Thesis Title Inhibitory Effect of Turmeric Curcuminoids on *in vitro* Oxidation of LDL

Author Mr. Ronnarong Kaewprasert

Degree Master of Science (Medical Technology)

Thesis Advisory Committee Associate Professor Nantaya Chanarat Chairperson

Mr.Prasit Chanarat Member

ABSTRACT

Background: The oxidative modification of LDL is one of crucial roles in the initiation of atherosclerosis. Diabetes is associated with an increased risk of atherosclerosis, which may be due in part to an increasing rate of low density lipoprotein modification. Antioxidant vitamins. herbs and other natural products from foods may protect LDL from oxidation. and high antioxidants intake should reduce risk of cardiovascular disease. Few data are available on the importance of antioxidant herbs in earlier stages of atherogenesis.

Objectives: To investigate *in vitro* the inhibitory effect of curcuminoids on oxidative modification of LDL promoted by copper ions in healthy with normolipidemic compared to diabetic with hyperlipidemic groups and to study the inhibitory effect of curcuminoids on oxidative modification of LDL compare to α-tocopherol and ascorbic acid.

Material and Method: LDL were isolated from ten healthy with normolipidemic and ten diabetics with hyperlipidemia persons by single vertical discontinuous density ultracentrifugation. Proteins in LDL was determined by Lowry method. Two hundred μg protein/mL LDL was oxidized by 20 μM $CuSO_4$ in the absence or presence of 30 μg/mL curcuminoids, α-tocopherol, or ascorbic acid. The extent of LDL oxidation was monitored kinetically of conjugated dienes formation at 234 nm and the formation of MDA by thiobarbituric acid reactive substances

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(TBARs). The cellular uptake of LDL by U937 cell line were also studied for the inhibition of LDL oxidation.

Results: The cellular LDL uptake in healthy group were significantly higher than diabetic group (85.6±1.71 *vs* 76.5±2.17 %, $P<0.05$) and significantly lower MDA concentration (4.2±0.63 *vs* 6.70±0.94 μM, $P<0.05$). The lag time of Cu^{2+}-induced LDL oxidation in healthy group were significantly longer than diabetic group (55.5±2.79 *vs* 47.8±2.29 minutes, $P<0.05$) and significantly lower MDA concentration (16.2±1.13 *vs* 19.0±0.81 μM, $P<0.05$). In the presence of curcuminoids, the U937 LDL uptake of Cu^{2+}-induced LDL oxidation were significantly lower than in the absence of antioxidant in healthy and diabetic groups (71.9±0.99 *vs* 5.1±0.73 % and 65.8±1.39 *vs* 4.00±0.81 %, respectively, $P<0.05$), significantly longer lag times (91.2±1.39 *vs* 55.5±2.79 minutes and 81.8±1.39, *vs* 47.8±2.29 minutes, respectively, $P<0.05$), and significantly lower MDA concentrations (6.9±0.73 *vs* 16.2±1.13 μM and 11.1±0.87 *vs* 19.0±0.81 μM, respectively, $P<0.05$) were also found. The curcuminoids affected on Cu^{2-}-induced LDL oxidation by lowing of U937 LDL uptake compared to α-tocopherol in healthy and diabetic groups (71.9±0.99 *vs* 76.0±2.0 % and 65.8±1.39 *vs* 70.2±1.54 % , respectively, $P<0.05$), significantly reducing the lag times (91.2±1.39 *vs* 95.0±1.82 minutes and 81.8±1.39 *vs* 84.8± 2.25 minutes , respectively, $P<0.05$) and significantly increased MDA concentrations (6.9±0.73 *vs* 6.0±0.81 μM and 11.1±0.87 *vs* 10.0±0.94 μM, respectively, $P<0.05$). The effect of curcuminoids on Cu^{2-}-induced LDL oxidation were no significantly different to ascorbic acid. In the presence of curcuminoids on ox-LDL were no significant different of U937 LDL uptake from in the absence of curcuminoids in both groups (6.2±0.0.63 *vs* 5.1±0.73 and 5.6±0.68 *vs* 4.6±0.81, respectively, $P<0.05$).

Conclusion: The LDL in diabetic with hyperlipidemic group is more susceptible to oxidation than in healthy with normolipidemic group. Curcuminoids can inhibit Cu^{2-}-induced oxidation of LDL in healthy group more than in diabetic groups. Curcuminoids can inhibit Cu^{2-}-induced oxidation of LDL *in vitro* as well as ascorbic acid, and has slightly lower effect than α-tocopherol. Curcuminoids, α-tocopherol and ascorbic acid could not reverse ox-LDL to be native LDL.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ผลยับยั้งของเคอร์คิวมินอยด์จากขมิ้นชันต่อการเกิดออกซิเดชันของไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำในหลอดทดลอง
ชื่อผู้เขียน	นายรณรงค์ แก้วประเสริฐ
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.นันทยา ชนะรัตน์	ประธานกรรมการ
	อ.ประสิทธิ์ ชนะรัตน์	กรรมการ

บทคัดย่อ

บทนำ: การเกิดออกซิเดชันของ LDL ในร่างกายเป็นสาเหตุเริ่มต้นที่สำคัญในกระบวนการเกิดภาวะหลอด เลือดแดงแข็ง และพบว่าในผู้ป่วยเบาหวานมีปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งสูง เนื่องจากมีอัตราการเกิดออกซิเดชันของ LDL มากกว่าคนปกติ จากการศึกษาพบว่าสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้แก่ วิตามินอี วิตามินซี สมุนไพร และสารอาหารต่างๆ สามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันของ LDL ได้ สารเหล่านี้จึงมีคุณสมบัติในการช่วยลดการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งได้

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาผลของสารเคอร์คูมินอยด์ซึ่งพบอยู่ในขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ต่อการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของ LDL ในผู้ป่วยเบาหวานเปรียบเทียบกับคนปกติ และเพื่อศึกษาผลของสาร เคอร์คิวมินอยด์เปรียบเทียบกับ วิตามินอี และวิตามินซี

การทดลอง: แยก LDL จากผู้ป่วยเบาหวานที่มีไขมันสูงและจากคนปกติ กลุ่มละ 10 คน โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ตรวจหาปริมาณโปรตีนจาก LDL โดยวิธี Lowry's method เตรียม ox-LDL โดยใช้ LDL ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร ผสมกับ $CuSO_4$ ความเข้มข้น 20 ไมโครโมล ที่อุณหภูมิ 37°C โดยมี และไม่มีเคอร์คิวมินอยด์ หรือ วิตามินอี หรือ วิตามินซี ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร วัดหาการเกิด ox-LDL โดยวัดการเกิด conjugated dienes ที่ 234 นาโนเมตร, วัดการเกิด MDA โดยหา Thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) และศึกษาการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของ LDL โดยดูเปอร์เซนต์ของเซลล์ U937 ที่มีการนำ LDL เข้าไปในเซลล์

ผลการทดลอง : การเปรียบเทียบ LDL ที่แยกจากคนปกติกับ LDL ของผู้ป่วยเบาหวาน พบว่าในคนปกติมีจำนวนร้อยละของเซลล์ U937 ที่มีการนำ LDL เข้าไปในเซลล์สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (85.6±1.71 ต่อ 76.5±2.17 %, P<0.05) และค่าปริมาณของ MDA ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (4.2±0.63 ต่อ 6.70±0.94 ไมโครโมล/ลิตร, P<0.05) การเปรียบเทียบการเกิดออกซิเดชันระหว่าง LDL ที่แยกจากคนปกติกับ LDL ของผู้ป่วยเบาหวาน พบว่าในคนปกติมีค่า lag time ของการเกิดออกซิเดชันนานกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (55.5±2.79 ต่อ 47.8±2.29 นาที, P<0.05) และมีปริมาณของ MDA ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (16.2±1.13 ต่อ 19.0±0.81 ไมโครโมล/ลิตร, P<0.05) และเคอร์คิวมินอยด์ยังช่วยยับยั้งคอปเปอร์ไอออนในการกระตุ้นให้เกิดออกซิเดชันของ LDL ได้ในคนปกติ และในผู้ป่วยเบาหวาน โดยพบมีจำนวนร้อยละของเซลล์ U937 ที่มีการนำ LDL เข้าไปในเซลล์ มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (71.9±0.99 ต่อ 5.1±0.73 % และ 65.8±1.39 ต่อ 4.00±0.81 % ตามลำดับ, P<0.05), ค่า lag time ของการเกิดออกซิเดชันมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (91.2±1.39, ต่อ 55.5±2.79 นาที และ 81.8±1.39 ต่อ 47.8±2.29 นาที, ตามลำดับ, P<0.05) และปริมาณของ MDA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (6.9±0.73 ต่อ 16.2±1.13 และ 11.1±0.87 ต่อ 19.0±0.81 ไมโครโมล/ลิตร ตามลำดับ, P<0.05) การเปรียบเทียบผลในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของ LDL ระหว่างสารเคอร์คิวมินอยด์กับวิตามินอีในคนปกติและในผู้ป่วยเบาหวาน พบว่าร้อยละของเซลล์ U937 ที่มีการนำ LDL เข้าเซลล์ มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (71.9±0.99 ต่อ 76.0±2.0 % และ 65.8±1.39 ต่อ 70.2±1.54 % ตามลำดับ, P<0.05), ค่า lag time สั้นลงอย่างมีนัยสำคัญ (91.2±1.39 ต่อ 95.0±1.82 นาที และ 81.8±1.39 ต่อ 84.8±2.25 นาที, ตามลำดับ, P<0.05) และปริมาณ MDA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (6.9±0.73 ต่อ 6.0±0.81 และ 11.1±0.87 ต่อ 10.0±0.94 ไมโครโมล/ลิตร, ตามลำดับ, P<0.05) และพบว่าผลในการยับยั้งการเกิด LDL ออกซิเดชันของสารเคอร์คิวมินอยด์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับวิตามินซี นอกจากนี้ยังพบว่าสารเคอร์คิวมินอยด์ไม่มีผลต่อ ox-LDL โดยพบมีจำนวนร้อยละของเซลล์ U937 ที่มีการนำ LDL เข้าไปในเซลล์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในคนปกติและในผู้ป่วย เบาหวาน (6.2±0.0.63 ต่อ 5.1±0.73 และ 5.6±0.68 ต่อ 4.6±0.81, ตามลำดับ, P>0.05)

สรุป: จากการศึกษานี้พบว่าในผู้ป่วยโรคเบาหวานเกิดออกซิเดชันของ LDL ได้ง่ายกว่าคนปกติ สารเคอร์คิวมินอยด์ สามารถยับยั้งสารคอปเปอร์ไอออนในการทำให้เกิดออกซิเดชันของ LDL ในคนปกติได้ดีกว่าในผู้ป่วยเบาหวาน และให้ผลการยับยั้งดีพอๆกับวิตามินซี แต่ให้ผลต่ำกว่าวิตามินอีเล็กน้อย และสารแอนติออกซิแดนท์ทั้ง 3 ชนิด ไม่มีผลทำให้ ox-LDL เปลี่ยนกลับมาเป็น LDL ปกติได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved