Thesis Title Effects of Cyclopentanone–anthracene Adducts on Activity of Cytochrome P450 from Porcine Liver Microsomes

Author Miss Laddawan Potprommanee

Degree Master of Science (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Lalida Shank Advisor

Asst. Prof. Dr. Puttinan Meepowpan Co-advisor

ABSTRACT

Piperine, an alkaloid compound, is a secondary metabolite found in pepper (*Piper nigrum* L.). Piperine displays a variety of pharmacological activities and is used for treatment of many health disorders in human. In this study piperine was utilized as the starting material for synthesis of the amide adducts *via* tandem Michael addition–Dieckmann condensation reactions to give cyclopentanone–anthracene adducts, namely spirolactone–anthracene adducts **11**, **12**, **13** and **14**. Their metabolic process by CYP 450 was also investigated. CYP 450 activity from porcine liver microsomes was determined using erythromycin as a substrate in the presence of β-NADPH. The absorbance of the product, diacetyldihydrolutidine (DDL), from the reaction of formaldehyde released from CYP 450 catalysis with Nash reagent was monitored at 405 nm. The quantitative analysis of protein content was determined using Bradford method for calculation of the CYP 450 specific activity.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Piperine, spirolactone–anthracene adducts **11**, **12**, **13** and **14** were tested with CYP 450 from porcine liver in the presence of β-NADPH. It was found that piperine, spirolactone–anthracene adducts **11**, **12**, **13** and **14** were all substrates of CYP 450 judging from the release of formaldehyde from individual reaction with K_m values of 29.24, 4.90, 15.7, 9.71 and 14.47 mM, V_{max} values of 1.63, 0.38, 0.73, 1.15 and 1.41 U mg^{-1} Protein and V_{max}/K_m values of 0.05, 0.07, 0.05, 0.12 and 0.09 U mg^{-1} Protein/mM respectively. This suggests that erythromycin, piperine, spirocyclopentanone–anthracene adducts **11**, **12**, **13** and **14** are likely to share the common metabolic pathway in the catalytic process by CYP 450. The effects of spirolactone–anthracene adducts **11** and **12** on the catalysis of CYP 450 when using erythromycin as a substrate were analyzed by the high performance liquid chromatography (HPLC). Experimental results revealed that spirolactone–anthracene adducts **11** and **12** increased the amounts of erythromycin remained in the reaction indicating the inhibition of CYP 450 catalysis. The concentration of erythromycin remained in the presence of spirolactone–anthracene adducts **11** and **12** by HPLC analysis was used for studying the type of inhibition of CYP 450. It was found that spirolactone–anthracene adducts **11** and **12** were competitive inhibitors of CYP 450 from porcine liver microsomes with apparent K_m values of 400.0 and 476.2 μM and apparent V_{max} values of 18.7 and 17.7 μM/min/mg, respectively, compared to the original K_m value of 344.8 and V_{max} value of 18.3 μM/min/mg. Hence, these compounds that have been prepared as potential bioactive agents may affect the metabolism of other drugs by acting as substrates and can compete with other substrates for the active site of CYP 450 enzymes.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของไซโคลเพนทาโนน–แอนทราซีนแอดดัค ต่อแอคติวิตีของไซโตโครม พี 450 จากไมโครโซมตับหมู

ผู้เขียน นางสาวลัดดาวัลย์ พจน์พรหมมณี

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร. ลลิดา แชงค์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ผศ.ดร. พุฒินันท์ มีเผ่าพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

พิพเพอรินคือ สารประกอบทุติยภูมิที่พบในพริกไทย (*Piper nigrum* L.) พิพเพอรินเป็นส่วนประกอบหลักของพริกไทย ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชกรรมและใช้สำหรับบำบัดความผิดปกติทางสุขภาพหลายอย่างในมนุษย์ ในการศึกษานี้ได้ใช้พิพเพอรินเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เอไมด์แอดดัคผ่านปฏิกิริยาแทนเดม ไมเคิลแอดดิชัน–ดิคแมนน์คอนเดนเซชัน ให้อนุพันธ์ของไซโคลเพนทาโนน–แอนทราซีนแอดดัค มีชื่อว่า spirolactone–anthracene adducts **11**, **12**, **13** และ **14** พร้อมทั้งศึกษากระบวนการเมตาบอลิสมโดยไซโตโครม พี 450 โดยศึกษาแอคติวิตีของไซโตโครม พี 450 จากไมโครโซมตับหมู โดยใช้อิริโทรมัยซินเป็นซับสเตรตในสภาวะที่มี β-NADPH ค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ diacetyldihydrolutidine (DDL) จากปฏิกิริยาที่ฟอร์มัลดีไฮด์ซึ่งถูกปลดปล่อยออกมาทำกับ Nash reagent จากการเร่งปฏิกิริยาของไซโตโครม พี 450 ที่ตรวจสอบโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทำโดยใช้วิธีแบรดฟอร์ด เพื่อนำไปใช้คำนวณหาค่าแอคติวิตีจำเพาะของไซโตโครม พี 450 ได้ทำการทดสอบพิพเพอริน spirolactone–anthracene adducts **11**, **12**, **13** และ **14** กับไซโตโครม พี 450 จากตับหมูในสภาวะที่มี β-NADPH จากผลการทดลองพบว่าพิพเพอริน รวมทั้ง spirolactone–anthracene adducts **11**, **12**, **13** และ **14** ทุกตัวเป็นซับสเตรตของไซโตโครม พี 450 โดยพิจารณาจากกระบวนการปลดปล่อยฟอร์มัลดีไฮด์ที่เกิดจากปฏิกิริยาของสารแต่ละตัว พบว่ามีค่า K_m 29.24, 4.90, 15.7, 9.71 และ 14.47 มิลลิโมลาร์ ค่า V_{max} 1.63, 0.38, 0.73, 1.15 และ 1.41 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน และค่า V_{max}/K_m 0.05, 0.07, 0.05, 0.12 และ 0.09 ยูนิต/มิลลิกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โปรตีน/มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่า อิริโทรมัยซิน พิพเพอริน spirolactone–anthracene adducts **11**, **12**, **13** และ **14** น่าจะมีวิถีของเมตาบอลิสมร่วมกันในกระบวนการเร่งปฏิกิริยาโดยไซโตโครม พี 450 ผลการทดลองแสดงว่า spirolactone–anthracene adducts **11** และ **12** ทำให้ปริมาณของอิริโทรมัยซินที่เหลือในปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ซึ่งระบุถึงการยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของไซโตโครม พี 450 ความเข้มข้นของอิริโทรมัยซินที่เหลือเมื่อมี spirolactone–anthracene adducts **11** และ **12** จากการวิเคราะห์โดย HPLC ถูกนำไปใช้ในการศึกษาชนิดของการยับยั้งการทำงานของไซโตโครม พี 450 ซึ่งพบว่า spirolactone–anthracene adducts **11** และ **12** มีการยับยั้งการทำงานของไซโตโครม พี 450 จากตับหมูแบบแข่งขัน พบว่ามีค่า K_m ที่ปรากฏเป็น 400.0 และ 476.2 ไมโครโมลาร์ และค่า V_{max} ที่ปรากฏเป็น 18.7 และ 17.7 ไมโครโมลาร์/นาที/มิลลิกรัม ตามลำดับ เทียบกับค่า K_m เดิมที่ 344.8 และ V_{max} เดิมที่ 18.3 ไมโครโมลาร์/นาที/มิลลิกรัม ดังนั้นสารประกอบเหล่านี้ซึ่งได้เตรียมมาเพื่อเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ อาจจะมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิสมของยาอื่นๆ โดยเป็นสับสเตรต และสามารถแข่งขันกับสับสเตรตอื่นๆ ในการเข้าจับกับเอนไซม์ไซโตโครม พี 450

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved