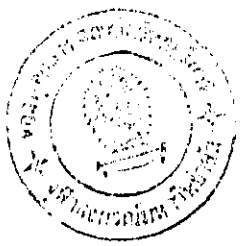
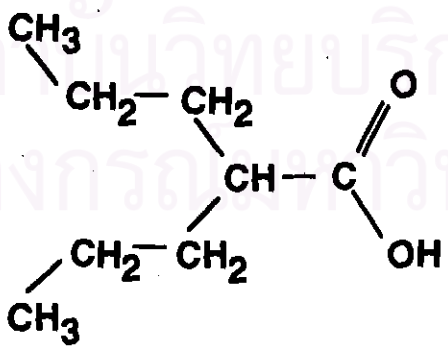
บทที่ 1

บทนำ



ในปัจจุบันพบว่ายังมีผู้ป่วยที่ต้องทุกข์ทรมานจากโรคลมชักอยู่อีกมาก เนื่องจากก่อให้เกิดความรำคาญต่อผู้เป็นและเกิดความหวาดกลัวต่อผู้พบเห็น ทำให้ผู้ป่วยโรคนี้ประสบปัญหาในการร่วมกิจกรรมกับผู้อื่นในสังคม ซึ่งพบได้ถึง 1-2 ล้านคนในสหรัฐอเมริกา และ 20-40 ล้านคนทั่วโลก โดยส่วนใหญ่แล้วจะพบในเด็กมากกว่าผู้ใหญ่ โดยเฉพาะเด็กที่มีช่วงอายุต่ำกว่า 10 ปี และผู้ชายมีแนวโน้มในการเกิดลมชักได้มากกว่าผู้หญิง (Rall and Schleifer, 1990 ; Fukuzako and Izumi, 1991) ดังนั้นจึงจำเป็นที่ต้องหาวิธีควบคุมไม่ให้เกิดอาการเหล่านี้ขึ้นด้วยการให้ยา หรือใช้วิธีการผ่าตัดซึ่งให้ผลดีในผู้ป่วยเพียงไม่ถึง 10% อาจกล่าวได้ว่าหลักสำคัญในการรักษาคือการใช้ยาควบคุมป้องกันไม่ให้เกิดภาวะลมชักยาต้านชักที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ส่วนใหญ่ยังไม่สามารถควบคุมการชักได้ทุกชนิดและเกิดผลข้างเคียงขึ้นมากเช่นDrowsiness,Gastrointestinal disturbances, Hepatotoxicity, Gingival hyperplasia (Chambon et al., 1985) ด้วยเหตุผลดังกล่าว ผศ.ดร. ชำนาญ ภัตรพานิช และนายเฉลิมเกียรติ สงคราม ภาคเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงได้พยายามดัดแปลงสูตรโครงสร้างของยาต้านชักที่มีอยู่แล้วในปัจจุบัน คือ Valproic acid เนื่องจาก Valproic acid (2-propylpentanoic acid, n-dipropylacetic acid, VPA) มีสูตรโครงสร้างดังในรูปที่ 1

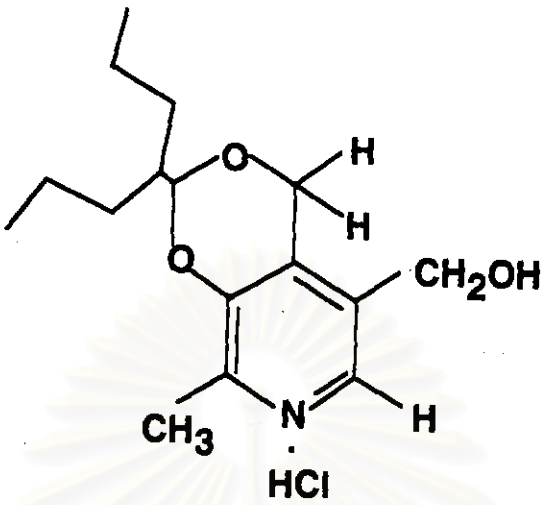


รูปที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างของ Valproic acid (VPA)

มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมอาการชักในคนชนิด Generalized seizures เมื่อให้แบบ monotherapy (Penry และ Dean, 1989) โดยมี efficacy rate 67-86% นอกจากนี้ยังสามารถใช้ได้ผลดีกับลมชักชนิด Partial seizures โดยมี efficacy rate 42-58% (Davis, Peter และ Mctavish, 1994) ดังนั้นจะเห็นว่า VPA มีฤทธิ์ในการต้านชักกว้างขวาง ถึงแม้ VPA จะมีข้อดีอยู่มาก แต่อย่างไรก็ตาม VPA เป็นยาที่มีฤทธิ์ต้านชักในระดับปานกลาง และพบว่ามีความแรงน้อยกว่า phenobarbital, phenytoin และ carbamazepine (Bialer และคณะ, 1994) นอกจากนี้ยานี้มีคุณสมบัติเป็นกรด จึงทำให้เกิดอาการข้างเคียงต่อระบบทางเดินอาหาร ซึ่งพบบ่อยที่สุดคือ ร้อยละ 16 มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน (นิพนธ์ พวงวรินทร์, 2533) และ VPA เป็นของเหลวที่มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ การนำ VPA มาใช้ในการเตรียมตำรับจึงนิยมใช้ในรูปของเกลือ Sodium valproate (S.V.) ซึ่งเป็นของแข็ง และสามารถละลายน้ำได้ดี แต่ sodium valproate เป็นสารที่สามารถดูดความชื้นได้เร็วมาก ทำให้มีความยุ่งยากในการเตรียมตำรับยา การทำยาให้อยู่ในรูป prodrug เป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนา เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของยาให้ดีขึ้น ในกรณีของ VPA การทำ prodrug เป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถใช้แก้ปัญหาเกี่ยวกับอาการข้างเคียง และปัญหาในการเตรียมตำรับของสารได้ ซึ่ง 2-propylpentanal acetals เป็น prodrug ของ VPA ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น และมีการรายงานว่ามีฤทธิ์ในการต้านชัก ส่วน pyridoxine หรือ vitamin B6 เป็น vitamin ที่ละลายน้ำได้ดีถูกดูดซึมได้อย่างรวดเร็วจากทางเดินอาหาร นอกจากนี้ pyridoxine ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลุ่มอาการชัก เนื่องจาก pyridoxal phosphate เป็น cofactor ของ glutamic acid decarboxylase (GAD) ซึ่งเป็น enzyme หนึ่งที่ใช้ในขบวนการสร้าง GABA (inhibitory neurotransmitter) (ราตรี สุดทรวง, 2535) โดยพบว่าในผู้ป่วยที่ขาด pyridoxine อย่างรุนแรง โดยเฉพาะในเด็กทารก จะเกิดภาวะชักขึ้นได้ ซึ่งภาวะชักดังกล่าวจะหายไป เมื่อผู้ป่วยได้รับการรักษาโดยใช้ pyridoxine ดังนั้นเพื่อให้ได้อนุพันธ์ตัวใหม่ ที่คาดว่าจะมีประสิทธิภาพในการต้านชักสูง และเกิดอาการข้างเคียงน้อยลง จึงรวมสูตรโครงสร้างของ 2-propylpentanal acetals เข้ากับ pyridoxine ได้เป็น **CU-763-10-01**

การศึกษาทางเภสัชเคมี

CU-763-10-01 มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 315.85 สูตรโครงสร้างดังในรูปที่ 2 จุดหลอมเหลวเท่ากับ 172-174°C สารนี้ละลายได้ดีในน้ำ, ethanol, methanol, chloroform, acetone



รูปที่ 2 แสดงสูตรโครงสร้างของ CU-763-10-01

การศึกษาทางเภสัชวิทยา

จากการศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านชักของ CU-763-10-01(มยุรีและทิพย์สุชน, 2538) พบว่า CU-763-10-01 สามารถออกฤทธิ์ต้านการชักที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Maximal Electroshock Seizure (MES) และขนาดของยาที่สามารถป้องกันการชักได้ 50 เปอร์เซนต์ (median effective dose ; ED_{50}) เท่ากับ 100 มิลลิกรัม / กิโลกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของ VPA ที่สามารถป้องกันการชักได้ 50 เปอร์เซนต์ ซึ่งเท่ากับ 320 มิลลิกรัม / กิโลกรัม (Loscher and Nolting, 1991) แสดงให้เห็นว่า CU-763-10-01 มีประสิทธิภาพในการต้านชักสูงกว่า VPA และจากการทดลองเพื่อศึกษาผลทางด้านพิษวิทยาของสารต่อระบบประสาท (neurotoxic effect) ใช้ Rotarod test พบว่าขนาดที่มีผลต่อการทำงานของระบบประสาททำให้การทำงานของกล้ามเนื้อเสียไป 50 เปอร์เซนต์ (median neurotoxic dose ; TD_{50}) เท่ากับ 310 มิลลิกรัม / กิโลกรัม ดังนั้นจะเห็นว่าขนาดที่ให้ผลในการรักษาอาการชักไม่มีผลเสียต่อระบบประสาทที่ทำให้การทำงานของกล้ามเนื้อเสียไป (ED_{50} ของ CU-763-10-01 = 100 มิลลิกรัม / กิโลกรัม TD_{50} ของ CU-763-10-01 = 310 มิลลิกรัม / กิโลกรัม) และความเป็นพิษต่อระบบประสาทของสารนี้สูงกว่า VPA (TD_{50} ของ CU-763-10-01 = 310 มิลลิกรัม / กิโลกรัม ; TD_{50} ของ VPA = 430 มิลลิกรัม / กิโลกรัม)

สำหรับการวิจัยครั้งนี้ เป็นการศึกษาถึงผลของ CU-763-10-01 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อลำไส้เล็ก (duodenum) และหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของกระต่าย และท่ออสุจิ (vas deferens) ของหนูขาว ซึ่งกล้ามเนื้อดังกล่าวข้างต้นเป็นกล้ามเนื้อเรียบ ดังนั้นจึงขอกล่าวถึงกลไกการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบได้โดยสังเขป ดังนี้

กลไกการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบนั้น ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่ามีความเกี่ยวข้องกับแคลเซียม (Ca^{2+}) โดยเชื่อว่าแคลเซียม ทำหน้าที่เป็น intracellular messenger ซึ่งเป็นองค์ประกอบในการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญ เช่น myosin light chain kinase (MLCK) หรือ protein kinase ชนิดอื่น ๆ โดยแคลเซียมที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ คือ แคลเซียมอิสระภายในเซลล์ (intracellular free calcium) ซึ่งแคลเซียมอิสระภายในเซลล์นี้ อาจจะมาจากแคลเซียมภายนอกเซลล์เคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) เข้าสู่ภายในเซลล์โดยตรง หรือมาจากแคลเซียมที่ปลดปล่อยออกจากแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ซึ่งเชื่อว่าเป็น sarcoplasmic reticulum (SR) (Aksoy, Murphy, และ Kamm, 1982; Ganonog, 1993)

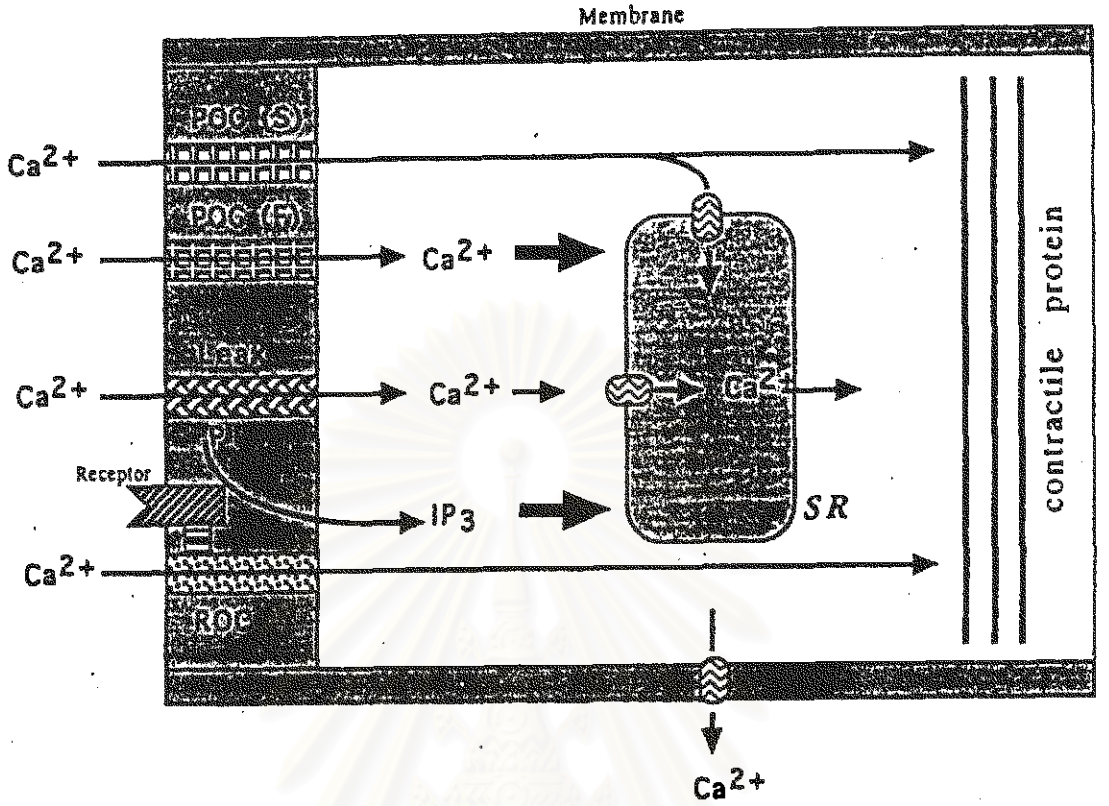
Karaki และ Weiss (1988) ได้เสนอกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ ไว้ดังนี้คือ

1. แคลเซียมจากภายนอกเซลล์เคลื่อนที่ผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ มีกลไกที่เกี่ยวข้องอย่างน้อย 4 กลไก ดังในรูปที่ 3 คือ

1.1 แคลเซียมผ่านเข้าเซลล์โดยอาศัย leak mechanisms หรือ resting influx ซึ่งแคลเซียมที่ผ่านเข้าเซลล์ด้วยกลไกนี้ จะถูกเก็บสะสมไว้ที่แหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ คือ SR และไม่ทำให้แคลเซียมอิสระภายในเซลล์เพิ่มขึ้นโดยตรง

1.2 แคลเซียมผ่านเข้าเซลล์ทาง potential (voltage) - operated calcium channel (POC หรือ VOC) โดยเกิดจากการเปลี่ยนแปลง action potential ของผนังเซลล์ เกิดการ depolarization ซึ่งจะกระตุ้นให้ POC เปิดออก ทำให้แคลเซียมจากภายนอกเซลล์ เคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์ได้ ซึ่ง POC ยังสามารถแบ่งออกเป็น 4 ชนิด คือ L-type channels, T-type channels,

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



Ca^{2+} Movement

Ca^{2+} Release Initiation

Ca^{2+} Pump

POC (F)	fast potential-operated calcium channel
POC (S)	slow potential-operated calcium channel
ROC	receptor-operated calcium channel
SR	sarcoplasmic reticulum
PI	phosphatidylinositol
IP_3	inositol-1,4,5-trisphosphate

รูปที่ 3 แสดงกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมอิสระภายใน cell

(Karaki and Weiss,1988)

	Channel (conductance)			
	L (25 pS*)	N (12-20 pS)	T (8 pS)	P (10-12 pS)
Properties				
Activation	High voltage	High voltage	Low voltage	Moderate high voltage
Inactivation	Slow	Moderate	Transient	Very slow
Location/function	Widespread muscle and nerve	Neuronal transmitter release	Widespread pacemaker activity	Neuronal, Purkinje
Blockers	DHP, calciseptine, phenylalkylamines	Conotoxin	Flunarizine?	Funnel web spider toxin

* 110 mM Ba^{2+} as charge carrier

DHP : Dihydropyridine

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติของ potential operated calcium channels

N-type channels, และ P-type channels ซึ่งคุณสมบัติของ channels แต่ละชนิดแสดงไว้ในตารางที่ 1 (Spedding และ Paoletti, 1992)

1.3 แคลเซียมผ่านเข้าเซลล์ทาง receptor-operated calcium channels (ROC) โดยเกิดจากการที่มีตัวกระตุ้นต่าง ๆ ของ acetylcholine serotonin, oxytocin, histamine เป็นต้น จับกับตัวรับสัมผัส (receptor) ที่เฉพาะเจาะจงต่อตัวกระตุ้นนั้น ๆ แล้วกระตุ้นให้ ROC เปิดออก ทำให้แคลเซียมจากภายนอกเซลล์เคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์ได้

2. การหลั่งของแคลเซียมจาก แหล่งเก็บสะสมแคลเซียมภายในเซลล์ คือ SR เกิดจาก 3 กลไก คือ

2.1 calcium induced calcium release (CCR) เกิดจากแคลเซียมจากภายนอกเซลล์ เคลื่อนที่ผ่าน POC แล้วไปกระตุ้นให้มีการหลั่งของแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์คือ SR

2.2 จากการกระตุ้นโดยสารเคมี ได้แก่ caffeine ซึ่งสามารถกระตุ้นให้มีการหลั่งของแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ได้ในกล้ามเนื้อเรียบหลายชนิด แต่ผลนี้ไม่เกิดในกล้ามเนื้อมดลูก

2.3 จากการที่ตัวรับสัมผัส (receptor) ถูกกระตุ้น แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีได้ IP_3 (inositol-1,4,5-triphosphate) มากขึ้น และ IP_3 ที่เพิ่มมากขึ้นนี้มีผลไปกระตุ้นให้มีการหลั่งของแคลเซียม จากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ คือ SR

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

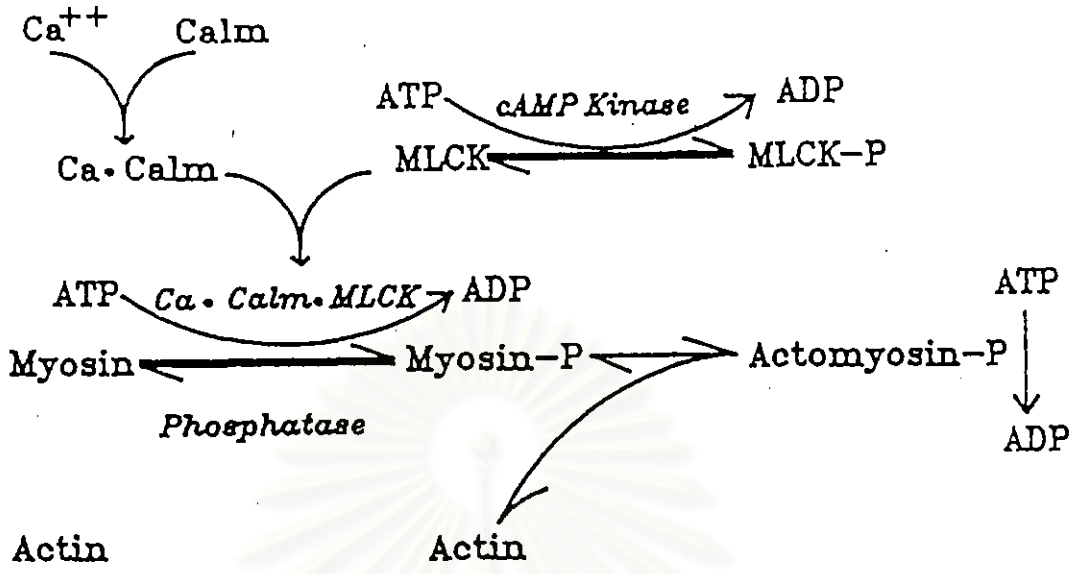
บทบาทของแคลเซียมต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

เมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมอิสระภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น แคลเซียมจะจับกับ receptor ภายในเซลล์ คือ calmodulin เป็น calcium calmodulin complex ซึ่งจะจับและกระตุ้นเอนไซม์ myosin light chain kinase (MLCK) ก่อให้เกิดการ phosphorylate ของ myosin light chain ซึ่งในสภาวะนี้ myosin light chain จะสามารถทำปฏิกิริยา (interact) กับ actin ได้และมีผลทำให้เกิดการหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ ส่วนการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบนั้น เกิดจากการ

ที่ความเข้มข้นของแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ลดลง ทำให้ calmodulin แยกตัวหลุดออกมาจาก complex ซึ่งจะ inactive MLCK ต่อจากนั้น myosin phosphatase จะทำให้เกิด dephosphorylate myosin light chain จะทำปฏิกริยากับ actin ไม่ได้ เป็นผลทำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

การออกฤทธิ์ของ MLCK ถูกควบคุมโดย cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-dependent protein kinase ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกริยา (catalyzes) phosphorylation ของMLCK จะมีความชอบ (affinity) ที่จะจับกับ calcium-calmodulin complex ได้น้อยมาก ทำให้เกิด dephosphorylate ของ myosin และเกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบในที่สุด ดังในรูปที่ 4 (Kamm และ Stull, 1985; Carsten และ Miller, 1987)

เนื่องจากการศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านชักของ CU-763-10-01 แสดงให้เห็นว่าสารนี้มีประสิทธิภาพในการต้านชักได้ การที่จะนำสารที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่มาใช้เป็นยาได้นั้น จะต้องผ่าน drug development Process ซึ่งการ screening เป็นขั้นตอนหนึ่งในกระบวนการทั้งหมดเพื่อทำให้ทราบถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ อย่างเช่นCU-763-10-01 เป็นต้น ประกอบกับยังไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ CU-763-10-01 มาก่อน จึงมีความสนใจในการศึกษาผลของ CU-763-10-01 ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อลำไส้เล็ก (duodenum) และหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของกระต่ายและกล้ามเนื้อท่อนำอสุจิ (vas deferens) ของหนูขาว โดยในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ เป็นการทดลองนอกร่าง (in vitro) เพื่อตัดปัจจัยภายนอก ได้แก่การควบคุมโดยระบบประสาท, ฮอร์โมนและเพื่อที่จะศึกษาเกี่ยวกับ drug receptor ของเนื้อเยื่อนั้น ๆ ในการทดลองเลือกใช้กล้ามเนื้อลำไส้เล็ก (duodenum) หลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของกระต่าย และกล้ามเนื้อท่อนำอสุจิ (vas deferens) ของหนูขาว เพราะกล้ามเนื้อเรียบเหล่านี้ตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นได้อย่างชัดเจน และในอวัยวะที่แตกต่างกัน อาจจะตอบสนองต่อสารกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อชนิดเดียวกันแตกต่างกันไป เช่น การกระตุ้นด้วย NE ที่ thoracic aorta ของกระต่ายทำให้หลอดเลือดหดตัว (Hudgins และ Weiss, 1968) เพราะ NE ออกฤทธิ์โดยการกระตุ้น α_1 -adrenergic receptor ส่งผลทำให้หลอดเลือดเกิดการหดตัว (Lee และ Stitzel, 1994) แต่ในหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery) ของสุกรตอบสนองต่อ NE โดยการคลายตัว (Bayer, Mentz และ Foster, 1974) เพราะ NE ออกฤทธิ์โดยการกระตุ้น β_2-adrenergic receptor ส่งผลให้หลอดเลือดเกิดการคลายตัว ดังนั้นการศึกษาโดยใช้กล้ามเนื้อเรียบในหลายอวัยวะจะทำให้เราศึกษาตำแหน่งและกลไกในการออกฤทธิ์ของCU-763-10-01 ต่อ tissue receptor ได้มากขึ้น



อธิบายคำย่อ

Calm	=	Calmodulin
cAMP Kinase	=	cAMP-dependent protein kinase
MLCK	=	myosin light chain kinase
MLCK-P	=	phosphorylated myosin light chain kinase
Myosin-P	=	phosphorylated myosin
Actomyosin-P	=	phosphorylated actomyosin
ADP	=	adenosine diphosphate
ATP	=	adenosine triphosphate
cAMP	=	cyclic adenosine monophosphate

รูปที่ 4 แสดงกลไกการหดตัว และ คลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

(Carsten and Miller, 1897)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ CU-763-10-01 ต่อการหดตัวของลำไส้เล็ก (duodenum) และหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของกระต่ายและท่อนำอสุจิ (vas deferens) ของหนูขาว

2. เพื่อศึกษาตำแหน่งในการออกฤทธิ์ (site of action) ของ CU-763-10-01 ที่มีผลต่อการหดตัวของลำไส้เล็ก (duodenum) และหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของกระต่าย และท่อนำอสุจิ (vas deferens) ของหนูขาว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทำให้ทราบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ CU-763-10-01 ต่อการหดตัวของลำไส้เล็ก (duodenum) และหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของกระต่ายและท่อนำอสุจิ (vas deferens) ของหนูขาว

2. ทำให้ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ที่เป็นไปได้ของ CU-763-10-01 ต่อการหดตัวของลำไส้เล็ก (duodenum) และ หลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของกระต่าย และ ท่อนำอสุจิ (vas deferens) ของหนูขาว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย