

รายงานการวิจัย

การศึกษากลไกการลดความดันโลหิตของสารสกัดใบบัวหลวง
Evaluation of hypotensive mechanisms of crude leaf extract of
Nelumbo nucifers Gaertn.

ผู้ดำเนินงานวิจัย

ผศ.ดร.เพชรรัตน์ ตรงต่อศักดิ์

18 พ.ค. 2552

254672

BUK 017195

เริ่มบริการ

19 ส.ค. 2552

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดินปี 2551

มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดินปี 2551
มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ : การศึกษากลไกการลดความดันโลหิตของสารสกัดใบบัวหลวง
Evaluation of hypotensive mechanisms of crude leaf extract of
Nelumbo nucifera Gaertn.

ผู้ดำเนินการวิจัย

ชื่อ	นางเพชรรัตน์ ตรงต่อศักดิ์
วุฒิการศึกษา	Ph.D. (Physiology), University of Melbourne, Australia
ตำแหน่ง	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
โทรศัพท์	038-102222 ต่อ 3166
E-mail	petchara@buu.ac.th

การศึกษากลไกการลดความดันโลหิตของสารสกัดใบบัวหลวง

เพชรรัตน์ ตรงต่อศักดิ์

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

บทคัดย่อ

มีรายงานยืนยันฤทธิ์ลดความดันโลหิตของสารสกัดใบบัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) สารสกัดใบบัวหลวงอาจจะออกฤทธิ์ที่หลอดเลือด โดยทำให้หลอดเลือดขยายตัว แต่ยังไม่มีความชัดเจนทางวิทยาศาสตร์ยืนยันฤทธิ์ของสารสกัดใบบัวหลวงต่อการทำงานของหลอดเลือด การศึกษานี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ขยายหลอดเลือดและกลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดใบบัวหลวงในหลอดเลือดเออร์ดำที่แยกจากหนูขาวปกติ และศึกษาผลของสารสกัดใบบัวหลวงต่อการตอบสนองของหลอดเลือด (vascular reactivity) ในหลอดเลือดเออร์ดำที่แยกจากหนูขาวความดันโลหิตปกติและหนูขาวที่มีภาวะความดันโลหิตสูง โดยการตีบ renal artery ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดใบบัวหลวง (10-100 μg) สามารถทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้ 6-63%, nadolol (β -adrenergic receptor antagonist) 10 μM ไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวงได้ แต่สามารถถูกยับยั้งด้วย L-NAME (nitric oxide synthase inhibitor) 10 μM และ methylene blue (gaunyl cyclase inhibitor) 1 μM โดยหลอดเลือดจะคลายตัวได้เพียง 40% และ 37% ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวงเกิดผ่าน nitric oxide-cGMP pathway สารสกัดใบบัวหลวงยังสามารถลดแรงตึงของหลอดเลือดที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย phenylephrine (PE, α -adrenergic receptor agonist) 1 μM ใน Ca^{2+} -free Krebs solution แสดงว่าสารสกัดใบบัวหลวงน่าจะมีผลยับยั้งการหลั่ง Ca^{2+} จากภายในเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดใบบัวหลวงสามารถลดการหดตัวของหลอดเลือดที่เกิดจาก PE 10^{-10} – 10^{-6} M ทั้งในหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตปกติและกลุ่มความดันโลหิตสูง แต่เพิ่มการคลายตัวของหลอดเลือดที่เหนี่ยวนำโดย isoproterenol (β -adrenergic receptor agonist) 10^{-9} – 10^{-5} M ในหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตสูง สารสกัดใบบัวหลวงยังลดการคลายตัวของหลอดเลือดที่เกิดจาก acetylcholine (muscarinic receptor agonist) 10^{-9} – 10^{-5} M ในหลอดเลือดทั้งสองกลุ่มการทดลอง โดยสรุปการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบบัวหลวงมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือดโดยออกฤทธิ์ผ่าน nitric oxide-cGMP pathway บางส่วน และอาจจะมีผลยับยั้งการหลั่ง Ca^{2+} ภายในเซลล์ นอกจากนี้สารสกัดใบบัวหลวงยังสามารถปรับเปลี่ยนการตอบสนองของหลอดเลือดที่ได้จากหนูขาวความดันโลหิตปกติและความดันโลหิตสูง โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของ adrenergic receptors ในหลอดเลือดทำให้แรงตึงของหลอดเลือดซึ่งน่าจะช่วยลดความดันโลหิตได้

Evaluation of hypotensive mechanisms of crude leaf extract of *Nelumbo nucifera* Gaertn.

Petcharat Trongtorsak

Department of Medical Science, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131.

Abstract

It has been reported that the crude leaf extract of *Nelumbo nucifera* Gaertn. (NN) possessed a hypotensive effect. NN may cause vascular relaxation resulting in decrease in the blood pressure. However, scientific evidence regarding its hypotensive mechanism has not yet been documented. The aims of the present study were to evaluate the vasorelaxant effects of NN and its possible mechanisms in isolated rat aortic rings, as well as to examine its effects on vascular reactivity in isolated aortic rings derived from normotensive and hypertensive rats induced by constriction of renal artery. NN (10-100 $\mu\text{g/ml}$) induced relaxation in aortic ring by 6-63%. The vasorelaxant effect of NN was not inhibited by nadolol (β -adrenergic receptor antagonist) 10 μM , but was significantly attenuated by L-NAME (nitric oxide synthase inhibitor) 10 μM and methylene blue (gaunyl cyclase inhibitor) 1 μM . In the presence of L-NAME and methylene blue, NN caused only 40% and 37% relaxation respectively, suggesting its vasorelaxant effect mediated through nitric oxide-cGMP pathway. NN also reduced vascular contraction induced by phenylephrine (PE, α -adrenergic receptor agonist) 1 μM in Ca^{2+} -free Krebs solution, suggesting its inhibitory effect on intracellular Ca^{2+} release. Moreover, NN attenuated contractile effect of PE 10^{-10} – 10^{-6} M in both normotensive and hypertensive aortic rings, but enhanced relaxation to isoproterenol (β -adrenergic receptor agonist) 10^{-9} – 10^{-5} M in hypertensive aortic rings. In addition, NN diminished vasorelaxant effect of acetylcholine (muscarinic receptor agonist) 10^{-9} – 10^{-5} M in both groups of aortic rings. In conclusion, NN can elicit vasorelaxant effect which is partly mediated via nitric oxide-cGMP pathway and may inhibit intracellular Ca^{2+} release. Additionally, NN can modulate vascular reactivity in both normotensive and hypertensive aortic rings, particularly alteration in the responses of vascular adrenergic receptors resulting in decrease in vascular tension, which may contribute to its hypotensive effect.

สารบัญเรื่อง

บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญเรื่อง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
สารบัญตาราง	ซ

บทที่ 1 : บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	2
กรอบแนวคิดของงานวิจัย	5
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	6
ขอบเขตของโครงการวิจัย	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6

บทที่ 2 : วิธีดำเนินการวิจัย

การสกัดสารจากใบบัวหลวง	7
การเตรียมสารละลายเลี้ยงเนื้อเยื่อและสารเคมี	7
สัตว์ทดลอง	8
การผ่าตัดเห็นยว่นำให้มีภาวะความดันโลหิตสูง	8
การวัดความดันโลหิตทางหางหนู	8
การเตรียมหลอดเลือดเอออร์ต้า	9
รายละเอียดการทดลอง	9
การศึกษาฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวง	
และกลไกการออกฤทธิ์	9
การศึกษาผลของสารสกัดใบบัวหลวงต่อการตอบสนองของหลอดเลือด	10
การวิเคราะห์ข้อมูล	11

บทที่ 3 : ผลการทดลอง

การศึกษาฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวงและกลไกการออกฤทธิ์	12
ผลของสารสกัดใบบัวหลวงต่อการหดตัวของหลอดเลือด	
ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย phenylephrine	12
ผลของสารสกัดใบบัวหลวงต่อการหลั่ง Ca^{2+} จากภายในเซลล์	15
การศึกษาผลของสารสกัดใบบัวหลวงต่อการตอบสนองของหลอดเลือด	16
ความดันโลหิตภายหลังจากการตีบ renal artery	16
การตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารตีบหลอดเลือด phenylephrine	17
การตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารคลายหลอดเลือด isoproterenol	20
การตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารคลายหลอดเลือด acetylcholine	23

บทที่ 4 : อภิปรายผลการทดลอง

ฤทธิ์ขยายหลอดเลือดและกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบบัวหลวง	26
สารสกัดใบบัวหลวงปรับเปลี่ยนการตอบสนองของหลอดเลือด	28
ศักยภาพในการลดความดันโลหิตของสารสกัดใบบัวหลวง	30
ข้อเสนอแนะ	31

เอกสารอ้างอิง	32
----------------------	----

สารบัญภาพ

รูปที่ 1	แสดงการคลายตัวของหลอดเลือดเมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวงเพียงอย่างเดียว และเมื่อให้ nadolol ร่วม	13
รูปที่ 2	แสดงการคลายตัวของหลอดเลือดเมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวงเพียงอย่างเดียว และเมื่อให้ L-NAME ร่วม	13
รูปที่ 3	แสดงการคลายตัวของหลอดเลือดเมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวงเพียงอย่างเดียว และเมื่อให้ methylene blue ร่วม	14
รูปที่ 4	แสดงผลของสารสกัดใบบัวหลวงต่อแรงหดตัวของหลอดเลือดที่เหนี่ยวนำด้วย Phenylephrine ใน Ca^{2+} -free Krebs solution	15
รูปที่ 5	การตอบสนองของหลอดเลือดกลุ่มความดันปกติและกลุ่มความดันโลหิตสูง ต่อสารตีบหลอดเลือด phenylephrine	18
รูปที่ 6	การตอบสนองของหลอดเลือดกลุ่มความดันปกติและกลุ่มความดันโลหิตสูง ต่อสารตีบหลอดเลือด isoproterenol	21
รูปที่ 7	การตอบสนองของหลอดเลือดกลุ่มความดันปกติและกลุ่มความดันโลหิตสูง ต่อสารตีบหลอดเลือด acetylcholine	24

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	การคลายตัวสูงสุดของหลอดเลือดเมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวงเพียงอย่างเดียว และให้ร่วมกับ nadolol หรือ L-NAME หรือ methylene blue
ตารางที่ 2	แสดงค่าความดันโลหิตของหนูขาวกลุ่มควบคุมและกลุ่มความดันโลหิตสูง
ตารางที่ 3	แสดงค่า pD_2 และ E_{max} ที่ได้จากการตอบสนองต่อ phenylephrine
ตารางที่ 4	แสดงค่า pD_2 และ E_{max} ที่ได้จากการตอบสนองต่อ isoproterenol
ตารางที่ 5	แสดงค่า pD_2 และ E_{max} ที่ได้จากการตอบสนองต่อ acetylcholine

บทนำ Introduction

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ความดันโลหิตสูงเป็นภาวะความเจ็บป่วยเรื้อรังซึ่งเป็นปัญหาสุขภาพที่อยู่ในอันดับนำของประเทศไทย จากการสำรวจผู้ป่วยในของสถานบริการสาธารณสุขของกระทรวงสาธารณสุขในปี 2548 มีผู้ป่วย 327,919 คน ที่ต้องทนทุกข์ทรมานกับภาวะความดันโลหิตสูง (สำนักงานสถิติแห่งชาติ, 2549) ความดันโลหิตสูงเป็นสาเหตุที่นำไปสู่ภาวะผิดปกติที่รุนแรงขึ้น เช่น ภาวะหัวใจเหลว (heart failure) และโรคหลอดเลือดในสมอง เป็นต้น จากการสำรวจยังพบว่าโรคความดันโลหิตสูงเป็นสาเหตุการตายในอันดับที่ 3 ในประชากรไทยในปี 2547 ซึ่งมีประชากรเสียชีวิตจากโรคความดันโลหิตสูงและโรคหลอดเลือดในสมองถึง 21,756 คนต่อประชากร 100,000 คน (สำนักงานสถิติแห่งชาติ, 2549) การควบคุมระดับความดันเลือดในผู้ป่วยเหล่านี้เป็นสิ่งที่มีความสำคัญอย่างยิ่งยวด โดยต้องปรับเปลี่ยนพฤติกรรมประจำวัน ชีวิตและรับประทานยาเพื่อช่วยลดความดันเลือดควบคู่กันไป ผู้ป่วยความดันโลหิตสูงจำเป็นต้องรับประทานยาลดความดันเลือดอย่างต่อเนื่อง หากคิดโดยรวมแล้วผู้ป่วยเหล่านี้ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการซื้อยาเป็นเงินมหาศาล อีกทั้งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตยาและยาสำเร็จรูปส่วนใหญ่ยังต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้เกิดปัญหาการขาดดุลการค้า สถิติการนำเข้ายาในกลุ่มรักษาโรกระบบหัวใจและหลอดเลือดในปี 2548 สูงถึง 4,155 ล้านบาท และเพิ่มขึ้นเป็น 7,915 ล้านบาท ในปี 2550 (กองควบคุมยา, 2551) ทำให้เห็นแนวโน้มในการนำเข้ายารักษาโรคในกลุ่มนี้จะสูงขึ้นอีกในอนาคต ดังนั้นการพัฒนาทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่ภายในประเทศขึ้นมาทดแทนยาแผนปัจจุบัน จึงเป็นวิถีทางหนึ่งในการแก้ปัญหาดังกล่าว

ในปัจจุบันคนทั่วโลกกำลังตื่นตัวในเรื่องผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมากขึ้น มีการนำสมุนไพรมาใช้ประโยชน์แทนสารสังเคราะห์ต่างๆ ในความเป็นจริงประเทศไทยได้มีวัฒนธรรมและภูมิปัญญาพื้นบ้านเกี่ยวกับการใช้สมุนไพรรักษาโรคมานานแล้ว อีกทั้งประเทศไทยยังมีความหลากหลายในพรรณพืชสมุนไพร จึงน่าจะพัฒนาวัตถุดิบที่มีอยู่ตามธรรมชาติให้เกิดประโยชน์โดยเฉพาะในด้านการรักษาโรคอย่างโรครักษาการนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคนั้น จำเป็นต้องมีการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและทดสอบพิษของสมุนไพรนั้นๆ เพื่อให้เกิดความปลอดภัยในการใช้

บัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn., วงศ์ Nymphaeaceae) เป็นไม้น้ำที่พบทั่วทุกภาคของประเทศไทย ในปัจจุบันได้มีการส่งเสริมให้บัวหลวงเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศ (พรรณนีย์ วิชชาชู, 2548) มีรายงานว่าประเทศไทยได้ส่งใบบัวไปขายแก่ประเทศจีนจำนวนมากต่อปีเพื่อนำไปใช้ในการเตรียมยา (ชยันต์ พิเชียรสุนทร และคณะ, 2544) ตามตำราสมุนไพรไทยทุกส่วนของบัวหลวงสามารถใช้เป็นสมุนไพรรักษาอาการผิดปกติต่างๆ ได้ (วิสุตา สุวิทย์วัฒน์, 2540) ดังนั้นบัวหลวงจึงเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพสูงที่น่าจะนำมาศึกษาพัฒนา ในทางการแพทย์แผนไทยได้ใช้ใบบัวหลวงมาดัดคั้นเพื่อลดความดันโลหิต (วันดี กฤษณพันธ์, 2541) จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเบื้องต้นของสารสกัดใบบัวหลวงพบว่า

สามารถลดความดันโลหิตได้แบบเฉียบพลันและแบบระยะยาว (Trongtorsak et al, 2007) ปัจจุบันยาที่ใช้ในการลดความดันโลหิตส่วนใหญ่มี 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ ยากลุ่มขยายหลอดเลือดและยากลุ่มขับปัสสาวะ คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาต่อเนื้อเพื่อตรวจสอบว่าสารสกัดใบบัวหลวงออกฤทธิ์ลดความดันโลหิตโดยผ่านกลไกใด ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าสารสกัดใบบัวหลวงอาจจะออกฤทธิ์ขยายหลอดเลือด อีกทั้งยังมีฤทธิ์ปกป้องการทำงานของหลอดเลือดจากพยาธิสภาพในภาวะความดันโลหิตสูง หรือสารสกัดใบบัวหลวงอาจจะออกฤทธิ์ขับปัสสาวะแล้วมีผลให้ความดันโลหิตลดลง การศึกษานี้จะให้องค์ความรู้ที่มีประโยชน์ในการใช้สมุนไพรเพื่อการบำบัดโรคและเพื่อการรักษาสุขภาพอนามัยแบบพึ่งตนเองของประชาชน อีกทั้งยังนำไปสู่การพัฒนาสมุนไพรบัวหลวงให้เกิดประโยชน์ต่อไป

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาหาสารประกอบในใบบัวหลวง พบว่าสารประกอบส่วนใหญ่เป็น isoquinoline alkaloid ชนิดต่างๆ alkaloid กลุ่มแรกที่สามารถแยกได้จากใบบัวหลวง คือ nuciferine, remerine, และ normuciferine โดยจากใบแห้ง 33 kg สามารถแยกได้ nuciferine 0.2 g, remerine 8 g, และ normuciferine 11 g (Tang และ Eisenbrand, 1992) ต่อมาสามารถแยก alkaloid อีกมากมายจากใบบัวหลวง ได้แก่ arnepavine, anonaine, dehydroanonaine, pronuciferine, *N*-normuciferine, dehydronuciferine, liriodenine, dehydroremerine, methylcocaurine, *N*-methylcocaurine, asimilobine, *N*-methylasimilobine, lirinidine, liensinine, isoqueritrine, และ roemerine (วิสุดา สุวิทย์วัฒน์, 2540; Tang & Eisenbrand, 1992) นอกจากนี้ในใบบัวหลวงยังประกอบด้วยสาร steroid คือ ginnol และ β -sitosterol ใบบัวยังมีน้ำมันระเหยเป็นสาร alkanes (C_{12} - C_{27}) และสาร phytol ด้วย (วิสุดา สุวิทย์วัฒน์, 2540)

รายงานทางการแพทย์แผนไทยและภูมิปัญญาไทยยืนยันว่าทุกส่วนของบัวหลวงสามารถใช้รักษาและป้องกันการเกิดโรคได้ ได้แก่ เหง้าบัวใช้เป็นยาบำรุงกำลัง แก้ก้อนใน แก้ก้อนรัง แก่ประจำเดือน ผิดปกติ และรักษาโรคริดสีดวงทวาร (รัชนี้ จวีราช, 2532) รากบัวใช้เป็นยาบำรุงกำลัง แก้ก้อนใน ลดไข้ แก้ไอและกระหายน้ำ โดยนำรากบัวมาต้มกับน้ำให้เดือด ต้มครั้งละ 1 แก้ว วันละ 3-4 ครั้ง (วันดี กฤษณพันธ์, 2541) เมล็ดบัวใช้เป็นยาบำรุงกำลัง บำรุงครรภ์ แก้กษัยและลำไส้อักเสบ (รัชนี้ จวีราช, 2532) ดอกบัวมีรสหวานแก้ช้ำใน ใช้ห้ามเลือด และแก้อาการผื่นคันโดยใช้กليبดอกพอกบริเวณที่คัน (วิจิต วัฒนาวินูตย์, 2529) เกสรตัวผู้เข้าเครื่องยาหอมบำรุงหัวใจและใช้เป็นยาชูกำลัง ในตำรับยาไทยที่ประกอบด้วยเกสรทั้ง 5 ได้แก่ เกสรมะลิ พิกุล สารภี บุนนาค และบัวหลวง ใช้เป็นตำรับเฉพาะสำหรับบำรุงหัวใจและบำรุงกำลัง (กัญญา คิวิเศษ และคณะ, 2542; วิสุดา สุวิทย์วัฒน์, 2540; รัชนี้ จวีราช, 2532) ดิบัวแห้งชงกับน้ำร้อนรับประทาน ช่วยขยายหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงหัวใจ นอกจากนี้ยังใช้แก้ไข้ แก้ก้อนในและกระหายน้ำ (ชยันตร์ พิเชียรสุนทร และคณะ, 2541) ใบบัวมีฤทธิ์ลดความดันโลหิต โดยนำใบบัวสดหรือแห้งต้มกับน้ำให้เดือด ต้มครั้งละ 1 แก้ว วันละ 3 ครั้ง คั้นติดต่อกันอย่างน้อย 20 วัน จะช่วยให้ความดันโลหิต

ลดลงได้ (วันดี กฤษณพันธ์, 2541) จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นว่าบัวหลวงเป็นสมุนไพรที่ทรงคุณค่าทางยา และเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพสูงที่จะนำมาพัฒนาให้เกิดประโยชน์

ได้มีการนำส่วนต่างๆของบัวหลวงมาทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ทำให้เกิดหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ยืนยันสรรพคุณทางยาของสมุนไพรบัวหลวง ดังนี้ สารสกัดจากเหง้าบัวสามารถลดน้ำตาลในเลือดในหนูขาวที่ทำให้เกิดเบาหวานโดย streptozotocin (Mukherjee et al, 1995a) และเสริมฤทธิ์ลดน้ำตาลของอินซูลิน (Mukherjee et al, 1997) สารสกัดจากเหง้ายังมีฤทธิ์ขับปัสสาวะในหนูขาว อีกทั้งยังเพิ่มการขับ Na^+ , K^+ และ Cl^- ในปัสสาวะ (Mukherjee et al, 1996) เมื่อฉีดสารสกัดจากเหง้าบัวหลวงเข้าช่องท้อง หนูถีบจักรในขนาด 0.5 mg/kg พบว่าสามารถป้องกันการชักที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (Dhawan et al, 1977) การทดลองในหนูขาวโดยฉีดสารสกัดจากเหง้าบัวหลวงเข้าช่องท้อง มีผลทำให้กล้ามเนื้อคลายตัว การเคลื่อนไหวไม่สัมพันธ์กัน และมีผลเพิ่มฤทธิ์ของ pentobarbitone ผลนี้บ่งชี้ว่าสารสกัดเหง้าบัวหลวงมีฤทธิ์กระบบประสาทส่วนกลาง (Mukherjee et al, 1996) เมื่อป้อนสารสกัดจากเหง้าบัวหลวงให้หนูขาวพบว่าสามารถลดอาการท้องเสียที่เหนียวน้ำให้เกิดด้วยน้ำมันละหุ่งและลดการเคลื่อนไหวของทางเดินอาหาร (Mukherjee et al, 1995b; Talukder et al, 1998) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากเหง้าบัวหลวงด้วย methanol สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ประสาทในสมองส่วน dentate gyrus ของ hippocampus ซึ่งนำไปสู่ข้อเสนอแนะว่าสารสกัดจากเหง้าบัวหลวงน่าจะสามารถเพิ่มการเรียนรู้และความจำได้ (Yang et al, 2008)

จากการทดสอบสารสกัดจากดีบัวหลวงต่อการทำงานของหัวใจในหนูขาวที่แยกจากร่างกาย พบว่าสารสกัดนี้สามารถเพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจและเพิ่มแรงบีบตัวของหัวใจห้องบน (Malakul et al, 2001) เมื่อนำใบบัวหลวงแห้งมาสกัดด้วย 95% ethanol แล้วป้อนสารสกัดแก่หนูขาว พบว่าสามารถป้องกันการเพิ่มระดับโคเลสเตอรอลในเลือด (Onishi et al, 1984) สารสกัดจากรากบัวหลวงมีฤทธิ์ลดไข้ในกระต่าย และลดการเกร็งของลำไส้เล็กหนูตะเภา (Mokkhasmit et al, 1971) นอกจากสารสกัดจากเหง้าบัวหลวงจะมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดแล้ว มีหลักฐานยืนยันว่าสารสกัดจากเมล็ดบัวหลวงก็มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดเช่นกัน โดยเสริมฤทธิ์ของอินซูลินในการนำน้ำตาลเข้าเซลล์ (Huralikuppi et al, 1991) สารสกัดจากเมล็ดยังมีฤทธิ์ยับยั้ง α_2 -adrenergic receptors (Han et al, 1991) แสดงว่าสารสกัดนี้สามารถต้านการออกฤทธิ์ของ catecholamine ในร่างกายได้ การศึกษาในประเทศอินเดีย พบว่าส่วนของดอกบัวหลวงแห้งมีฤทธิ์ลดไข้ และรักษาอาการท้องร่วงจากอหิวาตกโรค (Ahmad et al, 2001; Jain & Verma, 1981)

ส่วนของใบบัวหลวงสดสามารถนำมาทำเป็นยาพอกใช้ในการรักษาโรคเรื้อน (Mitra et al, 1976) เมื่อนำใบบัวสดมาสกัดแล้วทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกับเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่ามีฤทธิ์ต้านภูมิแพ้โดยยับยั้งการหลั่ง β -hexosaminidase จาก basophilic leukemia cells (Tanaka et al, 1992) สารสกัดใบบัวหลวงด้วย ethanol มีฤทธิ์กระตุ้น lipid metabolism และป้องกันการเพิ่มของน้ำหนักตัวในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง (Ohkoshi et al, 2007; Ono et al, 2006) เมื่อนำใบบัวหลวงมาสกัดด้วย methanol พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้าน

อนุมูลอิสระ (antioxidant effect) และพบว่าสารสกัดมีผลยับยั้งเอนไซม์ aldose reductase และการเกิด glycation products ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบบัวหลวงน่าจะสามารถป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวานและโรคที่มีความสัมพันธ์กับการเกิด oxidative stress (Jung et al, 2008)) สารสกัดจากใบบัวหลวงด้วย 5% ethanol เมื่อทดสอบกับการทำงานของหัวใจหนูขาวที่แยกจากตัวสัตว์ทดลองพบว่าสามารถเพิ่มอัตราการเต้นและแรงบีบตัวของหัวใจได้ และเมื่อให้สารสกัดแก่หนูขาวทางหลอดเลือดดำพบว่าผลเปลี่ยนแปลงลักษณะของคลื่นไฟฟ้าหัวใจ กล่าวคือทำ PR-interval สั้นลง และขนาดของ T-wave ใหญ่ขึ้นและเกิดเร็วขึ้น แสดงว่าสารสกัดใบบัวหลวงสามารถเร่งการนำไฟฟ้าจากห้องบนลงสู่ห้องล่างและเร่งการเกิดไฟฟ้าของหัวใจห้องล่าง (Trongtorsak et al, 2005) นอกจากนี้สารสกัดใบบัวหลวงยังสามารถลดความดันโลหิตแบบเฉียบพลันในหนูขาวปกติ และแบบระยะยาวในหนูขาวที่มีภาวะความดันโลหิตสูง (Trongtorsak et al, 2007) จากการวิเคราะห์สารประกอบในส่วนของใบบัวหลวงพบว่าส่วนใหญ่ประกอบด้วยสารในกลุ่ม alkaloids โดยเฉพาะ isoquinoline alkaloids และนอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารกลุ่ม flavonoids และ steroids (วิสุตา สุวิทย์วัฒน์, 2540; Kashiwada et al, 2005; Tang & Eisenbrand; 1992) มีรายงานว่าสาร asimilobine และ lirinidine สามารถป้องกันการหดเกร็งของหลอดเลือดเอออร์ตาของกระต่ายได้ (Shoji et al, 1987) alkaloid ทั้งสองนี้สามารถพบได้ในใบบัวหลวง (วิสุตา สุวิทย์วัฒน์, 2540) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากใบบัวหลวงอาจมีกลไกการออกฤทธิ์ลดความดันโลหิตโดยทำให้หลอดเลือดคลายตัว การศึกษานี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะทดสอบฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวง

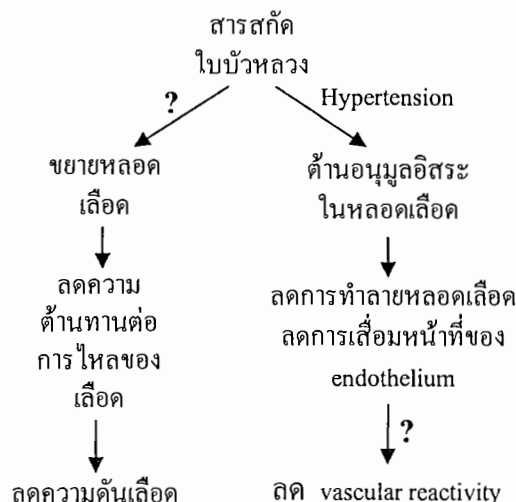
ในปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับภาวะความดันโลหิตสูงอย่างกว้างขวาง ทำให้ทราบถึงพยาธิสภาพของโรคนี้น่ามากขึ้น ในภาวะนี้มักพบว่าหลอดเลือดแดงจะมีความตึงตัวมากกว่าปกติซึ่งเป็นผลจากการทำงานที่ผิดปกติของประสาทและฮอร์โมน (Bakris & Mensah, 2003) นอกจากนี้ยังพบว่าหลอดเลือดทำงานผิดปกติ โดยอาจจะตอบสนองต่อสารตีบหลอดเลือดเพิ่มขึ้นแต่ตอบสนองต่อสารคลายหลอดเลือดลดลง (Takata & Kato, 1996) ในภาวะความดันโลหิตสูงหลอดเลือดยังคงพบว่ามีการเสื่อมหน้าที่ของ endothelium (endothelial dysfunction) กล่าวคือ endothelial cells จะหลั่งสารคลายหลอดเลือดได้น้อยกว่าปกติ จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งในการเพิ่มแรงตึงและแรงต้านทานในหลอดเลือด (Boulanger, 1999) มีรายงานยืนยันว่าในพลาสมาของผู้ป่วยความดันโลหิตสูงจะมีระดับ angiotensin II (AngII) สูงกว่าปกติ และ AngII นี้จะทำให้เกิดอนุมูลอิสระที่หลอดเลือดมากเกินไป หรือที่เรียกว่าเกิดภาวะ oxidative stress ส่งผลให้เกิดการทำลายหลอดเลือดและเกิดการเสื่อมหน้าที่ของ endothelium (endothelium dysfunction) ทำให้ผลิตสารคลายหลอดเลือด nitric oxide ได้น้อยลง (Sowers, 2002; Touyz, 2004)

จากที่กล่าวมาแล้วจะเห็นว่าหากยาที่ใช้รักษาโรคความดันโลหิตสูงมีทั้งฤทธิ์ขยายหลอดเลือดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidative activity) ก็น่าจะส่งผลดีต่อภาวะความดันโลหิตสูง กล่าวคือ ฤทธิ์ขยายหลอดเลือดจะช่วยให้ความดันโลหิตลดลง ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน่าจะป้องกันไม่ให้ endothelium เสื่อมมากขึ้น ซึ่งน่าจะส่งผลให้ endothelium ทำงานได้ดีขึ้น โดยหลั่งสารคลายหลอดเลือด

nitric oxide ได้ดีขึ้น ในการศึกษาเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยพบว่าสารสกัดใบบัวหลวงนอกจากมีฤทธิ์ลดความดันโลหิตแล้วยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นสารสกัดใบบัวหลวงน่าจะมีผลปกป้องหลอดเลือดจากอนุมูลอิสระในภาวะความดันโลหิตสูง ซึ่งน่าจะส่งผลให้การทำงานของหลอดเลือดในภาวะนี้ดีขึ้น คณะผู้วิจัยจึงมีจุดมุ่งหมายที่จะทดสอบผลในการปกป้องหน้าที่ของหลอดเลือดในภาวะความดันโลหิตสูงของสารสกัดใบบัวหลวง นอกจากนี้ยังทดสอบฤทธิ์ขยายหลอดเลือดและกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบบัวหลวง ดังจะเห็นแล้วว่าใบบัวหลวงเป็นส่วนที่มีคุณประโยชน์และคุณค่าทางยาสูง จึงควรแก่การนำมาศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องเพื่อที่จะนำไปสู่การพัฒนาใบบัวหลวงให้เป็นยารักษาโรคต่อไป

กรอบแนวความคิดของงานวิจัย

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้นจะเห็นว่าสารสกัดใบบัวหลวงมีฤทธิ์ลดความดันโลหิต แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ลดความดันโลหิตนี้ ความเป็นไปได้ทางหนึ่งคือ สารสกัดใบบัวหลวงอาจจะออกฤทธิ์โดยการทำให้หลอดเลือดขยายตัวเช่นเดียวกับลดความดันโลหิตที่ใช้ในการรักษาโรคความดันโลหิตสูงในปัจจุบัน (ดังแผนภูมิ) การศึกษานี้จึงทดสอบผลของสารสกัดใบบัวหลวงต่อหลอดเลือดและกลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้น นอกจากนี้สารสกัดใบบัวหลวงยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งน่าจะส่งผลดีต่อหลอดเลือดในภาวะความดันโลหิตสูง โดยลดการทำลายหลอดเลือดและลดการเสื่อมหน้าที่ของ endothelium ซึ่งผลดังกล่าวน่าจะเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของหลอดเลือด (vascular reactivity) ในภาวะความดันโลหิตสูง โดยหลอดเลือดอาจมีการตอบสนองต่อสารตีบหลอดเลือดลดลงแต่ตอบสนองต่อสารคลายหลอดเลือดมากขึ้น ซึ่งจะช่วยให้ความดันโลหิตลดลง (ดังแผนภูมิ) ดังนั้นการศึกษานี้จึงตรวจสอบผลของสารสกัดใบบัวหลวงในการปกป้องหน้าที่ของหลอดเลือดในภาวะความดันโลหิตสูงด้วย



แผนภูมิ: แสดงกรอบแนวความคิดของการใช้สมุนไพรใบบัวหลวงลดความดันโลหิตในภาวะความดันโลหิตสูง ตำแหน่งเครื่องหมาย “?” เป็นประเด็นที่จะศึกษา

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวงและกลไกการออกฤทธิ์
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดใบบัวหลวงต่อการตอบสนองของหลอดเลือด (vascular reactivity) ในภาวะความดันโลหิตสูง

ขอบเขตของโครงการวิจัย

รูปแบบของการวิจัยเป็นการวิจัยเชิงทดลอง (experimental research) โดยทำการทดลองในหนูขาว นำใบบัวหลวงมาเตรียมเป็นสารสกัดอย่างหยาบแล้วนำไปศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ดังนี้

- 1) ทดสอบผลของสารสกัดใบบัวหลวงต่อหลอดเลือดเอออร์ตา (aorta) ที่แยกจากหนูขาว โดยศึกษาฤทธิ์ขยายหลอดเลือด (vasorelaxant effect) และศึกษากลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้น เพื่อดูว่าสารสกัดใบบัวหลวงออกฤทธิ์ผ่าน receptors ชนิดใดในหลอดเลือด
- 2) ทดสอบผลของสารสกัดใบบัวหลวงในการปกป้องการทำงานของหลอดเลือดในภาวะความดันโลหิตสูง โดยเหนี่ยวนำให้หนูขาวมีภาวะความดันโลหิตสูงด้วยวิธีการผ่าตัดตีบหลอดเลือดแดงของไต (renal artery) เมื่อหนูขาวมีภาวะความดันโลหิตสูงแล้วทำการแยกหลอดเลือดเอออร์ตา (aorta) มาศึกษาการทำงานด้วยการตรวจสอบการตอบสนองต่อสารตีบหลอดเลือดและสารคลายหลอดเลือดในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดใบบัวหลวง โดยเปรียบเทียบกับการทำงานของหลอดเลือดจากหนูขาวปกติ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การศึกษานี้ทำให้ได้องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ลดความดันโลหิตของสารสกัดใบบัวหลวง ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อการศึกษาวิจัยในขั้นสูงต่อไป อีกทั้งยังเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่สำคัญจากนักวิจัยผู้สมัคร เป็น การสนับสนุนการพัฒนาสมุนไพรไทยให้ได้มาตรฐานสากล

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

การสกัดสารจากใบบัวหลวง

ใบบัวหลวงที่ใช้ในการศึกษานี้ซื้อมาจากบ่อบัวแห่งหนึ่งในจังหวัดชลบุรีในช่วงเดือน มกราคม พ.ศ. 2550 โดยเก็บจากบ่อบัวในตอนเช้าช่วง 9.00-11.00 น นำใบบัวหลวงสดมาล้าง แล้วตากแดดให้แห้ง จากนั้นหั่นเป็นชิ้นให้มีขนาดประมาณ 1 นิ้ว นำใบบัวที่หั่นแล้วไปอบด้วยเครื่อง hot air oven ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วเก็บใบบัวหลวงในถุงพลาสติกและผูกปากถุงให้แน่น ใบบัวเหล่านี้จะจัดเก็บไว้ในลักษณะนี้จนกว่าจะนำไปใช้ในการสกัดสารต่อไป

การสกัดสารได้ทำตามขั้นตอนที่ได้รายงานไว้แล้ว (Trongtorsak et al, 2007) โดยนำใบบัวหลวงแห้ง 50 g ต้มกับ 5% ethanol ปริมาตร 2000 ml โดยต้มให้เดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรองสารละลายด้วยผ้าขาวบาง นำสารละลายไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 37°C โดยใส่สารละลายจากใบบัวหลวงครั้งละ 250 ml ทำการระเหยจนสารละลายลดลงเหลือประมาณครึ่งหนึ่ง เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในตู้แช่แข็ง -80°C เป็นเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายแช่แข็งนี้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer ซึ่งจะได้สารสกัดที่มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาล การสกัดโดยวิธีนี้จะได้สารสกัดใบบัวหลวงประมาณ 19.87% ของน้ำหนักใบบัวแห้ง เก็บสารสกัดใบบัวหลวงไว้ในตู้ดูดความชื้นสำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

การเตรียมสารละลายเลี้ยงเนื้อเยื่อและสารเคมี

สารละลายเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใช้ในการศึกษาการทำงานของหลอดเลือดคือ Krebs solution ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ NaCl 118 mM, KCl 4.6 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, MgSO_4 1.2 mM, NaHCO_3 25 mM, CaCl_2 1.8 mM, glucose 11 mM ในบางการทดลองจะใช้ low sodium Krebs solution ซึ่งเตรียมโดยลด NaCl เหลือ 62.6 mM ส่วนองค์ประกอบอื่นๆเหมือน normal Krebs solution สำหรับการเตรียม Ca^{2+} -free Krebs solution จะแทนที่ CaCl_2 ด้วย EGTA 1 mM

สารสกัดใบบัวหลวงเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง โดยละลายใน Krebs solution แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง สารเคมีต่างๆ ได้แก่ phenylephrine (PE), acetylcholine (Ach), isoproterenol, Nadolol, N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), และ methylene blue เตรียมโดยการละลายในน้ำกลั่น เมื่อละลายสารเคมีแล้วจะทำการเป็น aliquot เก็บไว้ที่ -20°C เมื่อทำการทดลองจะนำไปเจือจางด้วย Krebs solution ให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ

สารเคมีทั้งหมดซื้อจากบริษัท Sigma Chemical (St. Louis, USA)

สัตว์ทดลอง

การศึกษานี้ใช้หนูขาว (rats) เพศผู้ สายพันธุ์ Sprague Dawley สัตว์ทดลองนี้ซื้อจาก สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้ให้หนูพักอยู่ในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองของภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยให้หนูขาวปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่เป็นเวลา 3-4 วัน ก่อนเริ่มการทดลอง .

ในการศึกษาฤทธิ์ขยายหลอดเลือดและกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบบัวหลวง ใช้หนูขาวอายุ 10-12 สัปดาห์ จำนวน 16 ตัว ส่วนการศึกษาผลของสารสกัดใบบัวหลวงต่อการตอบสนองของหลอดเลือดในภาวะความดันโลหิตสูง ใช้หนูขาวอายุ 6-7 สัปดาห์ จำนวน 20 ตัว โดยแบ่งเป็น หนูขาวกลุ่มควบคุม (ความดันโลหิตปกติ) 10 ตัว และหนูขาวกลุ่มความดันโลหิตสูง 10 ตัว

การผ่าตัดเหนี่ยวนำให้มีภาวะความดันโลหิตสูง

หนูขาวกลุ่มความดันโลหิตสูงจะได้รับการผ่าตัดเหนี่ยวนำให้เป็นความดันโลหิตสูงด้วยการตีบ renal artery ก่อนการผ่าตัด 3 วัน ได้ทำการวัดความดันโลหิตทางหางหนูเพื่อเก็บเป็นข้อมูลความดันโลหิตก่อนผ่าตัด การผ่าตัดเริ่มด้วยการทำให้หนูสลบโดยการฉีด Thiopental sodium (Abbott) ขนาด 20 mg/kg เข้าช่องท้อง แล้วตามด้วยการฉีด Ketamine ขนาด 70 mg/kg เข้าทางกล้ามเนื้อ เมื่อหนูสลบทำผ่าตัดเปิดไตข้างซ้าย เลาะเนื้อเยื่อเพื่อแยก renal artery นำลวดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3 mm วางตามแนวของหลอดเลือด ใช้ไหมผ่าตัด (size 2/0; Aesculap AG & CO.) ผูกหลอดเลือดแล้วดึงลวดออก จากนั้นเย็บปิดแผล วิธีนี้จะทำให้ renal artery ตีบ เลือดไปเลี้ยงไตลดลงทำให้เกิดการกระตุ้น renin-angiotensin-aldosterone system (Coleman, 1980) หลังทำผ่าตัดป้ายแผลด้วยยาฆ่าเชื้อ Betadine (New Life Pharma CO., LTD.) และป้ายยาทุกวันเพื่อป้องกันภาวะแทรกซ้อนจากการติดเชื้อ หลังผ่าตัด 6 สัปดาห์ หนูขาวกลุ่มนี้จะมีภาวะความดันโลหิตสูงโดยตรวจสอบความดันโลหิตทางหางหนู จะพบว่าความดันโลหิตเพิ่มขึ้นจากก่อนผ่าตัดมากกว่าหรือเท่ากับ 10 mmHg

การวัดความดันโลหิตทางหางหนู (Tail-cuff Blood Pressure Measurement)

การศึกษานี้ใช้วิธีวัดความดันโลหิตทางหางหนู โดยใช้เครื่อง ITC Model 229 Pulse Amplifier/Pump photoelectric tail cuff system (ITC Life Sciences; Woodland Hills, CA) ซึ่งจะเชื่อมต่อเข้ากับระบบบันทึก Biopac MP100 recording system (Biopac Inc.) เพื่อบันทึกคลื่นชีพจร (pulse waves)

ก่อนวัดความดันโลหิตต้องให้ความร้อนแก่หนูขาว (อุณหภูมิประมาณ 38°C) เป็นเวลา 3-5 นาที โดยใช้โคมไฟขนาด 100 วัตต์ เพื่อให้หลอดเลือดแดงบริเวณหางขยายตัว เครื่องจึงสามารถตรวจจับคลื่นชีพจรได้ หลังจากให้ความร้อนแล้วใช้ผ้าห่อหนู รอนหนูสงบนิ่ง ไม่ตื่นเต้น นำ tail cuff สวมที่หางหนูขาว เครื่อง ITC Model 229 จะทำหน้าที่ ป้อนลมเข้าและปล่อยออกจาก tail cuff แบบอัตโนมัติ เมื่อ

เครื่องปั๊มลมเข้าจะทำให้หลอดเลือดที่ทางหนูถูกกดจนบันทึกคลื่นชีพจรไม่ได้ จากนั้นเครื่องจะปล่อยลมออกจนถึงระดับหนึ่งจะสามารถบันทึกคลื่นชีพจรได้อีกครั้ง ความดันใน tail cuff ณ จุดที่บันทึกคลื่นชีพจรคลื่นแรกได้อีกครั้งคือค่า systolic blood pressure (SBP) ส่วนคลื่นชีพจรที่ใหญ่ที่สุดคือค่า Mean arterial pressure (MAP) ค่า pulse rate (PR) คำนวณจากกราฟบันทึกของคลื่นชีพจร หนูขาวแต่ละตัวจะได้รับการตรวจสอบความดันโลหิต 2 วันติดต่อกันแล้วนำค่าความดันโลหิตทั้ง 2 วันหาค่าเฉลี่ย

ทำการวัดความดันโลหิตของหนูขาวทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มความดันโลหิตสูงในสัปดาห์ก่อนทำผ่าตัด (week 0) และวัดความดันโลหิตอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 6 หลังผ่าตัด (week 6) โดยเปรียบเทียบความดันโลหิตของหนูขาวทั้ง 2 กลุ่ม

การเตรียมหลอดเลือดเอออร์ตา (Preparation of aortic rings)

สลบหนูขาวด้วย Thiopental ขนาด 70 mg/kg โดยการฉีดเข้าช่องท้อง เมื่อหนูขาวสลบจึงผ่าตัดเปิดช่องอกเพื่อแยก thoracic aorta นำหลอดเลือดแช่ใน oxygenated-Krebs solution ที่เย็น จากนั้นทำความสะอาดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกจากหลอดเลือด แล้วตัดหลอดเลือดเป็นวงจำนวน 4 ส่วน โดยแต่ละส่วนมีความยาวประมาณ 3 mm นำลวด stainless 2 เส้นสอดเข้าไปในรูของหลอดเลือด แล้วนำหลอดเลือดแขวนใน organ bath โดยให้ลวดเส้นหนึ่งยึดกับแท่งแก้วใน organ bath ส่วนลวดอีกเส้นหนึ่งต่อเข้ากับ isometric force transducer (Biopac Inc.) ซึ่งจะส่งสัญญาณเข้าสู่ระบบบันทึก Biopac MP100 acquisition system เพื่อบันทึกแรงดึงของหลอดเลือดทั้ง 4 ส่วน ขณะทดลองหลอดเลือดจะอยู่ใน organ bath ที่มี Krebs solution, pH 7.4 ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37°C และให้ 95%O₂-5%CO₂ เมื่อแขวนหลอดเลือดใน organ bath แล้วจะให้แรงดึง (resting tension) แก่หลอดเลือด 1 g จากนั้นปล่อยให้หลอดเลือดเข้าสู่สภาวะคงดุล (steady state) เป็นเวลา 60 min ก่อนเริ่มการทดลอง โดยเปลี่ยน Krebs solution ทุกๆ 15-20 min

รายละเอียดการทดลอง

ส่วนที่ 1 การศึกษาฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวงและกลไกการออกฤทธิ์

1. ผลของสารสกัดใบบัวหลวงต่อการหดตัวของหลอดเลือดที่เหนี่ยวนำด้วย Phenylephrine

ภายหลังจากหลอดเลือดเข้าสู่สภาวะคงดุลแล้ว กระตุ้นให้หลอดเลือดหดตัวด้วย phenylephrine (PE) 1 μ M จนได้แรงดึงสูงสุด (maximum tension) จากนั้นให้สารสกัดใบบัวหลวงแบบ cumulative dose ในขนาด 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 μ g/ml บันทึกการเปลี่ยนแปลงแรงดึงของหลอดเลือดตลอดการทดลอง ล้างหลอดเลือดหลายๆครั้งด้วย Krebs solution หลังจากหลอดเลือดเข้าสู่สภาวะคงดุลอีก 30 min แล้วจึง incubate กับ nadolol 10 μ M (β -adrenergic receptor antagonist) หรือ L-NAME 10 μ M (nitric oxide synthase inhibitor) หรือ methylene blue 1 μ M (guanylyl cyclase inhibitor) โดย incubate กับสารหนึ่งสารใดข้างต้นเป็นเวลา 30 min จากนั้นกระตุ้นให้หลอดเลือดหดตัวอีกครั้งด้วย PE 1 μ M จนได้แรง

ตั้งสูงสุดแล้วจึงให้สารสกัดใบบัวหลวงในขนาดเดิมอีกครั้งแบบ cumulative dose บันทึกการเปลี่ยนแปลงแรงดึงตลอดการทดลอง

2. ผลของสารสกัดใบบัวหลวงต่อการหลัง Ca^{2+} จากภายในเซลล์

เพื่อทดสอบว่าสารสกัดใบบัวหลวงทำให้หลอดเลือดคลายตัวโดยไปมีผลยับยั้งการหลัง Ca^{2+} ภายในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหรือไม่ การศึกษานี้จึงทดลองใน Ca^{2+} -free Krebs solution (Guedes et al, 2004) ภายหลังจากหลอดเลือดเข้าสู่สภาวะคงคูลแล้ว ล้างหลอดเลือดด้วย Ca^{2+} -free Krebs solution 3 ครั้ง จากนั้น incubate หลอดเลือดกับ Ca^{2+} -free Krebs solution เป็นเวลา 15 min กระตุ้นให้หลอดเลือดหดตัวด้วย PE 1 μ M จนได้แรงดึงสูงสุด วัดแรงดึงที่เกิดขึ้น ล้างหลอดเลือดด้วย normal Krebs solution หลายครั้งแล้ว incubate กับ normal Krebs solution เป็นเวลา 60 min ให้หลอดเลือดกลับสู่สภาวะคงคูล จากนั้นทำการทดสอบผลของ PE 1 μ M ต่อการหดตัวของหลอดเลือดอีกครั้งหลังจาก incubate หลอดเลือดกับสารสกัดใบบัวหลวงเป็นเวลา 15 min ตามวิธีการที่กล่าวมาแล้วข้างต้น เปรียบเทียบแรงดึงของหลอดเลือดที่เกิดจาก PE ขณะที่มีและไม่มีสารสกัดใบบัวหลวง

ส่วนที่ 2 การศึกษาผลของสารสกัดใบบัวหลวงต่อการตอบสนองของหลอดเลือด (vascular reactivity)

ในการศึกษานี้ใช้หลอดเลือดที่แยกจากหนูขาวที่มีความดันโลหิตปกติ (normotensive) และที่มีความดันโลหิตสูง (hypertensive) โดยนำหลอดเลือดทั้ง 2 กลุ่มมาทดสอบการตอบสนองต่อสารตีบหลอดเลือด PE (α -adrenergic receptor agonist) ขนาด 10^{-10} – 10^{-6} M และตอบสนองต่อสารคลายหลอดเลือด 2 ชนิดคือ Ach (muscarinic receptor agonist) และ isoproterenol ขนาด 10^{-9} – 10^{-5} M โดยทำการทดสอบในสภาวะที่ไม่มีและมีสารสกัดใบบัวหลวง 100 μ g/ml

การศึกษาในขั้นตอนนี้เริ่มจากให้หลอดเลือดเข้าสู่สภาวะคงคูลใน normal Krebs solution เป็นเวลา 60 min จากนั้น incubate หลอดเลือดใน low sodium Krebs solution อีก 15 min แล้วกระตุ้นให้หลอดเลือดตีบตัวด้วย KCl 60 mM จนได้ maximum tension จึงล้างหลอดเลือดด้วย normal Krebs solution ตามด้วยการ incubate หลอดเลือดกับ normal Krebs solution 30 min หลอดเลือดกลุ่มที่ต้องการทดสอบผลของสารสกัดใบบัวหลวงจะเติมสารสกัดใบบัวหลวง 100 μ g/ml แล้ว incubate ต่ออีก 15 min ส่วนหลอดเลือดอีกกลุ่มจะไม่เติมสารสกัดใบบัวหลวงจะ incubate ต่ออีก 15 min เช่นกัน เมื่อครบกำหนดกระตุ้นให้หลอดเลือดตีบตัวด้วย PE (10^{-10} – 10^{-6} M) แบบ cumulative dose พร้อมกับบันทึกการเปลี่ยนแปลงแรงดึงของหลอดเลือด ทำการล้างหลอดเลือดแล้วปล่อยให้หลอดเลือดเข้าสู่สภาวะคงคูล 60 min คำนวณหาขนาดความเข้มข้นของ PE ที่ทำให้เกิดการตอบสนอง 60% (60% response) ซึ่งจะใช้กระตุ้นหลอดเลือดให้ตีบตัวในการทดสอบการตอบสนองต่อ Ach และ isoproterenol ในขั้นต่อไป

เมื่อหลอดเลือดกลับสู่สภาวะคงตัว หลอดเลือดกลุ่มที่ต้องการทดสอบผลของสารสกัดใบบัวหลวงจะเติมสารสกัดใบบัวหลวง 100 µg/ml แล้ว incubate ต่ออีก 15 min ส่วนหลอดเลือดอีกกลุ่มจะไม่เติมสารสกัดใบบัวหลวงจะ incubate ต่ออีก 15 min เช่นกัน เมื่อครบกำหนดกระตุ้นให้หลอดเลือดตีบตัวด้วย PE ในขนาดความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการตอบสนอง 60% จนได้ maximum response เริ่มทดสอบผลของ Ach หรือ isoproterenol ขนาด 10^{-9} – 10^{-5} M โดยการให้แบบ cumulative dose และบันทึกแรงดึงของหลอดเลือดตลอดการทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลทั้งหมดแสดงในรูป mean±S.E.M. การเปรียบเทียบข้อมูลความดันโลหิตค่า SBP, MAP และ PR ระหว่างกลุ่มหนูขาวที่มีความดันโลหิตปกติกับหนูขาวที่มีความดันโลหิตสูง ใช้สถิติวิเคราะห์แบบ Student's *t* test หากค่า $P < 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในการศึกษาฤทธิ์ขยายหลอดเลือดและกลไกการออกฤทธิ์ ได้คำนวณแรงดึงของหลอดเลือดหลังจากให้สารสกัดใบบัวหลวงเป็นเปอร์เซ็นต์ของแรงดึงสูงสุดที่เกิดจาก PE (% of maximum contraction to PE) แล้วแสดงข้อมูลเป็นเปอร์เซ็นต์การคลายตัว (% relaxation) โดยคำนวณจากสมการ

$$\% \text{ relaxation} = 100 - (\% \text{ of maximum contraction to PE})$$

เปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลระหว่างกลุ่มด้วยสถิติวิเคราะห์แบบ Student's *t* test หากค่า $P < 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในการศึกษาผลของสารสกัดใบบัวหลวงต่อการตอบสนองของหลอดเลือด แรงดึงของหลอดเลือดที่เกิดจาก PE แสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของแรงดึงสูงสุดที่เกิดจาก KCl (% of maximum response to KCl) ส่วนการตอบสนองต่อ Ach และ isoproterenol แสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์การคลายตัว (% relaxation) เปรียบเทียบความแตกต่างของ dose-response curve ด้วยสถิติวิเคราะห์แบบ two-way analysis of variance (ANOVA) ตามด้วย Tukey HSD test หากค่า $P < 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คำนวณค่า EC_{50} (50% effective concentration) จาก dose-response curve ซึ่งจะนำไปคำนวณค่าเป็น pD_2 value จากสูตร $pD_2 = -\log EC_{50}$ นอกจากนี้ยังหาค่าการตอบสนองสูงสุดต่อสารต่างๆ (E_{max}) โดย E_{max} ที่เกิดจากการตอบสนองต่อ PE จะหมายถึงค่าการหดตัวสูงสุดเมื่อให้ PE แสดงค่าเป็น % of maximum response to KCl ส่วน E_{max} ที่เกิดจากการตอบสนองต่อ Ach และ isoproterenol หมายถึงการคลายตัวสูงสุดเมื่อให้ Ach และ isoproterenol ตามลำดับ โดยแสดงค่าเป็น % relaxation เปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลระหว่างกลุ่มด้วยสถิติวิเคราะห์แบบ Student's *t* test หากค่า $P < 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 3

ผลการทดลอง

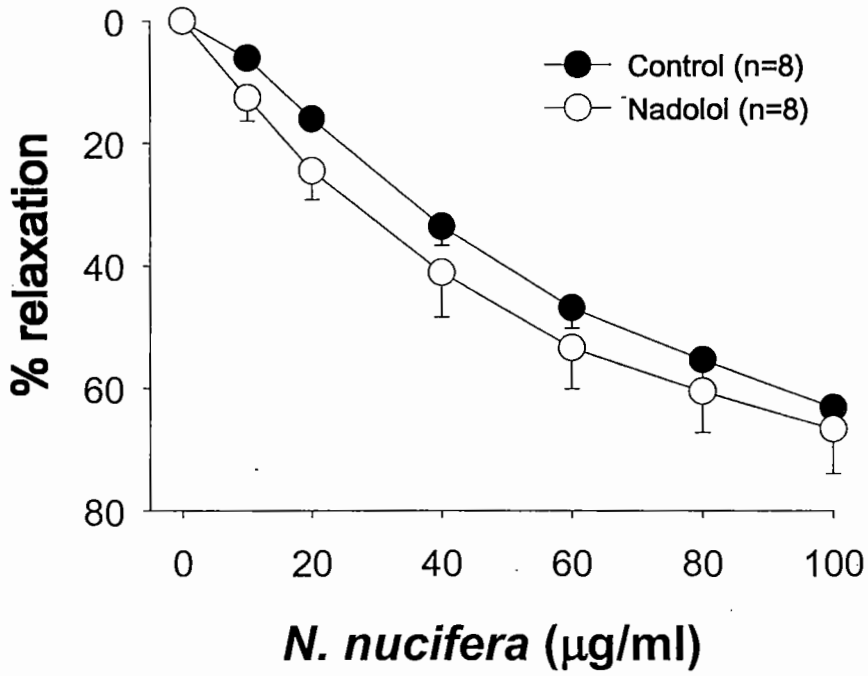
ส่วนที่ 1 การศึกษาฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวงและกลไกการออกฤทธิ์

1. ผลของสารสกัดใบบัวหลวงต่อการหดตัวของหลอดเลือดที่เหนี่ยวนำด้วย *Phenylephrine*

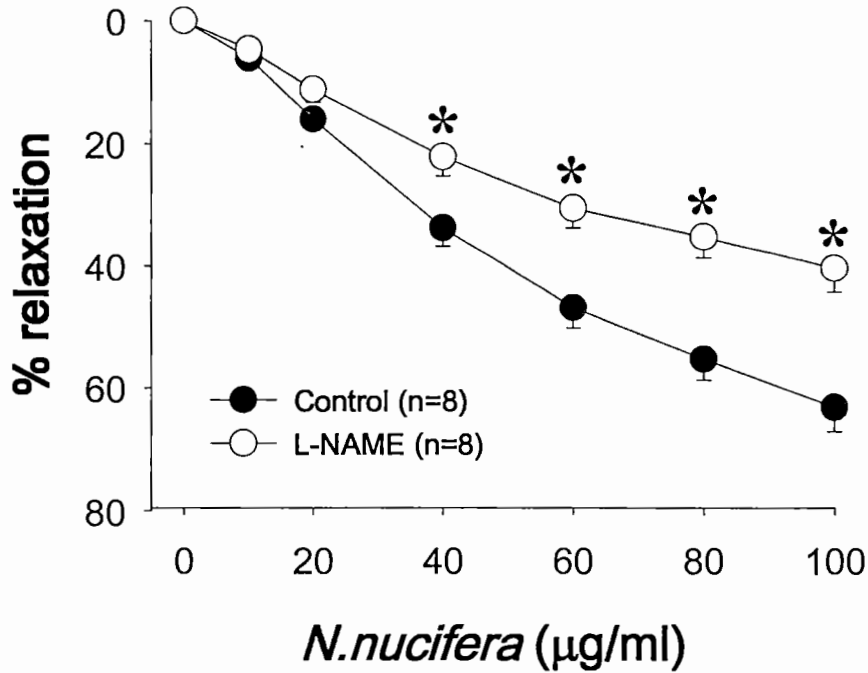
เมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวง 10-100 $\mu\text{g/ml}$ แก่หลอดเลือดที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้หดตัวด้วย PE 1 μM พบว่าหลอดเลือดจะคลายตัวได้ 6-63% ตามขนาดของสารสกัดใบบัวหลวง (dose-dependent response) ดังแสดงในรูปที่ 1 เมื่อให้ nadolol 10 μM ปิดกั้น β -adrenergic receptors พบว่าไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์ของสารสกัดใบบัวหลวงได้ (รูปที่ 1) ค่า E_{max} เมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวงอย่างเดียวมีค่าเท่ากับ $63.17 \pm 3.96\%$ ในขณะที่เมื่อให้ nadolol ร่วมด้วยมีค่าเท่ากับ $66.69 \pm 7.25\%$ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1)

เมื่อให้ L-NAME 10 μM ร่วมกับสารสกัดใบบัวหลวง พบว่าหลอดเลือดคลายตัวลดลง กล่าวคือคลายตัวได้เพียง 5-40% การคลายตัวของหลอดเลือดจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดใบบัวหลวง 40-100 $\mu\text{g/ml}$ (รูปที่ 2) เมื่อพิจารณาที่ค่า E_{max} จะเห็นว่าเมื่อให้ L-NAME ร่วมกับสารสกัดใบบัวหลวงค่า E_{max} ลดลงเหลือเพียง $40.37 \pm 3.86\%$ ซึ่งแตกต่างจากค่า E_{max} เมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวงเพียงอย่างเดียว ($P < 0.05$; ตารางที่ 1) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบบัวหลวงน่าจะออกฤทธิ์ขยายหลอดเลือดโดยผ่านทาง NO

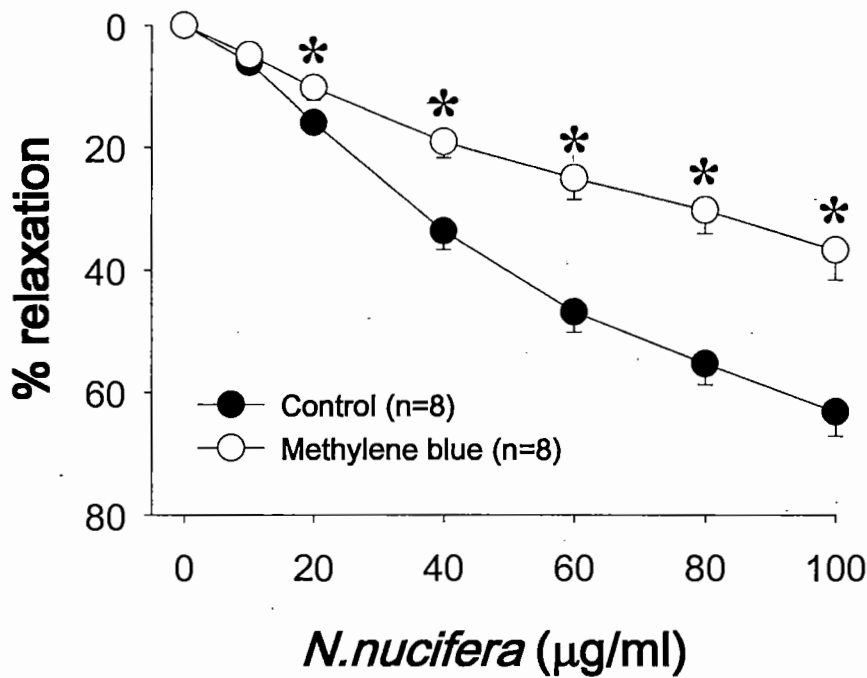
เพื่อยืนยันข้อสันนิษฐานดังกล่าวข้างต้น จึงได้ทำการทดลองโดยให้ methylene blue 1 μM ไปปิดกั้นเส้นทางการออกฤทธิ์ของ NO พบว่าเมื่อให้ methylene blue ร่วมกับสารสกัดใบบัวหลวง หลอดเลือดคลายตัวลดลง กล่าวคือคลายตัวได้เพียง 5-37% ซึ่งมีความแตกต่างจากการให้สารสกัดใบบัวหลวงเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดใบบัวหลวง 40-100 $\mu\text{g/ml}$ (รูปที่ 3) เมื่อพิจารณาที่ค่า E_{max} จะเห็นว่าเมื่อให้ methylene blue ร่วมกับสารสกัดใบบัวหลวงค่า E_{max} ลดลงเหลือเพียง $36.75 \pm 4.89\%$ ซึ่งแตกต่างจากค่า E_{max} เมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวงเพียงอย่างเดียว ($P < 0.05$; ตารางที่ 1) ดังนั้นผลการทดลองนี้ยืนยันให้เห็นอย่างเด่นชัดว่าสารสกัดใบบัวหลวงออกฤทธิ์ขยายหลอดเลือดโดยผ่านทาง NO



รูปที่ 1 แสดงการคลายตัวของหลอดเลือดเมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวง (*N. nucifera*) เพียงอย่างเดียว (control) และให้ nadolol 10 µM ร่วมด้วย



รูปที่ 2 แสดงการคลายตัวของหลอดเลือดเมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวง (*N. nucifera*) เพียงอย่างเดียว (control) และให้ L-NAME 10 µM ร่วมด้วย *P < 0.05 vs control (Student's t test)



รูปที่ 3 แสดงการคลายตัวของหลอดเลือดเมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวง (*N. nucifera*) เพียงอย่างเดียว (control) และให้ methylene blue 1 µM ร่วมด้วย * $P < 0.05$ vs control (Student's *t* test)

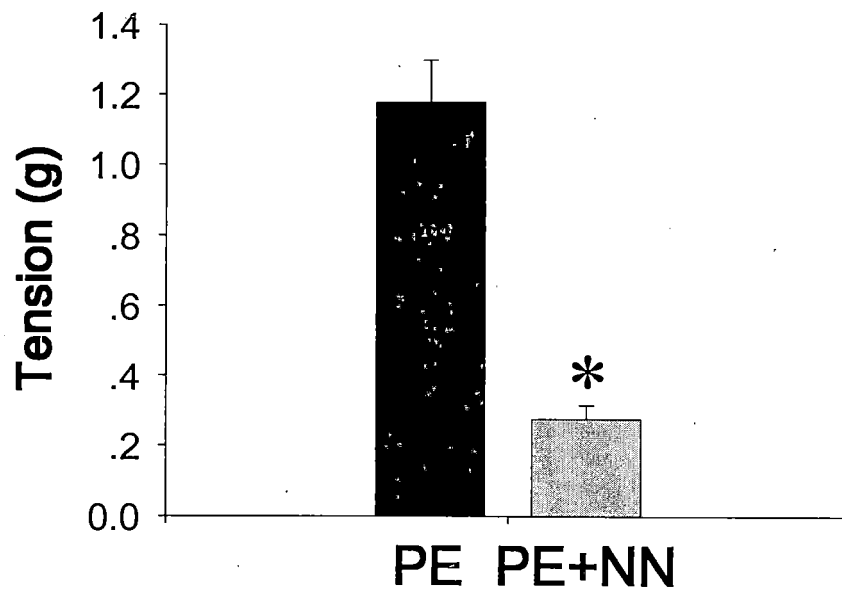
ตารางที่ 1 การคลายตัวสูงสุดของหลอดเลือดเมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวง (*N.nucifera*) อย่างเดียว (control) และให้ร่วมกับ nadolol 10 µM หรือ L-NAME 10 µM หรือ methylene blue 1 µM

Groups	E_{max} (% relaxation)
Control	63.17±3.96
Nadolol	66.69±7.25
L-NAME	40.37±3.86*
Methylene blue	36.75±4.89*

แสดงค่าเป็น mean±S.E.M., n = 8 ทุกการทดลอง, * $P < 0.05$ vs control (Student's *t* test)

2. ผลของสารสกัดใบบัวหลวงต่อการหลั่ง Ca^{2+} จากภายในเซลล์

ในการศึกษานี้ได้ให้หลอดเลือดอยู่ใน Ca^{2+} -free Krebs solution แล้วกระตุ้นให้หลอดเลือดหดตัวด้วย PE $1 \mu M$ ซึ่งเป็นผลจากการหลั่ง Ca^{2+} จาก sarcoplasmic reticulum ภายในเซลล์ จากรูปที่ 4 จะเห็นว่าเมื่อไม่มี Ca^{2+} ภายนอกเซลล์ PE สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดแรงดึงของหลอดเลือดโดยเฉลี่ย $1.18 \pm 0.12 g$ แต่เมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวงร่วมกับ PE จะเกิดแรงดึงของหลอดเลือดโดยเฉลี่ยเพียง $0.28 \pm 0.04 g$ ซึ่งแตกต่างจากเมื่อไม่มีสารสกัดใบบัวหลวงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบบัวหลวงน่าจะมีผลลดการหลั่ง Ca^{2+} จากภายในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด



รูปที่ 4 แสดงผลของสารสกัดใบบัวหลวง (NN) ต่อแรงหดตัวของหลอดเลือดที่เหนี่ยวนำด้วย PE $1 \mu M$ ใน Ca^{2+} -free Krebs solution แสดงค่าเป็น mean \pm S.E.M., $n = 10$ ทุกกลุ่มการทดลอง * $P < 0.05$ vs PE (Student's t test)

ส่วนที่ 2 การศึกษาผลของสารสกัดใบบัวหลวงต่อการตอบสนองของหลอดเลือด (vascular reactivity)

1. ความดันโลหิตภายหลังจากตีบ renal artery

ในการทดลองส่วนนี้ได้เหนี่ยวนำให้หนูกลุ่มหนึ่งมีภาวะความดันโลหิตสูงด้วยวิธีการตีบ left renal artery จากผลการทดลองในตารางที่ 2 จะเห็นว่าในสัปดาห์ก่อนทำการผ่าตัด (week 0) ค่า SBP, MAP และ pulse rate (PR) ของหนูขาวกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่จะเหนี่ยวนำให้มีความดันโลหิตสูงนั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในสัปดาห์ที่ 6 หลังการผ่าตัด (week 6) พบว่าค่า SBP และ MAP ของหนูขาวกลุ่มที่ได้รับการตีบ renal artery มีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับหนูขาวกลุ่มควบคุมแล้ว พบว่า ทั้งค่า SBP และ MAP มีค่าสูงกว่าหนูขาวกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ค่า pulse rate ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการตีบ renal artery สามารถเหนี่ยวนำให้เป็นความดันโลหิตสูงได้

ตารางที่ 2 แสดงค่า systolic blood pressure (SBP), mean arterial pressure (MAP) และ pulse rate (PR) ของหนูขาวกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มความดันโลหิตสูง (hypertensive) ในสัปดาห์ก่อนการผ่าตัด (week 0) และสัปดาห์หลังการผ่าตัด (week 6)

	Control	Hypertensive
Week 0		
SBP (mmHg)	159.44±1.36	157.94±2.33
MAP (mmHg)	127.78±1.23	130.11±2.10
PR (BPM)	357.00±3.25	352.28±9.93
Week 6		
SPB (mmHg)	163.56±1.93	186.22±2.29*
MAP (mmHg)	128.50±0.94	136.17±0.61*
PR (BPM)	350.78±8.92	362.33±12.28

แสดงค่าเป็น mean±S.E.M., n = 9 ทุกกลุ่มการทดลอง, * $P < 0.05$ vs control (Student's *t* test)

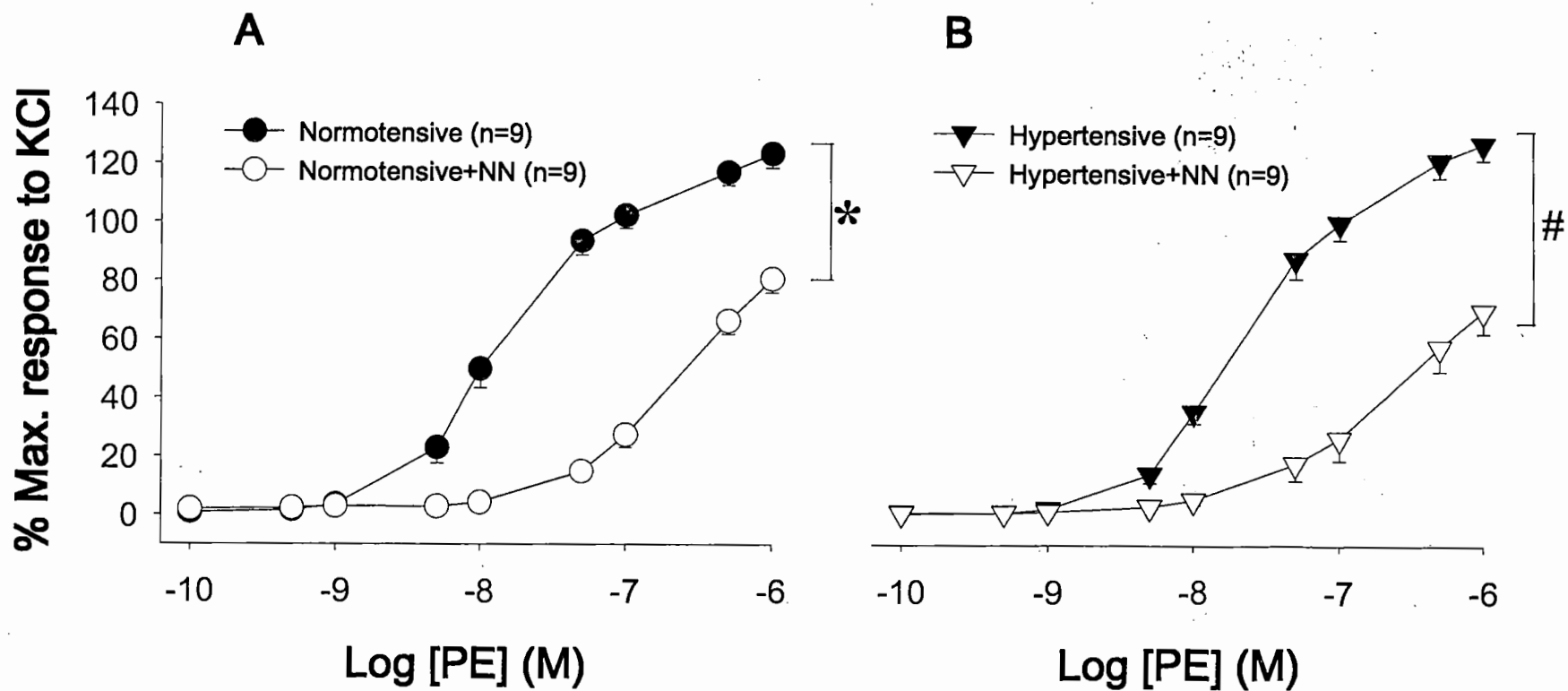
2. การตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารตีบหลอดเลือด phenylephrine

เมื่อนำหลอดเลือดของหนูขาวทั้งกลุ่มที่มีความดันโลหิตปกติ (กลุ่มควบคุม) และกลุ่มความดันโลหิตสูงมาทดสอบการตอบสนองต่อสารตีบหลอดเลือดในสถานะที่มีและไม่มีสารสกัดใบบัวหลวง ผลการทดลองในรูปแบบที่ 5 แสดงการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารตีบหลอดเลือด phenylephrine (PE, α -adrenergic receptor agonist) ความเข้มข้น 10^{-10} – 10^{-6} M ในสถานะที่มีและไม่มีสารสกัดใบบัวหลวง หากเปรียบเทียบการตอบสนองต่อ PE ของหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตปกติ (normotensive) และกลุ่มความดันโลหิตสูง (hypertensive) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 5) ค่า E_{max} ในการตอบสนองของหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตสูงจะมีค่ามากกว่ากลุ่มความดันโลหิตปกติแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($127.14 \pm 5.40\%$ vs $123.29 \pm 4.62\%$, ตารางที่ 3)

การตอบสนองต่อ PE ของหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตปกติลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวงร่วมด้วย ($P < 0.05$, รูปที่ 5A) การตอบสนองของหลอดเลือดในสถานะที่ไม่มีสารสกัดใบบัวหลวงได้ค่า pD_2 โดยเฉลี่ย 8.082 ± 0.067 ในขณะที่มีสารสกัดใบบัวหลวงจะมีค่าลดลงเป็น 6.816 ± 0.126 ซึ่งแตกต่างจากเมื่อไม่มีสารสกัดใบบัวหลวงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, ตารางที่ 3) นอกจากนี้สารสกัดใบบัวหลวงยังมีผลลดค่า E_{max} ในการตอบสนองของหลอดเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสถานะที่ไม่มีบัวหลวง ($80.44 \pm 4.62\%$ vs $123.29 \pm 4.62\%$, $P < 0.05$, ตารางที่ 3)

การตอบสนองต่อ PE ของหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตสูงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวงร่วม ($P < 0.05$, รูปที่ 5B) เมื่อพิจารณาค่า pD_2 พบว่าในสถานะที่ไม่มีสารสกัดใบบัวหลวงมีค่า 7.999 ± 0.073 โดยเฉลี่ย และเมื่อให้ร่วมกับสารสกัดใบบัวหลวงค่านี้จะลดลงเป็น 6.330 ± 0.365 ซึ่งแตกต่างจากเมื่อไม่มีสารสกัดใบบัวหลวงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, ตารางที่ 3) ในทำนองเดียวกันสารสกัดใบบัวหลวงมีผลลดค่า E_{max} ในการตอบสนองของหลอดเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสถานะที่ไม่มีสารสกัดใบบัวหลวง ($70.09 \pm 7.62\%$ vs $127.14 \pm 5.42\%$, $P < 0.05$, ตารางที่ 3)

ผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบบัวหลวงมีผลลดความไวในการตอบสนอง (sensitivity) และลดความแรงในการตอบสนอง (responsiveness) ต่อสารตีบหลอดเลือด PE ทั้งในหลอดเลือดของหนูความดันโลหิตปกติและความดันโลหิตสูง นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดใบบัวหลวงจะให้ผลแรงกว่าในหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตสูง โดยพิจารณาจากตาราง 3 จะเห็นว่าค่า pD_2 ของกลุ่มความดันโลหิตปกติลดลงโดยเฉลี่ย 16% เมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวงร่วม ส่วนค่า E_{max} จะลดลงโดยเฉลี่ย 43% เมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวงร่วม ในขณะที่หลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตสูงนั้นค่า pD_2 ลดลงมากถึง 21% โดยเฉลี่ยเมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวงร่วม และค่า E_{max} ลดลงโดยเฉลี่ยถึง 54% เมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวงร่วม (ตารางที่ 3)



รูปที่ 5 การตอบสนองของหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตปกติ (A) และกลุ่มความดันโลหิตสูง (B) ต่อสารตีบหลอดเลือด phenylephrine (PE) ในสถานะที่มีและไม่มีสารสกัดใบบัวหลวง (NN), * $P < 0.05$ vs normotensive, # $P < 0.05$ vs hypertensive (Two-way ANOVA)

ตารางที่ 3 แสดงค่า pD_2 และ E_{max} ที่ได้จากการตอบสนองต่อ phenylephrine (PE) ของ
 หลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตปกติ (normotensive) และกลุ่มความดันโลหิต
 สูง (hypertensive) ในสถานะที่มีและไม่มีสารสกัดใบบัวหลวง (NN)

Group	pD_2	E_{max} (% max. response to KCl)
Normotensive	8.082±0.067	123.29±4.62
Normotensive + NN	6.816±0.126*	80.44±4.62*
Hypertensive	7.999±0.073	127.14±5.40
Hypertensive + NN	6.330±0.365**	70.09±7.62**

แสดงค่าเป็น mean±S.E.M., n = 9 ทุกกลุ่มการทดลอง, * $P < 0.05$ vs normotensive

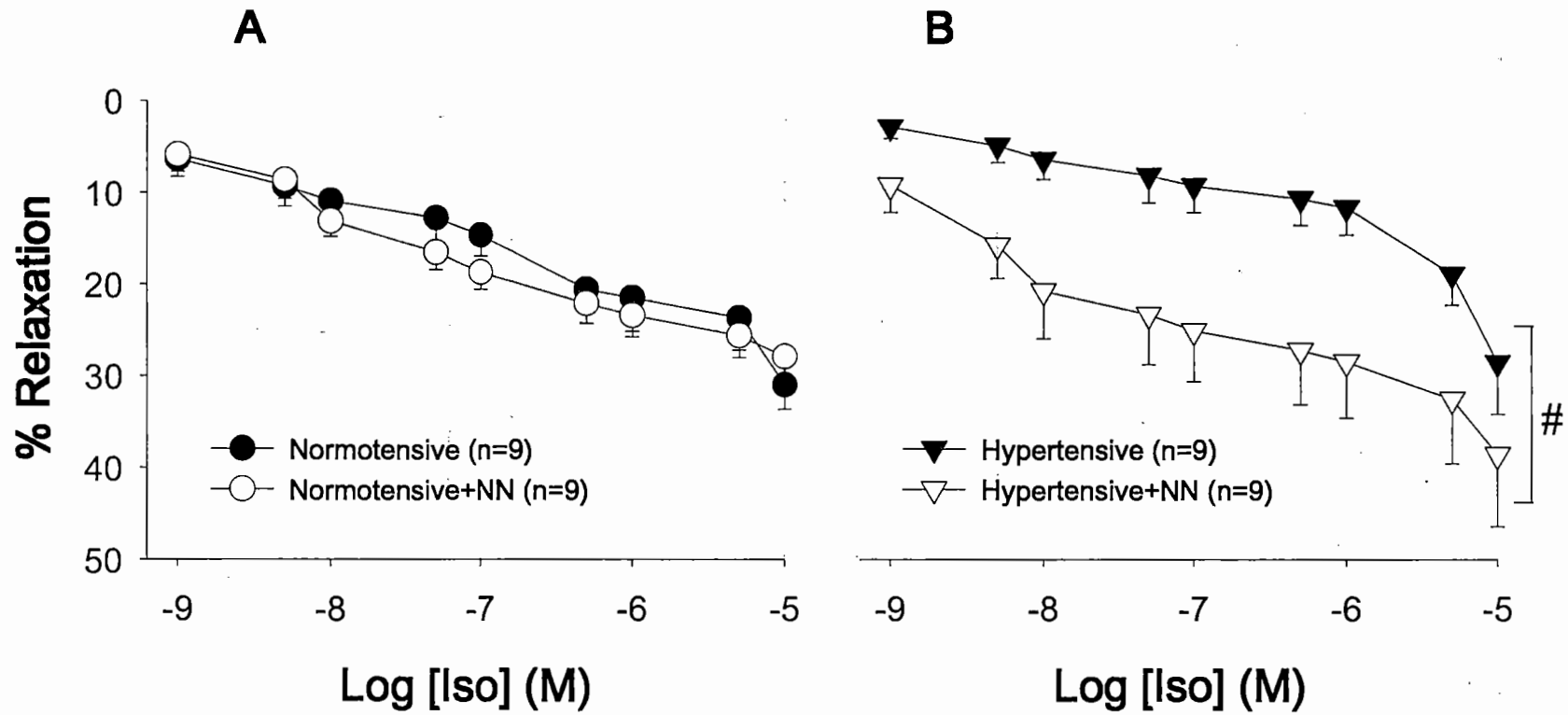
** $P < 0.05$ vs hypertensive (One-way ANOVA ตามด้วยการทดสอบแบบ Tukey HSD)

3. การตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารคลายหลอดเลือด isoproterenol

เมื่อนำหลอดเลือดของหนูขาวทั้งกลุ่มที่มีความดันโลหิตปกติ (กลุ่มควบคุม) และกลุ่มความดันโลหิตสูงมาทดสอบการตอบสนองต่อสารคลายหลอดเลือดในสถานะที่มีและไม่มีสารสกัดใบบัวหลวง ผลการทดลองในรูปที่ 6 แสดงการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารคลายหลอดเลือด isoproterenol (β -adrenergic receptor agonist) ความเข้มข้น 10^{-9} – 10^{-5} M ในสถานะที่มีและไม่มีสารสกัดใบบัวหลวง หากเปรียบเทียบการตอบสนองต่อ isoproterenol ของหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตปกติ (normotensive) และกลุ่มความดันโลหิตสูง (hypertensive) พบว่าหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตสูงมีแนวโน้มตอบสนองต่อ isoproterenol ได้น้อยกว่ากลุ่มความดันโลหิตปกติ ดังจะเห็นได้จากค่า E_{max} ของกลุ่มความดันโลหิตปกติมีค่าโดยเฉลี่ย $30.97 \pm 2.68\%$ ส่วนกลุ่มความดันโลหิตสูงมีค่าโดยเฉลี่ย $28.55 \pm 5.62\%$ (ตารางที่ 4) อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบทางสถิติแล้วไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การตอบสนองต่อ isoproterenol ของหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตปกติในสถานะที่มีและไม่มีสารสกัดใบบัวหลวงนั้น ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 6A) และค่า E_{max} ก็ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน (ตารางที่ 4) ส่วนการตอบสนองต่อ isoproterenol ของหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตสูงพบว่าเมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวงร่วมกับ isoproterenol หลอดเลือดจะเกิดการคลายตัวได้มากกว่าในสถานะที่ไม่มีสารสกัดใบบัวหลวงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, รูปที่ 6B) เมื่อพิจารณาที่ค่า E_{max} พบว่าในสถานะที่ไม่มีสารสกัดใบบัวหลวงหลอดเลือดคลายตัวได้ $28.55 \pm 5.62\%$ แต่เมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวงร่วมหลอดเลือดจะคลายตัวได้มากขึ้นเป็น $38.56 \pm 7.85\%$ อย่างไรก็ตามค่า E_{max} นี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4)

ผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบบัวหลวงมีแนวโน้มเพิ่มการตอบสนองต่อ isoproterenol ในหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตสูง แต่ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการตอบสนองในหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตปกติซึ่งสารสกัดใบบัวหลวงสามารถเพิ่มค่า E_{max} ของหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตสูงได้โดยเฉลี่ย 10% (ตารางที่ 4)



รูปที่ 6 การตอบสนองของหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตปกติ (A) และกลุ่มความดันโลหิตสูง (B) ต่อสารคลายหลอดเลือด isoproterenol (Iso) ในสถานะที่มีและไม่มีสารสกัดใบบัวหลวง (NN), # $P < 0.05$ vs hypertensive (Two-way ANOVA)

ตารางที่ 4 แสดงค่า E_{max} ที่ได้จากการตอบสนองต่อ isoproterenol (Iso) ของหลอดเลือด
กลุ่มความดันโลหิตปกติ (normotensive) และกลุ่มความดันโลหิตสูง
(hypertensive) ในสถานะที่มีและไม่มีสารสกัดใบบัวหลวง (NN)

Group	E_{max} (% max. response to KCl)
Normotensive	30.97±2.6
Normotensive + NN	27.91±2.67
Hypertensive	28.55±5.62
Hypertensive + NN	38.56±7.85

แสดงค่าเป็น mean±S.E.M., n = 9 ทุกกลุ่มการทดลอง

4. การตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารคล้ายหลอดเลือด *acetylcholine*

เมื่อนำหลอดเลือดของหนูขาวทั้งกลุ่มที่มีความดันโลหิตปกติ (กลุ่มควบคุม) และกลุ่มความดันโลหิตสูงมาทดสอบการตอบสนองต่อสารคล้ายหลอดเลือดในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดใบบัวหลวง ผลการทดลองในรูปที่ 7 แสดงการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารคล้ายหลอดเลือด *acetylcholine* (ACh, muscarinic receptor agonist) ความเข้มข้น 10^{-9} – 10^{-5} M ในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดใบบัวหลวง หากเปรียบเทียบการตอบสนองต่อ ACh ของหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตปกติ (normotensive) และกลุ่มความดันโลหิตสูง (hypertensive) พบว่าหลอดเลือดทั้ง 2 กลุ่มมีการตอบสนองต่อ ACh ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (รูปที่ 7) ค่า E_{max} ของกลุ่มความดันโลหิตปกติโดยเฉลี่ยมีค่า $70.56 \pm 3.84\%$ และกลุ่มความดันโลหิตสูงโดยเฉลี่ยมีค่า $67.41 \pm 5.44\%$ (ตารางที่ 5)

การตอบสนองต่อ ACh ของหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตปกติ พบว่าในสภาวะที่มีสารสกัดใบบัวหลวงหลอดเลือดจะตอบสนองต่อ ACh ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีสารสกัดใบบัวหลวง ($P < 0.05$, รูปที่ 7A) เมื่อพิจารณาที่ค่า E_{max} จะเห็นว่าในสภาวะที่มีสารสกัดใบบัวหลวงหลอดเลือดคลายตัวได้สูงสุดถึง $70.56 \pm 3.84\%$ โดยเฉลี่ย เมื่อมีสารสกัดใบบัวหลวงหลอดเลือดจะคลายตัวได้สูงสุดเพียง $33.33 \pm 5.33\%$ โดยเฉลี่ย ซึ่งมีความแตกต่างจากในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดใบบัวหลวงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, ตารางที่ 5)

การตอบสนองต่อ ACh ของหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตสูงพบว่าในสภาวะที่มีสารสกัดใบบัวหลวงหลอดเลือดจะตอบสนองต่อ ACh ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีสารสกัดใบบัวหลวง ($P < 0.05$, รูปที่ 7B) เมื่อพิจารณาที่ค่า E_{max} จะเห็นว่าในสภาวะที่มีสารสกัดใบบัวหลวงหลอดเลือดคลายตัวได้สูงสุด $67.41 \pm 5.44\%$ โดยเฉลี่ย เมื่อมีสารสกัดใบบัวหลวงหลอดเลือดจะคลายตัวได้สูงสุดเพียง $36.39 \pm 8.46\%$ โดยเฉลี่ย ซึ่งมีความแตกต่างจากในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดใบบัวหลวงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, ตารางที่ 5)

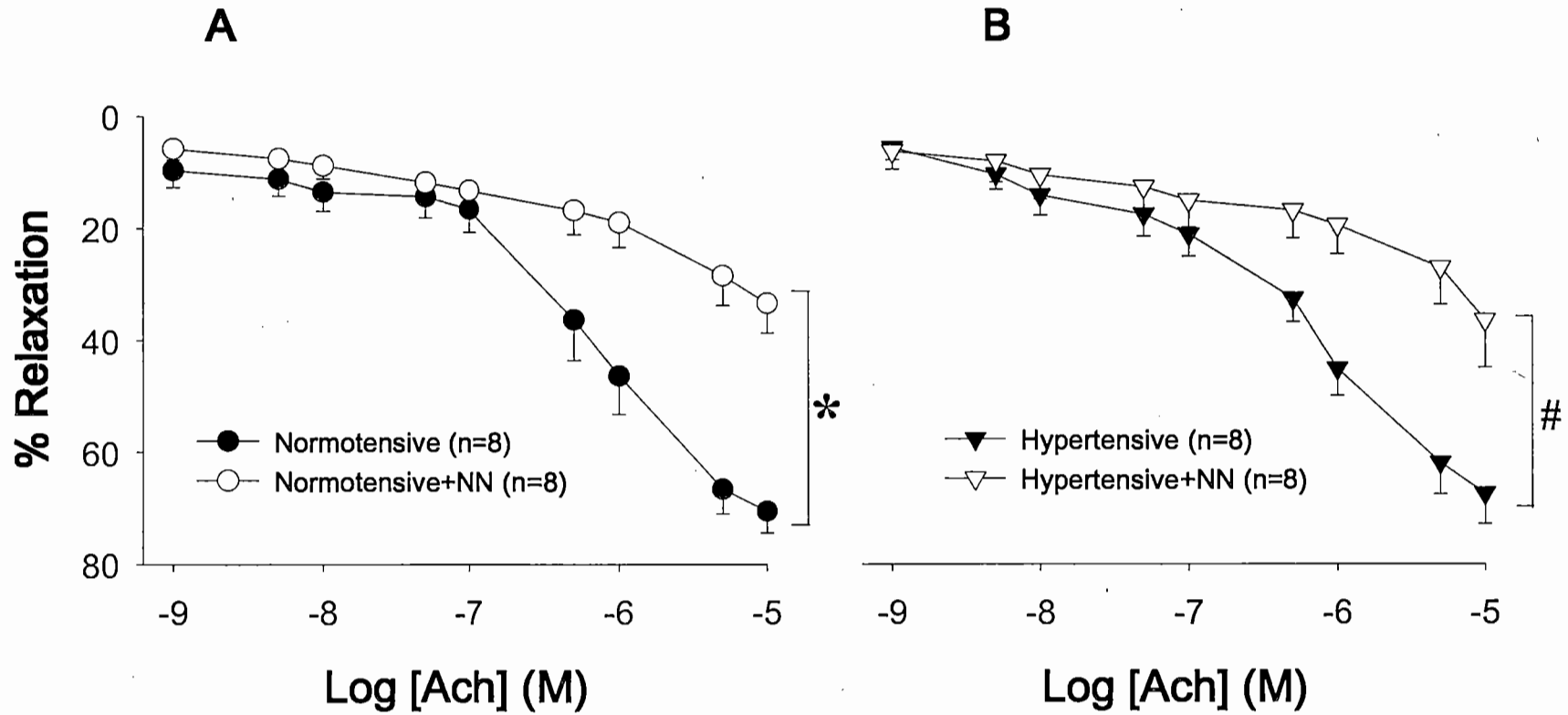
ผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบบัวหลวงมีแนวโน้มลดการตอบสนองต่อ ACh ในหลอดเลือดทั้งกลุ่มความดันโลหิตปกติและกลุ่มความดันโลหิตสูง หากพิจารณาจากตารางที่ 5 จะเห็นว่าสารสกัดใบบัวหลวงมีแนวโน้มลดการตอบสนองต่อ ACh ในหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตปกติมากกว่าในกลุ่มความดันโลหิตสูง โดยในกลุ่มความดันโลหิตปกติการตอบสนองต่อ ACh ลดลง 37% โดยเฉลี่ยเมื่อมีสารสกัดใบบัวหลวง ในขณะที่กลุ่มความดันโลหิตสูงลดลงเพียง 31% โดยเฉลี่ย

254672

635.9333

พ4471

ค-2



รูปที่ 7 การตอบสนองของหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตปกติ (A) และกลุ่มความดันโลหิตสูง (B) ต่อสารคลายหลอดเลือด acetylcholine (Ach) ในสถานะที่มีและไม่มีสารสกัดใบบัวหลวง (NN), * $P < 0.05$ vs normotensive, # $P < 0.05$ vs hypertensive (Two-way ANOVA)

ตารางที่ 5 แสดงค่า E_{max} ที่ได้จากการตอบสนองต่อ acetylcholine (ACh) ของหลอด
เลือดกลุ่มความดันโลหิตปกติ (normotensive) และกลุ่มความดันโลหิตสูง
(hypertensive) ในสถานะที่มีและไม่มีสารสกัดใบบัวหลวง (NN)

Group	E_{max} (% max. response to KCl)
Normotensive	70.56±3.84
Normotensive + NN	33.33±5.33*
Hypertensive	67.41±5.44
Hypertensive + NN	36.39±8.46**

แสดงค่าเป็น mean±S.E.M., n = 9 ทุกกลุ่มการทดลอง, * $P < 0.05$ vs normotensive,

** $P < 0.05$ vs hypertensive (One-way ANOVA ตามด้วยการทดสอบแบบ Tukey HSD)

บทที่ 4 อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบบัวหลวงมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือด โดยสามารถทำให้หลอดเลือดขยายตัวในลักษณะ dose dependent เมื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นพบว่า ฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวงไม่สามารถถูกยับยั้งด้วย nadolol (β -adrenergic antagonist) $10 \mu\text{M}$ แต่ถูกยับยั้งด้วย L-NAME (nitric oxide synthase inhibitor) $10 \mu\text{M}$ และ methylene blue (guanylyl cyclase inhibitor) $1 \mu\text{M}$ ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า ฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวงไม่ได้เกิดผ่านทาง β -adrenergic receptor ในหลอดเลือด แต่เกิดผ่านทาง NO-cGMP pathway นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดใบบัวหลวงมีผลยับยั้งการหลั่ง Ca^{2+} จากภายในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วย phenylephrine ในการศึกษาผลของสารสกัดใบบัวหลวงต่อการตอบสนองของหลอดเลือด (vascular reactivity) ในหลอดเลือดของหนูขาวความดันโลหิตปกติและความดันโลหิตสูงพบว่า สารสกัดใบบัวหลวงสามารถลดความไวและความแรงในการตอบสนองต่อสารตีบหลอดเลือด phenylephrine (α -adrenergic agonist) ในหลอดเลือดทั้งสองกลุ่ม และสามารถเพิ่มการตอบสนองต่อ isoproterenol (β -adrenergic agonist) ในหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตสูง นอกจากนี้สารสกัดใบบัวหลวงยังมีผลลดการตอบสนองต่อ acetylcholine (muscarinic receptor agonist) ในหลอดเลือดความดันโลหิตปกติและความดันโลหิตสูง ผลการทดลองเสนอแนะว่าสารสกัดใบบัวหลวงน่าจะออกฤทธิ์ขยายหลอดเลือดแล้วมีผลทำให้ความดันโลหิตลดลงในภาวะความดันโลหิตสูงได้ อีกทั้งยังน่าจะลดการตอบสนองของ α -adrenergic receptors แต่เพิ่มการตอบสนองของ β -adrenergic receptors ต่อสาร catecholamine ในภาวะความดันโลหิตสูงด้วย

ฤทธิ์ขยายหลอดเลือดและกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบบัวหลวง

จากการทดลองเมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวงขนาด $10-100 \mu\text{g/ml}$ ทำให้หลอดเลือดขยายตัวได้ 6-63% โดยเฉลี่ย ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบบัวหลวงมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือด จากรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ได้พบว่า สารสกัดใบบัวหลวงสามารถลดความดันโลหิตโดยออกฤทธิ์แบบเฉียบพลันในหนูขาวความดันโลหิตปกติ และสามารถออกฤทธิ์ลดความดันโลหิตในระยะยาวในหนูขาวความดันโลหิตสูง (Trongtorsak et al, 2007) จากรายงานการศึกษาดังกล่าวร่วมกับการศึกษาครั้งนี้ น่าจะสรุปได้ว่าสารสกัดใบบัวหลวงน่าจะลดความดันโลหิตโดยทำให้หลอดเลือดขยายตัว สารแอลคาลอยด์หลายตัวที่เป็นองค์ประกอบในบัวหลวงมีฤทธิ์ต่อหลอดเลือด ดังเช่นสาร asimilobine และ lirindine มีฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดที่เหนี่ยวนำด้วย serotonin (Shoji et al, 1987) และสาร leiensinine มีฤทธิ์ลดความดันโลหิตชั่วคราว (Wang et al, 1992) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวงที่พบในการศึกษานี้ เกิดจากผลร่วมกันของสารหลายตัวซึ่งเป็นส่วนประกอบอยู่ในใบบัวหลวง

อย่างไรก็ตามส่วนประกอบหลักในใบบัวหลวงยังประกอบด้วยสาร pronuciferine, nucifeme และ remerine (Wang et al, 2008) สารเหล่านี้อาจมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือดได้เช่นกัน ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปควรทำการสกัดสารบริสุทธิ์แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ลดความดันโลหิตและกลไกการออกฤทธิ์ต่อไป

จากการศึกษาของ Ohkoshi และคณะ (2007) พบว่าสารสกัดจากใบบัวหลวงสามารถกระตุ้น lipolysis ในเนื้อเยื่อไขมัน โดยผ่านทาง β -adrenergic receptors นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ฤทธิ์ลดความดันโลหิตของสารสกัดใบบัวหลวงสามารถถูกยับยั้งด้วย β -adrenergic receptor antagonist (Trongtorsak et al, 2007) จึงมีความเป็นไปได้ที่สารสกัดใบบัวหลวงจะออกฤทธิ์ขยายหลอดเลือดผ่านทาง β -adrenergic receptors ในหลอดเลือด แต่ผลการศึกษานี้กลับพบว่า nadolol ($10 \mu\text{M}$) ซึ่งเป็น nonspecific β -adrenergic receptor antagonist ไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวงได้ (รูปที่ 1) ความแตกต่างในผลการศึกษาอาจเกิดจากความแตกต่างในวิธีการสกัด ในการศึกษาของ Ohkoshi และคณะ (2007) ได้สกัดใบบัวหลวงด้วย 50% ethanol สารสกัดที่ได้จึงอาจประกอบด้วยสารสำคัญที่สามารถละลายใน ethanol และสารสำคัญนี้อาจออกฤทธิ์เหมือน β -adrenergic receptor agonist ส่วนฤทธิ์ลดความดันโลหิตของสารสกัดใบบัวหลวงในการทดลองแบบ *in vivo* ซึ่งพบว่าสามารถถูกยับยั้งด้วย β -adrenergic receptor antagonist (Trongtorsak et al, 2007) อาจเป็นไปได้ว่าในการศึกษานี้ได้ฉีด β -adrenergic receptor antagonist แก่หนูขาวก่อนที่จะให้สารสกัดใบบัวหลวง และ β -adrenergic receptor antagonist ที่ให้เข้าไปอาจไปออกฤทธิ์ที่ระบบประสาทส่วนกลางตรง anterior hypothalamic area ซึ่งบริเวณนี้มีรายงานยืนยันว่ามีระบบ β -adrenergic receptors ที่มีผลทำให้ความดันโลหิตลดลง แต่ถ้าให้ β -adrenergic receptor antagonist แก่สมองส่วนนี้มีผลยับยั้งฤทธิ์ลดความดันโลหิตของ isoproterenol (Hocht et al, 2004) จึงอาจเป็นไปได้ว่าในการศึกษาของ Trongtorsak และคณะ (2007) β -adrenergic receptor antagonist ที่ให้นั้นอาจไปออกฤทธิ์ปิดกั้น β -adrenergic receptors ที่ anterior hypothalamic area ส่งผลให้ความดันโลหิตเพิ่มขึ้นจึงค้านกับฤทธิ์ลดความดันโลหิตของสารสกัดใบบัวหลวง อย่างไรก็ตามผลการศึกษาในหลอดเลือดครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นแล้วว่าสารสกัดใบบัวหลวงไม่ได้ออกฤทธิ์ขยายหลอดเลือดผ่านทาง β -adrenergic receptors ในหลอดเลือด

เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า nitric oxide (NO) เป็นสารที่หลั่งจาก endothelial cells ของหลอดเลือด และมีบทบาทสำคัญในการควบคุมแรงตึงของหลอดเลือด โดยทำให้หลอดเลือดเกิดการคลายตัว (Furchgott & Zawadzki, 1980) การสร้าง NO ใน endothelial cells นั้นอยู่ภายใต้การควบคุมของ enzyme nitric oxide synthase (NOS) เมื่อ NO ถูกปล่อยจาก endothelium แล้วจะแพร่ไปที่กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด แล้วมีผลกระตุ้นการทำงานของ guanylyl cyclase ให้เปลี่ยน GTP เป็น cGMP ส่งผลให้หลอดเลือดคลายตัว (Ignarro et al, 1986; Ignarro, 1991) ในการศึกษานี้จึงได้ตั้งสมมุติฐานว่าฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวงอาจเกิดจาก NO ที่หลั่งจาก endothelium ในการทดลองได้ให้ L-NAME ไปยับยั้งการทำงานของ NOS แล้วพบว่า ฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวงลดลงอย่างเด่นชัดโดยทำให้ค่าการคลายตัวสูงสุดลดลง 23% โดยเฉลี่ย (รูปที่ 2 และตารางที่ 1) และเมื่อให้ methylene blue ไปยับยั้งการทำงานของ guanylyl cyclase ก็พบว่าฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวงลดลงเช่นกันโดยทำให้

ค่าการคลายตัวสูงสุดลดลง 26% โดยเฉลี่ย (รูปที่ 3 และตารางที่ 1) ผลการทดลองทั้ง 2 ส่วนสนับสนุนซึ่งกันและกัน และนำไปสู่ข้อสรุปว่าสารสกัดใบบัวหลวงออกฤทธิ์ขยายหลอดเลือดโดยผ่านทาง NO-cGMP pathway

การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดนั้นจะเกิดขึ้นเมื่อระดับ Ca^{2+} ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น Ca^{2+} ที่เพิ่มขึ้นนี้มาจาก 2 แหล่งคือ จากภายนอกเซลล์และหลังจาก sarcoplasmic reticulum ภายในเซลล์ (Garland & Angus, 1996) จากผลการศึกษาที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งพบว่าสารสกัดใบบัวหลวงออกฤทธิ์ขยายหลอดเลือดโดยอาจกระตุ้นให้ endothelium หลั่ง NO การออกฤทธิ์ของ NO หลังจากกระตุ้น guanylyl cyclase ให้เปลี่ยน GTP ไปเป็น cGMP แล้วจะกระตุ้น protein kinase ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการนำ Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้กล้ามเนื้อเรียบเกิดการคลายตัว (Galley & Webster, 2004) ดังนั้นเมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวงก็น่าจะมีผลยับยั้งการนำ Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ด้วยโดยเกิดทางอ้อมผ่าน NO ด้วยเหตุนี้การศึกษานี้จึงได้ทดสอบผลของสารสกัดใบบัวหลวงต่อการหลั่ง Ca^{2+} จากภายในเซลล์เท่านั้น ในการทดลองได้เหนี่ยวนำให้กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดหดตัวด้วย phenylephrine ใน Ca^{2+} -free Krebs solution ดังนั้น Ca^{2+} ที่ใช้ในการหดตัวจึงมาจากภายในเซลล์ (Guedes et al, 2004) ผลการทดลองพบว่าสารสกัดใบบัวหลวงสามารถลดแรงดึงของหลอดเลือดที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วย phenylephrine ใน Ca^{2+} -free solution ได้มากถึง 77% โดยเฉลี่ย (รูปที่ 4) ดังนั้นผลการทดลองนี้จึงช่วยเสนอแนะว่า สารสกัดใบบัวหลวงน่าจะขยายหลอดเลือดโดยไปมีผลยับยั้งการหลั่ง Ca^{2+} จากภายในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด

สารสกัดใบบัวหลวงปรับเปลี่ยนการตอบสนองของหลอดเลือด

เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าในภาวะความดันโลหิตสูงจะเกิดการกระตุ้น sympathetic nerve มากกว่าปกติทำให้ต่อมหมวกไตหลั่ง norepinephrine จึงทำให้ระดับ norepinephrine ในเลือดเพิ่มขึ้น แล้วส่งผลให้หลอดเลือดตีบตัวโดยกระตุ้น α -adrenergic receptors ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้ความดันโลหิตเพิ่มขึ้น และเกิดการเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสาร (vascular reactivity) (Bakris & Mensah, 2003) มีรายงานยืนยันว่าในภาวะความดันโลหิตสูง adrenergic receptors ในหลอดเลือดมีการตอบสนองต่อ catecholamine เปลี่ยนแปลงไปด้วย โดย α -adrenergic receptors จะตอบสนองต่อ α -adrenergic receptor agonist เพิ่มขึ้นทำให้หลอดเลือดตีบตัวมากขึ้น นอกจากนี้ β -adrenergic receptors จะตอบสนองต่อ β -adrenergic receptor agonist ลดลงทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้น้อยลง การเปลี่ยนแปลงนี้มีผลทำให้ความดันโลหิตเพิ่มขึ้น (Takata & Kato, 1996) การศึกษานี้จึงทดสอบผลของสารสกัดใบบัวหลวงต่อการตอบสนองของ α - และ β -adrenergic receptors ในหลอดเลือดของหนูขาวที่มีภาวะความดันโลหิตสูง

ในการศึกษาการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ phenylephrine (α -adrenergic receptor agonist) พบว่าการตอบสนองของกลุ่มความดันโลหิตสูงไม่แตกต่างจากกลุ่มความดันโลหิตปกติ (รูปที่ 5) แต่จะเห็น

ว่าหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตสูงมีแนวโน้มที่จะตอบสนองแรงกว่า (ตารางที่ 3) แสดงว่าการตีบ renal artery เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงในหน้าที่ของ α -adrenergic receptors ในหลอดเลือดอย่างเด่นชัดและเป็นระยะที่เริ่มเกิดการเปลี่ยนแปลงเท่านั้น อย่างไรก็ตามผลการศึกษาค้นพบว่าสารสกัดใบบัวหลวงมีผลลดทั้งความไว (sensitivity) และความแรงในการตอบสนอง (responsiveness) ของหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตปกติและกลุ่มความดันโลหิตสูงได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 5 และตารางที่ 3) ผลของสารสกัดใบบัวหลวงนี้จะให้ผลแรงกว่าในหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตสูง โดยพิจารณาจากค่า pD_2 และ E_{max} ซึ่งลดลงมากถึง 21% และ 57% ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มความดันโลหิตปกติลดลงได้เพียง 16% และ 42% ตามลำดับ ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่าสารสกัดใบบัวหลวงสามารถออกฤทธิ์โดยกระตุ้นการหลั่ง NO ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าการลดความไวและความแรงในการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ phenylephrine เมื่อมีสารสกัดใบบัวหลวงนั้นเป็นผลของ NO เพราะมีรายงานการศึกษาซึ่งพบว่าการยับยั้งการหลั่ง NO ด้วย L-NAME หรือการทำลาย endothelium ทำให้หลั่ง NO ไม่ได้ มีผลเพิ่มการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ phenylephrine ผลการศึกษาเสนอแนะว่า NO ที่หลั่งจาก endothelium สามารถลดความไวและความแรงในการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ phenylephrine (Davel et al, 2006) จากผลการศึกษาข้างต้นที่พบว่าสารสกัดใบบัวหลวงสามารถลดแรงดึงของหลอดเลือดที่เหนี่ยวนำด้วย phenylephrine ใน Ca^{2+} -free solution ทำให้มีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดใบบัวหลวงอาจมีผลลดการหลั่ง Ca^{2+} ภายในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นโดย phenylephrine ทำให้มีปริมาณ Ca^{2+} ที่จะใช้ในกระบวนการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลดลง จึงทำให้สารสกัดใบบัวหลวงสามารถลดความแรงในการตอบสนองต่อ phenylephrine ได้อีกทางหนึ่ง

ในการทดสอบการตอบสนองของ β -adrenergic receptors ในหลอดเลือดพบว่า หลอดเลือดของกลุ่มความดันโลหิตสูงมีแนวโน้มตอบสนองต่อ isoproterenol น้อยกว่าหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตปกติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการตีบ renal artery 6 สัปดาห์ ซึ่งเป็นระยะที่เริ่มเกิดการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของหลอดเลือดเท่านั้น การศึกษายังพบว่าสารสกัดใบบัวหลวงเพิ่มการตอบสนองต่อ isoproterenol ในหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตสูง แต่ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตปกติ โดยพื้นฐานของข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถอธิบายผลดังกล่าวของสารสกัดใบบัวหลวงได้ ฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของ β -adrenergic receptor agonist นั้นอาจเกิดผ่านทาง NO-cGMP pathway หรือผ่านทาง K^+ channels โดยทำให้เกิด K^+ efflux แล้วมีผลให้กล้ามเนื้อเรียบเกิด hyperpolarization จึงเกิดการคลายตัว (Matsushita et al, 2006; Kang et al, 2007) ดังนั้นสารสกัดใบบัวหลวงอาจเพิ่มฤทธิ์ของ β -adrenergic receptor agonist ในหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตสูงโดยอาจไปเพิ่มการหลั่ง NO หรือไปมีผลทำให้ K^+ channels เปิดมากขึ้น ซึ่งยังคงต้องการหลักฐานสนับสนุนจากการศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นแล้วว่าสารสกัดใบบัวหลวงสามารถลดการตอบสนองต่อ α -adrenergic receptor agonist และเพิ่มการตอบสนองต่อ β -adrenergic receptor agonist ของหลอดเลือดในสถานะความดันโลหิตสูง ดังนั้นการนำสารสกัดใบบัวหลวงไปรักษาโรคความดันโลหิตสูงน่าจะให้ผลดี

เพราะนอกจากจะทำให้หลอดเลือดขยายตัวแล้วยังมีผลปรับเปลี่ยนการตอบสนองของ adrenergic receptors ของหลอดเลือดไปในทิศทางที่จะช่วยให้ความดันโลหิตลดลง

ในภาวะความดันโลหิตสูงยังเกิดการเสื่อมหน้าที่ของ endothelium (endothelial dysfunction) โดยทำหน้าที่ในการหลั่ง NO ลดลง จึงทำให้แรงตึงในหลอดเลือดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (Boulanger, 1999) การศึกษานี้จึงได้ทดสอบการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ acetylcholine ซึ่งเป็นสารที่นิยมใช้ทดสอบการทำงานของ endothelium ในการหลั่ง NO ผลการทดลองพบว่าการตอบสนองต่อ acetylcholine ของหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตปกติและกลุ่มความดันโลหิตสูงไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 7) อย่างไรก็ตามหลอดเลือดกลุ่มความดันโลหิตสูงมีแนวโน้มตอบสนองได้ต่ำกว่ากลุ่มความดันโลหิตปกติ ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นอีกเช่นกันว่าการตีบ renal artery เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ยังไม่สามารถทำให้เกิดการเสื่อมหน้าที่ของ endothelium ได้อย่างเด่นชัด นอกจากนี้การศึกษายังพบว่าสารสกัดใบบัวหลวงทำให้การตอบสนองต่อ acetylcholine ลดลงทั้งในกลุ่มความดันโลหิตปกติและความดันโลหิตสูง (รูปที่ 7 และตารางที่ 5) เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าการเสื่อมหน้าที่ของ endothelium ในภาวะความดันโลหิตสูงนั้นเป็นผลจากอนุมูลอิสระที่มากกว่าปกติ (oxidative stress) (Touyz, 2004) จากผลการทดลองไม่น่าจะเป็นไปได้ว่าสารสกัดใบบัวหลวงทำให้เกิดการเสื่อมของ endothelium เพราะมีรายงานยืนยันว่าสารสกัดใบบัวหลวงมี phenolic content สูงมาก (Jung et al, 2008) และสารสกัดใบบัวหลวงยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) อย่างเด่นชัด (Wu et al, 2003) ดังนั้นสารสกัดใบบัวหลวงจึงน่าจะมีผลปกป้องหน้าที่ของ endothelium มากกว่าทำให้เสื่อมหน้าที่ ซึ่งข้อสันนิษฐานนี้ยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อสนับสนุนต่อไป อย่างไรก็ตามผลการศึกษาที่พบว่าสารสกัดใบบัวหลวงลดการตอบสนองต่อ acetylcholine นั้น อาจเป็นผลจากฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของ acetylcholine เกิดผ่านทาง NO-cGMP pathway (Ignarro, 1991) เช่นเดียวกับสารสกัดใบบัวหลวง ในการทดลองได้ incubate หลอดเลือดกับสารสกัดใบบัวหลวงก่อนให้ acetylcholine จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดใบบัวหลวงไปมีผลกระตุ้นให้ enzyme nitric oxide synthase (NOS) ทำงานเพิ่มขึ้นแล้วระดับหนึ่ง เมื่อให้ acetylcholine จึงมีผลเพิ่มการทำงานของ NOS อีกเพียงเล็กน้อย ทำให้หลั่ง NO ได้น้อยลงหลอดเลือดจึงคลายตัวได้น้อยกว่าเมื่อไม่มีสารสกัดใบบัวหลวง

ศักยภาพในการลดความดันโลหิตของสารสกัดใบบัวหลวง

การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบบัวหลวงมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือด ดังนั้นสารสกัดใบบัวหลวงน่าจะลดความดันโลหิตโดยทำให้หลอดเลือดขยายตัว นอกจากนี้สารสกัดใบบัวหลวงยังมีผลปรับเปลี่ยนการตอบสนองของ adrenergic receptors ในหลอดเลือดที่ได้จากหนูขาวความดันโลหิตสูง ดังนั้นสารสกัดใบบัวหลวงน่าจะมีผลลดการตอบสนองของ α -adrenergic receptors แต่เพิ่มการตอบสนองของ β -adrenergic receptors ต่อสาร catecholamine ที่หลั่งออกมามากกว่าปกติในภาวะความดันโลหิตสูง ซึ่งจะส่งผลลดแรงตึงของหลอดเลือด ช่วยให้ความดันโลหิตลดลงได้อีกทางหนึ่ง การศึกษาคั้งนี้จึงได้แสดงให้เห็นว่าใบบัวหลวงเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพสูงในการนำไปรักษาโรคความดันโลหิตสูง และเป็น

ข้อมูลพื้นฐานที่ใช้ประกอบการพิจารณาเพื่อพัฒนาสมุนไพรบัวหลวงเป็นยารักษาโรคความดันโลหิตสูงต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ในปัจจุบันยาที่ใช้ในการรักษาโรคความดันโลหิตสูงมีทั้งยาที่มีฤทธิ์ขยายหลอดเลือดและยาที่มีฤทธิ์ขับปัสสาวะ บางส่วนของสมุนไพรบัวหลวงมีรายงานยืนยันว่ามีฤทธิ์ขับปัสสาวะ เช่น ส่วนของเหง้าบัว สารสกัดใบบัวหลวงนอกจากจะมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือดดังที่ได้แสดงให้เห็นในการศึกษานี้ ยังอาจมีฤทธิ์ขับปัสสาวะซึ่งยังไม่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ยืนยัน ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาฤทธิ์ขับปัสสาวะของสารสกัดใบบัวหลวงในขั้นต่อไป
2. การที่จะนำสมุนไพรไปใช้ในการรักษาโรคหรือพัฒนาเป็นยาแผนปัจจุบัน ควรมีการศึกษายืนยันความปลอดภัยของสมุนไพรชนิดนั้นก่อน ดังนั้นจึงควรศึกษาพิษวิทยาของสมุนไพรบัวหลวงก่อนที่จะนำไปใช้ในการรักษาโรคความดันโลหิตสูงต่อไป
3. จากผลการศึกษาได้แสดงให้เห็นศักยภาพของสมุนไพรบัวหลวงในการลดความดันโลหิต โดยออกฤทธิ์ขยายหลอดเลือด อีกทั้งยังมีผลปรับการทำงานของหลอดเลือดไปในทางที่จะช่วยให้ความดันโลหิตลดลงในภาวะความดันโลหิตสูง ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปควรศึกษาระบบประสาทในใบบัวหลวงให้ได้สารบริสุทธิ์ แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ลดความดันโลหิตและฤทธิ์ขยายหลอดเลือดอีกครั้ง

เอกสารอ้างอิง References

- กองควบคุมยา (2551). การนำเข้ายาแผนปัจจุบันปี 2543-2550. วันที่ค้นข้อมูล 13 ก.พ. 2552. เข้าถึงได้จาก <http://www.app1.fda.moph.go.th/drug/>
- กัญจนา ดีวิเศษ และคณะ. (2542). ผักพื้นบ้านภาคกลาง (1). กรุงเทพฯ: องค์การส่งเสริมการค้าผ่านสี่ก. ชยันต์ พิเชียรสุนทร, แม้นมาส ชวลิต และวิเชียร จีรวงศ์. (2544). ตำราพระโอสถพระนารายณ์. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์อมรินทร์.
- พรรณนีย์ วิชชาชู. (2548). บัวหลวง...รอเวลาเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดใหม่. วารสารกสิกรรม, 78(4): 62-69.
- รัชณี จวีราช. (2532). พรรณไม้หน้า. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 17(3): 147-151.
- วันดี กฤษณพันธ์. (2541). สมุนไพรน่ารู้. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วิจิต วัฒนวิบูล. (2529). บัวสมุนไพรมีคุณค่า. หมอชาวบ้าน 8(88): 111-112.
- วิชุดา สุวิทยาวัฒน์. (2540). บัวหลวง. จุลสารข้อมูลสมุนไพร 14(3): 16-21.
- สำนักงานคณะกรรมการสถิติแห่งชาติ. (2549). สถิติสุขภาพ. วันที่ค้นข้อมูล 15 พฤศจิกายน 2549. เข้าถึงได้จาก <http://www.nso.go.th/thai/stat>.
- Ahmad I., & Beg AZ. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J Ethnopharmacol*, 74: 113-123.
- Bakris GL., & Mensah GA. (2003). Pathogenesis and clinical physiology of hypertension. *Curr Probl Cardiol.*, 28: 137-155.
- Boulanger CM. (1999). Secondary endothelial dysfunction : Hypertension and heart failure. *J Mol. Cell Cardiol.*, 31:39-49.
- Davel APC., Kawamoto EM., Scavone C., Vassallo DV., & Rossoni LV. (2006). Change in vascular reactivity following administration of isoproterenol for 1 week : a role for endothelial modulation. *Br J Pharmacol.*, 148:629-39.
- Furchgott RF., & Zawadzki JV. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288:373-376.
- Galley HF., & Webster NR. (2004). Physiology of endothelium. *Br J Anaesth.*, 93(1):105-13.
- Garland CJ., & Angus JA. (1996). Pharmacology of vascular smooth muscle. Oxford University Press, Oxford, P103-105.
- Guedes DF., Silva DF., Barbosa-Filho JM., & Medeiros IA. (2004). Calcium antagonism and the vasorelaxation of the rat aorta induced by rotundifolone. *Brax J Med Biol Res.*, 37(12):1881-87.

- Han GA., Pan JX., Li CL., & Tu F. (1991). The screening of Chinese traditional drugs by biological assay and the isolation of some active components. *Int J Chinese Med*, 16(1): 1-17.
- Hocht C. Opezzo JA., & Taira CA. (2004). Anterior hypothalamic beta-adrenergic activity in the maintenance of hypertension in aortic coarctated rats. *Pharmacol Res.*, 49(1): 17-21.
- Huralikuppi JC., Christopher AB., & Stephen PM. (1991). Antidiabetic effect of *Nelumbo nucifera* (Gaertn) extract : part II. *Phytother Res*, 5(5): 217-223.
- Ignarro LJ., Adams JB., Horwitz PM., & Wood KS. (1986). Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange. Comparison of heme-containing and heme-deficient enzyme forms. *J Biol Chem.*, 261:4997-5002.
- Ignarro LJ. (1991). Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem Pharmacol.*, 41:485-490.
- Ohkoshi E., Miyazaki H., Shindo K., Watanabe H., Yoshida A., & Yajima H. (2007) Constituents from the leaves of *Nelumbo nucifera* stimulate lipolysis in the white adipose tissue of mice. *Planta Med.*, 73(12):1255-9.
- Onishi E., Yamada K., Yamada T., Kaji K., Inoue H., Seyama Y., & Yamashita S. (1984). Comparative effects of crude drugs on serum lipids. *Chem Pharm Bull*, 32(2): 646-650.
- Ono Y., Hattori E., Fukaya Y., Imai S., & Ohizumi Y. (2006). Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats. *J Ethnopharmacol.*, 106(2):238-44.
- Jain SP., & Verma MD. (1981). Medicinal plants in the folklore of northeast Haryana. *Natl Acad Sci Lett (India)*, 4(7): 269-271.
- Jung HA., Jung YJ., Yoon NY., Jeon da M., Bae HJ., Kim DW., Na DH., & Choi JS. (2008). Inhibitory effects of *Nelumbo nucifera* leaves on rat lens aldose reductase, advanced glycation endproducts formation, and oxidative stress. *Food Chem Toxicol.*, 46(12):3818-26.
- Kashiwada Y., Aoshima A., Ikeshiro Y., Chen Y., Furukawa H., Itoigawa M., Fujioka T., Mihashi L., Cosentino M., Morris-Natschke SL., & Lee K. (2005). Anti-HIV benzylisoquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera*, and structure-activity correlations with related alkaloid. *Bio Med Chem.*, 13: 443-448.
- Malakul W., Wongkrajang Y., Thongpraditchote S., Tersiririrkkul R., & Kongsaktragoon B. (2001). Effects of extract of *Nelumbo nucifera* Gaertn. Embryo on isolated rat atria. *Thai J Phytopharm*, 8(2): 14-21.
- Matsushita M., Tanaka Y., & Koike K. (2006). Studies on the mechanisms underlying β -adrenoceptor-mediated relaxation of rat abdominal aorta. *J Smooth Muscle Res.*, 42(6):217-25.

- Mitra R., Mehrotra S., & Kapoor LD. (1976). Pharmacognostic study of *Nelumbo nucifera* Gaertn. J Res Indian Med Yoga Homeopathy, 11: 67-77.
- Mokkhasmit M., Ngarmwathana W., Sawasdimongkol K., Permiphath U. (1971). Pharmacological evaluation of Thai medicinal plants (continued). J Med Ass Thailand, 54(7): 490-504.
- Mukherjee PK., Pal M., Saha K., & Saha BP. (1995). Hyperglycemic activity of *Nelumbo nucifera* Gaertn. (Fam. Nymphaeaceae) rhizome (methanolic extract) in streptozotocin-induced diabetic rats. Phytotherapy Res, 9: 522-524.
- Mukherjee PK., Saha K., Balsubramanian R., Pal M., & Saha BP. (1996). Studies on psychopharmacological effect of *Nelumbo nucifera* Gaertn. Rhizome extract. J Ethnopharmacol, 54: 63-67.
- Mukherjee PK., Pal M., Saha K., & Saha BP. (1996). Diuretic activity of extract of the rhizomes of *Nelumbo nucifera* Gaertn. (Fam. Nymphaeaceae). Phytotherapy Res, 10: 424-425.
- Mukherjee PK., Saha K., Pal M., & Saha BP. (1997). Effect of *Nelumbo nucifera* rhizome extract on blood sugar level in rats. J Ethnopharmacol, 58: 207-213.
- Shoji N., Umeyama A., Saito N. et al. (1987). Asimilobine and lirinidine serotonergic receptor antagonist from *Nelumbo nucifera*. J Nat Prod, 50(4): 773-774.
- Sowers JR. (2002). Hypertension, angiotensin II, and oxidative stress. N Engl J Med., 346(25): 1999-2001.
- Takata Y., & Kato H. (1996). Adrenergic receptors in spontaneously hypertensive rats. Life Sci., 58(2):91-109.
- Tanaka Y., Kataoka M., Konishi Y., Nishimune T., Takagaki Y. (1992). Effects of vegetable foods on β -hexosaminidase release from rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3). Jpn J Toxicol Environ Health, 38(5): 418-424.
- Tang W., & Eisenbrand G. (1992). Chinese drugs of plant origin. Germany: Printed in Germany, 697-701.
- Touyz RM. (2004). Reactive oxygen species, vascular oxidative stress and redox signaling in hypertension. Hypertension, 44: 248-252.
- Trongtorsak P., Attachit S., Sanitwong na Ayuthaya S., & Athipchartsiri N. Effects of crude leaf extract of *Nelumbo nucifera* Gaertn. on cardiac functions. Proc. STT 31th; 2005 : 279.
- Trongtorsak P., Teerakulkittipong N., Panyajirawut J., & Athipchartsiri N. (2007). Effect of crude leaf extract of *Nelumbo nucifera* Gaertn. on blood pressure in normotensive and hypertensive rats. Thai J Pharmacol. 29 (2): 3-10.

- Talukder MJR., & Nessa J. (1998). Effect of *Nelumbo nucifera* rhizome extract on the gastrointestinal tract of rat. Bangladesh Med Res Counc Bull, 24(1): 6-9.
- Wang JL., Nong Y., & Jing MX. (1992). Effects of liensinine on haemodynamics in rats and the physiologic properties of isolated rabbit atria. Yao Xue Xue Bao., 27(12): 881-885.
- Wang YX., Lui B., & Shi RB. (2008). HPLC determination of 2-hydroxy-1-methoxyaporphine, pronuciferine, nuciferine and roemerine in *Nelumbo nucifera* and its alkaloid fraction. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi., 33(14):1713-16.
- Wu MJ., Wang L., Weng CY., & Yen JH. (2003). Antioxidant activity of methanol extract of the lotus leaf (*Nelumbo nucifera* Gaertn.). Am J Chin Med., 31(5):687-98.
- Yang WM., Shim KJ., Choi MJ., Park SY., Choi BJ., Chang MS., & Park SK. (2008). Novel effect of *Nelumbo nucifera* rhizome extract on memory and neurogenesis in the dentate gyrus of the rat hippocampus. Neurosci Lett., 443(2):104-7.