บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

coumarinเป็นสารบริสุทธิ์สกัดได้จากเปลือกต้นชะลูด เป็นสารต้นแบบ (prototype) ให้แก่สารอื่น ๆ ในกลุ่มคูมาริน ซึ่งมีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ต่าง ๆ ของสารกลุ่มคูมารินนวมทั้งฤทธิ์ antispasmodic (สรัญญา วัชโรทัย, 2523)และSupavilai(1974) ได้ศึกษาฤทธิ์ของ coumarin, scopoletin จากต้นชะลูด ต่อลำไส้เล็ก (jejunum) กระต่าย, ลำไส้เล็ก (ilium) หนูตะเภา, มดลูกหนูขาว, หัวใจห้องบนของหนูขาว ศึกษาฤทธิ์ต่อการ หดเกร็งทั้งที่เกิดขึ้นเองและเมื่อให้สารกระตุ้นการหดเกร็ง แล้วสรุปว่าการออกฤทธิ์ของ coumarin, scopoletin เป็น non-specific smooth muscle relaxant ในการทดลองนี้ได้ศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นของ coumarin ต่อกล้ามเนื้อเรียบ คือลำไส้เล็กกระต่าย,หนูตะเภาและทดสอบฤทธิ์ต่อหลอดเลือดแดงใหญ่(aorta) หนูขาว, ท่อนำอสุจิหนูขาว เพื่อศึกษาถึงกลไก การออกฤทธิ์ของ coumarin และนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบกับสารในกลุ่มคูมารินอีกหนึ่ง ชนิดที่เลือกมาศึกษา

microminutin เป็นสารบริสุทธิ์สกัดได้จากใบหัสคุณ โดย รศ.นิจศิริ เรืองรังษี เป็นสารในกลุ่ม simple coumarin เช่นเดียวกับ coumarin แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ดังนั้นในการศึกษานี้ จึงทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น ของ microminutin ต่อลำไส้เล็กกระต่าย, ลำไส้เล็กหนูตะเภา โดยศึกษาควบคู่ไปกับ coumarin ซึ่งทราบเกี่ยวกับฤทธิ์เบื้องต้นทางเภสัชวิทยาแล้ว และศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์กับ coumarin ในหลอดเลือดแดงใหญ่, ท่อนำอสุจิหนูขาว โดยใช้สารต่าง ๆ กระตุ้นการหดเกร็ง สารคูมารินทั้งสองชนิดไม่ละลายในน้ำ coumarin ละลายได้ดีใน alcohol ไม่ละลายใน DMSO ส่วน microminutin ละลายได้ดีใน DMSO ละลายได้บ้างใน alcohol ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือก alcohol เป็นตัวทำละลาย ซึ่งในการทดลองทุกครั้งจะให้

alcohol $7.14x10^{-2}$ M ซึ่งเป็นความเข้มข้นเดียวกับใช้สารละลายคูมารินทดสอบร่วมด้วย

ผลต่อการหดเกร็งของลำไส้กระต่าย

ผลการทดลอง coumarin สามารถลดการหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่าย ทั้งที่เกิดขึ้นเองและยับยั้งการหดเกร็งที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยสารต่างๆได้แก่ acetylcholine 5-hydroxytryptamine, histamine และ $BaCl_2$ พบว่า coumarin ออกฤทธิ์ลด การหดเกร็งของ sponteaneous contraction ได้อย่างรวดเร็วความสามารถในการลด การหดเกร็งนี้ขึ้นกับขนาดความเข้มข้นของสาร คือ เมื่อเพิ่มขนาดสูงขึ้นก็จะลดการหดเกร็งได้ เพิ่มขึ้น (รูป 8a, 8b)

microminmutin ให้ผลการทดสอบคล้ายกับ coumarin คือสามารถลดการหด เกร็งทั้งที่เกิดขึ้นเอง (แสดงในรูป 8c) และยับยั้งการหดเกร็ง ของลำไส้เล็กกระต่ายที่เกิด จากการกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นต่าง ๆ คือ acetylcholine (รูป 9b), 5-hydroxytryptamine, histamine (รูป 10b) และ $BaCl_2$ (รูป 12b) เนื่องจาก micriominutin ไม่สามารถเตรียมให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นได้เพราะมีข้อจำกัดเกี่ยวกับการละลาย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้ความเข้มข้นเดียว คือ $2.45x10^{-4}$ M ซึ่งเท่ากับ coumarinที่ เตรียมขนาดต่ำ (ขนาดสูงของ coumarin ที่เตรียมคือ $4.5x10^{-4}$ M)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารละลายคูมาริน ลดแรงหดเกร็งของลำไส้เล็ก กระต่ายที่เกิดขึ้นเอง แต่ไม่มีผลต่ออัตราเร็วของการหดเกร็ง และพบว่าฤทธิ์ในการลดแรงหดเกร็งนี้ไม่ใช่ฤทธิ์ถาวร เมื่อล้างออกแล้ว incubate ต่อไป ลำไส้สามารถบีบตัวได้แรงขึ้นอีก เป็นที่ทราบโดยทั่วกันแล้วว่า ลำไส้เล็กของกระต่ายสามารถเกิดการหดเกร็งได้เอง (generate action potential) bolton (1979) ได้เสนอกลไกการออกฤทธิ์ของ agonist ต่าง ๆ ต่อกล้ามเนื้อเรียบคือเมื่อ agonist จับกับ receptor มีผลทำให้ เกิดการเปลี่ยนแปลง 3 ทาง คือ 1) ทำให้เพิ่มขนาดและระยะเวลาของ plateau phase ของ action poteneial จึงเพิ่มความแรงของ phasic contraction 2) มีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีเป็นผลให้ receptor-operated channel เปิดจึงเพิ่ม Ca^{2+} ใน cell ซึ่งอาจจะเพิ่มได้อีกทางหนึ่ง คือ ผลจาก agonist จับกับ receptor แล้วทำให้มีการปลดปล่อย bound

calcium เมื่อ $CaCl_2$ ใน cellเพิ่ม เป็นผลให้เพิ่ม tensionใน contractile protein 3) เมื่อ receptor-operated calcium channel เปิด $CaCl_2$ ภายนอก cell จะเคลื่อนเข้าสู่ภายใน cell จึงเกิด depolarization ของ cell membrane เป็นการเพิ่ม action potential frequency เป็นผลให้เพิ่ม frequency ของการ contraction พบว่า microminutin สามารถลดการหดเกร็ง ได้เช่นเดียวกับ coumarin ซึ่งได้มีการศึกษามาก่อนแล้ว (Supavilai, 1974) แสดงให้ เห็นว่า microminutin มีฤทธิ์ยับยั้งการบีบตัวของลำไส้ (antispasmodic activity)ได้

การศึกษาที่กระตุ้นการหดเกร็งของลำไส้ด้วยสารกระตุ้นต่าง ๆ ทั้งที่เป็น specific agonist และ non-specific agonist แล้วทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของสารละลาย คูมารินต่อสารกระตุ้นต่าง ๆ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปสู่การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ สารละลายคูมาริน และเพื่อเปรียบเทียบความแรงของสารละลายคูมาริน 2 ชนิด ในการยับยั้ง ฤทธิ์ของสารกระตุ้นต่าง ๆ ซึ่งจะศึกษาต่อไปในหลอดเลือดแดงใหญ่และท่อนำอสุจิหนูขาว

จากผลการทดลองสารละลายคูมารินสามารถยับยั้งการหดเกร็ง ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย acetylcholine การออกฤทธิ์ของ acetylcholine ต่อลำไส้เล็กกระต่าย จะเป็นการออกฤทธิ์โดยทางตรง คือ acetylcholine จับกับ muscarinic receptor ที่ cell membrane ของ muscle fiber ของลำไส้ ทำให้เกิด depolarization ของ cell membrane ทำให้ permeability ของ cell membrane ต่อ ion บางชนิดเปลี่ยนแปลงไป โดยเฉพาะ Na^+ และ Ca^{2+} ทำให้ ion 2 ชนิดนี้จากภายนอก cell เคลื่อนเข้าสู่ ภายใน cell เพิ่มขึ้น (Bolton, 1972; Brading & Snedden, 1980; Burgen & Spero, 1968; Chand & Triggle, 1973; Day & Vane, 1963; Durbin & Jenkinno, 1961 ; Paton & Zar, 1968) และมีการเคลื่อนย้ายCa^{2+}ออกจากแหล่ง ที่เก็บภายใน cell ผลคือ Ca^{2+}อิสระใน muscle cellเพิ่มขึ้น ซึ่ง Ca^{2+} ทำให้เกิดการ coupling ของ actin และ myocin filament ทำให้เกิดการหดเกร็งของลำไส้ (Chand & Triggle, 1973; Edman & Schild, 1962) จากผลที่แสดงในรูป 9b microminutin สามารถลดการหดเกร็งที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย acetylcholine และ ยับยั้งการหดเกร็งเมื่อกระตุ้นลำไส้ด้วย acetylcholine ได้เช่นเดียวกับ coumarin (รูป 9a) ซึ่งมีรายงานว่า

สามารถยับยั้งฤทธิ์ acetylcholine ((Supavilai, 1974)

เนื่องจากการกระตุ้นลำไส้ให้เกิดการหดเกร็งเพิ่มขึ้นด้วย 5-hydroxytryptamine และ histamine พบว่าฤทธิ์ของสารกระตุ้นสองชนิดนี้จะอยู่ไม่นาน และการเพิ่มการหดเกร็งไม่ชัดเจนนัก ดังนั้นเมื่อให้สารละลายคูมารินทั้งสองชนิดไปลดการหดเกร็งจึงไม่สามารถสรุปได้ว่าการหดเกร็งที่ถูกลดลงนั้น เป็นการหดเกร็งที่เกิดจากสารกระตุ้นหรือเป็น spontaneous contraction แต่เมื่อให้สารละลายคูมารินไปก่อนการกระตุ้นด้วย 5-hydroxytryptamine หรือ histamine พบว่าไม่สามารถเพิ่มการหดเกร็งได้เลย (รูป 10) แสดงว่าสารละลายคูมารินสามารถยับยั้งฤทธิ์ของ 5-hydroxytryptamine,histamine เมื่อทดสอบในลำไส้เล็กกระต่าย จากรายงานการออกฤทธิ์ของ 5-hydroxytryptamine จากการศึกษาของ Boeckxstaens et al.(1990)ซึ่งได้ทำการศึกษาใน terminal ileum และ ileocolonic junction ของสุนัข และได้อธิบายไว้ว่าการออกฤทธิ์ของ 5-hydroxytryptamine ที่กระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบให้เกิดการหดเกร็งมีสองกลไกคือ 1)ทางตรงโดยกระตุ้นที่ 5-HT_1 like receptor บนเซลกล้ามเนื้อเรียบเมื่อ 5-hydroxytryptamineจับที่ receptor มีผลทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+} เข้าสู่ muscle cell หรือมีการเคลื่อนย้ายของ Ca^{2+} จากแหล่งเก็บใน cell ทำให้มี Ca^{2+} อิสระใน cell เพิ่ม ขึ้น ทำให้เกิดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อ เมื่อ 5-hydroxytryptamine ทำให้กล้ามเนื้อ หดเกร็งพบว่า c-GMP ใน muscle cell เพิ่มขึ้น แต่ยังไม่ทราบบทบาทหน้าที่ของ c-GMP (Goodman & Gilman, 1980; Hardcastle; Jacqueline & Hardcastle Redfern, 1981; Woolley & Campell, 1960) 2)ส่วนการออกฤทธิ์โดยทางอ้อม 5-hydroxytryptamineกระตุ้น 5-HT_3 receptor ที่ excitatory neuron ทำให้มีการหลั่ง acetylcholine ออกจากปลายประสาท ซึ่ง acetylcholine ที่ถูกปล่อยออกมา จะไปทำให้กล้ามเนื้อเกิดการหดเกร็ง (Costa & Furness, 1979 ; Henry, 1963) ผลการทดลองที่แสดงในรูป 10b microminutin สามารถยับยั้งการหดเกร็งของลำไส้กระต่าย เมื่อกระตุ้นการหดเกร็งด้วย 5-hydroxytryptamine ซึ่งผลการทดลองจะคล้ายกับ coumarin (รูป 10a) ที่ยับยั้งฤทธิ์ 5-hydroxytryptamine ได้เช่นเดียวกัน การออกฤทธิ์ของ histamine ต่อลำไส้เล็กกระต่าย มีรายงานสรุปว่าออกฤทธิ์ได้ 2 ทาง คือ 1) ทางตรงโดย histamine จับ H_1-receptor ที่ cell membrane ของ muscle

fiber ของลำไส้ (Ash & Schild, 1966; Goodman & Gilman, 1980) จะทำให้ membrane มี depolarization มีผลทำให้ permeability ของ cell membrane เปลี่ยนแปลงทำให้ Ca^{2+} channel ที่ cell membrane เปิด Ca^{2+} จากภายนอกเคลื่อนเข้า cellเพิ่มขึ้น และมี Ca^{2+} หลั่งออกมาจากที่เก็บภายใน cell ซึ่ง Ca^{2+} ที่เพิ่มขึ้นนี้ทำให้เกิดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อ ในการหดเกร็งของกล้ามเนื้อเรียบโดยผ่านทาง H_1-receptor จะมีการเพิ่มของ c-GMP แต่ผลทางสรีระ (physiclogical action)ของ c-GMP ต่อลำไส้ยังไม่ทราบ (Goodman & Gilman's, 1980) 2) การออกฤทธิ์โดยอ้อม (Harry, 1963) histamine ออกฤทธิ์ที่ receptor ที่ postganglionic membrane ของ ganglion cell ในintramural nerve plexuses ทำให้มีการปลดปล่อย acetylcholine ออกจากปลายประสาท ซึ่ง acetylcholine ที่ถูกปล่อยออกมานี้ จะทำให้เกิดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อเรียบของลำไส้ microminutin ให้ผลการทดสอบ (รูป 10d) คล้ายกับ coumarin (รูป10c) คือสามารถยับยั้งการหดเกร็งเมื่อกระตุ้นลำไส้ด้วย histamine ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Supavilai (1974) ที่ได้รายงานการยับยั้งฤทธิ์ histamine ของ coumarin

สารละลายคูมารินสามารถลดการหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่าย ที่เกิดจากการ กระตุ้นด้วย $BaCl_2$ ได้ ซึ่งฤทธิ์การกระตุ้นการหดเกร็งของลำไส้ของ $BaCl_2$ มี 2 ทาง คือ (Henderson, Ariens & Simonis, 1968) 1) ทางตรง Ba^{2+} จะทำให้มีการปล่อย Ca^{2+} ออกจาก cell membrane ของ muscle cell ซึ่งโดยปกติแล้ว Ca^{2+} เหล่านี้จะสะสมอยู่ที่ cell membrane โดยที่การเชื่อมระหว่าง Ca^{2+} กับ cell membrane นี้ต้องอาศัย Mg^{2+} (Autonio, Rocha & Yashuda, 1973) และ Ba^{2+} ทำให้ Ca^{2+} ภายนอก cell ไหลเข้าสู่ muscle cell เพิ่มขึ้น (Clement, 1981) ทำให้ Ca^{2+} อิสระภายใน cell เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อ 2) โดยทางอ้อม Ba^{2+} ไปออกฤทธิ์ที่ nerve fiber โดยกระตุ้น ganglion ทำให้มีการปลดปล่อย acetylcholine ออกจากปลายประสาท จะมีผลทำให้เกิดการหดเกร็งต่อไป (Feldberg, 1951; Henderson, 1968; Williams, 1954) ผลการทดลองรูป 12b พบว่า microminutin สามารถลด amplitude ของ rhythmic contraction ของลำไส้กระต่าย ที่กระตุ้นการหดเกร็งด้วย $BaCl_2$ ซึ่งให้ผลการทดสอบคล้ายกับ coumarin ที่มีผลลด amplitude โดยไม่มีผลต่อ

frequency

จากผลการทดลองฤทธิ์ของสารละลาย microminutin ต่อลำไส้เล็กกระต่าย แสดงให้เห็นว่า สารละลาย microminutin สามารถยับยั้งการหดเกร็งของลำไส้ที่เกิด ขึ้นเอง หรือที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นต่าง ๆ ได้แก่ acetylcholine, 5-hydroxytryptamine histamine ซึ่งเป็น specific agonist และสารกระตุ้นที่เป็น nonspecific agonist คือ $BaCl_2$ แต่ไม่ได้ แสดงลักษณะเฉพาะต่อ receptor ใด ๆ ชี้ให้เห็นว่าสารละลาย microminutin ออกฤทธิ์ ยับยั้งแบบ non-specific antagonism คือ site of action ที่ microminutin ออกฤทธิ์ยับยั้งสารต่าง ๆ ควรที่จะเป็นกระบวนการเดียวกัน และมีผลลดการหดเกร็งของลำไส้ ซึ่งจะออกฤทธิ์คล้ายกันกับ coumarin ซึ่ง Supavilai (1974)ได้ทำการศึกษาและสรุปว่า ออกฤทธิ์เป็น non-specific smooth muscle relaxant แต่เนื่องจากผลนี้เป็น ผลการทดลองเฉพาะต่อลำไส้เล็กกระต่าย ดังนั้นจึงยังไม่สามารถสรุปได้เลยทีเดียวว่าการ ออกฤทธิ์ของ microminutin จะเหมือนกับ coumarin จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไปในกล้ามเนื้อเรียบอื่น

ผลต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูตะเภา

coumarin สามารถยับยั้งการหดเกร็งของลำไส้ ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย acetylcholine (รูป 13b, 13c)ได้ตามขนาดความเข้มข้นของ coumarin ที่ให้ ส่วน microminutin ลดการหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูตะเภาที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย acetylcholine แต่ไม่สามารถขัดขวางฤทธิ์ของ acetylcholine ในการกระตุ้นการหดเกร็ง แต่กลับพบว่าการหดเกร็งนั้นมีtoneเพิ่มขึ้นมากกว่าเดิม (รูป 13d) ซึ่งการออกฤทธิ์ของ acetylcholine ต่อลำไส้หนูตะเภา มีรายงานว่าอาจจะเกิดได้ 2 ทาง คือ ทางตรงกับทางอ้อม (Day & Vane, 1963) ทางตรงนั้นจะมีกลไกเหมือนกับการออกฤทธิ์ที่ลำไส้กระต่าย ซึ่งอธิบายไว้ แล้วข้างต้น ส่วนทางอ้อมนั้นเป็นการออกฤทธิ์เพียงส่วนน้อย โดย acetylcholine จะไปจับ ที่ receptor ที่ ganglion cell ของ parasympathetic nerve ทำให้มีการปล่อย acetylcholine ออกจากปลายประสาท ไปออกฤทธิ์ที่ muscle fiber อีกทีหนึ่ง ทำให้ มีการหดเกร็งของลำไส้ จากผลการทดลอง microminutin ไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ

acetylcholineได้ (รูป 13d) ซึ่งแตกต่างจากผลการทดสอบในลำไส้เล็กกระต่ายและแตกต่างจากผลของ coumarin ที่ทดสอบในลำไส้เล็กหนูตะเภา ไม่สามารถอธิบายในที่นี้ได้ว่าเนื่องจากอะไร แต่อาจจะเป็นไปได้ว่า microminutin มีกลไกการออกฤทธิ์บางอย่างที่แตกต่าง ไปจาก coumarin ประกอบกับกลไกการออกฤทธิ์ของ acetylcholine ที่ลำไส้หนูตะเภามีความแตกต่างกับลำไส้กระต่ายคือมีการออกฤทธิ์ทางอ้อมด้วย (Day & Vane, 1963) ซึ่งถึง แม้จะเป็นการออกฤทธิ์เพียงเล็กน้อย ก็น่าที่จะนำมาประกอบการพิจารณาด้วย coumarin ลดความถี่ของการหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูตะเภาที่เกิดจากการกระตุ้น ด้วย $BaCl_2$ (ดังรูป 14b) ส่วน microminutin ลดความสูงของการหดเกร็งเพียง 2-3 นาทีแรกเท่านั้น (รูป 14c, 15) หลังจากนั้น amplitude ของการหดเกร็งก็จะกลับเพิ่มขึ้นมากกว่าเดิม ส่วนความถี่เปลี่ยนแปลงน้อยมาก ซึ่งการทดสอบในลำไส้หนูตะเภานี้ ผลของ coumarin จะเป็นไปในทางเดียวกับผลการทดสอบในลำไส้กระต่าย แต่ microminutin จะแสดงผลที่แตกต่างออกไป กลไกการหดเกร็งของลำไส้หนูตะเภาที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย $BaCl_2$ เป็นกลไกเดียวกับที่กระตุ้นในลำไส้เล็กกระต่าย ซึ่งได้อธิบายไปแล้วข้างต้น (Henderson, Arien & Simonis, 1968) จากผลการทดลองในลำไส้หนูตะเภา microminutin ไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์ $BaCl_2$ ได้เหมือนกับที่ทดสอบในลำไส้เล็กกระต่าย และแตกต่างจากผล ของ coumarin ซึ่งกลไกที่ทำให้ผลการทดสอบแตกต่างกันนี้ไม่สามารถอธิบายได้ในการทดลองขั้นนี้

ผลต่อการหดเกร็งของหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว

coumarin ขนาดต่ำลดการหดเกร็งของหลอดเลือด ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย phenylephrine โดยสามารถลดการหดเกร็งของหลอดเลือดทั้งที่มีเยื่อบุหลอดเลือด (รูป 17a) และไม่มีเยื่อบุหลอดเลือด (รูป 24) ซึ่งฤทธิ์ลดการหดเกร็งไม่สามารถยับยั้งได้ด้วย atropine (รูป 19) เมื่อเพิ่มขนาดความเข้มข้นของ coumarin พบว่า ให้ผลการทดสอบแตกต่างออกไป คือ ลดการหดเกร็งของหลอดเลือดที่มีเยื่อบุหลอดเลือดได้มากใน 2-3 นาทีแรก (รูป 17b) หลังจากนั้นจะ reverse กลับ ฤทธิ์ลดการหดเกร็งนี้ไม่สามารถยับยั้งได้ ด้วย atropine (รูป 20) แต่การให้ atropine ไปยับยั้ง กลับพบว่าการหดเกร็งนั้นจะ ไม่ reverse กลับ (รูป 20) เมื่อให้ atropine ไปยับยั้งก่อนแล้วให้ acetylcholine ร่วมกับ coumarin ขนาดสูง (4.5×10^{-4} M) จะให้ผลการทดสอบเหมือนกับผลการทดลอง เมื่อ

ให้ coumarin ขนาดสูงลดการหดเกร็งโดยลำพัง (รูป 20) ส่วนการทดสอบในหลอดเลือดที่ไม่มีเยื่อบุหลอดเลือด พบว่า coumarin สามารถลดการหดเกร็งได้ และไม่ reverse กลับ (รูป 25) ซึ่งผลการทดสอบนี้เหมือนกับการทดสอบ coumarin ในหลอดเลือดที่มีเยื่อบุที่ให้ atropine ไปขัดขวางฤทธิ์ coumarin (รูป 20) microminutin สามารถลดการหดเกร็งของหลอดเลือด ทั้งที่มี (รูป 17c) และ ไม่มีเยื่อบุหลอดเลือด (รูป 21) เมื่อกระตุ้นการหดเกร็งด้วย phenylephrine และไม่ถูกขัดขวางด้วย atropine (รูป 21) และการหดเกร็งที่ลดลงจะไม่ reverse กลับ

กลไกการกระตุ้นให้หลอดเลือดเกิดการหดเกร็งด้วย phenylephrine คือ phenylephrine จะไปจับอย่างเฉพาะเจาะจงที่ α_1-receptor ทำให้ G protein (Gps) กระตุ้นเอ็นไซม์ PLC ให้ active เพื่อไปเปลี่ยน PIP_2 จาก plasma membrane เป็น IP_3 ซึ่ง IP_3 นี้จะไปมีผลกระตุ้น receptor ที่ SR ให้มีการหลั่ง Ca^{2+} ออกมาสู่ cytosol (Garcia-Sainz, 1991) นอกจากนี้ผลของ phenylephrine ที่จับ α_1-receptor ทำให้เกิด action potential ทำให้มี Ca^{2+} จากภายนอกเข้ามาใน cytosol ทาง VOC การเพิ่ม Ca^{2+} อิสระใน cytosol ทำให้หลอดเลือดเกิดการหดเกร็ง ซึ่งการหดเกร็งนี้ acetylcholine สามารถลดได้ด้วยกลไกที่ acetylcholine จับอย่างเฉพาะเจาะจงที่ muscarinic receptor ทำให้มีการหลั่ง EDRF จาก cell เยื่อบุหลอดเลือด ซึ่ง EDRF จะไปเพิ่มการเปลี่ยนแปลง GTP เป็น c-GMP ที่ smooth muscle cell ทำให้หลอดเลือดเกิดการ คลายตัว (Luscher, 1988) เยื่อบุหลอดเลือดมีบทบาทสำคัญต่อ acetylcholine ในการลดการหดเกร็ง (Chand & Altura, 1981; De Mey & Vonhoutte, 1981; Van De Voorde & Leusen, 1983) ผลการทดลองจึงพบว่าเมื่อขูดหลอดเลือดเพื่อทำลายเยื่อบุหลอด เลือดแล้ว acetylcholine ไม่สามารถลดการหดเกร็งที่เกิดจาก phenylephrine ได้ดังแสดงในรูป 18b แต่พบว่าสารละลายคูมารินทั้งสองชนิดยังสามารถลดการหดเกร็งได้เมื่อ ทดสอบในหลอดเลือดที่ถูกทำลายเยื่อบุแล้ว โดยที่ให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกันกับการทดสอบฤทธิ์ในหลอดเลือดที่มีเยื่อบุ จากผลการลดการหดเกร็งของ coumarin สามารถสรุปได้ว่า การออกฤทธิ์ลดการหดเกร็งของ coumarin ไม่ขึ้นกับเยื่อบุหลอดเลือด แต่เยื่อบุหลอดเลือดอาจจะมีผลต่อการ reverse กลับคืออาจจะมีสารบางอย่างที่หลั่งจากเยื่อบุหลอดเลือด ที่สามารถกระตุ้นให้หลอดเลือดเกิดการหดเกร็งได้ ซึ่งสารนี้ถูกยับยั้งได้

ด้วย atropine จากผลการทดลองในรูป 26 พบว่า microminutin สามารถลดการหดเกร็งของหลอดเลือดที่ไม่มีเยื่อบุกับที่มีเยื่อบุหลอดเลือด ซึ่งกระตุ้นให้เกิดการหดเกร็งด้วย phenylephrine ได้ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ดังนั้นจากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการออกฤทธิ์ของ microminutin ไม่ขึ้นกับเยื่อบุหลอดเลือด ทั้งในเรื่องการออกฤทธิ์ลดการหดเกร็งและการถูกทำลายฤทธิ์ ซึ่ง จะแตกต่างกับ coumarin ชนาดสูง เมื่อเปรียบเทียบความแรงในการลดการหดเกร็งของ coumarin กับ microminutin ในหลอดเลือดที่กระตุ้นการหดเกร็งด้วย phenylephrine เมื่อให้ในขนาดเดียวกัน microminutin มีความแรงมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในรูป 22

การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารละลายคูมาริน ได้มีการศึกษาเพิ่มเติมในขั้นตอนต่อไปคือการต้านฤทธิ์ Ca^{2+} โดยเหตุที่ Ca^{2+} มีบทบาทสำคัญต่อร่างกายในการที่จะให้ cell ต่าง ๆ รวมทั้ง smooth muscle cell สามารถทำหน้าที่ทางสรีรวิทยาได้ตามปกติ การที่ Ca^{2+} จะออกฤทธิ์ดังกล่าวได้ Ca^{2+} ต้องผ่านเข้าไปใน cell ซึ่งจะเกิดขั้นตอน plateau phase (phase $_2$) ของ action potential (จุฑามาศ สัตยวิวัฒน์, 2532) เนื่องจาก Ca^{2+} มีบทบาทสำคัญต่อร่างกายนี้เอง การควบคุมปริมาณ Ca^{2+} อิสระใน cell จึงมีความสำคัญมาก ตามปกติ Ca^{2+} อิสระภายใน cell มีน้อยกว่าภายนอก cell เกือบ 10,000 เท่า โดยภายในcell มีประมาณ 1×10^{-7} M และภายนอก cell ประมาณ 1.6×10^{-3} M (จันทนา แซ่ตั้ง, 2533) ความแตกต่างระหว่างปริมาณของ Ca^{2+} ใน cell และนอก cell เกิดขึ้นได้เนื่องจากในระยะพักของ cell Ca^{2+} ไม่สามารถผ่านผนังของ cell เข้าใน cell ได้ ในการศึกษาเพื่อให้ทราบว่าสารหรือยาใดมีคุณสมบัติเป็น Ca^{2+} antagonist หรือไม่ วิธีการหนึ่งที่สามารถทดสอบได้ คือ การแยกกล้ามเนื้อเรียบที่จะศึกษานำมาใส่ในสารละลายซึ่งมีสภาพ high-potassium calcium-free depolari- zing solution จากนั้นเริ่มศึกษาการต้านฤทธิ์ Ca^{2+} โดยให้ $CaCl_2$ แบบสะสม(เทคนิค cumulative dose-response curve) (Van Rossum, 1963) ซึ่งจากการศึกษาการต้านฤทธิ์ Ca^{2+} พบว่าทั้ง coumarin และ microminutin สามารถต้านฤทธิ์ Ca^{2+}ได้ คือ เมื่อให้สารละลาย คูมารินแต่ละชนิดไปยับยั้งก่อนพบว่า maximum contraction จากการกระตุ้นด้วย $CaCl_2$ จะต่ำกว่า maximum contractionที่เป็น control(รูป 28) จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่า coumarin และ microminutin มีฤทธิ์เสมือนเป็น Ca^{2+}

antagonist โดยสามารถต้านฤทธิ์ Ca^{2+} ได้แบบ non-competitive antagonist โดย microminutin มีฤทธิ์ ต้าน Ca^{2+} ได้มากกว่า coumarin ขนาดเดียวกัน เมื่อคำนวณโดยใช้ค่า PD_2 (ตาราง 2) คือ ค่า PD_2 ของ microminutin 3.02 Ocoumarin เท่ากับ 2.42 และทั้งคู่มีฤทธิ์ต่ำกว่า verapamil (PD_2 7.69) จากการทดลองนี้เมื่อให้ verapamil ไปยับยั้งก่อนการกระตุ้นด้วย $CaCl_2$ พบว่า verapamil ลด tone ของหลอดเลือดลง (รูป 27) ได้ทดลองใส่ EGTA 0.1 mM. ใน high-potassium calcium-free depolarizing solution พบว่า verapamil แสดงผลลด tone ของหลอดเลือดลงจาก base line ซึ่งผลนี้ไม่สามารถอธิบายกลไกได้ในขณะนี้ แต่เป็นที่น่าสังเกตุว่า coumarin ขนาดสูง (4.5×10^{-4} M) สามารถลด tone ของหลอดเลือดลงได้เช่นเดียวกันแต่น้อยกว่า verapamil ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้นี้ชี้ให้เห็นว่า coumarin ขนาดสูง อาจจะมีกลไก การออกฤทธิ์บางอย่างคล้ายกับ verapamil ส่วน coumarinขนาดต่ำ และ microminutin ขนาดเดียวกันให้ผลการทดลองเหมือนกัน คือ ไม่เปลี่ยนแปลงtone ของหลอดเลือดเมื่อให้ สารทั้งสองตัวยับยั้ง Ca^{2+} ก่อนเริ่มทำ cumulative dose-response curve อย่างไรก็ตามจากผลการทดสอบสารละลายคูมารินทั้งสองชนิดแสดงฤทธิ์ต้าน Ca^{2+} เข้าสู่ภายใน cell เป็นสำคัญจึงควรที่จะทำการศึกษาต่อไป

ผลต่อการหดเกร็งของท่อนำอสุจิ

การทดสอบฤทธิ์ลดการหดเกร็งของท่อนำอสุจิของสารละลายคูมาริน เมื่อกระตุ้นการหดเกร็งด้วย KCl พบว่า coumarin ลด phasic contraction ตามขนาดที่ให้ ส่วน microminutin ลด phasic contraction ได้เช่นเดียวกัน ในการเกิด phasic และ tonic contraction จากการกระตุ้นท่อนำอสุจิด้วย KCl ต้องอาศัย Ca^{2+} จากภายนอก cell (Lengton & Huddart, 1988) ซึ่ง nifedipine และ verapamil ยับยั้ง phasic, tonic contraction จากการทดสอบกระตุ้นการหดเกร็งของท่อนำอสุจิในสาร ละลายที่ปราศจาก Ca^{2+} ด้วย KCl จึงไม่พบการตอบสนอง กลไกการหดเกร็งของท่อนำอสุจิเมื่อให้ KCl คือ K^+ จะกระตุ้นที่ VOC ทำให้ Ca^{2+} จากภายนอกเคลื่อนเข้าสู่ภายใน cell 90 (Hay & Wadsworth 1982, 1984) ซึ่ง Ca^{2+} อิสระที่เพิ่มขึ้นจะทำให้เกิดการ coupling ของ actin กับ myocin filament ทำให้ท่อนำอสุจิเกิดการหดเกร็ง จากผล

การทดลอง รูป 29, 30 สารละลาย coumarin ลด phasic contraction ได้เช่นเดียวกัน (รูป 31) จากผลการทดสอบยับยั้ง KCl ของสารละลายคูมาริน ทั้ง coumarin และ microminutin ขนาดความเข้มข้นเดียวกันยับยั้ง phasic contraction ได้ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ผลการทดลองนี้สนับสนุนผลการศึกษาแบบ cumulative dose-response curve ในหลอดเลือด (aorta)หนูขาวเกี่ยวกับฤทธิ์ต้าน Ca^{2+} จากภายนอกเข้าสู่ภายใน cell

เมื่อกระตุ้นการหดเกร็งด้วย $BaCl_2$ พบว่า coumarin ลด phasic contraction ได้ตามขนาดความเข้มข้นที่ให้ microminutin ลด phasic contraction ได้เช่น เดียวกันทั้ง coumarin และ microminutin ไม่ลด rhythmic contrraction การกระตุ้นท่อนำอสุจิด้วย $BaCl_2$ จะพบการหดเกร็งแบบ phasic ตามด้วยแบบ rhythmic (Hay & Wadsworth, 1983) ซึ่ง phasic contraction ต้องอาศัย Ca^{2+} ทั้งจากภายนอก cell และภายใน cell ส่วน rhythmic contraction อาศัยเฉพาะ Ca^{2+} จากภายนอก cell (Mishra, Dase Sanyal, 1988) nifedipine และ verapamil ยับยั้ง amplitude rhythmic ได้ดี กว่า frequency (Hay & Wadsworth, 1984) จากผลการทดลองรูป 32, 33 coumarin ขนาดความเข้มข้นต่างกัน ลด phasic contraction ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย $BaCl_2$ ได้ไม่แตกต่างกัน microminutin ลด phasic contraction ได้ (รูป 34) ไม่ แตกต่างกับ coumarin ขนาดความเข้มข้นเดียวกัน จากการทดลองให้ db-cAMP ซึ่งเป็น analog ของ c-AMP ยับยั้งการหดเกร็งที่เกิดจากการกระตุ้น $BaCl_2$ พบว่าสามารถลด phasic contraction ได้ตามขนาดความเข้มข้นที่ให้ (รูป 35) โดยมีผลน้อยมากต่อ rhythmic contraction เกี่ยวกับการออกฤทธิ์ของ c-AMP เมื่อกระตุ้น c-AMP ในcell ให้มีปริมาณมากขึ้น จะมีผลให้ Ca^{2+} ใน cell ลดลง (จันทนา, 2533) จากผลการทดลองที่ db-cAMP สามารถลด phasic contraction ได้ น่าจะมีกลไกรบกวน Ca^{2+} ใน cytosol สารละลายคูมารินให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับ db-cAMP ผลการทดลองเหล่านี้อาจจะเป็น ข้อชี้แนะได้ว่า กลไกการออกฤทธิ์ของสารละลายคูมาริน น่าจะเกี่ยวพันกับ c-AMP ภายใน 91 cell หรือปริมาณ Ca^{2+} ใน cell ซึ่งต้องมีการศึกษาหาข้อมูลเพิ่มเติมในขั้นต่อไป

การให้ noradrenaline กระตุ้นการหดเกร็งของท่อนำอสุจิในสารละลายสภาพ high-potassium calcium-free depolarizing พบว่ามีการหดเกร็งแบบ transient เมื่อกระตุ้นซ้ำด้วย noradrenaline ขนาดเดิมพบว่าการตอบสนองจะลดลงหรือหายไป (รูป 36) เมื่อใส่ EGTA 0.1 mM ในสารละลาย high-potassium calcium free depolarizing solution แล้วกระตุ้นด้วย noradrenaline พบว่าไม่มีการหดเกร็งใด ๆ เกิดขึ้นดังนั้นการหดเกร็งแบบtransientเนื่องจากการกระตุ้นด้วย noradrenaline ต้องอาศัย Ca^{2+} จากภายนอก cell เท่านั้น สารละลาย coumarin สามารถลด transient contraction ได้ตามขนาดความเข้มข้นที่ให้(รูป 37, 38) microminutin สามารถยับยั้งการหดเกร็งแบบ transientได้เช่นเดียวกัน(รูป 39)และลดได้มากกว่า coumarin ขนาดความเข้มข้นเดียวกัน (อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$) การทดลองนี้ให้ผลแตกต่างกับการทดลองของ Ashoori & Tomita (1983) ซึ่งได้เสนอว่าใน calcium-free solution noradrenaline กระตุ้น transient ได้โดยอาศัย Ca^{2+} ภายใน cell ซึ่งมี starage อยู่ใน mitochondia และ noradrenaline กระตุ้นการหลั่ง Ca^{2+} จากแหล่งเก็บภายในเซล ในการทดลอง Ashooi & Tomita (1983) ใช้ท่อนำอสุจิส่วน epididymal แต่จากการทดลองนี้ได้เลือกใช้ส่วนต่อระหว่าง phasic กับ epidi- dymal ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าการเลือกใช้ส่วนของท่อนำอสุจิมีผลตอบสนองต่อการกระตุ้นได้ แตกต่างกัน ซึ่งจากการทดลองของ Ashoori & Tomita (1983) พบว่า prostatic ไม่ตอบสนองต่อ noradrenaline ในสารละลายที่ปราศจาก Ca^{2+}

ส่วน epididymal ตอบสนองต่อ α_1-receptor ได้ดีกว่า prostatic (Rohde & Huidobro, 1988; Ashoori & Tomita, 1983) แต่ในการทดลองนี้พบว่าส่วนต่อระหว่าง prostatic กับ epididymal จะตอบสนองต่อ noradrenaline ได้ดีกว่า epididymal ดังนั้นจึงเลือกใช้ส่วนต่อนี้ในการทดลอง

จากการทดสอบในสารละลาย Krebs Henseleit พบว่าสารละลายคูมารินทั้งสองชนิดลด phasic contraction ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย noradrenaline ได้น้อย (ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ, $p > 0.05$) แต่สามารถลด amplitude และ frequency rhythmic contraction การกระตุ้นท่อนำอสุจิด้วย noradrenaline ในสารละลาย

Krebs Henseleit พบว่ามีการหดเกร็งแบบ phasic และ rhythmic โดย phasic เกิดจากnoradrenaline ไปกระตุ้นการหลั่ง Ca^{2+} ภายใน cellโดยผ่าน α_1-receptor (Garcia-Sainz, 1991) และ tonic เกิดจากการนำ Ca^{2+} จากภายนอกเข้าสู่ภายใน cell (Vesperinas et.al.,1989) และผลจากการทดลองรูป 40 coumarin สามารถลด rhythmic contraction ได้อย่างชัดเจน และเมื่อเพิ่มความเข้มข้น ของ coumarin (รูป 41) พบว่า rhythmic ลดลงเกือบสมบูรณ์ ส่วน microminutin ลด frequency ของ rhythmic ได้ชัดเจนกว่า amplitude (รูป 42) จากผลการทดลอง(รูป 40, 41, 42) สารคูมารินลด phasic contraction ได้เล็กน้อยไม่มีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) การที่สารละลายคูมารินลดเฉพาะ rhythmiccontraction เป็นผลการทดลองที่สนับสนุนว่าสารละลายคูมารินยับยั้งการนำ Ca^{2+} จากภายนอกเข้าcell แต่ไม่สามารถสรุปได้ว่าจะมี จะมีผลต่อ Ca^{2+} ใน cell หรือไม่ ได้ทดสอบฤทธิ์ของ db-cAMP ซึ่งแสดงผลลด amplitude ของ rhythmic โดยไม่มีผลต่อ phasic (รูป 44b) ได้อย่างชัดเจน (รูป 44d) จะเห็น ได้ว่าสารละลายคูมาริน มีฤทธิ์ลดการหดเกร็งของท่อนำอสุจิ ที่กระตุ้นด้วย noradrenaline คล้ายกับ db-cAMP ขนาด 10^{-5} M คือ ลดเฉพาะ rhythmic contraction แต่ db-cAMP 10^{-4} M แสดงผลการทดสอบที่แตกต่างกันออกไป อย่างไรก็ตามผล การทดลองนี้ ยังไม่สามารถสรุปเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารละลายคูมารินที่สัมพันธ์กับ c-AMP ได้ จะต้องมีการศึกษาต่อไป

นอกจาก Ca^{2+} จากภายนอก cell จะมีบทบาทต่อการหดเกร็งของกล้ามเนื้อแล้ว Ca^{2+} จาก storage ภายใน cell ก็มีบทบาทในการหดเกร็งเช่นเดียวกัน การศึกษาต่อไปนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารละลายคูมารินต่อการหลั่ง Ca^{2+} ภายใน cell โดยให้ Caffeine กระตุ้นกล้ามเนื้อท่อนำอสุจิให้เกิดการ contracture กลไกการกระตุ้น contracture ของ caffeine โดยจะกระตุ้นการหลั่ง Ca^{2+} จาก storage (Karaki, 1988, 1989) การทดลองใน skinned skeletal muscle พบว่า caffeine จะไปออกฤทธิ์ที่ CCR โดยจะเพิ่ม sensitivity ของ CCR ต่อ Ca^{2+} trigger ดังนั้น Ca^{2+} อิสระที่มีอยู่ภายใน cell ขณะพักก็เพียงพอที่จะกระตุ้น CCR ที่ SR ได้ (Karaki & Weiss, 1988; Itoh, Kuriyama & Suzuki, 1981; Saida, 1982; Stout & Diecke, 1983) จากผลการทดลอง (รูป 46) coumarin และ microminutin ไม่สามารถลด contracture ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย caffeine ได้ แต่กลับพบว่าเพิ่ม

contractureซึ่งไม่สามารถอธิบายถึงกลไกการเพิ่มcontracture นี้ได้

สรุปและเสนอแนะ

จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ microminutin ต่อ ลำไส้เล็กกระต่าย, หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว, ท่อนำอสุจิหนูขาว พบว่าจะมีฤทธิ์คล้ายกับ coumarin ในการลดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อเรียบชนิดต่าง ๆ คือเป็น non-specific smooth muscle relaxant แต่มีรายละเอียดเกี่ยวกับการออกฤทธิ์บางอย่างที่แตกต่างจาก coumarin โดยเฉพาะผลต่อลำไส้หนูตะเภา เมื่อศึกษาฤทธิ์เปรียบเทียบพบว่า microminutin ลดการหดเกร็งของหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาว (กระตุ้นด้วย phenylephrine) , ท่อนำอสุจิหนูขาว (กระตุ้นด้วย noradrenaline ในสารละลายสภาพ potassium-depolarizing Tyrode's solution) ได้มากกว่า coumarin แต่ผลการทดลองอื่น ๆ พบว่าลดการหดเกร็งได้ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ทั้งคู่ออก ฤทธิ์โดยไม่ขึ้นกับเยื่อบุหลอดเลือด การศึกษาแบบ cumulative dose-response curve, การใช้ noradrenaline กระตุ้นท่อนำอสุจิ (potassium-depolarizing Tyrode's solution และ Krebs Henseleit solution) สามารถสรุปได้ว่าสารละลายคูมาริน ออกฤทธิ์ขัดขวางการนำ Ca^{2+} จากภายนอกเข้าสู่ภายใน cell โดยไม่มีผลรบกวนการหลั่ง Ca^{2+} จากแหล่งเก็บภายใน cell ส่วนผลการทดลองที่ชี้แนะว่าสารละลายคูมารินอาจจะ สัมพันธ์กับ cAMP ภายใน cell นั้น ไม่สามารถสรุปผลได้แน่นอนในการวิจัยนี้