

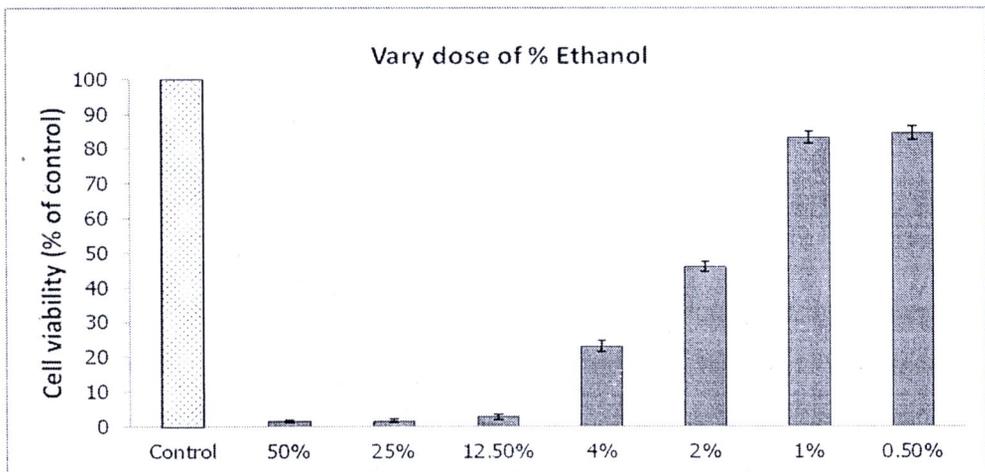


บทที่ 3
ผลการทดลอง

โครงการย่อยที่ 1: ไพเพอรีนและอนุพันธ์ยับยั้งออกซิเดชันของไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำ และการนำเข้าสู่เซลล์แมคโครฟาจ

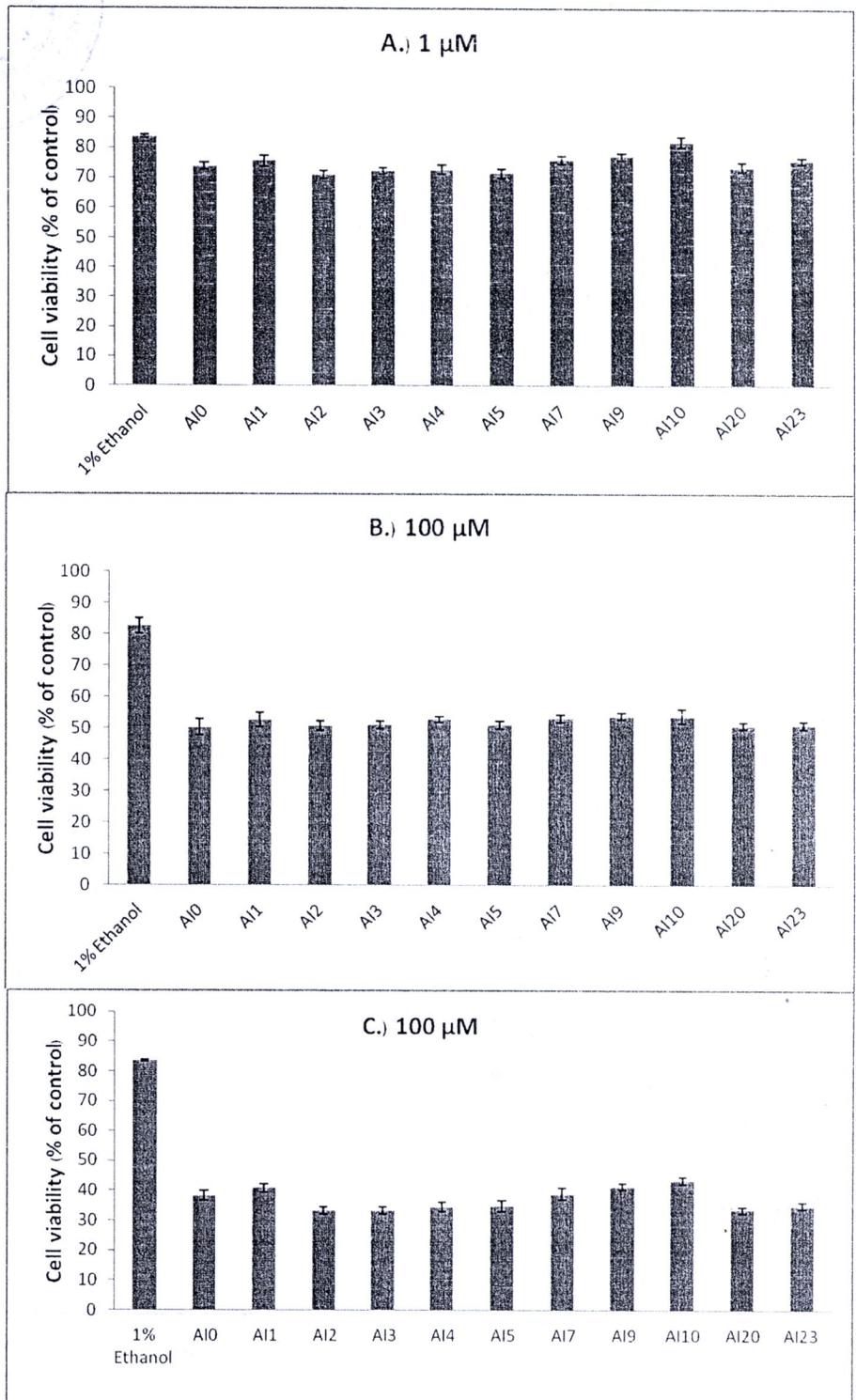
การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability test)

ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3 เมื่อทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น ethanol ต่างๆ ซึ่งเป็นสารที่ใช้สำหรับการละลายของไพเพอรีนและอนุพันธ์ในการทดลองนี้ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 1% และ 0.5% ของ ethanol พบว่ามีผลน้อยต่ออัตราการมีชีวิตของเซลล์ ผู้วิจัยจึงเลือกที่ระดับความเข้มข้น 1% ethanol สำหรับการละลายของ piperine และอนุพันธ์ในการทดลองนี้ อีกทั้งที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวช่วยในการทำละลายของไพเพอรีนและอนุพันธ์ได้เป็นอย่างดี

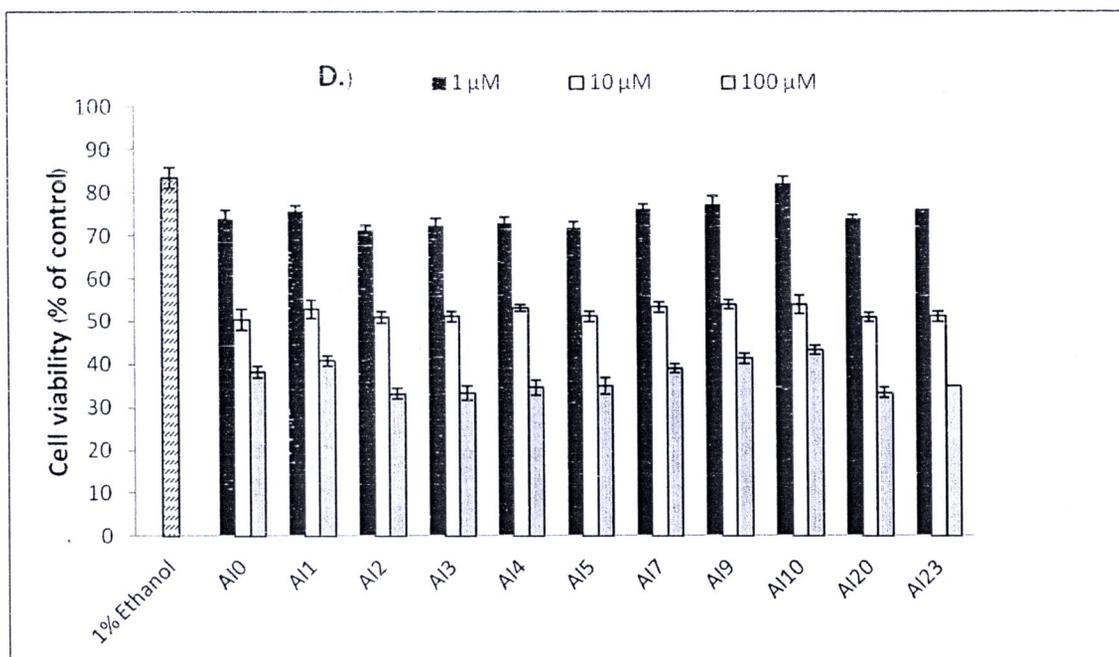


รูปที่ 3 ผลของ ethanol ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ murine macrophage RAW264.7 cells โดยเลี้ยงเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น 1%, 10%, 12.50%, 4%, 2%, 1%, และ 0.50% ของ ethanol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัด % cell viability ด้วย MTT assay ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean±SEM โดยแต่ละการทดลองทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง (triplication)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
 วันที่ 2 พ.ย. 2555
 เลขทะเบียน.....191054.....
 เลขเรียกหนังสือ.....



รูปที่ 4 ผลของ piperine และอนุพันธ์ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ Murine macrophage RAW264.7 cells เลี้ยงเซลล์ด้วยสารตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น 1, 10 และ 100 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัด cell viability ด้วย MTT assay ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean \pm SEM จาก 3 การทดลองโดยแต่ละการทดลองทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง (triplication)

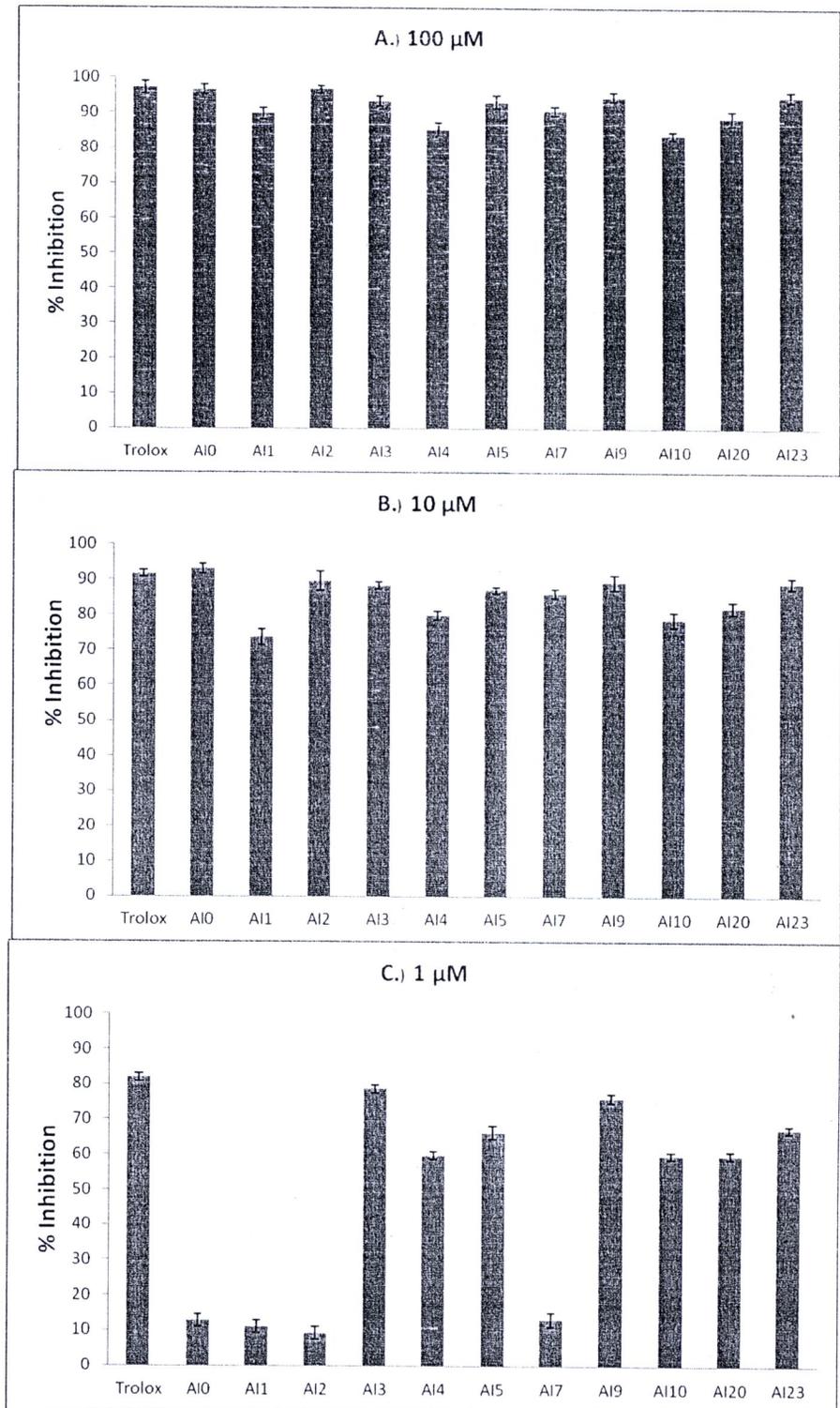


รูปที่ 5 สรุปผลของ piperine และอนุพันธ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ Murine macrophage RAW264.7 cells

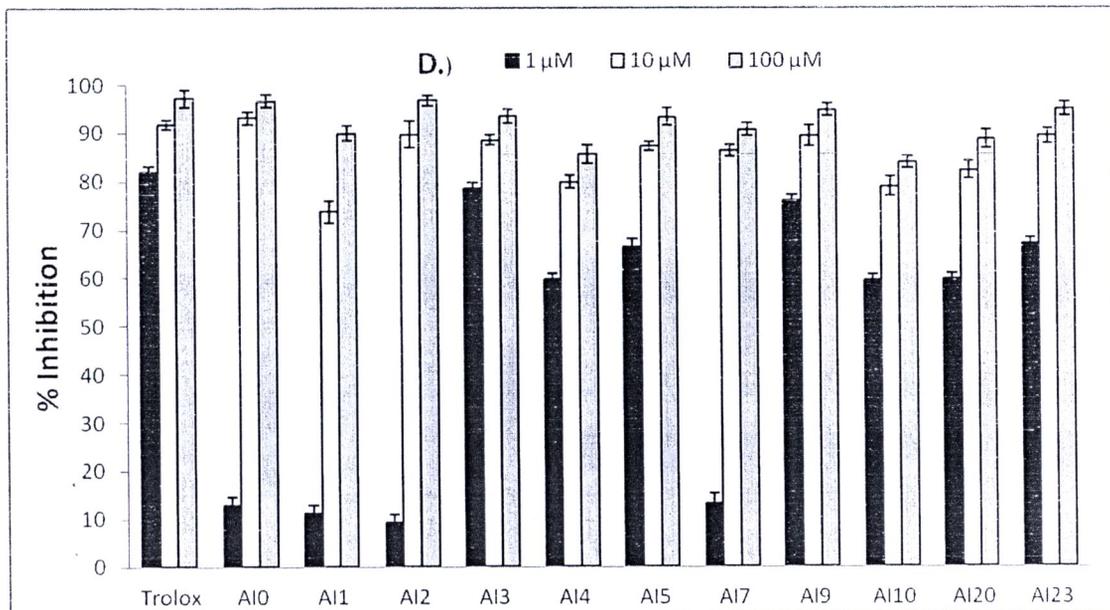
ผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4 A, B และ C พบว่าสารที่ระดับความเข้มข้น 100 μM และ 10 μM ทำให้เซลล์ Murine macrophage RAW264.7 cells ตายไป คงเหลือเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ประมาณ 30% และ 50% ตามลำดับ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 1 μM จะมีผลต่ออัตราการตายของเซลล์น้อย คือ มีค่า cell viability อยู่ที่ประมาณ 80% cell viability ซึ่งถือว่าเป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์ความสามารถในการยับยั้ง lipid peroxidation ในเซลล์หรือในการศึกษาต่อไป

การเกิด lipid oxidation ของ LDL

การทดสอบ piperine และอนุพันธ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาของการเกิด lipid oxidation ของ LDL ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบกับ trolox (vitamin E analog) การเหนี่ยวนำให้เกิด oxidation ทำได้โดย incubate LDL ด้วย CuSO_4 ที่ความเข้มข้น 50 μM ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 6 พบว่า LDL ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด oxidation ด้วย CuSO_4 ได้ดี ส่วนการทดสอบ piperine และอนุพันธ์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 μM มีความสามารถในการยับยั้ง lipid peroxidation ได้ดีกว่า 1 μM เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้ง lipid peroxidation จะเห็นได้ว่า ที่ระดับความเข้มข้น 100 μM ได้แก่ สารตัวอย่างรหัส A10 และ A12 มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับ trolox ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน และสารตัวอย่างรหัสทั้งหมดยังแสดงฤทธิ์ยับยั้งได้ดีกว่าระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าของสารตัวอย่างรหัสเหล่านั้นเป็น dose-dependent pattern ที่ระดับความเข้มข้น 10 μM ได้แก่ สารตัวอย่างรหัส A10 มีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีกว่า trolox และสารตัวอย่างรหัส A12, A13, A19 และ A123 มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับ trolox ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ที่ระดับความเข้มข้น 1 μM พบว่าไม่มีสารตัวอย่างรหัสใดมีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีกว่าหรือใกล้เคียงกับ trolox



รูปที่ 6 ผลของการทดสอบ piperine และอนุพันธ์ต่อ lipid peroxidation ที่เหนี่ยวนำให้เกิด oxidation ด้วย CuSO_4 โดยเติม piperine และอนุพันธ์ ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 μM ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean \pm SD จาก 3 การทดลองโดยแต่ละการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplication)

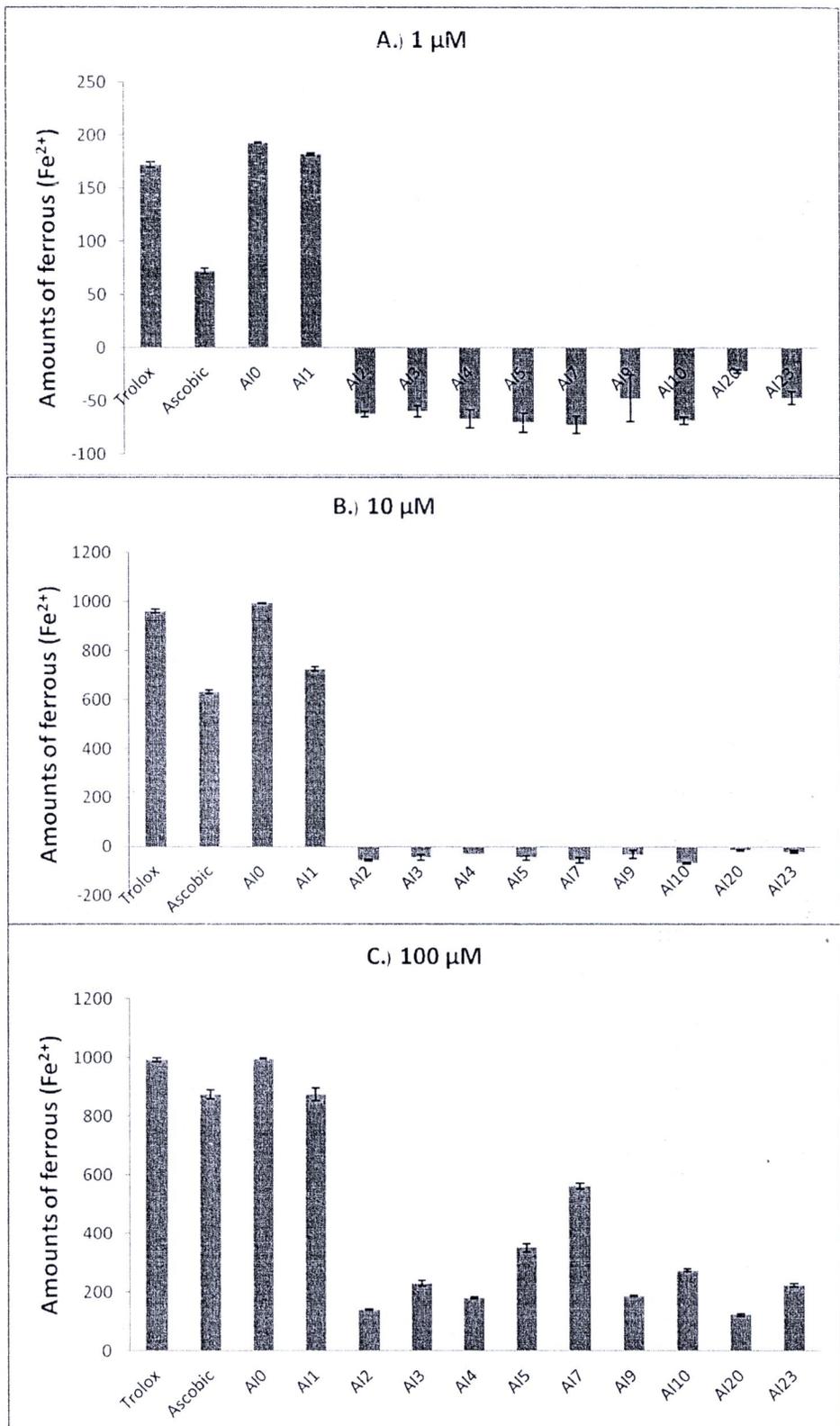


รูปที่ 7 สรุปผลของการทดสอบ piperine และอนุพันธ์ที่ความเข้มข้นต่างๆต่อ lipid peroxidation ที่เหนี่ยวนำให้เกิด oxidation ด้วย CuSO_4

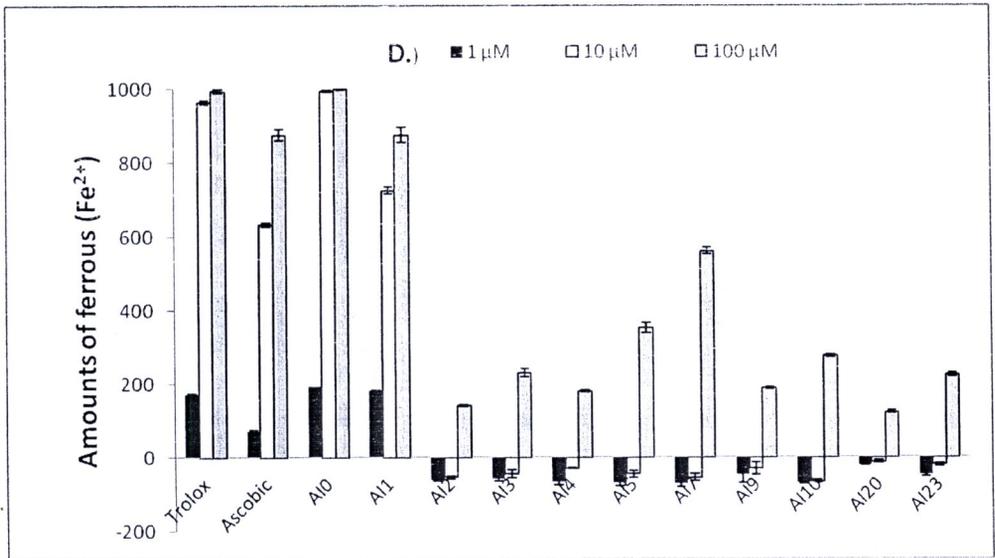
การทดสอบการเป็น reducing agent ด้วยวิธี FRAP

จากผลการทดลอง reducing activity ด้วย FRAP assay โดยการทดลองนี้ได้ทำการเปรียบเทียบกับ trolox และ ascorbic acid ผลการทดลองในการทดสอบฤทธิ์การเป็น reducing agent โดยทดสอบความสามารถในการเปลี่ยน Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ดังแสดงในรูปที่ 7 พบว่า piperine และสารอนุพันธ์ของ piperine ที่ระดับความเข้มข้น 100 μM ของสารตัวอย่างทุกหัตถ์ มีความสามารถในการเป็น reducing agent ได้ดีกว่า ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 1 μM ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่า สาร AI0, AI1 และ AI7 เป็นสาร reducing agent ที่ดี ระดับความเข้มข้น 100 μM เมื่อเปรียบเทียบกับสารตัวอย่างหัตถ์อื่นที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันอย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับ trolox จะเห็นได้ว่าสาร AI0, AI1 เป็นสาร reducing agent ที่ฤทธิ์ใกล้เคียงกัน ส่วนกรณีเปรียบเทียบกับ ascorbic acid จะเห็นได้ว่าสาร AI0, AI1 เป็นสาร reducing agent ที่ฤทธิ์ที่ดีกว่าที่ระดับความเข้มข้น 10, 100, 1000 μM

ส่วนความสามารถการเป็นสาร reducing agent ของสารตัวอย่างหัตถ์ที่เหลือนั้น ไม่ดีเท่าที่ควร เมื่อเทียบกับฤทธิ์ของ Trolox และ Ascorbic ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน



รูปที่ 7 การทดสอบ reducing activities ของ piperine และสารอนุพันธ์ ด้วยวิธี FRAP assay ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean \pm SEM จากระดับความเข้มข้น 10, 100, 1000 μM โดยแต่ละการทดลองทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง (triplication)



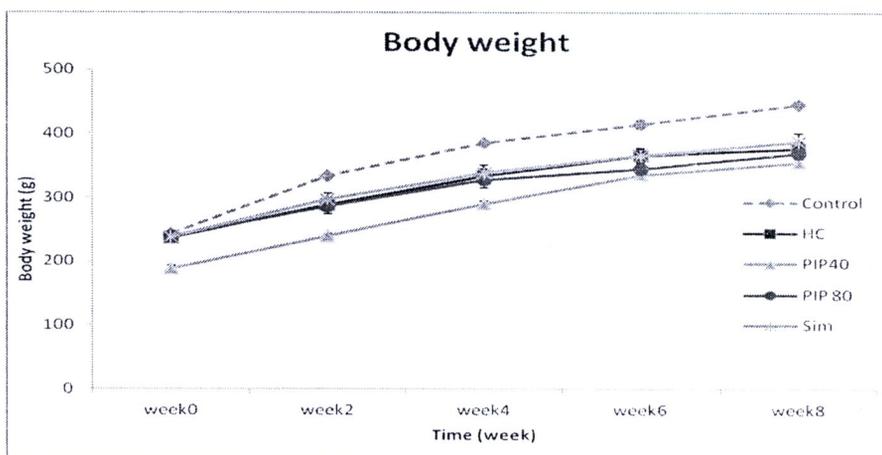
รูปที่ 8 สรุปผลการทดสอบ reducing activities ของ piperine และสารอนุพันธ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

โครงการย่อยที่ 2: ผลของสารไฟเพอรินต่อระดับไขมัน และหน้าที่ของหลอดเลือดในหนูที่มีภาวะไขมันในเลือดสูง

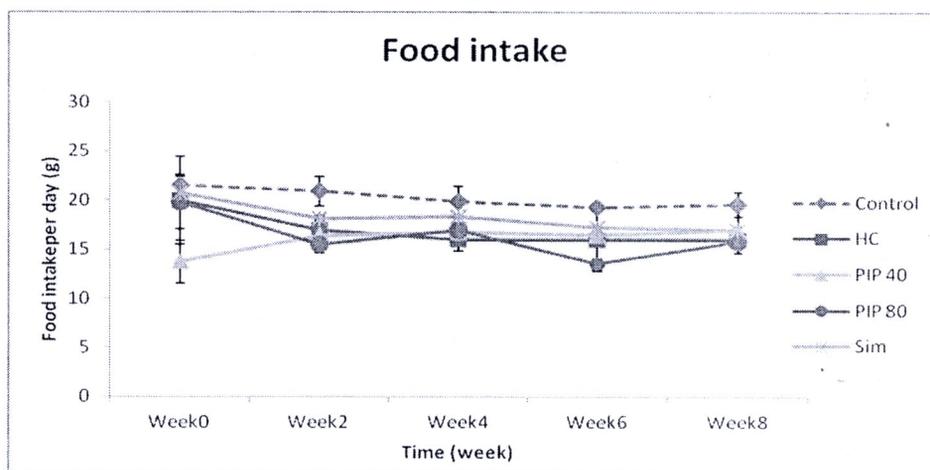
1. ผลของการให้สารไฟเพอรินต่อน้ำหนักตัวและปริมาณอาหารที่กินต่อวัน

จากการชั่งน้ำหนักตัวและปริมาณอาหารที่หนูกินตลอดช่วงระยะเวลาการทดลองพบว่า หนูทดลองมีการเจริญเติบโตเป็นปกติในทุกกลุ่ม โดยพบว่าหนูกลุ่มควบคุม (control) มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวมากที่สุดและในกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงร่วมกับสารสกัดไฟเพอริน ขนาด 40 mg/kg (กลุ่ม PIP40) 80 mg/kg (กลุ่ม PIP80) และ Simvastatin 2 mg/kg (กลุ่ม Sim) มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงเพียงอย่างเดียว (กลุ่ม HC) (รูปที่ 1A)

A



B



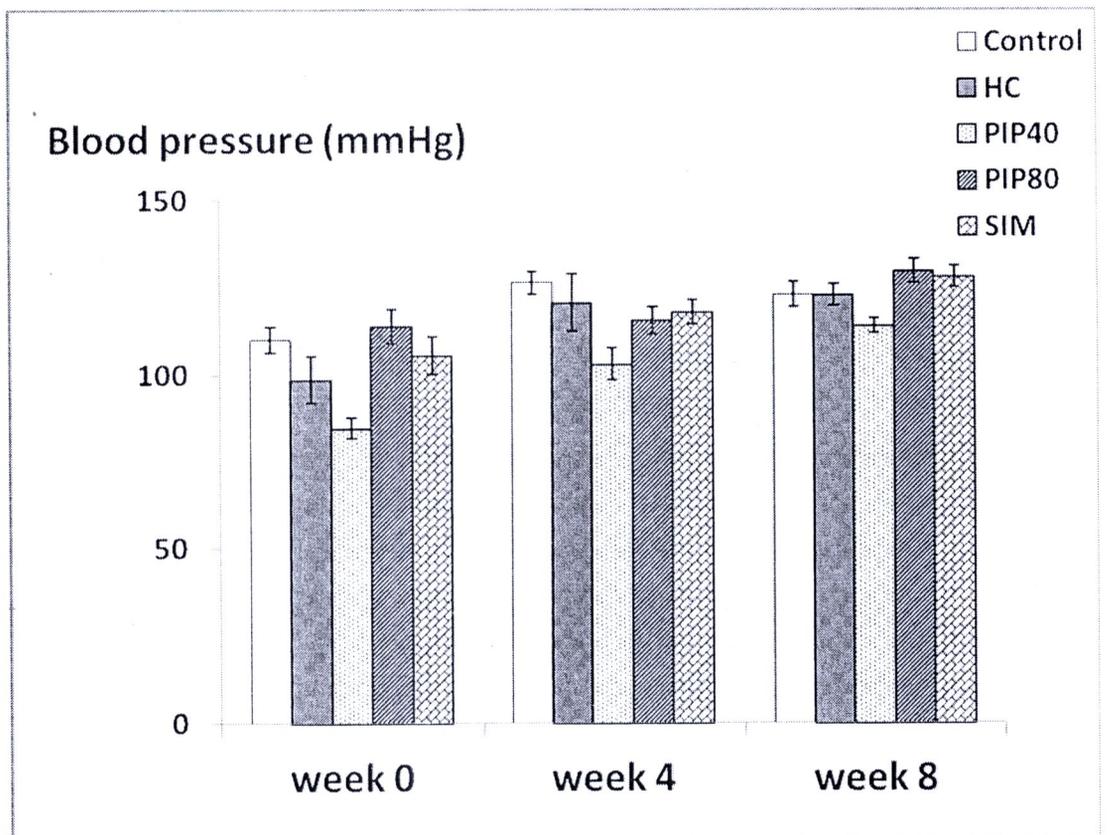
รูปที่ 1 ผลของการให้สารไฟเพอรินขนาด 40mg/kg BW (PIP40) 80 mg/kg BW (PIP80) หรือยา Simvastatin 2 mg/kg BW (Sim) ในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ต่อการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัว (A) และ ปริมาณอาหารที่หนูกินต่อวัน (B) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง (กลุ่ม HC) ค่าต่าง ๆ คือ means \pm sem, n=6-8

เช่นเดียวกับปริมาณอาหารที่หนูกินในแต่ละวัน พบว่าหนูทุกกลุ่มกินอาหารได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน โดยหนูกลุ่ม control กินอาหารได้มากกว่ากลุ่มอื่นเล็กน้อยในขณะที่หนูในกลุ่ม HC, PIP40, PIP80 และ Sim กินอาหารได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 1B)

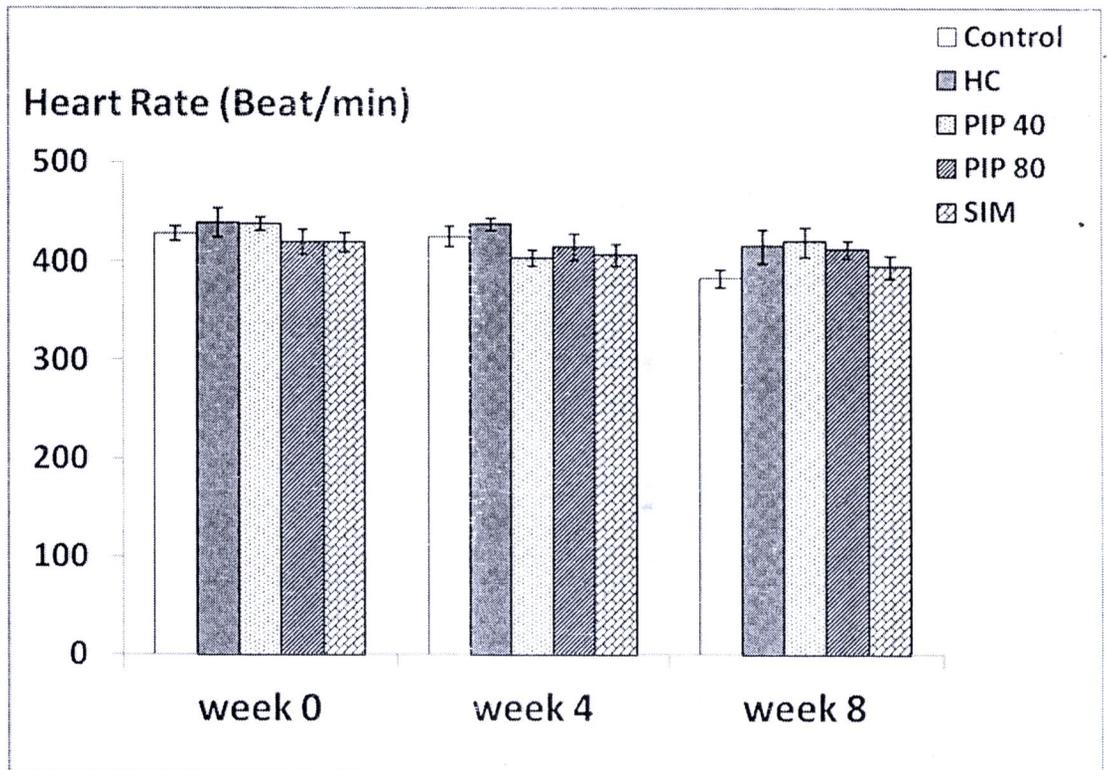
2. ผลของการให้สารไฟเพอรินต่อค่าความดันโลหิต Systolic และอัตราการเต้นของหัวใจ

ผู้วิจัยได้ทำการวัดค่าความดันโลหิต systolic blood pressure (SBP) ของหนูในกลุ่ม control, HC, PIP40, PIP80 และ Sim เป็นช่วงเวลาตั้งนี้คือ ก่อนการทดลอง (week0) หลังการทดลอง 4 สัปดาห์ (week4) และหลังการทดลอง 8 สัปดาห์ (week8) โดยพบว่าค่า SBP ในหนูทดลองแต่ละกลุ่มมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น เมื่อเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 2A) ส่วนอัตราการเต้นของหัวใจ (Heart rate; HR) เมื่อเปรียบเทียบทั้งก่อนและหลังการทดลองพบว่าไม่มีความแตกต่างกันในหนูแต่ละกลุ่ม (รูปที่ 2B)

A



B



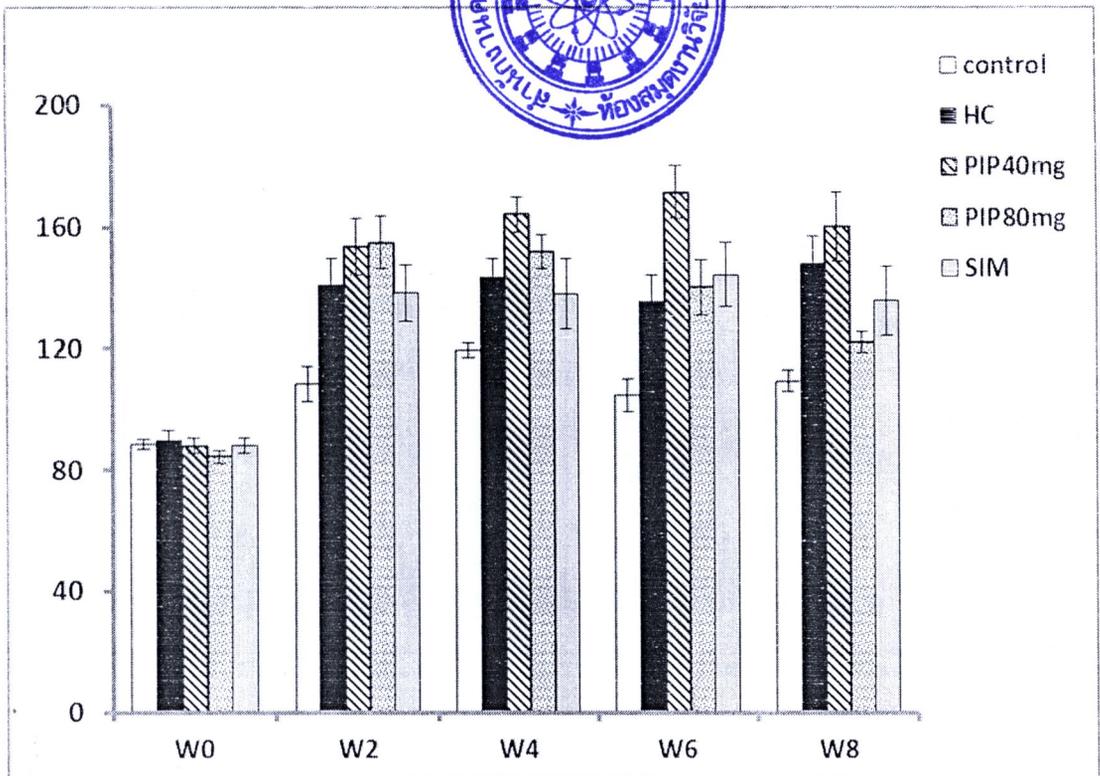
รูปที่ 2 ผลของการให้สารไฟเพอรินขนาด 40mg/kg BW (PIP40) 80 mg/kg BW (PIP80) หรือยา Simvastatin 2 mg/kg BW (Sim) ในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ ต่อ ค่าความดัน systolic blood pressure (A) และ อัตราการเต้นของหัวใจ (B) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง (กลุ่ม HC) ค่าต่าง ๆ คือ means \pm sem, n=6-8

3. ผลของการให้สารไฟเพอรินต่อค่าชีวเคมีในเลือดในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง

3.1 ผลของสารสกัดไฟเพอรินต่อระดับ total cholesterol

ภายหลังการทดลองผ่านไป 8 สัปดาห์ พบว่าการให้อาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงส่งผลให้ระดับ ระดับ total cholesterol ในหนูกลุ่ม HC เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$; รูปที่ 3) และเมื่อเปรียบเทียบระดับ total cholesterol ระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดไฟเพอรินกับกลุ่ม HC พบว่า ไฟเพอรินที่ขนาด 80 mg/kg และ Simvastatin 2 mg/kg มีผลลดระดับ total cholesterol ในกระแสเลือด (รูปที่ 3) ได้อย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 8 โดยมีระดับ total cholesterol ไม่แตกต่างจากกลุ่ม ควบคุม

จากข้อมูลนี้สามารถสรุปได้ว่าการให้สารสกัดไฟเพอรินขนาด 80 mg/kg เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงมีผลลดระดับ total cholesterol ในกระแสเลือดได้



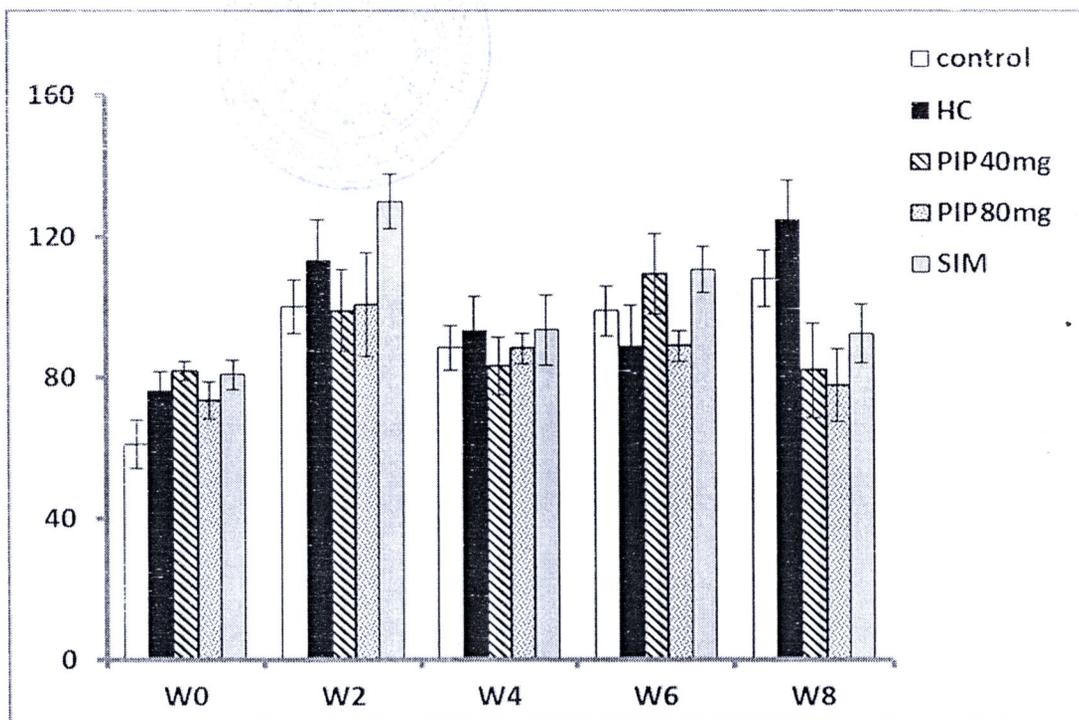
รูปที่ 3 ผลของการให้สารไฟเพอรินขนาด 40mg/kg BW (PIP40) 80 mg/kg BW (PIP80) หรือยา Simvastatin 2 mg/kg BW (Sim) ในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ ต่อระดับ total cholesterol ในกระแสเลือดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง (กลุ่ม HC) ค่าต่างๆ คือ means \pm sem, n=6-8

* คือ มีค่าทางชีวเคมีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

** คือ มีค่าทางชีวเคมีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

3.2 ผลของสารไฟเพอรินต่อระดับ triglycerides

ภายหลังการทดลองผ่านไป 8 สัปดาห์ พบว่าระดับของ triglyceride มีค่าเพิ่มขึ้นทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง (รูปที่ 4) การให้ไฟเพอรินที่ขนาด 40, 80 mg/kg และ Simvastatin 2 mg/kg มีผลลดระดับ triglyceride ในกระแสเลือด (รูปที่ 4) ได้อย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 8 โดยมีระดับ total cholesterol แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง ($p < 0.05$)

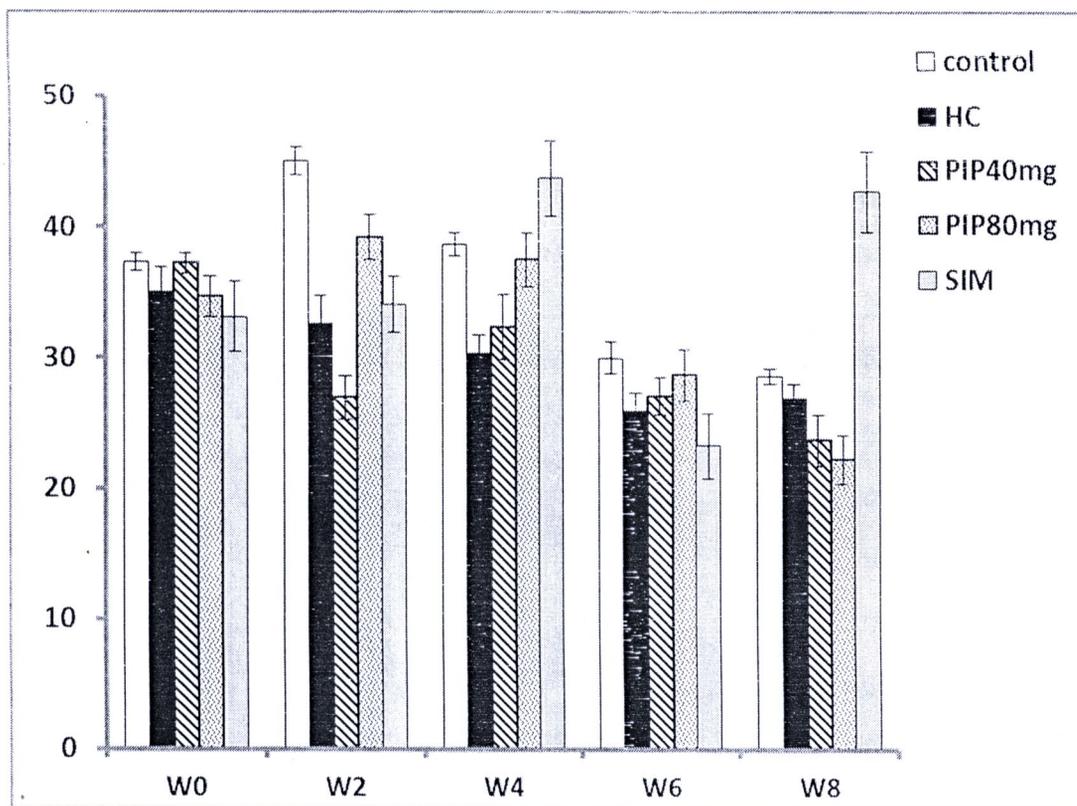


รูปที่ 4 ผลของการให้สารไฟเพอรินขนาด 40mg/kg BW (PIP40) 80 mg/kg BW (PIP80) หรือยา Simvastatin 2 mg/kg BW (Sim) ในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ ต่อระดับ triglyceride ในกระแสเลือดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง (กลุ่ม HC) ค่าต่าง ๆ คือ means \pm sem, n=6-8

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ คือ มีค่าทางชีวเคมีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้อาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง (กลุ่ม HC)

3.3 ผลของสารสกัดไฟเพอรินต่อระดับ HDL

ภายหลังการทดลองผ่านไป 8 สัปดาห์ พบว่าระดับของ HDL มีแนวโน้มลดลงในทุกกลุ่มยกเว้นกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin (รูปที่ 5) ซึ่งมีผลทำให้ HDL เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$)

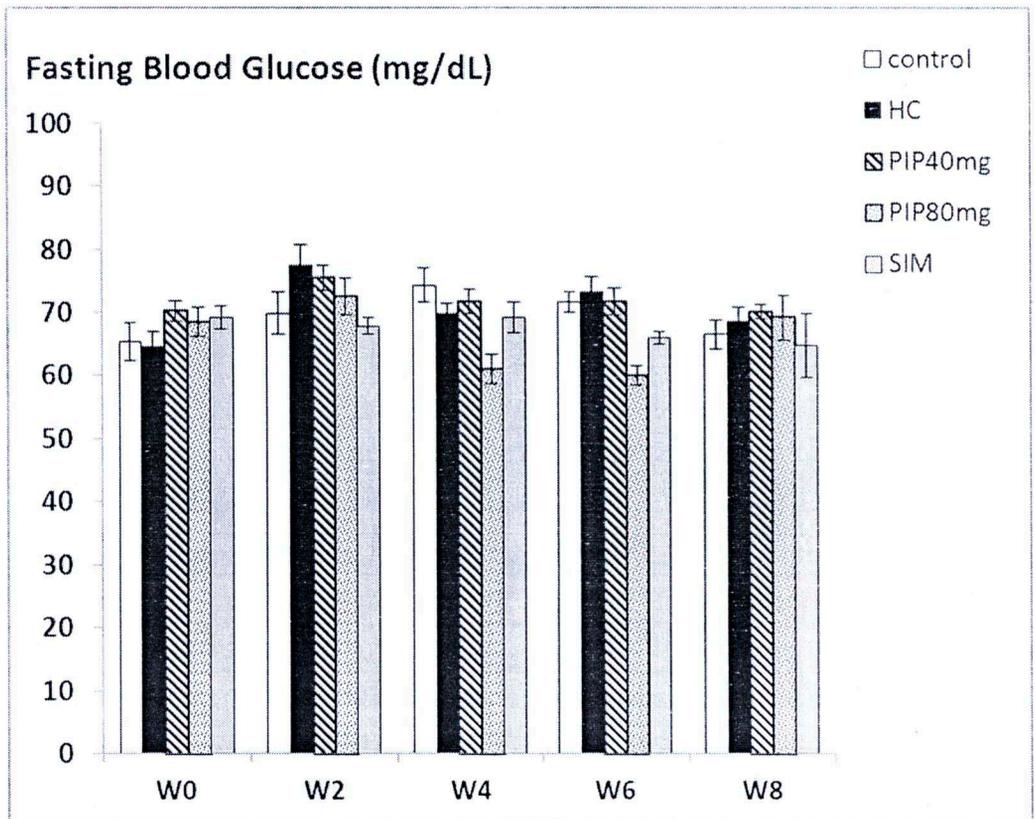


รูปที่ 5 ผลของการให้สารไฟเพอรินขนาด 40mg/kg BW (PIP40) 80 mg/kg BW (PIP80) หรือยา Simvastatin 2 mg/kg BW (Sim) ในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ ต่อระดับ HDL ในกระแสเลือดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง (กลุ่ม HC) ค่าต่าง ๆ คือ means \pm sem, n=6-8

* $p < 0.001$ คือ มีค่าทางชีวเคมีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม กลุ่ม PIP40, PIP80 และ กลุ่ม HC

3.4 ผลของสารสกัดไพเพอรินต่อระดับ fasting blood glucose

ภายหลังการทดลองผ่านไป 8 สัปดาห์ พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ Fasting blood glucose (รูป 6)

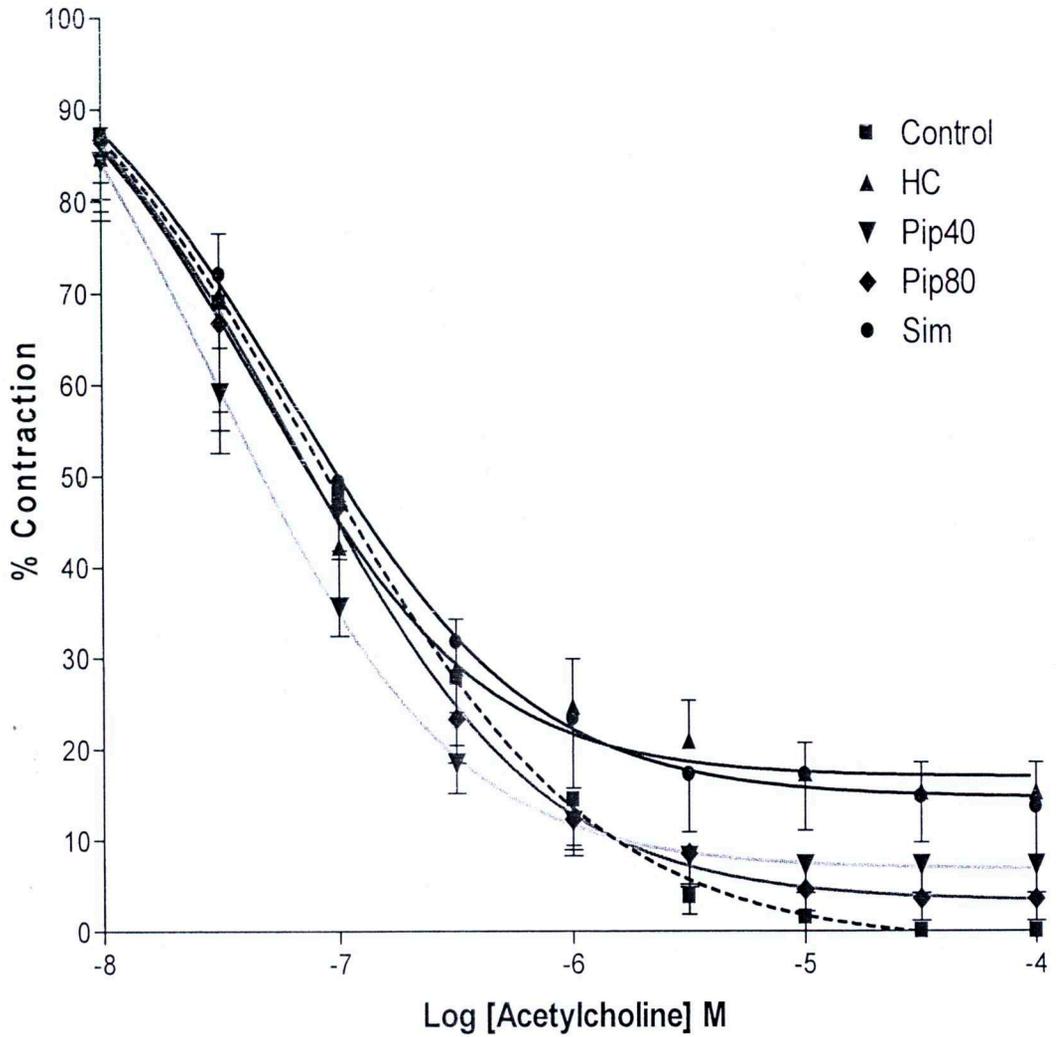


รูปที่ 6 ผลของการให้สารไพเพอรินขนาด 40mg/kg BW (PIP40) 80 mg/kg BW (PIP80) หรือยา Simvastatin 2 mg/kg BW (Sim) ในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ ต่อระดับ Fasting blood glucose ในกระแสเลือดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง (กลุ่ม HC) ค่าต่าง ๆ คือ means \pm sem, n=6-8

4. ผลของการให้สารสกัดไพเพอรินต่อการคลายตัวของหลอดเลือดเออร์ต้า

จากการศึกษาการคลายตัวของหลอดเลือดที่เหนียวแน่นโดยการให้สาร acetylcholine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันนั้น และนำข้อมูลมาทำ concentration response curve (รูปที่ 7) แล้วพบว่าหลอดเลือดเออร์ต้าของหนูกลุ่ม HC มีความสามารถในการคลายตัวลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control และการให้สารสกัดไพเพอรินขนาด 40mg/kg หรือ 80mg/kg (PIP40, PIP80) สามารถช่วยฟื้นฟูการทำงานของหลอดเลือดได้

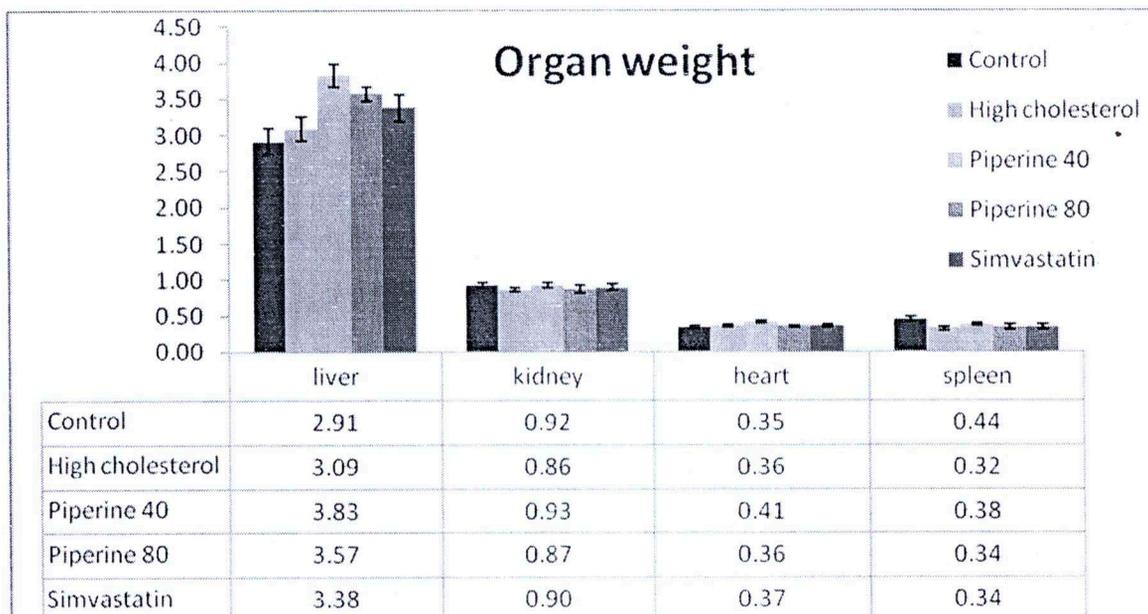
จากข้อมูลนี้บ่งชี้ว่าการให้อาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงแก่สัตว์ทดลองมีผลทำให้ความสามารถในการคลายตัวของหลอดเลือดเออร์ต้าลดลง และการให้สารสกัดไพเพอรินมีส่วนช่วยฟื้นฟูการทำงานของหลอดเลือดได้



รูปที่ 7 แสดงผลของการให้สารสกัดไพเพอรินขนาด 40 mg/kg หรือ 80 mg/kg หรือ simvastatin 2mg/kg เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ต่อการทำงานของหลอดเลือดเออร์ต้า ในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง (กลุ่ม HC) แกน X คือ ค่าความเข้มข้นของ Acetylcholine (log M) ส่วนแกน Y แสดง % Contraction ค่าต่าง ๆ คือ Mean \pm SEM, n=6-8

โครงการย่อยที่ 3: การวิเคราะห์ผลของสารไพเพอรินต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในตับหนูที่มีภาวะไขมันในเลือดสูง

กราฟแสดงน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์

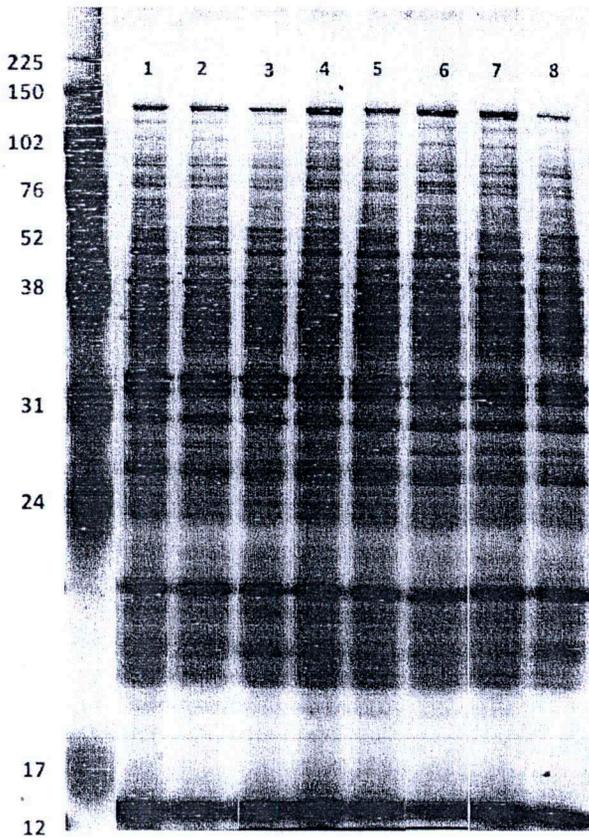


หมายเหตุ:

$$\text{น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์(กรัม\%)} = \left[\frac{\text{น้ำหนักอวัยวะ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัว(กรัม)}} \right] \times 100$$

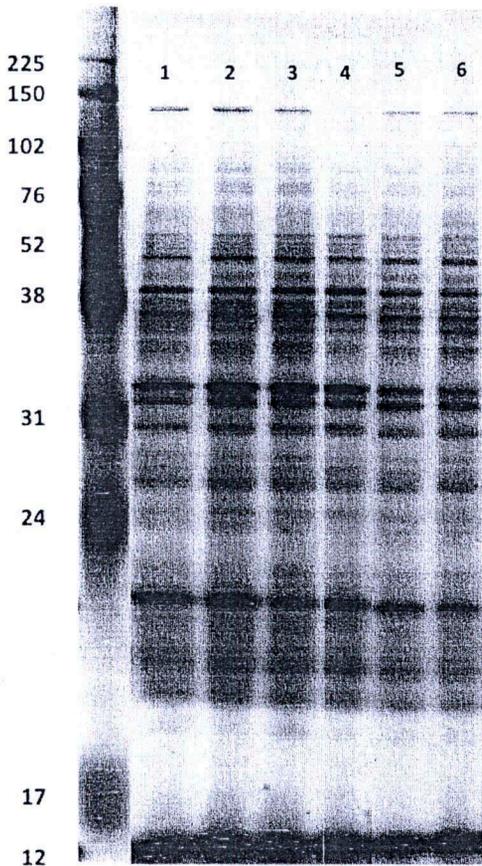
ผลการศึกษาแผนภูมิโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE

การศึกษาลงของสารไพเพอรินต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในตับหนู ในหนูทดลอง Sprague Dawley เพศผู้ น้ำหนัก 200-210กรัม (n=6-8) ในกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารไพเพอรินไกลคอล และกลุ่มที่ได้รับสารไพเพอริน ในปริมาณ 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ จากนั้นวิเคราะห์โปรตีนในตับด้วยเทคนิค SDS-PAGE ผลที่ได้พบว่า แถบโปรตีนของตับทั้งในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารไพเพอริน จากการ load ในปริมาณที่เท่ากัน 500µg/lane จากการวิเคราะห์ด้วยตาเปล่าในเบื้องต้น ยังไม่พบความแตกต่างของแถบโปรตีนระหว่าง กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง (ดังแสดงในภาพ A และ B)



**Rat liver protein profiles
of the control group (n=8)**

Amount of proteins in each lane is 500 ug



**Rat liver protein profiles
of the piperine treated group
(n=6)**

Amount of proteins in each lane is 500 ug