

Executive summary

ในปัจจุบันสมุนไพรหลายชนิดถูกใช้เป็นทั้งยาและอาหาร เช่น พริกไทย และ ดีปลี เป็นสมุนไพรไทยที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในชีวิตประจำวันโดยใช้เป็นเครื่องเทศเพื่อปรุงรสอาหาร สารที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของพริกไทยและดีปลี คือ Piperine มีรายงานวิจัย พบว่าสาร piperine มีฤทธิ์ลดความดันเลือดในหนูขาวและขยายหลอดเลือดแดง aorta และ ยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือด coronary artery และยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งถ้า piperine มีศักยภาพในต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ขยายหลอดเลือด 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 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 ที่ ความเข้มข้น 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 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 เป็นเวลา 30 นาทีแล้ว หัวใจจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือดแบบ global ischemia โดยการหยุดการให้ สารละลาย เป็นเวลา 25 นาที ก่อน reperfusion โดยการปล่อยสารละลาย Krebs-Hensleit solution ให้กับ หัวใจเป็นเวลา 30 นาที ขณะที่กลุ่ม sham จะให้ ให้กับหัวใจเป็นเวลา 120 นาที นอกจากนี้ บางกลุ่มจะได้รับ สาร piperine 10^{-6} M หรือ vehicle (30% DMSO) โดยให้ผ่านทาง syringe pump ก่อน 15 นาทีและหลังชัก นำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด เป็นเวลา 30 นาที ระหว่างนี้จะบันทึกผลการทำงานของหัวใจ และเก็บของเหลว ที่หลังจากหัวใจที่ช่วงเวลาต่างๆ 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 โดยส่วนหนึ่งออกฤทธิ์ผ่านทาง การเปิดของ K_{ATP} channel และกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับ NO pathway