บทคัดย่อ

T167476

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกในการแสดงฤทธิ์ลดความดันโลหิตของสารสกัดหยาบจากใบมะยม โดยคาดหวังว่าจะสามารถแยกสารที่แสดงฤทธิ์ดังกล่าวได้อย่างน้อย 1 ชนิด ทำการศึกษาทั้งแบบ *in vivo* ในหนูแร็ทสลบ และแบบ *in vitro* โดยตัดแยกหลอดเลือด thoracic aorta ออกมาศึกษานอกตัว ผลการทดลองพบว่า การฉีดสารสกัดหยาบจากใบมะยมเข้าทางหลอดเลือดดำของหนูแร็ท มีผลทำให้ลดทั้งความดันโลหิต และลดอัตราการเต้นของหัวใจแบบ dose-dependent ผลดังกล่าวนี้ไม่สามารถยับยั้งได้ด้วย Atropine และ/หรือ Propranolol การศึกษาแบบ *in vitro* พบว่าสารสกัดจากใบมะยมมีผลโดยตรงที่หลอดเลือดทำให้หลอดเลือดคลายตัวไม่ว่าหลอดเลือดถูกทำให้หดตัวอยู่ก่อนแล้วด้วย Phenylephrine ($3x10^{-6}$ M) หรือ 40 mM KCl และยิ่งไปกว่านั้นผลการคลายตัวของหลอดเลือดคงอยู่นานประมาณ 3 ชั่วโมงหลังจากล้างเนื้อเยื่อหลายครั้งด้วยสารละลาย Kreb's. Atropine, Propranolol, Indomethacin, Tetraethylammonium และ Suramin ไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารสกัดจากใบมะยมแต่อย่างใด ในขณะที่ Glybenclamide มีผลยับยั้งเล็กน้อยในหลอดเลือดที่ไม่มี endothelium ส่วน ODQ, ODQ + Glybenclamide หรือ DMPX สามารถยับยั้งการคลายตัวของหลอดเลือดต่อสารสกัดจากใบมะยมได้ไม่ว่าหลอดเลือดยังคงมี endothelium อยู่หรือไม่ก็ตาม การ incubate หลอดเลือดด้วย Nifedipine หรือใน Ca^{+2} free Kreb's solution มีผลทำให้ลดความแรงในการหดตัวของหลอดเลือดต่อ Phenylephrine ($3x10^{-6}$ M) และถ้าให้สารสกัดจากใบมะยมร่วม incubate ด้วย พบว่าการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ Phenylephrine ยิ่งลดน้อยลงทั้งหลอดเลือดที่มีและไม่มี endothelium

การแยกสารจากสารสกัดจากใบมะยมทำโดยวิธี column chromatography โดยใช้ Silica gel 100, Silica gel 60, Silica gel RP18 หรือ Sephadex gel-15 เป็นตัวยึดอยู่กับที่ และชะออกด้วย gradient concentration ของ $CHCl_3$: MeOH หรือ MeOH : H_2O หรือ 50% MeOH และทดสอบชนิดของสารด้วย TLC สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 19 ชนิด โดยได้รับความช่วยเหลือจาก Prof. Kurt Hostettmann, Switzerland ในการศึกษาหาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารดังกล่าว ทราบสูตรโครงสร้างแล้ว 5 ชนิดได้แก่ *p*-Salicylic acid, Hypogallic acid, Kaempferol, Adenosine และ Caffeic acid ในจำนวนสาร 19 ชนิดนี้พบว่า Hypogallic acid เป็นองค์ประกอบมากที่สุด รองลงมาได้แก่ Kaempferol, Adenosine และ *p*-Salicylic acid ตามลำดับ การศึกษาผลของสารแบบ *in vivo* พบว่า Adenosine เป็นสารที่มี potency สูงที่สุดในการลดความดันโลหิตและลดอัตราการเต้นของหัวใจ รองลงมาคือ Kaempferol สำหรับการศึกษาแบบ *in vitro* พบว่าทั้ง 5 ชนิดนี้ มีผลทำให้หลอดเลือด thoracic aorta ที่ให้หดตัวอยู่ก่อนแล้วด้วย Phenylephrine คลายตัวโดยมีผลโดยตรงที่หลอดเลือด และผลทางอ้อมโดยกระตุ้นให้มีการหลั่งของ Nitric oxide จาก endothelium โดยที่ Adenosine และ Caffeic acid มี potency ต่อการคลายตัวของหลอด

T 167476

เลือดสูงที่สุด รองลงมาได้แก่ *p*-Salicylic acid และ Kaempferol และ Hypogallic acid มี potency ต่ำสุด แต่อย่างไรก็ตามผลของ Kaempferol ทำให้หลอดเลือดยังคงคลายตัวต่อไปอีก 3 ชั่งโมงหลังจากที่ล้างหลอดเลือดแล้ว ในลักษณะเดียวกับผลการคลายตัวของสารสกัดหยาบจากใบมะยม การศึกษากลไกในการแสดงฤทธิ์ของ Adenosine ต่อการคลายตัวของหลอดเลือด thoracic aorta พบว่าการคลายตัวของหลอดเลือดต่อ Adenosine ไม่ได้กระตุ้นผ่าน P_2Y purinergic receptor, A_2A adenosine receptor หรือ ATP-sensitive K^+-Channel ที่หลอดเลือด แต่ Adenosine มีผลโดยตรงที่ vascular smooth muscle และผลทางอ้อมโดยการกระตุ้นให้มีการหลั่ง nitric oxide จาก vascular endothelium และยับยั้งการทำงานของ Guanylase cyclase ไปเสริมการคลายตัวของหลอดเลือด

ผลการศึกษาทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากใบมะยมมีผลลดความดันโลหิต และลดอัตราการเต้นของหัวใจในหนูแร็ทสลบ โดยมีกลไกในการแสดงฤทธิ์อย่างน้อย 5 แบบ คือ (1) ออกฤทธิ์โดยตรงที่กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดทำให้หลอดเลือดคลายตัว, (2) กระตุ้นให้มีการหลั่งของ nitric oxide จาก vascular endothelium, (3) กระตุ้นให้มีการเปิดของ ATP-sensitive K^+ channel ที่หลอดเลือด, (4) ยับยั้งการทำงานของ Guanylase cyclase และ (5) กระตุ้นผ่านทาง A_2A adenosine receptor ที่หลอดเลือด โดยที่ทั้ง 5 pathways นี้อาจจะทำงานเสริมกันและกันโดยการกระตุ้นจากสารต่างชนิดกัน สารที่น่าจะมีบทบาทมากที่สุดได้แก่ *p*-Salicylic acid, Hypogallic acid, Kaempferol, Adenosine และ Caffeic acid อย่างไรก็ตาม สารที่ออกฤทธิ์เด่นชัดที่สุดในการลดความดันโลหิตน่าจะเป็น Kaempferol และ Adenosine.

Abstract

T 167476

The aim of the present study was to investigate the mechanisms responsible for the hypotensive effect of an extract of *Phyllanthus acidus* (*P. acidus* extract). It was hoped to isolate and identify at least one compound with hypotensive activity. Studies were performed both *in vivo* on anesthetized rats, and *in vitro* on isolated rat's thoracic aorta. Results showed that an intravenous injection of *P. acidus* extract caused a decrease in both the mean arterial blood pressure and heart rate in a dose-dependent manner. These effects were not inhibited by Atropine and/or Propranolol. In the *in vitro* preparation, *P. acidus* extract had a direct effect on the thoracic aortic ring causing it to relax after the rings had been pre-constricted with Phenylephrine ($3x10^{-6}$ M) or 40 mM KCl. In addition, the relaxing effect persisted for about 3 hrs after washing the blood vessels with Kreb's solution. Atropine, Propranolol, Indomethacin, Tetraethylammonium (TEA) or Suramin did not modify the vasodilatory effect of the *P. acidus* extract. Glybenclamide had some inhibitory effect on the vasodilatory activity of the *P. acidus* extract but only on the ones without endothelium. ODQ, ODQ+Glybenclamide or DMPX had a substantial inhibitory effect on the vasodilatory activity of the *P. acidus* extract on the thoracic aortic rings whether the ring had an intact endothelium or not. Pre-incubation of the thoracic aortic rings with Nifedipine, or in Ca^{+2} free Kreb's solution, caused a marked reduction in the force of contraction induced by $3x10^{-6}$ M Phenylephrine. When the *P. acidus* extract was also added in the incubation medium, the magnitude of contraction induced by $3x10^{-6}$ M Phenylephrine was further reduced in both endothelium-intact and denuded thoracic aortic rings.

Substances from *P. acidus* extract were isolated by column chromatography using Silica gel 100, Silica gel 60, Silica gel RP 18 or Sephadex G-15 as a stationary phase, and elution with a gradient concentration of $CHCl_3$: MeOH, MeOH : H_2O, or 50 % MeOH, and substances were detected by TLC. Nineteen substances were isolated, and five of them were identified by Prof. Kurt Hostettmann, Switzerland. These were *p*-Salicylic acid, Hypogallic acid, Kaempferol, Adenosine and Caffeic acid. Among them, Hypogallic acid was present at the highest concentration, followed by Kaempferol, Adenosine and *p*-Salycylic acid respectively. In the *in vivo* study, Adenosine had the highest hypotensive activity followed by Kaempferol. In the *in vitro* study, all of the five substances caused a direct dilation of the thoracic aortic rings that had been pre-constricted with Phenylephrine. In addition, they had an indirect effect by

T167476

stimulating the release of nitric oxide from the vascular endothelium. Among them, Adenosine and Caffeic acid were the most effective vasodilators, followed by *p*-Salicylic acid and Kaempferol, and then Hypogallic acid that had the least effect. However, the vasodilatation produced by the Kaempferol persisted for about 3 hrs after washing. This is similar to that produced by the *P. acidus* extract. The mechanisms responsible for vasodilatation by Adenosine were studied and it was found that Adenosine did not act through a P_2Y purinergic receptor, an A_2A adenosine receptor, or at the ATP-sensitive K^+ channel in the blood vessel. Adenosine, however, acted directly on the vascular smooth muscle and indirectly via the vascular endothelium to release nitric oxide, and act as a guanylase cyclase inhibitor to promote vasodilatation.

All of these results demonstrated that *P. acidus* extract caused a decrease in blood pressure and heart rate in anesthetized rats. The mechanisms responsible for these may involve at least 5 pathways : (1) it acts directly on the blood vessel to cause vasodilatation, (2) it stimulated release of nitric oxide from the vascular endothelium, (3) it opened the ATP-sensitive K^+ channel of the blood vessel, (4) it inhibited guanylase cyclase activity, and (5) it acted on the A_2A adenosine receptor of the blood vessel. All of these 5 pathways may be affected synergistically each being affected by a different substance. The most probable active substances were *p*-Salicylic acid, Hypogallic acid, Kaempferol, Adenosine and Caffeic acid. However, the most potent substances for the hypotensive effect would probably be Kaempferol and Adenosine.