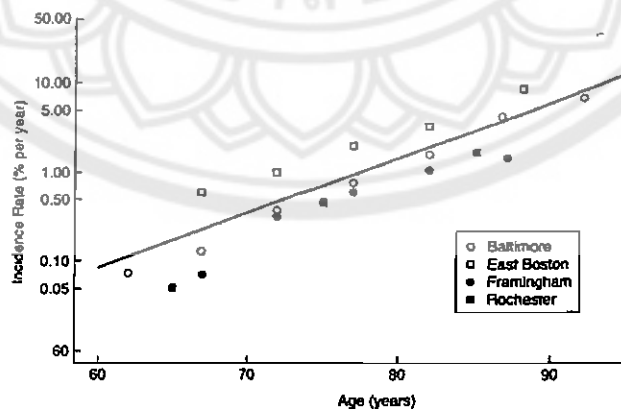


# บทที่ 1

## บทนำ

ปัจจุบันกลุ่มประชากรสูงอายุในประเทศไทยมีจำนวนเพิ่มขึ้นโดยข้อมูลจากทะเบียนราษฎรแสดงว่า ประเทศไทยมีจำนวนประชากรสูงอายุ เมื่อสิ้นปี พ.ศ. 2547 ประมาณ 6.2 ล้านคนจากประชากรทั้งหมด 62 ล้านคน คิดเป็นร้อยละ 10 ของประชากรทั้งหมด จากสัดส่วนประชากรสูงอายุนี้อาจกล่าวได้ว่าประเทศไทยกำลังก้าวเข้าสู่การเป็นสังคมผู้สูงอายุ ซึ่งอัตราการเป็นสังคมผู้สูงอายุของประเทศไทยเร็วกว่าของประเทศที่พัฒนาแล้วอย่างมาก เนื่องจากความสำเร็จของการลดภาวะเจริญพันธุ์อย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาที่สั้น ได้มีการคาดการณ์ว่าอีกประมาณ 20 ปีข้างหน้าทั้งจำนวนและสัดส่วนประชากรสูงอายุของไทยจะเพิ่มขึ้นเท่าตัว คือจากประมาณ 6.5 ล้านในปัจจุบัน เป็น 14 ล้าน ดังนั้นความผิดปกติที่พบได้บ่อยในวัยสูงอายุจึงพบได้มากขึ้นอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้<sup>(1)</sup>

โรคอัลไซเมอร์เป็นสภาวะความจำเสื่อม (dementia) ที่พบมากในผู้สูงอายุซึ่งมีการลุกลาม (progressive) ของการเสื่อมของเซลล์ประสาท (neurodegeneration) ชนิดต่างๆในสมองทำให้การทำงานของสมองเสื่อมลงจนกระทั่งส่งผลกระทบต่อกิจวัตรประจำวันของผู้ป่วย ในช่วง 8-10 ปีหลังจากเริ่มมีอาการและไม่ได้ได้รับการรักษาผู้ป่วยอัลไซเมอร์จะมีอาการสมองเสื่อมรุนแรงยิ่งขึ้นจนกระทั่งไม่สามารถปฏิบัติกิจวัตรประจำวันตามปกติ โดยอุบัติการณ์การเกิดโรคอัลไซเมอร์ (incidence rate, % per year) เพิ่มขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้นโดยพบประมาณ 0.17 % ในผู้ที่มีอายุประมาณ 65 ปี และเพิ่มขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับ 12.10 % ในผู้ที่มีอายุประมาณ 95 ปี<sup>(2)</sup> ดังแสดงในรูปที่ 1-1 จากการสำรวจของกระทรวงสาธารณสุขพบว่าในปัจจุบันมีคนไทยป่วยเป็นโรคอัลไซเมอร์ประมาณ 218,000 คนและได้มีการคาดการณ์ว่าในอนาคต จะมีผู้สูงอายุที่มีปัญหาจากกลุ่มอาการสมองเสื่อมเพิ่มขึ้นอยู่ที่ในอัตราประมาณ 3.4 %<sup>(3)</sup>



รูปที่ 1-1 แสดงอุบัติการณ์การเกิดโรคอัลไซเมอร์ตามช่วงอายุในประเทศสหรัฐอเมริกา (Framingham, East Boston, Rochester, Baltimore)

โรคอัลไซเมอร์แบ่งออกเป็น 2 ชนิด<sup>(4)</sup> ได้แก่

1. Sporadic type (late onset) เป็นชนิดที่พบได้ทั่วไปซึ่งมักเกิดในผู้สูงอายุที่มีอายุมากกว่า 65 ปีขึ้นไป นอกจากนี้ยังพบว่าสาเหตุทางพันธุกรรม ได้แก่ apolipoprotein E4 allele สามารถทำให้เกิด sporadic type ได้

2. Familial type เกิดขึ้นน้อยกว่า sporadic type โดยสาเหตุเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุมการสร้าง amyloid precursor protein (APP), presenilin-1 และ presenilin-2 โรคอัลไซเมอร์ชนิดนี้อาจเป็นได้ทั้ง early onset (เกิดขึ้นก่อนอายุ 65 ปี) หรือ late onset

สาเหตุของโรค<sup>(4-7)</sup>

1. จากความผิดปกติในเนื้อสมองจะพบลักษณะที่สำคัญสองอย่างคือกลุ่มใยประสาทที่พันกัน neurofibrillary tangles และมีสาร beta amyloid ในสมอง ใยสมองที่พันกันทำให้สารอาหารไม่สามารถไปเลี้ยงสมองและการที่สมองมีคราบ beta Amyloid หุ้มทำให้ระดับของ ACh ในสมองลดลงซึ่งส่งผลให้การเรียนรู้และความจำลดลง
2. การเกิด oxidative stress และการอักเสบ พบว่าเมื่อสาร amyloid สลายจะให้สารอนุมูลอิสระออกมา อนุมูลอิสระจะทำให้เกิดการอักเสบและการตายของเซลล์สมอง
3. กรรมพันธุ์ โรคอัลไซเมอร์ที่เกิด late onset จะมีการเพิ่มของ gene ที่ควบคุมการสร้าง apolipoprotein E4 (ApoE 4) ส่วนที่เกิด early onset จะมีการเปลี่ยนแปลงของ gene presenilin-1 (PS1) และ presenilin-2 (PS2)
4. ผู้ที่มีความผิดปกติของ mitochondria ส่งผลให้ระดับของอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้น ทำให้เกิดการทำลายและการตายของเซลล์ประสาท นอกจากนี้การทำงานที่ผิดปกติของ mitochondria ส่งผลให้เกิด ATP depletion calcium overload และทำให้ NMDA receptor ทำงานมากผิดปกติ เป็นเหตุให้เซลล์ประสาททำงานผิดปกติ
5. การทำงานที่มากเกินไปของ endogenous excitatory amino acid neurotransmitter glutamate receptor (excitotoxicity) ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ประสาท

ปัจจัยเสี่ยง<sup>(4)</sup>

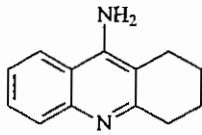
- อายุที่มากขึ้น
- พันธุกรรม
- เพศหญิง
- ผู้ที่มีการศึกษาน้อย
- ผู้ที่ได้รับบาดเจ็บที่ศีรษะ

#### อาการแสดงทางคลินิก<sup>(4)</sup>

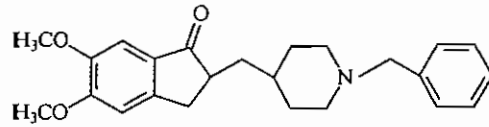
โดยทั่วไปในระยะเริ่มต้นของโรคผู้ป่วยยังไม่แสดงอาการของโรคอัลไซเมอร์ที่แน่ชัดและอาการแสดงที่เกิดขึ้นอาจมีไม่มาก เช่น ปัญหาเรื่องความจำ การแก้ปัญหา มักนึกถึงเหตุการณ์ในอดีต ตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นและสิ่งแวดล้อมลดลง ผู้ป่วยอาจลืมชื่อของสิ่งต่างๆ วางของผิดที่ผิดทาง หรือลืมว่าของแต่ละสิ่งเอาไว้ทำอะไร ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะรู้ตัวถึงความบกพร่องเกี่ยวกับความจำของตนเองและอาการดังกล่าวทำให้ญาติผู้ป่วยหรือผู้ดูแลผู้ป่วยรับภาระมากขึ้น เมื่อโรคดำเนินไปมากขึ้นผู้ป่วยเริ่มมีอาการรุนแรงขึ้นโดยนึกถึงคำที่ใช้เรียกสิ่งของนั้นไม่ได้ (anomia) เช่น ผู้ป่วยไม่สามารถเรียกดินสอได้ แต่อาจพูดเสียงไปว่าเป็นสิ่งที่เอาไว้เขียน เป็นต้น

เนื่องจากการบกพร่องของความจำจะเกิดกับสิ่งที่ผู้ป่วยได้เห็น ได้พบ หรือได้สัมผัสในระยะเวลาไม่นานนัก ดังนั้นผู้ป่วยจึงพยายามหลีกเลี่ยงการทำกิจกรรมต่างๆ ที่ไม่เคยทำหรือไม่คุ้นเคยมาก่อน และสิ่งที่ตามมาก็คือผู้ป่วยเกิดอาการสับสน ก้าวร้าว เดินไปอย่างเลื่อนลอยไร้จุดหมาย (wandering) หรือแสดงพฤติกรรมที่ไม่เหมาะสมร่วมกับมีความรู้สึกนึกคิดและการใช้ภาษาที่ผิดปกติไป เช่น ประสาทหลอน พูดไม่เป็นภาษาหรือพูดไม่รู้เรื่อง ในระยะนี้ผู้ป่วยจะไม่รู้สึกถึงอาการสมองเสื่อมที่เกิดขึ้น ในระยะสุดท้ายของโรคผู้ป่วยมักจะแสดงอาการบกพร่องทั้งทางกาย การเรียนรู้ การคิด และความจำที่รุนแรงมากขึ้น ผู้ป่วยเดินได้ลำบากขึ้น กล้ามเนื้อเริ่มเป็นอัมพาต มีอาการชัก เกิด peripheral neuropathy กลั้นอุจจาระและปัสสาวะไม่ได้ ผู้ป่วยจะพูดน้อยลงและไม่สามารถทำกิจกรรมต่างๆ ได้ ต้องนอนอยู่กับที่ตลอดเวลา ระยะเวลาตั้งแต่ผู้ป่วยเริ่มแสดงอาการของโรคอัลไซเมอร์จนถึงระยะสุดท้ายของโรคจะใช้เวลาประมาณ 8-10 ปี

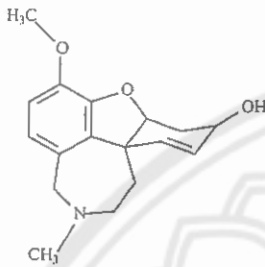
การรักษาโรคอัลไซเมอร์สามารถทำได้โดยการชะลอความก้าวหน้าของโรคและการเสริมสร้าง ความจำ ด้วยการให้ยา วิตามิน ฮอร์โมน และสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันไป เช่น acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs), NMDA antagonists, antioxidant,  $\beta$ -secretase inhibitors เป็นต้น<sup>(5)</sup> ในการศึกษานี้จะมุ่งเน้นความสนใจไปที่สารที่ออกฤทธิ์เป็น AChEIs โดยจากการยับยั้ง acetylcholinesterase (AChE) พบว่ามีผลไปลดการทำลาย ACh ทำให้การดำเนินของโรค ช้าลง และอาจมีผลทำให้การเรียนรู้ สติปัญญาและความจำของผู้ป่วยอัลไซเมอร์ดีขึ้น<sup>(6)</sup> ยาตัวแรกที่ได้รับการรับรองให้ใช้ใน สหรัฐอเมริกาและยุโรปในการรักษาโรคอัลไซเมอร์คือ tacrine แต่เนื่องจากเป็นพิษต่อดับทำให้ tacrine ถูกถอน ทะเบียนในปี พ.ศ. 2541<sup>(9-10)</sup> ปัจจุบันจึงมียาตัวอื่นๆ ในกลุ่มนี้ที่ได้รับการรับรองให้ใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ ซึ่งมีพิษต่อดับน้อยลง เช่น donepezil, galantamine, rivastigmine เป็นต้น<sup>(11)</sup> โครงสร้างและคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของยากลุ่ม AChEIs แสดงในรูปที่ 1-2 และตารางที่ 1-1 ตามลำดับ



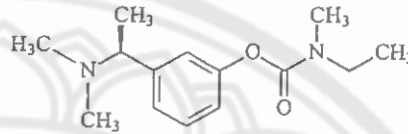
Tacrine



Donepezil



Galantamine



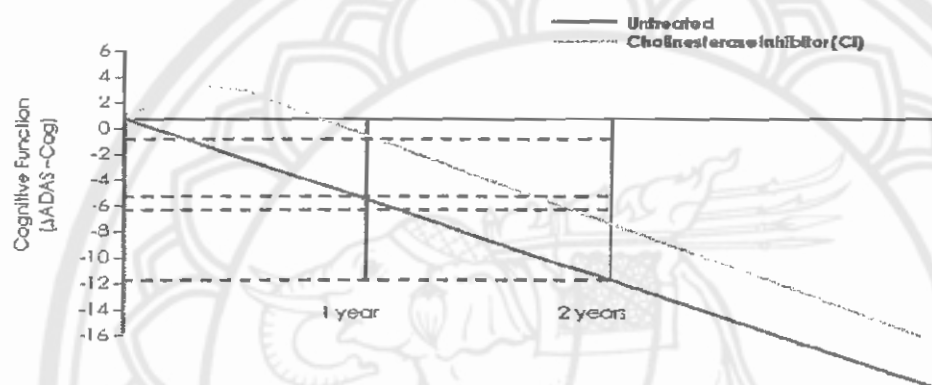
Rivastigmine

## รูปที่ 1-2 แสดงโครงสร้างของยากลุ่ม AChEIs

ตารางที่ 1-1 คุณสมบัติทางเภสัชศาสตร์และเภสัชจลนศาสตร์ของยาในกลุ่ม AChEIs<sup>(12-14)</sup>

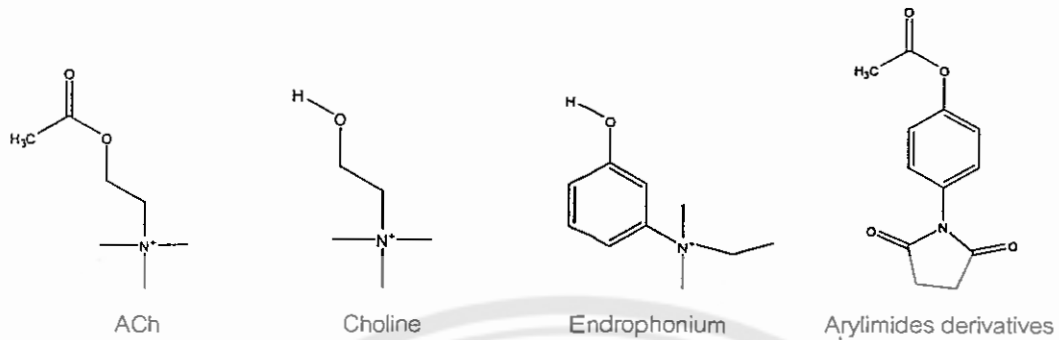
Pharmacology	Donepezil	Rivastigmine	Galantamine
Enzyme inhibition and selectivity	AChE	AChE and BuChE	AChE and allosterically potentiating ligands
Plasma half-life (hour)	70	1-2	4-6
Protein binding (%)	96	40	10-20
Metabolism	CYP3A4, CYP 2D6	Nonhepatic enzyme	CYP3A4, CYP 2D6
Elimination	Liver	Kidney	Liver and Kidney
Food delayed absorption	No	Yes	Yes
Drug interaction potential	Moderate	Very low	Moderate
Therapeutic dose(mg/day)	5-10	6-12	16-24
Titration period	No	Every 4 weeks	Every 4 weeks
Adverse drug reaction	nausea, vomiting, diarrhea, muscle cramps, anorexia, vivid dreaming	nausea, vomiting, diarrhea, weight loss, dizziness	nausea, vomiting, anorexia, dizziness
cost per year	£828.30 - £1160.96	£886.95	£890.60 - £1095
Long-Term Clinical Efficacy in mild-moderate alzheimer's disease	Limitation in long-term efficacy		

อย่างไรก็ตาม พบว่ายา donepezil ยังไม่สามารถเพิ่ม cognitive functional ได้ดีมากนักในการรักษาโรคในระยะยาว นอกจากนี้การศึกษาเกี่ยวกับต้นทุน-ประสิทธิผล (cost-effectiveness) ของยา donepezil นั้นพบว่า ยา donepezil มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ในระยะยาวต่ำและมีค่าใช้จ่ายในการรักษาสูง ส่งผลให้การใช้ยา donepezil ในการรักษาไม่มีความคุ้มค่าซึ่งเป็นข้อจำกัดที่สำคัญของ donepezil ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์<sup>(14)</sup> ส่วน rivastigmine นั้นมีค่าครึ่งชีวิตสั้นและยังมีประสิทธิภาพน้อยในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ขั้นรุนแรง<sup>(15)</sup> นอกจากนี้ยาในกลุ่ม AChEIs ยังมีข้อจำกัดในการรักษาโรคระยะยาวคือยังไม่สามารถเพิ่ม cognitive function ได้ดีมากนัก (รูปที่ 1-3) จึงควรมีการศึกษาถึงสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง AChE ที่มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น รวมทั้งมีความเป็นพิษต่ำและราคาไม่แพง<sup>(14)</sup>



รูปที่ 1-3 แสดงประสิทธิภาพของยากกลุ่ม cholinesterase inhibitor ในการใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ระยะยาวเปรียบเทียบกับ placebo

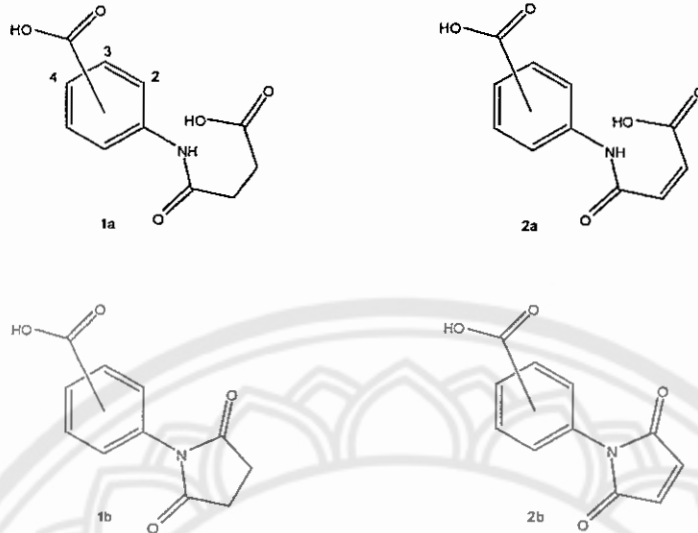
การออกแบบสารให้มีฤทธิ์ในการยับยั้ง AChE นั้นมีหลายแนวทาง หนึ่งในแนวทางในการพัฒนาสารกลุ่มนี้คือ การออกแบบโครงสร้างสารให้มีความคล้ายคลึงกับ ACh หรือ choline (รูปที่ 1-4) โดยได้มีการเพิ่ม benzene ring เข้าไปในโครงสร้างเพื่อให้โมเลกุลมีความคงตัวและสามารถจับกับ AChE ได้นานขึ้น เช่น โมเลกุลของ endrophonium<sup>(16)</sup> จากรายงานวิจัยของ Harel และคณะ<sup>(17)</sup> พบว่าโครงสร้างของสาร endrophonium ที่มีประจุบวกของกลุ่มแอมโมเนียมในโมเลกุลนั้นมีความจำเพาะเจาะจงกับ AChE มากกว่าโมเลกุลที่ไม่มีประจุบวกในโครงสร้าง แต่เนื่องจากการมีประจุบวกในโมเลกุลทำให้สารสามารถผ่าน blood brain barrier (BBB) ได้น้อย ต่อมาจึงได้มีการพัฒนาสารโดยเพิ่ม lipophilicity ของโมเลกุลเพื่อให้สารสามารถผ่าน BBB ได้มากขึ้น โดยการเปลี่ยนแปลงหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งเอมีนได้เป็นอนุพันธ์ของ arylamides และ arylimides ซึ่งไม่มีประจุบวกของกลุ่มแอมโมเนียมในโมเลกุลแต่ยังสามารถออกฤทธิ์ยับยั้ง AChE ได้ดี เนื่องจากพบว่าสารในกลุ่ม arylimides มีการถ่ายเทอิเล็กตรอนระหว่างหมู่ carbonyl และ aromatic ring ซึ่งทำให้เกิดผลเหมือนมีประจุบวกบน nitrogen atom ส่งผลให้โมเลกุลสามารถจับ AChE ได้อย่างจำเพาะเจาะจง



รูปที่ 1-4 แสดงโครงสร้างสาร ACh, choline, edrophonium และ arylimides derivatives


Jose Trujillo-Ferrara และคณะ<sup>(16)</sup> ได้ทำการศึกษาถึงผลของการเปลี่ยนแปลงหมู่แทนที่ในตำแหน่ง para เปรียบเทียบกับตำแหน่ง meta และ ortho พบว่า หมู่แทนที่ในตำแหน่ง para ให้ผลในการยับยั้ง AChE ดีที่สุดเนื่องจากมี steric interactions ที่น้อยกว่า ( $para > meta >> ortho$ ) ในส่วนของการเปลี่ยนแปลงหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง para เป็นกลุ่ม hydroxyl และ methoxyl พบว่าโมเลกุลที่ได้มีความสามารถในการยับยั้ง AChE ต่ำ ในขณะที่หมู่แทนที่เป็นกลุ่ม amino และ halogen พบว่าโมเลกุลที่ได้มีความเป็นพิษที่สูง แต่พบว่าการมีหมู่แทนที่เป็นกลุ่ม carboxylic acids นั้นส่งผลให้โมเลกุลที่ได้มีความสามารถในการยับยั้ง AChE ได้สูงและมีความเป็นพิษที่ต่ำ

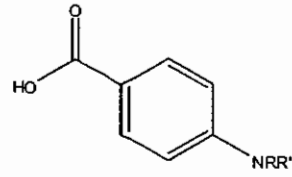
Jose Trujillo-Ferrara และคณะ ได้ทำการศึกษาสารที่มีโครงสร้างเป็น *m*-aminobenzoic acid derivatives<sup>(13)</sup> และ *p*-aminobenzoic acid derivatives (PABA derivatives)<sup>(19)</sup> (รูปที่ 1-5) พบว่า อนุพันธ์ที่ได้มีผลในการยับยั้ง AChE ได้ดีและเป็นสารที่มีพิษต่ำ พบว่าสารบางตัวยังมีผลในการยับยั้ง AChE ที่ดีกว่า tracrine และ galanthamine โดยสารในกลุ่มอนุพันธ์ของ PABA ( $K_i \sim 52-243$  nM) มีความสามารถในการจับกับ AChE ได้ดีกว่ากลุ่มอนุพันธ์ของ *m*-aminobenzoic acid ดังนั้นอนุพันธ์ของ PABA จึงเป็นอนุพันธ์ที่น่าสนใจที่จะศึกษาและพัฒนาเพื่อให้ได้สารที่ออกฤทธิ์ได้ดีขึ้น เนื่องจากอนุพันธ์ดังกล่าวออกฤทธิ์ในการยับยั้ง AChE ดี มีความเป็นพิษต่ำ ราคาถูก รวมถึงมีโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อน



รูปที่ 1-5 แสดงโครงสร้างของอนุพันธ์ของ *m*- (หมู่แทนที่อยู่ที่ตำแหน่งที่ 3) และ *p*- (หมู่แทนที่อยู่ที่ตำแหน่งที่ 4) ของ aminobenzoic acid ที่มีผลในการยับยั้ง acetylcholinesterase

จากการศึกษาของ Jose Trujillo-Ferrara และคณะ<sup>(19)</sup> ได้มีการตั้งสมมุติฐานถึงความสามารถในการยับยั้ง AChE ของอนุพันธ์ PABA ว่าขึ้นอยู่กับ 3 ปัจจัยหลัก ดังต่อไปนี้ 1. ความเป็น lipophilicity ของโมเลกุล 2. องศาของ dihedral angle ของหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งเอมีน และ 3. การกระจายของอิเล็กตรอนใน  $\pi$  orbital แต่ในการศึกษาวิจัยที่ผ่านมายังไม่มีการศึกษาถึงปัจจัยดังกล่าวมากนัก ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งนี้มุ่งหวังที่จะศึกษาโดยใช้โครงสร้างของอนุพันธ์ PABA เป็นต้นแบบเพื่อที่จะพัฒนาให้ได้สารที่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้ง AChE ดีขึ้น และมีความเข้าใจถึงการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลเพิ่มขึ้น โดยสารที่สังเคราะห์จะมุ่งเน้นไปที่การศึกษาถึงผลของการแทนที่กลุ่ม functional group ที่ส่วนของเอมีนในโมเลกุลซึ่งมีการกระจายของอิเล็กตรอนใน  $\pi$  orbital และ lipophilicity ที่แตกต่างกันในแต่ละโมเลกุลต่อฤทธิ์ในการยับยั้ง AChE จากนั้นสารที่สังเคราะห์ได้จะถูกนำไปหาผลในการยับยั้ง AChE และทำการประมวลผลเพื่อทำให้เกิดความเข้าใจถึงการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุล และสามารถนำเป็นข้อมูลเพื่อที่จะพัฒนาเป็นยาในการรักษาผู้ป่วยอัลไซเมอร์ได้ต่อไปในอนาคต

ในการวิจัยครั้งนี้ จะทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ PABA (รูปที่ 1-6) โดยมีการสังเคราะห์สารออกมาอยู่ในรูปของอนุพันธ์เอมีน (เช่น R, R' =H, CH<sub>3</sub>), อนุพันธ์เอไมด์ (เช่น R = C(=O)-CH<sub>3</sub> และ R' = H) และอนุพันธ์อิมไมด์ (เช่น R, R' = ) ปฏิกริยาในการสังเคราะห์ของอนุพันธ์เอมีนและเอไมด์สามารถทำได้โดยการใช้ปฏิกิริยา alkylation<sup>(20)</sup> และ amide formation<sup>(21)</sup> โดยทั่วไป ส่วนปฏิกิริยาในการสังเคราะห์กลุ่มอิมไมด์สามารถทำได้ตามขั้นตอนของ Jose Correa-Basurto และคณะ<sup>(18-19)</sup> หลังจากทำการสังเคราะห์แล้วทำการแยกสารให้บริสุทธิ์โดยวิธีการสกัด, column chromatography และการตกผลึก จากนั้นทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารโดยใช้เครื่อง <sup>1</sup>H NMR พร้อมทั้งหาจุดหลอมเหลวในกรณีที่สารเป็นของแข็ง จากนั้นสารที่สังเคราะห์ได้จะถูกนำไปทดสอบความสามารถในการจับกับ AChE โดยใช้วิธีที่ประยุกต์มาจากวิธีของ Ellman<sup>(22)</sup> เพื่อหาค่า IC<sub>50</sub> (ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้ง AChE ได้ครึ่งหนึ่ง) ของสารที่สังเคราะห์ได้แต่ละตัวโดยการแสดงจะใช้ค่า mean และ standard deviation ของ IC 50



รูปที่ 1-6 แสดงโครงสร้างสารกลุ่ม *p*-aminobenzoic acid derivatives

