

ผลของสารสกัดจากกระชายดำต่อการหดตัวของหัวใจห้องบนที่แยกจากตัว
ความดันเลือด และการทำงานของไตในหนูแร้ท

Effects of *Kaempferia parviflora* Extracts on Isolated-Atrial Contraction,
Blood Pressure and Renal Functions in Rats

ณัฐพร จุสะปาโล

Nattaporn Chusapalo

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาสรีรวิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Degree of Master of Science in Physiology

Prince of Songkla University

2550

๑ ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เลขที่	OK495.265 1663 2550	หน้า	2
Bib Key	300606		
	2/9 S.A. 2550/		

(1)

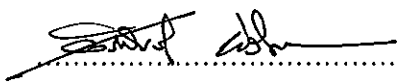
ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของสารสกัดจากกระชายดำต่อการหดตัวของหัวใจห้องบนที่แยกจากตัว
ความดันเลือด และการทำงานของไตในหนูแร้ท

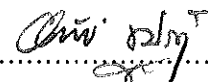
ผู้เขียน นายณัฐพร จุสะปาโล

สาขาวิชา สรีรวิทยา

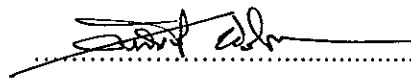
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก


คณะกรรมการสอบ

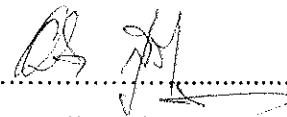

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพันธ์ุ หิรัญญะชาติธาดา)

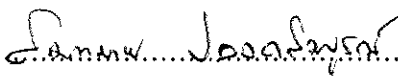

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิชัย ชูปรีชา)

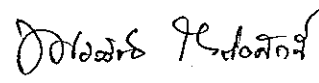
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพันธ์ุ หิรัญญะชาติธาดา)

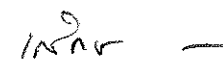

.....
(แพทย์หญิงคันสนีย์ สวัสดิพงษ์)


.....กรรมการ
(ดร.อลิสสา สุวัฒน์ประ)


.....
(นายแพทย์สมหมาย ปลอดสมบุญ)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เพชรรัตน์ ตรงต่อศักดิ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสรีรวิทยา


.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	ผลของสารสกัดจากกระชายดำต่อการหดตัวของหัวใจห้องบนที่แยกจากตัว ความดันเลือด และการทำงานของไตในหนูแร้ท
ผู้เขียน	นายณัฐพร จุสะปาโล
สาขาวิชา	สรีรวิทยา
ปีการศึกษา	2550

บทคัดย่อ

กระชายดำ (*Kaempferia parviflora*) เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae เป็นสมุนไพรที่เชื่อกันว่ามีสรรพคุณลดความดันเลือดและขับปัสสาวะ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ hexane extract, dichloromethane extract และ methanol extract ต่อการหดตัวของหัวใจห้องบนของหนูแร้ทที่แยกจากตัว และผลของ dichloromethane extract ต่อความดันเลือดและการทำงานของไตในหนูแร้ทที่สลบ และเปรียบเทียบผลต่อการหดตัวของหัวใจห้องบนของหนูแร้ทที่แยกจากตัว และผลต่อความดันเลือดและการทำงานของไตในหนูแร้ทที่สลบกับผลของ sildenafil citrate การศึกษาผลของสารสกัดต่อการหดตัวของหัวใจห้องบนแบ่งสัตว์ทดลองเป็น 5 กลุ่ม 1) กลุ่มควบคุม 2) กลุ่ม hexane extract 3) กลุ่ม dichloromethane extract 4) กลุ่ม methanol extract และ 5) กลุ่ม sildenafil citrate ขนาดของสารที่ใช้ทดสอบคือ 0.25-20 mg% โดยหยดสารที่ใช้ทดสอบแล้วล้างออกก่อนที่จะหยดสารความเข้มข้นที่สูงขึ้น ส่วนการศึกษาผลของ dichloromethane extract ต่อความดันเลือดและการทำงานของไตในหนูที่สลบ ใช้เทคนิค clearance การทดลองแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ 1) กลุ่มควบคุม 2) กลุ่ม dichloromethane extract ขนาด 10, 50 และ 100 mg/kg และ 3) กลุ่ม sildenafil citrate ขนาด 10 mg/kg ผลการทดลองสรุปว่าสารสกัดจากกระชายดำทั้งสามชนิดเพิ่มความแรง แต่ลดอัตราการหดตัวของหัวใจห้องบนของหนูแร้ทที่แยกจากตัว โดย dichloromethane และ methanol extract มีผลต่อความแรงในการหดตัวของหัวใจสูงกว่า sildenafil citrate ที่ความเข้มข้นเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ผลต่อการทำงานของไตนั้น dichloromethane extract มีผลลด MABP, RPF, GFR, FE_K และ FPR_{Na} ขณะเดียวกันมีผลเพิ่ม urine flow rate, FE_{Na} และ FDR_{Na} อย่างมีนัยสำคัญ กลไกการขับปัสสาวะและโซเดียมที่เกิดจาก dichloromethane extract น่าจะเกิดจากการยับยั้งการดูดกลับโซเดียมที่ proximal tubule

Thesis Title Effects of *Kaempferia parviflora* Extracts on Isolated-Atrial
Contraction, Blood Pressure, and Renal Functions in Rats

Author Mr.Nattaporn Chusapalo

Major Program Physiology

Academic Year 2007

ABSTRACT

Kaempferia parviflora (family Zingiberaceae), a traditional Thai herbal medicine, has been known to lower blood pressure and have diuretic effect. This study aimed to investigate the effects of hexane, dichloromethane and methanol extracts of *K. parviflora* rhizome on isolated rat atrial contraction, and effects of dichloromethane extract on mean arterial blood pressure (MABP) and renal functions in anesthetized rats and to compare these effects with those of a well known vasodilator phosphodiesterase type 5 inhibitor sildenafil citrate. The effect of extracts on isolated atrial contraction, were done by dividing animals into 5 groups as follow; 1) vehicle control, 2) *K. parviflora* hexane extract, 3) *K. parviflora* dichloromethane extract, 4) *K. parviflora* methanol extract and 5) sildenafil citrate. The doses of test substances were ranged from 0.25-20 mg%. Each tissue was given a test substance and washed before giving the next higher doses. The effects of dichloromethane extract on MABP and renal functions were studied using clearance technique. Animals were divided into 3 groups including 1) control group 2) *K. parviflora* dichloromethane extract group (10, 50 and 100 mg/kg) and 3) sildenafil citrate group (10 mg/kg). It is concluded that all three *K. parviflora* extracts possesses the ability to increase the force but lower the rate of isolated rat atrial contraction. Dichloromethane and methanol extracts significantly increased force of atrial contraction more than that of sildenafil citrate. Dichloromethane extract significantly decreased MABP, RPF, GFR, FE_K and FPR_{Na} while increased urine flow rate, FE_{Na} and FDR_{Na} . The inhibition of sodium reabsorption at the proximal tubule might be the underlying mechanism of diuresis and natriuresis caused by *K. parviflora* dichloromethane extract.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ รศ.ดร. ศิริพันธุ์ หิรัญญะชาติธาดา ประธานกรรมการที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำในการทำวิจัย สอนเทคนิคการผ่าตัดสัตว์ทดลอง แนะนำการ
เขียนและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ ขอขอบคุณ พญ.ศันสนีย์ สวัสดิพงษ์ ที่กรุณาให้
คำแนะนำในการเขียนและแก้ไขวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณ นพ.สมหมาย ปลอดสมบูรณ์ ที่แนะนำ
วิธีการนำเสนอผลการทดลองและการใช้โปรแกรม powerpoint ขอขอบคุณคณะกรรมการสอบ
และคณาจารย์ภาควิชาสัตววิทยาทุกท่านที่ช่วยให้คำแนะนำ ที่แนะนำข้อบกพร่องต่างๆ ขอขอบคุณ
รศ.ดร.ฉัตรชนก กะราลัย ที่ให้คำแนะนำเรื่องการแยกสารสกัดจากกระชายดำ และเชื้อเพื่ออุปกรณ์
การสกัดสาร ขอขอบคุณคุณวัชรวิ วัชรชัยกุล ที่สอนและแนะนำวิธีสกัดสารด้วยเครื่องกลั่นแบบลด
ความดัน ขอขอบคุณคุณกาญจนา อนุชาญ ที่ช่วยสอนการตัดแยกหัวใจออกจากตัวหนูทดลอง ขอ
ขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาสัตววิทยาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือทั้งในเรื่องการทดลองและการ
จัดทำเอกสารต่างๆ ขอขอบคุณเพื่อนๆ นักศึกษาปริญญาโททุกคนที่ให้คำแนะนำ สุดท้ายนี้
ขอขอบคุณพ่อแม่และพี่สาวที่คอยเป็นกำลังใจให้เสมอมา

ณัฐพร จุสะปาโล

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการรูป	(8)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(11)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	31
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	32
วัสดุ	32
อุปกรณ์	33
วิธีการ	34
3. ผลการทดลอง	45
4. วิจารณ์	85
5. สรุป	93
เอกสารอ้างอิง	94
ภาคผนวก	101
ประวัติผู้เขียน	106

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 ความแตกต่างในการควบคุมการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจและกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด	12
3.1 ค่าความแรงในการหดตัวของหัวใจห้องบนที่ตัดแยกจากตัวของหนูแร้ที่ได้รับ Tyrode's solution, 50% ethanol, 100% ethanol, สารสกัดจากกระชายดำด้วย hexane, สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane, สารสกัดจากกระชายดำด้วย methanol และ sildenafil citrate ขนาดต่างๆ	60
3.2 ค่าอัตราการหดตัวของหัวใจห้องบนที่ตัดแยกจากตัวของหนูแร้ที่ได้รับ Tyrode's solution, 50% ethanol, 100% ethanol, สารสกัดจากกระชายดำด้วย hexane, สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane, สารสกัดจากกระชายดำด้วย methanol และ sildenafil citrate ขนาดต่างๆ	61
3.3 Acute effect ของ 50% ethanol, สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ sildenafil citrate ต่อ mean arterial blood pressure และอัตราการหดตัวของหัวใจ	64
3.4 ปริมาณ Na^+ และ K^+ ในสารสกัดจากกระชายดำ	64
3.5 ค่า parameters ต่างๆ ในระบบหัวใจและหลอดเลือด และระบบไตของหนูกลุ่ม vehicle (50% ethanol)	79
3.6 ค่า % change and difference ของ parameters ต่างๆ ในระบบหัวใจและหลอดเลือดและระบบไตของหนูกลุ่ม vehicle (50% ethanol)	80
3.7 ค่า parameters ต่างๆ ในระบบหัวใจและหลอดเลือด และระบบไตของหนูกลุ่มที่ให้ <i>Kaempferia parviflora</i> dichloromethane extract	81
3.8 ค่า % change and difference ของ parameters ต่างๆ ในระบบหัวใจและหลอดเลือดและระบบไตของหนูกลุ่ม <i>Kaempferia parviflora</i> dichloromethane extract	82
3.9 ค่า parameters ต่างๆ ในระบบหัวใจและหลอดเลือด และระบบไตของหนูกลุ่มที่ให้ sildenafil citrate	83
3.10 ค่า % change and difference ของ parameters ต่างๆ ในระบบหัวใจและหลอดเลือดและระบบไตของหนูกลุ่ม sildenafil citrate	84

รายการรูป

รูปที่	หน้า
1.1	contractile proteins ที่ 3 stages ระหว่าง crossbridge cycle 3
1.2	high pressure receptor และ baroreceptor reflex ในการตอบสนองต่อยาที่ เหนี่ยวนำให้หลอดเลือดคลายตัวและความดันที่ต่ำลงอย่างเฉียบพลัน 6
1.3	low pressure และ Bainbridge reflexes ในการตอบสนองต่อ volume load เมื่อความดันเลือดเพิ่มขึ้น 7
1.4	กลไกการหลั่ง renin จาก juxtaglomerular cell ของไต 8
1.5	ตำแหน่งออกฤทธิ์ของ angiotensin II 11
1.6	การควบคุม arterioles ส่วนปลาย 13
1.7	ความสัมพันธ์ระหว่าง arterial blood pressure, renal blood flow และ glomerular filtration rate 15
1.8	ปริมาณการกรอง การดูดกลับของ Na^+ ที่ตำแหน่งต่าง ๆ ของท่อไตและการขับ ทิ้ง Na^+ ใน 1 วัน 17
1.9	โครงสร้างของ juxtaglomerular apparatus 18
1.10	ปริมาณการกรอง การดูดกลับและการขับทิ้ง K^+ ใน 1 วัน 19
1.11	การขนส่ง lithium ที่ tubule ส่วนต่าง ๆ ร่วมกับการขนส่ง lithium และน้ำ 20
1.12	การสังเคราะห์และ receptor ของ cGMP 22
1.13	ลำต้น ไบ เหง้า และดอกของกระชายดำ 24
2.1	แผนภูมิการสกัดสารจากเหง้ากระชายดำ 36
2.2	แผนการทดลองในการศึกษาการหดตัวของหัวใจห้องบนที่แยกจากตัว 37
2.3	แผนการทดลองในการศึกษาผลของกระชายดำต่อความดันเลือดและการทำงานของ ไต 41
3.1	ผลของTyrode's solution ต่อความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจห้องบนที่ ตัดแยกจากตัวของหนูแร้ท 50
3.2	ผลของ 50% ethanol ต่อความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจ ห้องบนที่ตัดแยกจากตัวของหนูแร้ท 51

รายการรูป

รูปที่	หน้า	
3.3	ผลของ 100% ethanol ต่อความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจห้องบนที่ตัดแยกจากตัวของหนูแร้ท	52
3.4	ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย hexane ต่อความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจห้องบนที่ตัดแยกจากตัวของหนูแร้ท	53
3.5	ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ต่อความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจห้องบนที่ตัดแยกจากตัวของหนูแร้ท	54
3.6	ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย methanol ต่อความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจห้องบนที่ตัดแยกจากตัวของหนูแร้ท	55
3.7	ผลของ sildenafil citrate ต่อความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจห้องบนที่ตัดแยกจากตัวของหนูแร้ท	56
3.8	ผลของ hexane extract ต่อ %change ของ force และ rate of contraction from control	57
3.9	ผลของ dichloromethane และ methanol extract ต่อ %change ของ force และ rate of contraction from control	58
3.10	ผลของ sildenafil citrate ต่อ %change ของ force และ rate of contraction from control	59
3.11	เส้นบันทึกของความดันเลือดและอัตราการเต้นของหัวใจ ขณะฉีด vehicle (50% ethanol) สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ sildenafil citrate	63
3.12	mean arterial pressure ของหนูกลุ่ม vehicle และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate	65
3.13	heart rate ของหนูกลุ่ม vehicle และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate	66
3.14	urine flow rate (\dot{V}) ของหนูกลุ่ม vehicle กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate	67

รายการรูป

รูปที่		หน้า
3.15	glomerular filtration rate (GFR) ของหนูกลุ่ม vehicle กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate	68
3.16	renal plasma flow (RPF) ของหนูกลุ่ม vehicle กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate	69
3.17	filtration fraction (FF) ของหนูกลุ่ม vehicle กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate	70
3.18	urinary excretion of sodium ($U_{Na} \dot{V}$) ของหนูกลุ่ม vehicle กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate	71
3.19	fractional sodium excretion (FE_{Na}) ของหนูกลุ่ม vehicle กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate	72
3.20	urinary excretion of potassium ($U_K \dot{V}$) ของหนูกลุ่ม vehicle กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate	73
3.21	fractional potassium excretion (FE_K) ของหนูกลุ่ม vehicle กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate	74
3.22	lithium clearance (C_L) ของหนูกลุ่ม vehicle กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate	75
3.23	fractional lithium excretion (FE_L) ของหนูกลุ่ม vehicle กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate	76
3.24	fractional proximal sodium reabsorption (FPR_{Na}) ของหนูกลุ่ม vehicle กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate	77
3.25	fractional distal reabsorption of sodium (FDR_{Na}) ของหนูกลุ่ม vehicle กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate	78

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

5'AMP	=	5' adenosine monophosphate
5'GMP	=	5' guanosine monophosphate
°C	=	degree celcius
µg	=	microgram
µl	=	microlitre
µm	=	micrometer
ACE	=	angiotensin converting enzyme
ACh	=	acetylcholine
ADH	=	antidiuretic hormone
ADP	=	adenosine diphosphate
Ang II	=	angiotensin II
ANP	=	atrial natriuretic peptide
ATP	=	adenosine triphosphate
ATPase	=	adenosine triphosphatase
AV block	=	atrioventricular block
AV conduction	=	atrioventricular conduction
AV junction	=	atrioventricular junction
AV node	=	atrioventricular node
BNP	=	brain-type natriuretic peptide
BP	=	blood pressure
bpm	=	beat per minute
BW	=	body weight
Ca ²⁺	=	calcium ion
cAMP	=	cyclic adenosine monophosphate
cGK	=	cyclic guanosine monophosphate kinases
cGMP	=	cyclic guanosine monophosphate
C _{in}	=	clearance of inulin

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

C_K	=	clearance of potassium
Cl ⁻	=	chloride ion
C_{Li}	=	clearance of lithium
cm	=	centimeter
C_{Na}	=	clearance of sodium
CNG channel	=	cyclic-nucleotide-gated cation channel
CNP	=	C-type natriuretic peptide
CO ₂	=	carbon dioxide
CO	=	cardiac output
C_{PAH}	=	clearance of para-aminohippuric acid
CVP	=	central venous pressure
DP	=	diastolic pressure
ECF	=	extracellular fluid
ECFV	=	extracellular fluid volume
ERPF	=	effective renal plasma flow
ET	=	endothelin
FDR_{Na}	=	fractional distal reabsorption of sodium
FE_K	=	fractional excretion of potassium
FE_{Li}	=	fractional excretion of lithium
FE_{Na}	=	fractional excretion of sodium
FF	=	filtration fraction
FPR_{Na}	=	fractional proximal sodium reabsorption
FR_{Li}	=	fractional lithium reabsorption
g	=	gram
GC-A	=	guanylyl cyclase-A
GFR	=	glomerular filtration rate
GTP	=	guanosine triphosphate

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

H^+	=	hydrogen ion
Hct	=	hematocrit
HR	=	heart rate
Hz	=	hertz
i_{Ca}	=	inward calcium current
i_f	=	inward current
i_k	=	outward potassium current
IP3	=	inositol-1, 5-triphosphate
K^+	=	potassium ion
K_f	=	filtration coefficient
kg	=	kilogram
<i>K. parviflora</i>	=	<i>Kaemferia parviflora</i>
kw	=	kidney weight
l	=	litre
LiCl	=	lithium chloride
M	=	molar
MABP	=	mean arterial blood pressure
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	millilitre
mM	=	millimolar
mmHg	=	millimetre of mercury
mmol	=	millimole
mS	=	millisecond
Na^+	=	sodium ion
NaCl	=	sodium chloride
NE	=	norepinephrine

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

NFP	=	net filtration pressure
NO	=	nitric oxide
O ₂	=	oxygen
P _a	=	mean arterial pressure
PAH	=	para-aminohippuric acid
P _d	=	diastolic pressure
PDE	=	phosphodiesterase
P _{GC}	=	glomerular capillary hydrostatic pressure
pGC	=	membrane-bound guanylyl cyclase
PGE ₂	=	prostaglandin E ₂
PGF ₂	=	prostaglandin F ₂
PGI ₂	=	prostacyclin
P _i	=	intratubular pressure
P _{In}	=	plasma inulin concentration
P _K	=	plasma potassium concentration
P _K	=	protein kinase
P _{Li}	=	plasma lithium concentration
P _{Na}	=	plasma sodium concentration
PO ₂	=	partial pressure of oxygen
PP	=	pulse pressure
P _{PAH}	=	plasma para-aminohippuric acid concentration
P _S	=	systolic pressure
PVR	=	peripheral vascular resistance
RBF	=	renal blood flow
RPF	=	renal plasma flow
S.E.M.	=	standard error of means
SA node	=	sinoatrial node

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

sGC	=	soluble guanylyl cyclase
SR	=	sarcoplasmic reticulum
STa	=	heat-stable enterotoxin of <i>E. coli</i>
SV	=	stroke volume
TRPF	=	total renal plasma flow
$U_K \dot{V}$	=	potassium excretion rate
U_{Na}	=	urine sodium concentration
$U_{Na} \dot{V}$	=	sodium excretion rate
\dot{V}	=	urine flow rate
VR	=	venous return
βR	=	beta adrenergic receptor
Π_{GC}	=	glomerular capillary oncotic pressure

1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

กระชายดำ (*Kaempferia parviflora*) เป็นพืชวงศ์ Zingiberaceae และเป็นพืชสมุนไพรตระกูลเดียวกับขิงข่า เปราะ เป็นพืชล้มลุก มีเหง้าหรือหัวใต้ดิน แตกหน่อเป็นกอ ขนาดลำต้นสูงประมาณ 30 เซนติเมตร ส่วนแกนกลางลำต้นแข็ง กาบใบ อวบหนา นุ่ม หุ้มแกนลำต้นไว้ โดยรวมลำต้นจะอวบ ใบยาว 10-15 เซนติเมตร ดอกมีสีม่วงขาว เหง้ามีลักษณะเป็นข้อๆ เกาะกัน เป็นปุ่ม เมื่อหั่นเนื้อในหัวเป็นสีม่วงเข้มหรือม่วงดำหรือสีดำ แล้วแต่ความสมบูรณ์ของสภาพดิน และความชื้น พบในป่าภูเขาประเทศไทย พบในจังหวัดเลย เพชรบูรณ์ พิษณุโลก น่าน เชียงใหม่ เชียงราย กาญจนบุรี ตาก นิยมขยายพันธุ์ด้วยเหง้า ปลูกได้ตลอดทั้งปี นิยมนำเหง้ากระชายดำมาใช้ทำยา มีกลิ่นเฉพาะ กลิ่นฉุน เผ็ดร้อน ซึ่งใช้บริโภคกันอย่างแพร่หลายเนื่องจากความเชื่อในสรรพคุณ เช่น เป็นยาบำรุงกำลัง แก้โรคปากเปื่อย ปากเป็นแผล ขยายหลอดเลือดหัวใจ รักษาโรคความดันโลหิตสูง แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ แก้ท้องเดิน ขับปัสสาวะ ขับลม แก้ปวดเมื่อย โรคเกาต์ โรคกระเพาะอาหาร สตรีประจำเดือนมาไม่ปกติ เพิ่มฮอร์โมนทำให้สมรรถภาพทางเพศเพิ่มขึ้นเป็นต้น (จำรัสและมนตรี, 2545) แต่สรรพคุณเหล่านี้ของกระชายดำยังไม่ได้มีการศึกษาทดลองทางวิทยาศาสตร์อย่างเป็นระบบเท่าที่ควร อย่างไรก็ตามได้มีการศึกษาทดลองกระชายดำในทางวิทยาศาสตร์ และทางการแพทย์มาบ้าง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากกระชายดำต่อหัวใจ ความดันเลือด และระบบไต ผลการศึกษาจะนำมาเปรียบเทียบกับ sildenafil citrate เนื่องจากสรรพคุณของกระชายดำที่ช่วยเสริมสมรรถภาพทางเพศ รักษาโรคความดันโลหิตสูง และขับปัสสาวะ ซึ่งน่าจะมีผลต่อระบบหัวใจและระบบไตด้วย จึงเปรียบเทียบกับ sildenafil citrate ซึ่งเป็นยากกลุ่มหนึ่งที่มีผลทำให้หลอดเลือดคลายตัวและลดความดันเลือดโดยการยับยั้งเอนไซม์ phosphodiesterase type 5 (PDE-5) ซึ่งทำหน้าที่สลาย cGMP ไปเป็น 5'GMP ทำให้ cGMP ออกฤทธิ์ได้นานขึ้น ซึ่ง cGMP เป็นตัวกลางให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่หลอดเลือด (Corbin and Francis, 1999; Kloner, et al., 1999) การศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัด 3 ชนิดจากกระชายดำต่อการทำงานของหัวใจ จะทำการทดลองในหัวใจห้องบน (atria) ที่แยกจากตัวของหนูแร้ทและจะคัดเลือกสารสกัดที่ให้ประสิทธิภาพดีที่สุดมาศึกษาผลต่อความดันเลือดและระบบไตต่อไป

การตรวจเอกสาร (Literature Review)

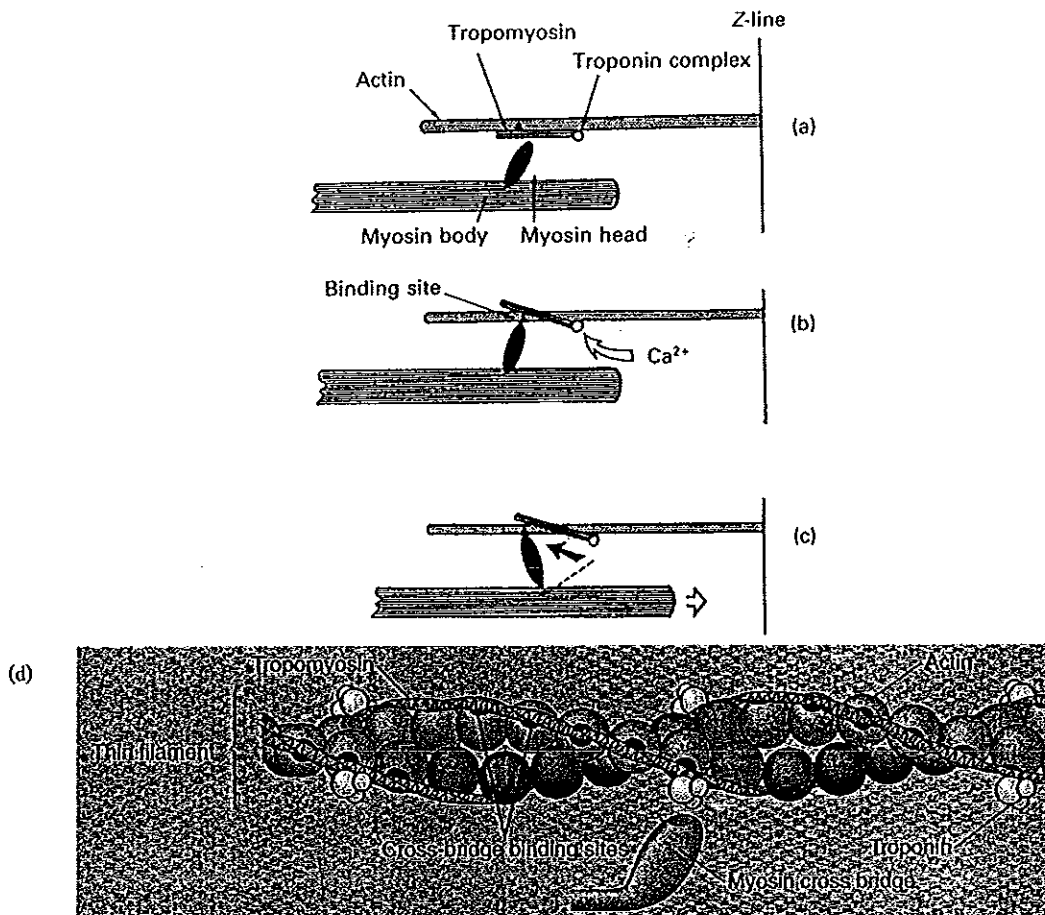
1.1 กลไกการหดตัวของ cardiac muscle (Levick, 2000)

การหดตัวของ myocyte เกิดจากการหดสั้นของ sarcomere โดย I band หดสั้นลงแต่ A band มีความยาวคงที่ แสดงว่าการหดตัวเกิดจาก thin filament ของ I band เคลื่อนเข้าไปในช่องว่างระหว่าง thick filament ของ A band ตามกลไกที่เรียกว่า sliding filament mechanism ซึ่ง filament จะถูกดันผ่านกันและกัน โดยสร้างและสลาย crossbridge ซ้ำๆ ระหว่าง thin กับ thick filament crossbridge เหล่านี้คือหัวของ myosin molecule ที่ยื่นออกไปด้านข้างของ thick filament (ดังรูป 1.1) ขณะพัก actin ตรงตำแหน่งที่ myosin head จะทำปฏิกิริยาด้วยนั้นจะถูกขวางกั้นโดย tropomyosin

การหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจเกิดจาก action potential ที่เกิดขึ้นบน membrane ของ myocyte ซึ่งจะชักนำให้เกิดการหลั่ง Ca^{2+} จาก SR store แล้วทำให้เกิดการหดตัวของ myocyte การหดตัวเริ่มจากการที่ความเข้มข้นของ free intracellular Ca^{2+} เพิ่มขึ้นทันทีทันใดเนื่องจาก Ca^{2+} ถูกหลั่งจาก sarcoplasmic reticulum store (SR store) แล้ว ion บางส่วนจับกับ troponin C (ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ troponin complex) การจับกันจะเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของ tropomyosin molecule ที่อยู่ติดกัน โดยวิธีนี้จะเปิด specific myosin binding site บน actin chain และทำให้ myosin head จับกับ actin

ความแรงและการหดตัวเกิดจากการเปลี่ยนแปลงมุมของ crossbridge เป็นลำดับ หลังจากหัว myosin แยกออก และเกิด crossbridge cycle ซ้ำที่ actin ตำแหน่งใหม่ไปเรื่อย ๆ ทำให้ thick filament เคลื่อนเข้าหาช่องว่างระหว่าง thin filament

สิ่งสำคัญที่สุดเกี่ยวกับกระบวนการทั้งหมดนี้ในทางสรีรวิทยาคือจำนวนการสร้าง crssbridge ดังนั้นความแรงในการหดตัวของหัวใจขึ้นโดยตรงกับความเข้มข้นของ free Ca^{2+} ภายใน myocyte ในกล้ามเนื้อลายความเข้มข้นของ Ca^{2+} ใน cytoplasm ขณะถูกกระตุ้นจำเป็นต้องสูงพอที่จะทำให้เกิด saturation ระหว่าง troponin C กับ Ca^{2+} จึงจะกระตุ้นการสร้าง crossbridge ได้สูงสุด แต่ในกล้ามเนื้อหัวใจไม่เป็นเช่นนั้น ระดับ Ca^{2+} เพียงพอที่จะกระตุ้น บางส่วนของ crossbridge site ที่ทำงานได้ ดังนั้นปัจจัยใดๆ ที่เพิ่ม Ca^{2+} เช่น norepinephrine จะกระตุ้น crossbridge จำนวนมากและทำให้ความแรงในการหดตัวของหัวใจเพิ่มขึ้น



รูปที่ 1.1 contractile proteins ที่ 3 stages ระหว่าง crossbridge cycle (a) resting stage ซึ่ง actin binding site ถูกขยับยั้งด้วย tropomyosin และไม่จับกับ myosin head (b) Ca^{2+} จับกับ troponin C ของ troponin complex แยก tropomyosin ที่ปิดกั้น binding site ออก ทำให้ myosin head จับกับ actin binding site ที่เปิดอยู่ (c) มุมของ myosin head เปลี่ยน ดึง thick filament เข้าหา Z line แล้วหัวของ myosin ก็หลุดออก และเกิดเหตุการณ์เช่นเดิมกับ actin ตำแหน่งใหม่ ในรูปนี้แสดง myosin เพียง 1 molecule ซึ่งใน thick filament ประกอบด้วย myosin 400 molecule และมี actin binding site หลายตำแหน่งด้วย (Levick, 2000) (d) ขยายให้เห็น actin binding site (Sherwood, 2001)

พลังงานสำหรับการหดตัวเกิดจาก adenosine triphosphate (ATP) ที่จับกับ ATPase site บน myosin head ที่ end stage (c) ดังรูปที่ 1.1 พลังงานถูกปลดปล่อยออกมาโดยวิธี hydrolysis ได้เป็น ADP และ inorganic phosphate พลังงานจะกระตุ้น myosin head ทันที ทำให้ myosin head ทำมุมเป็นลักษณะเดียวกันกับก่อนที่จะจับกับ actin (การทำมุมแบบนี้เนื่องจากมีพลังงานสูง) ในแต่ละรอบของ crossbridge มีการสลาย ATP molecule เกิดขึ้น

myocyte มีความหนาแน่นของ mitochondria สูง (30-35% ของปริมาตร cell) โดย mitochondria จะเรียงตัวเป็นแถวอยู่ระหว่าง myofibril ATP ถูกสร้างใน mitochondria โดย

oxidative phosphorylation ดังนั้นสมรรถภาพของหัวใจจึงขึ้นตรงกับ coronary blood flow โดย myocyte PO_2 อยู่ในช่วง 5-20 mmHg เป็น large O_2 gradient จากเลือด ($PO_2 = 100$ mmHg) ไปยัง cell เพื่อก่อให้เกิดการขนส่ง O_2 sarcoplasm ประกอบด้วยโปรตีน myoglobin เป็นแหล่งเก็บ O_2 ขนาดเล็ก myoglobin ช่วยให้การขนส่ง การแพร่ O_2 ผ่าน sarcoplasm ง่ายขึ้น มีความเข้มข้นของ O_2 3.4 g/l

1.2 ปัจจัยที่มีผลต่อความแรงในการหดตัวของหัวใจสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

1.2.1 ระบบประสาทอัตโนมัติ

การกระตุ้นระบบประสาท sympathetic มีผลทำให้ความแรงในการหดตัวของหัวใจเพิ่มขึ้น เนื่องจาก norepinephrine ที่ถูกหลั่งออกมาจากปลายประสาท sympathetic จับกับ β_1 -adrenergic receptor ที่เยื่อผนัง (membrane) cardiomyocyte ทำให้มี permeability ต่อ Ca^{2+} เพิ่มขึ้นและทำให้ความแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจเพิ่มขึ้นด้วย และเรียกผลนี้ว่า positive inotropic effect (Ganong, 2001)

การกระตุ้นระบบประสาท parasympathetic มีผลทำให้ความแรงในการหดตัวของหัวใจลดลงเรียกว่า negative inotropic effect พบที่ atrium เป็นส่วนใหญ่ โดย acetylcholine จะเพิ่ม membrane permeability ต่อ K^+ ทำให้ K^+ ออกนอก cell มากขึ้น ภายใน cell เป็นลบมากขึ้น ทำให้ resting potential เป็นลบมากขึ้น มีผลให้ความแรงในการหดตัวของหัวใจลดลง นอกจากนี้ระบบประสาท parasympathetic ที่ไปยังหัวใจมี presynaptic inhibition ต่อ sympathetic postganglionic fiber ซึ่งจะลดการกระตุ้นจากระบบประสาท sympathetic ได้ (Ganong, 2001)

1.2.2 ฮอร์โมนและสารต่าง ๆ ในเลือด

ฮอร์โมนที่ทำให้เกิด positive inotropic effect ได้แก่ thyroid hormone, epinephrine, norepinephrine และ glucagon โดยฮอร์โมนเหล่านี้จะไปเพิ่ม Ca^{2+} sensitivity ของ contractile protein ใน cardiomyocyte สำหรับสารที่ทำให้เกิด positive inotropic effect ได้แก่ adrenomedulline ซึ่งออกฤทธิ์เพิ่ม sympathetic tone ส่วนฮอร์โมนและสารต่างๆ ในเลือดที่ทำให้เกิด negative inotropic effect ได้แก่ ANP (Thoren *et al.*, 1986; Schultz *et al.*, 1988; Tajima *et al.*, 1998) เป็นต้น

1.2.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของ electrolyte ในเลือด

electrolyte ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของหัวใจที่สำคัญคือ K^+ และ Ca^{2+} โดยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ K^+ จะทำให้การหดตัวของหัวใจเปลี่ยนแปลงไป ปกติ

ระดับ K^+ นอกเซลล์มีค่า 3.5-5.5 mM (Levick, 2000) ถ้าระดับ K^+ นอกเซลล์สูงขึ้นเป็น 8-12 mM ทำให้ resting potential ของ cardiomyocyte ลดลง ทำให้ amplitude ของ action potential ลดลง เป็นผลให้กล้ามเนื้อหัวใจลดความแรงในการหดตัวและหดตัวไม่เป็นจังหวะ เนื่องจากการกระจายสัญญาณไฟฟ้าภายในหัวใจถูกยับยั้งได้ง่ายกว่าปกติ นอกจากนี้ยังทำให้อัตราการเต้นของหัวใจช้าลงอีกด้วย ในทางกลับกันถ้าระดับ K^+ นอกเซลล์ต่ำลงจะเกิดผลในทางตรงข้ามกับระดับ K^+ นอกเซลล์สูงกว่าปกติ (Guyton and Hall, 2006)

1.3 กลไกการควบคุมความดันเลือด

1.3.1 ความดันเลือด (Berne *et al.*, 2000)

ความดันเลือดมีความสำคัญต่อการทำงานของอวัยวะต่างๆในร่างกาย ดังนั้นการควบคุมความดันเลือดให้คงที่ จึงมีความสำคัญต่อการรักษาสภาพแวดล้อมของเซลล์ให้คงที่ เพื่อการทำงานที่พอเหมาะ

ค่า mean arterial pressure เป็นความดันในหลอดเลือดแดงขนาดใหญ่ การหาค่าความดันได้จาก tracing ของความดันเลือดแดงโดยวัดพื้นที่ใต้กราฟความดัน แล้วหารด้วยช่วงเวลาที่เกี่ยวข้อง mean arterial pressure (P_a) ใกล้เคียงกับค่า systolic pressure (P_s) และค่า diastolic pressure (P_d) โดยเฉลี่ยของสูตรนี้

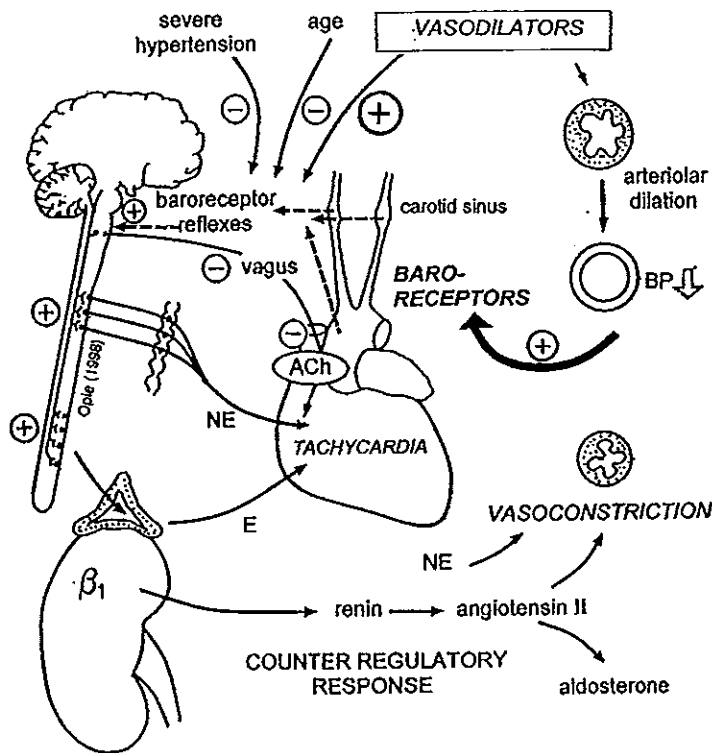
$$P_a = P_d + 1/3(P_s - P_d)$$

1.3.2 การควบคุมความดันเลือด (Opie, 1998)

autonomic control และ baroreceptor reflex

vasomotor center อยู่ที่ brain stem ส่วน medulla oblongata โดยมี afferent จาก baroreceptor ผ่าน vagus และ glossopharyngeal nerves ไปยัง nucleus tractus solitarius ซึ่งอยู่ภายใน vasomotor center โดย impulse จาก receptors เหล่านี้เป็น inhibitory impulse เพื่อการตอบสนองต่อ acute hypertension

Baroreceptor เป็น high pressure receptor ตั้งอยู่ที่ arterial side ของระบบไหลเวียนเลือดใน carotid sinus และ aortic arch ดังแสดงในรูปที่ 1.2 โดย receptor นี้เป็น stretch receptor หรือ mechanoreceptor ซึ่งตอบสนองต่อการยืดขยายของหลอดเลือดเหล่านี้มากกว่าความดันเลือด โดย mechanoreceptor เหล่านี้ป้องกันความดันเลือดสูงเฉียบพลันหรือความดันเลือดต่ำเฉียบพลัน โดยปรับ vagal tone และ sympathetic outflow ด้านระดับ receptor input

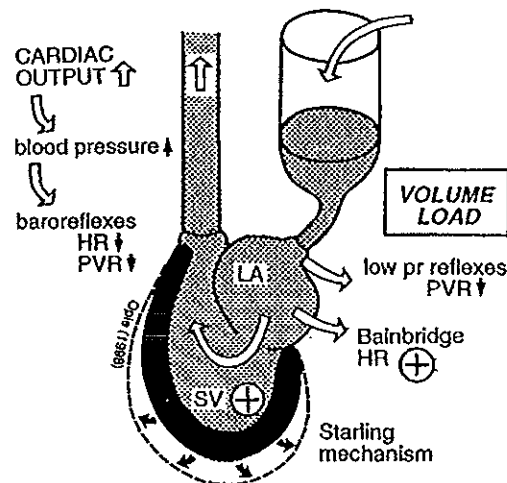


รูปที่ 1.2 High pressure receptor และ baroreceptor reflex ในการตอบสนองต่อยาที่เหนี่ยวนำให้หลอดเลือดคลายตัวและความดันที่ต่ำลงอย่างเฉียบพลัน baroreceptor reflex ยับยั้ง vagal outflow และกระตุ้น adrenergic outflow ซึ่งเป็นตัวที่ทำให้เกิด counter-regulation และการหดตัวของหลอดเลือด (Opie, 1998)

cardiopulmonary receptor เป็น stretch receptor ที่พบใน atria, pulmonary artery, endocardium ของ ventricle เป็น receptor ที่ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลง filling volume ของเลือดดำในหัวใจ การเพิ่มปริมาตรเลือด ทำให้มีการส่งสัญญาณประสาทผ่าน vagal afferent fiber ไปยังสมองเพื่อยับยั้ง sympathetic outflow และลดการหลั่ง renin ซึ่ง inhibitory signal ดังกล่าวจะมีผลลด peripheral vascular resistance (PVR) และลดความดันเลือดที่เพิ่มขึ้น

Bainbridge reflex เป็นการตอบสนองของ cardiopulmonary receptor (ที่บริเวณ venoatrial junction) ต่อ atrial filling และการหดตัวของหัวใจ ทำให้อัตราการหดตัวของหัวใจเพิ่มขึ้นเมื่อมีการยืดหัวใจ โดย venous return ทำให้เกิดการยืดหัวใจ ทำให้อัตราการหดตัวของหัวใจเพิ่มขึ้นได้ ในบางครั้ง การเพิ่มอัตราการหดตัวของหัวใจเกิดผ่านทาง การกระตุ้น medullary center ของ sympathetic efferent activity ไปยัง SA node

การเพิ่มอัตราการหดตัวของหัวใจ 15% เกิดจากการเพิ่ม atrial volume ซึ่งยืด SA node อีก 40-60% เกิดจาก Bainbridge reflex ซึ่งเพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจตอบสนองต่อการเพิ่มความดันเลือดแดง และ reflex นี้เกิดจาก stretch receptor ที่ atrium บริเวณที่ atrium ต่อกับ



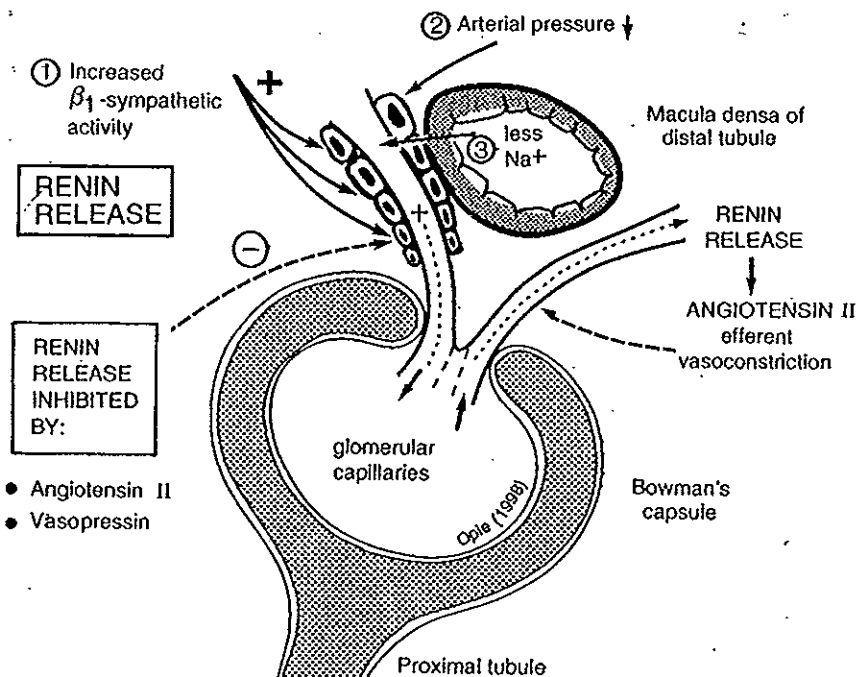
รูปที่ 1.3 low pressure และ Bainbridge reflexes ในการตอบสนองต่อ volume load เมื่อความดันเลือดเพิ่มขึ้น high pressure baroreflexes มีแนวโน้มที่จะลดอัตราการเต้นของหัวใจ (HR) และ PVR (Opie, 1998)

pulmonary vein เป็นผลให้เพิ่ม VR ไม่เพียงแต่เพิ่ม SV โดย Starling's law แต่ยังเพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจ เพื่อเพิ่ม CO ในบางสถานการณ์ ผลของอัตราการเต้นของหัวใจนี้สามารถอธิบายได้ว่าการเพิ่ม CO เพื่อตอบสนองต่อปริมาตรที่ฉีดเข้าไป ปกติในการตอบสนองต่อการออกกำลังกายในท่าตรง ทั้ง Starling's law และ ผลของอัตราการเต้นของหัวใจนั้นมีความสำคัญทั้งคู่ กลไกใดก็ตามที่เพิ่ม CO มักจะเพิ่มความดันด้วย ทำให้เกิดการตอบสนองของ inhibitory baroreflex และทำให้อัตราการเต้นของหัวใจช้าลง (เนื่องจาก cardiopulmonary reflexes ก็กระตุ้น vagal activity ด้วย) แต่ในความเป็นจริงอัตราการเต้นของหัวใจไม่ได้ช้าลง เนื่องจาก arterial pressure เพิ่มขึ้นโดย volume infusion และ baroreflex มี sensitivity ลดลง ผลทั้งหมดเป็นการเพิ่ม CO โดย tachycardia และน้อยมากที่จะเพิ่มความดันตามที่คาดหมายไว้

Integrated control of peripheral vascular resistance คือการควบคุมแบบบูรณาการของความต้านทานหลอดเลือดส่วนปลาย โดยการเพิ่มหรือลดรัศมีของหลอดเลือดส่งผลต่อการทำงานของระบบหัวใจและหลอดเลือดอย่างมาก โดยในระดับ local tissue รัศมีของหลอดเลือดควบคุม blood flow และการแลกเปลี่ยนสารอาหารและน้ำ ในระดับร่างกายรัศมีของหลอดเลือด

เลือดควบคุมปริมาตร plasma, central venous pressure, stroke volume และความดันเลือดแดง

เมื่อมีการลด sympathetic outflow จะมีการหลั่ง renin จากไตลดลง ทำให้การหดตัวของหลอดเลือดที่เกิดจาก angiotensin ลดลง ผลที่ตามมาตรงกันข้ามกันนั้นเกิดขึ้นร่วมกับการเพิ่ม sympathetic outflow เช่นขณะยืนมี reflex เพิ่ม PVR เพื่อรักษาความดันให้อยู่ในระดับปกติ ซึ่งการเพิ่มนี้เกิดโดย 1) reflex กระตุ้นของ vasoconstrictive α_1 adrenergic receptor เป็นผลของการกระตุ้น baroreceptor reflex 2) การกระตุ้นการหลั่ง renin จากไตทั้งโดย low renal artery pressure และ β_1 adrenergic reflexes ในทางกลับกันถ้าความดันเพิ่มมากเกินไป ขณะที่ความเย็นกระตุ้นให้หลอดเลือดหดตัวกลไกการป้องกันอันประกอบด้วย 1) การยับยั้ง adrenergic system โดย baroreceptor 2) การควบคุมความดันเลือดโดย endothelium เมื่อ endothelium ปกติการเพิ่มความดันจะเพิ่ม shear force ที่หลั่ง NO ที่ทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือด ในกรณีที่ endothelium ถูกทำลาย (การเพิ่มความดันซ้ำๆ) จะมีการกระตุ้น endothelium ให้หลั่ง endothelin ซึ่งทำให้หลอดเลือดหดตัว



รูปที่ 1.4 กลไกการหลั่ง renin จาก juxtaglomerular cell ของไต: (1) β_1 sympathetic activity, (2) ความดันต่ำหรือการลดลงของ renal blood flow และ (3) การลดการดูดกลับของ Na⁺ เช่นขณะได้รับอาหารที่มี Na⁺ ต่ำหรือ diuretic therapy โดย All สร้างจาก renin เพื่อทำให้ efferent arteriole หดตัวคงที่และ intraglomerular pressure คงที่ (Opie, 1998)

การควบคุมความดันโดย neurohormonal control

renin angiotensin system

All เป็นสารที่ทำให้หลอดเลือดหดตัวได้ดีมาก มีหน้าที่ควบคุมสมดุล fluid และ electrolyte ควบคุมปริมาณเลือดและความดัน การสร้าง All มาจากการหลั่ง renin จาก juxtaglomerular apparatus ในไตดังรูปที่ 1.4 (renin เป็น glycoprotein enzyme ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน angiotensinogen เป็น angiotensin I ซึ่งถูกเปลี่ยนเป็น All โดย angiotensin converting enzyme (ACE) พบใน endothelium ของหลอดเลือด) renin ตอบสนองต่อตัวกระตุ้นหลัก 3 ตัวคือ 1) การเพิ่มการกระตุ้น β , adrenergic receptor 2) การลด renal artery pressure หรือ hypotension 3) การลด tubular reabsorption ของ Na^+ เช่นในการตอบสนองต่ออาหารที่มี Na^+ ต่ำหรือ diuretic therapy การหลั่ง renin ถูกยับยั้งโดย negative feedback จาก All renin ยังกระตุ้นการหลั่ง aldosterone จาก adrenal cortex ทำให้เพิ่มการดูดกลับ Na^+ ในไตและลดการหลั่ง renin ส่วน angiotensin เป็น metabolite หลักของ All ที่ทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือดได้น้อยกว่า All

All มีผลที่สำคัญอื่นๆต่อการควบคุมความดันเลือดนอกเหนือจากการทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือดดังนี้

- 1) ควบคุมสมดุลของ Na^+ และน้ำในหลายระดับ โดยทำให้เกิดการหลั่ง aldosterone จาก adrenal cortex
- 2) มีบทบาทในการไหลเวียนเลือดที่ไต โดย All จะทำให้ efferent arteriole หดตัว ทำให้ intraglomerular pressure เพิ่มขึ้น จึงป้องกันความดันต่ำและรักษาหน้าที่เกี่ยวกับการกรองของไตไว้ได้
- 3) ส่วนบทบาทของ All ต่อ proximal tubule คือกระตุ้น Na^+/H^+ exchanger เพื่อช่วยการดูดกลับ Na^+
- 4) นอกจากนี้ All ยังกระตุ้น thirst center ใน hypothalamus ทำให้เพิ่ม water intake

All ยังมี indirect permissive adrenergic effect ไปกระตุ้นระบบประสาท sympathetic ที่หลายระดับ ดังรูปที่ 1.5 โดยมีบทบาทต่อ 1) brain stem เพื่อช่วยส่งเสริม central adrenergic activation 2) autonomic ganglia ช่วยการทำงานของ neurotransmission 3) presynaptic All receptor ของ sympathetic nerve terminal neuron กระตุ้นการหลั่ง norepinephrine และทำให้มีการ reuptake น้อยลง 4) endothelium ส่งเสริมการหลั่ง

endothelin โดยหน้าที่เหล่านี้ AII ควบคุมปริมาตรเลือดและความดันให้คงที่เมื่อเกิด arterial hypotension

AII ยังทำงานร่วมกับ baroreflex โดยต่อต้านทุกกลไกที่เพิ่มความดันจาก AII เช่น คาดว่าอัตราการเต้นของหัวใจลดลงเมื่อเพิ่มความดัน แต่ไม่เป็นเช่นนั้นเพราะ AII มีผลต่อ central receptor เพื่อที่จะ reset baroreflex ใหม่และลด anticipated bradycardia ลง catecholamines

ปกติ norepinephrine ในกระแสเลือดไม่มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญต่อหลอดเลือดเพราะความเข้มข้นใน plasma ต่ำมากๆ ในขณะที่ความเข้มข้นของ epinephrine อยู่ภายในค่า active range แต่อย่างไรก็ตาม norepinephrine ที่หลังจากปลายประสาทเข้าสู่ synaptic cleft ก็ออกฤทธิ์เฉพาะที่ โดยส่งเสริม α_1 mediated vasoconstriction

antidiuretic hormone (ADH)

เป็นฮอร์โมนที่ถูกหลั่งจากต่อมใต้สมองส่วนหลังในการตอบสนองต่อการกระตุ้น osmoreceptors โดยลดปริมาตรเลือด ความดันเลือด กระตุ้น β -adrenergic และช่วยควบคุมปริมาตรเลือด ADH เพิ่มการดูดกลับของน้ำในไต โดยทำงานผ่าน V_2 receptor ที่อยู่ที่ collecting duct ของ nephron นอกจากนี้ ADH เป็น vasoconstrictor ที่ออกฤทธิ์ผ่าน V_1 receptor ที่พบทั่วร่างกาย โดยฤทธิ์ทั้งสองอย่าง ADH เพิ่มความดันเลือดด้วยความเข้มข้นที่สูง แต่ในภาวะปกติหน้าที่หลักของ ADH คือลด CO ดังนั้นจึงมีผลต่อความดันเลือดโดยรวมเพียงเล็กน้อย

atrial natriuretic peptide (ANP)

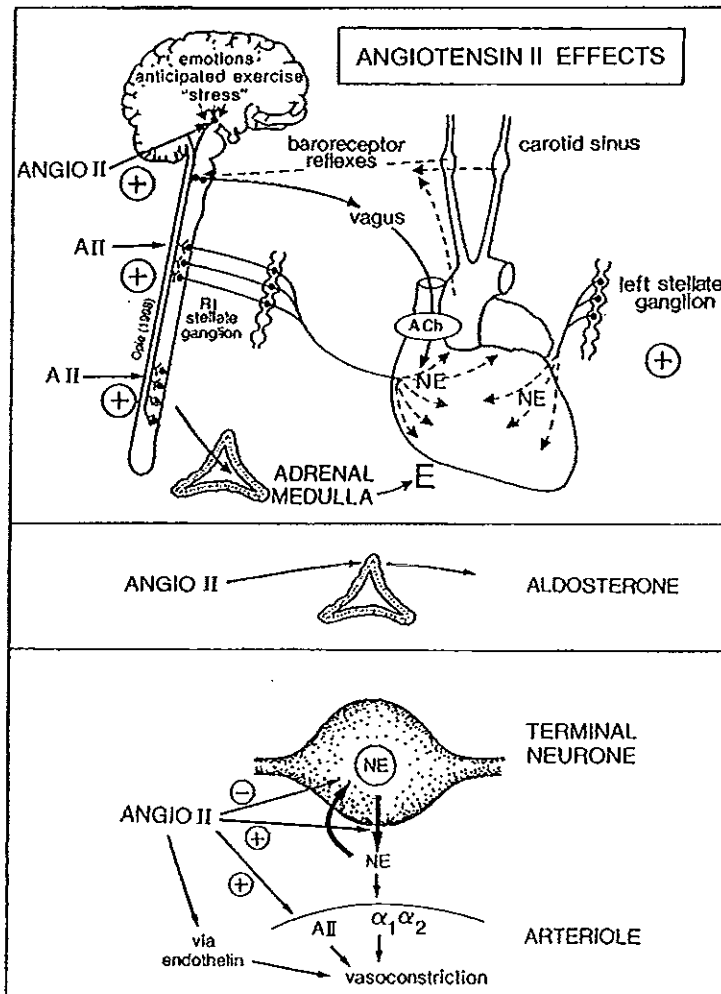
ANP มีชื่อเรียกอีกชื่อว่า atrial natriuretic factor ซึ่งหลั่งเพื่อตอบสนองต่อการยืดของ atrium เช่นในกรณี volume overload หรือหัวใจข้างซ้ายล้มเหลว โดยจะออกฤทธิ์ต่อกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด เพื่อเสริมการคลายตัวของหลอดเลือดผ่านระบบ cGMP (cyclic guanosine monophosphate) นอกจากนี้ ANP มีฤทธิ์ขับปัสสาวะด้วย ทั้งผ่านทางไตโดยตรงและผ่านการยับยั้งการหลั่ง aldosterone ANP เป็น antagonist ภายในร่างกายต่อ AII และ binding sites ของ ANP กับ AII นั้น overlap กัน ขณะออกกำลังกายการหลั่ง ANP อาจมีความสำคัญต่อการต่อต้านผลไม่พึงประสงค์ของ norepinephrine ที่ทำให้หลอดเลือดหดตัว

ในผู้ป่วย congestive cardiac failure ระดับของ ANP ในกระแสเลือดเพิ่มเพื่อต้าน Na^+ และ volume overload แต่ ANP receptor กลับต้านต่อผลของมันเอง

ความต้านทานหลอดเลือดส่วนปลาย (peripheral vascular resistance, PVR)

จากความรู้ที่ว่าความดัน systolic และ diastolic จะสูงใน aorta ที่ระดับ arteriole ความดันจะลดลงทันทีทันใด เส้นผ่านศูนย์กลางของ arteriole ควบคุม PVR ตามกฎของ

Poiseuille ซึ่งสามารถอธิบายได้ง่ายขึ้นดังนี้ "ความต้านทานแปรผกผันกับรัศมียกกำลัง 4" โดยเมื่อรัศมีลดลงครึ่งหนึ่งจะเพิ่ม PVR ขึ้น 16 เท่า



รูปที่ 1.5 ตำแหน่งออกฤทธิ์ของ angiotensin II (angio II) ประกอบด้วย 1) central activation, 2) facilitation ของ ganglionic transmission, 3) การหลั่ง aldosterone จาก adrenal medulla, 4) การหลั่ง norepinephrine (NE) จากปลาย sympathetic varicosities ร่วมกับยับยั้งการ reuptake และ 5) การกระตุ้น angiotensin II receptors ที่หลอดเลือดโดยตรง angiotensin II ทำให้มีการหลั่ง endothelin จาก endothelium ผลหลักๆ ของ angiotensin II คือทำให้หลอดเลือดหดตัว (Opie, 1998)

กลไกหลักที่ควบคุม PVR

1. การหดตัวของหลอดเลือดที่ขึ้นกับ IP_3

มี receptor บนหลอดเลือดอยู่ 3 ชนิดที่สัมพันธ์กับการสร้าง inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3) ซึ่ง receptor เหล่านี้ตอบสนองต่อ agonist ที่สะท้อนถึง neurologic,

neurohormonal และ endothelial function ดังรูปที่ 1.6 โดยประการแรก α_1 adrenergic vasoconstrictor system ทำงานผ่าน norepinephrine ที่หลังจากปลายประสาทตอบสนองต่อการกระตุ้น adrenergic ประการที่สอง All เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการหลั่ง renin ทำให้หลอดเลือดหดตัวทางอ้อมผ่าน norepinephrine ประการสุดท้าย endothelin เป็น vasoconstrictory peptide หลังจาก endothelium ที่ถูกทำลาย

2. cyclic nucleotide vasodilatory system

cAMP และ cGMP ยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดโดยไปยับยั้ง myosin light-chain kinase จึงทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือด cAMP เพิ่มโดยตอบสนองต่อ β -adrenergic vasodilation มี vasodilatory β -receptors (โดย β_2 เด่นกว่า β_1) ใน arteriole กล้ามเนื้อลายและใน coronary arteriole ซึ่ง receptor เหล่านี้ตอบสนองต่อ epinephrine ในกระแสเลือดที่หลังจาก adrenal gland เพื่อตอบสนองต่อ severe stress หรือ emotion พบว่า norepinephrine ที่หลังจากประสาท กระตุ้นให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือดอย่างชัดเจนผ่าน α_1 receptor ส่วน cGMP จะเพิ่มการตอบสนองต่อการกระตุ้นของ NO messenger system ซึ่งเกิดขณะออกกำลังกาย

ตารางที่ 1.1 ความแตกต่างในการควบคุมการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจและกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด (Opie, 1998)

	กล้ามเนื้อหัวใจ (myocardium)	กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด (vascular smooth muscle)
Major agonists	β -adrenergic	α -adrenergic, All, ET, β_2
Major messengers	cAMP	IP_3 and cyclic nucleotides
Histology	Striated	Smooth, nonstriated
Metabolic rate	High	Low
Rate of contraction and relaxation	Fast	Slow, maintains tone: latch mechanism
Site of calcium effect	Troponin-C	Myosin light-chain kinase
cAMP effects	Contract	Relax
cGMP effects	Inhibitory (modest effect)	Relax (powerful effect)

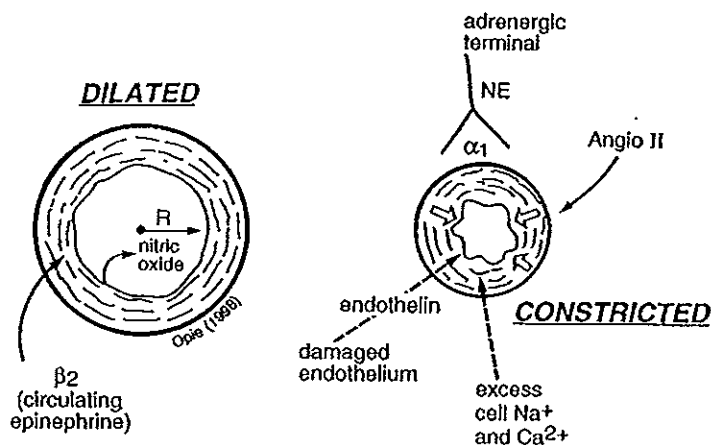
IP_3 , inositol triphosphate; ET, endothelin; β_2 , β_2 -adrenergic.

3. การควบคุมความต้านทานหลอดเลือดส่วนปลายโดย endothelium

endothelium ปกติจะหลั่ง vasodilatory NO แต่ endothelium ที่ถูกทำลายจะหลั่ง vasoconstrictory endothelin ดังนั้นคุณสมบัติของ endothelium มีความสำคัญในการรักษา vascular tone ของหลอดเลือด coronary และหลอดเลือดส่วนปลาย

endothelin เป็นสารที่ทำให้หลอดเลือดหดตัว โดยพบใน mouse knock-out model ที่ไม่มี endothelin ทำให้หนูตัวนั้นเป็น hypertension โดย endothelin ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า physiologic concentration จะทำให้หลอดเลือดคลายตัว โดยทำงานผ่าน vasodilatory ET_B receptors ที่ endothelium ทำให้ NO หลั่ง ในทางตรงข้าม vasoconstrictor receptor บนกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดเป็น ET_A receptor

นอกจากนี้ NO และ vasodilator อื่นๆที่ถูกสังเคราะห์รวมทั้ง prostacyclin (PGI_2) และ endothelium derived hyperpolarizing factor เป็น vasoactive substance ที่ออกฤทธิ์ผ่าน endothelium-derived factor หรือผ่าน metabolic activity ของ endothelium ประกอบด้วย acetylcholine, bradykinin, arachidonic acid, histamine, 5-hydroxy-tryptamine (serotonin), substance P และ vasopressin ส่วนปัจจัยที่ยับยั้งการทำงานของ vasodilator endothelial substance หรือเพิ่มการผลิต endothelin คือ hypoxia, thrombin และ oxygen derived free radical โดย shear stress ขณะเพิ่ม blood flow ทำให้ NO หลั่งและทำให้เกิดการไหลที่ชักนำให้หลอดเลือดคลายตัว แต่ถ้า shear stress มากเกินไป เดิมที่เคยต้านทาน hypertension สามารถทำลาย endothelium โดยการหลั่ง NO เสียไป และเพิ่มการผลิต endothelin มากขึ้น



รูปที่ 1.6 การควบคุม arterioles ส่วนปลาย (Opie, 1998)

Myogenic property

arteriole ตอบสนองต่อการเพิ่ม transmural pressure เช่นใน hypertension หรือ acute blood pressure elevation โดยการหดตัวของหลอดเลือดทำให้เพิ่ม PVR และความดันเลือด แต่การเพิ่ม wall tension ต้องการที่จะต้านแนวโน้มการเพิ่ม intraluminal pressure เพื่อให้ arteriole เปิด

1.4 กลไกควบคุมการไหลเวียนเลือดที่ไต

1.4.1 การควบคุมโดยระบบประสาท sympathetic

หลอดเลือดที่ไตทั้ง afferent และ efferent arteriole มีใยประสาท sympathetic มาเลี้ยง การกระตุ้นการทำงานของระบบประสาท sympathetic จะทำให้หลอดเลือด arteriole ที่ไตหดตัว (Hermansson *et al.*, 1981) หลอดเลือดนี้เป็นตำแหน่งที่ทำให้เกิดความต้านทานส่วนใหญ่ภายในไตทำให้ renal vascular resistance เพิ่มขึ้นมีผลให้ปริมาตรเลือดที่มาเลี้ยงไต (RBF) ลดลง (Hermansson *et al.*, 1981; Kon and Ichikawa, 1983)

1.4.2 การควบคุมโดย hormone และ autacoid

NE, epinephrine และ endothelin ทำให้หลอดเลือด afferent และ efferent arteriole หดตัว ทำให้ renal blood flow ลดลง (Yuan *et al.*, 1990)

angiotensin II เป็น hormone ที่ทำให้หลอดเลือดแดงหดตัวทั้ง afferent และ efferent arteriole ทำให้ความต้านทานของหลอดเลือดภายในไตเพิ่มขึ้น มีผลลด RBF อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษาผลของ angiotensin II ต่อการเพิ่มความต้านทานของ afferent และ efferent arteriole แตกต่างกันไป เช่น Kimura และคณะ (1997) พบว่าความต้านทานของหลอดเลือดทั้งสองไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ Yuan *et al.* (1990) พบว่า angiotensin II ทำให้ความต้านทานของ efferent arteriole มากกว่า afferent arteriole

renal vasodilator, hormone และ autacoid ที่ทำให้หลอดเลือดขยายตัวได้แก่ endothelial-derived nitric oxide, prostaglandins และ bradykinin สารเหล่านี้ทำให้ renal vascular resistance ลดลง มีผลให้ RBF เพิ่มขึ้น (Villa *et al.*, 1997; Matsumura *et al.*, 1999)

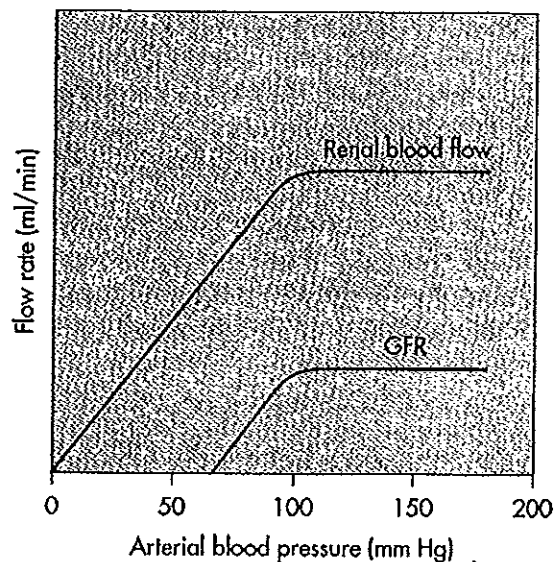
1.4.3 การควบคุมโดยกระบวนการ autoregulation

ไตสามารถควบคุม RBF ให้คงที่ในช่วงความดันเลือด 80-180 mmHg เพื่อให้ไตมีสารอาหารและออกซิเจนมาเลี้ยงเพียงพอ โดยไม่ต้องอาศัยระบบประสาทหรือ hormone จากภายนอกมาควบคุม (Ganong, 2001) เรียกว่า autoregulation (แสดงในรูปที่ 1.7) ซึ่งเกิดจากการทำงานของกลไก 2 อย่างร่วมกัน คือ

1. tubuloglomerular feedback เป็นกลไกที่เกิดขึ้นเนื่องจากแรงดันและ glomerular filtration rate ลดลง ทำให้ความเข้มข้นของ NaCl ที่ผ่าน macula densa cell ลดลง จึงทำให้เกิดการลดลงของ resistance ของ afferent arteriole เป็นผลให้ RBF ลดลง

2. myogenic mechanism เป็นกลไกที่เกิดขึ้นเพื่อควบคุมไม่ให้ glomerular filtration rate เปลี่ยนแปลงมากนัก ซึ่งเกิดจากคุณสมบัติของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด คือเมื่อมี

แรงดันมากกระทำต่อผนังหลอดเลือดมากขึ้นจะทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือดเพิ่มขึ้นด้วยทั้งนี้ เพื่อป้องกันไม่ให้หลอดเลือดถูกยืดมากเกินไป (Windhager, 1992)



รูปที่ 1.7 ความสัมพันธ์ระหว่าง arterial blood pressure, renal blood flow (RBF) และ glomerular filtration rate (GFR) autoregulation ทำให้ RBF และ GFR คงที่เมื่อ blood pressure เปลี่ยนแปลงในช่วง 90-180 mmHg (Koeppen *et al.*, 2000)

1.5 กลไกการควบคุมอัตราการกรองของไต (Windhager, 1992)

1.5.1 autoregulation

โดยปกติ GFR ถูกควบคุมโดย autoregulation เป็นการควบคุมในระดับค่อนข้างคงที่ในช่วงความดันเลือดแดงเฉลี่ยเปลี่ยนแปลงระหว่าง 80-180 mmHg โดยเกิดผ่านกลไก tubuloglomerular feedback และ/หรือ myogenic mechanism ดังที่กล่าวในหัวข้อการไหลเวียนเลือดที่ไตและกลไกการควบคุม

1.5.2 ระบบประสาท

การควบคุมโดยระบบประสาท sympathetic ซึ่งมีแขนงมาที่ไตจำนวนมากและแตกแขนงไปเลี้ยง mesangial cell ซึ่งมีกล้ามเนื้อเรียบแทรกอยู่ ดังนั้นเมื่อมีการกระตุ้นระบบประสาท sympathetic ทำให้ mesangial cell หดตัว ทำให้ค่า K_f ลดลง เป็นผลทำให้ GFR ลดลง นอกจากนี้ระบบประสาท sympathetic ยังมีแขนงไปเลี้ยง afferent และ efferent arteriole และ macular densa cell (Barajas, 1964; Bell, 1978) เมื่อมีการกระตุ้นระบบประสาท sympathetic ทำให้ arteriole หดตัวทำให้ความต้านทานของหลอดเลือดภายในไตเพิ่มขึ้น ทำให้ RPF และ GFR ลดลง

1.5.3 ฮอริโมน

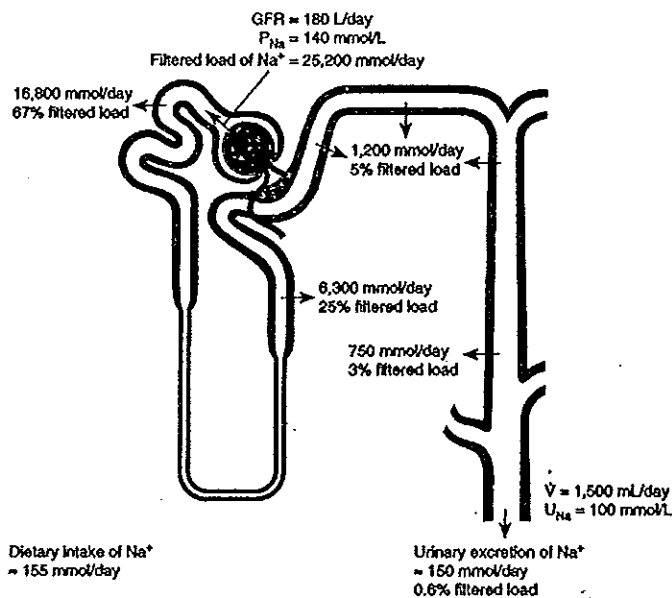
การควบคุมโดยฮอริโมนผ่าน mesangial cell ซึ่งเปลี่ยนแปลงค่า K_f ซึ่งจะมีผลทำให้ค่า GFR เปลี่ยนแปลงด้วย โดยเมื่อ mesangial cell หดตัวทำให้ K_f ลดลง เป็นผลให้ GFR ลดลงด้วย ซึ่งฮอริโมนและสารต่างๆที่ทำให้ mesangial cell หดตัว ได้แก่ endothelin, angiotensin II, thromboxane A_2 , vasopressin, PGF_2 , norepinephrine, leukotrienes C และ D, platelet-activating factor, histamine และ platelet-derived growth factor ส่วนฮอริโมนหรือสารที่ทำให้ mesangial cell คลายตัว จะทำให้ค่า K_f เพิ่มขึ้นเป็นผลให้ GFR เพิ่มขึ้น ได้แก่ ANP, dopamine, PGE_2 และ cAMP (Ganong, 2001)

1.6 บทบาทของไตกับการควบคุมการขับทิ้ง Na^+ และน้ำ

Na^+ เป็น electrolyte ที่สำคัญเพราะมีปริมาณมากที่สุดใน extracellular fluid ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ Na^+ จึงทำให้ปริมาตรและ osmolarity ของ ECF เปลี่ยนแปลงด้วย ทำให้การทำงานของ cell ต่างๆในร่างกายเปลี่ยนแปลงไปจากปกติ ร่างกายจึงมีกลไกควบคุมความเข้มข้นของ Na^+ ให้คงที่ ในร่างกายมนุษย์ไตเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่เป็นกลไกหลักในการปรับความเข้มข้นของ Na^+ โดยการเพิ่มหรือลดการขับทิ้งของ Na^+ ทั้งนี้การทำงานของไตต้องอาศัยการทำงานของฮอริโมนและระบบประสาทร่วมด้วย ซึ่งที่ผ่านมามีการศึกษาวิจัยที่มีผลต่อการขับทิ้ง Na^+ ซึ่งมีกลไกแตกต่างกันไป ปัจจัยที่มีผลเพิ่มการขับทิ้ง Na^+ ได้แก่ การเพิ่ม ECF volume (Windhager, 1992), การเพิ่ม perfusion pressure ของไต (Baer *et al.*, 1970), ACh (Lamiere *et al.*, 1980; Fadem *et al.*, 1982), serotonin (Fadem *et al.*, 1982), bradykinin (Fadem *et al.*, 1982), dopamine (Ball *et al.*, 1978; Krishna *et al.*, 1985), prostaglandin (Johnston *et al.*, 1967; Haas *et al.*, 1984), kinin (Marin-Grez *et al.*, 1972) ส่วนปัจจัยที่มีผลลดการขับทิ้ง Na^+ ได้แก่ การลด ECF volume (Windhager, 1992) angiotensin II (Hall *et al.*, 1979), aldosterone (Windhager, 1992) ซึ่งมีกลไกแตกต่างกันออกไป

1.6.1 การควบคุมการดูดกลับ Na^+ (Widmaier, 2004)

ปัจจัยหลักในการควบคุมอัตราการดูดกลับของ Na^+ ที่ท่อไตคือฮอริโมน aldosterone ซึ่งเป็น steroid hormone ที่สร้างจาก adrenal cortex ซึ่งกระตุ้นการดูดกลับ Na^+ ที่ distal convoluted tubule และ cortical collecting duct aldosterone ออกฤทธิ์โดยเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่ง Na^+ ใน target cell (nephron) คือ K^+ channel, Na^+ channel และ Na^+/K^+ ATPase pump



รูปที่ 1.8 ปริมาณการกรอง การดูดกลับของ Na^+ ที่ตำแหน่งต่างๆ ของท่อไตและการขับทิ้ง Na^+ ใน 1 วัน; GFR คือ glomerular filtration rate, P_{Na} และ U_{Na} คือความเข้มข้นของ Na^+ ใน plasma และในปัสสาวะตามลำดับ (Vallin and Schafer, 1989)

การกิน Na^+ มากทำให้การหลั่ง aldosterone ลดลง ในทางตรงข้ามการกิน Na^+ น้อยทำให้การหลั่ง aldosterone มากขึ้น สิ่งที่ควบคุมการหลั่ง aldosterone คือ angiotensin II (All) ซึ่งออกฤทธิ์โดยตรงต่อ adrenal cortex กระตุ้นการหลั่ง aldosterone (All สร้างมาจาก angiotensinogen ซึ่งเป็น plasma protein ที่สร้างจากตับเปลี่ยนเป็น angiotensin I โดย renin ซึ่งเป็น enzyme ที่หลั่งจาก juxtaglomerular cell จากนั้น angiotensin-converting enzyme (ACE) ซึ่งมีความเข้มข้นสูงที่ lumen ของ capillary epithelial cell จะเปลี่ยน angiotensin I เป็น All โดย All จะมีผลต่อร่างกายหลายส่วนที่สำคัญที่สุดคือกระตุ้นการหลั่ง aldosterone และการหดตัวของ arterioles)

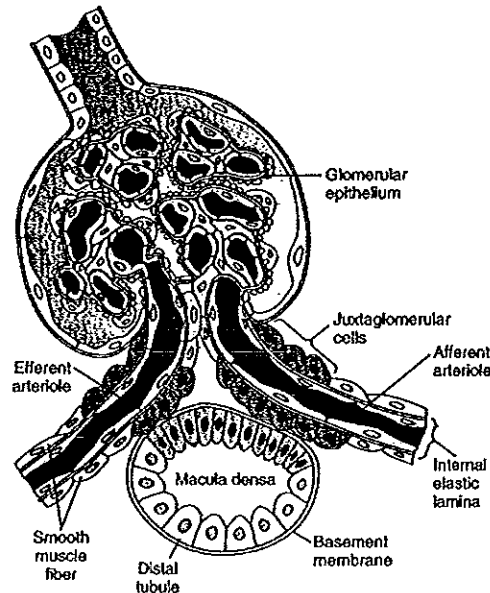
เมื่อขาด Na^+ จะทำให้ plasma All สูง ขณะที่การกิน Na^+ มาก plasma All จะต่ำ สิ่งที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงของ plasma All คือ ความเข้มข้น renin ใน plasma ซึ่งเป็น rate-limiting factor ของการสร้าง All โดยกลไกการเพิ่มการหลั่ง renin เมื่อขาด Na^+ มี 3 กลไกคือ

1) ระบบประสาท sympathetic ที่ไต

เส้นประสาท sympathetic ไปเลี้ยง juxtaglomerular cell โดยตรง ซึ่งการเพิ่มการทำงานของเส้นประสาท sympathetic จะกระตุ้นการหลั่ง renin

2) internal baroreceptor

juxtaglomerular cell ทำหน้าที่เสมือนเป็น baroreceptor จึงเรียกว่า internal baroreceptor โดย juxtaglomerular cell ตอบสนองต่อความดันภายใน afferent arteriole เมื่อความดันเลือดภายในไตลดลง juxtaglomerular cell จะบีบตัวลงทำให้มีการหลั่ง renin มากขึ้น



รูปที่ 1.9 โครงสร้างของ juxtaglomerular apparatus (Guyton and Hall, 2006)

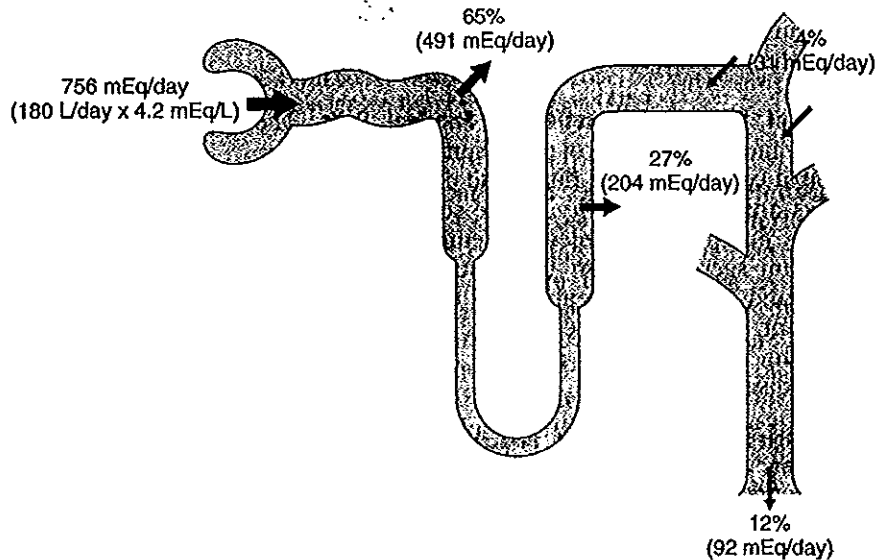
3) macula densa

macula densa อยู่ในตำแหน่งสิ้นสุดของ ascending limb ของ loop of Henle ตอบสนองต่อความเข้มข้น Na^+ ใน tubular fluid ที่ไหลผ่าน macula densa (แสดงในรูปที่ 1.9) การลดลงของความเข้มข้นของ Na^+ จะทำให้มีการหลั่ง renin มากขึ้น การลดลงของความเข้มข้นของ Na^+ เกิดเมื่อความดันเลือดลดลงทำให้ RPF ลดลง เป็นผลให้ GFR ลดลง ทำให้ tubular flow rate ลดลง ส่งผลให้ความเข้มข้น Na^+ ใน tubular fluid ที่ไหลผ่าน macula densa ลดลง

1.7 การควบคุมการคัดหลั่ง K^+ ของไต (Windhager, 1992)

K^+ ถูกกรองอย่างอิสระที่ renal corpuscle แล้วถูกดูดกลับที่ proximal tubule และ loop of Henle โดยมี K^+ ที่ถูกกรองน้อยมากถูกขับออกมาในปัสสาวะ ขณะที่ collecting duct สามารถคัดหลั่ง K^+ ได้ ทำให้การขับทั้ง K^+ เปลี่ยนแปลงได้โดยการเปลี่ยนแปลงการคัดหลั่ง K^+ ที่ cortical collecting duct เมื่อร่างกายอยู่ในสภาวะขาด K^+ จะไม่มีการคัดหลั่งของ K^+ ที่ cortical collecting duct ดังนั้นจะมีการขับทั้ง K^+ เฉพาะที่ถูกกรองออกมาเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

กลไกการคัดหลั่ง K^+ ที่ cortical collecting duct นั้น K^+ จาก basolateral membrane เข้า cell ผ่านทาง Na^+/K^+ ATPase pump แล้วแพร่ไปยัง tubular lumen ผ่านทาง K^+ channel ซึ่งอยู่ที่ luminal membrane

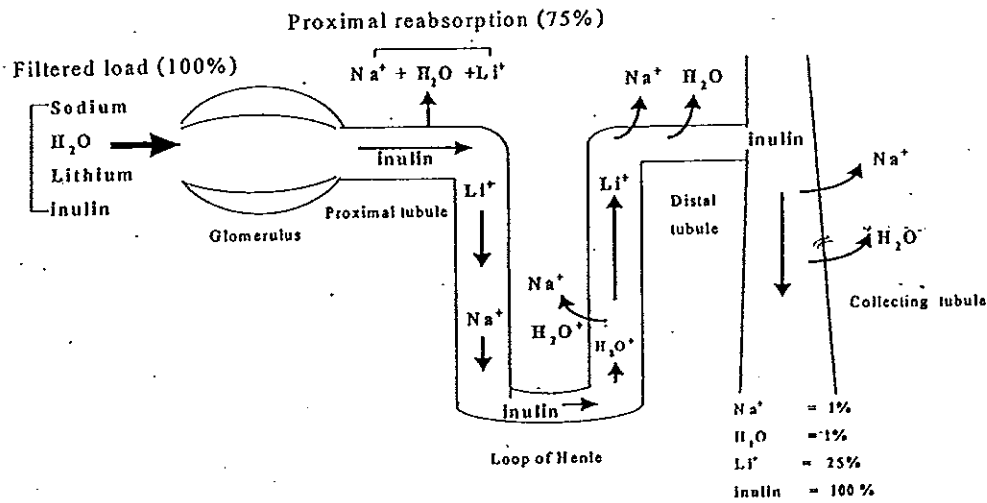


รูปที่ 1.10 ปริมาณการกรอง การดูดกลับและการขับทิ้ง K^+ ใน 1 วัน (Guyton and Hall, 2006)

1.8 วิธีการศึกษา proximal reabsorption ของ Na^+ โดยใช้ lithium clearance (Zhuo, 1990)

แม้จะเป็นที่ยอมรับในปัจจุบันว่า microperfusion เป็นวิธีที่ใช้ศึกษาการดูดกลับ Na^+ และน้ำของ proximal tubule ได้ดีในสัตว์ทดลอง แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดคือศึกษาได้เฉพาะ superficial nephron เท่านั้น ไม่สามารถใช้ศึกษาใน juxtamedullary nephron ซึ่งอยู่ลึกลงไปได้ จึงไม่สามารถใช้วิธีนี้บอกการทำงานของเซลล์ของ proximal tubule ทั้งหมดได้ และวิธีนี้จำเป็นต้องให้ยาสลบและการผ่าตัด ซึ่งอาจมีผลกระทบตามมา เช่น เสียเลือด ภาวะ stress ขณะที่การศึกษาโดยวิธี lithium clearance สามารถบอกการทำงานของ proximal tubule ทั้งหมดได้โดย lithium ใช้เป็นตัวบ่งบอกการดูดกลับ sodium และน้ำที่ proximal tubule ทั้งในคนและสัตว์ โดย lithium มีคุณสมบัติที่เหมาะสมดังนี้

- 1) ไม่จับกับ plasma protein จึงกรองผ่าน glomerulus อย่างอิสระ
- 2) การดูดกลับ lithium เกิดเฉพาะที่ proximal tubule ส่วนการดูดกลับที่ distal tubule ไม่เกิดขึ้น ถ้าระดับ Na^+ ในอาหารมากกว่า 50 mmol/kg
- 3) อัตราส่วนการดูดกลับ lithium ต่อ sodium และต่อน้ำที่ proximal tubule เท่ากับ 1:1:1
- 4) ไม่พบการคัดหลั่ง lithium ที่ renal tubule ส่วนต่างๆ



รูปที่ 1.11 การขนส่ง lithium ที่ tubule ส่วนต่างๆ ร่วมกับการขนส่ง lithium และน้ำ โดย Li⁺ = lithium ion, Na⁺ = sodium ion, H₂O = น้ำ (Zhuo, 1990)

หลักการของวิธี lithium clearance คือการเพิ่มระดับ lithium ใน plasma ด้วยวิธีที่เหมาะสมควบคุมระดับ plasma lithium ให้คงที่ตลอดการทดลอง และให้อาหารสัตว์ทดลองที่มี Na⁺ ขนาด 50-75 mmol/kg จะทำให้การศึกษาโดยวิธี lithium clearance มีประสิทธิภาพมากที่สุด การทดลองต่างๆที่สนับสนุนว่ามีการดูดกลับ lithium ที่ proximal tubule ได้แก่ การศึกษาการดูดกลับของ Na⁺ และน้ำที่ proximal tubule ในหนู rat โดยวิธี micropuncture ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับวิธี lithium clearance

นอกจากนี้มีการทดลองในหนู rat ที่ได้รับ sodium ในอาหารปกติและได้รับยาขับปัสสาวะชนิด loop diuretics คือ furosemide และ thiazides พบว่าไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่า fractional lithium excretion (FE_{Li}) ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการได้รับยาขับปัสสาวะที่ออกฤทธิ์ที่ distal tube เช่น spironolactone ขณะที่การให้ยาขับปัสสาวะที่ออกฤทธิ์ที่ proximal tubule เช่น acetazolamide พบว่าเพิ่มค่า FE_{Li}

1.9 บทบาทของ PDE ต่อการทำงานของหัวใจและไตในหนูแร้ท

PDE คือ enzyme ที่ทำหน้าที่สลาย cAMP และ cGMP โดย PDE มีทั้งหมด 11 ชนิด ปัจจุบันมีเฉพาะ PDE 1-6 ที่ทราบบทบาทที่แน่ชัด เนื่องจากพบในเนื้อเยื่อและ cell หลายชนิด เช่น PDE 4 มีบทบาทในเรื่องการอักเสบ PDE 5 มีบทบาทเกี่ยวกับการเสื่อมสมรรถภาพทางเพศในเพศชาย ขณะที่ PDE 7-11 ยังไม่ทราบบทบาทที่แน่ชัด เมื่อจำแนกตาม gene family (PDE 1-PDE 11) แต่ละ family ประกอบด้วย 1-4 gene ที่แยกจากกัน ซึ่งจะทำให้ gene มากกว่า 20

gene สร้าง PDE protein ที่แตกต่างกันมากกว่า 50 ชนิดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดย PDE มีการกระจายเฉพาะที่ระดับ cell และ subcellular PDE จะควบคุมการทำงานของ cell หลายอย่าง โดยมีบทบาทหลักเกี่ยวกับ intracellular signaling (Lugnier, 2006)

การสังเคราะห์ cGMP เกิดจาก nitric oxide (NO) กระตุ้น soluble guanylyl cyclase (sGC) ให้มีการสร้าง cGMP หรือสังเคราะห์โดย membrane-bound guanylyl cyclase (pGC) เช่น GC-A โดยจับกับ specific peptide เช่น atrial natriuretic peptide (ANP) ที่หลังจากหัวใจ ดังรูป 1.12 (Hofmann *et al.*, 2000)

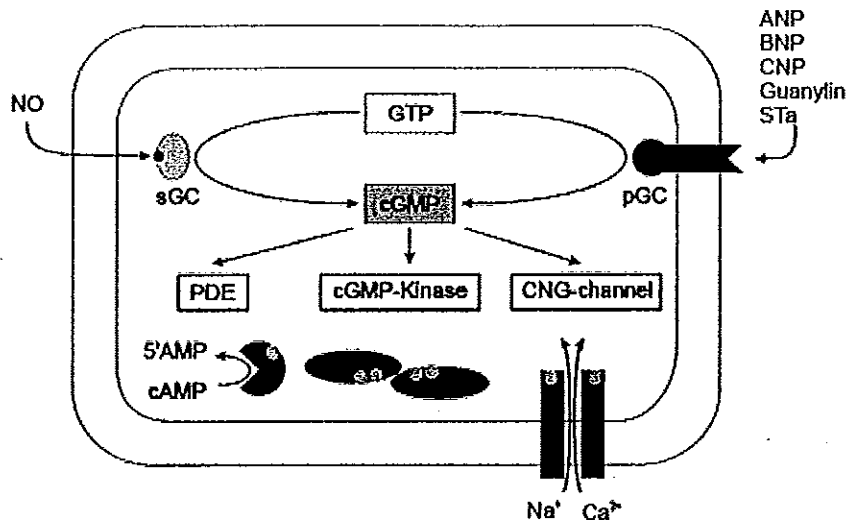
1.9.1 บทบาทของ PDE ที่พบในหัวใจ (Lugnier, 2006)

การทดสอบทางชีวเคมีทำให้ทราบการกระจายของ PDE 2, PDE 3 และ PDE 4 โดยพบว่า PDE 2 อยู่ที่ sarcolemma เป็นหลัก ส่วน PDE 3 พบมากที่ sarcoplasmic reticulum ขณะที่ PDE 4 พบที่ sarcolemma ซึ่งการกระจายของ PDE 2, PDE 3 และ PDE 4 แสดงให้เห็นบทบาทของ PDE ที่เป็นไปได้ในการควบคุม cAMP ในกล้ามเนื้อหัวใจ

ในระบบหัวใจและหลอดเลือด 1) การเพิ่มระดับของ cAMP จะชักนำให้เกิด positive inotropic effect ในหัวใจ และยังชักนำให้เกิด vasorelaxation และ 2) การเพิ่มระดับของ cGMP จะลดการหดตัวของหัวใจ และชักนำให้เกิด vasorelaxation โดย PDE มีบทบาทหลักในการควบคุมหน้าที่เหล่านี้ เนื่องจาก PDE มีบทบาทหลักในการยับยั้ง cyclic nucleotide

บทบาทของ PDE 3 ที่พบในกล้ามเนื้อหัวใจ มีการศึกษาในกล้ามเนื้อหัวใจของหนูตะเภา โดยที่ในกล้ามเนื้อหัวใจนั้น cAMP เป็น secondary messenger ภายใน cell ที่ทำให้เกิด positive inotropic effect ของ β -agonist ซึ่งผลดังกล่าวเกี่ยวข้องกับ PDE 3 ที่พบในหัวใจห้องบนซ้ายที่ตัดแยกจากตัวหนูตะเภา เนื่องจาก PDE 3 inhibitor ลดค่า EC_{50} ของ isoproterenol (ซึ่งเป็น β -agonist) และ forskolin เพิ่ม inotropic effect นอกจากนี้การศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า cGMP ออกฤทธิ์ตรงข้ามกับ cAMP ในแง่การหดตัวของหัวใจ โดย 8-Br-cGMP เพิ่มค่า EC_{50} ของ isoproterenol และลด inotropic effect ของ PDE3 inhibitor

ส่วนบทบาทของ PDE 4 นั้นพบว่า PDE 4 inhibitor (ได้แก่ rolipram, denbufylline, Ro 20-1724) ไม่ทำให้เกิด positive inotropic ในความเข้มข้น calcium นอก cell ปกติหรือสูง แต่ถ้ามี forskolin หรือ PDE 3 inhibitor ความเข้มข้นต่ำจะทำให้เกิด inotropic effect ขึ้น ดังนั้น PDE 4 จึงมีบทบาทควบคุมการหดตัวของหัวใจใน physiological condition ที่ sympathetic outflow ทำให้เกิดการกระตุ้นของ adenylyl cyclase ในกล้ามเนื้อหัวใจ



รูปที่ 1.12 การสังเคราะห์ และ receptor ของ cGMP โดย NO คือ nitric oxide, sGC คือ soluble guanylyl cyclase, GTP คือ guanosine triphosphatase, cGMP คือ cyclic guanosine monophosphatase, pGC คือ membrane-bound guanylyl cyclase, PDE คือ phosphodiesterase, CNG channel คือ cyclic-nucleotide-gated cation channel, 5'AMP คือ 5'adenosine monophosphate, cAMP คือ cyclic adenosine monophosphate, ANP คือ atrial natriuretic peptide, BNP คือ brain-type natriuretic peptide, CNP คือ C-type natriuretic peptide และ STa คือ heat-stable enterotoxin of *E. coli* (Hofmann, et al., 2000)

1.9.2 บทบาทของ PDE ในการทำงานของไต

เนื่องจาก PDE ทำหน้าที่เปลี่ยน cGMP ให้อยู่ในรูป inactive form ซึ่งไม่สามารถทำงานได้ ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของ PDE จึงทำให้ cGMP ออกฤทธิ์ได้นานขึ้น การสังเคราะห์ cGMP เกิดจาก nitric oxide (NO) กระตุ้น soluble guanylyl cyclase (sGC) ให้มีการสร้าง cGMP หรือสังเคราะห์โดย membrane-bound guanylyl cyclase (pGC) เช่น GC-A โดยจับกับ specific peptide เช่น atrial natriuretic peptide (ANP) ที่หลังจากหัวใจ และ ANP ควบคุม natriuresis และความดันเลือดผ่านการกระตุ้นของ GC-A ที่ไต (Hofmann et al., 2000) receptor ของ cGMP มีอย่างน้อย 3 ชนิดที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือ 1) cGMP-regulated PDEs 2) cyclic nucleotide gated cation channels 3) cGMP kinases (cGK) โดย cGMP kinase ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประกอบด้วย 2 isoform คือ cGMP kinase I และ cGMP kinase II โดย cGMP kinase I มีอยู่ในกล้ามเนื้อเรียบทุกชนิด, platelets และ cerebella Purkinje cells และพบใน hippocampus ขณะที่ cGMP kinase II ไม่พบใน cell ของกล้ามเนื้อหัวใจและหลอดเลือด แต่จะพบใน brush border ของ mucosa ของลำไส้, juxtaglomerular cell ของไต, chondrocytes และ specific brain regions (Ruth, 1999)

NO และ cGMP ควบคุมการหลั่ง renin ที่ไต โดย Wagner และคณะ (1998) ทำการวิเคราะห์การหลั่ง renin ในไตที่แยกจากตัว หรือ cell ที่หลั่ง renin พบว่า cGK II (cyclic guanosine kinase II) มีผลต่อการหลั่ง renin โดยในหนูที่มี cGK II-negative ผลการยับยั้งของ NO ต่อการหลั่ง renin จะหายไป (Hofmann *et al.*, 2000)

natriuretic peptides เพิ่ม diuresis และ natriuresis ซึ่งผลของ ANP ต่อไตคือ ทำให้ glomerular hydrostatic pressure และ capillary surface area เพิ่มขึ้นและยังทำให้ afferent arteriole คลายตัว เป็นผลให้อัตราการกรองของไต (GFR) เพิ่มขึ้น โดยมีกลไกคือ ANP จะส่งผลให้ระดับ cGMP เพิ่มขึ้น cGMP จะออกฤทธิ์ผ่าน cGK โดย cGK I จะพบใน cell กล้ามเนื้อเรียบที่ไตคือที่ 1) afferent arteriole 2) efferent arteriole 3) glomerular mesangial cell ซึ่ง mesangial cell ควบคุม GFR โดยสร้าง loop ไปล้อมรอบ capillary ของ mesangium การคลายตัวของ mesangial loop ทำให้เกิดการปรับปริมาตรเลือดภายใน capillary network ส่งผลเพิ่ม hydrostatic pressure, ultrafiltration surface area และผลสุดท้ายทำให้ GFR เพิ่มขึ้น นอกจาก ANP แล้วยังมี endogenous NO ซึ่งประกอบด้วย eNOS และ iNOS isoform ที่พบใน 1) glomerular capillary endothelium 2) mesangial cell ก็สามารถควบคุม RBF และ GFR ได้เช่นกัน โดยส่งเสริมการคลายตัวของ mesangium เช่นเดียวกับ ANP โดย initiating signal เป็นผลทำให้เกิด hyperpolarization และการปิดของ voltage-gated Ca^{2+} channel เป็นหลัก (Ruth, 1999)

ในการเพิ่ม GFR นั้น ANP จะชักนำให้เกิด natriuresis และ diuresis โดยยับยั้ง All-stimulated fluid reabsorption ใน proximal tubule และการดูดกลับน้ำและ Na^+ โดย medullary collecting duct cell นอกจากนี้การเพิ่ม GFR ยังเกิดจาก localization ของ cGK I ส่วนผลของ ANP ต่อ tubular function นั้นไม่สามารถอธิบายได้ (Ruth, 1999)

cGK II พบที่ juxtaglomerular renin-secreting cell และในหลาย ๆ nephron segment ได้แก่ thin limb ของ Henle's loop และ brush border ของ proximal convoluted tubule โดย cGK II อาจควบคุมการหลั่ง renin และการขนส่ง ion ใน tubule ในการควบคุมการหลั่ง renin ของ cGK II นั้น มีการศึกษาใน knock-out mice แสดงให้เห็นว่ามีการสังเคราะห์ renin transcripts และการหลั่ง renin เพิ่มขึ้นใน GMP kinase II-deficient mice แต่ไม่มีผลต่อ cGK I-deficient mice นอกจากนี้การเพิ่ม expression ของ cGK II และ cGK I ใน juxtaglomerular cell โดยใช้ adenoviral vector เพิ่มการยับยั้ง forskolin-stimulated renin secretion การทดลองนี้สนับสนุน negative regulatory link ระหว่าง cGK II กับการสังเคราะห์ renin และสนับสนุนการ

เกี่ยวข้องกับของ cGK II ในการควบคุมความดันเลือด ซึ่งตรงข้ามกับ renin-angiotensin aldosterone system การควบคุมการหลั่ง renin ไม่ได้ถูกควบคุมโดย ANP signal cascade เป็นพิเศษเนื่องจาก eNOS knock-out mice แสดงให้เห็นการเพิ่ม plasma renin activity ซึ่งกลไกการทำงานของ cGK II ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่า cGK II ไปกระตุ้น chloride channel ที่ส่งเสริม chloride efflux ส่วนการเปลี่ยนแปลง subsequence osmotic อาจส่งผลให้ renin granule หี่ยวลง ดังนั้นการขัดขวาง granule swelling อาจยับยั้ง exocytosis ของ renin ซึ่งถือเป็นกลไกของ renin ที่หลั่งโดย Ca^{2+} โดยสรุป localization ของ cGK II ใน juxtaglomerular cell และผลของ cGK II ต่อ renin ให้ความชัดเจนเกี่ยวกับ kinase ใน tubuloglomerular feedback ระหว่าง distal tubule และ afferent arteriole ซึ่ง feedback นี้ได้รับอิทธิพลหลักจากปริมาณ NaCl ซึ่งถูกดูดกลับโดย cell ของ macula densa

การยับยั้งการทำงานของ PDE โดย sildenafil citrate ได้มีการทดลองมาแล้วในเนื้อเยื่อหัวใจของ New Zealand White rabbit เพศผู้ โดยฉีด sildenafil citrate 0.71 mg/kg ทางหลอดเลือดดำก่อนทำ myocardial ischemia ซึ่งเป็นการทำ occlusion ของ left descending coronary artery เป็นเวลา 30 นาที แล้ว reperfusion 3 ชั่วโมง พบว่า infarction size ลดลง ($19.19 \pm 1.3 \%$) เมื่อเปรียบเทียบกับ control ($33.8 \pm 1.7 \%$) ดังนั้น sildenafil citrate จึงป้องกัน ischemic myocardium ที่เกิดจาก reperfusion injury ผ่านกลไก mitochondrial K_{ATP} channel opening ได้ (Salloum, et al., 2006)

1.10 กระชายดำ (*Kaempferia parviflora*)

1.10.1 ลักษณะทั่วไป-ลำต้น ใบ เหง้า ดอก (จรัสและมนตรี, 2545)



รูปที่ 1.13 ลำต้น ใบ เหง้า และดอกของกระชายดำ (รูปลำต้น, ใบ, เหง้า และดอกนำมาจาก http://www.doa.go.th/pl_data/02_LOCAL/oard3/kachaidum/main.html, <http://www.pharm.chula.ac.th/Museum/mus-stem.htm> และ <http://www.gingersrus.com/images/ImageFrame.php?imageID=7789> ตามลำดับ)

กระชายดำเป็นพืชตระกูลเดียวกับเปราะ อยู่ใน family Zingiberaceae มีลำต้นใต้ดินเรียกว่าเหง้า ลักษณะของเหง้าคล้ายเหง้าของพืชตระกูลขิง โดยมีลักษณะเป็นข้อารวม

ประกอบกันเป็นเหง้า เมื่อผ่าดูเนื้อในจะมีสีม่วงถึงม่วงเข้มหรือดำ เนื้อค่อนข้างละเอียด เส้นใยน้อย มีกลิ่นเฉพาะตัวเป็นกลิ่นน้ำมันหอมระเหย

กระชายดำเป็นพืชล้มลุก ขนาดลำต้นสมบูรณ์สูงประมาณ 30 เซนติเมตร ถ้าวัดความสูงถึงปลายสุดของใบจะสูงประมาณ 70-80 เซนติเมตร ส่วนแกนกลางของลำต้นมีลักษณะแข็ง มีกาบใบที่อวบหนา นุ่มหุ้มแกนลำต้นไว้ ลำต้นโดยรวมอวบอ้วนน้ำเหมือนพืชล้มลุกทั่วไป

กระชายดำเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เรียงสลับซ้อนกันเป็นรูปกรวย ซึ่งจะแยกออกจากกันเป็นใบอิสระเมื่อโตขึ้น สีของใบกระชายดำเมื่อเริ่มแตกใบอ่อนจะเป็นสีเขียวอมแดง เมื่อโตและใบใหญ่ขึ้นสีของใบจะค่อยๆ เป็นสีเขียวเข้ม ขอบใบมีสีแดงระเรื่อ หรือสีแดงอมชมพูเข้มคล้ายรอยไหม้กาบใบสีแดงจางๆ ก้านใบจะยาวเป็นร่องแทงขึ้นมาจากหัวที่อยู่ในดิน ใบมีกลิ่นเฉพาะตัว ใบกว้างประมาณ 7-20 เซนติเมตร ยาวประมาณ 30-40 เซนติเมตร ขึ้นอยู่กับความอุดมสมบูรณ์ของธาตุอาหารในดินหรือการดูแลรักษา ดอกของกระชายดำมีสีขาวอมชมพูหรือม่วงอมแดงในบางพื้นที่ ออกดอกเป็นช่อ โดยดอกจะออกมาระหว่างก้านใบ ยาวประมาณ 4-5 เซนติเมตร ช่อละ 1 ดอก แต่ละดอกจะมีใบประดับ 2 ใบสีขาวอมเขียวหรือแดงอมม่วง กลีบรองดอกเชื่อมติดกันเป็นท่อ มีขนอ่อนนุ่ม โคนดอกเชื่อมติดกันเป็นช่อยาว ปลายดอกเมื่อบานออกจะแยกจากกันออกเป็น 2 กลีบ กลีบใหญ่ 1 กลีบ กลีบเล็ก 1 กลีบ มีเกสรตัวผู้ประมาณ 6 อัน ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายกลีบดอก แต่อับเรณูอยู่ใกล้ปลายท่อ เกสรตัวเมียมีขนาดยาวแต่เล็ก ลักษณะคล้ายรูปปากแตร เกสรังไม่มีขน

1.10.2 สรรพคุณทางยา (จรัสและมนตรี, 2545)

เหง้ากระชายดำสด แก้อาการปวดท้อง ปวดมวน จุกเสียด ท้องเดิน แก้อาการบิด ช่วยเจริญอาหาร รักษาโรคกระเพาะ กระตุ้นประสาท ช่วยให้เลือดไหลเวียนดี แก้ใจสั่น เป็นยาบำรุงหัวใจรักษาความดันโลหิตสูง ขยายหลอดเลือด แก้โรคปากเปื่อย ปากเป็นแผล ปากแห้ง บำรุงกำลัง เป็นยาขับปัสสาวะ ขับระดูขาว บำรุงกำหนัด เพิ่มกำลังทางเพศ เพิ่มฮอร์โมนเพศ แก้ปวดเมื่อย ขับลม ขับพิษต่างๆ ในร่างกาย รักษาโรคเบาหวาน แก้ประจำเดือนมาไม่ปกติ แก้กวางเกลือ แก้กวางขมิ้น แก้กวางขมิ้น แก้กวางขมิ้น เป็นยาอายุวัฒนะ

1.10.3 สารที่สกัดได้จากกระชายดำ (Yenjai et al., 2004)

สารที่พบในกระชายดำประกอบด้วย flavonoids และ chalcones โดย flavonoids ประกอบด้วยสารประกอบ 9 ชนิด ดังนี้ 1) 5-hydroxy-3,7-dimethoxyflavone (0.2%), 2) 5-hydroxy-7-methoxyflavone (1.3%), 3) 5-hydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone (0.08%) 4) 5-hydroxy-7,4' dimethoxyflavone (0.3%), 5) 5-hydroxy -3,7, 3',4'-

tetramethoxyflavone (1.5%), 6) 3,5,7-trimethoxyflavone (0.14%), 7) 3,5,7,4'-tetramethoxyflavone (0.6%) 8) 5,7,4'-trimethoxyflavone (1.6%) และ 9) 5,7,3',4'-tetramethoxyflavone (1.01%)

1.10.4 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ที่แยกจากเหง้ากระชายดำ

Yenjai และคณะ (2004) ได้ทดสอบ antiplasmodial, antifungal, antimycobacterial activity และ cytotoxicity ของ flavonoids 9 ชนิดที่แยกจากกระชายดำ พบว่า 5,7,4'-trimethoxyflavone มี antiplasmodial, antifungal และ antimycobacterial activity โดย 3,5,7,4'-tetramethoxyflavone และ 5,7,4'-trimethoxyflavone มี antifungal และ antimycobacterial activity อย่างอ่อนๆ และ 5,7,3',4'-tetramethoxyflavone นั้นมี antiplasmodial activity ด้วยแต่ไม่มีสารประกอบใดมี cytotoxicity เลย

Rujjanawate และคณะ (2005) ได้ศึกษาผลของกระชายดำที่มีต่อแผลในกระเพาะอาหารของหนู Sprague-Dawley โดยให้แบบ oral administration ขนาด 30, 60 และ 120 mg/kg พบว่า ethanolic extract ของกระชายดำสามารถยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหารที่ถูกชักนำโดย indomethacin, HCl/EtOH และ water immersion restraint-stress

Tewtrakul และ Subhadhirasakul (2007) ได้ศึกษา anti-allergic effect ของสารสกัดจากกระชายดำด้วย ethanol พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้าน allergic reaction โดย anti-allergic effect ของสารสกัดสูงกว่า ketotifen fumarate ถึง 2 เท่า และสารสกัดมีค่า $IC_{50} = 10.9 \mu\text{g/ml}$ ซึ่งเมื่อเทียบกับ positive control คือ ketotifen fumarate ที่มี $IC_{50} = 20.2 \mu\text{g/ml}$ ดังนั้น สารสกัดจากกระชายดำอาจมีสารประกอบที่อาจเป็น flavonoid derivatives บางชนิดที่มีค่า IC_{50} ต่ำกว่า positive control ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเป็น anti-allergic agent ได้ต่อไป

Wattanapitayakul และคณะ (2007) ซึ่งทำการทดลองใน umbilical vein ของคน พบว่าสารสกัดจากกระชายดำด้วย ethanol กระตุ้นการผลิต NO โดยสัมพันธ์กับการเพิ่มของ eNOS mRNA และ eNOS protein ซึ่งสารสกัดจากกระชายดำเพิ่ม eNOS อย่างจำเพาะเจาะจง

Sookkongwaree (1999) ศึกษาผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย methanol ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase (HIV-1 rt) และ proteases จาก human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), hepatitis C virus (HCV) และ human cytomegalovirus (HCMV) จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดเมทานอลส่วนใหญ่สามารถยับยั้ง protease ทั้งสามชนิดได้ดี จึงแยกองค์ประกอบทางเคมีจากกระชายดำและชำ โดย

ใช้ฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นตัวชี้้นำการแยก โดยสามารถแยกสารประกอบฟลาโวนอยด์ได้ 8 ชนิด (สารประกอบ 1-8) จากกระชายดำ จากนั้นพิสูจน์สูตรโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี และได้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง protease ของไวรัสทั้งสามชนิด พบว่า 5-hydroxy-7-methoxyflavone (2) และ 5,7-dimethoxyflavone (1) ยับยั้ง HIV-1 protease โดยมี IC_{50} เท่ากับ 19 micromolar นอกจากนี้ 5-hydroxy-3,7-dimethoxyflavone (1) ยังสามารถยับยั้ง HCV protease และ HCMV protease โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 190 และ 250 micromolar ตามลำดับ

Jitjaingam และคณะ (2005) ศึกษาผลของชาขงกระชายดำขนาด 60 และ 120 มก./กก. น้ำหนักตัว ต่ออวัยวะสืบพันธุ์ของหนูขาวเพศผู้ รวมทั้งศึกษาผลต่อค่าโลหิตวิทยาและการทำงานของไตโดยวิธีทางชีวเคมี พบว่ากระชายดำทั้ง 2 ขนาด ไม่มีผลต่อน้ำหนักอวัยวะและต่อมลูกหมากของหนู นอกจากนี้ยังพบว่าความหนาแน่นของอสุจิใน cauda epididymis และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดสร้างอสุจิ ของหนูที่ได้รับชาขงกระชายดำทั้ง 2 ขนาด มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) สำหรับผลทางโลหิตวิทยาพบว่า ทั้งจำนวนเม็ดเลือดขาวโดยรวมและเม็ดเลือดขาวแยกชนิด (eosinophils, neutrophils, basophils, lymphocytes, monocytes) รวมทั้งปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit) ในหนูทุกกลุ่ม ล้วนมีค่าอยู่ในช่วงระดับปกติสำหรับหนูขาว นอกจากนี้ยังพบว่าชาขงกระชายดำทั้ง 2 ขนาดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่มีผลกระทบต่อค่า blood urea nitrogen และ creatinine ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกสภาวะการทำงานของไต ผลในเชิงบวกของชาขงกระชายดำต่อ seminal vesicle และการสร้างอสุจิ รวมถึงการยืนยันความปลอดภัยจากค่าโลหิตวิทยา และการทำงานของไต

Phurimsak และ Leardkamolkarn (2005) ศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัสของสมุนไพรรกระชายดำที่มีต่อไวรัสเดงกีทัยป์ 2 โดยในขั้นแรกได้หาค่าความเป็นพิษที่มีต่อเซลล์ และความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายไปครึ่งหนึ่งก่อน ด้วยเทคนิคเอ็มทีที จากนั้นจึงตรวจหาฤทธิ์ในการต้านไวรัสที่กลไกการออกฤทธิ์รูปแบบต่างๆ ด้วยเทคนิคการลดลงของไวรัส ซึ่งดัดแปลงจากวิธีในการหาปริมาณไวรัส ผลการทดลองพบว่ากระชายดำมีฤทธิ์ในการต้านไวรัสโดยตรง โดยทำให้เดงกีไวรัสอ่อนกำลังก่อนเกิดการติดเชื้อ

Tiamyuyen และ Leardkamolkarn (2006) ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโต การรุกรานและการกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ apoptosis โดยสารสกัดหยาบกระชายดำต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (HuCCA-1) โดยในขั้นแรกได้ทำการทดสอบหาความเป็นพิษและค่าความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ มะเร็งที่ 50% (IC_{50}) ด้วยวิธี MTT assay จากนั้นจึงตรวจหาฤทธิ์การยับยั้งการรุกรานของเซลล์ด้วยวิธี in vitro invasion assay และฤทธิ์

การกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ apoptosis ด้วยวิธีการยับยั้งเอนไซม์ caspase ผลการทดลองพบว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดหนาดด้วยตัวทำละลายแอลกอฮอล์ และ เฮกเซน มีค่า 29.97 และ 36.81 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถลดจำนวนการรุกรานของเซลล์มะเร็ง และกระตุ้นการตายในระยะแรก of เซลล์ได้

Tanasiriwattana, และคณะ (1997) ได้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของ น้ำมันหอมระเหยจากเหง้ากระชายดำพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำมีองค์ประกอบหลักทางเคมีคือ borneol ร้อยละ 46.41 และ sylvestrene ร้อยละ 25.30 นอกจากนี้เมื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยทดสอบกับเชื้อ 7 ชนิดคือ *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. faecalis*, *C. albicans* และ *M. gypseum* พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* ได้ดี

1.11 sildenafil citrate

ผลของ sildenafil citrate ต่อหัวใจ

Cremers และคณะ (2003) ได้ศึกษาผลของ sildenafil citrate ที่มีต่อ cardiovascular tissue ที่แยกจากตัวคนโดยตรง โดยกระตุ้น atrium ขวาและ ventricular muscle strips ข้างซ้ายด้วยไฟฟ้าที่ความถี่ 1 Hz และวัด vascular tension ใน ring ของ internal mammaria artery และ saphenous vein ผลการทดลองพบว่า sildenafil citrate ขนาด 0.0001-10 μM ไม่ทำให้เกิด inotropic response ใน atrium และ ventricle และยังไม่ทำให้เกิด arrhythmia จาก isoprenaline อีกด้วย โดย isoprenaline ขนาด 0.1 μM และ S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) ซึ่งเป็น nitric oxide donor ขนาด 100 μM ร่วมกับ sildenafil citrate ขนาด 10 μM ไม่มีผลต่อ myocardial contractility แต่ใน precontracted artery และ vein เมื่อให้ sildenafil citrate 0.1-10 μM ทำให้เกิด vasorelaxation เช่นเดียวกับการให้ 0.03 μM SNAP ที่ทำให้ artery และ vein คลายตัว จากการศึกษานี้สรุปว่า sildenafil citrate ทำให้เกิด vasorelaxation แต่ไม่มีผลโดยตรงต่อการหดตัวของหัวใจคนและ proarrhythmic effect ในหัวใจคน

Quan และคณะ (2006) ศึกษาผลของ sildenafil citrate ที่มีต่อ atrial contractile และ secretory function ใน atrium ของกระต่าย New Zealand White ซึ่ง perfuse ใน HEPES buffer solution โดยวิธี peristaltic pump แล้ววัดการเปลี่ยนแปลง atrial volume ขณะหดตัว, pulse pressure, transmural extracellular fluid, cGMP efflux และ ANP secretion พบว่า sildenafil citrate เพิ่ม basal level ของ cGMP efflux แต่ไม่เพิ่มอย่างมีนัยสำคัญ และ

พบว่า sildenafil citrate 10 μ M มีผลเพิ่ม atrial stroke volume และทำให้การหลั่ง ANP ลดลง การให้ sildenafil citrate ร่วมกับ SIN-1 (NO donor) ทำให้ atrial pulse pressure และการหลั่ง ANP ลดลง

ผลของ sildenafil citrate ต่อ MABP

มีการศึกษาผลของ sildenafil citrate ต่อความดันเลือดในสุนัข mongrel โดยฉีด sildenafil citrate 0.5 mg/kg ทำให้ความดันเลือดลดลง และอัตราการเต้นของหัวใจเพิ่มขึ้นแบบ transient เป็นเวลา 20 วินาที (11 ± 1.6 mmHg) แล้วตามด้วยการลดความดันเลือดแบบ prolong เป็นเวลา 10-15 นาที (11 ± 2.2 mmHg) (Zhao, *et al.*, 2006)

ได้มีการศึกษาในคนเกี่ยวกับฤทธิ์ที่ทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือดมีผลต่อ hemodynamic effect โดยทดสอบในชายสุขภาพดี 8 คน (Jackson, *et al.*, 1999) และในชายวัยกลางคน 16 คน (Zusman, *et al.*, 2000) โดยให้กิน sildenafil citrate ขนาด 100 mg พบว่า 3 ชั่วโมงหลังจากนั้น ความดันเลือดทั้ง systolic และ diastolic ลดลงประมาณ 10 และ 7 mmHg ตามลำดับ และความดันเลือดดังกล่าวกลับสู่ระดับ baseline ภายใน 6-8 ชั่วโมง

จากการศึกษากลไกการลดความดันของ sildenafil citrate พบว่าทำให้ PDE5 ซึ่งพบมากในกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดจะถูกยับยั้ง ส่งผลให้ระดับ cGMP เพิ่มขึ้นภายใน cell และ vascular smooth muscle คลายตัวโดย cGMP ทำให้ intracellular Ca^{2+} ลดลงและทำให้ contractile apparatus นั้นเกิด desensitization ต่อ intracellular Ca^{2+} การคลายตัวของ vascular smooth muscle นี้ ส่งผลให้ความดันเลือดทั้ง systolic และ diastolic ลดลง (Jackson, *et al.*, 2006)

ผลของ sildenafil citrate ต่อ renal functions

Thiesson และคณะ (2004) ทดสอบสมมติฐานว่าการยับยั้ง renal PDE5 ในผู้ป่วยตับแข็ง (liver cirrhosis) ร่วมกับ ascites ลด Na^+ excretion โดยศึกษาแบบ randomized double-blind, placebo-controlled crossover study ให้ผู้ป่วยกินอาหารที่มี Na^+ 100 mmol/day ให้แก่ผู้ป่วยเป็นเวลา 5 วันก่อนทดลอง หลังจาก basal period 60 นาที แล้วให้ผู้ป่วย 8 คนกิน sildenafil citrate (50 mg) หรือ placebo แล้ววัด GFR และ RBF ผลการทดลองพบว่า nephrectomy specimen ของคนมี PDE5 mRNA อยู่ใน cortex และ inner medulla และพบว่า histochemical stain มี PDE5 immunoactivity ใน collecting duct และ vascular smooth muscle ในผู้ป่วย cirrhosis พบว่าความเข้มข้นของ ANP, renin, Ang II และ aldosterone เพิ่มขึ้น โดยไม่แตกต่างกันใน 2 วันที่ทำการศึกษา ส่วน basal Na^+ excretion เหมือนกันทั้ง 2 วันที่ทำการศึกษา และพบว่า sildenafil citrate ลด heart rate, plasma renin activity และความ

เข้มข้นของ AII และ aldosterone ใน plasma อย่างมีนัยสำคัญหลัง 60 นาที และทำให้ความเข้มข้นของ cGMP ใน plasma เพิ่มขึ้นหลัง 120 และ 180 นาที ขณะที่ urinary Na⁺ excretion และความดันเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ 120 และ 180 นาที โดยหลังจากให้ sildenafil citrate แล้วไม่ทำให้ความเข้มข้นของ ANP ใน plasma, GFR และ RBF เปลี่ยนแปลง ดังนั้นผู้ป่วย cirrhosis ร่วมกับ ascites นั้นการยับยั้ง PDE5 ไม่ส่งเสริม natriuresis แต่ทำให้ระดับของ renin-angiotensin-aldosterone system ใน plasma เพิ่มขึ้น

สมมติฐาน

1. สารสกัดจากกระชายดำด้วย hexane, dichloromethane และ methanol อาจเพิ่มความแรงแต่ลดอัตราการหดตัวของหัวใจห้องบนของหนูแร้ที่แยกจากตัว
2. สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ทำให้ mean arterial pressure ลดลงในหนูแร้ที่สลบ
3. สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ทำให้ urine flow rate และ sodium excretion rate เพิ่มขึ้นในหนูแร้ที่สลบ
4. กลไกหนึ่งที่ทำให้เกิดการขับปัสสาวะและ sodium ของสารสกัดจากกระชายดำคือการลดการดูดกลับ Na^+ และน้ำที่ proximal tubule

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษามลของสารสกัดจากกระชายดำ 3 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากกระชายดำด้วย hexane (hexane extract), สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane (dichloromethane extract) และ สารสกัดจากกระชายดำด้วย methanol (methanol extract) ต่อการทำงานของหัวใจห้องบนของหนูแร้ที่แยกจากตัวโดยวัดความแรงและอัตราการหดตัว
2. ศึกษาผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ต่อความดันเลือดและต่อการทำงานของไตด้วย clearance technic โดยทำการศึกษาในหนูแร้ที่สลบ
3. ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ที่มีต่อการดูดกลับ sodium ที่ proximal tubule โดยใช้ lithium clearance technic
4. เปรียบเทียบผลของสารสกัดจากกระชายดำต่อการหดตัวของหัวใจห้องบนที่แยกจากตัว ความดันเลือด และการทำงานของไตกับ sildenafil citrate เพื่อตรวจสอบสรรพคุณรักษาความดันโลหิตสูง และขับปัสสาวะ (โดยเปรียบเทียบกับ sildenafil citrate เนื่องจากกระชายดำมีสรรพคุณเพิ่มสมรรถภาพทางเพศ)

2.วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

2.1 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูแรทเพศผู้สายพันธุ์ Wistar น้ำหนักตัว 230 ± 2 g จำนวน 72 ตัว จากหน่วยเรียนเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ หนูกุ่มนี้ถูกเลี้ยงในห้องปรับอากาศที่ควบคุมอุณหภูมิ 25°C ควบคุมแสงให้มีสัดส่วนระหว่างสว่าง : มืดเป็น 12 : 12 ชั่วโมง ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป (S.W.T.,ประเทศไทย) และน้ำกรองโดยไม่จำกัดปริมาณ

2.2 ยาและสารเคมี

1. Anthrone ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}$), Fluka, Buchs, สวิตเซอร์แลนด์
2. Ammonium sulfamate ($\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$), Fluka, Buchs, สวิตเซอร์แลนด์
3. Calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Merck, Darmstadt, เยอรมัน
4. D(+)-Glucose anhydrous ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), Fluka, Buchs, สวิตเซอร์แลนด์
5. D(-)-Fructose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), Fluka, Buchs, สวิตเซอร์แลนด์
6. Heparin ($\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{NO}_{20}\text{S}_3$), LEO, Ballerup, เดนมาร์ก
7. Hydrochloric acid (HCl), Merck, Darmstadt, เยอรมัน
8. Inactin [5-ethyl-5(L-methylpropyl)-2 thiobarbituric acid], RBI, Natick, MA, สหรัฐอเมริกา
9. Inulin ($\text{C}_{6n}\text{H}_{10n+2}\text{O}_{5n+1}$), Sigma, St. Louis, MO, สหรัฐอเมริกา
10. Lithium chloride (LiCl), J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, สหรัฐอเมริกา
11. Magnesium chloride hexahydrate ($\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Merck, Darmstadt, เยอรมัน
12. Magnesium sulfate heptahydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Merck, Darmstadt, เยอรมัน
13. N-(1-Naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2$), Merck, Darmstadt, เยอรมัน
14. Para-aminohippuric acid, sodium salt ($\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$), Sigma, St. Louis, MO, สหรัฐอเมริกา

15. Pentobarbitone sodium ($C_{11}H_{17}N_2O_3Na$), CEVA SANTE ANIMALE, Libourne, Cedex, ฝรั่งเศส
16. Potassium chloride (KCl), Merck, Darmstadt, เยอรมัน
17. Sildenafil citrate ($C_{22}H_{30}N_6O_4S$), Pfizer, New York, NY, สหรัฐอเมริกา
18. Sodium chloride (NaCl), Merck, Darmstadt, เยอรมัน
19. Sodium dihydrogen phosphate dihydrate ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$), Merck, Darmstadt, เยอรมัน
20. Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$), Merck, Darmstadt, เยอรมัน
21. Sodium nitrite ($NaNO_2$), CARLO ERBA REAGENTI, Rodano, MI, อิตาลี
22. Sulfuric acid (H_2SO_4), Merck, Darmstadt, เยอรมัน
23. Trichloroacetic acid (CCl_3COOH), CARLO ERBA REAGENTI, Rodano, MI, อิตาลี

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมือผ่าตัดสัตว์ทดลอง
2. เครื่องควบคุมอุณหภูมิน้ำ (thermostat-heater-circulator) model DIN12879 KLASSE I W, HAAKE, Karlsruhe, เยอรมัน
3. เครื่องชั่งอย่างละเอียด, model CC023D10ADBAAA, Avery Barckel, อังกฤษ
4. ไปเปตต์อัตโนมัติ (automatic pipettes), Eppendorf, Wesseling, เยอรมัน
5. เครื่องบันทึกกราฟ (polygraph), model 7D, Grass, สหรัฐอเมริกา พร้อมอุปกรณ์ประกอบด้วย tachograph preamplifier, model 7P44A, Grass, สหรัฐอเมริกา และ Force transducer, model FT03, Grass, Quincy, MA, สหรัฐอเมริกา
6. เครื่องแปลงสัญญาณความดัน (Pressure transducer), model 21060 P23AC, Statham, Hato Rey, เปอร์โตริโก
7. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter), model CyberScan pH 2000, Eutech, สิงคโปร์
8. ชุด organ bath ขนาด 20 ml
9. ถังก๊าซคาร์บอนเจน ($95\% O_2 + 5\% CO_2$) พร้อมตัวปรับก๊าซ (gas regulator)

10. เครื่องเหวี่ยงตะกอนความเร็วสูง (centrifuge), model 4232, A.L.C., Milano, อิตาลี
11. เครื่องปั่นแยกเม็ดเลือดแดง (microhematocrit centrifuge), model MB, IEC, Needham Heights, MA, สหรัฐอเมริกา
12. ท่อ polyethylene, Clay Adams, Parsippany, NJ, สหรัฐอเมริกา
13. เครื่องฉีดสารละลายต่อเนื่อง (infusion pump), model SP 101 iz, WPL, Sarasota, FL, สหรัฐอเมริกา
14. เครื่องวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเกลือแร่ (electrolyte analyzer), model AVL ISE 988-31988, Graz, ออสเตรีย
15. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณธาตุ (inductively coupled plasma-atomic emission spectrometer), model Plasma 1000, Fremont, CA, สหรัฐอเมริกา
16. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer), Spectro SC, Labomed, inc., Culver City, CA, สหรัฐอเมริกา
17. เครื่องควบคุมอุณหภูมิตัวทดลองทางทวารหนัก (temperature controller and electronic rectal temperature probe), Harvard Apparatus, Holliston, MA สหรัฐอเมริกา

วิธีการวิจัย

ตอนที่ 1 *In vitro* experiment

การศึกษาผลของสารสกัดจากกระชายดำ 3 ชนิด คือสารสกัดจากกระชายดำด้วย hexane (*K. parviflora* hexane extract) สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane (*K. parviflora* dichloromethane extract) และ สารสกัดจากกระชายดำด้วย methanol (*K. parviflora* methanol extract) และ sildenafil citrate ต่อการหดตัวของหัวใจห้องบนที่แยกจากตัว โดยวัดความแรงและอัตราการหดตัว

1.1 วิธีการเตรียมสารสกัดจากกระชายดำ

1. นำเหง้ากระชายดำที่ล้างสะอาดแล้ว ปริมาณ 1.63 กิโลกรัม มาหั่นเป็นแว่นบางๆแล้วนำไปตากที่อุณหภูมิห้องและนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 °C ให้แห้ง
2. นำกระชายดำที่หั่นเป็นแว่นที่ตากหรืออบจนแห้งแล้วไปสกัดด้วย hexane ปริมาตร 8 ลิตร โดยสกัด 2 ครั้ง ครั้งละ 7 วัน แล้วสกัดต่อด้วย dichloromethane ปริมาตร 8 ลิตร

2 ครั้ง ครั้งละ 7 วัน สุดท้ายสกัดด้วย methanol ปริมาตร 8 ลิตร โดยสกัด 2 ครั้ง ครั้งละ 7 วัน โดยเมื่อครบ 7 วัน แล้วแยกส่วนใส่ออกมาจากส่วนกากของกระชายดำ ดังแสดงในรูปที่ 2.1

3. นำสารสกัดที่ได้ทั้ง 3 ชนิด ไปกลั่นแยก hexane, dichloromethane และ methanol ที่เป็นตัวทำละลายออกให้หมด ด้วยเครื่องกลั่นแบบลดความดัน (evaporator) แล้วจึงนำสารที่สกัดได้แต่ละชนิดไปใช้ในการทดลอง โดยได้เป็น hexane extract 0.22% สีเหลือง มีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว dichloromethane extract 7.20% สีเหลืองอมน้ำตาล มีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว และ methanol extract 3.46% สีม่วงเข้ม มีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว สารสกัดที่ได้ก่อนจะนำไปใช้ทำการทดลอง จะละลายใน vehicle solvent คือ 50 % ethanol ใช้ละลาย dichloromethane extract และ methanol extract และ 100% ethanol ใช้ละลาย hexane extract

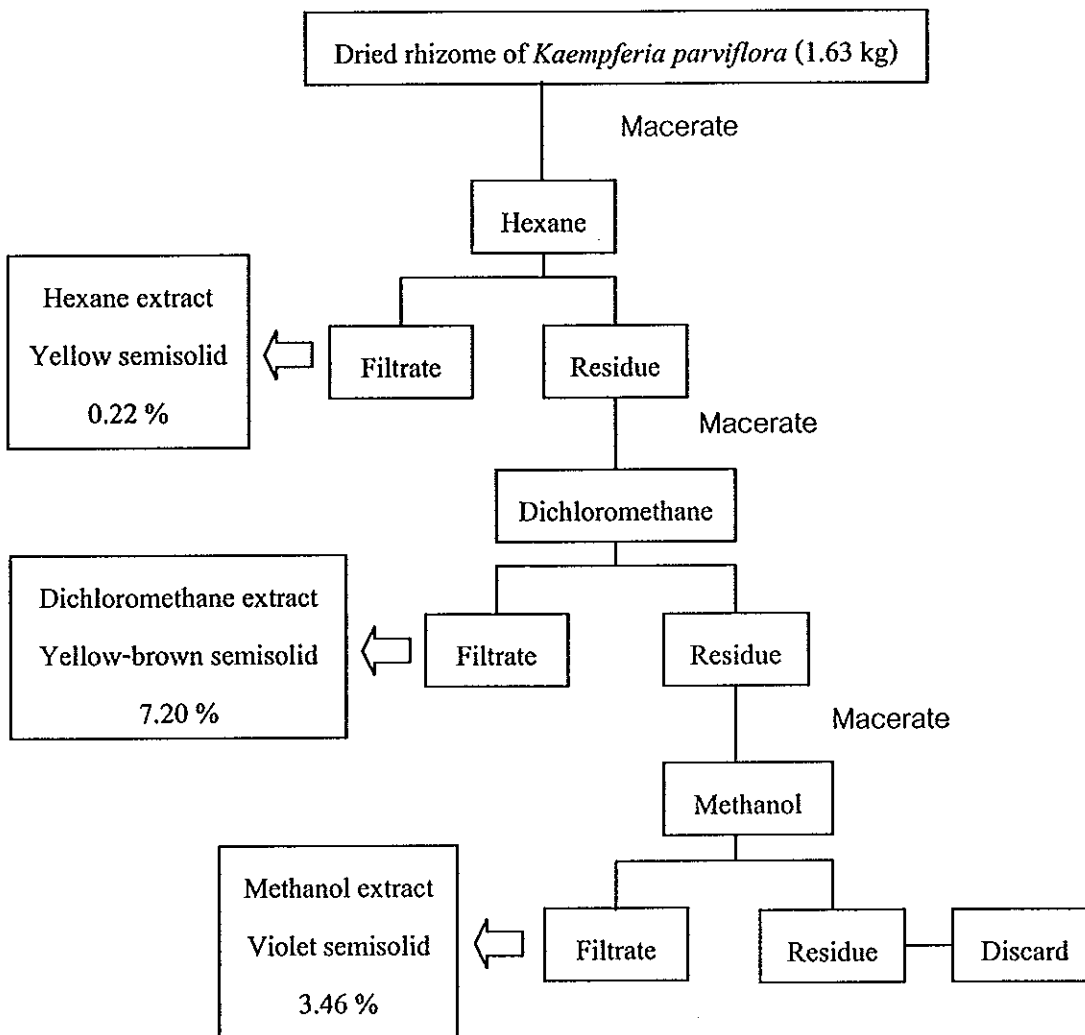
1.2 การเตรียม sildenafil citrate

ชั่งน้ำหนัก sildenafil citrate (ขนาด 100 mg) เพื่อที่จะนำมาใช้คำนวณหา น้ำหนักยาที่แท้จริงต่อไป แล้วแกะเปลือกที่หุ้มยาออก แล้วบดให้ละเอียดเพื่อที่จะใช้ในการทดลองต่อไป การคำนวณน้ำหนักยาทำโดยเทียบหาน้ำหนักยาที่แท้จริง เช่นชั่งได้ 641 mg จะมี sildenafil citrate อยู่ 100 g ถ้าต้องการเตรียม sildenafil citrate 5 mg/ml ต้องชั่งมา 32.05 mg แล้วละลายใน Tyrode's solution 1 ml ซึ่งใช้เป็น vehicle

ส่วนการเตรียม sildenafil citrate เพื่อศึกษาผลต่อความดันเลือดและการทำงานของไตนั้น จะชั่ง sildenafil citrate 13 mg (ซึ่งน้ำหนักที่แท้จริงของ sildenafil citrate คือ 2.2 mg โดยชั่ง sildenafil citrate ที่ลอก capsule ออก 576 g จะมี sildenafil citrate อยู่ 100 g ถ้าต้องการ sildenafil citrate 2.2 mg จะต้องชั่งจาก sildenafil citrate ที่ลอก capsule ออก 13 mg) ใส่ใน microtube แล้วผสมกับ 0.9 % NaCl 100 μ l จะได้ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองคือ 10 mg/kg bw โดยคำนวณจาก หนูหนัก 1 kg จะได้รับ sildenafil citrate 10 mg ถ้าหนูหนัก 220g จะได้รับ sildenafil citrate 2.2 mg จากนั้นนำไปผสมให้เข้ากันด้วย mixer นำไป centrifuge 10 นาที แล้วพบว่าสารละลายแยกเป็น 2 ส่วนคือตะกอนกับส่วนละลายใส แล้วดูเฉพาะส่วนที่ใสมาใช้ในการทดลอง

1.3 การเตรียมสารละลาย Tyrode (Tyrode's solution)

สารละลาย Tyrode เตรียมเพื่อใช้ในการทดลองเรื่องผลของสารสกัดจากกระชายดำต่อการหดตัวของหัวใจห้องบน ประกอบด้วยสารต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นดังนี้ NaCl 136.89, KCl 2.68, $MgCl_2$ 0.49, $CaCl_2$ 1.36, NaH_2PO_4 0.32, $NaHCO_3$ 11.90 และ glucose 5.55 mM โดยละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.4 ด้วย 1 M HCl



รูปที่ 2.1 แผนภูมิการสกัดสารจากเหง้ากระชายดำ

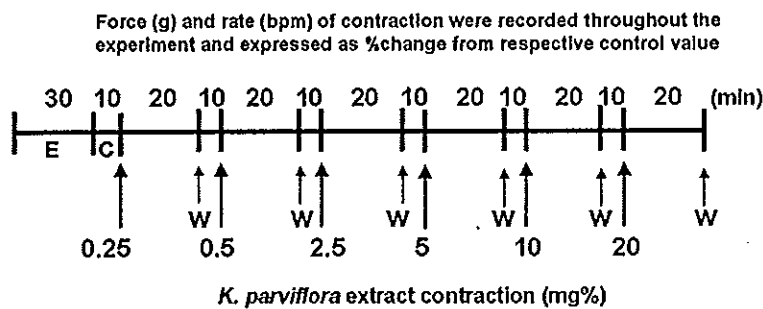
1.4 การเตรียมกล้ามเนื้อหัวใจห้องบน

ชั่งน้ำหนักหนูแล้วทำให้หนูเสียชีวิตโดยการตั้งคอ ผ่าตัดเปิดหน้าอก ตัดแยกเอาหัวใจห้องบนออกมาแช่ใน Tyrode's solution 37°C ที่มีแก๊ส carbogen ใช้ตะขอที่มีด้ายผูกเกี่ยวหัวใจห้องบนทั้งสอง เอาปลายด้ายที่ผูกกับตะขอที่เกี่ยวกับหัวใจห้องหนึ่งไปผูกเข้ากับ force transducer ที่ต่อกับเครื่องบันทึก polygraph เพื่อบันทึกความแรงและอัตราการหดตัว และเอาปลายอีกด้านหนึ่งของด้ายที่ผูกกับตะขอที่เกี่ยวกับหัวใจอีกห้องไปผูกกับปลายแท่งแก้วรูปตัว L ที่วางไว้ใน organ bath ซึ่งภายในบรรจุ Tyrode's solution 37°C ปริมาตร 20 ml ที่ให้แก๊ส carbogen ตลอดเวลา โดยให้ initial tension 1 g เท่ากันตลอดการทดลอง

1.5 แผนการทดลอง

หลังจาก calibrate เครื่อง polygraph และเตรียมกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนเสร็จแล้ว รอให้เส้นบันทึกความแรงในการหดตัวและอัตราการหดตัวของหัวใจคงที่เป็นเวลา 30 นาที ก่อนเริ่มการทดลอง จากนั้นเริ่มบันทึกค่า control เป็นเวลา 10 นาที แล้วหยุดสารสกัดจากกระชายดำ หรือ สารที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารสกัด (vehicle) โดยหยุด hexane, dichloromethane, methanol extract หรือ sildenafil citrate ปริมาตร 10, 20, 100, 200, 400 และ 800 μl ลงในสารละลาย Tyrode ใน organ bath ที่มีหัวใจห้องบนของหนูแร้ทแขวนอยู่ เมื่อหยุดลงใน organ bath แล้วจะมีความเข้มข้นเท่ากับ 0.25, 0.50, 2.50, 5.00, 10.0 และ 20.0 mg% ตามลำดับ บันทึกผลการทดลองเป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลาย Tyrode และรอให้เส้นบันทึกคงที่ แล้วบันทึกค่า control ครั้งต่อไป โดยหยุดความเข้มข้นที่สูงขึ้นเรื่อย ๆ อ่านผลการทดลองในช่วง control 3 ครั้งคือ นาทีที่ 3, 6 และ 9 และอ่านผลการทดลองในช่วงทดลอง 7 ครั้งคือ นาทีที่ 1, 2, 3, 5, 10, 15 และ 20 แล้วนำค่าที่อ่านได้ของ control ทั้ง 3 ค่ามาหาค่าเฉลี่ย ซึ่งจะนำไปให้เปรียบเทียบกับค่าผลการทดลองและแสดงผลการเปลี่ยนแปลงเป็นร้อยละของค่า control

Experimental protocol for atrial contraction study



E = equilibration period with 1 g resting tension
C = control period
W = wash

รูปที่ 2.2 แผนการทดลองในการศึกษาการหดตัวของหัวใจห้องบนที่แยกจากตัว

1.6 การออกแบบการทดลอง

การทดลองแบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

1. กลุ่มควบคุมที่ได้รับ vehicle คือ 50% ethanol (vehicle ของ dichloromethane และ methanol extract) และ 100% ethanol (vehicle ของ hexane extract) และ Tyrode's

solution (vehicle ของ sildenafil citrate) โดยหยด vehicle 10, 20, 100, 200, 400 และ 800 μ l ลงใน organ bath 20 ml

2. กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย hexane ขนาด 0.25, 0.50, 2.50, 5.00, 10.0 และ 20.0 mg%
3. กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 0.25, 0.50, 2.50, 5.00, 10.0 และ 20.0 mg%
4. กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย methanol ขนาด 0.25, 0.50, 2.50, 5.00, 10.0 และ 20.0 mg%
5. กลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate ขนาด 0.25, 0.50, 2.50, 5.00, 10.0 และ 20.0 mg%

1.7 การคำนวณ

คำนวณหาร้อยละการเปลี่ยนแปลงความแรงในการหดตัวของหัวใจหลังหยดสาร เมื่อเทียบกับความแรงในการหดตัวของหัวใจก่อนหยดสาร โดยคำนวณจากการอ่านค่าจากเส้นบันทึกความแรงในการหดตัวของหัวใจ ที่บันทึกด้วยเครื่อง polygraph

1.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองนำเสนอ เป็นค่า mean \pm standard error of means (S.E.M.) และนำมาวิเคราะห์หาค่าความแตกต่างทางสถิติโดยข้อมูลดิบ (force and rate of contraction) ใช้ one way analysis of variance (ANOVA) โดยยอมรับความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อ P-value < 0.05 ส่วนข้อมูลที่เป็น % change of force and rate of contraction from control นั้นใช้ t-test โดยยอมรับความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ P-value < 0.05

ตอนที่ 2 *In vivo* experiment

การศึกษาผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ต่อความดันเลือดและการทำงานของไตในหนูแร้ท โดยเปรียบเทียบผลกับ sildenafil citrate

การศึกษาผลของสารสกัดจากกระชายดำและ sildenafil citrate ต่อการทำงานของไตจะศึกษาผลในแง่การไหลเวียนของพลาสมาที่ไต (renal plasma flow, RPF) อัตราการกรองของไต (glomerular filtration rate, GFR) การขับทิ้ง sodium และ potassium (sodium and potassium excretion) และศึกษากลไกการดูดกลับ sodium และน้ำที่หลอดไตฝอยส่วนต้น (proximal tubular reabsorption of sodium)

2.1 การเตรียมอาหารหนูเพื่อเพิ่มระดับ lithium ใน plasma

ในการศึกษาการดูดกลับ sodium ที่หลอดไตฝอยส่วนต้น (proximal tubular reabsorption of sodium) จะใช้เทคนิค lithium clearance (Thomsen et al., 1984) โดยให้หนูได้รับอาหารที่เพิ่ม lithium ใน plasma 2 วันก่อนการทดลอง โดยส่วนประกอบในอาหารคือ lithium chloride (LiCl) 0.636 g (15 mmol) ต่อน้ำหนักอาหาร 1 kg ทำโดยบดอาหารหนู 1 kg เติมน้ำกลั่น 500 ml และ LiCl 0.636 g ผสมจนเข้ากันดี ปั่นเป็นก้อน แล้วนำไปอบให้แห้ง นำมาใช้เลี้ยงสัตว์ทดลอง (Zhuo, 1990)

2.2 การเตรียมการทดลองเพื่อศึกษาการทำงานของไตโดยวิธี clearance

2.2.1 การเตรียมสารละลายสำหรับฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำ

สารละลายสำหรับฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำเพื่อใช้เป็น clearance marker ในการประเมินค่า glomerular filtration rate (GFR), renal plasma flow (RPF) และการดูดกลับของเหลวที่หลอดไตฝอยส่วนต้น ประกอบด้วย 0.4% inulin, 0.5% para-aminohippuric acid (PAH) และ 4 mmol/l LiCl โดยละลายสารทั้งหมดใน 0.9% NaCl

2.2.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ชั่งน้ำหนักหนู แล้วทำให้สลบโดยการฉีด inactin ขนาด 110 mg/kg bw หรือ nembutal ขนาด 60 mg/kg bw เข้าภายในช่องท้อง (intraperitoneal, i.p.) เมื่อสัตว์ที่สลบดีแล้ว นำมาวางบนเตียงผ่าตัดซึ่งควบคุมความร้อนและอุณหภูมิกายให้คงที่โดยวัดทางทวารหนักที่ อุณหภูมิ 37 °C ด้วยเครื่อง temperature controller

ผ่าตัดสอดท่อหลอดลม (tracheostomy) โดยใช้ท่อ polyethylene เบอร์ 240 (PE 240) เพื่อเป็นทางผ่านของอากาศ ช่วยการหายใจและดูดเสมหะ และสอดท่อหลอดเลือดแดง (arterial catheterization) ทางหลอดเลือดแดงคาร์โรติด (carotid artery) โดยใช้ท่อ polyethylene เบอร์ 50 (PE 50) ที่มี heparinized saline บรรจุอยู่เต็ม (อัตราส่วนระหว่าง heparin 5,000 i.u./u.i./ml : 0.9% NaCl เป็น 1:100) แล้วปลายท่ออีกด้านต่อกับเครื่องแปลงสัญญาณความดันเลือด (pressure transducer) เพื่อบันทึกความดันเลือดแดง systolic และ diastolic ด้วยเครื่อง polygraph และเก็บตัวอย่างเลือด เพื่อนำไปวิเคราะห์ผลต่อไป ผ่าตัดและสอดท่อหลอดเลือดดำ (venous catheterization) ทางหลอดเลือดดำจุกูลาร์ (jugular vein) โดยใช้ท่อ polyethylene เบอร์ 50 (PE 50) เพื่อให้สารที่ใช้ในการวิเคราะห์หาเคลียแรนซ์ (clearance markers), glomerular filtration rate (GFR), renal plasma flow (RPF) และ proximal tubular reabsorption และเพื่อให้สารสกัดจากกระชายดำ (*Kaempferia parviflora* extract) และ sildenafil citrate

ผ่าตัดและสอดท่อกระเพาะปัสสาวะ (urinary bladder canulation) โดยใช้ท่อ polyethylene เบอร์ 200 (PE 200) ลงไปที่ปลายด้านหนึ่งให้หนาขึ้น สอดปลายด้านที่ลงไฟเข้าไปในกระเพาะปัสสาวะแล้วผูกยึดท่อไว้กับผนังกระเพาะปัสสาวะ เพื่อเก็บตัวอย่างปัสสาวะนำไปวิเคราะห์

2.2.3 วิธีการทดลอง

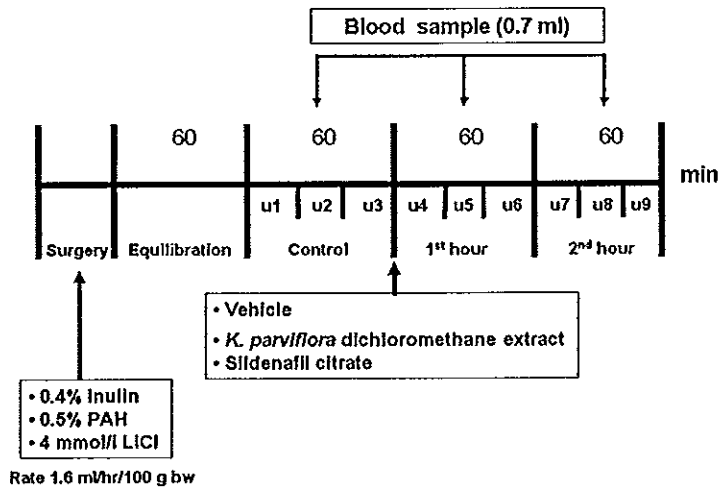
การทดลองทำในหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารที่ใช้ทดสอบ ศึกษาการทำงานของไตโดยใช้วิธีเคลียร์แรนซ์ หลังจากผ่าตัดสัตว์ทดลองเสร็จ ให้สารละลายที่ประกอบด้วย 0.4% inulin, 0.5% p-aminohippuric acid (PAH) และ lithium chloride (LiCl) 4 mmol/l ที่ละลายใน 0.9% NaCl เข้าหลอดเลือดดำ jugular ด้วยอัตรา 1.6 ml/hr/100 g bw ตลอดการทดลอง เพื่อชดเชยการสูญเสียของเหลวขณะทำการผ่าตัด

หลังจากช่วง equilibration period ประมาณ 60 นาทีแล้ว แบ่งการทดลองเป็น 3 ช่วงเวลา คือ ช่วง control, 0-60 นาที หลังฉีดสารและ 60-120 นาทีหลังฉีดสาร และเก็บตัวอย่างปัสสาวะเป็นเวลา 3 ชั่วโมงของการทดลอง โดยจะเก็บทุก ๆ 20 นาทีของแต่ละช่วงเวลากการทดลอง โดยใช้หลอดเก็บที่ซึ่งน้ำหนักเรียบร้อยแล้ว (ซึ่งการวัดความดันเลือดนั้นจะอ่านผล 3 ช่วงเวลา คือ ช่วง control, 5-60 นาที หลังฉีดสารและ 60-120 นาทีหลังฉีดสาร โดยไม่ได้รวม 0-5 นาทีของ acute/transient effect)

การเก็บตัวอย่างเลือด จะเก็บทางหลอดเลือดแดง carotid โดยเก็บกึ่งกลางของแต่ละช่วงเวลากการทดลอง ช่วงเวลาละ 1 ครั้ง เก็บเลือดครั้งละ 1 ml แล้วนำไปปั่นแยก (centrifuge) เพื่อหาค่า hematocrit และแยกเอาเฉพาะ plasma เก็บไว้เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารต่าง ๆ แล้วคืนเลือดกลับไปโดยนำเม็ดเลือดแดงที่เหลืออยู่ผสมกับ 0.9 % NaCl ปริมาตรเท่ากับ plasma ที่แยกออกไป

หลังจากเสร็จสิ้นการทดลอง ทำให้สัตว์ทดลองเสียชีวิตโดยการฉีดสาร saturated magnesium sulphate (saturated $MgSO_4$) เข้าทางหลอดเลือดดำ เพื่อให้สัตว์ทดลองเสียชีวิตอย่างสงบทันที เมื่อสัตว์ทดลองเสียชีวิตลง ทำการผ่าตัดเปิดช่องท้องเพื่อตัดไตออกทั้ง 2 ข้าง ชับน้ำให้แห้ง ลอกส่วนที่เป็นไขมัน และผนังหุ้ม (capsule) ออก ชั่งน้ำหนักและบันทึกค่าเพื่อใช้ในการคำนวณ

Experimental protocol



รูปที่ 2.3 แผนการทดลองในการศึกษาผลของกระชายดำต่อความดันเลือดและการทำงานของไต

2.3 การออกแบบการทดลอง

แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 3 กลุ่มคือ

1. หนูกลุ่มควบคุม เป็นกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ vehicle solvent (50% ethanol) ปริมาตร 100 μ l และ clearance markers เท่านั้น
2. หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane หนูกลุ่มนี้จะได้รับสาร clearance markers ร่วมกับสารสกัดจากกระชายดำขนาด 10, 50 และ 100 mg/kg BW ทุกความเข้มข้น
3. หนูกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate หนูกลุ่มนี้จะได้รับสาร clearance markers ร่วมกับ sildenafil citrate ขนาด 10 mg/kg bw

2.4 การคำนวณ

2.4.1 การคำนวณค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ย (mean arterial blood pressure, MABP)

$$\text{MABP} = \text{DP} + (1/3 \times \text{PP}) \text{ (mmHg)}$$

โดยที่

$$\text{DP} = \text{ค่าความดัน diastolic (mmHg)}$$

$$\text{PP} = \text{ค่าความดัน pulse pressure (mmHg)}$$

2.4.2 การคำนวณหาความเข้มข้น inulin และ PAH ในตัวอย่างปัสสาวะ และเลือด

นำตัวอย่างปัสสาวะและเลือดไปหาความเข้มข้นของ inulin และ PAH โดยวิธี spectrophotometry (Berglund, 1965 และ Smith, *et al.*, 1945) และวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ lithium โดยใช้วิธี inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICPAES) วิเคราะห์ความเข้มข้นของ sodium และ potassium โดยใช้เครื่อง electrolyte analyzer แล้วนำมาคำนวณหาค่า clearance (C) ดังนี้

$$C_x = [U_x] \times \dot{V} / [P_x]$$

C_x = clearance ของสาร X มีหน่วยเป็น ml/min

$[U_x]$ = ความเข้มข้นของสาร X ในปัสสาวะมีหน่วยเป็น mg%

$[P_x]$ = ความเข้มข้นของสาร X ในเลือด มีหน่วยเป็น mg%

\dot{V} = อัตราการไหลของปัสสาวะ มีหน่วยเป็น $\mu\text{l}/\text{min}$

โดยที่ clearance ของ PAH (C_{PAH}) เป็นตัวบอกระดับอัตราการไหลเวียนพลาสมาของไต
clearance ของ inulin (C_{in}) เป็นตัวบอกระดับอัตราการกรองของไต
clearance ของ lithium (C_{Li}) เป็นตัวบอกระดับอัตราการดูดกลับโซเดียมและน้ำที่หลอดไตฝอยส่วนต้น
clearance ของ sodium และ potassium (C_{Na} และ C_K) เป็นตัวบอกระดับอัตราการขับทิ้งของ Na^+ และ K^+

2.4.3 การคำนวณหาอัตราการไหลของปัสสาวะ โดยใช้วิธี gravitational method

โดยประมาณค่า specific gravity ของตัวอย่างปัสสาวะเท่ากับ 1.0 (ปัสสาวะ 1 กรัม มีปริมาตร 1 มล.) และคำนวณโดยแทนค่าตามสูตร

$$\dot{V} (\mu\text{l}/\text{min}) = \frac{\text{น้ำหนัก tube หลังเก็บปัสสาวะ (g)} - \text{น้ำหนัก tube ก่อนเก็บปัสสาวะ (g)} \times 1000}{20 \text{ min}}$$

2.4.4 การคำนวณ GFR และ RPF

ใช้ clearance ของ inulin ในการประมาณค่า GFR (Berglund, 1965) ส่วน clearance ของ PAH ใช้ประมาณค่า effective renal plasma flow (ERPF) แต่เนื่องจากมี plasma บางส่วนที่ไม่ผ่าน glomeruli หรือเนื้อเยื่อไตที่ไม่มีการคัดหลั่ง PAH โดย extraction

ratio ของ PAH ค่าประมาณ 0.9 (Valtin and Schafer, 1989) ดังนั้นในการคำนวณค่าประมาณของ total renal

plasma flow (TRPF) จึงใช้ $ERPF/0.9$ (ml/min) โดยการทดลองในครั้งนี้จะใช้อักษรย่อ RPF แทน TRPF

สำหรับค่า fractional excretion, FE ของสารใด (X) สามารถคำนวณโดยใช้สูตร

	FE_x	=	$(C_x/C_{in}) \times 100$	
โดยที่	FE_x	=	fractional excretion ของสาร X หน่วยเป็น %	
	C_x	=	clearance ของสาร X	ml/min
	C_{in}	=	clearance ของ inulin	ml/min

2.4.5 การคำนวณค่า filtration fraction (FF) คำนวณจากสูตร

FF	=	$(C_{in}/RPF) \times 100$	
FF	=	filtration fraction	หน่วยเป็น %
C_{in}	=	clearance ของ inulin	ml/min
RPF	=	renal plasma flow	ml/min

2.4.6 การคำนวณการดูดกลับ sodium ที่หลอดไตฝอยส่วนต้น (fractional proximal sodium reabsorption, FPR_{Na})

สามารถประมาณได้จากค่าการดูดกลับของ lithium ที่หลอดไตฝอยส่วนต้น (fractional lithium reabsorption, FR_{Li}) เนื่องจากพบว่า lithium จะถูกดูดกลับที่หลอดไตฝอยส่วนต้นเท่านั้น (Thomsen *et al.*, 1984) และคำนวณโดยใช้สูตร

FPR_{Na}	=	$\frac{(C_{in} \times P_{Li}) - (U_{Li} \times \dot{V})}{(C_{in} \times P_{Li})} \times 100$	
FPR_{Na}	=	fractional proximal sodium reabsorption หน่วยเป็น %	
C_{in}	=	clearance ของ inulin	ml/min
P_{Li}	=	ความเข้มข้นของสาร Li ใน plasma	mmol/l
U_{Li}	=	ความเข้มข้นของสาร Li ใน urine	mmol/l
\dot{V}	=	urine flow rate	ml/min

2.4.7 การคำนวณค่า fractional distal reabsorption of sodium (FDR_{Na})

คำนวณจากสูตร

$$FDR_{Na} = (C_{Li} - C_{Na}) / C_{In} \times 100$$

FDR_{Na} = fractional distal reabsorption of sodium หน่วยเป็น ml/min

C_{Li} = clearance ของ lithium หน่วยเป็น ml/min

C_{In} = clearance ของ inulin หน่วยเป็น ml/min

C_{Na} = clearance ของ sodium หน่วยเป็น ml/min

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองนำเสนอ เป็นค่า mean \pm standard error of means (S.E.M.)

และนำมาวิเคราะห์หาค่าความแตกต่างทางสถิติ โดยใช้ one way analysis of variance

(ANOVA) การเปรียบเทียบความแตกต่าง (multiple comparison) ใช้ student Neuman

Keuls post hoc test โดยยอมรับความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ P value < 0.05

3. ผลการทดลอง

ตอนที่ 1 ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย hexane, สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และสารสกัดจากกระชายดำด้วย methanol และ sildenafil citrate ต่อการหดตัวของหัวใจห้องบนที่แยกจากตัว

1.1 ผลของ vehicle control (ethanol) ต่อการหดตัวของหัวใจห้องบนที่แยกจากตัว

รูปที่ 3.2 และตารางที่ 3.1 และ 3.2 แสดงผลของ 50% ethanol ต่อความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจ ผลการทดลองพบว่า 50% ethanol ขนาด 10-200 $\mu\text{l}/20\text{ ml}$ ไม่ทำให้ความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจแตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญทั้ง 7 ครั้งที่วัดผล ส่วนขนาด 400 $\mu\text{l}/20\text{ ml}$ (นาที่ที่ 10, 15 และ 20) และ 800 $\mu\text{l}/20\text{ ml}$ (นาที่ที่ 15 และ 20) มีผลลดความแรงในการหดตัวของหัวใจอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม 50% ethanol ทั้งสองขนาดดังกล่าวไม่เปลี่ยนแปลงอัตราการหดตัวของหัวใจอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกเวลาที่วัดผล

รูปที่ 3.3 และตารางที่ 3.1 และ 3.2 แสดงผลของ 100% ethanol ต่อความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจ ผลการทดลองพบว่าที่ขนาด 10-400 $\mu\text{l}/20\text{ ml}$ ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของความแรงในการหดตัวของหัวใจอย่างมีนัยสำคัญจาก control ทั้ง 7 ครั้งที่วัดผล และที่ขนาด 10-100 และ 400 $\mu\text{l}/20\text{ ml}$ ไม่ทำให้อัตราการหดตัวของหัวใจเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญจาก control ทั้ง 7 ครั้งที่วัดผล แต่ที่ขนาด 200 $\mu\text{l}/20\text{ ml}$ ทำให้อัตราการหดตัวของหัวใจหลังหยดสารนาที่ที่ 2-20 เพิ่มขึ้นจาก control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าขนาด 800 $\mu\text{l}/20\text{ ml}$ ทำให้หัวใจหยุดเต้น

1.2 ผลของ vehicle control (Tyrode's solution) ต่อการหดตัวของหัวใจห้องบนที่แยกจากตัว

รูปที่ 3.1 และตารางที่ 3.1 และ 3.2 แสดงผลของ Tyrode's solution ต่อความแรงในการหดตัวและอัตราการหดตัวของหัวใจ ผลการทดลองพบว่า Tyrode's solution แต่ละขนาดไม่มีผลต่อความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับค่า control ทั้ง 7 ครั้งที่วัดผล

1.3 ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย hexane ต่อการหดตัวของหัวใจห้องบนที่แยกจากตัว

รูปที่ 3.4 และตารางที่ 3.1 และ 3.2 แสดงผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย hexane ทั้ง 5 ขนาดต่อความแรงในการหดตัวและอัตราการหดตัวของหัวใจ ผลการทดลองพบว่า สารสกัดความเข้มข้น (0.25-10.0 mg%) ไม่ทำให้ความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจแตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญในการวัดทุกครั้ง แต่ที่ความเข้มข้น 20 mg% ทำให้หัวใจหยุดเต้น จึงไม่สามารถบันทึกความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจได้

รูปที่ 3.8 แสดงค่า % การเปลี่ยนแปลงของความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจที่เกิดจากสารสกัดจากค่า control เทียบกับ vehicle พบว่าที่นาที่ที่ 1 กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย hexane ขนาด 0.50-5.00 mg% มีความแรงในการหดตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle (100% ethanol) นาที่ที่ 10 สารสกัดขนาด 0.50-10.0 mg% เพิ่มความแรงในการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle ส่วนนาที่ที่ 20 สารสกัดขนาด 2.50-10.0 mg% เพิ่มความแรงในการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle ส่วนผลของอัตราการหดตัวของหัวใจพบว่านาที่ที่ 1 กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย hexane ขนาด 2.50-5.00 mg% ลดอัตราการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle นาที่ที่ 10 สารสกัดขนาด 2.50-10.0 mg% ลดอัตราการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle ส่วนนาที่ที่ 20 สารสกัดขนาด 2.50-10.0 mg% ลดอัตราการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle และที่ความเข้มข้น 20 mg% นั้นทำให้หัวใจหยุดเต้น

ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากกระชายดำด้วย hexane ที่เพิ่มความแรงในการหดตัวของหัวใจอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 0.50 mg% โดยเพิ่ม $2.73 \pm 1.48\%$ ส่วนความเข้มข้นที่เพิ่มความแรงสูงสุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่น ๆ คือ 5.00 mg% โดยเพิ่ม $26.71 \pm 8.00\%$ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 20 mg% ทำให้หัวใจหยุดเต้น ส่วนผลต่ออัตราการหดตัวของหัวใจพบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ลดอัตราการหดตัวของหัวใจอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 2.50 mg% โดยลด $6.59 \pm 3.03\%$ และความเข้มข้นที่ลดอัตราการหดตัวมากที่สุดคือ 10.0 mg% โดยลด $14.14 \pm 2.66\%$

1.4 ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ต่อการหดตัวของหัวใจห้องบนที่แยกจากตัว

รูปที่ 3.5 และตารางที่ 3.1 และ 3.2 แสดงผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ทั้ง 5 ขนาดต่อความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจ ผลการทดลองพบว่า สารสกัดทุกความเข้มข้นไม่ทำให้ความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจแตกต่างจาก control ที่เวลาเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นที่ขนาด 5 mg% ทำให้อัตราการหดตัวลดลงจาก control อย่างมีนัยสำคัญที่นาที่ 10, 15 และ 20 และที่ความเข้มข้น 10-20 mg% ทำให้หัวใจหยุดเต้น

รูปที่ 3.9 แสดงค่า % การเปลี่ยนแปลงของความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจที่เกิดจากสารสกัดจากค่า control เทียบกับกลุ่ม vehicle พบว่าที่นาที่ที่ 1 สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 2.50-5.00 mg% เพิ่มความแรงในการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle (50% ethanol) นาที่ที่ 10 สารสกัดขนาด 0.50-5.00 mg% เพิ่มความแรงในการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle ส่วนนาที่ที่ 20 สารสกัดขนาด 0.50-5.00 mg% เพิ่มความแรงในการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle ส่วนผลของอัตราการหดตัวของหัวใจพบว่านาที่ที่ 1 สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 5.00 mg% ลดอัตราการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle นาที่ที่ 10 สารสกัดขนาด 2.50-5.00 mg% ลดอัตราการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle ส่วนนาที่ที่ 20 สารสกัดขนาด 2.50-5.00 mg% ลดอัตราการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle โดยที่ความเข้มข้น 10 และ 20 mg% นั้น ทำให้หัวใจหยุดเต้น

สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ความเข้มข้นต่ำสุดที่เพิ่มความแรงในการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle คือ 0.50 mg% โดยเพิ่ม $17.95 \pm 7.72\%$ ส่วนความเข้มข้นที่เพิ่มความแรงสูงสุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่น ๆ คือ 5.00 mg% โดยเพิ่ม $101.68 \pm 11.42\%$ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10.0 mg% ทำให้หัวใจหยุดเต้น ส่วนผลของอัตราการหดตัวของหัวใจพบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่ลดอัตราการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 2.50 mg% โดยลด $12.45 \pm 4.71\%$ และความเข้มข้นที่ลดอัตราการหดตัวมากที่สุดคือ 5.00 mg% โดยลด $25.71 \pm 4.75\%$

1.5 ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย methanol ต่อการหดตัวของหัวใจห้องบนที่แยกจากตัว

รูปที่ 3.6 และตารางที่ 3.1 และ 3.2 แสดงผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย methanol ทั้ง 5 ขนาดต่อความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจ ผลการทดลองพบว่าสารสกัดความเข้มข้น 0.25-5.00 mg% ไม่ทำให้ความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจทั้ง 7 เวลาที่วัดแตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนที่ความเข้มข้น 10 mg% พบว่าความแรงในการหดตัวเพิ่มขึ้นจาก control และอัตราการหดตัวของหัวใจลดลงจาก control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และที่ความเข้มข้น 20 mg% ทำให้หัวใจหยุดเต้น

รูปที่ 3.9 แสดงค่า % การเปลี่ยนแปลงของความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจที่เกิดจากสารสกัดจากค่า control เทียบกับกลุ่ม vehicle พบว่าที่นาที่ที่ 1 กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย methanol ทุกความเข้มข้นนั้นความแรงในการหดตัวไม่แตกต่างจากกลุ่ม vehicle (50% ethanol) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นาที่ที่ 10 สารสกัดขนาด 2.50-10.0 mg% เพิ่มความแรงในการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle ส่วนนาที่ที่ 20 สารสกัดขนาด 0.50-10.0 mg% เพิ่มความแรงในการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle ส่วนผลของอัตราการหดตัวของหัวใจพบว่านาที่ที่ 1 สารสกัดจากกระชายดำด้วย methanol ขนาด 5.00 mg% ลดอัตราการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle นาที่ที่ 10 สารสกัดขนาด 2.50-10.0 mg% ลดอัตราการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle ส่วนนาที่ที่ 20 สารสกัดขนาด 2.50-10.0 mg% ลดอัตราการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle โดยที่ความเข้มข้น 20 mg% นั้นทำให้หัวใจหยุดเต้น

สารสกัดจากกระชายดำด้วย methanol ความเข้มข้นต่ำสุดที่เพิ่มความแรงในการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle คือ 0.50 mg% โดยเพิ่ม $1.04 \pm 2.04\%$ ส่วนความเข้มข้นที่เพิ่มความแรงสูงสุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่น ๆ คือ 10.0 mg% โดยเพิ่ม $84.70 \pm 33.12\%$ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 20 mg% ทำให้หัวใจหยุดเต้น ส่วนผลต่ออัตราการหดตัวของหัวใจพบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่ลดอัตราการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 2.50 mg% โดยลด $8.52 \pm 2.36\%$ และความเข้มข้นที่ลดอัตราการหดตัวมากที่สุดคือ 10.0 mg% โดยลด $42.84 \pm 11.07\%$

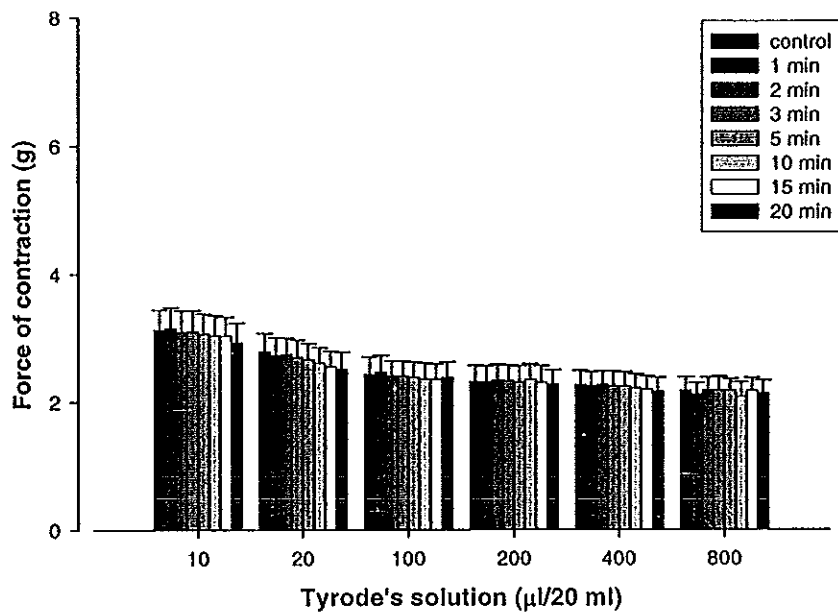
1.6 ผลของ sildenafil citrate ต่อการหดตัวของหัวใจห้องบนที่แยกจากตัว

รูปที่ 3.7 และ ตารางที่ 3.1 และ 3.2 แสดงผลของ sildenafil citrate ทั้ง 5 ขนาด ต่อความแรงในการหดตัว และอัตราการหดตัวของหัวใจ ผลการทดลองพบว่าทุกความเข้มข้นไม่ ทำให้ความแรงในการหดตัวของหัวใจแตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญในการวัดทุกครั้ง และ พบว่าความเข้มข้น 0.25-5.00 mg% ไม่ทำให้อัตราการหดตัวของหัวใจแตกต่างจาก control อย่าง มีนัยสำคัญ ส่วนความเข้มข้น 10 และ 20 mg% พบว่านาที่ที่ 1 และ 2 ของแต่ละความเข้มข้นมี อัตราการหดตัวของหัวใจลดลงจาก control อย่างมีนัยสำคัญ

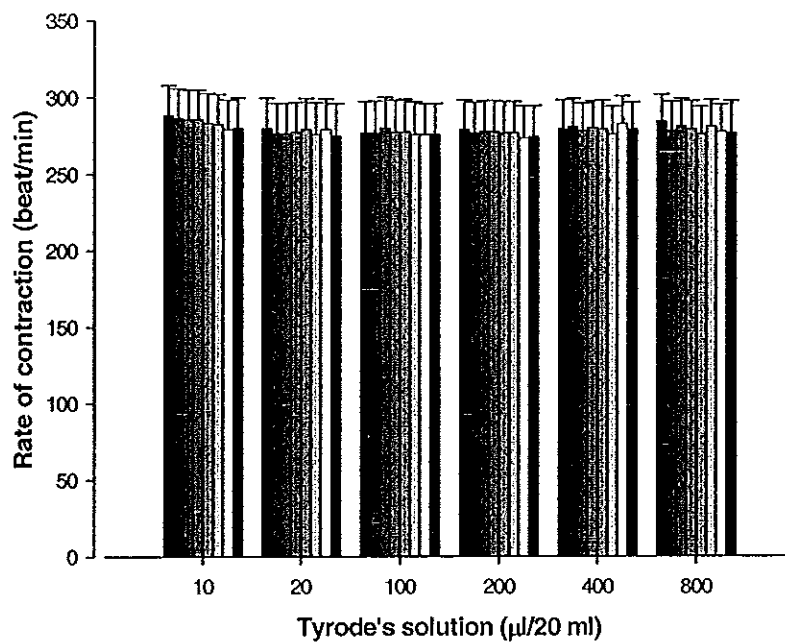
รูปที่ 3.10 แสดงค่า % การเปลี่ยนแปลงของความแรงและอัตราการหดตัวของ หัวใจที่เกิดจาก sildenafil citrate จากค่า control เทียบกับกลุ่ม vehicle พบว่าที่นาที่ที่ 1 sildenafil citrate ขนาด 10.0 mg% เพิ่มความแรงในการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ เทียบกับกลุ่ม vehicle (Tyrode's solution) นาที่ที่ 10 sildenafil citrate ขนาด 5.00-20.0 mg% เพิ่มความแรงในการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle ส่วนนาที่ที่ 20 sildenafil citrate ขนาด 5.00-20.0 mg% เพิ่มความแรงในการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle ส่วนผลของอัตราการหดตัวของหัวใจพบว่านาที่ที่ 1 sildenafil citrate ขนาด 5.00-20.0 mg% ลดอัตราการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle นาที่ที่ 10 sildenafil citrate ขนาด 0.25-0.50 mg% เพิ่มอัตราการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle ส่วนขนาด 10.0-20.0 mg% ลดอัตราการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle ส่วนนาที่ที่ 20 sildenafil citrate ขนาด 0.25 mg% เพิ่มอัตราการ หดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle

sildenafil citrate ความเข้มข้นต่ำสุดที่เพิ่มความแรงในการหดตัวอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle คือ 5.00 mg% โดยเพิ่ม $12.90 \pm 3.00\%$ ส่วนความ เข้มข้นที่เพิ่มความแรงสูงสุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่น ๆ คือ 10.0 mg% โดยเพิ่ม $19.96 \pm 4.06\%$ ส่วนผลต่ออัตราการหดตัวของหัวใจพบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่ลดอัตราการหดตัวอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ คือ 5.00 mg% โดยลด $6.53 \pm 0.80\%$ และความเข้มข้นที่ลดอัตราการหดตัว มากที่สุดคือ 20.0 mg% โดยลด $15.55 \pm 2.39\%$

A.

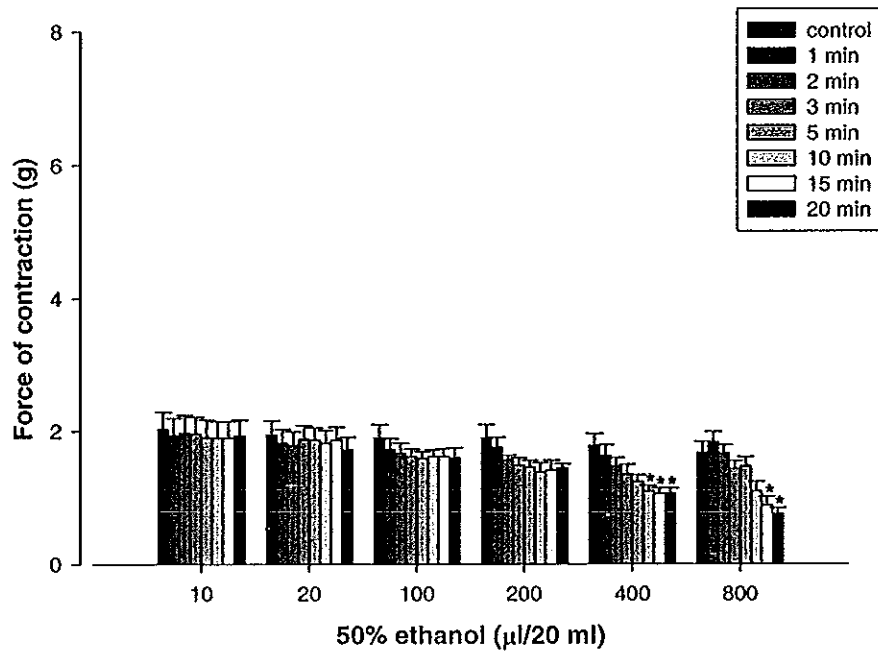


B.

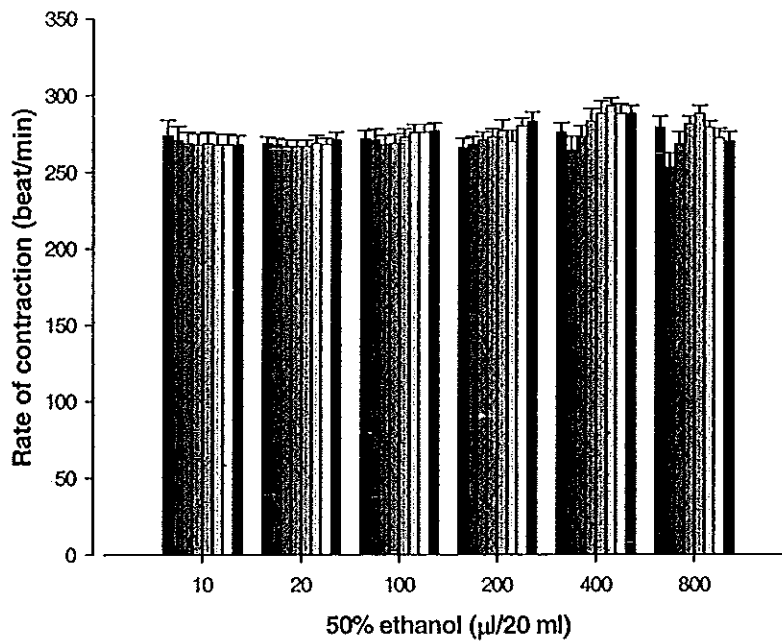


รูปที่ 3.1 ผลของTyrode's solution ต่อความแรง (A) และอัตรา (B) การหดตัวของหัวใจห้องบนที่ตัดแยกจากตัวของหนูแร้
ข้อมูลแสดงค่า mean \pm S.E.M. ที่เวลา 1, 2, 3, 5, 10, 15 และ 20 นาที หลังหยดสาร
control คือ resting tension

A.



B.



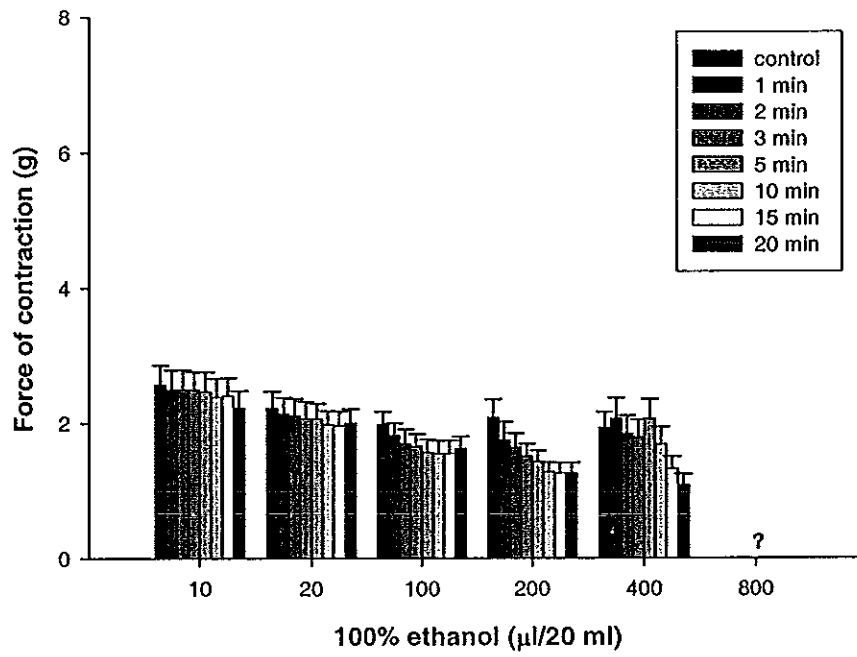
รูปที่ 3.2 ผลของ 50% ethanol ต่อความแรง (A) และอัตรา (B) การหดตัวของหัวใจห้องบนที่ตัดแยกจากตัวของหนูแร้ท

ข้อมูลแสดงค่า mean \pm S.E.M. ที่เวลา 1, 2, 3, 5, 10, 15 และ 20 นาที หลังหยดสาร

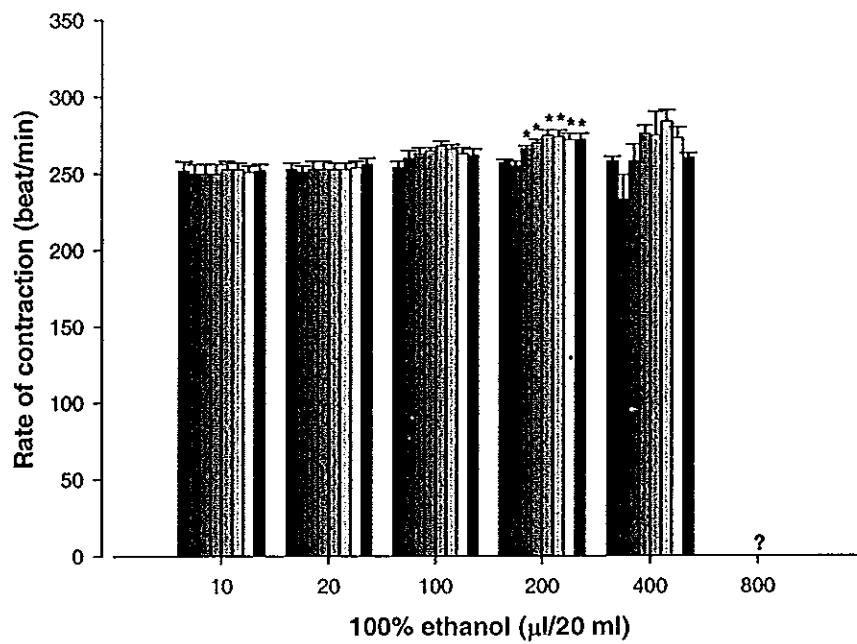
* คือ $p < 0.05$ (one way ANOVA) เทียบกับค่า control

control คือ resting tension

A.



B.



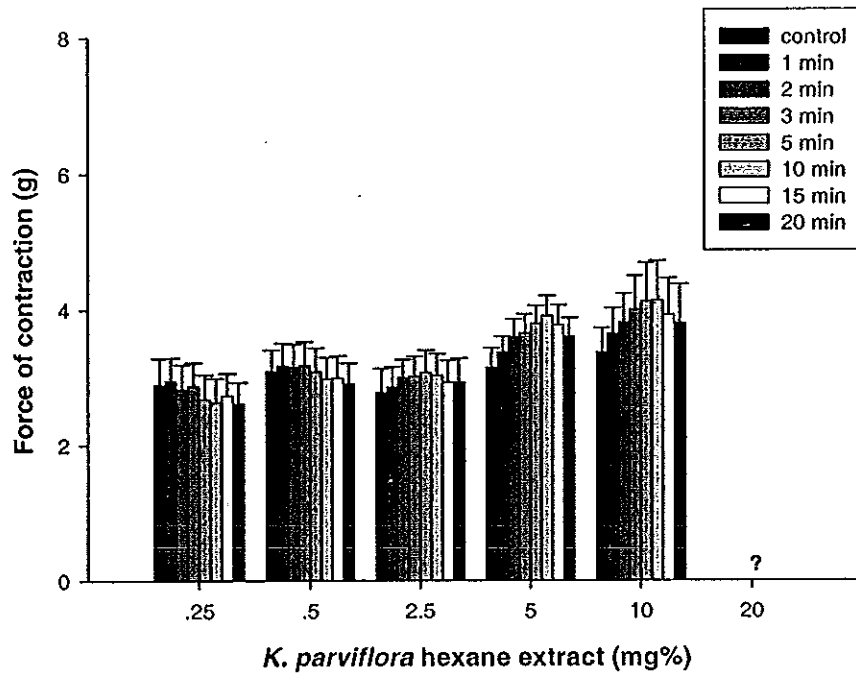
รูปที่ 3.3 ผลของ 100% ethanol ต่อความแรง (A) และอัตรา (B) การหดตัวของหัวใจห้องบนที่ตัดแยกจากตัวของหนูแร้ท

ข้อมูลแสดงค่า mean \pm S.E.M. ที่เวลา 1, 2, 3, 5, 10, 15 และ 20 นาที หลังหยุดสาร

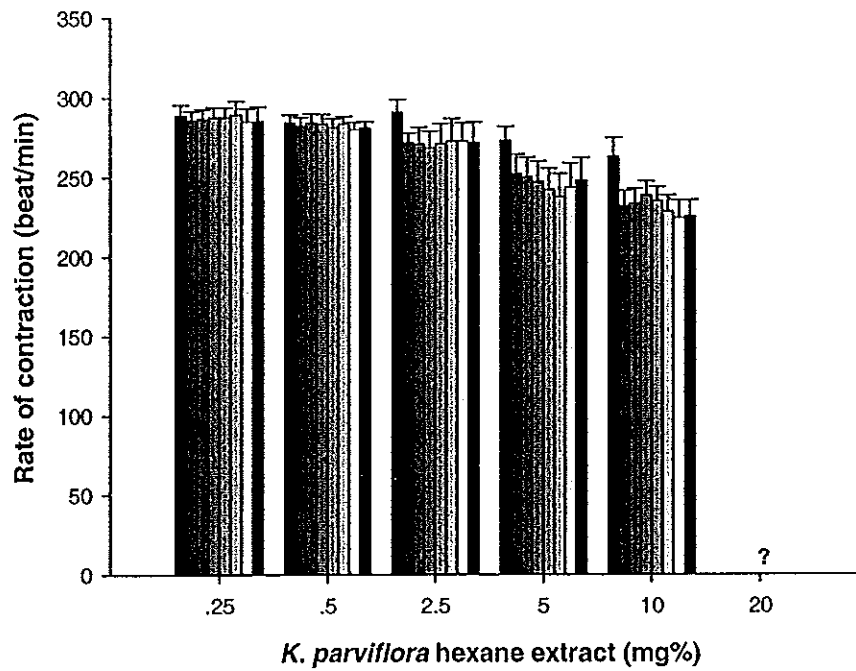
* คือ $p < 0.05$ (one way ANOVA) เทียบกับค่า control

? คือ หัวใจหยุดเต้น, control คือ resting tension

A.

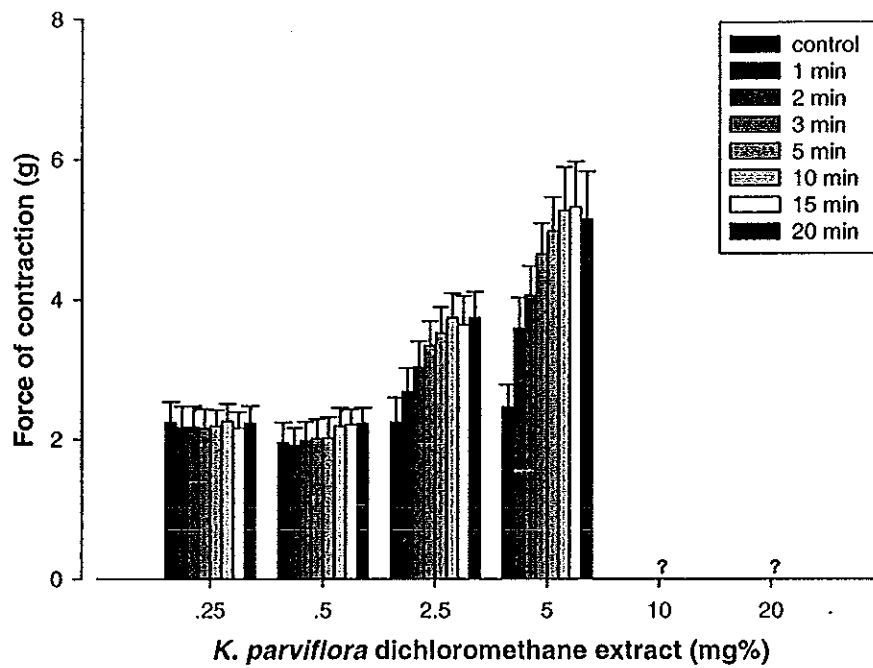


B.

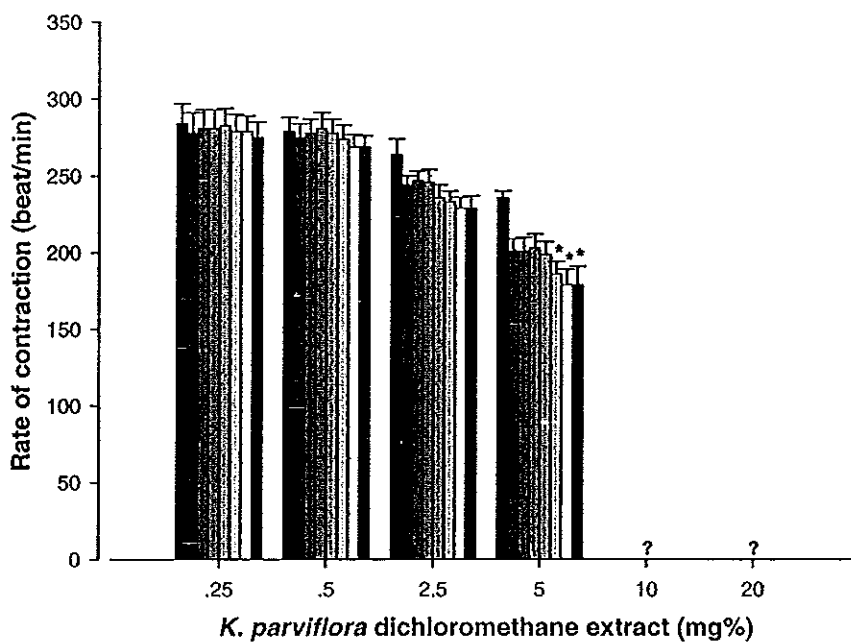


รูปที่ 3.4 ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย hexane ต่อความแรง (A) และอัตรา (B) การหดตัวของหัวใจของหนูที่ตัดแยกจากตัวของหนูแร้ท
ข้อมูลแสดงค่า mean \pm S.E.M. ที่เวลา 1, 2, 3, 5, 10, 15 และ 20 นาที หลังหยดสาร
? คือ หัวใจหยุดเต้น, control คือ resting tension

A.



B.



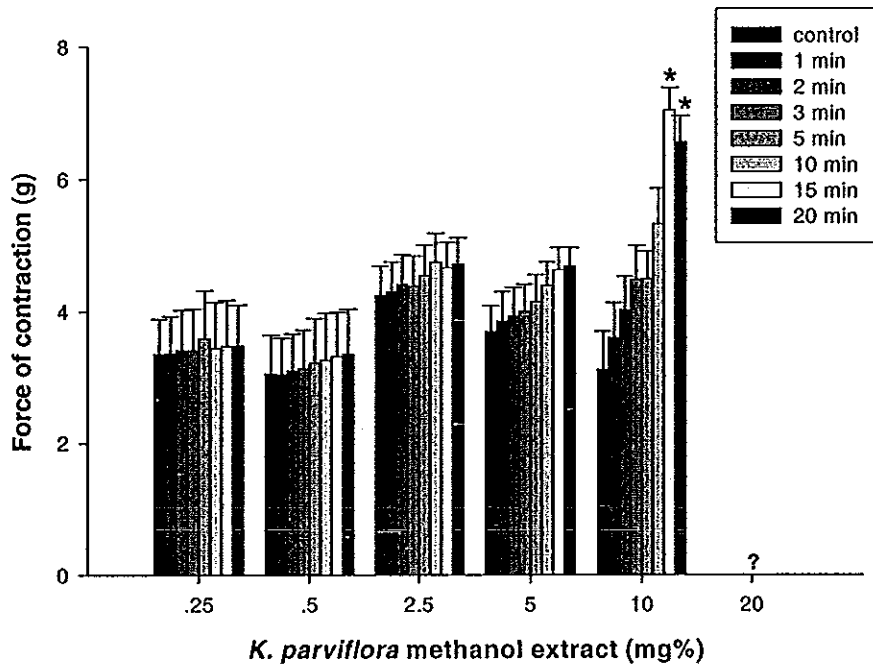
รูปที่ 3.5 ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ต่อความแรง (A) และอัตรา (B) การหดตัวของหัวใจห้องบนที่ตัดแยกจากตัวของหนูแร้ท

ข้อมูลแสดงค่า mean \pm S.E.M. ที่เวลา 1, 2, 3, 5, 10, 15 และ 20 นาที หลังหยดสาร

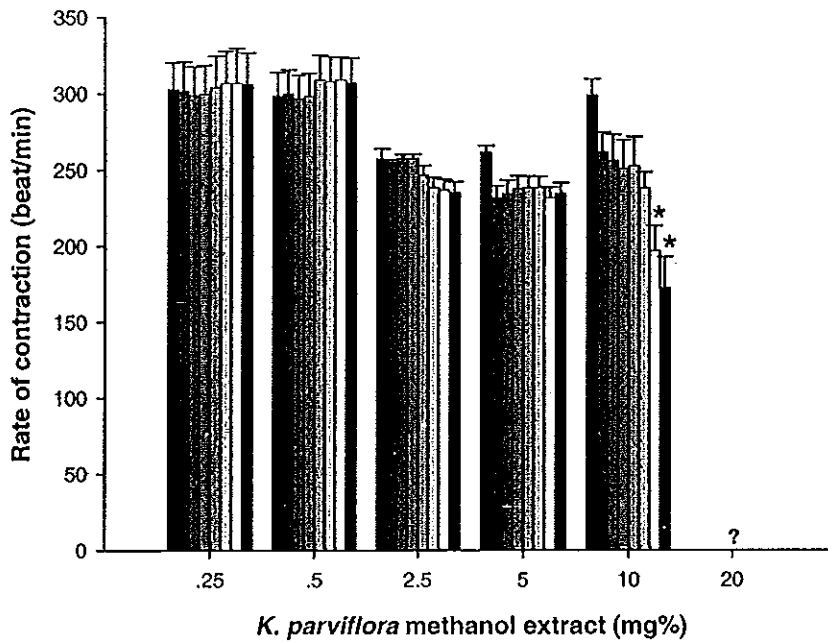
* คือ $p < 0.05$ (one way ANOVA) เทียบกับค่า control

? คือ หัวใจหยุดเต้น, control คือ resting tension

A.



B.



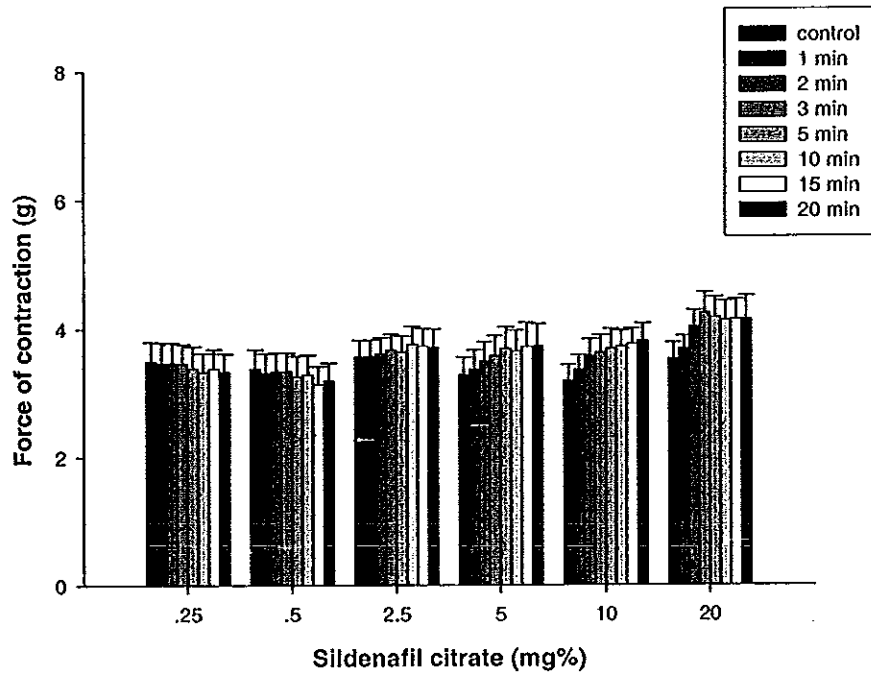
รูปที่ 3.6 ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย methanol ต่อความแรง (A) และอัตรา (B) การหดตัวของหัวใจของหนูที่ตัดแยก จากตัวของหนูแร้ท

ข้อมูลแสดงค่า mean \pm S.E.M. ที่เวลา 1, 2, 3, 5, 10, 15 และ 20 นาที หลังหยดสาร

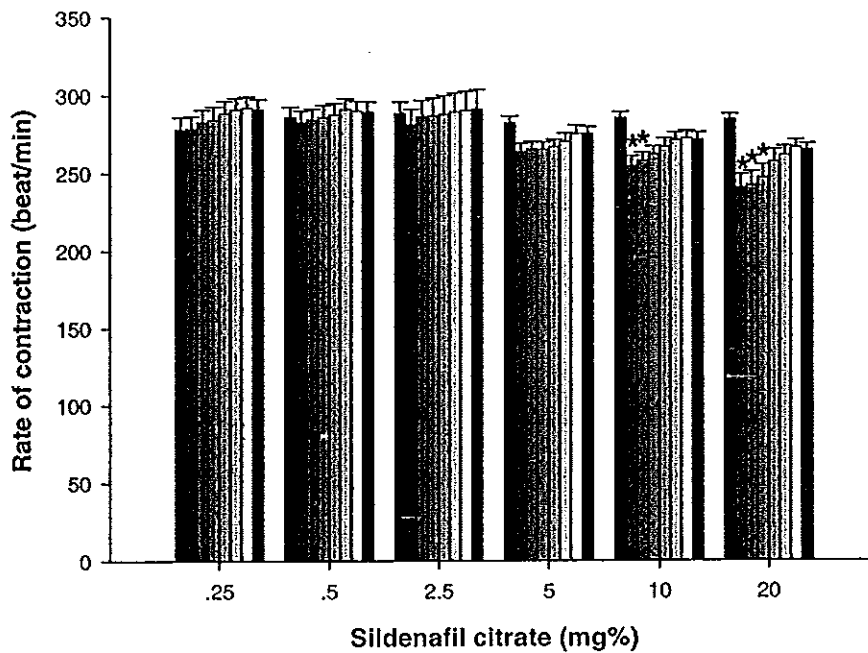
* คือ $p < 0.05$ (one way ANOVA) เทียบกับค่า control

? คือ หัวใจหยุดเต้น, control คือ resting tension

A.



B.

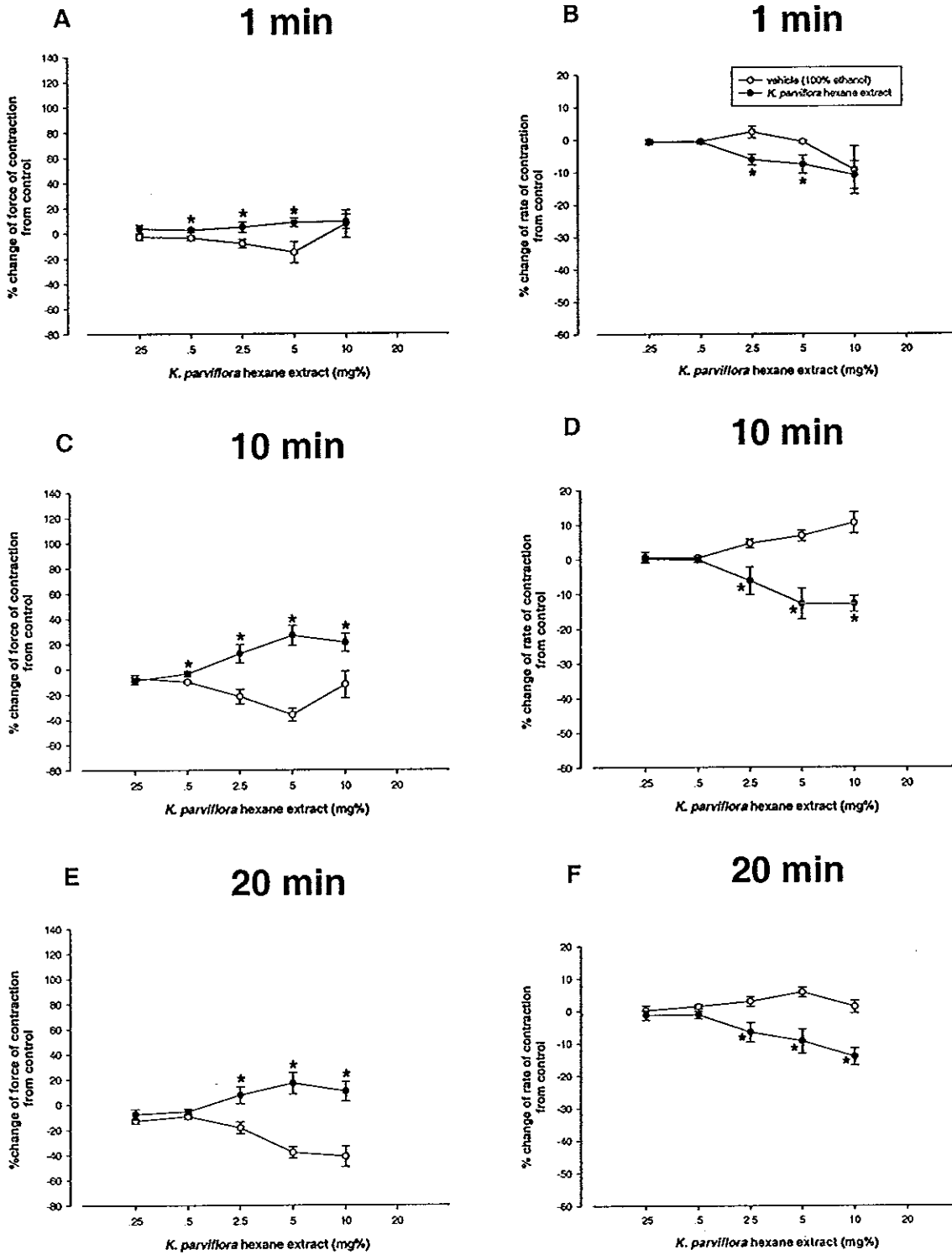


รูปที่ 3.7 ผลของ sildenafil citrate ต่อความแรง (A) และอัตรา (B) การหดตัวของหัวใจห้องบนที่ตัดแยกจากตัวของหนูแร้ท

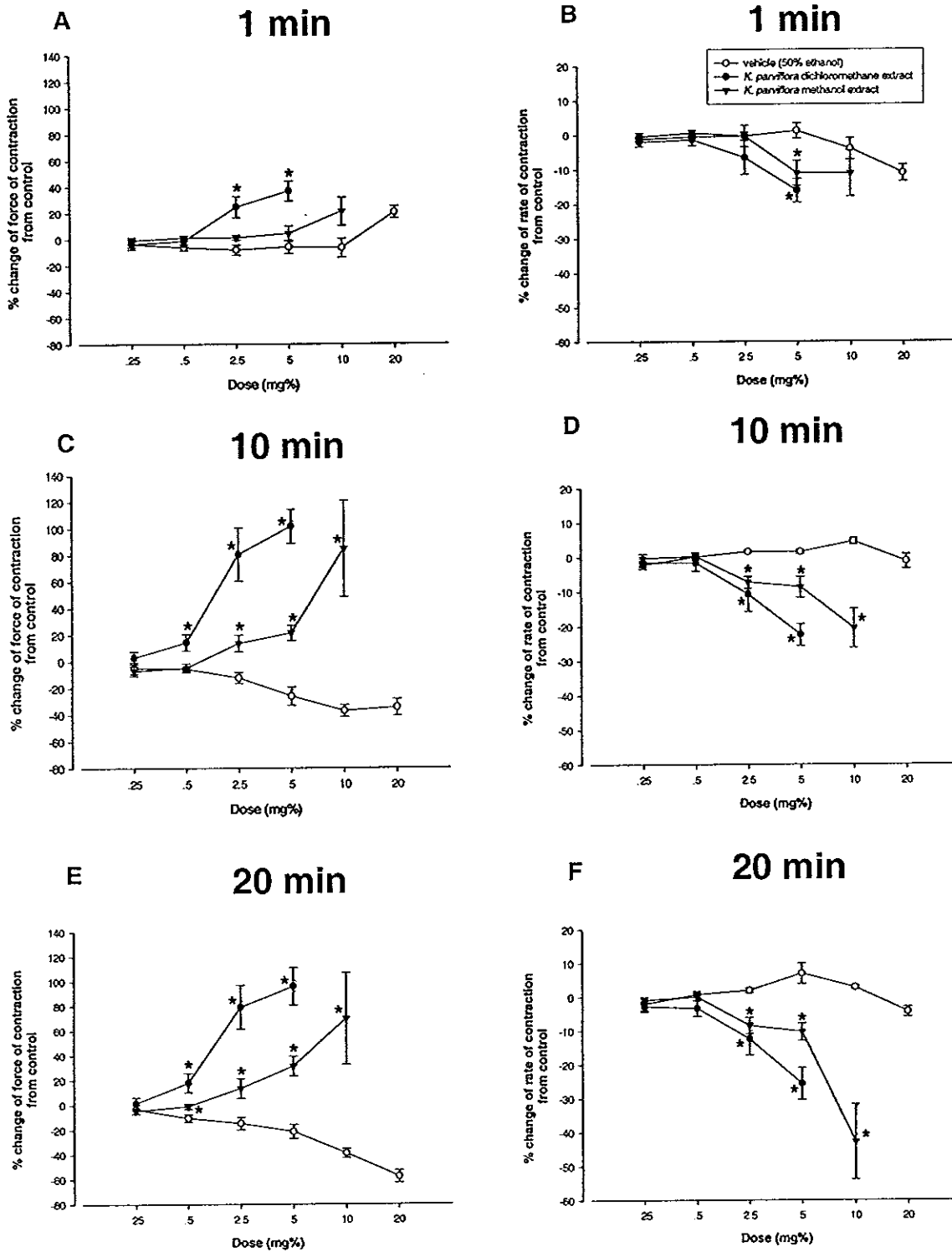
ข้อมูลแสดงค่า mean \pm S.E.M. ที่เวลา 1, 2, 3, 5, 10, 15 และ 20 นาที หลังหยดสาร

* คือ $p < 0.05$ (one way ANOVA) เทียบกับค่า control

control คือ resting tension



รูปที่ 3.8 ผลของ hexane extract ต่อ %change ของ force และ rate of contraction from control บันทึกในนาทีที่ 1 (A,B) นาทีที่ 10 (C,D) และนาทีที่ 20 (E,F) หลังหยดสาร
 ข้อมูลแสดงค่า mean \pm SEM $p < 0.05$ เทียบกับ vehicle คำอธิบายสัญลักษณ์ในกราฟเหมือนกันทุกรูป
 * คือ $p < 0.05$ (t-test) เทียบกับค่า control

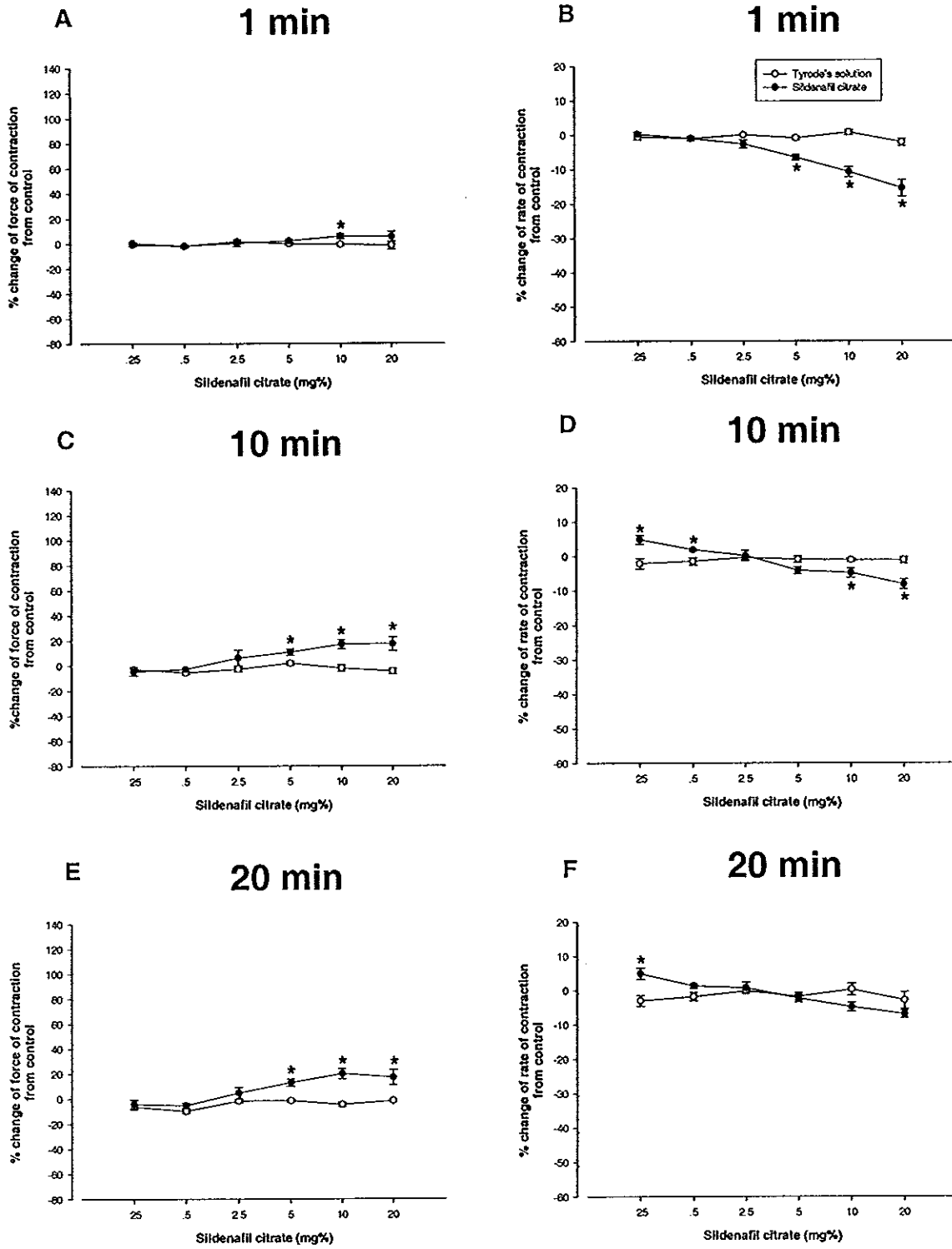


รูปที่ 3.9 ผลของ dichloromethane และ methanol extract ต่อ %change ของ force และ rate of contraction from control

บันทึกในนาทีที่ 1 (A,B) นาทีที่ 10 (C,D) และนาทีที่ 20 (E,F) หลังหยดสาร

ข้อมูลแสดงค่า mean \pm SEM $p < 0.05$ เทียบกับ vehicle ค่าอธิบายสัญลักษณ์ในกราฟเหมือนกันทุกรูป

* คือ $p < 0.05$ (t-test) เทียบกับค่า control



รูปที่ 3.10 ผลของ sildenafil citrate ต่อ %change ของ force และ rate of contraction from control บันทึกในนาทีที่ 1 (A,B)

นาทีที่ 10 (C,D) และนาทีที่ 20 (E,F) หลังหยดสาร

ข้อมูลแสดงค่า mean ± SEM p<0.05 เทียบกับ vehicle คำอธิบายสัญลักษณ์ในกราฟเหมือนกันทุกรูป

* คือ p<0.05 (t-test) เทียบกับค่า control

ตารางที่ 3.1 ค่าความแรงในการหดตัวของหัวใจห้องบนที่ตัดแยกจากตัวของหนูแร่งที่ได้รับ Tyrode's solution, 50% ethanol, 100% ethanol, สารสกัดจากกระชายดำด้วย hexane, สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane, สารสกัดจากกระชายดำด้วย methanol และ sildenafil citrate ขนาดต่างๆ

Substances and drug	Force of contraction (g)							
	control	1 min	2 min	3 min	5 min	10 min	15 min	20 min
Tyrode's solution (μ)								
10	3.13 \pm 0.31	3.16 \pm 0.32	3.10 \pm 0.33	3.10 \pm 0.33	3.07 \pm 0.31	3.04 \pm 0.31	3.04 \pm 0.29	2.93 \pm 0.30
20	2.79 \pm 0.28	2.73 \pm 0.27	2.75 \pm 0.25	2.70 \pm 0.27	2.67 \pm 0.24	2.61 \pm 0.23	2.56 \pm 0.23	2.52 \pm 0.26
100	2.43 \pm 0.27	2.47 \pm 0.26	2.41 \pm 0.23	2.41 \pm 0.23	2.39 \pm 0.24	2.36 \pm 0.25	2.35 \pm 0.23	2.38 \pm 0.24
200	2.32 \pm 0.25	2.31 \pm 0.25	2.34 \pm 0.25	2.33 \pm 0.24	2.31 \pm 0.25	2.35 \pm 0.24	2.31 \pm 0.26	2.27 \pm 0.22
400	2.27 \pm 0.22	2.25 \pm 0.22	2.27 \pm 0.21	2.25 \pm 0.23	2.25 \pm 0.22	2.22 \pm 0.21	2.19 \pm 0.21	2.16 \pm 0.21
800	2.17 \pm 0.21	2.12 \pm 0.18	2.18 \pm 0.20	2.18 \pm 0.21	2.18 \pm 0.18	2.08 \pm 0.22	2.18 \pm 0.19	2.13 \pm 0.20
50% ethanol (μ)								
10	2.03 \pm 0.26	1.94 \pm 0.26	1.97 \pm 0.27	1.96 \pm 0.25	1.91 \pm 0.26	1.90 \pm 0.25	1.09 \pm 0.25	1.93 \pm 0.24
20	1.94 \pm 0.22	1.82 \pm 0.21	1.79 \pm 0.20	1.88 \pm 0.20	1.87 \pm 0.18	1.82 \pm 0.19	1.87 \pm 0.19	1.72 \pm 0.19
100	1.90 \pm 0.20	1.73 \pm 0.16	1.67 \pm 0.15	1.62 \pm 0.11	1.59 \pm 0.10	1.62 \pm 0.10	1.62 \pm 0.12	1.60 \pm 0.15
200	1.90 \pm 0.20	1.76 \pm 0.15	1.57 \pm 0.07	1.49 \pm 0.11	1.46 \pm 0.10	1.38 \pm 0.14	1.41 \pm 0.15	1.44 \pm 0.07
400	1.78 \pm 0.18	1.63 \pm 0.16	1.47 \pm 0.13	1.35 \pm 0.15	1.24 \pm 0.10	1.09 \pm 0.09 *	1.06 \pm 0.08 *	1.06 \pm 0.08 *
800	1.67 \pm 0.17	1.83 \pm 0.16	1.66 \pm 0.13	1.43 \pm 0.12	1.47 \pm 0.14	1.09 \pm 0.15	0.88 \pm 0.13 *	0.75 \pm 0.09 *
100% ethanol (μ)								
10	2.57 \pm 0.29	2.50 \pm 0.29	2.50 \pm 0.29	2.50 \pm 0.26	2.47 \pm 0.29	2.39 \pm 0.27	2.41 \pm 0.26	2.23 \pm 0.25
20	2.22 \pm 0.25	2.14 \pm 0.24	2.11 \pm 0.25	2.07 \pm 0.25	2.06 \pm 0.23	1.98 \pm 0.20	1.96 \pm 0.21	2.00 \pm 0.21
100	1.98 \pm 0.19	1.82 \pm 0.18	1.70 \pm 0.21	1.66 \pm 0.18	1.57 \pm 0.19	1.55 \pm 0.19	1.55 \pm 0.19	1.62 \pm 0.18
200	2.08 \pm 0.27	1.75 \pm 0.27	1.64 \pm 0.21	1.51 \pm 0.18	1.43 \pm 0.16	1.28 \pm 0.14	1.26 \pm 0.15	1.26 \pm 0.15
400	1.93 \pm 0.23	2.06 \pm 0.31	1.84 \pm 0.27	1.79 \pm 0.26	2.06 \pm 0.29	1.68 \pm 0.26	1.32 \pm 0.18	1.08 \pm 0.16
800	?	?	?	?	?	?	?	?
Hexane extract (mg%)								
0.25	2.89 \pm 0.39	2.95 \pm 0.34	2.83 \pm 0.37	2.87 \pm 0.35	2.68 \pm 0.36	2.63 \pm 0.36	2.73 \pm 0.33	2.61 \pm 0.32
0.50	3.09 \pm 0.32	3.17 \pm 0.33	3.15 \pm 0.34	3.17 \pm 0.35	3.09 \pm 0.35	2.98 \pm 0.32	2.99 \pm 0.33	2.91 \pm 0.31
2.50	2.77 \pm 0.36	2.86 \pm 0.30	2.99 \pm 0.27	3.02 \pm 0.30	3.07 \pm 0.33	3.03 \pm 0.32	2.93 \pm 0.32	2.93 \pm 0.36
5.00	3.14 \pm 0.29	3.37 \pm 0.24	3.60 \pm 0.26	3.65 \pm 0.29	3.79 \pm 0.27	3.91 \pm 0.30	3.77 \pm 0.30	3.60 \pm 0.28
10.0	3.37 \pm 0.36	3.64 \pm 0.38	3.80 \pm 0.43	4.00 \pm 0.50	4.12 \pm 0.57	4.13 \pm 0.59	3.92 \pm 0.54	3.79 \pm 0.58
20.0	?	?	?	?	?	?	?	?
Dichloromethane extract (mg%)								
0.25	2.24 \pm 0.30	2.17 \pm 0.30	2.17 \pm 0.31	2.16 \pm 0.28	2.19 \pm 0.23	2.26 \pm 0.25	2.16 \pm 0.23	2.23 \pm 0.25
0.50	1.95 \pm 0.29	1.91 \pm 0.25	1.98 \pm 0.27	2.01 \pm 0.28	2.02 \pm 0.30	2.19 \pm 0.26	2.21 \pm 0.22	2.22 \pm 0.23
2.50	2.24 \pm 0.36	2.68 \pm 0.34	3.03 \pm 0.37	3.34 \pm 0.35	3.52 \pm 0.37	3.74 \pm 0.35	3.64 \pm 0.41	3.74 \pm 0.37
5.00	2.46 \pm 0.32	3.59 \pm 0.44	4.06 \pm 0.42	4.65 \pm 0.44	4.98 \pm 0.48	5.27 \pm 0.62	5.32 \pm 0.65	5.15 \pm 0.68
10.0	?	?	?	?	?	?	?	?
20.0	?	?	?	?	?	?	?	?
Methanol extract (mg%)								
0.25	3.36 \pm 0.53	3.37 \pm 0.57	3.41 \pm 0.61	3.41 \pm 0.63	3.31 \pm 0.66	3.21 \pm 0.62	3.26 \pm 0.61	3.25 \pm 0.56
0.50	3.06 \pm 0.59	3.05 \pm 0.55	3.10 \pm 0.56	3.14 \pm 0.58	3.01 \pm 0.59	2.99 \pm 0.64	3.06 \pm 0.60	3.07 \pm 0.62
2.50	4.24 \pm 0.44	4.30 \pm 0.45	4.41 \pm 0.45	4.39 \pm 0.45	4.55 \pm 0.46	4.75 \pm 0.43	4.66 \pm 0.38	4.71 \pm 0.40
5.00	3.70 \pm 0.39	3.85 \pm 0.45	3.93 \pm 0.43	4.01 \pm 0.41	4.15 \pm 0.41	4.39 \pm 0.35	4.63 \pm 0.34	4.69 \pm 0.28
10.0	3.11 \pm 0.58	3.60 \pm 0.53	4.02 \pm 0.50	4.49 \pm 0.51	4.49 \pm 0.42	5.33 \pm 0.53	7.04 \pm 0.34 *	6.56 \pm 0.39 *
20.0	?	?	?	?	?	?	?	?
Sildenafil citrate (mg%)								
0.25	3.50 \pm 0.30	3.48 \pm 0.31	3.48 \pm 0.31	3.47 \pm 0.30	3.39 \pm 0.34	3.33 \pm 0.29	3.39 \pm 0.30	3.33 \pm 0.28
0.50	3.38 \pm 0.30	3.32 \pm 0.30	3.35 \pm 0.28	3.35 \pm 0.28	3.27 \pm 0.31	3.29 \pm 0.30	3.14 \pm 0.28	3.19 \pm 0.28
2.50	3.57 \pm 0.25	3.58 \pm 0.25	3.62 \pm 0.24	3.68 \pm 0.24	3.65 \pm 0.24	3.76 \pm 0.27	3.73 \pm 0.27	3.72 \pm 0.28
5.00	3.29 \pm 0.27	3.37 \pm 0.30	3.50 \pm 0.30	3.58 \pm 0.31	3.70 \pm 0.33	3.66 \pm 0.32	3.72 \pm 0.38	3.73 \pm 0.35
10.0	3.19 \pm 0.24	3.37 \pm 0.23	3.58 \pm 0.26	3.63 \pm 0.27	3.70 \pm 0.30	3.72 \pm 0.25	3.77 \pm 0.24	3.81 \pm 0.27
20.0	3.53 \pm 0.25	3.69 \pm 0.20	4.03 \pm 0.26	4.25 \pm 0.31	4.18 \pm 0.31	4.13 \pm 0.30	4.15 \pm 0.30	4.15 \pm 0.37

ข้อมูลแสดงค่า mean \pm S.E.M. * คือ $p < 0.05$ (one way ANOVA) เทียบกับค่า control ? คือหัวใจหยุดเต้น

ตารางที่ 3.2 ค่าอัตราการหดตัวของหัวใจห้องบนที่ตัดแยกจากตัวของหนูแร้ที่ได้รับ Tyrode's solution, 50% ethanol, 100% ethanol, สารสกัดจากกระชายดำด้วย hexane, สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane, สารสกัดจากกระชายดำด้วย methanol และ sildenafil citrate ขนาดต่างๆ

Substances and drug	Force of contraction (g)							
	control	1 min	2 min	3 min	5 min	10 min	15 min	20 min
Tyrode's solution (μl)								
10	289 \pm 19	287 \pm 19	286 \pm 19	286 \pm 19	283 \pm 19	283 \pm 20	279 \pm 19	280 \pm 20
20	280 \pm 20	277 \pm 19	277 \pm 19	278 \pm 19	279 \pm 20	276 \pm 21	279 \pm 20	275 \pm 21
100	277 \pm 21	277 \pm 21	280 \pm 20	278 \pm 21	278 \pm 21	276 \pm 21	276 \pm 20	276 \pm 20
200	279 \pm 19	277 \pm 20	278 \pm 20	278 \pm 20	277 \pm 20	277 \pm 20	273 \pm 21	274 \pm 20
400	279 \pm 19	281 \pm 18	278 \pm 18	280 \pm 17	279 \pm 18	276 \pm 18	283 \pm 18	279 \pm 17
800	284 \pm 17	278 \pm 19	281 \pm 18	279 \pm 18	276 \pm 18	281 \pm 17	278 \pm 18	277 \pm 21
50% ethanol (μl)								
10	274 \pm 10	271 \pm 9	269 \pm 7	268 \pm 7	269 \pm 7	268 \pm 7	268 \pm 7	268 \pm 6
20	269 \pm 4	268 \pm 4	267 \pm 4	267 \pm 4	267 \pm 4	269 \pm 5	268 \pm 4	271 \pm 5
100	272 \pm 5	271 \pm 7	268 \pm 6	269 \pm 6	273 \pm 5	276 \pm 5	276 \pm 5	277 \pm 5
200	266 \pm 6	268 \pm 5	271 \pm 5	273 \pm 5	277 \pm 7	270 \pm 7	280 \pm 5	283 \pm 6
400	276 \pm 6	264 \pm 9	273 \pm 7	283 \pm 8	288 \pm 8	293 \pm 5	288 \pm 6	288 \pm 5
800	279 \pm 7	253 \pm 9	268 \pm 8	281 \pm 5	288 \pm 5	279 \pm 4	272 \pm 6	270 \pm 6
100% ethanol (μl)								
10	252 \pm 6	250 \pm 6	250 \pm 6	250 \pm 6	253 \pm 5	253 \pm 4	251 \pm 4	252 \pm 4
20	253 \pm 4	251 \pm 4	253 \pm 5	253 \pm 5	253 \pm 4	253 \pm 4	254 \pm 4	256 \pm 4
100	254 \pm 4	260 \pm 5	263 \pm 4	265 \pm 2	268 \pm 3	266 \pm 3	263 \pm 4	262 \pm 4
200	257 \pm 2	255 \pm 3	266 \pm 2	270 \pm 2 *	275 \pm 3 *	274 \pm 4 *	272 \pm 5 *	272 \pm 4 *
400	258 \pm 3	233 \pm 16	258 \pm 11	276 \pm 5	275 \pm 15	284 \pm 7	273 \pm 7	260 \pm 3
800	?	?	?	?	?	?	?	?
Hexane extract (mg%)								
0.25	289 \pm 7	286 \pm 6	287 \pm 6	288 \pm 7	288 \pm 6	289 \pm 9	285 \pm 8	285 \pm 9
0.50	284 \pm 5	282 \pm 6	284 \pm 5	284 \pm 6	281 \pm 5	284 \pm 5	280 \pm 5	281 \pm 4
2.50	291 \pm 8	272 \pm 6	271 \pm 10	268 \pm 11	271 \pm 13	273 \pm 14	273 \pm 11	272 \pm 13
5.00	273 \pm 9	252 \pm 12	250 \pm 12	247 \pm 13	242 \pm 13	238 \pm 14	244 \pm 15	248 \pm 14
10.0	263 \pm 12	232 \pm 10	233 \pm 9	238 \pm 9	235 \pm 9	228 \pm 10	224 \pm 11	225 \pm 11
20.0	?	?	?	?	?	?	?	?
Dichloromethane extract (mg%)								
0.25	284 \pm 13	278 \pm 13	281 \pm 13	281 \pm 12	283 \pm 11	279 \pm 11	279 \pm 10	275 \pm 10
0.50	279 \pm 9	275 \pm 9	278 \pm 9	281 \pm 10	278 \pm 9	274 \pm 9	269 \pm 8	269 \pm 7
2.50	264 \pm 10	244 \pm 6	247 \pm 6	246 \pm 8	236 \pm 8	233 \pm 7	229 \pm 7	229 \pm 8
5.00	236 \pm 4	201 \pm 8	201 \pm 9	203 \pm 9	199 \pm 8	188 \pm 8 *	179 \pm 10 *	179 \pm 12 *
10.0	?	?	?	?	?	?	?	?
20.0	?	?	?	?	?	?	?	?
Methanol extract (mg%)								
0.25	303 \pm 18	302 \pm 19	299 \pm 18	300 \pm 19	300 \pm 18	302 \pm 18	300 \pm 20	300 \pm 18
0.50	298 \pm 15	300 \pm 16	297 \pm 15	298 \pm 15	303 \pm 15	299 \pm 16	302 \pm 14	298 \pm 16
2.50	257 \pm 7	255 \pm 2	258 \pm 3	258 \pm 3	247 \pm 6	238 \pm 7	237 \pm 7	235 \pm 7
5.00	261 \pm 4	232 \pm 8	234 \pm 9	238 \pm 9	238 \pm 8	238 \pm 7	232 \pm 7	234 \pm 7
10.0	299 \pm 11	262 \pm 13	256 \pm 17	251 \pm 19	253 \pm 19	238 \pm 10	197 \pm 16 *	172 \pm 20 *
20.0	?	?	?	?	?	?	?	?
Sildenafil citrate (mg%)								
0.25	278 \pm 8	278 \pm 8	283 \pm 8	284 \pm 9	288 \pm 8	291 \pm 7	292 \pm 7	291 \pm 7
0.50	286 \pm 7	283 \pm 7	284 \pm 7	286 \pm 8	288 \pm 7	291 \pm 7	290 \pm 6	289 \pm 7
2.50	288 \pm 8	281 \pm 10	286 \pm 11	287 \pm 11	288 \pm 12	289 \pm 12	290 \pm 12	291 \pm 13
5.00	282 \pm 5	263 \pm 5	265 \pm 5	265 \pm 5	267 \pm 5	270 \pm 5	275 \pm 5	275 \pm 4
10.0	285 \pm 4	254 \pm 6 *	258 \pm 5 *	262 \pm 5	267 \pm 5	271 \pm 5	272 \pm 5	271 \pm 5
20.0	284 \pm 4	240 \pm 9 *	242 \pm 9 *	247 \pm 8 *	257 \pm 8	261 \pm 6	266 \pm 5	264 \pm 4

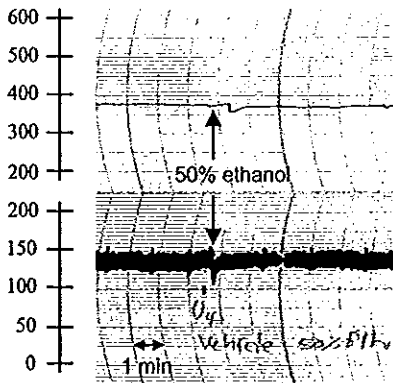
ข้อมูลแสดงค่า mean \pm S.E.M. * คือ $p < 0.05$ (one way ANOVA) เทียบกับค่า control ? คือหัวใจหยุดเต้น

ตอนที่ 2 ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ต่อความดันเลือดและการทำงานของไตในหนูแร้ท

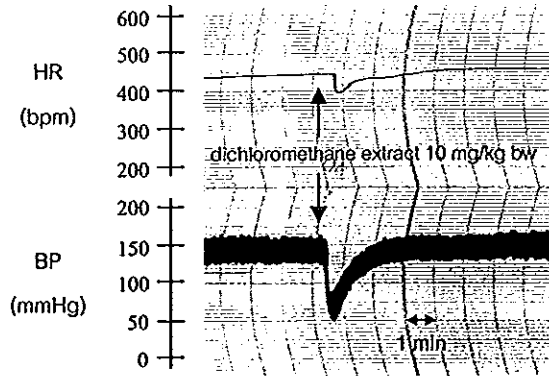
2.1 Vehicle control experiment

การทดลองในหนูกลุ่มนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ 50% ethanol ต่อความดันเลือดและการทำงานของไต ผลการทดลองตามที่แสดงในภาคผนวก ซึ่งแสดงค่า mean arterial blood pressure (MABP), heart rate (HR), hematocrit (Hct), plasma inulin and PAH concentration (P_{in} and P_{PAH}), glomerular filtration rate (GFR), renal plasma flow (RPF), filtration fraction (FF), urine flow rate (\dot{V}), plasma sodium and potassium concentration (P_{Na} and P_K), sodium and potassium excretion rate ($U_{Na} \dot{V}$ and $U_K \dot{V}$), fractional sodium and potassium extraction (FE_{Na} and FE_K), plasma lithium concentration (P_L), lithium clearance (C_L), fractional lithium extraction (FE_L), fractional proximal sodium reabsorption (FPR_{Na}), fractional distal reabsorption of sodium (FDR_{Na}), body weight (bw), kidney index ($2kw/bw$), ของหนูกลุ่ม vehicle (50% ethanol), $kw =$ kidney weight พบว่าค่าเฉลี่ยของทุกค่าดังกล่าวใน 3 ช่วงเวลาการทดลอง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่า MABP และ HR นั้นจะศึกษาผลเฉพาะเวลา 5-60 และ 60-120 นาที ส่วนค่าอื่น ๆ นั้น จะศึกษาผลที่เวลา 0-60 และ 60-120 นาที

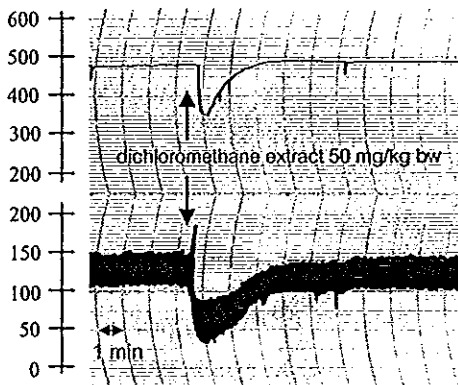
รูปที่ 3.11 เส้นบันทึกของความดันเลือด (BP) และอัตราการเต้นของหัวใจ (HR) ขณะฉีด vehicle (50% ethanol) (a), สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane 10 (b), 50 (c) และ 100 mg/kg bw (d) และ sildenafil citrate 10 mg/kg bw (e)



(a) Vehicle (50% ethanol)

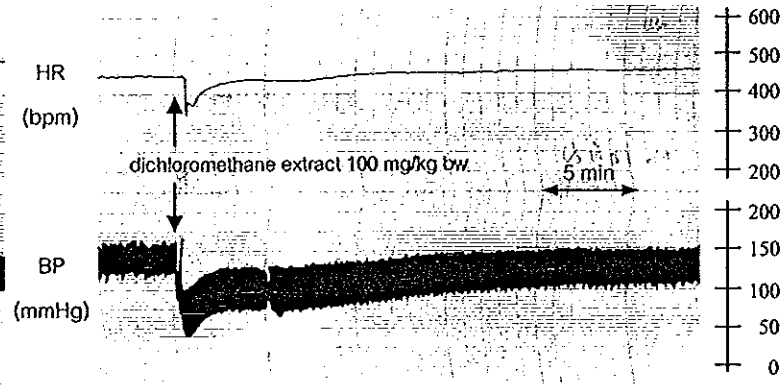


(b) สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane 10 mg/kg bw

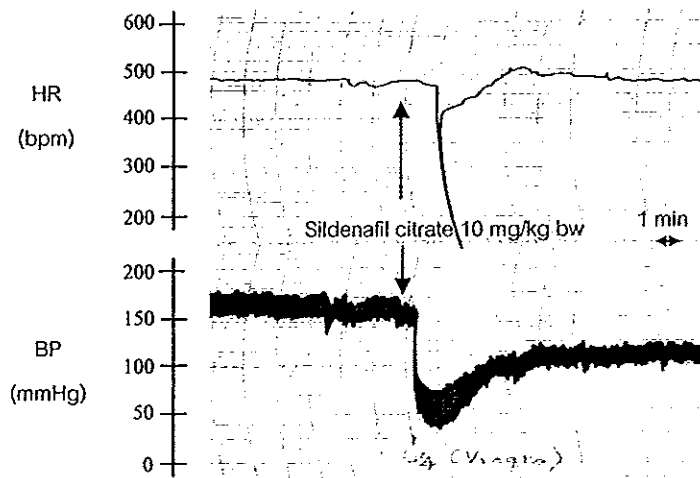


(c) สารสกัดจากกระชายดำด้วย

dichloromethane 50 mg/kg bw



(d) สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane 100 mg/kg bw



(e) Sildenafil citrate 10 mg/kg

ตารางที่ 3.3 Acute effect ของ 50% ethanol, สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ sildenafil citrate ต่อ mean arterial blood pressure และอัตราการหดตัวของหัวใจ

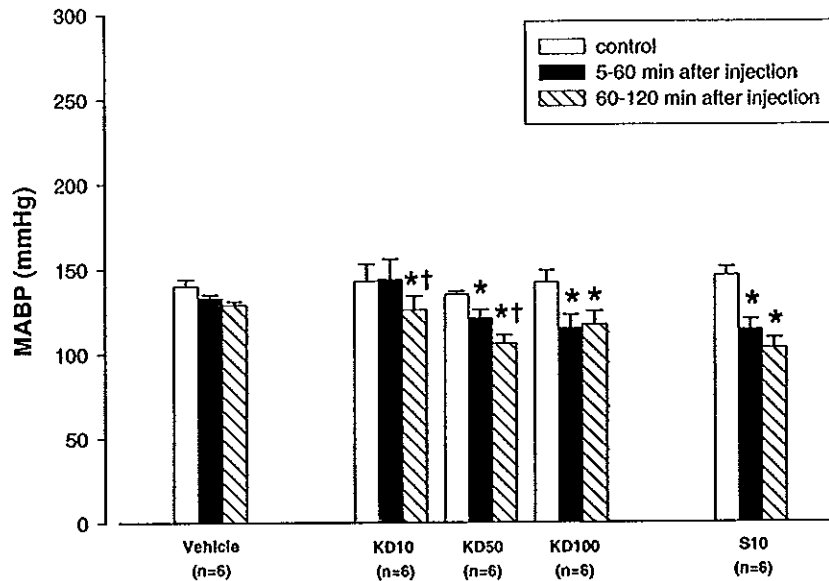
Substance (mg/kg bw)	MABP (mmHg)		Heart rate (beat/min)	
	5 นาที ก่อน ฉีดสาร	หลังฉีดสาร	5 นาที ก่อน ฉีดสาร	หลังฉีดสาร
50% ethanol	140 ± 4	102 ± 4 *	427 ± 16	364 ± 14 *
<i>K. parviflora</i> dichloromethane extract				
10 mg/kg	143 ± 10	67 ± 3 *	465 ± 21	359 ± 24 *
50 mg/kg	135 ± 2	57 ± 3 *	452 ± 10	345 ± 14 *
100 mg/kg	142 ± 7	61 ± 3 *	460 ± 5	362 ± 8 *
Sildenafil citrate				
10 mg/kg	146 ± 5	54 ± 2 *	468 ± 15	440 ± 39

* P < 0.05 compared with control period (paired *t*-test)

ผล acute effect ต่อ mean arterial blood pressure ของ 50% ethanol, สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ sildenafil citrate พบว่าหลังฉีดสาร 50% ethanol สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ทุกขนาดทำให้ mean arterial blood pressure และอัตราการหดตัวของหัวใจลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ 5 นาที ก่อนฉีดสาร ดังตารางที่ 3.4 ขณะที่ sildenafil citrate 10 mg/kg ทำให้ mean arterial blood pressure ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ 5 นาที ก่อนฉีดสาร แต่ไม่ทำให้อัตราการหดตัวของหัวใจลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ 5 นาที ก่อนฉีดสาร

ตารางที่ 3.4 ปริมาณ Na⁺ และ K⁺ ในสารสกัดจากกระชายดำ

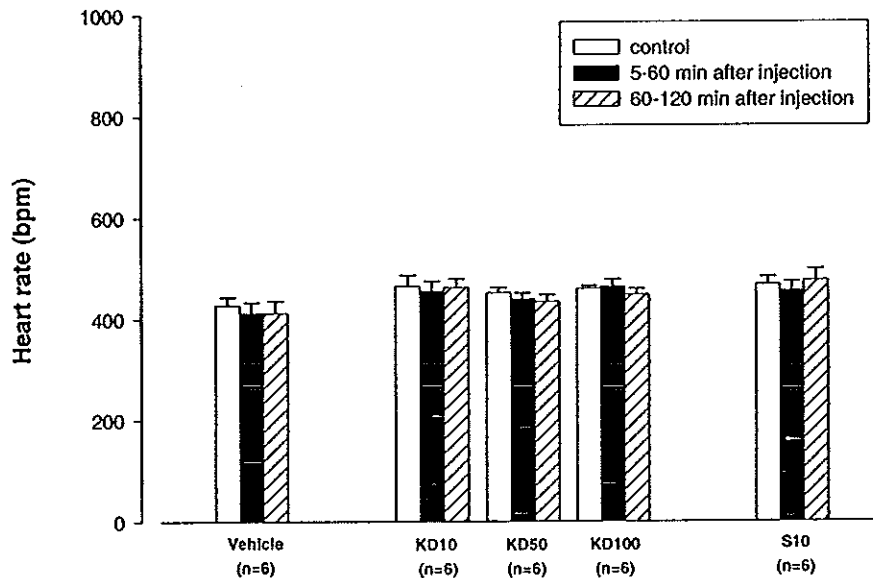
สารสกัดจากกระชายดำ	Na ⁺ (mEq/mg)	K ⁺ (mEq/mg)
hexane extract	ต่ำมาก	1.87
dichloromethane extract	51.66	0.42
Methanol extract	0.83	2.97



รูปที่ 3.12 mean arterial pressure (MABP) ของหนูกุ่ม vehicle และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane (ขนาด 10, 50 และ 100 mg/kg bw; KD10, KD50 และ KD100) และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate 10 mg/kg bw (S10) ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. *, † P < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control และเวลา 5-60 นาทีหลังฉีดสาร ตามลำดับ (One Way Repeated Measures Analysis of Variance using Student-Newman-Keuls post hoc test)

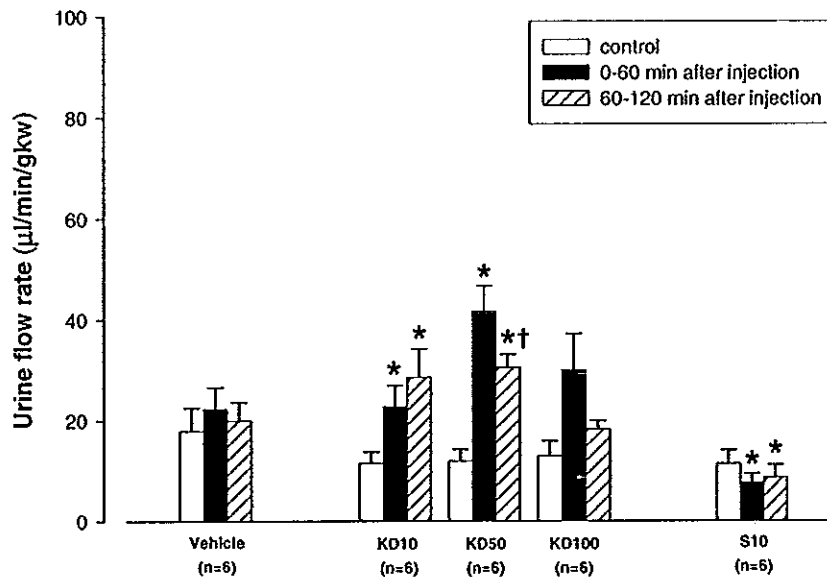
2.2 ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ sildenafil citrate ต่อ MABP ดังรูปที่ 3.12 และตารางที่ 3.7-3.10 พบว่าหลังฉีดสารช่วง 60-120 นาที สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 10 mg/kg bw ทำให้ค่า MABP ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control และหลังฉีดสาร 5-60 นาที คือลดลงเป็น 126 ± 8 จาก 143 ± 10 และ 144 ± 12 mmHg ตามลำดับและพบว่าผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 50 mg/kg bw ทำให้ค่า MABP หลังฉีดสารเป็นเวลา 5-60 นาที ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control คือลดลงจาก 135 ± 2 เป็น 121 ± 5 mmHg และพบว่าผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 50 mg/kg bw ทำให้ค่า MABP หลังฉีดสารเป็นเวลา 60-120 นาที ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control และช่วงหลังฉีดสารเป็นเวลา 5-60 นาที คือลดลงเป็น 106 ± 5 จาก 135 ± 2 และ 121 ± 5 mmHg ตามลำดับ ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 100 mg/kg bw ทำให้ค่า MABP หลังฉีดสารเป็นเวลา 5-60 นาที และ 60-120 นาที ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control คือลดลงจาก 142 ± 7 เป็น 115 ± 8 และ 117 ± 8 mmHg ตามลำดับ ส่วนผลของ sildenafil citrate ขนาด 10 mg/kg bw ทำให้ค่า MABP หลังฉีดสารเป็นเวลา 5-60 นาที

และ 60-120 นาที ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control คือลดลงจาก 146 ± 5 เป็น 114 ± 6 และ 103 ± 6 mmHg ตามลำดับ



รูปที่ 3.13 heart rate ของหนูกลุ่ม vehicle และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane (ขนาด 10, 50 และ 100 mg/kg bw; KD10, KD50 และ KD100) และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate 10 mg/kg bw (S10) ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M.

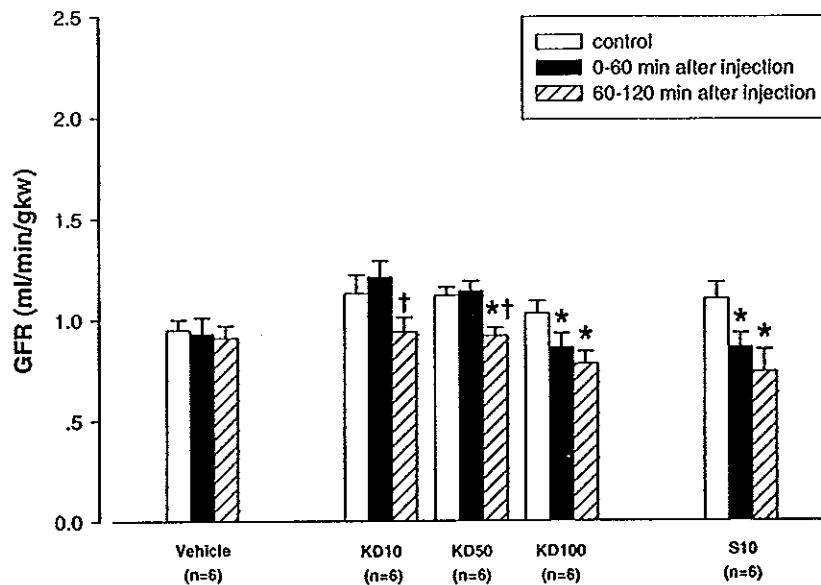
2.3 ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ sildenafil citrate ต่อ HR ดังที่แสดงในรูปที่ 3.13 และตารางที่ 3.7-3.10 พบว่าผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 10, 50 และ 100 mg/kg bw และ sildenafil citrate 10 mg/kg bw ในทั้ง 2 ช่วงเวลาหลังฉีดสารไม่ทำให้ค่า HR แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control และผลในทั้ง 2 ช่วงเวลา หลังฉีดสารก็ไม่แตกต่างกัน



รูปที่ 3.14 urine flow rate (\dot{v}) ของหมู่กลุ่ม vehicle และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane (ขนาด 10, 50 และ 100 mg/kg bw; KD10, KD50 และ KD100) และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate 10 mg/kg bw (S10) ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. *, † $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control และเวลา 0-60 นาทีหลังฉีดสาร ตามลำดับ (One Way Repeated Measures Analysis of Variance using Student- Newman-Keuls post hoc test)

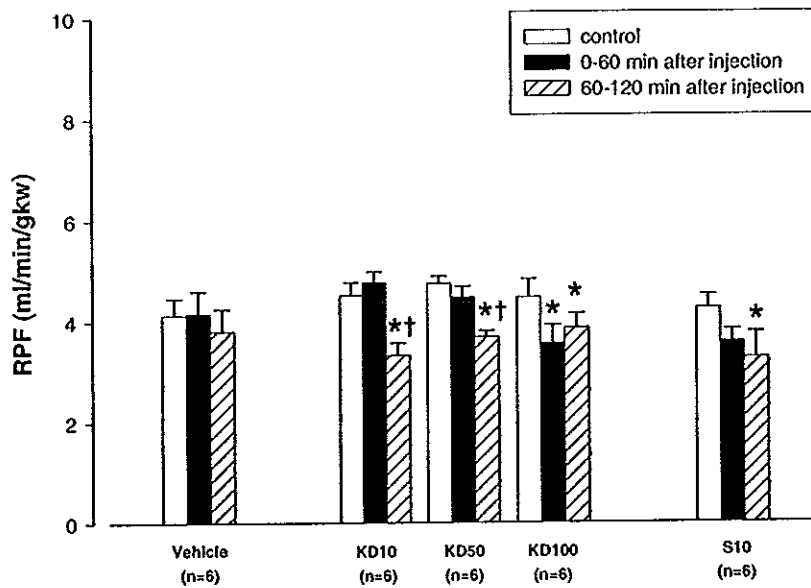
2.4 ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ sildenafil

citrate ต่อ urine flow rate (\dot{v}) ดังที่แสดงในรูปที่ 3.14 และตารางที่ 3.7-3.10 พบว่าผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 10 mg/kg bw ทำให้ค่า \dot{v} หลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที และ 60-120 นาที เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control คือเพิ่มขึ้นจาก 11.5 ± 2.3 เป็น 22.7 ± 4.2 และ 28.6 ± 5.6 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g kw}$ ตามลำดับ และพบว่าผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 50 mg/kg bw ทำให้ค่า \dot{v} หลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control คือเพิ่มขึ้นจาก 11.9 ± 2.3 เป็น 41.7 ± 5.1 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g kw}$ และผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 50 mg/kg bw ทำให้ค่า \dot{v} หลังฉีดสารเป็นเวลา 60-120 นาที เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control และช่วงหลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที คือเพิ่มขึ้นเป็น 30.5 ± 2.5 จาก 11.9 ± 2.3 และ 41.7 ± 5.1 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g kw}$ ตามลำดับ ส่วนผลของ sildenafil citrate นั้นพบว่า sildenafil citrate ขนาด 10 mg/kg bw ทำให้ค่า \dot{v} หลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที และ 60-120 นาที ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control คือลดลงจาก 11.4 ± 2.6 เป็น 7.6 ± 1.7 และ 8.6 ± 2.5 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g kw}$ ตามลำดับ



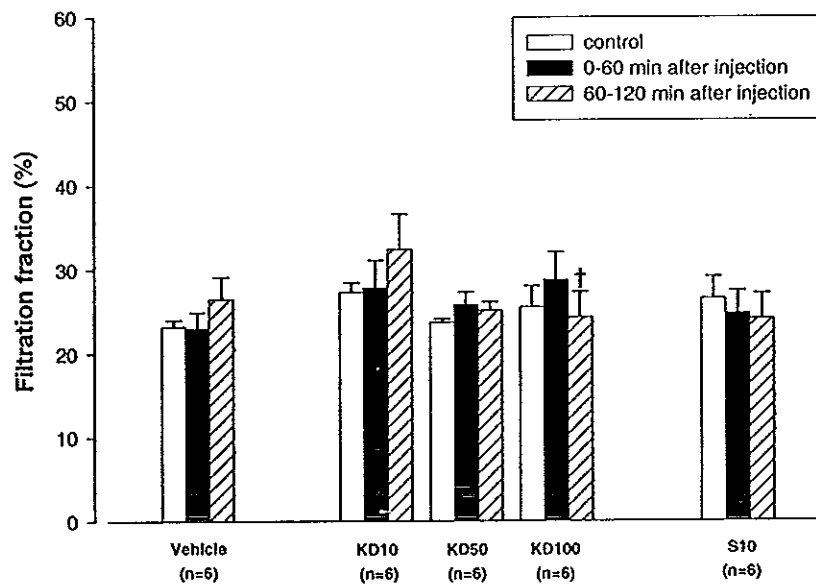
รูปที่ 3.15 glomerular filtration rate (GFR) ของหนูกลุ่ม vehicle และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane (ขนาด 10, 50 และ 100 mg/kg bw; KD10, KD50 และ KD100) และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate 10 mg/kg bw (S10) ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. *, † P<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control และเวลา 0-60 นาทีหลังฉีดสาร ตามลำดับ (One Way Repeated Measures Analysis of Variance using Student-Newman-Keuls post hoc test)

2.5 ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ sildenafil citrate ต่อ GFR ดังที่แสดงในรูปที่ 3.15 และตารางที่ 3.7-3.10 พบว่าผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 10 mg/kg bw ทำให้ค่า GFR หลังฉีดสารเป็นเวลา 60-120 นาที ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับระยะ 0-60 นาทีหลังฉีดสาร คือลดลงจาก 1.21 ± 0.08 เป็น 0.94 ± 0.07 ml/min/g kw และผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 50 mg/kg bw ทำให้ค่า GFR หลังฉีดสารเป็นเวลา 60-120 นาที ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control และช่วงหลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที คือลดลงเป็น 0.92 ± 0.04 จาก 1.12 ± 0.04 และ 1.14 ± 0.05 ml/min/g kw ตามลำดับ ส่วนผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 100 mg/kg bw ทำให้ค่า GFR หลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาทีและ 60-120 นาที ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control คือลดลงจาก 1.03 ± 0.06 เป็น 0.86 ± 0.07 และ 0.78 ± 0.06 ml/min/g kw ตามลำดับ ขณะที่ sildenafil citrate ขนาด 10 mg/kg kw ทำให้ค่า GFR หลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที และ 60-120 นาที ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control คือลดลงจาก 1.10 ± 0.08 เป็น 0.86 ± 0.07 และ 0.74 ± 0.11 ml/min/g kw ตามลำดับ



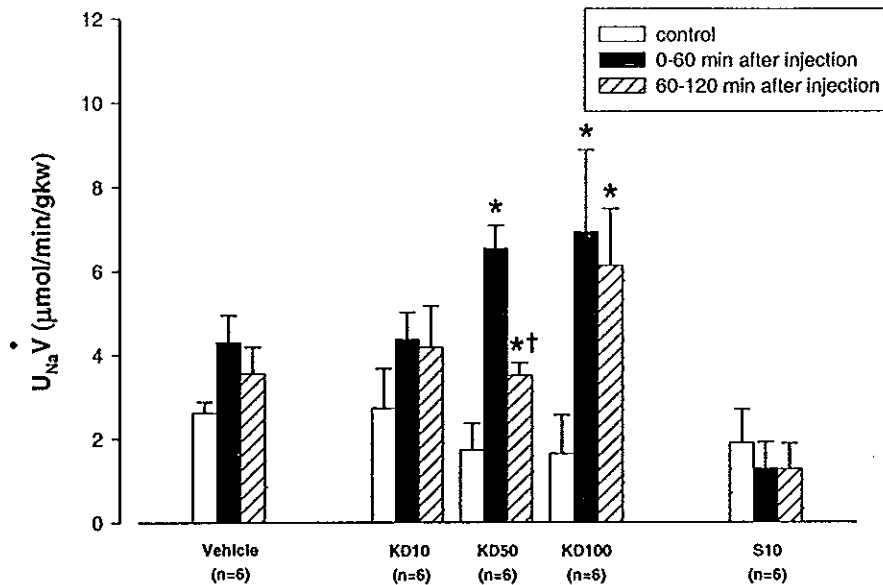
รูปที่ 3.16 renal plasma flow (RPF) ของหนูกลุ่ม vehicle กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane (ขนาด 10, 50 และ 100 mg/kg bw; KD10, KD50 และ KD100) และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate 10 mg/kg bw (S10) ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. *, † P<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control และเวลา 0-60 นาทีหลังฉีดสาร ตามลำดับ (One Way Repeated Measures Analysis of Variance using Student Newman-Keuls post hoc test)

2.6 ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ sildenafil citrate ต่อ RPF ดังรูปที่ 3.16 และตารางที่ 3.7-3.10 พบว่าผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 10 mg/kg bw ทำให้ค่า RPF หลังฉีดสารเป็นเวลา 60-120 นาที ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control และช่วงหลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที คือ ลดลงเป็น 3.33 ± 0.24 จาก 4.52 ± 0.25 และ 4.77 ± 0.21 ml/min/g kw ตามลำดับ และผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 50 mg/kg bw ทำให้ค่า RPF หลังฉีดสารเป็นเวลา 60-120 นาที คือ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control และช่วงหลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที คือ ลดลงเป็น 3.69 ± 0.12 จาก 4.75 ± 0.14 และ 4.48 ± 0.21 ml/min/g kw ตามลำดับ ส่วนผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 100 mg/kg bw ทำให้ค่า RPF หลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที และ 60-120 นาที ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control คือ ลดลงจาก 4.47 ± 0.36 เป็น 3.56 ± 0.36 และ 3.87 ± 0.28 ml/min/g kw ตามลำดับ ส่วน sildenafil citrate ขนาด 10 mg/kg bw ค่า RPF หลังจากฉีดสารเป็นเวลา 60-120 นาที ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control คือ ลดลงจาก 4.25 ± 0.27 เป็น 3.27 ± 0.51 ml/min/g kw



รูปที่ 3.17 filtration fraction (FF) ของหนูกลุ่ม vehicle กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane (ขนาด 10, 50 และ 100 mg/kg bw; KD10, KD50 และ KD100) และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate 10 mg/kg/ bw (S10) ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. † $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างช่วงเวลา 0-60 นาทีหลังฉีดสาร (One Way Repeated Measures Analysis of Variance using Student-Newman-Keuls post hoc test)

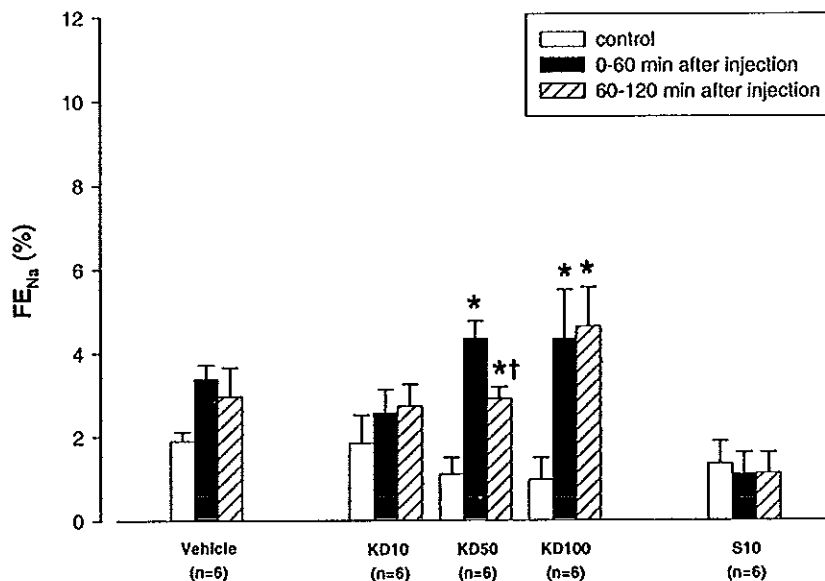
2.7 ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ sildenafil citrate ต่อ FF ดังรูปที่ 3.17 และตารางที่ 3.7-3.10 พบว่าสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 10 และ 50 mg/kg bw และ sildenafil citrate 10 mg/kg bw ไม่ทำให้ค่า FF ในทั้ง 3 ช่วงเวลาการทดลองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 100 mg/kg bw ทำให้ค่า FF หลังฉีดสารเป็นเวลา 60-120 นาที ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับระยะเวลาหลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที คือลดลงจาก 28.7 ± 3.3 เป็น $24.3 \pm 3.0\%$



รูปที่ 3.18 urinary excretion of sodium ($U_{Na} \dot{V}$) ของหนูกลุ่ม vehicle กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane (ขนาด 10,50 และ 100mg/kg bw; KD10, KD50 และ KD100) และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate 10 mg/kg bw (S10) ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. *, † $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control และเวลา 0-60 นาทีหลังฉีดสาร ตามลำดับ (One Way Repeated Measures Analysis of Variance using Student-Newman-Keuls post hoc test)

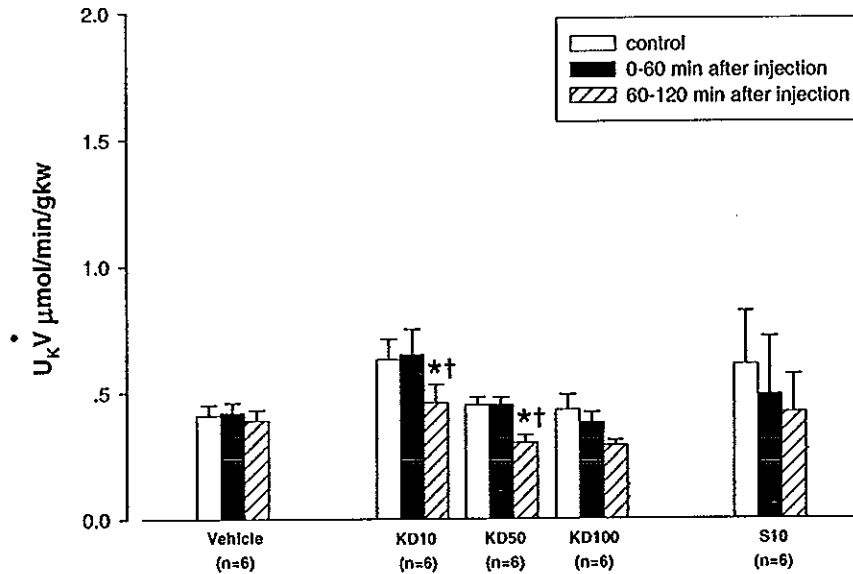
2.8 ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ sildenafil

citrate ต่อ sodium excretion rate ($U_{Na} \dot{V}$) ดังรูปที่ 3.18 และตารางที่ 3.7-3.10 พบว่าสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 10 mg/kg bw และ sildenafil citrate ขนาด 10 mg/kg bw นั้นไม่ทำให้ค่า $U_{Na} \dot{V}$ ในทั้ง 3 ช่วงเวลาการทดลองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 50 mg/kg bw ทำให้ค่า $U_{Na} \dot{V}$ หลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control คือเพิ่มขึ้นจาก 1.73 ± 0.63 เป็น 6.53 ± 0.54 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g kw}$ และพบว่าผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 50 mg/kg bw ทำให้ค่า $U_{Na} \dot{V}$ หลังฉีดสารเป็นเวลา 60-120 นาที เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control และหลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที คือเพิ่มขึ้นจาก 1.73 ± 0.63 เป็น 3.51 ± 0.30 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g kw}$ และลดลงจาก 6.53 ± 0.54 เป็น 3.51 ± 0.30 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g kw}$ ตามลำดับและพบว่าผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 100 mg/kg bw ทำให้ค่า $U_{Na} \dot{V}$ หลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาทีและ 60-120 นาที เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control คือเพิ่มขึ้นจาก 1.64 ± 0.92 เป็น 6.92 ± 1.94 และ 6.13 ± 1.34 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g kw}$ ตามลำดับ



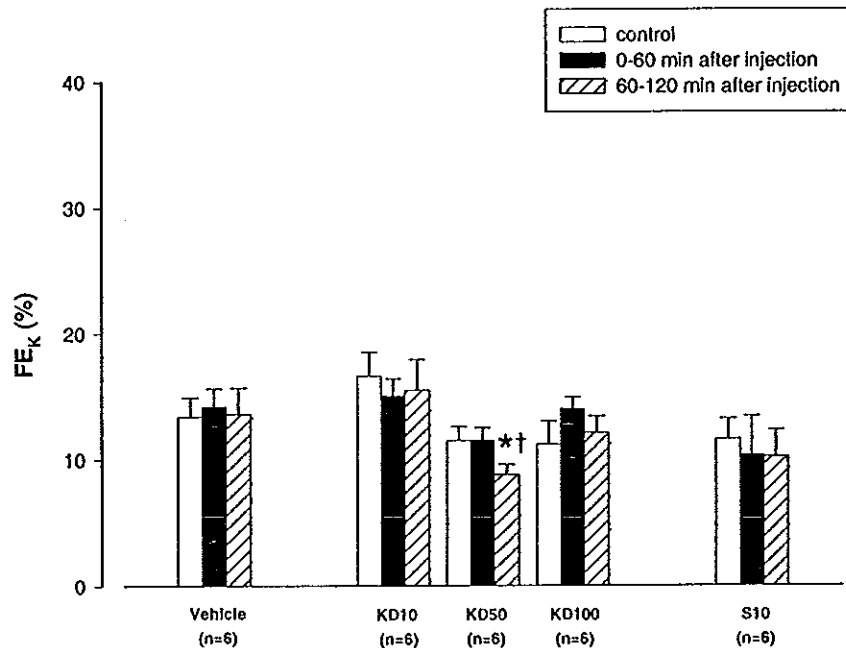
รูปที่ 3.19 fractional sodium excretion (FE_{Na}) ของหนูกลุ่ม vehicle กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane (ขนาด 10, 50 และ 100 mg/kg bw; KD10, KD50 และ KD100) และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate 10 mg/kg bw (S10) ค่าที่แสดงคือ mean ± S.E.M. *, † P<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control และเวลา 0- 60 นาทีหลังฉีดสาร ตามลำดับ (One Way Repeated Measures Analysis of Variance using Student -Newman-Keuls post hoc test)

2.9 ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ sildenafil citrate ต่อ fractional sodium excretion (FE_{Na}) ดังรูปที่ 3.19 และตารางที่ 3.7-3.10 พบว่าสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 50 mg/kg bw ทำให้ค่า FE_{Na} หลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control คือเพิ่มขึ้นจาก 1.11 ± 0.39 เป็น 4.35 ± 0.41 % และทำให้ค่า FE_{Na} หลังฉีดสารเป็นเวลา 60-120 นาที เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control และช่วงหลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที คือเพิ่มขึ้นจาก 1.11 ± 0.39 เป็น 2.91 ± 0.27% และลดลงจาก 4.35 ± 0.41 เป็น 2.91 ± 0.27% ตามลำดับ ขณะที่ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 100 mg/kg bw ทำให้ค่า FE_{Na} หลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที และ 60-120 นาที เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control คือเพิ่มขึ้นจาก 0.97 ± 0.52 เป็น 4.34 ± 1.16 และ 4.63 ± 0.93 % ตามลำดับ ส่วน sildenafil citrate 10 mg/kg bw ไม่ทำให้ค่า FE_{Na} ในทั้ง 3 ช่วงเวลาการทดลอง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



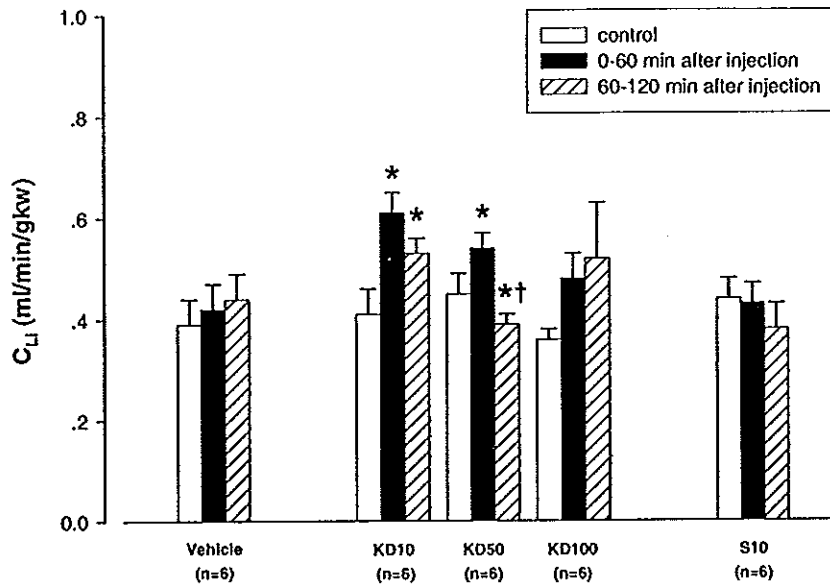
รูปที่ 3.20 urinary excretion of potassium ($U_K \dot{V}$) ของหนูกลุ่ม vehicle กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane (ขนาด 10, 50 และ 100 mg/kg bw; KD10, KD50 และ KD100) และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate 10 mg/kg bw (S10)
ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. *, † $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control และเวลา 0-60 นาทีหลังฉีดสารตามลำดับ (One Way Repeated Measures Analysis of Variance using Student- Newman-Keuls post hoc test)

2.10 ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ sildenafil citrate ต่อ potassium excretion rate ($U_K \dot{V}$) ดังรูปที่ 3.20 และตารางที่ 3.7-3.10 พบว่าผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 10 mg/kg bw ทำให้ค่า $U_K \dot{V}$ หลังฉีดสารเป็นเวลา 60-120 นาที ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control และช่วงหลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที คือลดลงเป็น 0.46 ± 0.07 จาก 0.63 ± 0.08 และ 0.65 ± 0.10 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g kw}$ ตามลำดับ และพบว่าผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 50 mg/kg bw ทำให้ค่า $U_K \dot{V}$ หลังฉีดสารเป็นเวลา 60-120 นาที ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control และช่วงหลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที คือลดลงเป็น 0.30 ± 0.03 จาก 0.45 ± 0.03 และ 0.45 ± 0.03 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g kw}$ ตามลำดับ ส่วน sildenafil citrate 10 mg/kg bw ไม่ทำให้ค่า $U_K \dot{V}$ ในช่วง 3 เวลาการทดลองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



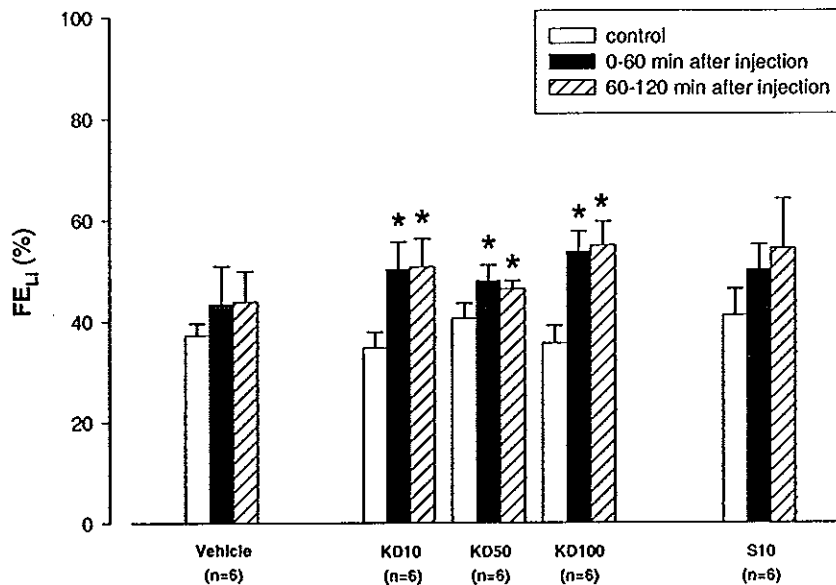
รูปที่ 3.21 fractional potassium excretion (FE_K) ของหนูกลุ่ม vehicle กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane (ขนาด 10, 50 และ 100 mg/kg bw; KD10, KD50 และ KD100) และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate 10 mg/kg bw (S10) ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. *, † $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control และเวลา 0-60 นาทีหลังฉีดสาร ตามลำดับ (One Way Repeated Measures Analysis of Variance using Student Newman-Keuls post hoc test)

2.11 ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ sildenafil citrate ต่อ fractional potassium excretion (FE_K) ดังรูปที่ 3.21 และตารางที่ 3.7-3.10 พบว่าผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 50 mg/kg bw ทำให้ค่า FE_K หลังฉีดสารเป็นเวลา 60-120 นาที ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control และช่วงหลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที คือลดลงเป็น 8.8 ± 0.8 จาก 11.5 ± 1.1 และ 11.5 ± 1.0 % ตามลำดับ ส่วน sildenafil citrate 10 mg/kg bw ไม่ทำให้ค่า FE_K ใน 3 ช่วงเวลาการทดลอง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



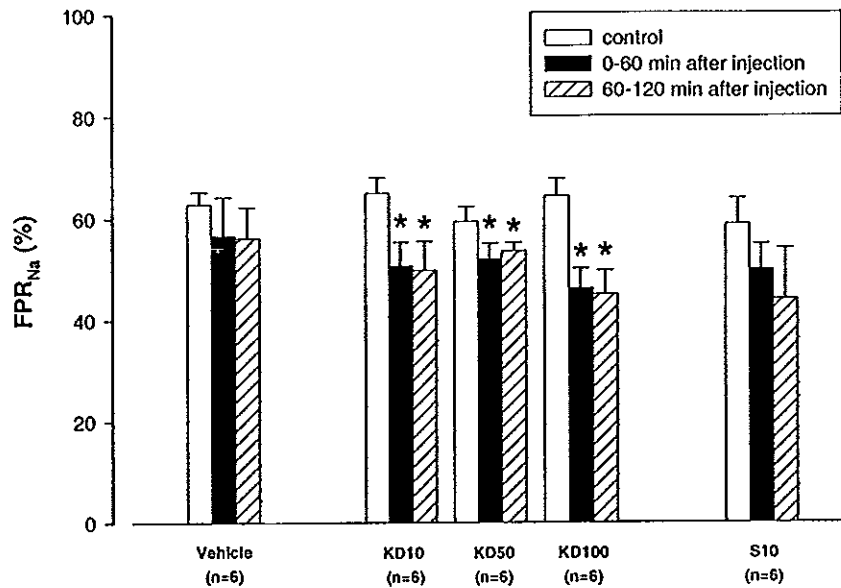
รูปที่ 3.22 lithium clearance (C_{Li}) ของหนูกลุ่ม vehicle กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane (ขนาด 10, 50 และ 100 mg/kg bw; KD10, KD50 และ KD100) และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate 10 mg/kg bw (S10) ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. *, † $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control และเวลา 0-60 นาทีหลังฉีดสารตามลำดับ (One Way Repeated Measures Analysis of Variance using Student-Newman-Keuls post hoc test)

2.12 ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ sildenafil citrate ต่อ C_{Li} ดังที่แสดงในรูปที่ 3.22 และตารางที่ 3.7-3.10 พบว่าสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 10 mg/kg bw หลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที และ 60-120 นาที ทำให้ค่า C_{Li} เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control คือเพิ่มขึ้นจาก 0.41 ± 0.05 เป็น 0.61 ± 0.04 ml/min/g kw และ 0.53 ± 0.03 ml/min/g kw ตามลำดับ สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 50 mg/kg bw หลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที ทำให้ค่า C_{Li} เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control คือเพิ่มขึ้นจาก 0.45 ± 0.04 เป็น 0.54 ± 0.03 ml/min/g kw และพบว่าหลังฉีดสารเป็นเวลา 60-120 นาที ทำให้ค่า C_{Li} ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control และหลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที คือลดลงเป็น 0.39 ± 0.02 จาก 0.45 ± 0.04 และ 0.54 ± 0.03 ml/min/g kw ตามลำดับ ส่วน sildenafil citrate 10 mg/kg bw ไม่ทำให้ค่า C_{Li} ทั้ง 3 ช่วงเวลาการทดลองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



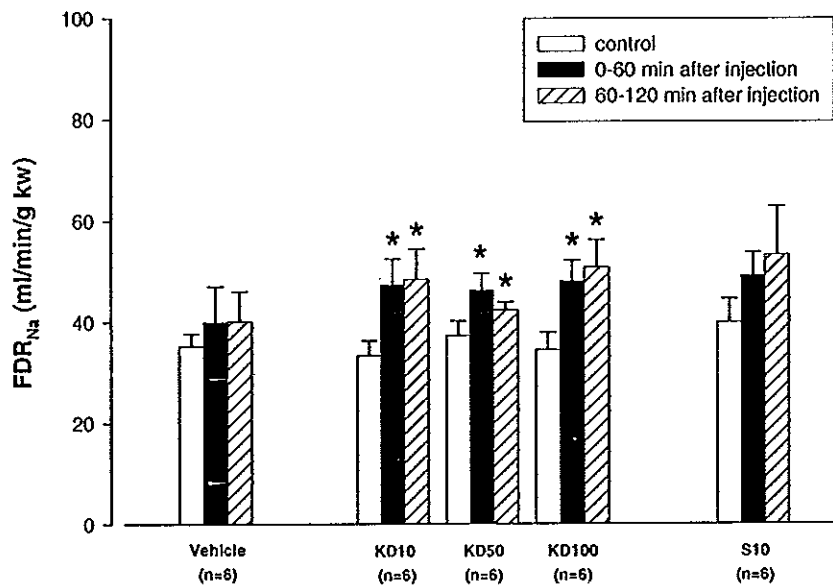
รูปที่ 3.23 fractional lithium excretion (FE_{Li}) ของหนูกลุ่ม vehicle กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane (ขนาด 10, 50 และ 100 mg/kg bw; KD10, KD50 และ KD100) และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate 10 mg/kg bw (S10) ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control (One Way Repeated Measures Analysis of Variance using Student-Newman-Keuls post hoc test)

2.13 ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ sildenafil citrate ต่อ FE_{Li} ดังที่แสดงในรูปที่ 3.23 และตารางที่ 3.7-3.10 พบว่าสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 10 mg/kg bw หลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาทีและ 60-120 นาที ทำให้ค่า FE_{Li} เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control คือเพิ่มขึ้นจาก 34.7 ± 3.1 เป็น $50.3 \pm 5.4\%$ และ $50.8 \pm 5.5\%$ ตามลำดับ และสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 50 mg/kg bw หลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาทีและ 60-120 นาที ทำให้ค่า FE_{Li} เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control คือเพิ่มขึ้นจาก 40.6 ± 2.9 เป็น $48.0 \pm 3.1\%$ และ $46.4 \pm 1.6\%$ ตามลำดับ และพบว่าสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 100 mg/kg bw หลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที และ 60-120 นาที ทำให้ค่า FE_{Li} เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control คือเพิ่มขึ้นจาก 35.6 ± 3.4 เป็น $53.7 \pm 4.0\%$ และ $55.0 \pm 4.7\%$ ตามลำดับ ส่วน sildenafil citrate 10 mg/kg bw ในทั้ง 3 ระยะนั้น ค่า FE_{Li} ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 3.24 fractional proximal sodium reabsorption (FPR_{Na}) ของหนูกลุ่ม vehicle กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane (ขนาด 10, 50 และ 100 mg/kg bw; KD10, KD50 และ KD100) และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate 10 mg/kg bw (S10) ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control (One Way Repeated Measures Analysis of Variance using Student-Newman-Keuls post hoc test)

2.14 ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ sildenafil citrate ต่อ FPR_{Na} ดังที่แสดงในรูปที่ 3.24 และตารางที่ 3.7-3.10 พบว่าสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 10 mg/kg bw หลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที และ 60-120 นาที ทำให้ค่า FPR_{Na} ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control คือลดลงจาก 64.9 ± 3.1 เป็น $50.7 \pm 4.6\%$ และ $49.8 \pm 5.7\%$ ตามลำดับ และสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 50 mg/kg bw หลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที และ 60-120 นาที ทำให้ค่า FPR_{Na} ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control คือลดลงจาก 59.4 ± 2.9 เป็น 52.0 ± 3.1 และ $53.6 \pm 1.6\%$ ตามลำดับ และพบว่าสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 100 mg/kg bw หลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที และ 60-120 นาที ทำให้ค่า FPR_{Na} ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control คือลดลงจาก 64.4 ± 3.4 เป็น $46.2 \pm 3.9\%$ และ $45.0 \pm 4.7\%$ ตามลำดับ ส่วน sildenafil citate 10 mg/kg bw ในทั้ง 3 ระยะนั้น ค่า FPR_{Na} ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 3.25 fractional distal reabsorption of sodium (FDR_{Na}) ของหนูกลุ่ม vehicle กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane (ขนาด 10, 50 และ 100 mg/kg bw; KD10, KD50 และ KD100) และกลุ่มที่ได้รับ sildenafil citrate 10 mg/kg bw (S10) ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M.* $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control หลังฉีดสาร (One Way Repeated Measures Analysis of Variance using Student – Newman – Keuls post hoc test)

2.15 ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ sildenafil citrate ต่อ FDR_{Na} ดังที่แสดงในรูปที่ 3.25 และตารางที่ 3.7-3.10 พบว่าสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 10 mg/kg bw หลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาทีและ 60-120 นาที ทำให้ค่า FDR_{Na} เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control คือเพิ่มขึ้นจาก 33.4 ± 2.9 เป็น 47.3 ± 5.1 % และ 48.4 ± 5.9 % ตามลำดับ และสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 50 mg/kg bw หลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที และ 60-120 นาที ทำให้ค่า FDR_{Na} เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control คือ เพิ่มขึ้นจาก 37.3 ± 2.9 เป็น 46.2 ± 3.4 % และ 42.4 ± 1.5 % ตามลำดับ และพบว่าสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 100 mg/kg bw หลังฉีดสารเป็นเวลา 0-60 นาที และ 60 – 120 นาที ทำให้ค่า FDR_{Na} เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับช่วง control คือเพิ่มขึ้นจาก 34.5 ± 3.4 เป็น 48.0 ± 4.1 % และ 50.8 ± 5.4 % ตามลำดับ ส่วน sildenafil citate 10 mg/kg bw ในทั้ง 3 ระยะนั้น ค่า FDR_{Na} ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 3.5 ค่า mean arterial blood pressure (MABP), heart rate (HR), hematocrit (Hct), plasma inulin and PAH concentration (P_{in} and P_{PAH}), glomerular filtration rate (GFR), renal plasma flow (RPF), filtration fraction (FF), urine flow rate (\dot{V}), plasma sodium and potassium concentration (P_{Na} and P_K), sodium and potassium excretion rate ($U_{Na} \dot{V}$ and $U_K \dot{V}$), fractional sodium and potassium extraction (FE_{Na} and FE_K), plasma lithium concentration (P_L) lithium clearance (C_L), fractional lithium extraction (FE_L), fractional proximal sodium reabsorption (FPR_{Na}), fractional distal reabsorption of sodium (FDR_{Na}), body weight (bw), kidney index (2kw/bw) ของหนูกลุ่ม vehicle (50% ethanol), kw = kidney weight

	Vehicle		
	50% ethanol (n = 6)		
	Control	0-60 min after injection	60-120 min after injection
MABP (mmHg)	140 ± 4	133 ± 2	129 ± 2
HR (bpm)	427 ± 16	412 ± 21	412 ± 23
Hct (%)	46.0 ± 0.7	44.0 ± 1.1	44.0 ± 0.9
P_{in} (mg%)	19.6 ± 1.0	19.2 ± 1.1	19.3 ± 1.3
P_{PAH} (mg%)	7.73 ± 0.73	7.26 ± 0.87	7.71 ± 0.83
GFR (ml/min/g kw)	0.95 ± 0.05	0.93 ± 0.08	0.91 ± 0.06
RPF (ml/min/g kw)	4.13 ± 0.32	4.16 ± 0.44	3.81 ± 0.44
FF (%)	23.2 ± 0.8	23.0 ± 1.9	26.5 ± 2.6
\dot{V} (μ l/min/g kw)	17.9 ± 4.6	22.3 ± 4.3	20.0 ± 3.6
P_{Na} (mmol/l)	137.4 ± 1.7	134.8 ± 2.1	134.3 ± 0.9
$U_{Na} \dot{V}$ (μ mol/min/g kw)	2.62 ± 0.26	4.30 ± 0.65	3.56 ± 0.63
FE_{Na} (%)	1.90 ± 0.22	3.39 ± 0.33	2.97 ± 0.69
P_K (mmol/l)	3.41 ± 0.07	3.42 ± 0.07	3.41 ± 0.12
$U_K \dot{V}$ (μ mol/min/g kw)	0.41 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.39 ± 0.04
FE_K (%)	13.4 ± 1.51	14.2 ± 1.41	13.6 ± 2.07
P_L (mmol/l)	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.31 ± 0.02
C_L (ml/min/g kw)	0.39 ± 0.05	0.42 ± 0.05	0.44 ± 0.05
FE_L (%)	37.3 ± 2.3	43.4 ± 7.5	43.9 ± 6.0
FPR_{Na} (%)	62.8 ± 2.4	56.6 ± 7.6	56.2 ± 6.0
FDR_{Na} (ml/min/g kw)	35.3 ± 2.4	40.0 ± 7.0	40.2 ± 5.8
BW (g)	220.8 ± 13.5		
2KW/BW (g/kg kw)	0.690 ± 0.021		

ข้อมูลแสดงค่า mean ± S.E.M.

ตารางที่ 3.6 ค่า % change and difference of mean arterial blood pressure (MABP), heart rate (HR), hematocrit (Hct), plasma inulin and PAH concentration (P_{in} and P_{PAH}), glomerular filtration rate (GFR), renal plasma flow (RPF), filtration fraction (FF), urine flow rate (\dot{V}), plasma sodium and potassium concentration (P_{Na} and P_K), sodium and potassium excretion rate ($U_{Na}\dot{V}$ and $U_K\dot{V}$), fractional sodium and potassium excretion (FE_{Na} and FE_K), plasma lithium concentration (P_U) lithium clearance (C_U), fractional lithium excretion (FE_U), fractional proximal sodium reabsorption (FPR_{Na}), fractional distal reabsorption of sodium (FDR_{Na}), body weight (bw), kidney index (2kw/bw) ของหนู กลุ่ม vehicle (50% ethanol), kw = kidney weight

	Vehicle		
	50% ethanol (n = 6)		
	Control	0-60 min after injection	60-120 min after injection
MABP (mmHg)	0	-7 ± 5	-11 ± 5
HR (bpm)	0	-15 ± 8	-15 ± 9
Hct (%)	0	-2.0 ± 1.4	-1.3 ± 1.0
P_{in} (mg%)	0	-0.4 ± 1.4	-0.3 ± 0.5
P_{PAH} (mg%)	0	-0.47 ± 0.21	-0.02 ± 0.30
GFR (ml/min/g kw)	0	-2.34 ± 6.56	-4.00 ± 5.89
RPF (ml/min/g kw)	0	-0.12 ± 4.16	-7.59 ± 8.31
FF (%)	0	-0.2 ± 2.0	3.3 ± 2.7
\dot{V} (μ l/min/g kw)	0	38.3 ± 20.3	55.9 ± 48.3
P_{Na} (mmol/l)	0	-1.9 ± 0.5	-2.2 ± 0.9
$U_{Na}\dot{V}$ (μ mol/min/g kw)	0	75.15 ± 34.43	51.84 ± 41.42
FE_{Na} (%)	0	1.49 ± 0.50	1.07 ± 0.83
P_K (mmol/l)	0	0.40 ± 2.01	0.25 ± 3.57
$U_K\dot{V}$ (μ mol/min/g kw)	0	3.14 ± 6.24	-4.37 ± 7.53
FE_K (%)	0	0.8 ± 2.1	0.2 ± 1.2
P_U (mmol/l)	0	0.34 ± 4.44	-1.97 ± 4.78
C_U (ml/min/g kw)	0	7.31 ± 7.85	14.41 ± 11.80
FE_U (%)	0	6.2 ± 7.5	6.6 ± 5.6
FPR_{Na} (%)	0	-6.2 ± 7.5	-6.6 ± 5.6
FDR_{Na} (ml/min/g kw)	0	15.3 ± 23.1	15.7 ± 18.0
BW (g)	220.8 ± 13.5		
2KW/BW (g/kg kw)	0.690 ± 0.021		

ข้อมูลแสดงค่า mean ± S.E.M.

ตารางที่ 3.7 ค่า mean arterial blood pressure (MABP), heart rate (HR), hematocrit (Hct), plasma inulin and PAH concentration (P_m and P_{PAH}), glomerular filtration rate (GFR), renal plasma flow (RPF), filtration fraction (FF), urine flow rate (\dot{V}), plasma sodium and potassium concentration (P_{Na} and P_K), sodium and potassium excretion rate ($U_{Na\dot{V}}$ and $U_{K\dot{V}}$), fractional sodium and potassium extraction (FE_{Na} and FE_K), plasma lithium concentration (P_L), lithium clearance (C_L), fractional lithium extraction (FE_L), fractional proximal sodium reabsorption (FPR_{Na}), fractional distal reabsorption of sodium (FDR_{Na}), body weight (bw), kidney index (2kw/bw) ของหนูกลุ่ม *Kaempferia parviflora* dichloromethane extract 10 mg/kg BW, 50 mg/kg BW และ 100 mg/kg BW, kw = kidney weight

	<i>Kaempferia parviflora</i> dichloromethane extract											
	10 mg/kg BW (n = 6)				50 mg/kg BW (n = 6)				100 mg/kg BW (n = 6)			
	Control	0-60 min after injection	60-120 min after injection	Control	0-60 min after injection	60-120 min after injection	Control	0-60 min after injection	60-120 min after injection			
MABP (mmHg)	143 ± 10	144 ± 12	126 ± 8 * †	135 ± 2	121 ± 5 *	106 ± 5 * †	142 ± 7	115 ± 8 *	117 ± 8 *			
HR (bpm)	465 ± 21	455 ± 19	462 ± 17	452 ± 10	439 ± 12	434 ± 13	460 ± 5	463 ± 15	448 ± 11			
Hct (%)	45.0 ± 1.2	44.0 ± 1.4	43.0 ± 1.6	43.0 ± 0.7	43.0 ± 1.0	42.0 ± 0.9	47.0 ± 1.6	46.0 ± 1.8	46.0 ± 1.5			
P_m (mg%)	15.2 ± 0.6	15.7 ± 0.6	17.8 ± 1.3	18.1 ± 0.7	17.6 ± 0.5	18.7 ± 0.5 †	19.6 ± 1.3	21.8 ± 0.8	19.9 ± 2.2			
P_{PAH} (mg%)	6.81 ± 0.37	6.55 ± 0.20	7.23 ± 0.27 †	5.96 ± 0.21	5.92 ± 0.15	6.32 ± 0.15 * †	7.69 ± 0.42	8.95 ± 0.83	7.90 ± 1.73			
GFR (ml/min/g kw)	1.13 ± 0.09	1.21 ± 0.08	0.94 ± 0.07 †	1.12 ± 0.04	1.14 ± 0.05	0.92 ± 0.04 * †	1.03 ± 0.06	0.86 ± 0.07 *	0.78 ± 0.06 *			
RPF (ml/min/g kw)	4.52 ± 0.25	4.77 ± 0.21	3.33 ± 0.24 * †	4.75 ± 0.14	4.48 ± 0.21	3.89 ± 0.12 * †	4.47 ± 0.36	3.56 ± 0.36 *	3.87 ± 0.28 *			
FF (%)	27.3 ± 1.1	27.8 ± 3.3	32.4 ± 4.2	23.7 ± 0.4	25.8 ± 1.5	25.1 ± 1.0	25.5 ± 2.5	28.7 ± 3.3	24.3 ± 3.0 †			
\dot{V} (μ l/min/g kw)	11.5 ± 2.3	22.7 ± 4.2 *	28.6 ± 5.6 *	11.9 ± 2.3	41.7 ± 5.1 *	30.5 ± 2.5 * †	12.9 ± 3.0	30.0 ± 7.2	18.3 ± 1.7			
P_{Na} (mmol/l)	131.7 ± 0.4	131.2 ± 0.5 *	131.1 ± 0.4 *	135.8 ± 0.8	132.5 ± 0.8 *	131.8 ± 0.8 *	133.4 ± 2.1	131.4 ± 1.7	130.9 ± 1.3			
$U_{Na\dot{V}}$ (μ mol/min/g kw)	2.73 ± 0.94	4.37 ± 0.64	4.18 ± 0.98	1.73 ± 0.63	6.53 ± 0.54 *	3.51 ± 0.30 * †	1.64 ± 0.92	6.92 ± 1.94 *	6.13 ± 1.34 *			
FE_{Na} (%)	1.85 ± 0.67	2.57 ± 0.56	2.73 ± 0.52	1.11 ± 0.39	4.35 ± 0.41 *	2.91 ± 0.27 * †	0.97 ± 0.52	4.34 ± 1.16 *	4.63 ± 0.93 *			
P_K (mmol/l)	3.34 ± 0.13	3.41 ± 0.12	3.40 ± 0.12	3.57 ± 0.09	3.48 ± 0.07	3.71 ± 0.10 * †	3.48 ± 0.10	3.23 ± 0.10	3.37 ± 0.08			
$U_{K\dot{V}}$ (μ mol/min/g kw)	0.63 ± 0.08	0.65 ± 0.10	0.46 ± 0.07 * †	0.45 ± 0.03	0.45 ± 0.03	0.30 ± 0.03 * †	0.43 ± 0.06	0.38 ± 0.04	0.29 ± 0.02			
FE_K (%)	16.6 ± 1.9	15.0 ± 1.4	15.5 ± 2.4	11.5 ± 1.1	11.5 ± 1.0	8.8 ± 0.8 * †	11.2 ± 1.8	14.0 ± 0.9	12.1 ± 1.3			
P_L (mmol/l)	0.31 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.30 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.30 ± 0.01 *	0.31 ± 0.01 *	0.34 ± 0.04	0.36 ± 0.03	0.32 ± 0.04			
C_L (ml/min/g kw)	0.41 ± 0.05	0.61 ± 0.04 *	0.53 ± 0.03 *	0.45 ± 0.04	0.54 ± 0.03 *	0.39 ± 0.02 * †	0.36 ± 0.02	0.48 ± 0.05	0.52 ± 0.11			
FE_L (%)	34.7 ± 3.1	50.3 ± 5.4 *	50.8 ± 5.5 *	40.6 ± 2.9	48.0 ± 3.1 *	46.4 ± 1.6 *	35.6 ± 3.4	53.7 ± 4.0 *	55.0 ± 4.7 *			
FPR_{Na} (%)	64.9 ± 3.1	50.7 ± 4.6 *	49.8 ± 5.7 *	59.4 ± 2.9	52.0 ± 3.1 *	53.6 ± 1.6 *	64.4 ± 3.4	46.2 ± 3.9 *	45.0 ± 4.7 *			
FDR_{Na} (ml/min/g kw)	33.4 ± 2.9	47.3 ± 5.1 *	48.4 ± 5.9 *	37.3 ± 2.9	46.2 ± 3.4 *	42.4 ± 1.5 *	34.5 ± 3.4	48.0 ± 4.1 *	50.8 ± 5.4 *			
BW (g)	248.2 ± 5.8											
2KW/BW (g/kg kw)	0.644 ± 0.007											

ข้อมูลแสดงค่า mean ± S.E.M. * † P < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control และ 0-60 min after injection ตามลำดับ

ตารางที่ 3.8 ค่า % change and difference of mean arterial blood pressure (MABP), heart rate (HR), hematocrit (Hct), plasma inulin and PAH concentration (P_n and P_{PAH}), glomerular filtration rate (GFR), renal plasma flow (RPF), filtration fraction (FF), urine flow rate (\dot{V}), plasma sodium and potassium concentration (P_{Na} and P_K), sodium and potassium excretion rate ($U_{Na}\dot{V}$ and $U_{K}\dot{V}$), fractional sodium and potassium extraction (FE_{Na} and FE_K), plasma lithium concentration (P_L), lithium clearance (C_L), fractional lithium extraction (FE_L), fractional proximal sodium reabsorption (FPR_{Na}), fractional distal reabsorption of sodium (FDR_{Na}), body weight (bw), kidney index (2kw/bw) ของหนูกลุ่ม *Kaempferia parviflora* dichloromethane extract 10 mg/kg BW, 50 mg/kg BW และ 100 mg/kg BW, kw = kidney weight

	<i>Kaempferia parviflora</i> dichloromethane extract											
	10% mg kg BW (n = 6)			50% mg kg BW (n = 6)			100% mg kg BW (n = 6)					
	Control	0-60 min after injection	60-120 min after injection	Control	0-60 min after injection	60-120 min after injection	Control	0-60 min after injection	60-120 min after injection	Control	0-60 min after injection	60-120 min after injection
MABP (mmHg)	0	2 ± 4	-16 ± 4 *†	0	-14 ± 5 *	-28 ± 6 *†	0	0	-27 ± 6 *	0	0	-25 ± 3 *
HR (bpm)	0	-10 ± 10	-3 ± 8	0	-13 ± 9	-16 ± 12	0	0	3 ± 11	0	0	-12 ± 9
Hct (%)	0	-0.7 ± 0.5	-1.7 ± 0.9	0	0.2 ± 1.0	-1.3 ± 1.0	0	0	-1.2 ± 0.9	0	0	-0.7 ± 0.6
P_n (mg%)	0	0.5 ± 0.8	2.6 ± 1.2	0	-0.5 ± 0.4	0.7 ± 0.4 †	0	0	2.2 ± 0.8	0	0	0.3 ± 2.5
P_{PAH} (mg%)	0	-0.26 ± 0.18	0.42 ± 0.23 †	0	-0.04 ± 0.18	0.36 ± 0.11 *†	0	0	1.26 ± 0.88	0	0	0.21 ± 1.89
GFR (ml/min/g kw)	0	9.47 ± 8.36	-15.15 ± 6.71 †	0	1.93 ± 2.16	-18.20 ± 2.45 *†	0	0	-16.11 ± 6.01 *	0	0	-23.09 ± 7.37 *
RPF (ml/min/g kw)	0	6.15 ± 4.66	-25.47 ± 5.63 *†	0	-5.75 ± 2.92	-22.37 ± 1.85 *†	0	0	-20.22 ± 4.52 *	0	0	-13.13 ± 1.61 *
FF (%)	0	0.6 ± 2.7	5.1 ± 4.3	0	2.2 ± 1.1	1.4 ± 0.8	0	0	3.3 ± 1.0	0	0	-1.1 ± 1.6 †
\dot{V} (μl/min/g kw)	0	120.7 ± 36.1 *	178.1 ± 48.7 *	0	286.3 ± 54.9 *	209.3 ± 56.0 *†	0	0	209.3 ± 123.8	0	0	93.7 ± 57.4
P_{Na} (mmol/l)	0	-0.3 ± 0.2 *	-0.4 ± 0.1 *	0	-2.4 ± 0.6 *	-2.9 ± 0.3 *	0	0	-1.5 ± 0.7	0	0	-1.8 ± 0.7
$U_{Na}\dot{V}$ (μmol/min/g kw)	0	83.43 ± 69.79	91.43 ± 91.22	0	1023.86 ± 465.27 *	631.60 ± 341.97 *†	0	0	2331.84 ± 1382.28 *	0	0	1800.60 ± 851.32 *
FE_{Na} (%)	0	0.72 ± 0.82	0.88 ± 1.03	0	3.24 ± 0.57 *	1.80 ± 0.62 *†	0	0	3.37 ± 1.36 *	0	0	3.66 ± 1.10 *
P_K (mmol/l)	0	2.32 ± 2.63	2.29 ± 3.90	0	-2.24 ± 1.95	4.13 ± 1.99 *†	0	0	-6.95 ± 3.72	0	0	-2.87 ± 2.62
$U_K\dot{V}$ (μmol/min/g kw)	0	6.39 ± 11.31	-24.38 ± 8.59 *†	0	0.69 ± 5.05	-34.07 ± 4.20 *†	0	0	-0.81 ± 16.92	0	0	-28.05 ± 7.76
FE_K (%)	0	-1.6 ± 1.5	-1.1 ± 2.2	0	0.0 ± 0.7	-2.6 ± 0.7 *†	0	0	2.8 ± 1.8	0	0	0.9 ± 2.3
P_L (mmol/l)	0	-6.98 ± 4.96	-3.89 ± 2.34	0	-10.97 ± 2.98 *	-6.95 ± 2.68 *	0	0	14.13 ± 18.26	0	0	1.69 ± 21.03
C_L (ml/min/g kw)	0	60.09 ± 17.17 *	35.28 ± 11.48 *	0	22.73 ± 8.09 *	-10.93 ± 5.76 *†	0	0	34.33 ± 15.90	0	0	44.99 ± 29.74
FE_L (%)	0	15.6 ± 4.8 *	16.1 ± 4.6 *	0	7.4 ± 2.7 *	5.8 ± 2.4 *	0	0	18.1 ± 5.8 *	0	0	19.4 ± 5.9 *
FPR_{Na} (%)	0	-14.3 ± 3.9 *	-15.2 ± 4.7 *	0	-7.4 ± 2.7 *	-5.8 ± 2.4 *	0	0	-18.2 ± 5.7 *	0	0	-19.4 ± 5.9 *
FDR_{Na} (ml/min/g kw)	0	13.9 ± 4.2 *	15.1 ± 4.8 *	0	25.6 ± 8.1 *	16.5 ± 8.0 *	0	0	13.5 ± 5.1 *	0	0	16.3 ± 6.1 *
BW (g)		248.2 ± 5.8			236.7 ± 5.6				233.5 ± 5.1			
2KW/BW (g/kg kw)		0.644 ± 0.007			0.663 ± 0.019				0.672 ± 0.029			

ข้อมูลแสดงค่า mean ± S.E.M. *† P < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control และ 0-60 min after injection ตามลำดับ

ตารางที่ 3.9 ค่า mean arterial blood pressure (MABP), heart rate (HR), hematocrit (Hct), plasma inulin and PAH concentration (P_{in} and P_{PAH}), glomerular filtration rate (GFR), renal plasma flow (RPF), filtration fraction (FF), urine flow rate (\dot{V}), plasma sodium and potassium concentration (P_{Na} and P_K), sodium and potassium excretion rate ($U_{Na}\dot{V}$ and $U_K\dot{V}$), fractional sodium and potassium excretion (FE_{Na} and FE_K), plasma lithium concentration (P_{Li}) lithium clearance (C_{Li}), fractional lithium excretion (FE_{Li}), fractional proximal sodium reabsorption (FPR_{Na}), fractional distal reabsorption of sodium (FDR_{Na}), body weight (bw), kidney index (2kw/bw) ของหนูกลุ่ม sildenafil citrate 10 mg/kg BW, kw = kidney weight

	Sildenafil citrate		
	10 mg/kg BW (n = 6)		
	Control	0-60 min after injection	60-120 min after injection
MABP (mmHg)	146 ± 5	114 ± 6 *	103 ± 6 *
HR (bpm)	468 ± 15	455 ± 18	476 ± 22
Hct (%)	44.0 ± 1.1	41.0 ± 2.2 *	39.0 ± 2.0 *
P_{in} (mg%)	17.2 ± 1.4	20.7 ± 2.0 *	22.6 ± 1.9 *
P_{PAH} (mg%)	7.44 ± 0.46	7.90 ± 0.45	8.56 ± 0.70 *
GFR (ml/min/g kw)	1.10 ± 0.08	0.86 ± 0.07 *	0.74 ± 0.11 *
RPF (ml/min/g kw)	4.25 ± 0.27	3.59 ± 0.24	3.27 ± 0.51 *
FF (%)	26.5 ± 2.6	24.7 ± 2.7	24.1 ± 3.0
\dot{V} (μ l/min/g kw)	11.4 ± 2.6	7.6 ± 1.7 *	8.6 ± 2.5 *
P_{Na} (mmol/l)	136.8 ± 2.0	133.5 ± 1.4 *	134.2 ± 1.4 *
$U_{Na}\dot{V}$ (μ mol/min/g kw)	1.90 ± 0.79	1.28 ± 0.63	1.27 ± 0.61
FE_{Na} (%)	1.35 ± 0.54	1.10 ± 0.52	1.12 ± 0.50
P_K (mmol/l)	3.43 ± 0.07	3.36 ± 0.13	3.50 ± 0.13
$U_K\dot{V}$ (μ mol/min/g kw)	0.61 ± 0.21	0.49 ± 0.23	0.42 ± 0.15
FE_K (%)	11.6 ± 1.6	10.3 ± 3.1	10.2 ± 2.1
P_{Li} (mmol/l)	0.42 ± 0.04	0.38 ± 0.03	0.42 ± 0.06
C_{Li} (ml/min/g kw)	0.44 ± 0.04	0.43 ± 0.04	0.38 ± 0.05
FE_{Li} (%)	41.2 ± 5.1	50.1 ± 5.0	54.4 ± 9.7
FPR_{Na} (%)	58.8 ± 5.1	49.9 ± 5.0	44.1 ± 10.0
FDR_{Na} (ml/min/g kw)	39.9 ± 4.6	49.0 ± 4.7	53.2 ± 9.5
BW (g)	225.0 ± 9.7		
2KW/BW (g/kg kw)	0.641 ± 0.015		

ข้อมูลแสดงค่า mean ± S.E.M. * P < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control และ 0-60 min after injection ตามลำดับ

ตารางที่ 3.10 ค่า % change and difference of mean arterial blood pressure (MABP), heart rate (HR), hematocrit (Hct), plasma inulin and PAH concentration (P_{in} and P_{PAH}), glomerular filtration rate (GFR), renal plasma flow (RPF), filtration fraction (FF), urine flow rate (\dot{V}), plasma sodium and potassium concentration (P_{Na} and P_K), sodium and potassium excretion rate ($U_{Na}\dot{V}$ and $U_K\dot{V}$), fractional sodium and potassium excretion (FE_{Na} and FE_K), plasma lithium concentration (P_L), lithium clearance (C_L), fractional lithium excretion (FE_L), fractional proximal sodium reabsorption (FPR_{Na}), fractional distal reabsorption of sodium (FDR_{Na}), body weight (bw), kidney index ($2kw/bw$) ของหนูกลุ่ม sildenafil citrate 10 mg/kg BW, kw = kidney weight

	Sildenafil citrate		
	10 mg/kg BW (n = 6)		
	Control	0-60 min after injection	60-120 min after injection
MABP (mmHg)	0	-32 ± 7 *	-43 ± 9 *
HR (bpm)	0	-14 ± 17	8 ± 11
Hct (%)	0	-3.8 ± 1.4 *	-5.0 ± 1.2 *
P_{in} (mg%)	0	3.5 ± 1.0 *	5.4 ± 1.8 *
P_{PAH} (mg%)	0	0.46 ± 0.26	1.12 ± 0.45 *
GFR (ml/min/g kw)	0	-20.78 ± 5.49 *	-31.01 ± 9.98 *
RPF (ml/min/g kw)	0	-14.88 ± 5.07	-24.47 ± 9.24 *
FF (%)	0	-1.7 ± 1.5	-2.4 ± 1.6
\dot{V} (μ l/min/g kw)	0	-30.9 ± 6.4 *	-29.2 ± 5.6 *
P_{Na} (mmol/l)	0	-2.4 ± 0.5 *	-1.9 ± 0.5 *
$U_{Na}\dot{V}$ (μ mol/min/g kw)	0	-46.80 ± 12.59	-42.42 ± 19.06
FE_{Na} (%)	0	-0.25 ± 0.16	-0.23 ± 0.22
P_K (mmol/l)	0	-2.24 ± 2.52	1.99 ± 2.76
$U_K\dot{V}$ (μ mol/min/g kw)	0	-29.15 ± 10.66	-30.26 ± 13.03
FE_K (%)	0	-1.0 ± 1.5	-1.1 ± 1.2
P_L (mmol/l)	0	-8.17 ± 3.85	-1.57 ± 7.28
C_L (ml/min/g kw)	0	-1.18 ± 5.23	-14.18 ± 8.60
FE_L (%)	0	8.9 ± 4.0	13.2 ± 8.6
FPR_{Na} (%)	0	-8.9 ± 4.0	-14.7 ± 9.3
FDR_{Na} (ml/min/g kw)	0	27.2 ± 12.0	36.8 ± 20.5
BW (g)	225.0 ± 9.7		
2KW/BW (g/kg kw)	0.641 ± 0.015		

ข้อมูลแสดงค่า mean ± SEM. * P < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา control และ 0-60 min after injection ตามลำดับ

4. วิจัยรณ

4.1 ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย hexane, dichloromethane และ methanol และ sildenafil citrate ต่อความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจห้องบนของหนูแร้ที่แยกจากตัว

ในการทดลองนี้ใช้ 50% ethanol เป็นตัวทำละลาย สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ methanol เนื่องจากสารทั้งสองละลายได้ดีใน solvent ดังกล่าว ส่วนการละลายสารสกัดจากกระชายดำด้วย hexane ใช้ 100% ethanol เนื่องจากสารสกัดนี้ละลายใน 50% ethanol ได้น้อยมาก การที่สารสกัดมีความสามารถในการละลายใน ethanol ต่างกัน เนื่องจากสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ methanol มีสภาพขั้วมากกว่าสารสกัดด้วย hexane (ซึ่งไม่มีขั้ว) อย่างไรก็ตามการใช้ ethanol ทั้งสองความเข้มข้นและทุกขนาดที่ใช้ในการทดลอง ไม่มีผลต่อความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจห้องบนของหนูแร้ที่แยกจากตัว

สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ methanol มีผลเพิ่มความแรงในการหดตัวของหัวใจห้องบนที่ตัดแยกจากตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ control เมื่อเปรียบเทียบความแรงที่ทำให้เกิดการหดตัวของหัวใจระหว่างสารสกัดจากกระชายดำทั้ง 3 ชนิด พบว่าที่ความเข้มข้นเท่ากันสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ทำให้หัวใจหดตัวแรงมากที่สุด แต่สำหรับสารสกัดจากกระชายดำด้วย methanol และ hexane เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงถึง 20 mg% ทำให้หัวใจหยุดเต้นได้เช่นเดียวกับสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 10 mg% กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากกระชายดำ ในการเพิ่มความแรงในการหดตัวของหัวใจห้องบนที่อาจเป็นไปได้มี 6 กลไก คือ 1) สารสกัดจากกระชายดำไปกระตุ้น β -adrenergic receptor 2) สารสกัดจากกระชายดำทำให้มีการเปิด Ca^{2+} channel 3) สารสกัดจากกระชายดำมีผลต่อ SR Ca^{2+} release (โดยทำให้ intracellular Ca^{2+} เพิ่มขึ้น ซึ่งจะกระตุ้นการหลั่ง Ca^{2+} ออกจาก SR ผ่านทาง Ca^{2+} release channel มากขึ้น) 4) สารสกัดจากกระชายดำมีผลต่อ SR Ca^{2+} uptake 5) สารสกัดจากกระชายดำอาจยับยั้ง Na^+-Ca^{2+} exchanger (ทำให้ระดับ Ca^{2+} ใน cell เพิ่มขึ้น) และ 6) สารสกัดจากกระชายดำทำให้ระดับของ cAMP เพิ่มขึ้น และ/หรือระดับของ cGMP ลดลง โดยการเพิ่มความแรงในการหดตัวของหัวใจห้องบนในการทดลองครั้งนี้ อาจเกิดจากกลไกอย่างใดอย่างหนึ่ง หรือเป็นการผสมผสานกันของ 2 กลไกขึ้นไป โดยกลไกข้อ 1-5 นั้นจะทำให้ Ca^{2+} ใน cell เพิ่มขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้ความแรงในการหดตัวของหัวใจเพิ่มขึ้นโดย Ca^{2+} บางส่วนจับกับ troponin C ทำให้ specific myosin binding site บน actin chain เปิดและทำให้ myosin head จับกับ actin โดยความแรงในการหดตัวเกิดจากการ

เปลี่ยนแปลงมุมของ crossbridge เป็นลำดับ หลังจากหัว myosin แยกออก และเกิด crossbridge cycle ซ้ำที่ actin ตำแหน่งใหม่ไปเรื่อย ๆ ทำให้ thick filament เคลื่อนเข้าหาช่องว่างระหว่าง thin filament ดังนั้นความแรงในการหดตัวของหัวใจขึ้นโดยตรงกับความเข้มข้นของ free Ca^{2+} ภายใน myocyte โดยปัจจัยใดๆ ที่เพิ่ม Ca^{2+} เช่น norepinephrine จะกระตุ้น crossbridge จำนวนมากและทำให้ความแรงในการหดตัวของหัวใจเพิ่มขึ้น

ในการทดลองครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากกระชายดำทั้ง 3 ชนิดมีผลเพิ่มความแรงและลดอัตราการหดตัวของหัวใจห้องบนได้ โดยเมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane เพิ่มความแรงและลดอัตราการหดตัวของหัวใจห้องบนได้มากกว่าสารสกัดจากกระชายดำด้วย methanol และ hexane ผลดังกล่าวนี้อาจเกิดจากสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane น่าจะมีองค์ประกอบของสารที่ทำให้เพิ่มความแรงและลดอัตราการหดตัวของหัวใจห้องบนมากกว่า อย่างไรก็ตามสารสกัดจากกระชายดำด้วย methanol และ hexane ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปเพิ่มความแรงและลดอัตราการหดตัวของหัวใจห้องบนได้มากขึ้น อาจเนื่องมาจากสารที่ออกฤทธิ์เพิ่มความแรงและลดอัตราการหดตัวของหัวใจในสารสกัดจากกระชายดำด้วย methanol และ hexane มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น โดยมีการศึกษาที่สนับสนุนถึงความแตกต่างในการออกฤทธิ์ระหว่างสารสกัดจากกระชายดำทั้ง 3 ชนิด โดย Yenjai และคณะ (2003) แยกสารที่เป็นองค์ประกอบของกระชายดำแล้วพบว่ามีสารกลุ่ม flavonoids 9 ชนิดเป็นองค์ประกอบ และแต่ละชนิดมีผลต่อ biological activity ที่แตกต่างกัน

นอกจากนี้ผลของสารสกัดจากกระชายดำทั้ง 3 ชนิดในนาที่ที่ 10 และ 20 จะเห็นผลที่ชัดเจนกว่านาที่ที่ 1 เนื่องจากปริมาณสารสกัดที่จะออกฤทธิ์ที่ receptor จะต้องใช้เวลาากเมื่อเวลามากขึ้น ปริมาณสารสกัดจะแพร่ไปถึงเนื้อเยื่อและออกฤทธิ์ที่ receptor เพิ่มมากขึ้นด้วย

แต่เนื่องจากมีรายงานมาแล้วว่ากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากกระชายดำด้วย methanol ในการเพิ่มความแรงในการหดตัวของหัวใจห้องบนที่ตัดแยกจากตัวในหนูแร้ไม่ได้ทำงานผ่าน β -adrenergic receptor หรือผ่าน muscarinic receptor (เลิศลักษณ์, 2546) ซึ่งศึกษาโดยใช้ propranolol (0.25 mg%) และ atropine (0.375 mg%) ซึ่งเป็น β -adrenergic receptor antagonist และ muscarinic receptor antagonist ตามลำดับใส่ลงใน organ bath 10 นาทีก่อนให้สารสกัด พบว่าไม่มีผลเปลี่ยนแปลงความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจห้องบนที่ตัดแยกจากตัวแต่อย่างใด เหตุผลอีกประการหนึ่งที่บ่งบอกว่าสารสกัดกระชายดำไม่นำออกฤทธิ์ผ่าน β -adrenergic receptor คือ heart rate ไม่เพิ่มขึ้นหลังให้สารสกัดแต่กลับลดลง นอกจากนี้ พิทักษ์ (2547) พบว่าสารสกัดจากกระชายดำทั้ง 3 ชนิดเช่นเดียวกับที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ มีผล

เพิ่มความแรงในการหดตัวของหัวใจห้องบนที่ตัดแยกจากตัวในหนูแรท ซึ่งการศึกษากลไกการออกฤทธิ์โดยใช้ propranolol (0.25 mg%), atropine (0.375 mg%) และ verapamil (10^{-6} M) ซึ่งเป็น β -adrenergic receptor antagonist, muscarinic receptor antagonist และ Ca^{2+} channel blocker ตามลำดับ พบว่าทั้ง propranolol และ atropine ไม่มีผลยับยั้งการออกฤทธิ์ต่อความแรงและอัตราการหดตัวของหัวใจที่เกิดจากสารสกัดจากกระชายดำทั้ง 3 ชนิด ขณะที่ verapamil สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ดังกล่าวที่เกิดจากสารสกัดจากกระชายดำด้วย methanol และ hexane ได้ โดย verapamil ทำให้ Ca^{2+} channel ที่ผนัง cell ของหัวใจปิด Ca^{2+} จึงไม่สามารถเข้าสู่ cell กล้ามเนื้อหัวใจได้ ทำให้ความแรงในการหดตัวลดลง

ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากกระชายดำในการเพิ่มความแรงในการหดตัวของหัวใจห้องบน โดยสารสกัดด้วย methanol และ hexane ในการทดลองนี้น่าจะทำงานผ่าน L-type Ca^{2+} channel ของ cell กล้ามเนื้อหัวใจห้องบนเป็นกลไกหลักอันหนึ่ง ส่วนสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane อาจจะมีกลไกการออกฤทธิ์เพิ่มความแรงในการหดตัวของหัวใจผ่านกลไกอื่นด้วย เนื่องจากมีรายงานว่า การเพิ่มขึ้นของระดับ cAMP และ/หรือการลดลงของระดับ cGMP ทำให้ความแรงในการหดตัวของหัวใจเพิ่มขึ้น (Lugnier, 2006) โดยการออกฤทธิ์ผ่าน cAMP ก็มีผลเปิด Ca^{2+} channels เช่นกัน เพราะ cAMP จะไป activate protein kinase ซึ่งจะไป phosphorylate calcium channel อีกที หรืออาจเกิดจากสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane มีผลต่อ SR Ca^{2+} release หรือ SR Ca^{2+} uptake หรือยับยั้ง $Na^+ - Ca^{2+}$ exchanger ซึ่งต้องมีการศึกษาทดลองต่อไป

sildenafil citrate ที่ความเข้มข้น 10 mg% มีผลเพิ่มความแรงในการหดตัวของหัวใจ 20 ± 4 % ซึ่งในการยับยั้งการทำงานของ PDE โดย sildenafil citrate นั้นจากรายงานของ Lugnier (2006) ได้อธิบายว่าหากมีการยับยั้ง PDE 2 และ/หรือ PDE 3 และ/หรือ PDE 4 ทำให้ cAMP เพิ่มขึ้นทำให้ความแรงในการหดตัวเพิ่มขึ้น (positive inotropic effect) ได้

ส่วนผลต่ออัตราการหดตัวของหัวใจห้องบนที่แยกจากตัวนั้นพบว่าสารสกัดจากกระชายดำด้วย hexane, dichloromethane และ methanol มีผลลดอัตราการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ control เมื่อเปรียบเทียบการลดอัตราการหดตัวของหัวใจระหว่างสารสกัดจากกระชายดำทั้ง 3 ชนิด พบว่าที่ความเข้มข้นเท่ากันสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ลดอัตราการหดตัวของหัวใจได้มากที่สุด แล้วตามด้วยสารสกัดด้วย methanol และ hexane ตามลำดับ

การที่สารสกัดจากกระชายดำสามารถทำให้อัตราการหดตัวของหัวใจต่ำลงได้นั้น พบว่าเป็นเช่นเดียวกับผลการทดลองของโสภิตและคณะ (2549) ที่รายงานว่าสารสกัดด้วย ethanol ลดอัตราการหดตัวของหัวใจอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากกระชายดำโดยเฉพาะสารสกัดด้วย dichloromethane น่าจะมีองค์ประกอบที่ทำให้ pacemaker cell ของหัวใจเกิด hyperpolarization มากขึ้น ทำให้ phase 4 นานขึ้นและหัวใจหดตัวช้าลงมากกว่าสารสกัดด้วย methanol และ hexane จากการศึกษาวิเคราะห์ K^+ ในสารสกัดจากกระชายดำทั้ง 3 ชนิด พบว่าสารสกัดทุกชนิดถ้าละลายหมดจะมี K^+ มากกว่าใน ECF (K^+ ใน ECF เท่ากับ 3.5-5.5 mM) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าสารสกัดกระชายดำอาจทำให้เกิด hyperpolarization ของ pacemaker cell แล้วมีผลลด HR เพราะมี potassium ใน ECF ในปริมาณมาก

ผลของ sildenafil citrate ต่ออัตราการหดตัวของหัวใจห้องบนที่ตัดแยกจากตัว ให้ผลเป็น 2 ทางคือที่ความเข้มข้นต่ำ โดยที่ความเข้มข้น 0.25 mg% เพิ่มอัตราการหดตัวมากที่สุดคือ $5 \pm 2\%$ ของ control ขณะที่ความเข้มข้น 20 mg% จะลดอัตราการหดตัวมากที่สุดคือ $16 \pm 2\%$ ของ control การที่ sildenafil citrate ออกฤทธิ์ให้ทั้งเพิ่มและลดอัตราการเต้นของหัวใจ น่าจะเกิดจากกลไกโดย sildenafil citrate ที่ความเข้มข้นต่ำทำให้ pacemaker cell เกิด depolarization มากขึ้น ทำให้ phase 4 สั้นลงและหัวใจหดตัวเร็วขึ้น ซึ่งมีรายงานสนับสนุนผลของ sildenafil citrate ที่เพิ่มอัตราการหดตัวของหัวใจมาบ้างแล้วคือการฉีด sildenafil citrate ขนาด 0.5 mg/kg ในสุนัข mongrel ทำให้อัตราการเต้นของหัวใจเพิ่มขึ้นแบบ transient เป็นเวลา 20 วินาที ($146 \pm 25\%$ จากค่าควบคุม 87 ± 10 beats/min) (Zhao, et al., 2006) ส่วน sildenafil citrate ที่ความเข้มข้นสูง ในการทดลองนี้อาจทำให้ pacemaker cell เกิด hyperpolarization มากขึ้น ทำให้ phase 4 นานขึ้นและหัวใจหดตัวช้าลง ซึ่งกลไกยังไม่ทราบแน่ชัด

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดจากกระชายดำทั้งสามชนิดกับ sildenafil citrate พบว่าสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ methanol มีฤทธิ์เพิ่มความแรงในการหดตัวของหัวใจห้องบนดีกว่า sildenafil citrate ในขนาดที่เท่ากัน แม้สารสกัดจากกระชายดำและ sildenafil citrate มีผลต่อความแรงในการหดตัวของหัวใจเหมือนกัน แต่เกิดจากกลไกที่ต่างกันนั่นคือสารสกัดด้วย methanol และ hexane ออกฤทธิ์ผ่าน L-type Ca^{2+} channel ส่วนสารสกัดด้วย dichloromethane ออกฤทธิ์ผ่านกลไกอื่นคือ 1) เพิ่มระดับ cAMP และ/หรือลดระดับ cGMP 2) สารสกัดจากกระชายดำมีผลต่อ SR Ca^{2+} release 3) สารสกัดจากกระชายดำมีผลต่อ SR Ca^{2+} uptake 4) สารสกัดจากกระชายดำอาจยับยั้ง Na^+-Ca^{2+} exchanger ซึ่งอาจเกิดจากกลไกอย่างใดอย่างหนึ่ง หรือเป็นการผสมผสานกันของ 2 กลไกขึ้นไปทำให้ความแรงในการหดตัว

เพิ่มขึ้น ส่วน sildenafil citrate นั้นออกฤทธิ์ผ่านการยับยั้ง PDE2 และ/หรือ PDE3 และ/หรือ PDE4 ทำให้ cAMP เพิ่มขึ้นและทำให้ความแรงในการหดตัวของหัวใจมากขึ้น ส่วนฤทธิ์ต่ออัตราการหดตัวของหัวใจห้องบนให้ผลแตกต่างกันคือสารสกัดจากกระชายดำทั้งสามชนิดทำให้อัตราการหดตัวของหัวใจลดลงเท่านั้น ขณะที่ sildenafil citrate มีผลต่ออัตราการหดตัวของหัวใจแบบ biphasic เพราะฉะนั้นสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane มีผลเพิ่มความแรงในการหดตัวของหัวใจ และลดอัตราการหดตัวของหัวใจมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากกระชายดำอีกสองชนิดและ sildenafil citrate ดังนั้นจึงสามารถนำสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ไปแยกสารบริสุทธิ์แล้วพัฒนาเป็นยารักษาโรคหัวใจ หรือนำมาทดสอบผลทางพิษวิทยาแล้วใช้เป็นสมุนไพรที่ใช้บำรุงหัวใจตามสรรพคุณของกระชายดำได้ต่อไป

4.2 ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ sildenafil citrate ต่อความดันเลือดและการทำงานของไตในหนูแร้ท

ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ sildenafil citrate ต่อความดันเลือด

สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ sildenafil citrate ทำให้ความดันเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ระหว่าง 14 ± 5 ถึง 28 ± 6 mmHg และ 43 ± 9 mmHg ตามลำดับ) แต่จากผลการฉีด vehicle หรือ ethanol ซึ่งใช้เป็นตัวทำลายสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane พบว่าไม่ทำให้ความดันเลือดเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการลดลงของความดันเลือดเป็นผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane โดยกลไกการลดความดันน่าจะมาจากปัจจัยที่ควบคุมความดันเลือดปัจจัยหนึ่งคือการลดลงของค่า total peripheral resistance (TPR) จากผลที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัว เนื่องจากมีรายงานว่าผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 0.1-10 mg% ทำให้หลอดเลือดแดง thoracic aorta ของหนูแร้ทที่แยกจากตัวคลายตัวได้ (Polpong et al., 2548) นอกจากนี้ โสภิตและคณะ (2549) ได้รายงานว่าสารสกัดจากกระชายดำด้วย ethanol ความเข้มข้น 100 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ norepinephrine ที่มีต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากตัวหนูแร้ท ดังนั้นสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ในการทดลองนี้น่าจะมีสารประกอบประเภทมีสภาพขั้วปานกลางที่ทำให้ arteriole คลายตัวทำให้ความดันเลือดลดลง และยังมีรายงานการทดลองที่ยืนยันกลไกการคลายตัวของหลอดเลือดที่เกิดจากสารสกัดจากกระชายดำด้วย ethanol โดย Wattanapitayakul และคณะ (2007) ซึ่งทำการทดลองใน umbilical vein ของคน พบว่าสารสกัดจากกระชายดำกระตุ้นการผลิต NO (ซึ่งสัมพันธ์กับการเพิ่มของ

eNOS mRNA และ eNOS protein โดยสารสกัดจากกระชายดำเพิ่ม eNOS อย่างจำเพาะเจาะจง โดยใน umbilical vein นั้นก็มีกล้ามเนื้อเรียบเช่นเดียวกับ arteriole ดังนั้นสารสกัดจากกระชายดำ อาจทำให้ arteriole คลายตัว เนื่องจากมีการหลั่ง NO เพิ่มขึ้นเป็นผลให้ TPR ลดลงได้

ส่วนการฉีด sildenafil citrate ในการทดลองนี้ทำให้ความดันเลือดลดลง ซึ่งการออกฤทธิ์ลดความดันเลือดของ sildenafil citrate นี้สอดคล้องกับผลการทดลองจากการฉีดสารนี้ ขนาด 0.5 mg/kg ในสุนัข mongrel ทำให้เกิดการลดลงของความดันเลือดแบบ transient เป็นเวลา 20 วินาที ($19 \pm 2.0\%$ จากค่าควบคุม 105 ± 3 mmHg) (Zhao, *et al.*, 2006) และจากการศึกษากลไกการลดความดันของ sildenafil citrate พบว่าทำให้ PDE5 ซึ่งพบมากในกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดจะถูกยับยั้ง ส่งผลให้ระดับ cGMP เพิ่มขึ้นภายใน cell และ vascular smooth muscle คลายตัวโดย cGMP ทำให้ intracellular Ca^{2+} ลดลงและทำให้ contractile apparatus นั้นเกิด desensitization ต่อ intracellular Ca^{2+} การคลายตัวของ vascular smooth muscle นี้ ส่งผลให้ความดันเลือดทั้ง systolic และ diastolic ลดลง (Jackson, *et al.*, 2006) ได้มีการศึกษาที่สนับสนุนว่าฤทธิ์ที่ทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือดมีผลต่อ hemodynamic effect โดยทดสอบในชายสุขภาพดี 8 คน (Jackson, *et al.*, 1999) และในชายวัยกลางคน 16 คน (Zusman, *et al.*, 2000) โดยให้กิน sildenafil citrate ขนาด 100 mg พบว่า 3 ชั่วโมงหลังจากนั้น ความดันเลือดทั้ง systolic และ diastolic ลดลงประมาณ 10 และ 7 mmHg ตามลำดับ และความดันเลือดดังกล่าวกลับสู่ระดับ baseline ภายใน 6-8 ชั่วโมง

ในการทดลองนี้พบว่าทั้งสารสกัดจากกระชายดำทั้ง 3 ชนิดและ sildenafil citrate ต่างก็มีผลทำให้ความดันเลือดลดลง แต่ผลดังกล่าวเกิดจากกลไกที่แตกต่างกัน โดยสารสกัดจากกระชายดำทั้ง 3 ชนิดทำให้ความดันเลือดลดลงผ่าน NO ขณะที่ sildenafil citrate ทำให้ความดันเลือดลดลงผ่านการยับยั้ง PDE5

ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ sildenafil citrate ต่อการทำงานของไตในหนูแร้ท

เมื่อฉีดสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ทั้ง 3 ชนิดทำให้ RPF ลดลง 22-25% โดยมีความสัมพันธ์กับขนาดที่ใช้ ซึ่งการลดลงของ RPF และ GFR นี้ไม่ได้เกิดจากผลของ vehicle (ethanol) เนื่องจากพบว่า ethanol ไม่ทำให้ RPF และ GFR เปลี่ยนแปลง การลดลงของ RPF น่าจะเกิดจาก arterial blood pressure ที่ลดลงจาก peripheral vasodilation นอกจากนี้การลดลงของความดันเลือดน่าจะทำให้ hydrostatic pressure ของ glomerular capillary ลดลง เป็นผลให้ net filtration pressure และ GFR ลดลงได้

สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ได้เพิ่ม urine flow rate อย่างมีนัยสำคัญ การเพิ่มการขับปัสสาวะไม่ได้เกิดจากผลของ vehicle แต่เกิดจากฤทธิ์ของกระชายดำเอง นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากกระชายดำ ทำให้ U_{Na} และ FE_{Na} เพิ่มขึ้น ซึ่งการเพิ่มขึ้นของค่าทั้งสองน่าจะเกิดจากกระบวนการยับยั้งการดูดกลับน้ำและ Na^+ ใน renal tubule เนื่องจากการลดลงของ GFR ในขณะที่ FE_{Na} เพิ่มขึ้น นอกจากนี้การขับทิ้ง Na^+ ที่เพิ่มขึ้นน่าจะเป็นสาเหตุให้ P_{Na} ลดลงได้ ภาวะ diuresis และ natriuresis จากการทดลองในครั้งนี้อาจเป็นผลจากฤทธิ์ของ flavonoids ซึ่งเป็นสารประกอบหลักในกระชายดำที่เพิ่มการขับทิ้งของ Na^+ และน้ำ เนื่องจากมีรายงานมาก่อนโดย Jouad และคณะ (2001) ที่ได้ศึกษาผลของ flavonoids ที่สกัดจาก *Spergularis purpurea* Pers. ต่อการทำงานของไตในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar ทั้ง normotensive และ hypertensive ผลการทดลองพบว่า flavonoids ทำให้ urine flow rate และการขับทิ้งของ Na^+ , K^+ และ Cl^- เพิ่มขึ้นในหนูทั้ง 2 กลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผู้วิจัยสรุปว่าเกิดจากการลด tubular reabsorption ของน้ำ, Na^+ , K^+ และ Cl^-

ในการทดลองนี้จึงใช้เทคนิค lithium clearance เพื่อระบุตำแหน่งของ nephron ที่เกิดการลดการดูดกลับ Na^+ และพบว่าสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ทั้ง 3 ขนาดทำให้ค่า FPR_{Na} ลดลง แสดงว่าสารสกัดจากกระชายดำออกฤทธิ์ยับยั้งการดูดกลับของ Na^+ และน้ำที่ nephron ส่วน proximal tubule ได้ ทำให้ Na^+ และน้ำถูกขับทิ้งเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามการยับยั้งการดูดกลับ Na^+ และน้ำอาจเกิดจาก nephron ส่วนอื่นก็ได้แต่ไม่ใช่ที่ distal tubule เนื่องจากในการทดลองพบว่าค่า FDR_{Na} เพิ่มขึ้น ค่า FDR_{Na} ที่เพิ่มขึ้นจากการคำนวณนี้อาจเกิดจากกลไกการเพิ่ม reabsorptive capacity หลังจากมี Na^+ load มายัง nephron ส่วนนี้มากขึ้น

กลไกการยับยั้งการดูดกลับ Na^+ และน้ำที่ proximal tubule อาจเกิดจากการที่สารสกัดด้วย dichloromethane กระตุ้นการสร้าง NO เนื่องจาก Eittle และคณะ (1998) ทำการทดลองใน Sprague-Dawley rat เพศผู้ โดยใช้วิธี split-droplet micropuncture เพื่อศึกษาผลของ SNP (NO donor) ที่มีผลต่อ proximal tubular fluid absorption พบว่า SNP ขนาด 10^{-4} M มีผลยับยั้งการดูดกลับ Na^+ และน้ำอย่างมีนัยสำคัญ และ SNP ทำให้ความเข้มข้นของ cGMP เพิ่มขึ้น 7 เท่าจากระดับ control นอกจากนี้ยังพบว่า SNP สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ intratubular AII ในการกระตุ้น fluid uptake โดยอาศัยกลไกคือ NO แพร่เข้าไปใน proximal tubular cell กระตุ้นการทำงานของ soluble guanylyl cyclase ให้เพิ่มระดับของ cGMP ทำให้มี cGMP คั่งภายใน cell และ cGMP จะไปลดการทำงานของ AII ในการกระตุ้น transepithelium Na^+ transport เมื่อพิจารณาร่วมกับการศึกษาของ Wattanapitayakul และคณะ (2007) ซึ่งทำการทดลองใน

umbilical vein ของคน พบว่าสารสกัดจากกระชายดำกระตุ้นการผลิต NO ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane อาจยับยั้งการดูดกลับ Na^+ และน้ำด้วยกลไกการสร้าง NO ที่ proximal tubule

สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ขนาด 10 และ 50 mg/kg bw ลด $U_K \dot{V}$ และ FE_K การลดลงของ $U_K \dot{V}$ อาจเกิดจากสารสกัดจากกระชายดำทำให้การคัดหลั่ง K^+ ที่ distal tubule และ collecting duct ลดลง และการที่ GFR ลดลงด้วยนั้นทำให้ปริมาณการกรอง K^+ ลดลงรวมกับการลดลงของการคัดหลั่ง K^+ ที่ distal tubule และ collecting duct จึงทำให้ค่า FE_K ลดลงด้วย กลไกการยับยั้งการคัดหลั่ง K^+ นี้จะส่งผลให้ P_K เพิ่มขึ้นได้ ดังแสดงในตารางที่ 3.7

sildenafil citrate ขนาด 10 mg/kg bw ทำให้ค่า MABP, RPF, GFR และ \dot{V} ลดลง การลด MABP อาจเนื่องมาจากการเกิด peripheral vasodilation (Corbin and Francis, 1999) การลด RPF เนื่องจาก arterial blood pressure ลดลงแต่ความต้านทานหลอดเลือดในไตเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก การลด arterial blood pressure ยังทำให้ hydrostatic pressure ที่ glomerulus ลดลงเป็นผลให้ GFR ลดลง และทำให้ \dot{V} ลดลงได้ อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลง renal hemodynamics ไม่ส่งผลต่อการขับน้ำ, Na^+ และ K^+ เนื่องจาก $U_{Na} \dot{V}$, $U_K \dot{V}$, FE_{Na} , FE_K , FPR_{Na} และ FDR_{Na} ไม่เปลี่ยนแปลงจากค่า control

นอกจากนี้ยังพบว่าขณะที่ \dot{V} ลดลงและ FE_{Na} ไม่เปลี่ยนแปลงจากช่วง control ค่า hematocrit และ P_{Na} ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลดังกล่าวนี้อาจเกิดจาก fluid retention หลังจากให้ sildenafil citrate ก็เป็นได้

ทั้งสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ sildenafil citrate ต่างก็ มีผลลดความดันโลหิต แต่ผลนี้เกิดผ่านกลไกที่แตกต่างกัน นั่นคือสารสกัดจากกระชายดำอาจทำให้ arteriole คลายตัว เนื่องจากมีการหลั่ง NO เพิ่มขึ้นและ NO กระตุ้นการสร้าง cGMP โดย guanylyl cyclase เป็นผลให้ TPR ลดลง และทำให้ความดันเลือดลดลง ส่วน sildenafil citrate เกิดโดยยับยั้ง PDE ทำให้ระดับ cGMP เพิ่มขึ้นภายใน cell ทำให้ vascular smooth muscle คลายตัว ส่งผลให้ความดันเลือดทั้ง systolic และ diastolic ลดลง ในแง่ผลต่อการทำงานของไต นั้นทั้งสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ sildenafil citrate ต่างก็ทำให้ RPF และ GFR ลดลง แต่สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane เท่านั้นที่มีผลขับปัสสาวะ โดยลดการดูดกลับ Na^+ ที่ proximal tubule ในขณะที่ sildenafil citrate ขนาดที่ใช้ในการทดลอง นี้ไม่ทำให้เกิดผลเหล่านี้ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ไปพัฒนาเป็นยาลดความดัน หรือยาขับปัสสาวะได้ต่อไปในอนาคต

5. สรุป

1. ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย hexane, dichloromethane และ methanol ต่อการหดตัวของหัวใจห้องบนที่แยกจากตัว

1.1 สารสกัดจากกระชายดำทั้ง 3 ชนิด และ sildenafil citrate เพิ่มความแรงแต่ลดอัตราการหดตัวของหัวใจห้องบนที่แยกจากตัว

1.2 เมื่อเปรียบเทียบกับ sildenafil citrate แล้ว สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ methanol มีผลต่อความแรงในการหดตัวของหัวใจห้องบนมากกว่า sildenafil citrate

1.3 สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane มีผลต่ออัตราการหดตัวของหัวใจห้องบนมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารอื่น

2. ผลของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane และ sildenafil citrate ต่อความดันเลือดแดงและการทำงานของไตที่ใช้ clearance technique ในหนูที่สลบ

2.1 สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane สามารถลด MABP, RPF, GFR, FE_K และ FPR_{Na} และเพิ่ม \dot{V} , FE_{Na} และ FDR_{Na} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.2 สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ทำให้เกิด diuretic และ natriuretic effect โดยยับยั้งการดูดกลับ sodium ที่ proximal tubule และทำให้ sodium ใน plasma ลดลง

2.3 สารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ทำให้ระดับ potassium ใน plasma เพิ่มขึ้นเนื่องจากการลดการขับทิ้ง potassium

2.4 การออกฤทธิ์ของสารสกัดจากกระชายดำด้วย dichloromethane ต่อความดันเลือดและการทำงานของไตในหนูแร้ท มีกลไกแตกต่างจาก sildenafil citrate คือสามารถลด MABP, RPF, GFR และ \dot{V} โดยไม่มีผลต่อการดูดกลับ Na^+ ที่ proximal tubule นอกจากนี้ sildenafil citrate ทำให้ \dot{V} ลดลงและ FE_{Na} ไม่เปลี่ยนแปลงจากช่วง control ค่า hematocrit และ P_{Na} ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ผลดังกล่าวอาจเกิดจาก fluid retention หลังจากให้ sildenafil citrate

เอกสารอ้างอิง

- จำรัส เข็นนิล, มนตรี ตีระชาติ. กระจายดำ...สมุนไพรหายาก เล่มที่ 1. กรุงเทพฯ: เคพีเอ็มมีเดียสยาม; 2545
- พิทักษ์ จันทรธรรมชาติ. กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากกระจายดำต่อการหดตัวของหัวใจห้องบนของหนูขาวที่แยกจากตัว. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; 2547.
- เลิศลักษณ์ พนมขวัญ. ผลของสารสกัดด้วยเมธานอลจากกระจายดำต่อการหดตัวของหัวใจห้องบนของหนูแร้ที่แยกจากตัว. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; 2546.
- โสภิต ธรรมอารี, กมลศรี สายพันธ์, วัชรภาพร วิกากรณ์, กรกนก อิงคินันท์. ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากกระจายดำด้วยเอธานอล. โครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย เรื่องการศึกษาระยะก่อนคลินิกด้านประสิทธิผลและความปลอดภัยของสมุนไพรกวาวเครือแดง กระจาย และกระจายดำ เพื่อพัฒนาเป็นยาขยายหลอดเลือดใช้รักษาผู้ป่วยเพศชายไม่ทำงาน. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ร่วมกับ ภาควิชาเภสัชวิทยา; 2549.
- Baer PG, Navar LG, Guyton AC. Renal autoregulation, filtration rate, and electrolyte excretion during vasodilatation. *Am J Physiol -- Legacy Content*. 1970 September 1, 1970;219(3):619-25.
- Ball SG, Oats NS, Lee MB. Urinary dopamine in man and rat: effects of inorganic salts on dopamine excretion. *Clin Sci Mol Med*. 1978;55:167-73
- Barajas L. The innervation of the juxtaglomerular apparatus an electron microscopic study of the innervation of the glomerular arterial. *Lab Invest*. 1964;13:916-29
- Bell PD. Cyclic AMP Calcium interaction in the transmission of tubuloglomerular feedback. *Annu Rev Physiol*. 1978;49:275-93
- Berglund F. Renal clearance of inulin, polyfructosan-S and a polyethylene glycol (PE1000) in rat. *Acta Physiol Scand*. 1965;64:238-44.
- Berne RM, Levy MN. *Cardiovascular Physiology*. 8th ed. Missouri: Mosby; 2000.
- Corbin JD, Francis SH. Cyclic GMP Phosphodiesterase-5: Target of Sildenafil. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:13729-32.

- Creemers B, Scheler M, Maack C, Wendler O, Schafers H, Sudkamp M, et al. Effects of sildenafil (viagra) on human myocardial contractility, in vitro arrhythmias, and tension of internal mammaria arteries and saphenous veins. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003;41(5):734-43.
- Davidson WD, Sackner MA. Inulin determination by anthrene method. *J Lab Clin Med* 1963;62:351-6.
- Eitle E, Hiranyachattada S, Wang H, Harris PJ. Inhibition of proximal tubular fluid absorption by nitric oxide and arterial natriuretic peptide in rat kidney. *Am J Physiol.* 1998;274(Cell Physiol. 43):C1075-C80.
- Fadem SZ, Hernandez-Liamas G, Patak RV, Rosenblatt SG, Lifschitz MD, Stein JH. studies on the mechanism of sodium excretion during drug-induced vasodilatation in the dog. *J clin Invest.* 1982;69:604-10.
- Ganong WF. *Review of Medical Physiology.* 20 th ed: McGraw-Hill; 2001.
- Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology.* 11th ed. Pennsylvania: Elsevier Saunders; 2006.
- Hall JE, Guyton AC, Smith MJ, Coleman TG. Chronic blockade of angiotensin 11 formation during sodium deprivation. *American Journal of Physiology.* 1979;237:F424-F32.
- Hass JA, Hammond TG, Granger JP, Blaine EH, Knox FG. Mechanism of natriuresis during intratrenal infusion of prostaglandin. *American Journal of Physiology.* 1984;247:F475-F9.
- Hermansson K, Laarson M, Kalls koy O, Wolgast M. Influence of renal nerve activity on arteriolar resistance, ultrafiltration dynamics and fluid reabsorption. *Pfugers Arch.* 1981;389:85-90.
- Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci.* 2000 May 15, 2000;113(10):1671-6.
- Jackson G, Benjamin N, Jackson N, Allen MJ. Effects of sildenafil citrate on human hemodynamics. *The American Journal of Cardiology.* 1999;83(5, Supplement 1):13-20.

- Jackson G, Montorsi P, Cheitlin MD. Cardiovascular safety of sildenafil citrate (Viagra(R)): An updated perspective. *Urology*. 2006;68(3, Supplement 1):47-60.
- Jitjaingam A, Kakaew A, Saenphet K, Saenphet S, Aritajat S. Effects of *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Bak. on Reproductive Organs Hematology and Kidney Function of Male Rats. 31st Congress on Science and Technology of Thailand. Suranaree University of Technology; 2005.
- Jouad H, Lacaille-Dubois MA, Lyoussi B, Eddouks M. Effects of the flavonoids extracted from *Spergularia purpurea* Pers. on arterial blood pressure and renal function in normal and hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001;76(2):159-63.
- Johnston HH, Herzog JP, Lauler DP. Effects of prostaglandin E1 on renal hemodynamics, sodium and water excretion. *American Journal of Physiology*. 1967;213:939-46.
- Kimura K, Sachiko I, Takeshi S, Hikaru Y, Isao S, Naobumi M, et al. Location and action of angiotensin II type I receptor in the renal microcirculation. *Kidney Int*. 1997;52:S-201-S-4.
- Kloner RA, Zusman RM. Cardiovascular effects of sildenafil citrate and recommendations for its use. *The American Journal of Cardiology*. 1999;84(5, Supplement 2):11-7.
- Koeppen BM, Stanton BA. *Renal Physiology*. 3rd ed. Missouri: Mosby; 2000.
- Kon V, Ichikawa I. Effector for renal nerve control of cortical microcirculation. *American Journal of Physiology*. 1983;245:F545-F53.
- Krishna GG, Danovitch GM, Beck FW, Sowers JR. Dopaminergic mediation of the natriuretic response to volume expansion. *J Lab Clin Med*. 1985;105:214-8.
- Lamiere N, Vanholder SR, Leusen I. Role of medullary hemodynamics in the natriuresis of drug-induced renal vasodilation in the rat. *Circ Res*. 1980;47:839-44.
- Levick JR. *An Introduction to Cardiovascular Physiology*. 3rd ed. New York: Arnole; 2000.

- Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacology & Therapeutics*. 2006;109(3):366-98.
- Marin-Grez M, Cottone P, Carretero OA. Evidence for an involvement of kinins in regulation of sodium excretion. *Am J Physiol -- Legacy Content*. 1972 October 1, 1972;223(4):794-6.
- Matsumura Y, Tadano K, Yamasaki T. Renal haemodynamic and excretory responses to bradykinin in anesthetized dogs. *Cli Exper Pharmacol & Physiol*. 1999;26:645-50.
- Opie LH. *Heart physiology from cell to circulation*. 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 1998.
- Phurimsak C, Leardkamolkarn V. Screening for antiviral effect of Thai herbs; *Kaempferia parviflora*, *Ellipeiopsis cherreensis* and *Stemona tuberosa* against Dengue virus type-2. 31st Congress on Science and Technology of Thailand. Suranaree University of Technology; 2005.
- Polpong N, Sawatdipong S, Hiranyachattada S. Effects of *Kaempfer parviflora* Extracts on Contraction of Isolated Rat Thoracic Aorta. The fifth National Symposium on Graduate Research; 2005 10th-11th October; Kasetsart University, Bangkok, Thailand; 2005.
- Quan HX, Kim SY, Jin XS, Park JK, Kim SZ, Cho kW. Effects of phosphodiesterase 5 inhibition with sildenafil on atrial contractile and secretory function. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2006;10:149-54.
- Rujjanawate C, Kanjanapothi D, Amornlerdpison D, Pojanagaroon S. Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;102(1):120-2.
- Ruth P. Cyclic GMP-Dependent Protein Kinases: Understanding in Vivo Functions by Gene Targeting. *Pharmacology & Therapeutics*. 1999;82(2-3):355-72.

- Salloum FN, Ockaili RA, Wittkamp M, Marwaha VR, Kukreja RC. Vardenafil: a novel type 5 phosphodiesterase inhibitor reduces myocardial infarct size following ischemia/reperfusion injury via opening of mitochondrial KATP channels in rabbits. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2006;40(3):405-11.
- Schultz HD, Gardner DG, DEschepper CF, Coleridge HM, Coleridge JC. Vagal C-fiber plockade abolishes sympathetic inhibition by atrial natriuretic factor. *American Journal of physiology*. 1988;255:R6-R13.
- Sherwood L. *Human physiology*. 4th ed California: Brooks/Cole; 2001.
- Smith HW, Finkelstein N, Aliminoso L. The renal clearances of substituted hippuric acids derivatives and other aromatic acids in dogs and man. *J Clin Invest*. 1945;42:388-404.
- Sookkongwaree K. HIV-1 reverse transcriptase inhibitors from family zingiberaceae. Bangkok: Chulalongkorn University; 1999.
- Tajima M, Bartunek J, Weinberg EO. Atrial natriuretic peptide has different effects on contractility and intracellular pH in normal and hypertrophied myocytes from pressure overloaded hearts. *Circulation*. 1998;98:2760-4.
- Tanasiriwattana N, Natakutung S, Tanajaro T. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from *Kaempferia galanga*, *K. parviflora* and *K. angustifolia*. Bangkok: Chulalongkorn University; 1997.
- Tewtrakul S, Subhadhirasakul S. Anti-allergic activity of some selected plants in the Zingiberaceae family. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;109(3):535-8.
- Thiesson HC, Jensen BL, Jespersen B, Schaffalitzky de Muckadell OB, Bistrup C, Walter S, et al. Inhibition of cGMP-specific phosphodiesterase type 5 reduces sodium excretion and arterial blood pressure in patients with NaCl retention and ascites. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;288:F1044-F52.
- Thomsen K, Olesen OV. Renal lithium clearance as a measure of the delivery of water and sodium from the proximal tubule in human. *Am J Med Sci*. 1984;288:158-61.

- Thoren P, Mark AL, Morgan DA, O'Neill TP, Needleman P, Brody MJ. Activation of vagal depressor reflexes by atriopeptins inhibits renal sympathetic nerve activity. *American journal of Physiology*. 1986;251:1252-9.
- Tiamyuyen S, Leardkamolkarn V. The effects of crude extracted *Kaempferia parviflora* on human cholangiocarcinoma cells proliferation, metastasis and apoptosis. 32nd Congress on Science and Technology of Thailand. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand; 2006.
- Valtin H, Schafer JA. *Renal Function*. 3rd ed. Massachusetts: Little, Brown and Company; 1994.
- Villa E, Garcia-Robles R, Haas J, Romero JC. Comparative Effect of PGE2 and PGI2 on Renal Function. *Hypertension*. 1997 September 1, 1997;30(3):664-6.
- Wagner C, Pfeifer A, Ruth P, Hofmann F, Kurtz A. Role of cGMP-Kinase II in the Control of Renin Secretion and Renin Expression. *J Clin Invest*. 1998 October 15, 1998;102(8):1576-82.
- 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;110(3):559-62.
- Widmaier EP, Raff H, Strang KT. *Human Physiology*. 9th ed. New York: McGraw-Hill; 2004.
- Windhager EE. *Handbook of Physiology* ; section 8 "Renal Physiology". New York: Oxford University Press; 1992.
- Yenjai C, Prasanphen K, Daodee S, Wongpanich V, Kittakoop P. Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. *Fitoterapia*. 2004;75(1):89-92.
- Yuan BH, Robinette JB, Corner JD. Effects of angiotensin II and norepinephrine on isolated rat afferent and efferent arterioles. *American Journal of Physiology*. 1990;258:F741-F50.

Zhao G, Messina E, Xu X, Ochoa M, Serpillon S, Shryock J, et al. Ranolazine, a novel anti-anginal agent, does not alter isosorbide dinitrate- or sildenafil-induced changes in blood pressure in conscious dogs. *European Journal of Pharmacology*. 2006;541(3):171-6.

Zhuo J. The regulation of proximal tubule reabsorption in the rat kidney. Parkville, Victoria, Australia: University of Melbourne 1990.

Zusman RM, Morales A, Glasser DB, Osterloh IH. Overall cardiovascular profile of sildenafil citrate. *The American Journal of Cardiology*. 1999;83(5, Supplement 1):35-44.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. ขั้นตอนการวิเคราะห์หาความเข้มข้น inulin (Davidson *et al.*, 1963)

1.1 เตรียม stock solution ของ fructose ที่มีความเข้มข้น 500, 1,100 และ 1,700 mg% แล้วนำไปเตรียมสารละลายมาตรฐาน fructose ที่ความเข้มข้น 2.0, 4.4 และ 6.8 mg % ตามลำดับ

1.2 เตรียม anthrone reagent โดยนำน้ำกลั่นปริมาตร 26 ml ใส่ในบีกเกอร์แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง จนมีอุณหภูมิต่ำมากๆ แล้วจึงค่อยๆ เท H_2SO_4 ปริมาตร 100 ml โดยทำให้เกิดควันน้อยที่สุดและยังแช่อยู่ในน้ำแข็งต่อไปจนอุณหภูมิลดต่ำลง แล้วเท anthrone 147 mg ผสมลงไปนในสารละลาย คนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันและได้สารละลายสีเหลืองใส เก็บสารละลายได้ใส่ขวดแก้วสีชาแช่ในน้ำแข็งไว้หรือเก็บไว้ในตู้เย็น

1.3 เจือจางตัวอย่างปัสสาวะที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:200 ถึง 1:1,000 โดยเจือจางตามความเหมาะสม เช่น อัตราไหลของปัสสาวะน้อยมากให้เจือจางด้วยอัตราส่วน 1:1,000 อัตราไหลของปัสสาวะสูงให้เจือจางด้วยอัตราส่วน 1:200

1.4 นำ plasma ปริมาตร 20 μ l ใส่ในหลอดทดลองที่มี 3% TCA 1,200 μ l แล้วนำมาผสมให้เข้ากันด้วย mixer แล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วผสมอีกครั้งด้วย mixer และนำไป centrifuge ด้วยความเร็วระหว่าง 3/4 กับความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 20 นาทีเพื่อแยกตะกอนโปรตีน

1.5 นำหลอดทดลองไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง โดยให้น้ำแข็งสูงท่วมปลายหลอดขึ้นมาประมาณ 5 cm แล้วไปเปิด anthrone reagent 3 ml ลงไปในหลอดทดลอง แล้วผสม sample (น้ำกลั่นสำหรับทำ blank, ตัวอย่างปัสสาวะที่เจือจางแล้ว, plasma ส่วนใสที่แยกตะกอนโปรตีนแล้ว และสารละลายมาตรฐาน 3 ความเข้มข้น) ที่เตรียมไว้ลงไป 0.5 ml ผสมให้เข้ากันจนเป็นสีเหลืองใส

1.6 นำหลอดทดลองไปแช่ในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 38°C เป็นเวลา 50 นาที แล้วนำออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.7 อ่านค่า %transmission ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 620 nm

2. ขั้นตอนการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ para-aminohippuric acid (PAH) (Smith *et al.*, 1945)

2.1 เตรียม stock solution ของ PAH 20 g% โดยใช้ PAH ละลายในน้ำกลั่น แล้วนำมาเจือจางเพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐาน PAH ความเข้มข้น 0, 1, 2, 4, 6 และ 10 mg%

2.2 เตรียมสารเคมีที่ใช้เป็น reagent ประกอบด้วย

1) 0.2 N HCl

2) 0.1 % sodium nitrite, NaNO_2

3) 0.5 % ammonium sulfamate, $\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$

4) 0.1 % N-(1-Naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride, $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2$

5) 3.2 % Trichloroacetic acid (TCA), CCl_3COOH

2.3 เจือจางปัสสาวะที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:200-1:1000 โดยเจือจางตามความเหมาะสม เช่น ปริมาณปัสสาวะน้อยมาให้เจือจางด้วยอัตราส่วน 1:1000, ปริมาณปัสสาวะมากให้เจือจางด้วยอัตราส่วน 1:200

2.4 นำปัสสาวะที่เจือจางแล้ว 45 μl ใส่ในหลอดทดลองที่มี 3.2% TCA 1 ml แล้วนำมาผสมให้เข้ากัน (ตัวอย่างละ 2 หลอด)

2.5 นำ plasma ปริมาตร 50 μl ใส่ในหลอดทดลองที่มี 3.2% TCA 1100 μl แล้วนำมาผสมให้เข้ากันด้วย mixer แล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วผสมอีกครั้งด้วย mixer และนำไป centrifuge เป็นเวลา 2 นาที เพื่อแยกตะกอนโปรตีน จากนั้นดูดเฉพาะ plasma ส่วนใสมา 1 ml ผสมกับ 3.2% TCA 1 ml ให้เข้ากัน

2.6 นำสารละลายมาตรฐาน PAH ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1 ml ใส่ในหลอดทดลองที่มี 3.2% TCA 1 ml แล้วนำมาผสมให้เข้ากัน (ตัวอย่างละ 2 หลอด)

2.7 นำสารละลายมาตรฐาน, plasma และปัสสาวะที่ผสม 3.2% TCA แล้วมาทดลอง โดยใส่ 0.2 N HCl ปริมาตร 200 μl และ 0.1% sodium nitrite 100 μl ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 3-5 นาทีแล้วใส่ 0.5% ammonium sulfamate 100 μl ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 3-5 นาที หลังจากนั้นใส่ 0.1% N-(1-Naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride 100 μl ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 15-60 นาที

2.8 อ่านค่า % transmission ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 nm

3. ขั้นตอนการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ lithium

3.1 เตรียม lithium diluent ประกอบด้วย KCl 4.7 mmol/l, Triton-X 0.1 g/l ผสมลงในน้ำกลั่นให้เข้ากัน

3.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน lithium chloride ละลายใน lithium diluent ให้ได้ความเข้มข้น 0.018, 0.036, 0.072, 0.108 และ 0.144 mmol/l นำสารละลายมาตรฐาน ปริมาตร 100 μ l ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นผสมด้วย lithium diluent จนได้ปริมาตร 2 ml

3.3 นำตัวอย่าง plasma ปริมาตร 100 μ l ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นผสมด้วย lithium diluent จนได้ปริมาตร 2 ml (ในกรณีที่มีปัสสาวะน้อยกว่า 100 μ l เช่น 25 μ l ให้ผสมด้วย lithium diluent จนได้ปริมาตร 2 ml เมื่ออ่านค่าด้วย ICP-AES ให้นำค่าที่ได้คูณด้วย 4

3.4 นำตัวอย่างปัสสาวะ ปริมาตร 100 μ l ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นผสมด้วย lithium diluent จนได้ปริมาตร 2 ml

3.5 วิเคราะห์หาปริมาณ lithium ด้วยเครื่อง inductively coupled plasma atomic emission spectrometer (ICP – AES) ที่ความยาวคลื่น 670.8 nm

ภาคผนวก ข

รางวัลที่ได้รับจากการนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ "Effects of *Kaempferia parviflora* Extracts on Isolated Atrial Contraction, Blood Pressure and Renal Functions in Rat." ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 5 จัดโดย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 10-11 ตุลาคม 2548



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 5
The 5th National Symposium on Graduate Research

เกียรติบัตรนี้ให้เพื่อแสดงว่า

Nattaporn CHUSAPALO
เป็นผู้เสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์

ใน

การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 5
วันที่ 10-11 ตุลาคม 2548

ขอแสดงความชื่นชมโดยสุจริตใจพร ทำคุณประโยชน์ในด้านการศึกษาสร้างศรัทธาด้วย
และผลงาน เพื่อพัฒนาประเทศสืบต่อไปจ้กภาคภูมิใจ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สมพงษ์ ปรีเปรม)
ประธานการประชุมระดับบัณฑิตศึกษาฯ มหาวิทยาลัยเกษตรฯ

(รองศาสตราจารย์ อากาศกานู)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายณัฐพร จุสะปาโล
 รหัสประจำตัวนักศึกษา 4422088
 วุฒิการศึกษา
 วุฒิ ชื่อสถาบัน ปีที่สำเร็จการศึกษา
 วิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2543
 (วิทยาศาสตรจารย์)

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนอุดหนุนผู้ช่วยสอน (Teaching Assistant) ระดับปริญญาโท ปีการศึกษา 2546-2547
 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

ณัฐพร จุสะปาโล, เลิศลักษณ์ พนมขวัญ, คันสนีย์ สวัสดิพงษ์ และศิริพันธุ์ หิรัญญะชาติธาดา. ผลของสารสกัดจากกระชายดำต่อการหดตัวของหัวใจห้องบนของหนูขาวที่แยกจากตัว. ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ครั้งที่ 2. จัดโดยบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. ณ ศูนย์ปาฐกถาประดิษฐ์ เขยจิตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 12 มีนาคม 2547.

Chusapalo N, Sawatdipong S and Hiranyachattada S. Effects of *Kaempferia parviflora* Extracts on Isolated Atrial Contraction, Blood Pressure and Renal Functions in Rat. In "The fifth National Symposium on Graduate Research". At Kasetsart University, Bangkok, Thailand. 10th-11th October 2005.