

คณาจารย์



สำนักหอสมุด

รายงานการวิจัย

เรื่อง

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดว่านอังกืต่อ
ระบบหลอดเลือดปอดหนู

Pharmacological action and cytotoxicity of *Eulophia
macrobulbon* extract on rat pulmonary arterial system

โดย

รศ.ดร.กรรองกาญจน์ ชูทิพย์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
หนังสือเลขที่ 15 51 2561
เลขทะเบียน 1039537
เลขเรียกหนังสือ ๑ ๑๕

495
064
ก1855
2561

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

มีรายงานว่าวานอิ่งซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่อยู่ในวงศ์กล้วยไม้ มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ phosphodiesterase5 (PDE5) แสดงว่าวานอิ่งน่าจะมีฤทธิ์จำเพาะเจาะจงต่อหลอดเลือดปอดเพราะเป็นบริเวณที่พบ PDE5 มาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดวานอิ่งและสารสำคัญ คือ 1-(4'-hydroxybenzyl)-4,8-dimethoxyphenanthrene-2,7-diol ที่มีต่อหลอดเลือดแดงปอดโดยใช้เทคนิค organ bath และทดสอบฤทธิ์ของวานอิ่งเปรียบเทียบกับยา sildenafil ในการป้องกันภาวะความดันหลอดเลือดสูง (pulmonary arterial hypertension: PAH) จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดวานอิ่งมีผลทำให้หลอดเลือดปอดคลายตัวได้ดีกว่าหลอดเลือดเออเออตาเร่แสดงว่าสารสกัดวานอิ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อระบบไหลเวียนเลือดปอดมากกว่าระบบไหลเวียนเลือดทั่วร่างกาย การขูดเอา endothelium ออกหรือการให้สาร L-NAME มีผลลดการคลายตัวของหลอดเลือดแดงปอด แต่การให้สารต่อไปนี้ ได้แก่ indomethacin, apamin+charybdotoxin, 4-aminopyridine, glibenclamide, iberiotoxin หรือ 1H-[1,2,4] oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one ไม่ผลเปลี่ยนแปลงการคลายตัวของหลอดเลือด แสดงว่าสารสกัดวานอิ่งออกฤทธิ์ผ่าน endothelium โดยผ่านการหลั่งสาร nitric oxide นอกจากนี้ การศึกษานี้ยังพบว่าสาร sodium nitroprusside มีผลเสริมฤทธิ์สารสกัด ดังนั้นสารสกัดจึงน่าจะออกฤทธิ์โดยยับยั้ง PDE5 ได้เช่นกัน สารสกัดยังสามารถยับยั้งการไหลเข้าของ Ca^{2+} สูเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด และยับยั้งการหลั่งของ Ca^{2+} ออกจาก sarcoplasmic reticulum กลไกเหล่านี้ล้วนเป็นกลไกที่สัมพันธ์กับการคลายตัวของหลอดเลือด สารสำคัญ คือ phenanthrene ก็มีผลทำให้หลอดเลือดแดงปอดขยายได้เช่นเดียวกับสารสกัด ส่วนการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าสารสกัดสามารถป้องกันพยาธิสภาพที่เกิดจากภาวะ PAH ได้ดีไม่แตกต่างจากยา sildenafil กล่าวคือสารสกัดและยา sildenafil มีผลลดความหนาของผนังหลอดเลือดและลดขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างซึ่งเป็นพยาธิสภาพที่เกิดเมื่อมีภาวะ PAH ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารสกัดวานอิ่งมีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดแดงปอดขยายและส่งผลป้องกันการเกิดพยาธิสภาพของภาวะ PAH

คำสำคัญ: วานอิ่ง, หลอดเลือดแดงปอด, หลอดเลือดขยาย, สารยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรส, ความดันหลอดเลือดสูง

Abstract

Phosphodiesterase5 (PDE5) inhibitory activity has been reported in a wild orchid, *Eulophia macrobulbon* (EM), suggesting that EM could act selectively on pulmonary vasculature. Therefore the vascular activity of EM extract and its active compound, 1-(4^t-hydroxybenzyl)-4,8-dimethoxyphenanthrene-2,7-diol was investigated in rat pulmonary artery (PA) in an organ bath. The EM extract and sildenafil preventive effects were also evaluated on monocrotaline (MCT)-induced pulmonary arterial hypertension (PAH). EM extract relaxed PA ($EC_{50}=0.17\text{mg/ml}$, $E_{max}\sim 94\%$) more than aorta ($EC_{50}=0.51\text{mg/ml}$, $E_{max}\sim 62\%$), indicating differential sensitivity between pulmonary and systemic circulation. PA vasorelaxation was reduced by endothelial removal and N⁶-nitro-L-arginine methyl ester, but unaffected by indomethacin, apamin+charybdotoxin, 4-aminopyridine, glibenclamide, iberiotoxin or 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. EM extract enhanced PA relaxation to sodium nitroprusside, likely through PDE5 inhibition. The extract also reduced extracellular Ca²⁺-induced contraction, and inhibited intracellular Ca²⁺ release sensitive to phenylephrine. The phenanthrene induced endothelium-independent vasorelaxation in PA. In MCT-induced PAH rats, 3-week oral administration of 15, 450 or 1,000mg/kg EM extract or 20mg/kg sildenafil reduced PAH severity, as indicated by a reduction of either pulmonary vascular wall thickness or right ventricular myocyte cross-sectional area. In conclusion, EM extract relaxed PA through endothelium-dependent and -independent mechanisms, which translated into a positive effect on PAH.

Keywords : *Eulophia macrobulbon*, pulmonary artery, vasorelaxation, phosphodiesterase5 inhibitor, pulmonary arterial hypertension

สารบัญ

เนื้อหา	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	5
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	6
ขอบเขตของโครงการวิจัย	7
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	7
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	7
บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย	
การขออนุมัติทำวิจัยในสัตว์ทดลอง	9
การเตรียมสารสกัด	9
การศึกษาในหลอดทดลอง (<i>In vitro</i>)	9
การศึกษาในสัตว์ทดลอง (<i>In vivo</i>)	12
การวิเคราะห์ผลการทดลอง	14
บทที่ 3 ผลการทดลองและการอภิปรายผล	
ผลของสารสกัดและสารสำคัญต่อหลอดเลือด	15
ผลของสารสกัดต่อการเคลื่อนที่ของแคลเซียมจากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์	17
ความเป็นพิษของสารสกัดและสารสำคัญต่อเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด	19
ผลของสารสกัดต่อภาวะ PAH	21
ผลของสารสกัดต่อน้ำหนักอวัยวะหนูที่มีภาวะ PAH	24
ผลของสารสกัดต่อระดับ Inflammatory cytokines	25
ผลของสารสกัดต่อ Histology ของหลอดเลือดและหัวใจ	26
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	28
บรรณานุกรม	29

บทที่ 1 บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

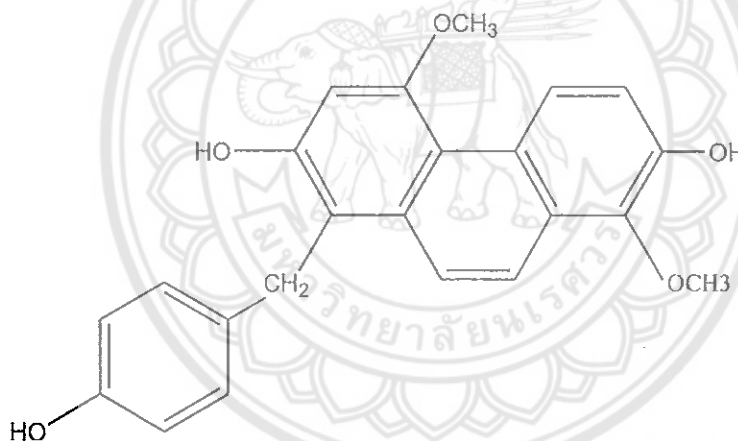
ภาวะความดันเลือดปอดสูงหรือ Pulmonary arterial hypertension (PAH) เป็นภาวะที่ความดันเฉลี่ยของหลอดเลือดแดงในปอดสูงผิดปกติ (mean pulmonary arterial pressure > 25 mmHg) มีสาเหตุหลักมาจากการหดตัวของหลอดเลือดแดงในปอดที่ส่งผลให้แรงต้านทานการไหลของเลือดในปอดเพิ่มขึ้น และนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของความดันของหลอดเลือดแดงในปอดตามลำดับ ถึงแม้ PAH จะมีอุบัติการณ์การเกิดโรคที่ค่อนข้างต่ำ แต่ความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตนั้นสูงมากเนื่องจากเป็นโรคที่มีความรุนแรงจนทำให้เกิดภาวะหัวใจล้มเหลว ซึ่งเป็นเหตุให้ถึงแก่ชีวิตได้ การรักษา PAH ในปัจจุบันประกอบด้วยการรักษาตามอาการ คือ ให้ oral anticoagulants, diuretics, digoxin, การใช้ oxygen therapy และการรักษาแบบเฉพาะเจาะจง คือทำให้หลอดเลือดปอดขยายโดยใช้ยาที่มีกลไกการออกฤทธิ์ผ่าน pathway ต่อไปนี้คือ endothelin pathway, nitric oxide (NO) pathway และ prostacyclin pathway ประกอบด้วยยา 4 กลุ่ม ได้แก่ endothelin-receptor antagonists, calcium channel blockers, phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibitor และ อนุพันธ์ของ prostacyclin

จากที่กล่าวมาข้างต้น ยาที่ใช้ในปัจจุบันนั้น มีอาการไม่พึงประสงค์ค่อนข้างมาก อาทิ ยาในกลุ่มอนุพันธ์ของ prostacyclin มีประสิทธิภาพในการรักษา PAH แต่มี systemic side effect สูง เช่น เสี่ยงต่อการติดเชื้อในกระแสเลือดเมื่อให้ผ่านทางหลอดเลือดดำ ยาในกลุ่ม endothelin-receptor antagonists เมื่อใช้ long term จะมีความเป็นพิษต่อดับ ส่วนยาในกลุ่ม PDE5 inhibitor มีประสิทธิภาพในการลดความต้านทานของหลอดเลือดได้ดี และใช้ในผู้ที่ไม่ตอบสนองต่อ inhale NO ได้ แต่มีอาการไม่พึงประสงค์คือ ปวดหัว ร้อนวูบวาบ epitaxis และ hypotension ทั้งนี้ American Heart Association and the American college of Cardiology แนะนำให้ใช้ sildenafil และยาในกลุ่ม endothelin-receptor antagonists เป็น first line therapy ในการรักษา PAH

ยาในกลุ่ม PDE5 inhibitor มีกลไกการออกฤทธิ์ผ่าน NO pathway ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการขยายตัวของหลอดเลือด ร่างกายสร้าง NO จาก endothelial cells เมื่อ NO ถูกสร้างขึ้นจะไปกระตุ้น guanylate cyclase ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน guanosine triphosphate (GTP) ให้เป็น cyclic guanosine monophosphate (cGMP) ซึ่งมีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดขยาย โดย cGMP ที่ถูกสร้างขึ้นจะถูกทำลายโดย เอนไซม์ PDE ซึ่งมีหลาย subtype ชนิดที่พบมากที่สุดที่ pulmonary vascular smooth muscle cells คือ PDE5 ซึ่งในผู้ป่วย PAH ที่มีความผิดปกติของ endothelial cells นั้น พบว่ามีภาวะ over activity ของ

PDE ส่งผลให้มีการทำลายฤทธิ์ของ NO มากกว่าปกติ ดังนั้นการให้ยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PDE5 จึงมีประโยชน์ในการแก้ไขพยาธิสภาพนี้ได้

จากข้างต้นที่กล่าวมาพบว่า PAH เป็นโรคที่มีความรุนแรง มีผลข้างเคียงจากยาค่อนข้างสูง และพบว่ายาที่มีฤทธิ์ยับยั้ง PDE5 นั้นมีประสิทธิภาพดีในการรักษาโรค PAH แต่มีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้ง PDE5 เพื่อพัฒนาเป็นยาทางเลือกให้กับผู้ป่วย PAH ทดแทนยาเคมีดังกล่าว มีการรายงานว่สารสกัดแอลกอฮอล์จากว่านอึ้งมีฤทธิ์ยับยั้ง PDE5 ได้ เมื่อเทียบกับ sildenafil ซึ่งเป็นยาที่ใช้สำหรับรักษาโรค PAH สารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้ง PDE5 ในสารสกัดแอลกอฮอล์จากว่านอึ้ง คือ 1-(4'-hydroxybenzyl)-4,8-dimethoxyphenanthrene-2,7-diol หรือสาร (1) (ภาพ 1) มีค่า inhibitory concentration (IC_{50}) ในการยับยั้ง PDE5 = $1.67 \pm 0.54 \mu M$ ในขณะที่ sildenafil มีค่า IC_{50} เท่ากับ $0.03 \pm 0.01 \mu M$ และเมื่อเปรียบเทียบกับสมุนไพรกระชายดำ พบว่า มีค่า $IC_{50} = 10.64 \pm 2.09 \mu M$ จะเห็นว่าสาร 1 มีฤทธิ์ในการยับยั้ง PDE5 ดีกว่า sildenafil แต่มีฤทธิ์ดีกว่าสมุนไพรกระชายดำถึง 10 เท่า



ภาพ 1 โครงสร้างของสาร 1-(4'-hydroxybenzyl)-4,8-dimethoxyphenanthrene-2,7-diol (1)

ทั้งนี้ยังไม่มีการศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของสารสกัดแอลกอฮอล์จากว่านอึ้งหรือสารสำคัญในว่านอึ้ง ที่มีผลต่อการขยายหลอดเลือดแดงในปอดหนู รวมทั้งการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารดังกล่าวในการขยายหลอดเลือดด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาถึงฤทธิ์ดังกล่าว เพื่อที่จะพัฒนาสารสกัดจากว่านอึ้งเพื่อใช้ในการแพทย์ เพื่อรักษาโรค PAH ซึ่งในการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะความดันเลือดปอดสูง

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของสารสกัดว่านอิ่งที่มีต่อ

.1 การคลายตัวของหลอดเลือดแดงปอด

.2 ระดับของ inflammatory cytokines ในเลือด และ ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของหัวใจ และหลอดเลือดปอดในหนูที่มีภาวะความดันเลือดปอดสูง

3 ความเป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดงปอด

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้มีการศึกษาผลของสารสกัดว่านอิ่งทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

การศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) แบ่งเป็น ส่วน 2 คือ การศึกษากลไกการคลายตัวของหลอดเลือดแดงปอดและการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์หลอดเลือดแดงปอด

การศึกษาในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) เป็นการศึกษาผลของสารสกัดที่มีต่อหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความดันเลือดปอดสูง

4. ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าสารสกัดว่านอิ่งและสารสำคัญมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PDE5 และทำให้หลอดเลือดแดงปอดขยาย ดังนั้นการให้สารสกัดว่านอิ่งจึงน่าจะมีผลช่วยลดความผิดปกติในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะความดันเลือดแดงปอดสูงได้

5. การทบทวนวรรณกรรม) สารสนเทศ/information) ที่เกี่ยวข้อง

ว่านอิ่งหรือ *Eulophia macrobulbon* (Parish & Rchb. f.) Hook. f. เป็นสมุนไพรในวงศ์ Orchidaceae จากการทบทวนวรรณกรรม มีการศึกษาของประภาพรรณ เต็มกิจฉาวร และคณะ พบว่าว่านอิ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PDE5 ได้ สารสำคัญในว่านอิ่ง คือ สาร 1 มีค่า IC_{50} ในการยับยั้ง PDE5 = $1.67 \pm 0.54 \mu M$ ในขณะที่ sildenafil มีค่า IC_{50} เท่ากับ $0.03 \pm 0.01 \mu M$ และเมื่อเปรียบเทียบกับสมุนไพรกระชายดำ พบว่า มีค่า $IC_{50} = 10.64 \pm 2.09 \mu M$ จะเห็นว่าสาร 1 มีฤทธิ์ในการยับยั้ง PDE5 ดีกว่า sildenafil แต่มีฤทธิ์ดีกว่าสมุนไพรกระชายดำถึง 10

การยับยั้ง PDE5 มีผลเพิ่ม cGMP และเพิ่มการคลายตัวของหลอดเลือด ดังนั้นจึงมีรายงานเกี่ยวกับการพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง PDE5 เช่น ฤทธิ์ของ sildenafil ที่สามารถยับยั้ง PDE5 และทำให้หลอดเลือดปอดคลายตัว ทั้งนี้ sildenafil สามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดโดยใช้

phenylephrine ได้อย่างสมบูรณ์ และ zaprinast กับ sodium nitroprusside ก็ออกฤทธิ์ได้เช่นเดียวกัน ซึ่งสัมพันธ์กับการยับยั้ง PDE5 แบบ selective โดย sodium nitroprusside มีความแรงใกล้เคียงกับ sildenafil ($IC_{50}=11$ nM) ซึ่งแรงกว่า zaprinast 60 เท่า ($IC_{50}= 600$ nM) และผลของ sildenafil ไม่ได้เปลี่ยนแปลงในหลอดเลือดที่นำ endothelium ออก

เนื่องจากว่านอิ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง PDE5 แต่ยังคงขาดข้อมูลสนับสนุนที่เพียงพอเกี่ยวกับฤทธิ์ที่มีต่อหลอดเลือดโดยตรงและฤทธิ์ที่อาจช่วยบรรเทาพยาธิสภาพของภาวะ PAH ผู้วิจัยจึงศึกษาฤทธิ์ของว่านอิ่งต่อระบบหลอดเลือดปอดเพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลในการพัฒนาว่านอิ่งต่อไป



บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย

1. การขออนุมัติทำวิจัยในสัตว์ทดลอง

โครงการนี้ได้รับอนุมัติการทำวิจัยในสัตว์ทดลองจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร หมายเลข NU-AE570720

2. การเตรียมสารสกัด

สารสกัดแอลกอฮอล์ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.กรกนก อิงคนินันท์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ควบคุมคุณภาพโดยวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ สาร 1 หรือ phenanthrene โดย HPLC

3. การศึกษาในหลอดทดลอง (*In vitro*)

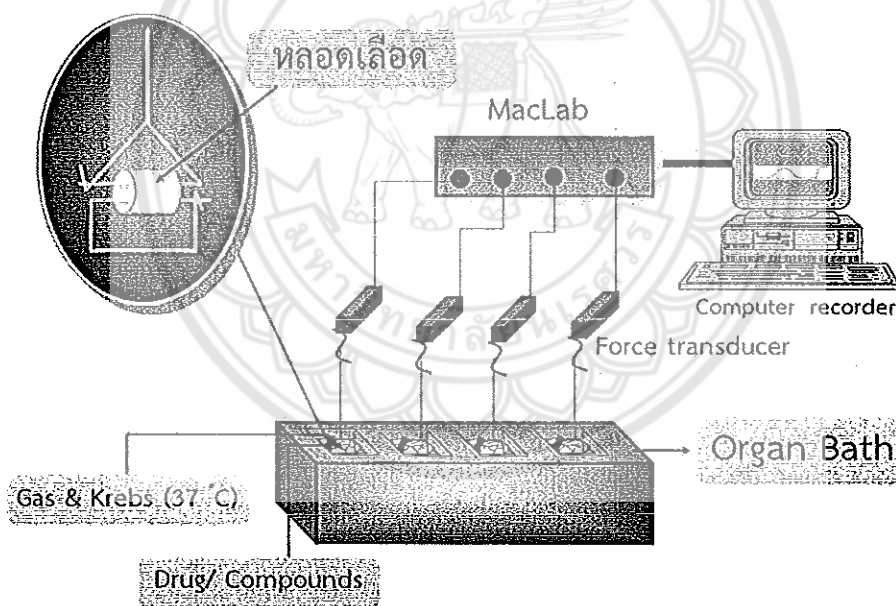
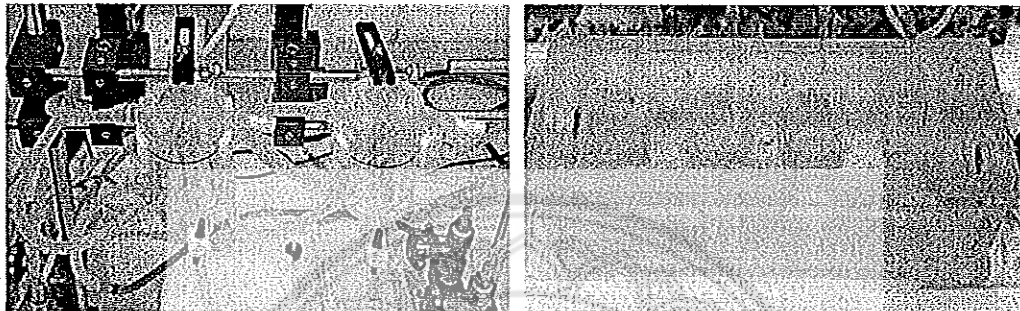
3.1 การคลายตัวของหลอดเลือดแดง

การเตรียมหลอดเลือดและ study protocol ต่าง ๆ ใช้วิธีการตามที่เคยมีรายงานมาก่อน (Kamkaew et al., 2011) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

การเตรียมหลอดเลือด

การศึกษานี้ใช้หนู Sprague Dawley rat เพศผู้ น้ำหนักระหว่าง 200-250 กรัม โดยสั่งซื้อจาก สำนักสัตว์ ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม หนูทั้งหมดถูกนำมาเลี้ยงอย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง ณ สถานสัตว์ทดลองเพื่อการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยมาตรฐานในการเลี้ยงเป็นไปตามเกณฑ์ที่สถานสัตว์ทดลองกำหนด สัตว์ทดลองถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบ โดยการฉีดยาสลบ Pentobarbital (50 mg/kg) ทาง Intraperitoneal หลังจากสัตว์ทดลองสลบ (ทดสอบโดยการใช้ forceps หนีบที่อุ้งเท้าแล้วหนูไม่รู้สึก) จึงเปิดช่องอกแล้วตัดขั้วหัวใจโดยทันที จากนั้นจึงแยกหลอดเลือดเอออร์ตาและหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary artery) ออกนำไปแขวนในหลอดทดลอง ที่มีสารละลาย Physiological solution หรือ KREBS Solution ที่มีส่วนประกอบ คือ NaCl 122 mM; KCl 5 mM; N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-(2-ethane-sulfonic acid) (HEPES) 10 mM; KH₂PO₄ 0.5 mM; NaH₂PO₄ 0.5 mM; MgCl₂ 1 mM; glucose 11 mM and CaCl₂ 1.8 mM และปรับ pH = 7.3 ด้วย NaOH ตลอดการทดลองจะ ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส หลอดเลือดที่แยกได้แล้วถูกแขวนด้วยแรงตึงที่ระดับ Optimal tension (1 กรัม) ดังภาพ 1 และทิ้งไว้ให้เข้าสู่สมดุลอย่างน้อยครึ่งชั่วโมงก่อนทำการทดลองโดยเปลี่ยน KREBS solution ทุก ๆ 10-15 นาที การตอบสนอง

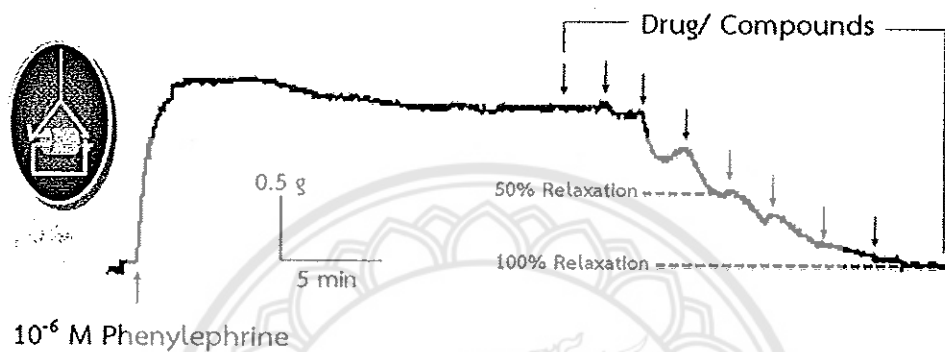
ของหลอดเลือดถูกวัดในรูปการเปลี่ยนแปลงของแรงดึงตัวของหลอดเลือดที่เกิดขึ้นเมื่อมีการหยุดสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันลงไปใน Organ bath ที่มีหลอดเลือดแดงแขวนอยู่ดังภาพ 2 แรงที่เกิดขึ้นถูกแปลงสัญญาณโดยตัวแปลงสัญญาณความแรง (Force transducer) กราฟการตอบสนองที่ได้ถูกบันทึกโดยชุดอุปกรณ์แมคแลบคอมพิวเตอร์ (MacLab, ADInstrument, Sydney, Australia) ซากสัตว์ทดลองที่เสียชีวิตแล้วถูกเก็บไว้ในที่เย็นประมาณ -20°C จนกว่าจะนำไปทำลาย



ภาพ 2 อุปกรณ์ Organ Bath สำหรับแขวนหลอดเลือด

ฤทธิ์ของสารสกัดที่มีต่อหลอดเลือด

ทำให้หลอดเลือดหดตัวก่อนด้วยสาร Phenylephrine (PE) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น α_1 -Receptor agonist เมื่อหลอดเลือดหดตัวในระดับที่คงที่แล้วจึงหยดสารสกัดหรือสารสำคัญที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงใน Organ bath ดังภาพ 3 และวัดความแรงการหดตัวที่เปลี่ยนแปลงไป โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารที่เป็นตัวทำลายสารสกัด และเปรียบเทียบระหว่างกรณีที่มีและไม่มี Endothelium



ภาพ 3 รูปแบบการศึกษาการคลายตัวของหลอดเลือด

หลักการออกฤทธิ์ของสารสกัด

ผลของสารสกัดต่อการเคลื่อนที่ของแคลเซียมจากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์

การทดลองนี้ใช้หลอดเลือดที่ปราศจาก Endothelium โดยหลังจากแขวนหลอดเลือดและทิ้งให้อยู่ในสภาวะ resting tone อย่างน้อย 30 นาที หลอดเลือดจะถูก Preincubate ด้วยสารละลาย Ca^{2+} -free Krebs Henseleit solution (0 Ca^{2+} Krebs) เป็นเวลานาน 10 นาที หลังจากนั้นจึงใส่ Ca^{2+} -free 80 mM K^+ เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดอยู่ในภาวะ Depolarization และกระตุ้นให้เกิดการเปิดของประตูแคลเซียม จากนั้นจึงหยดสารละลาย CaCl_2 โดยเพิ่มความเข้มข้นตามลำดับ ($10 \mu\text{M} - 10 \text{ mM}$) เมื่อหลอดเลือดหดตัวถึงจุดสูงสุดจึงล้างด้วย Krebs Henseleit solution และ Re-incubate หลอดเลือดด้วย Ca^{2+} -free Krebs Henseleit solution เป็นเวลานาน 10 นาที และ ใส่ Ca^{2+} -free 80 mM K^+ ซ้ำอีกครั้งเป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดอยู่ในภาวะ Depolarization และ กระตุ้นให้เกิดการเปิดของประตูแคลเซียม จากนั้นจึง Preincubate หลอดเลือดด้วยสารสกัดเป็นเวลานาน 10 นาที และตามด้วยการหยดสารละลาย CaCl_2 ($10 \mu\text{M} - 10 \text{ mM}$) ตามลำดับ เปรียบเทียบแรงหดตัวที่เปลี่ยนแปลงไปของ

หลอดเลือดในแต่ละความเข้มข้นของ CaCl_2 กับแรงกดตัวสูงสุด (10 mM CaCl_2) ในภาวะที่ไม่มีสารสกัด

3.2 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด

การแยกเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด

การแยกเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดจะใช้วิธีการตามที่เคยมีรายงานมาก่อน (Chootip et al., 2002) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

นำหลอดเลือดที่แยกได้มาตัดตามแนวยาวและแนวขวางตามลำดับให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปใส่ในสารละลายแยกเซลล์ (Dissociation Medium; DM) ที่มีส่วนประกอบ คือ NaCl 110 mM; KCl 5 mM; N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethane-sulfonic acid] (HEPES) 10 mM; KH_2PO_4 0.5 mM; NaH_2PO_4 0.5 mM; NaHCO_3 10; MgCl_2 2 mM; Phenol red 0.03 mM; Taurine 10 mM; EDTA 0.5; glucose 10 mM and CaCl_2 0.6 mM และ ปรับ pH = 7.3 ด้วย NaOH นำหลอดเลือดที่ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วไป Incubate ที่อุณหภูมิ 4 °C กับสารละลาย DM ที่มีส่วนผสมของ Papain (0.8 mg/ml), Bovine serum albumin (0.04%) และ 1,4-Dithiothreitol (0.4 mM) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C ต่อเป็นเวลา 30 นาที จึงเติม Collagenase (0.8 mg/ml) และ Incubate ต่ออีก 10 นาที แล้วนำหลอดเลือดมาเปลี่ยนใส่ Enzyme-free DM และ ใช้ Pasture pipette ดูดขึ้นหลอดเลือดขึ้นลงซ้ำ ๆ จนกว่าจะได้เซลล์หลอดเลือดที่มีลักษณะเป็นรูปกระสวยผิวเรียบ

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด

ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดว่านอึ้งและ สาร 1 ในความเข้มข้นต่าง ๆ และหาจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (Cell survival) ด้วย MTT Cell survival assay ทำการทดลอง 3 ครั้งที่ไม่ขึ้นต่อกันเป็นอย่างน้อย (3 Independent experiments) จากนั้นวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยสถิติ ANOVA หากค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (p value) มีค่าน้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4. การศึกษาในสัตว์ทดลอง (*In vivo*)

กลุ่มสัตว์ทดลองและการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความดันเลือดปอดสูง

การแบ่งกลุ่มและ study protocol ในการเหนี่ยวนำให้หนูมีภาวะความดันเลือดปอดสูง อ้างอิงตามการศึกษาที่เคยมีรายงานมาก่อน (Stenmark et al., 2009) โดยมีรายละเอียดดังนี้

หลังจากเลี้ยงสัตว์ทดลองในสถานสัตว์ทดลองเพื่อการวิจัยเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จะเหนี่ยวนำหนู

ให้มีภาวะความดันเลือดแดงปอดสูง โดยการให้สาร monocrotaline (monocrotaline pyrrole: MCT) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม toxic pyrrolizidine alkaloid (จากพืช *Crotalaria spectabilis*) มีผลทำให้เกิด vascular injury โดยเฉพาะอย่างยิ่งในหนูแรทที่สามารถถูกเหนี่ยวนำโดยการฉีด MCT แบบ subcutaneous หรือ intraperitoneal เพียงครั้งเดียว (Stenmark et al., 2009) ก็จะทำให้เกิดภาวะ pulmonary hypertension ขึ้นภายใน 1-2 สัปดาห์ และมีรายงานว่าสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง PDE5 สามารถป้องกันและรักษาภาวะ pulmonary hypertension ในโมเดลนี้ได้ (Kang et al., 2003; Liu et al., 2007)

หนูแบ่งเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

- 1) กลุ่มควบคุมได้รับ vehicle (propylene glycol)
- 2) กลุ่ม pulmonary arterial hypertension (ได้รับ MCT+propylene glycol)
- 3) กลุ่ม pulmonary arterial hypertension (ได้รับ MCT + สารสกัดว่านอึ้ง 15 mg/kg)
- 4) กลุ่ม pulmonary arterial hypertension (ได้รับ MCT + สารสกัดว่านอึ้ง 450 mg/kg)
- 5) กลุ่ม pulmonary arterial hypertension (ได้รับ MCT + สารสกัดว่านอึ้ง 1,000 mg/kg)
- 6) กลุ่ม pulmonary arterial hypertension (ได้รับ MCT + Sildenafil 20 mg/kg)

หนูกลุ่มควบคุม (control) ถูกป้อนด้วยตัวทำละลายคือ vehicle โดยป้อนด้วยเข็มป้อนสาร ปลายมนเบอร์ 18 ขนาดยาว 4 นิ้ว วันละ 1 ครั้ง ด้วยปริมาตร 0.1 มล./100 ก. น้ำหนักตัว ทุกวัน ติดต่อกันนาน 4 สัปดาห์

หนูกลุ่มความดันเลือดปอดสูง (PAH) ถูกป้อนด้วยตัวทำละลาย โดยป้อนด้วยเข็มป้อนสาร ปลายมนเบอร์ 18 ขนาดยาว 4 นิ้ว วันละ 1 ครั้ง ด้วยปริมาตร 0.1 มล./100 ก. น้ำหนักตัว ทุกวันติดต่อกัน นาน 4 สัปดาห์

หนูกลุ่มทดลอง (PAH + Extract) จะได้รับสารสกัดว่านอึ้ง ขนาด 15, 450, 1,000 มก./กก. น้ำหนักตัว โดยหนูแต่ละตัวถูกป้อนสารสกัด วันละ 1 ครั้ง ด้วยปริมาตร 0.1 มล./100 ก. ทุกวันติดต่อกัน นาน 4 สัปดาห์ โดยเริ่มให้พร้อมกับการได้รับ MCT

หนูกลุ่ม positive control (PAH + Standard drug) ได้รับยา sildenafil ขนาด 20 มก./กก. น้ำหนักตัว โดยหนูแต่ละตัวถูกป้อนยาวันละ 1 ครั้ง ด้วยปริมาตร 0.1 มล./100 ก. ทุกวันติดต่อกัน นาน 4 สัปดาห์

การป้อนสารสกัดหรือยาเริ่มให้พร้อมกับการให้หนูได้รับ MCT เมื่อครบ 4 สัปดาห์ หนูถูกทำให้สลบโดยฉีดยา pentobarbital 50mg/kg เข้าทางช่องท้อง ตัวอย่างเลือดถูกเก็บโดยเจาะจากหัวใจ (Cardiac puncture) เพื่อนำไปวัดระดับ inflammatory marker เช่น IL₆ และ TNF α โดยวิธี ELISA

น้ำหนักตัว น้ำหนักอวัยวะที่สำคัญของสัตว์ทดลอง เช่น หัวใจ ตับ ไต ฤกวัด และมีการศึกษา Histology ของหลอดเลือดปอดและหัวใจเพื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง

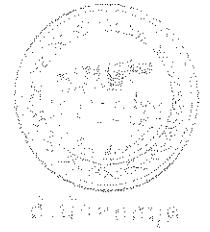
ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของหัวใจและหลอดเลือดในหนูที่มีภาวะความดันเลือดปอดสูง

แบบธรรมดา (LM): ด้วยวิธีการย้อมสี Hematoxylin & Eosin

ทำการเก็บหัวใจและหลอดเลือดปอด แล้วนำไปแช่ใน 4% paraformaldehyde/0.1 M phosphate buffer หรือ Bouin's solution ตัดแบ่งชิ้นเนื้อออกเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็กๆ แล้วนำไปแช่ในอัลกอฮอล์ความเข้มข้นต่างๆ ตามลำดับ (graded series of ethanol) และ xylene จากนั้นนำชิ้นเนื้อฝังลงใน block paraffin เมื่อ paraffin-แข็งตัวดีแล้วทำการตัด section ที่ความหนา 4-6 ไมครอน นำ sections ที่ได้ไปวางลงบน glass slides แล้วทำการดึง paraffin ออกจาก section (deparaffin) โดยการแช่ใน xylene จากนั้นนำน้ำเข้าชิ้นเนื้อโดยการแช่ในอัลกอฮอล์ความเข้มข้นต่างๆ ตามลำดับ (absolute, 95%, 90%, 80%, 70% alcohols and bring to distilled water) ย้อมด้วยสี hematoxylin แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำสะอาด แช่ใน 1% acid alcohol (1% HCl in 70% alcohol) แล้วล้างกรดออกด้วยน้ำสะอาด แช่ใน alkaline solution (28% NH₃ in distilled water) แล้วล้างเบสออกด้วยน้ำสะอาด ย้อมด้วยสี eosin จากนั้นทำการดึงน้ำออก โดยการแช่ในอัลกอฮอล์ความเข้มข้นต่างๆ ตามลำดับ (95% I, 95% II, absolute I, and absolute II alcohols) แล้วล้างเอาสีส่วนเกินออกด้วยการแช่ใน xylene ทำการ mount สไลด์ด้วย permount (cover media) แล้วปิดด้วย coverslip นำสไลด์ไปศึกษาและถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (light microscope) เพื่อทำการรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลในลำดับต่อไป

5. วิเคราะห์ผลการทดลอง

ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยเป็นข้อมูลเชิงปริมาณซึ่งถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยการหาค่าเฉลี่ย (Mean) และความน่าเชื่อถือของค่าเฉลี่ยโดยใช้ค่า standard error of the mean (S.E.M) การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหรือสารสำคัญ ทำโดยวิธี Student t-test และ ANOVA ตามความเหมาะสม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะและจำนวนกลุ่มของข้อมูลที่ต้องการเปรียบเทียบความแตกต่าง และค่า p value <0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



1039531

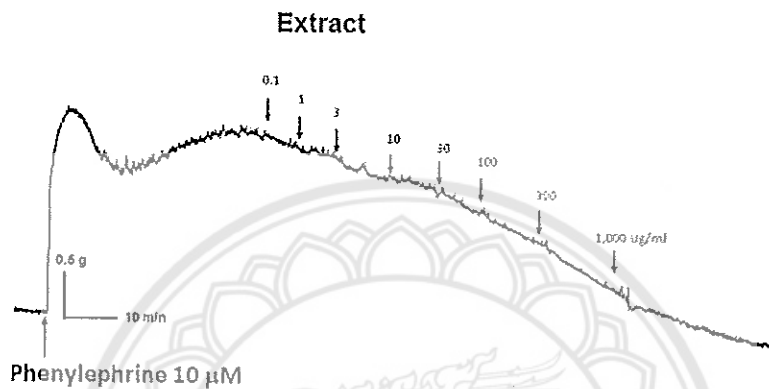
ส.ป.ค.ค.ม.จ.

บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผล

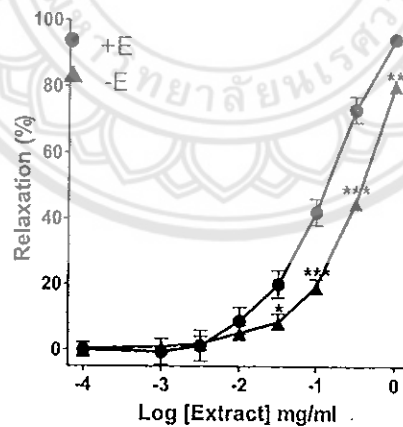
15 ส.ค. 2554

1. ผลของสารสกัดและสารสำคัญต่อหลอดเลือด

สารสกัดว่านอึ้งทำให้หลอดเลือดแดงปอดคลายตัวดังภาพ 4 และ 5 และสามารถทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้ทั้งหลอดเลือดที่มีและไม่มี endothelium (ภาพ 5) ภาวะที่ไม่มี endothelium มีผลลดการคลายตัวของหลอดเลือดเล็กน้อยแต่นัยสำคัญทางสถิติ



ภาพ 4 ตัวอย่างกราฟแสดงผลของสารสกัดว่านอึ้งในการทำให้หลอดเลือดแดงปอดหนูคลายตัว

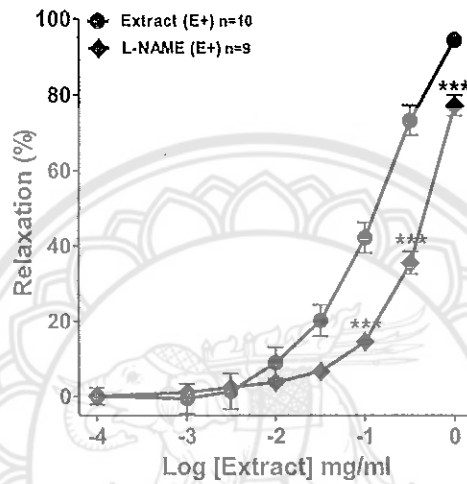


ภาพ 5 ผลของสารสกัดว่านอึ้งที่ทำให้หลอดเลือดแดงปอดที่แยกจากหนูมีการคลายตัว

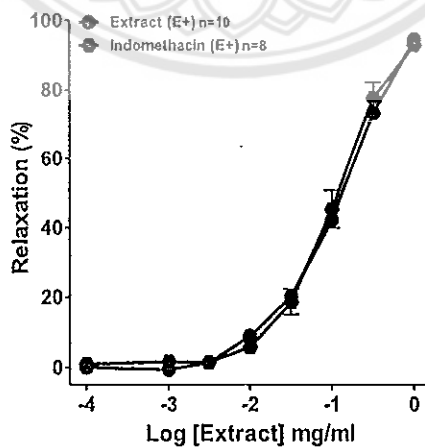
+E คือ มี endothelium และ -E คือ ไม่มี endothelium (n=10)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงว่าสารสกัดทำให้หลอดเลือดแดงปอดขยายโดยผ่านทั้งการกระตุ้น endothelium และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาหากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดต่อ จึงพบว่าการคลายตัวของหลอดเลือดที่มี endothelium นั้นสามารถถูกยับยั้งได้โดย L-NAME ซึ่งเป็น endothelial nitric oxide synthase inhibitor ดังภาพ 6 แต่ไม่สามารถถูกยับยั้งโดย indomethacin ซึ่งเป็น cyclooxygenase inhibitor ดังภาพ 7

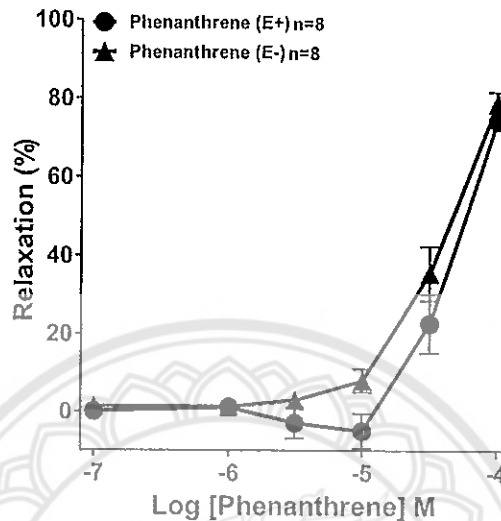


ภาพ 6 ผลของ L-NAME ต่อการคลายตัวของหลอดเลือดปอดที่มีต่อสารสกัด
*** $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Extract (+E))



ภาพ 7 ผลของ Indomethacin ต่อการคลายตัวของหลอดเลือดปอดที่มีต่อสารสกัด

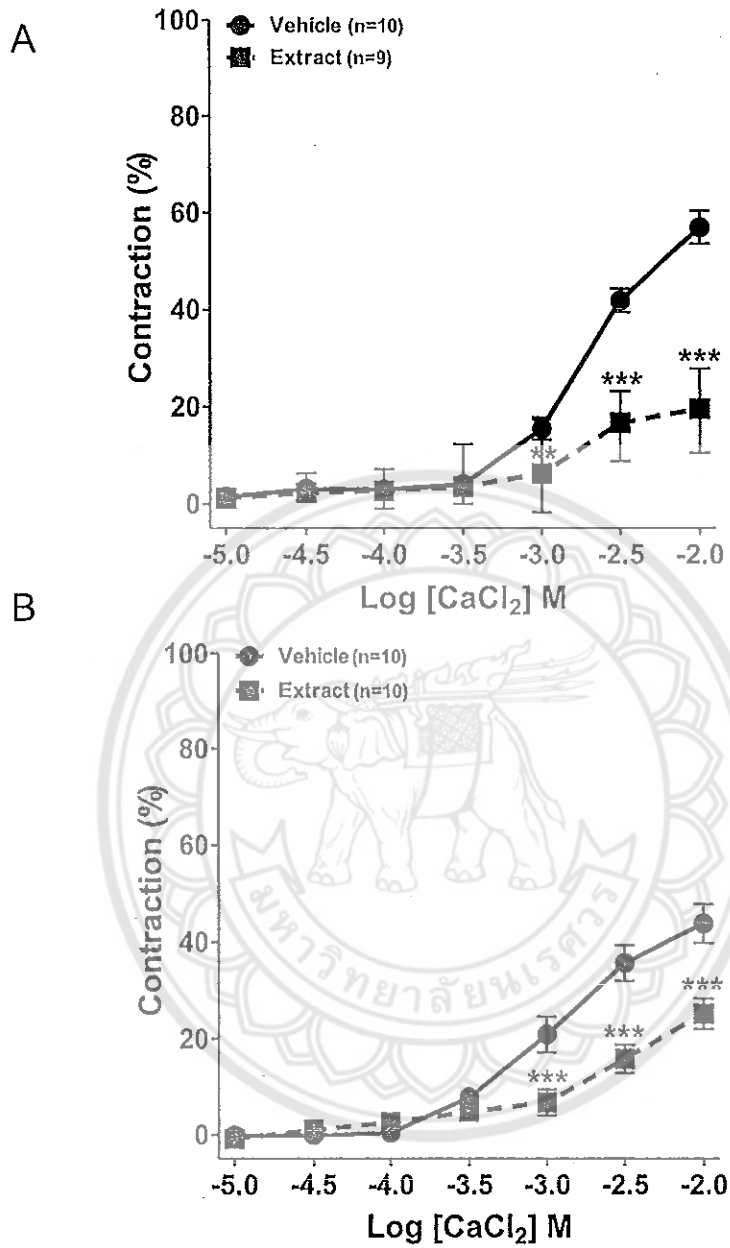
จากการทดสอบสารสำคัญ คือ สาร 1 หรือ phenanthrene (ภาพ 8) พบว่าสารสำคัญสามารถทำให้หลอดเลือดปอดคลายตัวได้เช่นกันทั้งในหลอดเลือดที่มีและไม่มี endothelium



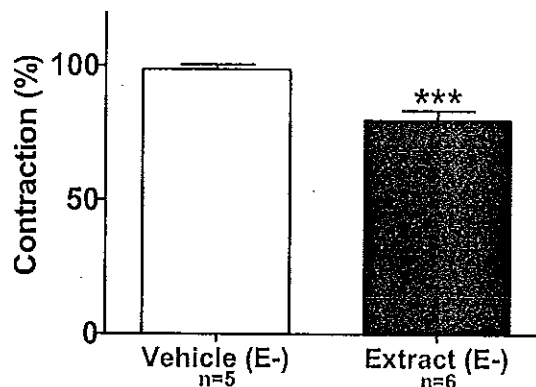
ภาพ 8 ผลของสาร phenanthrene ที่ทำให้หลอดเลือดแดงปอดที่แยกจากหนูมีการคลายตัว +E คือ มี endothelium และ -E คือ ไม่มี endothelium

2. ผลของสารสกัดต่อการเคลื่อนที่ของแคลเซียมจากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์

จากผลการทดลองพบว่า การให้ CaCl_2 สามารถชักนำให้หลอดเลือดหดตัวได้แบบ concentration-dependent ดังภาพ 8 และการ preincubate หลอดเลือดด้วยสารสกัดสามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพ 9) การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดว่านอึ้งมีฤทธิ์ยับยั้งการไหลเข้าเซลล์ของ Ca^{2+} ซึ่งน่าจะส่งผลให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือดได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดที่มีต่อ phenylephrine ในภาวะที่มี verapamil ซึ่งเป็น L-type Ca^{2+} -channel blocker ได้อีกด้วย ดังภาพ 10



ภาพ 9 ผลของสารสกัดที่มีต่อการหดตัวของหลอดเลือดปอดที่ถูกชักนำด้วย phenylephrine (A) หรือ 80mM KCl (B) ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (vehicle)



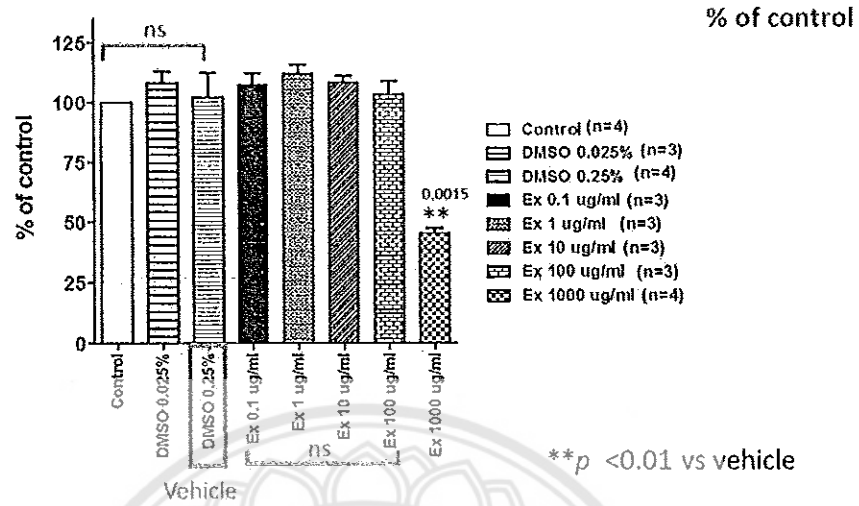
ภาพ 10 ผลของสารสกัดที่มีต่อการหดตัวของหลอดเลือดปอดที่ถูกชักนำด้วย phenylephrine ในภาวะที่มี Ca-channel blocker (verapamil) *** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

3. ความเป็นพิษของสารสกัดและสารสำคัญต่อเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด

จากการศึกษาผลของสารสกัดว่านอึ้งและสารสำคัญ (phenanthrene) ต่อ pulmonary artery smooth muscle cell (PASMC) viability โดย incubated กับสารสกัด หรือ phenanthrene เป็นเวลา 1 ชม. แล้วจึง incubated ต่อด้วย MTT reagent เป็นเวลา 4 ชม. เมื่อเปรียบเทียบ %cell viability กับกลุ่ม control (no treated) พบว่า (ภาพ 11, 12)

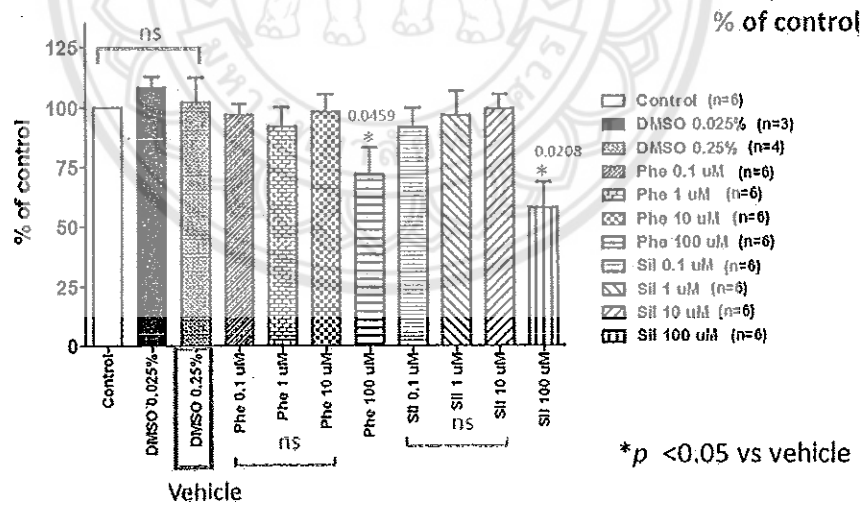
- กลุ่ม Vehicle (DMSO 0.25%) ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเทียบกับกลุ่ม control
- กลุ่มที่ treat ด้วยสารสกัดว่านอึ้งที่ขนาด 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม Vehicle
- กลุ่มที่ treat ด้วยสารสกัดว่านอึ้งที่ขนาด 1,000 $\mu\text{g/ml}$ มี %cell viability ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม Vehicle ($p = 0.0015$)
- กลุ่มที่ treat ด้วยสาร phenanthrene ที่ขนาด 0.1, 1, 10 μM ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม Vehicle
- กลุ่มที่ treat ด้วยสาร phenanthrene ที่ขนาด 100 μM มี %cell viability ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม Vehicle ($p = 0.045$)
- กลุ่มที่ treat ด้วยยา sildenafil ที่ขนาด 0.1, 1, 10 μM ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม Vehicle
- กลุ่มที่ treat ด้วยยา sildenafil ที่ขนาด 100 μM มี %cell viability ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม Vehicle ($p = 0.020$)

Effect of the extract on PSMCs viability (MTT assay)



ภาพ 11 ผลของสารสกัดว่านอังกืความเข้มข้น 0.1-1000 $\mu\text{g/ml}$ ต่อ %Viability ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดที่แยกจากหลอดเลือด pulmonary artery

Effect of the phenanthrene on PSMCs viability (MTT assay)



ภาพ 12 ผลของสาร Phenanthrene และ Sildenafil ที่ความเข้มข้น 0.1-100 μM ต่อ %Viability ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดที่แยกจากหลอดเลือด pulmonary artery

4. ผลของสารสกัดต่อภาวะ PAH

กลุ่มสัตว์ทดลองและการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความดันเลือดแดงปอดสูง (Pulmonary arterial hypertension: PAH)

การแบ่งกลุ่มและ study protocol ในการเหนี่ยวนำให้หนูมีภาวะ PAH มีรายละเอียดโดยย่อ ดังนี้

หลังจากเลี้ยงสัตว์ทดลองที่สถานสัตว์ทดลองเพื่อการวิจัยเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ผู้วิจัยได้ชักนำให้หนูมีภาวะความดันเลือดแดงปอดสูงด้วยสาร monocrotaline (MCT) โดยการฉีดแบบ subcutaneous ซึ่งพบว่าสามารถทำให้เกิดภาวะ PAH ขึ้นภายใน 1-2 สัปดาห์

หนูแบ่งเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

- 1) กลุ่มควบคุมได้รับ vehicle (propylene glycol)
- 2) กลุ่ม PAH (ได้รับ MCT + propylene glycol)
- 3) กลุ่ม PAH (ได้รับ MCT + สารสกัดว่านอึ้ง 15 mg/kg)
- 4) กลุ่ม PAH (ได้รับ MCT + สารสกัดว่านอึ้ง 450 mg/kg)
- 5) กลุ่ม PAH (ได้รับ MCT + สารสกัดว่านอึ้ง 1,000 mg/kg)
- 6) กลุ่ม PAH (ได้รับ MCT + Sildenafil 20 mg/kg)

การป้อนสารสกัดหรือยาเริ่มให้พร้อมกับการให้หนูได้รับ MCT และเมื่อครบ 4 สัปดาห์ หนูถูกทำให้สลบโดยฉีดยา pentobarbital 50mg/kg เข้าทางช่องท้อง ตัวอย่างเลือดได้ถูกเก็บโดยเจาะจากหัวใจ (Cardiac puncture) เพื่อนำไปวัดระดับ inflammatory marker เช่น IL₆ และ TNF α โดยวิธี ELISA

น้ำหนักตัวและน้ำหนักอวัยวะที่สำคัญของสัตว์ทดลอง เช่น หัวใจ ตับ ไต ถูกวัด เพื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง

ผลการทดลอง

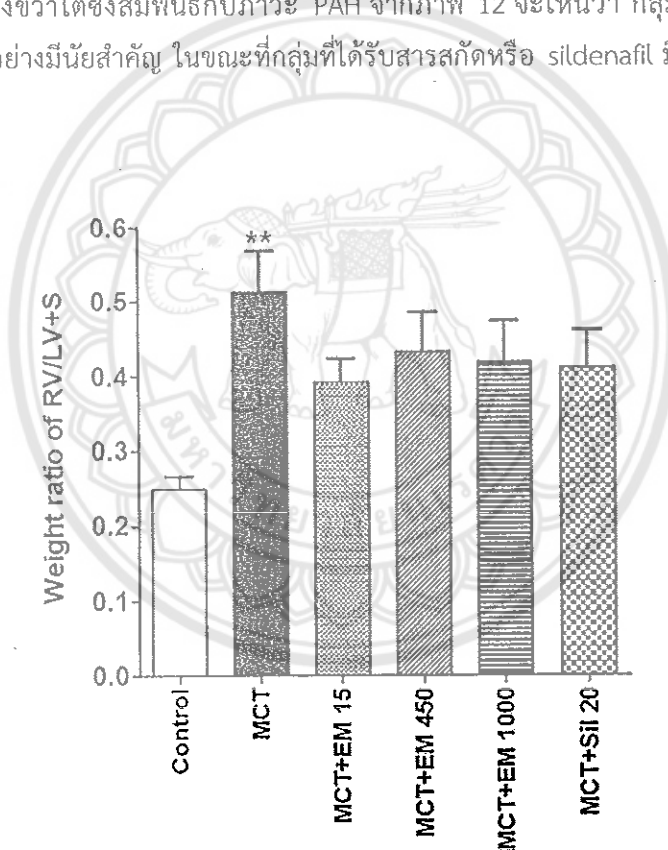
- กลุ่มควบคุมที่ได้รับ vehicle (propylene glycol) ไม่พบว่ามีอาการเปลี่ยนแปลงใด ๆ เกิดขึ้น
- กลุ่ม PAH ที่ได้รับ MCT + propylene glycol พบว่า MCT สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ PAH ได้ เนื่องจากพบมีการเพิ่มขึ้นของ Right ventricular/(Left ventricular+Septum) (RV/LV+S, ภาพ 13), ความหนาของผนังหลอดเลือด pulmonary artery (medial wall thickness) (ภาพ 14) และขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างขวา (right ventricular myocyte cross sectional area) (ภาพ 15) อย่างมีนัยสำคัญ
- กลุ่ม PAH (ได้รับ MCT + สารสกัดว่านอึ้ง 15 mg/kg) พบว่าสามารถป้องกันการเกิด PAH ได้ เนื่องจากมีผลลดขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างขวา (ภาพ 15)
- กลุ่ม PAH (ได้รับ MCT + สารสกัดว่านอึ้ง 450 mg/kg) พบว่าสามารถป้องกันการเกิด PAH ได้เนื่องจากมีผลลดทั้งความหนาของผนังหลอดเลือด pulmonary artery (medial wall thickness) (ภาพ 14) และขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างขวา (right ventricular myocyte cross sectional area) (ภาพ 15) อย่างมีนัยสำคัญ
- กลุ่ม PAH (ได้รับ MCT + สารสกัดว่านอึ้ง 1000 mg/kg) พบว่าสามารถป้องกันการเกิด PAH

ได้เนื่องจากมีผลลดทั้งความหนาของผนังหลอดเลือด pulmonary artery (medial wall thickness) (ภาพ 14) และขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างขวา (right ventricular myocyte cross sectional area) (ภาพ 15) อย่างมีนัยสำคัญ

- กลุ่ม PAH (ได้รับ MCT + Sildenafil 20 mg/kg) พบว่าสามารถป้องกันการเกิด PAH ได้ เนื่องจากมีผลลดทั้งความหนาของผนังหลอดเลือด pulmonary artery (medial wall thickness) (ภาพ 14) และขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างขวา (right ventricular myocyte cross sectional area) (ภาพ 15) อย่างมีนัยสำคัญ

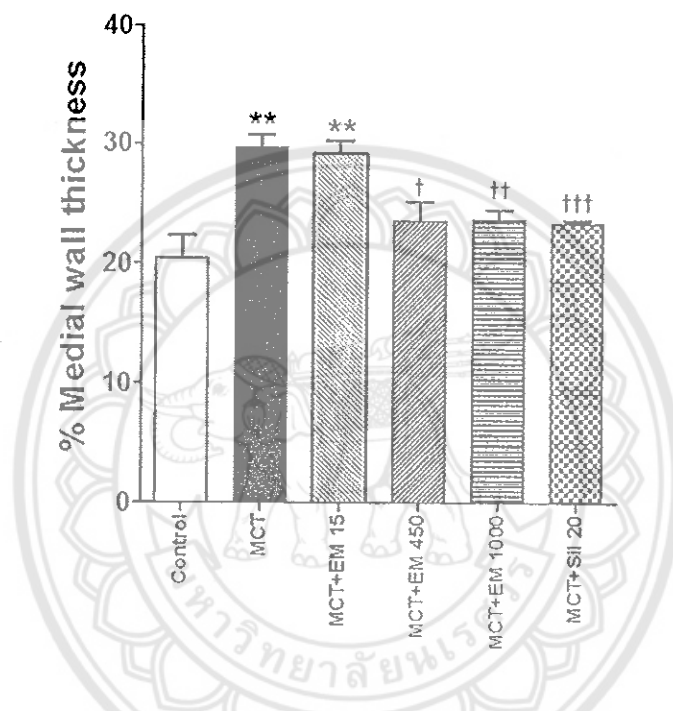
ผลการศึกษาในประเด็นต่าง ๆ มีรายละเอียดโดยย่อ ดังนี้

Right ventricular/(Left ventricular+Septum) (RV/LV+S, ภาพ 12): ค่านี้เป็นตัวบ่งชี้ภาวะหัวใจห้องล่างขวาโตซึ่งสัมพันธ์กับภาวะ PAH จากภาพ 12 จะเห็นว่า กลุ่มที่เป็น PAH มีค่า RV/LV+S เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหรือ sildenafil มีแนวโน้มทำให้ค่า RV/LV+S ลดลง



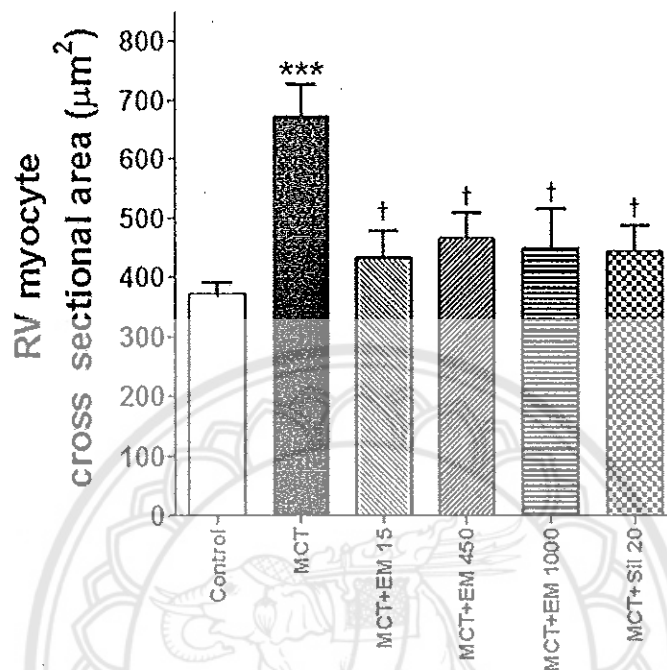
ภาพ 13 ผลของสารสกัดว่านอึ้ง (EM) ต่อค่า Ratio ของ Right ventricular/(Left ventricular+Septum) (RV/LV+S) (** $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)

Medial wall thickness หรือความหนาของผนังหลอดเลือดแดงปอด (ภาพ 14): ค่านี้บ่งชี้ว่าเกิด vascular remodeling ของหลอดเลือดซึ่งอาจเกิดจากกระบวนการอักเสบที่ทำให้หลอดเลือดได้รับความเสียหาย จากผลการทดลองพบว่าภาวะ PAH ส่งผลให้ medial wall thickness เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ การให้สารสกัดขนาด 450 mg/kg, 1,000 mg/kg หรือ sildenafil มีผลลด medial wall thickness อย่างมีนัยสำคัญแสดงว่าสารสกัดและ sildenafil มีผลในการป้องกันการเกิด vascular remodeling ซึ่งเป็นหนึ่งในพยาธิสภาพที่ทำให้เกิด PAH



ภาพ 14 ผลของสารสกัดว่านอึ้ง (EM) ต่อค่า Medial wall thickness (** $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับ กลุ่มควบคุม † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับ MCT group)

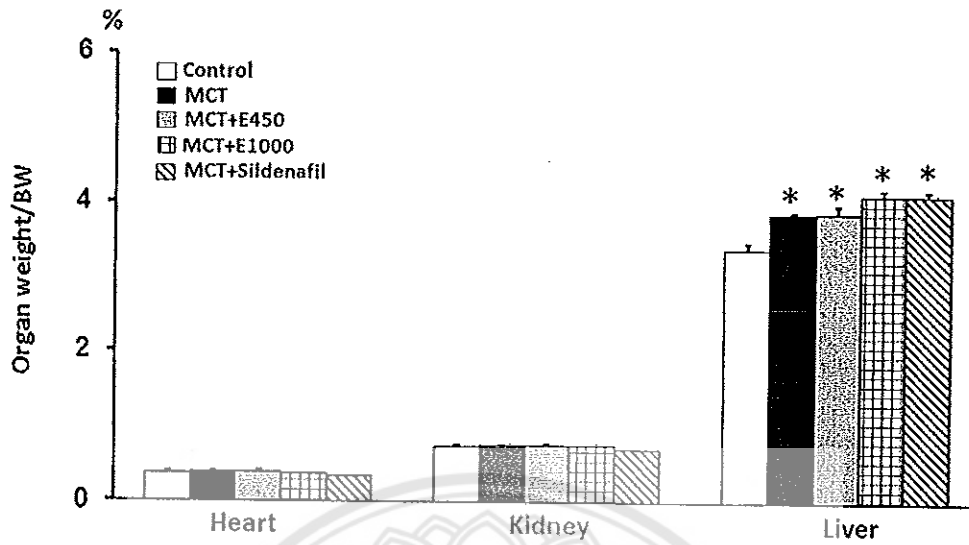
Right ventricular (RV) myocyte cross sectional area หรือขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (ภาพ 15): ค่านี้บ่งชี้ว่าเกิด RV hypertrophy ของหัวใจห้องล่างขวาจากภาวะ PAH จากผลการทดลองพบว่าภาวะ PAH ส่งผลให้ RV cross sectional area เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ การให้สารสกัดขนาด 15, 450, 1,000 mg/kg หรือ sildenafil มีผลลด medial wall thickness อย่างมีนัยสำคัญแสดงว่าสารสกัดว่านอึ้งและ sildenafil มีผลในการป้องกันการเกิด RV hypertrophy ซึ่งเป็นหนึ่งในพยาธิสภาพที่เป็นผลของ PAH



ภาพ 15 ผลของสารสกัดว่านอี้ง (EM) ต่อค่า Medial wall thickness (** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม † $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ MCT group)

5. ผลของสารสกัดต่อน้ำหนักอวัยวะหนูที่มีภาวะ PAH

จากภาพ 16 จะเห็นว่า ratio ของน้ำหนักหัวใจ และน้ำหนักไตไม่แตกต่างกันในหนูแต่ละกลุ่ม แต่ น้ำหนักตับต่อน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับ MCT เนื่องจาก MCT มีพิษต่อตับ



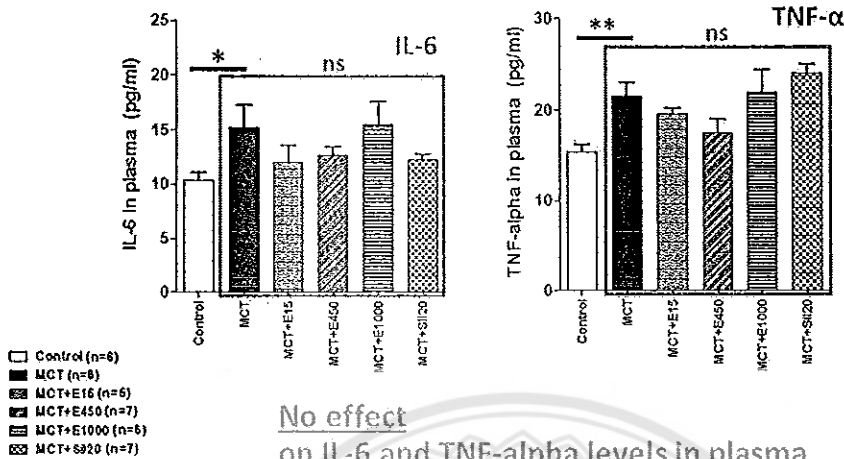
ภาพ 16 ผลของสารสกัดว่านอังกืต่อค่า Ratio ของ Organ weight/Body weight เมื่อคิดเป็น %
 (* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)

6. ผลของสารสกัดต่อระดับ Inflammatory cytokines ได้แก่ TNF alpha และ IL-6 ใน plasma

ระดับ TNF alpha และ IL-6 ใน plasma กลุ่ม MCT induced-PAH rat สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control แต่เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดว่านอังกืที่ขนาดต่าง ๆ 15, 450 และ 1,000 mg/kg และยา Sildenafil (20 mg/kg) กลุ่ม PAH rat พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเก็บ ดังภาพ 17

Effect of the extract on cytokine levels in plasma

** p < 0.01 vs. Control; * p < 0.05 vs. Control



No effect
on IL-6 and TNF-alpha levels in plasma

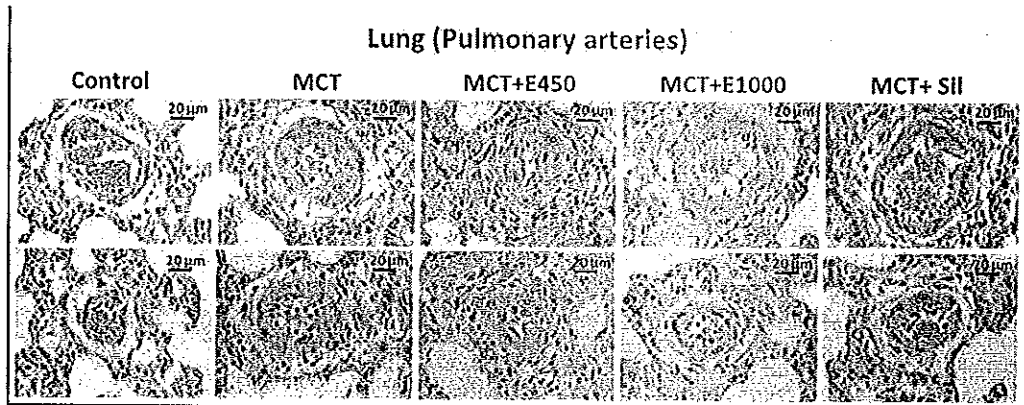
ภาพ 17 ผลของสารสกัดว่านอังกืต้อระดับ IL-6 และ TNF-alpha ใน plasma (*p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)

7. ผลของสารสกัดต่อ Histology ของหลอดเลือดและหัวใจ

ผลต่อ Histology ของ Pulmonary artery

จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของหลอดเลือดแดงปอดพบว่าในหนูแรทกลุ่ม PAH มีขนาดความหนาของชั้น tunica media ที่เพิ่มขึ้นในหลอดเลือดแดงปอดทั้ง pulmonary artery และ arterioles เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม control

หนูกลุ่มที่ถูกป้อนด้วยสารสกัดว่านอังกืต้อขนาด 450 mg/kg และ 1,000mg/kg หรือกลุ่มที่ถูกป้อนด้วยยา Sildenafil 20mg/kg มีขนาดความหนาของหลอดเลือดแดงปอดที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PAH ดังภาพ 18

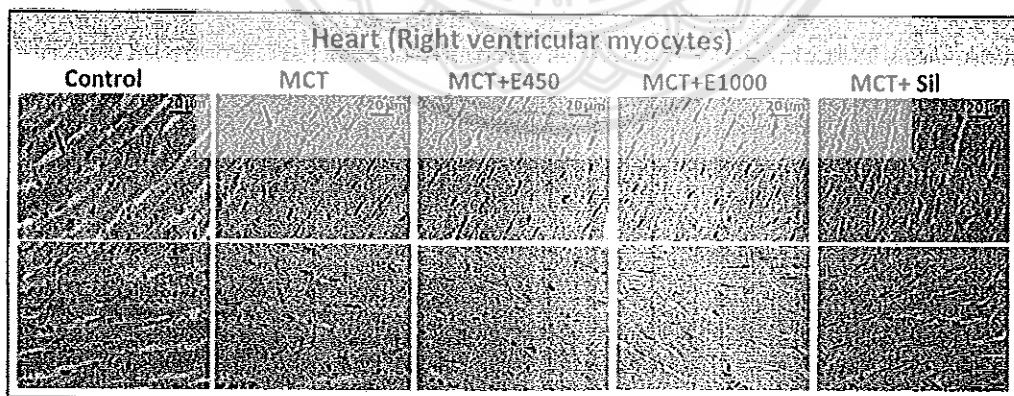


ภาพ 18 ผลของสารสกัดว่านอังก๋ต Histology ของปอด และ หลอดเลือด pulmonary artery

ผลต่อ Histology ของ Right ventricle

จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างขวา (Right ventricular myocardium) พบว่า หนูแรทกลุ่ม PAH มีเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม control

หนูกลุ่มที่ถูกป้อนด้วยสารสกัดว่านอังก๋ต ขนาด 450 mg/kg และ 1,000 mg/kg หรือกลุ่มที่ถูกป้อนด้วยยา Sildenafil 20mg/kg มีขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PAH ดังภาพ 19



ภาพ 19 ผลของสารสกัดว่านอังก๋ต Right ventricle

บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองสรุปประเด็นสำคัญได้ดังนี้

1. สารสกัดว่านอึ้งมีผลทำให้หลอดเลือดปอดคลายตัวได้ดีกว่าหลอดเลือดเอออดาร์แสดงว่าสารสกัดว่านอึ้งมีความจำเพาะเจาะจงต่อระบบไหลเวียนเลือดปอดมากกว่าระบบไหลเวียนเลือดทั่วร่างกาย
2. การขูดเอา endothelium ออกหรือการให้สาร L-NAME มีผลลดการคลายตัวของหลอดเลือดแสดงว่าสารสกัดออกฤทธิ์ผ่าน endothelium โดยผ่านการหลั่งสาร nitric oxide
3. สาร sodium nitroprusside มีผลเสริมฤทธิ์สารสกัด ดังนั้นสารสกัดจึงน่าจะออกฤทธิ์โดยยับยั้ง PDE5 ได้เช่นกัน
4. สารสกัดยังสามารถยับยั้งการไหลเข้าของ Ca^{2+} สู่มิตอคอนเดรียของหลอดเลือด และยับยั้งการหลั่งของ Ca^{2+} ออกจาก sarcoplasmic reticulum กลไกเหล่านี้ล้วนเป็นกลไกที่สัมพันธ์กับการคลายตัวของหลอดเลือด
5. สารสำคัญ คือ phenanthrene มีผลทำให้หลอดเลือดแดงปอดขยายได้เช่นเดียวกับสารสกัด
6. สารสกัดสามารถป้องกันพยาธิสภาพที่เกิดจากภาวะ PAH ได้ดีไม่แตกต่างจากยา sildenafil กล่าวคือสารสกัดและยา sildenafil มีผลลดความหนาของผนังหลอดเลือดและลดขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างซึ่งเป็นพยาธิสภาพที่เกิดเมื่อมีภาวะ PAH ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารสกัดว่านอึ้งมีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดแดงปอดขยายและส่งผลป้องกันการเกิดพยาธิสภาพของภาวะ PAH

บรรณานุกรม

- กฤตย์วิกรม ดุรงค์พิศิษฐ์กุล, รัตนาดี ณ นคร, สุรีย์ สมประดีกุล, บรรณาธิการ .Pulmonary Hypertension 2009) Raising the Bar for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension(. กรุงเทพฯ:ห้างหุ้นส่วนจำกัด นิวไพบาลการพิมพ์ ; 2552.
- Archer SL, Michelakis ED. Phosphodiesterase type 5 inhibitors for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 2009;5;361(19):1864-71
- Chootip K, Gurney A, Kennedy C. Multiple P2Y receptors couple to calcium-dependent, chloride channels in smooth muscle cells of the rat pulmonary artery. *Respir Res.* 2005;6(1):124.
- Corbin JD, Beasley A, Blount MA, Francis SH. High lung PDE5:A strong basis for treating pulmonary hypertension with PDE5 inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;334(3):930-8.
- Delpy E, Le AC, Gouville MD. Cardiovascular effects of a novel, potent and selective phosphodiesterase 5 inhibitor, DMPPO: in vitro and in vivo characterization. *British Journal of Pharmacology* 1996;118:1377-84.
- Ghofrani HA, Pepke-Zaba J, Barbera JA, Channick R, Keogh AM, Gomez-Sanchez MA, Kneussl M, Grimminger F. Nitric oxide pathway and phosphodiesterase inhibitors in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2004;16;43(12 SupplS):68S-72S.
- Hoepfer MM, Ghofrani HA, Gorenflo M, Grünig E, Schranz D, Rosenkranz S; European Society of Cardiology (ESC) und European Respiratory Society (ERS). [Diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: European guidelines 2009]. *Pneumologie.* 2010;64(7):401-14.
- Kamkaew N, Scholfield CN, Ingkaninan K, et al. Bacopa monnieri and its constituents is hypotensive in anaesthetized rats and vasodilator in various artery types. *J Ethnopharmacol.* 2011;137(1):790-795.
- Matsubara H, Ogawa A. Treatment of idiopathic/hereditary pulmonary arterial hypertension. *J Cardiol.* 2014; 28.:pii: S0914-5087(14)00183-X. doi: 10.1016/j.jjcc.2014.06.009

Pauvert O, Lugnier C, Keravis T, Marthan R, Rousseau E, and Savineau JP. Effect of sildenafil on cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, vascular tone and calcium signaling in rat pulmonary artery. *British Journal of Pharmacology* 2003;139:513-522.

Rabe KF, Tenor H, Dent G, Schudt C, Nakashima M, and Magnussen H. Identification of PDE isozymes in human pulmonary artery and effect of selective PDE inhibitors. *The American Physiological Society*. 1994;L536-543.

Temkithawon P. Investigation of phosphodiesterase 5 inhibitors from some Thai medicinal plants. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2014;16(1):43-65. doi: 10.1007/s40272-013-0052-2.

