



เภสัชจลนศาสตร์และผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือดของตำรับสารสกัดจาก
เหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทนในหนูแรท

**Pharmacokinetics and Cardiovascular Effects of *Kaempferia parviflora* Rhizome
Dichloromethane Extract (KPD) Preparations in Rats.**

ไพไลพรรณ ไชยรักษ์
Pilaipan Chairuk

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
การแพทย์แผนไทยดุษฎีบัณฑิต
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Doctor of Thai Traditional Medicine
Prince of Songkla University**

2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



เภสัชจลนศาสตร์และผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือดของตำรับสารสกัดจาก
เหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทนในหนูแรท

**Pharmacokinetics and Cardiovascular Effects of *Kaempferia parviflora* Rhizome
Dichloromethane Extract (KPD) Preparations in Rats.**

ไพไลพรรณ ไชยรักษ์

Pilaipan Chairuk

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
การแพทย์แผนไทยดุษฎิบัณฑิต
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Doctor of Thai Traditional Medicine
Prince of Songkla University**

2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ เกณฑ์จลนศาสตร์และผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือดของตำรับสารสกัดจาก
เหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทนในหนูแรท

ผู้เขียน นางสาวพิไลพรรณ ไชยรักษ์

สาขาวิชา การแพทย์แผนไทย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. นวีวรรณ จันสกุล) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กิจจา สว่างเจริญ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. นวีวรรณ จันสกุล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นิชาอุคะห์ ระเด่นอามัด) (รองศาสตราจารย์ ดร. นิชาอุคะห์ ระเด่นอามัด)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กัญญนัช กนกวิรุพห์) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กัญญนัช กนกวิรุพห์)

.....กรรมการ
(ดร. นงลักษณ์ กุลวรรรัตน์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาการแพทย์แผนไทยคุณวุฒิปบัณฑิต

.....
(ศาสตราจารย์ ดร. ดำรงค์ดี ฟ้ารุ่งสว่าง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ

(ศาสตราจารย์ ดร. ฉวีวรรณ จันสกุล)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ

(นางสาวพิไลพรรณ ไชยรักษ์)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ

(นางสาวพิไลพรรณ ไชยรักษ์)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ เกษัชจลนศาสตร์และผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือดของตำรับสารสกัดจาก
เหง้ากระชายดำด้วยไคคลอโรมีเทนในหนูแรท

ผู้เขียน นางสาวพิไลพรรณ ไชยรักษ์

สาขาวิชา การแพทย์แผนไทย

ปีการศึกษา 2564

บทคัดย่อ

Kaempferia parviflora (KP) Wall.Ex Baker หรือ กระชายดำ อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae พบทางภาคเหนือของประเทศไทย ทางกรมแพทย์พื้นบ้านใช้เหง้ากระชายดำเป็นยาบำรุงเพื่อสุขภาพ นับถึงปัจจุบันได้มีการศึกษาทางวิทยาศาสตร์เพื่อยืนยันสรรพคุณของเหง้ากระชายดำในการรักษาโรคต่าง ๆ เช่น ใช้เป็นยาบำรุงสมรรถภาพทางเพศ ด้านการอักเสบ ด้านความดันโลหิตสูง ป้องกันการเกิดโรคหัวใจ และด้านโรคอ้วน นอกจากนี้ Yorsin et al., 2014 ยังพบว่าการใช้หนุ่ยกลางชีวิตกินสารสกัดเหง้ากระชายดำด้วยไคคลอโรมีเทน (KPD) มีผลทำให้ลดการสะสมของไขมันในร่างกาย และเพิ่มการหลั่งไนตริกออกไซด์ที่ผนังหลอดเลือด ซึ่งเป็นปัจจัยที่ชะลอการพัฒนาไปเป็นโรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด แต่สารสกัด KPD เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ จึงได้พัฒนาสาร KPD ด้วยเทคนิค solid dispersion โดยใช้ kollicoat® IR (PVA-co-PEG) (K) เป็นสารช่วย ได้เป็นตำรับ K-KPD ที่มีความสามารถในการละลายได้ดี ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ ในหนูแรทโตเต็มวัย และฤทธิ์ทางชีวภาพของ K-KPD ในหนูแรทเพศผู้วัยกลางชีวิตต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด เพื่อดูว่า K จะมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ทางชีวภาพของ KPD หรือไม่

Solid dispersion ของ KPD ทำโดยใช้ KPD: K ในอัตราส่วน 1:1 ละลายสารแต่ละชนิดด้วยไคคลอโรมีเทน (1 กรัมต่อ 5 มิลลิลิตร) แล้วนำมาผสมเข้าด้วยกัน เมื่อสารแห้งจะได้สารที่เป็นเนื้อเดียวกันมีลักษณะเป็นผงเรียก K-KPD แล้วจึงนำไปศึกษาทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ในหนูแรทเพศผู้โตเต็มวัยด้วยการป้อนยาทางปาก จากนั้นเก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดแดงคาโรติดข้างซ้ายของหนูแรทสลับหลังจากป้อนยาไปแล้วที่เวลา 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240 และ 360 นาที มาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญหลักของกระชายดำ ได้แก่ PMF, DMF และ TMF ในน้ำเลือด สำหรับการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ K-KPD ศึกษาในหนูแรทเพศผู้วัยกลางชีวิตหลังจากป้อน K-KPD ขนาด 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, K (100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) หรือน้ำกลั่น วันละ 2 ครั้ง นาน 6 สัปดาห์

เภสัชจลนศาสตร์ของ K-KPD พบว่าความเข้มข้นของสารทั้ง 3 ชนิดในน้ำเลือด ถึงจุดสูงสุดหลังจากได้รับ K-KPD ไปแล้ว 90 นาที และพบว่าสาร DMF และ TMF มีความเข้มข้นเป็นสองเท่าของ PMF สำหรับผลทางชีวภาพของ K-KPD เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (น้ำกลั่น) พบว่า K ไม่ส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ในทุกปัจจัยที่ทำการศึกษา ส่วน K-KPD มีผลลดการสะสมไขมันในร่างกายและที่เซลล์ตับ ลดระดับน้ำตาล ไตรกลีเซอไรด์ และ alkaline phosphatase ในน้ำเลือด และลดจำนวนเกล็ดเลือด แม้ว่า K-KPD ไม่มีผลต่อความดันโลหิตหรืออัตราการเต้นของหัวใจพื้นฐานในหนูแรทเพศบ แต่ K-KPD มีผลลดความแรงในการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ทรวงอก (thoracic aorta) ต่อ phenylephrine ซึ่งผลดังกล่าวนี้สามารถยับยั้งได้ด้วย DL-propargyl glycine (PAG) หรือโดยการทำลายเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (endothelium) แต่ไม่สามารถยับยั้งได้ด้วย N-nitro-L-arginine (L-NA) K-KPD มีฤทธิ์เสริมการคลายตัวของ thoracic aorta ต่อ acetylcholine (ACh) และ glyceryl trinitrate (GTN) ที่ทำให้หดตัวอยู่ก่อนด้วย phenylephrine และผลดังกล่าวนี้สามารถยับยั้งได้ด้วย PAG การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Western blot พบว่า K-KPD มีผลทำให้เพิ่มการแสดงออกของโปรตีน CSE แต่ไม่เพิ่มการแสดงออกของโปรตีน eNOS

จากผลการทดลองทั้งหมดนี้สรุปได้ว่า Kollicoat ไม่มีผลต่อพารามิเตอร์ที่เป็นประโยชน์ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือดของ KPD ยกเว้นผลต่อกลไกการทำงานของหลอดเลือดที่พบว่ามีผลทำให้เพิ่มการผลิต H_2S แทนที่จะเป็น NO การกิน K-KPD ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่ออวัยวะภายใน เซลล์เม็ดเลือด รวมทั้งการทำงานของตับและไต ดังนั้น K-KPD น่าจะเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพแนวใหม่ที่ช่วยยืดอายุการมีสุขภาพดีของระบบหัวใจและหลอดเลือดในมนุษย์ได้ K-KPD เป็นผลิตภัณฑ์ที่คุ้มค่าที่จะพัฒนาต่อไปในรูปแบบที่สะดวกต่อการบริโภค เช่น เป็นเม็ด หรือบรรจุแคปซูล

คำสำคัญ: กระชายดำ, เภสัชจลนศาสตร์, ระบบหัวใจและหลอดเลือด, ไฮโดรเจนซัลไฟด์

Thesis	Pharmacokinetics and Cardiovascular Effects of <i>Kaempferia parviflora</i> Rhizome Dichloromethane Extract (KPD) Preparations in Rats.
Author	Miss Pilaipan Chairuk
Major Program	Thai Traditional Medicine
Academic Year	2021

ABSTRACT

Kaempferia parviflora (KP) Wall.Ex Baker or black ginger belongs to the family Zingiberaceae, found in the northern part of Thailand. Its rhizome has been used in folk medicine for health promotion. To date, a number of investigations have claimed therapeutic benefit such as: aphrodisiac, anti-inflammatory, anti-hypertensive, cardioprotective, and antiobesity effects. Yorsin et al., 2014 also found that consumption of dichloromethane extract of the KP rhizomes (KPD) by middle-aged male rats caused some beneficial changes in cardiovascular parameters, decreased body fat and up-regulated NO. KPD is poorly water soluble. Thus the present study aimed to enhance the KPD dissolubility by solid dispersion method using Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) (K) as an excipient. Pharmacokinetic of the product in the *in vivo* experiment on adult male rats and its biological activities in the middle-aged male rats were also investigated.

Solid dispersion of the KPD was prepared by dissolving KPD and K (1 g per 5 mL dichloromethane) separately and then mixing together at a 1: 1 ratio after dryness to yield homogeneous, powder solid dispersion of KPD (K-KPD). The *in vivo* pharmacokinetics of the K-KPD were studied in mature male rats by oral gavage of the K-KPD and blood collected from left carotid artery of the anesthetized rat at 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240 and 360 min and using the major components of the KPD: PMF, DMF and TMF as markers. Biological activities of the K-KPD were studied in middle-aged male rats after six weeks of oral gavage 200 mg/kg K-KPD, K (100 mg/kg) or distilled water (DW), twice a day.

The pharmacokinetic study found that the three major compounds reached their peaks at 90 min after oral gavage of the K-KPD and the concentration of the DMF and TMF were about two-fold that of PMF. Biological activities of the K-KPD, in comparison to control group (DW), K did not affect any of the study parameters. K-KPD caused decreases in body fat and liver cell

lipid accumulation, plasma level of glucose and triglycerides, plasma level of alkaline phosphatase, and blood platelets count. K-KPD did not affect basal blood pressure or heart rate in anesthetized rats. K-KPD causes decreased maximal contractile response of thoracic aortic rings to phenylephrine, and this effect disappeared in the presence of DL-propargylglycine (PAG) or by removal of the vascular endothelium but not N-nitro-L-arginine (L-NA). K-KPD potentiated vasodilatation of the aortic ring precontracted with phenylephrine to acetylcholine and glyceryl trinitrate, and these effects were abolished by PAG. Western blot analysis showed an increase in blood vessel CSE, but not eNOS protein expression.

Conclusion: Taken together, Kollicoat did not affect the beneficial cardiovascular health parameters of the KPD, except for the mechanism of the vascular function, which was found to cause increased blood vessel H₂S instead of the NO. K-KPD did not have any adverse effects on internal organ gross toxicity, liver and kidney functions, or on blood cells. Thus, the K-KPD would be a novel health product to prolong cardiovascular health functions in human. Further development of the K-KPD in a dosage form as tablets or capsules for convenient human consumption would be worthwhile.

Keywords: *Kaempferia parviflora* Wall. Ex. Baker, Pharmacokinetics, Cardiovascular systems, Hydrogen sulfide (H₂S)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนใคร่ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. ฉวีวรรณ จันสกุล ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างยิ่ง ที่ได้เสียสละเวลาในการให้คำแนะนำ ตลอดจนช่วยตรวจสอบวิทยานิพนธ์ และให้ข้อเสนอแนะที่เอื้อประโยชน์ต่องานวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นิชาอุตะหะ ระเด่นอาหมัด ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กัญญนัช กนกวิรุพห์ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม) และเกสัชกร ดร. ยศนันท์ วีระพลที่ได้เสียสละเวลาในการให้คำแนะนำ ตลอดจนให้ข้อเสนอแนะ และให้ความช่วยเหลือที่เอื้อประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กิจจา สว่างเจริญ และดร. นงลักษณ์ กุลวรรธต์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติม ในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ เพื่อความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาตลอดจนเป็นแบบอย่างในการนำวิชาความรู้ไปใช้ในการดำเนินชีวิต และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ โดยเฉพาะนางสาวศรีสุรัฐ ดวงใส ที่ให้ความช่วยเหลือและคำปรึกษาต่าง ๆ เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อคุณแม่และครอบครัว ด้วยความเคารพยิ่งที่ได้สนับสนุนทางการศึกษา และนักศึกษาปริญญาโทและเอก พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ คณะการแพทย์แผนไทย รวมทั้งบุคคลอื่น ๆ ที่มีได้เอ่ยนามไว้ ณ ที่นี้ได้ทั้งหมด ที่ได้เสียสละเวลาช่วยเหลือ แนะนำและให้คำปรึกษาที่ดีเสมอมา

คุณค่าและคุณประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบอุทิศแด่บุพการี และผู้มีพระคุณทุกท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อประเทศ และผู้ที่สนใจ

พิไลพรรณ ไชยรักษ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
ABSTRACT	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการรูป	(12)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(15)
บทที่ 1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	5
วัตถุประสงค์	53
บทที่ 2 วิธีการดำเนินการวิจัย	54
วัสดุและอุปกรณ์	54
วิธีการทดลอง	59
บทที่ 3 ผลการทดลอง	72
บทที่ 4 บทวิจารณ์	93
บทที่ 5 บทสรุป	97
เอกสารอ้างอิง	98
ภาคผนวก	118
ประวัติผู้เขียน	144

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงเกณฑ์การวินิจฉัยภาวะเมแทบอลิกซินโดรม	50
2. แสดงพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของตำรับสารสกัดเหง้ากระชายดำด้วย ไดคลอโรมีเทน (Pharmacokinetic parameters of K-KPD)	78
3. แสดงความเข้มข้นของสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของ KPD ได้แก่ PMF, DMF และ TMF ที่อวัยวะต่าง ๆ หลังจากป้อนให้แก่หนูแรทไปแล้ว 90 และ 240 นาที	79
4. แสดงผลของการกินตำรับ K-KPD, K หรือ น้ำกลั่น ต่อน้ำหนักอวัยวะภายใน	81
5. แสดงผลของการกินตำรับ K-KPD, K หรือ น้ำกลั่น ต่อน้ำหนักไขมันที่อวัยวะ ภายใน และที่ได้ผิวหนัง	82
6. แสดงผลของการกินตำรับ K-KPD, K หรือ น้ำกลั่น ต่อดัชนีน้ำตาลและไขมันใน เลือด	84
7. แสดงผลของการกินตำรับ K-KPD, K หรือ น้ำกลั่น ต่อดัชนีเอนไซม์ตับและไตใน เลือด (alkaline phosphatase (ALP), serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT), serum glutamic pyruvate transferase (SGPT), blood urea nitrogen (BUN) และ creatinine)	85
8. ผลของการกินตำรับ K-KPD, K หรือ น้ำกลั่น ต่อยานวนเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ (Hematology analysis: Complete blood count)	86
9. ผลของการกินตำรับ K-KPD, K หรือ น้ำกลั่น ต่อดัชนีโลหิตและอัตราการเต้น ของหัวใจพื้นฐานในหนูแรทวัยกลางชีวิตสลับ	88

รายการรูป

รูปที่	หน้า
1. แสดงลักษณะของเหง้ากระชายดำ (A) และดอกของกระชายดำ (B)	5
2. แสดงโครงสร้าง flavonoids ที่แยกได้จากกระชายดำ ทั้ง 11 ชนิด	7
3. แสดงวงจรการไหลเวียนเลือดในร่างกาย (Circulatory system) แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ วงจรการไหลเวียนผ่านปอด (Pulmonary circuit) และวงจรการไหลเวียนทั่วร่างกาย (Systemic circuit)	20
4. แสดงชนิดและโครงสร้างของหลอดเลือดแดง (Artery), หลอดเลือดดำ (Vein) และ หลอดเลือดฝอย (Capillary)	23
5. แสดงโครงสร้างพื้นฐานของหลอดเลือดแดง (Artery) และหลอดเลือดดำ (Vein) แบ่งเป็น 3 ชั้น ได้แก่ ผนังชั้นนอก (tunica adventitia) ผนังชั้นกลาง (tunica media) และผนังชั้นใน (tunica intima)	25
6. แสดงตำแหน่งของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด (A) และลักษณะของเซลล์ กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด (B)	28
7. แสดงการควบคุมการทำงานของหลอดเลือดโดยการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด เลือด ซึ่งเกิดจากการสูงขึ้นของระดับ Ca^{2+} ภายในเซลล์	30
8. แสดงการสร้างไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) โดยสร้างจาก L-arginine อาศัยการ ทำงานของของเอนไซม์ NOS และโคแฟกเตอร์ เช่น NADPH, Ca^{2+} และ calmodulin	34
9. แสดงกลไกการคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด โดยไนตริกออกไซด์ (NO)	37
10. แสดงผลทางสรีรวิทยาที่สำคัญของไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide; H_2S)	39
11. แสดงกลไกการคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดโดยไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S)	41

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
12. บทบาทของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดในภาวะปกติ (normal endothelial function) และภาวะผิดปกติ (endothelial dysfunction)	43
13. แสดงกลไกการเกิดพยาธิสภาพของภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis)	46
14. แสดงขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากเหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรโรมีเทน ขั้นตอนที่ 1 (A) และขั้นตอนที่ 2 (B)	60
15. แสดงสารสกัดจากเหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรโรมีเทน (<i>Kaempferia parviflora</i> rhizome-dichloromethane extract; KPD)	60
16. แสดงสีและลักษณะของตำรับยา Solid dispersion- <i>Kaempferia parviflora</i> rhizome- dichloromethane extract (K-KPD)	61
17. แสดงขั้นตอนการศึกษาทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ของตำรับยา	63
18. แสดงระยะเวลาการให้หนูกิน K-KPD, K หรือน้ำกลั่น	65
19. แสดงวิธีการดำเนินการทดลองหลังจากการให้กิน K-KPD, K หรือน้ำกลั่น วันละ 2 ครั้ง (เช้า-บ่าย) นาน 6 สัปดาห์	71
20. แสดงตัวอย่าง HPLC chromatogram ของสาร PMF, DMF และ TMF ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml, inject 10 μ l, UV spectrum และ retention time ของรูป standard curve; รูปทางขวาแสดง standard curve ที่ความเข้มข้น 0.0005-0.5 mg/ml และรูปทางซ้าย แสดง standard curve ที่ความเข้มข้น 0.005-0.03 mg/ml)	72
21. แสดงตัวอย่าง HPLC chromatogram ของตำรับยา K-KPD (A) และสารสกัด KPD (B) ซึ่งแต่ละตัวอย่างมีความเข้มข้น 1 mg/ml และ inject 10 μ l กราฟเล็ก ๆ หมายเลข 1, 2 และ 3 แสดง UV spectrum ส่วนตัวเลขที่เป็นนาฬิกาที่แสดง retention time ของสาร PMF, DMF และ TMF ตามลำดับ	74
22. แสดงค่าความเข้มข้น (μ g/ml) ของสาร PMF, DMF และ TMF ในเลือดของหนูแรทที่ ระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากที่ถูกป้อนตำรับ K-KPD	75

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
23. แสดงตัวอย่าง HPLC chromatogram ของสารสกัด KPD ในน้ำเลือดที่เวลา 30 (A), 60 (B), 90 (C), 120 (D), 180 (E) และ 240 นาที (F) ซึ่งแต่ละตัวอย่าง Inject 10 μ L กราฟเล็ก ๆ หมายเลข 1, 2 และ 3 แสดง UV spectrum ส่วนตัวเลขที่เป็นนาทีแสดง retention time ของสาร PMF, DMF และ TMF ตามลำดับ	76
24. แสดงผลของการกินตำรับยา K-KPD, K หรือ น้ำกลั่น ต่อน้ำหนักตัว (A) และ อาหารที่กินต่อวันต่อตัว (B)	80
25. แสดงผลของการกินตำรับยา K-KPD, K หรือ น้ำกลั่น ต่อการเก็บสะสมของไขมัน ในเนื้อเยื่อตับ	87
26. แสดงผลของการกินสารตำรับ K-KPD, K ต่อการตอบสนองของหลอดเลือดแดง ใหญ่ (thoracic aorta) ต่อ phenylephrine เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ป้อนน้ำกลั่น (A) หลอดเลือดที่มี endothelium (B) หลอดเลือดที่มี endothelium และถูกยับยั้งการสร้าง nitric oxide ด้วย N-nitro-L-arginine (L-NA) (C) หลอดเลือดที่มี endothelium ถูกยับยั้งการสร้าง nitric oxide ด้วย L-NA และถูกยับยั้งการสร้าง H_2S ด้วย propargylglycine (PAG) (D) หลอดเลือดที่ endothelium ถูกทำลาย (E) หลอดเลือดที่ endothelium ถูกทำลาย และถูกยับยั้งการสร้าง nitric oxide ด้วย N-nitro-L-arginine (L-NA) (F) หลอดเลือดที่ endothelium ถูกทำลาย ถูกยับยั้งการสร้าง nitric oxide ด้วย L-NA และถูกยับยั้งการสร้าง H_2S ด้วย propargylglycine (PAG)	90
27. แสดงผลของการกินสารตำรับ K-KPD, K หรือ น้ำกลั่น ต่อการคลายตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ (thoracic aorta) ที่ให้หดตัวอยู่ก่อนแล้วด้วย phenylephrine ต่อ acetylcholine ทั้งก่อน (A) และ หลังการสร้าง H_2S ด้วย PAG (B)	91
28. แสดงผลของการกินสารตำรับ K-KPD, K หรือ น้ำกลั่น ต่อการคลายตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ (thoracic aorta) ที่ให้หดตัวอยู่ก่อนแล้วด้วย phenylephrine ต่อ glyceryl trinitrate ทั้งก่อน (A) และ หลังการสร้าง H_2S ด้วย PAG (B)	91
29. แสดงผลของการกินสารตำรับ K-KPD, K หรือ น้ำกลั่น ต่อการแสดงออกของ โปรตีน eNOS (A) และ CSE (B) ที่หลอดเลือด thoracic aorta	92

ตัวย่อและสัญลักษณ์

μl	=	microliter
AC	=	adenylate cyclase
ACh	=	acetylcholine
ADMA	=	asymmetrical dimethyl arginine
ALT	=	alanine aminotransferase
AST	=	aspartate aminotransferase
BP	=	blood pressure
BSA	=	bovine serum albumin
BUN	=	blood urea nitrogen
$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	=	ethylene damine tetra acid; EDTA
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	=	ethanol
$\text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$	=	trifluoroacetic acid; TFA
$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	=	glycerol
Ca^{2+}	=	calcium ions
CBC	=	complete blood count
cAMP	=	cyclic adenosine monophosphate
CH_2Cl_2	=	dichloromethane
CH_3CN	=	acetonitrile
CH_3OH	=	methanol
Crea	=	creatinine
CSE	=	cystathionine- γ -lyase
DMF	=	5,7-dimethoxyflavone

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

DMSO	=	dimethyl sulfoxide
DW	=	distilled water
EDHF	=	endothelium-derived hyperpolarizing factors
EDRF	=	endothelium-derived relaxing factor
EGF	=	epidermal growth factor
eNOS	=	endothelial nitric oxide synthase, endothelial type
ET	=	endothelin
g	=	gram
GC	=	guanylate cyclase
GTN	=	glyceryl trinitrate
GTP	=	guanosine triphosphate
HCl	=	hydrochloric acid
ICAM-1	=	intercellular adhesion molecule 1
iNOS	=	inducible nitric oxide synthase, inducible type
IP ₃	=	inositol triphosphate
K ⁺	=	potassium ions
KCl	=	potassium chloride
kg	=	kilogram
KH ₂ PO ₄	=	monopotassium phosphate
KPD	=	<i>Kaempferia parviflora</i> rhizome-dichloromethane extract
LD ₅₀	=	50% lethal dose
L-NA	=	N ^G -nitro-L-arginine

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

L-NAME	=	L-nitroso arginine methylester
L-NMMA	=	L-NG-monomethyl arginine
MCP-1	=	monocyte chemotactic protein- 1
MCSF	=	macrophage colony-stimulating factor
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
MLCK	=	myosin light chain kinase
Na	=	sodium
NaCl	=	sodium chloride
NADPH	=	reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate
NF-kB	=	nuclear factor-kappa B
nNOS	=	neuronal nitric oxide synthase, neuronal type
NO	=	nitric oxides
NOS	=	nitric oxide synthase
PAG	=	DL-popragylglycine
PDE	=	phosphodiesterase
PDGF	=	platelet-derived growth factor
PGF _{2α}	=	prostaglandin F _{2α}
PGH ₂	=	prostaglandin H ₂
PGI ₂	=	prostacyclin
Phe	=	phenylephrine
PKA	=	protein kinase A

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

PKG	=	protein kinase G
PLC	=	phospholipase C
PMF	=	3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone
PPAR γ	=	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
RAS	=	renin- angiotensin system
ROS	=	reactive oxygen species
rpm	=	revolutions per minute
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
SERCA	=	sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPases
sGC	=	soluble guanylyl cyclase
SGOT	=	serum glutamic-oxaloacetic transaminase
SGPT	=	serum glutamate-pyruvate transaminase
TBH ₄	=	tetrahydrobiopterin
TMF	=	5,7,4'-trimethoxyflavone
TNF- α	=	tumor necrosis factor- α
TXA ₂	=	thromboxane A ₂
VCAM-1	=	vascular cell adhesion molecule 1
W: V	=	weight: volume
W: W	=	weight: weight

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวพิไลพรรณ ไชยรักษ์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5811430003

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
การแพทย์แผนไทยประยุกต์บัณฑิต	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี	2555

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

- ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

- นำเสนอผลงานวิจัยแบบ Poster presentation เรื่อง “Effects of 6-Week Oral Administration of *Kaempferia parviflora* Rhizome Dichloromethane Extract Formula on Body Fat and Vascular Function in Middle-Aged Male Rats.” ใน งาน The 7th International Conference on Natural Products (NATPRO7) ณ โรงแรมฮุนได (Hyundai) เมืองคยองจู (Gyeongju) ประเทศเกาหลีใต้ วันที่ 18-20 ตุลาคม พ.ศ. 2561

- Chairuk P, Tubtimsri S, Jansakul C, Sriamornsak P, Weerapol Y. Enhancing oral absorption of poorly water-soluble herb (*Kaempferia parviflora*) extract using self-nanoemulsifying formulation. Pharm Dev Technol. 2020 Mar; 25(3): 340-350.

- Chairuk P, Kanokwiroon K, Radenahmad, Weerapol Y, Jansakul C. Biological activities of solid dispersion kollicoat® IR (PVA-co-PEG)-*Kaempferia parviflora* dichloromethane extract (KPD) after six-week consumption by middle-aged male Rats. EC Pharmacol Toxicol 2021 Nov; 9(12): 86-98.

- อนุสิทธิบัตร เรื่อง “กรรมวิธีการสกัดสารกลุ่มเมทอกซีฟลาโวลจากเหง้ากระชายดำ” หมายเลขคำขอ 2003001333 วันที่ได้รับเลขที่คำขอ: 18 มิถุนายน พ.ศ. 2563

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

โรคทางระบบหัวใจและหลอดเลือดเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของการเสียชีวิตของมนุษย์ทั่วโลก และยังเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดความพิการทางร่างกายในระดับต่าง ๆ จนกระทั่งถึงระดับที่ไม่สามารถช่วยเหลือตัวเองได้ ทำให้เป็นภาระในการดูแลและการดำรงชีวิตในแต่ละวัน รวมไปถึงค่าใช้จ่ายต่าง ๆ เป็นอย่างมาก เช่น ค่ารักษาพยาบาล ค่ายารักษา เป็นต้น (Yazdanyar and Newman, 2009) ปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรกระบบหัวใจและหลอดเลือดเกิดจากหลายปัจจัยด้วยกัน โดยแต่ละปัจจัยนั้นจะส่งเสริมซึ่งกันละกัน มีทั้งปัจจัยที่สามารถเปลี่ยนแปลงได้ และไม่สามารถเปลี่ยนแปลงได้ ซึ่งในปัจจัยเหล่านั้น โดยอายุเป็นปัจจัยที่สำคัญมากที่สุดที่นำไปสู่การเกิดโรคทางระบบหัวใจและหลอดเลือด เนื่องจากเป็นปัจจัยที่ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงได้ (Herrera et al., 2010; Lakkatta, 2002; 2015; Lo Coco et al., 2016) มีรายงานว่าในเพศชายอายุ 30 ปี ไม่ควบคุมดูแลเรื่องอาหาร และครอบครัวมีประวัติของ premature coronary heart disease ใน 10 ปี จะมีอัตราเสี่ยงของการเกิดโรค coronary heart disease เพียง 16% เท่านั้น แต่ในผู้สูงอายุที่มีอายุ 60 ปีขึ้นไป จะมีอัตราเสี่ยงของการเกิดโรค coronary heart disease สูงถึง 50% (Thijssen et al., 2009) อีกทั้งจากรายงานในปี 2017 ของ United Nations (UN) รายงานว่าในหลายประเทศทั่วโลก รวมไปถึงประเทศไทยจะมีอัตราการเพิ่มขึ้นของจำนวนผู้สูงอายุ โดยจะมีจำนวนผู้สูงอายุ คือ ผู้ที่มีอายุ 60 ปีขึ้นไปมากกว่าจำนวนประชากรในทุกกลุ่มอายุ ซึ่งคาดว่าในปี 2050 จะมีจำนวนประชากรผู้สูงอายุทั่วโลกเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า และจะเพิ่มขึ้นเป็นสามเท่าในปี 2100 (He et al., 2016; UN, 2017) ดังนั้นจึงเป็นเรื่องสำคัญอย่างยิ่งที่แต่ละคนนั้นจะต้องหันมาดูแลสุขภาพของตัวเองให้มีสุขภาพดีตั้งแต่วัยกลางชีวิต เพื่อเป็นการชะลอ หรือป้องกันการเป็นโรกระบบหัวใจและหลอดเลือดในช่วงวัยชรา ทั้งนี้ นอกจากจะทำให้ตัวเองสุขภาพดีแล้วนั้นยังเป็นการลดภาระของลูกหลานอีกด้วย โดยปัจจัยที่สามารถช่วยทำให้มีสุขภาพที่ดีและยาวนานนั้น นอกจากการได้รับสารอาหารที่ดี และการออกกำลังกาย ยังมีการได้รับสารอาหารเสริมจากสมุนไพรที่มีสารที่ช่วยในการป้องกัน และ/หรือชะลอการเสื่อมประสิทธิภาพการทำงานของระบบหัวใจและหลอดเลือดอีกด้วย

ความชรา (aging) มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระบบหัวใจและหลอดเลือดทั้งในด้านโครงสร้างและการทำงาน โดยพบว่าเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้นทั้งในคนและสัตว์ทดลองนั้นผนังหลอดเลือดจะมีความหนาเพิ่มขึ้น เนื่องมาจากมีการเพิ่มทั้งขนาดและจำนวนของกล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle cell) ในผนังชั้นกลาง (tunica media) และมีการแทรกของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบเข้าไปในผนังชั้นใน (tunica intima) ซึ่งเป็นชั้นเซลล์บุผิวผนังหลอดเลือด (endothelial cell) เป็นผลให้ผนังหลอดเลือดมีความแข็งตัว (stiffness) (Gaballa et al., 1998; Guyton et al., 1983; Moreau et al., 1998) และพบว่าอายุที่เพิ่มมากขึ้นยังส่งผลให้การทำงานของเซลล์บุผิวผนังหลอดเลือด (vascular endothelium) เกิดความผิดปกติอีกด้วย โดยจะมีการสร้างและหลั่ง endothelium-derived relaxing factors เช่น nitric oxides (NO), endothelium-derived hyperpolarizing factors (EDHF) และ/หรือ vasodilator prostaglandins ลดน้อยลง (Fujii et al., 1993; Luscher and Tanner, 1993; Matz et al., 2000; Walsh et al., 2009) แต่กลับมีการหลั่ง endothelium-derived constricting factors เช่น endothelin (ET) และ thromboxane A₂ (TXA₂) เพิ่มมากขึ้น (Jani and Rajkumar, 2006; Matz et al., 2000; Van Guilder et al., 2007) ซึ่งจากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทั้งด้านโครงสร้างของผนังหลอดเลือดร่วมกับการทำงานที่ผิดปกติของเซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial dysfunction) นั้นจะทำให้มีการพัฒนาไปสู่การเกิดโรคความดันโลหิตสูง และโรคระบบหัวใจและหลอดเลือดในเวลาต่อมา (Duffy et al., 2005) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า อายุที่เพิ่มมากขึ้นทำให้เกิดการเพิ่มการสะสมไขมันที่เนื้อเยื่อตับและในร่างกายนมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งไขมันที่สะสมที่บริเวณอวัยวะภายในที่เรียกว่า “visceral fat” ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญที่นำไปสู่การพัฒนาไปเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 โรคความดันโลหิตสูง และ atherosclerosis เป็นต้น (Barbagallo et al., 2001; Blokhin and Lentz, 2013; Okosun et al., 2001; Park et al., 2006) มีการรายงานว่า การทำให้ไขมันที่อวัยวะภายในลดลงประมาณ 18% ของน้ำหนักตัว สามารถป้องกันภาวะการดื้อต่อ insulin (insulin resistance) และ glucose intolerance ของหนูวัยชราชนิด F344/Brown Norway และ Zucker Diabetes rat ได้ (Gabriely et al., 2002) ซึ่งการลดลงของไขมันดังกล่าวส่งผลให้ลดปัจจัยเสี่ยงในการพัฒนาไปเป็นโรคเบาหวาน และโรคความดันโลหิตสูง การทำงานที่ผิดปกติของเซลล์บุผิวหลอดเลือดมักเป็นมาจากการสร้างหรือหลั่งสาร NO ลดลงทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้น้อยลง ส่งผลให้หลอดเลือดมีความยืดหยุ่นลดลงซึ่งหากภาวะดังกล่าวเกิดขึ้นเป็นระยะเวลาานานก็จะทำให้เกิดโรคความดันโลหิตสูง มีรายงานว่า การลดระดับของ LDL-C ในเลือด โดยการให้ยาแผนปัจจุบันหรือยาสมุนไพรสามารถช่วยทำให้การทำงานที่ผิดปกติของเซลล์บุผิวหลอดเลือดกลับคืนสู่สภาพปกติได้ (Bergholm et al., 2003; Walker et al., 2012) ดังนั้นหากมีสารสกัดจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ลดน้ำหนักตัว ลดน้ำตาล และ/หรือลดไขมันในเลือดได้ก็น่าจะช่วยป้องกันหรือชะลอการเกิด

ความคิดปกติในการทำงานของหลอดเลือด และส่งผลให้หลอดเลือดมีสุขภาพที่ดีทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพอย่างยาวนาน

กระชายดำ หรือ Black Galingale มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Kaempferia parviflora* อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีถิ่นกำเนิดในประเทศเขตร้อน บริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กระชายดำเป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่นิยมปลูกในภาคเหนือตอนล่างและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยและประเทศลาว ซึ่งมีสรรพคุณทางยาที่หลากหลายและนำมาใช้เป็นยารักษาโรคทางการแพทย์พื้นบ้านมาช้านาน นิยมใช้ส่วนที่เรียกว่า “เหง้า” มีสรรพคุณเป็นยาบำรุงกำลัง บำรุงกำหนด บำรุงประสาทและสายตา บำรุงหัวใจ แก้โรคบิด แก้ปวดท้อง ทำให้ผิวพรรณมีน้ำมีนวล แก้โรคกระเพาะ โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ ปวดมวนในท้อง แก้อาการ ตกขาว เป็นต้น จากการวิพากษ์ของแพทย์แผนพื้นบ้านทั้ง 4 ภูมิภาค พบว่ามักใช้รับประทานเป็นยาอายุวัฒนะ บำรุงกำลัง บำรุงทางเพศ จึงได้ฉายาว่า โสมไทย (วุฒิ วุฒิชรรมเวช, 2540; บังอร ศรีพานิชกุลชัย, 2553; อัญชลี จุฑะพุธิ, 2556) และในการแพทย์ดั้งเดิมของประเทศลาวมีการนำเหง้ากระชายดำมาใช้เป็นยาลดระดับน้ำตาลในเลือด เพิ่มกำลัง อีกทั้งยังทำให้เลือดไหลเวียนดีขึ้น (Akase et al., 2011)

เหง้ากระชายดำมีรายงานการศึกษาทางวิทยาศาสตร์มากมาย โดยรายงานส่วนใหญ่จะทำการศึกษาฤทธิ์ของเหง้ากระชายดำที่สกัดด้วยเอทานอล (ethanol) พบว่าสารเหง้ากระชายดำด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ในการเสริมความต้องการทางเพศในหนูแรทเพศผู้ (Chaturapanich et al., 2008; 2012; Sudwan et al., 2006) ป้องกันการเกิดแผลที่กระเพาะอาหาร (Rujjanawate et al., 2005) ด้านการอักเสบ (Sae-wong et al., 2009; Tewtrakul and Subhadhirasakul, 2008) และช่วยป้องกันการขาดเลือดไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจที่ถูกชักนำให้กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (ischemic-reperfusion injury) ที่ทำการทดลองในหัวใจหนูที่ตัดแยกออกมาศึกษาในหลอดทดลอง (Malakul et al., 2011)

นอกจากนี้มีการศึกษาอื่นโดยสกัดเหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทน พบว่า สารสกัดจากเหง้ากระชายดำ มีสารสำคัญหลักที่พบในปริมาณสูง 3 ชนิด ได้แก่ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PMF), 5,7-dimethoxyflavone (DMF) และ 5,7,4'-trimethoxyflavone (TMF) โดยเมื่อให้หนูวัยกลางชีวิตกินสารสกัดเหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทน วันละ 2 ครั้งนาน 6 สัปดาห์ มีผลทำให้น้ำหนักตัวลดลง และมีการลดสะสมไขมันที่บริเวณผิวหนัง อวัยวะภายใน และที่เซลล์ตับ อีกทั้งยังสามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคส (glucose) และระดับไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) โดยไม่มีความเป็นพิษต่อร่างกาย รวมทั้งไม่ส่งผลต่อการทำงานของตับและไตและเม็ดเลือดต่างๆ และยังพบว่าการกินสารดังกล่าวยังมีผลต่อการทำงานของหลอดเลือดในหนูแรทวัยกลางชีวิตอีกด้วย โดยทำให้มีการเพิ่มการแสดงออกของ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ nitric oxides (NO) จากเซลล์บุผิวผนังหลอดเลือดทำ

ให้หลอดเลือดสร้างและหลั่งสาร NO ออกมามากขึ้น ส่งผลเสริมการคลายตัวของหลอดเลือดในการตอบสนองต่อ acetylcholine และด้านการหดตัวของหลอดเลือดในการตอบสนองต่อ phenylephrine (PE) เป็นการเพิ่มความยืดหยุ่นให้กับหลอดเลือดของหนูแรทวัยกลางชีวิตกลับคืนสู่วัยรุ่น (Yorsin et al., 2014) ซึ่งจากรายงานข้างต้นเป็นการชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากเหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทนน่าจะปลอดภัยและสมควรพัฒนาไปใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพสำหรับควบคุม และ/หรือลดน้ำหนัก ป้องกัน และ/หรือชะลอการนำไปสู่การพัฒนาไปเป็นโรกระบบหัวใจและหลอดเลือดโดยเฉพาะในคนวัยกลางชีวิต แต่เนื่องจากสารสกัดจากเหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทนนั้นเป็นสารที่ละลายน้ำได้ยาก ซึ่งทำให้ไม่สามารถดูดซึมที่ลำไส้ได้ ดังนั้นจึงต้องมีการเตรียมสารสกัดดังกล่าวให้เป็นตำรับยาที่สามารถละลายน้ำได้ดีเหมาะสำหรับการดูดซึมของสารออกฤทธิ์ (PMF, DMF, TMF) และสะดวกในการบริโภค ทั้งนี้จะต้องมีการศึกษาประสิทธิภาพของตำรับยาที่เตรียมขึ้นก่อนว่าเป็นอย่างไรเมื่อเตรียมเป็นตำรับแล้ว รวมไปถึงเภสัชจลศาสตร์ของตำรับยาดังกล่าวก่อนการนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ และเพื่อนำไปเป็นข้อมูลในการนำไปใช้ในมนุษย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัย

การตรวจเอกสาร

1. กระชายดำ

ชื่อสามัญ : Black ginger

ชื่ออื่น : ว่านจั้งจั้ง, ว่านพญานกยูง, ว่านกำบัง (ภาคเหนือ), จิงทราย
(มหาสารคาม)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker

ชื่อวงศ์ : Zingiberaceae



A

B

รูปที่ 1: แสดงลักษณะของเหง้ากระชายดำ (A) และดอกของกระชายดำ (B)

(ที่มา : ฐานข้อมูลพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์;

<http://www.qsbg.org/>) (สืบค้นวันที่ 7 กันยายน 2563)

1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

กระชายดำ เป็นไม้ล้มลุก มีลำต้นใต้ดิน (rhizome) เรียกว่า “เหง้า” หรือมักเรียกกันว่า “หัว” ซึ่งมีลักษณะคล้ายขิงหรือขมิ้นแต่มีขนาดเล็กกว่า (รูปที่ 1A) กาบใบมีสีแดงอ่อนอมม่วง เรียงสลับ โอบกันแน่นชูเหนือดินเป็นลำต้นสูงประมาณ 30-90 เซนติเมตร ใบเดี่ยวรูปไข่หรือรูปรี กว้างประมาณ 7-15 เซนติเมตร และยาว 30-35 เซนติเมตรเรียงสลับกัน ส่วนผิวใบด้านล่างจะมีขนสั้นๆ ขอบใบมีสีน้ำตาลแดง กระชายดำจะมีดอกสีชมพูอ่อน ริมปากดอกจะมีสีขาว ดอกออกเป็นช่อ ช่อละ 1-2 ดอก โดยดอกจะออกจากยอดของลำต้นเทียม (รูปที่ 1B) ก้านของช่อดอกยาวประมาณ 5-6 เซนติเมตร เส้าเกสรมีสีม่วง ส่วนเกสรมีสีเหลือง กลีบประดับเชื่อมติดกันเป็นรูปท่อ

และมีขน โคนเชื่อมติดกันเป็นท่อยาว เกสรตัวผู้ลักษณะเหมือนกับกลีบดอก อับเรณูอยู่ใกล้ปลายท่อ เกสรตัวเมียมีขนาดเล็กและยาว ยอดเป็นรูปปากแตร เกือบไม่มีขน เหง้าหรือหัวที่แก่เต็มที่จะมีสีม่วง ม่วงเข้มหรือดำสนิท ผิวเหง้ามีสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม กระจายค้ำจะมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว และมีน้ำมันหอมระเหย รสชาติขมเล็กน้อย (ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2553; อัญชลิ, 2556)

1.2 การนำมาใช้ทางการแพทย์พื้นบ้าน

1.2.1 ตำรายาไทย ใช้บำรุงกำลัง เพิ่มสมรรถภาพทางเพศ แก้อาการปวดเมื่อยและเหนื่อยล้า ขับลม ใช้เป็นยาอายุวัฒนะ (เชื่อว่าช่วยบำรุงสมรรถภาพทางเพศชาย) แก้อาการจุกเสียด แก้ปวดท้อง หรือโผลกเหง้ากระจายค้ำกับเหล้าขาวคั้นน้ำดื่ม ใช้แก้โรคมดลูกพิการ มดลูกหย่อน และใช้กวาดคอเด็ก แก้โรคตานขางในเด็ก หรือต้มดื่มแก้โรคตา

โดยวิธีการใช้เป็นยาอายุวัฒนะ คือ ใช้เหง้าสด ประมาณ 4-5 ชีด คองกับสุราขาว 1 ขวด นำมาต้มก่อนรับประทานอาหารเย็น ปริมาณ 30 ซีซี หรือฝานเหง้าสดเป็นแว่นบาง ๆ แช่น้ำดื่ม หรือคองกับน้ำผึ้งในอัตราส่วน 1:1 หรืออาจใช้เหง้ากระจายค้ำแห้งคองกับน้ำผึ้งในอัตราส่วน 1:1 นาน 7 วัน แล้วนำมาดื่มก่อนนอน (วุฒิ วุฒิศรรมเวช, 2540; ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2553)

1.2.2 ตำรายาพื้นบ้านอื่น ๆ ในทางการแพทย์พื้นบ้านของประเทศลาว นำเหง้ากระจายค้ำมาใช้เป็นยาลดระดับน้ำตาลในเลือด รับประทานเพื่อเพิ่มพลังกำลังของร่างกาย อีกทั้งยังช่วยทำให้เลือดไหลเวียนดีขึ้น ชาวเขาเผ่าม้ง นิยมนำหัวกระจายค้ำติดตัวไว้เพื่อรับประทานเมื่อมีอาการปวดเมื่อย เหนื่อยล้า และใช้เพิ่มสมรรถภาพทางเพศ (อัญชลิ, 2556)

1.3 องค์ประกอบทางเคมี

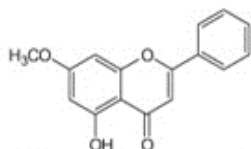
ในปี 2007 Sutthanut และคณะ ได้ทำการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีในเหง้ากระจายค้ำด้วยวิธี gas chromatographic พบว่า ในกระจายค้ำ ประกอบด้วยสารกลุ่ม flavonoids ซึ่งสามารถแยกสารบริสุทธิ์จากกระจายค้ำได้ 11 ชนิด (รูปที่ 2) ได้แก่

- | | |
|--|------------------------------------|
| 1) 5-hydroxy-7-methoxyflavone | 2) 5-hydroxy-3,7-dimethoxyflavone |
| 3) 5,7-dimethoxyflavone | 4) 3,5,7-trimethoxyflavone |
| 5) 5-hydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone | 6) 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone |
| 7) 5-hydroxy-3,7,3',4'-tetramethoxyflavone | 8) 5,7,4'-trimethoxyflavone |

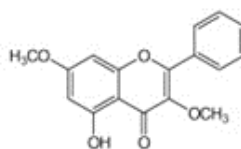
9) 3,5,7,4'- tetramethoxyflavone

10) 5,7,3,4'-tetramethoxyflavone

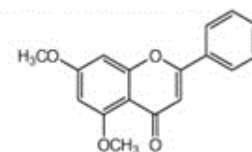
11) 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone



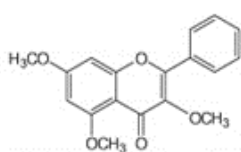
5-hydroxy-7-methoxyflavone



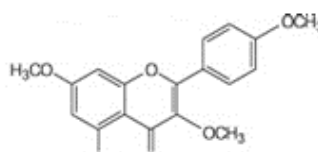
5-hydroxy-3,7-dimethoxyflavone



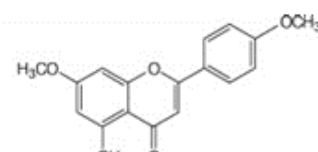
5,7-dimethoxyflavone



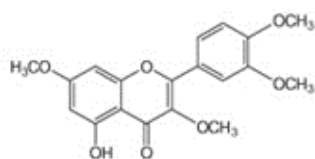
3,5,7-trimethoxyflavone



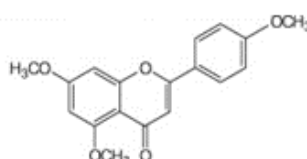
5-hydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone



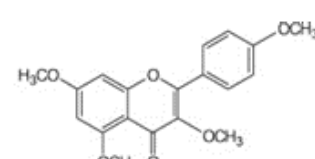
5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone



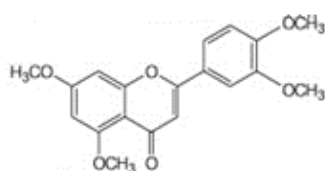
5-hydroxy-3,7,3',4'-tetramethoxyflavone



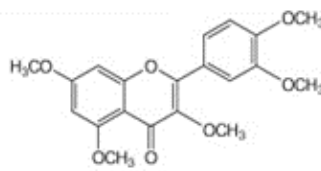
5,7,4'-trimethoxyflavone



3,5,7,4'- tetramethoxyflavone



5,7,3',4'-tetramethoxyflavone



3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone

รูปที่ 2: โครงสร้าง flavonoids ที่แยกได้จากกระชายดำ ทั้ง 11 ชนิด (ที่มา: Sutthanut et al., 2007)

1.4 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกระชายดำ

1.4.1 การศึกษาผลต่อระบบสืบพันธุ์

การศึกษาเกี่ยวกับผลต่อกิจกรรมทางเพศ ซึ่งทำการศึกษาในหนูเพศผู้ โดยหนูแรท แต่ละกลุ่มจะได้รับสารสกัดเอทานอลจากกระชายดำที่ขนาดต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 60 วันพบว่า หนูที่ได้รับสารสกัดเอทานอลจากกระชายดำขนาด 60 และ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำให้พฤติกรรมทางเพศเพิ่มขึ้น (หนูเพศผู้จับคู่กับหนูเพศเมียใน 10 นาทีแรก) แต่การได้รับสารสกัดในขนาด 240 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านพฤติกรรมทางเพศ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Sudwan et al., 2006)

Chaturapanich และคณะ(2008) ได้ศึกษาผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วยแอลกอฮอล์, เฮกเซน และน้ำ ในหนูแรทเพศผู้ นาน 5 สัปดาห์พบว่า สารสกัดทั้ง 3 ชนิด ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักร้อยละสืบพันธุ์ และการเคลื่อนไหวของอสุจิ แต่สารสกัดกระชายดำด้วยแอลกอฮอล์ขนาด 70 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน มีผลทำให้ระยะเวลาในการขึ้นคร่อม (mount latency) และการหลั่งน้ำอสุจิ (ejaculation latency) ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่กระชายดำที่สกัดด้วยเฮกเซนและน้ำ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงต่อพฤติกรรมทางเพศของหนูแรท และนอกจากนี้ยังพบว่า การให้สารสกัดกระชายดำด้วยแอลกอฮอล์ (10, 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ยังช่วยให้การไหลเวียนโลหิตไปที่อวัยวะเพิ่มขึ้น แต่ไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการเดินของหัวใจ และความดันโลหิตในหนู

ต่อมาในปี 2012 Chaturapanich และคณะ ได้ทำการศึกษาผลต่อสมรรถภาพทางเพศ พบว่า สารสกัดกระชายดำด้วยแอลกอฮอล์ ขนาด 70 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่มีผลต่อน้ำหนักของตับ ไต อวัยวะสืบพันธุ์ และกล้ามเนื้อลีเวเตอร์แอน ที่อุ้งเชิงกราน (levator ani muscle) แต่การให้หนูที่ออกกำลังกายร่วมกับการกินสารสกัดในขนาดดังกล่าว มีผลให้น้ำหนักของต่อมสร้างน้ำเลี้ยงอสุจิ (seminal vesicels) หลอดเก็บอสุจิ (epididymis) ต่อมลูกหมาก (prostate gland) และกล้ามเนื้อลีเวเตอร์แอนที่อุ้งเชิงกรานเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีผลให้ระยะเวลาในการขึ้นคร่อมของหนูลดลง แต่จำนวนครั้งของการหลั่งน้ำอสุจิเพิ่มขึ้น

การศึกษาผลของสารสกัดจากกระชายดำต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อคาเวอร์โนซั่ม (cavernosum) ที่ตัดแยกออกมาจากอวัยวะสืบพันธุ์เพศชาย (penis) โดยเป็นการศึกษาใน organ bath พบว่า สารสกัดแห้งกระชายดำด้วยเอทานอล และไดคลอโรมีเทน มีผลทำ

ให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อคาเวออร์โนซัม (ฉวีวรรณ และคณะ, 2552) นอกจากนี้ในปี 2012 มีการศึกษาเพิ่มเติมในเนื้อเยื่อดังกล่าว ซึ่งเป็นการทดลองโดยใช้สารบริสุทธิ์ที่แยกออกมาจากเหง้ากระชายดำ พบว่าสาร 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone มีฤทธิ์ทำให้กล้ามเนื้อคาเวออร์โนซัมคลายตัว โดยสารนี้ทำให้เกิดการกระตุ้นการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) และกระตุ้นการทำงานของ soluble guanylate cyclase (Jansakul et al., 2012)

1.4.2 การศึกษาผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด

สารสกัดกระชายดำด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดแดงใหญ่ที่ตัดแยกมาศึกษานอกตัวของหนูแรทคลายตัว และยังมีผลในการลดการหดเกร็งของลำไส้เล็กส่วนปลาย (Ileum) ของหนูแรทอีกด้วย และสารสกัดกระชายดำด้วยเอทานอลยังสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในมนุษย์ (Wattanapitayakul et al., 2008)

Tep-Areenan และคณะ (2010) ได้แยกสารออกจากเหง้ากระชายดำ คือ 5,7-dimethoxyflavone แล้วนำมาศึกษาในหลอดเลือดแดงใหญ่ที่ตัดแยกออกมาศึกษาใน organ bath พบว่า สาร 5,7-dimethoxyflavone มีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดแดงใหญ่คลายตัว โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ผ่าน NO-cGMP และ cyclooxygenase pathways นอกจากนี้สารดังกล่าวที่แยกมาจากเหง้ากระชายดำยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งแคลเซียม (Ca^{2+}) เข้าสู่เซลล์ (cells) และเพิ่มการนำโพแทสเซียม (K^+) ออกนอกเซลล์

การศึกษาผลของสารสกัดเหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทน โดยทำการทดลองในหนูแรทวัยกลางชีวิต (12-14 เดือน) ป้อนสารขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วันละ 2 ครั้งนาน 6 สัปดาห์ พบว่า สารสกัดเหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทน ทำให้เกิดการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน eNOS (endothelial nitric oxide synthase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ที่เยื่อบุผนังหลอดเลือดทำให้เกิดการสร้างและหลั่งไนตริกออกไซด์ (NO) เพิ่มมากขึ้น ส่งผลต่อการคลายตัวของหลอดเลือด (Yorsin et al., 2014)

นอกจากสารข้างต้นแล้วยังมีการแยกสาร 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone จากเหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทนออกมาทดสอบด้วยวิธีการเดียวกัน พบว่าสาร 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone มีผลทำให้หลอดเลือดแดงใหญ่ช่องอกของหนูคลายตัว โดยไปกระตุ้นการหลั่งไนตริกออกไซด์ และไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) (Yorsin et al., 2016)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Weerateerangkul และคณะ (2012) ศึกษาโดยใช้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่าง (left ventricular cells) พบว่า สารสกัดเอทานอลจากเหง้ากระชายดำมีฤทธิ์ในการกระตุ้น nitric oxide signaling ของกล้ามเนื้อหัวใจทำให้เกิดการเพิ่มของระดับ cGMP (cyclic guanosine monophosphate) ซึ่งคล้ายกับการออกฤทธิ์ของ sildenafil (ยาที่ใช้รักษาความดันโลหิตภายในหลอดเลือดแดงของปอดสูง และอาการเสื่อมสมรรถภาพทางเพศของบุรุษ) ทำให้ลดการทำงานของหัวใจ และลดการเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียมในเซลล์

สารสกัดเอทานอลจากเหง้ากระชายดำ ทำให้หลอดเลือดใหญ่ของอกหนูแรทคลายตัวแบบ concentration-dependent (หลอดเลือดคลายตัวเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของยาที่สูงขึ้น) อีกทั้งสารสกัดดังกล่าวยังมีฤทธิ์ในการช่วยลดการเกิดการบาดเจ็บของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่เกิดจากการที่เลือดมาเลี้ยงใหม่อีกครั้งหลังจากเกิดการขาดเลือด (myocardial ischemic-reperfusion injury) ในหัวใจของหนูแรทที่แยกออกมาศึกษาออกตัว โดยมีกลไกการออกฤทธิ์จากฤทธิ์การขยายตัวของหลอดเลือด และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (antioxidant) (Malakul et al., 2011)

เมื่อทำการศึกษาผลของสารสกัดเหง้ากระชายดำด้วยเอทานอลในเยื่อบุผนังหลอดเลือดดำที่แยกมาจากสายสะดือของคน พบว่า สารสกัดเหง้ากระชายดำด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ในการเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) จากเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด ทำให้เกิดการเพิ่มการแสดงออกของ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (Wattanapitayakul et al., 2007)

1.4.3 การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบ

การศึกษาผลของสาร 5,7 - dimethoxyflavone ที่แยกได้จากเหง้ากระชายดำต่อการต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ในหนูทดลองที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ โดยพบว่า 5,7 - dimethoxyflavone (5,7-DMF) มีฤทธิ์ด้านการอักเสบเทียบได้กับแอสไพริน (aspirin) , อินโดเมธาซิน (indomethacin) นอกจากนี้ยังพบว่าสาร 5,7-DMF สามารถต้านการอักเสบแบบเฉียบพลัน (acute inflammation) ได้ดีกว่าการอักเสบแบบเรื้อรัง (subacute inflammation) โดยสามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูทดลองที่เหนี่ยวนำให้เกิดการบวมโดยคาราจีนิน (carrageenin-induced hind paw edema) ได้ดีกว่าฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแกรนูโลมา (granuloma) จากการฝังสำลีได้ฝิวหนัง (cotton pellet- induced granuloma formation) และเมื่อศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบในเยื่อหุ้มปอดของหนูขาว (carrageenin-induced rat pleurisy) พบว่าสาร 5,7-DMF สามารถยับยั้งการ

สร้างสารพรอสตาแกลนดิน (prostaglandin) และยับยั้งการเกิดหนอง (exudate) (Panthong et al., 1989)

สารสกัดกระชายดำด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการสร้างพรอสตาแกลนดิน E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 macrophage cells ที่อักเสบจากไลโปพอลิแซกคาไรด์ (lipopolysaccharide-induced inflammation, LPS- induced) นอกจากนี้สารสกัดกระชายดำด้วยเอทานอล และสาร 5-hydroxy-3,7,3', 4' -tetramethoxyflavone ที่แยกได้จากสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 macrophage cells อีกทั้งยังยับยั้งการแสดงออกของ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Sae-Wong et al., 2009)

สารสกัดเหง้ากระชายดำด้วยคลอโรฟอร์ม มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบในหนูแรทที่ชักนำให้มีการบวมบริเวณอุ้งเท้าด้วย 1% คาราจีน และเมื่อแยกสารสำคัญจากสารสกัดกระชายดำด้วยคลอโรฟอร์ม พบว่าสาร 5,7-dimethoxyflavone, trimethylapigenin และ tetramethylfluteolin มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS- induced และมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง Tumor necrosis factor- α (TNF- α) อีกทั้งยังมีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ iNOS mRNA แบบ dose-dependent (Sae-Wong et al., 2011)

1.4.4 การศึกษาผลในสัตว์ทดลองที่เป็นเบาหวาน

เมื่อศึกษาผลของการให้กินกระชายดำในหนูอ้วนเบาหวานที่เป็นโดยพันธุกรรม (Obese Diabetes mice) โดยการผสมผงกระชายดำในอาหารปริมาณ 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับหนูปกติที่ไม่เป็นโรคอ้วนและเบาหวาน พบว่า การกินสารสกัดกระชายดำยับยั้งการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัว การเพิ่มการสะสมไขมันภายในช่องท้อง ความผิดปกติของการเมตาบอลิซึมไขมัน ระดับน้ำตาลในเลือดสูง ความไม่ทนต่อกลูโคส ความดันโลหิตสูง และโรคเส้นประสาทส่วนปลาย (peripheral neuropathy) ซึ่งผลดังกล่าวเป็นผลมาจากประสิทธิภาพของกระชายดำที่ช่วยป้องกันการเกิดโรคเมตาบอลิกซินโดรม (metabolic syndrome) โดยเฉพาะในหนูที่มีภาวะอ้วน (Obesity) ดังนั้นกระชายดำน่าจะนำมาทำเป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพได้ (Akase et al., 2011)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Shimada และคณะ (2011) ที่ทำการทดลองโดยใช้หนูอ้วนเบาหวานโดยพันธุกรรม ซึ่งศึกษาผลของการกินสารสกัดกระชายดำด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ พบว่า การให้กินสารสกัดกระชายดำนาน 8 สัปดาห์ ทำให้น้ำหนักตัวลดลง และลดการสะสมไขมัน

บริเวณช่องท้อง โดยไม่มีผลต่อการกินอาหารเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อีกทั้งยังช่วยป้องกันอาการที่เกี่ยวข้องกับภาวะคืออินซูลิน ความดันโลหิตสูง และภาวะตับแข็งที่เกิดจากการสะสมของไขมัน (fatty liver) โดยกลไกการออกฤทธิ์อาจเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไลเปสที่ตับอ่อน (pancreatic lipase) ของสารกลุ่ม polymethoxy flavonoid ที่แยกได้จากกระชายดำ (Shimada et al., 2011)

เมื่อให้หนูที่เหนียวน้ำให้เกิดเบาหวานด้วยสาร streptozotocin กินสารสกัดเหง้ากระชายดำด้วยเอทานอล พบว่าการให้กินสารสกัดนี้นาน 4 สัปดาห์ ในขนาด 100 มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัมสามารถทำให้หลอดเลือดแดงทรวงอกลดการสร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน (superoxide anion) และเพิ่มการสร้างไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) ส่งผลต่อการเพิ่มการคลายตัวของหลอดเลือด นอกจากนี้เมื่อทดลองในหลอดเลือด พบว่าสารสกัดกระชายดำด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ลดการสร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน และเพิ่มการตอบสนองต่อแอซิติลโคลีน (acetylcholine) ทำให้หลอดเลือดคลายตัวมากขึ้นแบบ concentration-dependent ทั้งในหลอดเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวาน (Malakul et al., 2011)

Lert-Amornpat และคณะ (2017) ศึกษาผลของผงกระชายดำต่อน้ำหนักตัว อาหารที่กิน ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด ค่าพารามิเตอร์ของอสุจิ (sperm count, sperm motility และ sperm viability) พฤติกรรมการผสม (copulatory behaviour) และระดับฮอร์โมนเพศชาย (testosterone) ในหนูที่เป็นเบาหวานจากสาร streptozotocin โดยให้หนูกินผงกระชายดำที่ขนาด 140, 280 และ 420 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมวันละครั้ง นาน 6 สัปดาห์ พบว่า การให้หนูเบาหวานกินผงกระชายดำไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว ปริมาณอาหารที่กิน และระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด แต่ในหนูเบาหวานที่กินผงกระชายดำในขนาดสูงสุดนั้นส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนตัวอสุจิ (sperm count) และนอกจากนี้ยังมีการเพิ่มขึ้นของพฤติกรรมการผสมพันธุ์ และมีระดับฮอร์โมนเพศชาย (testosterone) เพิ่มขึ้นอีกด้วย

ในปี 2020 Sripanidkulchai และคณะ ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำด้วยเอทานอลในหนูที่เป็นเบาหวานด้วยสาร streptozotocin พบว่าการให้หนูกินสารสกัดที่ขนาด 150 และ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้เมื่อเทียบกับหนูเบาหวานที่ได้รับยารักษาเบาหวาน glibenclamide อีกทั้งการกินสารสกัดดังกล่าวยังสามารถเพิ่ม insulin density ในตับอ่อนของหนูที่เป็นเบาหวานเช่นเดียวกันกับหนูกลุ่มเบาหวานที่ได้รับยารักษาเบาหวาน นอกจากนี้หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดในขนาดดังกล่าวและยารักษาเบาหวาน ยังมีผลลด

ปริมาณของ hepatic malondialdehyde แต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเพียงแก่กลุ่มที่ได้รับยารักษาเบาหวานเท่านั้น

1.4.5 การศึกษาฤทธิ์อื่น ๆ

1.4.5.1 การเมแทบอลิซึมไขมัน

รายงานการวิจัยของ Horikawa และคณะ (2012) มีการศึกษาพบว่าสารสกัดกระชายดำด้วยเอทิลเอซิเทตสามารถลดความผิดปกติของการเมแทบอลิซึมไขมัน และลดการสะสมไขมันในหนูไมซ์ที่เป็นโรคอ้วน และเมื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในเซลล์ไขมัน (adipocytes) พบว่า สารสกัดกระชายดำด้วยเอทิลเอซิเทต และสาร 3,5,7,4'-tetramethoxyflavone และ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone ที่แยกได้จากสารสกัดดังกล่าว มีผลกระตุ้นให้เซลล์ 3T3-L1 preadipocytes เปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์ adipocytes นอกจากนี้สารเมทอกซีฟลาโวนทั้งสองชนิดยังกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับ adiponectin mRNA และเพิ่มการปล่อย adiponectin ลงใน medium อีกทั้งยังเพิ่มการแสดงออกของ peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) ซึ่งเป็น nuclear receptor ที่เซลล์ไขมัน โดยเมื่อถูกกระตุ้นจะทำให้เกิดขบวนการสลายไขมันและทำให้ปริมาณกรดไขมันอิสระลดลง นอกจากนี้ยังมีผลต่อฮอร์โมนและสารต่าง ๆ ที่สร้างและหลั่งจากเนื้อเยื่อไขมัน (adipocytokines) อีกด้วย

14.5.2 การต้านการแพ้

Tewtraku, Subhadhirasakul และ Kummee (2008) ศึกษาฤทธิ์ต้านการแพ้ของสารสกัดกระชายดำด้วยเอทานอล โดยได้ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งเอนไซม์เบต้าเฮกซอซามินิเดส (β -hexosaminidase) จากเซลล์เม็ดเลือดขาวของหนู (RBL-2H3) ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการแพ้ พบว่าสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านการแพ้โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (μ g/ml) นอกจากนี้สารกลุ่มเมทอกซีฟลาโวน (methoxyflavone) ที่แยกได้จากสารสกัดกระชายดำ 7 ชนิด พบว่าสาร 5-hydroxy-3,7,3',4'-tetramethoxyflavone มีฤทธิ์ต้านการแพ้สูงสุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.0 μ g/ml รองลงมาคือสาร 5-hydroxy-7-methoxyflavone มีค่า IC_{50} เท่ากับ 20.6 μ g/ml ส่วนสารอีก 5 ชนิดมีฤทธิ์ต้านการแพ้ปานกลาง มีค่าอยู่ในช่วง $IC_{50} = 37.5-66.5$ μ g/ml เมื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ พบว่าสาร 5-hydroxy-3,7,3',4'-tetramethoxyflavone ออกฤทธิ์ต้านการแพ้โดยการยับยั้งแคลเซียม (Ca^{2+}) เข้าสู่เซลล์เพื่อยับยั้งการเกิดเซลล์ degranulation

นอกจากนี้ในการศึกษาของ Kobayashi และคณะ (2015) พบว่าสารสกัดเหง้า กระจายด้วยไดคลอโรมีเทน และส่วนสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ด้านการแพ้ โดยสามารถยับยั้งการเกิดเซลล์ degranulation ซึ่งส่งผลต่อการลดการหลั่งเอนไซม์เบต้าเฮกโซซามินิเดสที่เป็นตัวบ่งชี้ถึงอาการแพ้ที่เกิดขึ้นในเซลล์ (Kobayashi et al., 2015)

1.4.5.3 การต้านความเหนียวล้า

เสริมสกุล, ไชยง และปราสาท (2552) ศึกษาฤทธิ์ต้านความเหนียวล้าในหนูด้วยวิธีการบังคับให้หนูว่ายน้ำ ผู้วิจัยได้สกัดสารสกัดกระจายด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล หลังการป้อนสารสกัดดังกล่าวนาน 25 วัน ในขนาด 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าสารสกัดกระจายด้วยคลอโรฟอร์ม และเมทานอลไม่สามารถต้านความเหนียวล้าในการว่ายน้ำได้ แต่สารสกัดกระจายด้วยเฮกเซนสามารถต้านความเหนียวล้าได้โดยมีระยะเวลาของการว่ายน้ำนานกว่ากลุ่มสารสกัดอื่น ๆ ซึ่งสารสกัดกระจายด้วยเฮกเซนนั้นมีฤทธิ์ต้านความเหนียวล้าได้เช่นเดียวกับผงรากโสมเกาหลี นอกจากนี้เมื่อแยกส่วนสกัดจากสารสกัดด้วยเฮกเซนเพื่อทดสอบหาส่วนที่ออกฤทธิ์ต้านความเหนียวล้า พบว่า ส่วนสกัดของสารสกัดด้วยเฮกเซนที่มีสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) เป็นองค์ประกอบหลักมีฤทธิ์ต้านความเหนียวล้า โดยมีเวลาที่ไม่เคลื่อนไหวในน้ำน้อยเช่นเดียวกับผงรากโสมเกาหลี

1.4.5.4 การต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร

การศึกษาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของสารสกัดเอทานอลจากเหง้ากระจายในหนูที่ทำให้เกิดแผลในกระเพาะด้วยยาอินโดเมทาซิน (indomethacin) หรือกรดเกลือ (HCl) กับเอทานอล (EtOH) หรือความเครียดที่เกิดจากการแช่น้ำร่วมกับการอยู่ในที่แคบ พบว่า การให้สารสกัดดังกล่าวในขนาด 30, 60 และ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะได้ โดยความสามารถในการป้องกันการเกิดแผลนั้นเกี่ยวข้องกับการรักษาการหลั่งเมือกในกระเพาะอาหาร (gastric mucus) แต่ไม่มีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการหลั่งกรด (gastric acid) และไม่มีผลต่อปริมาตรของน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร (Rujjanawate et al., 2005)

1.4.5.5 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

รายงานการศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง พบว่า สารสกัดกระจาย และสารกลุ่มเมทอกซีฟลาโวนที่แยกได้จากกระจาย มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด และ/หรือทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis เช่น งานวิจัยของ

Banjerdpongchai และคณะ (2008) ได้ศึกษาผลของสารสกัดกระชายดำด้วยเอทานอลต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว พบว่า สารสกัดกระชายดำด้วยเอทานอลเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ชนิด HL-60 (Human promyelocytic leukemic HL-60 cells) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 (Human promonocytic leukemic U937 cells) (Banjerdpongchai et al., 2009) นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Leardkamolkarn, Tiamyuyen และSripanidkulchai (2009) ได้ศึกษาผลของสารสกัดกระชายดำด้วยเอทานอลเช่นกัน และได้มีการแยกสาร 5,7,4- trimethoxyflavone จากกระชายดำ พบว่าสารดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (human cholangiocarcinoma cell lines) ทั้ง 2 ชนิด คือ เซลล์ HuCCA-1 และ RMCCA-1, งานวิจัยของ Wanich and Yenjai (2009) ศึกษาผลของสาร 5,7-dimethoxyflavone ที่แยกได้จากกระชายดำ พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในช่องปากชนิด KB (epidermoid carcinoma of oral cavity) และงานวิจัยของ Tangjitjaroenkun และคณะ (2021) ได้มีการเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดน้ำและเอทานอลจากกระชายดำต่อความเป็นพิษต่อ เซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (Human urinary bladder cancer cell, T24) และเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดดำจากสายสะดือเด็กทารก (Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) พบว่า สารสกัดเอทานอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงกว่าสารสกัดในน้ำ อีกทั้งสารสกัดเอทานอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (T24) สูงกว่าเซลล์ปกติ (HUVEC) นอกจากนี้สารสกัดเอทานอลยังแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากทั้ง 3 ชนิด (human prostate cancer cell lines, PC3, DU145, and LNCaP) อีกด้วย

1.5 การศึกษาความเป็นพิษของกระชายดำ

รายงานการงานวิจัยเกี่ยวกับความเป็นพิษของกระชายดำ มีทั้งการศึกษาความเป็นพิษทั้งแบบเฉียบพลัน และแบบเรื้อรัง ในงานวิจัยของทรงพล ชีวะพัฒน์ และคณะ (2547) ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังของผงกระชายดำในหนูถีบจักรสายพันธุ์ ICR ในการศึกษาพิษเฉียบพลัน โดยป้อนผงกระชายดำขนาด 13.33 กรัมต่อกิโลกรัมทุกวัน ติดต่อกัน 14 วัน (เช้าและบ่าย) พบว่า ขนาดของผงกระชายดำที่ทำให้หนูตายครั้งหนึ่ง หรือ 50% ของจำนวนหนูทั้งหมดที่ได้รับสาร (LD_{50}) มีค่ามากกว่า 13.33 กรัมต่อกิโลกรัม และไม่พบความผิดปกติใดๆ ทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายใน ได้แก่ ตับ หัวใจ ปอด กระเพาะอาหาร ตับอ่อน ลำไส้ มดลูก อัณฑะ และรังไข่ ส่วนการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar โดยป้อนผงกระชายดำขนาด 20, 200, 1,000 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน นาน 6 เดือน พบว่า เมื่อครบกำหนดในสัปดาห์สุดท้ายหนูเพศเมียที่ได้รับผงกระชายดำทุกกลุ่มมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น สุขภาพ

พฤติกรรม และอาการต่าง ๆ โดยทั่วไปปกติ ส่วนหนูเพศผู้มีเพียงกลุ่มที่ได้รับผงกระชายดำขนาด 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเท่านั้นที่มีน้ำหนักลดลง แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีน้ำหนักตัวสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังมีค่าเม็ดเลือดขาวอีโอซิโนฟิล (eosinophil) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย หนูทั้งสองเพศที่ได้รับผงกระชายดำขนาด 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมมีระดับของโซเดียมในซีรัม (serum) สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ค่าดังกล่าวยังอยู่ในช่วงของค่าปกติ ในหนูเพศเมียที่ได้รับผงกระชายดำขนาด 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมมีระดับโคเลสเตอรอล (cholesterol) ในเลือดสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ค่าดังกล่าวยังอยู่ในช่วงของค่าปกติ นอกจากนี้ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในในหนูทั้งสองเพศไม่พบการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ที่บ่งชี้ถึงความผิดปกติของกระชายดำ

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Chivapat และคณะ ในปี 2010 ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดแห้งกระชายดำด้วย 95% เอทานอลในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar ทั้งหนูเพศผู้และเพศเมีย แบ่งเป็นเพศละ 5 กลุ่มกลุ่มละ 12 ตัว โดยป้อนสารสกัดดังกล่าวที่เตรียมด้วย 1% ทรากาคานท์ (tragacanth Gum) ขนาด 5, 50 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน (มก./กก./วัน) เป็นเวลานาน 6 เดือน ซึ่งขนาดที่หนูได้รับจะเทียบเท่ากับ 1, 10 และ 100 เท่าของขนาดที่ให้คนกิน ผลการทดลองพบว่า หนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับสารสกัดกระชายดำด้วยเอทานอลขนาด 500 มก./กก./วัน มีน้ำหนักตัวต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำและทรากาคานท์อย่างมีนัยสำคัญ และส่งผลต่อการลดลงของการกินอาหารอย่างมีนัยสำคัญอีกด้วย ส่วนผลต่อค่าทางโลหิตวิทยาในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดดังกล่าวในขนาด 500 มก./กก./วัน ของหนูทั้งสองเพศ พบว่า มีระดับของอีโอซิโนฟิล (eosinophil) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ค่าดังกล่าวยังคงอยู่ในช่วงของค่าปกติ นอกจากนี้ในหนูเพศเมียยังมีระดับของลิมโฟไซท์ (lymphocyte) สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ค่าดังกล่าวยังอยู่ในช่วงของค่าปกติเช่นกัน กลุ่มหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดกระชายดำด้วยเอทานอลขนาดสูงสุด พบระดับไตรกลีเซอไรด์ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดขนาดเท่ากันมีระดับของกลูโคส และโคเลสเตอรอลสูงกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนผลของการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะต่าง ๆ นั้น ไม่พบความผิดปกติใด ๆ ที่บ่งชี้ต่อการเป็นพิษเรื้อรังที่เกิดจากสารสกัดที่ได้รับ นอกจากนี้หนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดขนาดสูงสุดยังมีน้ำหนักสัมพัทธ์ของหัวใจ ตับ ไตข้างขวา และกระเพาะอาหารสูงกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญอีกด้วย แต่ผลดังกล่าวอาจเนื่องมาจากน้ำหนักตัวของหนูทั้งสองเพศต่ำกว่ากลุ่มควบคุม

รายงานการวิจัยของ Sudwan และคณะ (2006) ได้ศึกษาผลของสารสกัดกระชายดำด้วยเอทานอลต่อระบบสืบพันธุ์ โดยป้อนสารสกัดขนาด 60, 120, และ 240 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (มก./กก.) ทั้งนี้ยังมีการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดในขนาดดังกล่าวอีกด้วย พบว่า น้ำหนักตัวของหนูเพศผู้ทุกกลุ่มที่ได้รับสารสกัดไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ก็ไม่พบความผิดปกติของค่าทางโลหิตวิทยา เว้นแต่กลุ่มที่ได้รับได้สารในขนาด 60 มก./กก. ที่มีระดับฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดในขนาดสูงสุด ส่วนการตรวจทางเคมีในเลือด (Blood Chemistry) ไม่พบความแตกต่างของระดับ alanine aminotransferase (ALT), blood urea nitrogen (BUN) และ creatinine (Crea) แต่พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 60 และ 240 มก./กก. มีค่าของ aspartate aminotransferase (AST) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ค่าดังกล่าวอยู่ในช่วงค่าปกติ

การศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสารสกัดกระชายดำด้วยเฮกเซนในหนูถีบจักร โดยให้ขนาดสูงสุดคือ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (มก./กก.) ก่อนการทดลองจะให้หนูทุกตัวอดน้ำและอาหาร หลังจากได้รับสารสกัดจะสังเกตอาการนาน 14 วัน พบว่า หนูที่ได้รับสารสกัดในขนาด 2,000 มก./กก. ไม่มีความผิดปกติใด ๆ นอกจากมีการเคลื่อนไหวน้อยลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ไม่พบการตายของหนูถีบจักรภายใน 48 ชั่วโมงหลังได้รับสารสกัด จึงอนุมานได้ว่าขนาดของสารสกัดกระชายดำด้วยเฮกเซนที่ทำให้หนูตายครั้งหนึ่ง (LD_{50}) มากกว่า 2,000 มก./กก. (เสริมสกุล, ไชยง และปราสาท, 2552)

1.6 การศึกษาทางเภสัชจลศาสตร์ของกระชายดำ

รายงานการศึกษาทางเภสัชจลศาสตร์ของสารกลุ่มเมทอกซีฟลาโวนที่แยกได้จากสารสกัดเอทานอลกระชายดำ ซึ่งเป็นสารประกอบหลักมีอยู่ด้วยกัน 3 ชนิด คือ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PMF), 5,7,4'-trimethoxyflavone (TMF) และ 5,7-dimethoxyflavone (DMF) ในการทดสอบด้านเภสัชจลศาสตร์ (pharmacokinetics) และหาค่าชีวประสิทธิผล (bioavailability) ของสารดังกล่าว การทดลองครั้งนี้ใช้หนูแรทสายพันธุ์ Wistar อายุ 6-8 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 270 - 310 กรัม โดยป้อนสาร PMF, TMF และ DMF และฉีดเข้าเส้นเลือดดำที่หางขนาด 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (มก./กก.) จากนั้นเก็บเลือดที่ 10, 20 และ 30 นาที และที่ 1, 2, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ พบว่า ระดับความเข้มข้นสูงสุด (C_{max}) ของสาร PMF, TMF และ DMF ในน้ำเลือด เท่ากับ 0.55 - 0.88 $\mu\text{g/ml}$ ที่เวลา 0.76 - 1.71 ชั่วโมง หลังจากนั้นยาก่อย ๆ ถูกขับออก ค่าคงที่ของอัตราการดูดซึม (K_a) ของสาร PMF, TMF และ DMF เท่ากับ 1.23 ± 0.54 ,

8.53 ± 3.64 , และ 8.69 ± 2.33 h^{-1} ตามลำดับ และค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ของสาร PMF, TMF และ DMF เท่ากับ 3.12, 5.04, และ 5.85 ชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสาร PMF แสดงระดับค่าชีวประสิทธิผลทางปากต่ำ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.32% รองลงมาคือ DMF เท่ากับ 2.10% และ TMF เท่ากับ 1.75% ตามลำดับ สาร PMF, TMF และ DMF ทั้ง 3 ชนิดที่ให้โดยการฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำ ลดลงและถูกกำจัดออกจากร่างกายภายใน 24 ชั่วโมง และมีค่าครึ่งชีวิตอยู่ที่ 2.36, 4.19 และ 3.75 ชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ผู้วิจัยกลุ่มเดิมยังทำการศึกษาการกระจายตัวของยา (distribution) ไปยังอวัยวะต่าง ๆ และการขับยาออกจากร่างกาย (excretion) กลุ่มแรกป้อนสารดังกล่าวในขนาด 750 มล./กก. เก็บอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ ตับ ปอด ไต อวัยวะ และสมอง ที่เวลา 5, 30, 120 และ 240 นาที หลังป้อนสารสกัด ส่วนอีกกลุ่มป้อนสารในขนาดเดียวกัน แล้วเก็บอวัยวะทุก ๆ 6 ชั่วโมงจนครบ 72 ชั่วโมง พบว่ามีสารกลุ่มเมทอกซีฟลาโวน (PMF, TMF และ DMF) กระจายตัวไปยังอวัยวะต่าง ๆ โดยพบปริมาณสูงสุดที่ตับ รองลงมาคือไต นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่มนี้ในอวัยวะ ปอด และสมองอีกด้วย หลังจากสารเหล่านี้ผ่านการดูดซึม (absorption) จากนั้นกระจายไปยังอวัยวะต่าง ๆ (organ distribution) และมีการเผาผลาญ (metabolism) สาร PMF, TMF และ DMF ทั้ง 3 ชนิดจากกระชายดำถูกกำจัดออกไปทางปัสสาวะในรูปแบบของ demethylated, sulfated และ glucuronidated และ demethylated ในอุจจาระ นอกจากนี้พบสาร PMF, TMF และ DMF เท่ากับ 0.79, 1.76 และ 3.10 ในปัสสาวะ และ 1.06, 1.77 และ 0.96% ในอุจจาระตามลำดับ (Mekjaruskul, Jay and Sripanidkulchai, 2012)

2. ระบบหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular system)

ระบบหัวใจและหลอดเลือดเป็นระบบที่มีความสำคัญมากระบบหนึ่งในร่างกาย ซึ่งประกอบด้วยหัวใจ เลือดและหลอดเลือด โดยจะทำงานประสานกันอย่างต่อเนื่อง มีหน้าที่หลักในการขนส่งสารอาหารและสารต่างๆ ไปหล่อเลี้ยงเซลล์ และทำหน้าที่ร่วมกับระบบอื่นๆ ในการรักษาสมดุลของร่างกาย

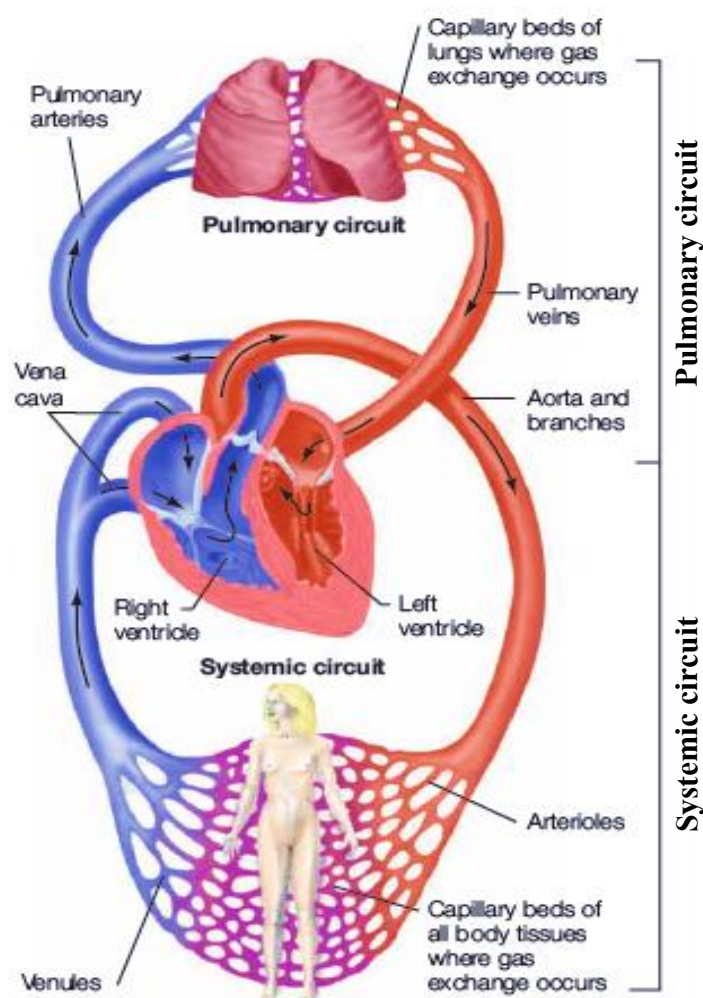
2.1 หัวใจและการไหลเวียนเลือด

หัวใจ ทำหน้าที่สูบเลือดไปทั่วร่างกาย แบ่งออกเป็น 4 ห้อง โดยมีห้องด้านบน 2 ห้อง เรียกว่า เอเทรียม (atrium) ส่วนห้องล่าง 2 ห้อง เรียกว่า เวนทริเคิล (ventricle) หัวใจด้านซ้ายมีลิ้นหัวใจไบคัสปิด (bicuspid) กั้นระหว่างห้องบนและห้องล่าง ส่วนด้านขวาจะมีลิ้นหัวใจไตรคัสปิด (tricuspid) กั้นระหว่างห้องบนและห้องล่าง ซึ่งหน้าที่คอยเปิด-ปิดไม่ให้เลือดไหลย้อนกลับ ในขณะที่หัวใจบีบตัวและคลายตัว

เมื่อหัวใจบีบตัว เลือดจะถูกส่งจากหัวใจส่วนล่างด้านซ้าย (left ventricle) เข้าสู่หลอดเลือดแดงขนาดใหญ่ (large artery, Aorta), หลอดเลือดแดงขนาดเล็ก (small artery) และหลอดเลือดแดงเล็ก (arteriole) ที่แตกแขนงเล็กๆ นำเลือดไปสู่หลอดเลือดฝอย (capillary) แล้วไปยังเนื้อเยื่อ และอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย (เลือดมีออกซิเจนสูง, คาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ) แล้วเลือดที่ออกจากหลอดเลือดฝอย (เลือดที่มีออกซิเจนต่ำ, คาร์บอนไดออกไซด์สูง) จะเข้าสู่หลอดเลือดดำเล็ก (venule), หลอดเลือดดำขนาดเล็ก (small vein) และหลอดเลือดดำขนาดใหญ่ (large vein, Venae cava) แล้วกลับคืนสู่หัวใจส่วนบนด้านขวา (right atrium) ส่งต่อไปยังหัวใจส่วนล่างด้านขวา (right ventricle) บีบตัว เลือดจะเข้าสู่ปอดผ่านทางหลอดเลือดแดงปอด (Pulmonary artery) จากนั้นจะเกิดการแลกเปลี่ยนก๊าซขึ้นที่ปอด โดยมีการปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์สู่ปอด และรับออกซิเจนเข้าสู่เลือด จากนั้นเลือดที่มีออกซิเจนสูงจะถูกส่งไปยังหัวใจส่วนบนซ้าย (left atrium) ผ่านทางหลอดเลือดดำปอด (Pulmonary vein) การไหลเวียนของเลือดในร่างกาย 1 รอบ จะมีการไหลของเลือดผ่านหัวใจ 2 ครั้ง คือ ครั้งแรก หัวใจห้องบนขวาจะรับเลือดดำจากส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย แล้วไหลลงสู่หัวใจห้องล่างขวาส่งออกไปยังปอดเพื่อรับออกซิเจนที่ได้มาจากการหายใจเข้าไป และครั้งที่สอง คือ เลือดจะไหลกลับเข้าสู่หัวใจห้องบนซ้ายลงสู่หัวใจห้องล่างซ้าย แล้วถูกสูบฉีดเพื่อนำออกซิเจนไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย แล้วไหลกลับสู่หัวใจอีกครั้งเพื่อเริ่มต้นการไหลเวียนเลือดใหม่ (Moini, 2013) ดังแสดงในรูปที่ 3

2.2 หลอดเลือด (blood vessel)

หลอดเลือด เป็น โครงสร้างที่กระจายอยู่ทั่วร่างกาย ทำหน้าที่ในการลำเลียงเลือด นำสารอาหารและสารต่างๆ ไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ทั่วร่างกาย และเป็นเส้นทางให้เลือดจากอวัยวะต่างๆ นำของเสียและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์กลับเข้าสู่หัวใจ โครงสร้างของหลอดเลือด หลอดเลือดมีลักษณะเป็นท่อประกอบด้วยโครงสร้างพื้นฐานคือ เนื้อเยื่อบุผิว (endothelium), กล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle) และกล้ามเนื้อเกี่ยวพัน (connective tissue) ได้แก่ elastin และ fibrous (Marieb, 1992; Wynsberghe et al., 1995)



รูปที่ 3: แสดงวงจรการไหลเวียนเลือดในร่างกาย (Circulatory system) แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ วงจรการไหลเวียนผ่านปอด (Pulmonary circuit) และวงจรการไหลเวียนทั่วร่างกาย (Systemic circuit) (ที่มา: Moini, 2013)

2.2.1 ชนิดและหน้าที่ของหลอดเลือด

หลอดเลือดแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่

1) หลอดเลือดแดง (Artery)

หลอดเลือดแดงเป็นหลอดเลือดที่รับเลือดมาจากหัวใจ นำเลือดแดงไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของร่างกาย ผนังหลอดเลือดแดงมีลักษณะหนา มีกล้ามเนื้อเรียบและเส้นใยอีลาสติก (elastic fibers) สามารถขยายตัวได้ดี แบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ

หลอดเลือดแดงอีลาสติก (elastic artery) เป็นหลอดเลือดแดงขนาดใหญ่ เช่น Aorta ทำหน้าที่รับเลือดโดยตรงจากหัวใจ ผนังหลอดเลือดประกอบด้วยเส้นใยอีลาสติกจำนวนมาก จึงยืดขยายได้ดี ทำให้มีคุณสมบัติในการรักษาระดับความดันโลหิตไม่ให้เปลี่ยนแปลงมาก ส่งผลต่อการส่งเลือดไปยังหลอดเลือดขนาดเล็กได้อย่างต่อเนื่อง

หลอดเลือดแดงมีสคูลาร์ (muscular artery) เป็นหลอดเลือดที่กระจายเลือดไปเลี้ยงยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่าหลอดเลือดแดงอีลาสติก (elasticartery) ผนังหลอดเลือดประกอบด้วยกล้ามเนื้อเรียบเป็นส่วนมาก หลอดเลือดชนิดนี้มีความสำคัญในการปรับการไหลของเลือดไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย เช่น เพิ่มการไหลเวียนเลือดไปยังแขนขาในขณะออกกำลังกาย

หลอดเลือดแดงเล็ก (arteriole) เป็นหลอดเลือดที่เล็กที่สุดของหลอดเลือดแดง มีผนังหนาและมีกล้ามเนื้อเรียบจำนวนมาก ทำหน้าที่ควบคุมความต้านทานต่อการไหลของเลือดไปยังอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกาย

2) หลอดเลือดดำ (Vein)

หลอดเลือดดำ เป็นหลอดเลือดที่มีผนังบาง ประกอบด้วย 3 ชั้น ภายในมีกล้ามเนื้อเรียบแทรกอยู่ จึงสามารถหดตัวและคลายตัวได้ เนื่องจากหลอดเลือดดำมีผนังที่บางทำให้ยุบตัวและยืดขยายได้ง่ายจึงสามารถเปลี่ยนแปลงปริมาตรในการสะสมเลือดได้มาก และหลอดเลือดดำมีความต้านทานต่อการไหลเวียนเลือดต่ำ

หลอดเลือดดำที่แขนและขา จะมีลิ้น (valve) เพื่อป้องกันการไหลย้อนกลับของเลือด ส่วนหลอดเลือดดำที่บริเวณส่วนกลางลำตัว และศีรษะจะไม่มีลิ้นดังกล่าว หลอดเลือดดำสามารถแบ่งได้ตามขนาด ดังนี้

หลอดเลือดดำขนาดใหญ่ (vena cava) เป็นหลอดเลือดที่เลือดจาก veins ไหลเข้าไปรวมกัน นำเลือดเข้าสู่หัวใจ เรียกชื่อตามตำแหน่งที่หลอดเลือดนั้นนำเลือดเข้าสู่หัวใจ โดยเรียกหลอดเลือดที่นำเลือดจากส่วนบนของร่างกายกลับสู่หัวใจว่า “superior vena cava” และเรียกหลอดเลือดที่นำเลือดจากส่วนล่างของร่างกายกลับสู่หัวใจว่า “inferior vena cava”

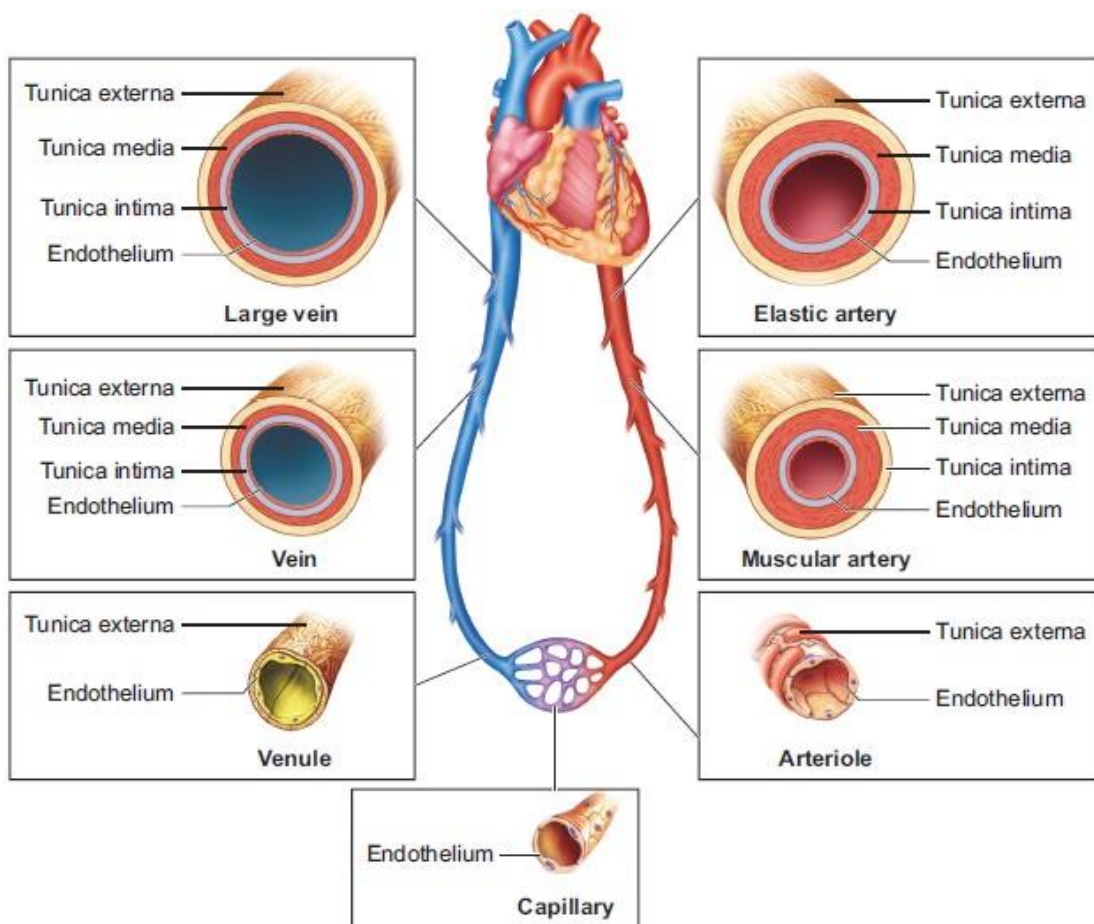
หลอดเลือดดำ (vein) เป็นหลอดเลือดที่รับเลือดต่อมาจาก venules ไหลเวียนกลับไปสู่หัวใจ เรียกชื่อหลอดเลือดตามอวัยวะที่นำเลือดออกมา เช่น นำเลือดออกมาจากปอด เรียกว่า “pulmonary vein” นำเลือดออกมาจากตับเรียกว่า hepatic vein เป็นต้น

หลอดเลือดดำขนาดเล็ก (venule) เป็นหลอดเลือดที่รับเลือดกลับไปจาก capillaries ตามเนื้อเยื่อต่างๆ เลือดใน venule เป็นเลือดที่มีออกซิเจนต่ำและมีสารต่างๆ พร้อมทั้งของเสียจากเนื้อเยื่อที่ไหลเวียนไปพร้อมกับเลือด

3) หลอดเลือดฝอย (Capillary)

หลอดเลือดฝอยเป็นหลอดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุด โดยผนังของหลอดเลือดจะประกอบด้วย เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด (endothelium cell) เพียงชั้นเดียว

หลอดเลือดฝอย ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมระหว่างหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดดำ ผนังของหลอดเลือดฝอยจะมีรูเล็ก ๆ เป็นบริเวณที่ยอมให้สารผ่านเข้า-ออกได้ และแลกเปลี่ยนสารต่างๆ หรือน้ำ ระหว่างเลือดกับเนื้อเยื่อ (Bassenge, 1996; Clark and Geithman, 2005; Wynsberghe et al., 1995)



รูปที่ 4: แสดงชนิดและ โครงสร้างของหลอดเลือดแดง (Artery), หลอดเลือดดำ (Vein)

และหลอดเลือดฝอย (Capillary)

(ที่มา: http://www.brainkart.com/article/Structure-of-blood-vessels_33216/)

(สืบค้นวันที่ 9 พฤศจิกายน 2563)

2.2.2 โครงสร้างของหลอดเลือด

โครงสร้างพื้นฐานของหลอดเลือดทั้งหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดดำจะมีโครงสร้างของผนังหลอดเลือดที่เหมือนกัน (รูปที่ 5) เว้นแต่หลอดเลือดฝอยที่มีผนังเพียงชั้นเดียว ผนังของหลอดเลือด แบ่งออกเป็น 3 ชั้น ดังนี้

1) ผนังชั้นใน (tunica interna)

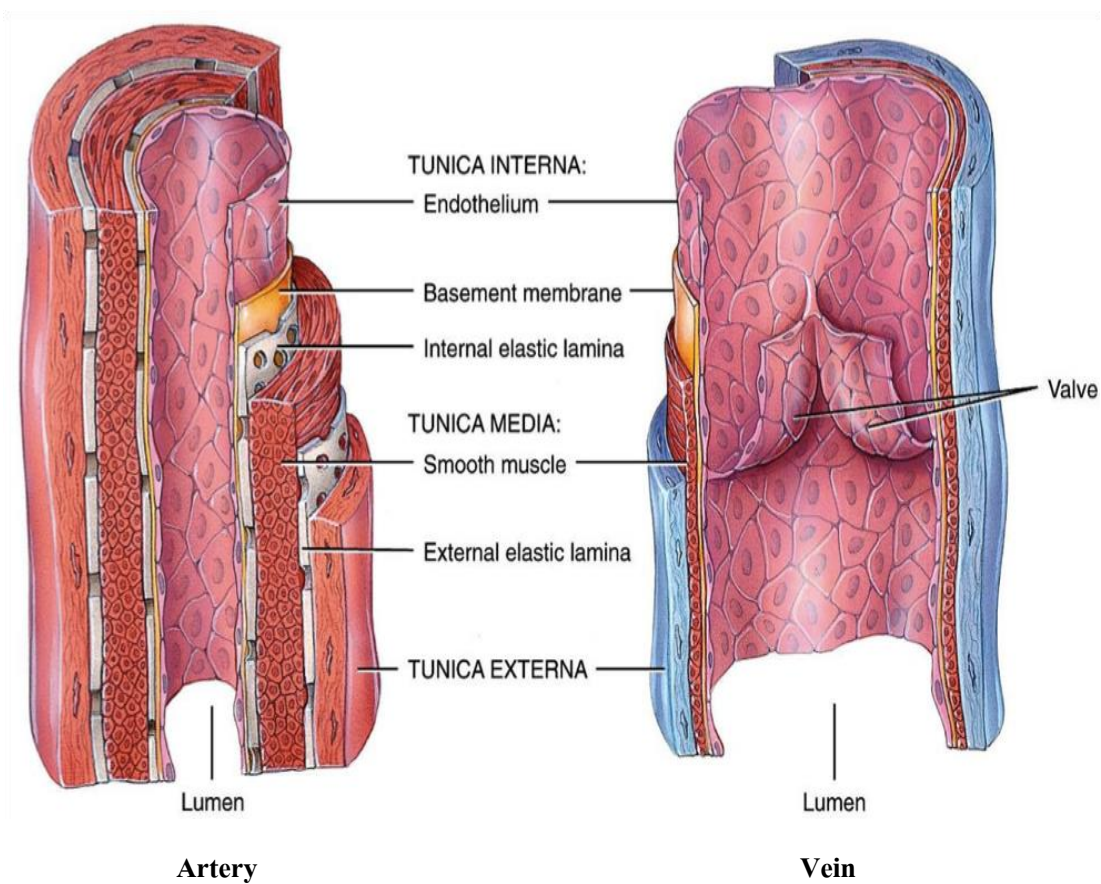
ผนังชั้นในเป็นส่วนชั้นในสุด ประกอบด้วยเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่เรียงตัวชั้นเดียวบุผนังภายในของหลอดเลือด ซึ่งติดกับชั้นบาง ๆ ของเส้นใยอีลาสติก (elastic fibers) ที่อยู่ถัดลงไปซึ่งเรียกว่า internal elastic lamina

2) ผนังชั้นกลาง (tunica media)

ผนังชั้นกลางเป็นผนังที่มีความหนามากที่สุด ซึ่งประกอบด้วยเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle cell) เป็นส่วนใหญ่แทรกอยู่ในส่วนของ connective tissue โดยมีเส้นใยอีลาสติก (elastic fibers) และเส้นใยคอลลาเจน (collagens) ยึดชั้นนี้ให้ติดกับผนังชั้นนอกและผนังชั้นใน เซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด จะถูกควบคุมโดยระบบประสาทซิมพาเทติก (sympathetic nervous system) โดยการควบคุมนี้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขนาดรูของหลอดเลือดในการปรับความดันโลหิตและการไหลเวียนของโลหิต เมื่อเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหดตัวหรือบีบตัวจะทำให้ขนาดรูของหลอดเลือดเล็กลง เรียกว่า “vasoconstriction” ส่งผลให้ความดันโลหิตสูงขึ้น และเมื่อเซลล์กล้ามเนื้อเรียบคลายตัวจะทำให้หลอดเลือดยืดขยายตัว รูของหลอดเลือดจึงกว้างขึ้น เรียกว่า “vasodilation” ส่งผลให้ความดันโลหิตลดลง

3) ผนังชั้นนอก (tunica externa)

ผนังชั้นนอกจะอยู่ชั้นนอกสุดของหลอดเลือด ประกอบไปด้วยเส้นใยอีลาสติก (elastic fibers) และเส้นใยคอลลาเจน (collagens) เป็นส่วนมากจึงมีความแข็งแรงและยืดหยุ่น ทำหน้าที่ป้องกันอันตรายที่จะเกิดกับหลอดเลือด และเส้นใยเหล่านี้ยังช่วยให้หลอดเลือดมีสภาพคงตัวอยู่ได้และไม่หดแฟบในขณะที่ไม่มีเลือดไหลผ่าน (Levick, 2000; Martini, 2006; Stenmark et al., 2013)



รูปที่ 5: แสดงโครงสร้างพื้นฐานของหลอดเลือดแดง (Artery) และหลอดเลือดดำ (Vein) แบ่งเป็น 3 ชั้น ได้แก่ ผนังชั้นนอก (tunica externa) ผนังชั้นกลาง (tunica media) และผนังชั้นใน (tunica interna) ซึ่งหลอดเลือดดำเป็นหลอดเลือดที่มีลิ้น (valve) แต่หลอดเลือดแดงไม่มี (ที่มา: <https://www.anatomynote.com/human-anatomy/blood-supplement/artery-vein-and-capillary-anatomical-structure-in-detail/>) (สืบค้นวันที่ 9 พฤศจิกายน 2563)

2.2.3 คุณสมบัติเชิงกลของผนังหลอดเลือด

1) ความสามารถในการยืดขยายและความจุของหลอดเลือด (Vascular distensibility and compliance)

ความสามารถในการยืดขยายและความจุของหลอดเลือดจะมีความสัมพันธ์ต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาตรความจุเลือดและความดันโลหิต โดยเมื่อมีการเพิ่มสูงขึ้นของความดันภายในท่อ (lumen) ของหลอดเลือดมากกว่าภายนอกหลอดเลือดจะส่งผลให้ผนังของหลอดเลือดยืดขยายออกตามแนวเส้นผ่าศูนย์กลางของท่อหลอดเลือด ถ้าผนังของหลอดเลือดมีการยืดขยาย (distensibility) ที่ดีก็จะทำให้ปริมาตรความจุของเลือด (compliance) ได้มาก ทั้งนี้ความสามารถในการยืดขยายนั้นสามารถเปลี่ยนแปลงไปตามอายุ (Milnor, 1960; Watson and Seelye, 1962)

2) ความยืดหยุ่นของผนังหลอดเลือด (Vascular elasticity)

ความยืดหยุ่นของผนังหลอดเลือด ขึ้นอยู่กับเส้นใยคอลลาเจนและอีลาสตินที่เป็นส่วนประกอบของผนังหลอดเลือด ซึ่งสามารถเสื่อมไปตามอายุที่มากขึ้น เมื่ออายุเพิ่มมากขึ้น คุณสมบัติในการยืดหยุ่นของผนังหลอดเลือดจะลดลงเมื่อมีแรงมากระทำ อีกทั้งเมื่อหมดแรงกระทำ ผนังของหลอดเลือดยังสูญเสียความสามารถในการหดกลับสู่ขนาดของหลอดเลือดเริ่มต้น (elastic recoil) อีกด้วย การยืดหยุ่นของผนังหลอดเลือดที่เปลี่ยนแปลงไปมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาตรในหลอดเลือด และความดันในหลอดเลือด (Banga and Balo, 1961)

3) แรงตึงของผนังหลอดเลือด (Wall tension/stress)

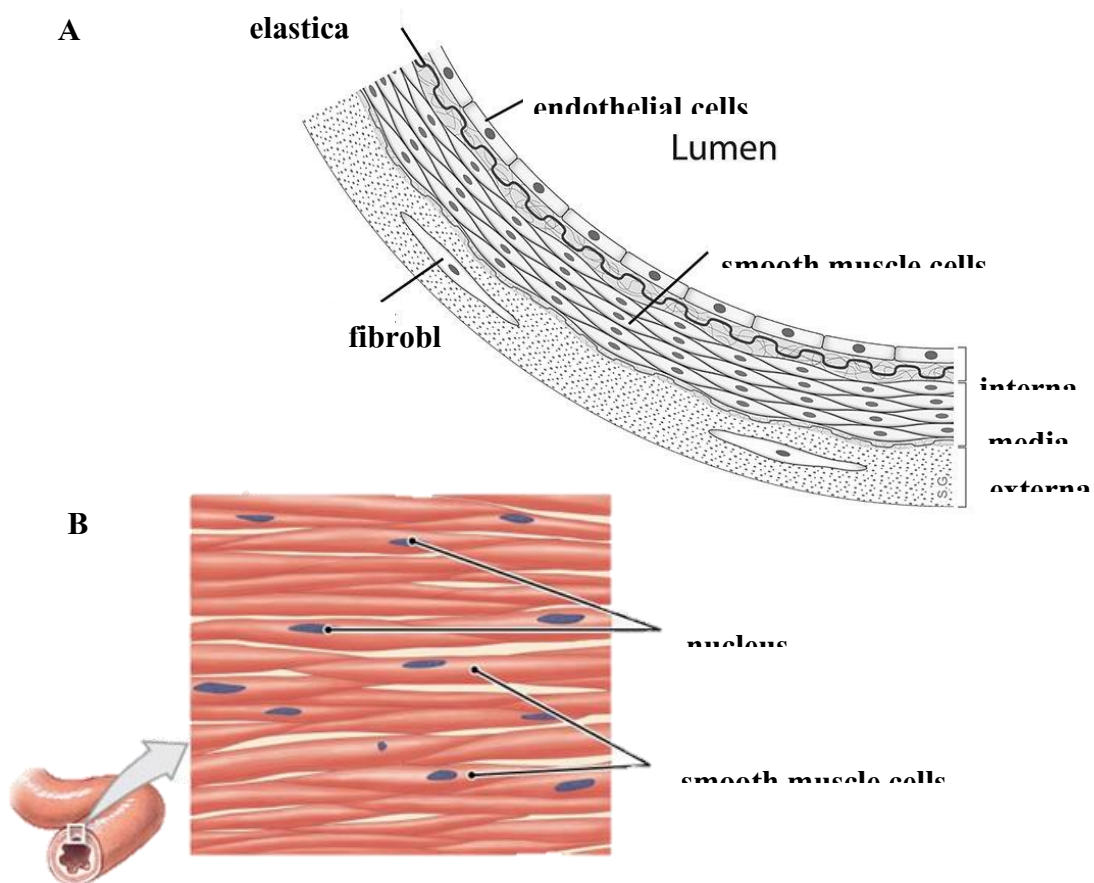
ภายในหลอดเลือดจะมีเลือดหรือของเหลวบรรจุอยู่ และมีการไหลผ่าน ทำให้มีแรงที่กระทำต่อผนังหลอดเลือดอยู่ตลอดเวลา แรงที่กระทำนี้จะทำให้เกิดความตึงของผนังหลอดเลือดซึ่งเป็นแรงที่ต้านแรงดันภายในหลอดเลือด ดังนั้นผนังหลอดเลือดต้องมีความแข็งแรงเพื่อต้านแรงที่มากระทำต่อผนังหลอดเลือด อีกทั้งแรงนี้ยังช่วยในการรักษาขนาดหลอดเลือดให้ปกติอีกด้วย (Kamiya et al., 1984; Papaioannou and Stefanadis, 2005)

2.2.4 เซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด

กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด (vascular smooth muscle cell) เป็นเซลล์ที่มีอยู่ทั้งในหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดดำ ยกเว้นหลอดเลือดฝอย เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายกระสวย (spindle-shaped cells) ยาวประมาณ 200 ไมโครเมตร และมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 ไมโครเมตร นิวเคลียสเป็นรูปไข่ (ellipse) วางอยู่ตรงกลางเซลล์ เซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด

เรียงตัวในแนววงกลม ทำให้เกิดโครงสร้างที่เป็นท่อของหลอดเลือด เซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดเป็นส่วนประกอบที่อยู่บริเวณชั้นกลางของผนังหลอดเลือด (รูปที่ 6) โดยแทรกตัวอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ได้แก่ collagen, elastin, proteoglycans และ glycoprotein ซึ่งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเหล่านี้มีหน้าที่ช่วยในการกระจายตัวของไอออนรอบ ๆ เซลล์ เพื่อให้ความเข้มข้นของไอออนทั้งภายในและพื้นที่รอบๆ เซลล์มีค่าใกล้เคียงกัน อีกทั้งยังช่วยในการกระจายแรงรัดหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดอีกด้วย

เซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดจะเชื่อมติดกันเป็นแผ่นหรือมัดซึ่งมีความหนาที่แตกต่างกันไปในแต่ละมัดต่างๆ เซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดเรียงตัวกันในแนวขนานและวงแหวนเป็นวงกลมจึงทำให้เกิดโครงสร้างของหลอดเลือดที่เป็นท่อ (lumen) เซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดที่อยู่ติดกันจะสัมผัสกันด้วยรอยต่อช่องว่าง เรียกว่า “gap junction” ซึ่งบริเวณนี้จะมีความต้านทานไฟฟ้าต่ำ เนื่องจากมีช่องของไอออนจึงทำให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบสามารถส่งต่อสัญญาณไฟฟ้าถึงกันได้ ดังนั้นเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดจึงทำงานเสมือนเป็นเซลล์เดียวกัน ซึ่งเรียกว่า “syncytium” คุณสมบัตินี้ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดจึงเป็นตัวที่ช่วยให้แต่ละเซลล์ทำงานสัมพันธ์กันเป็นผลให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดสามารถหดตัวพร้อมกันได้ ดังนั้นถ้ามีปัจจัยใดทำให้เซลล์บางเซลล์มีศักย์ไฟฟ้าที่เปลี่ยนไป เซลล์ข้างเคียงของเซลล์นั้นก็จะได้รับอิทธิพลในแบบเดียวกัน (Berne et al., 2004; Hartshorne, 1990; Wilson, 2011; Zhang et al., 1993)

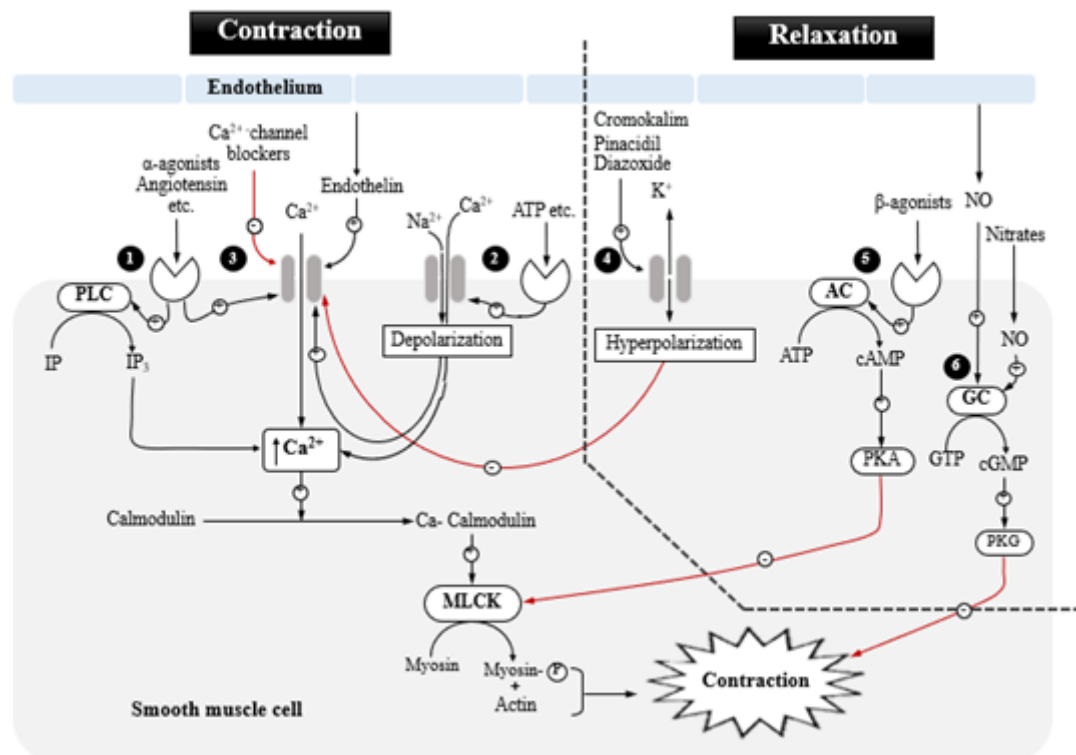


รูปที่ 6: แสดงตำแหน่งของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด (A) และลักษณะของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด (B) (ที่มา: https://en.wikipedia.org/wiki/Vascular_smooth_muscle (A) และ <https://www.pinterest.com/pin/777926535613618811/> (B)) (สืบค้นวันที่ 9 พฤศจิกายน 2563)

กลไกการหดตัวและคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด

กลไกการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดจะขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของ Ca^{2+} ภายในเซลล์ โดยพื้นฐานของกลไกดังกล่าวจะคล้ายกับกล้ามเนื้อหัวใจและกล้ามเนื้อลาย คือ จะมีการสอดประสานของกันของฟิลาเมนต์ชนิดหนา (thick filament) และฟิลาเมนต์ชนิดบาง (thin filament) (Feher, 2017; Nelson et al., 1990) สารที่มีฤทธิ์ทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด (vasoconstrictor substances) จะทำให้ระดับความเข้มข้นของ Ca^{2+} ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น ส่วนสารที่มีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดคลายตัว (vasodilator substances) จะทำให้ระดับความเข้มข้นของ Ca^{2+} ภายในเซลล์ลดลง โดยการหดตัวของหลอดเลือดอาศัยกลไกผ่านทาง voltage-gated Ca^{2+} channel และ receptor-operated Ca^{2+} channel (Berne and Levy, 1993; Feher, 2017) สำหรับกลไกของ receptor-operated Ca^{2+} channel จะอาศัย receptor ทำงานร่วมกับเอนไซม์ phospholipase (PLC) ทำให้ inositol triphosphate (IP_3) เพิ่มขึ้นส่งผลให้เกิดการปล่อย Ca^{2+} ออกมาจาก sarcoplasmic reticulum มากขึ้น (Abdel-Latif, 1986) และทำให้ Ca^{2+} จากภายนอกแพร่เข้าสู่ภายในเซลล์มากขึ้น เกิดภาวะ depolarization ไปกระตุ้นให้ voltage-gated Ca^{2+} channel เปิดออก Ca^{2+} จากภายนอกแพร่เข้าสู่ภายในเซลล์มากขึ้น เมื่อระดับของ Ca^{2+} ภายในเซลล์สูงขึ้น จะจับกับ calmodulin แล้วไปกระตุ้นเอนไซม์ myosin light chain kinase (MLCK) ทำให้เกิด phosphorylation ของ myosin มีผลให้ thin filament และ thick filament เลื่อนเข้าหากันทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดขึ้นได้ (Feher, 2017; Hartshorne and Kawanura, 1992; Zhang et al., 1994)

ในทางกลับกันการคลายตัวของหลอดเลือดจะเกิดขึ้นเมื่อระดับความเข้มข้นของ Ca^{2+} ภายในเซลล์ลดลง หรือมีการยับยั้งกลไกที่ทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด (Berne and Levy, 1993; Feher, 2017; Hartshorne and Kawanura, 1992) เช่น กระตุ้นให้ K^+ channel เปิด ส่งผลให้ K^+ ไหลออกนอกเซลล์มากขึ้นเกิดภาวะ hyperpolarization ไปยับยั้งการเปิดของ voltage-gated Ca^{2+} channel ทำให้ Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์ไหลเข้าสู่ภายในเซลล์ลดลง หรือยับยั้งกลไกการหดตัวของหลอดเลือดโดยกระตุ้นเอนไซม์ adenylate cyclase ทำให้ระดับของ cAMP เพิ่มขึ้นไปกระตุ้นเอนไซม์ protein kinase A หรือมีผลกระตุ้นเอนไซม์ guanylate cyclase ทำให้ระดับของ cGMP เพิ่มขึ้นไปกระตุ้นเอนไซม์ protein kinase G ซึ่งเอนไซม์ protein kinase A และ protein kinase G มีผลยับยั้งกลไกการหดตัวของหลอดเลือดส่งผลให้การคลายตัวของหลอดเลือดเพิ่มขึ้น (Feher, 2017; Kirby et al., 1991; Matz et al., 2000; Rang and Dale, 1991) ดังแสดงในรูปที่ 7 นอกจากนี้ยังมีกลไกอื่นที่ควบคุมการทำงานของหลอดเลือดโดยผ่านการควบคุมเฉพาะที่ เช่น การยืดหลอดเลือด (stretch), การเปลี่ยนแปลงความดันที่ผนังหลอดเลือด เป็นต้น



รูปที่ 7: แสดงการควบคุมการทำงานของหลอดเลือดโดยการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด ซึ่งเกิดจากการสูงขึ้นของระดับ Ca^{2+} ภายในเซลล์ ผ่านทาง (1) Receptor ทำงานร่วมกับ PLC ทำให้เพิ่มการสร้าง IP_3 ทำให้เกิดการหลั่ง Ca^{2+} จากแหล่งเก็บ (2) Receptor-operated channel ทำให้เกิดการเปิดของ Ca^{2+} channel แล้ว Ca^{2+} แพร่เข้าสู่เซลล์เกิดภาวะ depolarization และ (3) Voltage-gated Ca^{2+} channel เปิด ทำให้ Ca^{2+} แพร่เข้าสู่เซลล์มากขึ้น ส่วนการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดเกิดจากระดับ Ca^{2+} ภายในเซลล์ลดลงผ่านทาง (4) การเปิดของ K^{+} channel ทำให้เกิดภาวะ hyperpolarization ยับยั้งการเปิดของ voltage-gated Ca^{2+} channel (5) β -adrenergic agonist ทำให้เพิ่มการสร้าง cAMP (6) เกิดการกระตุ้น guanylate cyclase ทำให้เพิ่มการสร้าง cAMP

หมายเหตุ: PCL = phospholipase C, AC = adenylyate cyclase, GC = guanylate cyclase, PDE = phosphodiesterase, PKA = protein kinase A, PKG = protein kinase G, MLCK = myosin light chain kinase

(ที่มา: คัดแปลจาก Feher, 2017; Rang and Dale, 1991)

2.2.5 เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด (endothelium cell)

เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด มีโครงสร้างและหน้าที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของหลอดเลือดและอวัยวะที่เกี่ยวข้อง โดยทั่วไปเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดมีลักษณะเป็นเซลล์ชั้นเดียว (simple squamous epithelium) และเรียงตัวต่อกัน เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดเป็นโครงสร้างที่กั้นระหว่างเลือดกับของเหลวที่แทรกอยู่ในอวัยวะต่าง ๆ จึงทำให้ได้รับอิทธิพลจากทั้งปัจจัยทางชีวเคมี เช่น ฮอรโมน และสารเคมีอื่น ๆ ซึ่งอยู่ในเลือด และจากปัจจัยทางกายภาพที่กระทำต่อผนังหลอดเลือด เช่น ความดันเลือด การยืดขยาย และการไหลของเลือด เป็นต้น (Lai and Kan, 2015) เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดมีความสำคัญอย่างมากต่อการทำงานของหลอดเลือด เนื่องจากสามารถสร้างและหลั่งสารที่มีผลต่อการหดและขยายตัวของหลอดเลือดได้ โดยสารที่ทำให้หลอดเลือดขยายตัว ได้แก่ ไนตริก-ออกไซด์ (nitric oxide, NO) และสารที่ทำให้หลอดเลือดหดตัว ได้แก่ เอนโดลินลินส์ (endothelins), ทรอมนบอกแซนเอสสอง (thromboxane A₂) และพรอสตาแกลนดินส์เอฟสองแอลฟา (prostaglandin F_{2α}, PGF_{2α}) (Doni et al., 1988)

นอกจากนี้เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดยังมีคุณสมบัติป้องกันการเกิดลิ่มเลือดในหลอดเลือด (antithrombosis) โดยยับยั้งการจับตัวกันของเม็ดเลือดกับผนังหลอดเลือดทำให้เลือดในหลอดเลือดสามารถไหลได้สะดวก ทั้งนี้เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดยังสามารถสร้างและหลั่งสารที่เร่งการจับตัวกันของเม็ดเลือดกับเซลล์เยื่อผนัง และเร่งการเกิดลิ่มเลือดในหลอดเลือดได้อีกด้วย เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดยังมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและปรับสภาพ (growth and differentiation) ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดและการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) โดยการหลั่งสารที่กระตุ้นการเจริญเติบโต (growth factor) เช่น พีดีจีเอฟ (PDGF, platelet-derived growth factor) และอีจีเอฟ (EGF, epidermal growth factor) เป็นต้น การสร้างสารที่มีคุณสมบัติตรงข้ามกันของที่เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดในเวลาเดียวกันนั้นชี้ให้เห็นว่า ความสมดุลของสารทั้งสองกลุ่มเป็นตัวกำหนดอิทธิพลของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดต่อกระบวนการต่างๆ มากกว่าการเปลี่ยนแปลงสารใดสารหนึ่ง กล่าวคือ ความผิดปกติที่เกิดจากเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดเกิดจากการเสียสมดุลของการสร้างและหลั่งสารดังกล่าวแล้วเป็นส่วนใหญ่ โดยความผิดปกตินี้อาจมีความสัมพันธ์หรือการทำงานร่วมกันกับเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด, เม็ดเลือด, สารเคมี และปัจจัยจากภายนอกของเลือด ซึ่งความผิดปกตินี้มักจะนำไปสู่การเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบหัวใจและหลอดเลือดต่อไป (Lukaszyk et al., 1998; Namiki et al., 1990; Cahill and Redmond, 2016)

2.2.5.1 สารสำคัญที่สร้างและหลังจากเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด

สารสำคัญต่าง ๆ ที่สร้างและหลังจากเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ สารที่ทำให้หลอดเลือดขยายตัว (Vasodilators) และสารที่ทำให้หลอดเลือดหดตัว (Vasoconstrictors) ซึ่งสารเหล่านี้ส่งผลต่อการทำงานของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด

1) สารที่ทำให้หลอดเลือดหดตัว (Vasoconstriction)

สารที่สร้างและหลังจากเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่มีคุณสมบัติทำให้หลอดเลือดหดตัว ได้แก่ ทรอมบอกเซนเอทู (thromboxane A_2 , TXA_2) พรอสตาแกลนดินเอชทู (prostaglandin H_2 , PGH_2) เอนโดธิลินส์ (endothelins, ET) และแองจิโอเทนซินทู (angiotensin II, Ang II)

เอนโดธิลินส์ (endothelins, ET) เป็นโพลีเปปไทด์ (polypeptides) ที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 21 ตัว แบ่งได้ 3 ชนิด คือ เอนโดธิลินวัน (endothelin-1, ET-1) เอนโดธิลินทู (endothelin-2, ET-2) และเอนโดธิลินทรี (endothelin-3, ET-3) โดยไอโซพอร์มที่สร้างจากเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด คือ เอนโดธิลินวัน ซึ่งไอโซพอร์มดังกล่าวยังมีบทบาทมากที่สุดในกับระบบหัวใจและหลอดเลือดอีกด้วย (รูปที่ 11) การสร้างและหลังสารเอนโดธิลินส์เกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย เช่น การถูกกระตุ้นด้วยทรอมบิน (Thombin), อีพิเนฟริน (epinephrine), และ แองจิโอเทนซินทู (angiotensin II) เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาวะขาดออกซิเจน (hypoxia) และภาวะที่เนื้อเยื่อขาดเลือด (ischemia) นั้นสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างเอนโดธิลินส์ได้ดีที่สุด (Adner et al., 1994; Davenport et al., 2016) เอนโดธิลินส์มีตัวรับที่จำเพาะ 2 ชนิด อยู่ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ โดยตัวรับเอนโดธิลินเอ (ET_A) มีความจำเพาะต่อเอนโดธิลินวัน พบมากที่เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด ส่วนตัวรับเอนโดธิลินบี (ET_B) สามารถจับได้กับทั้งสามไอโซพอร์ม พบทั้งในเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด เมื่อตัวรับเอนโดธิลินเอและบีที่บริเวณเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดถูกกระตุ้นจะทำให้หลอดเลือดหดตัว ในขณะที่ตัวรับเอนโดธิลินบีที่บริเวณเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดจะทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้โดยทางอ้อมผ่านการสร้างและหลังสารอีดีอาร์เอฟ (endothelium-derived relaxing factor, EDRF) โดยสารไนตริกออกไซด์และพรอสตาไซคลิน (prostacyclin) (Saijonmaa et al., 1991; 1992)

เอนโดธิลินส์ มีความสำคัญต่อการควบคุมความตึงของผนังหลอดเลือดและความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มสูงขึ้นของความดันโลหิต นอกจากนี้ยังมีผลต่อการเพิ่มความแรงในการบีบตัวของหัวใจ, การกระตุ้นการแบ่งเซลล์, การกระตุ้นระบบประสาทซิมพาเทติก (sympathetic nervous systems) ทั้งในส่วนกลางและรอบนอก, การกระตุ้นระบบเรนินร่วมแองจิโอเทนซิน (renin-angiotensin system, RAS) และการยับยั้งการจับโซเดียม (Na) ที่ผ่านทางไต เป็นต้น (Adner et al., 1994)

2) สารที่ทำให้หลอดเลือดขยายตัว (Vasodilators)

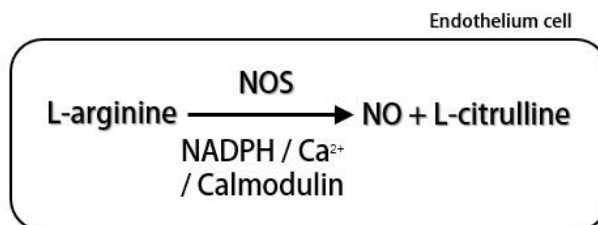
สารที่สร้างและหลังจากเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดที่มีคุณสมบัติทำให้หลอดเลือดขยายตัว ได้แก่ ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO), พรอสตาไซคลิน (prostaglandin, PGI₂) และอีดีเอชเอฟ (endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF)

ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide; NO) เป็นสารที่มีความสำคัญมากที่สุดตัวหนึ่งที่สร้างจากเซลล์บุผนังหลอดเลือดที่ทำให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดคลายตัว ไนตริกออกไซด์ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1980 โดยเฟอร์ชอกอดต์และชาวัดซกี นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมัน เดิมสารนี้ถูกเรียกว่า endothelium-derived relaxing factor (EDRF) (Furchgott and Zawadzki, 1980)

ไนตริกออกไซด์เป็นอนุมูลอิสระ (free radicle) ที่มีสูตรทางเคมี คือ NO สร้างมาจากแอลอาร์จินีน (L-arginine) ซึ่งเข้าเซลล์โดยอาศัยตัวพาจำเพาะที่เชื่อมกับเซลล์บุผนังหลอดเลือด กระบวนการสร้างไนตริกออกไซด์จะอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส (nitric oxide synthase, NOS) ทำให้เกิดออกซิเดชันแอลอาร์จินีนที่ปลายกวานิดีนไนโตรเจน (guanidine-nitrogen terminal) ได้เป็นไนตริกออกไซด์และแอลซิทรูลีน (L-citrulline) ในกระบวนการนี้มีโคแฟกเตอร์ (co-factor) ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH) tetrahydrobiopterin (TBH₄) แคลเซียมไอออน (Ca²⁺) และแคลโมดูลิน (calmodulin) เป็นต้น (รูปที่ 8) เอนไซม์ไนตริก-ออกไซด์ซินเทสสามารถถูกกระตุ้นจากหลายปัจจัย โดยเฉพาะการกระตุ้นด้วยแคลเซียมไอออน (Ca²⁺) และสามารถถูกยับยั้งด้วยสารที่คล้ายแอลอาร์จินีน เช่น L-NG-monomethyl arginine (L-NMMA), asymmetrical dimethyl arginine (ADMA) และ L-nitroso arginine methylester (L-NAME) เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้มีประโยชน์ต่อการศึกษายาต่างๆ

ไนตริกออกไซด์ในภาวะต่าง ๆ โดยแอลซิทรูลีนที่เกิดขึ้นมีความเสถียรมากกว่าไนตริกออกไซด์จึงสามารถวัดสารนี้เพื่อใช้ประเมินปริมาณของการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ ส่วนไนตริกออกไซด์

อิสระมีค่าครึ่งชีวิตเพียง 2 - 3 วินาที มีความเสถียรต่ำแต่อาจสามารถจับกับสารที่มีความเสถียรทำให้เกิดความเสถียรขึ้นได้ (Palmer, 1988; 1993; Yamamoto et al., 1993)



รูปที่ 8: แสดงการสร้างไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) โดยสร้างจาก L-arginine อาศัยการทำงานของของเอนไซม์ NOS และโคแฟกเตอร์ เช่น NADPH, แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) และแคลโมดูลิน (calmodulin) (ที่มา: คัดแปลงจาก Thong-Ngam, 2002)

เอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส (NOS) โครงสร้างคล้ายกับเอนไซม์ไซโทโครมออกซิเดส P450 (cytochrome P450) ซึ่งมีฮีม (heme) เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างเหมือนกัน แบ่งออกเป็น 3 ไอโซฟอร์ม (isoform) ซึ่งมีลักษณะของการทำงานและตำแหน่งที่พบแตกต่างกัน ได้แก่ นิวโรนอลไทป์ (neuronal type, nNOS), อินดิวิซิเบิลไทป์ (inducible type, iNOS) และเอ็นโดทีเลียลไทป์ (endothelial type, eNOS)

1) **นิวโรนอลไทป์ (nNOS)** มีน้ำหนักโมเลกุล 168 กิโลดัลตัน เป็นเอนไซม์ที่พบมากในเซลล์สมองและเส้นประสาทรอบนอก และอาจพบได้ในเซลล์กล้ามเนื้อลาย เอนไซม์นี้ถูกควบคุมการทำงานโดยแคลเซียมไอออน และแคลโมดูลิน (Bredt et al., 1990; Bredt and Snyder, 1990; Kobzik et al., 1994)

2) **อินดิวิซิเบิลไทป์ (iNOS)** มีน้ำหนักโมเลกุล 130 กิโลดัลตัน เป็นเอนไซม์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้น (inducible enzyme) ในเซลล์แมคโครฟาจ (macrophage) ทำให้เกิดการตอบสนองต่อการติดเชื้อ ช่วยให้เซลล์สามารถกำจัดจุลินทรีย์ต่าง ๆ (microorganisms) และเซลล์ที่เกิดความผิดปกติ (NO-induced cytotoxic and biological effects) เช่น iNOS ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นในหลอดเลือดโดยไวโตไคน์ (cytokines) จากภาวะช็อกจากการติดเชื้อ (septic shock) และในกระบวนการเกิดการอักเสบการบวมแดงต่าง ๆ ในการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ไม่ได้ถูกควบคุมด้วยแคลเซียมไอออน เนื่องจากเอนไซม์นี้มีการจับกับกับแคลโมดูลินอยู่แล้ว จึงสามารถยับยั้งการทำงานได้โดยคอร์ติโคสเตอรอยด์ (corticosteroid) (Petros et al., 1991; Sherman et al., 1999)

3) **เอ็นโดทีเลียสไทต์ (eNOS)** มีน้ำหนักโมเลกุล 135 กิโลดัลตัน พบมากในเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด มีทำหน้าที่ในการสร้างไนตริกออกไซด์เพื่อควบคุมการทำงานของผนังหลอดเลือด เอนไซม์นี้ถูกควบคุมการทำงานโดยแคลเซียมไอออน และแคลโมดูลิน อีกทั้งยังถูกกระตุ้นและ/หรือยับยั้งการทำงานได้ด้วยปัจจัยทางพลศาสตร์ของเลือดหลายชนิด (hemodynamic factors) เช่น การไหลของเลือด (blood flow) และความเค้นเฉือนของเลือด (shear stress) เป็นต้น (Anggard, 1992 ; Furchgott, 1996; Palmer et al., 1987; Palmer et al., 1988)

ปัจจัยที่มีผลต่อการกระตุ้นการหลั่งไนตริกออกไซด์

1) **ปัจจัยทางเคมี** เช่น ฮิสตามีน (histamine), ทروมบิโน (thrombin), แอซิติลโคลีน (acetylcholine), นอร์อิพิเนฟริน (norepinephrine) และเบรดีไคนิน (bradykinin) สารเคมีเหล่านี้จะจับกับตัวรับที่มีอยู่บนผิวของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด (Anggard, 1992)

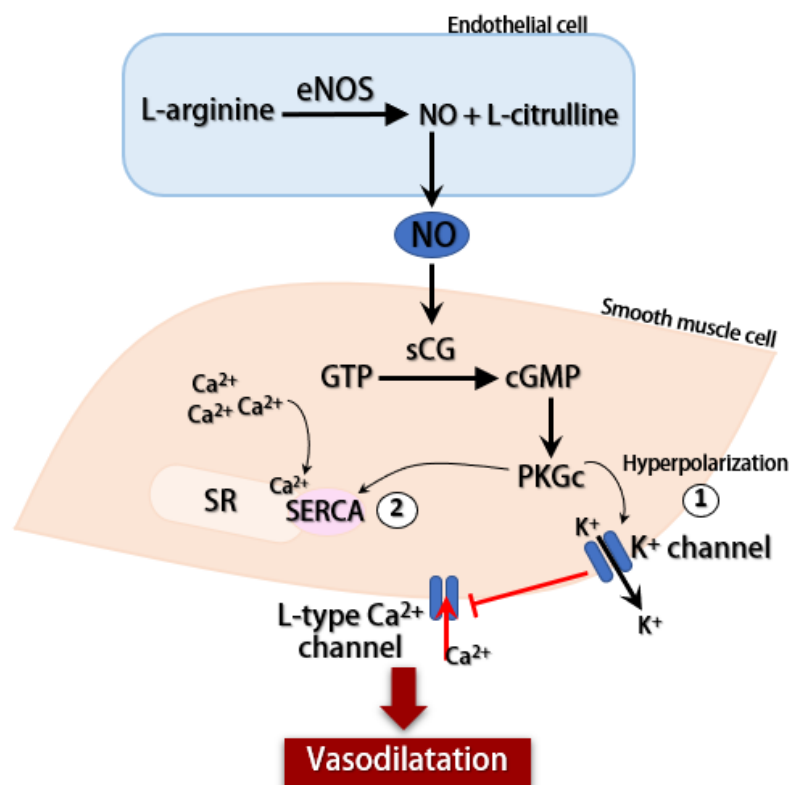
2) **ปัจจัยทางกายภาพ** เช่น แรงเสียดสีของเลือดต่อผนังหลอดเลือด หรือความเค้นเฉือน (shear stress), การไหลของเลือด (blood flow) เนื่องจากเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดจะสัมผัสกับการไหลของเลือดโดยตรง (Anggard, 1992; Kawai et al.; 2010)

กลไกการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดโดยไนตริกออกไซด์

ไนตริกออกไซด์ (NO) มีผลต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด โดยเมื่อมีการกระตุ้น เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดทั้งในปัจจัยทางกายภาพ และ/หรือปัจจัยทางเคมี เช่น acetylcholine, thrombin และ bradykinin เป็นต้น ส่งผลให้ในเซลล์มีการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมไอออน การเพิ่มขึ้นของแคลเซียมไอออนจะมีผลไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์อีโนส (eNOS) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีอยู่ในเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดส่งผลให้เกิดการสร้างไนตริกออกไซด์จาก L-arginine จากนั้นไนตริกออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะแพร่ผ่านเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ซอลูเบิลกัวนิลไซคลาส (soluble guanylyl cyclase, sGC) โดยเมื่อเอนไซม์ sGC ถูกกระตุ้นจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนกัวโนซีนไตรฟอสเฟต (guanosine triphosphate, GTP) เป็นไซคลิกกัวโนซีนโมโนฟอสเฟต (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) จากนั้น cGMP จะไปกระตุ้นการทำงานของโปรตีนไคเนสจี (protein kinase G, PKG) แล้วเข้าสู่กระบวนการการคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด โดยผ่านหลายกลไก ดังนี้ (รูปที่ 9)

- PKG กระตุ้นการทำงานของช่องโพแทสเซียมไอออน (K^+ channel) ทำให้ช่องโพแทสเซียมไอออนเปิด และเกิดไฮเปอร์โพลาไรเซชัน (hyperpolarization) ส่งผลให้ความแตกต่างของศักย์ไฟฟ้าของเซลล์สูงขึ้น เป็นผลให้ช่องแอลไทป์แคลเซียมไอออน (L-type calcium channel) ปิด ทำให้แคลเซียมไอออนเข้าสู่เซลล์ลดลงส่งผลให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดคลายตัว

- PKG กระตุ้นการทำงานของ sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPases (SERCA) ทำให้แคลเซียมไอออนถูกเก็บกลับเข้าสู่ซาโคพลาสมิกเรติคูลัม (Sarcoplasmic reticulum, SR) มากขึ้น ทำให้แคลเซียมไอออนในเซลล์ลดลงส่งผลต่อการเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดคลายตัว (Bolotina et al., 1994; Levick, 2000; Schini and Vanhoutte, 1993)



รูปที่ 9: แสดงกลไกการคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดโดยไนตริกออกไซด์ (NO) โดยเมื่อไนตริกออกไซด์แพร่เข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดจะไปกระตุ้นการทำงานของ soluble guanylyl cyclase เปลี่ยน guanosine triphosphate ให้เป็น cyclic guanosine monophosphate เพิ่มมากขึ้นซึ่งไปกระตุ้นการทำงานของ protein kinase G จึงทำให้เกิดกระบวนการคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด โดยผ่านหลายกลไก ดังนี้ (1) กระตุ้นให้เกิด hyperpolarization จากการเปิดของ K⁺ channel จึงมีผลไปปิด L-type calcium channel ทำให้ Ca²⁺ ในเซลล์ลดลงและเกิดการคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดคลายตัว (2) กระตุ้นการเก็บ Ca²⁺ เข้าสู่ Sarcoplasmic reticulum โดยไปกระตุ้นการทำงานของ sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPases ทำให้ Ca²⁺ ในเซลล์ลดลงและเกิดการคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดคลายตัว

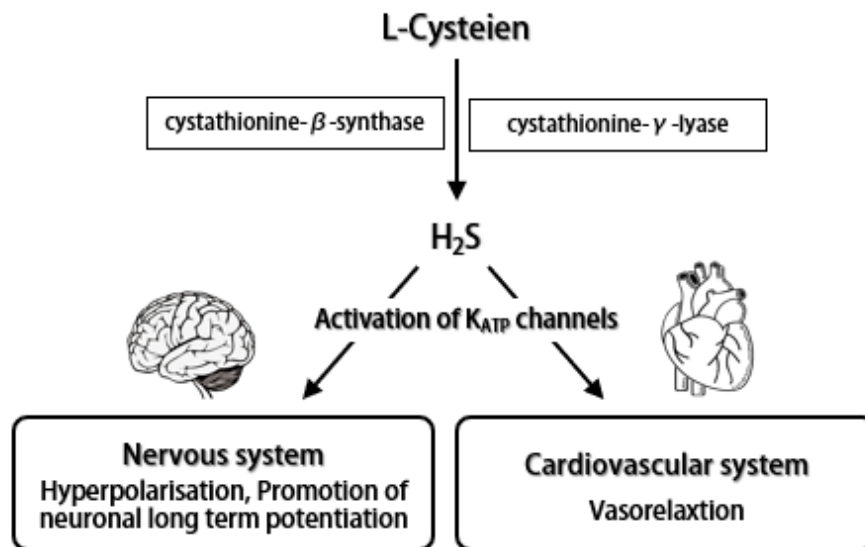
หมายเหตุ: eNOS = endothelial nitric oxide synthase, NO = nitric oxide, sGC = soluble guanylyl cyclase, GTP = guanosine triphosphate cGMP = cyclic guanosine monophosphate, PKGc = protein kinase G, SERCA = sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPases (ที่มา: ดัดแปลงจาก Bolotina et al., 1994; Levick, 2000; Schini and Vanhoutte, 1993)

ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide; H₂S) ที่ถูกคิดว่าเป็นเพียงก๊าซพิษที่มีกลิ่นฉุนซึ่งรู้จักกันในชื่อ “ก๊าซไข่เน่า” แต่ด้วยความก้าวหน้าทางด้านวิทยาศาสตร์ นักวิจัยได้ค้นพบว่า H₂S มีความสำคัญในกระบวนการทางสรีรวิทยาและพยาธิวิทยาต่าง ๆ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Abe and Kimura, 1996) โดยเฉพาะบทบาทสำคัญที่เกี่ยวข้องกับระบบหัวใจและหลอดเลือด ซึ่งพบว่า H₂S มีการส่งสัญญาณระดับโมเลกุลที่คล้ายกับไนตริกออกไซด์ (NO) (ทำหน้าที่เป็น endothelium-derived relaxing factor (EDRFs) และ endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHFs)) (Kohn et al., 2012) และคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) (Wang, 2002) ไฮโดรเจนซัลไฟด์สามารถผลิตขึ้นในร่างกายด้วยเอนไซม์หลายชนิด โดยการแสดงออกของเอนไซม์แต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน เช่น เอนไซม์ ซิสทาไธโอซินิน ซินเทส (cystathionine synthase; CBS) เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการผลิต H₂S ในระบบประสาท และซิสทาไธโอซินิน ไลเอส (cystathionine lyase; CSE) เป็นเอนไซม์ที่ผลิต H₂S ที่มีสำคัญในระบบหัวใจและหลอดเลือด (Hosoki et al., 1997; Liu et al., 2009; Wagner et al., 2009; Yang et al., 2008)

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม H₂S ถูกสังเคราะห์มาจากกรดอะมิโนแอล-ซิสเตอีน (L-cysteine) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ cystathionine-β-synthase หรือ cystathionine-γ-lyase ในการผลิต ซึ่งทั้งเอนไซม์ทั้งสองใช้ pyridoxal 5'-phosphate (วิตามิน B6) เป็นโคแฟกเตอร์ (Li et al., 2011; Miles and Kraus, 2002; Yang et al., 2008) ผลทางสรีรวิทยาที่สำคัญของ H₂S ที่ถูกผลิตขึ้นในร่างกาย ซึ่งมีกลไกทั่วไปผ่านการกระตุ้นการเปิดของ ATP sensitive K⁺ channel (K_{ATP}) ส่งผลให้เกิด vasorelaxation ในระบบหัวใจและหลอดเลือด และ neuronal hyperpolarization ในระบบประสาท อีกทั้งยังช่วยเพิ่มศักยภาพในระยะยาวให้เซลล์ประสาท (Ebrahimkhani et al., 2005) (รูปที่ 10)

ในระบบหัวใจและหลอดเลือด เอนไซม์ cystathionine-γ-lyase เป็นเอนไซม์หลักในการสังเคราะห์และผลิต H₂S โดยเกิดขึ้นทั้งในเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (endothelial cells), เซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด (smooth muscle cells) และเซลล์เนื้อเยื่อไขมันที่หุ้มหลอดเลือด (periadventitial adipose tissue; PVAT) (Kohn et al., 2012) H₂S มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางพยาธิสรีรวิทยาในระบบหัวใจและหลอดเลือดมากมาย เช่น ความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress), การอักเสบ (inflammation), การตายของเซลล์ (apoptosis) และการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) เป็นต้น นอกจากนี้ H₂S ยังมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการเกิดโรคทางระบบหัวใจและหลอดเลือด และภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น ภาวะความดันโลหิตสูง (Hypertension), ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (myocardial ischaemia-reperfusion (I/R) injury),

ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตาย/ขาดเลือด (myocardial infarction), ภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะ (cardiac arrhythmia), ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจหนาผิดปกติ (cardiac hypertrophy), ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจเกิดเยื่อพังพืด (myocardial fibrosis) และภาวะหัวใจล้มเหลว (heart failure) (Ufnal and Zera, 2010; Wang, 2012); Wagner et al., 2009)



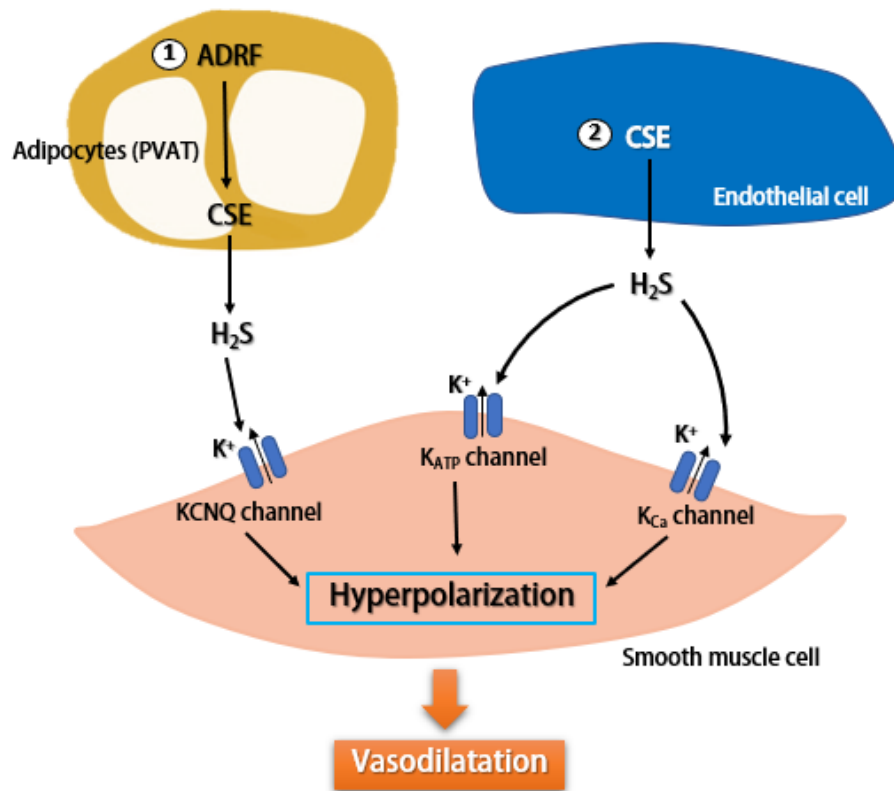
รูปที่ 10: แสดงผลทางสรีรวิทยาที่สำคัญของไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide; H₂S) โดย H₂S ถูกสังเคราะห์จากกรดอะมิโน L-cysteine โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ cystathionine-β-synthase หรือ cystathionine-γ-lyase ไปกระตุ้นการเปิดของ ATP sensitive K⁺ channel

ส่งผลให้เกิด neuronal hyperpolarization ในระบบประสาท และ vasorelaxation ในระบบหัวใจและหลอดเลือด (ที่มา: ดัดแปลงจาก Ebrahimkhani et al., 2005)

กลไกการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดโดยไฮโดรเจนซัลไฟด์

ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) เป็นสารชนิดหนึ่งที่มีฤทธิ์เป็น endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) ซึ่งมีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดคลายตัว โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านทาง Potassium (K^+) channels ได้แก่ ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP}) (Al-Magableh and Hart 2011; Mustafa et al., 2011; Zhao et al., 2001;), KCNQ-type voltage-dependent potassium channels (KCNQ channels) (Kohn et al., 2012; Schleifenbaum et al., 2010) และ Calcium (Ca^{2+}) activated potassium channels (K_{Ca} Channels) (Jackson-Weaver et al., 2011; Peer et al., 2012)

กลไกการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดโดยไฮโดรเจนซัลไฟด์จะเกิดขึ้นเมื่อมีการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ CSE ที่บริเวณเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด ทำให้เกิดการสร้างและหลั่งสาร H_2S ส่งผลไปกระตุ้นให้เกิดการเปิดของ ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP}) หรือ Calcium activated potassium channels (K_{Ca}) ที่อยู่บนเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด ซึ่งการเปิด K_{ATP} หรือ K_{Ca} จะทำให้เกิดเซลล์สูญเสียโพแทสเซียมไอออน (K^+) ออกนอกเซลล์จึงนำไปสู่กระบวนการไฮเปอร์โพลาไรเซชัน (hyperpolarization) ซึ่งมีผลไปต้านการหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด จึงทำให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดคลายตัว (Al-Magableh and Hart 2011; Jackson-Weaver et al., 2011; Peers et al., 2012; Zhao et al., 2001) นอกจากนี้การกระตุ้นการเปิดของ KCNQ channels ที่อยู่บนเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด โดยการเปิดออกของ KCNQ channels จะนำไปสู่กระบวนการไฮเปอร์โพลาไรเซชัน ส่งผลให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดเกิดการคลายตัว โดยการหลั่งสารกลุ่ม adipocyte derived relaxing factor (ADRF) จากเซลล์เนื้อเยื่อไขมันที่ห่อหุ้มหลอดเลือด (PVAT) สารดังกล่าวมีผลไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ CSE ทำให้มีการสร้างและหลั่ง H_2S เพิ่มมากขึ้น (Kohn et al., 2012) (รูปที่ 11)



รูปที่ 11: แสดงกลไกการคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดโดยไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H₂S) โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านทาง Potassium (K⁺) channels ได้แก่ ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP} channels), KCNQ-type voltage-dependent potassium channels (KCNQ channels) และ Ca²⁺ activated potassium channels (K_{Ca} Channels) นำไปสู่กระบวนการไฮเปอร์โพลาไรเซชัน (Hyperpolarization) ไปต้านการหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดเป็นผลให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดคลายตัว ซึ่งสาร H₂S ที่ทำให้เกิดกระบวนการ Hyperpolarization ถูกสร้างและหลั่งมาจาก (1) เซลล์เนื้อเยื่อไขมันที่ห่อหุ้มหลอดเลือด (PVAT) โดย PVAT จะมีการหลั่งสารกลุ่ม adipocyte derived relaxing factor ไปกระตุ้นการทำงานของ CSE ทำให้เกิดการหลั่ง H₂S แล้วไปกระตุ้น KCNQ channels ให้เปิดออกเกิดภาวะ Hyperpolarization และ (2) เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (endothelial cell) กระตุ้นการทำงานของ CSE ทำให้เกิดการหลั่ง H₂S แล้วไปกระตุ้น K_{ATP} channels หรือ K_{Ca} Channels ให้เปิดออกเกิดภาวะ Hyperpolarization

หมายเหตุ: H₂S = Hydrogen sulfide; CSE = cystathionine-γ-lyase; ADRF = Adipocyte derived relaxing factor (ที่มา: ดัดแปลงจาก (Kohn et al., 2012; Peer et al., 2012))

3. โรคหัวใจและหลอดเลือด

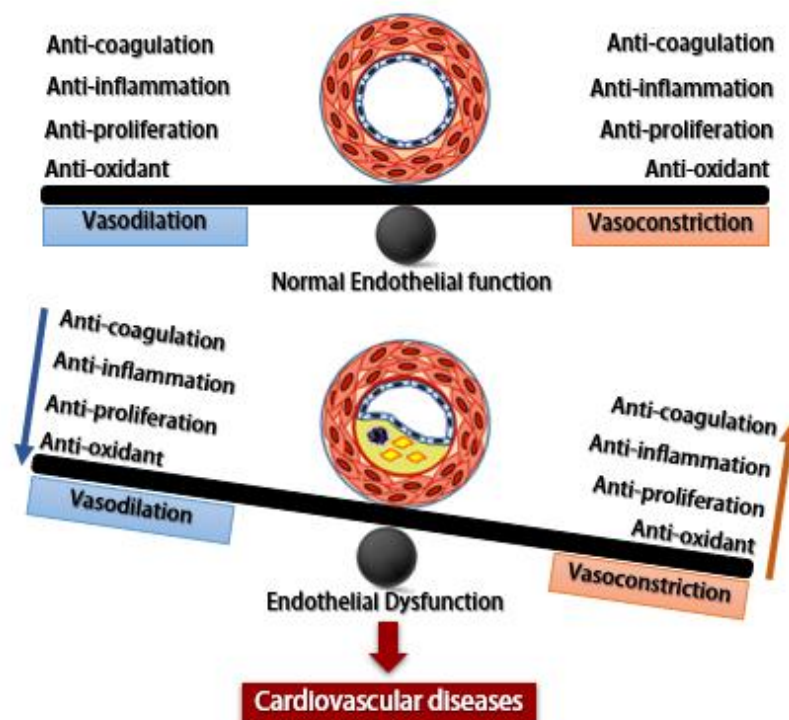
โรคหัวใจและหลอดเลือด หรือ cardiovascular diseases เป็นกลุ่มโรคที่เกิดขึ้นกับระบบหัวใจและหลอดเลือดซึ่งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตลำดับต้น ๆ ของคนไทย และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปี โรคหัวใจและหลอดเลือดที่เป็นสาเหตุของการเสียชีวิต ได้แก่ โรคหลอดเลือดสมอง (cerebrovascular diseases) และโรคหัวใจขาดเลือด (ischaemic heart diseases) (Wong, 2014) ซึ่งเกิดจากการที่หลอดเลือดตีบตันหรือขาดความยืดหยุ่นจากการสะสมของไขมัน โปรตีน แร่ธาตุ และการเกิดการติดเชื้อมาเป็นต้น ที่บริเวณผนังหลอดเลือด ปัจจัยเหล่านี้ส่งผลให้เกิดความเสียหายและการทำงานของที่ผิดปกติของเซลล์บุผนังหลอดเลือด เรียกเหตุการณ์นี้ว่า “endothelial dysfunction” (Grover-Paez and Zavalza-Gomez, 2009; Widlansky et al., 2003)

3.1 ความผิดปกติในการทำงานของเซลล์บุผนังหลอดเลือด

ความผิดปกติหรือความบกพร่องในการทำงานของเซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial dysfunction) เกิดจากการที่เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดได้รับบาดเจ็บ และทำให้เกิดความเสียหายของเซลล์จากสภาวะต่าง ๆ เช่น ความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ความแก่ชรา ความดันโลหิตสูงเรื้อรัง และภาวะน้ำตาลและไขมันในเลือดสูง ซึ่งนำไปสู่การเกิดกระบวนการอักเสบ เป็นต้น (Grover-Paez and Zavalza-Gomez, 2009; Widlansky et al., 2003)

ในสภาวะปกติของหลอดเลือด เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดจะสร้างและหลั่งสารที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัวและสารที่ทำให้หลอดเลือดหดตัวอย่างสมดุลกัน แต่เมื่อเกิดสภาวะพร่องการทำงานของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด หรือที่เรียกว่า endothelial dysfunction จะทำให้เกิดการเสียสมดุลของการสร้างและหลั่งสารดังกล่าว โดยเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดจะสร้างและหลั่งสารที่ทำให้หลอดเลือดหดตัวเพิ่มขึ้น แต่กลับสร้างและหลั่งสารที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัวลดลง ซึ่งสารที่ทำให้หลอดเลือดหดตัวนั้น นอกจากจะกระตุ้นให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือดหดตัวแล้วนั้น ยังทำให้เกิดการกระตุ้นการแข็งตัวของเลือด (coagulation) กระตุ้นกระบวนการอักเสบ (inflammation) เพิ่มการงอกของเซลล์ (cell proliferation) และกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) เป็นต้น ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวเป็นตัวที่กระตุ้นให้เกิดพยาธิสภาพของหลอดเลือด เช่น ภาวะหลอดเลือดแข็งตัว (arteriosclerosis) และการเกิดลิ่มเลือดอุดตัน (thrombosis) ส่วนสารที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัวมีฤทธิ์ตรงข้ามกับสารที่ทำให้หลอดเลือดหดตัว คือมีฤทธิ์ช่วยป้องกันการเกิดพยาธิสภาพข้างต้น โดยมีคุณสมบัติในการต้านการแข็งตัวของเลือด (anti-coagulation) ด้านการเจริญเติบโตของเซลล์ (anti-cell proliferation) ด้านการเกิดการอักเสบ (anti-inflammation) และ

ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) ที่เกิดจากความเครียดออกซิเดชัน (Hadi et al., 2005; Deanfield et al., 2007) ดังนั้นการเกิดสภาวะพร่องการทำงานของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดจึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญในการเกิดโรคทางระบบหัวใจและหลอดเลือด (รูปที่ 12)



รูปที่ 12: บทบาทของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดในภาวะปกติ (normal endothelial function) และภาวะผิดปกติ (endothelial dysfunction) (ที่มา: Hadi et al., 2005; Deanfield et al., 2007)

3.2 ภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง

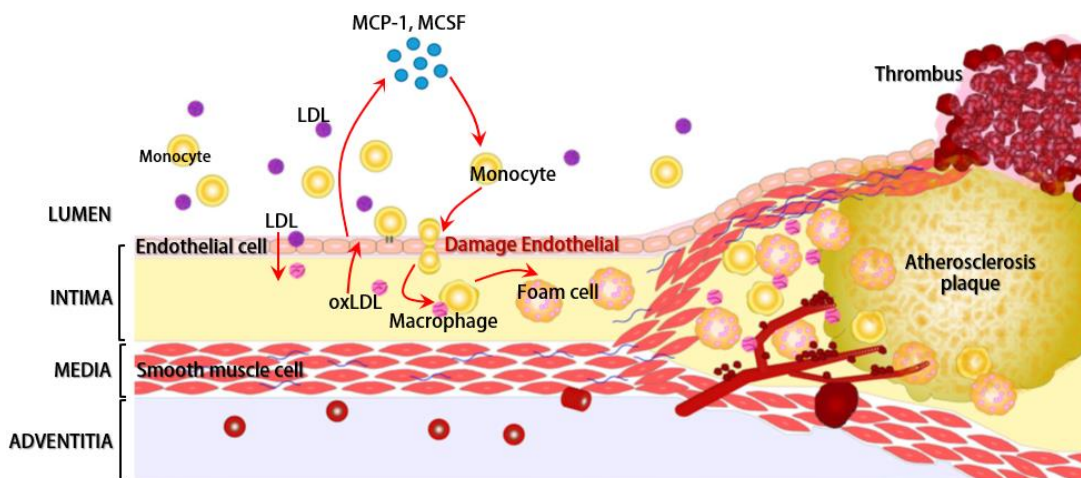
ภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) เป็นภาวะที่เกิดความผิดปกติที่หลอดเลือด โดยหลอดเลือดมีความแข็งตัวมากขึ้น และมีความยืดหยุ่นลดลง สาเหตุมาจากการสะสมของไขมันบริเวณผนังชั้นใน (tunica intima) หรือชั้นของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด มักพบในหลอดเลือดแดงขนาดใหญ่และหลอดเลือดแดงขนาดกลาง (Lusis, 2000)

ในระยะแรกของการเกิดโรคอาจยังไม่แสดงอาการใด ๆ แต่เมื่อเวลาผ่านไปเป็นระยะเวลานานจึงจะแสดงอาการทางคลินิกต่าง ๆ โดยอาการของภาวะหลอดเลือดแดงแข็งมีอาการทางคลินิกที่มีความคล้ายกับอาการของภาวะความดันโลหิตสูง เนื่องจากมีการอุดตันของหลอดเลือดทำให้บริเวณที่เกิดการอุดตันขาดเลือดไปเลี้ยง เช่น ถ้าเกิดการอุดตันที่หลอดเลือดสมองจะมีอาการแสดงทางระบบประสาท หรือถ้ามีการอุดตันที่หลอดเลือดเลี้ยงหัวใจก็จะมีอาการเจ็บหน้าอก หรืออาจมีอาการปวดท้องเนื่องจากการอุดตันของหลอดเลือดที่ขา เป็นต้น หากมีความรุนแรงของโรคมักก็จะทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อและอวัยวะนั้น ๆ

กลไกการเกิดพยาธิสภาพของภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (รูปที่ 13) เกี่ยวข้องกับหลายสาเหตุและปัจจัย เช่น ภาวะไขมันในเลือดสูง (hyperlipidemia), ความดันโลหิตสูง (hypertension), การสูบบุหรี่, และการได้รับสารพิษ เป็นต้น โดยสาเหตุและปัจจัยดังกล่าวนำไปสู่การอักเสบของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง มีผลทำให้เกิดการสะสมและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นส่วนประกอบของผนังหลอดเลือด เช่น เซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด, สารเคลือบเซลล์ (extracellular matrix), ไขมัน (lipid), คอเลสเตอรอล (cholesterol), แคลเซียม (calcium) และสารอื่น ๆ ที่พบในเลือด โดยการสะสมของสารดังกล่าวเป็นเหตุให้เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดทำงานผิดปกติ (endothelial dysfunction) ส่งผลให้มีการผลิตสารที่มีทำให้หลอดเลือดขยายตัวลดลง มีผลทำให้ไขมันที่อยู่ในกระแสเลือดชนิดหนึ่งที่เรียกว่า low density lipoprotein (LDL) เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจน ทำให้ LDL เปลี่ยนรูปไปเป็น oxidized LDL (oxLDL) เป็นเหตุให้ผนังหลอดเลือดถูกทำลายและมีการอักเสบที่รุนแรงมากขึ้น โดยการอักเสบดังกล่าวจะมีผลไปกระตุ้นให้เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดและเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดสร้างและหลั่งสารที่เรียกว่า “ไซโตไคน์” (cytokine) ไปกระตุ้นการทำงานของ monocyte chemotactic protein -1(MCP-1) และ macrophage colony-stimulating factor (MCSF) ส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ (monocyte) ซึ่งเป็นเม็ดเลือดขาวที่มีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบในระบบไหลเวียนโลหิต และแมคโครฟาจ (macrophage) ที่อยู่ในเนื้อเยื่อมายังบริเวณที่มีการอักเสบ เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นจะเกิด

การเพิ่มจำนวนมากขึ้น และเปลี่ยนแปลงเป็นแมโครฟาจเพื่อจับกินไขมันที่สะสมอยู่ในผนังหลอดเลือดด้วยกระบวนการที่เรียกว่า “ฟาโกไซโทซิส (phagocytosis)” ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งของร่างกายที่พยายามกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่อยู่ในชั้นผนังของหลอดเลือดให้หมดไป แต่เม็ดเลือดขาวเหล่านั้นก็ไม่สามารถทำลายไขมันที่สะสมอยู่เป็นจำนวนมากได้ โดยเมื่อแมโครฟาจจะจับกิน oxidized LDL ทำให้มีการสะสมของไขมันที่ถูกจับกินในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของแมโครฟาจ เรียกว่า “macrophage foam cell” และเมื่อมีการรวมกันของเซลล์ดังกล่าวเป็นจำนวนมากจะทำให้มองเห็นเป็นแถบสีเหลืองที่หนาตัวขึ้นที่ผนังชั้นในของหลอดเลือด เรียกว่า “fatty streaks” (Balligand, 2002; Berliner et al., 1995; Libby, 2002; Ross, 1993)

ในขณะเดียวกันเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดก็มีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างและหลั่งสารที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะที่บริเวณผิวเซลล์ เพื่อเหนี่ยวนำให้เม็ดเลือดขาวจากระบบไหลเวียนโลหิตให้มายังบริเวณที่มีการอักเสบ และแทรกตัวเข้าไปในผนังหลอดเลือด ทำให้เกิดการอักเสบเพิ่มมากขึ้นในผนังหลอดเลือด (Liscum and Munn, 1999) ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด เซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดและเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ อีกทั้งยังเกิดการแบ่งตัวและการเจริญเติบโต (proliferation) ของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดและเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดเพิ่มขึ้น ทำให้มีการเคลื่อนตัวของเซลล์ดังกล่าวเข้าสู่ผนังชั้นใน (intima) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงด้านโครงสร้างของผนังหลอดเลือดโดยมีการหนาตัวและนูนขึ้น เรียกว่า “fibrous cap” และพัฒนาต่อไปเป็น “atherosclerosis plaque” ที่มีขนาดใหญ่ได้ (Schwartz, 1997) ทั้งนี้การเพิ่มขนาดขึ้นของ plaque จะทำให้เกิดการรบกวนระบบการไหลเวียนโลหิต ส่งผลให้เลือดไปเลี้ยงอวัยวะต่าง ๆ ได้น้อยลง อีกทั้งการหนาตัวของ plaque ที่มากขึ้นเรื่อย ๆ นี้ ร่วมกับแรงดันที่เกิดจากการไหลเวียนโลหิตจะส่งผลให้ plaque เกิดการแตก และทำให้มีการเข้ามาเกาะของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) จึงเพิ่มการสะสมของลิ่มเลือดที่แข็งตัว (thrombus) ซึ่งมีความเสี่ยงที่จะหลุดเข้าสู่กระแสเลือดไปอุดตันหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกายทำให้เกิดอันตรายมากขึ้นตามความรุนแรงอาจถึงขั้นเสียชีวิตได้



รูปที่ 13: แสดงกลไกการเกิดพยาธิสภาพของภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) โดยเริ่มจาก (1) มีการสะสม low density lipoprotein (LDL) จำนวนมากในชั้น intima (ชั้นใน)

เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้ LDL เปลี่ยนรูปไปเป็น oxLDL ทำให้หลอดเลือดได้รับความเสียหาย (2) การอักเสบทำให้ local cytokine หลังเพิ่มขึ้นไปกระตุ้นการทำงานของ MCP-1 และ MCSF ทำให้ monocyte และ macrophage มายังบริเวณที่มีการอักเสบ (3) monocyte ที่เข้าสู่ผนังหลอดเลือดแดงเพิ่มจำนวนขึ้น และเปลี่ยนแปลงเป็น macrophage เพื่อจับกินไขมันที่สะสมอยู่ในผนังหลอดเลือดด้วย phagocytosis (4) การสะสมของไขมันที่ถูกจับกินใน cytoplasm ของ macrophage เรียกว่า “macrophage foam cell” (5) เกิดการรวมกันของ foam cell จำนวนมากทำให้มองเห็นเป็นแถบสีเหลืองที่ผนังหลอดเลือด (6) เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดและเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดเกิด proliferation และมีการเคลื่อนที่ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากชั้น media เข้าสู่ชั้น intima อีกทั้งยังมีการตายของเซลล์เกิดขึ้น ทำให้เกิดรอยโรคบริเวณผนังหลอดเลือด เรียกว่า “atherosclerotic plaque” (7) Plaque ที่มีการหนาตัวขึ้นแล้วแตก เกิดการสะสมของลิ่มเลือดที่แข็งตัว (thrombus) หลุดเข้าสู่กระแสเลือดไปอุดตันหลอดเลือด

หมายเหตุ: LDL = low density lipoprotein, oxLDL = oxidized LDL, MCP-1= monocyte chemotactic protein -1, MCSF = macrophage colony-stimulating factor

(ที่มา: คัดแปลงจาก Gordon and Libby, 2003; Park and Oh, 2019)

3.3 บทบาทสำคัญในการสร้างและหลังไนตริกออกไซด์ต่อการป้องกันการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง

1) การทำให้หลอดเลือดมีการขยายตัว (vasodilator effects) เมื่อมีการสร้างไนตริกออกไซด์ขึ้นที่เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดก็จะเกิดการแพร่ไปยังเซลล์กล้ามเนื้อเรียบซึ่งเป็นเซลล์ส่วนใหญ่ที่อยู่บริเวณชั้นกลางของผนังหลอดเลือด ทำให้มีการเพิ่มปริมาณของ cGMP และเกิดการกระตุ้นสารอื่น ๆ ที่พบในเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด ส่งผลให้หลอดเลือดขยายตัวและอยู่ในสภาวะสมดุล (Cahill and Redmond, 2016; Deanfield et al., 2007; Gkaliagkousi and Ferro et al., 2011)

2) การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (antiproliferative effects) เมื่อเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดมีความผิดปกติ (endothelial dysfunction) ทำให้มีการสร้างไนตริกออกไซด์ลดลง จะส่งผลให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดที่อยู่ในสภาวะปกติ (quiescent state) กลายเป็นสภาวะที่ถูกกระตุ้น (synthetic state) ทำให้มีการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์ (smooth muscle cells proliferation and migration) จากผนังหลอดเลือดชั้นกลางไปยังผนังหลอดเลือดชั้นในสุด ส่งผลให้เกิดการหนาตัวขึ้นของผนังหลอดเลือดและปิดกั้นทางเดินเลือด ผนังหลอดเลือดแข็งตัวขึ้น ความยืดหยุ่นน้อยลง และยังส่งผลให้เซลล์ในผนังหลอดเลือดเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) อีกด้วย (Heller et al., 1999; Schwartz et al., 1997;)

3) การยับยั้งการเกาะของเม็ดเลือดขาวบนเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด (anti-adhesive effects) ในสภาวะปกติที่มีการสร้างและหลั่งสารไนตริกออกไซด์จะทำให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะของเม็ดเลือดขาวที่บริเวณผิวเซลล์ เช่น vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) และ intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) โดยจะยับยั้งการทำงานของ nuclear factor-kappa B (NF- κ B) มีผลทำให้มีการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวลดลง ส่งผลให้การอักเสบที่รุนแรงจากการคั่งของเม็ดเลือดขาวในผนังหลอดเลือด (leukocyte infiltration) และการเกิดเป็น plaque อุดกั้นทางเดินเลือด (De Caterina et al., 1995; Peng et al., 1995; Rubanyi, 1993)

4) การป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (anti-oxidative effects) ในสภาวะที่ร่างกายมีไขมันในเลือดสูง (hyperlipidemia) จะทำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ทำให้มีการสร้างสารประกอบที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) เกิดขึ้น เช่น ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และไฮดรอกซิลเรดิคัล (hydroxyl radical) โดยสารเหล่านี้จะทำให้ไขมันที่อยู่ใน

ระบบไหลเวียนเลือดเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ถือเป็นสารที่ทำให้เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดเกิดการบาดเจ็บ (cell injury) ซึ่งถ้ามีการสร้างและหลั่งไนตริกออกไซด์ในปริมาณที่มากพอก็จะสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาข้างต้นได้ (Ray et al., 2012; Wink et al., 2001)

4. ภาวะเมแทบอลิกซินโดรม (Metabolic syndrome)

ภาวะเมแทบอลิก (metabolic syndrome) หรือที่เรียกว่า “ภาวะอ้วนลงพุง” หมายถึงกลุ่มอาการที่เกิดจากความผิดปกติของระบบเผาผลาญในร่างกาย (metabolism) เกิดความไม่สมดุลในการกินอาหาร การใช้พลังงานของร่างกาย และการเผาผลาญสารอาหารที่ผิดปกติ ทำให้เกิดมีการสะสมของน้ำตาล และไขมันในเลือด และที่อวัยวะต่างๆ ในร่างกายมากเกินไป โดยเฉพาะการมีไขมันสะสมบริเวณหน้าท้อง และภายในช่องท้อง (visceral fat) ทำให้เกิดการอ้วนลงพุง เกิดภาวะคืออินซูลิน มีการอุดตันของคราบไขมันในหลอดเลือดแดง และความดันโลหิตสูง (Alberti et al., 2009; Alshehri, 2010; Rochlani et al., 2017; Swarup et al., 2020)

4.1 พยาธิสภาพของการเกิดภาวะเมแทบอลิกซินโดรม

4.1.1 การสะสมไขมันในช่องท้อง (abdominal visceral fat) เมื่อร่างกายได้รับสารอาหารมากเกินไปความต้องการในการใช้งานพลังงาน จะทำให้เกิดการสะสมเป็นไขมันอยู่ภายในช่องท้อง (visceral fat) ไปสะสมอยู่ที่เยื่อช่องท้อง ตับ ผนังลำไส้ หัวใจ และอวัยวะอื่นๆ เมื่อเกิดการสะสมเป็นเวลานานส่งผลให้เซลล์เนื้อเยื่อไขมันมีขนาดโตขึ้นเรื่อยๆ โดยเนื้อเยื่อไขมันที่สะสมอยู่ในร่างกายจะทำหน้าที่เสมือนต่อมไร้ท่อ ซึ่งจะสร้าง และหลั่งสารชีวเคมีต่าง ๆ ออกสู่กระแสเลือด เช่น resistin, leptin, TNF-alpha, interleukin-6 เป็นต้น สารชีวเคมีเหล่านี้มีผลทำให้การทำหน้าที่ของอินซูลินลดน้อยลง และทำให้มีกระบวนการที่คล้ายกับการอักเสบเกิดขึ้นเพื่อเป็นการควบคุมการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อไขมัน นอกจากนี้เนื้อเยื่อไขมันยังมีการสลายตัวเป็นกรดไขมันออกมาในกระแสเลือดส่งผลให้ร่างกายเกิดภาวะคืออินซูลิน (insulin resistance) เพิ่มมากขึ้น (Unamuno et al.; 2018; Zagotta et al., 2015;)

4.1.2 ภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) เมื่อร่างกายมีระดับน้ำตาลในเลือดสูง อินซูลิน (insulin) จะทำหน้าที่ในการนำกลูโคส (glucose) เข้าสู่เซลล์ เพื่อเผาผลาญกลูโคสให้เป็นพลังงาน หรือสะสมไว้ในรูปของไกลโคเจน (glycogen) ที่เซลล์กล้ามเนื้อและตับ แต่ในกรณีที่ร่างกายได้รับกลูโคสและกรดไขมันมากเกินไปความต้องการของร่างกายจะทำให้มีการส่ง

สัญญาณให้อินซูลินทำหน้าที่ในการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ ลดลง และส่งผลให้ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ในเซลล์ต่าง ๆ ที่ทำหน้าที่ในการเผาผลาญสารอาหารให้เป็นพลังงานทำงานหนักขึ้น เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) และเกิดอนุมูลอิสระ (free radicals) ออกมา ซึ่งมีผลในการทำลายเบต้าเซลล์ (Beta Cell) ในตับอ่อน ที่ทำหน้าที่ผลิตอินซูลินฮอร์โมน (Insulin hormone). เมื่อเบต้าเซลล์ถูกทำลายการผลิตอินซูลินจึงลดน้อยลงทำให้ร่างกายมีภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูง ส่งผลให้เกิดภาวะคืออินซูลิน (Keane et al., 2015; Lopes et al., 2008; Rolo & Palmeira, 2006)

4.1.3 การทำงานที่ผิดปกติของเยื่อหลอดเลือด (endothelial dysfunction) ในภาวะร่างกายมีระดับน้ำตาล ไขมัน สารชีวเคมี และอนุมูลอิสระต่างๆ ในเลือดสูง ทำให้เซลล์เยื่อหลอดเลือดมีกระบวนการอักเสบเกิดขึ้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของผนังหลอดเลือด ส่งผลให้หลอดเลือดแข็งตัว เกิดการหดเกร็ง ทำให้เกิดความดันโลหิตสูงได้ (Letra & Sena, 2017; Kwaifa et al., 2020)

4.1.4 การอุดตันของไขมันที่หลอดเลือดแดง (atherogenic plaque) เมื่อร่างกายมีภาวะกรดไขมันไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) และโคเลสเตอรอล (cholesterol) ในเลือดสูง ทำให้มีการสะสมของคราบไขมันที่เยื่อผนังหลอดเลือด (endothelium) ร่วมกับการทำงานที่ผิดปกติของเยื่อหลอดเลือด ส่งผลให้หลอดเลือดตีบแคบจากคราบไขมัน (plaque) หรือเกิดการอุดตัน ทำให้มีอาการแสดงของภาวะหลอดเลือดอุดตัน โดยจะขึ้นอยู่กับบริเวณที่มีการอุดตัน หากเกิดการอุดตันที่หลอดเลือดสมองจะมีอาการของโรคหลอดเลือดสมอง (cerebrovascular disease) (Kwaifa et al., 2020; Letra & Sena, 2017; Park and Oh, 2019)

4.2 เกณฑ์การวินิจฉัยภาวะเมตาบอลิกซินโดรม

แนวทางในการวินิจฉัยตามเกณฑ์ของโครงการให้ความรู้เกี่ยวกับคอเลสเตอรอลของประเทศสหรัฐอเมริกา (National Cholesterol Education Program: NCEP) และสมาคมโรคเบาหวานนานาชาติ (International Diabetes Federation: IDF) โดยใช้เป็นเกณฑ์ประเมินทางคลินิก (NCEP, 2001; IDF, 2006) ดังนี้ 1. เส้นรอบเอว (waist circumference) 2. ระดับน้ำตาลในเลือดหลังอดรับประทานอาหาร (fasting plasma glucose; FBS) 3. ระดับไขมันไตรกลีเซอไรด์ในเลือด (triglyceride) 4. ระดับเอชดีแอลโคเลสเตอรอลในเลือด (high-density lipoprotein-cholesterol; HDL) และ 5. ความดันโลหิต (blood pressure) โดยผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น

ภาวะเมตาบอลิก-ซินโดรมจะต้องมีอาการแสดงที่ผิดปกติจากเกณฑ์ที่กำหนดอย่างน้อย 3 ข้อ จาก 5 ข้อ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงเกณฑ์การวินิจฉัยภาวะเมตาบอลิกซินโดรม

ลักษณะ/อาการ	เกณฑ์การวินิจฉัยของ NCEP
1. เส้นรอบเอว (waist circumference)	ชาย ≥ 36 นิ้ว (90 เซนติเมตร)* หญิง ≥ 32 นิ้ว (80 เซนติเมตร)* ชาย ≥ 40 นิ้ว (102 เซนติเมตร) หญิง ≥ 35 นิ้ว (88 เซนติเมตร)
2. ระดับน้ำตาลในเลือด (fasting blood sugar, FBS)	≥ 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร หรือได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเบาหวาน
3. ระดับไขมันไตรกลีเซอไรด์ในเลือด (triglyceride)	≥ 150 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร
4. ระดับเอชดีแอลโคเลสเตอรอลในเลือด (HDL-C)	ชาย < 40 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร หญิง < 50 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร
5. ความดันโลหิต (blood pressure)	$\geq 130/85$ มิลลิเมตรปรอท หรือได้รับการรักษาภาวะความดันโลหิตสูง

* ใช้สำหรับคนเอเชีย

4.3 ผลกระทบของภาวะเมตาบอลิกซินโดรมต่อสุขภาพ

ภาวะเมตาบอลิกซินโดรม ส่งผลกระทบต่อสุขภาพ โดยเพิ่มโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคเรื้อรังต่าง ๆ ได้แก่ โรคเบาหวาน โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคหลอดเลือดสมอง เป็นต้น (Alberti et al., 2009)

4.3.1 โรคเบาหวาน (Diabetes mellitus): ผู้ที่มีภาวะเมตาบอลิกซินโดรมทั้งผู้ชายและผู้หญิงมีแนวโน้มในการเป็นโรคเบาหวานมากกว่าคนทั่วไป จากการศึกษา พบว่า 35 เปอร์เซ็นต์ของผู้ที่มีภาวะเมตาบอลิกซินโดรมจะเป็นโรคเบาหวาน (ประเทศเกาหลี) โดยมีปัจจัยเสี่ยงร่วมกันคือ ภาวะอ้วน นอกจากนี้ในผู้ที่มีภาวะอ้วน และมีระดับน้ำตาลในเลือดสูง ร่วมกับการมีภาวะเมตาบอลิกซินโดรมจะมีโอกาสเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้สูงกว่าในผู้ที่ไม่มีความเสี่ยงภาวะเมตาบอลิก-ซินโดรมและมีน้ำหนักตัว และระดับน้ำตาลในเลือดอยู่ในเกณฑ์ปกติ (DeFina et al., 2012; Huang et al., 2011)

4.3.2 โรคหลอดเลือดหัวใจ (Coronary artery disease): ผู้ที่มีภาวะเมตาบอลิกซินโดรมมีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจมากกว่าคนทั่วไป เนื่องมาจากการมีภาวะความดันโลหิตสูง ภาวะระดับน้ำตาลในเลือดและไขมันในเลือดสูง โดยในผู้หญิงที่มีภาวะเมตาบอลิกซินโดรมมีอัตราการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจสูงกว่าผู้ชาย และพบว่า 72.9 เปอร์เซ็นต์ของผู้ที่มีภาวะเมตาบอลิกซินโดรมเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ และ 23.7 เปอร์เซ็นต์ของผู้ที่มีภาวะเมตาบอลิกซินโดรมเป็นโรคความดันโลหิตสูง (Grundy, 2012; Lim et al., 2011; Qiao et al., 2007)

4.3.3 โรคหลอดเลือดสมอง (Cerebrovascular disease): ผู้ที่มีภาวะเมตาบอลิกซินโดรมมีแนวโน้มต่อการเป็นโรคหลอดเลือดสมองมากกว่าผู้ที่ไม่มีความผิดปกติ 1.59 เท่า โดยผู้หญิงที่มีภาวะเมตาบอลิกซินโดรมมีโอกาสเสี่ยงในการเกิดโรคหลอดเลือดสมองสูงกว่าผู้ชายที่มีภาวะเมตาบอลิกซินโดรม (Rodriguez- Colon et al., 2009)

4.4 ปัจจัยเสี่ยงที่ก่อให้เกิดภาวะเมตาบอลิกซินโดรม

ปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับภาวะเมตาบอลิกซินโดรม ได้แก่ อายุ พันธุกรรม ภาวะน้ำหนักเกินหรืออ้วน พฤติกรรมการกินอาหาร การขาดการออกกำลังกาย

4.4.1 อายุ: จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ในกลุ่มผู้ใหญ่และกลุ่มผู้สูงอายุเป็นผู้ที่มีภาวะเมตาบอลิกซินโดรมมากกว่าในกลุ่มวัยรุ่น โดยในกลุ่มผู้สูงอายุที่มีอายุมากกว่า 66 ปี เป็นผู้ที่มีภาวะเมตาบอลิกซินโดรม 40.8 เปอร์เซ็นต์ และในผู้ที่มีอายุตั้งแต่ 40 ปีขึ้นไป คิดเป็น 24.8 ส่วนในกลุ่มวัยรุ่นพบว่ามีความผิดปกติเพียงร้อยละ 3-9 เท่านั้น (Lim et al., 2013; Morrell et al., 2012)

4.4.2 พันธุกรรม: จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า พันธุกรรม มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะเมตาบอลิกซินโดรม โดยจะมียีนส์ที่กำหนดรูปร่าง และโครงสร้างของร่างกาย การทำหน้าที่ของฮอร์โมนที่ควบคุมกระบวนการเผาผลาญสารอาหาร และการใช้พลังงานของร่างกาย รวมทั้งการควบคุมระดับน้ำตาล และไขมันในเลือด เช่น ยีนส์ LPL (lipoprotein lipase) และยีนส์ ApoE (apolipoprotein E) ซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมระดับไขมันในเลือดและยีนส์ MTHFR C677T ที่มีความเกี่ยวข้องต่อการเกิดภาวะคืออินซูลิน (Chen et al., 2010; Taylor et al., 2013) อีกทั้งอนุมูลอิสระที่เกิดจากการเผาผลาญสารอาหารมีผลทำลายดีเอ็นเอภายในเซลล์ของตับ ตับอ่อน และเยื่อผนังหลอดเลือด ซึ่งมีผลต่อการสร้างและหลั่งฮอร์โมนอินซูลินและไลเปส ที่ทำหน้าที่ควบคุมความสมดุลของน้ำตาลและไขมันชนิดต่างๆ ในร่างกาย (Bermudez et al., 2013) นอกจากนี้ยังพบว่า

ผู้ที่มีประวัติของคนในครอบครัวเป็นโรคเบาหวาน โรคหัวใจ และโรคหลอดเลือดสมอง มีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดภาวะเมตาบอลิกซินโดรมมากกว่าผู้ที่ไม่ประวัติบุคคลในครอบครัว โดยคิดเป็น 2.45 เท่าในผู้ที่มีประวัติของคนในครอบครัวเป็นโรคเบาหวาน 1.52 เท่าในผู้ที่มีประวัติของคนในครอบครัวเป็นโรคความดันโลหิตสูง, 8.74 เท่า ในผู้ที่มีประวัติของคนในครอบครัวเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ และ 4.83 เท่าในผู้ที่มีประวัติของคนในครอบครัวเป็นโรคหลอดเลือดสมอง (Steinberg et al.,2014)

4.4.3 ภาวะอ้วนหรือมีน้ำหนักเกิน: โดยการสะสมของเนื้อเยื่อไขมันบริเวณต่าง ๆ ในร่างกาย โดยเฉพาะที่บริเวณช่องท้องในผู้ที่มีภาวะอ้วน เป็นปัจจัยเสี่ยงที่ก่อให้เกิดภาวะเมตาบอลิกซินโดรมได้ โดยน้ำหนักตัวที่เพิ่มมากขึ้นมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือด และภาวะความดันโลหิตสูง และพบว่าผู้ที่มีดัชนีมวลกายมากกว่า 30 กิโลกรัมต่อเมตร² มีภาวะเมตาบอลิกซินโดรมถึงร้อยละ 41.4 (Abete et al., 2010; Yang et al., 2012)

3.4.4 พฤติกรรมการกินอาหาร: ผู้ที่มีพฤติกรรมการกินอาหารที่ไม่เหมาะสม ซึ่งชอบกินอาหารที่มีไขมัน และโคเลสเตอรอลสูง จะทำให้มีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะเมตาบอลิกซินโดรม โดยทำให้มีการสะสมของเนื้อเยื่อไขมันที่ช่องท้องและบริเวณใต้ผิวหนังมากขึ้น และมีระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงขึ้นเกินค่าปกติ นอกจากนี้การดื่มแอลกอฮอล์และน้ำอัดลมเป็นประจำ การกินอาหารสำเร็จรูปจากโรงงาน (processed foods) ที่มีน้ำตาลฟรุกโตสจากข้าวโพด (high-fructose corn syrup) ไขมันทรานส์ (trans fat) และเนยเทียม (margarine) เป็นส่วนประกอบ ทำให้เพิ่มโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดภาวะคือต่ออินซูลิน โรคเบาหวาน และเกิดภาวะเมตาบอลิกซินโดรม (Feliciano et al., 2014; Nettleton et al., 2009; Padwal & Sharma., 2010)

3.4.5 การขาดออกกำลังกาย: ผู้ที่ขาดออกกำลังกายจะทำให้มีโอกาเสี่ยงต่อการเกิดภาวะเมตาบอลิกซินโดรมได้มากกว่าผู้ที่ออกกำลังกายเป็นประจำ โดยพบว่าผู้ที่ใช้เวลาส่วนใหญ่ในการนั่งพัก ทำงานเบา ๆ และไม่ได้ออกกำลังกายมีแนวโน้มที่จะการเกิดภาวะเมตาบอลิกได้มากกว่าผู้ที่มีการเคลื่อนไหวร่างกาย ทำงานแบบใช้กำลัง และออกกำลังกายเป็นประจำ คิดเป็นร้อยละ 73 โดยจำนวนเวลาของการนั่งมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของเส้นรอบเอวในผู้ที่มีภาวะอ้วน และภาวะคืออินซูลิน (Bankoski et al., 2011; Longo-Mbenza et al., 2011; Myers et al., 2019)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ของตำรับยาสารสกัดจากเหง้ากระชายดำ
ด้วยไดคลอโรมีเทน (*Kaempferia parviflora* rhizome-dichloromethane extract)
2. เพื่อศึกษาผลของการบ้อนตำรับยาสารสกัดจากเหง้ากระชายดำด้วย
ไดคลอโรมีเทนในหนูแรทวัยกลางชีวิตเป็นเวลานาน 6 สัปดาห์ต่อ
 - การกินอาหาร น้ำหนักตัว น้ำหนักอวัยวะภายใน และน้ำหนักไขมันที่
อวัยวะภายในและไขมันบริเวณใต้ผิวหนัง
 - ระดับน้ำตาล และไขมันในเลือด (Glucose, Triglyceride, Cholesterol,
LDL และ HDL)
 - ความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (Complete blood count: CBC) และการ
ทำงานของตับและไต (Serum glutamic-oxaloacetic transaminase (SGOT),
Serum glutamate-pyruvate transaminase (SGPT), Alkaline phosphatase (ALP),
Blood urea nitrogen และ Creatinine)
 - ระดับความดันในเลือดเฉลี่ย (Basal mean arterial blood pressure) และ
อัตราการเต้นของหัวใจพื้นฐาน (heart rate)
 - การเปลี่ยนแปลงการทำงานของหลอดเลือดที่ตัดแยกออกมาศึกษาออก
ตัว (Vascular functions)
3. เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการคลายตัวของหลอดเลือด
(Expression of endothelium nitric oxide synthase (eNOS) and cystathionine- γ -lyase (CSE))

บทที่ 2

วิธีการดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. สัตว์ทดลอง

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ใช้หนูแรทสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ อายุ 7-8 สัปดาห์ น้ำหนักตัวประมาณ 300-350 กรัม สำหรับการทดลองทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ ส่วนการทดลองเพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จะใช้หนูแรทสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ อายุ 12 -14 เดือน น้ำหนักตัวประมาณ 550 - 700 กรัม โดยซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล (สาขายา) จังหวัดนครปฐม

2. สมุนไพร (กระชายดำ)

ใช้เหง้ากระชายดำสด อายุประมาณ 8-12 เดือน ซึ่งข้างในจะต้องเป็นสีม่วงเข้มหรือดำ โดยจัดซื้อจากอำเภอภูเรือ จังหวัดเลย จำนวน 100 กิโลกรัม

3. อุปกรณ์สำหรับการเตรียมสารสกัดกระชายดำ และตำรับยา

- เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุน (Rotary Evaporators)
- เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Dryer)
- เครื่องบดแห้งไฟฟ้า
- แท่งคนสาร (Stirring rod)
- โถแก้วดูดความชื้น (Desiccator) และ ปั๊มสุญญากาศ (Vacuum Pump)
- ขวดรูปชมพู่ขนาดต่าง ๆ
- จานแก้ว (Glass Petri dish)
- บีกเกอร์แก้วขนาดต่าง ๆ (Beaker)
- ผ้าขาวบาง
- พาราฟิล์ม (Parafilm)

- อลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminium foil)

4. อุปกรณ์สำหรับการทดลองทางด้านเภสัชจลนศาสตร์

- Autonomic pipettes
- Insert vial ขนาด 200 μ l
- Symmetry[®] C₁₈ columns (5 μ m, 3.9 x150 mm)
- Vial ขนาด 1.5 ml
- เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)
HP1100 system (Agilent Technologies)
- โกร่งบดสารเซรามิก พร้อมสาก
- ก๊าซไนโตรเจน (Nitrogen gases)
- หลอดทดลองขนาด 10 ml (Glass tubes)

5. อุปกรณ์สำหรับการทดลองทางด้านการทำงานของหลอดเลือด

- ก๊าซคาร์บอนเจน (Carbogen gases) เป็นก๊าซผสมระหว่าง 95% O₂ + 5% CO₂
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermostat heater circulator), Model D1, HAAK
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด Model AE200, Metter
 - เครื่องบันทึกตารางกราฟ (polygraph), Model 7 DAG พร้อมอุปกรณ์ประกอบด้วย tachographpreamplifier, Model 7P44B, force tranKucer, Model FT03 และ pressure tranKucer, Model Statham P2, Grass
- ชุด Isolated organ bath สำหรับใส่หลอดเลือด thoracic aorta
 - ชุดเครื่องมือสำหรับผ่าตัดสัตว์ทดลอง
 - อุปกรณ์เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น จานแก้ว ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์

6. อุปกรณ์สำหรับการตัดชิ้นเนื้อและย้อมสีของเนื้อเยื่อ

- กระดาษชำระ
- เครื่องตัดชิ้นเนื้อแบบทำความเย็น (Cryostat Microtome)
- โถแก้วสำหรับย้อมสี (Staining Jar)
- ใบมีดผ่าตัดพร้อมด้าม และใบมีดสำหรับตัดชิ้นเนื้อ
- แผ่นสไลด์ (Glass slide) พร้อมแผ่นปิด (Cover glass)

- หลอดหยดสาร (Dropper)

7. อุปกรณ์สำหรับการทำ Western blot

- 96 well plate
- Autonomic pipettes , Model 5000, Nichiryo
- Nitrocellulose membrane
- Transfer tank
- เครื่อง Centrifuge แบบควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่อง Ultrasonic probe sonicator
- เครื่องเขย่าสารแบบสั้น (Vortex Mixer)
- เครื่องเขย่าสารแบบหมุนวงกลม (Orbital shaker)
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด Model AE200, Metter
- ชุดอุปกรณ์สำหรับเตรียมเจลส่วน Stacking และ Separation
- ชุดอุปกรณ์สำหรับทำ Western blot

ยาและสารเคมี

1. สารเคมีสำหรับการเตรียมสารสกัดและตำรับยา

- Dichloromethane (CH_2Cl_2) RCI Labscan, สหรัฐอเมริกา
- Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) RCI Labscan, สหรัฐอเมริกา
- Kollicoat[®] IR BASF SE, เยอรมนี

2. ยาและสารเคมีสำหรับการทดลองด้านเภสัชจนศาสตร์

- Acetonitrile (CH_3CN) RCI Labscan, สหรัฐอเมริกา
- Deionized water
- Dichloromethane (CH_2Cl_2) RCI Labscan, สหรัฐอเมริกา
- Heparin Leo, เดนมาร์ก
- Methanol (CH_3OH) RCI Labscan, สหรัฐอเมริกา
- Trifluoroacetic acid Sigma, สหรัฐอเมริกา

3. ยาและสารเคมีสำหรับการทดลองด้านการทำงานของหลอดเลือด

- Acetylcholine (Ach) Mycomed, ประเทศเคนมาร์ก
- Ascorbic acid Sigma, สหรัฐอเมริกา
- DL-popargylglycine (PAG) Sigma, สหรัฐอเมริกา
- Glyceryl trinitrate (GTN) Mycomed, เคนมาร์ก
- Heparin Leo, เคนมาร์ก
- KCl Merck, เยอรมนี
- KH_2PO_4 Sigma, สหรัฐอเมริกา
- NaCl Merck, เยอรมนี
- Nembutal sodium Abbott Laboratories, สหรัฐอเมริกา
- *N*^G-nitro-L-arginine (L-NA) Sigma, สหรัฐอเมริกา
- Phenylephrine (Phe) Sigma, สหรัฐอเมริกา
- น้ำกลั่น (Distilled water)
- สารละลาย Kreb's Heinsleit solution

4. สารเคมีสำหรับการตัดเนื้อเยื่อและข้อมไขมันของเซลล์ตับ

- Dimethyl sulfoxide (DMSO) Merck, เยอรมนี
- Gelatin Sigma, สหรัฐอเมริกา
- Glycerin jelly Sigma, สหรัฐอเมริกา
- OCT compound Leica, สหรัฐอเมริกา
- Oil red O Sigma, สหรัฐอเมริกา
- Propylene glycol Sigma, สหรัฐอเมริกา
- น้ำกลั่น (Distilled water)

5. สารเคมีสำหรับทำ Western blot

- 40% Acrylamide/Bis solution Bio-Rad, แคลิฟอร์เนีย
- Actin antibody Cell-signaling, อังกฤษ
- Anti-mouse IgG,
HRP - linked antibody Cell-signaling, อังกฤษ

- Anti-rabbit IgG, Cell-signaling, อังกฤษ
HRP - linked antibody
- Bovine serum albumin powder (BSA) Sigma, สหรัฐอเมริกา
- Bradford's reagent Bio-Rad, แคลิฟอร์เนีย
- EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$) Fisher Chemical, สหรัฐอเมริกา
- Glycerol ($C_3H_8O_3$) Amresco, สหรัฐอเมริกา
- Glycine Amresco, สหรัฐอเมริกา
- Hydrochloric acid (HCl) RCI Labscan, สหรัฐอเมริกา
- Low-fat dry milk Fontera Brands, นิวซีแลนด์
- Methanol (CH_3OH) JT. Beaker, สหรัฐอเมริกา
- Mouse monoclonal cystathionine Cell-signaling, อังกฤษ
gamma-lyase antibody
- Ponceau S ($C_{22}H_{16}N_4O_{13}S_4$) Sigma, สหรัฐอเมริกา
- Rabbit monoclonal eNOS antibody Cell-signaling, อังกฤษ
- RIPA buffer Pierce, สหรัฐอเมริกา
- Sodium chloride (NaCl) EMURE, สหรัฐอเมริกา
- Sodium dodecyl sulfate (KS) Amresco, สหรัฐอเมริกา
- Spectra Multicolor Broad Range Thermo, สหรัฐอเมริกา
Protein Ladder
- SuperSignal West Dura Pierce, สหรัฐอเมริกา
chemiluminescence Substrate
- Supersignal West Femto Pierce, สหรัฐอเมริกา
chemiluminescence Substrate
- Tetramethylethylenediamine Bio-Rad, แคลิฟอร์เนีย
- Tris base ($C_4H_{11}NO_3$) Amresco, สหรัฐอเมริกา
- Tris-HCl ($NH_2C(CH_2OH)_3HCl$) JT Beaker, สหรัฐอเมริกา
- น้ำกลั่น (Distilled water)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัด และตำรับยาสารสกัดจากเหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทน

1.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากเหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทน

(*Kaempferia parviflora* rhizome-dichloromethane extract; KPD)

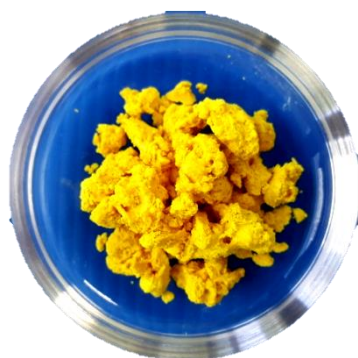
จัดซื้อเหง้ากระชายดำสด ที่มีอายุประมาณ 8-12 เดือน เมื่อผ่าดูข้างในจะต้องเป็นสีม่วงเข้มหรือดำ จากแหล่งปลูกที่อำเภอภูเรือ จังหวัดเลย ประมาณ 100 กิโลกรัม

ขั้นตอนที่ 1 : นำเหง้ากระชายดำมาล้างให้สะอาด คัดแยกสิ่งเจือปนออก และตัดส่วนของเหง้าที่เน่าทิ้ง แล้วตั้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน เพื่อให้ผิวของเหง้าแห้งจากน้ำที่ล้าง จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนัก (1 กิโลกรัม) หั่นเป็นแว่น ๆ จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดไฟฟ้า ล้างส่วนที่เป็นสีม่วงดำออกด้วยน้ำกรอง นำกากที่ได้ไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนประมาณ 24 ชั่วโมง ได้เป็นเหง้ากระชายดำอบแห้งมีสีม่วงน้ำตาลเข้ม จากนั้นนำกากที่ได้ไปสกัดด้วย 95% ethanol ที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 คืน เพื่อเป็นการกำจัดส่วนที่เป็นสีม่วงดำอีกครั้ง แล้วกรองส่วนที่เป็นของเหลวออกมา (สีน้ำตาลม่วง) สกัดซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำกากที่ได้ไปอบแห้งอีกครั้ง จะได้เป็นเหง้ากระชายดำอบแห้งที่มีสีน้ำตาลอ่อน (รูปที่ 14A)

ขั้นตอนที่ 2 : นำกากเหง้ากระชายดำที่ได้จากการสกัดในขั้นตอนแรกด้วย 95% ethanol ไปสกัดต่อด้วย 100% dichloromethane โดยใช้วิธีการเดียวกันกับการสกัดเหง้ากระชายดำด้วย ethanol แล้วกรองส่วนที่เป็นของเหลวออกมา (สีเหลือง) สกัดซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำของเหลวที่ได้ไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุน (Rotary Evaporators) แล้วนำสารสกัดที่ได้หลังจากการกลั่นไปกำจัด dichloromethane ที่อาจหลงเหลืออยู่อีกครั้งด้วย Vacuum pump นาน 24 ชั่วโมง (รูปที่ 14B) จะสารสกัดที่มีลักษณะข้นหนืด สีเหลือง และมีกลิ่นหอม เรียกสารสกัดที่ได้ว่า “*Kaempferia parviflora* rhizome-dichloromethane extract” หรือ KPD (รูปที่ 15)



รูปที่ 14: แสดงขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากเหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทน
ขั้นตอนที่ 1 (A) และขั้นตอนที่ 2 (B)



รูปที่ 15: แสดงสารสกัดจากเหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทน (*Kaempferia parviflora*
rhizome-dichloromethane extract: KPD)

1.2 การเตรียมตำรับสารสกัดจากเหง้ากระชายดำ

การเตรียมตำรับ Solid dispersion via solvent evaporation มีส่วนประกอบ ดังนี้

- 1) KPD 50%
- 2) Kollicoat[®] IR (PVA-co-PEG) 50%
- 3) 100% dichloromethane

นำสารสกัด KPD 1 กรัม ละลายด้วย 100% dichloromethane 5 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1: 5 (W: V)) รอให้สาร KPD ละลายจนหมด และนำสาร Kollicoat[®] IR มาละลายด้วย 100% dichloromethane ในอัตราส่วนเดียวกัน จากนั้นให้นำสารละลายทั้งสอง คือ สารละลาย KPD และ Kollicoat[®] IR มาผสมกันในอัตราส่วน 1: 1 แล้วคนให้สารทั้งสองผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเทสารที่ได้ใส่ลงในภาชนะปากกว้าง แล้วนำไปกำจัด dichloromethane ที่อุณหภูมิห้อง ด้วย Vacuum pump นาน 48 ชั่วโมง ได้เป็นสารแห้งสีเหลือง เรียกว่า “Kollicoat[®] IR - *Kaempferia parviflora* rhizome-dichloromethane extract”; K-KPD (รูปที่ 16)



รูปที่ 16: แสดงสีและลักษณะของตำรับยา Kollicoat[®] IR - *Kaempferia parviflora* rhizome dichloromethane extract (K-KPD)

2. การศึกษาทางด้านเภสัชจลศาสตร์ของตำรับ K-KPD

2.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้หนูแรทสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ อายุ 7-8 สัปดาห์ น้ำหนัก 300-350 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งนำมาเลี้ยงที่สถานสัตว์ทดลองภาคใต้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 22 ± 3 °C ความชื้น 40-70% โดยตั้งเวลาเปิด/ปิดไฟฟ้าแสงสว่าง/มืด เป็นเวลา 12/12 ชั่วโมง ให้อาหาร และน้ำตามต้องการ (*ad libitum*)

2.2 การเตรียมตำรับยา K-KPD สำหรับป้อนสัตว์ทดลอง

นำตำรับ K-KPD มาวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของสาร KPD ด้วยเทคนิค HPLC ตามวิธีการของ Yorsin et al. (2014) โดยเปรียบเทียบกับสารสกัด KPD ที่เป็นสารตั้งต้นในการผลิตตำรับยา เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณของยาที่จะใช้ป้อนให้มีขนาดความเข้มข้นของ KPD เท่ากับ 100 mg/kg ทำการทดลองโดยละลายสาร K-KPD ด้วย 100% methanol (HPLC grade) ให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml นิด 10 μ L เข้าเครื่อง HPLC รุ่น HP1100 system (Agilent Technologies), Symmetry[®] C₁₈ columns (5 μ m, 3.9 x150 mm), detect ด้วย UV- DAD (200-600 nm) และชะ column ด้วย gradient flow ของ methanol: water (10: 90→100: 0) ที่มี C₂H₂F₃O₂ 0.05% เป็นองค์ประกอบ โดยใช้อัตราการไหล 1 ml/min flow และวิเคราะห์หาปริมาณของสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของ KPD (PMF, DMF และ TMF) โดยคำนวณเปรียบเทียบกับปริมาณของสารสกัด KPD ที่ทราบความเข้มข้นอยู่ก่อนแล้วด้วยการฉีดสารเข้าสู่ HPLC ด้วยวิธีการเดียวกัน

2.3 Pharmacokinetics และ Tissue Distribution

ในการทดลองครั้งนี้สัตว์ทดลองจะถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย กลุ่มละ 6 ตัว โดยสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่มจะได้รับ K-KPD ขนาด 200 mg/kg ทางปาก ซึ่งมีความเข้มข้นของ KPD เท่ากับ 100 mg /kg (วิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของตำรับด้วยเทคนิค HPLC)

กลุ่มที่ 1 เก็บเลือดทาง carotid artery หลังจากป้อน K-KPD

ที่ 0, 30, 60 และ 90 นาที

กลุ่มที่ 2 เก็บเลือดทาง carotid artery หลังจากป้อน K-KPD

ที่ 120, 180 240 และ 360 นาที

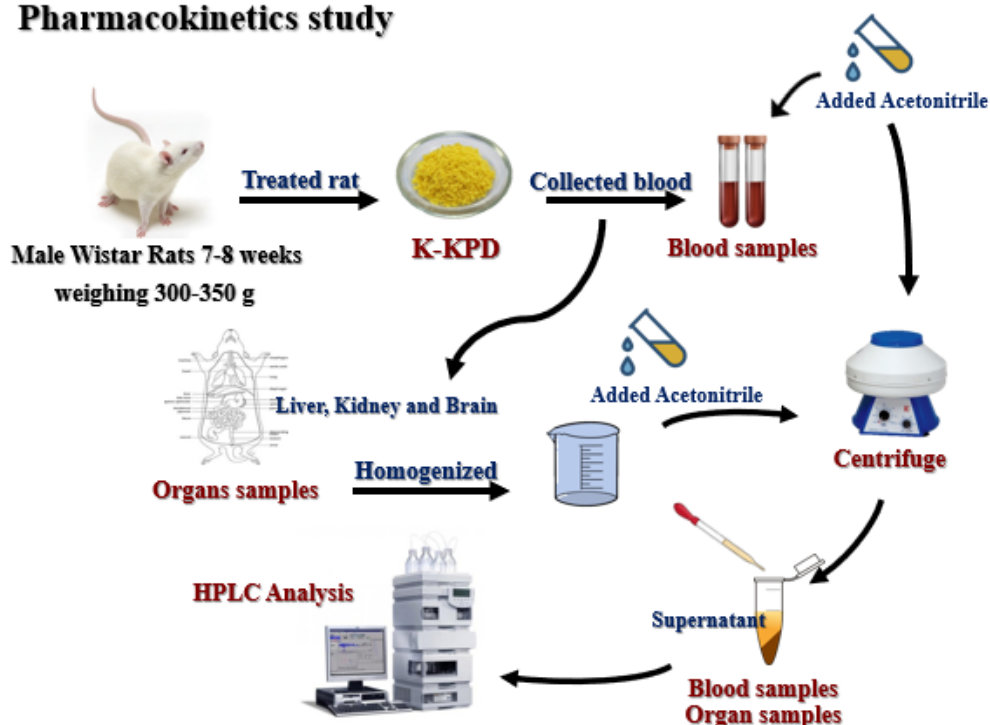
ทำการเก็บ blood samples ตามวิธีของ Yorsin et al. (2014) โดยหลังจากการป้อนสารจะสลบหนูแรทด้วย Nembutal (50 mg/kg, i.p) จากนั้น cannulate ท่อ polyethylene ที่มี Heparinized saline เข้าที่ carotid artery เก็บเลือดด้วย disposable syringe ขนาด 1 ml ที่เวลา 0, 30, 60 และ 90 นาที สำหรับกลุ่มที่ 1 และเก็บเลือด ที่เวลา 120, 180, 240 และ 360 นาทีสำหรับกลุ่มที่ 2

เลือดที่เก็บได้จะนำไปใส่ในหลอดที่ฉาบไว้ด้วย heparine (ยาต้านการแข็งตัวของเลือด) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงนาน 10 นาที ที่ความเร็วรอบ 4000 rpm จากนั้นเก็บเฉพาะส่วนที่เป็น plasma นำมาตกตะกอนโปรตีนด้วย 100% acetonitrile (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงแบบเดิมอีกครั้ง จากนั้นเก็บเอาส่วน acetonitrile ไปกำจัด acetonitrile ด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุน แล้ว

นำของเหลวที่ได้ไปทำ partition extraction ด้วย dichloromethane แล้วเก็บส่วนที่ละลายใน dichloromethane ไปกำจัด dichloromethane ออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุน นำสารแห้งที่ได้มาละลายใน 200 μ L methanol (HPLC grade) เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของสาร PMF, DMF และ TMF ด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีการและเทคนิคเดียวกันกับที่วิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของสาร KPD ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น (Yorsin et al., 2014)

จากนั้นทำการตัดคอหนูแรทด้วย guillotine กำจัดเลือดออกให้ได้มากที่สุด และทำการผ่าตัดซากหนูแรท เก็บอวัยวะภายในที่สำคัญ ได้แก่ ตับ ไต และสมอง เพื่อศึกษาการสะสมของสาร KPD ที่อวัยวะเหล่านั้นหลังจากการป้อนตำรับยา จากนั้นนำอวัยวะดังกล่าวไปชั่งน้ำหนักและบันทึกข้อมูลไว้ แล้วนำอวัยวะแต่ละชนิดมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ และบดละเอียดด้วยโกรงขนาดเล็ก จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่บดแล้วไปสกัดด้วย dichloromethane ทำซ้ำ 2 ครั้ง เก็บส่วนที่ละลายใน dichloromethane ไปปั่นเหวี่ยงนาน 10 นาที ที่ความเร็วรอบ 4000 rpm แล้วเก็บเฉพาะส่วนที่ละลายใน dichloromethane แล้วนำไปสกัดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญด้วยวิธีการเดียวกันกับการวิเคราะห์หาสารสำคัญในน้ำเลือด (รูปที่ 17)

Pharmacokinetics study



รูปที่ 17: แสดงขั้นตอนการศึกษาทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ของตำรับยา K-KPD

หลังจากการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในน้ำเลือดหลังการให้ตำรับยา K-KPD ทางปากเพียงครั้งเดียว จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ ซึ่งประกอบด้วยค่าต่าง ๆ ดังนี้

C_{\max} = ระดับความเข้มข้นสูงสุดของยาในน้ำเลือด

มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

T_{\max} = เวลาที่ระดับความเข้มข้นของยาในน้ำเลือดถึงระดับสูงสุด

มีหน่วยเป็นชั่วโมง (h)

AUC_{0-6h} = พื้นที่ใต้กราฟ (area under the curve) ระหว่างความเข้มข้นของยา

กับเวลา (0-6 ชั่วโมง) มีหน่วยเป็นมิลลิกรัม ชั่วโมงต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)

K_e = อัตราการกำจัดยาออกจากร่างกายต่อหนึ่งหน่วยเวลา

(elimination rate constant) มีหน่วยเป็นชั่วโมง⁻¹ (h^{-1})

$T_{1/2}$ = ค่าครึ่งชีวิตของการกำจัดยา (half-life)

มีหน่วยเป็นชั่วโมง (h)

3. การศึกษาผลทางสรีรวิทยาและเภสัชวิทยา

3.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้หนูแรทสายพันธุ์ Wistar เพศผู้วัยกลางชีวิตอายุ 12-14 เดือน น้ำหนักประมาณ 550 - 700 กรัม จากสถานสัตว์ทดลองภาคใต้ ซึ่งเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ $22 \pm 3^\circ\text{C}$ ความชื้น 40-70% โดยตั้งเวลาเปิด/ปิดไฟฟ้า แสงสว่าง/มืด เป็นเวลา 12/12 ชั่วโมง ให้อาหาร และน้ำตามต้องการ (*ad libitum*) เจาะหูเพื่อทำหมายเลขสัตว์ และให้สัตว์ทดลองคุ้นชินกับสภาพแวดล้อมในห้องทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนเริ่มทำการทดลอง

ในการทดลองนี้จะแบ่งหนูแรทออกเป็น 3 กลุ่มกลุ่มละ 7 ตัว (N=7) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ป้อนน้ำกลั่น (DW)

กลุ่มที่ 2 ป้อน Kollicoat (K) ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมต่อน้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 3 ป้อน K-KPD ขนาด 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมต่อน้ำหนักตัว

โดยป้อนสารให้สัตว์แต่ละกลุ่มวันละ 2 ครั้ง (เช้า - บ่าย) เป็นเวลา 6 สัปดาห์

สัตว์ทดลองแต่ละตัวในแต่ละกลุ่มจะถูกบันทึกน้ำหนักตัว และอาหารที่กินต่อวัน สัปดาห์ละครั้ง (รูปที่ 18)



รูปที่ 18: แสดงระยะเวลาการให้หนูกิน K-KPD, K หรือน้ำกลั่น (DW)

3.2 การศึกษาผลของการป้อน K-KPD หรือ K หรือน้ำกลั่นเป็นระยะเวลานานต่อความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจในหนูแรทสลบ

เพื่อศึกษาว่าหลังจากที่ได้ป้อน K-KPD หรือ K หรือน้ำกลั่นเป็นระยะเวลานาน 6 สัปดาห์มีผลต่อความดันโลหิต (basal mean arterial blood pressure) และอัตราการเต้นของหัวใจพื้นฐาน (heart rate) หรือไม่ หลังจากที่ได้ป้อน K-KPD หรือ K หรือน้ำกลั่นเป็นเวลา 6 สัปดาห์แล้ว นำสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่มมาทำการทดลอง โดยเริ่มจากการฉีดด้วย Nembutal ขนาด (50 มก/ก.ก.) เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal injection) เพื่อให้สัตว์ทดลองสลบ จากนั้นนำมาวัดความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจทาง common carotid artery ด้วยเครื่อง poly graph หลังจากที่ได้ equilibrate สัตว์ทดลองนาน 30-40 นาที เปรียบเทียบผลระหว่างกลุ่มที่ป้อน K-KPD หรือ K กับกลุ่มควบคุมที่ป้อนน้ำกลั่น

3.3 การศึกษาผลของการป้อน K-KPD หรือ K หรือน้ำกลั่น เป็นระยะเวลานาน ต่อระดับ glucose, triglyceride, cholesterol, LDL, HDL, SGOT, SGPT, ALP, blood urea nitrogen และ creatinine ในเลือด

เพื่อศึกษาว่าหลังจากที่ได้ป้อน K-KPD หรือ K หรือน้ำกลั่น ให้สัตว์ทดลองเป็นระยะเวลานาน 6 สัปดาห์มีผลต่อระดับ glucose, triglyceride, cholesterol, LDL, HDL, alkaline phosphatase, blood urea nitrogen และ creatinine ในเลือดหรือไม่ ก่อนนำสัตว์ทดลองมาทำการทดลอง สัตว์ทดลองแต่ละตัวจะถูกงดน้ำและอาหารเป็นเวลาอย่างน้อย 12-14 ชั่วโมง จากนั้นสลบสัตว์ทดลองด้วย Nembutal (50 มก/ก.ก.) เมื่อสลบนำสัตว์ทดลองมาตัดคอด้วย guillotine เก็บเลือดจากส่วนลำตัวลงในหลอดขนาด 5 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด หลอดที่ 1 เก็บเลือดประมาณ 5 มิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที เพื่อให้เลือดแข็งตัว (clot blood) แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 4000 rpm นาน 10 นาที เก็บเอาเฉพาะส่วน serum เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของ glucose, triglyceride, cholesterol, LDL, HDL, SGOT, SGPT, ALP, blood urea nitrogen และ creatinine ด้วยวิธี enzymatic method และหลอดที่ 2 เก็บเลือดประมาณ 1 มิลลิลิตรลงในหลอดที่เคลือบด้วย EDTA ซึ่งเป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เพื่อนำไปศึกษาทาง hematology (CBC, Hct, Hb และ platelet count) ลักษณะของเม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาว เปรียบเทียบผลระหว่างกลุ่มที่ป้อน K-KPD, K กับกลุ่มควบคุมที่ป้อนน้ำกลั่น

3.4 การศึกษาผลของการป้อน K-KPD หรือ K หรือน้ำกลั่นเป็นระยะเวลานานต่อน้ำหนักอวัยวะภายในและการสะสมไขมันในช่องท้องและไขมันบริเวณใต้ผิวหนัง

เพื่อศึกษาว่าหลังจากที่ได้ป้อน K-KPD หรือ K หรือน้ำกลั่นเป็นระยะเวลานาน 6 สัปดาห์ มีผลต่อน้ำหนักอวัยวะภายใน หรือทำให้มีการเปลี่ยนแปลงการสะสมไขมันที่ช่องท้องและไขมันบริเวณใต้ผิวหนังหรือไม่ โดยนำสัตว์ทดลองในข้อ 3.3 หลังจากเก็บตัวอย่างเลือดเรียบร้อยแล้ว ให้นำส่วนของลำตัวมาศึกษาต่อโดยตัดแยกอวัยวะภายใน ได้แก่ หัวใจ ปอด ตับ ไต ต่อมหมวกม้าม อัณฑะ ท่อเก็บอสุจิ และต่อมลูกหมากออกมาชั่งน้ำหนัก แล้วนำซากที่เหลือมาตัดแยกส่วนที่เป็นไขมันในช่องท้อง และตัดเลาะไขมันที่อยู่บริเวณใต้ผิวหนังออกมาชั่งน้ำหนัก เปรียบเทียบผลระหว่างกลุ่มที่ป้อน K-KPD, K กับกลุ่มควบคุมที่ป้อนน้ำกลั่น

3.5 การศึกษาผลของการบ้อน K-KPD หรือ K หรือน้ำกลั่นเป็นระยะเวลาานต่อการเก็บสะสมไขมันในเนื้อเยื่อตับ

เพื่อศึกษาว่าหลังจากที่ได้บ้อน K-KPD หรือ K หรือน้ำกลั่นเป็นระยะเวลาาน 6 สัปดาห์ มีผลทำให้เกิดการเพิ่มการสะสมไขมันในเนื้อเยื่อตับหรือไม่ สัตว์ทดลองในข้อ 3.4 หลังจากตัดแยกอวัยวะภายในและชั่งน้ำหนักเรียบร้อยแล้ว จะนำส่วนของตับโดยแยกเอาพูของตับที่มีขนาดใหญ่ที่สุดออกมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ตามความยาวของตับ ให้มีความกว้างประมาณ 0.5 ซม. นำไปแช่แข็งไว้ที่ 0 °C ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วนำชิ้นเนื้อตับที่เก็บไว้ไปตัดด้วยเครื่อง freezing myotome (อุณหภูมิ -20 °C) ให้เนื้อเยื่อตับมีความหนาประมาณ 20 ไมโครเมตร แล้ววางลงบนแผ่น glass slide จากนั้นย้อมเนื้อเยื่อตับด้วยสี oil red-O ทันที หลังจากนั้นนำมาตรวจดูลักษณะของไขมันที่บริเวณเนื้อเยื่อตับด้วยกล้องจุลทรรศน์และบันทึกภาพตัวอย่างไว้ จากนั้นนำแผ่น glass slide ที่มีเนื้อเยื่อตับวางอยู่ไปสกัดเอาสี oil red-O ออกจากเนื้อเยื่อด้วย DMSO แล้วนำสีที่ได้จากการสกัดไปวัดหาความเข้มข้นของ oil red-O ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Visible spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เปรียบเทียบผลระหว่างกลุ่มที่บ้อน K-KPD, K กับกลุ่มควบคุมที่บ้อนน้ำกลั่น

3.6 การศึกษาผลของการบ้อน K-KPD หรือ K หรือน้ำกลั่นเป็นระยะเวลาานต่อการทำงานของหลอดเลือดแดงที่ตัดแยกออกมาศึกษาแบบ *in vitro*

เพื่อที่จะศึกษาว่าหลังจากที่ได้บ้อน K-KPD หรือ K หรือน้ำกลั่นเป็นระยะเวลาาน 6 สัปดาห์ มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดโดยตรง หรือทางอ้อมโดยผ่านทางเยื่อหุ้มหลอดเลือด (endothelial cells) ในการสร้างหรือหลั่ง nitric oxide และ hydrogen sulfide หรือไม่ โดยนำสัตว์ทดลองในข้อ 3.3 หลังจากเก็บตัวอย่างเลือดเรียบร้อยแล้ว จะนำส่วนลำตัวมาเปิดช่องอกและช่องท้องเพื่อตัดแยกหลอดเลือด thoracic aorta ออกมาศึกษาใน organ bath ซึ่งจะเตรียมหลอดเลือดเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นหลอดเลือดที่มี endothelium

กลุ่มที่ 2 เป็นหลอดเลือดที่มี endothelium และถูกยับยั้งการสร้าง nitric oxide ด้วย N^G -nitro-L-arginine (LNA)

กลุ่มที่ 3 เป็นหลอดเลือดที่มีการทำลาย endothelium ด้วยวิธี mechanical disruption

หลังจากเตรียมหลอดเลือดใส่ลงใน organ bath เรียบร้อยแล้ว หลอดเลือดทั้ง 3 กลุ่มจะถูก equilibrate ใน Kreb's Heinsleit solution ประมาณ 40-50 นาที โดยเปลี่ยน Kreb's Heinsleit solution ทุก ๆ 10 นาที ทดสอบการทำงานของ endothelium ในการหลั่ง nitric oxide ตามวิธีการของ Jansakul et al., (1989) หลังจากนั้น equilibrate หลอดเลือดต่ออีก 40 นาที แล้วศึกษาผลการทำงานของหลอดเลือดในหัวข้อดังต่อไปนี้

3.6.1 การป้อน K-KPD หรือ K หรือน้ำกลั่นเป็นระยะเวลาานาน มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของหลอดเลือดหรือไม่ โดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้นที่ endothelium หรือที่เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle cell) และไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวหรือไม่ ทำการทดลองโดยศึกษา dose-response relationship ของ phenylephrine ต่อการหดตัวของหลอดเลือดที่มี basal tension ที่ 1, 2 และ 3 กรัม จะทำการศึกษาในหลอดเลือดที่มี endothelium, หลอดเลือดที่มี endothelium หลังจากยับยั้งการสร้าง nitric oxide ด้วย N^G -nitro-L-arginine (L-NA) และหลอดเลือดที่มีการทำลาย endothelium ด้วยวิธี mechanical disruption

3.6.2 การป้อน K-KPD หรือ K หรือน้ำกลั่นเป็นระยะเวลาานานมีผลทำให้เกิดการเพิ่มการคลายตัวของหลอดเลือดหรือไม่ โดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนั้นเกิดขึ้นที่ endothelium หรือที่เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle cell) ทำการทดลองโดยศึกษา dose-response relationship ต่อ acetylcholine และ glyceryl trinitrate ต่อการคลายตัวของหลอดเลือดที่มี endothelium และไม่มี endothelium ที่ชักนำให้หดตัวก่อนด้วย phenylephrine

3.6.3 การป้อน K-KPD หรือ K หรือน้ำกลั่นเป็นระยะเวลาานาน มีผลต่อการเพิ่มการหลั่ง hydrogen sulfide (H_2S) ที่ผนังหลอดเลือดหรือไม่ โดยทำการศึกษาในหลอดเลือดที่มี endothelium และ หลอดเลือดที่มี endothelium หลังจากยับยั้งการสร้าง nitric oxide ด้วย N^G -nitro-L-arginine (L-NA) นาน 40 นาที แล้วจึงหยด DL-propargylglycine (PAG) เพิ่มลงไป ใน organ bath และ incubate นาน 10 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของ cystathionine- γ -lyase (CSE) ในการสร้าง H_2S ก่อน แล้วจึงทำการศึกษา dose-response relationship ของ phenylephrine ต่อการหดตัวของหลอดเลือดอีกครั้ง

3.7 การศึกษาผลของการป้อน K-KPD หรือ K หรือน้ำกลั่นต่อการเปลี่ยนแปลง ปริมาณของโปรตีน endothelium nitric oxide synthase (eNOS) และ cystathionine- γ -lyase (CSE)

เพื่อเป็นการยืนยันว่าการให้กิน K-KPD หรือ K หรือน้ำกลั่น มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine และ/หรือการคลายตัวของหลอดเลือดต่อ acetylcholine นั้นเป็นผลสืบเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของการสร้างและการหลั่ง nitric oxide และ/หรือ H₂S จากหลอดเลือดหรือไม่ จะทำการทดลองโดยการวัดหาปริมาณโปรตีน eNOS และ CSE ของหลอดเลือด thoracic aorta ด้วยวิธี Western blotting โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) การสกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อหลอดเลือด โดยใช้ thoracic aorta โดยนำเนื้อเยื่อที่เก็บไว้ที่ -80 °C มาตัดให้ละเอียดใน sterile petri dish บนน้ำแข็ง และย้ายใส่หลอดพลาสติกขนาด 1.5 มล. เติม RIPA Buffer ซึ่งมี Protease inhibitor ผสมอยู่ จำนวน 200 ไมโครลิตร เพื่อการย่อยสลายของโปรตีน จากนั้นนำไป sonicate 30 วินาที จะได้ตัวอย่างเป็นฟอสฟอรัส แล้วนำไป centrifuge ที่ 14,000 rpm นาน 10 นาที จากนั้นดูดเก็บส่วนใส (supernatant) ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน BSA (bovine serum albumin) และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 595 nm ภายใน 5 นาที

2) การเตรียมเจลสำหรับการรัน Gel Electrophoresis แบบ KS-PAGE เจลที่ใช้จะประกอบไปด้วยชั้นของเจล 2 ชั้น คือ ชั้นที่อยู่บนสุด เรียกว่า stacking gel ซึ่งเป็นชั้นเจลที่มีความเข้มข้นของเจลต่ำ และมีรูพรุนขนาดใหญ่ ทำให้โปรตีนทั้งหมดมารวมอยู่ตรงจุดเดียวกันก่อนจะแยกโปรตีนในชั้นถัดไปซึ่งเรียกว่า separating gel โดยเจลชั้นนี้เป็นบริเวณที่ใช้แยกโปรตีนเนื่องจากมีความเข้มข้นของเจลสูง

3) การเตรียมโปรตีนสำหรับ load gel โดยต้องปรับความเข้มข้นของโปรตีนให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากัน จากนั้นนำโปรตีนที่ได้ใส่ sample buffer แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 100 °C เป็นเวลานาน 10 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 10 นาที และสุดท้ายนำออกมาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที ก่อนทำการหยดโปรตีนลงในแผ่นเจล (KS-PAGE) เพื่อแยกขนาดของโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า 120 V เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

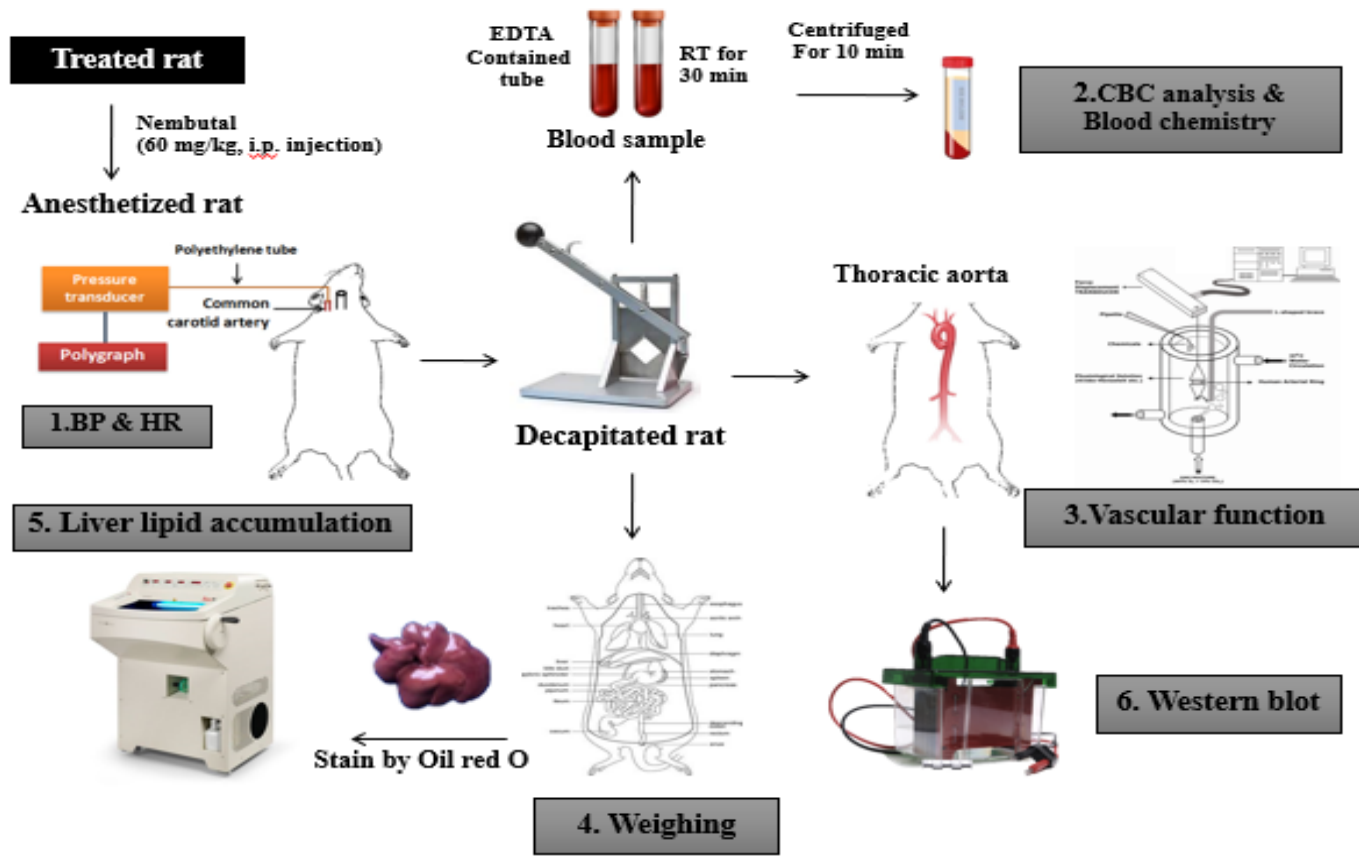
4) เมื่อครบเวลาที่กำหนด ให้สังเกตสีของโปรตีนที่ตกลงมา หากยังไม่ได้ตำแหน่งที่ต้องการ สามารถรันต่อไปได้ จากนั้นจะทำการย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose membrane) ด้วย transfer tank โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 V ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และหลังจากนั้นจะย้อมแผ่นไนโตรเซลลูโลส ด้วยสี Ponceau S (สีแดง) เป็นเวลา 1 นาที เพื่อดูว่าโปรตีนจากเจลได้ย้ายมาบนไนโตรเซลลูโลสแล้ว จากนั้นล้างสี Ponceau S ออกจากแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยน้ำกลั่น แล้วตัดเก็บแถบโปรตีนที่ต้องการศึกษา โดยดูและเปรียบเทียบจากแถบโปรตีนมาตรฐาน (rainbow marker) และต้องตัดเก็บแถบโปรตีน β -actin ซึ่งใช้เป็น internal control ใช้ในการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนเริ่มต้นที่หยดลงไปในแต่ละช่องของเจลว่าเท่ากันหรือไม่

5) นำแถบโปรตีนที่ต้องการศึกษาไปลงในภาชนะที่เตรียมไว้ แล้วเติม 5% non-fat dry milk ลงไปให้ท่วมแผ่นไนโตรเซลลูโลส นาน 1 ชั่วโมง เพื่อเป็นการ block non-specific protein (5% skim milk) จากนั้นหีบแผ่นไนโตรเซลลูโลสใส่ในถุงพลาสติก (hybridization bag) ที่บรรจุแอนติบอดีตามชนิดของที่ต้องการศึกษา (primary antibody) โดยต้องให้ด้านที่เป็นแถบโปรตีนอยู่ด้านบน ซึ่ง primary antibody เป็นแอนติบอดีที่จับอย่างเฉพาะเจาะจงต่อตัวโปรตีนที่ต้องการศึกษา จากนั้นนำไป incubate over night ที่ 4 °C

6) เมื่อครบกำหนดเวลาจะบ่มต่อด้วย secondary antibody เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่ง secondary antibody เป็นแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงต่อ primary antibody จากนั้นจะล้างแอนติบอดีส่วนเกินออกไปด้วย TTBS (tris-buffered saline + Tween 20) เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการล้างก็จะนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน โดยการทดสอบทดสอบ Chemiluminescent ลงไปให้ทั่วแผ่นทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นจับเอาสารละลายส่วนเกินออก นำไปตรวจด้วย Fluorescent detection และทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม vision-capt software เปรียบเทียบผลระหว่างกลุ่มที่ป้อน K-KPD, K กับกลุ่มควบคุมที่ป้อนน้ำกลั่น

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการทดลองจะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm S.E.M.) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม โดยใช้ Two-tail *t*-test และใช้ Analysis of variance (ANOVA) เพื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม และภายในกลุ่ม ซึ่งยอมรับค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.05$



รูปที่ 19: แสดงวิธีการดำเนินการทดลองหลังจากการให้กิน K-KPD, K หรือน้ำกลั่นวันละ 2 ครั้ง (เช้า-บ่าย) นาน 6 สัปดาห์

บทที่ 3

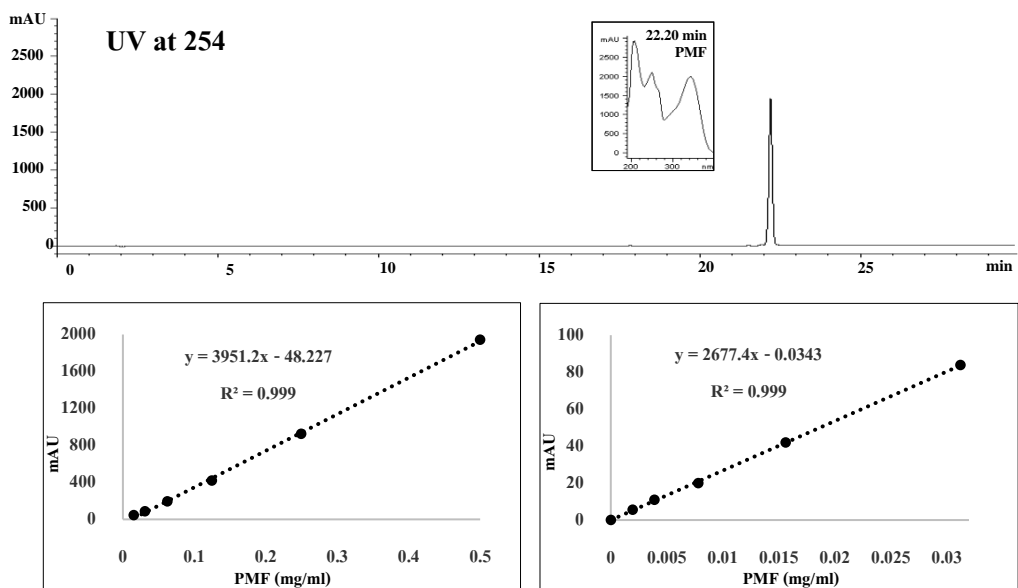
ผลการทดลอง

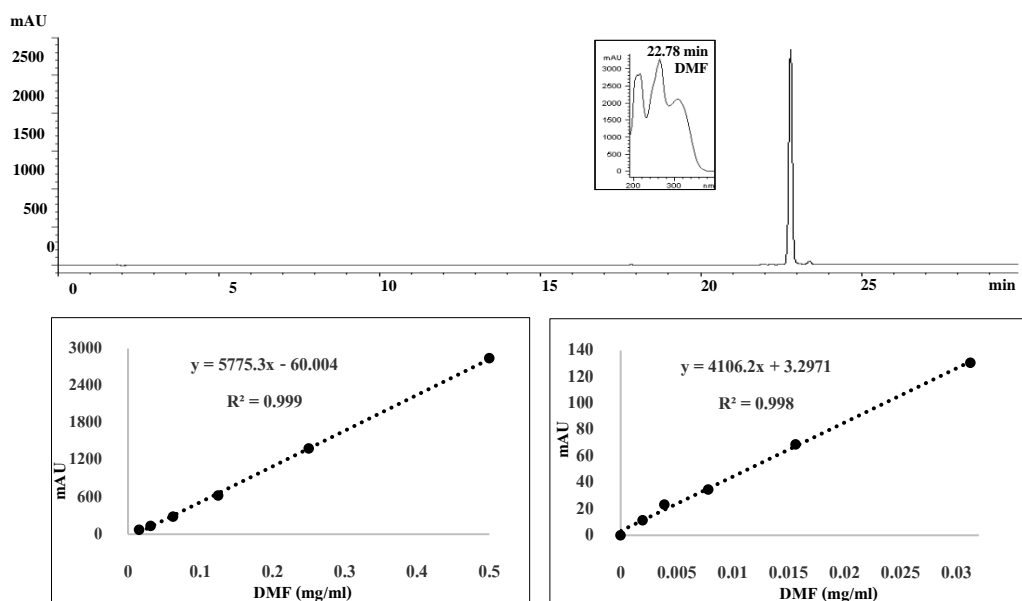
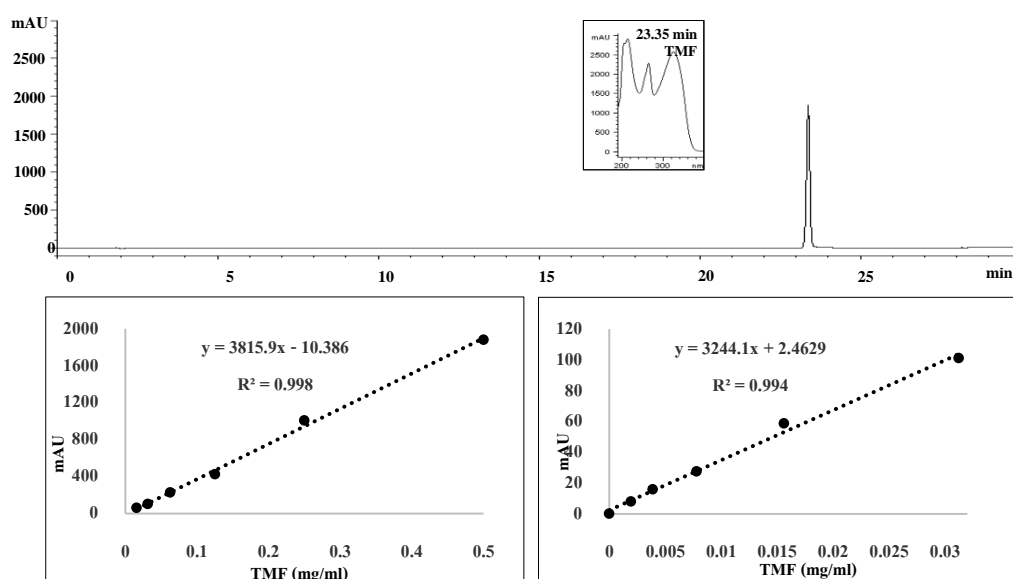
1. การศึกษาเอกลักษณ์ของตำรับสารสกัดจากเหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทน (K-KPD)

1.1 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารสกัดในตำรับ K-KPD ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatographic: HPLC)

จากการวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของสารสกัด KPD ในตำรับยา K-KPD โดยใช้พื้นที่ใต้ curve ใน HPLC chromatogram ของสารบริสุทธิ์ 3 ชนิดเป็น Markers ได้แก่ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PMF), 5,7-dimethoxyflavone (DMF) และ 5,7,4'-trimethoxyflavone (TMF) ซึ่งสารทั้ง 3 ชนิดนี้เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัด KPD พบว่า ในตำรับนี้มีปริมาณความเข้มข้นของสารสกัด KPD เป็นองค์ประกอบอยู่ 50% ซึ่งคำนวณเปรียบเทียบกับปริมาณของสารสกัด KPD ที่ทราบความเข้มข้นที่ได้มีการวิเคราะห์มาก่อนหน้าด้วยวิธีเดียวกัน ซึ่งโครมาโทแกรมของสาร PMF, DMF และ TMF และ standard curve แสดงไว้ในรูปที่ 20 และโครมาโทแกรมของสารสกัด KPD และตำรับ K-KPD แสดงไว้ในรูปที่ 21

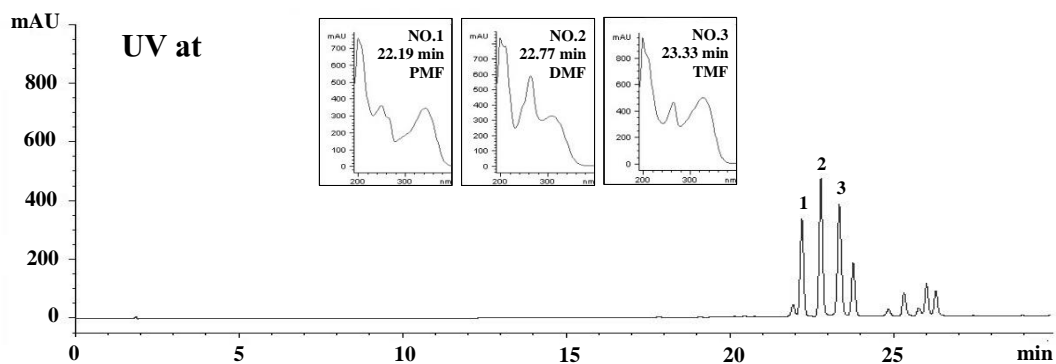
A: PMF 0.5 mg/ml, Inject 10 μ l



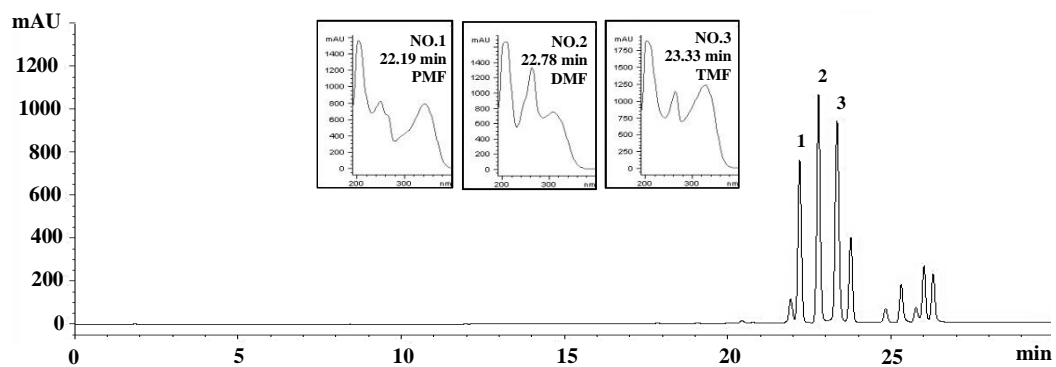
B: DMF 0.5 mg/ml, Inject 10 μ l**C: TMF 0.5 mg/ml, Inject 10 μ l**

รูปที่ 20: แสดงตัวอย่าง HPLC chromatogram ของสาร PMF (A), DMF (B) และ TMF (C) ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml, inject 10 μ l, UV spectrum และ retention time ของรูป standard curve; รูปทางขวาแสดง standard curve ที่ความเข้มข้น 0.0005-0.5 mg/ml และรูปทางซ้ายแสดง standard curve ที่ความเข้มข้น 0.005-0.03 mg/ml

A: K-KPD, 1 mg/ml, Inject 10 μ l



B: KPD, 1 mg/ml, Inject 10 μ l

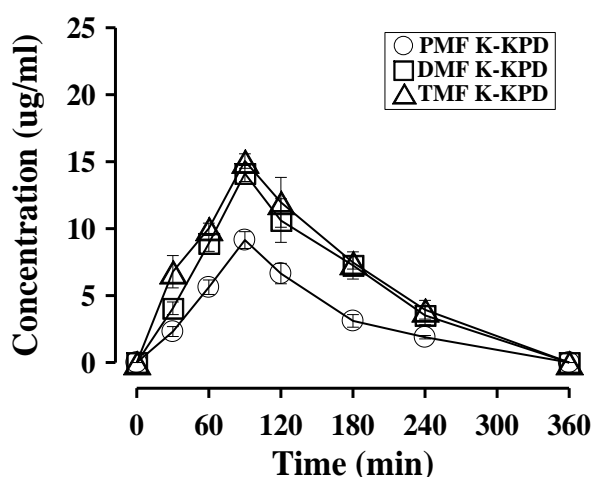


รูปที่ 21: แสดงตัวอย่าง HPLC chromatogram ของตำรับ K-KPD (A) และสารสกัด KPD (B) ซึ่งแต่ละตัวอย่างมีความเข้มข้น 1 mg/ml และ inject 10 μ l กราฟเล็ก ๆ หมายเลข 1, 2 และ 3 แสดง UV spectrum ส่วนตัวเลขที่เป็นนาที่แสดง retention time ของสาร PMF, DMF และ TMF ตามลำดับ

1.2 การวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของสาร PMF, DMF และ TMF ในน้ำเลือด (Pharmacokinetics)

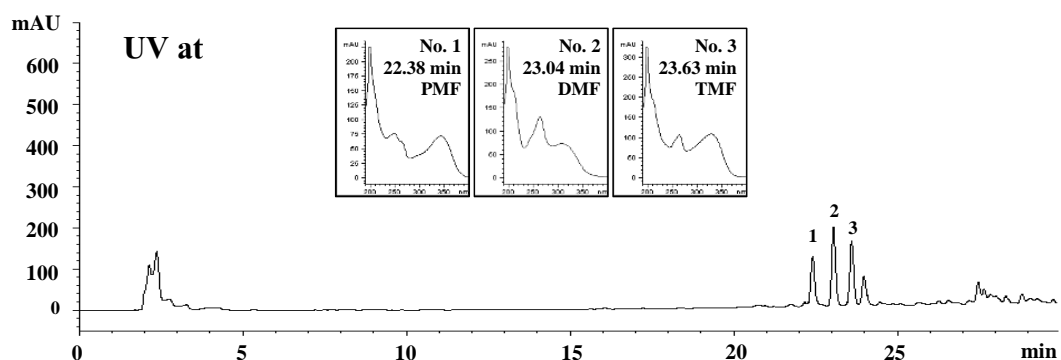
จากการวิเคราะห์หาปริมาณของสาร PMF, DMF และ TMF จาก HPLC chromatogram ของน้ำเลือดที่เก็บที่เวลา 30, 60, 90, 120, 180 และ 240 นาที โดยใช้พื้นที่ใต้กราฟของ PMF, DMF และ TMF ใน HPLC chromatogram ของแต่ละตัวอย่างมาคำนวณจาก standard curve ของสาร KPD (PMF, DMF และ TMF) ที่ทราบความเข้มข้นอยู่ก่อนแล้ว และแสดงผลการทดลองในรูปแบบกราฟ ซึ่งแสดงปริมาณความเข้มข้น (ไมโครกรัม; μg) ของสาร PMF, DMF และ TMF ต่อ 1 มิลลิลิตร (ml) ของน้ำเลือด ของตัวรับ ณ เวลาต่าง ๆ ที่เก็บเลือด โดยใช้ค่าเฉลี่ย (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร; $\mu\text{g}/\text{ml}$) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลจากการให้หนูแรทกินตัวรับ K-KPD ในขนาด 200 mg/Kg และทำการเก็บน้ำเลือดที่ 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240 และ 360 นาที พบว่าปริมาณความเข้มข้นของสาร PMF ในเลือดหนู เท่ากับ 0, 2.31, 5.62, 9.90, 6.64, 3.11, 1.89 และ 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ตามลำดับ, ปริมาณความเข้มข้นของสาร DMF เท่ากับ 0, 4.05, 8.90, 15.04, 10.61, 7.25, 3.52 และ 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ตามลำดับ และปริมาณความเข้มข้นของสาร TMF เท่ากับ 0, 6.78, 10.02, 16.61, 11.97, 7.47, 3.94 และ 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ตามลำดับ โดยปริมาณความเข้มข้นของสารทั้ง 3 ชนิด คือ PMF, DMF และ TMF จะมีระดับความเข้มข้นสูงสุดในน้ำเลือดที่เวลา 90 นาที แสดงในรูปแบบที่ 22 และโครมาโตแกรมของสารสกัด KPD ในน้ำเลือดที่เวลาต่าง ๆ แสดงไว้ในรูป 23A - 23F ตามลำดับ

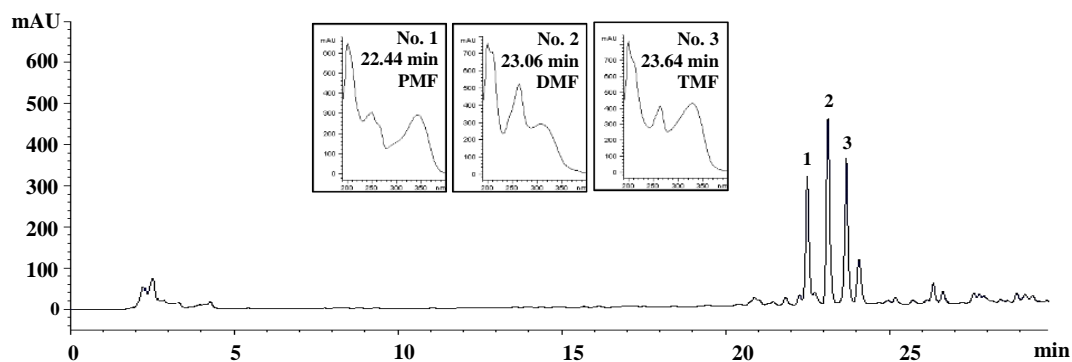


รูปที่ 22: แสดงค่าความเข้มข้น ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ของสาร PMF, DMF และ TMF ในเลือดของหนูแรทที่ระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากที่ถูกป้อนตัวรับ K-KPD

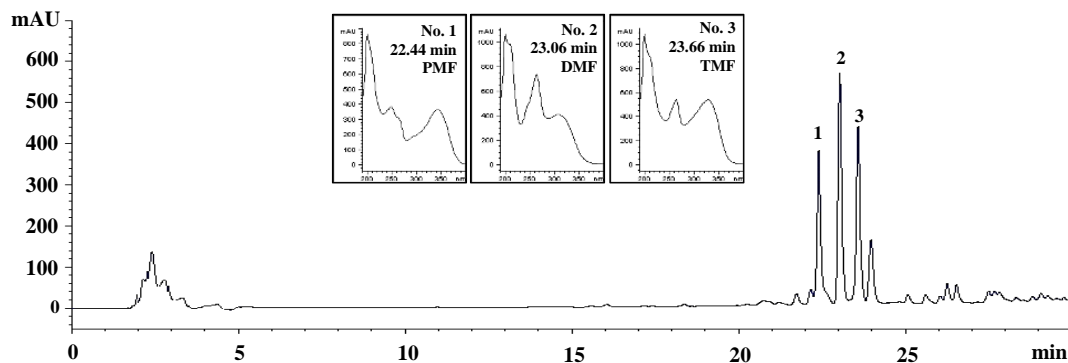
A: 30 min, Inject 10 μ l



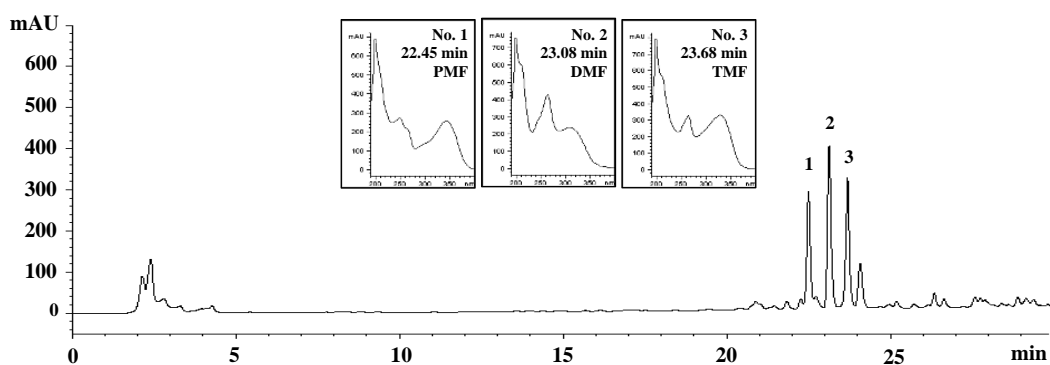
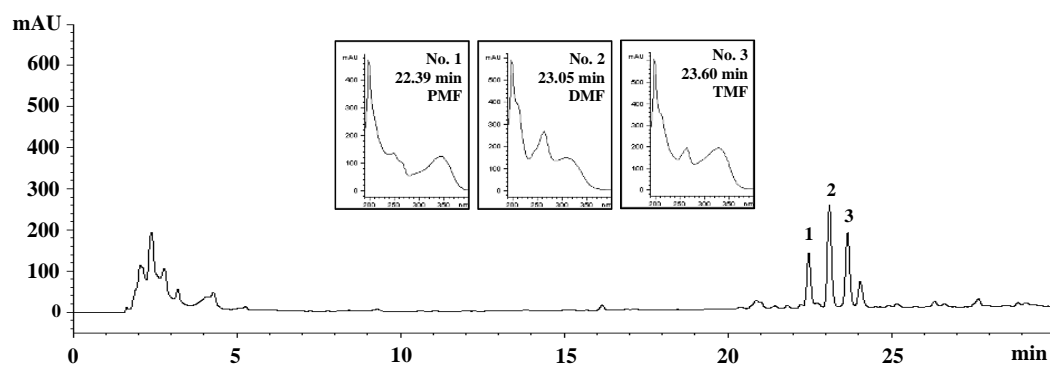
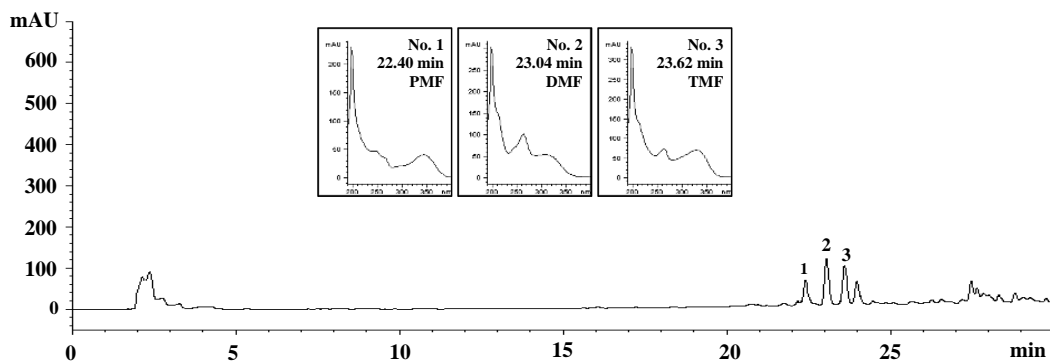
B: 60 min, Inject 10 μ l



C: 90 min, Inject 10 μ l



รูปที่ 23: แสดงตัวอย่าง HPLC chromatogram ของสารสกัด KPD ในน้ำเลือดที่เวลา 30 (A), 60 (B), 90 (C), 120 (D), 180 (E) และ 240 นาที (F) ซึ่งแต่ละตัวอย่าง Inject 10 μ L กราฟเล็ก ๆ หมายเลข 1, 2 และ 3 แสดง UV spectrum ส่วนตัวเลขที่เป็นนาทีแสดง retention time ของสาร PMF, DMF และ TMF ตามลำดับ

D: 120 min, Inject 10 μ l**E: 180 min, Inject 10 μ l****F: 240 min, Inject 10 μ l**

รูปที่ 23 (ต่อ): แสดงตัวอย่าง HPLC chromatogram ของสารสกัด KPD ในน้ำเลือดที่เวลา 30 (A), 60 (B), 90 (C), 120 (D), 180 (E) และ 240 นาที (F) ซึ่งแต่ละตัวอย่าง Inject 10 μ L กราฟเล็ก ๆ หมายเลข 1, 2 และ 3 แสดง UV spectrum ส่วนตัวเลขที่เป็นนาทีแสดง retention time ของสาร PMF, DMF และ TMF ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์หาค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์โดยคำนวณจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสำคัญในน้ำเลือดหนูที่ได้รับตำรับ K-KPD ทางปากกับเวลา ซึ่งจะแสดงค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของ KPD ได้แก่ PMF, DMF และ TMF โดยพบว่า ค่าครึ่งชีวิตของการกำจัดยา ($T_{1/2}$) ของสาร PMF, DMF และ TMF อยู่ที่ 1.26, 1.52 และ 1.21 ชั่วโมง ตามลำดับ และมีอัตราการกำจัดยาออกจากร่างกาย (K_e) ของสาร PMF, DMF และ TMF อยู่ที่ 0.57, 0.49 และ 0.57 ชั่วโมง⁻¹ ตามลำดับ แสดงค่าในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของตำรับสารสกัดเหง้ากระชายดำด้วย ไดคลอโรมีเทน (Pharmacokinetic parameters of K-KPD)

		AUC _{0-6h} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	T _{max} (h)	C _{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	K _e (h ⁻¹)	T _{1/2} (h)
K-KPD	PMF	19.70 ± 0.92	1.5	9.90 ± 0.35	0.57 ± 0.11	1.26 ± 0.29
	DMF	36.09 ± 0.86	1.5	15.09 ± 0.56	0.49 ± 0.13	1.52 ± 0.47
	TMF	38.07 ± 1.55	1.5	16.61 ± 0.61	0.57 ± 0.05	1.21 ± 0.12

1.4 การวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของสารที่กระจายตัวไปยังอวัยวะต่าง ๆ (Tissue Distribution)

จากการนำอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ เนื้อเยื่อตับ ไต และสมอง มาสกัดหาปริมาณความเข้มข้นของสาร PMF, DMF และ TMF พบว่ามีการกระจายตัวของยาไปยังเนื้อเยื่อทั้ง 3 ชนิด คือ ตับ ไต และสมอง (ตารางที่ 2) โดยพบว่าในเนื้อเยื่อตับมีระดับความเข้มข้นของสาร PMF, DMF และ TMF สูงสุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.40 ± 0.29 , 4.39 ± 0.54 และ 4.16 ± 0.37 ไมโครกรัมต่อกรัม (อวัยวะ) ตามลำดับ ที่เวลา 90 นาทีหลังได้รับสารสกัด และที่เวลา 240 นาทีหลังได้รับสารสกัด มีค่าเท่ากับ 1.54 ± 0.10 , 2.53 ± 0.35 และ 2.10 ± 0.19 ไมโครกรัมต่อกรัม ส่วนความเข้มข้นของสาร PMF, DMF และ TMF ในเนื้อเยื่อไต และสมองมีค่าใกล้เคียงกัน แสดงค่าในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงความเข้มข้นของสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของ KPD ได้แก่ PMF, DMF และ TMF ที่เนื้อเยื่อต่าง ๆ หลังจากป้อนให้แก่หนูแรทไปแล้ว 90 และ 240 นาที

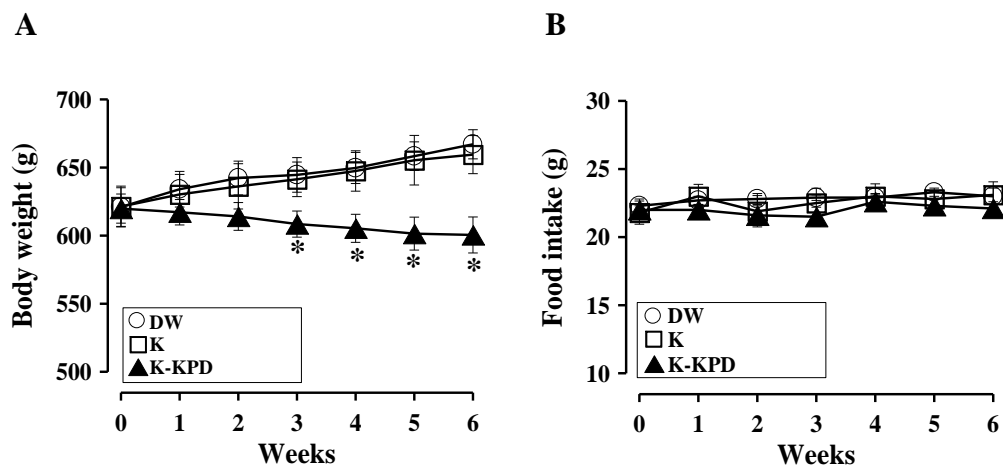
Tissues	90 min ($\mu\text{g/g tissue}$)			240 min ($\mu\text{g/g tissue}$)		
	PMF	DMF	TMF	PMF	DMF	TMF
Liver	3.40 ± 0.29	4.39 ± 0.54	4.16 ± 0.37	1.54 ± 0.10	2.53 ± 0.35	2.10 ± 0.19
Kidney	1.13 ± 0.10	2.64 ± 0.23	2.54 ± 0.25	0.42 ± 0.15	0.90 ± 0.19	0.77 ± 0.12
Brain	1.15 ± 0.12	2.12 ± 0.15	1.85 ± 0.18	0.58 ± 0.25	0.96 ± 0.14	0.82 ± 0.08

2. การศึกษาผลของการกินตำรับสารสกัดจากเหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทน (K-KPD)

ในหนูแรทเพศผู้วัยกลางชีวิต

2.1 ผลของการป้อน K-KPD หรือ K หรือน้ำกลั่นเป็นระยะเวลา 14 วันต่อน้ำหนักตัวและอาหารที่กิน

น้ำหนักตัวเฉลี่ยเริ่มต้นก่อนการทดลอง (สัปดาห์ที่ 0) ของหนูแรทเพศผู้ทั้ง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ป้อน K-KPD (กลุ่มทดลอง), กลุ่มควบคุมที่ป้อน K (vehicle) และกลุ่มควบคุมที่ป้อนน้ำกลั่น มีค่าใกล้เคียงกัน คือ 619.9 ± 10.7 , 621.4 ± 15.8 และ 621.5 ± 14.2 กรัม ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า การป้อน K-KPD ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมให้หนูแรทเพศผู้ มีผลทำให้น้ำหนักตัวของหนูแรทลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ป้อน K และกลุ่มควบคุมที่ป้อนน้ำกลั่น โดยน้ำหนักของหนูกลุ่มทดลองเริ่มลดลงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 และลดลงเรื่อย ๆ ทุกสัปดาห์ จนสัปดาห์สุดท้ายของการทดลอง มีน้ำหนักลดลงประมาณ 19.5 ± 14.0 กรัม เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 ในขณะที่กลุ่มที่ป้อน K และกลุ่มควบคุมที่ป้อนน้ำกลั่น มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นประมาณ 38.2 ± 4.4 และ 45.2 ± 5.7 กรัม ตามลำดับ แต่ปริมาณการกินอาหารของทั้ง 3 กลุ่ม ไม่พบความแตกต่าง (รูปที่ 24A และ 24B)



รูปที่ 24: แสดงผลของการกินตำรับ K-KPD, K หรือ น้ำกลั่น ต่อน้ำหนักตัว (A) และอาหารที่กินต่อวันต่อตัว (B) * มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

2.2 ผลของการป้อน K-KPD หรือ K หรือน้ำกลั่นเป็นระยะเวลานานต่อน้ำหนักของอวัยวะภายใน การเก็บสะสมไขมันภายในช่องท้อง และบริเวณใต้ผิวหนัง

เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า การป้อนตำรับ K-KPD, K และน้ำกลั่น ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักอวัยวะภายใน ได้แก่ หัวใจ (heart), ปอด (lung), ตับ (liver), ไต (kidney), ต่อมหมวกไต (adrenal gland), ม้าม (spleen), อัณฑะ (testis), หลอดเก็บอสุจิ (epididymis) และต่อมลูกหมาก (prostate gland) (ตารางที่ 3) อีกทั้งยังไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการสะสมไขมันบริเวณต่อมลูกหมาก (prostate) (ตารางที่ 4) แต่การป้อนตำรับ K-KPD ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมให้หนูแรทนั้น มีผลทำให้ลดการสะสมไขมันบริเวณหลอดเก็บอสุจิ (epididymis fat), ไขมันยึดลำไส้ (mesentery fat), ไขมันหลังเชื่อบุช่องท้อง (retroperitoneal fat) และไขมันใต้ผิวหนัง (subcutaneous fat) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ป้อน K และกลุ่มควบคุมที่ป้อนน้ำกลั่น (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลของการกินตำรับ K-KPD, K หรือ น้ำกลั่น ต่อน้ำหนักอวัยวะภายใน

Treatments	Absolute organs weight (g)								
	Heart	Lung	Liver	Kidney	Adrenal gland (mg)	Spleen	Testis	Epididymis	Prostate gl.
DW	1.70 ± 0.04	1.77 ± 0.04	16.84 ± 0.67	3.10 ± 0.24	91.22 ± 3.46	1.18 ± 0.08	4.06 ± 0.10	1.20 ± 0.05	1.66 ± 0.03
K	1.60 ± 0.09	1.72 ± 0.10	15.53 ± 0.78	3.22 ± 0.11	81.71 ± 5.85	1.17 ± 0.08	4.00 ± 0.15	1.33 ± 0.09	1.51 ± 0.09
K-KPD	1.60 ± 0.05	1.76 ± 0.04	16.21 ± 0.74	3.19 ± 0.22	92.33 ± 3.81	1.16 ± 0.05	3.95 ± 0.16	1.23 ± 0.16	1.55 ± 0.10

ตารางที่ 5 ผลของการกินตำรับ K-KPD, K หรือ น้ำกลั่น ต่อน้ำหนักไขมันที่อวัยวะภายในและที่ได้ผิวหนัง

Treatments	Body weight (g)		n	Absolute adipose tissue weight (g)				
	Initial	Final		Epididymis	Prostate	Mesentery	Retroperitoneal	Subcutaneous
DW	621.5 ± 14.2	667.1 ± 10.7	6	17.40 ± 1.39	1.06 ± 0.20	17.75 ± 0.78	26.06 ± 2.64	53.87 ± 5.21
K	621.4 ± 15.8	659.5 ± 14.0	7	18.06 ± 1.33	1.10 ± 0.10	18.50 ± 1.71	24.07 ± 3.53	53.39 ± 6.73
K -KPD	619.9 ± 10.7	600.5 ± 13.2*	6	13.79 ± 1.34*	1.03 ± 0.14	14.35 ± 1.11*	18.54 ± 2.18*	30.40 ± 5.01*

* มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

2.3 ผลของการป้อน K-KPD หรือ K หรือน้ำกลั่นเป็นระยะเวลาานต่อระดับ glucose, triglyceride, cholesterol, LDL, HDL, alkaline phosphatase (APL), SGOT, SGPT, blood urea nitrogen และ creatinine ในเลือด และความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด

ผลต่อระดับ glucose, triglyceride, cholesterol, LDL, HDL, alkaline phosphatase, SGOT, SGPT, blood urea nitrogen และ creatinine ในเลือด และความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดได้ แสดงไว้ในตารางที่ 5-7

ในตารางที่ 5 แสดงผลการให้กินตำรับยา K-KPD ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า มีผลทำให้ลดระดับน้ำตาลและ triglycerides ในเลือด แต่ไม่มีผลต่อระดับ cholesterol, HDL, LDL หรือ LDL/HDL ratio เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่กินน้ำกลั่น ส่วนกลุ่มควบคุมที่กิน K ก็มีแนวโน้มลดระดับน้ำตาล และ triglycerides ในเลือด เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่กินน้ำกลั่น แต่การลดลงนั้นยังไม่ถึงระดับนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.08$) ส่วนผลต่อการทำงานของตับและไต (ตารางที่ 6) พบว่า หลังจากให้หนูกินตำรับยา K-KPD ในขนาดดังกล่าว มีผลทำให้ระดับเอนไซม์ตับ alkaline phosphatase (ALP) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่กิน K และกลุ่มควบคุมที่กินน้ำกลั่น แต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ SGOT และ SGPT นอกจากนี้การกินตำรับยา K-KPD ยังไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ blood urea nitrogen (BUN) และ creatinine ในเลือดของทั้ง 3 กลุ่มอีกด้วย ส่วนในตารางที่ 7 แสดงผลการให้กินตำรับยา K-KPD ต่อความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (Complete blood count; CBC) พบว่า การกินตำรับยา K-KPD ในขนาดดังกล่าวไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด แต่มีผลทำให้จำนวนของเกล็ดเลือดลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่กิน K และกลุ่มควบคุมที่กินน้ำกลั่น ทั้งนี้ค่าดังกล่าวยังอยู่ในช่วงของค่าปกติ ($4.9 - 11.3 \times 10^5/\mu\text{l}$)

ตารางที่ 6 ผลของการกินตำรับ K-KPD, K หรือ น้ำกลั่น ต่อระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด

Groups	NLAC- MU normal range	n	Glucose	Triglyceride	Cholesterol	HDL-C	LDL-C	LDL/HDL
			(mg %)	(mg %)	(mg %)	-	-	ratio
			122.1 – 180.8	61.0 – 164.0	46.0 – 98.0	-	-	
DW		6	135.0 ± 5.7	78.2 ± 7.9	110.8 ± 4.8	105.3 ± 7.9	35.1 ± 7.6	0.33 ± 0.03
K		7	121.7 ± 6.3	68.29 ± 13.8	126.2 ± 5.7	115.0 ± 15.3	33.0 ± 2.7	0.30 ± 0.03
K -KPD		6	106.3 ± 3.2*	51.1 ± 8.4*	99.7 ± 7.6	115.5 ± 12.0	37.1 ± 6.3	0.31 ± 0.03

* มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

หมายเหตุ NLAC-MU = National Laboratory Animal Center Mahidol University

HDL-C = High Density Lipoprotein cholesterol

LDL-C = Low Density lipoprotein cholesterol

ตารางที่ 7 ผลของการกินตำรับ K-KPD, K หรือ น้ำกลั่น ต่อระดับเอนไซม์ตับและไตในเลือด (alkaline phosphatase (ALP), serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT), serum glutamic pyruvate transferase (SGPT), blood urea nitrogen (BUN) และ creatinine (Creat)

Groups	NLAC- MU normal range ⁿ	ALP	SGOT	SGPT	BUN	CREAT
		(U/L)	(U/L)	(U/L)	(mg %)	(mg %)
		46.0 – 92.0	111.0 – 225.0	25.0 – 64.0	10.3 – 23.6	0.5 – 0.7
DW	6	57.9 ± 8.5	123.9 ± 13.3	91.9 ± 14.2	23.1 ± 2.2	0.6 ± 0.09
K	7	56.9 ± 3.2	109.3 ± 17.2	89.3 ± 11.4	22.6 ± 3.0	0.6 ± 0.04
K-KPD	6	32.4 ± 3.4*	118.0 ± 15.7	92.0 ± 13.6	21.4 ± 3.9	0.6 ± 0.04

* มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

หมายเหตุ NLAC-MU = National Laboratory Animal Center Mahidol University

ALP = Alkaline phosphatase; SGOT = Serum glutamic oxaloacetic transaminase;

SGPT = Serum glutamic pyruvic transaminase; BUN = Blood urea nitrogen;

CREAT = Creatinine

ตารางที่ 8 ผลของการกินตำรับ K-KPD, K หรือ น้ำกลั่น ต่อจำนวนเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ (Hematology analysis: Complete blood count; CBC)

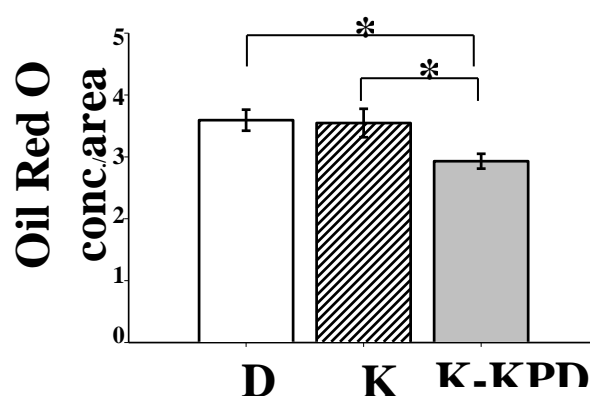
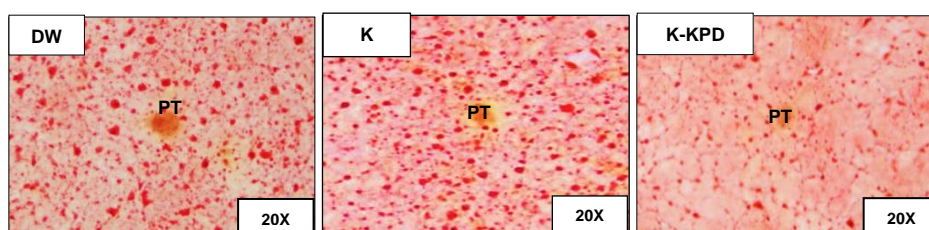
Groups	NLAC- MU normal range	n	HCT	HGB	MCV	MCH	MCHC	WBC	Neutrophil	LYMPH	Plt
			(%)	(g/dl)	(fl)	(pg)	(%)	(x10 ³ /μl)	(%)	(%)	(x10 ⁵ /μl)
			33.2 – 46.0	13.5 – 17.6	47.5 – 54.7	17.4 – 26.5	34.7 – 51.8	3.0 – 7.2	-	59.0 – 91.0	4.9 – 11.3
DW		6	45.6 ± 2.4	16.1 ± 0.5	52.6 ± 0.7	17.6 ± 0.2	33.6 ± 0.5	5.0 ± 0.6	69.1 ± 4.3	32.7 ± 4.0	8.5 ± 0.3
K		7	46.9 ± 2.7	16.1 ± 0.7	55.1 ± 1.1	19.0 ± 0.5	34.5 ± 1.0	4.2 ± 0.4	69.9 ± 2.6	28.9 ± 2.5	7.5 ± 0.5
K-KPD		6	47.0 ± 2.9	16.6 ± 0.9	55.0 ± 0.9	19.3 ± 0.3	34.5 ± 0.6	4.4 ± 0.3	62.5 ± 3.5	34.5 ± 2.9	6.9 ± 0.3*

* มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

หมายเหตุ NLAC-MU = National Laboratory Animal Center Mahidol University
WBC= White blood cell; HCT= Hematocrit; HGB= Hemoglobin;
MCV= Mean corpuscle volume; MCH= Mean corpuscle hemoglobin;
MCHC= Mean corpuscle hemoglobin concentration;
PMN= Polymorphonuclear leukocytes; Plt= Platelet count

2.4 ผลของการป้อน K-KPD หรือ K หรือน้ำกลั่นเป็นระยะเวลาานต่อการเก็บสะสมไขมันบริเวณเนื้อเยื่อตับ

ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 25 พบว่า การให้หนูกินตำรับยา K-KPD ในขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (เช้า-บ่าย) นาน 6 สัปดาห์ มีผลทำให้ลดการสะสมไขมันที่บริเวณเนื้อเยื่อตับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่กิน K และกลุ่มควบคุมที่กินน้ำกลั่น



รูปที่ 25: แสดงผลของการกินตำรับ K-KPD, K หรือน้ำกลั่น ต่อการเก็บสะสมของไขมันในเนื้อเยื่อตับ * มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

2.5 ผลของการป้อน K-KPD หรือ K หรือน้ำกลั่นเป็นระยะเวลานานต่อความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจในหนูแรทสลบ

จากตารางที่ 8 แสดงให้เห็นว่าการกินตำรับ K-KPD, K หรือน้ำกลั่น ในขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (เช้า-บ่าย) นาน 6 สัปดาห์ ไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิต และอัตราการเต้นหัวใจพื้นฐานในหนูแรทเพศผู้วัยกลางชีวิต

ตารางที่ 9 ผลของการกินตำรับ K-KPD, K หรือน้ำกลั่น ต่อความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจพื้นฐานในหนูแรทวัยกลางชีวิตสลบ

Treatments	n	Basal	Basal	Mean Arterial	Basal heart
		systolic BP (mmHg)	diastolic BP (mmHg)	Pressure (mmHg)	rate (bpm)
DW	6	152.6 ± 7.3	117.3 ± 6.0	127.2 ± 2.1	433.3 ± 8.9
K	7	142.0 ± 6.5	115.7 ± 4.4	124.1 ± 5.0	427.9 ± 5.1
K -KPD	6	141.2 ± 6.6	116.7 ± 5.7	124.8 ± 6.0	429.0 ± 7.6

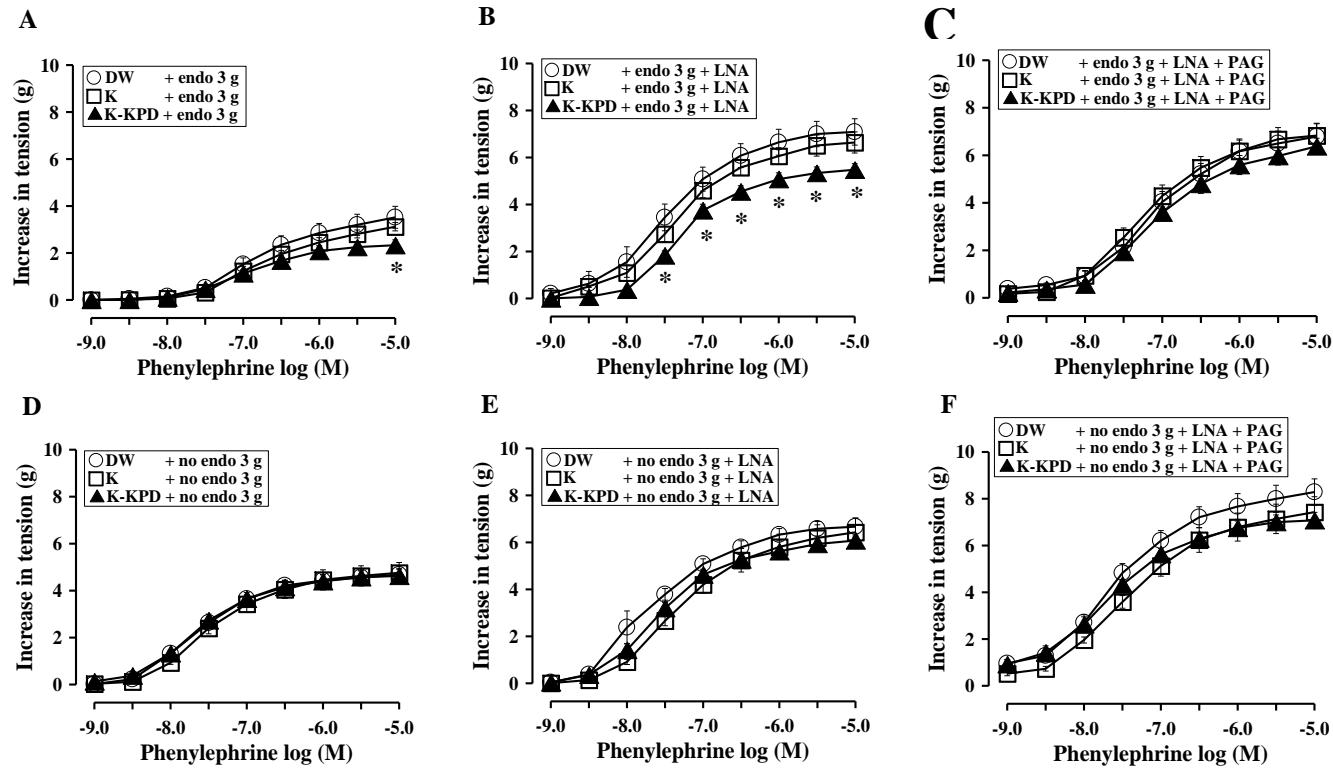
2.6 ผลของการป้อน K-KPD หรือ K หรือน้ำกลั่นเป็นระยะเวลาานต่อการทำงานหลอดเลือดที่ตัดแยกออกมาศึกษาอกตัว

ผลการทดลองได้แสดงไว้ในรูปที่ 26 พบว่าการให้หนูแรทเพศผู้วัยกลางชีวิตกินตำรับยา K-KPD วันละ 2 ครั้ง (เช้า-บ่าย) นาน 6 สัปดาห์ มีผลทำให้การหดตัวสูงสุดของหลอดเลือดแดงใหญ่ช่องอก (thoracic aorta) ที่ยังคงมีเยื่อบุผนังหลอดเลือด (endothelium) ต่อสารฟีนิลเอพรีน (phenylephrine) หดตัวได้ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (กลุ่มป้อนน้ำกลั่นและป้อนสาร Kollicoat) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (รูปที่ 26A) และเมื่อยับยั้งการทำงานของ endothelium nitric oxide synthase (eNOS) ในการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) ด้วย N-nitro-L-arginine (LNA) พบว่าการกินตำรับ K-KPD มีผลทำให้การหดตัวสูงสุดของหลอดเลือดต่อสารฟีนิลเอพรีน ยังคงมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (รูปที่ 26B) แต่เมื่อยับยั้งการทำงานของ cystathionine γ -lyase (CSE) ในการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ด้วย LNA ร่วมกับ DL-propargyl glycine (PAG) พบว่าการหดตัวของหลอดเลือดทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน (รูปที่ 26C)

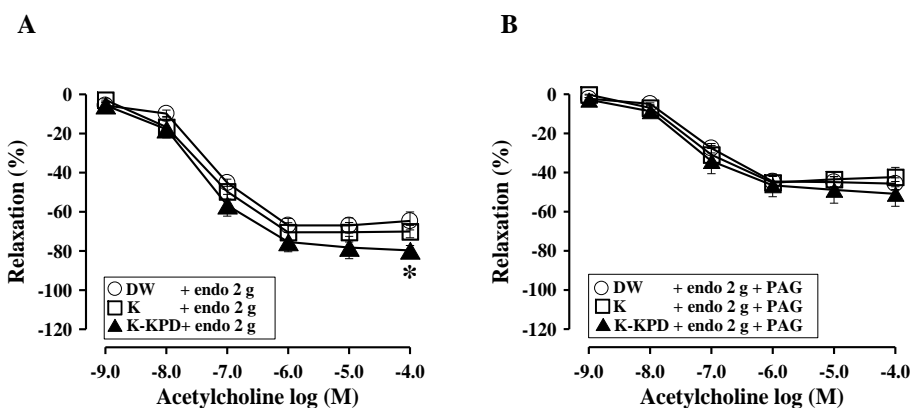
ส่วนผลของการตอบสนองโดยการหดตัวของหลอดเลือดที่เยื่อบุผนังหลอดเลือดถูกทำลาย (endothelium-denuded thoracic aortic ring) ต่อสารฟีนิลเอพรีน พบว่าการหดตัวของหลอดเลือดทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน (รูปที่ 26D) และเมื่อมีการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ด้วย LNA เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 26E) และยับยั้งการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ด้วย LNA ร่วมกับ PAG ก็พบว่าความแรงในการหดตัวของหลอดเลือดต่อสารฟีนิลเอพรีนของทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน (รูปที่ 26F)

ผลการตอบสนองโดยการคลายตัวของหลอดเลือดต่อแอซิติลโคลีน (acetylcholine) ที่ให้หดตัวอยู่ก่อนแล้วด้วยสารฟีนิลเอพรีน เมื่อให้หนูแรทเพศผู้วัยกลางชีวิตกินสารตำรับ K-KPD, K หรือน้ำกลั่นแสดงไว้ในรูปที่ 27 พบว่าการให้กิน K-KPD มีผลทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (รูปที่ 27A) แต่ผลดังกล่าวสามารถยับยั้งได้ด้วยการยับยั้งการสร้าง H_2S ด้วย PAG (รูปที่ 27B)

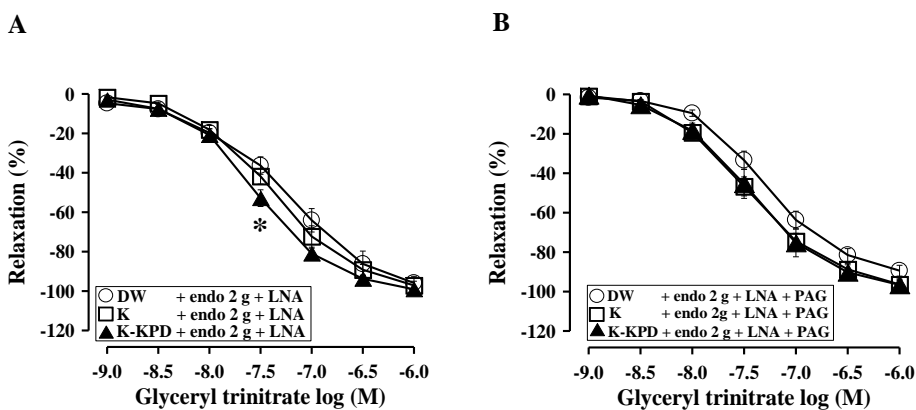
ส่วนผลการตอบสนองโดยการคลายตัวของหลอดเลือดต่อกลีเซอริลไตรไนเตรต (glyceryl trinitrate) แสดงไว้ในรูปที่ 28 พบว่ากลุ่มที่กินสารตำรับ K-KPD มีความไวในการตอบสนองโดยการคลายตัวมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (รูปที่ 28A) และผลดังกล่าวสามารถยับยั้งได้ด้วยการยับยั้งการสร้าง H_2S ด้วย PAG (รูปที่ 28B)



รูปที่ 26: แสดงผลของการกินสารตำรับ K-KPD ต่อการตอบสนองของหลอดเลือดแดงใหญ่ (thoracic aorta) ต่อ phenylephrine เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ป้อน K และกลุ่มควบคุมที่ป้อนน้ำกลั่น (A) หลอดเลือดที่มี endothelium (B) หลอดเลือดที่มี endothelium และถูกยับยั้งการสร้าง nitric oxide ด้วย N-nitro-L-arginine (L-NA) (C) หลอดเลือดที่มี endothelium ถูกยับยั้งการสร้าง nitric oxide ด้วย L-NA และถูกยับยั้งการสร้าง H₂S ด้วย propargylglycine (PAG) (D) หลอดเลือดที่ endothelium ถูกทำลาย (E) หลอดเลือดที่ endothelium ถูกทำลาย และถูกยับยั้งการสร้าง nitric oxide ด้วย N-nitro-L-arginine (L-NA) (F) หลอดเลือดที่ endothelium ถูกทำลาย ถูกยับยั้งการสร้าง nitric oxide ด้วย L-NA และถูกยับยั้งการสร้าง H₂S ด้วย propargylglycine (PAG) แต่ละจุดแสดงค่า mean ± SEM จากสัตว์ทดลอง 6 ตัว * มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, P < 0.05.



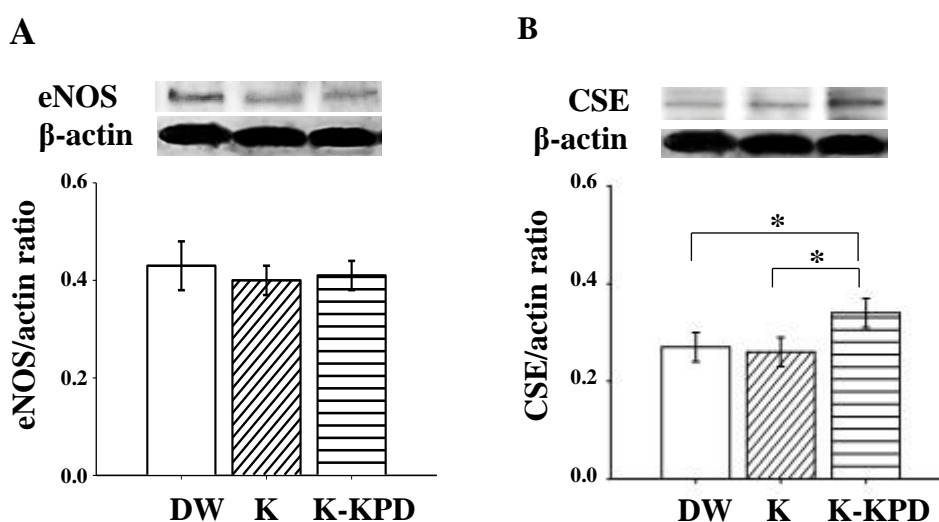
รูปที่ 27: แสดงผลของการกินสารตำรับ K-KPD, K หรือ น้ำกลั่น ต่อการคลายตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ (thoracic aorta) ที่ให้หดตัวอยู่ก่อนแล้วด้วย phenylephrine ต่อ acetylcholine ทั้งก่อน (A) และ หลังการสร้าง H_2S ด้วย PAG (B) แต่ละจุดแสดงค่า mean \pm SEM จากสัตว์ทดลอง 6 ตัว. * มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, $P < 0.05$.



รูปที่ 28: แสดงผลของการกินสารตำรับ K-KPD, K หรือ น้ำกลั่น ต่อการคลายตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ (thoracic aorta) ที่ให้หดตัวอยู่ก่อนแล้วด้วย phenylephrine ต่อ glyceryl trinitrate ทั้งก่อน (A) และ หลังการสร้าง H_2S ด้วย PAG (B) แต่ละจุดแสดงค่า mean \pm SEM จากสัตว์ทดลอง 6 ตัว. * มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, $P < 0.05$.

2.7 ผลของการป้อน K-KPD หรือ K หรือน้ำกลั่นต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีน endothelium nitric oxide synthase (eNOS) และ cystathionine- γ -lyase (CSE)

ผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีน eNOS และ CSE ของหลอดเลือด แสดงไว้ในรูปที่ 29 พบว่า การกินสารตำรับ K-KPD ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณการแสดงออกของโปรตีน eNOS (รูปที่ 29A) แต่มีผลเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน CSE เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่กิน K และกลุ่มควบคุมที่กินน้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (รูปที่ 29B)



รูปที่ 29: แสดงผลของการกินสารตำรับ K-KPD, K หรือน้ำกลั่น ต่อการแสดงออกของโปรตีน eNOS (A) และ CSE (B) ที่หลอดเลือด thoracic aorta แต่ละกลุ่มแสดงค่า mean ± SEM ของหลอดเลือดจากสัตว์ทดลอง 4 ตัว * มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่กิน K และกลุ่มควบคุมที่กินน้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, $P < 0.05$.

บทที่ 4

บทวิจารณ์

โรคทางระบบหัวใจและหลอดเลือดเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของการเสียชีวิตของมนุษย์ทั่วโลก อีกทั้งยังเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดความพิการและความทุพพลภาพ โดยอายุเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดที่นำไปสู่การเกิดโรคทางระบบหัวใจและหลอดเลือด เนื่องจากเป็นปัจจัยที่ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงได้ (Herrera et al., 2010; Lakkatta, 2002; 2015; Lo Coco et al., 2016) ดังนั้นการดูแลสุขภาพให้ดีตั้งแต่วัยกลางชีวิตจึงเป็นสิ่งจำเป็น ทั้งนี้เพื่อเป็นการชะลอหรือป้องกันการเกิดโรคระบบหัวใจและหลอดเลือดในช่วงวัยชรา

กระชายดำ (*Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker) เป็นสมุนไพรที่มีการใช้ทางการแพทย์พื้นบ้านของไทย โดยนิยมใช้ส่วนของเหง้าในการรักษาโรคต่าง ๆ และใช้เป็นยาอายุวัฒนะ (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2540) ปัจจุบันมีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์มากมายที่ยืนยันการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น บำรุงสมรรถภาพทางเพศ (aphrodisiac) (Chaturapanich et al., 2012; Jannsukul et al., 2012; Sudwan et al., 2006; Wattanathorn et al., 2012), ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) (Jin and Lee, 2018; Tewtrakul et al., 2009), ลดความดันโลหิต (anti-hypertensive) (Saokaew et al., 2017), ป้องกันระบบหัวใจและหลอดเลือด (cardioprotective) (Malakul et al., 2011; Tep-Areemnan et al., 2010) และต้านภาวะอ้วนลงพุง (antiobesity) (Akase et al., 2011) นอกจากนี้รายงานการวิจัยของ Yorsin et al., 2014 ยังพบว่า การกินสารสกัดกระชายดำด้วยไคคลอโรมีเทน (KPD) ทำให้เพิ่มการแสดงออกของโปรตีน eNOS ของหลอดเลือด ส่งผลให้มีการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) เพิ่มขึ้นในหนูแรทเพศผู้วัยกลางชีวิต อีกทั้ง KPD ยังช่วยลดน้ำหนักตัวและไขมันในร่างกาย รวมไปถึงลดการสะสมของไขมันที่ตับ ดังนั้น KPD น่าจะเป็นทางเลือกที่ดีในการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพในการป้องกันและ/หรือยืดอายุการเกิดโรคอ้วนลงพุงและ/หรือโรคทางระบบหัวใจและหลอดเลือดในมนุษย์ได้

อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบ KPD เป็นสารที่ละลายน้ำได้ยาก ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มความสามารถในการละลายของ KPD ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีการเตรียม KPD ขึ้นด้วยเทคนิค solid dispersion โดยใช้ Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) ซึ่งเป็นสารปรุงแต่งทางเภสัชกรรมที่

พัฒนาขึ้นเป็นพอลิเมอร์เคลือบรูปแบบที่ว่าจะถูกปลดปล่อยออกมาทันทีเมื่อเข้าสู่ร่างกาย (Janssens et al., 2007; Fouad et al., 2011; BASF, 2015; Fussnegger et al., 2016) โดยใช้อัตราส่วน KPD: Kollicoat® IR เท่ากับ 1: 1 (W: W) เรียกตำรับยานี้ว่า K-KPD ซึ่งการเตรียม KPD ด้วยเทคนิคดังกล่าวสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการละลายของ KPD ให้ดีขึ้นได้ (Weerapol et al., 2020)

จากการศึกษาทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ของตำรับ K-KPD หลังการบริหารยาทางปาก ที่เวลาต่าง ๆ โดยวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญหลักของกระชายดำ ได้แก่ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PMF), 5,7-dimethoxyflavone (DMF) และ 5,7,4'-trimethoxyflavone (TMF) ในน้ำเลือด จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ความเข้มข้นของสารทั้ง 3 ชนิดในน้ำเลือดถึงจุดสูงสุดหลังจากได้รับ K-KPD ไปแล้ว 90 นาที และพบว่าสาร DMF และ TMF มีความเข้มข้นเป็นสองเท่าของ PMF เมื่อเปรียบเทียบการดูดซึมของ KPD (Yorsin et al., 2014) กับตำรับ K-KPD ที่พัฒนาขึ้น พบว่าเมื่อเตรียมตำรับยาด้วย Kollicoat® IR (K) สามารถเพิ่มการดูดซึมยา (PMF, DMF และ TMF) เข้าสู่กระแสเลือดได้มากขึ้น แสดงให้เห็นว่าการละลายของยามีความสอดคล้องกับการดูดซึมยาเข้าสู่กระแสเลือด โดยยาที่มีการละลายที่ดีจะส่งผลให้ค่าความเข้มข้นของการดูดซึมยาเข้าสู่กระแสเลือดเพิ่มขึ้น (Weerapol et al., 2020)

การศึกษากการกระจายตัวของสารสำคัญไปยังอวัยวะต่าง ๆ ที่เวลาต่าง ๆ หลังการบริหาร โภค K-KPD โดยวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญหลักของกระชายดำ พบว่า ตับเป็นอวัยวะที่มีปริมาณของ PMF, DMF, และ TMF สูงที่สุด (Mekjaruskul et al., 2012) ที่เวลา 90 และ 240 นาที นอกจากนี้ยังสามารถพบสารสำคัญหลักทั้ง 3 ชนิดในสมองอีกด้วย (Mekjaruskul et al., 2012) ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านความวิตกกังวลและอาการซึมเศร้าในหนู, ฤทธิ์เพิ่มการจดจำและการเรียนรู้ในหนูที่มีภาวะเครียด (Wattanathron et al., 2007; Wattanathron et al., 2008) และฤทธิ์ป้องกันสมองจากภาวะความบกพร่องในการจดจำ และการลดลงของการสร้างเซลล์ประสาทในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (hippocampal neurogenesis) ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำโดยกรดวอลโปรอิก (valproic acid) (Welbat et al., 2016)

สำหรับการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ K-KPD ศึกษาในหนูแรทเพศผู้วัยกลางชีวิต สายพันธุ์ Wistar อายุ 12-14 เดือน ซึ่งเป็นช่วงอายุที่มีการเปลี่ยนแปลงของระบบต่าง ๆ ในร่างกายที่มีเกี่ยวข้องกับภาวะเมตาบอลิกซินโดรม (ภาวะอ้วนลงพุง) และโรคทางระบบหัวใจและหลอดเลือด (Ghezzi et al., 2012) โดยป้อน K-KPD ขนาด 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (เท่ากับ 100 มิลลิกรัม KPD/กิโลกรัม), K (100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) หรือน้ำกลั่น วันละ 2 ครั้ง นาน 6 สัปดาห์ ซึ่งใช้วิธีการ

เดียวกันกับการศึกษาก่อนหน้า (Yorsin et al., 2014) ทั้งนี้เพื่อเป็นการยืนยันฤทธิ์ทางชีวภาพ K-KPD และเพื่อแสดงให้เห็นถึงผลกระทบของ K ต่อกิจกรรมทางชีวภาพของ KPD จากการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าการบริโภคน้ำหนักของหนูแรทเพศผู้วัยกลางชีวิตลดลง รวมทั้งไขมันในร่างกายและไขมันในช่องท้อง (visceral fat) และลดการสะสมไขมันที่เนื้อเยื่อตับ แต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของอวัยวะภายในต่าง ๆ นอกจากนี้ยังมีผลต่อการลดลงของระดับน้ำตาลในเลือด (plasma glucose) และไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) อีกด้วย ซึ่งคล้ายกับรายงานก่อนหน้าที่เกี่ยวข้องกับการบริโภค KPD (Yorsin et al., 2014) ส่วนการบริโภค K เพียงอย่างเดียวไม่ส่งผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงใด ๆ ที่กล่าวมาข้างต้น ซึ่งผลลัพธ์เหล่านี้แสดงให้เห็นว่า K เป็นเพียงสารเพิ่มปริมาณเนื้อหาที่ใช้เป็นตัวช่วยเพิ่มการละลายของ KPD ในเทคนิค solid dispersion เท่านั้น และไม่ส่งผลกระทบต่อฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์ของ KPD

นอกจากนี้การบริโภค K-KPD และ K ไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจพื้นฐานในหนูแรทเพศผู้วัยกลางชีวิตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น อีกทั้งการบริโภค K-KPD ยังทำให้การตอบสนองต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงทรวงอก (thorasis aorta) ลดลง และเสริมการคลายตัวของหลอดเลือดต่อแอสซิติล โคลีน (acetylcholine) และกลีเซอริล ไตรไนเตรต (glyceryl trinitrate) ซึ่งผลดังกล่าวคล้ายกับรายงานการวิจัยของ Yosin และคณะ (2014) อย่างไรก็ตาม ผลดังกล่าวมีกลไกการออกฤทธิ์ที่ต่างกัน โดยพบว่าการลดลงของการตอบสนองต่อการหดตัวของหลอดเลือดที่ทำให้หดตัวอยู่ก่อนด้วย phenylephrine ถูกยับยั้งได้ด้วย PAG (cystathionine- γ -lyase inhibitor) หรือด้วยการทำลายเยื่อผนังหลอดเลือด (endothelium) แต่ไม่ใช่ด้วย L-NA (nitric oxide synthase inhibitor) ดังนั้นการศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นว่า การตอบสนองต่อการหดตัวของหลอดเลือดที่ลดลงเป็นผลมาจากไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ซึ่งไม่ใช่จากไนตริกออกไซด์ (NO) และในทำนองเดียวกันการคลายตัวที่เพิ่มขึ้นของหลอดเลือดต่อ acetylcholine หรือ glyceryl trinitrate ของหนูแรทที่บริโภค K-KPD ก็ถูกยับยั้งได้ด้วย PAG ซึ่งชี้ให้เห็นว่าผลเหล่านี้อาจถูกปรับเปลี่ยนหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงอันเนื่องมาจากการปรับขึ้นของ H_2S ด้วยเหตุนี้เพื่อเป็นการยืนยันผลการศึกษาดังกล่าวไว้ว่าสิ่งที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจาก KPD แต่ไม่ใช่จาก K จึงได้ทำการศึกษาโดยวิเคราะห์ดูการแสดงออกของ cystathionine- γ -lyase (CSE) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่กระตุ้นให้เกิดการสร้างและหลั่ง H_2S ด้วยวิธี Western blot analysis พบว่าการแสดงออกของโปรตีน CSE ของหลอดเลือดที่ได้รับ K-KPD สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับ K และกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญ

สารสกัดหยาบเหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทน (KPD) ประกอบด้วยสารสำคัญหลักอยู่ 3 ชนิด ได้แก่ PMF, DMF, และ TMF (Yorsin et al., 2014) มีรายงานการศึกษา ก่อนหน้าพบว่า สารทั้ง 3 ชนิดนี้ มีผลทำให้หลอดเลือดแดงทรวงอกที่ตัดแยกออกมามีการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) คลายตัว (vasodilatation) ซึ่งส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง NO

(Tep-Areenan et al., 2010; Tep-Areenan and Sawasdee, 2010; Yosin et al., 2015) ในรายงาน การศึกษาเกี่ยวกับสาร PMF ของ Yosin และคณะ (2015) พบว่า นอกจาก PMF จะกระตุ้นให้เกิด การหลั่ง NO เพื่อปรับการทำงานของหลอดเลือดแล้ว PMF ยังกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง H₂S ซึ่งมีผล ต่อการปรับการทำงานของหลอดเลือดอีกด้วย และผลดังกล่าวนี้ยังปรากฏในการศึกษาแบบ *in vivo* หลังจากการบริโภคนาน 6 สัปดาห์ (Yorsin et al., 2016) ดังนั้นสารออกฤทธิ์ของ K-KPD ที่มีผลต่อกิจกรรมทางชีวภาพข้างต้นจึงเป็นสารสำคัญหลักทั้ง 3 ชนิด (PMF, DMF, และ TMF) ของ KPD อย่างไรก็ตามจากการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของ KPD และ K-KPD โดยใช้สาร PMF, DMF และ TMF เป็น Markers กลับพบความแตกต่างบางประการ โดยในรายงานของ Yosin และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษา KPD ที่ละลายด้วยทวิน 80 (tween 80): คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสหรือ ซีเอ็มซี (carboxymethylcellulose): น้ำกลั่น (0.2 g: 0.2 g: 10 mL) และพบว่าสารสำคัญหลักทั้งสาม ชนิดในเลือดถึงจุดสูงสุดที่เวลา 60 นาทีหลังการบริหารยาทางปาก ส่วนในการศึกษาของ Weerapol และคณะ (2020) ละลาย K-KPD ด้วยน้ำกลั่น พบว่าสารสำคัญหลักทั้งสามชนิดในเลือดถึงจุดสูงสุด ที่เวลา 90 นาทีหลังการบริหารยาทางปาก และพบว่าสาร DMF และ TMF มีความเข้มข้นเป็นสอง เท่าของ PMF ซึ่งต่างจาก KPD ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่ DMF และ/หรือ TMF อาจจะเป็นองค์ประกอบ หลักของ K-KPD ที่มีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของโปรตีน CSE ของหลอดเลือด และส่งผล ให้มีการผลิต H₂S เพิ่มขึ้นเพื่อเป็นการปรับเปลี่ยนการทำงานของหลอดเลือด อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสาร DMF และ TMF โดยแยกสารทั้งสองออกมาแล้ว ตรวจสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในร่างกาย (*in vivo*) เพื่อเป็นการยืนยันความเป็นไปได้ดังกล่าว

บทที่ 5

บทสรุป

จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารสกัดหยาบเหง้ากระชายดำด้วยไดคลอโรมีเทน (KPD) เมื่อมีการเตรียมขึ้นใหม่ด้วยเทคนิค solid depression โดยใช้ Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) เป็นตัวช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการละลาย ส่งผลให้สาร KPD สามารถละลายน้ำได้ดีขึ้นจึงช่วยเพิ่มการดูดซึมสารสำคัญทั้ง 3 ชนิด (PMF, DMF และ TMF) ที่เป็นองค์ประกอบหลักในสาร KPD เข้าสู่กระแสเลือด และจากการศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ K-KPD พบว่า การบริโภคร K-KPD ทำให้การสะสมไขมันในร่างกาย และไขมันในเนื้อเยื่อตับลดลง ลดระดับน้ำตาลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือด และยังเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน CSE ของหลอดเลือดส่งผลให้การสร้างและหลั่ง H₂S เพิ่มขึ้นเพื่อเป็นการปรับการทำงานของหลอดเลือดในหนูเพศผู้วัยกลางชีวิต อีกทั้งยังเสริมการคลายตัวของหลอดเลือดต่อ acetylcholine (ACh) และ glyceryl trinitrate (GTN) ซึ่งเป็นยาที่มีฤทธิ์ขยายหลอดเลือด นอกจากนี้การบริโภคร K-KPD ยังไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าการทำงานของตับและไต และค่าทางโลหิตวิทยาต่าง ๆ ยกเว้นระดับของเกล็ดเลือด แต่ทั้งนี้ค่าดังกล่าวยังอยู่ในช่วงของค่าปกติ ดังนั้น K-KPD ซึ่งเป็นตำรับที่พัฒนาขึ้นด้วยเทคนิค solid depression น่าจะเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพแนวใหม่ที่จะช่วยยืดอายุการมีสุขภาพดีของระบบหัวใจและหลอดเลือด และ/หรือป้องกันการเกิดภาวะอ้วนลงพุง ซึ่งคุ้มค่าต่อการพัฒนาเพิ่มเติมในรูปแบบของยาเม็ดหรือแคปซูลเพื่อความสะดวกในการรับประทาน อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความเป็นพิษ (toxicity study) และการศึกษาทางคลินิก (clinical trials) รวมไปถึงผลข้างเคียง (side effect) ของตำรับยาในมนุษย์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร: กระจายคำ [ออนไลน์]. 2553, แหล่งที่มา : <http://www.thaicruddrug.com/main.php?action=viewpage&pid=4> [9 พฤศจิกายน 2563].
- ฉวีวรรณ จันสกุล, กุลเดช เตชะนภารักษ์, พวงเพ็ญ ศิริรักษ์. การแยกสารคล้ายตัวต่อเนื้อเยื่อ cavernosum จากเหง้ากระจายคำและกลไกในการแสดงฤทธิ์ของสารนั้นต่อเนื้อเยื่อ human cavernosum ที่ตัดออกมาศึกษาออกตัว (รายงานฉบับสมบูรณ์ ทุนอุดหนุนการวิจัย 2550-2551). มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2552.
- ทรงพล ชิวพัฒน์, ปราณิ ชวลิตธำรง และคณะ. การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังของผงกระจายคำ. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์แผนทางเลือก. 2547 กุมภาพันธ์-พฤษภาคม; 2(2): 3-15.
- บึงอร ศรีพานิชกุลชัย. ลักษณะพฤกษศาสตร์ของกระจายคำ. การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์. ขอนแก่น : คลังนานาวิทยา, 2553: 47-64
- วุฒิ วุฒิชรรมเวช. เกษษกรรมไทย รวมสมุนไพร ฉบับปรับปรุงใหม่. บางกอกน้อย กรุงเทพฯ: โอ เอส. พรีนติ้ง เฮ้าส์, 2540.
- วุฒิ วุฒิชรรมเวช. สารานุกรมสมุนไพร รวมหลักเภสัชกรรมไทย. บางกอกน้อย กรุงเทพฯ: โอเดียน สโตร์, 2540.
- เสริมสกุล พจนการุณ, ไชยขง รุจจนเวท, ประสาท กิตตะคุปต์. ส่วนสกัดของเหง้ากระจายคำที่มีฤทธิ์ต้านความเหนียวล้า. วารสารวิชาการเกษตร. 2552 กันยายน-ธันวาคม; 27(3): 256-274.
- องค์การสวนพฤกษศาสตร์ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. ฐานข้อมูลพรรณไม้-พื้นบ้าน: กระจายคำ [ออนไลน์]. 2556, แหล่งที่มา: <http://www.qsbg.org/Database/plantdb/mdp/medicinal-specimen.asp?id=26> [9 พฤศจิกายน 2563].
- อัญชลี จุฑะพุทธิ. กระจายคำ: สมุนไพร Champion Product. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์แผนทางเลือก. 2556 มกราคม-เมษายน; 11(1): 4-16.
- Abdel-Latif AA. Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and the generation of second messengers. Pharmacological reviews. 1986 Sep; 38(3): 227-272.

- Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 1996 Feb 1; 16(3):1066-71.
- Abete I, Astrup A, Martinez JA, Thorsdottir I, Zulet MA. Obesity and the metabolic syndrome: role of different dietary macronutrient distribution patterns and specific nutritional components on weight loss and maintenance. *Nutrition reviews*. 2010 Apr; 68(4): 214-231.
- Adner M, Jansen I, Edvinsson L. Endothelin-A receptors mediate contraction in human cerebral, meningeal and temporal arteries. *Journal of the autonomic nervous system*. 1994 Sep; 49: 117-121.
- Akase T, Shimada T, Terabayashi S, Ikeya Y, Sanada H, Aburada M. Antiobesity effects of *Kaempferia parviflora* in spontaneously obese type II diabetic mice. *Journal of natural medicines*. 2011 Jan; 65(1) :73-80.
- Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009 Oct 20; 120(16): 1640-1645.
- Al-Magableh MR, Hart JL. Mechanism of vasorelaxation and role of endogenous hydrogen sulfide production in mouse aorta. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2011 Apr; 383(4): 403-413.
- Alshehri AM. Metabolic syndrome and cardiovascular risk. *Journal of family & community medicine*. 2010 May; 17(2): 73-78.
- Anatomy Note. ARTERY, VEIN AND CAPILLARY ANATOMICAL STRUCTURE IN DETAIL [Online]. 2019, Available from: <https://www.anatomynote.com/human-anatomy/blood-supplement/artery-vein-and-capillary-anatomical-structure-in-detail/> [9 Nov 20].
- Anggard EE. Endogenous and exogenous nitrates. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. 1992 Dec; 36(97): 7-10.

- Balligand JL. New mechanisms of LDL-cholesterol induced endothelial dysfunction; correction by statins. Bulletin et memoires de l'Academie royale de medecine de Belgique. 2002; 157(10-12): 427-431.
- Banga I, Balo J. Elasticity of the vascular wall. I. The elastic tensibility of the human carotid as a function of age and arteriosclerosis. Acta physiologica Academiae Scientiarum Hungaricae. 1961; 20: 237-247.
- Banjerdpongchai R, Chanwikruy Y, Rattanapanone V, Sripanidkulchai B. Induction of apoptosis in the human Leukemic U937 cell line by *Kaempferia parviflora* Wall. ex. Baker extract and effects of paclitaxel and camptothecin. Asian Pacific journal of cancer prevention. 2009;10(6):1137-1140.
- Banjerdpongchai R, Suwannachot K, Rattanapanone V, Sripanidkulchai B. Ethanolic rhizome extract from *Kaempferia parviflora* Wall. ex. Baker induces apoptosis in HL-60 cells. Asian Pacific journal of cancer prevention. 2008 Oct- Dec; 9(4): 595 - 600.
- Bankoski A, Harris TB, McClain JJ, Brychta RJ, Caserotti P, Chen KY, et al. Sedentary activity associated with metabolic syndrome independent of physical activity. Diabetes care. 2011 Feb; 34(2): 497-503.
- Barbagallo CM, Cavera G, Sapienza M, Noto D, Cefalu AB, Pagano M, et al. Prevalence of overweight and obesity in a rural southern Italy population and relationships with total and cardiovascular mortality: the Ventimiglia di Sicilia project. International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity. 2001 Feb; 25(2): 185-190.
- BASF Pharma. Kollicoat® IR: Technical information 2015. [Online]. Available from : <https://pharma.basf.com/products/kollicoat-ir>. [7 Sep 20].
- Bassenge E. Endothelial function in different organs. Progress in Cardiovascular Diseases. 1996 Nov-Dec; 39(3): 209-228.
- Bergholm R, Tiikkainen M, Vehkavaara S, Tamminen M, Teramo K, Rissanen A, et al. Lowering of LDL cholesterol rather than moderate weight loss improves endothelium-dependent vasodilatation in obese women with previous gestational diabetes. Diabetes care. 2003 Jun; 26(6): 1667-1672.

- Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, et al. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*. 1995 May 1; 91(9): 2488-2496.
- Bermudez VJ, Rojas E, Toledo A, Rodriguez-Molina D, Vega K, Suarez L, et al. Single-nucleotide polymorphisms in adiponectin, AdipoR1, and AdipoR2 genes: insulin resistance and type 2 diabetes mellitus candidate genes. *American journal of therapeutics*. 2013 Jul-Aug; 20(4): 414-421.
- Berne R and Levy MN. The cardiovascular system: In physiology. Mosby-yearbook Inc.: 1993(3): 465-549.
- Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. *Physiology*. 5th Edition. Mosby Inc. USA. 2004.
- Blokhin IO, Lentz SR. Mechanisms of thrombosis in obesity. *Current opinion in hematology*. 2013; 20(5): 437-444.
- Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*. 1994 Apr 28; 368(6474): 850-853.
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*. 1990 Oct 25; 347(6295): 768-770.
- Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990 Jan; 87(2): 682-685.
- Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*. 2016 May; 248: 97-109.
- Chaturapanich G, Chaiyakul S, Verawatnapakul V, Pholpramool C. Effects of *Kaempferia parviflora* extracts on reproductive parameters and spermatid blood flow in male rats. *Reproduction*. 2008 Oct; 136(4): 515-522.
- Chaturapanich G, Chaiyakul S, Verawatnapakul V, Yimlamai T, Pholpramool C. Enhancement of aphrodisiac activity in male rats by ethanol extract of *Kaempferia parviflora* and exercise training. *Andrologia*. 2012 May; 44 Suppl 1:323-328.

- Chen AR, Zhang HG, Wang ZP, Fu SJ, Yang PQ, Ren JG, et al. C-reactive protein, vitamin B12 and C677T polymorphism of N-5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene are related to insulin resistance and risk factors for metabolic syndrome in Chinese population. *Clinical and investigative medicine Medecine clinique et experimentale*. 2010 Oct 1; 33(5): 290-297.
- Chivapat S, Chavalittumrong P, Attawish A, Rungsipipat A. Chronic toxicity study of *Kaempferia parviflora* Wall ex. Extract. *The Thai Journal of Veterinary Medicine* 2010; 40: 377-383.
- Clark J.F. and G. Pyne-Geithman, Vascular smooth muscle function: The physiology and pathology of vasoconstriction. *Pathophysiology*, 2005. 12(1): 35-45.
- Davenport AP, Hyndman KA, Dhaun N, Southan C, Kohan DE, Pollock JS, Maguire JJ. Endothelin. *Pharmacological Reviews*. 2016; 68(2): 357-418.
- De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr., et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *The Journal of clinical investigation*. 1995 Jul; 96(1): 60-68.
- Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007 Mar 13; 115(10): 1285-1295.
- DeFina LF, Vega GL, Leonard D, Grundy SM. Fasting glucose, obesity, and metabolic syndrome as predictors of type 2 diabetes: the Cooper Center Longitudinal Study. *Journal of investigative medicine: the official publication of the American Federation for Clinical Research*. 2012 Dec; 60(8): 1164-1168.
- Department of Economic and Social Affairs, Population Division, United Nations. *World Population Prospects: The 2017 Revision, Key Findings and Advance Tables*. New York. 2017; 1-53.
- Department of School education of Government of Tamil Nadu. Chapter 7: Body Fluids and Circulation: Structure of blood vessels [Online]. 2018, Available from: http://www.brainkart.com/article/Structure-of-blood-vessels_33216/ [9 Nov 20].

- Doni MG, Whittle BJ, Palmer RM, Moncada S. Actions of nitric oxide on the release of prostacyclin from bovine endothelial cells in culture. *European journal of pharmacology*. 1988 Jun 22; 151(1): 19-25.
- Duffy SJ, Biegelsen ES, Eberhardt RT, Kahn DF, Kingwell BA, Vita JA. Low-renin hypertension with relative aldosterone excess is associated with impaired NO-mediated vasodilation. *Hypertension*. 2005; 46(4): 707-713.
- Ebrahimkhani MR, Mani AR, Moore K. Hydrogen sulphide and the hyperdynamic circulation in cirrhosis: a hypothesis. *Gut*. 2005 Dec; 54(12): 1668-1671.
- Feher J. 3.8 Smooth Muscle. *Quantitative Human Physiology*. 2nd edition. Academic Press, USA. 2017.
- Feliciano Pereira P, Eloiza Priore S, Bressan J. Aldosterone: a cardiometabolic risk hormone? *Nutricion hospitalaria*. 2014 Dec 1; 30(6): 1191-1202.
- Fouad EA, El-Badry M, Neau SH, Alanazi FK, Alsarra IA. Technology evaluation: Kollicoat[®] IR. *Expert Opin Drug Deliv*. 2011 May; 8(5): 693-703.
- Fujii K, Ohmori S, Tominaga M, Abe I, Takata Y, Ohya Y, et al. Age-related changes in endothelium-dependent hyperpolarization in the rat mesenteric artery. *American Journal of Physiology*. 1993; 265(2 Pt 2): 509-516.
- Furchgott RF. The Discovery of Endothelium-Derived Relaxing Factor and Its Importance in the Identification of Nitric Oxide. *The Journal of the American Medical Association*. 1996; 276(14): 1186–1188.
- Furchgott RF, and Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288(5789): 373-376.
- Fussnegger B, Tawde V, Chivate A, Kolter K, Ali S. Kollicoat[®] IR: Minimizing the Risks for Oxidative Degradation of Drugs. *Journal of Analytical & Pharmaceutical research*. 2016 May; 2(3): 84-87.
- Gaballa MA, Jacob CT, Raya TE, Liu J, Simon B, Goldman S. Large artery remodeling during aging: biaxial passive and active stiffness. *Hypertension*. 1998; 32(3): 437-443.
- Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Atzmon G, Rajala MW, Berg AH, et al. Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process? *Diabetes*. 2002; 51(10): 2951-2958.

- Ghezzi AC, Cambri LT, Botezelli JD, Ribeiro C, Dalia RA, de Mello MA. Metabolic syndrome markers in wistar rats of different ages. *Diabetology & metabolic syndrome*. 2012 Apr 27; 4(1): 16.
- Gkaliagkousi E, Ferro A. Nitric oxide signalling in the regulation of cardiovascular and platelet function. *Frontiers in bioscience*. 2011 Jan 1; 16: 1873-1897.
- Gordon MB and Libby P. *Atherosclerosis*. 3rd edition. Lippincott Williams & Wilkins: Awolters Kluwer Company. USA. 2003.
- Grover-Paez F, Zavalza-Gomez AB. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors. *Diabetes research and clinical practice*. 2009 Apr; 84(1): 1-10.
- Grundy SM. Pre-diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012 Feb 14; 59(7): 635-643.
- Guyton JR, Lindsay KL, Dao DT. Comparison of aortic intima and inner media in young adult versus aging rats. *Stereology in a polarized system. The American journal of pathology*. 1983; 111(2): 234-246.
- Hadi HA, Carr CS, Al Suwaidi J: Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vascular health and risk management*. 2005; 1(3): 183-198.
- Hartshorne DJ. Biochemical basis for contraction of vascular smooth muscle. *Chest*. 1980 Jul; 78(1 Suppl): 140-149.
- Hartshorne DJ and Kawanura J. Regulation of contraction-relaxation in smooth muscle. *Neural Information Processing Systems*. 1992; 7(2): 59-64.
- He W, Goodkind D, and Kowal P. *An Aging World: 2015. International Population Reports*. U.S. Government Publishing Office. USA. 2016: 1-175.
- Heller R, Polack T, Grabner R, Till U. Nitric oxide inhibits proliferation of human endothelial cells via a mechanism independent of cGMP. *Atherosclerosis*. 1999 May; 144(1): 49-57.
- Herrera R, Almaguer M, Chipi J, Toirac X, Martinez O, Castellanos O, et al. Detection of markers of cardiovascular and renal risk in Cuba: Isle of Youth Study (ISYS). *Nephron Clinical practice*. 2011; 117(4): 353-362.

- Horikawa T, Shimada T, Okabe Y, Kinoshita K, Koyama K, Miyamoto K, et al.
Polymethoxyflavonoids from *Kaempferia parviflora* induce adipogenesis on 3T3-L1 preadipocytes by regulating transcription factors at an early stage of differentiation. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2012; 35(5): 686-692.
- Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997 Aug 28; 237(3): 527-531.
- Huang CY, Chi SC, Sousa VD, Wang CP, Pan KC. Depression, coronary artery disease, type 2 diabetes, metabolic syndrome and quality of life in Taiwanese adults from a cardiovascular department of a major hospital in Southern Taiwan. *Journal of clinical nursing*. 2011 May; 20(9-10):1293-1302.
- International Diabetes Federation (IDF). The IDF consensus, worldwide definition of the metabolic syndrome. 2006. [Online]. Available from: <https://www.idf.org/e-library/consensus-statements/60-idfconsensus-worldwide-definition-of-the-metabolic-syndrome>. [14 Feb 21].
- Jackson-Weaver O, Paredes DA, Gonzalez Bosc LV, Walker BR, Kanagy NL. Intermittent hypoxia in rats increases myogenic tone through loss of hydrogen sulfide activation of large-conductance Ca^{2+} -activated potassium channels. *Circulation research*. 2011 Jun 10; 108(12): 1439-1447.
- Jani B and Rajkumar C. Ageing and vascular ageing. *Postgraduate medical journal*. 2006; 82(968): 357-362.
- Jansakul C, Tachanaparuksa K, Mulvany MJ, Sukpondma Y. Relaxant mechanisms of 3, 5, 7, 3',4'-pentamethoxyflavone on isolated human cavernosum. *European journal of pharmacology*. 2012 Sep 15; 691(1-3): 235-244.
- Janssens S, de Armas HN, Remon JP, Van den Mooter G. The use of a new hydrophilic polymer, Kollicoat® IR, in the formulation of solid dispersions of Itraconazole. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007 Mar; 30(3-4): 288-294.
- Jin S, Lee MY. *Kaempferia parviflora* Extract as a Potential Anti-Acne Agent with Anti-Inflammator, Sebostatic and Anti-Propionibacterium acnes Activity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19(11): 3457.

- Kamiya A, Bukhari R, Togawa T. Adaptive regulation of wall shear stress optimizing vascular tree function. *Bulletin of mathematical biology*. 1984; 46(1): 127-137.
- Kawai Y, Yokoyama Y, Kaidoh M, Ohhashi T. Shear stress-induced ATP-mediated endothelial constitutive nitric oxide synthase expression in human lymphatic endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2010 Mar; 298(3): C647-655.
- Keane KN, Cruzat VF, Carlessi R, de Bittencourt PI, Jr., Newsholme P. Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and beta-Cell Dysfunction. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015; 2015: 1-15.
- Kirby RF, Woodworth CH, Woodworth GG, Johnson AK. Beta-2 adrenoceptor mediated vasodilation: role in cardiovascular responses to acute stressors in spontaneously hypertensive rats. *Clinical and experimental hypertension Part A, Theory and practice*. 1991; 13(5): 1059-1068.
- Kobayashi H, Horiguchi-Babamoto E, Suzuki M, Makihara H, Tomozawa H, Tsubata M, et al. Effects of ethyl acetate extract of *Kaempferia parviflora* on brown adipose tissue. *Journal of natural medicines*. 2016 Jan; 70(1): 54-61.
- Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature*. 1994 Dec 08; 372(6506): 546-548.
- Kohn C, Dubrovskaja G, Huang Y, Gollasch M. Hydrogen sulfide: potent regulator of vascular tone and stimulator of angiogenesis. *International journal of biomedical science: IJBS*. 2012 Jun; 8(2): 81-86.
- Kwaifa IK, Bahari H, Yong YK, Noor SM. Endothelial Dysfunction in Obesity-Induced Inflammation: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Biomolecules*. 2020 Feb 13; 10(2): 291.
- Lai WK, Kan MY. Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction. *Annals of nutrition & metabolism*. 2015; 67(1): 1-12.
- Lakatta EG. Cardiovascular ageing in health sets the stage for cardiovascular disease. *Heart, lung & circulation*. 2002; 11(2): 76-91.
- Lakatta EG. So! What's aging? Is cardiovascular aging a disease? *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2015; 83: 1-13.

- Leardkamolkarn V, Tiemyuyen S, Sripanidkulchai BO. Pharmacological activity of *Kaempferia parviflora* extract against human bile duct cancer cell lines. *Asian Pacific journal of cancer prevention*. 2009 Oct-Dec; 10(4): 695-698.
- Lert-Amornpat T, Maketon C, Fungfuang W. Effect of *Kaempferia parviflora* on sexual performance in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Andrologia*. 2017 Dec; 49(10): 1-6.
- Letra L, Sena C. Cerebrovascular Disease: Consequences of Obesity-Induced Endothelial Dysfunction. *Advances in neurobiology*. 2017; 19: 163-189.
- Levick JR. An introduction to cardiovascular physiology. 3rd edition. Arnold. USA. 2006.
- Li L, Rose P, Moore PK. Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2011; 51: 169-187.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002 Dec 19-26; 420(6917): 868-874.
- Lim ES, Ko YK, Ban KO. Prevalence and risk factors of metabolic syndrome in the Korean population--Korean National Health Insurance Corporation Survey 2008. *Journal of advanced nursing*. 2013 Jul; 69(7): 1549-1561.
- Lim S, Shin H, Song JH, Kwak SH, Kang SM, Won Yoon J, et al. Increasing prevalence of metabolic syndrome in Korea: the Korean National Health and Nutrition Examination Survey for 1998-2007. *Diabetes care*. 2011 Jun; 34(6):1323-1328.
- Liscum L, Munn NJ. Intracellular cholesterol transport. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999 Apr 19; 1438(1): 19-37.
- Liu H, Bai XB, Shi S, Cao YX. Hydrogen sulfide protects from intestinal ischaemia-reperfusion injury in rats. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2009 Feb; 61(2): 207-212.
- Lo Coco D, Lopez G, Corrao S. Cognitive impairment and stroke in elderly patients. *Vascular health and risk management*. 2016 Mar; 12: 105-116.
- Longo-Mbenza B, Nkongo Mvindu H, Kasiam On'kin JB, Bikuku N, Kianu Phanzu B, Nge Okwe A, et al. The deleterious effects of physical inactivity on elements of insulin resistance and metabolic syndrome in Central Africans at high cardiovascular risk. *Diabetes & metabolic syndrome*. 2011 Jan-Mar; 5(1):1-6.

- Lopes JP, Oliveira SM, Soares Fortunato J. [Oxidative stress and its effects on insulin resistance and pancreatic beta-cells dysfunction: relationship with type 2 diabetes mellitus complications]. *Acta Medica Portuguesa*. 2008 May-Jun;21(3): 293-302.
- Lukaszyc A, Bodzenta-Lukaszyc A, Aksiucik A, Gabryelewicz A, Konturek SJ, Bielawiec M. The role of epidermal growth factor in platelet-endothelium interactions. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*. 1998 Jun; 49(2): 229-239.
- Luscher TF, Tanner FC. Endothelial regulation of vascular tone and growth. *American journal of hypertension*. 1993; 6(7 Pt 2): 283S-293S.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000 Sep 14; 407(6801): 233-241.
- Malakul W, Ingkaninan K, Sawasdee P, Woodman OL. The ethanolic extract of *Kaempferia parviflora* reduces ischemic injury in rat isolated hearts. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011 Sep 1; 137(1): 184-191.
- Marieb EN. *Human anatomy and physiology: The cardiovascular system*. 3rd Edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. United States. 1995.
- Martini FH. *Fundamentals of Anatomy And Physiology*. 7th edition. Pearson Education Inc. New York. 2006.
- Matz RL, Schott C, Stoclet JC, Andriantsitohaina R: Age-related endothelial dysfunction with respect to nitric oxide, endothelium-derived hyperpolarizing factor and cyclooxygenase products. *Physiological research*. 2000; 49(1): 11-18.
- Mekjaruskul C, Jay M, Sripanidkulchai B. Pharmacokinetics, bioavailability, tissue distribution, excretion, and metabolite identification of methoxyflavones in *Kaempferia parviflora* extract in rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2012 Dec; 40(12): 2342-2353.
- Miles EW, Kraus JP. Cystathionine beta-synthase: structure, function, regulation, and location of homocystinuria-causing mutations. *The Journal of biological chemistry*. 2004 Jul 16; 279(29): 29871-29874.
- Milnor WR. The importance of vascular distensibility. *Maryland state medical journal*. 1960 Sep; 9: 554-555.

- Moini J. Chapter 5: Anatomy and Physiology of the Cardiovascular System [Online]. 2013, Available from: http://samples.jbpub.com/9781449652609/99069_ch05_6101.pdf . [9 Feb 21]
- Moreau P, d'Uscio LV, Luscher TF. Structure and reactivity of small arteries in aging. *Cardiovascular research*. 1998; 37(1): 247-253.
- Morrell JS, Lofgren IE, Burke JD, Reilly RA. Metabolic syndrome, obesity, and related risk factors among college men and women. *Journal of American college health*. 2012; 60(1): 82-89.
- Mustafa AK, Sikka G, Gazi SK, Steppan J, Jung SM, Bhunia AK, et al. Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulphydrates potassium channels. *Circulation research*. 2011 Nov 11; 109(11): 1259-1268.
- Myers J, Kokkinos P, Nyelin E. Physical Activity, Cardiorespiratory Fitness, and the Metabolic Syndrome. *Nutrients*. 2019 Jul 19; 11(7): 1652.
- Namiki A, Akatsuka N. Vascular smooth muscle relaxation induced by epidermal growth factor is endothelium- dependent. *European journal of pharmacology*. 1990 May 16; 180 (2-3): 247-254.
- National Cholesterol Education Program (*NCEP*). ATP III Guidelines At-A-Glance Quick Desk Reference [Online]. 2001, Available from: <https://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/guidelines/atglance.pdf> [15 Feb 21].
- Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *The American journal of physiology*. 1990 Jul; 259(1 Pt 1): C3-18.
- Nettleton JA, Lutsey PL, Wang Y, Lima JA, Michos ED, Jacobs DR, Jr. Diet soda intake and risk of incident metabolic syndrome and type 2 diabetes in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Diabetes care*. 2009 Apr;32(4): 688-694.
- Okosun IS, Chandra KM, Choi S, Christman J, Dever GE, Prewitt TE. Hypertension and type 2 diabetes comorbidity in adults in the United States: risk of overall and regional adiposity. *Obesity research*. 2001; 9(1): 1-9.

- Padwal RS, Sharma AM. Prevention of cardiovascular disease: obesity, diabetes and the metabolic syndrome. *The Canadian journal of cardiology*. 2010 Aug-Sep; 26 : 18C-20C.
- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L- arginine. *Nature*. 1988 Jun 16; 333(6174): 664-666.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327(6122): 524-526.
- Palmer RM. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 1993 Jan; 2(1): 122-128.
- Panthong A, Tassaneeyakul W, Kanjanapothi D, Tantiwachwuttikul P, Reutrakul V. Anti-inflammatory activity of 5,7-dimethoxyflavone. *Planta medica*. 1989 Apr; 55(2): 133-136.
- Papaioannou TG, Stefanadis C. Vascular wall shear stress: basic principles and methods. *Hellenic journal of cardiology = Hellenike kardiologike epitheorese*. 2005 Jan-Feb; 46(1): 9-15.
- Park JG, Oh GT. Current pharmacotherapies for atherosclerotic cardiovascular diseases. *Archives of pharmacal research*. 2019 Mar; 42(3): 206-223.
- Park SY, Kim YW, Kim JE, Kim JY. Age-associated changes in fat metabolism in the rat and its relation to sympathetic activity. *LifeSciences*. 2006; 79: 2228–2233.
- Pearson Education inc. Smooth muscle tissue. 2015, Available from: <https://www.pinterest.com/pin/777926535613618811/> [9 Nov 20]
- Peers C, Bauer CC, Boyle JP, Scragg JL, Dallas ML. Modulation of ion channels by hydrogen sulfide. *Antioxidants & redox signaling*. 2012 Jul 1; 17(1): 95-105.
- Peng HB, Libby P, Liao JK. Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *The Journal of biological chemistry*. 1995 Jun9; 270(23): 14214-14219.
- Petros A, Bennett D, Vallance P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet*. 1991 Dec 21-28; 338(8782-8783): 1557-1558.

- Qiao Q, Laatikainen T, Zethelius B, Stegmayr B, Eliasson M, Jousilahti P, et al. Comparison of definitions of metabolic syndrome in relation to the risk of developing stroke and coronary heart disease in Finnish and Swedish cohorts. *Stroke*. 2009 Feb; 40(2): 337-343.
- Rang HP and Dale MM. *Pharmacology*. 2nd edition. Churchill Livingstone. Medical Division of Longman Group. UK. 1991.
- Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling*. 2012 May; 24(5): 981-990.
- Rochlani Y, Pothineni NV, Kovelamudi S, Mehta JL. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Therapeutic advances in cardiovascular disease*. 2017 Aug; 11(8): 215-25.
- Rodriguez-Colon SM, Mo J, Duan Y, Liu J, Caulfield JE, Jin X, et al. Metabolic syndrome clusters and the risk of incident stroke: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Stroke*. 2009 Jan; 40(1): 200-205.
- Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and applied pharmacology*. 2006 Apr 15; 212(2):167-178.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993 Apr 29; 362(6423): 801-809.
- Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1993; 22 Suppl 4: S1-14.
- Rujjanawate C, Kanjanapothi D, Amornlerdpison D, Pojanagaroon S. Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. *Journal of ethnopharmacology*. 2005 Oct 31; 102(1): 120-122.
- Sae-Wong C, Matsuda H, Tewtrakul S, Tansakul P, Nakamura S, Nomura Y, et al. Suppressive effects of methoxyflavonoids isolated from *Kaempferia parviflora* on inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells. *Journal of ethnopharmacology*. 2011 Jul 14; 136(3): 488-95.

- Sae-wong C, Tansakul P, Tewtrakul S. Anti-inflammatory mechanism of *Kaempferia parviflora* in murine macrophage cells (RAW 264.7) and in experimental animals. *Journal of ethnopharmacology*. 2009 Jul 30; 124(3): 576-580.
- Saijonmaa O, Nyman T, Fyhrquist F. Endothelin-1 stimulates its own synthesis in human endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1992 Oct 15; 188(1): 286-291.
- Saijonmaa O, Nyman T, Hohenthal U, Fyhrquist F. Endothelin-1 is expressed and released by a human endothelial hybrid cell line (EA.hy 926). *Biochemical and biophysical research communications*. 1991 Dec 16; 181(2): 529-536.
- Saokaew S, Wilairat P, Raktanyakan P, Dilokthornsakul P, Dhippayom T, Kongkaew C, et al. Clinical Effects of Krachaidum (*Kaempferia parviflora*): A Systematic Review. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*. 2017 Jul; 22(3): 413-428.
- Schini VB, Vanhoutte PM. Role of the L-arginine-nitric oxide pathway in vascular smooth muscle. *European heart journal*. 1993 Nov; 14 Suppl I: 16-21.
- Schleifenbaum J, Kohn C, Voblova N, Dubrovskaya G, Zavarirskaya O, Gloe T, et al. Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide. *Journal of hypertension*. 2010 Sep; 28(9): 1875-1882.
- Schwartz SM. Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *The Journal of clinical investigation*. 1997 Dec 1; 100(11 Suppl): S87-89.
- Sherman TS, Chen Z, Yuhanna IS, Lau KS, Margraf LR, Shaul PW. Nitric oxide synthase isoform expression in the developing lung epithelium. *The American journal of physiology*. 1999 Feb; 276 (2 Pt 1): L383-L390.
- Shimada T, Horikawa T, Ikeya Y, Matsuo H, Kinoshita K, Taguchi T, et al. Preventive effect of *Kaempferia parviflora* ethyl acetate extract and its major components polymethoxyflavonoid on metabolic diseases. *Fitoterapia* 2011; 82: 1272-1278.
- Sripanidkulchai B, Somintara S, Pariwatthanakun CH, Sripanidkulchai K, Leardkamolkarn V. Antidiabetic activity of methoxyflavone-enriched extract of *Kaempferia parviflora* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 2020 Nov-Dec; 42 (6): 1239-1247.

- Steinberg GB, Church BW, McCall CJ, Scott AB, Kalis BP. Novel predictive models for metabolic syndrome risk: a "big data" analytic approach. *The American journal of managed care*. 2014 Jun 1; 20(6): e221-e228.
- Stenmark K.R., et al., The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. *Annual Review of Physiology*. 2013.; 75: 23-47.
- Sudwan P, Saenphet K, Saenphet S, Suwansirikul S. Effect of *Kaempferia parviflora* Wall. ex. Baker on sexual activity of male rats and its toxicity. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2006; 37 Suppl 3: 210-215.
- Sutthanut K, Sripanidkulchai B, Yenjai C, Jay M. Simultaneous identification and quantitation of 11 flavonoid constituents in *Kaempferia parviflora* by gas chromatography. *Journal of chromatography A*. 2007 Mar 2; 1143(1-2): 227-233.
- Swarup S, Goyal A, Grigorova Y, Zeltser R. *Metabolic Syndrome*. StatPearls. Treasure Island. 2021.
- Tangjitjaroenkun J, Yahayo W, Supabphol S, Supabphol R. Selective Cytotoxicity of *Kaempferia parviflora* Extracts in Human Cell Lines. *Asian Pacific journal of cancer prevention*. 2021 Feb 1; 22(S1): 73-79.
- Taylor JY, Kraja AT, de Las Fuentes L, Stanfill AG, Clark A, Cashion A. An overview of the genomics of metabolic syndrome. *Journal of nursing scholarship: an official publication of Sigma Theta Tau International Honor Society of Nursing*. 2013 Mar; 45(1): 52-59.
- Tep-Areenan, P., and P. Sawasdee. "Vasorelaxant Effects of 5,7,4'-Trimethoxyflavone from *Kaempferia parviflora* in the Rat Aorta". *International Journal of Pharmacology* 2010; 6(4): 419-424.
- Tep-Areenan P, Sawasdee P, Randall M. Possible mechanisms of vasorelaxation for 5,7-dimethoxyflavone from *Kaempferia parviflora* in the rat aorta. *Phytotherapy research: PTR*. 2010 Oct; 24(10): 1520-1525.
- Tewtrakul S, Subhadhirasakul S. Effects of compounds from *Kaempferia parviflora* on nitric oxide, prostaglandin E2 and tumor necrosis factor-alpha productions in RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of ethnopharmacology*. 2008 Oct 30; 120(1): 81-84.

- Tewtrakul S, Subhadhirasakul S, Karalai C, Ponglimanont C, Cheenpracha S. Anti-inflammatory effects of compounds from *Kaempferia parviflora* and *Boesenbergia pandurata*. *Food Chemistry*. 2009; 115(2): 534–538.
- Thijssen, D. H., Dawson, E. A., Tinken, T. M., Timothy, C. N., and Green, D. Retrograde flow and shear rate acutely impair endothelial function in humans. *Hypertension*. 2009; 53: 986–992.
- Thong-Ngam D. Nitric Oxide: a mediator in the gastrointestinal tract. *Chulalongkorn Medical Journal*. 2002 Jun; 46(6): 511-520.
- Ufnal M, Zera T. [The role of nitric oxide, hydrogen sulfide and carbon monoxide in the regulation of the circulatory system and their pharmacotherapeutic potential]. *Kardiol Pol*. 2010;68 Suppl 5: S436-S440.
- Unamuno X, Gomez-Ambrosi J, Rodriguez A, Becerril S, Fruhbeck G, Catalan V. Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. *European journal of clinical investigation*. 2018 Sep; 48(9): e12997.
- Van Guilder GP, Westby CM, Greiner JJ, Stauffer BL, DeSouza CA. Endothelin-1 vasoconstrictor tone increases with age in healthy men but can be reduced by regular aerobic exercise. *Hypertension*. 2007; 50(2): 403-409.
- Wagner F, Asfar P, Calzia E, Radermacher P, Szabo C. Bench-to-bedside review: Hydrogen sulfide--the third gaseous transmitter: applications for critical care. *Critical care*. 2009; 13(3): 213.
- Walker AE, Kaplon RE, Lucking SM, Russell-Nowlan MJ, Eckel RH, Seals DR. Fenofibrate improves vascular endothelial function by reducing oxidative stress while increasing endothelial nitric oxide synthase in healthy normolipidemic older adults. *Hypertension*. 2012 Dec; 60(6): 1517-1523.
- Walsh T, Donnelly T, Lyons D. Impaired endothelial nitric oxide bioavailability: a common link between aging, hypertension, and atherogenesis? *Journal of the American Geriatrics Society*; 2009. 57(1): 140-145.
- Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiological reviews*. 2012 Apr; 92(2): 791-896.

- Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2002 Nov; 16(13): 1792-1798.
- Wanich S, Yenjai C. Amino and nitro derivatives of 5,7-dimethoxyflavone from *Kaempferia parviflora* and cytotoxicity against KB cell line. Archives of pharmacal research. 2009 Sep; 32(9): 1185-1189.
- Watson WE, Seelye E. Vascular distensibility of the hand during reduction of the effective blood volume in man. British journal of an aesthesia. 1962 Feb; 34: 74-79.
- Wattanapitayakul SK, Chularojmontri L, Herunsalee A, Charuchongkolwongse S, Chansuvanich N. Vasorelaxation and antispasmodic effects of *Kaempferia parviflora* ethanolic extract in isolated rat organ studies. Fitoterapia. 2008 Apr; 79(3): 214-6.
- Wattanapitayakul SK, Suwatronnakorn M, Chularojmontri L, Herunsalee A, Niumsakul S, Charuchongkolwongse S, et al. *Kaempferia parviflora* ethanolic extract promoted nitric oxide production in human umbilical vein endothelial cells. Journal of ethnopharmacology. 2007 Apr 4; 110(3): 559-562.
- Wattanathorn J, Pangphukiew P, Muchimapura S, Sripanidkulchai K, Sripanidkulchai B. Aphrodisiac Activity of *Kaempferia parviflora*. American Journal of Agricultural and Biological Sciences. 2012; 7(2): 114-120.
- Weerapol Y, Tubtimsri S, Chairuk Pilaipan, Jansakul C, Sriamornsak P. Retracted article: Enhanced dissolution and oral bioavailability of poorly water-soluble herb (*Kaempferia parviflora*) extract using solid dispersions: effect of surfactants and concentrations. Journal of Pharmaceutical Investigation. 2020; 243: 51.
- Weerateerangkul P, Palee S, Chinda K, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Effects of *Kaempferia parviflora* Wall. Ex. Baker and sildenafil citrate on cGMP level, cardiac function, and intracellular Ca²⁺ regulation in rat hearts. Journal of cardiovascular pharmacology. 2012 Sep; 60(3): 299-309.

- Welbat JU, Chaisawang P, Chaijaroonkhanarak W, Prachaney P, Pannangrong W, Sripanidkulchai B, et al. *Kaempferia parviflora* extract ameliorates the cognitive impairments and the reduction in cell proliferation induced by valproic acid treatment in rats. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger: official organ of the Anatomische Gesellschaft*. 2016 Jul; 206: 7-13.
- Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Jr., Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003 Oct 01; 42(7): 1149-1160.
- Wikipedia. Vascular smooth muscle. 2020, Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Vascular_smooth_muscle [9 Nov 20].
- Wilson DP. Vascular Smooth Muscle Structure and Function. In: Fitridge R, Thompson M, editors. *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists*. Adelaide (AU). 2011.
- Wink DA, Miranda KM, Espey MG, Pluta RM, Hewett SJ, Colton C, et al. Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide. *Antioxidants & redox signaling*. 2001 Apr; 3(2): 203-213.
- Wong ND. Epidemiological studies of CHD and the evolution of preventive cardiology. *Nature Reviews Cardiology*. 2014 May; 11(5): 276-289.
- Wynsberghe DV, Noback CR and Carola R. *Human anatomy and physiology*. 3rd edition. McGraw-Hill College. USA. 1995.
- Yamamoto R, Wada A, Asada Y, Niina H, Sumiyoshi A. N omega-nitro-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis, decreases noradrenaline outflow in rat isolated perfused mesenteric vasculature. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 1993 Feb; 347(2): 238-240.
- Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, et al. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science*. 2008 Oct 24; 322(5901): 587-590.
- Yang SJ, Choi HY, Chee YK, Kim JA. Prevalence and correlates of obesity and overweight among asian immigrant women in Korea. *Asia-Pacific journal of public health*. 2012 Jul; 24(4): 620-630.

- Yazdanyar A, Newman AB: The burden of cardiovascular disease in the elderly: morbidity, mortality, and costs. *Clinics in geriatric medicine* 2009; 25(4): 563-577.
- Yorsin S, Kanokwiroon K, Radenahmad N, Jansakul C. Effects of *Kaempferia parviflora* rhizomes dichloromethane extract on vascular functions in middle-aged male rat. *Journal of ethnopharmacology*. 2014 Oct 28; 156: 162-174.
- Yorsin S, Kanokwiroon K, Radenahmad N, Jansakul C. Increased vascular eNOS and cystathionine-gamma-lyase protein after 6 weeks oral administration of 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone to middle-aged male rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2016 Nov; 389(11): 1183-1194.
- Yorsin S, Sukpondma Y, Jansakul C. Vasorelaxant effects of 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone isolated from *Kaempferia parviflora*: partly stimulating the release of NO and H₂S by rat thoracic aorta. *Journal of Physiological and Biomedical Sciences*. 2015 Apr; 28(1): 5-14.
- Zagotta I, Dimova EY, Debatin KM, Wabitsch M, Kietzmann T, Fischer-Posovszky P. Obesity and inflammation: reduced cytokine expression due to resveratrol in a human in vitro model of inflamed adipose tissue. *Frontiers in pharmacology*. 2015; 6: 79.
- Zhang Y, Moreland S, Moreland RS. Regulation of vascular smooth muscle contraction: myosin light chain phosphorylation dependent and independent pathways. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1994 Nov; 72(11): 1386-1391.
- Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. *The EMBO journal*. 2001 Nov 1; 20(21):6008-6016.

ภาคผนวก



Enhancing oral absorption of poorly water-soluble herb (*Kaempferia parviflora*) extract using self-nanoemulsifying formulation

Pilaipan Chairuk, Sukannika Tubtimsri, Chaweewan Jansakul, Pornsak Sriamornsak & Yotsanan Weerapol

To cite this article: Pilaipan Chairuk, Sukannika Tubtimsri, Chaweewan Jansakul, Pornsak Sriamornsak & Yotsanan Weerapol (2019): Enhancing oral absorption of poorly water-soluble herb (*Kaempferia parviflora*) extract using self-nanoemulsifying formulation, *Pharmaceutical Development and Technology*, DOI: [10.1080/10837450.2019.1703134](https://doi.org/10.1080/10837450.2019.1703134)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10837450.2019.1703134>



Accepted author version posted online: 09 Dec 2019.
Published online: 17 Dec 2019.



[Submit your article to this journal](#)



Article views: 7



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)

RESEARCH ARTICLE



Enhancing oral absorption of poorly water-soluble herb (*Kaempferia parviflora*) extract using self-nanoemulsifying formulation

Pilaipan Chairuk^a, Sukannika Tubtimsri^{b,c}, Chaweevan Jansakul^a, Pornsak Sriamornsak^{c,d,e} and Yotsanan Weerapol^{b,c}

^aFaculty of Traditional Thai Medicine, Prince of Songkla University, Hat Yai, Thailand; ^bFaculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University, Chonburi, Thailand; ^cPharmaceutical Biopolymer Group (PBiG), Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom, Thailand; ^dDepartment of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom, Thailand; ^eAcademy of Science, Royal Society of Thailand, Bangkok, Thailand

ABSTRACT

Kaempferia parviflora, a medicinal herb, treats hypertension and promotes longevity with good health and well-being. Its bioactive component is poorly soluble in water, resulting in poor absorption. This study aimed to enhance the bioavailability of *K. parviflora* dichloromethane (KPD) extract using a self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS). KPD was dissolved in diethylene glycol monoethyl, polyoxyl-35 castor oil and caprylic/capric glyceride, and clear yellow SNEDDS solution was obtained. The methoxyflavone markers were used for content and dissolution analysis. Solid SNEDDS was prepared by stepwise mixing of KPD using a mortar and pestle (1:1 ratio) with five solid carriers: Aerosil[®] 200, Florite[®] RE, Neusilin[®] US2 (NEUS), Fujicalin[®], and Neusilin[®] UFL2. The USP apparatus II with simulated gastric fluid USP (SGF without pepsin, pH 1.2) was used in order to perform the *in vitro* dissolution. The methoxyflavones dissolution at 60 min from KPD, SEDDS, and SNEDDS/NEUS were approximately 16, 92, and 73%, respectively. The pharmacokinetic profiles of methoxyflavones for oral administration were studied using Wistar rats; the areas under the curve of SNEDDS/NEUS (1.77-fold) and SNEDDS (5.38-fold) were significantly higher than that of KPD. The developed formulations showed good stability after storage for 6 months under accelerated and normal conditions.

ARTICLE HISTORY

Received 14 August 2019
Revised 7 December 2019
Accepted 7 December 2019

KEYWORDS

Poorly water-soluble herb; *Kaempferia parviflora*; self-nanoemulsifying drug delivery systems; methoxyflavone; *in vivo* study

Introduction

The most convenient and preferred route is oral route for drug delivery because it has a high degree of patient compliance. However, more than 40% of oral drugs administration have a limitation of therapeutic efficacy because of poor aqueous solubility (Hauss 2007). The poor aqueous solubility and oral absorption of drugs can be increased using alternate manufacturing techniques or formulations using oils or fats to develop self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) (Shah et al. 1994; Pouton 1997, 2006; Pouton and Porter 2008). SEDDS are mixture of liquid systems comprising of surfactants, co-surfactants, oils, and a drug, which spontaneously forms an oil-in-water emulsion in the gastric fluid and is thermodynamically unstable. The self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) are self-emulsifying and very fine dispersions (or nanoemulsions). SEDDS and SNEDDS can endure aqueous dilution of >100 times. Consequently, drug dissolution and gut absorption increases (Gupta et al. 2013; Patel et al. 2013; Nipun and Ashrafal Islam 2014).

Furthermore, SEDDS has the advantage that it is filled into a gelatin capsule, which preserves its physical and chemical nature. However, SEDDS has limitations from stability, such as liquid leakage by interaction of surfactants and oils with gelatin capsule (Wang et al. 2010; Weerapol et al. 2015). To overcome these limitations, the solid dosage form is prepared from liquid SEDDS by physical adsorption. This synergist advantages of liquid SEDDS with those of solid dosage forms. High specific surface area

(fumed silicas) has been used for solidifying SEDDS via physical adsorption by mixing in mortar and pestle (Planinsek et al. 2011; Milovic et al. 2012).

The rhizome of the medicinal herb *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker (family, Zingiberaceae) has been used in Thai traditional medicine and is found in northern Thailand. This rhizome has been claimed to treat various conditions, including inflammation, abdominal pain, erectile dysfunction, and hypertension and is effective for depressing blood glucose levels and improving circulation of blood (Sudwan et al. 2006; Malakul et al. 2011; Weerateerangkul et al. 2013; Yorsin et al. 2014). Currently, studies are being performed on *K. parviflora* at a moderate pace; however, it has started to get promoted as a food supplement to improve health (Leardkamolkarn et al. 2009; Promthep et al. 2015; Park et al. 2017). *Kaempferia parviflora* is a source of methoxy bioflavonoid compounds. Bioactive flavonoids show different activities, such as 5,7,4'-trimethoxyflavone and 5,7,3',4'-tetramethoxyflavone has been shown to exhibit antiplasmodial activity against *Plasmodium falciparum*, 3,5,7,4'-tetramethoxyflavone and 5,7,4'-trimethoxyflavone has shown activity against fungal (Yenjai et al. 2004), and 3,5,7,3',4'-pentathoxyflavone improved endothelial dysfunction in middle-aged rats via the stimulation of the blood vessels by release of nitric oxide and hydrogen sulfide (Yorsin et al. 2014). In a previous study, the following major bioactive compounds were extracted from *K. parviflora* using dichloromethane (KPD) were 5,7-dimethoxyflavone (DMF), 5,7,4'-trimethoxyflavone (TMF), and 3,5,7,3',4'-pentathoxyflavone (PMF).

In our previous dissolution study, we noted that TMF can be dissolved in simulated gastric fluid at a concentration of <15% (Weerapol et al. 2017).

Although, a solid dispersion of KPD has been formulated (Weerapol et al. 2017), such solid dispersion formulations are limited due to the low content of KPD. Results showed that a suitable formulation can dissolve only 85% of the active compound. Although a self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) incorporating the ethanolic extract of *K. parviflora* has been reported, the thermodynamic stability of SMEDDS can be disrupted by dilution with water or aqueous gastric content, causing the precipitation of poorly water-soluble substances before their absorption (Singh et al. 2008; Patel et al. 2013; Jaiswal et al. 2014; Bansode et al. 2016).

Therefore, we aimed to enhance KPD bioavailability using SNEDDS. This formulation will prove useful for developing formulations of herbal extracts that contain poor aqueous solubility compounds.

Materials and methods

Materials

KPD was prepared at the laboratory of the Jansakul C, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Thailand, as previously reported (Yorsin et al. 2014). Methanol was purchased from RCI Labscan, Thailand. Trifluoroacetic acid was purchased from Fisher Chemical, United Kingdom. Hydrochloric acid and sodium chloride were purchased from Ajax Finechem, New Zealand. The surfactant (polyoxyl 35 castor oil: P35) was acquired from BASF, Thailand. The co-surfactant (diethylene glycol monoethyl ether: DGE) was gifted by Gattefossé, France. The oils vehicle (caprylic/capric glyceride: CCG) was purchased from Sasol, Germany. Aerosil® 200 (silicon dioxide: FS200) was acquired from Evonik, Germany. Florite® RE (calcium silicate: PCS120) was gifted by Tomita Pharmaceutical, Japan. Fujicalin® (calcium phosphate: FCL), Neusilin® US2 (magnesium aluminometasilicate: NEUS), and Neusilin® UFL2 (magnesium aluminometasilicate: NEUF) were supplied by Fuji Chemical Industries, Japan. The three methoxyflavones DMF, TMF, and PMF were acquired from Sigma-Aldrich, USA.

KPD extraction

KPD was obtained from a laboratory in Prince of Songkla University, Hat-Yai, Thailand. In brief (Yorsin et al. 2014), 20 kg of fresh *K. parviflora* rhizomes were chopped, extracted using 95% ethanol, and macerated twice (2 × 20 L) for 2 days. Subsequently, the dark colored mass was removed, and the residue was then extracted using 100% dichloromethane in triplicate. The yellow solution of dichloromethane containing dissolved KP extracts was filtered and then evaporated under vacuum. A yellow dried mass was obtained and was then placed again under vacuum to remove any residual dichloromethane to finally yield a yellowish gummy KPD with a 2.6% yield.

The residual solvent test was modified from the study of Burapapadh and coworkers (Burapapadh et al. 2012) to confirm the complete removal of dichloromethane. The KPD without residual solvent was used for further study.

KPD solubility in SNEDDS

SNEDDS formulation was developed in accordance with that reported in a previous study (Weerapol et al. 2015). The mixture of CCG:P35:DGE was mixed in the ratio of 30:60:10, 10:10:80, and

80:10:10 with 500-mg KPD and then shaken at 150 rpm and 25 °C for 72 h. After equilibration, undissolved KPD was removed by centrifugation at 1166 × g for 15 min. The supernatants were collected and analyzed for content of methoxyflavone.

Methoxyflavone content analysis

Methoxyflavone contents were analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC) equipped with a photodiode array detector (model Agilent 1100 Series HPLC System; Agilent Technologies, USA) using a Luna 5- μ C18 column (particle size, 5 μ m; diameter 4.6 mm × 25 cm, Phenomenex®, USA) according to a method we previously reported (Yorsin et al. 2014). The mobile phase comprised methanol and 0.05% trifluoroacetic acid in water. The flow of elution system was set at a flow rate of 1 ml/min. The 40-min linear gradient was run from 10 to 100% methanol, followed by 10-min isocratic elution at 100% methanol before repeating to starting conditions. DMF, TMF, and PMF were detected at 210 nm. The peak area of signal was compared with the area of that standard solution.

SNEDDS and S-SNEDDS preparation

SNEDDS formulation was prepared by mixing CCG:P35:DGE at a ratio of 10:10:80, and then KPD was added to a concentration of 100 mg/mL at an ambient temperature (25 °C) in a light-protected container until a clear solution was obtained. Five different solid carriers (FS200, PCS120, FCL, NEUS, and NEUF) that have a fine white color were individually mixed stepwise (geometric dilution) to the SNEDDS formulation in a ratio of 1:1 using a mortar and pestle to give five different solid carrier mixtures. Five fine powders of S-SNEDDS comprising each of the five carriers were obtained.

Characterization of KPD and formulations

Thermal analysis of S-SNEDDS comprising five different solid carrier formulations was achieved using differential scanning calorimetry (DSC, model Sapphire; Perkin Elmer, USA). Accurately weighed 2.5 mg samples were put into a standard aluminum pan and the aluminum lid was crimped and then the sample was heated from 273 K–523 K at a raising rate of 10 K/min (Weerapol et al. 2017).

Morphological study

Morphological studies were conducted using scanning electron microscopy (SEM, LEO 1450VP; EDAX®, USA). The particles of samples were fixed on the metal stub using double-sided adhesive tape. The gold was coated on to sample surface under vacuum (Weerapol et al. 2017). The morphologies of all samples were investigated at an accelerating voltage of 20 keV.

Powder X-ray diffractometry (PXRD)

The crystallinity of KPD was investigated using powder X-ray diffractometer (model MiniFlex II; Rigaku, Japan). PXRD diffraction of KPD, SNEDDS formulation, S-SNEDDS formulations, and physical mixtures were performed using Cu K α radiation at 30 kV, 15 mA, and an angular rate of 4°/min from 5° to 45° 2 θ at a wavelength of 1.5406 Å (Weerapol et al. 2017).

Determination of emulsion droplet size

The sample was mixed with water or SGF (199-fold) and were then stored for 2 h. Subsequently, the solid carriers in sample were removed by centrifugation ($666 \times g$) for 10 min (Weerapol et al. 2015). The photon correlation spectroscopy (model Zetasizer Nano ZS; Malvern, England) was used to determine the size and size distribution of emulsion droplet.

In vitro dissolution study

The product dissolution was studied ($n=3$) using the paddle apparatus USP apparatus II (Pharma Test, Germany). The SGF 900-ml without pepsin (pH 1.2, $37^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$) was used as dissolution medium. The speed of paddle rotation was set at 50 rpm. All samples were precisely weighed (equivalent to 100 mg of KPD) before pouring into a dissolution vessel. The samples (5 mL) were collected after 5, 10, 15, 30, 60, 90, and 120 min, filtered through nylon membrane (0.45 μm) to eliminate undissolved particles. The methoxyflavones content were analyzed using HPLC as described above. The fresh dissolution medium (5 mL) was replaced to adjust for the loss of sampling volume.

Stability of SNEDDS and S-SNEDDS

SNEDDS formulations were stored for 6 months under two conditions: ambient (25°C) and accelerated ($40^\circ\text{C}/75\%$ relative humidity). Physical characterization, methoxyflavone content, and dissolution were investigated after 6 months. These analyses were performed in triplicate.

In vivo pharmacokinetic study

The experiment in animals were conducted according to the procedures reported by Yorsin et al. (2014), which were modifications from the study of Burapapadh et al. (2012). Male Wistar rats about 300–350 g of weight and 8 weeks of age (Southern Laboratory Animal Facility, Prince of Songkla University, Thailand) were used for the study. The rats (≤ 3) were stored in each cage, provided *ad libitum* access to food and water, and subjected to 12-h dark/light cycle. The sample (100 mg of KPD/kg body) weight were given to rat by oral gavage ($n=5$). The actual dose for PMF, TMF, and DMF was 7.00, 6.90, and 8.49 mg/kg, respectively. Before oral gavage, the samples (50 mg of KPD) were suspended in 1 ml of sodium carboxymethylcellulose solution (0.5% w/v) by vortex mixing for 5 min. These suspended samples (100 mg/kg) containing 50 mg/mL KDP was used for oral gavage to the rats. Next, venous blood (1.0 mL) at jugular vein was withdrawn from each animal after 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, and 360 min. The collected blood was purified by centrifugation at $3330 \times g$ for 5 min, and then the supernatants were transferred to a new tube. The separated plasma was stored at -20°C (Burapapadh et al. 2012).

The plasma was thawed at room temperature before analysis. The plasma (200 μL) was transferred to new tube, and acetonitrile (800 μL) was added to precipitate proteins using vortex mixing for 1 min. Then, 300 μL of clear solution was collected to evaporate the solvent. A precipitation sample was obtained. The precipitate was dissolved in 150 μL of methanol; methoxyflavone content was then determined using HPLC.

All experiments were approved by the Ethics Committee of the Use of Laboratory Animals, Prince of Songkla University (permission number: 10/2018) and were monitored by the Southern Laboratory Animal Facility, Prince of Songkla University, Thailand.

Animal experimental procedures complied with the ARRIVE guidelines and were performed in accordance with the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments and the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978).

Statistical analysis

Analysis of variance and the Levene's test for homogeneity of variance were performed using the SPSS version 10.0 for Windows (SPSS Inc., USA). Post hoc testing ($p < 0.05$) of multiple comparisons was performed using either the Scheffé or Games-Howell test depending on whether the Levene's test was insignificant or not, respectively.

Results and discussion

Physical characterization of SNEDDS and S-SNEDDS

KPD was dissolved in mixtures comprising CCG:P35:DGE, and the highest solubility of KPD was 142.90 ± 0.05 mg/mL at a ratio of 10:10:80, which was equivalent to DMF, TMF, and PMF at 12.18 ± 0.11 , 9.94 ± 0.21 , and 10.04 ± 0.05 mg/mL, respectively. Solubility results were similar to those noted in a previous study (Weerapol et al. 2015). Solubility improved due to the high amount of DGE possibly because of the use of DGE as a co-solvent in other formulations (Osborne 2011). SNEDDS formulation was prepared by mixing KPD with CCG:P35:DGE to give a clear yellow SNEDDS solution. S-SNEDDS was prepared by adsorption of SNEDDS onto five different solid carriers: FS200, PCS120, NEUS, FCL, and NEUF. Fine powders of SNEDDS/PCS120, SNEDDS/FS200, and SNEDDS/NEUS were visually observable. Conversely, SNEDDS/FCL and SNEDDS/NEUF were observed to be sticky and tacky masses (Figure 1). These results suggested that a high surface area ($>120 \text{ m}^2/\text{g}$) (Krupa et al. 2015) and surface roughness or pores were used to adsorb SNEDDS or liquids (Table 1) (General properties of Neusilin 2009; General Information of Fujicalin 2009; Weerapol et al. 2015). FCL may have low surface area ($40 \text{ m}^2/\text{g}$) so the obtained S-SNEDDS was sticky. The large pore volume of PCS120 could be adsorbed by the SNEDDS. The fine particles were found after preparation (Weerapol et al. 2015). The adsorption of FS200 was reported that liquid could be adsorbed at inter-particulate porosity and the loose agglomerated granules were found in SNEDDS/FS200 (Gumaste et al. 2013). The mixture of granule (NEUS) or fine particle (NEUF) 1 g to SNEDDS 1 g obtained the fine particle of SNEDDS/NEUS and sticky mass of SNEDDS/NEUF. These results may cause from the SNEDDS adsorbed in pore volume of NEUS (15 nm) and NEUF (17 nm). Figure 2 shows the schematic representation of SNEDDS/NEUS granules and agglomerated particle of SNEDDS/NEUF. The excessive SNEDDS may be located at inter-particulate spaces (in the granules of NEUS or on the particles of NEUF). The outer surface of SNEDDS/NEUS was less contacted with one another resulting in the fine granules (Gumaste et al. 2017). While, the outer surface of SNEDDS/NEUF may have a lot of contact forming a liquid bridges and particles agglomeration.

Morphology of S-SNEDDS

Figure 3 shows SEM images indicating the surface roughness or pores of FS200, PCS120, and NEUS. However, a fine powder was not obtained using NEUF, which has a high surface area, probably because of the small size and smooth surface of NEUF



Figure 1. S-NEDDS formulations prepared by adsorption of SNEDDS onto solid carriers. (i.e. FS200, PCS120, NEUS, FCL, and NEUF).

Table 1. Partide size, pore size, and surface area of the solid carriers used in this study.

Type of silica derivatives	Code	Trade name	Particle size (μm)	Pore size (nm)	Surface area (m^2/g)	References
Calcium silicate	PCS120	Florite [®] RE	21.6	150	120	Weerapol et al. (2015)
Fume silica	FS200	Aerosil [®] 200	0.012	no pore	200	Weerapol et al. (2015)
Magnesium alumino metasilicate	NEUS	Neusilin [®] US2	106	15	300	General properties of Neusilin (2009)
Calcium phosphate	FCL	Fujicalin [®]	11.5	7.35	40	General Information of Fujicalin (2009)
Magnesium alumino metasilicate	NEUF	Neusilin [®] UFL2	3.1	17	300	General properties of Neusilin (2009)

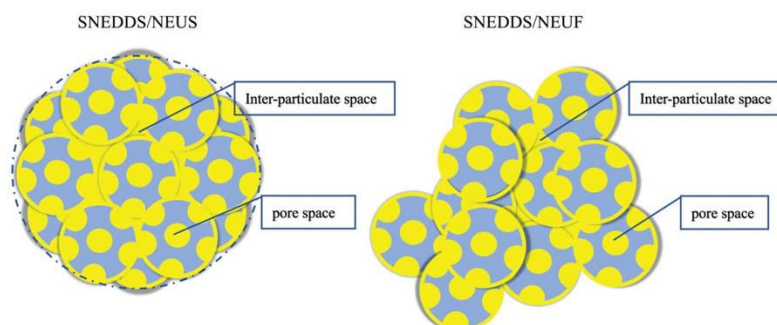


Figure 2. Schematic representation of SNEDDS/NEUS granules and agglomerated partide of SNEDDS/NEUF.

(Agarwal et al. 2009) as observed in the SEM images (Figure 3). From the available information (General properties of Neusilin 2009), NEUS and NEUF are known to have the same chemical composition but are prepared in granule and powder form, respectively. SEM image of KPD was found the small angular and angular outlines on the surfaces. The prepared S-NEDDS was not found the angular surface, probably because KPD was dissolved in SNEDDS and the SNEDDS might be adsorbed in the agglomerated solid carrier. Ideally, liquid SNEDDS should be adsorbed onto a granule, which is a fine particle. In a previous report, 30% of adsorbent could be used while still achieving a good free-flowing powder (Ito et al. 2005). In our previous study, 50% adsorbent was suitable for preparing S-NEDDS (Weerapol et al. 2015). These results suggested that adsorbent properties (surface roughness,

pore size, and surface area) were the main factors that affected the preparation of S-NEDDS.

Thermal analysis

DSC thermograms of the KPD, SNEDDS formulations, and physical mixture are shown in Figure 4, respectively. The thermograms of KPD presented broad endothermic peaks at 318 K–373 K and high intensity peak at 383–388 K (Figure 4). The PMs showed low-intensity endothermic peaks corresponding to KPD, which suggested no change in KPD. No endothermic peak was noted in any of the S-NEDDS formulations. DSC thermogram showed changes in thermal behavior of KPD in all S-NEDDS. This result suggested

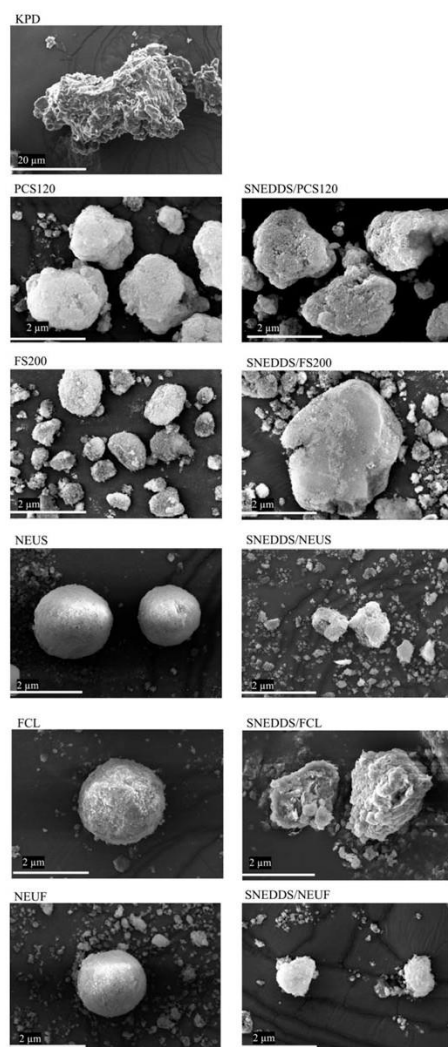


Figure 3. SEM images of KPD, solid carriers, SNEDDS formulation, and S-SNEDDS formulations.

KPD might be dissolved as molecular dispersion in SNEDDS adsorbed on the solid carrier.

Powder X-ray diffraction analysis

Diffraction patterns of KPD, SNEDDS formulations, and physical mixture are shown in Figure 5. The diffraction peaks of KPD

showed high and sharp intensity peaks at 2θ degrees of 7.22, 9.46, 14.90, and 26.56, presenting a crystalline nature of intrinsic KPD (Weerapol et al. 2017). The small intensity peaks of KPD crystalline along with peaks for FS200, PCS120, or NEUS were noted for PMs, indicating no change in the diffraction of KPD crystallinity. The PXRD patterns of all five S-SNEDDS presented no peaks for KPD, which suggested molecular dispersion of KPD in S-SNEDDS. These results were confirmed by the DSC thermograms, which showed no endothermic peak for KPD in any of the S-SNEDDS. These results suggested KPD was molecularly dispersed in SNEDDS that were adsorbed on solid carriers.

Droplet size analysis

Diameter size of droplet is an important factor for emulsification performance because it involves the rate and extent of *in vivo* drug absorption. Smaller emulsion size provides faster drug dissolution and a larger area of interface that enhances drug bioavailability (Liu et al. 2009). The mean diameter of emulsion droplet after dilution in water and SGF are presented in Table 2. The droplet sizes after dilution in SNEDDS, SNEDDS/P120, SNEDDS/FS200, and SNEDDS/NEUS in water or SGF were in the range of 140–180 nm. The mean droplet sizes after diluting SNEDDS/FCL and SNEDDS/NEUF in water or SGF were in the range of 220–270 nm. Slightly high polydispersity indexes (PDIs) were noted for SNEDDS, SNEDDS/FCL, and SNEDDS/NEUF (0.305–0.393). Emulsion droplet sizes noted after diluting SNEDDS and S-SNEDDS in water were similar to those noted after diluting them in SGF. Emulsion droplet size remained unchanged after centrifugation to remove solid particles. The results suggest that suitable solid carriers should be chosen to determine appropriate carriers to provide the desired size and size dispersion of an emulsion.

In vitro dissolution of SNEDDS and S-SNEDDS

The dissolution tests were performed to evaluate the performance of dissolution and emulsification of product in SGF. Dissolution profiles of KPD, SNEDDS, and S-SNEDDS using various adsorbents are shown in Figure 6. After 60 min, methoxyflavones dissolution from KPD was approximately 16%. The highest methoxyflavones dissolution was observed from SNEDDS (approximately 92%). Methoxyflavones dissolution percentages from SNEDDS/NEUS, SNEDDS/PCS120, SNEDDS/FS200, SNEDDS/NEUF, and SNEDDS/FCL were approximately 73, 71, 65, 51, and 47%, respectively. These results showed that a large area of adsorbents should increase the contact area of medium and provide the high dissolution profiles (except NEUF and FCL). The absorption on carriers could be done, but only some carriers provided high dissolution. SNEDDS/PCS120 had large pores, which was easily exposed to medium (Patel et al. 2012). NEUF and FS200 had a high surface area to encounter with water and the adsorbed SNEDDS may disperse easily (Sander and Holm 2009; Berings et al. 2018). The sticky and the tacky mass of SNEDDS/NEUF and SNEDDS/FCL after mixing (Figure 1) may have led to lower dissolution percentages than those for SNEDDS/NEUS, SNEDDS/PCS120, and SNEDDS/FS200. Furthermore, the low dissolution percentage of SNEDDS/NEUF and SNEDDS/FCL may have resulted from large emulsion size, which probably resulted from poor dispersion after diluting in aqueous (water/SGF) (Weerapol et al. 2014). Similar results were found in a previous study (Weerapol et al. 2015). The use of adsorbents to adsorb the SNEDDS onto solid particles affected the drug dissolution profiles. The solubility was found to be lesser compared to that reported in previous studies

6 P. CHAIRUK ET AL.

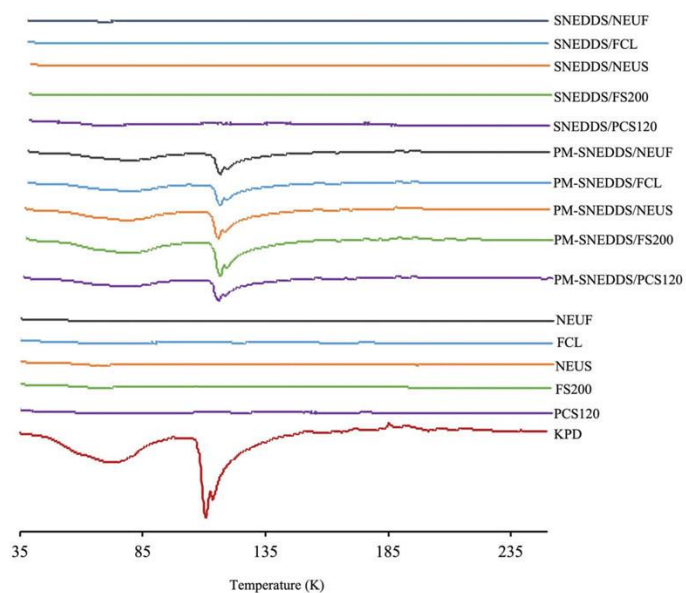


Figure 4. DSC thermograms of KPD, SNEDDS formulation, S-SNEDDS formulations, and physical mixtures.

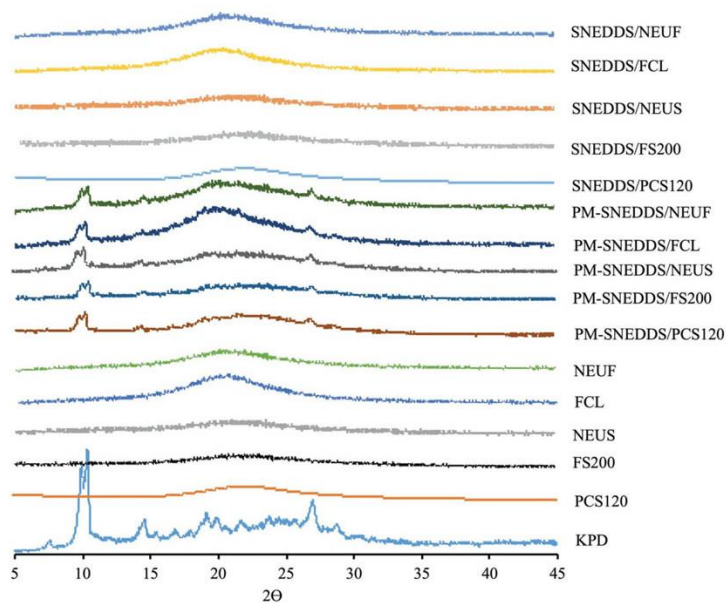


Figure 5. Powder X-ray diffraction patterns of KPD, SNEDDS formulation, S-SNEDDS formulations, and physical mixtures.

(Weerapol et al. 2015). The gelation of calcium silicate (PCS120) (Meiszterics and Sinkó 2008), calcium phosphate (in FCL) (Relyveld 1986), silicon dioxide (in FS200) (Sherriff and Enever 1979; Weerapol et al. 2015), and magnesium aluminometasilicate (in NEUS and NEUF) (Pongjanyakul et al. 2005; Adebisi et al. 2015) formed an obstruction layer that may have incompletely desorbed the emulsion from S-SNEDDS.

Stability of SNEDDS and S-SNEDDS

The physical stability of SNEDDS and SNEDDS/NEUS was investigated by analyzing methoxyflavone content, droplet size of emulsion after diluting in water and SGF, and drug dissolution after stability under the accelerated condition of 40 °C/75%RH for 6 months or normal storage at ambient condition (25 °C). SNEDDS and SNEDDS/NEUS showed no physical changes as observed visually during the study period. The methoxyflavone content of KPD, SNEDDS, and SNEDDS/NEUS before the stability test was approximately 100% (Table 3). At the end of 6 months, the methoxyflavone content was >99% under both accelerated and normal

conditions. No significant losses of methoxyflavones were noted in the tested formulations. Normally, drug precipitation from self-emulsions after dilution in the stomach and intestine is a risk that can lead to the loss of enhanced bioavailability. The stability of SNEDDS and SNEDDS/NEUS was evaluated by diluting it 199-fold in water or SGF and then measuring emulsion droplet size (data not shown). Emulsion droplet sizes of SNEDDS and SNEDDS/NEUS were still <200 nm (127–139 nm), and the PDLs ranged from 0.110–0.327; these were similar to those recorded on the initial day.

The physicochemical properties of SNEDDS and SNEDDS/NEUS after 6 months of storage under both accelerated and normal conditions were also investigated using DSC and PXRD. No endothermic peaks corresponding to the intrinsic peaks of KPD were noted using DSC in SNEDDS and SNEDDS/NEUS for both storage conditions after 6 months (data not shown). A pattern similar to a halo type of amorphous solid was observed in the PXRD patterns of SNEDDS and SNEDDS/NEUS under both storage conditions, which indicated the no peak of a crystalline KPD in S-SNEDDS (data not shown). The dissolution properties of SNEDDS and SNEDDS/NEUS were acceptable after 6 months of storage under both conditions and were similar to those of the initial day preparations (Figure 7). The dissolution profiles were compared by difference factor and similarity factor. These results demonstrated the performances of the formulations to retain the dissolution properties after storage under both conditions.

Table 2. Emulsion droplet size after dilution in SGF (simulated gastric fluid) and water ($n = 3$).

Sample name	Water		SGF	
	Z-Average \pm SD (d. nm)	Pdl	Z-Average \pm SD (d. nm)	Pdl
SNEDDS	146 \pm 1	0.305	154 \pm 0	0.244
SNEDDS (centrifuged) ^a	135 \pm 1	0.320	130 \pm 0	0.237
FS200	1472 \pm 0	0.227	133 \pm 0	0.310
FS200 (centrifuged) ^a	155 \pm 1	0.256	122 \pm 0	0.157
PCS120	146 \pm 1	0.145	130 \pm 0	0.214
PCS120 (centrifuged) ^a	145 \pm 0	0.166	144 \pm 1	0.151
FCL	265 \pm 1	0.294	222 \pm 0	0.113
FCL (centrifuged) ^a	251 \pm 0	0.295	242 \pm 0	0.137
NEUF	223 \pm 0	0.387	242 \pm 0	0.211
NEUF (centrifuged) ^a	245 \pm 0	0.393	243 \pm 0	0.159
NEUS	189 \pm 0	0.240	199 \pm 0	0.117
NEUS (centrifuged) ^a	164 \pm 0	0.232	167 \pm 0	0.109

Pdl: polydispersity index.

^aThe solid carriers were removed by centrifugation (666 \times g) for 10 min.

In vivo study

The effect of SNEDDS formulation on the bioavailability of orally administered KPD was studied in animals and is presented in Table 4 and Figure 8. Orally administered KPD resulted in low plasma concentrations of total flavonoids. The maximum concentration (C_{max}), time when the C_{max} is reached (T_{max}), and area under the curve (AUC) of KPD were 25.70 μ g/mL, 1 h and 25.30 μ g·h/mL, respectively (Table 4). The highest plasma concentration of total flavonoids was noted for SNEDDS. The C_{max} , T_{max} , and AUC of SNEDDS were 59.86 μ g/mL, 1.5 h, and 135.98 μ g·h/mL, respectively. When compared with KPD, the C_{max} of SNEDDS/NEUS and SNEDDS were 1.08 and 2.33-folds, respectively, which

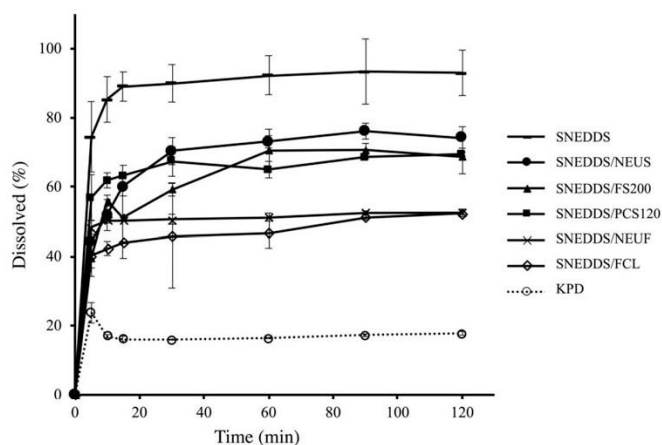


Figure 6. Dissolution profile of KPD, SNEDDS formulation, and S-SNEDDS formulations. (Bars indicate standard deviation; $n = 3$).

were slightly higher than those of KPD. Particularly, the AUC of SNEDDS/NEUS and SNEDDS (1.77 and 5.38-folds, respectively) were significantly higher than that of KPD ($P < 0.05$). The T_{max} of KPD was 1 h, which was less than that of SNEDDS and SNEDDS/NEUS (1.5 h each). These results were consistent with those obtained in a study by Mekjaruskul et al. (Mekjaruskul et al. 2012, 2013). A method for enhancing the bioavailability of methoxyflavones was previously developed by Mekjaruskul et al. (2013). SMEDDS and a complex of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin were shown to improve the plasma concentrations of methoxyflavones. The T_{max} of KPD and KPD formulations was recorded ranged from 0.76 to 1.66 h. Although the basic components of SNEDDS and SMEDDS are surfactants, co-surfactants, and oils, the type of each component can affect formulation properties, especially absorption (Shahnaz et al. 2011; Kalepu et al. 2013; Chudasama et al. 2014; Hasan 2014).

In our study, the plasma concentrations of methoxyflavones in KPD were in the following order: DMF > PMF > TMF. Conversely, the plasma concentrations decreased in the order of TMF > DMF > PMF in SNEDDS and SNEDDS/NEUS. These results may be due to the effect of SNEDDS and SNEDDS/NEUS

formulations, which have been shown to have different dissolution rates (Weerapol et al. 2015) and oral absorption of substances with various lipophilicities in rats (Weerapol et al. 2015). The absorption of methoxyflavones from SNEDDS/NEUS and SNEDDS was significantly higher than that of KPD. The absorption of methoxyflavones from SNEDDS was greater than that from S-SNEDDS; however, according to the dissolution test, the dissolution of methoxyflavones from SNEDDS was higher than that from SNEDDS/NEUS (Figure 6). The AUC of SNEDDS/NEUS lower than that SNEDDS was reported by Van Speybroeck et al. (2012). This result indicated the incomplete desorption of emulsion *in vitro* study has negative effect for *in vivo* study. The gelation of NEUS (Pongjanyakul et al. 2005) may be due to the formation of an obstruction layer that may have retarded dissolution of drug from the S-SNEDDS. This ultimately led to a bioavailability that is lower than SNEDDS. In addition, the values of standard error for SNEDDS and SNEDDS/NEUS were lower than that for total flavonoids. This may be attributed to the effectiveness of SNEDDS and SNEDDS/NEUS in reducing variability in

Table 3. Stability test results of flavonoids (%) in KPD, SNEDDS and SNEDDS/NEUS after 6-month storage ($n=3$).

	Content (%) \pm SD		
	DMF	TMF	PMF
KPD			
Initial	100.00 \pm 0.25	100.00 \pm 0.75	100.00 \pm 0.56
Accelerated condition	99.84 \pm 0.21	100.00 \pm 0.34	100.00 \pm 0.79
Normal storage condition	99.86 \pm 0.50	99.96 \pm 0.64	99.99 \pm 0.32
SNEDDS			
Initial	100.00 \pm 0.21	100.00 \pm 0.32	100.00 \pm 0.19
Accelerated condition	99.89 \pm 0.78	99.99 \pm 0.56	99.96 \pm 1.30
Normal storage condition	99.92 \pm 0.91	99.79 \pm 0.88	98.98 \pm 0.90
SNEDDS/NEUS			
Initial	100.00 \pm 0.09	100.00 \pm 0.75	100.00 \pm 0.31
Accelerated condition	99.98 \pm 0.29	100.00 \pm 0.16	100.00 \pm 0.64
Normal storage condition	99.93 \pm 0.17	99.98 \pm 2.09	99.99 \pm 1.30

Accelerated condition (40 °C/75% relative humidity). Normal storage condition (25 °C).

Table 4. Pharmacokinetic parameters of SNEDDS/NEUS, SNEDDS (100 mg of KPD/kg body) and KPD in rat ($n=5$).

	AUC _{0-6h} (μ g-h/mL)	T_{max} (h)	C_{max} (μ g/mL)
SNEDDS/NEUS			
DMF	16.80 \pm 0.79*	1.5 [1.5]	10.22 \pm 0.76*
TMF	18.77 \pm 0.55*	1.5 [1.5]	10.79 \pm 1.35*
PMF	9.26 \pm 0.46*	1.5 [1.5]	6.84 \pm 1.27*
Total flavonoids	44.88 \pm 1.36*	1.5 [1.5]	27.85 \pm 0.73*
SNEDDS			
DMF	48.36 \pm 2.2*	1.5 [1.5]	21.45 \pm 1.48*
TMF	54.59 \pm 1.64*	1.5 [1.5]	23.23 \pm 1.76*
PMF	33.02 \pm 1.59*	1.5 [1.5]	15.18 \pm 1.47*
Total flavonoids	135.98 \pm 3.22*	1.5 [1.5]	59.86 \pm 3.85*
KPD			
DMF	11.95 \pm 2.12	1.0 [1.0]	10.20 \pm 0.50
TMF	6.95 \pm 1.87	1.0 [1.0]	7.30 \pm 0.60
PMF	7.85 \pm 0.55	1.0 [1.0]	8.20 \pm 0.30
Total flavonoids	25.30 \pm 3.05	1.0 [1.0]	25.70 \pm 1.48

Median range in brackets. Values are expressed as mean \pm standard deviation (SD).

* $p < 0.5$ compared with KPD.

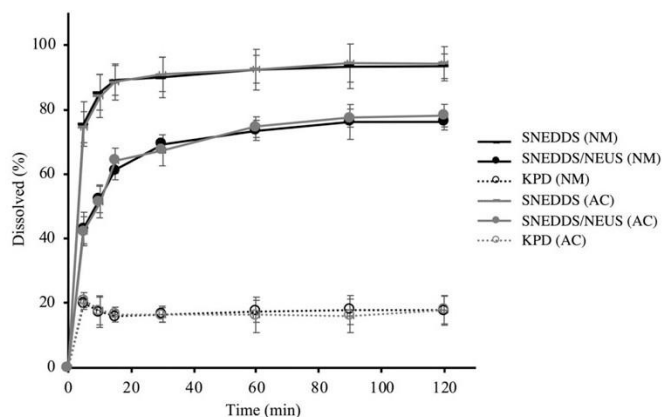


Figure 7. Dissolution profile of KPD, SNEDDS formulation, and S-SNEDDS formulations after 6 months of storage under accelerated (AC) and normal (NM) condition. (Bars indicate standard deviation; $n=3$).

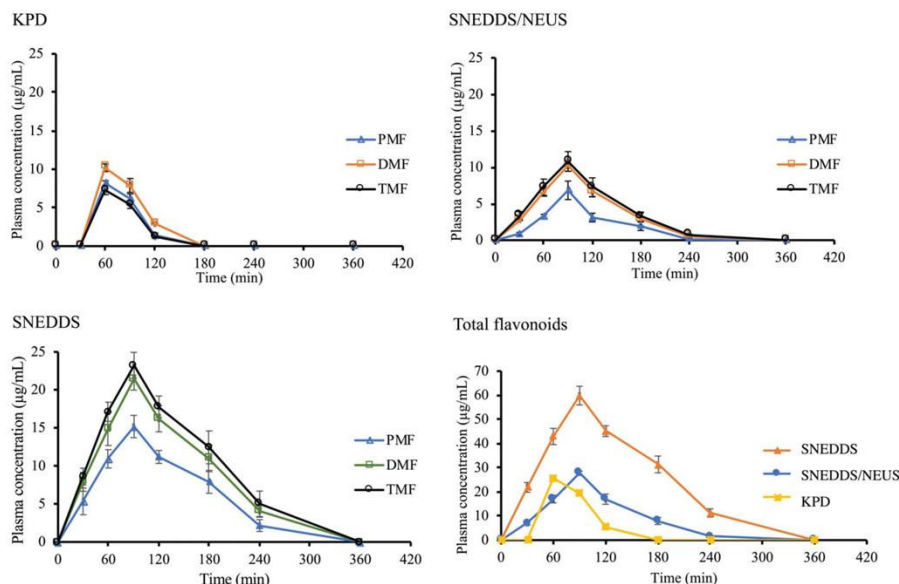


Figure 8. *In vivo* plasma concentration–time profiles of KPD, SNEDDS/NEUS, and SNEDDS (bars indicate standard deviation; $n = 5$).

absorption from the gastrointestinal tract (Weerapol et al. 2015). These results suggest that greater absorption was achieved from the formulation that provided higher solubility in the *in vitro* dissolution test. The developed SNEDDS and SNEDDS/NEUS formulations improved the oral absorption of methoxyflavones and their residence times in rats.

Conclusion

The SNEDDS formulation with a high concentration of KPD was prepared. The formulation comprised of CCG:P35:DGE in a ratio 10:10:80. Various solid carriers were tested to investigate their ability to adsorb liquid SNEDDS. SNEDDS and S-SNEDDS were able to self-emulsify after dilution with water or SGF. High methoxyflavones dissolutions were observed in SNEDDS and SNEDDS/NEUS (approximately 92 and 73%, respectively). The AUC of SNEDDS/NEUS and SNEDDS (1.77 and 5.38-folds, respectively) were significantly higher than that of KPD. These formulations were stable after storage under accelerated and normal conditions for 6 months. Therefore, the developed formulations can be used to enhance the solubility and bioavailability of KPD.

Disclosure statement

There is no conflict of interest and disclosures associated with this manuscript.

Funding

This work was supported by the National Research Council of Thailand under grant 80/2561; Thailand Center of Excellence for Life Sciences (Public Organization) under grant TC 22/61.

References

- Adebisi AO, Conway BR, Asare-Addo K. 2015. The influence of fillers on theophylline release from clay matrices. *Am J Pharmacol Sci*. 3(5):120–125.
- Agarwal V, Siddiqui A, Ali H, Nazzal S. 2009. Dissolution and powder flow characterization of solid self-emulsified drug delivery system (SEDDS). *Int J Pharm*. 366(1–2):44–52.
- Bansode ST, Kshirsagar SJ, Madgulkar AR, Bhalekar MR, Bandivadekar MM. 2016. Design and development of SMEDDS for colon-specific drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm*. 42(4): 611–623.
- Beringhs A, Minatovicz B, Zhang G, Chaudhuri B, Lu X. 2018. Impact of porous excipients on the manufacturability and product performance of solid self-emulsifying drug delivery systems. *AAPS Pharmscitech*. 19(7):3298–3310.
- Burapapadh K, Takeuchi H, Sriamornsak P. 2012. Novel pectin-based nanoparticles prepared from nanoemulsion templates for improving *in vitro* dissolution and *in vivo* absorption of poorly water-soluble drug. *Eur J Pharm Biopharm*. 82(2):250–261.
- Chudasama AS, Patel VV, Nivsarkar M, Vasu KK, Shishoo CJ. 2014. *In vivo* evaluation of self emulsifying drug delivery system for oral delivery of nevirapine. *Indian J Pharm Sci*. 76(3):218–224.
- General Information of Fujicalin. 2009. Fuji Chemical Industries Co. Ltd [accessed 2018 Sep 6]. http://www.fujicalin.com/product/general_properties.php.
- General Properties of Neusilin. 2009. Fuji Chemical Industries Co. Ltd [accessed 2018 Sep 6]. http://www.neusilin.com/product/general_properties.php.
- Gumaste S, Freire B, Serajuddin A. 2017. Development of solid SEDDS, VI: effect of pre-coating of Neusilin® US2 with PVP on

- drug release from adsorbed self-emulsifying lipid-based formulations. *Eur J Pharm*. 110:124–133.
- Gumaste S, Pawlak S, Dalrymple D, Nider C, Trombetta L, Serajuddin A. 2013. Development of solid SEDDS, IV: effect of adsorbed lipid and surfactant on tableting properties and surface structures of different silicates. *Pharm Res*. 30(12):3170–3185.
- Gupta S, Kesarla R, Omri A. 2013. Formulation strategies to improve the bioavailability of poorly absorbed drugs with special emphasis on self-emulsifying systems. *ISRN Pharm*. 2013:1–16.
- Hasan NM. 2014. Role of medium-chain fatty acids in the emulsification mechanistics of self-micro-emulsifying lipid formulations. *Saudi Pharm J*. 22(6):580–590.
- Hauss DJ. 2007. Oral lipid-based formulations. *Adv Drug Deliv Rev*. 59(7):667–676.
- Ito Y, Kusawake T, Ishida M, Tawa R, Shibata N, Takada K. 2005. Oral solid gentamicin preparation using emulsifier and adsorbent. *J Control Release*. 105(1–2):23–31.
- Jaiswal P, Aggarwal G, Harikumar SL, Singh K. 2014. Development of self-microemulsifying drug delivery system and solid-self-microemulsifying drug delivery system of telmisartan. *Int J Pharma Investig*. 4(4):195–206.
- Kalepu S, Manthina M, Padavala V. 2013. Oral lipid-based drug delivery systems – an overview. *Acta Pharm Sin B*. 3(6):361–372.
- Krupa A, Szlęk J, Jany B, Jachowicz R. 2015. Preformulation studies on solid self-emulsifying systems in powder form containing magnesium aluminometasilicate as porous carrier. *AAPS PharmSciTech*. 16(3):623–635.
- Leardkamolkarn V, Tiamyuyen S, Sripanidkulchai BO. 2009. Pharmacological activity of *Kaempferia parviflora* extract against human bile duct cancer cell lines. *Asian Pac J Cancer Prev*. 10(4):695–698.
- Liu Y, Zhang P, Feng N, Zhang X, Wu S, Zhao J. 2009. Optimization and in situ intestinal absorption of self-microemulsifying drug delivery system of oridonin. *Int J Pharm*. 365(1–2):136–142.
- Malakul W, Thirawarapan S, Ingkaninan K, Sawasdee P. 2011. Effects of *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker on endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 133(2):371–377.
- Meiszterics A, Sinkó K. 2008. Sol-gel derived calcium silicate ceramics. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 319(1–3):143–148.
- Mekjaruskul C, Jay M, Sripanidkulchai B. 2012. Pharmacokinetics, bioavailability, tissue distribution, excretion, and metabolite identification of methoxyflavones in *Kaempferia parviflora* extract in rats. *Drug Metab Dispos*. 40(12):2342–2353.
- Mekjaruskul C, Yang Y-T, Leed MGD, Sadgrove MP, Jay M, Sripanidkulchai B. 2013. Novel formulation strategies for enhancing oral delivery of methoxyflavones in *Kaempferia parviflora* by SMEDDS or complexation with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Int J Pharm*. 445(1–2):1–11.
- Milovic M, Djuris J, Djekic L, Vasiljevic D, Ibric S. 2012. Characterization and evaluation of solid self-microemulsifying drug delivery systems with porous carriers as systems for improved carbamazepine release. *Int J Pharm*. 436(1–2):58–65.
- Nipun TS, Ashrafal Islam SM. 2014. SEDDS of gliclazide: preparation and characterization by in-vitro, ex-vivo and in-vivo techniques. *Saudi Pharm J*. 22(4):343–348.
- Osborne DW. 2011. Diethylene glycol monoethyl ether: an emerging solvent in topical dermatology products. *J Cosmet Dermatol*. 10(4):324–329.
- Park J-E, Woo SW, Kim M-B, Kim C, Hwang J-K. 2017. Standardized *Kaempferia parviflora* extract inhibits intrinsic aging process in human dermal fibroblasts and hairless mice by inhibiting cellular senescence and mitochondrial dysfunction. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2017:1–14.
- Patel HK, Patel PV, Misan CK, Mehta DS, Patel MB. 2012. Development and characterization of liquid and solid self-microemulsifying drug delivery system of tacrolimus. *Asian J Pharm*. 6(3):204–211.
- Patel PV, Patel HK, Panchal SS, Mehta TA. 2013. Self micro-emulsifying drug delivery system of tacrolimus: formulation, in vitro evaluation and stability studies. *Int J Pharma Investig*. 3(2):95–104.
- Planinsek O, Kovacic B, Vrečer F. 2011. Carvedilol dissolution improvement by preparation of solid dispersions with porous silica. *Int J Pharm*. 406(1–2):41–48.
- Pongjanyakul T, Pripem A, Puttipipatkachorn S. 2005. Influence of magnesium aluminium silicate on rheological, release and permeation characteristics of diclofenac sodium aqueous gels in-vitro. *J Pharm Pharmacol*. 57(4):429–434.
- Pouton CW. 1997. Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*. 25(1):47–58.
- Pouton CW. 2006. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *Eur J Pharm Sci*. 29(3–4):278–287.
- Pouton CW, Porter C. 2008. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies. *Adv Drug Deliv Rev*. 60(6):625–637.
- Promthep K, Eungpinichpong W, Sripanidkulchai B, Chatchawan U. 2015. Effect of *Kaempferia parviflora* extract on physical fitness of soccer players: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Med Sci Monit Basic Res*. 21:100–108.
- Relyveld EH. 1986. Preparation and use of calcium phosphate adsorbed vaccines. *Dev Biol Stand*. 65:131–136.
- Sander C, Holm P. 2009. Porous magnesium aluminometasilicate tablets as carrier of a cyclosporine self-emulsifying formulation. *AAPS Pharm SciTech*. 10(4):1388–1395.
- Shah NH, Carvajal MT, Patel CI, Infeld MH, Malick AW. 1994. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) with polyglycolized glycerides for improving in vitro dissolution and oral absorption of lipophilic drugs. *Int J Pharm*. 106(1):15–23.
- Shahnaz G, Hartl M, Barthelmes J, Leithner K, Sarti F, Hintzen F, Rahmat D, Salvenmoser W, Bernkop-Schnurch A. 2011. Uptake of phenothiazines by the harvested chylomicrons ex vivo model: influence of self-nanoemulsifying formulation design. *Eur J Pharm Biopharm*. 79(1):171–180.
- Sherriff M, Enever RP. 1979. Rheological and drug release properties of oil gels containing colloidal silicon dioxide. *J Pharm Sci*. 68(7):842–845.
- Singh AK, Chaurasiya A, Singh M, Upadhyay SC, Mukherjee R, Khar RK. 2008. Exemestane loaded self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS): development and optimization. *AAPS PharmSciTech*. 9(2):628–634.
- Sudwan P, Saenphet K, Saenphet S, Suwansirikul S. 2006. Effect of *Kaempferia parviflora* Wall. ex. Baker on sexual activity of male rats and its toxicity. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 37 (Suppl 3):210–215.
- Van Speybroeck M, Williams HD, Nguyen T-H, Anby MU, Porter CJH, Augustijns P. 2012. Incomplete desorption of liquid excipients reduces the in vitro and in vivo performance of self-emulsifying drug delivery systems solidified by adsorption onto an inorganic mesoporous carrier. *Mol Pharm*. 9(9):2750–2760.

- Wang Z, Sun J, Wang Y, Liu X, Liu Y, Fu Q, Meng P, He Z. 2010. Solid self-emulsifying nitrendipine pellets: preparation and in vitro/in vivo evaluation. *Int J Pharm.* 383(1-2):1-6.
- Weerapol Y, Limmatvapirat S, Jansakul C, Takeuchi H, Sriamornsak P. 2015. Enhanced dissolution and oral bioavailability of nifedipine by spontaneous emulsifying powders: Effect of solid carriers and dietary state. *Eur J Pharm Biopharm.* 91:25-34.
- Weerapol Y, Limmatvapirat S, Kumpugdee-Vollrath M, Sriamornsak P. 2015. Spontaneous emulsification of nifedipine-loaded self-nanoemulsifying drug delivery system. *AAPS PharmSciTech.* 16(2):435-443.
- Weerapol Y, Limmatvapirat S, Nunthanid J, Sriamornsak P. 2014. Self-nanoemulsifying drug delivery system of nifedipine: impact of hydrophilic-lipophilic balance and molecular structure of mixed surfactants. *AAPS PharmSciTech.* 15(2):456-464.
- Weerapol Y, Limmatvapirat S, Takeuchi H, Sriamornsak P. 2015. Fabrication of spontaneous emulsifying powders for improved dissolution of poorly water-soluble drugs. *Powder Technol.* 271: 100-108.
- Weerapol Y, Tubtimsri S, Jansakul C, Sriamornsak P. 2017. Improved dissolution of *Kaempferia parviflora* extract for oral administration by preparing solid dispersion via solvent evaporation. *Asian J Pharm.* 12(2):124-133.
- Weerateerangkul P, Surinkaew S, Chattapakorn SC, Chattapakorn N. 2013. Effects of *Kaempferia parviflora* Wall. Ex. baker on electrophysiology of the swine hearts. *Indian J Med Res.* 137(1): 156-163.
- Yenjai C, Prasanphen K, Daodee S, Wongpanich V, Kittakoop P. 2004. Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. *Fitoterapia.* 75(1):89-92.
- Yorsin S, Kanokwiroon K, Radenahmad N, Jansakul C. 2014. Effects of *Kaempferia parviflora* rhizomes dichloromethane extract on vascular functions in middle-aged male rat. *J Ethnopharmacol.* 156:162-174.

Biological Activities of Solid Dispersion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) - *Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract (KPD) After Six-week Consumption by Middle-aged Male Rats

Pilaipan Chairuk¹, Kanyanatt Kanokwiroon^{2,4}, Nisaudah Radenahmad³, Yotsanan Weerepol⁵ and Chaweewan Jansakul^{1*}

¹Faculty of Traditional Thai Medicine, Prince of Songkla University, Thailand

²Department of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Thailand

³Department of Anatomy, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Thailand

⁴The Excellent Research Laboratory of Cancer Molecular Biology, Prince of Songkla University, Thailand

⁵Faculty of Pharmaceutical Science, Burapa University, Thailand

*Corresponding Author: Chaweewan Jansakul, Professor, Faculty of Traditional Thai Medicine, Prince of Songkla University, Thailand.

Received: October 26, 2021; Published: November 30, 2021

Abstract

Background: We previously demonstrated that consumption of *Kaempferia parviflora* (KP) rhizome dichloromethane extract (KPD) caused some beneficial changes in cardiovascular parameters, decreased body fat and up-regulated NO in middle-aged rats. KPD is poorly soluble and was developed to improve its solubility in solid dispersion form with Kollicoat® IR (PVA-co-PEG). Thus the present study aimed to investigate whether Kollicoat (K), an excipient, affected any biological activities of the KPD.

Methods: Solid dispersion of the KPD was prepared by dissolving KPD and K separately and then mixing together after drying to yield a solid dispersion of KPD (K-KPD). Middle-aged male rats were gavaged 200 mg/kg K-KPD, K (100 mg/kg) or distilled water (DW), twice a day, for 6 weeks.

Results: In comparison to control group (DW), K did not affect any of the study parameters. K-KPD caused decreases in body fat and liver cell lipid accumulation, plasma level of glucose and triglycerides, plasma level of alkaline phosphatase, and blood platelets count. K-KPD did not affect basal blood pressure or heart rate in anesthetized rats. K-KPD caused decreased maximal contractile response of thoracic aortic rings to phenylephrine, and this effect disappeared in the presence of DL-propargylglycine (PAG) or removal of the vascular endothelium, but not by nG-nitro-L-arginine (L-NA). K-KPD potentiated vasodilatation of the aortic ring precontracted with phenylephrine to acetylcholine and glyceryl trinitrate, and these effects were abolished by PAG. Western blot analysis showed an increase in blood vessel CSE, but not eNOS, protein expression.

Conclusion: Taken together, Kollicoat did not affect the beneficial cardiovascular health parameters of the KPD, except for the mechanism of the vascular function which was found to cause increased blood vessel H₂S instead of the NO. K-KPD did not have any adverse effects on internal organ gross toxicity, liver and kidney functions, or on blood cells. Thus, the K-KPD would be a novel health product to prolong cardiovascular health functions in human. Further development of the K-KPD in a dosage form as tablets or capsules for convenient human consumption would be worthwhile.

Keywords: Body Fat; Liver Lipid; Blood Vessel; CSE; Nitric Oxide; DL-propargylglycine

Abbreviations

Ach: Acetylcholine; CSE: Cystathionine-γ-lyase; DW: Distilled Water; eNOS: Endothelial Nitric Oxide Synthase; GTN: Glyceryl Trinitrate; H₂S: Hydrogen Sulfide; K: Kollicoat® IR (PVA-co-PEG); KPD: *Kaempferia parviflora* Rhizomes Dichloromethane Extract; K-KPD: Solid Dis-

Citation: Chaweewan Jansakul, et al. "Biological Activities of Solid Dispersion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) - *Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract (KPD) After Six-week Consumption by Middle-aged Male Rats". *EC Pharmacology and Toxicology* 9.12 (2021): 86-98.

Biological Activities of Solid Dispersion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) - *Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract (KPD) After Six-week Consumption by Middle-aged Male Rats

87

persion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG)-*Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract; L-NA: N⁶-nitro-L-arginine; NO: Nitric Oxide; PAG: DL-propargylglycine

Introduction

Cardiovascular disease is still the leading cause of death. Its etiology is multifactorial but age and nutrition are two of the most important risk factors. Population aging is accelerating in nearly all countries of the world [1, 2]. Unlike age, nutrition is modifiable, and thus consumption of supplementary cardiovascular health nutrients may prolong a healthy life and facilitate aging with less healthcare burden.

Advancing age is associated with increased intra-abdominal visceral fat accumulation [3-7]. This leads to endothelial dysfunction [8-10] due to decreased vascular eNOS expression, and thereby diminished nitric oxide (NO) production [11], which represents the early stage of pathophysiological changes in the development of cardiovascular disease [12-14]

Kaempferia parviflora (KP) Wall. Ex Baker or black ginger belongs to the family Zingiberaceae, found in the northern part of Thailand. Its rhizome has been used in folk medicine for health promotion [15]. To date, a number of investigations have claimed therapeutic benefit such as: an aphrodisiac [16-19], anti-inflammatory [20,21], anti-hypertensive [22], cardioprotective [23,24], and antiobesity [25] effects. Our group Yorsin, *et al.* [26] also found that consumption of dichloromethane extract of the plant rhizomes (KPD) by middle-aged male rats caused increased blood vessel eNOS protein expression resulting in an increased NO production, as well as decreased body and visceral fat and liver cell lipid accumulation, with no changes in liver and kidney functions. Thus KPD would be a good choice to develop as a health product to prevent and/or prolong the development of obesity and/or cardiovascular diseases in human.

KPD is poorly water soluble. To enhance its solubility the KPD was prepared as in a solid dispersion form with Kollicoat® IR (PVA-co-PEG). This solid dispersion-based KPD/Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) (K-KPD) was found to be effective both as regards solubility and the *in vivo* pharmacokinetics [27]. Therefore, in the present study we aimed to further investigate whether K-KPD still has the same beneficial cardiovascular health activity as previously reported by Yorsin, *et al.* [26]. The studies were performed in middle-aged male rats and followed the same methodology as previously described by Yorsin, *et al.* [26].

Materials and Methods

Kaempferia parviflora extract preparation

The same method as previously described by Yorsin, *et al.* [26] was used. Briefly, fresh rhizomes of *Kaempferia parviflora* were blended and extracted with 95% ethanol, twice, and followed by extracting three times with 100% dichloromethane. The dichloromethane soluble part was collected and evaporated to yield a yellowish gummy dichloromethane *Kaempferia parviflora* extract (KPD).

Preparation of KPD/PVA-co-PEG solid dispersion

Preparation of the solid dispersion of KPD followed the previous method described by Weerapol, *et al.* [27]. Briefly, KPD (1g) and K (1g) were separately dissolved in 5 mL dichloromethane, then mixed together and dryness at 50°C for 24 h or more in a water bath to obtain a yellowish solid dispersion product: K-KPD. The product was tested for dichloromethane residue by Gas Chromatograph-micro-Electron Capture Detector (GC-uECD) using the service operated by the Equipment Center, Prince of Songkla University. The product without residual solvent was used for animal consumption by dissolving in distilled water.

The K-KPD was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) for its major chemical profile as previously reported [26]. Briefly, analytical HPLC was carried out on a HP1100 system equipped with a photodiode array detector (Agilent Technologies). The

Citation: Chaweewan Jansakul, *et al.* "Biological Activities of Solid Dispersion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) - *Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract (KPD) After Six-week Consumption by Middle-aged Male Rats". *EC Pharmacology and Toxicology* 9.12 (2021): 86-98.

Biological Activities of Solid Dispersion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) - *Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract (KPD) After Six-week Consumption by Middle-aged Male Rats

88

K-KPD was analyzed on a Symmetry C₁₈ column (5 µm, 3.9 x 150 mm i.d: Waters), with a gradient of CH₃OH:H₂O+ 0.05% of trifluoroacetic acid (10: 90 to 100: 0) with a flow rate of 1 mL/min. The UV traces of the eluants were measured at 210 and 254 nm and the UV spectra (DAD) were recorded between 200 and 500 nm.

Pharmacological studies

Middle-aged (13-14 month old) male Wistar rats were bought from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University. The animals were housed in controlled environmental conditions at 25 °C on a 12 h dark and 12 h light cycle and allowed access to standard food (Perfect Companion Group Co. Ltd, Thailand), and tap water *ad libitum*. The animal methods employed in this study were approved by the Prince of Songkla University Animal Ethics Committee (Ethics Number: Ref. 10/2018). The investigation conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (CIOMS Guidelines). The rats were randomly divided into three groups, with six animals in each type of experiment except for the Western blot analysis in which 4 rats were used in each group. The experimental group was treated by oral administration of K-KPD (200 mg/kg which is equal to 100 mg/kg KPD), Kollicoat (100 mg/kg) and the control group animals received distilled water (DW) twice a day for six weeks. The body weight and 24 h food intake (one day before receiving oral gavage of K-KPD, K or DW) were recorded at day 0, and again every consecutive 7th day over a 6-week period.

Effects of the K-KPD, K or DW treatment on the basal blood pressure and on the haematology and clinical biochemical analysis

The same methods as previously described by Yorsin, *et al.* [26] were used. At the end of the 6-week treatment, blood pressure and heart rate were recorded in anesthetized rats. Following this, blood samples were collected for the analysis of glucose and lipid levels and for the analysis of total blood cell count. Then the rat was killed by decapitation with a guillotine.

Effects of K-KPD, K or DW treatment on internal organs and lipid accumulation

The decapitated rats were dissected as previously described [26]. The heart, lung, liver, adrenal gland, kidney and testes, and the visceral fats from the epididymis, testis, and retroperitoneal and subcutaneous fats were removed and weighed.

Two pieces of liver were cut, embedded into a cryostat gel, and the sections (20 µm thick) stained with oil red O, and mounted with glycerine jelly for observation by light microscopy. The oil red O of each slide of the liver tissue was extracted with 1 mL of 100% dimethyl sulfoxide (DMSO), and its absorbance was measured at 520 nm. The area of a thin whole-liver section was measured using the Auto CAD 2005 program. The amount of accumulated liver lipid was expressed in terms of µg/mL/cm² of the thin liver-tissue section area.

Preparation of the thoracic aortic rings

The thoracic aortic rings were prepared as previously described [26]. Six adjacent rings of 4-5 mm in length were cut. Each aortic ring was mounted in a 20 mL organ bath containing Krebs-Henseleit solution, maintained at 37 °C and bubbled with carbogen. The tissues were equilibrated for 60 min under a resting tension of 1 g and the bath solution was replaced with pre-warmed oxygenated Krebs-Henseleit solution every 15 min.

At the end of the equilibration period, each aortic ring was tested for viability of the endothelium by precontraction with phenylephrine (3 µM) until the response reached a plateau (5-8 min), followed by the addition of acetylcholine (30 µM). Endothelial viability was judged by a > 65% vasorelaxation back to the tension generated by the ring before the addition of the phenylephrine. After 45 min equilibration, the basal tension of the thoracic aortic rings adjusted to the optimal tension of 2 g before the experimental protocol began.

Effects of the K-KPD, K or DW treatment on the pharmacological vascular functions

Citation: Chaweewan Jansakul, *et al.* "Biological Activities of Solid Dispersion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) - *Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract (KPD) After Six-week Consumption by Middle-aged Male Rats". *EC Pharmacology and Toxicology* 9.12 (2021): 86-98.

Biological Activities of Solid Dispersion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) - *Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract (KPD) After Six-week Consumption by Middle-aged Male Rats

89

Effects on contraction to phenylephrine and role of NO and H₂S

After equilibration, the contractile response to the cumulative concentration-response (*C-R*) curve of phenylephrine was obtained. This was followed by several washings, and the aortic rings were allowed to fully relax for 50 min. They were then pre-incubated with L-NA for 40 min, and the second *C-R* curve to phenylephrine was then obtained. After repeated washings and re-equilibrations for 40 min, the third *C-R* curve to phenylephrine was obtained in the presence of both L-NA and DL-propargylglycine (PAG).

Effects on relaxation to acetylcholine and glyceryl trinitrate and role of NO and H₂S

Another set of aortic rings was precontracted with phenylephrine (3 μM) for 10-15 min (plateau phase) following which the cumulative dilator *C-R* curves to acetylcholine were determined. After repeated washing to remove the agonists and re-equilibration for 40 min, the second *C-R* curve to acetylcholine was obtained in the presence of DL-propargylglycine (PAG).

Using the above protocol and separate sets of aortic rings, the cumulative dilator *C-R* curves to glyceryl trinitrate (GTN) were obtained in the presence of L-NA alone and then together with PAG.

eNOS and CSE Western blot analysis

The thoracic aortas of the K-KPD, K- or DW- treated groups (n = 4) were obtained in order to measure the expression level of the enzymes, eNOS and CSE. After removal of the adhering connective tissue, each blood vessel was cut into small rings and kept at -70 °C until used. Protein extraction from the tissues and Western blot analysis were carried out as previously described [26]. Briefly, the total proteins were extracted in RIPA buffer, and quantitated by Bradford assay. Protein at 50 μg was separated by 12% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5% low fat dry milk in TBS-T, followed by primary antibody incubation against eNOS at 1:250 (Cell Signalling, USA), CSE at 1:1,000 (Abnova, USA) and β-actin at 1:1,000 (Cell Signalling, USA). The membranes were incubated with HRP-conjugated IgG (1:5,000) and detected by chemiluminescence detection kit (Pierce, Rockford, USA).

Drugs

The following chemicals were used: PVA-co-PEG (Kollicoat® IR) was obtained from BASF (Thai) Co. Ltd. (Bangkok, Thailand). Acetylcholine chloride, N^ω-nitro-L-arginine (L-NA), phenylephrine hydrochloride, DL-propargylglycine (PAG), pentobarbital, and oil red O from Sigma, USA. GTN was obtained from Mycomed, Denmark. The acetylcholine chloride and phenylephrine were dissolved in a solution containing NaCl 9 g/L, NaH₂PO₄ 0.19 g/L and ascorbic acid 0.03 g/L.

Statistical analysis

The results were expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM) (n = 6 for vascular function study and n = 4 for western blot analysis). Statistical differences were determined by unpaired *t*-test or by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's range test, using GraphPad Prism 5.00. A *P* value < 0.05 was considered to indicate a significant difference between values.

Results

Preparation of KPD/PVA-co-PEG solid dispersion (K-KPD)

The solid dispersion of KPD: K-KPD dissolved well in distilled water as previously reported by Weerapol, *et al.* [27]. The HPLC chromatograms of the K-KPD and its three major substances: 3, 5, 7, 3', 4'-pentamethoxyflavone, 5, 7-dimethoxyflavone (DMF) and 5, 7, 4'-trimethoxyflavone (TMF) together with their retention times and corresponding UV spectra are shown in Figure 1.

Citation: Chaweewan Jansakul, *et al.* "Biological Activities of Solid Dispersion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) - *Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract (KPD) After Six-week Consumption by Middle-aged Male Rats". *EC Pharmacology and Toxicology* 9.12 (2021): 86-98.

Biological Activities of Solid Dispersion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) - *Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract (KPD) After Six-week Consumption by Middle-aged Male Rats

90

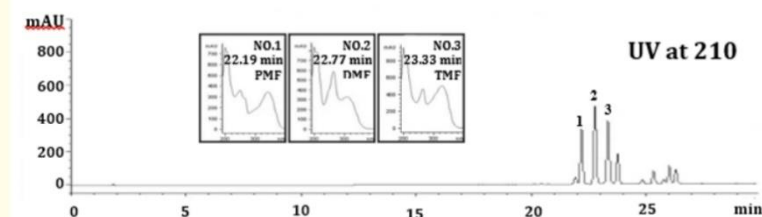


Figure 1: HPLC chromatogram of the K-KPD, and their major methoxyflavones: 3, 5, 7, 3', 4'-pentamethoxyflavone (PMF), 5, 7-dimethoxyflavone (DMF) and 5, 7, 4'-trimethoxyflavone (TMF). The column eluent from each extract was scanned at the wavelength 210 nm.

Effects on body weight, food intake, blood biochemistry, internal organ weight and body fat accumulation

In comparison to DW control groups, K, the excipient of the KPD, did not affect any parameters studied. K-KPD caused decreased animal body weight with no change in food intake (Figure 2). Fat accumulation at the epididymis, mesentery, retroperitoneum and subcutaneous site (Table 1), as well as the lipid accumulation in the liver cells, were found to be decreased (Figure 3). It also caused a decrease in fasting plasma levels of glucose, triglycerides and alkaline phosphatase, and platelet count (Table 2-4). None of the internal organ weights was found to be affected after treatment with K-KPD or K (Table 5).

Treatments	Body weight (g)		n	Absolute adipose tissue weight (g)				
	Initial	Final		Epididymis	Prostate	Mesentery	Retroperitoneum	Subcutaneous
DW	621.5 ± 14.2	667.1 ± 10.7	6	17.40 ± 1.39	1.06 ± 0.20	17.75 ± 0.78	26.06 ± 2.64	53.87 ± 5.21
K	621.4 ± 15.8	659.5 ± 14.0	7	18.06 ± 1.33	1.10 ± 0.10	18.50 ± 1.71	24.07 ± 3.53	53.39 ± 6.73
K-KPD	619.9 ± 10.7	600.5 ± 13.2*	6	13.79 ± 1.34*	1.03 ± 0.14	14.35 ± 1.11*	18.54 ± 2.18*	30.40 ± 5.01*

Table 1: Effect of K-KPD, K or DW consumption by middle-aged male rats on adipose tissue accumulation at the internal organs and at the subcutaneous site. *Significantly lower than the K and DW control group, $P < 0.05$.

NLAC- MU normal range	n	Glucose (mg %)	Triglyceride (mg %)	Cholesterol (mg %)	HDL-C	LDL-C	LDL/HDL ratio
		122.1 - 180.8	61.0 - 164.0	46.0 - 98.0	-	-	
DW	6	135.0 ± 5.7	78.2 ± 7.9	110.8 ± 4.8	105.3 ± 7.9	35.1 ± 7.6	0.33 ± 0.03
K	7	127.7 ± 6.3	68.3 ± 13.8	126.2 ± 5.7	115.0 ± 15.3	33.0 ± 2.7	0.30 ± 0.03
K-KPD	6	106.3 ± 3.2*	51.1 ± 8.4*	99.7 ± 7.6	115.5 ± 12.0	37.1 ± 6.3	0.31 ± 0.03

Table 2: Effect of K-KPD, K or DW consumption by middle-aged male rats on fasting plasma glucose and lipid profile. *Significantly lower than the K and DW control group, $P < 0.05$.

Citation: Chaweewan Jansakul, et al. "Biological Activities of Solid Dispersion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) - *Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract (KPD) After Six-week Consumption by Middle-aged Male Rats". *EC Pharmacology and Toxicology* 9.12 (2021): 86-98.

Biological Activities of Solid Dispersion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) - *Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract (KPD) After Six-week Consumption by Middle-aged Male Rats

91

NLAC- MU normal range	n	ALP (U/L) 46.0 - 92.0	SGOT (U/L) 111.0 - 225.0	SGPT (U/L) 25.0 - 64.0	BUN (mg %) 10.3 - 23.6	CREAT (mg %) 0.5 - 0.7
DW	6	57.9 ± 8.5	123.9 ± 13.3	91.9 ± 14.2	23.1 ± 2.2	0.6 ± 0.09
K	7	56.9 ± 3.2	109.3 ± 17.2	89.3 ± 11.4	22.6 ± 3.0	0.6 ± 0.04
K-KPD	6	32.4 ± 3.4*	118.0 ± 15.7	92.0 ± 13.6	21.4 ± 3.9	0.6 ± 0.04

Table 3: Effect of K-KPD, K or DW consumption by the middle-aged male rats on the plasma levels of alkaline phosphatase (ALP), Blood urea nitrogen (BUN) and Creatinine (CREAT). * Significantly lower than the K and DW control group, $P < 0.05$.

NLAC- MU Normal range	n	HCT (%) 33.2 - 46.0	HGB (g/dl) 13.5 - 17.6	MCV (fl) 47.5 - 54.7	MCH (pg) 17.4 - 26.5	MCHC (%) 34.7 - 51.8	WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$) 3.0 - 7.2	Neutrophil (%) -	LYMPH (%) 59.0 - 91.0	Plt ($\times 10^5/\mu\text{l}$) 4.9 - 11.3
DW	6	45.6 ± 2.4	16.1 ± 0.5	52.6 ± 0.7	17.6 ± 0.2	33.6 ± 0.5	5.0 ± 0.6	69.1 ± 4.3	32.7 ± 4.0	8.5 ± 0.3
K	7	46.9 ± 2.7	16.1 ± 0.7	55.1 ± 1.1	19.0 ± 0.5	34.5 ± 1.0	4.2 ± 0.4	69.9 ± 2.6	28.9 ± 2.5	7.5 ± 0.5
K-KPD	6	47.0 ± 2.9	16.6 ± 0.9	55.0 ± 0.9	19.3 ± 0.3	34.5 ± 0.6	4.4 ± 0.3	62.5 ± 3.5	34.5 ± 2.9	6.9 ± 0.3*

Table 4: Effect of K-KPD, K or DW consumption by the middle-aged male rats on complete blood count * Significantly lower than the DW control group, $P < 0.05$.

Treatments	Absolute organs weight (g)								
	Heart	Lung	Liver	Kidney	Adrenal gland (mg)	Spleen	Testis	Epididymis	Prostate gl.
DW	1.70 ± 0.04	1.77 ± 0.04	16.84 ± 0.67	3.10 ± 0.24	91.22 ± 3.46	1.18 ± 0.08	4.06 ± 0.10	1.20 ± 0.05	1.66 ± 0.03
K	1.60 ± 0.09	1.72 ± 0.10	15.53 ± 0.78	3.22 ± 0.11	81.71 ± 5.85	1.17 ± 0.08	4.00 ± 0.15	1.33 ± 0.09	1.51 ± 0.09
K-KPD	1.60 ± 0.05	1.76 ± 0.04	16.21 ± 0.74	3.19 ± 0.22	92.33 ± 3.81	1.16 ± 0.05	3.95 ± 0.16	1.23 ± 0.16	1.55 ± 0.10

Table 5: Effect of K-KPD, K or DW consumption by the middle-aged male rats on absolute internal organ weight.

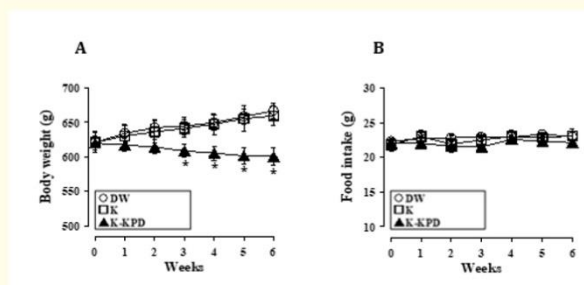


Figure 2: Effects of K-KPD, K or DW consumption by middle-aged male rats on body weight (a) and food intake (b). Each point represents mean ± SEM of 6 rats. * Significantly lower than the K and DW control group, $P < 0.05$.

Biological Activities of Solid Dispersion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) - *Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract (KPD) After Six-week Consumption by Middle-aged Male Rats

92

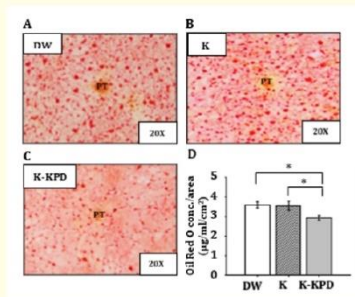


Figure 3: Effect of K-KPD, K or DW consumption by middle-aged male rats on liver cell lipid accumulation. (A) Distilled water (DW), (B) Kollicoat (K), (C) K-KPD and (D) oil red O concentration. Values represent mean \pm SEM of 6 experiments. * Significantly lower than that of the K and DW control group, $P < 0.05$. (PT = Portal triad; oil red O staining of liver tissue frozen section, 20 mm thick, 20X magnification).

Effects of on blood pressure

K-KPD or K treatment did not affect the basal arterial blood pressure or heart rate of the anesthetized middle-aged rats when compared to that of the DW control group (Table 6).

Treatments	n	Basal systolic BP	Basal diastolic BP	Mean Arterial Pressure	Basal heart rate
		(mmHg)	(mmHg)	(mmHg)	(bpm)
DW	6	152.6 \pm 7.3	117.3 \pm 6.0	127.2 \pm 2.1	433.3 \pm 8.9
K	7	142.0 \pm 6.5	115.7 \pm 4.4	124.1 \pm 5.0	427.9 \pm 5.1
K-KPD	6	141.2 \pm 6.6	116.7 \pm 5.7	124.8 \pm 6.0	429.0 \pm 7.6

Table 6: Effect of K-KPD, K or DW consumption by middle-aged male rats on blood pressure and heart rate in anesthetized middle-aged male rats.

Effects of the K-KPD, K or DW treatment on vascular functions

Effect on contraction and relaxation of the thoracic aorta

In comparison to the DW control group, K did not modify the aortic ring function, whereas K-KPD lowered maximal contractile response of the endothelium intact thoracic aortic ring to phenylephrine, and this effect persisted in the presence of N^o-nitro-L-arginine (L-NA), but disappeared when DL-propargylglycine (PAG) was also added (Figure 4 A-C). These effects were not found when the vascular endothelium had been removed (Figure 4 D-F). K-KPD also potentiated vasorelaxation to acetylcholine of the thoracic aortic ring precontracted with phenylephrine, and this effect was abolished in the presence of PAG (Figure 5). Similarly, K-KPD potentiated vasorelaxation

Citation: Chaweewan Jansakul, et al. "Biological Activities of Solid Dispersion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) - *Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract (KPD) After Six-week Consumption by Middle-aged Male Rats". *EC Pharmacology and Toxicology* 9.12 (2021): 86-98.

Biological Activities of Solid Dispersion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) - *Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract (KPD) After Six-week Consumption by Middle-aged Male Rats

93

to glyceryl trinitrate of the thoracic aortic ring in the presence of L-NA which had precontracted with phenylephrine; and this effect was abolished when PAG was also added (Figure 6).

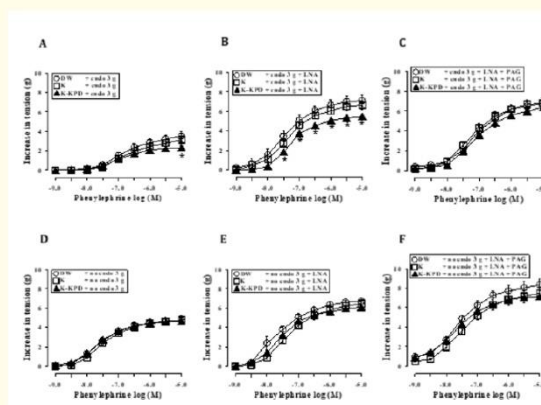


Figure 4: Effect of K-KPD, K or DW consumption by middle-aged male rats on contractile response to phenylephrine of endothelium-intact (upper panel, endo, A) and endothelium-denuded (lower panel, no endo, D), with L-NA (B, E), and in the presence of L-NA and PAG thoracic aorta (C, F). Values represent mean \pm SEM; $n = 6$. * Significantly lower than the K and DW control group, $P < 0.05$.

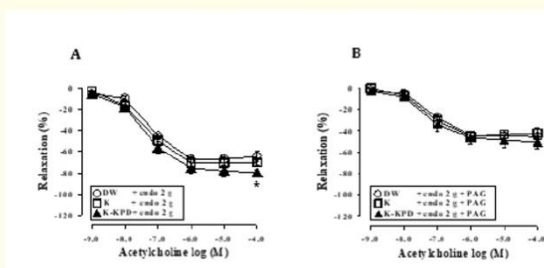


Figure 5: Effects of K-KPD, K or DW consumption by middle-aged male rats on relaxation of the endothelium-intact thoracic aortic ring precontracted with phenylephrine to acetylcholine (A) and in the presence of PAG (B). Values represent mean \pm SEM; $n = 6$. * Significantly lower than the DW control group, $P < 0.05$.

Citation: Chaweewan Jansakul, et al. "Biological Activities of Solid Dispersion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) - *Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract (KPD) After Six-week Consumption by Middle-aged Male Rats". *EC Pharmacology and Toxicology* 9.12 (2021): 86-98.

Biological Activities of Solid Dispersion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) - *Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract (KPD) After Six-week Consumption by Middle-aged Male Rats

94

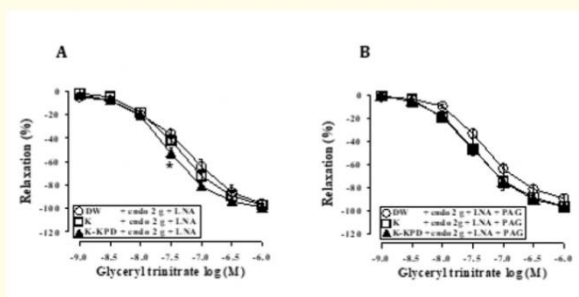


Figure 6: Effects of K-KPD, K or DW consumption by middle-aged male rats on relaxation of the endothelium-intact thoracic aortic ring precontracted with phenylephrine to glyceryl trinitrate in the presence of L-NA (A) and in the presence of L-NA and PAG (B). Values represent mean \pm SEM; $n = 6$. * Significantly lower than the DW control group, $P < 0.05$.

eNOS and CSE western blot analysis

Western blot results were compared among DW, K- and K-KPD-treated groups. For each group, the intensity of the protein concerned was divided by the intensity of actin for all of four independent tissue samples. The results showed significantly increased CSE, but not e-NOS protein expression between the K-KPD-treated and DW or K-treated groups (Figure 7).

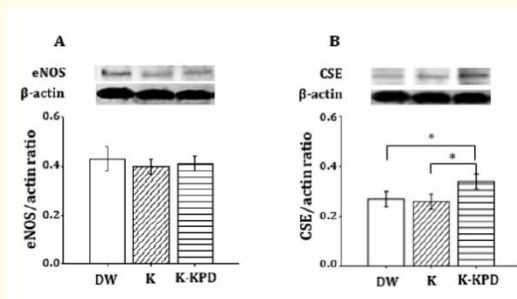


Figure 7: Effects of K-KPD, K or DW consumption by middle-aged male rats on eNOS protein expression (A) or CSE protein expression (B) of the thoracic aorta. For each blot, β -actin expression is shown as a loading control. Values represent mean \pm SEM; $n = 4$. * Significantly higher than the K and DW control group, $P < 0.05$.

Citation: Chaweewan Jansakul, et al. "Biological Activities of Solid Dispersion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) - *Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract (KPD) After Six-week Consumption by Middle-aged Male Rats". *EC Pharmacology and Toxicology* 9.12 (2021): 86-98.

Biological Activities of Solid Dispersion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) - *Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract (KPD) After Six-week Consumption by Middle-aged Male Rats

95

Discussion

Kollicoat IR® is a poly(vinyl alcohol)-poly(ethylene glycol). Kollicoat IR® (PVA-co-PEG), is a pharmaceutical excipient developed as a coating polymer for instant release dosage form [28-30]. Weerapol, *et al.* [27] reported that Kollicoat IR® used as a recipient for making solid dispersion of KPD, a very poor water soluble extract, was successful regarding both its solubility and the *in vivo* pharmacokinetics in adult male rats. However, K itself might affect the biological activities of the KPD. Therefore the present study aimed to investigate these, as well as its toxicity in the middle-aged male rats after 6 weeks of oral gavage of the K-KPD in comparison to K and in DW control. In the present study dosage of the K-KPD was used at 200 mg/kg which would be equal to 100 mg/kg of the KPD as used in our previous reported by Yorsin, *et al.* [26]. The reason for this is that the K-KPD was prepared by mixing the KPD and the K in the ratio of 1: 1.

The present study demonstrates that K-KPD consumption caused decreased body weight, body and visceral fat and liver cell lipid accumulation, as well as decreased plasma glucose and triglyceride levels, which are similar to our previous report on KPD consumption by the middle-aged male rats [26], whereas K alone showed no changes in any of these parameters. These results indicated that K, an excipient of the solid dispersion of KPD, did not disturb the beneficial activities of the KPD. In addition, the basal blood pressure and heart rate of the middle-aged rats treated with K-KPD or K alone were not different from those of the DW control group. It was also found that K-KPD, not K, caused decreased contractile response of the thoracic aortic with increased relaxation to acetylcholine and glyceryl trinitrate. These effects are also similar to those of KPD reported by Yorsin, *et al.* [26]. However, the mechanism responsible for the effect was different. In the present study, the lowering of the aortic ring contraction to phenylephrine was abolished by PAG; a cystathionine- γ -lyase inhibitor; but not by an L-NA, a nitric oxide synthase inhibitor; or by removal of the vascular endothelium. This suggests that H₂S, but not NO was responsible for the effect. Analogously, the higher dilatation of the aortic rings to acetylcholine or to glyceryl trinitrate of the K-KPD treated rats was also abolished by PAG, suggesting that these effects might be modified by up-regulation of the H₂S. To this end, results from the Western blot analysis could be confirmed by the finding that blood vessel CSE protein expression obtained from the K-KPD-, but not from the K treated rats, was significantly higher than in the DW control rats.

The major components of the KPD are PMF, DMF and TMF [26]. All of these substances have been reported to have vasodilation effects on the isolated thoracic aortic rings in the *in vitro* experiment in organ baths by partly stimulated release of NO [24, 31, 32]. In case of PMF, Yorsin, *et al.* [31] found that PMF also stimulated release of H₂S in addition to NO to modulate the blood vessel functions. The effect persisted in the *in vivo* experiments after consumption of the PMF for 6 weeks [33]. Therefore, the active component that was responsible for the K-KPD above mentioned effect would be the three major substances of the KPD. However, from the pharmacokinetic studies of the KPD and K-KPD using PMF, DMF and TMF as the markers found some differences. Yorsin, *et al.* [26] studied the PKD dissolved in a mixture of tween 80: carboxymethylcellulose: distilled water = 0.2 g: 0.2 g: 10 mL, and found all three substances reached their peaks at 60 min with the same ranges in the plasma levels. In contrast, Weerapol, *et al.* [27] studied K-KPD which was dissolved in distilled water, and found that the three substances reached their peaks at 90 min with the plasma levels about two-fold higher for the DMF and TMF, but not the PMF, than that of the KPD. Thus, it is possible DMF and/or TMF might be the active components of the K-KPD that are responsible for the up-regulation of the blood vessel CSE protein expression and resulting increased H₂S production to modify the blood vessel functions. However, further study by isolation of the DMF and TMF and investigating of their activities both *in vitro* and *in vivo* are needed to confirm the aforementioned possibilities.

Conclusion

Taken together, K-KPD consumption caused decreased body fat and liver cell lipid accumulation, lowered plasma levels of glucose and triglycerides and up-regulation of blood vessel CSE protein expression resulting increased H₂S production to modulate vascular functions in middle-aged male rats. It also decreased numbers of blood platelets with no changes in internal organ weight, blood cells count or the

Citation: Chaweewan Jansakul, *et al.* "Biological Activities of Solid Dispersion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) - *Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract (KPD) After Six-week Consumption by Middle-aged Male Rats". *EC Pharmacology and Toxicology* 9.12 (2021): 86-98.

Biological Activities of Solid Dispersion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) - *Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract (KPD) After Six-week Consumption by Middle-aged Male Rats

96

marker enzymes of liver and kidney functions. Thus, the K-KPD, a solid dispersion KPD product, is a novel cardiovascular and/or metabolic health product, and worth further development in the form of a tablet or capsule for toxicity test and human clinical trial.

Acknowledgements

This work was supported by the Thailand Centers of Excellent for Life Sciences, Thailand and Graduate School, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Thailand. The authors thank Miss. Srisurat Duangsai for her technical assistance and Prof. Michael J. Mulvany, Aarhus University, Denmark, for his valuable comments and editing the manuscript. CJ designed the research, conducted some experiments and wrote the manuscript, PC conducted the research and analyzed the data, KK assisted with the western blot experiment, NR assisted with the oil red O tissue staining technique and YW assisted with solid dispersion preparation of the KPD. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Conflict of Interest

All authors declare no any conflict of interest exists.

Bibliography

1. National Institute on Aging. NIA. Global Health and Aging (2019).
2. United Nation. UN. World Population Ageing (2020).
3. Huffman D M and N Barzilai. "Role of Visceral Adipose Tissue in Aging". *Biochimica et Biophysica Acta* 1790.10 (2009): 1117-1123.
4. Kotani K., et al. "Sexual Dimorphism of Age-Related Changes in Whole-Body Fat Distribution in the Obese". *International Association for the Study of Obesity* 18.4 (1994): 207-212.
5. Ponti F., et al. "Aging and Imaging Assessment of Body Composition: From Fat to Facts". *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)* 10 (2019): 861.
6. Tchkonja T., et al. "Fat Tissue, Aging, and Cellular Senescence". *Aging Cell* 9.5 (2010): 667-684.
7. Zamboni M., et al. "Adipose Tissue, Diet and Aging". *Mechanisms of Ageing and Development* 136-137 (2014): 129-137.
8. Arcaro G., et al. "Body Fat Distribution Predicts the Degree of Endothelial Dysfunction in Uncomplicated Obesity". *International Association for the Study of Obesity* 23.9 (1999): 936-942.
9. Chait A and LJ den Hartigh. "Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease". *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 7 (2020): 22.
10. Pazos F. "Range of Adiposity and Cardiorenal Syndrome". *World Journal of Diabetes* 11.8 (2020): 322-350.
11. Novella S., et al. "Aging-Related Endothelial Dysfunction in the Aorta from Female Senescence-Accelerated Mice Is Associated with Decreased Nitric Oxide Synthase Expression". *Experimental Gerontology* 48.11 (2013): 1329-1337.
12. Bhayadia R., et al. "Senescence-Induced Oxidative Stress Causes Endothelial Dysfunction". *The journals of gerontology Series A Biological Sciences and Medical Sciences* 71.2 (2016): 161-169.
13. Marchesi S., et al. "Short-Term Atorvastatin Treatment Improves Endothelial Function in Hypercholesterolemic Women". *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 36.5 (2000): 617-621.

Citation: Chaweewan Jansakul., et al. "Biological Activities of Solid Dispersion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) - *Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract (KPD) After Six-week Consumption by Middle-aged Male Rats". *EC Pharmacology and Toxicology* 9.12 (2021): 86-98.

Biological Activities of Solid Dispersion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) - *Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract (KPD) After Six-week Consumption by Middle-aged Male Rats

97

14. Rudolph TK, *et al.* "Acute effects of various fast-food meals on vascular function and cardiovascular disease risk markers: the Hamburg Burger Trial". *The American Journal of Clinical Nutrition* 86 (2007): 334-340.
15. Mekjaruskul CM Jay and B Sripanidkulchai. "Pharmacokinetics, Bioavailability, Tissue Distribution, Excretion, and Metabolite Identification of Methoxyflavones in *Kaempferia Parviflora* Extract in Rats". *Drug Metabolism and Disposition* 40.12 (2012): 2342-2353.
16. Chaturapanich G, *et al.* "Enhancement of Aphrodisiac Activity in Male Rats by Ethanol Extract of *Kaempferia Parviflora* and Exercise Training". *Andrologia* 44.1 (2012): 323-328.
17. Jansakul C, *et al.* "Relaxant Mechanisms of 3, 5, 7, 3', 4'-Pentamethoxyflavone on Isolated Human Caverosum". *European Journal of Pharmacology* 691.1-3 (2012): 235-244.
18. Sudwan P, *et al.* "Effect of *Kaempferia Parviflora* Wall. Ex. Baker on Sexual Activity of Male Rats and Its Toxicity". *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 37.3 (2006): 210-215.
19. Wattanathorn J, *et al.* "Aphrodisiac Activity of *Kaempferia parviflora*". *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 7.2 (2012): 114-120.
20. Jin S and Mi-Young L. "*Kaempferia parviflora* Extract as a Potential Anti-Acne Agent with Anti-Inflammator, Sebostatic and Anti-Propionibacterium acnes Activity". *International Journal of Molecular Sciences* 19.11 (2018): 3457.
21. Tewtrakul S, *et al.* "Anti-inflammatory effects of compounds from *Kaempferia parviflora* and *Boesenbergia pandurata*". *Food Chemistry* 115.2 (2009): 534-538.
22. Saokaew S, *et al.* "Clinical Effects of Krachaidum (*Kaempferia Parviflora*): A Systematic Review". *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 22.3 (2017): 413-428.
23. Malakul W, *et al.* "The Ethanolic Extract of *Kaempferia Parviflora* Reduces Ischaemic Injury in Rat Isolated Hearts". *Journal of Ethnopharmacology* 137.1 (2011): 184-191.
24. Tep-Areenan PP Sawasdee and M Randall. "Possible Mechanisms of Vasorelaxation for 5,7-Dimethoxyflavone from *Kaempferia Parviflora* in the Rat Aorta". *Phytotherapy Research* 24.10 (2010): 1520-1525.
25. Akase T, *et al.* "Antiobesity Effects of *Kaempferia Parviflora* in Spontaneously Obese Type II Diabetic Mice". *Journal of Natural Medicines* 65.1 (2011): 73-80.
26. Yorsin S, *et al.* "Effects of *Kaempferia Parviflora* Rhizomes Dichloromethane Extract on Vascular Functions in Middle-Aged Male Rat". *Journal of Ethnopharmacology* 156 (2014): 162-174.
27. Weerapol Y, *et al.* "Retracted article: Enhanced dissolution and oral bioavailability of poorly water-soluble herb (*Kaempferia parviflora*) extract using solid dispersions: effect of surfactants and concentrations". *International Journal of Pharmaceutical Investigation* 243 (2020): 51.
28. Fouad E. A., *et al.* "Technology Evaluation: Kollicoat IR". *Expert Opinion on Drug Delivery* 8.5 (2011): 693-703.
29. Fussnegger B, *et al.* "Kollicoat® IR: Minimizing the Risks for Oxidative Degradation of Drugs". *Journal of Analytical and Pharmaceutical Research* 2.3 (2016): 20.
30. Janssens S, *et al.* "The Use of a New Hydrophilic Polymer, Kollicoat Ir, in the Formulation of Solid Dispersions of Itraconazole". *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 30.3-4 (2007): 288-294.
31. Yorsin S, *et al.* "Vasorelaxant effects of 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone isolated from *Kaempferia parviflora*: partly stimulating the release of NO and H₂S by rat thoracic aorta". *Journal of Physiological and Biomedical Sciences* 28.1 (2015): 5-14.

Citation: Chaweewan Jansakul, *et al.* "Biological Activities of Solid Dispersion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) - *Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract (KPD) After Six-week Consumption by Middle-aged Male Rats". *EC Pharmacology and Toxicology* 9.12 (2021): 86-98.

Biological Activities of Solid Dispersion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) - *Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract (KPD) After Six-week Consumption by Middle-aged Male Rats

98

32. Tep-Areenan P and P Sawasdee. "Vasorelaxant Effects of 5,7,4'-Trimethoxyflavone from *Kaempferia parviflora* in the Rat Aorta". *International Journal of Pharmacology* 6.4 (2010): 419-424.
33. Yorsin S., et al. "Increased Vascular Enos and Cystathionine-Gamma-Lyase Protein after 6 Weeks Oral Administration of 3, 5, 7, 3', 4'-Pentamethoxyflavone to Middle-Aged Male Rats". *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 389.11 (2016): 1183-1194.

Volume 9 Issue 12 December 2021

©All rights reserved by Chaweewan Jansakul., et al.

Citation: Chaweewan Jansakul., et al. "Biological Activities of Solid Dispersion Kollicoat® IR (PVA-co-PEG) - *Kaempferia parviflora* Dichloromethane Extract (KPD) After Six-week Consumption by Middle-aged Male Rats". *EC Pharmacology and Toxicology* 9.12 (2021): 86-98.