

## บทนำ

จากผลการรายงานของ The World Health Organization ในปี 2004, โรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (coronary artery disease) จัดว่าเป็นอันดับหนึ่งของโรคที่คร่าชีวิตมนุษย์ทั่วโลก (1). โดยประชากรทั่วโลกที่เสียชีวิตด้วยโรคนี้นี้ 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 ผู้ป่วยบางรายจึงมีโอกาสเสียชีวิตแบบเฉียบพลัน ขณะที่บางรายก็กลายเป็นโรคเรื้อรัง (3-6)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงให้ความสำคัญกับวิธีการที่จะช่วยลดหรือป้องกันการขาดเลือดของกล้ามเนื้อหัวใจ เพื่อป้องกันการตายของกล้ามเนื้อหัวใจ ที่อาจนำไปสู่ภาวะหัวใจวายได้ ในปัจจุบันสมุนไพรหลายชนิดถูกใช้ทั้งยาและอาหาร 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 อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการศึกษาใดที่ศึกษาฤทธิ์การป้องกันภาวะหัวใจขาดเลือดของ piperine มาก่อน ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาแรกที่ศึกษาผลของ piperine ต่อการทำงานของหัวใจและการฟื้นฟูการทำงานของหัวใจหลังจากถูกชักนำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด แบบ *in vitro* และกลไกที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งการศึกษานี้ยังศึกษาผลของ 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 มหาวิทยาลัยมหิดล นำมาเลี้ยงที่ห้องควบคุมแสง light-dark cycle เท่ากับ 12:12 ชั่วโมง ที่ อุณหภูมิ  $24 \pm 1$  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

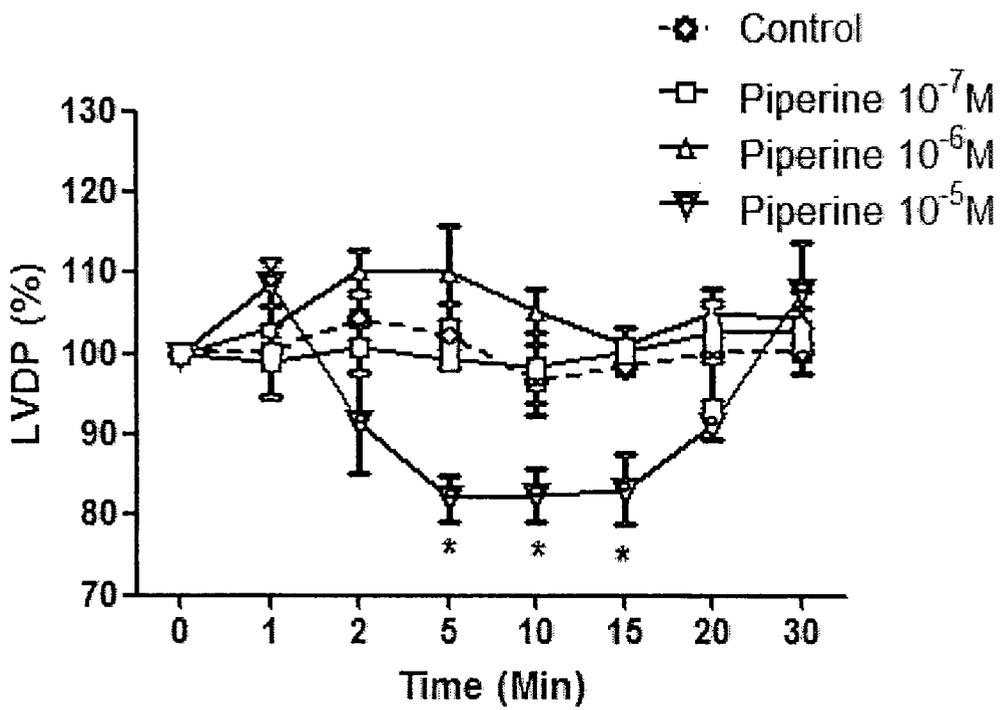
พบว่า สาร piperine ที่ความเข้มข้น  $10^{-7}$  M และ  $10^{-6}$  M ไม่มีผลต่อ left ventricular developed pressure และอัตราการเต้นของหัวใจเมื่อเทียบกับกลุ่ม control (30% DMSO) ขณะที่ สาร piperine ที่ความเข้มข้น  $10^{-5}$  M มีผลลด left ventricular developed pressure ที่เวลาที่ 5, 10 และ 15 และลดอัตราการเต้นของหัวใจ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

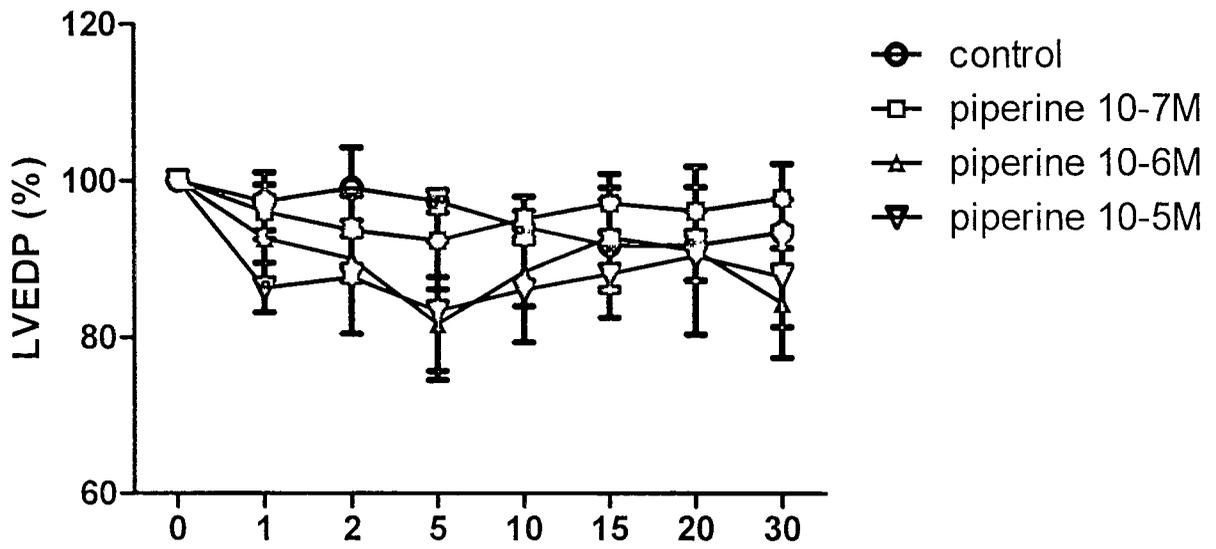


ภาพที่ 1 แสดงผลของ สาร piperine ที่ความเข้มข้น  $10^{-7}$  ,  $10^{-6}$  และ  $10^{-5}$  M ต่อ left ventricular developed pressure ที่เวลาต่างๆ โดยแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของ pretreatment; \* $P < 0.05$  เมื่อเทียบกับ กลุ่ม control ที่ช่วงเวลาเดียวกัน

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

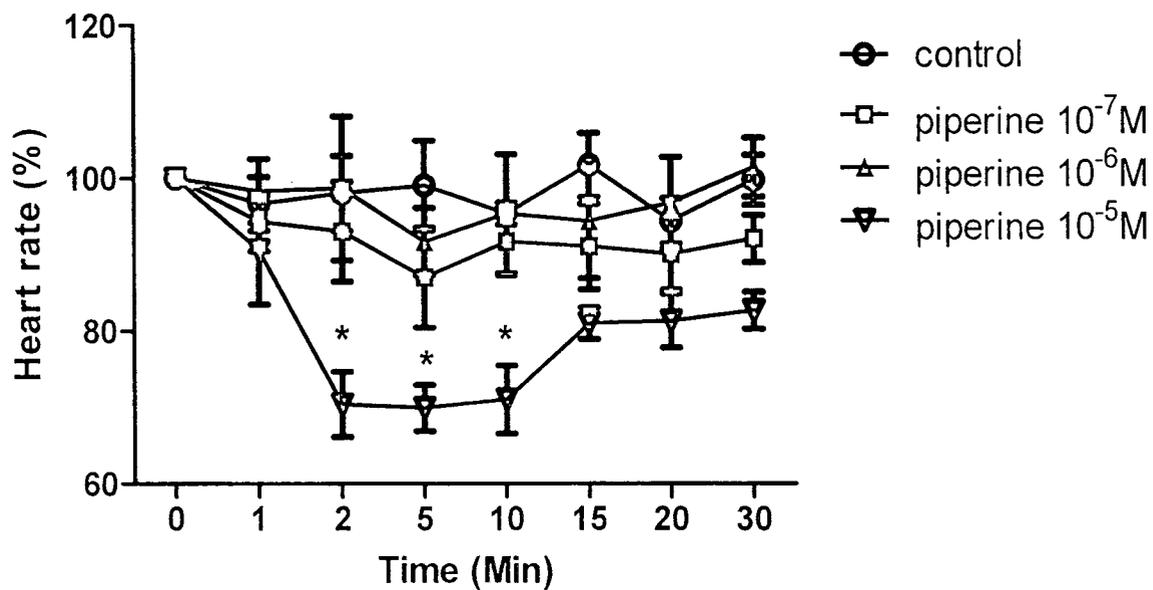


ภาพที่ 2 แสดงผลของ สาร piperine ที่ความเข้มข้น  $10^{-7}$  ,  $10^{-6}$  และ  $10^{-5}$  M ต่อ left ventricular end diastolic pressure ที่เวลาต่างๆ โดยแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของ pretreatment

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

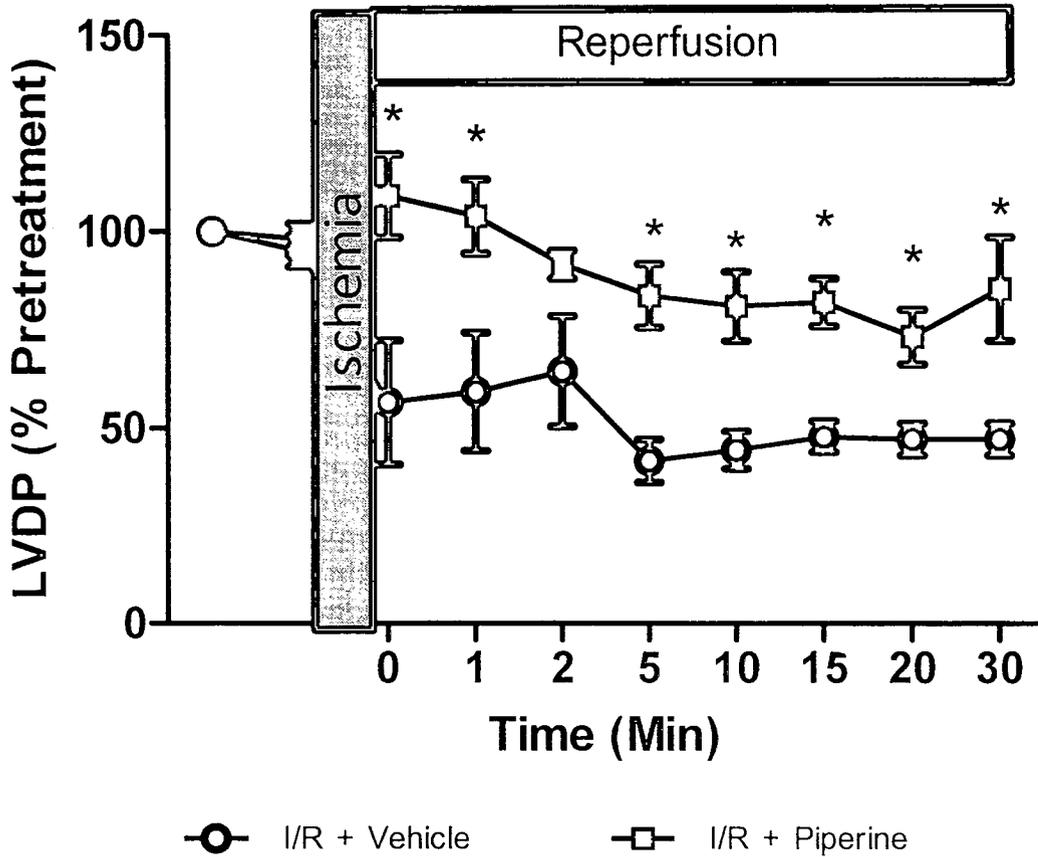
พบว่า หลังจากชักนำให้เกิดภาวะขาดเลือด โดยการหยุดการให้สารละลายกับหัวใจในกลุ่ม I/R เป็นเวลา 25 นาทีพบว่า ค่า left ventricular developed pressure (LVDP), the maximum rate of left ventricular (LV) pressure rise ( $dP/dt_{max}$ ) และ the maximum rate of LV pressure decline ( $dP/dt_{min}$ ) มีค่าลดลง แต่เมื่อให้สาร 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 ± 10 *
R-1	59 ± 15	104 ± 9 *
R-2	64 ± 14	92 ± 3
R-5	42 ± 5	84 ± 8*
R-10	44 ± 5	81 ± 8*
R-15	48 ± 4	82 ± 6*
R-20	47 ± 4	73 ± 7*
R-30	47 ± 5	85 ± 13*

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

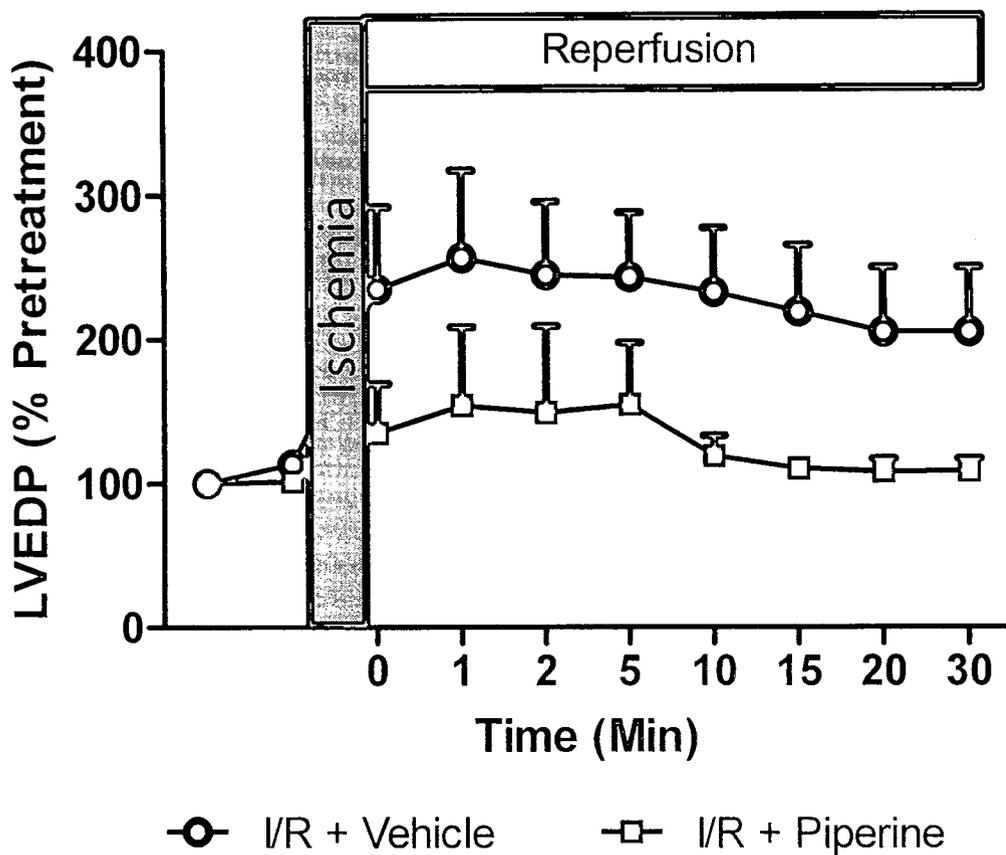


ภาพที่ 4 แสดงผลของสาร piperine  $10^{-6}$  M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ left ventricular developed pressure (LVDP) ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที (control) หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที (R-time); \* $P < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม I/R + Vehicle ที่ช่วงเวลาเดียวกัน

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±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

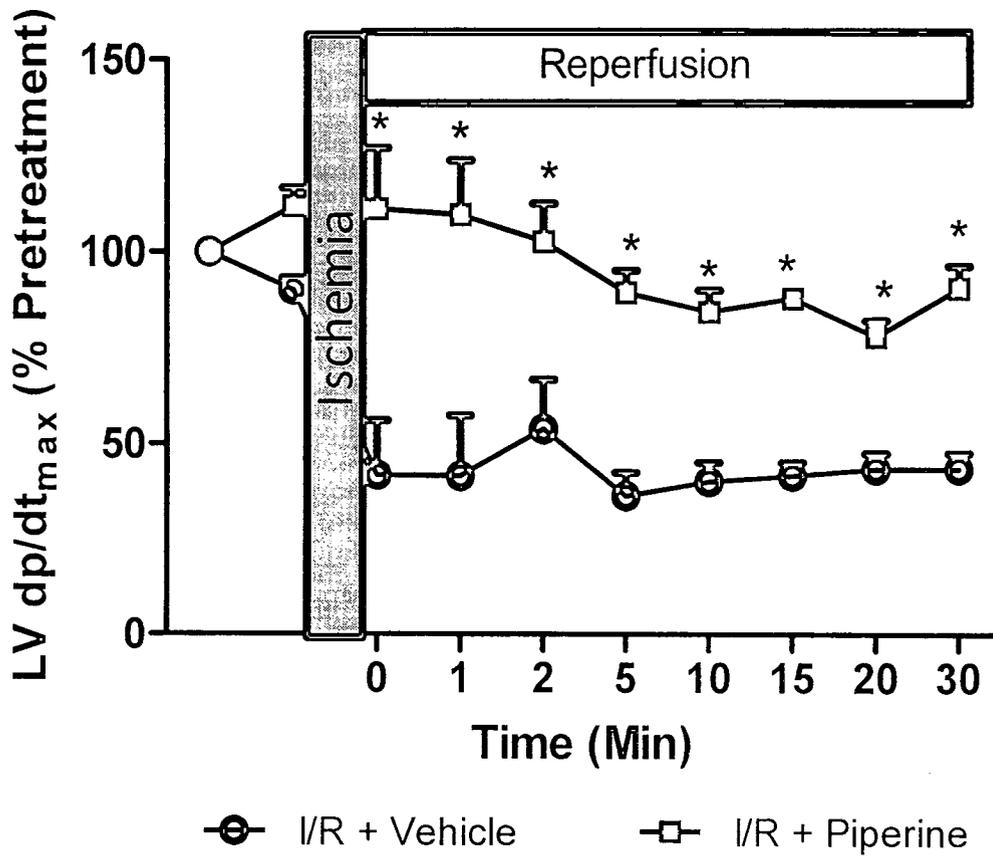


ภาพที่ 5 แสดงผลของสาร piperine  $10^{-6}$  M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ left ventricular end diastolic pressure (LVEDP) ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที

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 ± 16*
R-1	42 ± 16	110 ± 14*
R-2	54 ± 13	103 ± 10*
R-5	36 ± 6	89 ± 6*
R-10	40 ± 5	84 ± 6*
R-15	42 ± 3	88 ± 1*
R-20	43 ± 4	78 ± 4*
R-30	43 ± 4	90 ± 6*

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

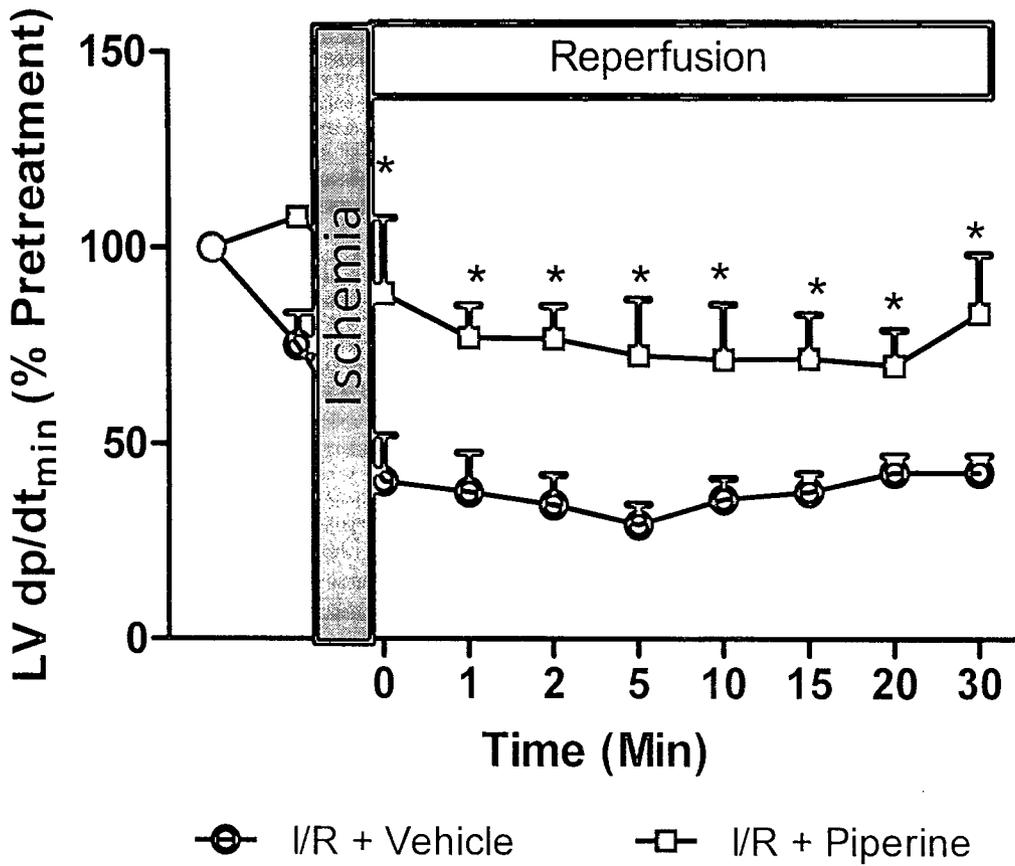


ภาพที่ 6 แสดงผลของสาร piperine  $10^{-6}$  M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ the maximum rate of left ventricular (LV) pressure rise (dP/dt<sub>max</sub>) ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที; \*P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม I/R + Vehicle ที่ช่วงเวลาเดียวกัน

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	$40 \pm 14$	$88 \pm 16^*$
R-1	$38 \pm 16$	$77 \pm 14^*$
R-2	$34 \pm 13$	$77 \pm 10^*$
R-5	$29 \pm 6$	$73 \pm 6^*$
R-10	$36 \pm 5$	$72 \pm 6^*$
R-15	$38 \pm 3$	$72 \pm 1^*$
R-20	$43 \pm 4$	$70 \pm 4^*$
R-30	$43 \pm 5$	$83 \pm 6^*$

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

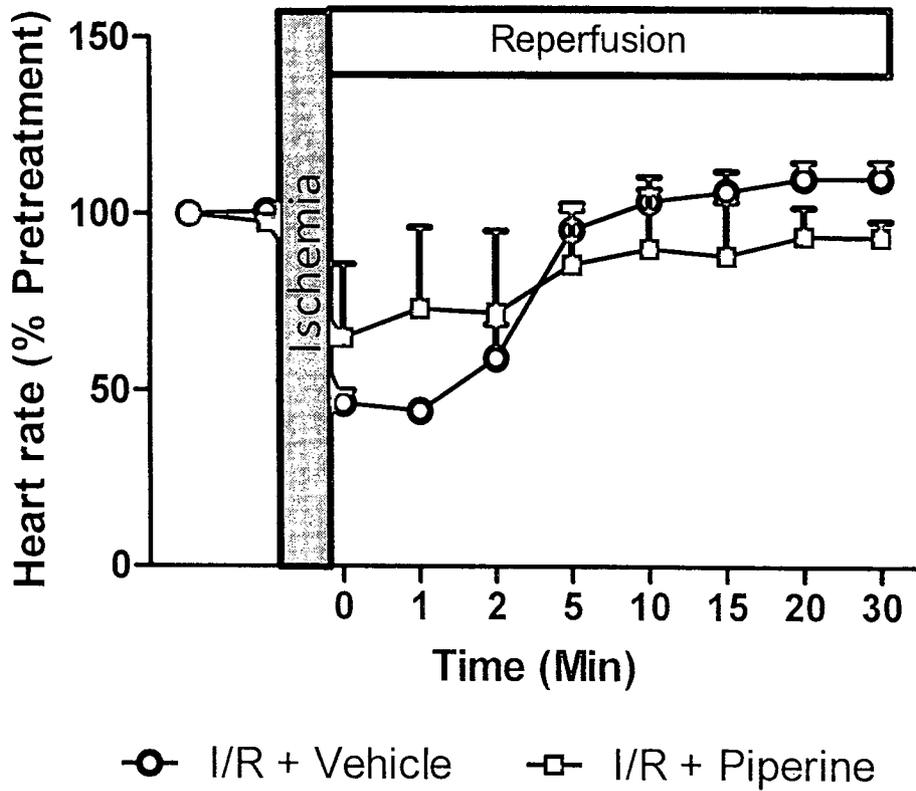


ภาพที่ 7 แสดงผลของสาร piperine  $10^{-6}$  M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ the maximum rate of LV pressure decline (dP/dt<sub>min</sub>)ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที ; \*P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม I/R + Vehicle ที่ช่วงเวลาเดียวกัน

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±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน;

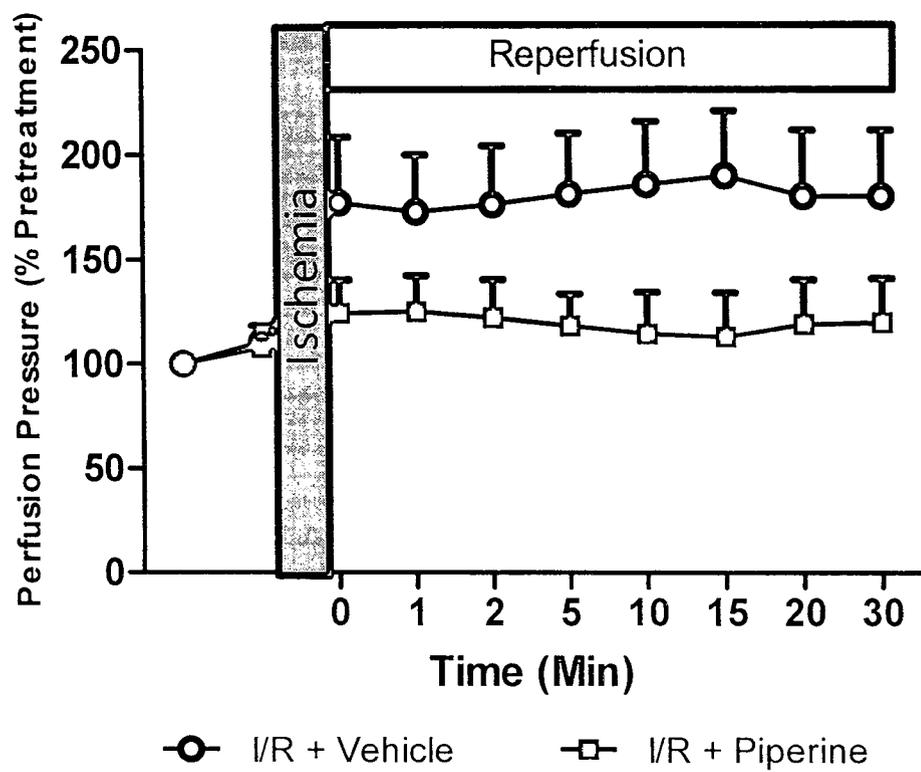


ภาพที่ 8 แสดงผลของสาร piperine  $10^{-6}$  M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อ อัตราการเต้นของหัวใจ (heart rate) ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที

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±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 จากการศึกษาพบว่าหลังจากชักนำให้เกิดภาวะ global ischemia ระดับ LDH ใน perfusate fluid ของกลุ่ม I/R + vehicle จะเพิ่มขึ้น  $99.9 \pm 9.4$  units/L ขณะที่ระดับ LDH ใน perfusate fluid ของกลุ่ม I/R + piperine  $47.5 \pm 3$  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  $19.4 \pm 2$  และ  $7.7 \pm 1$  units/L ตามลำดับ (ตารางที่ 10 และ ภาพที่ 10)

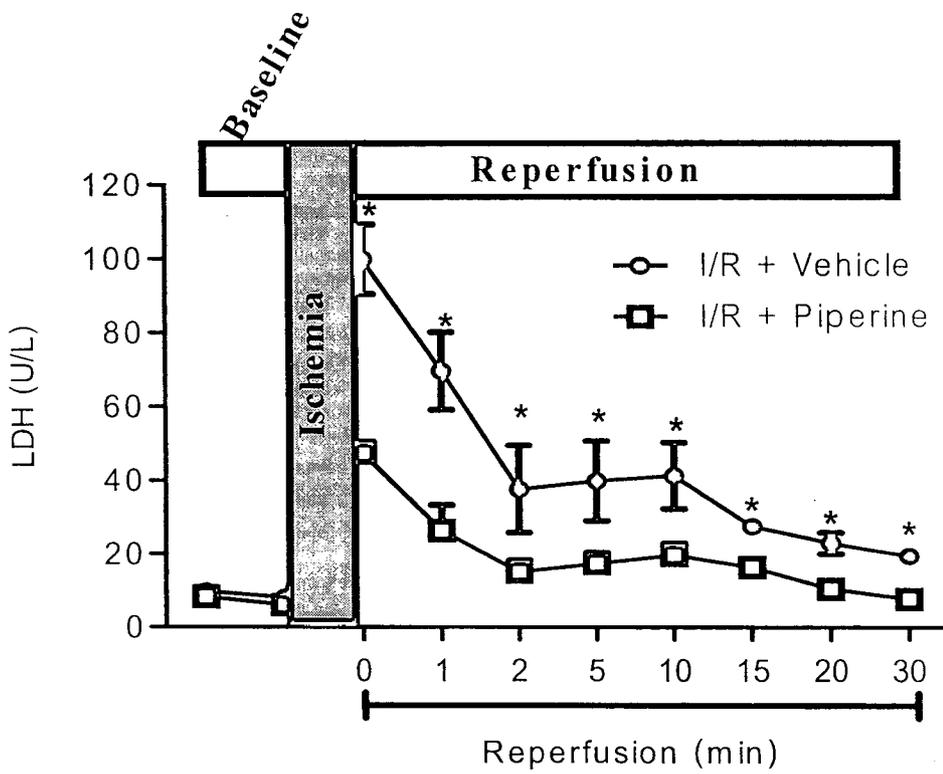
### 4. ฤทธิ์ต่อ CK activity

การวัดปริมาณ CK จะเป็นอีกหนึ่งตัวบ่งชี้ถึงภาวะ myocardial injury จากการศึกษาพบว่าหลังจากชักนำให้เกิดภาวะ global ischemia ตั้งแต่นาทีที่ 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;

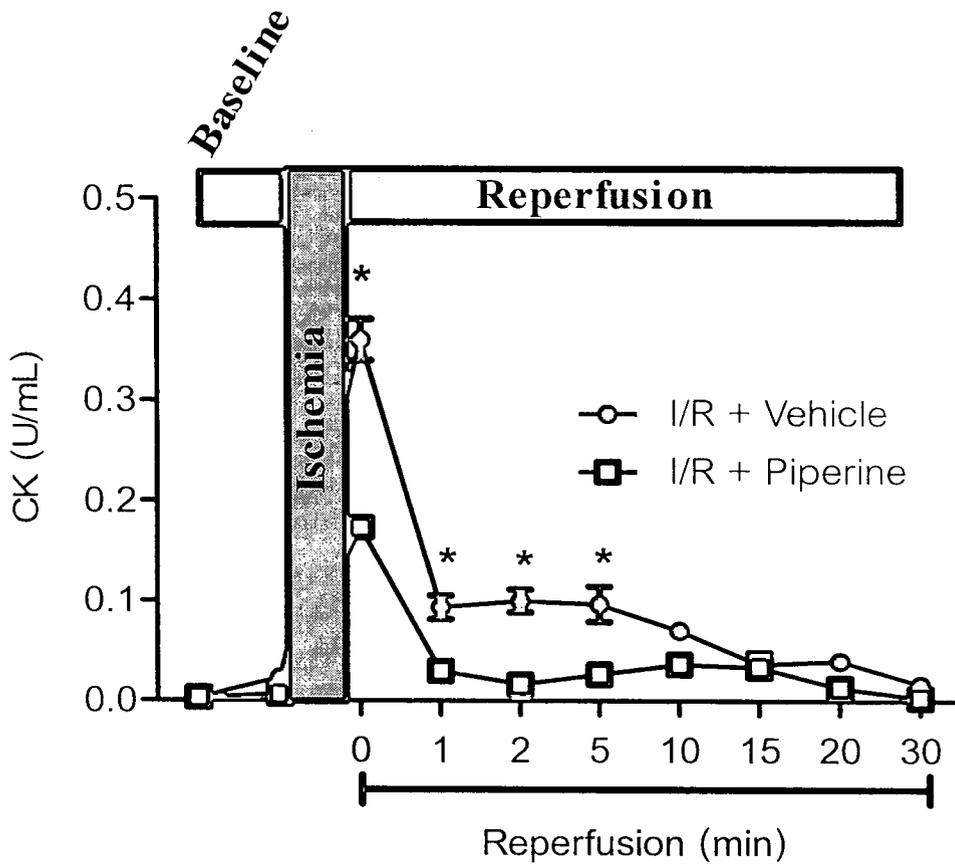


ภาพที่ 10 แสดงผลของสาร piperine  $10^{-6}$  M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อระดับ LDH (unit/L) ใน perfusate fluid ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที; \* $P < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม I/R + Vehicle ที่ช่วงเวลาเดียวกัน

ตารางที่ 11 แสดงผลของสาร piperine  $10^{-6}$  M หรือ vehicle (30% DMSO) ต่อระดับ CK (unit/mL) ใน perfusate fluid ของกลุ่ม I/R เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด 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

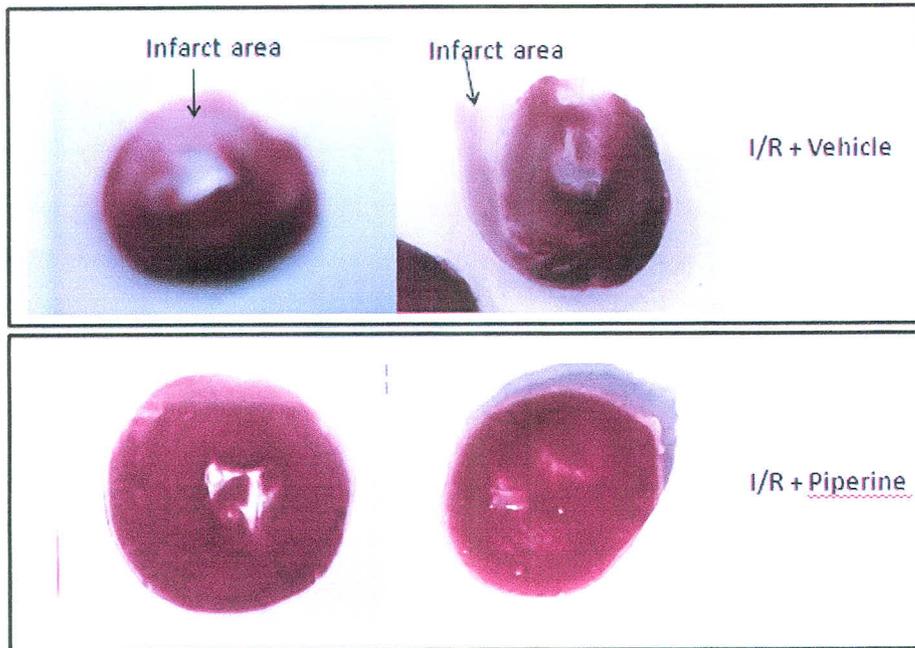
## 5. ฤทธิ์ต่อการตายของกล้ามเนื้อหัวใจ

บริเวณที่มีการตายของเซลล์จะถูกย้อมสีด้วย 1% TTC 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±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



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

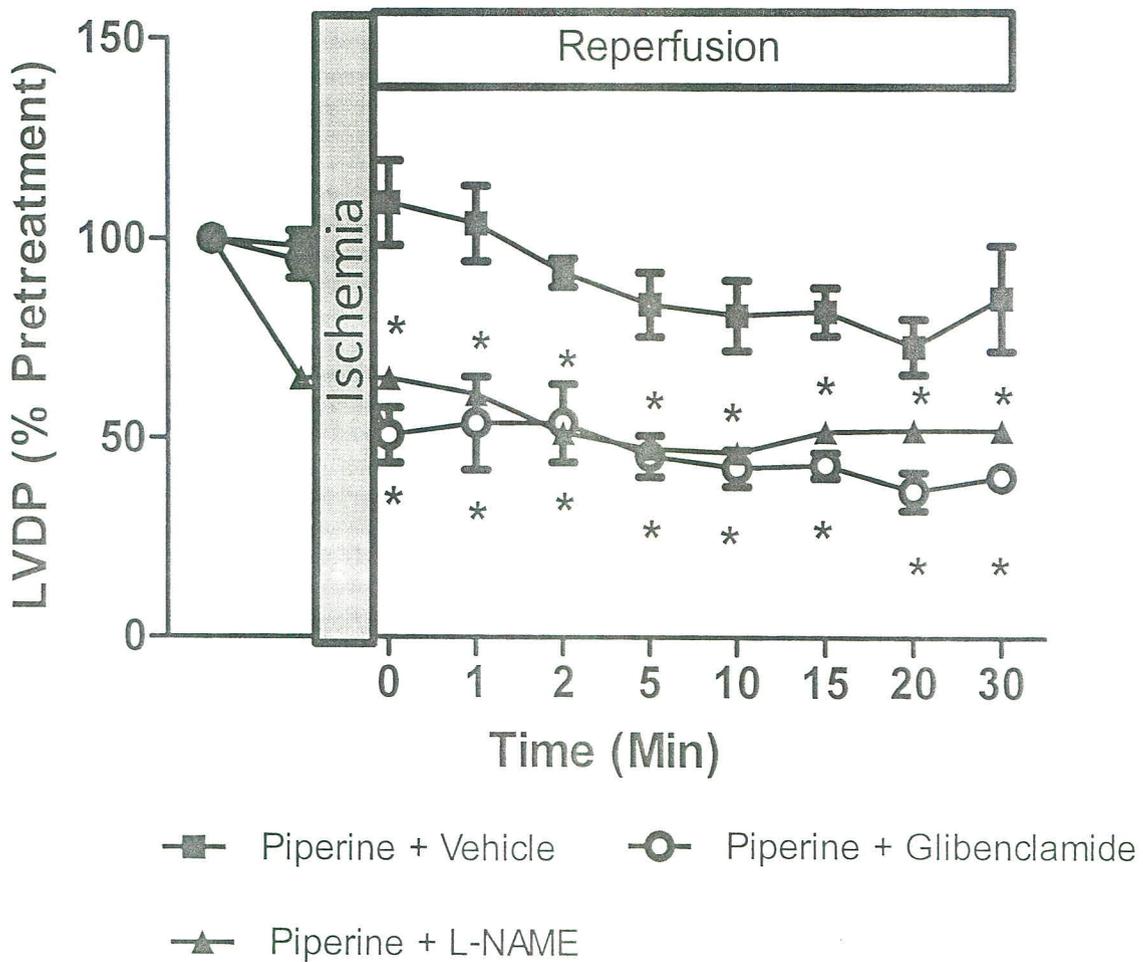
## 6. กลไกการออกฤทธิ์ของ piperine ในการป้องกันการขาดเลือดของกล้ามเนื้อหัวใจ

การให้สาร Glibenclamide ซึ่งเป็น  $K_{ATP}$  channel blocker และ L-NAME ซึ่งเป็น NOS inhibitor สามารถลดผลการฟื้นฟูหัวใจของสาร piperine ได้ โดยลด LVDP ตั้งแต่วันที่ 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;

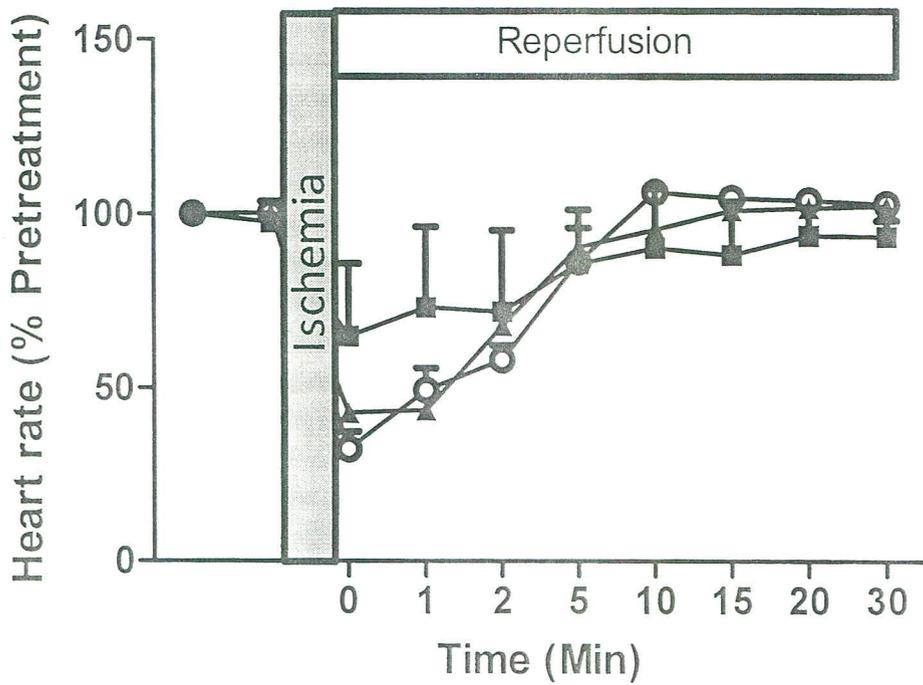


ภาพที่ 13 แสดงผลของสาร Vehicle, L-NAME ( $10^{-6}$  M) หรือ Glibenclamide ( $10^{-6}$  M) เมื่อให้ร่วมกับสาร piperine  $10^{-6}$  M ต่อ Left ventricular developed pressure (mmHg) เมื่อให้ก่อนชักนำให้เกิด ischemia 15 นาที หรือ หลัง ischemia เป็นเวลา 30 นาที ; \* $P < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม I/R + Vehicle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



- Piperine + Vehicle      ○ Piperine + Glibenclamide
- ▲ Piperine + L-NAME

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  $\mu\text{M}$  จะส่งผลลดแรงบีบตัวของหัวใจและอัตราการเต้นของหัวใจ ซึ่งผลนี้จะคล้ายคลึงกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่พบว่าสาร piperine สามารถลดแรงบีบตัวของหัวใจและทำให้หลอดเลือดหัวใจคลายตัวในหนูขาว ซึ่งเป็นผลจากการยับยั้ง  $\text{Ca}^{2+}$  Channel (7) มีรายงานวิจัย กล่าวว่า การเพิ่มขึ้นของแคลเซียมไอออนภายในเซลล์มากจนเกินปกติและการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด 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 ส่งผลให้ออกซิเจนที่มาทางกระแสเลือดทำปฏิกิริยากับ 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  $\mu\text{M}$  สามารถฟื้นฟูการทำงานของหัวใจที่ผิดปกติของหัวใจ 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 ส่วนหนึ่ง อาจผ่านทาง การเปิดของ  $K_{ATP}$  channel และกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับ NO pathway

### สรุปผลการทดลอง

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