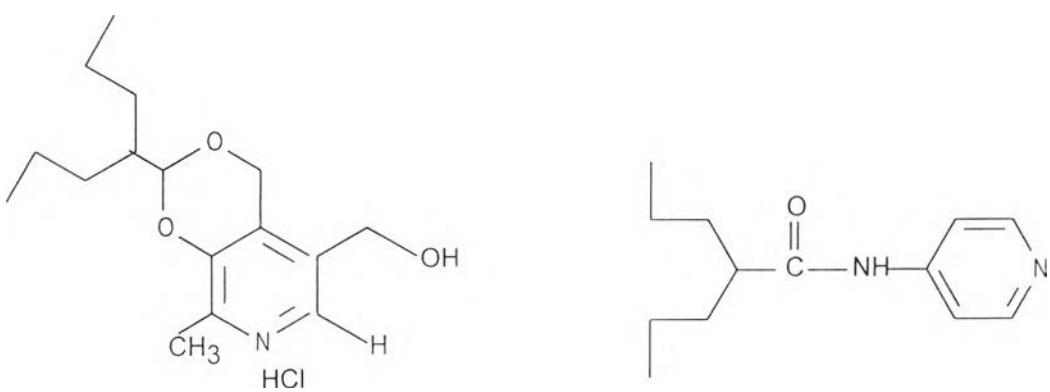
บทที่ 1

บทนำ

CU 763-15-13 และสารต้นแบบ CU 763-10-01

CU 763-10-01 ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดย ผศ.ดร.ชำนาญ ภัตรพานิช และนายเฉลิมเกียรติ สงคราม ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (เฉลิมเกียรติ, 2539) ได้จากการรวมสูตรโครงสร้างของ 2-propylpentanal acetal ซึ่งเป็น prodrug ของ valproic acid เข้ากับ pyridoxine มีสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 1 วัตถุประสงค์เพื่อให้ออกฤทธิ์เป็นยาต้านชัก ส่วนสาเหตุที่ใช้ pyridoxine หรือ vitamin B_6 รวมเข้าไปในสูตรโครงสร้าง เนื่องจาก pyridoxine ทำหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์ของ glutamic acid decarboxylase (GAD) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการสร้าง gamma aminobutyric acid (GABA) การขาด vitamin B_6 อาจทำให้เกิดการชักได้ จึงคาดว่า CU 763-10-01 ที่สังเคราะห์ขึ้นนี้จะมีประสิทธิภาพในการต้านชักสูง



CU 763-10-01 *MW = 315.85*

CU 763-15-13 *MW = 200*

ภาพที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างของ CU 763-10-01 และ CU 763-15-13

จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเบื้องต้นในหนูถีบจักร พบว่า CU 763-10-01 ออกฤทธิ์ต้านชักที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้า (Maximal Electroshock Seizure, MES) โดยขนาดของยาที่สามารถป้องกันการชักได้ร้อยละ 50 (median effective dose : ED_{50}) เท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่า valproic acid (ED_{50} = 320 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) การศึกษาด้านพิษวิทยาของสารต่อการทำงานของระบบประสาทโดยวิธี Rotorod test พบว่าขนาดที่มีผลต่อการทำงานของระบบประสาทที่ทำให้กล้ามเนื้อเสียไปร้อยละ 50 (median neurotoxic dose, TD_{50}) เท่ากับ 310 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งสูงกว่าของ valproic acid (TD_{50} = 430 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) อย่างไรก็ตามขนาดที่ให้ผลในการต้านชักไม่มีผลต่อระบบประสาท (มยุรีและทิพย์สุชน, 2538)

อุรารัตน์, 2539 ได้ทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบกระต่ายและหนูขาวพบว่า CU 763-10-01 ออกฤทธิ์เป็น non specific antagonist เพราะว่าสามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อลำไส้เล็กของกระต่าย ลดการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดแดงใหญ่ของกระต่าย และลดการหดตัวของกล้ามเนื้อท่อนำอสุจิของหนูขาวโดยไปยับยั้งการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+} จากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ผ่านทาง receptor-operated calcium channel (ROC) หรือ voltage-operated calcium channel (VOC) เป็นหลัก และจากการศึกษาต่อมาโดย สุนิสา, 2540 พบว่า CU 763-10-01 สามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบท่อนำอสุจิและหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากหนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วย norepinephrine (NE) ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากกระต่ายได้เมื่อกระตุ้นด้วย NE แต่เมื่อกระตุ้นด้วย KCl ปรากฏว่า CU 763-10-01 สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบทั้งสามชนิดได้ จะเห็นได้ว่าฤทธิ์ของ CU 763-10-01 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบท่อนำอสุจิหนูขาว หลอดเลือดแดงใหญ่กระต่ายและหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวมีความแตกต่างกันเมื่อกระตุ้นด้วย NE ในการกระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบด้วย NE จะ mediated ผ่าน α_1- adrenoceptor ซึ่งมีรายงานว่าในกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่และท่อนำอสุจิหนูขาว และหลอดเลือดแดงใหญ่กระต่าย จะมี α_1- adrenoceptor แตกต่างกัน (Minneman, 1998) จึงคาดว่ากลไกการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ CU 763-10-01 มีผลต่อ α_1- adrenoceptor แต่ละ subtype แตกต่างกัน

ผลการศึกษาด้านอื่นๆ โดย สุธาทิพ, 2539 พบว่า CU 763-10-01 มีผลต่อหน้าที่ทางชีวพลังงานของไมโตรคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว โดยมีฤทธิ์ยับยั้งการหายใจของไมโตรคอนเดรียมีผลยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอนในลูกโซ่หายใจที่ complex I แสดงว่า CU 763-15-13 มีผลต่อ oxidative-phosphorylation ของไมโตรคอนเดรีย และพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสในไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว

จากการที่ CU 763-10-01 มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการ ทำให้มีการสังเคราะห์สารใหม่ขึ้นมาจำนวนหนึ่ง ในจำนวนนี้มี CU 763-15-13 รวมอยู่ด้วย CU 763-15-13 สังเคราะห์ขึ้นโดยนางสาวลือลักษณ์ ล้อมลิ้ม ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยการปรับเปลี่ยนสูตรโครงสร้างของ CU 763-10-01 เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเบื้องต้น ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จะทำการศึกษาฤทธิ์ของ CU 763-15-13 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ ซึ่งเป็นการศึกษานอกร่างกายสัตว์ทดลอง โดยใช้กล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วนต้น หลอดเลือดแดงใหญ่กระต่าย และท่อนำอสุจิและหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว การเลือกใช้กล้ามเนื้อเรียบในหลายอวัยวะ ทั้งนี้เพราะกล้ามเนื้อในแต่ละอวัยวะเหล่านี้จะมีตัวรับ (receptor) ที่แตกต่างกัน จึงมีความไวต่อสารกระตุ้นที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น กล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กจะไวต่อ acetylcholine (ACh) ในขณะที่กล้ามเนื้อเรียบที่หลอดเลือดไม่สามารถกระตุ้นได้โดยใช้ ACh และถึงแม้ว่าอวัยวะจะมีตัวรับที่เหมือนกัน แต่ก็อาจมีความไวต่อสารกระตุ้นเดียวกันแตกต่างกัน จะเห็นได้ว่ามีความหลากหลายในกระบวนการกระตุ้นให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ นอกจากนี้แล้วตัวรับนี้ยังแบ่งเป็นชนิดย่อยๆ (subtype) ได้อีก เช่น α_1-adrenoceptor แบ่งเป็น α_{1a}, α_{1b} และ α_{1d}-adrenoceptor (Hieble และคณะ, 1995) หรือ 5-HT_1-receptor แบ่งเป็น 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} และ 5-HT_{1D} (Rang, Dale และ Ritter, 1995) ดังนั้นการใช้กล้ามเนื้อเรียบในหลายอวัยวะจะทำให้เราศึกษาตำแหน่งและกลไกการออกฤทธิ์ของ CU 763-15-13 ต่อ tissue receptor ได้มากขึ้น ซึ่งคาดว่าจะได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์เพื่อนำไปสู่การวิจัยและพัฒนาสารกลุ่มนี้ให้เป็นประโยชน์ทางการแพทย์ต่อไป

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ (antispasmodic) มักศึกษาเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของ papaverine ซึ่งมีฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบชนิดไม่จำเพาะเจาะจงต่อตัวกระตุ้น (non-specific smooth muscle relaxant) (Needemen, Corr และ Johnson, 1985) ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการศึกษาเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของ papaverine ด้วย

บทบาทของแคลเซียมต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบจะขึ้นกับปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ (intracellular free calcium) และความไวของ contractile element ต่อแคลเซียม ในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมภายในเซลล์ การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ เช่น การหลั่งสารสื่อประสาท ฮอร์โมน สารนี้จะจับกับตัวรับที่จำเพาะซึ่ง couple อยู่กับ G-protein ชนิดต่างๆ แล้วไปมีผลต่อการทำงานของ enzyme เช่น phospholipase C (PLC) ซึ่งจะ hydrolyse phosphotidylinositol-4, 5 biphosphate (PIP_2) ได้ 1, 4, 5-triphosphotidyl inosital และ diacylglycerol (DAG) หรือมีผลต่อเอนไซม์ adenylate

cyclase ซึ่งจะเปลี่ยน adenosine 5'-triphosphate ได้ cyclic adenosine 3', 5' monophosphate (cAMP) หรืออาจมีผลต่อเอนไซม์ guanylate cyclase ให้เปลี่ยน guanosine 5'-triphosphate (GTP) เป็น cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate (cGMP) เป็นต้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์

ปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ที่เพิ่มขึ้นระหว่างการหดตัวนั้น เพิ่มจาก 2 แหล่ง (Horowitz และคณะ, 1996) คือ

1. แคลเซียมภายนอกเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์โดยตรง ผ่าน ion channel หรือแลกเปลี่ยนกับไอออนอื่น (ion exchanger)

2. แคลเซียมที่ปลดปล่อยออกจากแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์

แคลเซียมจากภายนอกเคลื่อนที่ผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ มีกลไกที่เกี่ยวข้องต่างๆ ดังนี้ คือ (Karaki และคณะ, 1997)

1) แคลเซียมผ่านเข้าเซลล์ทาง L-type calcium channel

2) แคลเซียมผ่านเข้าเซลล์ทาง nonselective cation channel

3) แคลเซียมผ่านเข้าเซลล์ทาง calcium release activated calcium channel

4) แคลเซียมผ่านเข้าเซลล์ทาง sodium-calcium (Na^{+}/Ca^{2+}) exchanger

แคลเซียมที่ปลดปล่อยออกจากแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ มีกลไกที่เกี่ยวข้อง คือ

1) calcium-induced calcium release (CICR) เกิดจากแคลเซียมจากภายนอกเคลื่อนที่ผ่านเข้าในเซลล์แล้วกระตุ้นให้มีการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ (Karalo และ Weiss, 1988 ; Zucchi และ Ronca-Testoni, 1997) CICR นี้ สามารถกระตุ้นโดย caffeine และยับยั้งได้ด้วย ryanodine

2) inositol triphosphate-induced calcium release (IICR) เกิดจากการกระตุ้นตัวรับแล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีทำให้มีการเพิ่มขึ้นของระดับ IP_3 และ IP_3 ที่เพิ่มขึ้นนี้มีผลไปกระตุ้นให้มีการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ (Mikoshiba, 1993) โดย IICR นี้จะถูกควบคุมจากแคลเซียมอิสระภายในเซลล์

แคลเซียมเมื่อผ่านเข้าเซลล์แล้วจะไปมีผลต่อ compartment ภายในเซลล์ 2 แหล่ง คือ cytosolic compartment และ subplasmalemma compartment โดยแคลเซียมใน cytosolic compartment (contractile compartment) จะควบคุม contractile element ส่วนแคลเซียมใน subplasmalemma จะควบคุมกลไกที่เกี่ยวข้องกับแคลเซียม (Ca^{2+}-dependent mechanism)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

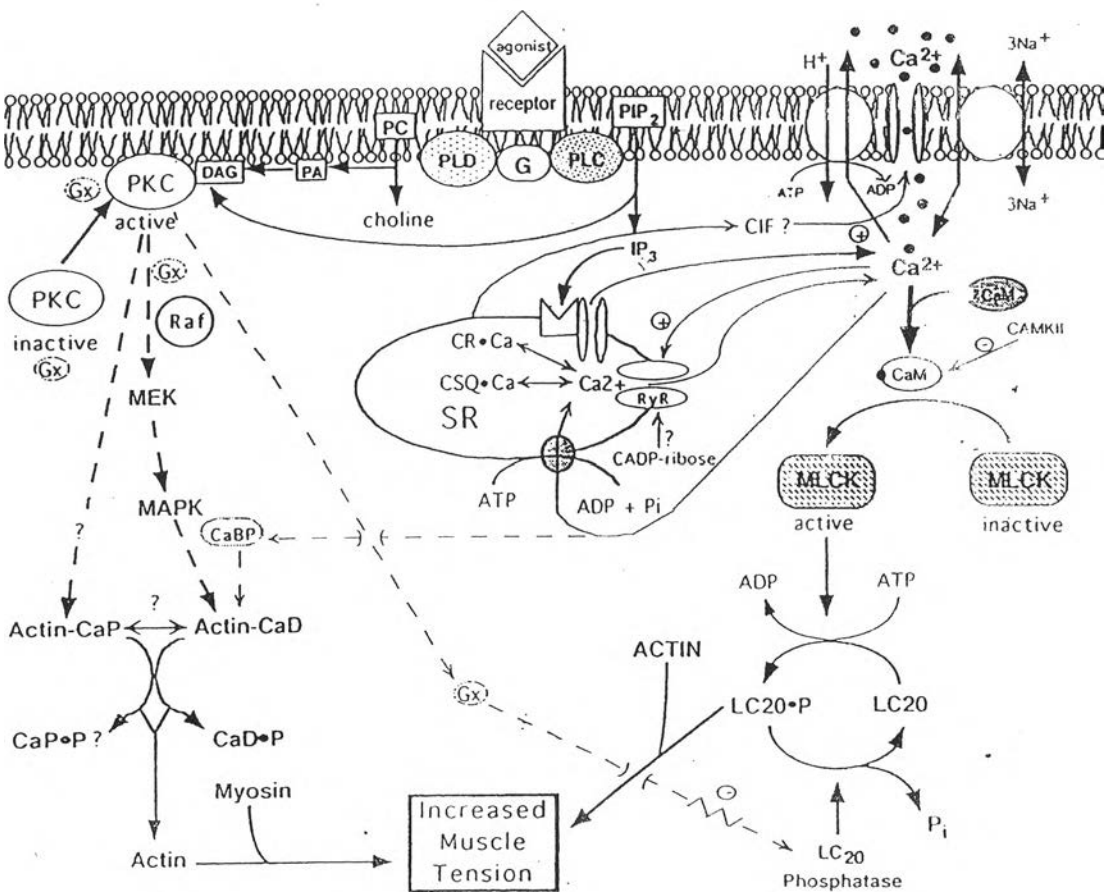
กลไกการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

เมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมอิสระภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น แคลเซียมจะจับกับ calmodulin (CaM) เป็น calcium-calmodulin complex ซึ่งจะกระตุ้นเอนไซม์ myosin light chain kinase (MLCK) ทำให้เกิด phosphorylation ของ myosin ซึ่งในสภาวะนี้ myosin สามารถทำปฏิกิริยากับ actin มีผลทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ phosphorylated myosin จะถูก dephosphorylate โดยเอนไซม์ MLC phosphatase ดังนั้นปริมาณของ phosphorylated myosin จะขึ้นกับความสมดุลของเอนไซม์ MLCK และ MLCK phosphatase (ภาพที่ 2) อย่างไรก็ตามพบว่า ในระหว่างการหดตัวนั้น phosphorylated myosin จะเพิ่มขึ้นอย่างมากใน 30-60 วินาทีแรก ในขณะที่ขนาดของการหดตัวเพิ่มขึ้น หลังจากนั้น phosphorylated จะลดลงอย่างมาก แสดงให้เห็นว่า phosphorylated myosin ไม่ได้มีส่วนสำคัญในการทำให้เกิด sustained contraction ซึ่ง sustained contraction นี้เกิดจากการเพิ่มขึ้นของ DAG ส่วนการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบนี้เกิดจากปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ลดลงสู่ระดับปกติ กลไกที่ทำให้ปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ลดลงอาจเกิดจากการขับออกของแคลเซียมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ทาง Ca^{2+} pump หรือ Na^{+}/Ca^{2+} exchanger หรือมีการจับแคลเซียมไว้ในเซลล์ (Ca^{2+} sequestration)

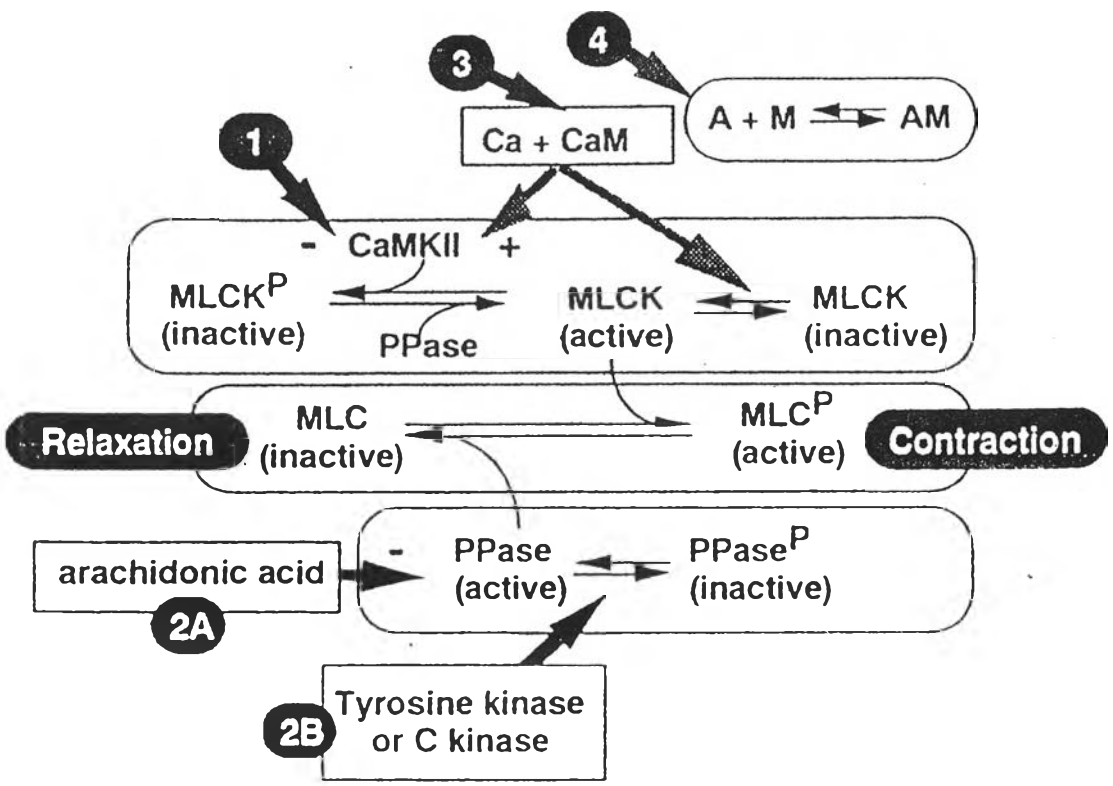
กลไกทั้งหลายเหล่านี้ต้องใช้พลังงานซึ่งส่วนใหญ่ได้มาจากขบวนการ oxidative phosphorylation และบางส่วนจากขบวนการ glycolysis สำหรับขบวนการ oxidative phosphorylation จะจ่ายพลังงานให้กับ contractile elements ในขณะที่ขบวนการ glycolysis จะจ่ายพลังงานให้กับ membrane ion pump ในการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบจะใช้พลังงานน้อยกว่ากล้ามเนื้อลาย 100-500 เท่า ดังนั้นจึงไม่พบว่ากล้ามเนื้อเรียบมีการหดตัวแบบหดเกร็ง (tetanus)

กลไกชักนำให้กล้ามเนื้อเรียบเพิ่มความไวต่อแคลเซียม

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้น การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบจะขึ้นกับปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ (intracellular calcium) และความไวของ contractile element ต่อแคลเซียม ในขั้นตอนการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบนั้น เมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมอิสระภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น แคลเซียมจะจับกับ calmodulin เป็น calcium-calmodulin conplex แล้วไปกระตุ้นเอนไซม์ myosin light chain kinase (MLCK) ทำให้เกิดการ phosphorylation ของ myosin ซึ่งในสภาวะนี้ myosin จะสามารถทำปฏิกิริยากับ actin ในขั้นตอนต่าง ๆ เหล่านี้มีกลไกที่เกี่ยวข้องในการเพิ่มความไวต่อแคลเซียม (Karaki และคณะ, 1997) แสดงดังภาพที่ 3 ดังนี้



ภาพที่ 2 กลไกการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ (Horowitz และคณะ, 1996)



ภาพที่ 3 กลไกในการเพิ่มความไวต่อแคลเซียม (Karaki และคณะ, 1997)

1. ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ calmodulin kinase II (CamKII) ซึ่งจะทำให้ MLCK อยู่ในรูป active
2. ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ myosin light chain phosphatase (PPase) อาจเกิดโดยสารกระตุ้นตัวรับมีผลไปกระตุ้นการทำงานของ เอนไซม์ Phospholipase A_2 ซึ่งจะเปลี่ยน phospholipid ไปเป็น arachidonic acid มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PPase (2A) ส่วน PKC และ tyrosine kinase จะทำให้ PPase อยู่ในรูป inactive (2B)
3. เพิ่มความเข้มข้นของ free calmodulin (CaM) ทำให้เพิ่มปริมาณของ Ca^{2+}-calmodulin complex แล้วมีผลกระตุ้นการทำงานของ MLCK มากขึ้น
4. กระตุ้นให้ actin สามารถทำปฏิกิริยากับ myosin ที่ไม่ถูก phosphorylated ได้

Yamagishi และ คณะ, 1994 พบว่าการกระตุ้น β-adrenoceptor จะทำให้ cAMP มีปริมาณเพิ่มขึ้น มีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบได้ ซึ่ง cAMP ที่เพิ่มขึ้นนี้มีผลในการลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมากกว่าการลดปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ จึงคาดว่าการที่ cAMP ทำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบเนื่องจากการลดความไวของ contractile element ต่อแคลเซียม

การกระตุ้นให้กล้ามเนื้อเรียบหดตัวโดยใช้ตัวกระตุ้น 2 ชนิด คือ high potassium (high K^+) และ NE (หรือ phenylephrine) สามารถนำไปคาดคะเนการเคลื่อนที่ของแคลเซียมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดยใช้แคลเซียมอิสระภายในเซลล์เป็นตัวชี้วัดได้ ตัวกระตุ้นทั้งสองตัวนี้จะทำให้กล้ามเนื้อเรียบเกิดการหดตัว และมี sustained contraction แต่มีกลไกต่างกัน เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบด้วย high K^+ จะทำให้เกิด membrane depolarization มีการเคลื่อนที่ของแคลเซียมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ผ่านทาง voltage-opertaed calcium channel ซึ่งสามารถยับยั้งได้ด้วย Ca^{2+} blocker เช่น verapamil แสดงให้เห็นว่า high K^+ กระตุ้นให้มีการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบโดยอาศัยแคลเซียมจากภายนอกเซลล์ ในขณะที่การกระตุ้น α-adrenoceptor ด้วย NE แคลเซียมจะเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ทาง receptor-operated calcium channel นอกจากนี้ จะชักนำให้เกิด transeit contraction แม้อยู่ในสารละลายที่ปราศจากแคลเซียมทั้งนี้เพราะในภาวะปราศจากแคลเซียม NE ออกฤทธิ์โดยกระตุ้นให้มีการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ (Nogueta และ D'Ocon, 1993)

Bolton, 1979 ได้อธิบายกลไกที่ทำให้แคลเซียมเคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์โดยอาศัยการกระตุ้นให้กล้ามเนื้อเรียบหดตัว พบว่า แคลเซียมเคลื่อนเข้าสู่ภายในเซลล์ 2 pathway คือ ผ่านเข้าสู่เซลล์ทาง voltage-operated calcium channel (VOC) และทาง receptor-operated calcium channel (ROC) ต่อมาพบว่าทั้ง high K^+ และ NE สามารถเปิด L-type calcium channel ดังนั้น Karaki และ คณะ, 1997 จึงอธิบายการเคลื่อนที่ของแคลเซียม (ภาพที่ 4) ไว้ดังนี้

1. high K^+ ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบโดยเพิ่มปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ ไม่มีผลในการเพิ่มความไวของ contractile element ต่อแคลเซียมการเพิ่มปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ เนื่องจาก high K^+ ทำให้เกิด membrane depolarization ทำให้มีการเคลื่อนที่ของแคลเซียมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ทาง L-type channel ซึ่งสามารถยับยั้งได้ด้วย Ca^{2+} blocker เช่น verapamil

2. NE และ agonist กระตุ้นให้มีการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ ซึ่งแคลเซียมที่ถูกปล่อยออกมาส่วนหนึ่งจะเคลื่อนที่เข้าสู่ subplasmalemma space (noncontractile compartment) ซึ่งจะควบคุม membrane Ca^{2+}-dependent mechanism เช่น CICR (2A) และอีกส่วนหนึ่งจะเคลื่อนที่เข้าสู่ cytoplasm (contractile compartment) มีผลทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ (2B)

3. NE และ agonist กระตุ้นให้มีการเปิดออกของ L-type calcium channel โดยการ couple กับ G-protein แต่ไม่มีผลทำให้เกิด membrane depolarization

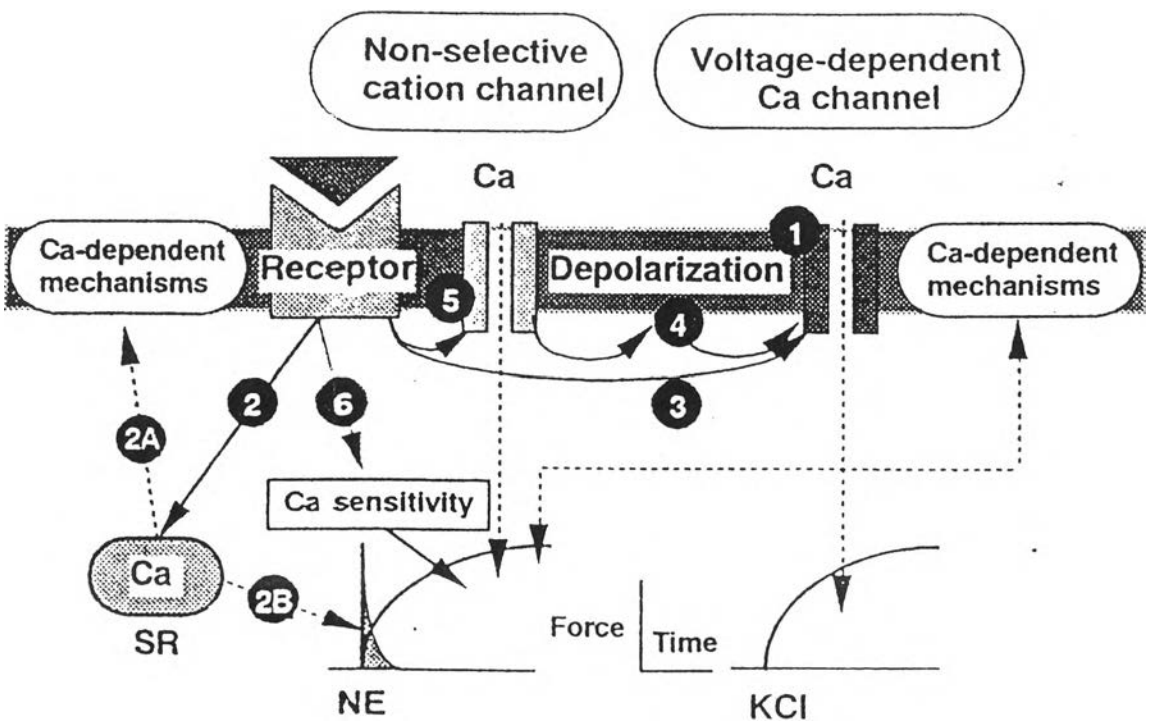
4. NE และ agonist ทำให้เกิด membrane depolarization กระตุ้นให้มีการเปิดออกของ nonselective cation channel มีผลทำให้แคลเซียมเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ทาง L-type channel

5. NE และ agonist กระตุ้นให้มีการเปิดออกของ nonselective cation channel ซึ่ง channel นี้ นอกจากจะยอมให้ monovalent cation ผ่านแล้วยังยอมให้แคลเซียมผ่านได้ด้วย

6. NE และ agonist เพิ่มความไวของ contractile elements ต่อแคลเซียม

agonist ชักนำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ โดยมีกลไกหลัก คือ การกระตุ้นให้มีการเปิดออกของ L-type calcium channel ส่วนน้อยที่จะผ่านทาง nonselective cation channel นอกจากนี้ การเกิด sustained contraction เกิดจากการที่ agonist ชักนำให้มีการเคลื่อนที่ของแคลเซียมเข้าสู่เซลล์ ทำให้มีปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์สูงขึ้น Ca^{2+} blocker สามารถลดปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ได้แต่ลดการหดตัวได้เล็กน้อย ทั้งนี้เพราะ Ca^{2+} blocker ไม่สามารถยับยั้งกลไกที่ agonist เพิ่มความไวของ contractile element ต่อแคลเซียมได้ และการหดตัวในช่วง phasic contraction เกิดจากการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์นั้น ถูกยับยั้งได้โดยการยับยั้งการทำงานของ SR แต่ไม่มีผลจากการใช้ Ca^{2+} blocker

เมื่อแคลเซียมภายใน noncontractile compartment นี้สูงขึ้นจะเป็นตัวควบคุมแบบย้อนกลับ (negative feedback) โดยที่แคลเซียมภายใน noncontractile compartment สามารถกระตุ้นกลไกต่างๆ ที่เยื่อหุ้มเซลล์ และ SR ได้ เช่น กระตุ้นให้ K^+ channel เปิดออกทำให้เกิด membrane hyperpolarization สามารถยับยั้ง receptor-mediated signal transduction pathway ได้ นอกจากนี้



ภาพที่ 4 กลไกการเคลื่อนที่ของแคลเซียมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Karaki และคณะ, 1979)

การกระตุ้น Ca^{2+} pump และ Na^{+}/Ca^{2+} exchange ทำให้แคลเซียมใน compartment และภายใน SR ลดลง

กลไกการเปลี่ยนแปลงแคลเซียมของเซลล์

1. Voltage-operated calcium channel (VOC)

VOC มี 6 subtype คือ L, N, P, Q, R และ T-type calcium channel โดยในกล้ามเนื้อเรียบจะเป็นชนิด L-type calcium channel (Kariyama และคณะ, 1995) ซึ่งถูกกระตุ้นโดยเกิด membrane depolarization และสามารถยับยั้งได้ด้วย Ca^{2+} blocker (Godfraind และคณะ, 1986) สารกระตุ้นตัวรับ (agonist) สามารถเปิด channel นี้ได้โดยมีผลกระตุ้น nonselective cation channel ทำให้เกิด membrane depolarization มีผลให้แคลเซียมเคลื่อนที่ผ่านเข้าเซลล์ทาง L-type calcium channel นอกจากนี้ยังพบว่า สารกระตุ้นตัวรับสามารถเปิด channel นี้ได้ ออกฤทธิ์โดย couple กับ G-protein โดยตรงแล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี ส่งผลให้มีการเปิดของ L-type calcium channel แต่ไม่ทำให้เกิด membrane depolarization (Kamishima และคณะ, 1992) ซึ่งจากการศึกษาของ Karaki และคณะ, 1997 พบว่า verapramil สามารถยับยั้งการหดตัวและลดปริมาณแคลเซียม แคลเซียมอิสระภายในเซลล์ของหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวได้ เมื่อกระตุ้นด้วย high K^{+} หรือ NE ซึ่งเป็นไปตามขนาดความเข้มข้น (dose - dependent)

นอกจากนี้ยังพบว่า Ca^{2+} blocker ยังสามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ได้โดยการยับยั้งการไล่ที่ (deplete) แคลเซียมออกจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์อีกด้วย เช่น เมื่อใช้ ryanodine กระตุ้น femoral artery หนูขาว จะทำให้แคลเซียมภายในแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมถูกไล่ที่ออกมา ส่งผลให้มีปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์สูงขึ้นและเกิดการหดตัว ซึ่ง verapramil สามารถยับยั้งได้ (Kojima และคณะ 1994)

2. Nonselective cation channel และ Calcium release catevated calcium channel (CRAC)

ในการกระตุ้น α-adrenoceptor ด้วย NE จะทำให้มีประมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์สูงขึ้นแล้วทำให้กล้ามเนื้อเรียบหดตัว (Godfraind, 1967) ซึ่งพบว่าปริมาณแคลเซียมอิสระนี้สูงขึ้นในช่วงเวลาสั้น ๆ ทำให้มีการหดตัวอย่างรวดเร็ว (phasic contraction) จากนั้นตามด้วย sustained contraction (tonic contraction) phasic contraction เกิดจากการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บ

สะสมแคลเซียมภายในเซลล์ (Rapoport, 1987) และ tonic contraction เกิดจากการเคลื่อนที่ของแคลเซียมจากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ (Nishimura, Ota และ Ito 1991)

จากการศึกษาของ Karaki และ Weiss, 1988 พบว่า verapramil ไม่สามารถลดปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อกระตุ้นหลอดเลือดด้วย NE ทั้งนี้เพราะ Ca^{2+} blocker สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+} ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์จำเพาะทาง L-type calcium channel (Godfraind และคณะ, 1986) แสดงว่ายังมี channel อื่นที่แคลเซียมสามารถเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ สรุปได้ว่า NE ทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือดในช่วง tonic contraction โดยการกระตุ้นให้ Ca^{2+} เคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ทาง L - type calcium channel และ non-L-type calcium channel นอกจากนี้ยังพบว่าการให้ NE กระตุ้น α-adrenoceptor ที่หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว ใน Ca^{2+}-free solution การหดตัวยังเกิดขึ้นได้ แสดงว่า NE ทำให้มีการปลดปล่อยแคลเซียมออกจากแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมออกจากแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ (Nogueta และ D'Ocon, 1993)

จากการศึกษาของ Benham และ Tsien, 1987 พบว่า ATP สามารถเปิด nonselective cation channel ทำให้แคลเซียมเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ ส่งผลให้แคลเซียมอิสระภายในเซลล์สูงขึ้น แคลเซียมที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ทาง nonselective cative channel นี้ไม่มีผลทำให้กล้ามเนื้อเรียบหดตัวได้ (Katajima และคณะ, 1996) อาจเป็นเพราะแคลเซียมที่เคลื่อนที่เคลื่อนเข้าสู่ภายในเซลล์นี้จะเคลื่อนไปยัง noncontractile compartment ซึ่ง Ca^{2+} blocker สามารถลดปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Katajima และคณะ 1994) การเคลื่อนที่ของแคลเซียมย่านเยื่อหุ้มเซลล์อีกทางหนึ่งซึ่งไม่สามารถยับยั้งได้ด้วย Ca^{2+} blocker คือ CRAC

3. Na^{+} / Ca^{2+} exchange

การแลกเปลี่ยนของโซเดียมและแคลเซียมจะมีผลทำให้มีการเคลื่อนที่ของแคลเซียมเข้าสู่ภายในเซลล์ หรือถ้าภายในเซลล์มีปริมาณแคลเซียมมากเกินไปก็จะมีการขับแคลเซียมออกสู่นอกเซลล์ แต่การเคลื่อนที่ของแคลเซียมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ทาง pathway นี้จะทำให้กล้ามเนื้อเรียบหดตัวเพียงเวลาสั้น ๆ เท่านั้น เพราะเซลล์จะนำแคลเซียมเข้าสู่แหล่งเก็บภายในเซลล์

4. Calcium release from SR

แคลเซียมที่ปลดปล่อยออกจากแหล่งสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ มีกลไกที่เกี่ยวข้อง คือ calciuminduced calcium release (CICR) (Karaki and Weiss, 1988; Zucchi และ Ronca

Testone, 1997) และ inositol trisphosohate-induced calcium release (IICR) (Mikoshiba, 1993) ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าแคลเซียมที่ปลดปล่อยจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์จะตอบสนองต่อ agonist ในช่วงแรกทั้งนี้เป็นเพราะ

1) NE ชักนำให้เกิด transient contraction เมื่ออยู่ในสภาวะที่ปราศจากแคลเซียม (Nogueta และ D'Ocon, 1993)

2) agonist สามารถกระตุ้นให้มีการ metabolize เกิด IP_3 ได้ช่วงเวลาหนึ่ง (transient) (Dorn และ Becker, 1993)

3) การยับยั้งการทำงานของ SR โดยใช้ ryanodine จะยับยั้ง initial phase ของการหดตัวแต่ไม่มีผลต่อ sustained contraction (Iino และคณะ, 1988)

Ashida และคณะ, 1988 พบว่า ryanodine สามารถยับยั้งการหดตัวเมื่อกระตุ้นด้วย NE ได้ 50% ในหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว และ 14% ใน bovine tail artery แต่ไม่มีผลถ้าหากกระตุ้นด้วย high K^+ นอกจากนั้น Ca^{2+} blocker สามารถยับยั้งการหดตัวเมื่อกระตุ้นด้วย NE ได้ 45% ในหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวและ 82% ใน bovine tail artery แต่สามารถยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์เมื่อกระตุ้นด้วย high K^+ เมื่อใช้ electro-microscopy พบว่าใน bovine tail artery มี SR เพียง 60% เมื่อเทียบกับปริมาณ SR ในหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว แสดงให้เห็นว่า NE ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบโดยมีผลต่อการเคลื่อนที่ของแคลเซียมเข้าสู่ภายในเซลล์ผ่าน L-type calcium channel และการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ผ่าน ryanodine-sensitive pathway

5. Ca^{2+} pump in plasmalemma and the SR

Ca^{2+} pump พบได้ทั้งใน plasmalemma และใน SR ซึ่งการขับแคลเซียมออกนอกเซลล์นั้นนอกจากจะขับออกทาง Na^+/Ca^{2+} exchange แล้วยังสามารถขับออกผ่านทาง Ca^{2+} pump ได้มากกว่า Na^+/Ca^{2+} exchanger

6. mitrochondria

การยับยั้งการทำงานของ mitochondria จะทำให้การสร้าง ATP และการหดตัวของลำไส้ลดลง แต่จะไม่มีผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดทั้งนี้เพราะแหล่งให้ ATP นอกจากจะได้จากการทำงานของ mitochondria แล้วยังได้จากขบวนการ glycolysis อีกด้วย แคลเซียมสามารถกระตุ้นให้ mitochondria สร้าง ATP ก่อนที่กล้ามเนื้อเรียบจะใช้ ATP ในการหดตัว และถ้าหากเกิดความผิด

ปกติขึ้นภายในเซลล์จนทำให้ปริมาณแคลเซียมสูงขึ้น mitochondria ก็ยังทำหน้าที่เป็นแหล่งเก็บแคลเซียมได้

Chance, 1965 พบว่า แคลเซียมอิสระภายในเซลล์มีส่วนเพิ่มอัตราการหายใจและขบวนการขนส่ง electron ใน mitochondria นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ dehydrogenase ในขบวนการ oxidative-phosphorylation และเอนไซม์ phosphorylase b kinase ในขบวนการ glycolysis ได้อีกด้วย

วัตถุประสงค์

1.เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ CU 763-15-13 ต่อการหดตัวของลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) และหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของกระต่าย รวมทั้งหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) และท่อนำอสุจิ (vas deferens) ของหนูขาว

2.เพื่อศึกษาตำแหน่งในการออกฤทธิ์ (site of action) ของ CU 763-15-13 ต่อการหดตัวของลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) และหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) และท่อนำอสุจิ (vas deferens)

3.เพื่อเปรียบเทียบผลของ CU 763-15-13 กับ papaverine ต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) และท่อนำอสุจิหนูขาว (vas deferens)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.ทำให้ทราบถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ CU 763-15-13 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) หลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของกระต่าย และหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) และท่อนำอสุจิ (vas deferens) ของหนูขาว

2.ทำให้ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ที่เป็นไปได้ของ CU 763-15-13 ต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของหนูขาวและกระต่าย และท่อนำอสุจิ (vas deferens) ของหนูขาว

3.ผลจากการทดลองจะเป็นข้อมูลพื้นฐานทางเภสัชวิทยาของ CU 763-15-13 สามารถนำมาพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์หรือเภสัชวิทยาต่อไป