บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

CU 763-15-13 เป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ และยังไม่มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะศึกษาผลของ CU 763-15-13 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่แยกจากสัตว์ทดลอง ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้กล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วนต้นและหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากกระต่าย และท่อนำอสุจิและหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกหนูขาว เพราะกล้ามเนื้อเรียบในแต่ละอวัยวะจะมีการตอบสนองต่อสารกระตุ้นหรือ neurotransmitter แตกต่างกัน การใช้กล้ามเนื้อเรียบในหลายอวัยวะจะทำให้ศึกษาตำแหน่งและกลไกการออกฤทธิ์ของ CU 763-15-13 ต่อ tissue receptor ได้มากขึ้น

จากการศึกษาเบื้องต้นถึงผลของ CU 763-15-13 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วนต้นของกระต่าย พบว่า CU 763-15-13 สามารถยับยั้งการหดตัวลำไส้เล็กของกระต่ายได้เมื่อเกิด spontaneous contraction และเมื่อกระตุ้นด้วยสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว Ach, $BaCl_2$ และ KCl โดยการยับยั้งเป็นไปตามขนาดความเข้มข้น (dose dependent) จากผลการทดลองอาจกล่าวได้ว่า CU 763-15-13 ออกฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non specific antagonist) กลไกหลักน่าจะเกิดจาก CU 763-15-13 มีผลยับยั้งผ่านทาง receptor-operated calcium channel (ROC) และ voltage-operated calcium channel (VOC)

การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ (intracellular free calcium) ซึ่งแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ที่เพิ่มขึ้นระหว่างการหดตัวนั้นอาจมาจากแคลเซียมภายนอกเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์โดยตรง หรืออาจมาจากแคลเซียมที่ปลดปล่อยออกมาจากแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ (Rang และ Dale, 1995 ; Horowitz, และคณะ, 1996) กลไกที่ทำให้แคลเซียมเข้าสู่ภายในเซลล์โดยอาศัยการกระตุ้นในกล้ามเนื้อเรียบหดตัวโดยใช้ตัวกระตุ้นที่มีกลไกการกระตุ้นให้กล้ามเนื้อเรียบหดตัวต่างกัน พบว่าแคลเซียมเคลื่อนเข้าสู่ภายในเซลล์ 2 pathway คือ ผ่านทาง VOC และ ROC ดังนั้นจึงใช้ agonist 2 ชนิด NE และ 5-HT ในการกระตุ้น ROC และใช้ $BaCl_2$ และ KCl ในการกระตุ้น VOC จากผลการทดลองสามารถอภิปรายผลได้ดังนี้

การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อกระตุ้นด้วย NE

กลไกที่ทำให้กล้ามเนื้อเรียบหดตัวเมื่อกระตุ้นด้วย norepinephrine นั้น เกิดจากการที่ NE ไปจับที่ α_1-adrenoceptor ซึ่ง couple อยู่กับ G protein ทำให้กระตุ้นการทำงานของ phospholipase C (PLC) แล้วเกิดการ hydrolysis ของ PIP_2 ได้ second messenger 2 ตัว คือ IP_3 และ DAG IP_3 จะกระตุ้นให้มีการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ นอกจากนี้การกระตุ้น α_1-adrenoceptor โดย NE ทำให้เกิด membrane depolarization กระตุ้นให้มีการเปิดออกของ ROC ทำให้แคลเซียมจากนอกเซลล์เคลื่อนเข้าสู่ภายในเซลล์ (Lee และ Stetizel ; 1994) จากกลไกดังกล่าวทำให้ระดับของแคลเซียมอิสระภายในเซลล์สูงขึ้น ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบได้ และระดับของแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ที่สูงขึ้นนั้นทำให้เกิด CICR

เมื่อกระตุ้นท่อนำอสุจิหนูขาวด้วย NE จะเกิดการตอบสนองโดยมีการหดตัวอย่างรวดเร็วเป็น phasic contraction และตามด้วย rhythmic contraction การหดตัวของท่อนำอสุจิหนูขาวนี้จะขึ้นกับ extracellular calcium เนื่องจาก calcium antagonist สามารถยับยั้งการหดตัวในส่วนนี้ได้ และขึ้นกับ intracellular calcium เพราะในสารละลายที่ปราศจากแคลเซียมการหดตัวยังเกิดขึ้นได้ (Verperinas, 1989) ส่วนการหดตัวของหลอดเลือดเมื่อกระตุ้นด้วย NE จะเกิดการตอบสนองอย่างรวดเร็วเป็น phasic contraction และตามด้วย tonic contraction โดยการหดตัวในส่วน phasic นั้นจะขึ้นกับ intracellular calcium (Rapoport, 1987) และการหดตัวในส่วน tonic นั้นจะขึ้นกับ extracellular calcium (Nishimura, Ota และ Ito, 1991) การกระตุ้นหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวด้วย NE ในสารละลายที่ปราศจากแคลเซียม การหดตัวยังเกิดขึ้นได้ (Nogueta และ D'con, 1993) โดยหลอดเลือดจะหดตัวอย่างรวดเร็วเกิดเป็น phasic contraction จากนั้นคลายตัวลดต่ำลง เนื่องจาก ปริมาณแคลเซียมในแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์มีจำกัด และแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ที่เพิ่มขึ้นนี้ถูกขับออกจากเซลล์ ซึ่งจากผลดังกล่าวแสดงว่า NE ทำให้มีการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์

จากผลการทดลองพบว่า CU 763-15-13 สามารถลดการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่สามารถลดการหดตัวของท่อนำอสุจิหนูขาวและหลอดเลือดแดงใหญ่กระต่ายเมื่อกระตุ้นด้วย NE ได้ ซึ่งผลที่ได้แตกต่างกับผลของ papaverine โดย papaverine ขนาด 5×10^{-5} M สามารถลดการหดตัวของท่อนำอสุจิหนูขาว หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวและกระต่ายได้ จากการที่ CU 763-15-13 มีผลยังยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อในแต่ละ

อวัยวะได้แตกต่างกันเมื่อกระตุ้นด้วย NE คาดว่าเนื่องจาก NE ทำให้กล้ามเนื้อเรียบเกิดการหดตัวจะกระตุ้นผ่านทางα_1- adrenoceptor และที่หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว หลอดเลือดแดงใหญ่กระต่าย และท่อนำอสุจิหนูขาวมีความแตกต่างกัน โดยที่หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เป็นชนิด α_{1d} -adrenoceptor (Fagura, Lydford และ Dougall, 1997 ; Testa และคณะ, 1995 ; Bucher และคณะ, 1996) หลอดเลือดแดงใหญ่กระต่ายเป็นชนิด α_{1b} -adrenoceptor (Muramatsu และคณะ,1990; Hieble และ Bond , 1994) และท่อนำอสุจิหนูขาวเป็นชนิด α_{1a}-adrenoceptor (Aboung, Shafil และ Dochrety , 1993; Kenny และ คณะ, 1994 : Burt, Chapple และ Marshall, 1995) โดยที่แต่ละ subtype จะมีกลไกเกี่ยวกับการเคลื่อนที่ผ่านเข้าเซลล์ต่างกัน คือ เมื่อกระตุ้น α_{1a}-adrenoceptor จะทำให้แคลเซียมผ่านเข้าเซลล์ทาง nifidipine-sensitive Ca^{2+} channel ซึ่งสามารถยับยั้งได้ด้วย Ca^{2+} blocker (Han, Abel และ Minneman, 1987) แต่เมื่อกระตุ้น α_{1b}-adrenoceptor แคลเซียมจะผ่านทาง inosital phospholipid pathway channel ซึ่ง Ca^{2+} blocker ไม่สามารถยับยั้งได้ (Minneman, 1988) แสดงดังภาพที่ 67 สำหรับการกระตุ้น α_{1d} -adrenoceptor กลไกที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของแคลเซียมเข้าสู่เซลล์นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่พบว่าการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวเมื่อกระตุ้น α_{1d} -adrenoceptor นั้น จะเกี่ยวข้องกับการ hydrolysis ของ PIP_2 และยังขึ้นกับการเคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์โดยผ่าน nifedipine - sensitive Ca^{2+} channel (Nishimura, Ota และ Ito, 1991) จากการที่ CU 763-15-13 สามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว แต่ไม่มีผลต่อการหดตัวของท่อนำอสุจิหนูขาว และหลอดเลือดแดงใหญ่กระต่าย เมื่อกระตุ้นด้วย NE อาจเป็นไปได้ว่า CU 763-15-13 มีความจำเพาะเจาะจงต่อ α_{1d} -adrenoceptor และการยับยั้งของ CU 763-15-13 น่าจะออกฤทธิ์ยับยั้งผ่านกลไกทาง ROC หรืออาจมีผลต่อ intracellular mediator ทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์ลดลง

ใน Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit solution เป็นสภาวะที่ไม่มีปริมาณของแคลเซียมภายนอกเซลล์ ดังนั้นการกระตุ้นหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวด้วย NE .แล้วเกิดการหดตัว อาจกล่าวได้ว่าเป็นผลมาจากแคลเซียมที่หลั่งออกมาจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ จากการทดลองพบว่า CU 763-15-13 สามารถลดการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากหนูขาวเมื่อกระตุ้นด้วย NE ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า CU 763-15-13 มีผลรบกวนการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ ซึ่งยืนยันผลการทดลองโดยใช้ KCl เป็นตัวกระตุ้นให้มีการหดตัวของหลอดเลือดใน Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit solution ในสภาวะที่ไม่มีปริมาณแคลเซียมภายนอกเซลล์ เมื่อให้ KCl หลอดเลือดจะมีการหดตัวโดยในระยะแรกการหดตัวจะ

ค่อยเป็นไปอย่างช้าๆ เนื่องจาก KCl ทำให้เกิด membrane depolarization กระตุ้นให้มีการหลั่งของแคลเซียมจากภายในเซลล์ ผลการทดลองปรากฏว่าให้ผลเช่นเดียวกันคือ CU 763-15-13 สามารถลดการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากหนูขาวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อกระตุ้นด้วย 5-HT

5-HT ทำให้กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดเกิดการหดตัว โดยในปัจจุบันจะแบ่ง 5-HT receptor ออกเป็น 4 กลุ่ม 5-HT_1, 5-HT_2, 5-HT_3, และ 5-HT_4 (Zifa และ Fillon, 1992 : Rang, Dale และ Ritter, 1995) โดย 5-HT receptor ที่เกี่ยวข้องกับการหดตัวของหลอดเลือดส่วนใหญ่จะเป็น 5-HT_2 receptor เช่นในหลอดเลือดแดงใหญ่กระต่าย (Clancy และ Maayani, 1985) และหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว (Killam และคณะ, 1990) 5-HT ทำให้หลอดเลือดหดตัวโดยไปกระตุ้น 5-HT_2 receptor ซึ่ง couple อยู่กับ G-protein ทำให้มีการกระตุ้น phospholipase C (PLC) ทำให้เกิดการ hydrolysis ของ PIP_2 เกิด IP_3 และ DAG ซึ่ง IP_3 นี้จะไปกระตุ้นให้เกิดการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บแคลเซียมภายในเซลล์ (Wang และคณะ, 1991) ทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์สูงขึ้น จึงทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ นอกจากนี้การออกฤทธิ์ของ 5-HT_2 receptor เป็นการออกฤทธิ์โดยตรงของ 5-HT โดย 5-HT ทำให้เกิด membrane depolarization โดยมีกลไกที่เกี่ยวข้องคือ ปิดประตู K^+ ทำให้แคลเซียมเคลื่อนที่ผ่านเข้าสู่เซลล์ และเมื่อเกิด hyperpolarization แล้วจะถูกควบคุมโดย Ca^{2+} regulated potassium channel (Zifa และ Fillion, 1992) ซึ่งกลไกโดยละเอียดยังไม่มีการศึกษา

Hay และ Wadsword, 1982 พบว่าการกระตุ้นท่อนำอสุจิหนูขาว ส่วน epididymal segment ด้วย 5-HT จะเกิดการตอบสนองโดยมี phasic contraction และตามด้วย rhythmic contraction ซึ่งผลดังกล่าวถูกยับยั้งได้ด้วย phentolamine, reserpine และ methylsergide แสดงให้เห็นว่ากลไกการออกฤทธิ์ของ 5-HT ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบท่อนำอสุจิ นอกจากจะเกิดจากการที่ 5-HT จับกับ receptor ซึ่งเป็นฤทธิ์โดยตรงแล้ว 5-HT ยังสามารถกระตุ้นการหลั่ง NE จากปลายประสาทด้วย (Nishino และคณะ, 1970)

จากการทดลองพบว่า CU 763-15-13 สามารถลดการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวและกระต่ายทั้ง phasic และ tonic contraction เมื่อกระตุ้นด้วย 5-HT ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และให้ผลลด phasic contraction ในท่อนำอสุจิหนูขาว ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลของ papaverine โดยกลไกที่อาจเป็นไปได้ คือ CU 763-15-13 ออกฤทธิ์ยับยั้งผ่านกลไกทาง

receptor-operated calcium channel (ROC) โดยอาจมีผลไปยับยั้งการเคลื่อนที่ของแคลเซียมที่อยู่ภายนอกเซลล์ หรือมีผลรบกวน intracellular mediator ทำให้ระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ลดลง ในกล้ามเนื้อเรียบท่อนำอสุจิ

การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อกระตุ้นด้วย $BaCl_2$

$BaCl_2$ กระตุ้นให้กล้ามเนื้อเรียบเกิดการหดตัวโดยยับยั้ง Ba^{2+} sensitive potassium channel ส่งผลให้เกิด membrane depolarization กระตุ้นให้มีการเปิดออกของ voltage-operated calcium channel (VOC) ทำให้แคลเซียมจากภายนอกเคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์มีผลทำให้แคลเซียมอิสระภายในเซลล์สูงขึ้น และแคลเซียมอิสระที่สูงขึ้นนี้จะไปกระตุ้นให้มีการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ (Huang, 1995) ในการกระตุ้นท่อนำอสุจิหนูขาวด้วย $BaCl_2$ พบว่าท่อนำอสุจิหนูขาวส่วน prostatic segment และ epididymal segment จะมีการตอบสนองเหมือนกัน (Hay และ Wadworth, 1984) โดยเกิดการหดตัวอย่างรวดเร็วเป็น phasic contraction และตามด้วย rhythmic contraction

จากการศึกษาของ Hay และ Wadsword (1992) พบว่า phasic contraction เกิดจาก

-Ba^{2+} มีผลยับยั้งการเคลื่อนที่ของ K^+ ผ่าน Ba^{2+} sensitive K^+ channel ที่ plasma membrane เกิดการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+} จากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์

-เมื่อ VOC เปิดออก Ba^{2+} จะเคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์มากขึ้น ส่งผลให้ Ca^{2+} หลั่งออกมาจากแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ ทำให้แคลเซียมอิสระภายในเซลล์สูงขึ้น

-Ba^{2+}ที่เคลื่อนที่ผ่าน VOC จะเข้าสู่ภายในเซลล์แล้วมีผลกระตุ้น contractile protein ในกล้ามเนื้อเรียบท่อนำอสุจิ

-Ba^{2+} มีผลต่อการปลดปล่อยแคลเซียมที่จับอย่างหนาแน่นกับ plasma membrane

ส่วน rhythmic contraction เกิดจาก trigger ของ Ca^{2+} ผ่าน channel ซึ่งแยกต่างหากจาก channel ที่ยอมให้ Ca^{2+} ผ่านใน phasic contraction และ channel นี้มี affinity ต่อ Ca^{2+} -blocker ต่ำ จากผลการทดลองพบว่า CU 763-15-13 ขนาด 5×10^{-5} M สามารถยับยั้งการหดตัวในส่วน phasic contraction ของท่อนำอสุจิได้เมื่อกระตุ้น $BaCl_2$ ได้เช่นเดียวกับ papaverine

เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ด้วย $BaCl_2$ พบว่า โดยจะมีการหดตัวเป็น phasic contraction และตามด้วย tonic contraction จากผลการทดลองพบว่า CU 763-15-13 สามารถลดการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวและกระต่ายได้ทั้ง phasic และ tonic

contraction เมื่อกระตุ้นด้วย $BaCl_2$ ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เช่นเดียวกับ papaverine จากผลการทดลองอาจกล่าวได้ว่า CU 763-15-13 ออกฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบโดยมีผลยับยั้งผ่านกลไกทาง VOC

ผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อกระตุ้นด้วย KCl

เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบด้วย KCl จะทำให้กล้ามเนื้อเรียบเกิดการหดตัว โดยเกิด membrane depolarization กระตุ้นให้มีการเปิดออกของ voltage-operated calcium channel (VOC) ทำให้เพิ่ม permeable ต่อ Ca^{2+} (Szeleres และ Papp, 1994) ส่งผลให้แคลเซียมจากภายนอกซึ่งมีความเข้มข้นสูงกว่าเคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์ นอกจากนี้แล้ว KCl ยังทำให้มีการปลดปล่อยแคลเซียมจากเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งมีผลทำให้แคลเซียมอิสระภายในเซลล์เพิ่มขึ้น (Hudgin และ Weiss 1968) แคลเซียมอิสระที่สูงขึ้นนี้จะไปกระตุ้นให้มีการหลั่งของแคลเซียมออกจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ ทำให้เกิดการหดตัวได้ KCl ในการกระตุ้นท่อนำอสุจิหนูขาวด้วย KCl จะกระตุ้นให้ท่อนำอสุจิเกิดการหดตัว โดยเกิดการตอบสนองเป็น 2 แบบ เริ่มด้วย phasic contraction และตามด้วย tonic contraction การที่ KCl ทำให้เกิด phasic และ tonic contraction นั้น อธิบายได้ว่า VOC ที่เปิดในขณะเกิด membrane depolarization โดย high K^+ นั้นแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ fast channel ซึ่งมีกลไกการเปิดและปิดเร็วส่งผลให้เกิดการหดเกร็งใน phasic phase และ slow channel ซึ่งมีกลไกการเปิดและปิดช้าส่งผลให้เกิดการหดเกร็งใน tonic phase และเชื่อกันว่า fast channel มีความไวต่อ Ca^{2+} antagonist มากกว่า slow channel (Langton and Huddert, 1987)

Hay และ Wardwerth,1982 พบว่าท่อนำอสุจิหนูขาวส่วน prostatic segment และ epededymal segment จะมีการตอบสนองต่อ KCl แตกต่างกัน โดยที่ tonic contraction ของส่วน prostatic segment จะคงอยู่ได้นานกว่า ดังนั้นในการทดลองจึงใช้ท่อนำอสุจิส่วนนี้ จากผลการทดลองพบว่า CU 763-15-13 ขนาด 5×10^{-5} M สามารถยับยั้งการหดตัวของท่อนำอสุจิหนูขาวได้เมื่อกระตุ้นด้วย KCl โดยมีผลยับยั้ง tonic contraction ได้มากกว่า phasic contraction ในขณะที่ papavarine ขนาด 5×10^{-5} M สามารถยับยั้งการหดตัวของท่อนำอสุจิหนูขาวมีส่วน phasic contraction ได้มากกว่า tonic contraction

KCl จะกระตุ้นให้กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดเกิดการหดตัว โดยในระยะแรกจะมีการหดตัวอย่างรวดเร็วเป็น phasic contraction แล้วเกิดการหดตัวคงที่เป็น tonic contraction การเกิด

phasic contraction เนื่องจากแคลเซียมที่อยู่ภายนอกเซลล์เคลื่อนที่ผ่านเข้าสู่เซลล์โดยผ่านทาง VOC ส่วน tonic contraction เกิดจากแคลเซียมที่เข้าไปมีส่วนกระตุ้นการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ ทำให้ปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มขึ้น (Bolton, 1979) จากผลการทดลองพบว่า CU 763-15-13 สามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว และกระต่ายได้ทั้ง phasic และ tonic contraction เมื่อกระตุ้น KCl อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับ papaverine จากผลการทดลองอาจกล่าวได้ว่า CU 763-15-13 ออกฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบโดยมีผลยับยั้งผ่านทาง VOC

ในการพิจารณากลไกในการคลายตัวของหลอดเลือด ในการทดลองนี้ได้ศึกษาดูผลของสาร CU 763-15-13 ว่าเกี่ยวข้องกับ endothelium หรือไม่ ได้มีผู้ทำการศึกษาทดลองเพื่อแสดงว่า acetylcholine (ACh) ออกฤทธิ์คลายหลอดเลือดได้ต้องมี endothelium หรือเป็น endothelium dependent vasodilator เมื่อหลอดเลือดถูกทำลาย endothelium ออกโดยวิธีการต่าง ๆ เช่น enzymatic technique โดยใช้ collagenase หรือ mechanic technique โดยการขูดเบา ๆ ที่ผนังด้านในของหลอดเลือดและตรวจสอบทาง histology ด้วย electron microscope พบว่าหลอดเลือดนั้นปราศจาก endothelium แล้วพบว่า ACh ไม่สามารถก่อให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือดได้ (Furchgott และ Zawadzki, 1980) ในการทดลองนี้จึงใช้วิธีการขูดเบาที่ผนังด้านในของหลอดเลือดและตรวจสอบด้วย ACh เพื่อพิสูจน์ว่าหลอดเลือดไม่มี endothelium อยู่จริงคือ ACh ไม่สามารถทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้และเมื่อกระตุ้นด้วย NE ยังสามารถก่อให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือดได้ดีเช่นเดิม จึงเป็นเหตุผลของการเลือกใช้ NE เพราะการออกฤทธิ์ไม่ขึ้นกับ endothelium ผลการทดลองพบว่า CU 763-15-13 สามารถลดการหดตัวของหลอดเลือดได้ ทั้งเมื่อมีและไม่มี endothelium โดยผลที่ได้ไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าการออกฤทธิ์ของ CU 763-15-13 ในการลดการหดตัวของหลอดเลือดไม่ขึ้นกับ endothelium

เนื่องจากกลไกการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเกี่ยวข้องกับปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ ซึ่งเพิ่มขึ้นจากแคลเซียมภายนอกเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์โดยตรง (calcium influx or extracellular calcium) หรือจากการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บภายในเซลล์ (intracellular calcium) เพื่อที่จะทดสอบดูว่าการออกฤทธิ์ของ CU 763-15-13 ที่ทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือดเกี่ยวข้องกับ calcium influx หรือไม่ ได้ทำการทดลองตามวิธีของ Hof และ Vuorela, 1983 โดยการใช้สารละลาย high K^+-Ca^{2+} free solution เพื่อก่อให้เกิดสภาวะ depolarizing ของหลอดเลือด แล้วจึงให้ $CaCl_2$ แบบสะสมขนาด เมื่อหลอดเลือดอยู่ในสภาวะ

depolarized ด้วยสารละลายที่มีความเข้มข้นของ K^+ สูงและปราศจากแคลเซียมอิสระ จะทำให้หลอดเลือดเกิด action potential ได้เนื่องจากมีการเคลื่อนที่ของ K^+ จากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ทำให้ความต่างศักย์ของเซลล์มีค่าลดลง ทำให้เกิด membrane depolarizing แล้วมีผลกระตุ้นให้ VOC เปิดออก มีผลทำให้ความสามารถในการนำแคลเซียมจากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์มากขึ้น (Wilffert and Van, 1990) และเมื่อให้ $CaCl_2$ แบบสะสมขนาดพบว่าหลอดเลือดจะมีการหดตัวตามปริมาณของ $CaCl_2$ ที่เพิ่มขึ้น ลักษณะเป็น dose dependent จากการทดลองพบว่า CU 763-15-13 สามารถลดการหดตัวของหลอดเลือดได้จากการกระตุ้นด้วย calcium chloride มีลักษณะเป็นแบบ non-competitive antagonist ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับ papaverine แต่มีความแรงน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบค่า pD_2' ดังแสดงตารางที่ 1

Hof และ Vuorela, 1993 กล่าวว่าการทดลองนี้เป็นวิธีเฉพาะในการยับยั้งการนำเข้าของแคลเซียมเข้าสู่ภายในเซลล์จากสภาวะ depolarized ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย $CaCl_2$ ดังนั้นจากผลการทดลองอาจกล่าวได้ว่า CU 763-15-13 ออกฤทธิ์ลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดโดยการยับยั้งการนำเข้าของแคลเซียมเข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่า ในสารละลาย high K^+-Ca^{2+} free solution นี้ เมื่อ incubate หลอดเลือดแล้วให้ CU 763-15-13 หลอดเลือดจะเกิดการคลายตัวได้ระดับหนึ่ง อาจเป็นไปได้ว่าขณะที่หลอดเลือดอยู่ในสภาวะ high K^+-Ca^{2+}-free solution ที่ผนังเซลล์จะเกิด membrane depolarization มีผลทำให้ Ca^{2+} channel เปิดออก เมื่อให้ CU 763-15-13 ลงไป CU 763-15-13 อาจเข้าสู่ภายในเซลล์แล้วไปมีผลต่อแคลเซียมที่อยู่ภายในเซลล์ก็ได้ โดยอาจมีผลยับยั้งการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาถึงผลของสาร CU 763-15-13 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ พบว่า CU 763-15-13 สามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อลำไส้เล็กกระต่ายได้ทั้งการหดตัวที่เกิดขึ้นเอง (spontaneous contraction) และเมื่อกระตุ้นด้วย ACh, $BaCl_2$ และ KCl สาร CU 763-15-13 สามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวเมื่อกระตุ้นด้วย NE, 5-HT, $BaCl_2$ และ KCl สำหรับผลต่อท่อนำอสุจิหนุขาวและหลอดเลือดแดงใหญ่กระต่าย CU 763-15-13 สามารถยับยั้งการหดตัวได้เมื่อกระตุ้นด้วย 5-HT,. $BaCl_2$ และ KCl แต่ไม่มีผลยับยั้งการหดตัวเมื่อกระตุ้นด้วย NE จากการที่ CU 763-15-13 สามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อกระตุ้นด้วยสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวชนิดต่างๆ ได้ แสดงให้เห็นว่า CU 763-15-13 ออกฤทธิ์ยับยั้งแบบไม่จำเพาะเจาะจง

(non-specific antagonist) ซึ่งคล้ายกับฤทธิ์ของ papaverine ดังนั้นกลไกที่ CU 763-15-13 มีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื่อเรียบน่าจะเป็นกลไกที่เกิดร่วมกัน การใช้ agonist 2 ชนิด คือ NE และ 5-HT จะทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบโดยผ่านกลไกทาง ROC และการใช้สารกระตุ้น $BaCl_2$ และ KCl จะกระตุ้นให้กล้ามเนื้อเรียบเกิดการหดตัวเช่นกันแต่จะผ่านกลไกทาง VOC ดังนั้นการที่ CU 763-15-13 สามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อกระตุ้นด้วยสารมาตรฐานชนิดต่างๆได้ สันนิษฐานว่า CU 763-15-13 ออกฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบผ่านได้ทั้งกลไกทาง ROC และ VOC นอกจากนี้ CU 763-15-13 ยังมีความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้ง α_{1d}-adrenoceptor เมื่อกระตุ้นด้วย NE ในหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว แต่ไม่มีผลต่อ α_{1a}-adrenoceptor ที่ท่อนำอสุจิหนูขาว และ α_{1b}-adrenoceptor ที่หลอดเลือดแดงใหญ่กระต่าย จึงเป็นที่น่าสนใจในการนำ CU 763-15-13 เพื่อใช้แยก α_{1d}-adrenoceptor ออกจาก subtype อื่นๆ

นอกจากนี้ จากการศึกษายังพบว่า CU 763-15-13 สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+} จากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ เมื่อกระตุ้นด้วย $CaCl_2$ ในสารละลาย high potassium depolarizing ได้ และมีผลรบกวนการหลั่งของแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ เมื่อกระตุ้นด้วย NE หรือ KCl ในสารละลายที่ปราศจากแคลเซียม อย่างไรก็ตามการศึกษาฤทธิ์ของ CU 763-15-13 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเป็นเพียงการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเบื้องต้นเท่านั้น ยังไม่สามารถที่จะสรุปกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่นอนได้ ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ที่จำเพาะเจาะจงมากขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบท่อนำอสุจิหนูขาว หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว และหลอดเลือดแดงใหญ่กระต่าย ของ CU 763-15-13 กับสารต้นแบบ CU 763-10-01 แสดงดังตารางที่ 2 พบว่า CU 763-15-13 และสารต้นแบบ CU 763-10-01 สามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อกระตุ้นด้วยสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัวได้แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาสารกระตุ้น $BaCl_2$ และ KCl พบว่า CU 763-15-13 และ CU 763-10-01 สามารถยับยั้งการหดตัวของท่อนำอสุจิและหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว และหลอดเลือดแดงใหญ่กระต่ายได้ แสดงให้เห็นว่า CU 763-15-13 และ CU 763-10-01 น่าจะออกฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบผ่านกลไกทาง ROC โดยอาจมีตำแหน่งในการออกฤทธิ์เหมือนหรือแตกต่างกัน สำหรับผลเมื่อกระตุ้นด้วย 5-HT พบว่า CU 763-15-13 สามารถยับยั้งการหดตัวได้ในทุกอวัยวะที่ทำการศึกษา ในขณะที่ CU 763-10-01 มีผลยับยั้งในท่อนำอสุจิและหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว แต่ไม่มีผลยับยั้งในหลอดเลือดแดงใหญ่

กระต่ายในทางตรงกันข้ามพบว่า CU 763-10-01 เสริมฤทธิ์ในการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่กระต่ายเมื่อกระตุ้นด้วย 5-HT ซึ่งผลดังกล่าวยังไม่สามารถอธิบายได้

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผลในการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของ CU 763-15-13 และ CU 763-10-01

สารกระตุ้น	NE	5-HT	KCl	BaCl2
ท่อนำอสุจิหนูขาว				
-CU 763-15-13	↔	↓	↓	↓
-CU 763-10-01	↓	↓	↓	↓
หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว				
-CU 763-15-13	↓	↓	↓	↓
-CU 763-10-01	↓	↓	↓	↓
หลอดเลือดแดงใหญ่กระต่าย				
-CU 763-15-13	↔	↓	↓	↓
-CU 763-10-01	↔	↑	↓	↓

เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบด้วย NE พบว่า CU 763-15-13 สามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวได้ แต่ไม่มีผลยับยั้งในหลอดเลือดแดงใหญ่กระต่ายและในท่อนำอสุจิหนูขาว ในขณะที่ CU 763-10-01 สามารถยับยั้งการหดตัวในหลอดเลือดแดงใหญ่และท่อนำอสุจิหนูขาว ไม่มีผลยับยั้งในหลอดเลือดแดงใหญ่กระต่าย แสดงให้เห็นว่า CU 763-15-13 มีผลยับยั้งต่อ α_{1d}-adrenocepotor ในขณะที่ CU 763-10-01 ไม่มีผลยับยั้งต่อ ต่อ α_{1b}-adrenocepotor แต่มีผลยับยั้งใน α_{1a} และ α_{1d} จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการปรับเปลี่ยนสูตรโครงสร้างของ CU 763-10-01 เป็น CU 763-15-13 ทำให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่มีต่อกล้ามเนื้อเรียบเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นจากผลการทดลองที่ได้อาจเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาสารกลุ่มนี้ต่อไป