บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

CU-763-10-01 เป็นอนุพันธ์ของ valproic acid ที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ จึงมีความสนใจในการศึกษาผลของ CU-763-10-01 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อลำไส้เล็ก (duodenum) และหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของกระต่ายและกล้ามเนื้อท่อนำอสุจิ (vas deferens)ของหนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วยสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวชนิดต่าง ๆ ที่เห็นผลชัดเจนในอวัยวะนั้น ๆ เช่น NE , 5HT , KCl และ $BaCl_2$ เนื่องจาก CU-763-10-01 มีบางส่วนในสูตรโครงสร้างคล้ายกับโครงสร้างของ VPA และ B_6 ดังนั้นจึงทำการศึกษาฤทธิ์ของ CU-763-10-01 เปรียบเทียบกับ VPA และ B_6 เพื่อแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ CU-763-10-01 ออกฤทธิ์โดยตัวเองหรือแสดงฤทธิ์เหมือน VPA และ B_6 เนื่องจาก VPA เป็นของเหลวที่ละลายน้ำยากในการทดลองนี้จึงใช้อยู่ในรูปของเกลือคือ S.V. แทนเนื่องจากสามารถละลายน้ำได้ดี และในปัจจุบันนี้ S.V.เป็นยาต้านชักที่ใช้กันแพร่หลายในหลายประเทศ มีชื่อทางการค้าว่า Depakin® จากผลการทดลองที่กล่าวมาแล้วในบทที่ 3 สามารถอภิปรายผลที่เกิดขึ้นได้ดังนี้

1. ผลต่อการหดตัวของลำไส้เล็ก (duodenum) กระต่าย

1.1 ผลต่อการหดตัวของลำไส้เล็กที่มี spontaneous contraction

ลำไส้เล็กของกระต่ายสามารถหดตัวได้เอง (spontaneous contraction) ผลการทดลองพบว่า CU-763-10-01 ออกฤทธิ์ลดแรงหดตัวของลำไส้เล็กกระต่ายได้อย่างรวดเร็ว และความสามารถในการลดการหดตัวนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณสาร คือ เมื่อให้ CU-763-10-01 ขนาด 4.4×10^{-6} M ไม่มีผลต่อการหดตัวของลำไส้จากนั้นจึงเพิ่มขนาดของ CU-763-10-01 โดยให้ CU-763-10-01 ขนาด 4.4×10^{-5} M พบว่าทันทีหลังจากที่ให้ CU-763-10-01 แรงหดตัวของลำไส้เล็กจะลดลงอย่างมาก แต่เมื่อล้างลำไส้ด้วยสารละลาย Tyrode หลาย ๆ ครั้ง พบว่าลำไส้จะมี spontaneous contraction กลับมาเหมือนเดิมแสดงให้เห็นว่า ฤทธิ์ของ CU-763-10-01 ไม่ใช่ฤทธิ์ถาวร สำหรับผลของ S.V. และ B_6 ขนาด 4.4×10^{-5} M ไม่มีผลต่อการหดตัวของลำไส้เล็กกระต่ายที่เกิดขึ้นเอง แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ของS.V. และ B_6 แตกต่างอย่างชัดเจนกับฤทธิ์ของ CU-763-10-01

1.2 ผลต่อการหดตัวของลำไส้เล็กเมื่อกระตุ้นด้วย Ach

เมื่อให้ Ach ขนาด $1x10^{-7}$ M สามารถกระตุ้นให้ลำไส้เล็กหดตัวได้ โดย Ach ออกฤทธิ์โดยตรงต่อ cholinergic receptor ซึ่งแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ muscarinic receptor และ nicotinic receptor atropine สามารถยับยั้งการหดตัวของลำไส้เล็กที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย Ach ได้ (Bolton, 1979b) แสดงให้เห็นว่าการหดตัวของลำไส้เล็กนั้นเกิดผ่าน muscarinic receptor โดย Ach ไปกระตุ้น muscarinic receptor ที่ cell membrane ของ muscle fiber ของลำไส้ ทำให้เกิด depolarization ของ cell membrane ส่งผลให้ receptor operated calcium channel (ROC) (Burgen และ Spero, 1968; Bolton, 1972) และ potential operated calcium channel (POC) เปิด (Bolton, 1979a) ทำให้ Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์เคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์ ทำให้ระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์สูงขึ้น นอกจากนี้แคลเซียมที่ผ่านเข้ามาทาง POC และ ROC ยังมีผลกระตุ้นการหลั่งของแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ ทำให้ระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์สูงขึ้นเกิดการหดตัวของลำไส้ (Chad และ Trigger, 1973) จากผลการทดลองพบว่า CU-763-10-01 ขนาด $4.4x10^{-5}$M สามารถลดการหดตัวที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย Ach ได้ทั้งแรงและความถี่ในการหดตัว น่าจะเกิดจากการที่ CU-763-10-01 อาจมีผลต่อ receptor หรือมีผลยับยั้งการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์โดยผ่านทาง ROC, POC และ CU-763-10-01 ไม่น่ามีผลยับยั้งการหลั่งของแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ เนื่องจากฤทธิ์ในการลดการหดตัวของ CU-763-10-01 เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากให้ CU-763-10-01 แรงหดตัวของลำไส้เล็กจะลดลง ทันที และเมื่อล้างลำไส้ด้วยสารละลาย Tyrode แล้วการหดตัวของลำไส้เล็กสามารถ reverse กลับมาได้ง่ายจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการออกฤทธิ์ของCU-763-10-01น่าจะอยู่ที่ cell membrane

1.3 ผลการหดตัวของลำไส้เล็กเมื่อกระตุ้นด้วย 5HT

เมื่อให้ 5HT ขนาด $1x10^{-6}$ M สามารถกระตุ้นให้ลำไส้เล็กหดตัวได้ ในระยะแรกๆ สามารถแบ่งชนิดของ 5HT receptor ที่ควบคุมการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบออกเป็น 2 ชนิด คือ D receptor ซึ่งสามารถยับยั้งได้ด้วย dibenzyline และ M receptor ซึ่งสามารถยับยั้งได้ด้วย morphine สำหรับ 5HT receptor ซึ่งอยู่ที่ลำไส้มี 2 ชนิด คือ M receptor อยู่ที่ nerve fiber และ D receptor อยู่ที่ muscle fiber(Gaddum และ Picarelli, 1957; Barlow และ Khan, 1959) ในปัจจุบันได้มีการแบ่ง 5HT receptor ตามคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของโมเลกุลออกเป็น 4 กลุ่ม คือ $5HT_1$ receptor : $5HT_{1A}$, $5HT_{1B}$, $5HT_{1D}$ เป็น G protein couple receptor ซึ่งพบที่ hippocampus, substantia nigra , $5HT_2$ receptor : $5HT_{2A}$, $5HT_{2B}$, $5HT_{2C}$ เป็น G protein couple receptor เช่น

เดียวกัน ซึ่งพบใน สมอง, กล้ามเนื้อเรียบ และเกร็ดเลือด , $5HT_3$ receptor เป็น ion channel receptor (Na^+/K^+ ion channel) ซึ่งพบใน peripheral nervous system, enteric nerve , $5HT_4$ receptor เป็น G protein couple receptor ซึ่งพบใน สมอง โดยที่ $5HT_2$ receptor เป็นชนิดเดียวกับ D receptor และ $5HT_3$ receptor เป็นชนิดเดียวกับ M receptor ตามที่ Gaddum และ Piacarelli เคยแบ่งไว้ (Zifa และ Fillion, 1992) ตำแหน่งการออกฤทธิ์ของ 5HT ที่ลำไส้มีหลายตำแหน่ง คือ

1) ออกฤทธิ์โดยตรงต่อกล้ามเนื้อเรียบ
2) ออกฤทธิ์ที่ cholinergic intramural nerve
3) ออกฤทธิ์ที่ intramural excitatory non cholinergic nerve
4) ออกฤทธิ์ที่ intramural inhibitory non cholinergic non adrenergic nerve

(Gonella, 1981) การออกฤทธิ์ที่ $5HT_2$ receptor เป็นการออกฤทธิ์โดยตรงของ 5HT 5HT จะไปจับกับ receptor ส่งผลให้ receptor operated calcium channel (ROC) เปิด ทำให้ Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์เคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์ (Hardcastle และคณะ, 1981) นอกจากนี้การกระตุ้น $5HT_2$ receptor นี้จะไปกระตุ้นการทำงานของ phospholipase C (PLC) ทำให้เกิดการ hydrolyze phosphatidylinositol เกิด second messenger 2 ตัวคือ IP_3 และ DAG ซึ่ง IP_3 จะกระตุ้นให้เกิดการหลั่งของแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ ทำให้ระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้เกิดการหดตัวของลำไส้ (Gaddum และ Picarelli, 1957; Zifa และ fillion, 1992 ; Burkhalter, Julis, และ Frick, 1995) ส่วนการออกฤทธิ์ของ 5HT ต่อ $5HT_3$ receptor นั้น เป็นการออกฤทธิ์โดยอ้อม โดย 5HT จะจับกับ receptor ที่ postganglionic membrane ของ cholinergic intramural gangion cell ทำให้มีการหลั่งของ Ach ออกจากปลายประสาท Ach ที่ถูกปล่อยออกมานี้ จะทำให้กล้ามเนื้อของลำไส้หดตัว (Harry, 1963; Costa และ Furness, 1979) จากผลการทดลองพบว่า CU-763-10-01 สามารถลดการหดตัวที่เกิดจาก 5HT ได้ น่าจะเกิดจากการที่ CU-763-10-01 อาจมีผลต่อ 5HT receptor หรือ ยับยั้งการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+} จากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ผ่าน ROC

1.4 ผลต่อการหดตัวของลำไส้เมื่อกระตุ้นด้วย $BaCl_2$

เมื่อให้ $BaCl_2$ ขนาด 1 mM แก่ลำไส้เล็กปรากฏว่า ลำไส้เล็กหดตัว การหดตัวที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย $BaCl_2$ เกิดจาก $BaCl_2$ ออกฤทธิ์ได้ 2 ลักษณะ คือ การออกฤทธิ์โดยตรงของ $BaCl_2$ คือการออกฤทธิ์ที่กล้ามเนื้อเรียบของลำไส้ โดย Ba^{2+} จะทำให้มีการปลดปล่อยของ Ca^{2+} ออกจาก cell membrane ของ muscle cell โดยปกติแล้ว Ca^{2+} เหล่านี้สะสมอยู่ที่ cell

membrane โดยที่การเชื่อมระหว่าง Ca^{2+} กับ cell membraneนี้ต้องอาศัย Mg^{2+} (Antonio, Rocha, และ Yashuda, 1973) นอกจากนี้ Ba^{2+} ยังทำให้ Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์เคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์เซลล์มากขึ้นผ่าน POC (Clement, 1981; Karaki, Sataka, และ Shibata, 1986) การออกฤทธิ์โดยย้อมของ $BaCl_2$ คือ การออกฤทธิ์ที่ nerve fiber Ba^{2+} จะออกฤทธิ์กระตุ้น ganglion ทำให้มีการหลั่งของ Ach ออกจากปลายประสาท Ach ที่ถูกหลั่งออกมานี้มีผลทำให้ลำไส้เล็กเกิดการหดตัว (Feldberg, 1951; William, 1954; Henderson, Ariens, และ Simonis, 1968) จากผลการทดลองพบว่า CU-763-10-01 สามารถลดการหดตัวที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย $BaCl_2$ น่าจะเกิดจากการที่ CU-763-10-01 มีผลยับยั้งการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+} จาก ภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ผ่าน POC

1.5 ผลต่อการหดตัวของลำไส้เมื่อกระตุ้นด้วย KCl

เมื่อให้ KCl ขนาด 50 mM แก่ลำไส้เล็กพบว่า ลำไส้เล็กจะหดตัวได้อย่างชัดเจน การหดตัวที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย KClเกิดจากการเกิด membrane depolarization ซึ่งมีผลให้ potential operated calcium channel (POC) เปิดออก Ca^{2+}จากภายนอกเซลล์เคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์ทำให้ระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ลำไส้เล็กเกิดการหดตัว (Bolton, 1979b, Rosenberger, Ticku, และ Trigger, 1979) จากการทดลองพบว่า CU-763-10-01 สามารถลดแรงหดตัวของลำไส้เล็กเมื่อกระตุ้นด้วย KCl ได้ น่าจะเกิดจากการที่ CU-763-10-01 มีผลยับยั้งการเคลื่อนที่ของCa^{2+}จากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ผ่าน POC ส่วน S.V. และ B_6 ไม่มีผลต่อแรงหดตัวของลำไส้เล็กเมื่อกระตุ้นด้วย KCl แสดงให้เห็นว่า S.V. และ B_6 มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อลำไส้เล็กไม่เหมือนกับ CU-763-10-01

ในกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน duodenum จากการทดลองพบว่า CU-763-10-01 ยับยั้งการหดตัวที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย Ach , 5HT, KCl , $BaCl_2$ แสดงว่าการออกฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของ CU-763-10-01 เป็น nonspecific antagonist การที่ CU-763-10-01สามารถลดการหดตัวของลำไส้เล็กเมื่อกระตุ้นด้วยสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวชนิดต่างๆได้ กลไกหลักน่าจะเกิดจากCU-763-10-01 ยับยั้งการเคลื่อนที่ของCa^{2+}จากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ผ่าน receptor operated calcium channel (ROC) และ potential operated calcium channel (POC) จากผลการทดลองพบว่า แสดงให้เห็นว่า S.V. และ B_6ไม่ได้ออกฤทธิ์เหมือน CU-763-10-01 เนื่องจาก S.V. และ B_6 ไม่มีผลต่อการหดตัวของลำไส้เล็กที่เกิดขึ้นเองและเมื่อกระตุ้นด้วย KCl

2. ผลต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) กระต่าย

2.1 ผลต่อการหดตัวของหลอดเลือดเมื่อกระตุ้นด้วย NE

เมื่อให้ NE $1x10^{-6}$ M แก่หลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของกระต่าย ปรากฏว่า หลอดเลือดจะหดตัว และผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับผลการทดลองที่มีผู้ศึกษามาแล้ว คือ NE ทำให้หลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของกระต่ายหดตัว (Aaronson และ Jones, 1985; Hudgin และ Weiss, 1968) นอกจากนี้หลอดเลือดในส่วนอื่น ๆ เช่น distal saphenous artery, ear vein, renal vein ของกระต่ายจะตอบสนองต่อ NE โดยการหดตัวเช่นกัน (Daly และคณะ, 1990) NE ทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือดได้ โดย NE ไปกระตุ้น α_1 adrenoceptor (Docherty และ starke, 1981a, 1982) ในปัจจุบันได้มีการแบ่ง α_1 adrenoceptor ตามคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาเป็นหลัก และใช้ความแตกต่างของ affinity ต่อ phentolamine (non selective) และ WB 4101 (selective α_1 adrenoceptor) ซึ่งแบ่ง α_1 adrenoceptor เป็น 3 subtype (Bylund และคณะ, 1994) คือ

α_{1A} : พบมากใน ท่อฉุจิของหนูขาว , hippocampus

α_{1B} : พบใน ตับ , cerebral cortex

α_{1D} : พบใน ปอด , หัวใจ

นอกจากนี้ยังพบว่า prazosin (selective α_1 antagonist) มี affinity ต่อ α_1 adrenoceptor ที่ต่อนข้างแตกต่างกันเป็นช่วงกว้าง Flavahan และ Vanhoutte(1986) จึงแบ่ง α_1 เป็น 3 กลุ่ม คือ

α_{1H} : high affinity to prazosine และ yohimbine

α_{1L} : low affinity to prazosine และ yohimbine

α_{1N} : low affinity to prazosine และมี high affinity to yohimbine และ HV 773 (selective α_{1H} antagonist)

ในหลอดเลือดเลือดแดงใหญ่ของกระต่าย NE จะกระตุ้นการหดตัวโดยออกฤทธิ์ผ่านทั้ง α_{1H} และ α_{1L} adrenoceptor (Muramatsu, Kigoshi, และ Oshita, 1990) ซึ่ง α_{1H} ที่พบในหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของกระต่ายเป็นชนิดเดียวกับ α_{1B} adrenoceptor (Hieble และ Bond, 1994) กลไกการออกฤทธิ์ของ NE ต่อ α_1 adrenoceptor มีกลไกระดับโมเลกุลคือ เมื่อ α_1 adrenoceptor ซึ่งcoupleอยู่กับG proteinและ phospholipase C (PLC) ถูกกระตุ้นตามลำดับด้วย NE PLC จะ hydrolyze phosphatidylinositol -4,5- bisphosphateได้ second messenger 2 ตัว คือ IP_3 และ DAG ซึ่ง IP_3 จะละลายน้ำได้ดี จะเข้าไปใน intracellular fluid จับ receptor ที่ SR กระตุ้นให้เกิดการหลั่งของ Ca^{2+} ออกจาก SR (Kajikuri และ Kuriyama, 1990) นอกจากนี้การกระตุ้น α_1

adrenoceptor โดย NE ทำให้เกิด membrane depolarization กระตุ้นให้ receptor operated calcium channel (ROC) เปิด ทำให้ Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์ เคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์ (Lee และ Stetizel, 1994; Daly และคณะ, 1990) และจากการเกิด membrane depolarization ทำให้เกิดการปลดปล่อยของ Ca^{2+} ที่ bound อยู่ที่ cell membrane (Abdel-Latif, 1986; Reynolds และ Dubyak, 1985) จากกลไกดังกล่าวทำให้ระดับของแคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น เป็นผลทำหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta)ของกระต่ายหดตัว เนื่องจากการกระตุ้นด้วย NE มีหลายกลไกเข้ามาเกี่ยวข้องในการหดตัวพบว่า กลไกหลักในการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ขึ้นอยู่กับการเพิ่มระดับของ IP_3 ทำให้เกิดการหลั่งของแคลเซียมออกจาก SR เพราะการหดตัวของหลอดเลือดเมื่อกระตุ้นด้วย NE ถูกยับยั้งได้เล็กน้อยด้วย calcium antagonist เช่น nifedipine , verapamil , diltiazem ต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึงสามารถยับยั้งการหดตัวนี้ได้ และการหดตัวเมื่อกระตุ้นด้วย NE เกิดได้ใน Ca^{2+} free solution (Hondeghem, Ayad, และ Robertson, 1986; Ljung และ Kjellstedt, 1987) จากผลการทดลองพบว่า CU-763-10-01 , S.V.และ B_6 เพิ่มการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ยังไม่สามารถอธิบายได้ จึงต้องทำการศึกษาต่อไป

2.2 ผลต่อการหดตัวของหลอดเลือดเมื่อกระตุ้นด้วย 5HT

เมื่อให้ 5HT $1x10^{-6}$ M แก่หลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของกระต่าย ปรากฏว่า หลอดเลือดจะหดตัว และผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองที่มีผู้ศึกษามาแล้ว คือ 5HT ทำให้หลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) หดตัว (Consigny, 1989; Ben-Harari และคณะ, 1990) ในขณะนี้เป็นที่ยอมรับกันดีว่า 5HT สามารถแสดงฤทธิ์ได้โดยจับกับ 5HT receptor ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ $5HT_1$, $5HT_2$, $5HT_3$, $5HT_4$ (Zifa และ Fillion, 1992) โดย receptor แต่ละชนิดจะมีการกระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ และมีบทบาทในการตอบสนองที่แตกต่างกันออกไป สำหรับหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของกระต่ายและหลอดเลือดหัวใจของมนุษย์ จะพบ $5HT_2$ receptor (Feniuk และคณะ,1985) และการหดตัวของหลอดเลือดที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย 5HT นี้ถูกยับยั้งได้ด้วย ketanserine (Feniuk และคณะ, 1985) 5HT ทำให้หลอดเลือดเกิดการหดตัวได้โดย 5HT จะไปกระตุ้น $5HT_2$ receptor ซึ่งcouple อยู่กับ G protein และ phospholipase C (PLC) ถูกกระตุ้นตามลำดับส่งผลให้เกิด second messenger คือ DAG และ IP_3 ซึ่ง IP_3 จะไปกระตุ้นทำให้เกิดการหลั่งของ Ca^{2+} จากแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ ทำให้เกิดการหดตัวขึ้น สำหรับ DAG จะไปรวมกับ phosphatidylserine และ calcium ซึ่งจะไปกระตุ้น protein kinase C ทำให้การหดตัวเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Consigny, 1989) นอกจากนี้จะเกิดขบวนการดัง

กล่าวแล้วยังเกิดจาก Ca^{2+}ภายนอกเคลื่อนที่ผ่าน ROC ด้วย (Hoyer และคณะ, 1994) และ 5HT ยังกระตุ้นการหลั่ง NE จากปลายประสาท adrenergic (adrenergic nerve terminal) (Vanhoulte, 1983) การหดตัวที่เกิดจาก 5HT นี้ไม่ได้ เกิดจากการที่ 5HT ไปกระตุ้น α_1 adrenoceptor ที่หลอดเลือด (aorta) ของกระต่าย(Apperly, Humphery, และLevy, 1976; Purdy, Murray, และ stupecky, 1986) เพราะ prazosin ไม่มีผลต่อการยับยั้งการหดตัวเมื่อกระตุ้นด้วย 5HT จากผลการทดลองพบว่า CU-763-10-01 , S.V. และ B_6 ขนาด $4.4x10^{-5}$ M เพิ่มการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ยังไม่สามารถอธิบายได้ จึงต้องมีการศึกษาทำการศึกษาต่อไป

2.3 ผลต่อการหดตัวของหลอดเลือดเมื่อกระตุ้นด้วย KCl

เมื่อให้ KCl ขนาด 50 mM หลอดเลือดจะเกิดการหดตัวขึ้น โดย KCl ทำให้ผนังเซลล์ของหลอดเลือดเกิด depolarization ซึ่งมีผลกระตุ้นให้ POC เปิดออก ทำให้ Ca^{2+} ภายนอกเซลล์เคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์ (Hudgin และ Weiss, 1968; Karaki และคณะ, 1988) และจากการเกิด membrane depolarization ทำให้เกิดการปลดปล่อยของ Ca^{2+} จาก cell membrane (Briggs, 1962; Hudgin และ Weiss, 1968) จากกลไกดังกล่าวทำให้ระดับของแคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้นทำให้หลอดเลือดหดตัว จากผลการทดลองพบว่า CU-763-10-01 ขนาด $4.4x10^{-5}$ M สามารถลดการหดตัวที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย KCl ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) น่าจะเกิดจากการที่ CU-763-10-01 ยับยั้งการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+} จากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ผ่าน POC ส่วน S.V. และ B_6 ขนาด $4.4x10^{-5}$ M ไม่มีผลต่อการหดตัวเมื่อกระตุ้นด้วย KCl ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงให้เห็นว่าการออกฤทธิ์ของ S.V. และ B_6 ไม่เหมือนกับ CU-763-10-01 เมื่อกระตุ้นด้วย KCl

ในกล้ามเนื้อหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) CU-763-10-01 ขนาด $4.4x10^{-5}$ M มีผลเพิ่มการหดตัวของหลอดเลือดแดงเมื่อกระตุ้นด้วย NE , 5HT ซึ่งกลไกในการเพิ่มการหดตัวของหลอดเลือดยังไม่สามารถอธิบายในขณะนี้ แต่ CU-763-10-01 ไม่น่าจะมีผลโดยตรงต่อ receptor เนื่องจาก CU-763-10-01 เพิ่มการหดตัวได้ทั้ง NE , 5HT ซึ่งมี receptor แตกต่างกัน CU-763-10-01 อาจมีผลต่อกระบวนการหดตัวกลไกใดกลไกหนึ่งที่ทำให้เกิดการเพิ่มระดับของแคลเซียมภายในเซลล์ทำให้หลอดเลือดเกิดการหดตัวขึ้น จากผลการทดลองพบว่า CU-763-10-01 ออกฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวเมื่อกระตุ้นด้วย KCl ซึ่งผลการทดลองให้ผลเช่นเดียวกับลำไส้เล็ก จึงแสดงให้เห็นว่ากลไกหลักของ CU-763-10-01 คือการยับยั้งการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+}จากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์

ผ่าน POC ส่วน S.V. และ B_6 ขนาด $4.4x10^{-5}$ M มีผลเพิ่มการหดตัวของหลอดเลือดเมื่อกระตุ้นด้วย NE ,5HT และไม่มีผลต่อการหดตัวของหลอดเลือดเมื่อกระตุ้นด้วย KCl ซึ่งผลการทดลองที่ได้ให้ผลเช่นเดียวกับลำไส้เล็กเมื่อกระตุ้นด้วย KCl แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ของ S.V.และ B_6 ที่หลอดเลือดแดงมีฤทธิ์บางส่วนเหมือน CU-763-10-01 อาจเป็นเพราะ S.V. และ B_6 มีสูตรโครงสร้างบางส่วนคล้ายกันกับ CU-763-10-01 ซึ่งอาจมีผลทำให้แสดงฤทธิ์เหมือนกัน

3. ผลต่อการหดตัวของท่ออสุจิ (vas deferens) หนูขาว

3.1 ผลต่อการหดตัวของท่ออสุจิเมื่อกระตุ้นท่ออสุจิด้วย KCl

เมื่อให้ KCl ขนาด 50 mM ท่ออสุจิจะหดตัวโดยการเกิด phasic contraction ในช่วงแรกและตามด้วย tonic contraction การหดตัวนี้เกิดจากการเกิด membrane depolarization กระตุ้นให้มีการเปิดออกของ potential operated calcium channel (POC) ชนิด L type เพราะ calcium antagonist เช่น nifedipine, verapamil, diltiazem ที่สามารถยับยั้งการหดตัวที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย KCl จะมีความจำเพาะเจาะจงต่อ L type calcium channel และ potential opertated calcium channel ชนิดอื่นๆ เช่น T , N , P type จะ resistant ต่อ calcium antagonist ในกลุ่ม dihydropyridines เช่น nifedipine ฯลฯ (Tsien, Ellinor, และ Horne, 1991) เมื่อ POC เปิดส่งผลให้ Ca^{2+} จากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ นอกจากนี้ K^+ จะไปมีผลทำให้เกิดการปลดปล่อยของ calcium ที่จับอย่าง high affinity กับ plasma membrane โดยตรง (Hay และ Wadsworth, 1982) ทำให้ Ca^{2+} อิสระภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น ส่งผลทำให้เกิดการหดตัว และจากผลการทดลองพบว่า CU-763-10-01 ขนาด $4.4x10^{-6}$ M และ $4.4x10^{-5}$ M สามารถยับยั้งการหดตัวของท่ออสุจิได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$) และความสามารถในการยับยั้งยังขึ้นอยู่กับปริมาณของสารที่ให้ จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการออกฤทธิ์ของ CU-763-10-01 ลดแรงหดตัวได้อาจจะเกิดเนื่องจากการยับยั้งการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+} จากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ผ่าน POC สำหรับ S.V.และ B_6 ขนาดความเข้มข้นเดียวกัน ไม่มีผลต่อการเกิด phasic อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แสดงให้เห็นว่า การออกฤทธิ์ของ S.V. และ B_6 ไม่เหมือน CU-763-10-01

3.2 ผลต่อการหดตัวของท่ออสุจิเมื่อกระตุ้นด้วย $BaCl_2$

เมื่อให้ $BaCl_2$ ขนาด 1 mM ท่ออสุจิจะหดตัวโดยการเกิด phasic และตามด้วย rhythmic contraction $BaCl_2$ เป็นสารมาตรฐานที่ไม่ได้ออกฤทธิ์ผ่าน specific receptor เป็นที่ทราบกันดีว่านอกจากแคลเซียมแล้ว Ba^{2+} สามารถเคลื่อนที่ผ่านเข่าสู่เซลล์ทาง potential operated

calcium channel ชนิด (POC) ได้ จากการศึกษาของ Hay และ Wadsworth (1992) พบว่า phasic contraction เกิดเนื่องจาก

1. Ba^{2+} จะเป็นตัวทำให้เกิด membrane depolarization ส่งผลทำให้ POC เปิดออก ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์
2. หรือเมื่อ POC เปิดออก Ba^{2+} เคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์ได้มากจึงส่งผลให้ Ca^{2+} หลั่งออกมาจากแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ทำให้อิสระภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น
3. Ba^{2+} เคลื่อนที่ผ่าน POC เข้าสู่ภายในเซลล์มีผลกระตุ้น contractile protein ในกล้ามเนื้อเรียบท่ออสุจิ
4. Ba^{2+} มีผลต่อการปลดปล่อยแคลเซียมที่จับอย่างแน่นหนากับ plasma membrane
5. Ba^{2+} ยับยั้งการเคลื่อนที่ของ K^+ ผ่าน Ba^{2+} sensitive K^+ channel ที่ plasma membrane ของ smooth muscle โดยลด K^+ current outward ทำให้เกิด membrane depolarization ส่งผลให้potential operated calcium channel เปิด (POC) ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ระดับของ Ca^{2+} ภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น ผลที่ตามมาคือ การกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง Ca^{2+} ของจากแหล่งที่เก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ (Huang, 1995)

ส่วน rhythmic contraction เกิดเนื่องมาจาก Ba^{2+} ทำให้เกิด membrane depolarization ส่งผลทำให้ POC เปิดซึ่ง POC นี้จะแยกต่างหากจาก POC ที่ถูกกระตุ้นเมื่อใช้ KCl เพราะ channel นี้มีความไวต่ำต่อ calcium antagonist (Hay และ Wadsworths, 1992) จากผลการทดลองของ CU-763-10-01 พบว่า ลด phasic contraction และไม่มีผลต่อ ความถี่ของ rhythmic contraction ซึ่งผลสอดคล้องกับการกระตุ้นท่ออสุจิด้วย KCl แสดงให้เห็นว่า CU-763-10-01 ออกฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+} จากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ผ่าน POC ซึ่ง sensitive ต่อ calcium antagonist ในกลุ่ม dihydropyridine และไม่มีผลต่อ POC ซึ่ง sensitive ต่ำต่อ calcium antagonist ในกลุ่ม dihydropyridine และจากผลการทดลอง S.V.และ B_6 เพิ่มการหดตัวในการเกิด phasic contraction และ ไม่มีผลต่อความถี่ของ rhythmic contraction แสดงว่า กลไกการออกฤทธิ์ของ S.V.และ B_6 แตกต่างจาก CU-763-10-01

3.3 ผลต่อการหดตัวของท่ออสุจิเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย NE

เมื่อให้ NE ขนาด $1x10^{-6}$ M แก่ท่ออสุจิพบว่าจะหดตัวโดยการเกิด phasic และตามด้วย rhythmic contraction NE ทำให้กล้ามเนื้อเรียบท่ออสุจิหดตัวโดยการกระตุ้น α_1 adrenoceptor NE ให้กล้ามเนื้อเรียบท่ออสุจิหดตัวโดยการกระตุ้น α_{1A} adrenoceptor (Bultmann, Kurz, และ

Starke, 1994; Guh และคณะ, 1995) โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุล คือ เมื่อ α_1 adrenocepter ซึ่ง couple อยู่กับ G protein และ phospholipase C (PLC) ตามลำดับถูกกระตุ้นโดย NE ส่งผลให้เกิดการ hydrolyse ของ phosphatidylinositol - 4,5- bisphosphate (PIP_2) ได้ second messenger คือ DAG และ IP_3 ซึ่ง IP_3 นี้จะไปกระตุ้นให้เกิดการปลดปล่อย Ca^{2+} จากแหล่งเก็บสะสม Ca^{2+} ภายในเซลล์ ทำให้ระดับ Ca^{2}ภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้นจึงทำให้เกิดการหดตัวของท่ออสุจิ (Khoyi และคณะ, 1993) นอกจากนี้การกระตุ้น α_{1A} adrenoceptor ส่งผลทำให้ receptor operated calcium channel (ROC) เปิด Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์จะเข้าสู่ภายในเซลล์และ Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์ที่เข้าสู่ภายในเซลล์นี้จะกระตุ้นการหลั่งของ Ca^{2+} จากแหล่งเก็บสะสม Ca^{2+} ภายในเซลล์ ทำให้ระดับ Ca^{2} ภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้นจึงทำให้เกิดการหดตัว การหดตัวของท่ออสุจินี้ขึ้นอยู่กับ extracellular calcium เนื่องจาก calcium channel antagonist ในกลุ่ม dihydropyridine , diphenylalkylamine สามารถยับยั้งการหดตัวนี้ได้ และ ยังขึ้นกับ intracellular calcium เพราะใน Ca^{2+} free solution การหดตัวยังเกิดขึ้นได้ (Vesperinas และคณะ, 1989) จากการทดลองจะเห็นว่า CU-763-10-01 สามารถยับยั้งการหดตัวของท่ออสุจิได้ ขึ้นอยู่กับปริมาณของสาร พบว่า ใน CU-763-10-01 ขนาด $4.4x10^{-6}$ M พบว่าไม่ลดการหดตัวที่ถูกกระตุ้นจาก NE ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และเมื่อให้ CU-763-10-01 ขนาด $4.4x10^{-5}$ M ลดการหดตัวของท่ออสุจิได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กลไกการยับยั้งการหดตัวของที่ CU-763-10-01 น่าจะมีผลยับยั้งต่อ α_{1A} adrenoceptor หรืออาจไปยับยั้ง receptor operated calcium channel (ROC) สำหรับ S.V. เพิ่มการหดตัวใน phasic contraction และ B_6 ไม่มีผลต่อการหดตัวเมื่อกระตุ้นด้วย NE แสดงว่า S.V.และB_6 ออกฤทธิ์ไม่เหมือนกับ CU-763-10-01

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาเบื้องต้นทางเภสัชวิทยาพบว่า CU-763-10-01 สามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อลำไส้เล็กของกระต่ายได้เกือบสมบูรณ์ทั้งการหดตัวที่เกิดขึ้นเอง(spontaneous contraction) และเมื่อกระตุ้นด้วย Ach, 5HT, KCl และ $BaCl_2$ สาร CU-763-10-01 สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดแดงเมื่อกระตุ้นด้วย KCl นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ลดการหดตัวของกล้ามเนื้อท่ออสุจิ เมื่อกระตุ้นด้วย NE, KCl และ $BaCl_2$ แสดงให้เห็นว่า CU-763-10-01 ออกฤทธิ์เป็น nonspecific antagonist ดังนั้นกลไกที่ CU-763-10-01 มีผลลดการหดตัวน่าจะเป็นกลไกที่เกิดร่วมกัน แม้ว่าจะใช้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวที่แตกต่างกัน เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณ Ca^{2+}อิสระภายในเซลล์ที่เพิ่มขึ้น (Botton,1979a;

Kiraki และคณะ, 1988) โดยเฉพาะเมื่อมีการจับกันระหว่างสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวกับตัวรับสัมผัสของสารกระตุ้นนั้น เช่น Ach และ 5HT จับกับ specific receptor เกิด membrane depolarization ส่งผลให้ ROC เปิด Ca^{2+} จากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ และเมื่อกระตุ้นด้วย KCl , $BaCl_2$ เกิด membrane depolarization ส่งผลให้ POC เปิด Ca^{2+} จากภายนอกเข้าสู่ภายในส่งผลทำให้เกิดการหดตัว เพราะฉะนั้นการที่ CU-763-10-01 สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่ใช้ในการศึกษา เมื่อกระตุ้นด้วยสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวชนิดต่าง ๆ ได้ เนื่องจาก CU-763-10-01 มีผลไปยับยั้งการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+}ภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ ผ่านทาง ROC หรือ POC เป็นกลไกหลัก ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ CU-763-10-01 ลด phasic contraction ของท่ออสุจิเมื่อกระตุ้นด้วย NE, KCl, $BaCl_2$ นอกจากนี้จากผลการทดลองยังพบว่า ในหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของกระต่าย CU-763-10-01 เสริมฤทธิ์ของ NE และ 5HT ในการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ส่วนในท่ออสุจิ (vas deferens) ของหนูขาว CU-763-10-01 ยับยั้งการหดตัวอย่างสมบูรณ์เมื่อกระตุ้นด้วย NE ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของ CU-763-10-01 ในการเสริมฤทธิ์ของ NE และ 5HT ยังไม่สามารถอธิบายได้ แต่จากการศึกษาพบว่าในหลอดเลือด (aorta) และ ท่ออสุจิ (vas deferens) มี $\alpha_1$subtype ต่างกัน ในหลอดเลือด (aorta) มี α_{1B}, α_{1L} (Muramatsu, Kigoshi, และ Oshita, 1990) และท่ออสุจิ (vas deferens) มี α_{1A} adrenoreceptor (Bultmann, Kurz, และ Strake, 1994) และจากที่กล่าวมาแล้วว่าการหดตัวของหลอดเลือดแดงเมื่อกระตุ้นด้วย NE ขึ้นกับแคลเซียมภายในเซลล์เป็นหลัก เนื่องจากการหดตัวที่เกิดขึ้นนี้ถูกยับยั้งได้เล็กน้อยด้วย calcium antagonist และยังคงเกิดการหดตัวได้ใน Ca^{2+} free solution สำหรับการหดตัวของท่ออสุจิต้องอาศัยแคลเซียมทั้งจากภายนอกและภายในเซลล์ เนื่องจากการหดตัวเมื่อกระตุ้นด้วย NE นี้ ถูกยับยั้งได้ด้วย calcium antagonist และการหดตัวเกิดขึ้นได้ใน Ca^{2+} free solution เมื่อกระตุ้นด้วย NE จากผลการทดลองนี้คาดว่า CU-763-10-01 มีกลไกหลักคือการยับยั้งการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ผ่านทาง POC และ ROC ดังนั้น CU-763-10-01 จึงสามารถยับยั้งการหดตัวในท่ออสุจิเมื่อกระตุ้นด้วย NE แต่ไม่สามารถยับยั้งการหดตัวในหลอดเลือดได้ การที่ CU-763-10-01 เสริมฤทธิ์ของ NE และ 5HT ในการหดตัวของหลอดเลือดแดง ขอเสนอกลไกที่คาดว่าน่าจะเป็นไปได้คือ เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า NE และ 5HT กระตุ้น receptor ส่งผลให้เกิด IP_3ขึ้น ขณะเดียวกันการกระตุ้น receptor จะเกิด membrane depolarization ทำให้ Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ผ่าน ROC CU-763-10-01 อาจไปยับยั้ง mediator บางตัวที่มีผลต่อกลไกการเปิดของ ROC แล้วทำให้ mediator นั้นมีผลเสริมกลไกในการเกิด IP_3 ทำให้เกิด IP_3 มากขึ้น

CU-763-10-01 เป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นทางเภสัชวิทยาของ CU-763-10-01 ซึ่งจากการศึกษาคาดว่า CU-763-10-01 อาจจะนำมาใช้เป็นสารต้นแบบในการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อ receptor ได้ แต่อย่างไรก็ตามน่าจะมีการศึกษารายละเอียดเพิ่มเติมให้มากขึ้นและศึกษาผลต่อกล้ามเนื้อเรียบในอวัยวะอื่นๆ เพื่อเป็นข้อมูลในการพิจารณาว่าสมควรจะนำมาพัฒนาเพื่อมาใช้เป็นยาหรือไม่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย