4. บทวิจารณ์

ผลของ cerberin, 17β-neriifolin และ digoxin ต่อความแรงการบีบตัวและอัตราการเต้นของหัวใจห้องบน ของหนูแร็ทที่แยกออกจากตัว

ethanol ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.012-0.188% (v/v) ไม่ส่งผลเปลี่ยนแปลงความแรงการบีบตัวและอัตราการเต้นของหัวใจห้องบน ของหนูแร็ทที่แยกออกจากตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3.1 และ รูปที่ 3.1-3.2) ในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้ absolute ethanol เป็นตัวทำละลายสารที่สกัดได้จากเมล็ดสดของตีนเป็ดทะเล ซึ่งได้แก่ cerberin และ 17β-neriifolin พบว่า 17β-neriifolin ละลายได้ง่ายกว่า cerberin ซึ่งคุณสมบัติในการละลายนี้อาจขึ้นอยู่กับโครงสร้างของสารทั้งสองชนิดที่มีบางส่วนแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามสารทั้งสองชนิดละลายได้สมบูรณ์ใน absolute ethanol ในการละลายสารสกัดในกลุ่ม glycoside เช่น digoxin มีรายงานว่าใช้ solvent หลายชนิดเช่น 40% propylene glycol และ 10% alcohol (Pace *et al.*, 1974 ; Ferraiolo and Pace, 1978), 70% ethanol (Kocic and Korolkiewicz, 1998) ในขณะที่การละลาย digitoxin มีรายงานว่าใช้ 49% alcohol (Pace *et al.*, 1974)

cerberin และ 17β-neriifolin ออกฤทธิ์เพิ่มความแรงในการบีบตัวของหัวใจ (ตารางที่ 3.1 รูปที่ 3.3 และ 3.5) เป็นที่น่าสังเกตว่าที่ความเข้มข้นระหว่าง 2.5-18.75 $\mu g\ ml^{-1}$ 17β-neriifolin ออกฤทธิ์เพิ่มความแรงการบีบตัวของหัวใจได้มากกว่า cerberin ซึ่งการออกฤทธิ์เพิ่มความแรงในการบีบตัวของหัวใจนี้มีผลคล้ายกับ digoxin ที่ความเข้มข้นระหว่าง 2.5-12.5 $\mu g\ ml^{-1}$ การออกฤทธิ์ของ digoxin ในการเพิ่มแรงในการบีบตัวของหัวใจ มีกลไกที่เป็นไปได้ 3 กลไกด้วยกันคือ 1) ยับยั้งการทำงานของ Na^+-K^+ ATPase ทำให้ความเข้มข้นของ Na^+ ภายในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ขบวนการ Na^+-Ca^{2+} exchange เกิดได้มาก จึงทำให้เพิ่ม Ca^{2+} ภายในเซลล์ (Smith, 1988 ; Medford, 1993) 2) กระตุ้นให้มีการหลั่ง Ca^{2+} จาก SR โดยตรง (McGarry and Williams, 1993) และ 3) การเพิ่ม transient inward Ca^{2+} current (Marban and Tsien, 1982) ซึ่งการเพิ่มขึ้นของระดับ Ca^{2+} ภายในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจะทำให้เกิดการบีบตัวได้แรงขึ้น การออกฤทธิ์ของ cerberin และ 17β-neriifolin ในการเพิ่มแรงในการบีบตัวของหัวใจห้องบน ของหนูแร็ทที่แยกออกจากตัว อาจจะมีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านกลไกใดกลไกหนึ่งใน 3 กลไกนี้หรือมากกว่าหนึ่งกลไกก็ได้ เป็นที่น่าสังเกตว่า digoxin ที่ความเข้มข้น 18.75 $\mu g\ ml^{-1}$ เพิ่มแรงในการบีบตัวของหัวใจได้น้อยกว่าที่ความเข้มข้น 12.5 $\mu g\ ml^{-1}$ และในนาทีที่ 1-10 และในนาทีที่ 10-20 ทำให้หัวใจหยุดเต้น ซึ่งเป็นไปได้ว่าการออกฤทธิ์ของ cardenolide glycoside ที่ความเข้มข้นสูงจะลดความแรงของการหดตัวและทำให้หัวใจหยุดเต้น ดังนั้น cerberin และ 17β-neriifolin อาจจะมีลักษณะของการออกฤทธิ์ในแบบเดียวกัน แต่ในการวิจัยครั้งนี้ไม่ได้ทำการ

ทดลองใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่า 18.75 μg ml^{-1} เนื่องจากปริมาณของสารสกัดที่ได้มีไม่เพียงพอ

cerberin และ 17β-neriifolin ที่ความเข้มข้นต่ำจะออกฤทธิ์ลดอัตราการเต้นของหัวใจ แต่ที่ความเข้มข้นสูงจะออกฤทธิ์เพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจ เช่น cerberin ขนาด 6.25 และ 12.5 μg ml^{-1} ออกฤทธิ์ลดอัตราการเต้นของหัวใจ (ตารางที่ 3.1 รูปที่ 3.4 และ 3.6) แต่ที่ขนาด 18.75 μg ml^{-1} มีแนวโน้มจะเห็นผลในทางตรงกันข้าม (นาทีที่ 10-20) ส่วนผลของ 17β-neriifolin ที่ขนาด 6.25 μg ml^{-1} ลดอัตราการเต้นของหัวใจเช่นเดียวกับ cerberin แต่ที่ขนาด 18.75 μg ml^{-1} เพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจในนาทีที่ 1-20 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการให้ digoxin ขนาด 2.5, 6.25, 12.5 และ 18.75 μg ml^{-1} จะลดอัตราการเต้นของหัวใจในนาทีที่ 0-1 เท่านั้นหลังจากนั้นมีแนวโน้มเพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจ การออกฤทธิ์ของ digoxin ต่ออัตราการเต้นของหัวใจในการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Kocic และ Korolkiewicz (1998) ที่ทำการทดลองในหัวใจห้องบนขวาที่แยกออกจากตัวของหนูตะเภาพบว่า digoxin ความเข้มข้น 30 μM ทำให้อัตราการเต้นของหัวใจลดลง (ค่าเฉลี่ยจากการวัด10 นาที) ซึ่งคณะผู้ศึกษาสรุปว่าผลของการลดลงของอัตราการเต้นของหัวใจเกิดจาก digoxin ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ Na^+-K^+ ATPase ที่เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจทำให้ความเข้มข้นของ K^+ ภายนอกเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งการเพิ่มขึ้นของ K^+ ภายนอกเซลล์เป็นผลให้อัตราการเต้นของหัวใจลดลงนอกจากนี้คณะผู้ศึกษา ได้เปรียบเทียบผลของ rimalkalim ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์กระตุ้น K_{ATP} channels พบว่าทำให้อัตราการเต้นของหัวใจเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ digoxin อย่างเดียว ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์ของ cerberin และ 17β-neriifolin ที่ออกฤทธิ์ลดอัตราการเต้นของหัวใจกับ digoxin อาจจะมีกลไกที่เหมือนกันได้ ส่วนการเพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจที่เกิดจาก 17β-neriifolin ที่ความเข้มข้น 18.75 μg ml^{-1} นั้นอาจจะเกิดจากเพิ่ม phase 4 slope ของ pacemaker cell ของหัวใจหนู เนื่องจากมีรายงานการศึกษาใน Purkinje fiber ของสุนัขพบว่า digitalis glycosides สามารถเพิ่ม phase 4 slope ในกรณีที่ K^+ นอกเซลล์มีความเข้มข้นต่ำ (2.7 mM) (Roden and Hoffman, 1985; Hardman *et al.*, 1996) ซึ่งการเพิ่ม phase 4 slope ทำให้อัตราการเต้นของหัวใจเพิ่มขึ้น

นอกจากการศึกษาผลของสารสกัด cardenolide glycoside (17β-neriifolin และ cerberin) จากเมล็ดสดของตีนเป็ดทะเล (*Cerbera odollam*) ใน isolated heart ครั้งนี้แล้ว ยังมีการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งสามชนิด ได้แก่ oral human epidermoid carcinoma (KB), human breast cancer cell (BC) และ human small cell lung cancer (NCI-H187) ซึ่งพบว่า 17β-neriifolin ออกฤทธิ์ได้ดีกว่า cerberin (Laphookhieo *et al.*, 2004) เช่นเดียวกัน

ผลของ 17β-neriifolin และ digoxin ต่อความดันเลือดและการทำงานของไตในหนูแร็ท

จากผลการทดลองในกลุ่ม time control (ตารางที่ 3.2) พบว่าค่า MABP และค่า renal functions ต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติใน 3 ช่วงเวลาของการทดลอง

ทำให้การทดลองครั้งนี้สามารถเปรียบเทียบผลของ 17β-neriifolin หรือ digoxin ต่อค่าความดันเลือดและการทำงานของไตกับช่วงเวลา control ของกลุ่มที่ได้รับสารต่างๆ ได้โดยไม่ต้องคำนึงถึงผลของเวลา

ผลของ 17β-neriifolin และ digoxin ต่อความดันเลือดแดงในหนูขาว

การให้ 17β-neriifolin ขนาด 2.4 mg kgbw^{-1} ทำให้ความดันเลือดเพิ่มขึ้นจากช่วง control ประมาณ 20 mmHg (ตารางที่ 3.3 และรูปที่ 3.9) หลังจากหยุดให้สาร 60 นาที (ช่วง post-treatment) ความดันเลือดก็ยังเพิ่มเท่าเดิมคือประมาณ 20 mmHg จากการศึกษาผลของการให้ ethanol ขนาด 5 µl 100gbw^{-1} ซึ่งใช้เป็น vehicle solvent ของ 17β-neriifolin พบว่าไม่ทำให้ความดันเลือดเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของความดันเลือดน่าจะเกิดจากผลการทดลองของ 17β-neriifolin ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลของ digoxin ขนาด 2.4 mg kgbw^{-1} พบว่า digoxin เพิ่มความดันเลือดประมาณ 30 mmHg แต่ที่แตกต่างกันคือในช่วง post-treatment ความดันเลือดจะกลับมาเป็นปกติผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า 17β-neriifolin ออกฤทธิ์เพิ่มความดันเลือดเช่นเดียวกับ digoxin แต่ 17β-neriifolin ออกฤทธิ์เพิ่มความดันเลือดได้นานกว่า digoxin มีรายงานหลายฉบับที่สนับสนุนผลการทดลองนี้โดยศึกษาสารกลุ่ม cardiac glycoside ให้ผลเพิ่มความดันเลือดหรือทำให้หลอดเลือดหดตัวเช่น ouabain ทำให้ความดันเลือดแดงเฉลี่ย, forearm vascular resistance และ venous tone เพิ่มขึ้นในคนปกติ (Mason and Braunwald, 1964) นอกจากนี้พบว่าทำให้ large coronary artery หดตัว (Schwartz and Bache, 1988) digoxin ทำให้หลอดเลือด arteries และ veins ของคนที่แยกออกจากร่างกายหดตัว (Mikkelsen *et al.*, 1979; Mason and Braunwald, 1964; Hardman *et al.*, 1996) ดังนั้นการออกฤทธิ์ของ 17β-neriifolin ในการเพิ่มความดันเลือดแดงอาจจะมีกลไกคล้ายกับสารในกลุ่ม cardiac glycoside ก็ได้

ผลของ 17β-neriifolin และ digoxin ต่อการทำงานของไตในหนูขาว

การให้ 17β-neriifolin มีผลทำให้ RPF ในช่วง post-treatment ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับช่วง control (ตารางที่ 3.3 และ รูปที่ 3.12) แต่ไม่มีผลต่อค่า GFR (ตารางที่ 3.3 และ รูปที่ 3.11) ซึ่งผลที่ได้คล้ายกับผลของ digoxin ที่ทำให้ RPF ลดลง 15 % ในช่วง post-treatment (ตารางที่ 3.3 และ รูปที่ 3.12) เมื่อเปรียบเทียบกับช่วง control ผลการลดลงของ RPF นี้ไม่น่าจะเกิดจาก vehicle solvent จากตารางที่ 3.3 และ รูปที่ 3.11 และ 3.12 จะเห็นว่า ethanol ขนาด 5 µl 100g bw^{-1} ไม่ทำให้ค่า GFR และ RPF เปลี่ยนแปลงจากช่วง control ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Bilotta *et al.* (1984) ที่ศึกษาใน isolated rat kidney พบว่า ethanol ปริมาตร 80 mg 100 ml^{-1} ไม่ทำให้ค่า GFR เปลี่ยนแปลงเช่นกัน จากการศึกษาของ Mason และ Braunwald (1964) พบว่าสารในกลุ่ม cardiac glycoside ทำให้ vascular smooth muscle หดตัว

ดังนั้น 17β-neriifolin และ digoxin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม cardiac glycoside เช่นกัน อาจจะออกฤทธิ์ทำให้หลอดเลือด afferent และ efferent arterioles หดตัวจึงทำให้ RPF ลดลงได้

17β-neriifolin มีผลยับยั้งการเกิดภาวะ diuresis และ natriuresis ที่เกิดจาก ethanol ขนาด 5 µl 100g bw^{-1} ทำให้อัตราการขับทิ้งปัสสาวะเพิ่มขึ้นจากช่วง control ประมาณ 2 เท่า (ตารางที่ 3.3 และ รูปที่ 3.10) ซึ่งจะเห็นว่าการเพิ่มขึ้นของการขับทิ้งปัสสาวะไม่น่าจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลง renal hemodynamics เนื่องจาก ethanol ไม่ทำให้ค่า GFR และ RPF เปลี่ยนแปลง (ตารางที่ 3.3 รูปที่ 3.11 และ รูปที่ 3.12) การที่ปริมาณปัสสาวะเพิ่มขึ้นน่าจะเกิดจากการยับยั้งการดูดกลับโซเดียมและน้ำที่หลอดไตฝอยส่วนอื่นที่ไม่ใช่ส่วนของ proximal tubule เนื่องจาก ethanol ไม่ทำให้ค่า FPR_{Na} ที่คำนวณได้จากค่า lithium clearance เปลี่ยนแปลงจาก control (ตารางที่ 3.5 และ รูปที่ 3.20) ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ethanol มีผลทำให้เกิดภาวะ diuresis โดยยับยั้งการหลั่ง antidiuresis hormone (ADH) (Eisenhofer and Johnson, 1982) นอกจากนี้ยังพบว่า ethanol ยังมีผลทำให้ลดการหลั่งฮอร์โมน aldosterone (Linkola *et al.*, 1979) ซึ่งฮอร์โมน aldosterone ออกฤทธิ์กระตุ้นการดูดกลับ Na^+ ที่หลอดไตฝอยส่วน distal และ collecting duct และเพิ่มการคัดหลั่ง potassium ดังนั้นเมื่อ ethanol ออกฤทธิ์ลดการหลั่งฮอร์โมน aldosterone ก็ทำให้การดูดกลับ Na^+ ที่หลอดไตฝอยส่วน distal และ collecting duct ก็ลดลง และการคัดหลั่ง potassium ก็ต้องลดลงด้วย แสดงว่า Na^+ excretion และ FE_{Na} ต้องเพิ่มขึ้นในขณะเดียวกัน K^+ excretion และ FE_K ลดลง แต่ผลการทดลองที่ได้ครั้งนี้ Na^+ excretion และ FE_{Na} เพิ่มขึ้น K^+ excretion ไม่เปลี่ยนแปลง ในขณะที่ FE_K เพิ่มขึ้น ซึ่งจะเห็นว่าในภาวะปกติร่างกายจะรักษาระดับ potassium ในเซลล์และใน plasma ให้คงที่เนื่องจากเป็นเกลือแร่ที่มีความสำคัญต่อการทำงานของเซลล์ ซึ่งปัจจัยที่ควบคุมการขับทิ้ง potassium ที่หลอดไตฝอยขึ้นอยู่กับ การดูดกลับ potassium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal, ฮอร์โมน aldosterone โดยการกระตุ้นเอนไซม์ Na^+-K^+ ATPase ที่ผนังด้าน basolateral ทำให้ปริมาณ sodium ในเซลล์ลดลง และปริมาณ potassium ในเซลล์เพิ่มขึ้น ส่งเสริมการคัดหลั่ง potassium สู่ของเหลวของหลอดไตฝอย, ความแตกต่างของความเข้มข้นของ potassium ภายในเซลล์กับของเหลวในหลอดไตฝอย และอัตราการไหลของของเหลวในหลอดไตฝอย ซึ่งการเพิ่ม FE_K ในครั้งนี้น่าจะเป็นผลจากกลไกอย่างใดอย่างหนึ่ง แต่อย่างไรก็ตามก็ยังมีรายงานการศึกษาผลของ ethanol ในไตหนูที่แยกออกจากตัวพบว่า ethanol มีผลยับยั้งเอนไซม์ Na^+-K^+ ATPase (Rodrigo and Thieleman, 1997) ทำให้การดูดกลับ sodium ลดลงและคงส่งผลถึง potassium ด้วยดังที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น

17β-neriifolin น่าจะออกฤทธิ์เพิ่มการดูดกลับโซเดียมและน้ำ ซึ่งการเพิ่มการดูดกลับโซเดียมและน้ำ โดย 17β-neriifolin ไม่น่าจะเกิดที่หลอดไตฝอยส่วน proximal เนื่องจาก 17β-neriifolin ไม่ทำให้ค่า FPR_{Na} เปลี่ยนแปลงจาก control (ตารางที่ 3.5 และ รูปที่ 3.20)

ส่วน digoxin ทำให้อัตราการขับทิ้งปัสสาวะเพิ่มขึ้น 88 % จากช่วง control (ตารางที่ 3.3 และรูปที่ 3.10) ซึ่งเคยมีการศึกษาในไตของไก่ที่แยกออกจากตัวพบว่า digoxin ทำให้เกิดภาวะ diuresis โดยการออกฤทธิ์ยับยั้ง Na^+-K^+ ATPase (Allen *et al.*, 1971) สำหรับการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธี lithium clearance ซึ่งสามารถยืนยันการดูดกลับ sodium และ น้ำที่หลอดไตฝอยส่วน proximal ได้ (Thomsen *et al.*, 1984) การขนส่ง lithium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal นั้นเชื่อว่ามีกลไกผ่านทาง paracellular space (Greger, 1990) ซึ่งผลการศึกษาที่ได้พบว่าค่า FPR_{Na} ลดลง 32 % เมื่อเปรียบเทียบกับช่วง control (ตารางที่ 3.5 และ รูปที่ 3.20) ดังนั้นแสดงว่า digoxin ออกฤทธิ์ยับยั้งการดูดกลับ sodium และ น้ำที่หลอดไตฝอยส่วน proximal ทำให้ sodium และน้ำถูกขับทิ้งเพิ่มขึ้นเกิดภาวะ diuresis และ natriuresis นอกจากนี้ยังเกิดภาวะ kaliuresis น่าจะเกิดจากเมื่อ sodium ถูกดูดกลับลดลง ผลที่ตามมาน่าจะทำให้การดูดกลับ potassium ลดลงด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการยับยั้งการดูดกลับ sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal จะลดการขนส่ง potassium ทางช่องทางการขนส่งระหว่างเซลล์ (Bomsztyk and Wright, 1982) ดังนั้นแสดงว่าการออกฤทธิ์ของ 17β-neriifolin ต่อการทำงานของไตอาจจะมีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างจาก digoxin แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า 17β-neriifolin มีฤทธิ์เพิ่มการขับทิ้ง potassium ซึ่งอาจจะเป็นผลจากการเพิ่มการดูดกลับ sodium จึงทำให้มีการคัดหลั่ง potassium เพิ่มขึ้น หรือ 17β-neriifolin กระตุ้นให้มีการหลั่งของฮอร์โมน aldosterone เพื่อเป็นการต้านการออกฤทธิ์ของ ethanol