

โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดสาร 'clonidine-displacing substance'(CDS) และศึกษาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ของสารนี้ที่  $\alpha_2$ -adrenoceptors และที่ imidazoline receptors สาร CDS คาดว่าเป็นสารที่มีอยู่ในร่างกาย (endogenous substance) และออกฤทธิ์ที่ receptors ทั้งสอง โดยเปรียบกับ agmatine ซึ่งมีรายงานว่า เป็นสารสำคัญของ CDS งานวิจัยนี้ ได้ทำการสกัด clonidine-displacing substance จากสมองหมู่อด้วย methanol และวิเคราะห์ CDS activity ของสารที่สกัดได้ในหน่วยเป็น unit โดยใช้เทคนิคทาง radioligand binding โดย 1 unit หมายถึงปริมาณสารสกัดที่สามารถแย่งที่ [ $^3$ H]-clonidine (1 nM) จับที่ตัวรับ  $\alpha_2$ -adrenoceptor ที่ porcine cerebral cortex membrane ได้ 50% ผลการศึกษาพบว่า สารสกัด CDS จากสมองหมู่อ มี activity 20 ไมโครลิตร/1 unit. หรือ  $7.71 \pm 1.96$  unit/g tissue (n=5) นอกจากนี้ สารสกัด CDS ยังสามารถจับกับตัวรับอิมิดาโซลีนด้วย affinity สูงกว่า ที่  $\alpha_2$ -adrenoceptor ประมาณ 2.7 เท่า คุณสมบัติของสารสกัด CDS ในการออกฤทธิ์ที่  $\alpha_2$ -adrenoceptor ได้ศึกษาโดยใช้ 2 model 1) การกระตุ้นการเกาะกันของเกร็ดเลือด (platelet aggregation) เปรียบเทียบกับ clonidine ซึ่งเป็น  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist และเปรียบเทียบกับผลการออกฤทธิ์กับ agmatine ซึ่งยังไม่มีการศึกษาการออกฤทธิ์ในระบบนี้ ผลการศึกษาพบว่า clonidine สามารถส่งเสริมฤทธิ์ ของ adenosine diphosphate (ADP) ในการกระตุ้นการจับตัวของเกร็ดเลือด ซึ่งผลนี้ถูกยับยั้งได้โดย  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist เช่น yohimbine แสดงว่าเป็นการออกฤทธิ์ผ่าน  $\alpha_2$ -adrenoceptors ส่วนสารสกัด CDS ให้ผล yohimbine แสดงว่าเป็นการออกฤทธิ์ผ่าน  $\alpha_2$ -adrenoceptors ส่วนสารสกัด CDS ให้ผลตรงข้าม โดยยับยั้งการเกาะกันของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย ADP ซึ่งผลนี้มาจากการกระตุ้นที่ non-adrenoceptor ส่วน agmatine แม้ที่ความเข้มข้นสูงถึง 0.1 mM ไม่มีผลต่อการเกาะกันของเกร็ดเลือด 2) model การกระตุ้นที่ prejunctional  $\alpha_2$ -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  $\alpha_2$ -adrenoceptor

คุณสมบัติของสารสกัด CDS ในการออกฤทธิ์ที่ตัวรับอิมิดาโซลีนที่เกร็ดเลือดได้ทำการศึกษาและเปรียบเทียบกับสารที่มีสูตรโครงสร้างเป็น imidazoline พบว่า สารสกัด 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 ดังนั้นการค้นหาระดับโครงสร้างของสารสำคัญในสารสกัด CDS ยังคงต้องศึกษาต่อไป

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  $\alpha_2$ -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  $\alpha_2$ -adrenoceptors on porcine cerebral cortex membranes. CDS activity in porcine brain extract was 20  $\mu$ l/unit or  $7.71 \pm 1.96$  unit/g tissue (n=5batch). Based on radioligand binding assay, CDS extract recognized both  $\alpha_2$ -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  $\alpha_2$ -adrenoceptors CDS activity was examined in unit by radioligand binding technique. Functional activities of CDS extract were examined in the 2 model of  $\alpha_2$ -adrenoceptor. First, platelet aggregation model, clonidine an  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist, was found to potentiate ADP-induced platelet aggregation in a concentration-dependent manner and the effect was inhibited by an  $\alpha_2$ -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  $\alpha_2$ -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  $\alpha_2$ -adrenoceptor activation since idazoxan, an  $\alpha_2$ -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  $\alpha_2$ -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, harmine was reported to be another candidate for CDS, however, this study did not found any significant effect of harmine in platelet aggregation model. In conclusion, CDS extract was not found to display any biological effects at  $\alpha_2$ -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.