จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบาราคอลจากใบขี้เหล็ก (*Cassia siamea*) ที่มีต่อตัวรับชนิด Ligand-gated ion channels ในเซลล์ประสาทของหนูขาว

โดย

ธงชัย สุขเศวต

มกราคม 2546

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบาราคอลจากใบขี้เหล็ก (*Cassia siamea*) ที่มีต่อตัวรับชนิดช่องไอออนที่กระตุ้นให้เปิดด้วยลิแกนด์ในเซลล์ประสาทของหนูขาว : ตัวรับกาบาเอและตัวรับไกลซีน

(Effects of Barakol Extracted from *Cassia siamea* on Ligand-gated Ion Channels in Rat Neurones : $GABA_A$ and Glycine Receptors)

โดย

ผศ.ดร. ธงชัย สุขเศวต

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มิถุนายน พ.ศ. 2545

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ กองทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัย ภาควิชาสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่และเครื่องมือในการวิจัย หน่วยปฏิบัติการวิจัยประสาทสรีรวิทยาและประสาทเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ ที่ให้การสนับสนุนด้านเครื่องมือในการวิจัย รศ.ดร.ภาวิช ทองโรจน์ รศ.ดร.บุญยงค์ ตันติสิระ ผศ.สำลี ใจดี ผศ.พงษ์ศักดิ์ กรรณล้วน ที่ให้การสนับสนุนในด้านต่างๆ รศ.ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ ให้ความสนับสนุนในการสกัดสารบาราคอลจากใบขี้เหล็ก เรือโทสุเทพ จันทร์เทศ ผู้เป็นผู้ช่วยและเป็นกำลังสำคัญในการทดลอง อาจารย์ บุคลากรและนิสิตบัณฑิตศึกษาของภาควิชาสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ ที่ให้การช่วยเหลือในการวิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่
เลขทะเบียน 011560
วัน,เดือน,ปี 13 มิ.ย. 46

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบาราคอลจากใบขี้เหล็ก (*Cassia siamea*) ที่มีต่อตัวรับชนิดช่องไอออนที่กระตุ้นให้เปิดด้วยลิแกนด์ ในเซลล์ประสาทของหนูขาว : ตัวรับกาบาเอและตัวรับไกลซีน

ชื่อผู้วิจัย ผศ.ดร.ธงชัย สุขเศวต

เดือนและปี มิถุนายน พ.ศ. 2545

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบาราคอลจากใบขี้เหล็กที่มีต่อตัวรับชนิดช่องไอออนที่กระตุ้นให้เปิดด้วยลิแกนด์ ในเซลล์ประสาทของหนูขาว ได้ทำการศึกษาเฉพาะผลที่มีต่อตัวรับกาบาเอและตัวรับไกลซีน โดยได้ดำเนินการพัฒนาวิธีการแยกเซลล์ประสาทเดี่ยวจากสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูขาวพันธุ์วิสตาร์ เพศผู้ อายุ 21-27 วัน เซลล์ประสาทรูปปิรามิดที่แยกได้ยังคงลักษณะทางกายสันฐานวิทยาไว้ได้ดีพอควรและมีการตอบสนองต่อกาบาและไกลซีนได้ดีด้วยการวัดกระแสไฟฟ้าที่ไหลผ่านเซลล์แบบทั้งเซลล์โดยเทคนิคแพทช์แคลมป์ การศึกษาผลของบาราคอลที่มีต่อตัวรับกาบาเอและตัวรับไกลซีน พบว่าบาราคอล (10-3000 ไมโครโมลาร์) ไม่มีผลกระตุ้นโดยตรงต่อเซลล์ประสาทรูปปิรามิด ในการทำให้เกิดกระแสไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ สารบาราคอลความเข้มข้นต่ำ (1-30 ไมโครโมลาร์) จะไม่มีผลต่อกระแสไฟฟ้าที่กระตุ้นให้เกิดจากไกลซีน แต่สามารถเสริมฤทธิ์กระแสที่เกิดจากกาบา เมื่อเปรียบเทียบกับไดอะซิแพม พบว่าต้องใช้บาราคอลที่มีความเข้มข้นสูงกว่า (30 ไมโครโมลาร์) จึงให้การเสริมฤทธิ์สูงสุด (ร้อยละ168.2±20.66) ใกล้เคียงกับการเสริมฤทธิ์โดยไดอะซิแพม (1 ไมโครโมลาร์) (ร้อยละ184.8±9.97) สำหรับเพนโตบาบิทาลโซเดียมมีผลเสริมฤทธิ์สูงสุดที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ โดยร้อยละของการเสริมฤทธิ์สูงถึง 482.3±32.54 ซึ่งมากกว่าผลจากบาราคอลและไดอะซิแพม ผลในการเสริมฤทธิ์กาบาของบาราคอลนี้ไม่สามารถยับยั้งด้วยสารฟลูมาเซนิลซึ่งเป็นสารต้านที่บริเวณยึดเหนี่ยวเบนโซไดอะซิพีนบนตัวรับกาบาเอ แสดงให้เห็นว่าการเสริมฤทธิ์กาบาของบาราคอ ลที่ตัวรับกาบาเอ ไม่ผ่านบริเวณยึดเหนี่ยวเบนโซไดอะซิพีน ในขณะที่สารบาราคอลความเข้มข้นสูง 1000-3000 ไมโครโมลาร์ จะยับยั้งกระแสที่เกิดจากกาบา และขนาด 100-1000 ไมโครโมลาร์ จะยับยั้งกระแสที่เกิดจากไกลซีน ซึ่งลักษณะการยับยั้งกระแสที่เกิดจากกาบาและไกลซีนของบาราคอลความเข้มข้นสูง มีลักษณะคล้ายคลึงกับสารต้านชนิดแข่งขันของตัวรับกาบาเอและไกลซีน คือ ไบคูคูลินและสตริกนินตามลำดับ สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของบาราคอลในการเสริมฤทธิ์กาบาที่ตัวรับกาบาเอในความเข้มข้นต่ำและการยับยั้งกาบาและไกลซีนในความเข้มข้นสูง ยังคงต้องการการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

Project Title	Effects of barakol extracted from *Cassia siamea* on ligand-gated ion channels in rat neurones : $GABA_A$ and glycine receptors
Name of Investigator	Assistant Professor Dr. Thongchai Sooksawate
Year	June 2002

Abstract

The study of the effects of barakol extracted from *Cassia siamea* on ligand-gated ion channels in rat neurones was performed, in this study, only the effects of barakol on $GABA_A$ and glycine receptors. The method of acute dissociation of hippocampal neurones from male Wistar rats aged 21-27 days was developed. The acutely dissociated hippocampal pyramidal neurones still preserved their morphological structure. The neurones could also response well to give the inward currents induced by gamma-aminobutyric acid (GABA) and glycine measured by whole-cell application of the patch clamp technique. The effects of barakol on the $GABA_A$ and the glycine receptors were also performed on the neurones using the whole-cell patch clamp technique. Barakol alone (10-3000 μM) did not induced inward or outward currents in these neurones. Barakol at low concentrations (1-30 μM) did not have any effect on glycine-induced currents but it enhanced GABA-induced currents. The maximal potentiation of GABA-induced currents by 30 μM barakol (168.2±20.66, n=13) was slightly lower than by 1 μM diazepam (184.8.2±9.97, n=15). The maximal potentiation of GABA-induced currents by 30 0 μM pentobarbital sodium (482.3±32.54, n=8) was higher than by 1 μM diazepam or by 30 μM barakol. The potentiation of GABA-induced currents by barakol could not inhibit by flumazenil, a benzodiazepine antagonist. This result indicated that the potentiation GABA-induced currents by barakol does not act via benzodiazepine site on the $GABA_A$ receptors. However, the high concentrations of barakol inhibited both GABA- (1000-3000 μM barakol) and glycine-induced (100-1000 μM barakol) currents. These inhibitory effects of high concentrations of barakol resembled the inhibitory effects of GABA-induced currents by a GABA competitive antagonist bicuculline and of glycine-induced currents by a glycine competitive antagonist strychnine. The mechanisms of the potentiation and inhibition of GABA-induced currents and inhibition of glycine-induced currents by barakol still remain to be further investigated.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อ	iii
Abstract	iv
สารบัญ	v
รายการภาพประกอบ	vi
รายการสัญลักษณ์	ix
บทนำ	1
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
วิธีการวิจัย	7
ผลการวิจัย	10
การอภิปรายผล	38
ข้อสรุป	44
ข้อเสนอแนะ	45
ส่วนอ้างอิง	46

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

รูปที่ หน้า

1. โครงสร้างทางเคมีของ A. สารบาราคอล (Barakol) B. แอนไฮโดรบาราคอล (Anhydrobarakol) และ C. บาราคอลไฮโดรคลอไรด์ (Barakol hydrochloride) 2
2. ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ของเซลล์ประสาทที่แยกออกมาทันที จากสมองส่วน Hippocampus ของหนูขาว 10
3. ภาพบันทึกของกระแสไฟฟ้าที่ไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทรูปปิรามิด ที่แยกได้ทันทีจากสมองส่วน Hippocampus ของหนูขาว จากการให้ GABA ความเข้มข้น 0.3-300 μM 11
4. ภาพบันทึกแสดงผลของ Bicuculline methochloride 5 μM ในการยับยั้งฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 3-300 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) 12
5. ภาพบันทึกแสดงผลของ Picrotoxinin 10 μM ในการยับยั้งฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 1-1000 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) 13
6. GABA concentration-response curve ที่ได้จากการให้ GABA ความเข้มข้น 0.3-300 μM ไปยังเซลล์ประสาทรูปปิรามิด 14
7. GABA concentration-response curve แสดงการยับยั้งฤทธิ์ของกาบาด้วยสาร bicuculline methochloride (BMC) 15
8. GABA concentration-response curve แสดงการยับยั้งฤทธิ์ของ GABA ด้วยสาร picrotoxinin 16
9. ภาพบันทึกแสดงผลของ Diazepam 1 μM ในการเสริมฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 0.3-1000 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) 17
10. ภาพบันทึกแสดงผลของ Pentobarbital sodium (PB) 10 μM ในการเสริมฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 0.3-1000 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) 18
11. GABA concentration-response curve แสดงการเสริมฤทธิ์ของกาบาด้วยสาร 0.3 และ 1 μM Diazepam (DZP) 19
12. GABA concentration-response curve แสดงการเสริมฤทธิ์ของกาบาด้วยสาร 10 และ 30 μM Pentobarbital sodium (PB) 20
13. ภาพบันทึกแสดงผลกระตุ้นโดยตรงของ Pentobarbital sodium 30-1000 μM ต่อตัวรับกาบาเอ ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) 20

รูปที่ หน้า

14. ภาพบันทึกของกระแสไฟฟ้าที่ไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทรูปปิรามิด ที่แยกได้ทันทีจากสมองส่วน Hippocampus ของหนูขาว จากการให้ ไกลซีน ความเข้มข้น 3-3000 μM 21

15. ภาพบันทึกแสดงผลของ Strychnine 5 μM ในการยับยั้งฤทธิ์ของ Glycine ความเข้มข้น 3-3000 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) 22

16. Glycine concentration-response curve ที่ได้จากการให้ Glycine ความเข้มข้น 3-3000 μM ไปยังเซลล์ประสาทรูปปิรามิด 23

17. Glycine concentration-response curve แสดงการยับยั้งฤทธิ์ของไกลซีนด้วยสาร strychnine 24

18. ภาพบันทึกแสดงผลของบาราคอล ความเข้มข้น 10 μM ในการเสริมฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 0.3-300 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) 25

19. ภาพบันทึกแสดงผลบาราคอล ความเข้มข้น 30-3000 μM ไม่ทำให้เกิดกระแสไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane currents) 26

20. ผลของบาราคอล 1 และ 10 μM ที่มีต่อ GABA concentration-response curve ที่ได้จากการให้ GABA ความเข้มข้น 0.3-300 μM ไปยังเซลล์ประสาทรูปปิรามิด 26

21. ผลของบาราคอล (1-3000 μM, Barakol), Diazepam (0.001-1000 μM, DZP), และ Pentobarbital sodium (10-1000 μM, PB) ที่มีต่อกระแสที่เกิดจากการให้ 3 μM GABA ไปยังเซลล์ประสาทรูปปิรามิด 27

22. ภาพบันทึกแสดงผลของบาราคอล (Barakol), ความเข้มข้น 10-3000 μM ในการเสริมฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 3 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) 28

23. ภาพบันทึกแสดงผลของ Diazepam (DZP) ความเข้มข้น 0.001-30 μM ในการเสริมฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 3 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) 28

24. ภาพบันทึกแสดงผลของ Pentobarbital sodium (PB) ความเข้มข้น 1-1000 μM ในการเสริมฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 3 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) 29

25. ภาพบันทึกแสดงผลของบาราคอล ความเข้มข้น 3000 μM ในการยับยั้งฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 0.3-300 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) 30

26. ผลของบาราคอล 1000 และ 3000 μM ที่มีต่อ GABA concentration-response curve ที่ได้จากการให้ GABA ความเข้มข้น 0.3-1000 μM ไปยังเซลล์ประสาทรูปปิรามิด 31

รูปที่ หน้า

27. ภาพบันทึกแสดงผล Flumazenil ความเข้มข้น 1-15 μM ไม่มีผลต่อกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ที่เกิดจากการให้ GABA ความเข้มข้น 3 μM 31

28. ภาพบันทึกและกราฟแสดงผลการยับยั้งของ Flumazenil (5-15 μM) (FMZ) ต่อการเสริมฤทธิ์ของ Diazepam (1 μM) ต่อ GABA (3 μM) ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ 32

29. ภาพบันทึกและกราฟแสดง Flumazenil (5-15 μM, FMZ) ไม่มีผลต่อการเสริมฤทธิ์ของบาราคอล (10-30 μM) ต่อ GABA (3 μM) ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ 33

30. บาราคอล 10 μM ไม่มีผลต่อ Glycine concentration-response curve ที่ได้จากการให้ Glycine ความเข้มข้น 3-3000 μM ไปยังเซลล์ประสาทรูปปิรามิด 34

31. ภาพบันทึกและกราฟแสดงผลของบาราคอล (1-1000 μM, Barakol) ที่มีต่อกระแสที่เกิดจากการให้ 30 μM Glycine ไปยังเซลล์ประสาทรูปปิรามิด 35

32. ภาพบันทึกแสดงผลของ บาราคอล 300 μM ในการยับยั้งฤทธิ์ของ Glycine ความเข้มข้น 3-3000 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) 36

33. ผลของบาราคอล 100 และ 300 μM ที่มีต่อ Glycine concentration-response curve ที่ได้จากการให้ Glycine ความเข้มข้น 3-3000 μM ไปยังเซลล์ประสาทรูปปิรามิด 37

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการสัญลักษณ์

ANOVA	=	analysis of variance
ATP	=	adenosine triphosphate
cAMP	=	cyclic adenosine monophosphate
DMSO	=	dimethylsulfoxide
DZP	=	diazepam
FMZ	=	flumazenil
GABA	=	gamma-aminobutyric acid
HCl	=	hydrochloric acid
μM	=	micromolar
PB	=	pentobarbital sodium
PTX	=	picrotoxinin
PTZ	=	pentylenetetrazol
S.E.M.	=	standard error of the mean
TBPS	=	*t*-butylbicyclophosphorothionate
TM	=	transmembrane

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

ต้นขี้เหล็ก (*Cassia siamea*) เป็นพืชสมุนไพรที่ได้รับการบันทึกในตำรายาแผนไทยมาเป็นเวลานานแล้วว่า มีฤทธิ์คลายกังวล ทำให้ง่วงนอน ช่วยให้นอนหลับ นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในการประกอบอาหาร ได้แก่ แกงขี้เหล็ก หรือใช้เป็นผักจิ้มน้ำพริก ชี้ให้เห็นคุณประโยชน์ทั้งทางยาและอาหาร จนในปัจจุบันได้มีการทำเป็นผลิตภัณฑ์ออกจำหน่ายเป็นยาช่วยให้นอนหลับภายใต้ลิขสิทธิ์ขององค์การเภสัชกรรม อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพรชนิดนี้ยังไม่ทราบเป็นที่แน่ชัด การสกัดสารจากใบอ่อนและดอกของต้นขี้เหล็กพบว่ามีสารบาราคอล (Barakol) เป็นสารหลัก ซึ่งก็มีความเป็นไปได้ที่สารนี้จะเป็นสารออกฤทธิ์ของขี้เหล็ก จากการศึกษาก็พบว่าสารนี้มีฤทธิ์คลายกังวลช่วยทำให้นอนหลับเช่นเดียวกับขี้เหล็ก จึงได้เริ่มมีการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารบาราคอล แต่ก็ยังไม่เป็นที่กระจ่างชัด ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารนี้ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาสารตัวนี้มาใช้เป็นยาที่จะใช้ในการคลายกังวล ทำให้สงบ และช่วยการนอนหลับ ตลอดจนถ้าสารนี้มีความเฉพาะเจาะจงต่อตัวรับชนิดใดชนิดหนึ่งสูง ก็อาจพัฒนาสารนี้มาใช้เป็นสารเครื่องมือทางเภสัชวิทยา (Pharmacological tool) ได้ต่อไป

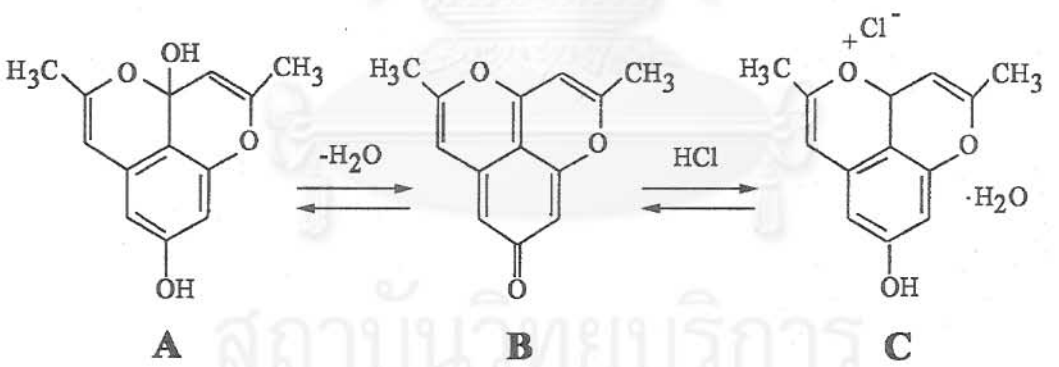
โดยที่สารที่ออกฤทธิ์ทำให้สงบและช่วยให้นอนหลับบางกลุ่ม จะมีผลต่อตัวรับชนิดช่องไอออนที่กระตุ้นให้เปิดด้วยลิแกนด์ (Ligand-gated ion channels ได้แก่ ตัวรับนิโคตินิกแอซีติลคอลีน (nicotinic acetylcholine receptor), ตัวรับกาบาเอ ($GABA_A$ receptor), ตัวรับไกลซีน (glycine receptor), ตัวรับกลูตาเมตชนิดช่องไอออน (ionotropic glutamate receptor), และตัวรับ ไฟฟ์-เอชทีทรี ($5\text{-}HT_3$ receptor) เป็นต้น โดยเฉพาะที่ตัวรับชนิดกาบาเอ ซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของสมอง ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาผลของสารบาราคอลที่มีต่อตัวรับชนิดช่องไอออนที่กระตุ้นให้เปิดด้วยลิแกนด์ของเซลล์ประสาท ที่มีต่อตัวรับชนิดกาบาเอและไกลซีน โดยใช้เทคนิคแพทช์แคลมป์ (Patch clamp) (Hamil *et al.*, 1981) ซึ่งจะช่วยให้สามารถศึกษาฤทธิ์ที่มีต่อตัวรับทั้งสอง ของสารตัวนี้ได้ โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ

1) เพื่อพัฒนาวิธีการแยกเซลล์ประสาทเดี่ยวจากสมองหนูขาว โดยยังคงมีชีวิตและมีคุณสมบัติที่จะสามารถนำมาใช้ในการศึกษาทางสรีรวิทยาไฟฟ้าได้เป็นอย่างดี
2) เพื่อศึกษาฤทธิ์ของบาราคอลต่อตัวรับของสารสื่อประสาทในสมอง ชนิดช่องไอออนที่กระตุ้นให้เปิดด้วยลิแกนด์ 2 ชนิด คือ ตัวรับชนิดกาบาเอและไกลซีน โดยใช้เทคนิค แพทช์แคลมป์

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

บาราคอล

สารสกัดจากใบขี้เหล็กได้รับการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเป็นครั้งแรกโดย อุไร อรุณลักษณ์ (1949) ซึ่งพบว่าสารสกัดนี้ออกฤทธิ์กดระบบประสาทส่วนกลาง ช่วยระงับประสาท และมีความเป็นพิษต่ำ ต่อมา Hassanali และคณะ (1969) ได้สกัด พิสูจน์เอกลักษณ์และตั้งชื่อสารสกัดหลักจากใบขี้เหล็กว่า Barakol (3a,4-dihydro-3a,8-dihydroxy-2,5-dimethyl-1,4-dioxaphenalene) ภายหลังจึงพบว่าบาราคอลอาจเป็นสารที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างสาร 5-acetonyl-7-hydroxy-2-methylchromone ในใบขี้เหล็กกับกรดในขั้นตอนการสกัด (Wagner *et al.*, 1978) บาราคอลจะไม่คงตัวเมื่อสูญเสียโมเลกุลของน้ำจากโครงสร้างจะเปลี่ยนเป็นแอนไฮโดรบาราคอล (anhydrobarakol) และสามารถทำปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริกได้เป็นเกลือบาราคอลไฮโดรคลอไรด์ (barakol hydrochloride) (Kaokeaw, 1992) (รูปที่ 1) ซึ่งมีความคงตัวสูงกว่า



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ A. สารบาราคอล (Barakol) ซึ่งเมื่อสูญเสียโมเลกุลของน้ำจากโครงสร้างจะเปลี่ยนเป็น B. แอนไฮโดรบาราคอล (Anhydrobarakol) และเมื่อทำปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริก จะเป็นเกลือ C. บาราคอลไฮโดรคลอไรด์ (Barakol hydrochloride)

สารบาราคอลนี้เมื่อให้ทางช่องท้องพบว่าในขนาดต่ำจะมีฤทธิ์ลดการเคลื่อนไหวของหนูถีบจักร แต่ในขนาดสูงมีฤทธิ์เพิ่มการเคลื่อนไหว ไวต่อการกระตุ้น จนถึงชักและตาย ในขนาดค่อนข้างสูงจะระงับอาการเจ็บปวด (พิกุล จันทรโยธา, 1988; Tongroach *et al.*, 1992) จากการศึกษาโดยเทคนิคอิน

วิโทรออโตเรดิโอกราฟฟี พบว่า 7,9-[$^{125}I_2$]-anhydrobarakol HCl มีตำแหน่งจับเกือบทั่วทั้งสมองของหนูขาว (Bhengsri, 1996) บาราคอลยังพบว่ามีฤทธิ์ลดอัตราการเต้นของหัวใจและความดันเลือดของหนูขาวและแมว (Suwan *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1999) และลดฤทธิ์ของสารอโคนิทีน (aconitine) ที่ทำให้เกิดหัวใจเต้นไม่เป็นจังหวะ (Chen *et al.*, 1999) สำหรับฤทธิ์คลายกังวลของสารบาราคอลยังมีข้อโต้แย้งกันอยู่ โดย Thongsaard และคณะ (1996) พบว่าบาราคอลมีฤทธิ์คลายกังวลที่ขนาดยา 10 มก./กก. ฉีดเข้าช่องท้อง ขนาดที่สูงจะไม่มีฤทธิ์ แต่ Fiorino และคณะ (1998) พบว่าบาราคอลไม่มีฤทธิ์ดังกล่าว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผลของบาราคอลต่อพฤติกรรมค่อนข้างซับซ้อนจึงอาจก่อให้เกิดผลการทดลองผิดพลาดได้ซึ่งต้องหารูปแบบการทดลองที่เหมาะสมที่จะศึกษาต่อไป (Fiorino *et al.*, 1998) นอกจากนี้บาราคอลยังมีฤทธิ์ลดการหลั่งของสารโดปามีนในสมองของหนูขาว (Thongsaard *et al.*, 1996; Thongsaard *et al.*, 1997) ซึ่ง Thongsaard และคณะ (1997) ได้เสนอว่าอาจเกิดจากการออกฤทธิ์ผ่านตัวรับของโดปามีนชนิดดี2 (D_2) และ/หรือดี3 (D_3) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่ได้เป็นการศึกษาผลของบาราคอลโดยตรงต่อตัวรับของโดปามีน จึงมีความเป็นไปได้ที่บาราคอลจะออกฤทธิ์ที่ตัวรับอื่นแล้วส่งผลลดการหลั่งสารโดปามีน ซึ่งจะต้องทำการศึกษาเพื่อพิสูจน์ต่อไป

<u>กรดแกมมาอมิโนบิวไทริกหรือกาบา</u> (γ-aminobutyric acid, GABA)

กรดแกมมาอมิโนบิวไทริก (γ-aminobutyric acid) หรือ กาบา (GABA) เป็นสารสื่อประสาทชนิดยับยั้งหลัก ในระบบประสาทของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยที่จุดประสานประสาท (synapse) ภายในระบบประสาทส่วนกลาง ที่ใช้กาบาเป็นสารสื่อประสาทจะมีประมาณ 20-50% ขึ้นกับบริเวณของสมอง (Sieghart, 1995) ในการออกฤทธิ์ของกาบานั้นจะผ่านทางตัวรับ 2 ชนิด คือ ตัวรับกาบาเอ ($GABA_A$ receptor) ซึ่งเป็นตัวรับชนิดช่องไอออน (ionotropic receptor) และตัวรับกาบาบี ($GABA_B$ receptor) ซึ่งเป็นตัวรับชนิดเมแทบอโทรพิก (metabotropic receptor) (Sieghart, 1995; Barnard *et al.*, 1998) การกระตุ้นตัวรับกาบาเอ จะเกิดการตอบสนองอย่างรวดเร็วทำให้ช่องไอออน (ion channel) ที่เฉพาะเจาะจงกับคลอไรด์ไอออนเปิดออก ซึ่งโดยทั่วไปจะทำให้คลอไรด์ไอออนแพร่เข้าสู่เซลล์อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์เกิดภาวะการเกิดขั้วเกิน (hyperpolarization) เป็นการยับยั้งการทำงานเซลล์ประสาท (Sieghart, 1995) สำหรับการกระตุ้นตัวรับกาบาบี จะมีการตอบสนองที่ช้ากว่าและยาวนานกว่า โดยจะส่งสัญญาณต่อไปยัง จี-โปรตีน (G-protein) ซึ่งจะไปมีผลต่อช่องโปแตสเซียม (potassium channel) ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของความนำของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane conductance) ต่อโปแตสเซียมไอออน ทำให้เกิดภาวะการมีขั้วเกินของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นการลดการทำงานของเซลล์ประสาท และยังมีผลต่อช่องแคลเซียม (calcium channel) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ก่อนจุดประสานประสาท (presynaptic

membrane) ทำให้มีการลดลงของความนำของเยื่อหุ้มเซลล์ต่อแคลเซียมไอออน ช่วยลดการหลั่งสารสื่อประสาทชนิดกระตุ้น นอกจากนี้ยังอาจออกฤทธิ์โดยการกระตุ้นหรือยับยั้ง (ขึ้นกับชนิดของจี-โปรตีนที่จับอยู่กับตัวรับกาบาบี) เอ็นไซม์อดีไนเลทไซเคลส (Adenylate cyclase) ในการสร้างไซคลิกอดีโนซีนโมโนฟอสเฟท (Cyclic adenosine monophosphate, cAMP) ซึ่งเป็นหนึ่งในระบบนำรหัสทุติยภูมิ (secondary messenger system) (รายละเอียดตัวรับกาบาบี ดูที่ Bowery, 2000)

ตัวรับกาบาเอ ($GABA_A$ receptor)

ตัวรับกาบาเอ ($GABA_A$ receptor) จัดเป็นหนึ่งในกลุ่มใหญ่ของช่องไอออนที่กระตุ้นให้เปิดด้วยลิแกนด์ (Ligand-gated ion channel superfamily) อันได้แก่ ตัวรับนิโคตินิกแอซีติลคอลิน (nicotinic acetylcholine receptor), ตัวรับกาบาเอ ($GABA_A$ receptor), ตัวรับไกลซีน (glycine receptor), ตัวรับกลูตาเมตชนิดช่องไอออน (ionotropic glutamate receptor), ตัวรับไฟฟ์-เอชทีทรี ($5\text{-}HT_3$ receptor) และตัวรับพีทูเอกซ์ (P2X receptor) สำหรับโครงสร้างของตัวรับกาบาเอประกอบขึ้นด้วยหน่วยย่อย (subunit) 5 หน่วย มารวมตัวกันเป็นตัวรับชนิดนี้ (Nayeem *et al.*, 1994) ซึ่งหน่วยย่อยเหล่านี้สามารถจัดแบ่งเป็นหมู่ (class) ได้หลายหมู่ จนถึงปัจจุบัน ได้แก่ หน่วยย่อยแอลฟา (α subunit) ประกอบด้วยหน่วยย่อยแอลฟา1-6 ($\alpha1$-$\alpha6$ subunits), หน่วยย่อยบีตา (β subunit) ประกอบด้วยหน่วยย่อยบีตา1-4 ($\beta1$-$\beta4$ subunits), หน่วยย่อยแกมมา (γ subunit) ประกอบด้วยหน่วยย่อยแกมมา1-3 ($\gamma1$-$\gamma3$ subunits), หน่วยย่อยเดลตา (δ subunit), หน่วยย่อยเอฟซิลอน (ε subunit), หน่วยย่อยไพ (π subunit), หน่วยย่อยโรห์ (ρ subunit) ประกอบด้วยหน่วยย่อยโรห์1-3 ($\rho1$-$\rho3$ subunits) (Barnard *et al.*, 1998; Sieghart *et al.*, 1999) และหน่วยย่อยเธตา (θ subunit) (Whitting, 1999)

หน่วยย่อยของตัวรับกาบาเอซึ่งเป็นสายพอลิเพปไทด์ (polypeptide) จะมีลำดับของกรดอมิโนเหมือนกับตัวรับอื่นในกลุ่มใหญ่ของช่องไอออนที่กระตุ้นให้เปิดด้วยลิแกนด์ (Whiting *et al.*, 1995) แต่ละสายพอลิเพปไทด์ จะประกอบขึ้นด้วยส่วนที่สำคัญ (Macdonald and Olsen, 1994; Whiting *et al.*, 1995) ได้แก่

- ส่วนไม่ชอบน้ำและผ่านข้ามเยื่อหุ้มเซลล์ (Transmembrane hydrophobic segment) จำนวน 4 ตอน (ตอนผ่านข้ามเยื่อหุ้มเซลล์ที่ 1-4, TM1-4) โดยเชื่อว่าตอนผ่านข้ามเยื่อหุ้มเซลล์ที่ 2 (TM2) ของทั้ง 5 หน่วยย่อยที่มารวมกันเป็นตัวรับ อาจเกี่ยวข้องกับโครงสร้างที่เป็นท่อของตัวรับชนิดนี้
- โดเมน (domain) ภายนอกเซลล์ซึ่งเป็นส่วนชอบน้ำขนาดใหญ่ที่ปลายด้านไนโตรเจน (N-terminal) ของสายพอลิเพปไทด์ จะมีหลายบริเวณที่เป็นบริเวณไกลโคซิเลชัน (glycosylation site) และบริเวณขมวดเป็นวง (loop) ที่เกิดจากกรดอมิโนซิสตีน 2 โมเลกุล

บนสายพอลิเพปไทด์ มาทำปฏิกิริยาจับกันอยู่ ซึ่งเชื่อว่าเป็นบริเวณที่สารกาบาและลิแกนด์บางชนิดมาจับกับตัวรับนี้

- โดเมนขนาดใหญ่ลักษณะเป็นวง (loop) ภายในเซลล์ ระหว่างตอนผ่านข้ามเยื่อหุ้มเซลล์ที่ 3 กับ ที่ 4 (TM3 and TM4) เป็นส่วนที่มีบริเวณที่จะเกิดปฏิกิริยาฟอสฟอไรเลชัน (phosphorylation) โดยเอนไซม์ไคเนส (kinase) หลายชนิด ซึ่งจะควบคุมการทำงานของตัวรับชนิดนี้

เนื่องจากในการสร้างตัวรับกาบาเอ 1 ตัวรับ ต้องอาศัยหน่วยย่อย (subunit) มารวมกัน 5 หน่วย ในขณะที่มีการพบหน่วยย่อยแล้วอย่างน้อย 20 ชนิด ถ้าหน่วยย่อยเหล่านี้สามารถมารวมกันเป็นตัวรับกาบาเอได้แบบสุ่ม จะมีโอกาสที่จะได้โครงสร้างของตัวรับกาบาเอที่แตกต่างกันเป็นจำนวนมาก (Sieghart *et al.*, 1999) อย่างไรก็ตามในความเป็นจริงแล้วจะมีจำนวนไม่เกิน 800 ชนิด (Barnard *et al.*, 1998) โดยทั่วไปตัวรับกาบาเอธรรมชาติ (native $GABA_A$ receptor) จะมีโครงสร้างปริมาณสัมพันธ์ (Stoichiometry) ของหน่วยย่อย เป็น $2\alpha2\beta1\gamma$ หรือ $2\alpha1\beta2\gamma$ โดยที่หน่วยย่อยแกมมา (γ subunit) อาจทดแทนได้ด้วย หน่วยย่อยเดลตา (δ subunit) หรือเอฟซิลอน (ε subunit) (Barnard *et al.*, 1998) ในสมองหนูขาวพบมีตัวรับกาบาเอชนิด $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ มากที่สุด (43%) รองลงมาเป็น ชนิด $\alpha_2\beta_{2/3}\gamma_2$ (18%) และ $\alpha_3\beta_n\gamma_{2/3}$ (17%) และชนิดอื่นๆ อีกไม่มากนัก (MacKernan and Whitting, 1996) จากการที่ตัวรับกาบาเอมีส่วนประกอบในโครงสร้างที่แตกต่างกัน ทำให้ตัวรับกาบาเอมีคุณสมบัติทางสรีรวิทยาไฟฟ้าและเภสัชวิทยาที่แตกต่างกัน (Sieghart, 1995; Barnard *et al.*, 1998; Sieghart *et al.*, 1999)

การจับของกรดอมิโนกาบากับตัวรับกาบาเอจะทำให้เกิดการเปิดของช่องในตัวรับนี้ ซึ่งเฉพาะเจาะจงกับคลอไรด์ไอออน ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของความนำของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane conductance) ต่อคลอไรด์ไอออน โดยทั่วไปจะทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเซลล์ประสาท (Study and Barker, 1981; Sieghart, 1995) ในการกระตุ้นตัวรับกาบาเอต้องอาศัยกรดอมิโนกาบาอย่างน้อย 2 ตัวจึงจะเพียงพอที่จะกระตุ้นตัวรับชนิดนี้ได้ (Sakmann *et al.*, 1983) นอกจากกรดอมิโนกาบาแล้วยังมีตัวทำการ (agonist) อีกหลายชนิดที่กระตุ้นตัวรับนี้ ได้แก่ muscimol, isoguvacine, piperidine-4-sulphonic acid และ 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolol [5,4-c]pyridin-3-ol (THIP) เป็นต้น สาร bicuculline จะเป็นตัวต้านชนิดแข่งขัน (competitive antagonist) ในขณะที่ picrotoxinin, pentylenetetrazol (PTZ) and *t*-butylbicyclophosphorothionate (TBPS) เป็นสารต้านชนิดไม่แข่งขัน (non-competitive antagonist) นอกจากนี้ยาหรือสารที่มีความสำคัญทางเภสัชวิทยาหลายชนิดยังสามารถปรับแต่ง (modulate) การกระตุ้นของกรดอมิโนกาบาต่อตัวรับกาบาเอ ซึ่งได้แก่ benzodiazepines, barbiturates, neuroactive steroids, ethanol, propofol, etomidate, loreclezole, anesthetics และ Zn^{2+} เป็นต้น สารเหล่านี้ออกฤทธิ์

โดยการจับกับบริเวณยึดเหนี่ยวออลโลสเตอริก (allosteric binding site) ที่แตกต่างกันบนตัวรับกาบาเอ (Macdonald and Olsen, 1994; Sieghart, 1995; Upton and Blackburn, 1998)

ไกลซีน (Glycine)

กรดอมิโนไกลซีน ถูกจัดเป็นสารสื่อประสาทชนิดยับยั้งในระบบประสาทของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง โดยเฉพาะที่ไขสันหลัง (spinal cord) และก้านสมอง (brain stem) (Betz, 1991) โดยมีส่วนเกี่ยวข้องกับการตอบสนองแบบรีเฟล็กซ์ การควบคุมการเคลื่อนไหลภายใต้อำนาจบังคับของจิตใจ และการรับความรู้สึกของสมองส่วนกลาง (Rajendra *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังพบว่ากรดอมิโนไกลซีนยังมีบทบาทเป็น ตัวทำการร่วม (coagonist) กับกรดอมิโนกลูตาเมต ที่ตัวรับเอนเอมดีเอ (NMDA receptor) ซึ่งเป็นตัวรับย่อยชนิดหนึ่งของตัวรับกลูตาเมตชนิดช่องไอออน (ionotropic glutamate receptor) ในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ประสาท (รายละเอียด ดู Danysz and Parsons, 1998)

ตัวรับไกลซีน (Glycine receptor)

ตัวรับไกลซีน (glycine receptor หรือ strycnine-sensitive glycine receptor) เช่นเดียวกับตัวรับกาบาเอ จัดอยู่ในกลุ่มใหญ่ของช่องไอออนที่กระตุ้นให้เปิดด้วยลิแกนด์ (Ligand-gated ion channel superfamily) ประกอบขึ้นด้วยหน่วยย่อย (subunit) 5 หน่วย มารวมตัวกันเป็นตัวรับชนิดนี้ (Betz, 1991; Kuhse *et al.*, 1995; Rajendra *et al.*, 1997) หน่วยย่อยของตัวรับไกลซีนจนถึงปัจจุบันพบ 2 กลุ่ม คือ หน่วยย่อยแอลฟา (α subunit) ประกอบด้วยหน่วยย่อยแอลฟา1-4 (α1-α6 subunits) และ หน่วยย่อยบีตา (β subunit) (Rajendra *et al.*, 1997; Maksay *et al.*, 2001)

ตัวรับนี้ส่วนใหญ่พบอยู่ที่ก้านสมองและไขสันหลัง (Young and Snyder, 1973; Triller *et al.*, 1985) นอกจากนี้ยังสามารถพบตัวรับชนิดนี้ได้ทั่วไปที่สมองส่วนที่เหนือขึ้นไปได้ (Malosio *et al.*, 1991) แต่ก็ไม่มากเท่าที่ก้านสมองและไขสันหลัง การกระตุ้นที่ตัวรับนี้จะทำให้เกิดการเปิดของช่องในตัวรับซึ่งเฉพาะเจาะจงกับคลอไรด์ไอออน ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของความนำของเยื่อหุ้มเซลล์ต่อคลอไรด์ไอออน ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเซลล์ประสาทเช่นเดียวกับตัวรับกาบาเอ (Betz, 1991; Kuhse *et al.*, 1995; Rajendra *et al.*, 1997)

วิธีการวิจัย

1. สกัดแยกสารบาราคอล จากใบอ่อน ยอดอ่อนและดอกของต้นขี้เหล็ก

ทำการสกัดแยกสารบาราคอลจาก ใบอ่อน ยอดอ่อนและดอกของต้นขี้เหล็ก แล้วนำไปทำให้เกิดเป็นเกลือกับกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid) ได้เป็นสารแอนไฮโดรบาราคอลไฮโดรคลอไรด์ (Anhydrobarakol HCl) โดยใช้วิธีของ รศ.ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ (Chaichantipyuth, 1979)

2. การแยกเซลล์ประสาทเดี่ยวจากสมองของหนูขาว ให้มีชีวิตและมีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการศึกษาทางสรีรวิทยาไฟฟ้า

โดยพัฒนาวิธีการมาจาก Sooksawate & Simmonds (1998) กล่าวโดยย่อได้ดังนี้ ใช้หนูขาว (rat) พันธุ์ Wistar เพศผู้ อายุ 21-27 วัน จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ทำหนูให้หมดความรู้สึกโดยวิธี cervical dislocation and decapitation จากนั้นผ่าตัดแยกสมองออกมา ฝานสมองให้เป็นแผ่นบางๆ หนา 400 ไมโครเมตร ด้วยเครื่อง Vibroslice (752M, Campden Instruments, England) ทำการย่อยด้วยเอนไซม์กลุ่ม Protease (Pronase และ Thermolysin; Sigma, USA) ด้วยการแช่แผ่นสมองกับเอนไซม์ใน สารละลายเกลือสรีรวิทยา (Physiological salt solution) (ประกอบด้วย NaCl 140 mM, KCl 4.7 mM, $MgCl_2$ 1.2 mM, $CaCl_2$ 2.5 mM, Glucose 11 mM และ HEPES 10 mM โดยปรับค่า pH เท่ากับ 7.4 ด้วย Tris-base) ที่ 31°C แช่สมองกับเอนไซม์แต่ละตัวนาน 20 นาที แล้วแยกสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (hippocampus) ออกมา จากนั้นแยกเซลล์ประสาทเดี่ยวจากแผ่นสมองฮิปโปแคมปัส ด้วยการดูดแผ่นสมองขึ้นลง (Trituration) ผ่านปิเปตต์แก้ว (glass pipette) ขนาดเล็กที่ปลายลบคมด้วยความร้อน แล้วทำการแยกเซลล์ประสาทเดี่ยวออกจากซากเนื้อเยื่อขนาดใหญ่ที่ไม่ต้องการ ด้วยวิธีตั้งให้ตกตะกอน (gravity sedimentation) นาน 10 นาที แล้วจึงนำไปใส่ลงใน ช่องบันทึก (recording chamber) บนแท่นของกล้องจุลทัศน์แบบกลับหัว (Inverted microscope; IMT2, Olympus, Japan) ทิ้งไว้ประมาณ 30-40 นาที เพื่อให้เซลล์ประสาทตกลงไปที่ฐานของช่องบันทึก แล้วจึงปล่อยให้สารละลายเกลือสรีรวิทยาไหลผ่านช่องบันทึกด้วยอัตราประมาณ 2.5-3.0 มิลลิลิตร/นาที

3. ศึกษาผลของสารบาราคอลต่อตัวรับของเซลล์ประสาทที่แยกออกมาได้ ชนิด Ligand-gated ion channels ได้แก่ $GABA_A$ receptor และ glycine receptor โดยใช้เทคนิค Patch clamp

ได้พัฒนามาจากวิธีการของ Hamil และคณะ (1981) และ Sooksawate and Simmonds (1998) ซึ่งมีวิธีการดังนี้ คือ แพทช์ปิเปตต์ (patch pipette) จะเตรียมมาจากหลอดแก้วรูเล็กบอโรซิริเกตชนิดผนังบาง (thin wall borosilicate glass capillary; Clark Electromedical Instruments, England) โดยใช้เครื่องดึงปิเปตต์ชนิดแนวตั้งแบบ 2 ขั้น (two-step vertical pipette puller; PP-83, Narishige, Japan) แพทช์ปิเปตต์ (patch pipette) ที่ได้จะบรรจุสารละลายในปิเปตต์ (intrapipette solution) ซึ่งประกอบด้วย CsCl 140 mM, $MgCl_2$ 4 mM, Na_2ATP 4 mM, EGTA 11 mM, $CaCl_2$ 1 mM และ HEPES 10 mM โดยปรับค่า pH เท่ากับ 7.2 ด้วย Tris-base ความต้านทานไฟฟ้าระหว่างแพทช์ปิเปตต์ (patch pipette) กับขั้วเปรียบเทียบ (reference electrode) ในสารละลายภายนอก (External solution) ในช่องบันทึกเท่ากับ 3-5 เมกาโอห์ม (MΩ) เยื่อหุ้มเซลล์ประสาทจะถูกโวลเทกแคลมป์ (voltage-clamp) ไว้ที่ –20 มิลลิโวลท์ (mV) กระแสไฟฟ้าที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แบบทั้งเซลล์ (whole-cell recording) จะถูกวัดและขยายสัญญาณโดยเครื่องขยายสัญญาณแพทช์แคลมป์ (patch clamp amplifier) (Axopatch 200B, Axon Instruments, USA) ทำการสังเกตสัญญาณบนจอออสซิลโลสโคป (Gould, England) และเปลี่ยนสัญญาณจาก อนาลอก (analog) ไปเป็นดิจิทอล (digital) ด้วยเครื่องแปลงสัญญาณอนาลอก-เป็น-ดิจิทอล (analog-to-digital converter) (MacLab/4, ADInstruments, Australia) แล้วทำการบันทึกสัญญาณที่ได้ด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ชนิดแมคอินทอช (Macintosh LC-630, Apple computer, USA) โดยใช้โปรแกรม Chart v.3.4.2 (ADInstruments, Australia)

- ในการศึกษาผลต่อตัวรับกาบาเอ ($GABA_A$ receptor) และกลไกการออกฤทธิ์ของบาราคอล จะทำการบันทึกกระแสไฟฟ้าที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แบบทั้งเซลล์ (whole-cell recording) เมื่อให้บาราคอลเดี่ยว; หรือให้บาราคอลร่วมกับกาบา; หรือให้บาราคอลร่วมกับกาบาและร่วมกับสารต้าน (antagonist or inhibitor) ของตัวรับกาบาเอ ($GABA_A$ receptor) บางชนิด
- ในการศึกษาผลต่อตัวรับไกลซีน (Glycine receptor) จะทำการบันทึกกระแสไฟฟ้าที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แบบทั้งเซลล์ (whole-cell recording) เมื่อให้บาราคอลเดี่ยว; หรือให้บาราคอลร่วมกับไกลซีน; หรือให้บาราคอลร่วมกับไกลซีน

4. สารเคมี

สารตัวทำการ สารเสริมฤทธิ์ สารต้าน จะเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น (stock solution) ด้วยการละลายลงในน้ำกลั่น หรือ dimethylsulfoxide (DMSO) แล้วจึงละลายเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการลงใน สารละลายเกลือสรีรวิทยา (Physiological salt solution) โดยความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO จะน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05% ซึ่งจะไม่ส่งผลใดๆ ต่อการทำงานของตัวรับชนิดต่างๆ (ข้อมูลมิได้แสดง) การให้สารเหล่านี้ไปยังด้านนอกของเซลล์ประสาทจะใช้วิธี U-tube method ตามวิธีการของ Sooksawate and Simmonds (1998) ซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นของสารที่ให้รอบๆ เซลล์ประสาทเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วจนถึงความเข้มข้นที่ต้องการ ก่อนที่จะเกิดภาวะการลดความไวต่อการกระตุ้น (Desensitization) ของตัวรับต่างๆ

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัยทั้งหมดสั่งซื้อมาจาก Sigma (USA) ยกเว้น NaCl, KCl, $CaCl.2H_2O$, $MgCl_2.6H_2O$ จาก Riedël-deHäen (Germany)

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลจะแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าผิดพลาดมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± standard error of the mean; mean ± S.E.M.) การวิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารและการตอบสนองของเซลล์ประสาท (Concentration-response analysis) จะใช้โปรแกรม GraphPad PRISM version 3.0 (GraphPad Software, USA) ด้วยสมการ

$$I = I_{min} + (I_{max} - I_{min})/(1+(EC_{50}/[X])^{H})$$

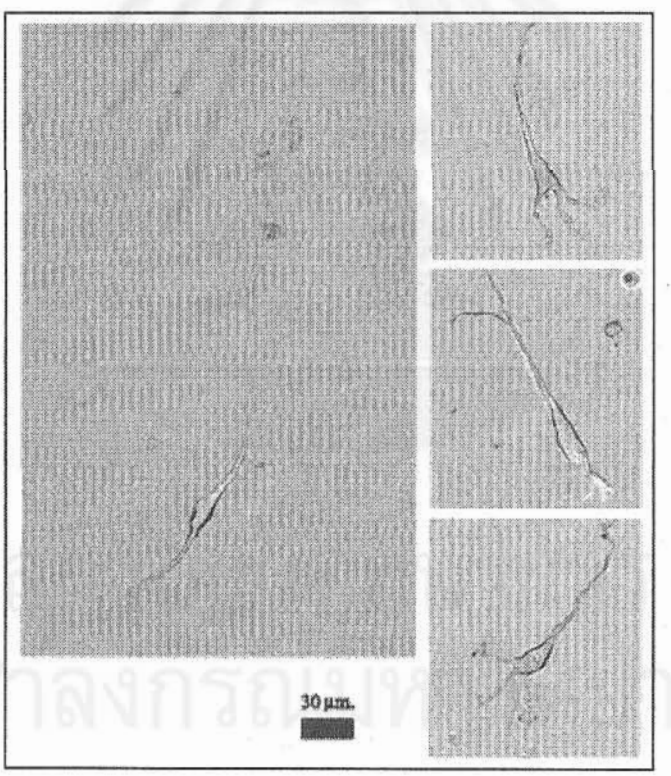
เมื่อ I คือ กระแสไฟฟ้าที่เหนี่ยวนำให้เกิดด้วยสารทำการ (agonist-induced current), I_{min} คือ กระแสตอบสนองต่ำสุด, I_{max} คือ กระแสตอบสนองสูงสุด, EC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารทำการที่ทำให้เกิดกระแสตอบสนองร้อยละ 50 ของกระแสตอบสนองสูงสุด, [X] คือ ความเข้มข้นของสารทำการ, H คือ สัมประสิทธิ์ความชัน (Hill coefficient)

การวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบทางสถิต เมื่อข้อมูลมากกว่า 2 กลุ่มจะใช้สถิติ Analysis of Variance (ANOVA) หลังจากนั้นจะเปรียบเทียบแต่ละกลุ่มเป็นคู่โดยใช้ Bonferroni test ถ้าข้อมูลมีเพียง 2 กลุ่มจะใช้สถิติ Student's *t*-test โดยที่ค่า *P* (*P* value) น้อยกว่า 0.05 แสดงว่าข้อมูลที่เปรียบเทียบมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย

1. การแยกเซลล์ประสาทเดี่ยวจากสมองของหนูขาว

ผลจากการแยกเซลล์ประสาทจากสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (Hippocampus) ของหนูขาวด้วยวิธีของ Sooksawate & Simmonds (1998) พบว่าเซลล์ประสาทที่แยกได้ยังคงลักษณะทางกายสันฐานวิทยา (Morphology) ไว้ได้ดีพอควร โดยเฉพาะเซลล์ซึ่งจะนำมาใช้ในงานวิจัย คือ เซลล์ประสาทรูปปิรามิด (Pyramidal neurones) ซึ่งเป็นเซลล์ประสาทที่สำคัญของสมองส่วนนี้ (รูปที่ 2) อย่างไรก็ตามจำนวนเซลล์ประสาทที่มีชีวิต (Viable neurones) ที่แยกได้ (โดยวิธี trypan blue exclusion) โดยใช้หนูขาวอายุ 21-27 วัน ก็ต่ำกว่า (ประมาณ 80%) การใช้สัตว์ทดลองที่มีอายุ 10-16 วัน (ประมาณ 90%) ดังในการศึกษาของ Sooksawate & Simmonds (1998)

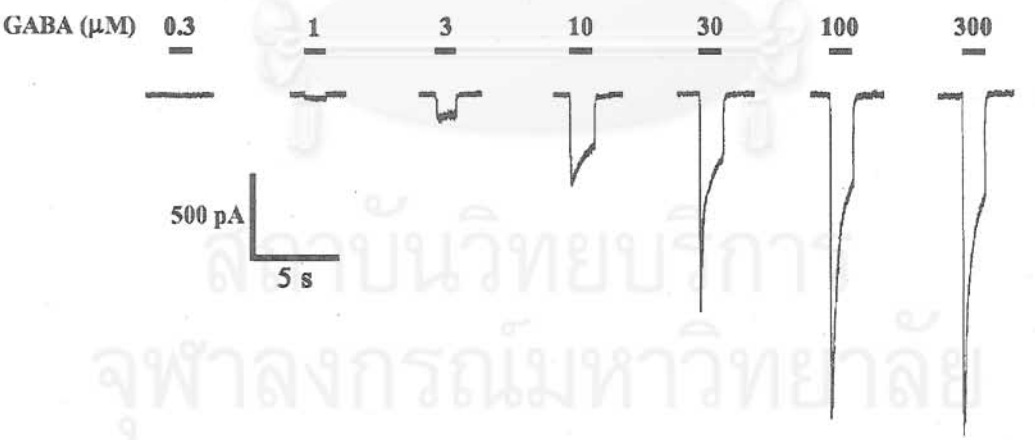


รูปที่ 2 ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ของเซลล์ประสาทที่แยกออกมาทันทีจากสมองส่วน Hippocampus ของหนูขาว เพศผู้ อายุ 23 วัน ตามวิธีการที่เขียนไว้ในวิธีดำเนินการวิจัย แถบสเกลสีดำในภาพขาว = 30 µm

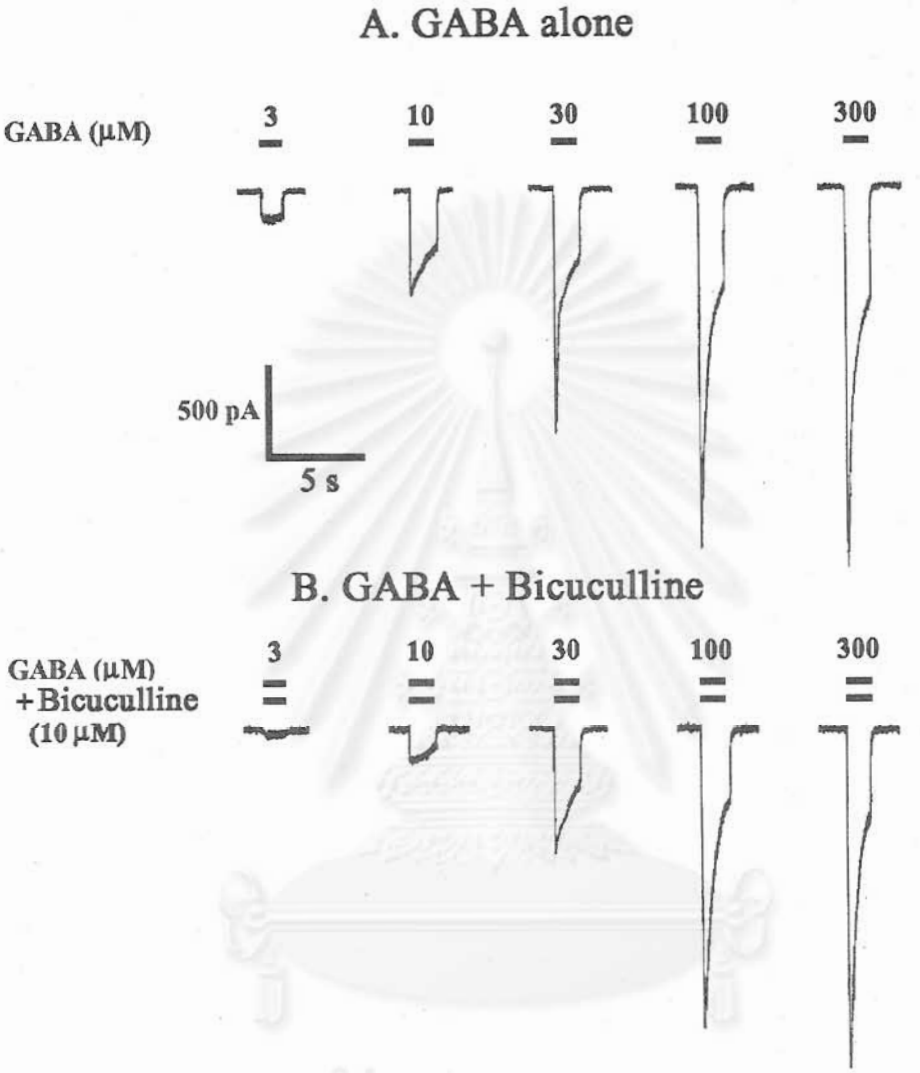
2. การศึกษาคุณสมบัติของตัวรับกาบาเอ ($GABA_A$ receptor) ของเซลล์ประสาทเดี่ยวที่แยกจากสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (Hippocampus) ของหนูขาว

2.1 ผลของกาบาและสารต้านกาบาต่อตัวรับกาบาเอ

จากการศึกษาผลของการให้สารสื่อประสาทกาบา (GABA, γ-aminobutyric acid) ซึ่งจะไปกระตุ้นตัวรับกาบาเอ ($GABA_A$ receptor) บนเยื่อหุ้มเซลล์ประสาททำให้ช่องไอออนของตัวรับเปิด เกิดการไหลของคลอไรด์ไอออนผ่านช่องภายในตัวรับ โดยใช้เทคนิคแพทช์แคลมป์ (Patch clamp) เพื่อบันทึกกระแสซึ่งไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แบบทั้งเซลล์ (Whole-cell recordings) พบว่าเซลล์ประสาทรูปปิรามิดที่แยกได้สามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นโดยสารกาบาได้ และมีการตอบสนองเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ กาบา ที่ให้ (รูปที่ 3) โดยกระแสที่เกิดจากการให้ กาบา จะถูกยับยั้งได้โดย Bicuculline methochloride ซึ่งเป็นสารต้าน กาบา ชนิดแข่งขัน (Competitive antagonist) (รูปที่ 4) และ Picrotoxinin ซึ่งเป็นสารต้าน กาบา ชนิดไม่แข่งขัน (Non-competitive antagonist) (รูปที่ 5) ที่ตัวรับกาบาเอ

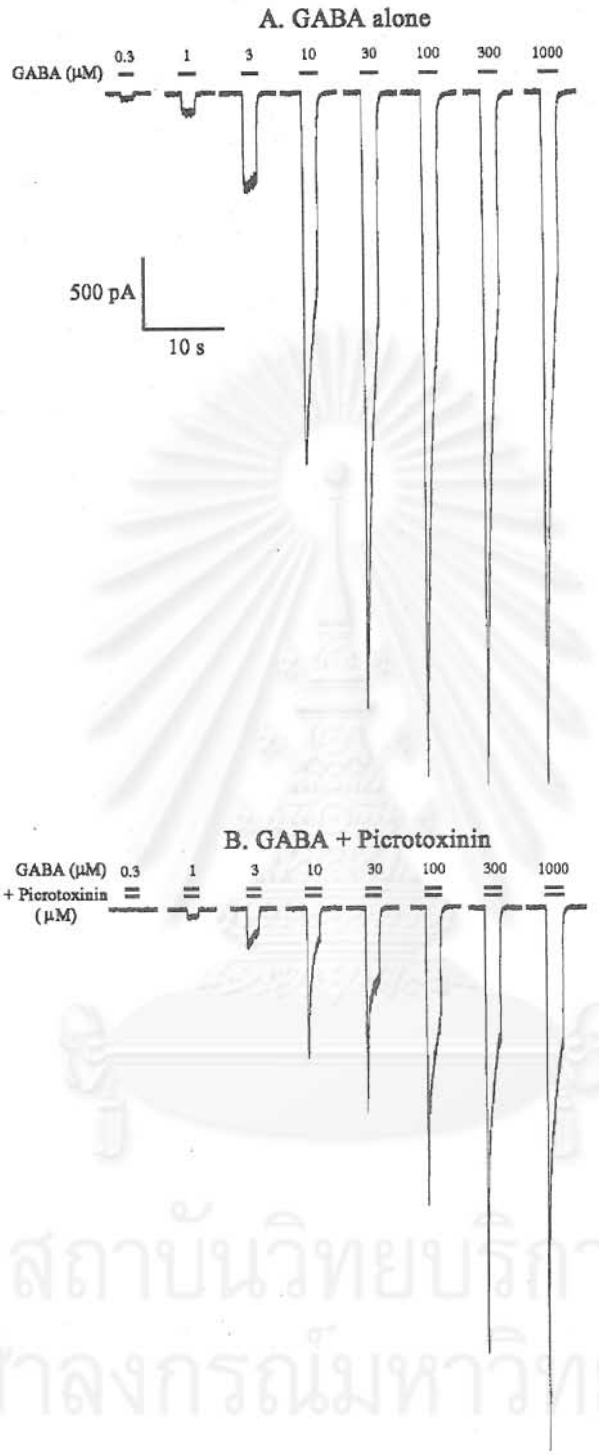


รูปที่ 3 ภาพบันทึกของกระแสไฟฟ้าที่ไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทรูปปิรามิดที่แยกได้ทันทีจากสมองส่วน Hippocampus ของหนูขาว จากการให้ GABA ความเข้มข้น 0.3-300 μM



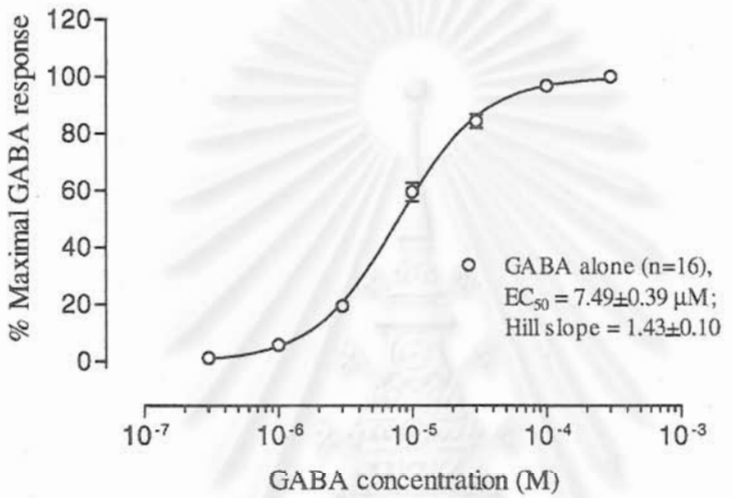
รูปที่ 4 ภาพบันทึกแสดงผลของ Bicuculline methochloride 5 μM ในการยับยั้งฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 3-300 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทรูปปีรามิด **A.** ผลจากการให้ GABA เดี่ยว , **B.** ผลจากการให้ GABA ร่วมไปกับ Bicuculline

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



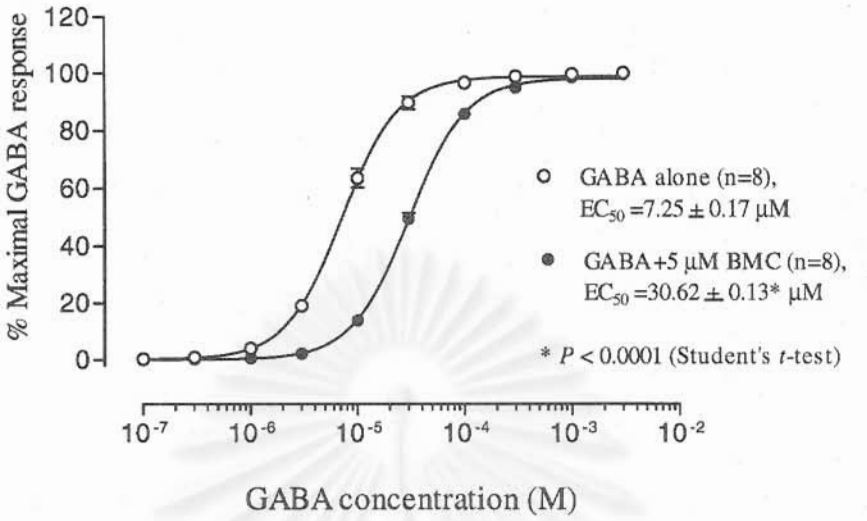
รูปที่ 5 ภาพบันทึกแสดงผลของ Picrotoxinin 10 μM ในการยับยั้งฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 1-1000 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทรูปปิรามิด **A.** ผลจากการให้ GABA เดี่ยว , **B.** ผลจากการให้ GABA ร่วมไปกับ Picrotoxinin

เมื่อนำผลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของกาบา (GABA concentration) กับ ร้อยละของการตอบสนองของเซลล์ประสาทสูงสุด (%Maximal GABA response) พบว่า ค่า GABA EC_{50} ที่หาได้จาก GABA concentration-response curves เท่ากับ 7.49 $\pm$ 0.39 μM (n=16) (รูปที่ 6)



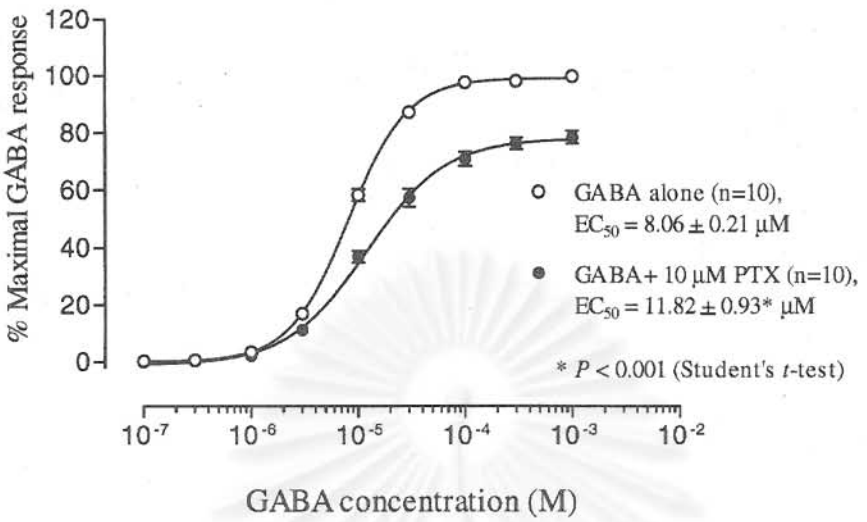
รูปที่ 6 GABA concentration-response curve ที่ได้จากการให้ GABA ความเข้มข้น 0.3-300 μM ไปยังเซลล์ประสาทรูปปิรามิด จากกราฟคำนวณหาค่า GABA EC_{50} = 7.49$\pm$0.39 μM และ Hill slope = 1.43$\pm$0.10 (n=16)

เมื่อให้สาร bicuculline methochloride 5 μM ร่วมกับสารกาบา ความเข้มข้น 0.1-1000 μM พบว่าสาร bicuculline methochloride สามารถยับยั้งฤทธิ์ของกาบาได้ โดยทำให้ค่า GABA EC_{50} เพิ่มขึ้นจาก 7.25 $\pm$ 0.17 μM เมื่อให้กาบาเดี่ยว ไปเป็น 30.62 $\pm$ 0.13 μM เมื่อให้กาบาร่วมกับ bicuculline (P<0.0001, Student's t-test; n=8) โดยค่าการตอบสนองสูงสุดไม่เปลี่ยนแปลง (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 GABA concentration-response curve แสดงการยับยั้งฤทธิ์ของกาบาด้วยสาร bicuculline methochloride (BMC) ค่า GABA EC_{50} เพิ่มขึ้นจาก 7.25 ± 0.17 μM เมื่อให้กาบาเดี่ยว ไปเป็น 30.62 ± 0.13 μM เมื่อให้กาบาร่วมกับ bicuculline (P<0.0001, Student's t-test; n=8)

เมื่อให้สาร picrotoxinin 10 μM ร่วมกับสารกาบา ความเข้มข้น 0.1-1000 μM พบว่าสาร bicuculline methochloride สามารถยับยั้งฤทธิ์ของกาบาได้ โดยทำให้ค่า GABA EC_{50} เพิ่มขึ้นจาก 8.06 ± 0.21 μM เมื่อให้กาบาเดี่ยว ไปเป็น 11.82 ± 0.94 μM เมื่อให้กาบาร่วมกับ picrotoxinin (P <0.001, Student's t-test; n=10) และยังทำให้ค่าการตอบสนองสูงสุดลดลงจาก 99.05 ± 0.61% เมื่อให้กาบาเดี่ยว ไปเป็น 77.96 ± 1.32% เมื่อให้กาบาร่วมกับ picrotoxinin (P<0.0001, Student's t-test; n=10) (รูปที่ 8)

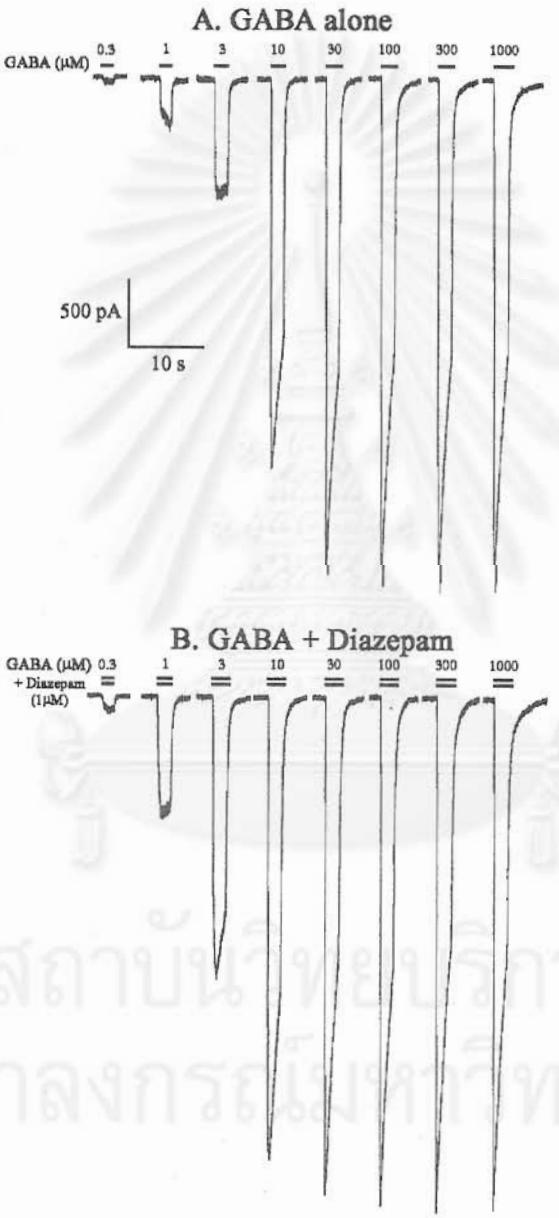


รูปที่ 8 GABA concentration-response curve แสดงการยับยั้งฤทธิ์ของ GABA ด้วยสาร picrotoxinin (PTX) ค่า GABA EC_{50} เพิ่มขึ้นจาก 8.06 ± 0.21 μM เมื่อให้ GABA เดี่ยว ไปเป็น 11.82 ± 0.21 μM เมื่อให้ GABA ร่วมกับ picrotoxinin (P<0.001, Student's t-test; n=10) และมีการลดลงของการตอบสนองสูงสุด

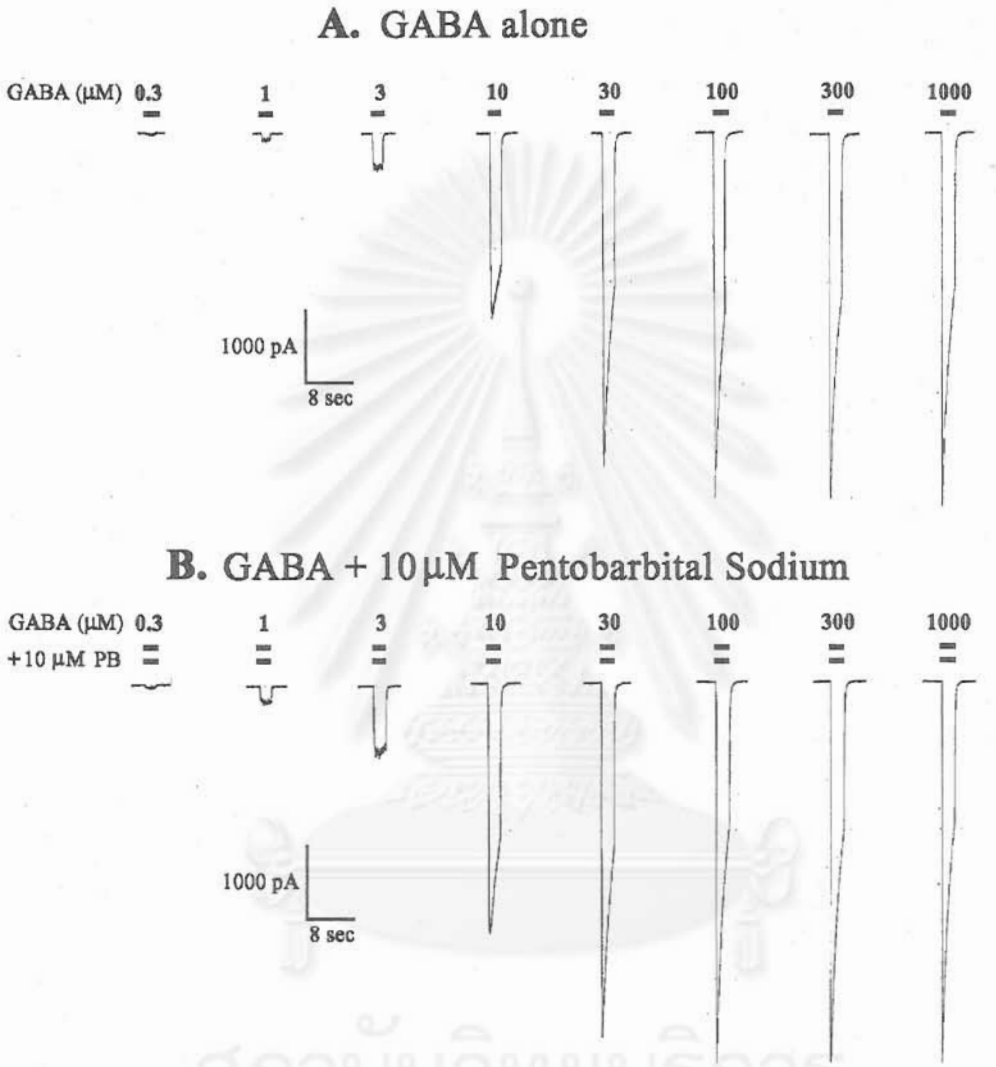
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 ผลของ Diazepam และ Pentobarbital sodium ต่อตัวรับกาบาเอ

กระแสที่เกิดจากการให้ กาบา (GABA) จะเพิ่มฤทธิ์ได้โดยให้ร่วมกับ Diazepam (รูปที่ 9) และ Pentobarbital sodium (รูปที่ 10)

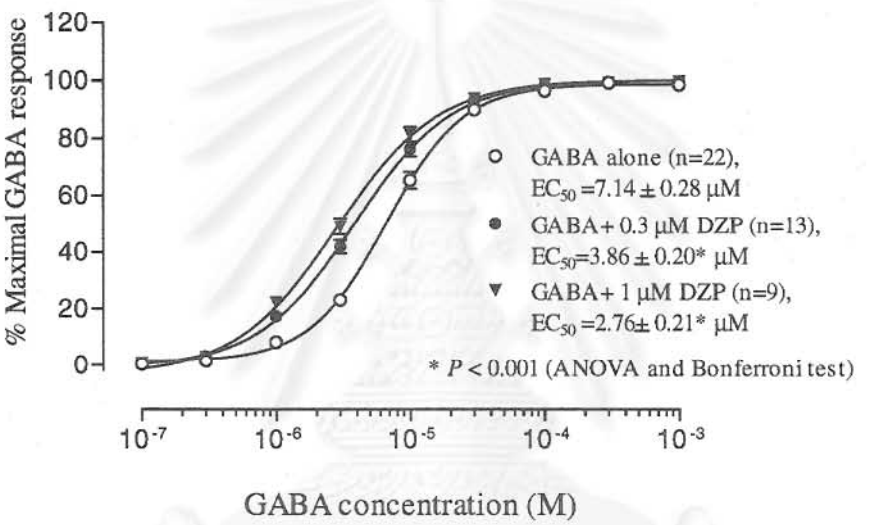


รูปที่ 9 ภาพบันทึกแสดงผลของ Diazepam 1 μM ในการเสริมฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 0.3-1000 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทรูปปิรามิด **A.** ผลจากการให้ GABA เดี่ยว , **B.** ผลจากการให้ GABA ร่วมไปกับ Diazepam



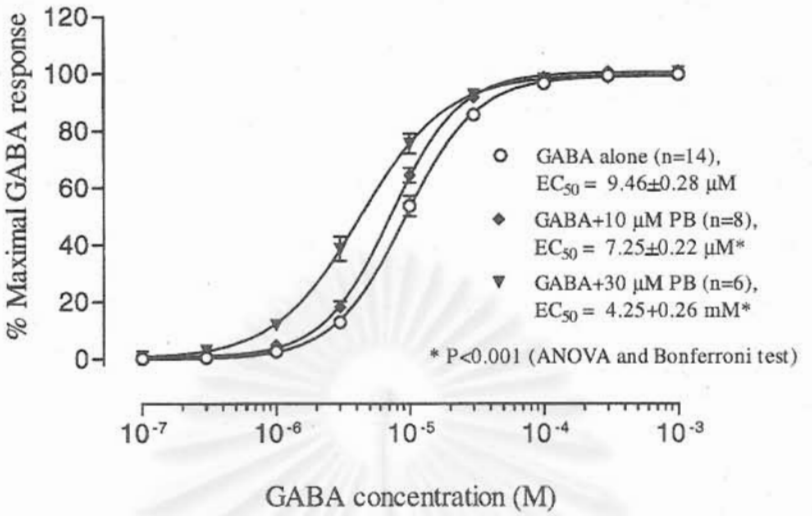
รูปที่ 10 ภาพบันทึกแสดงผลของ Pentobarbital sodium (PB) 10 μM ในการเสริมฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 0.3-1000 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทรูปปิรามิด **A.** ผลจากการให้ GABA เดี่ยว , **B.** ผลจากการให้ GABA ร่วมไปกับ Pentobarbital sodium

เมื่อให้สาร Diazepam 0.3 และ 1 μM ร่วมกับสารกาบา ความเข้มข้น 0.3-1000 μM พบว่าสาร Diazepam สามารถเสริมฤทธิ์ของกาบาได้ โดยทำให้ค่า GABA EC_{50} ลดลงจาก 7.14 ± 0.28 μM (n=22) เมื่อให้กาบาเดี่ยว ไปเป็น 3.86 ± 0.20 μM เมื่อให้กาบาร่วมกับ 0.3 μM Diazepam (P <0.001, ANOVA and Bonferroni test; n=13) และเป็น 2.76 ± 0.21 μM เมื่อให้กาบาร่วมกับ 1 μM Diazepam (P<0.001; n=9) (รูปที่ 11)



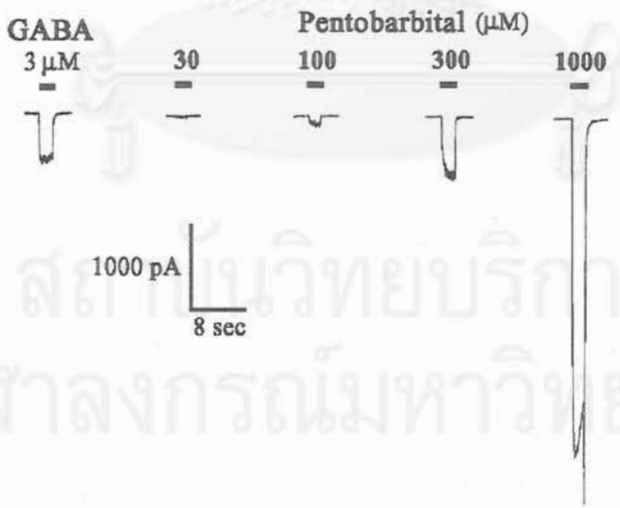
รูปที่ 11 GABA concentration-response curve แสดงการเสริมฤทธิ์ของกาบาด้วยสาร 0.3 และ 1 μM Diazepam (DZP)

เมื่อให้สาร Pentobarbital sodium 10 และ 30 μM ร่วมกับสารกาบา ความเข้มข้น 0.3-1000 μM พบว่าสาร Pentobarbital sodium สามารถเสริมฤทธิ์ของกาบาได้ โดยทำให้ค่า GABA EC_{50} ลดลงจาก 9.46 ± 0.28 μM (n=14) เมื่อให้กาบาเดี่ยว ไปเป็น 7.25 ± 0.22 μM เมื่อให้กาบาร่วมกับ 10 μM Pentobarbital sodium (P<0.001, ANOVA and Bonferroni test; n=8) และเป็น 4.25 ± 0.26 μM เมื่อให้กาบาร่วมกับ 30 μM Pentobarbital sodium (P<0.001; n=6) (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 GABA concentration-response curve แสดงการเสริมฤทธิ์ของกาบาด้วยสาร 10 และ 30 μM Pentobarbital sodium (PB)

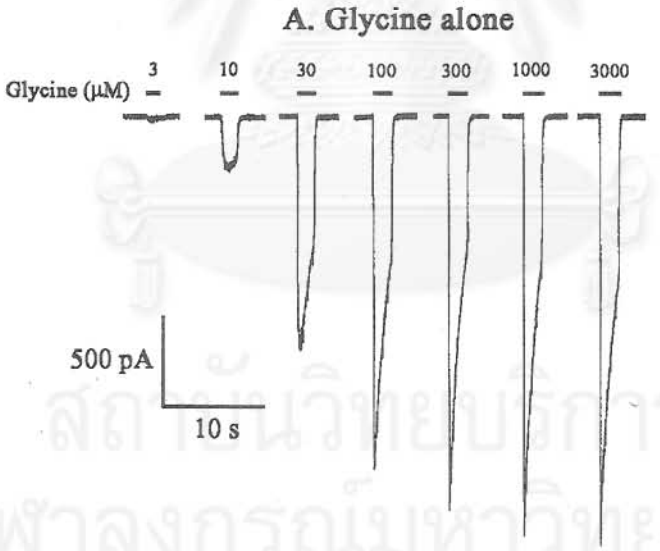
การให้ Pentobarbital sodium เดี่ยว ความเข้มข้น 30-1000 μM ก็สามารถกระตุ้นตัวรับกาบาเอ ให้เปิดและมีกระแสไหลเข้าเซลล์ได้เช่นเดียวกับกาบา (รูปที่ 13)



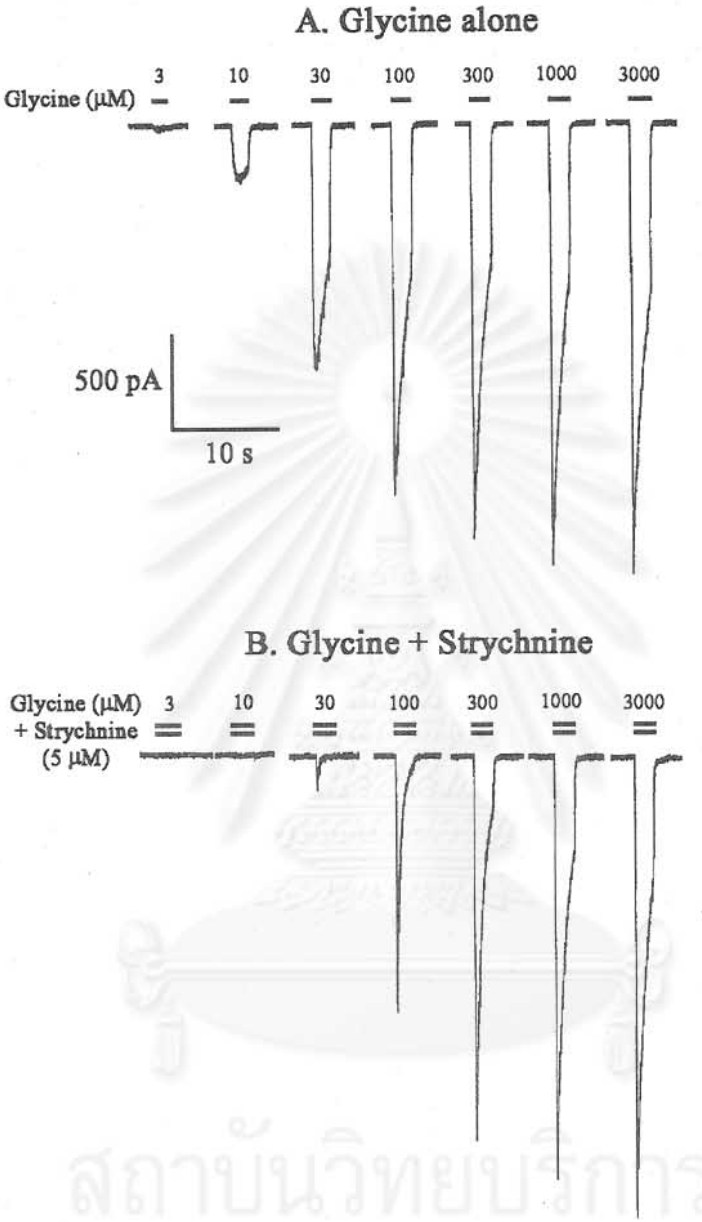
รูปที่ 13 ภาพบันทึกแสดงผลกระตุ้นโดยตรงของ Pentobarbital sodium 30-1000 μM ต่อตัวรับกาบาเอ ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทรูปปีรามิด เปรียบเทียบกับ GABA 3 μM

3. การศึกษาคุณสมบัติของตัวรับไกลซีน (Glycine receptor) ของเซลล์ประสาทเดี่ยวที่แยกจากสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (Hippocampus) ของหนูขาว

จากการศึกษาผลของการให้สารไกลซีน (Glycine) ซึ่งจะไปกระตุ้นตัวรับไกลซีน (Glycine receptor, Strychnine-sensitive glycine receptor) บนเยื่อหุ้มเซลล์ประสาททำให้ช่องไอออนของตัวรับเปิด เกิดการไหลของคลอไรด์ไอออนผ่านช่องภายในตัวรับ โดยใช้เทคนิคแพทช์แคลมป์ (Patch clamp) เพื่อบันทึกกระแสซึ่งไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แบบทั้งเซลล์ (Whole-cell recordings) พบว่าเซลล์ประสาทรูปปีรามิดที่แยกได้สามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นโดยสารไกลซีนได้ และมีการตอบสนองเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของไกลซีน ที่ให้ (รูปที่ 14) โดยกระแสที่เกิดจากการให้ไกลซีน จะถูกยับยั้งได้โดยสาร Strycnine ซึ่งเป็นสารต้านไกลซีน ชนิดแข่งขัน (Competitive antagonist) (รูปที่ 15) ที่ตัวรับไกลซีน



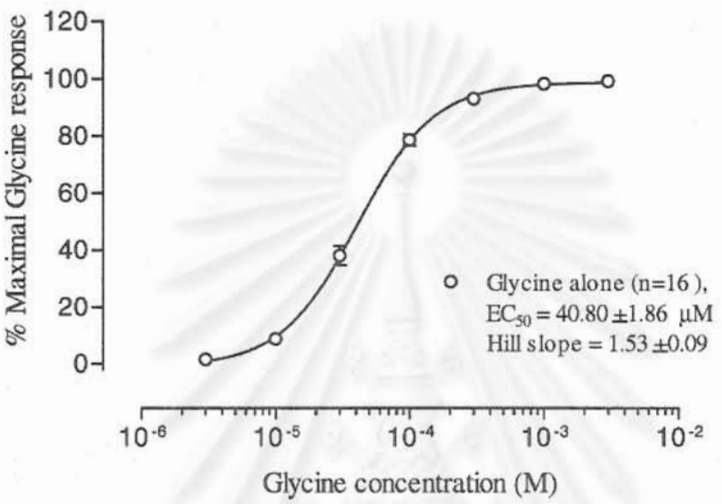
รูปที่ 14 ภาพบันทึกของกระแสไฟฟ้าที่ไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทรูปปีรามิดที่แยกได้ทันทีจากสมองส่วน Hippocampus ของหนูขาว จากการให้ไกลซีน ความเข้มข้น 3-3000 μM



รูปที่ 15 ภาพบันทึกแสดงผลของ Strychnine 5 μM ในการยับยั้งฤทธิ์ของ Glycine ความเข้มข้น 3-3000 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทรูปปีรามิด **A.** ผลจากการให้ Glycine เดี่ยว , **B.** ผลจากการให้ Glycine ร่วมไปกับ Strychnine

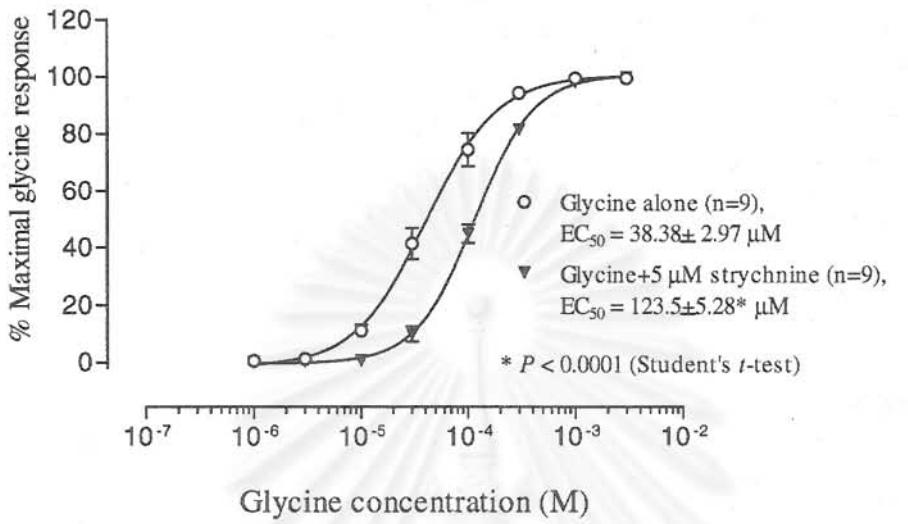
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อนำผลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่าง ความเข้มข้นของไกลซีน (Glycine concentration) กับร้อยละของการตอบสนองสูงสุดของเซลล์ประสาท (%Maximal Glycine response) พบว่า ค่า Glycine EC_{50} ที่หาได้จาก Glycine concentration-response curves เท่ากับ 40.80±1.86 μM (n=16) (รูปที่ 16)



รูปที่ 16 Glycine concentration-response curve ที่ได้จากการให้ Glycine ความเข้มข้น 3-3000 μM ไปยังเซลล์ประสาทรูปปิรามิด จากกราฟคำนวณหาค่า Glycine EC_{50} = 40.80±1.86 μM และ Hill slope = 1.53±0.09 (n=16)

เมื่อให้สาร strychnine 5 μM ร่วมกับสารไกลซีน ความเข้มข้น 3-3000 μM พบว่าสาร strychnine สามารถยับยั้งฤทธิ์ของไกลซีนได้ โดยทำให้ค่า Glycine EC_{50} เพิ่มขึ้นจาก 38.38 ± 2.97 μM เมื่อให้กาบาเดี่ยว ไปเป็น 123.5 ± 5.28 μM เมื่อให้ไกลซีนร่วมกับ strychnine (P<0.0001, Student's t-test; n=9) โดยค่าการตอบสนองสูงสุดไม่เปลี่ยนแปลง (รูปที่ 17)



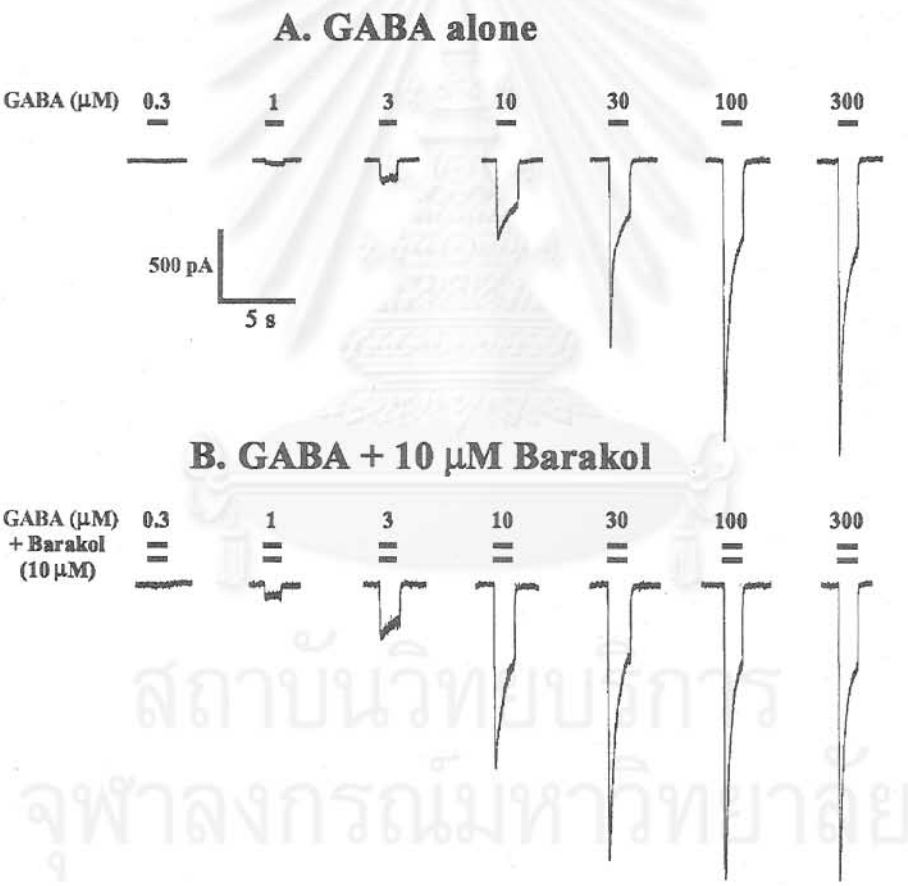
รูปที่ 17 Glycine concentration-response curve แสดงการยับยั้งฤทธิ์ของไกลซีนด้วยสาร strychnine ค่า Glycine EC_{50} เพิ่มขึ้นจาก 38.38 ± 2.97 µM เมื่อให้กาบาเดี่ยว ไปเป็น 123.5 ± 5.28 µM เมื่อให้ไกลซีนร่วมกับ strychnine (P <0.0001, Student's t-test; n=9)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การศึกษาผลของบาราคอลต่อตัวรับกาบาเอ ($GABA_A$ receptor)

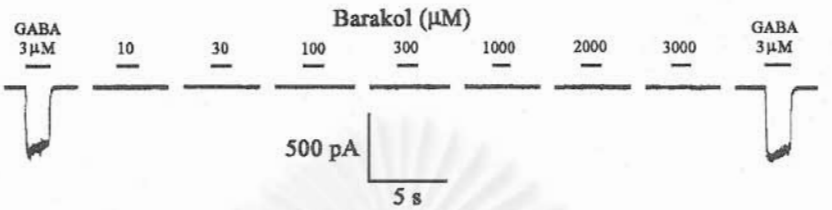
4.1 ผลของบาราคอล, Diazepam และ Pentobarbital sodium ต่อตัวรับกาบาเอ

การให้สารบาราคอล ความเข้มข้น 10 μM ร่วมไปกับ กาบา (ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.3-300 μM) แก่เซลล์ประสาทรูปปิรามิด พบว่าสารบาราคอลจะเสริมฤทธิ์ กาบา ทำให้เกิดการตอบสนองมากขึ้นโดยกระแสที่ไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ประสาทเพิ่มสูงขึ้น (รูปที่ 18, 20) ในขณะที่การให้สารบาราคอล ความเข้มข้น 1 μM ร่วมไปกับ กาบา พบว่าสารบาราคอลจะทำให้เกิดการตอบสนองมากขึ้นเล็กน้อย (รูปที่ 20)



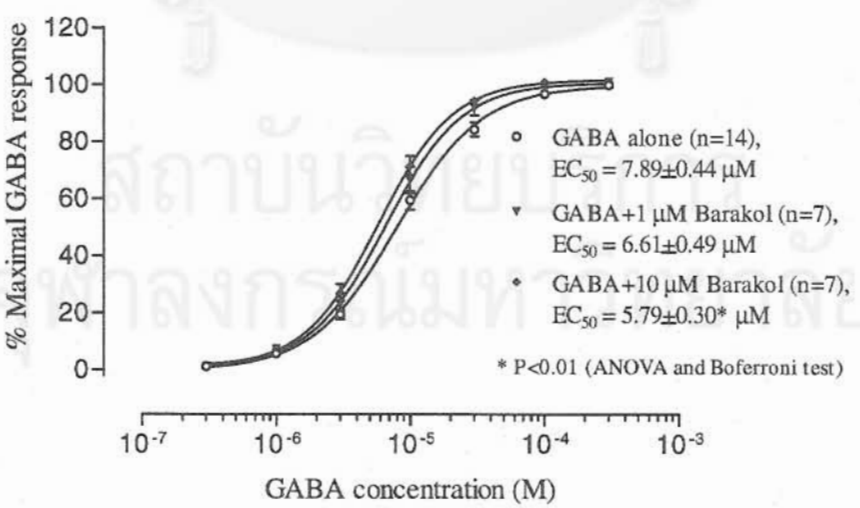
รูปที่ 18 ภาพบันทึกแสดงผลของบาราคอล ความเข้มข้น 10 μM ในการเสริมฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 0.3-300 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทรูปปิรามิด **A.** ผลจากการให้ GABA เดี่ยว , **B.** ผลจากการให้ GABA ร่วมไปกับบาราคอล

เมื่อให้สารบาราคอลเดี่ยว ความเข้มข้น 10-3000 μM ไม่พบว่าเกิดการกระตุ้นให้เกิดกระแสไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (n=5) (รูปที่ 19)



รูปที่ 19 ภาพบันทึกแสดงผลบาราคอล ความเข้มข้น 30-3000 μM ไม่ทำให้เกิดกระแสไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane currents) ในเซลล์ประสาทรูปปิรามิด เปรียบเทียบกับการให้ GABA 3 μM

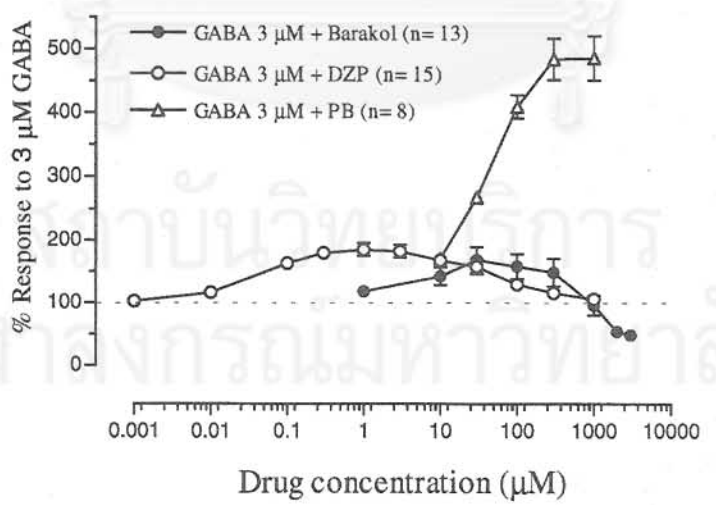
เมื่อให้สารบาราคอล 1 และ 10 μM ร่วมกับสารกาบา ความเข้มข้น 0.3-300 μM พบว่าสารบาราคอล 10 μM สามารถเสริมฤทธิ์ของกาบาได้ โดยทำให้ค่า GABA EC_{50} ลดลงจาก 7.89 ± 0.44 μM (n=14) เมื่อให้กาบาเดี่ยว ไปเป็น 5.79 ± 0.30 μM เมื่อให้กาบาร่วมกับบาราคอล 10 μM (P<0.01, ANOVA and Bonferroni test; n=7) สำหรับการให้กาบาร่วมกับบาราคอล 1 μM ค่า GABA EC_{50} จะลดลงเป็น 6.61 ± 0.49 μM แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05; n=7) (รูปที่ 20)



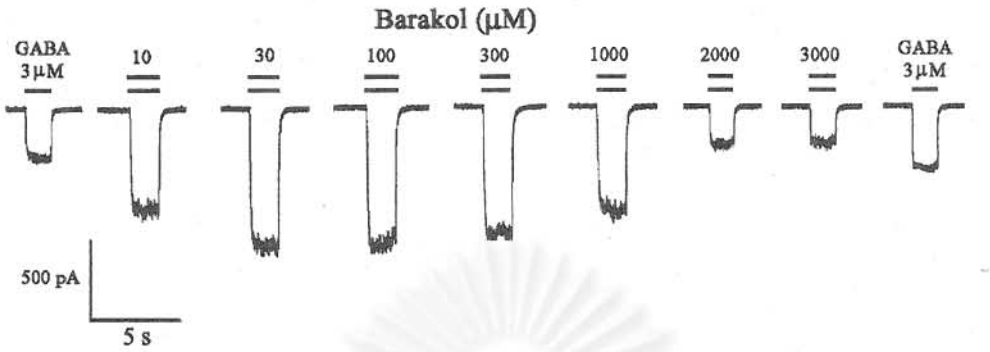
รูปที่ 20 ผลของบาราคอล 1 และ 10 μM ที่มีต่อ GABA concentration-response curve ที่ได้จากการให้ GABA ความเข้มข้น 0.3-300 μM ไปยังเซลล์ประสาทรูปปิรามิด

เมื่อให้สารกาบา (3 μM) ร่วมกับ บาราคอล (ความเข้มข้น 1-3000 μM) หรือ Diazepam (0.001-1000 μM) หรือ Pentobarbital sodium (10-1000 μM) เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารทั้ง 3 ที่มีต่อกระแสไหลเข้าเซลล์ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย กาบา (3 μM) พบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่เริ่มเห็นการเสริมฤทธิ์กาบา ของ Diazepam เท่ากับ 0.01 μM บาราคอล เท่ากับ 10 μM และ Pentobarbital เท่ากับ 10 μM โดยการเสริมฤทธิ์สูงสุดของ Diazepam อยู่ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1 μM เสริมฤทธิ์ได้เท่ากับ 184.8±9.97 % (n=15) ของบาราคอลอยู่ที่ 30 μM เสริมฤทธิ์ได้เท่ากับ 168.2±20.66 % (n=15) และของ Pentobarbital อยู่ที่ 300 μM เสริมฤทธิ์ได้เท่ากับ 482.3±32.54 % (n=8) (รูปที่ 21-24) ซึ่งสูงกว่าบาราคอล และ Diazepam อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.001, ANOVA and Bonferroni test)

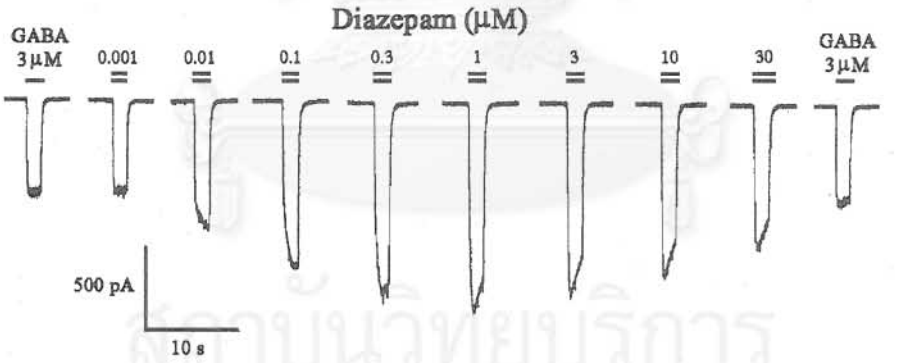
เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของบาราคอลขึ้นมากกว่า 30 μM ร้อยละของการเสริมฤทธิ์จะน้อยลง จนความเข้มข้นมากกว่า 1000 μM สารบาราคอลกลับมีฤทธิ์ยับยั้งสารกาบา (รูปที่ 21-22) ในขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Diazepam ขึ้นมากกว่า 1 μM ร้อยละของการเสริมฤทธิ์จะลดลงแต่ไม่ยับยั้งฤทธิ์ของกาบา (รูปที่ 21, 23) ซึ่งลักษณะการตอบสนองแบบนี้ไม่พบกับ Pentobarbital ที่ความเข้มข้นถึง 1000 μM (รูปที่ 21, 24)



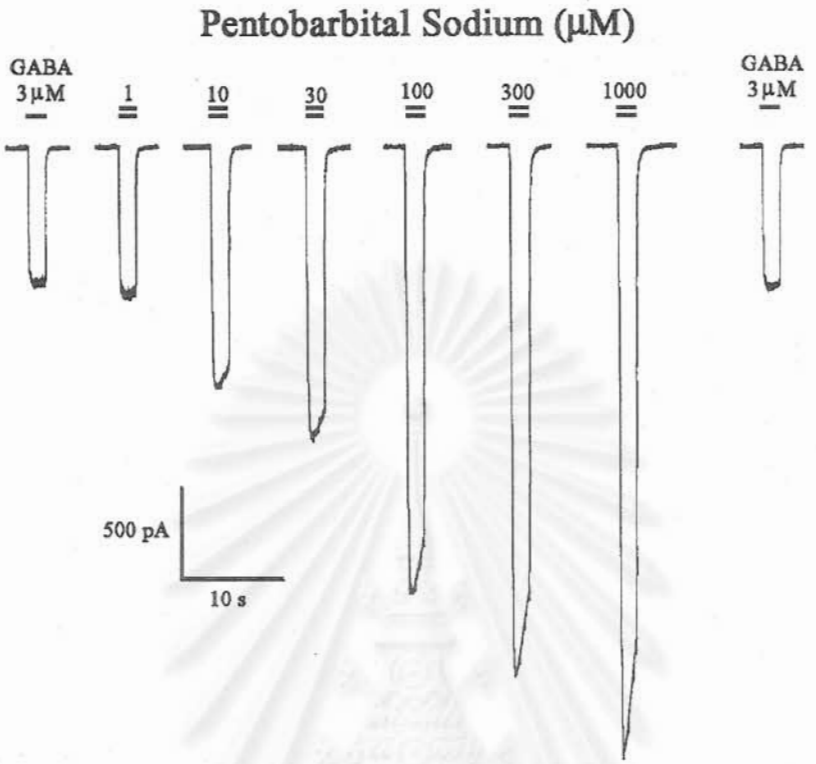
รูปที่ 21 ผลของบาราคอล (1-3000 μM, Barakol), Diazepam (0.001-1000 μM, DZP), และ Pentobarbital sodium (10-1000 μM, PB) ที่มีต่อกระแสที่เกิดจากการให้ 3 μM GABA ไปยังเซลล์ประสาทรูปปิรามิด



รูปที่ 22 ภาพบันทึกแสดงผลของบาราคอล (Barakol), ความเข้มข้น 10-3000 μM ในการเสริมฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 3 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทรูปปีรามิด

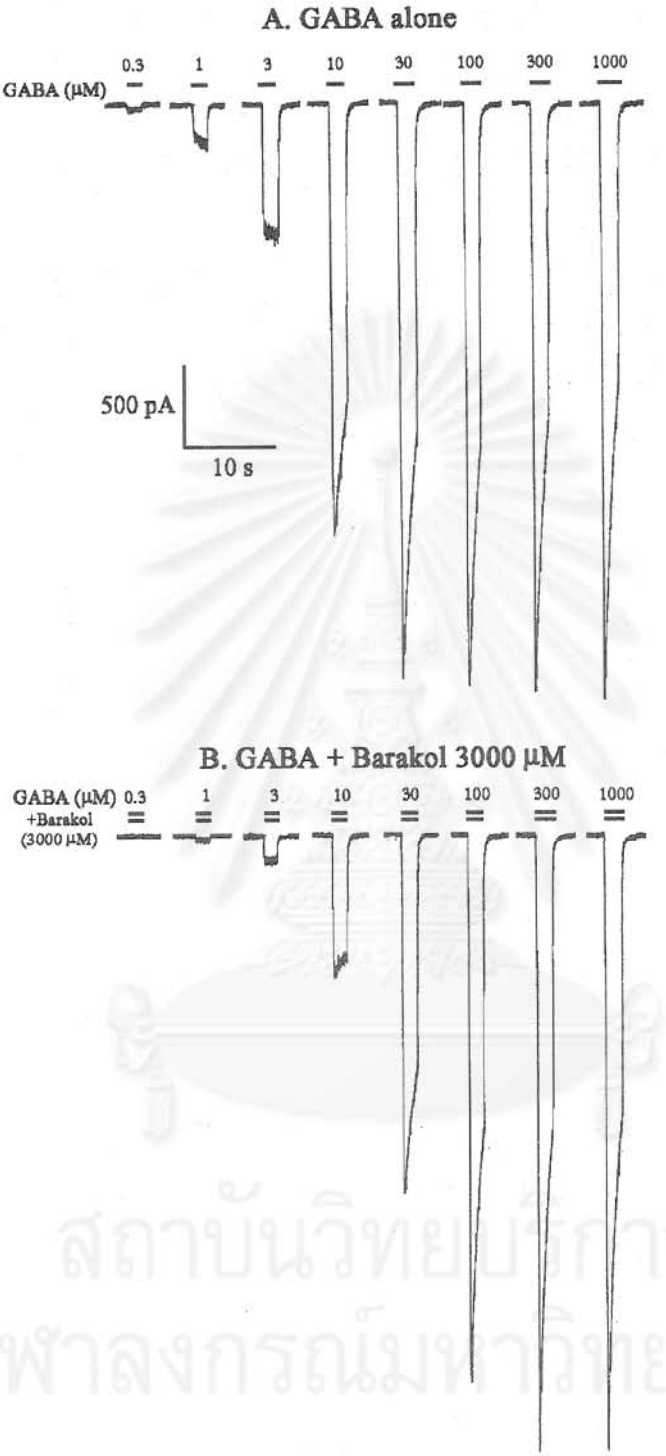


รูปที่ 23 ภาพบันทึกแสดงผลของ Diazepam (DZP) ความเข้มข้น 0.001-30 μM ในการเสริมฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 3 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทรูปปีรามิด



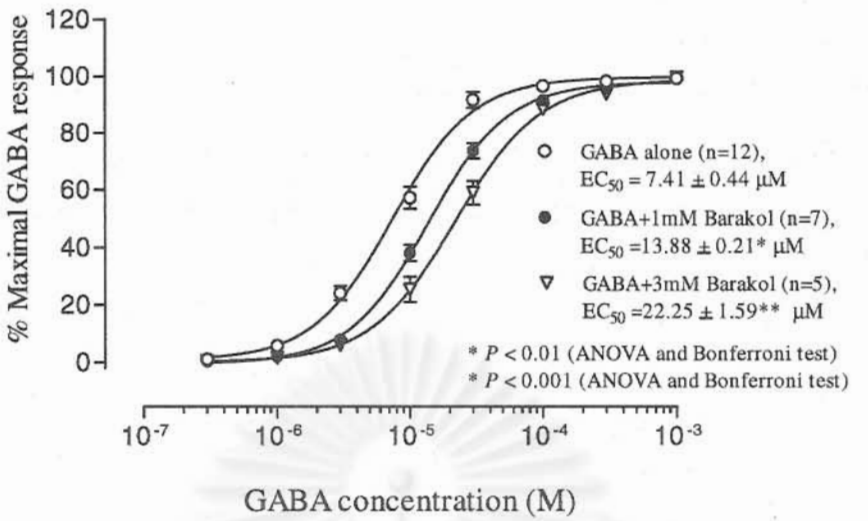
รูปที่ 24 ภาพบันทึกแสดงผลของ Pentobarbital sodium (PB) ความเข้มข้น 1-1000 μM ในการเสริมฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 3 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทรูปปิรามิด

เมื่อให้สาร บาราคอลความเข้มข้นสูง (1000-3000 μM) ร่วมกับสารกาบา ความเข้มข้น 0.3-1000 μM พบว่าสาร บาราคอลความเข้มข้นสูง สามารถยับยั้งฤทธิ์ของกาบาได้ โดยทำให้ค่า GABA EC_{50} เพิ่มขึ้นจาก 7.41 ± 0.44 μM เมื่อให้กาบาเดี่ยว (n=12) ไปเป็น 13.88 ± 0.21 μM เมื่อให้กาบาร่วมกับบาราคอล 1000 μM ($P<0.01$, ANOVA and Bonferroni test; n=7) และเป็น 22.22 ± 1.59 μM เมื่อให้กาบาร่วมกับบาราคอล 3000 μM ($P<0.001$; n=7) โดยค่าการตอบสนองสูงสุดไม่เปลี่ยนแปลง (รูปที่ 25-26)



รูปที่ 25 ภาพบันทึกแสดงผลของบาราคอล ความเข้มข้น 3000 μM ในการยับยั้งฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 0.3-300 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทรูปปิรามิด **A.** ผลจากการให้ GABA เดี่ยว , **B.** ผลจากการให้ GABA ร่วมไปกับบาราคอล

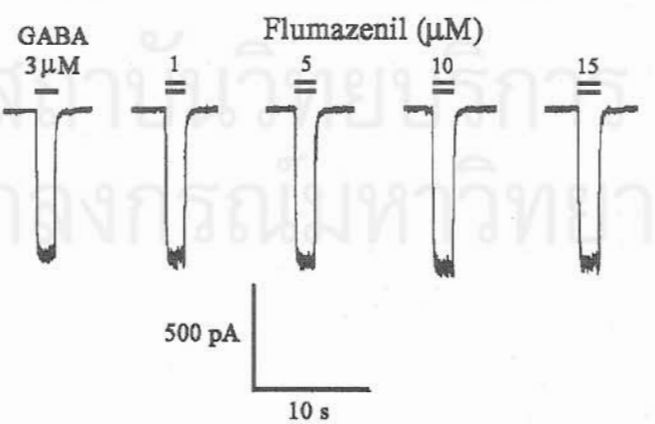
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 26 ผลของบาราคอล 1000 และ 3000 μM ที่มีต่อ GABA concentration-response curve ที่ได้จากการให้ GABA ความเข้มข้น 0.3-1000 μM ไปยังเซลล์ประสาทรูปปิรามิด

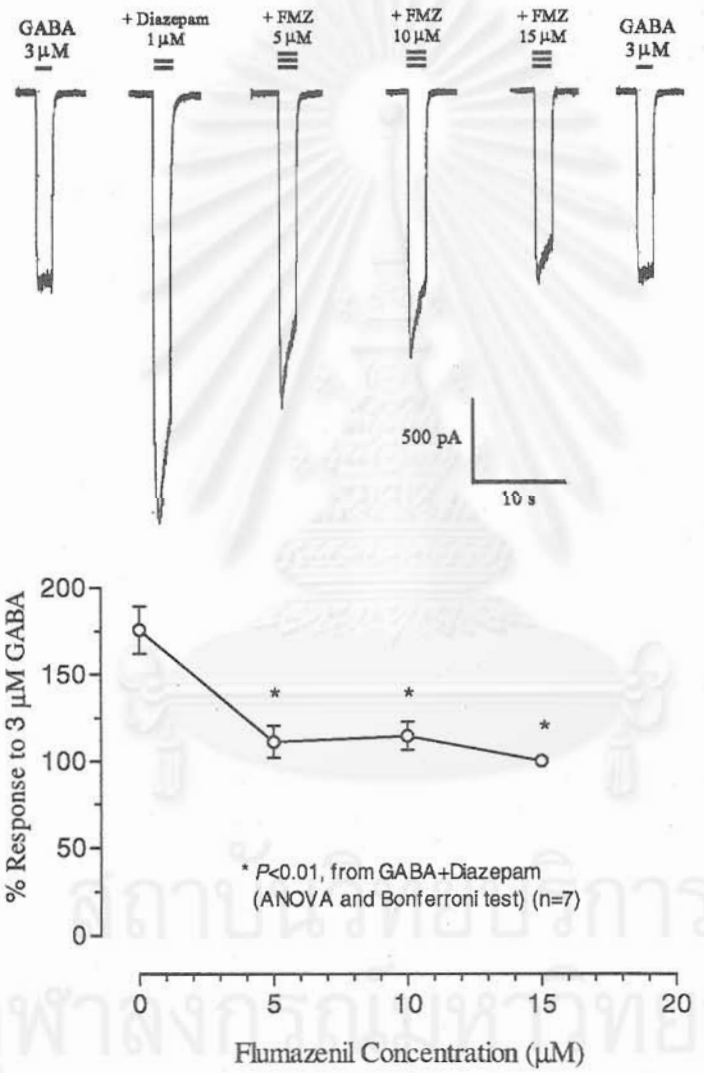
4.2 ผลของ Flumazenil ที่มีต่อการเสริมฤทธิ์ของบาราคอล และ Diazepam ต่อ กาบาที่ตัวรับกาบาเอ

การให้สาร Flumazenil ความเข้มข้น 1-15 μM ร่วมกับ กาบา ความเข้มข้น 3 μM พบว่าไม่มีผลต่อกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ที่เกิดจากการให้ กาบา ในเซลล์ประสาทรูปปิรามิด (n=5) (รูปที่ 27)



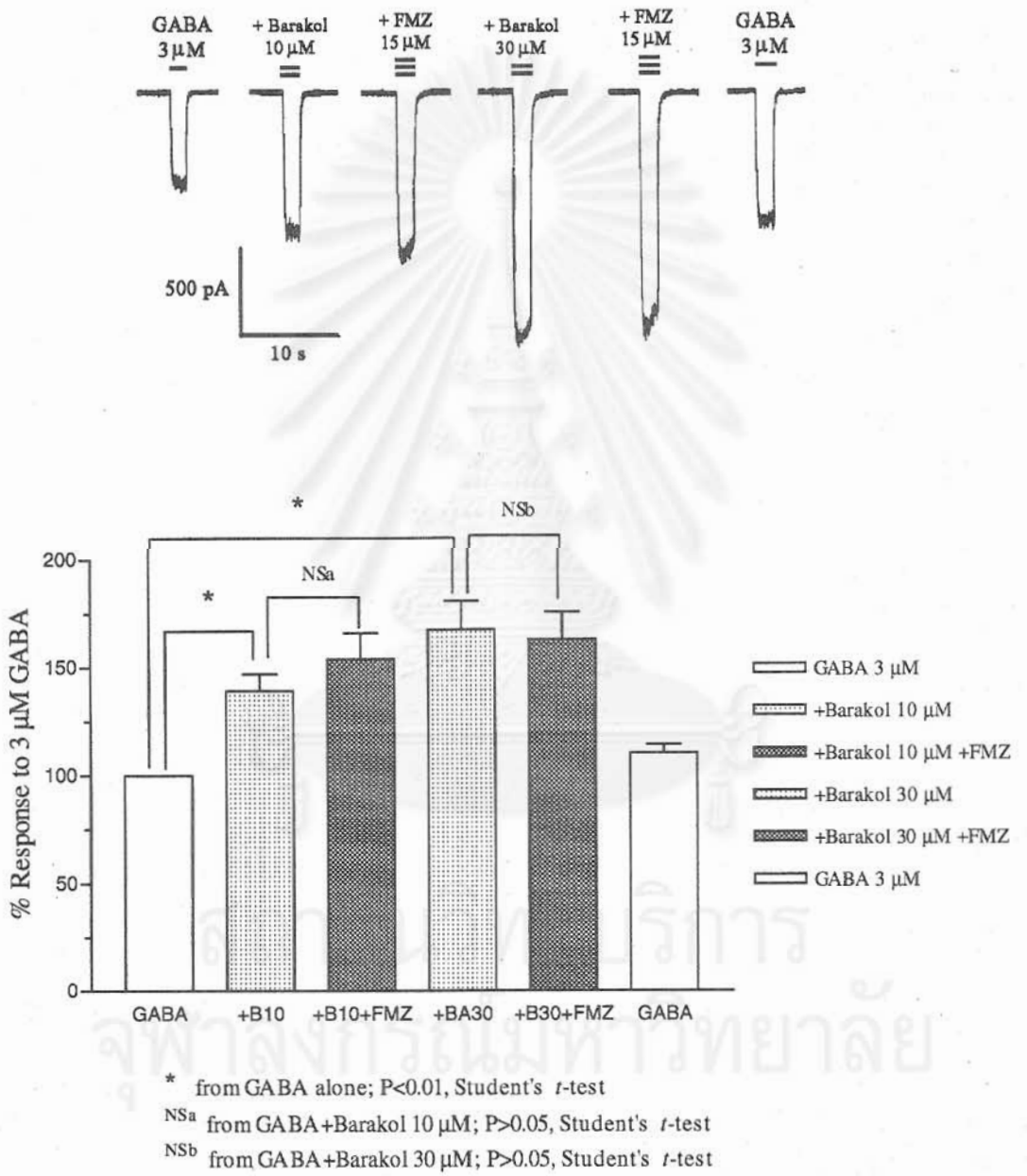
รูปที่ 27 ภาพบันทึกแสดงผล Flumazenil ความเข้มข้น 1-15 μM ไม่มีผลต่อกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ที่เกิดจากการให้ GABA ความเข้มข้น 3 μM ในเซลล์ประสาทรูปปิรามิด

เมื่อให้สาร Flumazenil ความเข้มข้น 5-15 μM ร่วมกับ กาบา ความเข้มข้น 3 μM และ Diazepam ความเข้มข้น 1 μM และ พบว่า สามารถยับยั้งการเสริมฤทธิ์ของ Diazepam ที่มีต่อ กาบา ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ ในเซลล์ประสาทรูปปิรามิด (n=7) (รูปที่ 28)



รูปที่ 28 ภาพบันทึกและกราฟแสดงผลการยับยั้งของ Flumazenil (5-15 μM) (FMZ) ต่อการเสริมฤทธิ์ของ Diazepam (1 μM) ต่อ GABA (3 μM) ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ ในเซลล์ประสาทรูปปิรามิด

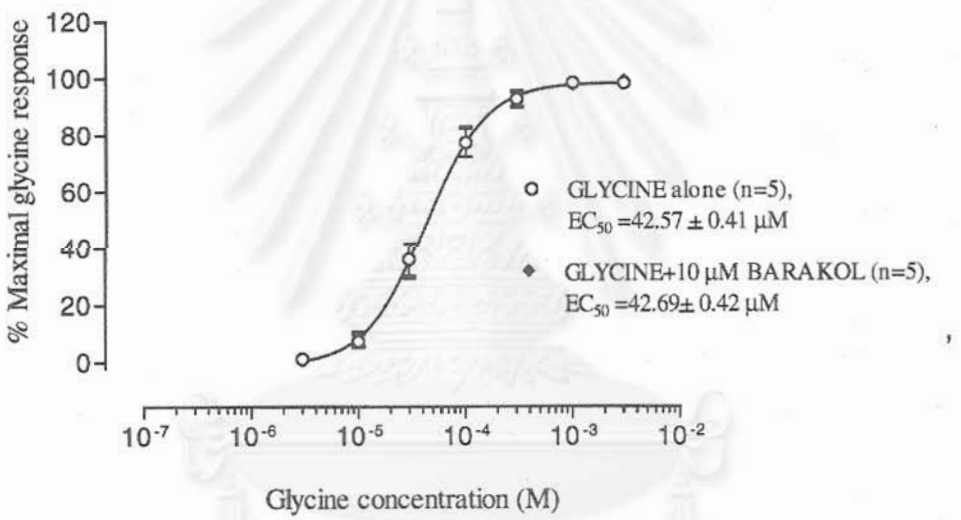
เมื่อให้สาร Flumazenil ความเข้มข้น 15 μM ร่วมกับ กาบา ความเข้มข้น 3 μM และ บาราคอล ความเข้มข้น 10 และ 30 μM พบว่า ไม่สามารถยับยั้งการเสริมฤทธิ์ของบาราคอลที่มีต่อ กาบา ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ ในเซลล์ประสาทรูปปิรามิด (n=6) (รูปที่ 29)



รูปที่ 29 ภาพบันทึกและกราฟแสดง Flumazenil (5-15 μM, FMZ) ไม่มีผลต่อการเสริมฤทธิ์ของ บาราคอล (10-30 μM) ต่อ GABA (3 μM) ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ในเซลล์ประสาทรูปปิรามิด

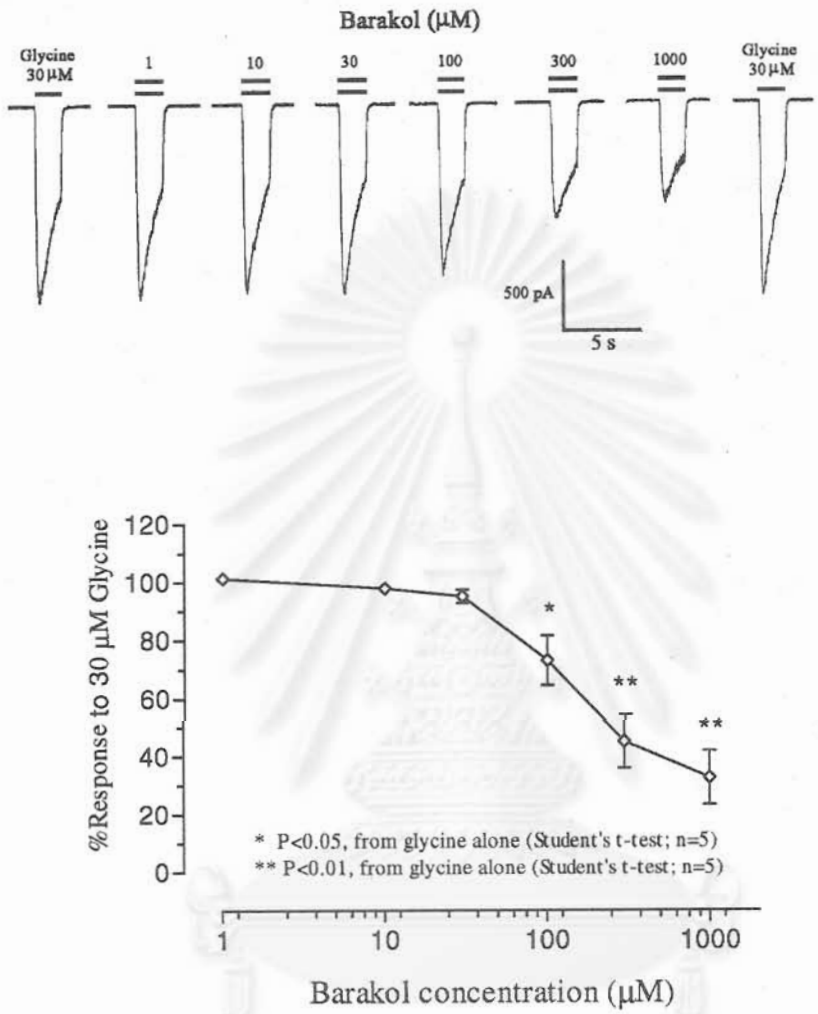
5. ผลของบาราคอลต่อตัวรับไกลซีน (Glycine receptor)

การให้สารบาราคอล ขนาดต่ำความเข้มข้น 10 μM ร่วมไปกับไกลซีน (Glycine) (ความเข้มข้นตั้งแต่ 3-3000 μM) แก่เซลล์ประสาทรูปปีรามิด พบว่าสารบาราคอลจะไม่มีผลต่อกระแสที่ไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่กระตุ้นด้วยไกลซีน โดยค่า Glycine EC_{50} เท่ากับ 42.57 ± 0.41 μM เมื่อให้ ไกลซีนเดี่ยว (n=5) และ 42.69 ± 0.42 μM เมื่อให้ไกลซีนร่วมกับบาราคอล 10 μM (P>0.05, Student's t-test) (รูปที่ 30)



รูปที่ 30 บาราคอล 10 μM ไม่มีผลต่อ Glycine concentration-response curve ที่ได้จากการให้ Glycine ความเข้มข้น 3-3000 μM ไปยังเซลล์ประสาทรูปปีรามิด

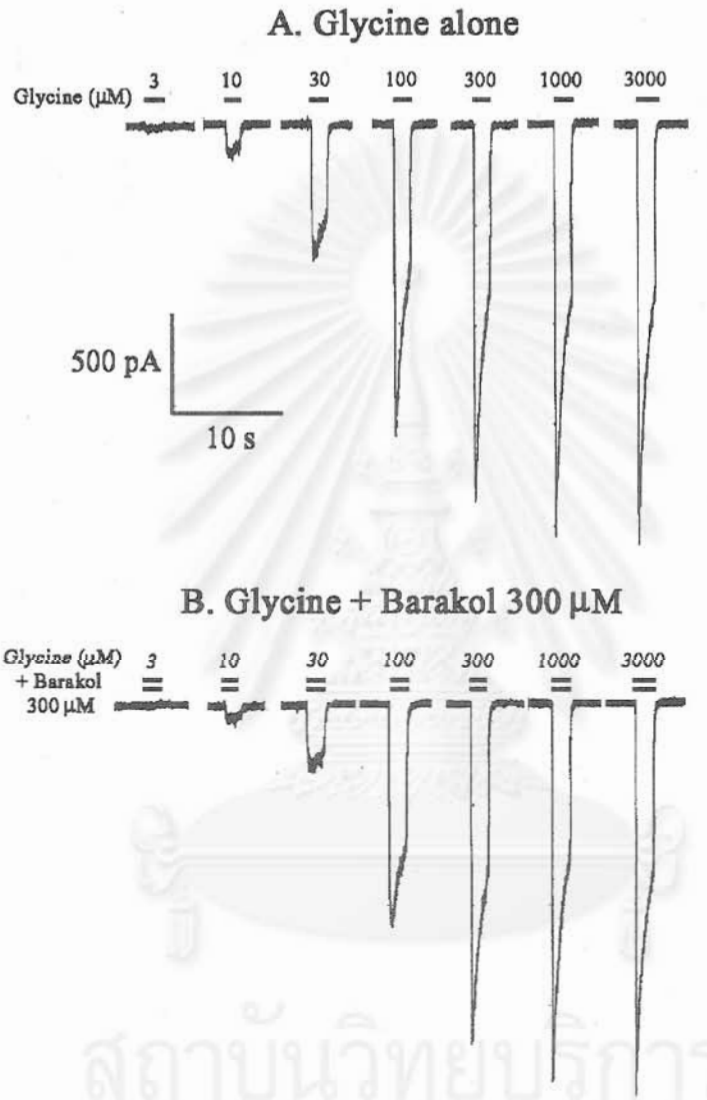
เมื่อให้สารไกลซีน (30 μM) ร่วมกับบาราคอล (ความเข้มข้น 1-3000 μM) เพื่อศึกษาฤทธิ์ของบาราคอล ที่มีต่อกระแสไหลเข้าเซลล์ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย ไกลซีน (30 μM) พบว่า บาราคอลความเข้มข้นต่ำ จะไม่มีผล แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นจนถึง 100-1000 μM จะพบว่าบาราคอลสามารถยับยั้งฤทธิ์ของไกลซีนได้โดยการยับยั้งจะเพิ่มตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 3 1)



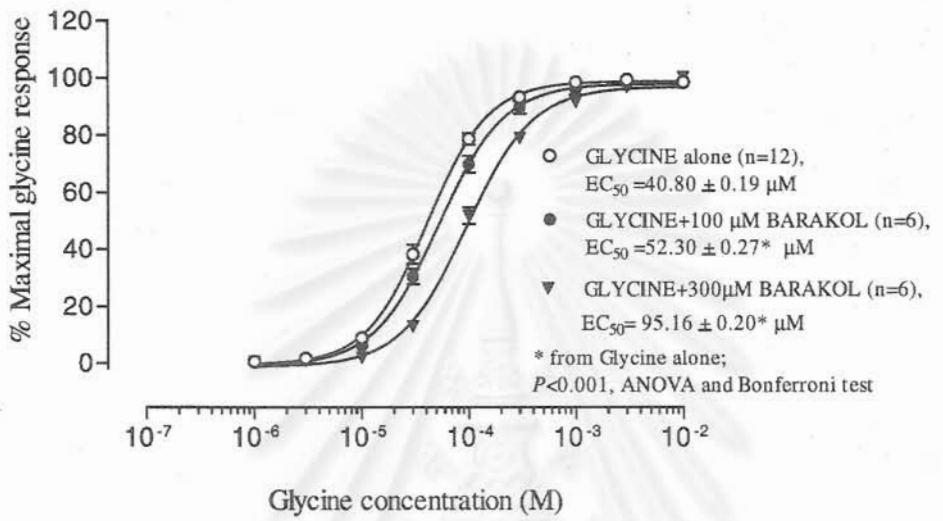
รูปที่ 31 ภาพบันทึกและกราฟแสดงผลของบาราคอล (1-1000 μM, Barakol) ที่มีต่อกระแสที่เกิดจากการให้ 30 μM Glycine ไปยังเซลล์ประสาทรูปปิรามิด

การให้สารบาราคอล ขนาดสูงความเข้มข้น 100 และ 300 μM ร่วมไปกับ ไกลซีน (ความเข้มข้นตั้งแต่ 1-10000 μM) แก่เซลล์ประสาทรูปปิรามิด พบว่าสารบาราคอลสามารถยับยั้งฤทธิ์ของไกลซีนได้ โดยทำให้ค่า Glycine EC_{50} เพิ่มขึ้นจาก 40.80 ± 0.19 μM เมื่อให้กาบาเดี่ยว (n=12) ไปเป็น 52.30 ± 0.27 μM เมื่อให้ไกลซีนร่วมกับบาราคอล 100 μM (P<0.001, ANOVA and Bonferroni test; n=6) และ

เป็น 95.16 ± 0.20 μM เมื่อให้ไกลซีนร่วมกับบาราคอล 300 μM (P<0.001; n=6) โดยค่าการตอบสนองสูงสุดไม่เปลี่ยนแปลง (รูปที่ 32, 33)



รูปที่ 32 ภาพบันทึกแสดงผลของ บาราคอล 300 μM ในการยับยั้งฤทธิ์ของ Glycine ความเข้มข้น 3-3000 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทรูปปีรามิด A. ผลจากการให้ Glycine เดี่ยว , B. ผลจากการให้ Glycine ร่วมไปกับ บาราคอล



รูปที่ 33 ผลของบาราคอล 100 และ 300 µM ที่มีต่อ Glycine concentration-response curve ที่ได้จากการให้ Glycine ความเข้มข้น 3-3000 µM ไปยังเซลล์ประสาทรูปปิรามิด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การอภิปรายผล

เทคนิคแพทช์แคลมป์ (Patch clamp) เป็นวิธีการหนึ่งทางสรีรวิทยาไฟฟ้า ที่ใช้ในการวัดการไหลของกระแสไฟฟ้าผ่านช่องไอออน (ion channels) ของเยื่อชีวภาพ (biological membranes) ทั้งในระดับเซลล์ทั้งเซลล์ (whole-cell) และระดับช่องไอออนเดี่ยว (single-channel) (Penner, 1995) สำหรับช่องไอออนที่ศึกษานั้นได้แก่ ช่องไอออนที่ถูกกระตุ้นด้วยความต่างศักย์ไฟฟ้า (voltage-gated ion channels เช่น ช่องไอออน Na^+, K^+, Ca^{2+}, Cl^- เป็นต้น), ช่องไอออนที่เป็นตัวรับ (receptor-gated ion channels) ของสิ่งเร้าต่างๆ เช่น สารสื่อประสาท ฮอร์โมน หรือ แรงกด เป็นต้น, ช่องไอออนที่ถูกควบคุมโดย Second-messenger (second-messenger-activated channels) เช่น แคลเซียมไอออนภายในเซลล์, cAMP, cGMP, IP_3, G protein หรือ kinase เป็นต้น เทคนิคนี้ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเป็นครั้งแรกเพื่อใช้ในการในการศึกษากระแสไฟฟ้าที่ไหลผ่านช่องไอออนเดี่ยว (single channel) บนเยื่อหุ้มเซลล์ เนื่องจากการที่เทคนิคนี้มีอำนาจการแยกสูงในการบันทึกกระแสไฟฟ้า (high-resolution current recording) ที่ไหลผ่านช่องไอออนช่องเดียวได้ (Neher and Sakmann, 1976) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จะเลือกใช้เทคนิคแพทช์แคลมป์ในการศึกษากระแสไฟฟ้าที่ไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แบบทั้งเซลล์ (Whole-cell application of the patch clamp technique) ทางช่องไอออนที่กระตุ้นให้เปิดโดยลิแกนด์ (Ligand-gated ion channel) 2 ชนิด คือ ตัวรับกาบาเอ ($GABA_A$ receptor) และ ตัวรับไกลซีน (Glycine receptor, strychnine-sensitive glycine receptor) เนื่องจากสารบาราคอลที่ใช้ในการศึกษามีฤทธิ์ทำให้สงบ (sedation) จึงมีความเป็นไปได้ที่อาจออกฤทธิ์ผ่านทางตัวรับทั้งสองชนิด ที่เป็นตัวรับชนิดยับยั้งการทำงานของเซลล์ประสาท (Inhibitory receptor)

ในการศึกษาทางสรีรวิทยาไฟฟ้าที่ใช้เทคนิคแพทช์แคลมป์นี้ จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการเตรียมเซลล์ที่จะนำมาศึกษาให้เหมาะสม โดยเซลล์ที่จะนำมาใช้นั้นมีได้หลายรูปแบบ ได้แก่ เซลล์เพาะเลี้ยง (cultured neurone) ทั้งที่ได้จาก Primary culture (Stanfeld and Mathie, 1993) หรือจาก Cell lines เซลล์ประสาทเดี่ยวที่แยกออกมาทันที (acutely dissociated neurone) โดยอาศัยเอนไซม์ ได้แก่ Trypsin (Kay and Wong, 1986), Protease (Kaneda *et al.*, 1988) โดยเฉพาะเอนไซม์ pronase and thermolysin (Sooksawate and Simmonds, 1998) และ แผ่นสมอง (brain slice) (Sakmann and Stuart, 1995) หรือแผ่นไขสันหลัง (Spinal cord slices) (Pickering *et al.*, 1993) ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้เซลล์ประสาทเดี่ยวที่แยกออกมาทันที โดยใช้วิธีของ Sooksawate and Simmonds (1998) และ Kaneda และคณะ (1988) ซึ่งมีข้อดี คือ สามารถทำได้ไม่ยาก และเซลล์ประสาทที่ได้ยังรักษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological structure) และสมบัติทางสรีรวิทยาไฟฟ้า และทางเคมี (Electrophysiological and chemical properties) ไว้ได้เป็นอย่างดี

ผลการศึกษาที่สามารถแยกเซลล์ประสาทเดี่ยวออกมาจากสมองส่วนฮิปปโปแคมปัสของหนูขาวได้ ตามวิธีของ Sooksawate and Simmonds (1998) ที่ใช้สัตว์ทดลองอายุ 21-27 วัน พบว่าจำนวนเซลล์ประสาทที่ยังมีชีวิตอยู่มีจำนวนน้อยกว่าเมื่อเทียบกับเมื่อใช้สัตว์ทดลองที่มีอายุน้อยกว่านี้ คือ 10-16 วัน ในการศึกษา ของ Sooksawate and Simmonds (1998) นอกจากนี้ยังพบว่าโอกาสที่จะประสบความสำเร็จในการทำการบันทึกแบบทั้งเซลล์ (Whole-cell recording) ก็ต่ำกว่า แต่ผลการศึกษานี้ก็ไม่ส่งผลกระทบต่อการศึกษาโดยใช้เทคนิคแพทช์แคลมป์ (Patch clamp) มากนัก เนื่องจากในการทดลองครั้งหนึ่งๆ เซลล์ประสาทที่แยกได้มีจำนวนมาก และมีเซลล์ที่มีชีวิตและสามารถทำการศึกษาได้เป็นระยะเวลานานถึงมากกว่า 6 ชั่วโมง (ภายหลังการแยกเซลล์เดี่ยว นำไปใส่ในช่องบันทึกแล้ว และมีการปล่อยให้สารละลายเกลือสรีรวิทยาที่อิ่มตัวด้วยออกซิเจน (Oxygenated physiological salt solution) ไหลผ่านเซลล์ตลอดเวลา) จำนวนมาก

ในการศึกษาตัวรับกาบาเอ ($GABA_A$ receptor) ของเซลล์ประสาทเดี่ยวที่แยกได้ พบว่า เซลล์ประสาทเดี่ยวที่แยกได้มีการตอบสนองต่อการให้สารกาบาได้เป็นอย่างดี โดยเริ่มตอบสนองต่อกาบาที่ความเข้มข้น 0.1-0.3 μM และมีค่าการตอบสนองสูงสุดอยู่ในช่วง 2000-5500 pA จากการให้กาบาที่ความเข้มข้น 300-1000 μM (รูปที่ 3-6) ซึ่งก็ใกล้เคียงกับการศึกษาที่มีผู้รายงานไว้ (Hara *et al.*, 1994; Sooksawate and Simmonds, 2001) การตอบสนองของเซลล์ประสาทต่อกาบานี้ สามารถยับยั้งได้โดยสาร Bicuculline ซึ่งเป็นสารต้านกาบาชนิดแข่งขัน (competitive antagonist) ที่ตัวรับกาบาเอ (รูปที่ 4) จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกาบากับร้อยละของการตอบสนองสูงสุด (รูปที่ 7) พบว่า Bicuculline ทำให้เส้นกราฟที่ได้เลื่อนไปทางขวาแบบขนาน ทำให้ค่า GABA EC_{50} เพิ่มขึ้นโดยไม่เปลี่ยนแปลงการตอบสนองสูงสุด ซึ่งเป็นรูปแบบการยับยั้งการตอบสนองของสารต้านชนิดแข่งขัน สำหรับการยับยั้งด้วยสาร Picrotoxinin ซึ่งเป็นสารต้านกาบาชนิดไม่แข่งขัน (non-competitive antagonist) ที่ตัวรับกาบาเอ (รูปที่ 5) พบว่า Picrotoxinin ทำให้เส้นกราฟที่ได้เลื่อนไปทางขวาแบบไม่ขนาน โดยมีการลดลงของการตอบสนองสูงสุด (รูปที่ 8) ซึ่งเป็นรูปแบบการยับยั้งการตอบสนองของสารต้านชนิดไม่แข่งขัน (Macdonald and Olsen, 1994; Sieghart, 1995; Barnard *et al.*, 1998; Sooksawate and Simmonds, 2001) การตอบสนองของเซลล์ประสาทเดี่ยวต่อกาบานี้ สามารถเสริมฤทธิ์ได้โดยการให้กาบาร่วมกับสารในกลุ่ม Benzodiazepines คือ Diazepam (รูปที่ 9) หรือสารในกลุ่ม Barbiturates คือ Pentobarbital sodium (รูปที่ 10) สารทั้งสองชนิดนี้ออกฤทธิ์เพิ่มการกระตุ้นของกาบาที่ตัวรับกาบาเอ (positive allosteric modulation) โดยการจับกับบริเวณยึดเหนี่ยวของสารนั้นบนตัวรับกาบาเอต่างบริเวณกันและต่างจากบริเวณยึดเหนี่ยวของกาบา (Sieghart, 1995) จากรูปที่ 11 ซึ่งเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกาบากับร้อยละของการตอบสนองสูงสุด จะเห็นได้ว่า

Diazepam ทำให้เส้นกราฟที่ได้เลื่อนไปทางซ้ายแบบขนาน ทำให้ค่า GABA EC_{50} ลดลง โดยไม่มีการเปลี่ยนการตอบสนองสูงสุด ซึ่งการเสริมฤทธิ์นี้สามารถยับยั้งได้โดย Flumazenil ซึ่งเป็นสารต้าน (antagonist) ที่บริเวณยึดเหนี่ยว (binding site) ของสารในกลุ่ม Benzodiazepines (Macdonald and Olsen, 1994; Sieghart, 1995; Barnard *et al.*, 1998) เมื่อให้กาบาร่วมกับ Pentobarbital sodium ก็ให้ผลเสริมฤทธิ์เช่นเดียวกันแต่ไม่สามารถยับยั้งด้วย Flumazenil (รูปที่ 12) นอกจากนี้ Pentobarbital sodium ยังมีฤทธิ์กระตุ้นโดยตรงต่อตัวรับกาบาเอ ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ได้ โดยไม่ต้องให้ร่วมกับกาบา (รูปที่ 13) และสามารถยับยั้งได้ด้วย Bicuculline (Macdonald and Olsen, 1994; Sieghart, 1995) จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าตัวรับที่ศึกษานี้เป็นตัวรับชนิดกาบาเอ ($GABA_A$ receptor) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นชนิดย่อย (subtype) ที่ไวต่อ Diazepam (High affinity for diazepam) ที่พบทั่วไปประมาณ 80% โดยเฉพาะในเปลือกสมองใหญ่ (cerebral cortex) และสมองส่วนฮิปโปแคมปัสที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (Sieghart, 1995; McKernan and Whiting, 1996; Möhler *et al.*, 1997; Barnard *et al.*, 1998) อย่างไรก็ตามในการศึกษาก็พบมีบางเซลล์แต่มีจำนวนน้อยที่ตอบสนองต่อ Diazepam ไม่มากนัก ก็อาจเป็นไปได้ว่าอาจเป็นชนิดย่อยอื่นที่ไวน้อยหรือไม่ไวต่อ diazepam (Low or no affinity for diazepam) ซึ่งก็พบได้ที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัสเช่นเดียวกันแต่ในสัดส่วนที่น้อย (McKernan and Whiting, 1996; Möhler *et al.*, 1997; Barnard *et al.*, 1998)

ในการศึกษาตัวรับไกลซีน (Glycine receptor or strychnine-sensitive glycine receptor) ของเซลล์ประสาทเดี่ยวที่แยกได้ พบว่า เซลล์ประสาทเดี่ยวที่แยกได้มีการตอบสนองต่อการให้สารไกลซีนได้เป็นอย่างดี โดยความเข้มข้นของไกลซีนที่ทำให้เซลล์ประสาทเริ่มตอบสนองจะสูงกว่ากาบา คือ ที่ความเข้มข้น 1-3 μM และมีค่าการตอบสนองสูงสุดอยู่ในช่วง 2000-5000 pA จากการให้ไกลซีนที่ความเข้มข้น 3000-10000 μM (3-10 mM) (รูปที่ 14-16) ซึ่งก็ใกล้เคียงกับการศึกษาที่มีผู้รายงานไว้ (Hara *et al.*, 1994; Kira *et al.*, 1998) การตอบสนองของเซลล์ประสาทต่อไกลซีนนี้ สามารถยับยั้งได้ด้วย Strychnine ซึ่งเป็นสารต้านไกลซีนชนิดแข่งขัน (competitive antagonist) ที่ตัวรับไกลซีน (รูปที่ 15) จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไกลซีนกับร้อยละของการตอบสนองสูงสุด (รูปที่ 17) พบว่า Strychnine ทำให้เส้นกราฟที่ได้เลื่อนไปทางขวาแบบขนาน ทำให้ค่า Glycine EC_{50} เพิ่มขึ้น โดยไม่เปลี่ยนแปลงการตอบสนองสูงสุด ซึ่งเป็นรูปแบบการยับยั้งการตอบสนองของสารต้านชนิดแข่งขัน (Rajendra *et al.*, 1997) นอกจากที่ตัวรับนี้แล้ว ไกลซีนยังเป็นตัวทำการร่วม (coagonist) กับกลูตาเมต ที่ตัวรับกลูตาเมต (Glutamate receptor) ชนิดตัวรับเอนเอ็มดีเอ (NMDA receptor) ซึ่งเป็นตัวรับในกลุ่มกระตุ้นการทำงานของเซลล์ประสาท (Danysz and Parsons, 1998) อย่างไรก็ตามตัวรับเอนเอ็มดีเอ (NMDA receptor) นี้ก็ไม่สามารถยับยั้งด้วย Strychnine ดังนั้นจากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็น

ว่าตัวรับนี้เป็นตัวรับไกลซีน (Glycine receptor) หรือที่เรียกว่า Strychnine-sensitive glycine receptor หรือ Inhibitory glycine receptor

จากผลการศึกษาสารสกัดจากใบขี้เหล็กโดย อุไร อรุณลักษณ์ (1949) ทำให้ทราบว่าสารสกัดนี้สามารถออกฤทธิ์กดระบบประสาทส่วนกลาง ช่วยระงับประสาท และมีความเป็นพิษต่ำ หลังจากนั้นจึงมีการสกัดแยกสารสำคัญในใบขี้เหล็กและพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็นสารบาราคอล (Hassanali *et al.*, 1969; Wagner *et al.*, 1978) จึงมีความเป็นไปได้ที่สารบาราคอลอาจเป็นสารออกฤทธิ์หลักในใบขี้เหล็ก

การวิจัยในครั้งนี้ เป็นการให้สารบาราคอลโดยตรงกับเซลล์ประสาทเดี่ยวที่แยกออกมาทันทีจากสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูขาว ที่ได้พิสูจน์แล้วว่ามีตัวรับกาบาเอที่มีสมบัติตอบสนองได้ดีต่อสารกาบา Diazepam และ Pentobarbital sodium รวมทั้งสามารถยับยั้งได้ด้วย Bicuculline และ Picrotoxinin (รูปที่ 3-13) พบว่าสารบาราคอลในขนาดต่ำ คือ 10 μM เพิ่มฤทธิ์ของกาบาที่ตัวรับกาบาเอ (รูปที่ 18) โดยสามารถเลื่อน GABA concentration-response curve ไปทางซ้าย ทำให้ค่า GABA EC_{50} ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อนำมาศึกษาการเพิ่มขนาดของบาราคอลที่มีต่อการเพิ่มฤทธิ์ของกาบาความเข้มข้น 3 μM ซึ่งทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ประมาณร้อยละ 20 ของกระแสสูงสุดที่เกิดจากการให้กาบาความเข้มข้นสูง (EC_{20}) พบว่าสารบาราคอลเริ่มเห็นผลเพิ่มกระแสไหลเข้าเซลล์ที่เกิดการกระตุ้นด้วยกาบา ที่ความเข้มข้น 1 μM และให้ผลเพิ่มฤทธิ์กาบาสูงสุดที่ความเข้มข้น 30 μM (รูปที่ 21-22) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ Diazepam จะเห็นว่า Diazepam มีผลเพิ่มฤทธิ์กาบาตั้งแต่ความเข้มข้น 0.01 μM และให้ผลเพิ่มฤทธิ์สูงสุดที่ความเข้มข้น 1 μM (รูปที่ 21, 23) โดยมีผลเพิ่มฤทธิ์กาบา 184.8±9.97% (n=15) ซึ่งสูงกว่าผลเพิ่มฤทธิ์กาบาของบาราคอลเล็กน้อย (168.2±20.66%, n=13) โดยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับ Pentobarbital sodium จะเริ่มเห็นผลเพิ่มฤทธิ์อย่างชัดเจนที่ความเข้มข้น 10 μM และให้ผลเพิ่มฤทธิ์สูงสุดที่ความเข้มข้น 300 μM (รูปที่ 21, 24) โดยมีผลเพิ่มฤทธิ์กาบา 482.3±32.54% (n=8) ซึ่งสูงกว่าบาราคอล และ Diazepam ประมาณ 2.5 เท่า

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของบาราคอลขึ้นมากกว่า 30 μM การเพิ่มฤทธิ์กาบาจะลดลง จนที่ความเข้มข้น 1000 μM ผลจากบาราคอล กลับให้ผลยับยั้งกระแสที่ไหลเข้าเซลล์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้นเป็น 2000 และ 3000 μM ผลการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของบาราคอลที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 21-22) จากกราฟ GABA concentration-response curve (รูปที่ 26) จะเห็นได้ว่า บาราคอลความเข้มข้น 1000 และ 3000 μM ทำให้เส้นกราฟที่ได้เลื่อนไปทางขวาแบบขนาน ทำให้ค่า GABA EC_{50} เพิ่มขึ้น โดยไม่เปลี่ยนแปลงการตอบสนองสูงสุด ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับผลจาก Bicuculline (รูปที่ 7) ซึ่งเป็นสารต้านกาบา

ชนิดแข่งขันที่ตัวรับกาบาเอ จึงอาจจะเป็นไปได้ที่บาราคอลขนาดสูงจะยับยั้งฤทธิ์ของกาบาต่อตัวรับกาบาเอด้วยการแย่งจับที่บริเวณยึดเหนี่ยวกับกาบา (GABA binding site) บนตัวรับกาบาเอ แต่อย่างไรก็ตามต้องมีการวิจัยเพิ่มเติมรวมทั้งการยืนยันด้วยวิธีการวิจัยอื่น เพื่อให้ทราบกลไกที่แน่ชัดต่อไป

จากการที่บาราคอลขนาดความเข้มข้นต่ำสามารถเพิ่มฤทธิ์ของกาบาที่ตัวรับกาบาเอ และการที่สารบาราคอลเดี่ยวไม่มีผลกระตุ้นโดยตรงต่อเซลล์ประสาทที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าหรือออกจากเซลล์ทันที (รูปที่ 19) ซึ่งมีผลต่อตัวรับกาบาเอคล้ายคลึงกับสาร Diazepam แต่แตกต่างจากเพิ่มฤทธิ์กาบาที่ตัวรับกาบาเออื่นที่มีทั้งฤทธิ์โดยตรงกระตุ้นตัวรับกาบาเอหรือเพิ่มฤทธิ์กาบา เช่น สาร Pentobarbital sodium (รูปที่ 13) (Study and Barker, 1981) หรือสารเพิ่มฤทธิ์กาบาที่ตัวรับกาบาเออื่นๆ เช่น Pregnanolone, Allopregnanolone, Etomidate, Sevoflurane (Wu *et al.*, 1996), และ Propofol (Hara *et al.*, 1994) เป็นต้น (Lambert *et al.*, 1997; Upton and Blackburn, 1997) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีเซลล์ประสาทที่แยกได้จำนวนหนึ่ง (6 เซลล์) ที่บาราคอลไม่มีผลเพิ่มฤทธิ์กาบาที่ตัวรับกาบาเอจากจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่ศึกษา 39 เซลล์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่บาราคอลจะมีความเฉพาะเจาะจงต่อหน่วยย่อย (subunit) บางชนิดของตัวรับกาบาเอ จึงมีผลเพิ่มฤทธิ์กาบาที่มีหน่วยย่อยนั้นเป็นองค์ประกอบ ซึ่งก็คล้ายคลึงกับ Diazepam (Möhler *et al.*, 1997; Upton and Blackburn, 1997) อย่างไรก็ตามยังต้องศึกษาเพิ่มเติมว่าบาราคอลมีความเฉพาะเจาะจงต่อหน่วยย่อย (subunit) บางชนิดของตัวรับกาบาเอต่อไป จากเหตุผลข้างต้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ใช้สาร Flumazenil ซึ่งเป็นสารต้าน Benzodiazepine ที่บริเวณยึดเหนี่ยวของ Benzodiazepine บนตัวรับกาบาเอ ที่เฉพาะเจาะจง (Sieghart, 1995; Upton and Blackburn, 1997) มายับยั้งการเพิ่มฤทธิ์กาบาของสาร Diazepam ซึ่งออกฤทธิ์ผ่านการจับที่บริเวณยึดเหนี่ยวของ Benzodiazepine บนตัวรับกาบาเอ และบาราคอล ผลการศึกษาก็พบว่า Flumazenil ความเข้มข้น 5-15 μM สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ Diazepam (1 μM) ได้ (รูปที่ 28) ในขณะที่ Flumazenil ความเข้มข้น 15 μM ไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์ของบาราคอลความเข้มข้น 10 และ 30 μM (รูปที่ 29) แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มฤทธิ์ของกาบาที่ตัวรับกาบาเอ ไม่ได้ออกฤทธิ์ผ่านบริเวณยึดเหนี่ยวของ Benzodiazepine จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาต่อไปถึงบริเวณบนตัวรับกาบาเอที่บาราคอลไปออกฤทธิ์

สำหรับการศึกษาผลของบาราคอลที่มีต่อตัวรับไกลซีน พบว่าบาราคอลความเข้มข้นต่ำ (10-30 μM)ไม่มีผลต่อกระแสไหลเข้าเซลล์ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยไกลซีน (รูปที่ 30-31) แต่บาราคอลขนาดตั้งแต่ 100 μM ขึ้นไปถึง 1000 μM จะมีผลยับยั้งฤทธิ์ของไกลซีน (31-33) จากกราฟ Glycine concentration-response curve (รูปที่ 33) จะเห็นได้ว่า บาราคอลความเข้มข้น 100 และ 300 μM ทำให้เส้นกราฟที่ได้เลื่อนไปทางขวาแบบขนาน ทำให้ค่า Glycine EC_{50} เพิ่มขึ้น โดยไม่เปลี่ยนแปลงการตอบสนองสูงสุด ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับผลจาก Strychnine (รูปที่ 17) ซึ่งเป็นสารต้านไกลซีนชนิดแข่งขัน

ที่ตัวรับไกลซีน จึงอาจจะเป็นไปได้ที่บาราคอลขนาดสูงจะยับยั้งฤทธิ์ของไกลซีนต่อตัวรับไกลซีนด้วยการแย่งจับที่บริเวณยึดเหนี่ยวกับไกลซีน (Glycine binding site) บนตัวรับไกลซีน แต่อย่างไรก็ตามต้องมีการวิจัยเพิ่มเติมรวมทั้งการยืนยันด้วยวิธีการวิจัยอื่น เพื่อให้ทราบกลไกที่แน่ชัดต่อไป

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าบาราคอลซึ่งเป็นสารหลักที่สกัดได้จากใบขี้เหล็ก มีฤทธิ์ 2 ลักษณะ ตรงกันข้าม คือ ฤทธิ์เสริมฤทธิ์กาบาที่ตัวรับกาบาเอ ในขนาดความเข้มข้นต่ำ (10-30 μM) และมีฤทธิ์ยับยั้งกาบาที่ตัวรับกาบาเอ ในขนาดความเข้มข้นสูง (1000-3000 μM) รวมทั้งยับยั้งไกลซีนที่ตัวรับไกลซีน ในขนาดความเข้มข้น 100-1000 μM ซึ่งก็สอดคล้องกับการศึกษาทางเภสัชวิทยาพฤติกรรมของพิกุล จันทรโยธา (1988) และ Tongroach และคณะ (1992) ที่พบว่าบาราคอลในขนาดต่ำ คือ 10-100 มก./กก. (ฉีดเข้าช่องท้อง) จะมีฤทธิ์ลดการเคลื่อนไหวของหนูถีบจักร ทำให้สงบ (sedation) แต่ในขนาดที่สูงขึ้น เป็น 150-200 มก./กก. (ฉีดเข้าช่องท้อง) จะมีฤทธิ์เพิ่มการเคลื่อนไหวและไวต่อการกระตุ้น เมื่อเพิ่มขนาดให้สูงขึ้นอีก เป็น 225-425 มก./กก. (ฉีดเข้าช่องท้อง) พบว่าหนูถีบจักรจะเกิดอาการชักและตาย โดยมีค่าขนาดยาที่ทำให้หนูร้อยละ 50 เกิดอาการชัก เท่ากับ 296.71 (265.25-331.56) มก./กก. (ฉีดเข้าช่องท้อง) และมีค่าขนาดยาที่ทำให้หนูร้อยละ 50 เกิดการตาย เท่ากับ 324.09 (302.36-347.39) มก./กก. (ฉีดเข้าช่องท้อง)

สำหรับฤทธิ์คลายกังวลของสารบาราคอลยังมีข้อโต้แย้งกันอยู่ โดย Thongsaard *et al.* (1996) พบว่าบาราคอลมีฤทธิ์คลายกังวลที่ขนาดยา 10 มก./กก. ฉีดเข้าช่องท้อง ขนาดที่สูงจะไม่มีฤทธิ์ แต่ Fiorino และคณะ (1998) พบว่าบาราคอลไม่มีฤทธิ์ดังกล่าว แต่จากการศึกษานี้พบว่าบาราคอลขนาดต่ำ (10-30 μM) เพิ่มฤทธิ์กาบาที่ตัวรับกาบาเอได้ จึงมีความเป็นไปได้ที่สารบาราคอลจะมีฤทธิ์ต้านความวิตกกังวล (Antianxiety) อย่างไรก็ตามต้องหารูปแบบการทดลองที่เหมาะสมที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านความวิตกกังวลของบาราคอลต่อไป (Fiorino *et al.*, 1998)

จากผลการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่าบาราคอลขนาดต่ำสามารถเสริมฤทธิ์กาบาต่อตัวรับกาบาเอ ทำให้อาจพัฒนาบาราคอลขึ้นมาเป็นยาที่มีฤทธิ์ทำให้สงบ รักษาอาการวิตกกังวล แต่มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาความเป็นพิษของบาราคอล เนื่องจากมีรายงานของการใช้สมุนไพรขี้เหล็กซึ่งมีผลข้างเคียงทำให้เกิดภาวะตับอักเสบเฉียบพลันในมนุษย์ (สมบัติ ตรีประเสริฐสุข และคณะ, 2543; Hongsirinirachorn *et al.*, 2001) อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปได้ว่าภาวะดังกล่าวเกิดจาก บาราคอล หรือเกิดจากสารอื่น ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาต่อไปว่าสารบาราคอลทำให้เกิดพิษต่อตับหรือไม่ ขณะนี้ได้มีหลายกลุ่มดำเนินการศึกษาอยู่ รวมทั้งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อสรุป

1. การพัฒนาการแยกเซลล์ประสาทเดี่ยวจากสมองของหนูขาว

สามารถแยกเซลล์ประสาทเดี่ยวจากสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (Hippocampus) ของหนูขาว อายุ 21-27 วันได้ โดยใช้เทคนิค Protease enzymatic treatment และ Trituration โดยเซลล์ประสาทรูปปิรามิดที่แยกได้ยังมีสมบัติตอบสนองต่อกาบา (GABA) และ ไกลซีน (Glycine) ได้ดี โดยมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและสามารถใช้ในการทดลองได้นานถึง 6 ชั่วโมงอย่างเพียงพอ

2. ผลของบาราคอลต่อตัวรับกาบาเอ ($GABA_A$ receptor) และตัวรับไกลซีน (Glycine receptor)

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า สารบาราคอลความเข้มข้นต่ำ 1-30 μM จะไม่มีผลต่อตัวรับไกลซีน (Glycine receptor) แต่สามารถเสริมฤทธิ์กาบาที่ตัวรับกาบาเอ ($GABA_A$ receptor) ของเซลล์ประสาทรูปปิรามิดที่แยกออกมาอย่างทันที จากสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูขาว เมื่อเปรียบเทียบกับ Diazepam พบว่าต้องใช้บาราคอลที่มีความเข้มข้นสูงกว่าจึงให้การเสริมฤทธิ์ใกล้เคียงกับการเสริมฤทธิ์โดย Diazepam ซึ่งผลในการเสริมฤทธิ์กาบาของบาราคอลนี้ไม่สามารถยับยั้งด้วยสาร Flumazenil ซึ่งเป็นสารต้าน Benzodiazepine ที่บริเวณยึดเหนี่ยว Benzodiazepine (Benzodiazepine binding site) บนตัวรับกาบาเอ ในขณะที่สารบาราคอลความเข้มข้นสูง 1000-3000 μM จะยับยั้งฤทธิ์ของกาบาที่ตัวรับกาบาเอ และขนาด 100-1000 μM จะยับยั้งไกลซีนที่ตัวรับไกลซีน ซึ่งลักษณะการยับยั้งกาบาและไกลซีนของบาราคอลความเข้มข้นสูงมีลักษณะคล้ายคลึงกับสารต้านชนิดแข่งขัน (competitive antagonist) ของตัวรับนั้น คือ Bicuculline (สารต้านกาบาที่ตัวรับกาบาเอ) และ Strychnine (สารต้านไกลซีนที่ตัวรับไกลซีน) นอกจากนี้บาราคอลไม่มีผลกระตุ้นโดยตรงต่อเซลล์ประสาทรูปปิรามิดในการทำให้เกิดกระแสไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ในสภาวะการทดลองนี้

ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาที่สามารถแยกเซลล์ประสาทเดี่ยวออกมาจากสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูขาวได้ พบว่ายังคงมีเซลล์ประสาทจำนวนหนึ่งยังมีชีวิตอยู่และสามารถนำมาใช้ในการศึกษาโดยใช้เทคนิคแพทช์แคลมป์ (Patch clamp) โดยตอบสนองต่อการให้สารกาบาและไกลซีน ซึ่งเทคนิคในการแยกเซลล์และเทคนิคแพทช์แคลมป์นี้จะเป็นรูปแบบ (Model) ที่สามารถนำมาใช้ในงานวิจัยที่ใช้ในการศึกษาสรีรวิทยาไฟฟ้าของเซลล์ประสาทเดี่ยวได้ อย่างไรก็ตามยังคงต้องการการศึกษาผลของการใช้สารสื่อประสาทตัวอื่นๆ เช่น Acetylcholine, Glutamate, 5-Hydroxytryptamine และ ATP เพื่อศึกษาถึงตัวรับชนิดอื่นๆ ในกลุ่มช่องไอออนที่กระตุ้นให้เปิดด้วยลิแกนด์ (Ligand-gated ion channels) นอกจากนี้วิธีการแยกเซลล์นี้ยังสามารถประยุกต์และพัฒนาไปใช้สำหรับสมองส่วนอื่นๆ และใช้ในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์และวิทยาศาสตร์ชีวภาพอื่นๆ ที่ใช้เซลล์ประสาทเป็นตัวอย่างในงานวิจัยได้

สำหรับการศึกษาผลของสารบาราคอลที่มีต่อตัวรับกาบาเอและตัวรับไกลซีนของเซลล์ประสาทนั้น ยังคงต้องการการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกการที่สารบาราคอลขนาดต่ำเสริมฤทธิ์กาบาที่ตัวรับกาบาเอและในขนาดสูงที่สามารถยับยั้งได้ทั้งตัวรับกาบาเอและตัวรับไกลซีน และผลของบาราคอลที่มีต่อตัวรับอื่นที่เกี่ยวข้อง เพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารบาราคอลอย่างละเอียด ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาสารนี้ต่อไป อย่างไรก็ตามเนื่องจากมีรายงานว่าสมุนไพรขี้เหล็กทำให้เกิดภาวะตับอักเสบเฉียบพลันได้ จึงต้องมีการศึกษาถึงพิษของบาราคอลทั้งแบบเฉียบพลัน แบบกึ่งเรื้อรัง และแบบเรื้อรังต่อไปด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วนอ้างอิง

พิกุล จันทรโยธา (1988) *ฤทธิ์ของบาราคอล, สารสกัดจากใบอ่อนของต้นขี้เหล็กต่อระบบประสาทส่วนกลาง*. วิทยานิพนธ์เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมบัติ ตรีประเสริฐสุข, มงคล หงษ์ศิรินิรชร และ อนุชิต จูฑะพุทธิ (2543) ภาวะตับอักเสบจากสมุนไพร "ขี้เหล็ก" บทเรียนเพื่อการพัฒนาสมุนไพรไทย. *วารสารคลินิก*. **186**: 385-390.

อุไร อรุณลักษณ์ (1949) การศึกษาเภสัชวิทยาของใบขี้เหล็ก. *สารศิริราช*, **1**: 434-444.

Barnard E.A., Skolnick P., Olsen R.W., Mohler H., Sieghart W., Biggio G., Braestrup C., Bateson A.N. and Langer S.Z. (1998) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of γ-aminobutyric acid receptors: Classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol. Rev.*, **50:** 291-313.

Betz H. (1991) Glycine receptors : Heterogeneous and widespread in the mammalian brain. *Trend Neurosc.*, 14 : 458-461.

Bhengsri S. (1996) *Detection and localization of barakol binding sites in rat brains* A thesis submitted for the degree of Master of Science, Chulalongkorn University, Bangkok.

Bowery N.G. (2000) $GABA_B$ receptors : Structure and function. In Martin D.L. and Olsen R.W. (eds.) *GABA in the Nervous System. The View at Fifty Years*, pp. 233-244, Lippincott Williams & Wilkin : Philadelphia.

Chaichantipyuth C. (1979) *A phytochemical study of the leaves of Cassia siamea and Cassia spectabilis.* A thesis submitted for the degree of Master of Science in Pharmacy, Chulalongkorn University, Bangkok.

Chen F.S., Ito H., Okabe F., Momose Y., Yamamura S., Ridtitid W., Chaichantipyuth C., Leelasangaluk V. and Tongroach P. (1999) Effects of barakol on aconitine-induced cardiac arrythmias. *Pharm.Biol.*, **37:** 105-108.

Danysz W. and Parsons C. (1998) Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: Physiological significance and possible therapeutic application. *Pharmacol. Rev.*, **50** (4): 597-664.

Fiorino D.F., Treit D., Menard J., Lermer L. and Phillips A.G. (1998) Is barakol anxiolytic? *Behav.Pharmacol.*, **9:** 375-378.

Hamil O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B. and Sigworth F.J. (1981) Improved patch clamp technique for high-resolution current recording from cell and cell-free membrane patches. *Pfluger Arch.*, **391:** 85-100.

Hara M., Kai Y. and Ikemoto Y. (1994) Propofol activates $GABA_A$ receptor-chloride ionophore complex in dissociated hippocampal pyramidal neurones of the rat. *Anesthesiology,* **79:** 781-787.

Hassanali A., King T.J. and Wallwork S.C. (1969) Barakol, a novel dioxaphenalene derivative *from Cassia Siamea. Chem.Comm.*, 678.

Hongsirinirachorn M, Threprasertsul S. and Chutaputti A. (2001) Hepatitis associated with barakol: Case report. *Thai J. Gastoenterol.*, **2** : 17-21.

Kaneda M., Nakamura H., and Akaike N. (1988) Mechanical and enzymatic isolation of mammalian CNS neurons, *Neuroscience Res.*, **5** : 299-315.

Kaokeaw K. (1992) Iodination reaction and evaluation of sedative action of barakol, the main ingredient extracted from the young leaves of *Cassia siamea* Lamk. A thesis submitted for the degree of Master of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok.

Kay A.R. and Wong R.K. (1986) Isolation of neurons suitable for patch-clamping from adult mammalian central nervous systems. *J. Neurosci. Methods*, **16** (3):227-38.

Kira T., Harata N., Sakata T. and Akaike N. (1998) Kinetics of sevoflurane action on GABA- and glycine-induced currents in acutely dissociated rat hippocampal neurons. *Neuroscience*, **85** (2): 383-394.

Kuhse J., Betz H. and Kirsch J. (1995) The inhibitory glycine receptor: architecture, synaptic localization and molecular pathology of a postsynaptic ion-channel complex. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **5**: 318-323.

Lambert J.J., Belelli D., Pistis M., Hil-Venning C. and Peters J.A. (1997) The interaction of intravenous anesthetic agents with native and recombinant $GABA_A$ receptors. An electrophysiological study. In Enna S.J. and Bowery N.G. (eds.) *The GABA Receptors.*, pp. 121-156, Humana Press : New Jersey.

Macdonald R.L. and Olsen R.W. (1994) $GABA_A$ receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci.*, **17:** 569-602.

Maksay G., Laube B. and Betz H. (2001) Subunit-specific modulation of glycine receptors by neurosteroids. *Neuropharmacology*, **41** : 369-376.

Malosio M.L., Marqueze-Pouey B., Kuhse I and Betz H. (1991) Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *Eur. Molec. Biol. Org. J.*, **10** : 2401-2409.

Möhler H., Benke D., Benson J., Lüscher B., Rudolph U. and Fritschy J.M. (1997) Diversity in structure, pharmacology and regulation of $GABA_A$ receotors. In Enna S.J. and Bowery N.G. (eds.) *The GABA Receptors.*, pp. 11-36, Humana Press : New Jersey.

Neher E. and Sakmann B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres, *Nature.* **260**: 799-802.

Penner R. (1995) A Practical guide to patch clamping, in Sakmann B. and Neher E. (eds.) *Single Channel Recording.* 2nd ed., pp.3-30, New York: Plenum Press.

Pickering T.E., Spanswick D. and Logan S.D. (1993) Whole-cell patch-clamp recording from neurones in spinal cord slices, in Wallis D.I. (ed.), *Electrophysiology : A practical approach,* pp. 169-188, New York : Oxford University Press.

Rajendra S., Lynch J.W. and Schofield P.R. (1997) The glycine receptor. *Pharmacol. Ther.*, **73** (2): 121-146.

Sakmann B., Hamil O.P. and Bormann J. (1983) Patch-clamp measurements of elementary chloride currents activated by the putative inhibitory transmitters GABA and glycine in mammalian spinal neurones. *J Neural Transm. Suppl.*, **18:** 83-95.

Sakmann B. and Stuart G. (1995) Patch-pipette recordings from the soma, dendrites, and axon of neurones in brain slices, in Sakmann B. and Neher E. (eds.) *Single Channel Recording.* 2nd ed., pp.199-211, New York: Plenum Press.

Sieghart W. (1995) Structure and pharmacology of γ-aminobutyric $acid_A$ receptor subtypes. *Pharmacol. Rev.*, **47:** 181-234.

Sieghart W., Fuchs K., Tretter V., Ebert V., Jechlinger M., Hoger H and Adamiker D. (1999) Structure and subunit composition of $GABA_A$ receptors. *Neurochem. Int..*, **34:** 379-385.

Sooksawate T. and Simmonds M.A. (1998) Increase membrane cholesterol reduces the potentiation of $GABA_A$ currents by neurosteroids in dissociated hippocampal neurones. *Neuropharmacology*, **37**: 1103-1110.

Sooksawate T. and Simmonds M.A. (2001) Effects of membrane cholesterol on the sensitivity of $GABA_A$ receptor to GABA in acutely dissociated hippocampal neurones. *Neuropharmacology*, **40**: 178-184.

Stanfeld C. and Mathie A. (1993) Recording membrane currents of peripheral neurones in short-term culture, in Wallis D.I. (ed.) *Electrophysiology, A practical approach.* pp. 3-28, New York : Oxford University Press.

Study R.E. and Barker J.L. (1981) Diazepam and (-) pentobarbital : Fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of γ-aminobutylic acid responses in cultured central neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78:** 7180-7184.

Suwan G., Sudsuang R., Dhamma-Upakorn P. and Werawong C. (1992) Hypotensive effects of barakol extracted from leaves of *Cassia siamea* Lam. in rats and cats. *Thai. J. Physiol.*, **5:** 53-65.

Thongsaard W., Deachapunya C., Pongsakorn S., Boyd E.A., Bennett G.W. and Marsden C.A. (1996) Barakol: a potential anxiolytic extracted from *Cassia siamea. Pharmacol.Biochem.Behav.*, **53:** 753-758.

Thongsaard W., Pongsakorn S., Sudsuang R., Bennett G.W., Kendall D.A., and Marsden C.A. (1997) Barakol: a natural anxiolytic, inhibits striatal dopamine release but not uptake in vitro . *Eur. J. Pharmacol.*, **319:** 157-164.

Tongroach P., Jantarayota P., Tantisira B., Kanluan P., Tongroach C. and Chaichantipyuth C. (1992) Barakol, a neuroactive compound from *Cassia siamea. Proceeding of the First JSPS-NRCT Joint Seminar in Pharmaceutical Sciences; Advance in Research on Pharmacologically Active Substances from Natural Sources.* Chiang Mai, Thailand, p. OP21.

Triller A., Cluzeaud F., Pfeiffer F., Betz H. and Korn H. (1985) Distribution of glycine receptors at central synapses: an immunoelectron microscopy study. *J. Cell Biol.*, **101** : 683-688.

Upton N. and Blackburn T. (1997) Pharmacology of mammalian $GABA_A$ receptors. In Enna S.J. and Bowery N.G. (eds.) *The GABA Receptors.*, pp. 83-120, Humana Press : New Jersey.

Wagner H., ElSayyad A.M., Seligmann O. and Chari V.M. (1978) Chemical constituents of *Cassia siamea* Lam., I. 2-methyl-5-acetonyl-7-hydroxychromone (Cassiachromone). *J. Med. Plant Res.*, **33**: 258-261.

Whitting P.J. (1999) The $GABA_A$ receptor gene family: new targets for therapeutic intervention. *Neurochem. Int.*, **34** : 387-390.

Wu J., Harata N. and Akaike N. (1996) Potentiation by sevoflurane of the gamma-aminobutyric acid-induced chloride current in acutely dissociated CA1 pyramidal neurones from rat hippocampus. *Br. J. Pharmacol.*, **119** (5): 1013-1021.

Young A.B. and Snyder S.H. (1973) Strychnine binding associated with glycine receptors of the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70** : 2832-2836.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย