

ชื่อวิทยานิพนธ์	ผลของอัลคาลอยด์สกัดบริสุทธิ์จากใบมะละกอต่อกการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกของหนูขาว
ผู้เขียน	นายธีรทัศน์ สูดสาย
สาขาวิชา	เภสัชวิทยา
ปีการศึกษา	2548

บทคัดย่อ

ผลจากการศึกษาฤทธิ์ของอัลคาลอยด์สกัดหยาบจากใบมะละกอบพบว่ามีสารสกัดนี้ทำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกของหนูขาวได้ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกของ carpaine ซึ่งเป็นอัลคาลอยด์หลักที่พบในใบมะละกอต่อกการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกของหนูขาว carpaine ถูกสกัดและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี acid-base และ column chromatography ตามลำดับ carpaine ที่ได้ถูกนำไปใช้ศึกษาการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับ Ca^{2+} -channel, K^+ -channel รวมถึงบทบาทของอัลคาลอยด์นี้ที่เกี่ยวข้องกับ cAMP, nitric oxide donor และ nitric oxide synthase ในการทำให้กล้ามเนื้อเรียบคลายตัว ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีการศึกษาผลของ carpaine เปรียบเทียบกับฤทธิ์ของ verapamil, cromakalim, forskolin, papaverine, sodium nitroprusside (SNP) และ L-arginine ต่อกการยับยั้งการหดตัวของมดลูกซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้หดตัวด้วย KCl (25, 56.3 and 60 mM) และ oxytocin (1 mU/ml) มดลูกของหนูขาวเพศเมียพันธุ์ Wistar ที่ได้รับ diethylstilbestrol (100 µg) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนทำการทดลองจะถูกเหนี่ยวนำให้หดตัวด้วย KCl 56.3 mM ในสารละลาย Jalon-Ringer's solution ผลจากการทดลองพบว่า carpaine (3×10^{-5} - 3×10^{-3} M) สามารถยับยั้งการหดตัวของมดลูกซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้หดตัวโดย KCl 56.3 mM ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้พบว่า carpaine ที่ความเข้มข้น 3×10^{-5} , 1×10^{-4} และ 3×10^{-4} M หรือ verapamil ที่ความเข้มข้น 1×10^{-9} , 1×10^{-8} และ 1×10^{-7} M สามารถทำให้กราฟ log concentration-response ของ $CaCl_2$ (1×10^{-6} ถึง 3×10^{-2} M) ซึ่งเหนี่ยวนำให้มดลูกหดตัวในสารละลาย Ca^{2+} -free-high KCl (60 mM KCl) เลื่อนไปทางขวาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และสามารถยับยั้งการหดตัวของมดลูกซึ่งถูกกระตุ้นให้หดตัวด้วย oxytocin (1 mU/ml) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้การศึกษารูปแบบของ carpaine ต่อก K^+ -channel พบว่า cromakalim (1×10^{-7} - 3×10^{-5} M) หรือ carpaine (3×10^{-5} - 3×10^{-3} M) สามารถยับยั้งการหดตัวที่เหนี่ยวนำด้วย oxytocin (1 mU/ml) หรือ KCl (25 mM) ได้ นอกจากนี้การศึกษาโดยใช้ Tetraethylammonium (TEA 1×10^{-3} M) ซึ่งมีฤทธิ์หลักในการยับยั้ง Ca^{2+} -activated K^+ -channel สามารถเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ของ carpaine ที่ทำให้มดลูกคลายตัวได้ แต่ TEA ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ cromakalim ที่ทำให้มดลูกคลายตัว

ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตาม Glibenclamide (1×10^{-7} - 1×10^{-5} M) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง ATP-sensitive K^+ -channel ทำให้กราฟ concentration-response ของ carpaine (3×10^{-5} - 3×10^{-3} M) ซึ่งเหนี่ยวนำให้มดลูกหดตัวด้วย oxytocin เลื่อนไปทางขวาแบบ non-parallel เล็กน้อย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ผลนี้ไม่เกิดในมดลูกที่ถูกเหนี่ยวนำให้หดตัวด้วย KCl (25 mM) glibenclamide ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ cromakalim (1×10^{-7} - 3×10^{-5} M) ที่ทำให้มดลูกคลายตัวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทั้งในมดลูกที่เหนี่ยวนำให้หดตัวด้วย oxytocin หรือ KCl (25 mM) นอกจากนี้การศึกษายังได้ทดสอบผลของ carpaine (3×10^{-5} - 3×10^{-3} M), forskolin (1×10^{-7} - 3×10^{-5} M) หรือ papaverine (1×10^{-7} - 1×10^{-4} M) และการยับยั้งเอนไซม์ cAMP-dependent protein kinase ด้วย Rp-cAMPS (3×10^{-6} - 3×10^{-5} M) ในมดลูกที่ถูกเหนี่ยวนำให้หดตัวด้วย KCl (56.3 mM) ผลการทดลองพบว่า carpaine, forskolin และ papaverine สามารถยับยั้งการหดตัวของมดลูกซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้หดตัวโดย KCl ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยความสามารถในการยับยั้งการหดตัวขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ carpaine, forskolin และ papaverine ยิ่งกว่านั้น Rp-cAMPS (3×10^{-6} - 3×10^{-5} M) สามารถต้านฤทธิ์ของ carpaine, forskolin และ papaverine ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับ NO donor พบว่า SNP (1×10^{-5} - 1×10^{-3} M) มีฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของมดลูกที่ถูกเหนี่ยวนำให้หดตัวด้วย KCl 56.3 mM ได้น้อยกว่า carpaine (3×10^{-5} - 3×10^{-3} M) L-arginine (3×10^{-4} - 3×10^{-3}) ที่เป็นสารตั้งต้นของ NO มีฤทธิ์ทำให้มดลูกเกิดการคลายตัวในมดลูกที่ถูกเหนี่ยวนำให้หดตัวด้วย KCl (56.3 mM) ได้น้อยกว่า carpaine (3×10^{-5} - 10^{-3} M) อย่างไรก็ตามเมื่อยับยั้งเอนไซม์ NOS ด้วย NOARG หรือโดยการยับยั้งเอนไซม์ GC ด้วย methylene blue จะสามารถต้านฤทธิ์ของการคลายตัวของ L-arginine และ NO donor ได้แต่ไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ carpaine ได้

จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า carpaine เป็นสารซึ่งมีฤทธิ์ทำให้มดลูกคลายตัวในหลอดทดลอง กลไกการคลายตัวของ carpaine อาจจะไม่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้น nitric oxide synthase หรือทำหน้าที่เป็น nitric oxide donor กลไกหลักของ carpaine อาจเกิดขึ้นจากการไปปิดกั้น voltage-operated Ca^{2+} -channel ซึ่งจะยับยั้ง Ca^{2+} ผ่านเข้าเซลล์และเป็นไปได้ว่าอาจจะมีฤทธิ์ในการทำให้ Ca^{2+} -activated K^+ -channel เปิดได้บ้าง นอกเหนือจากนี้ฤทธิ์ของ carpaine ที่ทำให้มดลูกคลายตัวบางส่วนอาจเกิดขึ้นจากการที่ carpaine ไปทำให้มีการสะสมของ cAMP ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า carpaine เป็นสารที่มีศักยภาพที่จะพัฒนาไปเป็น uterine relaxant ได้

Thesis Title Effect of Purified Alkaloid from *Carica papaya* L. Leaves on
Smooth Muscle Contraction in Rat Uterus

Author Mr. Teeratad Sudsai

Major Program Pharmacology

Academic Year 2005

ABSTRACT

Our previous investigations have shown the ability of crude alkaloid from *Carica papaya* L. leaves to cause uterine relaxation *in vitro*. The aim of this study is to investigate further effect of a major alkaloid of this plant, carpaine, on the isolated rat uterus. Carpaine is extracted and purified using conventional acid-base method and column chromatography, respectively. We then examine of the key role of carpaine on Ca²⁺-channel, K⁺- channel, the involvement of cAMP, nitric oxide donor and nitric oxide synthase (NOS) in mediating the uterine relaxation. Thus the effects of several relaxants verapamil, cromakalim, forskolin, papaverine, sodium nitroprusside (SNP) and L-arginine on rat uterine contraction induced by KCl (25, 56.3 and 60 mM) and

oxytocin (1 mU/ml) were tested in comparison to carpaine. Uterine horns from female Wistar rats pretreated with diethylstilbestrol (100 µg) for 24 hours before the commencement of the experiment were incubated in Jalon-Ringer's solution and stimulated with KCl 56.3 mM to induce contraction. Carpaine (3×10^{-5} - 3×10^{-3} M) significantly inhibited this contraction in a dose-dependent manner ($p < 0.05$). In Ca^{2+} -free-high K^+ solution (60 mM), the contractile response to cumulative concentrations of CaCl_2 (1×10^{-6} - 3×10^{-2} M) were blocked and the log concentration-response curves were shift to the right by 3×10^{-5} , 1×10^{-4} and 3×10^{-4} M of carpaine and 1×10^{-9} , 1×10^{-8} and 1×10^{-7} M of verapamil ($p < 0.05$). Carpaine or verpamil also significantly inhibited uterine contraction induced by oxytocin (1 mU/ml) ($p < 0.05$). The role of carpaine on K^+ -channel was also determined. Cromakalim (1×10^{-7} - 3×10^{-5} M) or carpaine (3×10^{-5} - 3×10^{-3} M) inhibited uterine contraction induced by oxytocin (1 mU/ml) or KCl (25 mM). Tetraethylammonium (TEA 1×10^{-3} M), the blocker mainly of Ca^{2+} -activated K^+ -channel, partially modified the uterine relaxation induced by carpaine (3×10^{-5} - 3×10^{-3} M). TEA at the same concentrations altered the cromakalim-induced uterine relaxation ($p < 0.05$). Glibenclamide (1×10^{-7} - 1×10^{-5} M), the ATP-sensitive K^+ -channel blocker, caused a small non-parallel rightward shifts of concentration-response curve for carpaine in uterus precontracted with oxytocin but not with 25 mM KCl. However, these

concentrations of glibenclamide were able to inhibit uterine relaxation induced by cromakalim ($p < 0.05$). Further more, the effects of carpaine (3×10^{-5} - 3×10^{-3} M), forskolin (1×10^{-7} - 3×10^{-5} M) and papaverine (1×10^{-7} - 1×10^{-4} M) on KCl (56.3 mM)-induced contraction in rat uterus and their modification with the inhibitor of cAMP-dependent protein kinase (Rp-cAMPs 3×10^{-6} - 3×10^{-5} M) have been tested. Carpaine, forskolin and papaverine relaxed the contraction induced by KCl in a concentration-dependent manner. Rp-cAMPs (3×10^{-5} M) significantly antagonized the effect of carpaine, forskolin and papaverine ($p < 0.05$). In the NO donor assay, SNP (1×10^{-5} - 1×10^{-3} M) caused the uterus precontracted with KCl (56.3 mM) to relax, however, with a smaller relaxation than those induced by carpaine (3×10^{-5} - 3×10^{-3} M). L-arginine, the NO substrate, at the concentrations of 3×10^{-4} - 3×10^{-3} M were also less effective than carpaine (3×10^{-5} - 10^{-3} M) to induce relaxation of the uterus precontracted with KCl (56.3 mM). This inhibition of contractility was abolished by inhibitor of NOS, such as NOARG, or by inhibitor of GC such as methylene blue, but not by carpaine.

The results of the present study demonstrated that carpaine produced a uterine relaxation *in vitro*. It seems likely that the mechanism underlying the action of carpaine is not related to a stimulation of nitric oxide synthase or nitric oxide donor. Carpaine may act principally

through the blockade of voltage-operated Ca^{2+} channel, probably by inhibiting the entry of the extracellular Ca^{2+} into muscle cell and partially by opening of Ca^{2+} -activated K^+ -channel. Moreover, carpaine may, at least in part, cause uterine relaxation by the induction of cAMP accumulation. The results from this study indicate that carpaine has a potential to be developed as a uterine relaxant.