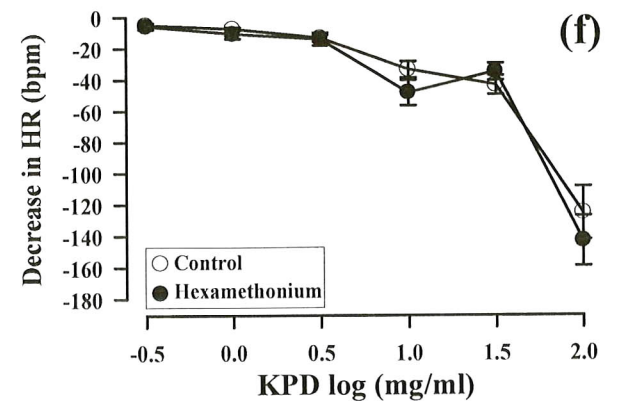
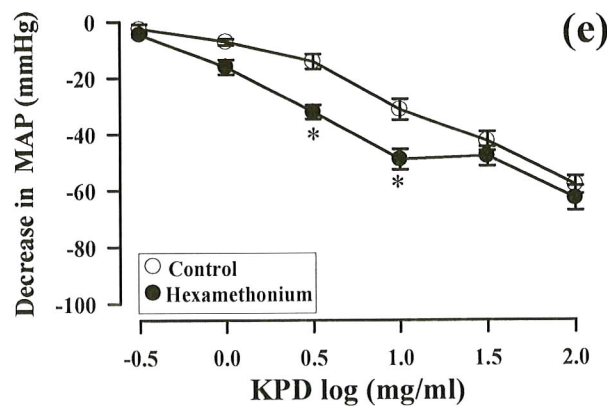
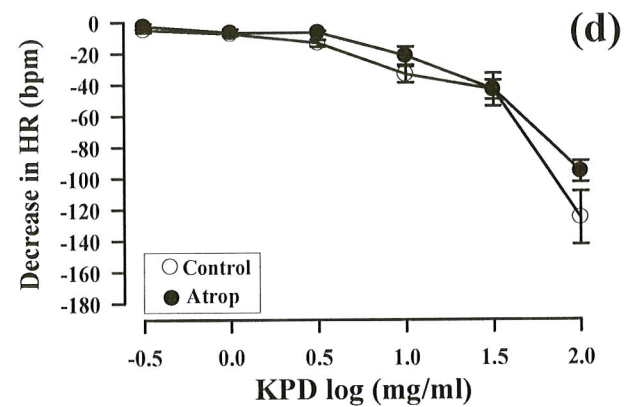
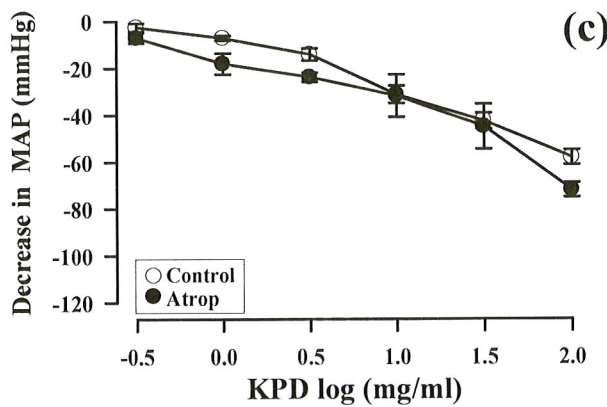
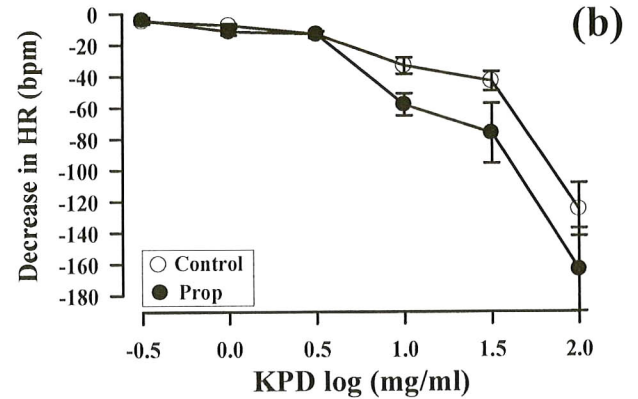
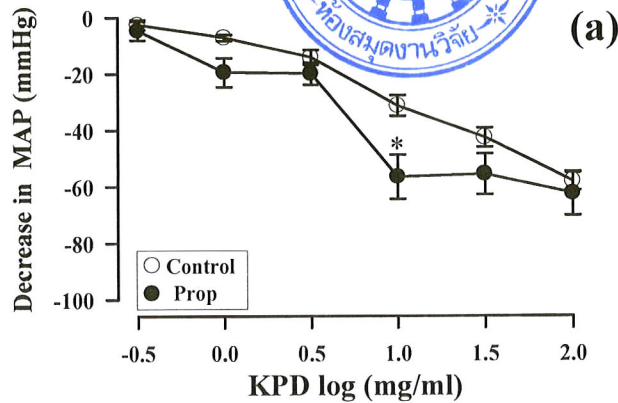


ผลการทดลอง

1. ผลและกลไกในการแสดงฤทธิ์ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือดของสาร KPD

1.1 ผลของสาร KPD ต่อความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจแบบ *in vivo*

ผลของ KPD ต่อความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจในหนูแร้ทสลบแสดงไว้ในรูปที่ 1 พบว่าการฉีด KPD เข้าทางหลอดเลือดดำมีผลทำให้ลดทั้งความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจ propranolol, atropine หรือ hexamethonium มีผลเสริมผลการลดความดันโลหิตโดย KPD ในบางขนาด แต่ทั้ง propranolol, atropine และ hexamethonium ไม่ผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อผลการลดอัตราการเต้นของหัวใจโดย KPD ในหนูแร้ทสลบ



รูปที่ 1 แสดงผลของ propranolol (Prop), atropine (Atrop) และ hexamethonium ต่อการลดความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจของสารสกัดจากเหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทน (KPD) ในหนูแร้ทสลบ แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M ของการทดลองในหนูแร้ท 6 ตัว. * มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$).

1.2 ผลของสาร KPD ต่อความแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนซ้าย และอัตราการเต้นได้เองของกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนขวา ที่ตัดแยกออกมาศึกษาใน organ bath แบบ *in vitro*

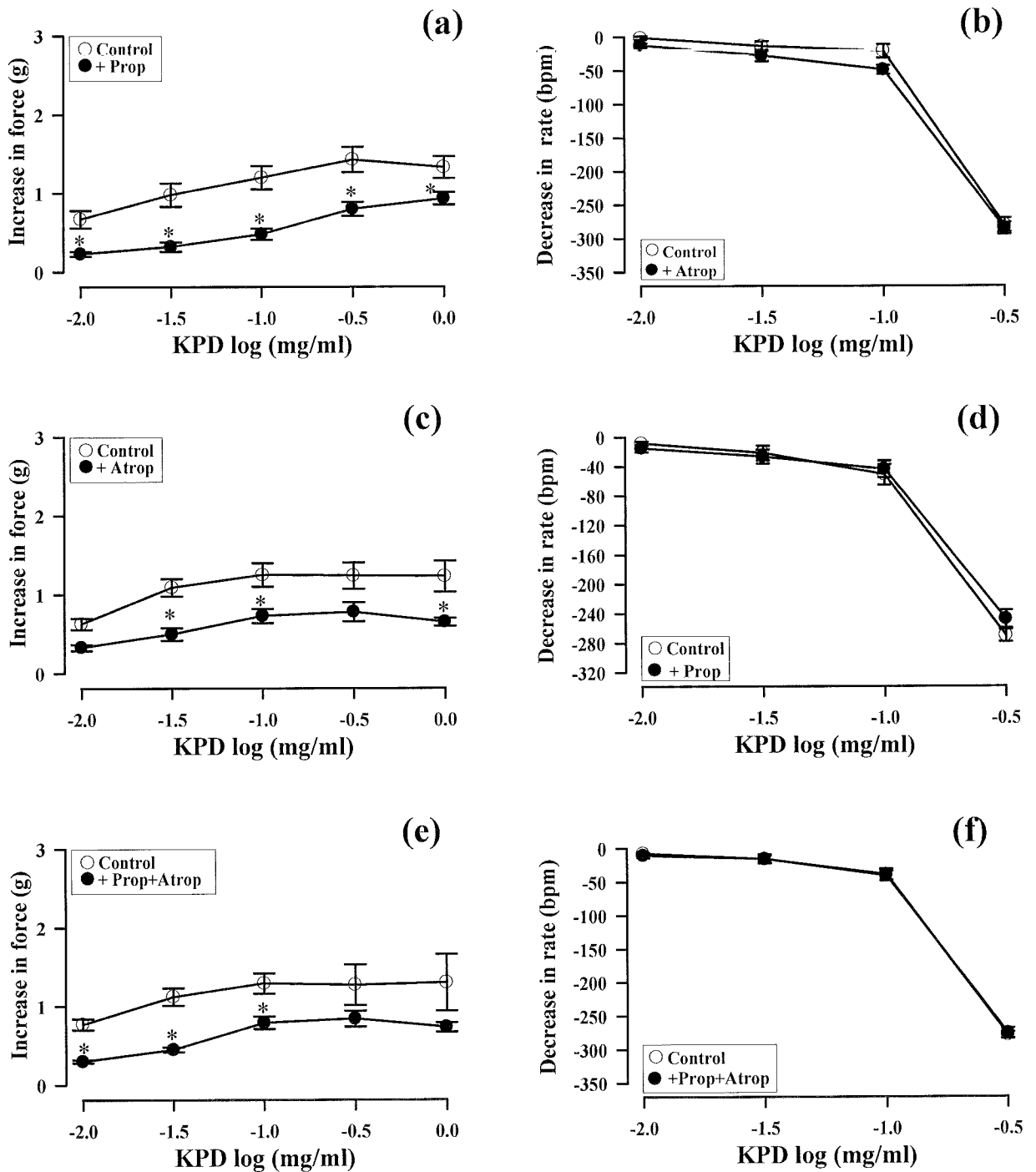
ผลของ KPD ต่อกล้ามเนื้อหัวใจที่ตัดแยกออกมาศึกษาใน organ bath แสดงไว้ในรูปที่ 2 (ซีกซ้าย) KPD มีผลทำให้เพิ่มความแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนซ้ายที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าแบบ concentration-dependent โดยความแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ KPD ผลดังกล่าวนี้สามารถยับยั้งได้ด้วย propranolol และ/ หรือ atropine ส่วนผลต่ออัตราการเต้นได้เองของกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนขวา (รูปที่ 2b, d และ f) พบว่า KPD มีผลทำให้ลดอัตราการเต้นได้เองของกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนขวาแบบ concentration-dependent แต่ผลดังกล่าวนี้ไม่สามารถยับยั้งได้ด้วย propranolol และ/ หรือ atropine

1.3 ผลของสาร KPD ต่อการคลายตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ที่ตัดแยกออกมาศึกษาใน organ bath แบบ *in vitro*

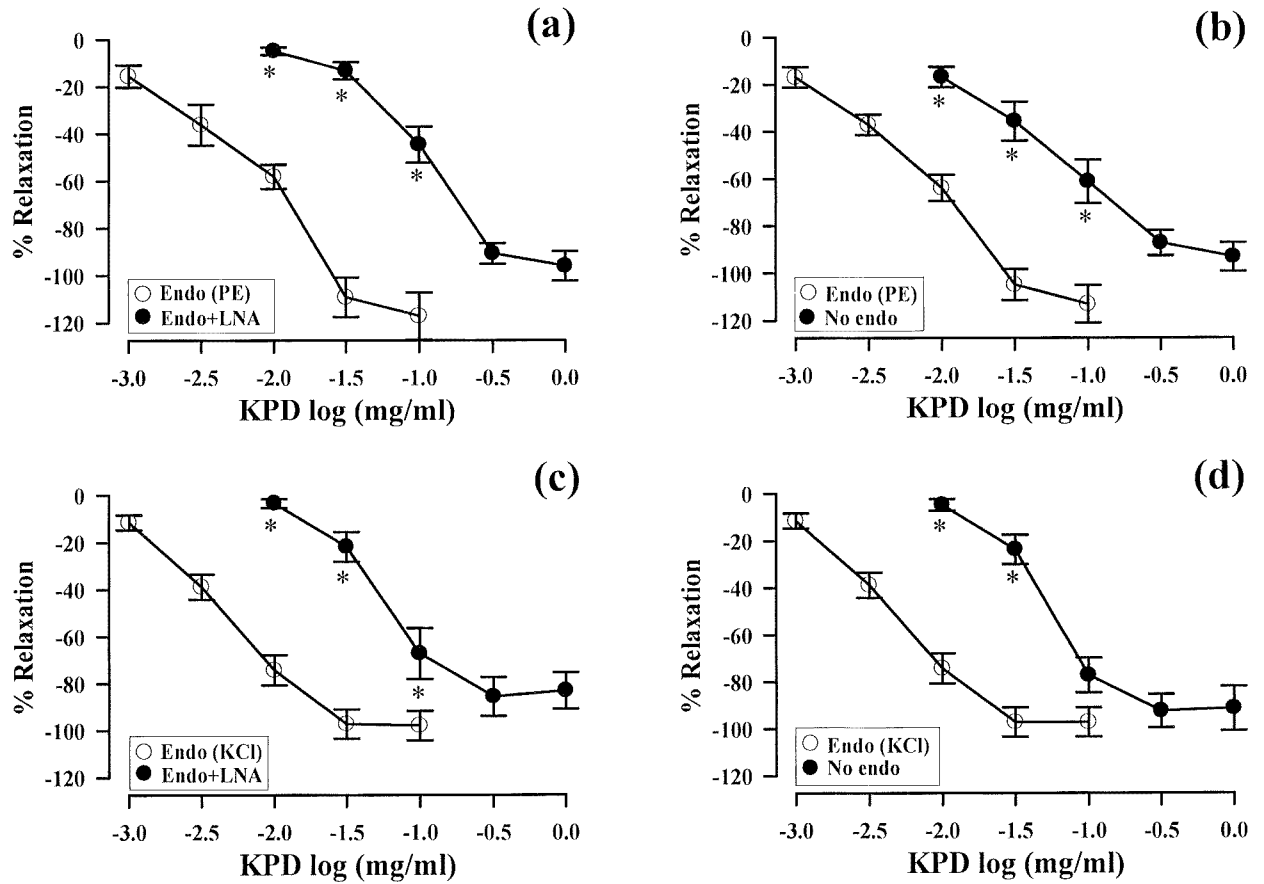
ผลของ KPD ต่อหลอดเลือดที่ตัดแยกออกมาศึกษาใน organ bath แสดงไว้ในรูปที่ 3-11 พบว่า KPD มีผลทำให้หลอดเลือด thoracic aorta เกิดการคลายตัวไม่ว่าหลอดเลือดดังกล่าวถูกทำให้มีการหดตัวอยู่ก่อนแล้วด้วย phenylephrine หรือ KCl การยับยั้งการสร้าง nitric oxide ด้วย N-nitro-L-arginine (LNA) หรือการทำลายเนื้อเยื่อชั้น endothelium มีผลทำให้ concentration-response curve (C-R curve) ของ KPD เคลื่อนไปทางขวาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 3)

ในหลอดเลือดที่มี functional endothelium สมบูรณ์ ODQ มีผลยับยั้งการคลายตัวของหลอดเลือดที่ให้หดตัวอยู่ก่อนแล้วด้วย phenylephrine ต่อ KPD โดยมีผลทำให้ (C-R curve) ของ KPD เคลื่อนไปทางขวาประมาณ 10 เท่า (รูปที่ 4a) แต่ผลการยับยั้งดังกล่าวโดย ODQ จะไม่พบในหลอดเลือดที่ถูกยับยั้งการสร้าง nitric oxide โดย LNA (รูปที่ 4b) สำหรับหลอดเลือดที่เนื้อเยื่อชั้น endothelium ถูกทำลาย พบว่า ODQ กลับมีผลเสริมการคลายตัวของหลอดเลือดต่อ KPD เล็กน้อย (รูปที่ 4c)

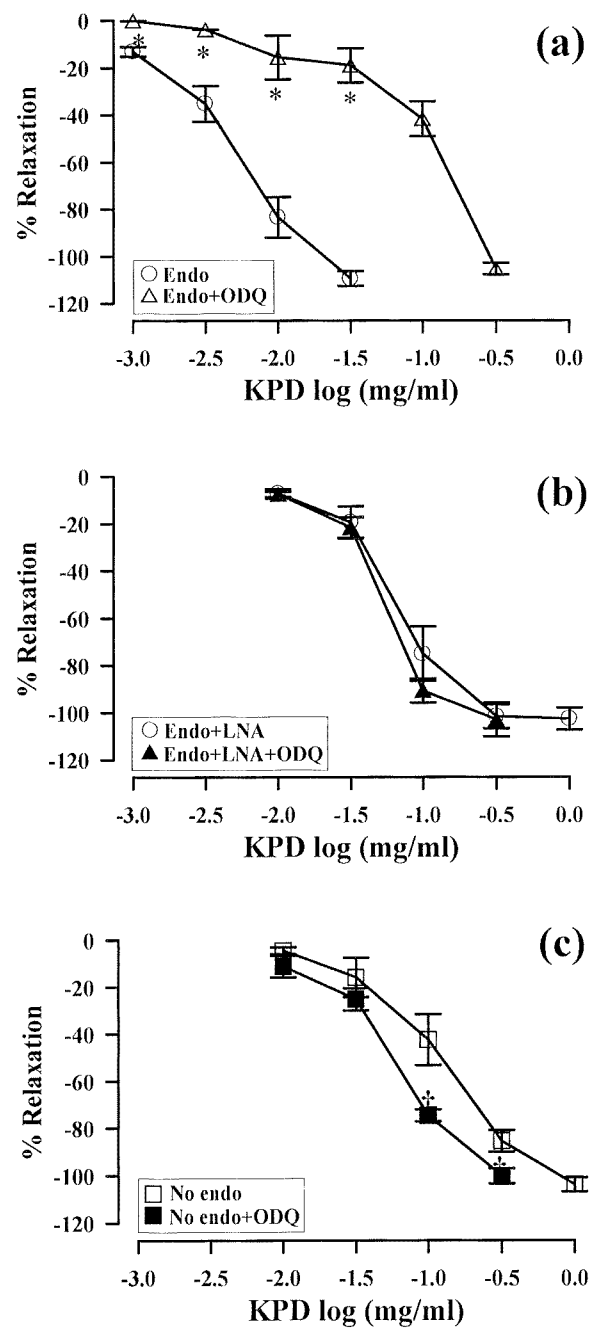
TEA ไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการตอบสนองโดยการคลายตัวของหลอดเลือดที่ให้หดตัวอยู่ก่อนแล้วด้วย phenylephrine ต่อ KPD แต่อย่างใด (รูปที่ 5 ซีกขวา) ในขณะที่ glybenclamide มีผลเสริมการคลายตัวของหลอดเลือดต่อ KPD ในหลอดเลือดที่ยังคงมี functional endothelium สมบูรณ์ (รูปที่ 5a) แต่ผลดังกล่าวไม่พบในเนื้อเยื่อชั้น endothelium ถูกทำลาย หรือยับยั้งการสร้าง nitric oxide โดย LNA (รูปที่ 5c และ c)



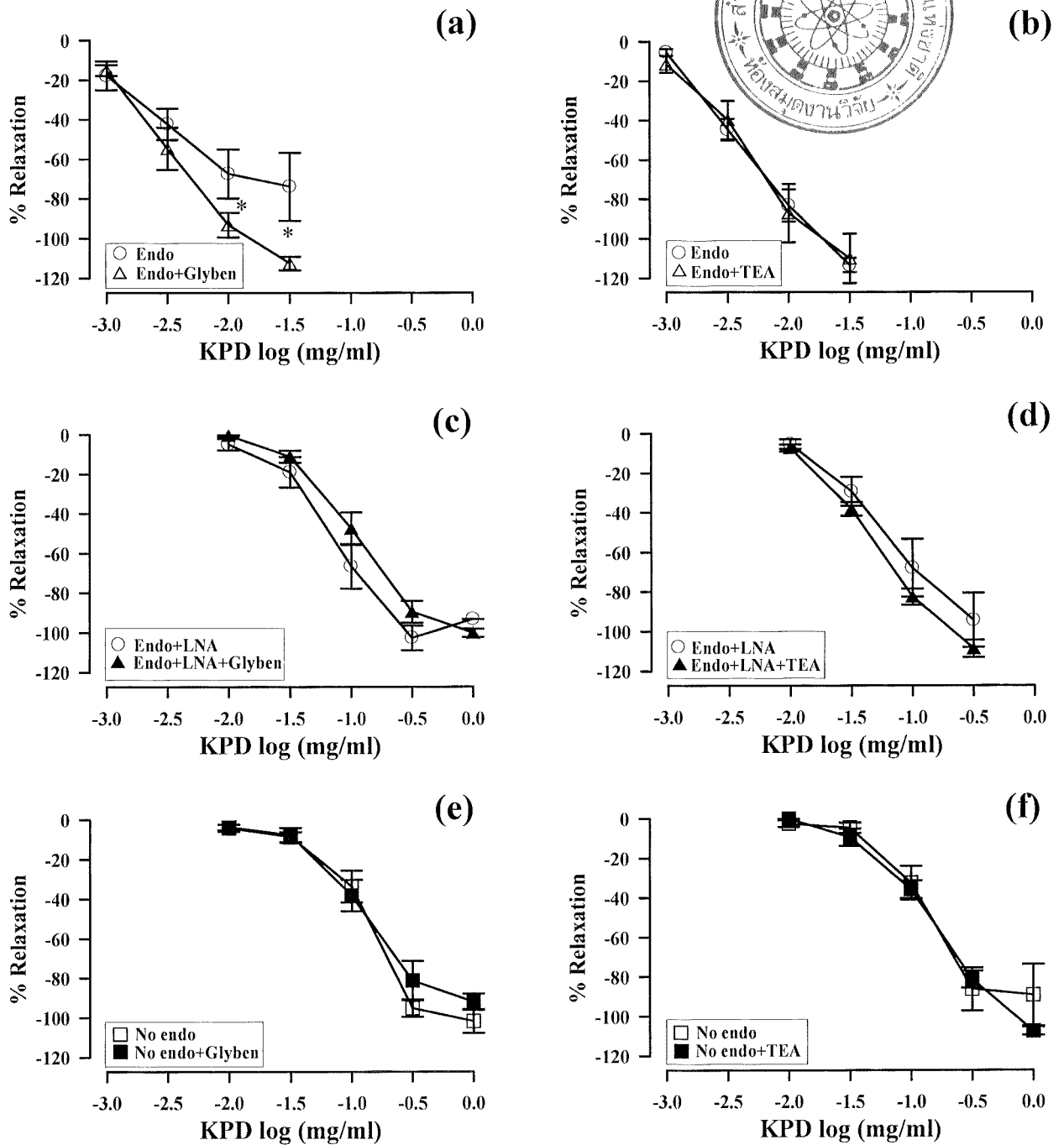
รูปที่ 2 แสดงผลของ propranolol (Prop) และ/ หรือ atropine (Atrop) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนซ้ายที่กระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (ซีกซ้าย) และอัตราการหดตัวได้เองของกล้ามเนื้อห้องบนขวา (ซีกขวา) ของหนูแร้ที่ตัดแยกออกมาศึกษาออกตัวต่อสารสกัดจากเหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทน (KPD) แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M ของการทดลองจากหนูแร้ 6 ตัว * มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$).



รูปที่ 3 แสดงผลของ N-nitro-L-arginine (LNA) และ endothelium (no endo) ต่อการคลายตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ที่ให้หดตัวอยู่ก่อนแล้วด้วย phenylephrine (PE, a,b) หรือ KCl (c, d) ต่อสารสกัดจากเหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทน (KPD) แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M ของการทดลองจากหนูแร้ 6 ตัว. * มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม (control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$).



รูปที่ 4 แสดงผลของ ODQ, N-nitro-L-arginine (LNA) และ endothelium (no endo) ต่อการคลายตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ที่ให้หดตัวอยู่ก่อนแล้วด้วย phenylephrine (PE) ต่อสารสกัดจากเหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทน (KPD) แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M ของการทดลองจากหนูแร้ 6 ตัว. * มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม (control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$). † มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$).



รูปที่ 5 แสดงผลของ N-nitro-L-arginine (LNA), endothelium (no endo) และ glybenclamide (Glyben) หรือ TEA ต่อการคลายตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ที่ให้หดตัวอยู่ก่อนแล้วด้วย phenylephrine (PE) ต่อสารสกัดจากเหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทน (KPD) แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M ของ 6 การทดลอง. * มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม (control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$).

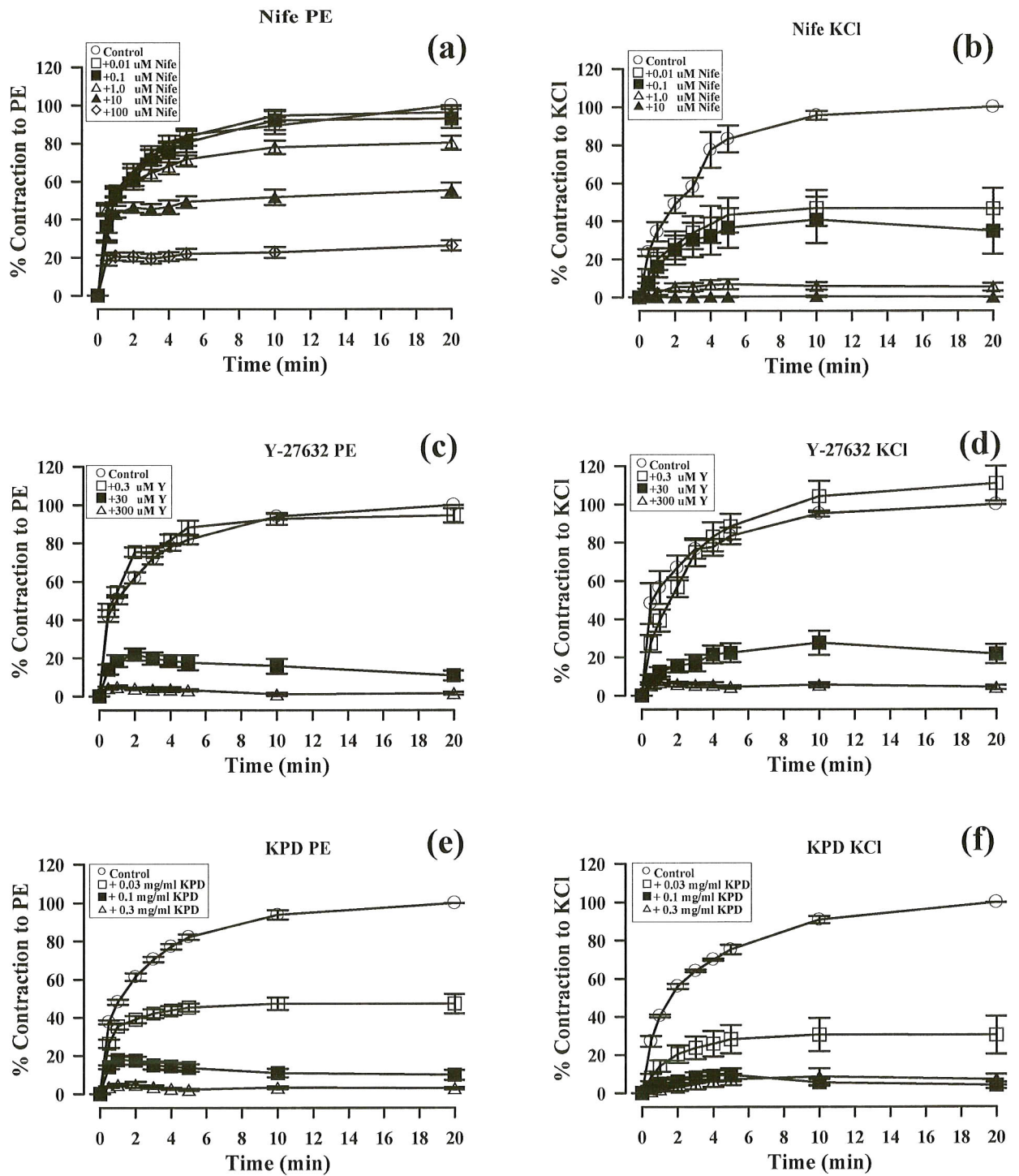
ผลของ KPD ต่อการแสดงฤทธิ์เป็น Rho-kinase inhibitor แสดงไว้ในรูปที่ 6 พบว่า nifedipine ซึ่งเป็น voltage Ca^{2+} channel blocker มีผลลดความแรงในการหดตัวแบบ tonic contraction แต่ไม่มีผลต่อ slope ของ phasic contraction ของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ phenylephrine แต่มีผลลดทั้งความแรงของ tonic contraction และ slope ของ phasic contraction ของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ KCl ในขณะที่ Y 27632 มีผลลดเฉพาะความแรงในการหดตัวแบบ tonic contraction ไม่มีผลต่อ slope ของ phasic contraction ไม่ว่าจะให้หลอดเลือด thoracic aorta หดตัวด้วย phenylephrine หรือ KCl (รูปที่ 6c และ d) ส่วนผลของ KPD แสดงไว้ในรูปที่ 6 e และ f พบว่า KPD แสดงฤทธิ์คล้ายกับ Y 27632 ซึ่งเป็น Rho-kinase inhibitor คือไม่มีผลต่อ slope ของ phasic contraction แต่มีผลยับยั้งความแรงในการหดตัวแบบ phasic contraction ของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ phenylephrine และ KCl

การศึกษาผลของ KPD ต่อการแสดงฤทธิ์เป็น voltage Ca^{2+} channel blocker แสดงไว้ในรูปที่ 7 พบว่า nifedipine และ Ca^{2+} free Kreb's solution มีผลยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ phenylephrine และเมื่อให้ KPD ร่วมด้วย การยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือด thoracic aorta เพิ่มมากยิ่งขึ้น (รูปที่ 7)

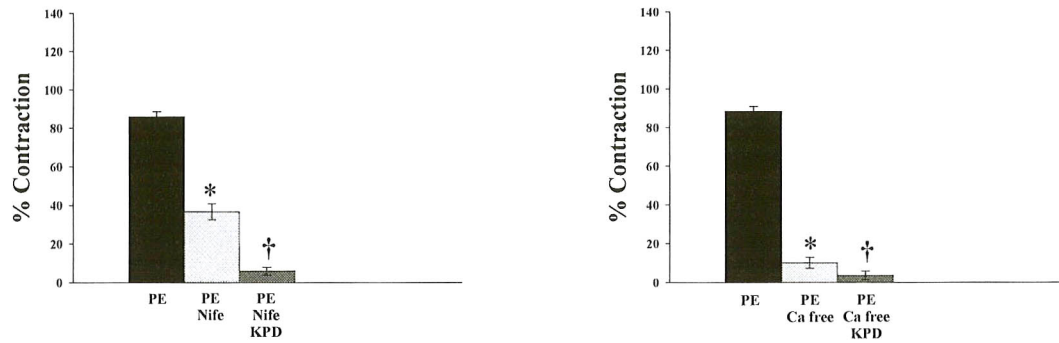
ศึกษาผลของ KPD ต่อการแสดงฤทธิ์เป็น store-operated Ca^{2+} channel blocker ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 8 พบว่า thapsigargin ซึ่งเป็น SERCA pump inhibitor ทำหน้าที่ยับยั้งการนำ Ca^{2+} เข้าไปเก็บไว้ใน sarcoplasmic reticulum ผลดังกล่าวทำให้หลอดเลือด thoracic aorta หดตัว และเมื่อให้ SKF 96365 ซึ่งเป็น store-operated Ca^{2+} channel blocker ทำให้หลอดเลือดหดตัวลดน้อยลง ส่วน Y-27632 ซึ่งเป็น Rho-kinase inhibitor และ KPD สามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดโดย thapsigargin ได้ทั้งหมด (100%) สำหรับการศึกษาใน Ca^{2+} free Kreb's solution ได้แสดงไว้ในรูปที่ 9 ใน Ca^{2+} free Kreb's solution การ incubate หลอดเลือดด้วย thapsigargin มีผลทำให้หลอดเลือด thoracic aorta หดตัวได้เล็กน้อย หลังจากที่ยืด Y 27632, SKF 96365 หรือ KPD ทำให้การหดตัวของหลอดเลือดต่อ thapsigargin ถูกยับยั้งได้ 100 % และเมื่อหยด CaCl_2 ลงไป พบว่า Y 27632 และ SKF 96365 มีผลทำให้หลอดเลือดหดตัวได้ประมาณ 50 % เมื่อเปรียบเทียบกับ การหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine (PE) แต่ในกรณีของ KPD มีผลทำให้หลอดเลือด thoracic aorta หดตัวได้เพียงเล็กน้อย (ประมาณ 10% ของ PE)

ศึกษาผลของสารสกัดจากกระชายดำ KPD ต่อ Ca^{2+} mobilization ที่ sarcoplasmic reticulum ทำการศึกษาใน normal Kreb's solution ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 10 พบว่าการ incubate หลอดเลือด thoracic aorta ด้วย thapsigargin เพื่อยับยั้งการนำ Ca^{2+} เข้าไปเก็บไว้ใน sarcoplasmic reticulum ก่อน แล้วจึง incubate หลอดเลือดต่อไปด้วย Y 27632, SKF 96365 หรือ KPD ก่อนที่จะศึกษาผลการหดตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ phenylephrine พบว่าทั้ง Y 27632 , SKF 96365 และ KPD มี

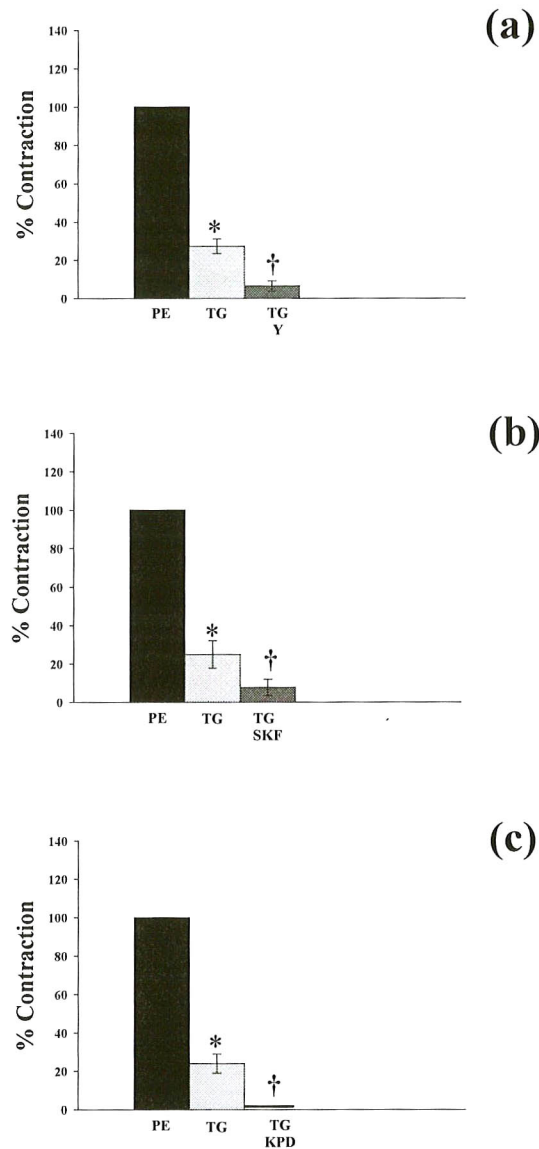
ผลยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ phenylephrine โดยที่ KPD สามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ phenylephrine ได้เกือบทั้งหมด สำหรับการศึกษาใน Ca^{2+} free Kreb's solution ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 11 พบว่า ทั้ง Y 27632 , SKF 96365 และ KPD มีผลยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ phenylephrine ได้เกือบ 100 %



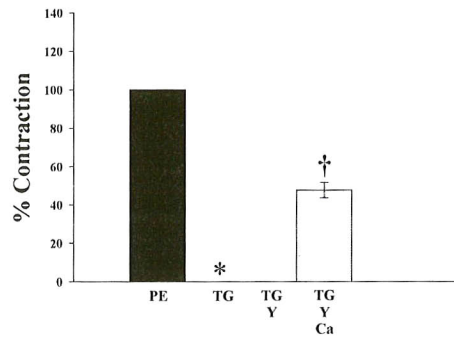
รูปที่ 6 แสดงผลของ nifedipine, Y-27632 หรือ KPD ต่อการหดตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ phenylephrine (ซีกขาว) หรือ KCl (80 mM, ซีกซ่าย) แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M ของการทดลองจากหนูแร้ 6 ตัว (n=6).



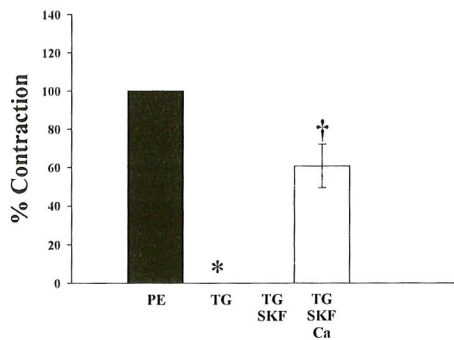
รูปที่ 7 แสดงผลของ nifedipine, Ca²⁺ free Kreb's solution และ/หรือ สารสกัดจากเหง้ากระชายดำ ด้วยไดคลอโรมีเทน (KPD) ต่อการหดตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ phenylephrine แต่ละจุด แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M ของการทดลองจากหนูแร้ 6 ตัว * มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$). † มีค่าต่ำกว่ากลุ่ม nifedipine หรือ กลุ่ม Ca²⁺ free อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$).



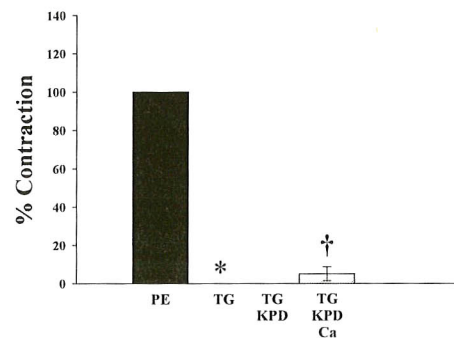
รูปที่ 8 ผลของ Y27632 (a), SKF 96365 (b) หรือ สารสกัดจากกระชายดำ (KPD, c) ต่อการหดตัวของ หลอดเลือด thoracic aorta ที่หดตัวอยู่ก่อนแล้วด้วย thapsigargin (TG) ใน normal Kreb's solution แต่ ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M ของ 6 การทดลอง (n=6) * มีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่หดตัวด้วย phenylephrine (PE) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$). † มีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่หดตัวด้วย thapsigargin เพียงอย่างเดียว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$).



(a)

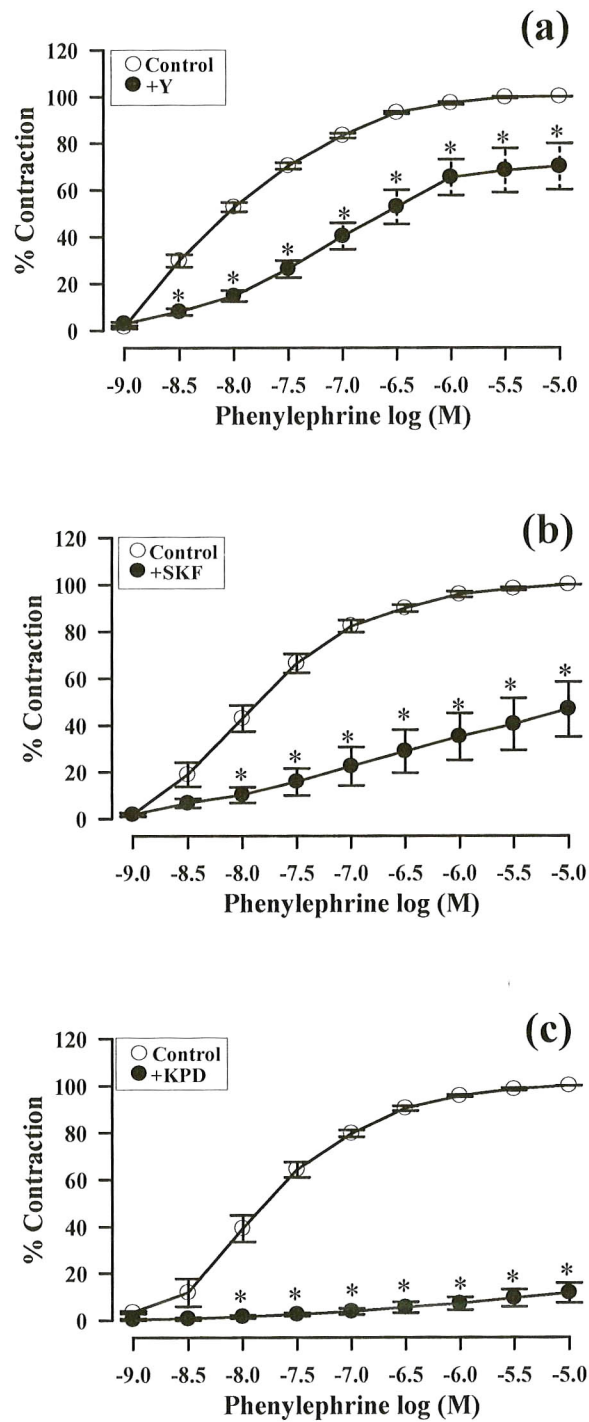


(b)

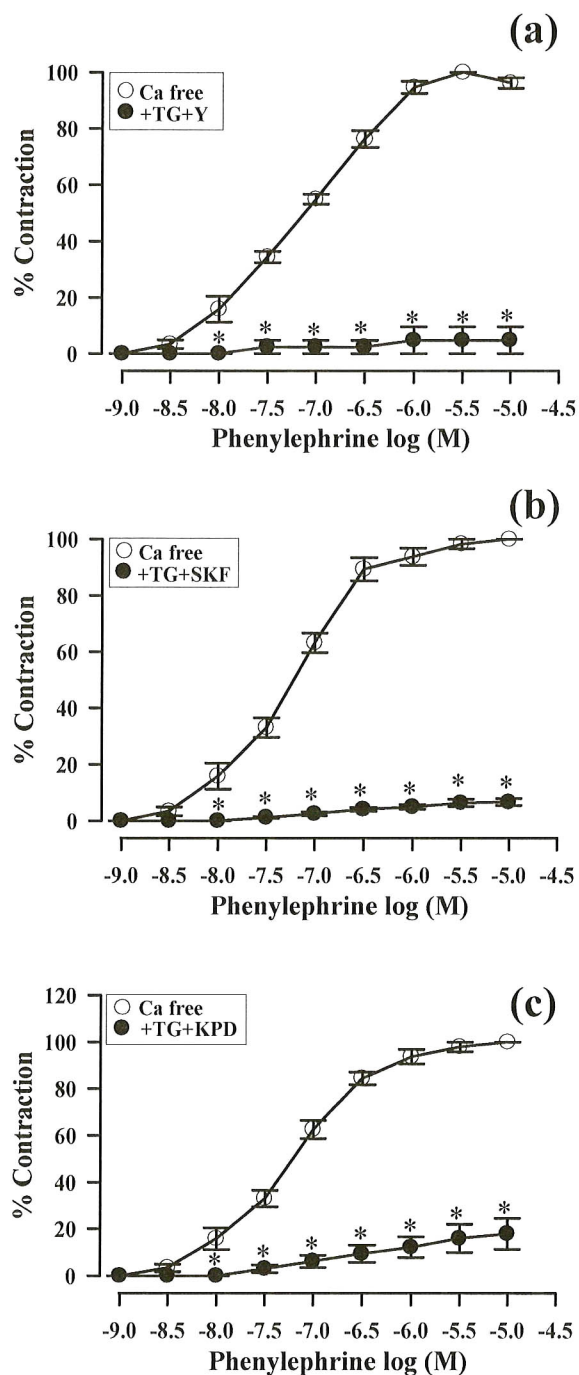


(c)

รูปที่ 9 แสดงการหดตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ CaCl_2 หลังจาก SERCA Pump ที่ sarcoplasmic reticulum ถูกยับยั้งด้วย thapsigargin (TG) และ incubate หลอดเลือดด้วย Y27632, SKF 96365 หรือ สารสกัดจากกระชายดำ (KPD) แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M ของ 6 การทดลอง (n=6) * มีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่หดตัวด้วย phenylephrine (PE) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$). † มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่หดตัวด้วย thapsigargin และ incubate ด้วย Y27632, SKF 96365 หรือ สารสกัดจากกระชายดำ (KPD) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$).



รูปที่ 10 การหดตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ phenylephrine ใน normal Krebs' solution ทั้งก่อน (control) และหลังจากที่ thoracic aorta ถูกยับยั้ง SRECA pump ที่ sarcoplasmic reticulum ด้วย thapsigargin (TG) และ incubate หลอดเลือดด้วย Y-27632 (a), SKF 96365 (b) หรือ สารสกัดจากเหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทน (KPD) แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M ของการทดลองจากหนูแร้ 6 ตัว (n=6). * ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$).



รูปที่ 11 การหดตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ phenylephrine ใน Ca^{2+} free Krebs solution ทั้งก่อน (control) และหลังจากที่ thoracic aorta ถูกยับยั้ง SERCA pump ที่ sarcoplasmic reticulum ด้วย thapsigargin (TG) และ incubate หลอดเลือดด้วย Y-27632 (a), SKF 96365 (b) หรือ สารสกัดจากเหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทน (KPD, c) แต่จุดแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M ของการทดลองจากหนูแร้ 6 ตัว ($n=6$). * ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$).

2. ผลและกลไกในการแสดงฤทธิ์ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือดต่อสารบริสุทธิ์จาก KPD

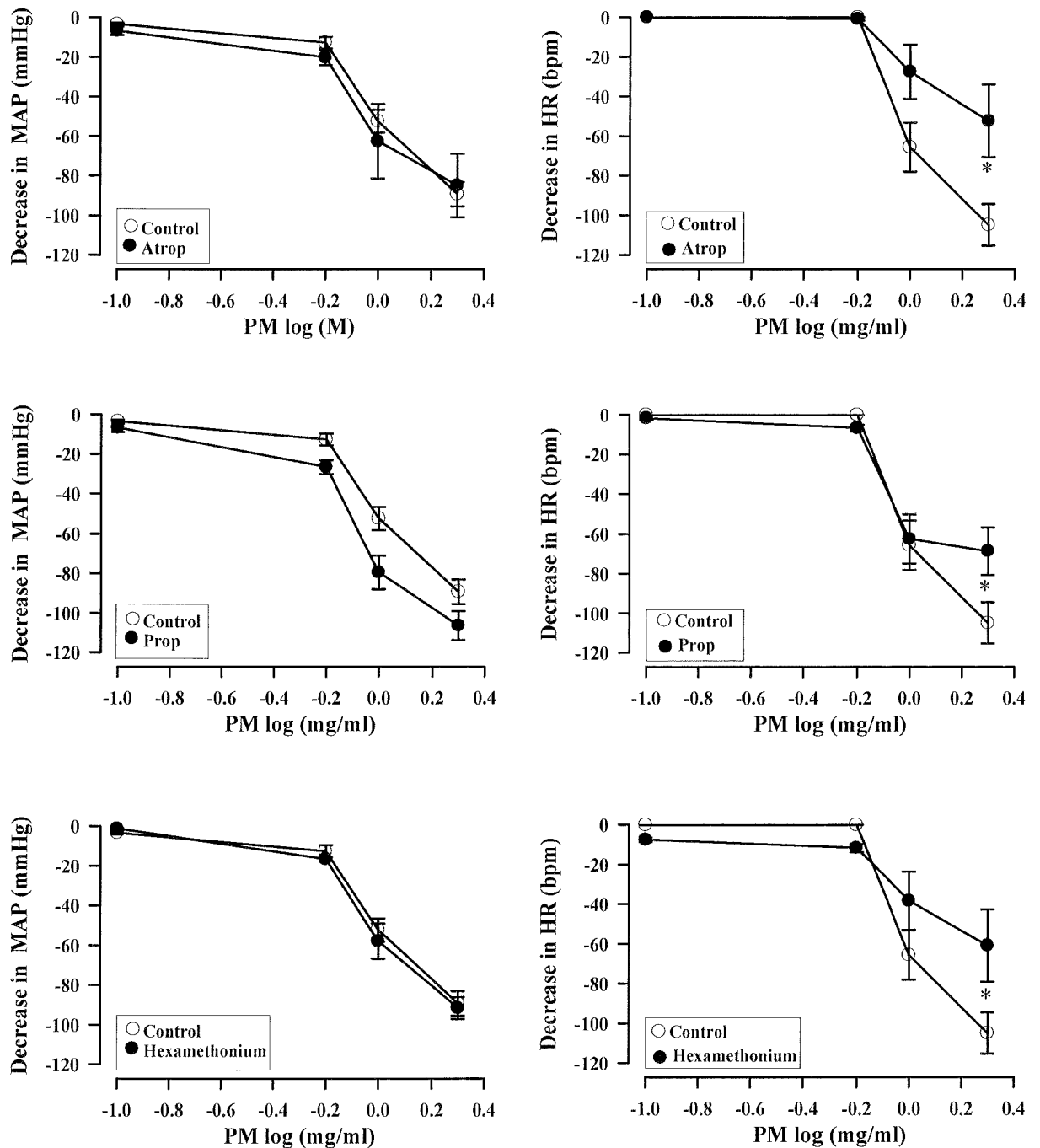
จากการแยกสารออกฤทธิ์ต่อการคลายตัวของหลอดเลือดจาก KPD ด้วยวิธี column chromatography แบบต่าง ๆ กัน สามารถแยกสารออกฤทธิ์ดังกล่าวได้ 3 ชนิด ได้แก่ 5,7-dimethoxyflavone (DM, chrysin dimethyl ether), 5,7,4'-trimethylflavone (TM, apigenin trimethyl ether) และ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) จากการศึกษาผลของสารทั้ง 3 ชนิดต่อการเต้นได้เองของกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนขวา พบว่า DM และ TM มีผลทำให้ลดอัตราการเต้นของหัวใจและที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ 3×10^{-4} M มีผลทำให้กล้ามเนื้อหัวใจห้องบนขวาหยุดเต้น ในขณะที่ PM มีผลทำให้เพิ่มอัตราการเต้นได้เองของกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนขวา ในงานวิจัยครั้งนี้จึงเลือกสาร PM มาใช้ศึกษาผล และกลไกในการแสดงของสาร PM ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด และได้แยกสาร PM ได้ประมาณ 3.0 กรัม เพื่อนำไปศึกษาผลและกลไกในการแสดงฤทธิ์ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือดในหนูแร้ท

2.1 ผลของสาร 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) ต่อความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจแบบ *in vivo*

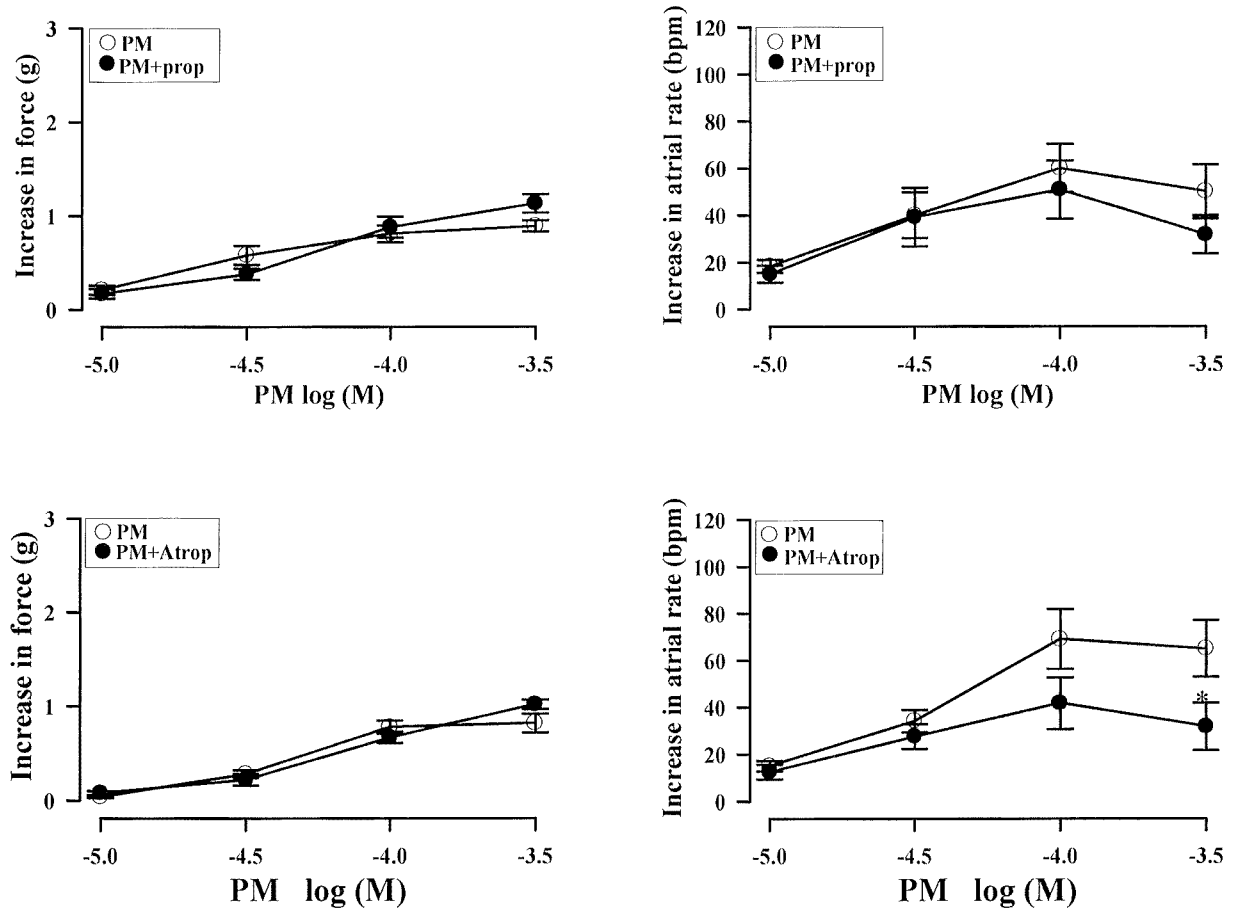
ผลของ PM ต่อความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจในหนูแร้ทสลบแสดงไว้ในรูปที่ 12 พบว่าการฉีด PM เข้าทางหลอดเลือดดำในหนูแร้ทสลบ มีผลทำให้ลดความดันโลหิต และลดอัตราการเต้นของหัวใจ ความแรงในการตอบสนองเพิ่มขึ้นตามขนาดของ PM ที่เพิ่มขึ้น พบว่า atropine ซึ่งเป็น muscarinic receptor antagonist, propranolol ซึ่งเป็น non-specific β -adrenergic receptor antagonist หรือ hexamethonium ซึ่งเป็น ganglion blocking agent ไม่มีผลยับยั้งผลการลดความดันโลหิตของ PM แต่มีผลยับยั้งการลดอัตราการเต้นของหัวใจที่ PM ขนาดสูงสุด (2 mg/kg) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.2 ผลของสาร 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) ต่อความแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนซ้าย และอัตราการเต้นได้เองของกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนขวา ที่ตัดแยกออกมาศึกษาใน organ bath แบบ *in vitro*

ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 13 พบว่า PM มีผลทำให้เพิ่มความแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนซ้ายที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าแบบ concentration-dependent คือความแรงในการหดตัวเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ PM ที่เพิ่มขึ้น ทั้ง propranolol และ atropine ไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการตอบสนองในการเพิ่มความแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนซ้ายต่อ PM ส่วนผลต่ออัตราการเต้นได้เองของกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนขวาพบว่า propranolol ไม่มีผลยับยั้งการเพิ่มอัตราการเต้นได้เองของกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนขวาต่อ PM ในขณะที่ atropine สามารถยับยั้งการเพิ่มอัตราการเต้นได้เองของกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนขวาต่อ PM ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 12 แสดงผลของ propranolol (Prop), atropine (Atrop) และ hexamethonium ต่อการลดความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจของสาร 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) ในหนูแร้ท สลับแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M ของการทดลองในหนูแร้ท 6 ตัว. * มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม (control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$).



รูปที่ 13 แสดงผลของ propranolol (Prop) หรือ atropine (Atrop) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนซ้ายที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (ช็อกซ้าย) และอัตราการหดตัวได้เองของกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนขวา (ขวา) ของหนูแร้ที่ตัดแยกออกมาศึกษาออกตัวต่อ 5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M ของการทดลองจากหนูแร้ 6 ตัว * มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (PM) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$).

2.3 ผลของสาร 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) ต่อการคลายตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ที่ตัดแยกออกมาศึกษาใน organ bath แบบ *in vitro*

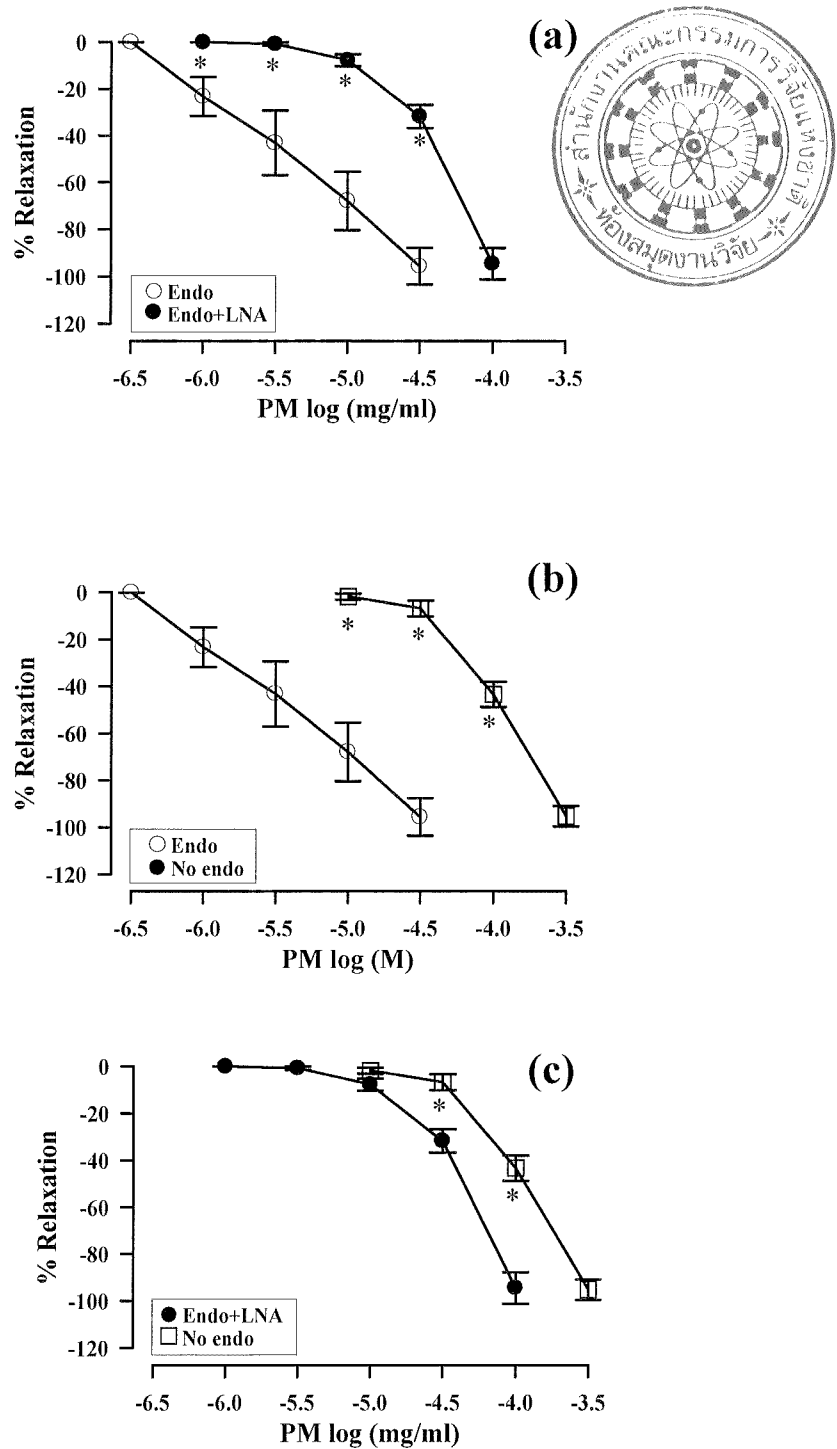
ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 14-19, PM มีผลทำให้หลอดเลือด thoracic aorta ที่ให้หดตัวอยู่ก่อนแล้วด้วย phenylephrine คลายตัวแบบ concentration-dependent ผลการคลายตัวของหลอดเลือดต่อ PM สามารถยับยั้งได้ด้วย N-nitro-L-arginine (LNA) ซึ่งเป็น nitric oxide synthase inhibitor โดยที่ LNA มีผลทำให้ concentration-response curve (C-R curve) ของ PM เคลื่อนไปทางขวา (รูปที่ 14a) ในทำนองเดียวกันการทำลายเนื้อเยื้อชั้น endothelium ของหลอดเลือดก็มีผลทำให้ C-R curve ของ PM เคลื่อนไปทางขวาเช่นกัน (รูปที่ 14b) และเคลื่อนไปได้มากกว่ากลุ่มที่ถูกยับยั้งการสร้าง nitric oxide ด้วย LNA (รูปที่ 14c)

ODQ ซึ่งเป็น soluble guanylate cyclase inhibitor มีผลยับยั้งการคลายตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ PM โดยมีผลทำให้ C-R curve ของ PM เคลื่อนไปทางขวาย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 15a) การยับยั้งการสร้าง nitric oxide ของหลอดเลือดด้วย LNA หรือ การทำลายเนื้อเยื้อชั้น endothelium (no endo) กลับพบว่า ODQ มีผลเสริมการคลายตัวของหลอดเลือดต่อ PM (รูปที่ 15b, c)

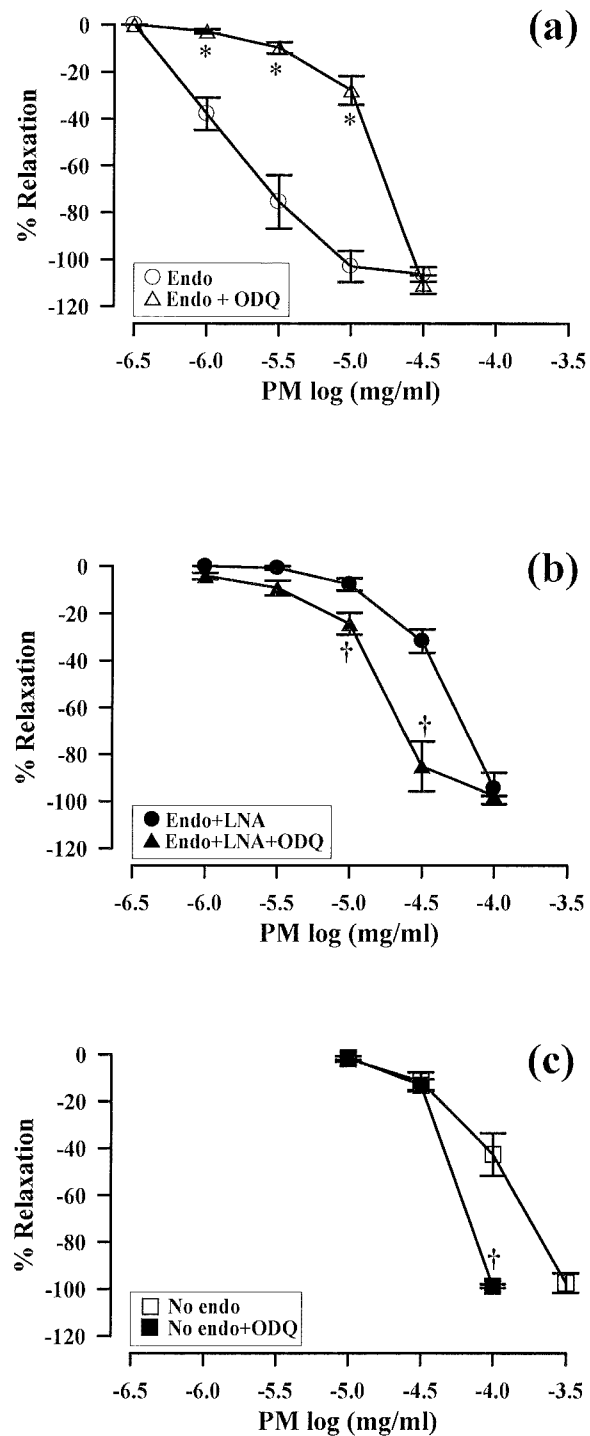
Glybenclamide ซึ่งเป็น ATP sensitive K^+ -channel inhibitor มีผลเสริมผลการคลายตัวของหลอดเลือดต่อ PM ไม่ว่าหลอดเลือดถูกยับยั้งการสร้าง nitric oxide synthase โดย LNA หรือยังคงมี endothelium อยู่หรือไม่ก็ตาม (รูปที่ 16 ซีกซ้าย)

TEA ซึ่งเป็น Ca^{2+} sensitive K^+ -channel inhibitor ไม่มีผลยับยั้งการคลายตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ PM ไม่ว่าหลอดเลือดจะถูกยับยั้งการสร้าง nitric oxide โดย LNA หรือ หลอดเลือดยังมี endothelium อยู่หรือไม่ (รูปที่ 16 ซีกขวา)

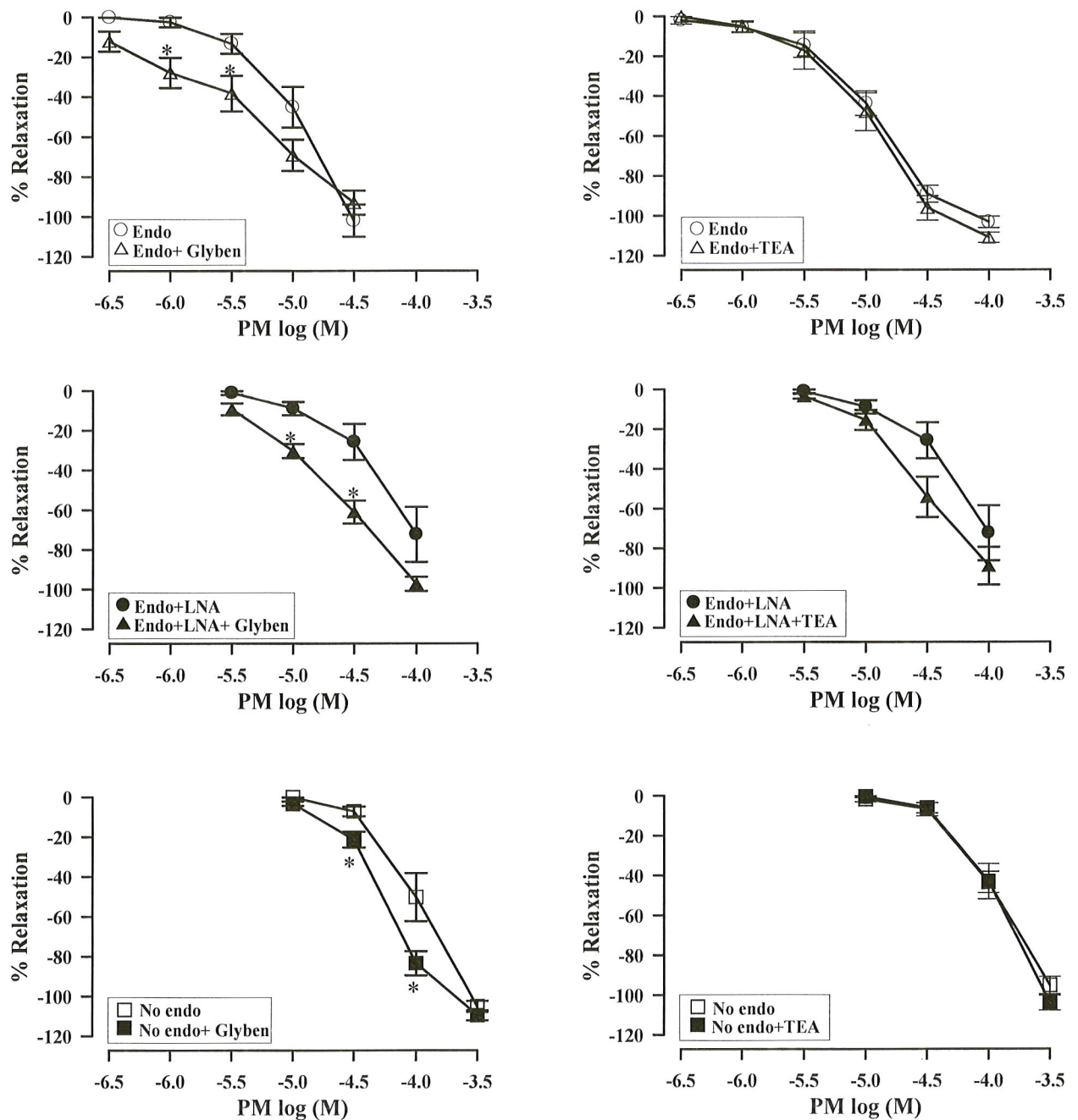
การศึกษาผลของ PM ต่อการแสดงฤทธิ์เป็น Rho-kinase inhibitor ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 17 พบว่า nifedipine ซึ่งเป็น voltage Ca^{2+} channel blocker มีผลลดความแรงในการหดตัวแบบ tonic contraction แต่ไม่มีผลต่อ slope ของ phasic contraction ของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ phenylephrine (รูปที่ 17a) แต่มีผลลดทั้งความแรงของ tonic contraction และ slope ของ phasic contraction ของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ KCl (รูปที่ 17b) ในขณะที่ Y 27632 มีผลลดเฉพาะความแรงในการหดตัวแบบ tonic contraction ไม่มีผลต่อ slope ของ phasic contraction ไม่ว่าจะให้หลอดเลือด thoracic aorta หดตัวด้วย phenylephrine หรือ KCl (รูปที่ 17c และ d) ผลของ PM แสดงไว้ในรูปที่ 17e และ 17f พบว่า PM แสดงฤทธิ์คล้ายกับ Y 27632 ซึ่งเป็น Rho-kinase inhibitor คือไม่มีผลต่อ slope ของ phasic contraction แต่มีผลยับยั้งความแรงในการหดตัวแบบ phasic contraction ของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ phenylephrine และ KCl



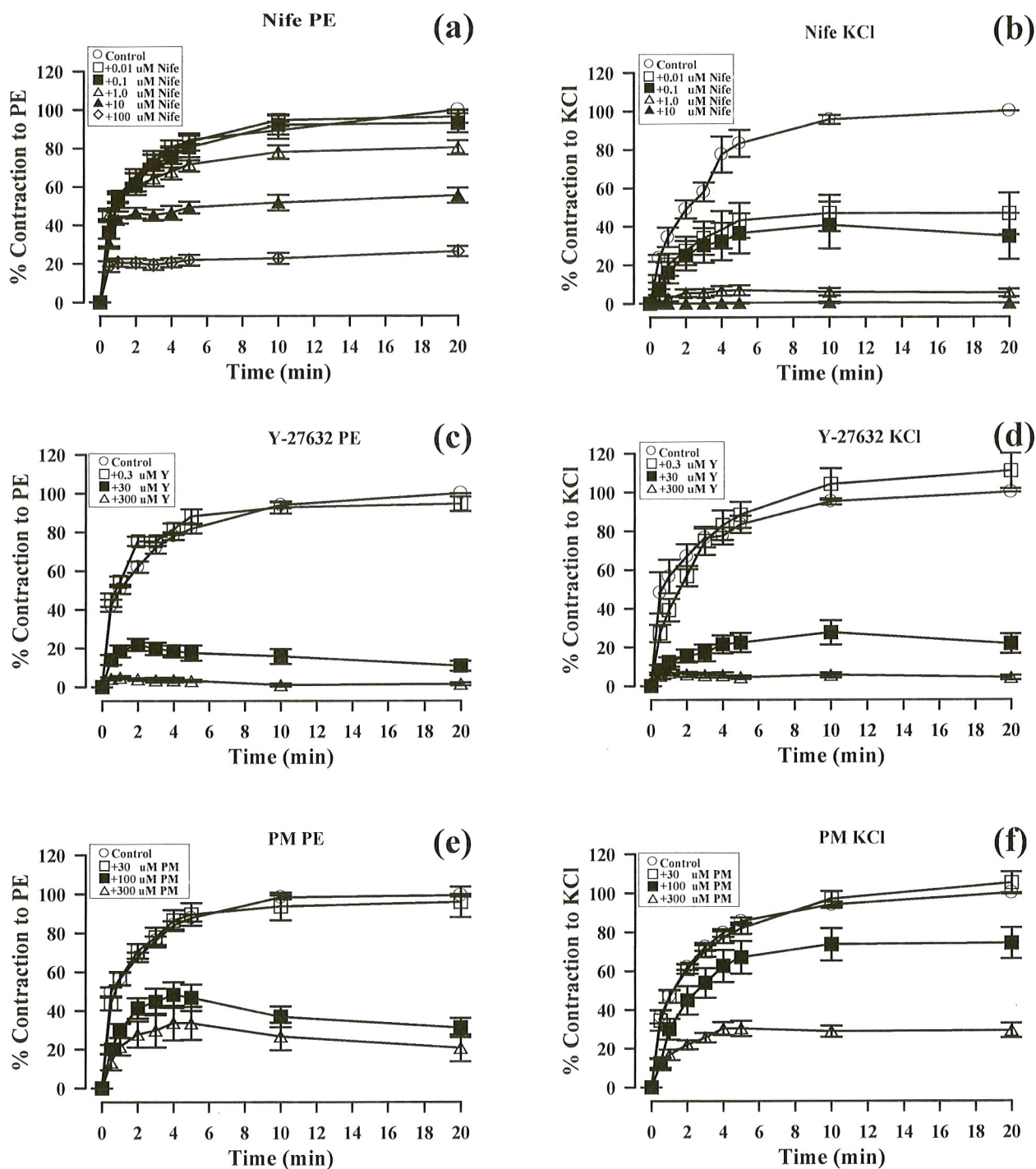
รูปที่ 14 แสดงผลของ N-nitro-L-arginine (LNA) หรือ endothelium (no endo) ต่อการคลายตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ที่ให้หดตัวอยู่ก่อนแล้วด้วย phenylephrine (PE) ต่อ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M ของการทดลองจากหนูแร้ 6 ตัว * มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$).



รูปที่ 15 แสดงผลของ N-nitro-L-arginine (LNA), endothelium (no endo) หรือ ODQ ต่อการคลายตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ที่ให้หดตัวอยู่ก่อนแล้วด้วย phenylephrine (PE) ต่อ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M ของการทดลองจากหนูแร้ 6 ตัว * มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม (control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) † มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



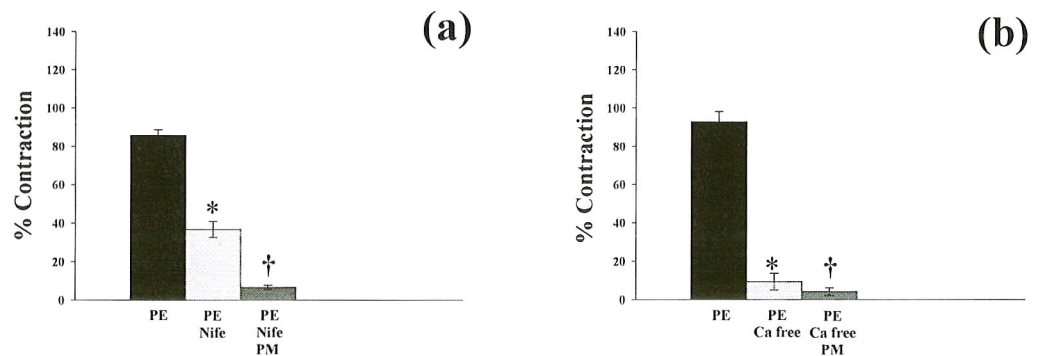
รูปที่ 16 แสดงผลของ N-nitro-L-arginine (LNA), glybenclamide (Glyben) หรือ TEA ต่อการคลายตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ที่ให้หดตัวอยู่ก่อนแล้วด้วย phenylephrine (PE) ต่อ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M ของการทดลองจากหนูแร้ 6 ตัว * มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$).



รูปที่ 17 แสดงผลของ nifedipine (.01- 100 μ M), Y-27632 (.3-3 μ M) หรือ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM, .03-3M) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ต่อการหดตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ phenylephrine (ซีกซ้าย) หรือ KCl (80 mM, ซีกขวา) แต่ละจุดแสดงค่า mean $\pm$ s.e. mean ของการทดลองจากหนูแร้ 6 ตัว (n=6).

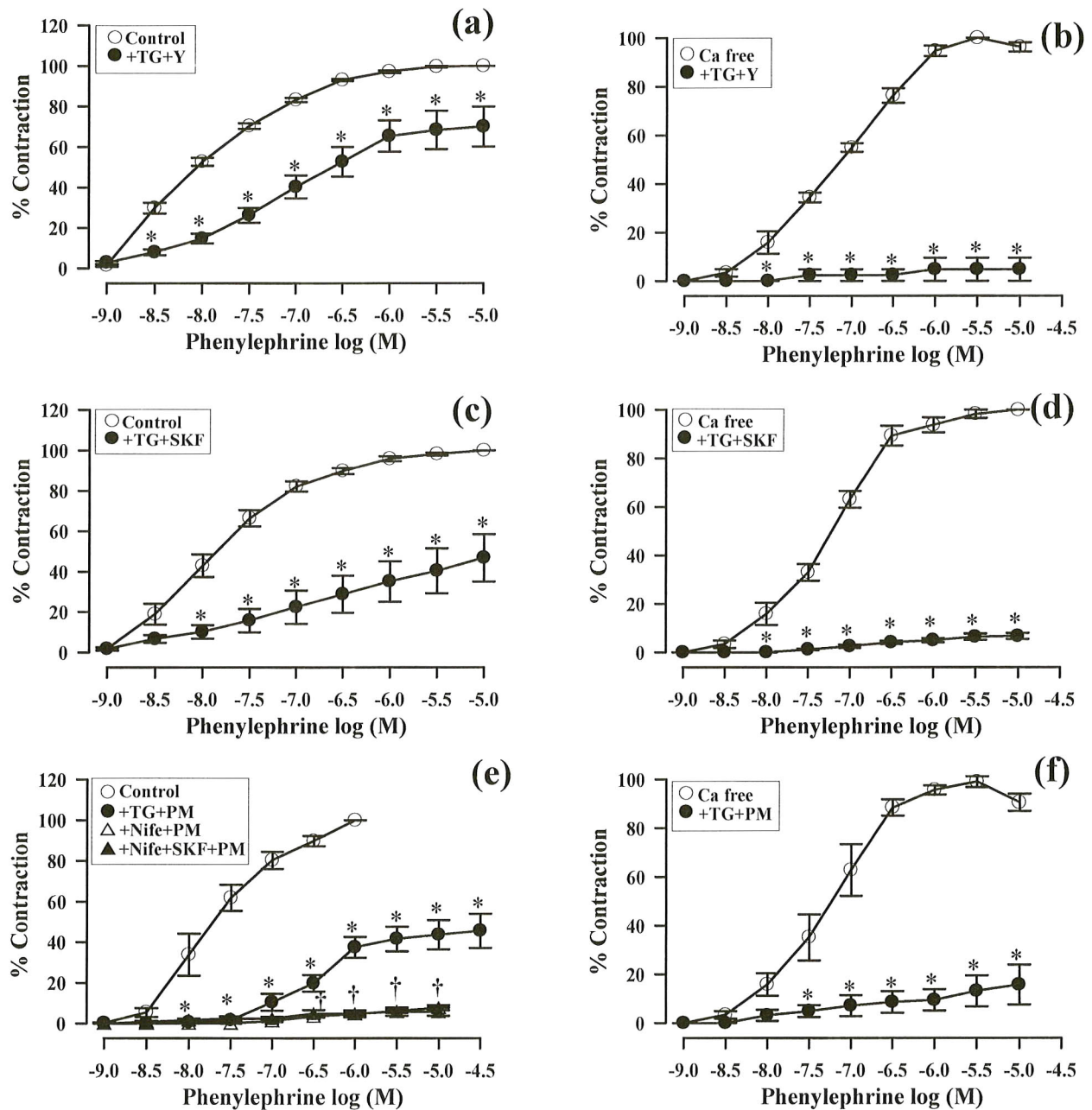
การศึกษาผลของ PM ต่อการแสดงฤทธิ์เป็น voltage Ca^{2+} channel blocker แสดงไว้ในรูปที่ 18 พบว่า nifedipine มีผลยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ phenylephrine และเมื่อให้ PM ร่วมกับ nifedipine ผลการยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine เพิ่มมากยิ่งขึ้น (รูปที่ 18a) ซึ่งความแรงในการยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดดังกล่าวนี้ใกล้เคียงกับผลการศึกษาใน Ca^{2+} free Kreb's solution (รูปที่ 18b)

การศึกษาผลของ PM ต่อการแสดงฤทธิ์เป็น store-operated Ca^{2+} channel blocker แสดงไว้ในรูปที่ 19 การศึกษาใน normal Kreb's solution (ซีกซ้าย) พบว่าหลังจากที่ incubate หลอดเลือดด้วย thapsigargin ซึ่งเป็น SERCA pump inhibitor ทำหน้าที่ยับยั้งการนำ Ca^{2+} เข้าไปเก็บไว้ใน sarcoplasmic reticulum หลอดเลือดยังคงสามารถตอบสนองโดยการหดตัวต่อ phenylephrine ได้ (control) แต่เมื่อให้ Y 27632, SKF 96365 หรือ PM ร่วมด้วย พบว่าทั้ง Y 27632, SKF 96365 หรือ PM มีผลทำให้การหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine ลดน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 19a, c และ e) สำหรับกลุ่มที่มี PM อยู่ด้วยเมื่อให้ nifedipine ร่วมด้วย พบว่าการหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine ลดลงไปอีก และเมื่อให้ SKF 96365 ร่วมลงไปอีก การหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine ยิ่งถูกยับยั้งมากขึ้น (รูปที่ 19e) ส่วนการศึกษาใน Ca^{2+} free Kreb's solution (รูปที่ 19 ซีกขวา) พบว่าทั้ง Y27632, SKF 96365 และ PM มีผลยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine ได้เกือบ 100 % (รูปที่ 19b, d และ f).



รูปที่ 18 แสดงผลของ nifedipine, Ca^{2+} free Kreb's solution และ/หรือ 3,5,7,3',4'-

pentamethoxyflavone (PM) ต่อการหดตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ phenylephrine แต่จะจุดแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M ของการทดลองจากหนูแร้ 6 ตัว * มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) † มีค่าต่ำกว่ากลุ่ม nifedipine หรือ กลุ่ม Ca^{2+} free อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$).



รูปที่ 19 การหาคัดตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ต่อ phenylephrine ใน normal Kreb's solution (ซีกซ้าย) หรือ Ca^{2+} free Kreb's solution (ซีกขวา) ทั้งก่อน (control) และหลังจากที่ thoracic aorta ถูกยับยั้ง SERCA pump ที่ sarcoplasmic reticulum ด้วย thapsigargin (TG) และ incubate หลอดเลือดด้วย Y-27632, SKF 96365 หรือ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M ของการทดลองจากหนูแร้ 6 ตัว (n=6). * ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$).
† มีค่าต่ำกว่ากลุ่ม TG+PM อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$).