บทที่ 4

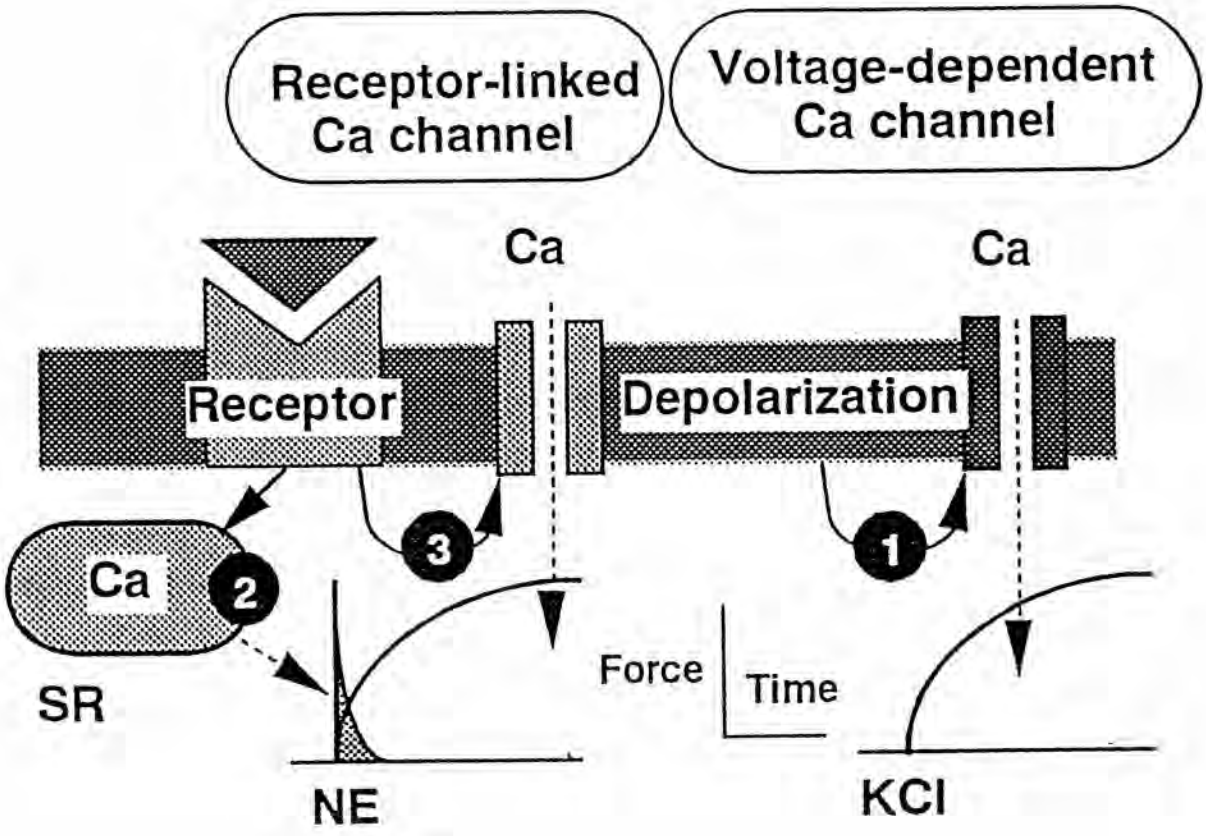
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

CU-763-10-01 เป็นอนุพันธ์ของ valproic acid ที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ จึงต้องมีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อระบบต่างๆ ทุกระบบ และการตอบสนองต่อสารกระตุ้นหรือ neurotransmitter ของหลอดเลือดและกล้ามเนื้อเรียบอื่นๆ ในต่างอวัยวะ มีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะศึกษากลไกของ CU-763-10-01 ต่ออวัยวะต่างๆ ที่แยกจากสัตว์ทดลอง และผลของ CU-763-10-01 ในตัวสัตว์ทดลอง เพื่อที่จะนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์หรือทางเภสัชวิทยาต่อไป

กลไกที่ทำให้แคลเซียมเคลื่อนเข้าสู่ภายในเซลล์โดยอาศัยการกระตุ้นให้กล้ามเนื้อเรียบหดตัวโดยใช้ตัวกระตุ้นที่มีกลไกการกระตุ้นให้กล้ามเนื้อเรียบหดตัวต่างกัน คือ high K^+ และ NE (หรือ phenylephrine) พบว่าแคลเซียมเคลื่อนเข้าสู่ภายในเซลล์ 2 pathway (ดังภาพที่ 49) คือ ผ่านเข้าเซลล์ทาง voltage-dependent calcium channel (voltage-operated calcium channel หรือ VOC) และทาง recepter-linked calcium channel (receptor-operated calcium channel หรือ ROC) (Bolton, 1979) ดังนั้นจึงใช้ agonist 3 ชนิด คือ NE, 5-HT และ histamine ในการกระตุ้น ROC และใช้ KCl และ $BaCl_2$ ในการกระตุ้น VOC จากผลการทดลองสามารถอภิปรายผลการทดลองได้ดังนี้

ผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อกระตุ้นด้วย KCl

การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ โดยทั่วไปการเคลื่อนที่ของแคลเซียมเข้าสู่ภายในเซลล์เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ ซึ่งกลไกการเคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์ของแคลเซียมที่ plasma membrane ที่สำคัญมี 2 pathway คือ ผ่าน voltage-operated calcium channel (VOC) และ receptor-operated calcium channel (ROC) ซึ่งในการกระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบด้วย KCl ทำให้เกิดการหดตัว การหดตัวนี้เกิด membrane depolarization กระตุ้นให้มีการเปิดออกของ VOC มีผลให้เพิ่ม permeable ต่อ Ca^{2+} (Szekeres และ Papp, 1994) นอกจากนี้แล้ว KCl ยังทำให้มีการปลดปล่อยแคลเซียมจากเยื่อหุ้มเซลล์ (superficial calcium store) โดยตรง ซึ่งมีผลให้แคลเซียมอิสระภายในเซลล์เพิ่มขึ้น (Hudgin และ Weiss, 1968) แคลเซียมอิสระที่สูงขึ้นนี้จะไปกระตุ้นให้เกิด CICR ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดได้ ดังนั้นจะเห็นได้ว่า แม้ใน Ca^{2+}-free solution เมื่อกระตุ้นหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวด้วย KClการหดตัวยังเกิดขึ้นได้ (ภาพที่ 44a) แต่แรงในการหดตัวในช่วง phasic contraction จะน้อยมากเมื่อเทียบกับในสารละลาย Krebs Henseleit (ภาพที่ 18a) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hudgin และ Wiess, 1968 ทั้งนี้เพราะ ปริมาณแคลเซียม



ภาพที่ 49 ทิศทางการเคลื่อนที่ของแคลเซียมเมื่อกระตุ้น ROC และ VOC (Karaki และคณะ, 1997)

ภายในเซลล์น้อยมากเมื่อเทียบกับแคลเซียมในสารละลาย Krebs Henseleit

Hay และ Wadsworth, 1982 พบว่าท่อนำอสุจิหนูขาวส่วน prostatic segment และ epididymal segment มีการตอบสนองต่อ KCl แตกต่างกัน โดยที่ tonic contraction ของส่วน prostatic segment จะคงอยู่ได้นานกว่า การทดลองนี้จึงใช้ท่อนำอสุจิส่วนนี้ จากผลการทดลองพบว่า CU-763-10-01 ขนาด $5x10^{-5}$ M สามารถลดการหดตัวของท่อนำอสุจิหนูขาว หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว และหลอดเลือดแดงใหญ่กระต่าย โดยลดทั้ง phasic และ tonic contraction เมื่อกระตุ้นด้วย KCl ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากผลการทดลองอาจกล่าวได้ว่า CU-763-10-01 ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+} เข้าสู่ภายในเซลล์โดยผ่าน VOC

ผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อกระตุ้นด้วย $BaCl_2$

$BaCl_2$ ทำให้กล้ามเนื้อเรียบหดตัวโดยยับยั้ง Ba^{2+}-sensitive potassium channel เกิด membrane depolarization กระตุ้นให้มีการเปิดออกของ VOC แคลเซียมจะเคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์ได้มากขึ้นมีผลให้แคลเซียมอิสระภายในเซลล์สูงขึ้น แคลเซียมอิสระที่สูงขึ้นนี้จะไปกระตุ้นให้เกิด CICR มีการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บภายในเซลล์ (Huang, 1995) ในกรณีที่ไม่มีแคลเซียมภายนอก Ba^{2+} สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ทาง calcium channel ได้ ซึ่งสามารถยับยั้งได้ด้วย nifedipine และ verapamil (Karaki, Satake และ Shibata, 1986) นอกจากนี้ Ba^{2+} จะไปแทนที่แคลเซียมที่จับกันอย่างแน่นหนากับ contractile protein ซึ่งทำให้มีปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยแต่ก็เพียงพอที่จะเกิดการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บภายในเซลล์ (Berridge, 1993) ซึ่งเป็น initial phasic contraction ของกล้ามเนื้อเรียบ

Hay และ Wadsworth, 1984 พบว่าท่อนำอสุจิหนูขาวส่วน prostatic segment และ epididymal segment มีการตอบสนองต่อ $BaCl_2$ เหมือนกัน เมื่อกระตุ้นท่อนำอสุจิหนูขาวด้วย $BaCl_2$ จะเกิด phasic contraction และตามด้วย rhythmic contraction ซึ่ง rhythmic contraction เกิดจาก trigger Ca^{2+} ผ่าน channel ซึ่งมี affinity ต่อ Ca^{2+} blocker ต่ำ (Hay และ Wadworth, 1992)

จากผลการทดลองพบว่า CU-763-10-01 ขนาด $5x10^{-5}$ M สามารถลดการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวและกระต่ายทั้ง phasic และ tonic contraction เมื่อกระตุ้นด้วย $BaCl_2$ ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และให้ผลลด phasic contraction ในท่อนำอสุจิหนูขาว จากผลการทดลองที่พบอาจกล่าวได้ว่า CU-763-10-01 ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+} เข้าสู่ภายในเซลล์โดยผ่าน VOC

ผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อกระตุ้นด้วย 5-HT

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

จากการทดลองพบว่า CU-763-10-01 ขนาด $5x10^{-5}$ M สามารถลดการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่และท่อนำอสุจิที่แยกจากหนูขาวได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงให้เห็นว่า CU-763-10-01 ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการเคลื่อนที่ของแคลเซียมเข้าสู่ภายในเซลล์ผ่าน ROC

ผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อกระตุ้นด้วย NE

การกระตุ้น α_1-adrenoceptor ด้วย NE จะทำให้มีปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์สูงขึ้นและทำให้กล้ามเนื้อเรียบหดตัว (Godfraind, 1976) ซึ่งเกิดจากการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์และจากการเคลื่อนที่ของแคลเซียมจากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ผ่าน Ca^{2+}-channel การหดตัวของหลอดเลือดแยกได้เป็น 2 ส่วน คือ phasic contraction และ tonic contraction โดยที่ phasic contraction ขึ้นกับ intracellular calcium (Rapoport, 1987) ในขณะที่ tonic contraction ขึ้นกับ extracellular calcium (Nishimura, Ota และ Ito, 1991) นอกจากนี้ยังพบว่าการให้ NE กระตุ้น α_1-adrenoceptor ที่หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว ใน Ca^{2+}-free solution การหดตัวยังเกิดขึ้นได้ (ภาพที่ 46a) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nogueta และ D'Ocon, 1993 แสดงว่า NE ทำให้มีการปลดปล่อยแคลเซียมออกจากแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ การกระตุ้นหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวด้วย NE ใน Ca^{2+}-free solution ทำให้หลอดเลือดหดตัวอย่างรวดเร็วเกิดเป็น phasic contraction จากนั้นคลายตัวทำให้เกิดเป็น peak เนื่องจาก

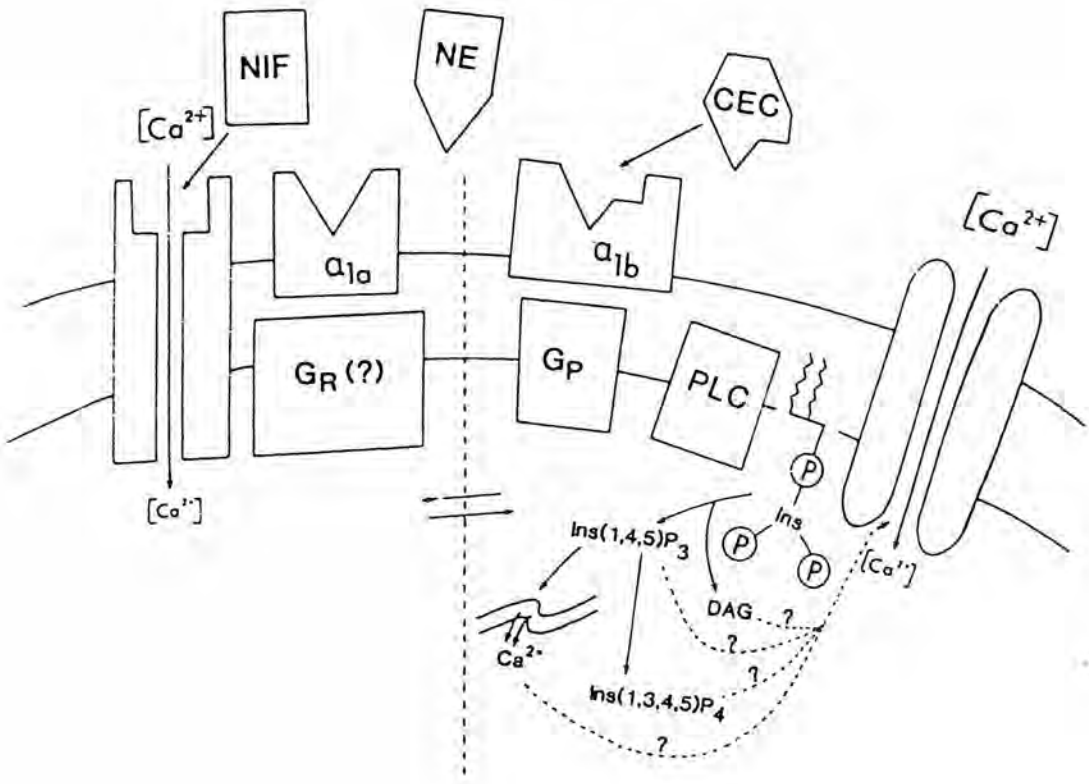
1. ปริมาณแคลเซียมในแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์มีจำกัด

2. แคลเซียมอิสระภายในเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้นนี้ถูกขับออกจากเซลล์

3. แคลเซียมอิสระภายในเซลล์ไปจับกับ calcium sequestered

การกระตุ้นหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวด้วย NE ซ้ำใน Ca^{2+}-free solution ปรากฏว่า NE ไม่สามารถทำให้เกิดการหดตัวได้อีก (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) เนื่องจากไม่มีแคลเซียมในแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ แต่เมื่อ incubate กล้ามเนื้อในสารละลาย Krebs Henseleit เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วย Ca^{2+}-free solution แล้วให้ NE พบว่า NE สามารถกระตุ้นให้มีการหดตัวได้ แสดงว่ามีการ refill ของแคลเซียมเข้าสู่แหล่งเก็บแคลเซียมภายในเซลล์

กลไกที่ทำให้เกิดการหดตัวเมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบด้วย NE คือ NE ไปจับที่ α_1- adrenoceptor ซึ่ง couple อยู่กับ G-protein ทำให้กระตุ้นการทำงานของ phospholipase C (PLC) ทำให้เกิดการ hydrolysis ของ PIP_2 เกิด second messenger 2 ตัว คือ IP_3 และ DAG ซึ่ง IP_3 นี้จะไปกระตุ้นให้เกิดการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บแคลเซียมภายในเซลล์ ทำให้ระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์สูงขึ้น นอกจากนี้การกระตุ้น α_1-adrenoceptor ส่งผลให้ ROC เปิด ทำให้ Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์จะเคลื่อนเข้าสู่ภายในเซลล์ ระดับของแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ที่สูงขึ้นนี้ ทำให้เกิด CICR จากการทดลองพบว่า ในสารละลาย Krebs Henseleit CU-763-10-01 ขนาด $5x10^{-6}$ M ไม่มีผลต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่กระต่าย แต่สามารถลดการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่และท่อนำอสุจิที่แยกจากหนูขาวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) คาดว่าเนื่องจาก α_1-adrenoceptor subtype ที่หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว หลอดเลือดแดงใหญ่กระต่าย และท่อนำอสุจิมีความแตกต่างกัน โดยที่หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวเป็นชนิด α_{1d}-adrenoceptor (Fagura, Lydford และ Dougall, 1997; Testa และคณะ, 1995; Kenny และคณะ, 1995; Buchner และคณะ, 1996) หลอดเลือดแดงใหญ่กระต่ายเป็นชนิด α_{1b}-adrenoceptor (Muramatsu และคณะ, 1990) และท่อนำอสุจิหนูขาวเป็นชนิด α_{1a}-adrenoceptor (Aboud, Shafii และ Docherty, 1993; Kenny และคณะ, 1994; Burt, Chapple, และ Marshall, 1995) โดยที่แต่ละ subtype มีกลไกเกี่ยวกับการเคลื่อนที่ผ่านเข้าเซลล์แตกต่างกัน คือ เมื่อกระตุ้น α_{1a}-adrenoceptor จะทำให้แคลเซียมผ่านเข้าเซลล์ทาง nifedipine-sensitive Ca^{2+} channel ซึ่งสามารถยับยั้งได้ด้วย Ca^{2+} blocker (Han, Abel และMinneman, 1987) แต่เมื่อกระตุ้น α_{1b}-adrenoceptor แคลเซียมจะผ่านทาง inositol phospholipid pathway channel ซึ่ง Ca^{2+} blocker ไม่สามารถยับยั้งได้ (Minneman, 1988) แสดงดังภาพที่ 50 สำหรับการกระตุ้น α_{1d}-adrenoceptor กลไกที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของแคลเซียมเข้าสู่เซลล์นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่พบว่าการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวเมื่อกระตุ้น α_1- adrenoceptor นั้นจะเกี่ยวข้องกับการ hydrolysis ของ PIP_2 และยังขึ้นกับการเคลื่อนที่



ภาพที่ 50 แผนภาพแสดงการเคลื่อนที่ของแคลเซียมเมื่อกระตุ้น α_1-adrenoceptor (Minneman, 1988)

เข้าสู่ภายในเซลล์โดยผ่าน nifedipine-sensitive Ca^{2+} channel (Nishimura, Ota และ Ito, 1991) แสดงให้เห็นว่า CU-763-10-01 ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+} เข้าสู่ภายในเซลล์ผ่าน ROC และใน Ca^{2+}-free solution CU-763-10-01 ขนาด $5x10^{-6}$ M สามารถลดการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากหนูขาวเมื่อกระตุ้นด้วย NE ใน Ca^{2+}-free solution ได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงว่า CU-763-10-01 สามารถยับยั้งการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ได้ ซึ่งยืนยันผลการทดลองโดยใช้ KCl เป็นตัวกระตุ้นให้มีการหดตัวของหลอดเลือดใน Ca^{2+}-free solution ปรากฏว่าให้ผลเช่นเดียวกัน คือ CU-763-10-01 ขนาด $5x10^{-6}$ M สามารถลดการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากหนูขาวได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ในการพิจารณากลไกการลดการหดตัวของหลอดเลือด ในการทดลองนี้ได้ศึกษาว่าการออกฤทธิ์ของ CU-763-10-01 เกี่ยวข้องกับ endothelium หรือไม่ Furchgott Zawadzki, 1980 ได้ทำการศึกษาพบว่า ACh ออกฤทธิ์คลายหลอดเลือดได้ต้องมี endothelium หรือเป็น endothelium dependent vasodilator เมื่อหลอดเลือดถูกทำลาย endothelium ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น enzymatic technique โดยใช้ collagenase หรือ mechanical technique โดยการขูดเบาๆ ที่ผนังด้านในของหลอดเลือด และตรวจสอบทาง histology ด้วย electromicroscope พบว่าหลอดเลือดนั้นปราศจาก endothelium แล้ว หรือทดสอบทาง pharmacology โดยการกระตุ้นหลอดเลือดด้วย NE ให้มีการหดตัว แล้วจึงให้ ACh ถ้าหลอดเลือดไม่มี endothelium แล้ว ACh จะไม่สามารถทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้ จากผลการทดลองพบว่า CU-763-10-01 สามารถลดการหดตัวของหลอดเลือดได้ ทั้งเมื่อมีและไม่มี endothelium แสดงให้เห็นว่าการออกฤทธิ์ของ CU-763-10-01 ในการลดการหดตัวของหลอดเลือดไม่ขึ้นกับ endothelium

เนื่องจากกลไกการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเกี่ยวข้องกับปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ ซึ่งเพิ่มขึ้นจากแคลเซียมภายนอกเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์โดยตรง (calcium influx or extracellular calcium) หรือจากการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บภายในเซลล์ (intracellular calcium) ดังนั้นเพื่อที่จะทดสอบดูว่าการออกฤทธิ์ของ CU-763-10-01 ที่สามารถลดการหดตัวของหลอดเลือดได้เกี่ยวข้องกับ calcium influx หรือไม่ ได้ทำการทดลองตามวิธีการของ Hof และ Vuorela, 1983 โดยการใช้สารละลาย high potassium-free calcium เพื่อก่อให้เกิดสภาวะ depolarized ของหลอดเลือดแล้วให้ calcium chloride แบบสะสมขนาด พบว่า CU-763-10-01 สามารถลดการหดตัวของหลอดเลือดได้จากการกระตุ้นด้วย calcium chloride ซึ่งมีลักษณะเป็นแบบ non-competitive antagonist

Hof และ Vuorela, 1983 กล่าวว่าการทดลองนี้เป็นวิธีเฉพาะในการยับยั้งการนำเข้าของแคลเซียมเข้าสู่ภายในเซลล์จากสภาวะ depolarized ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า CU-763-10-01 ออกฤทธิ์ลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด โดยการยับยั้งการนำเข้าของแคลเซียมเข้าสู่เซลล์

หรืออาจกล่าวได้ว่า CU-763-10-01 ออกฤทธิ์เป็น Ca^{2+} blocker นอกจากนี้ยังพบว่า ในสารละลาย high potassium-free calcium นี้ CU-763-10-01 สามารถทำให้หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวคลายตัวได้ระดับหนึ่ง (ภาพที่ 40b, 41b และ 42b) คาดว่า CU-763-10-01 สามารถเข้าสู่ภายในเซลล์แล้วไปมีผลต่อปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ โดยการยับยั้งการปลดปล่อยแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์

ผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อกระตุ้นด้วย histamine

histamine มีผลต่อกล้ามเนื้อเรียบหลายชนิด ซึ่งการตอบสนองของกล้ามเนื้อเรียบต่อ histamine จะแตกต่างกันไปตามอวัยวะและ species เช่น กระตุ้นหลอดลมด้วย histamine จะทำให้เกิดการหดตัวโดย mediated ผ่าน H_1-receptor และสำหรับหลอดเลือด histamine จะทำให้มีการคลายตัวโดย mediated ผ่าน H_1-receptor ส่งผลให้มีการปลดปล่อย nitric oxide จาก endothelium (Palmer และคณะ, 1988)

histamine ให้ผลต่อ receptor ที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ H_1 , H_2 , H_3 (Goodman&Gilman, 1996; Hill และคณะ, 1997) โดย H_1 receptor พบใน หลอดลม ลำไส้ และหลอดเลือด โดยจะไป couple กับ G-protein และ phospholipase C และไปเร่งการเกิด hydrolysis ของ PIP_2 ให้เป็น IP_3 ซึ่งจะเพิ่มการปลดปล่อยแคลเซียมออกจากแหล่งสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ส่วน H_2-receptor พบใน acid-secreting cell ในกระเพาะอาหาร มดลูก และหัวใจ โดย H_2 จะ couple กับ G-protein และไป กระตุ้น adenylyl cyclase และ H_3-receptor พบในสมองหนูขาวและสมองมนุษย์ส่วน presynaptic sites โดยจะควบคุมการปลดปล่อย neuropeptides จากปลายประสาทรับความรู้สึก และควบคุมการปลดปล่อย histamine จาก mast cell (Szekeres และ Papp, 1994)

จากการทดลองพบว่า CU-763-10-01 ขนาด ขนาด $5x10^{-5}$ M สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดลมหนูตะเภา เมื่อกระตุ้นด้วย histamine ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งการกระตุ้นหลอดลมด้วย histamine จะทำให้เกิดการหดตัวโดย mediated ผ่าน H_1-receptor (Hill และคณะ, 1997) เกิด hydrolysis ของ PIP_2 ให้เป็น IP_3 ซึ่งจะเพิ่มการปลดปล่อยแคลเซียมออกจากแหล่งสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ ทำให้ระดับของแคลเซียมอิสระภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น (Timmerman, 1990) มีการเพิ่ม vascular permeability และทำให้แคลเซียมเคลื่อนสู่ภายในเซลล์ โดยผ่านทาง ROC (Mori et al., 1990) แสดงว่า CU-763-10-01 ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+} เข้าสู่ภายในเซลล์โดยผ่าน ROC

ผลต่อความดันโลหิต

การศึกษาผลของ CU-763-10-01 ต่อการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตของหนูขาวที่สลบด้วย pentobarbitone เมื่อให้ CU-763-10-01 โดยการฉีดเข้า femoral vein สามารถลดความดันโลหิตของ

หนูขาวได้ตามขนาดที่ให้ คือ เมื่อเพิ่มปริมาณสารที่ให้ ความดันโลหิตจะลดลงได้มากขึ้น ดังกราฟภาพที่ 48 จากผลที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่า CU-763-10-01 สามารถลดความดันโลหิตได้ทั้งความดันโลหิตขณะหัวใจบีบตัว และคลายตัว อย่างไรก็ตามพบว่า ความดันโลหิตขณะหัวใจคลายตัวลดลงได้ใกล้เคียงกับความดันโลหิตขณะหัวใจบีบตัว ไม่พบว่าหัวใจมีการเต้นผิดปกติในขนาดต่ำ (0.625 mg/kg และ 1.25 mg/kg) แต่เมื่อให้ขนาดสูงขึ้น (2.5 mg/kg และ 5.0 mg/kg) พบว่าในระหว่างที่ความดันโลหิตลดลงหัวใจจะเต้นช้าลงในเวลาอันสั้น หลังจากนั้นจึงมี compensate หัวใจเต้นในอัตราที่สูงขึ้น

ลักษณะความดันโลหิตขณะหัวใจคลายตัวลดลงมากอาจกล่าวได้ว่าเป็นผลของ CU-763-10-01 ต่อการคลายตัวของหลอดเลือดส่วนหนึ่ง และการที่ความดันโลหิตขณะหัวใจบีบตัวลดลงอาจจะเป็นผลต่อแรงบีบตัวของหัวใจ แต่ไม่มีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจ ซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตามหลังจากที่ความดันโลหิตลดลงแล้วพบว่า ฤทธิ์ในการลดความดันโลหิตของ CU-763-10-01 อยู่ได้ไม่นาน ขึ้นอยู่กับขนาดที่ให้ แสดงให้เห็นว่าการออกฤทธิ์ in vivo เป็นแบบ transient effect การที่ CU-763-10-01 หมดฤทธิ์เร็ว เมื่อทดลองในตัวสัตว์ทดลองอาจเป็นเพราะ เกิดการเปลี่ยนแปลงยา เมื่อเปรียบเทียบกับผลของ CU-763-10-01 ต่ออวัยวะที่แยกจากกาย (isolated organ) พบว่าถ้าให้ขนาดสูงและแช่อวัยวะอยู่ในตัวยาเป็นเวลานาน (15 นาที) จะทำให้การกลับคืนสู่ปกตินั้นยาก ซึ่งจากผลการทดลองใน mitochondria พบว่า CU-763-10-01 มีผลยับยั้งกลไกใน oxidative pathway เกี่ยวข้องกับ ATP (สุธาทิพ, 2539)

การที่ความดันโลหิตขณะหัวใจคลายตัวลดลงเป็นผลจากการลด after load หรือลด peripheral resistant หมายถึงมีการคลายตัวของหลอดเลือด ซึ่งจากการศึกษาฤทธิ์ของ CU-763-10-01 ต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ ที่แยกจากกาย พบว่า CU-763-10-01 สามารถลดการหดตัวของหลอดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย $CaCl_2$ ได้อย่างชัดเจน และเป็นไปตามขนาดความเข้มข้น (dose-dependent) ซึ่งเมื่อพิจารณาจากค่า pD_2' กล่าวได้ว่า CU-763-10-01 ทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือดโดยออกฤทธิ์เป็น Ca^{2+} blocker ที่มีความแรงไม่มากนัก

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการที่ CU-763-10-01 มีผลต่อการหดตัวของท่อนำอสุจิหนูขาว หลอดเลือดแดงใหญ่กระต่าย และหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว ซึ่งมี α_1-adrenoceptor subtype แตกต่างกันคือเป็นชนิด α_{1a}-adrenoceptor, α_{1b}-adrenoceptor และ α_{1d}-adrenoceptor ตามลำดับ โดย CU-763-10-01 มีผลลดการหดตัวของท่อนำอสุจิหนูขาวและหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว แต่ไม่มีผลต่อหลอดเลือดแดงใหญ่กระต่าย เมื่อกระตุ้นด้วย NE นั่นก็คือ CU-763-10-01 ไม่มีผลยับยั้ง (antagonist) ต่อ α_{1b}-adrenoceptor จึงเป็นที่น่าสนใจในการนำ CU-763-10-01 เพื่อใช้แยก α_{1b}-adrenoceptor ออกจาก

subtype ชนิดอื่นๆ ดังเช่นในปัจจุบันได้ใช้ chloroethylclonidine (CEC) แยก α_{1b}-adrenoceptor ออกจาก α_1-adrenoceptor subtype อื่น (Minneman และคณะ, 1988; Hieble และคณะ, 1995) โดยที่ CEC มีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อกระตุ้น α_{1b}-adrenoceptor

การออกฤทธิ์ของ CU-763-10-01 ต่อกล้ามเนื้อที่แยกจากสัตว์ทดลองพบว่ามีฤทธิ์เป็น Ca^{2+} blocker น่าจะใช้ในการลดความดันโลหิตได้ ซึ่งปรากฏผล in vivo ว่า CU-763-10-01 สามารถลดความดันโลหิตหนูขาวที่สลบได้ และไม่มีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจ แต่จะออกฤทธิ์เพียงชั่วขณะ ดังนั้น การนำ CU-763-10-01 มาใช้ในการลดความดันโลหิตอาจต้องมีการปรับเปลี่ยนสูตรโครงสร้างของยาให้ออกฤทธิ์ได้นานขึ้น เช่นทำให้อยู่ในรูปของ prodrug หรืออาจใช้เทคนิคทางเภสัชกรรมปรับปรุงรูปแบบของยาเพื่อให้ออกฤทธิ์นานขึ้น แต่ทั้งนี้ต้องพิจารณาถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาอื่นๆ ของ CU-763-10-01 ต่อไป ส่วนผลต่อกล้ามเนื้อหลอดลมหนูตะเภาพบว่า CU-763-10-01 สามารถคลายหลอดลมและมีฤทธิ์ยับยั้ง histamine ได้ ซึ่งอาจมีประโยชน์ในการเป็น bronchodilator