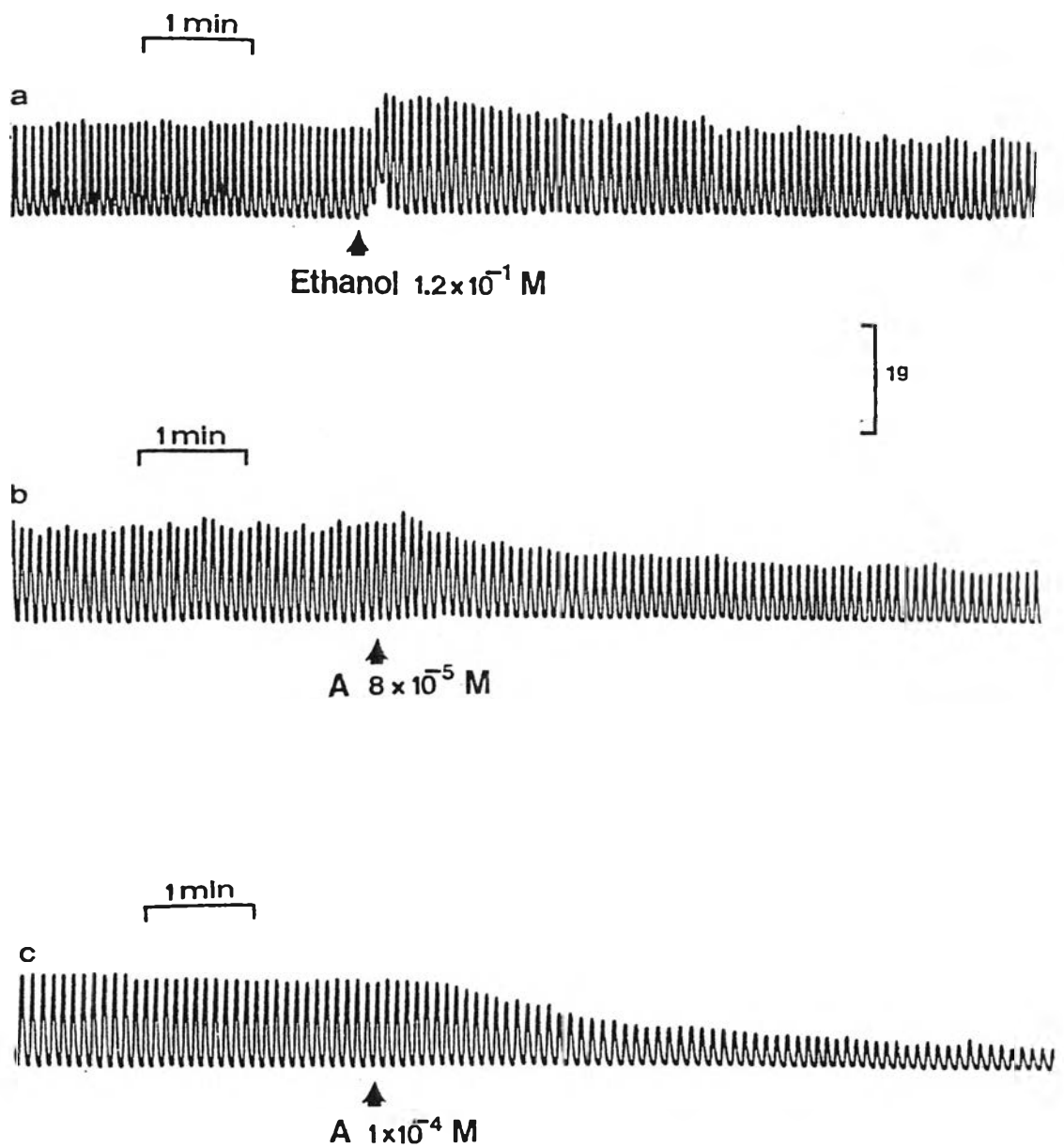


ผลการวิจัย

1. ศึกษาฤทธิ์ของ andrographolide ต่อการหดตัวของลำไส้เล็กที่แยกจากตัวกระต่าย (isolated rabbit jejunum)

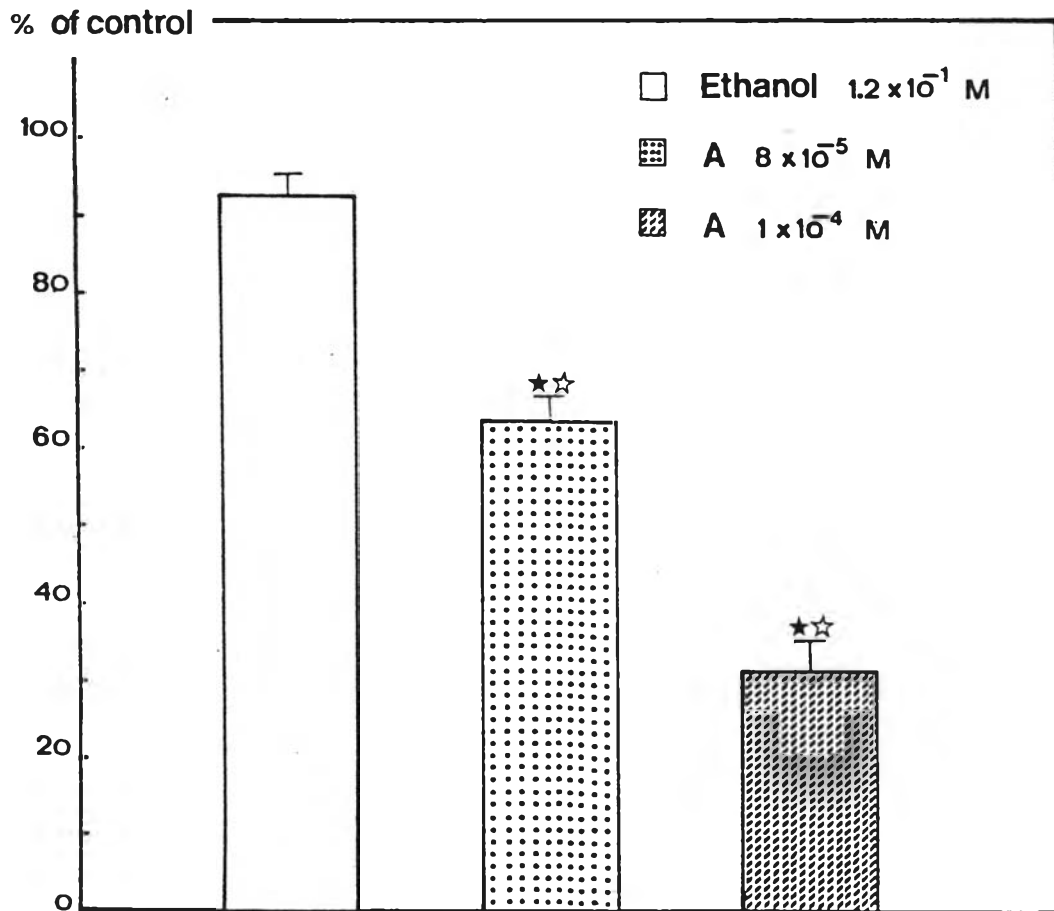
ในการศึกษาเบื้องต้นได้ทดสอบผลของ andrographolide ต่อ spontaneous contraction ของลำไส้กระต่าย การทดลองให้ยาแบบสะสม (cumulative dose) โดยให้ andrographolide ความเข้มข้นระหว่าง $1.14 \times 10^{-5} \text{M}$ ถึง $10.27 \times 10^{-5} \text{M}$ สังเกตผลของยาแต่ละความเข้มข้นนาน 5 นาที ผลการทดลองพบว่า andrographolide สามารถลด spontaneous contraction ของลำไส้กระต่ายตามความเข้มข้นของยาที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 6 ซึ่งผลการทดลองได้แสดงในรูปของ % inhibition โดยเทียบกับภาวะก่อนให้ยา andrographolide ความเข้มข้น $1.14 \times 10^{-5} \text{M}$ ลดแรงหดตัวของลำไส้ได้ $5.23 \pm 1.61\%$ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ andrographolide ใน organ bath จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น $10.27 \times 10^{-5} \text{M}$ พบว่า andrographolide สามารถลดแรงหดตัวของลำไส้ได้ $81.00 \pm 1.67\%$ andrographolide มีผลต่อความแรง (amplitude) ของการหดตัวเท่านั้นแต่ไม่มีผลต่ออัตราการหดตัวของลำไส้ เมื่อล้างลำไส้ด้วยสารละลาย Tyrode หลาย ๆ ครั้ง การหดตัวของลำไส้สามารถกลับคืนได้ แต่ความแรงในการหดตัวยังคงน้อยกว่าก่อนให้ andrographolide

เนื่องจากได้ใช้ absolute ethanol เป็นตัวทำละลาย จึงต้องศึกษาผลของ absolute ethanol ต่อ spontaneous contraction ของลำไส้กระต่ายเปรียบเทียบด้วย การทดลองได้ให้ absolute ethanol แบบสะสมเช่นกัน ปริมาตรของ absolute ethanol ที่ให้ในแต่ละขนาดเท่ากับปริมาตรที่ใช้ในการละลาย andrographolide แต่ละความเข้มข้น ผลการทดลองในรูปที่ 6 ได้ให้ absolute ethanol ความเข้มข้น $1.37 \times 10^{-2} \text{M}$ - $12.35 \times 10^{-2} \text{M}$ พบว่า absolute ethanol สามารถลดแรงหดตัวของ



รูปที่ 7

ผลของ andrographolide และ absolute ethanol ต่อ spontaneous contraction ของลำไส้เล็กที่แยกจากตัวกระต่าย เส้นในแนวนอนแสดงเวลาเป็นนาที และเส้นในแนวตั้งแสดงความแรงของการหดตัวเป็นกรัม



รูปที่ 8

ผลของ andrographolide และ absolute ethanol ต่อ spontaneous contraction ของลำไส้เล็กที่แยกจากตัวกระต่าย ผลแสดงในรูปของ mean และ SE.

ethanol ($n = 6$), A 8×10^{-5} M ($n = 8$),

A 1×10^{-4} M ($n = 6$)

★ มีความแตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

$P < 0.05$

☆ มีความแตกต่างจาก ethanol อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

$P < 0.05$

andrographolide ทั้งสองความเข้มข้นต่อแรงหดตัวของลำไส้แตกต่างจากผลของ absolute ethanol และแตกต่างจากภาวะควบคุมก่อนให้ยาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

2. ศึกษาฤทธิ์ของ andrographolide ต่อการหดตัวของลำไส้เล็กที่แยกจากตัวหนูตะเภา (isolated guinea pig ileum)

เนื่องจากลำไส้ของหนูตะเภาไม่สามารถหดตัวได้เอง จึงต้องกระตุ้นให้ลำไส้หดตัวด้วยวิธีการต่าง ๆ เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของ andrographolide ในแง่ต่าง ๆ ดังนี้

ก. ผลต่อ cholinergic action โดยกระตุ้นลำไส้ด้วย acetylcholine โดยตรงด้วยการให้ exogenous acetylcholine และให้ลำไส้ถูกกระตุ้นด้วย acetylcholine ทางอ้อมโดย postsynaptic release หลังจากกระตุ้นด้วยไฟฟ้า

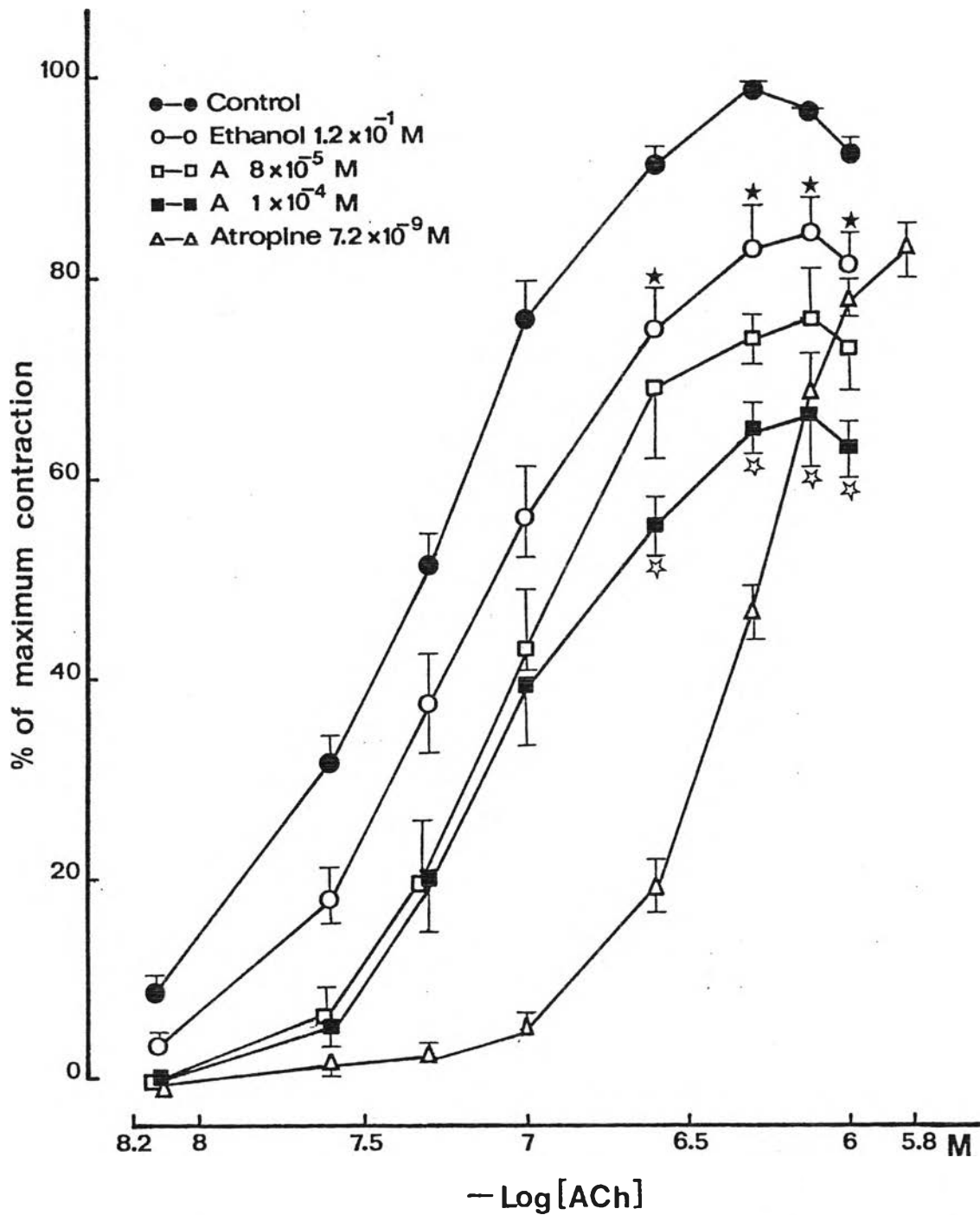
ข. ผลต่อ non-cholinergic action ซึ่งจะไม่เกี่ยวกับ acetylcholine และ cholinergic receptors การศึกษาในชั้นนี้สามารถแยกได้เป็น การศึกษาฤทธิ์ของ andrographolide ต่อ histaminergic action โดยกระตุ้นลำไส้ให้หดตัวด้วย histamine นอกจากนี้ยังศึกษาฤทธิ์ของ andrographolide ต่อสารกระตุ้นอื่น ๆ ได้แก่ barium chloride และ calcium chloride สารกระตุ้นเหล่านี้มีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันไป

2.1 ศึกษาผลของ andrographolide ต่อการออกฤทธิ์ของ acetylcholine การทดลองในชั้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ andrographolide ต่อการหดตัวของลำไส้ที่ถูกกระตุ้นด้วย acetylcholine และศึกษาเปรียบเทียบกับผลที่เกิดจาก absolute ethanol และ atropine จากการทดลองเมื่อให้ acetylcholine ความเข้มข้น $7.5 \times 10^{-9} \text{ M} - 1 \times 10^{-6} \text{ M}$ โดยให้เป็นแบบ cumulative dose พบว่าลำไส้หดตัวเพิ่มขึ้นตามขนาดความเข้มข้นของ acetylcholine และทำให้เกิด maximum contraction ที่ความเข้มข้นเท่ากับ $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ ดังแสดงในรูปที่ 9 andrographolide สามารถยับยั้งการหดตัวของลำไส้ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย acetylcholine ตามขนาดความ

เชมชนของ andrographolide ที่ได้จากลักษณะของ dose-response curve ในรูปที่ 9 แสดงให้เห็นว่า andrographolide ออกฤทธิ์เป็นแบบ noncompetitive inhibition จึงมีลักษณะต่างจากของ atropine ซึ่งออกฤทธิ์แบบ competitive inhibition ทำให้ dose-response curve ของ acetylcholine เคลื่อนไปทางขวาในลักษณะขนานกับ control หลังให้ atropine $7.2 \times 10^{-9} M$ andrographolide ความเข้มข้น $8 \times 10^{-5} M$ และ $1 \times 10^{-4} M$ ลด maximum contraction ได้ $24.19 \pm 5.05\%$ และ $33.51 \pm 5.57\%$ ตามลำดับ absolute ethanol ซึ่งเป็นตัวทำละลายสามารถลด maximum contraction ได้ $15.52 \pm 3.77\%$ เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่าทุก ๆ จุดของ dose-response curve หลังให้ andrographolide ทั้งสองความเข้มข้นและหลังให้ atropine มีความแตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จาก dose-response curve ได้คำนวณ potencies ของยาโดยแสดงในรูป PD_2 values สำหรับ andrographolide และ absolute ethanol และแสดงในรูป PA_2 value สำหรับ atropine ดังแสดงในตารางที่ 2 PD_2 values ของ andrographolide ความเข้มข้น $8 \times 10^{-5} M$ และ $1 \times 10^{-4} M$ เท่ากับ 3.49 ± 0.15 และ 3.64 ± 0.13 ตามลำดับ ค่าทั้งสองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่จะต่างจาก PD_2 value ของ absolute ethanol อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

2.2 การศึกษาผลของ andrographolide ต่อการหดตัวของลำไส้ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า

การศึกษาโคกระตุ้นลำไส้ของหนูตะเภาให้หดตัวโดยวิธี coaxial stimulation ตามแบบของ Paton จากการทดสอบผลทางเภสัชวิทยาของ twitch response แบบนี้ ยืนยันว่าเป็นการกระตุ้น postganglionic nerve fiber (Paton, 1955) เป็นผลให้เพิ่มการหลั่ง acetylcholine จาก myenteric plexus ของ guinea pig ileum (Paton & Zar, 1968) รูปที่ 10 แสดงตัวอย่างผลการทดลองที่ได้จากการกระตุ้นลำไส้ให้หดตัวด้วยไฟฟ้า การกระตุ้นแต่ละครั้งนานประมาณ 3 นาที แล้วให้ยาสัมผัสกับลำไส้นาน 10 นาทีจึงเริ่มกระตุ้นอีกครั้ง ในรูปที่ 10a แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นลำไส้ด้วยไฟฟ้าให้เกิด twitch response โดยเว้นช่วงการกระตุ้นห่างกัน 10 นาที ไม่ทำให้ความแรงในการหดตัวของลำไส้ลดลง เป็นการยืนยันว่าถ้าความแรงในการหดตัวที่เกิดจากการกระตุ้น



รูปที่ 9 cumulative log dose-response curve ซึ่งได้จากการกระตุ้นลำไส้ของหนูตะเภาด้วย acetylcholine แสดงผลในรูปของ mean และ SE. control (n = 34), ethanol (n = 6), A 8×10^{-5} M (n = 6), A 1×10^{-4} M (n = 8), atropine (n = 6) ทุก ๆ จุดของ dose-response curve หลังให้ andrographolide ทั้งสองความเข้มข้นและหลังให้ atropine แตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$

★ มีความแตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$

☆ มีความแตกต่างจาก ethanol อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$

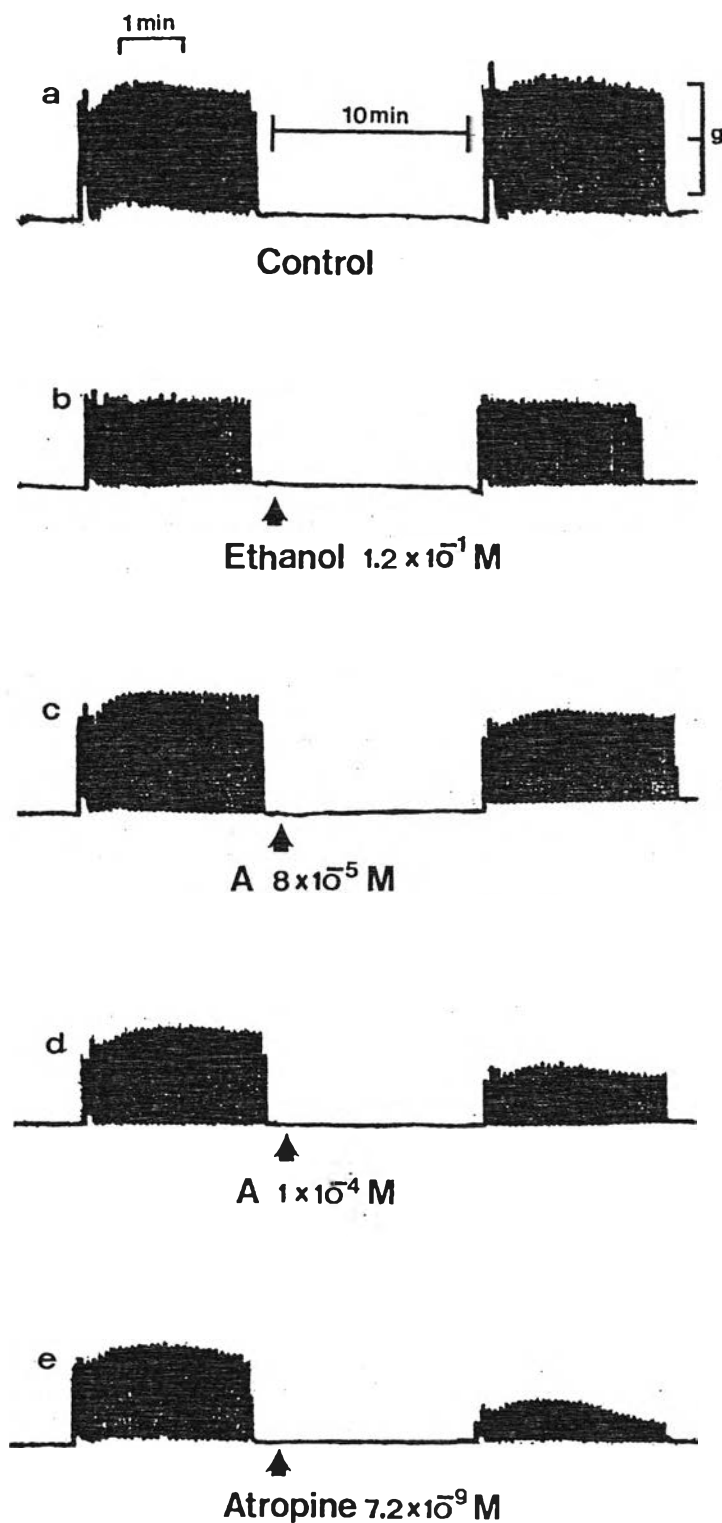
ตารางที่ 2 แสดง PD₂' values ของ andrographolide และของ absolute ethanol และ PA₂ value ของ atropine จำนวนจาก cumulative log dose-response curve ซึ่งได้จากการกระตุ้นลำไส้เล็กของหนู ตะเภอดวย acetylcholine ผลแสดงในรูป mean ± SE จำนวนการทดลองแสดงเป็นค่าในวงเล็บ

antagonist		log affinity of the antagonist	
<u>noncompetitive antagonist</u>			
A	8 x 10 ⁻⁵ M	PD ₂ '	3.49 ± 0.15 (n = 6)
A	1 x 10 ⁻⁴ M	PD ₂ '	3.64 ± 0.13 (n = 8)
Ethanol	1.2 x 10 ⁻¹ M	PD ₂ '	1.02 ± 0.22 (n = 6)
<u>competitive antagonist</u>			
Atropine	7.2 x 10 ⁻⁹ M	PA ₂	9.30 ± 0.09 (n = 6)

ครั้งที่สองลดลงต่องเป็นผลที่เกิดจากยาที่โทไมโซลันเกิดจากกลาเมเนอออนแรงเนื่องจากการกระตุ้น การทดลองได้ศึกษาผลของ absolute ethanol เปรียบเทียบด้วย (รูป 10b) absolute ethanol ทำให้ความแรงของการหดตัวลดลง $2.82 \pm 4.93\%$ ดังแสดงในรูปที่ 11 ซึ่งแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ของแรงหดตัวก่อนโทยา เมื่อทดสอบทางสถิติแล้วไม่มีความแตกต่างจากผลก่อนโท absolute ethanol อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) andrographolide สามารถลด twitch response ได้ตามขนาดของยาที่โท (รูป 10c,d) พบว่า andrographolide ความเข้มข้น $8 \times 10^{-5}M$ และ $1 \times 10^{-4}M$ สามารถลดความแรงของการหดตัวได้ $22.75 \pm 2.87\%$ และ $44.06 \pm 4.27\%$ ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 11 เมื่อทดสอบทางสถิติแล้วปรากฏว่าแตกต่างจากผลก่อนโทยาและผลของ absolute ethanol อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในรูปที่ 10e แสดงให้เห็นว่า atropine $7.2 \times 10^{-9}M$ สามารถลดแรงหดตัวของลำไส้ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าอย่างเด่นชัด โดยสามารถลดแรงหดตัวได้มากถึง $58.90 \pm 4.65\%$ (รูปที่ 11) เมื่อทดสอบทางสถิติแล้วแตกต่างจากผลก่อนโทยาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากผลการทดลองของ atropine เป็นการยืนยันได้ว่า การกระตุ้นลำไส้หนูตะเภาที่หดตัวโดยวิธี coaxial stimulation นั้นเป็นผลจากการกระตุ้น postganglionic neuron แล้วทำให้หลั่ง acetylcholine เพราะ atropine สามารถยับยั้งการหดตัวแบบนี้ได้อย่างเด่นชัดดังผลการทดลองในรูปที่ 10e และรูปที่ 11

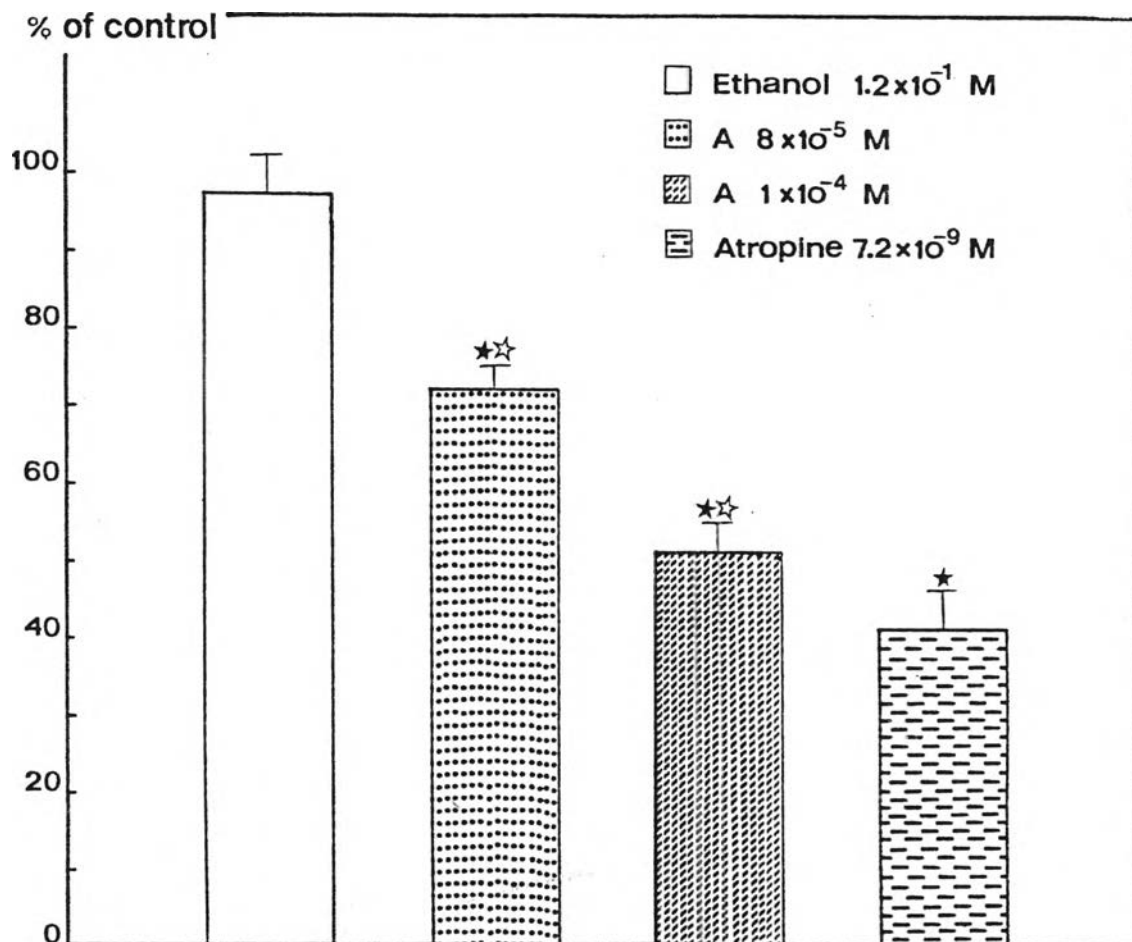
2.3 ศึกษาผลของ andrographolide ต่อการออกฤทธิ์ของ histamine

มีหลักฐานมากมายยืนยันว่าผลของ histamine ที่ทำให้ guinea pig ileum หดตัว สามารถถูกยับยั้งด้วย H_1 -receptor antagonist (Bertaccini, 1982; Parsons, 1982) การทดลองจึงได้เลือก chlorpheniramine ซึ่งเป็น potent H_1 -blocking agent ด้หนึ่งในการศึกษาเปรียบเทียบกับผลของ andrographolide จากการทดลอง histamine ความเข้มข้นระหว่าง $5 \times 10^{-8}M$ - $2 \times 10^{-6}M$ เมื่อให้ยาแบบสะสมสามารถทำให้ลำไส้หดตัวเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ histamine และทำให้เกิด maximum contraction ที่ความเข้มข้นเท่ากับ $1.5 \times 10^{-6}M$ ดังแสดงในรูปที่ 12 absolute ethanol $1.2 \times 10^{-1}M$ ทำให้ dose-response curve ของ histamine เคลื่อนไปทางซ้ายเมื่อทดสอบทางสถิติพบว่า ทุก ๆ จุดของ dose-response curve เมื่อให้



รูปที่ 10

ผลของ andrographolide, absolute ethanol และ atropine ต่อแรงหดตัวของลำไส้เล็กหนูตะเภาที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าแบบ coaxial stimulation เส้นในแนวแกนนอน แสดงเวลาเป็นนาที และเส้นในแนวแกนตั้งแสดงความแรงของการหดตัวเป็นกรัม



รูปที่ 11

ผลของ andrographolide, absolute ethanol และ atropine ต่อแรงหดตัวของลำไส้เล็กหนูตะเภาที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าแบบ coaxial stimulation ethanol (n = 7), andrographolide (n = 8), atropine (n = 7)

★ มีความแตกต่างจากผลก่อนให้ยาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

$P < 0.05$

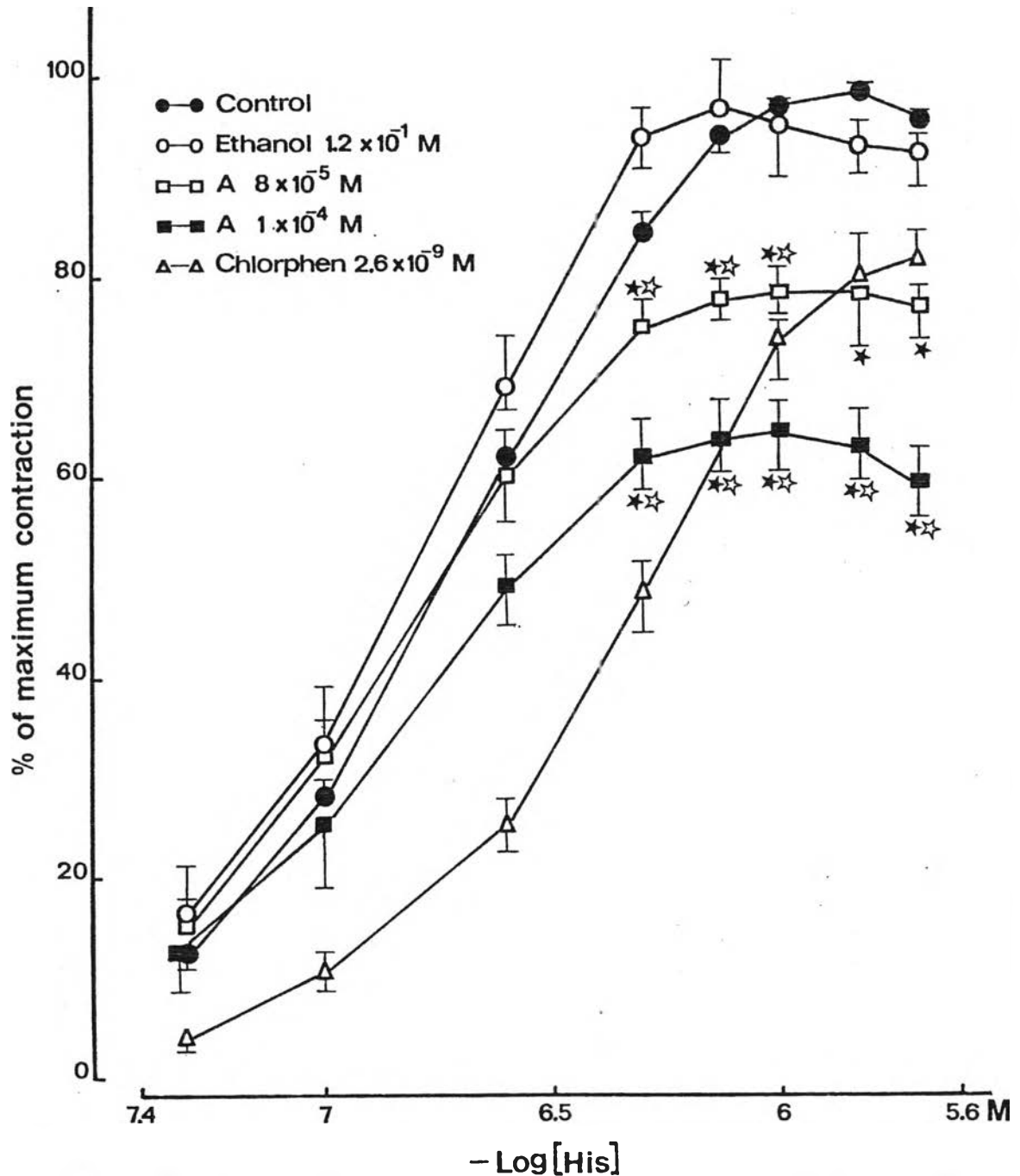
☆ มีความแตกต่างจากผลของ ethanol อย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติ $P < 0.05$



absolute ethanol ไม่มีความแตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) andrographolide สามารถลดแรงหดตัวของลำไส้ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย histamine ตามความเข้มข้นของ andrographolide ที่ให้ (รูปที่ 12) ลักษณะของ dose-response curve แสดงให้เห็นว่า andrographolide ออกฤทธิ์เป็นแบบ noncompetitive inhibition ซึ่งต่างจาก chlorpheniramine ที่ออกฤทธิ์เป็นแบบ competitive inhibition จึงทำให้ dose-response curve ของ histamine เคลื่อนไปทางขวาในลักษณะขนานกับ control หลังให้ chlorpheniramine $2.6 \times 10^{-9} M$ andrographolide ความเข้มข้น $8 \times 10^{-5} M$ และ $1 \times 10^{-4} M$ สามารถลด maximum contraction ได้ $21.42 \pm 5.26\%$ และ $35.15 \pm 7.11\%$ ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 12 หากจุดสุดท้ายของ dose-response curve หลังให้ andrographolide ทั้งสองความเข้มข้นมีความแตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จาก dose-response curve ใค้คำนวณ potencies ของยาตามวิธีการคำนวณของ VanRossum โดยแสดงในรูปของ PD_2 values สำหรับ andrographolide และ absolute ethanol และแสดงในรูปของ PA_2 value สำหรับ chlorpheniramine ดังแสดงในตารางที่ 3 PD_2 values ของ andrographolide ทั้งสองความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่แตกต่างจาก PD_2 value ของ absolute ethanol อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

2.4 ศึกษาผลของ andrographolide ต่อการออกฤทธิ์ของ barium chloride มีหลักฐานยืนยันว่าการออกฤทธิ์ของ Ba^{2+} ion โดย depolarize cell membrane (Suzuki, Nishiyama, & Okamura, 1964) ทำให้ voltage-dependent Ca^{2+} channels เปิด เป็นผลให้ Ca^{2+} ion นอกเซลล์และ membrane bound Ca^{2+} เคลื่อนเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ จึงเกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อ (Karaki, Ikeda & Urakawa, 1969; Clement, 1981; Karaki, Satake & Shibata, 1986) การศึกษาในขั้นตอนนี้จึงได้เลือก calcium antagonist ตัวหนึ่งคือ verapamil สำหรับศึกษาเปรียบเทียบกับผลของ andrographolide การทดลองได้ให้ barium chloride แบบสะสมความเข้มข้นระหว่าง $2.5 \times 10^{-5} M - 1.75 \times 10^{-3} M$ พบว่า barium chloride



รูปที่ 12 cumulative log dose-response curve ซึ่งได้จากการกระตุ้น ลำไส้เล็กหนูตะเภาให้หดตัวด้วย histamine ผลแสดงในรูปของ mean และ SE. control (n = 35), ethanol (n = 6), A 8×10^{-5} M (n = 6), A 1×10^{-4} M (n = 7), chlorpheniramine (n = 6) ทุก ๆ จุดของ dose-response curve หลังให้ chlorpheniramine ต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

* มีความแตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

☆ มีความแตกต่างจาก ethanol อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

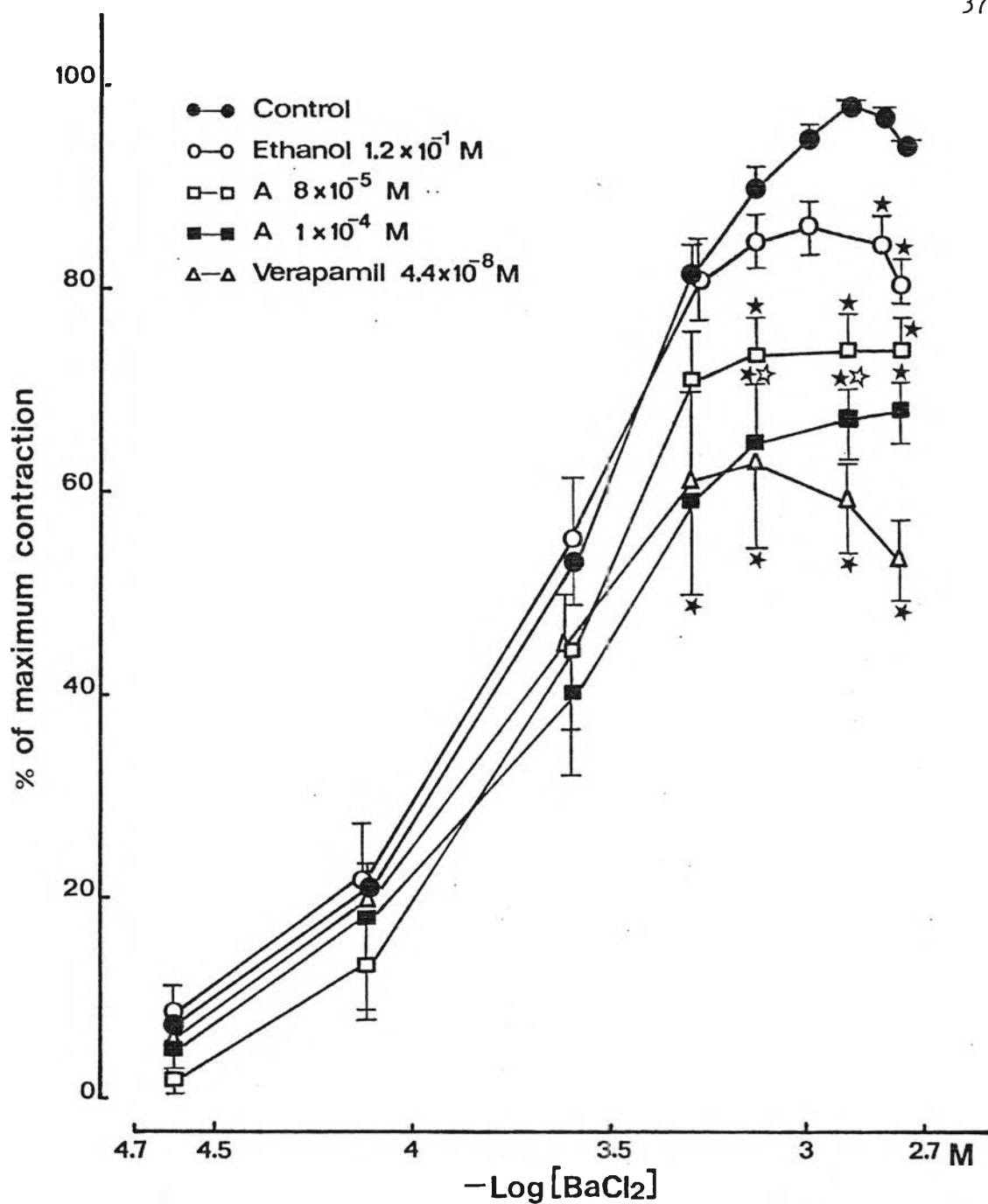
ตารางที่ 3 แสดง PD₂' values ของ andrographolide และของ absolute ethanol และ PA₂ values ของ chlorpheniramine คำนวณจาก cumulative log dose-response curve ซึ่งได้จากการกระตุ้นลำไส้เล็กหนูตะเภาด้วย histamine ผลแสดงในรูป mean ± SE จำนวนการทดลองแสดงเป็นค่าในวงเล็บ

antagonist		log affinity of the antagonist	
<u>noncompetitive antagonist</u>			
A	8 x 10 ⁻⁵ M	PD ₂ '	3.40 ± 0.12 (n = 6)
A	1 x 10 ⁻⁴ M	PD ₂ '	3.67 ± 0.15 (n = 7)
Ethanol	1.2 x 10 ⁻¹ M	PD ₂ '	0.60 ± 0.20 (n = 6)
<u>competitive antagonist</u>			
Chlorphen	2.6 x 10 ⁻⁹ M	PA ₂	8.98 ± 0.12 (n = 6)

ทำให้ลำไส้หดตัวเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของ barium chloride ที่ให้ และทำให้เกิด maximum contraction ที่ความเข้มข้นเท่ากับ $1.25 \times 10^{-3} M$ ดังแสดงในรูปที่ 13 absolute ethanol $1.2 \times 10^{-1} M$ สามารถลดแรงหดตัวของลำไส้ที่เกิดจาก barium chloride ได้เมื่อให้ barium chloride ความเข้มข้นสูงขึ้นโดยลด maximum contraction $13.98 \pm 5.17\%$ อย่างไรก็ตามมีเพียงสองจุดสุดท้ายของ dose-response curve หลังให้ absolute ethanol ที่ต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) andrographolide สามารถลดแรงหดตัวของลำไส้ที่ถูกกระตุ้นด้วย barium chloride ตามความเข้มข้นของยาที่ให้ (รูปที่ 13) จากลักษณะของ dose-response curve แสดงให้เห็นว่า andrographolide และ verapamil ยับยั้งฤทธิ์ของ barium chloride แบบ competitive inhibition andrographolide ความเข้มข้น $8 \times 10^{-5} M$ และ $1 \times 10^{-4} M$ ลด maximum contraction ได้ $26.31 \pm 4.00\%$ และ $33.64 \pm 5.90\%$ ตามลำดับ สามารถจุดสุดท้ายของ dose-response curve หลังให้ andrographolide ทั้งสองความเข้มข้นมีความแตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) verapamil ความเข้มข้น $4.4 \times 10^{-8} M$ สามารถลด maximum contraction ได้ $37.33 \pm 8.73\%$ จุดสุดท้ายของ dose-response curve หลังให้ verapamil มีความแตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จาก dose-response curve ได้คำนวณ potencies ของยาทุกตัวในรูป PD_2 values ดังแสดงในตารางที่ 4 PD_2 values ของ andrographolide ทั้งสองความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีความแตกต่างจาก PD_2 values ของ absolute ethanol และ verapamil อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

2.5 ศึกษาผลของ andrographolide ต่อการหดตัวของลำไส้ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย calcium chloride ใน potassium-depolarizing solution

ผลของ high potassium ต่อ contractile response เกี่ยวข้องกับการนำ Ca^{2+} เข้าเซลล์หรือการปลดปล่อย Ca^{2+} โดยตรง จึงทำให้ potassium-depolarized preparation มีประโยชน์ในการศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับ coupling process ซึ่งเน้นบทบาท Ca^{2+} เป็นสำคัญ (Weiss, 1975) การศึกษาในชั้นตอนนี้จึงใช้กระตุ้นลำไส้ให้หดตัวด้วย



รูปที่ 13 cumulative log dose-response curve ซึ่งได้จากการกระตุ้นลำไส้เล็กหนูตะเภาให้หดตัวด้วย barium chloride ผลแสดงในรูป mean และ SE. control (n = 33), ethanol (n = 6), A 8×10^{-5} M (n = 7), A 1×10^{-4} M (n = 6), verapamil (n = 6)

★ มีความแตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

P < 0.05

☆ มีความแตกต่างจาก ethanol อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

P < 0.05

ตารางที่ 4 แสดง PD₂' values ของ andrographolide, absolute ethanol และ verapamil จำนวนจาก cumulative log dose-response curve ซึ่งได้จากการกระตุ้นลำไส้เล็กหนูตะเภาด้วย barium chloride ผลแสดงในรูปของ mean ± SE จำนวนการทดลองแสดงเป็นค่าในวงเล็บ

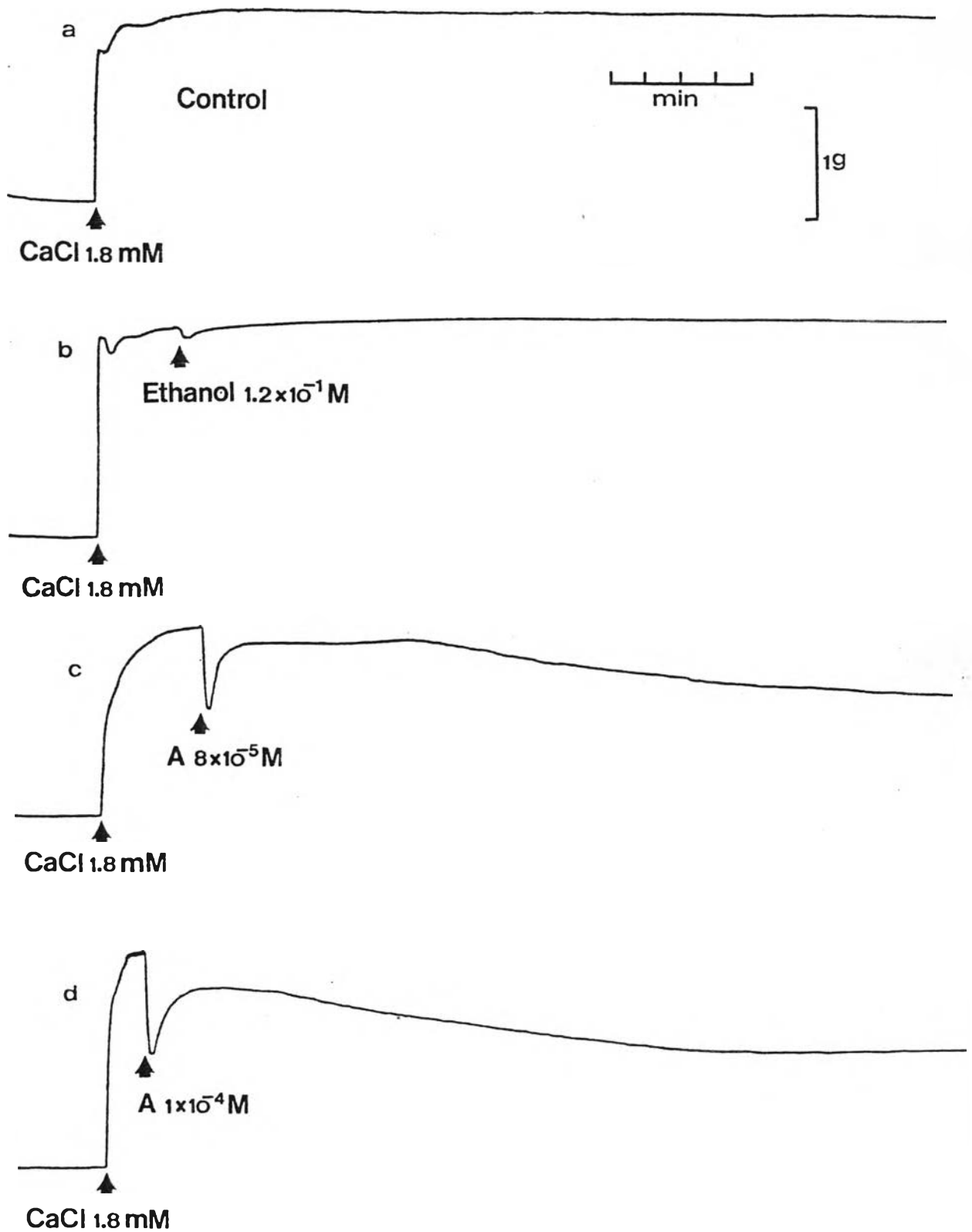
	noncompetitive antagonist	log affinity of the antagonist (PD ₂ ')
A	8 x 10 ⁻⁵ M	3.52 ± 0.09 (n = 7)
A	1 x 10 ⁻⁴ M	3.57 ± 0.16 (n = 6)
Ethanol	1.2 x 10 ⁻¹ M	0.88 ± 0.22 (n = 6)
Verapamil	4.4 x 10 ⁻⁸ M	7.06 ± 0.2 (n = 6)

calcium chloride ใน potassium depolarizing Tyrode's solution แล้วทดสอบผลของ andrographolide ต่อแรงหดตัวของลำไส้ ตัวอย่างผลการทดลองได้แสดงในรูปที่ 14 และผลการทดลองแสดงในรูปที่ 15 ซึ่งแกนตั้งเป็นแรงหดตัวโดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของ maximum contraction และแกนนอนเป็นเวลาโดยเริ่มนับเมื่อถึง maximum tension จากการทดลองเมื่อให้ calcium chloride 1.8 mM ลำไส้จะหดตัวทันทีจนถึง maximum contraction แล้วแรงหดตัวคงอยู่ระดับนี้ตลอดไป (รูปที่ 14a) จนประมาณนาทีที่ 12-18 แรงหดตัวลดลงเฉลี่ย $9.18 \pm 3.17\%$ ของ maximum tension (รูปที่ 15) ใ้ทดสอบผลของ absolute ethanol ซึ่งเป็นตัวทำลายกึ่งแสดงในรูปที่ 14b เมื่อ calcium chloride ทำให้เกิด maximum contraction แล้วให้ absolute ethanol $1.2 \times 10^{-1} M$ พบว่าแรงหดตัวลดลงในระยะแรกแล้วค่อย ๆ เพิ่มขึ้น (รูปที่ 15) หลังให้ absolute ethanol ไม่ทำให้แรงหดตัวของลำไส้แตกต่างจาก control อยางมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) จากการทดสอบผลของ andrographolide ในลักษณะเดียวกัน พบว่า andrographolide สามารถลดแรงหดตัวของลำไส้ที่เกิดจาก calcium chloride ตามความเข้มข้นของยาที่ให้ การตอบสนองของลำไส้มีลักษณะเป็นแบบ biphasic response (รูปที่ 14c,d) เมื่อให้ andrographolide แรงหดตัวลดลงอย่างรวดเร็วแล้วกลับเพิ่มขึ้นแต่ไม่ถึง maximum tension หลังจากนั้นแรงหดตัวค่อย ๆ ลดลงอีกครั้ง ในนาทีที่ 18 พบว่า andrographolide ความเข้มข้น $8 \times 10^{-5} M$ และ $1 \times 10^{-4} M$ ลดแรงหดตัวได้ $47.46 \pm 5.40\%$ และ $63.83 \pm 8.07\%$ ตามลำดับ (รูปที่ 15) ตลอดช่วงเวลาที่ยังเกิดการเปลี่ยนแปลงหลังให้ andrographolide ทั้งสองความเข้มข้นแรงหดตัวของลำไส้มีความแตกต่างจาก control อยางมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

3. ศึกษาฤทธิ์ของ andrographolide ต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็กในหนูถีบจักร

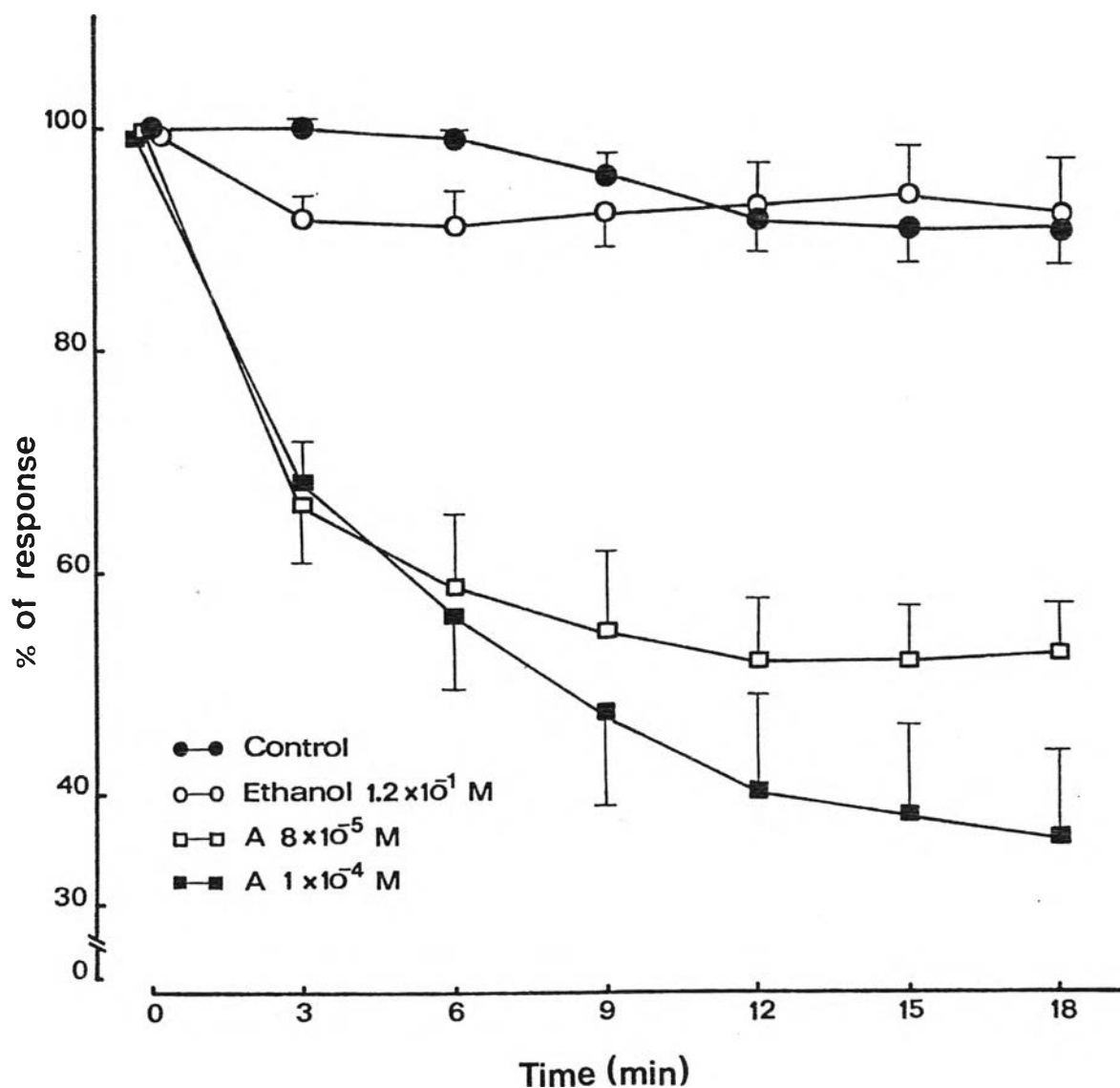
(intact experiment)

การทดลองในชั้นนี้วัตถุประสงค์คือ เพื่อทดสอบผลของ andrographolide ต่อ propulsive movement ของลำไส้เล็กของหนูถีบจักร (*in vivo*) เนื่องจากได้เปลี่ยนตัวทำละลายจาก absolute ethanol มาเป็น DMSO ซึ่งมีความสามารถในการทำละลายสูงกว่ามาก ดังนั้นในกลุ่มควบคุมจึงต้องฉีด DMSO 0.1 มล. เพื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม



รูปที่ 14

ผลของ andrographolide และ absolute ethanol ต่อแรง
 ทดตัวของลำไส้เล็กหนูตะเภาที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย calcium
 chloride ใน potassium-depolarizing Tyrode's
 solution เส้นในแนวนอนแสดงเวลาเป็นนาที และเส้นในแนว
 ด้งแสดงความแรงของการหดตัวเป็นกรัม



รูปที่ 15 ผลของ andrographolide และ absolute ethanol ต่อแรงหดตัวของลำไส้เล็กหนูตะเภาที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย calcium chloride ใน potassium-depolarizing Tyrode's solution ผลแสดงในรูป mean และ SE. หลังให้ andrographolide ทั้งสองความเข้มข้น แรงหดตัวของลำไส้มีความแตกต่างจาก control และจากผลของ ethanol อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$ control ($n = 7$), ethanol ($n = 6$), A 8×10^{-5} M ($n = 6$), A 1×10^{-4} M ($n = 7$)



ทดลอง ทดสอบผลของ andrographolide ต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้ในสภาพปกติ แล้วจะทำให้เห็นความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองไม่เคนซัค จึงต้องกระตุ้นให้ลำไส้มีการเคลื่อนไหวมากขึ้นด้วยการฉีด carbachol 1.5 มก. ต่อน้ำหนักตัว 1 กก. อีกทั้งยังเป็นการทดสอบผลของ andrographolide ต่อ carbachol ด้วย ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 5 กลุ่มควบคุมโคททดลองในหนู 20 ตัวปรากฏว่าระยะทางที่ charcoal meal เคลื่อนไปตามลำไส้คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของความยาวลำไส้เล็กโคคาเฉลี่ยเท่ากับ $50.08 \pm 3.66\%$ ในกลุ่มทดลองโคทให้ andrographolide ความเข้มข้น 0.5 และ 0.75 กรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กก. พบว่า charcoal meal เคลื่อนที่ไปได้ 33.55 ± 2.51 และ $29.38 \pm 1.36\%$ ของความยาวลำไส้เล็กตามลำดับ เมื่อทดสอบทางสถิติโดยใช้ "student's t test" กลุ่มทดลองทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า andrographolide สามารถลดการเคลื่อนไหวของลำไส้รวมทั้งยังสามารถยับยั้ง spasmogenic action ของ carbachol

4. ทดสอบหาขนาดที่ทำให้เกิดพิษของ andrographolide ในหนูถีบจักร

โคททดลองหาขนาดของ andrographolide ที่จะทำให้เกิดพิษ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ซึ่งจะนำมาประกอบการพิจารณาถึงแนวโน้มที่จะนำ andrographolide ไปใช้ในการรักษาโรคต่อไป เนื่องจาก andrographolide ไม่ละลายน้ำและละลายใน absolute ethanol โคทน้อยผสมโคทความเข้มข้นเพียง 5 มก./มล. จึงจำเป็นต้องเปลี่ยนตัวทำละลายมาเป็น DMSO ซึ่งมีความสามารถในการทำละลายสูงกว่า absolute ethanol มาก การทดลองโคทให้ andrographolide ความเข้มข้น 0.25, 0.50, 1.00, 1.50 และ 2.00 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กก. โดยฉีดเข้าช่องท้องและควบคุมปริมาตรที่ใช้ฉีดในหนูทุกกลุ่มเท่ากับ 0.15 มล. ในกลุ่มควบคุมฉีด DMSO 0.15 มล. ผลการทดลองโคทแสดงในตารางที่ 6 การตายของหนูในกลุ่มทดลองถึงแม้จะเพิ่มตามขนาดของยาที่ให้ แต่ก็พบว่าหนูในกลุ่มควบคุมซึ่งให้ DMSO อย่างเดียวก็มีการตายเช่นกัน และจากการสังเกตอาการหลังให้ andrographolide และ DMSO หนูทั้งสองกลุ่มมีอาการซึมเหมือนกัน อาการนี้จะคงอยู่ประมาณ 2-3 วัน หนูส่วนใหญ่ตายวันที่ 2-3 หลังให้ยา จากผลการทดลองยังไม่สามารถที่จะสรุปได้ว่าการตายของหนูในกลุ่มทดลองนั้นเป็นผลจาก andrographolide อย่างเดียว

ตารางที่ 5 แสดงผลของ andrographolide ต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็กในหนู
 ที่ถูกกระตุ้นด้วย carbachol 1.5 มก. ต่อน้ำหนักตัว 1 กก.

number	distance traversed (percentage of the small intestinal length)		
	control	A 0.5 g/Kg	A 0.75 g/Kg
1	38.46	30.95	42.86
2	68.75	27.78	33.33
3	77.27	31.43	22.50
4	51.16	40.63	27.14
5	37.78	33.33	39.39
6	25.61	32.56	29.87
7	52.33	38.46	32.14
8	55.00	26.19	21.52
9	45.00	28.72	28.50
10	24.39	23.86	29.63
11	55.00	29.49	25.29
12	59.46	66.67	20.99
13	64.63	13.24	30.77
14	36.11	25.00	24.14
15	72.50	26.47	24.14
16	36.59	46.59	28.92
17	46.15	28.89	25.97
18	43.90	35.71	25.88
19	79.07	62.50	43.37
20	32.56	35.14	25.00
21	-	21.25	36.49
22	-	27.50	28.57
23	-	39.29	-
mean	50.08	33.55	29.38
SE	3.66	2.51	1.36

ตารางที่ 6 แสดงผลการทดลองเพื่อหาขนาดของ andrographolide ที่ทำให้เกิดพิษ ในหนูถีบจักร โดยละลายใน DMSO และฉีดเข้าช่องท้อง

dose (g/Kg)	Experimental group		Control group	
	dead/tested	% of death	dead/tested	% of death
0.25	0/9	-	1/4	25.00
0.50	2/10	20.00	0/4	-
1.00	3/9	33.33	0/4	-
1.50	4/10	40.00	0/4	-
2.00	4/10	40.00	2/4	50.00

น่าจะมีผลของตัวทำละลายคือ DMSO รวมด้วย (ในหนูถีบจักร DMSO มี $LD_{50} > 15$ กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กก. ในการทดลองนี้ให้ DMSO 0.15 มล. เทียบเท่ากับ 6.69 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กก.) เนื่องจากมีขีดจำกัดในการผสมยาให้เข้มข้นทำให้ไม่สามารถลดปริมาณที่ใช้ฉีดให้ต่ำกว่า 0.15 มล. ด้วยเหตุนี้จึงไม่สามารถหา LD_{50} ของ andrographolide ได้

จากปัญหาของตัวทำละลายทำให้ไม่สามารถให้ andrographolide ด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง จึงได้ทำการทดลองโดยการให้ยาทางปาก ได้เตรียม andrographolide ในรูปของ suspension (ใช้ tragacanth 2%) ทดลองกับหนูถีบจักรทั้งหมด 19 ตัว โหยาทางปากด้วยขนาด 3 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กก. สังเกตอาการเปลี่ยนแปลง 3 วัน หลังให้ยา ไม่ปรากฏอาการซึม การกินอาหาร การเคลื่อนไหวและพฤติกรรมต่าง ๆ ยังคงปกติ เมื่อครบ 3 วันไม่ปรากฏว่ามีหนูตาย นอกจากนี้ยังได้ตรวจสอบอวัยวะภายในด้วยตาเปล่า พบว่า หัวใจ ปอด และทางเดินอาหาร ไม่มีความผิดปกติ