

บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย



กลไกการหลังแคลเซียมในการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบทั่ว ๆ ไปนั้น ในปัจจุบันเชื่อว่าเกี่ยวข้องกับแคลเซียม (Ca^{2+}) โดยแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ (intracellular calcium) ซึ่งอาจจะมาจากการปลดปล่อยจากแหล่งเก็บภายในเซลล์ (sarcoplasmic reticulum) หรืออาจจะมาจากภายนอกเซลล์

Karaki และ Weiss (1988) ได้สรุปถึงกลไกที่เกี่ยวข้องกับการหลังแคลเซียมในกล้ามเนื้อเรียบ ไว้ดังนี้คือ

1. Role of Ca^{2+} release in smooth muscle contraction
2. Mechanism of Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum

Role of Ca^{2+} release in smooth muscle contraction

ในการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบนั้น จะมีการเคลื่อนที่ของแคลเซียมจากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ซึ่ง Karaki และ Weiss ได้สรุปไว้อย่างน้อย 3 กระบวนการ (รูปภาพที่ 44) ที่แคลเซียมจากภายนอกเซลล์เคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์ดังนี้

1. Leak mechanism หรือ Resting influx

แคลเซียมที่เคลื่อนที่เข้าเซลล์โดยวิธีนี้ จะถูกเก็บสะสมไว้ที่ แหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ (sarcoplasmic reticulum) และไม่ทำให้แคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มขึ้นโดยตรง

2. Voltage-dependent Ca^{2+} channel

การเคลื่อนที่ของแคลเซียมโดยวิธีนี้จะขึ้นกับ voltage โดยเกิดการเปลี่ยนแปลง action potential ที่ผนังเซลล์ แล้วเกิด depolarization จะทำให้ Ca^{2+} channel เปิดออกแคลเซียมจึงสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ Voltage-dependent Ca^{2+} channel นี้แบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ

- 2.1 Fast-inactivating voltage-dependent Ca^{2+} channel

2.2 Slow-inactivating voltage-dependent Ca^{2+} channel

3. Receptor-linked Ca^{2+} channel

การเคลื่อนที่ของแคลเซียมโดยวิธีนี้เกิดจาก ligand จับกับ receptor ที่เฉพาะเจาะจงกับ ligand นั้น ๆ เช่น oxytocin กับ receptor ของ oxytocin เป็นต้น

Mechanism of Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum

การหลั่งของแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ (sarcoplasmic reticulum) เกิดจาก 4 กลไก ดังนี้

1. Calcium-induced calcium release (CCR)

เกิดจากการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมภายนอกเซลล์ เคลื่อนที่ผ่าน fast-inactivating voltage-dependent Ca^{2+} channel เข้าสู่ภายในเซลล์ แล้วไปเหนี่ยวนำให้ sarcoplasmic reticulum หลั่งแคลเซียมออกมา

2. Caffeine-induced calcium release

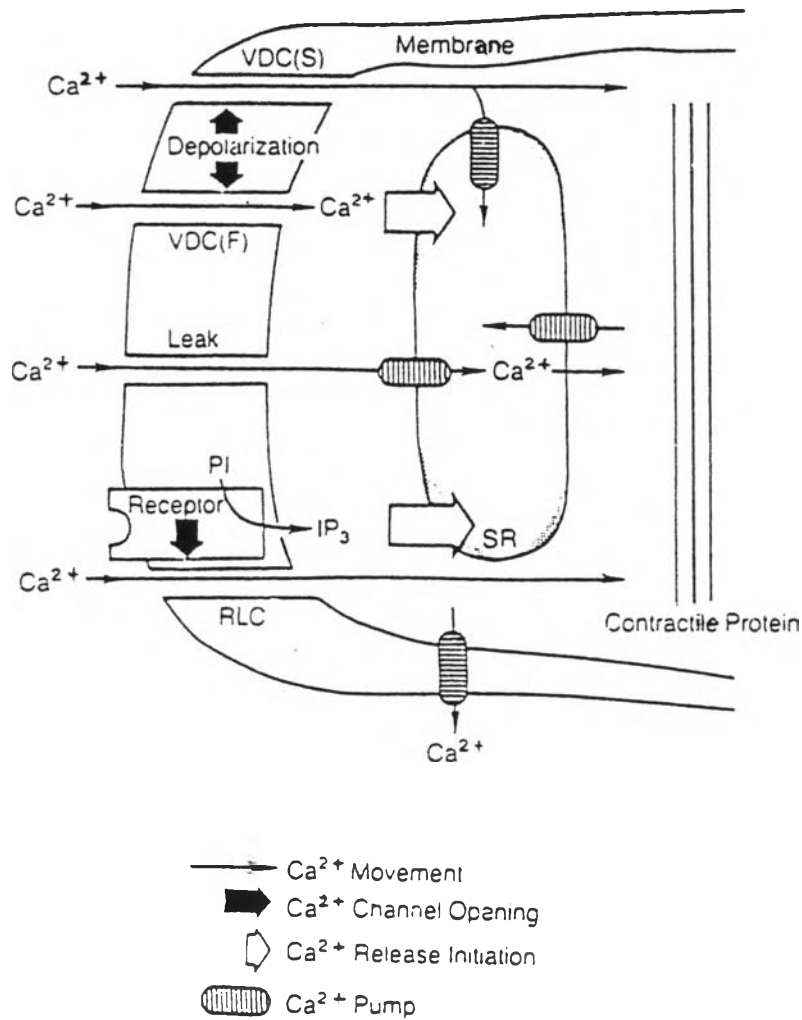
caffeine สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการหลั่งของแคลเซียมจาก sarcoplasmic reticulum ได้

3. Depolarization-induced calcium release

การเกิด depolarization ของ sarcoplasmic reticulum membrane สามารถทำให้เกิดการหลั่งแคลเซียมจาก sarcoplasmic reticulum ได้

4. Inositol triphosphate-induced calcium release

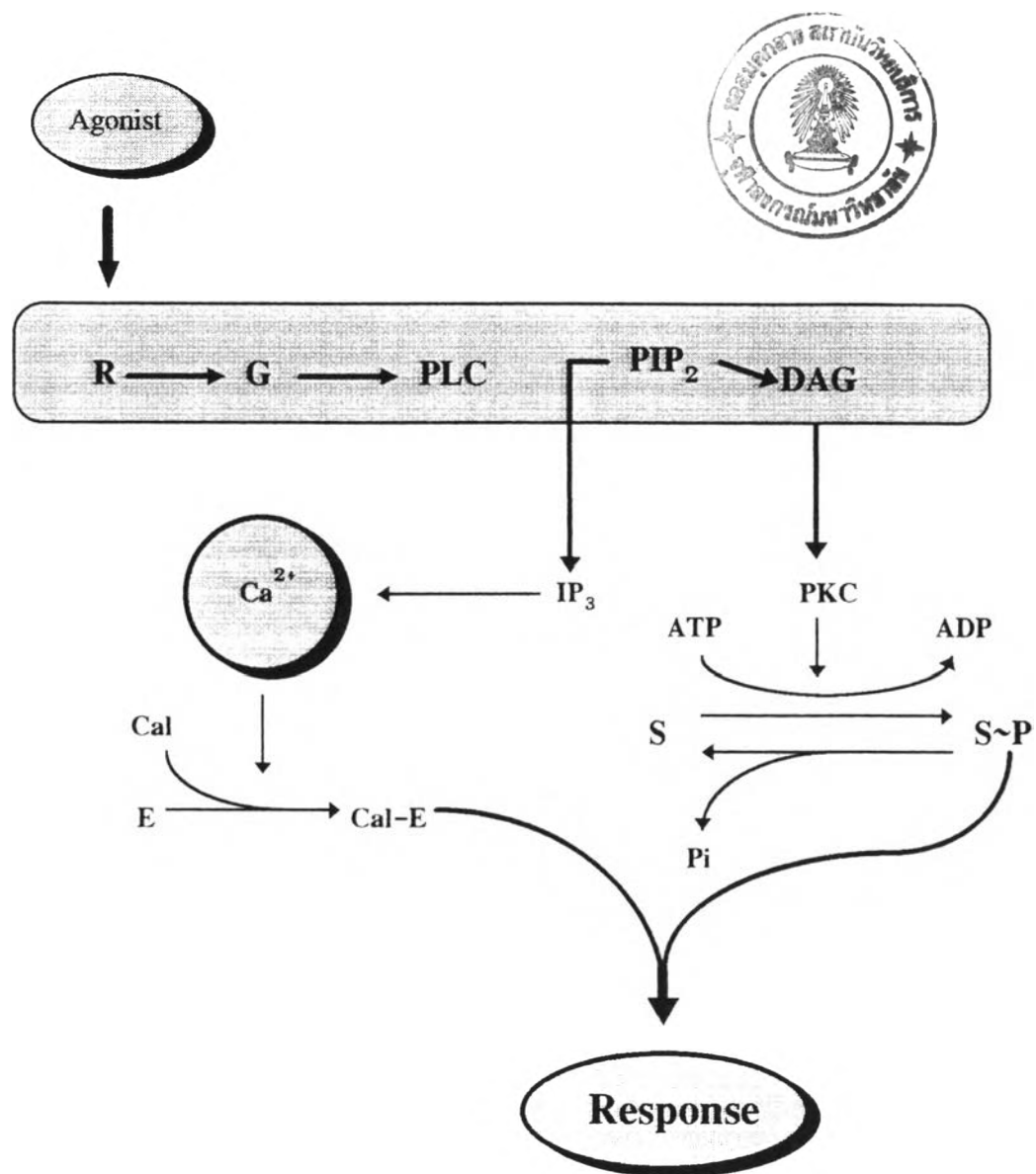
Inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3) ได้จากการ hydrolysis ของ membrane phosphoinositides (รูปภาพที่ 45) การเพิ่มขึ้นของ IP_3 ภายในเซลล์ ทำให้เกิดการหลั่งของแคลเซียมจาก sarcoplasmic reticulum



อธิบายคำย่อ

- Ca²⁺ : calcium ion
- VDC(F) : fast-inactivating voltage-dependent Ca²⁺ channel
- VDC(S) : slow-inactivating voltage-dependent Ca²⁺ channel
- RLC : receptor linked Ca²⁺ channel
- SR : sarcoplasmic reticulum
- PI : phosphatidylinositol
- IP₃ : inositol-1,4,5-triphosphate

รูปภาพที่ 44 แสดงการเคลื่อนที่ของแคลเซียมเข้าสู่เซลล์
(Karaki and Weiss, 1988)

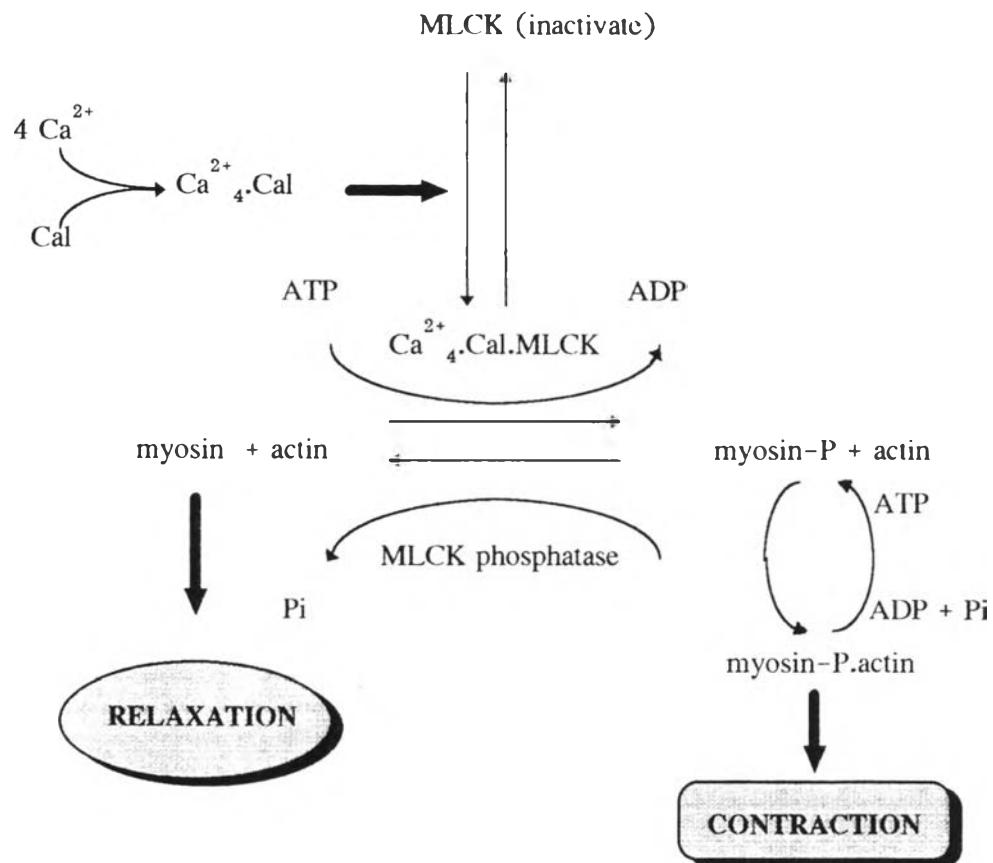


อธิบายคำย่อ

G	= G-protein	R	= receptor
PLC	= Phospholipase C	DAG	= diacylglycerol
Cal	= Calmodulin	S	= substrates of the kinase
PKC	= protein kinase C	ADP	= adenosine diphosphate
PIP ₂	= Inositol (1,4)-diphosphate	E	= enzyme
IP ₃	= Inositol (1,4,5)-triphosphate	Cal-E	= calmodulin binding enzyme
ATP	= adenosine triphosphate	S~P	= substrates phosphorylated

รูปภาพที่ 45 The Ca²⁺/phosphoinositide signaling path way

(Bourne and Roberts, 1995)



อธิบายคำย่อ

Ca^{2+}	= calcium ion
Cal	= calmodulin
MLCK	= myosin light chain kinase
myosin-P	= phosphorylated myosin
ATP	= adenosine triphosphate
ADP	= adenosine diphosphate
Pi	= gamma phosphate group

รูปภาพที่ 46 แสดงกลไกการหดตัวและคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (Murphy, 1993)

กลไกการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบทั่ว ๆ ไปนั้นมีความสัมพันธ์กับแคลเซียม แคลเซียมภายในเซลล์จะเพิ่มขึ้นโดยสิ่งกระตุ้นต่าง ๆ แคลเซียมจะไปจับกับ receptor ของแคลเซียมภายในเซลล์ก็คือ calmodulin เป็น calcium-calmodulin complex (ประกอบไปด้วย Ca^{2+} 4 ตัว และ calmodulin 1 ตัว) calcium-calmodulin complex นี้จะไปกระตุ้นให้เอนไซม์ myosin light chain kinase (MLCK) กลายเป็น calcium-calmodulin-MLCK ซึ่งจะ去做ทำให้ gamma phosphate group (Pi) จาก ATP ไปจับที่ P-light chain ของ myosin กลายเป็น myosin-P และ myosin-P นี้จะทำปฏิกิริยากับ actin เป็นผลให้เกิดการหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ

การคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบเกิดจากเมื่อหมดสิ่งกระตุ้น ก็จะทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์ลดลง ทำให้ calmodulin หลุดจาก calcium-calmodulin-MLCK (MLCK จะอยู่ในรูป inactivate) เอนไซม์ MLCK phosphatase ทำให้เกิด dephosphorylated ของ myosin-P ในสภาวะเช่นนี้ myosin ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ actin ได้ เป็นผลให้เกิดการคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (รูปภาพที่ 46) (Murphy, 1993)

สารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นส่วนที่ได้จากการสกัดด้วยเอธานอล 95 % ดังนั้นอาจจะมีสารสำคัญในการออกฤทธิ์ปะปนอยู่หลาย ๆ ตัว เพราะว่าจากการทดสอบเบื้องต้นพบสารดังต่อไปนี้

- saponin ซึ่งสามารถทดสอบเบื้องต้นโดยวิธี Froth test โดยการเขย่ากับน้ำ ทำให้เกิดฟองที่มีลักษณะคล้ายรังผึ้ง (honey comb) และฟองที่เกิดนี้จะคงทน

- สารกลุ่ม alkaloids เพราะจากการทดสอบ โดยการเติม 2 % H_2SO_4 ลงในสารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบแล้ว form salt alkaloid ให้เป็น alkaloid sulfate แล้วนำไปกรองได้สารละลายที่ใสขึ้น และนำไปแตะกระดาษกรอง แล้วหยด Dragendoff's reagent ที่กระดาษกรองบริเวณที่มีสารละลายที่ได้จากการกรอง จะเกิดการเปลี่ยนสีเป็นสีส้ม ซึ่งแสดงว่ามี alkaloids ปะปนอยู่ด้วย

เนื่องจากสารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบ ในประเทศไทยยังไม่มีเคยมีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามาก่อน การวิจัยครั้งนี้จึงเป็นในลักษณะการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นทางเภสัชวิทยาของสารสกัดนี้ จากผลการทดลองในบทที่ 3 ซึ่งเป็นผลการทดลอง in vitro แสดงให้เห็นว่าสารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบสามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ ไม่ว่าจะการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบนั้นเกิดจากการหดตัวที่เกิดขึ้นเอง (spontaneous contraction) หรือเกิดจากการให้สารกระตุ้นต่าง ๆ กระตุ้นให้เกิดการหดตัวในกล้ามเนื้อเรียบมดลูกของหนูขาว กล้ามเนื้อเรียบ

หลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาว กล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภา และตัวทำละลายสำหรับสารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสามสิบคือ 95 % ethanol จะมีผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) จากผลการทดลองที่กล่าวมาโดยสรุปทั้งหมดสามารถอภิปรายได้ดังนี้

ตอนที่ 1 การศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกของหนูขาวที่แยกจากกาย

1.1 ศึกษาผลของตัวทำละลาย (95 % ethanol) ที่ใช้สกัดสารจากรากสามสิบต่อการหดตัวของมดลูกที่เกิดขึ้นเอง (spontaneous contraction)

95 % ethanol ในปริมาตร 20 μ l ซึ่งเท่ากับปริมาตรของสารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสามสิบที่ใช้ในการศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูขาว มีผลต่อการหดตัวของมดลูกอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

1.2 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของมดลูกที่เกิดขึ้นเอง (spontaneous contraction)

ผลของสารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสามสิบ 0.2 mg/ml สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกที่เกิดขึ้นเองทั้ง tension และ frequency

1.3 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของมดลูกเมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว ACh ขนาด 5×10^{-6} M

สารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสามสิบ 0.2 mg/ml สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกทั้ง tension และ frequency ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย ACh ขนาด 5×10^{-6} M การออกฤทธิ์ของ acetylcholine นั้นสามารถอธิบายการออกฤทธิ์ได้ดังนี้

สำหรับการออกฤทธิ์ของ ACh โดยการจับกับ cholinergic receptor ซึ่งสามารถแยก cholinergic receptor ได้เป็น 2 ประเภทคือ muscarinic receptors และ nicotinic receptors บทบาทการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกเกิดผ่าน muscarinic receptors ซึ่งสามารถยับยั้งโดย atropine ในปัจจุบันได้มีรายงานการค้นพบ subtype ของ muscarinic receptors ประกอบด้วย 5 subtype โดยพบกระจายอยู่บริเวณต่าง ๆ เช่น (Pappano and Watanabe, 1995)

- M₁-subtype พบบริเวณระบบประสาท
- M₂-subtype พบบริเวณหัวใจ ระบบประสาท กล้ามเนื้อเรียบและสมองส่วนหลัง
- M₃-subtype พบบริเวณ กล้ามเนื้อเรียบ ต่อมและเนื้อเยื่อต่าง ๆ
- M₄-subtype พบที่สมอง
- M₅-subtype พบที่สมอง

กลไกการออกฤทธิ์ของ ACh ต่อ muscarinic receptors นั้น couple กับ G-protein ซึ่งสามารถอธิบายดังต่อไปนี้

- couple กับ G_p-protein (putative G protein) (หรือ G_s-protein) กระตุ้นการทำงานของ phospholipase C ส่งผลให้ระดับ second messenger คือ c-AMP และ IP₃ เพิ่มขึ้น ปรากฏการณ์นี้พบได้ที่ M₁-subtype, M₃-subtype, M₅-subtype

- couple กับ G_i-protein กระตุ้นการทำงานของ adenylyl cyclase ส่งผลให้ระดับ second messenger คือ c-AMP ลดลง และ IP₃ อาจคงที่หรือเพิ่มขึ้นเล็กน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ agonist ที่ให้ ส่วน G_k-protein couple กับ potassium channel กระตุ้นการทำงานของ PLA₂ ทำให้ระดับ lipooxygenase derived compound เพิ่มขึ้น ปรากฏการณ์นี้พบได้ที่ M₂-subtype และ M₄-subtype (Bonner, 1989; Hoover, 1994; Hulme, Birdsall and Buckley, 1990; Richards, 1991; Thomas and Ehlert, 1994; Pappano and Watanabe, 1995)

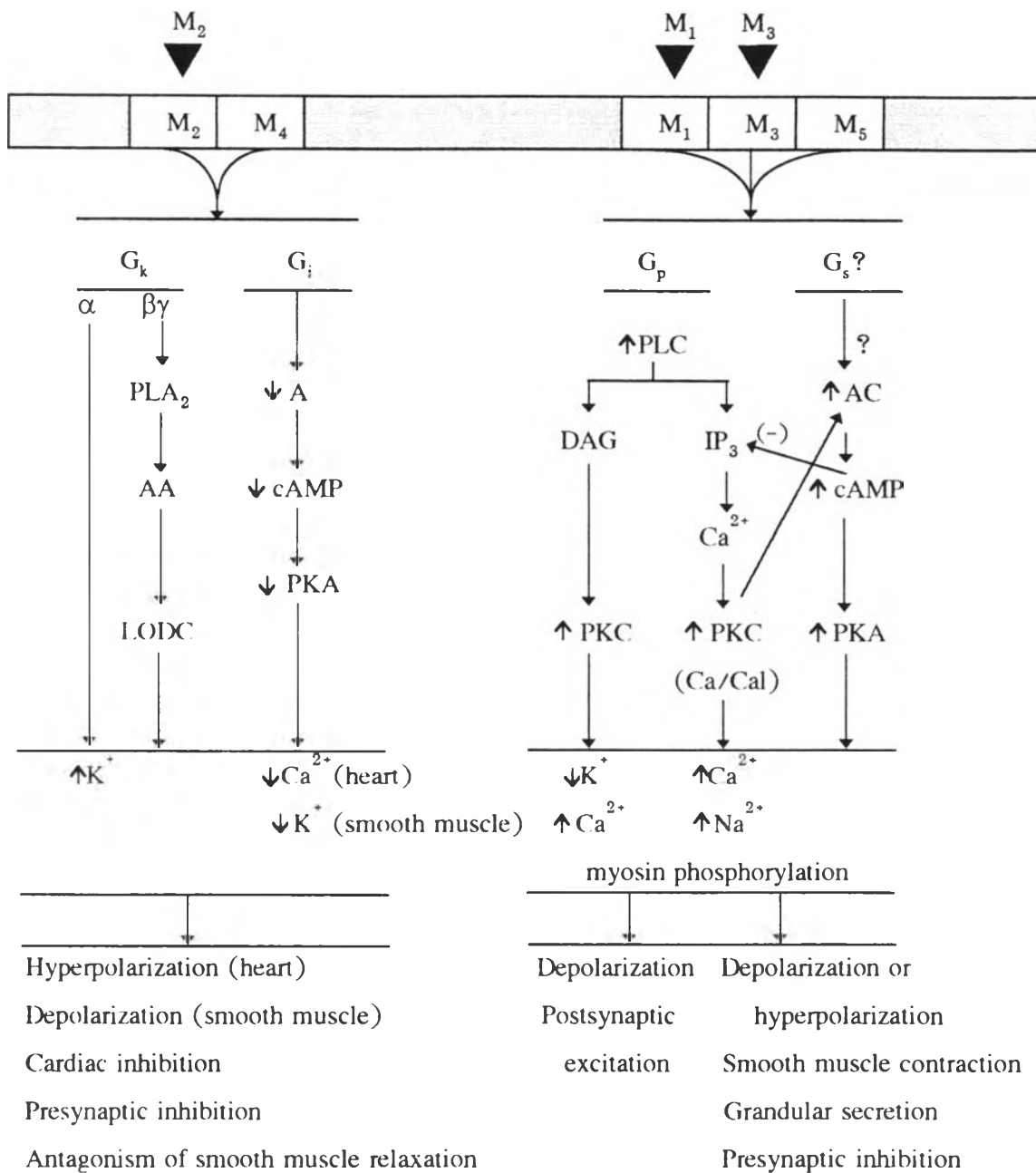
ACh สามารถทำให้แคลเซียมเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ 2 กลไกคือ

- potential operated Ca²⁺ channel (หรือ voltage-dependent Ca²⁺ channel) (Bolton, 1979a)
- receptor operated Ca²⁺ channel (หรือ receptor linked Ca²⁺ channel) (Bolton and Kitamura, 1983)

และ ACh ยังสามารถกระตุ้นการหลั่งของแคลเซียมจาก SR ภายในเซลล์ได้ (Brading and Sneddon, 1980; Casteels and Raeymaekers, 1979; Lalanne et al., 1984)

สำหรับกล้ามเนื้อเรียบมดลูกมี muscarinic receptor ชนิด M₃-subtype ซึ่ง ACh จะ couple กับ G_p-protein จะไปกระตุ้นการทำงานของ phospholipase C ทำให้ระดับของ IP₃ และ diacylglycerol (DAG) เพิ่มขึ้น การเพิ่มขึ้นของ IP₃ นั้นจะทำให้แคลเซียมในเซลล์จาก SR หลั่งออกมาสุดท้ายจึงเกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ (Lefkowitz, Hoffman and Taylor, 1991;

Rang and Dale, 1991; Pappano and Watanabe, 1995)



อธิบายคำย่อ

- AC = adenylyl cyclase
- PLC = phospholipase C
- G_k, G_i, G_p, G_s = family of G-protein
- AA = arachidonic acid
- PKA = protein kinase A
- PK(Ca/Cal) = protein kinase that is sensitive to calcium and calmodulin
- DAG = diacylglycerol
- IP₃ = inositol triphosphate
- PLA₂ = phospholipase A₂
- LODC = lipooxygenase derived compound
- PKC = protein kinase C

การที่สารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบ 0.2 mg/ml สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วย ACh (รูปภาพที่ 13) ได้นั้น น่าจะเกิดจากการที่สารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบออกฤทธิ์ยับยั้งผ่าน receptor operated Ca^{2+} channel (หรือ receptor linked Ca^{2+} channel) ซึ่งสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่แคลเซียมผ่านเข้าเซลล์ทาง Ca^{2+} channel หรืออาจจะมีผลต่อ intracellular mediators ตัวใดตัวหนึ่ง ทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์ลดลง หรืออาจจะเกิดจากหลาย ๆ กลไกดังที่ได้กล่าวมาแล้วก็ได้ เป็นผลให้การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกลดลง และกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูขาวสามารถหดตัวอีกครั้งเมื่อให้ ACh หลังจากยับยั้งการหดตัวโดยสารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบ แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการหดตัวของสารสกัดนั้นเป็นแบบไม่ถาวร

1.4 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของมดลูกเมื่อให้สารกระตุ้นการหดตัว oxytocin ขนาด 5×10^{-3} IU/ml

oxytocin เป็นฮอร์โมน ที่มีบทบาทต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก (uterus contraction) และยังช่วยในการหลั่งน้ำนม (milk ejection) กลไกการออกฤทธิ์ของ oxytocin นั้น จะออกฤทธิ์โดยจับกับ oxytocin receptor (โดยเฉพาะที่มดลูก) ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงนี้

- receptor operated Ca^{2+} channel (หรือ receptor linked Ca^{2+} channel) ทำให้แคลเซียมจากนอกเซลล์สามารถเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น (Matsuo and Uchida, 1987; Bolton, 1979b) oxytocin ไปจับกับ receptor แล้วกระตุ้นการทำงานของ phospholipase C ให้เกิดการ hydrolysis ของ inositol phospholipids ทำให้เกิด second messenger 2 ชนิดคือ DAG และ IP_3 การเพิ่มขึ้น IP_3 จะกระตุ้นให้เกิดการหลั่งของแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ (SR) (Carsten and Miller, 1985; Karibe, Oishi and Uchida, 1991)

- ยับยั้งการเก็บสะสมแคลเซียมโดย SR (Carsten, 1973; Carsten and Miller, 1977, 1987)

สารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบ 0.2 mg/ml สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วย oxytocin (รูปภาพที่ 16) ได้นั้น น่าจะเกิดจากการที่สารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการหดตัวที่ receptor และสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของแคลเซียมเข้าสู่เซลล์ หรืออาจจะไปมีผลต่อ intracellular mediators ทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์ลดลง หรืออาจจะเกิดจากหลาย ๆ กลไกดังที่ได้กล่าวมาแล้วก็ได้ ดังนั้นการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกจึงถูกยับยั้งได้ และกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูขาวสามารถหดตัวอีกครั้งเมื่อให้ oxytocin หลังจากยับยั้งการหดตัวโดยสารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบแสดงให้เห็น

เห็นว่าการยับยั้งการหดตัวของสารสกัดนั้นเป็นแบบไม่ถาวร

1.5 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของมดลูกเมื่อให้สารกระตุ้นการหดตัว oxytocin ใน calcium-free Locke Ringer solution

Oxytocin สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกในน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ปราศจากแคลเซียมและมี EGTA (Ca^{2+} -free contraction) การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก โดยวิธีนี้มีรายงานการศึกษาว่า Ca^{2+} -free contraction ที่เกิดขึ้นนั้นไม่เกี่ยวข้องกับระดับแคลเซียมภายในเซลล์ เมื่อวัดระดับแคลเซียมภายในเซลล์โดยใช้ fura-2 fluorescence และให้ quin-2 เพื่อจับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ (intracellular calcium chelator) (Matsuo et al., 1989) หรือการให้ calcium channel blocker เช่น D600 และ nifedipine พบว่าไม่มีผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก (Uchida, Sasaki and Matsuo, 1989) จากรายงานการศึกษาที่กล่าวถึงนี้สนับสนุน การศึกษา Ca^{2+} -free contraction สามารถเกิดขึ้นได้โดยไม่ต้องอาศัยการเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียมภายในเซลล์ และไม่เกี่ยวข้องกับ Ca^{2+} -calmodulin และ MLCK เพราะในการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบทั่ว ๆ ไป MLCK จะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ แต่เมื่อให้ MLCK inhibitor เช่น ML-9 หรือ KT-5926 ในการทดลองการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบทั่ว ๆ ไป พบว่าสามารถยับยั้งการหดตัวได้ แต่ใน Ca^{2+} -free contraction ของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกการให้ MLCK inhibitor นั้นจะไม่มีผลต่อการหดตัวเลย ซึ่งน่าจะกล่าวได้ว่าการเกิด phosphorylation โดย MLCK จะไม่เกิดขึ้นใน Ca^{2+} -free contraction

การศึกษาการเกิด myosin phosphorylation โดยวิธี eletrophoresis คือ pyrophosphate polyacrylamide gel eletrophoresis (PPi PAGE) และ urea-glycerol polyacrylamide gel eletrophoresis พบว่าในการศึกษา โดยวิธี PPi PAGE การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่มีแคลเซียมจะตรวจพบ one mono-phosphorylated 20 kDa light chains band (MP_1) และ two mono-phosphorylated 20 kDa light chains band (MP_2) การพบ band ดังกล่าวจะแสดงถึงการเกิด phosphorylation ของ myosin light chain แต่จะไม่พบใน Ca^{2+} -free contraction ส่วนในการศึกษาแบบ urea-glycerol polyacrylamide gel eletrophoresis การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่มีแคลเซียมอยู่ด้วยนั้น จะตรวจพบทั้ง unphosphorylated of the light chain (RLC) และ monophosphorylated of the light chain (RLCp) แต่ใน Ca^{2+} -free contraction จะไม่พบ RLCp แสดงให้เห็นว่า ใน Ca^{2+} -free contraction จะไม่เกิด phosphorylation ของ myosin light chain (Oishi et al., 1991)

ได้มีการสรุปว่า Ca^{2+} -free contraction น่าจะมีผลมาจาก protein kinase ซึ่งอาจจะเป็น

protein kinase C หรือ cytoskeletal element เพราะว่าจากการศึกษาได้ให้ protein kinase inhibitors คือ staurosporine หรือการให้ cytoskeletal inhibitors คือ cytochalasin B , cytochalasin D สามารถยับยั้ง Ca^{2+} -free contraction ได้ (Karibe et al., 1990) รายงานการศึกษาคผลของ protein kinase C มีผลต่อ Ca^{2+} -free contraction ในกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูขาว โดยการให้ diacylglycerol kinase inhibitor (R59022) จะทำให้เกิดการสะสมของ diacylglycerol ในเซลล์ การสะสมของ diacylglycerol ในเซลล์นี้จะไปทำให้ protein kinase C ถูกกระตุ้น (รูปภาพที่ 47) จะทำให้เกิด Ca^{2+} -free contraction ได้ เมื่อให้ tumor-promoting phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) เป็นระยะเวลาสั้น ๆ เมื่อกระตุ้น Ca^{2+} -free contraction ด้วย oxytocin ทำให้ Ca^{2+} -free contraction ลดลง เนื่องจาก TPA จะความสัมพันธ์กับการเกิด down-regulation ของ protein kinase C (Karibe, Oishi and Uchida, 1991)

สารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสามสิบ 0.2 mg/ml สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วย oxytocin ใน Ca^{2+} -free contraction (รูปภาพที่ 19) ได้นั้น น่าจะเกิดจากการที่สารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสามสิบออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการหดตัวของกล้ามเนื้อที่เกิดจาก protein kinase C หรือ cytoskeletal element โดยตรงก็ได้ และไม่น่าเกี่ยวข้องกับแคลเซียมใด ๆ เพราะใน Ca^{2+} -free contraction นั้นระดับแคลเซียมภายในเซลล์ไม่มีผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

ในกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูขาว กลไกในยับยั้งการหดตัวของสารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสามสิบ เมื่อกระตุ้นด้วยสารกระตุ้น ACh , oxytocin นั้นน่าจะเกิดจากการยับยั้งผ่านทาง receptor linked Ca^{2+} channel เป็นส่วนใหญ่ ส่งผลให้แคลเซียมไม่สามารถเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ หรืออาจจะเกิดจากระดับ intracellular mediators ภายในเซลล์เปลี่ยนแปลงไปทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์ลดลง หรืออาจจะเกิดจากหลาย ๆ กลไกดังที่ได้กล่าวมาแล้ว สำหรับใน Ca^{2+} -free contraction โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการหดตัวด้วย oxytocin นั้นกลไกการยับยั้งน่าจะเกิดผ่านทาง protein kinase C

ตอนที่ 2 การศึกษาคผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของหนูขาวที่แยกจากกาย

2.1 คีศึกษาคผลของตัวทำละลาย (95 % ethanol) ที่ใช้สกัดสารจากรากสามสิบต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว NE

กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาวสามารถหดตัวได้เมื่อให้สารกระตุ้น NE ตามความเข้มข้นต่าง ๆ ในลักษณะ cumulative dose แสดงให้เห็นว่า 95 % ethanol ในปริมาณ

20 μ l ซึ่งเท่ากับปริมาตรของสารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสามสิบที่ใช้ในการศึกษา มีผลต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

2.2 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว NE

เมื่อให้สารกระตุ้น NE ความเข้มข้นต่าง ๆ ในลักษณะ cumulative dose ต่อกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ ดังนั้นตำแหน่งของหลอดเลือดจึงมีผลต่อการออกฤทธิ์ของ NE เนื่องจากหลอดเลือดที่บริเวณต่างกันจะมีชนิดและปริมาณของ receptor แตกต่างกันไป การออกฤทธิ์ของ NE นั้นจะออกฤทธิ์ผ่าน adrenergic receptor ซึ่งประกอบด้วย 2 ชนิด (Bylund et al., 1994; Hoffman, 1995) คือ

1. α -adrenergic receptor สามารถแบ่งเป็น 2 subtype ได้แก่
 - α_1 -receptor ยังสามารถแบ่งได้ 4 subtype คือ α_{1A} -receptor, α_{1B} -receptor, α_{1C} -receptor และ α_{1D} -receptor
 - α_2 -receptor ยังสามารถแบ่งได้ 4 subtype คือ α_{2A} -receptor, α_{2B} -receptor, α_{2C} -receptor และ α_{2D} -receptor
2. β -adrenergic receptor สามารถแบ่งเป็น 3 subtype ได้แก่
 - β_1 -receptor พบได้ที่ heart
 - β_2 -receptor พบได้ที่ uterine , respiratory and vascular smooth muscle , human liver, skeletal muscle
 - β_3 -receptor พบได้ที่ fat cells

signal transduction ของ adrenergic receptor 3 ชนิด มีดังนี้

1. α_1 -receptor เมื่อมีการกระตุ้น receptor นี้ทำให้เกิด couple กับ G-protein ซึ่งจะไปกระตุ้นการทำงานของ phospholipase C เอนไซม์ตัวนี้สามารถ hydrolyzes phosphatidylinositol ให้กลายเป็น IP_3 (จึงทำให้ระดับ IP_3 ในเซลล์เพิ่มขึ้นเกิดการหลั่งแคลเซียมจาก SR) และ DAG ซึ่งไปกระตุ้นการทำงานของ protein kinase C (Minneman, 1988; Ruffolo et al., 1991)

2. α_2 -receptor ยับยั้งการ couple G-protein และเกิด inhibition ของ adenylyl cyclase activity

3. β -receptor β -receptor ทั้ง 3 subtype สามารถกระตุ้นการทำงานของ adenylyl cyclase ได้ และยังสามาร couple G-protein อีกด้วย (Bylund et al., 1994)

หลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาว (rat aorta) จะมี α_1 -receptor อยู่เพราะว่ามี high affinity ต่อ prazosin (α_1 -selective antagonist) (Bulbring and Tomita, 1987) และการที่ สารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบ 0.6 mg/ml สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ หลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วย NE (รูปภาพที่ 23) ได้นั้น น่าจะเกิดจากการที่ สารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการหดตัวผ่านทาง α_1 -receptor หรือ อาจมีผลต่อ intracellular mediators ทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์ลดลง

2.3 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว 5-HT

ในระยะแรก ๆ สามารถจำแนกชนิดของ 5-HT receptor ได้ 2 ชนิดคือ D receptor ซึ่งสามารถยับยั้งโดย dibenzylamine และ M receptor ซึ่งสามารถยับยั้งโดย morphine (Gaddum and Picarelli, 1957) ปัจจุบันได้มีการจำแนก 5-HT receptor ออกเป็น 7 ชนิด (Burkhalter, Julius and Frick, 1995; Hoyer et al., 1994) ดังนี้

1. 5-HT₁ receptors แบ่งแยกได้ 6 subtype คือ
 - 5-HT_{1A} พบที่ Rhae nuclei, hippocampus
 - 5-HT_{1B} พบที่ Substantia nigra, globus pallidus, basal ganglia
 - 5-HT_{1C} พบที่ Choroid, hippocampus, substantia nigra
 - 5-HT_{1Da,b} พบที่ สมอง
 - 5-HT_{1E} พบที่ cortex, putamen
 - 5-HT_{1F} พบที่ cortex, hippocampus

5-HT₁ receptors เมื่อถูกกระตุ้นจะ couple กับ G-protein ซึ่งเป็นผลให้ second messenger คือ cAMP ลดลง สำหรับ 5-HT_{1C} นั้นพบว่าไม่ได้เกี่ยวข้องกับ cAMP แต่อย่างใด แต่จะเกี่ยวข้องกับ IP₃

2. 5-HT₂ receptor แบ่งแยกได้ 2 subtype คือ
 - 5-HT_{2A} พบที่ platelet, smooth muscle, cerebral cortex
 - 5-HT_{2F} พบที่ Stomach fundus

5-HT₂ ซึ่งก็คือ D receptor ตามที่ Gaddum และ Picarelli ได้กล่าวไว้นั่นเอง จะพบ receptor ชนิดนี้ได้ทั้งที่สมอง กล้ามเนื้อเรียบ และ platelets เมื่อเกิดการจับกับ 5-HT₂ receptor แล้วส่งผลให้ receptor linked Ca²⁺ channel (หรือ receptor operated Ca²⁺ channel (ROC)) เปิด แคลเซียมจากนอกเซลล์สามารถเข้าสู่เซลล์ได้

นอกจากนี้ยังกระตุ้นการทำงานของ phospholipase C ทำให้เกิดการ hydrolysis ของ inositol phospholipids ทำให้เกิด second messenger IP₃ การเพิ่มขึ้น IP₃ จะกระตุ้นให้เกิดการหลั่งของแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ (SR) ทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มขึ้น (Gaddum and Picarelli, 1957; Rang and Dale, 1991; Zifa and Fillion, 1992; Burkhalter, Julius and Frick, 1995)

3. 5-HT₃ receptor พบได้ที่ peripheral nervous system , area postrema sensory and enteric nerves เมื่อมีการจับกับ 5-HT₃ receptor แล้วจะทำให้มีการ couple กับ ion channel (Na⁺/K⁺ ion channel) โดยตรง (Rang and Dale, 1991; Zifa and Fillion, 1992; Burkhalter, Julius and Frick, 1995)

4. 5-HT₄ receptor พบได้ที่ CNS and myenteric neurons , smooth muscle การจับกับ receptor นี้ ทำให้ระดับ cAMP เพิ่มขึ้น

5. 5-HT_{5a,b} receptor พบได้ที่ brain

6. 5-HT₆ receptor พบได้ที่ brain การจับกับ receptor นี้ ทำให้ระดับ cAMP เพิ่มขึ้น

7. 5-HT₇ receptor พบได้ที่ brain การจับกับ receptor นี้ทำให้ระดับ cAMP เพิ่มขึ้น

เมื่อให้สารกระตุ้น 5-HT ความเข้มข้นต่าง ๆ ในลักษณะ cumulative dose ต่อกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาว ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ซึ่งการหดตัวนี้น่าจะเกิดจาก 5-HT ไปจับกับ 5-HT_{2A} receptor และการที่สารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบ 0.6 mg/ml สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบได้ (รูปภาพที่ 25) น่าจะเกิดจากการมีผลต่อ 5-HT_{2A} receptor มีผลให้แคลเซียมเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลงหรือมีผลต่อ IP₃ ในเซลล์ให้ลดลงส่งผลให้แคลเซียมภายในเซลล์ลดลงด้วย

2.4 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่โดยใช้สารละลาย CaCl₂ ในสารละลาย potassium depolarizing

กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ในสภาวะ depolarizing ด้วยสารละลายที่มีโปแตสเซียมมีความเข้มข้นสูง แต่ไม่มีแคลเซียมอิสระ ($\text{high K}^+ - \text{Ca}^{2+}$ free solution) จะทำให้กล้ามเนื้อเรียบเกิด action potential เพราะ $\text{high K}^+ - \text{Ca}^{2+}$ free solution ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของโปแตสเซียมอิสระจากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ เป็นผลให้ความต่างศักย์ของเซลล์มีค่าลดลงทำให้ voltage-dependent Ca^{2+} channel เปิด (Rauwald, Brehm and Odenthal, 1994; Gouw, Wilffert and Van, 1990) แต่ยังไม่เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ เพราะยังไม่มีแคลเซียม (Ca^{2+} -free solution) และเมื่อให้แคลเซียม (cumulative dose) แคลเซียมที่ไหลจากภายนอกเซลล์นี้จะเข้าสู่ภายในเซลล์ ซึ่งเคลื่อนที่ผ่าน voltage-dependent Ca^{2+} channel ทำให้กล้ามเนื้อเรียบเกิดการหดตัว หรืออาจจะเกิดจากการปลดปล่อย NE ออกมาก็ได้ การให้ Ca^{2+} channel blocker เช่น verapamil สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของแคลเซียมจากนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ได้ โดยผ่าน voltage-dependent Ca^{2+} channel (Hof and Vuorela, 1983)

เมื่อให้แคลเซียมความเข้มข้นต่าง ๆ ในลักษณะ cumulative dose ต่อกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาว ในสารละลายที่มีโปแตสเซียมความเข้มข้นสูงที่ปราศจากแคลเซียม ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ ซึ่งการหดตัวนี้น่าจะเกิดจากแคลเซียมเคลื่อนที่ผ่าน voltage-dependent Ca^{2+} channel เข้าสู่ภายในเซลล์ได้ ระดับของแคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มขึ้นทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ และสารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบ 0.6 mg/ml สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบได้ (รูปภาพที่ 27) น่าจะเกิดจากการยับยั้งผ่านกลไก voltage-dependent Ca^{2+} channel โดยสารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบอาจจะไปยับยั้งการเคลื่อนที่ของแคลเซียมที่จะผ่านเข้ามาทาง VDC

ในกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาว กลไกการยับยั้งของสารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ เมื่อกระตุ้นการหดตัวด้วยสารกระตุ้น NE, 5-HT พบว่ากลไกหลักแล้วน่าจะเกิดจากการยับยั้งผ่านทาง receptor linked Ca^{2+} channel หรืออาจจะเกิดจากระดับของ intracellular mediators เปลี่ยนแปลงไปทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์ลดลง หรืออาจจะเกิดจากกลไกหลาย ๆ กลไกดังที่ได้กล่าวมาแล้ว สำหรับการหดตัวที่เกิดผ่านทาง voltage-dependent Ca^{2+} channel โดยการให้ โปแตสเซียมความเข้มข้นสูง พบว่าสารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบก็สามารถยับยั้งการหดตัวได้เช่นกัน ดังนั้นกลไกการยับยั้งการหดตัวของสารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบต่อกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาว ไม่มีความเฉพาะเจาะจง (non-specific antagonist)

ตอนที่ 3 การศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภาที่แยกจากกาย

3.1 ศึกษาผลของตัวทำละลาย (95 % ethanol) ที่ใช้สกัดสารจากรากสามสิบต่อการหดตัวของลำไส้เล็กส่วน ileum เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว ACh

กล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภาสามารถหดตัวได้เมื่อให้สารกระตุ้น ACh ตามความเข้มข้นต่าง ๆ ในลักษณะ cumulative dose แสดงให้เห็นว่า 95 % ethanol ในปริมาตร 20 μ l ซึ่งเท่ากับปริมาตรของสารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสามสิบที่ใช้ในการศึกษา มีผลต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

3.2 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของลำไส้เล็กส่วน ileum เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว ACh

การออกฤทธิ์ของ ACh ต่อลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภาสามารถออกฤทธิ์โดยการจับกับ muscarinic receptor ชนิด M_3 -subtype

ใน Ca^{2+} -free solution เมื่อกระตุ้น guinea-pig taenia coli ด้วย ACh พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการหลั่ง intracellular calcium จาก SR ได้ (Casteels and Raeymaekers, 1979) ACh และ carbachol สามารถ depolarized membrane ซึ่งทำให้ voltage-dependent Ca^{2+} channel ถูกเปิดออกแคลเซียมสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ ระดับแคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มขึ้น (Bolton, 1972) หรือเกิด couple กับ G_p -protein และกระตุ้นการทำงานของ phospholipase C ส่งผลให้ระดับ second messenger คือ และ IP_3 เพิ่มขึ้น การเพิ่มขึ้นของแคลเซียมภายในเซลล์ทำให้กล้ามเนื้อเรียบเกิดการหดตัว (Bonner, 1989; Hoover, 1994; Hulme, Birdsall and Buckley, 1990; Richards, 1991; Pappano and Watanabe, 1995; Rang and Dale, 1991)

การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภาเมื่อให้ ACh แบบ cumulative dose เกิดจาก ACh ไปจับกับ M_3 receptor เกิดการเพิ่มขึ้นของ เกิดจาก IP_3 แล้วทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มขึ้น หรืออาจทำให้เกิดการหลั่งแคลเซียมจาก SR

สารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสามสิบ 0.08 mg/ml สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum (รูปภาพที่ 31) ได้นั้น น่าจะเกิดจากการที่สารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสามสิบออกฤทธิ์ยับยั้งผ่าน M_3 receptor หรืออาจทำให้ระดับ IP_3 ลดลง หรือยับยั้งการหลั่งแคลเซียมจาก SR

3.3 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของลำไส้เล็กส่วน ileum เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว 5-HT

ปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าการจับกับ 5-HT₂ receptor แล้วส่งผลให้ receptor linked Ca²⁺ channel หรือ receptor operated Ca²⁺ channel (ROC) เปิด แคลเซียมจากนอกเซลล์สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ หรือการกระตุ้นการทำงานของ phospholipase C ทำให้เกิดการ hydrolysis ของ inositol phospholipids ทำให้เกิด second messenger IP₃ การเพิ่มขึ้น IP₃ จะกระตุ้นให้เกิดการหลั่งของแคลเซียมจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ (SR) ทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็น direct effect (Rang and Dale, 1991; Zifa and Fillion, 1992) นอกจากนี้จะเกิด direct effect แล้วยังมี indirect effect โดย 5-HT จะไปทำให้เกิดการหลั่ง ACh จาก nerve ใน ileum โดย interaction ระหว่าง 5-HT กับ presynaptic neuronal receptors (Cohen et al., 1985)

การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภาเมื่อให้ 5-HT แบบ cumulative dose เกิดจาก 5-HT ไปจับกับ 5-HT₂ receptor อาจเกิดจากการเพิ่มขึ้นของ IP₃ แล้วทำให้เกิดการหลั่งแคลเซียมจาก SR และการที่สารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบ 0.08 mg/ml สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum (รูปภาพที่ 33) ได้นั้น น่าจะเกิดจากการที่สารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบออกฤทธิ์ยับยั้งผ่าน 5-HT₂ receptor หรืออาจจะมีผลต่อ intracellular mediators แล้วทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์ลดลง ทำให้สามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบได้

3.4 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของลำไส้เล็กส่วน ileum เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว histamine

histamine ออกฤทธิ์ผ่าน histamine receptors ซึ่งในปัจจุบันได้ค้นพบ 3 subtype ได้แก่ (Rang and Dale, 1991; Hill, 1990; Burkhalter, Julius and Frick, 1995)

- H₁ receptor พบได้ที่ มนุษย์ guinea-pig bronchial muscle , guinea-pig ileum , endothelium , brain การจับกับ H₁ receptor เกิด couple กับ G-protein ทำให้ระดับของ IP₃ และ DAG เพิ่มขึ้นทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มขึ้นเกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

- H₂ receptor พบได้ที่ acid-secreting cells ในกระเพาะอาหาร , rat uterus และในหัวใจ และสมอง การจับกับ H₂ receptor ทำให้ระดับของ cAMP เพิ่มขึ้น

- H₃ receptor พบที่ presynaptic : brain , myenteric plexus, other neurons การจับกับ H₃ receptor แล้วเกิดการ couple กับ G-protein แล้วทำให้เกิดผลคือยับยั้งการหลั่ง histamine จากสมองของหนูขาว (Menkveld and Timmerman, 1990), ยับยั้งการหลั่ง ACh จาก

guinea-pig ileum and bronchea และยังพบว่าสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ histamine จาก rat lung , spleen , skin and brain (Leurs et al., 1991; Rang and Dale, 1991)

สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของ histamine ใน guinea-pig ileum จะจับกับ histamine receptor (postsynaptic receptors) ซึ่งจะ linked กับ phosphatidylinositol pathway ทำให้ระดับ IP_3 เพิ่มขึ้นส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ intracellular calcium (Arrang et al., 1987; Timmerman, 1990; Hill, 1990; Burkhalter, Julius and Frick, 1995)

การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภาเมื่อให้ histamine แบบ cumulative dose เกิดจาก histamine ไปจับกับ H_1 receptor โดยเกิดการเพิ่มขึ้นของ IP_3 ในเซลล์ทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มขึ้นแล้วทำให้เกิดการหลั่งแคลเซียมจาก SR สารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบ 0.08 mg/ml สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum (รูปภาพที่ 35) ได้นั้น น่าจะเกิดจากการที่สารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบ ออกฤทธิ์ยับยั้งผ่าน H_1 receptor หรืออาจไปมีผลต่อระดับของ IP_3 ทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์ลดลง การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบจึงลดลงด้วย

3.5 ศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของลำไส้เล็กส่วน ileum เมื่อให้สารกระตุ้นการหดตัว $BaCl_2$

barium chloride ออกฤทธิ์ต่อลำไส้ได้ 2 ลักษณะ ดังนี้

- direct action
- indirect action

การออกฤทธิ์โดยตรงของ barium chloride นั้นออกฤทธิ์ผ่าน calcium channel โดยตรง ซึ่งมี affinity ต่อ calcium channel ดีกว่าแคลเซียม (Spedding and Paoletti, 1992) Ba^{2+} ยังทำให้แคลเซียมที่อยู่นอกเซลล์เคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์เพิ่มมากขึ้นโดยผ่าน voltage-dependent Ca^{2+} channel ทำให้แคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น (Clement, 1981; Karaki, Satake, and Shibata, 1986) และ Ba^{2+} ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบได้โดยตรง โดยไม่เกี่ยวข้องกับแคลเซียมภายนอกเซลล์และอาจจะไม่เกี่ยวข้องกับการหลั่งแคลเซียมจาก SR (Karaki, Satake and Shibata, 1986) Ba^{2+} ทำให้เกิดการปลดปล่อย Ca^{2+} จากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ (Antonio, Silva and Yashuda, 1973)

Ba^{2+} ออกฤทธิ์ทางอ้อม (indirect action) โดยไปออกฤทธิ์ที่ nerve fiber โดยจะไปกระตุ้น ganglion ทำให้มีการปลดปล่อย ACh ออกมาจากปลายประสาท และ ACh นี้จะทำให้



เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้ออีกครั้งหนึ่ง (Feldberg, 1951; Henderson, Ariens and Simonis, 1968; Williams, 1954)

การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภาเมื่อให้ barium chloride แบบ cumulative dose เกิดจาก Ba^{2+} โดยตรงที่ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ หรือเกิดจากผ่าน voltage-dependent Ca^{2+} channel การที่สารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบ 0.08 mg/ml สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum (รูปภาพที่ 37) ได้นั้น น่าจะเกิดจากการที่สารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบออกฤทธิ์ยับยั้งผ่าน voltage-dependent Ca^{2+} channel หรืออาจจะยับยั้งฤทธิ์ของ Ba^{2+} โดยตรง

ในกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภา กลไกการยับยั้งของสารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ เมื่อกระตุ้นการหดตัวด้วยสารกระตุ้น NE, 5-HT และ histamine พบว่ากลไกหลักแล้วน่าจะเกิดจากการยับยั้งผ่านทาง receptor linked Ca^{2+} channel หรืออาจจะเกิดจากระดับของ intracellular mediators เปลี่ยนแปลงไปทำให้ระดับ แคลเซียมภายในเซลล์ลดลง หรืออาจจะเกิดจากกลไกหลาย ๆ กลไกดังที่ได้กล่าวมาแล้ว สำหรับกลไกการยับยั้งการหดตัวที่เกิดผ่านทาง voltage-dependent Ca^{2+} channel โดยการให้ Ba^{2+} พบว่าสารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบก็สามารถยับยั้งการหดตัวได้เช่นกัน หรือไม่ก็ยับยั้งการเข้าเซลล์ของ Ba^{2+} ดังนั้นกลไกยับยั้งการหดตัวของสารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบต่อกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภา ไม่มีความเฉพาะเจาะจง (non-specific antagonist)

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ของสารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบ ต่อกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูขาว กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว และกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภา ที่แยกจากกาย สามารถสรุปได้ว่า สารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบ มีฤทธิ์ลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบทั้งสามชนิดดังนี้

ในกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูขาว สารสกัดด้วยเอธานอลจากรากสามสิบ สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบได้ไม่ว่าจะกระตุ้นการหดตัวด้วย ACh หรือ oxytocin และกลไกการยับยั้งการหดตัวนี้น่าจะผ่านทาง receptor ของสารกระตุ้นแต่ละชนิด หรือไม่ก็น่าจะมีผลต่อระดับของ intracellular mediators ทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์ลดลง สำหรับใน Ca^{2+} -free contraction การหดตัวที่กระตุ้นด้วย oxytocin นั้นน่าจะผ่านทาง oxytocin receptor กลไกการหดตัวเกิดจาก protein kinase C และแคลเซียมภายในเซลล์ไม่มีผลต่อหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

ฉะนั้นสารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสามสิบน่าจะมีผลยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบผ่าน protein kinase C

สารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสามสิบสามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาวได้ โดยผ่านกลไก receptor linked Ca^{2+} channel และ voltage-dependent Ca^{2+} channel ได้ทั้งสองกลไก หรืออาจจะมีผลต่อระดับ intracellular mediators โดยทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์ลดลง หรืออาจจะเกิดจากหลาย ๆ กลไกดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ดังนั้นสารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสามสิบออกฤทธิ์ได้ไม่เฉพาะเจาะจง (non-specific antagonist) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาว

สารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสามสิบสามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภาได้ โดยผ่านกลไก receptor linked Ca^{2+} channel และ voltage-dependent Ca^{2+} channel ได้ทั้งสองกลไก หรืออาจจะมีผลต่อระดับ intracellular mediators โดยทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์ลดลง หรืออาจจะเกิดจากหลาย ๆ กลไกดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ดังนั้นสารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสามสิบออกฤทธิ์ได้ไม่เฉพาะเจาะจง (non-specific antagonist) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภา

โดยสรุปสารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสามสิบ สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบอย่างไม่เฉพาะเจาะจง (non-specific antagonist) เนื่องจากสารสกัดนี้เป็นสารสกัดหยาบ ซึ่งจะมีสารสำคัญหลายชนิดปะปนอยู่ กลไกที่เป็นไปได้จะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการผ่านเข้าเซลล์ของแคลเซียมไอออนทางช่องผ่านของแคลเซียม ทั้ง RLC หรือ VDC หรืออาจจะเกิดจากการยับยั้งการหลั่งแคลเซียมไอออนจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ (SR) และอาจจะเกิดจาก intracellular mediators ภายในเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไป อย่างไรก็ตามตำแหน่งของการออกฤทธิ์น่าจะอยู่ที่ membrane โดยจะออกฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของแคลเซียมจากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ โดยผ่านทาง calcium channel เนื่องจากการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบสามารถจะกลับสู่สภาพปกติได้เร็ว หลังจากการล้างเอาสารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสามสิบออก (recover contraction) สำหรับขนาดของสารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสามสิบที่ใช้ในการศึกษาในกล้ามเนื้อเรียบแต่ละชนิดไม่เท่ากัน เนื่องจากว่ากล้ามเนื้อเรียบแต่ละชนิดมีความไวต่อสารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสามสิบไม่เท่ากัน

ความคงตัวของสารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสามสิบนั้น ได้ทำการทดสอบโดยเก็บข้อมูลเริ่มทำการวิจัย โดยการศึกษาผลของสารสกัดด้วย ethanol จากรากสามสิบต่อการหดตัวของมดลูกที่เกิดขึ้นเอง (spontaneous contraction) และทำการทดลองซ้ำอีกครั้งเมื่อการวิจัยสิ้นสุด (เป็นเวลา 3 เดือน) ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสามสิบยังมีความคงตัวเมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน เห็นได้จากการที่ tension และ frequency ของการหดตัวของกล้ามเนื้อ

เรียบมดลูกที่เกิดขึ้นเมื่อเริ่มทำการวิจัยและหลังจากเสร็จสิ้นการวิจัยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ทั้งนี้ต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส และเก็บในภาชนะที่ป้องกันแสงได้

อย่างไรก็ดีการศึกษานี้เป็นการศึกษาผลสารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสามสิบเบื้องต้น ยังไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับมนุษย์อย่างปลอดภัยได้ ดังนั้นควรจะศึกษาเพิ่มเติมให้มีข้อมูลที่ละเอียดและมีความเฉพาะเจาะจงมากยิ่งขึ้น เช่น ศึกษาหากลไกการออกฤทธิ์ที่เฉพาะเจาะจงต่อกล้ามเนื้อแต่ละชนิดโดยละเอียด เพื่อให้ได้ข้อมูลทางด้านเภสัชวิทยาของ แยกสารออกฤทธิ์ (active ingredient) จากรากสามสิบ ให้เป็นสารบริสุทธิ์เพื่อให้นักศึกษามีความเฉพาะเจาะจงมากยิ่งขึ้น และมีการศึกษาทางพิษวิทยา ไม่ว่าจะพิษเฉียบพลัน พิษกึ่งเฉียบพลัน และพิษเรื้อรัง ในสัตว์ทดลองหลาย ๆ ชนิดตามขั้นตอนการศึกษาทางพิษวิทยา ข้อมูลการศึกษาเหล่านี้จะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพิจารณานำสารสกัดนี้มาใช้ประโยชน์ในการรักษา ในแง่ของการลดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อเรียบ และเป็นแนวทางในการพัฒนายาใหม่จากรพยากรในประเทศ