

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

andrographolide เป็นสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร ซึ่งมีหลักฐานยืนยันถึงสรรพคุณในการรักษาโรคบิดและท้องร่วง (Shamsuzzoha *et al.*, 1978; ปัญจงค์ ธนังกุล และ ชัยโย ชัยชาตพิพยุท, 2528; สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน, 2529) เนื่องจาก andrographolide สามารถสกัดได้จากสมุนไพรในปริมาณสูง จึงเชื่อว่า andrographolide น่าจะเป็นสารสำคัญในการออกฤทธิ์รักษาโรคท้องร่วงในประเทศจีนมีรายงานว่ andrographolide สามารถรักษาโรคบิดได้ผลดีรวมทั้งยังมีฤทธิ์ระงับเชื้อด้วย (สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน, 2529) แต่การรักษาโรคท้องร่วง นอกจากฤทธิ์ระงับเชื้อแล้วยังออกฤทธิ์ลดการเคลื่อนไหวของลำไส้ได้ จึงได้ตั้งสมมุติฐานว่า andrographolide อาจจะมีฤทธิ์ลดแรงบีบตัวของลำไส้ การศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของ andrographolide ต่อกล้ามเนื้อเรียบของลำไส้เล็กของกระต่าย หนูตะเภา และหนูถีบจักร

จากผลการทดสอบฤทธิ์ของ andrographolide ต่อ spontaneous contraction ของลำไส้เล็กที่แยกจากตัวกระต่าย พบว่า andrographolide สามารถลด spontaneous contraction ตามความเข้มข้นของยาที่ให้ (รูปที่ 6-8) การออกฤทธิ์ของ andrographolide จะมีผลต่อความแรงของการบีบตัวเท่านั้นแต่ไม่มีผลต่ออัตราการบีบตัว และฤทธิ์ในการลดแรงบีบตัวนี้ไม่ใช่ฤทธิ์ถาวรเมื่อดำยยาออกลำไส้สามารถบีบตัวได้แรงขึ้นอีก นอกจากนี้ andrographolide ยังลดแรงหดตัวของลำไส้เล็กหนูตะเภาที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย acetylcholine, histamine, barium chloride และ calcium chloride ใน potassium-depolarizing Tyrode's solution และที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (รูปที่ 9-15) จากการศึกษาใน *in vivo* พบว่า andrographolide ลด propulsive movement ของลำไส้เล็กหนูถีบจักร รวมทั้งยังสามารถยับยั้ง spasmogenic action ของ carbachol ด้วย (ตารางที่ 5) ผลการทดลองทั้งใน *in vitro* และ

in vivo แสดงให้เห็นว่า andrographolide มีฤทธิ์ยับยั้งการบีบตัวของลำไส้ (antispasmodic activity)

การศึกษาในลำไส้เล็กหนูตะเภาจำเป็นต้องกระตุ้นให้ลำไส้หดตัวด้วย agonist ต่าง ๆ แล้วทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของ andrographolide ต่อ agonist เหล่านั้น เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปสู่การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ andrographolide ต่อ intestinal smooth muscle จัดเป็น smooth muscle ที่สามารถ generate action potential เอง Bolton (1979 a) ได้เสนอกลไกการออกฤทธิ์ของ agonist ต่าง ๆ ต่อ smooth muscle ชนิดดังกล่าวนี้ เมื่อ agonist จับกับ receptor มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง 3 ทาง 1) ทำให้เพิ่มขนาดและระยะเวลาของ plateau phase ของ action potential จึงเพิ่มความแรงของ phasic contraction 2) มีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีเป็นผลให้ receptor-operated calcium channel เปิดจึงเพิ่ม Ca^{2+} ในเซลล์ซึ่งอาจจะเพิ่มได้อีกทางหนึ่งคือผลจาก agonist จับกับ receptor แล้วทำให้มีการปลดปล่อย bound calcium เมื่อ Ca^{2+} ในเซลล์เพิ่มเป็นผลให้เพิ่ม tension ใน contractile proteins 3) เมื่อ receptor-operated calcium channel เปิด Ca^{2+} ภายนอกเซลล์จะเคลื่อนเข้าสู่ในเซลล์ (และอาจมี Na^+ รวมด้วย) จึงเกิด depolarization ของ cell membrane เป็นการเพิ่ม action potential frequency เป็นผลให้เพิ่ม frequency of contraction ด้วยเหตุนี้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งต่อ agonists อาจจะมีกลไกการออกฤทธิ์โดยยับยั้งที่ receptor หรือจุดหนึ่งจุดใดของกระบวนการนี้ก็ได้

จากผลการทดลอง andrographolide สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ acetylcholine ต่อลำไส้เล็กหนูตะเภา การออกฤทธิ์ของ acetylcholine มีรายงานว่าอาจเกิดได้ 2 ทาง คือ 1) ออกฤทธิ์ทางตรงโดยจับกับ muscarinic receptor ที่ smooth muscle cell แล้วทำให้เกิดการหดตัว (Day & Vane, 1963; Paton & Zar, 1968) 2) ออกฤทธิ์ทางอ้อมโดยกระตุ้น intramural nerve plexus ทำให้หลั่ง acetylcholine ไปกระตุ้นกล้ามเนื้อให้หดตัว (Day *et al.*, 1963; Chiou, 1973) การออกฤทธิ์โดยตรงของ acetylcholine ที่ smooth muscle cell แล้วทำให้เกิดการหดตัว มีกลไกการเกิดที่เป็นไปได้คือ 1) เพิ่ม membrane permeability ต่อ Ca^{2+} (Durbin &

Jenkinson, 1961; Chang & Triggle, 1973; Brading & Sneddon, 1980) การกระตุ้น muscarinic receptor ทำให้เปิด receptor-operated channel Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์จึงเคลื่อนเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ เมื่อ Ca^{2+} ในเซลล์เพิ่มจึงเกิด muscle contraction (Bolton 1971; 1979 a,b) 2) เกิด depolarization ที่ cell membrane เป็นผลให้มี ion influx คือ Na^+ และ Ca^{2+} ผ่าน voltage-dependent ion channel จึงเพิ่มความถี่ของการเกิด action potential ทำให้กล้ามเนื้อหดตัวถี่ขึ้นและแรงขึ้น (Burgin & Spero, 1968; Bolton, 1979 b; Brading *et al.*, 1980) ลักษณะการตอบสนองต่อ acetylcholine ประกอบด้วย 2 components คือ phasic contraction โดยใช้ calcium จาก labile bound source ที่ cell membrane และ sustained tonic contraction โดยใช้ calcium จากภายนอกเซลล์ (Chang *et al.*, 1973; Takayanagi, Hongo & Kasoya, 1977) จากผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 9 andrographolide สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ acetylcholine ได้ในลักษณะ noncompetitive antagonism และต่างจากการออกฤทธิ์ของ atropine ซึ่งเป็นแบบ competitive antagonism แสดงให้เห็นว่า andrographolide ไม่ได้ ออกฤทธิ์โดยแย่ง acetylcholine จับที่ receptor ดังนั้นการออกฤทธิ์น่าจะเป็น post-receptor event โดยอาจจะยับยั้งที่จุดใดจุดหนึ่งของกลไกการออกฤทธิ์ของ acetylcholine ที่กล้ามเนื้อแล้ว

การทดลองยังได้ทดสอบผลของ andrographolide ต่อ cholinergic action ทางอ้อมโดยกระตุ้นลำไส้ใหญ่ด้วยไฟฟ้าแบบ coaxial stimulation ตามวิธีของ Paton (1955) ได้พิสูจน์แล้วว่า twitch response แบบนี้ถูกยับยั้งโดย atropine และ anticholinesterase compound จะเพิ่ม twitch response ในขณะที่ procaine จะลด twitch response นอกจากนี้การทำให้เกิด anoxia และ cooling มีผลให้ twitch response ลดลง เพราะทั้งสองสภาวะจะทำให้ nervous tissue เกิด inactivation (Day *et al.*, 1963) จากหลักฐานเหล่านี้เป็นการยืนยันว่าการกระตุ้น ลำไส้เล็กหนูตะเภาด้วยไฟฟ้าแบบ coaxial stimulation นั้นเกิดจากการกระตุ้น parasympathetic postganglionic nerve fibers แล้วทำให้หลัง acetylcholine ไปมีผลให้เกิด contraction มีรายงานว่าถ้าเอา myenteric plexus ออกจาก

longitudinal muscle strip ของ guinea pig ileum จะไม่ตอบสนองต่อ electrical stimulation รวมทั้งไม่พบ spontaneous acetylcholine output จึงเชื่อว่า acetylcholine ที่หลั่งจากการกระตุ้นแบบ coaxial stimulation นั้นมาจาก myenteric plexus เป็นส่วนใหญ่ (Paton *et al.*, 1968) ผลการทดลองในรูปที่ 10 และ 11 แสดงให้เห็นว่า andrographolide สามารถลด twitch response ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าตามความเข้มข้นของยาที่ให้ ได้ศึกษาผลของ atropine ต่อการหดตัวเพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์กับ andrographolide และเพื่อเป็นการยืนยันว่าการหดตัวของลำไส้ที่เกิดจากการกระตุ้นแบบนี้เป็นผลจากการกระตุ้น postganglionic neurons จะเห็นว่า atropine สามารถลดแรงหดตัวของลำไส้ได้อย่างเด่นชัด มีรายงานว่าใน guinea pig intestine พบ muscarinic receptor 2 subtypes โดย subtype หนึ่งอยู่ที่ nerve ending อีก subtype หนึ่งอยู่ที่ smooth muscle cell receptor ทั้งสอง subtypes มีการตอบสนองต่อ agonist ต่างกันในขณะที่มี affinity ต่อ antagonists เท่ากัน (Burgin *et al.*, 1968; Bolton, 1979 b) ด้วยเหตุนี้ atropine อาจจะออกฤทธิ์ได้ 2 ทางคือ ยับยั้งการหลั่งของ acetylcholine ที่ nerve ending และแย่ง acetylcholine จับกับ receptor ที่ postsynaptic membrane ผลการทดลองยังไม่สามารถยืนยันได้ว่า andrographolide ออกฤทธิ์ที่ pre- หรือ postsynaptic membrane เพียงแห่งเดียว จึงอาจเป็นไปได้ว่า andrographolide อาจ จะออกฤทธิ์ยับยั้งทั้งสองจุดเช่นเดียวกับ atropine แต่มีกลไกการออกฤทธิ์ที่ต่างกัน

histamine เป็นสารอีกตัวหนึ่งที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มีหลักฐานยืนยันผลของ histamine ต่อ guinea pig ileum เป็นไปได้ 2 ทางคือ 1) indirect action ทำให้เกิด fast unsustained contraction เมื่อให้ histamine small dose เป็นผลจากการกระตุ้น intrinsic nervous plexus ให้หลั่ง acetylcholine ไปทำให้กล้ามเนื้อหดตัว 2) direct action ทำให้เกิด sustained contraction เกิดจากการกระตุ้น H_1 -receptor ที่ cell membrane ของ smooth muscle นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า direct action ของ histamine มีผลที่ longitudinal smooth muscle cell ขณะที่ indirect action มีผลที่ nervous plexus ใน circular smooth muscle (Brownlee & Harry, 1963; Harry, 1963; Bertaccini, 1982;

Parsons, 1982) อย่างไรก็ตาม direct action ของ histamine จะแรงกว่า indirect action โดยสนับสนุนจากผลการทดลองที่พบว่า [^3H] mepyramine binding ใน longitudinal muscle สูงกว่าใน circular muscle ถึง 7 เท่า (Chang, Tran & Snyder, 1979; Bertaccini, 1982) กลไกการออกฤทธิ์ของ histamine ที่ smooth muscle cell คือ เมื่อ histamine จับกับ H_1 -receptor จะเกิดการเปลี่ยนแปลง membrane permeability ทำให้ Na^+ และ Ca^{2+} เคลื่อนเข้าสู่ภายในเซลล์และยังมีผลให้ปลดปล่อย Ca^{2+} จาก intracellular site (Douglas, 1980) นอกจากนี้ histamine ยังทำให้เกิด depolarization และเพิ่ม action potential discharge รวมทั้งทำให้ plateau phase ของ action potential ยาวนานขึ้น เป็นการชี้ให้เห็นว่า histamine น่าจะมีผลต่อ potential-sensitive ion channel จึงทำให้เกิด Na^+ และ Ca^{2+} influx เมื่อ Ca^{2+} ภายในเซลล์เพิ่มจากทั้ง 3 กระบวนการดังกล่าว ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อ (Bolton, 1979 a) ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 12 andrographolide สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ histamine ตามขนาดของยาที่ให้ จากลักษณะของ dose-response curve หลังให้ andrographolide แสดงให้เห็นว่า andrographolide ออกฤทธิ์เป็นแบบ noncompetitive antagonism ซึ่งต่างจาก chlorpheniramine ที่ออกฤทธิ์แบบ competitive antagonism คือจะแย่ง histamine จับที่ H_1 -receptor ดังนั้นการออกฤทธิ์ของ andrographolide น่าจะเป็น post-receptor event โดยอาจจะยับยั้งที่จุดหนึ่งจุดใดของกลไกการออกฤทธิ์ของ histamine ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น

ในการศึกษาไตทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของ andrographolide ต่อ barium chloride ซึ่งเป็นสารกระตุ้นที่ไม่ได้ออกฤทธิ์ผ่าน specific receptor มีรายงานยืนยันผลของ barium ต่อ guinea pig ileum ว่า barium กระตุ้น innervated longitudinal strips มากกว่า denervated longitudinal strips จึงเชื่อว่า barium น่าจะออกฤทธิ์อีกทางหนึ่งโดยกระตุ้น nerve plexus แล้วทำให้เกิดการหลั่ง acetylcholine (Paton, 1968) ต่อมาได้มีหลักฐานยืนยันว่า atropine ไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ barium chloride ต่อ guinea pig ileum (Antonio, Silva & Yashuda, 1973) ยังพบว่า botulinum toxin (block acetylcholine release), tetrodotoxin

(block neuronal conduction), hemicholinium (block acetylcholine synthesis) และ black widow spider venom (ลิด neurotransmitter ใน presynaptic neuron) ไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ barium chloride ได้ จึงมีข้อสรุปว่า barium chloride ไม่ได้ออกฤทธิ์โดยกระตุ้น nerve plexus ใต้หลัง acetylcholine (Clement, 1981) barium มีกลไกการออกฤทธิ์โดยทำให้ cell membrane ของ smooth muscle เกิด prolongation of depolarization (Suzuki *et al.*, 1964) เป็นผลให้ voltage-dependent Ca^{2+} channel เปิด จึงทำให้ Ca^{2+} ภายนอกเซลล์และ membrane bound Ca^{2+} เคลื่อนเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ เมื่อ Ca^{2+} ภายในเซลล์เพิ่มจึงเกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อ (Karaki *et al.*, 1969; Clement, 1981; Karaki *et al.*, 1986) มีหลักฐานยืนยันว่า barium สามารถเคลื่อนผ่าน voltage-dependent Ca^{2+} channel ได้ (Yoshino & Yabu, 1985) แต่ยังไม่ทราบบทบาทของ barium ที่เคลื่อนเข้าสู่ภายในเซลล์ มีการเสนอแนะว่าอาจจะไปมีผลทำให้ปลดปล่อย intracellular calcium หรือ มีผลกระตุ้น contractile protein โดยตรง (Yukisada & Ebashi, 1961; Clement, 1981) ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 13 andrographolide สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ barium chloride แบบ noncompetitive antagonism ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับ verapamil การออกฤทธิ์ของ verapamil โดยยับยั้ง Ca^{2+} ที่จะเคลื่อนผ่าน inward-current channel ซึ่งโดยปกติแล้วจะทำให้เกิด action potential upstroke เป็นผลให้ verapamil สามารถลดขนาดของ action potential และยับยั้งการเกิดของ action potential ดังนั้น verapamil จึงมีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ (Bolton, 1979 a) การออกฤทธิ์ของ andrographolide อาจจะมีกลไกการออกฤทธิ์เช่นเดียวกับ verapamil หรืออาจจะไปมีผลต่อ contractile protein โดยตรง

การทดลองเพื่อดูผลของ andrographolide ต่อการหดตัวของลำไส้หนูตะเภาที่ ถูกกระตุ้นด้วย calcium chloride ใน potassium-depolarizing Tyrode's solution การหดตัวของลำไส้ในลักษณะนี้เป็นผลจาก high potassium ซึ่งจะลด potassium gradient ระหว่าง membrane จึงทำให้ลด membrane potential หรือเกิด depolarization นั้นเอง ผลของ depolarization จะทำให้ potential-dependent



ion channel เปิด ทั้ง Na^+ และ Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์เคลื่อนเข้าสู่ภายในเซลล์ (Bolton, 1979 a) นอกจากนี้ยังมีผลทำให้มีการปลดปล่อย Ca^{2+} จาก cellular site (Urakawa & Holland, 1964; Karaki *et al.*, 1969) เมื่อ Ca^{2+} ภายในเซลล์เพิ่มจะนำไปสู่การหดตัวของกล้ามเนื้อ มีรายงานว่า high potassium จะทำให้เกิดการตอบสนอง 2 แบบคือ phasic contraction จะใช้ Ca^{2+} ที่ปลดปล่อยจาก cellular site และ tonic contraction จะใช้ Ca^{2+} ที่เคลื่อนจากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ (Urakawa *et al.*, 1964; Pfaffman, Urakawa & Holland, 1965; Karaki *et al.*, 1969; Bolton, 1979 a) จากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 14 และ 15 andrographolide สามารถลด tonic contraction ของลำไส้หนูตะเภาที่เกิดจาก high potassium ได้ตามความเข้มข้นของยาที่ให้ เมื่อให้ andrographolide การหดตัวของลำไส้จะมีลักษณะเป็น biphasic response การลดลงของ tension ทันทีที่ให้อาจจะมีผลของ absolute ethanol ซึ่งเป็นตัวทำลายรวมด้วย เพราะจากการทดสอบผลของ absolute ethanol หลาย ๆ ครั้ง พบว่า absolute ethanol เองก็สามารถทำให้ tension ลดลงทันทีเช่นกัน แล้ว tension จะเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ จนเกือบถึง maximum contraction ในการทดลองนี้ andrographolide อาจจะถูกฤทธิ์โดยไปยับยั้ง Ca^{2+} ภายนอกเซลล์ที่จะเคลื่อนเข้าสู่ภายในเซลล์โดยผ่าน potential-dependent calcium channel เพราะ tonic contraction ที่เกิดจาก high potassium จะขึ้นกับ Ca^{2+} ภายนอกเซลล์ดังกล่าวมาแล้ว มีหลักฐานยืนยันว่าผลจาก depolarization ที่เกิดจาก high potassium จะทำให้ปล่อย neurotransmitter จาก nerve-ending ได้ (Paton *et al.*, 1968; Bolton, 1979 a) เนื่องจาก guinea pig ileum ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จัดเป็น innervated preparation จึงอาจเป็นไปได้ว่า tension ส่วนหนึ่งนั้นเป็นผลจาก high potassium กระตุ้นให้ปล่อย acetylcholine ผลการทดลองยังไม่สามารถยืนยันได้ว่า andrographolide ออกฤทธิ์ยับยั้งที่ pre- หรือ postsynaptic membrane เพียงแห่งเดียวจึงอาจจะเป็นไปได้ว่า andrographolide ออกฤทธิ์ยับยั้งทั้งสองจุด แล้วทำให้ tension ลดลงอย่างเด่นชัดดังผลการทดลอง

เนื่องจากในการทดลองได้ใช้ absolute ethanol เป็นตัวทำลายของ andrographolide ฉะนั้นการทดลองทุกขั้นตอนจึงต้องทดสอบผลของ absolute ethanol

เปรียบเทียบควม มีรายงานถึงผลของ ethanol ต่อ guinea pig ileum longitudinal muscle strip พบว่า ethanol ความเข้มข้น 35-260 mM สามารถลดแรงหดตัวของ longitudinal muscle ที่ถูกกระตุ้นโดย acetylcholine, potassium chloride, barium chloride และยังมีลด twitch response ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า แต่ไม่มีผลต่อ binding ที่ muscarinic receptor จึงคิดว่า ethanol น่าจะยับยั้งกระบวนการหลังจากเกิด receptor activation แล้ว (Clement, 1980) นอกจากนี้ยังมีรายงานการทดลองผลของ ethanol ต่อ canine gastric antral circular muscle พบว่า ethanol ความเข้มข้น 17-260 mM สามารถลด frequency, amplitude และ plateau phase ของ slow wave รวมทั้งมีผลยับยั้ง phasic contraction ที่เกิดจาก acetylcholine และยังพบว่า ethanol ลด ^{45}Ca ที่จะเคลื่อนเข้าสู่อภายในเซลล์ จึงเชื่อว่า ethanol ออกฤทธิ์โดยยับยั้ง transmembrane Ca^{2+} flux (Sanders & Bauer, 1982) จากผลการทดลองทุกขั้นตอนพบว่า absolute ethanol $1.2 \times 10^{-1}\text{M}$ สามารถลดแรงหดตัวของลำไส้แต่เมื่อทดสอบทางสถิติแล้วไม่มีความแตกต่างจากภาวะก่อนให้ absolute ethanol อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ยกเว้นผลต่อ acetylcholine เท่านั้น อย่างไรก็ตามสารละลาย andrographolide ก็สามารถลดแรงหดตัวของลำไส้ได้มากกว่า absolute ethanol โดยเฉพาะเมื่อให้ความเข้มข้น $1 \times 10^{-4}\text{M}$ ผลต่อแรงหดตัวของลำไส้จะแตกต่างจากผลของ absolute ethanol อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทุกการทดลอง และจากผลการทดลองในหนูถีบจักรสามารถลด propulsive movement ได้ เป็นการยืนยันว่า andrographolide มี antispasmodic activity ทั้งผลต่อ spontaneous contraction ของลำไส้กระต่าย (รูปที่ 7) andrographolide สามารถแสดงผลได้อย่างเด่นชัด

จากผลการทดลองในลำไส้หนูตะเภา andrographolide สามารถยับยั้งการหดตัวของลำไส้ที่ถูกกระตุ้นด้วยวิธีการต่าง ๆ และไม่ได้แสดงลักษณะเฉพาะต่อ receptor ใด ซึ่งให้เห็นว่า andrographolide ออกฤทธิ์แบบ nonspecific antagonism คือ site of action ที่ andrographolide ออกฤทธิ์ยับยั้งสารต่าง ๆ ต้องเป็นกระบวนการเดียวกัน และมีผลลดแรงหดตัวของลำไส้ จาก cumulative dose-response curve ของ acetylcholine, histamine และ barium chloride ได้คำนวณ PD_2 values ของ

andrographolide ดังแสดงในตารางที่ 2-4 จะเห็นว่า PD_2 values ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกันและไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และจากรายงานการออกฤทธิ์ของ barium chloride ยืนยันว่าไม่มีผลต่อ nerve plexus จุดนี้ น่าจะชี้ให้เห็นว่า andrographolide อาจจะไม่ได้ออกฤทธิ์ยับยั้งที่ nerve plexus โดยมผลที่ smooth muscle cell เพียงแห่งเดียว และน่าจะยับยั้งกระบวนการหลังจากการเกิด receptor activation แล้ว จากสูตรโครงสร้างของ andrographolide ดังแสดงในรูปที่ 2 เมื่อวิเคราะห์ลักษณะสูตรโครงสร้างจะเห็นว่าตรงตำแหน่ง C_{16} เป็น carbonyl group ทำให้ Oxygen ที่อยู่ตรงตำแหน่งนี้มีแนวโน้มที่จะมีประจุเป็นลบและ C_{16} มีแนวโน้มที่จะมีประจุเป็นบวก จึงอาจทำให้ double bond ที่อยู่ระหว่าง C_{12} และ C_{13} เป็น reactive double bond ได้ ซึ่งอาจสามารถเกิดปฏิกิริยาที่ active site ของ proteins บางตัวใน tissue เป็นผลให้ function ของ tissue เปลี่ยนไป โดยได้มุ่งจุดสนใจไปที่ sulfhydryl group ซึ่งเป็น group ที่สามารถถูก reduce หรือ oxidize ได้ง่าย

จากรายงานว่า sulfhydryl reacting compound สามารถยับยั้ง electrical activity ของ electroplax โดยเสนอแนะว่าสารนี้อาจจะไปทำปฏิกิริยากับ sulfhydryl group ที่จุดหนึ่งจุดใดของ acetylcholine-activated permeability system (Karlin & Bartels, 1966) และ พบว่า dithiothreitol (DTT) ซึ่งเป็นสารที่จะ reduce disulfide linkages ไปเป็น sulfhydryl group สามารถ potentiate effect ของ histamine ใน rabbit aorta เนื่องจาก DTT ทำให้เกิด potentiation โดยไป reduce disulfide bridge ที่จุดหนึ่งจุดใดของกระบวนการซึ่งเชื่อมระหว่าง H_1 -receptor กับ contractile mechanism (Fleisch, Krzan & Titus, 1973; Bertaccini, 1982) จากแนวความคิดดังกล่าวจึงได้ทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อพิสูจน์สมมุติฐานที่ว่า andrographolide อาจจะถูกออกฤทธิ์โดยทำปฏิกิริยากับ sulfhydryl group ซึ่งมีความสำคัญต่อ tissue function และเนื่องจากมีรายงานว่า DTT เป็น sulfhydryl group protective reagent (Cleland, 1963) จึงได้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของ DTT ต่อ andrographolide โดยทำการทดลองคือ spontaneous contraction ของลำไส้เล็กที่แยกจากตัวกระต่าย ปรากฏว่า DTT ความเข้มข้น 1, 1.5

และ 2 mM ไม่สามารถยับยั้ง antispasmodic activity ของ andrographolide ได้ เป็นการยืนยันว่า andrographolide ไม่ได้ออกฤทธิ์โดยทำปฏิกิริยากับ sulfhydryl group ใน tissue

การออกฤทธิ์ของ andrographolide ที่น่าจะเป็นไปได้อีกทางหนึ่งก็คือ อาจจะไปมีผลต่อ plasma membrane โดยตรงในระยะลิบพิทลิ่งนักวิจัยได้มุ่งความสนใจต่อ phospholipid กลุ่มหนึ่งใน plasma membrane คือ polyphosphoinositides ซึ่งจะประกอบด้วย phosphatidylinositol 4-phosphate และ phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) PIP₂ นี้มีบทบาทในการควบคุม Ca²⁺ ในเซลล์ ซึ่งจำเป็นต่อ muscle contraction (Abdel-Latif, 1986) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อกระตุ้น smooth muscle ให้เกิดการหดตัวด้วย high potassium, histamine และ acetylcholine จะมีการเพิ่ม phosphatidylinositol turnover ฉะนั้นกลไกการออกฤทธิ์ของ agonists เหล่านี้จะต้องมีจุดหนึ่งที่ผ่าน PIP₂ (Bolton, 1979 a) จึงมีความเป็นไปได้ว่า andrographolide อาจจะไปรบกวนกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของ PIP₂ ทำให้ลดปริมาณ Ca²⁺ ในเซลล์ที่จะนำไปสู่การหดตัวของกล้ามเนื้อ ความเป็นไปได้อีกทางหนึ่งก็คือ andrographolide อาจจะไปออกฤทธิ์ที่ contractile mechanism โดยอาจจะรบกวน regulatory protein ที่เกี่ยวกับ contraction เช่น calmodulin หรืออาจจะรบกวน contractile apparatus โดยตรงก็ได้

จากผลการทดลองเพื่อศึกษาฤทธิ์ของ andrographolide ต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็กในหนูถีบจักร (*in vivo*) พบว่า andrographolide สามารถลดการเคลื่อนไหวที่ไปของ charcoal meal ได้อย่างเด่นชัด (ตารางที่ 5) น่าจะเป็นผลจาก andrographolide ลดการบีบตัวของลำไส้เล็ก รวมทั้งยังเป็นการพิสูจน์ว่า andrographolide สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ carbachol ได้ เป็นการสนับสนุนผลการทดลองใน *in vitro* ที่พบว่า andrographolide สามารถลดแรงหดตัวของลำไส้เล็กของกระต่ายและของหนูตะเภา ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น จากการทดสอบความเป็นพิษของ andrographolide โดยการให้ยาแก่หนูถีบจักร 19 ตัวทางปากในรูปของ suspension โดยให้ยาด้วยขนาด 3 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กก. หลังให้ยาหนูทั้ง 19 ตัว ยังคงกินอาหาร เคลื่อนไหว และมีพฤติกรรมต่าง ๆ ปกติ

ไม่ปรากฏว่ามีหนูตายภายใน 3 วัน และเมื่อทำการตรวจสอบอวัยวะภายในคือ หัวใจ ปอด และทางเดินอาหารไม่พบความผิดปกติ ในประเทศจีนได้ทดลองนำ andrographolide ไปใช้ในทางคลินิก การให้ยาในแต่ละครั้งประมาณ 2 มก. ต่อน้ำหนักตัว 1 กก. (สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน, 2529) แต่ในการทดลองนี้ได้ให้ยาขนาดสูงถึง 3 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กก. แสดงว่า andrographolide น่าจะมีความปลอดภัยด้านนำไปใช้ในการรักษาโรค อย่างไรก็ตาม andrographolide อาจจะทำให้เกิดพิษได้ถ้าให้ยาระยะยาว ดังนั้นจึงควรทำการศึกษา chronic toxicity ของ andrographolide ต่อไป

สรุปและเสนอแนะ

ผลการทดลองเพื่อทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นทางเภสัชวิทยาของ andrographolide สรุปได้ว่า andrographolide สามารถลด spontaneous contraction ของลำไส้เล็กของกระต่ายได้อย่างเด่นชัด รวมทั้งยังสามารถลดแรงหดตัวของลำไส้เล็กหนูตะเภาที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย acetylcholine, histamine, barium chloride, calcium chloride ใน potassium-depolarizing Tyrode's solution และที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าแบบ coaxial stimulation andrographolide ยังมีผลลด propulsive movement ของลำไส้เล็กในหนูถีบจักร (*in vivo*) และสามารถยับยั้งฤทธิ์ของ carbachol ผลการทดลองทั้งหมดสนับสนุนซึ่งกันและกันว่า andrographolide มี antispasmodic activity และฤทธิ์ยับยั้งของ andrographolide ไม่มีความเฉพาะต่อ receptor ก็จะมีลักษณะเป็นแบบ nonspecific antagonism ด้วยเหตุนี้ site of action ของ andrographolide ในการออกฤทธิ์ยับยั้งสารต่าง ๆ น่าจะเป็นกระบวนการเดียวกัน เชื่อว่าเป็นกระบวนการภายหลังจากเกิด receptor activation แล้ว โดย andrographolide อาจจะมีผลรบกวนกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่จะนำไปสู่การหดตัวของกล้ามเนื้อ หรืออาจจะมีผลรบกวน contractile mechanism โดยตรง กลไกการออกฤทธิ์ของ andrographolide จึงควรต้องทำการศึกษากันต่อไป แม้ว่า andrographolide จะมีฤทธิ์ลดการเคลื่อนไหวของลำไส้ค่อนข้างอ่อน แต่มีรายงานจากประเทศจีนยืนยันว่า andrographolide มีฤทธิ์ระงับเชื้อบิคมเมื่อทดสอบใน *in vitro* (สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน, 2529) รวมทั้งจากการทดลองนี้แสดงว่า

andrographolide น่าจะมีความปลอดภัยถ้านำไปใช้รักษาโรค ดังนั้นจึงน่าจะมีแนวโน้มที่จะนำ andrographolide ไปใช้เป็นยารักษาโรคบิดและท้องร่วงเพราะ andrographolide สามารถออกฤทธิ์รักษาโรคได้ถึง 2 ทางคือ ทำลายเชื้อซึ่งเป็นสาเหตุของโรคและลดการเคลื่อนไหวของลำไส้ อย่างไรก็ตาม andrographolide อาจจะมีฤทธิ์ไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มของร่างกาย จึงทำให้ฤทธิ์ในการทำลายเชือนั้นแรงกว่าเมื่อทดสอบใน *in vitro* ก็ได้ จึงควรทำการศึกษาฤทธิ์ของ andrographolide ในด้านนี้ด้วย รวมทั้งศึกษา chronic toxicity ของ andrographolide และฤทธิ์ต่อระบบอื่นของร่างกาย เพื่อจะได้นำมาเป็นข้อพึงระวังเมื่อนำ andrographolide ไปใช้ในการรักษาโรค andrographolide สามารถสกัดได้จากสมุนไพรฟ้าทะลายโจรในปริมาณค่อนข้างสูง สมุนไพรที่เหมาะสมแก่การปลูกในประเทศไทยรวมทั้งยังสามารถปลูกและกระจายพันธุ์ได้ง่าย ดังนั้นจึงสมควรอย่างยิ่งที่จะนำทรัพยากรธรรมชาตินี้มาใช้ให้เกิดประโยชน์โดยอาจใช้ในรูปแบบของสมุนไพรแห้งซึ่งเหมาะแก่งานสาธารณสุขมูลฐาน หรืออาจนำมาสกัดให้ได้สารบริสุทธิ์ andrographolide เพื่อผลิตให้อยู่ในรูปแบบของยาแผนปัจจุบัน ซึ่งจะเป็นการส่งเสริมการพัฒนาการใช้สมุนไพรให้ครบวงจรในอีกรูปแบบหนึ่ง