



**THE ROLE OF CLONIDINE-DISPLACING SUBSTANCE (CDS)
EXTRACT FROM PORCINE CEREBRAL CORTEX ON
ALPHA2-ADRENOCEPTOR**

RANEE SACHDEV

ฉบับนี้หนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (PHARMACOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2000

ISBN 974-664-482-3

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

4036168 SCPM/M : MAJOR : PHARMACOLOGY ; M.Sc. (PHARMACOLOGY)
KEYWORDS : CLONIDINE-DISPLACING SUBSTANCE (CDS) /
ALPHA2- ADRENOCEPTOR /IMIDAZOLINE RECEPTOR
/ AGMATINE

RANEE SACHDEV : THE ROLE OF CLONIDINE-DISPLACING
SUBSTANCE (CDS) EXTRACT FROM PORCINE CEREBRAL CORTEX ON
ALPHA2-ADRENOCEPTOR. THESIS ADVISORS: DARAWAN PINTHONG,
Ph.D., YUPIN SANVARINDA, Ph.D., SURIN PLASEN, M.D., Ph.D.,
LADDAWAL PHIVTHONGNGAM, Ph.D. 107P. ISBN 974-664-482-3

The purpose of this study was to examine the properties and functions of "clonidine-displacing substance" (CDS) and to determine whether it could be an endogenous substance that acts at alpha2-adrenoceptor apart from at non-adrenoceptor, imidazoline binding sites. Agmatine, a candidate for CDS was also studied in comparison with CDS extract.

In this study CDS was prepared from porcine cerebral cortex using methanolic extract and CDS activity is determined by the amount of the extract that displaces 50% of [³H]clonidine binding to porcine cerebral cortex membranes. The activity of CDS in porcine brain extract was 7.71±1.96 unit/g wet weight tissue (n=5). From the saturation binding assay, the maximum number of alpha2-adrenoceptor on porcine cerebral cortex membranes labeled by [³H]clonidine was 41.91±2.38 fmol/mg protein with K_d value of 3.009±0.371 nM (n=15). The maximum number of imidazoline receptor binding sites on porcine renal cortex membranes labeled by [³H]idazoxan was 368.89±60.55 fmol/mg protein with K_d 9.423±2.791 nM (n=7). Based on radioligand binding assays, porcine CDS extracts in this study recognized both alpha2-adrenoceptor and non-adrenoceptor, imidazoline binding sites with 2.7 fold more potent at imidazoline receptor on porcine renal cortex membranes labeled by [³H]idazoxan (IC₅₀=7.424±1.635 µl/ml) than at alpha2-adrenoceptors on porcine cerebral cortex membranes labeled by [³H]clonidine (IC₅₀=20.6±2.958 µl/ml).

The effect of porcine brain CDS extract on ADP-induced human platelet aggregation was investigated and compared to the effect of clonidine. Clonidine potentiated ADP-induced human platelet aggregation in a concentration dependent manner and the effect was inhibited by an alpha2-adrenoceptor antagonist, yohimbine. On the contrary, CDS inhibited ADP-induced human platelet aggregation in a concentration dependent manner and the effect was not reversed by yohimbine. The inhibitory effect of CDS on ADP-induced platelet aggregation is not due to alpha2-adrenoceptor activation but may be via a non-adrenoceptor site. Agmatine, a putative substance for CDS, showed only small potentiated effect on ADP-induced platelet aggregation at even the concentration as high as 10⁻⁴ M. This study supports previous observations that agmatine possesses distinct biological activity from that of CDS, therefore, it cannot account for CDS activity in the extract.

In conclusion, CDS is able to recognize alpha2-adrenoceptors but the functional activity in modulating human platelet aggregation does not involve with alpha2-adrenoceptor activation. The possibility that CDS is an endogenous ligand at alpha2-adrenoceptors and non-adrenoceptor imidazoline binding sites is still to be clarified.

4036168 SCPM/M : สาขาวิชา: เกษษวิทยา; วท.ม. (เกษษวิทยา)

ราณี สัจจแก้ว : บทบาทของสารสกัด clonidine-displacing substance จากสมองหมู ที่ อัลฟ่า2-อครีเนอจิกรีเซพเตอร์ (THE ROLE OF CLONIDINE-DISPLACING SUBSTANCE (CDS) EXTRACT FROM PORCINE CEREBRAL CORTEX ON ALPHA2-ADRENOCEPTOR) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ :
 คาราวรรณ ปิ่นทอง, Ph.D., ยุพิน สัจจวรินทร์, ปร.ค., สุรินทร์ พลเสน, พ.บ., ปร.ค., ถัดดาวัลย์ ผิวทองงาม, Ph.D.,
 107 หน้า ISBN 974-664-482-3

จากการศึกษา สารสกัด Clonidine-displacing substance (CDS) จากสมองหมูส่วน cerebral cortex พบว่ามีอยู่ในปริมาณ 7.71 ± 1.96 ไมโครกรัมของเนื้อเยื่อส่วนนี้ จาก Saturation assay เพื่อหาจำนวนของตัวรับอัลฟ่า2-อครีเนอจิก (Bmax) โดยใช้ เอมเบรอนจากสมองหมู และใช้ อัลคินาติน ที่ความเข้มข้น 10^{-4} โมลต่อลิตร ในการหาค่า non-specific binding พบว่ามีค่า Bmax 41.91 ± 2.38 พิโคโมล / มิลลิกรัมโปรตีน และมีค่า Kd เท่ากับ 3.009 ± 0.371 นาโนโมล (n=15) และ การศึกษาจำนวนตัวรับ imidazoline โดยใช้เอมเบรอนของไตส่วน cortex และใช้ cirazoline ความเข้มข้น 10^{-4} โมลต่อลิตร ในการหาค่า non-specific binding พบว่ามีค่า Bmax 368.89 ± 60.55 พิโคโมล / มิลลิกรัมโปรตีน และมีค่า Kd เท่ากับ 9.423 ± 2.791 นาโนโมล (n=7) ซึ่งค่าเหล่านี้นำมาใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของสารสกัด CDS ในการจับที่ตัวรับทั้งสอง โดยใช้ competitive binding assay

ผลจากการศึกษาพบว่าสาร CDS สามารถแย่งที่จับที่ ตัวรับอัลฟ่า 2-อครีเนอจิก และที่ตัวรับ imidazoline ด้วยความสามารถในการจับที่ ตัวรับ imidazoline ($IC_{50} = 7.424 \pm 1.635$ ไมโครลิตร/มิลลิลิตร) ได้ดีกว่าที่ตัวรับ อัลฟ่า2-อครีเนอจิก ($IC_{50} = 20.6 \pm 2.958$ ไมโครลิตร/มิลลิลิตร) ประมาณ 2.7 เท่า

เนื่องจากสารสกัดนี้สามารถจับที่ตัวรับอัลฟ่า2-อครีเนอจิก จึงศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดนี้ต่อการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย ADP และเปรียบเทียบผลของสารสกัด CDS กับ clonidine (สารที่ออกฤทธิ์ที่ตัวรับอัลฟ่า2-อครีเนอจิก) พบว่า clonidine สามารถเพิ่มการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเมื่อใช้ ADP เป็นตัวกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญ การเหนี่ยวนำเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ clonidine และผลของการเพิ่มการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดโดย clonidine สามารถถูกยับยั้งได้โดย yohimbine (alpha2-adrenoceptor antagonist) ในทางตรงกันข้ามเมื่อใช้สารสกัดจากสมองหมูพบว่า CDS มีผลยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย ADP และผลของการยับยั้งมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด แต่ไม่สามารถยับยั้งผลนี้ได้ด้วย alpha2-adrenoceptor antagonist เช่น yohimbine Agmatine ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้ว่าเป็นสาร CDS จากการศึกษาพบว่า Agmatine แม้ที่ความเข้มข้นสูงถึง 10^{-4} โมล ก็ไม่มีผลต่อการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเมื่อกระตุ้นด้วย ADP อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแตกต่างจากสารสกัด CDS

การศึกษานี้สรุปได้ว่าสารสกัด CDS สามารถจับได้ที่ตัวรับอัลฟ่า2-อครีเนอจิก แต่สารนี้ให้ผลตรงกันข้ามกับ clonidine ในการกระตุ้นการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดและผลของสารสกัดต่อการยับยั้งการเกาะกันของเกล็ดเลือดไม่ได้เกิดจากการกระตุ้นที่ตัวรับอัลฟ่า2-อครีเนอจิกแต่อาจเป็นที่ non-adrenoceptor ฤทธิ์ของ CDS ที่ตัวรับอัลฟ่า2-อครีเนอจิกยังคงต้องศึกษาต่อไป ส่วน Agmatine ไม่น่าจะเป็นสารสำคัญของสารสกัด CDS เนื่องจากมีผลการออกฤทธิ์ที่แตกต่างจากสารสกัด CDS