# บทที่ 4

## อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

KCl 100 mM ทำให้เกิด biphasic contraction ของท่อนำอสุจิหนูขาว คือมี phasic และ tonic contraction ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ส่วนของ prostatic part เพราะให้แอมปลิจูดที่สูงกว่าและกระตุ้น $^{45}Ca$-uptake ได้มากกว่า epididymal part(Hay และ Wadsworth, 1982a) จากผลการวิจัยนี้พบว่าเมื่อให้คาเฟอีนความเข้มข้น 3, 6 และ 10 mM (รูปที่ 5,6 และ 7) ยับยั้งทั้ง phasic และ tonic ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาของ Burdyga และ Magura (Burdyga และ Magura, 1986) ที่ศึกษาในกล้ามเนื้อเรียบท่อไตของหนูตะเภา โดยใช้คาเฟอีนความเข้มข้น 2, 10 และ 20 mM. เมื่อพิจารณาการหดตัวซึ่งเกิดจากการให้ KCl ในส่วนของ phasic part นั้นมีรายงานว่า 25% ของการตอบสนองเกิดจากมีการหลั่ง noradrenaline การตอบสนองที่เหลือเกิดจากผลโดยตรงต่อกล้ามเนื้อเรียบ (Hay และ Wadsworth, 1981) สำหรับในกล้ามเนื้อเรียบนั้น K-contraction เกิดจากการเพิ่ม membrane permeability ต่อแคลเซียม(Bolton,1979) ในรายงานวิจัยเกี่ยวกับกล้ามเนื้อของอวัยวะภายใน (visceral muscles)มีหลักฐานแสดงว่า phasic และ tonic ของ KCl อาศัย activator calcium จากแหล่งที่ต่างกัน (Imai และ Takeda 1967; Urakawa และ Holland, 1964; Shimo และ Holland, 1966; Syson และ Huddart, 1973) โดยที่ phasic response เกิดจากการเพิ่ม spike discharge อย่างมาก (Burnstock และ Holman, 1963; Chapman และ Holman, 1968; Syson และ Huddart, 1976) และยับยั้งได้ด้วย lanthanum และ $Ca^{2+}$ - free medium (Huddart และ Saad, 1977, 1978 barratt และ Huddart,1979) ดังนั้น phasic phase อาจเกิดจาก influx ของแคลเซียมภายนอกเซลล์ร่วมกับการเกิด spikes ขณะมี depolarization ส่วน tonic response แสดงถึงการเพิ่มของ myoplasmic free calcium อย่างคงที่ระหว่างที่เกิด depolarization ในการศึกษา calcium induced calcium release (Cheng, 1976; Barratt และ Huddart, 1979; Alohan และ Huddart, 1979) มีข้อเสนอแนะว่า K-induced tonic contracture เกิดจาก influx ของแคลเซียมไปกระตุ้นการหลั่งของแคลเซียมจากแหล่งแคลเซียมในเซลล์

คาเฟอีนมีผลต่อกล้ามเนื้อเรียบทั้งยับยั้งหรือกระตุ้นหรือใน tissue เดียวกัน อาจเริ่มต้นด้วยการกระตุ้นแล้วกลายเป็นยับยั้งในเวลาต่อมา (Bolton, 1979) รวมทั้งในการศึกษานี้ ซึ่งพบว่าคาเฟอีนยับยั้งทั้ง phasic และ tonic responses ของ KCl ชี้ให้เห็นว่าคาเฟอีนเป็น nonspecific Ca antagonist โดยฤทธิ์ยับยั้งนี้อาจเกิดจากไปลด membrane permeability ต่อแคลเซียม (Syson และ Huddart, 1976) หรือเกิดจากยับยั้ง Ca-influx ควบคู่กับการกระตุ้น intracellular calcium binding (Huddart และคณะ, 1983) หรือโดยยับยั้ง Ca-influx อย่างเดียวซึ่งเป็นผลให้แคลเซียมในเซลล์ลดลง Huddart และ Syson ในปี 1975 เสนอแนะว่าฤทธิ์ของคาเฟอีนต่อกล้ามเนื้อเรียบมี 2 phase phase แรกเกิดจากคาเฟอีนไปลด membrane calcium permeability ทำให้ลด Ca-influx ลด spike discharge และ phasic contracture ส่วน phase ต่อมาเป็นการกระตุ้นให้มี intracellular calcium binding ซึ่งมีผลยับยั้ง tonic contracture มีรายงานยืนยันว่าคาเฟอีนยับยั้ง Ca-influx ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย high K ทั้งใน aorta และ taenia coli (Ahn และคณะ, 1988) $Ca^{2+}$ - activator (Bay K 8644, CGP 28,392) ไม่ยับยั้ง inhibitory effect ของคาเฟอีน (Schramm และคณะ, 1983; Truog และคณะ, 1984; Karaki และคณะ, 1986) แต่ $Ca^{2+}$ - activator ดังกล่าวยับยั้งผลของ Verapamil, ditiazem และ dihydropyridine ยกเว้น diphenylalkylamine $Ca^{2+}$ antagonists (Spedding และ Berg, 1984) ดังนั้นคาเฟอีนอาจยับยั้ง Ca-channel โดยตรงเช่นเดียวกับ diphenylalkylamine หรือไม่ก็อาจมีผลต่อ Ca-channel โดยอ้อมด้วยกลไกบางอย่าง ซึ่งยังไม่สามารถอธิบายได้

ขนาดของคาเฟอีนที่ใช้ในการยับยั้ง KCl-contraction เป็นขนาดที่ค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับสารชนิดอื่นเช่น verapamil ซึ่งใช้ขนาดน้อยกว่า ($4 \times 10^{-6}$ - $1.2 \times 10^{-5}$) จึงอาจกล่าวได้ว่าฤทธิ์ของคาเฟอีนในการยับยั้ง KCl-contraction คงไม่เด่นชัด ในขนาดต่ำ ๆ

เป็นไปได้ว่า inhibitory effect ของคาเฟอีน mediated โดย cAMP เนื่องจากคาเฟอีนมีคุณสมบัติเหมือน methylxanthine อื่นๆ คือยับยั้ง phosphodiesterase

1103130047

enzyme (Kukovetz และ Poch, 1970; Andersson,1973; Poch และ Umfahrer, 1976) ซึ่งเอนไซม์ตัวนี้จะเปลี่ยน cAMP และ cGMP ให้เป็น inactive 5'AMP และ 5'GMP ซึ่งทั้ง cAMP และ cGMP เกี่ยวข้องกับ phosphorylation โดยกระตุ้น protein kinase เพื่อควบคุม membrane permeability และ ion movements ภายในเซลล์ (Weiss และ Hait,1977) มีหลักฐานเด่นชัดที่แสดงว่า cAMP มีบทบาททำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบโดยกระตุ้น $Ca^{2+}$ extrusion (Tomiyama และคณะ,1973; Bulbring และ Hertog,1980) และกระตุ้น intracellular calcium binding (Mueller และ Breemen, 1979) นอกจากนี้ยังยับยั้ง high-potassium-stimulated $Ca^{2+}$-influx (Meisheri และ Breemen, 1982) แต่อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่าง contractile state ของกล้ามเนื้อเรียบและระดับของ cyclic nucleotide ก็ยังเป็นข้อโต้แย้งกันอยู่ แม้ว่าจะเป็นที่ทราบกันว่าการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเกิดจากการลดลงของ cAMP และ/หรือ การเพิ่มขึ้นของ cGMP ก็ตามก็ยังพบว่าในกล้ามเนื้อเรียบบางชนิดไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ cAMP และ contractile state (Diamond และ Hartle, 1974; Reinhardt และคณะ, 1977) นอกจากนี้ dibutyryl cyclic AMP ยังช่วยเพิ่ม tension และการตอบสนองต่อ KCl ของลำไส้ และท่อนำอสุจิหนูขาว แต่ไม่มีผลต่อ $^{45}Ca$-uptake โดย microsomes (Saad และ Huddart, 1980)

เหตุผลหนึ่งซึ่งนำมาอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของคาเฟอีน (รวมทั้ง methylxanthine อื่น ๆ) ได้คือคาเฟอีนมี interact กับ adenosine receptor โดยมีหลักฐานแสดงว่าคาเฟอีน, theophylline, theobromine และ xanthine derivatives อื่น ๆ สามารถยับยั้งadenosine receptors ของเซลล์ไขมัน (fat cells)และที่ระบบประสาทส่วนกลาง (Fredholm, 1980; Daly และคณะ, 1981; Fredholm และ Persson, 1982) ส่วนในเซลล์กล้ามเนื้อนั้นก็พบว่าคาเฟอีนแข่งขันกับ ATP เพื่อจับกับ calcium transport sites ใน sarcoplasmic reticulum ของกล้ามเนื้อหัวใจกบ (Chapman และ Miller, 1974) ส่วน adenosine receptors นี้เกี่ยวข้องกับการควบคุมการตอบสนองของเซลล์ต่อฮอร์โมนและสารสื่อประสาทต่างๆ (Schubert และคณะ 1979; Fredholm และ Hedquist, 1980) และ purine nucleotides เองนั้นก็มีฤทธิ์โดยตรงต่อสารสื่อประสาทหรือ modulators ต่าง ๆ ของ กล้ามเนื้อเรียบ อวัยวะภายในของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammaliam visceral muscles) (Burnstock,1981)

จากผลการทดลองจะเห็นว่าคาเฟอีนมีฤทธิ์ยับยั้ง NE-induced contraction ได้ดังรูปที่ 8b, c, d, e รูปที่ 9 และ 10

เมื่อกระตุ้นท่อนำอสุจิด้วย NE ทำให้มีการหดตัว 2 แบบ คือ phasic และ tonic สำหรับท่อนำอสุจิหนูขาวเป็นที่ทราบว่าได้รับเลี้ยง โดยประสาท sympathetic (Holman, 1975) และ NE ทำให้เกิดการหดตัวของท่อนำอสุจิโดยมีฤทธิ์โดยตรงต่อกล้ามเนื้อเรียบ ซึ่งเฉพาะเจาะจงที่ post-synaptic $\alpha$ -receptors สำหรับกล้ามเนื้อเรียบผนังหลอดเลือดพบว่า NE เพิ่ม $^{45}Ca$ influx และ net calcium uptake (Godfraind, 1979; Karaki และ Weiss, 1980; Meisheri และคณะ, 1981) นอกจากนี้ยังชักนำให้เกิดการหดตัวในสารละลายที่ปราศจากแคลเซียม (Deth และ Van Breemen, 1974) โดยการวิจัยดังกล่าวเสนอว่า NE ไปเพิ่ม cytosolic calcium โดยเพิ่มทั้งการนำผ่านของแคลเซียมนอกเซลล์เข้าไปในเซลล์และปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บแคลเซียมภายในเซลล์ แต่อย่างไรก็ตาม Khoyi และคณะ (Khoyi และคณะ 1987) พบว่า NE ไม่ได้เพิ่ม $^{45}Ca$-influx นอกจากจะไม่เพิ่ม influx แล้วยังยับยั้ง K-induced $^{45}Ca$-influx ด้วย และคณะผู้วิจัยเดียวกันนี้ (Khoyi และคณะ,1988) ได้ศึกษาเพิ่มเติมถึงบทบาทของ NE-induced $Ca^{2+}$ translocation ในกล้ามเนื้อเรียบของท่อนำอสุจิ สรุปได้ว่า NE ไม่ได้กระตุ้น $Ca^{2+}$-influx แต่กระตุ้นการหลั่งของแคลเซียมจากแหล่งเก็บภายในเซลล์ โดยผ่านทาง formation ของ inositol triphosphate ($IP_3$) ใน aorta นั้นคาเฟอีนยับยั้ง NE-induced contraction ได้มากกว่า control เมื่อให้คาเฟอีนต่อไปอีกระหว่าง $Ca^{2+}$ loading period พบว่าไปยับยั้ง NE-induced contraction (Karaki และคณะ, 1979, 1988) แสดงว่าคาเฟอีนยับยั้ง NE-induced $Ca^{2+}$ -release จากผลการทดลองนี้พบว่าคาเฟอีนยับยั้งทั้ง phasic และ tonic component ของ NE แสดงว่านอกจากจะยับยั้ง $Ca^{2+}$-influx แล้ว (จากผลการทดลองด้วย KCl) คาเฟอีนยังยับยั้งการหลั่งแคลเซียมด้วย

ในท่อนำอสุจิหนูขาวนั้นส่วน epididymal part จะตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย 5-HT ได้เด่นชัดกว่า prostatic part ผลการทดลองนี้พบว่าทั้ง phasic และความถี่ของ rhythmic contraction ถูกยับยั้งโดยคาเฟอีนที่ทุกความเข้มข้น (รูปที่11, 12 และ 13) มีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับกลไกของ 5-HT contraction การศึกษาทางเคมีของเซลล์

และชีวเคมีพบว่าในสภาวะที่เหมาะสม exogenous 5-HT สะสมในแหล่งเก็บ NE ในปลายประสาท (neuronal noradrenaline store) ของท่อนำอสุจิ (Jaim-Elcheverry และ (Zieher, 1969; Thoa และคณะ,1969) Nishino และคณะ (1970) พบว่า 5-HT contraction ถูกยับยั้งโดย phentolamine, reserpine และ imipramine แต่ผลการศึกษาของ Ozawa และ Katsuragi (1974) สรุปว่า phasic component เกิดผ่าน postjunctional 5-HT receptors แต่ phase หลังเกิดจากการหลั่งของNE และ Hay และ Wadsworth (1982) ได้ศึกษาท่อนำอสุจิของหนูขาวโดยได้ผลการทดลองคล้าย ๆ กัน แต่สรุปเพิ่มเติมได้ว่า rhythmic contraction เกิดผ่านทั้ง 5-HT receptor และ noradrenaline release ซึ่ง 5-HT contraction นี้อาศัยแคลเซียมนอกเซลล์

จากการศึกษานี้พบว่าที่ความเข้มข้นของคาเฟอีนเป็น 1 และ 3 mM พบว่าทำให้ amplitude ของ rhythmic contraction ที่เกิดจาก 5-HT เพิ่มขึ้น (รูปที่ 11b และ c) คล้ายกับว่าฤทธิ์ของ 5-HT ถูกยับยั้งแบบไม่สมบูรณ์ (complete) เป็นไปได้ว่าคาเฟอีนที่ความเข้มข้นดังกล่าวจะกระตุ้นการหลั่ง NE จากแหล่งเก็บที่ปลายประสาท เนื่องจากว่าแอมปลิจูดของ rhythmic contraction ที่ induce โดย 5-HT นี้ส่วนใหญ่เกิดจากการหลั่งของ NE (Hay และ Wadsworth, 1982)

การที่คาเฟอีนยับยั้ง 5-HT induced contraction ทั้ง phasic และ rhythmic แบบ dose-dependence ก็เป็นอีกตัวอย่างหนึ่งซึ่งแสดงให้เห็นว่าคาเฟอีนเป็นเหมือน Ca antagonist ที่มีฤทธิ์แบบ non-specific และน่าจะมีกลไกแตกต่างจาก calcium channel inhibitors (verapamil, nifedipine) เพราะ calcium channel inhibitors เฉพาะเจาะจงต่อ phasic contraction ของ 5-HT มากกว่า (Hay และ Wadworth, 1982b) แต่คาเฟอีนยับยั้งทั้ง phasic และ tonic contraction ได้ไม่แตกต่างกัน

สำหรับผลของคาเฟอีนต่อ $BaCl_2$-induced contraction นั้นพบว่า phasic part ถูกยับยั้งโดยคาเฟอีนเฉพาะความเข้มข้น 10 mM (รูปที่ 14 e และ16)

มีผู้เสนอแนะว่า phasic contraction อาจเกิดจากการเพิ่ม $Ca^{2+}$-uptake ผ่าน voltage dependent channel แล้วกระตุ้น contractile protein (Hay และ Wadsworth, 1984)

ฤทธิ์ยับยั้งของคาเฟอีนต่อ phasic contraction ดูคล้ายกับฤทธิ์ของ verapamil ที่ยับยั้ง rhythmic contraction ของ $BaCl_2$ (Chantana, 1986) เฉพาะที่ความเข้มข้นสูง ๆ กลไกของ phasic contraction จาก $BaCl_2$ อาจแตกต่างจาก agonists ตัวอื่น ๆ เพราะ resistant ต่อคาเฟอีนมากกว่า เป็นไปได้ว่า phasic response นี้นอกจากจะอาศัย $Ca^{2+}$-influx แล้วอาจเป็นจากการ release ของ intracellular calcium ด้วย (Mishra และคณะ, 1988) หรืออาจเป็นเพราะการที่ $Ba^{2+}$ สามารถไปกระตุ้น contractile protein หรือ regulatory protein ได้โดยตรงโดยไม่อาศัยแคลเซียมเช่นเดียวกับในกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด (Timothy และคณะ, 1984)

Rhythmic contraction ของ $BaCl_2$ sensitive ต่อคาเฟอีนมากกว่า phasic part จากข้อสรุปของ Hay และ Wadsworth (Hay และ Wadsworth, 1984) พบว่า rhythmic contraction อาจเกิดจากการเข้าเซลล์ของ trigger $Ca^{2+}$ ผ่านทาง membrane channel ที่ไม่ sensitive ต่อ Ca-channel inhibitors ไปกระตุ้นการหลั่งของ intracellular calcium แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ของคาเฟอีนต่อ $BaCl_2$-induced contraction นี้เฉพาะเจาะจงต่อ $Ca^{2+}$-release มากกว่า

แม้ว่าทั้ง $BaCl_2$ และ 5-HT จะก่อให้เกิด rhythmic contraction เช่นเดียวกันแต่ก็มีกลไกที่แตกต่างกัน โดย rhythmic contraction ของ $BaCl_2$ ไม่ได้ mediated โดยการหลั่ง noradrenaline หรือ receptor systems ใด ๆ (Weiss, 1977) แต่ของ 5-HT mediated โดย 5-HT receptors และการหลั่งของ noradrenaline

สำหรับ KCl และ NE ถึงแม้กลไกที่ทำให้เกิดการหดตัวจะแตกต่างกัน แต่ผลของคาเฟอีนที่ยับยั้งทั้ง phasic และ tonic parts ของ agonists ทั้งสอง (เด่นชัดที่ความเข้มข้นของคาเฟอีนเป็น 3, 6 และ 10 mM) เป็นแบบ dose-dependence เช่นเดียวกัน (รูปที่ 5 และ 8)

สำหรับ in vivo คาเฟอีนเป็น potent stimulants ต่อระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) มีฤทธิ์เพิ่มการทำงานของระบบประสาท sympathetic มีผลต่อหน้าที่ทางสรีรวิทยาของท่อนำอสุจิทำให้มี ejaculation การบริโภคคาเฟอีน 250 mg ทำให้มี NE ในกระแสเลือด 10 ug/ml ความเข้มข้นของคาเฟอีนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ที่ต่ำสุดคือ 1 mM พบว่าอยู่ช่วงความเข้มข้นเดียวกับความเข้มข้นของคาเฟอีนในเลือดของผู้ตายซึ่งบริโภคคาเฟอีนมากเกินขนาดคือ 80 ug/ml ถึง 1 mg/ml (หรือมากกว่า) (Theodore W.Rall, 1985) ซึ่งถ้าวิเคราะห์ตามผลการทดลองของการวิจัยครั้งนี้แล้วกล่าวได้ว่าการบริโภคเครื่องดื่มที่ประกอบด้วยคาเฟอีนในชีวิตประจำวันของคนทั่วไปจะไม่มีผลต่อหน้าที่ตามปกติของท่อนำอสุจิ เนื่องจากความเข้มข้นของคาเฟอีนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จัดเป็นขนาดที่ทำให้เกิดพิษ (toxic dose)

## สรุป

1. คาเฟอีนมีผลต่อ agonists-induced contraction ของท่อนำอสุจิโดยผลที่ได้อาจเหมือนกันหรือแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของ agonists (KCl, $BaCl_2$, NE และ 5-HT) ในแต่ละ parts ของการหดตัว (phasic, tonic และ rhythmic) และในแต่ละความเข้มข้นของคาเฟอีน แต่ผลส่วนใหญ่เป็นผลยับยั้ง

2. ฤทธิ์ของคาเฟอีนต่อ agonists-induced contraction ของท่อนำอสุจิเป็น nonspecific antagonists มีผลไปยับยั้ง $Ca^{2+}$ influx หรือ $Ca^{2+}$ release ด้วยกลไกต่าง ๆ เช่นไปลด calcium permeability พร้อมกับกระตุ้น intracellular calcium binding