บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

อัลคาลอยด์หลักจากเปลือกตาเสือทุ่ง (D. cyrtobotryum Miq.) มีสูตรโครงสร้างคล้าย rohitukine ซึ่งสกัดจาก D. binectariferum Hook f Bedd จากการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งมีฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบที่กระเพาะอาหารหนูถีบจักร ,ลำไส้หนูตะเภา และกระต่าย (สมชาย แสงอำนาจเดช,2534) ลดการหดตัวของหลอดเลือดแดง aorta ที่แยกจากหนูขาว,ลดอัตราการเต้นหัวใจห้องบน แต่ไม่มีผลต่อการนำคลื่นไฟฟ้าของหัวใจห้องบนซ้ายที่กระตุ้นด้วยไฟฟ้าและลดความดันโลหิตหนูขาวได้ (จันทนา เลอมานนท์, 2534) ลดการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดลมของหนูขาวและหนูตะเภาได้ (ณรงค์ จันทร์เลย,2536) สูตรโครงสร้างอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งที่มี benzopyran nucleus ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม K^+ channel opener และมีคุณสมบัติเปิด K^+ channel ได้ ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ที่นำมาใช้ทางการแพทย์เช่น cromakalim ใช้ประโยชน์รักษาโรคหัวใจขาดเลือดเพราะสามารถเปิด K^+ channelของกล้ามเนื้อหลอดเลือดได้ ทำให้เกิดภาวะ hyperpolarization ส่งผลให้หลอดเลือดเกิดการคลายตัว(Cook N.S.,1988;Quast U. และ Baumlin Y.,1991 ;Eltze M.,1989;Edwards G. และ Weston A.H. 1990) ดังนั้นจึงสนใจศึกษาผลของอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่ง ต่อผลลดการหดตัวกล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจและไตเพราะโรคหัวใจขาดเลือดมีพยาธิสภาพที่หลอดเลือดที่มาเลี้ยงหัวใจ (coronary artery) มีความผิดปรกติซึ่งมีสาเหตุจาก coronary artherosclerosis และ coronary stenosis (Dobbs W.และ Povalske ,1977) และไตเป็นอวัยวะที่จะมีความผิดปรกติเกิดขึ้นเมื่อมีพยาธิสภาพผิดปรกติที่หัวใจ

จากการทดลองที่ศึกษาถึงการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดพบว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณแคลเซียมที่เพิ่มขึ้นภายในเซลล์และปัจจัยที่ทำให้ปริมาณแคลเซียมสูงขึ้นภายในเซลล์เกิดจากสาเหตุ 3 ประการคือ

1. การเกิดภาวะ depolarizationโดยการให้ outward current

2. การเกิดภาวะ depolarizationโดยให้สารละลายที่มีโปแตสเซียมสูง หรือองค์ประกอบที่เปลี่ยนแปลงไปของสารละลายที่แช่กล้ามเนื้อหลอดเลือด (other variations of bathing solution composition)

3. การกระตุ้นด้วยสารต่างๆซึ่งจับกับตัวรับ (receptor) บนเซลล์กล้ามเนื้อหลอดเลือดแล้วทำให้เกิดผลดังนี้

3.1 การเปิดของ ROC'sที่เปิดให้แคลเซียมหรือโซเดียมอิออนเข้าเซลล์ได้

3.2 การปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์

จากสาเหตุทั้ง 3 ประการจะส่งผลให้ปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์สูงขึ้นกระตุ้นให้กล้ามเนื้อหลอดเลือดหดตัว (Bolton T.B.,1979)

การกระตุ้นให้กล้ามเนื้อหลอดเลือดหดตัวสามารถกระตุ้นโดยวิธีต่างๆเช่น การกระตุ้นกล้ามเนื้อหลอดเลือดโดยวิธีเชิงกล (mechanical stimulation) เช่น การเพิ่มแรงดันทำให้หลอดเลือดหดตัว,การลดแรงดันทำให้หลอดเลือดคลายตัว ,การกระตุ้นกล้ามเนื้อหลอดเลือดโดยวิธีทางไฟฟ้า(electrical stimulation) เช่นการใช้ microelectrode แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าไป และการกระตุ้นโดยใช้ยาหรือสารต่างๆ เช่นการให้ 5-HT ,Ach ,NE และ การให้สารละลาย high potassium ซึ่งการออกฤทธิ์อาจเกิดผ่าน receptor หรือไม่ผ่าน receptor ก็ได้ (Furchgott R.F., 1955) การวิจัยนี้กระตุ้นหลอดเลือดให้หดตัวโดยวิธีให้ยาหรือสารต่างๆลงไปใน chamber ที่แช่กล้ามเนื้อหลอดเลือด ซึ่งปรากฏผลการทดลองดังต่อไปนี้

ผลของอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งต่อการกระตุ้นหลอดเลือดให้หดตัวด้วย Ach

เมื่อให้ Ach ความเข้มข้นต่างๆลักษณะ cumulative dose ต่อกล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจพบว่า หลอดเลือดหดตัวลักษณะ dose-dependent ตามขนาด Ach ที่ให้ ผลที่ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมาคือ Ach ทำให้หลอดเลือดหัวใจสุกรหดตัว (อรชร อิงคานุวัฒน์,2535;Ito Y.,Kitamura K. และKuriyama H.

,1979; Nakazawa N. และคณะ ,1982 ;Smith D.J. ,1950.) Ach ทำให้หลอดเลือดหัวใจของมนุษย์หดตัว (Smith D.J. 1950;Toda N. 1983) และ Ach ทำให้หลอดเลือดแดงหัวใจของวัวหดตัว (Ederstorm H.E. และ Oppelt W.W.,1958)เป็นต้น Ach ออกฤทธิ์โดยจับกับ cholinergic receptor ซึ่งเป็นผลโดยตรง (direct effect) และ atropine สามารถยับยั้งผลของ Ach ได้ (อรชร อิงคานุวัฒน์,2535 ; Bolton T.B. ,1979; Furchgott R.F. , 1955)หรือ Ach อาจออกฤทธิ์โดยอ้อม(indirect effect)กระตุ้นการหลั่งของ NE และ Epi. ที่ post-synaptic (Furchgott R.F.,1955) ปัจจุบันจำแนก receptor สำหรับ Ach ได้ 2 ประเภทคือ muscarinic และ nicotinic receptor ซึ่งบทบาทการหดตัวของหลอดเลือดเกิดผ่าน muscarinic receptor มีรายงานการค้นพบ subtype ของ muscarinic receptor ประกอบด้วย 5 subtype โดยพบกระจายอยู่บริเวณต่างๆ เช่น M_1-subtype พบบริเวณระบบประสาท ,M_2-subtype พบที่หัวใจ,สมองส่วนหลัง, M_3-subtype พบที่กล้ามเนื้อเรียบและเนื้อเยื่อต่อมต่างๆ ,M_4-และM_5-subtype พบที่สมองหนูขาว กลไกการออกฤทธิ์ของ Ach ต่อ muscarinic receptor ซึ่ง couple กับ G-protein แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ M_1-,M_3-และ M_5-subtype จะcouplกับG_q protein และ phospholipase C (PLC) และ M_2- และ M_4-subtype จะ couple กับ G_i protien และ adenylyl cyclase ซึ่งมี second messenger แตกต่างกันไปคือ M_1-,M_3- และ M_5-subtype ทำให้ระดับ cAMP และ IP_3 สูงขึ้น แต่ M_2- และ M_4-subtype ทำให้ระดับ c-AMP ลดลง และ IP_3 อาจคงที่หรือเพิ่มขึ้นเล็กน้อยขึ้นกับความเข้มข้นของ agonist ที่ให้ (Richards M.H.,1991) กลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลของ Ach คือ Ach จับกับ muscarinic receptor ได้เป็น agonist-receptor complex แล้วมีผลต่อ effector คือ calcium channel เกิดการตอบสนอง 2 ประการคือ

1. การเปลี่ยนแปลงความสามารถในการนำแคลเซียมอิออน เข้าเซลล์มากขึ้น

2. การเพิ่มขึ้นของปริมาณ c-GMP(Richelson E. และ Fakahany E.E.,1981) ดังนั้นผลการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดที่เกิดจาก Ach อาจมีผลมาจากการจับกันระหว่าง Ach กับ muscarinic receptor ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็น

M_3-subtype ที่พบกระจายอยู่ทั่วไปบนกล้ามเนื้อเรียบ และส่งผลให้ระดับ IP_3 ในเซลล์สูงขึ้นโดยเกิดผ่าน muscarinic receptor ซึ่งcouple กับ G_q-protein และ PLC นอกจากนี้ยังส่งผลต่อการเปิดของ Ca^{2+}-channelทำให้แคลเซียมอิออนผ่านเข้าเซลล์มากขึ้น ผลโดยสรุปทำให้ปริมาณแคลเซียมในเซลล์สูงขึ้น เมื่อให้อัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งพบว่าหลอดเลือดมีการตอบสนองต่อ Ach ลดลง โดยมีลักษณะเป็น non-competitive antagonist ต่อ Ach แสดงว่าอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งไม่ได้ออกฤทธิ์แข่งขันกับAchในการจับกับ muscarinic receptor ที่กล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจ

ผลของอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งต่อการกระตุ้นหลอดเลือดให้หดตัวด้วย NE

เมื่อให้ NE ความเข้มข้นต่างๆลักษณะ cumulative dose ต่อกล้ามเนื้อหลอดเลือดไตปรากฏว่าหลอดเลือดหดตัวลักษณะ dose-dependent ซึ่งเหมือนกับผลการทดลองที่มีผู้ศึกษามาแล้ว เช่น ผลของ NE ที่หลอดเลือดแดงไตของสุกรหดตัว (อรชร อิงคานุวัฒน์,2535 ;Ferguson D.R.,Johnson B.I. และ Price N.,1985)แต่ผลของ NE ต่อหลอดเลือดแดงหัวใจของสุกรทำให้หลอดเลือดคลายตัวโดยคาดว่าเกิดผ่าน β-receptor(อรชร อิงคานุวัฒน์,2535;Ito Y.,Kitamura K. และ Kuriyama H.,1979) ดังนั้นตำแหน่งของหลอดเลือดจึงมีผลต่อการออกฤทธิ์ของ NE เนื่องจากหลอดเลือดที่บริเวณต่างกันจะมีชนิดและปริมาณ receptor แตกต่างกันไป มีหลักฐานแสดงว่า adrenergic receptor ประกอบด้วย 2 ชนิดโดยใช้ agonist และ antagonistต่างๆกัน คือ α-receptor ซึ่งประกอบด้วย 2 subtype คือ α_1 - และ α_2 - subtype และ β - receptor ซึ่งประกอบด้วย 2 subtype คือ β_1- และ β_2-subtype ตำแหน่งที่พบ receptor จะแตกต่างกันคือ pre-synaptic มี α_2- และ β_2-subtype และ post-synaptic มี α_1- และ β_1-subtype (Arient E.J. และ Simonis A.M., 1983) สารสื่อประสาท NE สามารถจับกับ α_1- และ β_1-receptorได้ดีกว่า α_2- และ β_2-subtype ผลการตอบสนองของ agonist ต่อ adrenergic recepter ที่ระบบไหลเวียนโลหิต สรุปได้ดังนี้ β_1-subtype ที่หัวใจทำให้หัวใจบีบตัวเร็วและแรงขึ้น ,β_2-subtype พบที่หลอดเลือดแดงและหลอดเลือดดำทำให้

หลอดเลือดคลายตัว และ α_1-,α_2-subtype พบที่หลอดเลือดทำให้หลอดเลือดหดตัว ผลการทดลองที่ได้เกิดจาก NE จับกับ adrenergic receptor โดยไม่มีผลต่อความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มเซลล์แล้วทำให้หลอดเลือดหดตัว (Hudgins P. M. และ Weiss G. B. , 1967) แสดงว่า NE จับกับ α-receptor มากกว่า β_2-receptor หรือมีจำนวน β_2-receptor น้อยกว่า α-receptor กลไกการออกฤทธิ์ของ agonist ต่อ α-receptor มีกลไกระดับโมเลกุลคือ NE จับกับ α-receptor ที่ couple กับ G-protein และ PLC ตามลำดับ ส่งผลให้ระดับ IP_3 เพิ่มขึ้นและทำให้ระดับแคลเซียมอิออนในเซลล์เพิ่มขึ้น (Ruffolo R. R. และคณะ , 1991) ดังนั้นจึงสันนิษฐานว่า NE ทำให้หลอดเลือดไตหดตัวโดยจับกับ α-receptor มากกว่า β-receptor ซึ่งมีหลักฐานสนับสนุนคือ prazosin มีฤทธิ์เป็น selective α_1-antagonist สามารถยับยั้งผลการหดตัวของหลอดเลือดไตต่อการกระตุ้นด้วย NE แต่ผลของ yohimbine ซึ่งเป็น selective α_2-antagonist ไม่สามารถยับยั้งผลการหดตัวของหลอดเลือดที่เกิดจาก NE และ propranolol ซึ่งเป็น non-selective β-blocker ยับยั้งการหดตัวได้เล็กน้อย หรือไม่มีผลยับยั้งการหดตัวที่เกิดจาก NE (อรชร อิงคานุวัฒน์ , 2535) หรือเมื่อให้ propranolol มีผลทำให้หลอดเลือดหดตัวจากผลของ NE เพิ่มขึ้น (Ferguson D. R. ,Johnson B. I. และ Price N. , 1985) จึงสรุปว่า NE มีผลกระตุ้นหลอดเลือดไตให้หดตัวโดยจับกับ α_1-receptor เมื่อให้อัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งแล้วกระตุ้นหลอดเลือดให้หดตัวด้วย NE ปรากฏว่าการหดตัวของหลอดเลือดลดลงโดยมีลักษณะ non-competitive antagonist กับ NE ต่อ α-receptor

ผลของอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งต่อการกระตุ้นหลอดเลือดให้หดตัวโดย 5-HT

เมื่อให้ 5-HT ลักษณะ cumulative dose ต่อหลอดเลือดหัวใจและไตของสุกรพบว่าหลอดเลือดหดตัวแบบ dose-dependent ซึ่งเหมือนกับผลการทดลองที่ทำมาแล้วเช่น ผลการหดตัวที่หลอดเลือดแดงไตของสุกรที่เกิดจากการให้ 5-HT (Ferguson D.R.,Johnson B.I. และPrice N.,1985) ผลการหดตัวที่

หลอดเลือดแดงหัวใจของคนต่อการกระตุ้นหลอดเลือดให้หดตัวโดย 5-HT (Conner H.E.,Feniuk W. และ Hamphrey P.A.,1989; Conti A. และคณะ,1990) ผลของ 5-HT ต่อหลอดเลือดแดงใหญ่(aorta)ที่ขาของสุนัขหดตัว (Haddy F.J., Gordon P. และ Emanuel D.A.,1989) 5-HT แสดงฤทธิ์โดยจับกับ 5-HT receptor ซึ่งจำแนกได้ 3 ชนิดใหญ่ๆ คือ S_1-,S_2- และ S_3-receptor ซึ่งมีบทบาทหน้าที่และการกระจายตัวของ receptor ในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันไป เช่น กล้ามเนื้อหลอดเลือดดำบริเวณขาของสุนัขพบ S_1-receptor มีบทบาททำให้หลอดเลือดหดตัว,S_2-receptor พบที่หลอดเลือดแดงของแมวทำให้หลอดเลือดแดงหดตัว แต่ S_2-receptor พบที่หลอดเลือดดำบริเวณขาแมว ทำให้หลอดเลือดดำคลายตัว (Gothert M. และ Schlicker E. , 1987) จากการศึกษาชนิดของ 5-HT receptor ที่กล้ามเนื้อหลอดเลือดโดยการใช้ agonistและ antagonist ต่างๆ พบว่าหลอดเลือดประกอบด้วย S_1- และ S_2-receptor (Peroutka S.J., 1984) บทบาทของ 5-HT ต่อหลอดเลือดมีผลทำให้หลอดเลือดเกิดการหดตัวหรือคลายตัวก็ได้ขึ้นกับชนิดของ receptor คือ S_1-receptor ทำให้หลอดเลือดคลายตัว,S_2-receptor ทำให้หลอดเลือดหดตัว (Vanhoutte P.M.,1987) นอกจากนี้ผลที่แตกต่างกันอาจเกิดมาจากขนาดของหลอดเลือด (Haddy F.J.,Gordon P. และ Emanuel D.A. , 1959) , ชนิดของสัตว์ทดลอง (Gothert M. และ Schlicker E., 1987) จากผลการทดลองผลของ 5-HT ต่อหลอดเลือดไตและหัวใจของสุกรทำให้หลอดเลือดทั้ง 2 แห่งหดตัวโดยกลไกต่างๆดังนี้

1. ทำให้หลอดเลือดหดตัว โดยการกระตุ้น S_2-receptor
2. ทำให้ผลของสารที่มีฤทธิ์ต่อการหดตัวของหลอดเลือด (vasoconstrictor) ที่พบภายในเซลล์มีผลทำให้หลอดเลือดหดตัวเพิ่มขึ้น
3. ทำให้เกิดการหลั่งของ NE จาก adrenergic nerve
4. ทำให้เกิดการหลั่งของ EDCF ที่มีผลให้หลอดเลือดหดตัวได้ (Vanhoutte P.M. และ Luscher T.F.,1986)

ดังนั้นจึงอาจอ้างได้ว่า 5-HT ทำให้หลอดเลือดหดตัวโดยจับกับ S_2-receptor ซึ่งเป็นผลโดยตรงและมีหลักฐานสนับสนุนคือ ketaserine ซึ่งเป็น S_2-antagonist สามารถยับยั้งผลการหดตัวของหลอดเลือดที่เกิดจาก 5-HT (อรชร อิงคานุวัฒน์, 2535 ;Medgett I.C.,1987) โดยมีกลไกระดับโมเลกุล

ที่เกิดจาก 5-HT จับกับ S_2-receptor แล้วส่งผลให้ระดับ IP_3 เพิ่มขึ้น โดยเกิดผ่านการกระตุ้น PLC ซึ่งทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มขึ้น (Zifa E. และ Follion G.,1992) เมื่อให้อัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งต่อการกระตุ้นกล้ามเนื้อหลอดเลือดให้หดตัวด้วย 5-HT พบว่าหลอดเลือดหดตัวลดลงโดยมีลักษณะเป็น non - competitive antagonist กับ 5-HT ต่อ S_2-receptor

ผลของอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งต่อการหดตัวของหลอดเลือดหัวใจที่กระตุ้นด้วยแคลเซียมอิออน ในสภาวะ depolarization ด้วยสารละลาย high K^+

กล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจในภาวะ depolarization ด้วยสารละลายที่มีความเข้มข้นของโปแตสเซียมอิออนสูงแต่ไม่มีแคลเซียมอิออน(high K^+ - Ca^{2+} free solution) ทำให้กล้ามเนื้อเกิด AP เพราะสารละลายที่มีความเข้มข้นของโปแตสเซียมอิออนสูงทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของ K^+ จากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ ส่งผลต่อความต่างศักย์ของเซลล์มีค่าลดลง ทำให้ VOC's เปิด และทำให้ค่า P_{Ca} เพิ่มขึ้นส่งผลต่อความสามารถในการนำแคลเซียมจากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์มากขึ้น (Bolton T.B.,1979;Gouw M.A.,Wilffert B. และVan P.A.,1990) แต่ไม่เกิดการหดตัวเพราะไม่มีแคลเซียมอิออน เมื่อให้แคลเซียมจากภายนอกเซลล์จะส่งผลให้แคลเซียมอิออนเคลื่อนที่ผ่าน VOC's เข้าไปในเซลล์ ทำให้กล้ามเนื้อหลอดเลือดหดตัว (Hof R. P. และ Vuoreles H.J.,1983) หรือส่งผลต่อการปลดปล่อยสารสื่อประสาท เช่น NE (Hof R.P. และ Vuoreles H. J., 1983 ;Ito Y., Kitamura K.และ Kariyama H.,1979) ผลที่เกิดขึ้นส่งผลให้ระดับแคลเซียมในเซลล์สูงขึ้น ทำให้หลอดเลือดหดตัว (Hudgins P.M. และ Weiss G.B.,1967) เมื่อให้ Ca^{2+} antagonistเช่น verapamil มีผลยับยั้งการเคลื่อนที่ของแคลเซียมอิออนจากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์โดยผ่านทาง VOC's ในสภาวะ depolarization ด้วยสารละลาย high K^+- Ca^{2+}-free โดยมีผลเป็น competitive antagonist ของแคลเซียมอิออนต่อ VOC's (Hof R. P. และ Vuorela H.J.,1983) ผลของอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งในสภาวะ depolarization ด้วย high K^+-Ca^{2+} free depolarizing ต่อกล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจมีผลยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือด ที่กระตุ้นด้วย $CaCl_2$ แบบ

non-competitive antagonist กับแคลเซียมอิออนต่อ VOC's ซึ่งแตกต่างจาก verapamil ที่มีผลเป็น competitive antagonist

ผลของอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งต่อการกระตุ้นหลอดเลือดให้หดตัวด้วยแบเรียม

แบเรียมอิออนมีบทบาทต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดโดยการเกิดภาวะ depolarization แล้วส่งผลให้ VOC's เปิด ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคือเกิดการเคลื่อนที่ของแคลเซียมอิออนจากภายนอกเข้าสู่เซลล์และกระตุ้นให้ปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์สูงขึ้นโดยหลั่งมาจากแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ ; เกิดการเคลื่อนที่ของแบเรียมอิออนจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ทาง VOC's ส่งผลให้แหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์หลั่งแคลเซียมอิออน หรือเกิดการเคลื่อนที่ของแบเรียมอิออนจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ และกระตุ้นหลอดเลือดให้หดตัวโดยไม่เกี่ยวข้องกับแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมในเซลล์เพราะแบเรียมอิออนทำให้หลอดเลือดกระต่ายหดตัวโดยปราศจากแคลเซียมจากภายนอก และแหล่งเก็บแคลเซียมภายในเซลล์ซึ่งถูกกำจัดโดย caffeine หรือ NE (Karaki H., Satake N. และ Shibata S.,1986) จากการทดลองกระตุ้นกล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจและไตของสุกรให้หดตัวด้วยแบเรียมอิออนในสารละลาย Ca^{2+}-free Krebs Henseleit ดังนั้นการหดตัวของหลอดเลือดในการทดลองนี้เกิดจาก แบเรียมอิออนเคลื่อนที่เข้าเซลล์ทาง VOC's และมีผลต่อการหลั่งแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมในเซลล์หรือทำให้หลอดเลือดหดตัวจากแบเรียมอิออนเอง อัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งมีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดหัวใจและไต ที่เกิดจากแบเรียมอิออนลักษณะ non-competitive antagonist กับแบเรียมอิออนต่อการเคลื่อนที่ของแบเรียมอิออนผ่าน VOC's

ผลของอัลคาลอยด์หลักตาเสือทุ่งต่อการกระตุ้นหลอดเลือดให้หดตัวด้วย TEA

TEA ทำให้กล้ามเนื้อหลอดเลือดหดตัวโดยเกิด AP ซึ่ง TEA ยับยั้งการเคลื่อนที่ของโปแตสเซียมอิออนต่อ voltage-dependent K^+ channel โดยลด outward K^+ current ทำให้เกิดผลคือการยับยั้ง repolarization phase

ของ AP หรือการยับยั้งภาวะ hyperpolarization ที่เกิดจากการเคลื่อนที่ของโปแตสเซียมอิออน (Bolton T.B.,1979) การกระตุ้นหลอดเลือดในสารละลายที่มี TEA ด้วยวิธีทางไฟฟ้า(electrical stimulation) ทำให้หลอดเลือดหดตัวโดยมี amplitude สูงขึ้นและระยะเวลาการเกิด AP นานขึ้น (Fatt P. และ Katz B.,1953) บทบาทของแคลเซียมอิออนต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดที่กระตุ้นด้วย TEA ทำให้แคลเซียมอิออนจากภายนอกเคลื่อนที่เข้าเซลล์เพิ่มขึ้นโดยเยื่อหุ้มเซลล์จะมี permeability ต่อแคลเซียมอิออนเพิ่มขึ้น ซึ่งมีหลักฐานสนับสนุนคือ TEA ไม่สามารถทำให้หลอดเลือดหดตัวในสารละลายที่ปราศจากแคลเซียมอิออน และ TEA ไม่มีผลต่อการหลั่งของแคลเซียมอิออน จากแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์เหมือนกับผลของ caffeine (Nayler W.G.และ Emery P.F., 1972) และสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเคลื่อนที่ของแคลเซียมอิออนจากภายนอกเซลล์เข้าสู่เซลล์เช่น SKF 525A สามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดที่เกิดจาก TEA (Kalsner S.,1972) ดังนั้นผลการหดตัวของหลอดเลือดจาก TEA โดยกลไกเพิ่ม influx Ca^{2+} ทำให้ปริมาณแคลเซียมอิออนในเซลล์สูงขึ้น อัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดแบบ non-competitive antagonist กับ TEA ต่อการผ่านเข้าเซลล์ของแคลเซียมอิออน

ผลของ TEA ,Glibenclamide ต่อการต้านฤทธิ์การคลายตัวกล้ามเนื้อหลอดเลือดที่เกิดจากอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่ง

อัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งมีสูตรโครงสร้างคล้าย rohitukine ประกอบด้วย benzopyran ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารในกลุ่ม K^+ channel opener ชนิดหนึ่ง (Edwards G. และ Weston A.H.,1990) สามารถออกฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อลำไส้เล็กกระต่าย หนูตะเภาและกระเพาะอาหารหนูถีบจักร (สมชาย แสงอำนาจเดช,2534)ลดการหดตัวหลอดเลือด aorta ที่แยกจากหนูขาว (จันทนา เลอมานนท์,2534) และลดการหดตัวของหลอดลมที่แยกจากหนูขาวและหนูตะเภา (ณรงค์ จันทร์เลย,2536)กลไกการออกฤทธิ์ของ K^+ channel opener เกิดผ่านการกระตุ้นให้ K^+ channel เปิด ทำให้โปแตสเซียมอิออนเคลื่อนที่ออกนอกเซลล์เพราะความเข้มข้นของโปแตสเซียมอิออนภายในสูงกว่าภายนอกเซลล์ ส่งผลให้ศักย์

ไฟฟ้าที่เยื่อหุ้มเซลล์มีค่าเป็นลบมากขึ้นเกิดภาวะ hyperpolarization จากการสูญเสียประจุบวกโปแตสเซียมออกนอกเซลล์ กลไกการเปิดของ VOC's ให้ Ca^{2+} เคลื่อนที่เข้าเซลล์ขณะ depolarization แต่ในภาวะ hyperpolarization VOC's จะเปิดลดลงและอาจส่งผลกระทบต่อการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+} ผ่าน ROC's ผลที่เกิดขึ้นทั้งหมดทำให้ปริมาณแคลเซียมในเซลล์ลดลง กล้ามเนื้อหลอดเลือดจึงเกิดการคลายตัว การศึกษาคุณสมบัติของสารกลุ่ม K^+ channel opener ปัจจุบันทำโดยการใช้ selective K^+ channel inhibitor เช่น glibenclamide มีผลยับยั้งที่ ATP-sensitive K^+ channel พบที่กล้ามเนื้อหัวใจ ventricle และกล้ามเนื้อลายมีบทบาทป้องกันโรคหัวใจขาดเลือด , β-cell ทำให้เกิด resting potential (Cook N.S.,1988 ;Kukovetz W.R.,Holzmann S. และ Poch G.,1992) หรือ apamin เป็น specific Ca^{2+} activated K^+ channel inhibitor มีบทบาทต่อการเกิด hyperpolarization พบที่กล้ามเนื้อลาย ,เซลตับ และลำไส้ เป็นต้น (Blatz A.L.และ Magleby K.L. ,1986 ; Cook N. S., 1988) นอกจากนี้ยังพบสาร non-selective K^+ inhibitor เช่น TEA, Ba^{2+} และ 4-aminopyridine เป็นต้น potassium channel inhibitor มีหลายชนิด และยับยั้ง K^+ channel ที่แตกต่างกันเพราะปัจจุบันนี้พบ K^+ channel 13 ชนิด (Edwards G. และ Weston A. H. , 1990) TEA มีผลยับยั้ง K^+ channel ดังต่อไปนี้ voltage-sensitive channel พบที่กล้ามเนื้อลาย,หัวใจ และกล้ามเนื้อเรียบ , Ca^{2+} -activated channel พบที่ neurons,เซลล์ pituitary ,ต่อมน้ำลาย ,กล้ามเนื้อเรียบและกล้ามเนื้อลาย , Na^+ -activated K^+ channel พบที่กล้ามเนื้อที่ ventricle และ trigerminal ganglion neurons ; มีผลยับยั้งได้เล็กน้อยที่ receptor coupled channel และ 5-HT (via cAMP) -inactivated K^+ channel โดยมีผลทำให้เกิดภาวะ repolarization (Cook N.S.,1988;Kameyama M. และคณะ ,1984 ; Pfaffinger P.J.และคณะ ,1985 ; Sakmann B.,Noma A. และ Trautwein W. , 1983 ; Siegelbaum S.A. , Carmardo J.S. และ Kandel E.R.,1982) จากการทดลองอัลคาลอยด์หลักตาเสือทุ่งยับยั้งฤทธิ์การหดตัวของหลอดเลือดที่เกิดจาก Ach ,NE และ 5-HTโดยที่ TEA สามารถต้านฤทธิ์การคลายตัวของหลอดเลือดจากอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่ง

เปรียบเทียบกับผลที่ให้ verapamil คลายหลอดเลือดพบว่า TEA ไม่สามารถยับยั้งผลการคลายตัวของหลอดเลือดของ verapamil แสดงว่ากลไกการออกฤทธิ์ของอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งแตกต่างจาก Ca^{2+} antagonist ซึ่งมีผลยับยั้งการเคลื่อนที่ของแคลเซียมจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ทาง VOC's หรือยับยั้งผลของแคลเซียมอิออนโดยการจับกับ Ca^{2+} binding protein ใน cytosol (Janis R.A. และ Scriabine A.,1983) TEA เป็นสารในกลุ่ม non-selective K^+ inhibitor สามารถยับยั้งผลการคลายตัวของหลอดเลือดที่เกิดจาก K^+ channel opener ได้ (Eltze M.,1989) ดังนั้นอัลคาลอยด์หลักตาเสือทุ่งอาจมีคุณสมบัติเป็น K^+ channel opener โดยไม่ได้ออกฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของแคลเซียมผ่าน VOC's โดยตรงเหมือน verapamil ซึ่งผลจากการยับยั้ง Ca^{2+} influx ที่เกิดจากอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งเกิดผ่านภาวะ hyperpolarization ซึ่งมีผลทำให้ VOC's เปิดลดลงทำให้แคลเซียมอิออนเข้าเซลล์ลดลงส่งผลให้กล้ามเนื้อหลอดเลือดคลายตัว แต่เมื่อให้ glibenclamide ซึ่งเป็น specific K^+ inhibitor ต่อ ATP-sensitive K^+ channel สามารถยับยั้งผลการคลายตัวของหลอดเลือดที่เกิดจาก K^+ channel opener เช่น cromakalim, pinacidil,nicorandil และ RP 49356 (Eltze M.,1989 ;Holzmann S. และคณะ , 1992 ; Kreye V. A. และคณะ , 1992) ในการทดลองนี้ glibenclamide ไม่สามารถยับยั้งผลการคลายตัวของหลอดเลือดที่เกิดจากอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่ง แสดงว่าอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งไม่สามารถเปิด ATP-sensitive K^+ channel ซึ่งมีบทบาทช่วยป้องกันโรคหัวใจขาดเลือด ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งยับยั้งการหดตัวหลอดเลือดหัวใจโดยเกิดผ่านการเปิดของ K^+ channel ที่ไม่ใช่ ATP-sensitive K^+ channel แล้วมีผลต่อ Ca^{2+} influx ทำให้แคลเซียมจากภายนอกเคลื่อนที่เข้าเซลล์ลดลง

สรุปผลการทดลอง

ผลของอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่ง ต่อการหดตัวของหลอดเลือดหัวใจและไตของสุกร สรุปได้ว่าอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งลดการหดตัวของหลอดเลือดหัวใจที่กระตุ้นด้วย Ach ,5-HT ,$CaCl_2$,$BaCl_2$ และ TEA และลดการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดไตที่กระตุ้นด้วย NE ,5-HT ,$BaCl_2$ และ TEA ตำแหน่งการออกฤทธิ์ของอัลคาลอยด์หลักตาเสือทุ่งที่มีผลต่อ การเคลื่อนที่ของแคลเซียมอิออนจากภายนอกเซลล์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดยมีกลไกที่แตกต่างจาก Ca^{2+} antagonist เพราะ non-selective K^+ channel inhibitor คือ TEA สามารถยับยั้งผลการคลายตัวของหลอดเลือดที่เกิดจากอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่ง แต่ TEA ไม่สามารถต้านฤทธิ์การคลายตัวที่เกิดจาก verapamil แต่เมื่อให้ ATP-sensitive K^+ inhibitor คือ glibenclamide พบว่า glibenclamide ไม่สามารถยับยั้งผลการคลายตัวของหลอดเลือดที่เกิดจาก อัลคาลอยด์หลักตาเสือทุ่ง และ verapamil ผลที่ได้จากการใช้ K^+ channel inhibitor ทั้ง 2 ชนิดสรุปว่าอัคลาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งอาจมีผลเปิด K^+ channel เช่น Na^+ activated , voltage-sensitive และ Ca^{2+}-activated K^+ channel เป็นต้น แต่ไม่มีผลต่อ ATP-sensitive K^+ channel จากการเปิดของ K^+ channel ที่เยื่อหุ้มเซลล์จะเกิด hyperpolarization ทำให้ VOC's เปิดลดลงและอาจมีผลต่อการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+} ผ่าน ROC's ซึ่งทำให้ปริมาณแคลเซียมเข้าเซลล์ลดลงส่งผลให้หลอดเลือดคลายตัวแต่สารที่มีโครงสร้างเป็น benzopyran nucleus ที่ใช้รักษาโรคหัวใจขาดเลือดต้องมีผลทำให้ ATP-sensitive K^+ channel เปิด เพราะ K^+ channel ชนิดนี้มีบทบาทป้องกันโรคหัวใจขาดเลือด ซึ่งพบใน Ro 319630 , cromakalim ที่มีสูตรโครงสร้างเป็น benzopyran nucleus ดังนั้นต้องมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ อัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งให้มีผลต่อ ATP-sensitive K^+ channel และศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งกับ K^+ efflux เพิ่มเติมเช่นการใช้ ^{86}Rb efflux หรือการใช้เทคนิค voltage clamp วัด K^+ current เป็นต้น การสกัดอัลคาลอยด์จากต้นตาเสือทุ่งสามารถแยกสกัดได้ผลผลิตปริมาณสูง และการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่มีผลลดการหดตัวหลอดเลือดหัวใจและไตของสุกรโดยใช้สารมาตรฐานกระตุ้น

การหดตัวชนิดต่างๆ ดังนั้นการนำสมุนไพรตาเสือทุ่งมาใช้รักษาโรคหัวใจขาดเลือด เป็นการพัฒนาศักยภาพสมุนไพรไทยเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ แต่ควรมีการศึกษาขนาด, ปริมาณที่เหมาะสมต่อการรักษาโรคและพิษวิทยาของอัลคาลอยด์หลักจากตาเสือทุ่งเพิ่มเติมต่อไป