

LETTER TO EDITORS

ประวัติการค้นพบวิธีการศึกษา Receptor Binding

บพิตร กลางกัลยา

ภาควิชาเภสัชวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า

การศึกษาด้วยวิธี receptor binding เป็นเทคนิคที่ใช้กันมากที่สุดเรื่องหนึ่งในช่วงสิบถึงยี่สิบกว่าปีที่ผ่านมา ทำให้มีองค์ความรู้เกี่ยวกับ receptor ของฮอร์โมน สารสื่อประสาทและสารอื่นๆ อีกมาก รวมทั้งนำไปสู่การค้นพบสารชนิดใหม่ๆ อีกนับร้อยชนิด มีบทบาทหลากหลายในระบบต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต สามารถทำความเข้าใจลักษณะการทำงานของระบบต่างๆ ได้ดีขึ้น และนำความรู้ความเข้าใจเหล่านี้ไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวิธีการป้องกันหรือบำบัดรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น แม้ว่าในยุคสิบปีหลังนี้ความสนใจเกี่ยวกับวิธีการศึกษาจะโน้มไปทางสาขาพันธุศาสตร์มากขึ้น แต่ผลงานการตีพิมพ์ในเรื่อง receptor ของสารต่างๆ ก็ยังคงมีมากมายทุกเดือน และเป็นพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการศึกษาดังกล่าวใหม่ ๆ อีกหลายๆ วิธี

เมื่อย้อนอดีตไปถึงปีที่มีการตีพิมพ์เรื่อง receptor binding ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันในวงการอย่างกว้างขวางคือ ปี คศ. 1973¹⁻³ ก็นับได้ 31 ปี นานพอที่จะเป็นประวัติศาสตร์ได้แล้ว นักวิทยาศาสตร์ยุคใหม่หลายคนอาจไม่รู้ว่า กว่าที่จะพิสูจน์ได้ว่าเป็น receptor binding นักวิทยาศาสตร์ในยุคนั้นเขาต้องลองผิดลองถูกกันขนาดไหน มีวิธีการคิดและวิธีการพิสูจน์อย่างไร จึงนำมาสู่จุดเริ่มต้นแห่งความเจริญรุ่งเรืองของวิชาการด้านนี้ได้ ผู้เขียนพอมีประสบการณ์ในยุคเริ่มต้นนั้นอยู่บ้าง จึงขอนำมาสรุปเป็นเกร็ดประวัติศาสตร์ต่อไป

ยุคก่อน receptor binding นั้นมีผู้เรียกว่าเป็นยุค classical pharmacology วิธีการศึกษานิยมวัดการตอบสนองโดยตรง (*in vivo*) หรือใช้ organ

bath เพื่อวัดการตอบสนองของเนื้อเยื่อต่อยา *in vitro* ได้ dose response curves และหาค่า IC_{50} , K_d รวมทั้งความเป็น agonist หรือ antagonist ได้ คนไทยรุ่นแรกๆ ที่ศึกษาเรื่องนี้คืออาจารย์โรจากคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ซึ่งไปศึกษากับ Prof. Schild ที่เยอรมันนี่ มีผลงานเกี่ยวกับวิธีการหาค่าความเข้มข้นของ agonist ที่ต้องเพิ่มขึ้นเมื่อมี antagonist อยู่ด้วยเพื่อให้ผลเท่าเดิม (pA_x) และมี paper ที่ถูกอ้างถึงมาก⁴ คนต่อมาซึ่งน่าจะนับได้ว่าเป็นผู้ที่เข้าใจวิธีการศึกษาเรื่อง receptor ดีที่สุดผู้หนึ่งของเมืองไทยคือ อาจารย์จิรวรรณ สดางศ์วิวัฒน์⁵⁻⁶ ซึ่งใครที่ได้อ่านงานเขียนของท่านอย่างละเอียดจะเห็นได้ว่าการวิเคราะห์ได้อย่างลึกซึ้งทีเดียว

ความพยายามที่จะศึกษา receptor binding โดยการใช้ radioligand นั้น มีหลายกลุ่มที่ศึกษามาก่อนปี คศ.1973 แต่ยังหาวิธีการที่เหมาะสมที่สุดไม่ได้ เช่นกลุ่มของ Rang ซึ่งศึกษาการจับกับ muscarinic cholinergic receptor โดยใช้ ³H-atropine⁷ และ ³H-benzilylcholine⁸ กลุ่มของ Changenx⁹ และ Raftery¹⁰ ซึ่งศึกษาการจับกับ nicotinic cholinergic receptor ของปลาไหลไฟฟ้า โดยใช้ ¹²⁵I- α -bungarotoxin กลุ่มของ Cautrecasas¹¹ ซึ่งศึกษา insulin receptor binding โดยใช้ ¹²⁵I-insulin และกลุ่มของ Goldstein¹² ซึ่งหาทางวัดการจับของ ³H-levorphanol ต่อ opiate receptor ใน membrane ที่ได้จากสมองหนู วิธีการศึกษาต่างๆ เหล่านี้มีข้อจำกัดหลายอย่าง เช่นกลุ่มของ Rang⁷ และ Goldstein¹² ยังไม่สามารถพัฒนาให้ radioligand ที่ใช้มี specific activity สูงพอ จึง

จำเป็นต้องใช้สารที่ความเข้มข้นสูง ซึ่งการจับส่วนมากจะเป็นส่วน low affinity เลยไม่สามารถแสดงส่วนที่จับกับ receptor ได้ดีพอ ส่วน ligand ที่จับแบบ irreversible⁸ หรือแยกจาก receptor ช้ามาก⁹⁻¹⁰ ก็ไม่เหมาะสำหรับการวัดการจับกับ receptor ตามสมมุติฐานว่าเป็น reversible bimolecular reaction ส่วนการใช้ ¹²⁵I-insulin¹¹ หรือ ³H-levorphanol¹² ก็มีปัญหาเรื่อง specificity ซึ่งมีผู้พบว่าสามารถจับกับผนังหรือใยแก้วที่ใช้ในแผ่นกรอง หรือเนื้อเยื่อที่ไม่ใช่โปรตีนได้อย่างมีลักษณะของ specific binding ได้¹³ แต่จากประสบการณ์ของงานวิจัยที่กล่าวมาแล้วก็ทำให้กลุ่มที่ศึกษาในระยะต่อมาได้แนวคิดหลายอย่าง เช่นจะต้องมี radioligand ที่มี specific activity สูงมาก จับกับ receptor ได้แบบ reversible แต่มี high affinity และจะต้องมีวิธีการแยก radioligand ที่อิสระออกจากที่จับกับ membrane ได้อย่างรวดเร็วด้วย เช่นวิธีการแยกโดยใช้การกรองผ่าน manifold ซึ่งใช้ดูดด้วย vacuum และสามารถกรองพร้อมๆ กันหลายช่องก็ได้มาจากวิธีของ Cautrecasas¹¹ เป็นต้น

เมื่อมีแนวทางการศึกษาชัดเจนแล้ว จึงมีกลุ่มที่ต่างก็ศึกษาไปพร้อมๆ กันและตีพิมพ์พร้อมๆ กัน¹⁻³ โดยใช้ radioligand ต่างกันคือ กลุ่มของ Solomon H. Snyder¹ ที่ Johns Hopkins University ใช้ ³H-naloxone กลุ่มของ Eric J. Simon² ที่ New York University ใช้ ³H-etorphine และกลุ่มของ L. Terenius³ ที่ University of Uppsala ใช้ ³H-dihydromorphine เป็น radioligand สำหรับศึกษาการจับกับ opiate receptor

วิธีการศึกษาโดยย่อก็คือนำเนื้อสมองส่วนที่จะศึกษามาบดให้ละเอียดแล้วปั่นแยกส่วนเอาเฉพาะที่เป็น membrane (ในกรณีศึกษา membrane receptor) มา resuspend ใน medium ที่ต้องการ เติม radioactive ligand ลงไปที่อุณหภูมิและเวลาซึ่งการจับกับ receptor ไปถึงภาวะสมดุลแล้วแยก membrane ออกจาก medium ซึ่ง bound ligand จะจับอยู่กับส่วน membrane นำไปวัดปริมาณของกัมมันตรังสีเป็นปริมาณการจับทั้งหมด ในขณะที่การจับกับ receptor จะมีจำนวนจำกัดและ

มีลักษณะอิ่มตัว ส่วนที่จับอย่างไม่เฉพาะเจาะจงคือจับกับจุดอื่นๆ จะมีมากกว่าและไม่อิ่มตัว จึงวัดส่วนที่จับอย่างไม่เฉพาะเจาะจงได้โดยใช้ nonradioactive ligand ใส่ลงไปให้ล้นเพื่อไปแย่งจับ receptor จนหมด แล้ววัดปริมาณกัมมันตรังสีที่จับอยู่เป็น nonspecific binding หักลบจากปริมาณการจับกับทั้งหมดที่เหลือนับเป็น specific binding ซึ่งมักเปรียบเทียบกับว่าเป็น receptor binding แต่ทั้งนี้การที่จะสรุปว่าเป็น receptor binding จริงๆ จะต้องมีเกณฑ์อื่นๆ ประกอบอีกมาก เช่นการมี stereo-specificity และถูกแทนที่ได้ด้วย agonist หรือ antagonist ด้วยลักษณะเหมือนกับการวัดจากการตอบสนองต่อ receptor เป็นต้น¹³ นอกจากนี้วิธีการศึกษาที่กล่าวมานี้ ยังอาศัยหลักการว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นแบบ reversible bimolecular reaction ที่สามารถใช้ law of mass action ได้ สภาพการณ์ในการทดลองจึงอยู่บนสมมุติฐานหลายข้อ ซึ่งถ้าผิดไปจากนั้นก็อาจทำให้การวัดค่าต่างๆ ผิดพลาดไปได้ รายละเอียดของเรื่องนี้ได้เคยตีพิมพ์ในวารสารเภสัชวิทยาแล้วเมื่อปี พ.ศ. 2522¹⁴ และ 2524¹⁵

ภายหลังจากการตีพิมพ์วิธีการจับกับ opiate receptor ได้ไม่นาน หลักการดังกล่าวนี้ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้กับ receptor ของสารกลุ่มต่างๆ อีกมากมาย ปริมาณการตีพิมพ์ในเรื่อง receptor binding ในปี ค.ศ. 1975 ขยายเพิ่มขึ้นมาจนแซงหัวข้ออื่นๆ มาอยู่อันดับต้นๆ และด้วยการติดตามวัดว่าสารสกัดส่วนใดมีผลต่อการจับที่ opiate receptor ได้ ก็สามารถนำไปสู่การค้นพบสารที่มีอยู่แล้วในสิ่งมีชีวิตซึ่งออกฤทธิ์ต่อ opiate receptor เป็นระบบ endogenous morphine ในเนื้อเยื่อต่างๆ ในเวลาต่อมา (ดูรายละเอียดในบทความที่ตีพิมพ์แล้ว)¹⁶ กลุ่มที่ศึกษาไปพร้อมๆ กันและแข่งขันกันตีพิมพ์ผลการค้นพบสารจากสมองวัวที่สามารถแย่งจับกับ radioligand ที่ opiate receptor ได้ คือกลุ่ม Hughes และ Kosterlitz¹⁷ ที่มหาวิทยาลัย Aberdeen กลุ่ม Pasternak และ Snyder¹⁸ ที่ Johns Hopkins และ

กลุ่มของ Terenius¹⁹ ที่มหาวิทยาลัย Uppsala ใน ขณะที่กลุ่มของ Hughes ได้รับเครดิตมากที่สามารถแยกสารจากสมองซึ่งแย่งจับที่ opiate receptor ได้นี้ออกมาจนบริสุทธิ์เป็น pentapeptide 2 ตัวคือ methionine-enkephalin และ leucine-enkephalin ต่อมากลุ่มอื่นๆ อีกหลายกลุ่มได้ค้นพบ peptide ที่มีโมเลกุลยาวกว่าจาก hypothalamus และต่อมาได้สมองเรียกรวมกันว่า endorphins ซึ่งพบว่ามียับยั้งการทำหน้าที่อย่างกว้างขวางทั้งในระบบประสาทและระบบต่อมไร้ท่อ^{20,21} รวมถึงความรู้ที่คนทั่วไปได้รับทราบกันในปัจจุบันว่าการออกก้างกายทำให้เกิดความรู้สึกปิติได้ เนื่องจากการหลั่งสาร endorphins ก็มีที่มาจากความรู้เมื่อ 30 ปีมาแล้ว

ภายหลังจากที่เขียนบทความนี้จบแล้ว ได้อ่านพบบทความใน TIPS ซึ่งตีพิมพ์เมื่อไม่นานมานี้อีก 2 เรื่อง^{22,23} มีเนื้อหาเกี่ยวข้องกับเรื่องทฤษฎีของ receptor และการค้นพบ opioid receptors แสดงว่าในระดับนานาชาติยังให้ความสำคัญกับประเด็นทางทฤษฎีและหลักการที่นำมาศึกษา receptor binding อยู่ค่อนข้างมาก ประเด็นที่กล่าวถึงในบทความ 2 เรื่องดังกล่าว มีรายละเอียดมากกว่าบทความนี้มาก มีบางประเด็นที่เห็นว่ามันจะนำมาขยายความเพิ่มเติมเพื่อให้ผู้อ่านได้รับรู้เหตุผลและวิธีการศึกษาละเอียดขึ้น

บทความของ Snyder และ Pasternak²² ได้เล่าเบื้องหลังการค้นพบวิธีวัด opioid receptor ว่ามาจากเหตุผลที่หนึ่งคือนโยบายของประธานาธิบดีนิกสัน ซึ่งประกาศ "War on Heroin" ทำให้กลุ่มของเขาได้รับทุนมาศึกษา opioid receptors และเหตุผลที่สองซึ่งนักวิทยาศาสตร์ทั้งหลายควรจะรับเป็นตัวอย่างก็คือ เขาได้ให้เครดิตว่าได้รับแนวคิดมาจากผลงาน Goldstein¹² ตามที่กล่าวถึงมาแล้ว สิ่งในกลุ่ม Synder คิดต่อคือการหา radioligand ที่มี specific activity สูงขึ้น และการหาวิธีล้างเอา nonspecific binding ออกให้เหลือน้อยที่สุด ทำให้สามารถวัดส่วนที่เป็น specific binding ได้ถึงร้อยละ 70 ของปริมาณ binding ทั้งหมด

ประเด็นอื่นๆ ในบทความของ Synder และ Pasternak ได้กล่าวถึงงานลำดับต่อมา ซึ่งเป็นผลสืบเนื่องจากการค้นพบ opioid receptors เช่นการแสดงลักษณะการออกฤทธิ์ที่ต่างกันระหว่าง agonist และ antagonist การพัฒนาเทคนิค autoradiography เพื่อบอกตำแหน่ง receptor การค้นพบชนิดย่อยของ receptors และการค้นพบ endogenous opioid peptides อีกจำนวนมาก สิ่งที่น่าสนใจมานาน²⁴ และยังเป็นคำถามอยู่จนปัจจุบันก็คือบทบาททางสรีรวิทยาของ peptides เหล่านี้ และจะสามารถแยกบทบาทของ agonist หรือ antagonist ที่มีผลระงับปวดกับที่มีผลเสพติดได้หรือไม่ นี่ยังเป็นความหวังสำหรับอนาคตต่อไป

อีกประเด็นหนึ่งที่ได้กล่าวถึงแล้วคือการคำนวณ receptor binding อาศัยสมมุติฐานว่าเป็นปฏิกิริยาหนึ่งโมเลกุลของยากับหนึ่งโมเลกุลของ receptor แต่ข้อเท็จจริงก็เป็นที่ยอมรับกันอยู่แล้วว่า โมเลกุลของ receptor นั้นซับซ้อนและมีหลายกรณีที่ไม่ตรงกับที่สมมุติว่าเป็นโมเลกุลเดี่ยว เช่นอยู่ในหลายภาวะ (active, inactive) และควบคู่กับโมเลกุลอื่นเป็นลักษณะ complex ซึ่งมีการควบคุมกันและกัน ลักษณะเช่นนี้จะต้องมีการคิดปฏิกิริยาการจับระหว่างยากับ receptor เป็น model ที่อยู่ในหลากหลายภาวะและบทความของ Kenakin²³ ได้นำเสนอแนวทางการคำนวณและการหาปริมาณการตอบสนองเมื่อ receptor มีหลายภาวะดังกล่าว โดยใช้ข้อเท็จจริงจากลักษณะของ G-protein coupled receptors (GPCRs) แนวคิดที่น่าสนใจคือ GPCR ไม่ใช่ทำหน้าที่เป็นเพียงสวิตช์ที่เปิดปิดการสร้าง second messenger เท่านั้น แต่จะเป็น interactive information processing โดยมี protein อีกหลายตัวควบคุมกันอยู่

วิธีการคิด และการนำเสนอเป็น models และกราฟของ Kenakin นี้ตีพิมพ์แล้วหลายครั้งใน TIPS และ Annual Review of Pharmacology แต่เป็นบทความที่อ่านเข้าใจได้ยากมาก จะเห็นได้ว่าทฤษฎีการวัดเรื่อง receptor ตั้งแต่ยุคเริ่มต้นของ A.J. Clark ก็อาศัยความรู้ทางคณิตศาสตร์เป็นหลัก มาจนถึงแนวคิดของ Kenakin ก็ต้องมีความรู้

ทางคณิตศาสตร์มากพอสมควรจึงจะเข้าใจ จึง
อยากเสนอข้อคิดเห็นส่งท้ายไว้ว่าผู้จัดบัณฑิตศึกษา
ทางเภสัชวิทยาในบ้านเราน่าจะมองหาผู้เรียนที่จบ
และเก่งทางคณิตศาสตร์เข้ามาเรียนบ้าง จะได้มีผู้ที่
ศึกษาหลากหลายแนวทางต่าง ๆ กัน มิใช่ตาม
กระแสไปศึกษาเฉพาะด้านใดด้านหนึ่ง ซึ่งจะทำให้
อนาคตของวงการแคบลงได้

เอกสารอ้างอิง

1. Pert CB and Snyder SH. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 1973; 179: 1011-1014.
2. Simon EJ, Hiller JM and Edelman I. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic ³H-etorphine to rat brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1973; 70: 1947-1949.
3. Terenius L. Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol Toxicol* 1973; 32: 317-320.
4. Arunlakshana O and Schild HO. Some quantitative uses of drug antagonists. *Brit J Pharmacol* 1959; 14: 48-58.
5. Sadavongvivad C. Receptor theory of drug action. *J Sci Soc Thailand* 1977; 3: 61-72.
6. Sadavongvivad C. Quantitative analysis of biological responses. หนังสือชีวประวัติ รศ. ดร. จีรวัฒน์ สดางวงศ์วัฒน์ 2536: 96-110.
7. Paton WDM and Rang HP. The Uptake of atropine and related drugs by intestinal smooth muscle of the guinea-pig in relation to acetylcholine receptors. *Proc Roy Soc B* 1965; 163: 1-44.
8. Gill EW and Rang HP. An alkylating relative to benzilylcholine with specific and long-lasting parasympatholytic activity. *Mol Pharmacol* 1966; 2: 284-297.
9. Meunier J-C, Olsen RW, Menez A, Fromageot P, Boquet P, and Changeux J-P. Some physical properties of the cholinergic receptor α -toxin from *Naja nigricollis* venom. *Biochemistry* 1972; 11: 1200-1210.
10. Raftery MA, Schmidt J, Clark DG, and Wolcott RG. Demonstration of a specific α -bungarotoxin binding component in *Electrophorus electricus* electroplax membranes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1971; 45: 1622-1629.
11. Cuatrecasas P. Insulin-receptor interaction in adipose tissue cells: Direct measurement and properties. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1971; 68: 1264-1268.
12. Goldstein A, Lowney LI, and Pal BK. Stereospecific and nonspecific interactions of the morphine congener levorphanol in subcellular fractions of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1971; 68: 1742-1747.
13. Yamamura HI, Enna SJ, and Kuhar MJ. Editor: Neurotransmitter Receptor Binding. Raven Press, New York, USA, 1978.
14. Klangkalya B. Neurotransmitter receptor binding assay: theoretical considerations. *The Pharmacology* 1979; 1(3): 1-16.
15. บพิตร กลางกัลยา. Basic assumptions in the analysis of drug-receptor interaction. *วารสารเภสัชวิทยา* 2524; 3(1): 1-4.
16. บพิตร กลางกัลยา Opiate receptor และสารที่ออกฤทธิ์เหมือนฝิ่นในสมอง. *วิทยาศาสตร์เสนาธิการ* 2522; 32: 279-289.
17. Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA and Morris HR. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 1975; 258: 577-9.
18. Pasternak GW, Goodman R and Snyder SH. An endogenous morphine-like factor in mammalian brain. *Life Sci* 1975; 16: 1765-1769.
19. Terenius L and Wahlstrom A. Search for an endogenous ligand for the opiate receptor. *Acta Physiol. Scand* 1975; 94: 74-81.
20. Costa E and Trabucchi M Ed: Advance in Biochemical Psychopharmacology V.18, 1978 Raven Press, New York, N.Y. USA.
21. บพิตร กลางกัลยา Opiate receptors and opioid peptides: สรุปความก้าวหน้าของงานวิจัยและความสำคัญทางคลินิก. *วิทยาศาสตร์เสนาธิการ* 2524; 34: 241-257.
22. Snyder SH and Pasternak GW. Historical review: opioid receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24: 198-205.
23. Kenakin T. Principles: receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 186-192.
24. บพิตร กลางกัลยา. บทบาททางสรีรวิทยาของ opioid peptides และการตีความจากผลของ naloxone. *วารสารเภสัชวิทยา* 2524; 3: 85-93.