

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาสารแซนโทนพืชสกุล *Garcinia* บางชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีนช่องทางผ่านคลอไรด์ CFTR เพื่อเป็นยารักษาโรคอหิวาตกโรค

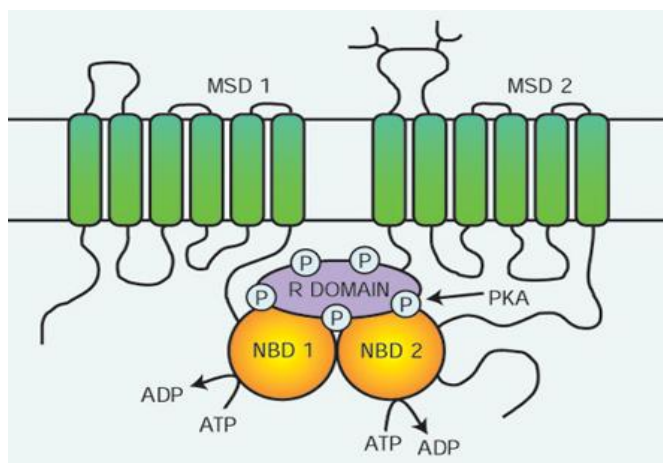
Development of xanthone from some *Garcinia* plants as CFTR inhibitor for therapeutic treatment of cholera

บทนำ

อหิวาตกโรค (Cholera) เป็นโรคท้องร่วงเฉียบพลันชนิดที่รุนแรงถึงแก่ชีวิตได้ จัดเป็นปัญหาสุขภาพสำคัญระดับโลกเนื่องจากประชากรหลายแสนคนตายด้วยโรคนี้ในแต่ละปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งประชากรที่อาศัยในประเทศกำลังพัฒนาเช่น ประเทศในแถบเอเชียใต้และอเมริกาใต้ เป็นต้น ลักษณะเฉพาะของท้องร่วงชนิดนี้คือ ผู้ป่วยจะถ่ายเป็นน้ำจำนวนมาก (ปริมาตรอาจสูงถึง 1 ลิตรต่อชั่วโมง) ทำให้เกิดภาวะขาดน้ำ (Dehydration) เลือดเป็นกรด (Metabolic acidosis) และอาจช็อค (Hypovolumic shock) เสียชีวิตได้ (Sack et al. 2004) การรักษาในปัจจุบันคือการให้ผู้ป่วยดื่มน้ำเกลือแร่ชดเชยน้ำและเกลือแร่ที่สูญเสียไปทางอุจจาระ ซึ่งเป็นการรักษาเฉพาะอาการที่ไม่ได้ลดความรุนแรงของอาการท้องร่วงแต่อย่างใด นอกจากนี้ยังมีการใช้ยาปฏิชีวนะซึ่งยังมีข้อจำกัดอยู่มากโดยเฉพาะในเรื่องประสิทธิภาพในการรักษาและการเพิ่มจำนวนของเชื้อโรคคือยา ดังนั้นจึงมีความสำคัญในการพัฒนายาใหม่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรคนี้ (Sack et al. 2004) พยาธิสรีรวิทยาของอาการท้องร่วงในผู้ป่วยอหิวาตกโรคเกิดจากผลของของสารพิษ Cholera toxin ซึ่งสร้างจากเชื้อ *Vibrio cholera* สาร Cholera toxin นี้สามารถจับกับตัวรับของมันบนผิวของเซลล์ลำไส้แล้วจึงถูกนำเข้าไปในเซลล์และออกฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ Adenylate cyclase ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของระดับ cAMP ภายในเซลล์ การเพิ่มขึ้นของ cAMP นี้จะกระตุ้น PKA ทำให้โปรตีน CFTR เปิดและเกิดการคัดหลั่งของคลอไรด์ไอออนและน้ำเข้าสู่โพรงลำไส้ นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของระดับ cAMP ภายในเซลล์ยังมีผลยับยั้งกระบวนการดูดซึมน้ำของลำไส้ทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการถ่ายเป็นน้ำจำนวนมากจนเกิดอาการขาดน้ำอย่างรุนแรงและช็อคถึงแก่ชีวิตได้ในที่สุด (Field 2003)

โปรตีน CFTR ทำหน้าที่เป็นโปรตีนช่องทางผ่านคลอไรด์ไอออนที่ได้รับการพิสูจน์แล้วว่ามีความสำคัญในการเกิดโรคท้องร่วงอหิวาตกโรค จึงถือเป็นโปรตีนเป้าหมายในการรักษาโรคนี้ซึ่งถือเป็นโรคสำคัญที่มีผลกระทบต่อมวลมนุษยชาติ กล่าวคือประชากรหลายแสนคนต่อปีเสียชีวิตด้วยโรค ผู้ป่วยมักจะเสียชีวิตภายใน 24 ชั่วโมงหลังเกิดอาการ ถ้าไม่ได้รับการรักษาอย่างทันที โรคนี้จึงถือเป็นโรคที่ร้ายแรงที่ยังไม่มีวิธีการรักษาแบบจำเพาะ (Specific therapy) หากแต่เป็นเพียงการรักษาที่อาการ (Symptomatic treatment) และแบบประคับประคอง (Supportive treatment) เท่านั้น

CFTR คือโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นช่องทางผ่านของคลอไรด์ไอออนบนเยื่อหุ้มของเซลล์เยื่อบุโพรงทางเดินหายใจ ลำไส้ และไต โครงสร้างของโปรตีนนี้ประกอบด้วย 3 องค์ประกอบสำคัญคือ ส่วนที่ข้ามผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Transmembrane domains; TMD1-TMD12) ส่วนที่จับกับ ATP (Nucleotide binding domains: NBD1 และ NBD2) และส่วนที่ควบคุมการทำงานของช่องทางผ่านคลอไรด์ (Regulatory domain, R) โดย TMD1 ถึง TMD12 ทำหน้าที่เป็นช่องทางผ่านของคลอไรด์ไอออน NBD1 และ NBD2 ทำหน้าที่ในการจับและย่อยสลาย ATP เพื่อควบคุมให้ช่องทางผ่านคลอไรด์เปิดหรือปิด ตามลำดับ (channel gating; closing or opening) ส่วน R domain นั้นทำหน้าที่ในการกำหนดว่าช่องทางผ่านคลอไรด์จะเปิดได้หรือไม่ (channel activation) โดยปกติโปรตีนนี้จะทำงานเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของระดับ cAMP ภายในเซลล์โดยอาศัยกลไกที่ cAMP กระตุ้น Protein kinase A (PKA) ให้เติมหมู่ฟอสเฟต (Phosphorylation) ที่ R domain ทำให้เปิดช่องทางผ่านสำหรับคลอไรด์ไอออน (Sheppard and Welsh 1999) รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างและการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน CFTR



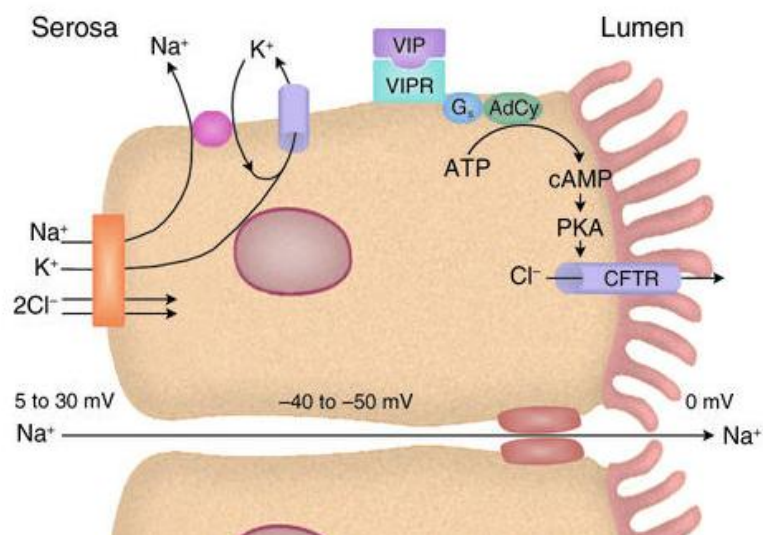
รูปที่ 2 โครงสร้างและกระบวนการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน CFTR (<http://physpharm.ohsu.edu>)

โปรตีน CFTR มีความสำคัญในการควบคุมสมดุลของเกลือแร่และน้ำที่หล่อเลี้ยงผนังโพรงเยื่อบุอวัยวะเช่นทางเดินหายใจ ลำไส้ และไต เมื่อมีการเพิ่มขึ้นของระดับ cAMP ภายในเซลล์จะทำให้ CFTR เปิดให้คลอไรด์ผ่านเกิดการคัดหลั่งของคลอไรด์เข้าไปในโพรงอวัยวะ ซึ่งกระบวนการนี้ทำให้เกิดแรงผลักดัน (Driving

force) ให้โซเดียมไอออนและน้ำหลังตามออกมาตามช่องทางผ่านระหว่างเซลล์ (Paracellular pathway) จึงเป็นการรักษาความชุ่มชื้นของผนังอวัยวะในสภาวะปกติ (Pilewski and Frizzell 1999) เมื่อ CFTR ทำงานน้อยลงผิดปกติเช่นในโรค Cystic fibrosis ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของโปรตีน CFTR ทำให้ไม่สามารถทำงานได้ ผนังเยื่อทางเดินหายใจและลำไส้จะขาดน้ำหล่อเลี้ยง เยื่อเมือกต่างๆหนืดข้นมากขึ้น ผนังอวัยวะเกิดความเสียหาย เกิดการติดเชื้อง่ายขึ้น ผู้ป่วยด้วยโรคนี้ส่วนใหญ่จะเสียชีวิตจากการติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจเป็นส่วนใหญ่และบางคนจะมีภาวะขาดสารอาหารและลำไส้อุดตันร่วมด้วย (Pilewski and Frizzell 1999)

กลไกการคัดหลั่งคลอไรด์ของเซลล์เยื่อบุอวัยวะ

ในภาวะที่มีการเพิ่มขึ้นของระดับ cAMP ภายในเซลล์ โปรตีน CFTR บนเยื่อหุ้มเซลล์ด้าน Apical เปิดและการที่ศักย์ไฟฟ้าภายในเซลล์เป็นลบเมื่อเทียบกับภายนอกเซลล์ทำให้คลอไรด์ไอออนซึ่งมีประจุลบถูกขับออกสู่ภายนอกเซลล์เข้าสู่โพรงของเยื่อบุอวัยวะ โดยตัวขนส่ง $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ cotransporter บนเยื่อหุ้มเซลล์ด้าน Basolateral จะทำหน้าที่ในการนำคลอไรด์ไอออนเข้ามาแทนที่คลอไรด์ไอออนที่ถูกขับออกไปและเพื่อเป็นการรักษาให้ความต่างศักย์ของเซลล์คงสภาพเป็นลบ โซเดียมไอออนและโพแทสเซียมไอออนที่เข้ามาผ่าน $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ cotransporter พร้อมกับคลอไรด์ไอออนจะถูกขนส่งออกจากเซลล์โดยโปรตีน $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ และ K^+ channel ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ด้าน Basolateral เพื่อรักษาแรงผลักดัน (Driving force) นี้ไว้ทำให้กระบวนการคัดหลั่งคลอไรด์เกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่อง (Barrett and Keely 2000) ดังแสดงในรูปที่ 3

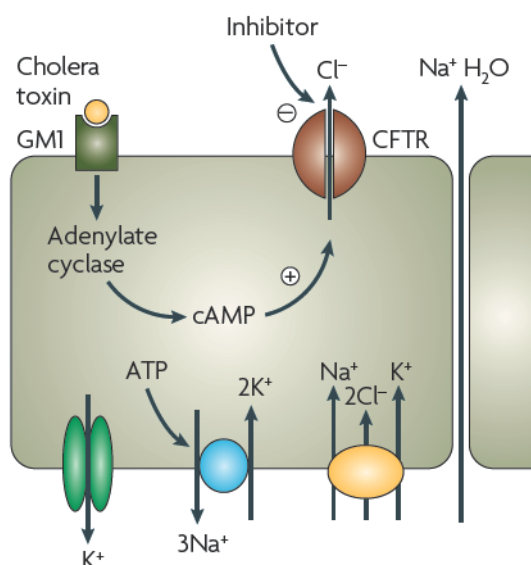


รูปที่ 3 กลไกการคัดหลั่งคลอไรด์ไอออนของเซลล์เยื่อบุอวัยวะ (Field M. 2003)

บทบาทของโปรตีน CFTR ต่อพยาธิสรีรวิทยาการโรคท้องร่วงอหิวาตกโรค

อหิวาตกโรค (Cholera) คือโรคท้องร่วงเฉียบพลันชนิดที่รุนแรงถึงแก่ชีวิตได้ จัดเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญระดับโลกเนื่องจากประชากรหลายแสนคนตายด้วยโรคนี้ในแต่ละปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งประชากรที่อาศัยในประเทศกำลังพัฒนาเช่น ประเทศในแถบเอเชียใต้และอเมริกาใต้ เป็นต้น ลักษณะเฉพาะของท้องร่วงชนิดนี้คือ ผู้ป่วยจะถ่ายเป็นน้ำจำนวนมาก (ปริมาตรอุจจาระอาจสูงถึง 1 ลิตรต่อชั่วโมง) ทำให้เกิดภาวะขาดน้ำ (Dehydration) เลือดเป็นกรด (Metabolic acidosis) และอาจช็อก (Hypovolumic shock) เสียชีวิตได้ (Sack et al. 2004) การรักษาในปัจจุบันเป็นการรักษาโดยการให้ผู้ป่วยดื่มน้ำเกลือแร่ชดเชยน้ำและเกลือแร่ที่สูญเสียไปทางอุจจาระ ซึ่งเป็นการรักษาเฉพาะอาการที่ไม่ได้ลดความรุนแรงของอาการท้องร่วงแต่อย่างใด นอกจากนี้ยังมีการใช้ยาปฏิชีวนะซึ่งยังมีข้อจำกัดอยู่มากโดยเฉพาะในเรื่องประสิทธิภาพในการรักษาและการเพิ่มจำนวนของเชื้อโรคดื้อยา ดังนั้นจึงมีความสำคัญในการพัฒนายาใหม่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรคนี้ (Sack et al. 2004)

พยาธิสรีรวิทยาของอาการท้องร่วงในผู้ป่วยอหิวาตกโรคเกิดจากผลของของสารพิษ Cholera toxin ซึ่งสร้างจากเชื้อ Vibrio cholera สาร Cholera toxin นี้สามารถจับกับตัวรับของมันเป็นบนผิวของเซลล์ลำไส้แล้วจึงถูกนำเข้าไปในเซลล์และออกฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ Adenylate cyclase ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของระดับ cAMP ภายในเซลล์ การเพิ่มขึ้นของ cAMP นี้จะกระตุ้น PKA ทำให้โปรตีน CFTR เปิดและเกิดการคัดหลั่งของคลอไรด์ไอออนและน้ำเข้าสู่โพรงลำไส้ นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของระดับ cAMP ภายในเซลล์ยังมีผลยับยั้งกระบวนการดูดซึมน้ำของลำไส้ทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการถ่ายเป็นน้ำจำนวนมากจนเกิดอาการขาดน้ำอย่างรุนแรงและช็อกถึงแก่ชีวิตได้ในที่สุด (Field 2003) รูปที่ 4 แสดงกลไกการกระตุ้นการคัดหลั่งของคลอไรด์ไอออนโดย cholera toxin



รูปที่ 4 กลไกการเกิดอาการท้องร่วงในผู้ป่วยอหิวาตกโรค (Verkman and Galletta. 2009)

การศึกษาในหนูถีบจักรที่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน CFTR (CFTR null mice) โดยการฉีด Cholera toxin เข้าไปในโพรงลำไส้เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการคัดหลั่งของน้ำพบว่าในหนูดังกล่าวไม่มีการคัดหลั่งของน้ำเมื่อเทียบกับหนูปกติ (wild type) (Gabriel et al. 1994) นอกจากนี้ยังมีหลายการศึกษาได้แสดงให้เห็นว่าสารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ CFTR (CFTR inhibitors) สามารถยับยั้งการคัดหลั่งของคลอไรด์ไอออนและน้ำที่ถูกกระตุ้นด้วย Cholera toxin ได้ทั้งในเซลล์เยื่อบุลำไส้ของมนุษย์และหนูถีบจักร (Ma et al. 2002; Schuier et al. 2005) ดังนั้นโปรตีน CFTR จึงจัดเป็นโปรตีนเป้าหมายที่สำคัญในการพัฒนารักษาโรคท้องร่วงอหิวาตกโรค

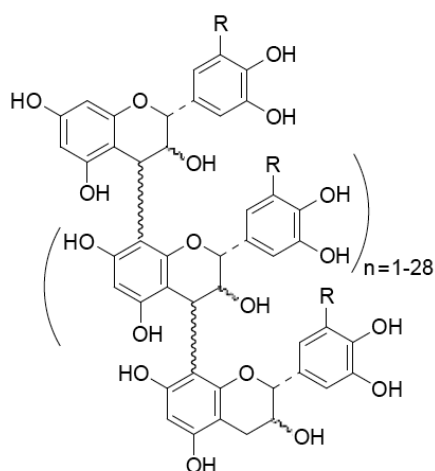
คุณสมบัติของสารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR และสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้อง

ด้วยบทบาทสำคัญของโปรตีน CFTR ในการเกิดอหิวาตกโรคและ PKD จึงมีความพยายามอย่างแพร่หลายในการคิดค้นและพัฒนาสารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR (CFTR inhibitor) เพื่อเป็นยารักษาโรคดังกล่าว (Verkman and Galletta 2009) CFTR inhibitor ที่พบในช่วงแรกนั้นเป็นสารในกลุ่ม Proanthocyanidin ซึ่งสกัดได้จากยางของต้น *Croton lechleri* ซึ่งเพาะปลูกกันมากในทวีปอเมริกาใต้ สารนี้ได้รับการจดสิทธิบัตรประเทศสหรัฐอเมริกาและนานาชาติเรียบร้อยแล้ว (Fischer et al. 2004) (Rozhon et al. 2008) และขณะนี้กำลังอยู่ในช่วงการทดสอบทางคลินิก (Clinical trial) เพื่อใช้เป็นยารักษาโรคท้องร่วงหลายชนิดเช่น โรคท้องร่วงเรื้อรังในผู้ป่วยเอดส์ โรคท้องร่วงชนิด Irritable bowel syndrome และโรคท้องร่วงเฉียบพลันในเด็กซึ่งรวมถึงอหิวาตกโรคด้วย โดยล่าสุดพบว่าการรักษาด้วยสารดังกล่าวได้ผลเป็นที่น่าพอใจ แต่ข้อจำกัดของสารนี้คือโครงสร้างทางเคมีที่ใหญ่และซับซ้อน ขั้นตอนการผลิตจึงค่อนข้างยุ่งยากและซับซ้อนทำให้ไม่สามารถผลิตเป็นจำนวนมากเพียงพอต่อความต้องการได้ ดังนั้นจึงมีการวิจัยคิดค้นเพื่อหา CFTR inhibitor ใหม่ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก (small molecule CFTR inhibitors, molecular weight ~ 300-500 daltons) ด้วยเทคนิค High-throughput screening ซึ่งนำไปสู่การค้นพบ small molecules หลายกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งโปรตีน CFTR แต่ทว่ามียาเพียง 2 กลุ่มเท่านั้นที่มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่ดีและได้รับการจดสิทธิบัตรประเทศสหรัฐอเมริกาและนานาชาติคือ Thiazolidinone (Ma et al. 2002) (Verkman et al. 2007) และ Hydrazide-containing compounds (Muanprasat et al. 2004) (Verkman et al. 2008).

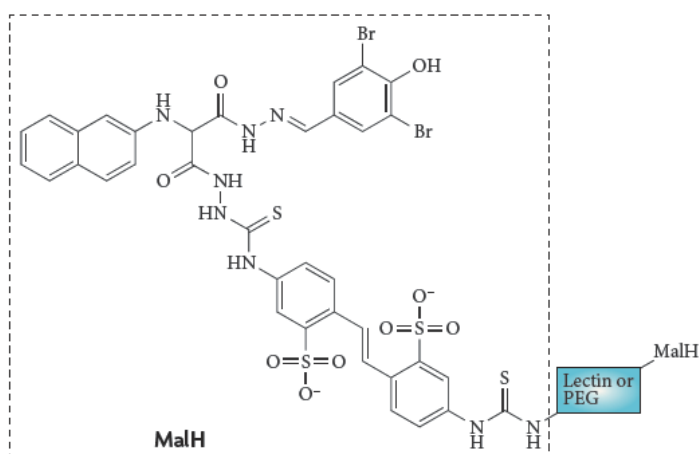
Thiazolidinone CFTR inhibitor เช่น CFTR_{inh}-172 ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 2002 โดย Ma et al. สารนี้ยับยั้งการทำงานของ CFTR ด้วย IC₅₀ ประมาณ 5 μ M ในเซลล์ลำไส้ (Ma et al. 2002) และออกฤทธิ์โดยการยับยั้งที่ NBD1 ของ CFTR (Thiagarajah and Verkman 2003) การทดลองในหนูถีบจักรพบว่าสารนี้สามารถลดการสูญเสียน้ำในหนูที่ได้รับ cholera toxin ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Ma et al. 2002) แต่ข้อจำกัด

ของสารในกลุ่มนี้คือการมีความสามารถในการละลายน้ำค่อนข้างต่ำ ส่วนสารในกลุ่ม Hydrazide-containing compounds ได้แก่ glycine hydrazide (GlyH-101) และ malonic hydrazide (MalH) ถูกค้นพบโดย ดร. นพ. ฉัตรชัย เหมือนประสาทและทีมวิจัยที่ UCSF ในปี ค.ศ. 2004 สารนี้ยับยั้งการทำงานของ CFTR ด้วย IC_{50} ประมาณ 5 μM โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างไปกล่าวคือสารนี้ออกฤทธิ์โดยการจับกับส่วนของโปรตีน CFTR ที่อยู่ภายนอกเยื่อหุ้มเซลล์ (Muanprasat et al. 2004) อันได้นำไปสู่การพัฒนาสารในกลุ่มนี้ให้มีขั้วมากขึ้นและขนาดโมเลกุลใหญ่ขึ้นทำให้สารนี้ไม่ถูกดูดซึมเข้าร่างกายและออกฤทธิ์เฉพาะที่ในลำไส้เท่านั้น (Sonawane et al. 2006) รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Proanthocyanidin, Non-absorbable/divalent malonic acid hydrazide (MalH), $CFTR_{inh}$ -172 และ GlyH-101,

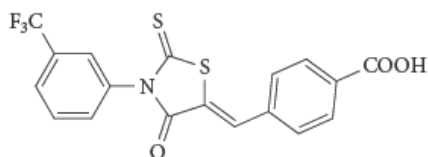
Proanthocyanidin (R=H)



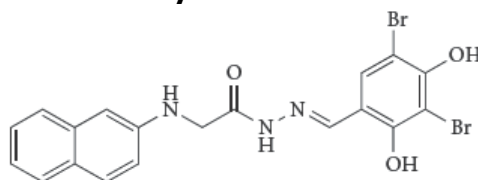
Non-absorbable malonic acid hydrazide (MalH)



$CFTR_{inh}$ -172



GlyH-101

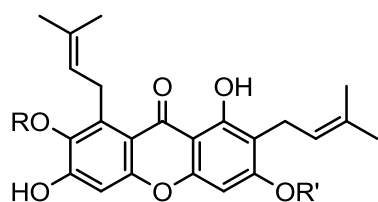


รูปที่ 5 สูตรโครงสร้างของ Proanthocyanidin, Non-absorbable/Divalent MalH, $CFTR_{inh}$ -172 และ GlyH-101

สารแซนโทนในพืช *Garcinia*

พืชในสกุล *Garcinia* (อยู่ในวงศ์ Clusiaceae หรือ Guttiferae) รวมทั้ง มังคุด เป็นแหล่งของสารแซนโทน มังคุดเป็นผลไม้ที่ได้รับความนิยมในการบริโภค นอกจากคุณค่าทางอาหารแล้ว เปลือกมังคุดยังมีสรรพคุณทางยาโดยใช้เป็นยาฝาดสมานแก้ท้องเสีย (Gritsanapan and Chulasiri, 1983) มังคุดเป็นพืชเศรษฐกิจของภาคตะวันออก และภาคใต้ จากรายงานการวิจัยพบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย (Chin and Kinghorn, 2008) สารแซนโทนเป็นรงควัตถุสีเหลือง พบได้ในทุกส่วนของพืช พบมากในเปลือกผลมังคุด แซนโทนที่พบในมังคุดมีไม่น้อยกว่า 40 ชนิดและส่วนใหญ่เป็นชนิด polyhydroxy prenylated xanthone (Pares et al, 2000) โดยมี α -mangostin และ γ -mangostin เป็นสารแซนโทนหลัก (Chaivishangkura, 2009) สารแซนโทนมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายและน่าสนใจ (Chen et al, 2018) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ของสารแซนโทนจากธรรมชาติ หรือจากการสังเคราะห์

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าสาร α -mangostin ซึ่งเป็นสารแซนโทนหลักในเปลือกผลมังคุดและมีปริมาณมาก แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR อย่างอ่อน แต่เมื่อได้ทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของแซนโทนนี้ พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ สิ่งที่น่าสนใจคือจะมีสารแซนโทนธรรมชาติชนิดอื่นหรือไม่ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ที่ดีกว่า α -mangostin รวมทั้งน่าจะได้มีการศึกษาวิธีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารแซนโทนอื่นตลอดจนสังเคราะห์สารแซนโทนให้มีโครงสร้างที่แตกต่างออกไป และทำการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR เพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ที่สูงมากและไม่มีพิษหรือมีพิษน้อย หากสามารถหาวิธีการที่เหมาะสม ในการสังเคราะห์หรือปรับเปลี่ยนให้ได้สารแซนโทนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ที่ดี จะเป็นสิ่งที่ดียิ่งในแง่ของการนำผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดและโดยเฉพาะเปลือกผลมังคุดซึ่งเป็นของเหลือทิ้งทางเกษตรกรรม



α - Mangostin : R = CH₃, R' = H

β - Mangostin : R = R' = CH₃

γ - Mangostin : R = R' = H

รูปที่ 6 สูตรโครงสร้างของสารแซนโทนหลักในมังคุด α -mangostin β -mangostin และ γ -mangostin

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1.1 เพื่อเสาะหาสารแซนโทนต้นแบบจากพืชมังคุด และพืชสกุล *Garcinia* อื่น รวมทั้งสารชนิดอื่นจากพืชมังคุดที่สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR

1.2 เพื่อปรับเปลี่ยนสารแซนโทนต้นแบบจากธรรมชาติให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ที่สูงขึ้นกว่าสารแซนโทนต้นแบบจากธรรมชาติ และเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะของโครงสร้างทางเคมีของสารแซนโทนกับฤทธิ์ในการยับยั้งโปรตีน CFTR

1.3 เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ของสารในกลุ่มแซนโทน

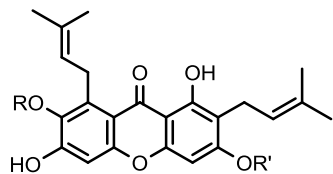
1.4 เพื่อศึกษาศักยภาพของสารในกลุ่มแซนโทนในการพัฒนาเป็นยารักษาอหิวาตกโรค

วิธีวิจัย ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเสาะหาสารแซนโทนต้นแบบจากพืชมังคุด และพืชสกุล *Garcinia* อื่น รวมทั้งสารชนิดอื่นจากพืชมังคุดที่สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR

1.1 การประเมินการเสาะหาสารแซนโทนต้นแบบจากพืชมังคุด และพืชสกุล *Garcinia* อื่น

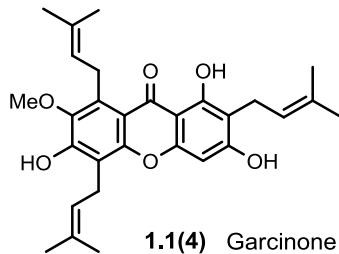
เป็นที่ทราบกันว่าสารแซนโทน สามารถพบได้ในปริมาณมากในพืช *Garcinia* (Peres et al, 2000) จึงได้ทำการสกัดแยกสารไฮดรอกซีแซนโทนชนิดมีหมู่ไฮดรอกซิล และหมู่ไอโซพรีน ที่ตำแหน่งต่างๆที่แตกต่างกัน จากพืช *Garcinia* 3 ชนิด ได้แก่ มังคุด (*Garcinia mangostana*) ส้มโม่ (*Garcinia fusca*) และมะตะหลวง (*Garcinia xanthochymus*) (รูปที่ 1(1)) ในปริมาณเพียงพอต่อการทดสอบ โดยใช้วิธีการแยกตามที่เคยได้รายงานไว้แล้ว ได้แก่ แซนโทนชนิดมีหมู่ฟีนีล (1.1(1)–1.1(7) และ 1.1.(12)) α -mangostin, β -mangostin, γ -mangostin, garcinone E, garcinone C, garcinone D, cratoxylone และ 9-hydroxycalabaxanthone จากมังคุด (Suksamrarn et al, 2006) แซนโทนชนิดมีหมู่จีรานิล ได้แก่ cowanin cowanol และ cowaxanthone (1.1(8)–1.1(10)) จาก *G. fusca* (Nonthakham et al, 2014) และ garciniaxanthone E (1.1(11)) จาก *G. xanthochymus* และสาร 1.1(13) ซึ่งเป็นชนิดมีหมู่ 1,1-dimethyl-2-propenyl จากพืช *G. xanthochymus* (โกมุติบาน, 2554)



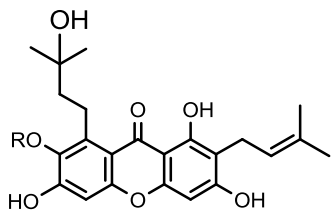
1.1(1) α - Mangostin : R = CH₃, R' = H

1.1(2) β - Mangostin : R = R' = CH₃

1.1(3) γ - Mangostin : R = R' = H

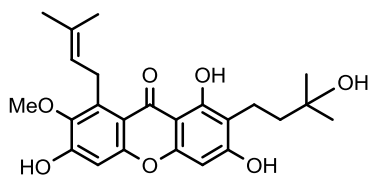


1.1(4) Garcinone E

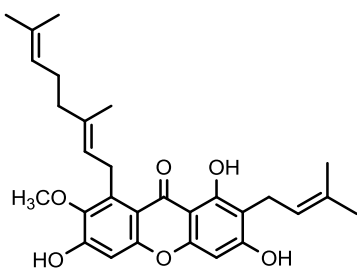


1.1(5) Garcinone C : R = H

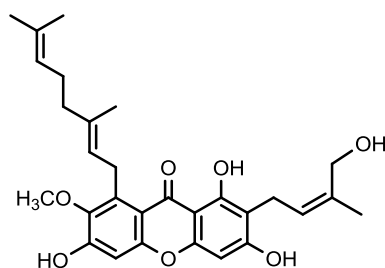
1.1(6) Garcinone D : R = CH₃



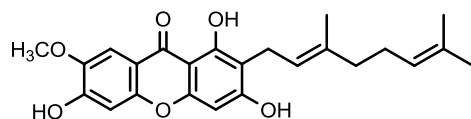
1.1(7) Cratoxylone



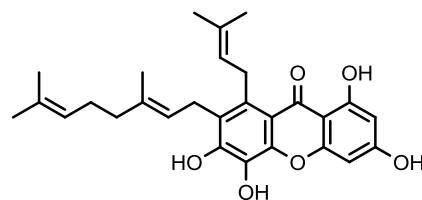
1.1(8) Cowanin



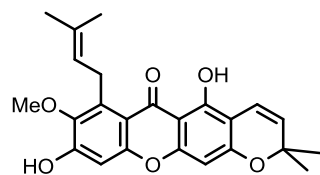
1.1(9) Cowanol



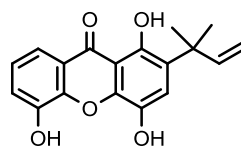
1.1(10) Cowaxanthone



1.1(11) Garcinixanthone E



1.1(12) 9-Hydroxycalabaxanthone



1.1(13)

รูปที่ 1(1) สูตรโครงสร้างของสารแซนโทนของ *G. mangostana*, *G. cowa* และ *G. xanthochymus*

เมื่อนำสาร 1.1(1)–1.1(13) ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ด้วยเทคนิคการวัดกระแสการไหลของคลอไรด์ในเซลล์ Fisher rat thyroid ซึ่งถูกทำให้มีการแสดงออกอย่างถาวรของโปรตีน CFTR ของมนุษย์ (เซลล์ FRT-CFTR) พบว่าสารแซนโทนเหล่านี้ มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ที่ต่ำมาก โดยมีร้อยละการยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ต่ำกว่า 50 ณ ความเข้มข้น 100 μM จึงไม่ได้ทำการศึกษาเพื่อหาค่า IC_{50} ของสารเหล่านี้

1.2 การหาสารชนิดอื่นจากพืชมังคุดที่สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR

ในทางยาสมุนไพร เปลือกมังคุดมีสรรพคุณใช้เป็นยาฝาดสมานแก้ท้องเสีย (Gritsanapan and Chulasiri, 1983) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานของเปลือกมังคุดมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR แต่อย่างไร

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในมังคุดที่มีรายงานไว้ พบว่านอกเหนือจาก oxygenated xanthenes และ prenylated xanthenes ยังมีสารอื่นได้แก่ phenolic acid, anthocyanins, และ procyanidins (Du and Francis, 1977; Fu *et al.*, 2007; Zadernowski *et al.*, 2009; Chaivisuthangkura *et al.*, 2009) proanthocyanidin ซึ่งสกัดได้จากยางของต้น *Croton lechleri* (Fischer *et al.* 2004; Rozhon *et al.* 2008) ใช้เป็นยารักษาโรคท้องร่วงหลายชนิดเช่น โรคท้องร่วงเรื้อรังในผู้ป่วยเอดส์ โรคท้องร่วงชนิด Irritable bowel syndrome และโรคท้องร่วงเฉียบพลันในเด็กซึ่งรวมถึง อหิวาตกโรคด้วย และ hydrolysable tannin ซึ่งสกัดจากเกาลัดจีน (Chinese gallnut) มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR (Wongsamitkul *et al.*, 2009)

ในการตรวจสอบความสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ของสารอื่นนอกเหนือจากแซนโทน จึงได้นำเปลือกผลมังคุด มาทำการสกัดด้วยน้ำ หรือตัวทำละลายชนิดต่างๆ เช่น เอทานอล หรือ อะซีโตน หรือ เอทานอล-น้ำ หรือ อะซีโตน-น้ำ ทั้งที่อุณหภูมิห้อง หรือให้ความร้อนไม่เกิน 60 °C เมื่อนำสารสกัดเหล่านี้ไปทำให้แห้ง แล้วนำไปทดสอบความสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่ (SS-CM69-73) (SS-CM201-208) แสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ที่อ่อน และบางสารสกัดไม่แสดงฤทธิ์ (SS-CM212-219) โดยที่สารสกัดชนิด SS-CM68 ยับยั้งได้ 57.9 % ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ และสารสกัด SS-CM201 สามารถยับยั้งได้ที่ IC_{50} 50 $\mu\text{g/ml}$

เมื่อนำบางสารสกัดเหล่านี้มาทำการแบ่งสกัด ร่วมกับการใช้โครมาโทกราฟีชนิดต่างๆ ในการแยกตรวจสอบส่วนสกัดย่อย (fraction) และทดสอบความสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ของส่วนสกัดย่อยต่างๆ ที่มีไซแซนโทน (SS-CM220-222, SS-CM232 ถึง SS-CM240) พบว่า ส่วนสกัดย่อย SS-CM232 (= SS-CM234 = SS-CM235) สามารถยับยั้งได้ดีมาก มีค่า IC_{50} ในช่วง 6-13 $\mu\text{g/ml}$ และยับยั้งได้หมดที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ และไม่แสดงความเป็นพิษที่ 200 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนสกัดย่อยที่ได้นี้ เป็น

ของแข็งสีน้ำตาล คิดเป็นร้อยละผลผลิต 0.4-0.5 เทียบจากเปลือกผลมังคุด เมื่อทำการศึกษาสูตรโครงสร้างของส่วนสกัดย่อย SS-CM232 ด้วยเทคนิค UV NMR ร่วมกับเทคนิค HPLC พบว่าสารกลุ่มนี้ น่าจะเป็นสารในกลุ่ม condensed tannin

การตีพิมพ์ผลงาน

ผลงานวิจัยชิ้นนี้กำลังอยู่ระหว่างการเรียบเรียง เพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ และ/หรือ น่าจะหาทางร่วมมือกับบริษัทเอกชนในการใช้ประโยชน์จากงานชิ้นนี้

2. การปรับเปลี่ยนสารแซนโทนต้นแบบจากธรรมชาติให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ที่สูงขึ้นกว่าสารแซนโทนต้นแบบจากธรรมชาติ

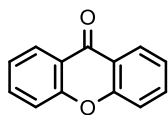
จากการที่สารไฮดรอกซีแซนโทนจากธรรมชาติชนิดมีหมู่ฟีนิล หรือหมู่จีรานิล แสดงฤทธิ์ที่อ่อนมาก จึงได้วางแผนการสังเคราะห์สารแซนโทนประเภทต่างๆ เพื่อตรวจสอบความสำคัญของหมู่แทนที่บนโครงสร้างของแซนโทนที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ ดังนี้

2.1 สารกลุ่มไฮดรอกซีแซนโทนชนิดไม่มีหมู่ฟีนิล และการประเมินความสามารถการยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR

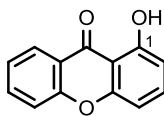
2.1.1 การสังเคราะห์สารไฮดรอกซีแซนโทน

สารไฮดรอกซีแซนโทนชนิดไม่มีหมู่ฟีนิล ที่เป็นสารธรรมชาติ ส่วนใหญ่เป็นสารที่พบได้ในปริมาณน้อยจากพืช *Garcinia* และอื่นๆ (Pares 2000) จึงได้ออกแบบและสังเคราะห์สารที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งต่างๆบนโครงสร้างแซนโทนหลัก ที่สามารถทำให้ทราบผลของความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นโดยใช้ปฏิกิริยา oxidative coupling ระหว่าง *ortho*-hydroxybenzoic acids และ hydroxyphenols ชนิดต่างๆ ตามวิธีที่มีผู้รายงานไว้แล้ว (Liu et al, 2006) จึงได้สังเคราะห์สาร 2.1(2)–2.1(8) ตามรูปที่ 2.1(1) ในร้อยละผลผลิต 2–71 โดยที่ สาร 1-hydroxyxanthone (2.1(2)) เป็นชนิดมี 1 หมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง 1 สาร 1,3-dihydroxyxanthone (2.1(3)), 1,6-dihydroxyxanthone (2.1(4)) และ 1,8-dihydroxyxanthone (2.1(5)) เป็นชนิดมี 2 หมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง 1,3-, 1,6- และ 1,8- ตามลำดับ สาร 1,3,6-trihydroxyxanthone (2.1(6)) และ 1,3,8-trihydroxyxanthone (2.1(7)) เป็นชนิดมี 3 หมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง 1,3,6-, และ 1,3,8- ตามลำดับ และสาร 1,3,6,8-tetrahydroxyxanthone (2.1(8)) เป็นชนิด 4 หมู่ไฮดรอกซีที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1,3,6,8 ในวงแซนโทน ส่วนสารแซนโทน 2.1(1) เป็นชนิดไม่มีหมู่ไฮดรอกซี ซึ่งมีจำหน่ายทั่วไป และสาร 1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone

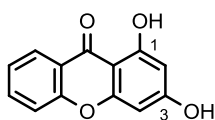
(2.1(9)) เป็นชนิดมี 4 หมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง 1,3,6,7 ซึ่งเป็นสารที่แยกได้จากรากมังคุด ข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี NMR และ MS ของสารแซนโทนเหล่านี้ สอดคล้องกับสูตรโครงสร้างของสาร และสอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้



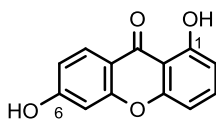
2.1(1)



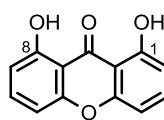
2.1(2)



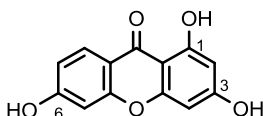
2.1(3)



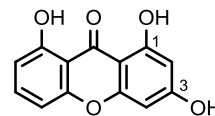
2.1(4)



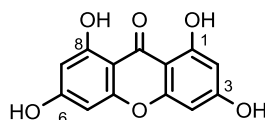
2.1(5)



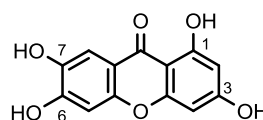
2.1(6)



2.1(7)



2.1(8)

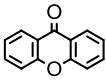
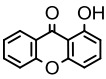
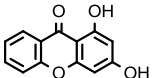
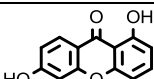
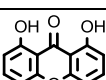
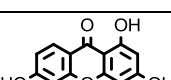
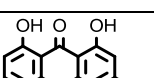
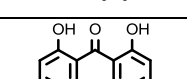
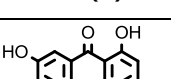


2.1(9)

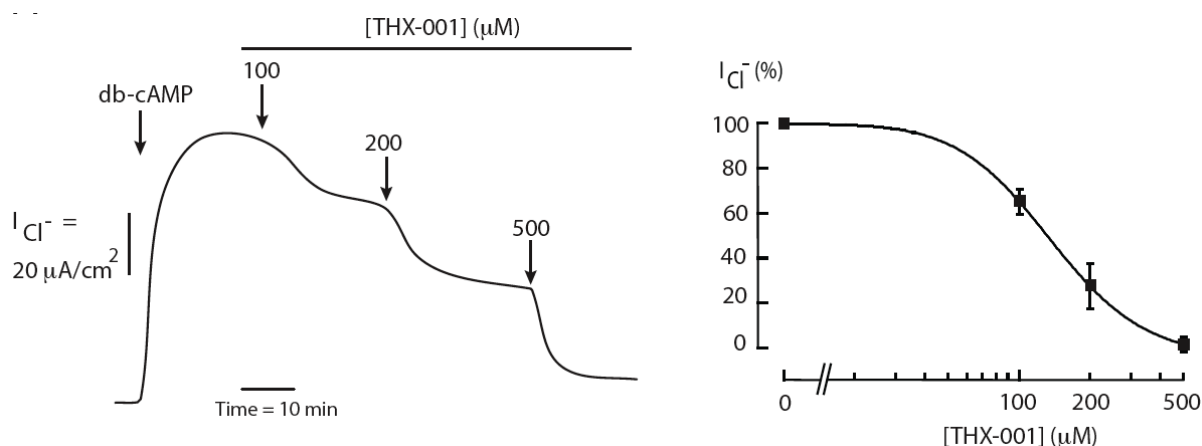
รูปที่ 2.1(1) สูตรโครงสร้างของสารไฮดรอกซีแซนโทน

เมื่อนำสารทั้ง 9 สารนี้ ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 1 พบว่าสารแซนโทนทั้งหมด ยกเว้นสาร 2.1(6) มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR อย่างอ่อน มีร้อยละการยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR เป็น 5, 8, 12, 16, 20, 52, 30, 42 และ 40 ตามลำดับ ณ ความเข้มข้น 100 μ M

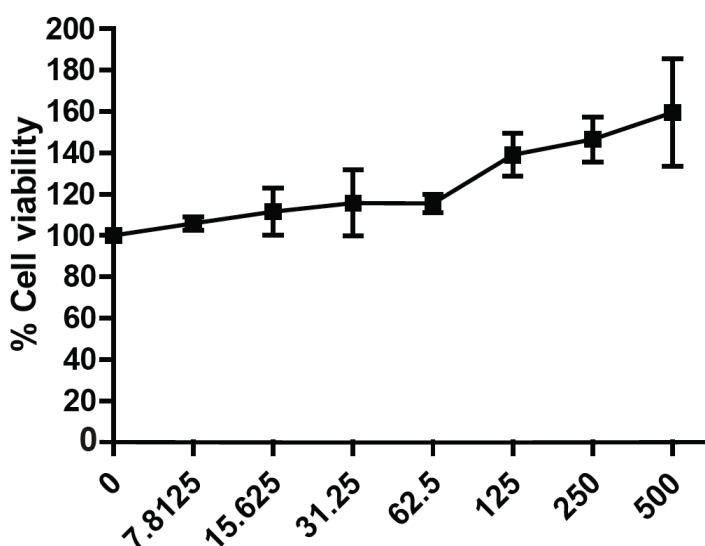
ตารางที่ 2.1(1) แสดงผลร้อยละการยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR และค่า IC_{50} ของสาร 2.1(1)–2.1(9)

ลำดับ	สูตรโครงสร้าง	% การยับยั้ง ที่ 100 μ M	IC_{50} (μ M)
1	 2.1(1)	5	>500
2	 2.1(2)	8	>500
3	 2.1(3)	12	>500
4	 2.1(4)	16	>500
5	 2.1(5)	20	200-500
6	 2.1(6)	52	~ 100
7	 2.1(7)	30	100-200
8	 2.1(8)	42	~ 100
9	 2.1(9)	40	100-200

จากผลการทดสอบพบว่าสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งโปรตีน CFTR สูงสุดคือสาร 1,3,6-trihydroxyxanthone (**2.1(6)**) และ 1,3,6,8-tetrahydroxyxanthone (**2.1(8)**) ซึ่งมี IC_{50} ประมาณ 100 μM จึงได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของสารทั้งสองตัวด้วยเทคนิค MTT assays ซึ่งวัดอัตราการอยู่รอดของเซลล์ (cell viability) พบว่า สาร 1,3,6,8-tetrahydroxyxanthone (**2.1(8)**) ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 200 μM ขึ้นไปในขณะที่สาร 1,3,6-trihydroxyxanthone (**2.1(6)**) ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์แต่อย่างใด เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นสูงสุด คือ 500 μM จึงทำการศึกษา Dose-response อย่างละเอียดใน FRT-CFTR เซลล์พบว่าค่า IC_{50} ของสารนี้เท่ากับ 127 μM และค่า Hill coefficient เท่ากับ 0.9 (รูปที่ 2.1(2) และรูปที่ 2.1(3))



รูปที่ 2.1(2) ผลของสาร 1,3,6-trihydroxyxanthone (**2.1(6)**) ต่อการทำงานของโปรตีน CFTR วัดโดยเทคนิค Apical chloride current measurements ในเซลล์ FRT-CFTR (ซ้าย) ตัวอย่างกระแสการเคลื่อนที่ของคลอไรด์ผ่านโปรตีน CFTR ซึ่งกระตุ้นด้วย db-cAMP (100 μM) (ขวา) การวิเคราะห์ Dose-response เพื่อหาค่า IC_{50} โดยใช้ Hill equation พบว่าค่า IC_{50} เท่ากับ 127 μM และค่า Hill coefficient เท่ากับ 0.9 ($n=3$)

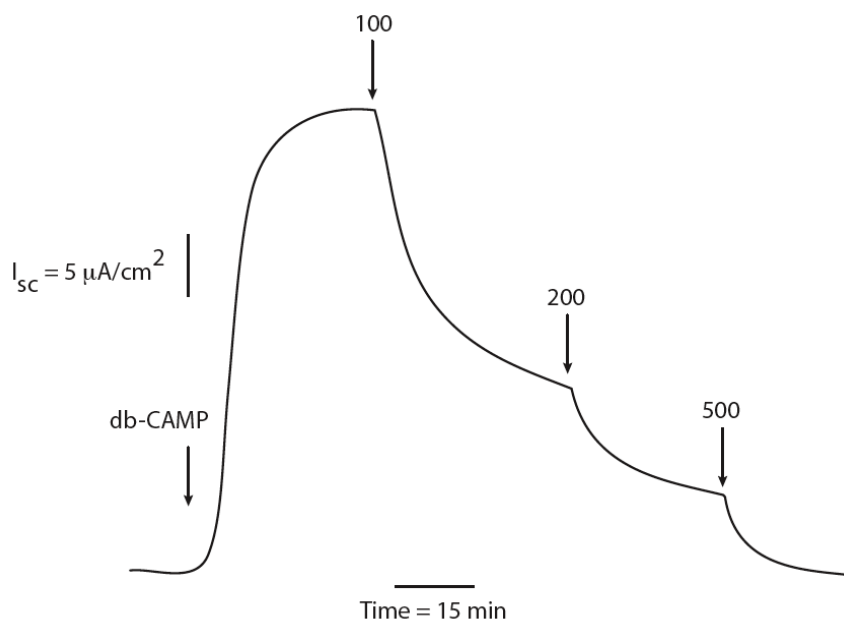


รูปที่ 2.1(3) ผลของสาร 1,3,6-trihydroxyxanthone (2.1(6)) ต่ออัตราการอยู่รอดของเซลล์ FRT-CFTR วัดด้วย MTT assay การทดลองนี้ใส่สาร 2.1(6) ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน (ดังแสดงในแกนนอน) ในสารอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการวัดอัตราการอยู่รอดด้วยการปฏิบัติการเปลี่ยนสีของ MTT (n=3)

2.1.2 การศึกษาคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของสาร 1,3,6-trihydroxyxanthone โดยใช้เซลล์ T84

2.1.2.1 ผลของสาร 2.1(6) ต่อการคัดหลั่งของคลอไรด์ในเซลล์ลำไส้มนุษย์ (เซลล์ T84)

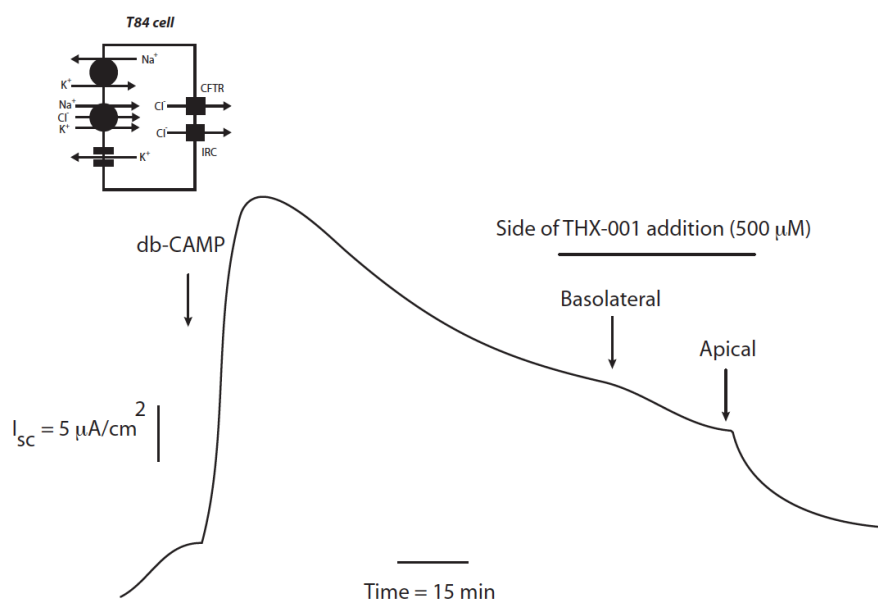
จากการวัด short-circuit current ในเซลล์ T84 พบว่าสาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) มีฤทธิ์ยับยั้งการคัดหลั่งคลอไรด์ที่กระตุ้นด้วย cAMP อย่างมีประสิทธิภาพด้วยค่า IC_{50} ประมาณ 100 μ M และสามารถยับยั้งการคัดหลั่งของคลอไรด์ดังกล่าวได้หมดที่ความเข้มข้น 500 μ M (รูปที่ 2.1(4))



รูปที่ 2.1(4) ผลของสาร 1,3,6-trihydroxyxanthone (**2.1(6)**) ต่อการคัดหลั่งของคลอไรด์ในเซลล์ลำไส้มนุษย์ซึ่งวัดด้วยเทคนิค Short-circuit current measurement การคัดหลั่งของคลอไรด์ในเซลล์นี้ถูกกระตุ้นด้วย db-cAMP (100 μ M) เมื่อกระแสดัดหลังของคลอไรด์คงที่แล้ว จึงใส่สาร **2.1(6)** ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100, 200 และ 500 μ M ลงไป (n=3)

2.1.2.2. การศึกษาของ **2.1(6)** ในการออกฤทธิ์กับโปรตีนขนส่งด้าน apical หรือ basolateral

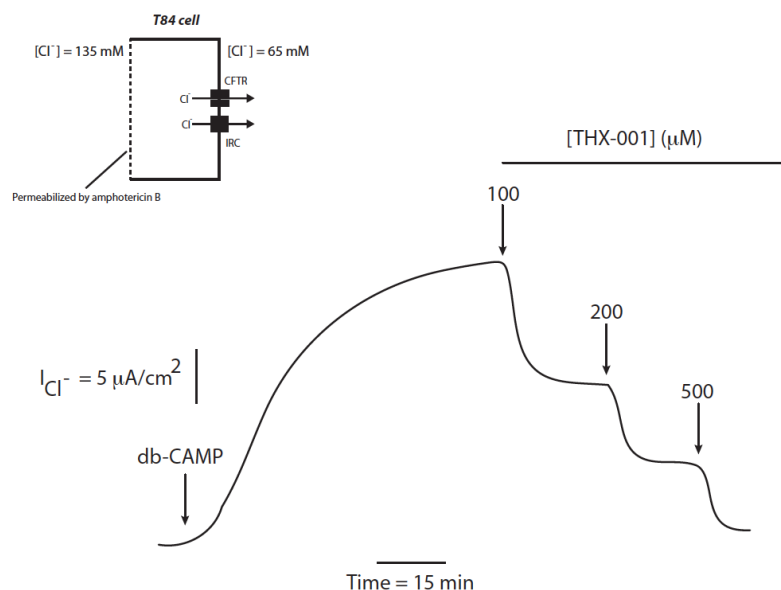
เพื่อศึกษาว่าสาร **2.1(6)** (หรือสาร THX-001) ออกฤทธิ์ยับยั้งโปรตีนขนส่งไอออนบน apical หรือ basolateral membrane ของเซลล์ลำไส้มนุษย์ (รูปที่ 2.1(5) inset) วิจัยจึงได้ศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้ง กระแสการคัดหลั่งของ คลอไรด์เมื่อใส่ สาร **2.1(6)** (หรือสาร THX-001) ไปด้าน basolateral กับด้าน apical ของเซลล์ T84 พบว่า เมื่อใส่สาร **2.1(6)** (หรือสาร THX-001) ไปในด้าน apical สามารถยับยั้งกระแสการคัดหลั่งของคลอไรด์ได้ มากกว่า เมื่อใส่ **2.1(6)** (หรือสาร THX-001) ไปในด้าน basolateral มาก (รูปที่ 2.1(5)) ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่า สาร **2.1(6)** (หรือสาร THX-001) ยับยั้งโปรตีนช่องทางผ่านคลอไรด์ ที่แสดงออก บน apical membrane ได้แก่ CFTR และ inward rectifying chloride channel (IRC)



รูปที่ 2.1(5) การศึกษาว่าสาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) ออกฤทธิ์ต่อโปรตีนขนส่งที่อยู่บนด้าน apical หรือ basolateral ของเซลล์ T84 (n = 3)

2.1.2.3 การศึกษาผลของ สาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) ต่อ cAMP-activated apical chloride channels

เพื่อพิสูจน์สมมติฐานว่า สาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) ออกฤทธิ์โดยยับยั้งโปรตีนขนส่งคลอไรด์ที่แสดงออกบน apical membrane ของเซลล์ T84 อันได้แก่ CFTR และ IRC (รูปที่ 2.1(6) inset) ผู้วิจัยใช้เทคนิคการวัด กระแส การไหลของคลอไรด์ผ่านโปรตีนช่องทางผ่านคลอไรด์ที่อยู่บน apical membrane (apical chloride current measurement) ของเซลล์ T84 พบว่าสาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) ยับยั้งกระแสการไหลของคลอไรด์ผ่าน cAMP-activated apical chloride channels ในเซลล์ T84 ด้วย IC_{50} ประมาณ 100 μM ดังแสดงในรูปที่ 2.1(6)



รูปที่ 2.1(6) การศึกษาผลของสาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) ต่อ cAMP-activated apical chloride channels ในเซลล์ T84 ด้วยเทคนิค apical chloride current measurement (n=3)

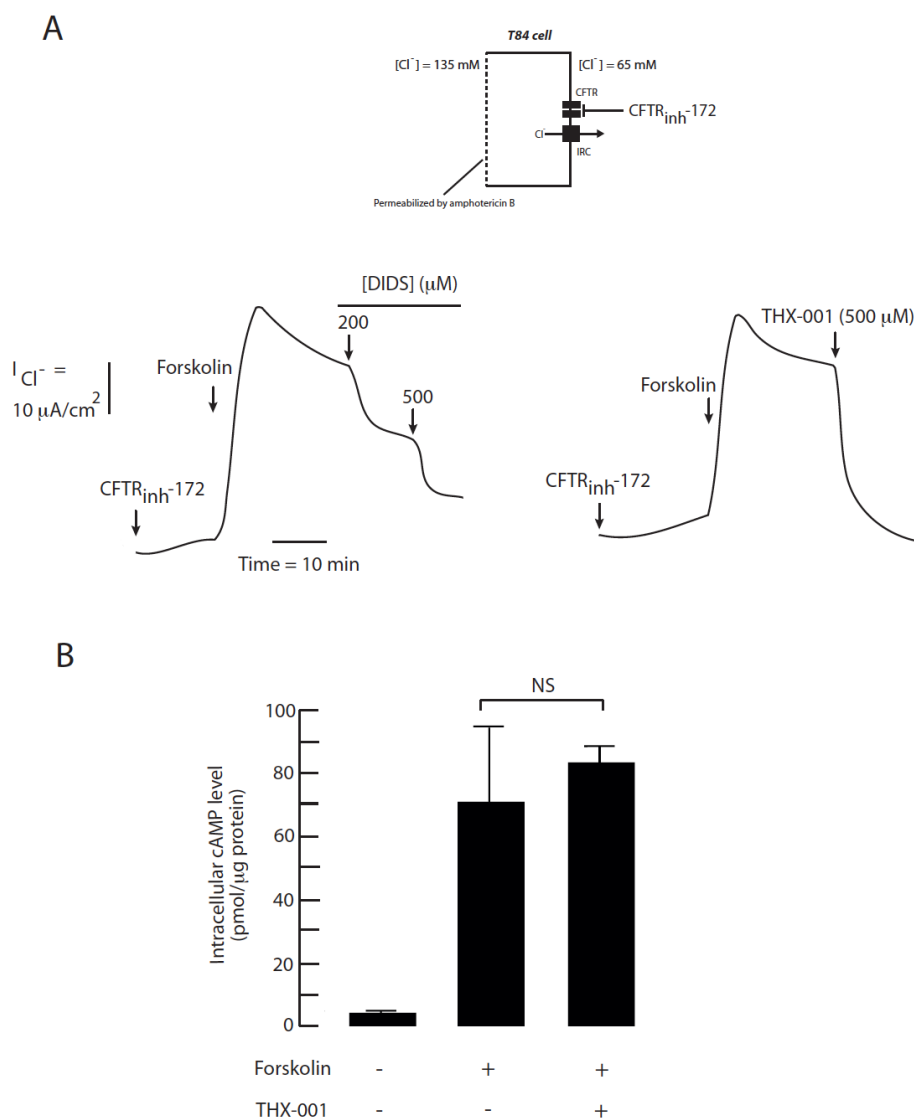
2.1.2.4 การศึกษาผลของสาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) ต่อโปรตีนขนส่งคลอไรด์ IRC

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) ในการยับยั้ง IRC ผู้วิจัยจึงได้ใช้เทคนิค apical chloride current measurement ศึกษา IRC ในเซลล์ T84 โดยได้ออกแบบการทดลองให้สามารถวัด กระแสการไหลของคลอไรด์ ผ่าน IRC ได้โดยตรง กล่าวคือ ใช้วิธีการยับยั้งโปรตีนขนส่งคลอไรด์ CFTR ด้วย CFTR_{inh}-172 แล้วกระตุ้นให้มีการเพิ่มของ cAMP ภายในเซลล์ด้วย forskolin กระแสของคลอไรด์ที่วัดได้จึงเกิดจากการเคลื่อนที่ของ คลอไรด์ผ่าน IRC เท่านั้น (รูปที่ 13A inset) ซึ่งสามารถยืนยันได้โดยการยับยั้งด้วย DIDS (รูปที่ 2.1(7)A) เมื่อใส่ สาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) (500 μM) ลงไปในสารละลายหล่อเลี้ยงด้าน apical พบว่า สาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) สามารถยับยั้ง กระแสการ ไหลของคลอไรด์ผ่าน IRC ได้โดยสมบูรณ์ (รูปที่ 2.1(7)A) ทำให้สามารถสรุปได้ว่า สาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) ออกฤทธิ์ยับยั้ง การคัดหลั่งคลอไรด์ที่กระตุ้นด้วย cAMP โดยการยับยั้งการทำงานของ cAMP-activated apical chloride channels ทั้งสองชนิดคือ CFTR และ IRC

2.1.2.5 ผลของ สาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) ต่อระดับของ cAMP ภายในเซลล์

เพื่อศึกษาว่า สาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) ออกฤทธิ์ยับยั้งโปรตีนขนส่ง คลอไรด์ทั้งสองชนิดโดยการยับยั้ง การทำงานของเอนไซม์ที่สร้าง cAMP (adenylate cyclase) หรือการกระตุ้น

เอนไซม์ที่ย่อยสลาย cAMP (phosphodiesterase) หรือไม่ ผู้วิจัยจึงได้วัดระดับของ cAMP ภายในเซลล์ T84 ด้วยเทคนิค ELISA ซึ่งใช้ antibody ที่จำเพาะต่อ cAMP พบว่า สาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) ไม่มีผลต่อระดับของ cAMP ภายในเซลล์ T84 ดังรูปที่ 2.1(7)B



รูปที่ 2.1(7) (A) ผลของสาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) ต่อ Inward rectifying chloride channel (IRC)
(B) ผลของ สาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) ต่อระดับของ cAMP ภายในเซลล์ T84

ผลการทดลองนี้จึงสามารถสรุปได้ว่าสาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) ออกฤทธิ์ยับยั้งโปรตีน CFTR และ inward rectifying chloride channel ได้โดยตรง

2.2.1.6 การศึกษาประสิทธิภาพของสาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) ในการยับยั้งการคัดหลั่งคลอไรด์ในเซลล์ลำไส้มนุษย์ และศักยภาพของสาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) ในการพัฒนาเป็นยารักษาอหิวาตกโรค

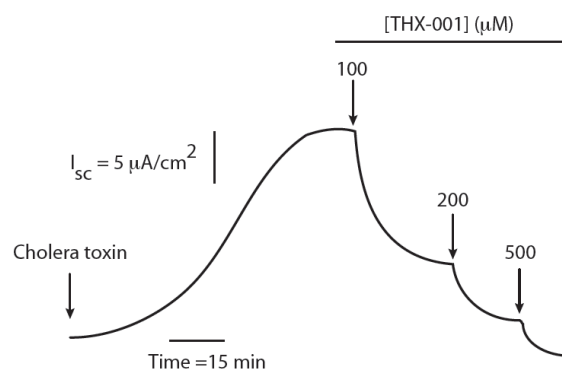
2.2.1.6.1 ประสิทธิภาพของ สาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) ในการลดการคัดหลั่งคลอไรด์ในเซลล์ลำไส้มนุษย์

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพและศักยภาพของสาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) ในการรักษาอหิวาตกโรคในมนุษย์ เราได้ใช้เซลล์ T84 ซึ่งเป็นเซลล์ลำไส้มนุษย์ในการศึกษาผลของสาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) ต่อการคัดหลั่งของ คลอไรด์ที่เหนี่ยวนำด้วย cholera toxin ซึ่งเป็นสารพิษจาก *Vibrio cholera* ที่มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดอาการท้องร่วงใน อหิวาตกโรค ดังแสดงในรูป 2.1(8)A สาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) สามารถยับยั้งการคัดหลั่ง ของคลอไรด์ที่เหนี่ยวนำด้วย cholera toxin (1 µg/ml) (ใส่ด้าน apical membrane ของเซลล์ T84) ด้วย IC₅₀ ประมาณ 100 µM และสามารถยับยั้ง ได้สมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 500 µM

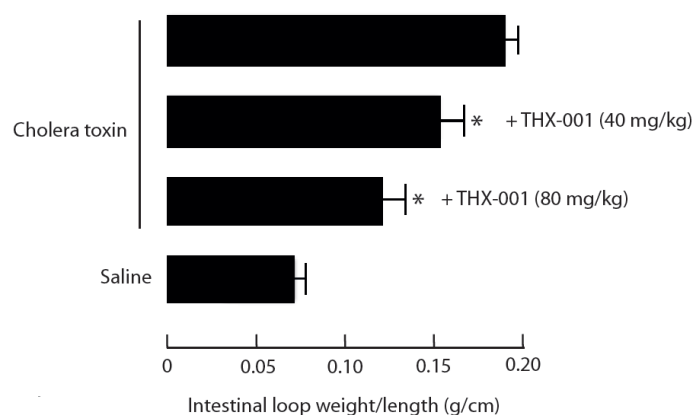
2.2.1.6.2 ศักยภาพของ สาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) ในการพัฒนาเป็นยารักษาอหิวาตกโรค

เพื่อศึกษาศักยภาพของสาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) ในการพัฒนาเป็นยารักษาอหิวาตกโรค ทำการ ศึกษาผลของสาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) ต่อการคัดหลั่งนำจากเซลล์ลำไส้ของหนูที่เหนี่ยวนำด้วย cholera toxin โดยฉีด cholera toxin (1 µg) เข้าไปใน loop ของลำไส้เล็ก แล้วปิดท้อง หลังจากนั้น 2 ชั่วโมง ฉีดสาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) ปริมาณ 40 และ 80 mg/kg เข้าไปในโพรงช่องท้อง (peritoneal cavity) แล้วเปิดท้องหนู 2 ชั่วโมงหลังจากนั้นเพื่อตัด loop ของลำไส้เล็กมาวัดน้ำหนักและความยาวเพื่อคำนวณการคัดหลั่ง คลอไรด์จากอัตราส่วนของน้ำหนักต่อความยาว รูปที่ 2.1(8)B แสดงผลการทดลอง ซึ่งพบว่า สาร 2.1(6) (หรือสาร THX-001) ที่ dose 40 mg/kg และ 80 mg/kg สามารถลดการคัดหลั่งของน้ำที่เหนี่ยวนำโดย cholera toxin ได้ 25 % และ 58 % ตามลำดับ

A



B



รูปที่ 2.1(8) (A) ประสิทธิภาพของสาร **2.1(6)** (หรือสาร **THX-001**) ในการยับยั้งการคัดหลั่งของคลอไรด์ในเซลล์ลำไส้มนุษย์ (T84 cells) ที่เหนี่ยวนำโดย cholera toxin (n=3) (B)ฤทธิ์ในการลดการคัดหลั่งน้ำจากลำไส้เล็กของหนูที่เหนี่ยวนำด้วย cholera toxin *, p< 0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ cholera toxin เท่านั้น (n = 4-10 ตัว)

การตีพิมพ์ผลงาน

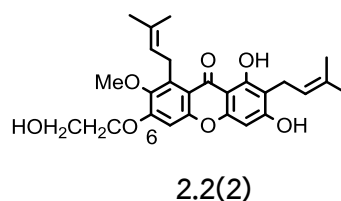
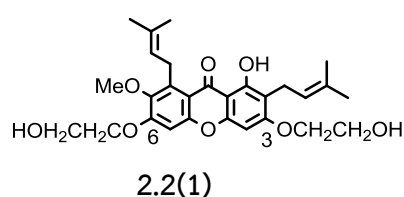
ผลงานวิจัย เรื่อง Hydroxyxanthone as an inhibitor of cAMP-activated apical chloride channels in human intestinal epithelial cells. ได้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ ดังนี้

Luerang W, Khammee T, Kumpum W, Suksamrarn S, Chatsudthipong V, Muanprasat C. Hydroxyxanthone as an inhibitor of cAMP-activated apical chloride channels in human intestinal epithelial cells. Life Sci. 2012, 90, 988-994.

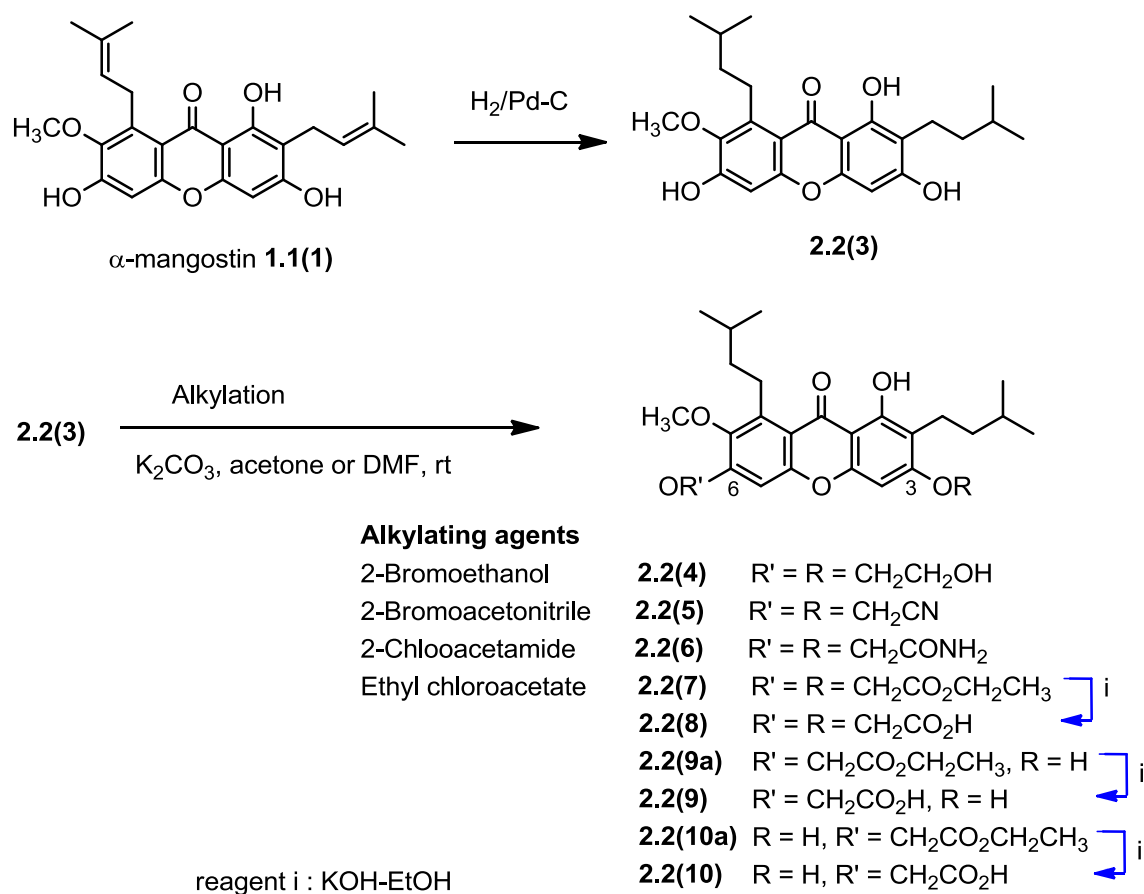
2.2 การปรับเปลี่ยนสารแซนโทนต้นแบบจากธรรมชาติให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ที่สูงขึ้น

2.2.1. การสังเคราะห์สาร α -mangostin analog และการประเมินฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR

จากการที่สาร 1,3,6-trihydroxyxanthone **2.1(6)** มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ที่ IC_{50} ประมาณ 100 μM แต่ α -mangostin ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งโปรตีน CFTR จึงได้ออกแบบการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ α -mangostin (**1.1(1)**) ซึ่งเป็นสารแซนโทนหลักในมังคุดและมีในปริมาณมาก ให้มีความเป็นขั้วแตกต่างกัน เช่น สาร **2.2(1)** และ **2.2(2)** ซึ่งมีหมู่ *O*-2-hydroxyethyl ether สารทั้งสองเตรียมได้โดยใช้ปฏิกิริยาอัลคิเลชันทั่วไปของ α -mangostin (**1.1(1)**) ตามวิธีที่ได้รายงานไว้แล้ว (Sudta et al, 2013) อย่างไรก็ตาม พบว่าสารทั้งสองไม่สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR



เพื่อประเมินว่าพันธะคู่ในหมู่ฟีนิลใน α -mangostin มีอิทธิพลต่อการออกฤทธิ์อย่างไร จึงได้ทำการไฮโดรจีเนตพันธะคู่ ด้วย $H_2/Pd-C$ ได้สาร tetrahydro α -mangostin (**2.2(3)**) ในปริมาณสูง ร่วมกับการเพิ่มหมู่ต่างๆที่ตำแหน่ง 3 และ 6 ในโครงสร้างหลัก โดยใช้ปฏิกิริยา alkylation ด้วย alkylating agent ชนิดต่างๆ และเบส ตามวิธีที่ได้รายงานไว้แล้ว (Sudta et al, 2013) (รูปที่ 2.2(1)) เช่นการเพิ่มหมู่ alcohol (สาร 3,6-di-*O*-ethanol **2.2(4)**) การเพิ่มหมู่ nitrile (สาร 3,6-di-*O*-acetonitrile **2.2(5)**) การเพิ่มหมู่ amide (สาร 3,6-di-*O*-acetamide **2.2(6)**) การเพิ่มหมู่ ester (ได้แก่สาร diethyl 3,6-di-*O*-acetate **2.2(7)**) และ carboxylic acid (ได้แก่สาร 3,6-di-*O*-acetic acid **2.2(8)**) ในกรณีของสาร tetrahydro α -mangostin 3,6-di-*O*-acetic acid **2.2(8)** นั้น เตรียมได้จากการ hydrolysis ของสาร **2.2(7)** ด้วยเบส KOH-EtOH

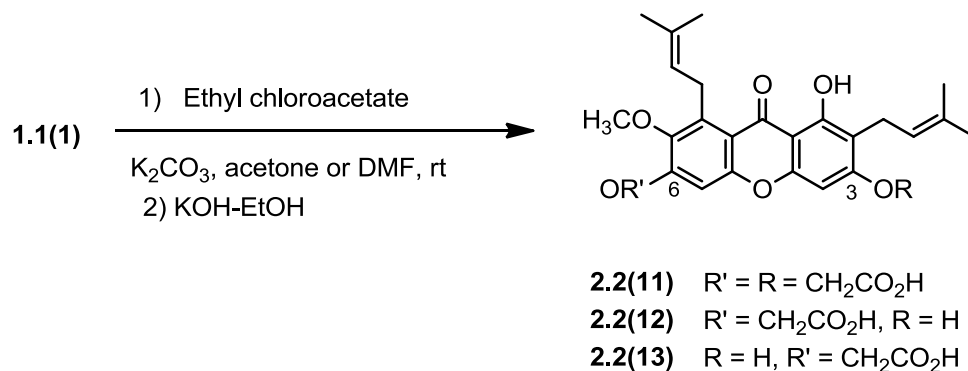


รูปที่ 2.2(1) ภาพรวมการสังเคราะห์สาร tetrahydro α -mangostin analogs 2.2(4) -2.2(10)

เมื่อนำสารเหล่านี้ไปทดสอบการยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR พบว่า เฉพาะสาร **2.2(8)** เท่านั้นสามารถยับยั้งโปรตีน CFTR ที่ IC₅₀ ประมาณ 20 μ M

จากการที่หมู่ dicarboxylic acid ในสาร tetrahydro α -mangostin 3,6-di-O-acetic acid **2.2(8)** เพิ่มการออกฤทธิ์ดีกว่าสารตั้งต้น **1.1(1)** อย่างน้อย 20 เท่า นั้น อย่างไรก็ตามควรตรวจสอบว่าหมู่ carboxylic acid เพียงหมู่เดียว มีประสิทธิภาพอย่างไร จึงได้สังเคราะห์อนุพันธ์ที่เป็น mono-acid ได้แก่ tetrahydro α -mangostin 3-mono-O-carboxylic acid (**2.2(9)**) และ tetrahydro α -mangostin 6-O-carboxylic acid (**2.2(10)**) ตามรูปที่ 2.2(1) α -mangostin 3,6-di-O-acetic acid (**2.2(11)**), α -mangostin 6-O-acetic acid (**2.2(12)**) และ α -mangostin 3-O-acetic acid (**2.2(13)**) ตามที่แสดงในรูปที่ 2.2(2) โดยการปรับสภาวะของปฏิกิริยาอัลคิเลชันระหว่างสารตั้งต้นแซนโทนกับ ethyl chloroacetate/

K_2CO_3 ให้เกิด mono-alkylation มากขึ้น ตามด้วยการใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแยกสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ แล้วนำไป hydrolysis ด้วยเบส (KOH-EtOH) ข้อมูล NMR และ MS ของสารสอดคล้องกับสูตรโครงสร้าง



รูปที่ 2.2(2) การสังเคราะห์สาร α -mangostin analogs 2.2(11) -2.2(13)

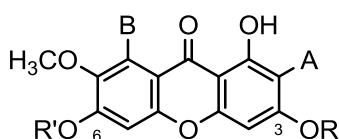
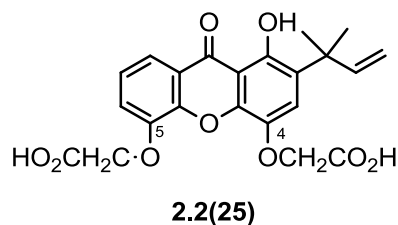
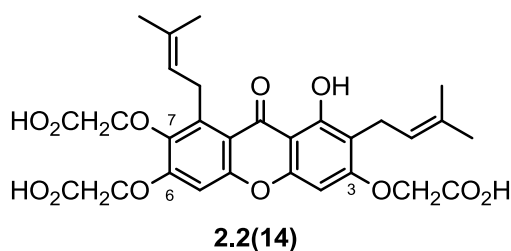
เมื่อนำสาร mono-acid 2.2(9)-2.2(13) ไปทดสอบ และเปรียบเทียบผลการทดสอบกับ สาร di-acid 2.2(8) (ตารางที่ 2.2(1)) พบว่า สาร 2.2(8) (IC_{50} ประมาณ 20 μM) สามารถยับยั้งการทำงานของ โปรตีน CFTR ได้ดีกว่าสารอื่นในกลุ่มนี้ (ตารางที่ 2.2(1) แสดงว่า พันธะคู่ที่หายไป ในสาร 2.2(8)- 2.2(10) ช่วยเพิ่มการออกฤทธิ์ เมื่อเทียบกับสาร 2.2(11)- 2.2(13) ซึ่งยังมีพันธะคู่ในโมเลกุล จึงได้ใช้สาร 2.2(8) เป็น lead structure ในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างต่อไป

ตารางที่ 2.2(1) แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมี และค่า IC_{50} ของสาร 2.2(8) -2.2(12)

สาร และ สูตรโครงสร้าง	IC_{50} (μM)		สาร และ สูตรโครงสร้าง	IC_{50} (μM)
 2.2(8)	10-20		 2.2(11)	50
 2.2(9)	~ 50		 2.2(13)	~ 50 -100
 2.2(10)	10-20		 2.2(12)	>100

2.2.2 การสังเคราะห์สาร xanthone acid analog อื่นๆ

ในการทำงานที่คล้ายกัน โดยใช้วิธีการสังเคราะห์เช่นเดียวกับสาร 2.2(11)-2.2(13) ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ carboxylic acid ของแซนโทนชนิดต่างๆได้แก่ สารอนุพันธ์ *γ*-mangostin 3,6,7-tri-*O*-acetic acid (2.2(14)) จาก *γ*-mangostin (1.1(3)), cowanin 3,6-di-*O*-acetic acid (2.2(15)), cowanin 3-*O*-acetic acid (2.2(16)) จาก cowanin (1.1(8)), hexahydrocowanin 3,6-di-*O*-acetic acid (2.2(18)) จาก hexahydrocowanin (2.2(17)), cowanol 3,6-di-*O*-acetic acid (2.2(19)) จาก cowanol (1.1(9)), cowaxanthone 3,6-di-*O*-acetic acid (2.2(20)) จาก cowaxanthone (1.1(10)), tetrahydrocowaxanthone 3,6-di-*O*-acetic acid (2.2(22)), tetrahydrocowaxanthone 3-*O*-acetic acid (2.2(23)) และ tetrahydrocowaxanthone 6-*O*-acetic acid (2.2(24)) จาก tetrahydrocowaxanthone (2.2(21)), และสาร 4,5-di-*O*-acetic acid (2.2(25)) จากสาร (1.1(13)) (รูปที่ 2.2(3))

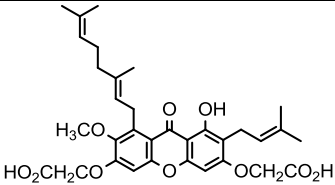
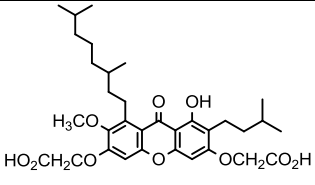
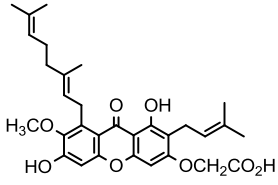
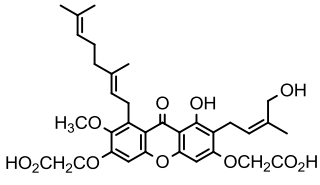
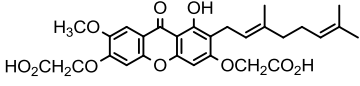
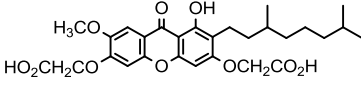
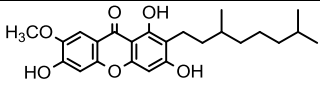
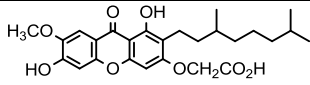
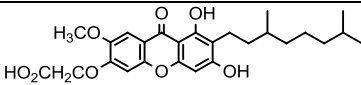


- 2.2(15) A = , B = , R' = R = CH₂CO₂H
 2.2(16) A = , B = , R' = H, R = CH₂CO₂H
 2.2(17) A = , B = , R' = R' = H
 2.2(18) A = , B = , R' = R = CH₂CO₂H
 2.2(19) A = , B = , R' = R = CH₂CO₂H
 2.2(20) A = , B = H, R' = R = CH₂CO₂H
 2.2(21) A = , B = R' = R = H
 2.2(22) A = , B = H, R' = R = CH₂CO₂H
 2.2(23) A = , B = H, R' = H, R = CH₂CO₂H
 2.2(24) A = , B = H, R' = CH₂CO₂H, R = H

รูปที่ 2.2(3) สูตรโครงสร้างของสารแซนโทนที่ปรับเปลี่ยนโครงสร้าง 2.2(14)–2.2(25)

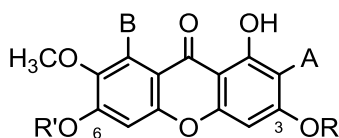
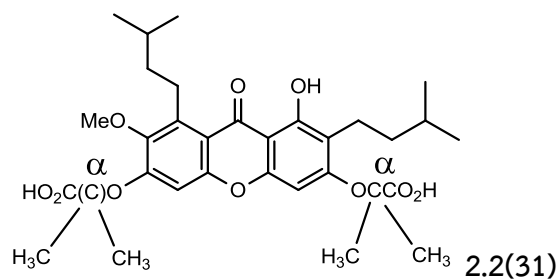
เมื่อนำสาร **2.2(14)-2.2(25)** มาทดสอบ พบว่าสารเหล่านี้สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ที่ค่า IC_{50} ในช่วง 10-200 μM ดังแสดงในตารางที่ 2.2(2) โดยที่สาร **2.2(15)** ออกฤทธิ์ดีที่สุดที่มีค่า IC_{50} 10 μM จากผลที่ได้นี้สามารถสรุปได้ดังนี้ในสาร **2.2(14)** ซึ่งมีหมู่ tri-acid ที่คาร์บอนตำแหน่ง 3, 6 และ 7 ทำให้ความสามารถในการยับยั้งลดลงอย่างมาก หมู่ diacid ที่คาร์บอนตำแหน่ง 3 และ 6 ใน แซนโทนชนิดมีหมู่จีรานิล ในสาร **2.2(15)** เป็นหมู่ที่สำคัญในการแสดงการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ซึ่งสอดคล้องกับ กรณียของ di-acid ที่คาร์บอนตำแหน่ง 3 และ 6 ใน tetraoxygenated xanthone ชนิดมีหมู่พรีนิล ในกลุ่มสาร mangostin **2.2(8)-2.2(12)**

ตารางที่ 2.2(2) แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมี และค่า IC_{50} ของสาร 2.2(15) -2.2(24)

สาร และ สูตรโครงสร้าง	IC_{50} (μM)		สาร และ สูตรโครงสร้าง	IC_{50} (μM)
 2.2(15)	10		 2.2(18)	100-200
 2.2(16)	20-50			
 2.2(19)	20-50			
 2.2(20)	200		 2.2(22)	200
 2.2(21)	500		 2.2(23)	200
			 2.2(24)	200

เพื่อให้ได้ ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ที่สมบูรณ์ จึงได้สังเคราะห์สารเพิ่มขึ้น (2.2(26)-2.2(35)) ในร้อยละผลผลิต 20-80 ตามรูปที่ 2.2(4) โดยมีการแปรรูปหมู่แทนที่ XY และความยาวสายโซ่ของหมู่ R และ R' เมื่อนำสารกลุ่มนี้มาทดสอบ ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 2.2(4) พบว่าสาร 2.2(31) (หรือ สาร SS-CM 223) เป็นสารที่ออกฤทธิ์ดีที่สุด แสดงฤทธิ์ที่สูงมาก มีค่า IC_{50} ประมาณ $1 \mu M$ และยับยั้งได้หมดที่ความเข้มข้น $10 \mu M$ ทั้งนี้สาร 2.2(31) นี้แสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ดีกว่าสารตั้งต้นแมงโกสตินประมาณ 500 เท่า และแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งดีกว่าสารมาตรฐาน $CFTR_{inh}-172$ ประมาณ 2 เท่า โดยรูปของการทดสอบฤทธิ์แสดงในรูป 2.2 (5)

เมื่อพิจารณาสูตรโครงสร้างของ สาร 2.2(31) (หรือ สาร SS-CM 223) ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ดีที่สุด พบว่าเป็นสาร di-acid โดยที่คาร์บอนที่ตำแหน่ง α มีหมู่แทนที่ 2 หมู่ เมื่อเทียบกับสารอื่นในชุดนี้ที่มีหมู่แทนที่หมู่เดียวที่ α -คาร์บอน (สาร 2.2(26) ถึง 2.2(33)) และเทียบกับสาร di-acid ชนิดไม่สมมาตรในสาร 2.2(34) และ 2.2(35) โดยมีลำดับของศักยภาพในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR เป็นดังนี้ สาร 2.2(31) > 2.2(35) $\sim$ 2.2(34) $\sim$ 2.2(26) > 2.2(27) > 2.2(28) >> 2.2(30) > 2.2(29) > 2.2(33) >>>> 2.2(32)



A, B = H, prenyl, geranyl or their hydrogenated form

$R' = R = C(XY)CO_2H$, $X = Y = \text{alkyl}$

$R' = R = C(XY)CO_2H$, $X = \text{alkyl or aryl}$; $Y = H$

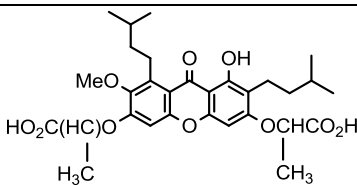
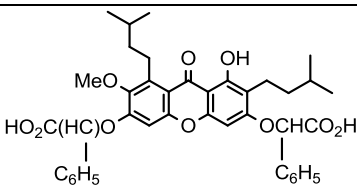
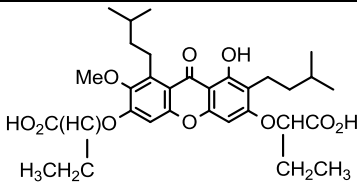
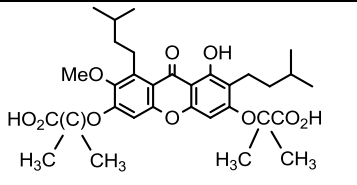
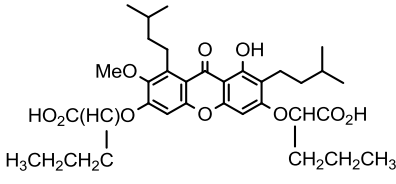
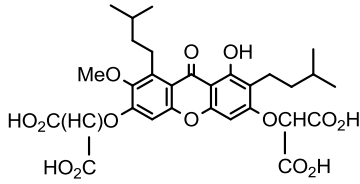
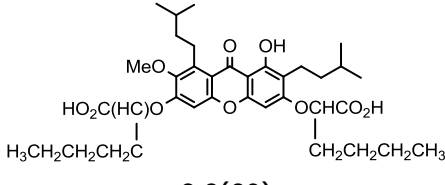
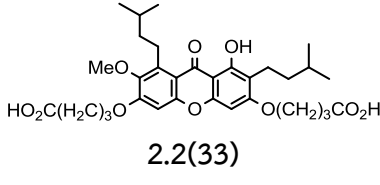
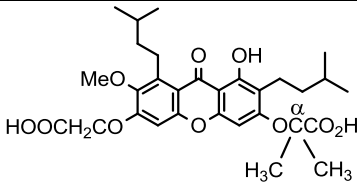
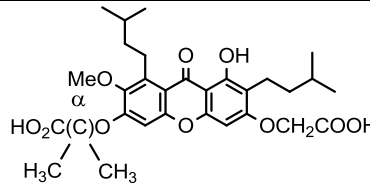
$R' = R = (CH_2)_nCO_2H$; $n = 1-3$

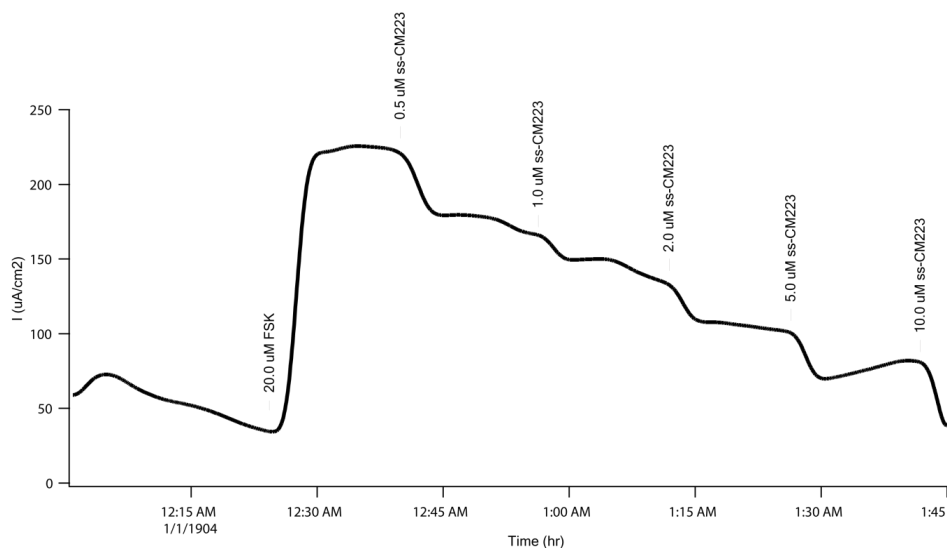
$R' = (CH_2)_nCO_2H$, $n = 1-3$; $R = H$

$R' = H$; $R = (CH_2)_nCO_2H$, $n = 1-3$

รูปที่ 2.2(4) สูตรโครงสร้างทางเคมีของสาร xanthone dicarboxylic acid (2.2(26)-2.2(35))

ตารางที่ 2.2(4) แสดงสูตรโครงสร้าง และค่า IC_{50} ของสาร 2.2(26) -2.2(35)

สาร และ สูตรโครงสร้าง	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	
 2.2(26)	3		 2.2(30)	25
 2.2(27)	3.7		 2.2(31)	0.93
 2.2(28)	7.3		 2.2(32)	Inactive
 2.2(29)	50		 2.2(33)	100-200
 2.2(34)	2.8		 2.2(35)	2



รูปที่ 2.2(5) การศึกษาผลของสาร 2.2 (31) หรือ SSCM223 ต่อการทำงานของโปรตีน CFTR

วิธีการสังเคราะห์ xanthone acid

ทำการกวนของผสมระหว่างแซนโทน เช่น α -mangostin หรือ tetrahydro α -mangostin ในตัวทำละลาย เช่น อะซีโทน หรือดีเอ็มเอฟ กับ alkylating agent เช่น ethyl chloroacetate โดยมีเบส เช่น โพแทสเซียมคาร์บอเนต ที่อุณหภูมิห้อง ติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดให้เติมน้ำ และทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย เช่น EtOAc ล้างชั้นตัวทำละลายด้วยน้ำ ตามด้วยการกำจัดน้ำด้วย anhydrous Na_2SO_4 และระเหยตัวทำละลายให้แห้ง เมื่อตรวจสอบด้วย TLC พบว่าได้ส่วนผสมของสารหลายชนิด โดยมีสารไดเอสเทอร์เป็นสารหลัก ซึ่งสามารถแยกออกจากกันได้โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี (ระบบจะเป็นเฮกเซน-อะซีโทน) ได้สารไดเอสเทอร์ และโมโนเอสเทอร์ ที่บริสุทธิ์

จากนั้นทำการไฮโดรไลซิสเอสเทอร์ที่แยกได้ ด้วยสารละลายเบส เช่น สารละลายโพแทสเซียม-เอทานอล (5 %) กวนสารละลายที่อุณหภูมิห้อง เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุด ทำการปรับส่วนผสมของปฏิกิริยาให้เป็นกรดโดยใช้กรดไฮโดรคลอริก แล้วสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ล้างชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์คาร์บอเนต กำจัดน้ำในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ ด้วย anhydrous Na_2SO_4 ระเหยตัวทำละลายให้แห้ง จะได้ xanthone acid เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน (ร้อยละผลผลิต 60-98) สารประกอบเอสเทอร์ และ carboxylic acid มีข้อมูลทางโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปี และแมสสเปกโตรเมตรีข้างต้นนี้สอดคล้องกับโครงสร้างของสาร

ปฏิกิริยาระหว่าง Tetrahydro α -mangostin กับ ethyl chloroacetate และ K_2CO_3 ให้ สาร เอสเทอร์ **2.2(7)** **2.2(9a)** และ **2.2(10a)** ในร้อยละผลผลิต 48, 20 และ 11 ตามลำดับ จากนั้นตามด้วยการ ไฮโดรไลซิส ให้ xanthone acid **2.2(8)** **2.2(9)** และ **2.2(10)** ในร้อยละผลผลิต มากกว่า 90

Tetrahydro α -mangostin 3,6-di-*O*-acetic acid (**2.2(8)**) เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$ + $DMSO-d_6$ 2 drop) δ : 13.54 (s, 1H, 1-OH), 6.56 (s, 1H, H-5), 6.13 (s, 1H, H-4), 4.67 (s, 2H, 6- OCH_2 -), 4.60 (s, 2H, 3- OCH_2 -), 3.82 (s, 3H, OCH_3), 3.27 (dt, J = 8.0, 5.6 Hz, 2H, H-16), 2.63 (dt, J = 7.8, 5.6 Hz, 2H, H-11), 1.68 (m, 1H, H-18), 1.56 (m, 1H, H-13), 1.37 (m, 4H, H-12 and H-17), 0.92 and 0.88 (each d, each J = 6.5 Hz, each 6H, H-19, H-20 and H-15, H-14); HR-ESIMS m/z : 529.2091 $[M-H]^-$; Calcd for $C_{28}H_{34}O_{10}$: 529.2079 $[M-H]^-$.

Tetrahydro α -mangostin 6-*O*-acetic acid **2.2(9)** เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$ + $DMSO-d_6$ 1 drop) δ : 13.66 (s, 1H, 1-OH), 6.73 (s, 1H, H-5), 6.17 (s, 1H, H-4), 4.66 (s, 2H, OCH_2 -), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 3.29 (dt, J = 8.0, 5.2 Hz, 2H, H-16), 2.68 (dt, J = 8.0, 5.4 Hz, 2H, H-11), 1.69 (m, 1H, H-18), 1.59 (m, 1H, H-13), 1.41 (m, 4H, H-12 and H-17), 0.96 and 0.92 (each d, each J = 6.5 Hz, each 6H, H-19, H-20 and H-15, H-14); HR-ESIMS m/z : 473.2166 $[M+H]^+$; Calcd for $C_{26}H_{32}O_8$ 473.2169 $[M+H]^+$.

Tetrahydro α -mangostin 3-*O*-acetic acid **2.2(10)** เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน 1H -NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 13.67 (s, 1H, 1-OH), 10.80 (s, 1H, 3-OH), 6.98 (s, 1H, H-5), 6.35 (s, 1H, H-4), 4.93 (s, 2H, OCH_2 -), 3.78 (s, 3H, OCH_3), 3.26 (m, 2H, H-16), 2.52 (m, 2H, H-11), 1.68 (m, 1H, H-18), 1.52 (m, 1H, H-13), 1.34 (m, 4H, H-12 and H-17), 0.95 and 0.90 (each d, each J = 6.5, each 6H, H-19, H-20 and H-15, H-14); HR-ESIMS m/z : 473.2172 $[M+H]^+$; Calcd for $C_{26}H_{32}O_8$ 473.2169 $[M+H]^+$.

ปฏิกิริยาระหว่าง α -mangostin กับ ethyl chloroacetate และ K_2CO_3 ตามด้วยการไฮโดรไลซิส ให้ xanthone acid **2.2(11)** **2.2(12)** และ **2.2(13)** ในร้อยละผลผลิต มากกว่า 90

α -Mangostin 3,6-di-*O*-acetic acid **2.2(11)** เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 13.40 (s, 1H, 1-OH), 6.59 (s, 1H, H-5), 6.16 (s, 1H, H-4), 5.20 (m, 2H, H-12 and H-17), 4.68 (s, 2H, 6- OCH_2 -), 4.63 (s, 2H, 3- OCH_2 -), 4.06 (d, J = 6.0 Hz, 2H, H-16), 3.80 (s, 3H, OCH_3), 3.36 (d, J = 7.2 Hz, 2H, H-11), 1.96 and 1.78 (each s, each 3H, H-15, H-20), 1.61 (s, 6H, H-14, H-19); ESI-MS m/z : 525.2 $[M-H]^-$

α -Mangostin 6-*O*-acetic acid **2.2(12)** เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 + $\text{DMSO-}d_6$ 1 drop) δ : 13.57 (s, 1H, 1-OH), 6.57 (s, 1H, H-5), 6.26 (s, 1H, H-4), 5.21 (m, 2H, H-12 and H-17), 4.70 (s, 2H, 6- OCH_2 -), 4.08 (d, J = 6.4 Hz, 2H, H-16), 3.81 (s, 3H, OCH_3), 3.33 (d, J = 6.5 Hz, 2H, H-11), 1.80 and 1.77 (each s, each 3H, H-20, H-15), 1.66 and 1.62 (each s, each 3H, H-14, H-19); ESI-MS m/z : 467.1 $[\text{M-H}]^-$

α -Mangostin 3-*O*-acetic acid **2.2(13)** เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 + $\text{DMSO-}d_6$ 1 drop) δ : 13.50 (s, 1H, 1-OH), 6.75 (s, 1H, H-5), 6.17 (s, 1H, H-4), 5.22 (m, 2H, H-12 and H-17), 4.64 (s, 2H, 3- OCH_2CO), 4.05 (d, J = 6.2 Hz, 2H, H-16), 3.55 (s, 3H, OCH_3), 3.38 (d, J = 7.0 Hz, 2H, H-11), 1.78 and 1.75 (each s, each 3H, H-15, H-20), 1.63 (s, 6H, H-14, H-19); ESI-MS m/z : 467.4 $[\text{M-H}]^-$

ปฏิกิริยาระหว่าง γ -mangostin **1.1(3)** กับ ethyl chloroacetate และ K_2CO_3 ตามด้วยการไฮโดรไลซิส ให้ xanthone acid **2.2(14)** ในร้อยละผลผลิต 10

γ -Mangostin 3,6,7-tri-*O*-acetic acid (**2.2(14)**) เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 13.46 (s, 1H, 1-OH), 7.02 (s, 1H, H-5), 6.47 (s, 1H, H-4), 5.19 (*br t*, J = 6.6 Hz, 2H, H-12), 5.13 (*br t*, J = 5.6 Hz, 2H, H-17), 4.92, 4.84 and 4.55 (each s, each 2H, 6- OCH_2 -, 3- OCH_2 - and 7- OCH_2 -, respectively), 4.14 (d, J = 5.6 Hz, 2H, H-16), 3.27 (d, J = 5.6 Hz, 2H, H-11), 1.74 and 1.72 (each s, each 3H, H-19 and H-14), 1.60 (s, 6H, H-15 and H-20); ESI-MS m/z : 569.4 $[\text{M-H}]^-$

ปฏิกิริยาระหว่าง cowanin **1.1(8)** กับ ethyl chloroacetate และ K_2CO_3 ตามด้วยการไฮโดรไลซิส ให้ xanthone acid **2.2(15)** และ **2.2(16)** ในร้อยละผลผลิต 95 และ 70 ตามลำดับ ส่วน cowanin 6-*O*-acetic acid มีความไม่เสถียร

Cowanin 3,6-di-*O*-acetic acid (**2.2(15)**) เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 + 2 drps CD_3OD) δ : 13.43 (s, 1H, OH), 6.60 (s, 1H, H-5), 6.16 (s, 1H, H-4), 5.23 (*br t*, J = 6.5 Hz, 1H, H-12), 5.17 (*br t*, J = 6.3 Hz, 1H, H-17), 4.99 (*br t*, J = 6.3 Hz, 1H, H-21), 4.72 and 4.66 (each s, each 2H, 6- and 3- $\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, respectively), 4.08 (d, J = 6.3 Hz, 2H, H-16), 3.80 (s, 3H, OCH_3), 3.37 (*br t*, J = 6.5 Hz, 2H, H-11), 1.94 (*m*, 4H, H-19, 20), 1.50 (s, 3H, H-24), 1.63 and 1.75 (each s, each 3H, H-14 and H-15), 1.50 and 1.56 (each s, each 3H, H-23 and H-25); ESI-MS m/z : 593.0

$[M-H]^-$; HRMS (ESI) m/z : 593.2385 $[M-H]^-$; Calcd for $C_{33}H_{38}O_{10}$ 593.2392 $[M-H]^-$

Cowanin 3-*O*-acetic acid (**2.2(16)**) เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$ + $DMSO-d_6$) δ : 13.78 (s, 1H, OH), 5.05 (s, 1H, H-5), 4.87 (s, 1H, H-4), 4.20 (*br t*, $J = 6.5$ Hz, 2 $\times$ 1H, H-12, 17), 4.00 (*br t*, $J = 5.9$ Hz, 2 $\times$ 1H, H-21), 3.23 (s, 2H, 3- OCH_2 -), 2.77 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H, H-16), 2.61 (s, 3H, OCH_3), 2.20 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H, H-11), 0.96 (*m*, 2H, H-20), 0.90 (*m*, 2H, H-19), 0.72 (s, 3H, H-24), 0.75 and 0.58 (each s, each 3H, H-14 and H-15), 0.51 and 0.49 (each s, each 3H, H-23 and H-25); ESI-MS m/z : 535.1 $[M-H]^-$

ปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน ของ cowanin 3,6-di *O*-acetic acid (**2.2(15)**) โดยใช้ Pd/C เป็นตัวเร่ง ให้ xanthone acid **2.2(18)** ในร้อยละผลผลิต 92

Hexahydrocowanin 3,6-di-*O*-acetic acid (**2.2(18)**) เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$ + $DMSO-d_6$) δ : 13.65 (s, 1H, OH), 6.54 (s, 1H, H-8), 6.20 (s, 1H, H-5), 4.64 (s, 2H, 6- OCH_2 -), 4.55 (s, 2H, 3- OCH_2 -), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 1.92-1.46 (*m*, hydrocarbon protons) ESI-MS m/z : 599 $[M-H]^-$

ปฏิกิริยาระหว่าง cowanol 1.1(9) กับ ethyl bromoacetate และ K_2CO_3 ให้เอสเทอร์ของสารนี้ ในร้อยละผลผลิต 58 .ตามด้วยการไฮโดรไลซิส ให้ xanthone acid **2.2(19)** ในร้อยละผลผลิต 77

Cowanol 3,6-di-*O*-acetic acid (**2.2(19)**) เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$ + $DMSO-d_6$ 2 drops) δ : 13.60 (s, 1H, OH), 6.58 (s, 1H, H-8), 6.15 (s, 1H, H-5), 5.31 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H, H-17), 5.13 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-12), 4.95 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H, H-21), 4.67 (s, 2H, 6- OCH_2 -), 4.60 (s, 2H, 3- OCH_2 -), 4.20 (s, 2H, H-14), 4.02 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, H-16), 3.77 (s, 3H, OCH_3), 3.41 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-11), 1.92 (*m*, 4H, H-19, H-20), 1.75 (3H, s, H-24), 1.70 (3H, s, H-15), 1.52 (3H, s, H-23), 1.46 (3H, s, H-25); ESI-MS m/z : 609 $[M-H]^-$

ปฏิกิริยาระหว่าง cowaxanthone 1.1(10) กับ ethyl chloroacetate และ K_2CO_3 ให้ไดเอสเทอร์ของสารนี้ ในร้อยละผลผลิต 5 ตามด้วยการไฮโดรไลซิส ให้ xanthone diacid **2.2(20)** ในร้อยละผลผลิต 90

Cowaxanthone 3,6-di-*O*-acetic acid (**2.2(20)**) เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 12.91 (s, 1H, OH), 7.47 (s, 1H, H-8), 6.71 (s, 1H, H-5), 6.23 (s, 1H, H-4), 5.21 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-12), 4.98 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H, H-16), 4.71 (s, 2H, 6- OCH_2CO_2H), 4.64 (s, 2H, 3-

OCH₂CO₂H), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 3.37 (d, J = 6.9 Hz, 2H, H-11), 1.96 (m, 2H, H-14), 1.89 (2H, m, H-15), 1.72 (3H, s, H-19), 1.59 (3H, s, H-20), 1.49 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 179.7 (C-9), 170.0 (6-CO), 169.6 (3-CO), 161.9 (C-3), 159.2 (C-1), 155.7 (C-4a), 153.5 (C-6), 151.7 (C-10a), 146.7 (C-7), 135.3 (C-13), 131.0 (C-17), 124 (C-12), 121.5 (C-16), 114.0 (C-8a), 112.2 (C-9a), 105.1 (C-8), 103.6 (C-2), 100.7 (C-5), 90.1 (C-4), 65.6 (6-OCH₂), 65.1 (3-OCH₂), 56.7 (OCH₃), 39.6 (C-15), 26.5 (C-14), 25.3 (C-20), 21.1 (C-11), 17.3 (C-18), 15.8 (C-19). HR-MS (ESI) m/z : 525.1734 [M-H]⁻; Calcd for C₂₈H₃₀O₁₀ 525.1766 [M-H]⁻

ปฏิกิริยาระหว่าง tetrahydrocowaxanthone 2.2(21) กับ ethyl chloroacetate และ K₂CO₃ ให้ 3,6-ไดเอสเตอร์ 3-เอสเตอร์ และ 6-เอสเตอร์ ของสารนี้ ในร้อยละผลผลิต 2 33 และ 11 ตามลำดับ เมื่อแยกสารเหล่านี้ออกจากกัน ตามด้วยการไฮโดรไลซิสของแต่ละเอสเตอร์ ให้ xanthone acid 2.2(22) 2.2(23) และ 2.2(24) ในร้อยละผลผลิต 90 98 และ 82 ตามลำดับ โดยที่สาร 2.2(21) เตรียมได้จากปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันของ cowaxanthone (1.1(10)) โดยใช้ Pd/C เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในร้อยละผลผลิต 90

Tetrahydrocowaxanthone 3,6-di-*O*-acetic acid (2.2(22)) เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃ + CD₃OD) δ : 12.93 (s, 1H, OH), 7.55 (s, 1H, H-8), 6.72 (s, 1H, H-5), 6.23 (s, 1H, H-4), 4.74 (s, 1H, 6-OCH₂-), 4.67 (s, 1H, 3-OCH₂-), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 2.66 (m, 2H, H-11), 1.49 (m, 2H, H-13, 17), 1.29 (4H, m, H-12, 14), 1.09 (4H, m, H-15, 16), 0.91 (3H, d, J = 6.1 Hz, H-19), 0.80 (6H, d, J = 6.6 Hz, H-18, 20); ESIMS m/z : 529.3 [M-H]⁻

Tetrahydrocowaxanthone 3-*O*-acetic acid (2.2(23)) เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃ + CD₃OD) δ : 13.02 (s, 1H, 1-OH), 7.52 (s, 1H, H-8), 6.84 (s, 1H, H-5), 6.24 (s, 1H, H-4), 4.66 (s, 1H, 3-OCH₂-), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 2.64 (m, 2H, H-11), 1.44 (m, 2H, H-13, H-17), 1.27 (m, 4H, H-12, H-14), 1.07 (m, 4H, H-15, H-16), 1.29 (4H, m, H-12, 14), 1.09 (4H, m, H-15, 16), 0.89 (3H, d, J = 6.1 Hz, H-19), 0.78 (6H, d, J = 6.6 Hz, H-18, 20); ESIMS m/z : 471.1 [M-H]⁻

Tetrahydrocowaxanthone 6-*O*-acetic acid (2.2(24)) เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃ + CD₃OD) δ : 13.98 (s, 1H, 1-OH), 7.51 (s, 1H, H-8), 6.66 (s, 1H, H-5), 6.24 (s, 1H, H-4), 4.71 (s, 1H, 6-OCH₂-), 3.92 (s, 3H, OCH₃), 2.60 (m, 2H, H-11), 1.45 (m, 2H, H-13, H-17), 1.29 (m, 4H, H-12, H-14), 1.09 (m, 4H, H-15, H-16), 0.91 (3H, d, J = 6.1 Hz, H-19), 0.80 (6H, d, J = 6.6 Hz, H-18, 20); ESIMS m/z : 471.2 [M-H]⁻

ปฏิกิริยาระหว่าง แซนโทน 1.1(13) กับ ethyl chloroacetate และ K_2CO_3 ให้ ไดเอสเทอร์ ของ สารนี้ ในร้อยละผลผลิต 55 ตามด้วยการไฮโดรไลซิส xanthone acid 2.2(25) ในร้อยละผลผลิต 90

1,4,5-trihydroxy-2-(2-methylbut-3-en-2-yl)-9H-xanthen-9-one 4,5-di-O-acetic acid (2.2(25)) เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 12.97 (s, 1H, 1-OH), 7.73 (d, J = 7.2 Hz, 1H, H-8), 7.30 (m, 3H, H-3, H-6 and H-7), 6.20 (dd, J = 10.2, 7.5 Hz, 1H, H-12), 5.00 and 4.98 (m, 2H, H-13), 4.88 and 4.77 (each s, each 2H, 4- OCH_2 - and 5- OCH_2 -), 1.46 (6H, s, H-14 and H-15); ESIMS m/z : 427.3 $[M-H]^-$

ปฏิกิริยาระหว่าง tetrahydro α -mangostin 2.2(3) กับ methyl 2-bromopropanoate และ K_2CO_3 ให้ ไดเอสเทอร์ ของสารนี้ ในร้อยละผลผลิต 69 ตามด้วยการไฮโดรไลซิสให้ xanthone acid 2.2(26) ในร้อยละผลผลิต 88

Tetrahydromangostin 3,6-di-O-2-propanoic acid (2.2(26)) เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$ + CD_3OD 3 drop) δ : 13.50 (s, 1H, OH), 6.48 (s, 1H, H-5), 6.05 (s, 1H, H-4), 4.71 and 4.67 (each q, each J = 6.7 Hz, each 1H, 6- and 3- $OCHCH_3$, respectively), 3.75 (s, 3H, OCH_3), 3.21 (m, 2H, H-16), 2.56 (m, 2H, H-11), 1.63 (m, 1H, H-18), 1.48 (m, 1H, H-13), 1.60 and 1.54 (each d, each J = 6.7 Hz, each 3H, 6- and 3- $OCHCH_3$, respectively), 1.48 (m, 4H, H-18, 13), 1.30 (m, 4H, H-17, 12), 0.86 (d, J = 6.5, 6H, H-19), 0.85 (d, J = 6.6 Hz, 6H, H-20), 0.82 (d, J = 6.5 Hz, 6H, H-14, 15); HRMS (ESI) m/z : 557.2387 $[M-H]^-$; Calcd for $C_{30}H_{38}O_{10}$ 557.2392 $[M-H]^-$

ปฏิกิริยาระหว่าง tetrahydro α -mangostin 2.2(3) กับ ethyl 2-bromobutanoate และ K_2CO_3 ให้ ไดเอสเทอร์ ของสารนี้ ในร้อยละผลผลิต 18 ตามด้วยการไฮโดรไลซิสให้ xanthone acid 2.2(27) ในร้อยละผลผลิต 60

Tetrahydromangostin 3,6-di-O-2-butanoic acid (2.2(27)) เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$ + CD_3OD) δ : 13.54 (s, 1H, 1-OH), 6.50 (s, 1H, H-5), 6.07 (s, 1H, H-4), 4.59 and 4.52 (each t, each J = 5.7 Hz, each 1H, 6- and 3- OCH , respectively), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 3.26 (m, 2H, H-16), 2.60 (m, 2H, H-11), 1.99 (m, 4H, 6- and 3- $OCHCH_2CH_3$, respectively), 1.65 (m, 1H, H-18), 1.54 (m, 1H, H-13), 1.34 (m, 4H, H-17, 12), 1.04 (t, J = 7.5 Hz, 6H, 2 x $OCHCH_2CH_3$), 0.89 (d, J = 6.6 Hz, 6H, H-19, 20), 0.85 (d, J = 6.5 Hz, 6H, H-14, 15); ESI-MS m/z : 585 $[M-H]^-$

ปฏิกิริยาระหว่าง tetrahydro α -mangostin 2.2(3) กับ ethyl 2-bromopentanoate และ K_2CO_3 ให้ ไดเอสเทอร์ของสารนี้ ในร้อยละผลผลิต 25 ตามด้วยการไฮโดรไลซิสให้ xanthone acid 2.2(28) ในร้อยละผลผลิต 61

Tetrahydro α -mangostin 3,6-di-O-2-pentanoic acid (2.2(28)) เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 13.52 (s, 1H, OH), 6.57 (s, 1H, H-5), 6.10 (s, 1H, H-4), 4.73 (t, J = 5.8 Hz, 1H, 6-OCH), 4.68 (t, J = 6.0 Hz, 1H, 3-OCH), 3.84 (s, 3H, OCH_3), 3.30 (m, 2H, H-16), 2.63 (m, 2H, H-11), 2.03 (4H, m, 2 x $OCHCH_2CH_2CH_3$), 1.73 (m, 1H, H-18), 1.61 (m, 5H, H-13 and 2 x $OCHCH_2CH_2CH_3$), 1.38 (m, 4H, H-17, 12), 1.00-0.92 (m, 18H, H-14, 15, 19, 20 and 2 x $OCHCH_2CH_2CH_3$); ESI-MS m/z : 613 $[M-H]^-$

ปฏิกิริยาระหว่าง tetrahydro α -mangostin 2.2(3) กับ ethyl 2-bromohexanoate และ K_2CO_3 ให้ ไดเอสเทอร์ของสารนี้ ในร้อยละผลผลิต 35 ตามด้วยการไฮโดรไลซิสให้ xanthone acid 2.2(29) ในร้อยละผลผลิต 79

Tetrahydro α -mangostin 3,6-di-O-2-hexanoic acid (2.2(29)) เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 13.59 (s, 1H, OH), 6.50 (s, 1H, H-5), 6.06 (s, 1H, H-4), 4.74 and 4.68 (each t, each J = 5.8 Hz, each 1H, 6- and 3-OCH-, respectively), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 3.25 and 2.62 (each m, each 2H, H-16 and H-11, respectively), 2.05 (m, 4H, 2 x $OCHCH_2CH_2CH_2CH_3$), 1.72 (m, 1H, H-18), 1.61 (m, 1H, H-13), 1.54 (m, 4H, 2 x $OCHCH_2CH_2CH_2CH_3$), 1.37 (m, 8H, H-17, 12 and 2 x $OCHCH_2CH_2CH_2CH_3$), 1.01-0.98 (m, 18H, H-14, 15, 19 and 20 and 2 x $OCHCH_2CH_2CH_2CH_3$); ESI-MS m/z : 641 $[M-H]^-$

ปฏิกิริยาระหว่าง tetrahydro α -mangostin 2.2(3) กับ methyl 2-bromo-2-phenylacetate และ K_2CO_3 ให้ ไดเอสเทอร์ของสารนี้ ในร้อยละผลผลิต 74 ตามด้วยการไฮโดรไลซิสให้ xanthone acid 2.2(30) ในร้อยละผลผลิต 94

Tetrahydro α -mangostin 3,6-di-O-2-phenylacetic acid (2.2(30)) เป็นของแข็งสีเหลือง 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$ + $DMSO-d_6$) δ : 13.58 (s, 1H, OH), 7.62 (m, 4H, ArH), 7.38 (m, 6H, ArH), 6.66 (s, 1H, H-5), 6.24 (s, 1H, H-4), 5.66 and 5.63 (each s, each 1H, 6- OCH- and 3-OCH-, respectively), 3.93 (s, 3H, OCH_3), 3.32 (m, 2H, H-16), 2.76 (m, 2H, H-11), 1.73 (m, 1H, H-18), 1.62 (m, 1H, H-13), 1.40 (m, 4H, H-17 and H-12), 0.97 and 0.96 (each d, J = 6.4 Hz, 6H, H-19 and H-20), 0.92 (d, J = 6.4 Hz, 6H, H-14 and H-15); ESI-MS m/z : 681.2 $[M-H]^-$

ปฏิกิริยาระหว่าง tetrahydro α -mangostin 2.2(3) กับ ethyl 2-bromo-2-methyl-2-propanoate และ K_2CO_3 ให้ ไดเอสเทอร์ของสารนี้ ในร้อยละผลผลิต 8 ตามด้วยการไฮโดรไลซิสให้ xanthone acid 2.2(31) ในร้อยละผลผลิต 70

Tetrahydro α -mangostin 3,6-di-O-2-methylpropanoic acid (2.2(31)) เป็นของแข็งสีเหลือง 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 13.60 (s, 1H, OH), 6.68 (s, 1H, H-5), 6.20 (s, 1H, H-4), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 3.32 (br t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-16), 2.64 (br t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-11), 1.75 (m, 1H, H-18), 1.76 and 1.71 (each s, each 6H, 6- and 3- $OC(CH_3)_2$, respectively), 1.61 (m, 1H, H-13), 1.40 (m, 4H, H-17, H-12), 0.98 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-19, 20), 0.94 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H, H-14, 15); ESIMS m/z : 587.8 $[M+H]^+$

ปฏิกิริยาระหว่าง tetrahydro α -mangostin 2.2(3) กับ diethyl 2-bromo-malonate และ K_2CO_3 ให้ ไดเอสเทอร์ของสารนี้ ในร้อยละผลผลิต 24 ตามด้วยการไฮโดรไลซิสให้ xanthone acid 2.2(32) ในร้อยละผลผลิต 89

Tetrahydro α -mangostin 3,6-di-O-2-malonic acid (2.2(32)) เป็นของแข็งสีเหลือง 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$ + CD_3OD 2 drops) δ : 13.48 (s, 1H, OH), 6.61 (s, 1H, H-5), 6.15 (s, 1H, H-4), 5.27 (s, 1H, 6-OCH), 5.20 (s, 1H, 3-OCH), 3.88 (s, 3H, OCH_3), 3.26 (br t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-16), 2.69 (br t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H-11), 1.70 (m, 1H, H-18), 1.58 (m, 1H, H-13), 1.39 (m, 4H, H-17, 12), 0.94 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H, H-19, 20), 0.90 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H, H-14, 15)

ปฏิกิริยาระหว่าง tetrahydro α -mangostin 2.2(3) กับ ethyl 4-bromobutanoate และ K_2CO_3 ตามด้วยการแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ให้ 3,6-ไดเอสเทอร์ (ร้อยละผลผลิต 44) 3-เอสเทอร์ (ร้อยละผลผลิต 11) และ 6-เอสเทอร์ (ร้อยละผลผลิต 22) ของสารนี้ ตามด้วยการไฮโดรไลซิสของแต่ละเอสเทอร์ให้ xanthone acid ในร้อยละผลผลิต 95-97

Tetrahydro α -mangostin 3,6-di-O-butanoic acid (2.2(33)) เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$ + $DMSO-d_6$ 1 drop) δ : 13.60 (s, 1H, 1-OH), 6.65 (s, 1H, H-5), 6.23 (s, 1H, H-4), 4.10 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, OCH_2), 4.04 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, OCH_2), 3.78 (s, 3H, OCH_3), 3.28 (dt, $J = 8.0$ and 5.3 Hz, 2H, H-16), 2.59 (m, 2H, H-11), 2.56 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2CO_2H$), 2.54 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2CO_2H$), 2.18 (quint, $J = 6.2$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2CO_2H$), 2.12 (quint, $J = 6.4$ Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_2CO_2H$), 1.71 (m, 1H, H-18), 1.57 (m, 1H, H-13), 1.37 (m, 2H,

H-17), 1.35 (m, 2H, H-12), 0.97 (each d, each 3H, H-14 and H-15), 0.91 (each d, $J = 6.0$, each 3H, H-19 and H-20); ESIMS: m/z 585 $[M-H]^-$

การเตรียมสาร ไดคาร์บอกซิลิกไม่สมมาตร (unsymmetrical dicarboxylic acid) 2.2(34)

และ 2.2(35) .โดยการใช้สภาวะของปฏิกิริยาล้ำคลั่งกับของการเตรียมสาร 2.2(31) เพียงแต่ปรับสภาวะของปฏิกิริยาให้เกิด monoester มากขึ้น ด้วยการใช้เวลาการกวนส่วนผสมของปฏิกิริยาน้อยลง ร่วมกับการติดตามปฏิกิริยา และให้หยุดปฏิกิริยาเมื่อพบว่าเริ่มมี diester ปรากฏบน TLC ตามด้วยการแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ให้ 3-เอสเทอร์ (ร้อยละผลผลิต 10) และ 6-เอสเทอร์ (ร้อยละผลผลิต 20) ของสารนี้ จากนั้นนำแต่ละเอสเทอร์มาทำปฏิกิริยากับ ethyl chloroacetate และ K_2CO_3 ตามด้วยการไฮโดรไลซิสให้ xanthone acid ในร้อยละผลผลิต 60-70

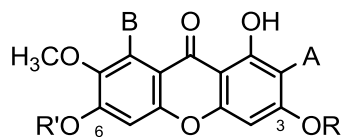
Tetrahydro α -mangostin 3-*O*-2-methylpropanoic-6-*O*-acetic diacid (2.2(34)) เป็นของแข็ง สีเหลือง 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$ + $DMSO-d_6$) δ : 13.60 (s, 1H, OH), 6.68 (s, 1H, H-5), 6.20 (s, 1H, H-4), 4.65 (s, 2H, 6- OCH_2 -), 3.80 (s, 3H, OCH_3), 3.32 (br t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-16), 2.64 (br t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-11), 1.75 (m, 1H, H-18), 1.76 and 1.71 (each s, each 3H, 3- $OC(CH_3)_2$), 1.61 (m, 1H, H-13), 1.40 (m, 4H, H-17, H-12), 0.98 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-19, 20), 0.94 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H, H-14, 15); ESIMS m/z : 559.3 $[M+H]^+$

Tetrahydro α -mangostin 3-*O*-acetic-6-*O*-2-methylpropanoic diacid (2.2(35)) เป็นของแข็ง สีเหลือง 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$ + $DMSO-d_6$) δ : 13.62 (s, 1H, OH), 6.63 (s, 1H, H-5), 6.18 (s, 1H, H-4), 4.61 (s, 2H, 3- OCH_2 -), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 3.32 (br t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-16), 2.64 (br t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-11), 1.75 (m, 1H, H-18), 1.74 and 1.71 (each s, each 3H, 3- $OC(CH_3)_2$), 1.61 (m, 1H, H-13), 1.40 (m, 4H, H-17, H-12), 0.98 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-19, 20), 0.93 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H, H-14, 15); ESIMS m/z : 559.2 $[M+H]^+$

2.2.3. การสังเคราะห์สารแซนโทนที่เพิ่มการละลายน้ำ

จากการที่สารบางชนิดมีความสามารถในการละลายน้ำไม่ดี ทำให้มีปัญหาในการประเมินฤทธิ์การยับยั้ง CFTR จึงได้ออกแบบการสังเคราะห์เกลือ carboxylate ดังนั้นได้ทำการคัดเลือกสาร xanthone dicarboxylic acid ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ที่ดีบางสาร มาเตรียมเป็นเกลือ carboxylate ชนิดต่างๆ ได้แก่สาร 2.2(36) – 2.2(39) ให้ร้อยละผลผลิต 50-90 ตามรูปที่ 2.2(6) โดยมีเป้าหมายเพื่อให้ได้สารที่ยังคงออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ที่ดี ร่วมกับมีความสามารถละลายน้ำได้ดีขึ้น เมื่อนำสารกลุ่มนี้มาทดสอบ พบว่าสาร 2.2(37) (หรือสาร SS-CM 130) เป็นสารที่ออกฤทธิ์ดี

ที่สุด มีค่า IC_{50} ประมาณ $10\ \mu M$ และยับยั้งได้หมดที่ความเข้มข้น $10\ \mu M$ และไม่มีความเป็นพิษที่ $200\ \mu M$ (ตารางที่ 2.2(3))



A, B = H, prenyl, geranyl or their hydrogenated form

$R' = R = (CH_2)_nCO_2^-M^+$; $n = 0-3$

รูปที่ 2.2(6) สูตรโครงสร้างของเกลือ xanthone dicarboxylate 2.2(36)-2.2(39)

ตารางที่ 2.2(3) แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมี และค่า IC_{50} ของสาร 2.2(36) -2.2(39)

สาร และ สูตรโครงสร้าง	IC_{50} (μM)	สาร และ สูตรโครงสร้าง	IC_{50} (μM)
2.2(36)	Inactive	2.2(37) หรือ THX-130	4-10
2.2(39)	10	2.2(38)	10 Incomplete inhibition

วิธีการสังเคราะห์เกลือของ xanthone acid

ละลายสารประกอบ xanthone acid เช่น สาร 2.2(15) ในเมทานอล ค่อยๆเติมสารละลายแอมโมเนียม ไฮดรอกไซด์ (25 %) หรือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จนกระทั่งสารละลายมี pH เป็นเบส แล้วนำของผสมนี้ไประเหยให้แห้ง จะได้ตะกอนสีเหลือง ล้างตะกอนด้วยน้ำเล็กน้อย นำไปทำให้แห้ง จะได้สารเกลือไดแอมโมเนียม หรือเกลือไดโซเดียม เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน ในร้อยละผลผลิต 77-83

Tetrahydro α -mangostin diammonium 3,6-di-O-acetate (**2.2(37)**) เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 13.66 (s, 1H, 1-OH), 6.73 (s, 1H, H-5), 6.17 (s, 1H, H-4), 4.66 and 4.61 (each s, each 2H, OCH_2 -), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 3.29 (dt, $J = 8.0, 5.2$ Hz, 2H, H-16), 2.68 (dt, $J = 8.0, 5.4$ Hz, 2H, H-11), 1.69 (m, 1H, H-18), 1.59 (m, 1H, H-13), 1.41 (m, 4H, H-12 and H-17), 0.96 and 0.92 (each d, each $J = 6.5$ Hz, each 6H, H-19, H-20 and H-15, H-14)

Tetrahydro α -mangostin disodium 3,6-di-O-acetate (**2.2(38)**) เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 13.65 (s, 1H, 1-OH), 6.71 (s, 1H, H-5), 6.19 (s, 1H, H-4), 4.64 and 4.60 (each s, each 2H, OCH_2 -), 3.81 (s, 3H, OCH_3), 3.24 (dt, $J = 8.0, 5.2$ Hz, 2H, H-16), 2.65 (dt, $J = 8.0, 5.4$ Hz, 2H, H-11), 1.65 (m, 1H, H-18), 1.53 (m, 1H, H-13), 1.41 (m, 4H, H-12 and H-17), 0.94 and 0.92 (each d, each $J = 6.5$ Hz, each 6H, H-19, H-20 and H-15, H-14)

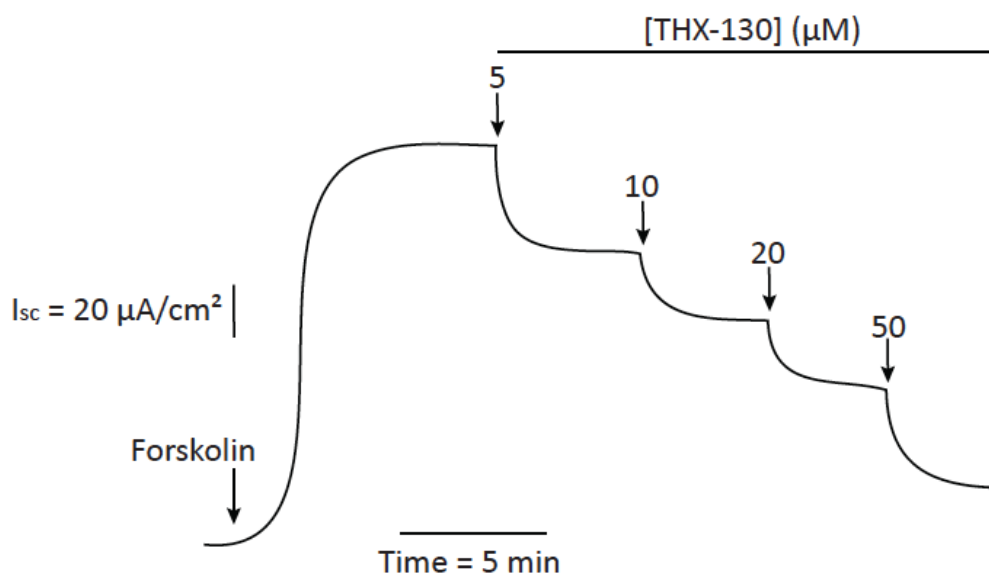
Cowanin diammonium 3,6-di-O-acetate (**2.2(39)**) เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 13.35 (br s, 1H, 1-OH), 6.68 (s, 1H, H-5), 6.13 (s, 1H, H-4), 5.08 (br t, 2H, $J = 5.9$ Hz, H-17 and H-12), 4.90 (br t, 1H, $J = 5.9$ Hz, H-21), 4.46 and 4.34 (each s, each 2H, 6- and 3- OCH_2 , respectively), 3.88 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H, H-16), 3.65 (s, 3H, OCH_3), 3.15 (d, 2H, $J = 5.9$ Hz, H-11), 1.85 (m, 4H, H-19 and 20), 1.67 (s, 3H, H-24), 1.50 and 1.62 (each s, each 3H, H-14 and H-15)^a, 1.39 and 1.43 (each s, each 3H, H-23 and H-25); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 181.1 (C-9), 169.7 (6-CO), 169.5 (3-CO), 162.2 (C-3), 158.8 (C-1), 157.2 (C-6), 154.4 (C-10a), 154.2 (C-4a), 143.7 (C-7), 135.6 (C-8), 133.7 (C-18), 130.5 (C-22), 130.3 (C-13), 124.1 (C-21), 123.5 (C-17), 122.3 (C-12), 110.5 (C-8a, C-2), 102.6 (C-9a), 99.4 (C-5), 89.8 (C-4), 66.6 (6- OCH_2), 66.4 (3- OCH_2), 60.1 (OCH_3), 39.7 (C-19), 26.0 (C-20), 25.4 (C-16, 14), 25.3 (C-25), 21.0 (C-11), 17.6 (C-15), 17.4 (C-23), 16.0 (C-24).

2.2.4 การศึกษาคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของสารแซนโทน **2.2(37)** (หรือ SS-CM 130 หรือ THX-130) โดยใช้เซลล์ลำไส้มนุษย์ (T84)

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ของสาร THX-130

ผู้วิจัยได้ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งโปรตีน CFTR ของสาร THX-130 โดยใช้ Fisher rat thyroid cells expressing human CFTR / FRT-CFTR cells ที่พัฒนาขึ้นด้วยเทคนิค Apical chloride current measurements โดยพบว่าสารนี้ยับยั้ง CFTR ด้วย IC_{50} ประมาณ 10 μM และยับยั้ง CFTR ได้หมดที่ความ

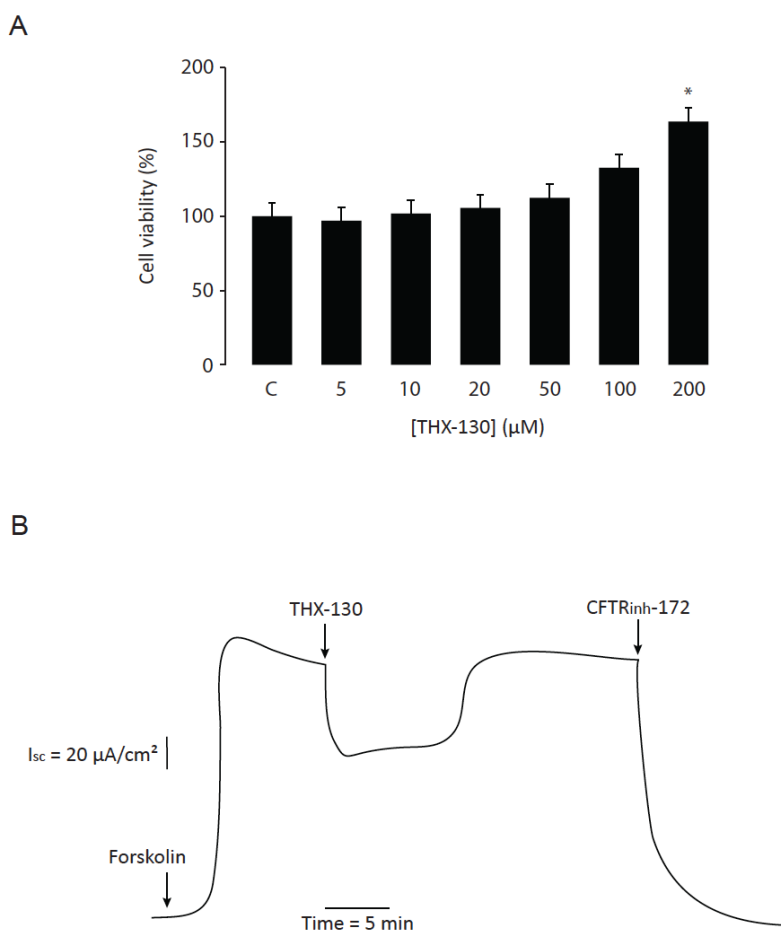
เข้มข้นของสารเท่ากับ 50 μM (รูปที่ 2.2 (7)) ซึ่งดีกว่าสาร THX-001 ที่ได้ค้นพบมาก่อนหน้าที่มี IC_{50} เท่ากับ 100 μM และยับยั้ง CFTR ได้หมดที่ความเข้มข้นเท่ากับ 500 μM



รูปที่ 2.2(7) ผลของสาร THX-130 ต่อการขนส่งคลอไรด์ผ่านโปรตีน CFTR ของมนุษย์ที่แสดงออกในเซลล์ FRT

การศึกษาความเป็นพิษ (cytotoxicity) และการย้อนกลับของฤทธิ์ (reversibility) ของสาร THX-130

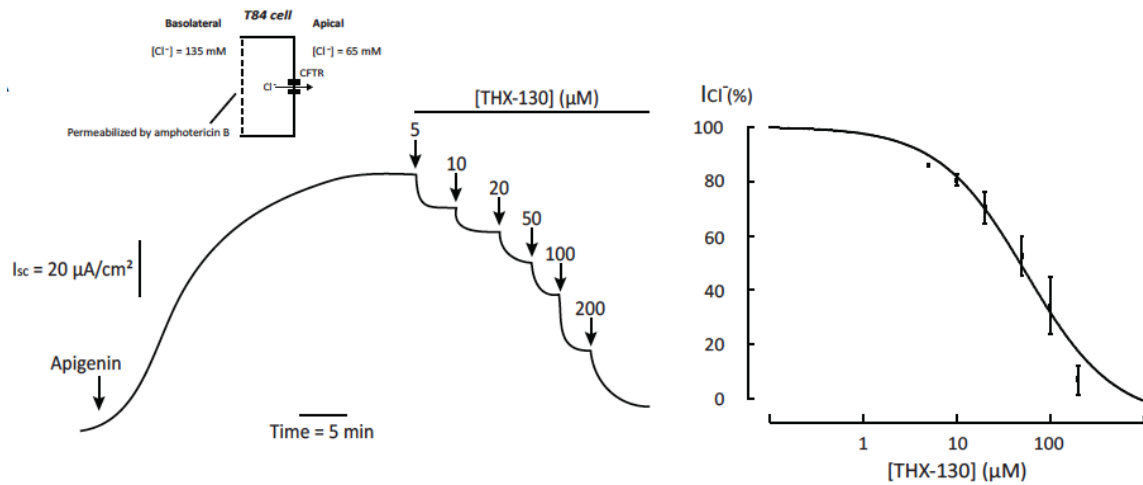
ผู้วิจัยได้ทดสอบความเป็นพิษของสาร THX-130 ต่อเซลล์ลำไส้มนุษย์ (T84 cells) ด้วยเทคนิค MTT assay พบว่าสาร THX-130 ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 5 μM -200 μM ไม่มีผลการอยู่รอดของเซลล์ T84 (รูป 2.2(8)A) นอกจากนี้ยังได้ศึกษา reversibility ของสาร THX-130 ในการยับยั้งกระแสของคลอไรด์ที่ไหลผ่าน CFTR โดยใช้ FRT cells พบว่า เมื่อใส่สาร THX-130 ที่ความเข้มข้น 10 μM สามารถยับยั้ง CFTR ได้ประมาณร้อยละ 50 และเมื่อเปลี่ยนสารละลายหล่อเลี้ยงเซลล์เป็นสารละลายที่ไม่มีสาร THX-130 พบว่ากระแสของคลอไรด์ที่ไหลผ่าน CFTR สามารถย้อนกลับไปที่เท่าเดิม (ก่อนที่จะใส่สาร THX-130 ลงไป) นอกจากนี้เมื่อใส่ $\text{CFTR}_{\text{inh}}-172$ ซึ่งเป็นสารยับยั้ง CFTR พบว่าสามารถยับยั้งกระแสที่ย้อนกลับมาได้หมดลงไปสู่จุดเริ่มต้นก่อนการกระตุ้น CFTR (รูป 2.2(8)B) ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่า กระแสที่ย้อนกลับหลังนำ THX-130 ออกไปเป็นกระแสคลอไรด์ที่ไหลผ่าน CFTR จริง



รูปที่ 2.2.2(8) (A) การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ T84 ของสาร THX-130 **(B)** การย้อนกลับของฤทธิ์ยับยั้ง CFTR ของสาร THX-130 ในเซลล์ FRT-CFTR

ผลของสาร THX-130 ต่อ CFTR ในเซลล์ลำไส้มนุษย์

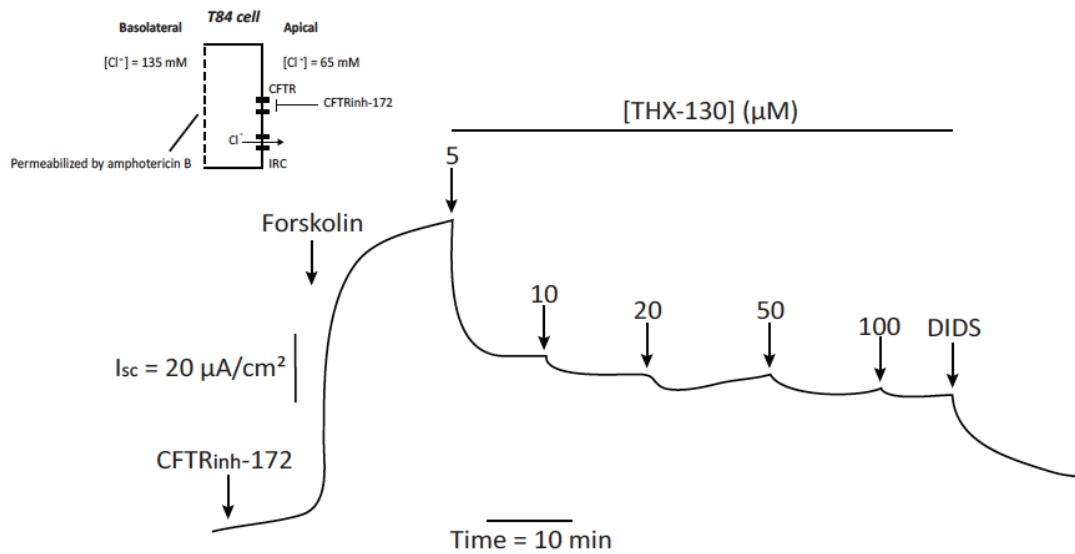
ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของสาร THX-130 ต่อการขนส่งคลอไรด์ผ่าน CFTR ในเซลล์ T84 ด้วยเทคนิค apical chloride current measurement โดยกระตุ้นการเปิดของ CFTR โดยตรงด้วย apigenin พบว่า THX-130 ยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ด้วย IC₅₀ ประมาณ 20 μM และยับยั้งได้หมดที่ความเข้มข้น 200 μM การทดลองนี้บ่งชี้ว่า THX-130 ยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR โดยตรง (รูปที่ 2.2(9))



รูปที่ 2.2(9) ผลของสาร THX-130 ต่อการขนส่งคลอไรด์ผ่าน CFTR ในเซลล์ลำไส้มนุษย์ (T84 cells)

การศึกษาผลของ THX-130 ต่อโปรตีนขนส่งคลอไรด์ inwardly rectifying chloride channel (IRC)

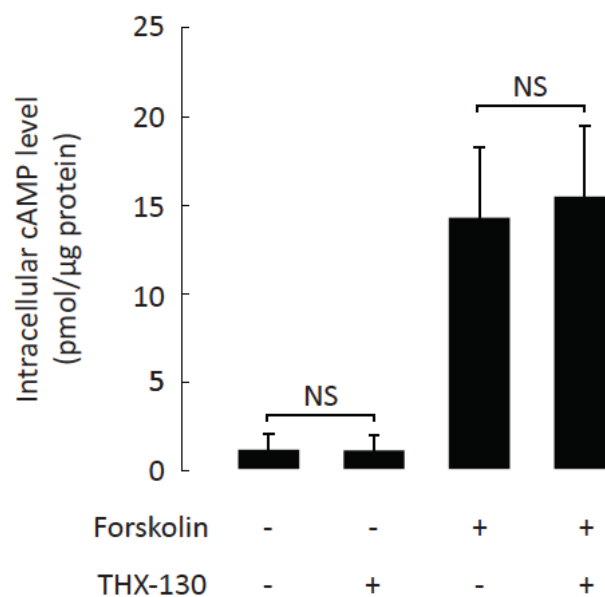
เพื่อศึกษาฤทธิ์ของ THX-130 ในการยับยั้ง IRC ผู้วิจัยจึงได้ใช้เทคนิค apical chloride current measurement ศึกษา IRC ในเซลล์ T84 โดยได้ออกแบบการทดลองให้สามารถวัดกระแสการไหลของคลอไรด์ผ่าน IRC ได้โดยตรง กล่าวคือ ใช้วิธีการยับยั้งโปรตีนขนส่งคลอไรด์ CFTR ด้วย $CFTR_{inh-172}$ แล้วกระตุ้นให้มีการเพิ่มของ cAMP ภายในเซลล์ด้วย forskolin กระแสของคลอไรด์ที่วัดได้จึง เกิดจากการเคลื่อนที่ของคลอไรด์ผ่าน IRC เท่านั้น (รูปที่ 2.2(10) inset) ซึ่งสามารถยืนยันได้โดยการยับยั้งด้วย DIDS เมื่อใส่ THX-130 ที่ความเข้มข้น 5 μM – 100 μM ลงไปในสารละลายหล่อเลี้ยงด้าน apical พบว่า THX-130 สามารถยับยั้งกระแสการไหลของคลอไรด์ผ่าน IRC ได้ประมาณร้อยละ 50 (รูปที่ 2.2(10)) ทำให้สามารถสรุปได้ว่า THX-130 ออกฤทธิ์ยับยั้งการคัดหลั่งคลอไรด์ที่กระตุ้นด้วย cAMP โดยการยับยั้งการทำงานของ cAMP-activated apical chloride channels ทั้งสองชนิดคือ CFTR และ IRC แต่สามารถยับยั้ง CFTR ได้มากกว่า IRC



รูปที่ 2.2(10) ผลของ THX-130 ต่อการขนส่งคลอไรด์ผ่าน IRC ในเซลล์ลำไส้มนุษย์

ผลของ THX-130 ต่อระดับของ cAMP ภายในเซลล์ลำไส้มนุษย์

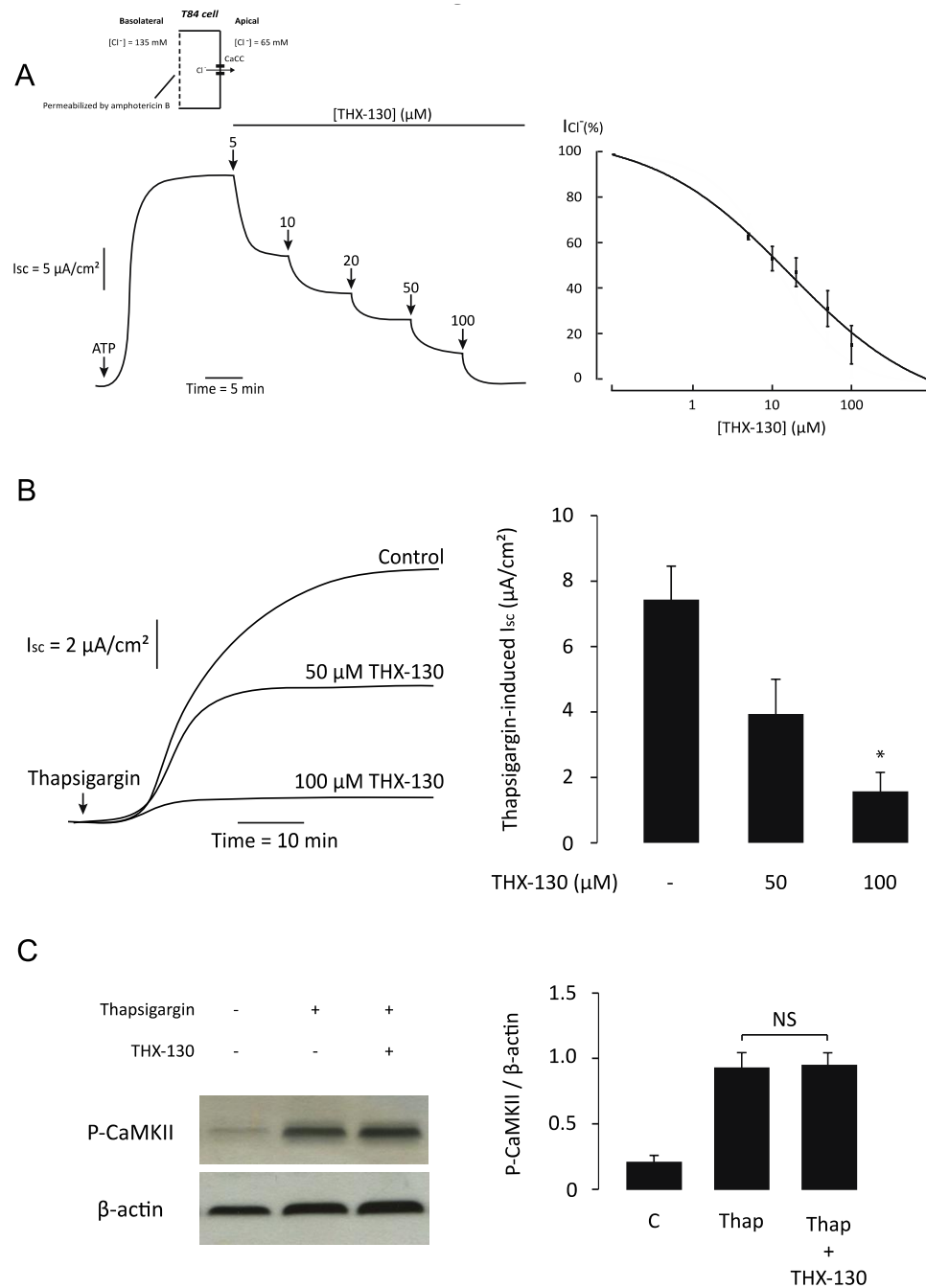
เพื่อศึกษาว่า THX-130 ออกฤทธิ์ยับยั้งโปรตีนขนส่งคลอไรด์ทั้งสองชนิดโดยการ ยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ที่สร้าง cAMP (adenylate cyclase) หรือการกระตุ้นเอนไซม์ที่ย่อยสลาย cAMP (phosphodiesterase) หรือไม่ ผู้วิจัยจึงได้วัดระดับของ cAMP ภายในเซลล์ T84 ด้วยเทคนิค ELISA ซึ่งใช้ antibody ที่จำเพาะต่อ cAMP พบว่า THX-130 ไม่มีผลต่อระดับของ cAMP ภายในเซลล์ T84 ที่เหนี่ยวนำ ด้วย forskolin ซึ่งออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของ adenylylate cyclase ดังรูปที่ 2.2(11)



รูปที่ 2.2(11) ผลของ THX-130 ต่อระดับของ cAMP ในเซลล์ลำไส้มนุษย์

ผลของ THX-130 ต่อการทำงานของโปรตีน calcium-activated chloride channel (CaCC)

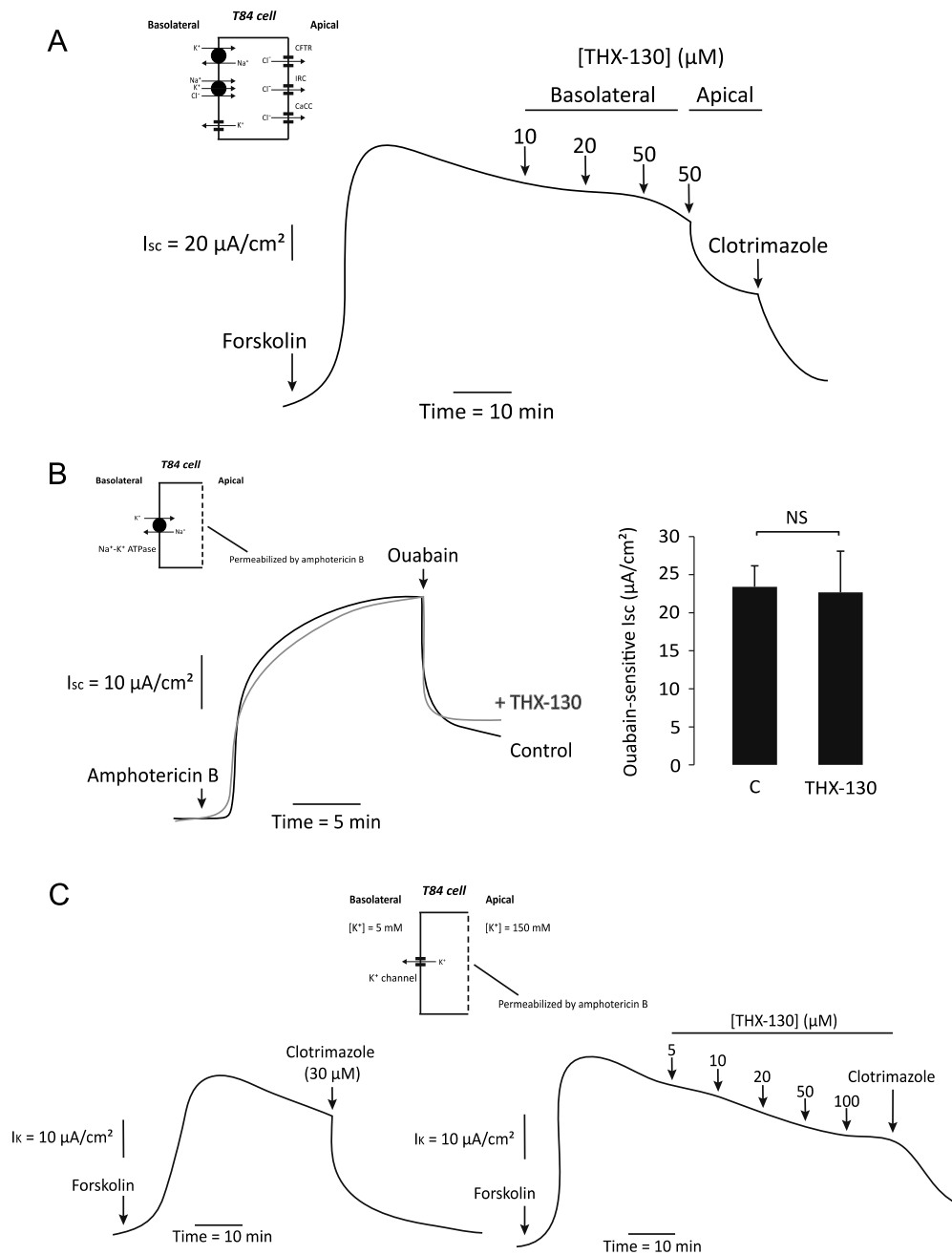
เพื่อศึกษาผลของสาร THX-130 ต่อโปรตีนช่องทางผ่านคลอไรด์อีกชนิดหนึ่งในเซลล์ลำไส้มนุษย์คือ CaCC จึงได้ทำการทดสอบในเซลล์ T84 ด้วยเทคนิค apical chloride current measurement โดยใช้ ATP เป็นตัวเหนี่ยวนำพบว่าสาร THX-130 สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน CaCC ด้วยค่า IC_{50} ประมาณ 10 μM ดังแสดงในรูป 2.2 (12)A และได้ทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์โดยศึกษาว่ายับยั้งที่ purinergic receptor หรือการส่งสัญญาณเพิ่มระดับแคลเซียมหรือไม่โดยใช้ thapsigargin เป็นตัวกระตุ้นเพิ่มระดับแคลเซียมโดยตรงพบว่าสาร THX-130 ยังคงออกฤทธิ์ยับยั้ง CaCC ได้เหมือนเดิม ดังรูปที่ 2.2 (12)B และเมื่อศึกษาระดับการทำงานของโปรตีนที่ตอบสนองต่อการเพิ่มระดับของแคลเซียมคือ CaMKII ด้วยเทคนิคการวัด active form ของ CaMKII (P-CaMKII) พบว่า TXH-130 ไม่มีผลต่อระดับการทำงานของ CaMKII ดังรูปที่ 2.2 (12)C จากผลการทดลองดังกล่าวบ่งชี้ว่า CaMKII ยับยั้ง CaCC โดยตรงโดยไม่ผลต่อการส่งสัญญาณภายในเซลล์และระดับของแคลเซียมภายในเซลล์ลำไส้



รูปที่ 2.2(12) ผลของ THX-130 ต่อการทำงานของโปรตีนช่องทางผ่านคลอไรด์ $CaCC$ ในเซลล์ลำไส้มนุษย์ (T84 cells) **(A)** ผลของ THX-130 ต่อการทำงานของโปรตีน $CaCC$ ที่เหนี่ยวนำด้วย ATP **(B)** ผลของ THX-130 ต่อการทำงานของโปรตีน $CaCC$ ที่เหนี่ยวนำด้วย thapsigargin **(C)** ผลของ THX-130 ต่อการทำงานของโปรตีน CaMKII วัดด้วยการทำ western blot ของ phosphorylated CaMKII (P-CaMKII)

ผลของ THX-130 ต่อโปรตีนขนส่งไอออนชนิดอื่นบน basolateral membrane

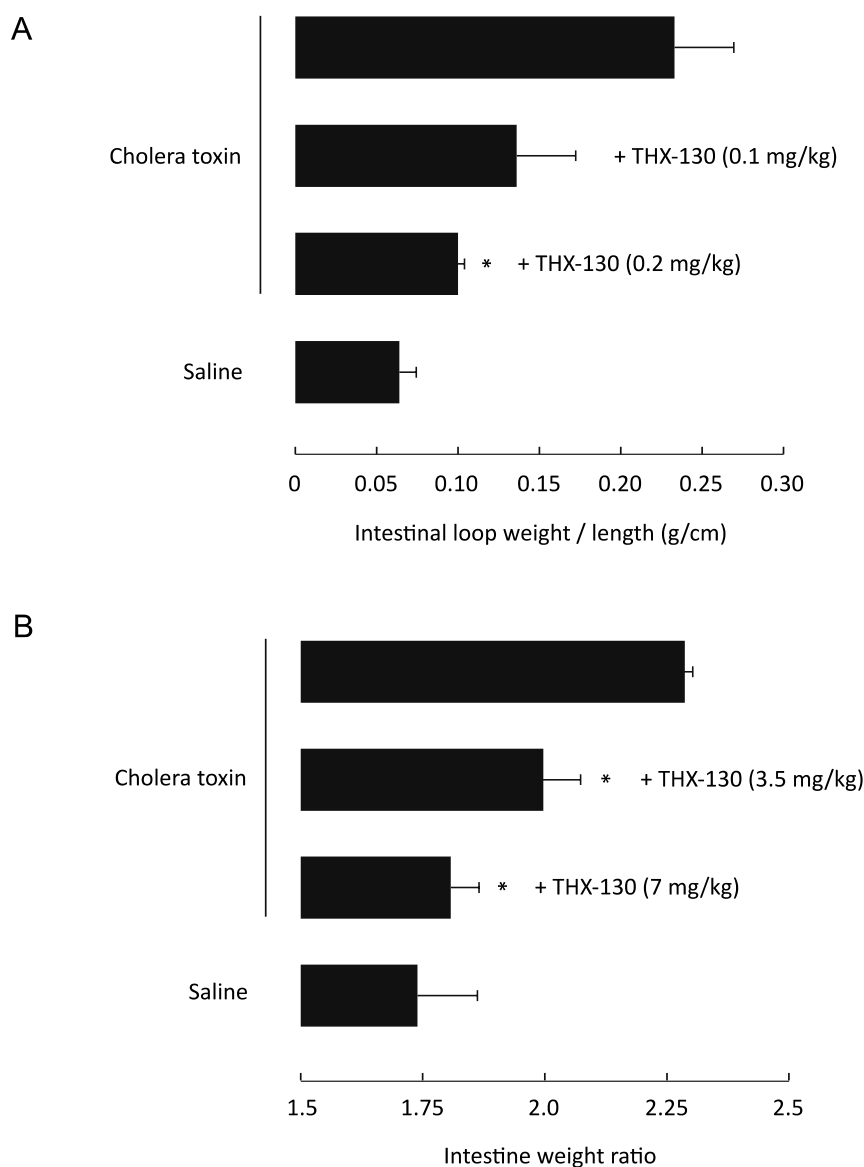
เพื่อการศึกษาว่าสาร THX-130 ยับยั้งการคัดหลั่งคลอไรด์ผ่าน CFTR โดยการยับยั้งโปรตีนตัวขนส่งไอออนตัวอื่นบนเยื่อหุ้มเซลล์ด้าน basolateral หรือไม่จึงได้ทำการทดลองโดยใช้สาร THX-130 ไปในสารละลายด้าน basolateral พบว่าความเข้มข้นถึง 50 μM ไม่มีผลต่อการคัดหลั่งคลอไรด์ แต่เมื่อใส่ด้าน apical สามารถยับยั้งการคัดหลั่งคลอไรด์ได้อย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อใช้สารยับยั้งช่องทางผ่านโพแทสเซียมไอออนคือ clotrimazole พบว่าสามารถยับยั้งการแสการคัดหลั่งคลอไรด์ผ่าน CFTR ได้หมด การทดลองนี้บ่งชี้ว่าสาร THX-130 ไม่มีผลต่อโปรตีนขนส่งไอออนที่เกี่ยวข้องกับการคัดหลั่งคลอไรด์ผ่าน CFTR และช่องทางผ่านโพแทสเซียมไอออนมีบทบาทในการทำให้เกิดการคัดหลั่งคลอไรด์ผ่าน CFTR ได้อย่างที่ทราบอยู่แล้ว ผลการทดลองดังแสดงในรูป รูปที่ 2.2(13) A ต่อมาจึงได้ทดสอบผลของสาร THX-130 ต่อโปรตีน $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPases พบว่าสาร THX-130 ไม่มีผลต่อการทำงานของโปรตีนดังกล่าวซึ่งวัดจาก ouabain-sensitive short-circuit current (รูปที่ 2.2(13) B) และได้ทำการศึกษาผลต่อการทำงานของช่องทางผ่านโพแทสเซียม โดยการทำยืนยันด้วย clotrimazole ซึ่งเป็น positive control ก่อนแล้วทดสอบฤทธิ์ของสาร THX-130 พบว่าสาร THX-130 ไม่มีผลต่อการขนส่งโพแทสเซียมไอออนผ่านโปรตีนช่องทางผ่านโพแทสเซียม (รูปที่ 2.2(13) C) จึงสามารถสรุปได้ว่าสาร THX-130 ยับยั้งโปรตีนช่องทางผ่านคลอไรด์โดยไม่มีผลต่อโปรตีนขนส่งไอออนทางด้าน basolateral membrane



รูปที่ 2.2(13) ผลของสาร THX-130 ต่อการทำงานของโปรตีนขนส่งไอออนที่รักษา driving force สำหรับการคัดหลั่งคลอไรด์ผ่าน CFTR (**A**) ผลของสาร THX-130 ที่ใส่ทางด้าน basolateral ต่อการคัดหลั่งคลอไรด์ผ่าน CFTR (**B**) ผลของสาร THX-130 ต่อการทำงานของ Na^+/K^+ ATPases (**C**) ผลของสาร THX-130 ต่อการทำงานของโปรตีนช่องทางผ่านโพแทสเซียมไอออน

ผลของสาร THX-130 ต่อการรักษาโรคอุจจาระร่วงในสัตว์ทดลอง

ผู้วิจัยได้ศึกษาผลของสาร THX-130 ต่อการคัดหลั่งสารน้ำในลำไส้ของหนูที่เหนียวน้ำด้วย cholera toxin ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงในอหิวาตกโรคโดยได้ทำการให้สาร THX-130 เข้าสองทาง คือ โดยการฉีดเข้าโพรงลำไส้ (รูปที่ 2.2(14) A) และการฉีดเข้าช่องท้อง (รูปที่ 2.2(14) B) พบว่าสาร THX-130 มีผลลดการคัดหลั่งของน้ำได้ทั้งสองวิธีการให้สารโดยสามารถลดการคัดหลั่งน้ำได้ประมาณ 70-80% และการให้สารทางโพรงลำไส้ซึ่งเลียนแบบการกินยาใช้ปริมาณสารน้อยกว่า



รูปที่ 2.2(14) ผลของสาร THX-130 ต่อการคัดหลั่งน้ำที่เหนียวน้ำด้วย cholera toxin ในหนู (A) ให้สาร THX-130 โดยการฉีดเข้าโพรงลำไส้ (B) ให้สาร THX-130 โดยการฉีดเข้าช่องท้อง

การตีพิมพ์ผลงาน

ได้ทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารแซนโทนจากธรรมชาติจนได้สารแซนโทนอนาลอกชุดใหม่ ประมาณ 40 ชนิด สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุดมีค่า IC_{50} ประมาณ 1 μM ซึ่งสูงกว่าสารตั้งต้นแซนโทนจากธรรมชาติไม่น้อยกว่า 500 เท่า และมีฤทธิ์ยับยั้งดีกว่าสารมาตรฐาน CFTR_{inh}-172 ประมาณ 2 เท่า สารที่ค้นพบสามารถยับยั้งการคัดหลั่งของสารน้ำในลำไส้ของสัตว์ทดลองได้มากกว่าร้อยละ 70 ผลงานวิจัยนี้ ได้ยื่นขอจดสิทธิบัตรแล้ว ในชื่อเรื่อง Xanthone acid as novel CFTR inhibitor ตามเลขที่คำขอ 1501001228 วันที่ 6 มีนาคม 2558 และกำลังอยู่ในระหว่างการเรียบเรียง เพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Barrett KE, Keely SJ. 2000. Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. *Annu Rev Physiol* 62, 535-572.
- Chaivishangkura A, Malaikaew Y, Chaovanalikit A, Jaratrungtawee A, Panseeta P, Ratananukul P, Suksamrarn S. 2009. Prenyxanthone composition of the *Garcinia mangostana* (mangosteen) fruit hull. *Chromatographia* 69, 315-318.
- Chen G, Li Y, Wang W, Deng L. 2018. Bioactivity and pharmacological properties of α -mangostin from the mangosteen fruit: a review. *Expert Opin Ther Pat* 28, 415-427.
- Chin Y-W, Kinghorn AD. 2008. Structural characterization, biological effects, and synthetic studies on xanthenes from mangosteen (*Garcinia mangostana*), a popular botanical dietary supplement. *Mini- Review Org Chem* 5, 355-364.
- Du CT, Francis FJ. 1977. Anthocyanins of mangosteen *Garcinia mangostana*. *J Food Sci* 42, 1667.
- Field M. 2003. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. *J Clin Invest*. 111(7), 931-943.
- [Fischer](#) H, Machen TE, [Widdicombe](#) JH, [Carlson](#) TJS, [King](#) SR. [Chow](#) JWS. [Illek](#) B. 2004. A novel extract SB-300 from the stem bark latex of *Croton lechleri* inhibits CFTR-mediated chloride secretion in human colonic epithelial cells. [J Ethnopharmacol](#). 93, 351-357.
- Fu C, Loo AEK, Chia FPP, Huang GD. 2007. Oligomeric proanthocyanidins from mangosteen pericarps. *J Agric Food Chem* 55, 7689-7694.

Gritsanapan W, Chulasiri M. 1983. A preliminary study of antidiarrheal plants: I. antibacterial activity. *Mahidol Univ. J. Pharmaceutical Sci.* 10(4), 119-122.

Liu Y, Zou L, Ma L, Chen WH, Wang B, Xu ZL. 2006. Synthesis and pharmacological activities of xanthone derivatives as alpha-glucosidase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 14, 5683-5690.

Ma T, Thiagarajah JR, Yang H, Sonawane ND, Folli C, Galletta LJ, Verkman AS. 2002. Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin-induced intestinal fluid secretion. *J Clin Invest.* 110(11), 1651-1658.

Muanprasat C, Sonawane ND, Salinas D, Taddei A, Galletta LJ, Verkman AS. 2004. Discovery of glycine hydrazide pore-occluding CFTR inhibitors: mechanism, structure-activity analysis, and in vivo efficacy. *J Gen Physiol.* 124(2), 125-137.

Nontakham J, Charoenram N, Upamai W, Taweechotipatr M' Suksamrarn S. 2014. Anti-*Helicobacter pylori* xanthones of *Garcinia fusca*. *Arch Pharm Res* 7(8), 972-979.

Pares V, Nagem TJ, de Oliveira FF. 2000. Tetraoxygenated naturally occurring xanthones. *Phytochemistry* 55, 683-710.

Pilewski JM, Frizzell RA. 1999. Role of CFTR in airway disease. *Physiol Rev* 79(1 Suppl), S215-255.

[Rozhon](#) EJ, [Khandwala](#) AS, [Sabouni](#) A, [Balwani](#) GP, [Chan](#) JWH, [Sesin](#) DF. 2008. Administering aqueous soluble proanthocyanidin polymer isolated from a *Croton* species or a *Calophyllum* species; protective coating for oral administration. US7341744 B1.

Sack DA, Sack RB, Nair GB, Siddique AK. 2004. Cholera. *Lancet.* 363 (9404), 223-233.

Wongsamitkul N, Sirianant L, Muanprasat C, Chatsudthipong V. 2010. A plant-derived hydrolysable tannin inhibits CFTR chloride channel: a potential treatment of diarrhea. *Pharm. Res* 27(3), 490-497.

Schuijter M, Sies H, Illek B, and Fischer H. 2005. Cocoa-related flavonoids inhibit CFTR-mediated chloride transport across T84 human colon epithelia. *J Nutr* 135(10):2320-2325.

Sheppard DN, Welsh MJ. 1999. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* 79(1 Suppl):S23-45.

Suksamrarn S, Komutiban O, Ratananukul P, Chimnoi N, Lartpornmatulee N,

Suksamran A. 2006. Cytotoxic prenylated xanthenes from the young fruits of *Garcinia mangostana*. Chem Pharm Bull 54, 351-355.

Sudta P, Jiarawapi P, Suksamrarn A, Hongmanee P, Suksamrarn S. 2013. Potent activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* of α -mangostin analogs Chem Pharm Bull 61, 194-203.

Thiagarajah JR, and Verkman AS. 2003. CFTR pharmacology and its role in intestinal fluid secretion. Curr Opin Pharmacol 3(6):594-599.

Verkman AS, Ma T. 2007. Methods of treating secretory diarrhea using cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein inhibitors. United States Patent No. 7235573.

Verkman AS, Sonawane ND, Muanprasat C. 2008. Hydrazide-containing CFTR inhibitor compounds and uses thereof. United States Patent No. 7414037.

Zadernowski R, Czaplicki S, Naczki M. 2009. Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (*Garcinia mangostana*). Food Chem 112, 685–689.

อรพิน โกมุติบาน, สุนิตย์ สุขสำราญ. 2554. สารประกอบแซนโทนจากเปลือกต้นมะตะหลวง. วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี) 3(6), 63-69.

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์