

ผลของเคอร์เซติน และนารินเจนินต่อความสามารถในการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่  
ที่แยกจากกายหนูขาว



นางสาว ปารณีย์ ญาติมาก

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1138-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF QUERCETIN AND NARINGENIN ON CONTRACTILITY OF  
ISOLATED RAT THORACIC AORTA



Miss Paranee Yatmark

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Pharmacology (Inter-Department)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-53-1138-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์      ผลของเคอร์เซติน และนารินเจนินต่อความสามารถในการหดตัวของ  
หลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากกายหนูขาว  
โดย                              นางสาวปารณีย์ ญาติมาก  
สาขาวิชา                      เกษัชวิทยา (สหสาขา)  
อาจารย์ที่ปรึกษา              ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีย์ เจียรณมงคล

---

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์.ดร.ม.ร.ว. กัลยา ติงศภัทย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์.ดร. สุพัตรา ศรีไชยรัตน์ )

..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์.ดร. สุรีย์ เจียรณมงคล)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประสาน ธรรมอุปการณ์)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัชรী ลิมปนสิทธิกุล)

นางสาวปารณีย์ ญาติมาก: ผลของเคอร์เซติน และนารินเจนินต่อความสามารถในการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากกายหนูขาว (EFFECTS OF QUERCETIN AND NARINGENIN ON CONTRACTILITY OF ISOLATED RAT THORACIC AORTA)

อาจารย์ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีย์ เจียรณมงคล. 103 หน้า.

ISBN 974-53-1138-3

Quercetin และ naringenin เป็นสารในกลุ่ม flavonoids ที่พบในผลิตภัณฑ์จากพืชสมุนไพรหลายชนิด ซึ่งมีการนำมาบริโภคในรูปของอาหารเสริม เนื่องจากเชื่อว่ามีฤทธิ์ในการป้องกันโรคหลอดเลือดและหัวใจ จึงต้องการศึกษาผลของ quercetin และ naringenin ต่อความสามารถในการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่ได้มาจากหนูขาวสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนัก 250-300 กรัม มาชุดเอา endothelium ออก แล้วทำการวัดผลการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด แบบ Isometric ผลการศึกษาพบว่า quercetin ความเข้มข้น 50  $\mu\text{M}$  - 1 mM และ naringenin ความเข้มข้น 50  $\mu\text{M}$  - 2 mM สามารถลดการหดตัวเมื่อกระตุ้นด้วย PE 10  $\mu\text{M}$  และ KCl 40 mM อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ quercetin และ naringenin ความเข้มข้น 500  $\mu\text{M}$  ยังสามารถลดการหดตัวที่ถูกกระตุ้นด้วย PE 10  $\mu\text{M}$  ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  free Krebs-Henseleit solution แต่มีเพียง naringenin ความเข้มข้น 500  $\mu\text{M}$  สามารถลดการหดตัวที่ถูกกระตุ้นด้วย caffeine 10 mM ยิ่งไปกว่านั้น quercetin และ naringenin ความเข้มข้น 500  $\mu\text{M}$  สามารถลดการเกิด increase in the resting tone in aorta (IRT) ได้ รวมถึงมีผลลดการหดตัว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย  $\text{CaCl}_2$  แบบสะสมความเข้มข้น ในสารละลาย high  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  free solution

นอกจากนี้ quercetin และ naringenin ทำให้กล้ามเนื้อหลอดเลือดคลายตัวได้โดยไม่ขึ้นกับ endothelium และ propranolol สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ quercetin และ naringenin ในการคลายตัวของหลอดเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วน indomethacin, atropine, glybenclamide, 4-AP สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ naringenin ในการคลายตัวของหลอดเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ TEA, methylene blue, L-NAME ไม่มีผลต่อฤทธิ์ในการคลายหลอดเลือดของ quercetin และ naringenin

จึงอาจสรุปได้ว่า quercetin และ naringenin อาจจะมีผลโดยตรงต่อการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดผ่านทางหลายกลไก โดยส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของ  $\text{Ca}^{2+}$  จากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ และบางส่วนมีผลต่อ  $\text{Ca}^{2+}$  จากภายในเซลล์ อีกทั้งยังทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้โดยไม่ขึ้นกับ endothelium รวมทั้งกลไกการออกฤทธิ์คลายหลอดเลือดของ quercetin และ naringenin ในสภาวะที่ไม่มี endothelium อาจเกี่ยวข้องกับการกระตุ้น  $\beta$  - adrenoceptor นอกจากนี้ naringenin นั้นอาจมีบางส่วนเกี่ยวข้องกับการกระตุ้น  $\text{K}^+$  channel, COX pathway และ muscarinic receptor.

สาขาวิชา เกษตรวิทยา (สหสาขาวิชา)

ปีการศึกษา 2547

ลายมือชื่อ.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

## 4689107020 MAJOR : PHARMACOLOGY

KEYWORD: QUERCETIN / NARINGENIN / CALCIUM / VASCULAR SMOOTH MUSCLE

PARANEE YATMARK: EFFECTS OF QUERCETIN AND NARINGENIN ON

CONTRACTILITY OF ISOLATED RAT THORACIC AORTA: ASST. PROF. SUREE

JIANMONGKOL, Ph.D., 103 pp. ISBN 974-53-1138-3.

Quercetin and naringenin are the flavonoids found in various types of plants and plant products. Quercetin found recently in many dietary supplements. Flavonoids are found to be associated with decreased risk of cardiovascular heart disease (CHD). In this study, the effects of quercetin and naringenin on contractility of isolated rat thoracic aorta in the absence of endothelium were investigated. The thoracic aortic strips were isolated from male Wistar rats (250-300 g), denuded the endothelium layer, and the contractility responses were measured isometrically. The results showed that quercetin (50  $\mu\text{M}$  - 1 mM) and naringenin (50  $\mu\text{M}$  - 2 mM) significantly inhibited the contraction induced by PE 10  $\mu\text{M}$  and KCl 40 mM. In addition, both quercetin and naringenin (500  $\mu\text{M}$ ) significantly inhibited the contraction induced by PE 10  $\mu\text{M}$  in  $\text{Ca}^{2+}$ - free Krebs-Henseleit solution. Quercetin (500  $\mu\text{M}$ ), but not naringenin (500  $\mu\text{M}$ ), significantly inhibited the contraction induced by caffeine 10 mM. Furthermore, quercetin and naringenin (500  $\mu\text{M}$ ) suppressed an increase in the resting tone in aorta (IRT) as well as suppressed  $\text{CaCl}_2$  - induced contraction in high  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  free solution.

In this study, quercetin and naringenin directly caused significantly vasodilatation effect in endothelium-denuded segment. In addition, propranolol significantly inhibited the relaxant effect of quercetin and naringenin. Indomethacin, atropine, glybenclamide, 4-AP significantly inhibited the relaxant effect of naringenin in endothelium - denuded aorta. However, TEA, methylene blue, L-NAME had no effect on quercetin- and naringenin- mediated relaxation.

In conclusion, quercetin and naringenin affect vascular contractility via several mechanisms. Ones of the mechanisms may involve the interference on  $\text{Ca}^{2+}$  entry into smooth muscle cells and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization. Moreover, quercetin and naringenin were able to induce endothelium- independent relaxation. It is possible that the mechanism of quercetin and naringenin-induced relaxation involved other mechanism including in activation of  $\beta$ -adrenoceptor on vascular smooth muscle. In addition, naringenin-induced relaxation may be involved in activation processes of  $\text{K}^+$  channel, COX pathway and muscarinic receptor.

Field of study Pharmacology (Inter-Department)

Academic year 2004

Student's signature.....

Advisor's signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีย์ เจียรณ์มงคล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ความรู้ ตลอดจนความช่วยเหลือต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. มยุรี ตันติสิทธิ์ หัวหน้าภาควิชาเกษตรชีววิทยา คณะเกษตรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาอำนวยความสะดวกในเรื่องการใช้สถานที่ เครื่องมือ และ อุปกรณ์ต่างๆ ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา ศรีไชยรัตน์ ที่ได้กรุณามาเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ประสาน ธรรมอุปกรณ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วชิรี ลิมนิสิตทิกุล ที่ได้กรุณามาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ให้ความรู้ตลอดการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา ที่ให้กำลังใจเสมอมาจนสำเร็จการศึกษาและขอขอบพระคุณทุกท่านที่ได้มีส่วนช่วยเหลือในความสำเร็จของวิทยานิพนธ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	ฌ
สารบัญตาราง.....	ณ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ต
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
สมมุติฐานของการวิจัย.....	2
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
ผลของ quercetin ต่อระบบหลอดเลือด.....	7
ผลของ naringenin ต่อระบบหลอดเลือด.....	9
ทฤษฎีที่สำคัญ: กลไกการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบ.....	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	15
สัตว์ทดลอง.....	15
เครื่องมือ.....	15
สารเคมี.....	15
วิธีดำเนินการวิจัย.....	18
การเตรียมกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว.....	18
วิธีการทดลอง.....	19

1. ศึกษาผลของ quercetin และ naringenin ในการยับยั้งการตอบสนองของ กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ ต่อการกระตุ้นด้วย PE, KCl .....	19
2. ศึกษาผลของ quercetin และ naringenin ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลง $Ca^{2+}$ ที่ปล่อย ออกจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่....	20
3. ศึกษาผลของ quercetin และ naringenin ต่อการเคลื่อนที่เข้าเซลล์ของ $Ca^{2+}$ และ การเก็บ $Ca^{2+}$ สู่แหล่งเก็บภายในเซลล์ที่สัมพันธ์กับ $\alpha_1$ -adrenergic receptor....	22
4. ศึกษาผลของ quercetin และ naringenin ต่อการเคลื่อนที่เข้าเซลล์ กล้ามเนื้อเรียบของ $Ca^{2+}$ อีอิสระจากภายนอก เมื่อถูกกระตุ้นด้วย $CaCl_2$ ใน สารละลายที่ปราศจาก $Ca^{2+}$ ที่มี $K^+$ สูง.....	24
5. ศึกษาผลของ quercetin และ naringenin ต่อการคลายตัวของ หลอดเลือดแดงใหญ่.....	25
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	26
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	27
1. ผลของ quercetin และ naringenin ในการยับยั้งการตอบสนองของกล้ามเนื้อเรียบ หลอดเลือดแดงใหญ่ ต่อการกระตุ้นด้วย PE, KCl.....	27
2. ผลของ quercetin และ naringenin ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลง $Ca^{2+}$ ที่ปล่อยออกจาก แหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่.....	28
3. ผลของ quercetin และ naringenin ต่อการเคลื่อนที่เข้าเซลล์ของ $Ca^{2+}$ และการเก็บ $Ca^{2+}$ เข้าสู่แหล่งเก็บภายในเซลล์ที่สัมพันธ์กับ $\alpha_1$ -adrenergic receptor.....	29
4. ผลของ quercetin และ naringenin ต่อการเคลื่อนที่เข้าเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของ $Ca^{2+}$ อีอิสระจากภายนอกเมื่อถูกกระตุ้นด้วย $CaCl_2$ ในสารละลายที่ปราศจาก $Ca^{2+}$ ที่มี $K^+$ สูง... ..	30
5. ผลของ quercetin และ naringenin ต่อการคลายตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่.....	31
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง.....	77
รายการอ้างอิง.....	82
ภาคผนวก.....	89
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	103



## สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
1. สูตรโครงสร้างของ quercetin .....	4
2. สูตรโครงสร้างของ naringenin.....	4
3. กลไกการเพิ่มปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์ของกล้ามเนื้อเรียบ.....	11
4. การเกิด Increase in the resting tone in aorta (IRT).....	12
5. การควบคุมการหดตัวหรือคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด.....	14
6. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองและ organ bath สำหรับ isolated rat aorta.....	17
7. การเตรียมกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว.....	17
8. การเกิด Increase in the resting tone in aorta (IRT).....	23
9. ผลการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE 10 $\mu\text{M}$ (1a), KCl 40 mM (1b) ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - containing solution.....	33
10. ผลการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE 10 $\mu\text{M}$ (1a), caffeine 10 mM (1b) ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - free medium .....	34
11. ผลของ quercetin ความเข้มข้น 50 $\mu\text{M}$ (1a), 100 $\mu\text{M}$ (1b) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE 10 $\mu\text{M}$ ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - containing solution.....	35
12. ผลของ quercetin ความเข้มข้น 500 $\mu\text{M}$ (1a), 1000 $\mu\text{M}$ (1b) ต่อการหดตัวของ กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE 10 $\mu\text{M}$ ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - containing solution.....	36
13. กราฟแสดงผลของ quercetin ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE 10 $\mu\text{M}$ .....	37
14. ผลของ naringenin ความเข้มข้น 50 $\mu\text{M}$ (1a), 100 $\mu\text{M}$ (1b) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE 10 $\mu\text{M}$ ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - containing solution.....	38

## ภาพประกอบ

หน้า

15. ผลของ naringenin ความเข้มข้น 500 $\mu\text{M}$ (1a), 1000 $\mu\text{M}$ (1b), 3000 $\mu\text{M}$ (1c) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE 10 $\mu\text{M}$ ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - containing solution.....	39
16. กราฟแสดงผลของ naringenin ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE 10 $\mu\text{M}$ .....	40
17. ผลของ quercetin ความเข้มข้น 50 $\mu\text{M}$ (1a), 100 $\mu\text{M}$ (1b) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย KCl 40 mM ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - containing solution.....	41
18. ผลของ quercetin ความเข้มข้น 500 $\mu\text{M}$ (1a), 1000 $\mu\text{M}$ (1b) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย KCl 40 mM ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - containing solution.....	42
19. กราฟแสดงผลของ quercetin ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย KCl 40 mM.....	43
20. ผลของ naringenin ความเข้มข้น 50 $\mu\text{M}$ (1a), 100 $\mu\text{M}$ (1b) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย KCl 40 mM ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - containing solution.....	44
21. ผลของ naringenin ความเข้มข้น 500 $\mu\text{M}$ (1a), 1000 $\mu\text{M}$ (1b) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย KCl 40 mM ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - containing solution.....	45
22. กราฟแสดงผลของ naringenin ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย KCl 40 mM.....	46
23. ผลของ quercetin ความเข้มข้น 500 $\mu\text{M}$ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE 10 $\mu\text{M}$ ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - free medium.....	47

## ภาพประกอบ

หน้า

24. ผลของ naringenin ความเข้มข้น 500 $\mu\text{M}$ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE 10 $\mu\text{M}$ ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - free medium .....	47
25. กราฟแสดงผลของ quercetin และ naringenin ความเข้มข้น 500 $\mu\text{M}$ ต่อการหดตัวของ กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวเมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE 10 $\mu\text{M}$ ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - free medium.....	48
26. ผลของ quercetin ความเข้มข้น 500 $\mu\text{M}$ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย caffeine 10 mM ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - free medium.....	49
27. ผลของ naringenin ความเข้มข้น 500 $\mu\text{M}$ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย caffeine 10 mM ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - free medium.....	49
28. กราฟแสดงผลของ quercetin และ naringenin ความเข้มข้น 500 $\mu\text{M}$ ต่อการหดตัวของ กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย caffeine 10 mM ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - free medium.....	50
29. ผลของ quercetin (1a) และ naringenin (1b) ความเข้มข้น 500 $\mu\text{M}$ ต่อการหดตัวของ กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวในขณะพัก [Increase in the resting tone in aorta (IRT)].....	51
30. กราฟแสดงผลของ quercetin และ naringenin ความเข้มข้น 500 $\mu\text{M}$ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวในขณะพัก [Increase in the resting tone in aorta (IRT)].....	52
31. ผลของ quercetin ความเข้มข้น 500 $\mu\text{M}$ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวเมื่อถูกกระตุ้นด้วย $\text{CaCl}_2$ แบบ cumulative dose-response curve ใน $\text{Ca}^{2+}$ - free depolarizing solution.....	53

ภาพประกอบ

หน้า

32. กราฟแสดงผลของ quercetin ความเข้มข้น 500  $\mu\text{M}$  ต่อการหดตัวของ  
 กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวเมื่อถูกกระตุ้นด้วย  $\text{CaCl}_2$   
 ใน  $\text{Ca}^{2+}$  - free depolarizing solution .....54

33. ผลของ naringenin ความเข้มข้น 500  $\mu\text{M}$  ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ  
 หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวเมื่อถูกกระตุ้นด้วย  $\text{CaCl}_2$  แบบ cumulative dose-response  
 curve ใน  $\text{Ca}^{2+}$  - free depolarizing solution .....55

34. กราฟแสดงผลของ naringenin ความเข้มข้น 500  $\mu\text{M}$  ต่อการหดตัวของ  
 กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวเมื่อถูกกระตุ้นด้วย  $\text{CaCl}_2$   
 ใน  $\text{Ca}^{2+}$  - free depolarizing solution.....56

35. กราฟแสดงผลของ quercetin และ naringenin ความเข้มข้น 500  $\mu\text{M}$  ต่อการหดตัว  
 ของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวเมื่อถูกกระตุ้นด้วย  $\text{CaCl}_2$   
 ใน  $\text{Ca}^{2+}$  - free depolarizing solution.....57

36. ผลการคลายตัวของ quercetin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000  $\mu\text{M}$  แบบ  
 cumulative dose-response curve ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution.....58

37. ผลการคลายตัวของ naringenin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000  $\mu\text{M}$  แบบ  
 cumulative dose-response curve ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution .....59

38. กราฟแสดงผลการคลายตัวของ quercetin และ naringenin ความเข้มข้น 50,100,  
 500,1000,2000  $\mu\text{M}$  แบบ cumulative dose-response curve.....60

39. ผลของ quercetin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัว  
 ของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ indomethacin  $10^{-5}$  M  
 ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution .....61

40. ผลของ quercetin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัว  
 ของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ atropine  $10^{-4}$  M  
 ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution.....61

ภาพประกอบ	หน้า
41. กราฟแสดงผลของ quercetin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000 $\mu\text{M}$ ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ indomethacin $10^{-5}$ M และ atropine $10^{-4}$ M .....	62
42. ผลของ quercetin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000 $\mu\text{M}$ ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ L-NAME $10^{-4}$ M ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - containing solution.....	63
43. ผลของ quercetin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000 $\mu\text{M}$ ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ propranolol $10^{-5}$ M ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - containing solution.....	63
44. กราฟแสดงผลของ quercetin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000 $\mu\text{M}$ ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ L-NAME $10^{-4}$ M และ propranolol $10^{-5}$ M.....	64
45. ผลของ quercetin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000 $\mu\text{M}$ ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาวเมื่อให้ methylene blue $10^{-5}$ M ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - containing solution.....	65
46. ผลของ quercetin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000 $\mu\text{M}$ ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ TEA $10^{-3}$ M ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - containing solution.....	65
47. กราฟแสดงผลของ quercetin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000 $\mu\text{M}$ ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาวเมื่อให้ methylene blue $10^{-5}$ M และ TEA $10^{-3}$ M ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - containing solution.....	66
48. ผลของ quercetin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000 $\mu\text{M}$ ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ 4-aminopyridine $10^{-4}$ M ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - containing solution.....	67

ภาพประกอบ	หน้า
49. ผลของ quercetin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000 $\mu\text{M}$ ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ glybenclamide $10^{-5}$ M ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - containing solution.....	67
50. กราฟแสดงผลของ quercetin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000 $\mu\text{M}$ ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ 4-aminopyridine $10^{-4}$ M และ glybenclamide $10^{-5}$ M.....	68
51. ผลของ naringenin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000 $\mu\text{M}$ ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ indomethacin $10^{-5}$ M ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - containing solution.....	69
52. ผลของ naringenin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000 $\mu\text{M}$ ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ atropine $10^{-4}$ M ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - containing solution.....	69
53. กราฟแสดงผลของ naringenin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000 $\mu\text{M}$ ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ indomethacin $10^{-5}$ M และ atropine $10^{-4}$ M.....	70
54. ผลของ naringenin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000 $\mu\text{M}$ ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ L-NAME $10^{-4}$ M ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - containing solution.....	71
55. ผลของ naringenin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000 $\mu\text{M}$ ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ propranolol $10^{-5}$ M ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - containing solution.....	71
56. กราฟแสดงผลของ naringenin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000 $\mu\text{M}$ ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ L-NAME $10^{-4}$ M และ propranolol $10^{-5}$ M .....	72

ภาพประกอบ

หน้า

57. ผลของ naringenin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของ  
 กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาวเมื่อให้ methylene blue  $10^{-5}$  M  
 ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution.....73

58. ผลของ naringenin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000  $\mu\text{M}$   
 ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ TEA  $10^{-3}$  M  
 ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution.....73

59. กราฟแสดงผลของ naringenin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000  $\mu\text{M}$  ต่อ  
 การคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ methylene blue  $10^{-5}$  M  
 และ TEA  $10^{-3}$  M .....74

60. ผลของ naringenin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัว  
 ของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ 4-aminopyridine  $10^{-4}$  M  
 ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution.....75

61. ผลของ naringenin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000  $\mu\text{M}$   
 ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ glybenclamide  
 $10^{-5}$  M ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution.....75

62. กราฟแสดงผลของ naringenin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000  $\mu\text{M}$  ต่อ  
 การคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ 4-aminopyridine  $10^{-4}$  M  
 และ glybenclamide  $10^{-5}$  M.....76

## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1. โครงสร้างของสารกลุ่ม flavonoids.....	90
2. ส่วนประกอบ Physiological solution (มิลลิโมล/ลิตร) .....	91
3. ข้อมูลของ DMSO, quercetin ความเข้มข้น 10,50,100,500,1000 $\mu\text{M}$ ต่อการหดตัวของ กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE และ KCl .....	92
4. ข้อมูลของ DMSO, naringenin ความเข้มข้น 10,50,100,500,1000,2000 $\mu\text{M}$ ต่อการหดตัว ของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE และ KCl .....	93
5. ข้อมูลของ DMSO, quercetin และ naringenin ความเข้มข้น 500 $\mu\text{M}$ ต่อการหดตัวของ กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE 10 $\mu\text{M}$ และ caffeine 10 $\mu\text{M}$ ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - free medium .....	94
6. ข้อมูลของ DMSO, quercetin และ naringenin ความเข้มข้น 500 $\mu\text{M}$ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวในขณะพัก [Increase in the resting tone in aorta (IRT)].....	95
7. ข้อมูลของ DMSO, quercetin และ naringenin ความเข้มข้น 500 $\mu\text{M}$ ต่อการหดตัว ของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวเมื่อถูกกระตุ้นด้วย $\text{CaCl}_2$ แบบ cumulative dose response curve ใน $\text{Ca}^{2+}$ - free depolarizing solution.....	96
8. ข้อมูลของ quercetin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000 $\mu\text{M}$ ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ indomethacin $10^{-5}$ M และ atropine $10^{-4}$ M ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - containing solution.....	97
9. ข้อมูลของ quercetin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000 $\mu\text{M}$ ต่อการคลายตัวของ กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ L-NAME $10^{-4}$ M, propranolol $10^{-5}$ M และ methylene blue $10^{-5}$ M ในสารละลาย $\text{Ca}^{2+}$ - containing solution.....	98



10. ผลของ quercetin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของ  
กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ TEA  $10^{-3}$  M, 4-aminopyridine  $10^{-4}$  M และ  
glybenclamide  $10^{-5}$  M ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution.....99
11. ข้อมูลของ naringenin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของ  
กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ indomethacin  $10^{-5}$  M  
และ atropine  $10^{-4}$  M ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution.....100
12. ข้อมูลของ naringenin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของ  
กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ L-NAME  $10^{-4}$  M, propranolol  $10^{-5}$  M และ  
methylene blue  $10^{-5}$  M ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution.....101
13. ผลของ naringenin ความเข้มข้น 50,100,500,1000,2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของ  
กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ TEA  $10^{-3}$  M, 4-aminopyridine  $10^{-4}$  M และ  
glybenclamide  $10^{-5}$  M ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution.....102

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

Ca <sup>2+</sup>	calcium ion
AC	adenylate cyclase
GTP	guanosine 5' - triphosphate
PLC	phospholipase C
IP <sub>3</sub>	inositol 1,4,5 - triphosphate
DAG	diacylglycerol
ATP	adenosine 5' - triphosphate
cAMP	cyclic adenosine 3',5'-monophosphate
cGMP	cyclic guanosine 3',5'-monophosphate
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
NO	nitric oxide
SR	sarcoplasmic reticulum
MLC	myosin light chain
MLCK	myosin light chain kinase
PE	phenylephrine
IRT	increase in the resting tone
CICR	Ca <sup>2+</sup> - induced Ca <sup>2+</sup> release
IICR	IP <sub>3</sub> - induced Ca <sup>2+</sup> release
K <sup>+</sup>	potassium ion
KCl	potassium chloride
ACh	acetylcholine
M	molar
mM	millimolar
ROC	Receptor-operated calcium channels
VOC	Voltage-operated calcium channel

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันพบว่าอุบัติการณ์การเกิดโรคระบบหัวใจและหลอดเลือด นับได้ว่าเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่มีความสำคัญ เนื่องจากพบว่าผู้ป่วยโรคระบบหัวใจและหลอดเลือดมากขึ้น รวมถึงเป็นสาเหตุการเสียชีวิตที่สำคัญที่สุดอันหนึ่ง โรคดังกล่าวมีสาเหตุสำคัญมาจากภาวะของผนังหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) ทำให้เกิดโรคซึ่งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตที่สำคัญคือโรคหลอดเลือดหัวใจตีบหรืออุดตัน และโรคหลอดเลือดสมอง (stroke) อาจเนื่องมาจากภาวะการดำรงชีวิตประจำวันมีการแข่งขันสูง ก่อให้เกิดความเครียด รวมถึงการบริโภคอาหารที่ไม่ถูกต้องขาดการเคลื่อนไหวออกกำลังกาย ทำให้เกิดโรคอ้วน ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด จึงได้มีความสนใจที่จะศึกษาถึงพยาธิสภาพการเกิดโรค กลไก การป้องกัน และแนวทางในการรักษาโรคที่เกี่ยวกับความผิดปกติของหลอดเลือดในปัจจุบัน

Flavonoids เป็นสารที่มีโครงสร้างเป็น polyphenol มีอยู่ในพืชหลายชนิด ทั้งนี้ได้มีรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารกลุ่ม flavonoids ในด้านต่าง ๆ เช่น ฤทธิ์ในการลดความดันโลหิตสูง ยับยั้งการแข็งตัวของเกล็ดเลือด ด้านการอักเสบ แก้แพ้ กำจัดสารอนุมูลอิสระ ป้องกันเซลล์เจริญเติบโตผิดปกติ ลดระดับไขมันในเส้นเลือด ไม่มีพิษต่อตับ และด้านการเกิดมะเร็ง (Formica and Regelson, 1995; Middleton, *et al.*, 1988) นอกจากนี้ยังมีรายงานการลดอุบัติการณ์การเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด เช่น หัวใจขาดเลือด (Hertog, *et al.*, 1993) ทั้งนี้ได้มีรายงานถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารกลุ่ม flavonoids บางตัวถึงผลต่อการขนส่งไอออนเข้าเซลล์พบว่าสามารถยับยั้ง  $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$ -ATPase,  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase, ยับยั้ง cAMP- หรือ cGMP-phosphodiesterase และ protein kinase (Formica and Regelson, 1995)

Quercetin และ naringenin (รูปที่ 1,2) เป็นสารในกลุ่ม flavonoids ที่พบในผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งพืช สมุนไพรหลายชนิด เช่น น้ำองุ่น ไวน์แดง ชา กาแฟ มันฝรั่ง ถั่ว หัวหอม แอปเปิ้ล เป็นต้น (Pierpoint, *et al.*, 1986; Hertog, *et al.*, 1993) ซึ่งผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเหล่านี้ได้มีการส่งเสริมให้มีการบริโภคมากขึ้น เนื่องจากมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ในการป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด รวมถึงมีคุณสมบัติในการเป็น antioxidant นอกจากนี้การศึกษากลไกทางเภสัชวิทยาในสัตว์ทดลองยังแสดงให้เห็นว่า flavonoids บางกลุ่มมีฤทธิ์โดยตรงในการทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือดที่แยกจากกายของหนูขาวและกระต่าย โดยกลไกใน

การคลายตัวของหลอดเลือดดังกล่าวขึ้นกับการทำงานของ endothelium โดยเกี่ยวข้องกับ NO/cGMP pathway (Benito, 2002) ในส่วนของ quercetin ยังได้มีการศึกษาพบว่าทำให้หลอดเลือดเกิดการคลายตัวได้โดยเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของ protein kinase (Fitzpatrick, *et al.*, 1993), การเพิ่ม cAMP ภายในเซลล์ และการยับยั้งแคลเซียมไอออนเข้าเซลล์ (Duarte, *et al.*, 1993) เป็นต้น นอกจากนี้ฤทธิ์ของสารกลุ่ม flavonoids ยังมีผลโดยตรงต่อการทำให้กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวเกิดการคลายตัวได้ โดยที่กลไกการออกฤทธิ์ไม่เกี่ยวข้องกับ endothelium (Chen, *et al.*, 1996)

อย่างไรก็ตาม กลไกการออกฤทธิ์ของสารกลุ่ม flavonoids ที่มีต่อการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดงใหญ่พบว่า ในการศึกษาส่วนใหญ่เน้นถึงอิทธิพลของ endothelium แต่ยังคงขาดการศึกษาเชิงลึกในแง่ของผลโดยตรงที่มีต่อกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด ดังนั้นในการศึกษาวิจัยนี้จึงได้ออกแบบ เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบกลไกในการออกฤทธิ์ของสารกลุ่ม flavonoids โดยเลือกทำการศึกษาสารกลุ่ม flavonoids 2 ชนิด คือ quercetin และ naringenin ซึ่งมีโครงสร้างหลักเหมือนกัน แต่มีความแตกต่างกันคือ quercetin มี hydroxyl groups ที่ตำแหน่ง 3,3' ดังตารางที่ 1 โดยทำการศึกษาในหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกได้จากกายหนูขาวที่ไม่มี endothelium

## สมมุติฐานของการวิจัย

Quercetin และ naringenin มีผลต่อการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากกายหนูขาว โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของ  $Ca^{2+}$  และผลนี้ไม่ขึ้นกับ endothelium

## วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบผลของ quercetin และ naringenin ที่มีต่อการตอบสนองของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ โดยศึกษาผลต่อการตอบสนองต่อตัวกระตุ้นต่าง ๆ เช่น  $\alpha$ -agonists, KCl, caffeine

2. เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบฤทธิ์ของ quercetin และ naringenin ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของ  $Ca^{2+}$  เข้าเซลล์และการหลั่ง  $Ca^{2+}$  จากแหล่งเก็บภายในเซลล์ ตลอดจนการจับ  $Ca^{2+}$  เข้าสู่แหล่งเก็บภายในเซลล์ ในหลอดเลือดแดงใหญ่ที่ไม่มี endothelium

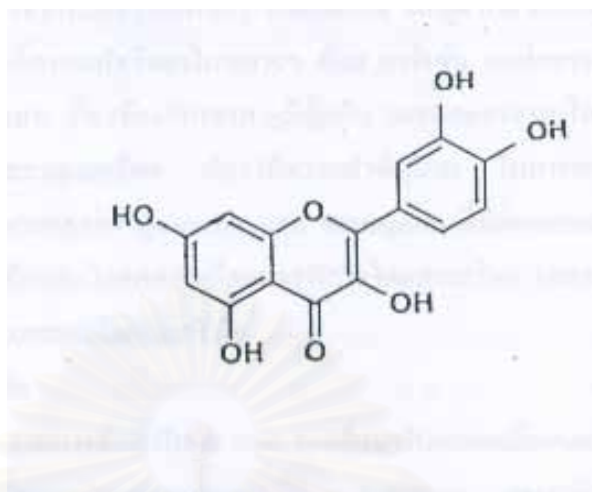
3. เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบกลไกการออกฤทธิ์ของ quercetin และ naringenin ในการทำให้หลอดเลือดแดงใหญ่ที่ไม่มี endothelium เกิดการคลายตัว

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

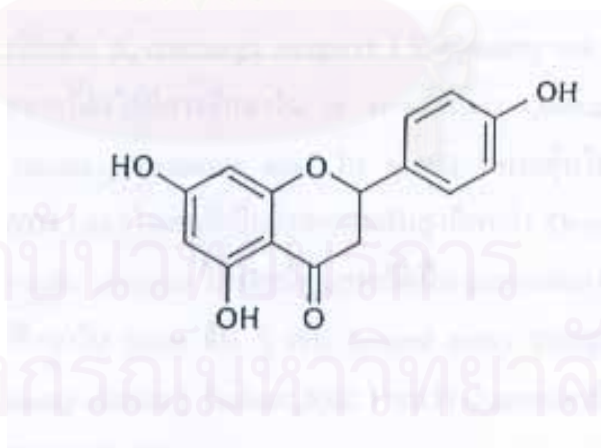
ข้อมูลอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของ quercetin และ naringenin ต่อความสามารถในการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ ซึ่งเป็นองค์ความรู้ที่จะนำไปประยุกต์ใช้หรือพัฒนาทางการแพทย์หรือทางเภสัชวิทยาต่อไป



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของ quercetin (Ajay, *et al.*, 2003)



รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของ naringenin (Ajay, *et al.*, 2003)

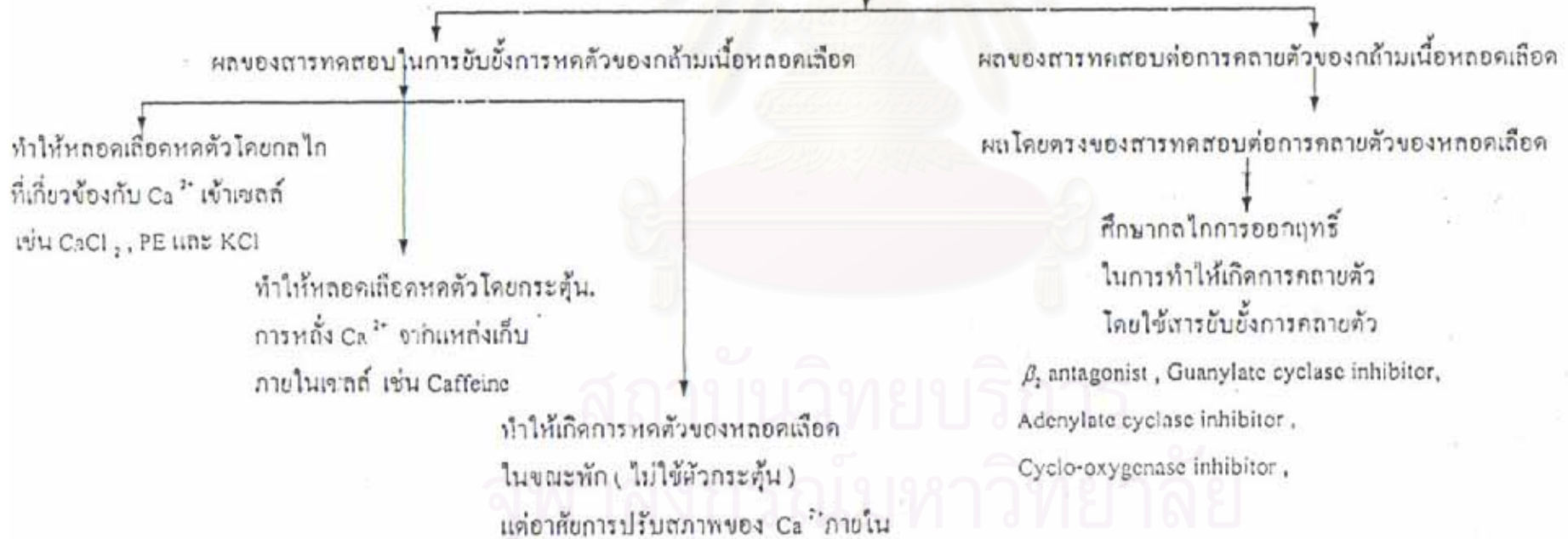
กรอบแนวคิดการวิจัย ( conceptual framework )

Animal : Male wistar rats , weight 250-300 g

สารทดสอบ : Quercetin and Naringenin

การทดสอบผลของสารทดสอบต่อการหดตัวของหลอดเลือดที่ไม่มี endothelium

ทำการแยกหลอดเลือดแดงใหญ่จากหนูขาวแล้วขูดเอา endothelium ออก



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เนื่องจากในปัจจุบันพบว่า flavonoids มีอยู่มากมายในพืชสมุนไพรหลายชนิด โดยสารกลุ่ม flavonoids ยังจำแนกได้เป็น 4 กลุ่ม (ตารางที่ 1) ได้แก่

1. flavonols เช่น quercetin, rutin, kaempferol
2. flavones เช่น apigenin, primuletin, chrysin
3. flavanes เช่น catechin, epigallocate chingallate
4. flavanones เช่น naringenin, hesperetin, hesperidin

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารกลุ่ม flavonoids ได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง เช่น ผลต่อการต้านมะเร็ง การต้านการอักเสบ ผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน และผลต่อระบบไหลเวียนโลหิต เป็นต้น เนื่องจากมีรายงานการศึกษาว่า quercetin และ naringenin ทำให้หลอดเลือดเกิดการคลายตัวได้ ซึ่งฤทธิ์ในการคลายตัวของหลอดเลือดนั้นจะเป็นกลไกสำคัญในการลด peripheral resistance, hypertension และ cardiovascular heart disease ได้ ดังนั้นในการทบทวนวรรณกรรมสำหรับการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นผลของ quercetin และ naringenin ที่มีต่อการทำงานของหลอดเลือด

Quercetin และ naringenin เป็นสารในกลุ่ม flavonoids ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม flavonols และ flavanones ตามลำดับ quercetin พบมากใน ไวน์แดง, ชาเขียว, แอปเปิ้ล, ชาดำ, หัวหอม และ naringenin พบมากใน องุ่น, ส้ม, มะเขือเทศ มีลักษณะโครงสร้างหลักเหมือนกัน แต่ต่างกันว่า quercetin มี hydroxyl groups ที่ตำแหน่ง 3,3' ดังรูปตารางที่ 1 และได้มีการศึกษาเปรียบเทียบความแรงในการทำให้หลอดเลือดคลายตัวของสารในกลุ่ม flavonoids พบว่า ความแรงในการคลายตัวนั้นมีความแตกต่างกัน ซึ่งสัมพันธ์กับโครงสร้าง คือ flavonols > flavones > flavanones (Duarte, *et al.*, 1993) การที่ quercetin มี hydroxyl groups ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 พบว่าทำให้เพิ่มความจำเพาะในการยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดด้วย PE มากกว่า KCl (Ajay, *et al.*, 2003) ประกอบกับการที่ quercetin และ naringenin ไม่มีหมู่น้ำตาล ทำให้มีความแรงในการคลายตัวเนื่องจากมีรายงานที่ rutin และ naringin มีส่วนประกอบที่เป็นหมู่ น้ำตาล ซึ่งทำให้ผลในการคลายตัวลดลง (Hammad and Abdalla, 1997)



## ผลของ quercetin ต่อระบบหลอดเลือด

เนื่องจากได้มีการศึกษาถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ quercetin ที่มีต่อการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากกายหนูขาว พบว่า quercetin สามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบได้ ทั้งนี้ผลในการยับยั้งการหดตัวอาจเกี่ยวข้องกับหลายกลไก เช่น การยับยั้งการเคลื่อนที่ของ  $Ca^{2+}$  เข้าเซลล์และการยับยั้ง  $Ca^{2+}$  ที่หลังจากภายในแหล่งเก็บ sarcoplasmic reticulum ซึ่งเป็นผลจากการศึกษาเมื่อใช้ NE 10  $\mu$ M, 5-HT 10  $\mu$ M, KCl 60 mM ในสภาวะที่มี  $Ca^{2+}$  อยู่ภายนอกเซลล์ และ caffeine 20 mM ในสารละลายที่ไม่มี  $Ca^{2+}$  เป็นสารกระตุ้นการหดตัว พบว่า quercetin ความเข้มข้น 50  $\mu$ M สามารถยับยั้งการหดตัวต่อสารกระตุ้นดังกล่าวได้ (Duarte, *et al.*, 1993) ผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาอื่น ๆ ซึ่งได้มีการศึกษาในหลอดเลือดแดง mesenteric arteries, หลอดเลือดดำ portal vein ของหนูขาว และหลอดเลือดแดง coronary arteries ของวัว พบว่า quercetin สามารถยับยั้งการหดตัวเมื่อกระตุ้นด้วย NE, KCl และ phorbol ester ได้ (Ibarra, *et al.*, 2002) รวมถึงผลการศึกษาในหลอดเลือดแดง tail artery ของหนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วย PE, KCl 60 mM พบว่า quercetin ความเข้มข้น 30  $\mu$ M สามารถยับยั้งการหดตัวได้ ซึ่งค่าความเข้มข้นของ quercetin ที่มีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE ได้ 50% ( $IC_{50}$ ) คือ  $3.1 \pm 0.7 \times 10^{-5}$  M (Chen and Pace-Asciak, 1996) และค่าความเข้มข้นของ quercetin ที่มีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อถูกกระตุ้นด้วย KCl 60 mM ได้ 50% ( $IC_{50}$ ) คือ  $3.9 \pm 0.03 \times 10^{-4}$  M (n=7) (Fusi, *et al.*, 2003)

แต่ทั้งนี้ไม่มีรายงานการศึกษาผลของ quercetin ต่อการตอบสนองของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อใช้ PE และ caffeine 20 mM เป็นตัวกระตุ้นในสภาวะที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$  ภายนอกเซลล์ พบว่า quercetin ความเข้มข้น 100  $\mu$ M ไม่สามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อใช้สารกระตุ้นดังกล่าว ซึ่งคณะผู้วิจัยสรุปว่า quercetin อาจไม่มีผลต่อ  $Ca^{2+}$  ที่หลังจากภายในเซลล์ (Morales and Lozoya, 1994)

นอกจากนี้ quercetin สามารถทำให้กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากกายหนูขาวเกิดการคลายตัวได้ ทั้งนี้ผลในการคลายตัวอาจเกี่ยวข้องกับหลายกลไก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการออกฤทธิ์ผ่าน endothelium ซึ่งเป็นเซลล์ที่บุผิวหลอดเลือด และทำหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด โดยการหลั่งสาร nitric oxide ซึ่งทำให้กล้ามเนื้อเรียบเกิดการคลายตัวได้ รวมถึงการสังเคราะห์และหลั่ง endothelium-derived relaxing factor อื่น ๆ เช่น prostaglandins จาก endothelium ซึ่งเกี่ยวข้องกับ cyclooxygenase pathway ซึ่งจากการศึกษาพบว่า quercetin ความเข้มข้น 0.1 - 100  $\mu$ M ทำให้หลอดเลือดเกิดการคลายตัวได้เมื่อกระตุ้นให้เกิดการหดตัวด้วย PE ซึ่งค่าความเข้มข้นของ quercetin ที่มีผลทำให้กล้ามเนื้อเรียบเกิด

การคลายตัวได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE ( $EC_{50}$ ) คือ  $2.3 \pm 0.05 \times 10^{-7}$  M และเมื่อมีการให้ L-NAME  $10^{-4}$  M ซึ่งเป็นสารยับยั้งการสร้าง nitric oxide และ indomethacin  $10^{-5}$  M ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase พบว่า quercetin ทำให้หลอดเลือดเกิดการคลายตัวได้ลดลง (Furchgott and Vanhoutte, 1989; Ajay, *et al.*, 2003) แม้กลไกการออกฤทธิ์ของ quercetin จะผ่านทาง cyclooxygenase pathway ในการศึกษาข้างต้น แต่มีการศึกษาที่ให้ผลในทางตรงข้าม เช่น จากการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ quercetin ต่อการคลายตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาว พบว่า indomethacin ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการคลายตัวของ quercetin (Morales and Lozoya, 1994) และ quercetin ที่ความเข้มข้น 0.3 mM ทำให้กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาวที่มี endothelium เกิดการคลายตัวได้เมื่อกระตุ้นด้วย PE  $10^{-5}$  M และ KCl 80 mM ซึ่งสามารถคลายตัวได้  $103.7 \pm 9.8$  % และ  $38.1 \pm 9.5$  % ตามลำดับ (Ajay, *et al.*, 2003)

ผลการคลายตัวของ quercetin ที่เกี่ยวข้องกับ endothelium ดังกล่าว ยังพบในหลอดเลือดแดงใหญ่ของกระต่ายเมื่อให้ quercetin ความเข้มข้น 0.1 - 100  $\mu$ M พบว่าทำให้หลอดเลือดเกิดการคลายตัวได้ ผ่านทาง NO-cGMP pathway และกลไกการเพิ่มของ cGMP (Cishek, *et al.*, 1997) และในหลอดเลือดแดง femoral artery ของสุนัข (Sagach, *et al.*, 1991) ยิ่งไปกว่านั้นได้มีการศึกษาผลของ quercetin เปรียบเทียบกับ flavonoids ตัวอื่น พบว่าความแตกต่างของโครงสร้างที่ functional groups ทำให้มีการหลั่ง nitric oxide ได้ต่างกัน และมีผลต่อความแรงในการคลายตัวของหลอดเลือด (Taubert, *et al.*, 2002; Guerrero, *et al.*, 2002)

นอกจากนี้ quercetin สามารถทำให้กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดเกิดการคลายตัวได้โดยไม่ขึ้นกับ endothelium (Perez-Vizcaino, *et al.*, 2002; Herrera, *et al.*, 1996) พบเมื่อให้ quercetin ความเข้มข้น 60  $\mu$ M (Chen and Pace-Asciak, 1996) และเมื่อให้ quercetin ความเข้มข้น 5.6, 8 และ 30  $\mu$ M พบว่า quercetin ทำให้หลอดเลือดแดง coronary ซึ่งเป็น resistance arteries มีความแรงในการคลายตัวมากกว่าหลอดเลือดแดงใหญ่ ซึ่งเป็น conductance arteries โดยการศึกษาดังกล่าวทำในหลอดเลือดของกระต่าย (Rendig, *et al.*, 2001) การศึกษาในหลอดเลือด portal vein ของหนูขาว พบว่า quercetin ความเข้มข้น 10 และ 50  $\mu$ M ทำให้หลอดเลือดเกิดการคลายตัวได้ ทั้งนี้ผู้วิจัยสันนิษฐานว่ากลไกในการคลายตัวของหลอดเลือดอาจเกี่ยวข้องกับการเพิ่มของ cAMP (Duarte, *et al.*, 1993) และเป็นไปได้ว่าอาจเกี่ยวข้องกับการที่ quercetin สามารถกระตุ้น  $\beta$ -adrenergic receptor ซึ่งได้มีการแสดงให้เห็นใน adipocytes ของหนูขาว (Kuppusamy and Das, 1994)

การศึกษาผลของ quercetin ได้มีการทำในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) เช่น หนูสายพันธุ์ที่มีภาวะความดันโลหิตสูง (spontaneously hypertensive rats) เมื่อได้รับ quercetin ขนาด 10 mg/kg โดยทางปาก เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับ quercetin มีระดับความดันโลหิตลดลง 21 % และ อัตราการเต้นของหัวใจลดลง 12 % ซึ่งคาดว่าเกี่ยวข้องกับผลในการลดภาวะ oxidative stress (Duarte, *et al.*, 2001) ตลอดจนการลด vascular tone ซึ่งพบว่ามีการศึกษาในหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูสายพันธุ์ที่มีภาวะความดันโลหิตสูง พบว่า quercetin ทำให้หลอดเลือดแดงใหญ่ที่ไม่มี endothelium เกิดการคลายตัวได้เช่นกัน (Ibarra, *et al.*, 2003)

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเบาหวาน เมื่อได้รับ quercetin ขนาด 50 และ 80 mg/kg โดยทางปาก เป็นเวลา 45 วัน พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับ quercetin มีระดับน้ำตาลในเลือดลดลง และ quercetin ยังมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase และ catalase ซึ่งช่วยลดภาวะ oxidative stress (Mahesh and Menon, 2004)

### ผลของ naringenin ต่อระบบหลอดเลือด

Naringenin ความเข้มข้น 0.3 mM ทำให้กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาวที่มี endothelium เมื่อกระตุ้นด้วย PE ( $10^{-5}$  M) และ KCl (80 mM) เกิดการคลายตัวได้ ซึ่งหลอดเลือดสามารถคลายตัวได้  $106.8 \pm 11.3$  % และ  $56.0 \pm 10.5$  % ตามลำดับ และค่าความเข้มข้นของ naringenin ที่มีผลทำให้กล้ามเนื้อเรียบเกิดการคลายตัวได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE ( $EC_{50}$ ) คือ  $2.4 \pm 0.1 \times 10^{-7}$  M โดยกลไกการออกฤทธิ์เกี่ยวข้องกับการหลั่ง nitric oxide และการหลั่ง prostaglandins จาก endothelium ผ่านทาง nitric oxide pathway และ cyclooxygenase pathway (Ajay, *et al.*, 2003) นอกจากนี้ naringenin มีผลต่อการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดโดยเกี่ยวข้องกับการยับยั้ง protein kinase C ทำให้หลอดเลือดเกิดการคลายตัวได้เช่นกัน (Herrera, *et al.*, 1996)

จากรายงานการศึกษาในหนูถีบจักรสายพันธุ์ IRC เมื่อให้ naringenin ขนาด 4.5 mg/kg พบว่า naringenin ช่วยลดภาวะ oxidative stress (Duarte, *et al.*, 1994) นอกจากนี้มีการศึกษาในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ hepatic injury เมื่อให้ naringenin ขนาด 20 และ 50 mg/kg โดยทางปาก เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า naringenin มีคุณสมบัติในการเป็น hepatoprotective และ anti-fibrogenic effect (Lee, *et al.*, 2004)

เมื่อเปรียบเทียบผลของ quercetin และ naringenin ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่ลำไส้ส่วน ileum พบว่า quercetin มีความแรงในการคลายตัวมากกว่า naringenin ซึ่งค่าความเข้มข้นของสารทั้งสองที่มีผลทำให้กล้ามเนื้อเรียบเกิดการคลายตัวได้ 50% ( $EC_{50}$ ) คือ  $2.0 \pm 0.6 \times 10^{-5}$  M (n=7) และ  $7.0 \pm 1.8 \times 10^{-5}$  M (n=6) ตามลำดับ (Hammad and Abdalla, 1997)

อย่างไรก็ตามการศึกษาถึงผลของ quercetin และ naringenin ต่อการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ที่ไม่มี endothelium ของหนูขาวนั้นยังมีน้อย และไม่มีข้อมูลที่ชัดเจนของกลไกที่ทำให้หลอดเลือดเกิดการคลายตัว ในการศึกษาวิจัยนี้จึงได้ออกแบบ เพื่อศึกษา กลไกการออกฤทธิ์ของ quercetin และ naringenin ต่อการทำงานของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกได้จากกายหนูขาวที่ไม่มี endothelium

### ทฤษฎีที่สำคัญ: กลไกการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบ

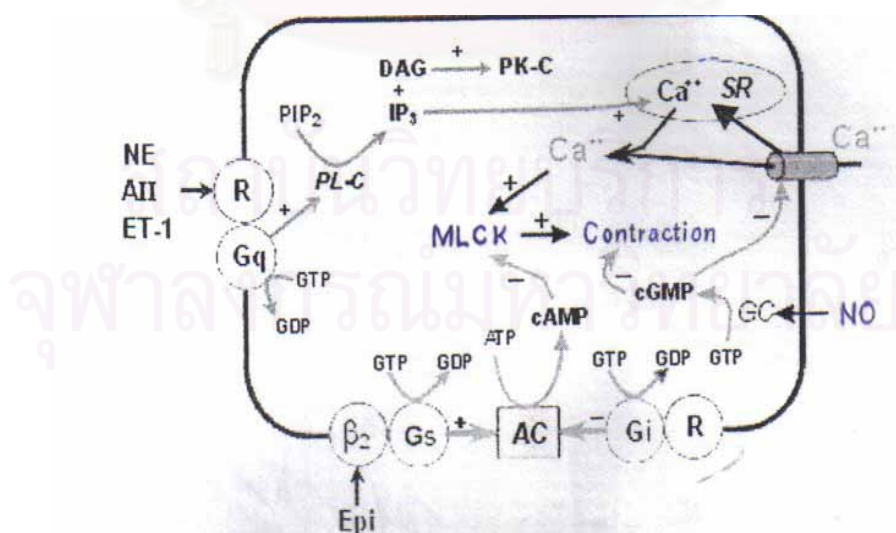
การหดตัวและการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ มีความเกี่ยวข้องกับ  $Ca^{2+}$  โดยระดับ  $Ca^{2+}$  ภายในกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดขึ้นกับการเคลื่อนที่เข้าของ  $Ca^{2+}$  ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ และ  $Ca^{2+}$  อีตระภายในเซลล์ ซึ่ง  $Ca^{2+}$  สามารถเคลื่อนที่ผ่านเข้าเซลล์ทาง Voltage-operated calcium channels (VOC) และ Receptor-operated calcium channels (ROC) (Rang, *et al.*, 1999) โดยเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของศักย์ไฟฟ้าจึงเกิด action potential ที่เยื่อหุ้มเซลล์ส่งผลให้เกิด membrane depolarization ทำให้ VOC เปิดออก ส่งผลให้มีการเคลื่อนที่เข้าของ  $Ca^{2+}$  ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Kuriyama, *et al.*, 1995) หรือการใช้ high  $K^+$  เป็นตัวกระตุ้น ทำให้เกิด membrane depolarization ส่งผลให้มีการเคลื่อนที่เข้าของ  $Ca^{2+}$  ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ทาง VOC เช่นกัน (Noguera and D'Ocon, 1993) นอกจากนี้ กล้ามเนื้อเรียบสามารถหดตัวได้เมื่อมีสารมากระตุ้นที่ receptor ได้แก่  $\alpha$ -adrenergic receptor มีผลเพิ่ม  $Ca^{2+}$  จากภายในเซลล์ผ่านกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับ inositol-1,4,5 - trisphosphate ( $IP_3$ ) ซึ่งจะกระตุ้นให้มีการปล่อย  $Ca^{2+}$  ที่เก็บสะสมใน sarcoplasmic reticulum (SR) เมื่อระดับ  $Ca^{2+}$  ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น ทำให้ ROC เปิดออก ส่งผลให้  $Ca^{2+}$  ที่อยู่ภายนอกเซลล์เคลื่อนที่เข้ามาภายในเซลล์

$Ca^{2+}$  ภายในกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดจะเก็บสะสมใน sarcoplasmic reticulum (SR) ซึ่งการปล่อย  $Ca^{2+}$  จากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์เกิดได้โดยไม่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลง membrane potential (Berne, 1993)

กลไกการปลดปล่อย  $\text{Ca}^{2+}$  จากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ (SR) สามารถเกิดได้ 2 กลไก คือ

1. Calcium-induced calcium release (CICR) เกิดจาก  $\text{Ca}^{2+}$  ภายนอกเซลล์เคลื่อนที่ผ่าน VOC เข้ามาภายในเซลล์ จากนั้นปริมาณ  $\text{Ca}^{2+}$  ที่ผ่านเข้ามานี้ไปมีผลกระตุ้นให้มีการปลดปล่อย  $\text{Ca}^{2+}$  จากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ที่ sarcoplasmic reticulum (SR) (Richard, 2002) นอกจากนี้ caffeine สามารถกระตุ้นให้มีการปลดปล่อย  $\text{Ca}^{2+}$  จากแหล่งเก็บนี้ได้เช่นกัน โดยกระตุ้นผ่าน ryanodine receptor (Kawakami, *et al.*, 1998) ทำให้เพิ่มความไวของกระบวนการ CICR ในการหลั่ง  $\text{Ca}^{2+}$  จาก SR โดยไม่ต้องเพิ่มความเข้มข้นของ  $\text{Ca}^{2+}$  อีกระภายในเซลล์จากระดับปกติในขณะพัก (Karaki and Weiss, 1984) แล้วจะมีการเคลื่อนที่ของ  $\text{Ca}^{2+}$  จากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ผ่านทาง VOC อีกด้วย

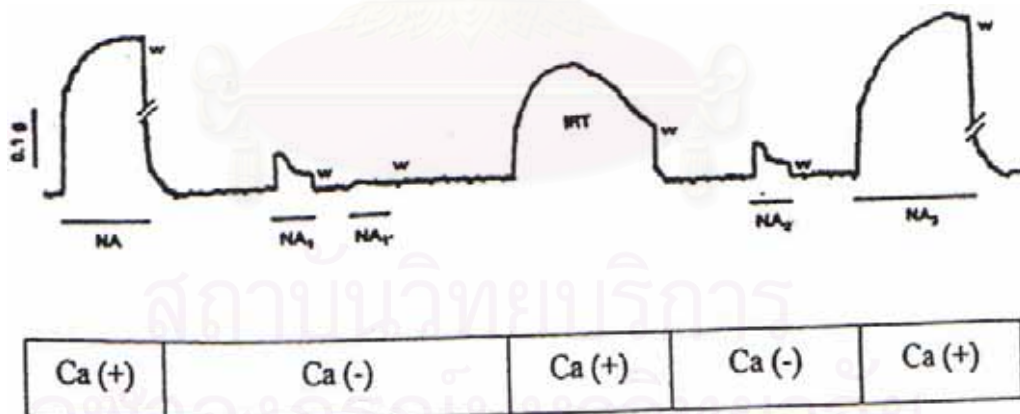
2.  $\text{IP}_3$ -induced calcium release (IICR) เกิดจากการที่มีสารมากระตุ้นการทำงานของ  $\alpha_1$ -adrenergic receptor ทำให้มีผลกระตุ้นให้เอนไซม์ phospholipase C ซึ่งทำหน้าที่ในการสลาย hydrolysis-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ( $\text{PIP}_2$ ) ได้เป็น diacylglycerol (DAG) และ inositol 1,4,5-trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ) ซึ่ง DAG จะไปกระตุ้น protein kinase C ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ขึ้นภายในเซลล์ ส่วน  $\text{IP}_3$  ก็ไปกระตุ้นการปลดปล่อย  $\text{Ca}^{2+}$  จาก SR ทำให้  $\text{Ca}^{2+}$  ภายในเซลล์สูงขึ้น นอกจากนี้การหลั่ง  $\text{Ca}^{2+}$  จาก SR ยังเกิดขึ้นได้โดยกลไกของ ATP-driven active transport system ซึ่งควบคุมระดับ cAMP และ cGMP ภายในเซลล์ (Richard, 2002) (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 กลไกการเพิ่มปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์ของกล้ามเนื้อเรียบ (Richard, 2002)

### การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด

เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงระดับ  $Ca^{2+}$  อีอิสระภายในเซลล์จะเป็นปัจจัยสำคัญของการหดตัวหรือการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบเห็นได้จากการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย noradrenaline ซึ่งจะกระตุ้น  $\alpha_1$ -adrenergic receptor ทำให้เกิดการปล่อย  $Ca^{2+}$  จากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ นอกจากนี้การกระตุ้นให้กล้ามเนื้อหดตัวในสภาวะที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$  ภายนอกเซลล์ ซ้ำ ๆ กันหลายครั้งด้วย noradrenaline จะทำให้  $Ca^{2+}$  ที่เก็บอยู่ในแหล่งสะสมภายในเซลล์ถูกปล่อยออกมาจนหมดโดยจะเห็นได้จากการที่กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดจะไม่เกิดการหดตัวขึ้นอีกเลย เมื่อได้รับ NE อีก ซึ่งเมื่อเกิดกรณีเช่นนี้แล้ว เซลล์กล้ามเนื้อเรียบสามารถชดเชยการสูญเสีย  $Ca^{2+}$  จากแหล่งเก็บภายในได้โดยยอมให้  $Ca^{2+}$  จากภายนอกสามารถเคลื่อนที่เข้ามาภายในเซลล์ เพื่อเก็บสะสมกลับเข้า SR ได้อีก ซึ่งปรากฏการณ์นี้สังเกตได้จากการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ เมื่อเปลี่ยนสารละลายที่ incubate กล้ามเนื้อเรียบจากที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$  เป็นสารละลายที่มี  $Ca^{2+}$  โดยที่ไม่ต้องอาศัยสารกระตุ้น เช่น NE ซึ่งปรากฏการณ์ลักษณะดังกล่าวได้รับคำนิยามว่า Increase in the resting tone in aorta (IRT) (รูปที่ 4) (Noguera, *et al.*, 1998)



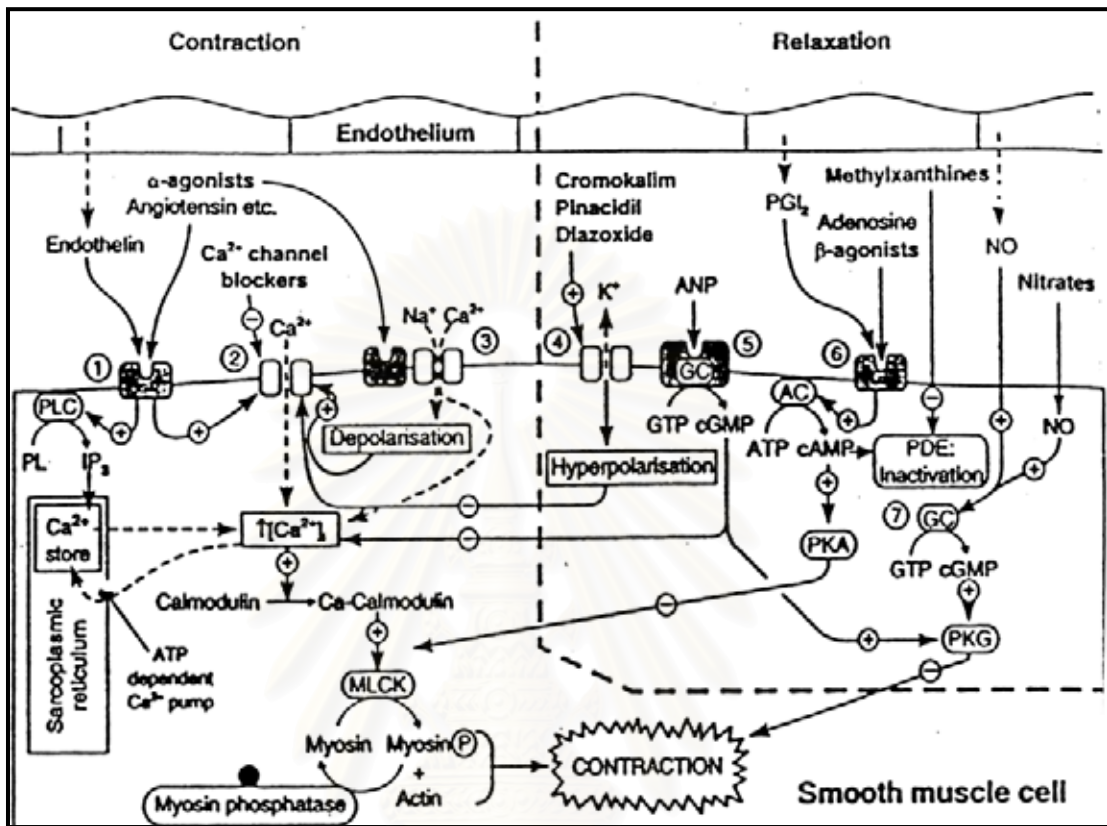
รูปที่ 4 การเกิด increase in the resting tone in aorta (IRT) (Noguera, *et al.*, 1996)

### การคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด

การคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบนั้นเกิดจากความเข้มข้นของ  $Ca^{2+}$  อีอิสระภายในเซลล์ลดลง หรือจากการที่  $K^+$  ภายในเซลล์ออกไปนอกเซลล์ ทำให้เกิดภาวะ hyperpolarization และไปมีผลยับยั้งการเปิดของ Voltage-gate calcium channels ทำให้  $Ca^{2+}$  เข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง เมื่อระดับของ  $Ca^{2+}$  ภายในเซลล์ลดน้อยลง ทำให้  $Ca^{2+}$  ไม่จับกับ calmodulin หลังจากนั้น myocin phosphatase จะทำให้เกิด dephosphorylate myocin light chain ในสภาวะนี้ myocin light chain จะทำปฏิกิริยากับ actin ไม่ได้ เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ และการออกฤทธิ์ของ MLCK จะถูกควบคุมโดย cyclic adenosine monophosphate (cAMP) cAMP-dependent protein kinase ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งปฏิกิริยา (catalysis) phosphorylation ของ MLCK และการที่ MLCK ถูกยับยั้ง ทำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

นอกจากนี้การคลายตัวเกิดขึ้นได้โดยการหลั่งสารที่ออกมาจาก endothelium สารดังกล่าวคือ endothelium-derived-relaxing factor (EDRF) ต่อมาได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางพบว่า EDRF คือ NO (nitric oxide) (Palmer, *et al.*, 1987) ซึ่งไปกระตุ้นให้มีการเพิ่มขึ้นของ cGMP โดย NO จะเคลื่อนที่ผ่านเข้ากล้ามเนื้อเรียบไปอย่างรวดเร็ว และเข้าไปจับกับ heme group ของ soluble guanylate cyclase (soluble GC) กระตุ้นให้เอนไซม์อยู่ในรูปของ active form หลังจากนั้น soluble GC ไปมีผลกระตุ้นการเปลี่ยน guanosine triphosphate (GTP) ให้เป็น cyclicguanosine monophosphate (cGMP) ใน cytosol ของกล้ามเนื้อเรียบ ผลจาก cGMP ที่เพิ่มขึ้น ทำให้ระดับ  $Ca^{2+}$  ภายในเซลล์ลดลง ทำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบได้ (Wennmalm, 1994) ยิ่งไปกว่านั้น การกระตุ้น muscarinic receptor ที่ endothelium นำไปสู่การหลั่ง NO (Furchgott, 1980) และการสังเคราะห์ prostaglandin จาก cyclooxygenase pathway ซึ่งไปกระตุ้นที่  $\beta$ -adrenergic receptor ทำให้หลอดเลือดเกิดการคลายตัวได้เช่นกัน

ส่วนการคลายตัวที่ไม่เกี่ยวข้องกับ endothelium นั้นสามารถเกิดขึ้นได้โดยการกระตุ้นที่  $\beta$ -adrenergic receptor เช่น isoproterenol สามารถทำให้หลอดเลือดเกิดการคลายตัวได้โดยเกี่ยวข้องกับ cAMP (Rang, *et al.*, 1999) จากการที่ adenylate cyclase enzyme ไปทำปฏิกิริยาเปลี่ยนจาก ATP ให้เป็น cAMP ซึ่งจะไปยับยั้ง MLCK ทำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ นอกจากนี้ การไปกระตุ้นที่  $K^+$  channel ทำให้เกิด hyperpolarization มีผลให้ระดับ  $Ca^{2+}$  ภายในเซลล์ลดลง ทำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบได้ (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 การควบคุมการหดหรือคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด (Rang, *et al.*, 1999)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### สัตว์ทดลอง

หนูขาว สายพันธุ์ Wistar rats เพศผู้ น้ำหนัก 250-300 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลอง แห่งชาติมหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จังหวัดนครปฐม และนำมาเลี้ยงต่อที่คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อทำการปรับสภาพร่างกาย 1-2 สัปดาห์ก่อนทำการทดลอง

#### เครื่องมือ

2.1 Organ bath แบบ double walled Harvard type ประกอบด้วย ผนังแก้ว 2 ชั้น ชั้นในบรรจุสารละลายที่ใช้หล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อ (physiological solution) มีความจุ 15 มิลลิลิตร สำหรับแช่เนื้อเยื่อที่แยกจากร่างแล้วมาทดลอง และมีช่องสำหรับการผ่านเข้าของ carbogen gas ( $95\% \text{O}_2 \pm 5\% \text{CO}_2$ ) ชั้นนอกของ organ bath มีน้ำไหลเวียนที่ส่งมาจาก water bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิคงที่ที่  $37^\circ\text{C} \pm 0.5$  ตลอดการทดลอง

2.2 เครื่องมือวัดการหดตัวของเนื้อเยื่อแบบ isometric ของ Washington transducer (Harvard Apparatus Ltd, England) และ Force transducer รุ่น MLT 050/A (ADInstruments, Australia)

2.3 เครื่องแปลงและขยายสัญญาณ รุ่น PowerLab /4sp พร้อมโปรแกรม PowerLab (Chart V 5.0.2) (ADInstruments, Australia)

2.4 ก๊าซ Carbogen ( $95\% \text{O}_2 \pm 5\% \text{CO}_2$ ) ของบริษัท Thai Industrial Gas (TIG)

#### สารเคมี

Diethyl sulfoxide (DMSO) : solvent

Acetylcholine (Ach) : endothelium dependent vasodilator

Phenylephrine (PE)	: $\alpha$ - adrenoceptor agonist
Potassium chloride (KCl)	: membrane depolarization agent
Caffeine	: $\text{Ca}^{2+}$ release from sarcoplasmic reticulum
Sodium nitroprusside	: endothelium-independent relaxant
Atropine	: muscarinic antagonist
Isoproterenol	: $\beta$ -adrenoceptor agonist
Propranolol	: $\beta$ -adrenoceptor antagonist
Indomethacin	: an inhibitor of cyclooxygenase
Methylene Blue	: an inhibitor of soluble guanylyl cyclase
Tetraethylammonium	: an inhibitor of $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive potassium channel
Glybenclamide	: an inhibitor of ATP-sensitive potassium channel
$N^G$ -nitro-L-arginine methyl ester	: an inhibitor of nitric oxide synthase
4-Aminopyridine	: a delayed rectifier potassium channel blocker

สารเคมีทั้งหมดจาก Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)

สารเคมีที่ใช้เตรียมสารละลาย Krebs-Henseleit Solution

NaCl , KCl ,  $\text{CaCl}_2$  ,  $\text{MgCl}_2$  ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ,  $\text{NaHCO}_3$  , Glucose ,  $\text{MgSO}_4$  , EDTA

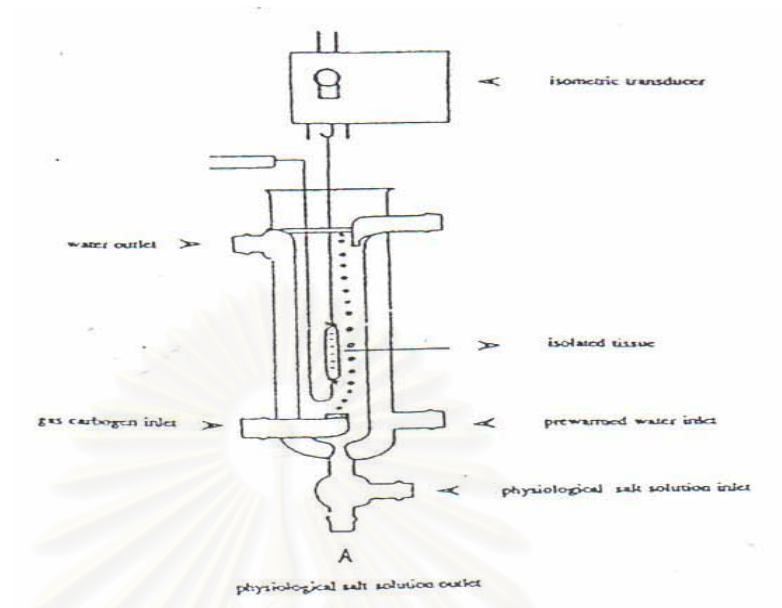
สารเคมีจาก Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) และ APS Chemicals Limited. (Seven Hills, NSW, Australia)

สารทดสอบ

Quercetin MW = 338.20

Naringenin MW = 272.27

สารเคมีจาก Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)



รูปที่ 6 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองและ organ bath สำหรับ isolated rat aorta



## จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7 การเตรียมกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว

## วิธีดำเนินการวิจัย

### การเตรียมกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว

1. นำหนูขาว สายพันธุ์ Wistar rats เพศผู้ น้ำหนัก 250-300 กรัม ทำให้หมดความรู้สึกโดยวิธี cervical dislocation จากนั้น เปิดช่องอก ทำการผ่าแยกเอาหลอดเลือดแดงใหญ่ ซึ่งอยู่ด้านหน้าติดกับกระดูกสันหลัง ทำความสะอาดเกาะเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกเหลือเพียงกล้ามเนื้อเรียบ จากนั้นตัดหลอดเลือดในลักษณะเกลียว จะได้ชิ้นกล้ามเนื้อเรียบเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า ตัดแบ่งให้มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร

2. นำชิ้นกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดมาขูด endothelium ออก โดยใช้ไม้พันสำลี ชูดเบา ๆ ด้านในของหลอดเลือด ทั้งนี้เพื่อลดปัจจัยการคลายตัวของกล้ามเนื้อที่หลังจาก endothelium ซึ่งการทดสอบว่าหลอดเลือดปราศจาก endothelium แล้วนั้น ทำได้โดยนำหลอดเลือดมากระตุ้นให้หดตัวด้วย PE (1  $\mu$ M) แล้วเติม acetylcholine (Ach) (10  $\mu$ M) ซึ่งเป็น endothelium dependent vasodilator หลอดเลือดที่ปราศจาก endothelium แล้วจะไม่เกิดการคลายตัว เมื่อได้รับ Ach

3. เมื่อได้กล้ามเนื้อเรียบตามต้องการแล้วนำไปแขวนใน organ bath ซึ่งมี Krebs-Henseleit solution อยู่ 15 มิลลิลิตร และมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอด โดยควบคุมอุณหภูมิของ organ bath ให้ได้ 37 °C ส่วนปลายด้านหนึ่งของชิ้นกล้ามเนื้อเรียบผูกเชื่อมกับ isometric transducer ซึ่งจะต่อเข้ากับเครื่องบันทึกผลและขยายสัญญาณไฟฟ้า โดยที่ดึงกล้ามเนื้อให้มีความตึงขณะพัก ประมาณ 1 กรัม แล้ว incubate เนื้อเยื่อประมาณ 60 นาที จนกระทั่งมีความตึงคงที่

## วิธีการทดลอง

### 1. ศึกษาผลของ quercetin และ naringenin ในการยับยั้งการตอบสนองของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ ต่อการกระตุ้นด้วย PE, KCl

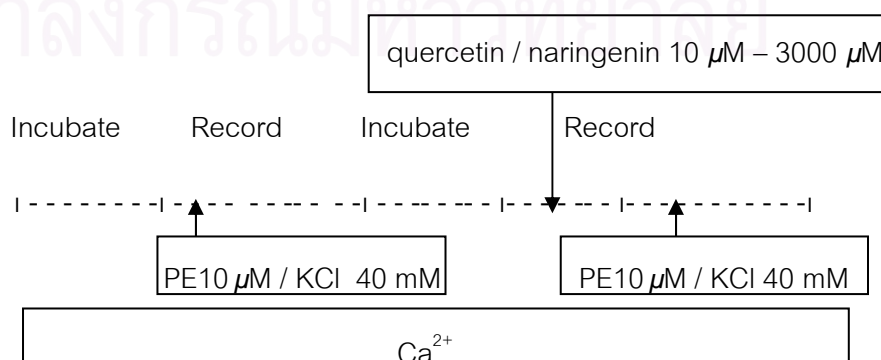
ในการศึกษาผลของ quercetin และ naringenin ที่มีต่อการตอบสนองของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ เมื่อใช้ตัวกระตุ้นให้เกิดการหดตัวในสารละลาย Krebs-Henseleit นั้น เริ่มจากเมื่อกล้ามเนื้อเรียบที่เตรียมไว้มีความตึงคงที่ในสารละลาย Krebs-Henseleit แล้วใช้สารกระตุ้นคือ PE ซึ่งเป็น  $\alpha$ -adrenoceptor agonist ความเข้มข้น  $10 \mu\text{M}$  หรือ KCl ความเข้มข้น  $40 \text{ mM}$  ซึ่งทำให้เกิดภาวะ membrane depolarization กระตุ้นให้กล้ามเนื้อหดตัวแล้ว บันทึกผลการหดตัวเป็นเวลา 20 นาที

ในการทดสอบผลของ quercetin และ naringenin ทำการทดลองซ้ำข้างต้น โดยหลังจากกล้ามเนื้อมีความตึงคงที่ในสารละลาย Krebs-Henseleit เติมสารทดสอบ ได้แก่ quercetin หรือ naringenin ในความเข้มข้นต่าง ๆ ระหว่าง  $10 \mu\text{M} - 3000 \mu\text{M}$  ทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงกระตุ้นการหดตัวอีกครั้งด้วย PE ความเข้มข้น  $10 \mu\text{M}$  หรือ KCl ความเข้มข้น  $40 \text{ mM}$  บันทึกผลการหดตัวเป็นเวลา 20 นาที

เนื่องจากการศึกษานี้ใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย quercetin และ naringenin จึงได้มีการทดสอบผลของ DMSO ความเข้มข้น  $0.07\% \text{ v/v}$  และใช้เป็นกลุ่มควบคุมเพื่อเปรียบเทียบผลของ quercetin และ naringenin

ทั้งนี้ผลของสารทดสอบต่อการตอบสนองของกล้ามเนื้อเรียบนั้นจะคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อได้รับสารทดสอบเทียบกับการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบก่อนได้รับสารทดสอบ

#### แผนภาพการทดลองที่ 1



## 2. ศึกษาผลของ quercetin และ naringenin ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลง $Ca^{2+}$ ที่ปล่อยออกจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่

การศึกษากการหลัง  $Ca^{2+}$  จากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์นั้นสามารถทำได้โดยใช้ PE หรือ caffeine กระตุ้นการหดตัวของหลอดเลือดในสารละลายที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$

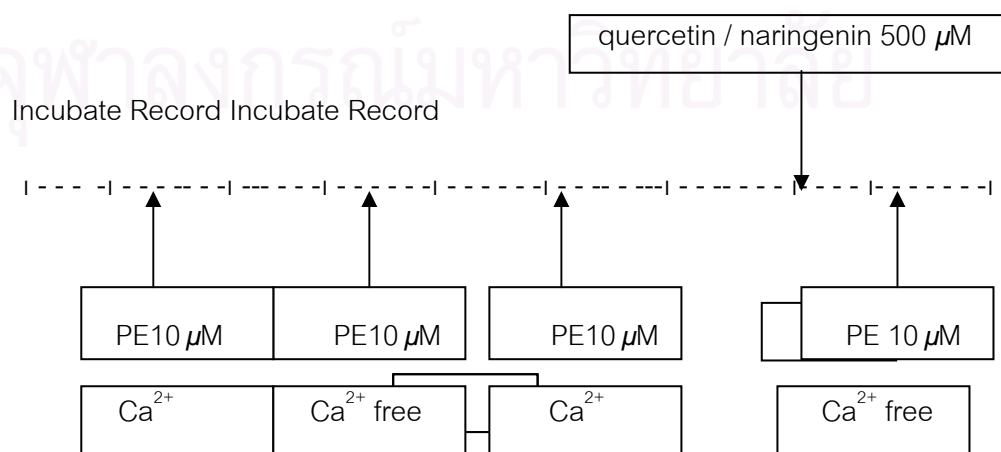
### 2.1 เมื่อใช้ PE ความเข้มข้น $10 \mu M$ เป็นตัวกระตุ้นในสารละลายที่ปราศจาก $Ca^{2+}$

ในการศึกษาผลของ quercetin และ naringenin ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลง  $Ca^{2+}$  ที่ปล่อยออกจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ที่สัมพันธ์กับ  $\alpha_1$ -adrenoceptor agonist เริ่มจากเมื่อกล้ามเนื้อที่เตรียมไว้มีความตึงคงที่ในสารละลาย Krebs-Henseleit แล้วใช้ PE ความเข้มข้น  $10 \mu M$  กระตุ้นให้กล้ามเนื้อหดตัว บันทึกผลการหดตัวเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างออกด้วยสารละลายที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$  3 ครั้ง incubate อีก 15 นาที ในสารละลายที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$  กระตุ้นการหดตัวด้วย PE ความเข้มข้น  $10 \mu M$  บันทึกผลการหดตัว

ในการทดสอบผลของ quercetin และ naringenin ทำการทดลองซ้ำข้างต้น โดยหลังจากกล้ามเนื้อมีความตึงคงที่ในสารละลาย Krebs-Henseleit ใช้ PE ความเข้มข้น  $10 \mu M$  กระตุ้นกล้ามเนื้อให้หดตัวในสารละลายที่มี  $Ca^{2+}$  บันทึกผลการหดตัวเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างออกด้วยสารละลายที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$  3 ครั้ง incubate อีก 15 นาที ในสารละลายที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$  เติมสารทดสอบ ได้แก่ quercetin หรือ naringenin ความเข้มข้น  $500 \mu M$  ทิ้งไว้ 10 นาทีตามด้วยการกระตุ้นการหดตัวด้วย PE ความเข้มข้น  $10 \mu M$  บันทึกผลการหดตัวเป็นเวลา 20 นาที

ทั้งนี้ผลของสารทดสอบต่อการตอบสนองของกล้ามเนื้อเรียบนั้นจะคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อได้รับสารทดสอบในสารละลายที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$  เทียบกับการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบก่อนได้รับสารทดสอบในสารละลายที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$

### แผนภาพการทดลองที่ 2.1



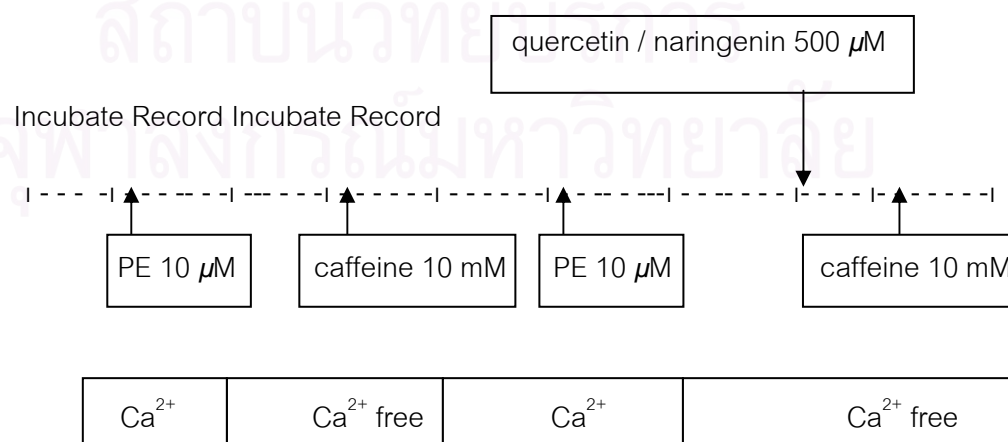
2.2 เมื่อใช้ caffeine ความเข้มข้น 10 mM เป็นตัวกระตุ้นในสารละลายที่ปราศจาก  $\text{Ca}^{2+}$

ในการศึกษาผลของ quercetin และ naringenin ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลง  $\text{Ca}^{2+}$  ที่ปล่อยออกจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ เริ่มจากเมื่อกล้ามเนื้อที่เตรียมไว้มีความตึงคงที่ในสารละลาย Krebs-Henseleit แล้วใช้ PE ความเข้มข้น 10  $\mu\text{M}$  กระตุ้นให้กล้ามเนื้อหดตัว บันทึกผลการหดตัวเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างออกด้วยสารละลายที่ปราศจาก  $\text{Ca}^{2+}$  3 ครั้ง incubate อีก 15 นาที ในสารละลายที่ปราศจาก  $\text{Ca}^{2+}$  กระตุ้นการหดตัวด้วย caffeine ความเข้มข้น 10 mM บันทึกผลการหดตัวเป็นเวลา 20 นาที

ในการทดสอบผลของ quercetin และ naringenin ทำการทดลองซ้ำข้างต้น โดยหลังจากกล้ามเนื้อมีความตึงคงที่ในสารละลาย Krebs-Henseleit ใช้ PE ความเข้มข้น 10  $\mu\text{M}$  กระตุ้นกล้ามเนื้อให้หดตัวในสารละลายที่มี  $\text{Ca}^{2+}$  บันทึกผลการหดตัวเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างออกด้วยสารละลายที่ปราศจาก  $\text{Ca}^{2+}$  3 ครั้ง incubate อีก 15 นาที ในสารละลายที่ปราศจาก  $\text{Ca}^{2+}$  เติมสารทดสอบ ได้แก่ quercetin หรือ naringenin ความเข้มข้น 500  $\mu\text{M}$  ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยการกระตุ้นการหดตัวด้วย caffeine ความเข้มข้น 10 mM บันทึกผลการหดตัวเป็นเวลา 20 นาที

ทั้งนี้ผลของสารทดสอบต่อการตอบสนองของกล้ามเนื้อเรียบนั้นจะคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อได้รับสารทดสอบในสารละลายที่ปราศจาก  $\text{Ca}^{2+}$  เทียบกับการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบก่อนได้รับสารทดสอบในสารละลายที่ปราศจาก  $\text{Ca}^{2+}$

### แผนภาพการทดลองที่ 2.2

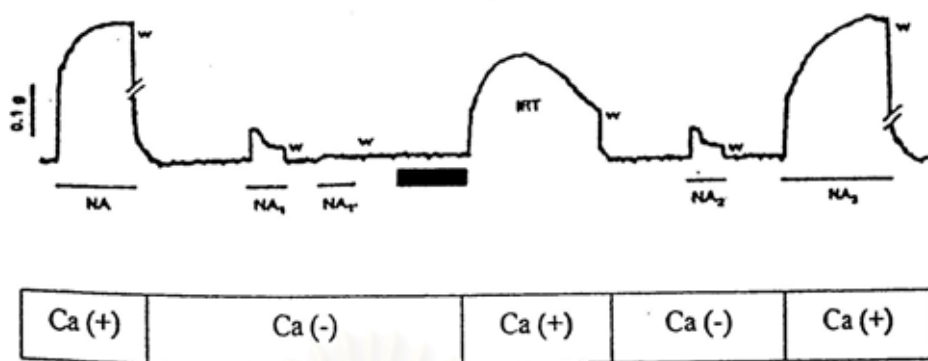


### 3. ศึกษาผลของ quercetin และ naringenin ต่อการเคลื่อนที่เข้าเซลล์ของ $Ca^{2+}$ และการเก็บ $Ca^{2+}$ เข้าสู่แหล่งเก็บภายในเซลล์ที่สัมพันธ์กับ $\alpha_1$ -adrenergic receptor

ในการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย  $\alpha_1$ -agonist เช่น PE จะทำให้เกิดการปล่อย  $Ca^{2+}$  จากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ ซึ่งถ้ากระตุ้นให้กล้ามเนื้อเรียบหดตัวซ้ำหลายๆ ครั้ง ด้วย PE ในสถานะที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$  ภายนอก เช่นในสารละลาย  $Ca^{2+}$ -free Krebs-Henseleit จะทำให้เซลล์ใช้  $Ca^{2+}$  ที่เก็บอยู่ในแหล่งสะสมภายในเซลล์จนหมด ซึ่งจะพบว่า ในขณะที่กล้ามเนื้อจะไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย PE อีก ซึ่งเมื่อเติม  $Ca^{2+}$  ลงในสถานะดังกล่าว จะพบว่าหลอดเลือดเกิดการหดตัวขึ้นได้เอง ในสถานะที่ปราศจากตัวกระตุ้น ซึ่งแสดงถึงการที่  $Ca^{2+}$  จากภายนอกสามารถเคลื่อนที่เข้ามาภายในเซลล์ จึงทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ขณะพัก ซึ่งกระบวนการนี้เกิดขึ้นโดยปราศจากสารกระตุ้นเรียกการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแบบนี้ว่า Increase in the resting tone in aorta (IRT) (Noguera, *et al.*, 1996)

ในการทดลองสามารถสร้างสถานะการทำให้เกิด IRT ได้ ดังปรากฏตามรูปที่ 8 โดยเริ่มจากเมื่อกล้ามเนื้อที่เตรียมไว้มีความตึงคั่งที่ในสารละลาย Krebs-Henseleit แล้วใช้สารกระตุ้น PE (PE ตามรูปที่ 8) ความเข้มข้น  $100 \mu M$  บันทึกผลการหดตัว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างออกด้วยสารละลายที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$  3 ครั้ง incubate อีก 15 นาที หลังจากนั้นกระตุ้นการหดตัวด้วย PE ( $PE_1$  ตามรูปที่ 8) ความเข้มข้น  $100 \mu M$  ในสถานะที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$  บันทึกผลการหดตัว จากนั้นล้างออกด้วยสารละลายที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$  3 ครั้ง incubate อีก 15 นาที กระตุ้นการหดตัวซ้ำอีกด้วย PE ( $PE_1'$  ตามรูปที่ 8) ความเข้มข้น  $100 \mu M$  ในสถานะที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$  บันทึกผลการหดตัว จากนั้นล้างออกด้วยสารละลายที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$  แล้ว incubate อีก 15 นาที หลังจากนั้นเปลี่ยนสารละลายที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$  เป็นสารละลาย Krebs-Henseleit จะพบการหดตัวของหลอดเลือดขึ้น (IRT) บันทึกผลการหดตัวเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างออกด้วยสารละลายที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$  และ incubate 15 นาที กระตุ้นการหดตัวด้วย PE ( $PE_2$  ตามรูปที่ 8) ความเข้มข้น  $100 \mu M$  ในสถานะที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$  บันทึกผลการหดตัว ซึ่งการหดตัวที่เกิดขึ้นในสถานะนี้จะเกิดจากการปลดปล่อย  $Ca^{2+}$  จากแหล่งเก็บภายในเซลล์ ในขั้นตอนสุดท้าย เพื่อทดสอบความสมบูรณ์ของกล้ามเนื้อให้ใช้ PE ( $PE_3$  ตามรูปที่ 8) ความเข้มข้น  $100 \mu M$  กระตุ้นการหดตัวในสารละลาย Krebs-Henseleit บันทึกผลการหดตัว



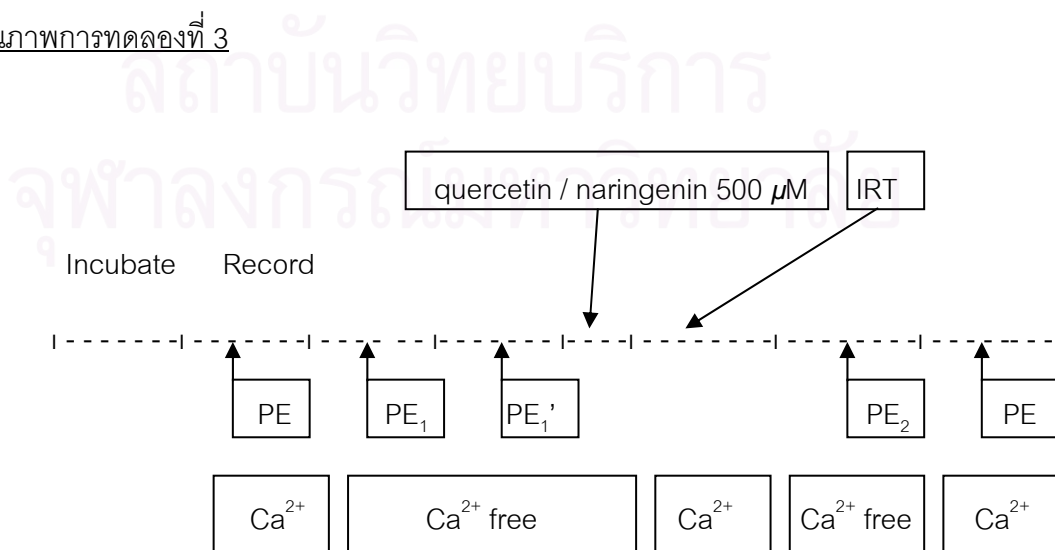


รูปที่ 8 การเกิด increase in the resting tone in aorta (IRT) (Noguera, *et al.*, 1996)

ในการทดสอบผลของ quercetin และ naringenin ที่มีต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบซึ่งเหนี่ยวนำโดยการเปลี่ยนแปลงของ  $Ca^{2+}$  ในสภาวะที่ปราศจากสารกระตุ้นทำได้โดยขั้นตอนเดียวกับการทดลองข้างต้น โดยทำให้กล้ามเนื้อเรียบปราศจาก  $Ca^{2+}$  โดยการกระตุ้นด้วย PE ในสารละลายที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$  แล้วเติมสารทดสอบได้แก่ quercetin หรือ naringenin ความเข้มข้น  $500 \mu M$  เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยการเปลี่ยนสารละลายที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$  เป็นสารละลาย Krebs-Henseleit เพื่อบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของการหดตัวเป็นเวลา 20 นาที (IRT)

ทั้งนี้ผลของสารทดสอบต่อการตอบสนองของกล้ามเนื้อเรียบนั้นจะคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบขณะพัก (IRT) เมื่อได้รับสารทดสอบเทียบกับการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบขณะพัก (IRT) ก่อนได้รับสารทดสอบ

แผนภาพการทดลองที่ 3



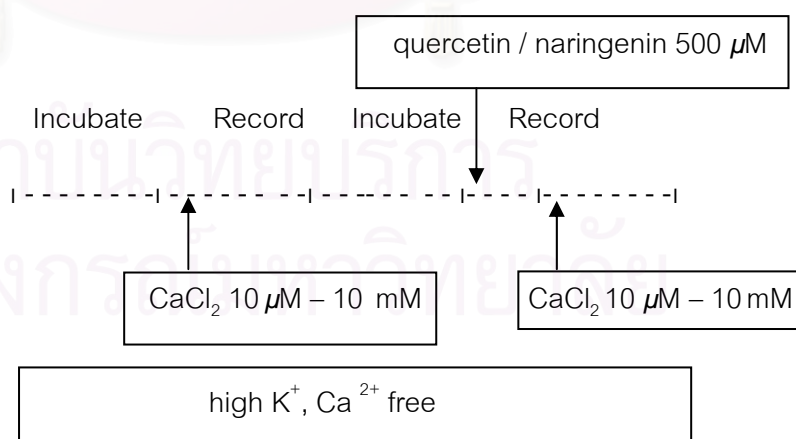
#### 4. ศึกษาผลของ quercetin และ naringenin ต่อการเคลื่อนที่เข้าเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของ $\text{Ca}^{2+}$ อีอิสระจากภายนอก เมื่อถูกกระตุ้นด้วย $\text{CaCl}_2$ ในสารละลายที่ปราศจาก $\text{Ca}^{2+}$ ที่มี $\text{K}^+$ สูง

ในการศึกษาผลของ quercetin และ naringenin ต่อการเคลื่อนที่เข้าเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของ  $\text{Ca}^{2+}$  อีอิสระจากภายนอกนั้น เริ่มจากเมื่อกล้ามเนื้อที่เตรียมไว้มีความตึงคงที่แล้ว ให้ incubate กล้ามเนื้อในสารละลายที่ปราศจาก  $\text{Ca}^{2+}$  ที่มี  $\text{K}^+$  สูง จากนั้นกระตุ้นการหดตัวด้วย  $\text{CaCl}_2$  แบบสะสมขนาด ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง  $10 \mu\text{M} - 10 \text{mM}$  บันทึกผลการหดตัว

ในการทดสอบผลของ quercetin และ naringenin ทำการทดลองซ้ำข้างต้น โดยหลังจากกล้ามเนื้อมีความตึงคงที่ในสารละลาย Krebs-Henseleit เปลี่ยนเป็นสารละลายที่ปราศจาก  $\text{Ca}^{2+}$  ที่มี  $\text{K}^+$  สูง เติมสารทดสอบ ได้แก่ quercetin หรือ naringenin ( $500 \mu\text{M}$ ) ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นกระตุ้นการหดตัวด้วย  $\text{CaCl}_2$  แบบสะสมขนาด ในความเข้มข้นระหว่าง  $10 \mu\text{M} - 10 \text{mM}$  บันทึกผลการหดตัว

ทั้งนี้ผลของสารทดสอบต่อการตอบสนองของกล้ามเนื้อเรียบนั้นจะคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อได้รับ  $\text{CaCl}_2$  แบบสะสมขนาด หลังได้รับสารทดสอบในสารละลายที่ปราศจาก  $\text{Ca}^{2+}$  ที่มี  $\text{K}^+$  สูง เทียบกับการหดตัวสูงสุดของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อได้รับ  $\text{CaCl}_2$  แบบสะสมขนาด ก่อนได้รับสารทดสอบในสารละลายที่ปราศจาก  $\text{Ca}^{2+}$  ที่มี  $\text{K}^+$  สูง

#### แผนภาพการทดลองที่ 4



## 5. ศึกษาผลของ quercetin และ naringenin ต่อการคลายตัวของหลอดเลือด

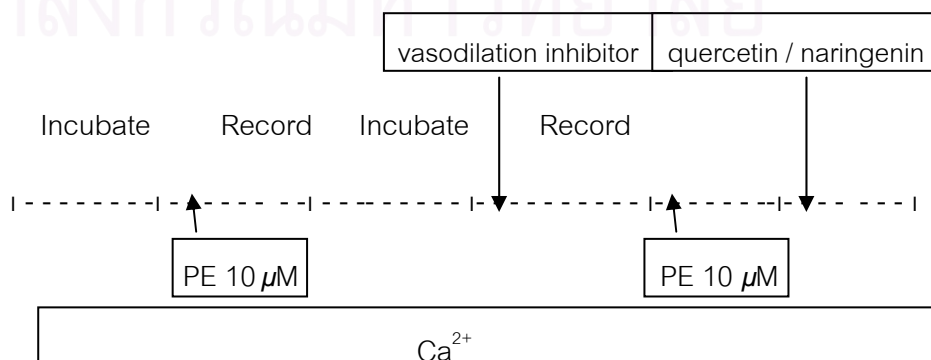
### แดงใหญ่

ในการศึกษาผลของ quercetin และ naringenin ต่อการคลายตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ นั้น เริ่มจากเมื่อกล้ามเนื้อที่เตรียมไว้มีความตึงคงที่ในสารละลาย Krebs-Henseleit แล้วกระตุ้นการหดตัวด้วย PE ความเข้มข้น  $10 \mu\text{M}$  เมื่อกล้ามเนื้อหดตัวสูงสุดและเข้าสู่ระยะ tonic phase แล้วเติมสารทดสอบ quercetin หรือ naringenin แบบสะสมขนาด ในช่วงความเข้มข้น  $50 \mu\text{M} - 2000 \text{ mM}$  บันทึกผลการคลายตัว

ในการศึกษากลไกการคลายตัวของ quercetin และ naringenin ทำการทดลองซ้ำข้างต้น โดย incubate กล้ามเนื้อกับสารยับยั้งการคลายตัวด้วยกลไกการออกฤทธิ์ต่างๆ ได้แก่ indomethacin ( $10^{-5} \text{ M}$ ), atropine ( $10^{-4} \text{ M}$ ), L-NAME ( $10^{-4} \text{ M}$ ), propranolol ( $10^{-5} \text{ M}$ ), methylene blue ( $10^{-5} \text{ M}$ ), 4-aminopyridine ( $10^{-4} \text{ M}$ ), glybenclamide ( $10^{-5} \text{ M}$ ), TEA ( $10^{-3} \text{ M}$ ) เป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่จะกระตุ้นให้กล้ามเนื้อหดตัวด้วย PE ความเข้มข้น  $10 \mu\text{M}$  และทำให้เกิดการคลายตัวด้วย quercetin หรือ naringenin ในช่วงความเข้มข้น  $50 \mu\text{M} - 2000 \text{ mM}$  บันทึกผลการคลายตัว

ทั้งนี้ผลของสารทดสอบต่อการตอบสนองของกล้ามเนื้อเรียบนั้นจะคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อได้รับสารทดสอบแบบสะสมขนาด เทียบกับการหดตัวสูงสุดของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อได้รับ PE ( $10 \mu\text{M}$ ) หลังได้รับสารยับยั้งการคลายตัว ก่อนได้รับสารทดสอบ

### แผนภาพการทดลองที่ 5



## การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  standard error of mean) ของเปอร์เซ็นต์การตอบสนองของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อได้รับสารทดสอบเทียบกับก่อนได้รับสารทดสอบ ตามที่ระบุไว้ในวิธีการทดลอง โดยมีค่า  $n=4-9$

การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มของสารทดสอบและกลุ่มควบคุมใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) ตามด้วย post hoc test ชนิด Dunnett's โดยพิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ )

การคำนวณ  $pD_2'$  ใช้วิธีของ Van Rossum และคณะ (Van Rossum, *et al.*, 1963)

$$pD_2' = -\log [B] + \log([E_{AM}]/[E_{AMB}]-1)$$

เมื่อ [B] คือ ขนาดความเข้มข้นของ non competitive antagonist ในหน่วยโมลาร์

$[E_{AM}]$  และ  $[E_{AMB}]$  คือ ค่าการหดตัวสูงสุด (maximum contraction) ที่เกิดจากตัวกระตุ้นเมื่อมีหรือไม่มีสารยับยั้งอยู่ด้วย ตามลำดับ

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 1. ผลของสาร quercetin และ naringenin ในการยับยั้งการตอบสนองของกล้ามเนื้อเรียบ หลอดเลือดแดงใหญ่ ต่อการกระตุ้นด้วย PE และ KCl

##### 1.1 เมื่อใช้ PE ความเข้มข้น $10\ \mu\text{M}$ เป็นตัวกระตุ้นการหดตัว

เนื่องจากการศึกษานี้ใช้ DMSO ความเข้มข้น 0.07% (v/v) เป็นตัวทำละลาย quercetin และ naringenin จึงใช้เป็นกลุ่มควบคุมเพื่อเปรียบเทียบกับผลของสารทดสอบ ซึ่งในความเข้มข้นดังกล่าว DMSO ไม่มีผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ โดยที่กล้ามเนื้อเรียบที่ได้รับ DMSO ในความเข้มข้นดังกล่าว ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงความตึงตัวของหลอดเลือด ตลอดจน DMSO ไม่มีผลยับยั้งการตอบสนองของหลอดเลือดต่อการกระตุ้นด้วย PE ความเข้มข้น  $10\ \mu\text{M}$  และ KCl ความเข้มข้น 40 mM ความแรงในการหดตัวเมื่อใช้ PE และ KCl เป็นตัวกระตุ้นก่อนได้รับสารทดสอบ ได้  $481 \pm 25.8\ \text{mg}$  (n=81),  $290 \pm 16.5\ \text{mg}$  (n=52) ตามลำดับ (รูปที่ 9)

จากการศึกษาพบว่า quercetin ในความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษานี้มีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ที่ปราศจาก endothelium เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE และลักษณะการยับยั้งการตอบสนองดังกล่าวขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ quercetin ทั้งนี้ผลของ quercetin ในการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด ปรากฏที่ความเข้มข้นในช่วง  $50\ \mu\text{M}$  -  $1000\ \mu\text{M}$  (รูปที่ 11,12) ดังปรากฏตามกราฟรูปที่ 13 ซึ่งค่าความเข้มข้นของ quercetin ที่มีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE ได้ 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) คือ  $138 \pm 0.8\ \mu\text{M}$  (n=7)

Naringenin ให้ผลเช่นเดียวกับ quercetin ในการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ที่ปราศจาก endothelium เมื่อกระตุ้นด้วย PE และลักษณะการยับยั้งการตอบสนองดังกล่าวขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ naringenin ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่  $50\ \mu\text{M}$  -  $500\ \mu\text{M}$  แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น  $1000\ \mu\text{M}$  และ  $3000\ \mu\text{M}$  ปรากฏว่า naringenin แสดงผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบได้น้อยลง (รูปที่ 14,15) ดังปรากฏตามกราฟรูปที่ 16 ซึ่งค่าความ

เข้มข้นของ naringenin ที่มีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE ได้ 50 % ในช่วงความเข้มข้น 50 - 500  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ) คือ  $209 \pm 0.6 \mu\text{M}$  ( $n=7$ )

## 1.2 เมื่อใช้ KCl ความเข้มข้น 40 mM เป็นตัวกระตุ้นการหดตัว

จากการศึกษาพบว่า quercetin มีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ที่ปราศจาก endothelium เมื่อกระตุ้นด้วย KCl ความเข้มข้น 40 mM และลักษณะการยับยั้งการตอบสนองดังกล่าวขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ quercetin ทั้งนี้ผลต่อการยับยั้งการหดตัวของ quercetin ปรากฏอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50  $\mu\text{M}$  - 1000  $\mu\text{M}$  (รูปที่ 17,18) ดังปรากฏตามกราฟรูปที่ 19 ซึ่งค่าความเข้มข้นของ naringenin ที่มีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อถูกกระตุ้นด้วย KCl ได้ 50 % ( $\text{IC}_{50}$ ) คือ  $89 \pm 0.5 \mu\text{M}$  ( $n=7$ )

Naringenin ให้ผลเช่นเดียวกับ quercetin ในการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ เมื่อกระตุ้นด้วย KCl และลักษณะการยับยั้งการตอบสนองดังกล่าวขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ naringenin ปรากฏอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50  $\mu\text{M}$  - 1000  $\mu\text{M}$  (รูปที่ 20,21) ดังปรากฏตามกราฟรูปที่ 22 ซึ่งค่าความเข้มข้นของ naringenin ที่มีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อถูกกระตุ้นด้วย KCl ได้ 50 % ( $\text{IC}_{50}$ ) คือ  $200 \pm 0.7 \mu\text{M}$  ( $n=7$ )

## 2. ผลของสาร quercetin และ naringenin ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลง $\text{Ca}^{2+}$ ที่ปล่อยออกจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว

ในการศึกษาผลของ quercetin และ naringenin ต่อการเปลี่ยนแปลง  $\text{Ca}^{2+}$  นั้น ได้เลือกใช้ PE และ caffeine เป็นตัวกระตุ้น โดย PE มีผลกระตุ้น  $\text{Ca}^{2+}$  หลังจากแหล่งเก็บภายในเซลล์ซึ่งสัมพันธ์กับ  $\alpha$ -adrenoceptor ส่วน caffeine มีผลกระตุ้น  $\text{Ca}^{2+}$  หลังจากแหล่งเก็บภายในเซลล์ซึ่งสัมพันธ์กับ ryanodine receptor ซึ่งในการศึกษาได้ตัดปัจจัยรบกวนภายนอกโดยทำการทดลองในสภาวะที่ปราศจาก  $\text{Ca}^{2+}$

### 2.1 เมื่อใช้ PE ความเข้มข้น 10 $\mu\text{M}$ เป็นตัวกระตุ้นการหดตัวในสภาวะที่ปราศจาก $\text{Ca}^{2+}$

ในการศึกษานี้เลือกใช้ quercetin ความเข้มข้น 500  $\mu\text{M}$  ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ยับยั้งการหดตัวที่กระตุ้นด้วย PE ในสภาวะที่มี  $\text{Ca}^{2+}$  โดยการตอบสนองของกล้ามเนื้อเรียบลดลงเหลือ

36.5 ± 3.6 % จากการศึกษพบว่า quercetin ในความเข้มข้นดังกล่าว เมื่ออยู่ในสภาวะที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$  สามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยการตอบสนองของกล้ามเนื้อเรียบต่อการกระตุ้นด้วย PE ลดลงเหลือเพียง 19.7 ± 1.8 % ( $n=6$ ) (รูปที่ 23) ดังปรากฏตามกราฟรูปที่ 25

เมื่อใช้ naringenin ความเข้มข้น 500  $\mu M$  ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ยับยั้งการหดตัวที่กระตุ้นด้วย PE ในสภาวะที่มี  $Ca^{2+}$  โดยการตอบสนองของกล้ามเนื้อเรียบลดลงเหลือ 34.1 ± 7.3 % จากการศึกษพบว่า naringenin ในความเข้มข้นดังกล่าว เมื่ออยู่ในสภาวะที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$  สามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยการตอบสนองของกล้ามเนื้อเรียบต่อการกระตุ้นด้วย PE ลดลงเหลือ 48.1 ± 4.7 % ( $n=6$ ) (รูปที่ 24) ดังปรากฏตามกราฟรูปที่ 25

2.2 เมื่อใช้ caffeine ความเข้มข้น 10 mM เป็นตัวกระตุ้นการหดตัวในสภาวะที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$

ความแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่ปราศจาก endothelium เมื่อกระตุ้นด้วย caffeine ในสภาวะที่ไม่มี  $Ca^{2+}$  คือ 44.6 ± 6.9 mg ( $n=19$ ) (รูปที่ 10) ผลของ DMSO ในความเข้มข้น 0.07% (v/v) ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมในการเปรียบเทียบผลของ quercetin และ naringenin ที่มีต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบนั้นพบว่า DMSO ความเข้มข้นดังกล่าว ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของหลอดเลือดต่อการกระตุ้นด้วย caffeine ในสภาวะที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$

จากการศึกษพบว่า เมื่อให้ quercetin ความเข้มข้น 500  $\mu M$  ก่อนการกระตุ้นด้วย caffeine ในสภาวะที่ไม่มี  $Ca^{2+}$  พบว่า quercetin มีผลทำให้การตอบสนองของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดลดลงเหลือ 48.8 ± 7.5 % ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 26) ดังปรากฏตามกราฟรูปที่ 28

อย่างไรก็ตาม naringenin ความเข้มข้น 500  $\mu M$  ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของหลอดเลือด เมื่อกระตุ้นด้วย caffeine ในสภาวะที่ไม่มี  $Ca^{2+}$  (รูปที่ 27) ดังปรากฏตามกราฟรูปที่ 28

### 3. ผลของสาร quercetin และ naringenin ต่อการเคลื่อนที่เข้าเซลล์ของ $Ca^{2+}$ และการเก็บ $Ca^{2+}$ เข้าสู่แหล่งเก็บภายในเซลล์ที่สัมพันธ์กับ $\alpha_1$ -adrenergic receptor

เมื่อกระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดให้หดตัวด้วย  $\alpha_1$ -adrenoceptor เช่น PE ในสภาวะที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$  หลายๆ ครั้งจะทำให้  $Ca^{2+}$  ภายในเซลล์ที่ถูกปล่อยจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์หมดไปได้ ซึ่งสามารถใช้การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบตรวจสอบว่าแหล่งเก็บสะสม  $Ca^{2+}$

ภายในเซลล์ไม่มี  $\text{Ca}^{2+}$  เก็บสะสมอีกโดยกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบด้วย PE จะพบว่ากล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดจะไม่เกิดการหดตัว และเมื่อเติม  $\text{Ca}^{2+}$  ลงในสภาวะดังกล่าว  $\text{Ca}^{2+}$  จากภายนอกจะเคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์ได้เองโดยพบว่าหลอดเลือดเกิดการหดตัวขึ้นโดยปราศจากตัวกระตุ้น หรือ Increase in the resting tone in aorta (IRT)

ในการศึกษาครั้งนี้ IRT ที่เกิดขึ้นหลังได้รับ DMSO ความเข้มข้น 0.07% (v/v) คิดเป็น  $74.2 \pm 3.9$  % (n=5) ของ IRT ก่อนได้รับ DMSO ซึ่งจากการทดสอบทางสถิติ พบว่า DMSO ในความเข้มข้นดังกล่าว มีผลยับยั้งการเกิด IRT ได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังปรากฏตามกราฟรูปที่ 30

จากการศึกษาพบว่า quercetin ความเข้มข้น  $500 \mu\text{M}$  สามารถยับยั้งการเกิด IRT ได้ โดย IRT ที่เกิดขึ้นลดลงเหลือ  $41.0 \pm 5.7$  % (n=4) โดยค่าดังกล่าวมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 29) ดังปรากฏตามกราฟรูปที่ 30 ซึ่งผลการทดลองบ่งชี้ว่า quercetin ในความเข้มข้นดังกล่าว สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของ  $\text{Ca}^{2+}$  เข้าสู่เซลล์ขณะพักภายใต้สภาวะที่กำหนดในการทดลองนี้

ในการทำงานเดียวกัน naringenin ความเข้มข้น  $500 \mu\text{M}$  สามารถยับยั้งการเกิด IRT ได้ โดย IRT ที่เกิดขึ้นลดลงเหลือ  $29.3 \pm 9.0$  % (n=4) โดยค่าดังกล่าวมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 29) ดังปรากฏตามกราฟรูปที่ 30 ซึ่งอาจสรุปได้ว่า naringenin สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของ  $\text{Ca}^{2+}$  เข้าสู่เซลล์ขณะพักภายใต้สภาวะที่กำหนดเช่นเดียวกับ quercetin

#### 4. ผลของ quercetin และ naringenin ต่อการเคลื่อนที่เข้าออกของ $\text{Ca}^{2+}$ ในกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ เมื่อถูกกระตุ้นด้วย $\text{CaCl}_2$ แบบสะสมขนาด

DMSO ความเข้มข้น 0.07% (v/v) ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมเพื่อเปรียบเทียบกับผลของ quercetin และ naringenin พบว่า DMSO ความเข้มข้นดังกล่าว มีผลเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของหลอดเลือดต่อการกระตุ้นด้วย  $\text{CaCl}_2$  แบบสะสมขนาด ดังปรากฏตามกราฟรูปที่ 35

จากการศึกษาพบว่า quercetin ความเข้มข้น  $500 \mu\text{M}$  มีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ เมื่อกระตุ้นด้วย  $\text{CaCl}_2$  แบบสะสมขนาดในสารละลายที่ปราศจาก  $\text{Ca}^{2+}$  ที่มี  $\text{K}^+$  สูง โดยผลการยับยั้งของ quercetin มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 31) ดังปรากฏตามกราฟรูปที่ 32



ในการทำงานเดียวกัน naringenin ความเข้มข้น 500  $\mu\text{M}$  มีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ เมื่อกระตุ้นด้วย  $\text{CaCl}_2$  แบบสะสมขนาดในสารละลายที่ปราศจาก  $\text{Ca}^{2+}$  ที่มี  $\text{K}^+$  สูง โดยผลการยับยั้งของ naringenin มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 33) ดังปรากฏตามกราฟรูปที่ 34

เมื่อดำเนินการทดลองพบว่า quercetin มีความสามารถในการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อกระตุ้นด้วย  $\text{CaCl}_2$  แบบสะสมขนาดได้มากกว่า naringenin โดย quercetin มีค่า  $\text{pD}_2'$  คือ  $3.7 \pm 0.2$  และ naringenin มีค่า  $\text{pD}_2'$  คือ  $3.5 \pm 0.2$

## 5. ผลของ quercetin และ naringenin ต่อการคลายตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่

จากการศึกษาพบว่า quercetin และ naringenin ที่ความเข้มข้นช่วง 50  $\mu\text{M}$  - 2000  $\mu\text{M}$  ทำให้กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ที่ไม่มี endothelium เมื่อกระตุ้นด้วย PE ความเข้มข้น 10  $\mu\text{M}$  ก่อน เกิดการคลายตัวได้ (รูปที่ 36,37) ดังปรากฏตามกราฟรูปที่ 38 ซึ่งจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการคลายตัวของ quercetin และ naringenin ไม่ขึ้นกับ endothelium และมีความแรงในการคลายตัวใกล้เคียงกัน

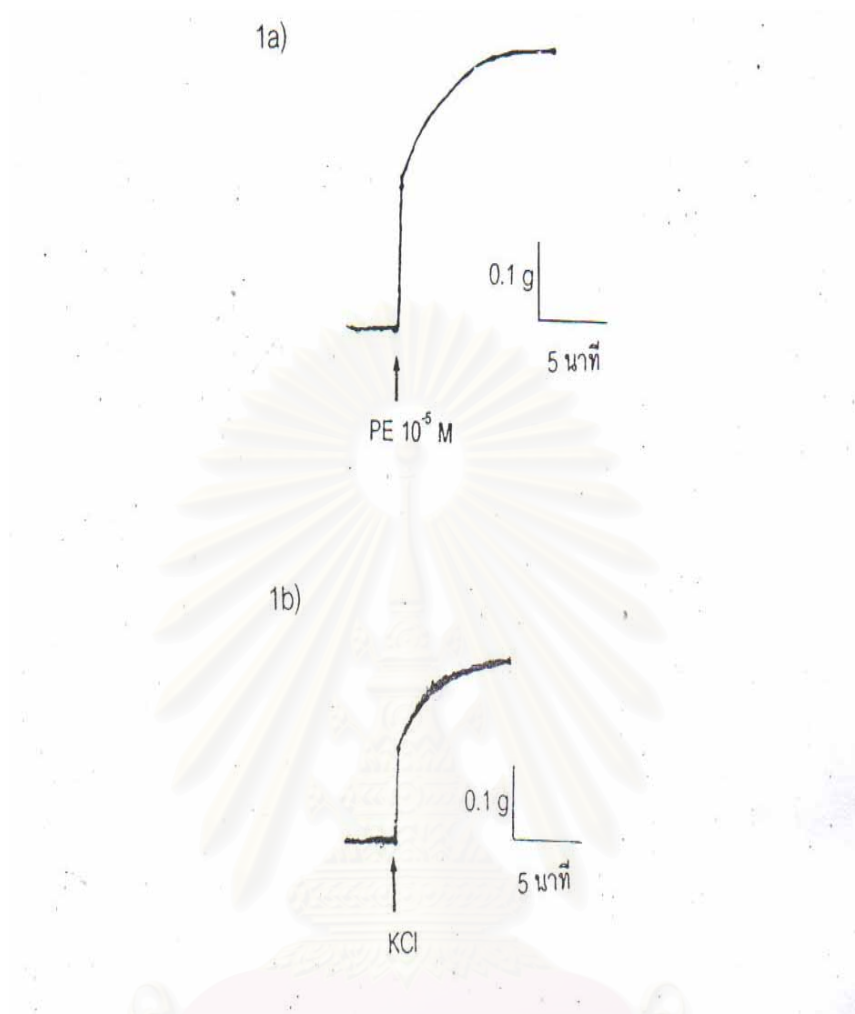
ในการศึกษานี้ได้ทดสอบหากลไกการออกฤทธิ์โดยใช้สารยับยั้งการคลายตัวต่างๆ ได้แก่ indomethacin ( $10^{-5}$  M), atropine ( $10^{-4}$  M), L-NAME ( $10^{-4}$  M), propranolol ( $10^{-5}$  M), methylene blue ( $10^{-5}$  M), 4-aminopyridine ( $10^{-4}$  M), glybenclamide ( $10^{-5}$  M) และ TEA ( $10^{-3}$  M) ซึ่งผลการทดลองพบว่า propranolol ซึ่งเป็น  $\beta$ -adrenoceptor antagonist สามารถยับยั้งการคลายตัวของ quercetin และ naringenin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเข้มข้นมากกว่า 500  $\mu\text{M}$  (รูปที่ 43,55) ดังปรากฏตามกราฟรูปที่ 44, 56 ตามลำดับ atropine ซึ่งเป็น muscarinic antagonist และ indomethacin ซึ่งเป็น COX inhibitor พบว่า สามารถยับยั้งการคลายตัวของ naringenin ที่ความเข้มข้นมากกว่า 100  $\mu\text{M}$  (รูปที่ 51,52) ดังปรากฏตามกราฟรูปที่ 53 นอกจากนี้ 4-aminopyridine หรือ glybenclamide ซึ่งเป็น  $\text{K}^+$  channel blocker นั้น สามารถยับยั้งการคลายตัวของ naringenin ที่ความเข้มข้นมากกว่า 100  $\mu\text{M}$  (รูปที่ 60,61) ดังปรากฏตามกราฟรูปที่ 62 L-NAME, methylene blue และ TEA ไม่มีผลต่อการคลายตัวของ naringenin (รูปที่ 54,57,58) ดังปรากฏตามกราฟรูปที่ 56,59

ในขณะที่ indomethacin, atropine, L-NAME, methylene blue, 4-aminopyridine, glybenclamide และ TEA ไม่มีผลต่อการคลายตัวของ quercetin (รูปที่ 39,40,42,45,46,48,49 ตามลำดับ) ดังปรากฏตามกราฟรูปที่ 41,44,47,50

จากการศึกษาสรุปได้ว่า quercetin และ naringenin ทำให้หลอดเลือดเกิดการคลายตัวได้ เป็นไปได้ว่าอาจเกี่ยวข้องกับการกระตุ้น  $\beta$ -adrenoceptor จากการที่ propranolol ไปมีผลยับยั้งการคลายตัวของสารทั้งสอง นอกจากนี้เฉพาะ naringenin ยังอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับ  $K^+$  channel, COX pathway, muscarinic receptor ด้วย ซึ่งผลนี้แสดงได้จากการที่ 4-aminopyridine, glybenclamide, indomethacin และ atropine ไปมีผลยับยั้งการคลายตัวของ naringenin

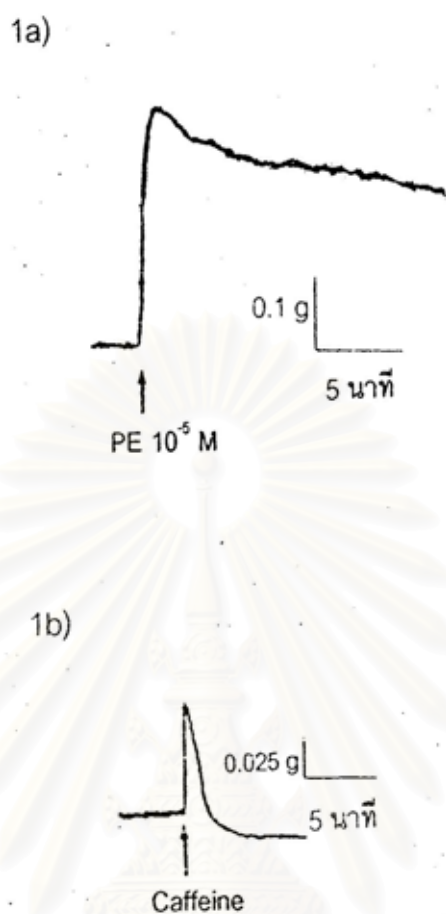


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



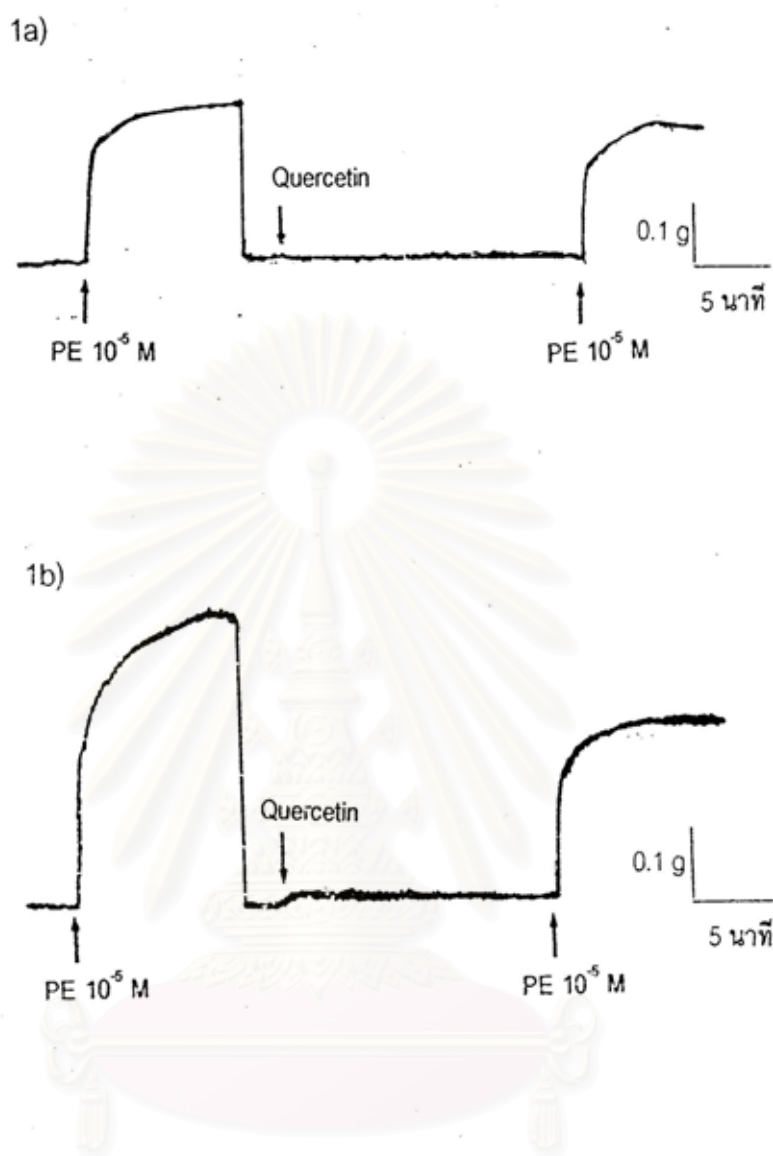
รูปที่ 9 ผลการหัดวัดของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวเมื่อกระตุ้นด้วย PE  $10^{-5}$  M (1a), KCl 40 mM (1b) ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$ -containing solution

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

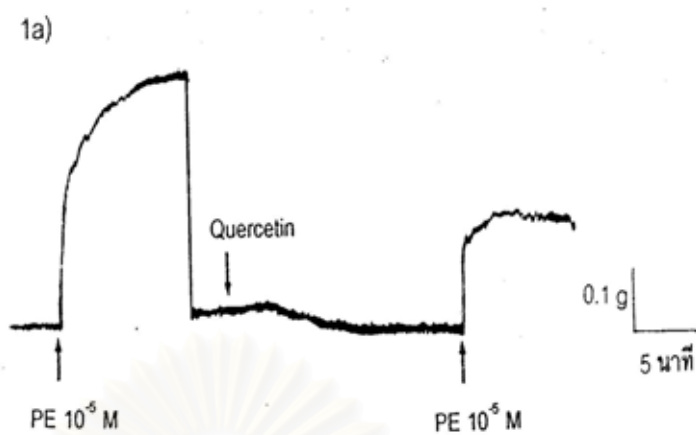


รูปที่ 10 ผลการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวเมื่อกระตุ้นด้วย PE  $10 \mu\text{M}$  (1a), caffeine  $10 \text{ mM}$  (1b) ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - free medium

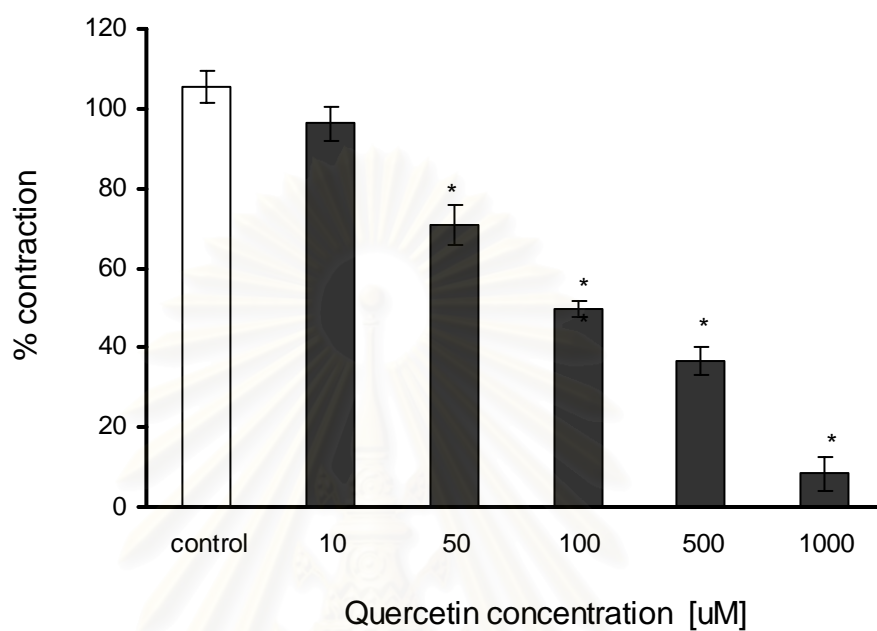
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 ผลของ quercetin ความเข้มข้น  $50 \mu\text{M}$  (1a),  $100 \mu\text{M}$  (1b) ต่อการหลุดตัวของ  
 กัลเลียมเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE  $10 \mu\text{M}$   
 ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$ -containing solution



รูปที่ 12 ผลของ quercetin ความเข้มข้น  $500 \mu\text{M}$  (1a),  $1000 \mu\text{M}$  (1b) ต่อการหลุดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE  $10 \mu\text{M}$  ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$ -containing solution

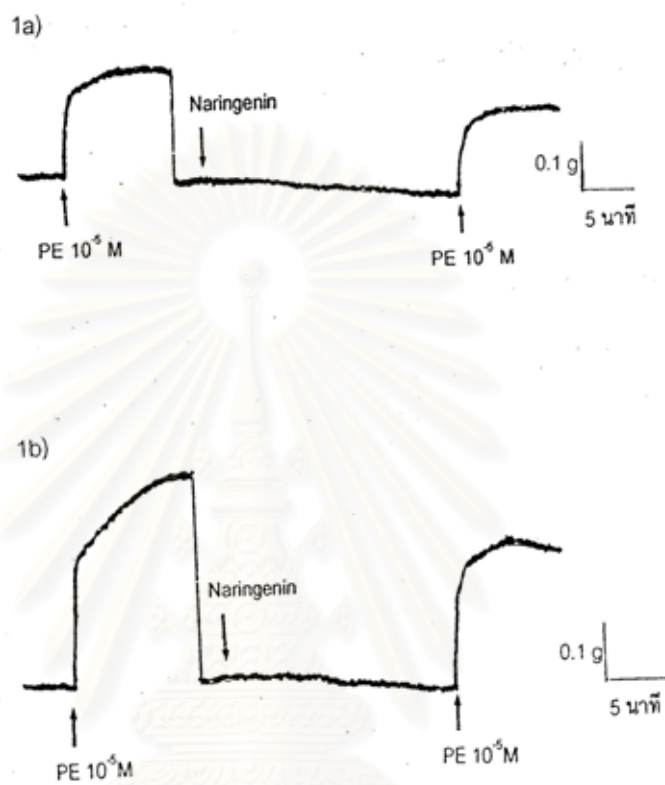


รูปที่ 13 กราฟแสดงผลของ quercetin ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ  
ของหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วย PE 10  $\mu$ M

กราฟแสดงค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (n=7)

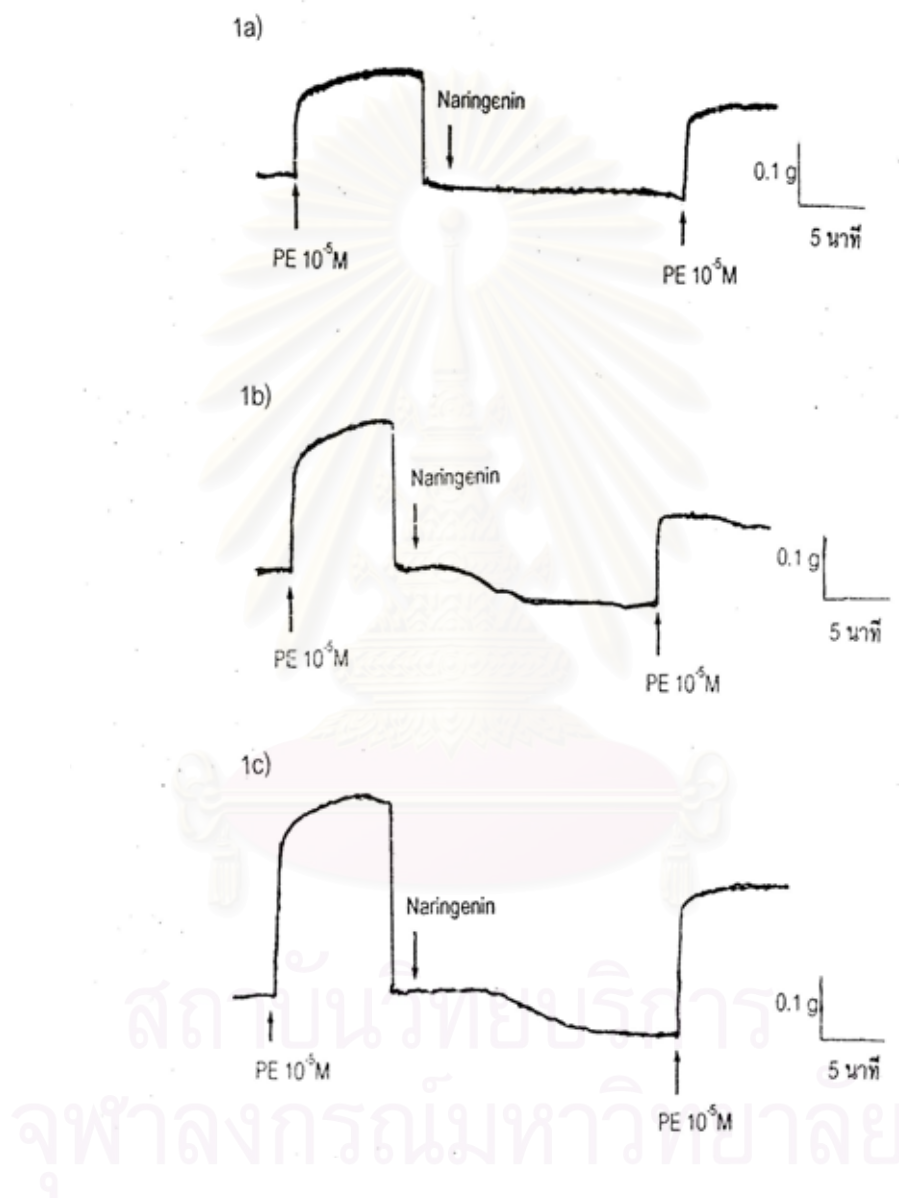
\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มก่อนได้รับสารทดสอบ ( $p < 0.05$ )

สถาบันนวัตยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

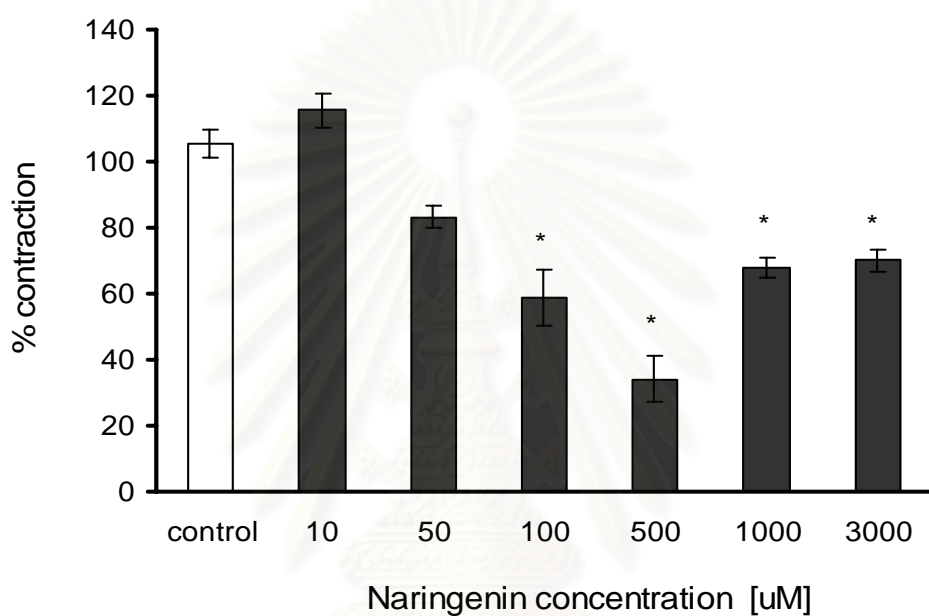


รูปที่ 14 ผลของ naringenin ความเข้มข้น 50  $\mu$ M (1a), 100  $\mu$ M (1b) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE 10  $\mu$ M ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$ -containing solution





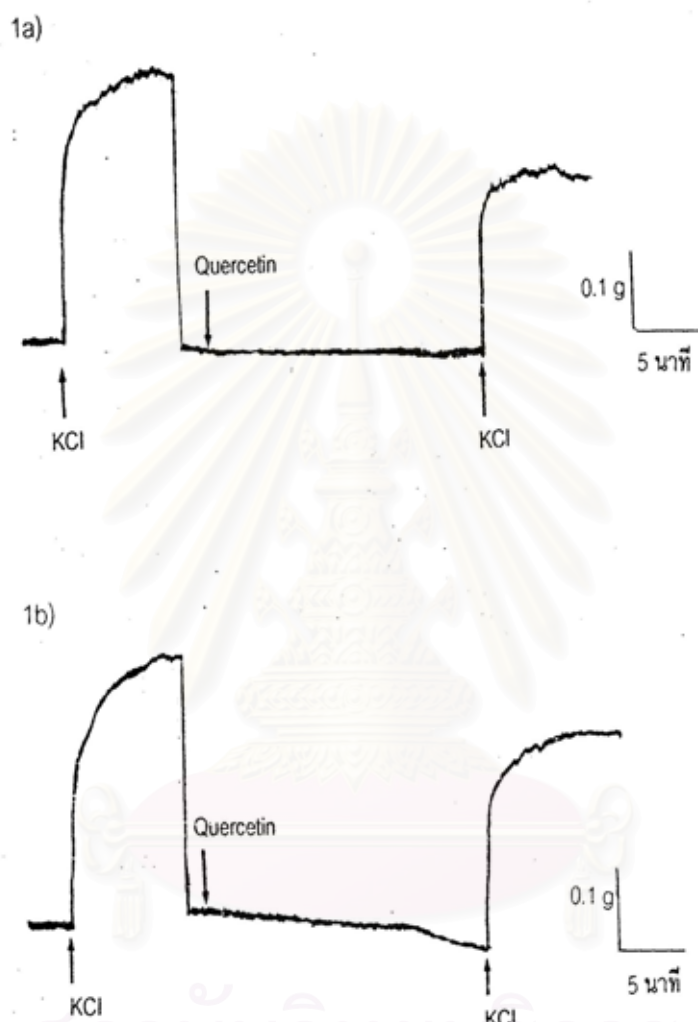
รูปที่ 15 ผลของ naringenin ความเข้มข้น 500  $\mu M$  (1a), 1000  $\mu M$  (1b) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE 10  $\mu M$  ในสารละลาย  $Ca^{2+}$ -containing solution



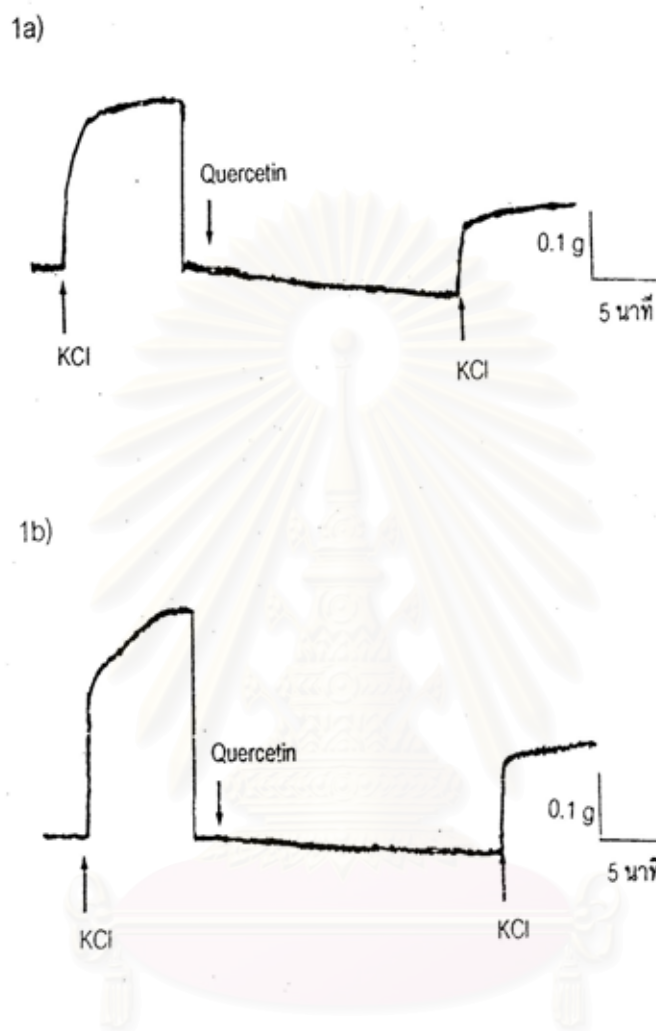
รูปที่ 16 กราฟแสดงผลของ naringenin ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ  
ของหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วย PE 10  $\mu$ M

กราฟแสดงค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (n=7)

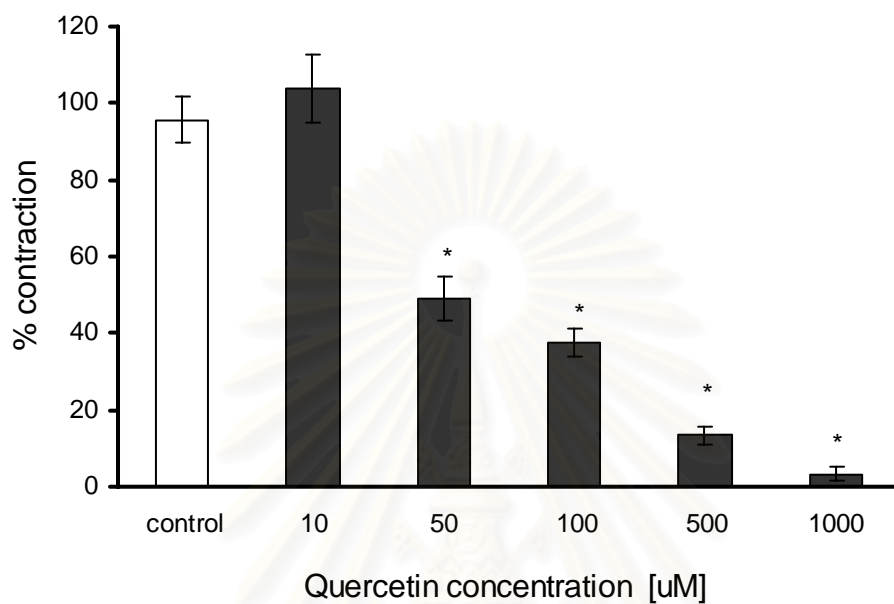
\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มก่อนได้รับสารทดสอบ ( $p < 0.05$ )



รูปที่ 17 ผลของ quercetin ความเข้มข้น 50  $\mu\text{M}$  (1a), 100  $\mu\text{M}$  (1b) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย KCl 40 mM ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$ -containing solution



รูปที่ 18 ผลของ quercetin ความเข้มข้น 500  $\mu\text{M}$  (1a), 1000  $\mu\text{M}$  (1b) ต่อ  
การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้น  
ด้วย KCl 40 mM ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$ -containing solution

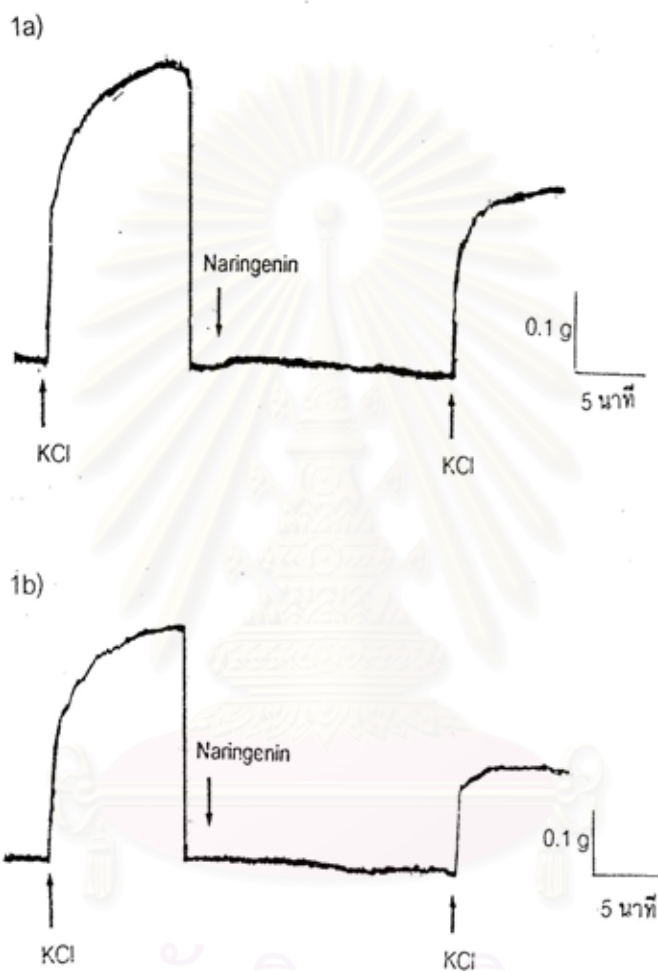


รูปที่ 19 กราฟแสดงผลของ naringenin ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ  
ของหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วย KCl 40 mM

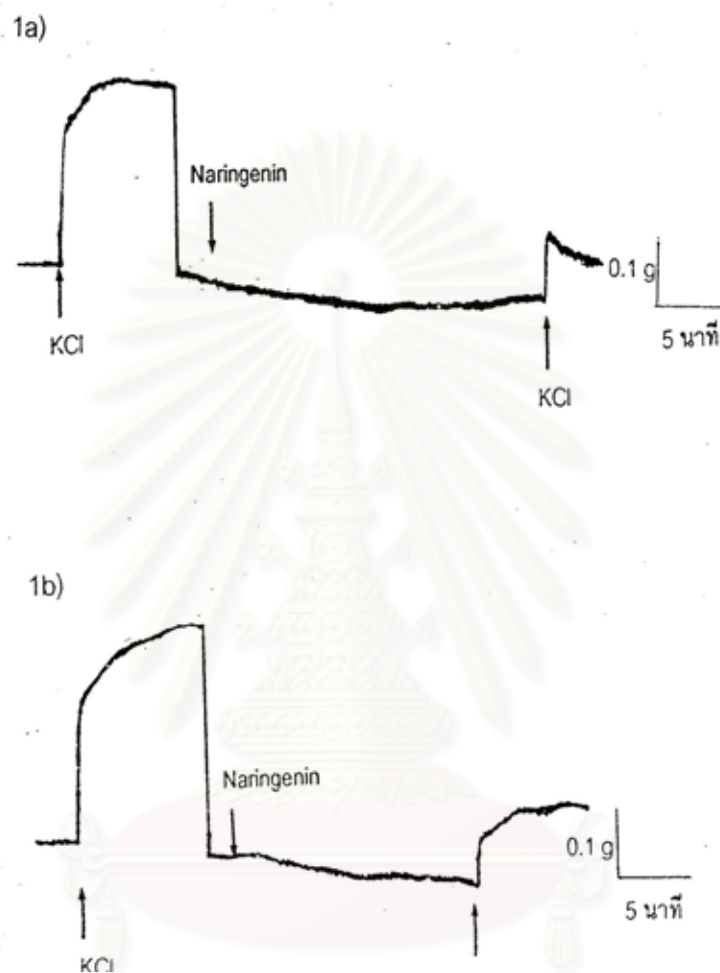
กราฟแสดงค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (n=7)

\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มก่อนได้รับสารทดสอบ  $p < 0.05$

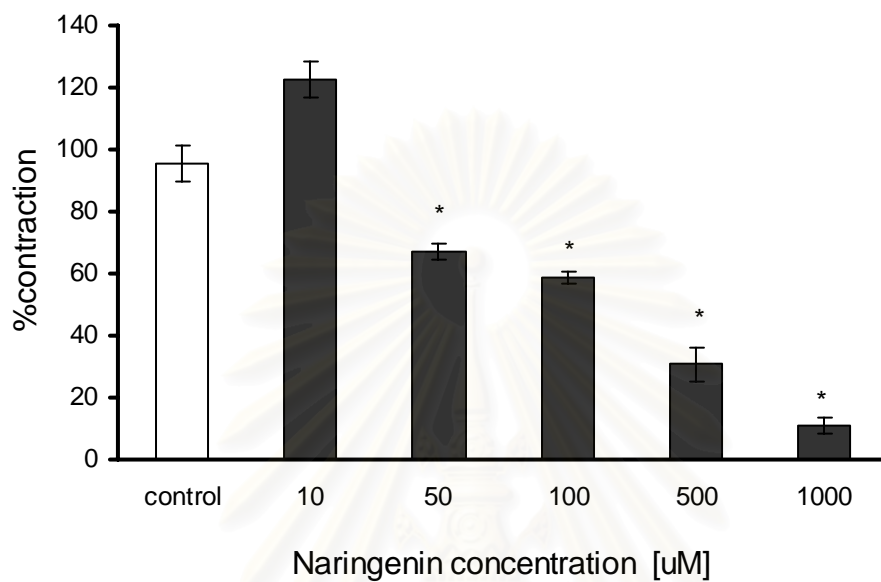
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 20 ผลของ naringenin ความเข้มข้น 50  $\mu\text{M}$  (1a), 100  $\mu\text{M}$  (1b) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย KCl 40 mM ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$ -containing solution



รูปที่ 21 ผลของ naringenin ความเข้มข้น 500  $\mu\text{M}$  (1a), 1000  $\mu\text{M}$  (1b) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย KCl 40 mM ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$ -containing solution

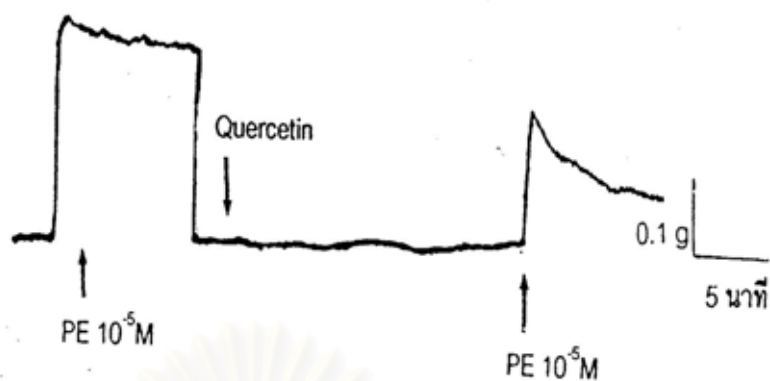


รูปที่ 22 กราฟแสดงผลของ quercetin และ naringenin ความเข้มข้น 500  $\mu\text{M}$  ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อกระตุ้น PE 10  $\mu\text{M}$  ใน  $\text{Ca}^{2+}$  - free medium

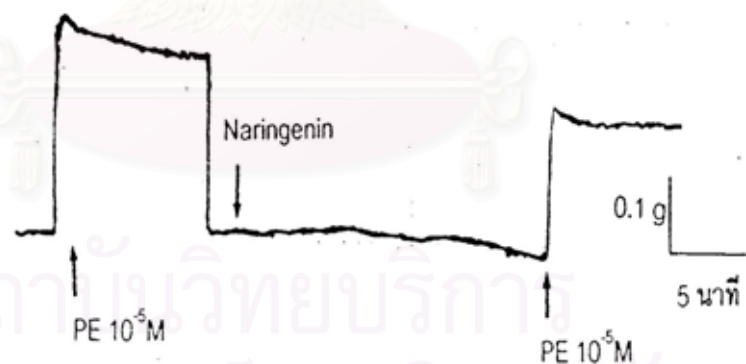
กราฟแสดงค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (n=6)

\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มก่อนได้รับสารทดสอบ  $p < 0.05$ )

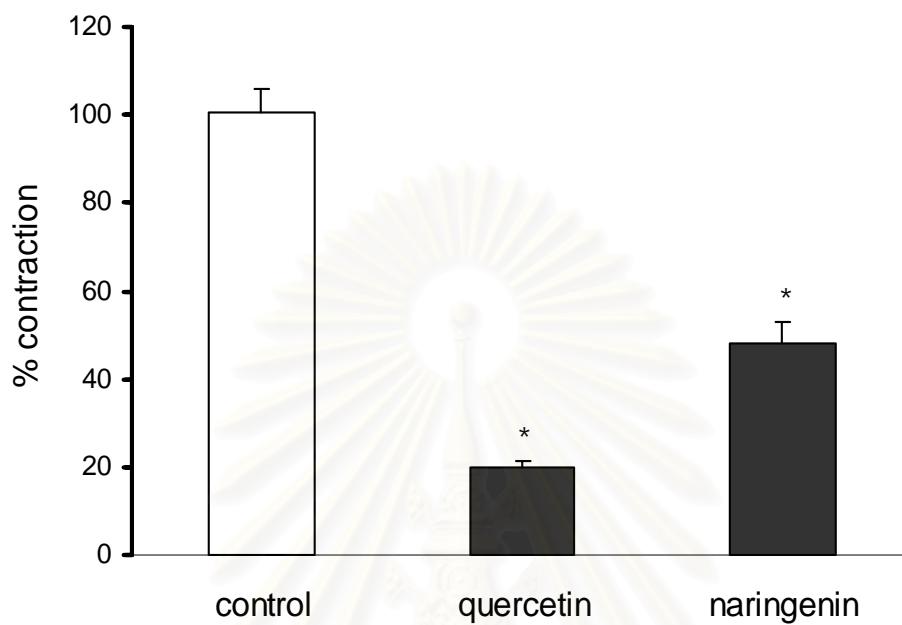




รูปที่ 23 ผลของ quercetin ความเข้มข้น 500  $\mu$ M ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ  
หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE 10<sup>-5</sup> M ในสารละลาย  
Ca<sup>2+</sup>-free medium



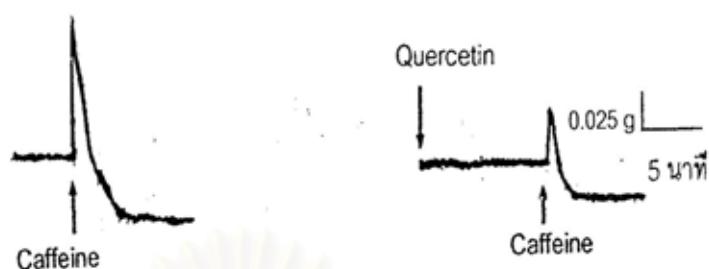
รูปที่ 24 ผลของ naringenin ความเข้มข้น 500  $\mu$ M ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ  
หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PE 10<sup>-5</sup> M ในสารละลาย  
Ca<sup>2+</sup>-free medium



รูปที่ 25 กราฟแสดงผลของ quercetin และ naringenin ความเข้มข้น 500  $\mu\text{M}$  ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อกระตุ้น PE 10  $\mu\text{M}$  ใน  $\text{Ca}^{2+}$  - free medium

กราฟแสดงค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (n=6)

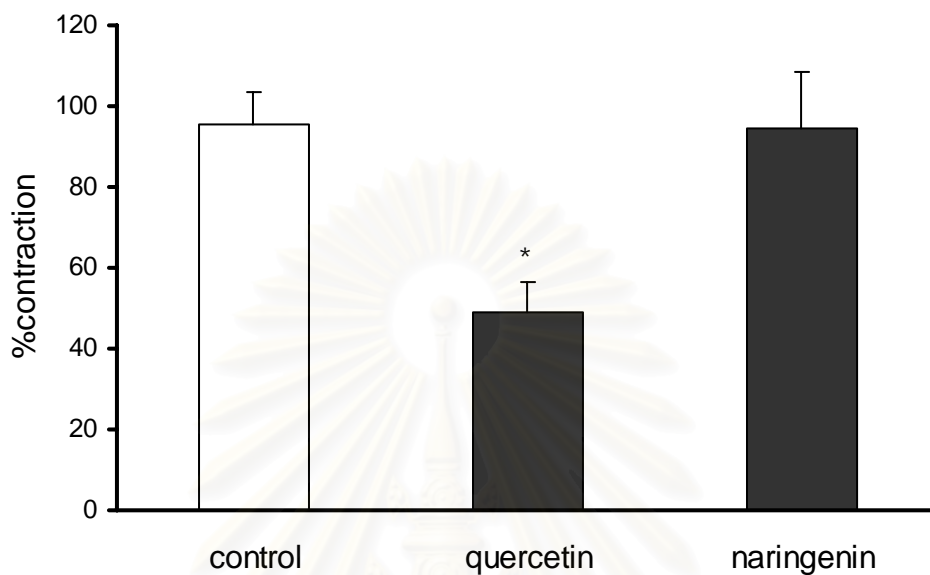
\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มก่อนได้รับสารทดสอบ  $p < 0.05$



รูปที่ 26 ผลของ quercetin ความเข้มข้น 500  $\mu\text{M}$  ต่อการหลุดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ  
หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย Caffeine  $10^{-2}$  M ใน  
สารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium



รูปที่ 27 ผลของ naringenin ความเข้มข้น 500  $\mu\text{M}$  ต่อการหลุดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ  
หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย Caffeine  $10^{-2}$  M ใน  
สารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium

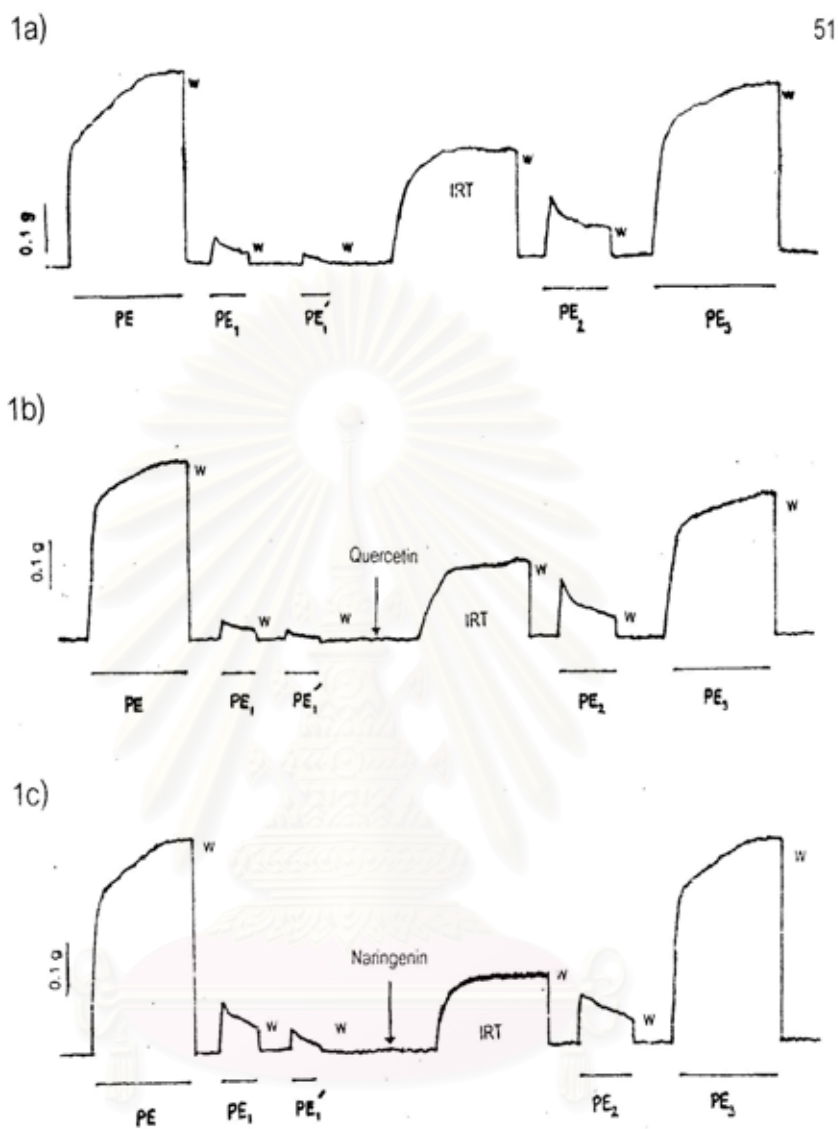


รูปที่ 28 กราฟแสดงผลของ quercetin และ naringenin ความเข้มข้น 500  $\mu\text{M}$  ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อกระตุ้น caffeine 10 mM ใน  $\text{Ca}^{2+}$  - free medium

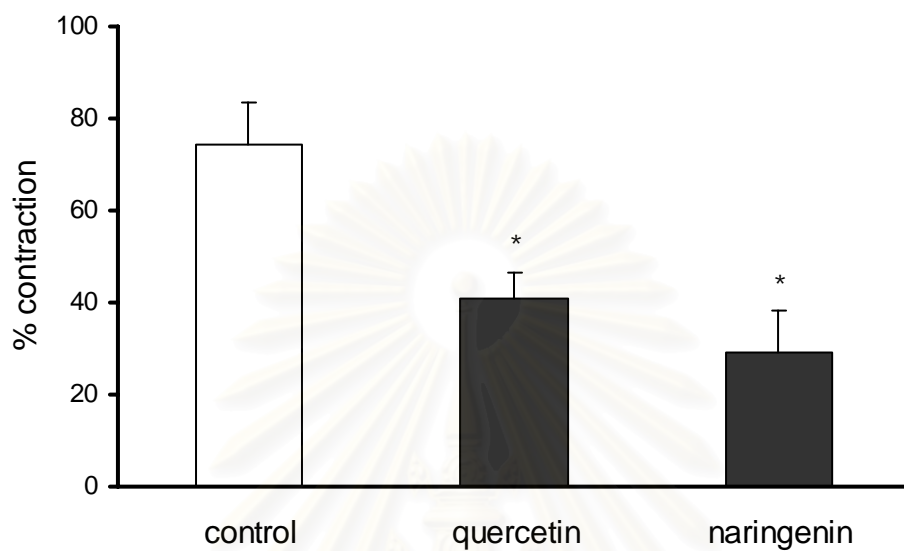
กราฟแสดงค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (n=6)

\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มก่อนได้รับสารทดสอบ  $p < 0.05$ )

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



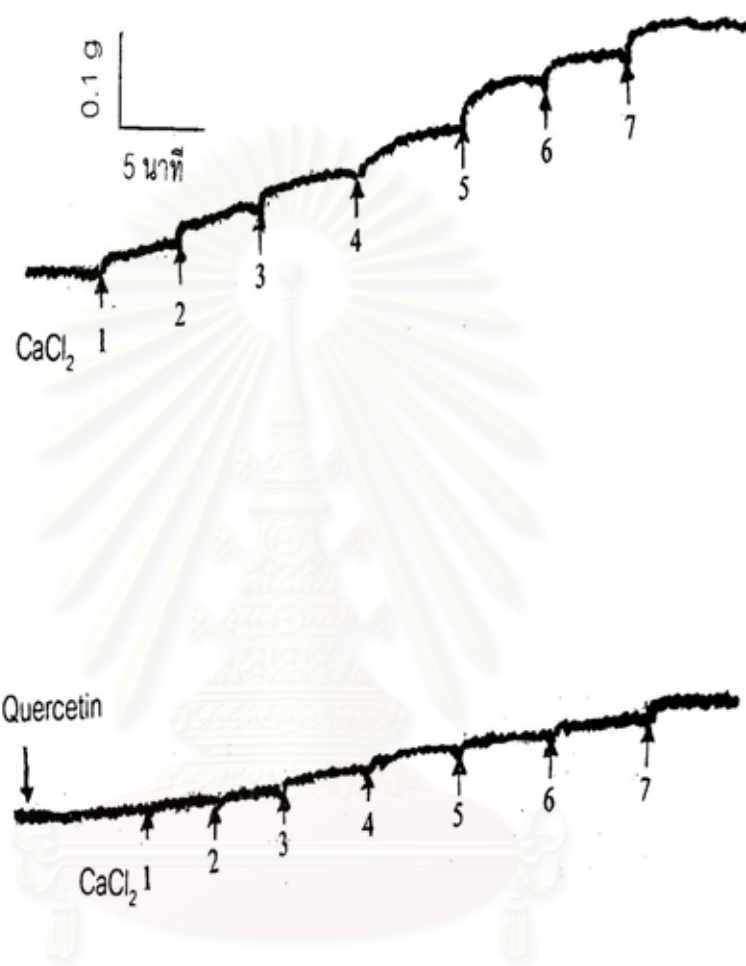
รูปที่ 29 ผลของ quercetin (1b) และ naringenin (1c) ความเข้มข้น 500  $\mu\text{M}$  ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวในขณะพัก [ Increase in the resting tone in aorta (IRT)]



รูปที่ 30 กราฟแสดงผลของ quercetin และ naringenin ความเข้มข้น  $500 \mu\text{M}$  ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดงหนูขาวขณะพัก [ Increase in the resting tone in aorta (IRT) ]

กราฟแสดงค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (n=6)  
\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มก่อนได้รับสารทดสอบ  $p < 0.05$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

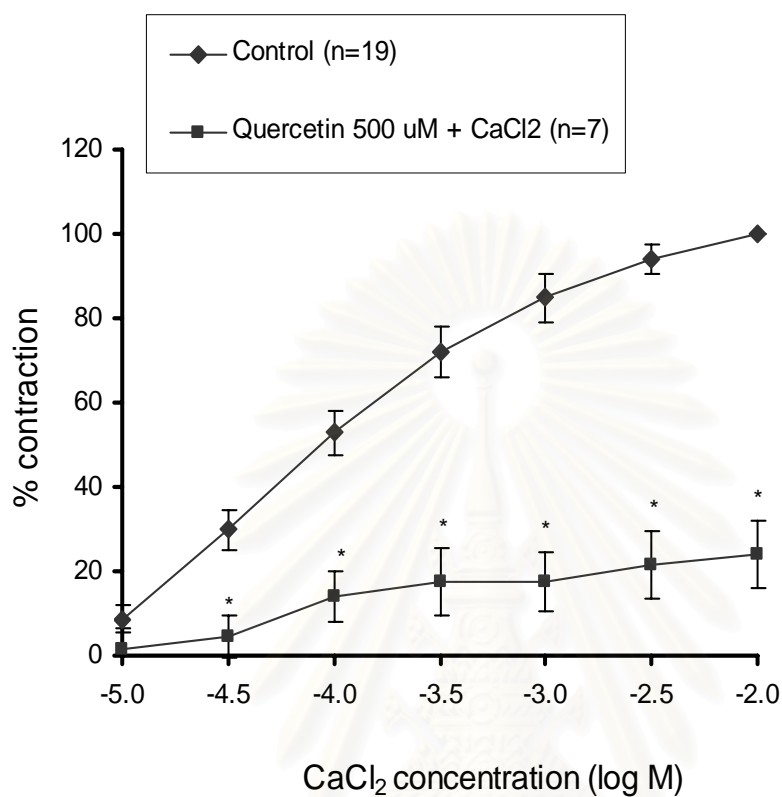


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 31 ผลของ quercetin ความเข้มข้น 500  $\mu\text{M}$  ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย  $\text{CaCl}_2$  แบบ cumulative

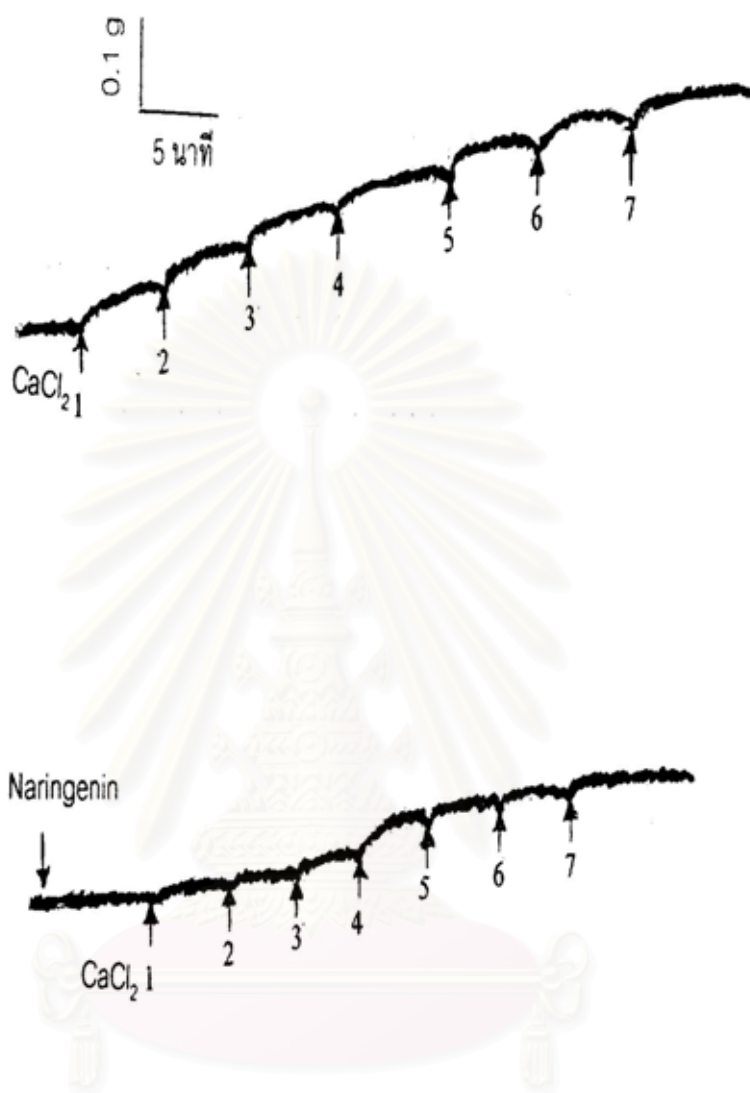
dose-response curve ใน calcium-free depolarizing solution



รูปที่ 32 กราฟแสดงผลของ quercetin ความเข้มข้น 500  $\mu$ M ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดงหนูขาวเมื่อถูกกระตุ้นด้วย CaCl<sub>2</sub> ใน Ca<sup>2+</sup>-free depolarizing solution

กราฟแสดงค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (n=7)  
\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มก่อนได้รับสารทดสอบ (p<0.05)



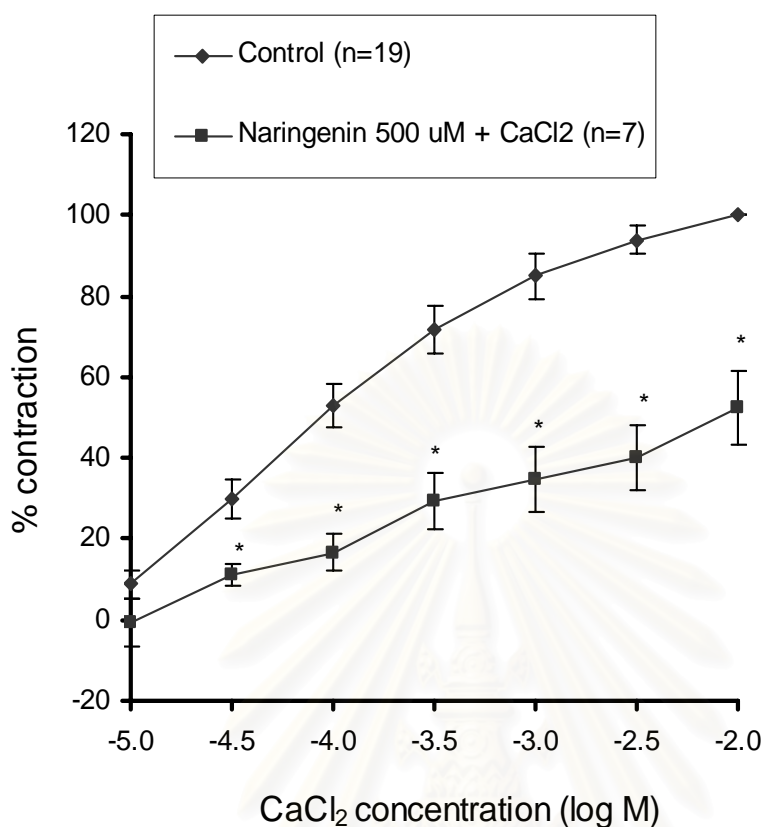


สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 33 ผลของ naringenin ความเข้มข้น 500  $\mu\text{M}$  ต่อการหัดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

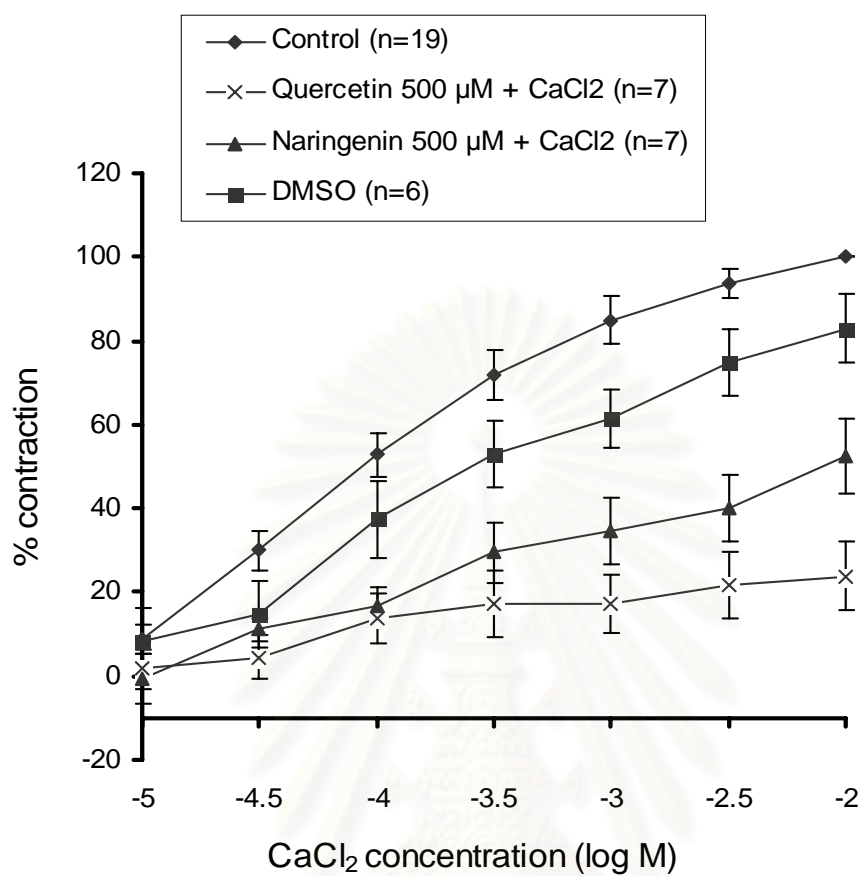
หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย  $\text{CaCl}_2$  แบบ cumulative dose-response curve ใน calcium-free depolarizing solution



รูปที่ 34 กราฟแสดงผลของ naringenin ความเข้มข้น 500  $\mu\text{M}$  ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดงหนูขาวเมื่อถูกกระตุ้นด้วย  $\text{CaCl}_2$  ใน  $\text{Ca}^{2+}$ -free depolarizing solution

กราฟแสดงค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (n=7)

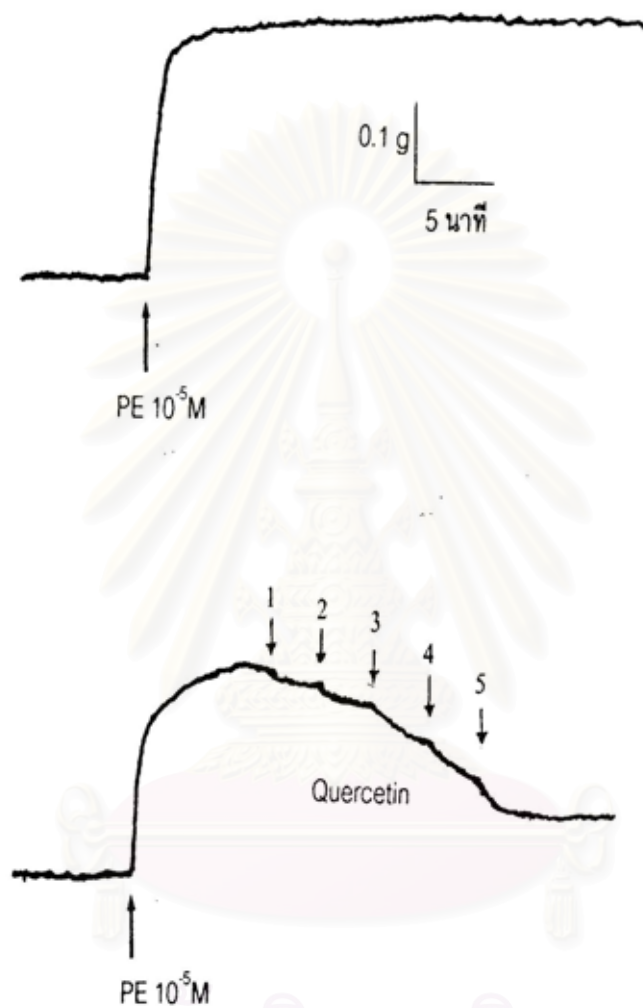
\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มก่อนได้รับสารทดสอบ ( $p < 0.05$ )



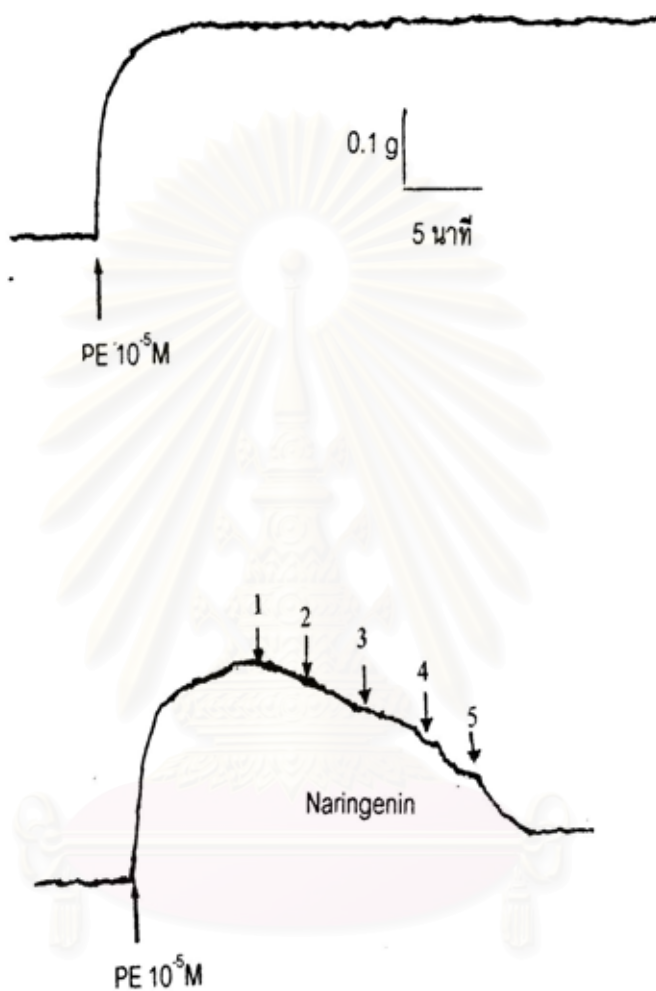
รูปที่ 35 กราฟแสดงผลของ quercetin และ naringenin ความเข้มข้น 500  $\mu\text{M}$  ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดงหนูขาวเมื่อถูกกระตุ้น ด้วย  $\text{CaCl}_2$  ใน  $\text{Ca}^{2+}$  - free depolarizing solution

กราฟแสดงค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (n=7)

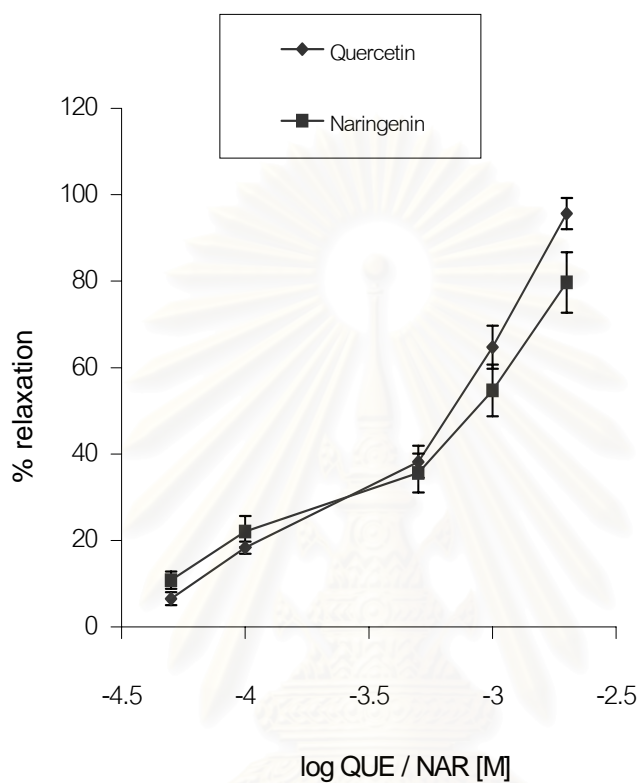
\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มก่อนได้รับสารทดสอบ ( $p < 0.05$ )



รูปที่ 36 ผลการคลายตัวของ quercetin ความเข้มข้น 1=50, 2=100, 3=500, 4=1000, 5=2000  $\mu$ M แบบ cumulative dose-response curve ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$ -containing solution



รูปที่ 37 ผลการคลายตัวของ naringenin ความเข้มข้น 1=50, 2=100, 3=500, 4= 1000, 5=2000  $\mu M$  แบบ cumulative dose-response curve ใน สารละลาย  $Ca^{2+}$  - containing solution



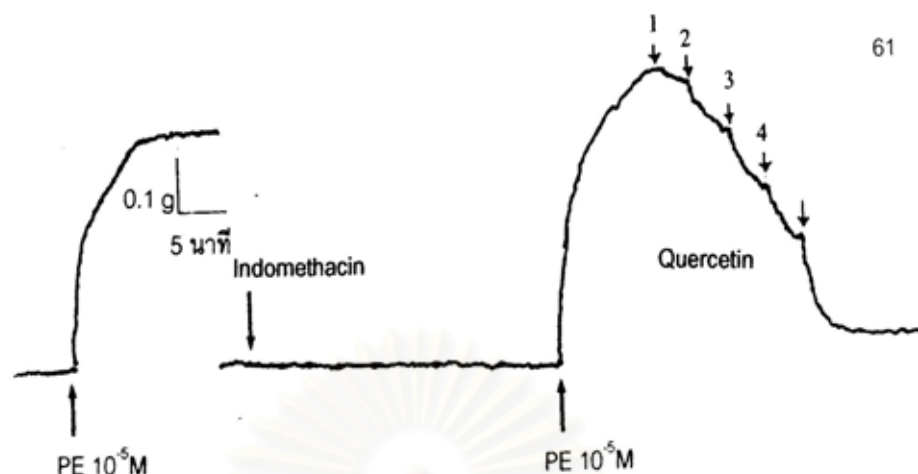
รูปที่ 38 กราฟแสดงผลการคลายตัวของ quercetin , naringenin

ความเข้มข้น 1=50, 2=100, 3=500, 4=1000, 5=2000  $\mu\text{M}$

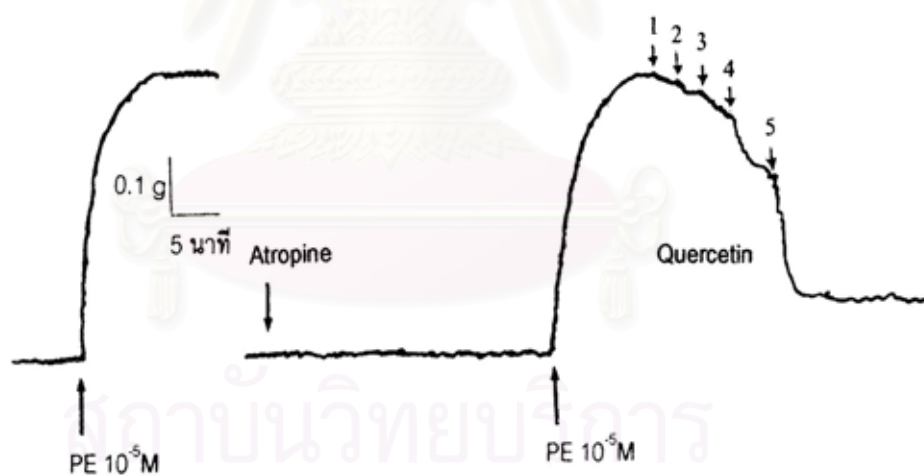
แบบ cumulative dose-response curve

กราฟแสดงค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (n=4)

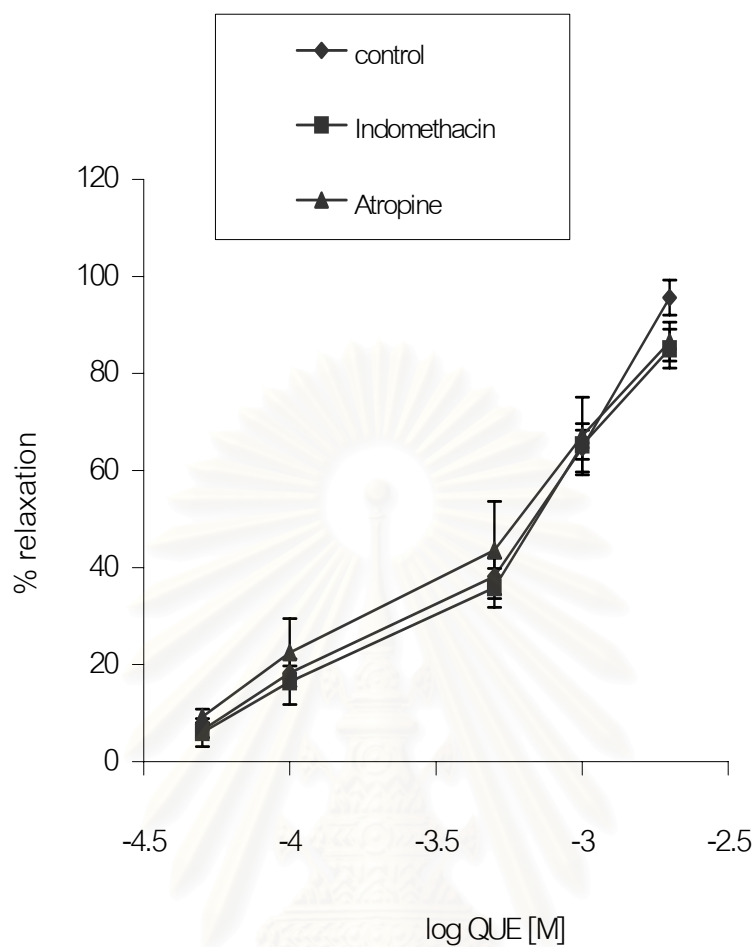
\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มก่อนได้รับสารทดสอบ ( $p < 0.05$ )



รูปที่ 39 ผลของ quercetin ความเข้มข้น 1=50, 2=100, 3=500, 4=1000, 5=2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ indomethacin  $10^{-5}$  M ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution



รูปที่ 40 ผลของ quercetin ความเข้มข้น 1=50, 2=100, 3=500, 4=1000, 5=2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ atropine  $10^{-4}$  M ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution

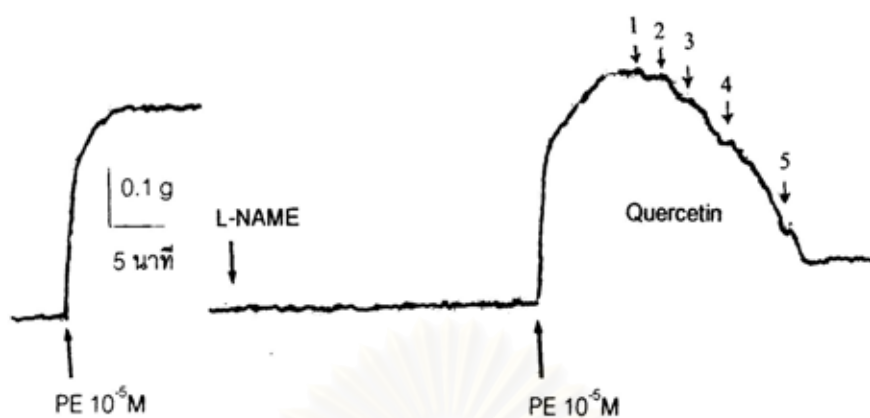


รูปที่ 41 กราฟแสดงผลของ quercetin ความเข้มข้น 50,100,500,1000 และ 2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ indomethacin  $10^{-5}$  M และ atropine  $10^{-4}$  M

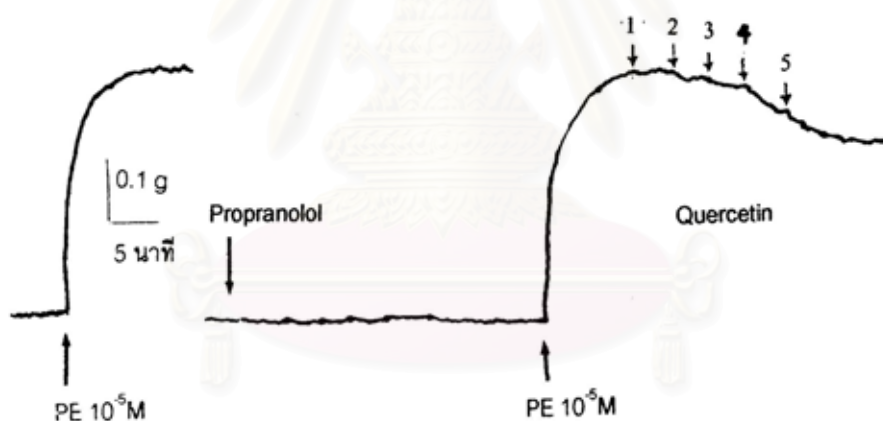
กราฟแสดงค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (n=4)

\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มก่อนได้รับสารทดสอบ ( $p < 0.05$ )

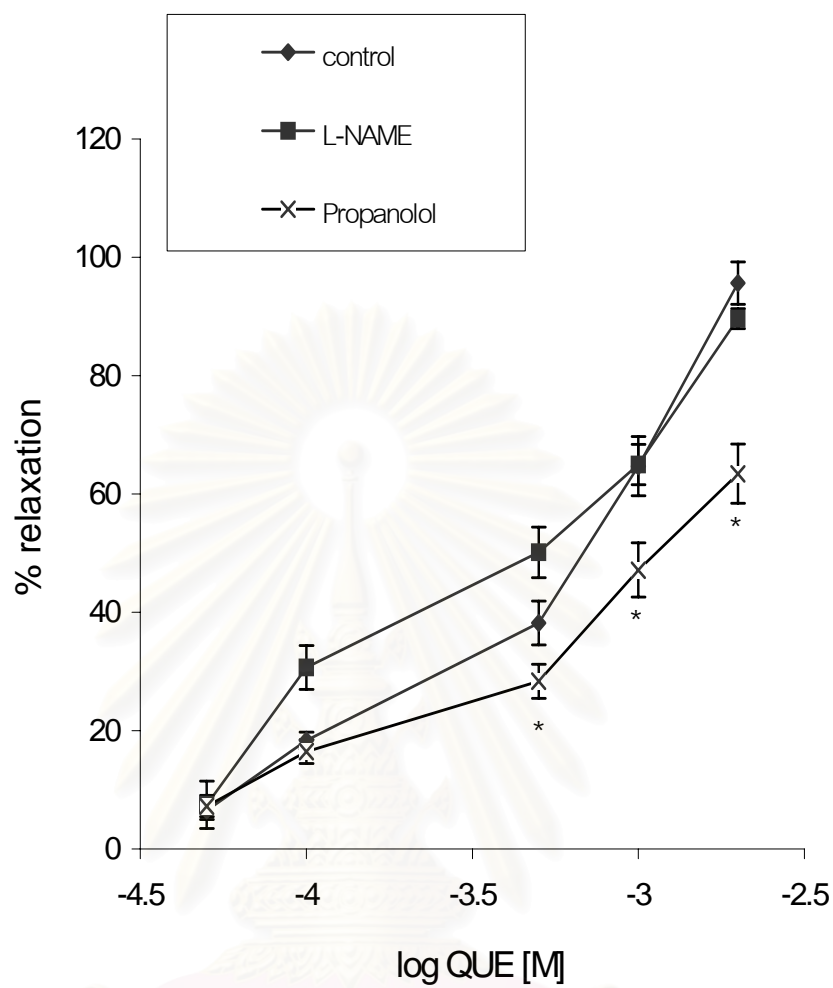




รูปที่ 42 ผลของ quercetin ความเข้มข้น 1=50, 2=100, 3=500, 4=1000, 5=2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ L-NAME  $10^{-4}\text{M}$  ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution



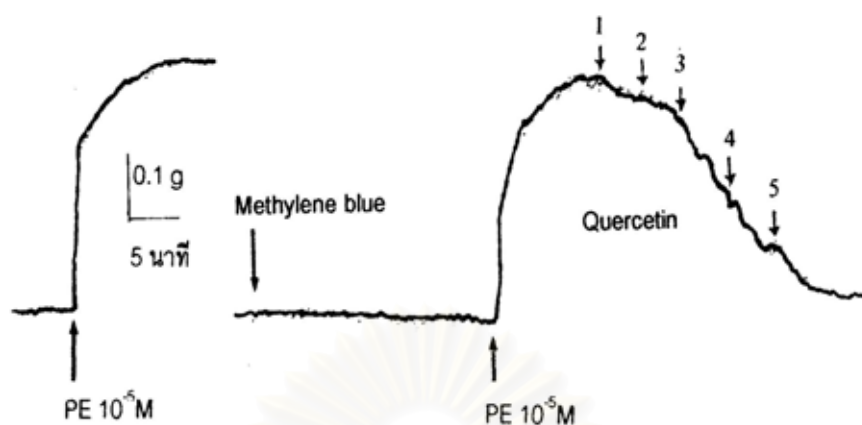
รูปที่ 43 ผลของ quercetin ความเข้มข้น 1=50, 2=100, 3=500, 4=1000, 5=2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ propranolol  $10^{-5}\text{M}$  ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution



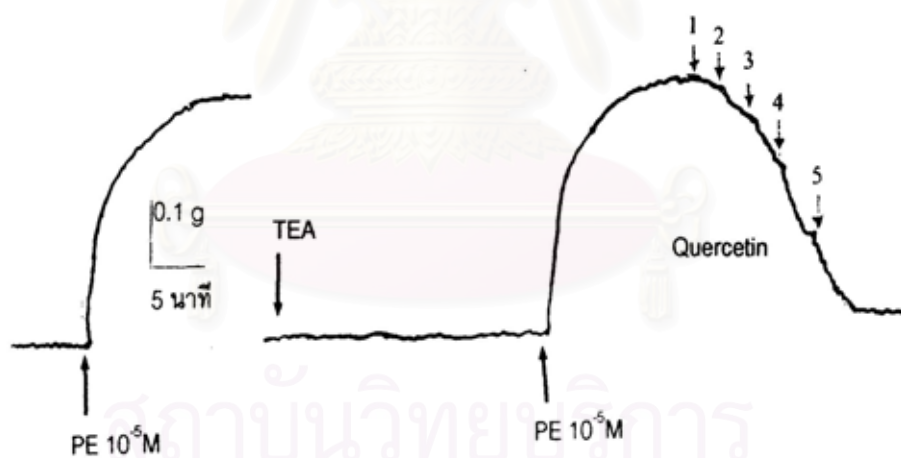
รูปที่ 44 กราฟแสดงผลของ quercetin ความเข้มข้น 50,100,500,1000 และ 2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ L-NAME  $10^{-4}$  M, propranolol  $10^{-5}$  M

กราฟแสดงค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (n=4)

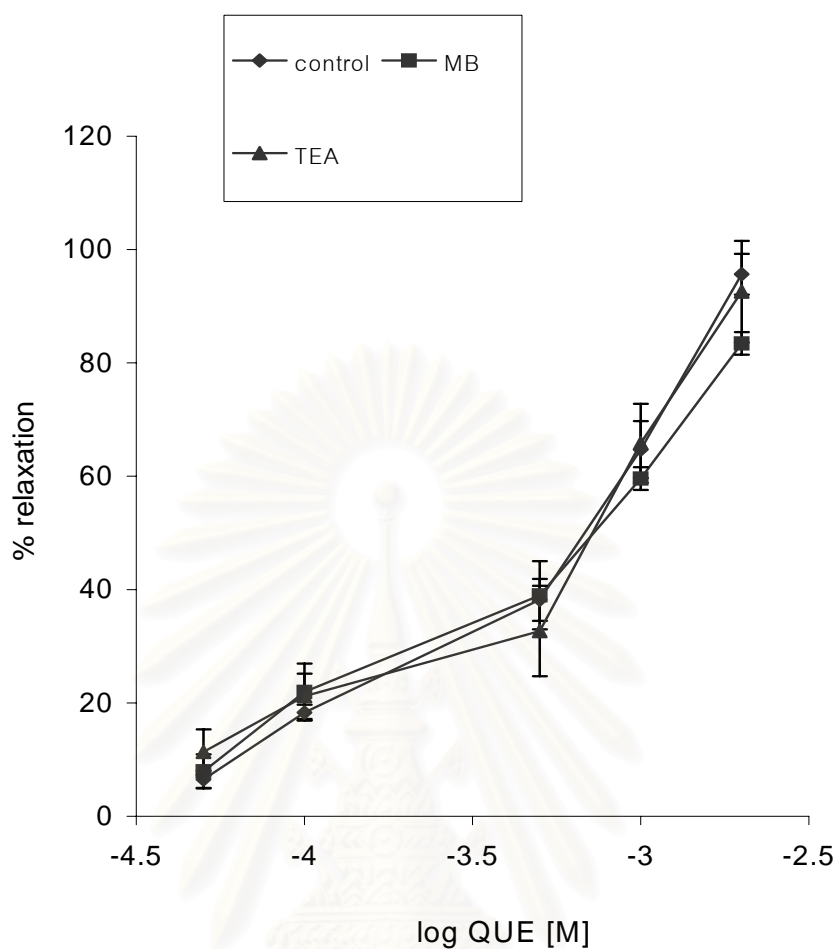
\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มก่อนได้รับสารทดสอบ ( $p < 0.05$ )



รูปที่ 45 ผลของ quercetin ความเข้มข้น 1=50, 2=100, 3=500, 4=1000, 5=2000  $\mu M$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ methylene blue  $10^{-5}M$  ในสารละลาย  $Ca^{2+}$  - containing solution



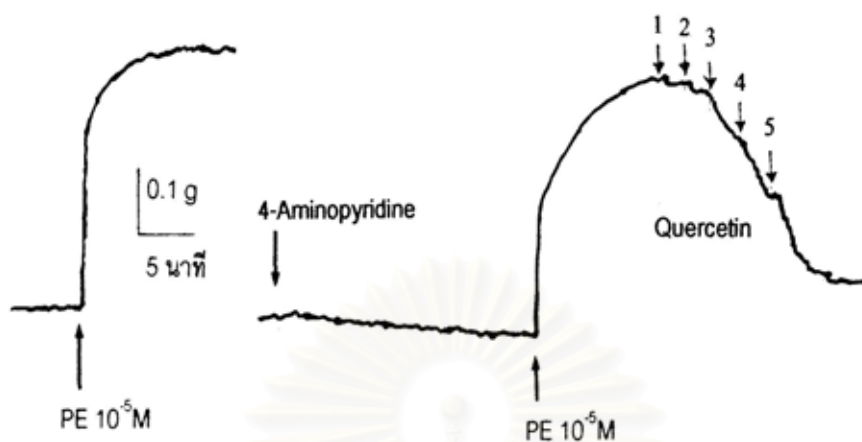
รูปที่ 46 ผลของ quercetin ความเข้มข้น 1=50, 2=100, 3=500, 4=1000, 5=2000  $\mu M$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ 4-Aminoperidine  $10^{-4}M$  ในสารละลาย  $Ca^{2+}$  - containing solution



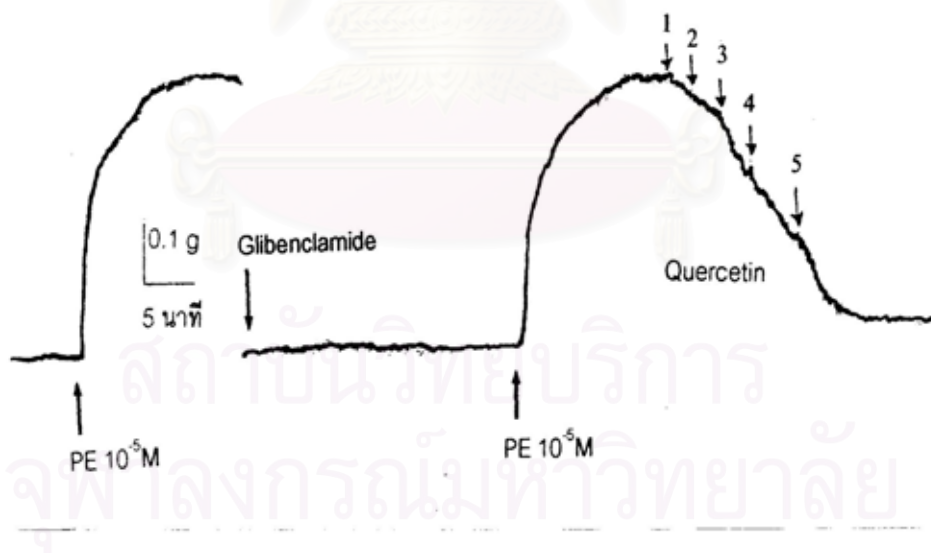
รูปที่ 47 กราฟแสดงผลของ quercetin ความเข้มข้น 50,100,500,1000 และ 2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ methylene blue  $10^{-5}$  M, TEA  $10^{-3}$  M

กราฟแสดงค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (n=4)

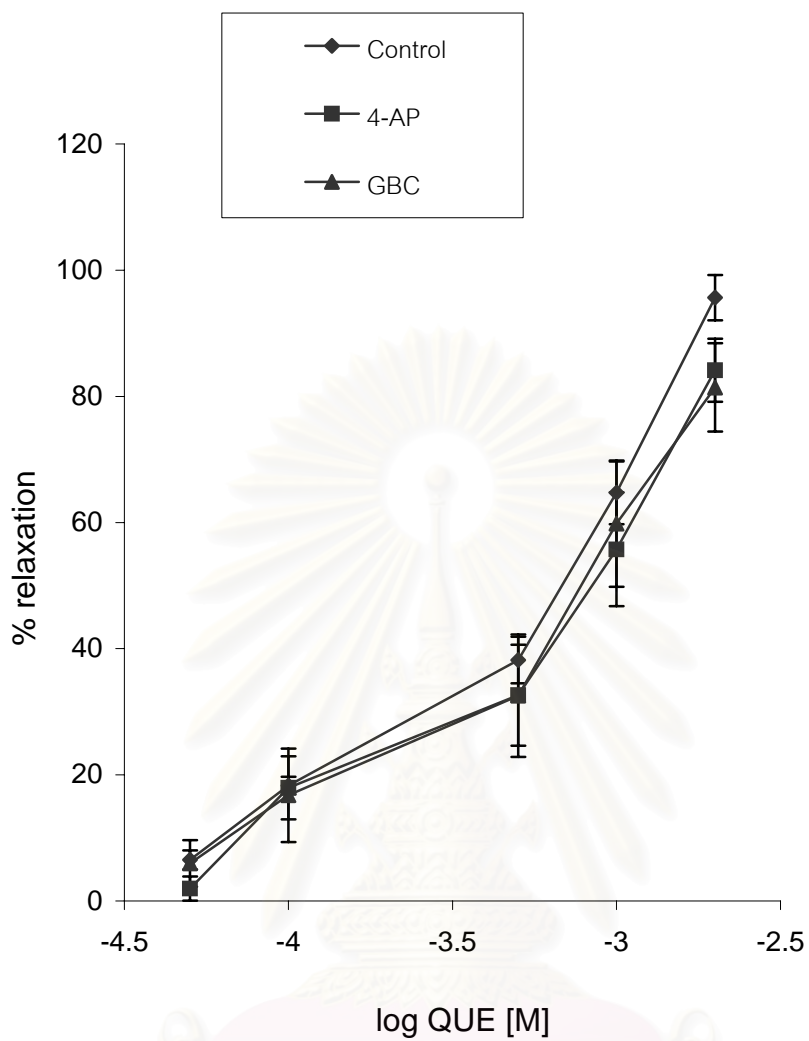
\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มก่อนได้รับสารทดสอบ ( $p < 0.05$ )



รูปที่ 48 ผลของ quercetin ความเข้มข้น 1=50, 2=100, 3=500, 4=1000, 5=2000  $\mu M$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ TEA  $10^{-3}M$  ในสารละลาย  $Ca^{2+}$  - containing solution



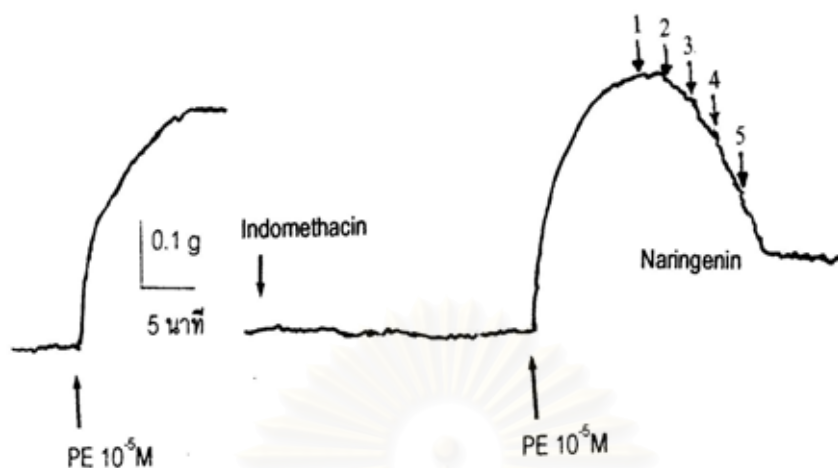
รูปที่ 49 ผลของ quercetin ความเข้มข้น 1=50, 2=100, 3=500, 4=1000, 5=2000  $\mu M$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ glybenclamine  $10^{-5}M$  ในสารละลาย  $Ca^{2+}$  - containing solution



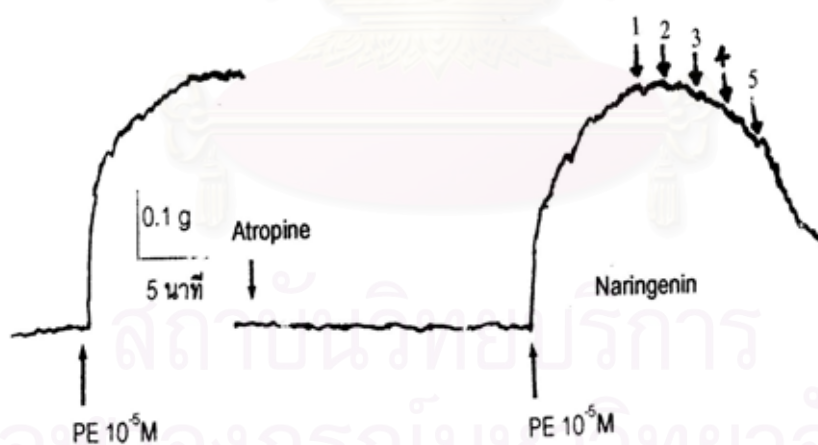
รูปที่ 50 กราฟแสดงผลของ quercetin ความเข้มข้น 50,100,500,1000 และ 2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ 4-AP  $10^{-4}$  M, glybenclamide  $10^{-5}$  M

กราฟแสดงค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (n=4)

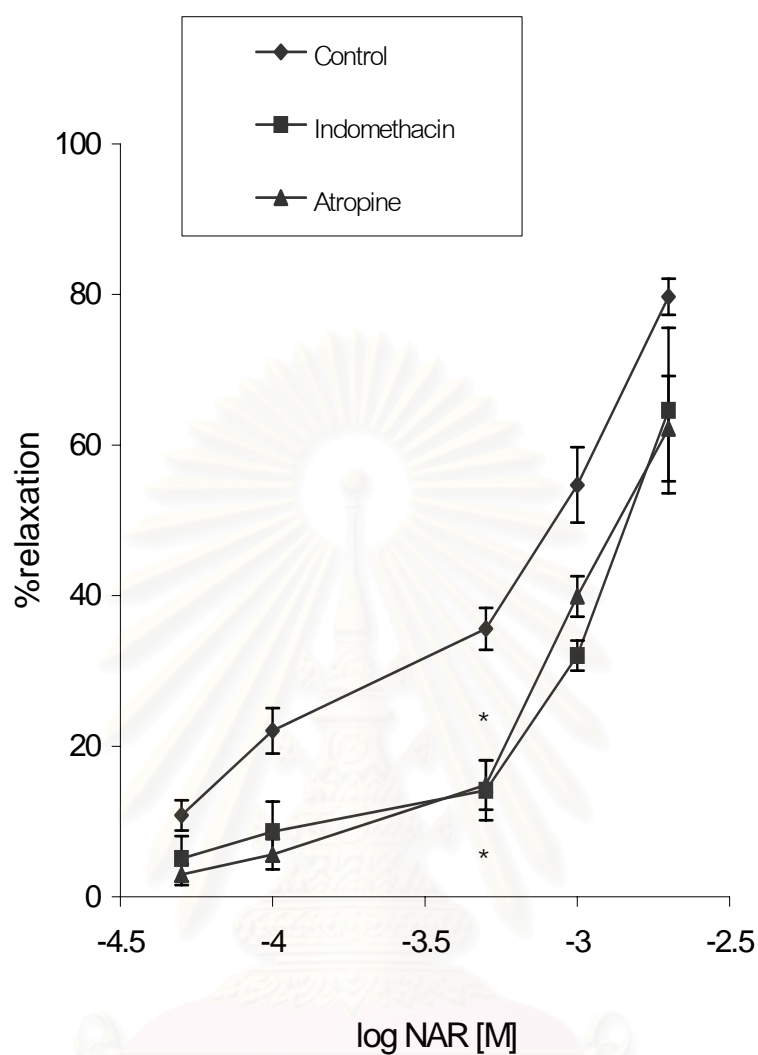
\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มก่อนได้รับสารทดสอบ ( $p < 0.05$ )



รูปที่ 51 ผลของ naringenin ความเข้มข้น 1=50, 2=100, 3=500, 4=1000, 5=2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ indomethacin  $10^{-5}\text{M}$  ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution



รูปที่ 52 ผลของ naringenin ความเข้มข้น 1=50, 2=100, 3=500, 4=1000, 5=2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ atropine  $10^{-4}\text{M}$  ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution

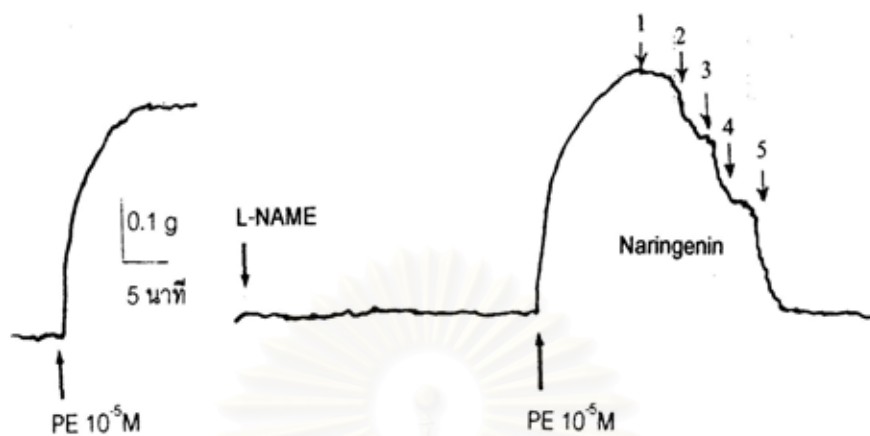


รูปที่ 53 กราฟแสดงผลของ naringenin ความเข้มข้น 50,100,500,1000 และ 2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ indomethacin  $10^{-5}$  M , atropine  $10^{-4}$  M

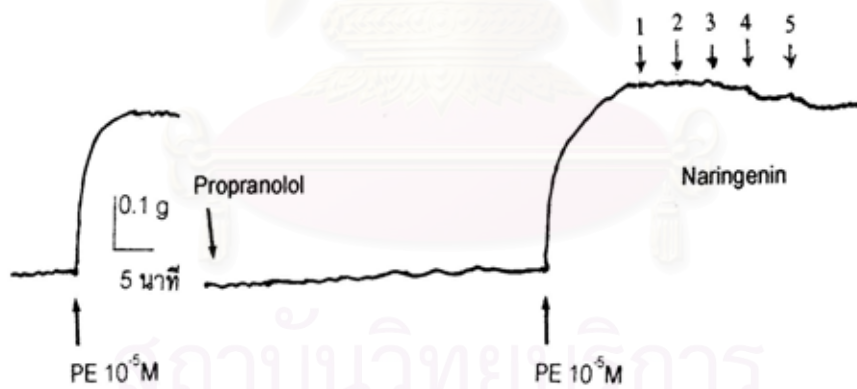
กราฟแสดงค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (n=4)

\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มก่อนได้รับสารทดสอบ ( $p < 0.05$ )

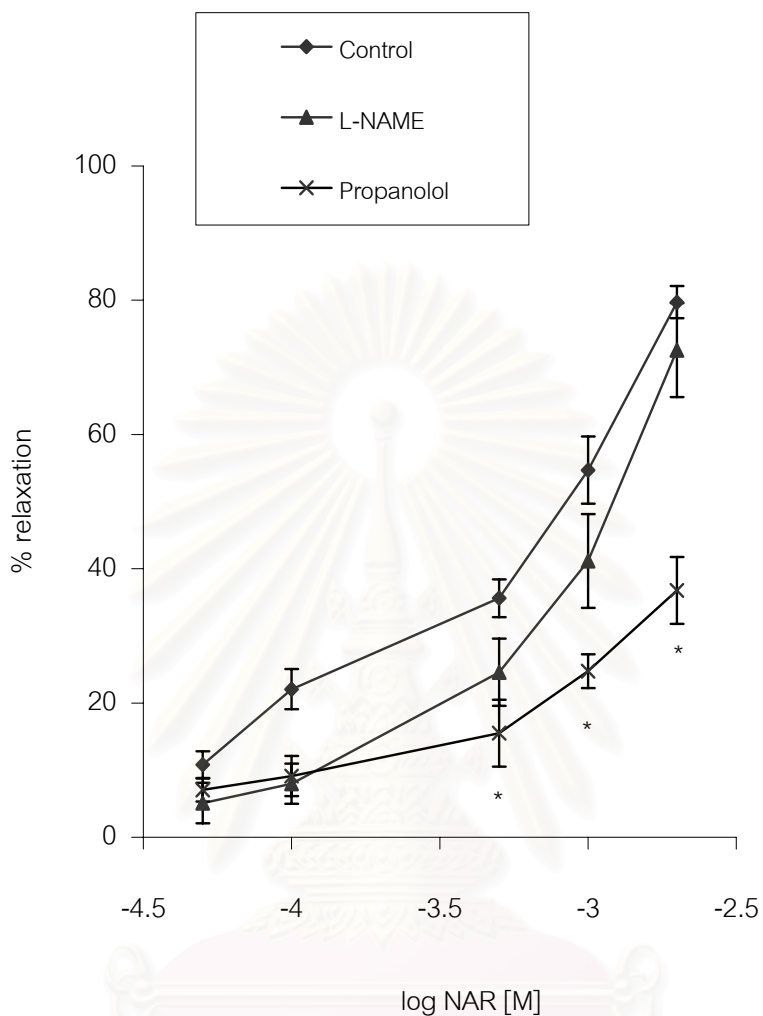




รูปที่ 54 ผลของ naringenin ความเข้มข้น 1=50, 2=100, 3=500, 4=1000, 5=2000  $\mu M$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้  $L-NAME 10^{-4}M$  ในสารละลาย  $Ca^{2+}$  - containing solution



รูปที่ 55 ผลของ naringenin ความเข้มข้น 1=50, 2=100, 3=500, 4=1000, 5=2000  $\mu M$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ propranolol  $10^{-5}M$  ในสารละลาย  $Ca^{2+}$  - containing solution



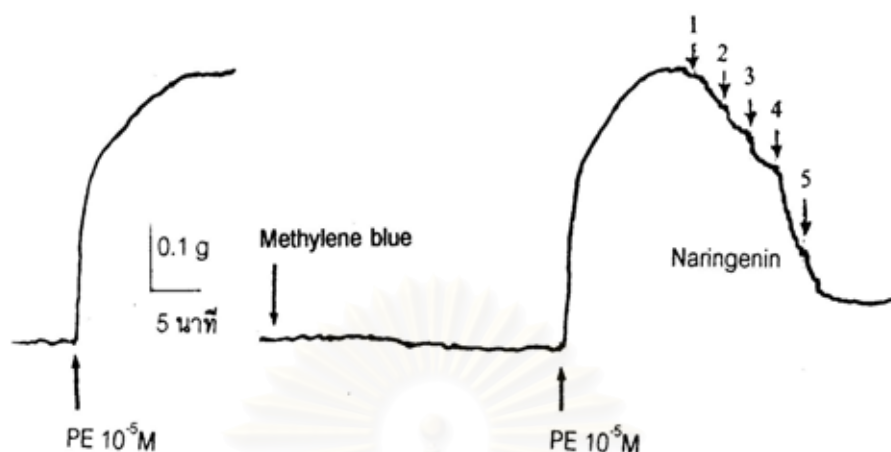
รูปที่ 56 กราฟแสดงผลของ naringenin ความเข้มข้น 50,100,500,1000

และ 2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดง

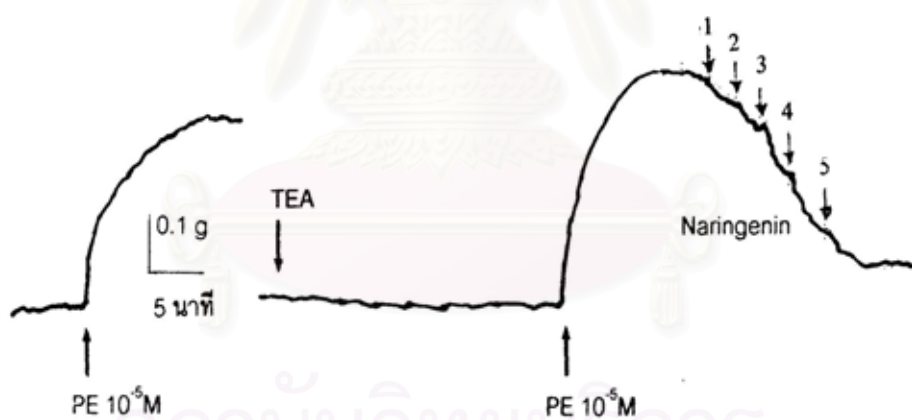
หนูขาว เมื่อให้ L-NAME  $10^{-4}$  M, propranolol  $10^{-5}$  M

กราฟแสดงค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (n=4)

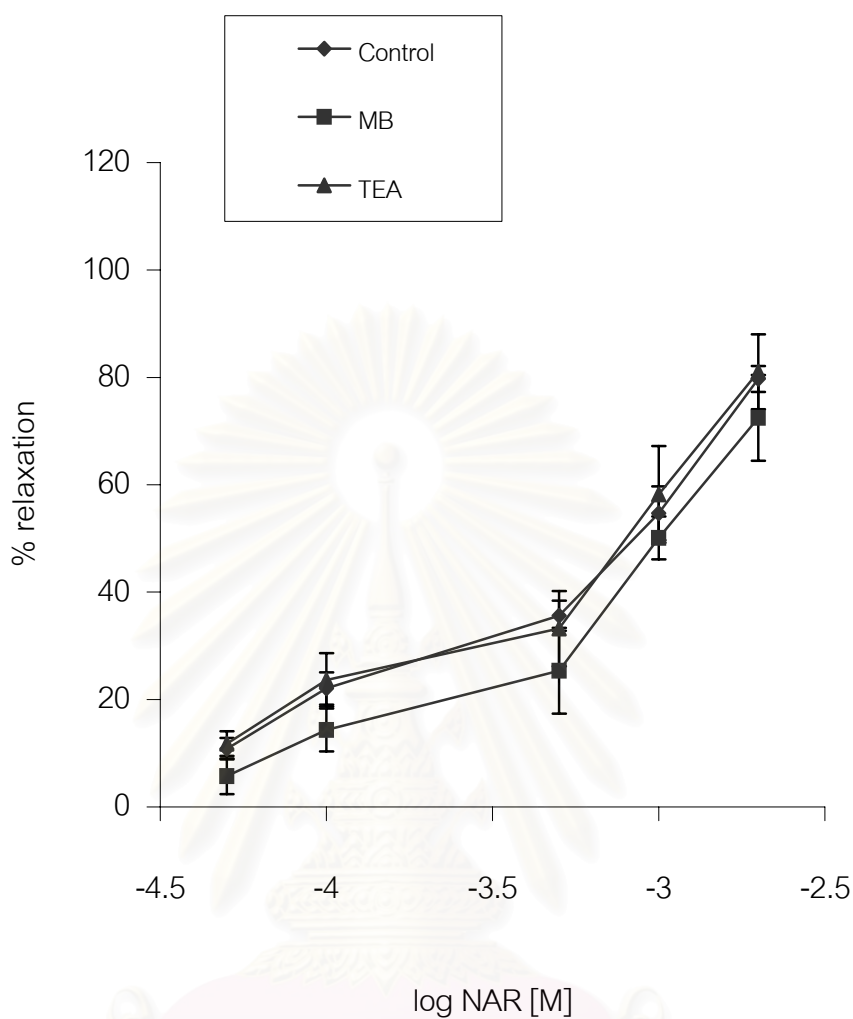
\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มก่อนได้รับสารทดสอบ (p<0.05)



รูปที่ 57 ผลของ naringenin ความเข้มข้น 1=50, 2=100, 3=500, 4=1000, 5=2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ methylene blue  $10^{-5}\text{M}$  ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution



รูปที่ 58 ผลของ naringenin ความเข้มข้น 1=50, 2=100, 3=500, 4=1000, 5=2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ TEA  $10^{-3}\text{M}$  ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution

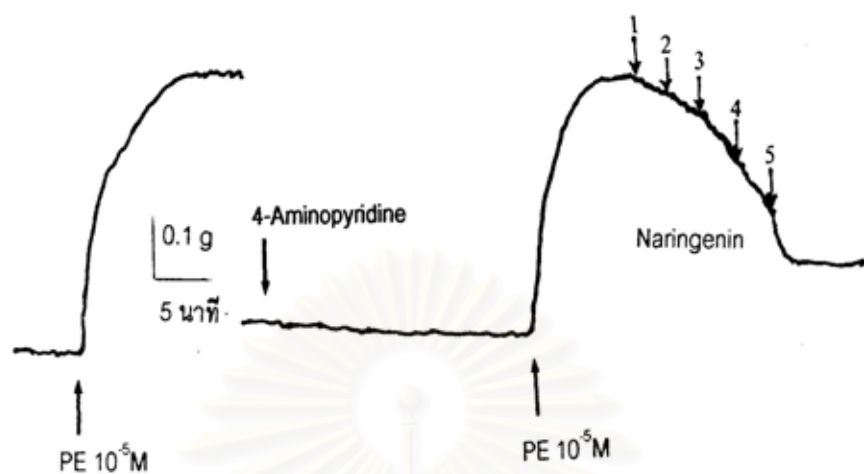


รูปที่ 59 กราฟแสดงผลของ naringenin ความเข้มข้น 50,100,500,1000

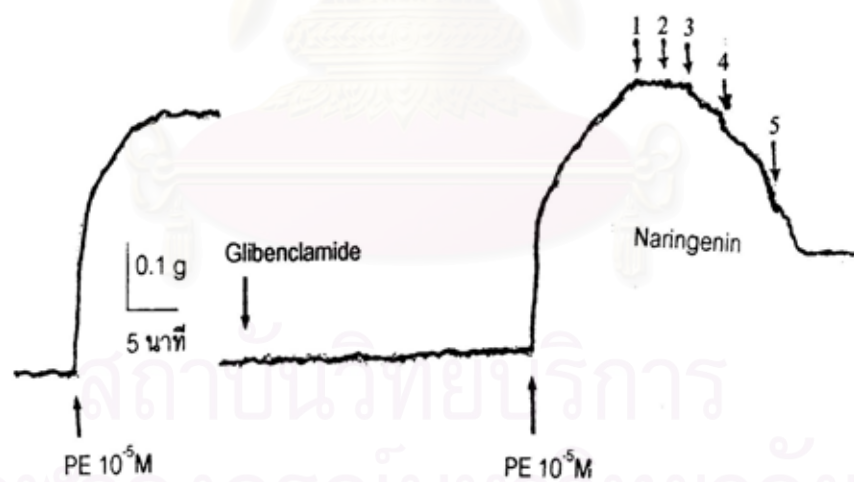
และ 2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว  
เมื่อให้ methylene blue  $10^{-5}$  M, TEA  $10^{-3}$  M

กราฟแสดงค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (n=4)

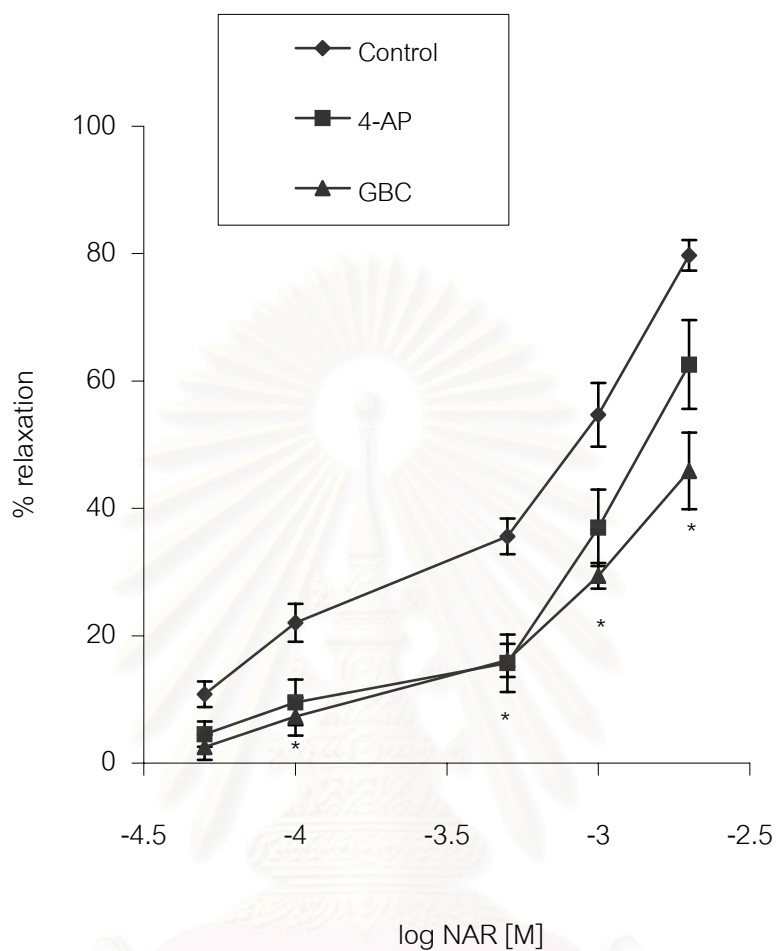
\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มก่อนได้รับสารทดสอบ ( $p < 0.05$ )



รูปที่ 60 ผลของ naringenin ความเข้มข้น 1=50, 2=100, 3=500, 4=1000, 5=2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ 4-Aminopyridine  $10^{-4}$  M ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution



รูปที่ 61 ผลของ naringenin ความเข้มข้น 1=50, 2=100, 3=500, 4=1000, 5=2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ glibenclamine  $10^{-5}$  M ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution



รูปที่ 62 กราฟแสดงผลของ naringenin ความเข้มข้น 50,100,500,1000

และ 2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดง

หนูขาว เมื่อให้ 4-AP  $10^{-4}$  M, glybenclamide  $10^{-5}$  M

กราฟแสดงค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (n=4)

\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มก่อนได้รับสารทดสอบ (p<0.05)

## บทที่ 5

### อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การศึกษาส่วนใหญ่ในเรื่องของกลไกการออกฤทธิ์ของสารกลุ่ม flavonoids ที่มีต่อการหดตัวและการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดงใหญ่ ส่วนใหญ่มุ่งเน้นถึงอิทธิพลของ endothelium ซึ่งเป็นเซลล์ที่บุอยู่ในกล้ามเนื้อเรียบ แต่ยังคงขาดการศึกษาเชิงลึกในแง่ของผลโดยตรงที่มีต่อกล้ามเนื้อเรียบ รวมถึงยังไม่สามารถสรุปถึงกลไกการออกฤทธิ์ได้ชัดเจน ดังนั้นในการศึกษาวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบผลของ quercetin และ naringenin ที่มีต่อการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ที่ไม่มี endothelium โดยเลือกทำการศึกษากลุ่ม flavonoids 2 ชนิดนี้ เนื่องจากมีความแตกต่างของโครงสร้างที่ functional groups คือ quercetin มี hydroxyl groups ที่ตำแหน่ง 3, 3' ดังตารางที่ 1 (Ajay, *et al.*, 2003)

ตามทฤษฎีกลไกการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่มีความสัมพันธ์กับปริมาณ  $Ca^{2+}$  อิสระภายในเซลล์ ซึ่ง  $Ca^{2+}$  อิสระภายในเซลล์ที่เพิ่มขึ้นนี้อาจมาจาก  $Ca^{2+}$  ภายนอกเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์โดยตรง หรืออาจมาจาก  $Ca^{2+}$  ที่หลั่งภายในเซลล์ (Rang, *et al.*, 1999) ดังนั้นจึงสามารถใช้การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบในสภาวะต่างๆ เพื่อบ่งชี้ถึงผลของ  $Ca^{2+}$  ภายในเซลล์ได้

ในการศึกษานี้ได้ใช้สารกระตุ้นต่างๆ ซึ่งมีการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันไป คือ PE เป็นสารที่กระตุ้น  $\alpha_1$ -adrenoceptor ทำให้  $Ca^{2+}$  หลั่งออกมาจาก SR ส่งผลให้กล้ามเนื้อเรียบเกิดการหดตัวขึ้น และยังมีผลทำให้  $Ca^{2+}$  จากภายนอกเคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์ผ่านทาง  $Ca^{2+}$  channel ได้ (Bolton, 1979; Karaki and Weiss, 1984) ส่วนการกระตุ้นด้วย KCl นั้นเกิดจากเมื่อ  $K^+$  ภายนอกมีความเข้มข้นสูงพอจะทำให้เกิด membrane depolarization แล้วจะไปกระตุ้นให้มีการเปิดช่อง VOC ทำให้  $Ca^{2+}$  จากภายนอกเคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์ (Karaki, *et al.*, 1997; Katz, 1997)

จากการศึกษานี้พบว่า quercetin ในช่วงความเข้มข้น (50  $\mu M$  - 1000  $\mu M$ ) และ naringenin ในช่วงความเข้มข้น (50  $\mu M$  - 3000  $\mu M$ ) มีผลโดยตรงในการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากกายหนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วย PE ( $\alpha_1$ -adrenoceptor agonist) และ KCl เป็นการทำให้เกิด membrane depolarization ในสภาวะที่มี  $Ca^{2+}$  ภายนอก

โดยผลการยับยั้งขึ้นอยู่กับความเข้มข้น จากผลดังกล่าวแสดงว่า quercetin และ naringenin สามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดได้แบบไม่จำเพาะเจาะจงกับกลไกการกระตุ้น  $\alpha_1$ -adrenoceptor เท่านั้น แต่เป็นไปได้ว่าสารทั้งสองชนิด อาจออกฤทธิ์รบกวนการเพิ่มขึ้นของ  $Ca^{2+}$  อีสาระภายในเซลล์ โดยที่อาจเกี่ยวข้องกับกำยั้ง  $Ca^{2+}$  จากภายนอกเซลล์ที่เข้าสู่ภายในหรือ  $Ca^{2+}$  ที่หลั่งออกมาจากภายในเซลล์หรือทั้งสองกรณี ซึ่งในการศึกษาเพื่อทดสอบผลของสารทั้งสองในการยับยั้ง  $Ca^{2+}$  ที่หลั่งออกมาจากภายในเซลล์ จึงได้ทำการศึกษการหดตัวในสภาวะที่ไม่มี  $Ca^{2+}$  อยู่ภายนอกเซลล์ โดยการกระตุ้นด้วย PE และ caffeine และเลือกความเข้มข้นของสารทดสอบ quercetin และ naringenin ที่  $500 \mu M$  เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการหดตัวได้ในสภาวะที่มี  $Ca^{2+}$  ตามปกติ ซึ่งผลการศึกษา แสดงให้เห็นว่า quercetin และ naringenin มีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดที่เกิดจากการหลั่งของ  $Ca^{2+}$  ภายในเซลล์จากการกระตุ้นด้วย PE โดย quercetin มีความแรงในการยับยั้งการหดตัวในสภาวะดังกล่าวมากกว่า naringenin อย่างไรก็ตามผลของ quercetin ที่ยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบในสภาวะที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$  เมื่อกระตุ้นด้วย PE นั้น แตกต่างจากที่เคยมีรายงานการศึกษาถึงผลของ quercetin ว่าไม่มีผลยับยั้งการหดตัว เมื่อกระตุ้นด้วย PE ในสภาวะที่ปราศจาก  $Ca^{2+}$  เนื่องจากในการศึกษานั้นใช้ quercetin ที่ความเข้มข้น  $100 \mu M$  (Ajay, *et al.*, 2003)

สิ่งที่น่าสนใจจากการศึกษานี้คือ quercetin เท่านั้นที่มีผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด เมื่อกระตุ้นด้วย caffeine ในขณะที่ naringenin ไม่มีผลแต่อย่างใด แสดงว่า quercetin มีผลยับยั้งการหลั่งของ  $Ca^{2+}$  จากแหล่งเก็บภายในได้มากกว่า naringenin โดย quercetin มีผลต่อแหล่งเก็บที่ไวต่อการกระตุ้นด้วยกลไกของ  $IP_3$  รวมทั้งแหล่งเก็บที่ไวต่อการกระตุ้นผ่านทาง ryanodine receptor แต่ naringenin จะมีผลจำเพาะต่อแหล่งเก็บที่หลั่ง  $Ca^{2+}$  โดยผ่านทางกลไกของ  $IP_3$  เท่านั้น ซึ่งการศึกษผลของ quercetin ในหลอดเลือดที่มี endothelium พบว่า quercetin สามารถยับยั้งการหดตัวเมื่อกระตุ้นด้วย caffeine ได้เช่นกัน (Duarte, *et al.*, 1994)

ในส่วนผลของ quercetin และ naringenin ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของ  $Ca^{2+}$  เข้าเซลล์และการจับเก็บ  $Ca^{2+}$  เข้าสู่แหล่งเก็บภายในเซลล์ โดยการกระตุ้นให้เกิด IRT ซึ่งวิธีนี้มีความจำเพาะกับ  $Ca^{2+}$  จากภายนอกเซลล์ที่เข้าเซลล์ ที่สัมพันธ์กับ  $\alpha_1$ -adrenergic receptor ในสภาวะที่ปราศจากสารกระตุ้นการหดตัว (Noguera, *et al.*, 1996) ซึ่งผลการศึกษาพบว่า quercetin และ naringenin ความเข้มข้น  $500 \mu M$  สามารถยับยั้งการเกิด IRT ได้ แสดงว่าสารทั้งสองชนิด อาจจะมีผลยับยั้งกระบวนการเคลื่อนที่ของ  $Ca^{2+}$  จากภายนอกเข้าเซลล์ ทำให้เกิดการหดตัวขึ้น โดย



เป็นไปได้ว่า quercetin และ naringenin ไปรบกวนการเคลื่อนที่เข้าเซลล์ของ  $\text{Ca}^{2+}$  และการเก็บ  $\text{Ca}^{2+}$  เข้าสู่แหล่งเก็บภายในเซลล์ เป็นไปได้ว่าสารทั้งสอง มีส่วนยับยั้งการเคลื่อนที่ของ  $\text{Ca}^{2+}$  จากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ที่ผ่านทาง  $\text{Ca}^{2+}$  channel ที่ couple กับ  $\alpha_1$ -adrenoceptor

ยิ่งไปกว่านั้น ได้ศึกษาการเคลื่อนที่เข้าเซลล์ของ  $\text{Ca}^{2+}$  เมื่อถูกกระตุ้นด้วย  $\text{CaCl}_2$  แบบสะสมขนาด ด้วยวิธีที่จะทำให้กล้ามเนื้อเรียบเกิด membrane depolarization เพื่อเปิด VOC ทั้งหมด ด้วยสารละลายที่มี  $\text{K}^+$  สูง ซึ่งการหดตัวของกล้ามเนื้อจะขึ้นกับปริมาณ  $\text{Ca}^{2+}$  จากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ได้อย่างอิสระ ดังนั้นเมื่อให้  $\text{CaCl}_2$  แบบสะสมขนาด จะเห็นได้ว่า กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดจะมีการหดตัวตามปริมาณ  $\text{Ca}^{2+}$  ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งจากการทดลองพบว่า quercetin และ naringenin ความเข้มข้น  $500 \mu\text{M}$  มีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบในสภาวะดังกล่าว มีลักษณะเป็นแบบ non competitive antagonist จากกราฟที่ได้พบว่าถ้าเพิ่มความเข้มข้นของ  $\text{CaCl}_2$  สูงขึ้น แต่ความเข้มข้นของ quercetin และ naringenin เท่าเดิม ยังสามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบได้ และการศึกษาได้ยืนยันส่วนหนึ่งว่ากลไกการออกฤทธิ์ของ quercetin และ naringenin ไปยับยั้งการเคลื่อนที่เข้าของ  $\text{Ca}^{2+}$  จากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ผ่านทาง  $\text{Ca}^{2+}$  channel

ข้อสังเกตประการหนึ่งในการเปรียบเทียบ quercetin และ naringenin ที่มีต่อการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ พบว่า naringenin ไม่ยับยั้งการหดตัวตามความเข้มข้น เมื่อความเข้มข้นมากกว่า  $500 \mu\text{M}$  และปรากฏการณ์นี้พบเฉพาะในกรณีที่กระตุ้นด้วย PE เท่านั้น

ในการศึกษาวิจัยนี้ นอกจากจะศึกษาผลของ quercetin และ naringenin ต่อการยับยั้งการหดตัวเมื่อใช้ตัวกระตุ้นต่าง ๆ แล้ว การศึกษายังแสดงให้เห็นว่าสารทั้งสองชนิด สามารถมีผลโดยตรงต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบขึ้นกับความเข้มข้นของสารทั้งสอง โดยไม่ผ่านกลไกของ endothelium ซึ่งการคลายตัวที่เกิดขึ้น จะมีลักษณะสอดคล้องกับรายงานการศึกษาอื่นๆ เช่น การศึกษาของ Chen และ Pace-Asciak ซึ่งแสดงให้เห็นว่า quercetin และ naringenin ทำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ โดยไม่ขึ้นกับ endothelium ได้ด้วย (Chen and Pace-Asciak, 1996) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาของ quercetin ที่ความเข้มข้นในช่วง  $1 \mu\text{M} - 100 \mu\text{M}$  ทำให้กล้ามเนื้อเรียบมดลูกของหนูขาวเกิดการคลายตัวได้ เมื่อกระตุ้นด้วย KCl (Revuelta, *et al.*, 1997) ซึ่งในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของหลอดเลือดที่ไม่มี endothelium ดังนั้น การคลายตัวจึงไม่เกี่ยวข้องกับ NO pathway ซึ่งการศึกษาก็สอดคล้องกับการศึกษาข้างต้น โดยใช้ L-NAME ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการสังเคราะห์ NO จาก L-arginine (Inarro, *et al.*, 1981) และ methylene blue ซึ่งยับยั้งเอนไซม์ guanylyl cyclase

(Gruetter, *et al.*, 1981) ซึ่งเป็นเป้าหมายการกระตุ้นของ NO โดยผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า quercetin และ naringenin ไม่ได้ออกฤทธิ์การคลายตัวผ่านทาง NO/cGMP pathway

เมื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในการทำให้กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดเกิดการคลายตัวที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้น  $\beta$ -adrenoceptor โดยให้ propranolol ซึ่งเป็น  $\beta$ -adrenoceptor antagonist (Rang, *et al.*, 1999) พบว่า propranolol สามารถยับยั้งการคลายตัวได้ อาจเป็นไปได้ว่า quercetin และ naringenin ทำให้หลอดเลือดเกิดการคลายตัวได้ โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับการกระตุ้น  $\beta$ -adrenoceptor ที่กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด ซึ่งจากการศึกษาอื่นพบว่า มี  $\beta$ -adrenoceptor อยู่บนกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดของหนูขาว (Brawley, *et al.*, 2000) นอกจากนี้ได้มีข้อเสนอแนะความเป็นไปได้ในการออกฤทธิ์ของ quercetin ผ่านทาง  $\beta$ -adrenoceptor จากการศึกษากการเสริมฤทธิ์กับ epinephrine ในการกระตุ้น  $\beta$ -adrenoceptor โดย quercetin ใน adipocytes ของหนูขาว (Kuppusamy and Das, 1994)

เมื่อให้ atropine ซึ่งเป็น muscarinic antagonist พบว่า atropine สามารถยับยั้งการคลายตัวของ naringenin ได้ นอกจากนี้ indomethacin ซึ่งเป็น COX inhibitor สามารถยับยั้งการคลายตัวของ naringenin ได้เช่นกัน จึงอาจเป็นไปได้ว่า naringenin ทำให้หลอดเลือดเกิดการคลายตัวได้ผ่านทางหลายกลไกหรือออกฤทธิ์อย่างไม่จำเพาะเจาะจง โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับการทำงานของ muscarinic receptor และ COX pathway นอกจากนี้ยังได้ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับ  $K^+$  channel ซึ่งเป็นผลจากการที่  $K^+$  ออกนอกเซลล์ทำให้หลอดเลือดเกิดการคลายตัวได้ (Karaki, *et al.*, 1997) อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้  $K^+$  channel blocker ได้แก่ 4-aminopyridine (selective voltage-operated  $K^+$  channel blocker) หรือ glybenclamide (ATP-activated  $K^+$  channel blocker) พบว่าสามารถยับยั้งการคลายตัวของ naringenin ได้ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า naringenin ทำให้หลอดเลือดเกิดการคลายตัวได้โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับ  $K^+$  channel ด้วยเช่นกัน ในขณะที่เมื่อใช้ indomethacin, atropine, 4-aminopyridine, glybenclamide พบว่าไม่มีผลต่อการคลายตัวของ quercetin

จากการศึกษาทั้งหมดอาจสรุปได้ว่า quercetin ที่ขนาดความเข้มข้น  $50 \mu\text{M} - 1 \text{mM}$  สามารถยับยั้งการตอบสนองของกล้ามเนื้อเรียบเมื่อกระตุ้นด้วย PE  $10 \mu\text{M}$  และ KCl  $40 \text{mM}$  ได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และผลการยับยั้งเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น รวมถึง quercetin ที่ขนาดความเข้มข้น  $500 \mu\text{M}$  สามารถลดการหดตัวที่ถูกกระตุ้นด้วย PE  $10 \mu\text{M}$  และ caffeine  $10 \text{mM}$  ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$ -free Krebs-Henseleit solution ยิ่งไปกว่านั้น quercetin ที่ขนาดความเข้มข้น  $500 \mu\text{M}$  สามารถลดการเกิด increase in the resting tone in aorta (IRT) ได้ รวมถึงมีผลลดการหดตัวเมื่อถูกกระตุ้นด้วย  $\text{CaCl}_2$  แบบสะสมขนาดในสารละลาย high  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$

- free solution ดังนั้น quercetin อาจจะมีผลโดยตรงต่อการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ผ่านทางหลายกลไก โดยส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของ  $Ca^{2+}$  จากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ และบางส่วนมีผลต่อ  $Ca^{2+}$  จากแหล่งเก็บภายในเซลล์ ในส่วนของการคลายตัวของ quercetin ที่ความเข้มข้นช่วง  $50 \mu M - 2000 \mu M$  ทำให้กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ที่ไม่มี endothelium เกิดการคลายตัวได้ เมื่อกระตุ้นด้วย PE ความเข้มข้น  $10 \mu M$  ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์คลายหลอดเลือดของ quercetin ในสภาวะที่ไม่มี endothelium นั้นอาจเกี่ยวข้องกับการที่ quercetin กระตุ้นการทำงานของ  $\beta$ -adrenoceptor

ในส่วนของ naringenin ที่ขนาดความเข้มข้น  $50 \mu M - 500 \mu M$  สามารถลดการหดตัวเมื่อกระตุ้นด้วย PE  $10 \mu M$  และ KCl  $40 mM$  ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และผลการยับยั้งเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น นอกจากนี้ naringenin ที่ขนาดความเข้มข้น  $500 \mu M$  สามารถลดการหดตัวที่ถูกกระตุ้นด้วย PE  $10 \mu M$  ในสารละลาย  $Ca^{2+}$ -free Krebs-Henseleit solution ยกเว้นเมื่อกระตุ้นด้วย caffeine  $10 mM$  ยิ่งไปกว่านั้น naringenin ความเข้มข้น  $500 \mu M$  สามารถลดการเกิด increase in the resting tone in aorta (IRT) ได้ รวมถึงมีผลลดการหดตัวเมื่อถูกกระตุ้นด้วย  $CaCl_2$  แบบสะสมขนาดในสารละลาย high  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  free solution ดังนั้น naringenin อาจจะมีผลโดยตรงต่อการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ผ่านทางหลายกลไก โดยส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของ  $Ca^{2+}$  จากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ และบางส่วนมีผลต่อ  $Ca^{2+}$  จากภายในเซลล์ ในส่วนของการคลายตัวของ naringenin ที่ความเข้มข้นช่วง  $50 \mu M - 2000 \mu M$  ทำให้กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ที่ไม่มี endothelium เกิดการคลายตัวได้ เมื่อกระตุ้นด้วย PE ความเข้มข้น  $10 \mu M$  ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์คลายหลอดเลือดของ naringenin ในสภาวะที่ไม่มี endothelium เป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจงเกี่ยวข้องกับหลายกลไก เช่น การกระตุ้น  $\beta$ -adrenoceptor,  $K^+$  channel, COX pathway และ muscarinic receptor ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่าความแตกต่างของการมี hydroxyl groups ระหว่าง quercetin และ naringenin ทำให้กลไกการออกฤทธิ์ในการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบแตกต่างกันอย่างมาก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กิจจา สุวรรณ . ฤทธิ์ลดความดันเลือดของบาราคอลที่สกัดจากใบชี่เหล็กในหนูแรทและแมว,  
วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์  
มหาวิทยาลัย, 2535.

จิตติมา ศรีสมบุญ. ผลของไคเมทิลซัลฟอกไซด์ต่อการทำงานของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจาก  
กายหนูขาว, วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2546.

ปทุมมาศ พีชพร. ผลของสารสังเคราะห์ CU 18-08 , CU 18-10 และ CU 18-11 ต่อการเคลื่อนที่  
เข้าออกของ  $Ca^{2+}$  ในกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวที่แยกจากกาย,  
วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2544.

อมรรัตน์ ชัยนการนาวิ. ผลของ ซึยู 18-07 ซึยู 18-09 ซึยู 18-12 และ ซึยู 13 ต่อการหดตัวของ  
กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากกายหนูขาว, วิทยานิพนธ์ปริญญา  
มหาบัณฑิต ภาควิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2545.

ภาษาอังกฤษ

Ahn, H.Y.; Karaki, H.; and Urakawa, N. Inhibitory effects of caffeine on contractions and  
calcium movement in vascular and intestinal smooth muscle. Br J Pharmacol. 93  
(1993): 80-87.

Ajay, M.; Gilani, A.U.; and Mustafa. M.R. Effect of flavonoids on vascular smooth muscle  
of the isolated rat thoracic aorta. Life Sci. 74 (2003): 603-612.

- Barney, B.M.; Schaab, M.R.; Lobrutto, R.; and Francisco, W.A. Evidence for a new metal in a known active site: purification and characterization of an iron-containing quercetin 2,3-dioxygenase from *Bacillus subtilis*. Protein Expr Purif. 35 (2004): 131-141.
- Beret, A.; Stoclet, J.; and Anton, R. Inhibition of isolated rat aorta contraction by flavonoids. Possible correlation with cAMP-phosphodiesterase inhibition. Planta Med. 39 (1980): 236.
- Berne, R.M.; and Levy, M.M. The United state of America :Mosby-Year Book, Physiology. 3<sup>rd</sup> ed (1993): 309-324.
- Benito, S.; Lopez, D.; Saiz, M.P.; Buxaderas, S.; Sanchez, J.; Puig-Parellada, P.; and Mitjavila, M.T. A flavonoid-rich diet increase nitric oxide production in rat aorta. Br J Pharmacol. 135 (2002): 910-916.
- Bolton, T.B. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscles. Physiol Rev. 59 (1979): 606-718.
- Chan, E.C.; Pannangpetch, P.; and Woodman, O.L. Relaxation to flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta:mechanism of action and structure-activity relationship. J Cardiovasc pharmacol. 35 (2000): 326-333.
- Chen, C.K.; and Pace-Asciak, C.R. Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. Gen Pharmacol. 27 (1996): 363-366.
- Cishek, M.B.; Galloway, M.E.; and Carim, M. Effect of red wine on endothelium-dependent relaxation in rabbits. Clin Sci. 93 (1997): 507-511.

Duarte, J.; Perez-Vizcaino, F.; Zarzuelo, A.; Jimenez, J.; and Tamargo, J., Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. Eur J Pharmacol. 239 (1993): 1-7.

Duarte, J.; Perez-Palencia, R.; Vargas, F.; Ocete, M.A.; Perez-Vizcaino, F.; Zarzuelo, A.; and Tamargo, J. Antihypertension effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. Br J Pharmacol. 133 (2001): 117-124.

Ferriola, P.C.; Cody, V.; and Middleton, E. Protein kinase C inhibition by flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. Biochem Pharmacol. 38 (1989): 1617-1624.

Fitzpatrick, D.F.; Hirschfield, S.L.; and Coffey, R.G. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. Am J Physiol. 265 (1993): H774-H778.

Flesch, M.; Andreas, S.; and Michael, B. Effects of red and white wine on endothelial dependent vasorelaxation of rat aorta and human coronary arteries. Am. J. Physiol. 275 (1998): H1183-H1190.

Formica, J.V.; and Regelson, W. 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. Food Chem Toxicol. 33 (1995): 1061-1080.

Furchgott, R.F. Role of endothelium in response of vascular smooth muscle. Circ Res. 52 (1980): 557-573.

Fusi, F.; Saponara, S.; and Passna, F. Effects of quercetin and rutin on vascular preparation: a comparison between mechanical and electrophysiological phenomena. Eur J Nut. 42 (2003):10-7.

- Guerrero, M.F.; Carron, R.; and Martin, M.L. Quercetin 3,7-dimethyl ether : a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeanus* Schlecht. J Pharmacol. 54 (2002): 1373-8.
- Hammad, H.M.; and Abdalla, S.S. Pharmacological effects of selected flavonoids on rat isolated ilium: structure-activity relationship. Gen Pharmacol. 28 (1997): 767-771.
- Herrera, M.D.; Duarte, J.; Jimenez, J.; and Marhuehda, E. Effect of flavonoids on rat thoracic muscle contractility. Structure-activity relationships. Gen Pharmacol. 27 (1996): 767-771.
- Hertog, M.G.L.; Feskens, E.J.M.; Hollman, P.C.H.; Katan, M.B.; and Klomhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen Elderly study. Lancet 342 (1993): 1007-1011.
- Hof, R.P.; and Vuorela, H.J. Assessing calcium antagonism on vascular smooth muscle: A comparison of three methods. J Pharmacol Methods. 9 (1983): 41-52.
- Ibarra, M.; Moreno, L.; Vera, R.; Cogolludo, A.; Duarte, J.; Perez-Vizcaino, F.; and Tamargo, J. Effects of flavonoid quercetin and its methylated metabolite isorhamnetin in isolated arteries from spontaneously hypertensive rats. Planta Med. 11 (2003): 995-1000.
- Ibarra, M.; Perez-Vizcaino, F.; Cogolludo, A.; Duarte, J.; Zaragoza-Arnez, F.; Lopez-Lopez, J.G.; and Tamargo, J. Cardiovascular effects of isorhamnetin and quercetin in isolated rat and porcine vascular smooth muscle and isolated rat atria. Planta Med. 68 (2002): 307-310.

- Karaki, H.; and Weiss, G.B. Calcium channels in smooth muscle. Gastroenterol 87 (1984): 960-970.
- Katz, A.M. Molecular biology of calcium channels in the cardiovascular system. Am J Cardiol. 80 (1997): 171-221.
- Kawakami, M.; and Okabe, E. Superoxide anion radical-triggered  $\text{Ca}^{2+}$  release from cardiac sarcoplasmic reticulum through ryanodine receptor  $\text{Ca}^{2+}$  channel Mol Pharmacol. 53 (1998): 497-503.
- Kuppusamy, U.R.; and Das, N.P. Potentiation of beta-adrenoceptor agonist-mediated lipolysis by quercetin and fisetin in isolated rat adipocytes. Biochem Pharmacol. 47 (1994): 521-529.
- Kuriyama, H.; Kitamura, K.; and Nabata, H. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. Pharmacol Rev. 47 (1995): 387-573.
- Lee, M.H.; Yoon, S.; and Moon, J.O. The flavonoid naringenin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. Biol Pharm Bull. 27 (2004): 72-76.
- Mahesh, T.; and Menon, V.P. Quercetin alleviates oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. Phytother Res. 18 (2004): 123 -127.
- Middleton, E.; Jr and Ferriola P. Effect of flavonoids on protein kinase C, relationship to inhibition of human basophil histamine release. In Progress in Clinical and Biological Research. 280 (1988): 251-266.



- Moore, P.K.; Griffiths, R.J.; and Lofts, F.J. The effect of some flavone drugs on the conversion of prostacyclin to 6-oxoprostaglandin E1. Biochem Pharmacol. 18 (1983): 2813-2817.
- Morales, M.A.; and Lozoya, X. Calcium-antagonist effect of quercetin on aortic smooth muscle. Planta Med. 60 (1994):313-317.
- Nishida, S.; and Satosh, S. Comparative vasodilating actions among terpenoid and flavonoid contained in Gingo biloba extract . Clin Chim Acta. 339 (2004): 129-133.
- Noguera, M.A.; and D'Ocon, M.P. Different and common intracellular calcium-stores mobilizes by noradrenaline and caffeine in vascular smooth muscle. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 345 (1992): 333-341.
- Noguera, M.A.; Madrero, Y.; Ivorra, M.D.; and D'Ocon, M.P. Characterization of two different  $Ca^{2+}$  entry pathways dependent on depletion of internal  $Ca^{2+}$  pools in rat aorta. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 357 (1998): 92-99.
- Perez-Vizcaino, F.; Ibarra, M.; Cogolludo, AL.; Duarte, J.; Zaragoza-Arnaez, F.; Moreno, L.; Lopez-Lopez, G.; and Tamargo, J. Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. J Pharmacol Exp Ther. 302 (2002): 66-77.
- Pierpoint, W.S. Flavonoids in the human diet. In Progress in Clinical and Biological Research. Edited by V. Cody, E. Middleton, Jr and J.B. Harborne. 213 (1986): 125-140.

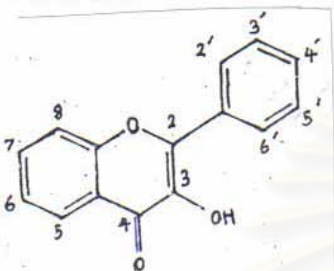
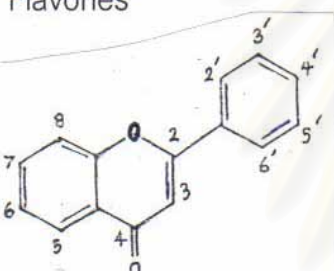
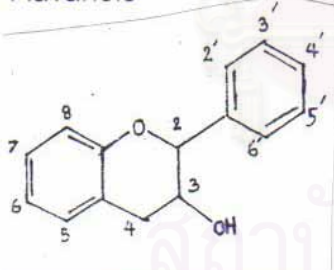

- Rang, H.P.; Dale, M.A.; and Ritter, J.M. The vascular system. In Rang, H.P.; Dale, M.M.; and Ritter, J.M. (eds.), Edinburgh: Churchill Livingstone. Pharmacology (1999): 278-300.
- Rendig, S.V.; Symons, J.D.; Longhurst, J.C.; and Amsterdam, E.A. Effects of red wine, alcohol, and quercetin on coronary resistance and conductance arteries. J Cardiovasc Pharmacol. 38 (2001): 219-227.
- Richard, K.E. Cardiovascular Physiology Concepts. [online]. Available from: URL: <http://www.oucom.ohio.edu/cvphysiology/bp026.html>.
- Sagach, V.F.; Tkachenko, M.N.; and Kovalenko, T.N. The participation of humoral factors released by the endothelium in the development of reactive hyperemia. Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova. 77 (1991): 20-27.
- Saponara, S.; Sgaragli, G.P.; and Fusi, F. Quercetin as a novel activator of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in rat tail artery smooth muscle cells. Br J Pharmacol. 135 (2003): 1819-1827.
- Taubert, D.; Berkels, R.; Klaus, W.; and Roesen, R. Nitric oxide formation and corresponding relaxation of porcine coronary arteries induced by plant phenols: essential structural features. J Cardiovasc Pharmacol. 40 (2002): 701-713.
- Van Rossum, J.M.; Hurkmans, J.A.; and Wolters C.J.J. Cumulative dose-response curves. Arch Int Pharmacodyn Ther. 143 (1963): 299-330.
- Vanhoutte, P.M.; Rubavyi, G.M.; Miller, V.M.; and Houston, D.S. Modulation of vascular smooth muscle contraction by endothelium. Annu Rev Physiol. 48 (1986): 307-330.
- William, F.J. Ion channels and vascular tone. Hypertention 35 (2000): 173-178.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 โครงสร้างของสารกลุ่ม flavonoids

Structure	Name	Substituents					
		3	5	7	3'	4'	5'
	Kaempferol	OH	OH	OH	H	OH	H
	Quercetin	OH	OH	OH	OH	OH	H
	Rutin	OR	OH	OH	OH	OH	H
	Apigenin	H	OH	OH	H	OH	H
	Primuletin	H	OH	H	H	H	H
	Catechin	OH	OH	OH	OH	OH	H
	Hesperetin	H	OH	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	H
	Hesperidin	H	OH	OR	OH	OCH <sub>3</sub>	H
	Naringenin	H	OH	OH	H	OH	H

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบ Physiological solution (มิลลิโมล/ลิตร)

สารเคมี	Physiological solution		
	Kreb Henseleit	Ca <sup>2+</sup> -free Kreb Henseleit	Potassium Depolarizing
NaCl	119	119	27
KCl	4.7	4.7	100
CaCl <sub>2</sub>	2.5	-	-
MgSO <sub>4</sub>	1.0	1.0	-
NaHCO <sub>3</sub>	25	25	14.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2	1.2	-
Glucose	11.1	11.1	10
EDTA	-	0.1	-
MgCl <sub>2</sub>	-	-	2.25

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 ข้อมูลของ DMSO , quercetin ความเข้มข้น 10,50,100,500 และ 1000  $\mu\text{M}$  ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วย PE และ KCl

Endothelium-denuded

contractants	quercetin concentration					
	DMSO	10	50	100	500	1000
PE 10 $\mu\text{M}$ (n=7)	105.5 $\pm$ 4.1	96.3 $\pm$ 4.3	70.8 $\pm$ 5.4 *	49.5 $\pm$ 2.1 *	36.5 $\pm$ 3.6 *	8.3 $\pm$ 2.3 *
KCl 40 mM (n=7)	92.5 $\pm$ 15	103.8 $\pm$ 8.8	57.9 $\pm$ 5.7 *	37.7 $\pm$ 3.7 *	16.3 $\pm$ 2.4 *	3.3 $\pm$ 1.7 *

\*แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับ DMSO ( $p < 0.05$ )

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ข้อมูลของ DMSO , naringenin ความเข้มข้น 10,50,100,500 ,1000 และ 2000  $\mu\text{M}$  ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วย PE และ KCl

Endothelium-denuded

contractants	naringenin concentration						
	DMSO	10	50	100	500	1000	2000
PE 10 $\mu\text{M}$ (n=7)	105.5±4.1	115.6±5.2	83.2±3.3 *	58.8±8.6 *	34.1±7.3 *	68±3.8 *	70.2±3.3 *
KCl 40 mM(n=7)	92.5±15	122.8±5.8	79±2.7 *	58.8±1.9 *	36.5±5.5 *	10.9±2.5 *	-

\*แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับ DMSO ( $p < 0.05$ )

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ข้อมูลของ DMSO , quercetin และ naringenin ความเข้มข้น 500  $\mu\text{M}$  ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วย PE 10  $\mu\text{M}$  และ caffeine 10 mM ใน  $\text{Ca}^{2+}$  - free medium

Endothelium-denuded

contractants	n	quercetin 500 $\mu\text{M}$	naringenin 500 $\mu\text{M}$	DMSO
PE 10 $\mu\text{M}$	6	19.7 $\pm$ 1.75 *	48.1 $\pm$ 4.7 *	100.5 $\pm$ 5.3
caffeine 10 mM	6	48.8 $\pm$ 7.5 *	94.3 $\pm$ 4.3	95.5 $\pm$ 7.8

\*แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับ DMSO ( $p < 0.05$ )

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 6 ข้อมูลของ DMSO , quercetin และ naringenin ความเข้มข้น 500  $\mu$ M ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดงหนูขาวในขณะพัก [ Increase in the resting tone in aorta (IRT)]

Endothelium-denuded

contractants	n	quercetin 500 $\mu$ M	naringenin 500 $\mu$ M	DMSO (n=5)
IRT	4	41 $\pm$ 5.7 *	29.3 $\pm$ 9 *	74.0 $\pm$ 3.7

\*แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับ DMSO ( $p < 0.05$ )

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ข้อมูลของ DMSO , quercetin และ naringenin ความเข้มข้น 500  $\mu\text{M}$  ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดงหนูขาวเมื่อถูกกระตุ้นด้วย  $\text{CaCl}_2$  แบบ cumulative dose-response curve ใน  $\text{Ca}^{2+}$  - free depolarizing solution

Endothelium-denuded

$\text{CaCl}_2$ concentration (M)	control (n=19)	quercetin 500 $\mu\text{M}$ (n=7)	naringenin 500 $\mu\text{M}$ (n=7)	DMSO (n=5)
$10^{-5}$	8.7 $\pm$ 3.4	1.8 $\pm$ 4.8	-0.7 $\pm$ 5.8	8.3 $\pm$ 11
$3\times 10^{-5}$	29.9 $\pm$ 4.8	4.6 $\pm$ 5.1	11.2 $\pm$ 2.7	14.9 $\pm$ 11
$10^{-4}$	52.8 $\pm$ 5.4	13.9 $\pm$ 6.2 *	16.6 $\pm$ 4.6 *	37.4 $\pm$ 13
$3\times 10^{-4}$	71.9 $\pm$ 5.9	17.4 $\pm$ 13 *	29.4 $\pm$ 10 *	53.1 $\pm$ 11 #
$10^{-3}$	84.9 $\pm$ 5.8	17.4 $\pm$ 12.6 *	34.5 $\pm$ 12 *	61.4 $\pm$ 9 #
$3\times 10^{-3}$	93.9 $\pm$ 3.5	21.6 $\pm$ 11 *	39.9 $\pm$ 12 *	74.7 $\pm$ 10 #
$10^{-2}$	100 $\pm$ 0	23.9 $\pm$ 11 *	52.3 $\pm$ 13 *	82.9 $\pm$ 10 #

\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับ DMSO ( $p < 0.05$ )

# แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบ ( $p < 0.05$ )

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 ข้อมูลของ quercetin ความเข้มข้น 50,100,500,1000 และ 2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ indomethacin  $10^{-5}$  M และ atropine  $10^{-4}$  M ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution

quercetin concentration (M)	control (n=9)	indomethacin $10^{-5}$ M (n=4)	atropine $10^{-4}$ M (n=4)
$5 \times 10^{-5}$	6.5 $\pm$ 1.5	5.9 $\pm$ 2.9	9.3 $\pm$ 1.6
$10^{-4}$	18.3 $\pm$ 1.4	16.5 $\pm$ 4.7	22.5 $\pm$ 7
$5 \times 10^{-4}$	38.2 $\pm$ 3.7	35.8 $\pm$ 4	43.6 $\pm$ 10
$10^{-3}$	64.7 $\pm$ 5	65.3 $\pm$ 3	67.1 $\pm$ 8
$2 \times 10^{-3}$	95.6 $\pm$ 3.6	86.6 $\pm$ 4	86.6 $\pm$ 4

\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับสารยับยั้งการคลายตัว ( $p < 0.05$ )

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 ข้อมูลของ quercetin ความเข้มข้น 50,100,500,1000 และ 2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ L-NAME  $10^{-4}$  M, propranolol  $10^{-5}$  M, methylene blue  $10^{-5}$  M ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution

quercetin concentration (M)	L-NAME $10^{-4}$ M (n=4)	propranolol $10^{-5}$ M (n=6)	methylene blue $10^{-5}$ M (n=4)
$5 \times 10^{-5}$	7.5 $\pm$ 4	7.3 $\pm$ 1.8	7.9 $\pm$ 3
$10^{-4}$	30.7 $\pm$ 3.7	16.5 $\pm$ 0	21.9 $\pm$ 5
$5 \times 10^{-4}$	50.1 $\pm$ 4.3	28.3 $\pm$ 2.9 *	38.9 $\pm$ 6
$10^{-3}$	64.9 $\pm$ 3.4	42.1 $\pm$ 4 *	59.5 $\pm$ 2
$2 \times 10^{-3}$	89.6 $\pm$ 1.7	63.4 $\pm$ 1 *	83.4 $\pm$ 2

\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับสารยับยั้งการคลายตัว ( $p < 0.05$ )

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 ข้อมูลของ quercetin ความเข้มข้น 50,100,500,1000 และ 2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ TEA  $10^{-3}$  M, 4-AP  $10^{-4}$  M, glybenclamide  $10^{-5}$  M ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution

quercetin concentration (M)	TEA $10^{-3}$ M (n=4)	4-AP $10^{-4}$ M (n=4)	glybenclamide $10^{-5}$ M (n=4)
$5 \times 10^{-5}$	11.3 $\pm$ 4	1.9 $\pm$ 1.9	5.9 $\pm$ 3.7
$10^{-4}$	21.2 $\pm$ 4	17.9 $\pm$ 5	16.8 $\pm$ 7.4
$5 \times 10^{-4}$	32.7 $\pm$ 8	32.6 $\pm$ 8	32.5 $\pm$ 9
$10^{-3}$	65.8 $\pm$ 7	55.8 $\pm$ 9	59.8 $\pm$ 10
$2 \times 10^{-3}$	92.6 $\pm$ 9	84.1 $\pm$ 5	81.4 $\pm$ 7

\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับสารยับยั้งการคลายตัว ( $p < 0.05$ )

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ข้อมูลของ naringenin ความเข้มข้น 50,100,500,1000 และ 2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ indomethacin  $10^{-5}$  M และ atropine  $10^{-4}$  M ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution

naringenin concentration (M)	control (n=6)	indomethacin $10^{-5}$ M (n=4)	atropine $10^{-4}$ M (n=4)
$5 \times 10^{-5}$	10.8 $\pm$ 2	5.1 $\pm$ 3	2.9 $\pm$ 1.4
$10^{-4}$	22.1 $\pm$ 3	8.7 $\pm$ 4	5.6 $\pm$ 2
$5 \times 10^{-4}$	35.6 $\pm$ 2.8	14.1 $\pm$ 4 *	14.8 $\pm$ 3.3 *
$10^{-3}$	54.7 $\pm$ 5	32.1 $\pm$ 2	39.9 $\pm$ 2.7
$2 \times 10^{-3}$	79.7 $\pm$ 2.4	64.6 $\pm$ 11	62.2 $\pm$ 7

\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับสารยับยั้งการคลายตัว ( $p < 0.05$ )

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 ข้อมูลของ naringenin ความเข้มข้น 50,100,500,1000 และ 2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ L-NAME  $10^{-4}$  M, propranolol  $10^{-5}$  M, methylene blue  $10^{-5}$  M ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution

naringenin concentration (M)	L-NAME $10^{-4}$ M (n=4)	propranolol $10^{-5}$ M (n=6)	methylene blue $10^{-5}$ M (n=4)
$5 \times 10^{-5}$	$5.1 \pm 3$	$7.0 \pm 1.7$	$5.7 \pm 3.3$
$10^{-4}$	$7.9 \pm 3$	$9.1 \pm 2$	$14.3 \pm 4$
$5 \times 10^{-4}$	$24.6 \pm 5$	$15.5 \pm 5$ *	$25.3 \pm 8$
$10^{-3}$	$41.1 \pm 7$	$24.7 \pm 2.5$ *	$50.1 \pm 4$
$2 \times 10^{-3}$	$72.6 \pm 7$	$36.8 \pm 1$ *	$72.5 \pm 12$

\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับสารยับยั้งการคลายตัว ( $p < 0.05$ )

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 ข้อมูลของ naringenin ความเข้มข้น 50,100,500,1000 และ 2000  $\mu\text{M}$  ต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงหนูขาว เมื่อให้ TEA  $10^{-3}$  M, 4-AP  $10^{-4}$  M, glybenclamide  $10^{-5}$  M ในสารละลาย  $\text{Ca}^{2+}$  - containing solution

naringenin concentration (M)	TEA $10^{-3}$ M (n=4)	4-AP $10^{-4}$ M (n=4)	glybenclamide $10^{-5}$ M (n=4)
$5 \times 10^{-5}$	11.8 $\pm$ 2.3	4.6 $\pm$ 2	2.5 $\pm$ 2
$10^{-4}$	23.6 $\pm$ 5	9.6 $\pm$ 3.6	7.3 $\pm$ 3
$5 \times 10^{-4}$	33.2 $\pm$ 7	15.7 $\pm$ 4.5 *	16.1 $\pm$ 2.6 *
$10^{-3}$	58.2 $\pm$ 13	36.9 $\pm$ 6 *	29.4 $\pm$ 2 *
$2 \times 10^{-3}$	81.1 $\pm$ 9	62.6 $\pm$ 9 *	45.9 $\pm$ 8 *

\* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับสารยับยั้งการคลายตัว ( $p < 0.05$ )

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว ปารณีย์ ญาติมาก เกิดเมื่อวันที่ 16 ธันวาคม 2523 ที่จังหวัดกาญจนบุรี สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต จากคณะเทคนิคการแพทย์ สาขารังสีเทคนิค มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปีการศึกษา 2545 และได้ศึกษาต่อในระดับปริญญาโทหลักสูตรวิทยาศา สตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยา สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2546



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย