2. แยกสารออกฤทธิ์ลดความดันโลหิต และลดอัตราการเต้นของหัวใจ จากเหง้ากระชายดำ

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาผลและกลไกในการแสดงฤทธิ์ของสารสกัดหยาบ และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเหง้ากระชายดำ ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือดในหนูแร็ท

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลสำเร็จที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบผลและกลไกในการแสดงฤทธิ์ของสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเหง้ากระชายดำ ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด
2. ทราบว่าสารออกฤทธิ์ลดความดันโลหิตและลดอัตราการเต้นของหัวใจในสารสกัดหยาบจากเหง้ากระชายดำประกอบด้วยสารกี่ชนิด
3. เป็นข้อมูลทางวิชาการที่สนับสนุนสรรพคุณบ่งชี้ของเหง้ากระชายดำ
4. ผลงานน่าจะตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติได้อย่างน้อย 1 เรื่อง

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข กระทรวงเกษตรและสหกรณ์การเกษตร

วัสดุและอุปกรณ์

วัสดุ

1. เหง้ากระชายดำสด อายุประมาณ 8-12 เดือน ซึ่งจะต้องมีเนื้อข้างในเป็นสีม่วงเข้ม หรือดำ ซื้อจากอำเภอภูเรือ จังหวัดเลย ประมาณ 30 กิโลกรัม ในจำนวนนี้ จะสุ่มตัวอย่างบางส่วนมาปลูกในกระถางเพื่อดูลักษณะของใบ ก้านใบ และดอก สำหรับใช้ในการจำแนกพันธุ์ไม้ ทำการศึกษาโดย ศ. พวงเพ็ญ ศิริรักษ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ตัวอย่างพืชที่ได้ทำแห้งเก็บไว้ที่ Herbareum ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (Vouchure No. : Chaweewan 1)

2. หนูแร็ทเพศเมีย ขนาดน้ำหนัก 220-280 กรัม ซื้อจากสถานสัตว์ทดลองภาคใต้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (ใบอนุญาตการใช้สัตว์ทดลอง คณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เลขที่ ศธ. 0521.11/031)

3. สารเคมี

-	Dichloromethane
-	Ethanol
-	Normal saline (0.9 % NaCl)
-	Atropine sulphate
-	Dimethylsulfoxide (DMSO)
-	Glybenclamide
-	N^G-nitro-L-arginine
-	Nifedipine
-	1H-(1,2,4)oxadiazolo (4,3-a)quinoxaline-1-one (ODQ)
-	Phenylephrine hydrochloride
-	Propranolol hydrochloride
-	Tetraethylammonium (TEA)
-	Y-27632 dihydrochloride
-	สารเคมีสำหรับเตรียม Kreb's solution
-	ไหมเย็บแผล
-	เข็มเย็บแผล
-	Pipet tips
-	Parafilm
-	ท่อ polyethylene และท่อ silicone ขนาดต่าง ๆ
-	วัสดุเครื่องแก้วต่าง ๆ สำหรับการศึกษาทางสรีรวิทยา

อุปกรณ์ สำหรับสกัดสารจากเหง้ากระชายดำ

-	บีคเกอร์ขนาดต่างๆ
-	ขวดรูปชมพู่ขนาดต่างๆ
-	กรวยแยกขนาด 1 ลิตร
-	หลอด capillary
-	Chromatographic tank
-	เครื่องเป่าผม
-	ขวดใส่สารขนาดต่าง ๆ
-	Aluminum foil
-	Parafilm
-	UV source
-	TLC aluminium sheets silica gel 60 F_{254} และ silica gel RP-18 F_{254}
-	เครื่องกลั่นแบบลดความดัน (Rotary evaporator)
-	เครื่องชั่งอย่างละเอียด
-	เครื่อง Lyophilizer
-	Analytical HPLC with UV detector

อุปกรณ์สำหรับศึกษาผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด

-	เครื่องชั่งอย่างละเอียด
-	กล้อง stereomicroscope
-	เครื่องมือผ่าตัดครบชุด พร้อมเข็ม หลอดฉีดยา และไหมเย็บแผล
-	ท่อ polyethylene ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 และ 0.7 มม.
-	เครื่องบันทึกกราฟ (polygraph) พร้อมอุปกรณ์
-	Organ bath พร้อมเครื่องควบคุมอุณหภูมิ
-	Carbogen gas
-	Automatic pipet และ Pipet tip ขนาดต่าง ๆ

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

การวิจัยแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ

1. การจัดหาและการสกัดสารอย่างหยาบจากเหง้ากระชายดำ
2. การศึกษาผลและกลไกในการแสดงฤทธิ์ของสารสกัดหยาบ และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเหง้ากระชายดำต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด
3. การศึกษาทางเคมีเพื่อแยกสารออกฤทธิ์ลดความดันโลหิตและลดอัตราการเต้นของหัวใจจากเหง้ากระชายดำ

1. วิธีการเก็บสมุนไพร และการจำแนกพันธุ์พืช

เหง้ากระชายดำสด อายุประมาณ 8-12 เดือน ซึ่งจะต้องมีเนื้อข้างในเป็นสีม่วงเข้ม หรือดำ ซื้อจากอำเภอกูเรือ จังหวัดเลย ประมาณ 100 กิโลกรัม ในจำนวนนี้ จะ sampling ตัวอย่างบางส่วนมาปลูกในกระถางเพื่อดูลักษณะของใบ ก้านใบ และดอก สำหรับใช้ในการจำแนกพันธุ์ไม้ ซึ่งจะทำโดย ศ. พวงเพ็ญ ศิริรักษ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ตัวอย่างพืชที่ได้จะทำแห้งเก็บไว้ที่ Herbareum ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. การสกัดสารอย่างหยาบจากเหง้ากระชายดำ

นำเหง้ากระชายดำมาล้างให้สะอาด ผึ่งไว้ในห้องปรับอากาศ 1 คืนเพื่อให้ผิวแห้งจากน้ำที่ล้าง ชั่งน้ำหนัก นำมาหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วบดด้วยครกไฟฟ้าจนละเอียด แล้วจึงนำไปสกัดด้วย 95 % ethanol ด้วยอัตราส่วน 1 :2 (V:V) นาน 3 คืน (สกัด 2 ครั้ง) กรองเอาส่วนที่เป็นของเหลวออกมากลั่นเพื่อกำจัดethanolออกด้วยเครื่องRotary evaporator ได้เป็นของเหลวข้นสีดำนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dry ได้สารเป็นผงสีดำเรียก ethanol extract กากที่เหลือ นำไปสกัดด้วย dichloromethane ด้วยวิธีการเดียวกับการสกัดด้วย ethanol แต่หลังจากกลั่นด้วยเครื่อง rotary evaporator เพื่อกำจัด dichloro-methane แล้ว ของเหลวที่ได้นำไปกำจัด dichloromethane ที่อาจหลงเหลืออยู่อีกด้วย vacuum pump นานประมาณ 24 ชั่วโมง ได้เป็นสารหนืดสีเหลืองเรียก *Kaempferia parviflora* dichloromethane extract (KPD)

3. การแยกสารออกฤทธิ์ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด จาก *Kaempferia parviflora* dichloromethane extract (KPD)

แยกสารด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ silica gel 100 เป็นตัวยึด และใช้ส่วนผสมของ CH_2Cl_2 : MeOH เป็นตัวชะ ทดสอบชนิดของสารในแต่ละ fraction ด้วย TLC-plate และทดสอบ

ฤทธิ์ต่อการคลายตัวของหลอดเลือดของสารแต่ละ subfraction เลือก subfraction ที่แสดงฤทธิ์มาแยกอีกครั้งด้วยวิธีการเดียวกัน โดยใช้ Silica gel 60 เป็นตัวยึดอยู่กับที่ และชะออกด้วย ส่วนผสมของ $CHCl_3$: MeOH เลือก subfraction ที่แสดงฤทธิ์คลายตัวของหลอดเลือดไปแยกต่ออีกครั้งด้วยวิธีการเดียวกัน แต่ใช้ silica gel RP-18 เป็นตัวยึดอยู่กับที่ และชะออกด้วย gradient concentration ของ MeOH : H_2O ตรวจสอบบริสุทธิ์ของสารด้วย analytical HPLC และทดสอบฤทธิ์ของสารที่แยกออกมาได้

พบว่าสารแสดงฤทธิ์คลายตัวต่อหลอดเลือดเป็นชนิดกันกับสารที่มีผลทำให้เกิดการคลายตัวของเนื้อเยื่อ human cavernosum ซึ่งได้แก่ 5,7-dimethoxyflavone (DM, chrysin dimethyl ether), 5,7,4'-trimethylflavone (TM, apigenin trimethyl ether) และ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) สามารถแยกสาร PM ได้ประมาณ 3.0 กรัม เพื่อนำไปศึกษาผลและกลไกในแสดงฤทธิ์ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือดในหนูแร็ท

4. การศึกษาผลทางเภสัชวิทยาของ *KPD* และ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด

การศึกษาแบ่งออกเป็น 2 หัวข้อใหญ่ ๆ คือ

4.1 การศึกษาแบบ *in vivo* ในหนูแร็ทสลบ

4.2 การศึกษาแบบ *in vitro* โดยการตัดแยกกล้ามเนื้อหัวใจ และหลอดเลือดออกมาศึกษาใน organ bath

4.1 การศึกษาแบบ in vivo ในหนูแร็ทสลบ

4.1.1 ศึกษาผลของ KPD และ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) *ต่อความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจในหนูแร็ทสลบ*

ศึกษา dose-response relationship ระหว่างขนาดของยาที่ให้กับการแสดงผลต่อความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจในหนูแร็ทที่สลบด้วย Nembutal sodium (50 mg/kg, i.v.) โดยฉีดยาเข้าทางหลอดเลือดดำ (jugular vein) และบันทึกผลทาง common carotid artery ด้วยเครื่อง polygraph หลังเสร็จการทดลองหนูแร็ททุกตัวจะถูกผ่าท้องเพื่อตรวจสอบความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันของสาร โดยการตรวจดูว่ามีการคั่งของเลือดในตับ ทางเดินอาหาร และที่กระเพาะปัสสาวะหรือไม่

4.1.2 ศึกษากลไกในการออกฤทธิ์ของ KPD* และ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) *ต่อระบบประสาทอัตโนมัติ

เพื่อที่จะศึกษาว่าการออกฤทธิ์ของ KPD และ PM ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือดเป็นผลมาจาก (1) สารออกฤทธิ์ผ่านทาง muscarinic receptor ของระบบประสาท parasympathetic และ (2) สารออกฤทธิ์ผ่านทาง β-adrenergic receptor ของระบบประสาท sympathetic ทำการทดลองโดยฉีด atropine (muscarinic receptor antagonist) ให้สัตว์ทดลองก่อนประมาณ 30 นาที เพื่อ block muscarinic receptor แล้วจึงศึกษา dose-response relationship ของ KPD หรือ PM ต่อความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจ และเปรียบเทียบผลที่ได้กับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้ฉีด atropine

ในทำนองเดียวกันเพื่อที่จะศึกษาว่า KPD และ PM ออกฤทธิ์ผ่านทาง β-adrenergic receptor หรือไม่ทำการทดลองโดยการฉีด propranolol (β-adrenergic receptor antagonist) ให้แก่สัตว์ทดลองก่อน 30 นาที แล้วจึงศึกษา dose response relationship ของ KPD หรือ PM ต่อความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจ เปรียบเทียบผลที่ได้กับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ฉีด propranolol

4.1.3 ศึกษาผลของ Hexamethonium ต่อการตอบสนองของ KPD* และ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) *ต่อความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจในหนูแร็ทสลบ

เพื่อที่จะศึกษาว่าผลของ KPD และ PM ต่อความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจในหนูแร็ท เป็นผลของสารออกฤทธิ์ผ่านทางระบบประสาทกลางหรือไม่ ทำการทดลองโดยการยับยั้งการทำงานของ sympathetic ganglion โดย hexamethonium ก่อนแล้วจึงศึกษา dose-response relationship ของ KPD และ PM ต่อความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจ เปรียบเทียบผลที่ได้กับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ฉีด hexamethonium

4.2 การศึกษาแบบ *in vitro* โดยการตัดแยกกล้ามเนื้อหัวใจ และหลอดเลือดออกมาศึกษาใน organ bath

4.2.1 ศึกษากลไกในการออกฤทธิ์ของ KPD* และ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) *ต่อหัวใจที่ตัดแยกออกมาศึกษาแบบ in vitro

เพื่อที่จะศึกษาว่าการออกฤทธิ์ของ KPD และ PM ต่ออัตราการเต้นของหัวใจเป็นผลของสารออกฤทธิ์โดยตรงที่กล้ามเนื้อหัวใจ ทำการทดลองโดยการตัดเอาหัวใจห้องบนแยกเป็นห้องบนซ้าย และห้องบนขวาออกจากกัน และนำมาใส่ใน organ bath ที่มี Kreb's Heinseleit solution ที่ 37 °C หลังจากที่ equilibrate เนื้อเยื่อนาน 50 นาที ศึกษา dose-response relationship ของ KP extract และ

สารบริสุทธิ์ฯต่อความแรงในการหดตัวของหัวใจห้องบนซ้ายที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าให้มีการหดตัว และผลต่ออัตราการเต้นได้เองของหัวใจห้องบนขวา

เพื่อที่จะดูว่าผลของ KPD และ PM ต่อความแรงในการบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้าย และอัตราการเต้นได้เองของหัวใจห้องบนขวา เป็นผลเนื่องมาจาก KPD และ PM ผ่านทาง muscarinic receptor และ/หรือ β-adrenergic receptor ที่หัวใจหรือไม่ ทำการทดลองโดย incubate หัวใจด้วย atropine และ/หรือ propranolol ก่อน แล้วจึงศึกษา dose-response relationship ต่อ KPD และ PM เปรียบเทียบผลการทดลองกับกลุ่มที่ไม่ได้ incubate ด้วยสารดังกล่าว

4.2.2 การศึกษากลไกในการแสดงฤทธิ์ของ KPD และ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) *ต่อหลอดเลือดแดงที่ตัดแยกออกมาศึกษาแบบ in vitro*

4.2.2.1 ศึกษาผลของ KPD และ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) *และ N-nitro-L-arginine ต่อการคลายตัวของหลอดเลือด*

เพื่อที่จะศึกษากลไกในการออกฤทธิ์ของ KPD และ PM ในการลดความดันโลหิตว่าเป็นผลโดยตรงของสารต่อหลอดเลือดหรือไม่ และผลดังกล่าวเป็นผลโดยตรงของสารกระทำที่กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด หรือเป็นผลทางอ้อมโดยกระทำผ่าน endothelium ของหลอดเลือดโดยการกระตุ้นให้มีการหลั่งของ nitric oxide และ/หรือ endothelium hyperpolarizing factors ทำการทดลองโดยการแยกหลอดเลือด thoracic aorta ของหนูแร็ทออกมาทำการทดลองใน organ bath โดยแบ่งหลอดเลือดออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่มี endothelium กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่มี endothelium แต่ยับยั้งการสร้าง nitric oxide ด้วย n-nitro-L-arginine กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่ endothelium ถูกทำลาย

หลังจากเตรียมหลอดเลือดและใส่ลงใน organ bath เรียบร้อยแล้ว หลอดเลือดทั้ง 3 กลุ่ม จะถูก equilibrate ใน Kreb's Heinseleit solution ประมาณ 40 นาที ทดสอบการทำงานของ endothelium ในการหลั่ง nitric oxide ตามวิธีการของ Jansakul และ King (1989) หลังจากนั้น equilibrate หลอดเลือดอีก 30 นาทีแล้วศึกษาผลของ KPD และ PM ต่อหลอดเลือด โดยศึกษา dose-response relationship ระหว่างความแรงในการหดตัวของหลอดเลือด กับขนาดของสาร KPD และ PM หลังจากนั้น ล้างหลอดเลือด 3-4 ครั้ง ด้วย Kreb's Heinseleit solution และ equilibrate หลอดเลือดอีกครั้งด้วย Kreb's Heinseleit solution นาน 40 นาที โดยเปลี่ยน Kreb's Heinseleit solution ทุก 10 นาที แล้วจึงศึกษาผลของสาร KPD และ PM ต่อการคลายตัวของหลอดเลือดที่ให้หดตัวอยู่ก่อนแล้วด้วย $3x10^{-6}$ M phenylephrine หรือ 40 mM KCl (ศึกษาเฉพาะ KPD) แบบcumulative dose-response โดยเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดครั้งละ 0.5 log concentration จนกระทั่งหลอดเลือดคลายตัวได้สูงสุด

4.2.2.2. ศึกษาผลของ KPD และ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) *ต่อการแสดงฤทธิ์เป็น Guanylate cyclase stimulator*

Guanylate cyclase เป็นเอ็นไซม์ ที่มีผลทำให้ GTP เปลี่ยนเป็น c-GMP ซึ่งเป็นสารที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัว เพื่อที่จะศึกษาว่า KPD และ PM มีผลเป็น guanylate cyclase stimulator หรือไม่ ทำการทดลองโดย incubate หลอดเลือดด้วย ODQ ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการทำงานของ guanylate cyclase แล้วจึงศึกษา Dose-response curve ในการคลายตัวของหลอดเลือดที่ให้หดตัวอยู่ก่อนแล้วด้วย phenylephrine ต่อ KPD และ PM

4.2.2.3 ศึกษาผลของ KPD และ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) *ต่อการแสดงฤทธิ์เป็น K^+-channel opener หรือ Ca^{2+} sensitive K^+ channel*

เพื่อที่จะศึกษาว่าผลการคลายตัวของหลอดเลือดเป็นผลเนื่องมาจากสารดังกล่าวมีผลทำให้มีการเปิดของ K^+-channel ทำการทดลองโดย incubate หลอดเลือดด้วย glybenclamide (ATP sensitive K^+-channel blocker) หรือ TEA ซึ่งเป็น Ca^{2+} sensitive K^+ channel blocker แล้วจึงศึกษาผลของ KPD และ PM ในการคลายตัวของหลอดเลือดที่ถูกทำให้หดตัวอยู่ก่อนแล้วด้วย phenylephrine เปรียบเทียบผลดังกล่าวกับกลุ่มที่ไม่ได้ incubate ด้วย glybenclamide หรือ TEA

4.2.2.4. ศึกษาผลของ KPD และ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) *ต่อการแสดงฤทธิ์เป็น Rho-kinase inhibitor*

Rho เป็นโปรตีนที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ phosphatase ซึ่งจะมีผลทำให้หลอดเลือดหดตัว ดังนั้นถ้า KP extract และสารบริสุทธิ์ฯมีผลยับยั้งการทำงานของ Rho kinase ก็จะทำให้เอนไซม์ phosphatase ไม่ถูกยับยั้ง ทำให้เกิด dephosphorylation ของ Myosin light chain kinase มากขึ้น ส่งผลให้หลอดเลือดคลายตัว เพื่อที่จะศึกษาผลดังกล่าว ทำการทดลองโดย incubate หลอดเลือดด้วย Y-27632 ซึ่งเป็น specific Rho-kinase inhibitor, KPD หรือ PM แล้วศึกษาผลการหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine เปรียบเทียบผลที่ได้กับกลุ่มที่ไม่ได้ incubate ด้วย Y-27632, KPD หรือ PM

4.2.2.5 ศึกษาผลของสาร KPD และ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) *ต่อการแสดงฤทธิ์เป็น voltage Ca^{2+} channel blocker*

เพื่อทีจะศึกษาว่าการคลายตัวของหลอดเลือด เป็นผลเนื่องมาจาก KPD และ PM แสดงฤทธิ์เป็น voltage Ca^{2+} channel blocker การศึกษาแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยที่ 1 ทำการศึกษาใน normal Kreb's solution กลุ่มย่อยที่ 2 ทำการศึกษาใน Ca^{2+}free Kreb's solution โดย inbubate

หลอดเลือดด้วย nifedepine, nifedipine บวก KPD และ PM แล้วศึกษาการหดตัวของหลอดเลือด ต่อ phenylephrine ทั้งในสารละลาย Normal Kreb's solution และในสารละลาย Ca^{2+}-free Kreb's solution

4.2.2.6 ศึกษาผลของสาร KPD* และ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) *ต่อการแสดงฤทธิ์เป็น store-operated Ca^{2+} channel blocker

เพื่อที่จะศึกษาว่าการคลายตัวหลอดเลือดเป็นผลเนื่องมาจาก KPD และ PM แสดงฤทธิ์เป็น store-operated Ca^{2+} channel blocker การศึกษาแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย

กลุ่มย่อยที่ 1 ทำการศึกษาใน normal Kreb's solution โดย inbubate หลอดเลือดด้วย thapsigargin เพื่อยับยั้งการนำ Ca^{2+} เข้าไปเก็บไว้ใน sarcoplasmic reticulum ก่อน แล้วจึงศึกษาการตอบสนองการคลายตัวของหลอดเลือดต่อ KPD, PM หรือ SKF 96365

กลุ่มย่อยที่ 2 ทำการศึกษาใน Ca^{2+}free Kreb's solution ทำการทดลองโดย inbubate หลอดเลือดด้วย thapsigargin ก่อน จากนั้น หยด KPD, PM หรือ SKF 96365 เพิ่มลงไป incubate นานประมาณ 30 นาที แล้วศึกษาการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ สารละลาย calcium chloride

4.2.2.7 ศึกษาผลของ KPD หรือ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) ต่อ calcium mobilization ที่ sarcoplasmic reticulum

การศึกษาแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยที่ 1 ทำการศึกษาใน normal Kreb's solution กลุ่มย่อยที่ 2 ทำการศึกษาใน Ca^{2+}free Kreb's solution โดย inbubate หลอดเลือดด้วย thapsigargin เพื่อยับยั้งการนำ Ca^{2+} เข้าไปเก็บไว้ใน sarcoplasmic reticulum ก่อน แล้วจึงหยดสาร KPD, PM หรือ SKF 96365 เพิ่มลงไป incubate ต่ออีกประมาณ 30 นาที แล้วจึงศึกษาการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ phenylephrine

แต่ละกลุ่ม (ข้อย่อย) ทำการทดลองซ้ำในหนูแร็ท หรือเนื้อเยื่อจากหนูแร็ท 6 ตัว (n = 6) และใช้สารขนาดต่าง ๆ ประมาณ 3-6 ขนาด

การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้ t-test หรือ ANOVA ตามด้วยการประเมินโดยใช้ Fisher's test ที่ระดับนัยสำคัญที่ $p \leq 0.05$