Thesis Title Contributions of Caffeic acid and Its Derivatives to Antioxidation, Microsomal Enzyme Activities and Toxicity on Human Liver Cells

Author Mr. Churdsak Jaikang

Degree Doctor of Philosophy (Pharmacy)

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Chaiyavat Chaiyasut	Advisor
Prof. Paitoon Narongchai, M.D.	Co-advisor
Assoc. Prof. Siripun Narongchai	Co-advisor
Assoc. Prof. Dr. Kanokporn Niwatananun	Co-advisor

ABSTRACT

Caffeic acid (CAF) and derivatives are a group of naturally occurring polyphenol, which have been shown to have beneficialhealth effects. In order to understand the structure-activity relationship on their properties including antioxidant activities,effect on microsomal enzymes activity and cytotoxicityon human liver cells, therefore CAF derivatives were synthesized and studied.The synthetic CAFester derivatives included ethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propenate (EDP),octyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propenate (ODP), phenylmethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

propenate(PMDP), phenylethyl 1- (3',4'-dihydroxyphenyl) propenate (PEDP), and amide derivatives included,ethyl 1-(3', 4'-dihydroxyphenyl) propenamide (EDPA), octyl 1-(3', 4'- dihydroxyphenyl) propenamide (ODPA), phenmethyl 1-(3', 4'-dihydroxyphenyl) propenamide (PMDPA) and phenethly 1-(3', 4'-dihydroxyphenyl) propenamide (PEDPA). The CAF derivatives were subsequently investigated for antioxidant microsomal enzymes and cytotoxicity.The resultsshowed that CAF and its derivatives had highpotency to scavenge DPPH radicals, hydroxyl radical, superoxide anion and nitric oxide in dose- dependent manner. Antioxidant properties were evaluated using ferric reducing antioxidant power (FRAP)**,** reducing power andinhibition of linoleic acid emulsion system. EDPA and EDP possessed the highest potency to scavenge free radicals and antioxidative activitycomparing with other derivatives. Pooled human liver microsomes were prepared as asource of microsomalenzymes andphenacetin, *p*-nitrophenol and diazepam were used as the substrates forCYP1A2, CYP2E1 and CYP3A4, respectively and were analysed by HPLC and spectrophotometer. Cornish-Bowden and Dixon plots showed that CAF inhibited all CYP isoforms with uncompetitive inhibition, whereas ester derivatives inhibited CYP1A2, CYP2E1 and CYP3A4 with mixed type, uncompetitive and competitive, respectively. In addition, the amide derivatives inhibited the CYP1A2 and CYP2E1 with uncompetitive type, whereas CYP3A4 was competitively inhibited. The EDPAstrongly inhibited CYP1A2 and CYP3A4 activity as indicated by IC_{50}of0.39 and 0.82 μM, respectively. The ODPwas found to be the most potent inhibitor of CYP2E1 with its IC_{50} of 0.14μM.

UDP-glucuronosyltransferase (UGT), glutathione S-transferase (GST), and heme oxygenase-1 (HO-1) were prepared from the extract from Hep G2cells line which had

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

been treated with CAF and its derivatives for 6,12,24,48 and 72 hrs. The UGT, GST and HO-1 activitywere determined using *p*-nitrophenol, CDNB and hemin as substrates and measured by spectrophotometer.The results showed that EDP, PMDPA and CAFwere the most potent inducers of UGT, GST and HO-1 activity, respectively. Cytotoxicity of the Hep G2 cells by CAF and its derivatives was assessed by MTT method. The PEDPA was the most cytotoxic compoundto human liver cells with IC_{50} of37.80 µM.The small molecules of CAF derivatives are highly effective to scavenge free radicals and antioxidant properties, while large molecules are highly effective to induce phase II enzymes and cytotoxicity.Furthermore,the effects of CAF and its derivatives, especially EDP, EDPA, PMDPA and PEDPA should be extensively studied in*invivo* models.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การมีส่วนร่วมของกรดคาเฟอิกและอนุพันธ์ในการต้านออกซิเดชัน กิจกรรมของเอนไซม์ไมโครโซมและความเป็นพิษต่อเซลล์ตับมนุษย์

ผู้เขียน นายเชิดศักดิ์ ใจแข็ง

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร. ไชยวัฒน์ ไชยสุต อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ศ.นพ. ไพฑูรย์ ณรงค์ชัย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รศ. สิริพันธ์ ณรงค์ชัย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รศ. ดร. กนกพร นิวัฒนนันท์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

กรดคาเฟอิกและอนุพันธ์จัดอยู่ในกลุ่มโพลีฟีนอล ซึ่งได้มีการศึกษาถึงผลประโยชน์ต่อสุขภาพ เพื่อที่จะเข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต่อเอนไซม์ในไมโครโซม และความเป็นพิษต่อเซลล์ตับมนุษย์ จึง ได้สังเคราะห์อนุพันธ์กรดคาเฟอิกขึ้นมาและศึกษาสมบัติต่างๆ โดยอนุพันธ์เอสเทอร์ ได้แก่เอทิล 1- (3’, 4’- ไดไฮดรอกซีฟีนิล) โพรพีเนท (อีดีพี) ออกซิล 1- (3’, 4’- ไดไฮดรอกซีฟีนิล) โพรพีเนท (โอดีพี) ฟีนิลเมทิล 1- (3’, 4’- ไดไฮดรอกซีฟีนิล) โพรพีเนท (พีเอ็มดีพี) ฟีนิลเอทิล 1- (3’, 4’- ไดไฮดรอกซีฟีนิล) โพรพีเนท (พีอีดีพี) และอนุพันธ์เอไมด์ได้แก่ เอทิล 1- (3’, 4’- ไดไฮดรอกซีฟีนิล) โพรเพนนาไมด์ (อีดีพีเอ) ออกซิล 1- (3’, 4’- ไดไฮดรอกซีฟีนิล) โพรเพนนาไมด์ (โอดีพีเอ) เฟนเมทิล 1- (3’, 4’- ไดไฮดรอกซีฟีนิล) โพรเพนนาไมด์ (พีเอ็มดีพีเอ) และเฟนเอทิล1- (3’, 4’- ไดไฮดรอกซีฟีนิล) โพรเพนนาไมด์(พีอีดีพีเอ) ผลการทดลองพบว่ากรดคาเฟอิกและอนุพันธ์มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระชนิด ดีพีพีเอช อนุมูลไฮดรอกซิลอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์และ ไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและฤทธิ์แปรผันตามความเข้มข้นของสา ร เอฟอาร์เอพีรีดิวซิงเพาเวอร์ และการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของไลโนเลอิกในระบบอิมัลชัน เมื่อศึกษาฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสังเคราะห์พบว่า อีดีพีเอนั้นมีฤทธิ์สูงที่สุดในการกำจัดอนุมูลอิสระและต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเมื่อเทียบกับสารสังเคราะห์ตัวอื่น ได้ใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไมโครโซมจากตับมนุษย์ เป็นแหล่งของเอนไซม์ และใช้ ฟีนาซีติน ไนโตรฟีนอล และ ไดอะซีแพม เพื่อศึกษากิจกรรมของ เอนไซม์ ไซโตโครมพี 4501เอ2 ไซโตโครมพี 4502อี1 และ ไซโตโครมพี 450 3เอ4ตามลำดับและได้วิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง และสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากการประเมิน รูปแบบการยับยั้งเอนไซม์ โดยความสัมพันธ์แบบ คอนิช-บาวเดนและดิกซอนพบว่ากรดคาเฟอิกยับยั้งเอนไซม์ทั้งหมดแบบ ไม่แข่งขันอนุพันธ์เอสเทอร์ยับยั้ง ไซโตโครมพี4501เอ2 ไซโตโครมพี 4502อี1และ ไซโตโครมพี 450 3เอ4แบบผสม แบบไม่แข่งขันและแบบแข่งขันตามลำดับ ส่วนสารอนุพันธ์เอไมด์ยับยั้ง ไซโตโครมพี4501เอ2 และไซโตโครมพี 4502 อี1 แบบไม่แข่งขันและยับยั้ง ไซโตโครมพี 450 3เอ4 แบบแข่งขันโดยสาร พีเอ็มดีพีมีฤทธิ์ยับยั้งไซโตโครมพี 4501เอ2และ ไซโตโครมพี 450 3เอ4 สูงที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งฤทธิ์ของเอนไซม์ร้อยละ 50(IC_{50}) มีค่า 0.39 และ 0.82 ไมโครโมลาร์ตามลำดับและกรดคาเฟอิกนั้นยับยั้ง ไซโตโครมพี 4502อี1 ได้ดีที่สุดโดยมีค่าIC_{50} เท่ากับ0.14 ไมโครโมลาร์ หลังจากให้สารสังเคราะห์แก่เซลล์มะเร็งตับเป็นเวลา 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงได้วิเคราะห์กิจกรรมของ เอนไซม์ ยูดีพี-กลูคิวโรโนซิลทรานเฟอเรสกลูทาไทโอน เอส ทรานเฟอเรส และ ฮีมออกซีจีเนส -1โดยใช้ ไนโตรฟีนอล, 1-คลอโร-2, 4- ไดไนโตรเบนซีน และ ฮีมินเป็นสับสเตรตตามลำดับ จากการทดลองพบว่า อีดีพี พีเอ็มดีพีเอและกรดคาเฟอิกเหนี่ยวนำกิจกรรมของเอนไซม์ ยูดีพี-กลูคิวโรโนซิลทรานเฟอเรส กลูทาไทโอน เอส ทรานเฟอเรส และ ฮีมออกซีจีเนส -1 ได้ดีที่สุดตามลำดับ นอกจากนี้ยัง พบอีกว่าวิธี เอ็มทีที พีอีดีพีเอ มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด (IC_{50}=37.80 ไมโครโมลาร์) จากผลทดลองพบว่าอนุพันธ์กรดคาเฟอิกที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและต้านออกซิเดชันได้ดีในขณะที่อนุพันธ์กรดคาเฟอิกที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่นั้นสามารถเหนี่ยวนำเอนไซม์ในเฟสที่ 2 และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ตับสูง จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาสมบัติอื่นๆของ กรดคาเฟอิกและอนุพันธ์ที่สังเคราะห์โดยเฉพาะ อีดีพี อีดีพีเอ พีเอ็มดีพีเอ ในสัตว์ทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved