



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการฤทธิ์ของสมุนไพรพรมิต่อความดันโลหิต และการเปลี่ยนแปลงแผนภูมิ
โปรตีนในหนูที่มีภาวะความดันโลหิตสูง

Effects of *Bacopa monniera* Linn. on arterial blood pressure and protein profiles
in hypertensive rat

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร

วันลงทะเบียน..... 19 11.ค. 2555

เลขทะเบียน..... 1.5936445

เลขเรียกหนังสือ..... 8. RC

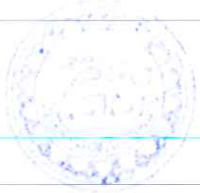
689

.H8

ก 1855

2555

โดย ศศ.ดร. กรองกาญจน์ ชูทิพย์ และคณะ



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการฤทธิ์ของสมุนไพรพรมมีต่อความดันโลหิต และ การเปลี่ยนแปลงแผนภูมิโปรตีนในหนูที่มี
ภาวะความดันโลหิตสูง

Effects of *Bacopa monniera* Linn. on arterial blood pressure and protein profiles in hypertensive
rat



คณะผู้วิจัย สังกัด

ผศ.ดร. กรองกาญจน์ ชูทิพย์¹

รศ.ดร. กรกนก อิงคินันท์²

Dr. C. Norman Scholfield²

รศ.ดร.สุขกิจ ยะโสธรศรีกุล¹

¹คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ²คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

ปัญหา : จากการศึกษาที่ผ่านมาของผู้วิจัยพบว่าสารสกัดพรหมมีมีผลลดความดันโลหิตในหนูปกติที่ถูกทำให้สลับแต่ยังไม่เคยมีการศึกษาผลของพรหมมีในหนูที่มีภาวะความดันโลหิตสูง ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งวิจัยศึกษาผลของสมุนไพรพรหมมีในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะความดันโลหิตสูงโดยใช้สาร N_{ω} -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) ซึ่งออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการสร้าง Nitric oxide

วัตถุประสงค์และวิธีการดำเนินการ : ศึกษาผลของสารสกัดพรหมมีต่อความดันโลหิต และ อัตราการเต้นของหัวใจ ในหนูทดลองเพศผู้ (Wistar rats, 200-250g) ทั้งหมด 4กลุ่ม ดังนี้ 1) กลุ่มควบคุมได้รับน้ำกลั่น 2) กลุ่มความดันโลหิตสูง ได้รับสาร L-NAME ขนาด 50mg/kg BW ผสมในน้ำดื่ม 3) กลุ่มความดันโลหิตสูง ได้รับสาร L-NAME ขนาด 50mg/kg BW และ สารสกัดพรหมมี 60 mg/kg BW ผสมในน้ำดื่ม 4) กลุ่มความดันโลหิตสูง ได้รับสาร L-NAME ขนาด 50mg/kg BW และ ยาลดความดันโลหิต captopril ขนาด 20 mg/kg BW ผสมในน้ำดื่ม โดยให้สารสกัดพรหมมีหรือ captopril ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 เป็นต้นไป คือหลังจากหนูถูกเหนี่ยวนำให้อยู่ในภาวะความดันโลหิตสูง

ผลของการศึกษาค้นคว้า : การให้สาร L-NAME ผสมในน้ำดื่มในขนาด 50 mg/kg BW เป็นเวลานานติดต่อกัน 4-8 สัปดาห์มีผลเพิ่มความดันโลหิตขณะหัวใจบีบตัว (Systolic blood pressure) อย่างมีนัยสำคัญ (เพิ่มจาก 94.7 ± 7.5 mmHg (Week 0, n=7) เป็น 166.6 ± 3.5 mmHg (Week 8, n=6, $p < 0.001$) เมื่อให้สารสกัดพรหมมีขนาด 60 mg/kg BW แก่หนูความดันโลหิตสูงติดต่อกันเป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ โดยเริ่มให้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 (ตั้งแต่หนูมีภาวะ Hypertension) พบว่าพรหมมีมีผลลดความดันโลหิตในหนูที่มีภาวะความดันโลหิตสูงอย่างมีนัยสำคัญโดยค่าความดันที่ลดลงมีค่าใกล้เคียงกับค่าความดันปกติ (ลดลงจาก 162.8 ± 4.9 mmHg เป็น 129.9 ± 6.8 mmHg, $p < 0.01$, n=6-8) การให้ captopril มีผลลดความดันโลหิตได้เช่นเดียวกันโดยลดลงจาก 166.4 ± 7.2 mmHg (week4) เป็น 140.4 ± 5.8 mmHg (week8, $p < 0.01$, n=6-7) แต่การให้พรหมมีหรือ captopril ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงอัตราการเต้นของหัวใจ

การค้นพบ : ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าพรหมมีมีประสิทธิภาพในการลดความดันโลหิตและอาจมีประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ในทางคลินิกต่อไป

Abstract

Introduction We have previously reported that intravenous injection of *Bacopa monnieri* (Brahmi) reduced blood pressure in normotensive anaesthetised rats, suggesting that Brahmi could be an effective antihypertensive. Therefore, the present study sought to show that orally administered Brahmi could lower blood pressure in rats made chronically hypertensive by N_ω-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) which blocks endothelial nitric oxide synthase.

Methods Male Wistar rats (200-250g) were divided into 4 groups: 1) Normotensive control, 2) L-NAME (50mg/kg), 3) L-NAME plus Brahmi (60mg/kg/day), 4) L-NAME plus captopril (20mg/kg/day). L-NAME was administered via the drinking water for 8 weeks. After 4 weeks, animal groups 3 and 4 also received Brahmi ethanolic extract or captopril in the drinking water for the remaining 4 weeks. Systolic blood pressure (SBP) and heart rate were measured weekly, whilst conscious, using an inflatable tail cuff.

Results L-NAME produced a sustained elevation of SBP from 94.7±7.5mmHg (week0, n=7) to 166.6±3.5mmHg (week8, n=6, $p<0.001$). A further 4 weeks of Brahmi reduced blood pressure from 162.8±4.9mmHg (week4) to 129.9±6.8mmHg (week8, $p<0.01$, n=6-8) and captopril from 166.4±7.2mmHg (week4) to 140.4±5.8mmHg (week8, $p<0.01$, n=6-7) but had no effect on normotensives. There was no difference in heart rate among the 4 groups studied.

Conclusion These data show that Brahmi is an effective antihypertensive. Thus Brahmi or its active ingredients may make a clinically efficacious antihypertensive treatment.

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและความเป็นมาของปัญหา

ความดันโลหิตสูง หรือ ความดันเลือดสูง เป็นหนึ่งในปัญหาทางสาธารณสุข ที่เกิดขึ้นกับประชากรทุกกลุ่มอาชีพ สาเหตุของการเกิดความดันเลือดสูงเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัยคือ พันธุกรรม การทำงานของไต ระบบประสาท การทำงานของระบบไหลเวียนที่ผิดปกติ สารอาหาร เช่น คาร์โบไฮเดรตมาก โซเดียมสูง โปแทสเซียมต่ำ และไขมันสูง เป็นต้น ฮอร์โมน เช่น แองจิโอเทนซินสอง (angiotensin II, ATH) แคลซิโคลามีนส์ อินซูลิน และไนตริกออกไซด์ เป็นต้น และสิ่งแวดล้อม (for review, see Patel, 2000) ปัจจัยเหล่านี้ทำให้ระบบควบคุมความดันเลือดผิดปกติจนเกิดความดันเลือดสูง ความชุกของความดันเลือดสูง จากการสำรวจของ the National Ambulatory Care ในปี 1991 พบว่า ประชากรในสหรัฐอเมริกาจำนวน 300 ล้านคน มีความดันเลือดสูงมากถึง 85 ล้านคน (28.33 เปอร์เซ็นต์) (Schappert, 1993) และความดันเลือดสูงในคนผิวดำมากกว่าคนผิวขาวถึง 2 เท่า (Cornoni-Huntley et al, 1989) ในเอเชียรวมทั้งประเทศไทย ความชุกของความดันเลือดสูงมีค่าระหว่าง 15-35 เปอร์เซ็นต์ โดยประชากรในเขตเมืองมีความชุกมากกว่าเขตชนบท 2-3 เท่า (Singh et al., 2000) โรคระบบหัวใจและหลอดเลือดเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญอันดับต้นๆของประเทศไทย กล่าวคือ ในประเทศไทยมีผู้ป่วยเสียชีวิตด้วยโรคหัวใจและหลอดเลือดสูงถึง 40,000 คนต่อปี หรือคิดเป็นชั่วโมงละ 5 คน (กระทรวงสาธารณสุข, 2550)

การรักษาความดันเลือดสูงโดยทั่วไป ผู้ป่วยมักได้รับการรักษาทางยา การปรับเปลี่ยนพฤติกรรม การดำรงชีวิต เพื่อรักษาและบรรเทาอาการของโรค ในปัจจุบันสมุนไพรไทยได้รับการยอมรับและนำมาใช้ในทางการแพทย์อย่างแพร่หลายและหลากหลายในด้านสรรพคุณต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นการใช้เพื่อรักษาโรค หรือเพื่อเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน เพื่อลดความเสี่ยงของการเกิดโรค อาทิเช่น พรมมิ (*Bacopa monniera*) มีสรรพคุณ บำรุงความจำ บำรุงสมอง (Das et al, 2002) และมีคุณสมบัติในการลดอาการซึมเศร้า (antidepressant) (Sairam et al, 2002) และ วิตกกังวล (anxiety) (Ernst, 2006) มีรายงานว่าสมุนไพรพรมมิมิฤทธิ์ขยายหลอดเลือดในปอดของกระต่าย หลอดเลือดเอออดตาร์ในหนูปกติ รวมทั้งมีฤทธิ์ลดความดันเลือดในหนูปกติ ส่วนการศึกษาผลของสมุนไพรพรมมิในหนูที่มีภาวะพยาธิสภาพ เช่น ภาวะความดันเลือดสูงนั้นยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน งานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งวิจัยศึกษาผลของสมุนไพรพรมมิในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะความดันโลหิตสูง โดยศึกษาทั้งในสัตว์ทดลอง และ ในหลอดทดลอง เพื่อเป็นข้อมูลวิจัยเชิงพื้นฐานในการศึกษาขั้นสูง และ พัฒนาผลิตภัณฑ์ยา และ/อาหารต่อไป

2. วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของพรมมีต่อความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจในหนูที่มีความดันโลหิตสูงโดยการเหนี่ยวนำจาก N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) ซึ่งเป็น nitric oxide synthase inhibitor ทำหน้าที่ยับยั้งการสร้าง nitric oxide



บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดพรมมิ

1.1 ตัวอย่างพืช

ตัวอย่างพรมมิได้จากจังหวัดเพชรบุรีเก็บในช่วงเดือนมกราคม-เมษายน ปี 2548 จัดหาให้โดย คุณคุณุฎี ผ่องแผ้ว บริษัท Health and Herbs ตัวอย่างเป็นส่วนเนื้อดินซึ่งถูกทำให้แห้งโดยวิธีึ่งลมเป็นเวลา 3 วัน แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเป็นเวลา 1 วัน ตัวอย่างพืชแห้งถูกนำไปบดเป็นผงหยาบ

ตัวอย่างพรมมิได้รับการพิสูจน์เอกลักษณ์โดย รศ. ดร. วงศ์สถิตย์ ธีวกุล คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล Voucher specimen (Phrompittayarat001, 002 และ 003) เก็บไว้ที่ PBM Herbarium มหาวิทยาลัยมหิดล

1.2 การควบคุมคุณภาพพรมมิ

ผู้วิจัยได้ควบคุมคุณภาพวัตถุดิบพรมมิและสารสกัดที่ใช้ในการศึกษาตามรายละเอียดที่ ดร. กร กนก อิงคินันท์ และ คณะ ได้รายงาน (Phrompittayarat, W., Wittaya-arekul, S., Jetiyanon, K., Putalun, W., Tanaka, H., and Ingkaninan, K. 2007)

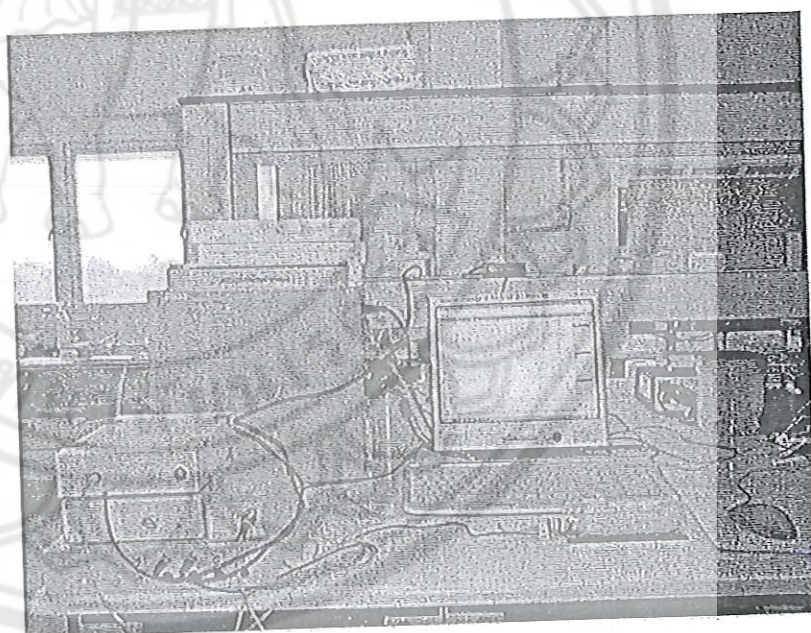
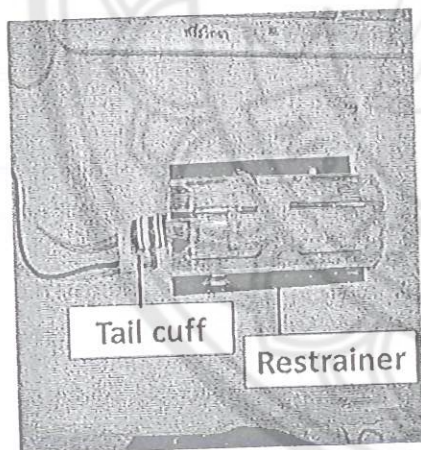
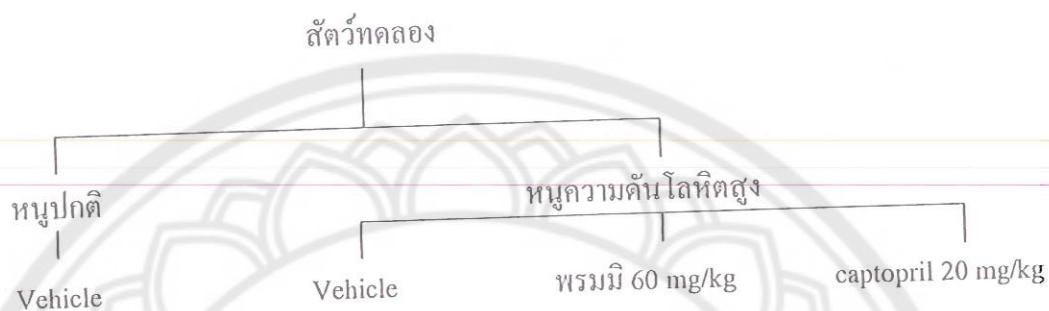
1.3 การสกัดพรมมิ

นำพรมมิส่วนเนื้อดิน ซึ่งได้จากบริษัท Health and Herbs จำกัด จังหวัดเพชรบุรี อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วนำไปบดให้ได้ผงหยาบของพรมมิหนัก 18 กิโลกรัม หมักในน้ำให้ชุ่มแช่ไว้ 24 ชั่วโมง แล้วคั้นน้ำออกให้หมด นำพรมมิที่หมักน้ำแล้ว ผ่าน percolator (รุ่น TC 201 ผลิตโดยบริษัท GBF Co., Ltd. ขนาดความจุ 2000) โดยปล่อยให้ น้ำยาสกัดคือ เอทิลแอลกอฮอล์ผ่านพรมมิ และผ่านแผ่นกรองออกจากเครื่อง แล้วป้อนสารสกัดเดิมใช้เวลา 8 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนเอทิลแอลกอฮอล์ใหม่ ทำวิธีการเดิมที่ใช้เครื่อง percolator ทำการสกัดอีก 2 ครั้ง นำสารละลายที่สกัดได้ทั้งหมดมารวมกัน และนำไปประเหยแห้งโดยให้เครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (รุ่น TCV201 ผลิตโดยบริษัท GBF Co., Ltd ขนาดความจุ 60 ลิตร) แล้วชั่งสารสกัดที่ได้ คำนวณ % yield

2. วิธีการดำเนินการวิจัยเพื่อศึกษาฤทธิ์ของพรมมิที่มีต่อความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจ

สัตว์ทดลองที่ใช้ คือ หนู (Wistar Rat) เพศผู้ (200-250 กรัม) สั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม หนูทุกตัวจะถูกนำมาเลี้ยงอย่างน้อย 1 สัปดาห์ ก่อนการทดลอง ณ ห้องสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยถูกเลี้ยงอย่างอิสระ ภายใต้การควบคุมแสงสว่าง 12:12 hr light:dark cycle และ ปรับอุณหภูมิให้เหมาะสม โดยจะมีการฝึกให้สัตว์ทดลองได้คุ้นเคยกับ rest trainer ก่อนจะเริ่มวัดความดันเลือด การวัดความดันเลือดทางหางใน

ขณะที่สัตว์ทดลองมีสติ สัตว์ทดลองจะถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะความดันโลหิตสูงโดยการได้รับสาร L-NAME ผสมในน้ำดื่มในขนาด 50 mg/kg BW เป็นเวลาติดต่อกันนานประมาณ 3 สัปดาห์จนมีความดันเลือดขณะหัวใจบีบตัว (Systolic blood pressure) สูงไม่น้อยกว่า 160 mmHg สัตว์ทดลองจะถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม



Tail cuff method for Systolic Blood Pressure Measurement (SBP)

Diagram แสดงการวัดความดันโลหิตจากหางหนู

3. วิเคราะห์ผลการทดลอง

ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยจะเป็นข้อมูลเชิงปริมาณซึ่งจะถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยการหาค่าเฉลี่ย (Mean) และ ความน่าเชื่อถือของค่าเฉลี่ยโดยใช้ค่า standard error of the mean (S.E.M) การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มควบคุม และ กลุ่มที่ได้รับสารสกัด หรือ ยามาตรฐาน จะทำโดยวิธี Student t-test และ ANOVA ตามความเหมาะสม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะและจำนวนกลุ่มของข้อมูลที่ต้องการเปรียบเทียบความแตกต่าง และ ค่า p value < 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

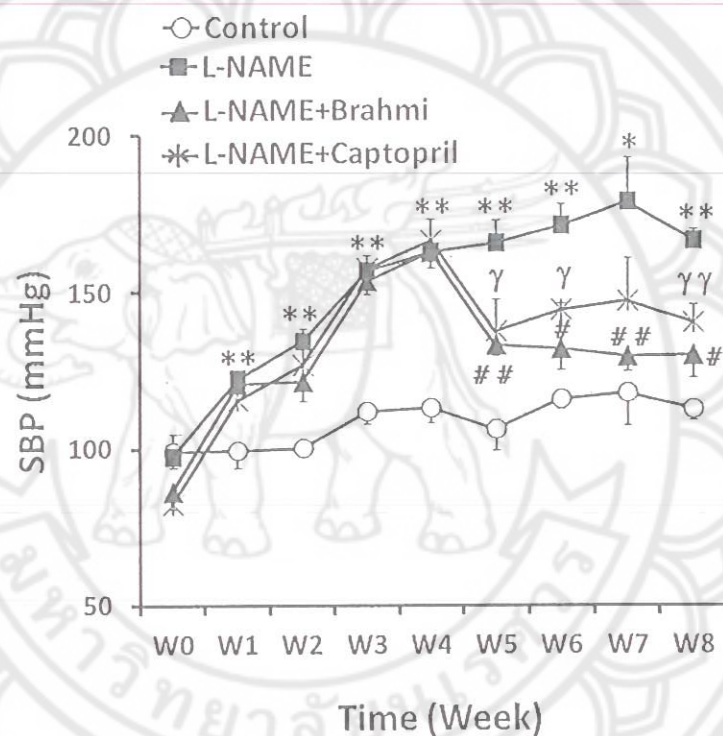


บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ผลของสารสกัดพรมมิต่อความดันโลหิต

การให้สาร L-NAME ผสมในน้ำดื่มในขนาด 50 mg/kg BW เป็นเวลานานติดต่อกัน 4-8 สัปดาห์มีผลเพิ่มความดันโลหิตขณะหัวใจบีบตัว (Systolic blood pressure) อย่างมีนัยสำคัญ (เพิ่มจาก 94.7 ± 7.5 mmHg (Week 0, n=7) เป็น 166.6 ± 3.5 mmHg (Week 8, n=6, $p < 0.001$, รูป 1)



รูป 1 ผลของสมุนไพรพรมมิ (60 mg/kg BW) และ captopril (20mg/kg) ต่อความดันโลหิตขณะหัวใจบีบตัว (Systolic blood pressure, SBP) ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะความดันโลหิตสูงโดย L-NAME (50mg/kg) โดยหนูได้รับ L-NAME ติดต่อกัน 4 สัปดาห์แล้วจึงได้รับสารสกัดหรือยา ข้อมูลที่แสดงคือ mean±SEM (n=5-8) W=สัปดาห์

* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ เปรียบเทียบกับ W0 (L-NAME), # $p < 0.01$, ## $p < 0.001$ เปรียบเทียบกับ W4 (L-NAME+Brahmi), γ $p < 0.05$, $\gamma\gamma$ $p < 0.01$ เปรียบเทียบกับ W4 (L-NAME+captopril)

เมื่อให้สารสกัดพรมมิขนาด 60 mg/kg BW แก่หนูความดันโลหิตสูงติดต่อกันเป็นเวลานาน 4 สัปดาห์โดยเริ่มให้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 (ตั้งแต่หนูมีภาวะ Hypertension) พบว่าพรมมิมิมีผลลดความดันโลหิตในหนูที่มีภาวะความดันโลหิตสูงอย่างมีนัยสำคัญโดยค่าความดันที่ลดลงมีค่าใกล้เคียงกับค่าความดันปกติ (ลดลงจาก 162.8 ± 4.9 mmHg เป็น 129.9 ± 6.8 mmHg, $p < 0.01$, $n=6-8$) การให้ captopril มีผลลดความดันโลหิตได้เช่นเดียวกันโดยลดลงจาก 166.4 ± 7.2 mmHg (week4) เป็น 140.4 ± 5.8 mmHg (week8, $p < 0.01$, $n=6-7$)

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทดสอบผลของพรมมิขนาด 20, 40 และ 60 mg/kg ที่มีต่อความดันโลหิตในหนูปกติ แต่พบว่าไม่มีผลใด ๆ

3.2 ผลของสารสกัดพรมมิต่ออัตราการเต้นของหัวใจ

หนูทั้ง 4 กลุ่มมีอัตราการเต้นของหัวใจที่ไม่แตกต่างกัน (ตาราง 1) อย่างไรก็ตามอัตราการเต้นของหัวใจมีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง W0 กับ W8 ของหนูในแต่ละกลุ่มซึ่งอาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงตามอายุที่มากขึ้น

Treatment	Heart Rate (beat/min)		
	W0	W4	W8
Control	390 ± 6	362 ± 9	349 ± 12
L-NAME	389 ± 5	367 ± 6	337 ± 18
L-NAME+Brahmi	402 ± 5	357 ± 10	362 ± 12
L-NAME+captopril	403 ± 7	372 ± 13	369 ± 26

ตาราง 1 อัตราการเต้นของหัวใจของหนูที่ได้รับ L-NMAE พรมมิ หรือ Captopril

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าพรมมีฤทธิ์ลดความดันโลหิตในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำโดย L-NAME โดยไม่มีผลต่อ Heart rate ดังนั้นฤทธิ์ของพรมมีจึงน่าจะผ่านกลไกที่มีผลทำให้หลอดเลือดขยายตัว เป็นที่ทราบกันดีว่าการให้ L-NMAE ติดต่อกันเป็นเวลานานสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความดันโลหิตสูงได้โดยผ่านกลไกการยับยั้งการสร้าง NO ทำให้เกิดภาวะ Vasoconstriction และเพิ่ม Vascular resistance ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของความดันโลหิต ดังนั้นการศึกษาจำนวนมากจึงใช้ Model นี้ในการศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรในที่มีต่อความดันโลหิต จากการศึกษาพบว่า L-NAME มีผลเพิ่ม Systolic blood pressure ของหนูทดลองตั้งแต่สัปดาห์แรกของการให้และมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึง สัปดาห์ที่ 3 จึงเริ่มมีค่าสูงอย่างคงที่ตลอดจนถึงสัปดาห์ที่ 8 ซึ่งเป็นสัปดาห์สุดท้ายของการทดลอง การให้สารสกัดพรมมีหรือยา Captopril มีผลลดความดันโลหิตอย่างมีนัยสำคัญและมีฤทธิ์ใกล้เคียงกัน ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลที่เคยมีรายงานมาก่อนคือการฉีดพรมมีเข้าหลอดเลือดดำที่ ขนาด 20, 40, 60 mg/kg มีผลลดความดันโลหิตในหนูปกติโดยไม่มีผลต่อ Heart rate ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพรมมีน่าจะออกฤทธิ์ผ่านทางกรขยายหลอดเลือด

ฤทธิ์ของพรมมีที่มีต่อการขยายหลอดเลือดได้มีรายงานมาก่อนหน้าแล้วในหลอดเลือดหลายชนิด เช่น Aorta, Mesenteric artery, Tail artery และ Renal artery เป็นต้น โดยกลไกอาจผ่านทั้ง NO pathway และ ออกฤทธิ์โดยตรงที่กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด โดยยับยั้งการไหลเข้าของ Ca^{2+} อย่างไรก็ดีกลไกโดยละเอียดของการออกฤทธิ์ของพรมมีควรต้องมีการศึกษาต่อไป

โดยสรุปผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าพรมมีมีประสิทธิภาพในการลดความดันโลหิตและอาจมีประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ในทางคลินิกต่อไป

บรรณานุกรม

กระทรวงสาธารณสุข. ข้อมูลเผยแพร่โดยศาสตราจารย์เกียรติคุณ นพ.ไกรสิทธิ์ ตันติศิรินทร์ ในการประชุมวิชาการโภชนาการแห่งชาติ ครั้งที่ 2 ณ ศูนย์ไบเทค บางนา เมื่อวันที่ 5 ตุลาคม 2550. กรองกาญจน์ ชูทิพย์. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรที่มีต่อหลอดเลือด. 2550

Anbarasi K, Kathirvel G, Vani G, Jayaraman G, and Shyamala Devi CS. Cigarette smoking induces heat shock protein 70 kDa expression and apoptosis in rat brain: Modulation by bacoside A. *Neuroscience*. 138(4):1127-35. 2006a.

Anbarasi K, Vani G, Balakrishna K, and Devi CS. Effect of bacoside A on brain antioxidant status in cigarette smoke exposed rats. *Life Sci*. 16;78(12):1378-84. 2006b.

Anbarasi K, Vani G, Balakrishna K, Devi CS. Creatine kinase isoenzyme patterns upon chronic exposure to cigarette smoke: protective effect of Bacoside A. *Vascul Pharmacol*. 42(2):57-61. 2005c.

Anbarasi K, Vani G, Balakrishna K, Devi CS. Effect of bacoside A on membrane-bound ATPases in the brain of rats exposed to cigarette smoke. *J Biochem Mol Toxicol*. 9(1):59-65. 2005b.

Anbarasi K, Vani G, Devi CS. Protective effect of bacoside A on cigarette smoking-induced brain mitochondrial dysfunction in rats. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 24(3):225-34. 2005a.

Channa, S., Dar, A., Yaqoop, M., Anjum, S., Sultani, Z., Rahman, A. Broncho-vasodilatory activity of fractions and pure constituents isolated from *Bacopa monniera*. *J. Ethno. Pharmacol*. 86: 27-35. 2003.

Chattipakorn, S., Pongpanparadorn, A., Pratchayasakul, W., Pongchaidacha, A., Ingkaninan, K. and Chattipakorn, N. *J Ethnopharmacol*. 2007; 110(1): 61-68.

Dar, A. and Channa, S. Calcium antagonistic activity of *Bacopa monniera* on vascular and intestinal smooth muscles of rabbit and guinea-pig. *J. Ethno. Pharmacol*. 66: 167-174. 1999.

Dar, A. and Channa, S. Relaxant effect of ethanol extract of *Bacopa monniera* on trachea, pulmonary artery and aorta from rabbit and guinea-pig. *Phytother. Res*. 11: 323-325. 1997.

Das, A. et al A comparative study in rodents of standardized extracts of *Bacopa monniera* and *Ginkgo biloba* anticholinesterase and cognitive enhancing activities. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 73: 893-900, 2002.

Garai, S., Mahoto, S.B., Ohtani, K., Yamasaki, K.: Bacosaponin D-a pseudojubilogenin glycoside from *Bacopa monniera*. *Phytochemistry*. 42: 815-920, 1996a.

- Garai, S., Mahoto, S.B., Ohtani, K., Yamasaki, K.: Dammarane-type triterpenoid saponins from *Bacopa monniera*. *Phytochemistry*. 42: 815-920, 1996b.
- Goel RK, Sairam K, Babu MD, Tavares IA, Raman A. In vitro evaluation of *Bacopa monniera* on anti-*Helicobacter pylori* activity and accumulation of prostaglandins. *Phytomedicine*. 10(6-7):523-7. 2003.
- Ingkaninan, K., Changwijit, K. and Suwanborirux, K. *J Pharm Pharmacol*. 2006; 58(6): 847-852.
- Kishore K, Singh M. Effect of bacosides, alcoholic extract of *Bacopa monniera* Linn. (brahmi), on experimental amnesia in mice. *Indian J Exp Biol*. 43(7):640-5. 2005
- Phrompittayarat, W., Wittaya-areekul, S., Jetiyanon, K., Putalun, W., Tanaka, H., and Ingkaninan, K. Determination of saponin glycosides in *Bacopa monniera* by reversed phase high performance liquid chromatography. *Srinakharinwirot Journal of Pharmaceutical Sciences* 2: 26-32., 2007.
- Sairam, K. Dorababu, M., Goel, R.K., Bhattacharya, S.K. Antidepressant activity of standardized extract of *Bacopa monniera* in experimental models of depression in rats. *Phytomedicine*. 9: 207-211, 2002.
- Stough et al. The chronic effect of an extract of *Bacopa monniera* (Brahmi) on cognitive function in healthy human subjects. *Psychopharmacology*. 1-6, 200.
- Zhou Y, Shen YH, Zhang C, Su J, Liu RH, Zhang WD. Triterpene saponins from *Bacopa monniera* and their antidepressant effects in two mice models. *J Nat Prod*. 70(4):652-5. 2007.

Output ที่ได้จากโครงการ

1. สร้างองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับสรรพคุณของสมุนไพรที่มีต่อระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด
2. นำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ Poster presentation ในที่ประชุมสรีรสมาคมแห่งประเทศไทย 2-4 พฤษภาคม 2555
3. นำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการนานาชาติ The Eighth Asian Congress for Microcirculation Bangkok, October 26-28, 2011
4. ตีพิมพ์ผลงานระดับชาติและนานาชาติ



Manuscript (Accepted and published in Journal of Physiological and Biomedical Sciences)

Oral *Bacopa monnieri* Is Antihypertensive In Rats Chronically Treated With L-NAME

Amnart Onsa-ard¹, C. Norman Scholfield², Kornkanok Ingkaninan², Sirintorn Srimachai^{1,3*}, Natakorn Kamkaew⁴, Krongkarn Chootip¹.

¹Department of Physiology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

²Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Phitsanulok 65000, Thailand

³Department of Physiology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand

⁴Academy of Science, Nakhonratchasima College, Nakhonratchasima 30000, Thailand

E-mail: krongkarnc@nu.ac.th (Dr. Krongkarn Chootip)

Key words: hypertension, *Bacopa monnieri*, L-NAME, vasodilatation, captopril

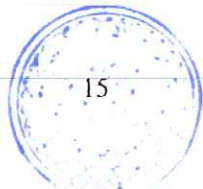
Introduction. We have previously reported that intravenous injection of *Bacopa monnieri* (Brahmi) reduced blood pressure in normotensive anaesthetised rats, suggesting that Brahmi could be an effective antihypertensive. Therefore, the present study sought to show that orally administered Brahmi could lower blood pressure in rats made chronically hypertensive by N^ω-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) which blocks endothelial nitric oxide synthase.

Methods. Male Wistar rats (200-250g) were divided into 4 groups: 1) Normotensive control, 2) L-NAME (50mg/kg), 3) L-NAME plus Brahmi (60mg/kg/day), 4) L-NAME plus captopril (20mg/kg/day). L-NAME was administered via the drinking water for 8 weeks. After 4 weeks, animal groups 3 and 4 also received Brahmi ethanolic extract or captopril in the drinking water for the remaining 4 weeks. Systolic blood pressure (SBP) and heart rate were measured weekly, whilst conscious, using an inflatable tail cuff. To elucidate the mechanism of action of Brahmi, we studied the vasodilator effects of Brahmi on phenylephrine (10μM) pre-contracted isolated mesenteric artery by organ bath technique using a separate group of normotensive rats.

Results. L-NAME produced a sustained elevation of SBP from 94.7±7.5mmHg (week0, n=7) to 166.6±3.5mmHg (week8, n=6, $p<0.001$). A further 4 weeks of Brahmi reduced blood pressure from 162.8±4.9mmHg (week4) to 129.9±6.8mmHg (week8, $p<0.01$, n=6-8) and captopril from 166.4±7.2mmHg (week4) to 140.4±5.8mmHg (week8, $p<0.01$, n=6-7) but had no effect on normotensives. There was no difference in heart rate among the 4 groups studied. In isolated mesenteric artery, Brahmi extract elicited endothelial independent vasorelaxation, suggesting that it acts directly on the vascular smooth muscle cells.

Conclusion. These data show that Brahmi is an effective antihypertensive animals, but unlikely to be nitric oxide-mediated. Thus Brahmi or its active ingredients may make a clinically efficacious antihypertensive treatment.

Supported by National Research Council of Thailand and Ministry of Science and Technology.



1.5936445

ค.บ. 19 ก.ค. 2555

Introduction

Hypertension is an important determinant of cardiovascular disease. Many plant products are vasoactive and thus have potential antihypertensive applications. *Bacopa monnieri* (Brahmi) is an Ayurvedic medicine traditionally used to improve mental health (1), learning and memory (2, 3) and is cardiogenic (4). Several studies have focused on its procognitive and neuroprotective properties (1, 2, 3), but its cardiovascular actions are yet to be fully explored.

Brahmi has been shown to cause relaxation in blood vessels from a wide range of tissues by an action on both endothelial cells and a direct effect on vascular smooth muscle (5, 6, 7, 8). It is also cardioprotective against isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats (9). Recently, we have shown that acute intravenous injection of Brahmi reduced blood pressure of anaesthetised rats (8). However, there is no information on the effects of Brahmi in chronic hypertension. Therefore, the present study aimed to explore the antihypertensive action of an ethanolic extract of Brahmi using rats made hypertensive by chronic oral administration of N^o-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME). The vasodilator action of Brahmi was also investigated in order to elucidate its mechanism of action.

Methods

Preparation of Brahmi extract

Brahmi was collected from Phetchaburi province, Thailand and its ethanolic extract was prepared as described previously (8). In brief, Brahmi was cut, dried and crushed. The dried powder was soaked in water, compressed, sonicated with 95% ethanol and filtered. The ethanolic extract was dried, evaporated under reduced pressure and contained 6.25% (w/w) saponins, including 0.87% bacoside A₃, 1.03% bacoside I, 1.82% bacoside II, 0.80% bacoside X, 1.73% bacosaponin C. The extract was stored at 5°C in a dark bottle until used.

Animals

Male Wistar rats (200-250g) were used for all experiments and were obtained from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Salaya, Nakhorn Pathom, Thailand. Rats were housed under standard conditions (25±2°C, 12 hours light-dark cycle) and received tap water and commercial rat diet *ad libitum*. Experimental protocols were approved by the Animal Ethics Committee (Naresuan University, Phitsanulok, Thailand).

Hypertensive model and blood pressure measurement

Rats were rendered hypertensive by blocking endothelial nitric oxide synthase (eNOS) with L-NAME administered via the drinking water (50mg/kg/day) for 8 weeks. When all the water had been consumed, extra plain water was provided. Over 4 weeks, this produced a sustained hypertension with systolic blood pressure (SBP) ≥ 140 mmHg (10), while the animals given plain water maintained a constant 'normal' blood pressure. After the initial 4 weeks, some animals received additionally either Brahmi ethanolic extract (60mg/kg/day) or captopril (angiotensin converting enzyme inhibitor (ACE), 20mg/kg/day) also in the drinking water. SBP and heart rate was measured weekly, whilst conscious, using an inflatable tail cuff (NIBP controller, ADInstrument, Australia). This method cannot measure diastolic blood pressure. The trial used 4 matched groups of rats: 1) normotensive controls, 2) hypertensives (L-NAME), 3) hypertensives (L-NAME) + Brahmi extract and 4) hypertensives (L-NAME) + captopril.

Vasodilator effects of Brahmi extract

To evaluate vasodilatory action of Brahmi, a separate group of normotensive rats (200-250g) were killed by cervical dislocation. The mesenteric artery was excised, cleaned of

8. Kamkaew N, Scholfield CN, Ingkaninan K, Maneesai P, Parkington HC, Tare M, Chootip K. *Bacopa monnieri* and its constituents is hypotensive in anaesthetised rats and vasodilator in various artery types. *J Ethnopharmacol* 2011; 137: 790-795.
9. Nandave M, Ojha SK, Joshi S, Kumari S, Arya DS. 2007. Cardioprotective effect of *Bacopa monniera* against isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. *Int J Pharmacol* 2007; 3: 385-392.
10. Colonna VDG, Rigamonti A, Fioretti S, Bonomo S, Manfredi B, Ferrario P, Bianchi M, Berti F, Muller EE, Rossoni G. Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin AT₁-receptor antagonism equally improve endothelial vasodilator function in L-NAME-induced hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 2005; 516: 253-259.
11. Chootip K, Ness KF, Wang Y, Gurney AM, Kennedy C. Regional variation in P2 receptor expression in the rat pulmonary arterial circulation. *Brit J Pharmacol* 2002; 137: 637-646.
12. Kamkaew N, Scholfield CN, Ingkaninan K, Taepavarapruk N, Chootip K. *Bacopa monnieri* increases cerebral blood flow in rat independent of blood pressure. *Phytother Res* DOI: 10.1002/ptr.4685.
13. Nguelefack-Mbuyo PE, Nguelefack TB, Dongmo AB, Afkir S, Azebaze AGB, Dimo T, Legssyer A, Kamanyi A, Ziyat A. Anti-hypertensive effects of the methanol/methylene chloride stem bark extract of *Mammea africana* in L-NAME-induced hypertensive rats. *J Ethnopharmacol* 2008; 117: 446-450.
14. Kang DG, Sohn EJ, Lee YM, Lee AS, Han JH, Kim TY, Lee HS. Effects of bulbus *Fritillaria* water extract on blood pressure and renal functions in the L-NAME-induced hypertensive rats. *J Ethnopharmacol* 2004; 91: 51-56.
15. Bahgat A, Abdel-Aziz H, Raafat M, Mahdy A, El-Khatib AS, Ismail A, Khayyal MT. *Solanum indicum* ssp. *distichum* extract is effective against L-NAME-induced hypertension in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 2008; 22: 693-699.

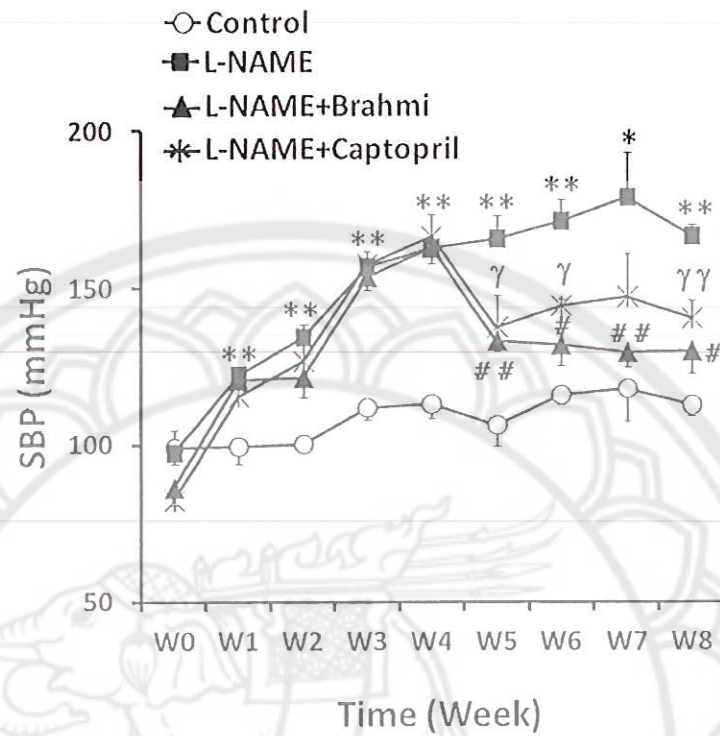


Figure 1

Effect of chronic oral administration of L-NAME (50mg/kg), L-NAME+Brahmi (60mg/kg) and L-NAME+captopril (20mg/kg) on systolic blood pressure (SBP). Rats were treated with L-NAME for 4 weeks and then some animals received additionally either Brahmi ethanolic extract (60mg/kg/day) or captopril (20mg/kg/day) for the remaining 4 weeks ($n=5-8$). (W, Week) All data points are mean \pm SEM. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ comparing with W0 (L-NAME), # $p < 0.01$, ## $p < 0.001$ comparing with W4 (L-NAME+Brahmi), $\gamma p < 0.05$, $\gamma\gamma p < 0.01$ comparing with W4 (L-NAME+captopril)

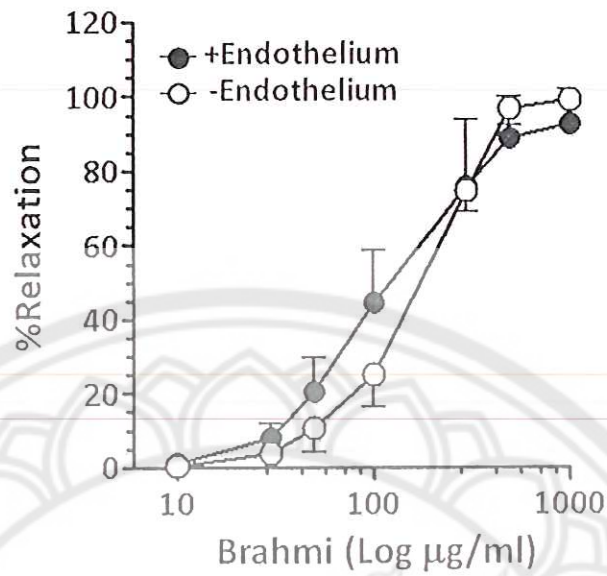


Figure 2 Concentration-relaxation curves for Brahmi extract (0-1000 µg/ml) in endothelium-intact (+Endothelium) and endothelium-denuded (-Endothelium) mesenteric arteries of normotensive rats. Arterial rings were pre-contracted with 10 µM phenylephrine. All data points are mean±SEM ($n=6-7$).

Treatment	Heart Rate (beat/min)		
	W0	W4	W8
Control	390±6	362±9	349±12
L-NAME	389±5	367±6	337±18
L-NAME+Brahmi	402±5	357±10	362±12
L-NAME+captopril	403±7	372±13	369±26

Table 1

Effect of chronic oral administration of L-NAME (50mg/kg), L-NAME+Brahmi (60mg/kg) and L-NAME+captopril (20mg/kg) on heart rate. Rats were treated with L-NAME for 4 weeks and then some animals received additionally either Brahmi ethanolic extract (60mg/kg/day) or captopril (20mg/kg/day) for the remaining 4 weeks ($n=5-8$). (W, Week) All data points are mean±SEM.

