

บทคัดย่อ

โรคเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ คือการที่อวัยวะเพศชายไม่สามารถแข็งตัวหรือคงการแข็งตัวได้ตลอดการมีเพศสัมพันธ์ ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคเสื่อมสมรรถภาพทางเพศนี้คือ ความชราภาพและโรคหลอดเลือด การลดการผลิตไนตริกออกไซด์ของเอนไซม์เอนโดทีเลียลไนตริกออกไซด์ซินเทส (eNOS) และการเพิ่มความเครียดออกซิเดชันเป็นผลให้มีการลดลงของชีวปริมาณของไนตริกออกไซด์ และสุดท้ายนำไปสู่ภาวะ endothelial dysfunction ซึ่งเป็นอาการเริ่มต้นของโรคเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ โรคนี้อาจเกิดได้จากอนุมูลอิสระที่ทำปฏิกิริยากับไนตริกออกไซด์ ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่สำคัญต่อการคลายตัวของหลอดเลือด นำไปสู่การลดลงของชีวปริมาณไนตริกออกไซด์ ในการศึกษาเลือกพืชสมุนไพรไทยจำนวน 5 ชนิด คือ มะรุม กระจ่างดำ ค้างคาวดำ เร่วหอม และกวาวเครือแดง ทำการสกัดพืชด้วย 95% เอทานอล 40% เอทานอล และน้ำร้อน นำส่วนสกัดทั้ง 15 ส่วนสกัดมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ การกำจัดอนุมูล DPPH และอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ รวมทั้งศึกษาผลต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ และการฟอสโฟริเลชันของเลชันของเอนไซม์ eNOS ในเซลล์เยื่อหลอดเลือดมนุษย์ (EA.hy926 cell line) จากนั้นทำการตั้งตำรายาสมุนไพรใหม่จากพืชที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ และนำไปตรวจสอบต้านอนุมูลอิสระ และการกระตุ้นเอนไซม์ eNOS ทำการสร้างตำรับยาใหม่แบบ blended extracts ได้ 4 สูตร (BF1-BF4) จากส่วนสกัด 95% เอทานอลของมะรุม กระจ่างดำ และกวาวเครือแดง และส่วนสกัดน้ำของกระจ่างดำ และเร่วหอม เราพบว่าตำรับยาสูตร BF3 และ BF4 มีฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH และอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ที่ดี ทั้งยังเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์และการฟอสโฟริเลชันของเลชันของเอนไซม์ eNOS นอกจากนี้ทำการเตรียมตำรับยาใหม่แบบ combined extracts ได้ 3 สูตร (CF1-CF3) จากมะรุม กระจ่างดำ และกวาวเครือแดง และทำการสกัดสารด้วยวิธีการหมัก และวิธี soxhlet พบว่าตำรับยาสูตร CF1 ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุดในตำรับยาแบบ combined extracts การสกัดสารด้วยวิธีการหมัก ให้ฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีกว่าวิธี soxhlet จากนั้นทำการศึกษากลไกการเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ของตำรับยาสูตร BF3 พบว่าตำรับยาสูตร BF3 กระตุ้นการฟอสโฟริเลชันของเอนไซม์ eNOS และเอนไซม์ที่ส่งสัญญาณชีวภาพที่อยู่เหนือขึ้นไป คือเอนไซม์ Akt ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าตำรับยาสูตร BF3 อาจถูกนำไปพัฒนาเป็นอาหารเสริมเพื่อใช้รักษาและป้องกันโรคเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ

คำสำคัญ : กระจ่างดำ, เร่วหอม, กวาวเครือแดง, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, เอนไซม์ eNOS, เซลล์เยื่อ

Abstract

Erectile dysfunction (ED) is the inability of penis to maintain or achieve completely sexual intercourse. The primary risk factors of ED are aging and vascular diseases. The reduction of nitric oxide (NO) production from endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and increased oxidative stress resulting in decreased NO bioavailability, and finally endothelial dysfunction which is an early stage of ED. In this study, five Thai herbal plants (*Moringa oleifera*, *Kaempferia parviflora*, *Tacca chantrieri*, *Etlingera pavieana* and *Butea superba*) were chosen. They were extracted by 95% ethanol, 40% ethanol and hot water. Then fifteen extracts were evaluated their in vitro DPPH and superoxide radical scavenging activity. The effect on NO production and eNOS protein phosphorylation in human endothelial EA.hy926 cells were also determined. The herbal mixture was designed from the plant showing potential biological activities and investigated in vitro antioxidant activity and eNOS activation. Four blended extracts (BF1-BF4) from 95% ethanol extract of *M. oleifera* (1E95), *K. parviflora* (2E95) and *B. superba* (5E95), water extract of *K. parviflora* (2W) and *E. pavieana* (4W) were prepared. We found that BF3 and BF4 showed high activity on DPPH and superoxide radical scavenging. In addition to, BF3 and BF4 significantly increased NO production and eNOS protein phosphorylation. Moreover, three combined extracts (CF1-CF3) from *M. oleifera*, *K. parviflora* and *B. superba* were made. These herbal formulations were extracted using maceration and soxhlet methods. Among them, CF1 contained the most potent antioxidant activity and stimulatory effect on NO production. Biological activities of combined extracts prepared from maceration technique were higher than that of soxhlet technique. The blended extract BF3 was further studied the molecular mechanism underlying its stimulatory effect on NO production. BF3 stimulated the phosphorylation of eNOS and upstream signaling Akt. The obtained data indicated that blended extract BF3 would be a good choice to develop as food supplement for treatment and prevention of ED.

Keywords: *Kaempferia parviflora*, *Etlingera pavieana*, *Butea superba*, Antioxidant activity, eNOS, Endothelial cell

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่างๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี และ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพาสำหรับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยในโครงการวิจัยนี้ และขอขอบคุณ นางสาวเพชรรัตน์ ไสว นางสาวฐิติพร ทองเย็น นางสาวสุปรีดา แซ่ตั้ง นางสาวสุนันทา สีสมุทร์ และ Dr. Liane Flor สำหรับความช่วยเหลือทางเทคนิค

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
กิตติกรรมประกาศ	3
สารบัญเรื่อง	4
สารบัญภาพ	5
สารบัญตาราง	8
บทนำ	9
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	13
วิธีการทดลอง	21
ผลการทดลอง	26
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	61
บรรณานุกรม	64
ผลผลิตของโครงการวิจัย	69
ประวัตินักวิจัย	70

สารบัญญภาพ

	หน้า	
รูปที่ 2-1	กวางเครือแดง	20
รูปที่ 2-2	เหง้ากระชายดำ	
รูปที่ 2-3	ใบมะรุม	
รูปที่ 2-4	ใบ ลำต้นและดอกของต้นค่างควาดำ	
รูปที่ 2-5	ลักษณะเหง้าของเร่วหอม (A) ลักษณะใบของเร่วหอม (B) และลักษณะดอกของเร่วหอม (C)	
รูปที่ 4-1	การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ (EA. hy926) ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	
รูปที่ 4-2	ความมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ (EA. hy926) ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดจากเร่วหอม	
รูปที่ 4-3	ผลของส่วนสกัด 95% เอทานอลของพืชสมุนไพรต่อปริมาณโปรตีน p-Ser 1177 eNOS ในเยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่ม ด้วยส่วนสกัดจากพืชสมุนไพร	
รูปที่ 4-4	ผลของส่วนสกัด 40% เอทานอลของพืชสมุนไพรต่อปริมาณโปรตีน p-Ser 1177 eNOS ในเยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่ม ด้วยส่วนสกัดจากพืชสมุนไพร	
รูปที่ 4-5	ผลของส่วนสกัดน้ำของพืชสมุนไพรต่อปริมาณโปรตีน p-Ser 1177 eNOS ในเยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วย ส่วนสกัดจากพืชสมุนไพร	
รูปที่ 4-6	การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ (EA. hy926) ที่ถูกบ่มด้วยตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	
รูปที่ 4-7	ความมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ (EA. hy926) ที่ถูกบ่ม ด้วยตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	
รูปที่ 4-8	ผลของตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract ต่อปริมาณโปรตีน p-Ser 1177 eNOS ในเยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์	

สารบัญญภาพ (ต่อ)

หน้า

- รูปที่ 4-9 การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดตมมนุษย์ (EA. hy926) ที่ถูกบ่มด้วยตำรับยาสมุนไพรแบบ combined extract เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (A) วิธีสกัดแบบ maceration และ (B) วิธีสกัดแบบ soxhlet
- รูปที่ 4-10 ความมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดตมมนุษย์ (EA. hy926) ที่ถูกบ่มด้วยตำรับยาสมุนไพรแบบ combined extract เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (A) วิธีสกัดแบบ maceration และ (B) วิธีสกัดแบบ soxhlet
- รูปที่ 4-11 ผลของตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract สูตร ต่อปริมาณ โปรตีน p-Ser 1177 eNOS ในเยื่อบุหลอดเลือดตมมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัด BF3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 10 นาที
- รูปที่ 4-12 ปริมาณโปรตีน pAkt ในเยื่อบุหลอดเลือดตมมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract สูตร BF3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 15 (A) และ 30 นาที (B)
- รูปที่ 4-13 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด 95% เอทานอลของใบมะรุม (1E95)
- รูปที่ 4-14 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด 40% เอทานอลของใบมะรุม (1E40)
- รูปที่ 4-15 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดน้ำของใบมะรุม (1W)
- รูปที่ 4-16 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด 95% เอทานอลของเหง้ากระชายดำ (2E95)
- รูปที่ 4-17 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด 40% เอทานอลของเหง้ากระชายดำ (2E40)
- รูปที่ 4-18 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดน้ำของเหง้ากระชายดำ (2W)
- รูปที่ 4-19 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด 95% เอทานอลของเหง้าค้ำคาวดำ (3E95)
- รูปที่ 4-20 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด 40% เอทานอลของเหง้าค้ำคาวดำ (3E40)
- รูปที่ 4-21 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดน้ำของเหง้าค้ำคาวดำ (3W)
- รูปที่ 4-22 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด 95% เอทานอลของเหง้าเร่วหอม (4E95)
- รูปที่ 4-23 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด 40% เอทานอลของเหง้าเร่วหอม (4E40)
- รูปที่ 4-24 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดน้ำของเหง้าเร่วหอม (4W)
- รูปที่ 4-25 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด 95% เอทานอลของหัวกวาวเครือแดง (5E95)
- รูปที่ 4-26 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด 40% เอทานอลของหัวกวาวเครือแดง (5E40)
- รูปที่ 4-27 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดน้ำของหัวกวาวเครือแดง (5W)
- รูปที่ 4-28 สเปกตรัม NMR ของตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract สูตร BF1

สารบัญญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4-29	สเปกตรัม NMR ของตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract สูตร BF2
รูปที่ 4-30	สเปกตรัม NMR ของตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract สูตร BF3
รูปที่ 4-31	สเปกตรัม NMR ของตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract สูตร BF4
รูปที่ 4-32	สเปกตรัม NMR ของตำรับยาสมุนไพรแบบ combined extract สูตร CF1 แบบสกัดวิธี maceration
รูปที่ 4-33	สเปกตรัม NMR ของตำรับยาสมุนไพรแบบ combined extract สูตร CF2 แบบสกัดวิธี maceration
รูปที่ 4-34	สเปกตรัม NMR ของตำรับยาสมุนไพรแบบ combined extract สูตร CF3 แบบสกัดวิธี maceration
รูปที่ 4-35	สเปกตรัม NMR ของตำรับยาสมุนไพรแบบ combined extract สูตร CF1 แบบสกัดวิธี soxhlet
รูปที่ 4-36	สเปกตรัม NMR ของตำรับยาสมุนไพรแบบ combined extract สูตร CF2 แบบสกัดวิธี soxhlet
รูปที่ 4-37	สเปกตรัม NMR ของตำรับยาสมุนไพรแบบ combined extract สูตร CF3 แบบสกัดวิธี soxhlet
รูปที่-4-38	โครมาโทแกรม HPLC ของส่วนสกัดน้ำของเหง้ากระชายดำ (2W) ในสถานะที่ใช้ mobile phase เป็น 20, 50, 70 และ 90 % methanol ตามลำดับ
รูปที่-4-39	โครมาโทแกรม HPLC ของส่วนสกัด 95% เอทานอลของหัวกวาว เครือแดง (5E95) ในสถานะที่ใช้ mobile phase เป็น 20, 50, 70 และ 90 % methanol ตามลำดับ
รูปที่-4-40	โครมาโทแกรม HPLC ของตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract สูตร BF3 ในสถานะที่ใช้ mobile phase เป็น 20, 50, 70 และ 90 % methanol ตามลำดับ

สารบัญตาราง

	หน้า	
ตารางที่ 4-1	เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดพืชสมุนไพรต่างๆ	19
ตารางที่ 4-2	ค่า IC ₅₀ ของการกำจัดอนุมูล DPPH ของส่วนสกัดพืชสมุนไพรต่างๆ	
ตารางที่ 4-3	ค่า IC ₅₀ ของการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ของส่วนสกัดพืชสมุนไพรต่างๆ	
ตารางที่ 4-4	ส่วนประกอบของตำรับยาสมุนไพรต่างๆ	
ตารางที่ 4-5	ค่า IC ₅₀ ของการกำจัดอนุมูล DPPH และอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของส่วนสกัดพืชสมุนไพรต่างๆ	
ตารางที่ 4-6	ค่า IC ₅₀ ของการกำจัดอนุมูล DPPH ของตำรับยาสมุนไพรแบบ c ombined extract	

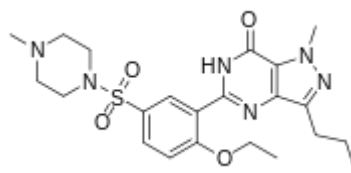
บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ (Erectile dysfunction, ED) หรือ ED หมายถึงภาวะที่ไม่สามารถทำให้อวัยวะเพศชายแข็งตัว หรือคงการแข็งตัวอยู่เป็นเวลานานพอจนกระทั่งเสร็จสิ้นการมีเพศสัมพันธ์ได้อย่างที่คาดหวัง โดยมีหลายสาเหตุและปัจจัยทั้งทางด้านร่างกาย จิตใจ หรือภาวะทางสังคม ความเครียด ระดับการศึกษา มีผลต่อภาวะนี้ ซึ่งสภาวะการทำงานที่มีการแข่งขันสูง การใช้ชีวิตที่สัมผัสกับสารเคมี และอื่นๆในสังคมปัจจุบันทำให้มีความเสี่ยงมีความเสื่อมสมรรถภาพทางเพศนี้เพิ่มขึ้น และปัญหาที่เกิดจากการเสื่อมสมรรถภาพทางเพศก็ส่งผลให้เกิดความเดือดร้อนทั้งกายและใจต่อผู้ป่วย ทั้งสูญเสียความมั่นใจ อับอาย ขาดความสุขในชีวิต จนบางครั้งก่อให้เกิดปัญหาครอบครัวแตกแยก หย่าร้างซึ่งทำให้คุณภาพชีวิตของคนเหล่านั้นแย่ลง ส่งผลต่อสุขภาพกายและจิตใจของผู้ป่วยและคนใกล้ชิดได้ ภาวะหย่อนสมรรถภาพทางเพศส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับโรคหัวใจและหลอดเลือด เบาหวาน สูบบุหรี่ และรุนแรง การผ่าตัดต่อลูกหมาก และพบเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามอายุที่เพิ่มขึ้น ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดภาวะนี้คือ อายุ โรคอ้วน การสูบบุหรี่เป็นปัจจัยเสี่ยงเดียวกันกับโรคหัวใจและหลอดเลือด มีหลักฐาน ในทางปริคณินกเภสัชวิทยา และทางคลินิกเภสัชวิทยาว่า โรคหลอดเลือดหัวใจเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญที่ทำให้เกิดภาวะนี้ (Cirino et.al, 2006, Ferrini et.al, 2001, Low and Tan, . 2007, MacKay, 2004, Toda et.al, 2005)

ดังนั้นจึงได้มีการคิดค้นยาที่สามารถรักษาโรคเสื่อมสมรรถภาพทางเพศมาแต่โบราณ ทั้งในรูปแบบสมุนไพร ตำรับยา และยาแผนปัจจุบัน ที่เห็นผลอย่างชัดเจน คือ ยาไวอากร้า (Viagra®) ที่เริ่มจากการพัฒนายาขยายหลอดเลือดในตอนแรกแต่พบว่ามีผลข้างเคียงทำให้อวัยวะเพศชายแข็งตัวได้ มีตัวยาที่สำคัญคือ Sildenafil citrate ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ phosphodiesterase-5 (PDE-5) ทำให้ลดการสลายตัวของ cGMP ที่ถูกสร้างโดยการกระตุ้นจาก nitric oxide จึงทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดนานขึ้น และทำให้อวัยวะเพศชายแข็งตัวได้ เมื่อมีการจำหน่ายยาไวอากร้าในท้องตลาดพบว่ามิผู้นิยมใช้เป็นจำนวนมาก



Sildenafil citrate

แต่อย่างไรก็ตามพบว่ามีผลข้างเคียงในการใช้ยาตามปกติ หรือใช้ยาเกินขนาด เช่น สูญเสียการมองเห็นอย่างฉับพลัน หรืออาจเกิดตาบอด การสูญเสียการได้ยินอย่างฉับพลัน การเจ็บปวดอวัยวะเพศที่เกิดจากการแข็งตัว อาการวิงเวียนศีรษะ ปวดศีรษะ ความดันโลหิตสูง และผลข้างเคียงเมื่อใช้ร่วมกับยาอื่น เช่น ยาในกลุ่มไนเตรท บางครั้งบางรายที่ใช้ยาเกินขนาดอาจทำให้เสียชีวิตได้ เนื่องจากยามีราคาแพง และมีความต้องการในการใช้ยามาก ทางองค์การเภสัชกรรมจึงได้ทำการผลิตและจำหน่ายยาที่มีตัวยา Sildenafil citrate เองในชื่อ Sidegra เพื่อลดราคายาในตลาดลง และลดการจำหน่ายยาเถื่อน

อย่างไรก็ตามการใช้ยา Viagra เป็นการรักษาที่ปลายเหตุเพียงอย่างเดียว และยังมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงปรารถนาหลายประการ แต่ในขณะที่ทางสมุนไพรดั้งเดิมที่มีสรรพคุณบำรุงกำลังด้านสมรรถภาพทางเพศของไทยและเอเชีย เช่น กระจับปี่ โด่ไม่รู้ล้ม ปลาไหลเผือก ม้ากระทืบโรง กวาวเครือแดง กำลังเสือโคร่ง กำลังวัวเถลิง ค้างคาวดำ เป็นต้น ที่มีประวัติการใช้มาอย่างยาวนานและมีการใช้ในการบำรุงสุขภาพด้วย ทางคณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะทำการวิจัยเพื่อทราบถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรเหล่านี้ ในผลการขยายหลอดเลือด และรวมทั้งการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ และการเกิดการอักเสบ ที่เป็นสาเหตุในเสื่อมของอวัยวะหรือโปรตีนในร่างกาย และพัฒนาตำรับยาใหม่ที่เกิดจากการสกัดตัวยาจากสมุนไพรเหล่านี้ ที่เป็นทางเลือกให้แก่ประชาชนในการรักษาแบบป้องกัน (Chemopreventive therapy) บำรุงร่างกาย และแก้ไขภาวะหย่อนสมรรถภาพทางเพศได้ ปราศจากผลข้างเคียงที่รุนแรง นอกจากนี้ยังเป็นการส่งเสริมการปลูกและจำหน่ายสมุนไพรภายในประเทศ ลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศอีกด้วย

1.2 ทฤษฎี สมมติฐานหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เซลล์เยื่อบุทำงานผิดปกติ (endothelial dysfunction) เป็นเครื่องหมายของการเกิดโรคในกลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือด ภายในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดจะมีไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) เป็นสารสื่อกลางในการรักษาภาวะธำรงดุลย์ของหลอดเลือด โดยยับยั้งการเกาะตัวของเกร็ดเลือด ป้องกันการจับและการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาว และทำให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบรอบหลอดเลือดเกิดการคลายตัว ทำให้หลอดเลือดขยายตัว (Vanhoutte et al., 2009) สาเหตุที่ทำให้เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดทำงานผิดปกติและเกิดพยาธิสภาพของโรคความดันโลหิตสูง และภาวะหลอดเลือดแข็ง คือการลดลงของชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ (NO bioavailability) ไนตริกออกไซด์ที่ควบคุมการทำงานของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดถูกผลิตจากเอนไซม์ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ไนตริกออกไซด์นี้จะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ soluble guanylate cyclase ที่อยู่ในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบทำให้มีการเพิ่ม cGMP ส่งผลให้เกิดขยายตัวของหลอดเลือด และยับยั้งการเกาะตัวของเกร็ดเลือด (Koltermann et al., 2007) ชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ขึ้นอยู่กับสมดุลระหว่างการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ และการสลายของไนตริกออกไซด์ ปัจจัยที่ทำให้ปริมาณไนตริกออกไซด์น้อยลง คือ ความเครียดจากออกซิเดชัน ความชราภาพ การพักผ่อนไม่เพียงพอและการสูบบุหรี่ เป็นต้น (Vanhoutte et al., 2009) ดังนั้นการเพิ่ม

การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อหลอดเลือดในผู้สูงอายุ หรือในผู้ป่วยกลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นวิธีการรักษาที่น่าสนใจอีกทางหนึ่ง แม้ว่าเอนไซม์ eNOS เป็นเอนไซม์ที่มีการแสดงออกตลอดเวลา แต่ ปริมาณการแสดงออกของเอนไซม์สามารถเปลี่ยนแปลงได้ด้วยสิ่งกระตุ้นทางชีวเคมี ชีวฟิสิกส์ และฮอร์โมน ทั้ง ในสภาวะสรีรวิทยา และพยาธิสภาพ (Li et al., 2002-) รวมทั้งอาหาร (Vanhoutte et al., 2009) ปัจจุบันมีการรายงานว่าส่วนสกัดจากพืชต่างๆ และสารบริสุทธิ์จากพืชสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ เอนไซม์ eNOS ได้ (Steinkamp-Fenske et al., 2007; Koltermann et al., 2007; Wattanapitayakul et al., 2007; Vanhoutte et al., 2009; Li et al., 2010) ดังนั้นการบริโภคส่วน สกัดพืชต่างๆ นี้จึงเป็นวิธีการหนึ่งในการป้องกันและรักษากลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือด รวมทั้งการ กระตุ้นให้มีปริมาณ BH4 ซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ eNOS ในเซลล์เพิ่มมากขึ้น เพื่อป้องกันการ ปฏิกริยา uncoupling ทำให้เกิด superoxide anion radical (O_2^-)

ไนตริกออกไซด์ที่ผลิตจากเอนไซม์ eNOS มีหน้าที่ทำให้หลอดเลือดขยายตัว ยับยั้งการเกาะ ตัวของเกร็ดเลือดและการยึดของเกร็ดเลือดจับกับผนังหลอดเลือด ลดการจับของเม็ดเลือดขาวกับผนัง หลอดเลือด และทำให้การเพิ่มจำนวนของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบลดลง (Forstermann and Sessa, 2012) เป็นผลให้การไหลเวียนของเลือดเป็นปกติ ผู้ป่วยที่มีภาวะเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดและหัวใจ เช่น ผู้ป่วยเบาหวาน ผู้ที่มีภาวะโคเลสเตอรอลในเลือดสูง ผู้ที่มีความดันโลหิตสูง ผู้สูบบุหรี่ และผู้ที่มี ความเครียด เป็นต้น (Vanhoutte et al., 2009; Forstermann and Sessa, 2012) และผู้ป่วยโรค หลอดเลือดและหัวใจ มีเซลล์เยื่อหลอดเลือดทำงานผิดปกติ (endothelial dysfunction) เช่น มีชีวปริ มานออกฤทธิ์ของไนตริก ออกไซด์ลดลง โดยลดการผลิตไนตริกออกไซด์ และเพิ่มการผลิต reactive oxygen species ทำให้เกิดความเครียดจากออกซิเดชัน วิธีการเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ ของเซลล์เยื่อหลอดเลือดทำได้หลายวิธี เช่น การเพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ eNOS โดยการเพิ่มการ แสดงออกของเอนไซม์ eNOS การเพิ่มปริมาณซับสเตรต L-arginine และการเพิ่มโคแฟกเตอร์ BH₄ และ การเพิ่มปริมาณไนตริกออกไซด์โดย NO donor เป็นต้น (Zhang et al., 2010) การบริโภคสารจาก ธรรมชาติที่สามารถเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อหลอดเลือดเป็นวิธีการหนึ่ง ในการป้องกันผู้ที่มีความเสี่ยงในการเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ และรักษาอาการของผู้ป่วยโรคหลอดเลือด หัวใจ เนื่องจากสารที่ได้จากธรรมชาติมีความปลอดภัย การค้นคว้าหาสารที่จะนำมาเป็นยาขยายหลอด เลือด โดยเฉพาะจากพืชที่มีศักยภาพในการเพิ่มไนตริกออกไซด์ เช่น สมุนไพรบำรุงสุขภาพสมรรถภาพทาง เพศเป็นพืชพื้นถิ่นที่พบในประเทศไทยและยังไม่มีมีการวิจัยในต่างประเทศ ควรทำวิจัยอย่างเร่งด่วน เพื่อให้ สิทธิดังกล่าวตกกับประเทศไทย ดังนั้นการศึกษาการออกฤทธิ์และกลไกในการขยายหลอดเลือดโดยเพิ่ม แอกติวิตีของเอนไซม์ eNOS ของสมุนไพรเหล่านี้ และการค้นหาสารที่ออกฤทธิ์ในการขยายหลอดเลือดนี้ จึงมีความสำคัญเพื่อความเข้าใจและยืนยันการออกฤทธิ์ของสมุนไพรเพื่อที่จะนำส่วนสกัดของสมุนไพร เหล่านี้ไปพัฒนาเป็นยาบำรุงสุขภาพด้านสมรรถภาพทางเพศ นอกจากนี้สมุนไพรมีสารหลายชนิดน่าจะ

ช่วยในการป้องกันการเกิดโรคเช่น ต้านอนุมูลอิสระและการอักเสบ และการนำสมุนไพรมาสกัดรวมกันจะทำให้ได้ตำรับยาใหม่ที่มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพรที่มีสรรพคุณบำรุงสมรรถภาพทางเพศ
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของตำรับยาของสมุนไพรที่มีสรรพคุณบำรุงสมรรถภาพทางเพศ
3. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลทางโครมาโตกราฟีและข้อมูลทาง NMR ของสารสกัด

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

คัดเลือกสมุนไพร 5 ชนิด ที่มีสรรพคุณบำรุงสมรรถภาพทางเพศ เช่น เหง้ากระชายดำ หัวกวาวเครือแดง ใบมะขาม เหง้าค่างควาดำ และเหง้าเร่วหอม เป็นต้น มาสกัดด้วยตัวทำละลายได้แก่ 40% เอทานอล 95% เอทานอล และต้มกับน้ำเดือด นำสารสกัดที่ได้มาทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูล DPPH และการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ทดสอบผลของส่วนสกัดต่อปริมาณการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ ทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดของมนุษย์เมื่อสัมผัสกับสารทดสอบ และทดสอบผลของส่วนสกัดต่อการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177ของเอนไซม์ eNOS

นำส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ดีที่สุดมาศึกษาการสร้างตำรับยาสมุนไพรใหม่ โดยการสกัด 2 วิธี คือ วิธี blended extract และวิธี combined extract โดยวิธีสร้างตำรับแบบ combined extract ทำการสกัด 2 แบบ คือ maceration และ soxhlet และนำตำรับยาที่ได้ไปทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพเปรียบเทียบกับสารสกัดของสมุนไพรเดี่ยว ต่อจากนั้นนำสารสกัดของสมุนไพรมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC และเครื่อง NMR ให้ได้โครมาโตแกรมและสเปกตรัมเพื่อใช้เป็น fingerprint

นำตำรับยาสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ดีที่สุดมาศึกษากลไกที่มีต่อปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ eNOS ตลอดจนทำการ ศึกษาผลของตำรับยาต่อการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177ของเอนไซม์ eNOS และศึกษาวิธีสัญญาณที่ส่วนสกัดใช้ในการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ ได้แก่ วิธี Akt

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไนตริกออกไซด์ เป็นอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์จาก L-arginine เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS, EC 1.14.13.39) มีโมเลกุลของออกซิเจนเป็นสารตั้งต้นร่วม เกิด five-electron oxidation ขึ้นที่อะตอมของไนโตรเจนที่อยู่ในกลุ่มกวานิดิน (guanidine) ของ L-arginine ได้เป็นไนตริกออกไซด์รวมทั้งได้ L-citrulline เป็นผลผลิตร่วม โดยในปฏิกิริยานี้จะอาศัย nicotinamide adenine dinucleotide (NADPH) flavin adenine dinucleotide (FAD), flavin mononucleotide (FMN), heme, calmodulin (CaM) และ tetrahydrobiopterin (BH₄) เป็นโคแฟกเตอร์ร่วม (Alderton et al., 2001) โมเลกุลของ NOS ที่แยกทีมีลักษณะเป็น dimer โครงสร้างของ NOS แต่ละหน่วยย่อยประกอบด้วย reductase domain และ oxygenase domain โดย oxygenase domain ประกอบด้วยบริเวณจับของกลุ่ม heme, L-arginine และ BH₄ ส่วน reductase domain ประกอบด้วยบริเวณจับของ NADPH, FAD, FMN และ calmodulin ในขณะที่ปฏิกิริยาจะมีการไหลของอิเล็กตรอนจาก NADPH ผ่านไปสู่ FAD และ FMN ใน reductase domain และไปที่กลุ่ม heme ใน oxygenase domain ซึ่งอิเล็กตรอนนี้จะใช้ในการรีดิวซ์อะตอมออกซิเจน และเกิดการออกซิไดซ์ L-arginine เป็น L-citrulline และไนตริกออกไซด์ (Forstermann and Sessa, 2012) เอนไซม์ NOS มีทั้งหมด 3 ไอโซฟอร์ม คือ neuronal nitric oxide synthase (nNOS) และ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ซึ่งมีการแสดงออกตลอดเวลา (constitutive isoforms) ผลิตไนตริกออกไซด์ในปริมาณต่ำ และ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ซึ่งจะมีการแสดงออกของยีนเมื่อถูกกระตุ้นโดยสิ่งเร้าต่างๆ (MacMicking, et al., 1997 และ Alderton et al., 2001) ไนตริกออกไซด์มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ในร่างกาย เช่น การสื่อสารสัญญาณประสาท (neurotransmission) ควบคุมความดันโลหิตโดยทำให้หลอดเลือดขยายตัว (vascular relaxation) ป้องกันการเกาะตัวของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) และการจับตัวกันของเม็ดเลือดขาว (leukocyte adhesion) รวมทั้งยังเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบมีมาแต่กำเนิด (innate immunity)

ไอโซฟอร์ม eNOS ส่วนมากมีการแสดงออกที่เซลล์เยื่อ การทำงานของเอนไซม์ eNOS จะถูกกระตุ้นเมื่อระดับ Ca²⁺ ในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น Ca²⁺ ที่สูงขึ้นจะจับกับ calmodulin และเหนี่ยวนำให้ calmodulin จับกับเอนไซม์ eNOS ได้แน่นขึ้นทำให้เพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ (Alderton et al., 2001) นอกเหนือจากการกระตุ้นด้วยการเพิ่มระดับของ Ca²⁺ แอกติวิตีของเอนไซม์ eNOS ยังถูกกระตุ้นด้วยการถูกฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) เอนไซม์ eNOS ถูกฟอสโฟรีเลชันที่กรดอะมิโนเซอรีน (Ser), ทรีโอนีน (Thr) และไทโรซีน (Tyr) ที่อยู่ในโครงสร้าง เช่น การฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 จะกระตุ้นการไหล

ของอิเล็กตรอนในบริเวณ reductase domain เพิ่มความไวต่อ Ca^{2+} (Fleming and Busse, 2003) สารต่างๆ ที่สามารถกระตุ้นการแอคติวิตีของเอนไซม์ของ eNOS โดยผ่านการกระตุ้นการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 ได้แก่ oestrogen และ VEGF กระตุ้นเอนไซม์ Akt ก่อนกระตุ้นการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 ฮอโรโมน insulin กระตุ้นเอนไซม์ Akt และ AMP-activated protein kinase (AMPK) ก่อนกระตุ้นการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 สาร bradykinin กระตุ้นการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 ผ่านการกระตุ้นเอนไซม์ Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) และ shear stress กระตุ้นเอนไซม์ PKA ก่อนกระตุ้นการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีการรายงานว่าเอนไซม์ kinase ต่างๆ ควบคุมเอนไซม์ eNOS ผ่านการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 แต่เอนไซม์ Akt เป็นเอนไซม์เพียงชนิดเดียวที่มีรายงานว่าควบคุมเอนไซม์ eNOS ได้ในสิ่งมีชีวิต (Forstermann and Sessa, 2012) นอกเหนือจากการควบคุมโดยการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 เอนไซม์ eNOS ยังถูกควบคุมโดยการฟอสโฟรีเลชันที่ Thr495, Ser114, Ser633, Tyr81 และ Tyr657 แต่กลไกที่ชัดเจนยังอยู่ในระหว่างการศึกษา

ไนตริกออกไซด์ที่ผลิตจากเอนไซม์ eNOS มีผลทางสรีรวิทยาต่างๆ โดยเฉพาะการควบคุมหลอดเลือด เช่น ทำให้หลอดเลือดขยายตัวโดยการไปจับกับกลุ่มฮีมของเอนไซม์ soluble guanylyl cyclase (sGC) ที่อยู่บริเวณกล้ามเนื้อเรียบรอบหลอดเลือดทำให้มีการเพิ่มการผลิต cGMP ส่งผลให้มีการขยายตัวของหลอดเลือด (Ignarro et al., 1986) และยับยั้งการเกาะตัวของเกร็ดเลือดและการยึดของเกร็ดเลือดจับกับผนังหลอดเลือด ทำให้การไหลเวียนของเลือดเกิดได้ดี ไนตริกออกไซด์ที่ผลิตจากเอนไซม์ eNOS ยังลดการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะการแข็งตัวของหลอดเลือด (atherosclerosis) เช่น โปรตีน MCP-1 ลดการจับของเม็ดเลือดขาวกับผนังหลอดเลือด นอกจากนี้ไนตริกออกไซด์ยังไปยับยั้งการหลั่งของ platelet-derived growth factor (PDGF) จึงทำให้การเพิ่มจำนวนของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบลดลง (Forstermann and Sessa, 2012) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าไนตริกออกไซด์ที่ผลิตจากเอนไซม์ eNOS แสดงฤทธิ์ต้านการเกิดการแข็งตัวของหลอดเลือด เมื่อเซลล์เยื่อหลอดเลือดทำงานผิดปกติ (endothelial dysfunction) จะทำให้ชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ (NO bioavailability) ลดลง สาเหตุหนึ่งที่ทำให้ชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ลดลงคือการเกิดความเครียดจากออกซิเดชัน เนื่องจากในขณะที่เกิดความเครียดจากออกซิเดชันทำให้มีการผลิต reactive oxygen species ในปริมาณที่สูงขึ้น โดยเฉพาะการผลิต superoxide ($O_2^{\cdot-}$) โดยเอนไซม์ NADPH oxidase ทำให้มีการรวมกันของไนตริกออกไซด์ และ $O_2^{\cdot-}$ เป็น peroxynitrite ($ONOO^-$) มากขึ้นจึงมีปริมาณไนตริกออกไซด์ลดลง นอกจากนี้ $ONOO^-$ ที่เพิ่มมากขึ้นยังไปออกซิไดซ์ BH_4 ที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ eNOS ทำให้ลด affinity ระหว่างเอนไซม์ eNOS กับ L-arginine จึงทำให้ eNOS เร่งปฏิกิริยา uncoupling แทน ทำให้เกิด $O_2^{\cdot-}$ แทนการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ (Zou et al., 2002) ดังนั้นจึงทำให้ชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อหลอดเลือดลดลงเป็นผลให้การควบคุมการทำงานของหลอดเลือด

ผิดปกติ นำไปสู่ภาวะการแข็งตัวของหลอดเลือด และโรคหลอดเลือดและหัวใจในที่สุด โดยเฉพาะในผู้ที่มีภาวะเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดและหัวใจ เช่น ผู้ป่วยเบาหวาน ผู้ที่มีภาวะโคเลสเตอรอลในเลือดสูง ผู้ที่มีความดันโลหิตสูง ผู้สูบบุหรี่ และผู้ที่มีความเครียด เป็นต้น (Vanhoutte et al., 2009; Forstermann and Sessa, 2012)

มีการศึกษาพบว่าการเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อหลอดเลือดทำได้หลายวิธี เช่น การเพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ eNOS โดยการเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS การเพิ่มปริมาณซัสเตรต L-arginine และการเพิ่มโคแฟกเตอร์ BH₄ และการเพิ่มปริมาณไนตริกออกไซด์โดย NO donor เป็นต้น (Zhang et al., 2010) การเพิ่มปริมาณ BH₄ โดยการเสริม BH₄ เป็นวิธีการป้องกันและรักษาโรคหลอดเลือดและหัวใจทางหนึ่ง แต่ปัญหาของการให้ BH₄ เสริมคือความไม่เสถียรของ BH₄ (Zhang et al., 2010) จึงมีความพยายามหาสารที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณ BH₄ ในเซลล์ เช่น fluvastatin สามารถเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ guanosine triphosphate cyclohydrolase-1 (GTPCH-1) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมการผลิต BH₄ ทำให้มีปริมาณ BH₄ มากขึ้น (Aoki et al., 2010) ในปัจจุบันมีการรายงานว่าส่วนสกัดจากพืชต่างๆ และสารบริสุทธิ์จากพืชสามารถกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS ได้ (Steinkamp-Fenske et al., 2007; Koltermann et al., 2007; Wattanapitayakul et al., 2007; Vanhoutte et al., 2009; Li et al., 2010)

Balayssac และคณะ (2009) ได้ศึกษาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคเสื่อมสมรรถภาพทางเพศที่จำหน่ายในฝรั่งเศส โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค diffusion ordered spectroscopy (DOSY) ¹H NMR พบว่ามีผลิตภัณฑ์ 8 ชนิดที่มีองค์ประกอบของสารที่มีโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับตัวยับยั้งเอนไซม์ PDE-5 ได้แก่ Sildenafil, tadalafil, vardenafil, hydroxyhomosildenafil, thiosildenafil, และยังพบสาร thiomethisosildenafil ใหม่ ได้ศึกษาการหาปริมาณของสารออกฤทธิ์ด้วยเทคนิค HPLC หรือ NMR นอกจากนี้ยังสามารถพิสูจน์สาร 30 ชนิดที่เป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์ได้อีกด้วย

Temkitthawon และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพรในการยับยั้งโรคเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ โดยทดสอบสารสกัดจากสมุนไพรจำนวน 81 ชนิดต่อการยับยั้งเอนไซม์ PDE-5 และมีสมุนไพรจำนวน 4 ชนิดที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งที่ดี และนำสารที่แยกได้จากเหง้าของต้นกระชายดำ (*Kaempferia parviflora*) มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PDE-5 และ PDE-6 พบว่า 7-methoxyflavones มีฤทธิ์ในการยับยั้งทั้งสองเอนไซม์ PDE-5 และ PDE-6 ในขณะที่ 5,7-dimethoxyflavone แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ PDE-5 ได้ดีที่สุด (IC₅₀) = 10.64 ± 2.09 μM, และมีความจำเพาะต่อเอนไซม์ PDE-5 มากกว่า PDE-6 เท่ากับ 3.71 นอกจากนี้จากการศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างสารต่อฤทธิ์ทางชีวภาพนั้น พบว่าหมู่ methoxyl ที่ตำแหน่งที่ 5 ของ 7-

methoxyflavones มีผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ แสดงถึงศักยภาพของสมุนไพรกระชายดำในการใช้ในการรักษาโรคนี้

ข้อมูลของพืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

1. กวาวเครือแดง

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Butea superba* Roxb

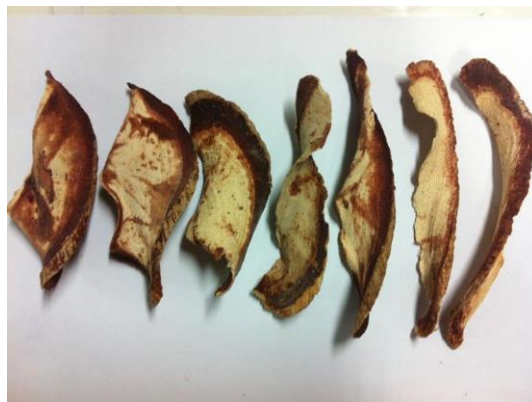
ชื่อวงศ์ : Papilionaceae

ชื่อสามัญ (ชื่อภาษาอังกฤษ) : -

ส่วนที่ใช้ : หัวใต้ดิน เถา

อยู่ในจำพวกไม้เลื้อยเป็นเถาวัลย์ เนื้อแข็ง ชอบขึ้นพาดกับต้นไม้ใหญ่ ใบใหญ่คล้ายใบของต้นทองกวาว ดอกใหญ่คล้ายดอกแคแสด เป็นพวงระย้าเหมือนดอกทองกวาว ฝักเล็กแบนบาง หัวใต้ดินมีรูปทรงกระบอกยาว เปลือกสีน้ำตาล มีหลายขนาด ฝานเปลือกออกจะมียางสีแดงสดซึมออกมา เนื้อในสีขาว (รูปที่ 2-1)

เป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณเป็นยาอายุวัฒนะ ช่วย บำรุงสมรรถภาพทางเพศ (Manosroi et al., 2006) ส่วนสกัดเอทานอลของกวาวเครือแดงมีประสิทธิภาพในการขยายหลอดเลือดของแกนองคชาติในหนูแรท (Tocharus et al., 2006)



รูปที่ 2-1 กวาวเครือแดง
(ภาพโดย ฐิติพร ทองเย็น)

2. กระชายดำ

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker

ชื่อวงศ์ : Zingiberaceae

ชื่อสามัญ (ชื่อภาษาอังกฤษ) : Belamcanda chimensis

ต้น กระจายดำเป็นพรรณไม้ล้มลุก ส่วนของแกนกลางลำต้นจะมีลักษณะแข็ง มีกาบใบที่อาบหนา นุ่ม หุ้มแกนลำต้นไว้ ใบของกระจายดำ เป็นใบเลี้ยงเดี่ยว สีของใบกระจายดำเมื่อเริ่มแตกใบอ่อนจะมีสีเขียวอมแดง และจะค่อยๆ สีจางไปเป็นสีเขียวเข้ม เหง้า รูปทรงกลม เรียงต่อกัน มักมีขนาดเท่าๆกัน หลายเหง้า อวบน้ำ ผิวเหง้าสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม อาจพบรอยที่ผิวเหง้าเป็นบริเวณที่จะงอกของต้นใหม่ เนื้อภายในสีม่วง (รูปที่ 2-2)



รูปที่ 2-2 เหง้ากระจายดำ
(ภาพโดย กล่าวขวัญ ศรีสุข)

เป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณเป็นยาบำรุงกำลัง เป็นยาอายุวัฒนะ (เชื่อว่าช่วยบำรุงสมรรถภาพทางเพศชาย) แก้ปวดเมื่อย และแก้อาการเหนื่อยล้า แก้โรคระเพาะ และปวดท้อง (Yenjai et al., 2004) ส่วนสกัดจากเหง้ากระจายดำสามารถเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์และเร่งการแสดงออกของโปรตีนและเอ็มอาร์เอ็นเอของเอนไซม์ eNOS (Wattanapitayakul et al., 2007) ต่อมาในปี ค.ศ. 2008 รายงานว่าส่วนสกัดจากเหง้ากระจายดำมีฤทธิ์เป็นยาบำรุงสมรรถภาพทางเพศ โดยเพิ่มการไหลเวียนของเลือด แต่ไม่มีผลต่อความดันเลือดที่หัวใจ และส่วนสกัดนี้ยังลดความเครียดจากออกซิเดชัน และเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ (Malakul et al., 2011).

3. มะรุม

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Moringa oleifera* Lam

ชื่อวงศ์ : Moringaceae.

ชื่อสามัญ (ชื่อภาษาอังกฤษ) : moringa, drumstick tree

ไม้พุ่ม หรือไม้ยืนต้น ใบประกอบแบบขนนก ใบย่อย 8-10 คู่ ดอก ออกเป็นช่อแบบแยกแขนง (รูปที่ 2-3) กลีบดอกสีเขียวอ่อน ผลเป็นฝักรูปดาบ หรือกระบอง เป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณใช้เปลือก ขับลมในลำไส้ พอกแผล ห้ามเลือด ใบ ห้ามเลือด ขับน้ำนม ทำให้นอนหลับ รักษาเลือดออกตามไรฟัน ดอก

ขับน้ำตา ขับปัสสาวะ กระตุ้นกำหนด ผล บำรุงกำลัง ถอนพิษไข้ แก้ขัดเบา แก้โรคตับและม้าม เมล็ด แก้ปวดตามข้อ (ฐานข้อมูลพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์, http://www.qsbg.org/database/botanic_book%20full%20option/search_detail.asp?botanic_id=2256) ใบมะรุรมีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ต้านเบาหวาน และต้านแบคทีเรีย (Anwar et al., 2007; Sreelatha & Padma, 2009)



รูปที่ 2-3 ใบมะรุรม

(ภาพโดย วิภาดา ศิริตันหยง)

4. ค้างคาวดำ

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Tacca chantrieri* Andr.

ชื่อวงศ์ : Taccaceae

ชื่ออื่น : เนระพูสีไทย (ตะวันออก) คลุ้มเลีย วานหัวฟา (จันทบุรี) ดิงหว่า (ภาคเหนือ) ดีปลากั้ง (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) ดีปลาซ่อน (ตราด) นิลพูสี (ตรัง) มังกรดำ (กรุงเทพฯ ฯ) ม้าถอนหลัก (ชุมพร) วานพังกอน (ยะลา)

เป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี มีเหง้าใต้ดิน ใบรูปขอบขนานถึงรูปใบหอก ปลายใบแหลมหรือเป็นติ่งแหลม โคนใบแหลมเบี้ยวเล็กน้อย ดอกออกเป็นช่อมี 1-3 ช่อ แต่ละช่อมี 4-25 ดอก ลักษณะคล้ายค้างคาวบิน กลีบประดับมี 2 คู่ ไร่ก้านสีม่วงแกมเขียวถึงสีม่วงดำ คุ่นอกรูปไข่ รูปขอบขนานหรือรูปใบหอก กลีบประดับเป็นเส้นมี 5-25 เส้น สีอ่อนกว่าแผ่นกลีบประดับยาว 10-25 ซม. กลีบรวมติดเป็นหลอดสั้นๆปลายแยกเป็น 6 กลีบ (รูปที่ 2-4) เป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณใช้เหง้ารักษาโรคความดันเลือดต่ำ บำรุงกำลัง บำรุงกำลัง ช่วยเจริญอาหาร ดับพิษไข้ กล่อมพิษทั้งปวง ทั้ง 5 แก้วเม็ดฝิ่นค้นตามร่างกาย (พงศศักดิ์ พลเสนา, 2550a และ http://www.panmai.Com/Warn/Warn_TACCAC_01.shtml)



รูปที่ 2-4 ใบ ลำต้นและดอกของต้นค่างควาดำ
(ภาพโดย กล่าวขวัญ ศรีสุข)

5. เร่วหอม

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Etlingera paviana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm.)

ชื่อวงศ์: Zingiberaceae

เป็นไม้ล้มลุก ลำต้นเป็นเหง้าใต้ดิน ใบเดี่ยว เรียงสลับดอกช่อ แหวงจากเหง้า ดอกย่อยสีแดง ทุกส่วนมีกลิ่นหอมเหง้าเร่วหอม แสดงดังรูปที่ 2-5 เป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณใช้ ผล ใช้เป็นเครื่องเทศ ขับลม แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ จุกเสียด เหง้า ขับลมในลำไส้ช่วยย่อยอาหาร แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ ใช้เป็นเครื่องเทศ แต่งกลิ่นอาหาร ใบ ช่วยในการขับปัสสาวะ หน่ออ่อน รับประทานเป็นผัก ขับลมในลำไส้ ช่วยย่อยอาหาร (พงศศักดิ์ พลเสนา, 2550b)

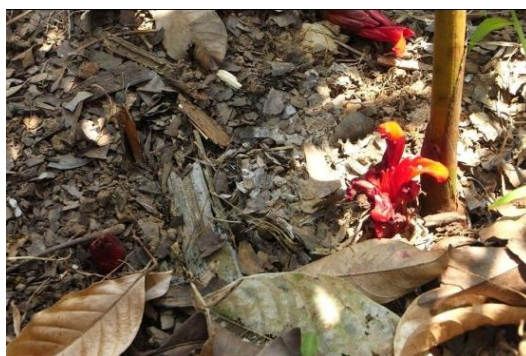
(A)



(B)



(C)



รูปที่ 2-5 ลักษณะเหง้าของเร่วหอม (A) ลักษณะใบของเร่วหอม (B) และลักษณะดอกของเร่วหอม (C)
(ภาพโดย กล่าวขวัญ ศรีสุข)

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมพืช และการสกัดสารจากสมุนไพรมะขาม

นำสมุนไพรมะขามที่ใช้ทดสอบคือ ค้างคาวดำ เร่วหอม มะขาม กระจ่างดำ และกวาวเครือแดง มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปา แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ก่อนนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสในตู้อบ จากนั้นนำไปบดเป็นผงให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพรมะขาม

การเตรียมส่วนสกัดเอทานอล โดยนำสมุนไพรมะขามที่บดละเอียด มาสกัดด้วย 95% เอทานอล และ 40% เอทานอล ในอัตราส่วน 1:10 ด้วยวิธี maceration นาน 7 วัน ทำการกรอง จากนั้นนำผงพืชกลับมาแช่ในเอทานอลซ้ำอีก 2 ครั้ง และนำสารละลายที่ได้มารวมกันและทำให้แห้งโดยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและเครื่องดูดสุญญากาศ จดบันทึกน้ำหนักของส่วนสกัดที่ได้ทั้งหมด ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสโดยไม่ให้โดนแสงเพื่อทำการทดสอบต่อไป

การเตรียมส่วนสกัดน้ำ โดยนำสมุนไพรมะขามที่บดละเอียด มาใส่ในน้ำเดือดนาน 30 นาที ในอัตราส่วน 1:30 ก่อนกรองสารละลายส่วนสกัดด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3 ภายใต้สุญญากาศโดยเครื่องดูดลดความดัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำผงพืชกลับมาต้มซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำส่วนสกัดน้ำของเหง้าเร่วหอม มาทำการระเหยน้ำด้วยเครื่อง Freeze dryer จดบันทึกน้ำหนักของส่วนสกัดที่ได้ทั้งหมด ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสโดยไม่ให้โดนแสงเพื่อทำการทดสอบต่อไป ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักของส่วนสกัดที่ได้ทั้งหมด พบว่าส่วนสกัดน้ำของพืชสมุนไพรมะขามชนิดมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง มากกว่าส่วนสกัด 40% เอทานอล และส่วนสกัด 95% เอทานอล ตามลำดับ

3.2 การทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด

3.2.1 การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยวิธี DPPH radical scavenging assay

การทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ทำตามวิธีที่รายงานโดย Srisook และคณะ (2012) มีวิธีทำโดยสุรุดังนี้เตรียมสารละลาย DPPH ในเมทานอลที่ความเข้มข้น 0.2 mM ปิเปตส่วนสกัดที่ละลายในเมทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆปริมาตร 50 μ L และสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 μ L ผสมให้เข้ากันในไมโครเพลทนาน 1 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท โดยใช้กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) และบีเอที (BHT) เป็นสารเปรียบเทียบ

3.2.2 ทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (ณัฐกานต์ แก้วมูล, 2557)

เตรียมสารละลายกรดแกลลิกในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เตรียมสารสกัดเอทานอลจากหัวกวาวเครือแดงที่ละลายในเอทานอลร้อยละ 95 สารสกัดน้ำจากเหง้ากระชายดำที่ละลายในน้ำกลั่น ตำรับยาสมุนไพรไทยสูตร BUU-ED-B3 ที่ละลายในเอทานอลร้อยละ 47.5 ที่ความเข้มข้น 1 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ไว้สำหรับใช้ละลาย NADH, NBT และ PMS จากนั้นทำการปิเปตต์สารสกัดหัวกวาวเครือแดง สารสกัดเหง้ากระชายดำ ตำรับยาสมุนไพรไทยสูตร BUU-ED-B3 อย่างละ 100 ไมโครลิตร และสารละลาย NADH ที่ความเข้มข้น 468 มิลลิโมลาร์ สารละลาย NBT ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ สารละลาย PMS ที่ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรอย่างละ 62.5 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มีดเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารควบคุมทางบวกและทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์จากสมการ

เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ = $[(A-(B-C))/A]*100$

โดย A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 100 ไมโครลิตร + NADH, NBT, PMS อย่างละ

62.5 ไมโครลิตร

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของส่วนสกัด 100 ไมโครลิตร + NADH, NBT, PMS อย่างละ

62.5 ไมโครลิตร

C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของส่วนสกัด 100 ไมโครลิตร + ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 187.5 ไมโครลิตร

3.2.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT

เซลล์เยื่อหลอดเลือดของมนุษย์ (human umbilical vein endothelial cells) EA.hy 926 cell line ซึ่งมาจาก ATCC นำมาเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ซึ่งมี 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 4 mM L-glutamine, 25 mM D-glucose, 1 mM sodium pyruvate และ 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) ในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ทำการ subculture โดยใช้ trypsin/EDTA

ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยใช้วิธี MTT assay มีวิธีการโดยย่อ ดังนี้ เลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีสารละลาย MTT แล้วนำกลับไปบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นละลายสาร formazan ที่เกิดขึ้นด้วย DMSO แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (Srisook และ Cha, 2004) แสดงผลในรูปร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งคำนวณจาก (ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สารทดสอบ/ ค่าการดูดกลืน

แสงของหลุมที่ไม่ใส่สารทดสอบ) X 100 ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละสภาวะการทดลอง

3.2.4 การทดสอบส่วนสกัดต่อการผลิตไนตริกออกไซด์

ไนไตรท์ (nitrite) และไนเตรท (nitrate) เกิดจากการออกซิเดชันไนตริกออกไซด์ ที่ผลิตโดยเอนไซม์ NOS ซึ่งปริมาณไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นดัชนีที่บ่งชี้แอกทีวิตีของเอนไซม์ NOS ปริมาณไนไตรท์ทดสอบได้โดยปฏิกิริยา Griess โดยมีวิธีการโดยย่อดังนี้ ให้เซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีส่วนสกัด และเลี้ยงเซลล์ในตู้บัพ 37 องศาเซลเซียส ที่เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml แล้วนำอาหารเลี้ยงเซลล์นี้จำนวน 100 μ l ผสมกับสารละลาย Griess [0.1% *N*-(1-naphtyl)-ethylenediamine and 1% sulfanilamide in 5 % phosphoric acid] จำนวน 100 μ l จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 นาโนเมตร และคำนวณความเข้มข้นของไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้จากกราฟมาตรฐานที่สร้างจาก sodium nitrite (Srisook และ Cha, 2005) ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละสภาวะการทดลอง ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ resveratrol เป็นสารควบคุมแบบบวกในการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อหุ้มเลือด

3.3 การทดสอบส่วนสกัดต่อปริมาณเอนไซม์ eNOS

การทดสอบปริมาณโปรตีน pSer1177-eNOS, total eNOS และ α -tubulin โดยวิธี Western blot analysis โดยให้เซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีส่วนสกัดในช่วงที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ และเลี้ยงเซลล์ในตู้บัพ 37 องศาเซลเซียส ที่เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ 1X PBS [137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4] ที่เย็น 2 ครั้งก่อนเติม RIPA protein lysis buffer [150 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 0.1% (v/v) SDS, 1% (v/v) sodium deoxycholate, 1% (v/v) Nonidet P-40] ปริมาตร 50 μ L ที่เติมสารละลาย 1X protease inhibitors จากนั้นใช้ cell scraper ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนเก็บใส่หลอดพลาสติกหลอดใหม่ นำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA assay และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ต่อไป

ทำการแยกโปรตีนรวมที่สกัดได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้โปรตีนเสียสภาพ ก่อนหยอดลงช่องของเจลที่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ (1X) running buffer [0.025 M Tris, 0.192 M glycine และ 0.1% (w/v) SDS] ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 80 V เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ก่อนจะย้ายแผ่นเจลที่ได้ไปบนเมมเบรน

Polyvinylidenedifluoride (PVDF) ที่ผ่านการแช่ใน absolute methanol เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ transfer buffer [192 mM glycine, 25 mM Tris, 10% (v/v) methanol] เป็นเวลา 5 นาทีแล้ว นำเมมเบรน PVDF ที่ประกบกับเจลไปใส่ในแทงค์ที่มีบัฟเฟอร์ transfer buffer ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 25 V เป็นเวลานานข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 °C นำแผ่นเมมเบรนที่ผ่านการส่งผ่านโปรตีนแล้วมาบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T [10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl และ 0.1% (v/v) Tween 20] ที่มี 5% (w/v) non-fat dried milk ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำเมมเบรนแช่ในสารละลายแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ทดสอบที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T จำนวน 3 ครั้ง เป็นเวลาครั้งละ 5 นาที ก่อนนำแผ่นเมมเบรนมาแช่ในสารละลาย anti-mouse IgG (H+L) ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ HRP เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T จำนวน 3 ครั้ง เป็นเวลาครั้งละ 5 นาที นำแผ่นเมมเบรนบ่มในสารละลายซับสเตรทสำหรับ enhanced chemiluminescence (ELC) เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปประกบฟิล์มเอกซเรย์ในห้องมืด วิเคราะห์ผลแถบสัญญาณโปรตีนที่ได้โดยโปรแกรม BIO-1D เวอร์ชัน 12.10a แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) ของโปรตีนเป้าหมาย เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ในการศึกษาที่ใช้ resveratrol เป็นสารควบคุมแบบบวกในการกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS ของเซลล์เยื่อหลอดเลือด

3.4 การทดสอบส่วนสกัดต่อการกระตุ้นวิถี Akt

วิถี PI(3)K/Akt เป็นวิถีที่ควบคุมการแสดงออกของยีน eNOS จึงทำการศึกษามูลของสารทดสอบต่อการฟอสโฟรีเลชันของเอนไซม์ Akt โดยใช้เทคนิค Wester blotting analysis เหมือนวิธีในข้อ 3.4 โดยใช้ anti pSer473-Akt, anti total Akt และ anti α -tubulin

3.5 การวิเคราะห์ chemical fingerprint ของสารสกัดโดยวิธี HPLC และ NMR spectroscopy

นำสารสกัดละลายในตัวทำละลายและวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ด้วย ODS column ขนาด 4.6x250 mm, 5 μ m ในสถานะตัวทำละลายสัดส่วนต่างๆ เช่น 20% MeOH 50% MeOH และ 100% MeOH วัดการดูดกลืนแสงด้วย UV detector ที่ 220, 254, 350 nm

นำสารสกัดละลายใน CDCl₃ หรือ DMSO-d₆ และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ¹H NMR spectroscopy โดยเครื่อง Bruker AVANC 400 เปรียบเทียบข้อมูลของสารสกัดต่างๆ ที่ได้จาก HPLC และ ¹H NMR

3.6 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ผลการทดลองที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของผลการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลการทดลองที่ได้ โดยเปรียบเทียบแบบ two-tailed student's t-test และ one-way ANOVA โดยกำหนดค่าความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 น้ำหนักของของส่วนสกัดพืชสมุนไพรต่างๆ

ตารางที่ 4-1 แสดงน้ำหนักของส่วนสกัดที่ได้ทั้งหมด พบว่าส่วนสกัดน้ำของพืชสมุนไพรทุกชนิดมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง มากกว่าส่วนสกัด 40% เอทานอล และส่วนสกัด 95% เอทานอล ตามลำดับ

ตารางที่ 4-1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดพืชสมุนไพรต่างๆ

พืชสมุนไพร	ส่วนสกัด	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง
ใบมะรุม (1)	95% เอทานอล (1E95)	3.4597	11.53
	40% เอทานอล (1E40)	8.1639	27.21
	น้ำ (1W)	4.5	45.00
เหง้ากระชายดำ (2)	95% เอทานอล (2E95)	2.3497	7.83
	40% เอทานอล (2E40)	4.6434	15.48
	น้ำ (2W)	3.02	30.20
เหง้าค้ำควาดำ (3)	95% เอทานอล (3E95)	2.8505	19.00
	40% เอทานอล (3E40)	4.22	28.13
	น้ำ (3W)	3.37	33.70
เหง้าเร่วหอม (4)	95% เอทานอล (4E95)	2.1619	7.21
	40% เอทานอล (4E40)	6.0832	20.28
	น้ำ (4W)	2.7	27.00
หัวกวาวเครือแดง (5)	95% เอทานอล (5E95)	2.3918	7.97
	40% เอทานอล (5E40)	7.7213	25.74
	น้ำ (5W)	3.89	38.90

4.2 ฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH และต้านอนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์ของส่วนสกัดพืชสมุนไพรต่างๆ

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีการ 2 วิธี คือ วิเคราะห์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH และต้านอนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์ พบว่าส่วนสกัดทุกส่วนสกัดออกฤทธิ์กำจัดอนุมูล DPPH ในลักษณะที่แปร

ผันตรงกับความสัมพันธ์ ดังแสดงในตารางที่ 4-2 นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาค่า IC_{50} ของการกำจัดอนุมูล DPPH ของส่วนสกัดพืชสมุนไพรต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าส่วนสกัด 95% เอทานอลของพืชทุกชนิดมีฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH สูงกว่าส่วนสกัด 40% เอทานอล และส่วนสกัดน้ำที่ได้จากพืชชนิดเดียวกัน ยกเว้นเร่วหอมที่ส่วนสกัดน้ำมีประสิทธิภาพดีที่สุด นอกจากนี้พบว่าส่วนสกัดน้ำของใบมะรุ้ม (1W) กับส่วนสกัดน้ำจากเหง้าค้ำคาวดำ (3W) มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับส่วนสกัด 95% เอทานอลของพืชแต่ละชนิด (1E95 และ 3E95) เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ของพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ พบว่าส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ดีที่สุดคือ 5E95 > 1W, 1E95 > 3E95, 3W ตามลำดับ ค่า IC_{50} ของการกำจัดอนุมูล DPPH ของ gallic acid ซึ่งเป็นสารควบคุมแบบบวก มีค่าเท่ากับ $6.47 \pm 0.22 \mu\text{g/ml}$

ตารางที่ 4-2 ค่า IC_{50} ของการกำจัดอนุมูล DPPH ของส่วนสกัดพืชสมุนไพรต่างๆ

พืชสมุนไพร	ส่วนสกัด	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
ใบมะรุ้ม (1)	95% เอทานอล (1E95)	325.77 ± 1.59^a
	40% เอทานอล (1E40)	402.49 ± 4.77^b
	น้ำ (1W)	296.58 ± 33.65^a
เหง้ากระชายดำ (2)	95% เอทานอล (2E95)	520.31 ± 52.59^a
	40% เอทานอล (2E40)	908.04 ± 49.66^b
	น้ำ (2W)	708.14 ± 29.85^c
เหง้าค้ำคาวดำ (3)	95% เอทานอล (3E95)	340.85 ± 1.63^a
	40% เอทานอล (3E40)	854.00 ± 34.37^b
	น้ำ (3W)	381.16 ± 1.48^a
เหง้าเร่วหอม (4)	95% เอทานอล (4E95)	770.98 ± 16.14^a
	40% เอทานอล (4E40)	1819.37 ± 0.33^b
	น้ำ (4W)	551.56 ± 24.41^c
หัวกวาวเครือแดง (5)	95% เอทานอล (5E95)	94.46 ± 0.52^a
	40% เอทานอล (5E40)	990.02 ± 12.29^b
	น้ำ (5W)	709.50 ± 3.32^c
Gallic acid		6.47 ± 0.22

หมายเหตุ ^{a, b, c} แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ $P < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยระหว่างส่วนสกัดของพืชชนิดเดียวกัน

ตัวทำละลายที่ออกฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ที่ดี คือ น้ำ เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ พบว่าส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ดีที่สุด คือ 3W > 2W > 4W ตามลำดับ (ตารางที่ 4-3) ค่า IC₅₀ ของการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของ gallic acid ซึ่งเป็นสารควบคุมแบบบวกมีค่าเท่ากับ 35.19±0.35 µg/ml

ตารางที่ 4-3 ค่า IC₅₀ ของการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ของส่วนสกัดพืชสมุนไพรต่างๆ

พืชสมุนไพร	ส่วนสกัด	IC ₅₀ (µg/ml)
ใบมะรุ้ม (1)	95% เอทานอล (1E95)	n.d.
	40% เอทานอล (1E40)	478.40±58.74 ^a
	น้ำ (1W)	321.93±45.28 ^b
เหง้ากระชายดำ (2)	95% เอทานอล (2E95)	n.d.
	40% เอทานอล (2E40)	380.97±17.25 ^a
	น้ำ (2W)	220.93±1.00 ^b
เหง้าค้ำคาวดำ (3)	95% เอทานอล (3E95)	2886.23±345.04 ^a
	40% เอทานอล (3E40)	286.98±2.45 ^b
	น้ำ (3W)	190.90±5.04 ^b
เหง้าเร่วหอม (4)	95% เอทานอล (4E95)	> 4 mg/ml
	40% เอทานอล (4E40)	691.77±6.29 ^a
	น้ำ (4W)	260.93±14.47 ^b
หัวกวาวเครือแดง (5)	95% เอทานอล (5E95)	295.61±27.13 ^a
	40% เอทานอล (5E40)	880.05±34.73 ^b
	น้ำ (5W)	534.24±48.33 ^c
Gallic acid		35.19±0.35

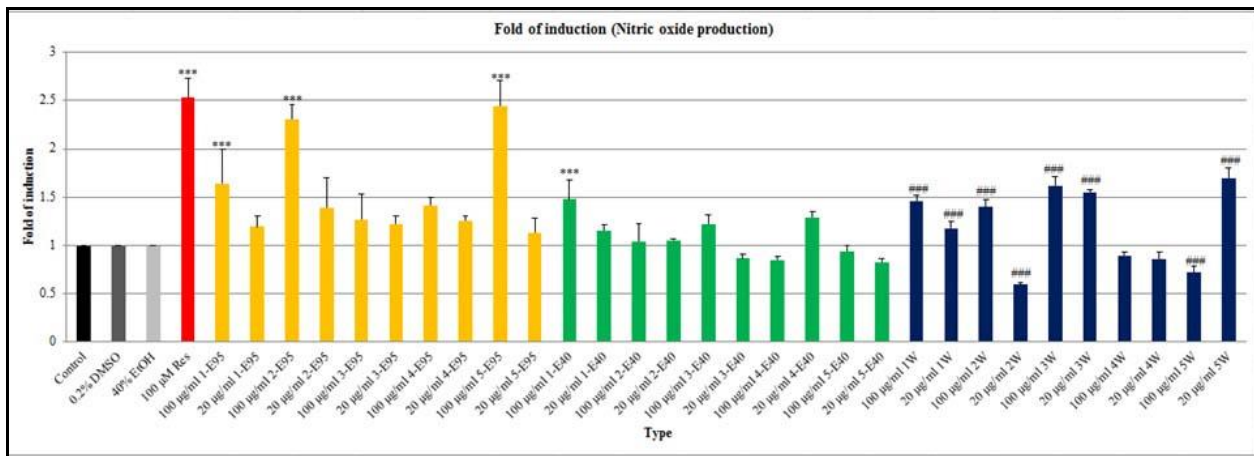
หมายเหตุ ^{a, b, c} แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ P<0.05) ของค่าเฉลี่ยระหว่างส่วนสกัดของพืชชนิดเดียวกัน, n.d. = not detect

4.3 ผลของส่วนสกัดพืชสมุนไพรต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ และควมมีชีวิตรอดของเซลล์

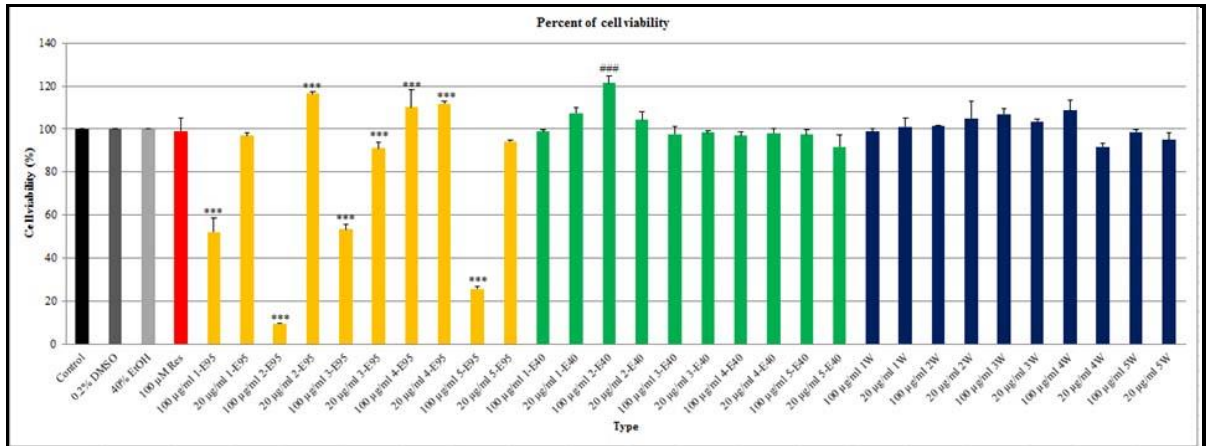
เมื่อให้เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ (EA. hy926) สัมผัสกับส่วนสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 20 และ 100 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณไนโตรทีโนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เป็นตัวชี้วัดปริมาณไนตริก

ออกไซด์ที่เซลล์ผลิตขึ้น โดยเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัด 95% เอทานอลของใบมะรุม (1E95) กระชายดำ (2E95) หัวกวาวเครือแดง (5E95) และส่วนสกัด 40% เอทานอลของใบมะรุม (1E40) ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ สามารถเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่สัมผัสกับ 0.2% DMSO (รูปที่ 4-1) ส่วนสกัดน้ำของพืชที่นำมาทดสอบทุกชนิดยกเว้นเร่วหอม สามารถเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ได้เช่นกัน ส่วน resveratrol ที่เป็นสารควบคุมแบบบวกสามารถเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อวิเคราะห์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ที่สัมผัสส่วนสกัดจากสมุนไพรมัน พบความมีชีวิตรอดของเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัด 95% เอทานอลของใบมะรุม (1E95) กระชายดำ (2E95) ค้างคาวดำ (3E95) และ หัวกวาวเครือแดง (5E95) ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเซลล์ควบคุม โดยมีชีวิตรอดน้อยกว่า 60% ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดอื่นมีค่ามากกว่า 80% (รูปที่ 4-2) ส่วน resveratrol ที่ความเข้มข้น 100 μM ไม่มีผลต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



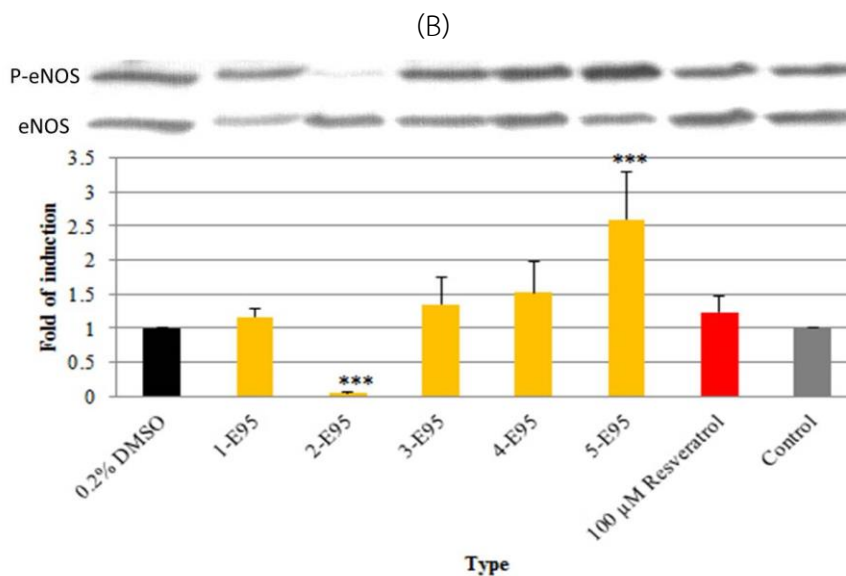
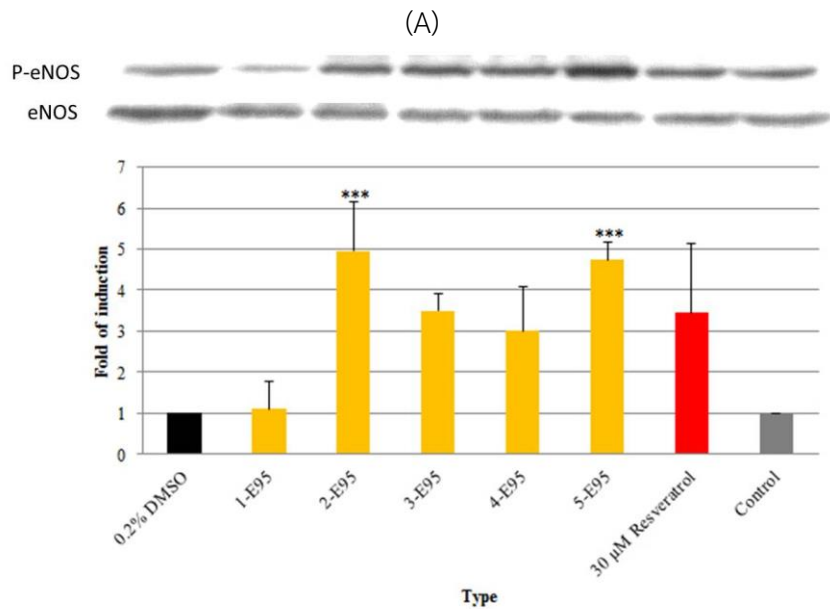
รูปที่ 4-1 การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อหุ้มนอกเซลล์ (EA. hy926) ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดสมุนไพรมันที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กราฟแสดงปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ ที่แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับส่วนสกัด ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่มีอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ *** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบแต่สัมผัสกับ 0.2 % (v/v) DMSO #### $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ (control)



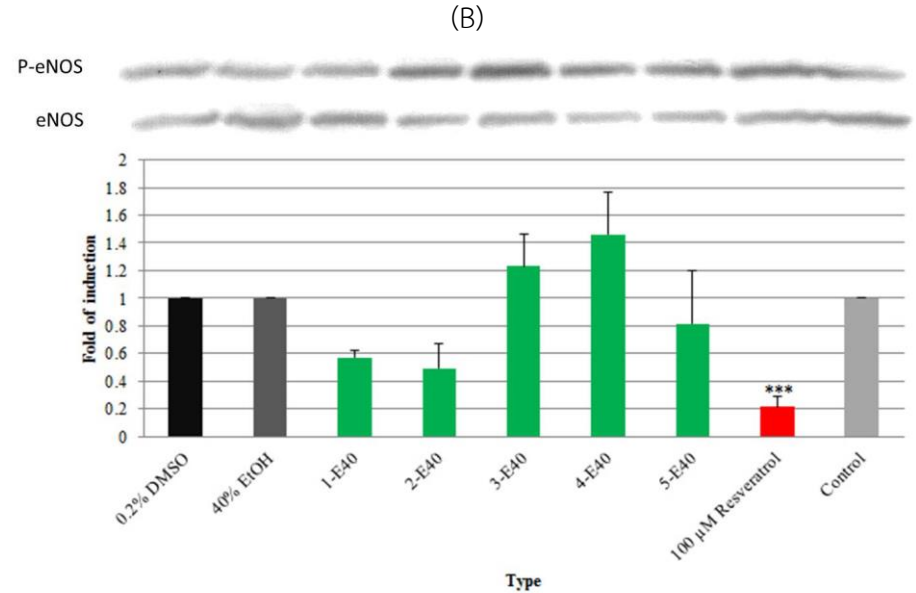
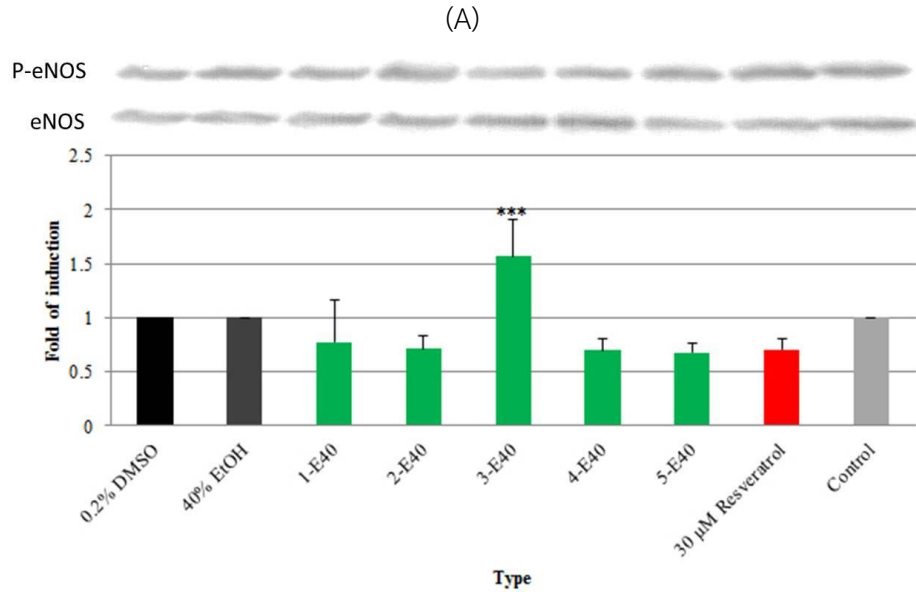
รูปที่ 4-2 ความมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อหุ้หลอดเลือดมนุษย์ (EA. hy926) ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งๆที่อิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ *** p<0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบแต่สัมผัสกับ 0.2 % (v/v) DMSO #### p<0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ (control)

4.4 ผลของส่วนสกัดพืชสมุนไพรต่อการกระตุ้นเอนไซม์ eNOS

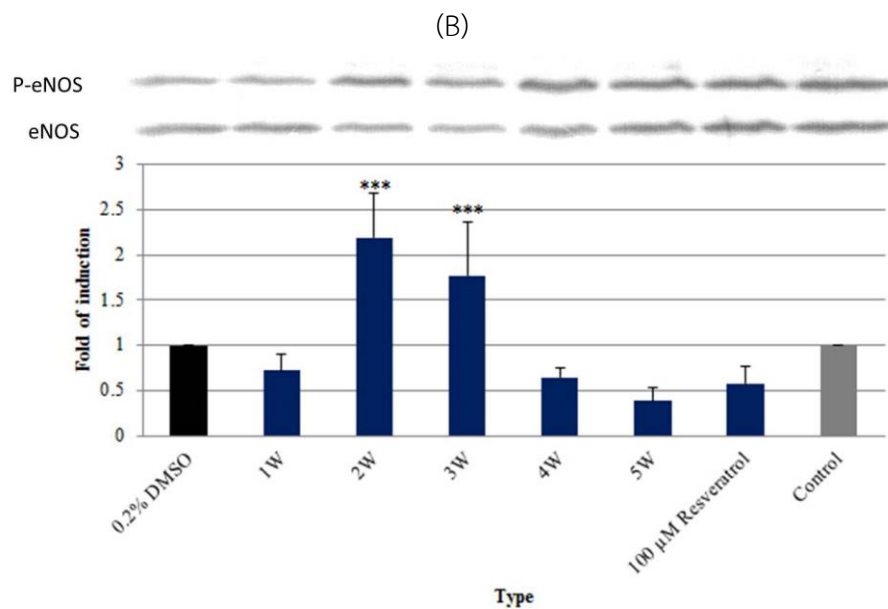
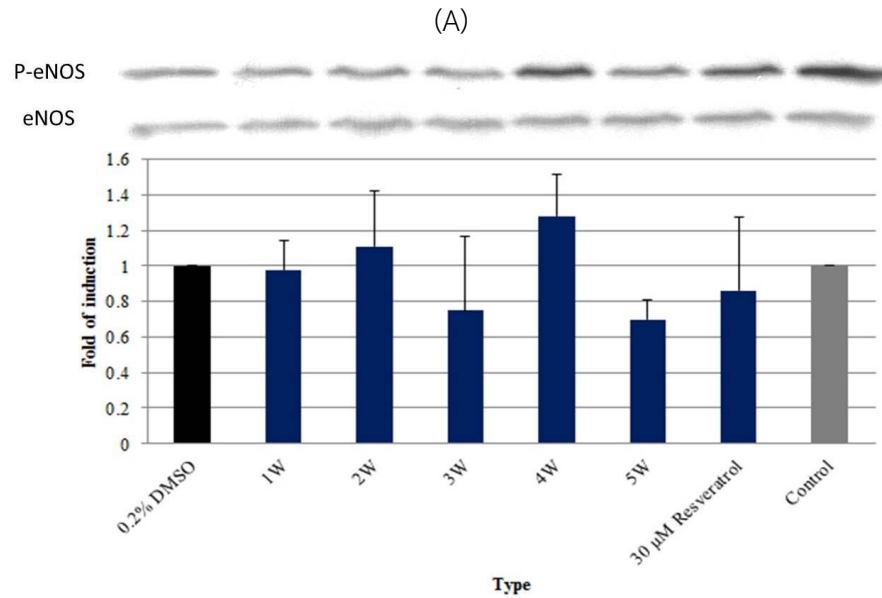
ส่วนสกัด 95% เอทานอลของกระชายดำ (2E95) และหัวกวาวเครือแดง (5E95) ส่วนสกัด 40% เอทานอลของค่างควาดำ (3E40) ส่วนสกัดน้ำของกระชายดำ (2W) และค่างควาดำ (3W) ที่ความเข้มข้น 100 μg/ml สามารถกระตุ้นเอนไซม์ eNOS โดยเพิ่มการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 ของเอนไซม์ eNOS เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่สัมผัสกับ 0.2 % (v/v) DMSO ดังแสดงในรูปที่ 4-3 ถึง 4-5



รูปที่ 4-3 ผลของส่วนสกัด 95% เอทานอลของพืชสมุนไพรต่อปริมาณโปรตีน p-Ser 1177 eNOS ในเยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดจากพืชสมุนไพรที่ความเข้มข้น 100 µg/ml เป็นเวลา 10 นาที (A) และ 60 นาที (B) เป็นภาพตัวแทนจาก immunoblot ของแถบโปรตีนจากการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน กราฟแสดงปริมาณของโปรตีน p-Ser 1177 eNOS ที่แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมสัมผัสกับ 0.2 % (v/v) DMSO ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง ***p<0.001 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่สัมผัสกับ DMSO



รูปที่ 4-4 ผลของส่วนสกัด 40% เอทานอลของพืชสมุนไพรต่อปริมาณโปรตีน p-Ser 1177 eNOS ในเยื่อหุ้มหลอดเลือดมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดจากพืชสมุนไพรที่ความเข้มข้น 100 μ g/ml เป็นเวลา 10 นาที (A) และ 60 นาที (B) เป็นภาพตัวแทนจาก immunoblot ของแถบโปรตีนจากการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน กราฟแสดงปริมาณของโปรตีน p-Ser 1177 eNOS ที่แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมสัมผัสกับ 0.2 % (v/v) DMSO ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง *** $p < 0.001$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่สัมผัสกับ DMSO



รูปที่ 4-5 ผลของส่วนสกัดน้ำของพืชสมุนไพรรตอปริมาณโปรตีน p-Ser 1177 eNOS ในเยื่อหลอดเลือดมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดจากพืชสมุนไพรรตอที่ความเข้มข้น 100 µg/ml เป็นเวลา 10 นาที (A) และ 60 นาที (B) เป็นภาพตัวแทนจาก immunoblot ของแถบโปรตีนจากการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน กราฟแสดงปริมาณของโปรตีน p-Ser 1177 eNOS ที่แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมสัมผัสกับ 0.2 % (v/v) DMSO ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง ***p<0.001 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่สัมผัสกับ DMSO

4.5 การตั้งตำรับยาสมุนไพร

ทำการตั้งตำรับยาสมุนไพรใหม่ โดยวิธีการสองวิธีคือ 1) วิธี blended extract โดยนำเอาส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดีมาผสมกัน จากการทดลองได้ตำรายาใหม่ 4 ตำรับ คือ BF1-BF4 ดังแสดงผลในตารางที่ 4-4 และ 2) วิธี combined extract โดยการนำพืชมารวมกันและสกัดด้วยตัวทำละลายพร้อมกัน จากการทดลองได้ตำรายาใหม่ 3 ตำรับ คือ CF1-CF4 ดังแสดงผลในตารางที่ 4-4

ตารางที่ 4-4 ส่วนประกอบของตำรับยาสมุนไพรต่างๆ

	ตำรับยาสมุนไพร	ส่วนประกอบ
Blended extract	BF1	5E95+1E95
	BF2	5E95+2E95
	BF3	5E95+2W
	BF4	5E95+4W
Combined extract	CF1	มะรุม+กระชายดำ
	CF2	มะรุม+กวาวเครือแดง
	CF3	กระชายดำ+กวาวเครือแดง

4.6 ฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH และต้านอนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์ของตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract

ตารางที่ 4-5 แสดงฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH และฤทธิ์การกำจัดอนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์ ของตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract พบว่าสูตร BF1, BF3 และ BF4 มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ที่ใกล้เคียงกัน แต่มีฤทธิ์ที่ต่ำกว่าสูตร BF2 ในส่วนของฤทธิ์การกำจัดอนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์พบว่า สูตร BF3 และ BF4 มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์ ที่สูงกว่าสูตร BF1 และ BF2 ประมาณ 3 เท่า

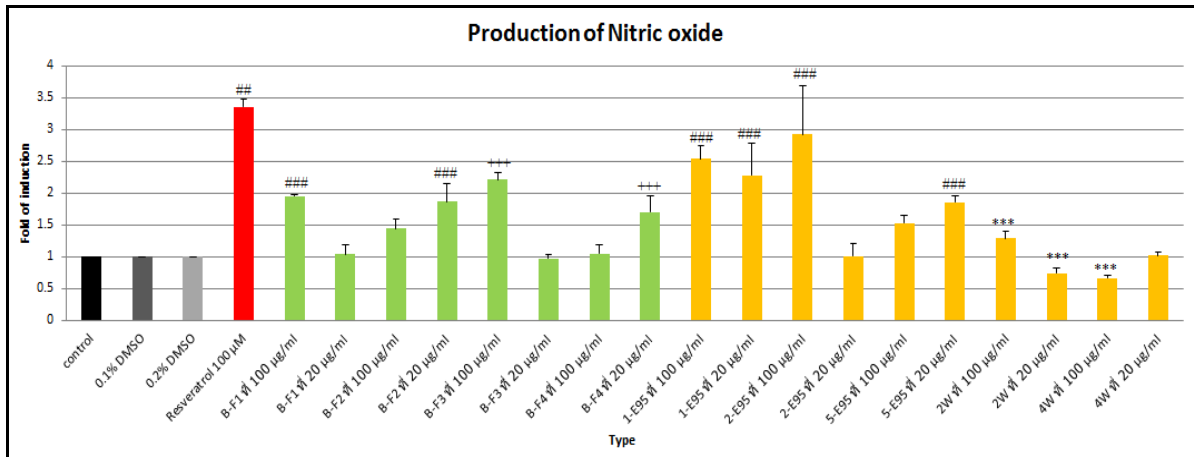
ตารางที่ 4-5 ค่า IC₅₀ ของการกำจัดอนุมูล DPPH และอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ของส่วนสกัดพืชสมุนไพรต่างๆ

ตำรับยาสมุนไพร	IC ₅₀ ของฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH (µg/ml)	IC ₅₀ ฤทธิ์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (µg/ml)
BF1	123.35±4.34 ^b	1131.54±136.42 ^a
BF2	150.39±0.96 ^a	1165.68±248.57 ^a
BF3	124.07±2.31 ^b	315.09±65.78 ^b
BF4	110.92±7.52 ^b	270.60±29.16 ^b

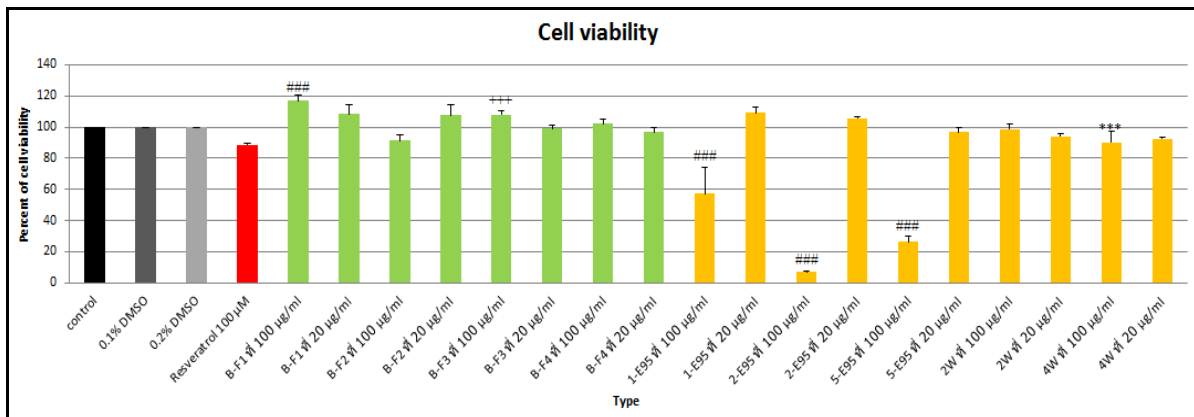
หมายเหตุ ^{a, b, c} แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ P<0.05) ของค่าเฉลี่ยในการทดสอบเดียวกัน

4.7 ผลของตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract ต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ และความมีชีวิตรอดของเซลล์

ตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract สูตร BF1 และ BF3 ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml และสูตร BF2 และ BF4 ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml สามารถเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ หรือตัวทำละลาย DMSO (รูปที่ 4-6) ในขณะที่ตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract ทุกสูตรไม่ทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม (รูปที่ 4-7)



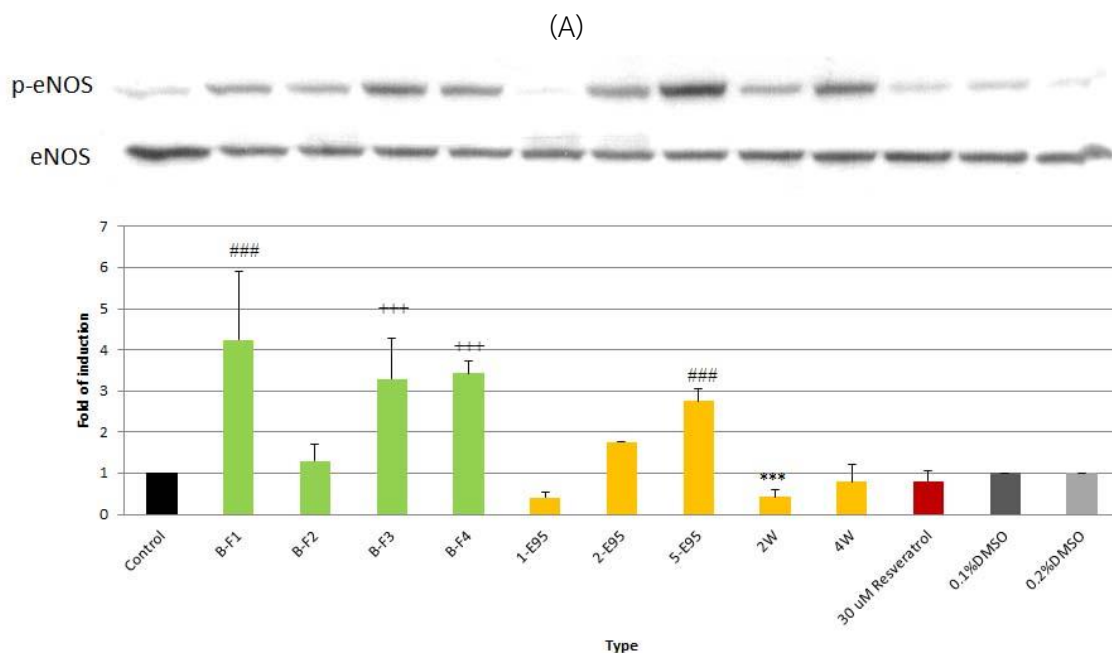
รูปที่ 4-6 การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อหุ้มหลอดเลือดมนุษย์ (EA. hy926) ที่ถูกบ่มด้วยตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กราฟแสดงปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ที่แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับส่วนสกัด ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่มีอิสระต่อกัน แต่แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ *** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ (control) ##, ### $p < 0.01$ และ $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบแต่สัมผัสกับ 0.2 % (v/v) DMSO และ +++ $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบแต่สัมผัสกับ 0.1% (v/v) DMSO



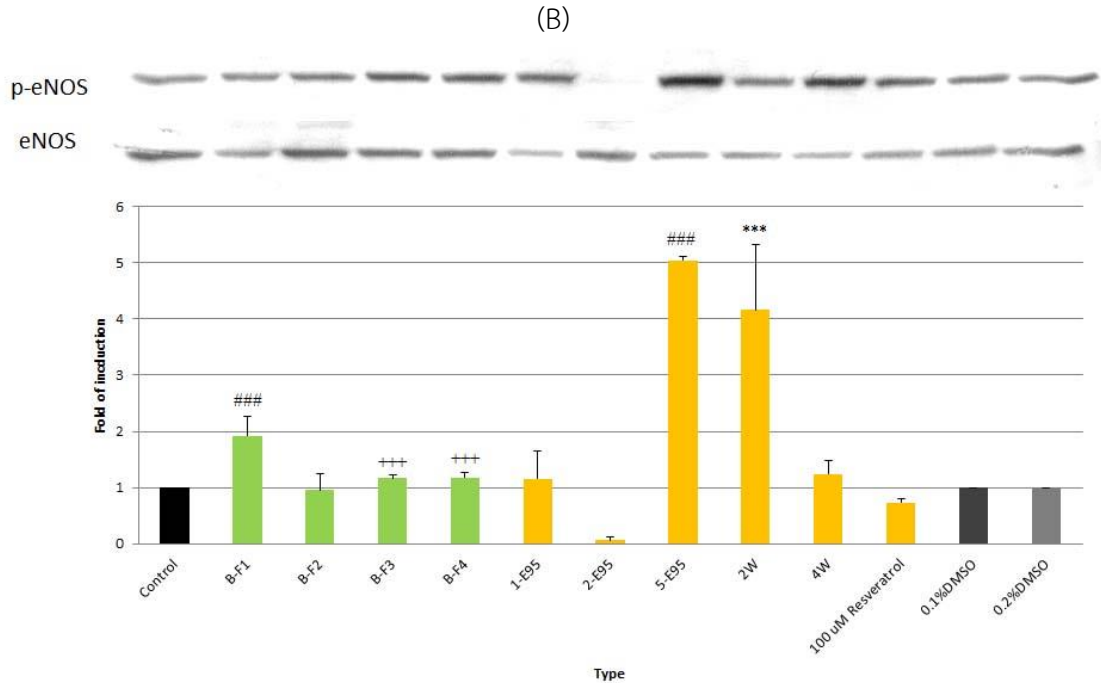
รูปที่ 4-7 ความมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อหุ้มหลอดเลือดมนุษย์ (EA. hy926) ที่ถูกบ่มด้วยตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่มีอิสระต่อกัน แต่แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ *** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ (control) #### $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบแต่สัมผัสกับ 0.2 % (v/v) DMSO และ +++ $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบแต่สัมผัสกับ 0.1% (v/v) DMSO

4.8 ผลของตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract ต่อการกระตุ้นเอนไซม์ eNOS

เมื่อให้เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดสัมผัสกับตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract เป็นเวลา 10 และ 60 นาที พบว่าสูตร BF1, BF3 และ BF4 สามารถเพิ่มการกระตุ้นเอนไซม์ eNOS โดยเพิ่มการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 ของเอนไซม์ eNOS เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่สัมผัสกับ 0.2 % (v/v) DMSO ดังแสดงในรูปที่ 4-8



รูปที่ 4-8 ผลของตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract ต่อปริมาณโปรตีน p-Ser 1177 eNOS ในเยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดจากพืชสมุนไพรที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 10 นาที (A) และ 60 นาที (B) เป็นภาพตัวแทนจาก immunoblot ของแถบโปรตีนจากการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน กราฟแสดงปริมาณของโปรตีน p-Ser 1177 eNOS ที่แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมสัมผัสกับ 0.2 % (v/v) DMSO ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง *** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ (control) #### $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบแต่สัมผัสกับ 0.2 % (v/v) DMSO และ +++ $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบแต่สัมผัสกับ 0.1% (v/v) DMSO



รูปที่ 4-8 (ต่อ) ผลของตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract ต่อปริมาณโปรตีน p-Ser 1177 eNOS ในเยื่อหลอดเลือดมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดจากพืชสมุนไพรที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 10 นาที (A) และ 60 นาที (B) เป็นภาพตัวแทนจาก immunoblot ของแถบโปรตีนจากการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน กราฟแสดงปริมาณของโปรตีน p-Ser 1177 eNOS ที่แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมสัมผัสกับ 0.2 % (v/v) DMSO ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง *** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ (control) #### $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบแต่สัมผัสกับ 0.2 % (v/v) DMSO และ +++ $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบแต่สัมผัสกับ 0.1% (v/v) DMSO

4.9 ฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ของตำรับยาสมุนไพรแบบ combined extract

ในการศึกษานี้ทำการเตรียมตำรับยาสมุนไพรแบบ combined extract โดยใช้วิธีสกัด 2 แบบ เพื่อเปรียบเทียบกันระหว่างวิธีสกัดแบบ maceration และวิธีสกัดแบบ soxhlet และนำตำรับยาสมุนไพรที่ได้จากการสกัดทั้งสองแบบมาทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ดังแสดงค่า IC_{50} ของการกำจัดอนุมูล DPPH ในตารางที่ 4-6 พบว่าตำรับยาสมุนไพรแบบ combined extract ที่สกัดโดยวิธีแบบ maceration นั้นสูตร CF1 มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ดีกว่าสูตร CF2 และ CF3 ตามลำดับ ส่วนการสกัดโดยวิธี soxhlet พบว่าสูตร CF2 มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ดีกว่าสูตร CF1 และ CF3 ตามลำดับ เมื่อ

เปรียบเทียบระหว่างวิธีการสกัดทั้งสองวิธี จะเห็นว่าการสกัดแบบ maceration ทำให้ตำรับยาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ที่ดีกว่าวิธีสกัดแบบ soxhlet อย่างชัดเจน

ตารางที่ 4-6 ค่า IC₅₀ ของการกำจัดอนุมูล DPPH ของตำรับยาสมุนไพรแบบ combined extract

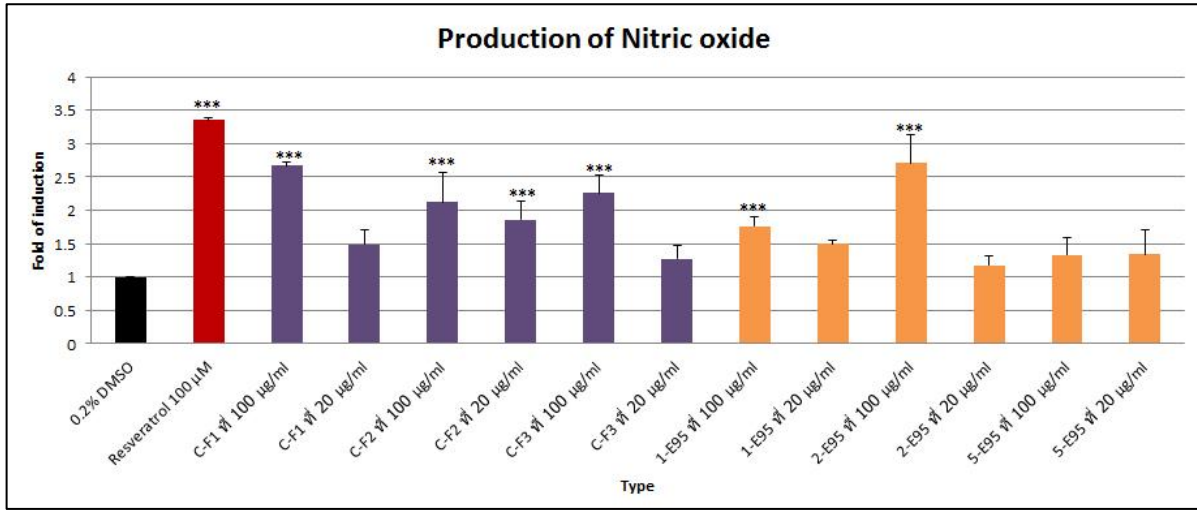
ตำรับยาสมุนไพร	IC ₅₀ ของฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH (µg/ml)	
	Maceration extraction	Soxhlet extraction
CF1	561.59 ± 25.04 ^a	902.85 ± 0.05 ^a
CF2	653.64 ± 10.47 ^b	800.88 ± 0.06 ^a
CF3	711.51 ± 17.97 ^c	1020.00 ± 0.03 ^b

หมายเหตุ ^{a, b, c} แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ P<0.05) ของค่าเฉลี่ยในการทดสอบเดียวกัน

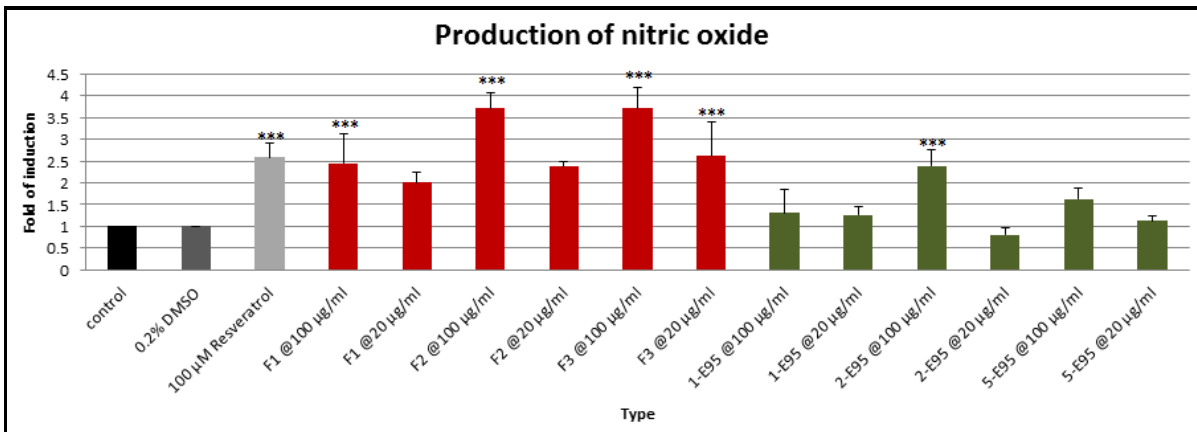
4.10 ผลของตำรับยาสมุนไพรแบบ combined extract ต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ และ ความมีชีวิตรอดของเซลล์

ตำรับยาสมุนไพรแบบ combined extract สูตร CF1, CF2 และ CF3 ที่สกัดแบบ maceration และแบบ soxhlet สามารถเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่สัมผัสกับ 0.2 % (v/v) DMSO (รูปที่ 4-9) และพบว่าตำรับยาสมุนไพรแบบ combined extract ที่สกัดแบบ maceration ทุกสูตร ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม (รูปที่ 4-10A) ส่วนตำรับยาสมุนไพรแบบ combined extract ที่สกัดแบบ soxhlet สูตร CF1 และ CF3 ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม แต่ในขณะที่สูตร CF2 ไม่ทำให้ความมีชีวิตรอดลดลง (รูปที่ 4-1B)

(A)

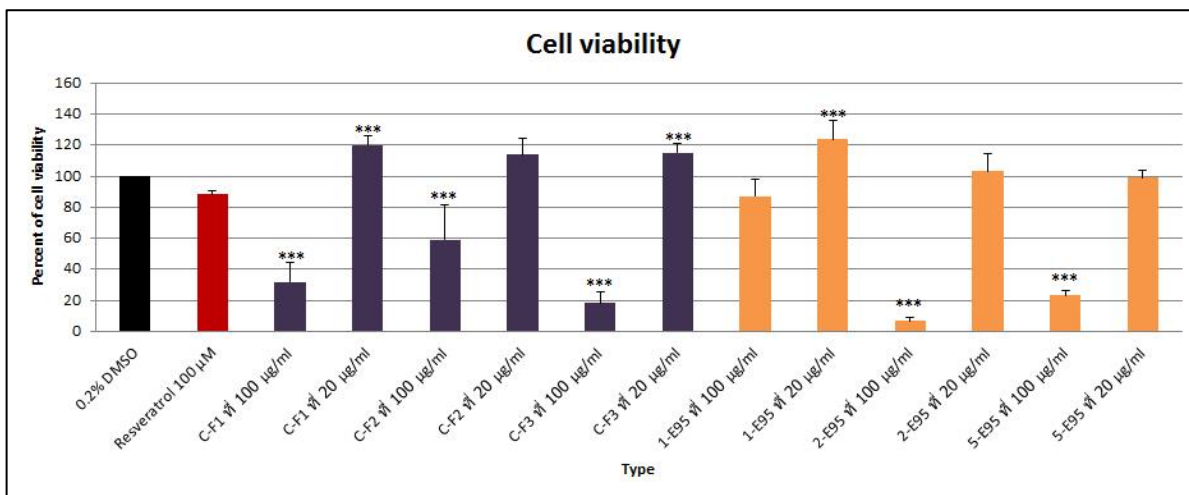


(B)

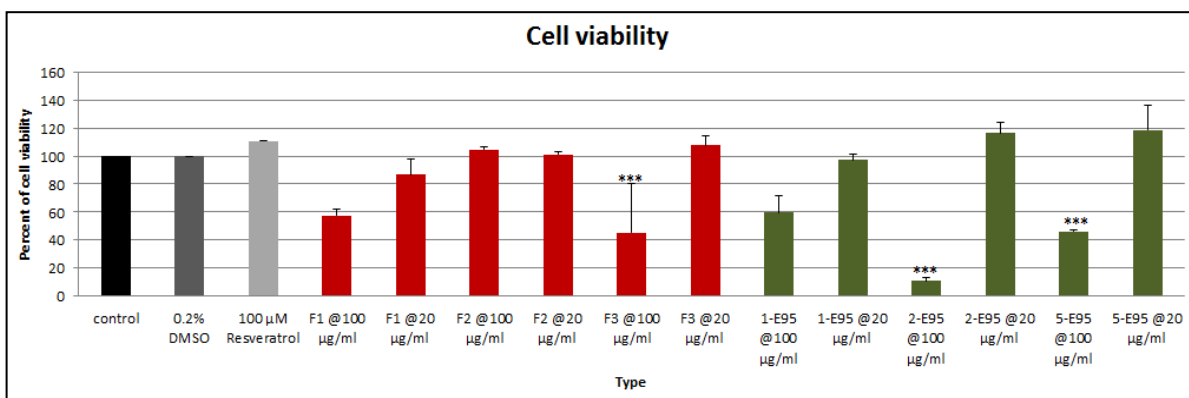


รูปที่ 4-9 การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อหุ้มหลอดเลือดมนุษย์ (EA. hy926) ที่ถูกบ่มด้วยตำรับยาสมุนไพรแบบ combined extract เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (A) วิธีสกัดแบบ maceration และ (B) วิธีสกัดแบบ soxhlet กราฟแสดงปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ที่แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับส่วนสกัด ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่มีอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ *** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบแต่สัมผัสกับ 0.2 % (v/v) DMSO

(A)



(B)



รูปที่ 4-10 ความมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อหุ้มหลอดเลือดมดมนุษย์ (EA. hy926) ที่ถูกบ่มด้วยตำรับยาสมุนไพรแบบ combined extract เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (A) วิธีสกัดแบบ maceration และ (B) วิธีสกัดแบบ soxhlet ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่มีอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ *** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบแต่สัมผัสกับ 0.2 % (v/v) DMSO

4.11 ผลของตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract สูตร BF3 ต่อการกระตุ้นเอนไซม์ eNOS

การกระตุ้นแอกติวิตีของเอนไซม์ eNOS อีกวิธีหนึ่งนอกเหนือจากการเพิ่มระดับ Ca^{2+} คือการถูกฟอสโฟริเลชันที่เอนไซม์ eNOS เช่น การฟอสโฟริเลชันที่ Ser1177, Thr495, Ser114, Ser633, Tyr81 และ Tyr657 แต่บริเวณการฟอสโฟริเลชันที่ถูกศึกษากลไกอย่างชัดเจน คือ ที่ Ser1177 (Fleming และ Busse, 2003) ดังนั้น

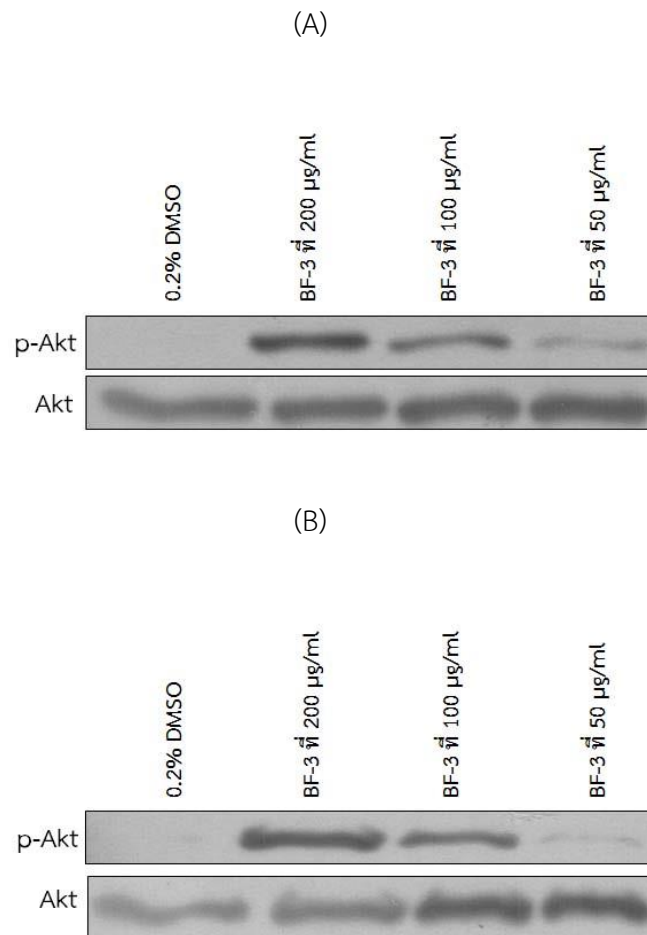
ในการศึกษานี้ทำการวิเคราะห์ผลของตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract สูตร BF3 ต่อการฟอสโฟริเลชันของโปรตีน eNOS (pSer1177-eNOS) ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด พบว่าตำรับยาสมุนไพรสูตร BF3 ที่ทุกความเข้มข้นสามารถเพิ่ม p-eNOS ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม (รูปที่ 4-11) โดยลักษณะของการเพิ่มการฟอสโฟริเลชันของโปรตีน eNOS เป็นไปในลักษณะที่แปรผกผันกับความเข้มข้นของสารทดสอบ



รูปที่ 4-11 ผลของตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract สูตร ต่อปริมาณโปรตีน p-Ser 1177 eNOS ในเยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัด BF3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 10 นาที เป็นภาพตัวแทนจาก immunoblot ของแถบโปรตีนจากการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน กราฟแสดงปริมาณของโปรตีน p-Ser 1177 eNOS ที่แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมสัมผัสกับ 0.2 % (v/v) DMSO ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง *** $p < 0.001$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่สัมผัสกับ DMSO

4.12 ผลของตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract สูตร BF3 ต่อวิถีสัญญาณ Akt ในเซลล์เยื่อหุ้มหลอดเลือด EA.hy 926

การศึกษาผลของตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract สูตร BF3 ต่อการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser 473 ของเอนไซม์ Akt พบว่า ตำรับยาสูตร BF3 เพิ่มปริมาณเอนไซม์ในรูป p-Akt ที่เวลา 15 และ 30 นาที หลังสัมผัสกับส่วนสกัด ในลักษณะที่แปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารทดสอบ (รูปที่ 4-12)

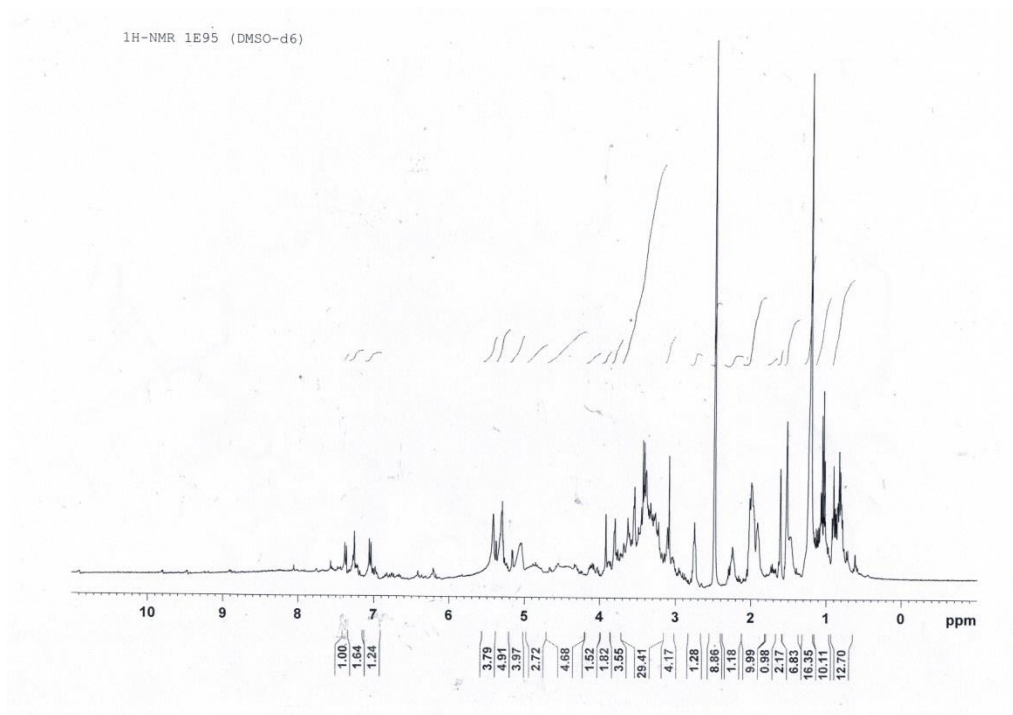


รูปที่ 4-12 ปริมาณโปรตีน pAkt ในเยื่อหุ้มหลอดเลือดมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract สูตร BF3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 15 (A) และ 30 นาที (B) กราฟแสดงปริมาณของโปรตีน pAkt ที่แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมสัมผัสกับ 0.2 % (v/v) DMSO

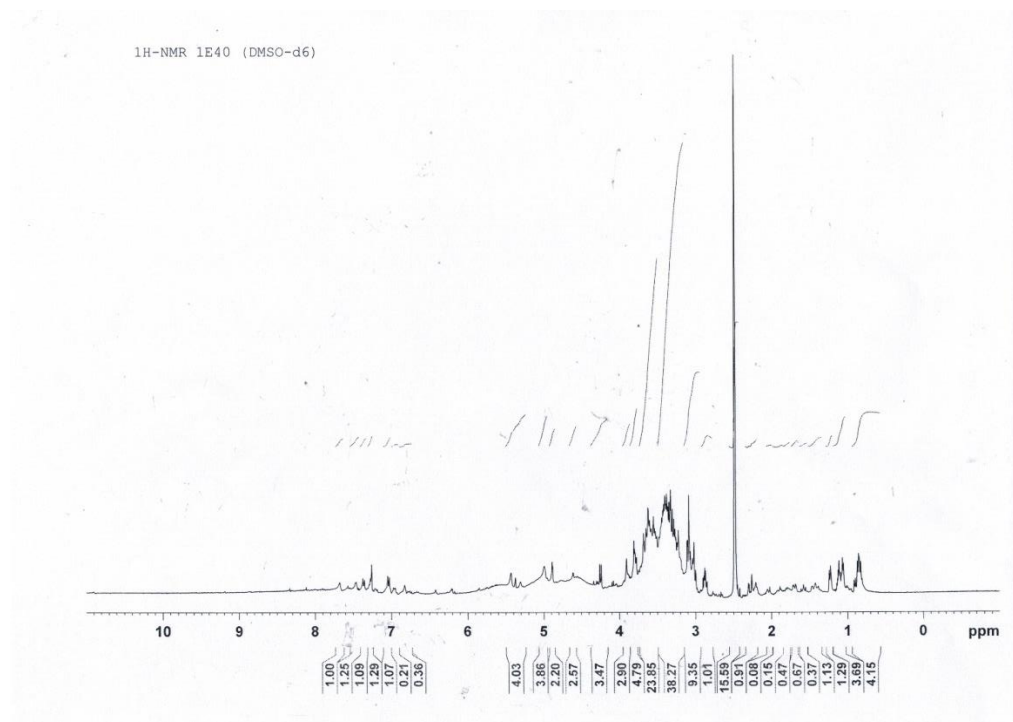
4.13 การศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลทางโครมาโตกราฟีและข้อมูลทาง NMR ของส่วนสกัดและตำรับยาสมุนไพร

จากผลการสกัดสารทั้งหมด 15 ส่วนสกัด จากสมุนไพร 5 ชนิด คือใบมะรุ้ม เหง้ากระชายดำ เหง้าค่างควาดำ เหง้าเร่วหอม หัวกวาวเครือแดง โดยใช้ตัวทำละลายเป็น เอทานอล 40%, เอทานอล 95% และ น้ำกลั่น เมื่อนำไปตรวจสอบคุณสมบัติทางเสปคโตรสโคปีเบื้องต้นด้วย ^1H NMR spectrometer (รูปที่ 4-13 ถึง 4-37) พบว่า สารสกัดส่วนใหญ่มีองค์ประกอบเป็นน้ำตาลหรืออนุพันธ์น้ำตาล จากที่มีพีคช่วง 3-5 ppm ยกเว้นส่วนสกัดจากกระชายดำ ที่มีสารกลุ่มนี้้น้อย นอกจากนี้ส่วนสกัดกลุ่มกระชายดำมีสารกลุ่มฟีนอลิกที่โดดเด่น จากที่มีพีคช่วง 6.5-8.5 ppm และสูตรตำรับที่เกิดจากการผสมของส่วนสกัดแสดงให้เห็นพีคที่เกิดจากการรวมกันของแต่ละส่วนผสม

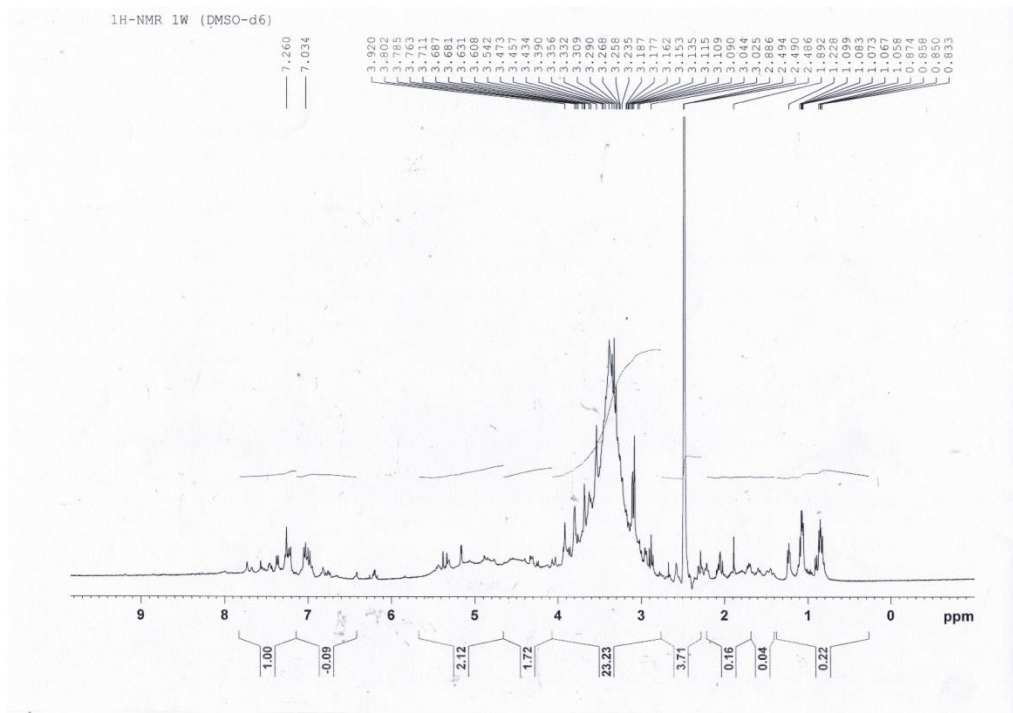
จากผลการวิเคราะห์ HPLC โครมาโตแกรมของส่วนสกัดสมุนไพรเดี่ยวและตำรับยาสูตรสมุนไพร สูตร BF3 ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ทำให้ข้อมูล HPLC fingerprint ของแต่ละส่วนนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงได้ในอนาคต (รูปที่ 4-38 ถึง 4-40)



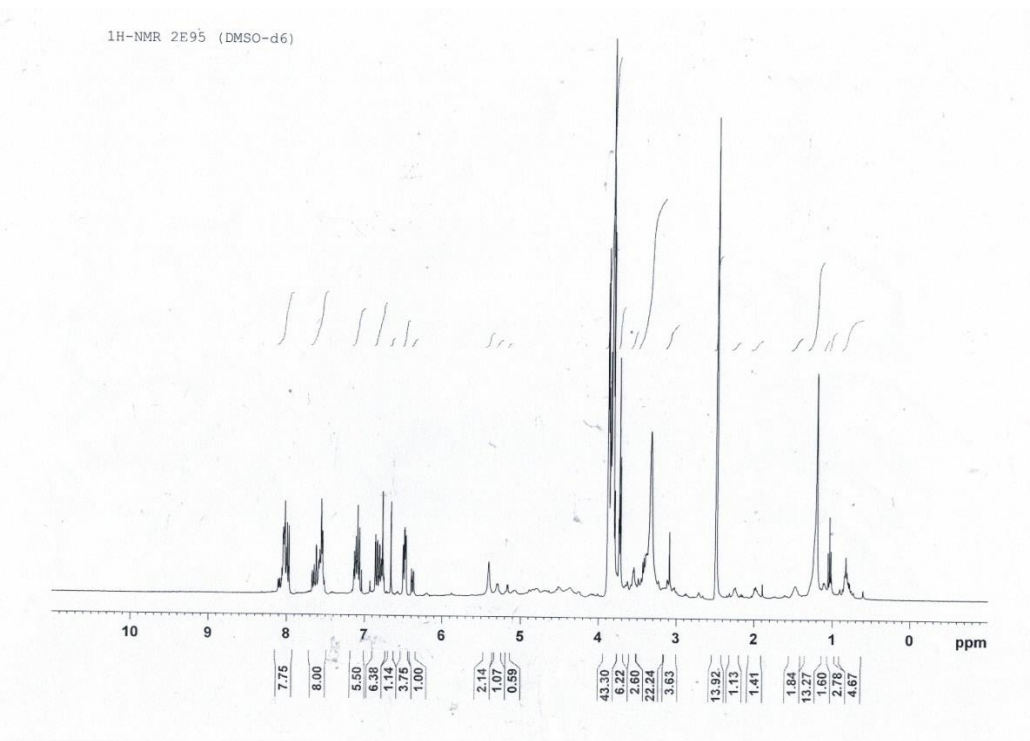
รูปที่ 4-13 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด 95% เอทานอลของโสมมะรุุม (1E95)



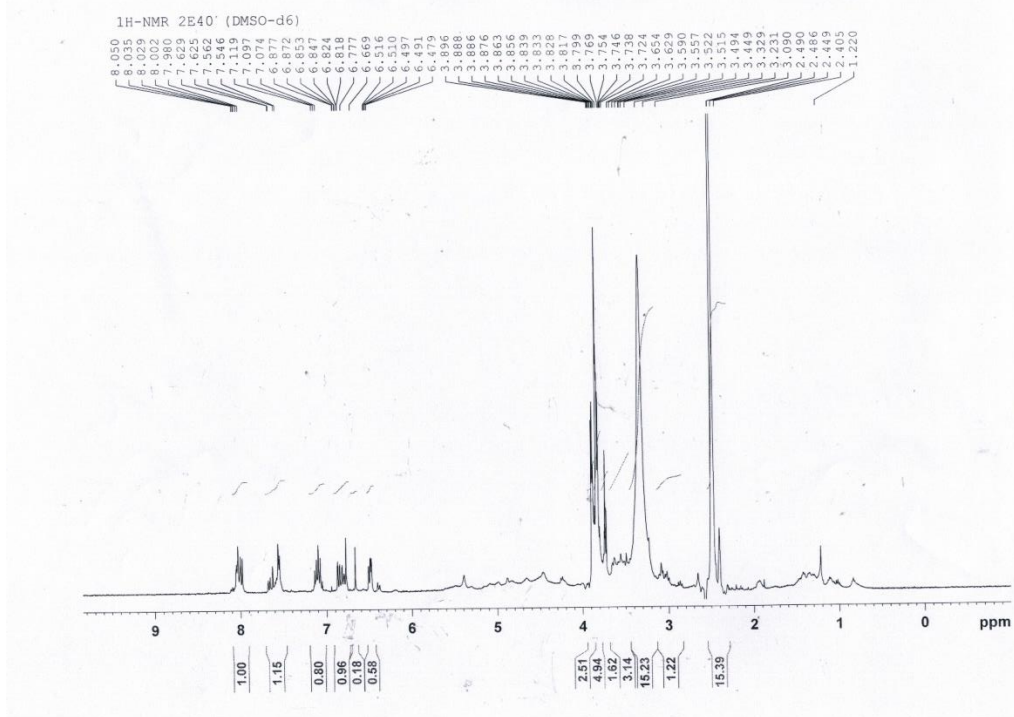
รูปที่ 4-14 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด 40% เอทานอลของโสมมะรุุม (1E40)



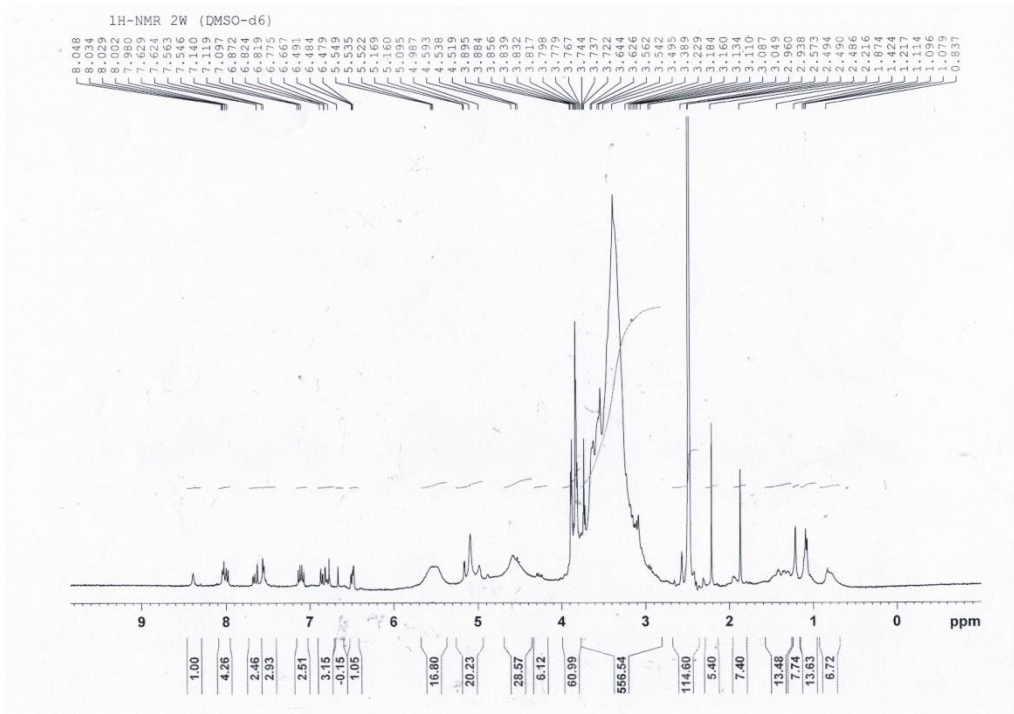
รูปที่ 4-15 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดน้ำของใบมะรุม (1W)



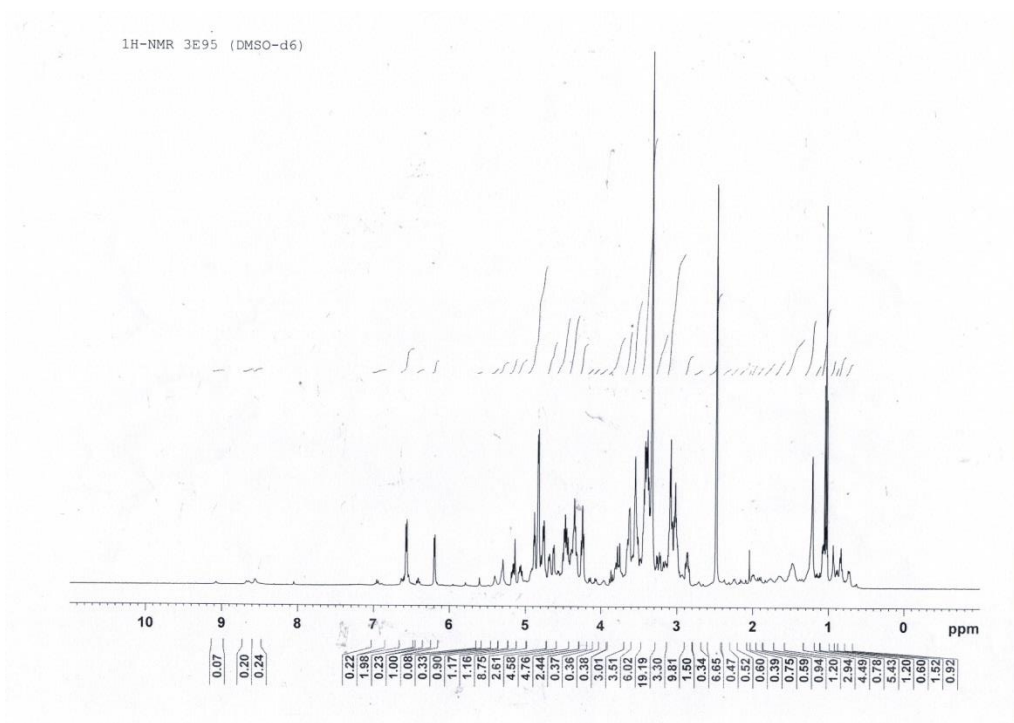
รูปที่ 4-16 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด 95% เอทานอลของเหง้ากระชายดำ (2E95)



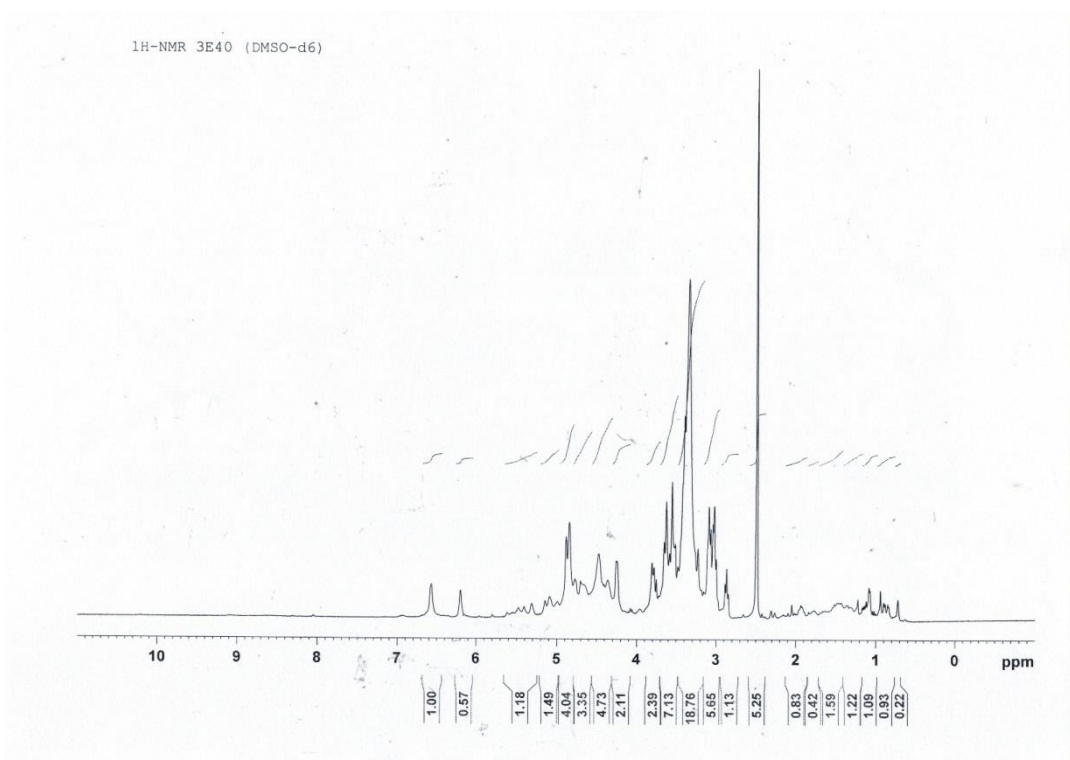
รูปที่ 4-17 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด 40% เอทานอลของเหง้ากระชายดำ (2E40)



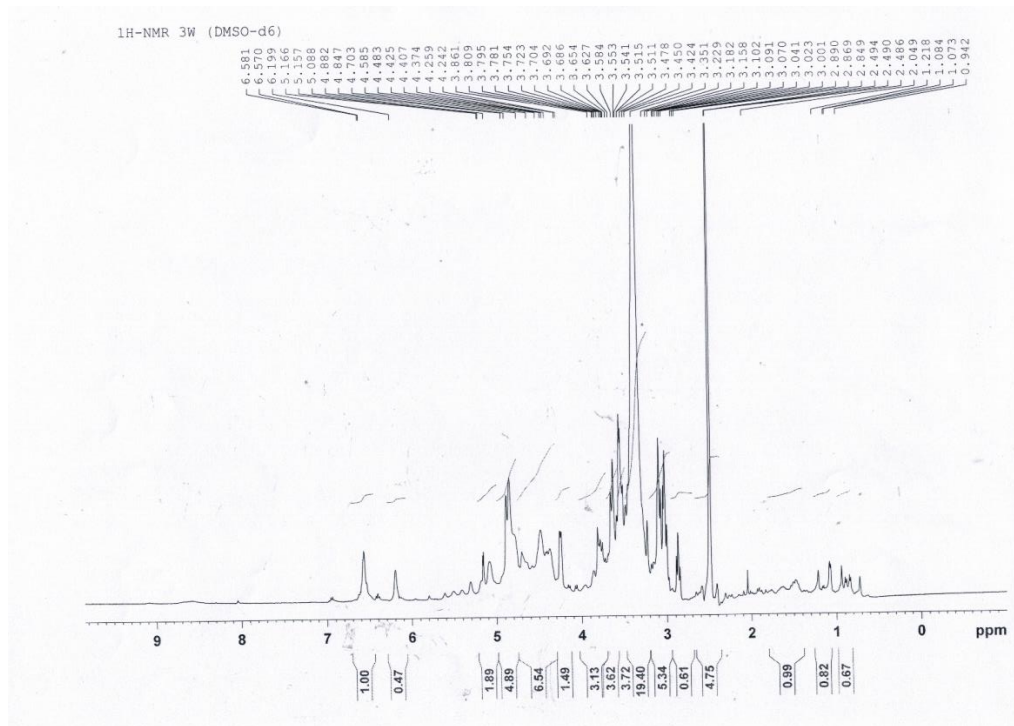
รูปที่ 4-18 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดน้ำของเหง้ากระชายดำ (2W)



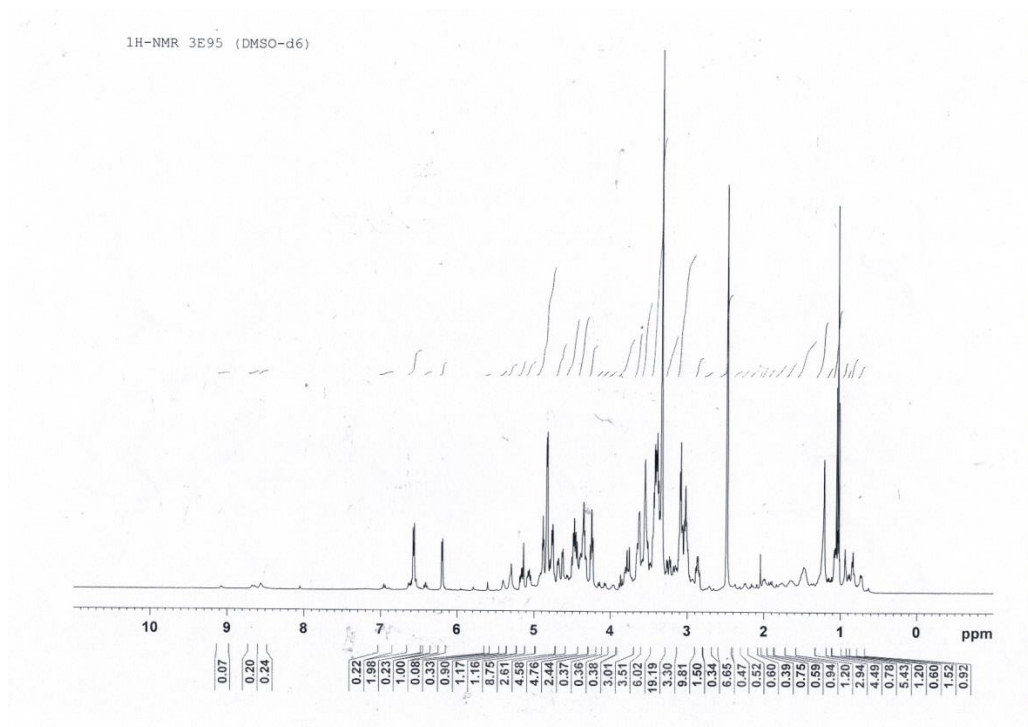
รูปที่ 4-19 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด 95% เอทานอลของเหง้าค้ำควาดำ (3E95)



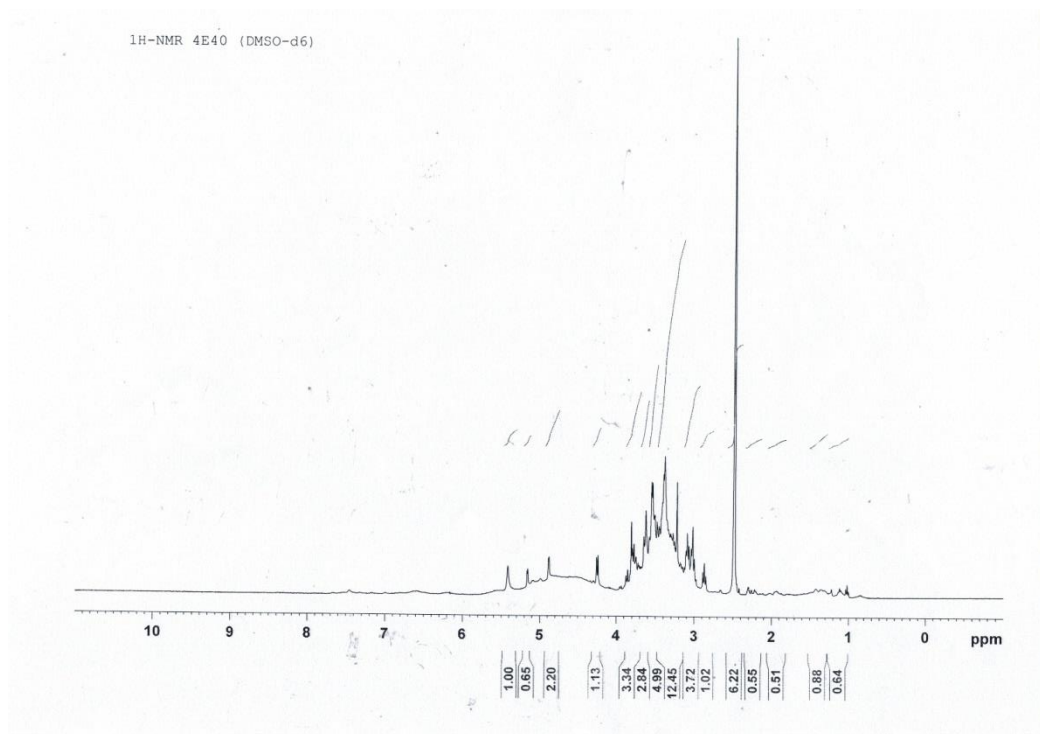
รูปที่ 4-20 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด 40% เอทานอลของเหง้าค้ำควาดำ (3E40)



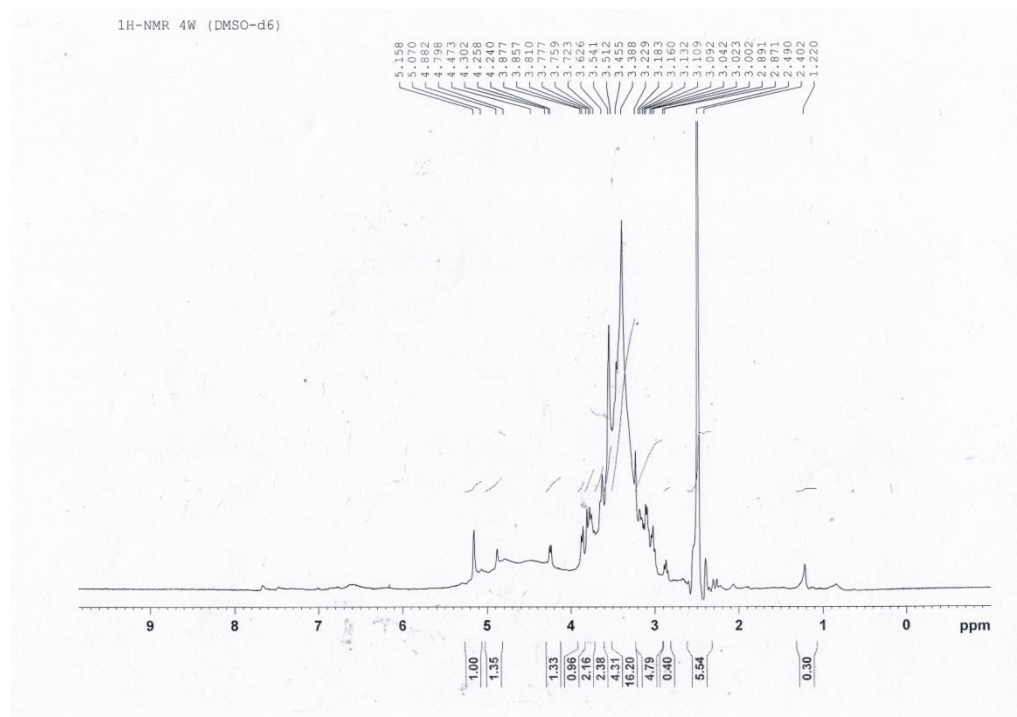
รูปที่ 4-21 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดน้ำของเหง้าค้ำงควดำ (3W)



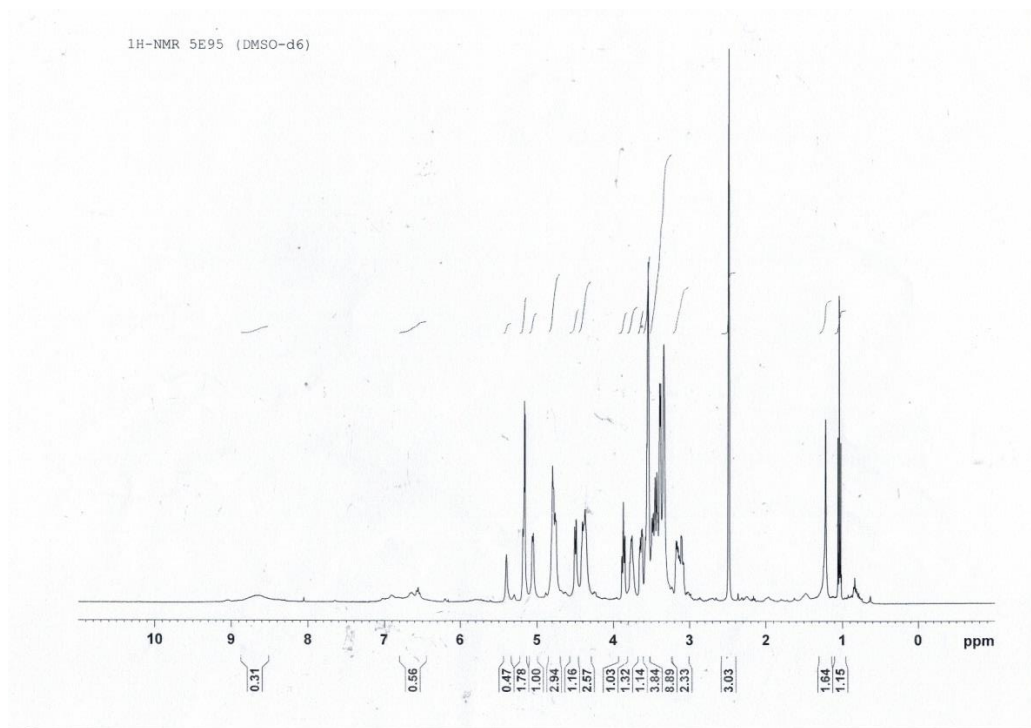
รูปที่ 4-22 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด 95% เอทานอลของเหง้าเร็วหอม (4E95)



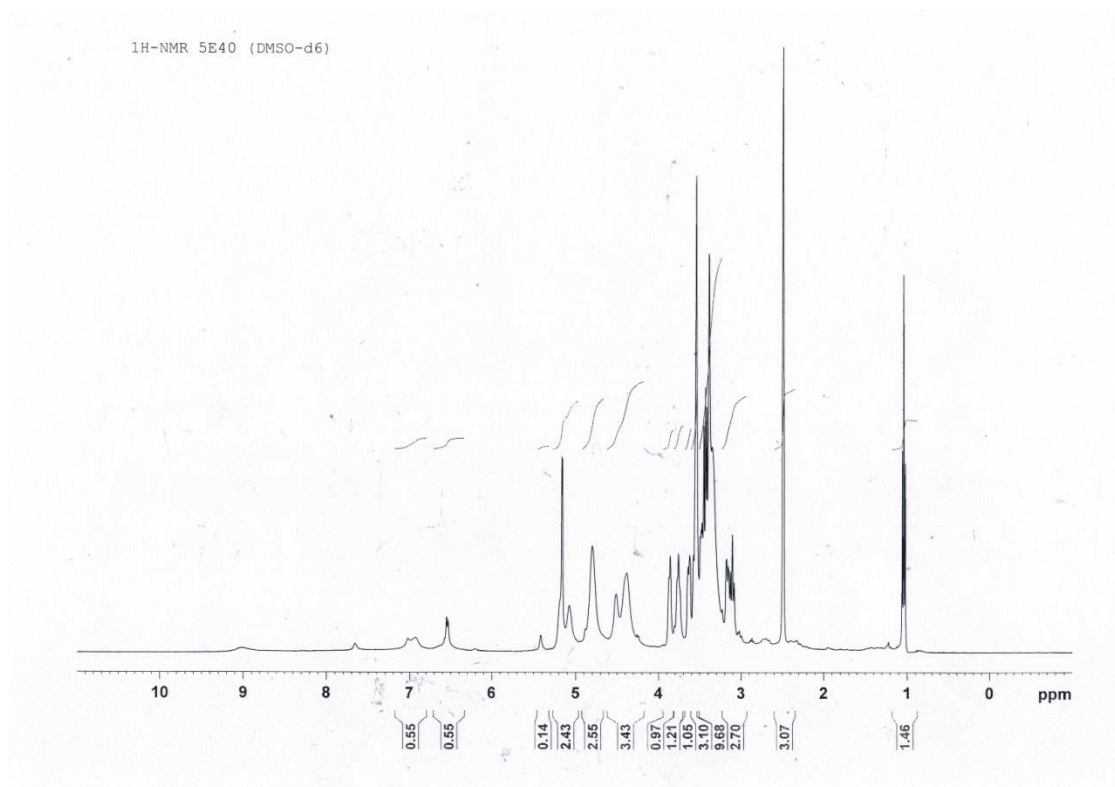
รูปที่ 4-23 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด 40% เอทานอลของเหง้าเร่วหอม (4E40)



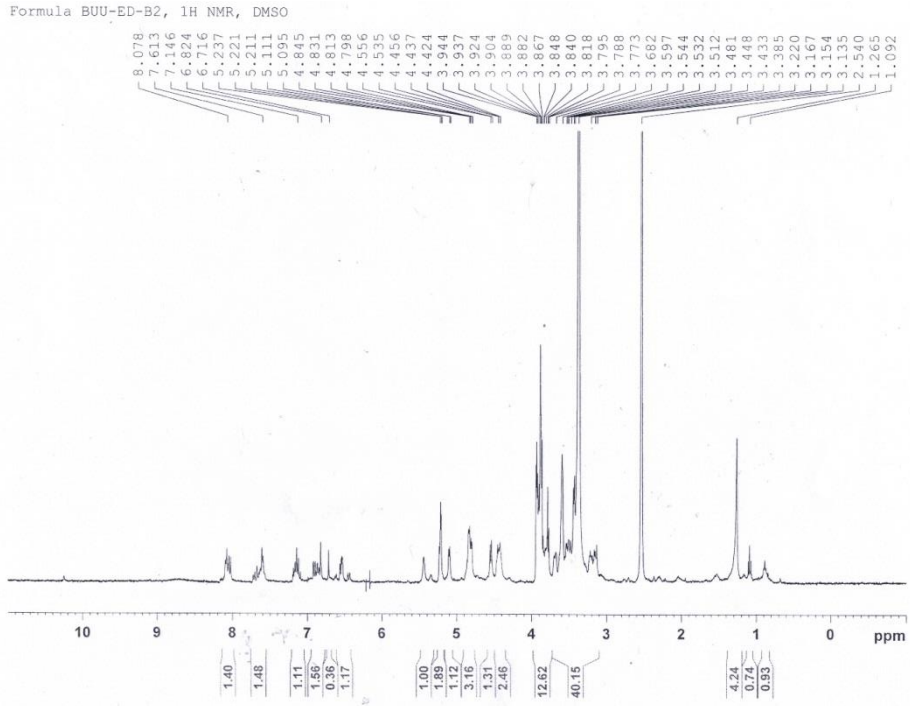
รูปที่ 4-24 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดน้ำของเหง้าเร่วหอม (4W)



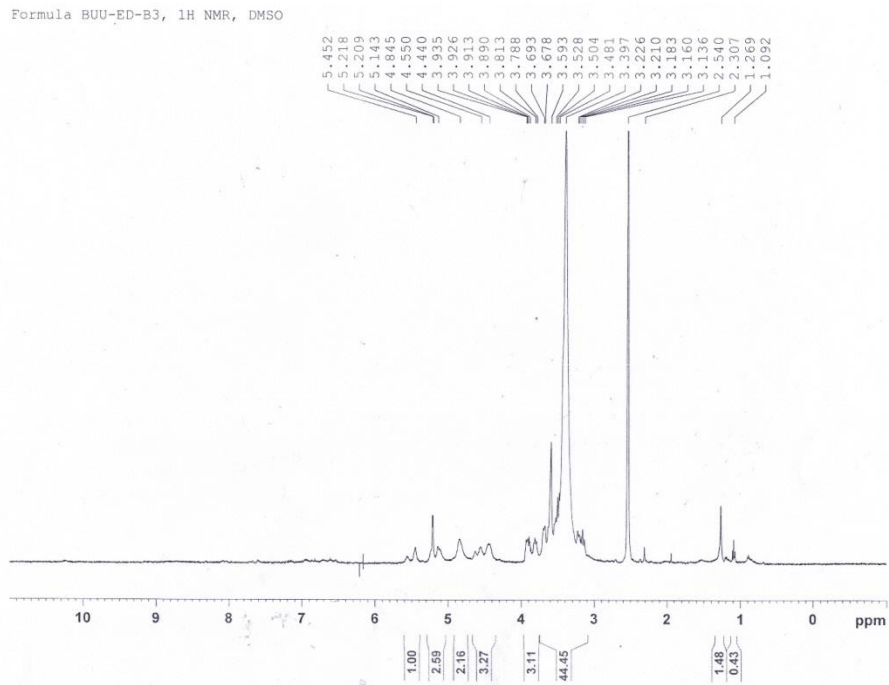
รูปที่ 4-25 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด 95% เอทานอลของหัวกวาวเครือแดง (5E95)



รูปที่ 4-26 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด 40% เอทานอลของหัวกวาวเครือแดง (5E40)

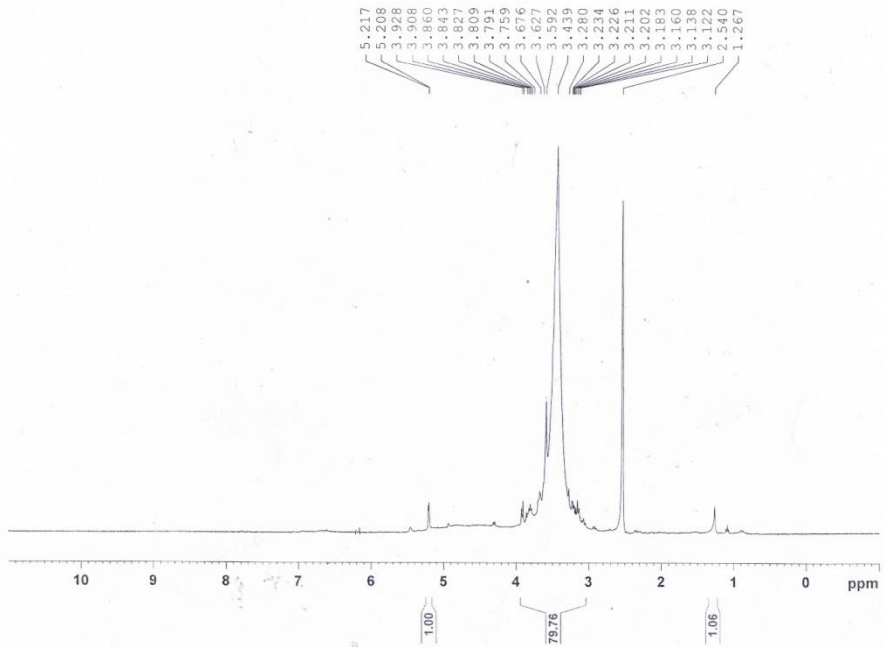


รูปที่ 4-29 สเปกตรัม NMR ของตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract สูตร BF2

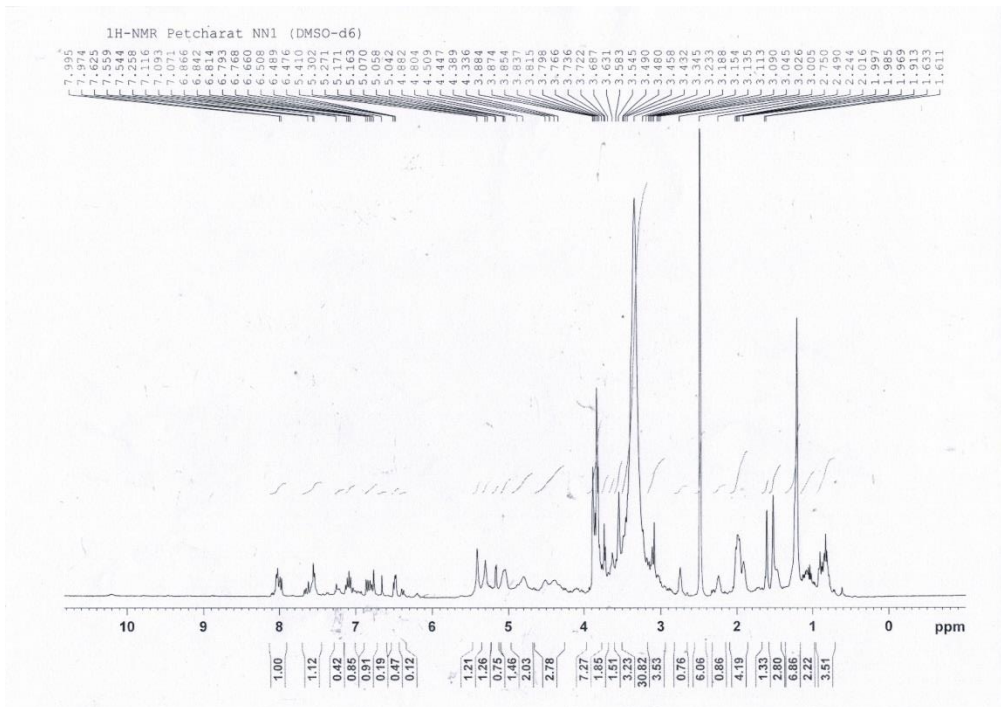


รูปที่ 4-30 สเปกตรัม NMR ของตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract สูตร BF3

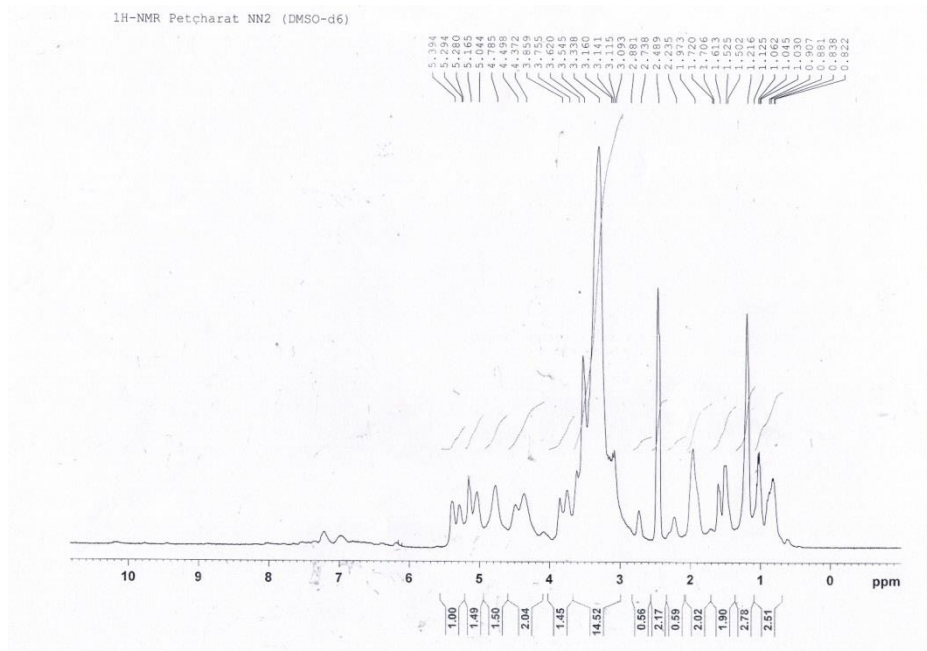
Formula BUU-ED-B4, 1H NMR, DMSO



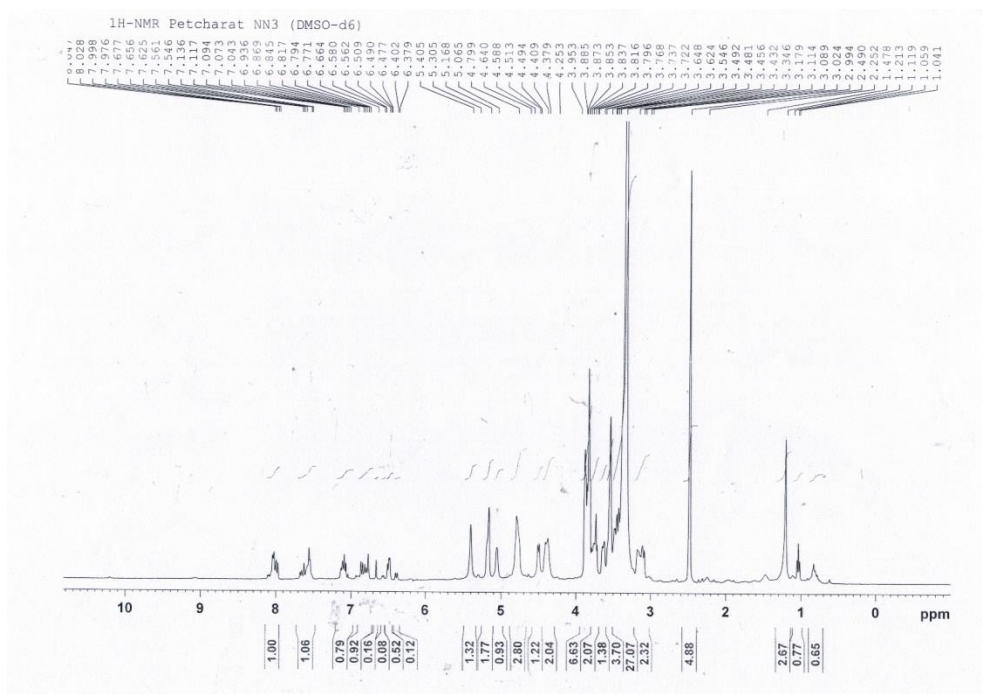
รูปที่ 4-31 สเปกตรัม NMR ของตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract สูตร BF4



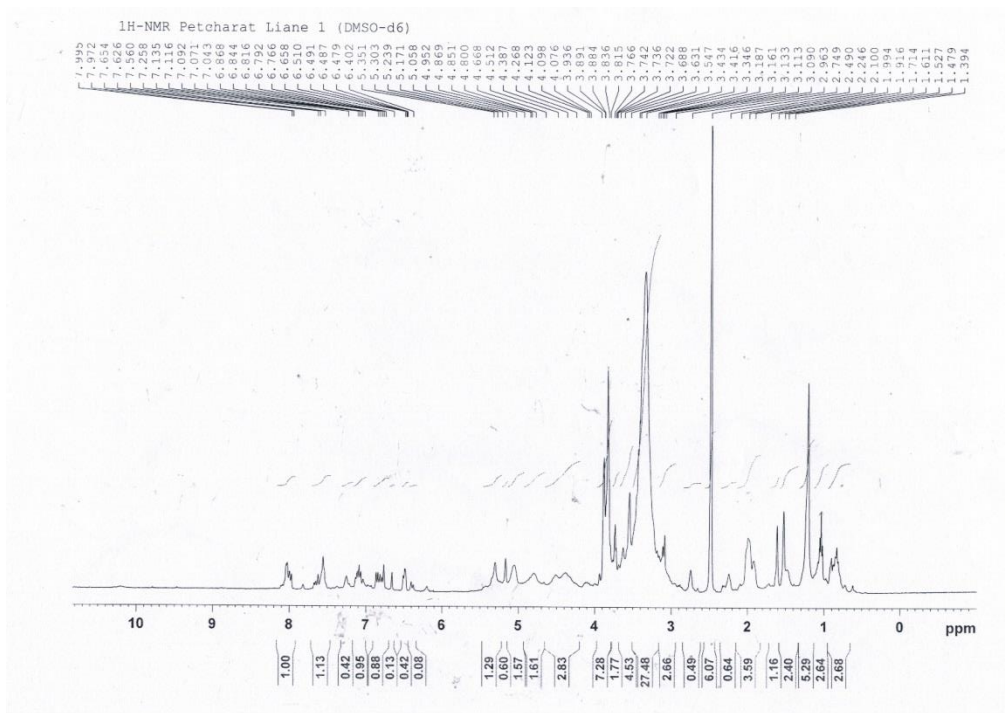
รูปที่ 4-32 สเปกตรัม NMR ของตำรับยาสมุนไพรแบบ combined extract สูตร CF1 แบบสกัดวิธี maceration



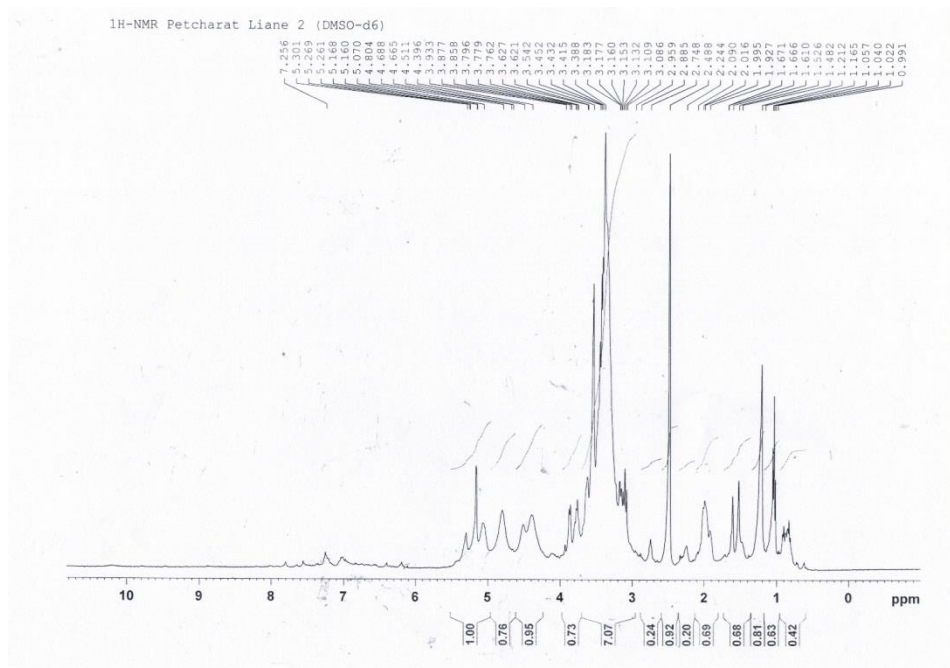
รูปที่ 4-33 สเปกตรัม NMR ของตำรับยาสมุนไพรแบบ combined extract สูตร CF2 แบบสกัดวิธี maceration



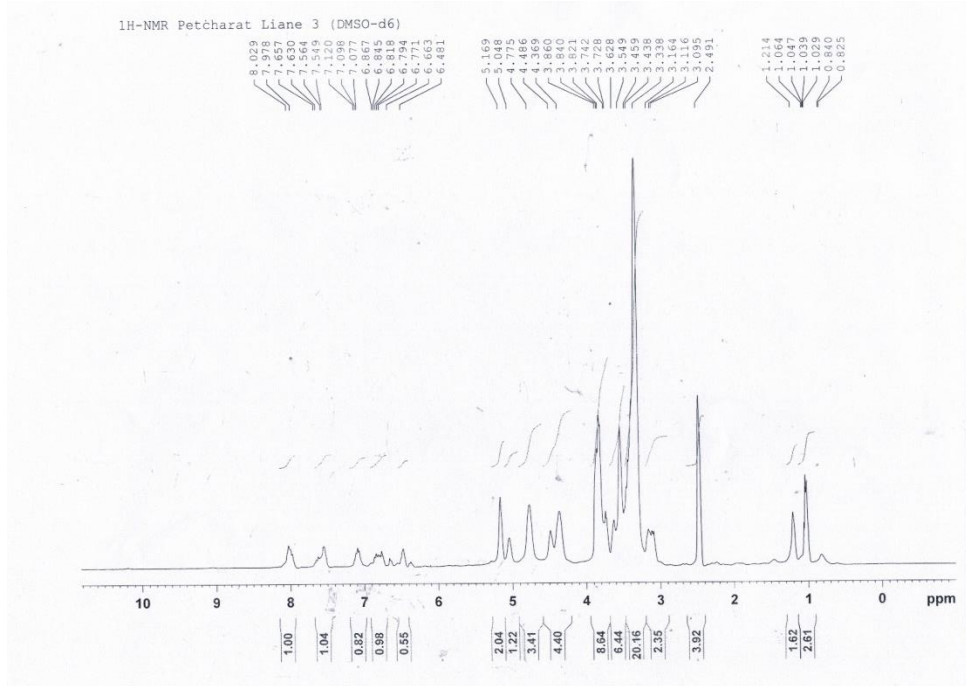
รูปที่ 4-34 สเปกตรัม NMR ของตำรับยาสมุนไพรแบบ combined extract สูตร CF3 แบบสกัดวิธี maceration



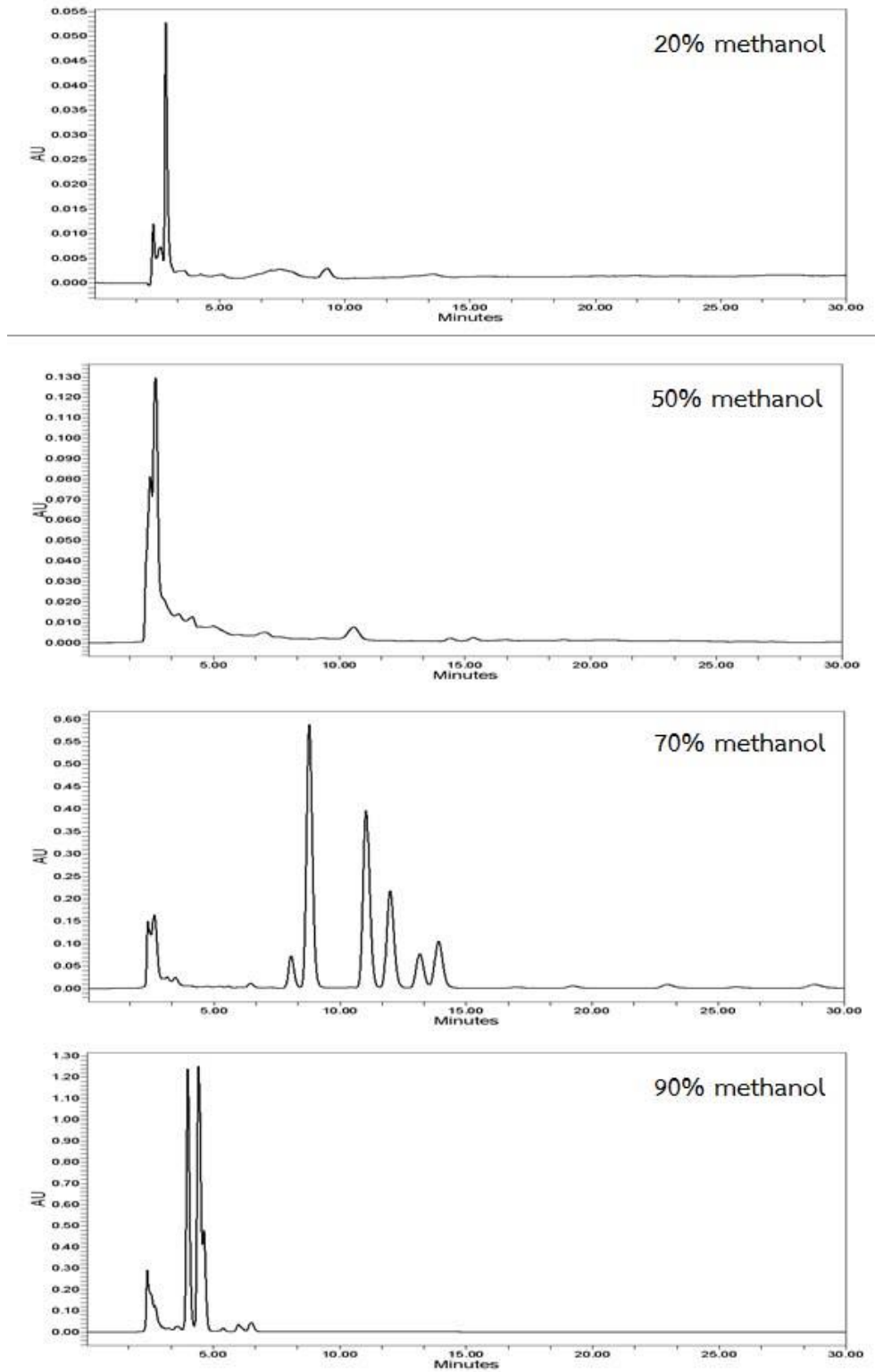
รูปที่ 4-35 สเปกตรัม NMR ของตำรับยาสมุนไพรแบบ combined extract สูตร CF1 แบบสกัดวิธี soxhlet



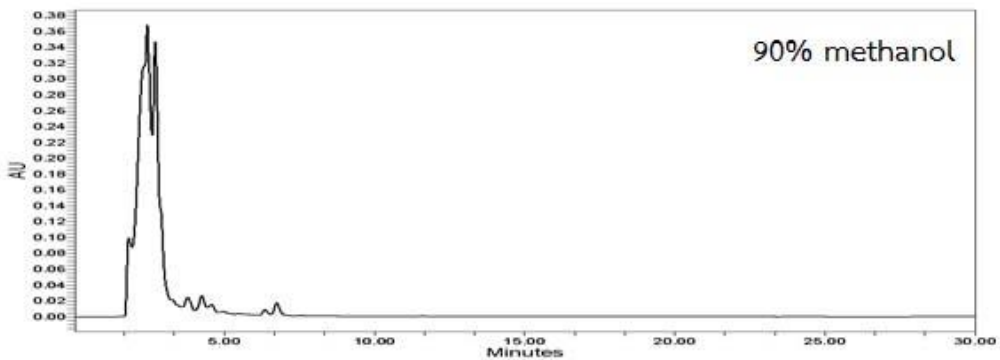
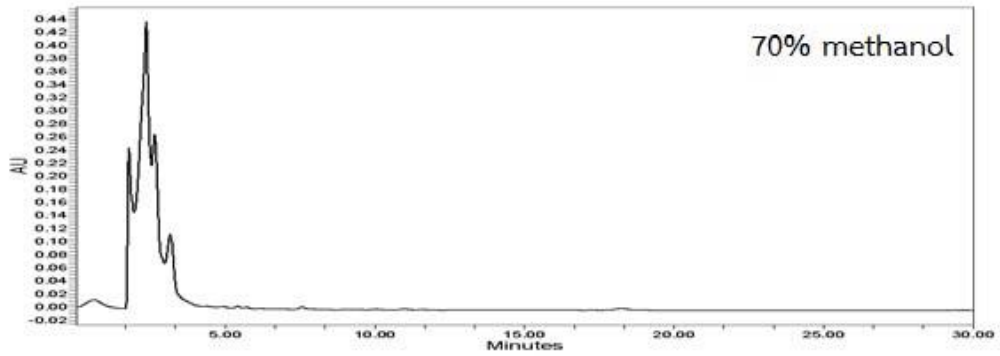
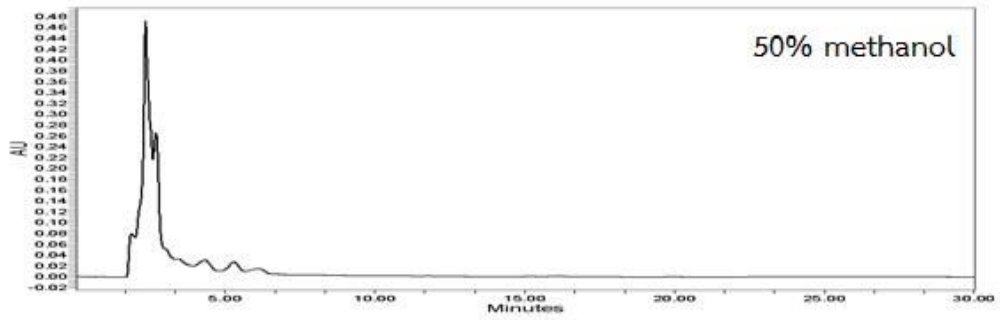
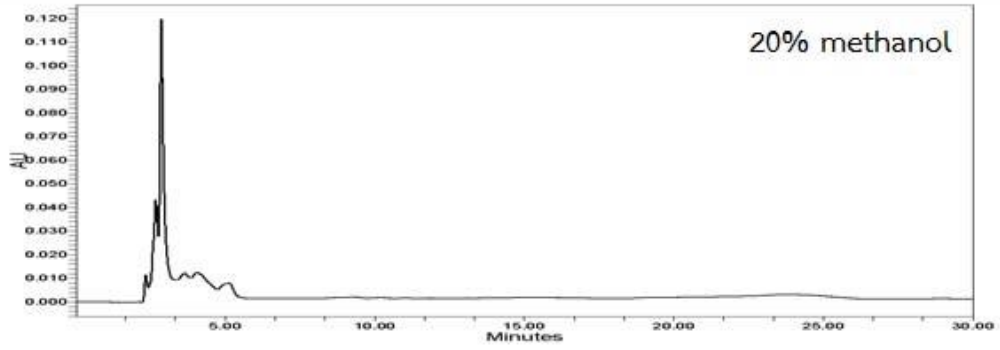
รูปที่ 4-36 สเปกตรัม NMR ของตำรับยาสมุนไพรแบบ combined extract สูตร CF2 แบบสกัดวิธี soxhlet



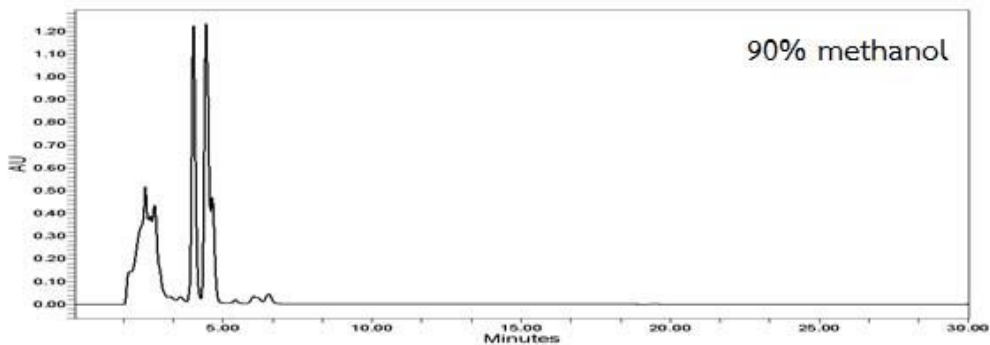
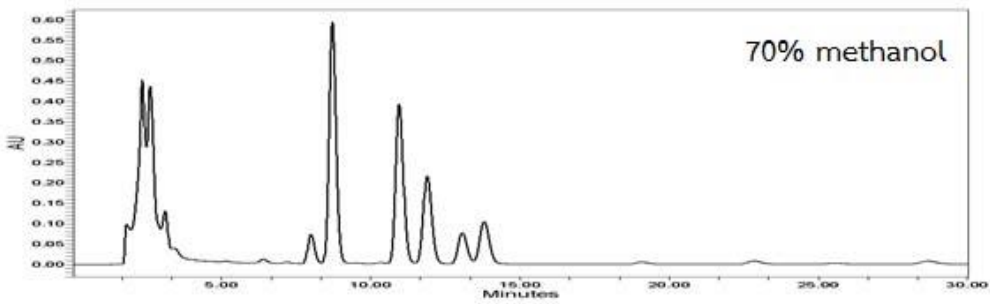
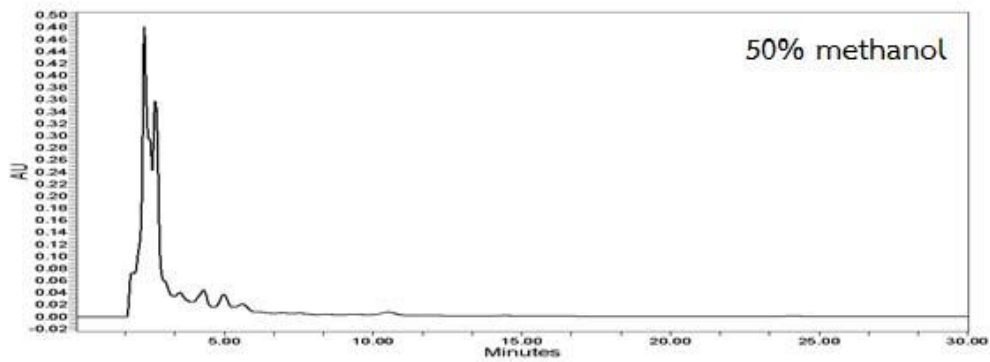
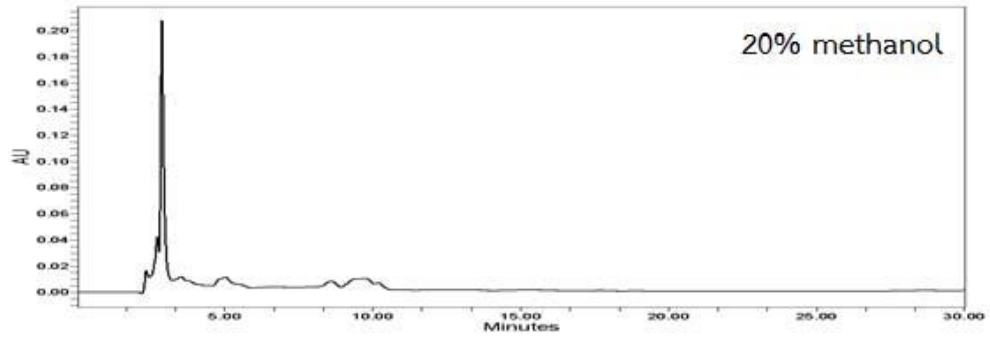
รูปที่ 4-37 สเปกตรัม NMR ของตำรับยาสมุนไพรแบบ combined extract สูตร CF3 แบบสกัดวิธี soxhlet



รูปที่-4-38 โครมาโทแกรม HPLC ของส่วนสกัดน้ำของเหง้ากระชายดำ (2W) ในสภาวะที่ใช้ mobile phase เป็น 20, 50, 70 และ 90 % methanol ตามลำดับ



รูปที่-4-39 โครมาโทแกรม HPLC ของส่วนสกัด 95% เอทานอลของหัวกวาวเครือแดง (5E95) ในสภาวะที่ใช้ mobile phase เป็น 20, 50, 70 และ 90 % methanol ตามลำดับ



รูปที่-4-40 โครมาโทแกรม HPLC ของตำรับยาสมุนไพรแบบ blended extract สูตร BF3 ในสภาวะที่ใช้ mobile phase เป็น 20, 50, 70 และ 90 % methanol ตามลำดับ

บทที่ 5

อภิปรายผลและสรุปผลการทดลอง

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดทำหน้าที่รักษาภาวะธำรงดุลย์ของหลอดเลือด (Michiels, 2003) ภายในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดจะมีไนตริก ออกไซด์เป็นสารสื่อกลางในการรักษาภาวะธำรงดุลย์ของหลอดเลือด โดยยับยั้งการเกาะตัวของเกร็ดเลือด ป้องกันการจับและการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาว และทำให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบรอบหลอดเลือดเกิดการคลายตัว ทำให้หลอดเลือดขยายตัว (Vanhouette et al., 2009) ดังนั้นไนตริกออกไซด์ที่ผลิตโดยเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดจึงเป็นเหมือนเครื่องหมายในการทำงานหรือทำหน้าที่ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด (Alberts et al., 2002) สาเหตุที่ทำให้เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดทำงานผิดปกติ (endothelial dysfunction) คือการลดลงของชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อบุนี้ ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดพยาธิสภาพของภาวะหลอดเลือดแข็ง โรคความดันโลหิตสูง และโรคสมรรถภาพทางเพศเสื่อม (Torregrossa, et al., 2011) ชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ขึ้นอยู่กับสมดุลระหว่างการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ และการสลายของไนตริกออกไซด์ ปัจจัยที่ทำให้ปริมาณไนตริกออกไซด์น้อยลง คือ การผลิตไนตริกออกไซด์น้อยลง และมีความเครียดจากออกซิเดชันเพิ่มขึ้น (Vanhouette et al., 2009) ในการศึกษานี้ทำการค้นหาสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ในการขยายหลอดเลือดและมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเพื่อพัฒนาหาตำรับยาสมุนไพรใหม่ในการนำไปบำรุงสุขภาพด้านสมรรถภาพทางเพศ โดยทำการตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของส่วนสกัดของสมุนไพรต่างๆ ทั้งหมด 15 ส่วนสกัด ทำการประเมินการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ เนื่องจากซูเปอร์ออกไซด์เป็นอนุมูลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมปกติของร่างกาย และเกิดจากปฏิกิริยา uncoupling ของเอนไซม์ eNOS ในภาวะที่มีความเครียดจากออกซิเดชัน อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์นี้สามารถทำปฏิกิริยากับไนตริกออกไซด์ ทำให้ชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ลดลง (Xia et al., 2014) จากการศึกษาพบว่าส่วนสกัดน้ำของกระชายดำ (2W) และส่วนสกัดน้ำของเร่วหอม (4W) ออกฤทธิ์กำจัดซูเปอร์ออกไซด์ได้ดี

การศึกษานี้ยังทำการศึกษามูลของส่วนสกัดของสมุนไพรทั้ง 15 ส่วนสกัด ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดของมนุษย์ (EA.hy 926 cell line) พบว่าส่วนสกัด 95% เอทานอลของโสม (1E95) กระชายดำ (2E95) หัวกวาวเครือแดง (5E95) และส่วนสกัดน้ำของกระชายดำ (2W) เพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาโดย Wattanapitayakul และคณะ (2007) ที่พบว่ากระชายดำสามารถผลิตไนตริกออกไซด์ได้ (Tocharus et al., 2006) และ Tocharus และคณะ (2006) พบว่ากวาวเครือแดงมีฤทธิ์ขยายตัวของหลอดเลือด และ การศึกษานี้เป็นการรายงานครั้งแรกที่พบว่าส่วนสกัดโสมสามารถเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ นอก

จากนี้ยังทำการทดสอบการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 ของเอนไซม์ eNOS ซึ่งเป็นการกระตุ้นแอกติวิตีของเอนไซม์ eNOS อีกวิธีหนึ่งนอกเหนือจากการเพิ่มระดับ Ca^{2+} (Fleming และ Busse, 2003) จากการทดลองพบว่าส่วนสกัด 95% เอทานอลของกระชายดำ (2E95) และหัวกวาวเครือแดง (5E95) ส่วนสกัดน้ำของกระชายดำ (2W) สามารถกระตุ้นเอนไซม์ eNOS โดยเพิ่มการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 ของเอนไซม์ eNOS เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัด 95% เอทานอลของกระชายดำ (2E95) หัวกวาวเครือแดง (5E95) และส่วนสกัดน้ำของกระชายดำ (2W) อาจเกิดผ่านการกระตุ้นการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 ของเอนไซม์ eNOS

ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการเลือกส่วนสกัดสมุนไพรมาทำการตั้งตำรับยาใหม่ โดยใช้ผลการทดลองข้างต้นเป็นข้อมูลในการคัดเลือก ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาด้วยวิธีการสองวิธีคือ วิธี blended extract และ วิธี combined extract โดยวิธี combined extract นี้ยังทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารด้วยวิธีสกัดแบบ maceration และวิธีสกัดแบบ soxhlet การตั้งตำรับยาโดยวิธี blended extract จะใช้ส่วนสกัด 95% เอทานอลของใบมะขาม (1E95) เหง้ากระชายดำ (2E95) หัวกวาวเครือแดง (5E95) และส่วนสกัดน้ำของกระชายดำ (2W) ที่ออกฤทธิ์ได้ดีในการเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด และยังใช้ส่วนสกัดน้ำของเร่วหอม (4W) ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดซูเปอร์ออกไซด์ เมื่อทำการทดสอบผลทางชีวภาพของตำรับยาแบบ blended extract ทั้งสี่สูตร พบว่าสูตร BF1, BF3 และ BF 4 มีความสามารถในการเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์และกระตุ้นการฟอสโฟรีเลชันของเอนไซม์ eNOS ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด สูตรทั้งสามสามารถกำจัดอนุมูล DPPH ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่สูตร BF3 และ BF 4 กำจัดซูเปอร์ออกไซด์ได้ดีกว่าสูตร BF1 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าตำรับยาแบบ blended extract สูตร BF3 และ BF 4 เป็นสูตรที่มีประสิทธิภาพดีกว่าสูตรอื่น

การศึกษาผลของส่วนสกัดสมุนไพรเดี่ยวและตำรับยาสมุนไพรสูตร BF3 และ BF 4 กับปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ พบว่าส่วนสกัดสมุนไพรเดี่ยวและตำรับยาสมุนไพรไทยมีฤทธิ์ในการเพิ่มปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ ในขณะที่ผลการทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ พบว่าส่วนสกัดจากหัวกวาวเครือแดงที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงแต่ตำรับยาสมุนไพร มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยเมื่อเทียบกับส่วนสกัดหัวกวาวเครือแดงและกระชายดำ อาจเนื่องมาจากปริมาณสารที่เป็นพิษที่พบในส่วนสกัดหัวกวาวเครือแดงถูกเจือจางไปครึ่งหนึ่ง แต่อย่างไรก็ตามตำรับยาสมุนไพรยังแสดงฤทธิ์ในการเพิ่มปริมาณไนตริกออกไซด์ได้ใกล้เคียงกับส่วนสกัดสมุนไพรเดี่ยวของหัวกวาวเครือแดง และสารสกัดเหง้ากระชายดำ

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตำรับยาแบบ combined extract ทั้งสามสูตร พบว่าทุกสูตรสามารถเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ แต่สูตร CF1 มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ได้สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธีการสกัดของตำรับยาแบบ combined extract พบว่าวิธีสกัดแบบ maceration ให้ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ที่ดีกว่าการสกัดแบบ soxhlet ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความร้อนที่ใช้ในการสกัดแบบ soxhlet ทำให้สารออกฤทธิ์สลายตัวได้ การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตำรับยาระหว่างวิธี

blended extract และวิธี combined extract พบว่าตำรับยาที่เตรียมแบบ blended extract มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล DPPH ที่สูงกว่าการเตรียมแบบ combined extract อย่างน้อย 4 เท่า ในขณะที่ประสิทธิภาพในการเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดของตำรับยาที่เตรียมทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกัน

จากผลการศึกษาข้างต้น คณะผู้วิจัยได้คัดเลือกตำรับยาสูตร BF3 ไปทดลองต่อโดยศึกษากลไกการเพิ่มปริมาณไนตริกออกไซด์ของตำรับยา พบว่าตำรับยากระตุ้นการฟอสโฟริเลชันของเอนไซม์ eNOS และเอนไซม์ Akt ดังนั้นกลไกการเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ของตำรับยาสูตร BF3 อาจเป็นผลมาจากการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ eNOS โดยผ่านการกระตุ้นเอนไซม์ Akt ซึ่งเป็นวิถีสัญญาณหนึ่งที่กระตุ้นการฟอสโฟริเลชันของเอนไซม์ eNOS กลไกที่ได้นี้เหมือนกับการออกฤทธิ์ของส่วนสกัดสมุนไพรเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของตำรับยา คือ ส่วนสกัด 95% เอทานอลของหัวกวาวเครือแดง (5E95) และส่วนสกัดน้ำของกระชายดำ (2W) นอกจากนี้ตำรับยาสูตร BF3 ยังสามารถกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้ดีเหมือนกับส่วนสกัดน้ำของกระชายดำ (2W) ดังนั้นตำรับยาสูตร BF3 นี้จึงมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพในการป้องกันหลอดเลือดให้ทำงานได้เป็นปกติ จึงช่วยรักษาโรคเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ โดยเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดและกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์เพื่อลดการทำลายไนตริกออกไซด์ เป็นการเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ในที่สุด แต่อย่างไรก็ตามการระบุสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่อยู่ในตำรับยาสูตร BF3 นั้นมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาต่อ เพื่อนำข้อมูลนี้มาเป็นตัวกำหนดคุณภาพของตำรับยาสมุนไพรสูตร BF3 ต่อไป

5.2 สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดสามารถสรุปได้ดังนี้

1. ส่วนสกัดน้ำของกระชายดำ (2W) และส่วนสกัดน้ำของเร่วหอม (4W) ออกฤทธิ์กำจัดซูเปอร์ออกไซด์ได้ดีที่สุด
2. ส่วนสกัด 95% เอทานอลของใบมะรุม (1E95) กระชายดำ (2E95) หัวกวาวเครือแดง (5E95) และส่วนสกัดน้ำของกระชายดำ (2W) เพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม
3. ส่วนสกัด 95% เอทานอลของกระชายดำ (2E95) และหัวกวาวเครือแดง (5E95) ส่วนสกัดน้ำของกระชายดำ (2W) สามารถกระตุ้นเอนไซม์ eNOS โดยเพิ่มการฟอสโฟริเลชันของเอนไซม์ eNOS
4. ตำรับยาที่เตรียมโดยวิธี blended extract สูตร BF3 และ BF4 สามารถเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดและกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้ดีที่สุด
5. ตำรับยาที่เตรียมโดยวิธี combined extract สูตร CF1 สามารถเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดและกำจัดอนุมูล DPPH ได้ดีที่สุด

6. การตั้งตำรับยาที่เตรียมโดยวิธี blended extract มีประสิทธิภาพในการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดและต้านออกซิเดชันได้ดีกว่าตำรับยาที่เตรียมโดยวิธี combined extract

7. กลไกในการเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดของตำรับยาสูตร BF3 อาจเกิดผ่านการกระตุ้นเอนไซม์ Akt และการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ eNOS ตามลำดับ

บรรณานุกรม

- กล่าวขวัญ ศรีสุข และเอกรัฐ ศรีสุข. (2556). การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของใบเร่วหอม: มูลค่าเพิ่มจากของเหลือทิ้งทางการเกษตร. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ณัฐกานต์ แก้วมูล. (2557). ผลของตัวทำละลายที่ใช้สกัดต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าเร่วหอม. ปรียญานินพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
- พงศักดิ์ พลเสนา. (2550a). พืชสมุนไพรในสวนป่าสมุนไพรเขาหินซ้อน ฉบับสมบูรณ์. ห้างหุ้นส่วนจำกัด เจตนารมณณ์ภัณฑ์ ปราจีนบุรี. 301น.
- พงศักดิ์ พลเสนา. (2550b). เร่วหอมพันธุ์ไม้ชนิดใหม่ของไทย และรายงานการพบ “ผลเร่วหอม” ครั้งแรก. หมายเหตุนิเวศวิทยา : บันทึกธรรมชาติหลากหลายพันธุ์. ปีที่ 1 ฉบับที่ 4, 25-26.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. . 4th edition., from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26848/>
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 357, 593-615.
- Balayssac S., Trefi S., Gilard V., Malet-Martino M., Martino R., Delsuc M.A. (2009) 2D and 3D DOSY ¹H NMR, a useful tool for analysis of complex mixtures: application to herbal drugs or dietary supplements for erectile dysfunction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 50(4), 602-612
- Cirino G., Fuscob F., Imbimbob C. and Mirone V. (2006) Pharmacology of erectile dysfunction in man. *Pharmacology & Therapeutics*. 111, 400-423.
- Ferrini M., Magee T.R., Vernet D., Rajfer J., Gonzalez-Cadavid N.F. (2001) Aging-related expression of inducible nitric oxide synthase and markers of tissue damage in the rat penis. *Biology of Reproduction*. 64, 974-982
- Fleming I, Busse R. (2003) Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 284, R1-R12.

- Forstermann U, and Sessa W. (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal* 33, 829–837
- Gonzalez-Cadavid N.F. and Rajfer J. (2004) Molecular pathophysiology and gene therapy of aging-related erectile dysfunction. *Experimental Gerontology*. 39, 1705–1712
- Huige Li. (2012) Effects of Vasoactive Chinese Herbs on the Endothelial NO System, *Recent Advances in Theories and Practice of Chinese Medicine*, Prof. Haixue Kuang (Ed.), ISBN: 978-953-307-903-5.
- Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, Kadowitz PJ. (1986) Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 237, 893–900.
- Koltermann A, Hartkorn A, Koch E, Fürst R, Vollmar AM, Zahler S. (2007) Ginkgo biloba extract EGb 761 increases endothelial nitric oxide production in vitro and in vivo. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 64(13), 1715-22.
- Li H, Wallerath T, Förstermann U. (2002) Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide* 7, 132–147.
- Low W.Y. and Tan, H.M.. (2007). Asian traditional medicine for erectile dysfunction *The Journal of Men's Health & Gender*. 4, 245–250.
- MacKay D. (2004) Nutrients and botanicals for erectile dysfunction: examining the evidence *Alternative Medicine Review*, 9 (1), 4–16.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*. 15, 323-350.
- OECD (The Organisation of Economic Co-operation and Development), (1998). The OECD guideline for Testing of Chemicals: 408 Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents.
- OECD (The Organisation of Economic Co-operation and Development), (2001). The OECD guideline for Testing of Chemicals: 420 Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure.
- Seo JW, Srisook E, Son HJ, Hwang O, Cha YN, Chi DY. (2005) Syntheses of NAMDA derivatives inhibiting NO production in BV-2 cells stimulated with lipopolysaccharide. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*. 15(14), 3369-3373.

- Srisook, K., Cha., Y.N. (2004). Biphasic induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages stimulated with lipopolysaccharides. *Biochemical Pharmacology* 68, 1709-1720.
- Steinkamp-Fenske K, Bollinger L, Völler N, Xu H, Yao Y, Bauer R, Förstermann U, Li H. (2007) Ursolic acid from the Chinese herb Danshen (*Salvia miltiorrhiza* L.) upregulates eNOS and downregulates Nox4 expression in human endothelial cells. *Atherosclerosis* 195 e104–e111.
- Temkitthawon P, Hinds T.R., Beavo J.A., Viyoch J., Suwanborirux K, Pongamornkul W, Sawasdee P, Ingkaninan K. (2011) *Kaempferia parviflora*, a plant used in traditional medicine to enhance sexual performance contains large amounts of low affinity PDE5 inhibitors. *Journal of Ethnopharmacology*. 37(3), 1437-1441.
- Tocharus C, Smitasiri Y, Jeenapongsa R. (2006). *Butea superba* Roxb. enhances penile erection in rats. *Phytotherapy Research*. 20: 484–489.
- Toda N., Ayajikia K., Okamura T., (2005) Nitric oxide and penile erectile function. *Pharmacology & Therapeutics*. 106, 233– 266.
- Torregrossa, A. C., Aranke, M., & Bryan, N. S. (2011). Nitric oxide and geriatrics: Implications in diagnostics and treatment of the elderly. *Journal of Geriatric Cardiology*, 8(4), 230-242.
- Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. (2009) Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiologica (Oxford)*, 196(2), 193-222.
- World Health Organization. (1978) *The Promotion and Development of Traditional Medicine*. Technical Report Series. pp 622.
- World Health Organization. *World Health Statistics* (2012). All rights reserved. Publications of the World Health Organization are available on the WHO web site (www.who.int).
- Wattanapitayakul SK, Suwatronnakorn M, Chularojmontri L, Herunsalee A, Niumsakul S, Charuchongkolwongse S, Chansuvanich N. (2007) *Kaempferia parviflora* ethanolic extract promoted nitric oxide production in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Ethnopharmacology* 110 559–562.

- Xia N, Pautz A, Wollscheid U, Reifenberg G, Förstermann U, Li H. (2014). Artichoke, cynarin and cyanidin downregulate the expression of inducible nitric oxide synthase in human coronary smooth muscle cells. *Molecules*. 19: 3654-3668.
- Zhang X, Xiong H, Liu L. (2012). Effects of taraxasterol on inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. 141, 206-211.
- Zou MH, Shi C, Cohen RA. (2002) Oxidation of the zinc–thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *Journal of Clinical Investigation*. 109, 817–826.

ผลผลิตของโครงการวิจัย (Outputs):

1. ผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาชีวเคมี จำนวน 1 คน คือนางสาวฐิติพร ทองเย็น (อยู่ในระหว่างการศึกษา) ระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีวเคมี จำนวน 2 คน คือนางสาวสุปรีดา แซ่ตั้ง และนางสาวสุนันทา สีสมุทร์
2. Srisook, K, Thongyen, T., Sawai, P., & Srisook, E. (2016). Role of herbal mixture on in vitro antioxidant activity and eNOS activation in human endothelial cells. Proceeding of the 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty. (pp. 245-248). KhonKaen: KhonKaen University
3. Srisook, E, Thongyen, T., Sawai, P., & Srisook, K. (2016). Vasoprotective effect of new herbal formula BUU-ED-BF3 in human vascular endothelial cells. Atherosclerosis. (Manuscript in preparation).
4. ผลการศึกษาที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะทำให้มีการเพิ่มมูลค่าของพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทย ได้แก่ เรว้หอม กระชายดำ และกวาวเครือแดง นำไปสู่การเพิ่มรายได้ของเกษตรกรไทย

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย :

1. ชื่อ นายเอกรัฐ ศรีสุข
Mr. Ekaruth Srisook
2. ตำแหน่ง คณบดีคณะวิทยาศาสตร์/ผู้ช่วยศาสตราจารย์
3. หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง ชลบุรี 20131
โทรศัพท์ 038-745900 ต่อ 3009 E: mail ekaruth@buu.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

ปี พ.ศ.	คุณวุฒิ	สาขาวิชา	สถานศึกษา
2548	Ph.D.	Chemistry	Inha University, Korea
2539	วท.ม.	อินทรีย์เคมี	มหาวิทยาลัยมหิดล
2534	วท.บ.	เคมี	มหาวิทยาลัยมหิดล

5. สาขาที่ชำนาญพิเศษ

Organic synthesis, Medicinal chemistry, Natural products

6. ผลงานทางวิชาการ

Journals

กล่าวขวัญ ศรีสุข, สาวินีย์ สีมาพันธ์, ปริญญา เกตุกุล, พรสุดา กันแก้ว, **เอกรัฐ ศรีสุข**, กาญจนา หริมเพ็ง และคณะ. (2557). ฤทธิ์ต้านการอักเสบของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 19, 304-311

กล่าวขวัญ ศรีสุข, ปรีดาวรรณ สาลี, เยาวลักษณ์ เจริญสุข และ **เอกรัฐ ศรีสุข**. ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง. *วารสารพฤกษศาสตร์ไทย*, 2553, 2 :143-150

Keun Sam Jang, Dong Seok Shin, **Ekaruth Srisook**, Ho-Chun Song, Dae Yoon Chi. (2016). Versatile functionalization of electron rich-fused heterocyclic arenes via electrophilic aromatic addition reaction and their applications. *Tetrahedron*. (In press). doi: 10.1016/j.tet.2016.07.010.

Klaiwattana, P., Srisook, K., **Srisook, E.**, Vuthiphandchai, V., & Neamvonk, J. (2016). Effect of cryopreservation on lipid composition and antioxidant enzyme activity of seabass (*Lates calcarifer*) sperm. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15, 157-169.

- Klaokwan Srisook*, **Ekaruth Srisook***, Wenuka Nachaiyo, Mingkwan Chan-In, Jitra Thongbai, Karnjanapa Wongyoo, Sasithorn Chawsuanthong, Kanita Wannasri, Sudarat Intasuwan and Kingkan Watcharanawee. (2015). Bioassay-guided fractionation of anti-inflammatory agents from *Clerodendrum inerme* (L.) Gaertn. leaves and its mechanistic action through the suppression of iNOS and COX-2 pathways in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. 165, 94-102.
- Prasopthum A, Pouyfung P, Sarapusit S, **Srisook E**, Rongnoparut P. (2015). Inhibition effects of *Vernonia cinerea* active compounds against cytochrome P450 2A6 and human monoamine oxidases, possible targets for reduction of tobacco dependence. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 30, 174-181.
- Rattanawadee Kotewong, Panida Duangkaew, **Ekaruth Srisook**, Songklod Sarapusit, Pornpimol Rongnoparut. Structure-function relationships of inhibition of mosquito cytochrome P450 enzymes by flavonoids of *Andrographis paniculata*. *Parasitology research*. 2014; 113(9): 3381-3392.
- Phisit Pouyfung, Aruna Prasopthum, Songklod Sarapusit, **Ekaruth Srisook**, Pornpimol Rongnoparut. Mechanism-based Inactivation of Cytochrome P450 2A6 and 2A13 by *Rhinacanthus nasutus* Constituents. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2014; 29:75-83.
- Klaokwan Srisook, Doungnapa Buapool, Rattiya Boonbai, Panadda Simmasut, Yaowaluck Charoensuk, **Ekaruth Srisook**. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Pluchea indica* Less herbal tea. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6; 4077-4081.
- Sirikun Pethuan, Panida Duangkaew, Songklod Sarapusit, **Ekaruth Srisook**, Pornpimol Rongnoparut. Inhibition against mosquito cytochrome P450 enzymes by rhinacanthin-A, -B, and -C elicits synergism on cypermethrin cytotoxicity in *Spodoptera frugiperda* cells. *Journal of Medical Entomology*. 2012 49(5):993-1000
- Seo JW, **Srisook E**, Son HJ, Hwang O, Cha YN, Chi DY. Syntheses of tetrahydroisoquinoline derivatives that inhibit NO production in activated BV-2 microglial cells *Eur J Med Chem*. 2008 Jun;43(6):1160-70

Ekaruth Srisook,^{*} Areerat Makbodee and Supatra Karnkla “Synthesis of 3-Substituted-*p*-cresol via 2,5-Cyclohexadienone Intermediate” *Burapha Science Journal*. **2006**, 11 (2).

JaeWoong Seo, **Ekaruth Srisook**, Hyo Jin Son, Oon Yoo Hwang, Young Nam Cha, Dae Yoon Chi. Syntheses of NAMDA derivatives inhibiting NO production in BV-2 cells stimulated with lipopolysaccharide. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005,15:3369-3373.

Han Young Choi, **Ekaruth Srisook**, Kun Sam Jung, Dae Yoon Chi. Electrophilic Aromatic Addition : Electrophilic Attack at H Position. *J. Org. Chem*. 2005, 70, 1222-1226.

Ekaruth Srisook and Dae Yoon Chi, The Syntheses of 3-Substituted 4-(Pyridin-2-ylthio)indoles via Leimgruber-Batcho Indole Synthesis. *Bull. Korean Chem. Soc*. 2004, 25, 895-899.

Gloria L. Silva, Roberto R. Gil, Baoliang Cui, Heebyung Chai, Thawatchai Santisuk, **Ekaruth Srisook**, Vichai Reutrakul, Patoomratana Tuchinda, Smaisukh Sophasan, Suparp Sujarit *et al.* Novel cytotoxic ring-a *seco*-cycloartane triterpenes from *Gardenia coronaria* and *G. sootepensis*. *Tetrahedron*, 1997, 53, 529-538.

Proceedings

Srisook, K., Thongyen, T., Sawai, P., & Srisook, K. (2016). Role of herbal mixture on in vitro antioxidant activity and eNOS activation in human endothelial cells. *Proceeding of the 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty*. (pp. 245-248). KhonKaen: KhonKaen University.

Wohankla, M., **Srisook, K.**, & Sootanan, P. (2015). Identification of low differentially expressed

responsive genes in microarray data of LPS-stimulated macrophage RAW264.7.

Proceeding of the 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (pp.752-757). Bangkok: the Thai Society for Biotechnology.

Seemakhan, S., & **Srisook, K.** (2014). *Ageratum conyzoides* leaf extract inhibit inflammatory response via suppression of NF- κ B and MAPKs pathway in LPS-induced macrophages. *Proceeding of the 5th international Conference on Natural Products for Health and Beauty* (pp. 158-163). Phuket: Natural Product Research Center of Excellence, Prince of Songkla University.

- Buranakit, P., **Srisook, K.**, Srisook, E., & Hrimpeng, K. (2014). Bioassay-guided isolation, characterized and antibacterial activity of isolated compound from *Zingiber mekongense* rhizome. *Proceeding of the 1st Joint ACS AGFD – ACS ICSCS Symposium on Agricultural and Food Chemistry*(pp. 185-190). Bangkok:The American Chemical Society International Chemical Sciences Chapter in Thailand (ACS-ICSCS) and ACS Agricultural and Food Chemistry Division (ACS-AGFD).
- Udompong, S., Tuengpanya, S., Jaratjaroonphong, J., & **Srisook, K.** (2013). Anti-inflammatory effect of bis(heteroaryl)alkanes in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. In *Proceedings of the 5th Science Research Conference*(pp. 273-279). Phayao: University of Phayao.
- Srisook, K.**, Nounnang, N., Thabthim, Y., & Srisook, E. (2012). .A comparative study of antioxidant and anti-tyrosinase activities of rhizomes and leaves of *Etlingera pavieana*. *Proceedings of the 4th International Natural Products for Health and Beauty* (pp. 551.332-551.335) Chiangmai: ChaingMai University.
- Srisook, E., Palachot, M., & **Srisook, K.** (2012). *In vitro* anti-inflammatory effect of *Etlingera pavieana* rhizomes and its compounds in lipopolysaccharide-induced macrophages. *Proceedings of the 4th International Natural Products for Health and Beauty* (pp. 551.329-551.331). Chiangmai: ChaingMai University.
- Jirapa Chantiman, Ekaruth Srisook, Narumon Phaonakrop, Janthima Jaresitthikunchai, Sittiruk Roytrakul, **Klaokwan Srisook***. (2011). Proteome Analysis of Murine Macrophage Cell in Response to Ethyl 2-acetyl-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylate (EAMA). *Proceeding of the 3rd International Conference on Biochemistry and Molecular Biology*. 6-8 April, 2011. p62-66. (Fulltext, CD version).
- Klaokwan Srisook***, Ekaruth Srisook. Evaluation of Antioxidant Capacity of Fractions from *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. Rhizome. *Proceeding of the 3rd International Natural Products for Health and Beauty*. 16-18 March, 2011. (Fulltext, CD version).
- Yaowalak Charoensuk, **Klaokwan Srisook***, Ekaruth Srisook and Siriporn Kongniyai. Anti-tyrosinase activity of extracts and compound from *Amomum biflorum* Jack. Leaves. *Proceeding of the 3rd International Conference on Biochemistry and Molecular Biology*. 6-8 April, 2011. P201-204. (Fulltext, CD version).

Jirapa Chantiman, Ekaruth Srisook, Narumon Phaonakrop, Janthima Jaresitthikunchai, Sittiruk Roytrakul, **Klaokwan Srisook***. Proteomic analysis of murine macrophage cell line in response to lipopolysaccharide. the 6th International Symposium of the Protein Society of Thailand. 31 Aug-2 Sep 2011. P167-173.

Yaowalak Charoensuk, Ekaruth Srisook and **Klaokwan Srisook***. Inhibitory effect of (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene isolated from leaves of *Amomum biflorum* Jack. On nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. Proceeding of the 1st International Congress on Natural Products. Pang-nga, Thailand, 17-18 October, 2011. P133-136.

Nadtaya Mongkol, **Klaokwan Srisook***. Ekaruth Srisook and Supatra Karnkla. Suppressive effects of nitric oxide (NO) production and inducible nitric oxide synthase by NAMDA derivatives in LPS-stimulated macrophages. *The 9th National Symposium on Graduate Research*, Chonburi, Thailand, 2008.

Phrommanich, S., Techasauvapak, P., **Srisook, E.**, Mujchacheep, S., Hrimpeng, K. *Screening for anti-Staphylococcus aureus activity of plant extracts*. The 18th Biennial Conference of the Asian Association for Biology Education, The Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong, 2000.8.

Ekaruth Srisook, Supatra Karnkla and Klaokwan Srisook. Syntheses and biological activity of NAMDA derivatives. The 1st Congress on Chemistry and Applied Chemistry, Chonburi, Thailand, Mar 2007.

Ekaruth Srisook*, Supatra Karnkla and Klaokwan Srisook. "Syntheses of NAMDA derivatives as nitric oxide reducing agents." *The 6th National Symposium on Graduate Research, Bangkok, Thailand, 2006*.

ผู้ร่วมโครงการวิจัย :

1. ชื่อ นางกล่าวขวัญ ศรีสุข
Mrs. Klaokwan Srisook
2. ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์
3. หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อ.เมือง ชลบุรี 20131
โทรศัพท์ 038-745-900 ต่อ 3058 E-mail: klaokwan@buu.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

<u>ปี พ.ศ.</u>	<u>คุณวุฒิ</u>	<u>สาขาวิชา</u>	<u>สถานศึกษา</u>
2547	Ph.D.	Medical Science	Inha University, Korea
2539	วท.ม.	ชีวเคมี	มหาวิทยาลัยมหิดล
2534	วท.บ.	เทคนิคการแพทย์	มหาวิทยาลัยมหิดล

5. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ

ชีวเคมีของอนุมูลอิสระ อนุมูลชีววิทยา และการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์

6. ผลงานทางวิชาการ

Books

กล่าวขวัญ ศรีสุข. (๒๕๕๖). หลักการและเทคนิคพื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ (พิมพ์ครั้งที่ ๒). กรุงเทพมหานคร: โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

Srisook, K. & Cha, Y. N. (2005). Biphasic induction of HO-1 in macrophages treated with lipopolysaccharide: role of HO-1 induction in cell survival from oxidative stress. In Y.J. Surh & L. Packer (Eds), *Oxidative stress, Inflammation and Health* (pp. 145-193). Boca Raton: Taylor & Francis.

Journals

กล่าวขวัญ ศรีสุข, สาวินีย์ สีมาพันธ์, ปริญญา เกตุกุล, พรสุดา กันแก้ว, เอกรัฐ ศรีสุข, กาญจนา หริ่มเพ็ง และคณะ. (๒๕๕๗). ฤทธิ์ต้านการอักเสบของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, ๑๙, ๓๐๔-๓๑๑.

กล่าวขวัญ ศรีสุข*, ปรีดาวรรณ สาลี, เยาวลักษณ์ เจริญสุข และ เอกรัฐ ศรีสุข. ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง. *วารสารพฤกษศาสตร์ไทย*, 2553, 2 :143-150

Klaiwattana, P., Srisook, K., Srisook, E., Vuthiphandchai, V., & Neamvonk, J. (2016). Effect of cryopreservation on lipid composition and antioxidant enzyme activity of seabass (*Lates calcarifer*) sperm. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15, 157-169.

, K., Srisook, E., Nachaiyo, W., Chan-In, M., Thongbai, J., Wongyoo, K., et al. (2015). Bioassay-guided isolation and mechanistic action of anti-inflammatory agents from *Clerodendrum inerme* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 165, 94-102.

- Jaratjaroonphong, J., Tuengpanya, S., Saeeng, R., Udompong, S., & **Srisook, K.** (2014). Green synthesis and anti-inflammatory studies of a series of 1,1-bis(heteroaryl)alkane derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *83*, 561-568.
- Buapool, D., Mongkol, N., Chantimal, J., Roytrakul, S., Srisook, E., & **Srisook, K.** (2013). Molecular mechanism of anti-inflammatory activity of *Pluchea indica* leaves in macrophages RAW 264.7 and its action in animal models of inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, *146*, 495-504.
- Srisook, K.**, Buapool, D., Boonbai, R., Simmasut, P., Charoensuk, Y., & Srisook, E. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Pluchea indica* Less. herbal tea. *Journal of Medicinal Plants Research*, *6*, 4077-4081.
- Srisook, K.**, Palachot, M., Mongkol, N., Srisook, E., & Sarapusit, S. (2011). Anti-inflammatory effect of ethyl acetate extract from *Cissus quadrangularis* Linn. may be involved with induction of heme oxygenase-1 and suppression of NF- κ B activation. *Journal of Ethnopharmacology*, *133*, 1008-1014.
- Klaokwan Srisook**, Shan-Shu Han, Hyung-Sim Choi, Mei-Hua Li, Hideo Ueda, Chaekyun Kim, Young-Nam Cha. (2006). CO from enhanced HO activity or from CO-donor inhibits both O_2^- and NO production and downregulates HO-1 expression in LPS-stimulated macrophages. *Biochemical Pharmacology*. *71*: 307-318.
- Klaokwan Srisook**, Nam-Hee Jung, Bum-Rae Kim, Seok-Ho Cha, Hye-Sun Kim, Young-Nam Cha. (2005). Heme oxygenase-1-mediated partial cytoprotection effect by NO on cadmium induced cytotoxicity in C6 rat glioma cells. *Toxicology in Vitro*. *19*: 31-39.
- Klaokwan Srisook** and Young-Nam Cha. (2005). Superinduction of heme oxygenase-1 in macrophages stimulated with lipopolysaccharide by prior depletion of glutathione decreases iNOS expression and NO production. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. *12*: 70-79.
- Klaokwan Srisook**, Chaekyun Kim and Young-Nam Cha. (2005). Role of NO in enhancing the expression of HO-1 in LPS-stimulated macrophages. *Methods in Enzymology*. *396*: 368-377.
- Klaokwan Srisook**, Chaekyun Kim and Young-Nam Cha. (2005). Cytotoxic and cytoprotective actions of O_2^- and NO ($ONOO^-$) are determined both by cellular GSH level and HO activity in macrophages. *Methods in Enzymology*. *396*: 414-424.

- Klaokwan Srisook**, Chaekyun Kim and Young-Nam Cha. (2005). Molecular mechanisms involved in enhancing in HO-1 expression: De-repression by heme and activation by Nrf2 , the “one-two” punch. *Antioxidants Redox Signaling*. 7: 1674-1687.
- Klaokwan Srisook**, Nopporn Sarataphan Kosum Chansiri. (2005). Detection of *Babesia bovis* in Cow Blood by PCR-ELISA. *Burapha Science Journal*. 10: 49-57.
- Klaokwan Srisook** and Young-Nam Cha. (2004). Biphasic induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages stimulated with lipopolysaccharides. *Biochemical Pharmacology* 68: 1709-1720.
- Chantra Tananyutthawongese, **Klaokwan Saengsombut**, Wasana Sukhumsirichat, Walaya Uthaisang, Nopporn Sarataphan and Kosum Chansiri. (1999). Detection of bovine hemoparasite infection using multiplex polymerase chain reaction. *ScienceAsia* 25: 85-90.

Proceedings

- Srisook, K.**, Thongyen, T., Sawai, P., & Srisook, K. (2016). Role of herbal mixture on in vitro antioxidant activity and eNOS activation in human endothelial cells. *Proceeding of the 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty*. (pp. 245-248). KhonKaen: KhonKaen University.
- Wohankla, M., **Srisook, K.**, & Sootanan, P. (2015). Identification of low differentially expressed responsive genes in microarray data of LPS-stimulated macrophage RAW264.7. *Proceeding of the 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference* (pp.752-757). Bangkok: the Thai Society for Biotechnology.
- Seemakhan, S., & **Srisook, K.** (2014). *Ageratum conyzoides* leaf extract inhibit inflammatory response via suppression of NF- κ B and MAPKs pathway in LPS-induced macrophages. *Proceeding of the 5th international Conference on Natural Products for Health and Beauty* (pp. 158-163). Phuket: Natural Product Research Center of Excellence, Prince of Songkla University.
- Buranakit, P., **Srisook, K.**, Srisook, E., & Hrimpeng, K. (2014). Bioassay-guided isolation, characterized and antibacterial activity of isolated compound from *Zingiber mekongense* rhizome. *Proceeding of the 1st Joint ACS AGFD – ACS ICST*

Symposium on Agricultural and Food Chemistry(pp. 185-190). Bangkok:The American Chemical Society International Chemical Sciences Chapter in Thailand (ACS-ICSCT) and ACS Agricultural and Food Chemistry Division (ACS-AGFD).

Udompong, S., Tuengpanya, S., Jaratjaroonphong, J., & **Srisook, K.** (2013). Anti-inflammatory effect of bis(heteroaryl)alkanes in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. In *Proceedings of the 5th Science Research Conference*.(pp. 273-279). Phayao: University of Phayao.

Srisook, K., Nounnang, N., Thabthim, Y., & Srisook, E. (2012). .A comparative study of antioxidant and anti-tyrosinase activities of rhizomes and leaves of *Etlingera pavieana*. *Proceedings of the 4th International Natural Products for Health and Beauty* (pp. 551.332-551.335) Chiangmai: ChaingMai University.

Srisook, E., Palachot, M., & **Srisook, K.** (2012). .*In vitro* anti-inflammatory effect of *Etlingera pavieana* rhizomes and its compounds in lipopolysaccharide-induced macrophages. *Proceedings of the 4th International Natural Products for Health and Beauty* (pp. 551.329-551.331). Chiangmai: ChaingMai University.

Jirapa Chantiman, Ekaruth Srisook, Narumon Phaonakrop, Janthima Jaresitthikunchai, Sittiruk Roytrakul, **Klaokwan Srisook***. (2011). Proteome Analysis of Murine Macrophage Cell in Response to Ethyl 2-acetyl-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylate (EAMA). Proceeding of the 3rd International Conference on Biochemistry and Molecular Biology. 6-8 April, 2011. p62-66. (Fulltext, CD version).

Klaokwan Srisook*, Ekaruth Srisook. Evaluation of Antioxidant Capacity of Fractions from *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. Rhizome. Proceeding of the 3rd International Natural Products for Health and Beauty. 16-18 March, 2011. (Fulltext, CD version).

Yaowalak Charoensuk, **Klaokwan Srisook***, Ekaruth Srisook and Siriporn Kongniyai. Anti-tyrosinase activity of extracts and compound from *Amomum biflorum* Jack. Leaves. Proceeding of the 3rd International Conference on Biochemistry and Molecular Biology. 6-8 April, 2011. P201-204. (Fulltext, CD version).

Jirapa Chantiman, Ekaruth Srisook, Narumon Phaonakrop, Janthima Jaresitthikunchai, Sittiruk Roytrakul, **Klaokwan Srisook***. Proteomic analysis of murine macrophage cell line in

response to lipopolysaccharide. the 6th International Symposium of the Protein Society of Thailand. 31 Aug-2 Sep 2011. P167-173.

Yaowalak Charoensuk, Ekaruth Srisook and **Klaokwan Srisook***. Inhibitory effect of (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene isolated from leaves of *Amomum biflorum* Jack. On nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. Proceeding of the 1st International Congress on Natural Products. Pang-nga, Thailand, 17-18 October, 2011. P133-136.

Nadtaya Mongkol, **Klaokwan Srisook***. Ekaruth Srisook and Supatra Karnkla. Suppressive effects of nitric oxide (NO) production and inducible nitric oxide synthase by NAMDA derivatives in LPS-stimulated macrophages. *The 9th National Symposium on Graduate Research*, Chonburi, Thailand, 2008.

Klaokwan Srisook and Nadtaya Mongkol. Effect of carboxy-PTIO on heme oxygenase-1 expression in RAW 264.7 macrophages. *The 32nd Congress on Science and Technology of Thailand*, Bangkok, Thailand, 2006.

Klaokwan Saengsombut, Wasana Sukhumsirichart, Jarun Boonchai, Nopporn Sarataphan and Kosum Chansiri. *Analysis of partial sequences of LSUrRNA genes of Theileria parasites isolated in Thailand and T. sergenti*. The 25th Congress on Science and Technology of Thailand, Pitsanuloke, Thailand, 1999, p. 804-805.