactors* 2013; 39(1): 37–55. doi:10.1002/biof.1041.

25. Metzler M *et al.* Curcumin uptake and metabolism. *BioFactors* 2013; 39(1): 14–20. doi:10.1002/biof.1042.



Figure 1

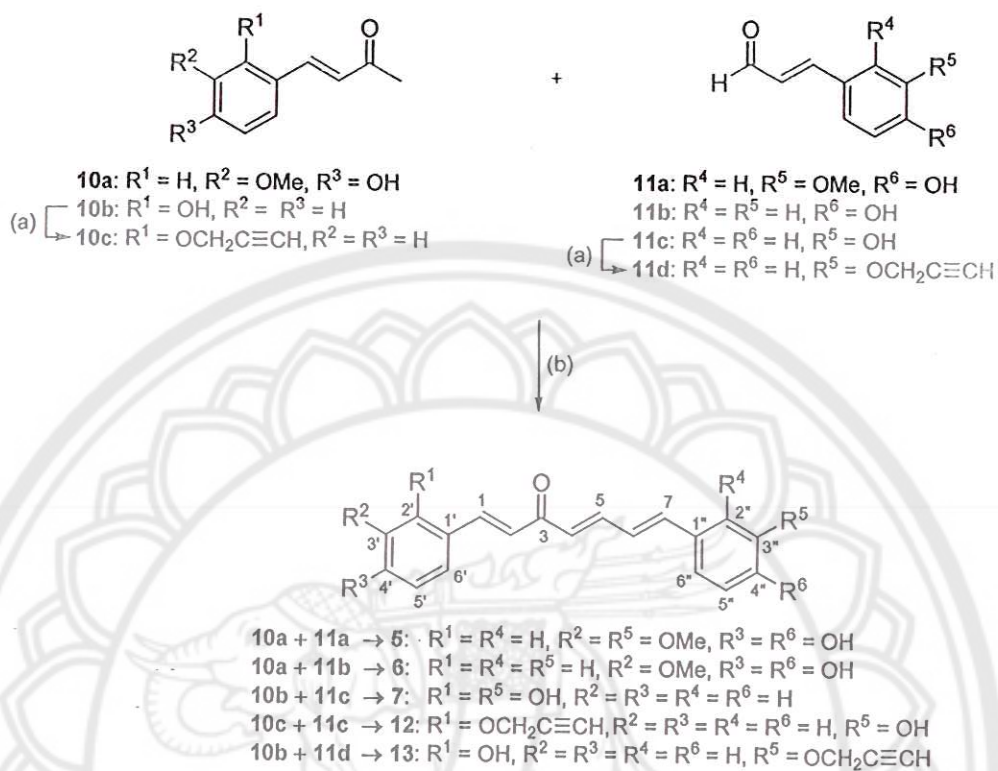


Figure 1 Preparation of compounds 5–7. Reagents and conditions: (a) propargyl bromide,  $K_2CO_3$ , acetone, room temperature; (b) 20% aq. NaOH, EtOH,  $0^\circ C$ – room temperature

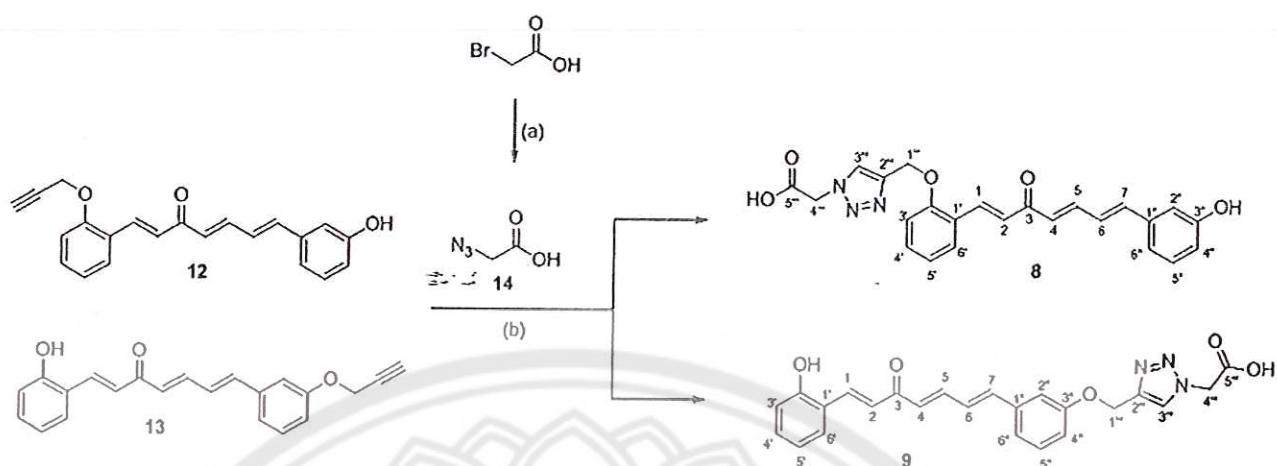


Figure 2 Preparation of compounds 8 and 9. Reagents and conditions: (a)  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , room temperature; (b)  $\text{CuSO}_4$ , sodium ascorbate,  $\text{THF}:\text{H}_2\text{O}$  (9:1)

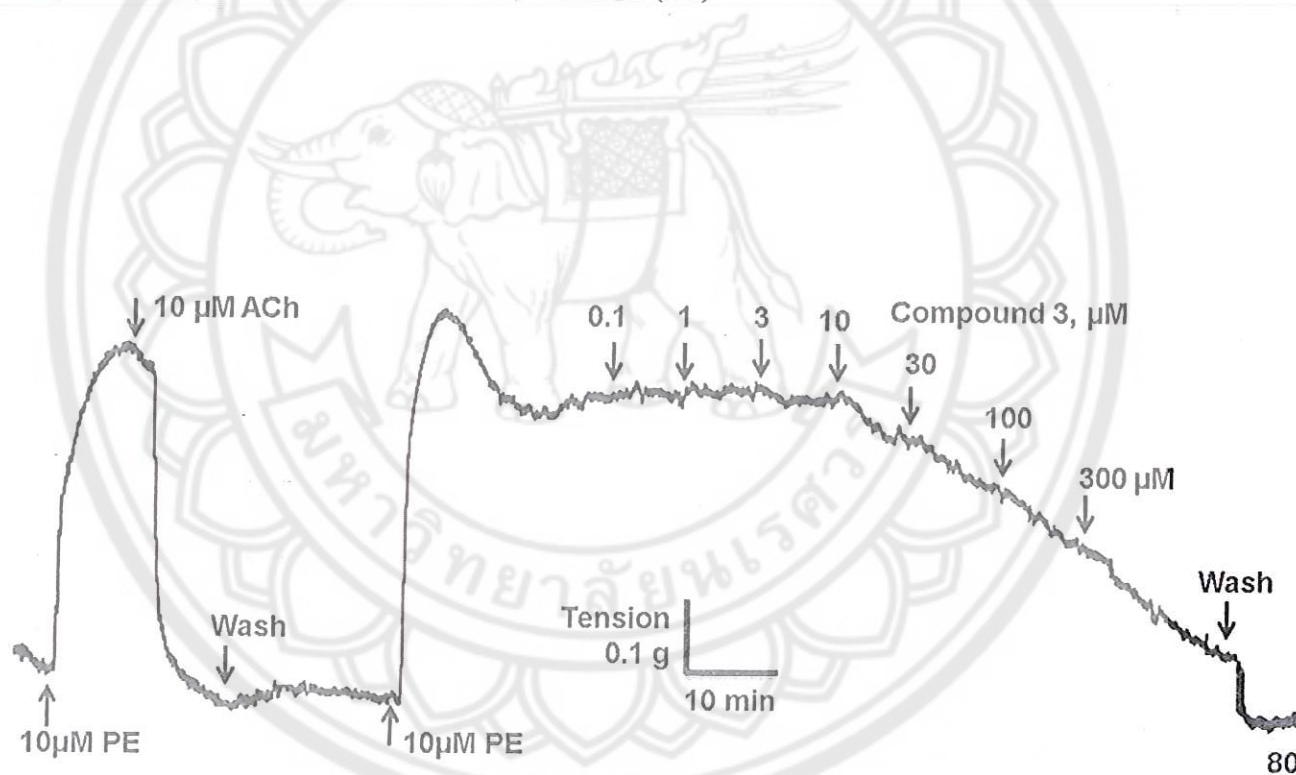


Figure 3 An example time-course showing vasorelaxation of an endothelium-intact pulmonary artery to ACh followed by the relaxant effect of compound 3 at 0.1 to 300  $\mu\text{M}$ .

PE=phenylephrine, ACh=acetylcholine, K= high potassium solution.

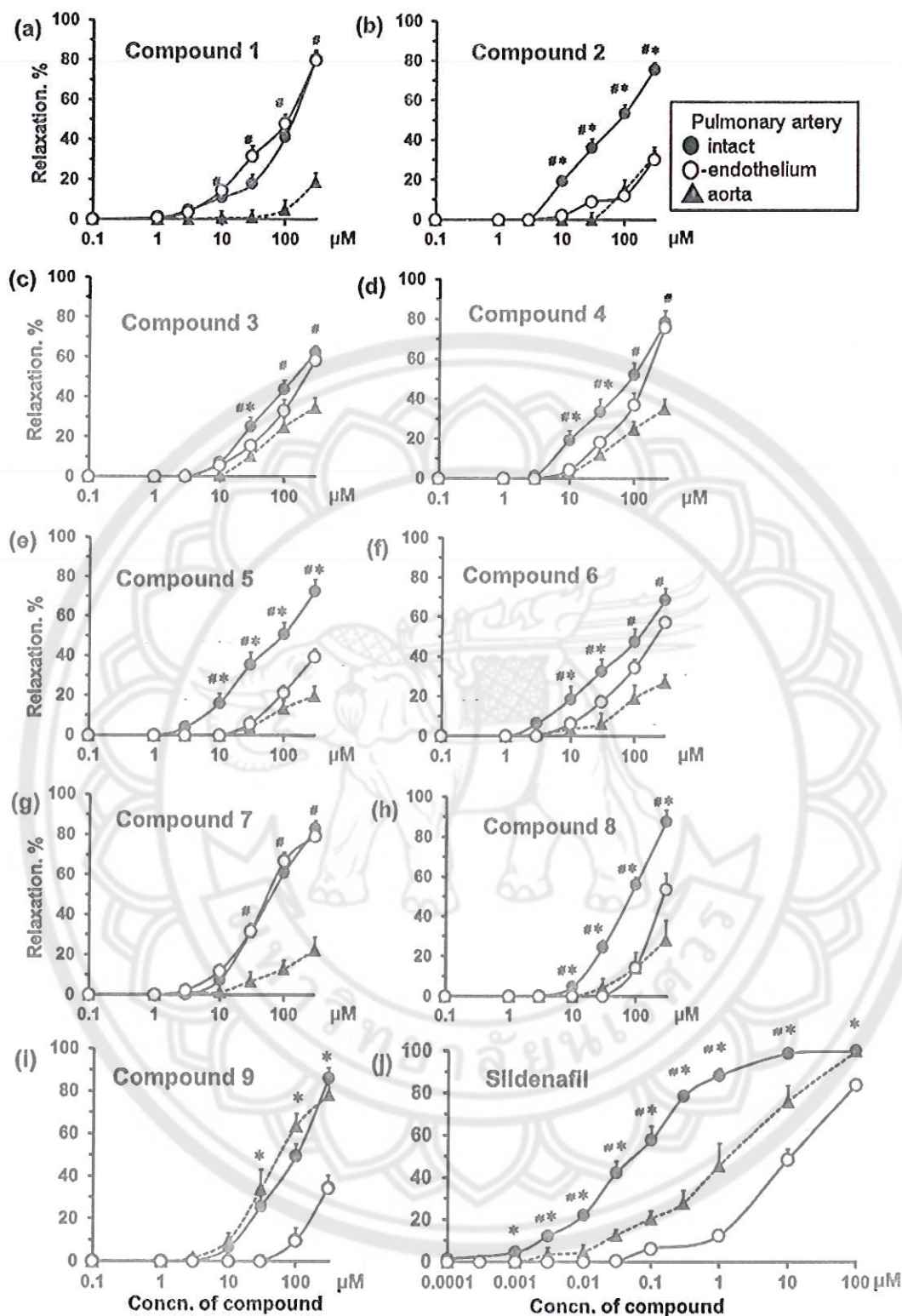


Figure 4 Concentration-vasorelaxation plots for the nine curcumin analogues and sildenafil. Each value is mean  $\pm$  SEM (n=5-6). \*  $p < 0.05$  compared relaxation of pulmonary arteries with and without endothelium, #  $p < 0.05$  comparing endothelium intact pulmonary arteries with aortas.

**Table 1** The inhibitory effects of curcumin and its analogues on PDE5 and PDE6. Values are means  $\pm$  S.E.M (n=3).

Compounds	Chemical structures	IC <sub>50</sub> against	
		PDE5 ( $\mu$ M)	PDE6 ( $\mu$ M)
1		18.8 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	113.9 $\pm$ 20.9 <sup>b</sup>
2		50.6 $\pm$ 3.3 <sup>c</sup>	12.6 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>
3		94.4 $\pm$ 5.2 <sup>d</sup>	>500 <sup>c</sup>
4		44.5 $\pm$ 1.5 <sup>c</sup>	>700 <sup>d</sup>
5		30.5 $\pm$ 5.1 <sup>b</sup>	18.1 $\pm$ 9.7 <sup>a</sup>
6		27.6 $\pm$ 5.7 <sup>b</sup>	7.6 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>
7		4.4 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	4.0 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>
8		17.1 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	5.1 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>
9		3.9 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	2.8 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
Sildenafil		0.03 $\pm$ 0.01 <sup>e</sup>	ND

<sup>a-c</sup> Difference within columns (samples not connected by the same letter are statistically different at  $p < 0.05$ )

**Table 2** Vasorelaxant actions of curcumin and its analogues on rat endothelium-intact and denuded pulmonary arteries and aorta. (n=5-6), *p*-values listed are for differences between endothelium-intact vs endothelium-denuded pulmonary arteries. <sup>#</sup> *p*<0.0001 for endothelium-intact vs intact aorta.

Compounds	EC <sub>40</sub> (μM)		
	pulmonary artery <i>intact</i>	pulmonary artery <i>denuded</i>	aorta- <i>intact</i>
1	109 ± 23	93 ± 30 ( <i>p</i> =0.82)	>300±0 <sup>#</sup>
2	58 ± 10	>300 ± 0 ( <i>p</i> <0.0001)	>300±0 <sup>#</sup>
3	111 ± 29	184 ± 31 ( <i>p</i> =0.14)	>300±0 <sup>#</sup>
4	58 ± 20	121 ± 20 ( <i>p</i> =0.058)	>300±0 <sup>#</sup>
5	76 ± 24	>300 ± 0 ( <i>p</i> <0.0001)	>300±0 <sup>#</sup>
6	98 ± 28	147 ± 21 ( <i>p</i> =0.17)	>300±0 <sup>#</sup>
7	59 ± 8	52 ± 6 ( <i>p</i> =0.74)	>300±0 <sup>#</sup>
8	59 ± 8	208 ± 17 ( <i>p</i> <0.0001)	>300±0 <sup>#</sup>
9	71 ± 15	>300 ± 0 ( <i>p</i> <0.0001)	46±11
Sildenafil	0.042 ± 0.009	8.4 ± 0.8 ( <i>p</i> <0.0001)	1.8±1.0 <sup>#</sup>