ข้อวิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดหยาบจากเหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทน (KPD) มีผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด โดยมีผลทำให้ลดทั้งความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจในหนูแร็ทโดยที่ KPD ไม่ได้ออกฤทธิ์ผ่านทาง β-adrenergic receptors, muscarinic receptors หรือผ่านทางระบบประสาทกลาง เนื่องจาก propranolol ซึ่งเป็น non-specific β-adrenergic receptor antagonist; atropine ซึ่งเป็น non-specific muscarinic receptor antagonist และ hexamethonium ซึ่งเป็น ganglion blocking agent ไม่สามารถยับยั้งการลดความดันโลหิต และการลดอัตราการเต้นของหัวใจของหนูแร็ทต่อ KPD ได้ นอกจากนี้ hexamethonium ยังมีผลเสริมการลดความดันโลหิตของ KPD อีกด้วย

ผลการลดความดันโลหิต และการลดอัตราการเต้นของหัวใจของ KPD ในหนูแร็ทสลบน่าจะเป็นการออกฤทธิ์โดยตรงของ KPD ที่หัวใจและหลอดเลือด KPD มีผลทำให้ลดอัตราการเต้นได้เองของหัวใจห้องบนขวา ที่ตัดแยกออกมาศึกษานอกตัว ผลดังกล่าวนี้ไม่ได้เป็นผลมาจากสารออกฤทธิ์ผ่านทาง adrenergic หรือ muscarinic receptors ที่หัวใจ เนื่องจาก propranolol และ/หรือ atropine ไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอัตราการเต้นได้เองของกล้ามเนื้อหัวใจต่อ KPD แต่อย่างใด การที่พบว่า KPD มีผลทำให้เพิ่มการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจและผลดังกล่าวนี้สามารถยับยั้งได้ด้วย propranolol และ/หรือ atropine แต่เนื่องจากการยับยั้งไม่ได้ทำให้เกิด parallel shift ของ C-R curve ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าผลการยับยั้งของ propranolol และ atropine ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนซ้ายอาจเป็นแบบ non-specific อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมยืนยันผลดังกล่าวนี้

จากการที่พบว่า KPD มีผลทำให้หลอดเลือดแดง thoracic aorta ที่ให้หดตัวอยู่ก่อนแล้วด้วย phenylephrine หรือ KCl คลายตัว และผลดังกล่าวถูกทำให้ shift ไปทางขวาถึง 10 เท่าเมื่อมีการยับยั้งการสร้าง nitric oxide ด้วย LNA (Frew et al., 1993) หรือโดยการทำลายเนื้อเยื่อชั้น endothelium เป็นการชี้ให้เห็นว่า KPD มีผลโดยตรงที่หลอดเลือดทำให้หลอดเลือดคลายตัว และมีผลโดยทางอ้อมกระตุ้นให้มีการหลั่ง nitric oxide จาก endothelium cells แล้ว nitric oxide จึงมีผลทำให้หลอดเลือดคลายตัว ซึ่งผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับรายงานของ Wattanapitayakul et al. (2007) ที่พบว่า Kaempferia parviflora ethanolic extract กระตุ้นให้มีการหลั่งของ nitric oxide จาก endothelial cell ของ umbilical vein การที่พบว่า ODQ สามารถยับยั้งการคลายตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ในหลอดเลือดที่มี endothelium แต่ผลดังกล่าวนี้หมดสิ้นไปถ้ามีการยับยั้งการสร้าง nitric oxide ด้วย LNA และยิ่งไปกว่านั้นถ้าเนื้อเยื่อชั้น endothelium ถูกทำลาย ODQ กลับมีผลเสริมการคลายตัวของหลอดเลือดคลายตัว จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ผลการยับยั้งการคลายตัวของหลอดเลือดต่อ KPD โดย ODQ น่าจะเป็นผลมาจาก ODQ ยับยั้งการสร้าง cGMP (Woodman et al., 2000) ที่ถูกสร้าง

ขึ้นมาโดย nitric oxide ซึ่งถูกกระตุ้นให้หลั่งโดย KPD ซึ่งจะเห็นได้ว่าฤทธิ์ดังกล่าวนี้หมดไปเมื่อการสร้าง nitric oxide ถูกยับยั้งโดย LNA หรือเนื้อเยื่อชั้น endothelium ถูกทำลาย การที่พบว่า ODQ เสริมการคลายตัวของหลอดเลือดที่ไม่มี endothelium เป็นผลการทดลองที่แปลกมากยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน กลไกเกี่ยวข้องเป็นอย่างไรจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

การคลายตัวของหลอดเลือดโดย KPD ไม่น่าจะเป็นผลเนื่องมาจาก KPD ออกฤทธิ์ผ่านทาง muscarinic receptors, adrenergic receptors หรือกระตุ้นให้มีการเปิดของ Ca^{2+}-sensitive K-channels เนื่องจาก atropine, proptranolol หรือ TEA ไม่มีผลยับยั้งการคลายตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ KPD แต่อย่างใด ส่วน glybenclamide ซึ่งเป็น ATP-sensitive K^{+}-channels กลับพบว่ามีผลทำให้การคลายตัวของหลอดเลือดต่อ KPD มีการคลายตัวแรงมากขึ้นในหลอดเลือดที่ยังคงมี endothelium อยู่ แต่ผลดังกล่าวหมดสิ้นไปเมื่อ nitric oxide synthase ถูกยับยั้งการทำงานโดย LNA หรือโดยการทำลายเนื้อเยื่อชั้น endothelium เป็นการชี้แนะให้เห็นว่า KPD ไม่ได้กระตุ้นให้มีการเปิดของ ATP sensitive K^{+}channel แต่กลับมีผลเสริมการคลายตัวของหลอดเลือดที่มี endothelium ต่อ KPD ผลดังกล่าวนี้ผ่านทางกลไกใดจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

จากการที่พบว่า nifedipine มีผลยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ phenylephrine และเมื่อให้ KPD ร่วมด้วย พบว่าการยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine มากยิ่งขึ้น เป็นการชี้ให้เห็นว่า KPD น่าจะมีผลอย่างอื่นนอกเหนือจากการยับยั้งการนำเข้าของ Ca^{2+} เข้าสู่เซลล์ ซึ่งเหตุผลดังกล่าวนี้สามารถพิสูจน์ได้เมื่อทำการศึกษาใน Ca^{2+} free Kreb's solution พบว่า KPD มีผลยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ phenylephrine เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ศึกษาใน Ca^{2+} free Kreb's solution เพียงอย่างเดียว ซึ่งเป็นการชี้แนะว่า KPD น่าจะมีผลต่อการหลั่งของ Ca^{2+} จากแหล่งเก็บภายในเซลล์โดยอาจจะยับยั้งการหลั่งของ Ca^{2+} จาก sarcoplasmic reticulum หรือทำให้ลด sensitization ของ contractile machinery ต่อ Ca^{2+} ผ่านทาง Rho-kinase เพื่อที่จะพิสูจน์ว่า KPD มีผลดังกล่าวนี้หรือไม่ ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบการหดตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ phenylephrine และต่อ KCl เปรียบเทียบผลกับ nifedipine ซึ่งเป็น Ca^{2+} channel blocker และ Y-27632 ซึ่งเป็น Rho-kinase inhibitor ซึ่งมีผลทำให้ลด sensitivity ของ contractile machinery ต่อ Ca^{2+} (Chitaley et al., 2001; Somlyo and Somlyo, 2000) ดังรายละเอียดในรูปที่ 6 จะเห็นว่ารูปแบบในการหดตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ phenylephrine ที่มี KPD อยู่ด้วยมีรูปแบบคล้ายกับการหดตัวของหลอดเลือดที่มี Y-27632 อยู่ด้วย ส่วนรูปแบบการหดตัวต่อ KCl จะคล้ายกับการหดตัวของหลอดเลือดที่มี nifedipine อยู่ด้วย ผลการทดลองดังกล่าวนี้เป็นการชี้แนะว่า KPD น่าจะออกฤทธิ์ยับยั้งการนำเข้าของ Ca^{2+} เข้าสู่เซลล์ และอาจมีผลเป็น Rho-kinase inhibitor ในทำนองเดียวกับ Y 27632

การลดระดับ Ca^{2+} ใน sarcoplasmic reticulum จะกระตุ้นให้มีการเปิดของ store-operated Ca^{2+} channel ส่งผลให้มีการเคลื่อนของ Ca^{2+} จากนอกเซลล์เคลื่อนเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อทำให้เกิดการเติมเต็มที่ sarcoplasmic reticulum เป็นไปได้ว่าผลการคลายตัวของ KPD ต่อหลอดเลือด thoracic aorta อาจเป็นผลเนื่องมาจาก KPD มีผลยับยั้งการเปิดของ store-operated Ca^{2+} channel เพื่อพิสูจน์สมมุติฐานดังกล่าว ทำการทดลองโดย incubate หลอดเลือด thoracic aorta ด้วย thapsigargin เพื่อยับยั้งการทำงานของ SERCA pump ที่ sarcoplasmic reticulum ทำให้ Ca^{2+} ไม่สามารถถูก pump จาก intracellular fluid นำไปเก็บไว้ที่ sarcoplasmic reticulum ทำให้เกิดการพร่องของ Ca^{2+} ใน sarcoplasmic reticulum ส่งผลให้มีการเปิดของ store-operated Ca^{2+} channels ซึ่งการเปิดของ store-operated Ca^{2+} channels จะถูกยับยั้งได้ด้วย SKF 96365 (Quinn et al., 2004, 2006) จากผลการทดลองในรูปที่ 8 การศึกษาใน normal Kreb's solution พบว่า SKF 96365 สามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือด thoracic aorta โดย thapsigargin ได้บางส่วน ในขณะที่ Y 27632 และ KPD สามารถยับยั้งได้ 100 % จากผลการทดลองดังกล่าวเป็นการชี้ให้เห็นว่า KPD น่าจะมีฤทธิ์ คล้ายกับ Y 27632 หรืออาจจะมีฤทธิ์บางส่วนคล้ายกับ SKF 96365 เพื่อที่จะยืนยันสมมุติฐานดังกล่าวนี้ได้ทำการศึกษาใน Ca^{2+} free Kreb's solution ดังผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 9 พบว่าหลังจากที่ incubate หลอดเลือดด้วย Thapsigargin ประมาณ 40 นาที แล้วเพิ่ม Y 27632, SKF 96356 หรือ KPD ลงไป และ incubate ต่อไปอีก 40 นาที แล้วศึกษาผลการหดตัวต่อ $CaCl_2$ พบว่าหลอดเลือดที่มี Y27632 หรือ SKF 96356 อยู่ด้วย สามารถตอบสนองในการหดตัวต่อ $CaCl_2$ได้สูง แต่หลอดเลือดที่มี KPD สามารถหดตัวต่อ $CaCl_2$ ได้เพียงเล็กน้อย จากผลการทดลองดังกล่าวนี้เป็นการชี้ให้เห็นว่า KPD น่าจะมีผลผ่านทางกลไกอื่นแตกต่างจาก Y 27632 หรือ SKF 96365 หรืออาจจะมีผลเหมือนกับสารทั้ง 2 นี้ และมีผลผ่านทางกลไกอื่นร่วมด้วย เช่นการยับยั้งการหลั่ง Ca^{2+} จาก intracellular store เพื่อที่จะพิสูจน์สมมุติฐานดังกล่าวนี้ ได้ทำการทดลองเพิ่มเติมในหลอดเลือดที่ incubate ด้วย thapsigargin ซึ่งเป็น SERCA pump inhibitor ทำให้ Ca^{2+} ที่อยู่ภายในเซลล์ไม่สามารถนำกลับเข้าไปเก็บไว้ใน sarcoplasmic reticulum ได้ ส่งผลให้ sarcoplasmic reticulum ไม่มี Ca^{2+} สะสมอยู่และกระตุ้นให้มีการเปิดของ store-operated Ca^{2+} channel ที่ plasma membrane จากนั้น incubate หลอดเลือดพร้อมกับ Y 27632, SKF 96365 ซึ่ง store-operated Ca^{2+} channel inhibitor หรือ KPD แล้วจึงศึกษาการหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine ซึ่งกระตุ้นให้มีการหลั่งของ Ca^{2+} จาก intracellular store สำหรับการเริ่มต้นในการหดตัวของหลอดเลือด ดังผลการทดลองที่แสดงไว้ในรูปที่ 10 ผลการทดลองใน normal Kreb's solution พบว่าทั้ง Y 27632 และ SKF 96365 สามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine ได้ระดับหนึ่ง ในขณะที่ KPD สามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine ได้เกือบ 100 % ส่วนผลการหดตัวของหลอดเลือดใน Ca^{2+} free Kreb's soltution พบว่าทั้ง Y 27632, SKF 96365 และ KPD

สามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine ได้เกือบ 100 % ซึ่งจากผลการทดลองทั้งหมดดังกล่าวนี้สรุปได้ว่า KPD ไม่น่าจะแสดงฤทธิ์เป็น Rho-kinase inhibitor หรือ store-operated Ca^{2+} channel blocker แต่น่าจะออกฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง Ca^{2+} จาก sarcoplasmic reticulum ส่งผลให้หลอดเลือดคลายตัว

3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) มีผลลดความดันโลหิตและลดอัตราการเต้นของหัวใจแบบ dose-dependent ในทำนองเดียวกันกับ KPD แม้ว่า atropine หรือ propranolol ไม่สามารถยับยั้งการลดอัตราการเต้นของหัวใจต่อ KPD ได้ แต่สามารถยับยั้งผลของ PM ได้ นอกจากนี้จากผลการศึกษาในกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนซ้ายพบว่า KPD มีผลเพิ่มความแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนซ้ายที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าและผลดังกล่าวสามารถยับยั้งได้ด้วย propranolol และ/หรือ atropine ในขณะที่ PM มีผลทำให้เพิ่มความแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนขวาเช่นกัน แต่ผลดังกล่าวไม่สามารถยับยั้งได้ด้วย propranolol หรือ atropine และประการสุดท้าย KPD มีผลทำให้ลดอัตราการเต้นได้เองของกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนขวา แต่ PM มีผลทำให้เพิ่มอัตราการเต้นได้เองของกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนขวา ผลการทดลองทั้งหมดนี้ชี้ให้เห็นว่า KPD น่าจะมีสารออกฤทธิ์ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือดหลายชนิดผสมกันอยู่ และ PM เป็นสารออกฤทธิ์ตัวหนึ่งของ KPD ที่มีผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้สามารถแยกสารออกฤทธิ์ได้ 3 ชนิด คือ 5,7-dimethoxyflavone (DM), 5,7,4'-trimethylflavone (TM) และ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) แต่เนื่องจาก 5,7-dimethoxyflavone (DM), 5,7,4'-trimethylflavone (TM) มีผลทำให้ลดอัตราการเต้นได้เองของหัวใจห้องบนขวา และที่ขนาดของสารสูง ๆ มีผลทำให้หัวใจหยุดเต้น ประกอบกับความจำกัดของเวลาและงบประมาณ และ PM เป็นสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของ KPD สามารถแยกออกมาได้ในปริมาณมาก ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกสาร PM มาศึกษาต่อในเชิงลึกเกี่ยวกับกลไกในการแสดงฤทธิ์ของสารต่อหลอดเลือด

จากผลการทดลองที่พบว่า PM มีผลทำให้หลอดเลือดที่หดตัวอยู่ก่อนแล้วด้วย phenylephrine คลายตัว และผลดังกล่าวสามารถยับยั้งได้ด้วย LNA ซึ่งเป็น nitric oxide synthase inhibitor หรือโดยการทำลายเนื้อเยื่อชั้น endothelium เป็นการชี้ให้เห็นว่า PM ออกฤทธิ์โดยตรงที่ผนังหลอดเลือด ทำให้หลอดเลือดคลายตัว และออกฤทธิ์ทางอ้อมผ่านทาง endothelium โดยกระตุ้นให้มีการหลั่ง nitric oxide มาเสริมการคลายตัวของผนังหลอดเลือดต่อ PM

PM ไม่น่าจะมีผลเป็น adenylate cyclase stimulator เนื่องจาก ODQ ซึ่งเป็น adenylate cyclase stimulator สามารถยับยั้งการคลายตัวของหลอดเลือดต่อ PM ได้เฉพาะในหลอดเลือดที่มี endothelium แต่เมื่อ endothelium ถูกทำลายหรือเมื่อมีการยับยั้งการสร้าง nitric oxide โดย LNA กลับพบว่า ODQ มีผลเสริมการคลายตัวของหลอดเลือดต่อ PM ส่วนการยับยั้งการคลายตัวของหลอดเลือดของ ODQ ใน

หลอดเลือดที่มี endothelium น่าจะเป็นผลมาจากการกระตุ้นให้มีการหลั่ง nitric oxide จาก endothelium cells โดย PM การที่พบว่า ODQ มีผลเสริมการคลายตัวของหลอดเลือดต่อ PM เป็นเรื่องที่น่าสนใจ และมีกลไกเป็นอย่างไรจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

PM ไม่มีฤทธิ์เป็น ATP sensitive K^+ channel opener หรือ Ca^{2+} sensitive K^+ channel opener เนื่องจาก glybenclamide ซึ่งเป็น ATP sensitive K^+ channel inhibitor หรือ TEA ซึ่งเป็น Ca^{2+} sensitive K^+ channel inhibitor ไม่สามารถยับยั้งการคลายตัวของหลอดเลือดต่อ PM ได้ นอกจากนี้ glybenclamide กลับมีฤทธิ์เสริมการคลายตัวของหลอดเลือดต่อ PM จากการที่พบว่า nifedipine ซึ่ง Ca^{2+} channel blocker สามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine ได้ระดับหนึ่ง แต่เมื่อให้ PM ร่วมด้วยกลับมีผลยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine มากยิ่งขึ้น เป็นการชี้ให้เห็นว่า PM อาจมีฤทธิ์ยับยั้งการนำเข้าของ Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์ในทำนองเดียวกับ nifedipine และอาจจะมีผลยับยั้งการหลั่งของ Ca^{2+} จาก sarcoplasmic reticulum และ/หรือออกฤทธิ์เป็น Rho-kinase inhibitor จึงทำให้มีผลยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine ได้เกือบ 100% เพื่อที่จะพิสูจน์สมมุติฐานที่ว่า PM มีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งของ Ca^{2+} จาก sarcoplasmic reticulum ได้ทำการทดลองโดยศึกษาผลของ PM ต่อการหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine ใน Ca^{2+} free Kreb's solution การหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine ในสภาวะเช่นนี้เกิดจากการหลั่งของ Ca^{2+} จาก intracellular store ซึ่งแหล่งเก็บหลักได้แก่ sarcoplasmic reticulum จากผลการทดลองที่แสดงไว้ในรูปที่ 18 พบว่า PM สามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine ได้เกือบ 100 % ในลักษณะคล้ายกับการหดตัวของหลอดเลือดใน normal Kreb's solution ที่มี nifedipine อยู่ด้วย เป็นการยืนยันว่า PM น่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งของ Ca^{2+} จาก sarcoplasmic reticulum เพื่อที่จะยืนยันว่า PM น่าจะออกฤทธิ์เป็น Rho-kinase inhibitor ได้ทำการทดลองเพิ่มเติมโดยศึกษาลักษณะการหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine และ KCl ทั้งก่อนและหลังจากที่ได้ incubate หลอดเลือดด้วย PM ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เปรียบเทียบกับการหดตัวของหลอดเลือดที่ได้ incubate ด้วย nifedipine หรือ Y 27632 ซึ่งเป็น Rho-kinase inhibitor ดังผลการทดลองที่แสดงไว้ในรูปที่ 17 พบว่า phasic contraction ของหลอดเลือดต่อ phenylephrine ที่มี PM อยู่ด้วยมีลักษณะคล้ายกับของหลอดเลือดที่มี nifedipine คือสารทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง slope ของ phasic contraction แต่มีผลยับยั้งความแรงของ tonic contraction ในขณะ Y27632 สามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดได้เกือบ 100 % และเมื่อเปรียบเทียบกับการหดตัวของหลอดเลือดต่อ KCl พบว่า nifedipine และ Y 27632 สามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดต่อ KCl ได้เกือบ 100 % ในขณะที่ PM ที่ความเข้มข้นสูงสุดสามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดได้ประมาณ 60% เท่านั้น จากผลการทดลองนี้เป็นการชี้แนะให้เห็นว่า PM ไม่น่าจะออกฤทธิ์เป็น Rho-kinase inhibitor แต่น่าจะออกฤทธิ์ส่วนหนึ่งยับยั้งการนำเข้า

ของ Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์และอีกส่วนหนึ่งยับยั้งการหลั่งของ Ca^{2+} จาก intracellular store เนื่อง phasic contraction ที่เกิดจากการกระตุ้นโดย phenylephrine เกิดจากการหลั่งของ Ca^{2+} จาก sarcoplasmic reticulum ส่วน phasic contraction ที่ชักนำโดย KCl เกิดจากการนำเข้าของ Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์

เพื่อเป็นการพิสูจน์ให้แน่ชัดว่า PM น่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการหลั่ง Ca^{2+} จาก sarcoplasmic reticulum ได้ทำการศึกษาในหลอดเลือดที่ sarcoplasmic reticulum ไม่มี หรือมีCa^{2+} เหลืออยู่น้อย ทำการทดลองโดย incubate หลอดเลือดด้วย thapsigargin ซึ่งเป็น Ca^{2+} pump inhibitor จำเพาะที่ sarcoplasmic reticulum นาน 40 นาทีเพื่อยับยั้งการนำ Ca^{2+} เข้าสู่ sarcoplasmic reticulum ส่งผลให้ sarcoplasmic reticulum มี Ca^{2+} ลดน้อยลง หรือแทบจะไม่มีเลย แล้วศึกษาการหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine ในหลอดเลือดที่มีเฉพาะ thapsigargin และหลอดเลือดที่มีทั้ง thapsigargin และ Y 27632, SKF 96365 หรือ PM จากผลการทดลองที่ศึกษาใน normal Kreb's solution ซึ่งการหดตัวของหลอดเลือดอาศัยการนำเข้าของ Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์ พบว่าทั้ง Y 27632, SKF 96365 และ PM สามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีเฉพาะ thapsigargin (รูปที่ 19 ซีกซ้าย) ซึ่งผลดังกล่าวเป็นการชี้แนะว่า PM อาจจะมีฤทธิ์คล้ายกับทั้ง Y27632, SKF 96365 และ nifedipine แต่เมื่อทำการทดลองเพิ่มเติมโดยการให้ nifedipine ร่วมกับ PM และ thapsigargin พบว่าการหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine ถูกยับยั้งมากขึ้น และเมื่อให้ SKF 96365 เพิ่มเข้าไปอีก การหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine ยิ่งถูกยับยั้งเพิ่มขึ้นอีก ซึ่งจากผลการทดลองนี้เป็นการแสดงให้เห็นว่า PM ไม่น่าจะแสดงฤทธิ์เป็น Ca^{2+} channel blocker หรือ store-operated Ca^{2+} channel inhibitor สำหรับการศึกษาใน Ca^{2+} free Kreb's solution ซึ่งการหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine ต้องอาศัย Ca^{2+} ที่หลั่งออกมาจาก intracellular store ซึ่งหลอดเลือดเหล่านี้ถูก incubate ไว้ด้วย thapsigargin ซึ่งเป็นหลอดเลือดที่ sarcoplasmic reticulum ไม่มี Ca^{2+} พบว่าทั้ง Y 27632 และ SKF 96356 สามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine ได้ 100 % ในขณะที่ PM ยังมีผลทำให้หลอดเลือดสามารถหดตัวต่อ phenylephrine ได้อีกเล็กน้อย ซึ่งผลดังกล่าวนี้เป็นการยืนยันว่า PM ไม่น่าจะออกฤทธิ์เป็น Rho-kinase inhibitor หรือ store-operated Ca^{2+} channel inhibitor แต่ PM น่าจะออกฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งของ Ca^{2+} จาก sarcoplasmic reticulum และอาจจะมีผลกระตุ้นการหลั่งของ Ca^{2+} จากแหล่งอื่นใน intracellular store ได้ด้วย ซึ่งจะเป็นที่ส่วนใดของเซลล์จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป