ผลของสารมาดีคาสโซไซด์ร่วมกับยาแอสไพรินต่อการทำงานของเกล็ดเลือด

Effect of madecassoside combined with aspirin on platelet functions

เธียรวัฒน์ ไกรเกตุ ศศิวิมล มากทรัพย์ หนึ่งฤทัย นิลศรี*
*Theiarawat Kraikate Sasivimon Maksub Nungruthai Nilsri**

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University

** Corresponding author (Email: nungruthai.ni@gmail.com)*

Received June 2015
Accepted as revised September 2015

Abstract

Introduction: Platelet is a key factor of thrombosis; thus, antiplatelet drugs especially aspirin were generally used to treat patients. However, these drugs have long term side effects. Recently, many studies found that triterpenoid substances from plants can inhibit platelet aggregation. The “madecassoside” extracted from *Centella asiatica* was also triterpenoid.

Objective: To investigate the effect of madecassoside combined with aspirin on platelet adhesion and aggregation.

Materials and methods: Platelets were mixed with madecassoside at the concentration of 25, 50, 100 and 200 µg/mL. The ADP was used as agonist and the aggregation of platelet was monitored using microplate assay.

Results: The result showed that 50, 100 and 200 µg/mL of madecassoside significantly inhibited platelet aggregation at $p<0.05$ compared with the control. The 100 and 200 µg/mL of madecassoside plus half-dose of aspirin showed platelet anti-aggregation effect similar to full-dose. Furthermore, 25, 50, 100 and 200 µg/mL of madecassoside mixed with platelet were used to investigate platelet adhesion by adding the mixture into the collagen-coated microplate. The result showed that all concentrations of madecassoside had no inhibition effect on the platelet adhesion induced by ADP.

Conclusions: Madecassoside from *Centella asiatica* can be used to inhibit platelet aggregation. In addition, combination of madecassoside aspirin could reduce the side effects of aspirin in thrombosis patients.
Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2015; 48(3): 214-221. Doi: 10.14456/jams.2015.22

Keywords: Madecassoside, aspirin, platelet adhesion, platelet aggregation

บทคัดย่อ

บทนำ: เกล็ดเลือดเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือด ดังนั้นจึงมีการใช้ยาต้านเกล็ดเลือด โดยเฉพาะแอสไพรินในการรักษาผู้ป่วย แต่การใช้ยาดังกล่าวเป็นระยะเวลานานทำให้เกิดผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ได้ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สารไตรเทอร์พีนอยด์ที่สกัดได้จากพืชชนิดต่างๆ สามารถยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือดได้

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารมาดีคาสโซไซด์ในใบบัวบกซึ่งเป็นไตรเทอร์พีนอยด์ ร่วมกับยาแอสไพรินในการยับยั้งการเกาะติดและเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด

วัสดุและวิธีการ: นำเกล็ดเลือดผสมกับสารมาดีคาสโซไซด์ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 µg/mL กระตุ้นเกล็ดเลือดด้วยเอดีพี และตรวจสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดด้วยวิธี microplate assay

สรุปผลการศึกษา: สารสกัดที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 200 µg/mL สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อนำสารสกัดที่ความเข้มข้น 100 และ 200 µg/mL ผสมกับแอสไพรินความเข้มข้นลดลงกึ่งหนึ่ง พบว่าสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้ใกล้เคียงกับการใช้แอสไพรินเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังศึกษาการเกาะติดของเกล็ดเลือด โดยเติมสารสกัดที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 µg/mL ร่วมกับเกล็ดเลือดลงในไมโครเพลทที่เคลือบคอลลาเจน พบว่าสารมาดีคาสโซไซด์ในทุกๆ ความเข้มข้นไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะติดของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วยเอดีพี

สรุปผลการศึกษา: สารมาดีคาสโซไซด์มีฤทธิ์การยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด และสามารถทำงานร่วมกับแอสไพรินได้ จึงอาจเป็นแนวทางในการใช้สารมาดีคาสโซไซด์ร่วมกับแอสไพรินเพื่อลดผลข้างเคียงจากการใช้ยาสำหรับผู้ป่วยโรคหลอดเลือดอุดตันต่อไป

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2558; 48(3): 214-221. Doi: 10.14456/jams.2015.22

คำหัส: มาดีคาสโซไซด์ แอสไพริน การเกาะติดของเกล็ดเลือด การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด

บทนำ

เกล็ดเลือด มีหน้าที่หลักในกระบวนการห้ามเลือดขั้นปฐมภูมิ (primary hemostasis) เมื่อมีการบาดเจ็บหรือฉีกขาดของหลอดเลือด หลอดเลือดจะหดตัวทันทีเพื่อลดอัตราการไหลของเลือดให้ช้าลง หลังจากนั้นจะเกิดการเกาะติดของเกล็ดเลือดกับผนังของหลอดเลือด (platelet adhesion) และเกล็ดเลือดถูกกระตุ้น (platelet activation) ทำให้รูปร่างเปลี่ยนแปลงและมีการหลั่งสารออกจากแกรนูลของเกล็ดเลือด ซึ่งส่งผลให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) เป็นก้อน (platelet plug) อุดรอยฉีกขาดของหลอดเลือด[1] อย่างไรก็ตาม ในภาวะปกติที่ไม่เกิดบาดแผล เกล็ดเลือดอยู่ในสภาวะพัก เนื่องจากร่างกายมีกลไกต่างๆ ป้องกันไม่ให้เกล็ดเลือดถูกกระตุ้นจนเกิดเป็นลิ่มเลือดได้ แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าโรคหรือพยาธิสภาพบางอย่าง สามารถกระตุ้นเกล็ดเลือดได้เองในร่างกายของผู้ป่วยมากกว่าปกติ เช่น โรคธาลัสซีเมีย[2] กลุ่มอาการเมตาบอลิก[3] มะเร็ง[4] และโรคเบาหวาน[5] เมื่อเกล็ดเลือดถูกกระตุ้นให้ทำงานมากกว่าปกติย่อมทำให้เกิดผลเสียต่อร่างกาย โดยทำให้เกิดก้อนลิ่มเลือดอุดตันหลอดเลือดที่หล่อเลี้ยงอวัยวะที่สำคัญต่างๆ โดยเฉพาะหลอดเลือดสมองและหลอดเลือดหัวใจ จากสถิติของกระทรวงสาธารณสุข ปี พ.ศ. 2556 พบว่า โรคหัวใจและโรคหลอดเลือดสมองอุดตันเป็นสาเหตุที่ทำให้คนไทยเสียชีวิตเป็นอันดับที่ 3 และ 4 ของประเทศ รองจากโรคมะเร็งและอุบัติเหตุ[6]

ยาที่นิยมใช้ในการรักษาภาวะลิ่มเลือดอุดตัน ได้แก่ ยาต้านการทำงานของเกล็ดเลือด โดยทำให้เกล็ดเลือดไม่สามารถรวมตัวกันและไม่เกิดเป็นลิ่มเลือดในที่สุด ยาที่สำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่ แอสไพริน (aspirin) คลอพิโดเกรล (clopidogrel) และไกลโคโปรตีนทูบีทรีเอ แอนทาโกนิส (GP IIb/IIIa antagonists)[7-9] อย่างไรก็ตาม การรับยาเหล่านี้เป็นระยะเวลานาน อาจทำให้เกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ได้

โดยเฉพาะแอสไพริน ผลข้างเคียงที่พบได้บ่อย คือ ระคายเคืองกระเพาะอาหาร ทำให้เกิดแผลและมีการอักเสบในกระเพาะอาหาร หรืออาจรุนแรงจนถึงขั้นทำให้กระเพาะอาหารทะลุได้ ทั้งยังทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน มีผื่นตามผิวหนัง เลือดออกง่าย นอกจากนี้ยังพบว่า ยาส่งผลต่อการทำงานของไตและการควบคุมความดันโลหิตอีกด้วย[10]

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สารสกัดหยาบจากใบบัวบกมีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดจากการกระตุ้นด้วยธรอมบินได้[11] และเมื่อศึกษาองค์ประกอบหลักในใบบัวบกพบว่ามีสารกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์เป็นองค์ประกอบ และสารสำคัญคือ มาดีคาสโซไซด์ (madecassoside)[12] มีรายงานว่าสารในกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ที่สกัดจากพืชสามารถต้านการทำงานของเกล็ดเลือดได้[13] แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาใดที่ศึกษาฤทธิ์ของสารมาดีคาสโซไซด์ ซึ่งเป็นไตรเทอร์พีนอยด์ที่พบในใบบัวบกต่อกระบวนการทำงานของเกล็ดเลือด ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาฤทธิ์ของมาดีคาสโซไซด์ต่อกระบวนการทำงานที่สำคัญของเกล็ดเลือดคือการเกาะติดและเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ร่วมกับการใช้แอสไพริน ซึ่งเป็นยาต้านการทำงานของเกล็ดเลือดที่ใช้เป็นทางเลือกแรกในการรักษาโรคหัวใจและหลอดเลือด

วัสดุและวิธีการศึกษา

การคัดเลือกอาสาสมัคร

คัดเลือกอาสาสมัครสุขภาพดีที่มีอายุตั้งแต่ 20 ปีขึ้นไป จำนวน 10 ราย อาสาสมัครต้องมีจำนวนเกล็ดเลือดมากกว่า 200,000 platelets/μL ไม่รับประทานยาหรืออาหารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือด เช่น แอสไพริน การศึกษานี้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เลขที่รับรอง 74/2013

การเตรียมเกล็ดเลือดสำหรับทดสอบ

เจาะเลือดจากอาสาสมัครโดยใช้สารกันเลือดแข็งชนิด sodium citrate ที่ความเข้มข้น 3.2% ในอัตราส่วน 9:1 ปั่นที่ความเร็ว 140xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 22°C เก็บส่วนบนซึ่งเป็น platelet rich plasma (PRP) หลังจากนั้นปรับความเข้มข้นของเกล็ดเลือดด้วย PBS ให้ได้เท่ากับ $2x10^8$ platelets/mL และปั่นเลือดที่ 1,500xg เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเก็บส่วนบนเป็น platelet poor plasma (PPP)

การศึกษาความเป็นพิษของสารมาดีคาสโซไซด์ต่อเกล็ดเลือด

เพื่อเป็นการทดสอบว่าสารมาดีคาสโซไซด์ (madecassoside from *Centella asiatica*; HPLC, Sigma-aldrich, China) ที่นำมาทดสอบ หรือแอสไพริน ไม่มีผลในการทำลายเกล็ดเลือด โดยการนำเกล็ดเลือดที่ $2x10^8$ platelets/mL ปริมาตร 500 μL ทำปฏิกิริยาร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 μg/mL หรือแอสไพรินที่ความเข้มข้น 81 mg/mL ปริมาตร 250 μL บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 1,500xg เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสด้านบนตรวจวัดปริมาณแลคเตทดีไฮโดรจีเนส ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Cobas 6000 โดยใช้สาร Triton X-100 ผสมกับเกล็ดเลือดเป็นชุดควบคุมบวก

การทดสอบการเกาะติดของเกล็ดเลือดกับคอลลาเจนด้วยวิธี microplate assay[14]

เติมเกล็ดเลือด $2x10^8$ platelets/mL ปริมาตร 25 μL กับสารมาดีคาสโซไซด์ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 μg/mL หรือแอสไพรินความเข้มข้น 81 mg/mL ปริมาตร 25 μL ลงใน 96 well plate ที่เคลือบด้วย collagen type I ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกระตุ้นเกล็ดเลือดด้วยเอดีพี (Helena, USA) ความเข้มข้น 50 μM ปริมาตร 5 μL บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาล้างเพลทด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติม p-nitrophenyl phosphate ปริมาตร 140 μL/หลุม และตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2N NaOH ก่อนอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครไตเตอร์เพลท ที่ความยาวคลื่น 450 nm คำนวณค่าการเกาะติดของเกล็ดเลือดโดยเทียบกับหลุมควบคุมลบ (PBS) และหลุมควบคุมบวก (แอสไพริน)

การทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดด้วยวิธี microplate assay[15]

นำเกล็ดเลือด $2x10^8$ platelets/mL ปริมาตร 100 μL ผสมกับสารมาดีคาสโซไซด์ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 μg/mL หรือแอสไพริน หรือสารมาดีคาสโซไซด์ร่วมกับแอสไพริน ปริมาตร 25 μL ลงใน 96 well plate ปริมาตร 25 μL ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ครบเวลาเติมสารกระตุ้นเกล็ดเลือดเอดีพี ความเข้มข้น 50 μM ปริมาตร 10 μL และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครไตเตอร์เพลท (PerkinElmer; USA) ที่ความยาวคลื่น 600 nm โดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงในนาทีที่ 0 และ 20 คำนวณร้อยละการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ด้วยสมการ

$$\% \text{ Aggregation} = \frac{100 \times \text{OD}(plt_0) - \text{OD}(plt_{20})}{\text{OD}(\text{vehicle}_0) - \text{OD}(\text{PPP})}$$

วิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์และแสดงผลด้วยค่าร้อยละของการเกาะติดและการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด และเนื่องจากข้อมูลมีการกระจายตัวแบบไม่ปกติ จึงวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วย Mann-Whitney U test จากนั้นรายงานผลเป็นค่ามัธยฐาน (median) โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์สถิติสำเร็จรูป เปรียบเทียบข้อมูลกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมสารสกัดลงไป (vehicle control) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05)

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารมาดีคาสโซไซด์ต่อเกล็ดเลือด

หากเกล็ดเลือดถูกทำลายจะมีการหลั่งสารแลคเตทดีไฮโดรจีเนสออกมาในหลอดที่ทำปฏิกิริยา การทดสอบพบว่าปริมาณแลคเตทดีไฮโดรจีเนสในกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดสอบที่เติมสารมาดีคาสโซไซด์ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 µg/mL ไม่มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) จึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาทดสอบไม่มีฤทธิ์ทำลายเกล็ดเลือด (ตารางที่ 1)

Table 1 Effects of madecassoside on platelets by lactase dehydrogenase release assay.

Test	Concentration (µg/mL)	Lactate dehydrogenase (U/L) (mean±SD)	*p*-value
Vehicle control	-	59.0±3.0	-
Positive control	-	305.0±13.0	p=0.033
Aspirin	81 mg/mL	56.0±8.0	p=0.478
Madecassoside	25	54.5±8.5	p=0.444
	50	55.0±7.0	p=0.480
	100	53.5±6.5	p=0.917
	200	52.5±9.5	p=0.903

ฤทธิ์ของสารมาดีคาสโซไซด์ต่อกระบวนการเกาะติดของเกล็ดเลือดกับคอลลาเจน

จากการทดสอบการเกาะติดของเกล็ดเลือดกับ collagen type I พบว่าสารมาดีคาสโซไซด์ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 µg/mL ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะติดของเกล็ดเลือด (ตารางที่ 2)

Table 2 The percentage of platelet adhesion and inhibitory effect of madecassoside on platelet adhesion.

Test	Concentration (µg/mL)	The percentage of platelet adhesion Median (min-max)	Inhibitory effect value (%)	*p*-value
Vehicle control	-	100	0	-
Positive control	81 mg/mL	64.29 (22.22-87.50)	35.71	p=0.292
Madecassoside	25	100	0	p=0.317
	50	100	0	p=0.317
	100	100	0	p=0.317
	200	100	0	p=0.317

** Samples were tested in triplicate and 3 time-independent experiments.*

ฤทธิ์ของสารมาดีคาสโซไซด์ต่อกระบวนการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด

ผลการทดสอบพบว่าสารมาดีคาสโซไซด์ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 µg/mL สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วยเอดีพีได้ โดยสารมาดีคาสโซไซด์ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 µg/mL ทำให้การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p=0.004 และสารมาดีคาสโซไซด์ที่ความเข้มข้น 200 µg/mL ลดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p<0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม แปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัด (ตารางที่ 3 และ รูปที่ 1) และเมื่อทดสอบสารมาดีคาสโซไซด์ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 µg/mL ร่วมกับแอสไพรินที่มีความเข้มข้นลดลงกึ่งหนึ่ง (40.5 mg/mL) พบว่าลดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดใกล้เคียงกับการใช้แอสไพรินเพียงชนิดเดียว แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ p=0.368 (รูปที่ 2)

Table 3 The percentage of platelet aggregation and inhibitory effect of madecassoside on platelet aggregation.

Test	Concentration (µg/mL)	The percentage of platelet adhesion Median (min-max)	Inhibitory effect value (%)	*p*-value
Vehicle control	-	35.3 (25.0-39.7)	0	-
Positive control	81 mg/mL	7.1 (4.9-9.2)	79.8	p<0.001
Madecassoside	25	27.5 (14.9-35.0)	22.1	p=0.051
	50	25.2 (13.6-30.1)	28.6	p=0.004
	100	21.9 (12.7-30.1)	37.9	p=0.004
	200	18.4 (11.1-27.4)	47.8	p=0.001
Madecassoside	100	14.0 (8.6-20.6)	60.3	p=0.001
with aspirin 40.5 mg/mL	200	10.5 (6.0-19.0)	70.1	p=0.001

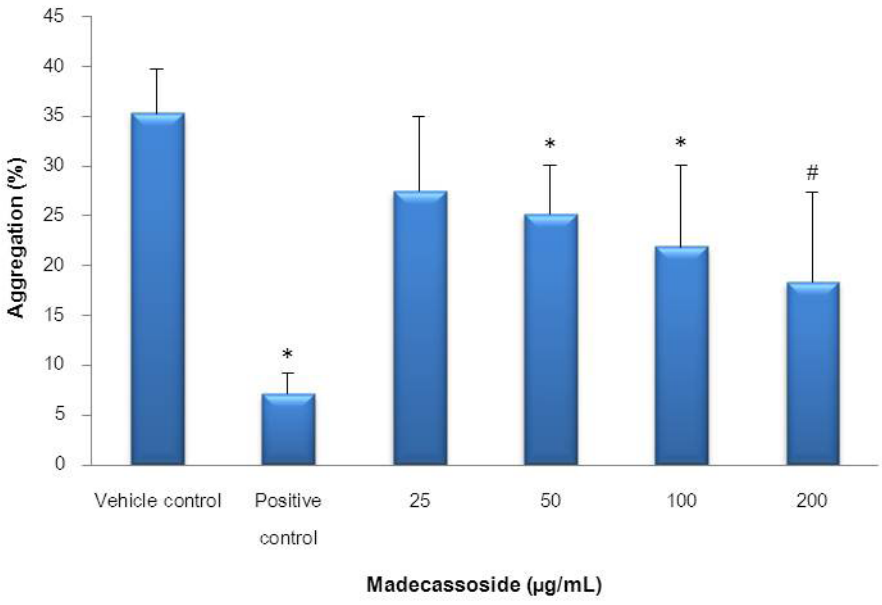

Figure 1 *Effects of madecassoside on platelet aggregation. Data are shown as median (min-max); n=10. Asterisks (*) denote value that were significantly different from the vehicle control (p<0.05) and (#) denote value that were significantly different from the vehicle control (p<0.001).*

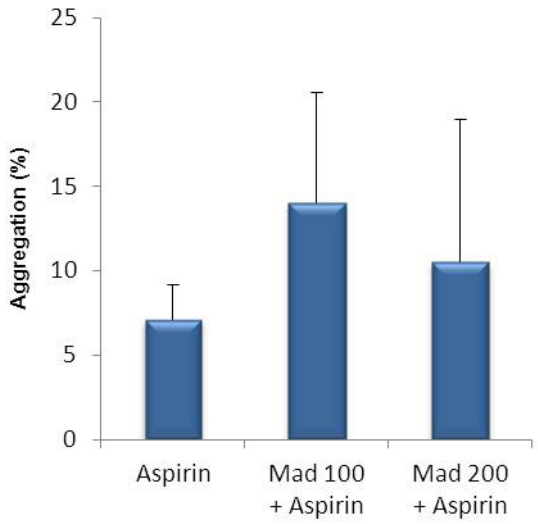

Figure 2 *The inhibitory effect of madecassoside (Mad) at concentration 100 and 200* μ*g/mL combined with half-dose of aspirin on platelet aggregation. Data are shown as median (min-max); n=10.*

วิจารณ์และสรุปผล

การทดสอบฤทธิ์ของสารมาดีคาสโซไซด์ต่อการเกาะติดของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วยเอดีพี พบว่าสารมาดีคาสโซไซด์ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 μg/mL ไม่สามารถยับยั้งการเกาะติดของเกล็ดเลือดได้ จากการศึกษาของ Hu H และคณะ[16] พบว่าสารไตรเทอร์พีนอยด์ที่สกัดจากพืชสามารถยับยั้งการเกาะติดของเกล็ดเลือดกับไฟบริโนเจนได้ โดยการเข้าจับกับ glycoprotein IIb/IIIa ทำให้เกล็ดเลือดไม่สามารถเกิดการเกาะติดได้ ผู้วิจัยคาดว่า สารมาดีคาสโซไซด์ที่นำมาทดสอบนี้ ไม่ได้ส่งผลต่อโมเลกุลที่เกล็ดเลือดใช้ในกระบวนการเกาะติดกับคอลลาเจน เช่น glycoprotein VI และ glycoprotein Ia/IIa นอกจากนี้อาจเป็นผลมาจากการใช้ collagen type I เคลือบไมโครเพลท เนื่องจากการศึกษาของ Jung และคณะ[17] พบว่าเกล็ดเลือดใช้ glycoprotein VI ในการจับกับ collagen type III ได้ดีกว่า collagen type I และ II เนื่องจาก collagen type III มีจำนวนของตำแหน่งจับจำเพาะ (binding site) ของ glycoprotein VI มากกว่า จึงทำให้เกิดการกระตุ้นและมีการเกาะติดของเกล็ดเลือดมากกว่าการใช้คอลลาเจนชนิดอื่นๆ

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดของสารมาดีคาสโซไซด์ที่สกัดจากใบบัวบก พบว่าสารมาดีคาสโซไซด์ที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 200 μg/mL สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วยเอดีพีได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ Ibrahim และคณะ[18] ศึกษาสารไตรเทอร์พีนอยด์ที่พบได้ในพืชหลายชนิด พบว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase ของเกล็ดเลือด ส่งผลให้สาร arachidonic acid ไม่ถูกเปลี่ยนเป็นสาร thromboxane A_2 เกล็ดเลือดจึงไม่เกิดการเกาะกลุ่มกัน และผลการทดสอบที่น่าสนใจคือ เมื่อผสมสารมาดีคาสโซไซด์ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 μg/mL กับแอสไพรินที่มีความเข้มข้นลดลงกึ่งหนึ่ง พบว่าสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้ใกล้เคียงกับการใช้แอสไพรินเพียงอย่างเดียว แอสไพรินเป็นยาในกลุ่ม platelet cyclooxygenase inhibitor มีฤทธิ์ต้านการทำงานของเกล็ดเลือดโดยยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase อย่างถาวร จากกระบวนการ acetylation ของ prostaglandin G/H synthase I ลดการสร้าง thromboxane A_2 ซึ่งเป็นสารกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด จะเห็นได้ว่ากระบวนการทำงานของสารไตรเทอร์พีนอยด์และแอสไพรินมีกลไกคล้ายคลึงกันคือออกฤทธิ์ต้านการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase ในเกล็ดเลือด ดังนั้นผู้วิจัยคาดว่าสารมาดีคาสโซไซด์ซึ่งเป็นสารในกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ที่นำมาใช้ในการทดสอบครั้งนี้ จะออกฤทธิ์ผ่านกลไกเดียวกันกับแอสไพรินและสารไตรเทอร์พีนอยด์ที่พบได้ในพืชหลายชนิด อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เช่น การศึกษาปริมาณของ thromboxane A_2 ที่เกิดขึ้น เพื่อยืนยันว่าสารมาดีคาสโซไซด์ออกฤทธิ์ต้านการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase ในเกล็ดเลือดได้จริง[19]

การศึกษาพิษของสารสกัดจากใบบัวบก โดยการให้ผงใบบัวบกที่ความเข้มข้น 20, 200, 600 และ 1,200 mg/kg/day แก่หนูทดลองทางปาก (gastric intubation) ติดต่อกันเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าสารสกัดจากใบบัวบกไม่ทำให้เกิดความผิดปกติทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่ออวัยวะภายในร่างกายของหนูทดลอง และไม่ส่งผลให้ค่าทางโลหิตวิทยาเปลี่ยนแปลง ยกเว้นในหนูเพศผู้ที่ได้รับผงใบบัวบกที่ความเข้มข้น 600 และ 1,200 mg/kg/day มีจำนวนของเม็ดเลือดขาวต่ำกว่ากลุ่มควบคุม

และพบว่าจำนวนของเม็ดเลือดขาวกลับมาเป็นปกติหลังหยุดให้ผงใบบัวบกแล้ว 2 สัปดาห์[20] ดังนั้นการรับประทานใบบัวบกอย่างต่อเนื่อง ถึงแม้จะไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่ควรคำนึงถึงปริมาณที่เหมาะสมและระยะเวลาที่ได้รับสารสกัดด้วย

International clinical guideline แนะนำให้ผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตันรับประทานแอสไพรินขนาดต่ำทุกวันเพียงวันละ 1 เม็ด[21] แต่จากการศึกษาของ Morten และคณะ[22] พบว่าแอสไพรินมีฤทธิ์ลดลงในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง เนื่องจากมีเกล็ดเลือดใหม่เกิดขึ้นได้ตลอดทั้งวัน และเกล็ดเลือดใหม่นี้ไม่ได้ถูกยับยั้งจากแอสไพริน จึงส่งผลให้ผู้ป่วยเกิดการอุดตันของลิ่มเลือดซ้ำในหลอดเลือดโดยเฉพาะผู้ป่วยที่ได้รับการใส่ขดลวดขยายหลอดเลือด (stent thrombosis) แม้ผู้ป่วยจะรับประทานแอสไพรินอยู่เป็นประจำ อีกทั้งการได้รับแอสไพรินติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน จะทำให้เกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ ดังนั้นการนำสารสกัดจากธรรมชาติเช่น มาดีคาสโซไซด์ มาใช้ร่วมกับยาแอสไพรินเพื่อต้านการทำงานของเกล็ดเลือดในผู้ป่วยโรคหัวใจและหลอดเลือดนั้น จะช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดก้อนลิ่มเลือดอุดตันซ้ำในหลอดเลือดได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์สำหรับตรวจวิเคราะห์ในครั้งนี้ และงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก งบประมาณรายได้ กองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2557

เอกสารอ้างอิง

1. Rodvien R, Mielke C. Role of platelets in hemostasis and thrombosis. West J Med. 1976; 125(3): 181-86.
2. Taher A, Otrock Z, Uthman I, Cappellini M. Thalassemia and hypercoagulability. Blood Rev. 2008; 22: 283–92.
3. Arteaga RB, Chirinos JA, Soriano AO, Jy W, Horstman L, Jimenez JJ, et al. Endothelial microparticles and platelet and leukocyte activation in patients with the metabolic syndrome. Am J Cardiol. 2006; 98(1): 70-4.
4. Heinmoller E, Weinel RJ, Heidtmann HH, Salge U, Seitz R, Schmitz I, *et al*. Studies on tumor-cell-induced platelet aggregation in human lung cancer cell lines. J Cancer Res Clin Oncol. 1996; 122(12): 735-44.
5. Carr M. Diabetes mellitus: A hypercoagulable state. J Diabetes Complications. 2001; 15: 44-54.
6. National Statistical Office. Population & Society [Internet]. 2012 [cited 2015 Jun 15]. Available from: http://service.nso.go.th/nso/web/statseries/statseries09.html
7. Smith JB, Willis AL. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. Nature 1971; 231: 235-7.
8. Savi P, Nurden P, Nurden AT, Levy-Toledano S, Herbert JM. Clopidogrel: a review of its mechanism of action. Platelets. 1998; 9: 251-5.
9. Marciniak SJ Jr, Mascelli M, Furman M, Michelson A, Jakubowski J, Jordan R, *et al*. An additional mechanism of action of abciximab: dispersal of newly formed platelet aggregates. Thromb Haemost. 200; 87: 1020-5.
10. Jorgensen PW, Calleja EL, Gasó PS, Matarranz M, Navarro RA, Sánchez JM. Antiaggregation and anticoagulation, relationship with upper gastrointestinal bleeding. Rev Esp Enferm Dig. 2011; 103(7): 360-5.
11. Prommarak P, Junta C, Chaichana C. Effect of *Morus alba*, *Centella asiatica* and *Coccinia grandis* leave extracts on platelet aggregation. School of Allied Health Sciences, University of Phayao. 2554.
12. Bian D, Liu M, Li Y, Xia Y, Gong Z, Dai Y. Madecassoside, a triterpenoid saponin isolated from *Centella asiatica* herbs, protects endothelial cells against oxidative stress. J Biochem Mol Toxicol. 2012; 26(10): 399-406.
13. Huang HC, Tsai WJ, Liaw CC, Wu SH, Wu YC, Kuo YH. Anti-platelet aggregation triterpene saponins from the galls of Sapindus mukorossi. Chem Pharm Bull. 2007; 55(9): 1412-5.

14. Eriksson AC, Whiss PA. Measurement of adhesion of human platelets in plasma to protein surfaces in microplates. J Pharmacol Toxicol Methods. 2005; 52(3): 356-65.
15. Moran N, Kiernan A, Dunne E, Edwards RJ, Shields DC, Kenny D. Monitoring modulators of platelet a ggregation in a microtiter plate assay. Anal Biochem. 2006; 357(1): 77-84.
16. Hu H, Straub A, Tian Z, Bassler N, Cheng J, Peter K. Celastrol, a triterpene extracted from *Tripterygium wilfordii* Hook F, inhibits platelet activation. J Cardiovasc Pharmacol. 2009; 54(3): 240-5.
17. Jung SM, Takemura Y, Imamura Y, Hayashi T, Adachi E, Moroi M. Collagen-type specificity of glycoprotein VI as a determinant of platelet adhesion. Platelets. 2008; 19(1): 32-42.
18. Ibrahim T Babalola, Francis O Shode. Ubiquitous Ursolic Acid: A Potential Pentacyclic Triterpene Natural Product. Int J of Phyto Pharm. 2013; 37(5): 462-77.
19. Raghavendra RH, Naidu KA, Spice active principles as the inhibitors of human platelet aggregation and thromboxane biosynthesis. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2009; 81(1): 73-8.
20. Chivapat S, Chavalittumrong P, Attawish A. Toxicity study of Centella asiatica (L) Urban. Journal of Thai Traditional and Alternative Medicine. 2004; 2: 3-17.
21. Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, Andreotti F, Arden C, Budaj A, *et al*. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. Eur Heart J. 2013; 34(38): 2949-3003.
22. Wurtz M, Hvas AM, Jensen LO, Kaltoft AK, Tilsted HH, Kristensen SD, *et al*. 24-hour antiplatelet effect of aspirin in patients with previous definite stent thrombosis. Int J Cardiol. 2014; 175(2): 274-9.