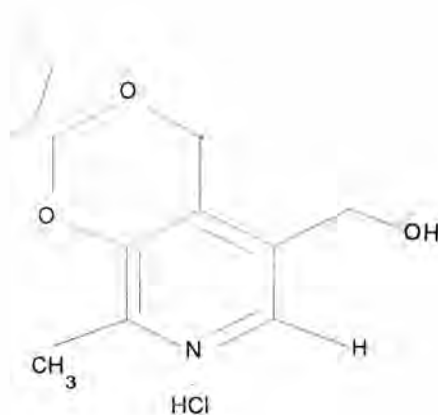


บทที่ 1

บทนำ

CU-763-10-01

CU-763-10-01 เป็นสารสังเคราะห์โดย ผศ.ดร. ชำนาญ ภัทรพานิช และ นายเฉลิมเกียรติ สงคราม ภาควิชา เคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีมวลโมเลกุล 315.85 โดยเป็นการรวมสูตรโครงสร้างของ 2-propylpentanal acetals เข้ากับ pyridoxine สูตรโครงสร้างดังภาพที่ 1 โดยที่ 2-propylpentanal acetals เป็น prodrug ของ valproic acid ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงและออกฤทธิ์กว้างขวางในการต้านชัก ส่วน pyridoxine หรือ vitamin B6 เป็น cofactor ของ glutamic acid decarboxylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในขบวนการสร้าง gamma aminobutyric acid (GABA) จึงคาดว่า CU-763-10-01 ที่สังเคราะห์ขึ้นนี้จะมีประสิทธิภาพในการต้านชักสูง



ภาพที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างของ CU-763-10-01

จากการศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านชักของ CU-763-10-01 (มยุรีและทิพย์สุชน, 2538) สามารถออกฤทธิ์ต้านชักที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Maximal Electroshock Seizure (MES) ได้ แต่ขนาดของยาที่สามารถป้องกันการชักได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (median effective dose : ED_{50}) ซึ่งเท่ากับ 100 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม นั้นทำให้สัตว์ทดลองตาย ดังนั้นขนาดที่ให้ผลการรักษาจึงเป็นขนาดที่ไม่ปลอดภัยสำหรับใช้เป็นยาด้านชัก

อุรารัตน์, 2539 ได้ศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ CU-763-10-01 พบว่า สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบท่อนำสุจิ (vas deferens) ที่แยกจากหนูขาวเมื่อกระตุ้นด้วย norepinephrine (NE) ได้ แต่ไม่สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ที่แยกจากกระต่ายได้ เมื่อกระตุ้นด้วย NE แต่เมื่อกระตุ้นด้วย KCl ปรากฏว่า CU-763-10-01 สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบทั้งสองชนิดนี้ได้ จะเห็นได้ว่า ฤทธิ์ของ CU-763-10-01 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบท่อนำสุจิหนูขาวและหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากกระต่ายมีความแตกต่างกันเมื่อกระตุ้นด้วย NE ซึ่งมียางานว่า ในกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดและท่อนำสุจิ NE จะ mediated ผ่าน α_1 -adrenoceptor (Minneman, 1988) จึงคาดว่ากลไกการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ CU-763-10-01 มีผลต่อ α_1 -adrenoceptor แต่ละ subtype แตกต่างกัน

นอกจากนี้แล้ว α -adrenoceptor มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ทางสรีรวิทยา รวมถึงการควบคุมความดันโลหิต (Minneman, 1988) การยับยั้ง α -adrenoceptor สามารถลดความดันโลหิตได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการยับยั้งที่ α_1 -adrenoceptor เช่น prazosin โครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่มนี้ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ดังจะเห็นได้จาก prazosin อยู่ในกลุ่ม piperaziny quinazoline ส่วน yohimbine เป็น alkaloid มีโครงสร้างทางเคมีคล้าย reserpine และ phentolamine อยู่ในกลุ่ม imidazoline เป็นต้น

กล้ามเนื้อเรียบมีอยู่ทั่วไปตามอวัยวะต่างๆ เช่น หลอดเลือด ทางเดินหายใจ ทางเดินปัสสาวะ ระบบสืบพันธุ์ ระบบทางเดินอาหาร และ ตา ซึ่งในแต่ละอวัยวะเหล่านี้จะมีตัวรับ (receptor) ที่แตกต่างกัน จึงมีความไวต่อตัวกระตุ้นต่างกัน เช่น กล้ามเนื้อเรียบที่ลำไส้จะไวต่อ acetylcholine ในขณะที่กล้ามเนื้อเรียบที่หลอดเลือดไม่สามารถกระตุ้นโดยใช้ acetylcholine และ ถึงแม้ว่าอวัยวะมีตัวรับที่เหมือนกัน แต่ก็อาจมีความไวต่อสารกระตุ้นตัวเดียวกันไม่เหมือนกัน จะเห็นได้ว่า มีความหลากหลายในกระบวนการกระตุ้นให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ นอกจากนี้แล้วตัวรับนั้นยังแบ่งเป็นชนิดย่อยๆ (subtype) ได้อีก เช่น 5-HT₇-receptor แบ่งเป็น 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} และ 5-HT_{1D} (Rang, Dale และ Ritter, 1995) หรือ α_1 -adrenoceptor แบ่งเป็น α_{1a} , α_{1b} และ α_{1d} -adrenoceptor เป็นต้น ทำให้ต้องมีการศึกษาคุณสมบัติของกล้ามเนื้อเรียบต่อไป

Hieble และคณะ, 1995 ได้แบ่ง α_1 -adrenoceptor เป็น 3 subtype คือ α_{1A} , α_{1B} และ α_{1D} -adrenoceptor โดยอาศัยวิธีการต่างๆ เช่น การวิเคราะห์โดย radioligand binding การทำงาน (functional experiments) เทคนิคทางชีวโมเลกุล (molecular biological techniques) และการใช้สารยับยั้งจำเพาะ (selective antagonists) α_1 -adrenoceptor ทั้ง 3 subtype นี้จะมี high affinity ต่อ prazosin ($pK_{11} > 9$) นอกจากนี้ยังพบว่ามี α_1 -adrenoceptor ที่มี affinity ต่อ prazosin ต่ำ ($pK_{11} < 9$) จึง

แยกเป็น α_{11} -adrenoceptor (Ford และคณะ, 1994) จากวิธีการต่างๆ เหล่านี้ พบว่า ท่อน้ำอสุจิหนูขาว จะหดตัวเมื่อกระตุ้นด้วย NE โดยจะ mediated ผ่าน α_{1a} -adrenoceptor (Aboud, Shafii และ Docherty, 1993; Kenny และคณะ, 1994; Burt, Chapple, และ Marshall, 1995)

Kenny และคณะ, 1995 ได้ศึกษาการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว พบว่าเมื่อกระตุ้นด้วย NE จะ mediated ผ่าน α_{1c} -adrenoceptor ซึ่งตรงกับผลการศึกษาของ Testa และคณะ, 1995 ในขณะที่ หลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากกระต่าย NE จะ mediated ผ่าน α_{1L} และ α_{1B} -adrenoceptor (Muramatsu, Kigoshi และ Oshita, 1990) จึงเป็นที่น่าสนใจว่า สามารถใช้ CU-763-10-01 เป็นเครื่องมือ ทางเภสัชวิทยา (pharmacological tool) สำหรับแยก α_1 -adrenoceptor subtype ออกจากกันได้หรือไม่ โดยใช้กล้ำมเนื้อเรียบท่อน้ำอสุจิหนูขาว หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวและกระต่ายเป็นตัวแทนของ α_1 -adrenoceptor subtype แต่ละชนิด

ในปัจจุบันได้แบ่ง α_1 -adrenoceptor โดยอาศัยคุณสมบัติต่างๆ เช่น affinity ต่อ antagonist และการวิเคราะห์โดย radio-binding เป็นต้น ซึ่งแบ่ง α_1 -adrenoceptor ได้เป็น 3 subtype ดังตารางที่ 1 (Hieble และคณะ, 1995)

ตารางที่ 1 การแบ่ง α_1 -adrenoceptor เป็น subtype ต่างๆ

α_1 -adrenoceptor		Functional response	Binding assay	Chloroethylclonidine sensitivity	Selective antagonist
Native	Cloned				
α_{1A}	α_{1a}	rat kidney	rabbit liver	\pm species-dependent	SNAP-5089 5-methylurapidil
α_{1B}	α_{1b}	rat spleen		++++	
α_{1L}	α_{1d}	rat aorta	rat liver rat spleen	+++	BMY 7378 SK&F 105854

การหดตัวของกล้ำมเนื้อเรียบจะขึ้นกับปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ (intracellular free calcium) และความไวของ contractile elements ต่อแคลเซียม ในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมภายในเซลล์ การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ เช่น การหลั่งสารสื่อประสาท ฮอว์โมน สารนี้จะจับกับตัวรับที่จำเพาะ ซึ่ง couple อยู่กับ G-protein ชนิดต่างๆ แล้วไปมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เช่น phospholipase C (PLC) ซึ่งจะ hydrolysis phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate (PIP₂) ได้

inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) และ diacylglycerol (DAG) หรือมีผลต่อเอนไซม์ adenylyl cyclase (AC) ซึ่งจะเปลี่ยน adenosine 5'-triphosphate (ATP) ได้ cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) เป็นต้น จากนั้นแล้วจะมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ ทำหน้าที่เป็น second messenger ปริมาณของแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ที่เพิ่มขึ้นระหว่างการหดตัวนั้น เพิ่มจาก 2 แหล่ง (Horowitz, และคณะ, 1996 : Rang และ Dale, 1995) คือ

1. แคลเซียมภายนอกเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์โดยตรง ผ่าน ion channel หรือ แลกเปลี่ยนกับไอออนอื่น (ion exchanger)

2. แคลเซียมที่ปลดปล่อยออกจากแหล่งสะสมแคลเซียมภายในเซลล์

แคลเซียมจากภายนอกเซลล์เคลื่อนที่ผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ 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

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

แคลเซียมที่ปลดปล่อยออกจากแหล่งสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ มีกลไกที่เกี่ยวข้อง คือ

1. calcium-induced calcium release (CICR) เกิดจากแคลเซียมจากภายนอกเซลล์เคลื่อนที่ผ่านเข้าภายในเซลล์แล้วกระตุ้นให้มีการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ (Karaki และ Weiss, 1988 ; Zucchi และ Ronca-Testoni, 1997) CICR นี้สามารถกระตุ้นโดย caffeine และ ยับยั้งได้ด้วย ryanodine

2. inositol trisphosphate-induced calcium release (IICR) เกิดจากการกระตุ้นตัวรับ แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีทำให้มี IP_3 มากขึ้นมีผลไปกระตุ้นให้มีการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ (Mikoshiba, 1993) โดย IICR นี้จะถูกควบคุมทั้งจากแคลเซียมอิสระภายใน

เซลล์และ IP_3 ถ้าแคลเซียมอิสระภายในเซลล์มีปริมาณต่ำ (<300 nM) จะกระตุ้น IICR แต่ถ้าสูงเกินกว่านี้จะยับยั้ง IICR (Iino และ Endo,1992)

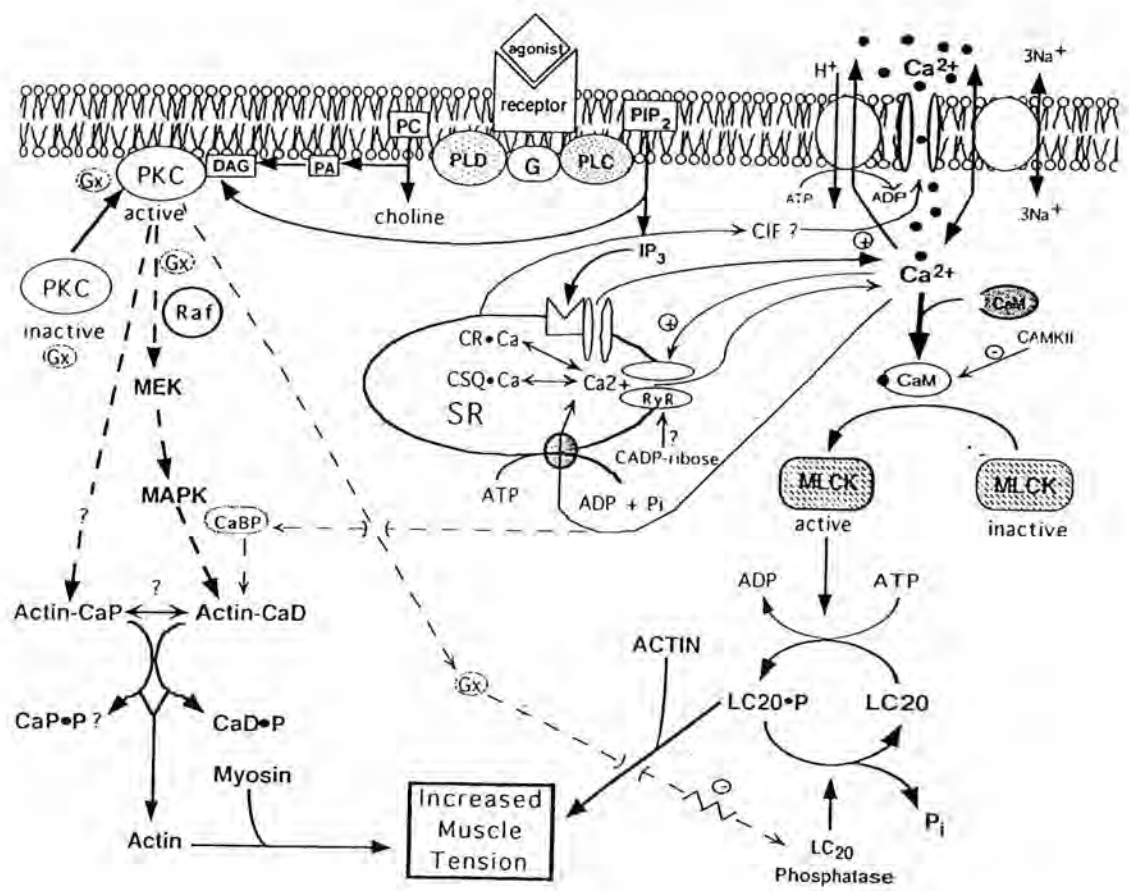
กลไกการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

เมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมอิสระภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น แคลเซียมจะจับกับ calmodulin (CaM) เป็น calcium-calmodulin complex ซึ่งจะกระตุ้นเอนไซม์ myosin light chain kinase (MLCK) ทำให้เกิด phosphorylation ของ myosin ซึ่งในสภาวะนี้ myosin จะสามารถทำปฏิกิริยากับ actin มีผลทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ phosphorylated myosin จะถูก dephosphorylate โดยเอนไซม์ MLC phosphatase ดังนั้นปริมาณของ phosphorylated myosin จะขึ้นกับความสมดุลของเอนไซม์ MLCK และ MLC phosphatase แสดงดังภาพที่ 2 อย่างไรก็ตามพบว่า ในระหว่างการหดตัวนั้น phosphorylated myosin จะเพิ่มขึ้นอย่างมากใน 30-60 วินาทีแรก ในขณะที่ขนาดของการหดตัวเพิ่มขึ้น หลังจากนั้น phosphorylation จะลดลงอย่างมาก แสดงให้เห็นว่า phosphorylated myosin ไม่ได้มีส่วนสำคัญในการทำให้เกิด sustained contraction ซึ่ง sustained contraction นี้เกิดจากการเพิ่มขึ้นของ DAG ส่วนการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบเกิดจากของแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ลดลงสู่ระดับปกติ ทำให้ CaM แยกตัวหลุดออกจาก complex ซึ่งจะ inactivate MLCK ทำให้เกิด dephosphorylation ของ myosin โดยเอนไซม์ MLC phosphatase มีผลให้ myosin ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ actin ได้นอกจากนี้การออกฤทธิ์ของ MLCK ถูกควบคุมโดย cAMP-dependent protein kinase ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา phosphorylation ของ MLCK ทำให้มีความชอบ (affinity) ที่จะจับกับ calcium-calmodulin complex ได้น้อยมาก ทำให้เกิด dephosphorylation ของ myosin และเกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

ปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ลดลงโดยกลไกดังนี้ คือ

1. ขับออกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ทาง Ca^{2+} pump หรือ Na^+/Ca^{2+} exchanger
2. มีการจับแคลเซียมไว้ในเซลล์ (Ca^{2+} sequestration)

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



ภาพที่ 2 กลไกการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ (Horowitz และคณะ, 1996)

การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบสามารถนำไปคาดคะเนการเคลื่อนที่ของแคลเซียมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ โดยใช้แคลเซียมอิสระภายในเซลล์เป็นตัวชี้วัด (indicator) ได้ด้วยการใช้ตัวกระตุ้น 2 ชนิด คือ high potassium (high K^+) และ NE (หรือ phenylephrine) ตัวกระตุ้นทั้งสองนี้จะทำให้กล้ามเนื้อเรียบหดเลือดหดตัวและมี sustained contraction แต่มีกลไกต่างกัน โดยที่เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบหดเลือดด้วย high K^+ จะเกิด membrane depolarization ทำให้มีการเคลื่อนที่ของแคลเซียมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ทาง L-type calcium channel ซึ่งสามารถยับยั้งได้ด้วย Ca^{2+} blocker เช่น verapamil และเมื่อกระตุ้น α -adrenoceptor ด้วย NE (หรือ phenylephrine) หดเลือดจะมีการหดตัวเมื่อน้ำสารละลายที่ปราศจากแคลเซียม ทั้งนี้เพราะในภาวะปราศจากแคลเซียม NE ออกฤทธิ์โดยการกระตุ้นให้มีการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ (Nogueta และ D'Ocon, 1993)

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 verapamil สามารถยับยั้งการหดตัวและลดปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ของหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวได้ เมื่อกระตุ้นด้วย high K^+ หรือ NE ซึ่งเป็นไปตามขนาดความเข้มข้น (dose-dependent)

แคลเซียมที่เคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ทาง L-type calcium channel จะมีส่วนสำคัญในการคงระดับของ basal tone ของกล้ามเนื้อเรียบหดเลือด (Asano และคณะ, 1995) จากการศึกษาของ Nakayama และ Tanaka, 1993 พบว่า การยึดของกล้ามเนื้อหลอดเลือด coronary artery สามารถกระตุ้นให้ L-type calcium channel เปิดออกได้ และทำให้ basal tone เพิ่มขึ้น

นอกจากนี้ยังพบว่า Ca^{2+} blocker ยังสามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ได้ โดยการยับยั้งการไล่ที่ (deplete) แคลเซียมออกจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์อีกด้วย เช่น เมื่อใช้

ryanodine กระตุ้น femoral artery หนูขาว จะทำให้แคลเซียมภายในแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมถูกไล่ออกมา ส่งผลให้มีปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์สูงขึ้นและเกิดการหดตัว ซึ่ง verapamil สามารถยับยั้งได้ (Kojima และคณะ, 1994)

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

ในการกระตุ้น α_1 -adrenoceptor ด้วย NE จะทำให้มีปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์สูงขึ้น และทำให้กล้ามเนื้อเรียบหดตัว (Godfraind, 1967) ซึ่งพบว่าปริมาณแคลเซียมอิสระนี้สูงขึ้นในช่วงเวลาสั้นๆ ทำให้มีการหดตัวอย่างรวดเร็ว (phasic contraction) จากนั้นตามด้วย sustained contraction (tonic contraction) phasic contraction เกิดจากการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ (Rapoport, 1987) และ tonic contraction เกิดจากการเคลื่อนที่ของแคลเซียมจากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ (Nishimura, Ota และ Ito 1991)

จากการศึกษาของ Karaki และ Weiss, 1988 พบว่า verapamil 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 นอกจากนี้ยังพบว่า การให้ NE กระตุ้น α_1 -adrenoceptor ที่หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว ใน Ca^{2+} -free solution การหดตัวยังเกิดขึ้นได้ แสดงว่า NE ทำให้มีการปลดปล่อยแคลเซียมออกจากแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ (Nogueta และ D'Ocon, 1993)

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

3. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange

การแลกเปลี่ยนของโซเดียมและแคลเซียมจะมีผลทำให้มีการเคลื่อนที่ของแคลเซียมเข้าสู่ภายในเซลล์ หรือถ้าภายในเซลล์มีปริมาณแคลเซียมมากเกินไปก็จะมีการขับแคลเซียมออกสู่นอกเซลล์ แต่การเคลื่อนที่ของแคลเซียมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ทาง pathway นี้จะทำให้กล้ามเนื้อเรียบหดตัวเพียงเวลาสั้นๆ เท่านั้น เพราะเซลล์จะนำแคลเซียมเข้าสู่แหล่งเก็บภายในเซลล์

4. Calcium release from SR

แคลเซียมที่ปลดปล่อยออกจากแหล่งสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ มีกลไกที่เกี่ยวข้อง คือ calcium-induced calcium release (CICR) (Karaki and Weiss, 1988 ; Zucchi และ Ronca-Testoni, 1997) และ inositol trisphosphate-induced calcium release (IICR) (Mikoshiba, 1993) ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าแคลเซียมที่ปลดปล่อยจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์จะตอบสนองต่อ agonist ในช่วงแรกทั้งนี้ เป็นเพราะ

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^+ และ Ca^{2+} blocker สามารถยับยั้งการหดตัวเมื่อกระตุ้นด้วย NE ได้ 45% ในหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว และ 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 ซึ่งการขับแคลเซียมออกนอกเซลล์นั้น นอกจากจะขับออกทาง $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange แล้วยังสามารถขับออกผ่านทาง Ca^{2+} pump ได้ด้วย ซึ่งส่วนใหญ่แล้วแคลเซียมจะถูกขับออกจากเซลล์ผ่านทาง Ca^{2+} pump ได้มากกว่า $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange

6. mitochondria

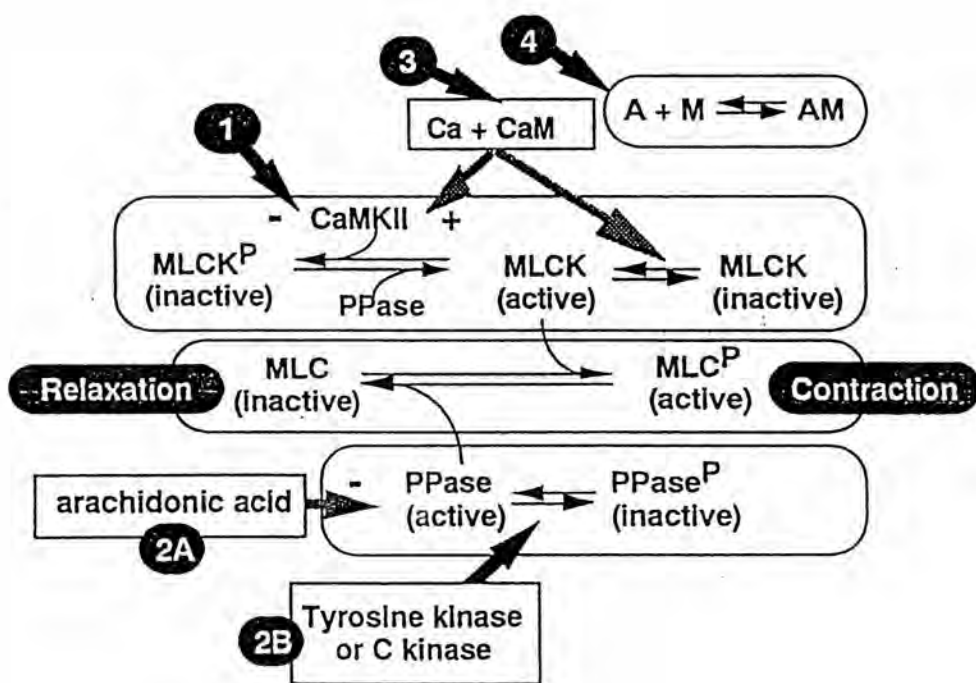
การยับยั้งการทำงานของ mitochondria จะทำให้การสร้าง ATP และการหดตัวของกล้ามเนื้อลดลง แต่จะไม่มีผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดทั้งนี้เพราะ แหล่งให้ ATP นอกจากจะได้จากการทำงานของ mitochondria แล้วยังได้จากขบวนการ glycolysis อีกด้วย แคลเซียมสามารถกระตุ้นให้ mitochondria สร้าง ATP ก่อนที่กล้ามเนื้อเรียบจะใช้ ATP ในการหดตัว และถ้าหากเกิดความผิดปกติขึ้นภายในเซลล์จนทำให้ปริมาณแคลเซียมสูงขึ้น mitochondria ก็ยังทำหน้าที่เป็นแหล่งเก็บแคลเซียมได้

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

กลไกที่สารกระตุ้นตัวรับชักนำให้กล้ามเนื้อเรียบเพิ่มความไวต่อแคลเซียม

ในขั้นตอนการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบนั้น เมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมอิสระภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้นแคลเซียมจะจับกับ calmodulin เป็น calcium-calmodulin complex แล้วไปกระตุ้นเอนไซม์ myosin light chain kinase (MLCK) ทำให้เกิด phosphorylation ของ myosin ซึ่งในสภาวะนี้ myosin จะสามารถทำปฏิกิริยากับ actin ในขั้นตอนต่างๆ เหล่านี้มีกลไกที่เกี่ยวข้องในการเพิ่มความไวต่อแคลเซียม แสดงดังภาพที่ 3 ดังนี้ (Karakci และคณะ, 1997)

1. ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ calmodulin kinase II (CaMKII) ซึ่งจะทำให้ MLCK อยู่ในรูป active
2. ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ myosin light chain phosphatase (PPase) ทำให้ myosin light chain อยู่ในรูป active โดยที่ arachidonic acid ซึ่งได้จากการเปลี่ยน phospholipid โดยเอนไซม์ Phospholipase A_2 จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PPase (2A) ส่วน PKC และ tyrosine kinase จะทำให้ PPase อยู่ในรูป inactive (2B)
3. เพิ่มความเข้มข้นของ free calmodulin (CaM)



ภาพที่ 3 กลไกในการเพิ่มความไวต่อแคลเซียม (Karaki และคณะ, 1997)

4. กระตุ้นให้ actin สามารถทำปฏิกิริยากับ myosin ที่ไม่ถูก phosphorylate ได้

เมื่อกระตุ้น β -adrenoceptor จะทำให้ cAMP มีปริมาณเพิ่มขึ้น มีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ ซึ่ง cAMP ที่เพิ่มขึ้นนี้มีผลในการลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมากกว่าการลดปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ จึงคาดว่า cAMP ทำให้กล้ามเนื้อคลายตัวเนื่องจากการลดความไวของ contractile elements ต่อแคลเซียม (Yamagishi และคณะ, 1994)

การเคลื่อนที่ของแคลเซียมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์

Bolton, 1979 ได้อธิบายกลไกที่ทำให้แคลเซียมเคลื่อนเข้าสู่ภายในเซลล์โดยอาศัยการกระตุ้นให้กล้ามเนื้อเรียบหดตัวโดยใช้ตัวกระตุ้นที่มีกลไกการกระตุ้นให้กล้ามเนื้อเรียบหดตัวต่างกัน คือ high K^+ และ NE (หรือ phenylephrine) พบว่า แคลเซียมเคลื่อนเข้าสู่ภายในเซลล์ 2 pathway คือ ผ่านเข้าเซลล์ทาง voltage-dependent calcium channel (voltage-operated calcium channel หรือ VOC) และทาง receptor-linked calcium channel (receptor-operated calcium channel หรือ ROC) ต่อมาพบว่าทั้ง high K^+ และ NE สามารถเปิด L-type calcium channel ดังนั้น Karaki และคณะ, 1997 จึงอธิบายการเคลื่อนที่ของแคลเซียม (แสดงดังภาพที่ 4) ไว้ดังนี้

1. high K^+ ทำให้เกิด membrane depolarization ทำให้มีการเคลื่อนที่ของแคลเซียมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ทาง L-type calcium channel ซึ่งสามารถยับยั้งได้ด้วย Ca^{2+} blocker เช่น verapamil nifedipine

2. NE และ agonist กระตุ้นให้มีการปลดปล่อยแคลเซียมออกจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ ซึ่งแคลเซียมที่ปลดปล่อยมานี้จะมีผล 2 อย่างคือ

2A. เคลื่อนที่เข้าสู่ subplasmalemma space (noncontractile compartment) ซึ่งจะควบคุม membrane Ca^{2+} -dependent mechanism เช่น CICR

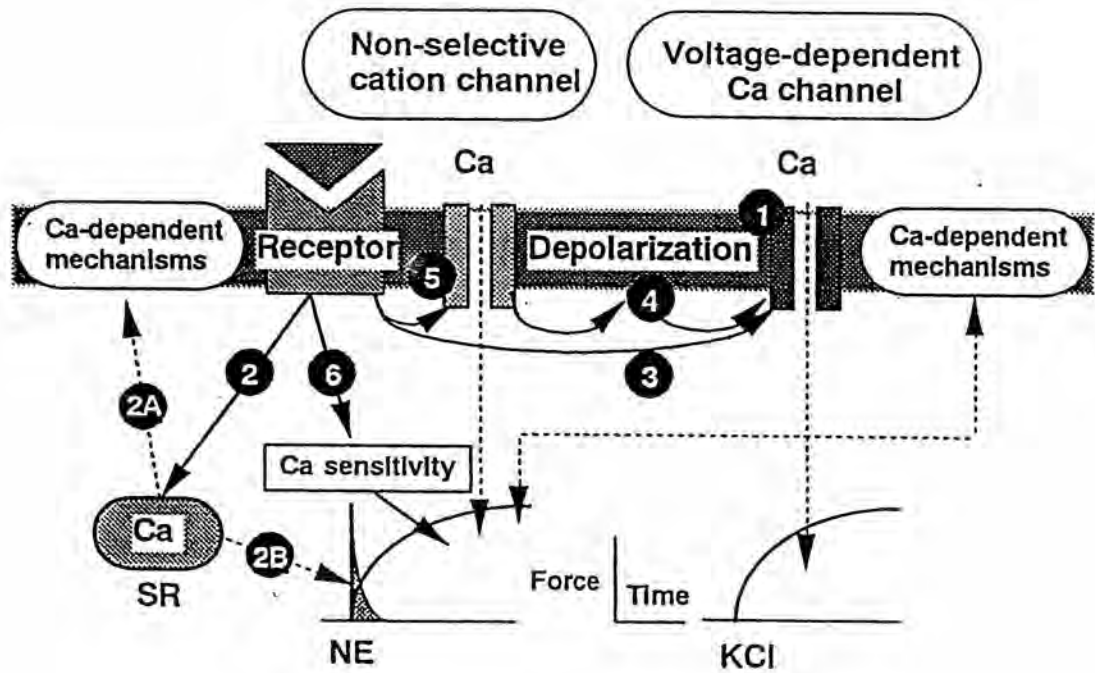
2B. เคลื่อนที่เข้าสู่ cytoplasm (contractile compartment) มีผลให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

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

4. NE และ agonist กระตุ้นให้มีการเปิดของ nonselective cation channel ทำให้เกิด membrane depolarization มีผลให้แคลเซียมเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ทาง L-type calcium channel ซึ่งกลไกนี้ก็คือ ROC ที่เสนอโดย Bolton ดังที่กล่าวข้างต้น

5. NE และ agonist กระตุ้นให้มีการเปิดของ nonselective cation channel ซึ่ง channel นี้ นอกจากจะยอมให้ monovalent cation ผ่านแล้วยังให้แคลเซียมผ่านได้ด้วย

6. NE และ agonist สามารถเพิ่มความไวของ contractile elements ต่อ Ca^{2+}



ภาพที่ 4 กลไกการเคลื่อนที่ของแคลเซียมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Karakci และคณะ, 1997)

กลไกหลักในการชักนำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบโดย agonist นั้นคือ การกระตุ้นให้มีการเปิดออกของ L-type calcium channel ส่วนน้อยที่จะผ่านทาง nonselective cation channel หรือ CRAC นอกจากนี้การเกิด sustained contraction เกิดจากการที่ agonist ชักนำให้มีการเคลื่อนที่ของแคลเซียมเข้าสู่เซลล์ ทำให้มีปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์สูงขึ้น Ca^{2+} blocker สามารถลดปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ได้แต่ลดการหดตัวได้เล็กน้อย ทั้งนี้เพราะ Ca^{2+} blocker ไม่สามารถยับยั้งกลไกที่ agonist เพิ่มความไวของ contractile elements ต่อแคลเซียมได้ และการหดตัวในช่วง phasic contraction เกิดจากการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บภายในเซลล์นั้น จะถูกยับยั้งได้โดยการยับยั้งการทำงานของ SR แต่ไม่มีผลจากการใช้ Ca^{2+} blocker

เมื่อแคลเซียมภายใน noncontractile compartment ที่สูงขึ้นจะเป็นตัวควบคุมแบบย้อนกลับ (negative feedback) โดยที่แคลเซียมใน noncontractile compartment สามารถกระตุ้นกลไกต่างๆ ที่เยื่อหุ้มเซลล์และ SR ได้ เช่น กระตุ้นให้ K^+ channel เปิดออกทำให้เกิด membrane hyperpolarization สามารถยับยั้ง receptor-mediated signal transduction pathway ได้ นอกจากนี้การกระตุ้น Ca^{2+} pump และ Na^+/Ca^{2+} exchange ทำให้แคลเซียมใน compartment นี้และภายใน SR ลดลง

เมื่อไม่มี agonist มาจับที่ตัวรับ L-type calcium channel และ nonselective cation channel ก็จะปิดทำให้แคลเซียมไม่สามารถผ่านเข้าเซลล์ได้ และร่วมกับการทำงานของ Ca^{2+} pump และ Na^+/Ca^{2+} exchange ก็จะทำให้แคลเซียมอิสระภายในเซลล์ลดลงสู่ภาวะปกติ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ CU-763-10-01 ต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของหนูขาวและกระต่าย ท่อนำสุจิ (vas deferens) ของหนูขาว และหลอดลม (trachea) ของหนูตะเภา
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ CU-763-10-01 ต่อความดันโลหิตในหนูขาวและกระต่าย
3. เพื่อศึกษาตำแหน่งในการออกฤทธิ์ (site of action) ของ CU-763-10-01 ที่มีผลต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของหนูขาวและกระต่าย ท่อนำสุจิ (vas deferens) ของหนูขาว และหลอดลม (trachea) ของหนูตะเภา

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ CU-763-10-01 ต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของหนูขาวและกระต่าย ท่อนำอสุจิ (vas deferens) ของหนูขาว และหลอดลม (trachea) ของหนูตะเภา
2. ทำให้ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ของ CU-763-10-01 ต่อความดันโลหิตในหนูขาวและกระต่าย
3. นำมาพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์หรือทางเภสัชวิทยาต่อไป