

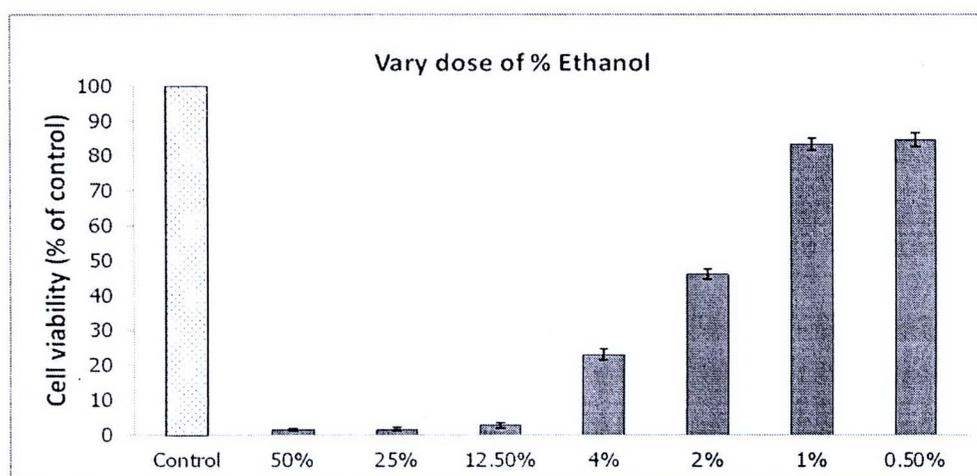


บทที่ 3  
ผลการทดลอง

โครงการย่อยที่ 1: ไพเพอรินและอนุพันธ์ยับยั้งออกซิเดชันของไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำ และการนำเข้าสู่เซลล์แมโครฟาจ

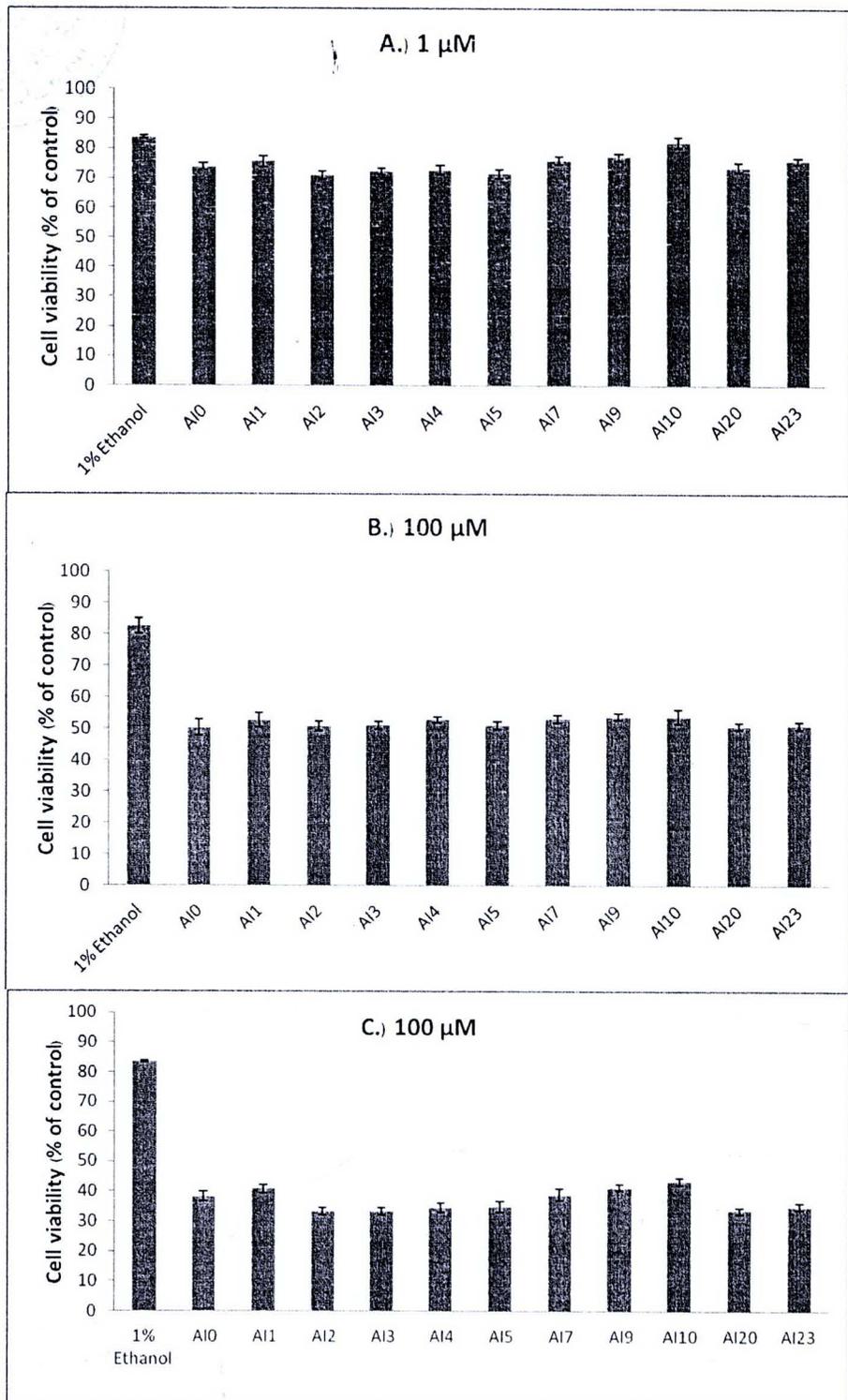
การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability test)

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

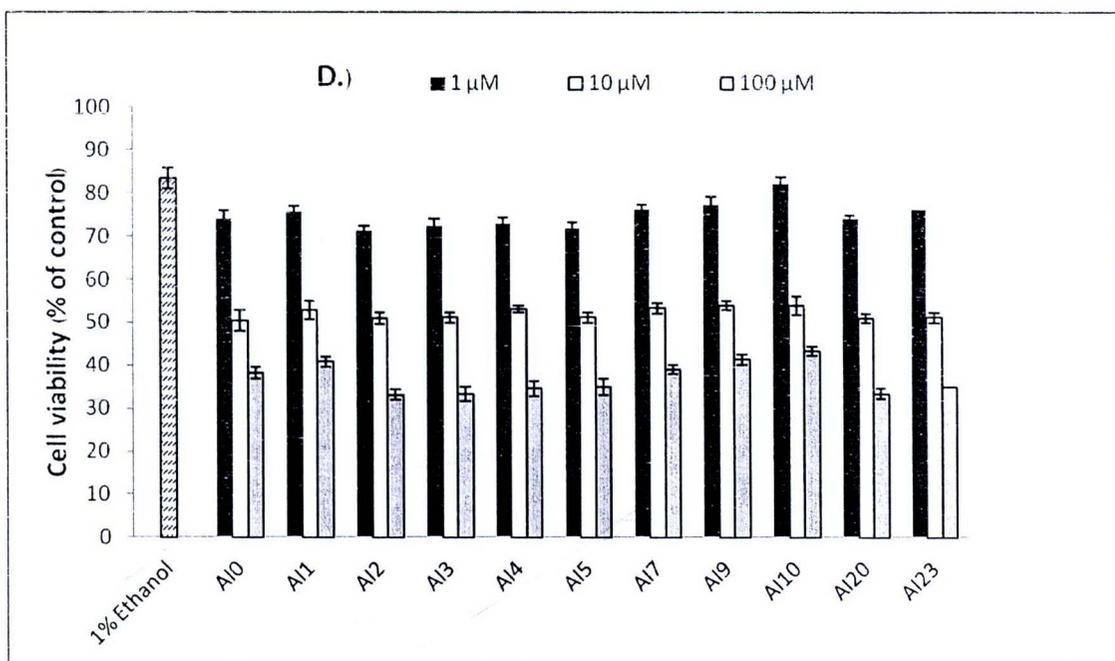


รูปที่ 3 ผลของ ethanol ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ murine macrophage RAW264.7 cells โดยเลี้ยงเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น 1%, 10%, 12.50%, 4%, 2%, 1%, และ 0.50% ของ ethanol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัด % cell viability ด้วย MTT assay ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean±SEM โดยแต่ละการทดลองทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง (triplication)





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

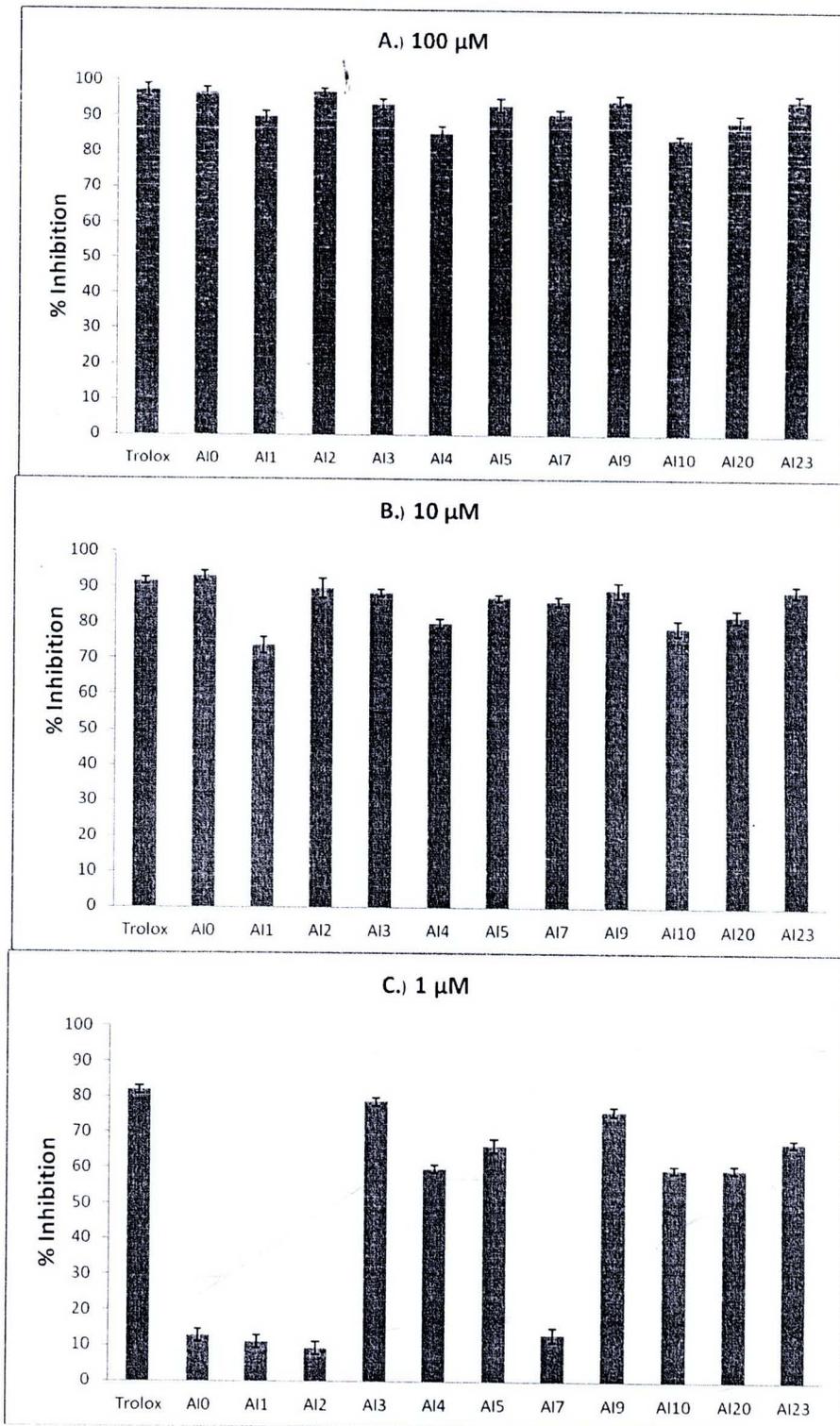


รูปที่ 5 สรุปผลของ piperine และอนุพันธ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ Murine macrophage RAW264.7 cells

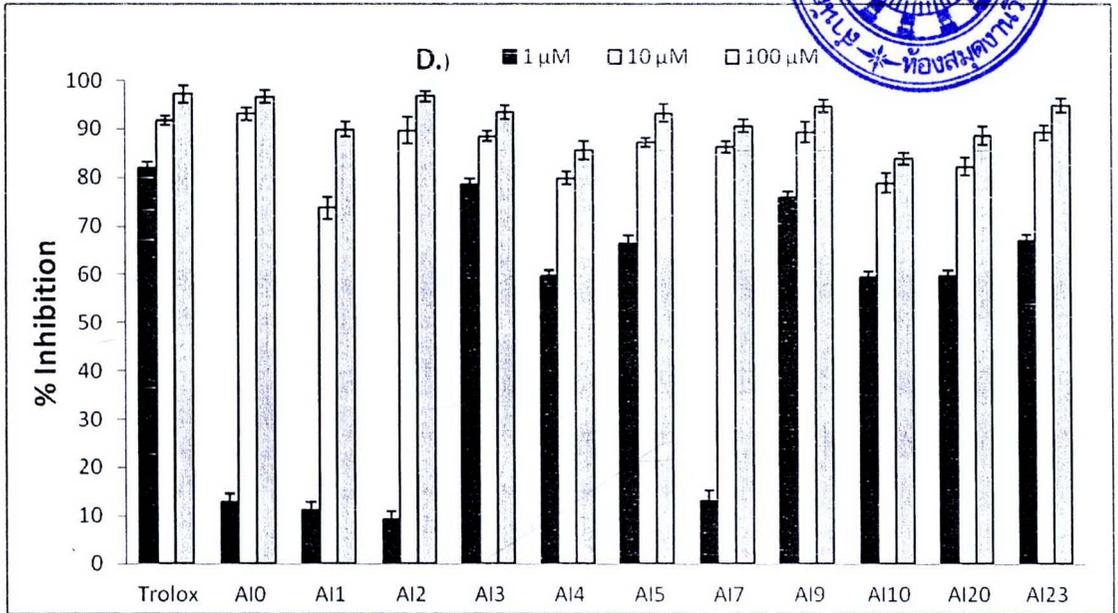
ผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4 A, B และ C พบว่าสารที่ระดับความเข้มข้น 100  $\mu\text{M}$  และ 10  $\mu\text{M}$  ทำให้เซลล์ Murine macrophage RAW264.7 cells ตายไป คงเหลือเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ประมาณ 30% และ 50% ตามลำดับ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 1  $\mu\text{M}$  จะมีผลต่ออัตราการตายของเซลล์น้อย คือ มีค่า cell 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  $\text{CuSO}_4$  ที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{M}$  ที่อุณหภูมิ 37  $^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 6 พบว่า LDL ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด oxidation ด้วย  $\text{CuSO}_4$  ได้ดี ส่วนการทดสอบ piperine และอนุพันธ์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100  $\mu\text{M}$  มีความสามารถในการยับยั้ง lipid peroxidation ได้ดีกว่า 1  $\mu\text{M}$  เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้ง lipid peroxidation จะเห็นได้ว่า ที่ระดับความเข้มข้น 100  $\mu\text{M}$  ได้แก่ สารตัวอย่างรหัส A10 และ A12 มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับ trolox ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน และสารตัวอย่างรหัสทั้งหมดยังแสดงฤทธิ์ยับยั้งได้ดีกว่าระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าของสารตัวอย่างรหัสเหล่านั้นเป็น dose-dependent pattern ที่ระดับความเข้มข้น 10  $\mu\text{M}$  ได้แก่ สารตัวอย่างรหัส A10 มีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีกว่า trolox และสารตัวอย่างรหัส A12, A13, A19 และ A123 มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับ trolox ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ที่ระดับความเข้มข้น 1  $\mu\text{M}$  พบว่าไม่มีสารตัวอย่างรหัสใดมีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีกว่าหรือใกล้เคียงกับ trolox



รูปที่ 6 ผลของการทดสอบ piperine และอนุพันธ์ต่อ lipid peroxidation ที่เหนี่ยวนำให้เกิด oxidation ด้วย  $\text{CuSO}_4$  โดยเติม piperine และอนุพันธ์ ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100  $\mu\text{M}$  ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean $\pm$ SD จาก 3 การทดลองโดยแต่ละการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplication)

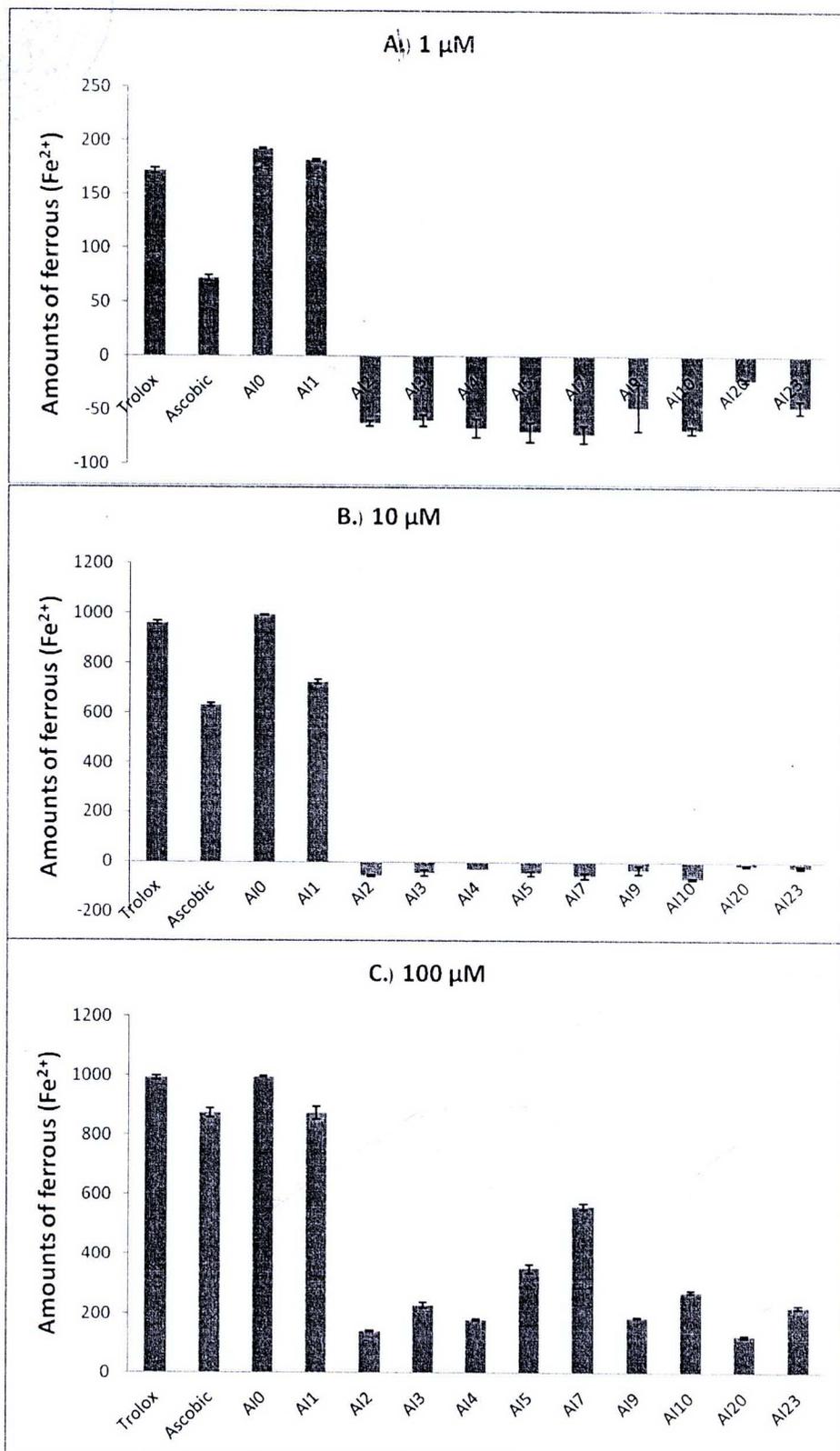


รูปที่ 7 สรุปผลของการทดสอบ piperine และอนุพันธ์ที่ความเข้มข้นต่างๆต่อ lipid peroxidation ที่เหนี่ยวนำให้เกิด oxidation ด้วย  $\text{CuSO}_4$

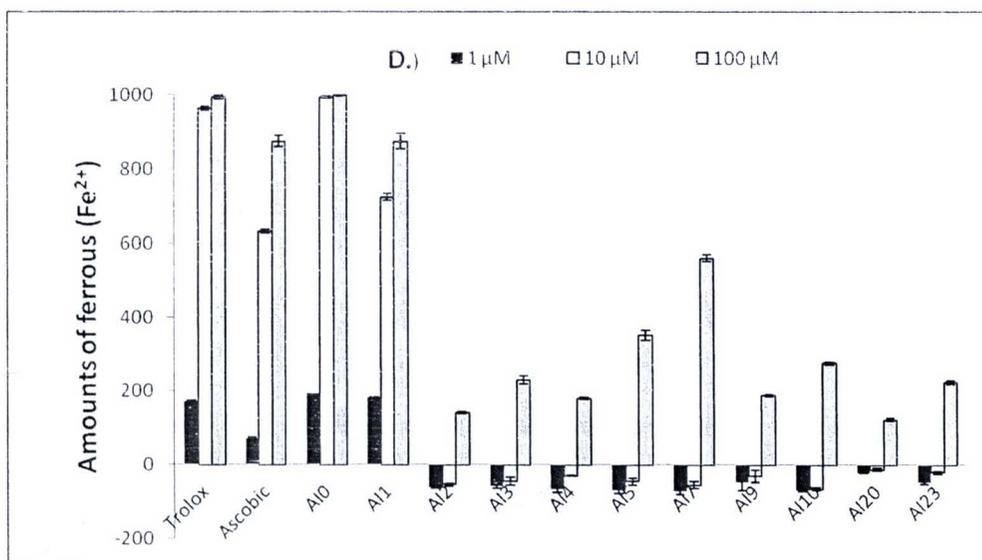
**การทดสอบการเป็น reducing agent ด้วยวิธี FRAP**

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

ส่วนความสามารถการเป็นสาร reducing agent ของสารตัวอย่างหัตถ์ที่เหลือนั้น ไม่ดีเท่าที่ควร เมื่อเทียบกับฤทธิ์ของ Trolox และ Ascorbic ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน



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

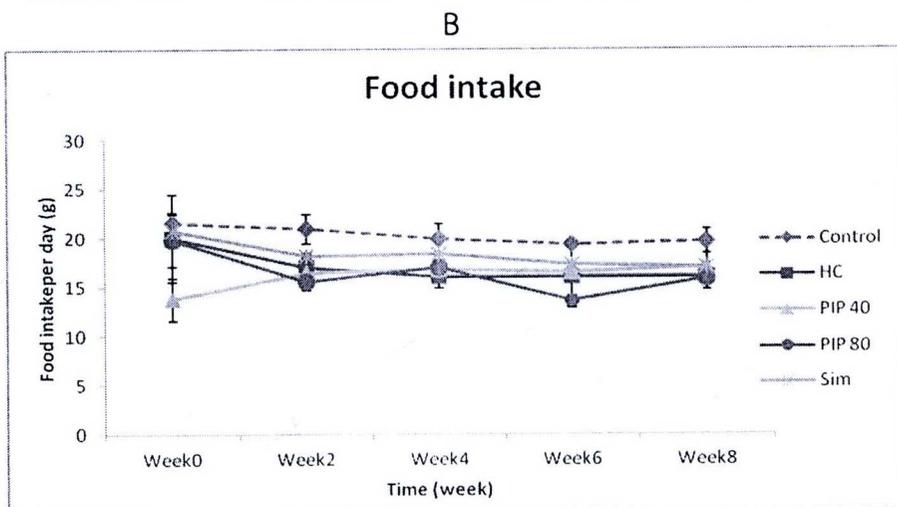
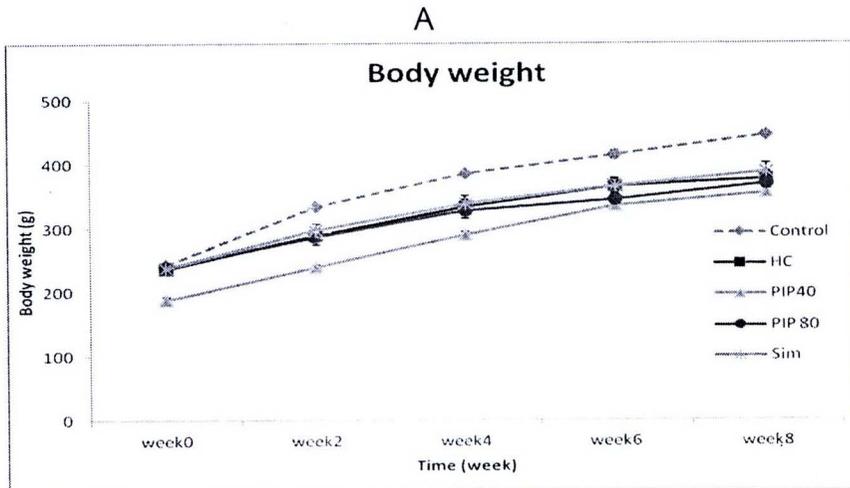


รูปที่ 8 สรุปผลการทดสอบ reducing activities ของ piperine และสารอนุพันธ์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ

## โครงการย่อยที่ 2: ผลของสารไพเพอรินต่อระดับไขมัน และหน้าที่ของหลอดเลือดในหนูที่มีภาวะไขมันในเลือดสูง

### 1. ผลของการให้สารไพเพอรินต่อน้ำหนักตัวและปริมาณอาหารที่กินต่อวัน

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



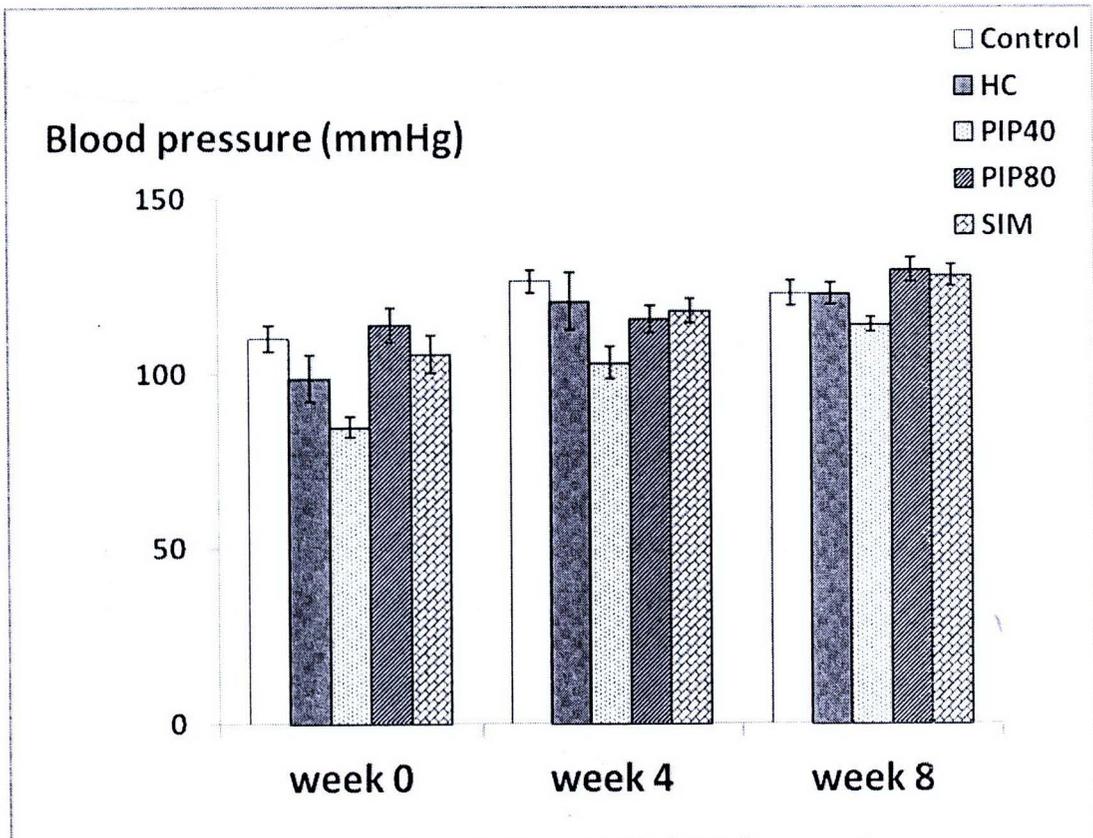
รูปที่ 1 ผลของการให้สารไพเพอรินขนาด 40mg/kg BW (PIP40) 80 mg/kg BW (PIP80) หรือยา Simvastatin 2 mg/kg BW (Sim) ในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ต่อการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัว (A) และ ปริมาณอาหารที่หนูกินต่อวัน (B) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง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

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

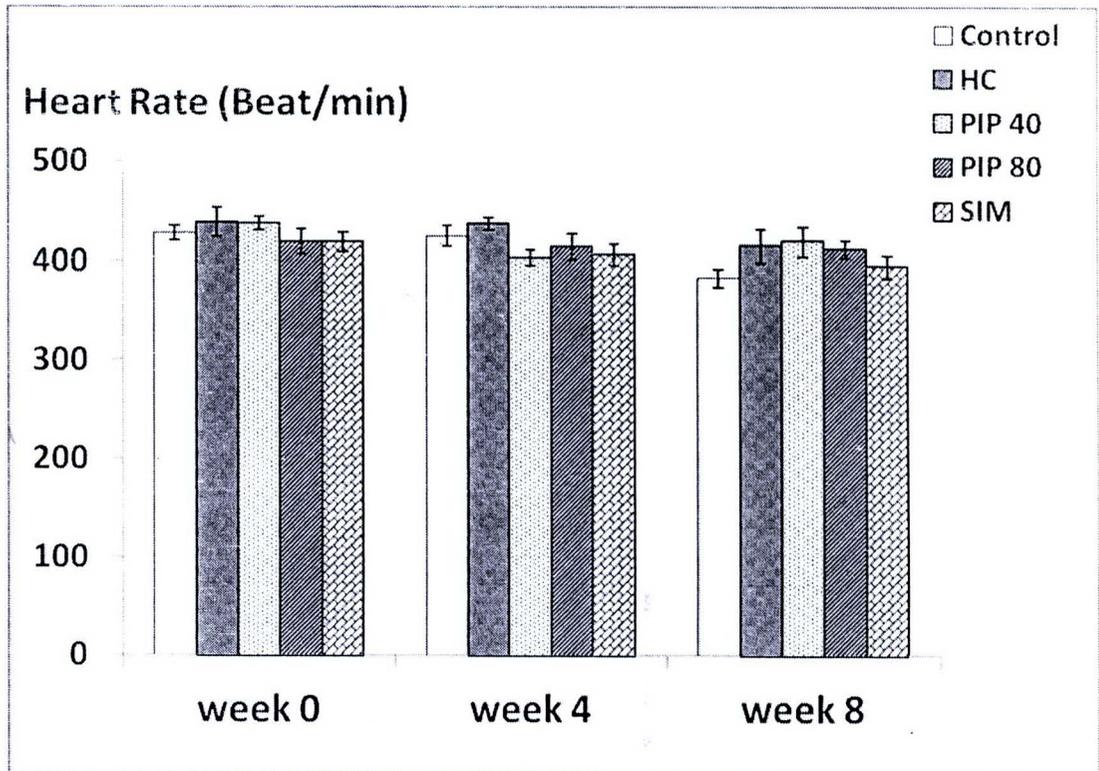
## 2. ผลของการให้สารไพเพอรินต่อค่าความดันโลหิต Systolic และอัตราการเต้นของหัวใจ

ผู้วิจัยได้ทำการวัดค่าความดันโลหิต systolic blood pressure (SBP) ของหนูในกลุ่ม control, HC, PIP40, PIP80 และ Sim เป็นช่วงเวลาดังนี้คือ 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



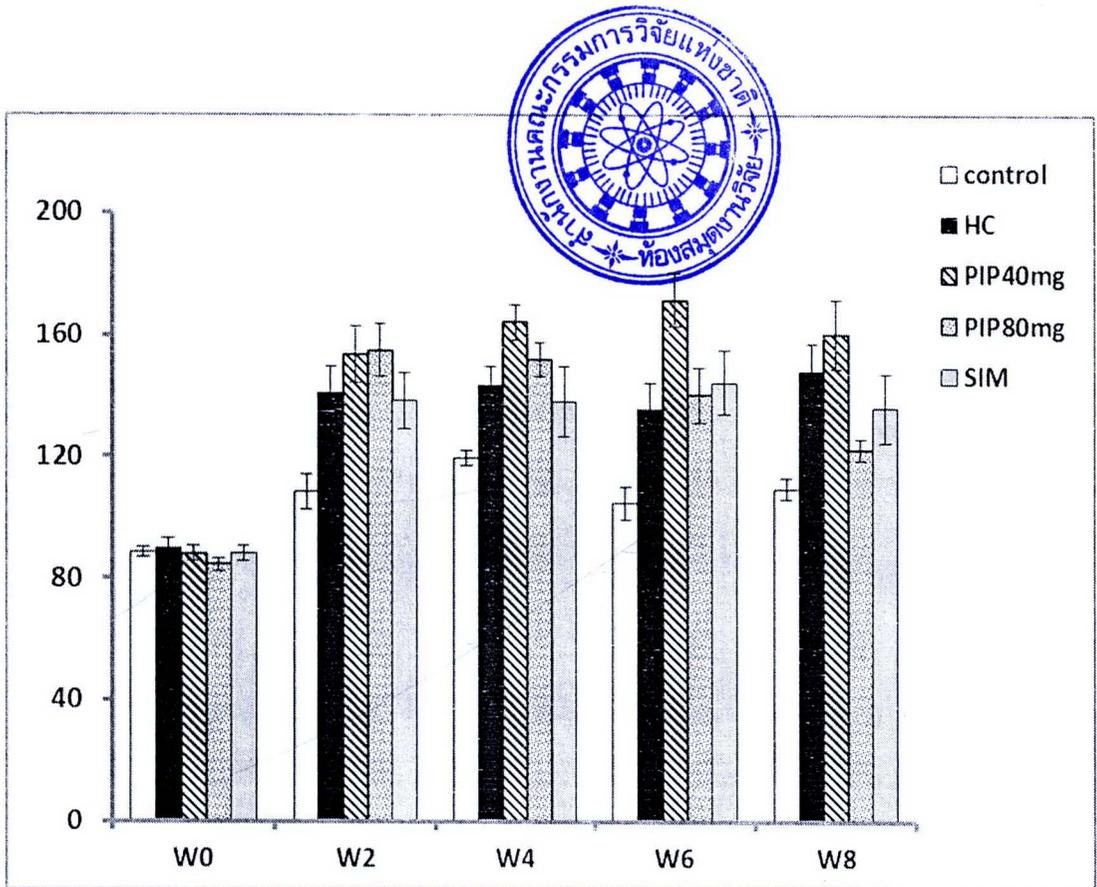
รูปที่ 2 ผลของการให้สารไฟเพอรินขนาด 40mg/kg BW (PIP40) 80 mg/kg BW (PIP80) หรือยา Simvastatin 2 mg/kg BW (Sim) ในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ ต่อค่าความดัน systolic blood pressure (A) และ อัตราการเต้นของหัวใจ (B) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง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

### 3. ผลของการให้สารไฟเพอรินต่อค่าชีวเคมีในเลือดในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง

#### 3.1 ผลของสารสกัดไฟเพอรินต่อระดับ total cholesterol

ภายหลังการทดลองผ่านไป 8 สัปดาห์ พบว่าการให้อาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงส่งผลให้ระดับระดับ total cholesterol ในหนูกลุ่ม HC เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ ; รูปที่ 3) และเมื่อเปรียบเทียบระดับ total cholesterol ระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดไฟเพอรินกับกลุ่ม HC พบว่าไฟเพอรินที่ขนาด 80 mg/kg และ Simvastatin 2 mg/kg มีผลลดระดับ total cholesterol ในกระแสเลือด (รูปที่ 3) ได้อย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 8 โดยมีระดับ total cholesterol ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

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



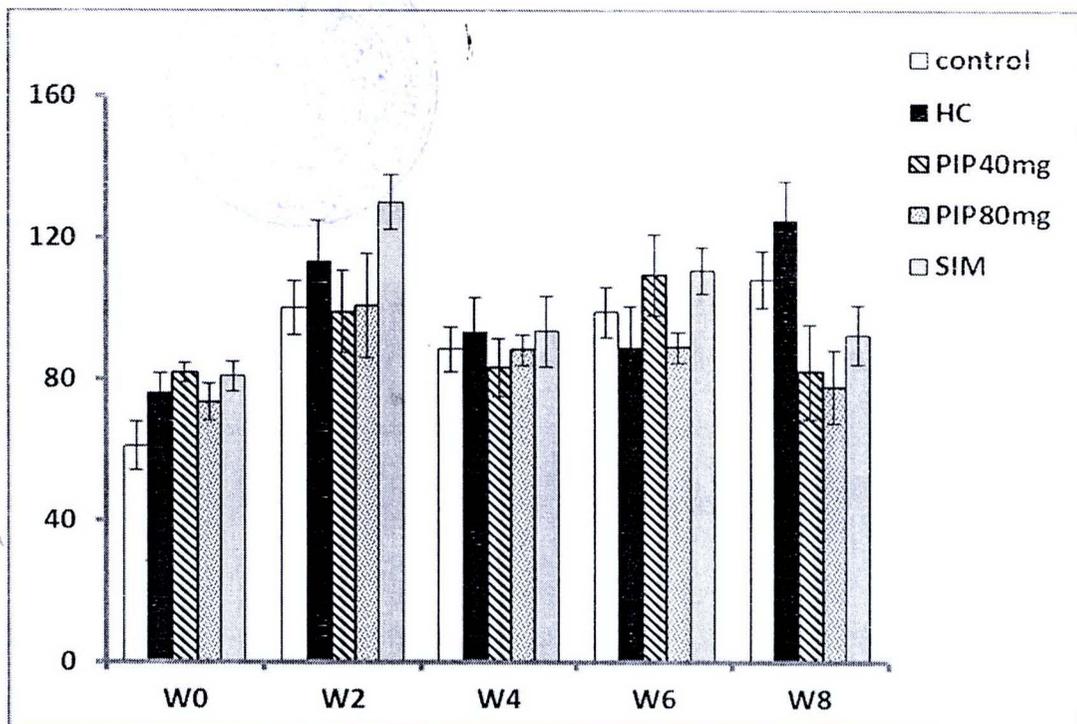
รูปที่ 3 ผลของการให้สารไฟเพอรินขนาด 40mg/kg BW (PIP40) 80 mg/kg BW (PIP80) หรือยา Simvastatin 2 mg/kg BW (Sim) ในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ ต่อระดับ total cholesterol ในกระแสเลือดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง (กลุ่ม HC) ค่าต่างๆ 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 ( $p < 0.05$ )

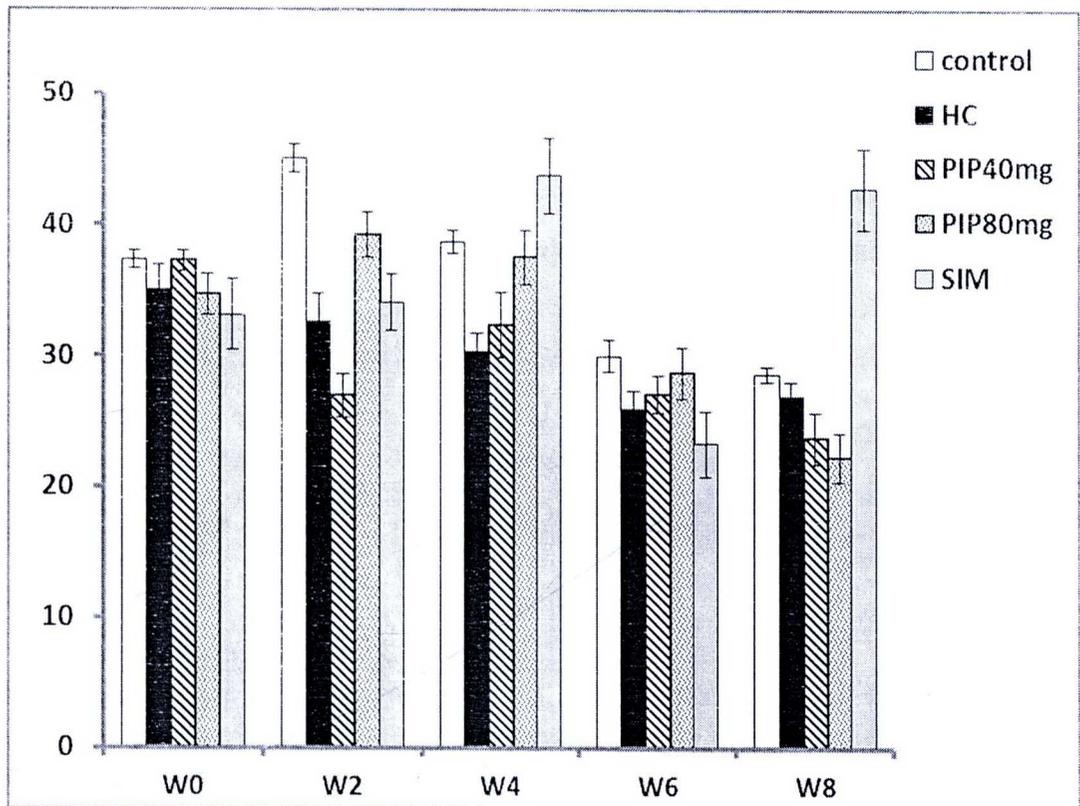


รูปที่ 4 ผลของการให้สารไฟเพอรินขนาด 40mg/kg BW (PIP40) 80 mg/kg BW (PIP80) หรือยา Simvastatin 2 mg/kg BW (Sim) ในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ ต่อระดับ triglyceride ในกระแสเลือดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง (กลุ่ม HC) ค่าต่าง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

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

### 3.3 ผลของสารสกัดไฟเพอรินต่อระดับ HDL

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

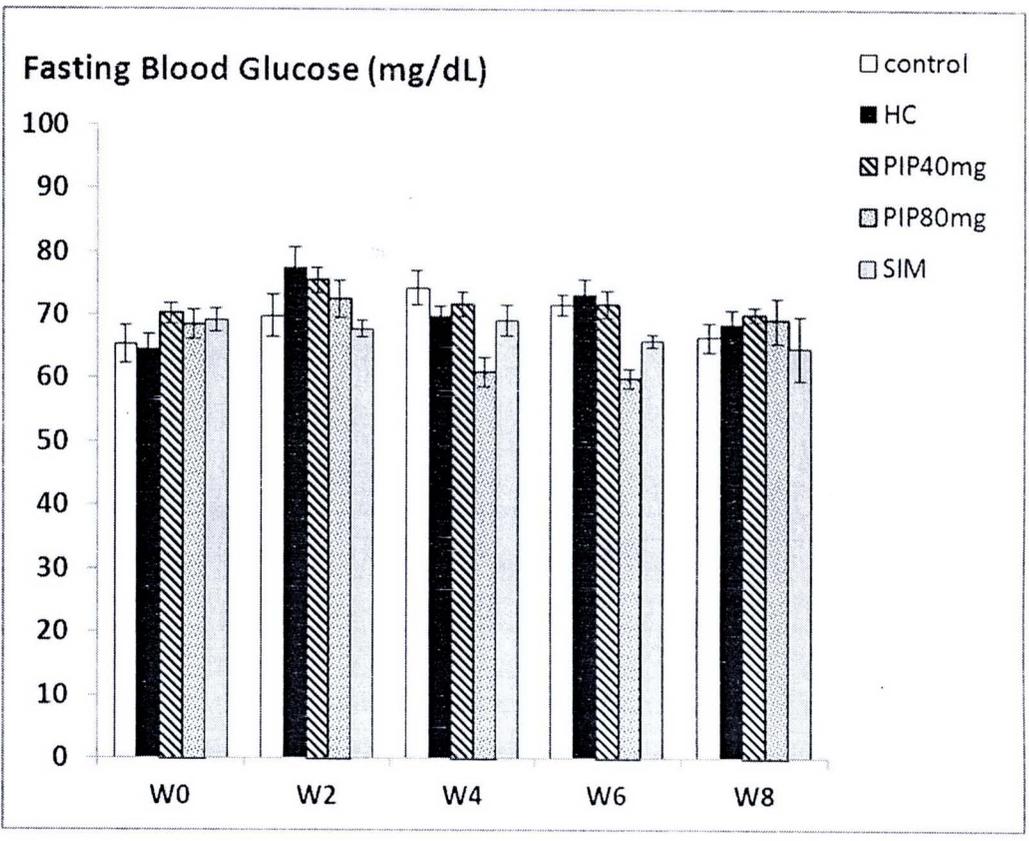


รูปที่ 5 ผลของการให้สารไฟเพอรินขนาด 40mg/kg BW (PIP40) 80 mg/kg BW (PIP80) หรือยา Simvastatin 2 mg/kg BW (Sim) ในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ ต่อระดับ HDL ในกระแสเลือดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง (กลุ่ม HC) ค่าต่าง ๆ คือ means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

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

3.4 ผลของสารสกัดไพเพอรินต่อระดับ fasting blood glucose

ภายหลังการทดลองผ่านไป 8 สัปดาห์ พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ Fasting blood glucose (รูป 6)

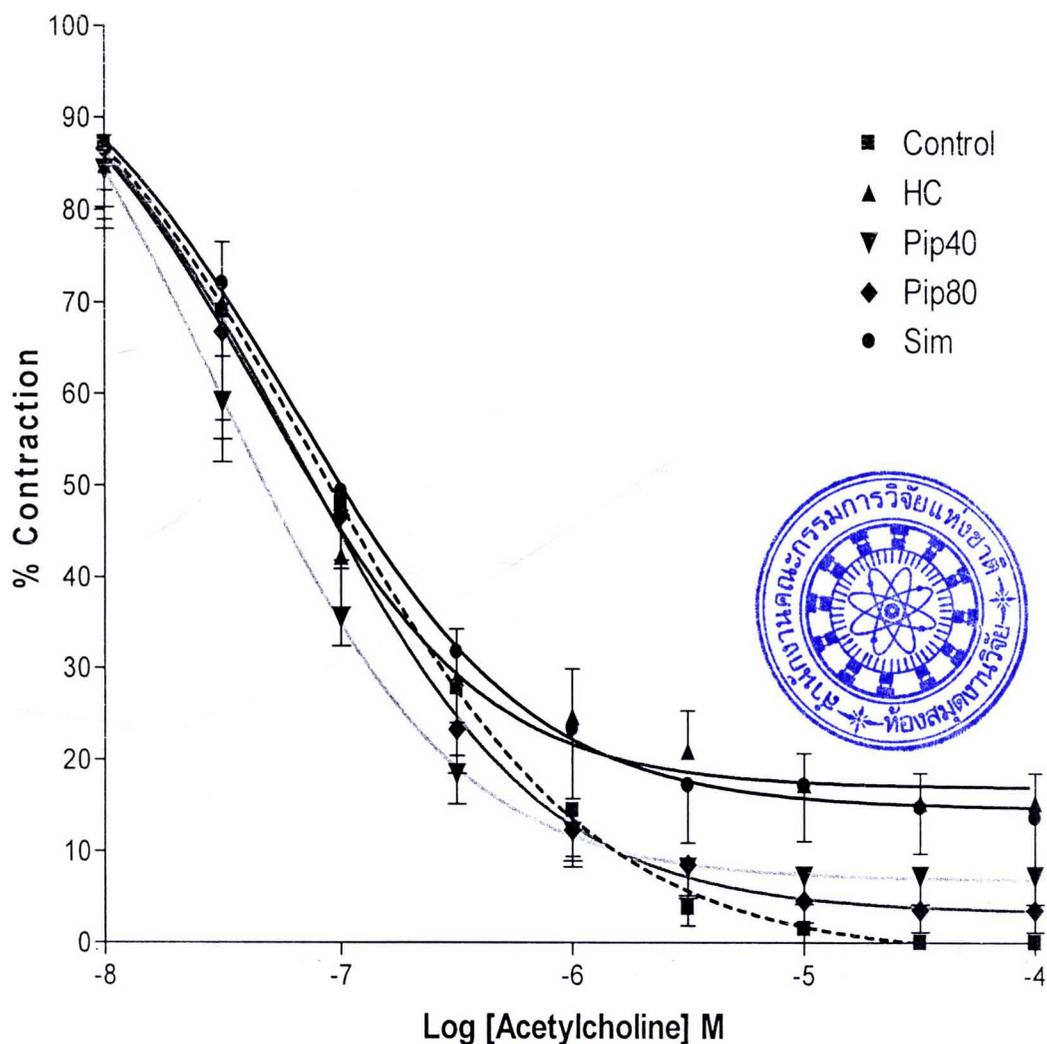


รูปที่ 6 ผลของการให้สารไพเพอรินขนาด 40mg/kg BW (PIP40) 80 mg/kg BW (PIP80) หรือยา Simvastatin 2 mg/kg BW (Sim) ในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ ต่อระดับ Fasting blood glucose ในกระแสเลือดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง (กลุ่ม HC)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

4. ผลของการให้สารสกัดไพเพอรินต่อการคลายตัวของหลอดเลือดเออร์ต้า

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

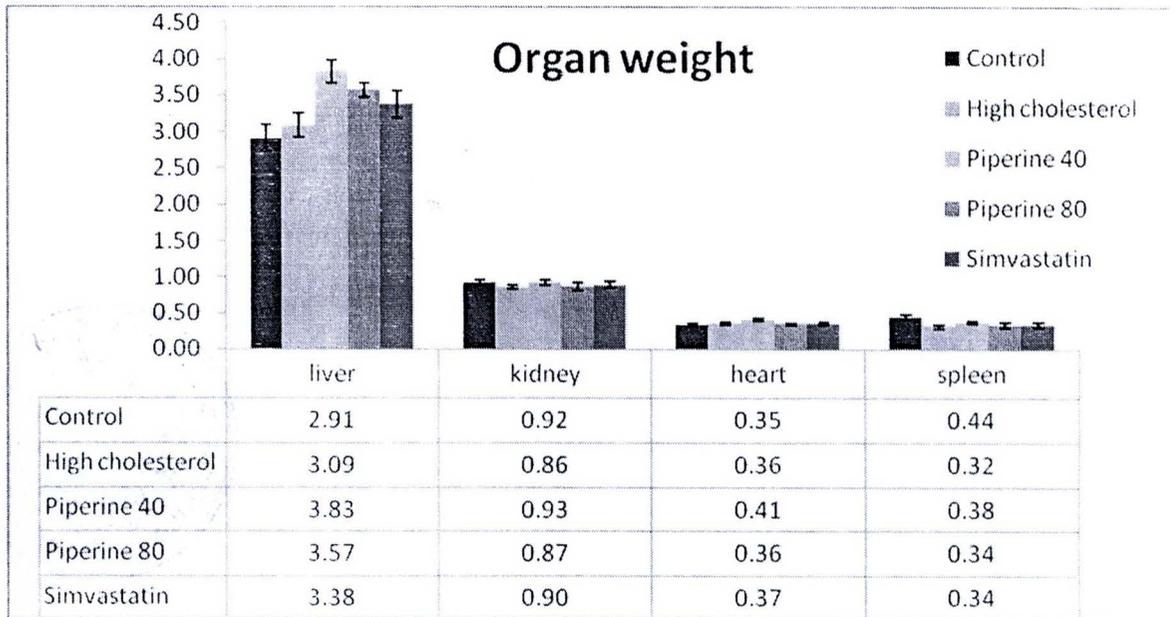
จากข้อมูลนี้บ่งชี้ว่าการให้อาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงแก่สัตว์ทดลองมีผลทำให้ความสามารถในการคลายตัวของหลอดเลือดเออร์ต้าลดลง และการให้สารสกัดไพเพอรินมีส่วนช่วยฟื้นฟูการทำงานของหลอดเลือดได้



รูปที่ 7 แสดงผลของการให้สารสกัดไฟเพอรินขนาด 40 mg/kg หรือ 80 mg/kg หรือ simvastatin 2mg/kg เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ต่อการทำงานของหลอดเลือดเออร์ตา 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: การวิเคราะห์ผลของสารไพเพอรีนต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในตับหนูที่มีภาวะไขมันในเลือดสูง

กราฟแสดงน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์

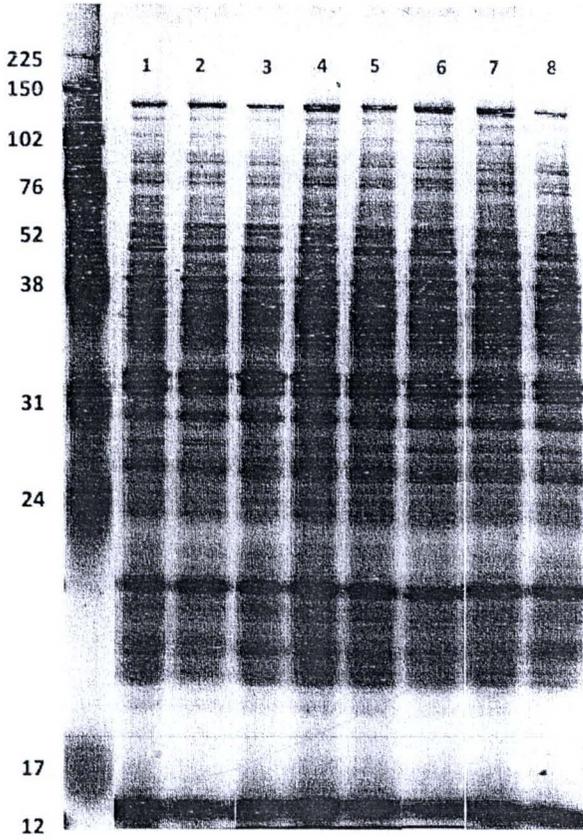


หมายเหตุ:

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

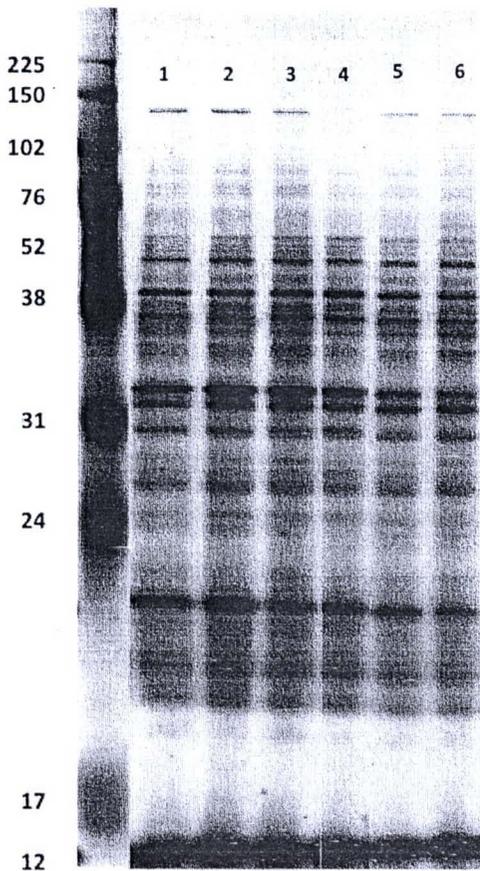
#### ผลการศึกษาแผนภูมิโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE

การศึกษาผลของสารไพเพอรีนต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในตับหนู ในหนูทดลอง Sprague Dawley เพศผู้ น้ำหนัก 200-210กรัม (n=6-8) ในกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารไพเพอรีนไกลคอล และกลุ่มที่ได้รับสารไพเพอรีน ในปริมาณ 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ จากนั้นวิเคราะห์โปรตีนในตับด้วยเทคนิค SDS-PAGE ผลที่ได้พบว่า แถบโปรตีนของตับทั้งในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารไพเพอรีน 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