



สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
THE THAILAND RESEARCH FUND

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษา clonidine-displacing substance
และออกฤทธิ์ที่ α_2 -adrenoceptor และที่
imidazoline receptor

โดย ผศ.ดร. ดาราวรรณ ปิ่นทอง

31 กรกฎาคม 2544

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาสาร clonidine-displacing substance
และการออกฤทธิ์ที่ α_2 -adrenoceptor และที่
imidazoline receptor

ผศ.ดร. ดาราวรรณ ปิ่นทอง ภาควิชาเภสัชวิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ	4
Abstract	5
บทคัดย่อ	7
บทนำ	9
วัตถุประสงค์	13
วิธีการทดลอง	14
1. การสกัดสาร clonidine-displacing substance จากสมองของหมู	14
2. การเตรียม porcine cerebral cortex membranes	14
3. การทดสอบคุณสมบัติของ CDS ใน extract	14
4. การเตรียม renal cortex membrane จากไตของหมู	15
5. ศึกษาคุณสมบัติของ CDS ในการจับที่ imidazoline receptor	16
6. ศึกษาและตรวจสอบความสามารถของสารสกัด CDS ในการกระตุ้น α_2 -adrenoceptors	16
6.1 Model ของการกระตุ้นการจับตัวของเกร็ดเลือด	16
6.2 Model ของการกระตุ้น prejunctional α_2 -adrenoceptors ที่ rat vas deferens	17
7. ศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัด CDS ที่ imidazoline receptor	17
8. วัสดุวิทยาศาสตร์	18
9. การคำนวณข้อมูล	19
10. แผนการดำเนินการทดลองโครงการ 3 ปี	20
ผลการทดลอง	22
1. คุณสมบัติของสารสกัด CDS	22
2. ผลของสารสกัด CDS ในการกระตุ้น α_2 -adrenoceptors	24
2.1 Model ของการจับตัวของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย ADP	
2.1.1 ผลของ α_2 -adrenoceptor agonist, clonidine	24
2.1.2 ผลของสารสกัด CDS	27
2.1.3 ผลของ agmatine	30
2.2 Model prejunctional α_2 -adrenpceptor ที่ rat vas deferens	31
2.2.1 ผลของ α_2 -adrenoceptor agonist, clonidine	31
2.2.2 ผลของสารสกัด CDS	31

สารบัญ (ต่อ)

2.2.3 ผลของสารสกัด CDS ต่อ การยับยั้งการหดตัวของ ท่อน้ำเชื้อของ clonidine	31
3. ผลของสารสกัด CDS ในการกระตุ้น imidazoline receptor	36
3.1 ผลของimidazoline agents and non-imidazoline α -adrenergic agents ต่อการจับกันของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย noradrenaline	36
3.2 ผลของ clonidine-displacing substance (CDS) ต่อการจับกันของ เกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย noradrenaline	38
3.3 ผลของ imidazoline agents and non-imidazoline α -adrenergic agents ต่อการจับกันของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย ADP	40
บทวิจารณ์	42
หนังสืออ้างอิง	46
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจากสกว.	51
ภาคผนวก	52
1. รูปสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารและ trace record	
1.1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารที่เป็น imidazoline และ imidazoline derivatives	52
1.2 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารที่เป็น imidazoline derivatives, adrenergic non-imidazoline และ agmatine	53
1.3 ตัวอย่าง trace record ของการจับกันของเกร็ดเลือด	54
2. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ : Manuscript	56
3. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ : Reprint	89

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้คงไม่สำเร็จลงได้หากไม่ได้รับทุนพัฒนานักวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) และทุนสนับสนุนจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ทำให้สามารถซื้อสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยโดยเฉพาะสารกัมมันตรังสี และวัสดุวิทยาศาสตร์บางชิ้นที่มีราคาค่อนข้างแพง จึงใคร่ขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ ห้องปฏิบัติการ และเครื่องมือเครื่องใช้ในการทำวิจัย และงานนี้สำเร็จลงได้ด้วยความร่วมมือของคณะผู้ช่วยวิจัยได้แก่ น.ส. ราณี สัจจเดวี น.ส. ปิยะดา ส่งเสริมสกุล นักศึกษาปริญญาโทสาขาเภสัชวิทยา น.ส. นิตดา ภูแล่นเกี๋ นายชาญณรงค์ พูนเพิ่ม และนางปิยานี รัตนชำนอง ซึ่งได้ร่วมกันฟันฝ่าอุปสรรคมาตลอดช่วงเวลาของงานวิจัยนี้ และท้ายสุดขอขอบคุณ Professor David Kendall, School of Biomedical Science, Nottingham University, UK ที่ให้คำปรึกษาเมื่อมีปัญหาเกี่ยวกับ model ที่ใช้ในงานวิจัย และขอขอบคุณทุกๆท่านที่มีได้เอื้อนมา ผู้ซึ่งมีส่วนช่วยเหลือ มา ณ ที่นี้

Abstract

Project code : RSA/10/2540

Project Title : The study of the presence of clonidine-displacing substance and its interaction at α_2 -adrenoceptor and imidazoline receptor

Investigator : Darawan Pinthong, Ph.D., Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University

E-mail Address : scdpt@mahidol.ac.th

The aims of this study are to examine the properties and functions of clonidine-displacing substance (CDS), and to determine whether it could be an endogenous ligand at α_2 -adrenoceptors and non-adrenoceptor imidazoline binding sites. Agmatine, a candidate for CDS was also studied in comparison to CDS extract.

In this study CDS was prepared from porcine cerebral cortex using methanolic extract. CDS activity was determined by the amount of the extract that displaces 50% of 1 nM [3 H]-clonidine binding from α_2 -adrenoceptors on porcine cerebral cortex membranes. CDS activity in porcine brain extract was 20 μ l/unit or 7.71 ± 1.96 unit/g tissue (n=5batch). Based on radioligand binding assay, CDS extract recognized both α_2 -adrenoceptors and imidazoline receptor with 2.7 fold more potent at imidazoline receptor on porcine renal cortex membranes labelled by [3 H]-idazoxan than at α_2 -adrenoceptors. CDS activity was examined in unit by radioligand binding technique. Functional activities of CDS extract were examined in the 2 model of α_2 -adrenoceptor. First, platelet aggregation model, clonidine an α_2 -adrenoceptor agonist, was found to potentiate ADP-induced platelet aggregation in a concentration-dependent manner and the effect was inhibited by an α_2 -adrenoceptor antagonist, yohimbine. On the contrary, CDS inhibited ADP-induced platelet aggregation in a concentration-dependent manner and the effect was not reversed by yohimbine. The inhibitory effect of CDS may act

through the non-adrenoceptor site. Agmatine showed only slightly potentiated effect on ADP-induced platelet aggregation even at the concentration as high as 10^{-4} M. Second, model of prejunctional α_2 -adrenoceptor of the rat vas deferens, CDS extract showed biphasic effects on electrically-evoked contraction of the rat vas deferens. Lower concentration showed inhibitory effect like clonidine whereas higher concentration enhanced the contractile response. The effect was not due to α_2 -adrenoceptor activation since idazoxan, an α_2 -adrenoceptor antagonist, did not modify the effect of CDS extract. Functional activity of CDS at imidazoline receptor was examined in platelet aggregation model compared to other imidazoline compounds, with or without α_2 -adrenoceptor activity. CDS extract and all imidazoline compounds were found to inhibit adrenaline-induced platelet aggregation mediated by non-adrenoceptor imidazoline sites. The inhibitory effect was more sensitive to catecholamine than ADP- stimulation. Nearly the end of the project, harmane was reported to be another candidate for CDS, however, this study did not found any significant effect of harmane in platelet aggregation model. In conclusion, CDS extract was not found to display any biological effects at α_2 -adrenoceptor, however, it may be an endogenous substance that regulates platelet hyperreactivity to adrenaline and imidazoline compound may be useful to prevent this condition. The exact chemical structure of CDS in the extract remained to be clarified.

Key words : clonidine-displacing substance (CDS), endogenous ligand, α_2 -adrenoceptor, imidazoline receptor

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA/10/2540

ชื่อโครงการ : การศึกษา clonidine-displacing substance และการออกฤทธิ์ที่ α_2 -adrenoceptor และที่ imidazoline receptor

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร. ดาราวรรณ ปิ่นทอง ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : scdpt@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : ธันวาคม 2540 – กรกฎาคม 2544

โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดสาร 'clonidine-displacing substance' (CDS) และศึกษาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ของสารนี้ที่ α_2 -adrenoceptors และที่ imidazoline receptors สาร CDS คาดว่าเป็นสารที่มีอยู่ในร่างกาย (endogenous substance) และออกฤทธิ์ที่ receptors ทั้งสอง โดยเปรียบเทียบกับ agmatine ซึ่งมีรายงานว่าเป็นสารสำคัญของ CDS งานวิจัยนี้ได้ทำการสกัด clonidine-displacing substance จากสมองหมู่น้ำหนักด้วย methanol และวิเคราะห์ CDS activity ของสารที่สกัดได้ในหน่วยเป็น unit โดยใช้เทคนิคทาง radioligand binding โดย 1 unit หมายถึงปริมาณสารสกัดที่สามารถแย่งที่ [3 H]-clonidine (1 nM) จับที่ตัวรับ α_2 -adrenoceptor ที่ porcine cerebral cortex membrane ได้ 50% ผลการศึกษาพบว่าสารสกัด CDS จากสมองหมู่น้ำหนัก มี activity 20 ไมโครลิตร/1 unit. หรือ 7.71 ± 1.96 unit/g tissue (n=5) นอกจากนี้สารสกัด CDS ยังสามารถจับกับตัวรับอิมิดาโซลีนด้วย affinity สูงกว่า ที่ α_2 -adrenoceptor ประมาณ 2.7 เท่า คุณสมบัติของสารสกัด CDS ในการออกฤทธิ์ที่ α_2 -adrenoceptor ได้ศึกษาโดยใช้ 2 model 1) การกระตุ้นการเกาะกันของเกร็ดเลือด (platelet aggregation) เปรียบเทียบกับ clonidine ซึ่งเป็น α_2 -adrenoceptor agonist และเปรียบเทียบผลการออกฤทธิ์กับ agmatine ซึ่งยังไม่มีการศึกษาการออกฤทธิ์ในระบบนี้ ผลการศึกษาพบว่า clonidine สามารถส่งเสริมฤทธิ์ของ adenosine diphosphate (ADP) ในการกระตุ้นการจับตัวของเกร็ดเลือด ซึ่งผลนี้ถูกยับยั้งได้โดย α_2 -adrenoceptor antagonist เช่น yohimbine แสดงว่าเป็นการออกฤทธิ์ผ่าน α_2 -adrenoceptors ส่วนสารสกัด CDS ให้ผล

yohimbine แสดงว่าเป็นการออกฤทธิ์ผ่าน α_2 -adrenoceptors ส่วนสารสกัด CDS ให้ผลตรงข้าม โดยยับยั้งการเกาะกันของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย ADP ซึ่งผลนี้มาจากการกระตุ้นที่ non-adrenoceptor ส่วน agmatine แม้ที่ความเข้มข้นสูงถึง 0.1 mM ไม่มีผลต่อการเกาะกันของเกร็ดเลือด 2) model การกระตุ้นที่ prejunctional α_2 -adrenoceptor ที่ rat vas deferens พบว่า clonidine ยับยั้ง twitch contractile response และผลนี้ถูกยับยั้งได้ด้วย idaxozan ส่วนสารสกัด CDS นั้นพบว่าการออกฤทธิ์เป็นแบบ biphasic คือที่ความเข้มข้นต่ำ CDS ยับยั้ง twitch contractile response แต่ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นกลับมีผลกระตุ้น contractile response ซึ่งผลนี้มาจากการกระตุ้นที่ non-adrenoceptor เช่นกัน การวิจัยนี้ไม่พบการออกฤทธิ์ของสารสกัด CDS ที่ α_2 -adrenoceptor

คุณสมบัติของสารสกัด CDS ในการออกฤทธิ์ที่ตัวรับอิมิดาโซลีนที่เกร็ดเลือดได้ทำการศึกษาและเปรียบเทียบกับสารที่มีสูตรโครงสร้างเป็น imidazoline พบว่าสารสกัด CDS และสารที่มีสูตรโครงสร้างเป็น imidazoline ยับยั้งการจับกันของเกร็ดเลือดเมื่อถูกกระตุ้นด้วย adrenaline สารสกัด CDS มีความไวต่อการยับยั้งการจับกันของเกร็ดเลือดเมื่อถูกกระตุ้นด้วย adrenaline มากกว่าเมื่อกระตุ้นด้วย ADP ดังนั้น CDS อาจเป็นสารที่มีในร่างกายและมีบทบาทป้องกันการตอบสนองของเกร็ดเลือดมากเกินไป (platelet hyperreactivity) ส่วนสารที่มีสูตรโครงสร้างเป็น imidazoline อาจมีประโยชน์ในการนำมาใช้ป้องกันภาวะดังกล่าว ในช่วงปลายของการวิจัยมีรายงานถึงสารสำคัญของ CDS อีกตัวคือ Harmane ซึ่งได้ทำการศึกษาต่อและพบว่า Harmane ไม่มีผลในการกระตุ้นเกร็ดเลือดเช่นเดียวกับ agmatine ซึ่งให้ผลแตกต่างจากสารสกัด ดังนั้นการค้นหายุทธศาสตร์โครงสร้างของสารสำคัญในสารสกัด CDS ยังคงต้องศึกษาต่อไป

คำหลัก : clonidine-displacing substance (CDS), การออกฤทธิ์ของสารนี้ในร่างกาย ตัวรับแอลฟา2-อตรีเนอจิก, ตัวรับอิมิดาโซลีน

บทนำ

Clonidine เป็นยาลดความดันเลือดอยู่ในกลุ่มที่มีสูตรโครงสร้างโมเลกุลเป็น imidazoline ring กลไกการออกฤทธิ์ในการลดความดันโลหิตของ Clonidine¹ เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับการกระตุ้น α_2 -adrenoceptors ที่สมอง ทำให้ลดการส่งสัญญาณ sympathetic จากสมอง, กระตุ้น postsynaptic α_2 -adrenoceptors ทำให้เกิด vasoconstriction และยังสามารถกระตุ้น presynaptic α_2 -adrenoceptors ทำให้ลดการปล่อย noradrenaline กลไกการออกฤทธิ์ที่แน่นอนของ Clonidine ยังไม่ทราบแน่ชัด ต่อมาพบว่านอกจาก Clonidine จะสามารถออกฤทธิ์โดยจับกับ α_2 -adrenoceptors แล้วยังสามารถจับกับ non-adrenoceptor imidazoline binding sites (NAIBS หรือ imidazoline receptor, IR) ที่สมอง^{2,3} มีรายงานในระยะต่อมาพบว่ากลไกในการลดความดันเลือดเกี่ยวข้องกับการจับกับ receptor นี้ โดยเฉพาะที่อยู่ภายในสมองส่วน rostral ventrolateral medulla ซึ่ง clonidine และสารที่มีโครงสร้างเป็น imidazoline เท่านั้นที่ออกฤทธิ์ ในขณะที่ catecholamines ซึ่งจับเฉพาะ adrenoceptor sites ไม่มีผลที่สมองส่วนนี้^{2,4} งานวิจัยต่อมาสนับสนุนว่า imidazoline receptor เป็น receptor กลุ่มใหม่ซึ่งสารพวก imidazol(e)ine เช่น clonidine สามารถจับและออกฤทธิ์ได้นอกเหนือจากที่ α_2 -adrenoceptors นอกจากนี้พบ imidazoline receptor ที่สมองแล้วต่อมายังพบที่ peripheral tissues^{5,6} อื่นๆ ดังนั้นจึงมีคำถามเกิดขึ้นว่าเมื่อร่างกายมี imidazoline binding sites สำหรับ clonidine จับแล้ว ร่างกายมีการผลิตสาร endogenous substance ที่สามารถจับกับ receptor นี้และมี biological activity อย่างไรหรือไม่

Clonidine-displacing substance (CDS)

จากปี ค.ศ.1984 Atlas และ Burstein^{7,8} พบสารสกัดจากสมองของวัวซึ่งสารนี้ไม่ใช่ catecholamines แต่สามารถจับกับ α_2 -adrenoceptor โดยไล่ที่ clonidine ออกจากตัวรับที่ cerebral cortex membrane ของหนู และวัวได้ จึงเรียกสารสำคัญนี้ว่า "clonidine-displacing substance" (CDS) ต่อมาพบว่าสารสกัดนี้สามารถไล่ที่ [³H]-para-aminoclonidine จาก binding site ที่สมองตรงส่วน rostral ventrolateral medulla (RVLM) membrane ซึ่งเป็น site ของ imidazoline receptor ด้วย affinity ที่สูงกว่าเมื่อจับที่ α_2 -adrenoceptor ถึง 30 เท่า⁹ และโดยใช้เทคนิคทาง radioligand binding พบว่า สาร CDS มีลำดับ potency ในการไล่ที่ agonist และ antagonist จับที่ตัวรับทั้ง 2 เช่นเดียวกับ clonidine ทำให้เชื่อว่าสมองสามารถสร้างสารที่คล้าย clonidine ได้

ต่อมาจึงได้มีการสกัดสาร CDS จากสมองและ peripheral tissues ต่างๆ^{10,11} ได้แก่ ที่ไต, ตับ, ปอด, ต่อมหมวกไต¹⁰ เลือด¹¹ หัวใจ, ลำไส้เล็ก¹² เป็นต้น การที่พบสาร CDS

ใน organ และ tissue ต่างๆ ยิ่งเป็นการสนับสนุนว่า CDS น่าจะเป็นสารที่ร่างกายสร้างขึ้นได้ และมีบทบาทใน tissue ต่างๆ เหล่านี้

Biological activity ของสาร CDS

จากรายงานแรกๆ ภายหลังที่พบสารสกัดตัวนี้พบว่าสามารถออกฤทธิ์ได้ทั้งที่ α_2 -adrenoceptor และที่ non-adrenoceptor เช่นกระตุ้น α_2 -adrenoceptor ที่ท่อน้ำน้ำเชื้อของหนูทำให้ยับยั้งการหดตัวของท่อน้ำน้ำเชื้อที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า¹³ สำหรับการออกฤทธิ์ที่ non-adrenoceptor พบว่าสารสกัด CDS กระตุ้นการหดตัวของ rat gastric fundus¹⁴ และ thoracic aorta¹¹, กระตุ้นการหลั่ง catecholamine จาก bovine adrenal chromaffin cells¹⁵ และเปลี่ยนแปลงความดันเลือดเมื่อฉีดโดยตรงเข้าสมองส่วน rostral ventrolateral medulla¹⁶ หรือฉีดเข้าสมองส่วน cerebrum¹⁷ ซึ่งผลการออกฤทธิ์เหล่านี้ไม่สามารถบล้างได้ด้วย α_2 -adrenoceptor antagonist ดังนั้นจึงคาดว่า CDS อาจเป็น endogenous substance ที่มีในร่างกายและร่างกายสามารถสร้างขึ้นได้และออกฤทธิ์ที่ imidazoline receptor อย่างไรก็ตามผลการศึกษาดังกล่าวยังเป็นที่ยขัดแย้งระหว่างกลุ่มวิจัยทั้ง 2 (Reis และ Atlas) ซึ่งอาจเนื่องมาจากมีความแตกต่างของสารสำคัญและสารที่ปนอยู่ในสารสกัดซึ่งใช้วิธีการเตรียมที่แตกต่างกัน^{16,17}

สูตรโครงสร้างทางเคมีของ CDS

ในช่วงปี ค.ศ.1986-89 กลุ่มของ Reis ได้ตรวจหา CDS ใน tissue ต่างๆ เป็น immunoreactive clonidine-displacing substance โดยตั้งสมมุติฐานว่าสาร CDS ต้องมีสูตรโครงสร้างเป็น imidazoline แล้วพัฒนา polyclonal antibody ต่อ para-aminoclonidine ในการ detect สาร CDS ในร่างกาย อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันยังไม่พบสูตรโครงสร้างทางเคมีของ CDS แม้ว่าในปี ค.ศ.1994 กลุ่มของ Reis ได้ทำการสกัดสาร แล้วผ่านขั้นตอนการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างได้ออกมาเป็นสาร agmatine (decarboxylated arginine)¹⁸ และพบว่าสารนี้ก็สามารถจับได้ที่ตัวรับทั้ง 2 เช่นกัน และมี biological activity ในการกระตุ้นการหลั่ง catecholamine จาก bovine adrenal chromaffin cells ได้เช่นเดียวกับสารสกัด CDS¹⁸ แต่ต่อมาพบว่า agmatine มีคุณสมบัติในการจับที่ตัวรับทั้ง 2 ด้วยลำดับ potency ในการไล่ที่ agonist และ antagonist แตกต่างจาก clonidine และ สารสกัด CDS หรือสาร immunoreactive clonidine-displacing substance เอง นอกจากนี้ agmatine ยังไม่จับกับ antibody ที่ใช้ detect CDS¹⁹

การออกฤทธิ์ของ Agmatine มีรายงานพบเฉพาะที่ imidazoline receptor เช่น กระตุ้นการหลั่ง catecholamine จาก bovine adrenal chromaffin cells¹⁸, เพิ่มความดันโลหิตเมื่อฉีดเข้าไขสันหลังของหนู²⁰ ส่วน action ของ agmatine ที่ α_2 -adrenoceptor นั้นไม่พบ evidence แต่อย่างใด²¹ ข้อมูลจากรายงานเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า agmatine อาจไม่ใช่สารที่เป็นตัวแทนของ CDS เนื่องจากออกฤทธิ์แตกต่างกัน และคุณสมบัติของ agmatine ที่ imidazoline

binding site มีทั้งให้ผลที่เหมือน¹⁸ และแตกต่าง^{20,22} จาก CDS ทั้งในแง่ binding affinity และ function ในระยะหลัง agmatine จึงลบลบบาทและความเป็นไปได้ที่จะเป็นตัวแทนของ CDS ลง การค้นหาสูตรโครงสร้างของ CDS ยังคงดำเนินต่อไป ในช่วงปี ค.ศ.2000 ได้มีรายงานการค้นพบสารที่คาดว่าเป็นสารสำคัญของ CDS อีกครั้ง คือสาร Harmane²³ การศึกษาคุณสมบัติของสารนี้ยังไม่มีรายงานมากนัก พบเพียงลดความดันโลหิตเมื่อฉีดโดยตรงเข้า rostral ventrolateral medulla²⁴ เท่านั้น

Imidazoline receptor (IR)

Imidazoline preferring site เป็น non-adrenoceptor ซึ่งสารที่มีสูตรโครงสร้างเป็น imidazoline จะจับได้ ส่วน catecholamine ไม่มีผลที่ site นี้²⁵ IR นี้ สามารถ label ได้ด้วย imidazoline compound เช่น [³H]-Clonidine, [³H]-moxonidine, [³H]-idazoxan ปัจจุบันสามารถแยกได้เป็น 3 subclass คือ

- I₁ site พบที่ adrenal chromaffin cell¹⁵, rostral ventrolateral medulla²⁶, human platelet membrane²⁷ เป็นต้น I₁ site จะมี high affinity ต่อ [³H]-clonidine binding, [³H]-para-amino clonidine

- I₂ site พบที่ porcine kidney cortex membrane⁶, cortical astrocytes^{28,29} site นี้มี low affinity ต่อ [³H]-Clonidine แต่จะมี high affinity ต่อ [³H]-idazoxan, [³H]-BFI

- I₃ site พบที่ pancreatic β -cell³⁰ และที่ RIN-5AH³¹ จัดเป็น I₃ เนื่องจากมีคุณสมบัติแตกต่างจาก I₁ และ I₂ receptor เต็ม imidazoline binding site ที่ pancreatic β -cell เชื่อว่าเป็น I₂ และมี I₁ receptor density น้อยมากในเซลล์นี้ แต่ต่อมาพบว่า I₂ ligand เช่น idazoxan ไม่มีผลกระตุ้นการหลั่ง insulin ในขณะที่ efaroxan, antazoline เป็น insulin secretagogue³² จึงจัดเป็น subclass ใหม่

α_2 -adrenoceptor และ imidazoline receptor มักจะพบอยู่ด้วยกันใน tissue ต่างๆ อย่างไรก็ตาม tissue ที่มี α_2 -adrenoceptor แต่ไม่มี/หรือมี imidazoline receptor ร่วมด้วยแต่ในสัดส่วนที่น้อยมาก ได้แก่ cerebral cortex Clonidine ที่จับ receptor ในบริเวณนี้ จะพบเฉพาะ α_2 -adrenoceptor ในทางกลับกัน ที่ adrenal chromaffin cell จะพบเฉพาะ imidazoline receptor ไม่พบ α_2 -adrenoceptor^{33,34}

Functions ของ IR ที่มีรายงานได้แก่

1. ที่ central nervous system สารที่มีสูตรโครงสร้างเป็น imidazoline จะเกี่ยวข้องกับการควบคุมความดันโลหิต ในบริเวณที่เฉพาะของสมอง เช่นที่ nucleus reticularis lateralis^{2,35} ซึ่ง Rilmenidine และ moxonidine มี high affinity ที่ site นี้ และได้มีการพัฒนาเป็นยาลดความดัน³⁶ และออกสู่ตลาดในเวลาต่อมา

2. สาร imidazoline กระตุ้น imidazoline receptor (IR) ส่งผลยับยั้ง acetylcholine กระตุ้น catecholamine release จาก adrenal chromaffin cell โดยการกระตุ้น IR³⁷
4. การกระตุ้น IR ด้วยสาร imidazoline จะกระตุ้นการหลั่ง insulin โดยการ block ATP-sensitive K⁺ channel ใน islet β -cell³⁸
5. นอกจากนี้ยังพบ presynaptic IR ที่ adrenal medulla³⁹ ซึ่งเมื่อ block α_2 -adrenoceptor แล้ว การกระตุ้นที่ imidazoline receptor จะให้ผลยับยั้งการหลั่ง noradrenaline

Imidazoline receptor ที่พบใน tissue ต่างๆเหล่านี้จะเป็น target ในการออกฤทธิ์ของ endogenous ligand CDS นี้

งานวิจัยเกี่ยวกับ imidazoline receptors และ clonidine-displacing substance ในระยะแรกจะเน้นที่บทบาทในการควบคุมความดันเลือดเป็นหลัก ใน model อื่นๆเช่น กระตุ้นการหลั่ง insulin จาก islet cell และการหลั่ง catecholamines จาก adrenal chromaffin cells ส่วน model อื่นนอกจากนี้ยังเป็นที่โต้แย้ง ต่อมารายงานในระยะหลังพบความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงจำนวน imidazoline receptor บนเกร็ดเลือดในคนไข้อาการซึมเศร้า (depressive patient) และในผู้ที่ฆ่าตัวตาย และจำนวน receptor ลดลงภายหลังการรักษาด้วย antidepressive drug⁴⁰ บทบาทของ imidazoline receptor ที่เกร็ดเลือดจึงได้รับความสนใจในขณะนี้ งานวิจัยในปีที่ 3 จึงเลือกศึกษา imidazoline receptor ใน model ของ human platelet ให้ลึกซึ้งยิ่งขึ้น โดยการกระตุ้นด้วยสารที่มีสูตรโครงสร้างเป็น imidazoline อื่นๆที่นอกเหนือจาก clonidine และ clonidine-displacing substance ด้วย.

ดังนั้นงานวิจัยในโครงการนี้จึงมุ่งศึกษาสาร CDS โดยการสกัดสารและศึกษาการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารนี้ และเข้าใจถึงบทบาทของสารตัวนี้ในการควบคุมระบบต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้น α_2 -adrenoceptor และโดยเฉพาะ *receptor กลุ่มใหม่คือ imidazoline receptor ซึ่งจะเป็นเป้าหมายใหม่ในการพัฒนายาตัวใหม่ที่ออกฤทธิ์ที่ receptor นี้ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. การสกัดสารนี้จากสมองหมู(วัว) แล้วนำสารสกัดที่ได้มาหา CDS activity ซึ่งวัดจากความสามารถของสารสกัดในการแย่งที่ clonidine จับที่ α_2 -adrenoceptors โดยใช้เทคนิค radioligand binding assay

2. ศึกษาคุณสมบัติของ CDS ในการจับที่ตัวรับอิมิดาโซลีน

3. ศึกษาคุณสมบัติของ CDS ในการออกฤทธิ์กระตุ้นที่ α_2 -adrenoceptor เนื่องจากยังไม่มีรายงานสนับสนุนมากนัก จึงใช้ model ของ α_2 -adrenoceptor ได้แก่

3.1 model การกระตุ้นการจับตัวของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย adenosine diphosphate โดยเปรียบเทียบกับสารสกัดกับ clonidine ซึ่งเป็น α_2 -adrenoceptor agonist และมีสูตรโครงสร้างเป็น imidazoline และเปรียบเทียบผลการออกฤทธิ์กับ agmatine (หรือ harmane ซึ่งมีรายงานว่า เป็น active compound ของสารสกัดนี้แต่ยังไม่มีการศึกษาการออกฤทธิ์ในระบบนี้)

3.2 model ที่ 2 ศึกษาคุณสมบัติของ CDS ในการออกฤทธิ์กระตุ้นที่ α_2 -adrenoceptor ที่ prejunctional α_2 -adrenoceptor ของ rat vas deferens เปรียบเทียบกับ clonidine และ agmatine

4. ศึกษาคุณสมบัติของ CDS ในการออกฤทธิ์กระตุ้นที่ imidazoline receptor ที่เกร็ดเลือด เปรียบเทียบกับ clonidine และสารที่มีสูตรโครงสร้างเป็น imidazoline อื่นๆทั้งที่มีหรือไม่มีฤทธิ์ที่ α_2 -adrenoceptor เมื่อเกร็ดเลือดถูกกระตุ้นด้วย platelet aggregating agent 2 ตัวคือ noradrenaline และ adenosine diphosphate (ADP)

(การที่เลือก model การจับตัวของเกร็ดเลือดเนื่องจากผลการทดลองในข้อ 3 พบว่าการออกฤทธิ์ของ CDS ไม่ผ่านการกระตุ้น α_2 -adrenoceptor แต่ผ่านทาง non-adrenoceptor)

วิธีการทดลอง

1 การสกัดสาร clonidine-displacing substance จากสมองของหนู

วิธีการ

- 1.1 เก็บสมองของหนูจากโรงฆ่าสัตว์ โดยเก็บทันทีหลังจากฆ่าแล้วบรรจุในถังน้ำแข็งเพื่อการขนส่ง
- 1.2. สมองครึ่งซีก (หรือน้ำหนักประมาณ 110-160 กรัม) นำมาตัดเอาส่วน cerebellum และ pia mater ออก เอาเฉพาะส่วน cerebral cortex ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปปั่นละเอียดในน้ำกลั่นโดยใช้ Polytron homogenizer (model LS-10-35, Kinematica GmbH, Switzerland)
- 1.3. ทำการแยก homogenates โดยการปั่นแยก ที่ 65000 g (Sorvall[®] RC-5C Plus, Dupont) แล้วนำ supernatant มาต้มประมาณ 40-60 นาที เพื่อให้ตกตะกอนโปรตีนและลดปริมาณ จากนั้นทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- 1.4. สารละลายที่ได้นำมาปั่นแยกอีกครั้งที่ 65000 g เป็นเวลา 20 นาที แยก supernatant แล้วทำให้แห้งโดยใช้ speedvacuum (Speed Vac[®] plus SC110A).
- 1.5. สกัด CDS ด้วย methanol นำ material หลังจากทำให้แห้งด้วย speedvacuum มาสกัดด้วย methanol โดย sonication ที่อุณหภูมิห้อง ปั่นแยกเอาแต่ supernatant ใส่ แล้วนำมาระเหย methanol โดยใช้ rotary evaporator
- 1.6. residue ที่ได้นำมาละลายใน double distilled water, ทำให้แห้งอีกทีโดย freeze-dry สุดท้ายจะได้สารสกัดที่เป็น crude CDS extract นำไปละลายในน้ำกลั่นด้วยสัดส่วนปริมาตรที่พอเหมาะเพื่อหา CDS activity

2. การเตรียม porcine cerebral cortex membranes ซึ่งเป็น site ของ α_2 -adrenoceptor

วิธีการ

- 2.1 ทำเช่นเดียวกับข้อ 1.1 และ ข้อ 1.2 ในหัวข้อ 1 การสกัดสาร clonidine-displacing substance จากสมองของหนู
- 2.2 ทำการแยก homogenates โดยการปั่นแยก ที่ 20000 g ทั้ง supernatant นำ pellet มาละลายใหม่ใน Tris buffer และปั่นละเอียดอีกครั้งด้วย homogenizer
- 2.3 ปั่นแยก homogenates อีกครั้ง ทั้ง supernatant นำ pellet ที่เหลือมาชั่งน้ำหนักและละลายใน Tris buffer ด้วยปริมาตรที่เหมาะสม เช่น 6 volume
- 2.4. แบ่งสารละลายนี้เป็นส่วนๆ ปริมาตรประมาณ 3 ml สำหรับใช้ใน Radioligand binding assay

3. ทดสอบคุณสมบัติของ CDS ใน extract วัด CDS activity โดยใช้ Radioligand binding assay

วิธีการ

3.1 incubate porcine cerebral cortex membrane, [³H]-clonidine (1 nM) และ CDS ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน Tris buffer (pH 7.4) สำหรับ total binding จะ incubate porcine cerebral cortex membrane และ [³H]-clonidine โดยไม่เติม CDS ส่วนค่า non-specific binding วัดจากการ incubate กับ 10⁻⁴ M noradrenaline

3.2 หลังจาก incubate ที่ 28 °C 45 นาที แยก bound form radioactivity จาก free form โดยใช้ vacuum filtration บน Whatman GF/B glass fibre filters ล้าง filters 2-3 ครั้งด้วย Tris buffer

3.3 วัด radioactivity โดย scintillation spectrometry

3.4 หาปริมาณ CDS activity จาก IC₅₀ จาก displacement curve คำนวณ CDS activity เป็น unit/g wet weight

CDS activity คิดเป็น unit โดย 1 unit ของ CDS = ปริมาณ CDS (ไมโครลิตร) ที่สามารถแทนที่ 1 nM [³H]-clonidine binding ออกจาก α_2 -adrenoceptor sites บน porcine cerebral cortex membrane ได้ 50%

4. การเตรียม renal cortex membrane จากไตของหนู ซึ่งเป็น site ของ imidazoline receptor ใช้ศึกษาคุณสมบัติของ clonidine-displacing substance ในการจับ (binding affinity) ที่ imidazoline binding site โดยใช้ receptor binding technique

วิธีการ

4.1 เก็บไตหนูจากโรงฆ่าสัตว์ โดยเก็บทันทีหลังจากฆ่าแล้วบรรจุในถังน้ำแข็งเพื่อการขนส่ง

4.2 ตัดครึ่งซีก เอาส่วน membrane รอบนอกออก แยกส่วน cortex ออกจาก medulla แล้วตัดส่วน cortex เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปปั่นละเอียดใน ice-cold Tris buffer (50mM Tris HCl, 5.0 mM EDTA; pH 7.4) โดยใช้ Polytron homogenizer (Kinematica GmbH) setting 6; 3x30 วินาที)

4.3 กรอง homogenate ด้วย nylon mesh ขนาด 25 μ m เพื่อกำจัด particle ใหญ่ๆทิ้ง

4.4 centrifuge homogenate ด้วย Sorvall[®] RC-5C plus, Dupont (Rotor SS-34) ที่ 20,000 g เป็นเวลา 15 นาทีที่ 4 °C

4.5 ทิ้ง supernatant เอาส่วน pellet มาละลายใน ice-cold Tris buffer (50mM Tris HCl, 5.0 mM EDTA; pH 7.4) แล้ว centrifuge 15 นาทีที่ 4 °C

4.6 Pellet สุดท้ายที่ได้ละลายใน 10 volume ของ Tris assay buffer (50mM Tris HCl, 5.0 mM EDTA; pH 7.4) แล้วเก็บไว้ที่ -70°C membrane จะอยู่ได้นาน 1-3 เดือนโดยไม่เสียสภาพ

5. ศึกษาคุณสมบัติของ CDS ในการจับที่ imidazoline receptor โดยใช้ Radioligand binding assay

วิธีการ

- 5.1 incubate porcine renal cortex membrane, [^3H]-idazoxan (0.3 nM) และ CDS ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน Tris buffer (pH 7.4) สำหรับ total binding จะ incubate porcine renal cortex membrane และ [^3H]-idazoxan โดยไม่เติม CDS ส่วนค่า non-specific binding วัดจากการ incubate กับ 10^{-4}M cirazoline
- 5.2 หลังจาก incubate ที่ 28°C 45 นาที แยก bound form radioactivity จาก free form โดยใช้ vacuum filtration บน Whatman GF/B glass fibre filters ล้าง filters 2-3 ครั้งด้วย Tris buffer
- 5.3 วัด radioactivity โดย scintillation spectrometry

6. ศึกษาและตรวจสอบความสามารถของสารสกัด CDS ในการกระตุ้น α_2 -adrenoceptors

- 6.1 Model ของการกระตุ้นการจับตัวของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย adenosine diphosphate (ADP) สารที่มีคุณสมบัติเป็น α_2 -adrenoceptor agonist จะสามารถเสริมฤทธิ์ ADP ในการกระตุ้นการจับตัวของเกร็ดเลือด และผลการออกฤทธิ์จะถูกยับยั้งโดย α_2 -adrenoceptor antagonist เช่น yohimbine

วิธีการ

- 6.1.1 เก็บเลือดจากผู้บริจาคที่ธนาคารเลือดลงใน siliconized glass test tube ที่มี 3.2% sodium citrate ด้วยสัดส่วนเลือด 9 ส่วน : sodium citrate 1 ส่วน
- 6.1.2 นำมาปั่นแยกเอาพลาสมาที่มีเกร็ดเลือดเข้มข้น (platelet-rich plasma) โดยการ centrifuge ที่ 800 g 10 นาที (Beckman J-6B)
- 6.1.3 วัด platelet count โดยใช้ Coulter thrombocounter โดยปรับให้มีความเข้มข้นของเกร็ดเลือด $2.5\text{--}3.0 \times 10^5$ เกร็ดเลือด/ μL ด้วยพลาสมาที่ปราศจากเกร็ดเลือด (platelet-poor plasma)
- 6.1.4 ศึกษาการจับตัวของเกร็ดเลือดโดยใช้ chronolog aggregometer (Model 550, Chronolog corporation, Harverton PA, USA) ดูการเปลี่ยนแปลงของ light transmission เมื่อถูกกระตุ้นด้วย ADP เกร็ดเลือดจะจับตัวกันและเพิ่มการผ่านของแสง บันทึกผล
- 6.1.5 จากนั้นกระตุ้นด้วย α_2 -adrenoceptor agonist เช่น clonidine (10^{-8} – 10^{-6}M)
- 6.1.6 ในการศึกษาผลของ antagonist เพื่อตรวจสอบว่าผลต่อการจับตัวกันของเกร็ดเลือดเกิดจากการกระตุ้น α_2 -adrenoceptor ทำได้โดยการเติม α_2 -adrenoceptor antagonist เช่น yohimbine (10^{-6}M) และ incubate 1 นาทีก่อนเติม agonist บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงการ light transmission อย่างน้อย 5 นาที

9. การคำนวณข้อมูล (Data analysis)

IC₅₀ ของ displacement curve (สารสกัด CDS ไส้ที่ [³H]-clonidine หรือ [³H]-idazoxan ได้ 50%) หามาจาก non-linear least square method โดยใช้ Kaleidograph (Synergy software) on a MacIntosh computer. แล้วเปลี่ยนค่า IC₅₀ เป็น inhibition constant (K_i) โดยใช้ Cheng&Prusoff equation $K_i = IC_{50} / (1 + [L] / K_d)$

[L] เป็นความเข้มข้นของ radioligand

K_d เป็น dissociation constant

ใน model การหดตัวของ rat vas deferens Response ต่อตัวกระตุ้น (agonist) คือ clonidine (10⁻⁹–10⁻⁸ M) หรือ สารสกัด CDS (10⁻³–10¹ unit/ml) โดยคำนวณเป็น percentage ของ control contractile response จากการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า ค่า negative logarithm ของความเข้มข้นของตัวกระตุ้นที่ให้ผล 50% ของ maximum response คือค่า pD₂ คำนวณมาจาก logistic equation.

ใน model การจับกันของเกร็ดเลือดเมื่อกระตุ้นด้วยสารต่างๆ ผลการส่งเสริมหรือยับยั้งการจับกันของเกร็ดเลือดเทียบกับเมื่อกระตุ้นด้วย aggregating agent เช่น noradrenaline หรือ ADP ซึ่งคิดเป็น 100%

ข้อมูลแสดงเป็น mean ± SEM จากอย่างน้อยที่สุด 5 experiment (ยกเว้น ใน model ของ rat vas deferens น้อยที่สุด 4) ค่าเปรียบเทียบทางสถิติโดยใช้ Student's t test ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจะถือว่ามีความสำคัญทางสถิติที่ p<0.05

6.1.7 เปรียบเทียบผลที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ agmatine หรือ Harmane กระตุ้น และเมื่อใช้สารสกัด CDS กระตุ้น

6.2. ศึกษาความสามารถของสารสกัด CDS ในการกระตุ้น prejunctional α_2 -adrenoceptors ที่ rat vas deferens โดย α_2 -adrenoceptor agonist ยับยั้งการหลั่ง neurotransmitter และการหดตัวของท่อน้ำเชื้อที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า

วิธีการ

6.2.1 ใช้ส่วน prostatic end ของท่อน้ำเชื้อของหนู incubate ใน oxygenated, ice-cold Krebs-Henseleit saline (NaCl 118.4 mM, KCl 4.7mM, CaCl_2 1.25, MgSO_4 1.2 mM, NaHCO_3 24.9mM KH_2PO_4 1.2 และ glucose 11.1) 5 ml ใน organ bath

6.2.2 ยึดปลายข้างหนึ่งของส่วน prostatic end ของท่อน้ำเชื้อไว้(ยาวประมาณ 2cm)กับ platinum wire electrode และอีกข้างหนึ่งต่อกับ Grass FT-03 isometric transducer ซึ่งต่อกับ Grass Polygraph

6.2.3 หลังจาก equilibrate 30 นาที apply resting tension ที่เหมาะสม การหดตัวของท่อน้ำเชื้อถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยSRI stimulator (transmural stimulation 0.1-0.2 ms duration, 0.05 Hz, 10 volts) และบันทึกความเปลี่ยนแปลงการหดตัวของท่อน้ำเชื้อ

6.2.4 เติมสารที่จะทดสอบเช่น สารสกัดCDS, α_2 -adrenoceptor antagonist เปรียบเทียบผลต่อการหดตัวของท่อน้ำเชื้อที่ถูกกระตุ้นโดย α_2 -adrenoceptor agonist, clonidine และ agmatine

7. ศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัด CDS ที่ imidazoline receptor เปรียบเทียบกับสารที่เป็น imidazoline และ non-imidazoline adrenergic agents ใน human platelet โดยการกระตุ้นด้วย adrenaline และ ADP

7.1 เก็บเลือดจากผู้บริจาคที่ธนาคารเลือดลงใน siliconized glass test tube ที่มี 3.2% sodium citrate ด้วยสัดส่วนเลือด 9 ส่วน : sodium citrate 1 ส่วน

7.2 นำมาปั่นแยกเอาพลาสมาที่มีเกร็ดเลือดเข้มข้น (platelet-rich plasma) โดยการ centrifuge ที่ 800 g 10 นาที (Beckman J-6B) แยกเอาส่วนบนมา ส่วนล่างนำไป centrifuge ต่อที่ 3600 g 15 นาที แยกเอาส่วนใสมาเป็นพลาสมาที่ปราศจากเกร็ดเลือด (platelet-poor plasma)

7.3 วัด platelet count โดยใช้ Coulter thrombocounter โดยปรับให้มีความเข้มข้นของเกร็ดเลือด $2.5-3.0 \times 10^5$ เกร็ดเลือด/ μl ด้วยพลาสมาที่ปราศจากเกร็ดเลือด

7.4 ศึกษาการจับตัวของเกร็ดเลือดโดยใช้ chronolog aggregometer (Model 550, Chronolog corporation, Harverton PA, USA) โดย incubate เกร็ดเลือดที่ 37°C ใน chamber ของเครื่อง

7.5 จากนั้นเติม agonist ซึ่งในการทดลองนี้เป็น imidazoline agents ได้แก่ clonidine, tolazoline, antazoline, idazoxan หรือสารสกัด CDS

7.6 ในการทดสอบว่าผลที่ได้เกี่ยวข้องกับการกระตุ้น α_2 -adrenoceptor หรือไม่นั้น α_2 -adrenoceptor antagonist เช่น yohimbine จะเติมก่อน agonist และ incubate 1 นาที

7.7 หลังจากนั้นกระตุ้นด้วย adrenaline/noradrenaline หรือ adenosine diphosphate (ADP) บันทึกผลการเปลี่ยนแปลง light transmission จากการกระตุ้นด้วย aggregating agent (catecholamines หรือ ADP) และ เมื่อมี imidazoline agents กระตุ้นร่วมด้วย

8. วัสดุวิทยาศาสตร์ (Materials)

Idazoxan hydrochloride (FW 240.7), Clonidine (2-(2,6-Dichloroaniline)-2-imidazoline hydrochloride (FW 266.6), Adenosine-5'-diphosphate sodium salt from equine muscle (FW 427.2), Yohimbine hydrochloride (FW 390.9), Antazoline hydrochloride (FW 301.8), ($\pm$)Arterenol (($\pm$)-Norepinephrine FW 319.3), Tolazoline hydrochloride (FW 196.7), Cirazoline HCl (MW 252.75), agmatine (1- amino-4-guanidinobutane) sulfate salt (FW 228.3), Harmane hydrochloride (2-methyl- β -carboline; 1-methyl-9H pyrido[3,4- β]indole)Norharmane hydrochloride (9H pyrido[3,4- β]indole) and Sodium citrate ซื้อจาก Sigma.

Methanol HPLC grade (Baker Analyzed®, F.W. 32.04) Trizma® hydrochloride anhydrous M.W.157.6, ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA).

[Benzene ring ^3H]-clonidine hydrochloride, specific activity 70.5 Ci/mmol, [^3H]-idazoxan ([^3H]-RX781094), specific activity 45.0 Ci/mmol ซื้อจาก NEN DuPont, Poly FlourTM (Scintillation fluid), Packard.

คุณสมบัติของ imidazoline and nonimidazoline α -adrenergic agents ที่ใช้ในการศึกษามีดังนี้ :

Imidazoline agents	Clonidine (α_2 -adrenergic partial agonist)
	Idazoxan (α_2 -adrenergic antagonist)
	Antazoline (devoid of α_2 -adrenergic activity)
	Tolazoline (α_1 -adrenergic antagonist)
Non-imidazoline agent Yohimbine	(α_2 -adrenergic antagonist)

กิจกรรม/ ขั้นตอนการทำงาน	เดือน											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
15. เตรียม rat vas deferens model								←→				
16. ทดสอบ CDS effect ใน model rat vas deferens									←→			
17. วิเคราะห์ผลการทดลอง											←→	
18. รายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 4 ปีที่ 3												←→
19. สกัดสาร CDS				←→								
20. เตรียม membrane สำหรับ radioligand binding				←→								
21. ทดสอบ CDS activity ของสารสกัด lot ต่างๆ				←→								
22. เตรียมงานตีพิมพ์			←→									
23. รายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 5						←→						
24. ศึกษา CDS effect ที่ imidazoline receptor						←→						
25. เสนอผลงานปลายปีที่ 3 ปีที่ 4											←→	
26. ศึกษา CDS effect ที่ imidazoline receptor (ต่อ)		←→										
27. วิเคราะห์ผลการทดลองทั้งหมด				←→								
28. เตรียมงานตีพิมพ์			←→									
29. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์				←→								
30. เตรียมงานตีพิมพ์เพิ่มเติม					←→							

ผลการทดลอง

1. คุณสมบัติของสารสกัด CDS

จากการสกัด CDS จากสมอหมี 5 สมอ พบว่ามีค่าเฉลี่ย CDS activity ประมาณ 7.71 ± 1.963 unit/g wet weight tissue (n=5)

สารสกัด CDS สามารถ ไล่ที่ [3 H]-clonidine จาก α_2 -adrenoceptor binding site ที่ cerebral cortex membrane แสดงว่าสารสกัดสามารถจับได้ที่ α_2 -adrenoceptor binding site และไล่ที่ [3 H]-clonidine ด้วย IC_{50} (Inhibitory concentration ที่ 50%) 20.6 ± 2.958 μ l/ml (n=16) ซึ่งคือปริมาณที่เท่ากับ 1 unit ของ CDS activity

นอกจากนี้สารสกัด CDS ยังสามารถไล่ที่ [3 H]-idazoxan จาก porcine kidney cortex membrane ซึ่งเป็น imidazoline binding site ด้วย IC_{50} 7.724 ± 1.635 μ l /ml (n=10) จากค่า IC_{50} แสดงว่าสารสกัด CDS มีความสามารถในการจับที่ imidazoline receptor มากกว่าที่ α_2 -adrenoceptor ถึง 2.7 เท่า ($p < 0.05$) ดังกราฟแสดงในรูปที่ 1

**Competitive binding of CDS at α_2 -adrenoceptors
on porcine cerebral cortex membrane and at imidazoline receptor
on porcine renal cortex membrane**

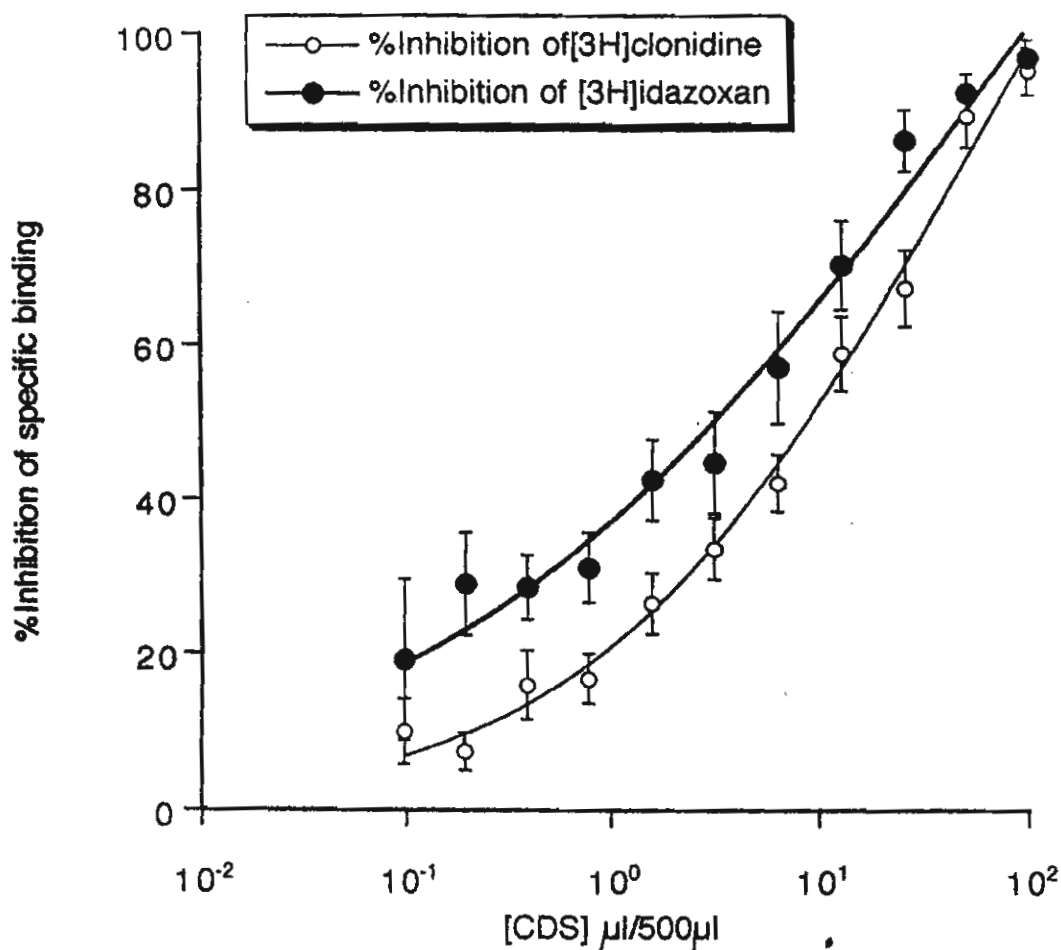


Figure 1 Competitive binding of porcine brain methanolic CDS extract against 1 nM of [^3H]- clonidine binding to porcine cerebral cortex membranes (O) and against 0.3 nM of [^3H]-idazoxan binding to porcine renal cortex membranes (●) Nonspecific binding was determined in the presence of 10^{-4} M arterenol (NA) for α_2 -adrenoceptors and in the presence of 10^{-4} M of cirazoline for imidazoline receptors. The concentration of CDS is expressed in μl of extract per 500 μl assay volume. The results shown are the mean $\pm$ SEM of % inhibition of radioligand binding from 16 experiments of porcine cerebral cortex and 10 experiments for porcine renal cortex.

2. ศึกษาและตรวจสอบความสามารถของสารสกัด CDS ในการกระตุ้น α_2 -adrenoceptors

2.1 Model ของการจับตัวของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย ADP

2.1.1 ผลของ α_2 -adrenoceptor agonist เช่น clonidine

ใน model การกระตุ้นการจับกันของเกร็ดเลือดพบว่าสารที่เป็น α_2 -adrenoceptor agonist เช่น clonidine สามารถส่งเสริมฤทธิ์ ของ $1\ \mu\text{M}$ adenosine diphosphate (ADP) ในการกระตุ้นการจับตัวของเกร็ดเลือด ซึ่งเห็นผลได้ชัดที่ความเข้มข้น 3×10^{-7} – 10^{-6} M clonidine ผลนี้ถูกยับยั้งได้โดย α_2 -adrenoceptor antagonist เช่น yohimbine แสดงว่าเป็นการออกฤทธิ์ผ่าน α_2 -adrenoceptors ส่วนสารสกัด CDS ยับยั้งการจับกันของเกร็ดเลือดซึ่งตรงข้ามกับ clonidine

รูปที่ 2 แสดงถึง clonidine สามารถส่งเสริมฤทธิ์ ของ adenosine diphosphate (ADP) $1\ \mu\text{M}$ ในการกระตุ้นการจับตัวของเกร็ดเลือด ซึ่งผลเป็นแบบ concentration-dependent

Clonidine ลำพังเมื่อไม่มี ADP กระตุ้น จะไม่เห็นผลต่อการจับตัวของเกร็ดเลือด(ไม่ได้แสดงในกราฟ)

รูปที่ 3 แสดงถึงผลการกระตุ้นการจับตัวของเกร็ดเลือดโดย clonidine ถูกยับยั้งได้ด้วย α_2 -adrenoceptor antagonist (10^{-6} M) yohimbine

Effect of clonidine on ADP (1 μ M)-induced platelet aggregation

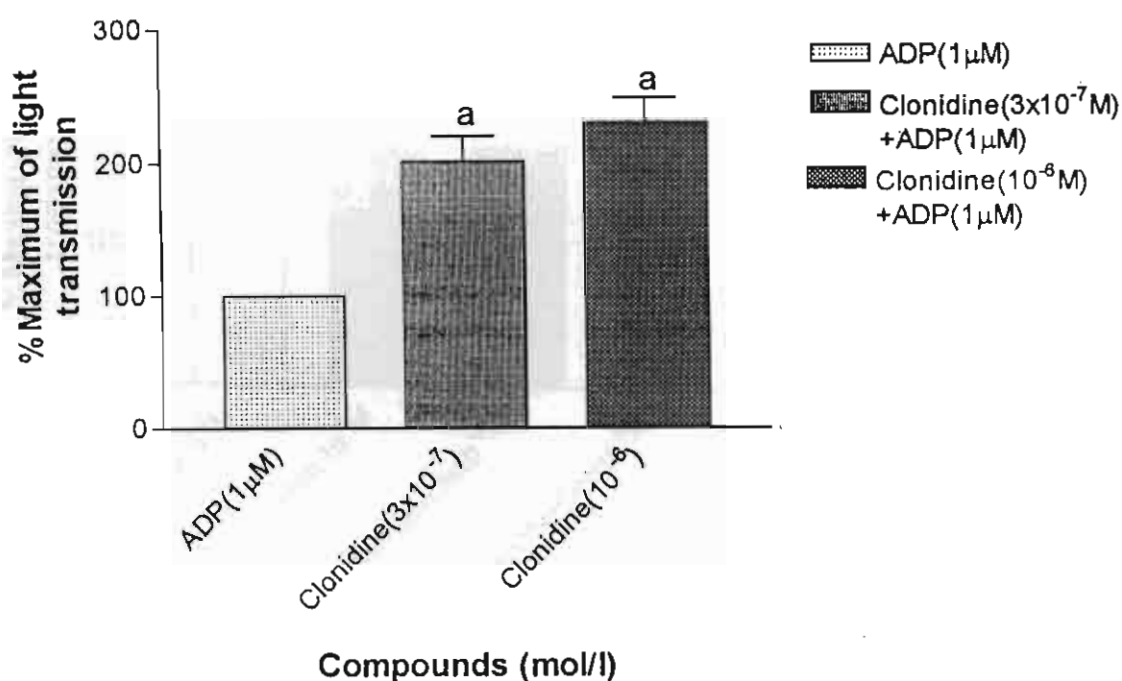


Figure 2 The potentiation effect of clonidine on ADP-induced human platelet aggregation. Platelet-rich plasma (PRP) was preincubated with clonidine (3×10^{-7} or 10^{-6} M) 1 min before addition of 1 μ M ADP, in a final assay volume of 250 μ l.

The effect of clonidine stimulation is shown as percentage of 1 μ M ADP response. The value shown are mean $\pm$ SEM (n=14).

a : represents statistical significant difference from the effect of 1 μ M ADP stimulation at $p < 0.05$.

Effect of yohimbine on clonidine potentiated ADP-induced platelet aggregation

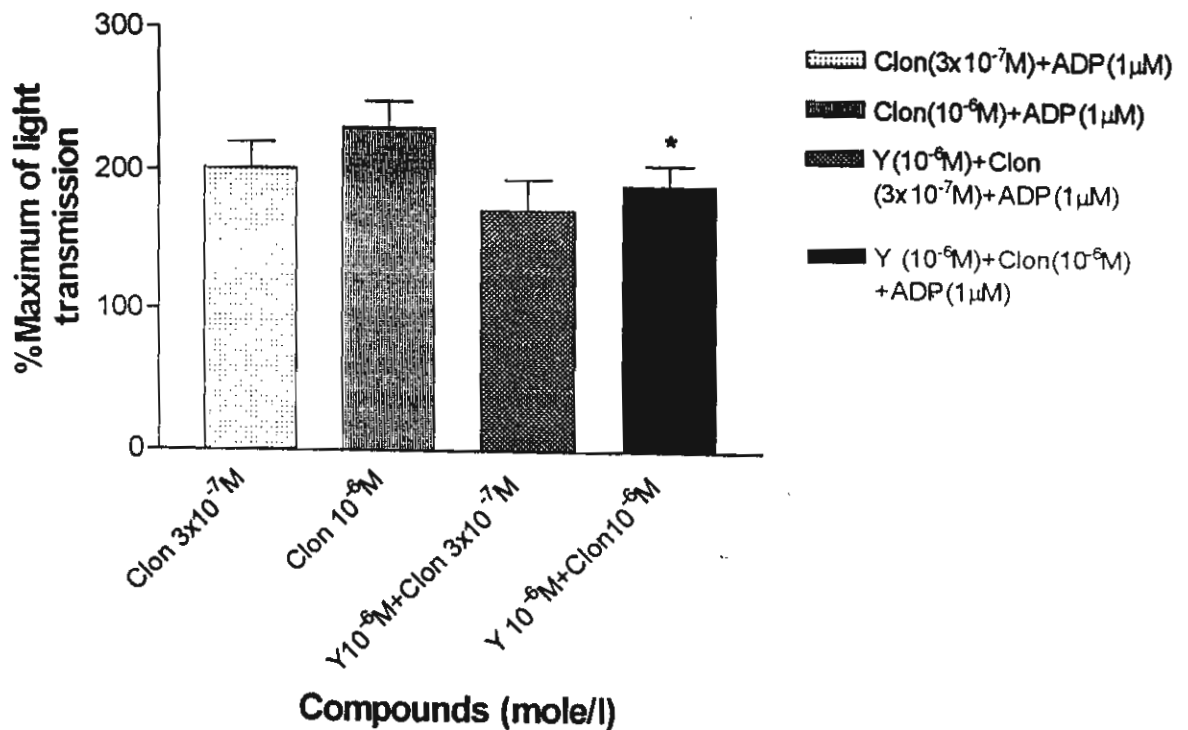


Figure 3 Effects of alpha2-adrenoceptor antagonist, yohimbine (10^{-6} M) on clonidine potentiated ADP-induced human platelet aggregation. Platelet-rich plasma (PRP) were preincubated with or without yohimbine (10^{-6} M) 2 min before addition of clonidine (3×10^{-7} or 10^{-6} M) 3 min prior to the addition of 1 μ M ADP.

The effect of clonidine and/or yohimbine are shown as percentage of 1 μ M ADP response. The value shown are mean $\pm$ SEM (n=14).

* : represents statistical difference from the effect of clonidine (10^{-6} M) + 1 μ M ADP stimulation in the absence of yohimbine at $p < 0.05$.

2.1.2 ผลของ clonidine-displacing substance ต่อการจับตัวของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย ADP

เก็บเลือดจากผู้บริจาค 8 คน และมีค่าเฉลี่ยของ platelet count ที่ใช้ในการทดลอง $2.96 \pm 0.37 \times 10^5/\mu\text{l}$

สารสกัด CDS (0.02 unit) โดยลำพังมีผลเล็กน้อยต่อการกระตุ้นเกร็ดเลือด แต่เมื่อเกร็ดเลือดถูกกระตุ้นด้วย ADP $1 \mu\text{M}$ สารสกัด CDS ($1.25 \times 10^{-3} - 0.02$ unit) สามารถยับยั้งการจับตัวของเกร็ดเลือดได้ ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น (concentration-dependent) ผลจะเห็นได้ชัดที่ CDS 0.02 unit ซึ่งยับยั้งได้ประมาณ 50% เมื่อเทียบกับ ADP กระตุ้นโดยลำพัง ดังแสดงในรูปที่ 4 และผลของ CDS ในการยับยั้งการจับกันของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย ADP นี้ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงด้วย α_2 -adrenoceptor antagonist (10^{-6} M yohimbine) (yohimbine ไม่มีผลต่อการกระตุ้นเกร็ดเลือดเมื่อทดสอบโดยลำพังหรือเมื่อมี ADP) แสดงว่า CDS ไม่ได้ออกฤทธิ์ยับยั้งโดยผ่าน α_2 -adrenoceptor แต่เป็นที่ nonadrenoceptor site ดังแสดงในรูปที่ 5

Effect of CDS extract on ADP(1 μ M)-induced platelet aggregation

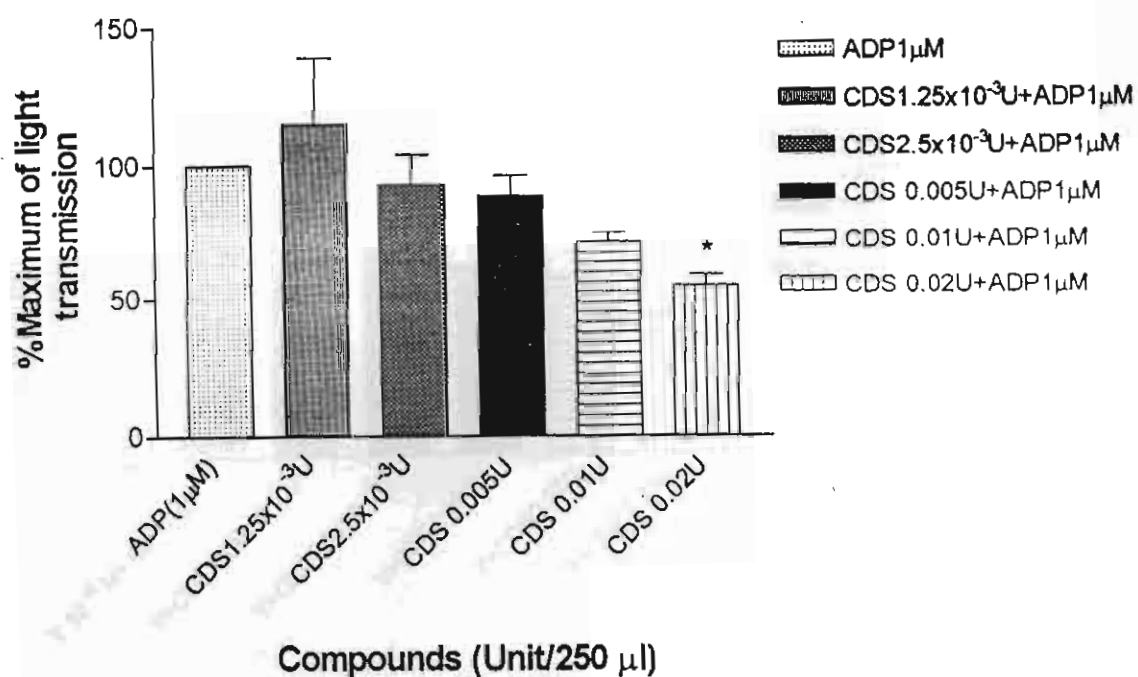


Figure 4 The effect of CDS extract on ADP-induced platelet aggregation. Human platelet-rich plasma (PRP) was preincubated for 1 min in aggregometer prior to the addition of 1 μ M ADP. PRP was then incubated with various concentration of CDS (units/250 μ l assay volume) for 1 min prior to addition of 1 μ M ADP in 250 μ l assay.

The effect of CDS inhibition is shown as percentage of 1 μ M ADP response. The values shown are mean $\pm$ SEM (n=8).

* : represents statistical difference from the effect of 1 μ M ADP stimulation at p <0.05.

Effect of yohimbine on CDS extract inhibited ADP (1 μ M)-induced human platelet aggregation

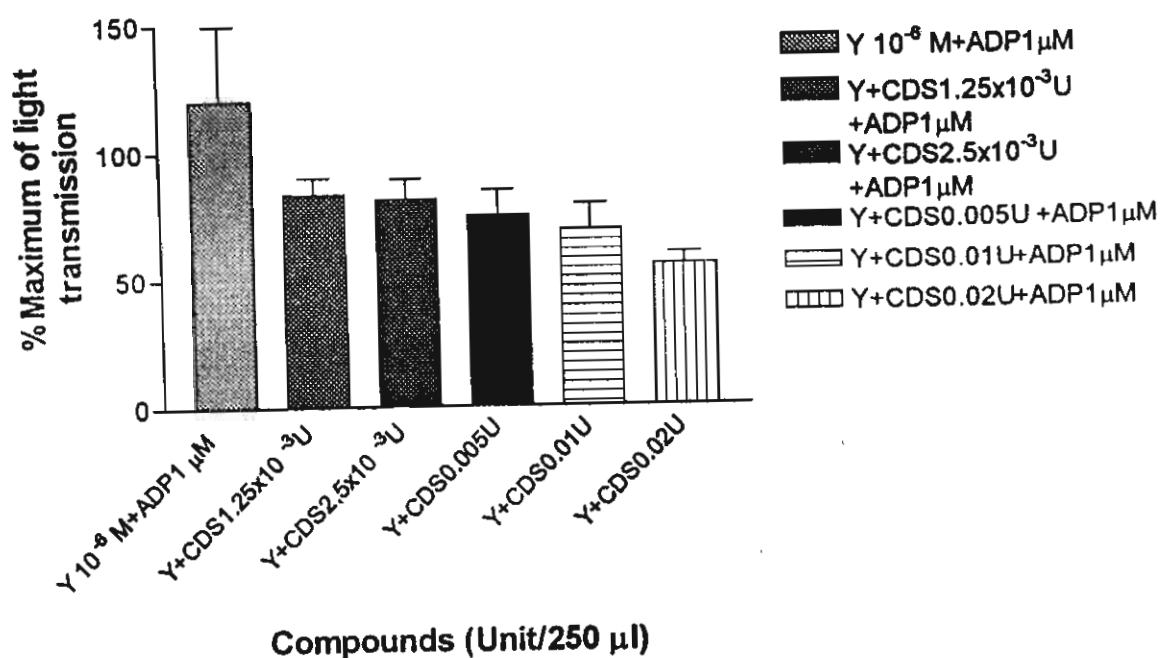


Figure 5 Effect of yohimbine on the inhibitory effect of CDS on ADP-induced aggregation. Platelet-rich plasma (PRP) was incubated with yohimbine (10^{-6} M) 2 min prior to the addition of CDS extract at various concentrations (units/250 μ l) and incubated for further 1 min before the addition of 1 μ M ADP.

The effect of yohimbine and/or CDS extract is shown as percentage of 1 μ M ADP response. The values are shown as mean $\pm$ SEM from 8 experiments using platelet-rich plasma from 8 separate blood donors.

2.1.3 ผลของ agmatine agmatine มีผลต่อการเกาะกันของเกร็ดเลือดเพียงเล็กน้อยแม้ที่ความเข้มข้นสูงถึง 0.1 mM ซึ่งให้ผลแตกต่างจาก ADP 1 μ M กระตุ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 6

หมายเหตุ ผลของ Harmane ซึ่งพบสารตัวนี้ในช่วงท้ายของงานวิจัยจะอยู่ในงานตีพิมพ์ที่ 1.1 ภายใต้หัวข้อ Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจากสกว

Effect of agmatine on ADP (1 μ M)-induced platelet aggregation

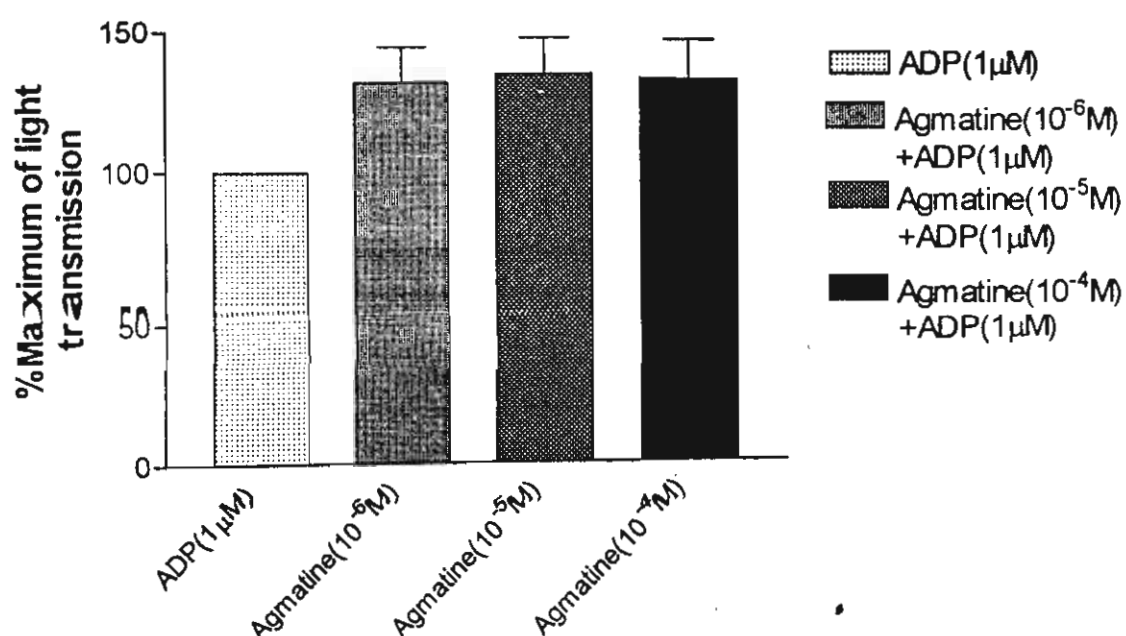


Figure 6 Effect of agmatine on ADP (1 μ M)-induced human platelet aggregation. Platelet-rich plasma (PRP) was preincubated with various concentration of agmatine 1 min before the addition of 1 μ M ADP, in a final assay volume of 250 μ l.

The effect of agmatine is shown as percentage of 1 μ M ADP response. The values shown are mean $\pm$ SEM (n=10).

2.2 Model prejunctional α_2 -adrenoceptor ที่ rat vas deferens

2.2.1 ผลของ α_2 -adrenoceptor agonist เช่น clonidine พบว่า clonidine ยับยั้ง twitch contractile response ของท่อน้ำเชื้อที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า และผลนี้ถูกยับยั้งได้ด้วย idazoxan (10^{-6} M) ซึ่งเป็น α_2 -adrenoceptor antagonist แสดงว่าเป็นการออกฤทธิ์ผ่าน α_2 -adrenoceptors ดังแสดงในรูปที่ 7 clonidine ยับยั้งการหดตัวของท่อน้ำเชื้อแบบ concentration-dependent โดยยับยั้งได้ 100% ที่ความเข้มข้นของ clonidine ที่ 10^{-8} M (pD_2 8.62 ± 0.04 , $n=4$)

ผลของ clonidine เมื่อมี α_2 -adrenoceptor antagonist, idazoxan (10^{-6} M) idazoxan จะ shift concentration-response curve ของ clonidine ไปทางขวาด้วยความเข้มข้นที่สูงกว่า 100 เท่า (pD_2 6.63 ± 0.004 , $n=4$)

รูปที่ 8 แสดง trace recording ของ clonidine และ methanolic CDS extract ต่อการหดตัวของท่อน้ำเชื้อที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า

2.2.2 ผลของสารสกัด CDS ต่อการหดตัวของท่อน้ำเชื้อที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า เป็น biphasic ดังแสดงในรูป 9 ที่ความเข้มข้นต่ำของสารสกัด CDS (0.003-0.1 unit/ml) จะให้ผลยับยั้งการหดตัวของท่อน้ำเชื้อเพียงเล็กน้อย โดยให้ contractile response ประมาณ 79-92% ของ control response (ไม่มี agonist กระตุ้น) ซึ่งมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$ ($n=5$) ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น (มากกว่า 0.5 units/ml) สารสกัด CDS 1.5 unit กลับกระตุ้น twitch contractile response ของท่อน้ำเชื้อเพิ่มขึ้น 32 ± 12 % จาก control response (100%) ($n=5$)

ผลการกระตุ้นของสารสกัดเมื่อมี idazoxan (10^{-6} M) พบว่า idazoxan ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงผลของสารสกัด CDS ที่มีต่อการหดตัวของท่อน้ำเชื้อที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (รูปที่ 9)

2.2.3 ผลของสารสกัด CDS ต่อ การยับยั้งการหดตัวของท่อน้ำเชื้อของ clonidine

จากผลการทดลองในข้อ 2.2 ทำให้เกิดคำถามว่า สารสกัด CDS มีคุณสมบัติเป็น α_2 -adrenoceptor antagonist ที่ prejunctional α_2 -adrenoceptor ที่ rat vas deferens หรือไม่ จึงได้ทำการทดลองเพิ่มโดยดูผลของสารสกัด CDS ต่อ clonidine ดังแสดงในรูป 10 clonidine ยังคงแสดงการยับยั้งการหดตัวของท่อน้ำเชื้อได้ 100% ที่ความเข้มข้น 3×10^{-8} M อย่างไรก็ตาม potency ของ clonidine ที่ rat vas deferens (pD_2 8.62 ± 0.06 , $n=4$) ลดลงเล็กน้อยเมื่อมีสารสกัด CDS 1.7 units/ml (pD_2 8.27 ± 0.12 , $n=5$) ซึ่งมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$

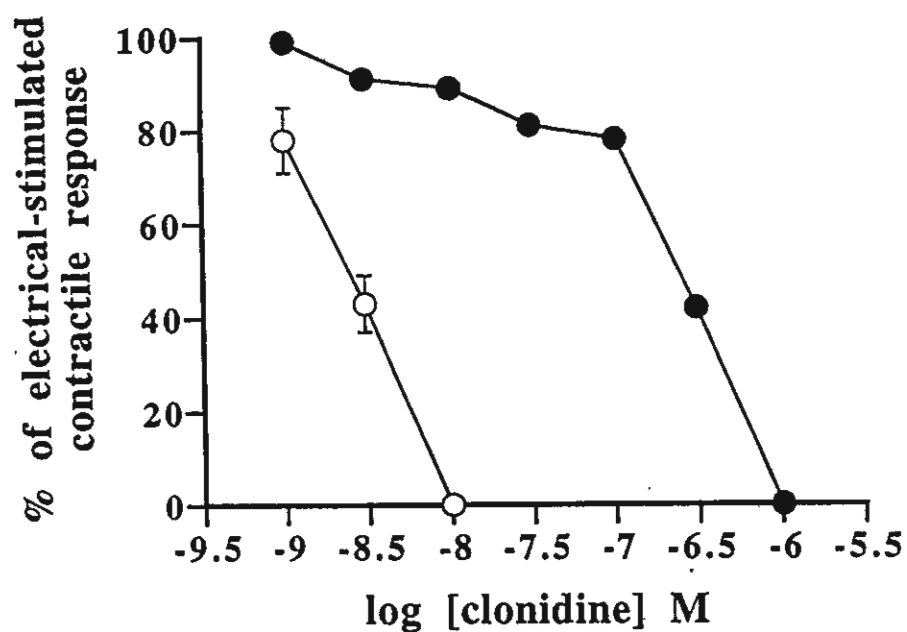


Figure 7 The cumulative concentration response curves of clonidine (O) and clonidine in the presence of 10^{-6} M idazoxan (●) against electrically-evoked contractions of prostatic segments of the rat isolated vas deferens. Contractions were elicited by transmural electrical stimulation (0.5 ms duration, 0.005 Hz, 70 volts) and had equilibrated before adding the drugs. Contractile response in the presence of the agonists have been calculated as a percentage of a response in the absence of the agonist and expressed as the mean $\pm$ SEM of 2-4 separate experiments.

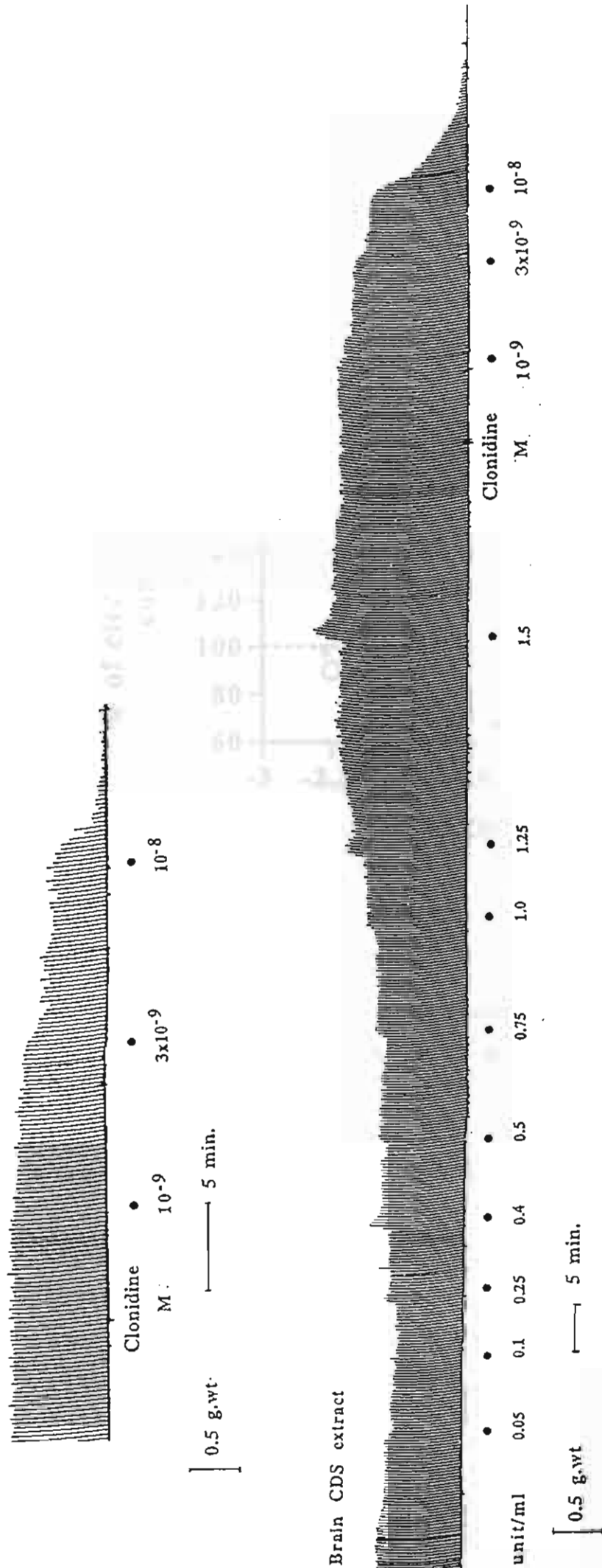


Figure 8 Representative trace recording of the electrically-evoked contractile response of prostatic end of the rat vas deferens. The upper tracing shows the effect of clonidine (10^{-9} - 10^{-8} M) on electrically-evoked contraction. The lower tracing shows the effect of brain methanolic CDS extract (cumulative concentration of 0.5 - 1.5 units/ml), followed by clonidine (10^{-9} - 10^{-8} M), on electrically-evoked contractions.

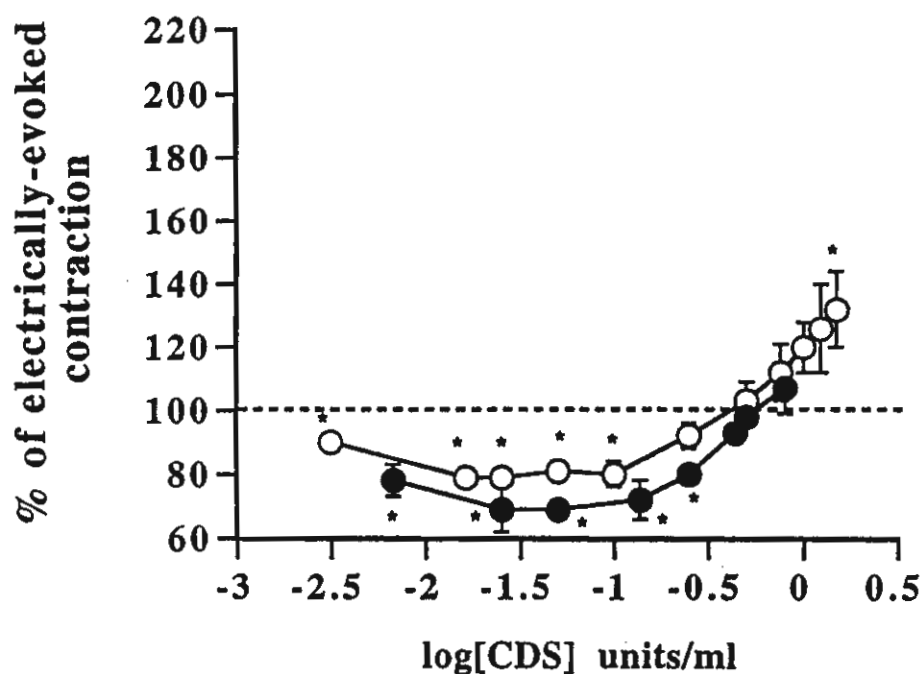


Figure 9 Cumulative concentration response curves of brain methanolic CDS extract in the absence (O) and presence (●) of 10^{-6} M idazoxan against electrically-evoked contractions of prostatic segment of the rat isolated vas deferens. Contractions were elicited by transmural electrical stimulation (0.5 ms duration, 0.005 Hz, 70 volts) and had equilibrated before adding the antagonist and the extract. Contractile responses in the presence of the extract have been calculated as a percentage of the control response (before adding the antagonist or the extract) and are expressed as the mean $\pm$ SEM of 2-3 separate experiments for the extract in the presence of idazoxan and 5 separate experiments for the brain extract.

* represents statistical difference from the control contractile response at $p < 0.05$.

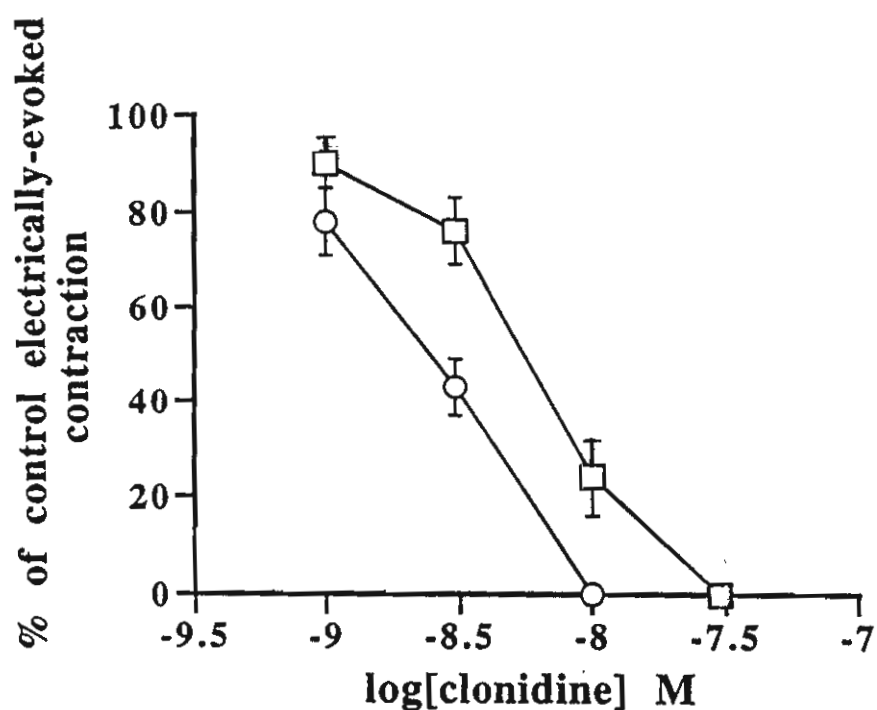


Figure 10 The cumulative concentration response curves of clonidine (O) and clonidine in the presence of (1.7 units/ml) methanolic brain CDS extract (□) against electrically-evoked contractions of prostatic segment of the rat isolated vas deferens. Contractions were elicited by transmural electrical stimulation (0.5 ms duration, 0.005 Hz, 70 volts) and had equilibrated before adding the drug or the extract. Contractile responses in the presence of the agonist have been calculated as a percentage of the control response (before adding the drug or the extract) and are expressed as the mean $\pm$ SEM of 4-6 separate experiments.

3. ผลของสารสกัด CDS ในการกระตุ้น imidazoline receptor

การศึกษาการออกฤทธิ์ของสาร imidazoline ซึ่งมีหรือไม่มี adrenergic activity และ non-imidazoline adrenergic agents ใน การกระตุ้น human platelet พบว่า สารที่มีสูตรโครงสร้างเป็น imidazoline เช่น clonidine, antazoline, tolazoline มีคุณสมบัติในการกระตุ้นเกร็ดเลือดที่แตกต่างจาก adrenergic agent ที่สูตรโครงสร้างไม่เป็น imidazoline ซึ่งความแตกต่างนี้เป็นผลมาจากความสามารถของ imidazoline compound ที่สามารถกระตุ้น imidazoline receptor ที่เกร็ดเลือด

3.1 ผลของimidazoline agents and non-imidazoline α -adrenergic agents ต่อการจับกันของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย noradrenaline

จากการศึกษาการกระตุ้นเกร็ดเลือดด้วยNoradrenaline 10^{-8} – 10^{-4} M ได้เลือกที่ความเข้มข้น 4 μ M ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่กระตุ้นการจับกันของเกร็ดเลือดโดยไม่มี reversible phase เนื่องจากต้องการดูผลในแง่ยับยั้งการจับกันของเกร็ดเลือด เพื่อให้เห็นการเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจน

การทดลองนี้พบว่าสารที่มีสูตรโครงสร้างเป็น imidazoline ไม่ว่าจะเป็น agonist activity (เช่น clonidine, tolazoline), antagonist activity (เช่น idazoxan)หรือไม่มี activity ที่ α -adrenoceptor (เช่น antazoline) ทุกตัวสามารถยับยั้งการจับกันของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย noradrenaline ดังแสดงในรูป11 และค่า inhibitory concentration (IC_{50}) ดังตาราง1

	Drug	IC_{50} [M]
Imidazoline agents	clonidine	4.56×10^{-7}
	Idazoxan	4.21×10^{-8}
	Antazoline	2.85×10^{-6}
	Tolazoline	1.64×10^{-6}
Non- Imidazoline agents	Yohimbine	3.40×10^{-7}

Table1 Potencies of imidazoline agents and non-imidazoline α -adrenergic agent in inhibiting human platelet aggregation induced by noradrenaline 4 μ M. Each value indicated the mean of IC_{50} from 5 experiments.

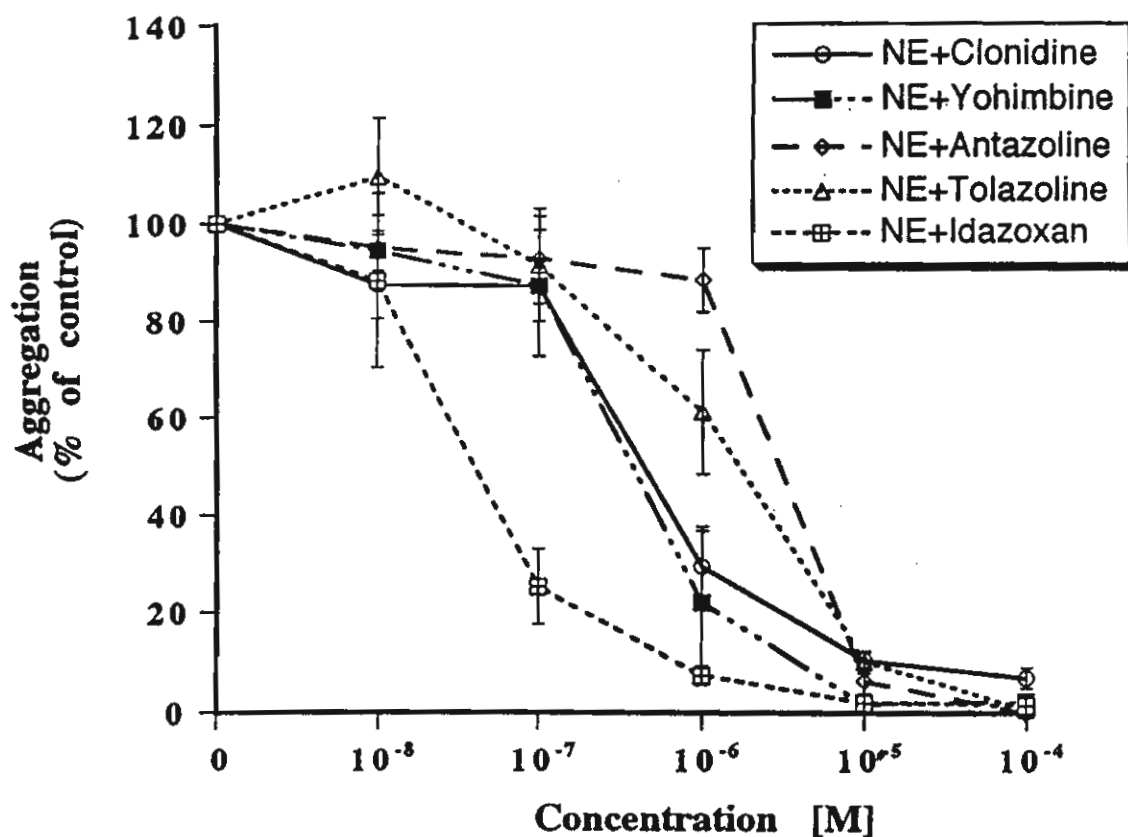


Figure 11 Concentration-effect curves of imidazoline and non-imidazoline α -adrenergic agents on noradrenaline (4 μ M)-induced human platelet aggregation. The effects shown were percent of control response of maximum stimulation by noradrenaline alone-induced aggregation. Values shown are mean $\pm$ SEM of 5 experiments.

ลำดับของ potency ในการยับยั้งการจับกันของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย Noradrenaline คือ idazoxan > yohimbine > clonidine > antazoline > tolazoline

Idazoxan ซึ่งเป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างเป็น imidazoline potent กว่า yohimbine ซึ่งเป็น α_2 -adrenoceptor antagonist 10 เท่า ในการยับยั้ง noradrenaline ในการกระตุ้นเกร็ดเลือด

Antazoline ซึ่งเป็น imidazoline compound และไม่มีคุณสมบัติกระตุ้น α_2 -adrenoceptor ก็สามารถยับยั้งการจับกันของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย Noradrenaline ได้เช่นกัน แสดงว่า imidazoline compound มีคุณสมบัตินี้ โดยออกฤทธิ์ผ่าน imidazoline receptor

3.2 ผลของ clonidine-displacing substance (CDS) ต่อการจับกันของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย noradrenaline

สารสกัด CDS โดยลำพังไม่มีผลต่อการยับยั้งการจับกันของเกร็ดเลือด แต่จะยับยั้งเมื่อเกร็ดเลือด ถูกกระตุ้นด้วย Noradrenaline (4 μ M) ดังแสดงในรูป 12 แม้ว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้จะไม่สูงมาก เช่นที่ 0.25 unit สามารถยับยั้งการจับกันของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย Noradrenaline ได้ 40%

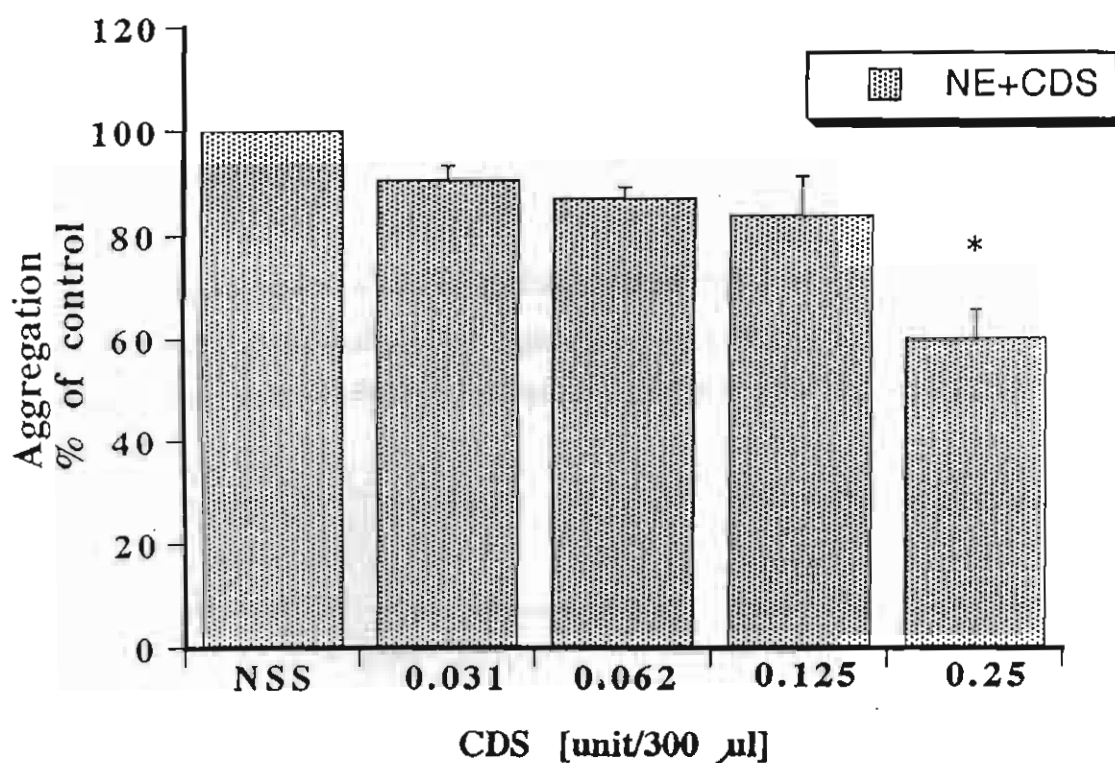


Figure 12 The effects of clonidine-displacing substance (CDS) extract, a putative endogenous ligand at imidazoline receptor, on noradrenaline (4 μ M)-induced human platelet aggregation. The effects shown were percent of control response of maximum stimulation by noradrenaline alone-induced aggregation. Values shown are mean $\pm$ SEM of 5 experiments.

* represents significant difference from noradrenaline-induced human platelet aggregation at $p < 0.05$.

3.3 ผลของ imidazoline agents and non-imidazoline α -adrenergic agents ต่อการจับกันของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย ADP

Imidazoline agents ทุกตัวโดยลำพังไม่มีผลต่อการจับกันของเกร็ดเลือด แต่เมื่อกระตุ้นด้วย ADP ($4\ \mu\text{M}$) imidazoline agents ทุกตัวที่ความเข้มข้นต่ำกว่า $10^{-5}\ \text{M}$ ไม่แสดงผลยับยั้งหรือเสริมการจับกันของเกร็ดเลือด ดังแสดงในรูป 13

Clonidine ซึ่งเป็น partial agonist ที่ α_2 -adrenoceptor ที่ความเข้มข้นสูงถึง $10^{-5}\ \text{M}$ จึงแสดงผลเสริมการจับกันของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย ADP ทั้งนี้เนื่องจากตัวกระตุ้นคือ ADP ที่ใช้ความเข้มข้น $4\ \mu\text{M}$ ซึ่งกระตุ้นเสริมการจับกันของเกร็ดเลือดได้ โดยไม่มี reversible phase ซึ่งเกือบถึงการจับตัวสูงสุดของเกร็ดเลือดในตัวอย่างเลือดส่วนใหญ่ จึงแสดงผลเสริมการจับกันของเกร็ดเลือดที่ความเข้มข้นค่อนข้างสูง

Imidazoline agents ตัวอื่นที่ความเข้มข้นสูงขนาด $10^{-5} - 10^{-4}\ \text{M}$ แสดงผลยับยั้งการจับกันของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย ADP เพียง 20% ของ ADP เมื่อกระตุ้นโดยลำพัง ส่วนผลของสารสกัด CDS ต่อการจับกันของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย ADP ดังในหัวข้อ 2.1.2

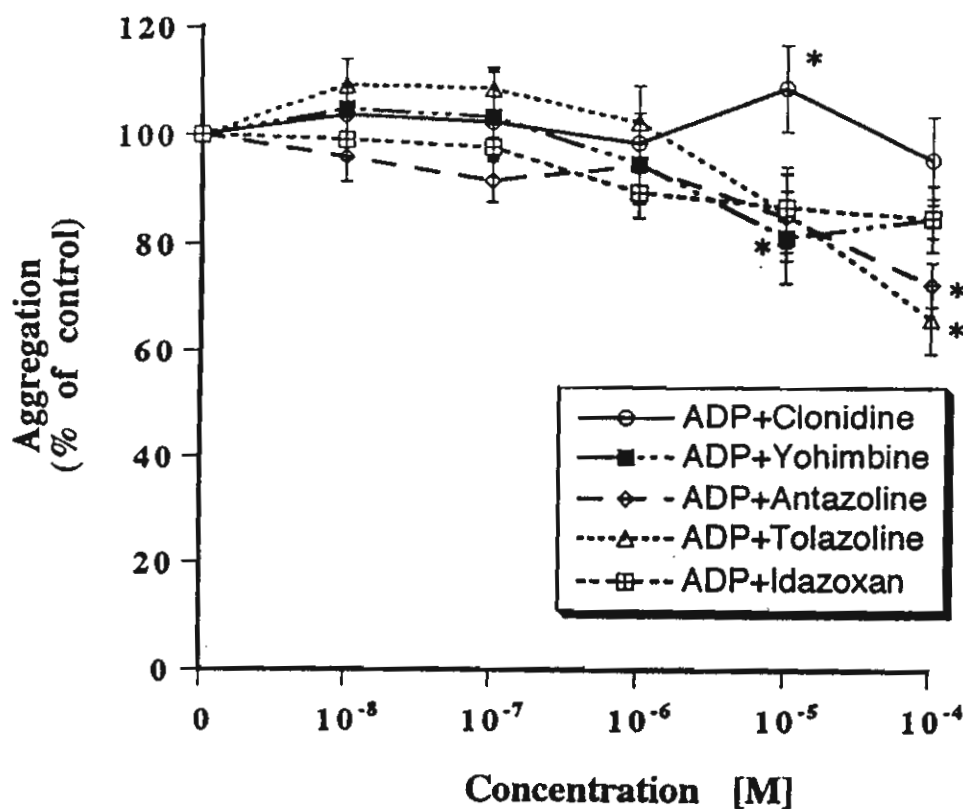


Figure 13 Concentration-effect curves of imidazoline and non-imidazoline α -adrenergic agents on ADP (4 μ M)-induced human platelet aggregation. The effects shown were percent of control response of maximum stimulation by ADP alone-induced aggregation. Values shown are mean $\pm$ SEM of 5 experiments.

* represents statistical significant difference from ADP alone-induced human platelet aggregation at $p < 0.05$.

บทวิจารณ์

โครงการวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะสกัดสาร clonidine-displacing substance (CDS) และศึกษาความเป็นไปได้ของสารนี้ที่จะเป็นสารธรรมชาติในร่างกาย (endogenous substance) โดยศึกษาคุณสมบัติและการออกฤทธิ์ของสารนี้ CDS ถูกสกัดจากสมองส่วน cerebral cortex โดยส่วนใหญ่ใช้สมองหมู แม้การทดลองบางส่วนก่อนหน้านี้ได้ใช้สมองวัวในการสกัดซึ่งพบว่ามี CDS activity เท่าๆกับของหมู และมีข้อดีกว่าคือมีปริมาณเนื้อ cerebral cortex ใน 1 สมองมากกว่าหมู ทำให้สกัดสาร CDS ได้ในปริมาณมากกว่า แต่ระยะต่อมาพบว่าการเก็บตัวอย่างสมองวัวค่อนข้างลำบากกว่าเก็บสมองหมู เนื่องจากต้องเก็บในเวลากลางวัน งานวิจัยในโครงการนี้จึงใช้สมองหมูเป็นหลัก

จากการที่สารสกัด CDS มีคุณสมบัติในการไล่ที่ [³H]-clonidine ที่จับกับ α_2 -adrenoceptor ที่ porcine cerebral cortex membrane ทำให้เชื่อได้ว่ามีสาร CDS ปรากฏอยู่ในสมองหมู นอกจากนี้สารสกัด CDS ยังจับกับ imidazoline receptor เช่นที่ porcine kidney cortex CDS จึงอาจเป็น endogenous ligand ที่ receptor site นี้ ซึ่งสารสกัด CDS มี binding affinity ที่ imidazoline receptor (IR) มากกว่าที่ α_2 -adrenoceptor เช่นเดียวกับคุณสมบัติของสารสกัด CDS จากกลุ่มของ Singh⁴¹ ซึ่งใช้สารสกัดจากสมองวัว

บทบาทของสารสกัด CDS ที่ α_2 -adrenoceptor ใน model ของกระตุ้นการจับกันของเกร็ดเลือดนั้นแตกต่างจาก clonidine ซึ่งเป็น partial agonist ที่ α_2 -adrenoceptor สารสกัด CDS ให้ผลยับยั้งการกระตุ้นการจับกันของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย ADP ซึ่งไม่ได้เกิดจากการกระตุ้น α_2 -adrenoceptor ตรงข้ามกับผลของ clonidine และผลการวิจัยนี้ตรงข้ามกับกลุ่มของ Atlas⁴² ซึ่งทำเมื่อหลายปีก่อน โดยพบว่าสารสกัด CDS กระตุ้นการจับกันของเกร็ดเลือดเมื่อถูกกระตุ้นด้วย ADP เป็นที่สงสัยว่ามีเพียงกลุ่มนี้ที่พบ activity ของ CDS ที่ α_2 -adrenoceptor จึงอาจเป็นไปได้ว่ามี catecholamine ปนมาในสารสกัดทำให้ทำให้สามารถกระตุ้น α_2 -adrenoceptors ได้ อย่างไรก็ตามหลังจากนั้นยังไม่พบรายงานยืนยันการออกฤทธิ์ของสารสกัดที่ α_2 -adrenoceptors อีก

การศึกษาบทบาทของสารสกัด CDS ที่ prejunctional α_2 -adrenoceptor ที่ prostatic end ของท่อน้ำเชื้อของหนู พบผลของสารสกัดเป็นแบบ biphasic คือที่ความเข้มข้นต่ำยับยั้งการหดตัวเช่นเดียวกับ clonidine ซึ่งเป็น α_2 -adrenoceptor agonist แต่ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นกลับกระตุ้นหรือเพิ่ม contractile response ซึ่ง action นี้ไม่ได้ผ่านการกระตุ้น α_2 -adrenoceptor เพราะ idazoxan ซึ่งเป็น α_2 -adrenoceptor antagonist ไม่เปลี่ยนแปลงผลของ CDS ผลในการยับยั้งที่ความเข้มข้นต่ำก็ไม่น่าเกิดจาก inhibitory β -adrenoceptor ซึ่งพบอยู่ที่ส่วน prostatic end ของท่อน้ำเชื้อของหนูเช่นกัน⁴³ เนื่องจากการทดลองได้ใช้ propranolol ซึ่งเป็น β -adrenoceptor antagonist block การกระตุ้น receptor นี้ด้วย การทดลองนี้เป็นอีก

evidence ที่แสดงว่าสารสกัด CDS ไม่มี agonist activity โดยตรงที่ α_2 -adrenoceptor ที่ tissue นี้ งานวิจัยนี้พบว่า CDS ลด potency ของ clonidine ลงเล็กน้อย ก็อาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดนี้มีคุณสมบัติเป็น antagonist ที่ α_2 -adrenoceptor หรือมี negative regulatory role ที่ตัวรับนี้ อย่างไรก็ตามต้องมีการพิสูจน์ว่า antagonistic effect ของสารสกัด CDS นี้ selective ที่ α_2 -adrenoceptor หรือไม่ โดยทำการทดลองต่อไปโดยใช้ non-adrenergic agent ที่มีผลยับยั้งการหดตัวของท่อน้ำเชื้อของหนูเช่นกัน เช่น enkephalin ซึ่งเป็น opioid agonist⁴³ แล้วดูผลของสารสกัด CDS หากสามารถ shift enkephalin concentration curve ไปทางขวาได้เช่นกันแสดงว่า antagonistic effect ของสารสกัด CDS ไม่ selective หรือมีได้ออกฤทธิ์เฉพาะเจาะจงที่ α_2 -adrenoceptor

ดังนั้นถึงแม้ว่าสารสกัด CDS จะจับกับ α_2 -adrenoceptor แต่ยังไม่พบบทบาทที่เป็น agonist ที่ α_2 -adrenoceptor อย่างมีนัยสำคัญ เป็นเวลา 10 กว่าปี ที่มีการค้นหาสาร endogenous CDS นี้ ถึงวันนี้ยังไม่พบ evidence สนับสนุนเพิ่มขึ้นอีกว่า CDS มีบทบาทที่ α_2 -adrenoceptor ดังที่เคยมีรายงานไว้เมื่อปี 1986-87^{13,42}

งานวิจัยนี้พบว่าถึงแม้ว่าสารสกัด CDS สามารถแทนที่ clonidine binding และจับกับ α_2 -adrenoceptors ได้ แต่ biological activity ที่ sites นี้ก็ไม่ได้เลียนแบบ clonidine ส่วน agmatine ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้ว่าเป็น active compound ของสารสกัด CDS งานวิจัยนี้ยังคงยืนยันงานที่ดีพิมพ์แล้วก่อนหน้านี้ (Pinthong *et al.*, 1995)²¹ ว่ายังไม่พบ action ของ agmatine ที่ α_2 -adrenoceptors ใน tissue อื่นอีก ดังนั้น agmatine ไม่น่าจะเป็นตัวแทนของสาร CDS ถึงแม้ว่า agmatine จะสามารถจับกับ α_2 -adrenoceptors แต่ไม่พบ functional activity ที่ site นี้

ส่วนบทบาทของสารสกัด CDS ที่ imidazoline receptor นั้น พบว่าการที่สารสกัดยับยั้งการกระตุ้นการจับกันของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย ADP นั้นเป็นการกระตุ้นที่ผ่านทาง non-adrenoceptor site ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้สนับสนุนว่าพบ imidazoline receptor ที่ human platelet membrane²⁷

จากการศึกษาการออกฤทธิ์ของสาร imidazoline และ non-imidazoline adrenergic agents ในการกระตุ้น human platelet เทียบกับสารสกัด CDS พบว่า สารที่มีสูตรโครงสร้างเป็น imidazoline เช่น clonidine, antazoline, tolazoline มีคุณสมบัติในการกระตุ้นเกร็ดเลือดที่แตกต่างจาก adrenergic agent ที่สูตรโครงสร้างไม่เป็น imidazoline ซึ่งความแตกต่างนี้เป็นผลมาจากความสามารถของ imidazoline compound ที่สามารถกระตุ้น imidazoline receptor ที่เกร็ดเลือด กลไกและนัยสำคัญของการกระตุ้น imidazoline receptor ที่เกร็ดเลือดที่เกี่ยวข้องกับระบบอื่นๆยังต้องศึกษาต่อไป จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า non-adrenoceptor imidazoline binding site มีบทบาทต่อการจับกันของเกร็ดเลือด

การที่พบว่า imidazoline receptor มีบทบาทที่เกร็ดเลือด อาจช่วยตอบคำถามถึงคุณสมบัติของ clonidine ที่เป็น partial agonist ที่ α_2 -adrenoceptor คือตัว clonidine เองไม่มีผลต่อการจับกันของเกร็ดเลือดหรือมีเพียงเล็กน้อยในขณะที่ α -adrenergic agonist เช่น noradrenaline/adrenaline กระตุ้นการจับกันของเกร็ดเลือด แต่ clonidine กลับยับยั้งการจับกันของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย noradrenaline เนื่องจาก clonidine สามารถจับได้ทั้ง 2 receptor ผลที่เห็นยับยั้งการจับกันของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย noradrenaline อาจเกิดจากการกระตุ้น imidazoline receptor ซึ่งเป็นที่ยืนยันแล้วว่ามี receptor นี้ที่เกร็ดเลือด²⁷ อย่างไรก็ตามควรได้ทำการทดลองด้วย imidazoline agent ที่หลากหลายกว่านี้โดยเฉพาะที่มีคุณสมบัติที่จำเพาะเจาะจงต่อ imidazoline receptor เท่านั้น และปราศจาก activity ที่ α_2 -adrenoceptor ปัญหาในการศึกษาคุณสมบัติของ imidazoline receptor คือ receptor ทั้งสอง มักอยู่ใน cell หรือ tissue เดียวกัน ถึงแม้จะมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาต่างกัน แต่สาร imidazoline ที่พบในปัจจุบันส่วนใหญ่จะจับและกระตุ้นได้ทั้ง 2 receptor การพัฒนา ligand ที่ selective ต่อ imidazoline receptor จะช่วยให้แยกบทบาทของตัวรับทั้ง 2 จากกันได้ชัดเจน

เนื่องจากอุปสรรคในการเตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้นสูง ปริมาณของสารสกัดที่ใช้ในการทดลองศึกษาผลของ CDS ต่อการจับกันของ platelet จึงค่อนข้างน้อย ถึงแม้ที่ 0.25 unit จะเห็นผลการยับยั้งการจับกันของเกร็ดเลือดที่กระตุ้นด้วย noradrenaline ได้ 40% แต่ก็ควรใช้ความเข้มข้นที่สูงขึ้น เช่น ช่วง 1-10 Unit เพื่อจะได้เห็นการยับยั้งการจับกันของเกร็ดเลือดได้สมบูรณ์ (100%)

การเกิด spontaneous platelet aggregation อาจพบได้ในการทดลองโดยใช้เลือดของผู้ป่วยที่เป็นโรคเกี่ยวกับเส้นเลือดเลี้ยงหัวใจหรือเลี้ยงสมอง (cardiovascular and cerebrovascular disease)⁴⁴ และการที่พบ CDS ใน serum¹² และใน human plasma⁴⁵ แสดงว่า CDS อาจเป็นสารที่มีในร่างกายและมีบทบาทในการยับยั้งการจับกันของเกร็ดเลือดเมื่อถูกกระตุ้นด้วย noradrenaline นอกจากนี้การที่ imidazoline compound sensitive ต่อ การกระตุ้นด้วย noradrenaline มากกว่า ADP แสดงว่า สารพวกนี้อาจมีบทบาทในการรักษาหรือป้องกันภาวะที่เกร็ดเลือดมีความไวสูงต่อ catecholamine (platelet hyperreactivity) และ CDS อาจเป็นสารธรรมชาติในร่างกายที่ช่วยป้องกันภาวะนี้

ปัญหาในการศึกษาคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของสารสกัดคือเมื่อนำสารมาสกัดผ่านขั้นตอนในการแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ยิ่งขึ้น เช่นผ่าน HPLC ต้องทำการสกัดในปริมาณมาก และเมื่อแยก fraction ออกมาแล้วส่วนหนึ่งต้องใช้สำหรับทดสอบหา CDS activity ในทุก fraction ทำให้ได้สารปริมาณน้อยมาก เกินกว่าที่จะใช้ทดสอบ functional activity ส่วนการใช้ crude extract ก็มีปัญหาคืออาจมีสารอื่นอีกหลายตัวปนอยู่ด้วยซึ่งอาจรบกวนการตีผลของการทดลอง ดังนั้นการค้นหาสู่ตรโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญในสารสกัด ยังคงเป็นงานที่ต้องค้นหา ถึงแม้ว่าจะมีกลุ่มวิจัยอื่นได้เสนอ Agmatine และ Harmane แต่เมื่อศึกษา biological activity แล้วพบว่ายังแตกต่างจากสารสกัด CDS

โดยสรุปงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าการออกฤทธิ์ของสารสกัด CDS น่าจะเกี่ยวข้องกับ การกระตุ้น imidazoline receptor จากจุดเริ่มต้นที่พบว่าสารที่สูตรโครงสร้างเป็น imidazoline มีบทบาทในการลดความดันโลหิตโดยลด sympathetic outflow ซึ่งในภาวะที่มี sympathetic activity สูงจะเกี่ยวข้องกับภาวะที่มี excess catecholamine⁴⁶ ซึ่งจะโยงไปถึงการเพิ่มความดันโลหิต การหดตัวของเส้นเลือด การกระตุ้นการหลั่ง renin-angiotensin รวมทั้ง catecholamine ที่สูงจะกระตุ้น platelet hyperaggregability⁴⁷ และเพิ่ม blood viscosity จากงานวิจัยนี้พบว่าการใช้ยาลดความดันโลหิตที่เป็น imidazoline compound เช่น clonidine, moxonidine, rilmenidine นอกจากช่วยลดความดันโลหิตแล้วจะมีกลไกเสริมในการลดการกระตุ้นการจับกันของเกร็ดเลือด ซึ่งจะช่วยลดอัตราเสี่ยงของการเกิด myocardial infarction และ stroke ในผู้ป่วยความดันโลหิตสูงได้

ปัจจุบันงานวิจัยส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาที่ imidazoline receptor มากกว่าที่ CDS เนื่องจากสูตรโครงสร้างของสารสำคัญยังไม่พบแน่ชัด งานวิจัยในอนาคตเกี่ยวกับ imidazoline receptor โดยเฉพาะในแง่การออกฤทธิ์และผลการกระตุ้นที่ receptor จะมุ่งเน้นที่ 3 ระบบหลักคือ 1)ระบบความดันโลหิตโดย I₁ receptor, 2)โรคความผิดปกติของระบบประสาทส่วนกลาง เช่น โรคซึมเศร้า⁴⁰ (depression) และ Alzheimer's type dementia, Parkinson's disease⁴⁸ โดยเกี่ยวกับ I₂ receptor พบว่า site นี้มีอยู่ที่ binding domain ของ monoamine oxidaseB⁴⁹ และที่ outer membrane ของ mitochondria²⁶ ซึ่งอาจมีบทบาทในการควบคุม activity ของเอ็นไซม์นี้ซึ่งสำคัญในการควบคุมปริมาณ catecholamine ในสมอง, 3) การกระตุ้นการหลั่ง insulin จาก pancreatic β -cell โดย กระตุ้น I₃ receptor ซึ่งกลุ่มวิจัยนี้ก็ให้ความสนใจในระบบที่ 2 และ 3 เช่นกัน

หนังสืออ้างอิง

1. Kobinger W. Central α -adrenergic system as targets for hypertensive drugs. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1978; 81 :30-100.
2. Bousquet P., Feldmen J., Schwart J. Central cardiovascular effects of alpha-adrenergic drugs : differences between catecholamines and imidazolines. *J Pharmacol Exp ther* 1984; 230 : 232-6
3. Ernsberger P, Meeley MP, MannJJ, Reis DJ. Clonidine binds to imidazole binding site as well as alpha2-adrenoceptor in the ventrolateral medulla. *Eur J Pharmacol* 1987; 134 :1-13
4. Ernsberger P, Giuliano R, Willette RN, Granata AR, Reis DJ. Hypotensive action of clonidine analogues correlates with binding affinity at imidazole and not α_2 -adrenoceptors in the rostral ventrolateral medulla. *J Hypertension* 1988; 6[Suppl.] :S554-7.
5. Langin D, Lafontan M. [3 H]-idazoxan binding at non α_2 -adrenoceptors in rabbit adipocyte membranes. *Eur J Pharmacol* 1989; 159 : 199-203.
6. Vigne P, Lazdunski M, Frelin C. Guanabenz, guanochlor, guanoxan and idazoxan bind with high affinity to non-adrenergic sites in pig kidney membranes *Eur J Pharmacol* 1989; 160 : 295-8.
7. Atlas D, Burstein Y. Isolation of endogenous clonidine displacing substance from rat brain. *FEBS Lett.* 1984a;170 : 387-91.
8. Atlas D, Burstein Y. Isolation and partial purification of a clonidine displacing endogenous brain substance. *Eur J Biochem.*1984b; 144 : 287-93.
9. Ernsberger P, Meeley MP, Reis DJ. An endogenous substance with clonidine-like properties : selective binding to imidazole sites in the ventrolateral medulla. *Brain Res.* 1988; 441 : 309-18.
10. Hensley ML, Meeley MP, McCauley PM, Ernsberger P, Reis DJ. Clonidine-displacing substance is present in peripheral tissues of the rat. *Am J Hypertension* 1989; 2 : 917-9.
11. Synetos D, Manolopoulos VG, Atlas D, Synetos EP. Human plasma-derived material with clonidine displacing substance (CDS)-like properties contracts the isolated rat aorta. *J Auton Pharmacol* 1991; 11 : 343-51.
12. Meeley MP, Hensley ML, Ernsberger P, Felsen D, Reis DJ. Evidence for a bioactive clonidine-displacing substance in peripheral tissue and serum. *Biochem Pharmacol.* 1992; 44 : 733-40.

13. Diamant S, Atlas D. An endogenous brain substance, CDS (clonidine-displacing substance, inhibit the twitch response of rat vas deferens. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 134 :184-90.
14. Felsen D, Meeley, MP, Reis DJ. Clonidine displacing substance is biologically active on smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 1987; 142 : 453–5.
15. Regunathan S, Meeley, MP, Reis DJ. Clonidine-displacing substance from bovine brain binds to imidazoline receptors and releases catecholamines in adrenal chromaffin cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991; 40 : 884-8.
16. Meeley MP, Ernsberger PR, Granata AR, Reis DL. An endogenous clonidine-displacing substance from bovine brain : receptor binding and hypotensive actions in the ventrolateral medulla. *Life Sci.* 1987; 38 : 1119-26.
17. Atlas D, Diamant S, Fales HM, Pannell L. The brain's own clonidine : Purification and characterization of endogenous clonidine-displacing substance from brain. *J Cardiovas. Pharmacol.* 1987; 10 (suppl.12) : S122-7.
18. Li G, Regunathan S, Barrow CJ, Eshraghi J, Cooper R, Reis DJ. Agmatine : an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science* 1994; 263 : 966-9.
19. Reis DJ, Regunathan S. Agmatine : an endogenous ligand at imidazoline receptors is a novel neurotransmitter. *Annals New York Acad Sciences* 1999; 881 :65-80.
20. Sun MK, Regunathan S, Reis DJ. Cardiovascular responses to agmatine, a clonidine-displacing substance, in anesthetized rat. *Clin. Exp.Hypertension* 1995; 17 : 115-28.
21. Pinthong D, Wright IK, Hanmer C, Kendall DA, Vincent VG. Agmatine recognizes alpha2-adrenoceptor binding site but neither activates nor inhibits alpha2-adrenoceptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1995; 351 : 10-16.
22. Piletz J.E, Chikkala DN, Ernsberger P. Comparison of the properties of agmatine and endogenous clonidine-displacing substance at imidazoline and alpha2-adrenergic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995; 272 : 581-7.
23. Hudson AL. Harmane, norharmane and tetrahydro β -carboline have high affinity for rat imidazoline binding sites. *Br.J.Pharmacol.* 1999;126 : 2P
24. Musgrave F, Badoer E. Harmane produces hypotension following microinjection into the RLVM: possible role of I_1 -imidazoline receptors. *Br.J.Pharmacol.* 2000; 129:1057-59.

25. MacKinnon AC, Brown CM, Spedding M, Kilpatrick AT. [³H]-Idazoxan binds with high affinity to two sites on hamster adipocytes : an α_2 -adrenoceptor and a non-adrenoceptor sites. *Br J Pharmacol.* 1989; 98 : 1143-50.
26. Ernsberger PR, Westbrook KL, Christen MO, Schafer SG. A second generation of centrally acting antihypertensive agents act on putative I₁-imidazoline receptors. *J Cardiovascular Pharmacol.* 1992; [suppl.4] : S1-10.
27. Piletz J.E, Slettens K. Non-adrenergic imidazoline binding sites on human platelets. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1993; 267: 1493-1502.
28. Regunathan S, Feinstein DL, Reis DJ. Expression of non-adrenergic imidazoline sites in rat cerebral cortical astrocytes. *J Neurosci Res.* 1993; 34 : 681-8.
29. Olmos G, Alemany R, Escriba PV, Garcia-Sevilla JA. The effects of chronic imidazoline drug treatment on glial fibrillary acidic protein concentrations in rat brain. *Br J Pharmacol.* 1994; 111 : 997-1002.
30. Morgan NG, Chan SLF, Brown CA, Tsoli E. Characterization of imidazoline binding site involved in regulation of insulin secretion. *Ann N Y Acad Sci.* 1995; 763 : 361-73.
31. Olmos G, Kulkarni RN, Haque M, MacDermont J. Imidazolines stimulate release of insulin from RIN-5AH cells independently from imidazoline I₁ and I₂ receptors. *Eur J Pharmacol.* 1994; 262 : 41-8.
32. Morgan G, Chan SLF, Moutada M, Monk LK, Ramsden A. Imidazolines and pancreatic hormone secretion. *Annals New York Acad Sciences* 1999; 881 :217-228.
33. Regunathan S, Meeley MP, Reis DJ. Expression of non-adrenergic imidazoline sites in chromaffin cells and mitochondrial membrane of bovine adrenal medulla. *Biochem Pharmacol.* 1993; 45 : 1667-75.
34. Molderings GJ, Moura D, Fink K, Bonish H, Gothert M. Binding of [³H]-clonidine to I₁-imidazoline sites in bovine adrenal medullary membranes. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol.* 1993; 348 : 70-6.
35. Ernsberger P, Giuliano R, Willette RN, Reis DJ. Role of imidazole receptors in the vasodepressor response to clonidine analog, in the rostral ventrolateral medulla. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990; 253 : 408-18.

36. Ernsberger P, Damon TH, Graff M, Schafer SG, Christen O. Moxonidine, a centrally acting antihypertensive agent, is a selective ligand for I₁-imidazoline sites. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993; 264 : 172-82.
37. Ohara-Imaizumi M, Kumakura K. Effects of imidazoline compounds on catecholamine release in adrenal chromaffin cells. *Cell Mol Neurobiol*. 1992; 12 : 273-83.
38. Chan SLF. Role of α_2 -adrenoceptors and imidazoline binding sites in the control of insulin secretion. *Clin Sci*. 1993; 85 : 671-7.
39. Moldering GJ, Gothert M. Inhibitory presynaptic imidazoline receptors on sympathetic nerves in the rabbit aorta differ from I₁ and I₂-imidazoline binding sites. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol*. 1995; 351 : 507-16.
40. Halaris, A., Zhu, H., Feng, Y. and Piletz, J.E. (1999). Plasma agmatine and platelet imidazoline receptors in depression. *Annals New York Academy of Sciences*, 881: 445-51.
41. Singh G, Hussain JF, MacKinnon A, Brown CM, Kendall DA, Wilson VG. Evidence for the presence of a non-catecholamine, clonidine-displacing substance in crude, methanolic extracts of bovine brain and lung. *Naunyn Schmied Arch Pharmacol*. 1995; 351 : 17-26.
42. Diamant S, Eldor A, Atlas D. A low molecular weight brain substance interacts, similarly to clonidine, with alpha2-adrenoceptors of human platelets. *Eur J Pharmacol*. 1987; 144 : 245-55.
43. MacDonald A, MacGrath JC. The distribution of adrenoceptors and other drug receptors between the two ends of the rat vas deferens as revealed by selective agonists and antagonists. *Br J Pharmacol*. 1980; 71, 445-58.
44. Hoogendijk EMG, Jenkins CSP, van Wijk EM, Jos J, Ten Cate JW. Spontaneous platelet aggregation in cerebrovascular disease. *Thromb Haemost*. 1979; 41 : 512-22.
45. Synetos D, Manolopoulous VG, Atlas D, Synetos EP. Human plasma-derived material with clonidine-displacing substance (CDS)-like properties contracts the isolated rat aorta. *J Auton Pharmacol*. 1991; 11 : 343-51.
46. Rupp H. Excess catecholamine syndrome : pathophysiology and therapy. *Annals New York Acad Sciences* 1999; 881 :430-444.

47. Anfossi G, Trovati M. Role of catecholamines in platelet function : Pathophysiological and clinical significance. *Eur J Clin Invest.* 1996; 26 : 353-70.
48. Ulibarri I, Soto J, Ruiz J, Ballesteros J, Jauregui JV, Meana JJ. I₂-imidazoline receptor in platelets of patients with Parkinson's disease and Alzheimer's type dementia. *Annals New York Acad Sciences* 1999; 881 :199-202.
49. Raddatz R, Parini A, Laniers SM. Localization of the imidazoline binding domain on monoamine oxidase. *Mol Pharmacol.* 1997; 52 : 549-53.