

**DESIGN AND SYNTHESIS OF NOVEL COMPOUNDS AS  
NEUROPROTECTIVE AGENTS: A DUAL ACTION OF RADICAL  
SCAVENGER AND NITRIC OXIDE SYNTHASE INHIBITOR**

**CHANTANA BOONYARAT**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND PHYTOCHEMISTRY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

**2005**

**ISBN 974-04-6610-9**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การออกแบบและการสังเคราะห์สารใหม่ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส (DESIGN AND SYNTHESIS OF NOVEL COMPOUNDS AS NEUROPROTECTIVE AGENTS: A DUAL ACTION OF RADICAL SCAVENGER AND NITRIC OXIDE SYNTHASE INHIBITOR)

จันทนา บุญยะรัตน์ 4436780 PYPP/D

ปร.ค. (เภสัชเคมีและพฤกษเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: โอภา วัชรกุลต์, Ph.D., Hiroshi Watanabe, Ph.D., Arthur J. Olson, Ph.D.

#### บทคัดย่อ

การวิจัยนี้เป็นการออกแบบและสังเคราะห์สารใหม่ที่ประกอบด้วยโครงสร้างสำคัญในการออกฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทสในโมเลกุล ที่มีฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาท สารใหม่ที่สังเคราะห์ได้จำนวน 4 สาร (N-1 - N-4) เมื่อนำสารใหม่มาทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทสทั้งโดยวิธี *in vitro*, *in vivo* และ *in silico* ผลการวิจัยพบว่าสารสังเคราะห์ใหม่ทั้งสี่สารมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระจำพวกไนตริกออกไซด์ และอนุมูลอิสระ 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl พบว่า N-1, N-2 และ N-4 ที่ความเข้มข้น 10  $\mu$ M สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทสชนิด neuronal (nNOS) โดย N-1 มีฤทธิ์สูงสุดสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ nNOS ได้ 88% ตามด้วย N-2 และ N-4 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ nNOS ได้ 81% และ 17% ตามลำดับ ผลการศึกษาการจับกันระหว่างโมเลกุลของสารสังเคราะห์กับเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทสชนิด nNOS โดยใช้โปรแกรม AutoDock 3.0.5 พบว่ามีเพียง N-1 และ N-2 เท่านั้นที่สามารถจับกับ active site ของเอนไซม์ nNOS โดยจับกับ Gln478, Arg481, Tyr588, Glu592 และ Trp587 โดย N-1 จับได้แน่นที่สุดด้วยพลังงานในการจับกับเอนไซม์ต่ำสุดที่ -10.2 kcal/mol นอกจากนี้ยังพบว่าสารสังเคราะห์ N-1 และ N-2 สามารถลดระดับไนตริกออกไซด์ที่เพิ่มขึ้นในบริเวณ hippocampus ของสมองเมื่อหนูถูกกระตุ้นด้วยกรดไลโนิก ผลการวิจัยทั้งหมดนี้ชี้ให้เห็นว่าสารสังเคราะห์ใหม่นี้ยกเว้น N-3 มีวิธีการออกฤทธิ์ร่วมกันสองแบบคือออกฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระและออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส ซึ่งมีประโยชน์อย่างยิ่งในการพัฒนาต่อไปเพื่อใช้ในการรักษาภาวะผิดปกติที่เกิดจากการทำลายเซลล์ประสาทอันเนื่องมาจากอนุมูลอิสระจำพวกไนตริกออกไซด์ และ reactive oxygen species อื่นๆ ในปริมาณสูงเกินควร

DESIGN AND SYNTHESIS OF NOVEL COMPOUNDS AS NEUROPROTECTIVE AGENTS: A DUAL ACTION OF RADICAL SCAVENGER AND NITRIC OXIDE SYNTHASE INHIBITOR.

CHANTANA BOONYARAT 4436780 PYPP/D

Ph.D. (PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND PHYTOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS: OPA VAJRAGUPTA, Ph.D., HIROSHI WATANABE, Ph.D., ARTHUR J. OLSON, Ph.D.

ABSTRACT

Four novel neuroprotective agents (**N-1** – **N-4**) that are active natural antioxidants and nitric oxide synthase inhibitors were developed and investigated for their neuroprotective properties. The radical scavenging action and nitric oxide synthase inhibitory action were evaluated by *in vitro*, *in vivo* and *in silico* methods. For radical scavenging activity, all four compounds showed an ability to scavenge both nitric oxide in the cell culture model and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals in the *in vitro* method. At a concentration of 10  $\mu\text{M}$ , **N-1**, **N-2** and **N-4** were able to inhibit nNOS activity as shown by enzyme assay. **N-1** was the most potent inhibitor of nNOS activity with 88% inhibition, followed by 81% for **N-2** and 17% for **N-4**. The docking results using AutoDock3.0.5 indicated that **N-1** and **N-2** served as ligands bound to nNOS active sites at Gln478, Arg481, Tyr588, Glu592 and Trp587 amino acid residues. **N-1** tightly bound to nNOS with the lowest  $\Delta G_{\text{bind}}$  of -10.2 kcal/mol. For protective effect against hydrogen peroxide-induced cell damage, the four newly designed compounds were more potent than their corresponding acids in the reduction of cell death. The *in vivo* neuroprotective effect on kainic acid-induced nitric oxide production in rat brain via microdialysis indicated that only **N-1** and **N-2** were able to suppress the increased NO<sub>x</sub> (nitrite plus nitrate) level significantly when compared with the untreated group (*p* value < 0.05). The overall results indicated that all the synthesized compounds except **N-3** possess two modes of actions as radical scavengers and as nitric oxide synthase inhibitors. These compounds are promising candidates for the treatment of neurodegenerative disorders that involve overproduction of nitric oxide and reactive oxygen species.

KEY WORDS : RADICAL SCAVENGER / NITRIC OXIDE SYNTHASE INHIBITOR / NEUROPROTECTION / CELL CULTURE / NG 108-15 / MICRODIALYSIS / DOCKING / NITROARGININE / CITRULLINE.

189 P. ISBN 974-04-6610-9