

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของสาร piperine ต่อการทำงานของหัวใจที่ถูก
ชักนำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด

โดย ดร. วชิราวดี มาลากุล

มิถุนายน 2556

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของสาร piperine ต่อการทำงานของหัวใจที่ถูก
ชักนำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด

ดร.วชิราวดี มาลากุล

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และ มหาวิทยาลัยนเรศวร

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5480010

ชื่อโครงการ : ผลของสาร piperine ต่อการทำงานของหัวใจที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: ดร. วชิราวดี มาลากุล มหาวิทยาลัยนเรศวร

อีเมล: wachirawadeem@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 15 มิถุนายน 2554 ถึง 14 มิถุนายน 2556

บทคัดย่อ:

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อศึกษาฤทธิ์ปกป้องหัวใจของสาร piperine ต่อหัวใจขาดเลือดของหนูขาว ซึ่งเป็นการศึกษาในหลอดทดลอง และกลไกการออกฤทธิ์ โดยหัวใจของหนูขาวจะถูกแยกออกจากกายและให้สารละลายใน Langendorff apparatus หัวใจจะถูกชักนำให้เกิดการขาดเลือดเป็นเวลา 25 นาที ตามด้วยการให้สารละลายเป็นเวลา 30 นาที สาร piperine หรือ vehicle (30% DMSO) ถูกปล่อยให้หัวใจ ก่อนเกิดการขาดเลือด 15 นาที และหลังจากการขาดเลือดตลอดการทดลอง ค่าแสดงของการทำงานของหัวใจห้องล่างซ้าย รวมถึง LV developed pressure (LVDP), the maximum rate of LV pressure rise (dP/dt_{max}) และ the maximum rate of LV pressure decline (dP/dt_{min}) จะถูกบันทึกอย่างต่อเนื่อง พื้นที่การตายของกล้ามเนื้อหัวใจถูกประเมินโดยวิธีtriphenyltetrazolium chloride staining และเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) และ creatine kinase (CK) จะถูกวิเคราะห์จากของเหลวจากหลอดเลือด coronary รวมทั้งฤทธิ์ของสารยับยั้งการสร้างสาร nitric oxide คือ N-omega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 1 ไมโครโมลาร์) และ สารยับยั้ง ATP-dependent potassium (K_{ATP}) channel คือ glibenclamide (1 ไมโครโมลาร์) ต่อ ฤทธิ์ปกป้องหัวใจของสาร piperine จะถูกวิเคราะห์ ในหัวใจหนูที่ได้รับ vehicle พบว่า ค่า LVDP, dP/dt_{max} and dP/dt_{min} เท่ากับ $47 \pm 5\%$, $43 \pm 4\%$, and $43 \pm 5\%$ ตามลำดับ ที่เวลาสิ้นสุดการให้สารละลาย เปรียบเทียบกับผลในช่วงเวลาก่อนชักนำให้เกิดการขาดเลือด การหลัง LDH และ CK เพิ่มขึ้น ในหัวใจหนูที่ได้รับ vehicle เปรียบเทียบกับผลในช่วงเวลาก่อนชักนำให้เกิดการขาดเลือด รวมทั้งการให้สาร piperine จะเพิ่มการทำงานของหัวใจห้องล่างซ้ายตลอดการให้สารละลาย และลดการหลัง LDH และ CK ฤทธิ์ปกป้องหัวใจของสาร piperine ส่วนหนึ่งถูกยับยั้งโดยสาร L-NAME หรือ glibenclamide จากผลการทดลอง สรุปได้ว่า สาร piperine ออกฤทธิ์ปกป้องความเสียหายของหัวใจจากการขาดเลือดในหนูขาว ฤทธิ์ปกป้องหัวใจของสาร piperine นั้น จะควบคุมผ่านการเปิดของ K_{ATP} channels และกระบวนการที่ขึ้นกับสาร NO

คำหลัก : piperine, ภาวะขาดเลือด, reperfusion, หัวใจ

Abstract

Project Code : MRG5480010

Project Title : Effects of piperine on myocardial ischemia-reperfusion injury.

Investigator : Dr. Wachirawadee Malakul; Naresuan University

E-mail Address : wachirawadeem@hotmail.com

Project Period : 15th June 2011 -14th June 2013

Abstract:

The objective of this study was to investigate the cardioprotective effects of piperine on ischemic reperfused rat heart *in vitro* and the underlying mechanisms. The isolated rat heart was perfused in a Langendorff apparatus. Hearts were subjected to global ischemia for 25 min followed by 30 min reperfusion. Piperine or vehicle (30% DMSO) were infused for 15 min before ischemia and during reperfusion. The parameters of left ventricular (LV) function include LV developed pressure (LVDP), the maximum rate of LV pressure rise (dP/dt_{max}) and the maximum rate of LV pressure decline (dP/dt_{min}) were continuously recorded. Myocardial infarct size was estimated by triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining and lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase (CK) was analyzed from coronary effluent. The effects of the nitric oxide synthesis inhibitor N-omega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 1 μ M) and the ATP-dependent potassium (K_{ATP}) channel blocker glibenclamide (1 μ M) on the cardioprotection of piperine were also measured. In vehicle-treated hearts, LVDP, dP/dt_{max} and dP/dt_{min} were $47 \pm 5\%$, $43 \pm 4\%$, and $43 \pm 5\%$, respectively, at the end of reperfusion compared to the preischemic level. LDH and CK release was elevated in vehicle-treated hearts compared to the preischemic level. In addition piperine treatment increased LV function upon reperfusion and decreased LDH and CK leakage. The cardioprotective effects of piperine were partially inhibited by L-NAME or glibenclamide. The results suggest that piperine has a protective effect against ischemia/reperfusion injury in rat heart. The cardioprotection of piperine is mediated by the opening of K_{ATP} channels and NO -dependent pathway.

Keywords : piperine, ischemia, reperfusion, heart

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
สารบัญ	3
สารบัญตาราง	4-6
สารบัญรูปภาพ	7-8
สรุปโครงการ (Executive Summary)	9-12
บทนำ	13
วัตถุประสงค์โครงการ	14
วิธีการทดลอง	15-17
ผลการทดลอง	18-48
วิจารณ์ผลการทดลอง	49-50
เอกสารอ้างอิง	51-53
ภาคผนวก	54-55

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของ สาร piperine ที่ความเข้มข้น 10^{-7} , 10^{-6} และ 10^{-5} M ต่อ left ventricular developed pressure ที่เวลาต่างๆ โดยแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของ pretreatment	19
2	ผลของ สาร piperine ที่ความเข้มข้น 10^{-7} , 10^{-6} และ 10^{-5} M ต่อ left ventricular end diastolic pressure ที่เวลาต่างๆ โดยแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของ pretreatment	21
3	ผลของ สาร piperine ที่ความเข้มข้น 10^{-7} , 10^{-6} และ 10^{-5} M ต่ออัตราการเต้นของหัวใจที่เวลาต่างๆ โดยแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของ pretreatment	23
4	ผล ของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ left ventricular developed pressure (LVDP ; % Control) ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที (Control) หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที (R-time)	26
5	แสดงผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ Left ventricular (LV) end diastolic pressure (LVEDP ; % Control) ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที (Control) หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที (R-time)	28
6	ผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ the maximum rate of left ventricular (LV) pressure rise (dP/dt_{max} ; % Control) ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที (Control) หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที (R-time)	30

ตารางที่		หน้า
7	ผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ the maximum rate of LV pressure decline (dp/dt_{min} ; % Control) ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที (Control) หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที (R-time)	32
8	ผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ อัตราการเต้นของหัวใจ (heart rate ; % Control) ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที (control) หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที (R-time)	34
9	ผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ perfusion pressure (% Control) ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที (Control) หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที (R-time)	36
10	ผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อระดับ LDH (unit/L) ใน perfusate fluid ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที (Control) หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที (R-time)	39
11	ผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อระดับ CK (unit/mL) ใน perfusate fluid ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที (Control) หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที (R-time)	41
12	ฤทธิ์ของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อการตายของกล้ามเนื้อหัวใจที่ถูกชักนำโดย I/R ซึ่งกล้ามเนื้อหัวใจจะถูกย้อมสีด้วย 1% โดยค่าแสดงในรูปบริเวณที่มีการตายของเซลล์ต่อพื้นที่ของชิ้นกล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างทั้งหมด เมื่อให้สารก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที	43

ตารางที่		หน้า
13	ผลของสาร vehicle, L-NAME หรือ Glibenclamide เมื่อให้ร่วมกับสาร piperine 10^{-6} M ต่อ Left ventricular developed pressure (% Control) เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที (Control) หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที (R-time)	45
14	ผลของสาร vehicle, L-NAME หรือ Glibenclamide เมื่อให้ร่วมกับสาร piperine 10^{-6} M ต่อ อัตราการเต้นของหัวใจ (% Control) โดยให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที (Control) หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที (R-time)	47

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ผลของ สาร piperine ที่ความเข้มข้น 10^{-7} , 10^{-6} และ 10^{-5} M ต่อ left ventricular developed pressure ที่เวลาต่างๆ โดยแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของ pretreatment	20
2	ผลของ สาร piperine ที่ความเข้มข้น 10^{-7} , 10^{-6} และ 10^{-5} M ต่อ left ventricular end diastolic pressure ที่เวลาต่างๆ โดยแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของ pretreatment	22
3	ผลของ สาร piperine ที่ความเข้มข้น 10^{-7} , 10^{-6} และ 10^{-5} M ต่ออัตราการเต้นของหัวใจที่เวลาต่างๆ โดยแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของ pretreatment	24
4	ผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ left ventricular developed pressure (LVDP; % Pretreatment) ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที (control) หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที (R-time)	27
5	ผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ left ventricular end diastolic pressure (LVEDP; % Pretreatment) ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที	29
6	ผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ the maximum rate of left ventricular (LV) pressure rise (dP/dt_{max} ; % Pretreatment) ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที	31
7	ผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ the maximum rate of LV pressure decline (dP/dt_{min} ; % Pretreatment) ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที	33
8	ผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ อัตราการเต้นของหัวใจ (heart rate; % Pretreatment) ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที	35

ภาพที่		หน้า
9	ผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ perfusion pressure ; (% Pretreatment) ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที	37
10	ผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อระดับ LDH (unit/L) ใน perfusate fluid ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที	40
11	ผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อระดับ CK (unit/mL) ใน perfusate fluid ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที	42
12	ผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อการตายของกล้ามเนื้อหัวใจที่ถูกชักนำโดย I/R	44
13	ผลของสาร vehicle, L-NAME หรือ Glibenclamide เมื่อให้ร่วมกับสาร piperine 10^{-6} M ต่อ Left ventricular developed pressure (% Pretreatment) เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที	46
14	ผลของสาร Vehicle, L-NAME หรือ Glibenclamide เมื่อให้ร่วมกับสาร piperine 10^{-6} M ต่อ อัตราการเต้นของหัวใจ (% Pretreatment) เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที	48

Executive summary

ในปัจจุบันสมุนไพรหลายชนิดถูกใช้เป็นทั้งยาและอาหาร เช่น พริกไทย และ ดีปลี เป็นสมุนไพรไทยที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในชีวิตประจำวันโดยใช้เป็นเครื่องเทศเพื่อปรุงรสอาหาร สารที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของพริกไทยและดีปลี คือ Piperine มีรายงานวิจัย พบว่าสาร piperine มีฤทธิ์ลดความดันเลือดในหนูขาวและขยายหลอดเลือดแดง aorta และ ยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือด coronary artery และยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งถ้า piperine มีศักยภาพในด้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ขยายหลอดเลือด อาจช่วยป้องกันกล้ามเนื้อหัวใจเสียหายหรือการตายที่เกิดขึ้นในช่วงที่หัวใจขาดเลือด ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาผลของ piperine ต่อการทำงานของหัวใจและการฟื้นฟูการทำงานของหัวใจหลังจากถูกชักนำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด แบบ *in vitro* และกลไกที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งการศึกษาผลของ piperine ต่อ CK และ LDH activity ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่บ่งชี้การถูกทำลายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจและ ศึกษาผลของ piperine ต่อการตายเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหลังจากถูกชักนำให้เกิดภาวะขาดเลือด

วัตถุประสงค์

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบ *In vitro* โดยศึกษาฤทธิ์ของสาร piperine ต่อ

1. การทำงานของหัวใจ ในหนูปกติ
2. การทำงานของหัวใจ และ coronary flow ในหัวใจที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะขาดเลือด
3. ปริมาณ LDH และ CK activity ใน perfusate fluid จากหัวใจที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะขาดเลือด
4. การตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหลังจากถูกชักนำให้เกิดภาวะขาดเลือด
5. กลไกการออกฤทธิ์ของ piperine ในการป้องกันการขาดเลือดของกล้ามเนื้อหัวใจ

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

หนูทดลอง จะถูกทำให้สลบลึก ก่อนผ่าตัดแยกหัวใจออกจากกายหนู แล้วนำมาแขวนใน Langendorff apparatus โดยให้มีการไหลผ่านของสารละลาย Krebs-Hensleit solution ที่ $\text{pH} = 7.4$, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นใส่ ballon เข้าในหัวใจห้องล่างซ้าย ซึ่ง ballon จะเชื่อมต่อกับ pressure transducer ที่ แปลผลผ่านทางโปรแกรม powerlab โดยจะวัดความสามารถในการหดตัวของหัวใจ (LDP, left ventricular developed pressure, + LV dP/dt; rate of pressure development), และความสามารถในการคลายตัวของหัวใจ (- LV dP/dt; rate of pressure decline, LVEDP; left ventricular diastolic pressure), อัตราการเต้นของหัวใจ และ coronary perfusion pressure

2. ฤทธิ์ต่อ อัตราการเต้นและการทำงานของหัวใจ

หลังจากที่แยกหัวใจหนูแขวนใน Langendorff apparatus แล้วเป็นเวลา 30 นาที สาร piperine ที่ความเข้มข้น 10^{-7} - 10^{-5} M (ละลายใน 30% DMSO) หรือ vehicle (30% DMSO) จะถูกใส่ในหัวใจโดย โดยให้ผ่านทาง syringe pump แล้วบันทึกผลการทำงานของหัวใจ ที่เวลา 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20 และ 30 นาที

3 ฤทธิ์ต่อการ coronary perfusion pressure อัตราการเต้นและการทำงานของหัวใจ หลังจากถูกชักนำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด ในการทดลองจะแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

- กลุ่มที่ชักนำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด (I/R) + ได้รับ vehicle (30% DMSO)
- กลุ่มที่ชักนำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด (I/R) + ได้รับสาร piperine 10^{-6} M
- กลุ่มควบคุม (sham) + ได้รับ vehicle (30% DMSO)
- กลุ่มควบคุม (sham) + ได้รับสาร piperine 10^{-6} M

สำหรับกลุ่ม I/R หลังจาก incubate หัวใจกับสารละลาย Krebs-Hensleit solution เป็นเวลา 30 นาทีแล้ว หัวใจจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือดแบบ global ischemia โดยการหยุดการให้สารละลาย เป็นเวลา 25 นาที ก่อน reperfusion โดยการปล่อยสารละลาย Krebs-Hensleit solution ให้กับหัวใจเป็นเวลา 30 นาที ขณะที่กลุ่ม sham จะให้ หัวใจเป็นเวลา 120 นาที นอกจากนี้ บางกลุ่มจะได้รับสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) โดยให้ผ่านทาง syringe pump ก่อน 15 นาทีและหลังชักนำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด เป็นเวลา 30 นาที ระหว่างนี้จะบันทึกผลการทำงานของหัวใจ และเก็บของเหลวที่หลังจากหัวใจที่ช่วงเวลาต่างๆ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ LDH และ CK เมื่อสิ้นสุดการทดลอง หัวใจจะถูกย้อมด้วย 1% triphenyltetrazolium chloride (TTC) เพื่อวิเคราะห์พื้นที่การตายของกล้ามเนื้อหัวใจ

3 กลไกการออกฤทธิ์ในการป้องกันการขาดเลือดของกล้ามเนื้อหัวใจ

เพื่อวิเคราะห์กลไกการออกฤทธิ์โดยการให้สาร N (G)-nitro-L- arginine methyl ester (L-NAME ; 10^{-6} M) ซึ่งเป็น Nitric oxide syntase inhibitor และ Glibenclamide (10^{-6} M) ซึ่งเป็น K_{ATP} channel blocker ร่วมกับการให้สาร piperine 10^{-6} M โดยให้ผ่านทาง syringe pump ก่อน 15 นาทีและหลังชักนำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด เป็นเวลา 30 นาที และบันทึกการทำงานของหัวใจ

ผลการทดลอง

1. ฤทธิ์ต่อ อัตราการเต้นและการทำงานของหัวใจ

สาร piperine ที่ความเข้มข้น 10^{-5} M มีผลลด left ventricular developed pressure ที่เวลาที่ 5, 10 และ 15 และ ลดอัตราการเต้นของหัวใจ ที่เวลาที่ 2, 5 และ 10 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่ม control ขณะที่ความเข้มข้น 10^{-6} และ 10^{-7} ไม่มีผลต่อการทำงานของหัวใจ

2. ฤทธิ์ต่อการทำงานของหัวใจ หลังจากถูกชักนำให้เกิดภาวะขาดเลือดในหนูกลุ่ม sham และกลุ่ม I/R พบว่า หลังจากชักนำให้เกิดภาวะขาดเลือด โดยการหยุดการให้สารละลายกับหัวใจในกลุ่ม I/R + vehicle เป็นเวลา 25 นาทีพบว่า ค่า LVDP, LV dP/dt_{max} และ LV dP/dt_{min} มีค่าลดลง และค่า LDH และ CK เพิ่มขึ้น แต่เมื่อให้สาร piperine 10^{-6} M พบว่า piperine สามารถเพิ่ม ค่า LVDP, LV dP/dt_{max} และ LV dP/dt_{min} และลดค่า LDH และ CK ตั้งแต่นาทีที่ 0 ถึง นาทีที่ 30 หลังการ reperfusion แต่ ไม่มีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจและ perfusion pressure และ LVEDP ตลอดการทดลอง เมื่อเทียบกับกลุ่ม I/R + vehicle ส่วนกลุ่ม Sham + piperine จะมีค่า LVDP, dP/dt_{max} , dP/dt_{min}, LVEDP และ HR ไม่แตกต่างจากกลุ่ม sham + vehicle

เมื่อย้อมหัวใจด้วย 1% triphenyltetrazolium chloride (TTC) เพื่อวิเคราะห์พื้นที่การตายของกล้ามเนื้อหัวใจ พบว่ากลุ่ม I/R + vehicle ไม่แตกต่างจาก I/R + piperine

3. กลไกการออกฤทธิ์ของ piperine ในการป้องกันการขาดเลือดของกล้ามเนื้อหัวใจ

การให้สาร Glibenclamide ซึ่งเป็น K_{ATP} channel blocker และ L-NAME ซึ่งเป็น NOS inhibitor สามารถลดผลการฟื้นฟูหัวใจของสาร piperine ได้ โดยลด LVDP ตั้งแต่นาทีที่ 0-30 หลังการ reperfusion อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับการได้รับ vehicle โดยไม่มีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจ

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาแบบ *in vitro* สรุปได้ว่า สาร piperine ออกฤทธิ์ฟื้นฟูการทำงานของหัวใจหลังจากเกิดภาวะขาดเลือด โดยส่วนหนึ่งออกฤทธิ์ผ่านทางการเปิดของ K_{ATP} channel และกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับ NO pathway

บทนำ

จากผลการรายงานของ The World Health Organization ในปี 2004, โรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (coronary artery disease) จัดว่าเป็นอันดับหนึ่งของโรคที่คร่าชีวิตมนุษย์ ทั่วโลก (1). โดยประชากรทั่วโลกที่เสียชีวิตด้วยโรคนี้ มีประมาณ 7.2 ล้านคน ในปี 2004 และอาจเพิ่มถึง 23.6 ล้านคน ในปี 2030 (2) ดังนั้นจากการคาดการณ์ของ The World Health Organization อัตราป่วยด้วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (coronary artery disease) จะมีอัตราเพิ่มขึ้นทุกปี

โรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (coronary artery disease) นั้น เกิดจากการตีบ และแข็งตัวของหลอดเลือดแดงที่ไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจ หรือที่เรียกว่าหลอดเลือดโคโรนารี (Coronary artery) ทำให้เลือดไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจลดลงหรือชะงักไป ทำให้กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด ส่งผลให้หัวใจขาดพลังงาน ATP และออกซิเจนและสารอาหาร รวมทั้งมีปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์มากเกินไป (Calcium overload) ทำให้เพิ่มปริมาณอนุมูลอิสระทำลายกล้ามเนื้อหัวใจ จนก่อให้เกิดการตายของกล้ามเนื้อหัวใจ (Myocardial infarction) และอาจเกิดภาวะหัวใจวายตามมา ผู้ป่วยบางรายจึงมีโอกาเสียชีวิตแบบเฉียบพลัน ขณะที่บางรายก็กลายเป็นโรคเรื้อรัง (3-6)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงให้ความสำคัญกับวิธีการที่จะช่วยลดหรือป้องกันการขาดเลือดของกล้ามเนื้อหัวใจ เพื่อป้องกันการตายของกล้ามเนื้อหัวใจ ที่อาจนำไปสู่ภาวะหัวใจวายได้ ในปัจจุบันสมุนไพรหลายชนิดถูกใช้เป็นทั้งยาและอาหาร เช่น พริกไทย และ ดีปลี เป็นสมุนไพรไทยที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในชีวิตประจำวันโดยใช้เป็นเครื่องเทศเพื่อปรุงรสอาหาร สารที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของพริกไทยและดีปลี คือ ไพเพอรีน (Piperine or (1-Piperoyl piperidine)) {1-[5-(1,3)-benzodioxol-5-yl]-1-oxo-2,4-pentadienyl}piperidine}) จากการศึกษาผลของ piperine พบว่า มีฤทธิ์ลดความดันเลือดในหนูขาวและขยายหลอดเลือดแดง aorta และ ยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือด coronary artery (7) และยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (8-9) จากงานวิจัยในสัตว์ทดลอง พบว่า สาร piperine จะเพิ่มปริมาณของ antioxidant enzyme และลดการเกิด lipid peroxidation ในหนูขาวที่มีโคเลสเตอรอลในเลือดสูง (8, 10) ภาวะเบาหวาน (11) และโรคมะเร็งปอด (12) ดังนั้นถ้า piperine มีศักยภาพในด้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ขยายหลอดเลือด อาจช่วยป้องกันกล้ามเนื้อหัวใจเสียหายหรือการตายที่เกิดขึ้นในช่วงที่หัวใจขาดเลือด อย่างไรก็ตาม ยังไม่เคยมีการศึกษาใดที่ศึกษาฤทธิ์การป้องกันภาวะหัวใจขาดเลือดของ piperine มาก่อน ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาแรกที่ศึกษาผลของ piperine ต่อการทำงานของหัวใจและการฟื้นฟูการทำงานของหัวใจหลังจากถูกชักนำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด แบบ *in vitro* และกลไกที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งการศึกษผลของ piperine ต่อ CK และ LDH activity ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่บ่งชี้การถูกทำลายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจและ ศึกษาผลของ piperine ต่อการตายเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหลังจากถูกชักนำให้เกิดภาวะขาดเลือด ซึ่งทั้งหมดนี้ถ้าเป็นไปตามสมมุติฐานที่ตั้งเอาไว้ ก็อาจจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดอัตราการป่วยและอัตราการตายจากโรคหัวใจขาดเลือด

วัตถุประสงค์

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบ *In vitro* โดยศึกษาฤทธิ์ของสาร piperine ต่อ

6. การทำงานของหัวใจ ในหนูปกติ
7. การทำงานของหัวใจ และ coronary flow ในหัวใจที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะขาดเลือด
8. ปริมาณ LDH และ CK activity ใน perfusate fluid จากหัวใจที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะขาดเลือด
9. การตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหลังจากถูกชักนำให้เกิดภาวะขาดเลือด
10. กลไกการออกฤทธิ์ของ piperine ในการป้องกันการขาดเลือดของกล้ามเนื้อหัวใจ

วิธีการทดลอง

1. สัตว์ทดลอง

หนูขาว เพศผู้สายพันธุ์ Wistar rats น้ำหนัก 180-200 กรัม จำนวน 120 ตัวจากสำนักสัตว์ทดลอง แห่งชาติศัลยา มหวิทยาลัยมหิดล นำมาเลี้ยงที่ห้องควบคุมแสง light-dark cycle เท่ากับ 12:12 ชั่วโมง ที่ อุณหภูมิ 24 ± 1 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมหัวใจ

หนูทดลอง จะถูกทำให้สลบลึกโดยการฉีด Nembutal 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม ทางหน้า ท้อง (intraperitoneal injection) ก่อนผ่าตัดแยกหัวใจออกจากกายหนู แล้วนำมาแขวนใน Langendorff apparatus โดยให้มีการไหลผ่านของสารละลาย Krebs-Hensleit solution ที่ pH = 7.4, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นใส่ ballon เข้าในหัวใจห้องล่างซ้าย ซึ่ง ballon จะเชื่อมต่อกับ pressure transducer ที่ แปลผลผ่านทางโปรแกรม powerlab โดยจะวัดความสามารถในการหดตัวของหัวใจ (LDP, left ventricular developed pressure, + LV dP/dt; rate of pressure development), และความสามารถในการคลายตัวของหัวใจ (- LV dP/dt; rate of pressure decline, LVEDP; left ventricular diastolic pressure), อัตราการเต้นของหัวใจ และ coronary perfusion pressure

3. ฤทธิ์ต่อ อัตราการเต้นและการทำงานของหัวใจ

หลังจากที่แยกหัวใจหนูแขวนใน Langendorff apparatus แล้วเป็นเวลา 30 นาที สาร piperine ที่ ความเข้มข้น 10^{-7} - 10^{-5} M (ละลายใน 30% DMSO) หรือ vehicle (30% DMSO) จะถูกใส่ในหัวใจโดย โดยให้ ผ่านทาง syringe pump แล้วบันทึกค่าความสามารถในการหดตัวของหัวใจ (LDP, left ventricular developed pressure, + LV dP/dt; rate of pressure development), และความสามารถในการคลายตัวของหัวใจ (- LV dP/dt; rate of pressure decline, LVEDP; left ventricular diastolic pressure) และ อัตราการเต้นของหัวใจ ที่เวลา 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20 และ 30 นาที

4. ฤทธิ์ต่อการ coronary perfusion pressure อัตราการเต้นและการทำงานของหัวใจ หลังจากถูกชัก นำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด ในการทดลองจะแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

- กลุ่มที่ชักนำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด (I/R) + ได้รับ vehicle (30% DMSO)
- กลุ่มที่ชักนำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด (I/R) + ได้รับสาร piperine 10^{-6} M
- กลุ่มควบคุม (sham) + ได้รับ vehicle (30% DMSO)
- กลุ่มควบคุม (sham) + ได้รับสาร piperine 10^{-6} M

สำหรับกลุ่ม I/R หลังจาก incubate หัวใจกับสารละลาย Krebs-Hensleit solution ที่ pH = 7.4, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีแล้ว หัวใจจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือดแบบ global ischemia โดยการหยุดการให้สารละลาย เป็นเวลา 25 นาที ก่อน reperfusion โดยการปล่อยสารละลาย Krebs-Hensleit solution ที่ pH = 7.4, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้กับหัวใจเป็นเวลา 30 นาที ขณะที่กลุ่ม sham จะให้สารละลาย Krebs-Hensleit solution ที่ pH = 7.4, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้กับหัวใจเป็นเวลา 120 นาที นอกจากนี้ บางกลุ่มจะได้รับ สาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) โดยให้ผ่านทาง syringe pump ก่อน 15 นาทีและหลังชักนำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด เป็นเวลา 30 นาที ระหว่างนี้จะบันทึกค่า บันทึกค่าความสามารถในการหดตัวของหัวใจ (LVDP, left ventricular developed pressure) และ the maximum rate of left ventricular (LV) pressure rise (dP/dt_{max}) และ ความสามารถในการคลายตัวของหัวใจ (the maximum rate of LV pressure decline (dP/dt_{min})) และ coronary blood flow โดยประเมินจาก perfusion pressure

5. ฤทธิ์ต่อ creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) activity

เพื่อประเมินการถูกทำลายของกล้ามเนื้อหัวใจ Perfusate solution จากหัวใจในข้อ 4. จะถูกเก็บใส่ eppendorff ที่ช่วงเวลาก่อนชักนำให้เกิดการขาดเลือดที่เวลาที่ 0 และ 15 นาที และหลังการชักนำให้เกิดการขาดเลือดที่เวลาที่ 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20 และ 30 นาที เพื่อนำมาวิเคราะห์หา CK and LDH ที่หลั่งออกมาจากหัวใจ โดย Creatine kinase enzymatic kit (Bioo Scientific, USA) และ LDH assay kit (Cayman, USA)

6. ฤทธิ์ต่อการตายของกล้ามเนื้อ

หลังจากสิ้นสุดการทดลอง หัวใจจะถูกแยกจาก Langendorff apparatus และนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ก่อนตัดเป็นชิ้นตามขวางหนา หนา 2-3 มม. และนำไป incubate ร่วมกับ 1% triphenyltetrazolium chloride (TTC) เป็นเวลา 30 นาที บริเวณของเซลล์ที่ปกติจะปรากฏสีแดง แต่บริเวณที่มีการตายของเซลล์จะไม่ติดสี หรือมีสีเหลือง ซึ่งบริเวณที่มีการตายของเซลล์จะถูกวัดโดย macroscopic method โดยแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของบริเวณที่มีการตายของเซลล์ต่อพื้นที่ของกล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างทั้งหมด

7. กลไกการออกฤทธิ์ในการป้องกันการขาดเลือดของกล้ามเนื้อหัวใจ

เพื่อวิเคราะห์กลไกการออกฤทธิ์โดยการให้สาร N (G)-nitro-L- arginine methyl ester (L-NAME ; 10^{-6} M) ซึ่งเป็น Nitric oxide syntase inhibitor และ Glibenclamide (10^{-6} M) ซึ่งเป็น K_{ATP} channel blocker ร่วมกับการให้สาร piperine 10^{-6} M โดยให้ผ่านทาง syringe pump ก่อน 15 นาทีและหลังชักนำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด เป็นเวลา 30 นาที และบันทึกค่า LVDP และอัตราการเต้นของหัวใจ

8. วิเคราะห์ข้อมูล

จากผลการทดลองนี้ ข้อมูลที่ได้จะอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ one way analysis of variance (ANOVA) และวัดค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้ Duncann test ทดสอบค่าความแตกต่างทางสถิติและค่าระดับความเชื่อมั่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$

ผลการทดลอง

1.ฤทธิ์ต่ออัตราการเต้นและการทำงานของหัวใจ

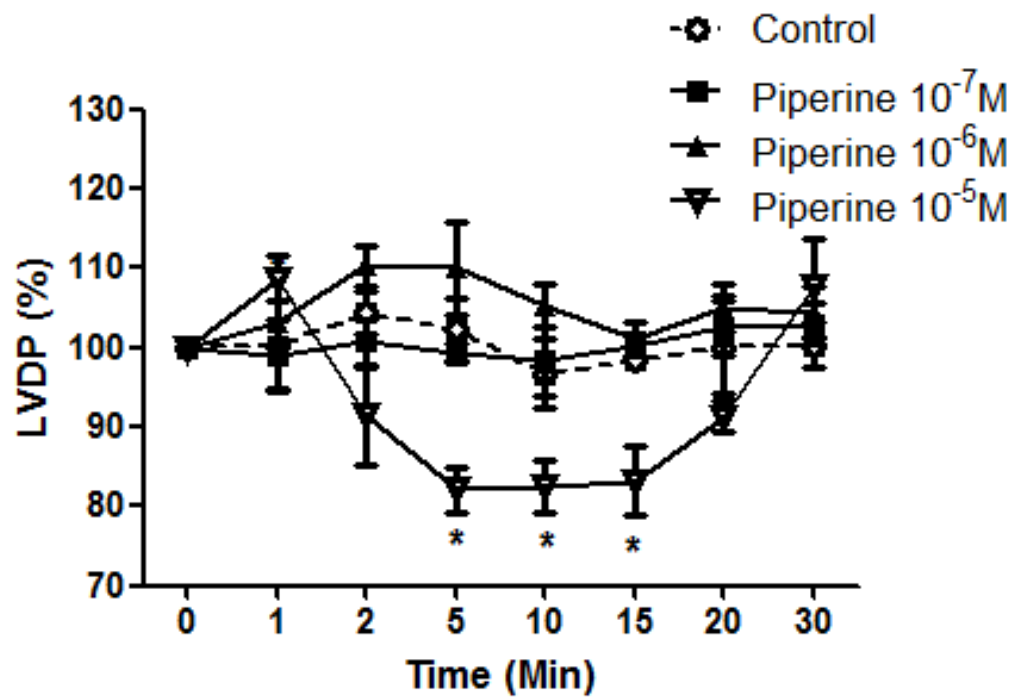
พบว่า สาร piperine ที่ความเข้มข้น 10^{-7} M และ 10^{-6} M ไม่มีผลต่อ left ventricular developed pressure และอัตราการเต้นของหัวใจเมื่อเทียบกับกลุ่ม control (30% DMSO) ขณะที่ สาร piperine ที่ความเข้มข้น 10^{-5} M มีผลลด left ventricular developed pressure ที่เวลาที่ 5, 10 และ 15 และลดอัตราการเต้นของหัวใจ ที่เวลาที่ 2, 5 และ 10 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่ม control (ภาพที่ 1 และ 3, ตารางที่ 1 และ 3)

สาร piperine ที่ความเข้มข้น 10^{-7} , 10^{-6} และ 10^{-5} M ไม่มีผลต่อ left ventricular end diastolic pressure ที่เวลาต่างๆ (ภาพที่ 2 และตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 แสดงผลของ สาร piperine ที่ความเข้มข้น 10^{-7} , 10^{-6} และ 10^{-5} M ต่อ left ventricular developed pressure ที่เวลาต่างๆ โดยแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของ pretreatment

เวลา	Left ventricular developed pressure (% Pretreatment)			
	Control (30%DMSO)	Piperine 10^{-7} M	Piperine 10^{-6} M	Piperine 10^{-5} M
0 (%Pretreatment)	100	100	100	100
1	100 ± 6	99 ± 5	103 ± 1	108 ± 3
2	104 ± 3	101 ± 3	110 ± 3	91 ± 6
5	102 ± 4	99 ± 1	110 ± 6	82 ± 3*
10	97 ± 4	98 ± 4	105 ± 3	83 ± 3*
15	98 ± 1	100 ± 1	101 ± 2	83 ± 3*
20	100 ± 6	102 ± 4	105 ± 3	91 ± 2
30	100 ± 3	103 ± 3	104 ± 3	108 ± 6

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; *P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม control ที่ช่วงเวลาเดียวกัน

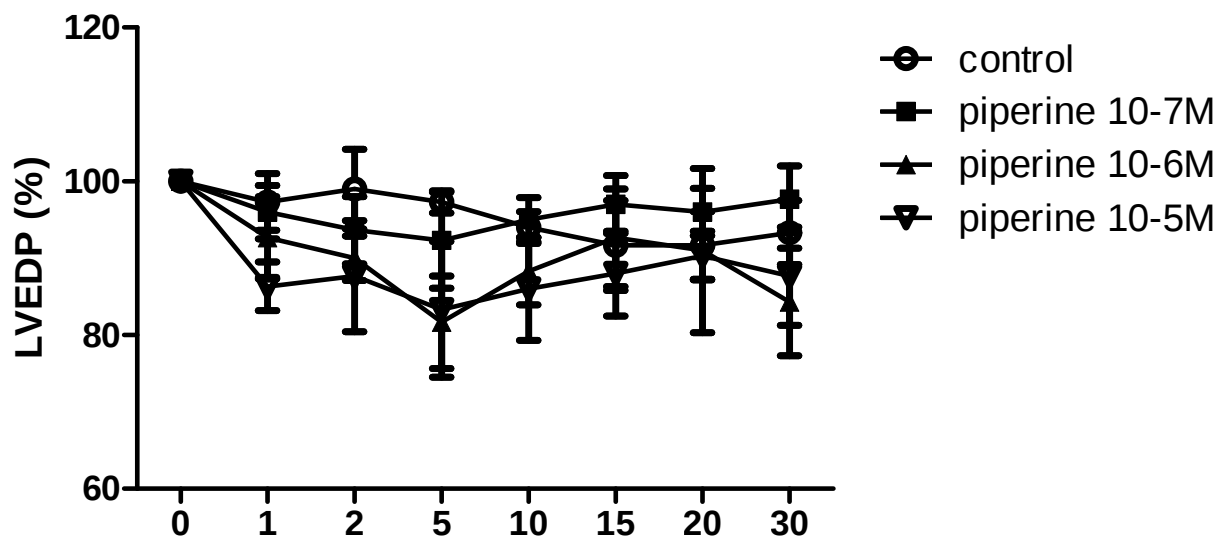


ภาพที่ 1 แสดงผลของ สาร piperine ที่ความเข้มข้น 10⁻⁷ , 10⁻⁶ และ 10⁻⁵ M ต่อ left ventricular developed pressure ที่เวลาต่างๆ โดยแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของ pretreatment; *P<0.05 เมื่อเทียบกับ กลุ่ม control ที่ช่วงเวลาเดียวกัน

ตารางที่ 2 แสดงผลของ สาร piperine ที่ความเข้มข้น 10^{-7} , 10^{-6} และ 10^{-5} M ต่อ left ventricular end diastolic pressure ที่เวลาต่างๆ โดยแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของ pretreatment

เวลา	Left ventricular end diastolic pressure (% Pretreatment)			
	Control (30%DMSO)	Piperine 10^{-7} M	Piperine 10^{-6} M	Piperine 10^{-5} M
0 (%Pretreatment)	100	100	100	100
1	97 ± 4	96 ± 3	93 ± 5	86 ± 3
2	99 ± 5	94 ± 4	90 ± 2	88 ± 7
5	97 ± 2	92 ± 6	82 ± 6	83 ± 9
10	94 ± 2	95 ± 3	88 ± 4	86 ± 7
15	92 ± 6	97 ± 4	93 ± 6	88 ± 6
20	92 ± 4	96 ± 3	91 ± 11	90 ± 3
30	93 ± 4	98 ± 4	84 ± 7	88 ± 6

ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ; ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

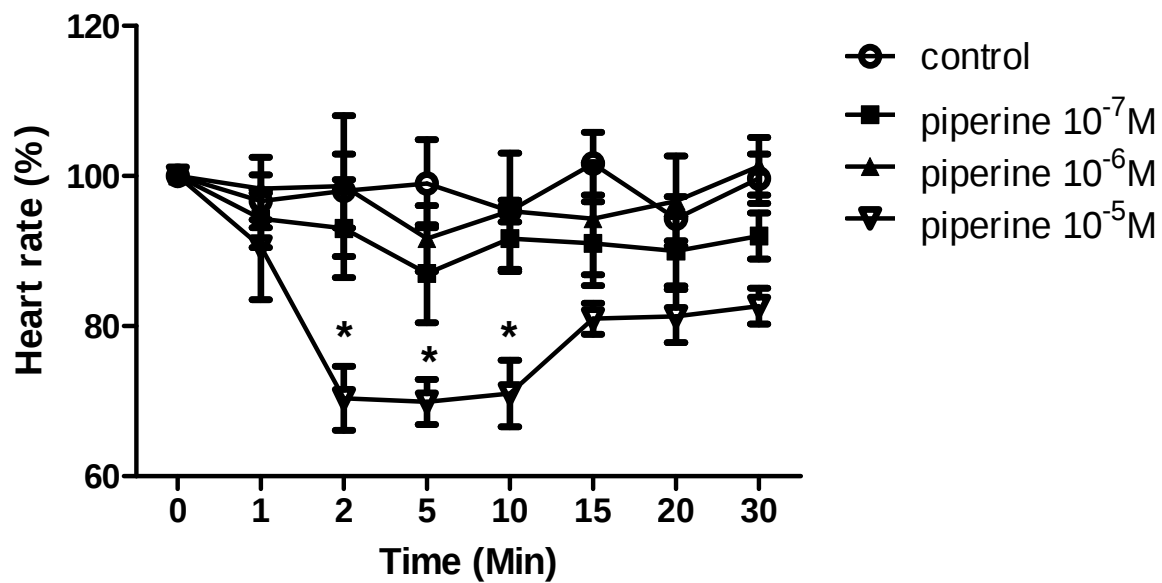


ภาพที่ 2 แสดงผลของ สาร piperine ที่ความเข้มข้น 10^{-7} , 10^{-6} และ 10^{-5} M ต่อ left ventricular end diastolic pressure ที่เวลาต่างๆ โดยแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของ pretreatment

ตารางที่ 3 แสดงผลของ สาร piperine ที่ความเข้มข้น 10^{-7} , 10^{-6} และ 10^{-5} M ต่ออัตราการเต้นของหัวใจที่เวลาต่างๆ โดยแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของ pretreatment

เวลา	อัตราการเต้นของหัวใจ (% Pretreatment)			
	Control (30%DMSO)	Piperine 10^{-7} M	Piperine 10^{-6} M	Piperine 10^{-5} M
0 (%Pretreatment)	100	100	100	100
1	97 ± 4	94 ± 4	98 ± 4	91 ± 7
2	98 ± 5	93 ± 7	99 ± 10	70 ± 4*
5	99 ± 6	87 ± 7	91 ± 4	69 ± 3*
10	95 ± 2	92 ± 4	95 ± 8	71 ± 4*
15	102 ± 4	91 ± 6	94 ± 7	81 ± 2
20	94 ± 3	90 ± 5	97 ± 6	81 ± 4
30	100 ± 3	92 ± 3	101 ± 4	83 ± 2

*P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม control ที่ช่วงเวลาเดียวกัน; ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน;



ภาพที่ 3 แสดงผลของ สาร piperine ที่ความเข้มข้น 10^{-7} , 10^{-6} และ 10^{-5} M ต่ออัตราการเต้นของหัวใจที่เวลาต่างๆ โดยแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของ pretreatment (n=5); *P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม control ที่ช่วงเวลาเดียวกัน

2.ฤทธิ์ต่อการทำงานของหัวใจ หลังจากถูกชักนำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือดในหนูกลุ่ม sham และกลุ่ม I/R

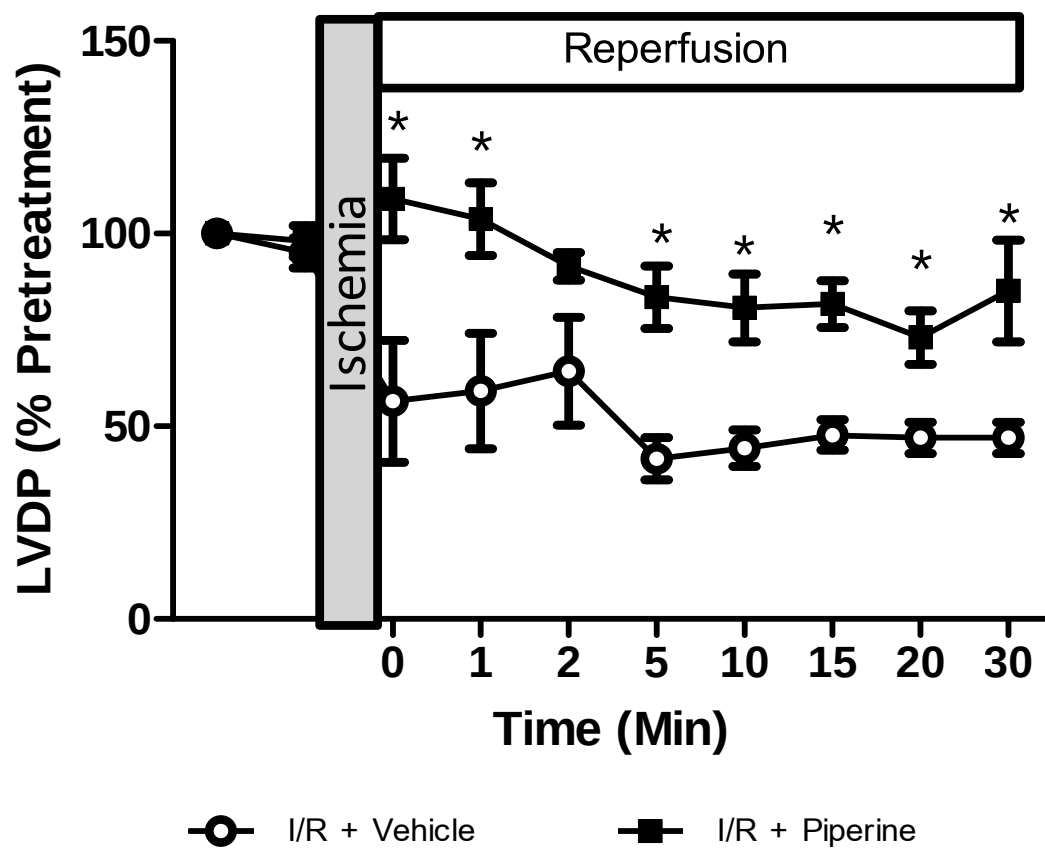
พบว่า หลังจากชักนำให้เกิดภาวะขาดเลือด โดยการหยุดการให้สารละลายกับหัวใจในกลุ่ม I/R เป็นเวลา 25 นาทีพบว่า ค่า left ventricular developed pressure (LVDP), the maximum rate of left ventricular (LV) pressure rise (dP/dt_{max}) และ the maximum rate of LV pressure decline (dP/dt_{min}) มีค่าลดลง แต่เมื่อให้สาร piperine 10^{-6} M ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที และ หลังเกิด ischemia เป็นเวลา 30 นาที พบว่า piperine สามารถเพิ่ม left ventricular developed pressure (LVDP), the maximum rate of left ventricular (LV) pressure rise (dP/dt_{max}) และ the maximum rate of LV pressure decline (dP/dt_{min}) ตั้งแต่นาทีที่ 0 ถึง นาทีที่ 30 ขณะที่สาร piperine ไม่มีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจและ perfusion pressure และ LVEDP ตลอดการทดลอง เมื่อเทียบกับกลุ่ม I/R ที่ได้รับ vehicle (ตารางที่ 4-9 และภาพที่ 4-9)

ส่วนกลุ่ม Sham + piperine จะมีค่า LVDP, dP/dt_{max} , dP/dt_{min} , LVEDP และ HR ไม่แตกต่างจากกลุ่ม sham + vehicle

ตารางที่ 4 แสดงผล ของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ left ventricular developed pressure (LVDP) ของกลุ่ม I/R หรือ sham เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที (control) หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที (R-time)

เวลา	LVDP (% Control)	
	I/R + Vehicle	I/R + Piperine
Control	100	100
R-0	57 ± 16	$109 \pm 10^*$
R-1	59 ± 15	$104 \pm 9^*$
R-2	64 ± 14	92 ± 3
R-5	42 ± 5	$84 \pm 8^*$
R-10	44 ± 5	$81 \pm 8^*$
R-15	48 ± 4	$82 \pm 6^*$
R-20	47 ± 4	$73 \pm 7^*$
R-30	47 ± 5	$85 \pm 13^*$

หมายเหตุ R = reperfusion ; $*P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม I/R + Vehicle ที่ช่วงเวลาเดียวกัน; ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน;

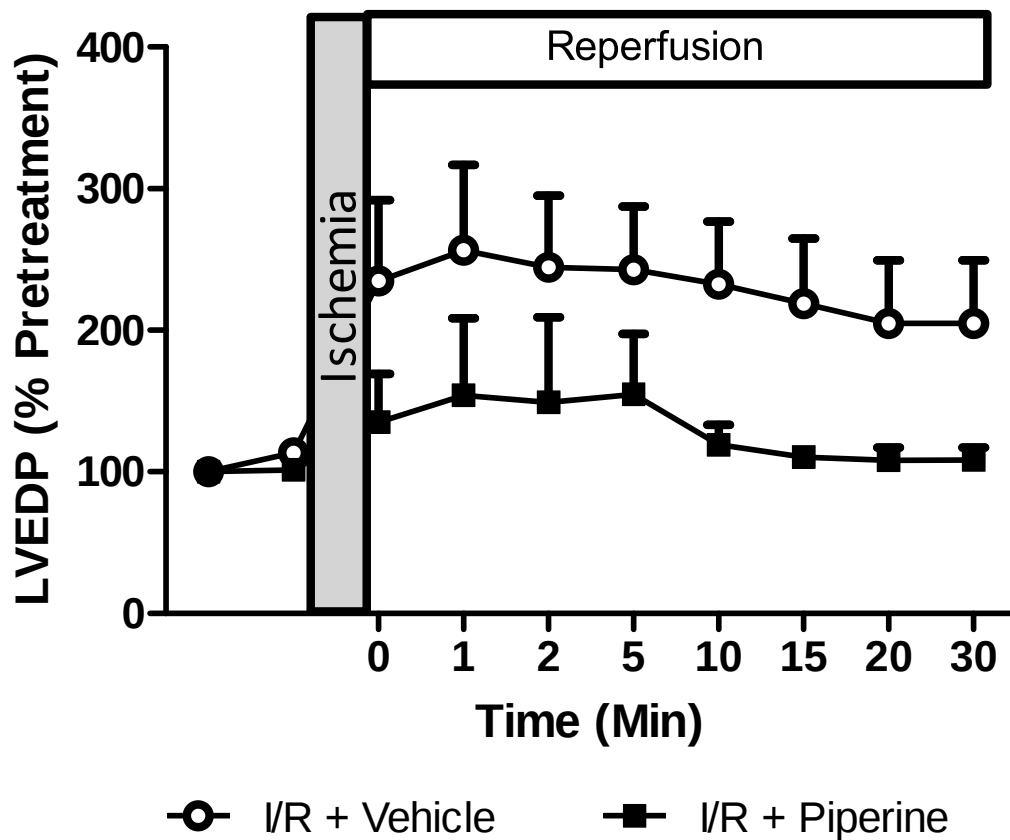


ภาพที่ 4 แสดงผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ left ventricular developed pressure (LVDP) ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที (control) หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที (R-time); * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม I/R + Vehicle ที่ช่วงเวลาเดียวกัน

ตารางที่ 5 แสดงผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ Left ventricular (LV) end diastolic pressure (LVEDP) ของกลุ่ม I/R หรือ sham เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที (control) หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที (R-time)

เวลา	LVEDP (% Control)	
	I/R + Vehicle	I/R + Piperine
Control	100	100
R-0	235 ± 57	135 ± 34
R-1	257 ± 60	154 ± 54
R-2	245 ± 50	149 ± 60
R-5	243 ± 45	155 ± 43
R-10	233 ± 44	119 ± 14
R-15	219 ± 46	110 ± 7
R-20	205 ± 45	108 ± 9
R-30	205 ± 46	109 ± 9

หมายเหตุ R = reperfusion ; ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ; ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

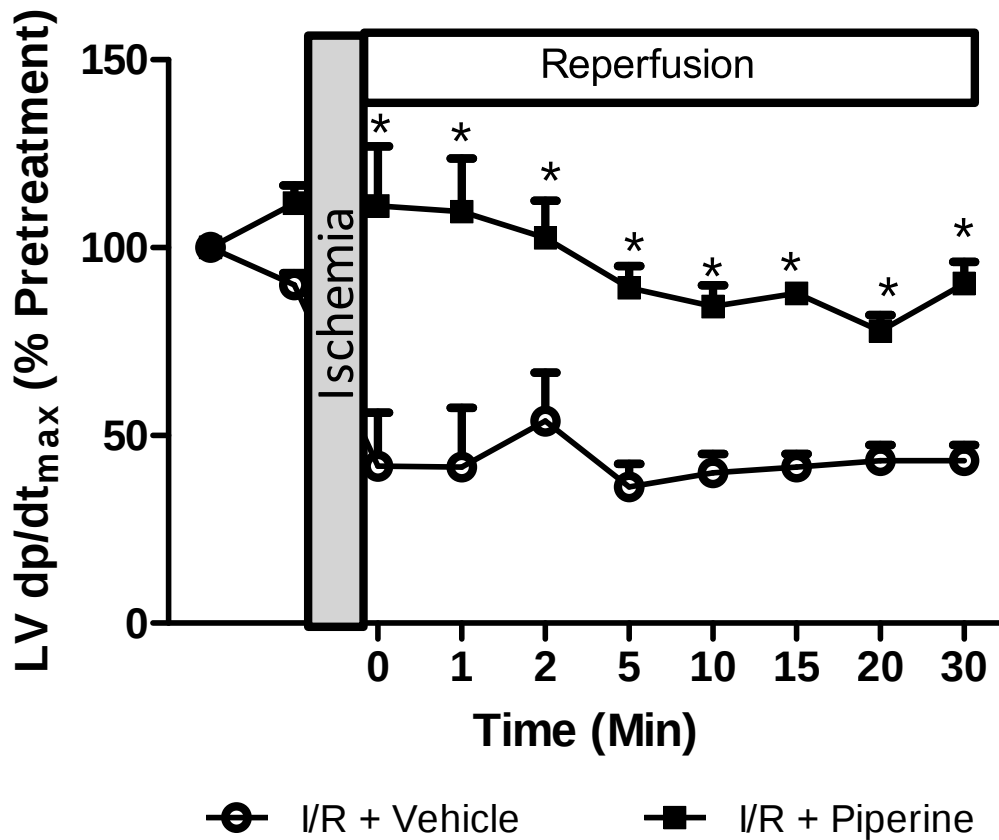


ภาพที่ 5 แสดงผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ left ventricular end diastolic pressure (LVEDP) ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที

ตารางที่ 6 แสดงผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ the maximum rate of left ventricular (LV) pressure rise ($dP/dt_{\max}$) ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที (control) หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที (R-time)

เวลา	LV $dP/dt_{\max}$ (% Control)	
	I/R + Vehicle	I/R + Piperine
Control	100	100
R-0	42 ± 14	$111 \pm 16^*$
R-1	42 ± 16	$110 \pm 14^*$
R-2	54 ± 13	$103 \pm 10^*$
R-5	36 ± 6	$89 \pm 6^*$
R-10	40 ± 5	$84 \pm 6^*$
R-15	42 ± 3	$88 \pm 1^*$
R-20	43 ± 4	$78 \pm 4^*$
R-30	43 ± 4	$90 \pm 6^*$

หมายเหตุ R = reperfusion ; $*P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม I/R + Vehicle ที่ช่วงเวลาเดียวกัน; ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

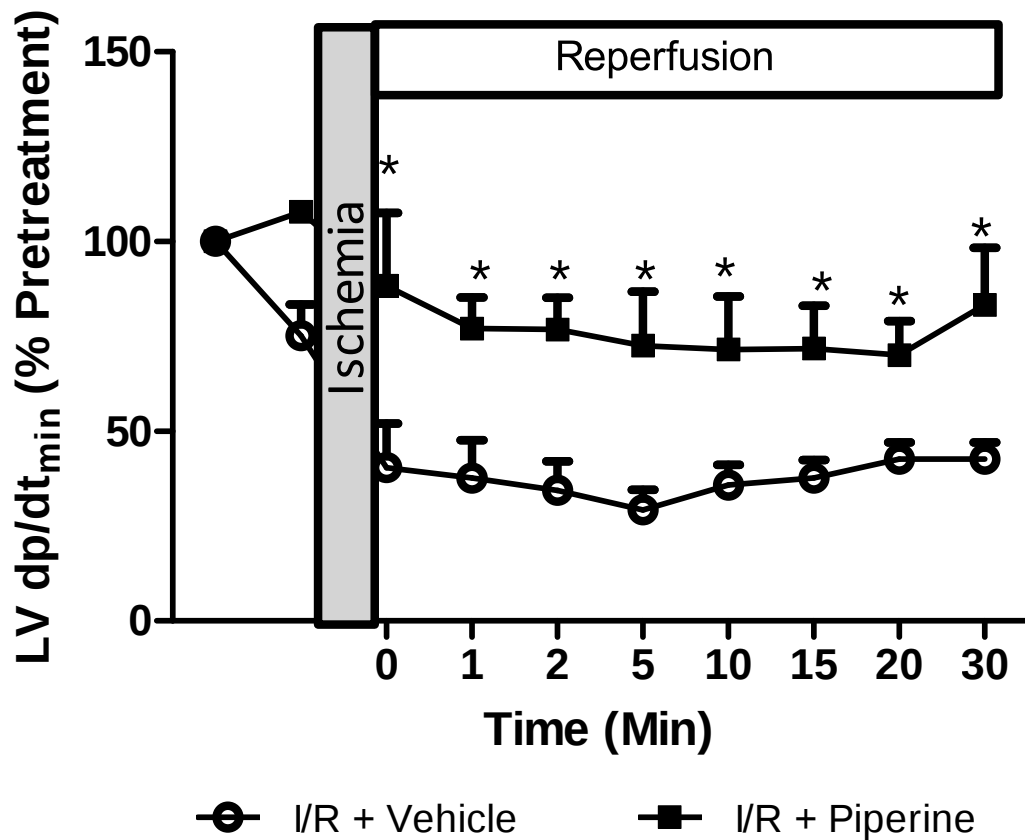


ภาพที่ 6 แสดงผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ the maximum rate of left ventricular (LV) pressure rise (dp/dt_{max}) ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที; *P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม I/R + Vehicle ที่ช่วงเวลาเดียวกัน

ตารางที่ 7 แสดงผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ the maximum rate of LV pressure decline (dP/dt_{min}) ของกลุ่ม I/R หรือ sham เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที (control) หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที (R-time)

เวลา	LV dP/dt_{min} (% Control)	
	I/R + Vehicle	I/R + Piperine
Control	100	100
R-0	40 ± 14	$88 \pm 16^*$
R-1	38 ± 16	$77 \pm 14^*$
R-2	34 ± 13	$77 \pm 10^*$
R-5	29 ± 6	$73 \pm 6^*$
R-10	36 ± 5	$72 \pm 6^*$
R-15	38 ± 3	$72 \pm 1^*$
R-20	43 ± 4	$70 \pm 4^*$
R-30	43 ± 5	$83 \pm 6^*$

หมายเหตุ R = reperfusion ; $*P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม I/R + Vehicle ที่ช่วงเวลาเดียวกัน; ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน;

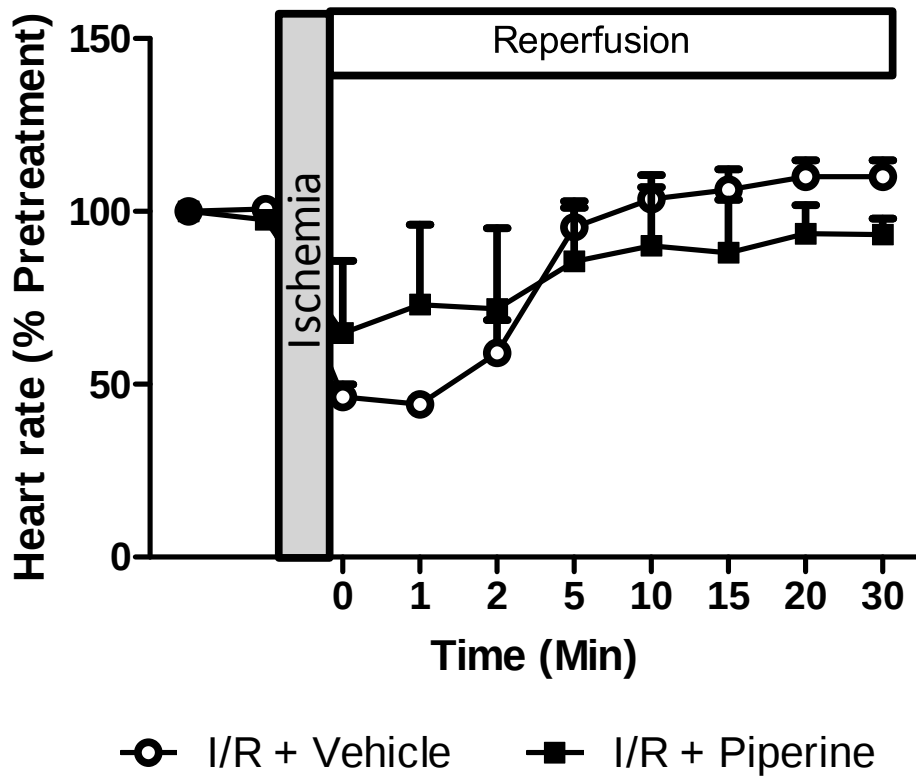


ภาพที่ 7 แสดงผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ the maximum rate of LV pressure decline (dP/dt_{min})ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที ; *P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม I/R + Vehicle ที่ช่วงเวลาเดียวกัน

ตารางที่ 8 แสดงผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ อัตราการเต้นของหัวใจ (heart rate) ของกลุ่ม I/R หรือ sham เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที (control) หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที (R-time)

เวลา	อัตราการเต้นของหัวใจ (% Control)	
	I/R + Vehicle	I/R + Piperine
Control	100	100
R-0	46 ± 4	65 ± 20
R-1	44 ± 1	73 ± 23
R-2	59 ± 10	72 ± 23
R-5	95 ± 7	86 ± 16
R-10	104 ± 7	90 ± 17
R-15	106 ± 6	88 ± 15
R-20	110 ± 5	94 ± 8
R-30	110 ± 7	93 ± 5

หมายเหตุ R = reperfusion ; ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ; ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน;

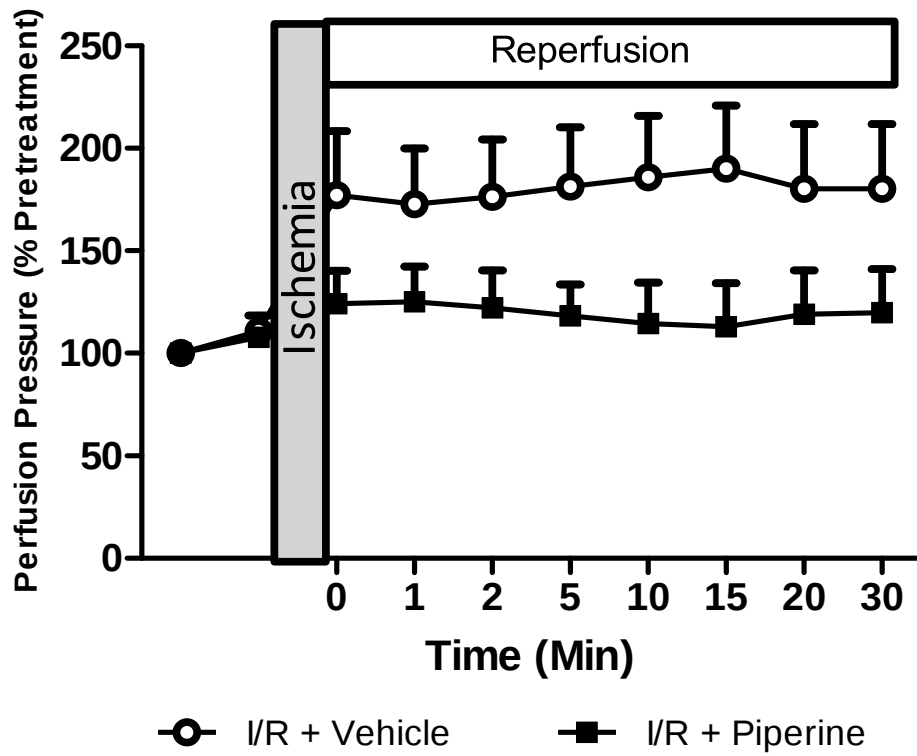


ภาพที่ 8 แสดงผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ อัตราการเต้นของหัวใจ (heart rate) ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที

ตารางที่ 9 แสดงผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ perfusion pressure ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที (control) หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที (R-time)

เวลา	Perfusion pressure (mmHg)	
	I/R + Vehicle	I/R + Piperine
Control	100	100
R-0	177 ± 31	124 ± 16
R-1	173 ± 27	125 ± 17
R-2	176 ± 28	122 ± 18
R-5	181 ± 29	118 ± 15
R-10	186 ± 30	115 ± 20
R-15	190 ± 31	113 ± 21
R-20	180 ± 32	119 ± 22
R-30	180 ± 32	120 ± 21

หมายเหตุ R = reperfusion ; ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ; ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน;



ภาพที่ 9 แสดงผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ perfusion pressure ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที

3.ฤทธิ์ต่อ LDH activity

การวัดปริมาณ LDH จะเป็นตัวบ่งชี้ถึงภาวะ myocardial injury จากการศึกษพบว่าหลังจากชักนำให้เกิดภาวะ global ischemia ระดับ LDH ใน perfusate fluid ของกลุ่ม I/R + vehicle จะเพิ่มขึ้น 99.9 ± 9.4 units/L ขณะที่ระดับ LDH ใน perfusate fluid ของกลุ่ม I/R + piperine 47.5 ± 3 units/L และหลังจากที่ reperfusion พบว่า ระดับ LDH ใน perfusate fluid จะลดลง โดยที่นาทีที่ 30 หลัง reperfusion ระดับ LDH ใน perfusate fluid ของกลุ่ม I/R + vehicle และ กลุ่ม I/R + piperine จะลดลง 19.4 ± 2 และ 7.7 ± 1 units/L ตามลำดับ (ตารางที่ 10 และ ภาพที่ 10)

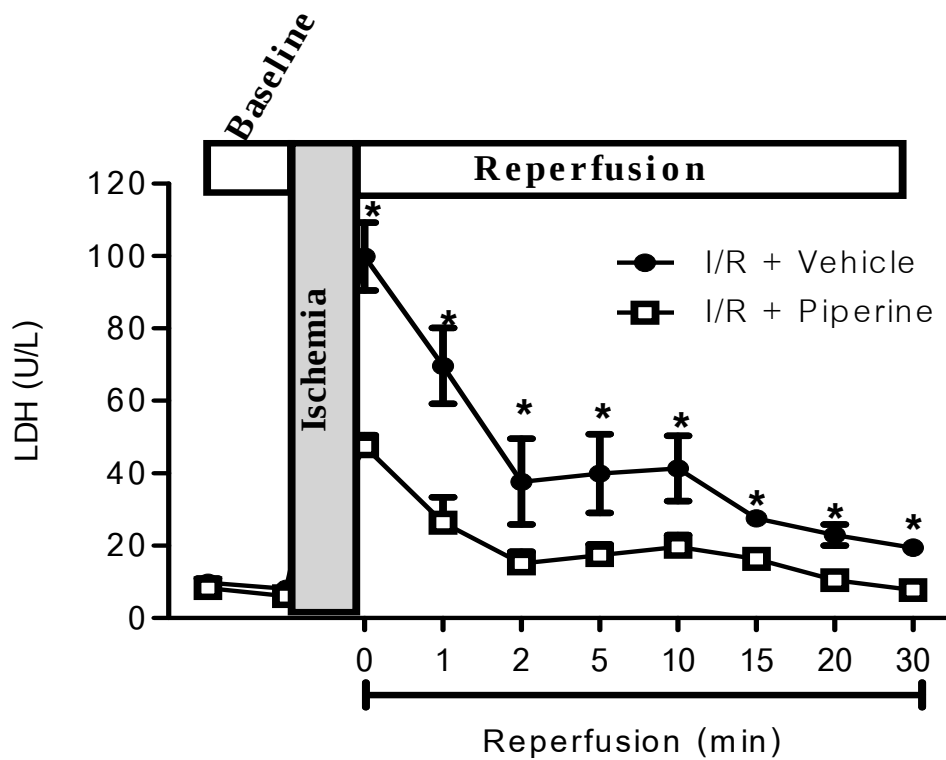
4.ฤทธิ์ต่อ CK activity

การวัดปริมาณ CK จะเป็นอีกหนึ่งตัวบ่งชี้ถึงภาวะ myocardial injury จากการศึกษพบว่าหลังจากชักนำให้เกิดภาวะ global ischemia ตั้งแต่วันที่ 0-15 พบว่า ระดับ CK ใน perfusate fluid ของกลุ่ม I/R + vehicle มากกว่ากลุ่ม I/R + piperine อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และหลังจากที่ reperfusion 20 -30 นาที พบว่าระดับ CK ใน perfusate fluid ของกลุ่ม I/R + vehicle และ กลุ่ม I/R + piperine ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 11 และ ภาพที่ 11)

ตารางที่ 10 แสดงผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อระดับ LDH (unit/L) ใน perfusate fluid ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที (control) หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที (R-time)

เวลา	LDH (U/L)	
	I/R + Vehicle	I/R + Piperine
Control	8.1 ± 0.9	6.0 ± 0.6
R-0	99.9 ± 9.4	47.5 ± 3*
R-1	63.0 ± 10.4	26.4 ± 7*
R-2	37.7 ± 11.8	15.0 ± 3.3*
R-5	39.9 ± 10.8	17.3 ± 2.9*
R-10	41.3 ± 9	19.7 ± 3.2*
R-15	27.6 ± 1.9	16.3 ± 0.6*
R-20	23.0 ± 2.9	10.4 ± 0.4*
R-30	19.4 ± 2	7.7 ± 1.0*

หมายเหตุ R = reperfusion ; *P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม I/R + Vehicle ที่ช่วงเวลาเดียวกัน; ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน;

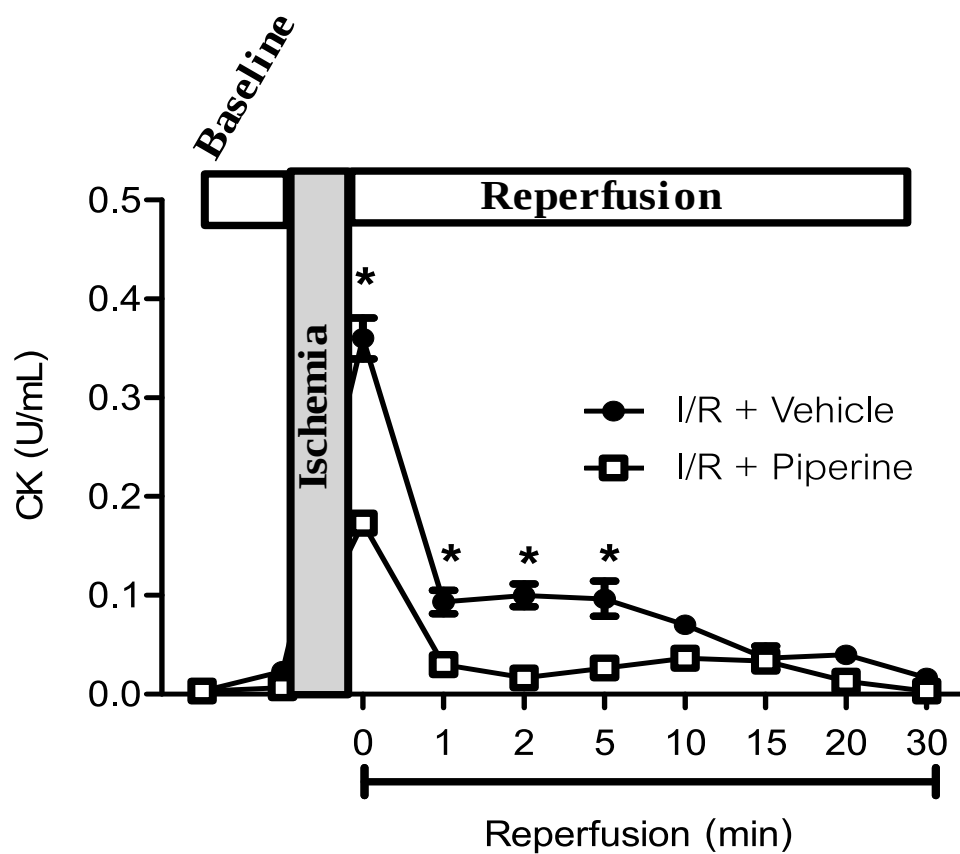


ภาพที่ 10 แสดงผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อระดับ LDH (unit/L) ใน perfusate fluid ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที; * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม I/R + Vehicle ที่ช่วงเวลาเดียวกัน

ตารางที่ 11 แสดงผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อระดับ CK (unit/mL) ใน perfusate fluid ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ออกซิเจนซ้ำทำให้เกิด ischemia 30 นาที (control) หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที (R-time)

เวลา	CK (U/mL)	
	I/R + Vehicle	I/R + Piperine
Control	0.003 ± 0.003	0.003 ± 0.003
R-0	0.36 ± 0.021	0.17 ± 0.009*
R-1	0.09 ± 0.012	0.03 ± 0.006*
R-2	0.10 ± 0.012	0.02 ± 0.003*
R-5	0.10 ± 0.018	0.03 ± 0.003*
R-10	0.07 ± 0.006	0.04 ± 0.009
R-15	0.04 ± 0.012	0.03 ± 0.009
R-20	0.04 ± 0.006	0.01 ± 0.009
R-30	0.02 ± 0.009	0.003 ± 0.003

หมายเหตุ R = reperfusion ; *P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม I/R + Vehicle ที่ช่วงเวลาเดียวกัน; ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน;



ภาพที่ 11 แสดงผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อระดับ CK (unit/mL) ใน perfusate fluid ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที ; * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม I/R + Vehicle ที่ช่วงเวลาเดียวกัน

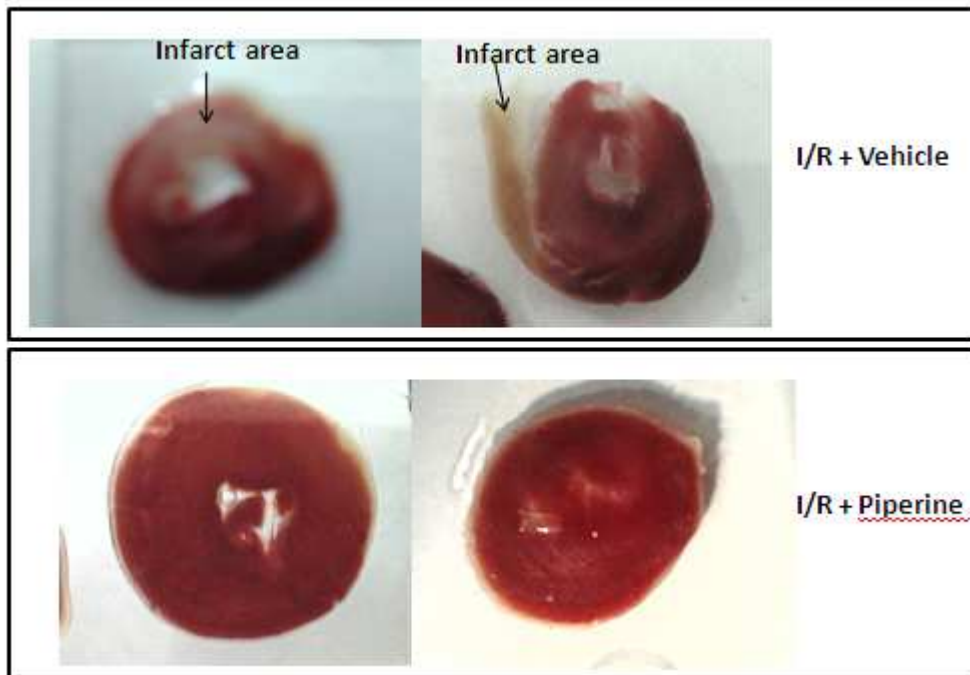
5. ฤทธิ์ต่อการตายของกล้ามเนื้อหัวใจ

บริเวณที่มีการตายของเซลล์จะถูกย้อมสีด้วย 1% TTC โดย โดยบริเวณของเซลล์ที่ปกติจะปรากฏสีแดง แต่บริเวณที่มีการตายของเซลล์จะไม่ติดสี หรือมีสีเหลือง (ภาพที่ 12) พบว่า กลุ่ม I/R + Vehicle จะมีเปอร์เซ็นต์ของบริเวณที่มีการตายของเซลล์ต่อพื้นที่ของชั้นกล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างทั้งหมด ไม่แตกต่างจากกลุ่ม I/R + Piperine อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 แสดงฤทธิ์ของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO)ต่อการตายของกล้ามเนื้อหัวใจที่ถูกชักนำโดย I/R ซึ่งกล้ามเนื้อหัวใจจะถูกย้อมสีด้วย 1% โดยค่าแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์ของบริเวณที่มีการตายของเซลล์ต่อพื้นที่ของชั้นกล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างทั้งหมด เมื่อให้สารก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที

กลุ่ม	% infarct area
I/R + Vehicle	8.3 ± 2.5
I/R + Piperine	3.6 ± 0.3

ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ; ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน;



ภาพที่ 12 แสดงผลของสาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อการตายของกล้ามเนื้อหัวใจที่ถูกชักนำโดย I/R ซึ่งบริเวณที่มีการตายของกล้ามเนื้อจะถูกย้อมสีด้วย 1% TTC โดยบริเวณที่มีการตายของกล้ามเนื้อหัวใจจะมีสีขาว หรือสีเหลือง

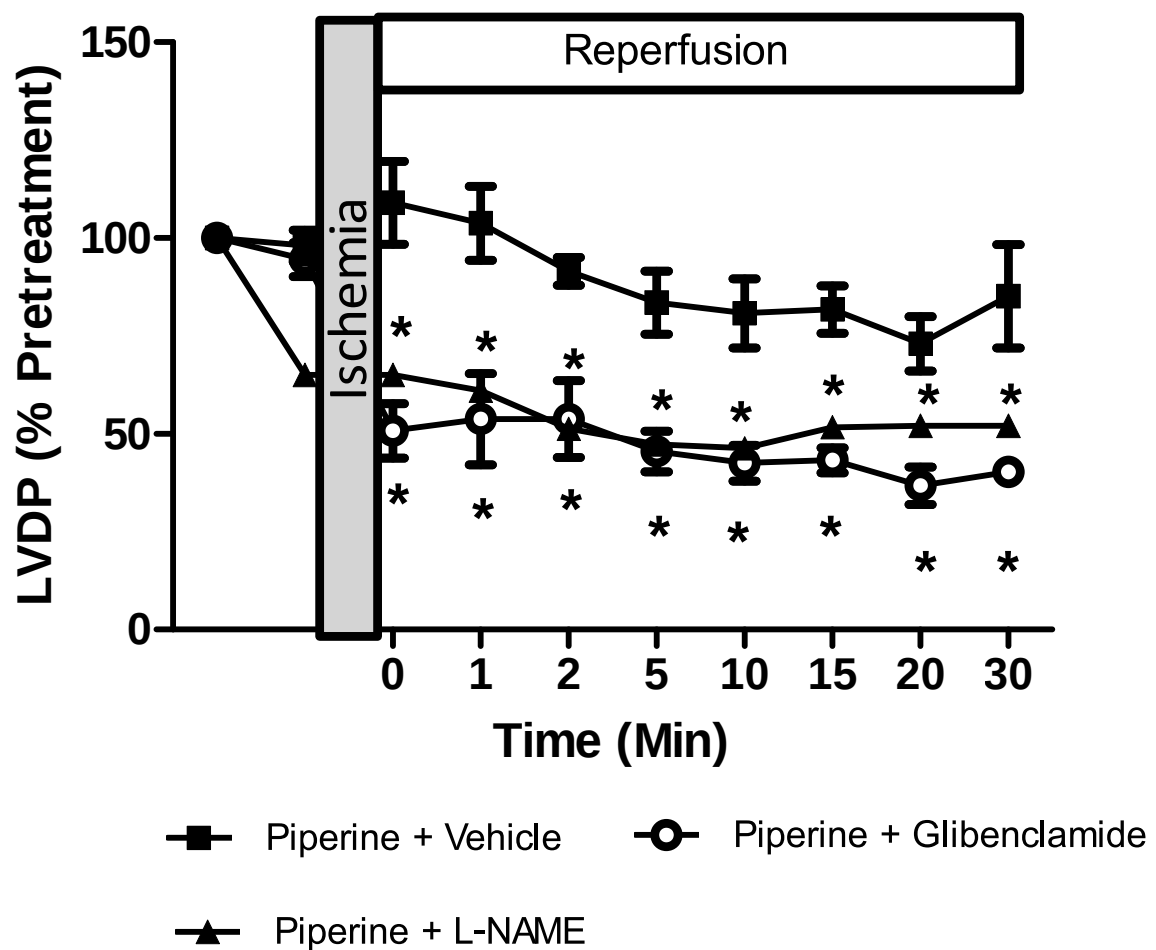
6. กลไกการออกฤทธิ์ของ piperine ในการป้องกันการขาดเลือดของกล้ามเนื้อหัวใจ

การให้สาร Glibenclamide ซึ่งเป็น K_{ATP} channel blocker และ L-NAME ซึ่งเป็น NOS inhibitor สามารถลดผลการฟื้นฟูหัวใจของสาร piperine ได้ โดยลด LVDP ตั้งแต่นาทีที่ 0-30 หลังการ reperfusion อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับการได้รับ vehicle โดยไม่มีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจ ดังแสดงในตารางที่ 13 – 14 และภาพที่ 13-14

ตารางที่ 13 แสดงผลของสาร Vehicle, L-NAME (10^{-6} M) หรือ Glibenclamide (10^{-6} M) เมื่อให้ร่วมกับสาร piperine 10^{-6} M ต่อ Left ventricular developed pressure (% Control) เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที (Control) หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที (R-time)

เวลา	LVDP (% Control)		
	Piperine + Vehicle	Piperine + L-NAME	Piperine + Glibenclamide
Control	100	100	100
R-0	109 ± 11	65 ± 7*	51 ± 4*
R-1	104 ± 9	61 ± 12*	54 ± 3*
R-2	92 ± 4	51 ± 10*	54 ± 4*
R-5	84 ± 8	47 ± 5*	46 ± 12*
R-10	81 ± 9	46 ± 5*	43 ± 9*
R-15	82 ± 6	52 ± 3*	43 ± 9*
R-20	73 ± 7	52 ± 5*	37 ± 10*
R-30	85 ± 13	52 ± 3*	40 ± 10*

* $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Piperine+ Vehicle ที่ช่วงเวลาเดียวกัน; ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน;

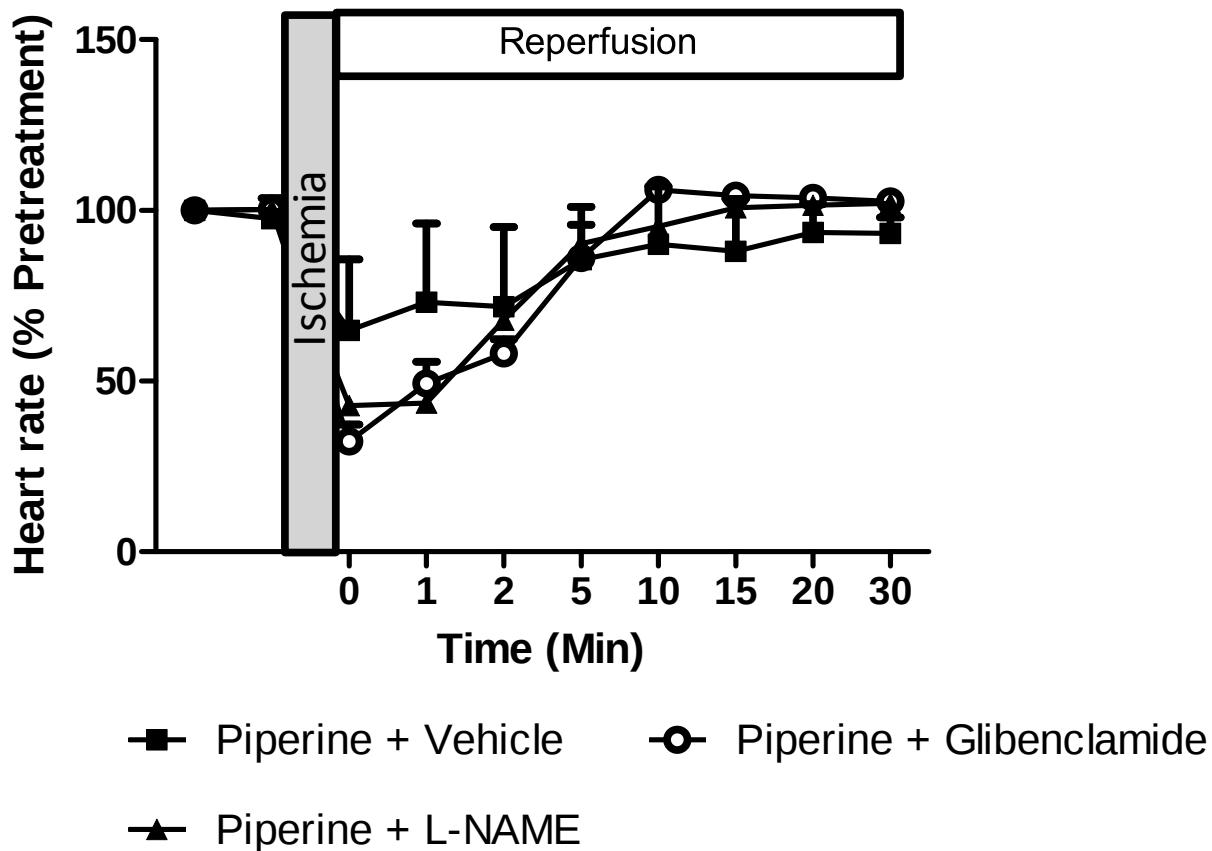


ภาพที่ 13 แสดงผลของสาร Vehicle, L-NAME (10^{-6} M) หรือ Glibenclamide (10^{-6} M) เมื่อให้ร่วมกับสาร piperine 10^{-6} M ต่อ Left ventricular developed pressure (mmHg) เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที ; * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม I/R + Vehicle ที่ช่วงเวลาเดียวกัน

ตารางที่ 14 แสดงผลของสาร Vehicle, L-NAME (10^{-6} M) หรือ Glibenclamide (10^{-6} M) เมื่อให้ร่วมกับสาร piperine 10^{-6} M ต่อ อัตราการเต้นของหัวใจ (ครั้งต่อนาที) โดยให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที (control) หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที (R-time)

เวลา	อัตราการเต้นของหัวใจ (% Control)		
	Piperine + Vehicle	Piperine + L-NAME	Piperine + Glibenclamide
Control	100	100	100
R-0	65 ± 21	43 ± 3	32 ± 5
R-1	73 ± 23	44 ± 2	49 ± 6
R-2	72 ± 23	68 ± 9	58 ± 4
R-5	86 ± 16	90 ± 5	86 ± 10
R-10	90 ± 17	95 ± 5	106 ± 3
R-15	88 ± 15	101 ± 3	104 ± 2
R-20	94 ± 8	102 ± 2	104 ± 1
R-30	93 ± 5	102 ± 2	103 ± 2

ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ; ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน;



ภาพที่ 14 แสดงผลของสาร Vehicle, L-NAME (10^{-6} M) หรือ Glibenclamide (10^{-6} M) เมื่อให้ร่วมกับสาร piperine 10^{-6} M ต่อ อัตราการเต้นของหัวใจ (ครั้งต่อนาที) เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที

อภิปรายผล

จากการศึกษาแบบ *in vitro* พบว่า สาร piperine มีฤทธิ์ลดแรงบีบตัวและอัตราการเต้นของหัวใจ และรวมทั้งยังออกฤทธิ์ฟื้นฟูความผิดปกติของการทำงานของหัวใจหนูที่ถูกชักนำให้เกิดการขาดเลือด

เมื่อทดสอบฤทธิ์ของการให้สาร piperine เพียงครั้งเดียว ในหัวใจของหนูขาว พบว่า สาร piperine ที่ความเข้มข้น 10 μM จะส่งผลลดแรงบีบตัวของหัวใจและอัตราการเต้นของหัวใจ ซึ่งผลนี้จะคล้ายคลึงกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่พบว่าสาร piperine สามารถลดแรงบีบตัวของหัวใจและทำให้หลอดเลือดหัวใจคลายตัวในหนูขาว ซึ่งเป็นผลจากการยับยั้ง Ca^{2+} Channel (7) มีรายงานวิจัย กล่าวว่า การเพิ่มขึ้นของแคลเซียมไอออนภายในเซลล์มากเกินไปจนเกิดและการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด ถือว่าเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้ contractile filament ลดการตอบสนองต่อแคลเซียมไอออน จึงทำให้การหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจผิดปกติ ส่งผลให้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเกิดความเสียหาย (13, 14)

ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด เป็นภาวะที่มีการลดหรือหยุดการไหลของเลือดผ่านทางหลอดเลือด coronary ไปยังบริเวณกล้ามเนื้อหัวใจ ทำให้ลดปริมาณออกซิเจน น้ำตาลกลูโคส กรดไขมัน หรือสารอาหารอื่นๆ ไปยังบริเวณนั้น จึงยับยั้งการทำงานของกระบวนการ oxidative phosphorylation ส่งผลลด adenine nucleotide และ cytochrome c รวมทั้งส่งผลเพิ่ม lactic acid และ intracellular calcium และเพิ่มความเป็นกรดในเซลล์หัวใจ (13,15) ทั้งหมดนี้จะส่งผลให้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเกิดความเสียหาย ส่วนการเกิด reperfusion เป็นภาวะที่มีการไหลของเลือดผ่านทางหลอดเลือด coronary ไปยังบริเวณกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด ส่งผลให้ออกซิเจนที่มาจากกระแสเลือดทำปฏิกิริยากับ respiratory chain ที่เสียหายจากภาวะ ischemia จึงเกิดการสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของการทำงานของหัวใจมากขึ้น เรียกว่า Ischemia/Reperfusion (I/R) injury แต่อย่างไรก็ตาม แม้ว่าการเกิดภาวะ ischemia จะทำให้หัวใจทำงานผิดปกติ แต่ถ้าเป็นการ ischemia ในระยะเวลาสั้นๆ แล้วมีการ reperfusion เกิดขึ้นตามมา การทำงานที่ผิดปกติของหัวใจอาจถูกฟื้นฟูกลับสู่ปกติได้ โดยปราศจากการตายของกล้ามเนื้อหัวใจ (necrosis) (16) มีรายงานวิจัย พบว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถช่วยฟื้นฟู I/R injury ของหัวใจได้ (17-20) ซึ่งสาร piperine เคยมีรายงานวิจัยว่าสามารถลดการเกิดอนุมูลอิสระ (8-12, 21) จึงเป็นไปได้ว่า สาร piperine อาจออกฤทธิ์ลดการเกิด I/R injury ของหัวใจ

ในงานวิจัยนี้ ศึกษา cardiac I/R injury โดยใช้ Langendorff model พบว่า การหยุดในสารละลายแก่หัวใจ เป็นเวลา 25 นาที (เลียนแบบภาวะ ischemia) แล้วตามด้วยการ reperfusion 30 นาที จะลดการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ โดยลดค่า LVDP, LVdp/dtmax, LVdp/dtmin และเพิ่มค่า LVEDP ซึ่งหมายถึงการลดแรงและอัตราเร็วของการบีบตัวและคลายตัวของหัวใจ แสดงถึงการเกิด I/R injury สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ (22) และการให้สาร piperine 1 μM สามารถฟื้นฟูการทำงานที่ผิดปกติของหัวใจ โดยส่งผลเพิ่มค่า LVDP, LVdp/dtmax และ LVdp/dtmin เมื่อวิเคราะห์ปริมาณของ LDH และ CK ในของเหลวที่ไหลออกจากหัวใจ ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงภาวะ myocardial injury พบว่า การให้สาร piperine

สามารถลด LDH และ CK ในของเหลวที่ไหลออกจากหัวใจ แสดงว่าสาร piperine น่าจะมีผลลดความเสียหายของหัวใจจากภาวะขาดเลือด แต่ เมื่อย้อมสี TTC เพื่อประเมินพื้นที่การตายของกล้ามเนื้อหัวใจ พบว่า กลับมีค่าไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่ม I/R + vehicle และ I/R + piperine

นอกจากนี้ การออกฤทธิ์ในการฟื้นฟูการทำงานของหัวใจหลังจากเกิดภาวะขาดเลือดของ piperine สามารถถูกยับยั้งโดยการให้สาร glibenclamide และ L-NAME จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้น การเพิ่มปริมาณของ Ca^{2+} มากเกินไป (Ca^{2+} overload) จะส่งผลทางด้านลบต่อการฟื้นฟูการทำงานของหัวใจหลังเกิดภาวะขาดเลือด โดยจะลดการบีบตัวของหัวใจ ซึ่งการเปิด K_{ATP} channel ที่บริเวณ sarcolemma จะทำให้เกิดภาวะ hyperpolarization และลดปริมาณ Ca^{2+} เข้าเซลล์ จึงควบคุมปริมาณ Ca^{2+} ในไมโทคอนเดรียไม่ให้มากเกินไป ดังนั้นจึงฟื้นฟูการทำงานของไมโทคอนเดรียและการทำงานของหัวใจหลังจากการขาดเลือด สาร glibenclamide จะออกฤทธิ์ยับยั้ง K_{ATP} channel ส่งผลเพิ่มระยะเวลาของ action potential ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มปริมาณของ Ca^{2+} เข้าเซลล์ทาง sarcolemma และอาจก่อให้เกิดความผิดปกติของการทำงานของหัวใจที่ถูกชักนำให้เกิดการขาดเลือดได้ (23) ส่วนสาร L-NAME จะออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Nitric oxide synthase (NOS) ซึ่งสามารถเปลี่ยนสารตั้งต้น L-arginine และ ออกซิเจนให้กลายเป็นสาร nitric oxide (NO) ซึ่งการเพิ่มการทำงานของสาร NO ในกล้ามเนื้อหัวใจ สามารถฟื้นฟูการทำงานของหัวใจหลังจากเกิดภาวะขาดเลือด โดยออกฤทธิ์ขยายหลอดเลือดหัวใจ และยังออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีงานวิจัย พบว่า การให้สาร L-arginine สามารถลดปริมาณการตายของกล้ามเนื้อหัวใจหลังจากเกิดภาวะขาดเลือด และผลนี้ถูกยับยั้งโดยสาร L-NAME (24-26) ดังนั้น การที่ฤทธิ์ของสาร piperine ในการฟื้นฟูการทำงานของหัวใจหลังจากเกิดภาวะขาดเลือด ถูกยับยั้งโดยสาร glibenclamide และ L-NAME แสดงว่าการออกฤทธิ์ของสาร piperine ส่วนหนึ่งอาจผ่านทางการเปิดของ K_{ATP} channel และกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับ NO pathway

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาแบบ *in vitro* สรุปได้ว่า สาร piperine ออกฤทธิ์ฟื้นฟูการทำงานของหัวใจหลังจากเกิดภาวะขาดเลือด โดยส่วนหนึ่งออกฤทธิ์ผ่านทางการเปิดของ K_{ATP} channel และกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับ NO pathway

เอกสารอ้างอิง

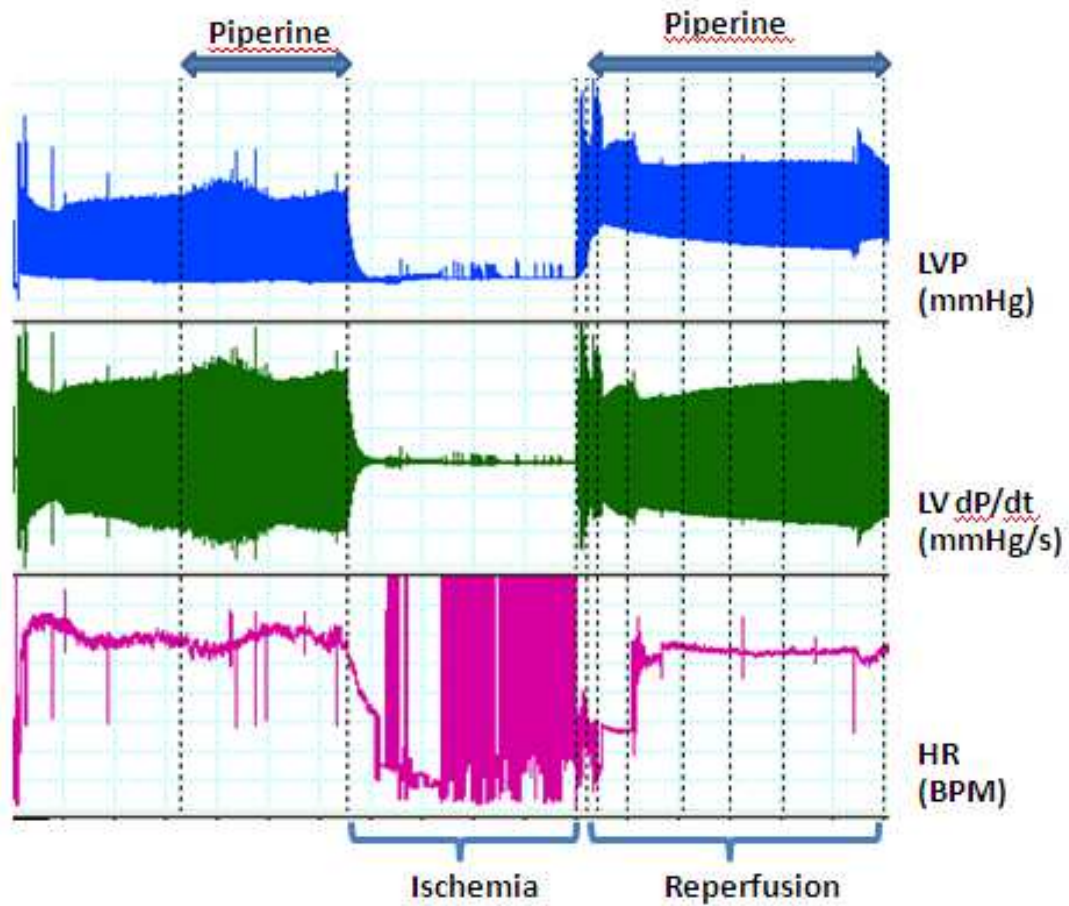
1. World Health Organization.
<http://www.who.int/whosis/whostat/2008/en/index.html>
2. World Health Organization.
<http://www.who.int/whosis/whostat/2007/en/index.html>
3. Weisfeldt ML, Zweier J, Ambrosio G, Becker LC, Flaherty JT. Evidence that free radicals result in reperfusion injury in heart muscle. *Basic Life Sci.* 1988;49:911–919.
4. Ambrosio G, Flaherty JT. Effects of the superoxide radical scavenger superoxide dismutase, and of the hydroxyl radical scavenger mannitol, on reperfusion injury in isolated rabbit hearts. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1992;6:623–632.
5. Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation.* 2003;108:1912–1916.
6. Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation.* 2003;108:2034–2040.
7. Taqvi SI, Shah AJ, Gilani AH. Blood pressure lowering and vasomodulator effects of piperine *J Cardiovasc Pharmacol.* 2008;52:452-8.
8. Vijayakumar RS, Surya D, Nalini N. Antioxidant efficacy of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. *Redox Rep.* 2004;9:105-10
9. Mittal R, Gupta RL. In vitro antioxidant activity of piperine. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2000; 22:271-4.
10. Vijayakumar RS, Nalini N. Efficacy of piperine, an alkaloidal constituent from *Piper nigrum* on erythrocyte antioxidant status in high fat diet and antithyroid drug induced hyperlipidemic rats. *Cell Biochem Funct.* 2006;24:491-8.
11. Rauscher FM, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Effects of piperine on antioxidant pathways in tissues from normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 2000;14:329-34.
12. Selvendiran K, Senthilnathan P, Magesh V, Sakthisekaran D. Modulatory effect of Piperine on mitochondrial antioxidant system in Benzo(a)pyrene-induced experimental lung carcinogenesis. *Phytomedicine.* 2004 ;11:85-9.

13. Weiss JN, Korge P, Honda HM, Ping P. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res.* 2003;93:292-301.
14. Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev.* 2008;88:581-609.
15. Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987;84:1404-7.
16. Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation.* 1982;66:1146-9.
17. Kilgore KS, Friedrichs GS, Johnson CR, Schasteen CS, Riley DP, Weiss RH, Ryan U, Lucchesi BR. Protective effects of the SOD-mimetic SC-52608 against ischemia/reperfusion damage in the rabbit isolated heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1994;26: 995–1006.
18. Ambrosio G, Becker LC, Hutchins GM, Weisman HF, Weisfeldt ML. Reduction in experimental infarct size by recombinant human superoxide dismutase: insights into the pathophysiology of reperfusion injury. *Circulation.* 1986;74: 1424–33.
19. Victoria JA, Joanne CH, Carolyn MP, Andrew MJ[†], Robin AJ, Michael PM, Ivan AS. Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *The FASEB Journal.* 2005;19:1088-95.
20. Xiang JZ, Li KZ, Hong XW. Apelin protects heart against ischemia/reperfusion injury in rat. *Peptides.* 2009;30: 1144–52.
21. Naidu KA, Thippeswamy NB. Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by active principles from spices. *Mol Cell Biochem.* 2002;229:19-23.
22. Chang L, Ren Y, Liu X, Li WG, Yang J, Geng B. Protective effects of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;43:165–70.
23. Mosca SM. Cardioprotective effects of stretch are mediated by activation of sarcolemmal, not mitochondrial, ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:H1007-12.
24. Suematsu Y, Ohtsuka T, Hirata Y, Maeda K, Imanaka K, Takamoto S. L-Arginine given after ischaemic preconditioning can enhance cardioprotection in isolated rat hearts. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001; 19: 873-879.

25. Izhar U, Schwalb H, Borman J B, Merin G. Cardioprotective effect of *L*-arginine in myocardial ischemia and reperfusion in an isolated working rat heart model. *J Cardiovasc Surg* 1998; 39:321-329.
26. Zhang LP, Yang CY, Wang YP, Cui F, Zhang Y. Protective effect of polydatin again ischemia/reperfusion injury in rat heart. *Acta Physiologica Sinica*. 2008;25:161-8

ภาคผนวก

ตัวอย่างภาพของฤทธิ์ของสาร piperine ที่ความเข้มข้น 1 μM ต่อ I/R injury ของหัวใจหนูขาว



ตัวอย่างภาพของฤทธิ์ของสาร vehicle (30%DMSO) ต่อ I/R injury ของหัวใจหนูขาว

