



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลของสารสกัดสะระแหน่ต่อการลดความดันเลือดและเพิ่มประสิทธิภาพ
ในการทำงานของหลอดเลือด

โดย ผศ.ดร. พวงรัตน์ ภัคดีโชติ

สัญญาเลขที่ MRG5180002

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลของสารสกัดสระระแห่นต่อการลดความดันเลือดและเพิ่มประสิทธิภาพ
ในการทำงานของหลอดเลือด

คณะผู้วิจัย สังกัด

1. ผศ.ดร. พวงรัตน์ ภัคดีโชติ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2. รศ.ดร. ยูพา คู่คงวิริยพันธุ์ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดย

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องผลของสารสกัดสระแห่นต่อการลดความดันเลือดและเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของหลอดเลือด ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาและสำนักงานสนับสนุนการวิจัยประจำปี ภายใต้งบพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ปี 2551 จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย

สิงหาคม 2553

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
Executive summary	3
เนื้อหางานวิจัย	4
Output จากโครงการ	29
ภาคผนวก	29

บทคัดย่อ

สระแหน่เป็นผักพื้นเมืองที่พบมากในประเทศไทยโดยนิยมใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารไทยและสมุนไพรไทย การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชตระกูลมินต์พบว่ามิฤทธิ์แก้ปวด ยาชาเฉพาะที่ สารต้านออกซิแดนซ์และออกฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดขยายตัว อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงผลของสารสกัดสระแหน่ต่อภาวะความดันเลือดสูง ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ป้องกันและฤทธิ์รักษาของสารสกัดสระแหน่ในสภาวะความดันเลือดสูงที่ถูกชักนำด้วยสาร L-NAME และกลไกที่เกี่ยวข้อง ดังนั้นเพื่อศึกษาฤทธิ์ป้องกันของสารสกัดสระแหน่ต่อการพัฒนาความดันเลือดสูงในหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วยสาร L-NAME หนูทดลองสายพันธุ์ Sprague-Dawley ได้รับสาร L-NAME ในขนาด 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ในน้ำดื่ม หรือน้ำดื่มอย่างเดียว พร้อมกับการป้อนสารสกัดสระแหน่ เมื่อครบ 3 สัปดาห์ ความดันเลือดแดงเฉลี่ย (MAP) มีค่าเท่ากับ 162.3 ± 2.7 mmHg. และอัตราการเต้นของหัวใจ (HR) มีค่าเท่ากับ 414.7 ± 13.1 ครั้ง / นาที ซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในหนูกลุ่มที่ได้รับ L-NAME เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (MAP = 92.9 ± 5.4 mmHg, HR = 331.7 ± 16.2 ครั้ง/นาที) ($P < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการลดลงของค่าการไหลของเลือดไปยังอวัยวะท่อนล่างและขาหลัง (HBF) และการเพิ่มขึ้นของค่าความต้านทานต่อการไหลของเลือดไปยังอวัยวะท่อนล่างและขาหลัง (HVR) สารสกัดสระแหน่ป้องกันการเพิ่มขึ้นของความดันเลือดแดงเฉลี่ยในหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME ประมาณ 16.7% เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME อย่างเดียว นอกจากนี้สารสกัดสระแหน่ยังปรับการตอบสนองของหลอดเลือดตอบสนองต่อ Acetylcholine ในหนูความดันเลือดสูงให้ดีขึ้น และลดปริมาณ oxidative stress markers (malondialdehyde (MDA) ในพลาสมา การสร้าง superoxide ในเนื้อเยื่อของหลอดเลือดที่เพิ่มขึ้นในหนูความดันเลือดสูง สำหรับการศึกษาฤทธิ์รักษาความดันเลือดสูงนั้นทำการทดลองแยกกับฤทธิ์ป้องกัน โดยใช้รูปแบบการทดลองเหมือนฤทธิ์ป้องกันดังที่กล่าวมาข้างต้น แต่การศึกษาฤทธิ์รักษาของสารสกัดสระแหน่นั้นจะศึกษาในหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME เป็นเวลา 5 สัปดาห์ และให้สารสกัดสระแหน่ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 ผลการทดลองพบว่าหลังจากหนูทดลองได้รับ L-NAME เป็นเวลา 5 สัปดาห์แล้ว ค่า MAP (184.3 ± 8.7 mmHg) และ HR เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (102.8 ± 2.7 mmHg) สอดคล้องกับการเพิ่มของ HBF และการลดลงของ HVR ในหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME การให้สารสกัดสระแหน่สามารถลดความดันเลือดในหนูความดันเลือดสูงได้ประมาณ 14% นอกจากนี้สารสกัดสระแหน่ยังลดการเสียหายที่ของหลอดเลือดในการตอบสนองต่อสารที่มีผลต่อหลอดเลือดและลดปริมาณ oxidative stress markers ในหนูความดันเลือดสูง ในการทดลองครั้งนี้ยังพบว่าสารสกัดสระแหน่ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงของพลาสมาการไหลเวียนเลือดในกลุ่มควบคุม สำหรับการศึกษาในหลอดเลือดแดงใหญ่เออร์ดำ พบว่าสารสกัดสระแหน่ออกฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดขยายตัว ทั้งหลอดเลือดหนูทดลองความดันเลือดปกติ และหนูทดลองที่ได้รับสาร L-NAME จากผลการทดลองที่ผ่านมาสรุปได้ว่าสารสกัดสระแหน่ออกฤทธิ์ทั้งป้องกันการเกิดความดันเลือดสูงในหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME และยังลดความดันเลือดในหนูทดลองความดันเลือดสูงที่ได้รับ L-NAME และผลนี้อาจเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัด

(คำหลัก) ความดันเลือดสูง สระแหน่ สารต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

Mentha Cordifolia Opiz is a traditional plant in Thailand and an ingredient in Thai food and herbal medicine. Many biological activities of the mint family including analgesic, local anesthetic, antioxidant and vascular relaxation effects have been reported. However, evidence of protective effects of *Mentha Cordifolia* aqueous extract (MC extract) on the development of hypertension has not been extensively reported. The purpose of this study was to investigate preventive and therapeutic effects of MC extract against hypertension in L-NAME-induced hypertensive rats and its involved mechanisms. To study the preventive effect of MC extract on the development of hypertension in L-NAME-induced hypertension, male Sprague-Dawley rats received N[omega]-nitro-arginine methyl ester (L-NAME) (50 mg/kg/day) in drinking water and were either intragastrically administered with MC extract (200 mg/kg/day) or deionized water as vehicle for 3 weeks. After 3 weeks of treatment, mean arterial blood pressure (MAP) (162.3 ± 2.7 mmHg) and heart rate (414.7 ± 13.1 beat/min) of rats treated with L-NAME were significantly increased when compared to those of the control group (92.9 ± 5.4 mmHg, 331.7 ± 16.2 beat/min) ($P < 0.05$). Decreased hindlimb blood flow (HBF) was found in L-NAME-induced hypertensive rats, indicating that hindlimb vascular resistance (HVR) was increased ($P < 0.05$). MC extract markedly prevented the development of hypertension in L-NAME-treated animals by reducing the MAP 16.7 % as compared to those of L-NAME rats and this effect was associated with an improvement in HBF and HVR. In addition, MC extract alleviated the decrease in vascular responses to acetylcholine in the hypertensive rats but not the response to phenylephrine. The levels of plasma malondialdehyde (MDA) and superoxide production in vascular tissues were significantly increased in hypertensive rats. These oxidative markers were decreased in the MC extract-treated group ($P < 0.05$). In separate set of experiment, the therapeutic effect of MC extract on hypertension was studied in the same way of experiment as mentioned above but rats received L-NAME for 5 weeks and orally received MC extract the 4th and 5th week. After 5 weeks of L-NAME treatment, MAP significantly increased (184.3 ± 8.7 mmHg) and heart rate comparing to control group (102.8 ± 2.7 mmHg). An increase of HBF and a reduction in HVR were observed in L-NAME hypertension and these were improved by MC extract. Vascular responsiveness was impaired and high level of oxidative stress markers were found in rats received L-NAME for 5 weeks. Treatment of MC extract for 2 weeks decreased MAP about 14% in L-NAME-induced hypertension. Vasorelaxant responses to Ach and SNP were improved by MC extract in L-NAME hypertension. In addition, MC extract also decreased the excess oxidative stress markers in L-NAME hypertension. MC extract had no effect on hemodynamic status in normal rats. In isolated aortic ring preparation, MC extract caused vasorelaxation in all experimental groups. Results of this study indicated that MC extract exhibited inhibitory effects on the development of hypertension and antihypertensive effects in rats treated with L-NAME, and this effect might be due to the antioxidant capacity of the extract.

Keywords; *Mentha Cordifolia* Opiz, L-NAME, hypertension, antioxidant, nitric oxide

Executive Summary

1. ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) ผลของสารสกัดสระแหน่ต่อการลดความดันเลือดและเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของหลอดเลือด

(ภาษาอังกฤษ) Effects of *Mentha cordifolia* extracts on the reduction of blood pressure and improvement of vascular function

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

ชื่อ นางสาวพวงรัตน์ ภักดีโชติ

สถานที่ทำงาน ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นอำเภอมือ

จังหวัด ขอนแก่น รหัสไปรษณีย์ 40002

โทรศัพท์ 043 348394 โทรสาร 043 348394

โทรศัพท์มือถือ 0814066810 e-mail ppoung@kku.ac.th

3. สาขาวิชาที่ทำการวิจัย สรีรวิทยาระบบไหลเวียนเลือด

4. งบประมาณทั้งโครงการ 480,000 บาท

5. ระยะเวลาดำเนินงาน 2 ปี 3 เดือน (ม.ย. 2551 – ส.ค. 2553)

6. ได้เสนอโครงการนี้ หรือโครงการที่มีส่วนเหมือนกับเรื่องนี้บางส่วนเพื่อขอทุนต่อแหล่งทุนอื่นที่ใดบ้าง

☒ ไม่ได้เสนอต่อแหล่งทุนอื่น

☐ เสนอต่อ

ชื่อโครงการที่เสนอ

กำหนดทราบผล (หรือสถานภาพที่ทราบ)

7. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

โรคความดันเลือดสูง (hypertension) เป็นโรคที่มีอุบัติการณ์เกิดโรคที่สูงมากในประเทศไทย โดยพบได้สูงถึง 40 % ของประชากร และนับเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญของประชากรไทย ปัจจุบันแม้จะมีการศึกษาวิจัยค้นคว้าเกี่ยวกับโรคนี้อย่างมาก แต่ก็ยังไม่สามารถลดจำนวนประชากรที่ป่วยเป็นโรคนี้ได้ และมีแนวโน้มเพิ่มจำนวนมากขึ้นทุกๆปี จึงนับว่าเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยรวมถึงทุกประเทศทั่วโลก สำหรับสาเหตุของโรคความดันเลือดสูงนี้มีมากมายทั้งที่ไม่ทราบสาเหตุ (essential hypertension หรือ primary hypertension) และที่ทราบสาเหตุแน่ชัด (secondary hypertension) อย่างไรก็ตามเมื่อป่วยด้วยโรคนี้แล้ว ผู้ป่วยมักไม่ใส่ใจมากนัก เพราะไม่รู้สึกว่าตนเองป่วยและมีผลกระทบต่อการดำเนินชีวิต จึงนับเป็นโรคเงียบ (silent disease) ที่ค่อยๆทำลายร่างกายอย่างช้าๆ และยังประกอบกับการไม่ติดตามการรักษาอย่างสม่ำเสมอ โรคจะทวีความรุนแรงมากขึ้นและทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนอื่นๆตามมา ได้แก่ สโตรก โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคหลอดเลือดแข็ง โรคกล้ามเนื้อหัวใจตาย โรคหัวใจวาย โรคไตวาย เป็นต้น และสุดท้ายส่งผลให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในที่สุด ดังนั้นหากมีแนวทางที่สามารถป้องกันโรคความดันเลือดสูงหรือชะลอไม่ให้โรคดำเนินแล้วร้ายจนกระทั่งเกิดโรคแทรกซ้อนต่างๆขึ้น จะ

ช่วยให้ผู้ป่วยมีอายุยืนยาวขึ้นและมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น ซึ่งนับว่าเป็นวิถีทางหนึ่งของการสร้างเสริมสุขภาพของประชาชนไทย และเป็นการแก้ไขปัญหาสาธารณสุขของประเทศได้อย่างดีเยี่ยม จากการศึกษาวิจัยไม่นานนี้ได้พบประเด็นสำคัญของความเชื่อมโยงระหว่างภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) กับ ภาวะความดันเลือดสูง โดยพบว่าเมื่อหลอดเลือดมีการสร้างอนุมูลอิสระ (free radicals) มากขึ้นจนก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันขึ้น จะเป็นปัจจัยสำคัญที่ชักนำให้เกิดภาวะความดันเลือดสูงและส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อ นอกจากนี้รายงานการศึกษาวิจัยเมื่อเร็ว ๆ นี้ได้แสดงให้เห็นถึงวิถีความเชื่อมโยง (common pathway) ระหว่างภาวะความดันเลือดสูงและภาวะเครียดจากออกซิเดชัน นั่นคือ การทำงานของหลอดเลือดที่ผิดปกติ (vascular dysfunction) [1] ซึ่งมีสาเหตุหลักมาจากการขาดไนตริกออกไซด์ (nitric oxide; NO) อันเป็นสารสำคัญที่สร้างและคั่งหลังจากเซลล์เอนโดทีเลียมของหลอดเลือดและออกฤทธิ์ให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบคลายตัวแล้วทำให้หลอดเลือดขยาย (vasodilation) ภาวะการขาด NO ในสภาวะนี้นิยมเรียกว่า “ภาวะ NO bioactivity ลดลง” โดยเกิดขึ้นเนื่องจาก NO สร้างน้อยลง และ/หรือ NO ถูกทำลายมากขึ้น และทั้งสองกรณีนี้มักพบร่วมกับภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ดังนั้น หากหลอดเลือดทำงานผิดปกติเป็นเวลานานๆ ในภาวะความดันเลือดสูง และไม่ได้รับการรักษาหรือแก้ไขอย่างเหมาะสม ก็จะส่งผลกระทบต่อให้ระบบไหลเวียนเลือดล้มเหลว และเสียชีวิตในที่สุด [1-3]

สำหรับแนวทางการรักษาโรคความดันเลือดสูงในปัจจุบัน คือการใช้ยารักษาควบคู่กับการปรับเปลี่ยนวิถีการดำเนินชีวิต (life style modification) เช่น เลิกสูบบุหรี่ เลิกดื่มสุรา ลดความอ้วน ลดความเครียด ออกกำลังกาย และสิ่งสำคัญที่สุดก็คือการจำกัดอาหารประเภทเค็มจัด หวานจัดและไขมันสูง ในขณะที่รับประทานอาหารจำพวกผักและผลไม้มากขึ้น เนื่องจากผักและผลไม้มีสารต้านออกซิเดชั่นสูง จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาทั้งในสัตว์ทดลองและ clinical trials สารต้านออกซิเดชั่นนำมาใช้ร่วมกับการรักษาโรคความดันเลือดสูง ได้แก่ วิตามินอี, วิตามินซี, แอลฟา- และ บีตา-แคโรทีน เป็นต้น [4-9] อย่างไรก็ตามสารเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นวิตามิน มีราคาค่อนข้างแพง และเนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนที่อุดมสมบูรณ์ด้วยผักและผลไม้มานานานชนิด ประกอบกับประชาชนไทยนิยมบริโภคผักในชีวิตประจำวัน โดยเฉพาะชาวอีสาน และผักหลากหลายชนิดเหล่านี้ต่างมีฤทธิ์อ้างอิงในตำรับยาแผนโบราณในการรักษาโรคและบรรเทาอาการของโรคต่างๆ แต่ทั้งนี้ภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทยไม่ได้ถูกนำมาพัฒนาอย่างจริงจังและเป็นรูปธรรม ทั้งนี้เนื่องจากขาดหลักฐานการวิจัยทางวิทยาศาสตร์เพื่อยืนยันถึงฤทธิ์ที่กล่าวอ้างต่างๆ

ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2545 กลุ่มผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของผักพื้นบ้านไทยมากมายหลายชนิดเป็นจำนวนกว่า 20 ชนิด และจากผลการศึกษาที่ผ่านมาทั้งในรูปแบบการวิจัยในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture) เซลล์ที่แยกจากสัตว์ทดลอง (isolated cell) และการศึกษาภายในตัวสัตว์ทดลอง (in vivo study) พบว่าผักพื้นบ้านไทยหลายชนิดมีศักยภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ, ต้านออกซิเดชั่น และปกป้องหลอดเลือดจากการบาดเจ็บในภาวะเม็ดเลือดแดงแตก [10-17] อย่างไรก็ตามผักหลายชนิดที่ทำการศึกษายังมีประเด็นที่น่าสนใจทำการวิจัยต่อเนื่องในเชิงลึก ในการศึกษาวิจัยนี้กลุ่มผู้วิจัยได้คัดเลือกสาระแน ซึ่งมีลักษณะโดดเด่นนอกเหนือจากความนิยมในการบริโภคแล้ว ยังมีฤทธิ์กล่าวอ้างทางเภสัชวิทยาด้านระบบไหลเวียนเลือด แต่ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานการวิจัยในประเทศไทยมาก่อน โดยการศึกษาวิจัยนี้จะทำการศึกษาด้านฤทธิ์ลดความดันเลือดและเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของหลอดเลือด สำหรับผลจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้นอกจากจะได้องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับประโยชน์ของผักไทยในการลดภาวะเครียดออกซิเดชั่น ลดความดันเลือด และเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของหลอดเลือดแล้ว ยังเป็นแนวทางในการพัฒนาพืชผักไทยในแง่ของการเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพและป้องกันโรคความดันเลือดสูง ซึ่งเป็นวิถีทางหนึ่งในการช่วยแก้ไขปัญหาสาธารณสุขของประเทศ สร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่พืชผักสมุนไพรไทย พัฒนาภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย และเสริมสร้างความสามารถในการพึ่งตนเองของประชาชนบนพื้นฐานเศรษฐกิจพอเพียง

8. วัตถุประสงค์

8.1 เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดสระแหมในการกำจัดอนุมูลอิสระและลดภาวะเครียดออกซิเดชันในหนูทดลอง ความดันเลือดสูง

8.2 เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดสระแหมในการลดความดันเลือด, ปรับเปลี่ยนสถานะพลศาสตร์การไหลเวียนเลือดและเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของหลอดเลือดในหนูทดลองความดันเลือดสูง

9. ระเบียบวิธีวิจัย

สัตว์ทดลองที่ใช้: หนูทดลองความดันเลือดสูง ใช้หนูทดลองสายพันธุ์ Spontaneously hypertensive rat ส่วนหนูทดลองความดันเลือดปกติใช้หนูทดลองสายพันธุ์ Wistar โดยทั้งสองสายพันธุ์ จะใช้หนูเพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์ น้ำหนัก 230-250 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ อ.สาขลา จ.นครปฐม

การเก็บและเตรียมสารสกัด: ทำการเก็บผักสระแหมในฤดูกาลที่มีผลผลิตมาจากแหล่งเพาะปลูกในเขตอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่นและ ตัวอย่างพืชจะเก็บรักษาเพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์ นำส่วนใบสระแหมสกัดสดๆด้วยน้ำ เพื่อให้เหมือนกับการนำไปบริโภคทั่วไป โดยทำการหั่นตัวอย่างสระแหมเป็นชิ้นย่อยๆ ใส่ลงในน้ำกลั่น และต้มที่อุณหภูมิราว 95 °ซ เป็นเวลา 30 นาที กรองเอาน้ำสกัดผักไปทำการระเหิดให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer จนได้เป็นผงแห้ง เก็บสารสกัดผงแห้งในขวดทึบแสงที่สะอาดปราศจากเชื้อและมีฝาปิดมิดชิด ที่อุณหภูมิ -20 °ซ

การเลี้ยงและดูแลสัตว์ทดลอง: หนูทดลองทั้งหมดจะถูกเลี้ยงในห้องพักสัตว์ทดลองซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 28-30 °ซ และควบคุมแสงสว่าง (มืดและสว่างสลับกันทุก 12 ชม.) ตามมาตรฐานจรรยาบรรณการใช้สัตว์ที่สำนักงานสภาวิจัยแห่งชาติได้กำหนด และหนูทดลองจะถูกชั่งน้ำหนัก สังเกตพฤติกรรมตลอดการทดลอง

แผนการทดลอง:

1. สกัดสระแหมทำการศึกษาในหนูทดลองความดันเลือดสูง in vivo ใน 2 การทดลองคือ

1.1 ผลของสารสกัดสระแหมต่อการป้องกันความดันเลือดสูงจากการชักนำด้วยสาร L-NAME (protective effects)

2.2 ผลของสารสกัดสระแหมต่อการลดความดันเลือดสูงจากการชักนำด้วยสาร L-NAME (therapeutic effects)

2. การตรวจวัด oxidative stress markers

3. ใช้สารสกัดสระแหมทำการศึกษาในหนูทดลองความดันเลือดสูง in vitro โดยทำการศึกษาในหลอดเลือดแดงใหญ่เออร์ต้าในหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วย L-NAME (50 mg/kg)

วิธีการทดลอง

1.1 ผลของสารสกัดสระแหมต่อการป้องกันความดันเลือดสูงจากการชักนำด้วยสาร L-NAME เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (protective effects) โดยจะแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่มย่อย แต่ละกลุ่มมีจำนวนหนูทดลอง 8-10 ตัว/กลุ่ม ดังนี้

(1) Control group เป็นกลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติที่ถูกป้อนด้วยน้ำเป็นเวลา 3 สัปดาห์

(2) Normal control treated with MC extract group เป็นกลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติที่ถูกป้อนด้วยสารสกัดสระแหมขนาดความเข้มข้น (200mg/kg/day) เป็นเวลา 3 สัปดาห์

(3) Hypertensive group เป็นกลุ่มหนูทดลองความดันเลือดสูงที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วย L-NAME ถูกป้อนด้วยน้ำเป็นเวลา 3 สัปดาห์

(4) Hypertensive rats treated with MC extract group เป็นกลุ่มหนูทดลองความดันเลือดสูงที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วย L-NAME พร้อมทั้งป้อนด้วยสารสกัดสระแหม ขนาดความเข้มข้น 200 mg/kg/day เป็นเวลา 3 สัปดาห์

1.1 ผลของสารสกัดสระแหมต่อการลดความดันเลือดสูงจากการชักนำด้วยสาร L-NAME เป็นเวลา 5 สัปดาห์ (therapeutic effects) โดยจะแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่มย่อย แต่ละกลุ่มมีจำนวนหนูทดลอง 8-10 ตัว/กลุ่ม ดังนี้

- (1) Control group เป็นกลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติที่ถูกป้อนด้วยน้ำเป็นเวลา 5 สัปดาห์
- (2) Normal control treated with MC extract group เป็นกลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติที่ถูกป้อนด้วยสารสกัดสะระแหน่ขนาดความเข้มข้นต่ำ (200mg/kg) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ คือเริ่มสัปดาห์ที่ 4 และ 5
- (3) Hypertensive group เป็นกลุ่มหนูทดลองความดันเลือดสูงที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วย L-NAME 5 สัปดาห์โดยจะถูกป้อนด้วยน้ำเป็นเวลา 2 สัปดาห์ คือเริ่มสัปดาห์ที่ 4 และ 5
- (4) Hypertensive rats treated with MC extract group เป็นกลุ่มหนูทดลองความดันเลือดสูงที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วย L-NAME 5 สัปดาห์ ที่ถูกป้อนด้วยสารสกัดสะระแหน่ขนาดความเข้มข้นต่ำ (200mg/kg) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ คือเริ่มสัปดาห์ที่ 4 และ 5

หมายเหตุ: สำหรับขนาดความเข้มข้นของสารสกัดผักทั้งระดับสูงและระดับต่ำที่จะป้อนให้แก่หนูทดลองนี้จะได้จากการทำ preliminary study ก่อน ทั้งนี้เพื่อที่จะทราบถึง effective doses ที่ไม่เป็นพิษต่อสัตว์ทดลอง

การเก็บข้อมูล:

(1) การประเมินการเปลี่ยนแปลงพลศาสตร์การไหลเวียนเลือด เมื่อครบกำหนด หนูทดลองในแต่ละกลุ่มการทดลอง จะถูกทำให้สลบด้วยการฉีด Ketamine 100 มก./กก. ร่วมกับ Xylazine 2.5 มก./กก. เข้าทางกล้ามเนื้อ เมื่อสลบเรียบร้อยแล้ว ทำการผ่าตัดเปิดหลอดเลือดเพื่อช่วยหายใจ เมื่ออัตราการหายใจสม่ำเสมอแล้ว ทำการสอดสายสวน (polyethylene tube) เข้าที่ femoral artery เพื่อวัดความดันเลือดแดง (arterial blood pressure) และอัตราการเต้นของหัวใจ (heart rate) โดยปลายอีกด้านหนึ่งของสายสวนจะต่อเข้ากับ pressure transducer ของ BIOPAC system (BIOPAC system Inc., California, U.S.A) เพื่อทำการบันทึกค่าผ่านทางเครื่องคอมพิวเตอร์ด้วยโปรแกรม AcqKnowledge data acquisition จากนั้นทำการวัดปริมาณเลือดที่ไปเลี้ยงบริเวณลำตัวท่อนล่าง (hindlimb blood flow; HBF) โดยการคล้อง blood flow probe ขนาดที่พอเหมาะเข้าที่หลอดเลือด abdominal aorta ช่วงใต้ไต และวัดอัตราการไหลของเลือดโดยใช้เครื่อง electromagnetic flowmeter (Carolina Medical Electronics, Inc., U.S.A) ระหว่างการทดลองอุณหภูมิของหนูทดลองจะถูกควบคุมให้คงที่ประมาณ 37°C ด้วยผ้าห่มไฟฟ้า และแสงไฟ อุณหภูมิแกนวัดโดยใช้ electronic rectal temperature probe ต่อกับเครื่องวัดอุณหภูมิ (indication temperature controller, Bangkok, Thailand) สำหรับค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยและ HBF สามารถนำมาคำนวณหาค่าความต้านทานการไหลของเลือดบริเวณลำตัวท่อนล่าง (hindlimb vascular resistance) ได้ เมื่อความดันเลือด และ HBF ของหนูทดลองคงที่อย่างน้อย 15-20 นาที ทำการลงยอยดังนี้

(2) การประเมินประสิทธิภาพการทำงานของหลอดเลือด ขณะที่หนูทดลองยังสลบ ทำการสอดสายสวนเข้าที่ femoral vein เพื่อ infuse สาร vasoactive ต่างๆ ที่จะทำให้การทดสอบการตอบสนองของหลอดเลือด (vascular reactivity) ทั้งที่เป็น vasodilators และ vasoconstrictors ได้แก่ acetylcholin, sodium nitroprusside, phenylephrine และ angiotensin II โดยการทดสอบผลของสารแต่ละตัวจะเว้นระยะห่างประมาณ 5 นาทีหรือจนกระทั่งค่าความดันเลือดกลับเข้าสู่ baseline และเมื่อทดสอบการตอบสนองของหลอดเลือดแล้ว จะให้ยาสลบเกินขนาดแก่หนูทดลองเพื่อให้ตายอย่างสงบ และรีบเก็บตัวอย่างเลือดและหลอดเลือดเพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี

(3) การตรวจวิเคราะห์ antioxidant/oxidative stress markers และปริมาณการสร้างอนุมูลอิสระ ตัวอย่างเลือดและหลอดเลือดจะนำมาตรวจวิเคราะห์ทางชีวเคมี ได้แก่ plasma เม็ดเลือดแดงและ carotid artery ของหนูทดลอง จะถูกนำมาวิเคราะห์หา antioxidant markers ได้แก่ ระดับของ GSH ทั้ง oxidized และ reduced GSH ในเลือดและเนื้อเยื่อ [15] และทำการวัด oxidative stress markers ในเลือดและเนื้อเยื่อ ได้แก่

ระดับ malondialdehyde เพื่อประเมินสถานะ lipid peroxidation [18], ระดับ protein carbonyl เพื่อประเมินสถานะ protein peroxidation [15,19], ปริมาณการสร้าง NO ในพลาสมา โดยวัดปริมาณ nitrites and nitrates [12,20], และปริมาณการสร้าง $O_2^{\bullet -}$ ทั้งในเลือดและใน carotid artery [12,21]

การวิเคราะห์ข้อมูล: ผลการทดลองทั้งหมดจะนำมาคำนวณหาค่า Mean $\pm$ S.E.M. และทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม Sigma statistics โดยใช้ Analysis of Variance และตามด้วย Student-Newman-Keuls เพื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลอง ส่วนการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าตัวแปรต่างๆ จะใช้ Pearson correlations กำหนดค่าความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $P < 0.05$

10. จำนวนโครงการที่ผู้สมัครกำลังดำเนินการอยู่ โดยขอให้ระบุระยะเวลาเริ่มต้นและสิ้นสุดของแต่ละโครงการ แหล่งทุน และงบประมาณสนับสนุนที่ได้รับ เวลาที่ใช้ทำโครงการวิจัยในแต่ละโครงการ เป็นกี่ชั่วโมงต่อสัปดาห์ ทั้งในฐานะหัวหน้าโครงการ ผู้ร่วมโครงการของแต่ละโครงการที่กำลังดำเนินการอยู่

ชื่อโครงการ

.....

ระยะเวลาโครงการปี ตั้งแต่ถึง

แหล่งทุนที่ให้การสนับสนุน.....

.....

งบประมาณที่ได้รับ

สถานะผู้สมัคร ☐ หัวหน้าโครงการ

☐ ผู้ร่วมโครงการ

เวลาที่ใช้ทำวิจัยในโครงการนี้กี่ชั่วโมงต่อสัปดาห์.....

เนื้อหางานวิจัยประกอบด้วย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดสระแหม่นในการลดความดันเลือด, ปรับเปลี่ยนสถานะพลศาสตร์การไหลเวียนเลือดและเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของหลอดเลือดในหนูทดลองความดันเลือดสูง
2. เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดสระแหม่นในการกำจัดอนุมูลอิสระและลดภาวะเครียดออกซิเดชันในหนูทดลองความดันเลือดสูง
3. เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดสระแหม่นต่อการขยายตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่เออร์ตาในหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วย L-NAME (50 mg/kg/day)

วิธีทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้: ใช้หนูทดลองสายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์ น้ำหนัก 230-250 กรัม จากหน่วยสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น

การเก็บและเตรียมสารสกัดผัก: ทำการเก็บผักสระแหม่นในฤดูกาลที่มีผลผลิตมากจากแหล่งเพาะปลูกในเขตอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่นและ ตัวอย่างพืชจะเก็บรักษาเพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์ นำส่วนใบสระแหม่นสกัดสดๆด้วยน้ำ เพื่อให้เหมือนกับการนำไปบริโภคทั่วไป โดยทำการหั่นตัวอย่างสระแหม่นเป็นชิ้นย่อยๆ ใส่ลงในน้ำกลั่น และต้มที่อุณหภูมิราว 95°C เป็นเวลา 30 นาที กรองเอาน้ำสกัดผักไปทำการระเหิดให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer จนได้เป็นผงแห้ง เก็บสารสกัดผงแห้งในขวดทึบแสงที่สะอาดปราศจากเชื้อและมีฝาปิดมิดชิด ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ -20°C

การเลี้ยงและดูแลสัตว์ทดลอง: หนูทดลองทั้งหมดจะถูกเลี้ยงในห้องพักสัตว์ทดลองซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 28-30°C และควบคุมแสงสว่าง (มืดและสว่างสลับกันทุก 12 ชม.) ตามมาตรฐานจรรยาบรรณการใช้สัตว์ที่สำนักงานสภาวิจัยแห่งชาติได้กำหนด และหนูทดลองจะถูกชั่งน้ำหนัก สังกะยัตติกรรมตลอดการทดลอง โดยงานวิจัยครั้งนี้ได้ผ่านจริยธรรมสัตว์ทดลองจากคณะกรรมการจริยธรรมสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยขอนแก่น (AEKKU 20/2551)

การชักนำให้หนูทดลองเกิดความดันเลือดสูง: หนูทดลองจะถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วยการให้สารยับยั้งการสร้าง nitric oxide คือ L-NAME ในขนาด 50 mg/kg/day โดยการผสมในน้ำดื่ม ในขณะที่กลุ่มควบคุมจะได้รับน้ำดื่มตามปกติ

แผนการทดลอง

1. สกัดสระแหม่นทำการศึกษาในหนูทดลองความดันเลือดสูง in vivo ใน 2 การทดลองคือ
 - 1.1 ผลของสารสกัดสระแหม่นต่อการป้องกันความดันเลือดสูงจากการชักนำด้วยสาร L-NAME (protective effects)
 - 2.2 ผลของสารสกัดสระแหม่นต่อการลดความดันเลือดสูงจากการชักนำด้วยสาร L-NAME (therapeutic effects)
2. การตรวจวัด oxidative stress markers
3. ใช้สารสกัดสระแหม่นทำการศึกษาในหนูทดลองความดันเลือดสูง in vitro โดยทำการศึกษาในหลอดเลือดแดงใหญ่เออร์ตาในหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วย L-NAME (50 mg/kg)

วิธีการทดลอง

- 1.1 ผลของสารสกัดสระแหม่นต่อการป้องกันความดันเลือดสูงจากการชักนำด้วยสาร L-NAME เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (protective effects) โดยจะแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่มย่อย แต่ละกลุ่มมีจำนวนหนูทดลอง 8-10 ตัว/กลุ่ม ดังนี้
 - (1) Control group เป็นกลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติที่ถูกป้อนด้วยน้ำเป็นเวลา 3 สัปดาห์
 - (2) Normal control treated with MC extract group เป็นกลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติที่ถูกป้อนด้วยสารสกัดสระแหม่นขนาดความเข้มข้น (200mg/kg/day) เป็นเวลา 3 สัปดาห์

(3) Hypertensive group เป็นกลุ่มหนูทดลองความดันเลือดสูงที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วย L-NAME ถูกป้อนด้วยน้ำเป็นเวลา 3 สัปดาห์

(4) Hypertensive rats treated with MC extract group เป็นกลุ่มหนูทดลองความดันเลือดสูงที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วย L-NAME พร้อมทั้งป้อนด้วยสารสกัดสะระแหน่ ขนาดความเข้มข้น 200 mg/kg/day เป็นเวลา 3 สัปดาห์

1.1 ผลของสารสกัดสะระแหน่ต่อการลดความดันเลือดสูงจากการชักนำด้วยสาร L-NAME เป็นเวลา 5 สัปดาห์ (therapeutic effects) โดยจะแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่มย่อย แต่ละกลุ่มมีจำนวนหนูทดลอง 8-10 ตัว/กลุ่ม ดังนี้

(1) Control group เป็นกลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติที่ถูกป้อนด้วยน้ำเป็นเวลา 5 สัปดาห์

(2) Normal control treated with MC extract group เป็นกลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติที่ถูกป้อนด้วยสารสกัดสะระแหน่ ขนาดความเข้มข้นต่ำ (200mg/kg) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ คือเริ่มสัปดาห์ที่ 4 และ 5

(3) Hypertensive group เป็นกลุ่มหนูทดลองความดันเลือดสูงที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วย L-NAME 5 สัปดาห์ โดยจะถูกป้อนด้วยน้ำเป็นเวลา 2 สัปดาห์ คือเริ่มสัปดาห์ที่ 4 และ 5

(4) Hypertensive rats treated with MC extract group เป็นกลุ่มหนูทดลองความดันเลือดสูงที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วย L-NAME 5 สัปดาห์ ที่ถูกป้อนด้วยสารสกัดสะระแหน่ขนาดความเข้มข้นต่ำ (200mg/kg) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ คือเริ่มสัปดาห์ที่ 4 และ 5

หมายเหตุ: สำหรับขนาดความเข้มข้นของสารสกัดผักที่ป้อนให้แก่หนูทดลองนี้จะได้จากการทำ preliminary study ก่อน ทั้งนี้เพื่อที่จะทราบถึง effective doses ที่ไม่เป็นพิษต่อสัตว์ทดลอง

การเก็บข้อมูล:

(1) วัดความดันเลือดแบบทางอ้อม (Indirect Blood Pressure Measurement)

ทำการประเมินความดันเลือดของสัตว์ทดลองโดยการวัดความดันเลือดที่หางสัปดาห์ละครั้งด้วยเครื่อง Tail-cuff Plethymography (IITC model 179 blood pressure analyzer) เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าความดันเลือดจนเสร็จสิ้นการทดลอง

(2) การประเมินการเปลี่ยนแปลงพลศาสตร์การไหลเวียนเลือด

เมื่อครบกำหนดหนูทดลองในแต่ละกลุ่มการทดลองจะถูกทำให้สลบด้วยการฉีดยาสลบ Nembutal (50 mg/kg) เข้าทางช่องท้อง เมื่อสลบเรียบร้อยแล้ว ทำการผ่าตัดเปิดหลอดเลือดเพื่อช่วยหายใจ เมื่ออัตราการหายใจสม่ำเสมอแล้ว ทำการสอดสายสวน (polyethylene tube) เข้าที่ femoral artery เพื่อวัดความดันเลือดแดง (arterial blood pressure) และอัตราเต้นของหัวใจ (heart rate) โดยปลายอีกด้านหนึ่งของสายสวนจะต่อเข้ากับ pressure transducer ของ BIOPAC system (BIOPAC system Inc., California, U.S.A) เพื่อทำการบันทึกค่าผ่านทางเครื่องคอมพิวเตอร์ด้วยโปรแกรม AcqKnowledge data acquisition จากนั้นทำการวัดปริมาณเลือดที่ไปเลี้ยงบริเวณลำตัวท่อนล่าง (hindlimb blood flow; HBF) โดยการสอด blood flow probe ขนาดที่พอเหมาะเข้าที่หลอดเลือด abdominal aorta ช่วงใต้ไต และวัดอัตราการไหลของเลือดโดยใช้เครื่อง electromagnetic flowmeter (Carolina Medical Electronics, Inc., U.S.A) ระหว่างการทดลองอุณหภูมิของหนูทดลองจะถูกควบคุมให้อยู่ที่ประมาณ 37°C ด้วยผ้าห่มไฟฟ้าและแสงไฟ อุณหภูมิแกนวัดโดยใช้ electronic rectal temperature probe ต่อกับเครื่องวัดอุณหภูมิ (indication temperature controller, Bangkok, Thailand) สำหรับค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยและค่าการไหลของเลือดไปยังท่อนล่างและขาหลัง (Hindlimb blood flow; HBF สามารถนำมาคำนวณหาค่าความต้านทานการไหลของเลือดบริเวณลำตัวท่อนล่าง (hindlimb vascular resistance) ได้ เมื่อความดันเลือด และ HBF ของหนูทดลองคงที่อย่างน้อย 15-20 นาที

จากนั้นทำการเก็บเลือดจาก abdominal aorta เพื่อวิเคราะห์หา plasma MDA, protein carbonyl และหลอดเลือดคาโรติดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ superoxide production

(3) การประเมินประสิทธิภาพการทำงานของหลอดเลือด (Vascular reactivity assessments)

ทำการทดสอบในกลุ่มที่ไม่ได้เก็บเลือดและหลอดเลือดสำหรับการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางเคมี โดยขณะที่หนูทดลองยังสลบ ทำการสอดสายสวนเข้าที่ femoral vein เพื่อ infuse สาร vasoactive ต่างๆ ที่จะทำให้การทดสอบการตอบสนองของหลอดเลือด (vascular reactivity) ทั้งที่เป็น vasodilators และ vasoconstrictors ได้แก่ acetylcholine, sodium nitroprusside และ phenylephrine โดยการทดสอบผลของสารแต่ละตัวจะเว้นระยะห่างประมาณ 5 นาทีหรือจนกระทั่งค่าความดันเลือดกลับเข้าสู่ baseline

(4) การวิเคราะห์ทางชีวเคมี (Biochemical assays)

ประเมินการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่งจะเกิดการสร้างอนุมูลอิสระมากขึ้น โดยการวิเคราะห์หาการสร้าง superoxide จากหลอดเลือดคาโรติด โดยใช้เทคนิค lucigenin-enhanced chemiluminescence และวิเคราะห์หาตัวชี้วัดของการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อ lipid และ protein ซึ่งเป็นโครงสร้างที่สำคัญของร่างกาย โดยวัดระดับของ malondialdehyde และ protein carbonyl จากพลาสมาของหนูทดลองในแต่ละกลุ่ม

(5) การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดสระแหม่นต่อการขยายตัวของหลอดเลือดในหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วย L-NAME (50 mg/kg)

การแยกหลอดเลือดแดงใหญ่เออร์ตา สลบหนูทดลองด้วย pentobarbitone sodium (50 mg/kg i.p.) วัดความดันหลอดเลือดแดง จากนั้นให้ยาสลบเกินขนาดและทำการแยกหลอดเลือดแดงใหญ่เออร์ตาแล้วนำไปแขวนใน organ bath ที่หล่อด้วย physiological salt solution (NaCl 118.2, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.18 Glucose 11.0 mmol/L, NaHCO_3 25 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5 mM) อุณหภูมิ 37 °C และเติม O_2 95 และ CO_2 5% ตลอดเวลา จากนั้นปล่อยให้หลอดเลือดเข้าสู่ภาวะสมดุลประมาณ 90 นาที ก่อนการทดลอง จากนั้นหลอดเลือดแดงใหญ่เออร์ตาจะถูกเพิ่มความตึงตัวด้วยสาร phenylephrine (0.1-1 μM)

ในการทดลองครั้งนี้แบ่งในหนูทดลองออกเป็น 4 กลุ่มคือ

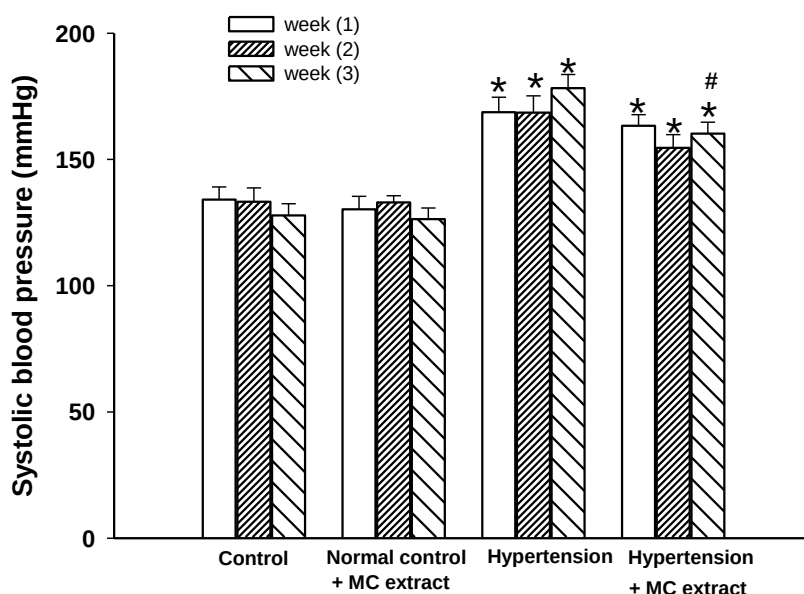
- 1 Control group + vehicle (น้ำ) เป็นหนูปกติที่ได้ทดสอบด้วยสารที่ใช้ละลายสระแหม่นคือน้ำ
- 2 Normotensive group + MC เป็นหนูปกติที่ได้ทดสอบการตอบสนองของหลอดเลือดด้วยสารสกัดสระแหม่นความเข้มข้น (10-1000 $\mu\text{g/ml}$)
- 3 Hypertensive group + vehicle (น้ำ) เป็นหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความดันเลือดสูงด้วย L-NAME (50 mg/kg) โดยผสมในน้ำดื่มให้หนูทดลองดื่มเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3 แต่ใช้น้ำแทนสารสกัดสระแหม่น
- 4 Hypertensive group + MC เป็นหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความดันเลือดสูงด้วย L-NAME (50 mg/kg) โดยผสมในน้ำดื่มให้หนูทดลองดื่มเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ทดสอบด้วยสารสกัดสระแหม่นความเข้มข้น (10-1000 $\mu\text{g/ml}$)

ผลการทดลอง

1. ฤทธิ์ป้องกัน (Preventive effects) ความดันเลือดสูงในหนูทดลองที่ได้รับสาร L-NAME

การทดลองครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์ป้องกันความดันเลือดสูงที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารยับยั้งการสร้าง nitric oxide (protective effects) ของสารสกัดสระแหม่น โดยทำการป้อนสารสกัดสระแหม่นพร้อมทั้งให้สาร L-NAME (50 mg/kg/day) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ผลการทดลองจากการวัดความดันเลือดที่หางหนูสัปดาห์ละครั้งพบว่าในหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME จะมีค่าความ

ดันเลือดซิสโตลิก (systolic pressure; SP) เท่ากับ 168.7 ± 5.8 mmHg ในสัปดาห์ที่ 1 ซึ่งมีค่ามากกว่าความดันเลือดซิสโตลิกในหนูทดลองที่ไม่ได้รับ L-NAME (134.1 ± 5.03 mmHg) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และค่าความดันเลือดซิสโตลิกนี้มีค่าสูงกว่าในหนูทดลองที่ไม่ได้รับ L-NAME ในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 และพบว่าสารสกัดชะระแห่นไม่มีผลลดความดันเลือดในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดปกติทั้งในสัปดาห์ที่ 1, 2 และ 3 อย่างไรก็ตามในสัปดาห์ที่ 3 สารสกัดชะระแห่นมีฤทธิ์ป้องกันความดันเลือดสูงเนื่องจากการให้สาร L-NAME นั่นคือในหนูทดลองที่ได้รับสาร L-NAME พร้อมทั้งป้อนสารสกัดชะระแห่นมีความดันเลือดซิสโตลิกเท่ากับ 160.2 ± 4.5 mmHg ซึ่งน้อยกว่าหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสาร L-NAME (178.2 ± 5.4 mmHg) อย่างเดียว ($P < 0.05$) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงค่าความดันเลือดซิสโตลิก (Systolic pressure; SP) ในสัปดาห์ที่ 1, 2 และ 3 ในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดปกติ (Control group), กลุ่มความดันเลือดปกติที่ได้รับสารสกัดชะระแห่น (Normal control + MC extract group), กลุ่มความดันเลือดสูงเนื่องจากได้รับสาร L-NAME (50 mg/kg) (Hypertensive group) และกลุ่มความดันเลือดสูงเนื่องจากได้รับสาร L-NAME พร้อมกับป้อนสารสกัดชะระแห่น (200 mg/kg) (Hypertensive + MC extract group) ($n=8-10$) * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับ normal control, # $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับ hypertension (ANOVA)

ผลของสารสกัดชะระแห่นต่อความดันเลือดและอัตราการเต้นของหัวใจ

ในสัปดาห์ที่ 3 ของการทดลอง หนูทดลองจะถูกวัดความดันเลือดและอัตราการเต้นของหัวใจทางหลอดเลือดแดง (femoral artery) ซึ่งผลการทดลองพบว่าสอดคล้องกับผลของการวัดความดันเลือดทางหางนั่นคือหนูทดลองที่ได้รับสาร L-NAME (50mg/kg) เป็นเวลา 3 สัปดาห์มีค่าความดันเลือดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) ทั้งค่าความดันเลือดซิสโตลิกและไดแอสโตลิก (199.1 ± 3.2 , 129.1 ± 3.5 mmHg ตามลำดับ) โดยมีความดันเลือดเฉลี่ยเท่ากับ 162.3 ± 2.7 mmHg เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำดื่มปกติซึ่งมีค่าความดันเลือดซิสโตลิกและไดแอสโตลิกและค่าความดันเลือดเฉลี่ยเท่ากับ 129.6 ± 5.1 , 76.1 ± 7.7 และ 92.9 ± 5.4 mmHg ตามลำดับ นอกจากนี้ในกลุ่มหนูทดลองที่ที่ได้รับ L-NAME พร้อมทั้งป้อนสารสกัดชะระแห่น (200 mg/kg) มีค่าความดันเลือดซิสโตลิกและไดแอสโตลิกและค่าความดันเลือดเฉลี่ยลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (176.4 ± 4.8 , 98.8 ± 6.3 และ 135.1 ± 5.8 mmHg) ดังแสดงในตารางที่ 1 ส่วนอัตราการไหลของเลือดไปยังท่อนล่างและขาหลัง (HBF) พบว่าในหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME (50 mg/kg/day) เป็นเวลา 3 สัปดาห์มีค่า HBF เท่ากับ 3.6 ± 0.2 ml/100 g tissue/min ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำดื่มปกติ (6.8 ± 0.3 ml/100

g tissue/min) นอกจากนี้ในกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME และถูกป้อนด้วยสารสกัดสระแหน่ (200 mg/kg) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าสารสกัดสระแหน่เพิ่มค่าการไหลของเลือดไปยังท่อนล่างและขาหลัง (5.4 ± 0.3 ml/100 g tissue/min) ($P < 0.05$) นอกจากนี้เมื่อคำนวณค่าความต้านทานต่อการไหลของเลือดไปยังท่อนล่างและขาหลังพบว่าในหนูทดลองที่ได้รับสาร L-NAME (50mg/kg) มีค่าเท่ากับ 39.1 ± 3.8 mmHg/min/100 g/ml ซึ่งมากกว่าหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำดื่มปกติ 12.6 ± 0.6 mmHg/min/100 g/ml ($P < 0.05$) และจะพบว่าในกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME และถูกป้อนด้วยสารสกัดสระแหน่ (200 mg/kg) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าสารสกัดสระแหน่สามารถลดค่าความต้านทานต่อการไหลของเลือดไปยังท่อนล่างและขาหลัง 28.5 ± 2.2 mmHg/min/100 g/ml ($P < 0.05$)

สำหรับค่าอัตราการเต้นของหัวใจในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดปกติมีค่าเท่ากับ 331.7 ± 16.2 ครั้ง/นาที ในหนูทดลองที่ได้รับสาร L-NAME (50mg/kg) เป็นเวลา 3 สัปดาห์มีค่าอัตราการเต้นของหัวใจสูงกว่ากลุ่มความดันเลือดปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือมีค่าเท่ากับ 414.7 ± 13.1 ครั้ง/นาที แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดสระแหน่ไม่มีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจนั่นคือในหนูความดันเลือดปกติที่ได้รับสระแหน่มีค่าเท่ากับ 368.3 ± 8.8 ครั้ง/นาที และในกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับสาร L-NAME (50mg/kg) เป็นเวลา 3 สัปดาห์พร้อมทั้งได้รับสระแหน่มีอัตราการเต้นของหัวใจเท่ากับ 363.5 ± 9.3 ครั้ง/นาที ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงค่าความดันเลือดซิสโตลิก (systolic pressure; SP) ความดันไดแอสโตลิก (Diastolic pressure; DP) ความดันเลือดแดงเฉลี่ย (mean arterial pressure; MAP) ค่าการไหลของเลือดไปยังท่อนล่างและขาหลัง (Hindlimb blood flow; HBF) ค่าความต้านทานการไหลของเลือดบริเวณลำตัวท่อนล่าง (hindlimb vascular resistance; HVR) และอัตราการเต้นของหัวใจ (heart rate; HR) ในหนูทดลองทั้ง 4 กลุ่ม (n = 8-10) * $P < 0.001$ vs normal control, # $P < 0.05$ vs hypertension (ANOVA) (n = 8-10)

Parameters	Normal control	Normal control + MC extract	Hypertension + vehicle	Hypertension + MC extract
SBP (mmHg)	129.6 ± 5.1	136 ± 4.3	$199.1 \pm 3.2^*$	$176.4 \pm 4.8^{* \#}$
DBP (mmHg)	76.1 ± 7.7	74.1 ± 4.8	$129.1 \pm 3.5^*$	$98.8 \pm 6.3^{* \#}$
MAP (mmHg)	92.9 ± 5.4	102.5 ± 4.7	$162.3 \pm 2.7^*$	$135.1 \pm 5.8^{* \#}$
HBF (ml/100 g tissue/min)	6.8 ± 0.3	7.4 ± 0.6	$3.6 \pm 0.2^*$	$5.4 \pm 0.3^{* \#}$
HVR(mmHg/min/100 g/ml)	12.6 ± 0.6	15.3 ± 1.8	$39.1 \pm 3.8^*$	$28.5 \pm 2.2^{* \#}$
HR (beat/min)	331.7 ± 16.2	368.3 ± 8.8	$414.7 \pm 13.1^*$	$363.5 \pm 9.3^{\#}$

ผลการตอบสนองของสารที่มีผลต่อหลอดเลือด (Vascular reactivity assessments)

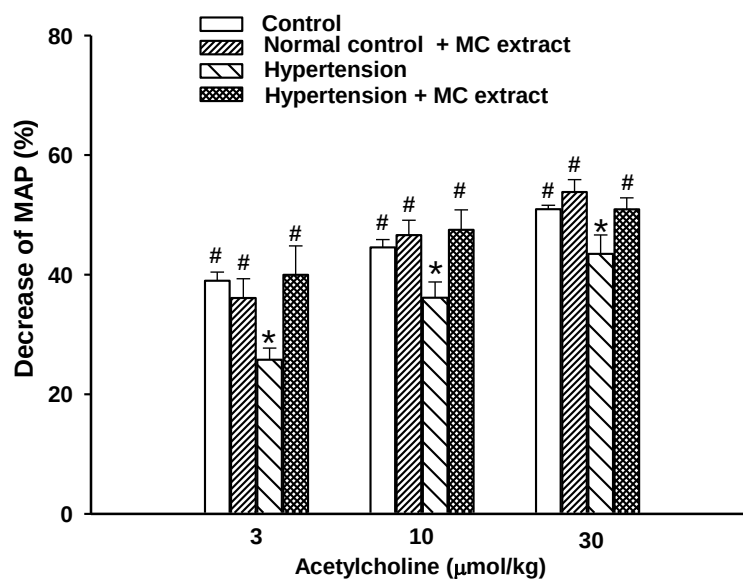
จากการทดสอบการทำงานของหลอดเลือดโดยใช้สารที่มีผลต่อหลอดเลือด 3 ชนิด คือ Acetylcholine (ACh; endothelium dependent relaxation) 3, 10, 30 nmol/kg, Sodium nitroprusside (SNP; endothelium independent relaxation) 1, 3, 10 nmol/kg และ Phenylephrine (PE; α_1 adrenoceptor agonist) 0.01, 0.03, 0.1 μ mol/kg. พบว่าหนูทดลองในแต่ละกลุ่มจะตอบสนองต่อ ACh เป็นแบบ dose-dependent โดยหนูทดลองในกลุ่มความดันเลือดสูงเนื่องจากการได้รับ L-NAME นั้น พบว่าการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ ACh ในทุก dose เท่ากับ 29.7 ± 3.0 , 39.4 ± 3.0 , 45.6 ± 3.5 ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติ 38.9 ± 1.4 , 44.5 ± 1.3 , 50.9 ± 0.6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$ และเป็นที่น่าสนใจว่าในกลุ่มหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วยการให้สาร L-NAME ร่วมกับการป้อนด้วยสารสกัดสระแหน่

ขนาดความเข้มข้น 200 mg/kg เป็นเวลา 3 สัปดาห์นั้น หลอดเลือดจะตอบสนองต่อ ACh ในทุก dose เท่ากับ 35.1 ± 5.0 , 48.4 ± 2.8 , 51.9 ± 1.7 ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าหนูทดลองความดันเลือดสูงที่ได้รับ L-NAME เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$ ดังแสดงในรูปที่ 2A ส่วนการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ SNP ในหนูทดลองแต่ละกลุ่มนั้น พบว่ามีค่าไม่ต่างกัน และพบว่าการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ PE ในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดสูงที่ได้รับ L-NAME นั้น ตอบสนองต่อ PE เท่ากับ 8.5 ± 2.0 , 24.2 ± 3.6 , 28.9 ± 3.5 ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติ 19.4 ± 5.2 , 41.6 ± 6.1 , 45.9 ± 5.9 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$ นอกจากนั้นจะพบว่าการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ PE ในกลุ่มหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วยการให้สาร L-NAME ร่วมกับการป้อนด้วยสารสกัดสระแหนเป็นเวลา 3 สัปดาห์นั้นไม่แตกต่างกับหนูทดลองความดันเลือดสูงที่ได้รับ L-NAME เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ 2B

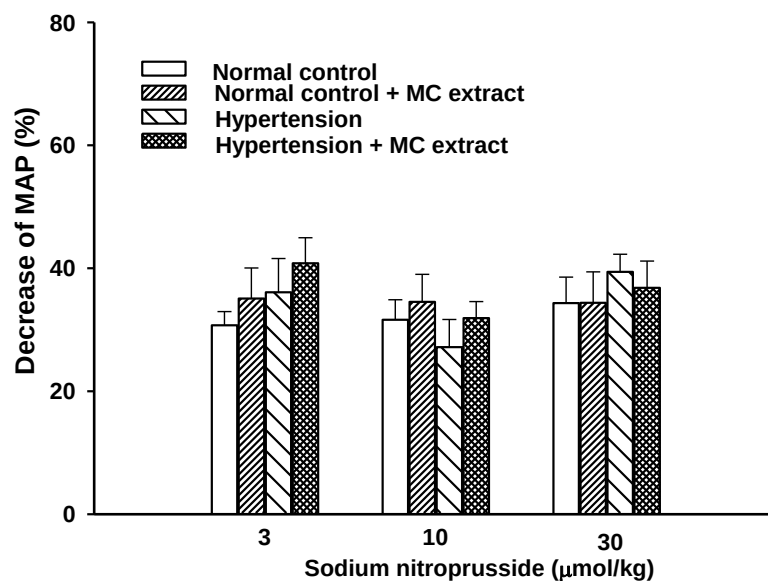
ผลของสารสกัดสระแหนต่อระดับ MDA ในพลาสมา และ การสร้าง superoxide ในหลอดเลือด carotid arteries

ผลการทดลองทางชีวเคมีพบว่าระดับ MDA ในพลาสมา และ superoxide ในหลอดเลือด carotid artery ของหนูทดลองความดันเลือดสูงเนื่องจากได้รับสาร L-NAME (50mg/kg/day) ($9.8 \pm 0.8 \mu\text{M}$, $78.5 \pm 8.3 \text{ count/mg dry weight/min}$ ตามลำดับ) สูงกว่ากลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติ ($3.6 \pm 0.7 \mu\text{M}$, $48.9 \pm 14.2 \text{ count/mg dry weight/min}$ ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดสระแหนมีผลต่อระดับของ MDA ในพลาสมา ($5.4 \pm 0.8 \mu\text{M}$) และ superoxide ในหลอดเลือด carotid artery ($52.0 \pm 6.8 \text{ count/mg dry weight/min}$) ($P < 0.05$) ในหนูทดลองความดันเลือดสูงเนื่องจากได้รับสาร L-NAME (50mg/kg) แต่สารสกัดสระแหนไม่มีผลต่อระดับของ MDA ในพลาสมา ($3.7 \pm 1.0 \mu\text{M}$) และ superoxide ในหลอดเลือด carotid artery ($48.9 \pm 8.4 \text{ count/mg dry weight/min}$) ในหนูทดลองความดันเลือดปกติ ดังแสดงในรูปที่ 3A, 3B สำหรับ protein carbonyl พบว่าในหนูทดลองทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกัน รูปที่ 3C

A

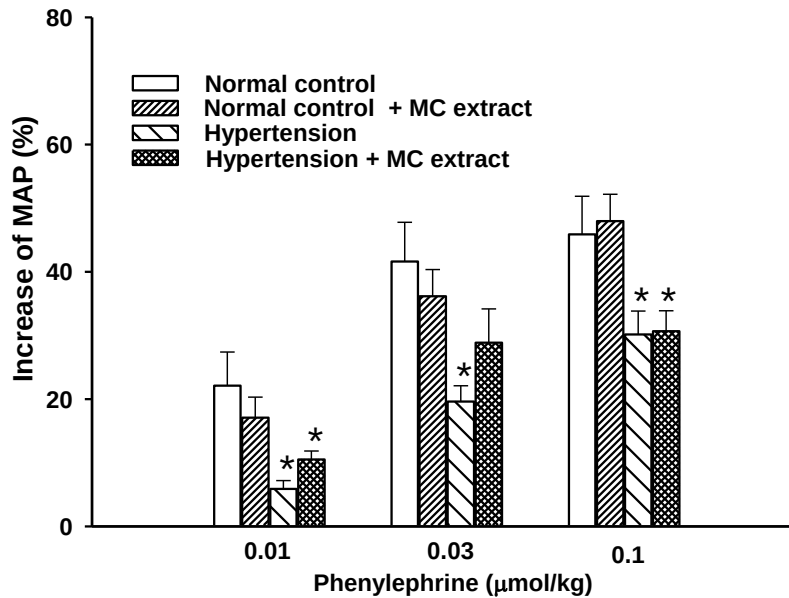


B



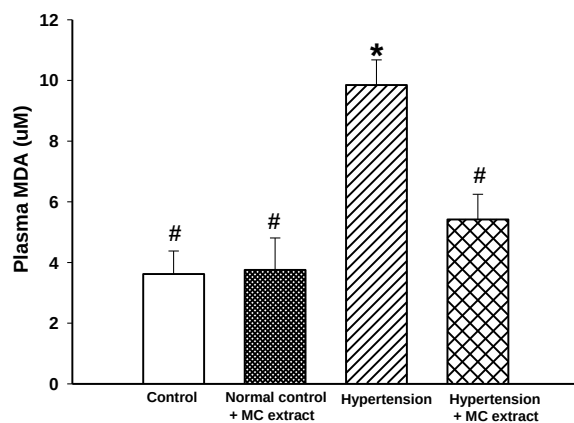
รูปที่ 2 ผลการเปลี่ยนแปลงของค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยในการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ ACh 3, 10, 30 nmol/kg (A); และ SNP 3, 10, and 30 μmol/kg (B) ในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดปกติ (Control group), กลุ่มความดันเลือดปกติที่ได้รับสารสกัดสระแหม่น (Normal control + MC extract group), กลุ่มความดันเลือดสูงเนื่องจากได้รับสาร L-NAME (50 mg/kg) (Hypertensive group) และกลุ่มความดันเลือดสูงเนื่องจากได้รับสาร L-NAME พร้อมกับป้อนสารสกัดสระแหม่น (200 mg/kg) (Hypertensive + MC extract group) (n=8-10) * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับ normal control, # $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับ hypertension (ANOVA)

C

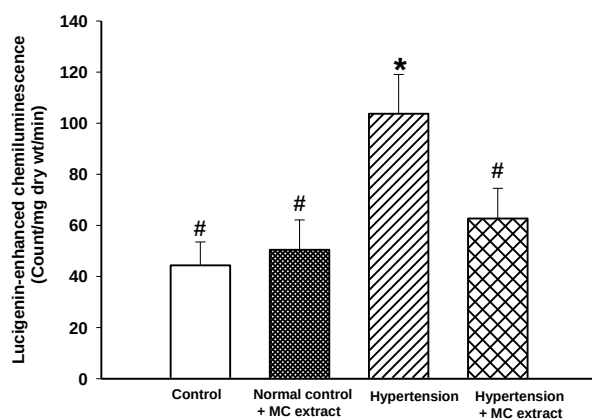


รูปที่ 2C ผลการเปลี่ยนแปลงของค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยในการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ phenylephrine ในขนาด 0.01, 0.03 และ 0.1 μmol/kg ในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดปกติ (Control group), กลุ่มความดันเลือดปกติที่ได้รับสารสกัด สะระแหน่ (Normal control + MC extract group), กลุ่มความดันเลือดสูงเนื่องจากได้รับสาร L-NAME (50 mg/kg) (Hypertensive group) และกลุ่มความดันเลือดสูงเนื่องจากได้รับสาร L-NAME พร้อมกับป้อนสารสกัดสะระแหน่ (200 mg/kg) (Hypertensive + MC extract group) (n=8-10) * $P<0.05$ เมื่อเทียบกับ normal control, # $P<0.05$ เมื่อเทียบกับ hypertension (ANOVA)

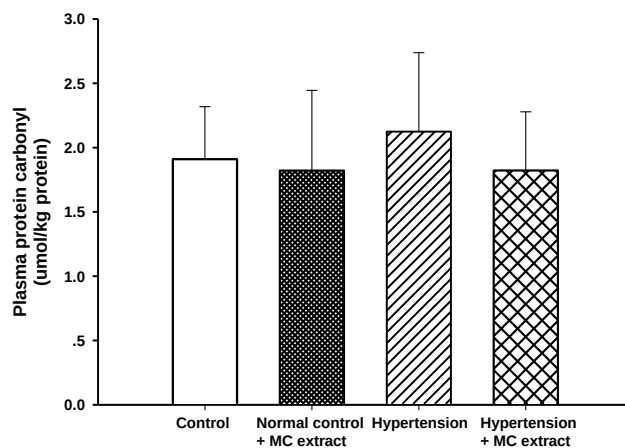
A



B



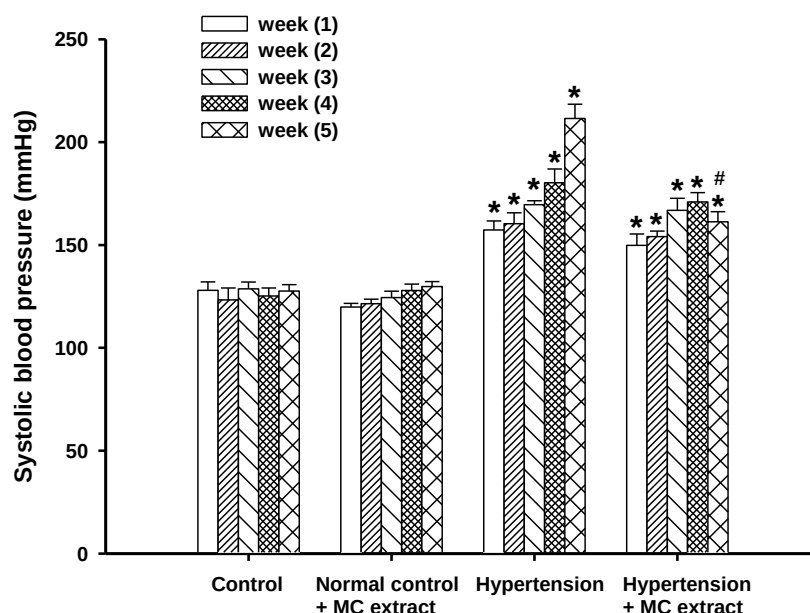
C



รูปที่ 3 แสดงระดับของ MDA ในพลาสมา และ superoxide ในหลอดเลือด carotid artery ในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดปกติ (Control group), กลุ่มความดันเลือดปกติที่ได้รับสารสกัดสะระแหน่ (Normal control + MC extract group), กลุ่มความดันเลือดสูงเนื่องจากได้รับสาร L-NAME (50 mg/kg) (Hypertensive group) และกลุ่มความดันเลือดสูงเนื่องจากได้รับสาร L-NAME พร้อมกับป้อนสารสกัดสะระแหน่ (200 mg/kg) (Hypertensive + MC extract group) (n=8-10) * $P<0.05$ เมื่อเทียบกับ normal control, # $P<0.05$ เมื่อเทียบกับ hypertension (ANOVA)

2. ฤทธิ์รักษา (Therapeutic effects)

ผลการทดลองจากการวัดความดันเลือดที่หางหนูสัปดาห์ละครั้งพบว่าในหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME จะมีค่าความดันเลือดซิสโตลิก (systolic pressure; SP) เท่ากับ 157.3 ± 4.4 mmHg ในสัปดาห์ที่ 1 ซึ่งมีค่ามากกว่าความดันเลือดซิสโตลิกในหนูทดลองที่ไม่ได้รับ L-NAME (128.0 ± 4.1 mmHg) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) และค่าความดันเลือดซิสโตลิกนี้มีค่าสูงกว่าในหนูทดลองที่ไม่ได้รับ L-NAME ในทั้ง 5 สัปดาห์ นอกจากนั้นยังพบว่าสารสกัดสระแหน่ไม่มีผลลดความดันเลือดในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดปกติในทั้ง 5 สัปดาห์ ส่วนในกลุ่มหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงและได้รับสารสกัดสระแหน่ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 นั้น พบว่าสารสกัดสระแหน่มีฤทธิ์รักษาความดันเลือดสูงเนื่องจากการให้สาร L-NAME โดยในสัปดาห์ที่ 5 ค่าความดันซิสโตลิกจะมีค่าเท่ากับ 161.3 ± 4.9 mmHg ซึ่งน้อยกว่าหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสาร L-NAME เพียงอย่างเดียว 211.5 ± 6.9 mmHg ($P < 0.01$) ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงค่าความดันเลือดซิสโตลิก (systolic pressure; SP) ในสัปดาห์ที่ 1-5 ในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดปกติ (Control group), กลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติที่ได้รับน้ำดื่มตามปกติเป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 จะทำการป้อนด้วยสารสกัดสระแหน่ขนาดความเข้มข้น 200 mg/kg/day (normal control + MC extract group), กลุ่มความดันเลือดสูงเนื่องจากได้รับสาร L-NAME (50 mg/kg/day) (hypertensive group) และกลุ่มหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วยการให้สาร L-NAME เป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 จะทำการป้อนด้วยสารสกัดสระแหน่ขนาดความเข้มข้น 200 mg/kg (hypertensive + MC extract)

* $P < 0.01$ เมื่อเทียบกับ normal control, # $P < 0.01$ เมื่อเทียบกับ hypertension ($n = 6-10$)

เมื่อครบ 5 สัปดาห์ของการทดลอง หนูทดลองจะถูกวัดความดันเลือดและอัตราการเต้นของหัวใจทางหลอดเลือดแดง (femoral artery) ซึ่งผลการทดลองพบว่าสอดคล้องกับผลของการวัดความดันเลือดทางหางนั่นคือหนูทดลองที่ได้รับสาร L-NAME (50 mg/kg/day) เป็นเวลา 5 สัปดาห์มีค่าความดันเลือดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ทั้งค่าความดันเลือดซิสโตลิกและไดแอสโตลิก (231.5 ± 6.9 , 152.0 ± 9.8 mmHg ตามลำดับ) โดยมีความดันเลือดแดงเฉลี่ยเท่ากับ 184.3 ± 8.7 mmHg เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำดื่มปกติซึ่งมีค่าความดันเลือดซิสโตลิกและไดแอสโตลิกและค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยเท่ากับ 133.2 ± 1.8 , 83.4 ± 5.5 และ 102.8 ± 2.7 mmHg ตามลำดับ นอกจากนี้ในกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME และถูกป้อนด้วยสารสกัดสระแหม่ (200 mg/kg/day) ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 มีค่าความดันเลือดซิสโตลิกและไดแอสโตลิกและค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 2

ส่วนอัตราการไหลของเลือดไปยังท่อนล่างและขาหลัง (HBF) พบว่าในหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME (50 mg/kg/day) เป็นเวลา 5 สัปดาห์ มีค่า HBF เท่ากับ 3.7 ± 1.0 มล. /นาท./เนื้อเยื่อ 100 กรัม ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำดื่มปกติ (8.3 ± 0.8 มล./นาท./เนื้อเยื่อ 100 กรัม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ในกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME และถูกป้อนด้วยสารสกัดสระแหม่ (200 mg/kg) ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 พบว่าสารสกัดสระแหม่เพิ่มค่าการไหลของเลือดไปยังท่อนล่างและขาหลัง (6.2 ± 1.0 มล. / นาที่ / เนื้อเยื่อ 100 กรัม) เมื่อคำนวณหาความต้านทานต่อการไหลของเลือดไปยังท่อนล่างและขาหลังพบว่าในหนูทดลองที่ได้รับสาร L-NAME (50mg/kg/day) มีค่าเท่ากับ 47.7 ± 9.9 มม.ปรอท .นาท./เนื้อเยื่อ 100 กรัม/มล. ซึ่งมากกว่าหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำดื่มปกติ 13.1 ± 1.7 มม.ปรอท .นาท./เนื้อเยื่อ 100 กรัม/มล. ($P < 0.05$) และจะพบว่าในกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME และถูกป้อนด้วยสารสกัดสระแหม่ (200 mg/kg) ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 พบว่าสารสกัดสระแหม่ลดค่าความต้านทานต่อการไหลของเลือดไปยังท่อนล่างและขาหลัง 24.4 ± 6.4 มม.ปรอท . นาที่ . เนื้อเยื่อ 100 กรัม/มล. ($P < 0.05$)

สำหรับค่าอัตราเต้นของหัวใจในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดปกติมีค่าเท่ากับ 321.0 ± 7.7 ครั้ง/นาท. ในหนูทดลองที่ได้รับสาร L-NAME (50mg/kg) เป็นเวลา 5 สัปดาห์มีค่าอัตราการเต้นของหัวใจสูงกว่ากลุ่มความดันเลือดปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือมีค่า เท่ากับ 403.6 ± 12.5 ครั้ง/นาท. แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดสระแหม่ไม่มีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจนั่นคือในหนูความดันเลือดปกติที่ได้รับสระแหม่มีค่าเท่ากับ 349.8 ± 9.9 ครั้ง/นาท. และในกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME และถูกป้อนด้วยสารสกัดสระแหม่ (200 mg/kg) ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 มีอัตราการเต้นของหัวใจเท่ากับ 382.0 ± 9.9 ครั้ง/นาท. ดังแสดงในตารางที่

2

ตารางที่ 2 แสดงค่าความดันเลือดซิสโตลิก (systolic pressure; SP) ความดันไดแอสโตลิก (Diastolic pressure; DP) ความดันเลือดแดงเฉลี่ย (mean arterial blood pressure; MAP) ค่าการไหลของเลือดไปยังท่อนล่างและขาหลัง (Hindlimb blood flow; HBF) ค่าความต้านทานการไหลของเลือดบริเวณลำตัวท่อนล่าง (hindlimb vascular resistance; HVR) และอัตราการเต้นของหัวใจ (heart rate; HR) ในหนูทดลองทั้ง 4 กลุ่ม (n = 6-10) * $P < 0.01$ vs normal control, # $P < 0.05$ vs hypertension (ANOVA) (n = 8-10)

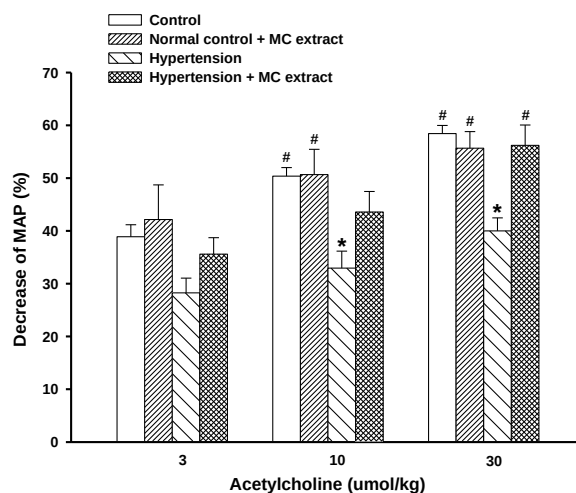
Parameters	Normal control	Normal control + MC extract	Hypertension + vehicle	Hypertension + MC extract
SBP (mmHg)	133.2 ± 1.8	129.1 ± 2.7	231.5 ± 6.9*	190.4 ± 6.7*#
DBP (mmHg)	83.4 ± 5.5	75.0 ± 5.6	152.0 ± 9.8*	125.7 ± 9.1*#
MAP (mmHg)	102.8 ± 2.7	96.4 ± 3.9	184.3 ± 8.7*	158.6 ± 6.4*#
HBF (ml/100 g tissue/min)	8.3 ± 0.8	7.7 ± 0.7	3.7 ± 1.2	6.2 ± 1.0 *#
HVR(mmHg/min/100 g/ml)	13.1 ± 1.7	13.3 ± 1.1	47.7 ± 9.9*	24.4 ± 6.4#
HR (beat/min)	321.0 ± 7.7	349.8 ± 9.9	403.6 ± 12.5*	382.0 ± 9.9*

จากการทดสอบการทำงานของหลอดเลือดโดยใช้สารที่มีผลต่อหลอดเลือด 3 ชนิด คือ Acetylcholine (ACh) 3, 10, 30 $\mu\text{mol/kg}$, Sodium nitroprusside (SNP) 1, 3, 10 $\mu\text{mol/kg}$ และ Phenylephrine (PE) 0.01, 0.03, 0.1 $\mu\text{mol/kg}$. พบว่าหนูทดลองในแต่ละกลุ่มจะตอบสนองต่อ ACh เป็นแบบ dose-dependent โดยหนูทดลองในกลุ่มความดันเลือดสูงเนื่องจากการได้รับ L-NAME นั้น พบว่าการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ ACh ใน dose 10 และ 30 nmol/kg เท่ากับ 32.9 ± 3.2 , 39.9 ± 2.4 ตามลำดับ น้อยกว่ากลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติ 50.3 ± 1.6 , 58.4 ± 1.5 ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) และในกลุ่มหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วยการให้สาร L-NAME เป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 จะทำการป้อนด้วยสารสกัดสระแหน่นั้น หลอดเลือดจะตอบสนองต่อ ACh ใน dose 30 nmol/kg เท่ากับ 56.2 ± 3.8 ซึ่งมากกว่าหนูทดลองความดันเลือดสูงที่ได้รับ L-NAME เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ดังแสดงในรูปที่ 5A

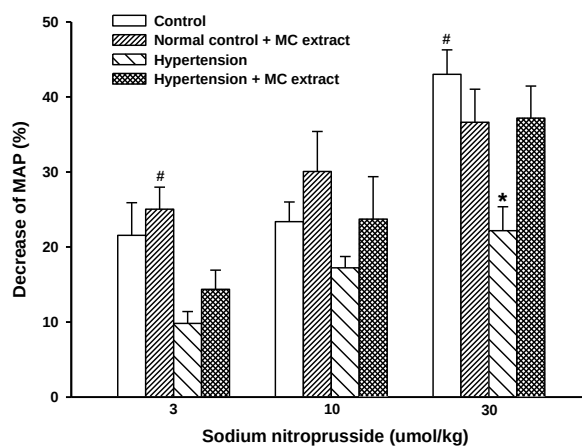
ส่วนการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ SNP ในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดสูงเนื่องจากการได้รับ L-NAME นั้น พบว่าการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ SNP ใน dose 10 nmol/kg เท่ากับ 22.1 ± 3.1 ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติ 43.0 ± 3.2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.005$) ส่วนในกลุ่มหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วยการให้สาร L-NAME เป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 จะทำการป้อนด้วยสารสกัดสระแหน่นั้นการคลายตัวตอบสนองต่อ SNP ไม่แตกต่างกับหนูทดลองความดันเลือดสูงที่ได้รับ L-NAME เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ 5B

นอกจากนั้นผลการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ PE ในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดสูงที่ได้รับ L-NAME นั้น ตอบสนองต่อ PE ใน dose 0.1 $\mu\text{mol/kg}$ เท่ากับ 15.0 ± 3.3 ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติ 42.6 ± 5.1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ส่วนในกลุ่มหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วยการให้สาร L-NAME เป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 จะทำการป้อนด้วยสารสกัดสระแหน่นั้นไม่แตกต่างกับหนูทดลองความดันเลือดสูงที่ได้รับ L-NAME เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ 5C

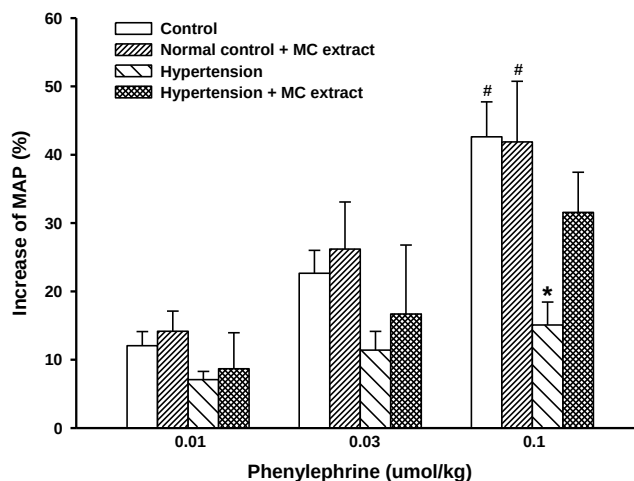
A



B



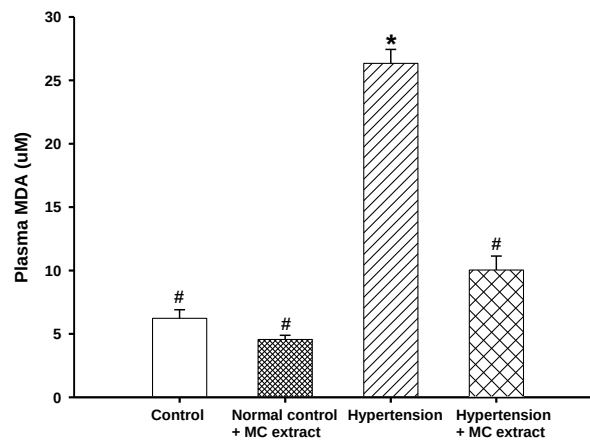
C



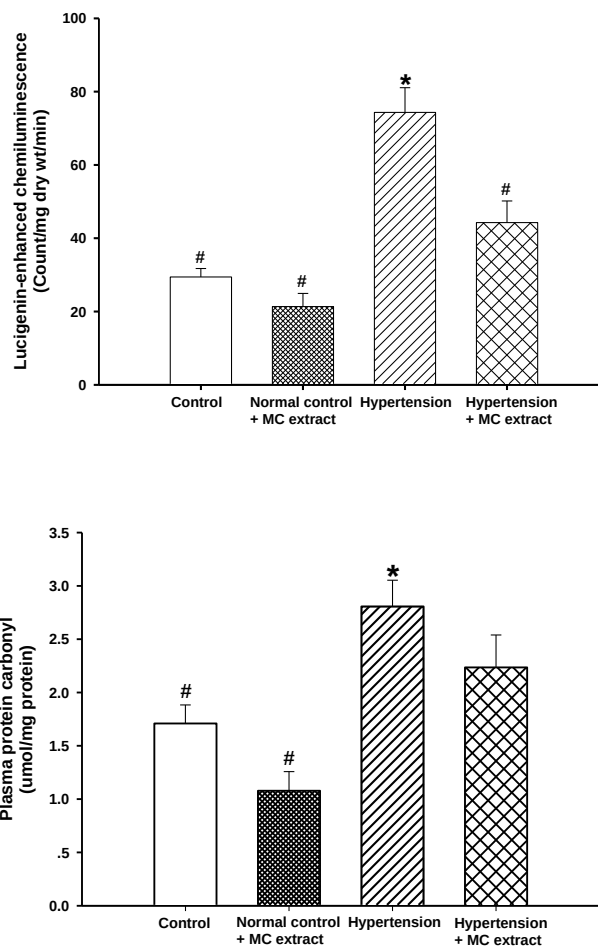
รูปที่ 5 ผลการเปลี่ยนแปลงของค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยในการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ ACh 3, 10, 30 nmol/kg (A); SNP 1, 3, and 10 nmol/kg (B); and PE 0.01, 0.03, and 1 mol/kg (C) ในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดปกติ (Control group), กลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติที่ได้รับน้ำดื่มตามปกติเป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 จะทำการป้อนด้วยสารสกัดสะระแหน่ขนาดความเข้มข้น 200 mg/kg (normal control + MC extract), กลุ่มความดันเลือดสูงเนื่องจากได้รับสาร L-NAME (50 mg/kg) (hypertension) และกลุ่มหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วยการให้สาร L-NAME เป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 จะทำการป้อนด้วยสารสกัดสะระแหน่ขนาดความเข้มข้น 200 mg/kg (hypertension + MC extract) (n = 6-10) * P<0.01 เมื่อเทียบกับ normal control, # P<0.01 เมื่อเทียบกับ hypertension (ANOVA)

ผลการทดลองทางชีวเคมีพบว่าระดับ MDA ในพลาสมา และ superoxide ในหลอดเลือด carotid artery ของหนูทดลองความดันเลือดสูงเนื่องจากได้รับสาร L-NAME (50mg/kg) ($26.3 \pm 1.1 \mu\text{M}$, $74.3 \pm 6.7 \text{ count/mg dry weight/min}$ ตามลำดับ) สูงกว่ากลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติ ($6.2 \pm 0.6 \mu\text{M}$, $29.4 \pm 2.3 \text{ count/mg dry weight/min}$ ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดสระแหันมีผลลดระดับของ MDA ในพลาสมา ($10.0 \pm 1.1 \mu\text{M}$) และ superoxide ในหลอดเลือด carotid artery ($44.2 \pm 5.8 \text{ count/mg dry weight/min}$) ($P < 0.01$) ในหนูทดลองความดันเลือดสูงเนื่องจากได้รับสาร L-NAME (50mg/kg) แต่สารสกัดสระแหันไม่มีผลต่อระดับของ MDA ในพลาสมา ($4.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$) และ superoxide ในหลอดเลือด carotid artery ($21.3 \pm 3.5 \text{ count/mg dry weight/min}$) ในหนูทดลองความดันเลือดปกติ ดังแสดงในรูปที่ 6 A, B และ C

A



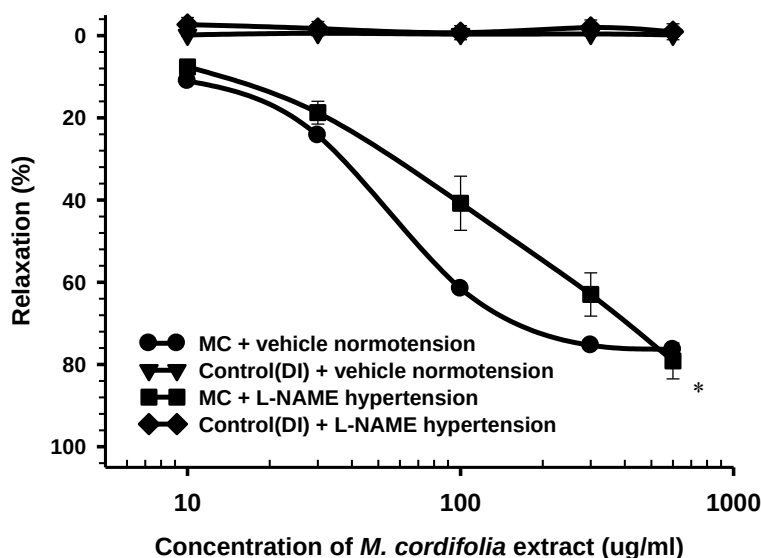
B



รูปที่ 6 แสดงค่า MDA ในพลาสมา และ superoxide ในหลอดเลือด carotid artery ในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดปกติ (Control group), กลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติที่ได้รับน้ำดื่มตามปกติเป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 จะทำการป้อนด้วยสารสกัดสระแห่น้ำความเข้มข้น 200 mg/kg (normal control + MC extract), กลุ่มความดันเลือดสูงเนื่องจากได้รับสาร L-NAME (50 mg/kg) (hypertension) และกลุ่มหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วยการให้สาร L-NAME เป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 จะทำการป้อนด้วยสารสกัดสระแห่น้ำความเข้มข้น 200 mg/kg (hypertension + MC extract) (n = 8-10) * P<0.01 เมื่อเทียบกับ normal control, # P<0.01 เมื่อเทียบกับ hypertension (ANOVA)

ผลของสารสกัดสระแหน่ต่อการขยายตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่เออร์ตาในหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วย L-NAME (50 mg/kg)

ก่อนการแยกหลอดเลือดแดงใหญ่เออร์ตาได้ทำการวัดความดันเลือดทางหลอดเลือดแดง femoral artery พบว่า L-NAME (50 mg/kg) มีผลเพิ่มความดันเลือดในหนูทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยเท่ากับ 159.74 ± 1.97 mmHg เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองความดันเลือดปกติที่ได้รับน้ำ ซึ่งมีค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยเท่ากับ 104.22 ± 2.5 mmHg และผลการทดลองในหลอดเลือดแดงใหญ่เออร์ตาพบว่าสารสกัดสระแหน่ความเข้มข้น 10-600 $\mu\text{g/ml}$ มีผลทำให้หลอดเลือดแดงใหญ่เออร์ตาที่ถูกเพิ่มความตึงตัวด้วย phenylephrine (0.1-1 μM) ขยายตัวเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้นทั้งในกลุ่มความดันเลือดปกติและความดันเลือดสูงที่ถูกชักนำด้วย L-NAME เมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มที่ได้รับสารทำลายของสารสกัดอย่างเดียวคือน้ำกลั่น (vehicle) ($P < 0.001$) โดยสารสกัดสระแหน่จะทำให้หลอดเลือดทั้งสองกลุ่มขยายตัวได้สูงสุดในนาที่ 15 หลังจากให้สารสกัด ดังแสดงในรูปที่ 5 นอกจากนี้ค่า EC_{50} ของสารสกัดสระแหน่ในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดสูงมีค่าสูงกว่ากลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติดังแสดงในตารางที่ 3



รูปที่ 7 แสดงผลของสารสกัดสระแหน่ (MC extract) และน้ำ (DI, deionization water) ต่อการขยายตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่เออร์ตาที่ถูกเพิ่มความตึงตัวด้วยสาร phenylephrine (0.1-1 μM) ในหลอดเลือดของหนูทดลองความดันเลือดปกติ (normotensive rats) และหลอดเลือดของหนูกลุ่มความดันเลือดสูงเนื่องจากได้รับสาร L-NAME (50 mg/kg) (L-NAME hypertension) * $P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับหลอดเลือดของหนูทดลองที่ตอบสนองต่อน้ำ (DI, deionization water) ($n = 5-8$)

ตารางที่ 3 แสดงผลของสารสกัดสระแหน่ต่อการขยายตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่เออร์ตาที่ถูกเพิ่มความตึงตัวด้วย phenylephrine (0.1-1 μ M) ในหลอดเลือดของหนูทดลองความดันเลือดปกติ (normotensive rats) และหลอดเลือดของหนูกลุ่มความดันเลือดสูงเนื่องจากได้รับสาร L-NAME (50 mg/kg) (L-NAME hypertension) # $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหลอดเลือดของหนูทดลองความดันเลือดปกติ (n = 6-8)

Parameters	Vehicle-treated normotension	L-NAME hypertension
EC ₅₀ (μ g/mL)	53.04 $\pm$ 1.31	110.15 $\pm$ 8.82 #
E _{max} (%)	81.96 $\pm$ 1.08	90.98 $\pm$ 3.87

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการทดลองทั้งใน in vivo คือทดสอบฤทธิ์ป้องกันและฤทธิ์รักษาของสารสกัดจากสระแหน่ในหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วยสาร L-NAME และ in vitro คือศึกษาในหลอดเลือดแดงใหญ่เออร์ตาโดยทดสอบฤทธิ์ของสระแหน่ต่อขยายตัวของหลอดเลือด และศึกษาผลของสารสกัดสระแหน่ต่อภาวะเครียดออกซิเดชัน ผลการทดลองพบว่าสารสกัดสระแหน่มีฤทธิ์ป้องกันหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วยสาร L-NAME นั่นคือหนูทดลองที่ได้รับสาร L-NAME เพียงอย่างเดียวจะมีความดันเลือดสูง ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มของอัตราการเต้นของหัวใจ การลดลงของการไหลของเลือดไปเลี้ยงอวัยวะท่อนล่างและขาหลัง และการเพิ่มขึ้นของความต้านทานต่อการไหลของเลือดไปยังอวัยวะท่อนล่างและขาหลัง นอกจากนี้ยังมีการเสียหายที่ในตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารที่มีผลต่อการหดและคลายตัวของหลอดเลือด ตรวจพบระดับ oxidative stress markers เพิ่มขึ้น สารสกัดสระแหน่มีฤทธิ์ป้องกันการเพิ่มความดันเลือดในหนูที่ได้รับ L-NAME และปรับพลศาสตร์การไหลเวียนในหนูทดลองโดยสัมพันธ์กับการลดลงระดับ oxidative stress markers

ความดันเลือดในร่างกายขึ้นกับปริมาตรเลือดที่ออกจากหัวใจในหนึ่งนาที (cardiac output) และความต้านทานรวมของหลอดเลือดส่วนปลาย (total peripheral resistance) การเพิ่มขึ้นของปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งทำให้เกิดภาวะความดันเลือดสูงได้ การให้สาร L-NAME เป็นเวลานานชักนำให้เกิดภาวะความดันเลือดสูงได้เนื่องจาก L-NAME ยับยั้งการทำงานของ nitric oxide synthase เป็นผลให้การสร้างไนตริกออกไซด์ในหลอดเลือดลดลง หลอดเลือดมีความตึงตัวมากขึ้นส่งผลให้เพิ่มความต้านทานรวมของหลอดเลือดส่วนปลายเพิ่มขึ้น [22] การศึกษาครั้งนี้พบว่าสาร L-NAME เป็นเวลา 3 สัปดาห์ มีผลเพิ่มความดันเลือดเกิดภาวะความดันเลือดสูงซึ่งสัมพันธ์กับการลดลงของการไหลของเลือดไปเลี้ยงอวัยวะท่อนล่างและขาหลัง และการเพิ่มขึ้นของความต้านทานต่อการไหลของเลือดไปยังอวัยวะท่อนล่างและขาหลังซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่ผ่านมา [23] สำหรับอัตราการเต้นของหัวใจที่เพิ่มขึ้นในหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME จะอธิบายได้ว่า nitric oxide มีผลลดการทำงานของระบบประสาทซิมพาเทติกดังนั้นการให้สาร L-NAME มีผลให้ระบบประสาทซิมพาเทติกทำงานเพิ่มขึ้น [24,25] สารสกัดสระแหน่มีผลลดความดันเลือด แสดงว่าความดันเลือดที่ลดลงอาจเป็นผลมาจากการลดลงของความต้านทานรวมของหลอดเลือดส่วนปลาย และในการทดลองครั้งนี้พบว่าสารสกัดสระแหน่ทำให้หลอดเลือดแดงเออร์ตาขยายตัวได้ การลดความตึงตัวของหลอดเลือดอาจเนื่องจากมีปริมาณไนตริกออกไซด์เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากภาวะเครียดออกซิเดชันที่ลดลง เนื่องจากสารสกัดสระแหน่สามารถลด oxidative stress markers ที่เพิ่มขึ้นในหนูทดลองที่ได้รับสาร L-NAME ได้ นั่นคือระดับ MDA ในพลาสมาและการสร้าง superoxide ของหลอดเลือดแดงคาโรติดลดลง ส่งผลให้ปริมาณไน

ตรีกอกไกซ์เพิ่มขึ้น และทำให้หลอดเลือดขยายตัวได้เพิ่มขึ้นทั้งนี้เนื่องจาก superoxide สามารถจับกับ nitric oxide ได้เป็นสาร peroxynitrite ซึ่งอนุมูลอิสระที่ทำให้หลอดเลือดเสียหายที่ได้ [26] นอกจากนี้ปริมาณ nitric oxide bioavailability ที่เพิ่มขึ้นในหนูทดลอง L-NAME ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร อาจมีผลลดการทำงานของระบบประสาทซิมพาเทติกและลดอัตราการเต้นของหัวใจ และมีรายงานสนับสนุนว่าการให้สารต้านออกซิเดชันสามารถลดความดันเลือดและลดสารอนุมูลอิสระในหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME ได้ [27]

เป็นที่ทราบกันว่า acetylcholine จับกับตัวรับที่เซลล์ชั้นเอนโดทีเลียมมีผลให้เกิดการสร้างและหลั่ง nitric oxide ซึ่งทำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด [28] และมีรายงานว่าพบว่าเซลล์ชั้นเอนโดทีเลียมสูญเสียหน้าที่ในหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME ทำให้การตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารที่ทำให้หลอดเลือดหดและคลายตัวเสียไปด้วย [29] ดังเช่นผลการทดลองในครั้งนี้พบว่า การคลายตัวของหลอดเลือดต่อสาร acetylcholine ลดลง แต่ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงต่อการคลายตัวของหลอดเลือดตอบสนองต่อการให้ sodium nitroprusside ในหนูทดลองที่ได้รับสาร L-NAME เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ซึ่งสามารถแสดงได้ว่าการเสียหน้าที่ของเซลล์ชั้นเอนโดทีเลียมการตอบสนองต่อสารที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัว แต่การทำหน้าที่ของกล้ามเนื้อเรียบตอบสนองต่อสารที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัวไม่เปลี่ยนแปลง การให้สารสกัดสมุนไพรสามารถปรับการคลายตัวของหลอดเลือดต่อ acetylcholine ได้ เนื่องจากสารสกัดสมุนไพรสามารถลดการสร้าง superoxide ในหนูความดันเลือดสูงที่ถูกชักนำด้วย L-NAME ได้ ทำให้เพิ่มปริมาณ nitric oxide bioavailability และช่วยในการคลายตัวของหลอดเลือดตอบสนองต่อ acetylcholine ส่วนการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารที่ทำให้หลอดเลือดหดตัวคือ phenylephrine นั้นพบว่าลดลงในหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME อาจเนื่องจากภาวะ downregulation ของสารในกระบวนการ signal pathway และมีผลลดปริมาณ Ca^{2+} ภายในเซลล์แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดสมุนไพรไม่สามารถปรับการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ phenylephrine ให้เหมือนเดิมได้

สำหรับฤทธิ์รักษาของสารสกัดจากสมุนไพรในหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วยสาร L-NAME ผลการทดลองพบว่าสารสกัดสมุนไพรมีฤทธิ์รักษาหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วยสาร L-NAME นั่นคือหนูทดลองที่ได้รับสาร L-NAME เพียงอย่างเดียวจะมีความดันเลือดสูง ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มของอัตราการเต้นของหัวใจ การลดลงของการไหลของเลือดไปเลี้ยงอวัยวะท่อนล่างและขาหลัง และการเพิ่มขึ้นของความต้านทานต่อการไหลของเลือดไปยังอวัยวะท่อนล่างและขาหลัง นอกจากนี้ตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัวและหดตัวเสียหน้าที่ไป ระดับ oxidative stress markers ทั้ง 3 ชนิด คือ plasma MDA, superoxide production ใน carotid arteries และ plasma protein carbonyl เพิ่มขึ้น สารสกัดสมุนไพรมีฤทธิ์ลดความดันเลือดในหนูที่ได้รับ L-NAME และปรับผลศาสตร์การไหลเวียนในหนูทดลองโดยสัมพันธ์กับการลดลงระดับ oxidative stress markers ดังนั้นพบว่าฤทธิ์รักษาของสารสกัดสมุนไพรมีผลไปในทิศทางเดียวกับฤทธิ์ป้องกัน แต่อาจมีบางผลการทดลองที่ให้ผลต่างกัน ดังนั้นการวิจารณ์ผลการทดลองจึงแสดงในจุดที่แตกต่างกัน นั่นคือในฤทธิ์รักษาของสารสกัดสมุนไพรนั้นการให้สารสกัดสมุนไพรในหนูที่มีความดันเลือดสูงเนื่องจากได้รับสาร L-NAME นั้นอัตราการเต้นของหัวใจของหนูความดันเลือดสูงมีแนวโน้มลดลงแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเนื่องจากระยะเวลาของการให้สาร L-NAME ที่ยาวถึง 5 สัปดาห์ ส่วนการให้สารสกัดให้แค่ 2 สัปดาห์เท่านั้น สำหรับการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสาร sodium nitroprusside นั้นพบว่าผลการคลายตัวของหลอดเลือดต่อ sodium nitroprusside ในขนาดสูงนั้นลดลงแสดงถึงการเสียหน้าที่ของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดสำหรับกลไกที่เกี่ยวข้องนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อาจเนื่องมาจากการให้สาร L-NAME เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหลอดเลือดทั้ง endothelial cells และ smooth muscle cells [30] และการให้สารสกัดสมุนไพรสามารถปรับการคลายตัวของหลอดเลือดต่อ sodium nitroprusside ให้ดีขึ้นทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและเพิ่มปริมาณ nitric oxide bioavailability ในหลอดเลือดได้ดังที่กล่าวมาข้างต้น สำหรับฤทธิ์ขยายตัวของหลอดเลือดของสารสกัดสมุนไพรนั้นยังไม่ทราบแน่ชัดดังนั้นการศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องซึ่งอาจเป็นกลไกที่ผ่าน endothelial cells หรือสารสกัด

จะออกฤทธิ์ต่อกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดโดยตรงโดย
preliminary study

ยังต้องทำการศึกษาต่อไปเนื่องจากการทดลองนี้จัดเป็น

สรุปผลการทดลอง จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดสระแห่นสามารถออกฤทธิ์ทั้งการป้องกันและการรักษาภาวะความดันเลือดสูงเนื่องจากการให้สาร L-NAME และปรับพลศาสตร์การไหลเวียนเลือดให้ดีขึ้น รวมทั้งช่วยให้การทำงานของหลอดเลือดที่ตอบสนองต่อสารที่ออกฤทธิ์ต่อหลอดเลือดได้ดีขึ้น สำหรับกลไกที่เกี่ยวข้องอาจเป็นผลจากคุณสมบัติของการเป็นสารที่มีฤทธิ์ขยายหลอดเลือดและต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสระแห่น

เอกสารอ้างอิง

- [1] Ferroni P, Basili S, Paoletti V, Davi G. Endothelial Dysfunction and Oxidative Stress in Arterial Hypertension. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16 (2006) 222-233.
- [2] Cohn JN, Quyyumi AA, Hollenberg NK, Jamerson KA. Surrogate Markers for Cardiovascular Disease: Functional Markers. *Circulation* 109 (2004) IV31-46.
- [3] Tomiyama H, Kushiro T, Okazaki R, Yoshida H, Doba N, Yamashina A. Influences of Increased Oxidative Stress on Endothelial Function, Platelets Function, and Fibrinolysis in Hypertension Associated with Glucose Intolerance. *Hypertens Res* 26 (2003) 295-300.
- [4] Burke V, Beilin LJ, Cutt HE, Mansour J, Wilson A, Mori TA. Effects of a Lifestyle Programme on Ambulatory Blood Pressure and Drug Dosage in Treated Hypertensive Patients: A Randomized Controlled Trial. *J Hypertens* 23 (2005) 1241-1249.
- [5] Galley HF, Thornton J, Howdle PD, Walker BE, Webster NR. Combination Oral Antioxidant Supplementation Reduces Blood Pressure. *Clin Sci (Lond)* 92 (1997) 361-365.
- [6] Gokcimen A, Kocak A, Kilbas S, Bayram D, Kilbas A, Cim A, et al. Effect of Lisinopril on Rat Liver Tissues in L-Name Induced Hypertension Model. *Mol Cell Biochem* 296 (2007) 159-164.
- [7] John JH, Ziebland S, Yudkin P, Roe LS, Neil HA. Effects of Fruit and Vegetable Consumption on Plasma Antioxidant Concentrations and Blood Pressure: A Randomised Controlled Trial. *Lancet* 359 (2002) 1969-1974.
- [8] Rauchova H, Pechanova O, Kunes J, Vokurkova M, Dobesova Z, Zicha J. Chronic N-Acetylcysteine Administration Prevents Development of Hypertension in N(Omega)-Nitro-L-Arginine Methyl Ester-Treated Rats: The Role of Reactive Oxygen Species. *Hypertens Res* 28 (2005) 475-482.
- [9] Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM, Appel LJ, Bray GA, Harsha D, et al. Effects on Blood Pressure of Reduced Dietary Sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (Dash) Diet. Dash-Sodium Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 344 (2001) 3-10.

- [10] Pakdeechote P, Kukongviriyapan V, Kukongviriyapan U. Screening for Free Radicals Scavenging Activities of Extracts from *Coccinia Grandis* and *Centella Asiatica*. *Srinagarind Med J* 18 (2003) 78-84.
- [11] Kukongviriyapan U, Kukongviriyapan V, Pakdeechote P, Pannangpetch P. Antioxidant Effect of Vitamin E in Experimentally Induced Anemic Rats. *Thai journal Physiological Science* 14 (2001) 78.
- [12] Kukongviriyapan U, Luangaram S, Leekhaosoong K, Kukongviriyapan V, Preeprame S. Antioxidant and Vascular Protective Activities of *Cratoxylum Formosum*, *Syzygium Gratum* and *Limnophila Aromatica*. *Biol Pharm Bull* 30 (2007) 661-666.
- [13] Kukongviriyapan V, Janyacharoen T, Kukongviriyapan U, Laupattarakasaem P, Kanokmedhakul S, Chantaranonthai P. Hepatoprotective and Antioxidant Activities of *Tetracera Loureiri*. *Phytother Res* 17 (2003) 717-721.
- [14] Kwuangthip P. (2003) Free Radical Scavenging and Antioxidant Activities of Local Vegetables. in *Department of Physiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University*
- [15] Luangaram S, Kukongviriyapan U, Pakdeechote P, Kukongviriyapan V, Pannangpetch P. Protective Effects of Quercetin against Phenylhydrazine-Induced Vascular Dysfunction and Oxidative Stress in Rats. *Food Chem Toxicol* 45 (2007) 448-455.
- [16] Kantip S. (2006) Antioxidant and Immunomodulatory Activities of Thai Vegetable Extracts on Stimulated Macrophages. in *Department of Physiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University*
- [17] Tangsucharit P, Kukongviriyapan V, Kukongviriyapan U, Airarat W. Screening for Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Extracts from Local Vegetables in Northeast Thailand. *Srinagarind Med J* 21 (2006) 305-310.
- [18] Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. A Comparative Evaluation of Thiobarbituric Acid Methods for the Determination of Malondialdehyde in Biological Materials. *Free Radic Biol Med* 15 (1993) 353-363.
- [19] Reznick AZ, Packer L. Oxidative Damage to Proteins: Spectrophotometric Method for Carbonyl Assay. *Methods Enzymol* 233 (1994) 357-363.
- [20] Verdon CP, Burton BA, Prior RL. Sample Pretreatment with Nitrate Reductase and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Quantitatively Reduces Nitrate While Avoiding Interference by Nadp^+ When the Griess Reaction Is Used to Assay for Nitrite. *Anal Biochem* 224 (1995) 502-508.

- [21] Lu FJ, Lin JT, Wang HP, Huang WC. A Simple, Sensitive, Non-Stimulated Photon Counting System for Detection of Superoxide Anion in Whole Blood. *Experientia* 52 (1996) 141-144.
- [22] Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic Inhibition of Nitric Oxide Synthesis. A New Model of Arterial Hypertension. *Hypertension* 20 (1992) 298-303.
- [23] Gardiner SM, Compton AM, Bennett T, Palmer RM, Moncada S. Regional Haemodynamic Changes During Oral Ingestion of Ng-Monomethyl-L-Arginine or Ng-Nitro-L-Arginine Methyl Ester in Conscious Brattleboro Rats. *Br J Pharmacol* 101 (1990) 10-12.
- [24] Gerova M, Torok J, Pechaoova O, Matuskova J. Rilmenidine Prevents Blood Pressure Increase in Rats with Compromised Nitric Oxide Production. *Acta Pharmacol Sin* 25 (2004) 1640-1646.
- [25] Cunha RS, Cabral AM, Vasquez EC. Evidence That the Autonomic Nervous System Plays a Major Role in the L-Name-Induced Hypertension in Conscious Rats. *Am J Hypertens* 6 (1993) 806-809.
- [26] Brandes RP, Koddenberg G, Gwinner W, Kim D, Kruse HJ, Busse R, et al. Role of Increased Production of Superoxide Anions by Nad(P)H Oxidase and Xanthine Oxidase in Prolonged Endotoxemia. *Hypertension* 33 (1999) 1243-1249.
- [27] Kojsova S, Jendekova L, Zicha J, Kunes J, Andriantsitohaina R, Pechanova O. The Effect of Different Antioxidants on Nitric Oxide Production in Hypertensive Rats. *Physiol Res* 55 Suppl 1 (2006) S3-16.
- [28] Furchgott RF, Zawadzki JV. The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine. *Nature* 288 (1980) 373-376.
- [29] Bryant CE, Allcock GH, Warner TD. Comparison of Effects of Chronic and Acute Administration of Ng-Nitro-L-Arginine Methyl Ester to the Rat on Inhibition of Nitric Oxide-Mediated Responses. *Br J Pharmacol* 114 (1995) 1673-1679.
- [30] Neto-Ferreira R, Novaes Rocha V, da Silva Torres T, Mandarim-de-Lacerda CA, de Carvalho JJ. Beneficial Effects of Rosuvastatin on Aortic Adverse Remodeling in Nitric Oxide-Deficient Rats. *Exp Toxicol Pathol*

ภาคผนวก

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. P. Pakdeechote¹, U. Kukongviriyapan¹, S. Nakmareong¹, P. Prachaney², W. Berkban¹, S. Luangaram³.

Antioxidant and antihypertensive effects of *Mentha Cordifolia* extract in L-NAME-induced hypertensive rats

SFRR-Europe meeting 2009 in Rome (poster presentation)

2. P. Pakdeechote¹, U. Kukongviriyapan¹, S. Nakmareong¹, P. Prachaney², W. Berkban¹, S. Luangaram³.

Antioxidant and antihypertensive effects of *Mentha Cordifolia* extract in L-NAME-induced hypertensive rats. Free radicals, health and Lifestyle; Europe Meeting of Society for Radical Research, Rome (Italy), August 26-29, 2009; 105-108. International proceeding.

3. อยู่ในช่วงดำเนินการส่งตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ดั่ง manuscript ที่แนบ)