เนื้อหางานวิจัยประกอบด้วย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดสะระแหน่ในการลดความดันเลือด, ปรับเปลี่ยนสถานะพลศาสตร์การไหลเวียนเลือดและเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของหลอดเลือดในหนูทดลองความดันเลือดสูง
2. เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดสะระแหน่ในการกำจัดอนุมูลอิสระและลดภาวะเครียดออกซิเดชันในหนูทดลองความดันเลือดสูง
3. เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดสะระแหน่ต่อการขยายตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่เออร์ตาในหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วย 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: ทำการเก็บผักสะระแหน่ในฤดูกาลที่มีผลผลิตมากจากแหล่งเพาะปลูกในเขตอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่นและ ตัวอย่างพืชจะเก็บรักษาเพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์ นำส่วนใบสะระแหน่สกัดสดๆด้วยน้ำ เพื่อให้เหมือนกับการนำไปบริโภคทั่วไป โดยทำการหั่นตัวอย่างสะระแหน่เป็นชิ้นย่อยๆ ใส่ลงในน้ำกลั่น และต้มที่อุณหภูมิราว 95° ซ เป็นเวลา 30 นาที กรองเอาน้ำสกัดผักไปทำการระเหิดให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer จนได้เป็นผงแห้ง เก็บสารสกัดผงแห้งในขวดทึบแสงที่สะอาดปราศจากเชื้อและมีฝาปิดมิดชิด ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ -20°ซ

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

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

แผนการทดลอง

1. สกัดสะระแหน่ทำการศึกษาในหนูทดลองความดันเลือดสูง in vivo ใน 2 การทดลองคือ

1.1 ผลของสารสกัดสะระแหน่ต่อการป้องกันความดันเลือดสูงจากการชักนำด้วยสาร L-NAME (protective effects)

2.2 ผลของสารสกัดสะระแหน่ต่การลดความดันเลือดสูงจากการชักนำด้วยสาร L-NAME (therapeutic effects)

2. การตรวจวัด oxidative stress markers

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

วิธีการทดลอง

1.1 ผลของสารสกัดสะระแหน่ต่อการป้องกันความดันเลือดสูงจากการชักนำด้วยสาร 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 เป็นกลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติที่ถูกป้อนด้วยสารสกัดสะระแหน่ ขนาดความเข้มข้น (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 สัปดาห์โดยจะถูกป้อนด้วยน้ำเป็นเวลา 2 สัปดาห์ คือเริ่มสัปดาห์ที่ 4 และ 5

(4) Hypertensive rats treated with MC extract group เป็นกลุ่มหนูทดลองความดันเลือดสูงที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วย L-NAME 5 สัปดาห์ ที่ถูกป้อนด้วยสกัดสะระแหน่ขนาดความเข้มข้นต่ำ (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 Plethymosgraphy (IITC model 179 blood pressure analyzer) เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าความดันเลือดจนเสร็จสิ้นการทดลอง

(2) การประเมินการเปลี่ยนแปลงพลศาสตร์การไหลเวียนเลือด

เมื่อครบกำหนดหนูทดลองในแต่ละกลุ่มการทดลองจะถูกทำให้สลบด้วยการฉีดยาสลบ Nembutal (50 mg/kg) เข้าทางช่องท้อง เมื่อสลบเรียบร้อยแล้ว ทำการผ่าตัดเปิดหลอดลมเพื่อช่วยหายใจ 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) โดยการคล้อง blood flow probe ขนาดที่พอเหมาะเข้าที่หลอดเลือด abdominal aorta ช่วงใต้ไต และวัดอัตราการไหลของเลือดโดยใช้เครื่อง electromagnetic flowmeter (Carolina Medical Electronics, Inc., U.S.A) ระหว่างการทดลองอุณหภูมิของหนูทดลองจะถูกควบคุมให้คงที่ประมาณ 37°C ด้วยผ้าห่มไฟฟ้าและแสงไฟ อุณหภูมิแกนวัดโดยใช้ electronic rectal temperature probe ต่อกับเครื่องวัด

อุณหภูมิ (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)

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

(4) การวิเคราะห์ทางชีวเคมี (Biochemical assays)

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

(5) การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดสะระแหน่ต่อการขยายตัวของหลอดเลือดในหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วย 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 ,$MgSO_4$.7H2O 1.18 Glucose 11.0 mmol/L, $NaHCO_3$ 25 mM, $CaCl_2$.2H2O_2.5 mM) อุณหภูมิ 37 °C และเติม O_2% 95 และ CO_2 5% ตลอดเวลา จากนั้นปล่อยให้หลอดเลือดเข้าสู่ภาวะสมดุลประมาณ 90 นาที ก่อนการทดลอง จากนั้นหลอดเลือดแดงใหญ่เออร์ตาจะถูกเพิ่มความตึงตัวด้วยสาร phenylnephrine (0.1-1 μM)

ในการทดลองครั้งนี้แบ่งในหนูทดลองออกเป็น 4 กลุ่มคือ

1 Control group + vehicle (น้ำ) เป็นหนูปกติที่ได้ทดสอบด้วยสารที่ใช้ละลายสะระแหน่คือน้ำ

2 Normotensive group + MC เป็นหนูปกติที่ได้ทดสอบการตอบสนองของหลอดเลือดด้วยสารสกัดสะระแหน่ความเข้มข้น (10-1000 μg/ml)

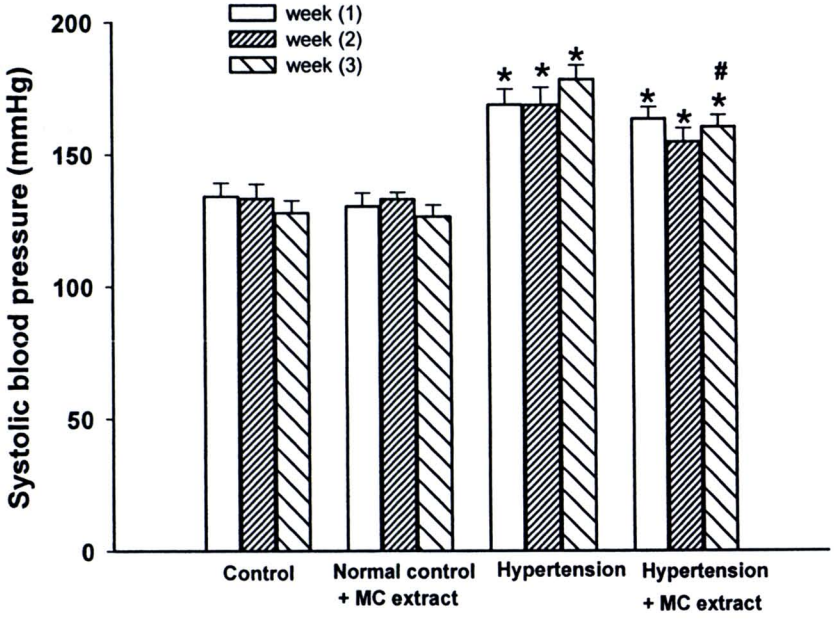
3 Hypertensive group + vehicle (น้ำ) เป็นหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความดันเลือดสูงด้วย L-NAME (50 mg/kg) โดยผสมในน้ำดื่มให้หนูทดลองดื่มเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3 แต่ใช้น้ำแทนสารสกัดสะระแหน่

4 Hypertensive group + MC เป็นหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความดันเลือดสูงด้วย L-NAME (50 mg/kg) โดยผสมในน้ำดื่มให้หนูทดลองดื่มเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ทดสอบด้วยสารสกัดสะระแหน่ความเข้มข้น (10-1000 μg/ml)

ผลการทดลอง

1. ฤทธิ์ป้องกัน (Preventive effects) ความดันเลือดสูงในหนูทดลองที่ได้รับสาร L-NAME

การทดลองครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์ป้องกันความดันเลือดสูงที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารยับยั้งการสร้าง nitric oxide (protective effects) ของสารสกัดสะระแหน่ โดยทำการป้อนสารสกัดสะระแหน่พร้อมทั้งให้สาร L-NAME (50 mg/kg/day) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ผลการทดลองจากการวัดความดันเลือดที่หางหนูสัปดาห์ละครั้งพบว่าในหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME จะมีค่าความดันเลือดซีสโทลิก (systolic pressure; SP) เท่ากับ 168.7 ± 5.8 mmHg ในสัปดาห์ที่ 1 ซึ่งมีค่ามากกว่าความดันเลือดซิสโทลิกในหนูทดลองที่ไม่ได้รับ L-NAME (134.1 ± 5.03 mmHg) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และค่าความดันเลือดซีสโทลิกนี้มีค่าสูงกว่าในหนูทดลองที่ไม่ได้รับ L-NAME ในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 และพบว่าสารสกัดสะระแหน่ไม่มีผลลดความดันเลือดในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดปกติทั้งในสัปดาห์ที่ 1, 2 และ 3 อย่างไรก็ตามในสัปดาห์ที่ 3 สารสกัดสะระแหน่มีฤทธิ์ป้องกันความดันเลือดสูงเนื่องจากการให้สาร L-NAME นั่นคือในหนูทดลองที่ได้รับสาร L-NAME พร้อมทั้งป้อนสารสกัดจะมีความดันเลือดซิสโทลิกเท่ากับ 160.2 ± 4.5 mmHg ซึ่งน้อยกว่าหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสาร L-NAME (178.2 ± 5.4 mmHg) อย่างเดียว ($P < 0.05$) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงค่าความดันเลือดซิสโทลิก (Systolic pressure; SP) ในสัปดาห์ที่ 1, 2 และ 3 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)

ผลของสารสกัดสะระแหน่ต่อความดันเลือดและอัตราการเต้นของหัวใจ

ในสัปดาห์ที่ 3 ของการทดลอง หนูทดลองจะถูกวัดความดันเลือดและอัตราการเต้นของหัวใจทางหลอดเลือดแดง (femoral artery) ซึ่งผลการทดลองพบว่าสอดคล้องกับผลของการวัดความดันเลือดทางหางนั่นคือหนูทดลองที่ได้รับสาร L-NAME (50mg/kg) เป็นเวลา 3 สัปดาห์มีค่าความดันเลือดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P <0.001$) ทั้งค่าความดันเลือดซีส

โทลิกและไดแอสโทลิก (199.1 ± 3.2, 129.1 ± 3.5 mmHg ตามลำดับ) โดยมีความดันเลือดเลือดแดงเฉลี่ยเท่ากับ 162.3 ± 2.7 mmHg เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำดื่มปกติซึ่งมีค่าความดันเลือดซีสโทลิกและไดแอสโทลิกและค่าความดันเลือดเลือดแดงเฉลี่ยเท่ากับ 129.6 ± 5.1, 76.1 ± 7.7 และ 92.9 ± 5.4 mmHg ตามลำดับ นอกจากนี้ในกลุ่มหนูทดลองที่ที่ได้รับ L-NAME พร้อมทั้งป้อนสารสกัดสะระแหน่ (200 mg/kg) มีค่าความดันเลือดซีสโทลิกและไดแอสโทลิกและค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) (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 และถูกป้อนด้วยสารสกัดสะระแหน่ (200 mg/kg) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าสารสกัดสะระแหน่เพิ่มค่าการไหลของเลือดไปยังท่อนล่างและขาหลัง (5.4 ± 0.3 ml/100 g tissue/min) ($P< 0.05$) นอกจากนี้เมื่อคำนวณหาค่าความทานต่อการไหลของเลือดไปยังท่อนล่างและขาหลังพบว่าในหนูทดลองที่ได้รับสาร 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 และถูกป้อนด้วยสารสกัดสะระแหน่ (200 mg/kg) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าสารสกัดสะระแหน่สามารถลดค่าความต้านทานต่อการไหลของเลือดไปยังท่อนล่างและขาหลัง 28.5 ± 2.2 mmHg/min/100 g/ml ($P< 0.05$)

สำหรับค่าอัตราเต้นของหัวใจในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดปกติมีค่าเท่ากับ 331.7 ± 16.2 ครั้ง/นาที ในหนูทดลองที่ได้รับสาร L-NAME (50mg/kg) เป็นเวลา 3 สัปดาห์มีค่าอัตราการเต้นของหัวใจสูงกว่ากลุ่มความดันเลือดปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือมีค่า เท่ากับ 414.7 ± 13.1ครั้ง/นาที แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดสะระแหน่ไม่มีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจนั่นคือในหนูความดันเลือดปกติที่ได้รับสะระแหน่มีค่าเท่ากับ 368.3 ± 8.8ครั้ง/นาที และในกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับสาร L-NAME (50mg/kg) เป็นเวลา 3 สัปดาห์พร้อมทั้งได้รับสะระแหน่มีอัตราการเต้นของหัวใจเท่ากับ 363.5 ± 9.3ครั้ง/นาที ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงค่าความดันเลือดซิสโทลิก (systolic pressure; SP) ความดันไดแอสโทลิก (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 ± 3.2*	176.4 ± 4.8*#
DBP (mmHg)	76.1 ± 7.7	74.1 ± 4.8	129.1 ± 3.5*	98.8 ± 6.3*#
MAP (mmHg)	92.9 ± 5.4	102.5 ± 4.7	162.3 ± 2.7*	135.1 ± 5.8*#
HBF (ml/100 g tissue/min)	6.8 ± 0.3	7.4 ± 0.6	3.6 ± 0.2*	5.4 ± 0.3*#
HVR(mmHg/min/100 g/ml)	12.6 ± 0.6	15.3 ± 1.8	39.1 ± 3.8*	28.5 ± 2.2*#
HR (beat/min)	331.7 ± 16.2	368.3 ± 8.8	414.7 ± 13.1*	363.5 ± 9.3#

ผลการตอบสนองของสารที่มีผลต่อหลอดเลือด (Vascular reactivity assessments)

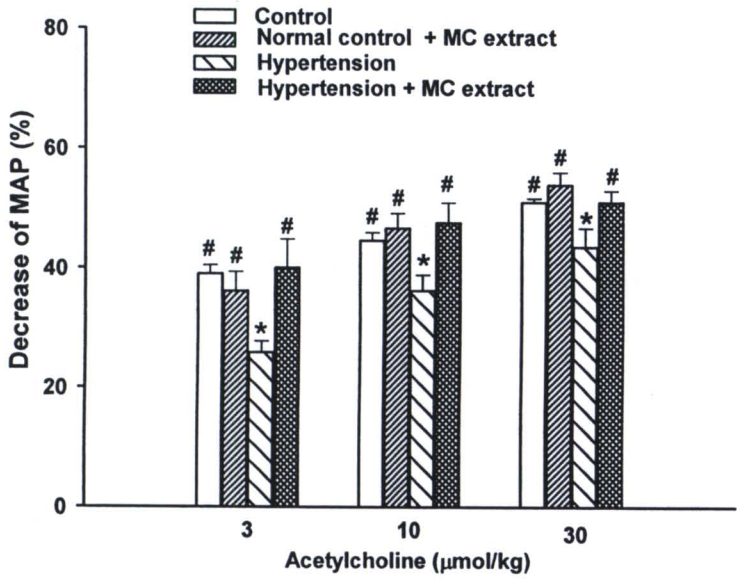
จากการทดสอบการทำงานของหลอดเลือดโดยใช้สารที่มีผลต่อหลอดเลือด 3 ชนิด คือAcetylcholine (ACh; endothelium dependent relaxation) 3, 10, 30 nmol/kg, Sodium nitroprusside (SNP; endothelium independent relaxation) 1, 3, 10 nmol/kg และ Phenylephine (PE; alpha1 adrenoceptor agonist) 0.01, 0.03, 0.1 μmol/kg. พบว่าหนูทดลองในแต่ละกลุ่มจะตอบสนองต่อ 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 ร่วมกับการป้อนด้วยสารสกัดสะระแหน่ขนาดความเข้มข้น 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 ร่วมกับการป้อนด้วยสารสกัดสะระแหน่เป็นเวลา 3 สัปดาห์นั้นไม่แตกต่างกับหนูทดลองความดันเลือดสูงที่ได้รับ L-NAME เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ 2B

ผลของสารสกัดสะระแหน่ต่อระดับ MDA ในพลาสมา และ การสร้าง superoxide ในหลอดเลือด carotid arteries

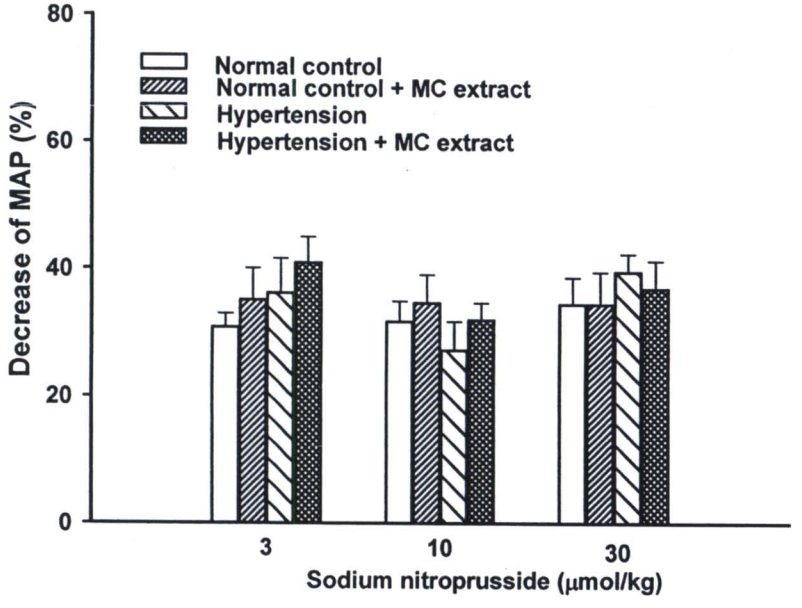
ผลการทดลองทางชีวเคมีพบว่าระดับ MDA ในพลาสมา และ superoxide ในหลอดเลือด carotid artery ของหนูทดลองความดันเลือดสูงเนื่องจากได้รับสาร L-NAME (50mg/kg/day) (9.8 ± 0.8 μM, 78.5 ± 8.3 count/mg dry weight/min ตามลำดับ) สูงกว่ากลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติ (3.6 ± 0.7 μM, 48.9 ± 14.2 count/mg dry weight/min ตามลำดับ)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

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 01 ต.ค. 2555
เลขทะเบียน 247340
เลขเรียกหนังสือ

A

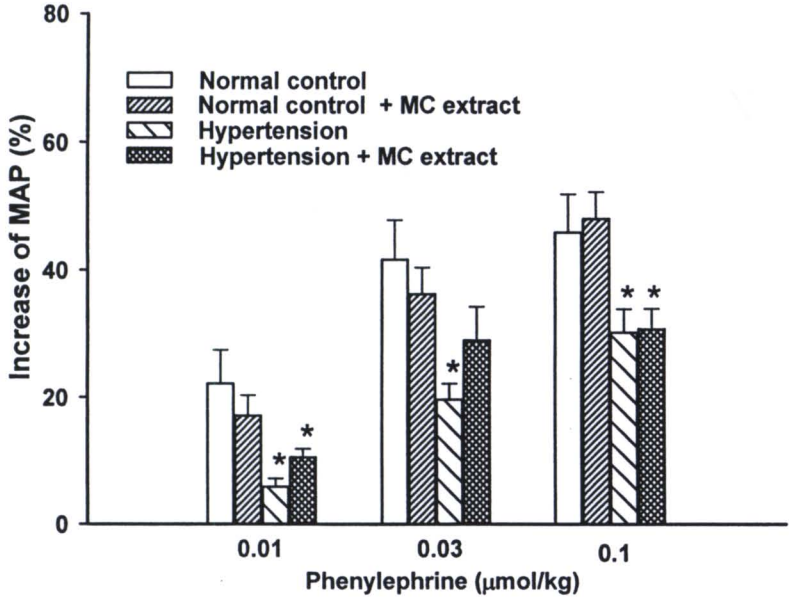


B



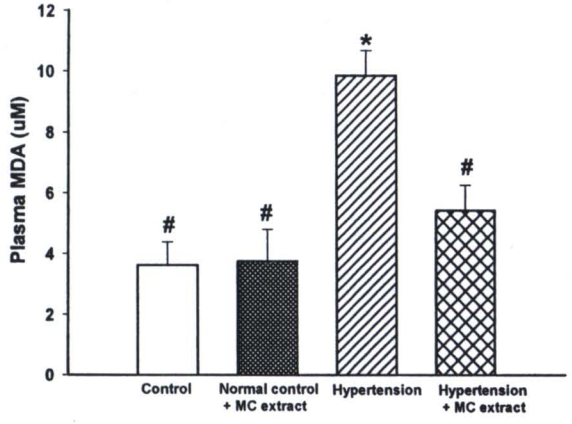
รูปที่ 2 ผลการเปลี่ยนแปลงของค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยในการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ ACh 3, 10, 30 nmol/kg (A); และ SNP 3, 10, and 30 μmol/kg (B) ในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดปกติ (Control group), กลุ่มความดันเลือดปกติที่ได้รับสารสกัดสะระแหน่ (Normal control + MC extract group), กลุ่มความดันเลือดสูงเนื่องจากได้รับสาร 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)

C

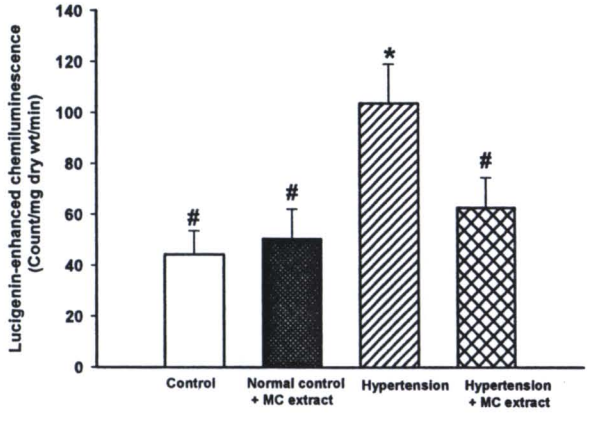


รูปที่ 2C ผลการเปลี่ยนแปลงของค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยในการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ phenylephrine ในขนาด 0.01, 0.03 และ 0.1 μmol/kg ในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดปกติ (Control group), กลุ่มความดันเลือดปกติที่ได้รับสารสกัดสะระแหน่ (Normal control + MC extract group), กลุ่มความดันเลือดสูงเนื่องจากได้รับสาร L-NAME (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)

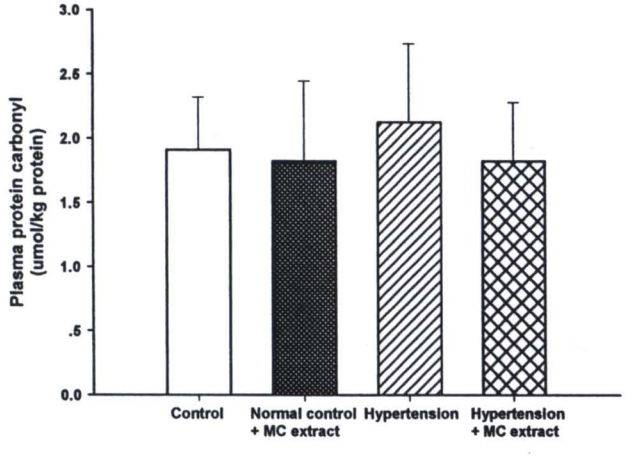
A



B



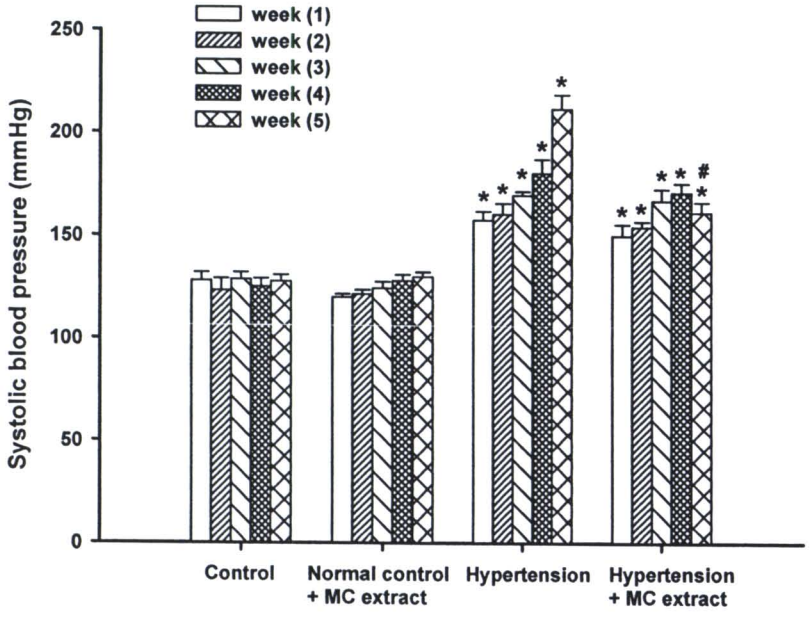
C



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 จะมีค่าความดันเลือดซีสโทลิก (systolic pressure; SP) เท่ากับ 157.3 ± 4.4 mmHg ในสัปดาห์ที่ 1 ซึ่งมีค่ามากกว่าความดันเลือดซิสโทลิกในหนูทดลองที่ไม่ได้รับ L-NAME (128.0 ± 4.1 mmHg) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) และค่าความดันเลือดซีสโทลิกนี้มีค่าสูงกว่าในหนูทดลองที่ไม่ได้รับ L-NAME ในทั้ง 5 สัปดาห์ นอกจากนั้นยังพบว่าสารสกัดสะระแหน่ไม่มีผลลดความดันเลือดในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดปกติในทั้ง 5 สัปดาห์ ส่วนในกลุ่มหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงและได้รับสารสกัดสะระแหน่ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 นั้น พบว่าสารสกัดสะระแหน่มีฤทธิ์รักษาความดันเลือดสูงเนื่องจากการให้สาร L-NAME โดยในสัปดาห์ที่ 5 ค่าความดันซิสโทลิกจะมีค่าเท่ากับ 161.3±4.9 mmHg ซึ่งน้อยกว่าหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสาร L-NAME เพียงอย่างเดียว 211.5 ± 6.9 mmHg ($P < 0.01$) ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงค่าความดันเลือดซิสโทลิก (systolic pressure; SP) ในสัปดาห์ที่ 1-5 ในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดปกติ (Control group), กลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติที่ได้รับน้ำดื่มตามปกติเป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 จะทำการป้อนด้วยสารสกัดสะระแหน่ขนาดความเข้มข้น 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 จะทำการป้อนด้วยสารสกัดสะระแหน่ขนาดความเข้มข้น 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 ($P < 0.01$) ทั้งค่าความดันเลือดซีสโทลิกและไดแอสโทลิก (231.5 ± 6.9, 152.0 ± 9.8 mmHg ตามลำดับ) โดยมีความดันเลือดเลือดแดงเฉลี่ยเท่ากับ 184.3 ± 8.7 mmHg เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำดื่มปกติซึ่งมีค่าความดันเลือดซีสโทลิกและไดแอสโทลิกและค่าความดันเลือดเลือดแดงเฉลี่ยเท่ากับ 133.2 ± 1.8, 83.4 ± 5.5 และ 102.8 ± 2.7 mmHg ตามลำดับ นอกจากนี้ในกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME และถูกป้อนด้วยสารสกัดสะระแหน่ (200 mg/kg/day) ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 มีค่าความดันเลือดซีสโทลิกและไดแอสโทลิกและค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 2

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

สำหรับค่าอัตราเต้นของหัวใจในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดปกติมีค่าเท่ากับ 321.0 ±7.7ครั้ง/นาที ในหนูทดลองที่ได้รับสาร L-NAME (50mg/kg) เป็นเวลา 5 สัปดาห์มีค่าอัตราการเต้นของหัวใจสูงกว่ากลุ่มความดันเลือดปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือมีค่า เท่ากับ 403.6 ± 12.5 ครั้ง/นาที แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดสะระแหน่ไม่มีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจนั่นคือในหนูความดันเลือดปกติที่ได้รับสะระแหน่มีค่าเท่ากับ 349.8 ± 9.9 ครั้ง/นาที และในกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME และถูกป้อนด้วยสารสกัดสะระแหน่ (200 mg/kg) ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 มีอัตราการเต้นของหัวใจเท่ากับ 382.0 ± 9.9 ครั้ง/นาที ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงค่าความดันเลือดซิสโทลิก (systolic pressure; SP) ความดันไดแอสโทลิก (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)

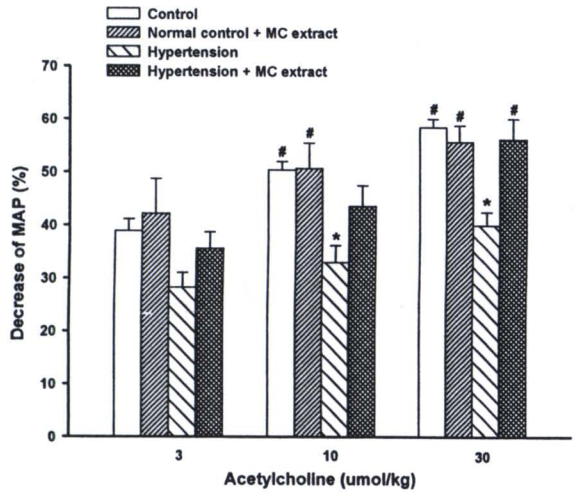
Parameters	Normal control	Normal control + MC extract	Hypertension + vehicle	Hypertension + MC extract
SBP (mmHg)	133.2 ± 1.8	129.1 ± 2.7	231.5 ± 6.9*	190.4 ± 6.7*#
DBP (mmHg)	83.4 ± 5.5	75.0 ± 5.6	152.0 ± 9.8*	125.7 ± 9.1*#
MAP (mmHg)	102.8 ± 2.7	96.4 ± 3.9	184.3 ± 8.7*	158.6 ± 6.4*#
HBF (ml/100 g tissue/min)	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 µmol/kg, Sodium nitroprusside (SNP) 1, 3, 10 µmol/kg และ Phenylephine (PE) 0.01, 0.03, 0.1 µmol/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 จะทำการป้อนด้วยสารสกัดสะระแหน่นั้น หลอดเลือดจะตอบสนองต่อ ACh ใน dose 30 nmol/kg เท่ากับ 56.2 ± 3.8 ซึ่งมากกว่าหนูทดลองความดันเลือดสูงที่ได้รับ L-NAME เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.01$) ดังแสดงในรูปที่ 5A

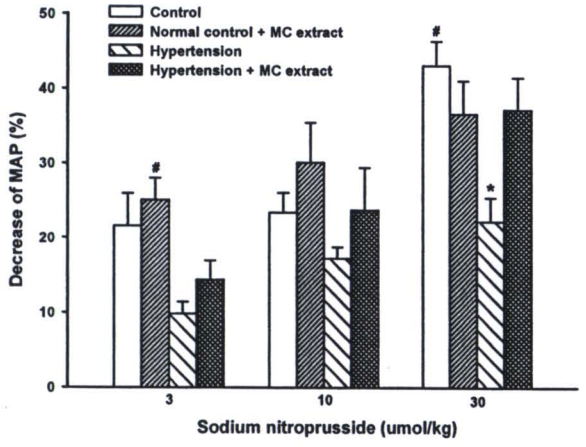
ส่วนการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ SNP ในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดสูงเนื่องจากการได้รับ L-NAME นั้น พบว่าการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ SNP ใน dose 10 nmol/kg เท่ากับ 22.1 ± 3.1 ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติ 43.0 ± 3.2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.005$) ส่วนในกลุ่มหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วยการให้สาร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

นอกจากนั้นผลการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ PE ในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดสูงที่ได้รับ L-NAME นั้น ตอบสนองต่อ PE ใน dose 0.1 µmol/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 จะทำการป้อนด้วยสารสกัดสะระแหน่นั้นไม่แตกต่างกับหนูทดลองความดันเลือดสูงที่ได้รับ L-NAME เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ 5C

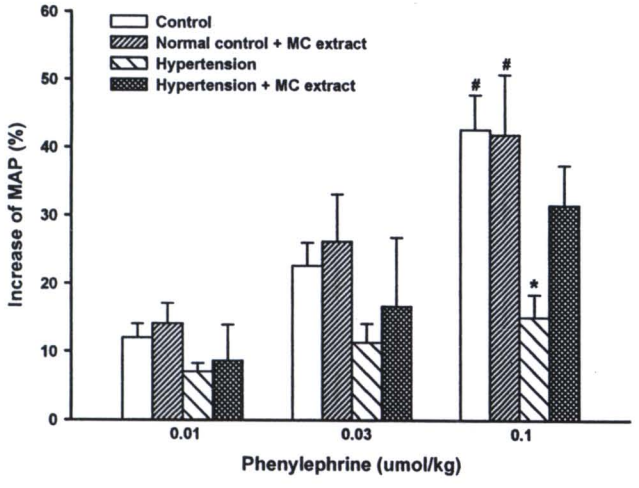
A



B



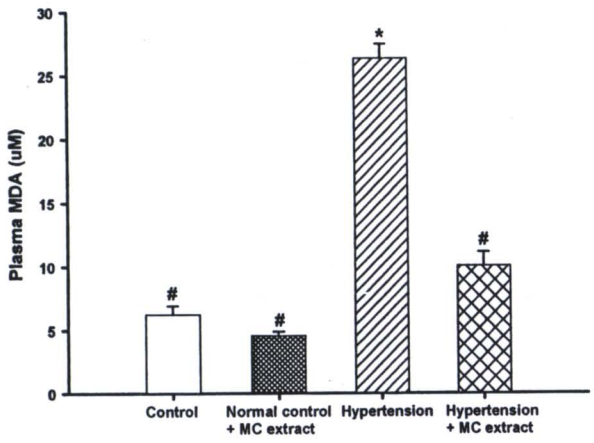
C



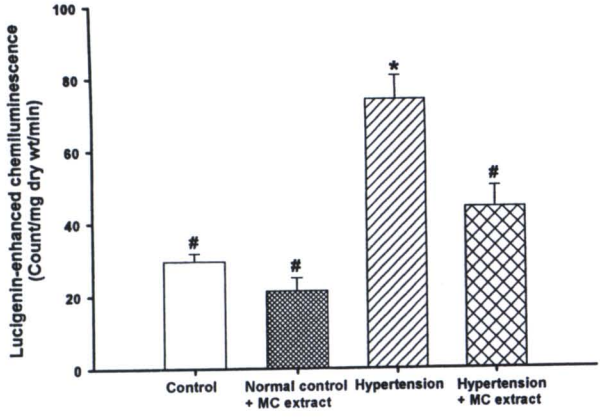
รูปที่ 5 ผลการเปลี่ยนแปลงของค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยในการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ ACh 3, 10, 30 nmol/kg (A); SNP 1, 3, and 10 nmol/kg (B); and PE 0.01, 0.03, and 1 mol/kg (C) ในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดปกติ (Control group), กลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติที่ได้รับน้ำดื่มตามปกติเป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยในสัปดาห์ที่ 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)

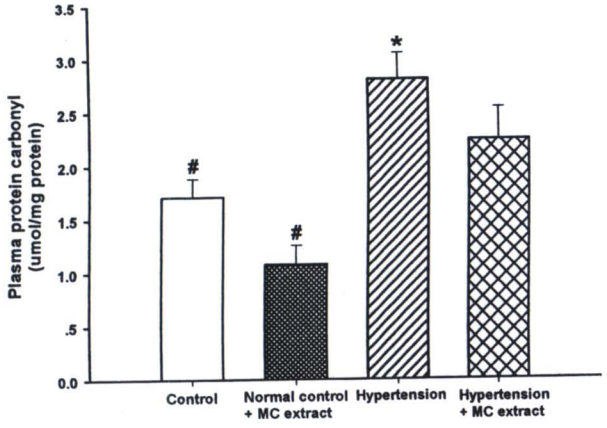
ผลการทดลองทางชีวเคมีพบว่าระดับ MDA ในพลาสมา และ superoxide ในหลอดเลือด carotid artery ของหนูทดลองความดันเลือดสูงเนื่องจากได้รับสาร L-NAME (50mg/kg) (26.3 ± 1.1 μM, 74.3 ± 6.7 count/mg dry weight/min ตามลำดับ) สูงกว่ากลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติ (6.2 ± 0.6 μM, 29.4 ± 2.3 count/mg dry weight/min ตามลำดับ)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

A



B

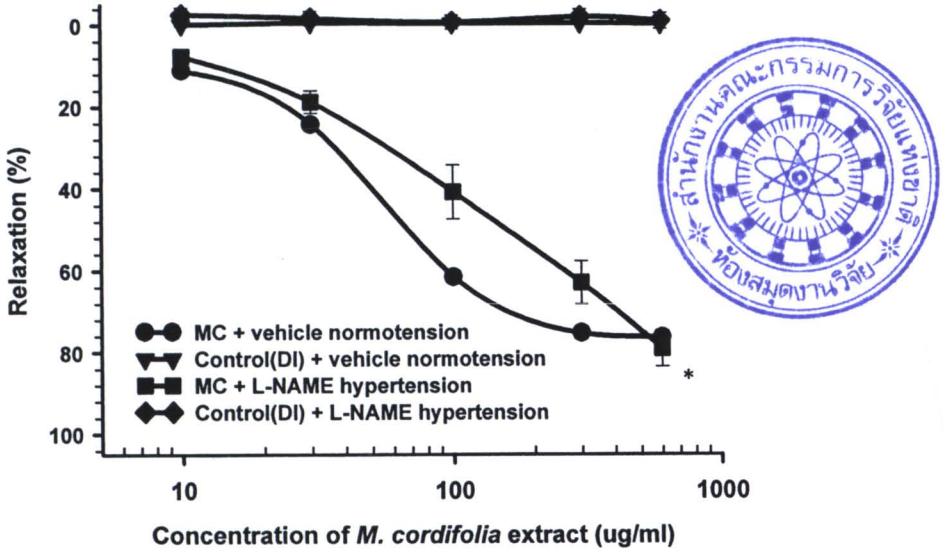




รูปที่ 6 แสดงค่า MDA ในพลาสมา และ superoxide ในหลอดเลือด carotid artery ในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดปกติ (Control group), กลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติที่ได้รับน้ำดื่มตามปกติเป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 จะทำการป้อนด้วยสารสกัดสะระแหน่ขนาดความเข้มข้น 200 mg/kg (normal control + MC extract),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

ผลของสารสกัดสะระแหน่ต่อการขยายตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่เอออร์ตาในหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วย L-NAME (50 mg/kg)

ก่อนการแยกหลอดเลือดแดงใหญ่เออร์ตาได้ทำการวัดความดันเลือดทางหลอดเลือดแดง femoral artery พบว่า L-NAME (50 mg/kg) มีผลเพิ่มความดันเลือดในหนูทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยเท่ากับ 159.74 ± 1.97 mmHg เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองความดนเลือดปกติที่ได้รับน้ำ ซึ่งมีค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยเท่ากับ 104.22 ± 2.5 mmHg และผลการทดลองในหลอดเลือดแดงใหญ่เอออร์ตาพบว่าสารสกัดสะระแหน่ความเข้มข้น 10-600 µg/ml มีผลทำให้หลอดเลือดแดงใหญ่เออร์ตาที่ถูกเพิ่มความตึงตัวด้วย phenylnephrine (0.1-1 µM) ขยายตัวเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้นทั้งในกลุ่มความดันเลือดปกติและความดันเลือดสูงที่ถูกชักนำด้วย L-NAME เมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มที่ได้รับสารทำละลายของสารสกัดอย่างเดียวคือน้ำกลั่น (vehicle) ($P<0.001$) โดยสารสกัดสะระแหน่จะทำให้หลอดเลือดทั้งสองกลุ่มขยายตัวได้สูงสุดในนาทีที่ 15 หลังจากให้สารสกัด ดังแสดงในรูปที่ 5 นอกจากนี้ค่า EC_{50} ของสารสกัดสะระแหน่ในหนูทดลองกลุ่มความดันเลือดสูงมีค่าสูงกว่ากลุ่มหนูทดลองความดันเลือดปกติดังแสดงในตารางที่ 3



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

รูปที่ 7 แสดงผลของสารสกัดสะระแหน่ (MC extract) และน้ำ (DI, deionization water) ต่อการขยายตัวตอบสนองของหลอดเลือดแดงใหญ่เอออร์ตาที่ถูกเพิ่มความตึงตัวด้วยสาร phenylnephrine (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 แสดงผลของสารสกัดสะระแหน่ต่อการขยายตัวตอบสนองของหลอดเลือดแดงใหญ่เออร์ตาที่ถูกเพิ่มความตึงตัวด้วย phenylnephrine (0.1-1 μM) 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} (μg/mL)	53.04 ± 1.31	110.15 ± 8.82 #
E_{max} (%)	81.96 ± 1.08	90.98 ± 3.87

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการทดลองทั้งใน in vivo คือทดสอบฤทธิ์ป้องกันและฤทธิ์รักษาของสารสกัดจากสะระแหน่ในหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วยสาร L-NAME และ in vitro คือศึกษาในหลอดเลือดแดงใหญ่เอเออร์ต้าโดยทดสอบฤทธิ์ของสะระแหน่ต่อขยายตัวของหลอดเลือด และศึกษาผลของสารสกัดสะระแหน่ต่อภาวะเครียดออกซิเดชัน ผลการทดลองพบว่าสารสกัดสะระแหน่มีฤทธิ์ป้องกันหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วยสาร L-NAME นั่นคือหนูทดลองที่ได้รับสาร L-NAME เพียงอย่างเดียวจะมีความดันเลือดสูง ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มของอัตราการเต้นของหัวใจ การลดลงของการไหลของเลือดไปเลี้ยงอวัยวะท่อนล่างและขาหลัง และการเพิ่มขึ้นของความต้านทานต่อการไหลของเลือดไปยังอวัยวะท่อนล่างและขาหลัง นอกจากนี้ยังมีการเสียหน้าที่ในตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารที่มีผลต่อการหดและคลายตัวของหลอดเลือด ตรวจพบระดับ oxidative stress markers เพิ่มขึ้น สารสกัดสะระแหน่มีฤทธิ์ป้องกันการเพิ่มความดันเลือดในหนูที่ได้รับ L-NAME และปรับพลศาสตร์การไหลเวียนในหนูทดลองโดยสัมพันธ์กับการลดลงระดับ oxidative stress markers

ความดันเลือดในร่างกายขึ้นกับปริมาตรเลือดที่ออกจากหัวใจในหนึ่งนาที (cardiac output) และความต้านทานรวมของหลอดเลือดส่วนปลาย (total peripheral resistance) การเพิ่มขึ้นของปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งทำให้เกิดภาวะความดันเลือดสูง ได้การให้สาร L-NAME เป็นเวลานานชักนำ ให้เกิดภาวะความดันเลือดสูงได้เนื่องจาก L-NAME ยับยั้งการทำงานของ nitric oxide synthase เป็นผลให้การสร้างไนตริกออกไซด์ในหลอดเลือดลดลง หลอดเลือดมีความตึงตัวมากขึ้นส่งผลให้เพิ่มความต้านทานรวมของหลอดเลือดส่วนปลายเพิ่มขึ้น [22] การศึกษาครั้งนี้พบว่าการให้สาร L-NAME เป็นเวลา 3 สัปดาห์ มีผลเพิ่มความดันเลือดเกิดภาวะความดันเลือดสูงซึ่งสัมพันธ์กับการลดลงของการไหลของเลือดไปเลี้ยงอวัยวะท่อนล่างและขาหลัง และการเพิ่มขึ้นของความต้านทานต่อการไหลของเลือดไปยังอวัยวะท่อนล่างและขาหลังซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่ผ่านมา [23] สำหรับอัตราการเต้นของหัวใจที่เพิ่มขึ้นในหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME จะอธิบายได้ว่า nitric oxide มีผลกดการทำงานของระบบประสาทซิมพาเทติกดังนั้นการให้สาร L-NAME มีผลให้ระบบประสาทซิมพาเทติกทำงานเพิ่มขึ้น [24,25] สารสกัดสะระแหน่มีผลลดความดันเลือด แสดงว่าความดันเลือดที่ลดลงอาจเป็นผลมาจากการลดลงของความต้านทานรวมของหลอดเลือดส่วนปลาย และในการทดลองครั้งนี้พบว่าสารสกัดสะระแหน่ทำให้หลอดเลือดแดงเออร์ต้าขยายตัวได้ การลดความตึงตัวของหลอดเลือดอาจเนื่องจากมีปริมาณไนตริกออกไซด์เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลจากจากภาวะเครียดออกซิเดชันที่ลดลง เนื่องจากสารสกัดสะระแหน่สามารถลด oxidative stress markers ที่เพิ่มขึ้นในหนูทดลองที่ได้รับสาร L-NAME ได้ นั่นคือระดับ MDA ในพลาสมาและการสร้าง superoxide ของหลอดเลือดแดงคาโรติดลดลง ส่งผลให้ปริมาณไน

ตริกออกไซด์เพิ่มขึ้น และทำให้หลอดเลือดขยายตัวได้เพิ่มขึ้นทั้งนี้เนื่องจาก superoxide สามารถจับกับ nitric oxide ได้เป็นสาร peroxynitrite ซึ่งอนุมูลอิสระที่ทำให้หลอดเลือดเสียหน้าที่ได้ [26] นอกจากนี้ปริมาณ nitric oxide bioavailability ที่เพิ่มขึ้นในหนูทดลอง L-NAME ที่ได้รับสารสะระแหน่ อาจมีผลกดการทำงานของระบบประสาทซิมพาเทติกและลดอัตราการเต้นของหัวใจ และมีรายงานสนับสนุนว่าการให้สารต้านออกซิเดชันสามารถลดความดันเลือดและลดสารอนุมูลอิสระในหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME ได้ [27]

เป็นที่ทราบว่า acetylcholine จับกับตัวรับที่เซลล์ชั้นเอนโดทีเลียมมีผลให้เกิดการสร้างและหลั่ง nitric oxide ซึ่งทำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด [28] และมีรายงานว่าพบว่าเซลล์ชั้นเอนโดทีเลียมสูญเสียหน้าที่ในหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME ทำให้การตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารที่ทำให้หลอดเลือดหดและคลายตัวเสียไปด้วย [29] ดังเช่นผลการทดลองในครั้งนี้พบว่าการคลายตัวตอบสนองของหลอดเลือดต่อสาร acetylcholine ลดลง แต่ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงต่อการคลายตัวของหลอดเลือดตอบสนองต่อการให้ sodium nitroprusside ในหนูทดลองที่ได้รับสาร L-NAME เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ซึ่งสามารถแสดงได้ว่ามีการเสียหน้าที่ของเซลล์ชั้นเอนโทเลียมการตอบสนองต่อสารที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัว แต่การทำหน้าที่ของกล้ามเนื้อเรียบต่อสนองต่อสารที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัวไม่เปลี่ยนแปลง การให้สารสกัดสะระแหน่สามารถปรับการคลายตัวตอบสนองของหลอดเลือดต่อ acetylcholine ได้ เนื่องจากสารสกัดสะระแหน่สามารถลดการสร้าง superoxide ในหนูความดันเลือดสูงที่ถูกชักนำด้วย L-NAME ได้ ทำให้เพิ่มปริมาณ nitric oxide bioavailability และช่วยในการคลายตัวของหลอดเลือดตอบสนองต่อ acetylcholine ส่วนการตอบสนองขอหลอดเลือดต่อสารที่ทำให้หลอดเลือดหดตัวคือ phenyleprine นั้นพบว่าลดลงในหนูทดลองที่ได้รับ L-NAME อาจเนื่องจากภาวะ downregulation ของสารในกระบวนการ signal pathway และมีผลลดปริมาณ Ca^{2+} ภายในเซลล์แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดสะระแหน่ไม่สามารถปรับการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ phenyleprine ให้เหมือนเดิมได้

สำหรับฤทธิ์รักษาของสารสกัดจากสะระแหน่ในหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วยสาร L-NAME ผลการทดลองพบว่าสารสกัดสะระแหน่มีฤทธิ์รักษาหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงด้วยสาร 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 สารสกัดสะระแหน่มีฤทธิ์ลดความดันเลือดในหนูที่ได้รับ L-NAME และปรับพลศาสตร์การไหลเวียนในหนูทดลองโดยสัมพันธ์กับการลดลงระดับ oxidative stress markers ดังนั้นพบว่าฤทธิ์รักษาของสารสกัดสะระแหน่มีผลไปในทิศทางเดียวกับฤทธิ์ป้องกัน แต่อาจมีบางผลการทดลองที่ให้ผลต่างกัน ดังนั้นการวิจารณ์ผลการทดลองจึงแสดงในจุดที่แตกต่างกัน นั่นคือในฤทธิ์รักษาของสารสกัดสะระแหน่นั้นการให้สารสกัดสะระแหน่ในหนูที่มีความดันเลือดสูงเนื่องจากได้รับสาร L-NAME นั้นอัตราการเต้นของหัวใจของหนูความดันเลือดสูงมีแนวโน้มลดลงแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเนื่องจากระยะเวลาของการให้สาร L-NAME ที่ยาวถึง 5 สัปดาห์ ส่วนการให้สารสกัดให้แค่ 2 สัปดาห์เท่านั้น สำหรับการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสาร sodium nitroprusside นั้นพบว่าการคลายตัวตอบสนองของหลอดเลือดต่อ sodium nitroprusside ในขนาดสูงนั้นลดลงแสดงถึงมีการสียหน้าที่ของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด สำหรับกลไกที่เกี่ยวข้องนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อาจเนื่องมากจากการให้สาร L-NAME เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหลอดเลือดทั้ง endothelial cells และ smooth muscle cells [30] และการให้สารสกัดสระแหน่สามารถปรับการคลายตัวตอบสนองต่อ sodium nitroprusside ให้ดีขึ้นทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและเพิ่มปริมาณ nitric oxide bioavailability ในหลอดเลือดได้ดังที่กล่าวมาข้างต้น สำหรับฤทธิ์ขยายตัวของหลอดเลือดของสารสกัดสะระแหน่นั้นยังไม่ทราบแน่ชัดดังนั้นการศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องซึ่งอาจเป็นกลไกที่ผ่าน endothelial cells หรือสารสกัด