บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงฤทธิ์ของสารสกัดว่านชักมดลูกต่อระบบหลอดเลือดและหัวใจในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้ขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนด้วยการผ่าตัดรังไข่ทั้ง 2 ข้างออก เหตุผลที่ทำการศึกษาในตัวอย่างดังกล่าว เหตุผลแรกเนื่องมาจากการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนจะมีความเสี่ยงต่อความผิดปกติของระบบหลอดเลือดและหัวใจ ซึ่งทั้งมีผลทำให้ปริมาณคอเลสเตอรอลทั้งหมด ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ ปริมาณคอเลสเตอรอลชนิดเลว (LDL cholesterol) ในเลือดเพิ่มสูงขึ้น (Gaspard *et al.*, 1995) และยังมีผลทำให้น้ำหนักตัว ปริมาณไขมันในช่องท้อง และความต้านทานต่อฮอร์โมนอินซูลิน (insulin resistance) เพิ่มสูงขึ้นอีกด้วย (Stevenson *et al.*, 1993) เหตุผลที่สองนั้นเนื่องมาจากมีการศึกษาถึงฤทธิ์ของไฟโตเอสโตรเจนหลายชนิด ที่พบว่ามีฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบหลอดเลือดและหัวใจได้ดังที่ได้กล่าวไว้ในทบทวนวรรณกรรม และว่านชักมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb.) ซึ่งเป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งที่พบว่ามีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogenic-like activity) และจากการศึกษาที่ผ่านมายังพบว่ามีฤทธิ์ในการลดไขมันในเลือดได้อีกด้วย จากเหตุผลดังกล่าวน่าจะเป็นไปได้ว่า ว่านชักมดลูกอาจจะเป็นหนึ่งในไฟโตเอสโตรเจนที่มีฤทธิ์ในการปกป้องการเกิดโรคที่เกี่ยวกับระบบหลอดเลือดและหัวใจได้ จึงได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของว่านชักมดลูกว่ามีผลต่อการทำงานของหลอดเลือดทั้งแบบอาศัยและไม่อาศัยเยื่อบุหลอดเลือด (endothelium) ผลต่อพยาธิสภาพของหลอดเลือดและระดับไขมันในเลือดหรือไม่

1. ผลของสารสกัดว่านชักมดลูกต่อน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในสตรีวัยหมดประจำเดือนจะมีแนวโน้มต่อการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวเนื่องจากสมดุลของระบบเผาผลาญพลังงานในร่างกายมีการเปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน (Poehlman *et al.*, 1995) การศึกษาที่ผ่านมา พบว่าการตัดรังไข่ (ovariectomy) ในหนูขาวมีผลทำให้หนูมีพฤติกรรมการกินอาหารเพิ่มขึ้นจนมีผลทำให้น้ำหนักตัวเพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อได้รับเอสโตรเจนทดแทนผลดังกล่าวจะกลับคืนสู่สภาวะปกติ (Tattelin and Gorski., 1978 ; Hidaka *et al.*, 2006) จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการตัดรังไข่เป็นเวลา 7 สัปดาห์มีผลทำให้น้ำหนักของหนูขาวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูขาวที่ถูกตัดรังไข่และได้รับเอสโตรเจนทดแทนเป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่ำกว่ากลุ่มที่ถูกตัดรังไข่และได้รับแต่น้ำมันข้าวโพดทดแทนอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษาที่ได้จึงสอดคล้องกับการศึกษาดังที่กล่าวมาข้างต้น จึงเป็นไปได้ว่าเอส-

โตรเจนในขนาดที่ทดลองดังกล่าวมีผลไปเพิ่มการทำงานของระบบการเผาผลาญไขมัน (lipid metabolism) ได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่สอดคล้องกับผลของเอสโตรเจนในครั้งนี้ที่ทดลองให้เอสโตรเจนทดแทนกับหนูขาวที่ถูกผ่าตัดรังไข่ออกในขนาด 10 มิลลิกรัมต่อวัน พบว่ามีผลลดการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวของหนูขาวและลดการรับประทานอาหาร (food intake) ของหนูขาวได้ ฤทธิ์ของเอส-โตรเจนในขนาดดังกล่าวที่เกี่ยวข้องกับพฤติกรรมการกินอาหารจะออกฤทธิ์ผ่านทางตัวรับเอสโตรเจนชนิด ERα (Roesch. 2006) นอกจากเหตุผลดังกล่าว เอสโตรเจนยังมีผลไปเพิ่มความไวของสมองต่อฮอร์โมนที่ควบคุมความอิ่ม หรือฮอร์โมน Cholecystokinin (CCK) ด้วย จึงมีผลให้ลดการกินอาหาร (food intake) และมีผลไปลดปริมาณอาหารที่กินในแต่ละมื้อ (meal size) ด้วย (Geary. 2001)

ส่วนผลของสารสกัดว่านชักมดลูกนั้น จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดว่านชักมดลูกทั้งสามขนาด คือ 100, 250 และ 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน นั้นไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับน้ำมันข้าวโพดอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดว่านชักมดลูกทั้ง 3 ขนาดไม่มีผลน้ำหนักตัวของหนูขาวที่เพิ่มขึ้นจากการเหนี่ยวนำด้วยการผ่าตัดรังไข่

2. ผลของการตัดรังไข่ต่อเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวช่องคลอด (vaginal epithelial cells) ของหนูขาว

วัฏจักรการตกไข่ (estrous cycle) ของหนูปกติ 1รอบจะมีระยะเวลา 4-5 วัน วัฏจักรดังกล่าวจะประกอบไปด้วย 4 ระยะด้วยกัน คือ ระยะ diestrus ระยะ proestrus ระยะ estrus และระยะ metestrus ระยะ diestrus จะพบสารคัดหลั่ง (secretory materials) และเศษของเซลล์ที่ตายแล้ว (debris cells) เป็นส่วนใหญ่ อาจจะพบเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวช่องคลอดชนิด parabasal cells และ intermediate cells บ้างเล็กน้อย และอาจพบเม็ดเลือดขาวบ้างเล็กน้อย, ระยะต่อมาคือระยะ proestrus จะพบ intermediate cells เป็นส่วนใหญ่ ส่วน parabasal cells แทบจะไม่พบเลย, ระยะ estrus จะพบ keratinized superficial cells ซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่มีนิวเคลียส รูปร่างหลายเหลี่ยมและแบน ระยะนี้จะเป็นระยะที่มีการตกไข่ ส่วนระยะสุดท้ายคือระยะ diestrus จะพบเมือก (mucus) เป็นจำนวนมาก และพบ debris cells มากเช่นกัน

จากการศึกษาในครั้งนี้ เมื่อได้ทำการผ่าตัดรังไข่หนูขาวทั้งสองข้างของหนูออก (bilateral ovariectomy) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วนำมาตรวจทางเซลล์วิทยาของเยื่อบุผิวช่องคลอดด้วยวิธี vaginal smear พบว่า หนูกลุ่มที่ถูกตัดรังไข่แทบจะไม่พบ cornified cells (epithelial cells) ที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากเซลล์ที่มีนิวเคลียสกลายเป็นเซลล์ที่ไม่มีนิวเคลียสเลย เป็นการยืนยันว่าหนูดังกล่าวไม่มีระยะ estrus ซึ่งเป็นระยะที่ฮอร์โมนเอสโตรเจนสูงขึ้นมากจนทำให้เกิดการตกไข่ได้ บ่ง

บอกว่าหนูกลุ่มดังกล่าวนั้นขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาในครั้งนี้แทนสตรีวัยหมดประจำเดือนได้

3. ผลของสารสกัดว่านชักมดลูกต่อปริมาณไขมันในเลือด

ภาวะหมดประจำเดือนที่เกิดขึ้นในสตรีนั้นมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับไขมันในร่างกายอันเนื่องมาจากการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน การเปลี่ยนแปลงของไขมันที่เกิดขึ้นนั้นได้แก่ ระดับคอเลสเตอรอลชนิดเลว (LDL cholesterol), ระดับของ apoprotein B และระดับของคอเลสเตอรอลทั้งหมด (total cholesterol) ในเลือดจะเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อโรคหลอดเลือดและหัวใจตามมา แต่อย่างไรก็ตามภาวะดังกล่าวแทบจะไม่มีผลต่อปริมาณคอเลสเตอรอลชนิดดี (HDL cholesterol) หรือมีผลเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Scarabin *et al.*, 1990)

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าหนูขาวในกลุ่มควบคุมที่ถูกตัดรังไข่และได้รับน้ำมันข้าวโพดทดแทนนั้นมีปริมาณคอเลสเตอรอลทั้งหมดและปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงกว่ากลุ่มหนูปกติที่ไม่ได้ถูกตัดรังไข่อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลนี้สัมพันธ์กับน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น จึงเป็นการยืนยันว่าการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนมีผลทำให้ปริมาณไขมันในเลือดสูงขึ้น นอกจากยังมีค่า atherogenic index ซึ่งเป็นดัชนีที่บ่งบอกโอกาสการเกิดโรค atherosclerosis สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ถูกตัดรังไข่อีกด้วย จากค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการตัดรังไข่มีแนวโน้มในการเกิดโรค atherosclerosis ได้สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ถูกตัดรังไข่

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการให้เอสโตรเจนทดแทนในสตรีวัยหมดประจำเดือนนั้นมีผลต่อระดับไขมันในร่างกาย พบว่าคอเลสเตอรอลโดยรวมและคอเลสเตอรอลชนิดเลวในเลือดลดลงได้ และมีผลทำให้คอเลสเตอรอลชนิดดีและไตรกลีเซอไรด์เพิ่มขึ้น ซึ่งผลดังกล่าวของเอสโตรเจนขึ้นอยู่กับวิธีการบริหารยา (route of administration) (The writing group for the PEPI Trial. 1995) ผลการศึกษาฤทธิ์ดังกล่าวในไฟโตเอสโตรเจน พบว่าการบริโภคอาหารที่ทำจากโปรตีนจากถั่วเหลืองไปมีผลทำให้ปริมาณคอเลสเตอรอลชนิดเลวและไตรกลีเซอไรด์ลดลง และเพิ่มปริมาณคอเลสเตอรอลชนิดดีในเลือดได้ (Anderson *et al.*, 1995)

การศึกษาในครั้งนี้พบว่าในภาวะที่ขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน ระดับไขมันในเลือดทั้งคอเลสเตอรอลโดยรวม คอเลสเตอรอลชนิดดีและไตรกลีเซอไรด์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่เลวลง และการให้เอสโตรเจนทดแทนไม่มีผลต่อทั้งคอเลสเตอรอลโดยรวมและไตรกลีเซอไรด์ในเลือด ซึ่งผลที่ได้แตกต่างจากการศึกษาที่ผ่านมาที่เคยพบว่าเอสโตรเจนมีผลลดระดับไขมันในร่างกาย จึง

เป็นไปได้ว่าขนาดของเอสโตรเจนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้สูงกว่าระดับปกติของร่างกาย (supraphysiological concentration) และชนิดของตัวอย่างที่ใช้ในแต่ละการศึกษานั้นแตกต่างกัน ผลของเอสโตรเจนต่อระดับคอเลสเตอรอลดังกล่าวจึงมีความแตกต่างกัน

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยเอธิลอะซิเตท มีผลลดระดับไขมันในเลือด ทั้งไตรกลีเซอไรด์และคอเลสเตอรอลทั้งหมด และเพิ่มระดับคอเลสเตอรอลชนิดดีในหนูแฮมสเตอร์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะคลอเรสเตรอรอลสูงได้ (Piyachaturawat *et al.*, 1999) โดยฤทธิ์ดังกล่าวนั้นเกิดโดยการเร่งการเคลื่อนที่ของไขมันจาก extrahepatic tissues ไปสู่ตับได้ แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาในครั้งนี้พบว่าสารสกัดว่านชักมดลูกทั้ง 3 ขนาด มีผลลดปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้สารสกัดว่านชักมดลูกในขนาด 100 มก./กก./วัน ยังมีผลเพิ่มปริมาณ HDL ในเลือดได้ซึ่งสูงกว่ากลุ่มที่ถูกตัดรังไข่ปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) อย่างไรก็ตาม สารสกัดทั้ง 3 ขนาดนั้นไม่มีผลต่อปริมาณคอเลสเตอรอลทั้งหมดและ LDL ในเลือด ซึ่งเป็นไปได้ว่า ผลการทดลองที่แตกต่างกันนี้เป็นผลมาจากความแตกต่างของชนิดของสารที่ใช้สกัด ชนิดของสัตว์ที่ใช้ในการทดลอง ภาวะที่เหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นในการทดลองและขนาดของว่านชักมดลูกที่ใช้ในแต่ละการทดลองนั้นมีความแตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการศึกษาในครั้งนี้ใช้เอธานอลในการสกัดว่านชักมดลูก อาจมีผลทำให้ได้สารประกอบที่แตกต่างกัน และครั้งนี้ได้เหนี่ยวนำให้หนูขาดเอสโตรเจนด้วยการตัดรังไข่ซึ่งอาจจะมีผลต่อกระบวนการเผาผลาญไขมันในร่างกาย จนทำให้ผลที่ได้แตกต่างจากการศึกษาที่ผ่านมาได้ ส่วนฤทธิ์ของว่านชักมดลูกในการลดปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในเลือดในการทดลองครั้งนี้ยังต้องการการศึกษาถึงกลไกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเผาผลาญไขมันในร่างกายต่อไปในอนาคต นอกจากนี้ยังพบว่าค่า atherogenic index ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดว่านชักมดลูกในขนาด 100 และ 250 มก./กก./วัน มีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่ถูกตัดรังไข่ปกติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดว่านชักมดลูกในขนาดดังกล่าวอาจมีความสามารถในการลดโอกาสเกิดโรค atherosclerosis ในหนูที่ขาดเอสโตรเจนจากการผ่าตัดรังไข่ได้

4. ผลของสารสกัดว่านชักมดลูกต่อการทำงานของหลอดเลือด

เซลล์บุหลอดเลือดและเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดมีบทบาทสำคัญต่อการหดและคลายตัวของหลอดเลือด ซึ่งส่งผลต่อจังหวะการหดและคลายตัวของหลอดเลือด (vascular tone) ให้การทำงานเป็นไปอย่างปกติ โดยที่เซลล์บุหลอดเลือดนอกจากจะหลั่งสารที่มีผลทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้ เช่น nitric oxide, prostacyclin และ EDHF แล้ว ยังหลั่งสารที่มีผลทำให้หลอดเลือดหดตัว เช่น thromboxane, free radical, endothelin-1, cytokine และ angiotensin II (Nevala *et al.*, 2001) ส่วน

เซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด จะรับผิดชอบต่อการหดและคลายตัวของหลอดเลือดโดยมีกลไกที่อาศัยการทำงานของ potassium channel, calcium channel และ tyrosine phosphorylation (ดังที่ได้กล่าวในบททบทวนวรรณกรรม)

จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าว่านชักมดลูกมีฤทธิ์ทำให้ระดับไขมันในร่างกายเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดีขึ้น นำมาซึ่งความสนใจในฤทธิ์ของว่านชักมดลูกที่น่าจะมีผลต่อการทำงานของหลอดเลือดให้ดีขึ้นได้เช่นกัน การศึกษาในครั้งนี้จึงทำการศึกษาผลของสารสกัดว่านชักมดลูกในการหดตัวของหลอดเลือดที่ตอบสนองต่อสาร norepinephrine และผลในการคลายตัวของหลอดเลือดที่ตอบสนองต่อสาร acetylcholine ซึ่งเป็นการทำให้หลอดเลือดคลายตัวแบบอาศัยเยื่อบุหลอดเลือด หรือตอบสนองต่อสาร sodium nitroprusside ซึ่งเป็นการทำให้หลอดเลือดคลายตัวแบบไม่อาศัยเยื่อบุหลอดเลือด รวมไปถึงการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดเมื่อได้รับสารสกัดว่านชักมดลูกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ด้วย

การผ่าตัดรังไข่ออกมีผลทำให้หนูขาวเพศเมียเกิดภาวะขาดเอสโตรเจนจนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือด จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการทำงานของหลอดเลือดเสียไป (Hayashi *et al.*,1992) ที่เห็นได้ชัดเจนเป็นส่วนที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัวแบบที่อาศัยเยื่อบุหลอดเลือด แสดงให้เห็นว่าเอสโตรเจนมีบทบาทสำคัญในการปกป้องเยื่อบุหลอดเลือด ความผิดปกติของเยื่อบุหลอดเลือดเป็นจุดเริ่มต้นของการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพและสูญเสียการทำงาน จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า การหดตัวของหลอดเลือดที่เกิดขึ้นจากการเหนี่ยวนำด้วย norepinephrine ในหนูที่ขาดเอสโตรเจนแตกต่างจากกลุ่มปกติอย่างไม่มีนัยสำคัญ แม้ว่าจะเห็นแนวโน้มว่ากลุ่มที่ถูกผ่าตัดรังไข่ออกมีการหดตัวของหลอดเลือดน้อยกว่า เมื่อเหนี่ยวนำด้วย norepinephrine ในขนาดต่ำ เมื่อเปรียบเทียบผลการคลายตัวของหลอดเลือดที่เหนี่ยวนำด้วย acetylcholine และ sodium nitroprusside ซึ่งเป็น NO donor พบว่าการขาดเอสโตรเจนทำให้หลอดเลือดสูญเสียการทำงานในการตอบสนองต่อฤทธิ์ของ Acetylcholine ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่า การกระตุ้นที่ muscarinic receptor มีผลทำให้เกิดการหลั่ง NO ออกมาจากเยื่อบุหลอดเลือด จากการศึกษาถึงผลของว่านชักมดลูกต่อปริมาณ NO ในเลือด พบว่าการขาดเอสโตรเจนเนื่องจากการตัดรังไข่ออกทำให้ปริมาณ NO ในเลือดลดลงและต่ำกว่ากลุ่มปกติได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (วัลยา, ข้อมูลที่ยังไม่เผยแพร่) ผลที่ได้สามารถอธิบายได้ว่าการทำงานของหลอดเลือดที่ลดลงนั้นเนื่องมาจากการหลั่ง nitric oxide ออกมาจากเยื่อบุหลอดเลือดลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าหนูขาวที่ขาดเอสโตรเจนโดยการผ่าตัดรังไข่ออกนั้นมีการทำงานของเยื่อบุหลอดเลือดลดลง ทำให้มีการหลั่ง nitric oxide ออกมาจากเยื่อบุหลอดเลือดลดลงจากสภาวะปกติ (Hayashi *et al.*,1992) เช่นกัน ส่วนผลทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดใน

หนูขาวที่ขาดเอสโตรเจนสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ ว่าการขาดเอสโตรเจนน่าจะมีผลที่เยื่อบุหลอดเลือดก่อนที่จะขยายความผิดปกติไปยังกล้ามเนื้อเรียบ

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการขาดเอสโตรเจนจากการตัดรังไข่นั้นมีผลทำให้เกิดสภาวะ oxidative stress ภายในเซลล์ของหลอดเลือด ซึ่งมีผลทำให้เยื่อบุหลอดเลือดสูญเสียการทำงาน (endothelial dysfunction) แต่เมื่อได้รับเอสโตรเจนทดแทนกลับพบว่าสามารถฟื้นฟูการทำงานของเยื่อบุหลอดเลือดที่เสียไปกลับคืนมาสู่ปกติได้ เนื่องจากเอสโตรเจนนั้นมีผลลดการเกิด oxidative stress (Virdis *et al.*, 2000) อันเนื่องมาจากคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ (Liehr., 1996) การศึกษาที่มีก่อนหน้านี้ได้รายงานไว้ว่าเมื่อให้เอสโตรเจนทดแทนกับหนูที่ถูกตัดรังไข่ในขนาด 1 มก./กก./วัน เป็นเวลา 14 วัน พบว่าทำให้การหดตัวของหลอดเลือดที่เหนี่ยวนำด้วย norpinephrine ดีขึ้น (Cheng and Gruetter., 1992) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเป็นจำนวนมากที่ศึกษาฤทธิ์ของเอสโตรเจนต่อการคลายตัวของหลอดเลือด ซึ่งพอจะสรุปได้ว่าเอสโตรเจนนั้นมีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้ทั้งอาศัยและไม่อาศัยเยื่อบุหลอดเลือดในการทำงาน โดยเอสโตรเจนจะไปทำให้เกิดการหลั่ง nitric oxide อย่างรวดเร็วโดยไม่เกี่ยวข้องกับการทำงานของยีน (nongenomic effect) และเอสโตรเจนยังออกฤทธิ์ผ่านตัวรับของเอสโตรเจนเองที่อยู่บนเยื่อหุ้มผนังหลอดเลือด (plasma membrane) ทำให้หลอดเลือดคลายได้โดยฉับพลัน การได้รับเอสโตรเจนเป็นเวลานานจะมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase ซึ่งมีผลทำให้มีการสร้าง nitric oxide อีกด้วย (Mendelsohn and Karas., 1999) นอกจากนี้เอสโตรเจนยังมีผลทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้โดยตรงที่กล้ามเนื้อเรียบ โดยเอสโตรเจนจะออกฤทธิ์ที่ ion channel ที่ควบคุมการไหลเข้า-ออกของโพแทสเซียมไอออน โซเดียมไอออนและแคลเซียมไอออน (Tostes *et al.*, 2003) แต่ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการหดตัวของหลอดเลือดที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Norepinephrine และการคลายตัวของหลอดเลือดแบบอาศัยเยื่อบุหลอดเลือดในกลุ่มที่ได้รับเอสโตรเจนทดแทนไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มที่ถูกตัดรังไข่และไม่ได้รับสารทดแทนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ที่น่าสนใจในการศึกษาครั้งนี้พบว่า การคลายตัวแบบไม่อาศัยเยื่อบุหลอดเลือดในกลุ่มที่ถูกตัดรังไข่และได้รับเอสโตรเจนทดแทนในขนาดที่สูงกว่าปกติ กลับมีผลทำให้การคลายตัวจากการกระตุ้นด้วย NO donor ได้มากกว่ากลุ่มปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งๆที่ผลจากการกระตุ้นด้วย acetylcholine กลับต่ำกว่าที่ควรจะเป็น ผลที่ได้อาจเกิดจากการที่ NO ยังคงมีอยู่ในกล้ามเนื้อเรียบได้นานขึ้นกว่าปกติ (Hamilton *et al.*, 2006) จึงทำให้หลอดเลือดตอบสนองต่อ NO ได้มากกว่าที่ควรจะเป็น หรืออาจเกิดจากการ upregulation ของตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor) ที่เกี่ยวข้องกับคลายคลายตัวที่กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด อย่างไรก็ตามมีความเป็นไปได้ว่าขนาดของเอสโตรเจนนั้นมีส่วนทำให้ผลการทดลองที่ได้แตกต่างกัน โดยที่เอสโตรเจนในขนาดที่มีอยู่ตามปกติภายในร่างกาย (physiological concentration) จะมีผลทำให้มีการหลั่ง nitric oxide ออกมาจากเยื่อบุหลอดเลือดตามปกติ (Caulin-Glaser *et al.*, 1997) แต่ขนาดของเอสโตรเจนที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้

น่าจะเป็นขนาดที่ทำให้ระดับเอสโตรเจนในกระแสเลือดสูงกว่าระดับที่มีตามปกติ (supraphysiological concentration) ผลที่ได้จึงไม่เป็นการปกป้องหลอดเลือดอย่างที่ควรจะเป็น

การศึกษาที่ผ่านมาถึงฤทธิ์ของ isoflavone ซึ่งเป็นไฟโตเอสโตรเจนชนิดหนึ่ง พบว่าสามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วย phenylnephrine ได้ (Ajay *et al.*, 2003) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดว่านชักมดลูกมีการหดตัวที่ตอบสนองต่อ norepinephrine ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ถูกตัดรังไข่ปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดว่านชักมดลูกในขนาด 250 มก./กก./วัน มีแนวโน้มว่าการหดตัวที่เกิดจาก norepinephrine ในความเข้มข้นที่สูง (10^{-6} และ10^{-5} M) ลดลง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดว่านชักมดลูกในขนาด 250 มิลลิกรัม อาจมีฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดได้เช่นเดียวกับ isoflavone ซึ่งอาจจะเป็นผลดีต่อการควบคุมความดันโลหิตของร่างกายได้ ส่วนการคลายตัวของหลอดเลือดแบบอาศัยเยื่อบุหลอดเลือดนั้น พบว่าสารสกัดว่านชักมดลูกทั้ง 3 ขนาด (100, 250 และ 500 มก./กก./วัน) มีแนวโน้มในการทำให้หลอดเลือดคลายตัวแบบอาศัยเยื่อบุหลอดเลือดที่เหนี่ยวนำด้วยสาร acetylcholine ได้ดีกว่ากลุ่มที่ถูกตัดรังไข่ปกติ ซึ่งสารสกัดว่านชักมดลูกในขนาด 500 มก./กก./วัน มีการตอบสนองต่อการคลายตัวของหลอดเลือดที่เหนี่ยวนำด้วย acetylcholine ในความเข้มข้นที่สูง (10^{-7}M และ 10^{-5}M) ได้สูงกว่ากลุ่มที่ถูกตัดรังไข่ปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลดังกล่าวอาจอธิบายได้ว่าสารสกัดว่านชักมดลูกอาจช่วยในการฟื้นฟูการทำงานของเยื่อบุหลอดเลือดให้ดีขึ้นได้ (vascular reactivity) การทำงานที่ดีขึ้นนี้อาจเป็นผลมาจากการที่ว่านชักมดลูกไปมีผลทำให้มีการหลั่ง nitric oxide ออกมาจากเยื่อบุหลอดเลือดได้มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่าการให้ว่านชักมดลูกแก่หนูที่ถูกตัดรังไข่ทำให้ปริมาณ nitric oxide ในเลือดเพิ่มขึ้น (วัลยา, ผลการทดลองที่ยังไม่เผยแพร่) ผลที่คล้ายคลึงกันนี้พบในการศึกษาใน genistein ซึ่งเป็นไฟโตเอสโตรเจนชนิดหนึ่ง ที่มีผลทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้ดีขึ้นเช่นกัน (Squadrito *et al.*, 2000) ส่วนผลของว่านชักมดลูกต่อการคลายตัวของหลอดเลือดแบบไม่อาศัยเยื่อบุหลอดเลือดนั้น พบว่าสารสกัดว่านชักมดลูกทั้ง 3 ขนาดไม่มีผลต่อการคลายตัวของหลอดเลือดแบบไม่อาศัยเยื่อบุหลอดเลือดที่เหนี่ยวนำด้วย sodium nitroprusside และยังมีการคลายตัวของหลอดเลือดได้ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ถูกตัดรังไข่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย

5. ผลของสารสกัดว่านชักมดลูกต่อพยาธิสภาพของหลอดเลือด

หลอดเลือดแดงในร่างกายจะประกอบไปด้วยชั้น tunica intima, tunica media และ tunica adventitia ซึ่งชั้น intima ในหลอดเลือดแดงปกติ จะรายล้อมไปด้วยเซลล์บุหลอดเลือด (endothelial cells) ซึ่งภายใต้จะมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissues) เพียงเล็กน้อย ส่วนชั้น media จะ

ประกอบไปด้วย lamellae หลายชั้น ช่องว่างที่อยู่ระหว่าง lamellae จะมี เซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด, เส้นใยคอลลาเจน และสารบางอย่างเป็นส่วนประกอบ (Rossi and Colombini-Netto. 2001)

เมื่อเกิดการบาดเจ็บขึ้นภายในชั้น intima จะนำไปสู่การเกิดกระบวนการสะสมของก้อนไขมันภายในผนังหลอดเลือด (atherosclerosis) และ การเจริญของชั้น intima มากเกินไป (intimal hyperplasia) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดทุพลภาพและการเสียชีวิตได้ กระบวนการของโรค atherosclerosis จะเกิดขึ้นโดยการตอบสนองของเซลล์บุหลอดเลือดต่อการบาดเจ็บที่เกิดจากการกระตุ้นได้หลายปัจจัย ซึ่งเนื่องมาจากความสามารถในการยอมให้ไขมันผ่านเข้าออก (lipid permeability) เพิ่มสูงขึ้น, เกิดการชุมนุมกันของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด macrophage และต่อมาจะเกิดการรวมตัวกลายเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่เรียกว่า "foam cells" จากนั้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T-lymphocyte และเกล็ดเลือดก็จะเข้ามาบริเวณนี้ด้วย ส่วนพยาธิสภาพของ intimal hyperplasia เริ่มแรกนั้นเซลล์บุหลอดเลือดจะตอบสนองต่อการบาดเจ็บที่เกิดขึ้นโดยการหลั่งสารต่างๆ ออกมา เซลล์ทั้งหลายเหล่านั้นที่มีส่วนร่วมในการหลั่งสาร ได้แก่ เยื่อบุหลอดเลือด เกล็ดเลือด เซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน (inflammatory cells) สารที่หลั่งออกมา ได้แก่ growth factors และ cytokines ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดผลตามมาอีกหลายประการ รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดด้วย โดยจากที่อยู่ในระยะสงบ (quiescent contraction state) จะกลายเป็นระยะที่พร้อมที่จะทำงานทุกขณะ (active synthetic state) และเกิดการรวมตัวกัน (deposition) ของ extracellular matrix (ECM) protein นอกจากนี้กล้ามเนื้อเรียบยังเกิดการแบ่งเซลล์ (cell proliferation) และเคลื่อนย้าย (migration) จากบริเวณชั้น media ไปสู่ชั้น intima ด้วย (Schachter. 1997; Davies and Hagen. 1994) เมื่อกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดเข้าไปอยู่ในชั้น intima แล้ว จะเกิดการแบ่งตัวและเกิดการสร้าง ECM protein ที่มีส่วนในการแผ่ขยาย (lesion) ของโรค intimal hyperplasia (Davis and Hagen. 1994; Kaiura *et al.*, 2000) การเคลื่อนย้ายของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดจากชั้น media ไปยังชั้น intima นี้เป็นส่วนของกระบวนการเกิดพยาธิสภาพ (pathological process) ที่สำคัญของทั้งโรค atherosclerosis และ intimal hyperplasia

การศึกษาครั้งนี้พบว่า จากการตรวจทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงใหญ่ในหนูขาวที่ขาดเอสโตรเจนเนื่องจากถูกตัดรังไข่เป็นเวลา 7 สัปดาห์ พบว่ามีการหนาตัวขึ้นของเซลล์บุหลอดเลือดในบางบริเวณ และพบว่ามีเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดบางส่วนมาแทรกตัวอยู่ในชั้น intima นอกจากนี้ยังพบ foam cells เกิดขึ้น และพบเม็ดเลือดขาวมาประชิดผนังเยื่อบุหลอดเลือดอีกด้วย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการขาดเอสโตรเจนเนื่องจากการตัดรังไข่มีผลทำให้หลอดเลือดเกิดพยาธิสภาพคล้ายคลึงกับหลอดเลือดที่มีภาวะของโรค atherosclerosis หรือ intimal hyperplasia ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น

หลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาวกลุ่มที่ถูกตัดรังไข่และได้รับเอสโตรเจนทดแทนนั้น พบว่าชั้น media มีความหนากว่ากลุ่มปกติที่ไม่ได้ถูกตัดรังไข่ ซึ่งเกิดจากเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดเกิดการหนาตัวขึ้น ดังเช่นการศึกษาที่ผ่านมาที่กล่าวถึงฤทธิ์ของเอสโตรเจนมีผลเพิ่มปริมาณเซลล์กล้ามเนื้อเรียบในชั้น media ของหลอดเลือดได้ หลังจากที่เหนี่ยวนำให้เกิดการบาดเจ็บขึ้นในหลอดเลือด (Karas *et al.*, 1999) แต่มีการศึกษาที่รายงานขัดแย้งกันไว้ว่าเอสโตรเจนยังมีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด (Espinosa *et al.*, 1996) โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านทางตัวรับของเอสโตรเจนที่อยู่บนเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด (Cathapermal *et al.*, 1998) เอสโตรเจนมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดโดยไปกระตุ้นการสร้าง cyclic adenosine-5'-monophosphate (cAMP) นำไปสู่การสร้าง adenosine ซึ่งเป็นตัวควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ผ่านทาง A2-adenosine receptor (Dubey *et al.*, 1999) โดยที่ความเข้มข้นของเอสโตรเจนในการทำให้เกิดฤทธิ์กระตุ้นการสร้าง cAMP นั้นจะต้องมีระดับสูงกว่าระดับของเอสโตรเจนที่มีอยู่ปกติภายในร่างกาย (supraphysiological concentration) (Christ *et al.*, 1999) ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดมีการเจริญเพิ่มมากขึ้น จึงเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นของเอสโตรเจนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้สูงเกินกว่าระดับปกติ (supraphysiological concentration) เช่นเดียวกัน จึงมีผลทำให้การเจริญของเซลล์ดังกล่าวเพิ่มขึ้นได้ นอกจากนี้การที่ไม่พบเซลล์เม็ดเลือดขาวภายในชั้น intima นั้นเนื่องจากเอสโตรเจนมีฤทธิ์ยับยั้งเม็ดเลือดขาวเข้ามายึดเกาะบริเวณชั้น intima ของหลอดเลือด ซึ่งจะมีผลยับยั้งการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวไปยังชั้น subendothelium ได้ (Nathan *et al.*, 1999)

ส่วนหลอดเลือดของหนูที่ถูกตัดรังไข่และได้รับสารสกัดว่านชักมดลูกทดแทนในขนาด 100 และ 500 มก./กก./วัน นั้นไม่พบว่ามีการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติเกิดขึ้น น่าจะเป็นไปได้ว่าว่านชักมดลูกในขนาด 100 และ 500 มิลลิกรัม มีความสามารถในการปกป้องเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด การที่ไม่พบเซลล์เม็ดเลือดขาวแทรกอยู่ภายในชั้น media จึงเป็นข้อดีของการให้ว่านชักมดลูกทดแทนภาวะขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน นอกจากนี้ยังพบว่ามีการตายของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดเป็นบางบริเวณ ซึ่งสอดคล้องกับผลการคลายตัวของหลอดเลือดแบบไม่อาศัยเยื่อบุหลอดเลือดของหนูที่ได้รับสารสกัดว่านชักมดลูกที่มีการคลายตัวน้อยกว่าหนูปกติ เนื่องจากการที่เกิดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบบางส่วนนี้อาจมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเซลล์ดังกล่าวลดลงไปด้วย

บทสรุป

การทำงานที่ลดลงของหลอดเลือดสอดคล้องกับพยาธิสภาพที่เปลี่ยนแปลงไปของหลอดเลือด หนูขาวที่ทำให้ขาดเอสโตรเจนโดยการผ่าตัดรังไข่เป็นรูปแบบการทดลองที่แสวงหายาที่มีฤทธิ์แบบฮอร์โมนเอสโตรเจน จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า สารสกัดว่านชักมดลูกด้วยเอธานอลสามารถทำให้การทำงานของหลอดเลือดดีขึ้นได้ โดยทำให้หลอดเลือดของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้ขาดเอสโตรเจนโดยการตัดรังไข่มีการคลายตัวแบบอาศัยการทำงานของเยื่อบุหลอดเลือดได้ดีขึ้น สอดคล้องกับผลที่มีการหลั่ง nitric oxide ออกมาจากเยื่อบุหลอดเลือดในปริมาณที่มากขึ้น ซึ่งการทำงานของหลอดเลือดที่ดีขึ้นนั้นยังสอดคล้องกับผลทางพยาธิสภาพที่มีการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดีขึ้นเนื่องจากได้รับว่านชักมดลูก นอกจากนี้สารสกัดว่านชักมดลูกด้วยเอธานอลยังมีแนวโน้มที่ดีต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับไขมันในร่างกายไปในทางที่ดีขึ้นโดยทำให้ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในเลือดและ atherogenic index ลดลงได้ ผลจากการศึกษาในครั้งนี้สนับสนุนประโยชน์ของการใช้ว่านชักมดลูกซึ่งเป็นสมุนไพรดั้งเดิมของไทย ซึ่งอาจเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการรักษาหรือป้องกันโรคหลอดเลือดและหัวใจในสตรีวัยหมดประจำเดือนแทนการใช้ฮอร์โมนเอสโตรเจนได้ อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาต่อไปถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดว่านชักมดลูกด้วยเอธานอลต่อคลายตัวของหลอดเลือดและผลกระทบต่ออวัยวะอื่นๆ จากการได้รับสารสกัดว่านชักมดลูกในระยะเวลานาน เนื่องจากการนำมาใช้ในรูปแบบฮอร์โมนทดแทนนั้นเป็นการใช้ยาในระยะยาวนาน นอกจากนี้ควรทำการศึกษาทดลองถึงขนาดและระยะเวลาการใช้ที่เหมาะสมจะมีผลทำให้ได้รับประโยชน์การรักษาสูงสุดจากว่านชักมดลูก