

สารต้านอนุมูลอิสระในข้าวดำ ข้าวเหนียวดำ และข้าวแดง: การป้องกันการเป็นพิษต่อเซลล์และสารพันธุกรรมจาก
อนุมูลอิสระและการแสดงออกของยีนสะสมไขมันในเซลล์เพาะเลี้ยง



นางสาว อชิตยา ไรจนสโรช

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูพันธุศาสตร์ ภาควิชาชีวเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANTIOXIDANTS IN BLACK RICE, BLACK STICKY RICE AND RED RICE: PROTECTIVE EFFECT ON CYTOTOXICITY
AND GENOTOXICITY BY FREE RADICALS AND GENE EXPRESSION ON LIPID ACCUMULATION
IN CULTURE CELLS



Miss Atittaya Rocejanasaroj

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

สารต้านอนุมูลอิสระในข้าวดำ ข้าวเหนียวดำ และข้าวแดง : การป้องกันการเป็นพิษต่อเซลล์และสารพันธุกรรมจากอนุมูลอิสระและการแสดงออกของยีนสะสมไขมันในเซลล์เพาะเลี้ยง

โดย

นางสาว อติตยา วจนสโรช

สาขาวิชา

ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร.วาริน แสงกิติโกมล

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนา

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา นพพรพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์)

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วาริน แสงกิติโกมล)

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนา)

.....
(รองศาสตราจารย์ เทียนชัย ไชยเศรษฐ)

อติทยา โรจนสโรช : สารต้านอนุมูลอิสระในข้าวดำ ข้าวเหนียวดำ และข้าวแดง: การป้องกันการเป็นพิษต่อเซลล์และสารพันธุกรรมจากอนุมูลอิสระและการแสดงออกของยีนสะสมไขมันในเซลล์เพาะเลี้ยง.

(ANTIOXIDANTS IN BLACK RICE, BLACK STICKY RICE AND RED RICE: PROTECTIVE EFFECT ON CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY BY FREE RADICALS AND GENE EXPRESSION ON LIPID ACCUMULATION IN CULTURE CELLS) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ดร. วาริน แสงกิติโกมล, อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ. ดร. เทวิน เทนคำเนาวั, 149 หน้า.

อนุมูลอิสระเป็นสาเหตุของโรคที่เกิดจากความเสื่อมของร่างกาย เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคหลอดเลือดสมอง มะเร็ง และความชรา สารต้านอนุมูลอิสระยับยั้งการทำลายของอนุมูลอิสระได้ งานวิจัยนี้ศึกษาข้าวที่มีสารแอนโทไซยานินซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมีประโยชน์ในการส่งเสริมสุขภาพ โดยเลือกซื้อข้าว 3 ประเภทได้แก่ ข้าวดำ ข้าวแดง และข้าวเหนียวดำ กลุ่มละ 7 ชนิดรวม 21 ชนิด ซื้อมาจากตลาดในกรุงเทพฯ มาตรวจหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ 4 วิธี ได้แก่ Oxygen Radical Absorbance Capacity assay (ORAC), Folin Ciocalteu Phenol Reagent assay (FCP), Vanillin assay (VA) และ Total Anthocyanins Content assay (TAC) พบว่าสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากข้าวที่ตรวจ 3 วิธีแรก โดยมีความสอดคล้องกันดีมาก ($r>0.9$) ข้าวเหนียวดำมีค่าสูงสุด รองลงมาคือข้าวแดง และข้าวดำ แต่วิธี TAC assay ให้ผลแตกต่างโดยข้าวดำมีสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวแดง โดยที่ข้าวเหนียวดำมีค่าสูงสุด คือ 1368.34 ± 41.27 TE mM/kg dry wt., 922.03 ± 9.42 GE mM/kg dry wt., 218.97 ± 1.82 CE mM/kg dry wt. และ 690 mg/kg dry wt. ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดข้าวเหนียวดำมาทดสอบกับเซลล์ พบว่าสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระในการทำลาย DNA ของเม็ดเลือดขาวเมื่อตรวจด้วยวิธี Comet Assay ซึ่งผลการยับยั้งแปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดข้าวเหนียวดำ และตรวจพบการยับยั้งอนุมูลอิสระในการทำลายโปรตีนและไขมันของเม็ดเลือดแดงโดยสารสกัดข้าวเหนียวดำ $100-600$ $\mu\text{g/ml}$ ยับยั้ง hemolysis และที่ความเข้มข้น 600 $\mu\text{g/ml}$ ยับยั้งการเกิด Heinz bodies ได้ แต่สารสกัดข้าวเหนียวดำ $700-1000$ $\mu\text{g/ml}$ ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกเอง อีกทั้งสามารถยับยั้งการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง HepG2 และ Jurkat โดยมีผลต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแปรผันตามระดับความเข้มข้นและเวลาที่เพิ่มขึ้นที่ใช้ในการทดสอบ (Dose and Time dependent manner) นอกจากนี้สารสกัดข้าวเหนียวดำ $600-1000$ $\mu\text{g/ml}$ ลดระดับ Oxidative stress ภายในเซลล์ HepG2 ($p<0.05$) และสารสกัดข้าวเหนียวดำ 200 $\mu\text{g/ml}$ เพิ่มการแสดงออกของยีน LDLR ($p<0.05$) ของเซลล์ HepG2 ซึ่งเป็นยืนยันที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้าง LDL receptor บนผนังเซลล์ในการนำ LDL-cholesterol เข้าเซลล์

ภาควิชาเคมีคลินิก
สาขาวิชาชีวเคมีและอนุทางการแพทย์
ปีการศึกษา 2551

ลายมือชื่อนิสิต.....อติทยา โรจนสโรช
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....วาริน แสงกิติโกมล
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....เทวิน เทนคำเนาวั

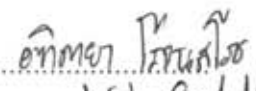
4977209637 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEY WORD: ANTHOCYANINS, ANTIOXIDANTS, BLACK RICE, BLACK STICKY RICE, RED RICE.

ATITTAYA ROCEJANASAROJ : ANTIOXIDANTS IN BLACK RICE, BLACK STICKY RICE AND RED RICE: PROTECTIVE EFFECT ON CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY BY FREE RADICALS AND GENE EXPRESSION ON LIPID ACCUMULATION IN CULTURE CELLS.
 PRINCIPAL THESIS ADVISOR : Assoc. Prof. WARIN SANGKITIKOMOL, D.Sc., THESIS COADVISOR : Asst. Prof. TAWIN TENCOMNOA, Ph.D., 149 pp.

Pigments, Anthocyanins, in black and red rice are reported to have health promoting properties. Oxidative stress is a major role in pathogenesis of many degenerative diseases induced by free radicals such as cardiovascular disease, stroke, cancer and aging. Antioxidant properties of rice pigments may improve antioxidant status of blood cells and decrease oxidative damage to DNA, proteins, lipids and other biomolecules. To find out which rice possesses the highest antioxidant level from 7 kinds of red rice, 7 kinds of black rice and 7 kinds of black sticky rice, bought from supermarket in Bangkok, were analyzed by 4 different methods. We found that the results of 3 methods; Oxygen Radical Absorbance Capacity assay (ORAC), Folin Ciocalteu Phenol assay (FCP), and Vanillin assay (VA), were very good correlation ($r > 0.9$). Black sticky rice had the highest antioxidant level and followed by red and black rice. But Total anthocyanins content assay (TAC) gave black rice was second highest antioxidant level and red rice was the third. Black sticky rice had the highest antioxidant level within the range 1368.34 ± 41.27 TE mM/kg dry wt., 922.03 ± 9.42 GE mM/kg dry wt. and 218.97 ± 1.82 CE mM/kg dry wt., 690 mg/kg dry wt. respectively. Rice pigments from the highest one at the concentration range from 100-600 $\mu\text{g/ml}$ could inhibit proteins and lipids from oxidative damage by inhibition of hemolysis induced by 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) hydrochloride and 600 $\mu\text{g/ml}$ could completely inhibit Heinz body formation in human red blood cells induced by N-acetylphenylhydrazine, respectively. But rice pigments range from 700-1,000 $\mu\text{g/ml}$ could induce hemolysis. Comet assay showed inhibition effect of rice pigments, range from 200-1000 $\mu\text{g/ml}$, on DNA oxidative damage of mononuclear cells in dose and time dependent manner. However, rice pigments range from 800-1000 $\mu\text{g/ml}$ showed slightly toxic and reduced HepG2 and Jurkat cancer cells viability in dose-time dependent manner. Moreover, rice pigments range from 600-1000 $\mu\text{g/ml}$ could decrease intracellular oxidative stress ($p < 0.05$) and 200 $\mu\text{g/ml}$ of rice pigments could enhance expression of LDLR gene of HepG2 cells ($p < 0.05$). This LDLR gene regulates the production of LDL receptor on cell-surface membrane that mediates the endocytosis of LDL-cholesterol.

Department : Clinical Chemistry

Student's signature : 

Field of study : Clinical Biochemistry And Molecular Medicine

Principal Advisor's signature : 

Academic year : 2008

Co-advisor's signature : 

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร. วาริน แสงกิติโกมล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์คือผู้ให้แก่ศิษย์ ทั้งวิชาความรู้ มุมมอง คำแนะนำในการแก้ไขปัญหา ตลอดจนข้อคิดต่าง ๆ ในการทำงานวิจัย อีกทั้งได้ให้กำลังใจยามที่ศิษย์ท้อแท้สิ้นหวัง อาจารย์ได้ชี้ให้ศิษย์เห็นถึงศักยภาพและความสามารถภายในตัวศิษย์ที่ศิษย์คิดว่าไม่มีและทำให้ศิษย์ได้รู้ว่าตัวเราเองเป็นผู้กำหนดพรหมลิขิตตัวเอง ศิษย์ ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่เป็นดั่งแสงสว่างของศิษย์เรื่อยมา

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ เทียนชัย ไชยเศรษฐ์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นพ.ดร.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร ที่กรุณาเอื้อเพื่อเซลล์เพาะเลี้ยง Jurkat และรองศาสตราจารย์ ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล ที่กรุณาเอื้อเพื่อเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 ให้ศิษย์ได้ทำการวิจัย

ขอขอบพระคุณ ท่านอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ท่านค่าลงทะเบียน และท่านอุดหนุนการศึกษาเพื่อทำหน้าที่ผู้ช่วยสอน ของคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณ บุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ และศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีบางส่วนในการศึกษาวิจัย

สุดท้ายนี้ ลูกขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่เป็นสิ่งที่ดีและสวยงามที่สุดในโลก เป็นความรักบริสุทธิ์ไร้ขีดจำกัดที่หล่อเลี้ยงหัวใจลูกให้แข็งแกร่งและผลักดันให้ลูกก้าวไปตามเส้นทางฝันเพื่อบรรลุเป้าหมายในชีวิต

ความดีของการศึกษาและคุณค่าของวิทยานิพนธ์นี้ ข้าพเจ้าขออุทิศแด่บูรพาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฐ
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
ขอบเขตของงานวิจัย.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
อนุมูลอิสระ.....	5
สารต้านอนุมูลอิสระ.....	10
โพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์.....	15
แอนโทไซยานินส์.....	22
ข้าว ลักษณะและประโยชน์.....	27
โรคหลอดเลือดและหัวใจ.....	32
3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	47
ตัวอย่างข้าว เซลล์ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	47
การเตรียมสารสกัดจากข้าว.....	52
การตรวจสอบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ORAC assay.....	53
การตรวจสอบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FCR assay.....	55
การตรวจสอบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Vanillin assay.....	56
การตรวจสอบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี TAC assay.....	57
การตรวจสอบความสามารถของสารสกัดข้าวเหนียวดำในการป้องกัน DNA ของ เซลล์เม็ดเลือดขาวจากอนุมูลอิสระด้วยวิธี Comet assay.....	57
การตรวจสอบความสามารถของสารสกัดข้าวเหนียวดำในการป้องกันโปรตีนฮีมของ เซลล์เม็ดเลือดแดงจากอนุมูลอิสระด้วยวิธี Heinz body Inhibition assay.....	60
การตรวจสอบความสามารถของสารสกัดข้าวเหนียวดำในการป้องกันผนังเซลล์ของ เซลล์เม็ดเลือดแดงจากอนุมูลอิสระด้วยวิธี Hemolysis Inhibition assay.....	61
การเพาะเลี้ยงเซลล์ในการวิจัย.....	62

บทที่	หน้า
การตรวจสอบผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี MTT assay.....	64
การตรวจสอบผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Trypan Blue dye exclusion assay.....	65
การตรวจสอบผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Neutral Red Dye Accumulation assay.....	65
การตรวจสอบความสามารถของสารสกัดข้าวเหนียวดำในการป้องกันเซลล์เพาะเลี้ยง จากภาวะ Oxidative stress ด้วยวิธี DCFH-DA assay	66
การตรวจสอบผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง กับกระบวนการเมแทบอลิซึมไขมันในเซลล์ HepG2.....	67
การสกัด RNA จากเซลล์ HepG2.....	67
การวัดค่า Optical Density (OD) เพื่อหาความเข้มข้นของ RNA ที่สกัดได้.....	68
การเตรียม cDNA ด้วยเอนไซม์ Reverse transcriptase.....	68
การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ของยีนที่ศึกษาด้วยวิธี PCR.....	70
การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	72
4 ผลการทดลอง.....	73
การเปรียบเทียบค่าสารต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจวัดด้วยวิธีต่างๆ.....	73
ผลการตรวจสอบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ORAC assay.....	73
ผลการตรวจสอบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FCR assay.....	73
ผลการตรวจสอบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Vanillin assay.....	74
ผลการตรวจสอบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี TAC assay.....	74
การเปรียบเทียบค่าสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากข้าวชนิดต่างๆ.....	74
ความสามารถของสารสกัดข้าวเหนียวดำในการป้องกัน DNA ของเซลล์เม็ดเลือดขาว จากอนุมูลอิสระ.....	77
ความสามารถของสารสกัดข้าวเหนียวดำในการป้องกันโปรตีนฮีมของเซลล์เม็ดเลือดแดง จากอนุมูลอิสระ.....	80
ความสามารถของสารสกัดข้าวเหนียวดำในการป้องกันชั้นผนังเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือด แดงจากอนุมูลอิสระ.....	82
ผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง Jurkat ตรวจสอบด้วย วิธี MTT assay.....	84
ผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง HepG2 ตรวจสอบด้วย วิธี MTT assay.....	84
ผลกระทบของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อเซลล์ปกติเพาะเลี้ยง PBMCs ตรวจสอบด้วย วิธี MTT assay.....	84

บทที่	หน้า
ผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง HepG2 ตรวจสอบด้วยวิธี Neutral Red dye Accumulation assay.....	86
ผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง Jurkat ตรวจสอบด้วยวิธี Trypan Blue dye exclusion assay.....	87
ความสามารถของสารสกัดข้าวเหนียวดำในการลดระดับ Oxidative stress จากเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง Jurkat.....	88
ความสามารถของสารสกัดข้าวเหนียวดำในการลดระดับ Oxidative stress จากเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง HepG2.....	88
ความสามารถของสารสกัดข้าวเหนียวดำในการป้องกันเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง HepG2 จากภาวะ Oxidative stress	90
ผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมไขมันในเซลล์ HepG2.....	91
5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง.....	94
รายการอ้างอิง.....	111
บรรณานุกรม.....	134
ภาคผนวก.....	136
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	150

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
2.1	โครงสร้าง ชื่อ และแหล่งที่พบของพลาโวนอยด์ส์ประเภทต่าง ๆ.....	21
2.2	ชื่อ ตัวย่อ และหมู่ฟังก์ชันที่เกาะบนโมเลกุลแอนโทไซยานินส์.....	24
2.3	ปริมาณสารอาหารต่าง ๆ ที่พบได้ในเมล็ดข้าว.....	28
3.1	ขั้นตอนการเติมสารเพื่อตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ORAC assay.....	55
3.2	ขั้นตอนการเติมสารเพื่อตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FCR assay.....	56
3.3	ขั้นตอนการเติมสารเพื่อตรวจวัดสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Vanillin assay.....	57
3.4	ขั้นตอนการเติมสารเพื่อตรวจวัดค่าการป้องกัน DNA จากสารออกซิไดซ์ด้วยวิธี Comet assay.....	58
3.5	ขั้นตอนการเติมสารเพื่อตรวจวัดค่าการป้องกันโปรตีนและไขมันบนผนังเซลล์เสียสภาพ จากอนุมูลอิสระด้วยวิธี Heinz body inhibition assay และ Hemolysis inhibition assay.....	61
3.6	ขนาดจานเลี้ยงเซลล์ เวลา และจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยง ที่ใช้ในการทดสอบกับสารสกัด ข้าวเหนียวดำ.....	63
3.7	ขั้นตอนการเติมสารเพื่อตรวจวัดผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำต่อการอยู่รอดเซลล์ในการ ทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี MTT assay, Neutral Red dye accumulation assay, Trypan Blue dye exclusion assay และผลต่อค่า Oxidative stress ภายในเซลล์โดย การทดสอบด้วยวิธี DCFHDA assay.....	63
3.8	ขั้นตอนการเติมสารเพื่อตรวจจสอบผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อการแสดงของของยีน.....	68
3.9	ขั้นตอนการเติมสารในการขจัด DNA ปนเปื้อนออกจากตัวอย่าง RNA ที่สกัดได้.....	69
3.10	ขั้นตอนการเติมสารเพื่อสร้าง cDNA จาก RNA ที่สกัดได้.....	70
3.11	ขั้นตอนการเติมสารเพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ของยีนที่สนใจศึกษา.....	71
3.12	Primers จำเพาะที่ใช้ในการตรวจวัดการแสดงออกของยีนและขนาดผลิตภัณฑ์ชิ้นส่วน DNA ที่คาดว่าจะได้.....	71
3.13	ปฏิกิริยาและอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน cDNA ของยีนที่สนใจศึกษา.....	72
4.1	ค่าสารต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี ORAC Assay, FCP Assay, Vanillin Assay และ TAC Assay ของข้าวดำ ข้าวแดง และข้าวเหนียวดำ.....	76
4.2	ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระ 4 วิธี ของสารสกัด ข้าวดำ ข้าวแดง และข้าวเหนียวดำ.....	77
4.3	ผลการ ทำลาย DNA ของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ เมื่อทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำ ความเข้มข้นต่างๆ ที่ใส่และไม่ใส่ H ₂ O ₂	78
4.4	ผลของ สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นต่าง ๆ ในการป้องกันการเกิด Heinz body ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ.....	81
4.5	ผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อการแสดงออกของยีน (mRNA) 5 ชนิดที่เกี่ยวข้องใน กระบวนการเมแทบอลิซึมไขมันในเซลล์ HepG2.....	92

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
1.1 โครงสร้างโมเลกุลแอนโทไซยานินส์	2
2.1 การทำปฏิกิริยาระหว่างเบส guanine และอนุมูลอิสระ peroxy.....	8
2.2 แหล่งที่มาอนุมูลอิสระ และภาวะ Oxidative Stress	9
2.3 โครงสร้างของ GSH, GSSG และเครือข่ายสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์	12
2.4 ลักษณะโครงสร้างพื้นฐาน ชนิดของโพลีฟีนอล และหมู่ฟังก์ชันบนโครงสร้าง ฟลาโวนอยด์ที่มีผลต่อการออกฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	16
2.5 การจับพันธะระหว่างฟลาโวนอยด์และโลหะไอออน	18
2.6 ลักษณะโครงสร้างของแอนโทไซยานิน	23
2.7 ลักษณะทางกายภาพ เมล็ดข้าวชั้น Aleurone และ Kernel layer	27
2.8 พยาธิสภาพการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบตันจากการสะสมของไขมันบริเวณ ผนังหลอดเลือด	33
2.9 การสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์ผนังหลอดเลือด	34
2.10 ลักษณะของ ไลโปโปรตีนและหน้าที่ในการขนส่งไขมัน	35
2.11 พยาธิสภาพการเกิดพังผืดไขมันในผนังหลอดเลือด	37
2.12 กลไกการควบคุมปริมาณไขมันภายในเซลล์ตับ	39
2.13 กลไกควบคุมโปรตีน LDLR บนผนังเซลล์ตับ	40
2.14 nuclear factor ที่ควบคุมสมดุลโคเรสเตอรอลภายในเซลล์	43
3.1 ชนิดข้าวเมล็ดสีที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย	47
3.2 ลักษณะและรูปร่างของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง Jurkat	48
3.3 ลักษณะและรูปร่างของเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยง HepG2	49
3.4 วิธีการสกัดสารธรรมชาติจากผงข้าวเมล็ดสีด้วยการ Reflux	53
3.5 ลักษณะกราฟที่ได้จากการตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ORAC assay	54
3.6 ลักษณะ DNA ที่วิ่งออกมาจากนิวคลีออยเมื่อทำการวิ่งแยกบนสนามไฟฟ้า	59
3.7 ลักษณะ Heinz bodies ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง	60
3.8 ตะกอนสีม่วงดำที่ไม่ละลายน้ำในการทดสอบด้วยวิธี MTT assay	64
3.9 วิธีการสกัด RNA จากเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยน้ำยาฟีนอล-คลอโรฟอร์ม	67
3.10 ขั้นตอนการสร้าง cDNA จาก RNA	69
4.1 การทดสอบความสามารถของสารสกัดข้าวเหนียวดำในการป้องกัน DNA ของ เม็ดเลือดขาว (PBMCs) จากการทำลายด้วย H ₂ O ₂	79
4.2 ลักษณะ Heinz bodies ที่ตรวจพบภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง เมื่อทดสอบด้วยวิธี Heinz body Inhibition assay	82
4.3 ผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นต่าง ๆ ในการป้องกันการเกิดเม็ดเลือดแดงแตก	83

ภาพประกอบ	หน้า
4.4 ผล ของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อ %Viability ของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง Jurkat เมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT assay.....	85
4.5 ผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อ %Viability ของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง HepG2 เมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT assay.....	85
4.6 ผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อ %Viability ของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ PBMC เมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT assay.....	86
4.7 ผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อ %Viability ของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง HepG2 เมื่อทดสอบด้วยวิธี Neutral Red dye accumulation assay.....	87
4.8 ลักษณะเซลล์ย้อมสี Trypan Blue.....	87
4.9 ผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อจำนวนเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง Jurkat ด้วยวิธี Trypan Blue dye exclusion assay.....	88
4.10 ผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อระดับ Oxidative stress ภายในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง Jurkat.....	89
4.11 ผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อระดับ Oxidative stress ภายในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง HepG2.....	90
4.12 ผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อระดับ Oxidative stress ภายในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง HepG2 เมื่อทดสอบพร้อมกับ H ₂ O ₂	91
4.13 ผลการแสดงออกของยีน LDLR และยีน HMG-CoA reductase ของเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยง HepG2 เมื่อทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำ.....	93
4.14 ผลการแสดงออกของยีน PPAR α ของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง HepG2 เมื่อทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำ.....	93
4.15 ผลการแสดงออกของยีน PPAR γ และ LXR α ในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง HepG2 เมื่อทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำ.....	93
5.1 โครงสร้างเชิงซ้อนระหว่าง Cyanidins กับสาย DNA.....	96
5.2 การสร้างอนุมูลอิสระจากฟลาโวนอยด์ส์ เมื่อทำปฏิกิริยากับอากาศ และผลของหมู่ฟังก์ชันต่อลักษณะความเรียบของโมเลกุลแอนโทไซยานินส์.....	103
5.3 การตอบสนองของเซลล์ต่อภาวะ Oxidative stress.....	105
5.4 การจำแนกประเภทของ nuclear receptor.....	108
5.5 กลไกของโพลีฟีนอลที่มีประโยชน์ ลดการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด.....	110

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์และคำย่อ ความหมาย

%	Per cent
/	Per
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
μ	Micro
μ l	Microlitre
μ M	Micromolar
p	Pico
pM	Picomolar
$^{\circ}$ C	Degree Celsius
8-OHdG	8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine
AA	Arachidonic acid
AAPH	Azobis (2-amidinopropane) hydrochloride
ABCA	Adenosine triphosphate-binding cassette protein
Abs.	Absorbance
ACAT	Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase
ACC	Acyl-CoA carboxylase
Ahr	Aryl hydrocarbon receptor
AMP	Adenosine monophosphate
AMPK	AMP-activated protein kinase
AP-1	Activation protein-1
APHZ	N-acetylphenylhydrazine
apo	Apolipoprotein
ARE	Antioxidant response element
AR	Aldose reductase
ATP	Adenosine triphosphate
AUC	Area Under Curve
bp	Base pairs
BPDE	Benzo(a)pyrene-7, 8-diol-9, 10-epoxide
cAMP	3', 5'-Cyclic AMP
Cat	Catalase

CD	Circular dichroism
CZE	Capillary zone electrophoresis
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CE	Cholesterol ester
CE.	Catechin equivalent
CETP	Cholesterol ester transport protein
CH ₃ •	Methyl radical
ChREBP	Carbohydrate response element-binding protein
CHD	Coronary heart disease
CO ₂	Carbon dioxide
CoA	Coenzyme A
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reactive protein
CVD	Cardiovascular disease
Cy	Cyanidin
CYP	Cytochrome
CYP7A1	Cholesterol 7 α hydrolase
DCFH-DA	2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Deoxyribonuclease
Dox	Doxorubicin
Dp	Delphinidin
DPPH	Diphenyl-1-picrylhydrazyl assay
DR	Direct repeat motif
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGCG	Epigallocatechin-3-gallate
EGF	Epidermal growth factor
ER	Endoplasmic reticulum
ERK	Extracellular signal regulated kinase
FAS	Fatty acid synthase
FAS	Fast atom bombardment mass spectroscopy

FBS	Fetal Bovine Serum
FCP	Folin Ciocalteu Phenol Reagent
FFA	Free fatty acid
FH	Familial hypercholesterolemia
FRAP method	Ferric reducing ability of plasma
FTIR	Fourier Transform infrared spectroscopy
g	Gram
<i>g</i>	G-force
GE	Gallic Acid Equivalent
GLUT	Glucose transporter
GK	Glucokinase
GPB	Glucose phosphate buffer
GPDH	Glycerol 3-phosphate dehydrogenase
GTP	Guanosine triphosphate
GPx	Glutathione oxidase
GRed	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
GSHPX	Glutathione peroxidase
GSSG	Oxidized Glutathione, Glutathione disulfide
GTP	Guanosine triphosphate
H	Enthalpy of a system
HDL	High density lipoprotein
HepG2	Human hepatocellular carcinoma cell line
HGF	Hepatocyte growth factor
HIF	Hypoxia inducible factor
HMG-CoA	3-hydroxyl-3-methylglutaryl-CoA
HMP	Hexose monophosphate shunt
HNE	4-Hydroxynonenal
HO•	Hydroxyl radical
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSC	Hepatic Stellate cells
IC ₅₀	Inhibitory Concentration at 50%
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFNs	Interferon

IGF	Insulin-like growth factor
ILs	Interleukins
IPs	Isoprostanes
JNK	Jun N-terminal kinase
Jurkat	Human T cell Lymphoblast-like cell line
K_a	Association constant
kg.	Kilogram
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
LDL	Low density lipoprotein
LDLR	Low density lipoprotein receptor
LOO•	Peroxy radical
LOOH	Linoleic acid hydroperoxide
LPL	Lipoprotein lipase
LPS	Lipopolysacchoride
LTD	LeukotieneB ₄ dehydrogenase
LXR	Liver X receptor
LXRE	Liver X receptor response element
M	Molar
MAPK	Mitrogen-activated protein kinase
MCP	Monocyte chemoattractant protein
MDA	Malondialdehyde
MEC	Miscellar electrokinetic chromatography
MgCl ₂	Magnesium Chloride
mg	Milligram
MIP	Macrophage inflammation protein
ml	Millilitre
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrix metalloproteinase
MTP	Microsomal triglyceride transfer protein
MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyl tetrazolium bromide
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
Mv	Malvidin
MRP	Multidrug resistance-associated protein

NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide (reduced)
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced)
N-CoR	Nuclear receptor Corepressor
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
nm	Nanometer
NMR	Nuclear magnetic resonance
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
$^1\text{O}_2$	Singlet oxygen
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Superoxide anion radical
OD	Optical Density
ODQ	Guanylyl cyclase inhibitor
OLR	Oxidized LDL receptor
ONOO \cdot	Peroxynitrite
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
<i>p</i>	P-value
PAA	3, 4-Dihydroxyphenylacetic acid
PAI	Plasminogen activator inhibitor
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Phospholipid
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	Platelet-derived growth factor
Pg	Pelargonidin
PLC	Phytochemoluminescence assay
PLTP	Phospholipid transfer protein
pH	negative logarithm of the hydrogen ion concentration
PHA	Phytohemagglutinin
PHGPx	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
pO_2	Partial pressure of oxygen
PPAR	Peroxisome proliferators-activated receptors

ppm	Part per million
PRE	Pigmented Rice Extract
Pt	Petunidin
QR	NAD(P)H : quinine reductase
<i>r</i>	Linear Association
RBC	Red blood cell
RDI	Recommended Daily Intakes
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
RNS	Reactive nitrogen species
ROO•	Peroxy radical
RONS	Reactive oxygen and nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Revolution per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute -1640 Medium
RT- PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RXR	Retinoid X receptor
S	Entropy of a system
SCD	Stearoyl-CoA desaturase
S.D.	Standard deviation
S.E.M	Standard Error of Mean
SGLT	Sodium-dependent glucose transporter
SMAT	Silence mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor
SODs	Superoxides dismutase
SR-BI	Scavenger receptor class B type I
SRE	Sterol regulatory element
SREBPs	Sterol regulatory element binding protein
TAC	Total anthocyanins content
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TE	Trolox Equivalent
TEAC	Trolox equivalence antioxidant capacity
TG	Triglyceride
TLC	Thin layer chromatography
TOSCA	Total antioxidant scavenging assay

TNF	Tumor Necrosis Factor
TPA	12-O-Tetradecanoyl phorbol-13-acetate
TRAP	Total radical trapping antioxidant parameter
Trx	Thioredoxin
TZDs	Thiazolidinediones
u-PA	Urokinase-type plasminogen activator
U	Unit
UV	Ultraviolet
VA	Vanillin assay
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VLDL	Very low density lipoprotein
wt.	Weight
w/v	Weight by volume
XOD	Xanthine oxidase



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

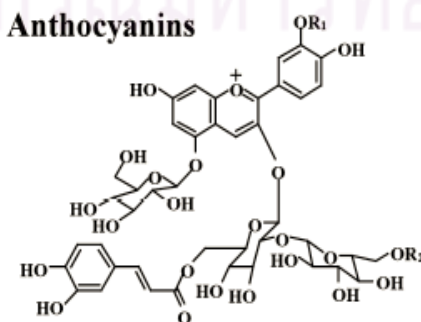
บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อนุมูลอิสระ (Free radical) เป็นอะตอมหรือโมเลกุลของสารใดๆ ที่มีอิเล็กตรอนอิสระที่ขาดคู่ (unpaired electron) สารดังกล่าวไวต่อการเกิดปฏิกิริยาและมีความเป็นพิษสูงมาก สารอนุมูลอิสระที่มีการศึกษามากคือ Reactive oxygen species (ROS) และ Reactive nitrogen species (RNS) ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ (free radicals) ได้แก่ superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical (HO^{\cdot}), peroxyl radical (ROO^{\cdot}), peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$), methyl radical (CH_3^{\cdot}) เป็นต้น เนื่องจากเป็นสารอนุมูลอิสระส่วนใหญ่ที่พบในร่างกายมนุษย์ จากการศึกษาพบว่า ROS สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การตายของเซลล์ และ ROS ทำหน้าที่ส่งสัญญาณต่างๆ ในเซลล์ หากมีระดับอนุมูลอิสระ ROS ที่ไม่สมดุล สารอนุมูลอิสระส่วนเกินไปทำอันตรายส่วนประกอบของเซลล์และเนื้อเยื่อ เช่น ดีเอ็นเอ โปรตีน และกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว หากมีอนุมูลอิสระปริมาณสูงในร่างกายจะส่งผลให้เซลล์ผิดปกติทั้งการทำงานและองค์ประกอบของเซลล์ทำให้เกิดโรค และพยาธิสภาพต่างๆ เช่น โรคหลอดเลือดและหัวใจ โรคหัวใจวาย โรคไตวาย โรคเบาหวาน โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง โรคมะเร็ง การอักเสบและความแก่ชรา เป็นต้น อนุมูลอิสระสามารถผลิตขึ้นได้ในร่างกายจากปฏิกิริยาต่างๆ เช่น 1. กระบวนการเมแทบอลิซึมของการหายใจและการสันดาปให้เกิดพลังงานของเซลล์ทั่วไป 2. กลไกการทำลายเชื้อโรคของเม็ดเลือดขาว (phagocytes) 3. ระบบส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ (signal transduction) 4. การตอบสนองต่อการได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ต สารมลพิษต่างๆ การสูบบุหรี่ การออกกำลังกายที่หนักเกินไป เป็นต้น ⁽¹⁾ อนุมูลอิสระแต่ละโมเลกุลที่สร้างขึ้นในร่างกายสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการทำลาย ซึ่งจะดำเนินต่อไปเรื่อยๆ จนกว่าอนุมูลอิสระจะถูกกำจัดทิ้ง โดยปกติร่างกายจะซ่อมแซมส่วนที่เสียหายได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วย สารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายผลิตขึ้นเอง เช่น superoxide dismutase, glutathione peroxidase, ferritin, ceruloplasmin และได้รับจากอาหาร เช่น ซีลีเนียม วิตามินเอ วิตามินซี วิตามินอี ⁽²⁾ และโพลีฟีนอล (polyphenol) ที่ได้จากผักผลไม้สมุนไพรและเครื่องดื่มจากสมุนไพร ซึ่งสารในกลุ่ม โพลีฟีนอล ที่มีปริมาณมากที่สุดในธรรมชาติคือฟลาโวนอยด์ (flavonoids) มีประโยชน์และสำคัญต่อร่างกาย เช่น ทำหน้าที่เป็น anti-inflammatory, antioxidative stress, antimutagenesis, และ anticarcinogenesis ⁽³⁾ จากงานวิจัยพบว่าสมุนไพรไทย เช่น เบญจกานี ผลหมาก สมอเทศ มะขามป้อม เปลือกทับทิม ชาเขียว ดอกกานพลู ยอดมะม่วง ใบฝรั่ง ผักเม็ก ผักบุ้งนา และใบแปะก๊วย มีสารต้านอนุมูลอิสระสูงมาก สามารถห้ามการทำลายไขมันโปรตีนของผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ ⁽⁴⁻⁶⁾ มีรายงานเพิ่มเติมอีกว่า เบญจกานีและมะขามป้อม สามารถป้องกันการทำลายสารพันธุกรรมหรือ DNA (antigenotoxicity) แต่ทว่า กานพลู อบเชย ขมิ้นชัน และเพกา สามารถทำลายสารพันธุกรรม (genotoxicity) ⁽⁷⁾ เมื่อทดสอบโดยวิธี Single cell gel electrophoresis (Comet Assay) ⁽⁸⁾ นอกจากนี้ มีรายงานวิจัยที่ชี้ว่าสารโพลีฟีนอลยังมีความสามารถอื่นๆ ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายอีก เช่น Kaempferol ซึ่งเป็นฟลาโวนอยด์ชนิดหนึ่งก็สามารถห้ามการเกิด oxidative stress ที่นำไปสู่การตายของเซลล์ (apoptosis) ⁽⁹⁾

เนื่องจากประเทศไทยผลิตข้าวเลี้ยงคนทั่วโลก คนในประเทศควรได้รับรู้ในคุณค่าของข้าว และเลือกบริโภคข้าวที่ให้ประโยชน์สูงสุดเพื่อความแข็งแรงของร่างกาย แต่ในปัจจุบัน คนให้ความสำคัญในการบริโภคข้าวที่ดูขาวสะอาด หอม ทานแล้วนุ่มลิ้น ข้าวจึงถูกขัดสีเอาสารสำคัญทางโภชนาการออกไปเกือบหมด เหลือแต่แป้งไว้ ข้าวแดงหรือข้าวมันญี่ปุ่น ข้าวดำหรือข้าวสีนิล และข้าวเหนียวดำมีสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น ferulic acid, phytic acid⁽¹⁰⁾, γ -Oryzanol และ tocopherol⁽¹¹⁾ นอกจากนี้ยังมีสาร สีม่วงแดง คือ แอนโทไซยานินส์ (anthocyanins) ซึ่งเป็นสารโพลีฟีนอลชนิดหนึ่งที่จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ส์ มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระให้คุณประโยชน์ในการเสริมสุขภาพ ตั้งแต่โบราณในประเทศจีนใช้ข้าวดำเป็นอาหารบำรุงสุขภาพ เพื่อให้คนไทยกลับมารับประทานข้าวแดงหรือข้าวมันญี่ปุ่น ข้าวดำหรือข้าวสีนิล และข้าวเหนียวดำเป็นอาหารประจำวัน ซึ่งจะช่วยให้ร่างกายแข็งแรงมีระดับสารต้านอนุมูลอิสระอย่างพอเพียงในการช่วยต้านโรคภัยต่างๆ⁽¹²⁻¹³⁾ จากงานวิจัยพบว่า ภาวะตายที่กินข้าวแดงและข้าวดำสามารถลดไขมันที่เกาะบนผนังหลอดเลือด (plaque) ได้ถึง 50% และมีระดับ HDL และระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ superoxide dismutase มากขึ้นเมื่อเทียบกับภาวะตายที่กินข้าวขาว⁽¹⁴⁾ สารสกัดจากข้าวดำยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งมนุษย์ชนิดต่างๆ เช่น Human breast carcinoma, Lewis lung carcinoma⁽¹⁵⁾ และมีฤทธิ์ลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการรุกรานของเซลล์มะเร็ง matrix metalloproteinase (MMP)-9 และ urokinase-type plasminogen activator (u-PA) ในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงหลายชนิด⁽¹⁶⁾ สามารถช่วยป้องกันเซลล์ผิวหนัง HaCaT จากรังสีอัลตราไวโอเล็ต⁽¹²⁾ นอกจากนี้แอนโทไซยานินส์ยังพบได้มากในองุ่น เมล็ดองุ่น ผลเบอร์รี่ชนิดต่างๆ ธัญพืชที่มีสีม่วงดำและดอกไม้ ซึ่งพบว่า เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถลดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และปริมาณไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์เพาะเลี้ยง⁽¹⁷⁾ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยลดการแสดงออกของยีน cyclooxygenase-2 (COX-2)⁽¹⁸⁾ ยับยั้งเกร็ดเลือดเกาะตัว^(19,20) มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง⁽²¹⁾ โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง^(22,23) ยับยั้งไม่ให้เซลล์มะเร็งแพร่กระจาย⁽²⁴⁾ กระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตายแบบ apoptosis^(25,26) ปกป้องเซลล์เรตินาจากภาวะ photooxidation⁽²⁷⁾ มีรายงานวิจัยว่า สารสกัดจากเมล็ดองุ่นยังสามารถควบคุมระดับน้ำตาลในหนูทดลองที่เป็นโรคเบาหวาน⁽²⁸⁾ มีรายงานอีกว่า ร่างกายสามารถดูดซึม anthocyanidin-3-glycosides เข้าสู่กระแสเลือดได้และถูกขับออกทางปัสสาวะเมื่อดื่มน้ำองุ่นแดงและไวน์แดง⁽²⁹⁾ ไวน์แดงที่ปราศจากแอลกอฮอล์สามารถ ถ้ามารการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) ในภาวะตายที่เป็นโรคไขมันในเลือดสูง (hypercholesterolemia)⁽³⁰⁾ คณะผู้วิจัยคาดว่าสารสกัดจากข้าวแดง ข้าวดำ และข้าวเหนียวดำ ซึ่งตรวจพบว่า มีแอนโทไซยานินส์⁽¹⁵⁾ น่าจะให้ผลประโยชน์ในการป้องกันร่างกายเช่นเดียวกัน



ภาพที่ 1.1: สารประกอบแอนโทไซยานินส์⁽ⁿ⁾

ในการวิจัยนี้ได้แบ่งการทดสอบเป็น 2 ส่วนคือ ประการแรก ศึกษาระดับสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดได้จากข้าวแดง ข้าวดำ และข้าวเหนียวดำ เนื่องจากการตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระในอาหารและสมุนไพรมีหลายวิธี ยากต่อการนำมาเปรียบเทียบ จึงมีนักวิจัย 2 คนะคือ คนะของ Prior⁽³¹⁾ และคนะของ Huang⁽³²⁾ ทำการศึกษาและสรุปวิธีตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระให้ใช้เป็นมาตรฐานสากล 2 วิธีตรงกันคือ วิธี Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) ซึ่งเป็นวิธีตรวจวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการทำหน้าที่จับอนุมูลอิสระ (radical scavenging capacity) โดยใช้เครื่องวัดการ เปล่งแสง (fluorometer)⁽³³⁾ และวิธี Folin Ciocalteu Phenol Reagent (FCP) เป็นวิธีตรวจวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการทำหน้าที่รีดิวซ์ (reducing capacity) โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)⁽³⁴⁾ ในงานวิจัยครั้งนี้จะทำการตรวจเพิ่มเติมอีก 2 วิธีที่นิยมใช้ เนื่องจากการตรวจสอบได้ง่าย คือ วิธี Vanillin assay ใช้ในตรวจสอบสารฟลาโวนอยด์โดยเฉพาะแอนโทไซยานินส์ และคาเทชิน (catechin) ทำปฏิกิริยารวมตัว (coupling reaction) กับ vanillin เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีชมพูแดง⁽³⁵⁾ และวิธีคำนวณค่าแอนโทไซยานินส์จากการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตรโดยตรง⁽³⁶⁾

ประการที่สองคือ การ ศึกษาผลของสารสกัดข้าวเมล็ดสีที่มีต่อเซลล์ร่างกายมนุษย์ โดยป้องกันการเกิดภาวะ oxidative damage ในเซลล์โดยใช้เม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวเป็นแบบในการทดสอบ^(5-6,37) ศึกษาผลกระทบต่อการทำลาย ไขมัน โปรตีนของผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยใช้การตรวจ hemolysis และการเกิด Heinz body ศึกษาผลกระทบต่อสารพันธุกรรม DNA โดยใช้การตรวจวิธี Comet Assay⁽⁷⁻⁸⁾ ผลต่อระดับ oxidative stress ภายในเซลล์ และผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน (genes) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสะสมไขมันของเซลล์เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง โดยตรวจปริมาณของ mRNA ในเซลล์ ได้แก่ LDLR mRNA ซึ่งจะทำให้การสร้าง LDL receptor บนผนังเซลล์ ทำหน้าที่จับไขมัน LDL เข้าไปใช้ในเซลล์ HMG-CoA reductase mRNA ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ HMG-CoA reductase ที่ใช้ผลิต โคเรสเตอรอลภายในเซลล์ Peroxisome proliferators-activated receptors α และ γ (PPAR α และ PPAR γ) mRNA และ Liver X receptor α (LXR α) mRNA ซึ่งเป็น nuclear receptors ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเมแทบอลิซึมของไขมันในเซลล์โดยใช้ วิธี reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)⁽³⁸⁻³⁹⁾ โดยศึกษาใน เซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (peripheral blood mononuclear cells: PBMC) และเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ได้แก่ เซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ในเรื่องความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในข้าวเมล็ดสีพันธุ์ไทยคือ ข้าวดำ ข้าวแดง และข้าวเหนียวดำ และในการต้านการเกิด cytotoxicity และ DNA oxidation ของเซลล์จากอนุมูลอิสระและผลกระทบต่อแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของไขมันที่จะนำไปสู่โรคไขมันสูงและโรคหัวใจและหลอดเลือดของสารสกัดข้าวเหนียวดำ
2. เพื่อให้ทราบถึงความเป็นได้และปัญหาเพื่อใช้ในการปรับปรุงเทคโนโลยีในการตรวจวิเคราะห์ให้มีความเหมาะสมและใช้ประโยชน์จากเทคโนโลยีได้อย่างเป็นรูปธรรม

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้จะทำการทดสอบข้าวเมล็ดสีที่มีอยู่ทั่วไปในประเทศไทยและนำมาทำปฏิกิริยากับเซลล์มนุษย์เท่านั้น

ปัญหาการวิจัย

สารต้านอนุมูลอิสระที่มีใน ข้าวดำ ข้าวแดง และข้าวเหนียวดำพันธุ์ไทยสามารถป้องกันเซลล์มนุษย์จากภาวะ oxidative stress ต่างๆ ได้หรือไม่ หากป้องกันได้จะป้องกันด้วยประสิทธิภาพดีเพียงใด และมีผลต่ออื่นที่เกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมไขมันอย่างไร

เป้าหมาย

โครงการวิจัยนี้มีเป้าหมายในการเพิ่มคุณค่าของ ข้าวเมล็ดสีพันธุ์ไทยโดยการใช้วิทยา ศาสตร์และเทคโนโลยี พัฒนาเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์ระดับสารต้านอนุมูลอิสระและปฏิกิริยาที่มีต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตตลอดจน พัฒนาการความรู้พื้นฐานด้านเทคโนโลยีชีวภาพให้เข้ามามีส่วนในระบบการวิเคราะห์ โดยมีเป้าหมายในการ วิเคราะห์ข้าวเมล็ดสีให้ได้อย่างน้อย 3 ชนิด ภายในระยะเวลา 1 ปีหรือภายในปี พ.ศ. 2551

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำความรู้ที่ได้มาใช้เป็นแนวทางเพื่อให้คำแนะนำในการบริโภคอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระสูง มีข้อมูลการบริโภคให้มีสุขภาพดีออกเผยแพร่ให้ประชาชนทั่วไปสามารถนำไปใช้ประโยชน์กับตนเองเพื่อการมีสุขภาพที่ดีและทำให้คนไทยนิยมใช้สมุนไพรไทยมากขึ้น
2. เป็นการยกระดับมาตรฐานสุขภาพประชาชนให้ดีขึ้น
3. สามารถนำความรู้ที่ได้ไปใช้เป็นข้อมูลเพื่อใช้ผลิตอาหารเสริมจากสารเคมีจากพืช (Phytonutrients) ใช้สร้างเสริมสุขภาพให้แข็งแรงและป้องกันโรคจากความเสื่อมของร่างกาย
4. สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการผลิตยาใช้รักษาและป้องกันโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคติดเชื้อ
5. อาจนำสารสกัดที่ได้ไปพัฒนาและส่งเสริมผลิตภัณฑ์ยาจากธรรมชาติให้เหมาะสมกับโครงสร้างทางพันธุกรรมของคนไทยและลดผลข้างเคียงที่เกิดจากการรับประทานยาสังเคราะห์ให้น้อยที่สุดเนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและสามารถหาได้ง่าย ทำให้สามารถนำมาผลิตและจำหน่ายแก่ประชาชนได้ในราคาถูก ลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์ยาและอาหารเสริมราคาแพงจากต่างประเทศ

หน่วยงานที่สามารถนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ได้

1. หน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนที่เกี่ยวข้องทางด้านสาธารณสุข
2. บุคลากรทางด้านสาธารณสุขและผู้สนใจทั่วไป

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. นำเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติหรือระดับชาติ
2. ตีพิมพ์ในวารสาร หนังสือ
3. ออกรายการวิทยุ

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อนุมูลอิสระ (Free Radical)

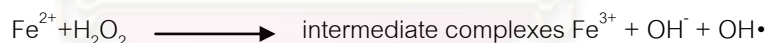
อิเล็กตรอนในอะตอมจะอยู่ในออร์บิทัล ทุกออร์บิทัลจะบรรจุอิเล็กตรอนได้สองตัวและอิเล็กตรอนเหล่านี้จะวิ่งวนตรงข้ามกันและมีความเสถียร ดังนั้นอนุมูลอิสระคือ อะตอมหรือโมเลกุลที่อิเล็กตรอนในออร์บิทัลไม่ครบคู่โดยอาจขาดหายไปหนึ่งตัวหรือมากกว่า เช่น ไฮโดรเจนอะตอมเป็นอนุมูลอิสระอย่างง่ายสุด เนื่องจากมีอิเล็กตรอนอิสระหนึ่งตัว⁽⁴⁰⁾ เช่นเดียวกับธาตุโลหะทรานซิชันและโมเลกุลออกซิเจน ซึ่งอะตอมเหล่านี้ไม่มีความเสถียร มีความสามารถในการทำปฏิกิริยากับสสารอื่นสูงโดยอาจทำปฏิกิริยาปฏิกิริยาชีวเคมี อิเล็กตรอนไม่ครบคู่ให้ (reducing agent: ปฏิกิริยาออกซิเดชัน) หรือแย่งจากสสารอื่น (oxidizing agent: ปฏิกิริยารีดักชัน) เป็นการขูดขอยอิเล็กตรอนที่ขาดไป และการสร้างพันธะโคเวเลนต์เพื่อขอให้อิเล็กตรอนร่วมยกตัวอย่างเช่น ธาตุโลหะทรานซิชันที่พบบริเวณแอกทีฟของเอนไซม์ oxidases และ oxygenases เนื่องจากความสามารถในการรับและให้อิเล็กตรอน⁽⁴¹⁾ โดยมากโมเลกุลในร่างกายจะเป็นสารธรรมดา เมื่ออนุมูลอิสระมากระทบก็ทำให้สารธรรมดามีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่เกิดขึ้นได้อนุมูลอิสระตัวใหม่ เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ไปเรื่อยๆ สิ่งมีชีวิตทั้งหลายต้องใช้พลังงานในการดำรงชีวิต โดยใช้ออกซิเจนในการผลิตพลังงานและเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ สิ่งมีชีวิตจะควบคุมการขนส่งออกซิเจนและมีระบบป้องกันอย่างดี โดยไมโทคอนเดรียจะเปลี่ยน O_2 มากกว่า 95% ที่ได้รับให้เป็นน้ำโดยใช้เอนไซม์ Cytochrome oxidase เพื่อไม่ให้เกิดพิษจากออกซิเจนได้เพราะออกซิเจนจัดว่าเป็น diradical และเป็นตัวออกซิไดซ์อย่างแรง เนื่องจากเซลล์ส่วนใหญ่ในร่างกายไม่ได้สัมผัสออกซิเจนมากนัก และพบว่าค่า pO_2 ในกระแสเลือดต่ำนั้นกว่าในบรรยากาศมาก⁽⁴⁰⁾ สารอนุมูลอิสระที่พบมากในระบบชีวภาพจึงมักเกี่ยวข้องกับออกซิเจนและตัวอื่นๆ โดยเรียกรวมๆ ว่า Reactive oxygen and nitrogen species [RONS] ซึ่งในที่นี้ reactive species ใช้เป็นชื่อเรียกอนุมูลอิสระออกซิเจนและออกซิเจนที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระแต่มีฤทธิ์ออกซิไดซ์ เช่น H_2O_2 , HOCl รวมถึงอนุมูลอิสระไนโตรเจน คลอรีน โบรมีน ด้วย⁽⁴⁰⁾ ตัวอย่างของ RONS ที่มีความสำคัญทางชีวภาพดังต่อไปนี้

1. Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) พบในสิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจนทุกชนิด $O_2^{\cdot-}$ เกิดจากการเติมอิเล็กตรอนอิสระหนึ่งตัวให้โมเลกุลออกซิเจน $O_2^{\cdot-}$ ไม่สามารถผ่านผนังเซลล์ได้นอกจากการผ่านทาง channel บางชนิด $O_2^{\cdot-}$ มีความสำคัญต่อร่างกายคือ ใช้ในการทำลายสิ่งแปลกปลอมและกระตุ้น immune complex ของเม็ดเลือดขาว เช่น นิวโทรฟิล อีโอซิโนฟิล โมโนไซต์ แมคโครฟาจ⁽⁴¹⁾ หากไม่มีสารนี้จะทำให้ร่างกายต้านทานเชื้อโรคได้น้อย เช่น ผู้ป่วย Chronic granulomatous disease⁽⁴²⁾ ถ้าหากนิวโทรฟิลปล่อย $O_2^{\cdot-}$ จำนวนมากเกินไป เช่น จากเอนไซม์ NADH dehydrogenase complex⁽⁴³⁾ $O_2^{\cdot-}$ จะทำปฏิกิริยากับสารน้ำนอกเซลล์ กระตุ้นเคมีแทกติกเพคเตอร์ก่อให้เกิดการอักเสบ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตพลังงาน และเมแทบอลิซึมของกรดอะมิโน $O_2^{\cdot-}$ ยังเป็นสารรีดิวซ์ ซึ่งทำให้เหล็กถูกปลดปล่อยออกจาก ferritin ในกระแสเลือด หากมีธาตุเหล็กอิสระปริมาณมาก (โดยเฉพาะในเวลาที่ยังมีสภาวะเป็นกรด ซึ่งมักเกิดจากการขาดอากาศ พบมากในกรณีของโรคหัวใจขาดเลือด) จะก่อให้เกิดเนื้อเยื่อเสียหายรุนแรงเรียกว่า Reperfusion

injury⁽⁴⁴⁾ เซลล์ของผนังหลอดเลือดจะผลิตไนตริกออกไซด์ (Nitric Oxide: NO•) เพื่อใช้เป็นสาร vasodilator มาทำปฏิกิริยากับ $O_2^{\cdot-}$ ที่พบได้ในกระแสเลือด เกิดเป็นไนเทรทไอออน (ONOO•) เป็นการกำจัด $O_2^{\cdot-}$

2. Hydrogen peroxide (H_2O_2) เมื่อเติมอิเล็กตรอนอิสระสองตัวให้โมเลกุลออกซิเจนจะเกิดเป็น O_2^{2-} ซึ่งไม่มีอิเล็กตรอนขาดคู่และไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระ แต่ O_2^{2-} เมื่ออยู่ใน pH ร่างกายปกติจะเกิดปฏิกิริยา dismutation reaction ได้รับโปรตอนเกิดเป็น H_2O_2 แต่หากอยู่ในสภาวะที่เป็นกรด ปฏิกิริยานี้จะเกิดเร็วขึ้น เนื่องจากค่า pKa ของ H_2O_2 สูง H_2O_2 มีอัตราการทำปฏิกิริยาต่ำแต่สามารถผ่านผนังเซลล์ได้ง่าย⁽⁴¹⁾ โดย H_2O_2 จะทำปฏิกิริยา 2 แบบคือ 1. เป็น secondary messenger ส่งเสริม transcription factor คือ NF- κ B ให้เข้าจับกับ DNA ดังนั้นจึงมีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ควบคุมโดย NF- κ B รวมทั้งยีนอื่นๆ เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับไวรัส provirus HIV-1 2. เป็นตัวออกซิไดซ์เข้าทำลายผนังเซลล์ โปรตีน และ DNA ให้เสียหาย ทำให้ Ca^{2+} รั่วไหลออกมาจากแหล่งเก็บภายในเซลล์ไปกระตุ้นเอนไซม์ proteolytic ให้ทำลายระบบการสร้างพลังงานของเซลล์ เช่น เอนไซม์ในกระบวนการ glycolytic คือ glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase ทำให้เซลล์ขาดแคลนพลังงานและตาย อย่างไรก็ตาม H_2O_2 ก็ยังเป็นสิ่งที่ร่างกายเราขาดไม่ได้เพราะ H_2O_2 ทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณระดับเซลล์และ thyroid oxidase ใช้ H_2O_2 ในการสร้างฮอร์โมนไทรอยด์ เป็นต้น⁽⁴³⁾

3. Hydroxyl radical (OH•) เกิดได้จากหลายปฏิกิริยา เช่น เกิดจากโมเลกุลน้ำในร่างกายแตกตัว เกิดจากการแตกของพันธะ O-O ของ H_2O_2 เกิดจากการรับรังสีหรือความร้อน⁽⁴²⁾ หรือเกิดจากปฏิกิริยา Haber-Weiss reaction ระหว่าง H_2O_2 และ $O_2^{\cdot-}$ เป็นต้น อัตราการเกิด OH• ในร่างกายโดยอาศัยการแตกตัวของสารตั้งต้นอย่างเดียวนั้นต่ำมาก หากเราผสม H_2O_2 กับเกลือของเหล็ก (Fe^{2+}) ก็จะทำให้เร่งการสร้าง OH• ได้มากขึ้น เนื่องจากโลหะไอออนสามารถรีดิวซ์อิเล็กตรอนส่วนเกินทำให้แตกพันธะ O-O ได้ง่าย⁽⁴⁴⁾ ทองแดง (Cu^{1+}) ก็สามารถเร่งปฏิกิริยาสร้างอนุมูลไฮดรอกซิลได้ด้วยอัตราที่รวดเร็วกว่าเหล็กเสียอีก เราเรียกปฏิกิริยาที่มีโลหะเป็นตัวเร่งนี้ว่า Fenton reaction ดังสมการ



เนื่องจาก H_2O_2 และ Fe^{2+} หรือ Cu^{1+} พบได้ในร่างกายจึงมีการสร้าง OH• ตลอดเวลาโดยอัตราเร็วจะขึ้นกับ pH ของร่างกาย OH• มีอัตราการทำปฏิกิริยาที่สูงมากทำให้สามารถทำปฏิกิริยาได้กับโมเลกุลทุกอย่างที่พบในเซลล์สิ่งมีชีวิต แต่เนื่องจาก OH• ไม่สามารถผ่านข้ามผนังเซลล์ได้และมี half-life ที่สั้นมาก ดังนั้นจึงมักทำปฏิกิริยากับผนังเซลล์ที่พบใกล้ที่สุดโดยเฉพาะส่วนของหมู่คาบอนิลที่เชื่อมส่วนกรดไขมัน (fatty acids) กับกลีเซอรอล (glycerol) บนโมเลกุลฟอสโฟลิปิด ในอวัยวะของร่างกายที่มีสารรีดิวซ์สูงและสัมผัสกับออกซิเจนมาก เช่น นัยน์ตาและปอด ซึ่งมีแอสคอร์เบตความเข้มข้นสูง ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่เปลี่ยน Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ตลอดเวลา ทำให้เกิดการสร้าง OH• ปริมาณมากในอวัยวะดังกล่าว⁽⁴¹⁾

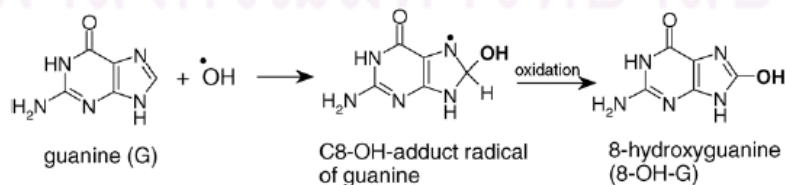
4. Singlet oxygen (1O_2) เกิดจากการดึงอิเล็กตรอนอิสระหนึ่งตัวออกจากโมเลกุลออกซิเจนหรือเติมพลังงานให้โมเลกุลออกซิเจน⁽⁴⁰⁾ นั่นคือ 1O_2 เป็นภาวะกระตุ้นของ O_2 (O_2 $^1\Delta_g$) ทำให้ 1O_2 ไม่มีอิเล็กตรอนขาดคู่และไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระ พบได้มากในบริเวณที่สารชีวภาพสัมผัสกับออกซิเจน เช่น เลนส์เรตินา⁽⁴¹⁾ และผิวหนัง 1O_2 ในร่างกายมักทำหน้าที่เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณ หากมีมากเกินไป 1O_2 เข้าทำปฏิกิริยาโดยตรงกับกรดไขมันไม่อิ่มตัวของผนังเซลล์เกิดเป็น Peroxide radical (ROO•)⁽⁴⁰⁾

5. Peroxynitrite (ONOO•) เป็นสารออกซิไดซ์อย่างแรง เกิดจาก NO• ทำปฏิกิริยาสั่งร้างพันธะโควาเลนต์ กับ $O_2^{\cdot-}$ อย่างรวดเร็ว⁽⁴⁰⁾ ได้เป็น ONOO• NO• เป็นตัวส่งสัญญาณที่สำคัญและเป็นอนุมูลอิสระที่สร้างโดยเซลล์บุผนังหลอดเลือด เซลล์สมอง เซลล์เม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ NO• ยังมีหน้าที่ควบคุมการบีบตัวกล้ามเนื้อเรียบรอบหลอดเลือด การส่งกระแสประสาท และสามารถป้องกันเซลล์ผนังหลอดเลือดจากภาวะ Oxidative damage⁽⁴³⁾

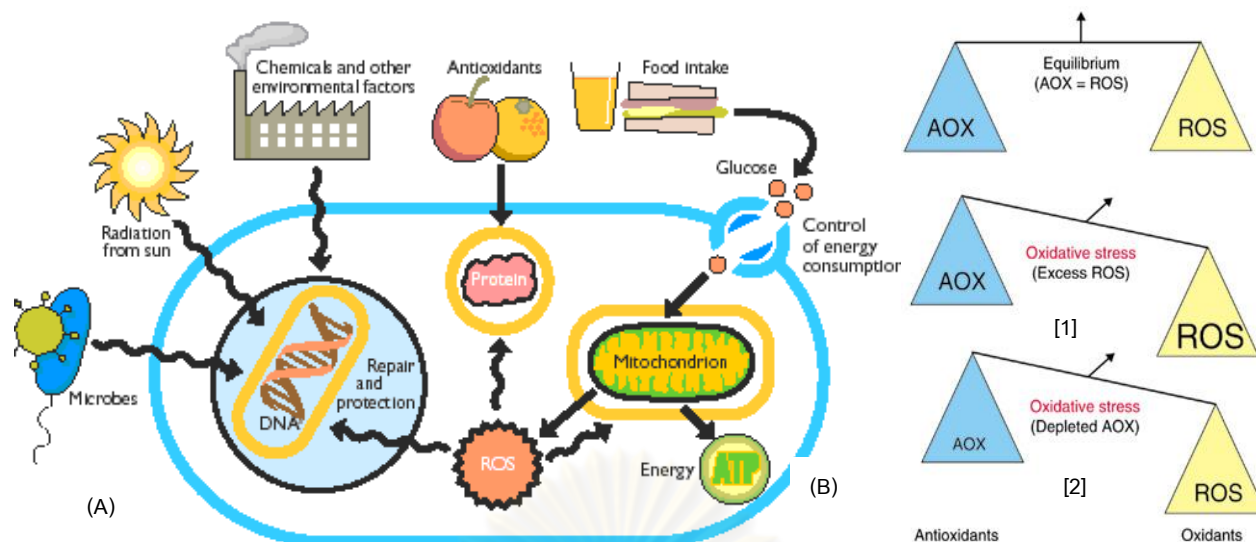
6. Peroxyl radical (LOO•) เกิดจากการที่ OH• เข้าทำปฏิกิริยากับส่วนฟอสโฟลิปิดบนผนังเซลล์ในส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัว หรือในบริเวณที่มีพันธะคู่มากโดยเฉพาะที่กรดไขมันตำแหน่งที่ 2 ของ glycerophospholipids เช่น phosphatidylcholine และ arachidonic acid เกิดเป็น hydroxyl aldehydes LOO• ที่เกิดขึ้นทำปฏิกิริยากับกรดไขมันตัวอื่น เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไปเรียกว่า lipid peroxidation รวมทั้งทำให้เกิดการออกซิเดชันโปรตีนบนผนังเซลล์ด้วย เช่น รีเซพเตอร์ ช่อง channel และเอนไซม์ต่างๆ⁽⁴⁰⁾ ส่งผลให้ผนังเซลล์สูญเสียความยืดหยุ่น องค์ประกอบต่างๆ ในเซลล์สามารถหลุดออกมาทำให้เซลล์ตาย อีกทั้งผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการแตกตัวของผนังเซลล์ เช่น พวก Isoprostanes (IPs) epoxides แอลดีไฮด์ คีโตน และไฮโดรคาร์บอน สามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพในร่างกายได้เช่นเดียวกัน

สาร Reactive species ส่วนใหญ่เกิดขึ้นโดย**ไม่ตั้งใจ** (accidental generation) จากกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ เช่น การหายใจของเซลล์ โดยมักหลุดรอดจากกระบวนการส่งต่ออิเล็กตรอน โดยเฉพาะช่วง ubiquinone ส่งต่อไป Cytochrome c1 กับช่วง NADH-dehydrogenase⁽⁴⁴⁾ กระบวนการกำจัดสารพิษของเซลล์โดย Cytochrome P450 การย่อยอาหาร รวมถึงกระบวนการ autooxidation และการที่สารในร่างกายทำปฏิกิริยา Fenton reaction กับโมเลกุลออกซิเจน เช่น catecholamines, ascorbic acid และ reduced flavin สาร reactive species ที่เกิดแบบ**ตั้งใจ** (Deliberate Synthesis) มักเกิดจากการผลิตของเอนไซม์ NADPH oxidase และ myeloperoxidase บนผนังเซลล์เม็ดเลือดขาว ไฟโบรบลาสต์ เซลล์บุผนังหลอดเลือด และเอนไซม์ oxidases อื่นๆ เช่น glycolate oxidase, xanthine oxidase เป็นต้น⁽⁴³⁾ ไว้ใช้ในการป้องกันร่างกายจากสิ่งแปลกปลอม ในปัจจุบันเชื่อว่าสาเหตุโรคมกมายเกิดจากการเสื่อมของเซลล์และสารต่างๆ ในร่างกายที่เกิดจากการทำลายของอนุมูลอิสระทั้งที่เกิดขึ้นในร่างกายสร้างขึ้นมาเอง เช่น ระบบภูมิคุ้มกันในการต่อสู้เชื้อโรค และที่ได้รับมาจากภายนอกร่างกาย เช่น มลภาวะจากสิ่งแวดล้อม อาหาร การออกกำลังกายอย่างหนัก **ดังภาพที่ 2.2** อนุมูลอิสระนี้จะไปทำอันตรายส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์และเนื้อเยื่อ เช่น ผนังเยื่อหุ้มเซลล์ ไทโทพลาซิม ไมโทคอนเดรีย และนิวเคลียส ทำให้สูญเสียโครงสร้าง หน้าที่การทำงาน และทำให้เซลล์ตาย เกิดเป็นพยาธิสภาพของโรคต่างๆ⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾ ยกตัวอย่างเช่น คนที่สูบบุหรี่จะแก่เร็วกว่าคนที่ไม่ได้สูบบุหรี่ เนื่องจากสาร reactive species โดยเฉพาะ H_2O_2 (พบมากโดยเฉพาะจากการสูบบุหรี่) จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ myeloperoxidase เกิดเป็น HOCl ไปทำลายเอนไซม์ α 1-antiproteinase ซึ่งเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ serine proteinase เช่น elastase และ collagenase ทำให้เอนไซม์เหล่านี้ย่อยโปรตีนโครงสร้างร่างกายตลอดเวลา จึงทำให้คนสูบบุหรี่ดูแก่กว่าคนที่ไม่สูบบุหรี่⁽⁴⁸⁾ อีกหนึ่งตัวอย่างคือ การเกิด Fatty liver ในผู้ป่วยโรคอ้วน พบว่ามีระดับ oxidative stress และมีการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2E1 (เป็นเอนไซม์ cytochrome P450 ที่มี pro-oxidant activity สูง) เพิ่มขึ้นและมีสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายลดลง จึงทำให้พัฒนาไปเป็นโรคตับแข็งอย่างรวดเร็ว⁽⁴⁹⁾ ที่อันตรายที่สุดคือ อนุมูลอิสระจะโจมตีสารพันธุกรรมที่ใช้ควบคุมให้เซลล์ดำรงชีวิตต่อไปคือ DNA

และ RNA ในนิวเคลียสและไมโทคอนเดรีย ซึ่ง DNA ของไมโทคอนเดรียไม่มีโปรตีนฮิสโตน (histone) ปกป้องกัน ดังเช่น DNA ในนิวเคลียส จึงถูกทำลายได้ง่ายกว่า นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่า DNA ในไมโทคอนเดรียที่เสียหายนี้มีบทบาทสำคัญในพยาธิสภาพโรคทางประสาท⁽⁵⁰⁾ อนุมูลอิสระยังทำปฏิกิริยาให้โครงสร้างสาย DNA หรือโครโมโซมให้ผิดปกติกจากกระบวนการ oxidation, methylation, depurination และ deamination โดยเฉพาะบริเวณ microsatellites บนสาย DNA เป็นบริเวณที่อนุมูลอิสระเข้าโจมตีสูง ซึ่งการมีความผิดปกติในบริเวณนี้มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็ง พบว่าเบสที่ถูกโจมตีบ่อยที่สุดคือ guanine เปลี่ยนไปเป็น hydroxyguanine *ดังภาพที่ 2.1* ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับเบส cytosine ทำให้เกิดการถอดรหัสที่ผิดพลาดและ oxidized base เหล่านี้มักเป็นสารไม่มีชีวิต (เบสธรรมดาเป็นสารที่มีชีวิต) จึงทำให้โครงสร้าง DNA เปลี่ยนไป อีกทั้งการเกิดปฏิกิริยาเติมหมู่เมทิล (methylation) ให้ cytosine จะส่งผลกระทบต่อควบคุมการแสดงออกของยีน โดยที่อนุมูลอิสระแต่ละตัวจะทำปฏิกิริยาแตกต่างกัน เช่น O_2 และ H_2O_2 จะไม่ทำปฏิกิริยากับเบส DNA ส่วน 1O_2 จะเลือกทำปฏิกิริยากับเบส guanine เท่านั้น เป็นต้น⁽⁵⁰⁾ การที่ร่างกายมีอนุมูลอิสระไม่สมดุลกับสารต้านอนุมูลอิสระอาจเกิดจาก 1. การมีอนุมูลอิสระมากเกินไป เช่น ภาวะเหล็กเกินในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย (iron overload และ ferritin ลดลง) ผู้ป่วยจากพิษยาฆ่าวัชพืช Paraquat และผู้ที่มีภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia) เป็นต้น 2. การมีระดับสารต้านอนุมูลอิสระลดลงจึงป้องกันอนุมูลอิสระไม่ได้ เช่น ในผู้ป่วยโรค Kwashiorkor ซึ่งเป็นโรคที่ร่างกายขาดสารอาหารโดยเฉพาะโปรตีนทำให้มีระดับ GSH (ซึ่งเป็น peptide) ลดลง เรียกว่าภาวะ oxidative stress นอกจากนี้ oxidative stress ยังอาจเป็นปรากฏการณ์ต่อเนื่องจากโรคภัยที่เป็นอยู่ปัจจุบัน เพราะเมื่อเนื้อเยื่อได้รับความเสียหายจะสร้างสารก่อการอักเสบและสารก่อบาดแผล (injury mediators) หลายชนิด เช่น prostaglandins, leukotrienes, interleukins (ILs), interferons (IFNs), tumor necrosis factor (TNF)⁽⁴³⁾ เพิ่มความเสียหายมากขึ้น⁽⁴²⁾ ตัวบ่งชี้ภาวะ oxidative stress ระยะเริ่มต้นได้แก่ GSH ภายในเซลล์ลดลง และการผลิต ROS ภายในเซลล์ที่เพิ่มขึ้น⁽⁵¹⁾ หากมี oxidative stress มาก ร่างกายจะถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระเหล่านี้ ส่งผลให้เซลล์สูญเสียสภาพและหน้าที่เรียกว่า oxidative damage นอกจากนี้ยังทำให้ระบบซ่อมแซมส่วนที่เสียหายล้มเหลว ทำให้เอนโดพลาสมิก เรติคูลัม (endoplasmic reticulum: ER) ซึ่งเป็นตัวควบคุมและเก็บ Ca^{2+} ภายในเซลล์สูญเสียหน้าที่ ปล่อย Ca^{2+} อีกระลอกมาสูงเกินจนยับยั้งกระบวนการหายใจระดับเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์เปลี่ยนสภาพ และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ endonuclease ย่อย DNA⁽⁴³⁾ ทำลายเซลล์ให้ตายไปในที่สุด⁽⁵²⁾ เซลล์หลายชนิดสามารถทนและตอบสนองต่อภาวะ oxidative stress อ่อนๆ ได้โดยการเพิ่มการแบ่งตัวและเพิ่มการแสดงออกของระบบป้องกัน/ซ่อมแซม ซึ่งเป็นประโยชน์ในกรณีการรักษาบาดแผล แต่เป็นผลเสียในกรณีมีแบ่งตัวมากเกินไปกลายเป็นเนื้อเยื่อพังพืด⁽⁴⁰⁾



ภาพที่ 2.1: แสดงปฏิกิริยาระหว่าง guanine และ $OH\cdot$ กลายเป็นเบสเสียหายและแตกออกจากสาย DNA สามารถตรวจวัดได้ในสารคัดหลั่งจากร่างกาย เช่น เลือด น้ำไขข้อ หรือปัสสาวะ



ภาพที่ 2.2: อนุมูลอิสระเกิดขึ้นตลอดเวลารอบตัวเราทั้งจากสิ่งแวดล้อมเช่นจากเชื้อจุลินทรีย์ รังสีจากแสงอาทิตย์ สารพิษจากโรงงาน รวมถึงอาหารที่เรารับประทาน และสามารถเกิดขึ้นได้ภายในเซลล์เอง เช่น กระบวนการหายใจของเซลล์ ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะเข้าทำลายสารชีวโมเลกุล เช่น DNA โปรตีน และไขมัน ทำให้การทำงานของเซลล์ผิดปกติ การถอดรหัสพันธุกรรมผิดปกติ การผลิตพลังงานของไมโทคอนเดรียลดลง อนุมูลอิสระจะถูกสะเทินด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ จนไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับสารอื่นได้ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญมาจากอาหาร ผักผลไม้ และโปรตีนที่เซลล์สร้างขึ้นมา (A), สมดุลระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระ (AOX) และอนุมูลอิสระ (ROS) หากมีอนุมูลอิสระที่มากเกินไป [1] หรือมีสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ลดลง [2] จะทำให้เกิดภาวะ oxidative stress (B)

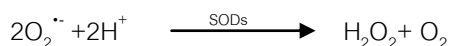
อนุมูลอิสระมีประโยชน์ต่อร่างกายเหมือนกัน จากการทำหน้าที่ในการต่อต้านเชื้อโรคและมีบทบาทในการส่งสัญญาณสื่อสารของเซลล์ (cell signaling) การสร้าง ROS ในร่างกายจะอยู่ในบริเวณที่จำกัดและเป็นสัญญาณที่จำเพาะ กลไกสมดุลดอกซ์ (สมดุลปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชัน) หรือ Redox state จะคงให้เซลล์อยู่ในสภาวะรีดิวซ์ตลอดเวลาเพื่อที่จะได้ใช้สัญญาณ ROS ได้ตรงจุดและถูกต้องแม่นยำสูงสุดในการสื่อสารทั้งในและระหว่างเซลล์ สารส่งสัญญาณที่สำคัญมี 2 ชนิดคือ แคลเซียมและ ROS โดยใช้กระบวนการเติม/ดึงหมู่ฟอสเฟตให้โปรตีนและเอนไซม์ต่างๆ (phosphorylation-dephosphorylation) ในการควบคุมการทำงานของเซลล์เช่นเดียวกัน ทำให้โปรตีนดังกล่าวเปลี่ยนแปลงโครงสร้างการจัดเรียงตัวมีผลให้โปรตีนนั้นทำงานหรือหยุดการทำงาน แต่กลไกต่างกันคือแคลเซียมจะใช้การเข้าจับกับโปรตีนโดยตรง ส่วน ROS จะใช้การออกซิไดซ์หมู่ซัลไฟด์ของโปรตีน⁽⁵³⁾ โดยการส่งสัญญาณสื่อสารของ ROS มักจะเกี่ยวกับการแบ่งตัว การเจริญเติบโต และการตายของเซลล์ โดยส่งกระตุ้นผ่านทางเอนไซม์ transcription factors และ nuclear factors ต่างๆ เช่น NF- κ B, MAP-kinase/AP-1, peroxisome proliferation-activated receptor (PPARs), extracellular signal regulated kinase1/2 (ERK1/2) และ Na⁺/H⁺ exchanger ฯลฯ เป็นต้น ซึ่งโปรตีนเหล่านี้มีกรดอะมิโน cysteine เป็นองค์ประกอบสูงทำให้ค่า reduction potential ต่ำ มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงภาวะรีดอกซ์ภายในเซลล์เรียกว่า redox sensitive protein ยกตัวอย่างเช่น การจับระหว่าง growth factor กับ growth factor receptor มีผลเพิ่มระดับ cAMP ภายในเซลล์ทำให้ภาวะรีดอกซ์ภายในเซลล์เปลี่ยนแปลง เกิดการกระตุ้นโปรตีนไคเนส (kinase) ทำให้เกิดปฏิกิริยา phosphorylation นักวิทยาศาสตร์

พบว่าโดยมาก ROS จะไม่กระตุ้นการ phosphorylation โดยตรง แต่มักจะยับยั้งการ dephosphorylation จึงทำให้การ phosphorylation โดยรวมเพิ่มขึ้น อีกทั้งเอนไซม์ kinase เช่น protein kinase c ก็ถูกกระตุ้นจาก ROS ได้โดยตรง⁽⁴⁰⁾

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

ร่างกายมนุษย์เรามีระบบการป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระไม่ให้มาทำอันตรายนั้นก็คือ สารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นสารที่มีความสามารถในการสะเทิน (neutralize) อนุมูลอิสระโดยการให้อิเล็กตรอน หรือไฮโดรเจนอะตอมหนึ่งตัวหรือมากกว่าแก่อนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระมีความไวในการทำปฏิกิริยากับสารอื่นลดลงหรือหมดไปโดยเมื่อสารต้านอนุมูลอิสระให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระไปแล้วก็จะกลายเป็นอนุมูลอิสระที่เฉื่อย ไม้ไวต่อปฏิกิริยา สารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันหรือหน่วงเหนี่ยวอันตรายอันเกิดจากอนุมูลอิสระได้จากหลายกระบวนการ เช่น ทำปฏิกิริยาจับโลหะไม่ให้เข้าร่วมในปฏิกิริยาสร้างอนุมูลอิสระ เก็บกินอนุมูลอิสระ ทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่อนุมูลอิสระ หรือเข้าเป็นส่วนหนึ่งของเครือข่าย redox antioxidant ของร่างกาย ดังภาพที่ 2.3 และควบคุมการแสดงออกของยีนของเซลล์ต่างๆ ให้เหมาะสม มนุษย์รู้จักการนำสารต้านอนุมูลอิสระมาใช้เป็นเวลานานมาแล้ว ในสมัยจีนโบราณเชื่อว่า การมีอายุวัฒนะนั้นนั้นเกิดจากมีธาตุหยิน (เย็น : antioxidant) และหยาง (ร้อน: oxidant) ในร่างกายสมดุลกัน แพทย์จีนโบราณใช้การรักษาสมดุลนี้ในการรักษาสุขภาพผู้ป่วยให้แข็งแรง ปัจจุบันความรู้ทางวิทยาศาสตร์สรุปว่า สมดุลหยินและหยางก็คือ สมดุลสารต้านอนุมูลอิสระ-อนุมูลอิสระนั่นเอง⁽⁵⁴⁾ ร่างกายเรามีสารต้านอนุมูลอิสระรูปแบบต่างๆ มากมาย ทั้งที่สร้างขึ้นเองในร่างกายซึ่งจะเป็นพวกเอนไซม์หรือโปรตีนต่างๆ ที่สามารถจับอนุมูลอิสระไว้กับตัวเอง เช่น albumin หรือเปลี่ยนอนุมูลอิสระให้เป็นรูปที่ไม่ไวทำให้ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่น เช่น ferritin ซึ่งเป็นโปรตีนจับเหล็กที่อยู่ในกระแสเลือด แต่ถ้าเรามีภาวะอนุมูลอิสระมากกว่าที่สารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายเราจะต้านทานได้ ซึ่งอาจจะเกิดจากการบาดเจ็บ ป่วยไข้ ฯลฯ จึงต้องได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกมาเสริม แหล่งที่พบสารต้านอนุมูลอิสระมากและหาง่ายก็คืออาหารที่เรารับประทานนั่นเอง ไม่ว่าจะเป็นเนื้อสัตว์ ไขมัน ผัก ผลไม้ ธัญญาพืชและสมุนไพรต่างๆ ต่างก็มีสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประโยชน์ทั้งสิ้น สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกายได้แบ่งเป็นสองประเภทคือ สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ซึ่งเป็นหลักในการป้องกันอนุมูลอิสระและที่ไม่ใช่เอนไซม์ได้แก่ โปรตีนและไขมัน และสารอื่นๆ เอนไซม์และโปรตีนที่ทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ ได้แก่

1. Superoxides dismutase (SODs) เอนไซม์นี้มีอยู่ 2 ชนิดคือ SODs ที่บริเวณแอคทีฟมีแมงกานีสเป็นองค์ประกอบ (MnSOD) พบในเมทริกซ์ของไมโทคอนเดรียและ SODs ที่บริเวณแอคทีฟมีทองแดงกับสังกะสีเป็นองค์ประกอบ (CuZnSOD) พบในช่องว่าง inter-membrane ของไมโทคอนเดรียและกระจายอยู่ตามส่วนอื่นๆ ในเซลล์ เป็นเอนไซม์ที่ใช้สำหรับกำจัด $O_2^{\cdot -}$ โดยเฉพาะ โดยจะเปลี่ยน $O_2^{\cdot -}$ ให้เป็น H_2O_2 และออกซิเจนดังสมการ

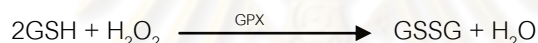


เมื่อ H_2O_2 เกิดขึ้นดังนั้นจึงต้องมีเอนไซม์ที่ใช้กำจัด H_2O_2 ต่อ เช่น glutathione peroxidase และ catalase SODs มีประโยชน์ในการป้องกันร่างกายในภาวะขาดออกซิเจน (reoxxygenation injury)⁽⁵⁵⁾ โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ผ่าตัดหัวใจแต่หากร่างกายมีเอนไซม์ SODs มากเกินไปอาจก่อให้เกิดกระบวนการ lipid peroxidation ได้จาก H_2O_2 ที่เกิดจากปฏิกิริยาทำให้ปลดปล่อยเหล็กอิสระออกมาจาก ferritin⁽⁴⁴⁾ เพิ่ม activity

ของเซลล์โดยเฉพาะเซลล์ไม่ปกติ จากงานวิจัยพบว่า เซลล์มะเร็งที่มีปริมาณเอนไซม์นี้สูงจะมีการพยากรณ์โรคที่เลว เซลล์มะเร็งสามารถแพร่กระจายได้รวดเร็วเนื่องจาก SODs สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Matrix metalloproteinase (MMP) ได้⁽¹⁾ SODs ที่มากเกินไปยังก่อโรคทางเมแทบอลิซึมหลายโรค เนื่องจากปริมาณทองแดงและสังกะสีที่สูงมากดังกล่าวอาจทำให้ระบบประสาททำงานผิดปกติ เช่น ในผู้ป่วย Down syndrome เป็นที่น่าสงสัยเกิดวาระหัสพันธุกรรมของเอนไซม์ Cu-ZnSOD ก็อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 21 เช่นเดียวกัน⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾

2. **Catalase (Cat)** ส่วนมากจะอยู่ใน peroxisomes ใช้เพื่อกำจัด H_2O_2 ที่เกิดจากเอนไซม์ oxidase ทั้งหลายภายในไซโทพลาซึมแต่พบน้อยมากในไมโทคอนเดรียจึงไม่มีความสำคัญในการกำจัดอนุมูลอิสระที่หลุดจากกระบวนการหายใจระดับเซลล์

3. **Glutathione peroxidase (GPX)** ภาพที่ 2.3 เป็นเอนไซม์ชนิดเดียวในร่างกายมนุษย์ที่มีธาตุซีลีเนียมเป็นองค์ประกอบ ซึ่งจับอยู่ในรูป selenocysteine ที่แอดทีฟของเอนไซม์ เอนไซม์นี้ทำหน้าที่กำจัด H_2O_2 เช่นเดียวกับ catalase แต่พบมากในไมโทคอนเดรียจึงทำงานร่วมกับ SODs โดยดึง glutathione (GSH เป็น tripeptide: glu-cys-gly) ฐปรีดิวิซีให้มารับอิเล็กตรอนอิสระกลายเป็น glutathione รูปออกซิไดซ์ GSSG (GSH สองโมเลกุลที่เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์) ดังสมการ



GSSG ที่เกิดขึ้นสามารถเปลี่ยนกลับเป็น GSH ได้ด้วยเอนไซม์ glutathione reductase ดังสมการ

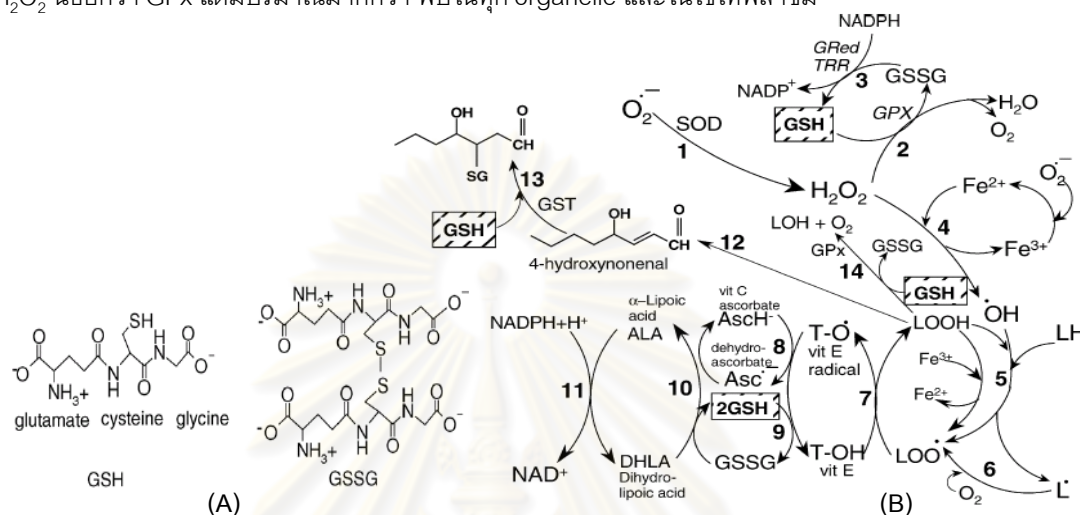


4. **Glutathione reductase (Gred)** เป็นโปรตีนทำหน้าที่เปลี่ยน GSSG กลับคืนเป็น GSH ได้โดยใช้ NADPH ซึ่งเป็นสารรีดิวซ์ที่พบได้ในร่างกาย ทำหน้าที่ในการบริจาดเอนไซม์นี้ด้วยกัน 4 ชนิดคือ GPx1 พบมากที่สุด GPx2 พบในเซลล์ทางเดินอาหารมีส่วนช่วยในการย่อยอาหารจำพวกไขมัน GPx3 พบในสารน้ำในร่างกายและ GPx4 ซึ่งมีชื่อเรียกอีกอย่างว่า phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) ที่นอกจากกำจัด H_2O_2 แล้วยังสามารถเปลี่ยน fatty acid hydroperoxide ที่เกิดจาก Lipid peroxidation ไปเป็นแอลกอฮอล์

5. **Glutathione (GSH)** มีความสำคัญทำให้เซลล์ทนต่อภาวะ oxidative damage เพราะเป็นสารรีดิวซ์หลักที่ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ peroxide และสาร reactive species โดย GSH จะใช้ส่วน thiol ที่มีหมู่ sulfhydryl (-SH) ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปทำปฏิกิริยากับสารอื่นในเซลล์⁽⁵⁹⁻⁶⁰⁾ นอกจากนี้ยังมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึม เช่น ร่วมกับเอนไซม์ NAD(P)H : quinone reductase (QR) ดึงอิเล็กตรอนสองตัวออกจากสารเมแทบอลิต์ต่าง ๆ⁽⁶¹⁾ เป็นต้น การที่ GSH ภายในเซลล์ลดลงจะส่งผลให้ผนังของไมโทคอนเดรียเกิดความเสียหาย (เนื่องจากขาดการป้องกันจาก GSH) ทำให้ Cytochrome c สามารถหลุดลอดออกมาไปกระตุ้นเอนไซม์ caspase และไปรบกวนการเปิด-ปิดของ channel ของผนังด้านในไมโทคอนเดรียทำให้กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนในการหายใจระดับเซลล์ผิดปกติจนระดับพลังงานของเซลล์ (ATP) ลดลงจน เซลล์ไม่สามารถดำรงชีวิตได้⁽⁶²⁾ ซึ่งพบว่าเป็นกลไกพิษยาหลายชนิดที่มีต่อตับ ส่วนใหญ่เกิดจากการที่ปริมาณ NADPH ลดลงเนื่องจากกระบวนการ Hexose monophosphate shunt (HMP) ซึ่งเป็น

กระบวนการหลักในการผลิต NADPH ของเซลล์ตับเสียหายจนทำให้การเปลี่ยน GSSG เป็น GSH เกิดขึ้นไม่ได้⁽⁵¹⁻⁶³⁾

6. Peroxiredoxin เป็นระบบที่ใช้ในการกำจัด H₂O₂ ที่สำคัญที่สุดในสัตว์พืชและแบคทีเรีย มีรูปร่างเป็น homodimer มีกรดอะมิโนซิสทีนเป็นองค์ประกอบบริเวณแอคทีฟ มีความสามารถในการกำจัด H₂O₂ น้อยกว่า GPx แต่มีปริมาณมากกว่า พบในทุก organelle และในไซโทพลาซึม⁽⁴⁰⁾



ภาพที่ 2.3: ลักษณะโครงสร้างของ GSH และ GSSG (A), เครือข่ายสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ glutathione (GSH) และสารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ ภายในเซลล์ (วิตามินอี, วิตามินซี, liponic acid) (1): ซูเปอร์ออกไซด์ถูกเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) เปลี่ยนไปเป็น H₂O₂ (2): H₂O₂ ถูกเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) ทำลายอย่างรวดเร็วโดยมี GSH เป็นตัวบริจาคอิเล็กตรอนให้ (3): oxidized glutathione (GSSG) ถูกเปลี่ยนกลับไปเป็น GSH ด้วยเอนไซม์ glutathione reductase (Gred) โดยใช้ NADPH เป็นตัวบริจาคอิเล็กตรอนให้ (4): โลหะเช่น Fe²⁺, Cu⁺ สามารถแตก H₂O₂ ไปเป็น reactive hydroxyl radical (Fenton reaction) (5): OH• มักทำปฏิกิริยาดังอิเล็กตรอนจากโมเลกุลที่อยู่ใกล้ที่สุดเช่นกรดไขมันไม่อิ่มตัว (LH) เกิดเป็น carbon-centered lipid radical (L•) (6): L• ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลออกซิเจนต่อเกิดเป็น lipid peroxy radical (LOO•) (7): LOO• ถูกรีดิวซ์โดยวิตามินอี (T-OH) ได้เป็น lipid hydroperoxide และอนุมูลอิสระของวิตามินอี (T-O•) (8): T-O• จะถูกเปลี่ยนกลับเป็นวิตามินอีโดย ascorbic acid (AscH-) เกิดเป็น ascorbyl radical (Asc•-) (9): การเปลี่ยน T-O• กลับเป็นวิตามินอีโดย GSH (10): oxidized glutathione (GSSG) และ ascorbyl radical (Asc•-) รีดิวซ์กลับไปเป็น GSH และวิตามินซี (11): Dihydrolipoic acid (DHLA) โดยสามารถเปลี่ยนกลับไปเป็น α-lipoic acid (ALA) โดยใช้ NADPH เป็นตัวบริจาคอิเล็กตรอนให้ (12): lipid hydroperoxide แตกสลายไปเป็นแอลดีไฮด์ซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์ที่มีบทบาทสำคัญ เช่น 4-hydroxynonenal (13): 4-hydroxynonenal เปลี่ยนไปเป็น innocuous glutathyl adduct โดยเอนไซม์ glutathione S-transferase (GST) (14): lipid hydroperoxide ถูกรีดิวซ์ไปเป็นแอลกอฮอล์และออกซิเจนโดยเอนไซม์ GPx โดยใช้ GSH เป็นตัวบริจาคอิเล็กตรอนให้ (B)

7. **เอนไซม์เฟส II (phase II xenobiotic detoxification enzyme)** เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในไมโทคอนเดรียที่ทำหน้าที่เปลี่ยนสารต่างๆ ให้สามารถละลายในน้ำได้มากขึ้นเพื่อที่ร่างกายจะได้ขับสารเหล่านี้ ออกจากปัสสาวะ พบมากในเซลล์ตับ เช่น glutamate-cysteine ligase (GCL), hemeoxygenase-1 (HO-1), Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD), quinine reductase (QR), dihydrodiol dehydrogenase (3 α -HSD), expoxide hydrolase (EPHX1), leukotieneB₄ dehydrogenase (LTD), aflatoxinB₁ dehydrogenase เป็นต้น

8. **โปรตีนที่ทำหน้าที่จับโลหะ** มีหน้าที่จับและเก็บกักโลหะ เช่น เหล็กและทองแดง ให้เพียงพอกับที่ร่างกายต้องการใช้โดยไม่ให้มีโลหะอิสระหลงเหลือในพลาสมา เนื่องจากโลหะอิสระสามารถเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการสร้างอนุมูลอิสระ แต่ร่างกายไม่มีกระบวนการกำจัดโลหะส่วนเกินนี้⁽⁴⁴⁾ เหล็กในร่างกายมีประมาณ 4 กรัม 60% จับอยู่กับ hemoglobin 10% พบใน myoglobin และที่เหลือเป็นเอนไซม์ที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบหรือจับกับโปรตีนเช่น transferrin, ferritin, ceruloplasmin, hemoglobin และอัลบูมิน ส่วนโปรตีนจับทองแดงคือ ceruloplasmin ในร่างกายมีทองแดงประมาณ 80 มิลลิกรัม ส่วนใหญ่ (>95%) จับกับโปรตีนชนิดนี้⁽⁴¹⁾

9. **สารอื่นๆ** ที่แสดงคุณสมบัติในการป้องกันเซลล์ เช่น **กรดอะมิโน Carnosine และ Ansenine** ที่พบได้ในกล้ามเนื้อสัตว์มีกระดูกสันหลังทั่วไป สามารถป้องกันการทำลาย DNA จาก Fe²⁺ และ Cu¹⁺ แต่ไม่สามารถป้องกันการทำลายที่เกิดจาก H₂O₂ แสดงว่ากรดอะมิโนทั้งสองตัวนี้มีสมบัติในการดึงโลหะ ออกจากปฏิกิริยาแต่ไม่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระนั่นเอง⁽⁶⁴⁾ มีรายงานวิจัยอีกว่า **เมลาโทนิ (melatonin)** ระดับ ความเข้มข้นต่ำๆ สามารถเพิ่มปริมาณ GSH ภายในเซลล์ และเพิ่มการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 แต่หาก ทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยงนานขึ้นพบว่า ความเข้มข้นเดียวกันนี้ กลับสามารถลดอัตราการอยู่รอดของเซลล์ลง หากเพิ่มความเข้มข้นขึ้นกลับทำให้ GSH ลดลง อีกทั้งเพิ่มภาวะ oxidative stress ในเซลล์อย่างรวดเร็ว (15 นาทีหลังทดสอบกับเมลาโทนิ)⁽⁵¹⁾ **อัลบูมิน กลูโคส กรดยูริค บิลิรูบิน** สารเหล่านี้แม้จะไม่สามารถยับยั้งปฏิกิริยากำเนิด OH• แต่สามารถทำตัวเป็นเป้าหมายของ OH• โดยให้ OH• ทำลายตัวเองเท่านั้นไม่ไปกับปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ เรียกว่าเป็น sacrificial antioxidant นอกจากนี้ กรดยูริคและแอสคอร์เบสในพลาสมายังทำหน้าที่เป็น free radical scavenger เก็บกิน O₃ และ NO₂• ซึ่งมีให้เกิด lipid peroxidation ต่อไปและพบว่ามีความสูงหากร่างกายเกิดภาวะ acute oxidative stress⁽⁴³⁾

สารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ จะได้รับจากภายนอกร่างกาย ส่วนมากจะได้รับจากอาหารที่เรารับประทานได้แก่

1. **วิตามิน** เป็นสารที่ร่างกายต้องการน้อยแต่ขาดไม่ได้มีความจำเป็นต่อการทำงานของร่างกาย มีหน้าที่นำสารอาหารหลัก เช่น โปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรตไปใช้ในการสร้างเนื้อเยื่อและผลิตพลังงานสำหรับการดำรงชีวิต และจำเป็นสำหรับการทำงานของอวัยวะต่างๆ เช่น การสร้างเม็ดเลือดแดง การแข็งตัวของเลือด การสร้างกระดูก การมองเห็น และการทำงานของระบบประสาท วิตามินแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ ก. วิตามินที่ละลายในน้ำ เช่น กลุ่มวิตามินบีและวิตามินซี นักวิทยาศาสตร์พบว่า pyridoxine และ niacin มีส่วนช่วยป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวาน⁽⁶⁵⁾ และ ข. วิตามินที่ละลายในไขมัน เช่น แครโรทีน

และเบตาแคโรทีน วิตามินดี วิตามินเค และวิตามินอี ซึ่งมีด้วยกันหลายไอโซฟอร์มโดย γ -tocopherol เป็นตัวที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดและเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในส่วนไขมันที่สำคัญที่สุดในร่างกาย ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาถูกใช้จาก lipid peroxidation⁽⁴²⁾

2. เกลือแร่ มีบทบาทความสำคัญเช่นเดียวกับวิตามินคือร่างกายต้องการน้อยแต่ขาดไม่ได้ ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของร่างกาย องค์ประกอบของเซลล์เนื้อเยื่อ เส้นประสาทและเอนไซม์รวมถึงฮอร์โมนต่าง ๆ ช่วยควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อในทุกอวัยวะ สามารถแบ่งเกลือแร่ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ 1. เกลือแร่หลัก เช่น กำมะถัน คลอรีน แคลเซียม โคบอลต์ ซิลิคอน โซเดียม โปแทสเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม แมงกานีส เหล็ก และไอโอดีน 2. เกลือแร่ส่วนน้อย เช่น โครเมียม ซีลีเนียม ทองแดง นิกเกิล โบรมีน โบรอน ฟลูรีน โมลิบดีนัม วานาเดียม สตรอนเทียม สังกะสี อะลูมิเนียม

3. กรดไขมันจำเป็น (Essential Fatty acid) คือ linoleic acid (ω -3) พบมากในน้ำมันพืช และ γ -linoleic acid (ω -6) พบมากในน้ำมันปลา

4. โพลีฟีนอลและไบโอฟลาโวนอยด์ ซึ่งจะกล่าวถึงในหัวข้อถัดไป นอกจากสารหลักๆ ดังที่กล่าวมาแล้วยังมีสารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพอื่นๆ เช่น ผักกาดเขียวเข้มจำพวกหัวหอม กระเทียม จะมีสารประกอบซัลเฟอร์จำนวนมากซึ่งจะถูก hydrolyze ด้วยเอนไซม์ myrosinase ในร่างกายให้เป็นสาร sulforaphane ซึ่งสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ phase II ทำให้สามารถหยุดกระบวนการเพิ่มประสิทธิภาพสารก่อนมะเร็งได้หลายชนิด⁽⁶⁶⁾ หรือสาร phytosterols ซึ่งเป็นไขมันชนิดหนึ่งที่สกัดได้จากพืช นักวิทยาศาสตร์พบว่า มาร์การีนมี sterol จำพวก stigmasterol, campesterol และ β -sitosterol สามารถช่วยลดการหลังโปรตีน apoB100 และระดับโคเรสเตอรอลเอสเตอรีนเซลล์ตับ HepG2 แล้วยังสามารถลดการหลังโปรตีน apoB48 จากเซลล์ลำไส้เล็ก CaCo-2 อีกด้วย⁽⁶⁷⁾

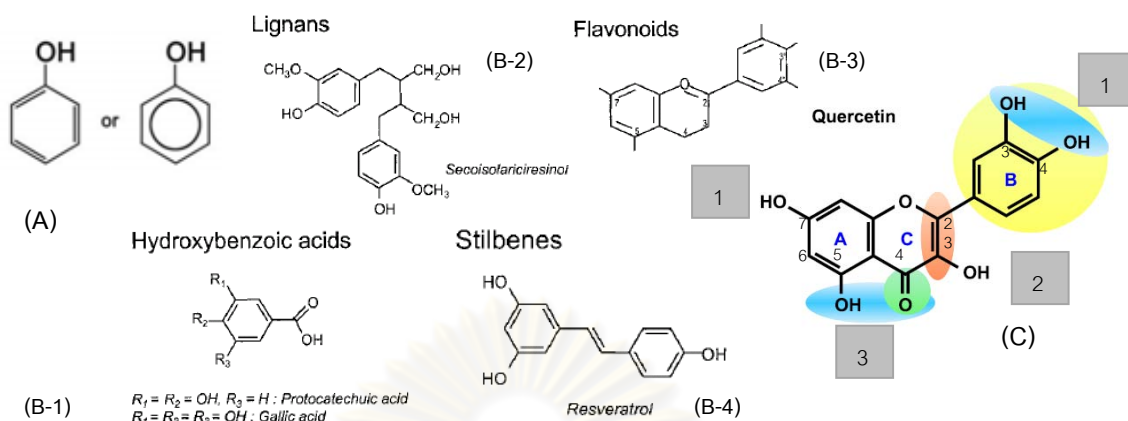
บทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ในปัจจุบันเนื่องจากยังมีบทความและงานวิจัยมากมายให้ผลที่ไม่สอดคล้องกัน ในการศึกษาความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระภายนอกร่างกาย (*In vitro*) โดยการวัดด้วยวิธีทางเคมี Oxygen radical absorbance assay (ORAC), phytochemoluminescence assay (PLC), Trolox equivalence antioxidant capacity (TEAC), Total antioxidant scavenging assay (TOSCA), Diphenyl-1-picrylhydrazyl assay (DPPH), Total radical trapping antioxidant parameter (TRAP), Ferric reducing ability of plasma method (FRAP), Thiobarbituric acid reactive substances test (TBARS) พบว่าให้ผลค่าสารต้านอนุมูลอิสระสูงแต่เมื่อทดลองกับเซลล์เพาะเลี้ยง สัตว์ทดลอง (*In vivo*) หรือการทดสอบทางคลินิก (Clinical trial) แล้วกลับไม่เห็นผลหรือผลไม่เป็นไปตามคาดหมาย เช่น การทดสอบแบบ *In vitro* สารบางชนิดกลับสร้างผลเสียต่อร่างกายเลยด้วยซ้ำ เช่น β -carotene ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างวิตามินเอที่ตับและมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระแต่รายงานการทดสอบการป้องกันโรคแบบ randomized lung cancer chemoprevention trial 3 ฉบับกลับสรุปว่า β -carotene ทั้งแบบให้เดี่ยวและให้ร่วมกับสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่นไม่สามารถป้องกันโรคหัวใจและมะเร็งในอาสาสมัคร แต่ยังเพิ่มอุบัติการณ์เกิดโรคมะเร็งปอด โรคหัวใจและอัตราการตายโดยเฉพาะผู้ป่วยที่สูบบุหรี่และดื่มจัด⁽⁶⁸⁻⁷¹⁾ นอกจากนี้วิตามินเอยังลดการดูดซึมของวิตามินอีอีกด้วย⁽⁷²⁾ รายงานที่เกี่ยวกับวิตามินอี

หรือวิตามินซีก็มีความขัดแย้งกันอย่างมากคือ รายงานบางส่วนกล่าวว่าวิตามินอีขนาดสูงๆ นั้นสามารถลดอัตราตายและป้องกันโรคหัวใจได้ แต่งานวิจัยบางส่วนที่ไม่พบผลต่อการป้องกันโรคอีกทั้งเชื่อว่าเมื่ออยู่ในสภาพที่ไม่มีอนุมูลอิสระแล้ววิตามินทั้งคู่จะเป็นอนุมูลอิสระเสียเอง⁽⁷³⁾ ซึ่งอาจเป็นเพราะปัจจัยต่างๆ ที่แตกต่างกันในแต่ละการทดลอง เช่น คนเชื้อชาติหนึ่งอาจให้ผลการทดลองดีกว่าอีกเชื้อชาติหนึ่งหรือช่วงที่ศึกษา เช่น หากให้ในคนก่อนเกิดโรค (primary prevention) จะให้ผลลดความเสี่ยงที่ดีกว่ากลุ่มที่เกิดโรค (secondary prevention) และสภาวะในการทดลองต่างๆ ว่ามีการควบคุมดีเพียงใด และใช้เวลาในการติดตามผลนานเท่าใด อีกทั้ง biomarkers ที่ใช้ก็มีประสิทธิภาพ ความไว ความแม่นยำ ความถูกต้องสะท้อนถึงภาวะในร่างกายจริงๆ ได้ไม่เหมือนกัน⁽⁷⁴⁾ บางการวิจัยใช้ biomarker ตรวจวัดเพียงตัวเดียวก็รายงานการวิจัยแล้วไม่ได้ตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายจริงๆ เนื่องจากสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันระหว่างภายนอกและภายในร่างกายอาจทำให้สารต้านอนุมูลอิสระนั้นแสดงคุณสมบัติเปลี่ยนไป เช่น ขนาดการดูดซึมและการสะสมในร่างกาย ขนาดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของสารที่ให้ในแต่ละการทดลอง ตำแหน่งออกฤทธิ์ภายในเซลล์เนื้อเยื่อหรือสารน้ำนอกเซลล์ การทำปฏิกิริยากับสารหรือเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระตัวอื่นภายในเซลล์ การทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ต่างๆ กลายเป็นสารเมแทบอลิต์ซึ่งมีความสามารถในการเก็บกักอนุมูลอิสระ การกำจัดสารก่อมะเร็ง ลดภาวะ oxidative stress และมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่แตกต่างจากสารเดิม⁽⁷⁵⁾ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการกำหนดมาตรฐานการวิจัยด้านนี้ให้ครบถ้วนตรงกันเพื่อผลที่ถูกต้องสามารถนำไปพัฒนาเป็นสารหรือยารักษาโรคได้จริง

โพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์และสารประกอบอื่นๆ

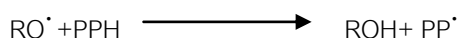
นอกจากวิตามินและเกลือแร่แล้ว สมุนไพรและพืชหลายชนิดยังมีสารต้านอนุมูลอิสระปริมาณสูงซึ่งไม่ใช่วิตามินหรือเกลือแร่ ยกตัวอย่างเช่น *Garcinia indica* (kokam) ซึ่งเป็นเครื่องเทศที่ใช้แกงในประเทศอินเดีย⁽⁷⁶⁾, เปลือกต้น *Astronium umuderuva* ที่ใช้กันมากในบราซิล⁽⁷⁷⁾ ถั่วชนิดต่างๆ เช่น ถั่วแดง ถั่วสีน้ำตาล และดำ (*Phaseolus Vulgaris* L.)⁽⁷⁸⁾ สารสกัดจากต้น *Achillea santolina* เป็นยาสมุนไพรโบราณใช้ในการรักษาโรคเบาหวานและอาการอักเสบที่ประเทศอิรัก และ *Phyllanthus niruri* ซึ่งใช้ในการรักษาโรคตับอักเสบและความเจ็บปวดต่างๆ ที่ประเทศอินเดีย⁽⁷⁹⁾ สารเหล่านี้สามารถเก็บกักอนุมูลอิสระต่างๆ และเป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่ขาดแก่นอนุมูลอิสระและยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่⁽⁸⁰⁾ จึงมีการนำพืชผักสมุนไพรเหล่านี้มาใช้อย่างแพร่หลายในการรักษาและบำรุงสุขภาพจากอดีตจนถึงปัจจุบัน สารดังกล่าวนี้เรียกว่า โพลีฟีนอล (polyphenol) ซึ่งเป็นสารที่พืชสร้างขึ้นเพื่อใช้ป้องกันตนเองจากสิ่งแวดล้อมที่เป็นอันตราย มีสูตรโครงสร้างเป็นหมู่ phenol (hydroxybenzenes) ต่อกันมากกว่า 2 หมู่ขึ้นไป ดังภาพที่ 2.4 A-B ในธรรมชาติ โพลีฟีนอลมีรูปแบบที่หลากหลายจากการบิดของโครงสร้างและการปลดน้ำออกจากโมเลกุลฟีนอลิกหลายแห่งจึงมีหลายไอโซเมอร์ นอกจากนี้โพลีฟีนอลยังเชื่อมกับโพลีฟีนอลตัวอื่นและหมู่ น้ำตาล มักเป็นน้ำตาลพวกกลูโคสและแรมโนส 1, 2 หรือ 3 โมเลกุล โดยหมู่ น้ำตาลนี้มีอิทธิพลต่อลักษณะทางเคมี ลักษณะทางกายภาพ และฤทธิ์ทางชีวภาพของโพลีฟีนอล เนื่องจากทำให้สมบัติการละลายน้ำของโพลีฟีนอลลดลง แต่อาจมีประโยชน์ช่วยในการแพร่แบบ passive transport ผ่านเข้าผนัง brush border ของเซลล์ลำไส้ เมื่อผ่านเข้าสู่เซลล์ลำไส้แล้วโพลีฟีนอลจะถูกแยกหมู่ น้ำตาลออกเป็นลำดับแรกโดยเอนไซม์ glycosidase ส่วนมากโพลีฟีนอลในพืชมักถูกสูญเสียและแตกสลายไปตั้งแต่ในกระบวนการปรุงอาหารแล้วโดยจะสลายเปลี่ยนเป็นตัวที่มีโครงสร้างเล็กลงไป เหตุนี้

ร่างกายจึงมักได้รับฟลาโวนอยด์สในปริมาณที่ต่ำกว่ากรดฟีโนลิก (phenolic acid) เสมอแต่มีข้อยกเว้นสำหรับโปรแอนโทไซยานินและแอนโทไซยานินส์ ซึ่งทนทานต่อการแตกสลายมากกว่าฟลาโวนอยด์ส์ตัวอื่น

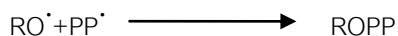


ภาพที่ 2.4: ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของโพลีฟีนอลเรียกว่าหมู่ phenol (A), ลักษณะโครงสร้างของโพลีฟีนอลหลัก 4 ประเภท (B) คือ Phenolic acid (B-1), Lignans (B-2), Flavonoids (B-3) และ Stilbenes (B-4), หมู่ฟังก์ชันบนโครงสร้างฟลาโวนอยด์ที่มีผลต่อการออกฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมีดังต่อไปนี้ 1. หมู่ไฮดรอกซิล ณ ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 บนวงแหวน A/C และตำแหน่งคาร์บอน 3 และ 4 บนวงแหวน B เมื่อมีทั้งหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ทั้งตำแหน่งคาร์บอน 3 และ 4 รวมกันเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า Catechol o-dihydroxy จะเสริมฤทธิ์ป้องกันเซลล์ได้ดีกว่าการมีหมู่ไฮดรอกซิล ณ คาร์บอนตำแหน่งคาร์บอน 3 หรือ 4 เพียงตัวเดียว 2. พันธะคู่ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 รวมทั้งออกซิเจนในตำแหน่งที่ 4 บนวงแหวน C ทำให้เกิดตรอนวงแหวนอย่างเสถียรไม่ไปทำปฏิกิริยากับสารอื่น⁽⁸¹⁾ 3. หมู่ไฮดรอกซิล ณ ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 บนวงแหวน C และ/หรือ 5, 7 บนวงแหวน A⁽⁶⁰⁾ (C)

ฤทธิ์ทางชีวภาพของโพลีฟีนอลในการป้องกันและยับยั้งอนุมูลอิสระขึ้นกับหมู่ฟังก์ชัน เช่น ภาพที่ 2.4C เนื่องจากบริเวณเหล่านี้มีความสามารถในการดึงดูดอิเล็กตรอนมากที่สุดและเป็นบริเวณทำปฏิกิริยากับโปรตีนและโลหะไอออนต่างๆ สามารถรับอิเล็กตรอนอิสระได้ดีและคงตัวอยู่ได้หลังจากรับอิเล็กตรอนอิสระไปแล้ว⁽⁸²⁾ จึงทำให้โพลีฟีนอลมีความสามารถในการยับยั้งอิเล็กตรอนอิสระมากกว่าวิตามินอีหรือวิตามินซี เนื่องจากโพลีฟีนอลมีวงแหวนอะโรมาติกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเกาะอยู่มากกว่าและเมื่อบริจาดอิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอมให้อนุมูลอิสระแล้วก็จะกลายเป็นอนุมูลอิสระเฉื่อยที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่ครบคู่ รั้งรอบโครงสร้างวงแหวนอะโรมาติกไปเรื่อยๆ ซึ่งมีความเสถียรมากกว่าและความสามารถทำปฏิกิริยาน้อยกว่าอนุมูลอิสระอื่นๆ ต่างจากวิตามินอีที่เมื่อรับอิเล็กตรอนอิสระเข้าไปจะต้องมีตัวรีดิวซ์ เช่น วิตามินซี มารับอิเล็กตรอนและเปลี่ยนวิตามินอีรูป oxidized form กลับเป็นรูป reduced form ดังเดิม กล่าวคือโพลีฟีนอลสามารถ form stable free radical ได้ดีกว่านั่นเอง⁽⁸³⁾ โพลีฟีนอล (PPH) ยังทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายของปฏิกิริยาถูกใช้ โดยการบริจาดไฮโดรเจนอะตอมให้อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็วดังสมการ



ฟีนอลิล (PP[•]) ที่เกิดขึ้นจะเสถียร และทำหน้าที่เป็นตัวจบปฏิกิริยาถูกใช้ จากการทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระตัวอื่นดังสมการ⁽⁸⁴⁾



นอกจากนี้โพลีฟีนอลยังกระตุ้นการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ เช่น เอนไซม์ phase II ที่จะเร่งการขับสารพิษ สารออกซิเดนท์ ออกจากร่างกาย และเหนี่ยวนำระบบเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น รวมทั้งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม Cytochrome P450 บางตัวได้อย่างเฉพาะ⁽⁸⁵⁾ รวมถึงเอนไซม์ก่อการอักเสบ เช่น cyclooxygenase และ lipoxygenase ด้วย⁽⁸⁴⁾ การป้องกันร่างกายดังกล่าวนี้ขึ้นกับปริมาณโพลีฟีนอลที่ร่างกายดูดซึมได้เป็นหลัก ซึ่งการดูดซึมมักแปรตามความสามารถในการละลายน้ำของโพลีฟีนอลนั่นเอง การละลายน้ำของโพลีฟีนอลก็จะขึ้นกับโครงสร้างโมเลกุลเช่น หมู่เมทิล หมู่ไฮดรอกซิลหรือหมู่น้ำตาล และมวลโมเลกุลเป็นสำคัญ โดยพบว่า การละลายน้ำจะ ลดลงเมื่อมีการเติมหมู่น้ำตาล หมู่ไฮดรอกซิลหรือไอออนให้กับโมเลกุลโพลีฟีนอล แต่จะทำให้สามารถผ่านเข้าผนังเซลล์ได้ง่ายขึ้น⁽⁸¹⁾ โครงสร้างโพลีฟีนอลแต่ละชนิดที่แตกต่างกันทำให้การดูดซึมต่างกันด้วยเป็นเหตุให้ปริมาณโพลีฟีนอลที่พบในร่างกายแต่ละชนิดมีปริมาณมากน้อยไม่เท่ากัน นอกจากนี้การตัดหมู่น้ำตาลออกโดยแบคทีเรียในทางเดินอาหารให้เป็นสารฟีนอลิกในรูปแบบต่างๆ อาจทำให้การดูดซึมเปลี่ยนไป โพลีฟีนอลมักมีการดูดซึมบริเวณ brush border membrane ที่ลำไส้เล็ก⁽⁸⁶⁾ ปริมาณโพลีฟีนอลในพลาสมาจะขึ้นสูงสุดหลังจากดูดซึม 1-2 ชั่วโมงและจะลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อดูดซึมเข้ามาในร่างกายแล้ว โพลีฟีนอลจะเข้าสู่กระบวนการเมแทบอลิซึมโดยเอนไซม์ในร่างกายให้อยู่ในรูปอะโกลิโคน (aglycone: ไม่มีหมู่น้ำตาลเกาะ) และถูกเติมหมู่ฟังก์ชันต่างๆ เช่น หมู่เมทิล หมู่ซัลไฟด์ หมู่น้ำตาล อย่างรวดเร็ว หากได้รับในปริมาณน้อยๆ กระบวนการเมแทบอลิซึมเหล่านี้จะเกิดที่ชั้น mucosa ของลำไส้เล็กเลย⁽⁸⁶⁾ แต่หากได้รับโพลีฟีนอลในปริมาณมากๆ เช่น ระดับ pharmacological dose แหล่งที่เกิดขบวนการเมแทบอลิซึมหลักคือ ตับ เอนไซม์หลักในการเมแทบอลิซึมโพลีฟีนอลคือ CYP1A2 และ CYP2E1⁽⁸⁷⁾ มีรายงานวิจัยว่า สามารถตรวจพบโพลีฟีนอลรูปอะโกลิโคนได้ในพลาสมาโดยมี half-life ยาวนานกว่าและร่างกายขับออกช้ากว่ารูปที่มีหมู่น้ำตาลเกาะ จึงทำให้ประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ดีกว่า⁽⁸⁸⁾

โพลีฟีนอลแบ่งเป็น 4 ประเภท

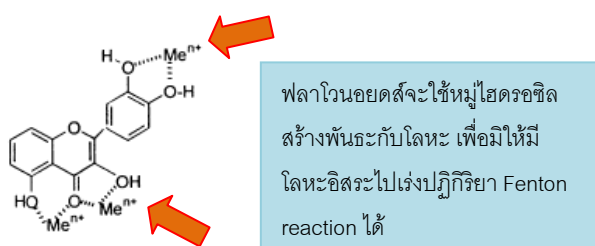
1. กรดฟีนอลิก (Phenolic acid) มีประมาณ 30% ของโพลีฟีนอลทั้งหมด ที่พบมากที่สุดคือ Caffeic acid รองมาคือ Ferulic acid กรดฟีนอลิกในธรรมชาติจะสร้างพันธะเอสเทอร์กับน้ำตาลส่วนมากคือกลูโคส อยู่ในรูป polyol เช่น Garlic acid⁽⁸⁸⁾ มีรายงานวิจัยชี้ว่ากรดฟีนอลิกที่พบมากในอาหารเช่น Caffeic acid, 3,4-dihydroxy-phenylacetic acid (PAA) มีผลในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านม T47D ซึ่งเกิดจากการที่ PAA สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase และ caffeic acid สามารถจับกับรีเซพเตอร์คือ Aryl hydrocarbon receptor (Ahr) ทำให้มีผลลดการแสดงออกของยีนและการทำงานของเอนไซม์ CYP1A1 และกระตุ้นให้เซลล์ตาย⁽⁸⁹⁾ Chlorogenic acid พบมากในผลไม้ เช่น พลัม แอปเปิล เชอร์รี่ มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสามารถจับกับ Benzodiazepine receptor ลดอาการกังวล (anxiety) ได้⁽⁹⁰⁾

2. ลิกนิน (Lignin) พบไม่มาก ส่วนใหญ่พบในเมล็ดปอ (flaxseed) และน้ำมันเมล็ดปอจัดว่าเป็นสาร phytoestrogens สามารถจับกับ estrogen receptor ยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งเต้านม นอกจากนี้เมล็ดปอยังมีปริมาณเส้นใยสูง สามารถลดการดูดซึมไขมันเข้าเซลล์ลำไส้

3. สติเบนส์ (Stibenes) พบไม่มาก โดยตัวที่เป็นหลักของกลุ่มนี้คือ Resveratrol พบในพืชสมุนไพรต่างๆ และไวน์แดง มีฤทธิ์ต้านการเกิดมะเร็งโดยการยับยั้งเอนไซม์ cytochrome P450 1B1⁽⁹¹⁾

4. ฟลาโวนอยด์ส (Flavonoids) มีประมาณ 60%

ฟลาโวนอยด์สเป็นโพลีฟีนอลที่พบมากสุดในอาหาร มีสูตรโครงสร้างเป็น 3-คาร์บอนเชื่อมกับวงแหวนไพแรนหรือวงแหวนไพโรนเรียกว่า CHO Tricyclic flavalium cation (C₆-C₃-C₆) หรือ Flavone Skeleton มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระป้องกันเซลล์ดังนี้ 1) ฟลาโวนอยด์สจับกับโลหะป้องกันไม่ให้เข้าร่วมปฏิกิริยาในการสร้างอนุมูลอิสระ เก็บกินโมเลกุลออกซิเจนและไนโตรเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยา และถึงแม้ว่า ฟลาโวนอยด์สจะจับเป็นคอมเพล็กซ์กับโลหะไอออนแล้วก็ยังสามารถในการเก็บกินอนุมูลอิสระได้อีก 2) เหนี่ยวนำการทำงานเอนไซม์เฟส II ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการป้องกันและกำจัดสารพิษจากเซลล์ 3) ฟลาโวนอยด์สอาจไม่ได้ป้องกันเซลล์ผ่านการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระหรือทำปฏิกิริยากับโลหะ แต่จากการเข้าจับกับเป้าหมายเฉพาะได้โดยตรง เช่น รีเซพเตอร์ ผังเซลล์ เอนไซม์ ที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณสื่อสารของเซลล์และควบคุมการแสดงออกของยีนทั้งในระดับ transcription และระดับ down-regulation pathway เช่น ระดับ post-transcription, translation และ post-translation ทั้งนี้ฟลาโวนอยด์สต่างชนิดกันก็จะมี การดูดซึมแตกต่างกันดังที่กล่าวไปแล้ว โดยน้ำตาลที่จับกับฟลาโวนอยด์สจะมีส่วนช่วยในการดูดซึมเข้าทางลำไส้เล็กผ่านทาง sodium-dependent glucose transporter 1 (SGLT1) เช่น ร่างกายจะดูดซึม Quercetin aglycone ประมาณ 24% แต่หากเป็น quercetin glycoside จะดูดซึมถึง 52% ฟลาโวนอยด์สที่ไม่ถูกดูดซึมก็มีประโยชน์เช่นกันในการช่วยดูแลรักษาระบบทางเดินอาหารโดยเฉพาะเซลล์กระเพาะอาหารและลำไส้ แต่ฟลาโวนอยด์สที่รับประทานเข้าไปนี้ก็มักถูกแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารและกรดในกระเพาะอาหารสลายไปเสียก่อน ดังนั้นการรวมตัวเป็นโพลิเมอร์จึงทำให้ฟลาโวนอยด์สทนทานต่อการสลายได้มากกว่า อีกทั้งเซลล์ลำไส้จะมีโปรตีน Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) บนผนังเซลล์ทำหน้าที่เป็นช่องทางขับฟลาโวนอยด์สไกลโคไซด์ออกจากเซลล์ รวมทั้งการที่โปรตีนพลาสมาจะจับกับฟลาโวนอยด์สไว้ถึง 99.1 % ซึ่งมีผลต่อลักษณะเภสัชจลนศาสตร์ของฟลาโวนอยด์ส⁽⁸⁷⁾ ด้วยเหตุนี้ปริมาณฟลาโวนอยด์สรูป active ในร่างกายจึงต่ำมาก ดังนั้นการศึกษาที่จะใช้ประโยชน์จากฟลาโวนอยด์สในการเสริมหรือรักษาสุขภาพจึงต้องคำนึงถึงความสามารถในการรับฟลาโวนอยด์สและการขับฟลาโวนอยด์สออกจากเซลล์⁽⁹²⁾ รวมถึงขนาดฟลาโวนอยด์สที่จะใช้ศึกษาด้วยเพราะการได้รับฟลาโวนอยด์สที่มากเกินไปจะเป็นอันตราย พิษของฟลาโวนอยด์สมักเกิดจากการรับในปริมาณมากแบบเรื้อรัง (Chronic pharmacologic dose) เช่น การรับประทาน Genistein มากกว่า 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน มีผลเสียต่อโครงสร้างและการทำงานของเซลล์⁽⁹³⁾



ภาพที่ 2.5 : การจับพันธะระหว่างฟลาโวนอยด์สและโลหะไอออนไม่ให้ไปเร่งปฏิกิริยาสร้างอนุมูลอิสระ ซึ่งแม้จะจับเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนกับโลหะ ฟลาโวนอยด์สก็ยังสามารถเก็บกินอนุมูลอิสระอื่นๆ ต่อได้

รายงานวิจัยหลายฉบับมีหลักฐานว่าฟลาโวนอยด์ในอาหารอาจมีประโยชน์ต่อร่างกาย จากงานวิจัยพบว่า สารสกัดจากรวงผึ้ง (propolis) อาจมีส่วนลดพิษของยาต่อต้านและเม็ดเลือด เช่น พาราเซตามอลและยาต้านมะเร็ง Cyclophosphamide และ Vinblastine⁽⁶⁰⁾ การรับประทานแอบเปิล 600 กรัมต่อวันมีผลป้องกันการแตกสลาย DNA ของลิมโฟไซต์คนปกติจาก H₂O₂⁽⁹⁴⁾ สารสกัดรากต้น English Spinach สามารถลดการทำลายไขมันและ DNA จากสารออกซิไดซ์ Ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) ที่ทำลายเซลล์ตับ⁽⁶¹⁾ สารสกัดจากต้นสะเดา (Neem) และใบกะเพรา (Holy basil) สามารถปรับการแสดงออกของยีนควบคุมการเมแทบอลิซึมไขมันและการสังเคราะห์สารไฮโดรคาร์บอนที่มีความสำคัญต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจ เช่น LDLR, LXR α , PPAR γ , CD-36, c-myc และ PPAR α ⁽³⁸⁾ สมุนไพร Chamomile, rosehip, hawthorn, lemon rerbena และชาเขียว สามารถรักษาการติดต่อกิ่งของเซลล์ผ่านทาง Gap-junction ซึ่งมีความจำเป็นในการคงความสมดุลระหว่างการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตของเซลล์ให้เป็นปกติ⁽⁹⁵⁾ สารสกัดโพลีฟีนอลที่พบในเมล็ดของ *Silybum marianum* สามารถรักษาระดับ GSH ด้านการผลิต ROS และ lipid peroxidation ในเซลล์ผิวหนัง HaCaT ที่ฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตเอ และลดการแตกสลายของ DNA มีประโยชน์ที่จะใช้ในการรักษาผิวไหม้แดดหรือผิวหนังอักเสบได้⁽⁶²⁾ แครอท, ขึ้นฉ่าย, ผักชี, ยี่ห่วย, ผักชีฝรั่ง รวมถึงขมิ้นชันสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ เนื่องจากสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวน การทำงานและการหลั่งไฮโดรคาร์บอน IFN- γ ⁽⁹⁶⁾ ในประเทศฝรั่งเศสและแถบเมดิเตอร์เรเนียนซึ่งผู้คนมีปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดสูงแต่อุบัติการณ์ที่เกิดจริงนั้นต่ำมากเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า French paradox เนื่องจากคนในแถบนี้นิยมดื่มไวน์แดงซึ่งมีปริมาณฟลาโวนอยด์เข้มข้นที่สามารถป้องกันมิให้ platelet-derived growth factor (PDGF) ซึ่งเป็นสาร mitogenic และ chemotatic อย่างแรง กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เยื่อหลอดเลือดและเหนียว ทำให้เม็ดเลือดขาวและเกร็ดเลือดมาบริเวณอักเสบดังกล่าว⁽⁹⁷⁾ นักวิจัยคาดว่าประโยชน์ต่อร่างกายนี้เกิดจากกลไกที่ฟลาโวนอยด์เหล่านี้ช่วยเพิ่มระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น catalase และ superoxide dismutase (SODs)⁽⁹⁵⁾ ช่วยในการคงระดับ GSH ในเซลล์ไว้เพื่อใช้ป้องกันอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น⁽⁶⁰⁾ ช่วยลดระดับ oxidative stress ภายในเซลล์ ยับยั้งการทำลาย DNA จากสารพิษ⁽⁹⁴⁾ ออกฤทธิ์ส่งเสริมสัญญาณที่ ห้ามกิจกรรมโปรตีน caspase-3⁽⁶²⁾ และรบกวนการทำงานของโปรตีนซึ่งส่งสัญญาณเป็น chemotaxis และ mitogenic⁽⁹⁷⁾ รวมถึงช่วยเพิ่มปริมาณ Ca²⁺ อิสระภายในเซลล์โดยการปลดปล่อยจากแหล่งเก็บภายในเซลล์ และรับเพิ่มจากภายนอก ส่งผลให้มีการผลิต NO \cdot เพิ่มขึ้น⁽⁹⁸⁾ จากที่กล่าวมาทั้งหมดนี้ จะเห็นได้ว่า ฟลาโวนอยด์มักไม่ได้มีผลต่อร่างกายผ่านการต้านอนุมูลอิสระมากนัก แต่ฟลาโวนอยด์มีผลดีต่อร่างกายโดยการเป็นตัวเป็นสารสื่อสัญญาณเสียมากกว่า⁽⁹⁹⁾ เราสามารถแบ่ง ฟลาโวนอยด์ตามโครงสร้างระหว่างวงแหวน B หรือ C และการออกซิเดชันของออกซิเจนบนวงแหวนได้เป็น 6 ประเภทคือ Flavonol, Flavones, Flavanones, Flavanols หรือ Catechins, Isoflavones และ Anthocyanidins ฟลาโวนอยด์ในธรรมชาติจะมีหมู่น้ำตาลเกาะเรียกว่าพวก glycoside (ชื่อสารจะลงท้ายด้วย “in”) และกลุ่มที่ไม่มีหมู่ น้ำตาลเกาะเรียกว่า aglycone (ชื่อสารจะลงท้ายด้วย “etin” หรือ “idin”)⁽¹⁰⁰⁾ นอกจากนี้ยังมีฟลาโวนอยด์ที่จับต่อกันเป็นโมเลกุลใหญ่เรียกว่าแทนนิน (tannin) มักรวมตัวกันแน่นเรียกว่า โปรแอนโทไซยานิน ปัจจุบันค้นพบโปรแอนโทไซยานินในอาหารจากพืชเพียง 3 ชนิดคือ procyanidins([epi]catechin-polymers), prodelephinidins([epi]gallocatechin polymers) และ propelargonidins([epi]afselechin)⁽¹⁰¹⁾

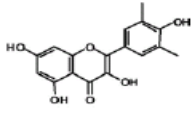
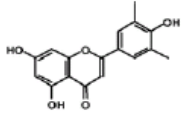
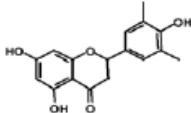
1. **ฟลาโวนอลส์ (Flavonols)** ฟลาโวนอลส์ตัวหลักที่พบมากคือ Myricetin, Fisetin, Kaempferol และตัวที่พบได้ในอาหารมากที่สุดคือ Quercetin โดยเฉพาะในหัวหอมและชา Quercetin ความเข้มข้นต่ำ (5-10 μM) เสริมฤทธิ์กับ Eallic acid ยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มและกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว MOLT-4⁽¹⁰²⁾ และมีงานวิจัยพบว่า Fesitin, Quercetin, Chysin, Morin และ 3-hydroxyflavones สามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ของผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง เข้าเกาะกับไขมันและโปรตีนองค์ประกอบบนผนังเซลล์โดยเฉพาะทรिปีโดเฟน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีน เพิ่มความคงตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงเมื่ออยู่ในสภาวะ hypotonic⁽¹⁰³⁾

2. **ไอโซฟลาโวนส์ (Isoflavones)** ไอโซฟลาโวนส์หลักที่พบมากคือ Genistein, Daidzein และ Glycetein พบมากในถั่วเหลือง มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน จึงมีส่วนช่วยในการป้องกันมะเร็งเต้านมและโรคกระดูกพรุน⁽¹⁰⁴⁾ อีกทั้งยังมีผลเพิ่มระดับสเตอรอยด์ภายในเซลล์ตับ HepG2 โดยการเพิ่มระดับ Sterol regulatory element binding proteins (SREBP) และเพิ่มการแสดงออกของยีนเอนไซม์ HMG-CoA synthase⁽¹⁰⁵⁾ และ LDLR แต่ลดระดับ HMG-CoA reductase⁽¹⁰⁶⁾ ทำให้สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลจากพลาสมาได้

3. **ฟลาวาโนนส์ (Flavanones)** ฟลาวาโนนส์หลักที่พบมากคือ Taxifolin, Naringenin และ Hesperetin พบมากในผลไม้รสเปรี้ยว เช่น ส้ม มีรายงานวิจัยที่พบว่า มีฤทธิ์ยังลดการหลั่ง apo-B จากเซลล์ตับ HepG2 โดยเกิดจากการลดการ hydrolysis และลดปริมาณของโคเลสเตอรอลเอสเตอร์ภายในเซลล์ ซึ่งเป็นผลจากการลดการแสดงออกแบบจำเพาะต่อยีนที่ถอดรหัสเอนไซม์ ACAT2 ลดกิจกรรมของเอนไซม์ ACAT ทั้ง 2 ไอโซฟอร์ม และโปรตีน Microsomal triacylglycerol transfer protein (MTP) ซึ่งเป็นโปรตีนที่นำโคเลสเตอรอลเอสเตอร์ใส่ให้ apoprotein แต่จะเพิ่มการแสดงออกของยีน LDLR ผู้วิจัยชี้ว่าผลที่เกิดขึ้นนี้อาจเกิดจากการจับระหว่างฟลาวาโนนส์กับ p-glycoprotein ซึ่งเป็น efflux pump ที่ทำหน้าที่ในการขับสาร โดยเฉพาะสาร lipophilic โมเลกุลเล็กๆ อีกทั้งคุณสมบัติที่สามารถเพิ่มการแสดงออกของ LDLR แต่ไม่เพิ่มการแสดงออกของ HMG-CoA reductase นั้นเป็นคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกับผลการทดสอบของฮอร์โมนเอสโตรเจนกับเซลล์ จึงเชื่อว่าจะใช้กลไกในการออกฤทธิ์แบบเดียวกัน⁽¹⁰⁷⁾

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1: โครงสร้าง ชื่อ และแหล่งที่พบของฟลาโวนอยด์ประเภทต่างๆ

Flavonoid subgroup	Representative flavonoid	Food source	Flavonoid subgroup	Representative flavonoid	Food source
Flavanols	EGCG  Epigallocatechin Catechin Epicatechin	Chocolate, beans, tea, red wine, apple, cherry, apricot	Flavanols	Quercetin Myricetin Kaempferol Rutin	Onion, apple, cherry, broccoli, tomato, berries, tea, red wine, leek
Flavones	Luteolin  Apigenin Chrysin	Capsicum pepper, thyme, Celery, Parsley	Isoflavonoids	Genistein Daidzein	Soya beans, legumes
Flavanones	Naringenin  Hesperidin Eriodictyol	Orange, Grapefruit	Anthocyanidins	Pelargonidin Cyanidin Malvidin	Rhubarb, cherry, stawberry, red wine, black rice, red rice

4. ฟลาวานอลส์ (Flavanols) ฟลาวานอลส์ตัวหลักที่พบคือ Catechin และ Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) พบมากในใบชาโดยเฉพาะชาเขียว ส่วนชาดำและชาอูหลงจะพบได้น้อยกว่าเนื่องจากกระบวนการหมักใบชาทำให้ Catechin เกิดการออกซิเดชันเป็นสารประกอบโพลีฟีนอลเชิงซ้อนหรือเรียกอีกอย่างว่า โปรแอนโทไซยานิน ชาเขียวสกัดสามารถลดผลข้างเคียงและป้องกันเซลล์ตับจากการใช้ยารักษาโรคมะเร็งเต้านมชนิดฟิงพาสอร์โมน Tamoxifen ซึ่งจะผลิตอนุมูลอิสระออกมาปริมาณมากเมื่อเข้าสู่กระบวนการเมแทบอลิซึมที่ตับทำให้เซลล์ตับได้รับความเสียหาย⁽⁶³⁾ Catechin ยังสามารถเพิ่มค่า antioxidant activity ในเลือดของสัตว์ทดลองให้สูงขึ้น⁽¹⁰⁸⁾ EGCG เป็นฟลาวานอลอีกชนิดหนึ่งที่สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว B-lymphocyte ให้ตายได้โดย EGCG จะออกฤทธิ์เป็น pro-oxidant ไปเพิ่มระดับการผลิต ROS ภายในเซลล์ ทำลายผนังไมโทคอนเดรียเสียหายจนทำให้ Cytochrome c หลุดรั่วออกมาในไซโทพลาซึมไปกระตุ้นกระบวนการตายของเซลล์และ EGCG ยังจับกับ Ca^{2+} channel ไม่ให้เปิดออก⁽¹⁰⁹⁾ อีกทั้งยังรบกวนเซลล์มะเร็งตับมิให้จับกับฮอร์โมนเจริญเติบโต เช่น insulin-like growth factor-1 (IGF-1)⁽¹¹⁰⁾ รวมถึงมีประโยชน์โดยการเพิ่มมวลกระดูกและยับยั้งเซลล์ osteoblast ไม่ให้กลายเป็นตัวแก่⁽¹¹¹⁾ ป้องกันเซลล์ประสาท⁽¹¹²⁾ และยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ กระตุ้นและเร่งการกำจัดสารพิษออกจากร่างกายด้วยกลไกต่างๆ โดยเฉพาะผ่านทางกระบวนการ tyrosine kinase⁽¹¹³⁾

5. ฟลาโวนส์ (Flavones) ฟลาโวนส์ตัวหลักที่พบคือ Luteolin พบมากในพริกหวานและ Apigenin พบในขึ้นฉ่ายและไวโกนิช Luteolin มีฤทธิ์เป็นสารต้านอักเสบที่แรงที่สุดในบรรดาฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยยับยั้งการหลั่งสาร TNF- α และ TNF- γ จากเม็ดเลือดขาวมิให้ออกมาในซีรัม⁽¹¹⁴⁾ อีกทั้งลดการแสดงออกของ COX-2 ในสัตว์ทดลองที่มีภาวะอักเสบทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง⁽¹¹⁵⁾ Luteolin ยังสามารถลดอัตราการสร้าง O_2^- ในร่างกายและมีส่วนสำคัญในการลดการอักเสบในสัตว์ทดลองแบบ *In vivo* แต่กลับไม่พบว่ามึผลดีอย่างไรกับอาการโรคหัวใจ⁽¹¹⁶⁻¹¹⁷⁾

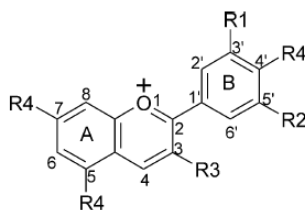
6. แอนโทไซยานินส์ (Anthocyanins) ซึ่งจะขอล่าวในหัวข้อถัดไป

นอกจากทั้งหมดที่กล่าวมาแล้วยังมีฟลาโวนอยด์อีก 2 ชนิดที่พบได้ปริมาณน้อยนั้นคือ **ซาลโคน (Chalcone)** สามารถสกัดได้จาก *Zucagnia punctata* พบว่าสามารถป้องกัน DNA จากสารพิษที่มีฤทธิ์เป็น genotoxic เช่น 4-nitroquinoline-n-oxide (4-NQO) และ benzo[a]pyrene ได้⁽¹¹⁸⁾ และ**ฟลาโวนอยด์เชิงซ้อน (Proanthocyanidin)** ซึ่งเป็นฟลาโวนอยด์ที่รวมตัวกันแน่น (condense tennin) มีโมเลกุลฟลาโวนอยด์ต่อกัน 17 ตัวขึ้นไปจึงทำให้มีตำแหน่ง catechol หรือ pyrogallol site มากขึ้นและมีน้ำหนักโมเลกุลมาก โปรไซยานิดิน (procyanidin) แบบ di หรือ trimer ที่ไม่ใหญ่เกิน 7 ยูนิตจะสามารถผ่านเซลล์ผนังลำไส้เล็กโดยจับกับ organic anion membrane carrier ที่ชื่อ bilirubin translocase เข้าสู่กระแสเลือดได้โดยตรง จากงานวิจัยพบว่าโปรไซยานิดินของ flavan-3-ols แบบ di, tri, หรือ oligo-mer ที่พบในเมล็ดองุ่น (PA) สามารถป้องกันสารก่อมะเร็ง phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) ที่ออกฤทธิ์คล้าย epidermal growth factor (EGF) ยกตัวอย่างเช่น s-phenylmercapturic acid ไม่ให้ทำอันตราย DNA และลดกิจกรรมของ respiratory burst ของเซลล์ fibroblast ของหนู อีกทั้งลดการปลดปล่อย H_2O_2 จากเม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA ผลการทดลองชี้ว่า PA มีคุณสมบัติป้องกันเซลล์จากสารก่อมะเร็งและป้องกันพิษแบบ genotoxic damage ได้⁽¹¹⁹⁾ นอกจากนี้ช่วยส่งเสริมการทำงานของระบบสืบพันธุ์เพศหญิงโดยเข้าปรับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องเช่น PGHS-2, TIS116 และ FOXO3 เป็นต้น⁽¹²⁰⁾

แอนโทไซยานินส์ สารสีในพืชผักและมีประโยชน์ต่อสุขภาพ

แอนโทไซยานินส์คือ สารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์แบ่งได้เป็นประเภทที่ไม่มีหมู่ น้ำตาลเกาะเรียกว่า แอนโทไซยานิดิน (Anthocyanidin) มีมากกว่า 400 ชนิดในธรรมชาติ แต่ที่พบบ่อยมีประมาณ 6 ชนิดคือ Pelargonidin (Pg), Cyanidin (Cy), Malvidin (Mv), Petunidin (Pt) และ Delphinidin (Dp) ส่วนอีกประเภทคือ มีหมู่น้ำตาลเกาะเรียกว่า แอนโทไซยานิน (Anthocyanin) ที่มักพบมี 3 ชนิดคือ Cyanidin glycoside (Cy-g), Delphinidin glycoside (Dp-g) และ Pelargonidin glycoside (Pg-g)⁽¹²¹⁾ แอนโทไซยานินส์สามารถละลายน้ำได้ดีมีสูตรโครงสร้าง ดังภาพที่ 2.6 และชื่อเรียกแอนโทไซยานินส์ ดังตารางที่ 2.2 แอนโทไซยานินส์พบมากในพืชหลายชนิดโดยเป็นสารรงควัตถุที่มีสีเหลืองเข้ม แดง ชมพู บานเย็น ม่วง น้ำเงิน และดำ มีมากในชั้น kernel, aleurone และ pericarp ของพืช⁽³⁶⁾ ในธรรมชาติแอนโทไซยานินส์มักไม่อยู่ในรูปแอนโทไซยานิดิน แต่จะจับรวมเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนกับสารสีชนิดอื่นๆ (intermolecular copigment) เช่น flavone, flavonol และ tannin หรือจับกับโลหะกลายเป็นสารรงควัตถุสีน้ำเงิน⁽¹²²⁾ และเกาะกับหมู่น้ำตาล (O-glucosylated) ซึ่งส่วนใหญ่มี 4 แบบคือ 3'-monosides, 3'-binosides, 3',5'-diglycosides และ 3',7'

diglycosides⁽¹²¹⁾ แต่สามารถพบแอนโทไซยานินได้ในพืชได้เช่นกัน โดยสามารถตรวจพบสาร Apigeninidin จากต้น Sorgham⁽¹²³⁾ พืชที่พบแอนโทไซยานินส์มากจะเป็นผลไม้สีแดงดำนั้นเอง เช่น เซอร์รี่ บลูเบอร์รี่ พลับองุ่น สตรอเบอร์รี่ ราสเบอร์รี่ เป็นต้น นอกจากนี้จะพบในผลไม้หรือดอกไม้แล้วยังสามารถพบได้ในธัญญาพืช เช่น ข้าวโอ๊ตสีน้ำเงินดำ (*Triticum aestivum* L.CV. Hedong Wumai) ตรวจพบ Cyanidin-3-glucoside, Cyanidin-3-galactoside, Pelargonidin-3-glucoside และ Peonidin-3-glucoside สูงและสามารถลดพิษของ H₂O₂ และ lipopolysaccharide ซึ่งเป็น endotoxin จากแบคทีเรียแกรมลบได้⁽¹⁷⁾ ต้น buckwheat sprout และกากกาแฟก็พบ cyanidin-3-O-rutinoside มาก⁽¹²⁴⁻¹²⁵⁾ ร่างกายมนุษย์เราได้รับแอนโทไซยานินส์จากอาหารประมาณ 180 ถึง 250 มิลลิกรัมต่อวัน⁽¹²⁶⁾ แอนโทไซยานินส์สามารถผ่านกระเพาะอาหารได้ในปริมาณที่มากกว่าฟลาโวนอยด์ตัวอื่นๆ เนื่องจากสามารถทนและคงสภาพในสภาวะเป็นกรดของกระเพาะอาหารได้ดี^(27,127) แอนโทไซยานินส์จะถูกดูดซึมที่กระเพาะอาหารและลำไส้ได้โดยตรงหลังจากรับประทานเนื่องจากตรวจพบได้ในกระแสเลือดทันที⁽¹²⁸⁻¹²⁹⁾ แม้ว่าเป็นปริมาณที่ต่ำมาก (<1% ของขนาดที่รับประทาน) อีกทั้งแอนโทไซยานินส์มีประจุบวกบนวงแหวน ซึ่งต่างจากฟลาโวนอยด์ตัวอื่นทำให้ยากต่อการขับออกจากเซลล์ลำไส้ผ่านทาง Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำให้ร่างกายดูดซึมฟลาโวนอยด์ส์ไกลโคไซด์อย่างมีขีดจำกัด⁽⁸⁷⁾ นักวิทยาศาสตร์คาดว่าแอนโทไซยานินส์มีการดูดซึม เมแทบอลิซึม และขับออกจากร่างกายอย่างรวดเร็ว มีรายงานว่าร่างกายจะมีปริมาณแอนโทไซยานินส์ในพลาสมาสูงสุดหลังรับประทานไป 2 ถึง 8 ชั่วโมง ซึ่งเป็นแอนโทไซยานินส์เพียง 32 % และเป็นรูปเมแทบอลิต์ 68 % และขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะสูงสุดหลังรับประทาน 3.72 ชั่วโมงในรูปแอนโทไซยานินส์ 32.5% และเมแทบอลิต์ 67.5%⁽¹³⁰⁾ ซึ่งคาดว่าเกิดจากการย่อยด้วยเอนไซม์ของตับอ่อน (pancreatic digestion)⁽¹³¹⁾ โดยสารเมแทบอลิต์ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูป glucuro- และ sulfo-conjugation⁽¹³²⁾ การเมแทบอลิซึมมีความแตกต่างกันในแอนโทไซยานินส์แต่ละชนิดขึ้นกับความเข้มข้น ปริมาณที่รับประทานและหมู่ น้ำตาลที่เกาะ เช่น delphinidin ไม่พบเมแทบอลิซึมใดๆ ต่างจาก cyanidin ซึ่งจะมีการเติมหมู่ น้ำตาลและหมู่ methyl เข้าไป หรือหากหมู่ น้ำตาลที่เกาะเป็น rutinose หรือ sambubinoside จะทำให้การกำจัดออกจากร่างกายช้าลง และแอนโทไซยานินส์ที่เกาะกับ น้ำตาลแบบ diglycosides จะคงสภาพได้มากกว่าหมู่ น้ำตาล monoglycosides⁽¹³³⁾ นอกจากนี้หมู่ น้ำตาลยังมีอิทธิพลต่อการรับแอนโทไซยานินส์เข้าเซลล์ลำไส้อีกด้วย⁽¹³⁴⁾ โดยพบว่า น้ำตาลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 ซึ่งมีผลต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินส์ แต่การเกาะของหมู่ น้ำตาล ณ ตำแหน่งนี้จะส่งผลต่อแอนโทไซยานินส์เฉพาะบางตัวเท่านั้นคือ malvidin (Mv) แต่ไม่มีผลต่อความคงตัวของ cyanidin (Cy), delphinidin (Dp), และ petunidin (Pt) ซึ่ง น้ำตาลที่มีผลต่อ malvidin มากที่สุดเรียงตามลำดับดังนี้ glucosides>galaetosides>arabinosides⁽²⁶⁾



ภาพที่ 2.6: ลักษณะโครงสร้างของแอนโทไซยานิน

ตารางที่ 2.2: ชื่อ ตัวย่อ และหมู่ฟังก์ชันที่เกาะ ณ ตำแหน่งต่างๆ บนโมเลกุลแอนโทไซยานินส์

Name	Abbreviation	Substitution pattern							Color
		3	5	6	7	3'	4'	5'	
Apigeninidin	Ap	H	OH	H	OH	H	OH	H	Orange
Aurantininidin	Au	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	Orange
Capensinidin	Cp	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	Bluish-red
Cyanidin	Cy	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Orange-red
Delphinidin	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Bluish-red
Europinidin	Eu	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	Bluish-red
Hirsutidin	Hs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	Bluish-red
6-Hydroxycyanidin	6OHCy	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H	Red
Luteolinidin	Lt	H	OH	H	OH	OH	OH	H	Orange
Malvidin	Mv	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	Bluish-red
5-Methylcyanidin	5-MCy	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H	Orange-red
Pelargonidin	Pg	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Orange
Peonidin	Pn	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Orange-red
Petunidin	Pt	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Bluish-red
Pulchellidin	Pl	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	Bluish-red
Rosinidin	Rs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	Red
Tricetinidin	Tr	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	Red

ลักษณะทางเคมีของแอนโทไซยานินส์

แอนโทไซยานินส์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ⁽¹³⁵⁻¹³⁹⁾ สามารถจับกับโลหะต่างๆ เช่น Cu^+ ไม่ให้เกิดปฏิกิริยาถูกขัดต่อได้⁽¹⁴⁰⁾ โดยธรรมชาติแล้วแอนโทไซยานินส์เป็นสารที่ขาดอิเล็กตรอนอยู่ 1 ตัวจึงทำให้มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและความเป็นกรดต่าง⁽¹⁴¹⁻¹⁴⁴⁾ ทำให้เกิดเป็นลักษณะเฉพาะของแอนโทไซยานินส์ที่สามารถเปลี่ยนแปลงสีกันไปมาตามสภาวะแวดล้อม เช่น สีแดง (flavylium cation), สีฟ้า (quinonoidal anhydro base), สีเหลือง (chalcone) และไม่มีสี (carbinol pseudo base) ได้ดังที่เราพบเห็นได้จากการเปลี่ยนสีของดอกบานเย็น ซึ่งสามารถอธิบายได้จากการเพิ่มขึ้นของความเป็นกรดทำให้แอนโทไซยานินส์เกิด bathochromic shift คือ การเกิด transformation ของโครงสร้างโมเลกุลทำให้มีการดูดกลืนแสงและสีที่เปลี่ยนไป⁽¹²²⁾ ณ ความเป็นกรดต่าง เช่น ที่ pH ประมาณ 3 หรือต่ำกว่าแอนโทไซยานินส์จะ shift ไปเป็น flavylium cation ซึ่งมีสีแดง เมื่อความเป็นกรดลดลงจนเป็นกลางจะมีเปลี่ยนแปลง เกิดกระบวนการดึงน้ำออก (dehydration) และ photon-transfer reaction เปลี่ยนเป็น quinonoidal base มีประจุลบ เปลี่ยนสีน้ำเงินออกมาและแตกสลายได้ง่ายขึ้นจึงทำให้แอนโทไซยานินส์ไม่เสถียรเมื่ออยู่ในภาวะเป็นกลางหรือต่างแต่จะคงสภาพได้มากกว่าในสภาพที่เป็นกรด⁽¹⁴⁵⁻¹⁴⁶⁾ ในพืชผักผลไม้ก็จะมีแอนโทไซยานินส์แต่ละรูปผสมปนเปกันอย่างเท่าเทียม⁽²⁶⁾ ความเสถียรของแอนโทไซยานินส์ยังขึ้นกับหมู่ฟังก์ชันที่เกาะอยู่บนโมเลกุลด้วย เช่น หมู่ น้ำตาลที่เกาะ ณ ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 ด้วยเนื่องจากทำให้เกิด hypsochromic shift นั่นคือ มีการเปลี่ยนค่า pKa เพิ่มขึ้น ส่วนหมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะ ณ ตำแหน่งคาร์บอนที่ 5 จะมีผลให้ค่า pKa ลดลง ทั้งหมดที่

กล่าวมานี้มีผลต่อการรับจ่ายโปรตอนจาก flavylum cation ของแอนโทไซยานินส์ทั้งสิ้น โดยพบว่า Cyanidin-3-O-glucoside มีความเสถียรมากที่สุด⁽¹⁴⁷⁾ ทำให้การเก็บรักษาสารสกัดพลาโวนอยด์ส์โดยเฉพาะแอนโทไซยานินส์จึงเป็นเรื่องยาก เนื่องจากแอนโทไซยานินส์ไวต่อสภาพแวดล้อมรอบข้างมากดังที่กล่าวมาแล้วจากการวิจัยพบว่า monomeric anthocyanins 50% จะคงสภาพได้นานประมาณ 6 เดือนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสและมักสูญเสียไป 25 ถึง 30% จากกระบวนการคั้นน้ำ แอนโทไซยานินส์จะทนทานความร้อน อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 80 องศาเซลเซียส จะทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินส์ลดลง 20% และ ณ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ปริมาณแอนโทไซยานินส์จะลดลงถึง 53 % Cyanidin-3-rutinoside สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิสูงที่สุด ส่วน Delphinidin-3-glucoside และ Cyanidin-3-glucoside จะลดลงถึง 48.3 และ 47 % เมื่อเก็บรักษาสารสกัดไว้ในหลอดทดลองปิดแน่น ณ อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียสในที่มีเป็นเวลา 1 ปี⁽¹⁴⁸⁾ การตรวจวัดปริมาณแอนโทไซยานินส์ในสิ่งตัวอย่างก็เป็นเรื่องยากเนื่องจากต้องใช้สารเทียบหลายชนิด ซึ่งหาใช้ได้ยากและมีราคาแพง ส่วนเทคนิคที่ใช้ตรวจวัดก็ต้องการเครื่องมือราคาแพง เช่น NMR, FAB-MS, LC-MS, API-MS, MAIDI-TOF-MS, FTIR⁽¹⁴⁹⁾, CZE, MEKC⁽¹²¹⁾ และ HPLC ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการแยกวิเคราะห์ เป็นต้น

รายงานการวิจัยที่พบว่าแอนโทไซยานินส์มีผลในการป้องกันและยับยั้งการเกิดมะเร็งมีมากมาย ซึ่งสามารถแบ่งเป็นชนิดของแอนโทไซยานินส์ได้ดังนี้ กลุ่มแอนโทไซยานินดิน เช่น Cyanidin (Cy) มีผลยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านม⁽²²⁾ และหยุดการเจริญเซลล์ fibroblast ปกติไว้ในระยะ S phase Delphinidin (Dp) มีผลหยุดการเจริญของเซลล์ fibroblast ปกติและเซลล์มะเร็งปากมดลูก Hela ไว้ในระยะ G₁/S phase และหยุดการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้เล็ก CaCo-2 ไว้ในระยะ G₂/M phase⁽¹³⁴⁾ รวมถึงยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านมได้^(22,134) Petunidin (Pt) สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านม⁽²²⁾ Malvidin (Mv) มีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของ caspase-3 จึงสามารถระงับการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทางเดินอาหาร gastric adenocarcinoma (AGS) ไว้ในระยะ sub-G₁ phase อีกทั้งยังยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT-116, มะเร็งปอด NCI-H460, มะเร็งเต้านม MCF-7, และมะเร็งเซลล์ประสาทส่วนกลาง SF-268⁽²⁷⁾ Pelargonidin (Pg) ลดการแบ่งตัวของเซลล์ AGS, HCT-116, NCI-H40, MCF-7 และ SF-268 ได้มากกว่า Malvidin⁽²²⁾ นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าหมู่ไฮดรอกซิล ณ ตำแหน่งคาร์บอน 3 บนวงแหวน flavylium⁽²²⁻¹³⁴⁾ นั้นเป็นตัวแสดงฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง หากมีหมู่น้ำตาลมาจับบริเวณดังกล่าว (พบได้ในแอนโทไซยานินทุกตัว) จะมีผลให้ฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ลดลงเช่นเดียวกับการมีหมู่ไฮดรอกซิลและเมทิลเกาะบนวงแหวน B⁽²²⁾ ส่วนกลุ่มแอนโทไซยานิน เช่น Cyanidin-3-O-β-glucoside ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งปอดชนิดแพร่กระจายเร็ว A549⁽¹⁵⁰⁾ สามารถทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat ตาย (necrosis) แต่ทำให้เซลล์ HL-60 เกิดการเจริญเติบโตเป็น macrophage หรือ granulocyte ตัวแก่ (Cytodiferentiation) แทนการตาย⁽²⁴⁾ เช่นเดียวกับเซลล์มะเร็ง melanoma TVM-A12 ซึ่ง Cyanidin-3-O-β-glucoside จะยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ไว้ที่ S phase แล้วเพิ่มระดับ AMP ในเซลล์จึงทำให้เซลล์เริ่มเปลี่ยนแปลงรูปร่างมีลักษณะของการเป็นเซลล์ประสาทมากขึ้น⁽¹⁵¹⁾ Cyanidin-3-O-β-glucoside ยังลดจำนวนเนื้องอกและเนื้อร้ายในหนูที่ได้รับสารก่อมะเร็ง 12-O-tetradecanoly phorbol-13-acetate (TPA) รวมทั้งป้องกันเซลล์ผิวหนังหนูจากแสงอัลตราไวโอเล็ตบี (UVB) และสารก่อมะเร็ง TPA ลดขนาดของก้อนมะเร็งและยับยั้งการแพร่กระจายและรุกรานของเซลล์มะเร็ง⁽²³⁾ Cyanidin-3-glucoside ยังเพิ่มการแสดงออกของ COX-2 และ

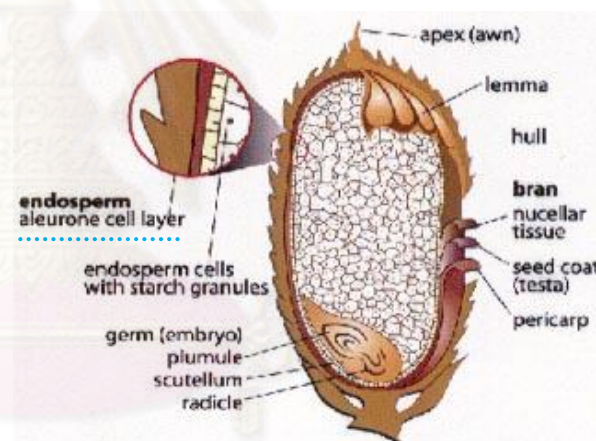
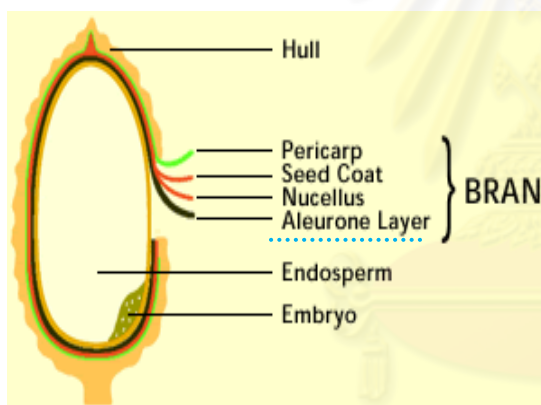
TNF- α ซึ่งว่า Cyanidin-3-glucoside อาจมีคุณสมบัติเป็นทั้ง chemopreventive และ chemotherapeutic⁽¹⁵²⁾ Cyanidin-3-O-(2G-xylosylrutinoside) และ Cyanidin-3-O-rutinoside ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ปอดมนุษย์ชนิดแพร่กระจายเร็ว A549 ได้ อีกทั้งยังสามารถป้องกันเซลล์ผิวหนังหนู JB6Cl41 จากสารก่อมะเร็ง benzo(a)pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide (BPDE)⁽¹⁵⁰⁾ อีกด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกว่า Peonidin-3-glucoside ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านม HS578T และเซลล์มะเร็งปอด Lewis LLC แต่ไม่มีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร AGS, เซลล์มะเร็งตับ SKHep-1 และ Huh-7 หรือเซลล์มะเร็งปากมดลูก Hela โดย cyanidins-3-glycoside และ peonidin-3-glycoside จะยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ไว้ในระยะ G2/M เฟส⁽¹⁵⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยที่ชี้ว่าแอนโทไซยานินส์ยังมีประโยชน์อื่นๆ อีก เช่น Cyanidin-3-glucoside มีผลการลดการหดโปรตีน glucose transporter 4 (GLUT4) ส่งผลให้เซลล์รับกลูโคสได้น้อยลง⁽¹⁵³⁾ Cyanidin-3-glucoside ยังช่วยลดการแสดงออกยีนถอดรหัสเอนไซม์ iNOS แล้วเพิ่มปริมาณเอนไซม์ eNOS⁽¹⁵⁴⁾ และป้องกันมิให้ lipopolysaccharide กระตุ้นกระบวนการอักเสบ⁽¹⁵⁵⁾

แอนโทไซยานินส์ยังช่วยเสริมระบบภูมิคุ้มกันและป้องกันเซลล์จากสารพิษและอนุมูลอิสระ เช่น Cyanidin, Pelargonidin และ Delphinidin มีประสิทธิภาพในการป้องกันเซลล์ fibroblast TIG-7 จากพิษของอนุมูลอิสระ linoleic acid hydroperoxide (LOOH) ได้⁽¹⁴⁵⁾ Cyanidin และ Delphinidin ยังมีผลป้องกันเซลล์หัวใจ H9c2 จากพิษยา Doxorubicin (Dox) ซึ่งเป็น anthracyclin antibiotic และเป็นยาต้านมะเร็งหลายชนิด แต่มีผลข้างเคียงคือ ทำให้หัวใจทำงานผิดปกติรุนแรงหรือหัวใจวาย เนื่องจากหัวใจมีการเมแทบอลิซึมสูง แต่หัวใจกลับมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระป้องกันต่ำกว่าอวัยวะอื่นๆ จึงเป็นเนื้อเยื่อที่ไวต่อภาวะ oxidative stress⁽¹⁵⁶⁾ Delphinidin ก็สามารถป้องกันเซลล์ endothelial มิให้ตายจากพิษ dioxin หรือ ODQ โดยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ guanylyl cyclase ให้ตัด guanosine triphosphate (GTP) เป็น cGMP มากขึ้น ซึ่งเป็นตัวควบคุมให้ระดับ Ca^{2+} ภายในเซลล์สมดุล อีกทั้ง delphinidin สามารถเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS ทำให้มีปริมาณ Nitric oxide เพียงพอที่จะป้องกันเซลล์⁽¹⁵⁷⁾ Delphinidin ยังมีฤทธิ์ยับยั้งไม่ให้ lipopolysaccharide (LPS) endotoxin จากแบคทีเรียแกรมลบเข้ากระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจของหนู RAW264 ยับยั้งมิให้เพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ COX-2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการสังเคราะห์ dienoic eicosanoids เช่น prostaglandin(PG) E_2 ในกระบวนการอักเสบ⁽¹⁸⁾ Cyanidin สามารถเพิ่มการแสดงออกของ thioredoxin (Trx) ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของ caspase-3 และ apoptosis signal-regulating kinase (ASK) และป้องกัน TNF- γ มิให้เหนี่ยวนำระดับ glutathione ภายในเซลล์ให้ลดลงจนเกิด lipid peroxidation⁽¹⁵⁸⁾ Cyanidin-3-O- β -glucopyranoside มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของ hepatic stellate cells (HSC) ที่เกิดจากพิษของ ferric nitrilotriacetate มิให้พัฒนาเป็น myofibroblast-like phenotype ที่อาจพัฒนากลายเป็นตับแข็ง⁽²⁵⁾ Delphinidin, Cyanidin, Petunidin และ Malvidin สามารถกำจัด singlet oxygen ทำให้ระงับการเกิด photooxidation ของเรตินามีให้กลายเป็น bisretinoid fluorophore A2E ซึ่งมีลักษณะคล้ายสารชักฟอกและเป็นสาเหตุของโรคตาหลายชนิดและทำให้ผนังเซลล์เรตินาหนาทนทาน A2E มากขึ้น⁽²⁶⁾ คาดว่าฤทธิ์ของแอนโทไซยานินส์น่าจะเกิดจาก 1. โครงสร้าง ortho-dihydroxyphenyl (catechol) บนวงแหวน B 2. โครงสร้าง Diene บนวงแหวน C (Pyrane)^(18,26,145) นอกจากนี้คาดว่า การเกิด glycosylation หรือ methylation จะทำให้แอนโทไซยานินส์ลดสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระรวมทั้งการรับแอนโทไซยานินส์เข้าเซลล์⁽¹⁵⁶⁾

ข้าวดำ ข้าวแดง และข้าวเหนียวดำเป็นแหล่งสำคัญของสารแอนโทไซยานินส์เช่นกัน มีรายงานวิจัยพบว่าสีจากข้าวมีประโยชน์ต่อสุขภาพหรือป้องกันโรคภัยต่างๆ ได้ ตัวอย่างเช่น สีสกัดจากข้าวญี่ปุ่นมีคุณสมบัติจับ ROS ที่เกิดจากเซลล์ผิวหนัง HaCaT ได้รับแสงอัลตราไวโอเล็ตบี เมื่อนำ สีสกัดจากข้าวแยกองค์ประกอบก็พบว่าเป็น Cyanidin-3-glucoside และ Cyanidin ที่ออกฤทธิ์ดังกล่าวนี้ และยังพบว่าสารสกัดมีแร่ธาตุเช่นแมงกานีส (Mn) และเหล็ก (Fe) ในปริมาณสูง จึงเป็นไปได้ว่าแอนโทไซยานินส์อาจเกาะกับแร่ธาตุเหล่านี้และ/หรือสารอินทรีย์อื่นๆ เช่น กรดอะมิโน ช่วยกันเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระให้แรงยิ่งขึ้น⁽¹²⁾ นอกจากนี้ยังพบว่าสีสกัดข้าวในเกาหลีมีคุณสมบัติเป็นสารรีดิวซ์ สามารถ ป้องกันผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงจากอนุมูลอิสระ lipid peroxyl ไม่ให้เกิด peroxidation และทำหน้าที่กำจัด $O_2^{\cdot -}$ ผู้วิจัยคาดว่าสารสกัดอาจมีฤทธิ์ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ xanthine oxidase (XOD) และกำจัดอนุมูลอิสระ $OH\cdot$ และยังรายงานด้วยว่าสารสกัดข้าวดังกล่าวสามารถกำจัด $O_2^{\cdot -}$ ได้ดีกว่าอนุมูลอิสระ $OH\cdot$ ⁽¹⁵⁹⁾

ข้าว: ลักษณะ สารอาหาร ประโยชน์

ข้าว (Rice) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza sativa* เป็นพืชในกลุ่ม POACEAE (GRAMINEAE) เพราะปลูกมากในเขตอากาศอบอุ่นโดยเฉพาะที่ทวีปเอเชีย เช่น ไทย อินเดีย อินโดจีน จีน และทวีปแอฟริกาตะวันออก



ภาพที่ 2.7: ภาพหน้าตัดของเมล็ดข้าว ส่วนรำข้าว คือ ชั้น Aleurone layer และ Kernel เป็นชั้นที่มีแอนโทไซยานินส์ ส่วนของเมล็ดที่สะสมแป้งจะอยู่ที่ชั้น endosperm

ข้าวเปลือกเมื่อตำเพื่อแยกเปลือกออกจะได้เมล็ดข้าวสีน้ำตาล 80% เมื่อนำข้าวผ่านกระบวนการขัดสีก็จะได้ข้าวขาวและรำข้าว รำข้าวจะอุดมไปด้วยน้ำมันปริมาณมากถึง 20-22% โดยเฉพาะกรดไขมันไม่อิ่มตัวจำพวก oleic, linoleic, linolenic acid และใยอาหาร สามารถแบ่งได้เป็นส่วนที่ละลายน้ำไม่ได้ 42% ที่เหลือเป็นใยอาหารที่ละลายน้ำได้เป็นพวก non-starchy polysaccharides ซึ่งคุณภาพคาร์โบไฮเดรตและใยอาหารนั้นพบว่าสูงเมื่อเทียบกับรำไค้ต มีรายงานวิจัยพบว่า รำข้าวทั้งส่วนที่เป็นแป้งและน้ำมันสามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในพลาสมาหนู⁽¹⁶⁰⁻¹⁶²⁾ โดยเฉพาะ LDL และ apo-B แต่ไม่มีผลต่อ HDL⁽¹⁶⁰⁾ และสามารถลดระดับไตรกลีเซอไรด์ในเซลล์ตับ⁽¹⁶¹⁾ น้ำมันรำข้าว ซึ่งมีปริมาณ γ -Oryzanol และ γ -tocotrienol สูง สามารถเพิ่มความไวต่ออินซูลินในหนูที่เป็นเบาหวาน กระตุ้นการสันดาปและสังเคราะห์โคเลสเตอรอลโดยเพิ่มการแสดงออกของยีน LDLR และ HMG-CoA reductase⁽¹⁶²⁾ โปรตีนรำข้าวจัดเป็นแหล่ง

โปรตีนอย่างดี พบว่าค่าประสิทธิภาพโปรตีน (Protein efficiency ratio: PER) คือ 2.0 ซึ่งถือว่าสูง อีกทั้งยังมีกรดอะมิโนครบถ้วน โดยกรดอะมิโนส่วนใหญ่คือ threonine และ isoleucine ทำให้เกิดการแพ้ตัวสารอาหารอื่นๆ ในรำข้าว เช่น inositol ปริมาณสูง ส่วน niacin, riboflavin, tocopherols, tocotrienols แมกนีเซียม โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส ก็พบในปริมาณที่สูงกว่าที่ RDI กำหนดไว้ นอกจากนี้ยังมีสารต้านอนุมูลอิสระพวก γ -oryzanol, phytosterol และโพลีฟีนอลอื่นๆ ดังตารางที่ 2.3 ข้าวเมล็ดสีได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาทางแพทย์แผนโบราณทั่วโลก เช่น ที่ประเทศจีนและไต้หวันให้ผู้ป่วยดื่มน้ำข้าวต้มเพื่อรักษาโรคตับอักเสบ ที่ประเทศอินเดียนิยมดื่มน้ำข้าวต้มเพื่อรักษาโรคดีซ่านและรับประทานผงเมล็ดข้าวต้มเพื่อรักษาโรคไทรอยด์ ที่ประเทศอิหร่านจะให้ผู้ป่วยรับประทานข้าวเพื่อรักษาลำไส้อักเสบและใช้น้ำข้าวสอนทวารเพื่อรักษาโรคท้องร่วง ประเทศเม็กซิโกใช้ เมล็ดรักษาโรคท้องร่วง ส่วนที่ประเทศญี่ปุ่นนิยมใช้ข้าวดำในการบำรุงร่างกาย⁽¹⁶³⁾

ตารางที่ 2.3: ปริมาณสารอาหารต่างๆ ที่พบได้ในเมล็ดข้าว

γ-Oryzanol 2200-3000 ppm	Tocopherols/Tocotrienols 220-320 ppm	Polyphenols Ferulic acid	Minerals Magnesium (6250-6440)
Cycloartenyl ferulate	α -Tocopherol	α -Lipoic acid	Calcium (303-500)
24-methylene	β -Tocopherol	Methyl ferulate	Phosphorous (14700-17000)
Cycloartenyl ferulate	γ -Tocopherol	ρ -Coumaric acid	
Campesterol ferulate	δ -Tocopherol	ρ -Sinapic acid	
β -Sitosterol ferulate	α -Tocotrienol	Isovitexin	
Stigmasteryl ferulate	β -Tocotrienol	Proanthocyanidins	
	γ -Tocotrienol		
	δ -Tocotrienol		
Polysaccharides	Carotenoids 0.9-1.6 ppm	Amino acids	
Cycloartenol ferulic acid	-Carotene	Tryptophen (2100)	
Glycoside	-Carotene	Histidine (3800)	
Diferulic-acid complex	Lycopene	Methionine (2500)	
Diferulic-acid-3 Glucose-2-	Lutein	Cystein (336-448)	
calcium complex	Zeaxanthone	Cystine (336-448)	
		Argenine (108000)	
Phytosterols 2230-4400 ppm	Phospholipids	Enzymes	B-vitamins
β -Sitosterol	Phosphatidylcholine	Glutathione peroxidase	Thiamin (22-31)
Campesterol	Ethanolamine	Methionine reductase	Riboflavin (2.2-3.5)
Stigmasteryl	Lysolecithin	Superoxidase dismutase	Niacin (370-660)
5 Avinsterol		Polyphenol oxidase	Pantothenic acid (36-50)
7 Stigmasteryl		Aspartate amino transferase	Pyridoxin (29-42)
Isofucosterol		Isozymes AAT-1, AAT-2	Inositol/myoinositol (1200/1880)
Gramisterol		Coenzyme Q 10	Biotin (0.1-0.22)
Citrostadienol			Choline (930-1150)
Obtusifololol			Phytates (1500-1710)
Branosterol			
28-Homotyphasterol			
28-Homosteasteronic acid			
6-Deoxycastasterone			
β -Amyrin			

ข้าวมีประโยชน์ต่อสุขภาพ⁽¹⁶⁴⁾ เนื่องจากมีสารต้านอนุมูลอิสระทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอม เป็นตัวจับโลหะ (metal-chelating) ยับยั้งการเกิด peroxide และ singlet oxygen ทำให้ RONS ถูกกำจัด ยับยั้งเอนไซม์เฟส I ซึ่งเปลี่ยนสารก่อมะเร็งให้อยู่ในรูป active แต่เพิ่มประสิทธิภาพและการทำงานของเอนไซม์เฟส II ซึ่งทำหน้าที่ในระบบกำจัดสารพิษออกจากร่างกาย เช่น Ferulic acid ซึ่งเป็นโพลีฟีนอลที่พบมากในข้าว ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งแบบแย่งจับโดยเฉพาะเอนไซม์ที่กระตุ้นสารก่อมะเร็งไม่ให้จับกับสารก่อมะเร็ง อีกทั้งยังทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณระหว่างเซลล์และควบคุมการทำงานของ

เซลล์ให้สมดุล เช่น สาร inositol-hexa-phosphate อีกทั้งเนื่องจากสาร phytochemical ที่พบในรำข้าวนั้นจะมีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายคลึงกับสาร bioactive ในร่างกาย เช่น cycloartenol ซึ่งเป็นสารกลุ่มเดียวกับ γ -oryzanol จะมีโครงสร้างที่คล้ายกับโคเรสเตอรอล ดังนั้น cycloartenol จึงสามารถแย่งจับกับ active binding sites ของ โคเรสเตอรอลในตับ และสามารถขับโคเรสเตอรอลออกจากเซลล์ โดยเปลี่ยนเป็นกรดน้ำดีและสื่อน้ำดีทางลำไส้เล็ก ส่งผลให้เกิดภาวะ hypocholesterolemic propionic acid ซึ่งเป็นโพลีฟีนอลที่พบมากในข้าวเช่นกันจะขัดขวางมิให้ร่างกายดูดซึมไขมัน จึงช่วยลดระดับโคเรสเตอรอล LDL และไตรกลีเซอไรด์ในซีรัมได้⁽¹⁶¹⁾ สารชีวภาพในข้าวที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย มีดังนี้ carotenoids พบ 130 ไมโครกรัมต่อข้าว 100 กรัม วิตามินบีต่างๆ เช่น Niacin มีหน้าที่ในการคงระดับน้ำตาลในเลือด ป้องกันภาวะ hyperglycemia และควบคุมการผลิตพลังงานของเซลล์ Pyridoxin เป็นตัวสำคัญในการป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อนทางประสาทในผู้ป่วยเบาหวาน Biotin ควบคุมการเผาผลาญน้ำตาลของเซลล์ และยังทำหน้าที่คงระดับน้ำตาลในเลือด Inositol เป็นสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ ช่วยลดระดับโคเรสเตอรอล ยับยั้งเกร็ดเลือดเกาะผนังหลอดเลือด ลดไขมันในตับ กระตุ้นการหลั่งอินซูลิน และยับยั้งการเจริญของมะเร็งหลายชนิดเช่นมะเร็งตับ ผิวน้ำลำไส้ และเต้านม **วิตามินอี** เป็นชื่อเรียกโดยรวมของกลุ่มสาร tocopherols และ tocotrienols ซึ่งมีโครงสร้างที่ประกอบด้วย ส่วนหัวเป็นหมู่ chromanol ต่อกับสาย phytyl- หรือ farnesyl- วิตามินอี และไอโซเมอร์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถละลายในไขมัน นักวิทยาศาสตร์พบว่า tocopherols สามารถป้องกันการเป็นพิษต่อหัวใจ และพบว่า tocotrienols(T3) เป็นสารต้านมะเร็งอย่างแรงสามารถยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการสังเคราะห์โคเรสเตอรอลของเซลล์ตับ ทำให้ลดปริมาณโคเรสเตอรอล, LDL, apo-B รวมถึง thromboxaneB2 และ platelet factor4 ในกระแสเลือด ที่อาจเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ γ -oryzanol เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบได้เฉพาะในรำข้าว มีโครงสร้างคล้ายการผสมระหว่าง ferulic acid esters ของ triterpene alcohol กับ phytosterols แบ่งย่อยได้เป็น 5 ชนิด ดังตารางที่ 2.3 γ -oryzanol สามารถป้องกันแสงอัลตราไวโอเล็ต จึงนิยมผสมลงในผลิตภัณฑ์บำรุงผิว นอกจากนี้ γ -oryzanol ยังจัดเป็นสาร hypolipidemic และ antiatherogenic เนื่องจากสามารถลดการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือดกับผนังหลอดเลือด ยับยั้งการเกิดผังพืดบนหลอดเลือด aortic และการเกิด oxidized-LDL นอกจากนี้ γ -oryzanol ยังเป็น neuroregulator โดยจะออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทอัตโนมัติคล้ายสเตอรอยด์ ควบคุมการเพิ่มปริมาณกล้ามเนื้อในร่างกาย และเป็นสารต้านการกลายพันธุ์และต้านมะเร็ง⁽¹⁶⁴⁾ **Oryzafuran** เป็นผลิตภัณฑ์สกัดสีน้ำตาลที่พบได้เฉพาะในข้าวเช่นเดียวกับ γ -oryzanol รายงานวิจัยชี้ว่าสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH• ได้⁽¹¹⁾ **Phytosterol** เป็นสารที่มีโครงสร้างที่คล้ายโคเรสเตอรอลจึงแข่งขันกับโคเรสเตอรอลแย่งจับเข้าเซลล์ลำไส้ ด้วยเหตุนี้ phytosterol จึงช่วยลดการดูดซึมและขับ โคเรสเตอรอลออกจากร่างกาย นอกจากนี้ phytosterol ยังยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ เต้านม และอวัยวะ จากการเปลี่ยนแปลงสภาพผนังเซลล์และลดกระบวนการอักเสบ **โพลีฟีนอล** พบ 85.6 มิลลิกรัมต่อข้าว 1 กิโลกรัม ประกอบด้วย Cinnamic acid, Ferulic acid, p-Coumeric acid, α -Lipoic acid และ Sinapic acid เป็นต้น ข้าวดำและข้าวแดงมีกรดฟีนอลิกประมาณ 1-3% ของน้ำหนักข้าว จะอยู่ในชั้น outer layer ทำหน้าที่ห่อหุ้มปฏิกิริยา Fenton reaction โดยกลไกที่ใช้จะต่างจากสาร metal-chelating ตัวอื่นๆ คือจะสร้างสารประกอบเชิงซ้อนกับ Fe^{3+} ทำให้เหล็กไม่สามารถเข้าร่วมในปฏิกิริยา Fenton และ Haber-Weiss เพื่อสร้างอนุมูลอิสระ $OH\cdot$ **แร่ธาตุ** ที่พบมากในข้าวดำและข้าวแดงคือแมงกานีส (Mn) เหล็ก (Fe), ทองแดง (Cu), สังกะสี (Zn), แอลลูมิเนียม (Al) และ

โครมเมียม(Cr)⁽¹⁶⁵⁾ โดยเฉพาะแมงกานีส มีงานวิจัยที่พบว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและกำจัด ROS หลักที่พบในข้าวแดง สามารถรอกับกับ O₂, ¹O₂, OH• และ TBARS ไม่ให้ไปทำปฏิกิริยากับสารอื่นเช่นเดียวกับ โครเมียมในข้าวแดงจะเข้าจับกับ O₂ และ OH• ไม่ให้ไปทำปฏิกิริยากับสารอื่น โดยเรียงลำดับความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในข้าวดังนี้ ข้าวแดง >ข้าวดำ>ข้าวขาว⁽¹⁶⁶⁾ มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับพบว่าข้าวแดงที่ปลูกในอิตาลีพบว่า มีแร่ธาตุซีลีเนียมสูงกว่าข้าวขาว⁽¹⁶⁷⁾ **ใยอาหาร** ข้าวแดงเป็นแหล่งสำคัญของแป้งย่อยยาก (resistant starch) และสารโพลีแซ็กคาไรด์อื่นที่มีไซเบียง (Non-starch polysaccharide) ที่เรียกว่า ใยอาหาร แบบที่เรียในลำไส้จะย่อยใยอาหารได้เป็น กรดไขมันสายสั้นๆ (short chain fatty acid) จำพวก acetate, propionate และ butyrate ซึ่งกรดไขมันเหล่านี้มีผลในการลดระดับ pH ในลำไส้ใหญ่ทำให้ดูดซึมอิเล็คโทรไลต์และเกลือแร่ เช่น Ca²⁺ กลับได้เพิ่มมากขึ้น จึงมีส่วนในการป้องกันอาการท้องร่วง -ท้องเสียได้อีกทั้ง butyrate ยังเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์เยื่อบุลำไส้ สามารถลดอาการแผลในลำไส้ และเพิ่มปริมาณ buck mass⁽¹⁶⁸⁾ แต่ถ้ามีใยอาหารปริมาณมากเกินไป ใยอาหารจะจับกับสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารอาหารอื่นๆ ทำให้การดูดซึมสารอาหารตัวอื่นๆ ลดลงเรียกว่า “anti-nutrient”

สีของเมล็ดข้าวที่พบมากมักมีสี แดง น้ำตาล ม่วง และดำ มีหลายสายพันธุ์ เช่น Indica, Japonica, Heugjinjubyes และ Javanica เป็นต้น ข้าวตระกูลเหล่านี้จะมีปริมาณสารอาหารที่สูงกว่าข้าวขาว โดยเฉพาะส่วนโปรตีน ใยอาหาร และวิตามินบี⁽¹⁶⁵⁾ ในข้าว *Oryza sativa Linn.* Indica สารรงควัตถุอยู่ที่ชั้น aleurone⁽¹⁶⁹⁾ เมื่อนำสารสกัดตรงควัตถุนี้มาทำการทดสอบ พบว่าสารรงควัตถุส่วนใหญ่จะเป็นแอนโทไซยานินส์ ซึ่งแอนโทไซยานินส์หลักที่พบจากข้าวเมล็ดสีพันธุ์ Indica คือ Cyanidin-3-glucoside และ Peonidin-3-O-glucoside⁽¹⁷⁰⁻¹⁷²⁾ นอกจากนี้ยังพบรงควัตถุปริมาณน้อยอื่นๆ เช่น แอนโทไซยานินส์ Cyanidine-3-O-glucopyranoside, Peonidin-3-O-β-glucopyranoside **แอนโทไซยานิน** เช่น Cyanidin, Malvidin⁽¹⁷³⁾, polymeric procyanidin⁽¹⁷⁴⁾ **สารฟีโนลิกจำพวก Anisole** เช่น 4-hydroxycinnamic acid (p-coumaric), 4,7-dihydroxyvanillic acid, Photocatechuic acid methyl ester, Syringaldehyde, Vanillin⁽¹⁷⁵⁻¹⁷⁸⁾ **สารฟีโนลิกจำพวก Ferulic** เช่น Sinapinic acids sucrose esters 6'-O-(E)-feruoylsucrose, 6'-O-(E)-sinapoylsucrose⁽¹⁷⁹⁾, Ferulic acid sterol ester, γ-Oryzanol⁽¹⁸⁰⁾ **สาร Alkaloid** เช่น 4-carbomethoxy-6-hydroxy-2-quinolone⁽¹⁸¹⁾ Phytic acid⁽¹⁸²⁻¹⁸⁴⁾ นักวิจัยพบว่า Cyanidin-3-glucoside และ Peonidin-3-O-glucoside ในข้าวเมล็ดสีมีฤทธิ์ลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งระดับ SKHep-1 โดยลดการแสดงออกของเอนไซม์ matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) และ urokinase-type plasminogen activator (u-PA) ซึ่ง MMPs เป็นเอนไซม์ proteolytic ที่ย่อย extracellular matrix และ basal membrane ทำให้เซลล์มะเร็งรุกรานจากอวัยวะแรกแพร่กระจายไปทั่วร่างกาย ส่วน u-PA จะกระตุ้นเอนไซม์ในกระบวนการเปลี่ยน plasminogen ไปเป็น plasmin และยังกระตุ้นเอนไซม์ MMP⁽¹⁶⁾ แอนโทไซยานินส์และฟีโนลิกที่แยกได้จากข้าวพันธุ์ Japonica สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ aldose reductase เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกระบวนการ polyol pathway ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาล aldose เป็น sorbitol ซึ่งเป็น sugar alcohol มีผลทำให้เนื้อเยื่อเสียหายและเป็นอันตรายมากในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนหลายประการ เช่น retinopathy และ neuropathy⁽¹⁸⁵⁾ มีรายงานวิจัยพบว่า แอนโทไซยานินส์ลดการเกิด lens opacity ในหนูที่เป็นเบาหวาน ผู้วิจัยคาดว่า Malvidin-3-glucoside และ Delphinidin-3-glucoside (พบในปริมาณน้อยในข้าวดำ) มีฤทธิ์ระงับที่สูงกว่า Cyanidin-3-glucoside, Petunidin-3-glucoside และ Peonidin-3-glucoside (พบปริมาณมาก)⁽¹⁸⁶⁾

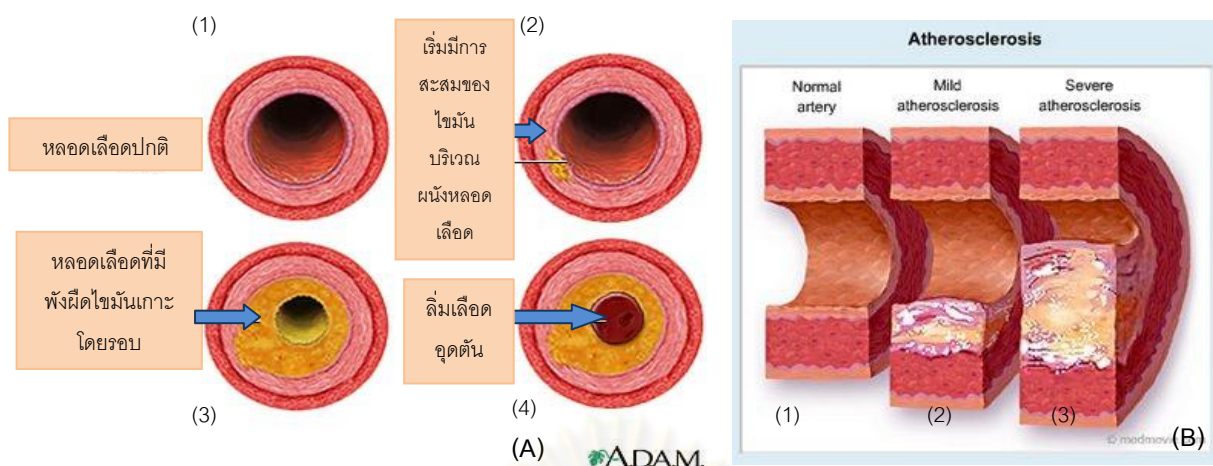
งานวิจัยหลายฉบับแสดงว่าสารสกัดข้าวมีประโยชน์ต่อสุขภาพมาก เช่น สามารถลดจำนวนเซลล์อีโอซิโนฟิล (eosinophil) ที่ก่ออาการแพ้จากน้ำล้างช่องหลอดลม (bronchoalveolar lavage fluid) ลดสารก่ออาการแพ้จากลิมโฟไซต์ชนิด helper T-lymphocyte 2 (Th2) และ B-cell เช่น interleukin-4 (IL-4), IL-5, IL-13 รวมทั้งลดอิมมูโนโกลบูลิน G และ E (IgG, IgE) จาก mast cell ไม่ให้ปล่อย histamine ออกมาจึงสามารถลดอาการแพ้และอาการอักเสบของหลอดลมใหญ่ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในโรคหอบหืด นอกจากนี้รายงานยังกล่าวว่า ข้าวดำสามารถป้องกันอีโอซิโนฟิลไม่ให้เข้ามาในอวัยวะเป้าหมาย ทำให้สามารถรักษาโรคภูมิแพ้ต่างๆ ที่มีอีโอซิโนฟิลเกี่ยวข้อง เช่น allergic rhinitis, allergic conjunctivitis, asthma, chronic obstructive pulmonary disease, atopic dermatitis และ allergic diarrhea⁽¹⁸⁷⁾ Protocatechuic acid ซึ่งเป็นฟีนอลิกที่สามารถพบได้ในข้าวเมล็ดสีก็มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase (monophenol monooxygenase) ที่อยู่ใน melanosome ของเซลล์ผิวหนังไม่ให้เปลี่ยนกรดอะมิโน L-tyrosine ไปเป็น DOPA ซึ่งจะเปลี่ยนต่อไปเป็นเม็ดสีผิว (melanin)⁽¹⁷⁸⁾ สารสกัดจากข้าวดังกล่าวยังขัดขวางสารก่อมะเร็งต่างๆ เช่น ป้องกัน มิให้สารก่อมะเร็ง 12- O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) กระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ติดเชื้อไวรัส Estein-Barr กลายพันธุ์เป็นเซลล์มะเร็ง⁽¹⁸⁸⁾ รวมทั้งลดภาวะไขมันในเลือดสูง ภาวะดื้ออินซูลิน ระดับ thiobarbituric acid reative substance (TBARS) และ oxidized glutathione ในเลือดของหนูที่รับประทานอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสสูง⁽¹⁸⁹⁾ นอกจากนี้แอนโทไซยานินส์แล้ว ยังพบ Quinolone alkaloid และ Phenolic acid อื่นๆ ซึ่งเป็นสารเมแทบอลิต์ที่สำคัญจากข้าวเมล็ดสีพันธุ์ Heugjinjubyes ซึ่งสารดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ⁽¹¹⁾ เช่นเดียวกับ γ -Oryzanol, tocopherol, polymeric procyanidin และ Oryzafuran⁽¹⁹⁰⁾ สารสกัดจากข้าวยังเก็บกัก Fe^{3+} ไว้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ คาดว่าเกิดจาก phytic acid ที่พบมากบริเวณ aleurone layer ของเมล็ดข้าว⁽¹⁰⁾ นอกจากนี้ยังมีสารอื่นๆ ที่มีปริมาณน้อยมากและยังวิเคราะห์ไม่ได้ว่าเป็นอะไร แต่ทราบว่ามีประโยชน์ต่อสุขภาพ เช่น กรณีของ ข้าวพันธุ์ไทย RD-7 ที่ออกฤทธิ์เป็นพิษต่อมะเร็ง 4 ชนิดคือ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหนู P388, เซลล์กระดูกมนุษย์ HSOS-1, เซลล์มะเร็ง Myeloma หนู X-63-Ag และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมนุษย์ Jurkat จากทั้งหมด 17 ชนิดที่ใช้ทดสอบแต่ไม่แสดงฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ปกติคือ เซลล์มนุษย์ embryo fibroblasts YH-3, เซลล์จากสายสะดือมนุษย์ KC-T1 และเซลล์หลอดเลือดแดงใหญ่วัว PAE โดยโมเลกุลที่ออกฤทธิ์ดังกล่าวพบว่าเป็นโปรตีนขนาด 40 กิโลเดลตัน สามารถทนทานต่อความเย็นความร้อนและ pH ต่ำ-สูง แต่กลับไม่ทนทานต่อเอนไซม์ trypsin ผู้วิจัยคาดว่าโมเลกุลโปรตีนดังกล่าวน่าจะเป็น DNase หรือ RNase⁽¹⁹¹⁾

เมื่อทำการทดสอบผสมข้าวแดงและข้าวดำกับอาหารไขมันสูงให้สัตว์ทดลองรับประทาน พบว่า ภาวะตายมีแผ่นไขมันตามผนังหลอดเลือดน้อยกว่า 50% และมีระดับสารต้านอนุมูลอิสระในกระแสเลือด เอนไซม์ SODs ในเม็ดเลือดแดง และระดับ HDL รวมทั้ง Apo-AI ในพลาสมาเพิ่มขึ้น อีกทั้งการผลิต ROS และ malondialdehyde จากตับก็ลดลง เมื่อเทียบกับ ภาวะตายที่รับประทานข้าวขาวผสมกับอาหารไขมันสูง ผู้วิจัยคาดว่าเกิดจากการที่ข้าวเมล็ดสีมีปริมาณแร่ธาตุอื่น เช่น ซีลีเนียมและสังกะสีและวิตามินสูงกว่าข้าวขาว⁽¹⁴⁾ จึงผสมเปลือกนอกข้าวดำกับอาหารไขมันสูงให้กระต่ายรับประทานพบว่า ภาวะตายที่รับประทานอาหารที่ผสมเปลือกนอกข้าวดำมีปริมาณแผ่นไขมันที่เกาะผนังหลอดเลือด ปริมาณ 8-hydroxyl- α -deoxyguanosine (8-OHdG) ซึ่งเป็นตัวชี้วัดของการทำลาย DNA และระดับ malondialdehyde จากหลอดเลือดแดงใหญ่ aorta น้อยกว่าภาวะตายที่รับประทานอาหารผสมเปลือกนอกข้าวขาวกับอาหารไขมันสูง (66%) แต่ผู้วิจัยไม่พบ

ความแตกต่างของระดับโคเรสเตอรอล LDL และ HDL หรือระดับวิตามินอีในพลาสมา รวมทั้งระดับเอนไซม์ SODs ในกระต่ายทั้งสามกลุ่ม ผู้วิจัยในการทดลองนี้จึงสรุปว่าปรากฏการณ์ลดแผ่นไขมันบนผนังหลอดเลือดของข้าวสาลีไม่ได้เกิดจากน้ำมันรำข้าว แต่น่าจะเกิดจากสารฟลาโวนอยด์ที่พบมากในชั้นเปลือกนอกของข้าวดำ⁽¹⁹²⁾ ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบต่อไปอีก โดยผสมเปลือกชั้นนอกข้าวดำและเปลือกชั้นนอกของข้าวขาวกับอาหารพิเศษ AIN-93G ให้หนูที่ขาด ApoE มาแต่กำเนิด (apo-proteinE null mice) รับประทานพบว่า หนูที่รับประทานอาหารผสมกับเปลือกชั้นนอกของข้าวดำมีแผ่นไขมันเกาะผนังหลอดเลือดน้อยกว่าหนูที่รับประทานเฉพาะอาหาร AIN-93G และอาหารผสมเปลือกชั้นนอกของข้าวขาว (48 และ 46% ตามลำดับ) ในการทดลองครั้งนี้พบว่าระดับโคเรสเตอรอลในซีรัมจาก plague และหลอดเลือดแดงใหญ่, ลิ้มโฟไซท์ CD4⁺, แอนติบอดีต่อ Ox-LDL และการแสดงออกโปรตีนและ mRNA ของเอนไซม์ iNOS ลดลง แต่ระดับ HDL ในซีรัมเพิ่มขึ้น⁽¹⁹³⁾

โรคหัวใจและหลอดเลือด

โรคหัวใจขาดเลือด หรือโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ หรือโรคหลอดเลือดโคโรนารี หมายถึงโรคหัวใจที่เกิดจากการตีบตันของหลอดเลือดแดงที่ส่งเลือดหล่อเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจ ทำให้เลือดที่ไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจลดลงหรือชะงักไป เมื่อผู้ป่วยมีภาวะที่กล้ามเนื้อหัวใจต้องการออกซิเจนมากขึ้น เช่น การออกกำลังกาย รู้สึกโกรธ เครียด ก็จะทำให้มีอาการเจ็บหน้าอกเป็นครั้งคราว โดยที่ยังไม่มีการตายของกล้ามเนื้อหัวใจเกิดขึ้นเรียกว่า โรคหัวใจขาดเลือดชั่วคราว (angina pectoris) แต่ถ้ากล้ามเนื้อหัวใจมีการตายเกิดขึ้นบางส่วน เนื่องจากหลอดเลือดโคโรนารีเกิดอุดตันจากลิ้มเลือดทำให้เลือดไปเลี้ยงหัวใจไม่ได้เลย ผู้ป่วยจะเกิดอาการเจ็บหน้าอกรุนแรง (angina) ซึ่งผู้ป่วยมักมีภาวะช็อกและหัวใจวายร่วมด้วยเรียกว่า โรคกล้ามเนื้อหัวใจตาย (myocardial infarction) ภาวะที่มีการตีบตันของหลอดเลือด cardiovascular disease (CVD หรือ stroke) และ coronary heart disease (CHD) นี้พบทั่วโลกโดยผู้ชายมีโอกาสเสี่ยงมากกว่าผู้หญิง และอัตราเสี่ยงจะเพิ่มขึ้นตามอายุ ส่วนมากมีอาการเริ่มแรกเมื่ออายุมากกว่า 40 ปี การตีบตันของหลอดเลือดแดงนี้มักเป็นผลจากภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง เนื่องจากมีไขมันเกาะเรียกว่า atherosclerosis ดังภาพที่ 2.8 ซึ่งอาจมาจากการที่ร่างกายเสื่อมตามวัย นอกจากนี้ยังมีอีกหลายปัจจัยที่ทำให้หลอดเลือดแดงแข็งเร็วขึ้น เช่น การสูบบุหรี่จัด ภาวะไขมันในเลือดสูง โรคความดันโลหิตสูง ความอ้วน ขาดการออกกำลังกาย และเบาหวาน ซึ่งมีรายงานว่า การฉีดอินซูลินจะลดระดับสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายและเพิ่มการทำงานของ growth factor เช่น rennin-angiotensin ที่จำเพาะต่อเซลล์หัวใจแทน ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคหัวใจในผู้ป่วยเบาหวาน⁽¹⁹⁴⁾ atherosclerosis เกิดจาก plaque ที่อุดมด้วยโคเรสเตอรอลเข้าเกาะและสะสมเรื้อรังกับผนังหลอดเลือด arteries ขนาดกลางและขนาดใหญ่ อาจไม่แสดงอาการเป็นเวลานาน 20-30 ปี จนมีขนาดของ plaque ที่ใหญ่มาก เมื่อโดนบีบหรือสะกิดจะแตกออกไปกระตุ้นการทำงานของระบบการแข็งตัวของเลือด เกิดเป็นลิ่มเลือด (thrombosis) เข้ากีดขวางทางเดินเลือดไปเลี้ยงอวัยวะต่างๆ กล้ามเนื้อที่หล่อเลี้ยงโดยหลอดเลือด Artery จะขาดออกซิเจนและตาย (infraction) คาดว่า Coronary thrombosis เป็นสาเหตุหลักของการเกิดหัวใจวาย และหากลิ้มเลือดไปอุดตันที่ Artery ขนาดเล็ก เช่น Carotid หรือ Basilar ก็เป็นสาเหตุของการเกิดหลอดเลือดในสมองแตก (Cerebral infraction)



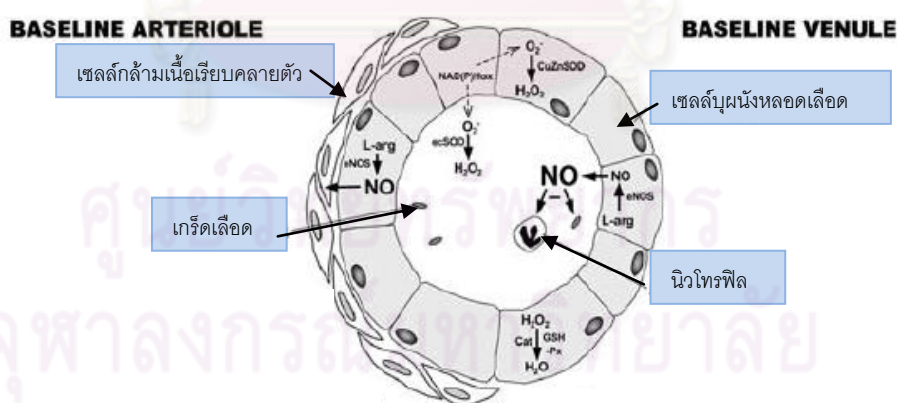
ภาพที่ 2.8: พยาธิสภาพการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบตันจากการสะสมของไขมันบริเวณผนังหลอดเลือด โดย (1): หลอดเลือดปกติ, (2): เริ่มมีแผ่นไขมันมาเกาะตามผนังหลอดเลือดเป็นบางจุด (mild atherosclerosis), (3): มีแผ่นไขมันเกาะรอบผนังหลอดเลือดโดยรอบและมีความหนาเพิ่มขึ้น ทำให้ทางเดินกระแสเลือดตีบตัน (severe atherosclerosis), (4): เยื่อที่หุ้มแผ่นไขมันแตกออกไป กระตุ้นการทำงานของระบบการแข็งตัวของเลือดและเกร็ดเลือด จนเกิดเป็นลิ่มเลือดอุดตันกระแสเลือด ภาพหน้าตัดของหลอดเลือด (A), ภาพตัดขวางของหลอดเลือด (B)

ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด

1. ความดันเลือด

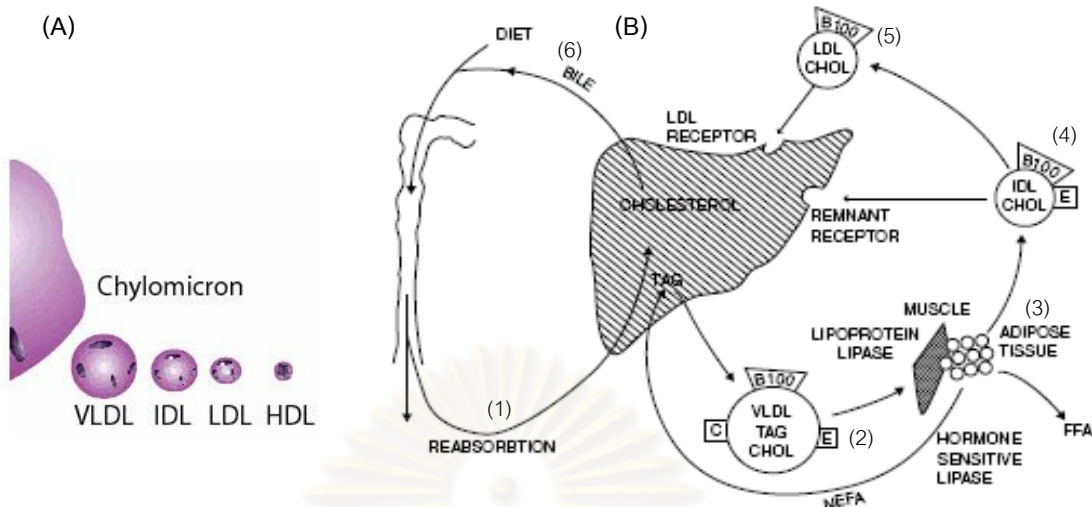
ความดันเลือดคือ ความแรงที่หัวใจบีบนำเลือดออกจากหัวใจและความต้านทานของหลอดเลือดขนาดเล็ก โดยความดันเลือดคนปกติคือ 120/80 มิลลิเมตรปรอท ความดันเลือดจะถูกควบคุมโดยการเพิ่มปริมาณหรือการทำงานของไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide: NO•) ซึ่งสร้างจาก L-arginine โดยใช้เอนไซม์ nitric oxide synthetase (NOS) ในร่างกายมีด้วยกัน 3 ไอโซฟอร์มคือ neuronal NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS) และ endothelial NOS (eNOS) ซึ่ง nNOS และ eNOS จะถูกควบคุมโดยกลไก Ca^{2+} /Calmodulin ภายในเซลล์ผนังหลอดเลือด (endothelium) ส่วน iNOS สามารถผลิต NO• ได้รวดเร็วโดยอาศัยการกระตุ้นจากกระบวนการอักเสบหรือจากสารพิษ เช่น lipopolysaccharide และไซโตไคน์โดยไม่มีขึ้นกับกลไก Ca^{2+} /calmodulin ภายในเซลล์⁽¹⁵⁴⁾ NO• จะออกฤทธิ์โดยแพร่เข้าเซลล์กล้ามเนื้อเรียบแล้วกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ guanyl cyclase ซึ่งทำหน้าที่ในการผลิต cGMP จนเพิ่มขึ้นไปกระตุ้นการทำงานของ protein kinase G ทำให้หลอดเลือดขยายตัว⁽¹⁹⁵⁾ นอกจากนี้ NO• ยังมีคุณสมบัติเป็นสาร antiadhesive, antithrombotic และ antiproliferative มีบทบาทสำคัญในการควบคุม tone ของหลอดเลือด การแบ่งตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ การเกาะของเซลล์เม็ดเลือดขาวและลิ่มเลือด การสื่อประสาท ฆ่าเชื้อโรคและเซลล์มะเร็ง และปรับสมดุลร่างกาย⁽¹⁵³⁾ หากมีปริมาณที่พอเหมาะและช่วยป้องกันการเกิดหลอดเลือดอุดตันได้ ดังภาพที่ 2.9 แต่หากมีมากเกินไปจากการอักเสบจะรวมตัวกับ O_2^{\bullet} เป็น peroxynitrite⁽¹⁹³⁾ ก่อให้เกิดพยาธิสภาพหลายประการ เช่น circulatory shock, การอักเสบ และมะเร็ง⁽¹⁵⁴⁾ NO• ยังสามารถยับยั้งการตายของเซลล์ผนังหลอดเลือดได้โดยป้องกันการเพิ่มขึ้นของ caspase 3 ภายในเซลล์⁽¹⁵⁷⁾ โรคความดันโลหิตสูงจึงหมายถึง การมี

ความดันเลือดสูงกว่า 140/90 มิลลิเมตรปรอท หากเกิน 160/105 มิลลิเมตรปรอทจะเป็นภาวะความดันโลหิตสูงรุนแรง ความดันเลือดจะเพิ่มขึ้นตามอายุและในผู้ชายจะสูงกว่าผู้หญิงจนถึงช่วงหมดประจำเดือนจากนั้นจะไม่ต่างกันมากนัก สาเหตุหลักของความดันสูงมาจากความต้านทานของหลอดเลือดขนาดเล็กที่เพิ่มขึ้น โรคความดันโลหิตสูงมักจะพบในผู้ป่วยที่มีค่า BMI สูง รับประทานโซเดียมและแอลกอฮอล์ปริมาณมาก แต่รับประทานโพแทสเซียมน้อย ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อระบบความดันเลือดในวัยกลางคนขึ้นไปมากกว่าคนอายุน้อย เนื่องจากการทำงานของระบบ rennin-angiotensin ในคนวัยเยาว์ที่ทำงานได้เต็มที่ แต่จะเสื่อมลงตามวัยที่มากขึ้น เช่น ในการทดลองแบบ randomized controlled trial หนึ่งในผู้ป่วยโรคความดันโลหิตสูงที่มีอายุ 50 ปีขึ้นไปพบว่า การรับประทานเกลือลดลงจะช่วยลดความดัน systolic ได้ประมาณ 5-10 มิลลิเมตรปรอท แต่ไม่มีผลในกลุ่มคนปกติ ธาตุโพแทสเซียมซึ่งมักพบมากในผักผลไม้และเนื้อขาวจะช่วยลดความดันเลือดได้ประมาณ 2-5 มิลลิเมตรปรอท อาจเป็นเพราะการรับประทานผักผลไม้มากขึ้นจะทำให้การรับประทานเกลือลดลงนั่นเอง มีการศึกษาพบว่าความดันเลือดที่เพิ่มขึ้นเป็นปัจจัยเสี่ยงอันดับหนึ่งของ CVD ส่วนปัจจัยอื่นๆ นั้นแบ่งเป็นประเภทที่ควบคุมไม่ได้ เช่น อายุ เพศ ลักษณะทางพันธุกรรม และปัจจัยเสี่ยงที่ควบคุมได้ เช่น การออกกำลังกาย การสูบบุหรี่ อาหารที่รับประทาน อาหารมีอิทธิพลต่อการเสี่ยงเป็น CHD ในหลายๆ ทาง แต่ที่สำคัญและให้ความสนใจมากที่สุดก็คือ 1. ผลของอาหารกับความดันเลือดและระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดและ 2. ความเสี่ยงต่อการเกิดโรคความดันโลหิตสูงจะเพิ่มขึ้น เมื่อผู้ป่วยมีน้ำหนักเกินและเป็นโรคเบาหวานหรือดื่มแอลกอฮอล์อย่างหนัก เนื่องจากแอลกอฮอล์จะไปกดการผลิต vasopressin ทำให้ปริมาณ rennin ในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น⁽¹⁹⁶⁾ ดังที่กล่าวมาแล้วว่า ความสมดุลระหว่างระบบ Vasodilatation-vasoconstriction, procoagulant-antithrombotic effect, การโต-ตายของเซลล์ จะช่วยกันขับเคลื่อนให้เซลล์บุผนังหลอดเลือดทำงานต่อไปได้อย่างปกติ ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระ oxidized LDL, Tumor necrosis factor (TNF) และ interleukin ที่มีผลต่อ Vasomotricity และการผลิต NO \cdot จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการเกิดพยาธิสภาพของโรคหลอดเลือดและหัวใจ⁽¹⁹⁵⁾



ภาพที่ 2.9: ไนตริกออกไซด์จะถูกสร้างจากเซลล์บุผนังหลอดเลือดจาก L-arginine โดยเอนไซม์ NOS เพื่อใช้ในการปรับสมดุลการทำงานของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ เซลล์เม็ดเลือดขาว เกร็ดเลือด และเซลล์บุผนังหลอดเลือดเอง นอกจากนี้ ไนตริกออกไซด์ยังมีหน้าที่ในการเก็บกักอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในกระแสเลือด เช่น O₂⁻ อีกด้วย

2. ไขมันในกระแสเลือด

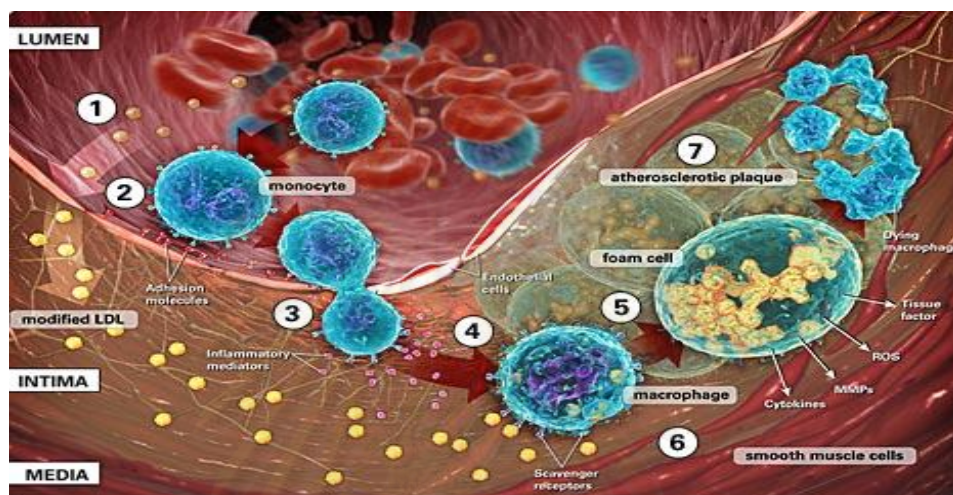


ภาพที่ 2.10: ขนาดของอะโปไลโปโปรตีนชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกัน (A), (1): ไขมันจากอาหารจะถูกดูดซึมผ่านเข้าลำไส้เล็ก ขนส่งโดย chylomicron ไปยังตับ, (2): เซลล์ตับจะสร้าง VLDL ซึ่งมีไขมัน โคเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์รวมกับ Apo B100 apo E และ apo C ซึ่ง VLDL จะถูกส่งไปยังเซลล์ของอวัยวะต่างๆ ทางกระแสเลือด, (3): เซลล์ต่างๆ เช่น เซลล์กล้ามเนื้อ เซลล์ไขมัน เซลล์หลอดเลือด จะมีเอนไซม์ lipoprotein lipase ใช้ย่อยส่วนไตรกลีเซอไรด์จาก VLDL ได้เป็นกรดไขมันนำไปนำไปใช้สร้างพลังงาน, (4): เมื่อ VLDL สูญเสียไตรกลีเซอไรด์ไปก็จะทำให้ในโมเลกุลอุดมไปด้วยโคเลสเตอรอลเรียกว่า IDL, (5): IDL สูญเสีย apoE ไปเปลี่ยนเป็น LDL และโคเลสเตอรอลบางส่วน ของ LDL จะถูกนำไปสร้างฮอร์โมน เช่น เอสโตรเจน, (6): ทั้ง IDL และ LDL จะเข้าจับกับรีเซพเตอร์บนเซลล์ตับที่เรียกว่า LDLR และถูกกำจัดทิ้งในรูปกรดน้ำดี (B)

ไขมันในกระแสเลือดที่ถูกขนส่งโดยร่วมกับโปรตีนเป็น particles ที่เรียกว่า ไลโปโปรตีน (lipoprotein) สามารถแบ่งประเภทตามความหนาแน่นได้เป็น 5 ประเภท ดังภาพที่ 2.10A คือ chylomicrons, very low density lipoprotein (VLDL), low density lipoprotein (LDL) และ high density lipoprotein (HDL) และส่วนที่เหลือจะเป็น intermediate density lipoprotein (IDL) โปรตีนในไลโปโปรตีนเหล่านี้เรียกว่า apoprotein ซึ่งแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ ApoA แบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ apoA1, apoA1: AII, apo AII กลุ่มนี้ยังรวมถึง apoC และ apoE อีกด้วย และ ApoB แบ่งเป็น 5 กลุ่มคือ apoB, apoB:C, apoB:E, apoB:C:E และ apoAII:B:C:E ApoB ยังสามารถแบ่งเป็น 2 ชนิด ที่มีความสำคัญคือ apoB48 สร้างจากเซลล์ลำไส้ ใช้เป็นส่วนประกอบของ chylomicron และ apoB100 สร้างจากเซลล์ตับ ใช้เป็นส่วนประกอบของ VLDL IDL และ LDL apoB100 จะถูกจดจำด้วย LDL receptor (LDLR) บนผนังเซลล์ทำหน้าที่รับ LDL เข้าเซลล์ ส่วนใหญ่จะแสดงออกมากที่สุดที่ตับ apoprotein เหล่านี้มีหน้าที่เป็นตัวกำหนดกระบวนการเมแทบอลิซึมของไลโปโปรตีนโดยการกระตุ้นเอนไซม์และเป็น ligand สำหรับรีเซพเตอร์ต่างๆ ไขมันที่ถูกขนส่งส่วนใหญ่คือโคเลสเตอรอล, โคเลสเตอรอลเอสเทอร์ ไตรกลีเซอไรด์ และฟอสโฟลิปิด VLDL จะขนส่งไตรกลีเซอไรด์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ตับไปสู่เนื้อเยื่อต่างๆ เช่น กล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อไขมันโดย VLDL จะกระตุ้นเอนไซม์ lipoprotein lipase (LPL) จากเซลล์บุผนังหลอดเลือดให้เข้าย่อยไตรกลีเซอไรด์ใน VLDL แล้วปลดปล่อยกรดไขมันออกมา เซลล์บุผนังหลอดเลือดจะนำกรดไขมันนี้ไปใช้หรือส่งต่อไปที่กล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อไขมันต่อไป VLDL ที่ได้ส่งถ่ายไตรกลีเซอไรด์

แล้วจะกลายเป็น IDL และจะเปลี่ยนต่อไปเป็น LDL ที่อุดมด้วยโคเรสเตอรอลแต่มีไตรกลีเซอไรด์น้อย ดังภาพที่ 2.10B ซึ่งทำหน้าที่ในการขนส่งโคเรสเตอรอลที่ใช้ในการสร้างผนังเซลล์และสเตอรอยด์ฮอร์โมนไปเนื้อเยื่อต่างๆ ส่วน โคเรสเตอรอลในพลาสมาที่เหลือประมาณหนึ่งในสี่และโคเรสเตอรอลจากผนังเซลล์ตามเนื้อเยื่อต่างๆ จะถูกขนส่งกลับไปที่ตับด้วย HDL⁽¹⁹⁸⁾ ส่วน apoprotein อื่นๆ ที่สำคัญคือ apoE เป็นส่วนประกอบของ VLDL และ IDL สามารถจับกับรีเซพเตอร์บนเซลล์ตับได้เช่นเดียวกับ apoB100 เพื่อให้เซลล์ตับรับไขมันเข้าเซลล์ แต่ในระหว่างนั้น IDL บางตัวอาจจะถูกเอนไซม์ lipase ที่เซลล์ตับหลั่งออกมาแยกกลายเป็น LDL ที่อุดมไปด้วย โคเรสเตอรอลเอสเตอรัคที่ได้กล่าวไปแล้ว กระบวนการรับโคเรสเตอรอลเข้าเซลล์นี้จะถูกควบคุมโดยการสร้างโคเรสเตอรอลภายในเซลล์ตับ เพื่อให้เซลล์ตับมีโคเรสเตอรอลที่สมดุล หรือกล่าวได้ว่า ปริมาณโคเรสเตอรอลในเซลล์นั้นควบคุมการสร้าง LDLR บนเซลล์นั่นเองซึ่งจะได้กล่าวในหัวข้อต่อไป ไขมัน โดยเฉพาะผลึกของ โคเรสเตอรอลที่ฝังตัวบริเวณ atherosclerosis plaque ส่วนมากมาจาก LDL ที่เสื่อมสภาพจากกระบวนการต่างๆ ทั้งจากการถูกออกซิไดซ์ การไกลเคชัน (เติมหมู่น้ำตาล) และอื่นๆ รวมเรียกว่า oxidized LDL (Ox-LDL) เชื่อว่าเกิดขึ้นในช่องว่างผนังหลอดเลือด โดยเอนไซม์ที่ผลิตจากเซลล์บุหลอดเลือดและเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด Ox-LDL นี้มี epitopes เปลี่ยนไปจำนวนมาก (neoepitopes) เช่น เกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่างกรดอะมิโน lysine และ histidine ใน apoB เป็น malondialdehyde lysine และ 4-hydroxynonenal lysine ซึ่งสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของลิมโฟไซต์ CD4⁺ และ B-cell ให้ผลิตแอนติบอดีต่อ Ox-LDL และผลิตไซโตไคน์ Interleukin (IL-2) และ Interferon- γ (IFN- γ) ทำให้เกิดการอักเสบบริเวณหลอดเลือด⁽¹⁹³⁾ ในภาวะร่างกายปกติ Ox-LDL จะเกิดขึ้นปริมาณน้อยมาก แต่จะเกิดขึ้นมากหากมีภาวะไขมันและปริมาณ LDL ในกระแสเลือดสูง Ox-LDL ปริมาณมากทำให้แมคโครฟาจอยู่ตามเนื้อเยื่อเข้าไปภายในช่องว่างผนังหลอดเลือดเพื่อเก็บกิน Ox-LDL แต่เมื่อ apoB ของ LDL ถูกเปลี่ยนโครงสร้างไปจากการถูกออกซิไดซ์หรือไกลเคชันจึงทำให้แมคโครฟาจจับกับ Ox-LDL ด้วย LDLR ได้ไม่แน่น (low affinity) แต่จะจับผ่านรีเซพเตอร์ที่จำเพาะกว่านั้น คือ scavenger receptor CD36 ที่เป็นรีเซพเตอร์ที่เก็บกินของเสียทุกชนิดไม่ว่าจะเป็น Ox-LDL ฟอสโฟลิปิด เซลล์ที่ตายแล้ว และกรดไขมันสายโซ่ยาว แต่เนื่องจากการเก็บกินนี้ไม่ได้ผ่านทาง LDLR ปกติจึงทำให้ไม่มีกระบวนการยับยั้งแบบป้อนกลับ (negative feedback loop) ต่อการสร้าง scavenger receptor เช่นเดียวกับ LDLR ทำให้เกิดการสะสมไขมันที่เสื่อมสภาพภายในเซลล์มากมาย แต่แมคโครฟาจก็สามารถขับไขมันในเซลล์ออกจาก channel เช่น ATP-binding cassette protein (ABCA) บนผนังเซลล์ซึ่งเป็นกระบวนการขนส่งสารออกจากเซลล์ (efflux pump) โดย ABCA1 ทำหน้าที่ควบคุมการขับโคเรสเตอรอลออกจากเซลล์ให้กับ apoA1 ของ HDL หากยีนที่ควบคุมโปรตีนนี้กลายพันธุ์จะทำให้ผู้ป่วยเป็นโรค Familial high-density lipoprotein deficiency⁽¹⁹⁹⁾ เช่น Tangier disease แมคโครฟาจเนื้อเยื่อของผู้ป่วยเหล่านี้จะมีปริมาณโคเรสเตอรอลสูงมาก⁽²⁰⁰⁾ หากร่างกายอยู่ในภาวะ oxidative stress เช่น การอักเสบ จะมีผลต่อการขับไขมันออกจากแมคโครฟาจโดยตรง ดังภาพที่ 2.14C คือ เมื่อลดองศาหนักและ ascorbate มาทดสอบกับแมคโครฟาจ THP-1 จะตรวจพบ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลผลิตของกระบวนการ lipid peroxidation เกิดขึ้นและ MDA ดังกล่าวมีผลลดการแสดงออกของยีนและโปรตีน ABCA1 แต่ไม่กระทบกับยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการรับโคเรสเตอรอลเข้าเซลล์ เช่น scavenger receptor class B type I (SR-BI) และ CD 36 คาดว่า MDA สามารถลดการแสดงออกของ nuclear factor เช่น LXR α , PPAR α และ PPAR γ และเสนอว่าภาวะ lipid peroxidation มีผลต่อ

กระบวนการจับโคเรสเตอรอลออกจากเซลล์เพียงอย่างเดียว⁽¹⁹⁹⁾ ดังนั้นเมื่อการจับโคเรสเตอรอลออกจากเซลล์ลดลงแต่การรับยังคงเดิมจึงทำให้แมคโครฟาจมีปริมาณไขมันในเซลล์สะสมมากขึ้นเรียกว่า Form cell ไปขัดขวางการทำงานของเซลล์และทำให้เซลล์ตายบริเวณช่องว่างในผนังหลอดเลือดดังกล่าว การที่แมคโครฟาจแปรสภาพเป็น Form cell ถือได้ว่าเป็นระยะเริ่มต้นของโรคหลอดเลือดและหัวใจ เพราะในภาวะปกติ Form cell จะถูกกำจัดและไม่เป็นอันตรายนัก แต่หากมีปริมาณ Form cell ตายจำนวนมากจะผนังเป็นแผ่นไขมันบริเวณผนังหลอดเลือดก่อเกิดพยาธิสภาพต่อไป ดังภาพที่ 2.11 หากสามารถลดระดับโคเรสเตอรอลในพลาสมาได้ก็จะสามารถลดการเกิดแผ่นไขมันบริเวณผนังหลอดเลือดได้เช่นกัน

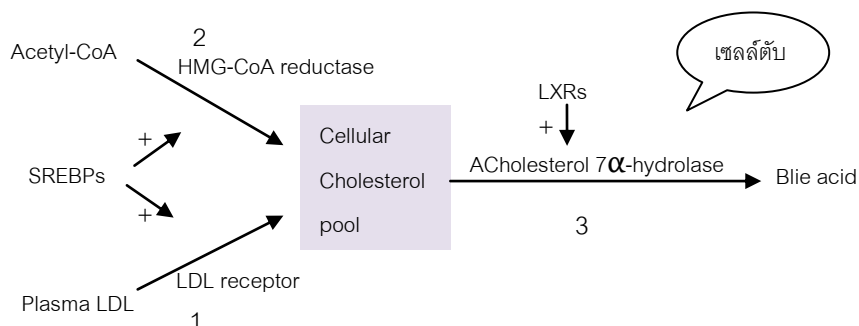


ภาพที่ 2.11: พยาธิสภาพการเกิดพังผืดไขมันในผนังหลอดเลือด (1): เมื่อระดับไขมันในเลือดสูงจะเกิดการสะสมของไขมันบริเวณช่องว่างชั้นผนังหลอดเลือด และเสื่อมสภาพจนกระตุ้นให้เซลล์ผนังหลอดเลือดจะเพิ่มการแสดงออกของ adhesion molecule คือ P- และ E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), (2): เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันในกระแสเลือดเข้าจับกับ adhesion molecule ดังกล่าว, (3): แทรกผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ผนังหลอดเลือดเข้าไปในชั้น Intima และ, (4): เซลล์จะเข้าไปเก็บกินไขมันเสื่อมสภาพดังกล่าวจนเซลล์มีไขมันสะสมในเซลล์มากเกินไปและ, (5): ปลดปล่อยสาร cytokines และ chemokines ออกมาหลายชนิด เช่น monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) และ macrophage inflammation protein (MIP), นอกจากนี้ (6): ลิมโฟไซต์ชนิด T-cell ยังปลดปล่อยสาร IFN- γ และ lymphotoxin กระตุ้นให้เซลล์โดยรอบสร้างสาร TNF- α และ IL-6 ในบริเวณ atheroma กระตุ้นการจับของ CD40 กับ CD40 ligand ทำให้เพิ่มการแสดงออกและการทำงานของเอนไซม์ MMP ทำหน้าที่ย่อยสลาย collagen จนผนัง atherosclerotic plaque แตกออกเกิดภาวะ thrombosis

ยื่นที่เกี่ยวข้องในการควบคุมระดับไขมันในกระแสเลือดที่สำคัญในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

1. LDL receptor: LDLR หรือ B/E receptor เป็นโปรตีนที่มีหมู่อะมิโนต่อกัน 839 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 120 กิโลเดอลตัน เซลล์ทั่วไปมีการสร้าง LDLR โดยจะสังเคราะห์ LDLR ภายในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมแบบหยาบ (rough ER) และส่งไปในบริเวณพิเศษที่ผนังเซลล์ที่เรียกว่า Coated pits ซึ่งเป็นบริเวณที่

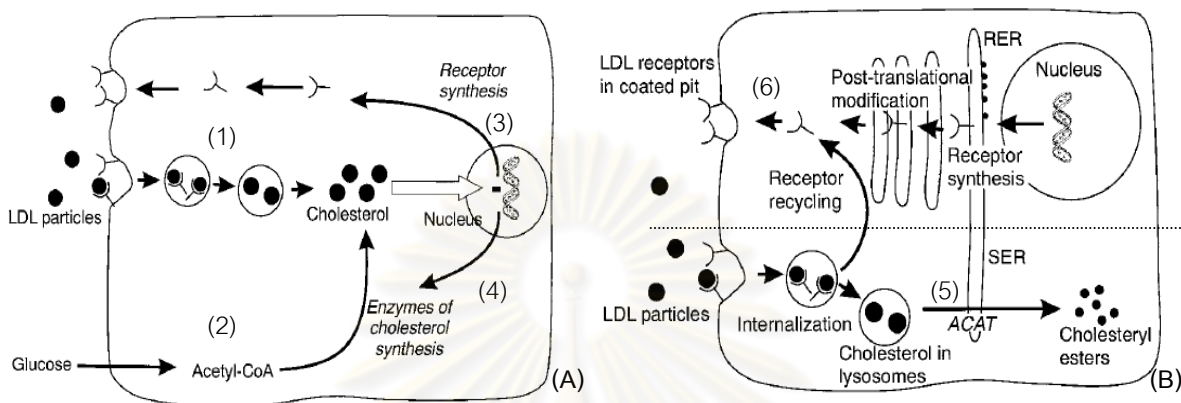
ไซโทพลาซึมมุ่งลงไป LDLR สามารถจดจำ apoB และ apoE ของ LDL ได้ เมื่อ LDL จับกับเซลล์จะเกิดการโอบหุ้ม (endocytosis) ดึง LDL เข้าเซลล์ และนำโคเรสเตอรอลจาก LDL ไปใช้ ดังนั้น LDLR จึงมีบทบาทสำคัญในการคงระดับโคเรสเตอรอลในพลาสมาและในเซลล์ให้เป็นปกติโดยควบคุมการรับ LDL เข้าเซลล์ (201-202) นั่นคือ หากมีการดูดซึมโคเรสเตอรอลจากทางเดินอาหารมากจะทำให้การสร้าง LDL เพิ่มขึ้น (203) เมื่อ LDL เข้ามาในเซลล์แล้วจะถูกส่งไปไลโซโซมที่ซึ่งย่อยโคเรสเตอรอลเอสเตอรัด้วยเอนไซม์ lysosomal acid hydrolases (LAH) เป็นโคเรสเตอรอลแล้วไปสะสมในคลังโคเรสเตอรอลภายในเซลล์ ซึ่งปริมาณของโคเรสเตอรอลที่เซลล์เก็บสะสมไว้นี้จะเป็นตัวควบคุมการสร้าง LDL เช่นกัน การกลายพันธุ์จะทำให้โปรตีนชนิดนี้สูญเสียหน้าที่การนำ LDL เข้าไปในเซลล์ ส่งผลให้ระดับ LDL ในพลาสมาเพิ่มสูงขึ้นอย่างรุนแรงดังที่พบในผู้ป่วย Familial Hypercholesterolaemia (FH) พบว่าผู้ป่วยเหล่านี้ขาด LDLR ทำให้เป็นโรคหลอดเลือดหัวใจตั้งแต่อายุน้อย หากผู้ป่วยผ่าตัดเปลี่ยนตับ (ของคนปกติ) จะทำให้ระดับความเข้มข้นโคเรสเตอรอลในพลาสมาลดลงอย่างรวดเร็ว ยีนถดถอยโปรตีน LDLR พบอยู่บนโครโมโซมที่ 19 เช่นเดียวกับยีนถดถอยโปรตีน apoE ยีน LDLR มีความยาวประมาณ 50000 นิวคลีโอไทด์ แยกเป็นส่วนๆ โดย intron จำนวนมาก ลักษณะ mRNA ของยีนนี้จะมีส่วนปลาย 5' ยาวประมาณ 13 นิวคลีโอไทด์ และปลาย 3' ยาวถึง 2500 นิวคลีโอไทด์ เป็นกลุ่มลำดับเบสซ้ำหลายตำแหน่ง และถูกควบคุมการถดถอยยีนโดย Sterol regulatory element binding protein (SREBPs) ซึ่งเป็น transcription factor ที่ควบคุมการถดถอยยีนหลายตัวที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของโคเรสเตอรอล และกรดไขมันอิสระ พบมากในเซลล์ตับและต่อมหมวกไต โดย activated SREBP จะเข้าสู่นิวเคลียสไปจับกับ Sterol regulatory element (SRE) เพื่อกระตุ้นการถดถอยยีน (204-205) เนื่องจากยีน LDLR มีลำดับเบสบริเวณ promoter ที่ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 8 ตัว (206) เรียกว่า Sterol regulatory element-1 (SRE-1) (5'-CACCCCAC-3') SREBPs จึงสามารถจับส่วน promoter ดังกล่าวเพื่อเพิ่มการถดถอยยีน LDLR ได้โดยเฉพาะในภาวะที่เซลล์ขาด sterol จะมีเอนไซม์ proteinase ชนิดพิเศษมาย่อยและปลดปล่อย SREBP ให้เข้าไปในนิวเคลียสเพื่อถดถอยยีนต่อไป (207) SREBP มีด้วยกันทั้งหมด 3 รูปคือ SREBP-1a, SREBP-1c และ SREBP-2 โดย SREBP-1a ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนถดถอยเอนไซม์สังเคราะห์โคเรสเตอรอลต่างๆ เช่น HMG-CoA synthase, squalene synthase ยีนถดถอยเอนไซม์สังเคราะห์กรดไขมันเช่น acetyl-CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS), stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1) (208) เป็นต้น และยังควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเผาผลาญ-สร้างน้ำตาล (Glucolysis-Gluconeogenesis) เช่น การศึกษาในเซลล์ตับ HepG2 พบว่า SREBP-1c ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ Glucokinase ซึ่งจำเป็นในการควบคุมระดับน้ำตาลในร่างกายให้สมดุล (209) LDLR ยังถูกควบคุมด้วยสเตอรอยด์ฮอร์โมน เช่น ไทรอยด์ฮอร์โมน และเอสโตรเจน การรับประทานโปรตีนถั่วเหลือง ซึ่งมีไอโซฟลาโวนอยด์ที่มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนจึงสามารถลดระดับโคเรสเตอรอลในพลาสมาได้ ส่วนฮอร์โมนอื่นๆ เช่น corticosteroids จะยับยั้งการสร้าง LDLR



ภาพที่ 2.12: การควบคุมปริมาณไขมันภายในเซลล์ตับทั้งการรับเข้า การสังเคราะห์ และการขับออกจากเซลล์ ตับ การควบคุมระดับโคเลสเตอรอลภายในเซลล์สามารถแบ่งเป็น 3 ลักษณะนั้นคือ 1. ควบคุมการรับโคเลสเตอรอลจาก LDL ทางโปรตีน LDLR 2. ควบคุมการสังเคราะห์ โคเลสเตอรอลจาก Acetyl-CoA เองภายในเซลล์ เช่น เอนไซม์ HMG-CoA reductase 3. การขับ โคเลสเตอรอลออกจากเซลล์โดยใช้เอนไซม์ CYP7A ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนโคเลสเตอรอลไปเป็นกรดน้ำดี SREBPs เป็น transcription factor ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน LDLR และ HMG-CoA, LXRs เป็น nuclear receptor ที่ตอบสนองต่อสารก่ออาการอักเสบ โคเลสเตอรอล oxysterols หลายชนิด รวมถึงสารพิษจากเชื้อโรคต่างๆ ด้วย

2. HMG-CoA reductase สมดุลระดับโคเลสเตอรอลภายในเซลล์ นอกจากจะควบคุมด้วยการรับโคเลสเตอรอลเข้าทาง LDLR แล้วยังถูกควบคุมด้วยกระบวนการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลเองภายในเซลล์ เมื่อปริมาณโคเลสเตอรอลภายในเซลล์ลดลง จะมีสัญญาณกระตุ้นให้เซลล์สังเคราะห์ cholesterol เพื่อรักษาสมดุลดังกล่าว⁽²⁰⁵⁾ ในกระบวนการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล มีเอนไซม์เข้าร่วมด้วยกันหลายตัว แต่เอนไซม์ที่เป็นตัวควบคุมปฏิกิริยา (key limiting enzyme) คือ 3-hydroxyl-3-methylglutaryl coenzyme A reductase เรียกสั้น ๆ ว่า HMG-CoA reductase (HMGCoAR E.C. 1.1.1.34) ซึ่งเป็น glycoprotein ขนาด 97 กิโลเดอลตัน ต่อกันด้วยหมู่อะมิโน 887 ตัว จับอยู่กับผนังนิวเคลียส⁽²⁰⁷⁾ และผนังด้านในของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมทำหน้าที่หลักในการสังเคราะห์ isoprenoid ต่างๆ เช่น cholesterol, ubiquinone, dolichol ฯลฯ HMG-CoA reductase ถูกควบคุมอย่างเข้มงวดด้วยกระบวนการมากมาย ทั้งการควบคุมแบบระยะสั้นโดยใช้กระบวนการ dephosphorylation เพื่อเพิ่ม-ลด activity ของเอนไซม์ เช่น dephosphorylation ณ กรดอะมิโน Serine ตำแหน่ง 871 โดย protein kinase จะลด activity ของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ลง⁽²⁰⁵⁾ และการควบคุมแบบระยะยาวจากการเพิ่ม-ลดปริมาณเอนไซม์พบว่า ฮอร์โมนหลายตัว เช่น ไทรอยด์ฮอร์โมนและอินซูลิน สามารถเพิ่มการสังเคราะห์เอนไซม์นี้ และลดปริมาณจากการถูกย่อยสลายในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมด้วยระบบ Ubiquitin-proteasome⁽²¹⁰⁾ ยีนถอดรหัสเอนไซม์นี้จะถูกควบคุมการแสดงออกโดยด้วย SREBP เช่นเดียวกับยีน LDLR แต่ยีน HMGCoAR ไม่มีส่วน TATA box ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นการถอดรหัสยีนบริเวณ promoter เช่น ยีนอื่นๆ แต่จะมีบริเวณ GC rich อยู่หลายตำแหน่งทำให้สามารถถอดรหัสได้หลายตำแหน่ง ลักษณะ mRNA ของยีนนี้จะมีส่วนปลาย 5' ที่ค่อนข้างยาวประมาณ 670 นิวคลีโอไทด์และปลาย 3' มีความยาวถึง 1942 นิวคลีโอไทด์ สารกลุ่ม non-sterol เช่น สารในกลุ่ม mevalonate จะเข้าจับบริเวณนี้ทำให้เพิ่ม-ลดการถอดรหัสได้ ส่วนโคเลสเตอรอลนั้นจะควบคุมการแสดงออกในระดับ post-transcription⁽²⁰⁵⁾ หากสารที่ไม่มีผลต่อการสังเคราะห์และปริมาณโคเลสเตอรอลเอสเตอร์ภายในเซลล์ก็จะมีผลต่อการแสดงออกของยีนนี้⁽²¹¹⁾

มีรายงานว่าเอนไซม์ AMP-activated protein kinase (AMPK) ซึ่งควบคุมระดับ ATP ภายในเซลล์ให้ลดลง สามารถยับยั้ง HMG-CoA reductase โดยการเติมหมู่ฟอสเฟต และยังยับยั้งเอนไซม์ hormone dependent lipase ทำให้การสังเคราะห์โคเลสเตอรอลลดลง เพื่อรักษาแหล่งพลังงานของเซลล์เอาไว้⁽²⁰⁷⁾ และยังพบอีกว่า cAMP ควบคุม SREBP ในระดับ post-translocation โดยเป็นสารยับยั้งมิให้ SREBP active จึงคาดว่าพลาไวนอยด์ที่สามารถเพิ่มระดับ cAMP อาจทำให้กระบวนการสังเคราะห์ไขมันเชิงข้างได้⁽¹⁹⁸⁾



ภาพที่ 2.13: การควบคุมจำนวนโปรตีน LDLR บนผนังเซลล์ (1): เมื่อเซลล์รับโคเลสเตอรอลจาก LDL หรือ (2): จากกระบวนการ lipogenesis และ glycolysis ทำให้โคเลสเตอรอลภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น (3): โคเลสเตอรอลจะผ่านเข้าผนังนิวเคลียสไปมีผลต่อการถอดรหัสยีน LDLR และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลภายในเซลล์ (A), (5): เมื่อทำให้โคเลสเตอรอลภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น เซลล์จะเปลี่ยนโคเลสเตอรอลให้เป็นโคเลสเตอรอลเอสเทอร์ เก็บสะสมไว้ในแหล่งสะสมภายในเซลล์ เพื่อให้ในภาวะขาดแคลนต่อไป โดยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) บริเวณ SER ซึ่งจะเปลี่ยนโคเลสเตอรอลให้อยู่ในรูปโคเลสเตอรอลเอสเทอร์ หากแหล่งสะสมเต็ม เซลล์จะเปลี่ยนโคเลสเตอรอลส่วนเกินไปเป็นกรดน้ำดีและขับออกจากเซลล์ (6): เมื่อ LDLR แยกจากโคเลสเตอรอลในไลโซโซมแล้วเซลล์จะนำรีเซพเตอร์นี้กลับไปใช้ใหม่หรือทำลายทิ้ง (post-translation) ขึ้นกับสภาพแวดล้อมที่กระตุ้นเซลล์ (B)

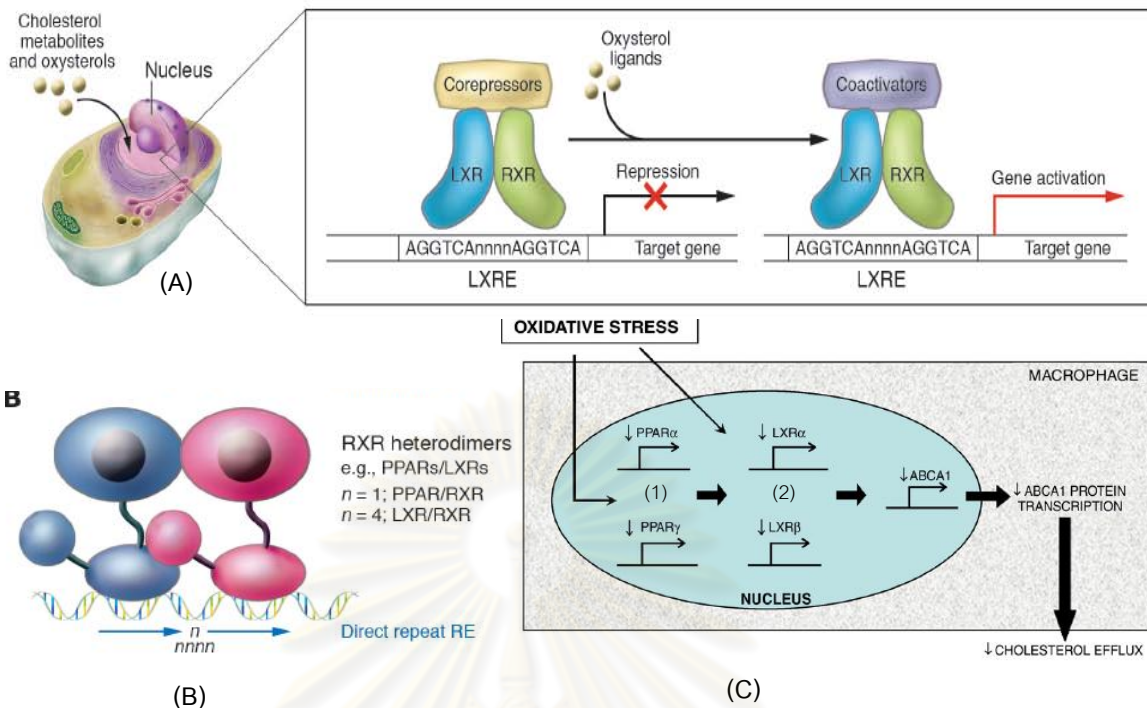
3. Liver X receptors (LXRs) เป็น adopted-orphan nuclear receptor มีด้วยกัน 2 ไอโซฟอร์มนั่นคือ LXR α (NR1H3) และ LXR β (NR1H2) โดย LXR α พบมากที่ตับและแสดงออกเล็กน้อยที่ลำไส้ ม้าม ไต ปอด แมคโครฟาจ และเซลล์ไขมัน ส่วน LXR β พบในเซลล์ทั่วไป เมื่อ LXR ถูกกระตุ้นโดยสารเมแทบอลิต์ของ oxysterols มีที่พบในธรรมชาติและที่สังเคราะห์ขึ้น รวมทั้งฮอร์โมนอินซูลิน⁽²¹²⁾ LXR ที่ถูกกระตุ้นจะเข้าจับ Retinoid X receptor (RXR) เป็น heterodimer "LXRs/RXRs" เข้าจับกับ LXR response elements (LXREs) ที่นิวเคลียส ซึ่งประกอบด้วยลำดับเบสคู่ซ้ำ 6 ตัว (AGGTCA) ที่แยกกันด้วยนิวคลีโอไทด์ 4 ตัวเรียกว่า DR-4 recognition sequence ในบริเวณ promoter ของยีนเป้าหมายในการจับมี Co-repressor เช่น silence mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor (SMRT) และ nuclear receptor corepressor (N-CoR) เข้าร่วมเป็น complex ดังภาพที่ 2.14A-B เมื่อมี ligand ซึ่งก็คือ oxysterol มาจับเพิ่มจะทำให้ complex นี้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างบางส่วนที่เอื้อให้ Co-activator เข้าจับเป็น complex แทน corepressor และเกิดการถอดรหัสยีนต่อไป ดังภาพที่ 2.14A ยีนตัวแรกที่ได้รับการยืนยันว่า

ควบคุมโดย LXRs คือ Cytochrome P450 7A1 (CYP7A1) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมการเปลี่ยนโคเลสเตอรอลไปเป็นน้ำดี⁽²¹³⁾ มีงานวิจัยพบว่า LXRs เป็น whole-body cholesterol sensors เนื่องจากหน้าที่หลักของ LXRs คือ 1. ควบคุมการถอดรหัสยีนในกระบวนการเมแทบอลิซึมไขมันและน้ำดี โดยเฉพาะโปรตีนที่ทำงานในกระบวนการดูดซึม ขับออก ขนส่ง การหลั่งของโคเลสเตอรอลและกรดไขมัน เช่น SREBP-1c และ fatty acid synthase รวมทั้งเอนไซม์ที่ใช้ในการ remodeling ไขมัน โดยเฉพาะ HDL เช่น Lipoprotein lipase (LPL), cholesterol ester transport protein (CETP) และ phospholipid transfer protein (PLTP)⁽²¹⁴⁾ 2. ควบคุมการขับและขนส่งโคเลสเตอรอลออกจากเซลล์ผ่านทาง adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) protein เช่น ABCA1⁽²¹⁵⁻²¹⁶⁾, ABCG1⁽²¹⁷⁻²¹⁹⁾ และ ABCG5/ABCG8⁽²²⁰⁻²²¹⁾ ซึ่งเป็นโปรตีนที่ช่วยป้องกันเซลล์มิให้รับไขมันมากเกินไป และเกี่ยวข้องในการขับโคเลสเตอรอลออกจากเซลล์ตับ โดยเปลี่ยนโคเลสเตอรอลไปเป็นน้ำดี หากขาดยีน ABCA1 จะทำให้เกิดโรค Tangier 3. ควบคุม transcription factor ตัวอื่นๆ เช่น Carbohydrate-response element-binding protein (ChREBP) ซึ่งเป็น glucose-sensitive transcription factor กระตุ้นให้เปลี่ยนกลูโคสส่วนเกินไปเป็นไขมัน⁽²²²⁾ LXR α ยังสามารถควบคุมการถอดรหัส LXR α เอง เรียกว่าเป็น positive feedback loop ซึ่งลักษณะนี้จะพบเฉพาะในเซลล์แมคโครฟาจของมนุษย์เท่านั้น⁽²²³⁾ และมีอิทธิพลต่อระบบภูมิคุ้มกัน และ 4. การตอบสนองต่อภาวะอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ⁽²²⁴⁾ รายงานวิจัยยังระบุว่ายาในกลุ่ม LXR α ligand คือ ยา GW3965 สามารถลด atherosclerosis lesion ในหนูที่ขาด LDLR และ ApoE แต่กำเนิด (LDLR $^{-/-}$ และ ApoE $^{-/-}$)⁽²²⁵⁾ LXR ยังควบคุมการเมแทบอลิซึมกลูโคสของเซลล์ตับด้วยมีรายงานว่าพบว่ายาน T0901317 ซึ่งเป็น LXRs agonist สามารถยับยั้งการถอดรหัสยีนในกระบวนการ gluconeogenesis ของเซลล์ตับ เช่น phosphoenolpyruvate carboxykinase⁽²¹⁴⁾ และ Glucose-6-phosphatase ไม่นานมานี้มีรายงานที่พบว่าตับของหนูที่ขาด LXR α และ LXR β แต่กำเนิด (LXR α -/ β -) ไม่มีการเมแทบอลิซึมโคเลสเตอรอล มีลักษณะคือต่อกรอ้วนเมื่อได้รับอาหารไขมันสูงและโคเลสเตอรอลสูง ซึ่งพบว่า ปริมาณโคเลสเตอรอลในอาหารจะเป็นตัวกระตุ้นพีโนไทป์เช่นนี้ ยังพบว่า เซลล์ตับของหนูสามารถผลิตฮอร์โมนไทรอยด์เพิ่มขึ้น ทำให้มีการเผาผลาญพลังงานในกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อไขมันเพิ่มขึ้น⁽²²⁶⁾ โคเลสเตอรอลที่มากเกินไปในระดับจะกระตุ้นการผลิต oxysterols ซึ่งทำให้ LXR เพิ่มการถอดรหัสยีน CYP7A1 เพื่อเปลี่ยนโคเลสเตอรอลไปเป็นกรดน้ำดี และการกระตุ้น LXR พบว่าทำให้มีการ สะสมไตรกลีเซอไรด์ในเซลล์ตับจนอาจเกิดภาวะ hypertriglyceridemia ได้ ซึ่งร่างกายจะสามารถป้องกันภาวะดังกล่าวได้โดยเพิ่มการทำงานของ (FXR) ซึ่งเป็น nuclear receptor อีกชนิดที่ควบคุมการขับกรดน้ำดีและสีน้ำดีออกจากเซลล์ ดังภาพที่ 2.12⁽²²⁷⁾

4. Peroxisome proliferators-activated receptors (PPARs) เป็น adopted-orphan nuclear receptor และจับกับ RXRs เป็น heterodimer ไปกระตุ้นการถอดรหัสยีนเช่นเดียวกับ LXRs โดยจะเข้าจับส่วน peroxisome proliferators-activated response element (PPREs) ในบริเวณ promoter บนยีนเป้าหมายที่ประกอบด้วยลำดับเบสคู่ซ้ำ 6 ตัวเช่นเดียวกับ LXR แต่แยกกันด้วยนิวคลีโอไทด์เพียง 1 ตัวเรียกว่า DR-1 (เป็น motifs RGGTCA ที่คั่นเป็นช่องว่างด้วยนิวคลีโอไทด์ 1 ตัวซึ่งต่างจาก DR-4 ที่ช่องว่างคั่นด้วยนิวคลีโอไทด์ 4 ตัว) ยีนเป้าหมายของ PPARs เกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมคาร์โบไฮเดรตและไขมันเป็นส่วนใหญ่ จึงเชื่อว่าจะสามารถใช้เป็นเป้าหมายในการรักษาโรคหัวใจและโรคของระบบเมแทบอลิซึมต่างๆ เช่น โรคเบาหวาน โรคไขมันในเลือดสูง PPARs พบว่ามีด้วยกัน 3 ไอโซฟอร์มคือ α , β/δ และ γ แต่นิยมศึกษา PPAR α และ PPAR γ กันมากโดย PPAR α จะแสดงออกมากในระดับ จัดได้ว่าเป็น nutrient sensor มีหน้าที่ใน

ควบคุมการสร้าง apolipoprotein กระบวนการ ketogenesis ยับยั้งการเผาผลาญกรดอะมิโนและการผลิตยูเรีย⁽²²⁸⁾ การเก็บสะสมและเผาผลาญกรดไขมัน (β -oxidation)⁽²²⁹⁾ และกลีเซอรอลของตับ นอกจากนี้ยังควบคุมยีนที่มีบทบาทในกระบวนการ gluconeogenesis จากกลีเซอรอล เช่น cytosolic glycerol 3-phosphate dehydrogenase (cGPDH), glycerol kinase, glycerol transporters aquaporin 3/9⁽²³⁰⁾ เพื่อผลิตเป็นกลูโคสแจกจ่ายไปตามเนื้อเยื่อต่างๆ โดยเฉพาะในช่วงอดอาหาร⁽²³⁰⁻²³¹⁾ เป็นการช่วยลดระดับกรดไขมันอิสระในพลาสมาเพราะกรดไขมันจะถูกปลดปล่อยออกมาในซีรัมเมื่อร่างกายต้องการใช้พลังงาน การมีปริมาณกรดไขมันในซีรัมสูงและการเพิ่มขึ้นของไตรกลีเซอไรด์ตามเซลล์กล้ามเนื้อจะทำให้เกิดการดื้ออินซูลิน⁽²³²⁻²³³⁾

นอกจากนี้ งานวิจัยยังพบว่ายากลุ่ม Fibrates ซึ่งเป็น PPAR α agonists มีผลเป็น antiatherogenic effect ในหนู และสามารถลดอุบัติการณ์โรคหัวใจในผู้ป่วยที่รับยาชนิดนี้⁽²³⁴⁻²³⁵⁾ PPAR γ มีการแสดงออกสูงสุดที่เซลล์ไขมันโดยเฉพาะส่วนไขมันขาว รองมาคือ แมคโครฟาจ ligand (เรียกว่าเป็น peroxisome proliferators ก็ได้) ที่สามารถจับรีเซพเตอร์นี้อาจเป็น กรดไขมันไม่อิ่มตัว, ไขมันเสื่อมสภาพ เช่น 9- hydroxy-(S)-10,12-octadecadienoic acid (9(S)-HOSE) และ (13(S)-HOSE), ยาลดระดับน้ำตาลในเลือดหลายชนิด, eicosanoids หรือ prostaglandins เช่น 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 (15d-PGJ2)⁽²³⁶⁻²³⁸⁾ PPAR γ มีหน้าที่ช่วยส่งเสริมให้เซลล์ไขมันเปลี่ยนเป็นเซลล์ตัวแก่ (differentiation) และควบคุมการเก็บสะสม เผาผลาญ และแปรสภาพกรดไขมัน โคเรสเตอรอล และกลีเซอรอลของเซลล์ไขมัน รวมทั้งควบคุมการถอดรหัสยีน ABCA1 และ ABCG1 ซึ่งมีบทบาทในการขับโคเรสเตอรอลจากเซลล์ให้กับ HDL⁽²⁰⁰⁾ นอกจากนี้ยังพบอีกว่า PPAR γ มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดต่อการเกิดพยาธิสภาพ และการตายของเซลล์มะเร็งปอดหลายชนิด โดยเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ caspase 3⁽²³⁹⁾ และมีฤทธิ์เป็น antitumor ต่อเซลล์มะเร็งอีกหลายชนิด เช่น HL-60⁽²⁴⁰⁾ เนื่องจากมีอิทธิพลต่อการทำงานของโปรตีน Bcl-xL และ Bcl-2⁽²⁴¹⁾ Thiazolidinediones (TZDs) เป็นยาในกลุ่ม PPAR γ agonists พบว่าเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน leptin-like oxidized LDL receptor 1 (OLR1) ซึ่งเป็น receptor ที่สามารถจดจำ LDL ที่เสื่อมสภาพได้ทุกรูปแบบ ทำให้เซลล์ไขมันรับ oxLDL เข้าเซลล์ได้จึงสามารถลดระดับ oxLDL ในซีรัม⁽²⁴²⁾ และยังสามารถเพิ่มการแสดงออกของ hepatocyte growth factor (HGF) ซึ่งควบคุมการเจริญเติบโต การเกิดใหม่ ของเซลล์ตับและเซลล์อวัยวะอื่นอีกหลายชนิด เช่น ปอด และไต⁽²⁴³⁾ พบว่า PPARs ligands ยังช่วยเร่งการใช้ไขมันในร่างกายโดยเฉพาะกรดไขมันและพอสตาแกลนิน⁽¹⁹⁸⁾ PPAR α และ PPAR γ จึงสามารถป้องกันการเกิด atherosclerosis เช่นมีงานวิจัยที่พบว่า PPAR α และ PPAR γ และ LXR α ที่แสดงออกในเซลล์บุผนังหลอดเลือด เซลล์กล้ามเนื้อเรียบรอบหลอดเลือด T-lymphocyte และโมโนไซต์จะควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ vascular remodeling รวมถึงยีนที่เพิ่มการขับโคเรสเตอรอลออกจากเซลล์ เช่น ABCA1 ระดับไตรกลีเซอไรด์และ HDL และความไวต่ออินซูลินของเซลล์⁽³⁸⁾ ซึ่งฤทธิ์นี้กลับไม่พบที่เกิดจาก PPAR β แต่อย่างไรก็ตามนักวิจัยยังพบว่า cyanidin-3-glucoside สามารถกระตุ้นการเพิ่มปริมาณโปรตีน PPAR γ และ LXR α ในแมคโครฟาจจึงส่งผลให้มีการแสดงออกของยีน ABCA1 มากขึ้น ทำให้หนูทดลองขับโคเรสเตอรอลออกจากเซลล์ได้มากขึ้น⁽²⁰⁰⁾ นอกจากนี้ phytol ซึ่งเป็นไขมันแอลกอฮอล์ที่พบในพืชก็มีผลเพิ่มการทำงานของ PPAR α ในเซลล์ตับ HepG2 โดยตรงจากการจับ PPAR ligand ไขมันแอลกอฮอล์ตัวอื่น เช่น geraniol, farnesol มีผลในลักษณะเดียวกันกับ phytol⁽²²⁹⁾



รูปที่ 2.14: ligand จะสามารถกระตุ้นการทำงานของ LXR โดยการเข้าจับกับ RER/LXR complex บนส่วนของ promoter ทำให้ complex ดังกล่าวเปลี่ยนรูปร่างของโครงสร้างไปซึ่งไม่เหมาะสมต่อการจับของ corepressor ทำให้ corepressor หลุดออก coactivators จึงสามารถเข้ามาจับแทนเกิดการกระตุ้นการถอดรหัสยีนต่อไป (A), ลักษณะรูปร่างของ RER heterodimers ในการเข้าจับกับช่วง core recognition elements e.g., PPARs/LXRs $n = 1$; PPAR/RXR $n = 4$; LXR/RXR (B), Oxidative stress มีอิทธิพลต่อการถอดรหัสยีน ABCA1 โดย (1): กัดการทำงานของ PPAR α และ PPAR γ ซึ่งมีอิทธิพลต่อการทำงานของ LXR α และ LXR β หรือ (2): เข้าทำลาย ligand ของ LXRs โดยตรง เมื่อแมคโครฟาจเข้าสู่บริเวณที่มีการอักเสบของผนังหลอดเลือดที่มีภาวะ oxidative Stress การขับไขมันออกจากเซลล์แมคโครฟาจจะลดลง ซึ่งเป็นปัจจัยหลักอันหนึ่งในการเกิดภาวะหลอดเลือดตีบตัน (C)

เอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการเมแทบอลิซึมไขมันอื่นๆ เช่นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์โคเรสเตอรอลเอสเตอ์ภายในเซลล์คือ Acyl coenzymeA: cholesterol acyltransferase (ACAT) มี 2 ไอโซฟอร์มคือ ACAT1 และ ACAT2 โดยเฉพาะ ACAT2 ที่พบมากในเซลล์ทางเดินอาหารและเซลล์ตับถูกควบคุมในระดับการถอดรหัสยีนด้วยโคเรสเตอรอล เมื่อทานอาหารที่มีไขมันสูงจะมีผลเพิ่มการแสดงออกของยีนและโปรตีน ACAT2 ทำให้ปริมาณ LDL และโคเรสเตอรอลภายในเซลล์เพิ่มขึ้น⁽²⁰⁴⁾ เราอาจกล่าวแบบสรุปได้ว่า HMG-CoA reductase ควบคุมปริมาณโคเรสเตอรอล ส่วน ACAT ควบคุมปริมาณโคเรสเตอรอลเอสเตอ์ภายในเซลล์ เพื่อใช้ในการผลิต lipoprotein โดยมีโปรตีน microsomal triglyceride transfer protein ในเอนโดพลาสมิก เรติคูลัมทำหน้าที่ตั้งโคเรสเตอรอลเอสเตอ์ไปสร้าง apoB ดังนั้น หากโคเรสเตอรอลเอสเตอ์ภายในเซลล์ลดลงก็จะทำให้การสร้าง apoB จากเซลล์ตับลดลงด้วย⁽²⁹⁾ ACAT ยังเป็นตัวควบคุมการ

หลัง apoprotein มาจาก ER สู่ภายนอกเซลล์อีกด้วย⁽³⁸⁾ และยีนถอดรหัสเอนไซม์ที่เปลี่ยนโคเรสเตอรอลให้เป็นกรดน้ำดีในเซลล์ตับที่สำคัญมี 2 ชนิดคือ cholesterol 7- α -hydroxylase (CYP7A1) ซึ่งควบคุม Classical pathway และ mitochondria sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) ควบคุม Alternative pathway⁽²⁴⁵⁾ ปัจจุบันการรักษาโรคไขมันในเลือดสูงจะมุ่งประเด็นการรักษาไปที่ 1) ยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase โดยใช้ยาในกลุ่ม Statin พบว่าสามารถลดระดับโคเรสเตอรอลในพลาสมาและลดอัตราการตายจากโรคหัวใจได้ 2) ลดการหลั่ง VLDL จากเซลล์ตับโดยยาในกลุ่ม nicotinic acid 3) ยับยั้งเซลล์ไขมันไม่ให้ดูดซึมกรดน้ำดีและโคเรสเตอรอลกลับ 4) กระตุ้นการทำงานของ PPAR โดยยาในกลุ่ม fibric acid เช่น Fenofibrate และ ยากลุ่ม TZD เช่น Rosiglitazone ปัจจุบันก็มีการพัฒนายาสำหรับลดไขมันในเลือดหลายชนิด เช่น ยา 4-amino-2-(4,4-dimethyl-2-oxo-1-imidazolidinyl)pyrimidine-5-N-(trifluoromethyl-phenyl)carboxamide monohydrochloride (HOE402) ซึ่งพบว่าสามารถลดระดับโคเรสเตอรอลในหนูที่ขาด LDLR แต่กำเนิด (LDLR^{-/-}) โดยใช้กลไกการปรับขนาดไตรกลีเซอไรด์ใน VLDL มากกว่าลดการหลั่งของ VLDL จึงทำให้ HOE402 ลดไขมันอุดตันหลอดเลือดได้⁽²¹¹⁾

ปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเกิดโรคหลอดเลือดและหัวใจ

การเกาะตัวของเกร็ดเลือดเป็นลิ่มเลือดกับผนังหลอดเลือด (platelet aggregation และ adhesion) เป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดภาวะหลอดเลือดอุดตัน ซึ่งเกร็ดเลือดเกาะรวมตัวกันเป็นลิ่มเลือดมักเกิดภาวะอัมพฤกษ์ อัมพาต Thromboxane A₂ ซึ่งเป็น eicosanoid โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) จาก arachidonic acid (AA) ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเกร็ดเลือด ดังนั้นยาต้านการอักเสบ เช่น ยาแอสไพรินสามารถยับยั้งการทำงานของ COX จึงมีฤทธิ์ป้องกันการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด มีหลักฐานพบว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัว n-3 ในอาหารที่พบมากในน้ำมันปลาเรียกว่า โอเมก้า-3 (ω -3) ก็สามารถช่วยยับยั้งการเกาะเกิดลิ่มเลือดได้เช่นกัน นักวิจัยยังพบอีกว่าระบบการแข็งตัวของเลือดโดยเฉพาะ Cofactor 7a อาจมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับการเผาผลาญไตรกลีเซอไรด์ และการเพิ่มระดับ cAMP ภายในเซลล์จะยับยั้งมิให้ Ca²⁺ เคลื่อนที่ ส่งผลให้เกร็ดเลือดไม่อาจทำงาน⁽¹⁹⁸⁾ นอกจากกรดไขมันอิสระ (FFAs) ส่วนเกินในพลาสมา ยังมีบทบาทสำคัญที่อาจเพิ่มอุบัติการณ์เกิดโรคต่างๆ ดังที่กล่าวแล้ว FFAs ยังสามารถกระตุ้นการหลั่ง VLDL อีกทั้งรบกวนการส่งสัญญาณของอินซูลินโดยตรง จากการยับยั้งกระบวนการขนส่งกลูโคสและกระบวนการ Protein phosphorylation ของเซลล์⁽¹⁸⁹⁾ ทำให้หลอดเลือดมีความเครียดสูงจนสูญเสียจังหวะหน้าที่ (ventricular dysrhythmias) ซึ่งกรดไขมันอิสระในกระแสเลือดจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อรับประทานอาหารที่มีไขมันสูงทั้งกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัว⁽⁶⁷⁾ โดยเฉพาะ arachidonic acid ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายสั้น (n=6) ที่ถูกปลดปล่อยมาจาก linoleic acid มีรายงานว่า arachidonic acid จะถูกรับเข้าเซลล์ตับและถูกเมแทบอลิซึมอย่างรวดเร็วโดยเอนไซม์ cyclooxygenase, lipoxygenase หรือ cytochrome P450-dependent oxygenase เปลี่ยนเป็น prostaglandines, leukotrienes และ epoxy eicosatrienoic acid ก่อให้เกิด ROS ปริมาณมากภายในเซลล์ เข้รบกวนกลไกของยีนที่มีผลให้การแบ่งตัวของเซลล์ลดลงและทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis⁽²⁴⁶⁾ นักวิจัยจึงนำสารต้านอนุมูลอิสระต่างๆ มาทดลองเพื่อหาทางป้องกันและลดอัตราเสี่ยงของการเกิดโรค เชื่อว่า สารต้านอนุมูลอิสระน่าจะสามารถต่อต้านและป้องกัน LDL oxidation ช่วยป้องกันการสูญเสียความยืดหยุ่นของผนังหลอดเลือด และต้านการอักเสบ สารต้านอนุมูลอิสระที่ศึกษากัน

มากและทำกันอย่างแพร่หลายคือ วิตามินต่างๆ เช่น วิตามินเอ วิตามินอี วิตามินซี และอนุพันธ์ของวิตามินเหล่านี้ เนื่องจากพบวิตามินมีปริมาณมากในอาหารทั่วไปและมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สามารถช่วยลดความเสี่ยง ความรุนแรง และอัตราการเกิดโรคในสัตว์ทดลอง⁽²⁴⁷⁾ และพบว่าในผู้ป่วยโรคหัวใจจะมีระดับ β -carotene วิตามินอี และวิตามินซีต่ำกว่าคนปกติ⁽²⁴⁸⁾ การศึกษาทาง clinical trial หลายฉบับซึ่งทำการศึกษาในคนสุขภาพแข็งแรงและผู้ป่วยที่เป็นโรคหัวใจพบผลการทดลองที่สนับสนุนว่าสารต้านอนุมูลอิสระมีประโยชน์ เช่น การรับประทานผักผลไม้ที่มีระดับ β -carotene สูงเป็นเวลาติดต่อกันนานๆ ช่วยลดอัตราการเป็นโรคเรื้อรังต่างๆ ได้⁽²⁴⁹⁾ สารต้านอนุมูลอิสระมีผลดีต่อร่างกายและลดอุบัติการณ์โรคหัวใจขาดเลือดได้จริง โดย ฤทธิ์ของวิตามินที่ให้ประโยชน์แบบเด่นชัดจะอยู่ในรูปของผักและผลไม้สดมากกว่าสารสกัดหรือตัววิตามินโดยตรง^(51,250) แต่ก็มีรายงานวิจัยที่ให้ผลขัดแย้ง เช่น β -carotene ลดอัตราเสี่ยงการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดได้เพียงเล็กน้อยเมื่อได้รับในปริมาณปกติ หลายการวิจัยที่ชี้ว่าไม่สามารถป้องกันการเกิดโรคและลดอัตราการตายจากโรคหัวใจได้เลย⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾ และสรุปว่า β -carotene มีประโยชน์เพียงเป็นตัวบ่งชี้พฤติกรรมกรรมการรับประทานอาหารของผู้ป่วยเท่านั้น⁽²⁴⁹⁾ การศึกษาแบบ meta-analysis สำหรับวิตามินอีพบว่า ไม่มีประโยชน์ในการป้องกันอัตราการตายจากโรคหัวใจ ลดความเสี่ยงจากการเสียชีวิตด้วยโรคหัวใจ หรืออุบัติการณ์เส้นเลือดในสมองแตกแต่อย่างใด⁽²⁵¹⁾ ระดับวิตามินอีที่เพิ่มขึ้นในกระแสเลือดก็ไม่มีผลลดอัตราการแตกสลายของ lipid peroxidation⁽²⁵²⁾ การวิจัยส่วนใหญ่ยังระบุว่า การรับประทานวิตามินอีในปริมาณปกติไม่สามารถป้องกันการเกิดโรคหัวใจ แต่อาจให้ประโยชน์ในการลดการดำเนินของโรคไม่ให้รุนแรงกว่าเดิมได้ (secondary prevention) วิตามินอีจึงอาจเป็นทางเลือก adjuvant therapy สำหรับผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยารักษาโรคหัวใจอยู่⁽²⁵³⁾ เช่น การรับประทานวิตามินอีควบคู่ไปกับยา platelet antiaggregating agent เช่น แอสไพริน อาจมีส่วนเสริมประสิทธิภาพยาในการป้องกัน transient ischemic attack และ ischemic cerebrovascular อื่นๆ⁽²⁵⁴⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยแบบ prospective สองฉบับพบว่า หากรับประทานวิตามินอีเป็นระยะเวลานานมากกว่าสองปีขึ้นไป มีส่วนช่วยในการลดอัตราการเกิดโรคได้⁽²⁵⁵⁾ สำหรับวิตามินซีนั้นไม่มีผลในการลดอัตราเกิดโรคหัวใจ อีกทั้งการศึกษาในผู้ป่วยความดันโลหิตสูงพบว่า วิตามินซีและวิตามินอี นอกจากไม่มีฤทธิ์ลด oxidative stress แล้วยังอาจมีผลเพิ่มความดันโลหิตขึ้นไปอีก ซึ่งผู้วิจัยชี้ว่า เป็นเหตุผลที่อธิบายว่าเหตุใดอัตราการตายจึงเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยที่ได้รับวิตามินอีและซีบีปริมาณสูง⁽²⁵⁶⁾ และสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงคือ สารต้านอนุมูลอิสระ เมื่อถูกดูดซึมเข้าร่างกายแล้วก็จะเกิดการแตกสลายและขับออกจากร่างกายตลอดเวลา ทำให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ในร่างกายมีระดับต่ำ ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการดำเนินของโรคระยะแรกๆ ที่ความผิดปกติยังไม่มากนัก สารต้านอนุมูลอิสระยังพอยับยั้งได้ เช่น ลดการเกิด fatty streak ได้มากกว่าในระยะหลังที่การดำเนินโรคเป็นไปมากแล้ว⁽²⁵¹⁾ เช่น การใช้วิตามินอีในการป้องกันภาวะ vasculopathy ระยะแรกๆ ในผู้ป่วยที่ทำการผ่าตัดเปลี่ยนหัวใจ⁽²⁵³⁾ นอกจากวิตามินที่กล่าวมาแล้วสารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ ที่นำมาทดลองเช่นสารสกัดจากพืชสมุนไพร เช่น โพลีฟีนอลกลุ่มต่างๆ การศึกษาทางระบาดวิทยาคลินิกพบว่า การรับสารต้านอนุมูลอิสระโพลีฟีนอลเพิ่มขึ้นจะลดอัตราเสี่ยงการเป็นโรคหัวใจ⁽²⁵⁷⁾ และมีหลักฐานมากมายที่ชี้ว่า โพลีฟีนอลอาจมีประโยชน์ลดการเกิดโรคหัวใจ เช่น โพลีฟีนอลสามารถลดการทำงานของเอนไซม์ที่เกิดโดยการยับยั้งการสร้าง Thromboxane A₂ และออกฤทธิ์ควบคุม NO ซึ่งเป็นสารที่ควบคุมการทำงานของเซลล์บุหลอดเลือด⁽¹⁹⁵⁾ นอกจากนี้โพลีฟีนอลสามารถจับกับ P-glycoprotein pump บนผนังเซลล์ตับ ส่งสัญญาณลดการสร้างโคเลสเตอรอลเอสเตอร์ทำให้ลดการผลิต apo-B และยังเพิ่มการทำงานและแสดงออกของ LDLR เกิดการ

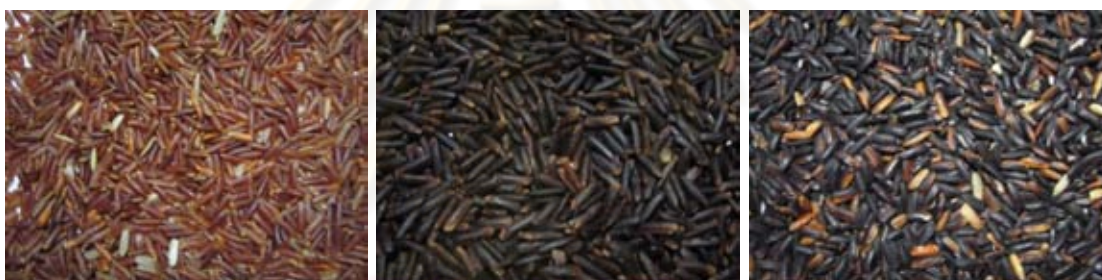
ควบคุมย้อนกลับไม่ให้เกิดโคเรสเตอรอลภายในเซลล์⁽²⁵⁸⁾ มีการค้นพบว่าข้าวสามารถลดความเสี่ยงโรคหัวใจได้โดย 1. สามารถยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการเมแทบอลิซึมไขมัน เช่น Tocotrienol ยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase, γ -Oryzanol ยับยั้งเอนไซม์ ACAT และ cholesterol esterase ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนโคเรสเตอรอลเอสเตอริ์ให้อยู่ในรูปโคเรสเตอรอลอิสระ ทำให้กำจัดโคเรสเตอรอลออกจากร่างกายดีขึ้น เพิ่มระดับ HDL และลดระดับการสังเคราะห์ VLDL 2. ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันการเกิด LDL oxidation 3. ลดเกร็ดเลือดรวมตัวกันเป็นลิ่มเลือด รวมทั้งยับยั้งการหลั่งสาร leucotrienes จากแมคโคฟาจ 4. ลดการดูดซึมและเพิ่มการเมแทบอลิซึมของโคเรสเตอรอลจากทางเดินอาหาร โดยใยอาหารและในข้าวยังมี phytosterol ช่วยลดการดูดซึมโคเรสเตอรอลจากทางเดินอาหาร ขับออกจากร่างกายได้รวดเร็ว และดูดกลับน้อยลง 5. กรดอะมิโนในรำข้าวจะช่วยคงระดับโคเรสเตอรอลในร่างกายให้ปกติ ปัจจุบันมีการพัฒนาการตรวจ biomarkers ตัวใหม่ทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์เพื่อใช้บ่งบอกภาวะเสี่ยงและควบคุมโรคหัวใจในผู้ป่วย biomarkers ที่ได้รับการวิจัยและพัฒนามากคือ COX-2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบมากในโรคที่มีการอักเสบหลายชนิด เช่น ข้ออักเสบ มะเร็ง โรคหัวใจ แต่งานวิจัยทางคลินิกที่พบว่าผู้ป่วยหลายรายที่ใช้ยากดการสร้างเอนไซม์ COX-2 กลับมีอาการโรคหัวใจ การศึกษาในหนูที่ขาดเอนไซม์ COX แต่กำเนิด (COX-/-) ให้รับประทานอาหารก่อโรคหัวใจพบว่า มีไขมันเกาะใน aorta, สาร eicosanoid เช่น TXA₂, PGE₂ และ PGI₂ ในกระแสเลือดของหนูเหล่านี้ไม่สมดุลอย่างรุนแรง มีการเพิ่มขึ้นของ cytokines เช่น TNF และ IL-6 นักวิจัยคาดว่า COX-2 มีประโยชน์ในการคงระดับ prostanoid และสารก่ออาการอักเสบ เช่น 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ ให้สมดุลและยับยั้งการเกิด pro-inflammatory HDL ซึ่งประสิทธิภาพในการขนส่งโคเรสเตอรอลลดลง และอาจส่งเสริมการเกิด Ox-LDL อีกด้วย จึงรับการพัฒนาเพื่อใช้เป็น biomarker ตัวใหม่ใช้ควบคุมการรักษาโรคหัวใจอีกตัวหนึ่งเช่นกัน⁽²⁵⁹⁾

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

กลุ่มตัวอย่างที่เกี่ยวข้องที่ใช้ในการวิจัยมีดังนี้

1. ตัวอย่างข้าวเมล็ดสี ข้าวเมล็ดสีที่นำมาวิจัยเป็นพันธุ์ข้าวที่ปลูกในประเทศไทย โดยผู้วิจัยทำการเก็บตัวอย่างข้าวเมล็ดสีชนิดต่างๆ โดยแบ่งตามลักษณะสีและรูปร่างเมล็ดข้าว แบบสุ่มจากแหล่งการค้าในแถบกรุงเทพมหานครและปริมณฑลระหว่าง 1 กุมภาพันธ์ ถึง 31 มีนาคม พ.ศ. 2550 ทั้งนี้เพื่อป้องกันความแปรปรวนของสิ่งแวดล้อมที่อาจมีผลต่อปริมาณสารต่างๆ ที่มีในเมล็ดข้าว รวมทั้งหมด 21 ตัวอย่าง สามารถแบ่งได้เป็น 3 สายพันธุ์ดังนี้
 - 1.1. ข้าวกล้องแดงหรือข้าวแดงมันปู รวมทั้งสิ้น 7 ตัวอย่าง
 - 1.2. ข้าวกล้องดำหรือข้าวสีนิล รวมทั้งสิ้น 7 ตัวอย่าง
 - 1.3. ข้าวเหนียวดำ รวมทั้งสิ้น 7 ตัวอย่าง



(A)

(B)

(C)

ภาพที่ 3.1: ชนิดข้าวเมล็ดสีที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย ข้าวแดง (A), ข้าวดำ (B), และข้าวเหนียวดำ (C)

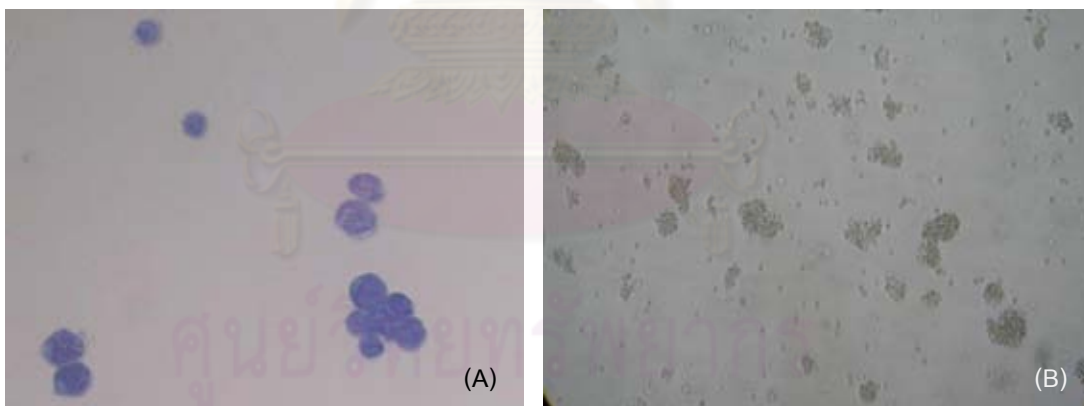
2. ตัวอย่างเซลล์ที่ใช้ในการวิจัย ตัวอย่างเซลล์ทั้งหมดเป็นเซลล์ร่างกายมนุษย์ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ
 - 2.1. ตัวอย่างเซลล์ร่างกายปกติมีดังนี้
 - 2.1.1. เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ (Red blood cells) โดยเก็บตัวอย่างจากอาสาสมัครหญิงชายที่มีอายุระหว่าง 18-30 ปี สุขภาพแข็งแรง ไม่รับประทานยาในช่วงที่ทำการเจาะเก็บตัวอย่าง โดยทำการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดครบปริมาณ 5 ml ใส่หลอดเก็บที่มีเฮปารินเป็นสารกันเลือดแข็งตัว บั่น 1500 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดเฉพาะส่วนเม็ดเลือดแดงออกมาใช้ เตรียมเซลล์ใหม่ทุกครั้งก่อนการทดลอง
 - 2.1.2. เซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (Peripheral blood mononuclear cells : PBMCs) โดยเก็บตัวอย่างจากอาสาสมัครหญิงชายที่มีอายุระหว่าง 18-30 ปี สุขภาพแข็งแรง ไม่รับประทานยาในช่วงที่ทำการเจาะเก็บตัวอย่าง โดยทำการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดครบปริมาณ 12 ml ใส่หลอดเก็บที่มีเฮปารินเป็นสารกันเลือดแข็งตัวเช่นเดียวกับเซลล์เม็ดเลือดแดง แล้วทำการแยกตัวอย่าง

เซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยหลักการ Density gradient centrifugation โดยใช้ยา Ficoll-hypaque solution ซึ่งมีความหนาแน่น 1.077 เท่าของน้ำ เติริมเซลล์ใหม่ทุกครั้งก่อนการทดลอง วิธีการเป็นดังนี้

- 2.1.2.1. เจาะเลือดใส่ใน accuspin tube รินด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในอัตราส่วนเลือด 1 ส่วนต่อบัฟเฟอร์ 2 ส่วน นำไปปั่นที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 800 g เป็นเวลา 15 นาที
- 2.1.2.2. ดูดส่วนพลาสมาทิ้งแล้วเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้เท่ากับปริมาณที่ทิ้งไปแล้วค่อยๆ เทลงบน Ficoll-hypaque solution ที่เตรียมไว้ในหลอดขนาด 50 ml ในอัตราส่วนเลือด 4 ส่วนต่อ Ficoll-hypaque solution 3 ส่วน ปั่นที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 400 g เป็นเวลา 20 นาที
- 2.1.2.3. ดูดชั้นขุ่นที่อยู่ระหว่าง Ficoll-hypaque solution และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ออกมาแล้วปั่นล้างเซลล์ที่ได้ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 400 g เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำเดิม 2-3 ครั้ง เทส่วนน้ำใสทิ้งไปแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 2 ml นับจำนวนเซลล์แล้วคำนวณเพื่อทำการทดสอบต่อไป

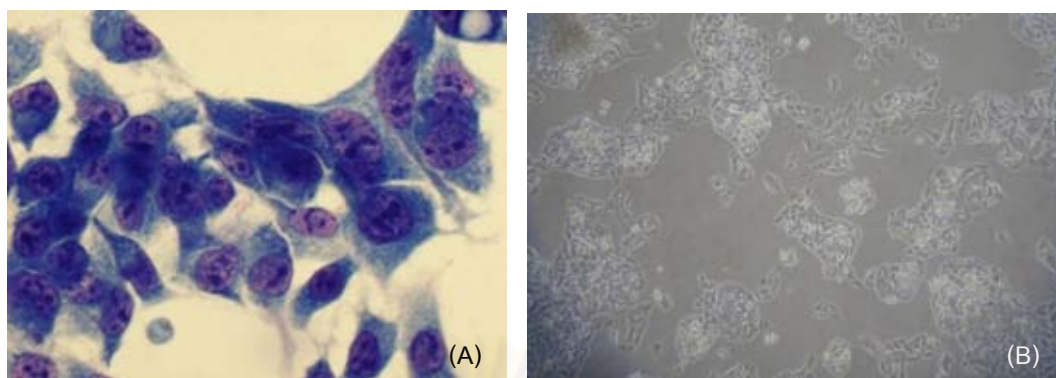
2.2. ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยงมีดังนี้

- 2.2.1. เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat (Human T cell lymphoblast-like cell line) ได้รับการอนุเคราะห์เซลล์จาก ศ.นพ.ดร.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 3.2: ลักษณะและรูปร่างของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat เมื่อย้อมด้วยสีกิมาถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า (A), ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Invert Microscopy) โดยตรงกำลังขยาย 40 เท่า (B)

- 2.2.2. เซลล์มะเร็งตับ HepG2 (Human hepatocellular liver carcinoma cell line) ได้รับการอนุเคราะห์ตัวอย่างเซลล์จาก รศ.ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 3.3: ลักษณะและรูปร่างของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 เมื่อย้อมด้วยสีกิมซาถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (A), ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Invert Microscopy) โดยตรงกำลังขยาย 40 เท่า (B)

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัยสามารถแบ่งได้เป็น 4 หมวดคือ

I. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจวัดค่าสารต้านอนุมูลอิสระ

AAPH	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Catechin	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Fluorescien	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Folin Ciocalteu's phenol reagent	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Gallic acid	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Methanol	Merck, เยอรมนี
Sodium carbonate	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Sodium phosphate	Merck, เยอรมนี
Sulfuric acid	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา

II. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจวัดการป้องกันเซลล์ร่างกายปกติจากอนุมูลอิสระ

Acetphenylhydrazide	General purpose reagent, อังกฤษ
Crystal violet	Merck, เยอรมนี
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Mayer&Barker, อังกฤษ
Hydrogen peroxide	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Low temperature melting point agarose gel	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Normal temperature melting point agarose gel	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Sodium chloride	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา

Sodium hydroxide	Merck, เยอรมนี
Titan-X 100	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Tris base	Riedel-de Haen, เยอรมนี
<i>III. สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยากับเซลล์เพาะเลี้ยง</i>	
2',7'-Dichlorofluorescein diacetate	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Dimethyl Sulphoxide (DMSO)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM : with 4 mM/L Glutamine, 4500 mg/L Glucose without Sodium Pyruvate)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
EDTA-Trypsin 0.25% (1X)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
Ethanol	Merck, เยอรมนี
Ethidium Bromide	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Fetal Bovine Serum (FBS)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
Fungizone Amphotericin B 250 µg/ml	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Isoprep Ficoll-Hypaque 1077	Robbins Scientific corp., สหรัฐอเมริกา
Neutral Red Dye	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Penicillin-Streptomycin Solution (10,000 units/ml Penicillin, 10,000 µg/ml Streptomycin)	Biochrom AG, เยอรมนี
Phosphate Buffered Saline (PBS : without calcium without magnesium)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
Phytohemagglutinin (PHA)	Biochrom AG, เยอรมนี
Roswell Park Memorial Institute -1640 Medium (RPMI-1640 medium with 2.05 mM L-Glutamine)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Trypan Blue Stain 0.4%	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
<i>IV. สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบสารสกัดที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับไขมัน</i>	
Chloroform	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Deoxyribonuclease I	Biobasic, แคนาดา
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
DNA Ladder 100 bp	Biobasic, แคนาดา
Isopropanol	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
i-Tag DNA polymerase with dNTPs 10 mM	iNtron biotechnology, เกาหลีใต้
M-Mllv-Reverse transcriptase	Finnzymes, ฟินแลนด์
Oligo-dT 20-mer	Biobasic, แคนาดา

Primer	Biobasic, แคนาดา
RNAse Inhibitor	Biobasic, แคนาดา
เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยมีดังนี้	
-20 °C Freezer	Sanyo Electric, ญี่ปุ่น
-80 °C ULT Deep Freezer	IIShin Lab, เกาหลีใต้
4 °C Refrigerator	Sharp, ญี่ปุ่น
6 well cell culture plate flat bottom with lid	Nunc, เดนมาร์ก
12 well cell culture plate flat bottom with lid	Nunc, เดนมาร์ก
96 well cell culture plate flat bottom with lid	Nunc, เดนมาร์ก
Analytical Balances	Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์
Auto pipette	GILSON, ฝรั่งเศส
Block heater	Wealtec Corp., สหรัฐอเมริกา
Cell Culture Flask (25 cm ²)	Nunc, เดนมาร์ก
Centrifuge tube 15, 50 ml	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
CO ₂ incubator	Sheldon Manufacturing, สหรัฐอเมริกา
Cryovial tube 2.0 ml	Nunc, เดนมาร์ก
Disposable Serological pipette (5, 10 ml)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Electrophoresis power supply	Bio-Rad Laboratories, สหรัฐอเมริกา
Fluorescence microscope	Olympus Optical, ญี่ปุ่น
Freeze dryer	Thermo Electron Corporation, สหรัฐอเมริกา
Gel documentation (gel doc) systems	Syngene, อังกฤษ
Gel Electrophoresis Apparatus	Bio-Rad Laboratories, สหรัฐอเมริกา
Glassware	Pyrax, สหรัฐอเมริกา
Hemocytometer	Hausser Scientific, สหรัฐอเมริกา
High-Pressure Steam Sterilizer	Tomy Kogyo, ญี่ปุ่น
Incubator	Memmert, เยอรมนี
Inverted microscope	Olympus Optical, ญี่ปุ่น
Laminar Flow Cabinet	E.S.I. Flufrance, ฝรั่งเศส
Light microscope	Olympus Optical, ญี่ปุ่น
Liquid Nitrogen Tank	Taylor-Wharton, สหรัฐอเมริกา
Luminometer Plate	PerkinElmer, ฟินแลนด์
Microcentrifuge	Denver Instrument, สหรัฐอเมริกา
Microcentrifuge tube (1 .5 ml)	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
Micro Refrigerated Centrifuge	Vision Scientific, เกาหลีใต้

Microscope slide (1"x3"), Cover glass	Sail Brand, จีน
Multichannel pipette	Brand, เยอรมนี
PCR tube	Bioscience Inc., สหรัฐอเมริกา
Pipette controller	Jencons (Scientific), อังกฤษ
Pipette tips (10, 200, 1000 µl)	Biobasic, แคนาดา BIORAD, สหรัฐอเมริกา
Rotary Evaporator	Heidolph Instruments, เยอรมนี
Sonicator	Soniclean, สหรัฐอเมริกา
Sterile aerosol pipette tip (10, 200, 1000 µl)	Labcon, สหรัฐอเมริกา
SUB CELL electrophoresis tray	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
Thermal Cycler	MJ Research Inc., สหรัฐอเมริกา
UV Transilluminator	UVIttec, อังกฤษ
UV-Visible Spectrophotometer	Shimadzu, ญี่ปุ่น
UV-Visible Spectrophotometer for RNA	Beckman Coulter Inc., สหรัฐอเมริกา
Vacuum Concentrator (DNA SpeedVacs)	Thermo Electron Corporation, สหรัฐอเมริกา
Vortex Mixer	FINEPCR, เกาหลีใต้
Wallac 1420 VICTOR ² Multilabel Counter flourometer	PerkinElmer Life and Analytical Sciences, ฟินแลนด์
Water Bath	Memmert, เยอรมนี

น้ำที่ใช้ในการวิจัยทั้งหมดเป็นน้ำ Milli-Q™ ซึ่งเป็นน้ำที่ผ่านความต่างศักย์ 18 mΩ แสงอัลตราไวโอเล็ต และรูกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตรเพื่อดึงแร่ธาตุและสารปนเปื้อนออกจนเกือบหมด

วิธีการวิจัย

1. การสกัดแยกสารรงควัตถุจากข้าวเมลดสีเพื่อนำมาวิจัย ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ดังนี้
 1. การสกัดสารรงควัตถุจากเมล็ดข้าวโดยใช้การต้มกลั่น (reflux) ด้วยตัวทำละลายเมทานอล (methanol) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการสกัดสารต่างๆ โดยเฉพาะสารจากธรรมชาติและดัดแปลงวิธีการบางส่วนจาก Kaneda และคณะ⁽¹²⁾ วิธีการเป็นดังนี้
 - 1.1. นำตัวอย่างข้าวแต่ละตัวอย่างประมาณ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น จากนั้นนำมาบดด้วยครกต่ออีกจนรู้สึกละเอียดพอสมควร แล้วร่อนผงเมล็ดข้าวปั่นด้วยตะแกรงร่อนที่มีซี่ตะแกรงที่ประมาณ 1-2 มิลลิเมตรเพื่อแยกส่วนที่ยังหยาบออก
 - 1.2. ชั่งผงข้าวเมลดสี 10 กรัมผสมกับ 80% เมทานอล 100 ml ทำการต้มกลั่น ณ อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 นาที ดังภาพที่ 3.4 แยกส่วนที่เป็นน้ำ supernatant ออกแล้วเติม 80% เมทานอลลงไปใหม่ 100 ml ทำการต้มกลั่นต่ออีก 90 นาที เเท่น้ำ supernatant ทั้งหมดลงขวดฝาปิด



ภาพที่ 3.4: การสกัดสารธรรมชาติจากผงข้าวเมล็ดสีด้วยวิธี Reflux

- 1.3. สั่นด้วยเครื่อง sonicator คลื่นเสียงความถี่สูงเพื่อให้ผนังเซลล์แตกปลดปล่อยสารต่างๆ ออกมาได้มากยิ่งขึ้น เป็นเวลา 30 นาทีแล้วเก็บสารสกัดที่ได้ในที่มีด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน
- 1.4. บั่นเพื่อแยกส่วนน้ำใสที่ความเร็ว 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดเก็บส่วนน้ำใสไว้ส่วนหนึ่งเพื่อทำการตรวจวัดค่าสารต้านอนุมูลอิสระและส่วนที่เหลือให้ทำการระเหิดแห้งเก็บ
2. การระเหิดและการระเหยแห้ง วิธีการเป็นดังนี้
 - 2.1. นำสารสกัดข้าวระเหยเพื่อแยกตัวทำละลายที่มีใช้น้ำในที่นี้คือ เมทานอล ออกโดยนำสารสกัดเข้าเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสแล้วนำสารสกัดที่เหลือเข้าตู้แช่เย็น -80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 วัน
 - 2.2. นำสารสกัดแข็งจากตู้เย็น -80 องศาเซลเซียสเข้าเครื่อง Freeze dryer ซึ่งเป็นเครื่องเตรียมสารให้แห้งด้วยวิธีการระเหิด (Sublimation) โดยใช้ความเย็นในสภาวะสูญญากาศ ทำให้สามารถระเหิดส่วนที่เป็นน้ำแข็งออกจากสารตัวอย่างได้ ไม่ทำให้สารตัวอย่างเสียคุณสมบัติ โดยทำการระเหิดที่อุณหภูมิ -47 องศาเซลเซียสความดัน 35×10^{-3} มิลลิบาร์เป็นเวลา 19 ชั่วโมงหรือจนกว่าสารสกัดจะแห้งเป็นผง ใสหดรอดฝาปิดแยกเป็นหดรอดเล็กๆ แล้วเก็บเข้าตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส
2. การตรวจวัดค่าสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดข้าวเมล็ดสีประกอบด้วย 4 ขั้นตอน⁽²⁶⁰⁻²⁶²⁾ ดังนี้
 - 2.1 การตรวจวัดคุณสมบัติในการเก็บกวาดอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity) ของสารสกัดข้าวด้วยวิธี Oxygen Radical Absorbance Capacity assay (ORAC Assay)^(31,263-264)

ORAC assay เป็นการตรวจวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระ ในสิ่งตัวอย่างไปกวาดจับอนุมูลอิสระ มีที่มาจากทฤษฎี Hydrogen atom transfer base (HAT) อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากสาร 2,2' azobis (2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH)⁽²⁶⁵⁾ จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลอิสระเปอรอร์ออกซิลเข้าไปทำลายสีฟลูออเรสซิน (fluorescein) ทำให้โครงสร้างสีเปลี่ยนไป ส่งผลให้คุณสมบัติการเรืองแสงค่อยๆ ลดลง สารต้านอนุมูลอิสระในสิ่งตัวอย่างที่ใส่เข้าไปจะมีผลในการยับยั้งการทำลายสีฟลูออเรสซินจึงทำให้สียังคงเรืองแสงอยู่ ความเข้มของการเรืองแสงจะแปรผันตามปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในสิ่ง

ตัวอย่าง ทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง Fluorometer แล้วคำนวณความแตกต่างของพื้นที่ใต้กราฟระหว่าง แบลงค์ (blank) และสิ่งตัวอย่าง (sample) หรือสารมาตรฐาน (Standard) วิธีนี้ใช้ Trolox ซึ่งเป็นอนุพันธ์วิตามินอีที่ละลายน้ำได้เป็นสารมาตรฐาน⁽²⁶⁶⁾ สารต้านอนุมูลอิสระในสิ่งตัวอย่างที่ได้แสดงค่าในหน่วย mM โดยเทียบกับ Trolox ต่อน้ำหนักข้าวที่นำมาสกัด 1 กิโลกรัม (Trolox equivalents (TE) mM/kg of dry wt.) วิธีการเป็นดังนี้

2.1.1 เตรียมสารก่อนการทดลองดังนี้

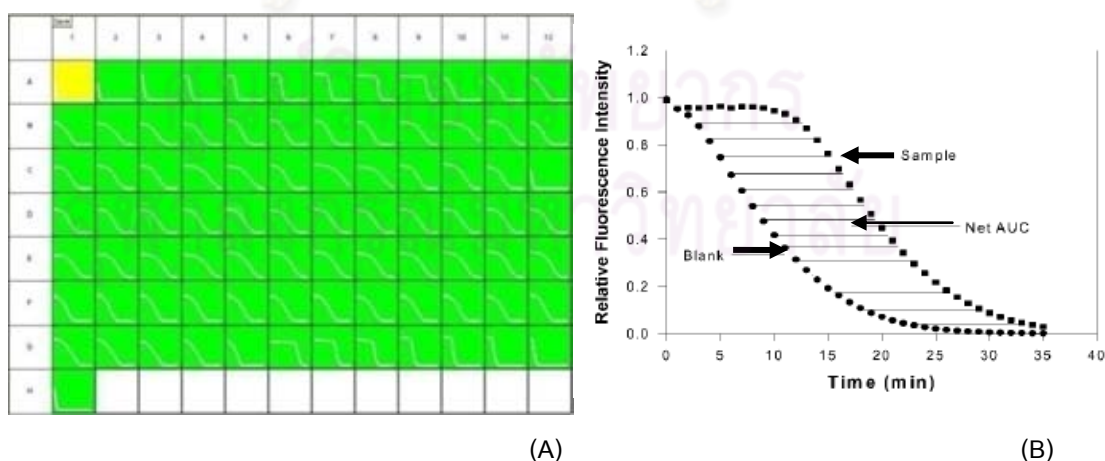
2.1.1.1 สารละลาย AAPH ความเข้มข้น 153 mM ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์

2.1.1.2 สีฟลูออเรสซิน (fluorescein stock solution) ให้เตรียมความเข้มข้น 40 μM ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ก่อนใช้เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 1000 เป็น working fluorescein solution

2.1.1.3 สารละลาย Trolox ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 60, 80 และ 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$

2.1.2 ผสมสีฟลูออเรสซิน (working sodium fluorescein solution) ปริมาตร 80 μl กับสารที่ต้องการทดสอบ ลงภาชนะขนาด 96 หลุม ดังตารางที่ 3.1 ประกอบด้วย 1) blank 2) สารมาตรฐาน 7 หลุม นั่นคือ สารละลาย Trolox ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ 3) ตัวอย่างสารสกัดข้าว (ที่เจือจางได้ความเข้มข้นเหมาะสม) จากนั้นนำภาชนะ 96 หลุมนี้มาวางในเครื่อง VICTOR² Fluorometer ให้ตั้งเครื่องทำงานอัตโนมัติในการเติมสีฟลูออเรสซินโดยใช้ระบบปั๊มภายในเครื่องจ่าย จากนั้นให้ทำการเขย่าให้สารในหลุมผสมกันนาน 10 วินาที ตั้งภาชนะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีดเป็นเวลา 30 นาที

2.1.3 เริ่มปฏิกิริยาโดยใช้ระบบปั๊มภายในเครื่องตัวที่ 2 จ่ายสารละลาย AAPH ปริมาตร 25 μl จนได้ปริมาตรสุดท้าย 130 μl เขย่าภาชนะนาน 10 วินาทีแล้วเริ่มกระตุ้นการเรืองแสงของปฏิกิริยาทันทีที่ความยาวคลื่นแสงกระตุ้น 485 นาโนเมตรและวัดการเรืองแสงความยาวคลื่นแสงปลดปล่อย 535 นาโนเมตรซึ่งจะทำการวัดทุกๆ นาทีจนครบ 35 นาที โดยที่มีปริมาณการเรืองแสงที่นาทีที่ 35 ได้น้อยกว่า 5% ของการเรืองแสงเริ่มต้น เครื่องจะบันทึกการวัดแบบต่อเนื่องเป็นกราฟ ดังภาพที่ 3.5 โดยใช้ซอฟต์แวร์ Wallac1420 เวอร์ชัน 3.00 โดยโปรแกรมจะคำนวณพื้นที่ใต้กราฟสิ่งตัวอย่าง หรือกราฟสารมาตรฐาน มาหักลบจากพื้นที่ใต้กราฟ Blank ได้เป็นพื้นที่ใต้กราฟสุทธิ (Net AUC) ค่าพื้นที่ใต้กราฟสุทธิที่ได้จะนำมาเทียบกับกราฟสารมาตรฐาน



ภาพที่ 3.5: ลักษณะกราฟที่ได้จากการตรวจสอบค่าความสามารถสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ORAC (A), ลักษณะการเรืองแสงของสีฟลูออเรสซินที่ได้จากการบันทึกอย่างต่อเนื่องของเครื่อง Fluorometer cJt แสดงการคำนวณพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) (B)

ตารางที่ 3.1: ขั้นตอนการเติมสารเพื่อตรวจวัดค่าระดับสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ORAC assay

Reagents	Blank (µl)	Sample (µl)	Standard (µl)
1. สารสกัดข้าวเม็ล็ดสี	-	25	-
2. สารละลาย phosphate buffer (pH 7.4)	25	-	-
3. สารละลาย Trolox	-	-	25
4. สี Working Fluorescein	80	80	80
เขย่าและตั้งที่อุณหภูมิ 37 °C 30 นาที			
5. AAPH solution	25	25	25

ผสมและวัดทันทีและวัด ต่อเนื่อง ทุกๆ นาที จนครบ 35 นาที โดยใช้ ความยาวคลื่น excitation 485 nm, emission 528 nm เขียน curve โดยนำค่า Net AUC_{standard} ที่ได้จาก Trolox ความเข้มข้นต่างๆ มาเขียนกราฟ เส้นตรงและนำค่า Net AUC_{Sample} มาอ่านค่าเปรียบเทียบ ซึ่ง AUC (area under curve) สามารถคำนวณค่าได้จากสูตรดังนี้

$$AUC = 0.5 + (R2/R1) + (R3/R1) + (R4/R1) + \dots + 0.5(Rn/R1)$$

โดย R1 คือการเรืองแสงเริ่มต้น ณ เวลา 0 นาที, R2 คือการเรืองแสงครั้งที่ 2 ณ เวลา 1 นาที และ Rn คือการเรืองแสงสุดท้าย

$$\text{Net AUC}_{\text{Standard}} = \text{AUC}_{\text{standard}} - \text{AUC}_{\text{blank}}$$

$$\text{Net AUC}_{\text{Sample}} = \text{AUC}_{\text{Sample}} - \text{AUC}_{\text{blank}}$$

2.2 การตรวจวัดคุณสมบัติรีดิวซ์ของสารโพลีฟีนอล (reducing property) จากสารสกัดข้าวด้วยวิธี Folin Ciocalteu Phenol assay (FCP)⁽³⁴⁾

Folin Ciocalteu Phenol assay เป็นวิธีการตรวจความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในสิ่งตัวอย่างบริจาคคือเล็กทรอนิกส์หรือรีดิวซ์สารประกอบอื่นๆ มีที่มาจากทฤษฎี Single electron transfer base (SET) แอนโทไซยานินส์ ที่มีโครงสร้างเป็นโพลีฟีนอลิก สามารถ รีดิวซ์สารละลาย Folin Ciocalteu Phenol reagent ที่มีสีเหลืองเปลี่ยนไปเป็นสารละลายที่มีสีฟ้า น้ำเงิน ความเข้มของสีจะแปรผันตามปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในสิ่งตัวอย่าง การตรวจวิธีนี้ใช้ Gallic acid เป็นสารมาตรฐาน ค่า ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด (Phenolic content) ในสิ่งตัวอย่างแสดงค่าในหน่วย mM โดยเทียบกับ Gallic acid ต่อน้ำหนักข้าวที่นำมาสกัด 1 กิโลกรัม (Gallic acid equivalent (GE) mM /kg of dry wt.)

2.2.1 เตรียมสารก่อนการทดลองดังนี้

2.2.1.1 สารละลาย Working Folin Ciocalteu's Phenol Reagent

2.2.1.2 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na₂CO₃) 1.0 M

2.2.1.3 สารละลาย Gallic acid ความเข้มข้น 1.56, 3.125, 6.25, 12.50, 25.00 และ 50.00 µg/ml

2.2.2 ผสมสารละลาย ดังตารางที่ 3.2 ดังนี้ 1) blank 2) สารมาตรฐาน 3) สารสกัดข้าว กับ 10% Folin-Ciocalteu's phenol reagent 500 µl ตั้งไว้ในที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วเติม

สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 350 μ l ลงไปเขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน ตั้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสต่อเป็นเวลา 20 นาที หากมีสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างจะเห็นสีน้ำเงินเกิดขึ้นซึ่งแปรผันตามปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในตัวอย่าง

2.2.3 นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์โดยใช้สารละลาย gallic acid ความเข้มข้น 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25 และ 50 μ g/ml เป็นสารมาตรฐาน

ตารางที่ 3.2: ขั้นตอนการเติมสารเพื่อตรวจวัดค่าระดับสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FCP assay

Reagents	Blank (μ l)	Sample (μ l)	Standard (μ l)
1. สารสกัดข้าวเมลดิสตี	-	-	500
2. สารละลาย Gallic acid	-	500	-
3. Deionized distilled water	500	-	-
4. สารละลาย Working Folin Ciocalteu's Phenol Reagent	500	500	500
เขย่าและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที			
5. สารละลาย Na_2CO_3	350	350	350
ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง (Abs.) ของทั้งสารมาตรฐานและสิ่งตัวอย่างที่ 750 nm เทียบกับ blank			

2.3 การตรวจวัดคุณสมบัติการเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Vanillin assay⁽⁷⁷⁾

สารประกอบจำพวกโปรแอนโทไซยานิดิน (Proanthocyanidins) ในสารสกัดข้าวเมลดิสตี เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด (70% H_2SO_4) จะเกิดปฏิกิริยา depolymerization และเกิดปฏิกิริยา coupling กับสารประกอบแวนนาลลิน (Vanillin) เป็นแวนนาลลินแอดดัก (Vanillin adduct) ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีชมพูแดงดูดกลืนความยาวคลื่นแสง 500 นาโนเมตร ความเข้มของสีจะแปรผันตามปริมาณสาร โปรแอนโทไซยานิดินที่มีในสิ่งตัวอย่าง และใช้คาเทชิน (Catechin) ความเข้มข้นระหว่าง 2, 5, 10, 20, และ 40 μ g/ml เป็นสารมาตรฐาน การทดสอบนี้จะจำเพาะกับฟลาโวนอยด์ ค่าปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสิ่งตัวอย่าง จะแสดงค่าในหน่วย mM โดยเทียบกับ Catechin ต่อน้ำหนักข้าวที่นำมาสกัด 1 กิโลกรัม (Catechin equivalent (CE) mM /kg of dry wt.)

2.3.1 เตรียมสารก่อนการทดลองดังนี้

2.3.1.1 สารละลาย 1% Vanillin reagent ใน 70% H_2SO_4

2.3.1.2 สารละลาย Catechin ความเข้มข้น 2, 5, 10, 20, และ 40 μ g/ml

2.3.2 ผสมสารละลาย ดังตารางที่ 3.3 ดังนี้ 1) blank 2) สารมาตรฐาน 3) สารสกัดข้าวเมลดิสตี ปริมาตร 1 ml กับสารละลาย 1% Vanillin reagent ใน 70% H_2SO_4 (Vanillin reagent) ปริมาตร 2 ml เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน แล้วตั้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที จะเห็นสารละลายสีชมพูเกิดขึ้นโดยความเข้มของสีจะแปรผันตรงกับปริมาณสารประกอบโปรแอนโทไซยานิดินในสารสกัดตัวอย่าง

2.3.3 วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 500 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์โดยใช้คาเทชิน ความเข้มข้น 2, 5, 10, 20, และ 40 $\mu\text{g/ml}$ เป็นสารมาตรฐาน ผลที่ได้จะแสดงในรูป

ตารางที่ 3.3: ขั้นตอนการเติมสารเพื่อตรวจวัดค่าระดับสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Vanillin assay

Reagents	Blank (ml)	Sample (ml)	Standard (ml)
1. สารสกัดข้าวเม็ดสี	-	-	1.0
2. สารละลาย Catechin	-	1.0	-
3. Deionized distilled water	1.0	-	-
4. สารละลาย Vanillin reagent	2.0	2.0	2.0
เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน ตั้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 15 นาทีแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง (Abs.) ของทั้งสารมาตรฐานและสิ่งตัวอย่างที่ 500 nm เทียบกับ blank			

2.4 การตรวจวัดคุณสมบัติในการดูดกลืนคลื่นแสงความยาว 535 นาโนเมตรของสารแอนโทไซยานินส์ด้วยวิธีวัดการดูดกลืนแสงอย่างง่าย⁽³⁶⁾

นำสารสกัดข้าวเม็ดสีเข้าวัดค่าการดูดกลืนแสง ณ ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตรโดยตรง ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์โดยเตรียมสารสกัดตัวอย่างละ 1 ml ทั้ง 21 ตัวอย่าง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เข้าสู่สูตร $TAC = A \times 288.21$ (A= ค่าการดูดกลืนของแสงที่วัดได้) ตามสูตรของ Abdel-Aol et al. 1999⁽³⁶⁾ แสดงผลเป็นจำนวนมิลลิกรัม (mg) ของแอนโทไซยานินส์ต่อสารตัวอย่าง 10 กรัม

3. การตรวจวัดความสามารถของสารสกัดจากข้าวในการป้องกันการทำลาย DNA ในนิวเคลียสของเม็ดเลือดขาว ไข่มันและโปรตีน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงจากการออกซิเดชันโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดจากเลือดครบเป็นแบบ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

3.1. การตรวจวัดความสามารถในการป้องกันการทำลาย DNA (Genotoxicity) จากสารออกซิไดซ์โดยใช้ DNA เม็ดเลือดขาวปกติเป็นแบบ ด้วยวิธี Comet assay⁽²⁶⁸⁾

Comet assay หรือ single cell gel electrophoresis ใช้เพื่อการศึกษาและตรวจวัดการแตกสลายของสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ (DNA) เป็นชิ้นเล็กๆ จากการทำลายโดยอนุมูลอิสระ สารพิษ และสารออกซิเดชัน ในการทดสอบนี้จะใช้ H_2O_2 (100 mM) และใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวปกติเป็นเซลล์ตัวอย่าง หากนิวเคลียสของเซลล์ถูกออกซิไดซ์จน DNA แตกเสียหาย เมื่อนำไปวิ่งแยกบนสนามไฟฟ้า (electrophoresis)⁽²⁶⁹⁾ ใช้วิธี microgel DNA electrophoresis⁽²⁷⁰⁾ จะเห็นเศษ DNA ที่เสียหายแตกสลายเป็นชิ้นเล็กๆ กระจายออกมาจากนิวเคลียสดูคล้ายดาวหางเมื่อดูด้วยกล้อง Fluorescence ทางที่ยาวมากแสดงถึงสาย DNA ที่แตกสลายมาก ในการทดสอบนี้จะใช้เม็ดเลือดคนปกติที่เจาะจากอาสาสมัคร โดยกำหนดว่า อาสาสมัครจะต้องมีสุขภาพแข็งแรง ณ ช่วงที่เจาะเลือดและไม่พบในสิ่งต่อไปนี้ สูบบุหรี่ ต้มแอลกอฮอล์ ใช้ยารักษาโรคหรือยากุมกำเนิด ติดเชื้อรุนแรงหรือติดไวรัสก่อนหน้าอย่างน้อย 6 เดือน รับประทาน มีโรคทางพันธุกรรมแต่กำเนิดหรือโรคติดเชื้อเรื้อรัง อาบแดด รับประทานด้วยรังสีเอ็กซ์เรย์ (X-rays) หรือรับประทานยาต้านมะเร็ง⁽¹⁴³⁾ ข้อดีของวิธีนี้คือ มีความไวในการตรวจจับการทำลายแม้เพียงเล็กน้อย

3.1.1 เตรียมสารก่อนการทดลองดังนี้

3.1.1.1 แผ่นสไลด์เคลือบ 1% Normal melting point agarose Gel (NMP)

3.1.1.2 1% Low melting point agarose gel (LMP)

3.1.1.3 Lysis solution, pH 10 เตรียมก่อนทดลองไม่เกิน 24 ชั่วโมง

3.1.1.4 Alkaline electrophoresis solution, pH>13 ใช้เป็นบัฟเฟอร์สนามไฟฟ้า

3.1.1.5 Neutralization buffer, pH 7.5

3.1.1.6 สีเอทิลเดียมโบรมาดัย ความเข้มข้น 20 mg/l

3.1.1.7 H₂O₂ ความเข้มข้น 10 mM

3.1.2 เจาะเลือดโดยใช้เฮปารินเป็นสารกันเลือดแข็ง ควรเจาะก่อนการทดลองไม่เกิน 2-3 ชั่วโมงแล้วผสมเลือดครบ 80 μ l กับสารละลาย ดังตารางที่ 3.4 ดังนี้ 1) สารสกัดข้าวเมล็ดสีความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1000 μ g/ml ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2) สารสกัดข้าวเมล็ดสีความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1000 μ g/ml ใส่พร้อมกับ H₂O₂ 10 mM 3) H₂O₂ 10 mM (Positive control) 4) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Negative control) จนได้ปริมาตรสุดท้าย 1 ml ตั้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงในหลอดที่มีฝาปิดขนาด 1.5 ml เพื่อป้องกันผลกระทบจากออกซิเจนในอากาศ

3.1.3 ปั่นล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2-3 ครั้งแล้วดูดตะกอนเซลล์ 10 μ l ผสมกับเจล LMP 75 μ l ที่เตรียมไว้ให้เข้ากันแล้วหยดบนสไลด์ 3.1.1.1 ปิดด้วย cover slip ทันที จากนั้นนำไปแช่ที่ 4 องศาเซลเซียสจนเจลแข็งตัว ค่อยๆ ดึง cover slip ออกแล้วทาเจล LMP 120 μ l ที่เตรียมไว้ทับอีกชั้น ปิดด้วย cover slip ทันทีนำไปแช่ที่ 4 องศาเซลเซียสจนเจลแข็งตัว

3.1.4 นำสไลด์แช่ใน lysis solution เย็นที่เตรียมไว้ที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วล้างด้วย Alkaline electrophoresis solution, pH>13 3-4 ครั้งเบาๆ จากนั้นนำไปวางในถาดสนามไฟฟ้าแบบข้างต่อข้าง (side-by-side) ใน horizontal electrophoresis chamber ให้ปริมาณบัฟเฟอร์ท่วมเหนือสไลด์ ประมาณ 2 มิลลิเมตร ตั้งไว้ประมาณ 40 นาทีเพื่อให้ DNA คลายเกลียวแล้วทำการวิ่งแยกบนสนามไฟฟ้าด้วยไฟกำลัง 300 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 25 นาทีในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.4: ขั้นตอนการเติมสารเพื่อตรวจวัดความสามารถในการป้องกันสาย DNA จากสารออกซิไดซ์ด้วยวิธี Comet assay

Reagents	Negative Control (μ l)	sample (μ l)		Positive Control (μ l)
		เท่านั้น	พร้อม H ₂ O ₂	
เลือดครบ	80	80	80	80
สารละลาย PBS, pH 7.4	920	-	-	-
สารสกัดข้าวเหนียวดำ	-	920*	460**	-
H ₂ O ₂ 10 mM	-	-	460**	920

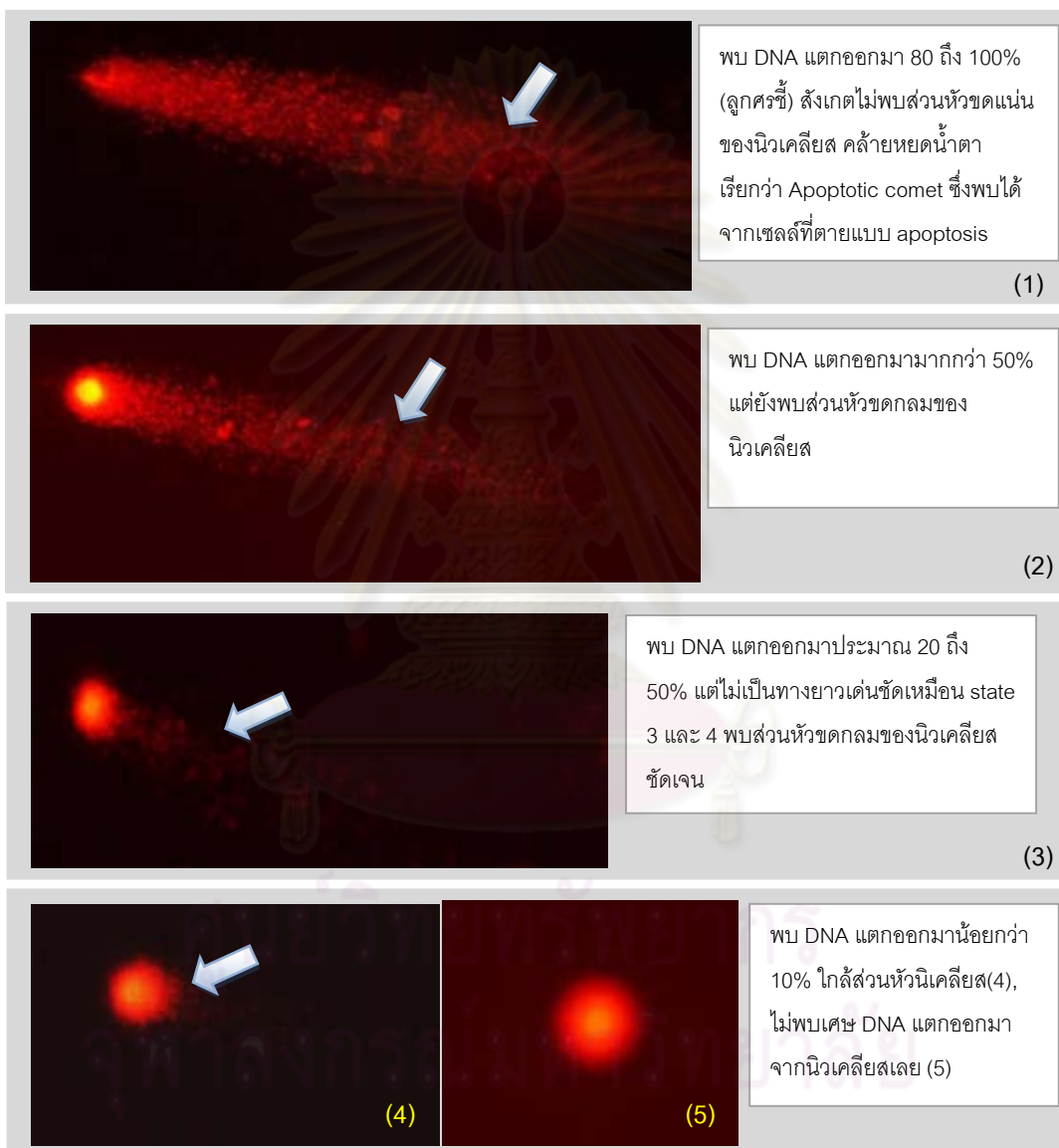
เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน ตั้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 4 °C ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วปั่นนำตะกอนเซลล์มาทำการทดสอบต่อ

* สารสกัดข้าวเหนียวดำใช้ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1000 μ g/ml

** ความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นที่ใช้เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากัน

3.1.5 ล้างสไลด์ด้วย neutralization buffer 3-4 ครั้ง ย้อมสไลด์ด้วยเอทีเดียมโบรมาดัยแล้วส่องดูใต้กล้องฟลูออโรเรสซัน โดยสู่มนั้บคะแนนด้วย ระบบ microscope digital camera system ที่กำลังขยาย 200x เท่าทั้งหมด 200 นิวเคลียสโดยหลักการให้คะแนนเป็นดังภาพที่ 3.6 คือ 0(N0) = ไม่เห็นหาง, 1(N1) = มีหางเล็กมาก, 2(N2) = เห็นหางเล็กๆ ออกจากนิวเคลียส, 3(N3) = เห็นหางออกจากนิวเคลียสชัดเจน และ 4(N4) = DNA ทั้งหมดอยู่ที่หาง คะแนนจะอยู่ระหว่าง 0 ถึง 800 โดยคะแนนมากแสดงว่ามีการทำลายสารพันธุกรรมมาก โดยสามารถคำนวณ %การทำลายสารพันธุกรรมได้จากสูตร

$$\text{Total damage (\%)} = (N0 \times 0) + (N1 \times 1) + (N2 \times 2) + (N3 \times 3) + (N4 \times 4)$$



ภาพที่ 3.6: ภาพลักษณะ DNA ที่วิ่งออกมาจากนิวเคลียสเมื่อทำการวิ่งแยกบนสนามไฟฟ้า สามารถแบ่งเป็นระดับต่างๆ ได้ 5 ระดับคือ ระดับ 4 = DNA ทั้งหมดอยู่ที่หางไม่เห็นนิวเคลียสหลงเหลือ (1), ระดับ 3 = เห็นหางออกจากนิวเคลียสชัดเจนเป็นหางยาว (2), ระดับ 2 = เห็นหางเล็กๆ ออกจากนิวเคลียส (3) , ระดับ 1 = มีหางเล็กมากกระจุกอยู่ใกล้นิวเคลียส (4) , และระดับ 0 = นิวเคลียสเป็นก้อนกลมไม่เห็นหาง (5)

3.2. การตรวจวัดความสามารถในการป้องกันโปรตีนเสียสภาพจากสารออกซิไดซ์โดยใช้โปรตีนฮีมี (Heme) เป็นแบบ ด้วยวิธี Heinz body Inhibition assay⁽⁵⁾

N-acetylphenylhydrazine (APHZ) เป็นสารผลิต intermediate ของอนุมูลอิสระไปออกซิไดซ์กรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid) บนผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระไปออกซิไดซ์ฮีโมโกลบินที่มีธาตุเหล็ก (Fe^{2+}) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีมากในเม็ดเลือดแดง โดย Fe^{2+} จะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้โมเลกุลของฮีโมโกลบินผิดปกติมากขึ้นแล้วจับตัวตกตะกอนเกาะบนผนังเม็ดเลือดแดงเรียกว่า Heinz body พบมากในผู้ป่วยโรคโลหิตจาง (hemolytic anemia) หรือได้รับสารพิษ เช่น Nitrobenzene ดังภาพที่ 3.7A โดยการทดสอบนี้จะเป็นตัวบ่งชี้ภาวะการเกิด Oxidative stress ของโปรตีน

3.2.1 เตรียมสารก่อนการทดสอบ ดังนี้

3.2.1.1 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 1/15 โมล 1.3 ส่วนและ Na_2HPO_4 1/15 โมล 8.7 ส่วน, pH 7.4 กลูโคส 200 mg%

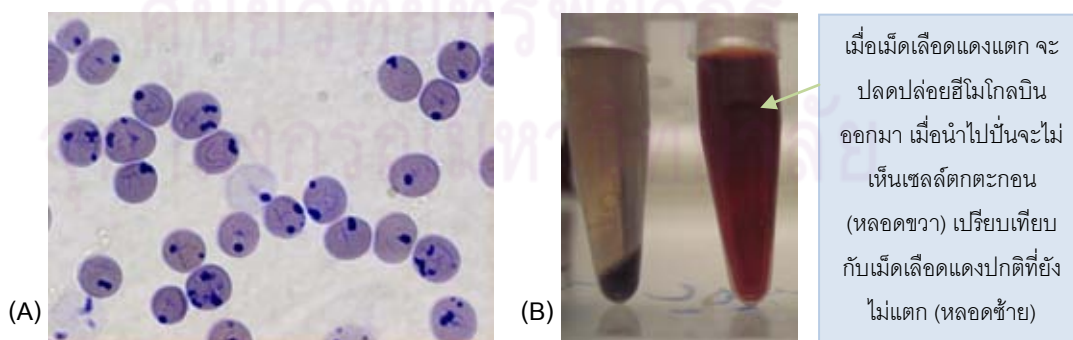
3.2.1.2 APHZ 100 mg% ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์

3.2.1. 3 คลิสตัลไวโอเล็ต 1 g% (w/v) ใน 0.73% NaCl

3.2.2 เจาะเลือดโดยใช้เฮปารินเป็นสารกันเลือดแข็ง ก่อนการทดลองไม่เกิน 2-3 ชั่วโมง บั่นที่ 1500 rpm เป็นเวลา 2-3 นาทีให้เม็ดเลือดแดงตกตะกอนแล้วดูเฉพาะส่วนเม็ดเลือดแดง 100 μ l ผสมกับสาร ดังตารางที่ 3.5 คือ 1) สารสกัดข้าวเม็ลด์สีความเข้มข้น 100, 200, 400, 600, 800 และ 1000 μ g/ml ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2) สารสกัดข้าวเม็ลด์สีความเข้มข้น 100, 200, 400, 600, 800 และ 1000 μ g/ml ผสมพร้อมทั้ง APHZ 100 mg% 3) APHZ 100 mg% (Positive control) 4) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Negative control) ปริมาตรสุดท้ายทั้งหมดเท่ากับ 2 ml

3.2.3 เขย่าหลอดทดลองใน waterbath ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงโดยใช้ pipette เป่าให้อากาศถ่ายเททุกๆ 30 นาที

3.2.4 ดูดน้ำเลือดจากหลอดทดลองมาหยดบนสไลด์แล้วย้อมด้วยคลิสตัลไวโอเล็ตปริมาณเท่ากันเป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้องแล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า นับเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 1000 เซลล์ ผลที่ได้จะรายงานเป็นเปอร์เซ็นต์ของ Heinz body formation



ภาพที่ 3.7: ลักษณะ Heinz body ที่เกิดขึ้นในเม็ดเลือดแดง (A), ลักษณะสารละลายเมื่อเม็ดเลือดแดงแตกปลดปล่อยฮีโมโกลบินออกมา(หลอดทดลองทางขวา) เมื่อนำไปปั่นเพื่อให้เซลล์ตกตะกอน จะไม่เห็นเซลล์เม็ดเลือดแดงตกตะกอนดังเช่นหลอดทดลองทางซ้าย (B)

ตารางที่ 3.5: ขั้นตอนการเตรียมสารเพื่อตรวจวัดค่าการป้องกันโปรตีนและไขมันบนผนังเซลล์เสียสภาพจากอนุมูลอิสระด้วยวิธีการ Heinz body inhibition assay และ Hemolysis inhibition assay

Reagents	Negative Control (µl)	Sample (µl)				Positive Control (µl)		Hemolysis reference (µl)
		Heinz body inhibition assay ^a		Hemolysis inhibition assay ^b		Heinz body inhibition assay	Hemolysis inhibition assay	
		เท่านั้น	พร้อม AAPH	เท่านั้น	พร้อม APHZ			
เลือดครบ	100	100	100	100	100	100	100	100
PBS, pH 7.4	900 ^b 1900 ^a	-	-	-	-	-	-	-
สารสกัดข้าวเหนียวดำ	-	900*	450**	1800*	900**	-	-	-
AAPH	-	-	-	-	900**	-	900	-
APHZ	-	-	450**	-	-	900	-	-
น้ำ Milli-Q	-	-	-	-	-	-	-	900
เขย่าเบาๆ ให้เข้ากันและตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ในที่มี مدتตามเวลาที่กำหนด ปั่นน้ำตะกอนเซลล์มาทำการทดสอบต่อไป								

a= ปริมาตรสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 2 ml

b= ปริมาตรสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 1 ml

* สารสกัดข้าวเหนียวดำใช้ความเข้มข้น 100, 200, 400, 600, 800 และ 1000 µg/ml

** ความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นที่ใช้เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากัน

3.3. การตรวจวัดความสามารถในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไขมันจากสารออกซิไดซ์โดยใช้ผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงเป็นแบบ ด้วยวิธี Hemolysis Inhibition assay⁽⁶⁾

สาร 2 ,2-Azobis (2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH) ซึ่งเป็นสารกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระเข้าทำลายชั้นไขมัน (lipid peroxidation) ของผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงทำให้เม็ดเลือดแดงแตกและปล่อยฮีโมโกลบินที่อยู่ภายในเซลล์ออกมา ข้อดีของวิธีนี้คือเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกต่อการทดสอบอีกทั้งให้ผลที่ใกล้เคียงกับความเป็นจริงอีกด้วย

3.3.1 เตรียมสารก่อนการทดลองดังนี้

3.3.1.1. AAPH ความเข้มข้น 200 mM ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 7.4

3.3.2 เจาะเลือด ใส่หลอดเหบบารินเป็นสารกันเลือดแข็งก่อนการทดลองไม่เกิน 2-3 ชั่วโมง แล้ว ปั่นที่ 1500 rpm เป็นเวลา 2-3 นาทีจนเม็ดเลือดแดงตกตะกอน ดูเฉพาะส่วนเม็ดเลือดแดงไปทำการทดสอบโดย เติมน้ำเม็ดเลือดแดง 100 µl ผสมสาร ดังตารางที่ 3.5 ดังนี้ 1) สารสกัดความเข้มข้นสุดท้าย 100, 200, 400, 600, 800

และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ 2) สารสกัดความเข้มข้นสุดท้าย 100, 200, 400, 600, 800 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ ผสมพร้อมกับ AAPH ความเข้มข้น 100 mM ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3) AAPH ความเข้มข้น 100 mM โดยในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Positive control) 4) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Negative control) 5) น้ำกลั่นแทนสภาวะที่เม็ดเลือดแดงแตกตัว สมบูรณ์ ปริมาตรสุดท้ายทั้งหมดเท่ากับ 1 ml นำไปเขย่าใน waterbath ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ณ บริเวณที่มีอากาศถ่ายเทเป็นเวลา 240 นาที

3.3.3 ทุกครั้งที่ครบเวลาที่ 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 นาที ดูดสารละลายเลือดจากหลอดทดสอบมา 100 μl ผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์เย็น 4 องศาเซลเซียส เพื่อหยุดปฏิกิริยาแล้วปั่นที่ 3500 rpm เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อให้เม็ดเลือดแดงและเศษเซลล์ตกตะกอน ดูดส่วนน้ำด้านบนไป อ่านการดูดกลืนแสงที่ความยาวแสง 540 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

4. การทำปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดกับเซลล์เพาะเลี้ยง

การเพาะเลี้ยงเซลล์⁽²⁷¹⁾

เซลล์มะเร็งตับ HepG2 เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)⁽²⁷²⁾ ส่วนเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat และเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ PBMC เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 โดยทั้งคู่จะเติมซีรัม 10% และยาต้านแบคทีเรีย (100 Unit/100 $\mu\text{g/ml}$ Penicillin-Streptomycin) 1% และยาด้านเชื้อรา (0.25 $\mu\text{g/ml}$ Fungizone Amphotericin B) 0.1% และเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้อบเพาะเลี้ยง CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ในกรณี PBMC จะกระตุ้นการแบ่งตัวด้วย Phytohemagglutinin (PHA) ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ ก่อนทำการทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การเก็บรักษาเซลล์เพาะเลี้ยง

การแช่แข็งเซลล์ (Freezing Cell)

เตรียมเซลล์ที่ต้องการแช่แข็งโดยใช้หลอด cryovial ซึ่งหนึ่งหลอดจะเก็บได้ประมาณ 2-5 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร เริ่มต้นโดยผสมเซลล์กับซีรัมเย็น 925 μl แล้วค่อยๆ เติม DMSO ซึ่งใช้เป็นสารป้องกันเซลล์จากเกล็ดน้ำแข็ง 75 μl ทำการแช่แข็งเซลล์อย่างช้าๆ โดยย้ายเซลล์เข้าตู้เย็นเป็นลำดับดังนี้ เก็บหลอดไปที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีแล้วย้ายไปที่ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 วัน แล้วย้ายไปที่ -39 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 วัน แล้วย้ายไปที่ -80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน สุดท้ายจึงนำเข้าถังไนโตรเจนเหลว -190 องศาเซลเซียสเก็บเซลล์ได้นานหลายปี

การละลายเซลล์ (Thawing Cell)

นำหลอด cryovial ออกจากถังไนโตรเจนเหลว อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสประมาณ 1 นาที จนเห็นซีรัมเริ่มละลาย เททั้งหมดใส่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้ก่อนแล้ว 5 ml แล้วปั่นที่ความเร็ว 1500 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารเก่าทิ้งแล้วเก็บเฉพาะเซลล์ เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ 5 ml ลง flask เลี้ยงเซลล์ต่อไป

การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อใช้ในการทดลอง

เพาะเลี้ยงเซลล์กับสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นต่างๆ และสารละลายอื่นๆ ตามเวลาที่กำหนด ดังตารางที่ 3.6 ณ ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ มีด อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาจึงนำเซลล์ไปทำการทดสอบต่อไป

ตารางที่ 3. 6: จำนวนเซลล์ ขนาดจานเลี้ยงเซลล์ และเวลาที่ใช้ในการทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำ ของเซลล์ชนิดต่างๆ คือ เซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง HepG2, Jurkat และเซลล์ปกติเพาะเลี้ยง PBMCs

ขนาดจานเลี้ยง	ปริมาตรต่อหลุม	เวลาในการบ่มกับสารสกัดจากข้าว**						
		HepG2		Jurkat			PBMC	
		29 ชั่วโมง	58 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
6 well plate	5 มิลลิลิตร	1×10^6	-	-	-	-	-	-
12 well plate	2 มิลลิลิตร	-	-	1×10^5	5×10^4	2.5×10^4	-	-
96 well plate	200 ไมโครลิตร	1×10^4	5×10^3	1×10^4	5×10^3	-	2×10^5	1×10^5

* ปริมาณเซลล์ต่อจานเลี้ยง

*เพื่อให้จำนวนเซลล์สุดท้ายของทุกเวลามีปริมาณเท่ากันจึงเริ่มต้นเพาะเลี้ยงด้วยจำนวนที่แตกต่างกัน โดยคำนวณจำนวนเซลล์สุดท้ายจากสูตร จำนวนเซลล์สุดท้าย=จำนวนเซลล์เริ่มต้น $\times 2^{\text{[เวลาที่เลี้ยงเซลล์/เวลา doubling time]}}$

** เวลาที่ใช้ในการทดสอบเซลล์กับสารสกัดข้าวเหนียวดำจะกำหนดตามเวลา Doubling time ของเซลล์แต่ละชนิด

ตารางที่ 3.7: ขั้นตอนการเตรียมสารเพื่อตรวจวัดผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำต่อการรอดของเซลล์ในการทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี MTT assay, NR assay, Trypan Blue dye exclusion assay และเพื่อตรวจวัดผลต่อค่า Oxidative stress ภายในเซลล์ในการทดสอบด้วยวิธี DCFH-DA assay

Reagents	Negative control (-) (μ)	Positive control (+) (μ)		Sample (μ)			ทดสอบตัวทำละลายที่ใช้ (μ)
		MTT assay NR assay ^a และ Trypan Blue dye exclusion ^b	DCFHDA assay	MTT assay NR assay ^a และ Trypan Blue dye exclusion ^b	DCFHDA assay		
					เท่านั้น	พร้อมสารพิษ	
เซลล์เพาะเลี้ยง	200	$150^a / 1500^b$	150	$150^a / 1500^b$	150	150	150
PBS, pH 7.4	-	-	-	-	-	-	50
สารสกัดข้าวเหนียวดำ	-	-	-	$50^a / 500^b$	50	25	-
H ₂ O ₂ ความเข้มข้น 25 mM ^c หรือ 0.25 mM ^d	-	$50^a / 500^b$	50	-	-	25	-

a=ปริมาตรสุดท้ายของปฏิกิริยาเท่ากับ 200 μ b=ปริมาตรสุดท้ายของปฏิกิริยาเท่ากับ 2 ml c= H₂O₂ ความเข้มข้น 25 mM ใช้เป็นกลุ่มควบคุมบวกในการทดสอบด้วยวิธี MTT assay, NR assay และ Trypan Blue dye exclusion d= H₂O₂ ความเข้มข้น 0.25 mM ใช้เป็นกลุ่มควบคุมบวกในการทดสอบด้วยวิธี DCFH-DA assay

4.1 การตรวจวัดการทำงานของเซลล์เพื่อการดำรงชีวิต (Cellular Metabolism) โดยการตรวจวัดความสามารถในการเมแทบอลิซึมของไมโทคอนเดรีย (Metabolic capacity) ด้วยวิธี MTT assay

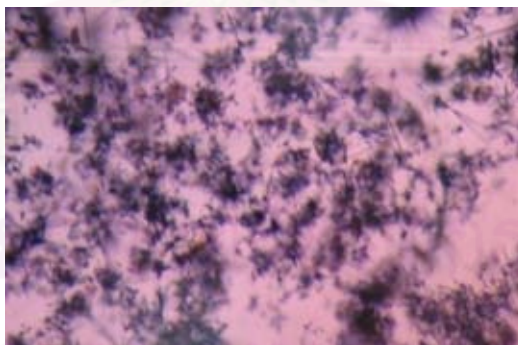
MTT assay เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจวัดความอยู่รอดของเซลล์ โดยวิธีนี้จะขึ้นกับปริมาณสารรีดิวซ์คือ NADPH ซึ่งเกิดจากการขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ที่สะสมอยู่ภายในเซลล์และเอนไซม์ที่ผลิตจากบริเวณผนังด้านในของไมโทคอนเดรียและเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม ซึ่งจะหลั่งออกมาทำปฏิกิริยากับสารละลายน้ำสีเหลือง 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) ที่แพร่เข้าไปในเซลล์โดยมี NADPH เป็นตัวบริจาคอิเล็กตรอนให้ เกิดเป็นสารประกอบสีม่วงดำที่ไม่ละลายน้ำ ปริมาณตะกอนจะแปรผันตรงกับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่และเป็นวิธีที่มีประโยชน์ในการตรวจวัดเซลล์ที่ไม่เจริญเติบโตแต่ทว่ายังมีชีวิตอยู่⁽²⁷³⁻²⁷⁴⁾

4.1.1 เตรียมสารก่อนการทดลองดังนี้

4.1.1.1 สารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 mg/ml ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 7.5

4.1.2 เพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2, Jurkat และ PBMCs ในจานขนาด 96 หลุมกับสารทดสอบ ดังตารางที่ 3.7 ดังนี้ 1) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2) สารสกัดจากข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 µg/ml ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3) H₂O₂ ความเข้มข้น 25 mM (Positive control) 4) อาหารเลี้ยงเซลล์ (Negative control) ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, CO₂ 5% เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงสำหรับเซลล์ Jurkat และ PBMCs และ 29 และ 58 ชั่วโมงสำหรับเซลล์ HepG2

4.1.3 หลังจากบ่มกับสารสกัดข้าวเหนียวดำครบตามเวลาที่กำหนด เติมสารละลาย MTT reagent 20 µl ลงไป แล้ววางในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, CO₂ 5% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะเห็นตะกอนสีม่วงดำไม่ละลายน้ำ ดังภาพที่ 3.8



ภาพที่ 3.8: ลักษณะของตะกอนสีม่วงดำที่ไม่ละลายน้ำเมื่อทดสอบการอยู่รอดของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT

4.1.4 ปั่นถาดเลี้ยงเซลล์ที่ความเร็ว 2500 rpm เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อให้เซลล์ทั้งหมดตกตะกอนอยู่ที่พื้น ดูดส่วนน้ำ supernatant ด้านบน 150 µl ทิ้งแล้วเติมตัวทำละลายผสมของ 50 % เอทานอลกับ 50 % DMSO ปริมาณเท่ากันลงไป ดูดขึ้นลงเบาๆ จนไม่เห็นตะกอน

4.1.5 ปั่นถาดเลี้ยงเซลล์อีกครั้งที่ความเร็ว 2500 rpm เป็นเวลา 10 นาทีแล้วดูดส่วนน้ำ supernatant 100 µl ไปอ่านการดูดกลืนแสงที่ความยาวแสง 550 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์และคำนวณดังนี้

$$\text{การอยู่รอดของเซลล์ (\% Cellular viability)} = \frac{\text{ความเข้มสีที่วัดจากตัวอย่าง} \times 100}{\text{ความเข้มสีที่วัดจากกลุ่มควบคุม}}$$

4.2 การตรวจวัดจำนวนเซลล์มีชีวิตและการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Cell proliferation) ด้วยวิธี Trypan Blue Dye Exclusion Method⁽²⁷⁵⁾

Trypan Blue Dye Exclusion Method เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ประเมินความเสียหายของเซลล์ นั่นคือ ขณะที่ผนังเซลล์ได้รับความเสียหายหรือเซลล์ตายจะทำให้ผนังเซลล์ไม่สามารถควบคุมการเข้าออกของสารต่างๆ ได้อีก ดังนั้นสี Trypan Blue จึงสามารถผ่านผนังเซลล์เข้าไปจับกับโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์เมื่อมองจากกล้องจุลทรรศน์จึงเห็นเซลล์เหล่านั้นมีสีฟ้าของ Trypan Blue ในขณะที่เซลล์ที่มีสุขภาพดีจะไม่ติดสีดังกล่าว

4.2.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ Jurkat ลงบนจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 12 หลุมกับสารทดสอบ ดังตารางที่ 3.7 ดังนี้ 1) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2) สารสกัดจากข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 $\mu\text{g/ml}$ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3) H_2O_2 ความเข้มข้น 25 mM (Positive control) 4) อาหารเลี้ยงเซลล์ (Negative control) ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีความเข้มข้น CO_2 5% เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

4.2.2 ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 1500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดเซลล์มา 20 μl ผสมกับสี Trypan Blue 80 μl (หรือในอัตราส่วนเซลล์ต่อสี 1:5) แล้วนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ไม่มีชีวิตและเซลล์ทั้งหมดด้วย Hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดากำลังขยาย 400 เท่าแล้วคำนวณร้อยละเซลล์ที่มีชีวิตดังนี้

$$\text{ร้อยละเซลล์ที่มีชีวิต (\% Live cells viability)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \times 100$$

4.3 การตรวจวัดกิจกรรมของเซลล์ (Cellular activity) โดยการตรวจวัดความสามารถในการเก็บกักเม็ดสี ด้วยวิธี Neutral Red accumulation assay⁽²⁷⁶⁾

สี Neutral Red (3-amino-7-dimethyl-2-methylphenazine hydrochloride) เป็นสีที่มีประจุลบอ่อนๆ ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ สีจะเข้าเซลล์โดยการจับกับโปรตีนของเซลล์เองซึ่งเป็นขบวนการที่ต้องใช้พลังงาน ATP จากกระบวนการเมแทบอลิซึม สีจะเข้าไปเกาะกับสายโพลีแซคคาไรด์ซึ่งมีความเป็นกรดอ่อนๆ ที่ติดอยู่บนผิวไลโซโซมหรือเข้าจับกับโปรตอนในก้อนกรดไลโซโซมติดอยู่ภายในเซลล์ หากเซลล์ถูกทำลายหรือตายจะไม่มีพลังงานในการเก็บกักสีดังกล่าวหรือสีจับกับเข้าไปจะหลุดออกจากถุงในไซโทพลาซึมผ่านผนังเซลล์ออกมาเนื่องจากผนังเซลล์เสียหายไม่สามารถกักเก็บสีไว้ในเซลล์ต่อไปได้

4.3.1 เตรียมสารก่อนการทดลองดังนี้

4.3.1.1 สารละลายสี Neutral Red ความเข้มข้น 4 mg/ml ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 7.5

4.3.1.2 สารละลาย 0.5% ฟอร์มาดีไฮด์, 1% แคลเซียมคลอไรด์

4.3.1.3 สารละลาย 1% เกซียลแอสติติกเอซิก, 50% เอทานอล

4.3.2 เพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 ลงบนจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม กับสารทดสอบ ดังตารางที่ 3.7 ดังนี้ 1) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2) สารสกัดจากข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 2000 และ 3000 $\mu\text{g/ml}$ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3) H_2O_2 ความเข้มข้น 25 mM (Positive control) 4) อาหารเลี้ยงเซลล์ (Negative control) ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีความเข้มข้น CO_2 5% เป็นเวลา 29 และ 58 ชั่วโมง

4.3.3 หลังจากบ่มกับสารสกัดครบตามเวลาที่กำหนด ดูดน้ำด้านบนออก 100 μl แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสี Neutral Red กลับไปในปริมาณเท่าเดิมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4.3.4. คว่ำจานเพื่อเอาสี่ส่วนเกินออกแล้วล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 0.5% พอร์มาดีไฮด์, 1% แคลเซียมคลอไรด์ 50 μM ซึ่งสารละลายนี้จะช่วยส่งเสริมเซลล์ให้เกาะกับพื้นที่ยิ่งขึ้นไม่หลุดไปกับการล้างเซลล์และจะเห็นตะกอนสีชมพูภายในเซลล์

4.3.5. เติมตัวทำละลายตะกอน 1% เกซีเยลแอซิดิกเอซิก, 50% เอทานอล 200 μL ลงไปแล้วเขย่าเบาๆ ให้ตะกอนละลายหมด

4.3.6. บั่นจานที่ความเร็ว 2500 rpm เป็นเวลา 10 นาทีแล้วดูดส่วนน้ำด้านบน 100 μL ไปอ่านการดูดกลืนแสงที่ความยาวแสง 550 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์และคำนวณดังนี้

$$\text{การอยู่รอดของเซลล์ (\% Cellular viability)} = \frac{\text{ความเข้มสีที่วัดจากตัวอย่าง}}{\text{ความเข้มสีที่วัดจากกลุ่มควบคุมลบ}} \times 100$$

4.4 การตรวจวัดค่าความเครียดออกซิเดชัน (Oxidative Stress) จากเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงด้วยวิธี DCFH-DA assay ⁽²⁷⁷⁻²⁸¹⁾

DCFH-DA assay เป็นเทคนิคที่นิยมในการตรวจวัดระดับ ROS ภายในเซลล์กันมาก สาร DCFH-DA (Dichlorofluorescein-diacetate) สามารถผ่านเข้าเซลล์ได้ด้วยกระบวนการแพร่ผ่าน เมื่อเข้าไปอยู่ในเซลล์แล้ว DCFH-DA จะถูกเอนไซม์ esterase ภายในเซลล์ตัดหมู่อะซิเตตออกกลายเป็น DCFH ซึ่งไม่สามารถออกจากเซลล์ได้และจะถูกออกซิไดซ์ต่อไปโดยสารออกซิเดนท์ทั้งหมดภายในเซลล์ได้แก่ ONOO^- , $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} และ lipid hydroperoxides เปลี่ยนเป็นสารเรืองแสง 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) สามารถวัดการเรืองแสงด้วยเครื่องฟลูออโรมิเตอร์โดยใช้ความยาวคลื่นแสงกระตุ้นที่ 485 นาโนเมตรและวัดการเรืองแสงที่ 535 นาโนเมตร

4.4.1 เตรียมสารก่อนการทดลองดังนี้

4.4.1.1 DCFH-DA dye ความเข้มข้น 10 mM ในเอทานอลบริสุทธิ์

4.4.2 เพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2, Jurkat ในจานขนาด 96 หลุมกับสารทดสอบ ดังตารางที่ 3.7 ดังนี้ 1) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2) สารสกัดจากข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 50, 100, 200, 400, 600, 800 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3) H_2O_2 ความเข้มข้น 0.25 mM (Positive control) 4) อาหารเลี้ยงเซลล์ (Negative control) ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีความเข้มข้นของ CO_2 5% เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงสำหรับเซลล์ Jurkat และ 29 และ 58 ชั่วโมงสำหรับเซลล์ HepG2

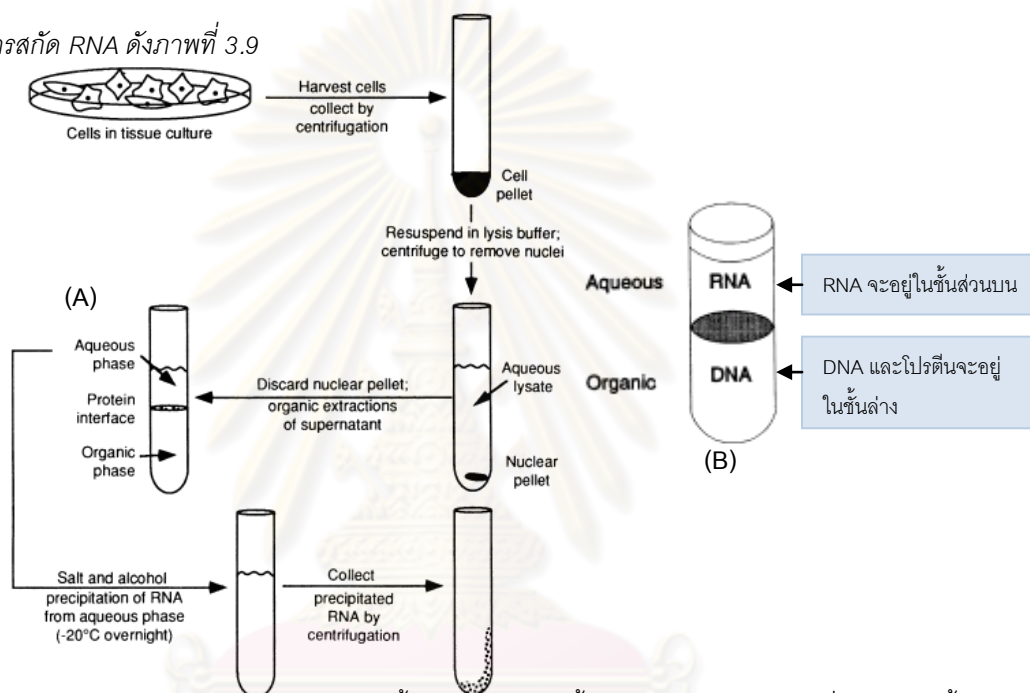
4.4.3 บั่นล้างเซลล์ที่ความเร็ว 2500 rpm เป็นเวลา 10 นาทีด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 7.4 2-3 ครั้งแล้วดูดน้ำส่วนบน 100 μL ทั้ง เติม DCFH-DA 100 μM ปริมาณเท่าเดิมลงไป วางในตู้อบเพาะเลี้ยง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีความเข้มข้น CO_2 5% และมีดเป็นเวลา 90 นาที

4.4.4 บั่นล้างเซลล์ที่ความเร็ว 2500 rpm เป็นเวลา 10 นาทีด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 7.4 2 ครั้งแล้วนำไปเซลล์ไปอ่านการเรืองแสงโดยใช้ความยาวคลื่นแสงกระตุ้น 485 นาโนเมตรและความยาวคลื่นแสงดูดกลืน 535 นาโนเมตรด้วยเครื่องฟลูออโรมิเตอร์

5. การทดสอบผลกระทบของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อการแสดงออกยีนที่เกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมไขมันด้วยวิธี RT-PCR⁽²⁸²⁾

ในการตรวจวัดอิทธิพลของสารสกัดข้าวเหนียวดำต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานและกิจกรรมของเซลล์นั้น ปัจจุบันนิยมตรวจวัดด้วยเทคนิคทางอณูชีวภาพ เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไว ให้ผลเที่ยงตรงและสะดวกมากกว่าวิธีในอดีต สามารถตรวจวัดได้ลึกถึงระดับการแสดงออกของยีนถอดรหัสโปรตีนที่สนใจศึกษา ในการทดลองนี้จะเปรียบเทียบปริมาณ mRNA ของยีนที่สนใจเป็นตัวบ่งชี้โดยใช้วิธีคือ Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction assay ซึ่งจะทำการเปลี่ยน mRNA ทั้งหมดภายในเซลล์ให้เป็น cDNA ก่อนแล้วจึงใช้ primer จำเพาะจับเพื่อเพิ่มชิ้นยีนที่สนใจเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม

5.1 การสกัด RNA ดังภาพที่ 3.9



ภาพที่ 3.10: วิธีการสกัด RNA จากเซลล์เพาะเลี้ยง (A), การแยกชั้นของ DNA และ RNA เมื่อสกัดด้วยน้ำยาฟีนอล-คลอโรฟอร์ม (B)⁽¹⁴⁾

5.1.1 เตรียมสารก่อนการทดสอบดังนี้

5.1.1.1 ไอโซไพพานอลบริสุทธิ์คุณภาพ 4 องศาเซลเซียส

5.1.1.2 70% เอทานอลอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.1.1.3 สารละลายคลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.1.1.4 ก่อนการทดสอบในขั้นตอนนี้จำเป็นต้องล้างอุปกรณ์จำพวกแก้วด้วย Diethyl pyrocarbonate (DEPC) ซึ่งเป็น Anti-RNase agent ความเข้มข้น 0.1% ก่อนข้ามคืน น้ำกลั่นทั้งหมดที่ใช้ในปฏิบัติการก็จะต้องผสมกับ DEPC ก่อนเช่นกันเรียกว่า DEPC-treated water จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมงเพื่อฆ่าเชื้อและกำจัด DEPC ที่

5.1.2 เพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 ลงบนจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุมสารทดสอบ ดังตารางที่ 3.8 ดังนี้ 1) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2) สารสกัดจากข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 200, 400 และ 600 µg/ml ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3) อาหาร

เลี้ยงเซลล์ (Negative control) ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีความเข้มข้นของ CO₂ 5% เป็นเวลา 29 ชั่วโมง

5.1.3 ล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เย็นก่อน 1 ครั้งแล้วเติมน้ำยา Easy-Blue RNA extraction™ ปริมาตร 1 ml ลงไปในจานเลี้ยงเซลล์แล้วถ่ายสารละลายเซลล์นี้ใส่หลอดขนาด 1.5 ml เขย่าอย่างแรงจนไม่เห็นตะกอน เซลล์จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) เย็นลงไป 200 µl ต่อน้ำยา Easy-Blue RNA extraction™ 1 ml แล้วเขย่าอย่างแรงจากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 13000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5.1.4 สารละลายที่ได้จะแยกเป็นชั้นโดยชั้นล่างสุดคือชั้น organic phase (phenol-chloroform phase) ถัดขึ้นมาเป็นชั้น interphase และบนสุดคือชั้นน้ำที่ไม่มีสีเป็นชั้นของ aqueous phase ซึ่ง RNA จะอยู่ในชั้นนี้ ดังภาพที่ 3.8(B) ให้ดูเฉพาะส่วนน้ำใสชั้นบนสุดประมาณ 400 µl ใส่ในหลอดใหม่แล้วตกตะกอน RNA โดยเติม 100% ไอโซโพรพานอลเย็นลงไป 400 µl ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นความเร็ว 13,000 g นาน 5 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจะเห็นตะกอนสีขาวขุ่นที่ก้นหลอด ทั้งน้ำส่วนบนและล้างตะกอน RNA ให้บริสุทธิ์ด้วย 70% เอทานอลเย็นปริมาตร 1 ml ทำการล้างซ้ำ 3 รอบ

5.1.5 ตากตะกอน RNA ให้แห้งแล้วละลายด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase (DEPC-treated water) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนานไม่เกิน 5 นาทีเพื่อป้องกันการแตกสลายของ RNA ซึ่งสารละลาย RNA ที่สกัดได้นี้สามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสได้นานหลายเดือน

ตารางที่ 3.8: ขั้นตอนการเติมสารเพื่อตรวจวัดผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมไขมันในเซลล์ HepG2

Reagent**	Untreated (ml)	Sample (ml)
เซลล์เพาะเลี้ยง HepG2	2.5	2.5
อาหารเลี้ยงเซลล์	2.5	-
สารสกัดข้าวเหนียวดำ*	-	2.5
เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ มีด อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 29 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์ไปสกัด RNA ต่อไป		

*สารสกัดข้าวเหนียวดำใช้ความเข้มข้น 200, 400 และ 600 µg/ml

**ปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์และเซลล์สุดท้ายเท่ากับ 5 ml โดยในการทดลองนี้จะใช้อาหารเลี้ยงเซลล์เป็นตัวทำลายสารสกัดข้าวเหนียวดำ

5.2 การวัดความเข้มข้นของ RNA ที่สกัดได้ด้วยการวัดค่า OD (Optical Density)

แบ่ง RNA ที่สกัดได้มา 3 µl ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์เฉพาะสำหรับปริมาณ RNA โดยให้ค่า OD₂₆₀ ที่มีค่าเท่ากับ 1.00 เทียบได้กับปริมาณ RNA 40 µg/ml โดยมีต้องเจือจางด้วยน้ำกลั่นก่อนแต่อย่างใด โดยเครื่องจะทำการคำนวณความเข้มข้น RNA ที่สกัดได้ให้เลยจากสูตร $[RNA] = OD_{260} \times 40 \times \text{ค่าการเจือจาง} \times 10^{-3}$

5.3 การสร้าง cDNA จาก RNA

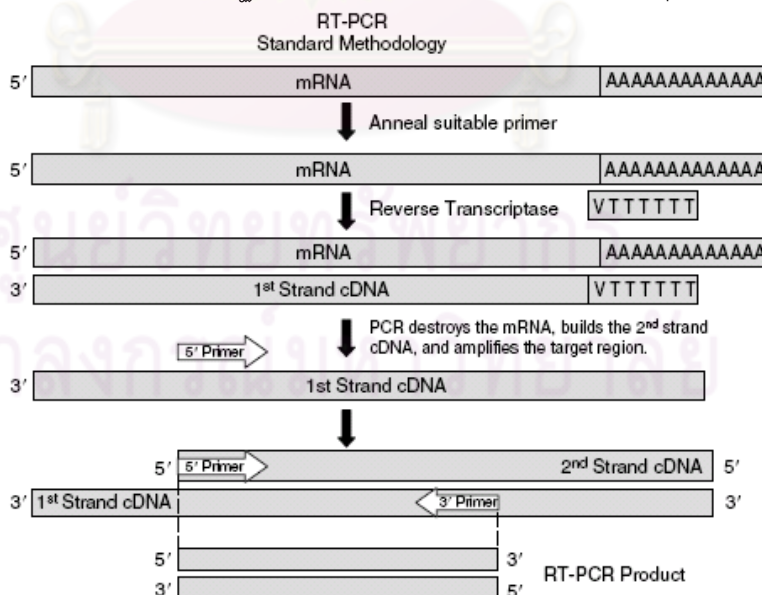
5.3.1 นำ RNA มาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ Deoxyribonuclease I (DNase I) เพื่อกำจัด DNA ที่อาจปนเปื้อนมาจากการสกัดโดยผสม RNA ความเข้มข้น 1 µg/µl กับสาร ดังตารางที่ 3.9 แล้วนำไปวางที่อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียสนาน 15 นาทีเมื่อครบเวลาให้หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNase I ด้วย 25 mM EDTA, pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

ตารางที่ 3.9: ขั้นตอนการเติมสารในการขจัด DNA ปนเปื้อนออกจากตัวอย่าง RNA ที่สกัดได้

Reagents	ความเข้มข้นเริ่มต้น	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกริยา (µl)
RNA	1 µg /µl	2
10x DNase I Reaction buffer	10x	1
DNase I	0.1 Unit/ml	1
น้ำ DEPC treated water	-	6
รวมปริมาณทั้งหมดเป็น 10 µl แล้วนำไปวางที่อุณหภูมิ 37°C นาน 15 นาที		
EDTA, pH 8.0	25 mM	1
ตั้งที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที		

5.3.2 นำ RNA ที่ได้ มาเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยาเปลี่ยน RNA เป็น cDNA โดยผสม RNA ต้นแบบจากขั้นตอนที่ 5.3.1 ปริมาตร 5 µl กับสาร ดังตารางที่ 3.10 แล้วตั้งที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส 5 นาทีเพื่อกระตุ้นให้ RNA คลายโครงสร้างมาจับกับ primer จากนั้นวางบนน้ำแข็งทันทีเพื่อมิให้ RNA กลับมาจับโครงสร้างแบบเดิมแล้วเติมน้ำยา ดังตารางที่ 3.10 ตั้งที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสก่อน 1-2 นาทีแล้วเติมเอนไซม์ Reverse Transcriptase จนรวมปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 µl ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยตั้งที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2-3 นาที แล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทดสอบต่อหรือเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ปฏิกริยาการสร้าง cDNA จาก mRNA อาจสรุปได้ ดังภาพที่ 3.10



ภาพที่ 3.10: การสร้าง cDNA จาก mRNA โดยสังเขปในกระบวนการ RT-PCR ที่ใช้ตรวจวัดการแสดงออกของยีนจากเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2⁽¹⁾

ตารางที่ 3.10: ขั้นตอนการเติมสารเพื่อเปลี่ยน RNA ที่สกัดได้ให้เป็น cDNA

Reagents	ความเข้มข้นเริ่มต้น	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกริยา (µl)
RNA	1 µg/µl	5
dNTPs	10 mM	1
Oligo-dT20mer	10 pM/µl	2
DEPC treated water	-	7
รวมปริมาณทั้งหมดเป็น 15 µl บ่มที่อุณหภูมิ 75 °C เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อกระตุ้นให้ RNA คลายโครงสร้างมาจับกับไพรเมอร์จากนั้นวางบนน้ำแข็งทันทีเพื่อมิให้ RNA กลับมาจับโครงสร้างแบบเดิม		
10x reaction buffer	500 mM Tris-HCl, 30 mM MgCl ₂ , 750mM KCl, 100 mM DTT	2
RNase inhibitor	40 Unit/µl	1
น้ำกลั่น DEPC-treated water	-	0.5
ตั้งที่อุณหภูมิ 42°C ก่อน 1-2 นาที		
เอนไซม์ Reverse Transcriptase	200 Unit/µl	1.5
รวมปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 µl ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 42°C ต่อไปอีกเป็นเวลา 60 นาที ทำการหยุดปฏิกริยาโดยตั้งที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 2-3 นาที นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทำ PCR ต่อหรือเก็บที่ -20°C		

5.4 การทดสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

การทำ PCR เพื่อศึกษา ผลการแสดงออกของยีน LDLR, HMG-CoA reductase, PPAR γ , PPAR α และ LXR α ของเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 โดยใช้ cDNA จากขั้นตอน 5.3.2 เป็นต้นแบบจำนวน 10 µl ผสมกับน้ำยา ดังตารางที่ 3.11 และ primer ที่จำเพาะสำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนสนใจศึกษา ดังตารางที่ 3.12 รวมปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 µl จากนั้นเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้เครื่อง ThermalCycler มีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยา ดังตารางที่ 3.13 แล้วตรวจสอบขนาดของชิ้น DNA ที่ได้ด้วยกระแสไฟฟ้าบน agarose gel ความเข้มข้น 2% ด้วยความต่างศักย์ 100 volt (gel electrophoresis) ย้อมด้วยสีเอทีเดียมโบรมาอิดและถ่ายภาพเจลที่ย้อมแล้วจากเครื่องถ่ายภาพเจลเปรียบเทียบความเข้มของชิ้นผลิตภัณฑ์ (product band) เพื่อดูระดับการแสดงออกของ mRNA เทียบกับชิ้นผลิตภัณฑ์ของยีนควบคุม (β -actin band)

ตารางที่ 3.11: ขั้นตอนการเติมสารเพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ของยีนที่สนใจศึกษา

Reagents	ความเข้มข้นเริ่มต้น	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกริยา (μl)
cDNA	0.5 μg/μl หรือประมาณ 10 ⁴ -10 ⁷ โมเลกุล	10
10x Reaction buffer	100 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl ₂ , 500 mM KCl, Enhancer solution	2
dNTPs	10 mM*	2
Primer จำเพาะ	10 pM	2**
น้ำ Milli-Q water	-	8.8
เอนไซม์ Taq-DNA polymerase***	5 Unit/μl	0.2
ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 μl จากนั้นเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้เครื่อง ThermalCycler		

*ความเข้มข้นสุดท้ายของ dNTPs จะต้องอยู่ระหว่าง 20-200 μM หากมีปริมาณ dNTPs มากเกินไปจะทำให้เอนไซม์ Taq DNA polymerase ทำงานผิดพลาด

** primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ที่สนใจจะมี 1 คู่ (2 เส้น: Forward และ Reverse) โดยจะใส่ในปฏิกริยาเส้นละ 1 μl รวม 2 μl

*** เอนไซม์ Taq DNA polymerase มีค่าครึ่งชีวิต 40 นาที ที่อุณหภูมิ 95°C

ตารางที่ 3.12: Primers* จำเพาะที่ใช้ในการตรวจวัดการแสดงออกของยีนและขนาดผลิตภัณฑ์ที่คาดว่าจะได้

ยีน	ลำดับเบส	ขนาดผลผลิต mRNA ที่จะได้
LDLR sense primer	5'-CAA TGT CTC ACC AAG CTC TG-3'	258 bp
LDLR anti-sense primer	5'-TCT GTC TCG AGG GGT AGC TG-3'	
HMGCoA-red sense primer	5'-CTT GTG TGT CCT TGG TAT TAG AGC TT-3'	247 bp
HMGCoA-red anti-sense primer	5'-TTA TCA TCT TGA CCC TCT GAG TTA CAG-3'	
PPARα sense primer	5'-AGT CTC CCA GTG GAG CAT TGA ACA-3'	728 bp
PPARα anti-sense primer	5'-ATA CGC TAC CAG CAT CCC GTC TTT-3'	
PPARγ sense primer	5'-AGC CTC ATG AAG AGC CTT CCA ACT-3'	434 bp
PPARγ anti-sense primer	5'-TGT CTT TCC TGT CAA GAT CGC CCT-3'	
LXRα sense primer	5'-AAC CCA CAG AGA TCC GTC CAC AAA-3'	818 bp
LXRα anti-sense primer	5'-ATT CAT GGC CCT GGA GAA CTC GAA-3'	
β-actin sense primer	5'-ACG GGT CAC CCA CAC TGT GC-3'	656 bp
β-actin anti-sense primer	5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT G-3'	

*ขนาด primer ที่ใช้ในการวิจัยนี้มีขนาดระหว่าง 18-28 base pair โดยใช้โปรแกรม Primer Quest และค่า melting temperature (T_m)

คำนวณจากสูตร $T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln(C)} - 273.15 + 16.6 \log[Na^+]$ และ $[Na^+] = 4 \times [Mg^{2+}]$

$$\Delta S + R \ln(C)$$

ตารางที่ 3.13: ปฏิบัติการและอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ของยีนที่สนใจศึกษา

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)						เวลา	No. cycle
	LDLR	HMGCoAR	LXR α	PPAR α	PPAR γ	β -actin		
Pre- Denature	94	94	94	94	94	94	4 min	1
Denature	94	94	94	94	94	94	30 sec	35
Annealing**	58.5	56.5	62.9	60.2	59.4	58	30 sec	
Extension	72	72	72*	72*	72	72*	30 sec/1 min*	
Final extension	72						7 min	1
Hold temp	4						forever	-

*ใช้เวลาในขั้นตอน Extension 1 นาทีเนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความยาวมากกว่า 500 base pair

**อุณหภูมิในขั้นตอน Annealing จะคำนวณโดยใช้โปรแกรม Oligo-PCR T₀^{OPT} Calculator จาก www.webu.co.uk

การวิเคราะห์ทางสถิติ

- 1) การทดสอบปริมาณและคุณภาพสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดข้าวเมลดัสทั้ง 3 กลุ่ม จะแสดงผลเป็นค่าสารต้านอนุมูลอิสระเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation) และคำนวณความสัมพันธ์ (Correlation) ด้วยสมการ linear regression และค่าประสิทธิสัมพันธ์ Person's correlation coefficient (r)
- 2) การทดสอบผลสารสกัดข้าวเหนียวดำในการป้องกันสารพิษกรรรมจากสารออกซิเดนท์ ที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ กับกลุ่มควบคุม แสดงผลเป็นคะแนน 0 ถึง 800 และคำนวณความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้สูตรสถิติ One-way ANOVA
- 3) การทดสอบผลสารสกัดข้าวเหนียวดำในการป้องกันโปรตีนฮีโมโกลบินและชั้นไขมันบนผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงจะแสดงผลร้อยละ Heinz body ที่เกิดขึ้นและการดูกลืนแสงของฮีโมโกลบินในสารละลายเจลลี่
- 4) การทดสอบผลสารสกัดข้าวเหนียวดำต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ปกติและเซลล์เพาะเลี้ยง แสดงผลเป็นค่า %Viability เฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และคำนวณความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ กับกลุ่มควบคุมโดยใช้สูตรสถิติ One-way ANOVA
- 5) การทดสอบผลสารสกัดข้าวเหนียวดำในการลดค่า Oxidative Stress ของเซลล์แสดงผลเป็นค่า %Oxidative Stress เฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและคำนวณความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ กับกลุ่มควบคุมโดยใช้สูตรสถิติ One-way ANOVA
- 6) การทดสอบผลสารสกัดข้าวเหนียวดำต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมไขมัน 5 ชนิด คือ LDLR, HMG-CoA reductase, PPAR γ , PPAR α และ LXR α ของเซลล์ตับ แสดงผลเป็นค่าการแสดงออกของยีนดังกล่าวกับยีนควบคุม β -actin ของเซลล์กลุ่มที่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นต่างๆ กับกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด (กลุ่มควบคุม) เป็นเท่าและคำนวณความแตกต่างระหว่างกลุ่มดังกล่าวโดยใช้ One-way ANOVA

การทดสอบทั้งหมดจะถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่า p -value น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05 (ความมั่นใจ 95 %) โดยใช้โปรแกรมคำนวณทางสถิติ SPSS เวอร์ชัน 15.0 (SPSS, สหรัฐอเมริกา) และแสดงผลเป็น รูป ตาราง และกราฟ โดยใช้โปรแกรม Microsoft office Excel เวอร์ชัน 2007 (Microsoft, สหรัฐอเมริกา)

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิจัย

4.1 ผลการตรวจวัดค่าสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดข้าวเม็ลต์สี 4 วิธี ดังนี้

การเปรียบเทียบปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระของข้าว 3 กลุ่ม คือ ข้าวเหนียวดำ ข้าวแดง และข้าวดำ อย่างละ 7 ชนิด รวม 21 ชนิด ที่ชื่อมาจากตลาดในกรุงเทพมหานคร จากการตรวจวิเคราะห์ 4 วิธี คือวิธี ORAC Assay, FCP Assay, Vanillin Assay และ TAC assay ค่าที่ได้แสดงใน ตารางที่ 4.1 ซึ่งทำการเปรียบเทียบปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดข้าว 3 กลุ่มที่ตรวจด้วยวิธีเดียวกัน เปรียบเทียบปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากข้าวกลุ่มเดียวกัน และหาค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างวิธี 4 วิธี โดย ORAC Assay เป็นวิธีการตรวจความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการกวาดจับอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity) Folin Ciocalteu Phenol Assay เป็นวิธีการตรวจความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์ (reducing property) Vanillin Assay เป็นวิธีการตรวจวัดปริมาณสารประกอบโปรแอนโทไซยานิน (Proanthocyanidins) ด้วยปฏิกิริยาเคมี และ TAC assay เป็นการวัดการดูดกลืนแสงของสีแอนโทไซยานินสีโดยตรงในสิ่งตัวอย่าง

4.1.1 เปรียบเทียบปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดข้าว 3 กลุ่มที่ตรวจด้วยวิธีเดียวกัน

4.1.1.1 ผลของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากข้าวตรวจด้วยวิธี ORAC Assay

กลุ่มข้าวเหนียวดำมีค่าสารต้านอนุมูลอิสระเฉลี่ย 1074.56 ± 83.95 mM TE/kg dry wt. ค่าน้อยที่สุดคือ 722.96 ± 15.50 mM TE/kg dry wt. ค่ามากที่สุดคือ 1368.34 ± 41.27 mM TE/kg dry wt. กลุ่มข้าวแดงมีค่าสารต้านอนุมูลอิสระเฉลี่ย 525.43 ± 46.33 mM TE/kg dry wt. ค่าน้อยที่สุด คือ 371.18 ± 27.11 mM TE/kg dry wt. ค่ามากที่สุดคือ 724.66 ± 51.52 mM TE/kg dry wt. กลุ่มข้าวดำมีค่าสารต้านอนุมูลอิสระเฉลี่ย 446.22 ± 20.98 mM TE/kg dry wt. ค่าน้อยที่สุดคือ 405.94 ± 54.66 mM TE/kg dry wt. ค่ามากที่สุดคือ 564.84 ± 36.68 mM TE/kg dry wt. เมื่อนำมาเปรียบเทียบกลุ่มข้าวแดงและข้าวดำมีปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่กลุ่มข้าวดำและข้าวแดงมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกัน ($p = 0.276$)

4.1.1.2 ผลของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากข้าวเมื่อตรวจด้วยวิธี FCP Assay

กลุ่มข้าวเหนียวดำมีปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระเฉลี่ย 702.46 ± 60.82 mM GE/kg dry wt. ค่าน้อยที่สุดคือ 471.88 ± 5.84 mM GE/kg dry wt. ค่ามากที่สุดคือ 922.03 ± 9.42 mM GE/kg dry wt. กลุ่มข้าวแดงมีค่าเฉลี่ย 385.77 ± 34.64 mM GE/kg dry wt. ค่าน้อยที่สุดคือ 233.38 ± 5.46 mM GE/kg dry wt. มากที่สุดคือ 516.83 ± 7.34 mM GE /kg dry wt. กลุ่มข้าวดำมีค่าเฉลี่ย 250.50 ± 18.91 mM GE /kg dry wt. ค่าน้อยที่สุดคือ 199.56 ± 2.40 mM GE /kg dry wt. ค่ามากที่สุดคือ 347.46 ± 1.39 mM GE/kg dry wt. เมื่อนำปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระมาเปรียบเทียบกันสารสกัดจากข้าว 3 กลุ่มมีปริมาณรวมสารต้าน

อนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ข้าวเหนียวดำมีสารต้านอนุมูลอิสระสูงสุดรองมาเป็นข้าวแดงและข้าวดำ

4.1.1.3 ผลของสารอนุมูลอิสระในสารสกัดจากข้าวเมื่อตรวจด้วยวิธี Vanillin assay

กลุ่มข้าวเหนียวดำมีปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระเฉลี่ย 166.74 ± 15.75 mM CE/kg dry wt. ค่าน้อยที่สุด 111.96 ± 2.37 mM CE/kg dry wt. ค่ามากที่สุด 218.97 ± 1.82 mM CE/kg dry wt. กลุ่มข้าวแดงมีค่าเฉลี่ย 70.62 ± 8.72 mM CE/kg dry wt. ค่าน้อยที่สุด 34.77 ± 0.17 mM CE/kg dry wt. ค่ามากที่สุด 102.88 ± 0.26 mM CE/kg dry wt. กลุ่มข้าวดำมีค่าเฉลี่ย 29.40 ± 8.40 mM CE/kg dry wt. ค่าน้อยที่สุด 16.77 ± 0.03 mM CE/kg dry wt. ค่ามากที่สุด 57.70 ± 2.25 mM CE/kg dry wt. เมื่อนำปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระมาเปรียบเทียบกันสารสกัดจากข้าว 3 กลุ่มมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ข้าวเหนียวดำมีสารต้านอนุมูลอิสระสูงสุดรองมาเป็นข้าวแดงและข้าวดำ

4.1.1.4 ผลของสารอนุมูลอิสระในสารสกัดจากข้าวเมื่อตรวจด้วยวิธี TAC Assay

กลุ่มข้าวเหนียวดำมีปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระเฉลี่ย 518 ± 41 mg/kg dry wt. ค่าน้อยที่สุด 393 mg/kg dry wt. ค่ามากที่สุด 690 mg/kg dry wt. กลุ่มข้าวแดงมีค่าเฉลี่ย 69.7 ± 11 mg/kg dry wt. ค่าน้อยที่สุด 39 mg/kg dry wt. ค่ามากที่สุด 116 mg/kg dry wt. กลุ่มข้าวดำมีค่าเฉลี่ย 157 ± 25 mg/kg dry wt. ค่าน้อยที่สุด 81 mg/kg dry wt. ค่ามากที่สุด 245 mg/kg dry wt. เมื่อนำปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระมาเปรียบเทียบกันสารสกัดจากข้าว 3 กลุ่มมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ข้าวเหนียวดำมีสารต้านอนุมูลอิสระสูงสุดรองมาเป็นข้าวดำและข้าวแดง

ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากข้าว 3 กลุ่มเมื่อตรวจด้วยวิธี ORAC assay มีความแตกต่างจากค่าเฉลี่ยสูงสุดกับค่าเฉลี่ยต่ำสุดประมาณ 2 เท่า ตรวจด้วยวิธี FCP assay มีความแตกต่างกันประมาณ 3 เท่า ตรวจด้วยวิธี Vanillin assay มีความแตกต่างกันประมาณ 5 เท่า และตรวจด้วยวิธี TAC assay มีความแตกต่างกันประมาณ 7 เท่า

4.1.2 เปรียบเทียบปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระระหว่างวิธี ORAC Assay, FCP Assay Vanillin assay และ TAC assay ในสารสกัดจากข้าวกลุ่มเดียวกัน

4.1.2.1. ผลปริมาณรวมสารอนุมูลอิสระในกลุ่มข้าวเหนียวดำ

ค่าปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจด้วยวิธี ORAC Assay ได้ค่าเฉลี่ย 1074.56 ± 83.95 mM TE/kg dry wt. ค่าน้อยที่สุด 722.96 ± 15.50 mM TE/kg dry wt. ค่ามากที่สุด 1368.34 ± 41.27 mM TE/kg dry wt. ตรวจด้วยวิธี FCP Assay ได้ค่าเฉลี่ย 702.46 ± 60.82 mM GE/kg dry wt. ค่าน้อยที่สุด 471.88 ± 5.84 mM GE/kg dry wt. ค่ามากที่สุด 922.03 ± 9.42 mM GE/kg dry wt. ตรวจด้วยวิธี Vanillin assay ได้ค่าเฉลี่ย 166.74 ± 15.75 mM CE/kg dry wt. ค่าน้อยที่สุด 111.96 ± 2.37 mM CE/kg dry wt. ค่ามากที่สุด 218.97 ± 1.82 mM CE/kg dry wt. และตรวจด้วยวิธี TAC assay ได้ค่าเฉลี่ย 518 ± 41 mg/kg dry wt. ค่าน้อยที่สุด 393 mg/kg dry wt. ค่ามากที่สุด 690 mg/kg dry wt. เมื่อเปรียบเทียบปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจด้วยวิธีต่างกัน 4 วิธี พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.1.2.2 ผลปริมาณรวมสารอนุมูลอิสระในกลุ่มข้าวแดง

ค่าปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจด้วยวิธี ORAC Assay ได้ค่าเฉลี่ย 525.43 ± 46.33 mM TE/kg dry wt. ค่าน้อยที่สุด 371.18 ± 27.11 mM TE/kg dry wt. ค่ามากที่สุด 724.66 ± 51.52 mM TE/kg dry wt. ตรวจด้วยวิธี FCP Assay ได้ค่าเฉลี่ย 385.77 ± 34.64 mM GE/kg dry wt. ค่าน้อยที่สุด 233.38 ± 5.46 mM GE/kg dry wt. ค่ามากที่สุด 516.83 ± 7.34 mM GE/kg dry wt. ตรวจด้วยวิธี Vanillin assay ได้ค่าเฉลี่ย 70.62 ± 8.72 mM CE/kg dry wt. ค่าน้อยที่สุด 34.77 ± 0.17 mM CE/kg dry wt. ค่ามากที่สุด 102.88 ± 0.26 mM CE/kg dry wt. และตรวจด้วยวิธี TAC assay ได้ค่าเฉลี่ย 69.7 ± 11 mg/kg dry wt. ค่าน้อยที่สุด 39 mg/kg dry wt. ค่ามากที่สุด 116 mg/kg dry wt. เมื่อเปรียบเทียบปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจด้วยวิธีต่างกัน 4 วิธี พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.1.2.3 ผลปริมาณรวมสารอนุมูลอิสระในกลุ่มข้าวดำ

ค่าปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจด้วยวิธี ORAC ได้ค่าเฉลี่ย 446.22 ± 20.98 mM TE/kg dry wt. ค่าน้อยที่สุด 405.94 ± 54.66 mM TE/kg dry wt. ค่ามากที่สุด 564.84 ± 36.68 mM TE/kg dry wt. ตรวจด้วยวิธี FCP ได้ค่าเฉลี่ย 250.50 ± 18.91 mM GE/kg dry wt. ค่าน้อยที่สุด 199.56 ± 2.40 mM GE/kg dry wt. ค่ามากที่สุด 347.46 ± 1.39 mM GE/kg dry wt. และตรวจด้วยวิธี Vanillin assay ได้ค่าเฉลี่ย 29.40 ± 8.40 mM CE/kg dry wt. ค่าน้อยที่สุด 16.77 ± 0.03 mM CE/kg dry wt. ค่ามากที่สุด 57.70 ± 2.25 mM CE/kg dry wt. และตรวจด้วยวิธี TAC assay ได้ค่าเฉลี่ย 157 ± 25 mg/kg dry wt. ค่าน้อยที่สุด 81 mg/kg dry wt. ค่ามากที่สุด 245 mg/kg dry wt. เมื่อเปรียบเทียบปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจด้วยวิธีต่างกัน 4 วิธี พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลการตรวจหาค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ของ 3 วิธี (ตารางที่ 4.2) ที่ตรวจปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากข้าว 3 กลุ่มพบว่ามีความสอดคล้องกัน (correlation) ดีเยี่ยม จากการเปรียบเทียบผลการตรวจระหว่าง วิธี ORAC กับวิธี FCP ได้ค่า $r = 0.983$ ($p < 0.01$) ซึ่งวิธี ORAC และวิธี FCP เป็นวิธีมาตรฐานสากล เมื่อเปรียบเทียบวิธี Vanillin กับวิธี ORAC ได้ค่า $r = 0.984$ ($p < 0.01$) และวิธี Vanillin กับวิธี FCP ได้ค่า $r = 0.992$ ($p < 0.01$) โดยมีความสอดคล้องกัน (correlation) ดีเยี่ยมเช่นกัน ดังนั้นวิธี Vanillin ให้ผลการตรวจที่สอดคล้องดีเยี่ยมเช่นเดียวกับวิธี ORAC กับวิธี FCP เมื่อเปรียบเทียบทั้ง 3 วิธีดังกล่าวไปแล้วกับวิธี TAC assay พบว่าสอดคล้องกับวิธี ORAC assay $r = 0.921$ ($p < 0.01$), วิธี FCP assay $r = 0.870$ ($p < 0.01$) และวิธี Vanillin assay $r = 0.872$ ($p < 0.01$) สามารถสรุปได้ว่าการตรวจเพื่อค่าสารต้านอนุมูลอิสระ 3 วิธีแรก คือ ORAC assay, FCP assay และ Vanillin assay สามารถนำมาใช้วิเคราะห์ที่มีความถูกต้องใกล้เคียงกันอย่างมาก ($r > 0.9$) สำหรับผลจากการตรวจวัด ด้วยวิธี TAC assay มีความถูกต้องที่น้อยกว่า 3 วิธีแรก ($r > 0.8$) สามารถเรียงลำดับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจากมากไปน้อยได้ดังนี้ ข้าวเหนียวดำ > ข้าวแดง > ข้าวดำ เมื่อตรวจด้วยวิธี ORAC assay, FCP assay และ Vanillin assay และ ข้าวเหนียวดำ > ข้าวดำ > ข้าวแดง เมื่อตรวจด้วยวิธี TAC assay

ผู้วิจัยจึงเลือกนำสารสกัดจากข้าวเหนียวดำซึ่งมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดมาทำการทดสอบกับเซลล์มนุษย์ในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.1: แสดงค่าสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ORAC Assay, FCP Assay, Vanillin Assay และ TAC Assay ของข้าวดำ ข้าวแดง และข้าวเหนียวดำ

สารสกัดจากข้าว	ORAC Assay (TE mM/kg. dry wt.) (Mean \pm SD)	FCP Assay (GE mM/kg. dry wt.) (Mean \pm SD)	Vanillin Assay (CE mM/kg. dry wt.) (Mean \pm SD)	TAC assay (mg/kg dry wt.) (Mean \pm SD)
ข้าวดำ				
หมายเลข 1	564.84 \pm 36.68	347.46 \pm 1.39	57.70 \pm 2.25	245
หมายเลข 2	476.02 \pm 61.64	282.96 \pm 6.62	35.44 \pm 2.04	230
หมายเลข 3	454.04 \pm 49.37	240.07 \pm 1.92	30.57 \pm 0.94	197
หมายเลข 4	427.84 \pm 34.79	199.56 \pm 2.40	16.77 \pm 0.03	81
หมายเลข 5	422.85 \pm 37.65	215.77 \pm 4.50	21.32 \pm 1.55	101
หมายเลข 6	419.65 \pm 43.77	240.82 \pm 0.65	21.84 \pm 0.60	143
หมายเลข 7	405.94 \pm 54.66	226.81 \pm 10.27	22.14 \pm 0.76	103
ค่าเฉลี่ย \pm SEM	446.22\pm20.98	250.50\pm18.91	29.40 \pm 8.40	157 \pm 25
ข้าวแดง				
หมายเลข 1	724.66 \pm 51.52	475.03 \pm 5.45	102.88 \pm 0.26	67
หมายเลข 2	658.22 \pm 55.01	516.83 \pm 7.34	94.19 \pm 0.27	105
หมายเลข 3	529.89 \pm 26.19	393.88 \pm 2.24	72.22 \pm 0.06	58
หมายเลข 4	513.75 \pm 66.00	364.69 \pm 3.78	71.06 \pm 1.12	39
หมายเลข 5	504.30 \pm 10.72	359.51 \pm 5.30	65.30 \pm 0.63	50
หมายเลข 6	491.31 \pm 49.44	357.07 \pm 11.69	53.89 \pm 1.78	116
หมายเลข 7	371.18 \pm 27.11	233.38 \pm 5.46	34.77 \pm 0.17	53
ค่าเฉลี่ย \pm SEM	525.43 \pm 46.33	385.77 \pm 34.64	70.62 \pm 8.72	69.7 \pm 11
ข้าวเหนียวดำ				
หมายเลข 1	1368.34 \pm 41.27	922.03 \pm 9.42	218.97 \pm 1.82	690
หมายเลข 2	1254.01 \pm 31.96	864.68 \pm 7.58	210.96 \pm 4.40	610
หมายเลข 3	1199.93 \pm 74.15	737.12 \pm 1.95	191.11 \pm 1.90	534
หมายเลข 4	1095.09 \pm 83.64	723.99 \pm 5.38	163.54 \pm 1.83	537
หมายเลข 5	985.19 \pm 42.61	646.19 \pm 10.85	144.23 \pm 1.28	452
หมายเลข 6	898.13 \pm 77.05	551.34 \pm 9.01	126.42 \pm 0.28	411
หมายเลข 7	722.96 \pm 15.50	471.88 \pm 5.84	111.96 \pm 2.37	393
ค่าเฉลี่ย \pm SEM	1074.56 \pm 83.95	702.46 \pm 60.82	166.74 \pm 15.75	518 \pm 41
ค่าเฉลี่ยโดยรวม \pm SEM	689.91 \pm 68.65	446.24 \pm 48.16	88.92 \pm 14.17	248.6 \pm 46

ทุกตัวอย่างสารสกัดทำซ้ำ 3 ครั้งและยืนยัน 4 ครั้งการทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระของข้าวแต่ละกลุ่มที่ตรวจด้วยวิธีต่างกัน 4 วิธีด้วย ANOVA พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4.2: แสดงค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการตรวจสอบด้านอนุมูลอิสระ 4 วิธี ของสารสกัดข้าวดำ ข้าวแดง และข้าวเหนียวดำ

		ORAC	FCP	Vanillin	TAC
ORAC	Pearson Correlation	1	.983(**)	.984(**)	.921(**)
	Sig. (2-tailed)		0.000	0.000	0.000
FCP	Pearson Correlation	.983(**)	1	.992(**)	.870(**)
	Sig. (2-tailed)	0.000		0.000	0.000
Vanillin	Pearson Correlation	.984(**)	.992(**)	1	.872(**)
	Sig. (2-tailed)	0.000	0.000		0.000
TAC	Pearson Correlation	.921(**)	.870(**)	.872(**)	1
	Sig. (2-tailed)	0.000	0.000	0.000	

** มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยค่า p value < 0.01 (2-tailed)

4.2 ผลการตรวจวัดความสามารถ ของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำในการป้องกันการทำลายดีเอ็นเอในนิวเคลียสของเม็ดเลือดขาว ไชมัน และโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงจากการออกซิเดชันโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดจากเลือดครบเป็นแบบในการทดลอง 3 วิธี ดังนี้

4.2.1 ผลการตรวจวัดความสามารถของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำในการป้องกันการทำลาย DNA ในนิวเคลียส (Genotoxicity) ของเม็ดเลือดขาว จากสารออกซิไดซ์โดยใช้วิธี Comet assay

เมื่อทดสอบเม็ดเลือดขาวจากการใส่เลือดครบ (whole blood) กับสารชนิดต่างๆ ดังตารางที่ 4.3 จากนั้นแยกส่วนเม็ดเลือดขาวมา ตรวจด้วยวิธี Comet assay พบว่าเม็ดเลือดขาวที่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 800 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ มี DNA เสียหายเล็กน้อยคิดเป็น 18 และ 12 คะแนน เมื่อเทียบกับเม็ดเลือดขาวกลุ่มควบคุมบวกที่ได้รับ H_2O_2 ความเข้มข้น 10 mM ซึ่งมีคะแนนการทำลายเป็น 533 คะแนน และกลุ่มควบคุมลบ ซึ่งได้รับเฉพาะฟอสเฟตบัพเฟอร์ ไม่พบการแตกสลายของ DNA ได้ 0 คะแนน จึงสรุปได้ว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นสูงๆ ทำให้ DNA ของเซลล์เม็ดเลือดขาวแตกสลายได้เล็กน้อย คาดว่า ผนวกความเข้มข้นดังกล่าว สารสกัดข้าวเหนียวดำสามารถผ่านเข้าผนังเซลล์ได้มากพอจนสามารถเข้าไปทำปฏิกิริยากับ DNA ได้ เม็ดเลือดขาวที่ใส่สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 200 , 400 และ 600 $\mu\text{g/ml}$ ไม่พบการทำลาย DNA ได้ 0 คะแนน เมื่อทดสอบเลือดครบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำพร้อมกับ H_2O_2 ความเข้มข้น 10 mM พบว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 200 , 400, 600, 800 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ พบ DNA แตกสลายออกมา ซึ่งคำนวณคะแนนการทำลาย DNA ได้เป็น 232, 228, 171, 131 และ 81 คะแนน ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดข้าวเหนียวดำ ทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองนี้ มีคะแนนการแตกสลาย DNA น้อยกว่าเม็ดเลือดขาวของกลุ่มควบคุมบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยการยับยั้งการแตกสลายของ DNA ของสารสกัดข้าวเหนียวดำจะ แปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดข้าวเหนียวดำ (Dose-dependent) ดังภาพที่ 4.1

ตารางที่ 4.3: แสดงผลการทำลาย DNA ของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ เมื่อทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำ ความเข้มข้นระหว่าง 50 ถึง 1000 µg/ml ในสารละลาย phosphate buffer saline ที่ใส่และไม่ใส่ H₂O₂

ตัวอย่างทดสอบ	จำนวน nuclei ในแต่ละระดับการทำลาย					คะแนนการทำลาย (arbitrary units) (0-800)**
	ระดับ 0	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 3	ระดับ 4	
1. Cells+PBS+PRE 200 µg/ml + H ₂ O ₂ ***	109	20	27	18	26	232*
2. Cells+PBS+PRE 400 µg/ml + H ₂ O ₂	125	14	9	12	40	228*
3. Cells+PBS+PRE 600 µg/ml + H ₂ O ₂	138	14	10	15	23	171*
4. Cells+PBS+PRE 800 µg/ml + H ₂ O ₂	152	11	8	12	17	131*
5. Cells+PBS+PRE 1000 µg/ml + H ₂ O ₂	165	14	5	7	9	81*
6. Cells+PBS+PRE 200 µg/ml	200	0	0	0	0	0
7. Cells+PBS+PRE 400 µg/ml	200	0	0	0	0	0
8. Cells+PBS+PRE 600 µg/ml	200	0	0	0	0	0
9. Cells+PBS+PRE 800 µg/ml	193	1	3	1	2	18
10. Cells+PBS+PRE 1000 µg/ml	195	1	2	1	1	12
11. Cells+PBS (Negative control)	200	0	0	0	0	0
12. Cells+PBS+ H ₂ O ₂ (Positive control)	4	36	51	41	68	533

ทำการตรวจสอบซ้ำ 3 ครั้งทุกตัวอย่างการทดลอง โดย Cell=เซลล์เม็ดเลือดขาว PBS=phosphate buffer saline,

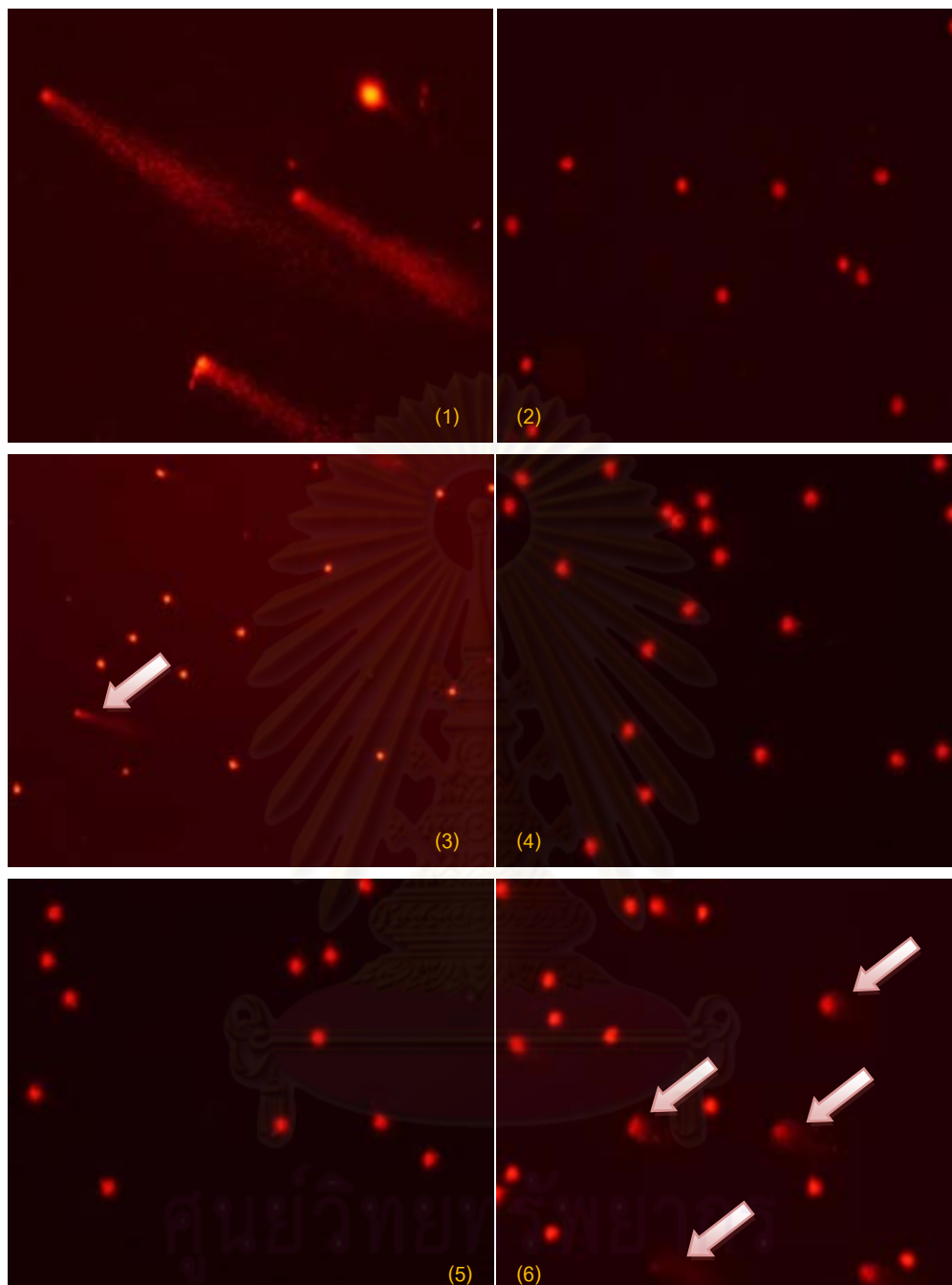
PRE= pigmented rice extract in µg/ml

* มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

** นับเซลล์แบบสุ่มจำนวน 200 เซลล์

*** H₂O₂ ที่ใช้ในการทดสอบนี้มีความเข้มข้น 10 mM

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.1: ภาพจากการทดสอบความสามารถของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำในการป้องกัน DNA ของเม็ดเลือดขาว (PBMCs) จากการทำลายของ H_2O_2 , nuclei ของเม็ดเลือดขาว (PBMCs) ทดสอบกับสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและ H_2O_2 ความเข้มข้น 0.01 M (1), PBMCs ที่ได้รับเฉพาะตัวทำละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (2), PBMCs ที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้นสูงๆ เช่น 800, 1000 $\mu\text{g/ml}$ (3), PBMCs ที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้นต่ำๆ เช่น 200, 400, 600 $\mu\text{g/ml}$ (4), PBMCs ที่ได้รับทั้ง H_2O_2 และสารสกัดความเข้มข้นสูงๆ เช่น 800, 1000 $\mu\text{g/ml}$ (5), PBMCs ที่ได้รับทั้ง H_2O_2 และสารสกัดความเข้มข้นต่ำๆ เช่น 200, 400, 600 $\mu\text{g/ml}$ (6) ลูกศรชี้คือ DNA ที่แตกสลายและเห็นเป็นลักษณะดาวหางเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Comet assay

4.2.2 ผลการตรวจวัดความสามารถของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำในการป้องกันโปรตีนเสียสภาพจากสารอนุมูลอิสระโดยใช้โปรตีนฮีม (Heme) เป็นแบบ ด้วยวิธี Heinz body Inhibition assay

เมื่อทดสอบสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 100, 200, 400, 600, 800 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ ในสารละลาย buffer กับเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติจากเลือดครบ (whole blood) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผลเป็นดังตารางที่ 4.4 คือพบว่า เมื่อใส่สารสกัดข้าวเหนียวดำกับเซลล์เม็ดเลือดแดงเพียงอย่างเดียว ที่ระดับความเข้มข้น 700, 800 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ แสดงความเป็นพิษและทำลายผนังเม็ดเลือดแดงจนเกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นระหว่าง 100 ถึง 600 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อทดสอบกับเม็ดเลือดแดงนั้นตรวจไม่พบว่าทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก และไม่พบลักษณะ Heinz body ภายในเซลล์ดังกล่าว จึงอาจสรุปได้ว่า สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 100 ถึง 600 $\mu\text{g/ml}$ ไม่แสดงความเป็นพิษต่อผนังเซลล์และโปรตีนภายในเซลล์ เมื่อทดสอบเซลล์เม็ดเลือดแดงกับสารสกัดจากข้าวเหนียวดำพร้อมสาร APHZ ซึ่งเป็นสารออกซิเดนท์ความเข้มข้น 100 mg% พบว่าทำให้เกิดลักษณะ Heinz bodies ในเม็ดเลือดแดง (positive control) และที่ระดับความเข้มข้น 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ ของสารสกัดข้าวเหนียวดำนั้นตรวจไม่พบเม็ดเลือดแดงแตกแต่พบลักษณะ Heinz bodies ในเม็ดเลือดแดง มีเพียงสารสกัดความเข้มข้น 600 $\mu\text{g/ml}$ เท่านั้นที่ตรวจไม่พบทั้งการแตกสลายของเม็ดเลือดแดงและลักษณะ Heinz body ในเม็ดเลือดแดง ดังภาพที่ 4.2(2) จึงสรุปได้ว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 600 $\mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์ป้องกันทั้งผนังเซลล์และโปรตีนฮีมจากสารออกซิเดนท์ APHZ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสารสกัดข้าวเหนียวดำเป็น 700 $\mu\text{g/ml}$ พบว่า เซลล์เม็ดเลือดแดงส่วนใหญ่เกิดการแตกสลายไป แต่ยังคงเหลือเซลล์เม็ดเลือดแดงอยู่บางส่วน ซึ่งในเซลล์เม็ดเลือดแดงเหล่านี้ตรวจ ไม่พบลักษณะ Heinz body ส่วนสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 800 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ นั้นสามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกหมด ดังภาพที่ 4.2(4)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

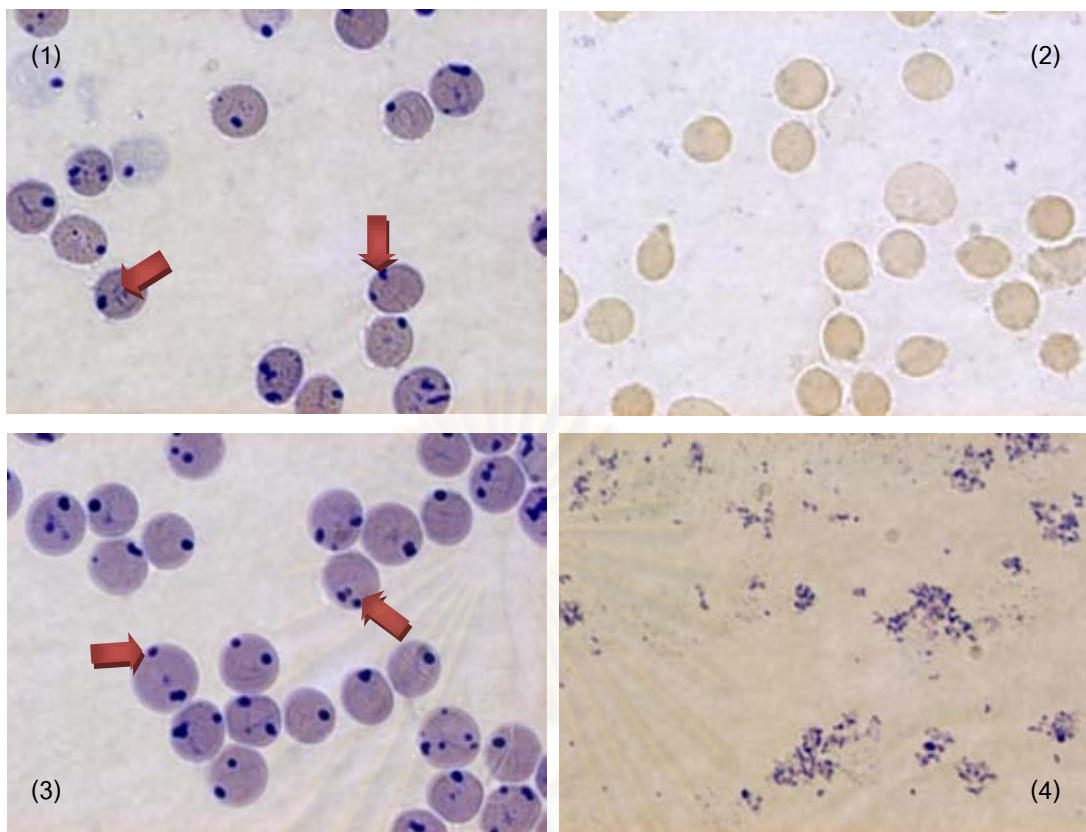
ตารางที่ 4.4: แสดงฤทธิ์ของสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นต่างๆ ในการป้องกันการเกิด Heinz body ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ

กลุ่มตัวอย่างทดสอบ	จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติที่นับได้ทั้งหมด*	เซลล์เม็ดเลือดแดงที่พบลักษณะ Heinz body	% การยับยั้งการเกิด Heinz body
1. RBC+GPB+PRE 100 µg/ml	1,000	0	100
2. RBC+GPB+PRE 200 µg/ml	1,000	0	100
3. RBC+GPB+PRE 400 µg/ml	1,000	0	100
4. RBC+GPB+PRE 500 µg/ml	1,000	0	100
5. RBC+GPB+PRE 600 µg/ml	1,000	0	100
6. RBC+GPB+PRE 700 µg/ml	(hemolysis) 0	0	-
7. RBC+GPB+PRE 800 µg/ml	(hemolysis) 0	0	-
8. RBC+GPB+PRE 1,000 µg/ml	(hemolysis) 0	0	-
9. RBC+GPB+APHZ+PRE 100 µg/ml	0	1,000	0
10. RBC+GPB+APHZ+PRE 200 µg/ml	0	1,000	0
11. RBC+GPB+APHZ+PRE 400 µg/ml	0	1,000	0
12. RBC+GPB+APHZ+PRE 500 µg/ml	0	1,000	0
13. RBC+GPB+APHZ+PRE 600 µg/ml	1,000	0	100
14. RBC+GPB+APHZ+PRE 700 µg/ml	(partial hemolysis left some RBC) 100	0	100
15. RBC+GPB+APHZ+PRE 800 µg/ml	(hemolysis) 0	0	-
16. RBC+GPB+APHZ+PRE 1000 µg/ml	(hemolysis) 0	0	-
17. RBC+GPB (negative control)	1,000	0	100
18. RBC+GPB+APHZ (positive control)	0	1,000	0

ทำการตรวจสอบซ้ำ 3 ครั้งทุกตัวอย่างการทดลอง RBC = red blood cells, GPB = glucose phosphate buffer,

PRE = pigmented rice extract in µg/ml, APHZ = N-acetylphenylhydrazine

* นำเซลล์เม็ดเลือดแดงจากการทำซ้ำ 3 ครั้งมารวมกันและนับเซลล์แบบสุ่มทั้งหมด 1000 เซลล์



ภาพที่ 4.2: ลักษณะ Heinz bodies ตรวจพบในเซลล์เม็ดเลือดแดง เมื่อทดสอบกับสารออกซิเดนท์ APHZ (positive control) (1), เมื่อใส่สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 600 $\mu\text{g/ml}$ พร้อม APHZ ตรวจไม่พบลักษณะ Heinz body เกิดขึ้น (2), เมื่อใส่สารสกัดความเข้มข้น 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ พร้อม APHZ ตรวจพบลักษณะ Heinz bodies (3), สารสกัดความเข้มข้นสูงเช่น 700, 800, 1000 $\mu\text{g/ml}$ จะก่อให้เกิดเม็ดเลือดแดงแตกสลายเหลือให้เห็นเศษของผนังเซลล์ (4)

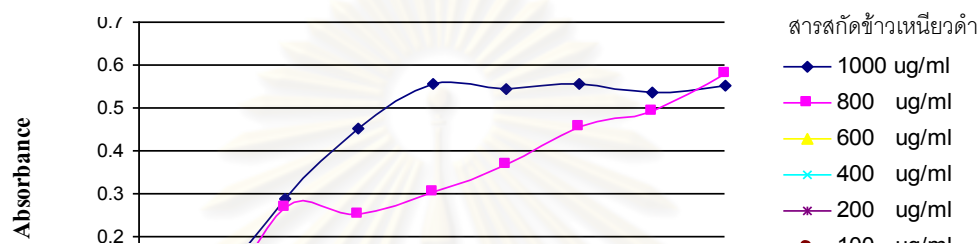
4.2.3 ผลการตรวจวัดความสามารถของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไขมันจากสารออกซิไดซ์โดยใช้ผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงเป็นแบบ ด้วยวิธี Hemolysis Inhibition assay

เมื่อทดสอบเลือดครบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 100, 200, 400, 600, 800 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 0, 30, 60, 90, 120, 180, 210 และ 240 นาที พบว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 0, 200, 400 และ 600 $\mu\text{g/ml}$ ไม่ก่อให้เกิดเม็ดเลือดแดงแตกตลอดช่วงเวลาที่ใช้ทำการทดลองนี้ แต่สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 800 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ ทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง แตกและปล่อยฮีโมโกลบินออกมาในสารละลาย เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของฮีโมโกลบิน พบว่าเพิ่มขึ้นทันทีหลังใส่สารสกัดข้าวเหนียวดำ โดยเปรียบเทียบกับเม็ดเลือดแดง ที่ใส่น้ำกลั่นเพื่อให้เกิดการแตก ของเม็ดเลือดแดงอย่าง สมบูรณ์ (วัดได้ค่าการดูดกลืนแสง ณ ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร = 0.65) และหลอดควบคุมบวก ซึ่งได้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นตามเวลาอย่างช้าๆ แสดงว่าเม็ดเลือดแดงแตกหลังจากใส่ AAPH ฮีโมโกลบินถูกปล่อยออกมา ในสารละลายเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามเวลา ดังภาพที่ 4.3(A) เมื่อทำการทดลองโดยผสมเซลล์เม็ดเลือดเข้ากับสารสกัด

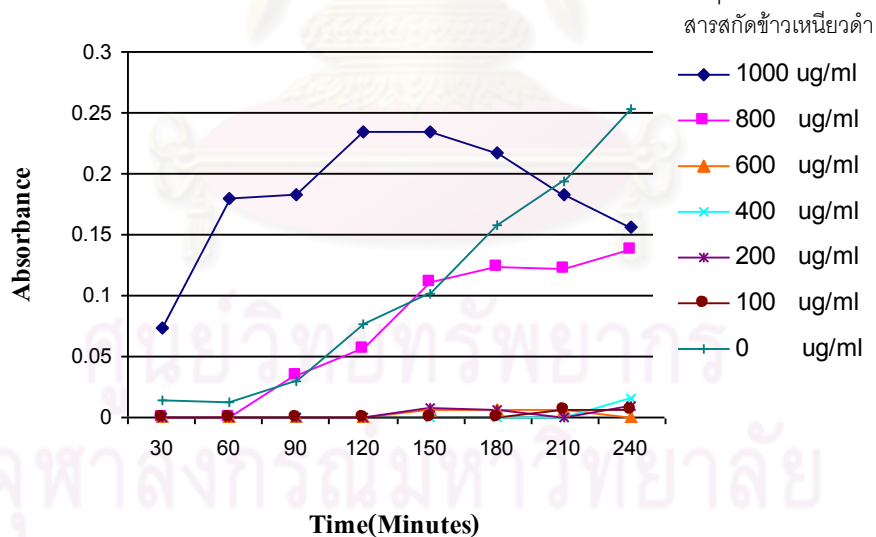
ข้าวเหนียวดำความเข้มข้นต่างๆ พร้อมกับ AAPH (สาร oxidant) ความเข้มข้นสุดท้าย 100 mM พบว่า เม็ดเลือดแดงที่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 100, 200, 400 และ 600 $\mu\text{g/ml}$ สามารถป้องกันการแตกของเม็ดเลือดแดงจากการกระตุ้นสาร AAPH แต่เม็ดเลือดแดงที่ใส่สารสกัดสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 800 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ พร้อมกับสารละลาย AAPH มีเม็ดเลือดแดงแตก เช่นเดียวกับเม็ดเลือดแดงที่ได้รับสาร AAPH ความเข้มข้น 100 mM และเม็ดเลือดแดงที่รับเฉพาะสารสกัดสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 800 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ เพียงอย่างเดียว แต่เป็นไปในลักษณะที่ช้ากว่า คาดว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำอาจทำปฏิกิริยากับสาร AAPH จนทำให้ความเป็นพิษน้อยลง ดังภาพที่ 4.3(B)

A. RBC with PRE treatment

(A) เม็ดเลือดแดงทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นต่างๆ เพียงอย่างเดียว



(B) เม็ดเลือดแดงทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นต่างๆ พร้อมกับ AAPH 100 mM



ภาพที่ 4.3: ผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นต่างๆ ในการป้องกันการเกิด hemolysis โดยวัด การดูดกลืนแสงของฮีโมโกลบินที่ปล่อยออกจากเม็ดเลือดแดงที่แตก ณ ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เมื่อเวลาต่างๆ ดังนี้ 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 และ 240 นาที ของการทดสอบ ผลการทดสอบของเม็ดเลือดแดงกับสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 1000 $\mu\text{g/ml}$ (A), ผลการทดสอบของเม็ดเลือดแดงกับสารสกัดข้าวเหนียวดำตั้งแต่ 0 ถึง 1000 $\mu\text{g/ml}$ พร้อมกับ AAPH ความเข้มข้น 100 mM (B), RBC = red blood cells, PRE = pigmented rice extract

4.3 ผลการทดสอบสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นต่างๆ ต่อการอยู่รอดของเซลล์ (Cell Viability)

ในทดสอบสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2000 และ 3000 $\mu\text{g/ml}$ กับเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งหมด 3 ชนิดคือ เซลล์มะเร็งตับ HepG2, เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat และเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติโดยใช้วิธี MTT assay ซึ่งเป็นวิธีตรวจวัดระดับการเมแทบอลิซึมของไมโทคอนเดรีย (Mitochondria's Metabolism), Neutral Red (NR) accumulation assay ใช้ตรวจวัดระดับกิจกรรมของเซลล์ (Cell Activity) และ Trypan Blue dye exclusion assay ใช้ตรวจสอบความเสียหายของผนังเซลล์ ในการทดสอบสารสกัดข้าวเหนียวดำกับเซลล์ HepG2 จะใช้เวลา 29 และ 58 ชั่วโมง, เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat และเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติใช้เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยให้เซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดๆ เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์มีรูปร่าง การเจริญเติบโต การเมแทบอลิซึม และการแบ่งตัวเซลล์ (cell proliferation) เป็นปกติจะให้ค่า viability เป็น 100% (negative control) ส่วน positive control เป็นเซลล์ที่ทดสอบกับ H_2O_2 ความเข้มข้น 25 mM ตามเวลาที่กำหนด เมื่อตรวจดูสภาพเซลล์ทางกล้องจุลทรรศน์พบว่า เซลล์ตายทั้งหมด จึงมีค่า viability เป็น 0% ผลที่ได้ทั้งหมดจะแสดงค่าเป็น %viability เปรียบเทียบกับ negative control

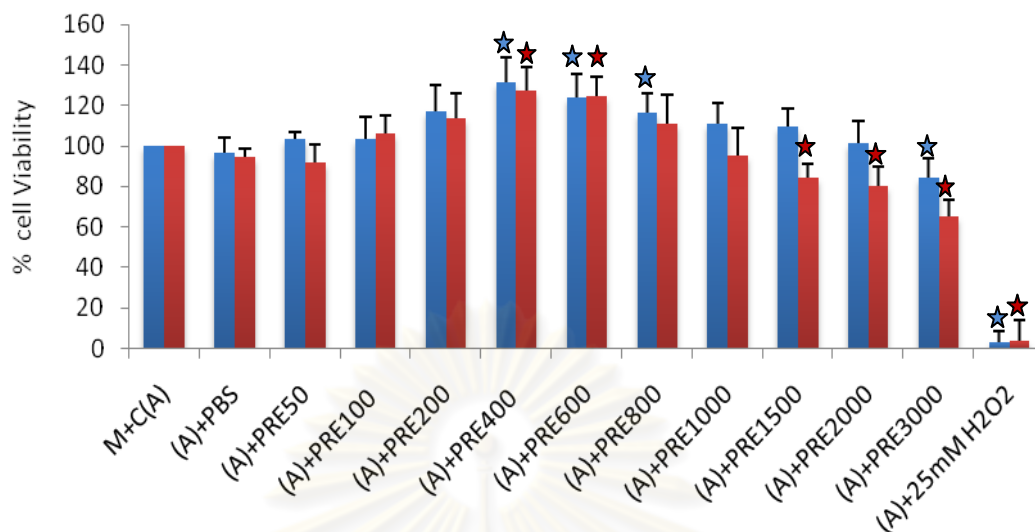
4.3.1 ผลการทดสอบของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อการอยู่รอดของเซลล์โดยใช้วิธี MTT assay ผลการทดลองทั้งหมดแสดงใน ตารางที่ 1 ภาคผนวก ก

เมื่อทดสอบเซลล์เม็ดเลือดขาว Jurkat กับ สารสกัดข้าวเหนียวดำเป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าสารสกัดความเข้มข้น 3000 $\mu\text{g/ml}$ ลด %viability ของเซลล์ ($p < 0.05$) มากที่สุดถึง 15.7% เมื่อลดระดับความเข้มข้นของสารสกัดข้าวเหนียวดำลงมาที่ระดับ 400, 600 และ 800 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสารสกัดกลับเพิ่ม %viability ของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตเป็นปกติ ที่ระดับความเข้มข้น 400 $\mu\text{g/ml}$ จะเพิ่ม %viability สูงที่สุดคือ 31.6% เมื่อเพิ่มเวลาในการทดสอบเป็น 48 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดความเข้มข้น 1500, 2000 และ 3000 $\mu\text{g/ml}$ ลด %viability ของเซลล์ ($p < 0.05$) ลง โดยที่ความเข้มข้น 3000 $\mu\text{g/ml}$ ลด %viability ของเซลล์มากที่สุดคือ 34.5% โดยที่ความเข้มข้นสารสกัดข้าว 400 และ 600 $\mu\text{g/ml}$ กลับสามารถเพิ่ม %Viability ของเซลล์ ($p < 0.05$) โดยความเข้มข้น 400 $\mu\text{g/ml}$ มีผลเพิ่ม %viability สูงที่สุดคือ 27.4% ดังภาพที่ 4.4

เมื่อทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำกับเซลล์ HepG2 เป็นเวลา 29 ชั่วโมงพบว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำ ไม่มีผลต่อ %viability แต่เมื่อทดสอบต่อไปเป็น 58 ชั่วโมง จึงพบว่าสารสกัดความเข้มข้น 2000 และ 3000 $\mu\text{g/ml}$ ลด %viability ของเซลล์ ($p < 0.05$) โดยสามารถลดได้ถึง 23.9% ที่ความเข้มข้น 3000 $\mu\text{g/ml}$ และสารสกัดความเข้มข้น 100, 200 และ 400 $\mu\text{g/ml}$ สามารถเพิ่ม %viability ($p < 0.05$) ได้เช่นเดียวกับที่พบในการทดสอบกับเซลล์ Jurkat โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 400 $\mu\text{g/ml}$ สามารถเพิ่ม %viability มากที่สุดคือ 34.6% ดังภาพที่ 4.5

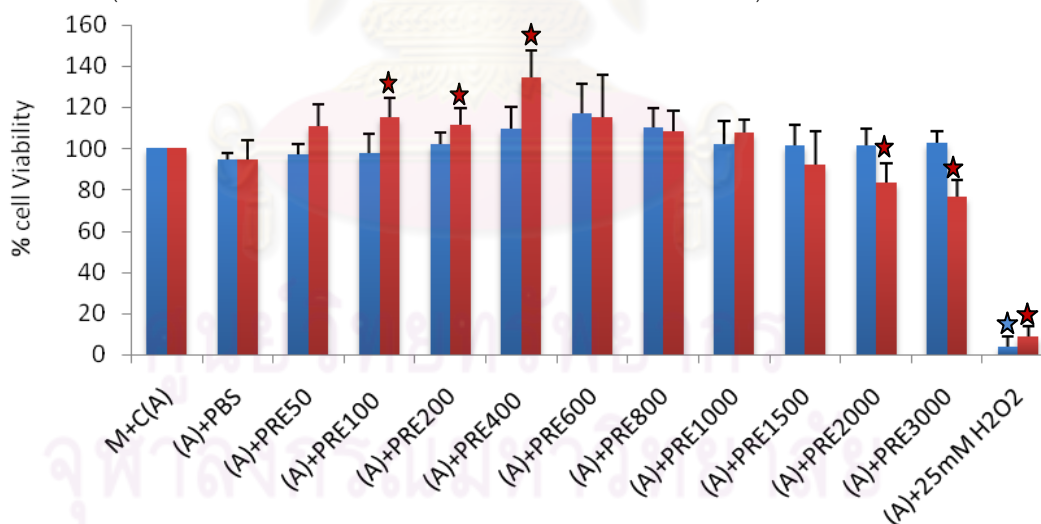
เมื่อทำการทดสอบสารสกัดข้าวเหนียวดำกับ เซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ PBMCs เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำไม่มีผลต่อ %viability แต่เมื่อทดสอบต่อไปจนครบ 48 ชั่วโมงพบว่าสารสกัดความเข้มข้น 400, 600, 800 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ สามารถลด %Viability ($p < 0.05$) โดยสังเกตพบว่าค่า %viability

ของเซลล์จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้นไปเป็น 800 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งสามารถลด %viability ของเซลล์ 53.4% และ 64.6% ตามลำดับ สามารถคำนวณค่า IC_{50} ได้เท่ากับ 876.61 $\mu\text{g/ml}$ ดังภาพที่ 4.6



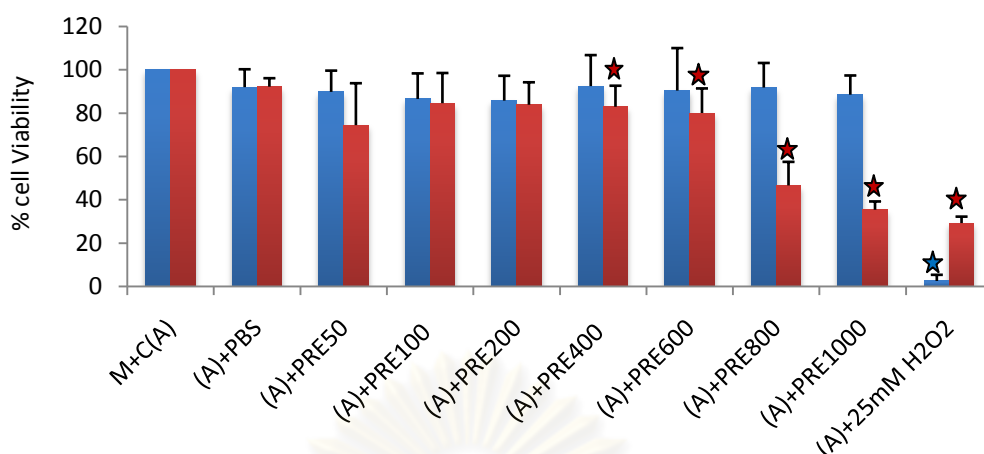
เซลล์ Jurkat ทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นต่าง ๆ ($\mu\text{g/ml}$)

ภาพที่ 4.4: ผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นตั้งแต่ 50 ถึง 3000 $\mu\text{g/ml}$ ต่อ %viability ของเซลล์ Jurkat เมื่อทดสอบเป็นเวลา 24(ฟ้า)-48(แดง) ชั่วโมงด้วยวิธี MTT assay โดย M=อาหารเลี้ยงเซลล์, C=เซลล์, A=เซลล์เพาะเลี้ยง(C)กับอาหารเลี้ยงเซลล์, PRE=สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นเป็น $\mu\text{g/ml}$, H2O2=H₂O₂, ★★ = มีความต่างแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง)



เซลล์ HepG2 ทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นต่าง ๆ ($\mu\text{g/ml}$)

ภาพที่ 4.5: ผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นตั้งแต่ 50 ถึง 3000 $\mu\text{g/ml}$ ต่อ %viability ของเซลล์ HepG2 เมื่อทดสอบเป็นเวลา 29(ฟ้า)-58 (แดง) ชั่วโมงด้วยวิธี MTT assay โดย M=อาหารเลี้ยงเซลล์, C=เซลล์, A=เซลล์เพาะเลี้ยง(C)กับอาหารเลี้ยงเซลล์, PRE=สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นเป็น $\mu\text{g/ml}$, H2O2=H₂O₂, ★★ = มีความต่างแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง)



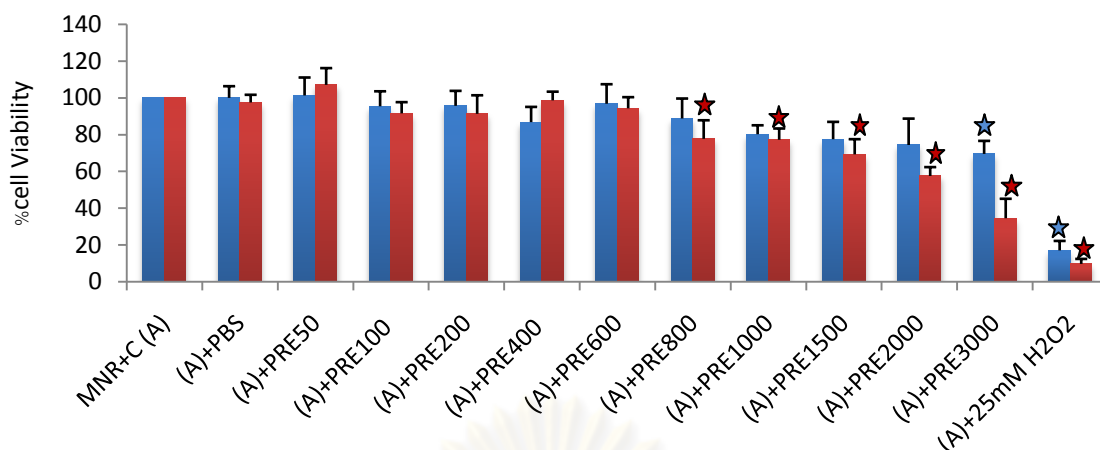
เซลล์PBMCs ทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นต่าง ๆ ($\mu\text{g/ml}$)

ภาพที่ 4.6: ผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นตั้งแต่ 50 ถึง 1000 $\mu\text{g/ml}$ ต่อ %viability ของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ PBMC เมื่อทดสอบเป็นเวลา 24 (ฟ้า)- 48 (แดง) ชั่วโมงด้วยวิธี MTT assay โดย M=อาหารเลี้ยงเซลล์, C=เซลล์, A=เซลล์เพาะเลี้ยง(C)กับอาหารเลี้ยงเซลล์, PRE=สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นเป็น $\mu\text{g/ml}$, $\text{H}_2\text{O}_2=\text{H}_2\text{O}_2$, ★★ = มีความต่างแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง)

4.3.2 ผลการทดสอบของสารสกัดข้าวเหนียวดำต่อการอยู่รอดของเซลล์ HepG2 โดยวิธี Neutral red accumulation assay

ผล ความอยู่รอดของเซลล์ HepG2 เมื่อทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นตั้งแต่ 50 ถึง 3000 $\mu\text{g/ml}$ โดยใช้วิธี Neutral Red accumulation assay ผลการทดลองทั้งหมดแสดงใน ตารางที่ 2 ภาคผนวก ก หากทดสอบเซลล์กับสารสกัดข้าวเหนียวดำเป็นเวลา 29 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 3000 $\mu\text{g/ml}$ ลด %viability ของเซลล์ ($p < 0.05$) ถึง 30.5% เมื่อทดสอบจนครบเวลา 58 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 800, 1000, 1500, 2000 และ 3000 $\mu\text{g/ml}$ ลด %viability ($p < 0.05$) โดยสารสกัดความเข้มข้น 3000 $\mu\text{g/ml}$ ลด %viability ของเซลล์มากที่สุด คือ 65.5% โดยคำนวณค่า IC_{50} ได้เท่ากับ 2722.07 $\mu\text{g/ml}$ ดังภาพที่ 4.7

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



เซลล์ HepG2 ทำปฏิกิริยากับสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นต่าง ๆ ($\mu\text{g/ml}$)

ภาพที่ 4.7: ผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นตั้งแต่ 50 ถึง 3000 $\mu\text{g/ml}$ ต่อ %viability ของเซลล์

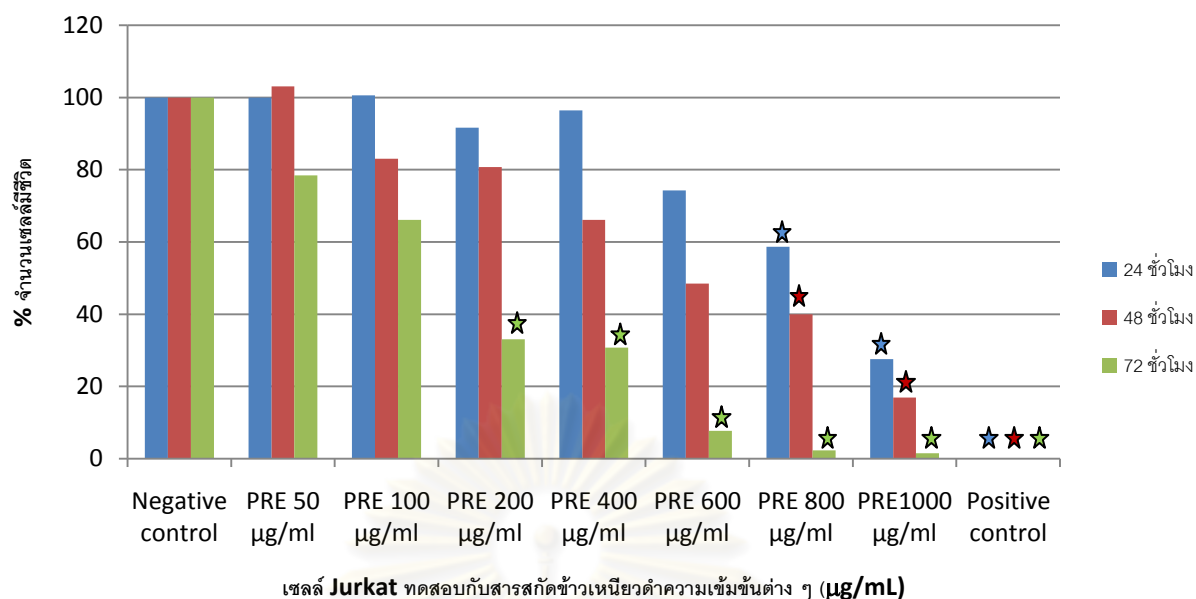
HepG2 เมื่อทดสอบเป็นเวลา 29(ฟ้า)-58(แดง) ชั่วโมงด้วยวิธี NR assay โดย M=อาหารเลี้ยงเซลล์, C=เซลล์, A=เซลล์เพาะเลี้ยง(C)กับอาหารเลี้ยงเซลล์, PRE=สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นเป็น $\mu\text{g/ml}$, $\text{H}_2\text{O}_2=\text{H}_2\text{O}_2$, ★★ = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ทำการทดสอบแต่ละกลุ่มตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง)

4.3.3 ผลการทดสอบของสารสกัดข้าวเหนียวดำต่อการอยู่รอดของเซลล์ Jurkat โดยใช้วิธี Trypan Blue dye Exclusion

เมื่อเซลล์เกิดความเสียหาย สี Trypan Blue จะสามารถแทรกผ่านรูที่ผนังเซลล์เข้าไปในเซลล์ ทำให้เซลล์ที่มีผนังเซลล์เสียหายจะติดสีฟ้า เมื่อทดสอบเซลล์เม็ดเลือดขาว Jurkat กับสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 50 ถึง 1000 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำมีผลต่อการนับจำนวนเซลล์มีชีวิตทั้งหมด (Total live cell count) ผลการทดลองทั้งหมดแสดงใน ตารางที่ 3 ภาคผนวก ก เมื่อตรวจสอบทางกล้องจุลทรรศน์ ณ เวลา 24 ชั่วโมงสังเกตพบ เซลล์ตายอย่างมากเมื่อทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 800, 1000 $\mu\text{g/ml}$ และเซลล์ที่เป็น Positive control เท่านั้น เมื่อเพิ่มเวลาในการทดสอบต่อไปเป็น 48 และ 72 ชั่วโมงพบว่า กลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำมีจำนวนเซลล์ตายมากขึ้น และจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำ จึงอาจสรุปได้ว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำมีผลยับยั้งการดำรงชีวิตของเซลล์ได้แปรผันตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดข้าวเหนียวดำและเวลาที่นานขึ้น ที่ใช้ในการทดสอบ (Dose and Time dependent manner) ดังภาพที่ 4.8



ภาพที่ 4.8: เมื่อย้อมเซลล์ด้วยสี Trypan Blue จะเห็นเซลล์ 2 เซลล์คือ เซลล์ที่ติดสีฟ้าเป็นเซลล์ผนังเซลล์เสียหาย (ลูกศรสีดำชี้) ส่วนเซลล์ที่ผนังเซลล์ไม่เสียหายจะไม่ติดสีฟ้า (ลูกศรสีเหลืองชี้)



ภาพที่ 4.9: ผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นตั้งแต่ 50 ถึง 1000 µg/ml ที่มีต่อจำนวนเซลล์ Jurkat มีชีวิต (live cells) เมื่อทดสอบเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดย Negative control=เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์เท่านั้น, Positive control=เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์พร้อม H₂O₂ ความเข้มข้น 0.25 mM, PRE=สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นเป็น µg/ml, ★★ = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้งและเลือกนับแบบสุ่มทั้งหมด 100 เซลล์ต่อ 1 กลุ่มตัวอย่างที่ทำการทดสอบ)

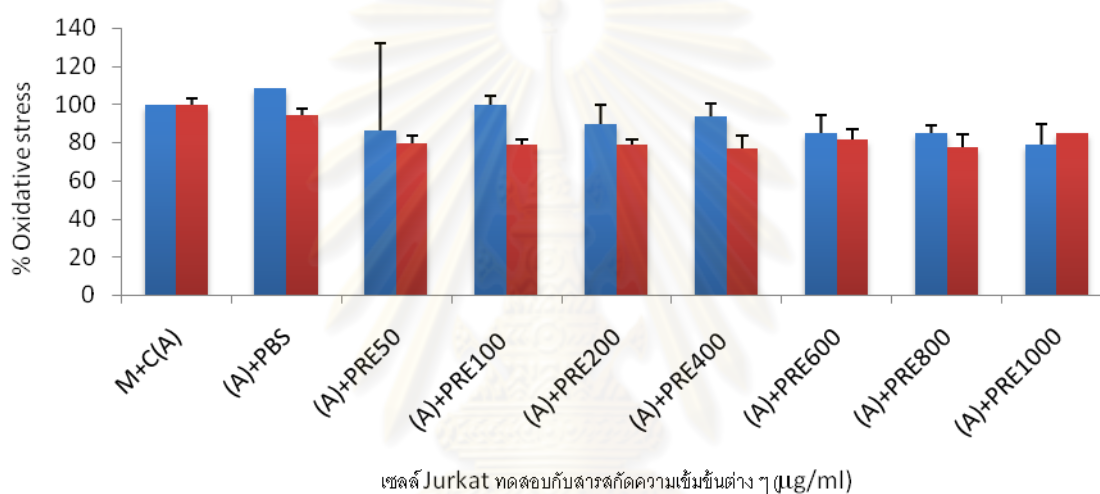
จากการทดสอบผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำต่อความอยู่รอดของเซลล์ อาจสรุปได้ว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำมีผลต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแปรผันตามระดับความเข้มข้นและเวลาที่เพิ่มขึ้นที่ใช้ในการทดสอบ (Dose and Time dependent manner) คือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นและเวลามากขึ้น สารสกัดข้าวเหนียวดำลด %viability ของเซลล์มากขึ้นตามกันไป

4.4 ผลการทดสอบของสารสกัดข้าวเหนียวดำในการลดภาวะเครียด (Oxidative Stress) ของเซลล์โดยใช้วิธี DCFH-DA assay

4.4.1 ทดสอบผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อเซลล์

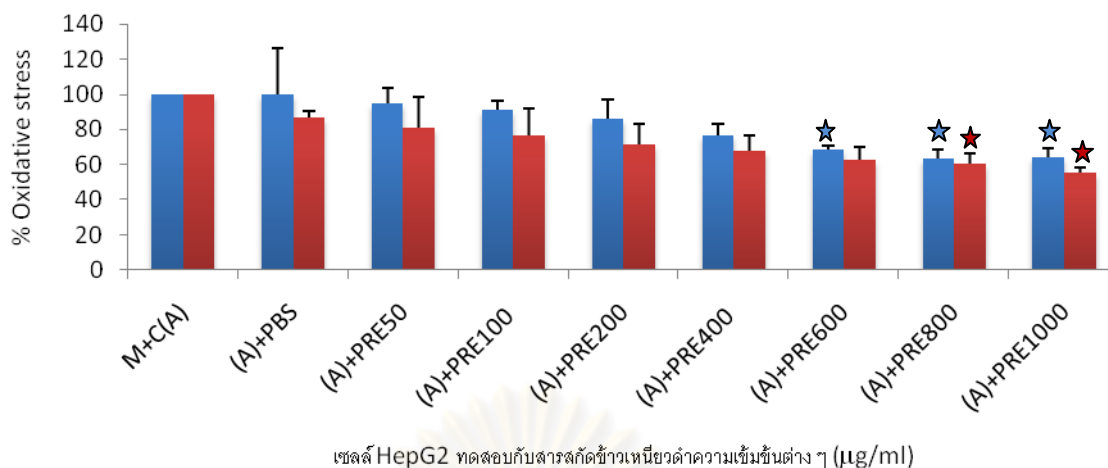
ทำการทดสอบสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 50 ถึง 1000 µg/ml กับเซลล์ 2 ชนิดคือ เซลล์ Jurkat เป็นเวลา 24, 48 ชั่วโมง ดังภาพที่ 4.9 และเซลล์ HepG2 เป็นเวลา 29, 58 ชั่วโมง ดังภาพที่ 4.10 ผลการทดลองทั้งหมดแสดงใน ตารางที่ 4 ภาคผนวก ก โดยให้ระดับของกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับสารใดๆ เป็นกลุ่มที่มีระดับ %oxidative stress ภายในเซลล์ปกติเท่ากับ 100% ให้เป็น Negative control และกลุ่มเซลล์ที่ได้รับ H₂O₂ ความเข้มข้น 0.25 mM ซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์ที่ผ่านผนังเซลล์และเพิ่มระดับ %oxidative stress ภายในเซลล์อย่างมากให้เป็น Positive control ซึ่งเซลล์ในกลุ่ม positive control นี้จะมีค่า %oxidative stress เพิ่มขึ้น 50.6% จากค่าของเซลล์ในกลุ่ม negative control เมื่อครบเวลา 29 ชั่วโมงและเพิ่มขึ้น 35.2% เมื่อครบเวลา 58 ชั่วโมง จากการทดสอบกับเซลล์ Jurkat พบว่า สารสกัดข้าวเหนียวดำไม่มีผลต่อระดับ %oxidative stress

ภายในเซลล์ Jurkat ทั้งเวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง เมื่อทดสอบเซลล์ HepG2 กับสารสกัดข้าวเหนียวดำเป็นเวลา 29 ชั่วโมงพบว่า สารสกัดความเข้มข้น 600, 800 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ ลดระดับ %oxidative stress ภายในเซลล์ ($p < 0.05$) โดยความเข้มข้น 800 $\mu\text{g/ml}$ และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ สามารถลด %oxidative stress ภายในเซลล์ ได้มากใกล้เคียงกันคือ 36.7% และ 35.93% ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบเซลล์กับสารสกัดข้าวเหนียวดำครบ 58 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 800 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ ลด %oxidative stress ภายในเซลล์ได้ ($p < 0.05$) โดยความเข้มข้นสารสกัดข้าวเหนียวดำ 1000 $\mu\text{g/ml}$ สามารถลด %oxidative stress ภายในเซลล์ได้มากที่สุดคือ 44.9% จึงอาจสรุปได้ว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำมีความจำเพาะในการลด %oxidative stress ภายในเซลล์แต่ละชนิดแตกต่างกัน (cell specific) นั่นคือสารสกัดข้าวเหนียวดำไม่มีผลต่อค่า %oxidative stress ภายในเซลล์ Jurkat แต่สามารถลดค่า %oxidative stress ภายในเซลล์ HepG2 ได้ตามระดับความเข้มข้นและเวลาที่ใช้ในการทดสอบ (Dose and Time dependent manner)



ภาพที่ 4.10: ผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 50 ถึง 1000 $\mu\text{g/ml}$ ต่อค่า %oxidative stress ภายในเซลล์ Jurkat เมื่อทดสอบเป็นเวลา 24(ฟ้า)-48(แดง) ชั่วโมงด้วยวิธี DCFH-DA assay โดย M=อาหารเลี้ยงเซลล์, C=เซลล์, A=เซลล์เพาะเลี้ยง(C)กับอาหารเลี้ยงเซลล์, PBS=ฟอสเฟตบัฟเฟอร์, PRE=สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นเป็น $\mu\text{g/ml}$ (ทำการทดสอบแต่ละกลุ่มตัวอย่างซ้ำ 4 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง)

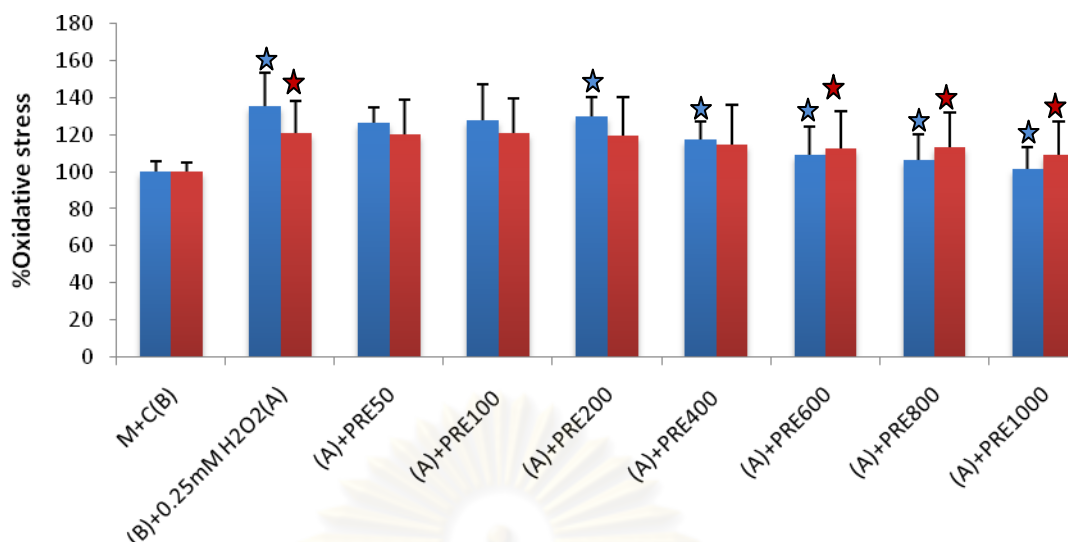
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.11: ผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 50 -1000 $\mu\text{g/ml}$ ต่อ %oxidative stress ภายในเซลล์ HepG2 เมื่อทดสอบเป็นเวลา 29(ฟ้า)-58(แดง) ชั่วโมงด้วยวิธี DCFH-DA assay โดย M=อาหารเลี้ยงเซลล์, C=เซลล์, A=เซลล์เพาะเลี้ยง(C)กับอาหารเลี้ยงเซลล์, PBS= ฟอสเฟตบัฟเฟอร์, PRE=สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นเป็น $\mu\text{g/ml}$, ★★ = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ทำการทดสอบแต่ละกลุ่มตัวอย่างซ้ำ 4 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง)

4.4.2 ผลการทดสอบของสารสกัดข้าวเหนียวดำในการป้องกันภาวะ Oxidative stress ที่เกิดจากสารออกซิไดซ์ H_2O_2

ในการทดสอบนี้จะทำการทดสอบสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 50 ถึง 1000 $\mu\text{g/ml}$ กับเซลล์ HepG2 เป็นเวลา 29, 58 ชั่วโมงเท่านั้น เนื่องจากพบว่าสามารถลด %oxidative stress ได้ในการทดลองที่ 4.4.1 โดยให้กลุ่มเซลล์ได้รับ H_2O_2 ความเข้มข้น 0.25 mM พบว่าไม่ทำให้เซลล์ตาย (เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์) เท่ากับ 100 % ผลการทดลองที่ได้แสดงในตารางที่ 5 ภาคผนวก ก เมื่อทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 29 ชั่วโมง พบว่าสามารถป้องกันภาวะ oxidative stress ภายในเซลล์ที่เกิดจาก H_2O_2 ความเข้มข้น 0.25 mM ได้ ($p<0.05$) โดยสารสกัดความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/ml}$ มีผลในการป้องกันเซลล์มากที่สุด เมื่อเพิ่มเวลาในการทดสอบจนครบ 58 ชั่วโมงพบว่า สารสกัดความเข้มข้น 800 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ สามารถป้องกันเซลล์จากภาวะ oxidative stress ได้ ($p<0.05$) โดยความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/ml}$ มีผลในการป้องกันมากที่สุด จากการทดลองทั้งหมดอาจสรุปได้ว่า สารสกัดข้าวเหนียวดำสามารถป้องกันเซลล์จากภาวะ oxidative stress ที่เกิดจาก H_2O_2 โดยแปรผันตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดข้าวเหนียวดำและแปรผกผันกับเวลาที่ใช้ในการทดสอบ (Dose and Time dependent manner)



เซลล์ HepG2 เมื่อทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำ (µg/ml) พร้อม H2O2 0.25 mM

ภาพที่ 4.12: ผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 50 ถึง 1000 µg/ml ต่อ %oxidative stress ภายในเซลล์ HepG2 เมื่อทดสอบร่วมกับ H₂O₂ ความเข้มข้น 0.25 mM เป็นเวลา 29 (ฟ้า)-58(แดง) ชั่วโมงด้วยวิธี DCFH-DA assay โดย M=อาหารเลี้ยงเซลล์, C=เซลล์, A=เซลล์เพาะเลี้ยง(C) กับอาหารเลี้ยงเซลล์, PBS=ฟอสเฟตบัฟเฟอร์, H₂O₂=H₂O₂, PRE=สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นเป็น µg/ml, ★★ = มีความต่างแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ทำการทดสอบแต่ละกลุ่มตัวอย่างซ้ำ 4 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง)

4.5 ผลการทดสอบเพื่อวัดผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของไขมันในเซลล์ HepG2

ทำการทดสอบในเซลล์ตับเนื่องจากตับเป็นแหล่งเมแทบอลิซึมหลักที่ทำการเก็บสะสม แปรสภาพ ขนส่ง และจัดไขมันของร่างกาย โดยจะใช้เซลล์ HepG2 ซึ่งเป็นเซลล์ตับที่มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของไขมันคล้ายคลึงกับเซลล์ตับปกติมาทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 200, 400 และ 600 µg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เป็นเวลา 29 ชั่วโมง ผลการ แสดงออกของยีนทั้ง 5 ชนิดเป็นจำนวนเท่า ซึ่งนำมาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำ แสดงในตารางที่ 4.8 (คำนวณจากการเทียบกับยีนของกลุ่มควบคุม โดยนำผลการแสดงออกของยีนดังกล่าวในกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำ หาค่าด้วยยีนที่แสดงออกในกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำ ค่าที่ได้จะเป็นจำนวนเท่า เช่นยีนกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสาร A มีการแสดงออกของยีน D=10 ส่วนในกลุ่มเซลล์ควบคุมมีการแสดงออกของยีน D=5 ดังนั้นกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสาร A จึงมีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เป็นต้น)

4.5.1 ผลการทดสอบเพื่อวัดผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำต่อการแสดงออกของยีน LDLR : Low

Density Lipoprotein Receptor พบว่าผลของสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 200 µg/ml เพิ่มการแสดงออกของยีน LDLR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเพิ่ม 2.057 เท่า สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 600 และ 400 µg/ml มีแนวโน้มในการเพิ่มการแสดงออกของยีนแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ดังกล่าว ดังภาพที่ 4.12 (A) และตารางที่ 4.8

4.5.2 ผลการทดสอบเพื่อวัดผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำต่อการแสดงออกของยีน HMGC α R : 3-hydroxyl-3-methylglutaryl-CoA reductase พบว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 200, 400 และ 600 μ g/ml ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน HMGC α R ในเซลล์ตับ HepG2 ดังภาพที่ 4.12(B) และตารางที่ 4.8

4.5.3 ผลการทดสอบเพื่อวัดผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำต่อการแสดงออกของยีน PPAR α : Peroxisome proliferators-activated receptors α พบว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 200, 400 และ 600 μ g/ml ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน PPAR α ในเซลล์ตับ HepG2 ดังภาพที่ 4.13 และตารางที่ 4.8

4.5.4 ผลการทดสอบเพื่อวัดผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำต่อการแสดงออกของยีน PPAR γ : Peroxisome proliferators-activated receptors γ พบว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 200, 400 และ 600 μ g/ml ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน PPAR γ ในเซลล์ตับ HepG2 ดังภาพที่ 4.14(A) และตารางที่ 4.8

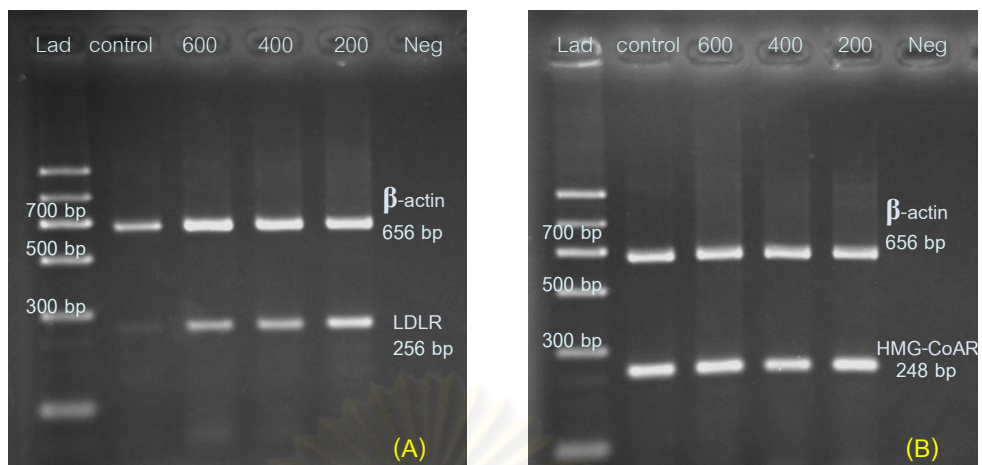
4.5.5 ผลการทดสอบเพื่อวัดผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำต่อการแสดงออกของยีน LXRA α : Liver X receptor α พบว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 200, 400 และ 600 μ g/ml ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน LXRA α ในเซลล์ตับ HepG2 ดังภาพที่ 4.14(B) และตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.5: แสดงผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อการแสดงออกของยีน (mRNA) 5 ชนิดที่เกี่ยวข้องในการเมแทบอลิซึมไขมันในเซลล์ HepG2

Treatment	mRNA				
	LDLR	HMGC α R	PPAR γ	PPAR α	LXRA α
Control (-)	1	1	1	1	1
PRE 600 μ g/ml	1.393 (<i>p</i> =0.613)	0.943 (<i>p</i> =1.000)	1.014 (<i>p</i> =1.000)	0.840 (<i>p</i> =0.758)	0.965 (<i>p</i> =0.998)
PRE 400 μ g/ml	1.516 (<i>p</i> =0.369)	1.043 (<i>p</i> =1.000)	1.076 (<i>p</i> =0.991)	0.986 (<i>p</i> =0.716)	0.909 (<i>p</i> =0.942)
PRE 200 μ g/ml	2.057* (<i>p</i> =0.014)	1.045 (<i>p</i> =1.000)	1.487 (<i>p</i> =0.268)	1.048 (<i>p</i> =0.845)	1.021 (<i>p</i> =0.963)

* มีผลเพิ่มการแสดงออกของยีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*p*<0.05)

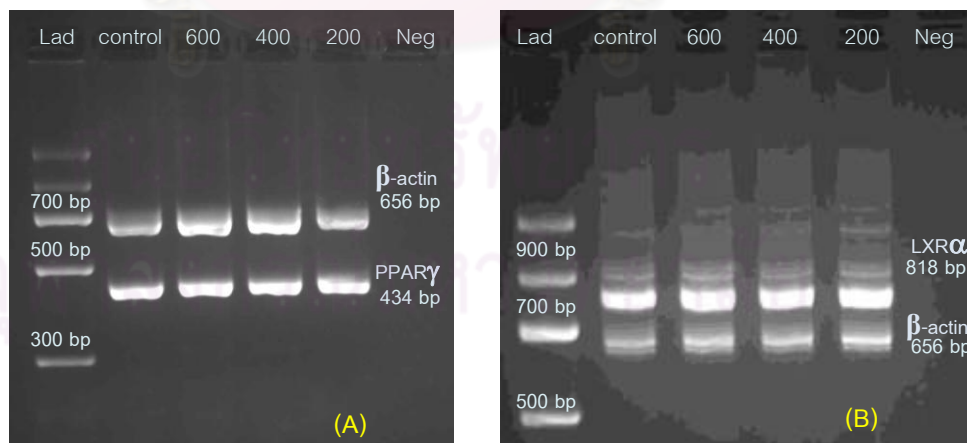
PRE=สารสกัดข้าวเหนียวดำ มีหน่วยความเข้มข้นเป็น μ g/ml



ภาพที่ 4.13: ผลการแสดงออกของยีน LDLR (A), HMG-CoAR (B) ของเซลล์ตับ HepG2 เมื่อทดสอบเซลล์กับสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 200, 400 และ 600 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 29 ชั่วโมง Lad=Ladder, bp=base pair



ภาพที่ 4.14: ผลการแสดงออกของยีน PPAR α ของเซลล์ HepG2 เมื่อทดสอบเซลล์กับสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 200, 400 และ 600 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 29 ชั่วโมง Lad=Ladder, bp=base pair



ภาพที่ 4.15: ผลการแสดงออกของยีน PPAR γ (A), LXRO α (B) ในเซลล์ HepG2 เมื่อทดสอบเซลล์กับสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 200, 400 และ 600 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 29 ชั่วโมง Lad=Ladder, bp=base pair

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

วิธีการสกัดสารจากข้าวเมล็ดสีทั้ง 3 สายพันธุ์

ผู้วิจัยเลือกใช้ 80 % เมทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากเมล็ดข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ เพราะว่าเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดที่ใช้ในการสกัด เมื่อเทียบกับน้ำกลั่น แอลกอฮอล์ 100% และสารละลายอื่นๆ⁽²⁸³⁻²⁸⁵⁾ การสกัดด้วยตัวทำละลายที่ผสมกัน เช่น แอลกอฮอล์ผสมน้ำหรือแอลกอฮอล์ผสมกรด จะถูกดูดซึมและกระจายสู่น้ำเยื่อได้ดีกว่าการใช้แอลกอฮอล์เพียงอย่างเดียว⁽⁷⁵⁾ ทำให้สามารถแยกสารต้านอนุมูลอิสระออกมาได้มากกว่า แต่ผู้วิจัยไม่ใช้กรด HCl หรือกรด Formic acid ที่นิยมใช้ในกระบวนการสกัดสารธรรมชาติมาผสมเป็นตัวทำละลายแม้จะมีข้อดีในการแยกสารจำพวกแอนโทไซยานินส์ออกมาได้มากกว่าและคงสภาพแอนโทไซยานินส์ได้ดีกว่า แต่เมื่อทำการระเหยแอลกอฮอล์ออก กรดที่เข้มข้นขึ้นอาจทำลายแอนโทไซยานินส์ให้แตกสลายได้จากการดึงน้ำออกจากโมเลกุล นอกจากนี้กรดที่ปนเปื้อนมีผลรบกวนในการทำปฏิกิริยาเมื่อนำสารสกัดมาทดสอบกับเซลล์ และจะต้องควบคุมอุณหภูมิไม่ให้เกิน 75 องศาเซลเซียสในทุกขั้นตอนของการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากข้าวเพราะ ณ อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส พบว่าไม่มีผลทำให้แอนโทไซยานินส์แตกสลาย⁽¹⁴⁷⁾ เมื่อสกัดสารได้แล้วได้ทำให้อยู่ในรูปผงแห้งใส่ในหลอดที่ปิดสนิทและเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาคุณสมบัติของสารสกัดให้คงที่ตลอดเวลาการทดสอบ ผู้วิจัยใช้ฟอสเฟสบัฟเฟอร์, pH 7.4 เป็นตัวทำละลายผงสารสกัดข้าวในการทดสอบกับเซลล์ชนิดต่างๆ แทนการใช้ DMSO ซึ่งนิยมใช้ในการทดลองอื่นๆ เนื่องจากพบว่าสารสกัดสามารถละลายในน้ำได้ดีและมีรายงานการทดลองที่ว่าค่าสารต้านอนุมูลอิสระของ Cyanidins และ Cyanidin-3-glycoside ลดลงอย่างมากเมื่อละลายด้วย DMSO เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ตัวทำละลายแอลกอฮอล์อื่นๆ⁽²⁸⁶⁾

การตรวจสอบคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวเมล็ดสี

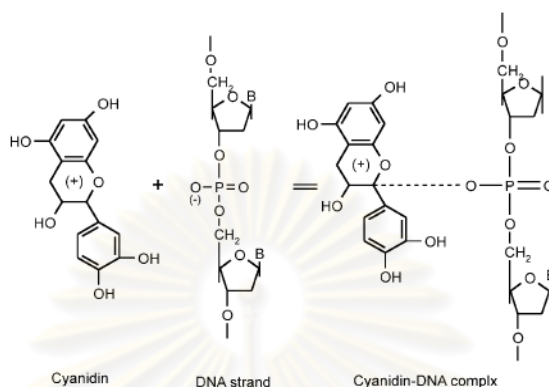
การตรวจปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระทางเคมีที่เป็นวิธีมาตรฐานสากล 2 วิธีนั้นคือ **วิธีที่ 1 ORAC assay** โดยวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในกลไกการทำหน้าที่รับส่งไฮโดรเจนอะตอม (hydrogen atom transfer based assay: HAT) ซึ่งเป็นการทดสอบคุณสมบัติในการกวาดจับอนุมูลอิสระ (free radical scavenging capacity) ที่เกิดขึ้นจาก AAPH ไปทำลายสีฟลูออเรสเซนต์ทำให้โครงสร้างเปลี่ยนไปส่งผลให้การเรืองแสงค่อยๆ ลดลง สารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างมีผลยับยั้งการทำลายสี ฟลูออเรสเซนต์จึงทำให้สียังคงเรืองแสงอยู่ ความเข้มของการเรืองแสงจะแปรผันตามปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในตัวอย่าง **วิธีที่ 2 FCP assay** เป็นวิธีตรวจวัดการทำหน้าที่รับส่งอิเล็กตรอน (single electron transfer based assay: SET) ซึ่งเป็นการทดสอบคุณสมบัติในการบริจาคอิเล็กตรอนหรือรีดิวซ์ (electron donating capacity) ของ สารต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบแอนโทไซยานินส์และสารที่มีโครงสร้างเป็นโพลีฟีนอลอื่นๆ สามารถรีดิวซ์สารละลาย Folin Ciocalteu Phenol reagent ที่มีสีเหลืองให้เปลี่ยนเป็นสารละลายที่มีสีฟ้าเงิน ความเข้มของสีจะแปรผันตามปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในตัวอย่าง **วิธีที่ 3** ซึ่งเป็นวิธีดั้งเดิมคือ Vanillin assay แอนโทไซยานินส์

ทำปฏิกิริยารวมตัว (coupling reaction) กับ vanillin เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีชมพูแดง ความเข้มของสีจะแปรผันตามปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในตัวอย่ง การตรวจทั้ง 3 วิธีนี้ใช้ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันในการทำปฏิกิริยาทางเคมี โดยสรุปแล้วทั้ง 3 วิธีนี้สามารถใช้ตรวจหาปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากข้าวได้ดีมาก เพราะเมื่อนำผลจากการตรวจ 3 วิธี มาเปรียบเทียบทางสถิติหาค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ พบว่ามีความสอดคล้องกันดีเยี่ยม ($r > 0.9$) ซึ่ง ORAC assay และ FCP assay เป็นวิธีมาตรฐานสากล จึงสรุปว่า Vanillin assay น่าจะเป็นวิธีมาตรฐานสากลอีก 1 วิธีในการตรวจหาสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดข้าว จากผลการตรวจปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ด้วย 3 วิธีดังกล่าว ข้าวเหนียวดำน่าจะเป็นตัวเลือกที่ดีในการนำมาสกัดแยกเอาสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อใช้ประโยชน์ในการทดสอบต่อไป เพราะมีปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมาคือ ข้าวแดง และข้าวดำมีค่าสารต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด

วิธีที่ 4 TAC assay เป็นการวัดการดูดกลืนสี (absorption) ของแอนโทไซยานินส์รวมโดยตรง ซึ่งเป็นวิธีการตรวจวัดที่นิยมใช้วัดค่าแอนโทไซยานินส์ทางด้านเภสัชกรรม ในการทดสอบนี้พบว่า กลุ่มสารสกัดข้าวเหนียวดำให้ค่าสารต้านอนุมูลอิสระสูงสุด เช่นเดียวกับการทดลองที่ผ่านมาทั้ง 3 วิธี แต่พบว่าสารสกัดจากกลุ่มข้าวดำกลับมีค่าสูงกว่าสารสกัดข้าวแดง ผู้วิจัยคาดว่าสาเหตุที่เป็นเช่นนี้ เนื่องจากในการตรวจสอบแบบ TAC เป็นเพียงการนำตัวอย่างสารสกัดมาวัดความเข้มของสีม่วงแดง ณ ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตรเท่านั้น และสารในกลุ่มแอนโทไซยานินส์หลายตัวมิได้มีสีม่วงแดงตัว ยกตัวอย่างเช่น Pelargonidin มีสีส้มแต่ก็มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูง^(121,135) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับการดูดกลืนสีของข้าวเมล็ดสีที่พบว่าข้าวแดงมีการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรต่างจากข้าวดำที่มีการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร⁽²⁸⁷⁾ ดังนั้นการตรวจสอบด้วยวิธีนี้จึงมีความถูกต้องน้อยกว่า 3 วิธีแรกซึ่งเป็นการทดสอบทางเคมี เหตุที่ผู้วิจัยทำการทดสอบค่าสารต้านอนุมูลอิสระใช้หลายวิธีเป็นเพราะการตรวจวัดคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระใช้เพียงวิธีเดียวนั้นอาจให้ผลที่ไม่ถูกต้อง เนื่องจากแต่ละวิธีใช้จะตรวจวัดคุณสมบัติที่แตกต่างกันของสารต้านอนุมูลอิสระ การตรวจอาจพบด้วยวิธีหนึ่งแต่อาจไม่พบในอีกวิธีก็เป็นได้ นอกจากนี้สาร สกัดจากพืชยังเป็นสารหลายๆ ชนิดที่มีคุณลักษณะแตกต่างกันผสมกันอยู่และค่า activity ของสารเหล่านี้มักขึ้นกับระบบที่ใช้ในการตรวจสอบ⁽⁷⁸⁾ เช่น ascorbic acid ทำให้ผลการตรวจโดยเฉพาะวิธี FCP assay มีค่าสูงขึ้น เนื่องจาก ascorbic acid มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสารรีดิวซ์อย่างแรง ดังนั้นจึงควรใช้หลายวิธีในการตรวจสอบเพื่อยืนยันคุณสมบัติความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มิได้มีเพียงคุณสมบัติเป็นสารรีดิวซ์ หรือเป็น metal-chelating เท่านั้น จะต้องมียุทธสมบัติในการเก็บกักหรือยับยั้งอนุมูลอิสระมิให้ทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ⁽²⁸⁸⁾ ซึ่งสามารถตรวจวัดด้วยวิธี ORAC assay ซึ่งมีข้อดีคือกลไกในการตรวจด้วยวิธี ORAC assay จะอิงตามกลไก HAT (hydrogen atom transfer based assay) เป็นการตรวจวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการตัดโซ่ปฏิกิริยาลูกโซ่จากอนุมูลอิสระ $\text{OH}\cdot$ โดยตรงและเป็นการวัดทั้งเวลาที่ยับยั้งและระดับการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ อีกทั้งไม่แปรผันตามค่า pH และตัวทำละลายที่ใช้สกัดสาร จึงบ่งบอกค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ใกล้เคียงความเป็นจริงมากกว่าวิธีอื่นๆ ส่วนวิธี FCP assay และ Vanillin assay เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวัดปริมาณโพลีฟีนอลและโปรแอนโทไซยานินในสารสกัดจากพืชแต่ก็มีข้อเสียเนื่องจากวิธีการทั้งสองอย่างนี้มีใช้การตรวจวัดที่จำเพาะ ยกตัวอย่างเช่น Vanillin assay สามารถใช้ในการวัดฟลาโวนอยด์อื่นๆ เช่น Dihydro-chalcone หรือโปรแอนโทไซยานินได้ และการใช้ Catechin เป็นสารมาตรฐานอาจมีส่วนทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อน

เนื่องจากความเร็วในการทำปฏิกิริยากับ vanillin ของ Catechin อาจแตกต่างจากสารในสิ่งตัวอย่างที่อาจมีโมเลกุลใหญ่กว่าซึ่งทำให้ทำปฏิกิริยากับ vanillin ได้ช้ากว่า⁽²⁸⁹⁾

การตรวจวัดความสามารถในการป้องกันการทำลาย DNA (Genotoxicity) จากสารออกซิไดซ์โดยใช้ DNA เม็ดเลือดขาวปกติเป็นแบบ ด้วยวิธี Comet assay



ภาพที่ 5.1: แสดงการจับเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนระหว่าง Cyanidins และสาย DNA เป็น DNA-Cyanidins complex⁽⁹⁾

Comet assay นิยมใช้ในการศึกษาการแตกสลายของ DNA แบบ endpoint ซึ่งจะวัดการเคลื่อนที่ของ DNA แตกสลายขนาดต่างๆ กันในสนามไฟฟ้า โดยระยะที่ DNA เคลื่อนที่ไปนั้นจะเป็นเครื่องบ่งชี้ถึงปริมาณ DNA ที่ถูกทำลายในระดับเซลล์เดียว⁽²⁹⁰⁾ ค่าที่ได้จาก Comet assay สามารถเป็น biomarker ที่บ่งชี้ว่าร่างกายอาจได้รับสารพิษเป็นระยะเวลาสั้นๆ ก่อนการตรวจวัดไม่นาน (ประมาณ 2-3 สัปดาห์)⁽¹⁴³⁾ ในการทดสอบนี้ ผู้วิจัยเลือกใช้เลือดครบ (whole blood) มาทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 เพราะว่าการกระบวนกรคัดแยกเซลล์อาจทำให้สาย DNA เสียหาย ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อผลของการทดสอบผิดพลาดได้ มีรายงานวิจัยว่า H_2O_2 ซึ่งนิยมใช้ในการตรวจทาง toxicity เป็นสารที่ละลายได้ในไขมัน สามารถแพร่ผ่านผนังเซลล์และตรวจพบได้ภายในเซลล์และมีผลต่อเซลล์หลายประการ เช่น เพิ่มการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการขจัด H_2O_2 เพิ่มระดับ Ca^{2+} ภายในเซลล์ กัดการแสดงออกของยีนบางชนิด รบกวนสมดุลรีดอกซ์ภายในเซลล์รวมทั้งการทำงานของโปรตีนและยีนที่ตอบสนองต่อภาวะเครียด เช่น c-Jun N-terminal kinase (JNK) H_2O_2 จึงถูกเลือกให้เป็นตัวแทนของสารที่มีคุณสมบัติ genotoxic ในการทดลองนี้⁽²⁹¹⁾ จากกรวิจัยนี้พบว่า สารสกัดข้าวเหนียวดำสามารถลดความเสียหาย DNA ของเม็ดเลือดขาวปกติในเลือดครบจากการทำลายของ H_2O_2 ความเข้มข้น 10 mM โดยความสามารถในการป้องกัน DNA แปรผันตามความเข้มข้นสารสกัดข้าวเหนียวดำที่ใช้ จึงสรุปว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำสามารถป้องกันการแตกสลายของ DNA จาก H_2O_2 ได้และระดับที่ป้องกันจะมากขึ้นตามความเข้มข้นที่ใช้เพิ่มขึ้น คาดว่ากลไกการป้องกัน DNA ดังกล่าวน่าจะเกิดจากการที่สารสกัดข้าวเหนียวดำเข้าทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 โดยตรงและอาจเกิดจากการจับเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างแอนโทไซยานินสีในสารสกัดข้าวเหนียวดำกับ DNA เป็นโครงสร้างเชิงซ้อนที่เรียกว่า Cyanin-DNA copigmentation ดังภาพที่ 5.1 โดย Cyanins จะใช้ตัวเองเป็นปราการในการป้องกัน DNA จากภาวะ oxidative stress ต่างๆ ทำให้ DNA สามารถคงรูปร่างแบบ triple-helical complex ไว้ได้⁽²⁹²⁾ นอกจากนี้สารสกัดแอนโทไซยานินสีชนิดอื่นๆ ก็สามารถ

ป้องกัน DNA แตกสลายได้เช่นเดียวกัน Cyanins⁽²⁹³⁾ แต่ก็มีรายงานว่าภาวะ DNA damage อาจหมายความถึงอัตราการแตกสลายต่ออัตราการซ่อมแซมของ DNA ก็ได้ ยกตัวอย่างเช่นการมี DNA damage ต่ำ อาจหมายความว่าปริมาณการแตกสลาย DNA น้อยกว่าประสิทธิภาพในการซ่อมแซม เช่น มีรายงานวิจัยกล่าวว่า นิลเกิล (Ni) ถือเป็นสาร genotoxic เนื่องจากสามารถเสริมฤทธิ์ H₂O₂ โดยสามารถยับยั้งเอนไซม์ที่ใช้ซ่อมแซมสลาย DNA และทำให้ระดับสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ลดลง⁽²⁹¹⁾ แต่ถึงแม้ว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำจะสามารถลด H₂O₂ มิทำลายสาย DNA แตกสลายได้แต่ก็มีได้หมายความว่า จะป้องกันการเกิดออกซิไดซ์ของเบส DNA ไปด้วย มีรายงานการวิจัยที่พบว่า สารฟลาโวนอยด์ Catechin และ Quercetin ในระดับที่ตรวจพบได้ในร่างกาย (ความเข้มข้น 0.1 μ M) พบว่าสามารถลดปริมาณเบสผิดปกติ 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxy-guanosine (8-OHdG) adduct formation ได้แต่ในขณะเดียวกันก็แสดงสมบัติ Pro-oxidant โดยเพิ่มปริมาณเบสผิดปกติอีกชนิดคือ 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine (Fapy-adenine) ซึ่งเป็น adduct formation เช่นกัน ผู้วิจัยในการทดลองนี้เสนอว่าการตรวจวัด adduct formation เพียงตัวเดียวนั้นอาจทำให้ผลการทดลองผิดพลาดจากความเป็นจริงได้ อีกทั้งยังมีรายงานวิจัยที่พบว่า ROS ไม่ได้ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับเบสเท่านั้นยังทำปฏิกิริยากับ deoxyribose backbone ของ DNA ด้วย⁽²⁹⁰⁾ ผู้วิจัยจึงเสนอว่าควรจะทำการศึกษาการป้องกันการทำลายเบส DNA ของสารสกัดข้าวเหนียวดำเพิ่มเติมต่อไป นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ควบคุมการเก็บตัวอย่างเลือดครบในการวิจัยครั้งนี้อย่างรัดกุมเนื่องจากพบว่าระดับการแตกสลายของ DNA ยังได้รับอิทธิพลจากพฤติกรรมในการดำรงชีวิตของแต่ละบุคคลอีกด้วย เช่น การสูบบุหรี่ การเข้ารับการรักษาโรคที่ใช้รังสี X-ray⁽²⁹¹⁾ ในการทดลองนี้ยังพบอีกว่า ณ ความเข้มข้นของสารสกัดข้าวเหนียวดำสูงๆ คือระดับ 800 และ 1000 μ g/ml จะทำให้ DNA เกิดการแตกสลายได้เองปริมาณเล็กน้อย คาดว่าลักษณะดังกล่าวน่าจะเกิดจาก A) สารสกัดข้าวเหนียวดำอาจกระตุ้นระบบเอนไซม์ซ่อมแซมสลาย DNA⁽²⁹⁴⁾ เช่นเดียวกับสารฟลาโวนอยด์ Myricetin⁽²⁹⁵⁾ ซึ่งกระบวนการซ่อมแซมดังกล่าวจำเป็นต้องมีการตัดเบสส่วนที่เสียหายทิ้งเสียก่อนแล้วจึงทำการเติมเบสใหม่ทดแทน ทำให้เห็นเบสที่ถูกตัดกระจายออกมามีปริมาณเล็กน้อย หรือ B) สารสกัดข้าวเหนียวดำอาจแสดงคุณสมบัติเป็น Co-mutagens จากงานวิจัยอื่นๆ พบว่าสารฟลาโวนอยด์และสารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ ก็ให้ผลการทดสอบในลักษณะเช่นเดียวกันนี้⁽²⁹¹⁾ ตัวอย่างเช่น Quercetin⁽²⁹⁶⁾ Luteolin⁽²⁹⁷⁾ Vanillin และ Tannic acid⁽²⁹⁸⁻³⁰⁰⁾ จะแสดงลักษณะเป็น mutagens ในบางสภาวะโดยเฉพาะ Quercetin ซึ่งพบว่าเป็น mutagen ที่แรงที่สุดในกลุ่มฟลาโวนอยด์⁽³⁰¹⁾ นักวิจัยคาดว่าสมบัติดังกล่าวของโพลีฟีนอลน่าจะเกิดจาก B-1) โพลีฟีนอลทำหน้าที่เป็นสาร catalyse ในกระบวนการ nitrosylation (เป็นกระบวนการเปลี่ยนสารประกอบจำพวก nitrite และ nitrates ในอาหารให้เป็น N-nitrosamines ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งและจะเกิดปฏิกิริยาได้ดีเมื่อมี pH ต่ำ โดยเฉพาะในกระเพาะอาหาร) B-2) โพลีฟีนอลอาจเหนี่ยวนำให้เกิด oxidative stress เมื่อมีสารรีดิวซ์ภายในเซลล์ เช่น ascorbate และ thiol รวมถึงเอนไซม์หรือสารจากกระบวนการส่งถ่ายอิเล็กตรอนซึ่งสามารถหมุนเวียนอนุมูลอิสระ phenoxyl กลับไปเป็น phenolic ดังเดิมแต่ในขั้นตอนนี้จะมีการผลิตอนุมูลอิสระตัวใหม่ขึ้นมา (secondary radicals) เช่น OH \cdot ไปทำปฏิกิริยากับผนังนิวเคลียสและ DNA นอกจากนี้โพลีฟีนอลยังเป็นสารออกซิเดนต์ได้ เช่น Morin จะแสดงความเป็น pro-oxidant เมื่อพบกับ NO ส่วนโพลีฟีนอลอื่นๆ จะแสดงความเป็น pro-oxidant เมื่อมีความเข้มข้นสูง B-3) โพลีฟีนอลหลายชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการ replication และ transcription คือ topoisomerase II โดยที่สารโพลีฟีนอล เช่น Tannins,

Catechin, flavones และ Genistein จะขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ไม่ให้ relegation สาย DNA ที่ขาดจน สะสมมากและเกิดการกลายพันธุ์เรียกว่า เป็น topo II “poison”⁽⁸⁴⁾

การทดสอบความสามารถของสารสกัดข้าวเหนียวดำในการป้องกันไขมันผนังเซลล์และโปรตีนจากอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดข้าวเหนียวดำในการป้องกันเม็ดเลือดแดงมิให้เสียสภาพจากภาวะ oxidative stress โดยใช้การทดสอบ 2 วิธีคือ Heinz body inhibition assay ซึ่งใช้เป็นแบบในการศึกษาการป้องกันโปรตีนโดยเฉพาะฮีโมซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญในเม็ดเลือดแดงจากสารออกซิเดนท์ และ Hemolysis inhibition assay เพื่อใช้ศึกษาการป้องกันผนังเซลล์มิให้ได้รับอันตรายจากอนุมูลอิสระ โดยผู้วิจัยใช้เม็ดเลือดแดงเป็นแบบในการศึกษาเนื่องจากสามารถเก็บตัวอย่างได้ง่ายและเป็นตัวแทนโปรตีน ไขมัน และผนังเซลล์ในร่างกายมนุษย์ได้อย่างดี เม็ดเลือดแดงเป็นเซลล์ที่มีปริมาณมากที่สุดในกระแสเลือดและมีหน้าที่สำคัญในการลำเลียงอาหารและออกซิเจนไปหล่อเลี้ยงอวัยวะต่างๆ ชั้น lipid bilayer ของผนังเม็ดเลือดแดงจะประกอบด้วยโปรตีน 50% ไขมัน 40% ซึ่งประมาณครึ่งหนึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว และคาร์โบไฮเดรตอีก 10% โปรตีนในไซโทพลาซึมประมาณ 95% คือ ฮีโมโกลบิน (5mM) ซึ่งทำหน้าที่ในการตรึงออกซิเจนไว้ด้วย Fe^{2+} ดังนั้นหากร่างกายเกิดภาวะ oxidative stress จึงทำให้เม็ดเลือดแดงซึ่งไม่มีการผลิตโปรตีนมาป้องกันได้เช่นเดียวกับเซลล์อื่นๆ ในร่างกายเสียสภาพได้ง่าย ซึ่งอาจทำให้ Fe^{2+} ที่บรรจุอยู่ภายในถูกปลดปล่อยออกมาและเร่งการออกซิเดชันกรดไขมันไม่อิ่มตัวบริเวณผนังเซลล์ไปเป็นสาร prostaglandins, leukotrienes หรือผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ lipid peroxidation อื่นๆ ซึ่งอาจทำให้เกิดพยาธิสภาพ เช่น การอักเสบ ณ บริเวณอื่นๆ ของร่างกายต่อไปโดยเฉพาะบริเวณหลอดเลือดหัวใจเนื่องจากสามารถรบกวนกระบวนการสร้างไนตริกออกไซด์ของเซลล์บุหลอดเลือด และพบว่าสารที่เกิดจากปฏิกิริยา lipid peroxidation เหล่านี้ยังมีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์และสามารถกระตุ้นให้ DNA แตกสลายซึ่งอาจทำให้เซลล์กลายพันธุ์เป็นมะเร็งได้⁽³⁰²⁻³⁰³⁾ จากงานวิจัยนี้พบว่า สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 100, 200, 400 และ 600 $\mu\text{g/ml}$ สามารถป้องกันผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงมิให้แตกสลาย เมื่อทำปฏิกิริยากับสารออกซิเดนท์ แต่สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ ไม่สามารถป้องกันโปรตีนฮีโมมิให้เสียสภาพจึงพบลักษณะ oxidized hemoglobin ตกตะกอนอยู่ตามผนังเซลล์ที่เรียกว่า Heinz body เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสารสกัดข้าวเหนียวดำเป็น 600 $\mu\text{g/ml}$ จึงสามารถป้องกันโปรตีนฮีโมมิให้เสียสภาพจากอนุมูลอิสระได้ ผู้วิจัยจึงสรุปว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สามารถป้องกันเม็ดเลือดแดงทั้งการป้องกันผนังเซลล์มิให้สูญเสียสภาพจาก lipid peroxidation และการเกิด protein oxidation คือที่ระดับความเข้มข้น 600 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสารสกัดข้าวเหนียวดำต่อไปที่ระดับ 800 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ จะทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (Hemolysis) ทั้งในการทดสอบ Heinz body inhibition assay และ Hemolysis inhibition assay ผู้วิจัยคาดว่า ณ ความเข้มข้นน้อยๆ นั้น ฟลาโวนอยด์ส์ในสารสกัดข้าวเหนียวดำจะจับกับ 1. โปรตีนบนผนังเซลล์โดยเฉพาะส่วน tryptophan ทำให้โปรตีนเปลี่ยนโครงร่าง (conformation) ทนทานต่อสภาวะแวดล้อมมากขึ้น 2. จับกับไขมันบนผนังเซลล์ทำให้เกิด lipid peroxidation ได้ยากขึ้น⁽¹⁰³⁾ ซึ่งมีงานวิจัยที่พบว่า ระดับ lipid peroxidation จะแปรผกผันกับระดับสารต้านอนุมูลอิสระ⁽³⁰⁴⁾ คือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสารสกัดข้าวเหนียวดำปริมาณมากขึ้นจะทำให้การเกิด lipid peroxidation และ protein oxidation ลดลงได้จริง แต่เนื่องจากมีรายงานว่าฟลาโวนอยด์ส์จะแทรกผ่านผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงได้น้อยมาก⁽³⁰⁵⁾ และ ณ ระดับ pH ในร่างกาย โพลีฟีนอลมักทำปฏิกิริยากับส่วนฟอสโฟลิปิดบนผนังเซลล์⁽³⁰⁶⁾ ณ

ระดับความเข้มข้นที่สูงมาก ผู้วิจัยคาดว่าแอนโทไซยานินสีในสารสกัดข้าวเหนียวดำซึ่งเข้มข้นมากจะรวมตัวกัน ณ บริเวณระหว่างชั้นน้ำและไขมันบนผนังเซลล์เหมือนฟลาโวนอยด์ส์อีกหลายตัวจากงานวิจัยอื่นๆ⁽³⁰⁷⁻³⁰⁸⁾ เมื่อมีปริมาณมากจึงก่อให้เกิดสภาวะล้อมรอบเซลล์ไม่เหมาะสม เช่น ไม่เป็น isotonic จึงทำให้น้ำเซลล์สูญเสียความยืดหยุ่น อีกทั้งฟลาโวนอยด์ส์ที่มีสมบัติเป็นสารรีดิวซ์อย่างแรง อย่างเช่น แอนโทไซยานินสีนั้นมักจะมี ความไวในการทำปฏิกิริยากับอากาศ เกิดปฏิกิริยา autooxidation ได้ง่ายและสร้างอนุมูลอิสระขึ้น⁽³⁰⁹⁾ เพราะโปรตีนส่วนใหญ่ที่พบในไซโทพลาซึมจะคงอยู่ในรูปรีดิวซ์ เมื่อความเข้มข้นของฟลาโวนอยด์ส์ภายในเซลล์ต่ำกว่าภายนอกเซลล์ (transmembrane gradient) เนื่องจากฟลาโวนอยด์ส์ผ่านเข้าผนังเซลล์ได้น้อย เป้าหมายของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่ตกอยู่ที่ผนังเซลล์ด้านนอก^(51,310-311) ทั้งปฏิกิริยาถูกโซ่ lipid peroxidation และ protein membrane oxidation แต่จากการศึกษารายงานวิจัยสารพิษชนิดอื่นพบว่า พิษของ ROS ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาที่มีต่อเนื้อเยื่อไม่ได้เกิดจาก Lipid peroxidation และการเติมสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งสามารถยับยั้งการเกิด Lipid peroxidation กลับไม่สามารถยับยั้งพิษของปฏิกิริยาหรือพาราเซตามอลในร่างกายได้ แต่กลับพบว่า การที่ระดับ GSH ลดลงอย่างรุนแรง DNA เสียหาย และการสูญเสียการควบคุม Ca^{2+} ภายในเซลล์ดังกล่าวนี้ที่พบว่าเป็นฤทธิ์ของสารพิษเหล่านี้⁽⁵⁵⁾ อีกทั้งยังมีรายงานว่าการแตกสลายของเม็ดเลือดแดงส่วนใหญ่มักเกิดจากการลดลงของระดับ GSH ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญและมีบทบาทมากที่สุดภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง⁽³¹²⁾ ดังนั้นการที่สารสกัดข้าวเหนียวดำก่อให้เกิดเม็ดเลือดแดงแตกนั้นอาจเกิดจากกลไกการลดระดับ GSH ภายในเซลล์ก็เป็นได้ จึงควรศึกษาถึงกลไกที่แท้จริงต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดข้าวเหนียวดำต่อเซลล์ต่างๆ จากร่างกายมนุษย์

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดข้าวเหนียวดำต่อเซลล์ทั้งเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง ผู้วิจัยใช้เซลล์ทั้งหมด 3 ชนิดในการศึกษาวิจัยนี้คือ 1. เซลล์มะเร็งตับ HepG2 ซึ่งนิยมใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาด้านพิษวิทยาและด้านพิษวิทยาของสารพิษ ซึ่งทางสมาคม Multicentre Evaluation of *In vitro* cytotoxicity แนะนำให้ใช้เซลล์ HepG2 ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและยอมรับว่าเป็นวิธี *In vitro* ในการตรวจสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสารพิษต่อร่างกายที่ดีที่สุด⁽³¹³⁾ นอกจากนี้ยังนิยมใช้ในการศึกษาสมบัติของสารต้านหรือก่อนอนุมูลอิสระและใช้เป็นตัวอย่างที่ดีในการศึกษาด้าน genotoxicity เช่น การศึกษาพิษของสาร Acrylamide⁽²⁸⁹⁾ รวมถึงกลไกในการเมแทบอลิซึมยาของเซลล์ซึ่งพบว่าดีกว่าเซลล์ในร่างกายอื่นๆ อีกหลายชนิดเนื่องจาก HepG2 ยังคงลักษณะของเซลล์ตับปกติอยู่อีกหลายประการเช่น การทำงานของเอนไซม์เฟส I และ II โดยเฉพาะเอนไซม์ CYP1A1 CYP1A2 CYP2A1 และ CYP3A4 ซึ่งทำหน้าที่ในการเมแทบอลิซึมยาและสารพิษหลายชนิด⁽³¹⁴⁾ ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ HepG2 เพื่อศึกษา 1. ฤทธิ์ของสารสกัดข้าวเหนียวดำและสารเมแทบอลิซึมที่เกิดขึ้นของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อตับ ทั้งแบบระยะสั้นและระยะยาวเนื่องจากตับเป็นอวัยวะหลักที่ทำการปรับเปลี่ยนสารต่างๆ เช่น สารพิษ ยาต่างๆ รวมถึงโพลีฟีนอลทุกชนิดเพื่อกำจัดสารที่อาจเป็นพิษต่อร่างกายทิ้งไป โดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องอยู่ 2 ระบบนั่นคือระบบเอนไซม์ Cytochrome P450 หรือเอนไซม์เฟส I monooxygenase ทำหน้าที่ปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารให้มีประจุมากขึ้น ทำให้สารเมแทบอลิซึมที่เกิดขึ้นมีความเป็นพิษลดลงหรือเพิ่มขึ้นก็ได้ และเอนไซม์เฟส II xenobiotic detoxification ที่จะทำการปรับเปลี่ยนสารเพื่อให้สามารถละลายน้ำได้มากขึ้นจนสามารถขับออกทางปัสสาวะหรือระบบน้ำดี โดยมากมักเติมหมู่น้ำตาลหรือหมู่ซัลไฟด์ให้ นอกจากนี้ตับยังเป็นผลิตภัณฑ์หลักของร่างกาย

หลายชนิดทั้งเอนไซม์ ฮอร์โมน สารในระบบภูมิคุ้มกันต่างๆ และโปรตีนขนส่ง การที่ดับเกิดภาวะผิดปกติ เช่น เกิดภาวะ oxidative stress จากพิษของยา แอลกอฮอล์ หรือการติดเชื้อ เช่น ไวรัสตับอักเสบ อาจทำให้เซลล์ตับได้รับความเสียหายจนการทำงานของเซลล์ตับเปลี่ยนไป เกิดการกระตุ้นยีนที่ตอบสนองต่อภาวะ oxidative stress เช่น NF-KB เพิ่มการผลิตโปรตีน pro-inflammation และ acute phase reactants หลายชนิด เช่น Fibrinogen, C-reactive protein (CRP), IL-6, TNF- α และ IL-1 β ออกมาปริมาณมาก ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะแพร่ไปและมีผลกระทบต่ออวัยวะอื่นๆ ในร่างกาย เช่น ระบบความดันเลือด ระบบประสาท ระบบกล้ามเนื้อ⁽³¹⁵⁾

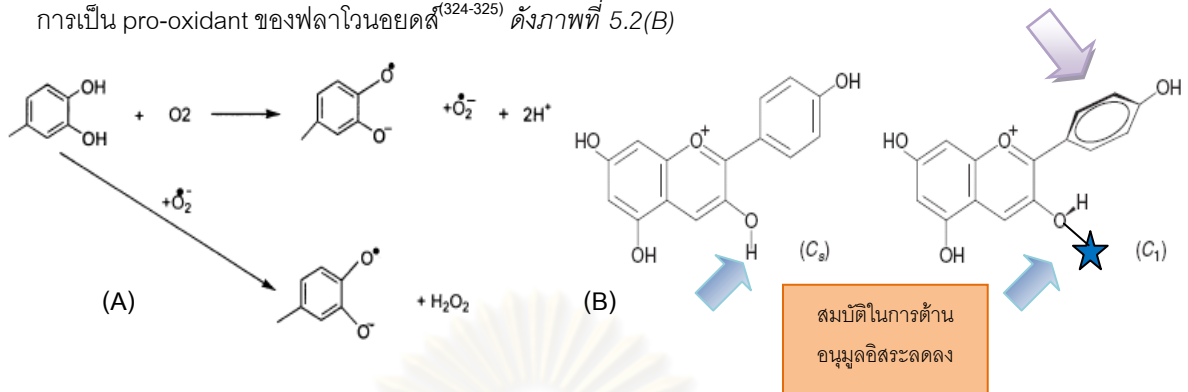
2. ศึกษาผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำต่อการเมแทบอลิซึมไขมันเนื่องจากตับเป็นอวัยวะหลักที่ทำหน้าที่รักษาระดับโคเรสเตอรอลในร่างกายและเป็นอวัยวะหลักในการสังเคราะห์ apolipoprotein ชนิด apoB100 ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ VLDL⁽¹⁹⁸⁾ และผู้วิจัยได้เลือกใช้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ Jurkat และเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ปกติในการศึกษาพิษของสารสกัดข้าวเหนียวดำในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตาย ซึ่งเซลล์ลิมโฟไซต์เป็นเซลล์ที่นิยมใช้เป็นแบบในการศึกษากลไกการตายแบบ Apoptosis⁽³¹⁶⁾ ลักษณะของเซลล์จะเปลี่ยนไป ดังนี้คือ มีรูปร่างผิดปกติ โครมาทินขดกลมแน่น DNA แตกสลายออกมาและมีรูปร่างในไซโทพลาซึมจนเซลล์ไม่สามารถทำงานได้และตายในที่สุด ซึ่งเป็นการตายของเซลล์ภายใต้ภาวะปกติหรือการรับยาบางชนิด อย่างเช่น ยาต้านมะเร็ง Cycloheximide หรือ ActinomycinD เป็นต้น นอกจากนี้อนุมูลอิสระหรือออกซิเจนก็สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายได้โดยเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์และจับกับ DNA รวมถึงขัดขวางการสังเคราะห์ DNA ซึ่งส่งผลกระทบต่อกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน และ RNA ต่อไป จนเซลล์ไม่สามารถดำรงชีวิต ผู้วิจัยใช้เวลาในการทดสอบสารสกัดข้าวเหนียวดำตามเวลาในการแบ่งตัว (doubling time) ของเซลล์แต่ละชนิดเป็นหลักเพื่อให้ปริมาณเซลล์สุดท้ายในทุกการทดลองมีจำนวนเท่ากันหมด อีกทั้งผู้วิจัยพบว่าฟลาโวนอยด์แต่ละชนิดมีต่อการแบ่งตัวของเซลล์แตกต่างกันเช่น Quercetin จะเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายโดยกระตุ้นระดับ oxidative stress ให้เพิ่มขึ้น ในขณะที่ Luteolin เหนี่ยวนำให้เซลล์ดับหนู H4IIE ตายโดยการขัดขวางการทำงานของ Topoisomerase II ทำให้เกิดการแตกของสาย DNA สะสมไปเรื่อยๆ⁽²⁹⁸⁾ แม้แต่สารที่อยู่ในกลุ่มแอนโทไซยานินส์เหมือนกันก็มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์แตกต่างกัน เช่น Cyanidin-3-glucoside และ Peonidin-3-glucoside ทั้งคู่เพิ่มกิจกรรมของ caspase 3 และสามารถลดระดับโปรตีน Cyclin-dependent Kinase (CDK)-1, CDK-2, CyclinB1 เช่นเดียวกันแต่ต่างกันว่า Peonidin-3-glucoside จะลดปริมาณ CyclinE ส่วน Cyanin-3-glucoside จะลดปริมาณ CyclinD1⁽¹⁵⁾ ดังนั้นการใช้เวลาทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำที่เท่ากัน (เช่น 24 หรือ 48 ชั่วโมงเท่ากันในทุกชนิดของเซลล์) ผู้วิจัยคิดว่าอาจไม่ครอบคลุมจุดใดจุดหนึ่งซึ่งอาจเป็นกลไกของสารที่มีผลกระทบต่อเซลล์ชนิดนั้น เนื่องจากเซลล์แต่ละชนิดใช้เวลาในการแบ่งตัวไม่เท่ากัน ผู้วิจัยคาดว่าใช้เวลาทดสอบสารตามเวลา doubling time ของเซลล์นั้นๆ น่าจะให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องตามความเป็นจริงมากกว่า เมื่อทดสอบเซลล์ HepG2 กับสารสกัดข้าวเหนียวดำเป็นเวลา 29 ชั่วโมง ผู้วิจัยพบว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำแทบไม่มีผลต่อ Viability เซลล์เลยมีเพียงสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นสูงมากๆ เท่านั้นที่เริ่มมีผลลด viability (ความเข้มข้น 3000 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อทดสอบด้วยวิธี NR) เมื่อผู้วิจัยทำการทดสอบสารสกัดข้าวเหนียวดำกับเซลล์เป็นเวลาที่ยาวขึ้นคือ 58 ชั่วโมง สังเกตพบว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำสามารถลด viability เซลล์ได้มากขึ้น (ความเข้มข้น 2000, 3000 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT และ 1500, 2000, 3000 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อทดสอบด้วยวิธี NR) และเมื่อลองทำการทดสอบกับเซลล์ชนิดอื่นคือ เซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (PBMCs) พบว่าเริ่มแรก (24 ชั่วโมง) สารสกัดข้าวเหนียวดำจะไม่มีผลต่อเซลล์ แต่เมื่อทดสอบเซลล์กับสารสกัด

เป็นเวลานานขึ้น (48 ชั่วโมง) จะทำให้ viability เซลล์ลดลงอย่างรวดเร็ว (ความเข้มข้น 800, 1000 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อตรวจสอบโดยใช้วิธี MTT) ในกรณีเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat ก็พบลักษณะเดียวกันนั้นคือ เฉพาะสารสกัดความเข้มข้นสูงมากๆ เท่านั้น (ความเข้มข้น 3000 $\mu\text{g/ml}$ ณ เวลา 24 ชั่วโมง และ 1500, 2000, 3000 $\mu\text{g/ml}$ ณ เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบโดยใช้วิธี MTT) ที่ลด viability เซลล์ ผลการทดสอบบางประการที่น่าสนใจก็คือ เมื่อทดสอบด้วย MTT การลดความเข้มข้นลงมาอยู่ในช่วงระหว่าง 400 ถึง 800 $\mu\text{g/ml}$ กลับเพิ่ม viability เซลล์ทั้ง HepG2 (ความเข้มข้น 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ ณ เวลา 58 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบโดยใช้วิธี MTT) และ Jurkat (ความเข้มข้น 400, 600, 800 $\mu\text{g/ml}$ ณ เวลา 24 ชั่วโมง และ 400, 600 $\mu\text{g/ml}$ ณ เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบโดยใช้วิธี MTT) ซึ่งเมื่อทดสอบ HepG2 ด้วยวิธี NR ก็ไม่พบค่า viability ที่เพิ่มขึ้นนี้ ผู้วิจัยจึงลองทดสอบค่า viability ด้วยอีกวิธีหนึ่งคือ Trypan Blue Dye Exclusion กับเซลล์ Jurkat พบว่าเซลล์ลดการแบ่งตัวลงเมื่อความเข้มข้นสารสกัดข้าวเหนียวดำและเวลาที่ทำการทดสอบเพิ่มขึ้น (24, 48, 72 ชั่วโมง) (Dose and time-dependent manner) (ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบ Acridine-Orange Stain เพื่อยืนยันผลการทดสอบนี้และไม่พบลักษณะเซลล์ตายแต่อย่างใดเมื่อทดสอบเซลล์กับสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 50 ถึง 600 $\mu\text{g/ml}$ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้นเป็น 800 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ กลับพบลักษณะเซลล์ตายทั้งแบบ apoptosis และ necrosis : ไม่แสดงข้อมูล) ในการทดสอบนี้ ผู้วิจัยคาดว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 400 และ 600 $\mu\text{g/ml}$ นั้นอาจเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ organelle เช่นไมโทคอนเดรียหรือเอนโดพลาสมิก เรติคูลัมเท่านั้น โดยไม่มีผลกระทบต่อการอยู่รอดของเซลล์แต่สามารถลดการแบ่งตัวของเซลล์ Jurkat ซึ่งเป็นลักษณะที่เรียกว่า cytostatic เช่นเดียวกับฟลาโวนอยด์ส Tangerelin และ Nobietin ในผลไม้วรสเปรี้ยวซึ่งสามารถหยุดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-435, MCF-7 และเซลล์มะเร็งลำไส้ HT-29 ไว้ในระยะ G1 เฟสโดยไม่มีผลทำให้เซลล์ตายในลักษณะ Dose-time dependent manner⁽³¹⁷⁾ ซึ่งสารที่แสดงสมบัติเป็น cytostatic มีข้อดีคือสามารถเพิ่มช่องว่างระหว่าง effective dose และ toxic dose ดังนั้นผู้ป่วยจะมีความเสี่ยงน้อยกว่ายาที่เป็น cytotoxic เมื่อศึกษาปฏิกริยาเคมีในกระบวนการตรวจทั้ง 3 วิธีแล้วจะพบว่าการวัดด้วยสารประกอบ MTT มักจะขึ้นกับ 1. ปริมาณสาร NADH และ NAD(P)H ภายในเซลล์ซึ่งผลิตจากขบวนการ glycolytic และจะเป็นตัววัดวิธี MTT และ 2. เอนไซม์ภายในเอนโดพลาสมิก เรติคูลัมและไมโทคอนเดรียเพื่อทำหน้าที่เร่งปฏิกริยาดังกล่าว ดังนั้นค่าที่ได้จึงมักใช้บ่งชี้ภาวะเสียหายของเอนโดพลาสมิก เรติคูลัมและไมโทคอนเดรีย ส่วนค่าที่ได้จากการทดสอบด้วย NR assay มักบ่งชี้ถึงระดับพลังงานและกิจกรรมของเซลล์ซึ่งใช้ในการเก็บกินสี Neutral red และวิธี Trypan Blue Dye Exclusion จะเป็นการตรวจวัดความเสียหายของผนังเซลล์ ค่าทั้ง 3 จึงไม่จำเป็นต้องเท่ากันเพราะกลไกปฏิกริยาและความไวในการตรวจวัดทั้ง 3 วิธีนี้แตกต่างกัน จากผลงานวิจัยอื่นพบว่า ฟลาโวนอยด์สอื่นๆ จะมีประโยชน์ในการป้องกันเซลล์เมื่อมีความเข้มข้นต่ำและเมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้นก็มักจะมีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งค่าความเข้มข้นที่จัดว่าสูงนั้นจะมีค่าตั้งแต่ 50 μM ขึ้นไป เช่น Quercetin และ Fisetin (10-25 $\mu\text{M/L}$) จะมีฤทธิ์ป้องกันเซลล์ตับหนู H4IIE และ DNA จาก H_2O_2 ⁽²⁹⁶⁾ Quercetin (10 μM) สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวและเพิ่มระดับปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระของเซลล์มะเร็งปอด A549⁽³¹⁸⁾ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้น (50-250 $\mu\text{M/L}$) พบว่าทั้งสอง ออกฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์สามารถทำลาย DNA และกระตุ้นการทำงานของ caspase อย่างเดียว โดยไม่พบ lipid peroxidation และไม่มี การสร้าง ROS เพิ่มขึ้นในเซลล์⁽²⁹⁶⁾ Quercetin ยังมีผลลดจำนวนเซลล์มีชีวิต (live cell), ปริมาณ สาร thiol ภายในเซลล์ รวมทั้งเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น SOD, Cat และ GST และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ตัว

อื่นๆ โดยรวมของเซลล์⁽³¹⁸⁾ Luteolin ที่พบมากในเปลือกโคลี่ พริกหวาน และต้นหอมก็มีความเป็นพิษเช่นเดียวกันหากใช้ในปริมาณมาก (Efficiency concentration : $EC_{50} = 95 \mu M$) โดยมีฤทธิ์เป็น pro-oxidant สามารถผลิตอนุมูลอิสระ $OH\cdot$ จากกระบวนการ autooxidation และ redox-cycling เข้าสลาย DNA และกระตุ้นระบบ caspase ภายในเซลล์รวมทั้งก่อให้เกิดปฏิกิริยาถูกไข่ lipid peroxidation ในเซลล์ตับหนู H4IIE⁽²⁹⁷⁾ Kaempferol ($50 \mu M$) ที่เข้าสู่เซลล์ตับหนู H4IIE อย่างรวดเร็วและสามารถป้องกันเซลล์ตับหนูจาก H_2O_2 ($500 \mu M$) มิให้ทำลาย DNA ลด oxidative stress ภายในเซลล์ และลดการกระตุ้น caspase แต่ Kaempferol ความเข้มข้นเดียวกันนี้ ก็กลับก่อให้เกิด lipid peroxidation ลดปริมาณ เซลล์มีชีวิตลงกว่าครึ่ง เพิ่มการแตกสลายของ DNA จนเป็นเห็นเป็นลักษณะ DNA Ladder⁽⁹⁾ ผู้วิจัยสรุปว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำ ความเข้มข้นสูงมาก ($3000 \mu g/ml$) เท่านี้ที่มีฤทธิ์เป็นพิษ สามารถลด viability ของเซลล์มะเร็งทั้ง HepG2 และ Jurkat ในเวลาอันสั้นหรือแบบเฉียบพลัน (ภายใน 24-29 ชั่วโมง) ส่วนสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นสูงระดับอื่นๆ ($800, 1000, 1500$ และ $2000 \mu g/ml$) จะก่อพิษเมื่อทดสอบกับเซลล์เป็นระยะเวลาที่นานขึ้น ส่วนสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นต่ำ (400 และ $600 \mu g/ml$) และความเข้มข้นที่ต่ำมากๆ ($50, 100$ และ $200 \mu g/ml$) ไม่มีผลใดๆ ต่อ Viability ของเซลล์

ผู้วิจัยคาดว่าลักษณะที่เป็นพิษของสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นสูงนี้อาจเกิดจาก ประการแรก สารสกัดข้าวเหนียวดำเมื่อมีปริมาณความเข้มข้นสูงจะเก็บกินอนุมูลอิสระจนหมด เมื่อในสภาวะแวดล้อมไม่มีอนุมูลอิสระหลงเหลือ สารสกัดก็จะแสดงสมบัติเป็น pro-oxidant สามารถสร้างอนุมูลอิสระได้จากกระบวนการ autooxidation และ redox-cycling ดังที่กล่าวไปแล้วหรือเกิดเป็นสาร Quinone ซึ่งเป็นสารที่ไวต่อการทำปฏิกิริยามาก โดยเฉพาะกับหมู่ฟังก์ชันที่เป็น nucleophiles เช่น หมู่ thiol บนกรดอะมิโน cysteine ให้กลายเป็นสารประกอบ quinone-thiol หรือ Michael adduct ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์รุนแรงเพราะรบกวนการเชื่อมพันธะ Disulfide ของโปรตีนให้ผิดพลาดเกิดเป็นโปรตีนโครงสร้างที่ไม่ถูกต้องสะสมอยู่ในเอนโดพลาสมิก เรติคูลัมทำให้เกิดความเครียด (ER Stress)⁽³¹⁹⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เมื่อผสมสารฟลาโวนอยด์กับอาหารเลี้ยงเซลล์ ฟลาโวนอยด์จะบริจาศไฮโดรเจนอะตอมบนโครงสร้าง catechol บนวงแหวน B ให้กับออกซิเจนในกระบวนการ autooxidation ดังภาพที่ 5.2(A) เพื่อจับตัวเป็นโครงสร้างเชิงซ้อน dimer และปลดปล่อย ROS เช่น H_2O_2 และ $O_2^{\cdot -}$ ออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์⁽³²⁰⁻³²²⁾ ผู้วิจัยคาดว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 400 หรือ $600 \mu g/ml$ น่าจะเก็บกินอนุมูลอิสระในระบบทั้งหมดได้แล้วจึงเริ่มแสดงสมบัติเป็น pro-oxidant บ้าง ทำให้เซลล์เกิดการตอบสนองโดยการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ โดยเฉพาะเอนไซม์กำจัดสารพิษเพื่อป้องกันตนเองทันที^(51,99) นอกจากนี้ผู้วิจัยยังคิดว่ายังมีเหตุผลอีกประการหนึ่งที่เป็นไปได้ นั่นคือ ยีนถอดรหัสเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น GST และเอนไซม์ที่สามารถผลิตอนุมูลอิสระ เช่น CytochromeP450 จะมีบริเวณ antioxidant response element (ARE) บนส่วน promoter ซึ่งตอบสนองต่อภาวะเครียดต่างๆ โพลีฟีนอลอาจจับกับส่วน ARE โดยตรงหรือผลิตสาร pro-oxidant ขึ้นจนกระตุ้นให้ ARE นี้เริ่มการทำงานก็เป็นได้⁽⁸⁴⁾ เมื่อความเข้มข้นสารสกัดข้าวเหนียวดำเพิ่มขึ้นคุณสมบัติในการเป็น pro-oxidant ก็จะมากขึ้นด้วย ทำให้เซลล์ไม่อาจต้านทานหรือซ่อมแซมส่วนที่ถูกทำลายไม่ไหวจนตายไปในที่สุด⁽⁵⁰⁾ ประการที่สอง สารสกัดข้าวเหนียวดำ อาจถูกเมแทบอลิต์เป็นสารที่คุณสมบัติเปลี่ยนไป ผู้วิจัยพบว่าการเติมหรือตัดหมู่บนโครงสร้างฟลาโวนอยด์ เช่น การ conjugation บนวงแหวน C จะมีผลต่อความราบของโมเลกุล (planarity) ทำให้สารทนทานต่อสภาวะแวดล้อม สามารถรับส่งอิเล็กตรอนได้มากขึ้น รวมทั้งมีอิทธิพลต่อมุมบิดตัวของวงแหวน B ให้ราบโดยการลด

rotational energy barrier ซึ่งจะมีผลต่อการจับกับสารชีวโมเลกุล เช่น DNA⁽³²³⁾ รวมถึงการผ่านเข้าผนังเซลล์ของสารอีกด้วย หรือการเติมหมู่เมทิลให้วงแหวน B ก็มีอิทธิพลต่อคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและสมบัติการเป็น pro-oxidant ของฟลาโวนอยด์⁽³²⁴⁻³²⁵⁾ ดังภาพที่ 5.2(B)



ภาพที่ 5.2: การสร้างอนุมูลอิสระเมื่อฟลาโวนอยด์ทำปฏิกิริยากับอากาศจะเกิดอนุมูลอิสระ เช่น $O_2^{\cdot-}$ และ H_2O_2 ขึ้น⁽³²⁰⁾ โดยฟลาโวนอยด์ยังมีหมู่ OH บนวงแหวน B มากเท่าใดก็ยิ่งทำให้ 1. สามารถต้านอนุมูลอิสระได้มาก 2. เกิดปฏิกิริยาสร้างอนุมูลอิสระได้มาก (A), ผลการเกาะของหมู่ Hydroxyl บนวงแหวน C จะมีผลต่อความرابของโมเลกุลฟลาโวนอยด์ ตัวอย่างในภาพคือ pelargonidin เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งมีผลต่อคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสาร⁽¹²²⁾(B)

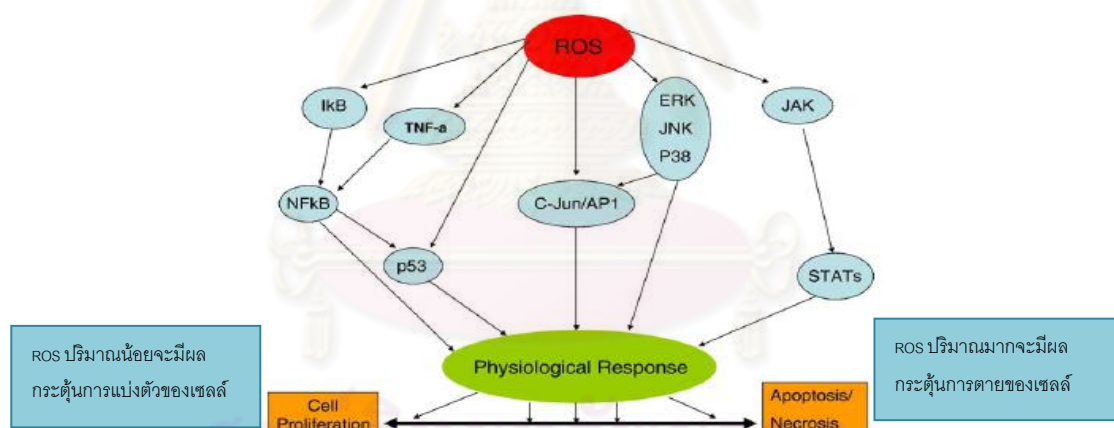
นอกจากนี้ต้องคำนึงด้วยว่าการทดสอบแบบ *In vitro* นั้นมักได้รับอิทธิพลจากสภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการทดสอบ เช่น pH, ปริมาณไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์รวมถึงสภาวะรีดอกซ์ของสิ่งแวดล้อมและวิธีการตรวจสอบซึ่งล้วนมีผลกระทบต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระหรือรอกอนุมูลอิสระของสาร (pH มีผลต่อโครงสร้างฟลาโวนอยด์และความสามารถในการทำปฏิกิริยา ปริมาณไอออนมีผลโดยตรงต่อค่า reducing power ของฟลาโวนอยด์)⁽³²³⁾ ฟลาโวนอยด์อาจถูกออกซิไดซ์ได้ทันที ณ สภาวะที่อุณหภูมิสูง โดยเฉพาะกับอาหารเลี้ยงเซลล์ (โดยเฉพาะ DMEM ที่มีปริมาณเหล็กไอออนสูง) เกิดเป็นสารอนุมูลอิสระ เช่น phenoxyl radical⁽³²¹⁻³²²⁾ นอกจากนี้มีรายงานว่า ฟลาโวนอยด์ยังเก็บกักอนุมูลอิสระได้ลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่มี HCO_3^-/CO_2 เป็นระบบบัฟเฟอร์ ซึ่งจะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับ peroxyxynitrite เกิดเป็นอนุมูลอิสระที่ฟลาโวนอยด์เก็บกักได้ไม่ค่อยดี⁽¹⁰⁹⁾ อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากการที่ ฟลาโวนอยด์ทำปฏิกิริยากับสิ่งแวดล้อมมักทำให้นักวิจัยส่วนมากเข้าใจผิดว่า ฟลาโวนอยด์สามารถแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง การแยกผลของฟลาโวนอยด์จริงกับผลหลุดดังกล่าวนี้ได้เป็นไปได้ยากมากเนื่องจากต้องควบคุมการทดลองให้อยู่ในสภาวะที่เกิด phenol oxidation น้อยที่สุด⁽³²⁵⁾ อีกทั้งการทดสอบแบบ *In vitro* มักใช้ความเข้มข้นที่สูงมากและไม่อาจพบได้ในร่างกาย หากทำการทดสอบเซลล์กับความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกับที่พบในร่างกายหรือการศึกษาแบบ *In vivo* แล้วจึงมักไม่ได้ผลในการป้องกันร่างกายดังเช่นที่พบจากการทดลองแบบ *In vitro* ตัวอย่างเช่น แอนโทไซยานินส์ความเข้มข้น $0.5 \mu M$ ซึ่งเป็นระดับที่ใกล้เคียงกับที่พบในร่างกายกลับไม่สามารถป้องกันพิษของยา Dioxin ($0.1 nM$) ซึ่งทำให้เกิดการ transformation ของ Aryl hydrocarbon receptor (Ahr) ซึ่งเป็น transcription factor ที่ควบคุมการถอดรหัสของไซม์ เช่น CYP1A1, GST และ NAD(P)H Quinone oxidoreductase (NQO) ทั้งที่ความเข้มข้นสารที่สูงขึ้นจะป้องกันพิษดังกล่าวได้⁽²⁸⁶⁾ บางการวิจัยจะทำการทดลองในเซลล์และสัตว์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดพยาธิสภาพ มิได้ทำการทดลองในสภาวะปกติ ยกตัวอย่างเช่น หนูปกติที่ได้รับไวโรแดงซึ่งมีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงพบว่า ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวมในพลาสมาสูงขึ้น

จริงแต่ไม่พบฟลาโวนอยด์ที่เพิ่มขึ้นและความแตกต่างระหว่างปริมาณ dienes หรือ malondialdehyde (MDA) ของหนูทั้งกลุ่มที่ได้รับไวน์และไม่ได้รับไวน์ นักวิจัยในการทดลองนี้คาดว่าในหนูปกตินั้นไม่มีภาวะ oxidative stress ใดๆ ที่จะกระตุ้นระบบการป้องกันและอาจเป็นเพราะระดับความเข้มข้นของฟลาโวนอยด์ในเลือดต่ำมากจนไม่มีผลป้องกัน LDL oxidation ก็เป็นไปได้⁽³²⁶⁾

ความสามารถของสารสกัดข้าวเหนียวดำในการลดระดับ Oxidative stress ภายในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง

เมื่อทำการทดสอบความสามารถของสารสกัดข้าวเหนียวดำในการลดระดับ oxidative stress ภายในเซลล์โดยใช้วิธี DCFH-DA assay กับเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง 2 ชนิดคือ HepG2 และ Jurkat พบว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำไม่มีผลต่อระดับ oxidative stress ภายในเซลล์ Jurkat แต่อย่างใด (ทุกความเข้มข้นทั้งเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง) แต่พบว่าสามารถลดระดับ oxidative stress ในเซลล์ HepG2 ได้ แต่เมื่อเวลาที่ทำการทดสอบนานขึ้น ระดับความเข้มข้นสารสกัดข้าวเหนียวดำที่พบว่าสามารถลดระดับ oxidative stress ภายในเซลล์ได้จะลดลง (ความเข้มข้น 600, 800, 1000 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 29 ชั่วโมง และ 800, 1000 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 58 ชั่วโมง) ผู้วิจัยจึงได้นำเซลล์ HepG2 ทำการทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำพร้อมกับ H_2O_2 (0.25 mM) พบว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำสามารถลดระดับ oxidative stress ภายในเซลล์ที่เกิดจากพิษ H_2O_2 ได้ แต่เมื่อทำการทดสอบที่นานขึ้น ความสามารถในการลดระดับ oxidative stress ภายในเซลล์ของสารสกัดข้าวเหนียวดำจะลดลงเช่นเดียวกับในการทดสอบเซลล์กับสารสกัดเพียงอย่างเดียว (800, 1000 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 29 ชั่วโมง และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 58 ชั่วโมง) จากผลการทดลองพอสรุปได้ว่า 1. สารสกัดข้าวเหนียวดำอาจออกฤทธิ์จำเพาะต่อชนิดของเซลล์ ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น สารสกัดอาจเข้าเซลล์แต่ละชนิดได้ไม่เท่ากัน มีรายงานวิจัยที่พบว่าฟลาโวนอยด์สามารถเข้าเซลล์เพิ่มขึ้นหลายเท่าหากในระบบมี ATP อยู่ ดังนั้นเซลล์ใดที่มีระดับ ATP ในเซลล์สูง เช่น HepG2 ซึ่งเป็นเซลล์ตับมีอัตราการเมแทบอลิซึมสูง ก็น่าที่จะรับฟลาโวนอยด์เข้าเซลล์ได้มากกว่า⁽³⁰⁷⁾ 2. เมื่อลองเปรียบเทียบผลการทดสอบเซลล์ HepG2 กับสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นเดียวกัน ณ เวลา 29 และ 58 ชั่วโมง พบว่าความสามารถในการต้าน oxidative stress ลดลงเมื่อเวลานานขึ้น เหตุผลที่เป็นไปได้ ประการแรกคือ สารสกัดข้าวเหนียวดำเป็น pro-oxidant ผลิตอนอนุมูลอิสระสะสมในเซลล์ เมื่อเวลานานขึ้นอนุมูลอิสระจะมีมากขึ้นจนเป็นพิษต่อเซลล์ เช่น เข้าทำลายสารชีวโมเลกุล และเปลี่ยนแปลงสภาพรีดอกซ์ภายในเซลล์ หากระดับรีดอกซ์ภายในและภายนอกเซลล์ไม่สมดุลจะทำให้การส่งสัญญาณของเซลล์ (cell signaling) ผิดปกติเนื่องจาก ROS เป็นสารส่งสัญญาณที่สำคัญ ทำหน้าที่ควบคุม transcription factor และการแสดงออกของยีนหลายชนิด มีการวิจัยฟลาโวนอยด์ชนิดอื่นคือ Quercetin ที่พบว่าลดการผลิต ROS ภายในเซลล์แต่กลับเพิ่มการสร้างเปอร็อกไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์⁽³¹⁸⁾ ประการที่ 2 สารสกัดข้าวเหนียวดำเกิดการแตกสลายเมื่อเวลาผ่านไปมากขึ้น โดยเฉพาะแอนโทไซยานินส์ซึ่งพบว่าไม่เสถียรและแตกสลายได้ง่ายและรวดเร็วเมื่ออยู่ในสภาวะ pH ที่เป็นกลางและอุณหภูมิสูง จึงทำให้ความสามารถในการต้าน oxidative stress ลดลงเมื่อเวลานานขึ้น 3. ในกรณีของ Jurkat แม้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับ oxidative stress ภายในเซลล์ก็ไม่ได้หมายความว่าไม่มีผลจากกลไกอย่างอื่น เนื่องจากพบว่าเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อทดสอบผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่มีต่อ viability ของเซลล์แสดงว่าสารสกัดไม่ได้เป็นพิษต่อเซลล์โดยการเพิ่ม ROS ภายในเซลล์แต่อาจก่อพิษด้วยกลไกอื่นเช่นเดียวกับโพลีฟีนอลอื่นๆ ที่มีได้มีผลต่อเซลล์ผ่านกลไกระบบเพิ่มหรือลด ROS เช่น ฟลาโวนอยด์ที่พบในช็อกโกแลตแม้จะไม่สามารถลดระดับ oxidative stress

ในซีรัมได้ แต่พบว่าสามารถปรับปรุงการทำงานของเซลล์บุหลอดเลือดให้ดีขึ้น⁽³²⁷⁾ หรือ Tanshonones IIA ที่สกัดได้จากต้น Denshen สามารถกระตุ้นการตายแบบ apoptosis โดยไม่อาศัยอิทธิพลจากกลไก oxidative stress⁽³²⁸⁾ ในกรณีของ HepG2 การเพิ่มขึ้นของ ROS ภายในเซลล์จะรบกวนการรับส่งสัญญาณทาง ligand-receptor binding ซึ่งจะเกิดการ autophosphorylation ของรีเซพเตอร์และเกิดการส่งสัญญาณต่อไป โดยเฉพาะกับ stress-activated protein kinase (SAPK) เช่น NF- κ B, MAPK/AP-1, JNK, p38 และ hypoxia-inducible factor 1 (HIF) เป็นต้น การที่เซลล์ดับมีระดับ oxidative stress ลดลง ผู้วิจัยคาดว่าน่าจะช่วยให้ยีนเหล่านี้ลดการแสดงออก สามารถปรับการสร้างและการหลั่งโปรตีนที่อาจเป็นพิษ เช่น pro-inflammation protein ให้สมดุล 4. เมื่อเปรียบเทียบผลของการทดสอบอื่นที่ผ่านมา พบว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นตั้งแต่ 800 μ g/ml ขึ้นไปจะมีผลเป็นพิษต่อเซลล์แต่ในการทดสอบนี้กลับพบว่า สารสกัดความเข้มข้น 800 และ 1000 μ g/ml กลับมีผลลด oxidative stress มากที่สุด ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าน่าจะเกิดจากฟลาโวนอยด์ส์อาจลดระดับ ROS ภายในเซลล์ได้จริงแต่ในขณะเดียวกันนั้นจะผลิตสาร ROS ออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งการลดลงของ ROS ภายในเซลล์และการที่เซลล์ไม่สามารถควบคุมการไหลเข้า (influx) ของไฮโดรเจนอะตอมจากอาหารเลี้ยงเซลล์ได้จึงทำให้เกิดภาวะ disorders of redox homeostasis ซึ่งรบกวนการส่งสัญญาณของเซลล์ เนื่องจาก ROS ก็เป็นสาร signal molecule เช่นกัน⁽³²⁹⁾ นอกจากนี้ผู้วิจัยพบว่า DCFH-DA assay เป็นวิธีที่มีความไวและเป็นการตรวจสอบภาวะ oxidative stress ภายในเซลล์โดยรวมโดยตรง แต่ก็มีข้อเสียคือ วิธีนี้จะใช้วัดความเป็นพิษของสารที่ฟังกดไกลการสร้าง ROS บางตัวเพิ่มขึ้นเป็นฤทธิ์ของการเกิดพิษ⁽³¹³⁾ เท่านั้น



ภาพที่ 5.3: การตอบสนองของเซลล์ต่อภาวะ Oxidative stress (ROS) ที่มีผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน และ transcription factor ที่มีสมบัติเป็น redox sensitive

ผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมไขมันของเซลล์ตับ HepG2

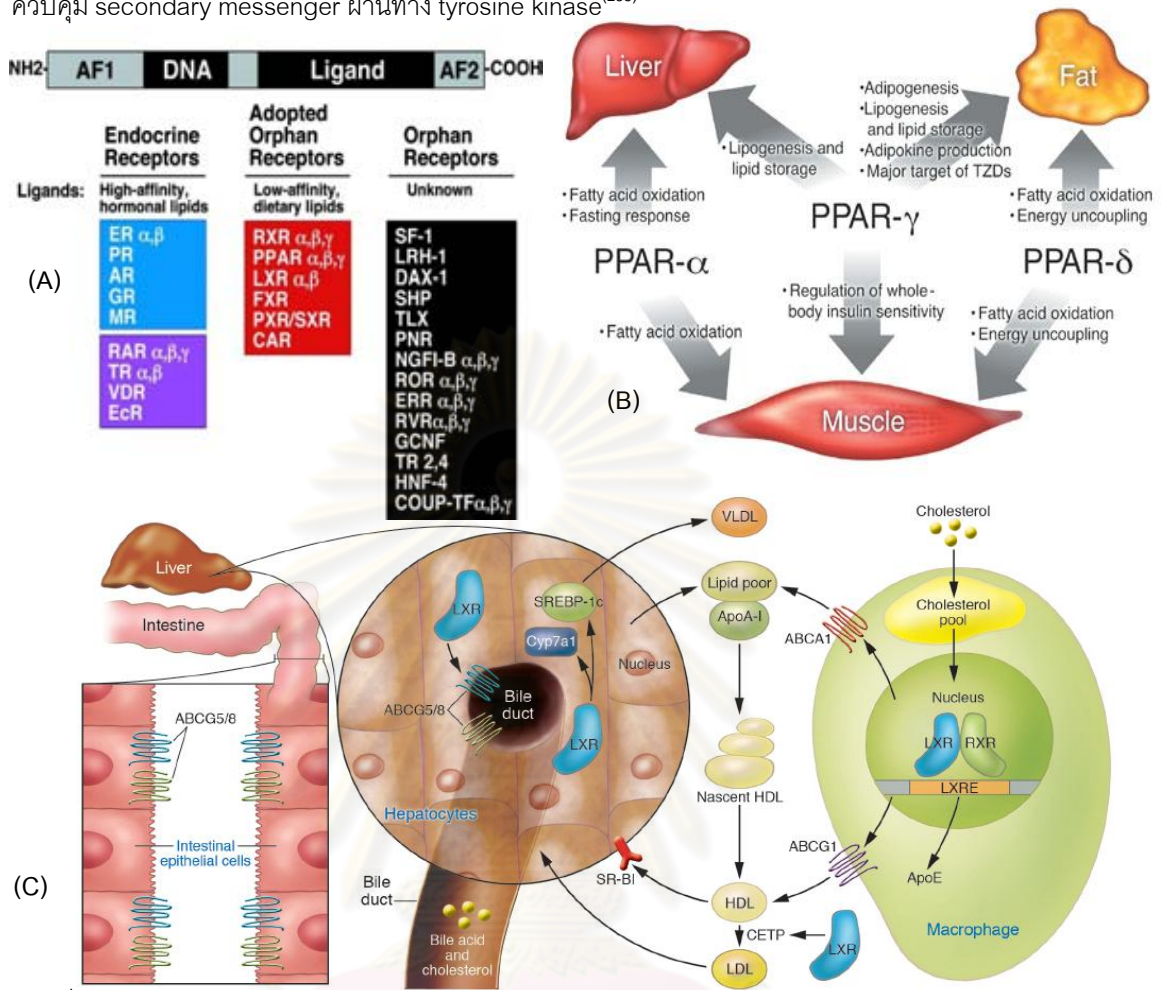
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดข้าวเหนียวดำต่อการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมเมแทบอลิซึมไขมันทั้งหมด 5 ยีนคือ LDLR, HMGCoAR, PPAR α , PPAR γ และ LXR α โดย LDLR เป็นโปรตีนรีเซพเตอร์บนผนังเซลล์ ทำหน้าที่รับ LDL เข้าเซลล์, HMG-CoA reductase เป็น rate-limiting เอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลขึ้นเองภายในเซลล์ซึ่งทั้ง LDLR และ HMG-CoA reductase จะทำงานเพื่อคงระดับโคเลสเตอรอลภายในเซลล์ให้สมดุล ส่วน PPAR α , PPAR γ และ LXR α เป็น nuclear receptor ที่

ควบคุมยีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมของสารอาหารโดยเฉพาะไขมันและคาร์โบไฮเดรต ผู้วิจัยเลือกใช้สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 200, 400 และ 600 $\mu\text{g/ml}$ ในการทดสอบผลต่อการแสดงออกของยีนครั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีฤทธิ์เป็นลดค่า viability ของเซลล์ เมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT assay และ NR accumulation assay จากการทดลองผู้วิจัยพบว่า สารสกัดข้าวเหนียวดำมีฤทธิ์เพิ่มการแสดงออกของยีน LDLR โดยสารสกัดความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ มีผลเพิ่มการแสดงออกมากที่สุดและการแสดงออกจะลดลงเมื่อความเข้มข้นสารสกัดเพิ่มขึ้น ผู้วิจัยคาดว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำ ณ ระดับความเข้มข้น 400 และ 600 $\mu\text{g/ml}$ สารสกัดข้าวเหนียวดำเริ่มแสดงฤทธิ์ pro-oxidant ดังที่กล่าวไปแล้ว จึงอาจทำให้ลดการแสดงออกของยีน LDLR อย่างชัดเจน ซึ่งในรายงานการวิจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับพลาโวนอยด์และผลต่อการเมแทบอลิซึมไขมันพบว่า ในหนูที่ได้รับ Genistein ความเข้มข้นน้อย (0.1%) จะเพิ่มระดับการทำงานของไมโทคอนเดรียรวมทั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและใช้ไขมันแต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้น (0.4%) จะเปลี่ยนเป็นยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมของตับทำให้มีระดับไขมันไตรกลีเซอไรด์ในเซลล์ลดลง⁽³³⁰⁾ นอกจากนี้ อาจเกิดจากสารสกัดข้าวเหนียวดำ อาจมีผลเพิ่มอายุ mRNA คงสภาพ LDLR โดยไม่มีผลกระทบการถอดรหัสของยีนดังกล่าว เช่นเดียวกับสาร berberine ที่สกัดจากต้น Golden seal ก็เป็นได้⁽³³¹⁾ สำหรับยีน HMG-CoA reductase ผู้วิจัยพบว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน HMG-CoA reductase เมื่อศึกษา รายงานวิจัยอื่น เช่น น้ำมันหอยระเหยที่สกัดจากต้น wormwood⁽³³²⁾ หรือพลาโวนอยด์ naringenin และ hesperetin⁽¹⁰⁷⁾ พบว่าสารในงานวิจัยทั้งคู่มีผลเพิ่มการแสดงออกของยีน LDLR แต่กลับไม่มีผลต่อยีน HMG-CoA reductase ของเซลล์ HepG2 เช่นเดียวกัน เหตุผลที่น่าจะเป็นไปได้มี 2 ประการคือ ประการแรก แม้ยีน LDLR และ HMG-CoA จะถูกควบคุมโดย sterol regulatory element-binding protein (SREBP) ซึ่งตอบสนองต่อสาร sterol เช่นเดียวกันแต่ SREBP ก็มีด้วยกันถึง 3 ไอโซฟอร์มซึ่งมีการทำงานที่แตกต่างกัน SREBP-1a ซึ่งมีการทำงานมากที่สุดจะควบคุมการแสดงออกของยีน LDLR และ HMG-CoA syntase มีเอนไซม์ HMG-CoA reductase⁽²⁰⁷⁾ ประการที่สอง การส่งสัญญาณเพิ่มการกระตุ้นยีนทั้งสองตัวนี้แตกต่างกัน เช่น อินซูลิน ไทรอยด์ และฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ตับโดยตรงเช่น Hepatocyte growth factor (HGF) สามารถกระตุ้น LDLR ให้เพิ่มการแสดงออกผ่านทาง mitogen-activated protein kinase (MAPK) ได้ทั้งระดับยีนและโปรตีนแต่ไม่มีผลต่อยีน HMG-CoA reductase⁽²⁰¹⁾ แต่เนื่องจากสมดุลโคเรสเตอรอลภายในเซลล์จะถูกควบคุมอย่างดี เมื่อเซลล์มีการรับโคเรสเตอรอลไปใช้ในเซลล์เพิ่มขึ้น (LDLR เพิ่มขึ้น) และระดับการสร้างโคเรสเตอรอลในเซลล์ไม่ลดลง (HMG-CoA reductase ไม่เปลี่ยนแปลง) ดังนั้นจะต้องมีกลไกอย่างอื่นในการรักษาสมดุลดังกล่าว ผู้วิจัยจึงคาดว่าน่าจะเกิดจากการขับโคเรสเตอรอลออกจากเซลล์ตับมากขึ้นแทนทางระบบน้ำดีและกรดน้ำดีโดยเอนไซม์ cholesterol 7- α hydroxylase (CYP7A)⁽²⁰⁷⁾ นอกจากนี้ผู้วิจัยพบว่า LDLR ถูกควบคุมด้วย SREBP-1 ซึ่งเป็น transcription factor ที่ถูกควบคุมด้วย nuclear receptor จึงได้ทำการวิจัยเพิ่มเติมในส่วนของ การแสดงออกของยีนของ nuclear receptor ที่คาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องทั้งหมด 3 ชนิดคือ PPAR α , PPAR γ และ LXR α ซึ่งมีการแสดงออกมากที่สุด ผู้วิจัยพบว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำไม่มีผลเพิ่มการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ชนิดในเซลล์ตับ ผู้วิจัยคาดว่า 1. สารสกัดข้าวเหนียวดำอาจมีลักษณะคล้าย ligands ของ nuclear receptor ดังกล่าวหรืออาจมีผลต่อการแสดงออกในระดับอื่น ๆ เช่น post-transcription, translation หรือระดับ activity ของโปรตีนจึงอาจสามารถกระตุ้นการทำงานของ nuclear receptor ได้โดยที่ไม่จำเป็นต้องเพิ่มการถอดรหัสยีนดังกล่าวขึ้น ดังที่ผู้วิจัยพบในรายงานการศึกษาพลาโวนอยด์ในผลไม้รสเปรี้ยว เช่น Hesperidin และ Naringin เพิ่มการ

แสดงออกของโปรตีน PPAR γ โดยไม่มีผลต่อระดับโปรตีน PPAR α ของตับหนูที่เป็นเบาหวาน⁽³³³⁾, ฟลาโวนอยด์ที่สกัดจาก *Eugenia jambolana* หรือ black pulm มีผลเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน PPAR γ และ PPAR α ในเซลล์ไขมันหนูที่เป็นเบาหวาน⁽³³⁴⁾ การศึกษาต่อว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำสามารถกระตุ้นการทำงานของโปรตีนเหล่านี้หรือไม่ จึงควรทำการศึกษาในระดับการแสดงออกของโปรตีนเหล่านี้ด้วยเทคนิค Western blot หรือตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เป็นเป้าหมายของ nuclear receptor เหล่านี้ด้วยวิธีอื่น ๆ เช่น เอนไซม์ acyl CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT), Glucokinase (GK) หรือโปรตีน Hepatic glucose transporter protein 2 เป็นต้น ต่อไป 2. การทำงานของ nuclear receptor เหล่านี้ในเซลล์แต่ละชนิดจะไม่เหมือนกันจึงควรทำการศึกษาผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำต่อเซลล์ชนิดอื่นๆ เพิ่มเติมอีก โดยงานวิจัยที่ศึกษายีนเหล่านี้มักทำการศึกษาในเซลล์แมคโครฟาจซึ่งเป็นเซลล์อีกชนิดหนึ่งซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพโรคหลอดเลือดและหัวใจ มีรายงานวิจัยที่พบว่า Resveratrol ซึ่งพบมากในไวน์แดงสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน LXR α ในเซลล์แมคโครฟาจ⁽³³⁵⁾ หรือในการศึกษาฟลาโวนอยด์ 25 ชนิดพบว่า มีเพียง Apigenin, Chysin และ Kaempferol ที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน PPAR γ ในเซลล์แมคโครฟาจหนูได้⁽³³⁶⁾ ผู้วิจัยขอสรุปว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำสามารถกระตุ้นเซลล์ตับให้เพิ่มการรับ LDL เข้าเซลล์มากขึ้นโดยไม่มีผลต่อการสังเคราะห์โคเรสเตอรอลภายในเซลล์หรือระดับ PPAR α , PPAR γ และ LXR α สารสกัดข้าวเหนียวดำอาจมีประโยชน์อย่างยิ่งในการควบคุม และลดระดับโคเรสเตอรอลในพลาสมา เป็นเป้าหมายในการใช้รักษาภาวะโคเรสเตอรอลในเลือดสูงได้ต่อไป

ไขมันนอกจากจะมีบทบาทในการเกิดพยาธิสภาพโรคหัวใจแล้วอาจมีผลต่อการเกิดพยาธิสภาพอื่นๆ อีกด้วย เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์โคเรสเตอรอลรวมทั้งโคเรสเตอรอลเอง มักมีบทบาทให้เซลล์สิ่งมีชีวิตชั้นสูง (eukaryotic cell) แบ่งตัว ยกตัวอย่างเช่น โคเรสเตอรอลเอสเตออร์จะมีผลควบคุมการเจริญเติบโตและแบ่งตัวของเซลล์หลายชนิด กรดไขมันอิสระ (FFA) จะมีส่วนควบคุมการดำรงชีวิตของเซลล์ ดังที่ ยาต้านมะเร็ง Hexadecylcyclophosphocholine (HEPC) ซึ่งรบกวนกระบวนการเมแทบอลิซึมไขมันในเซลล์จนเสียสมดุลกล่าวคือ มีการสร้างโคเรสเตอรอลเพิ่มแต่ไม่สามารถเปลี่ยนเป็นโคเรสเตอรอลเอสเตออร์ได้ ทำให้เซลล์มีปริมาณโคเรสเตอรอลและกรดไขมันอิสระสูง แต่โคเรสเตอรอลเอสเตออร์ (CE) และฟอสโฟลิปิด (PC) ต่ำ ซึ่งเมื่อกรดไขมันอิสระสูง จะสามารถกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งหลายชนิด จากตัวอย่างดังกล่าวอาจสรุปได้ว่า การรักษาสมดุลโคเรสเตอรอลภายในเซลล์รวมทั้งอัตราส่วนระหว่าง FFA/PC ratio จึงจำเป็นต่อการดำรงชีวิตและควบคุมพฤติกรรมของเซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ตับ ซึ่งมีปริมาณไขมันในเซลล์สูง⁽³³⁷⁾ มีหลักฐานว่า Epigallocatechin-3-gallate ยับยั้งเอนไซม์ fatty acid synthase (FAS เป็นเอนไซม์ที่ควบคุมการสังเคราะห์กรดไขมัน ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นมากในเซลล์มะเร็งหลายชนิด) และแสดงผลเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากเช่นเดียวกับความสามารถของ Luteolin, Quercetin, Kaempferol, Apigenin และ Taxifolin ในการยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมันภายในเซลล์ ซึ่งพบว่าสัมพันธ์กับความสามารถในการยับยั้งการแบ่งตัวและการตาย⁽³³⁸⁾ ผู้วิจัยยังพบอีกว่า cholesterol ester hydroperoxides และ phospholipid hydroperoxides อาจมีใช้สารหลักที่ส่งเสริมการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจเนื่องจากเป็นเพียงผลิตภัณฑ์ขึ้นเพียงส่วนน้อย แต่อาจเป็นสารผลิตภัณฑ์ตัวอื่น เช่น แอลดีไฮด์ เช่น 4-Hydroxynonenal (HNE) รวมทั้ง acrolein, lysophosphatidylcholine, oxidized phospholipid และ oxysterol ที่มีการผลิตออกมาในปริมาณมากน่าจะ

ความสำคัญมากกว่า⁽³³⁹⁾ และการรับประทานอาหารไขมันสูงจะเพิ่มการแสดงออกของ NF- κ B ซึ่งเป็นตัวควบคุม secondary messenger ผ่านทาง tyrosine kinase⁽²⁵⁸⁾



ภาพที่ 5.4: การจำแนกกลุ่มของ nuclear factor ชนิดต่างๆ โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดคือ 1. Endocrine receptor เป็น nuclear receptor ที่ ligand คือฮอร์โมนสเตอรอยด์ต่างๆ เช่น เอสโตรเจน กลูคากอน เป็นต้น 2. Orphan receptor เป็น nuclear receptor ที่ยังไม่พบ ligand ที่จำเพาะ และ 3. Adopted Orphan receptor แยกมาจาก orphan receptor ซึ่ง ligand ที่จับรีเซพเตอร์เหล่านี้คือ สาร lipophilic โมเลกุลเล็กๆ เช่น กรดไขมันสายสั้นๆ (A), PPARs ซึ่งเป็น nuclear receptor ประเภทหนึ่ง มีหน้าที่หลักในการควบคุมการใช้ เก็บสะสม และเผาผลาญพลังงาน โดยเฉพาะจากไขมัน มี 3 ไอโซฟอร์ม แสดงออกแตกต่างกันในแต่ละเนื้อเยื่อ (B), LXRs เป็น nuclear receptor อีกชนิดหนึ่งที่มีการแสดงออกมากที่เซลล์ตับ เซลล์ลำไส้ และ แมคโครฟาจ ทำหน้าที่ในการควบคุมแหล่งพลังงานของร่างกายเช่นเดียวกับ PPARs มีบทบาทสำคัญในการขับไขมันออกจากเซลล์เพื่อกำจัดทิ้ง (C)

ข้อสรุป

สารสกัดข้าวข้าวแดง ข้าวดำ และข้าวเหนียวดำ ล้วนแสดงคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบทางเคมี โดยสารสกัดข้าวเหนียวดำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด เมื่อทำการทดสอบสารสกัดข้าวเหนียวดำกับเซลล์ พบว่าสามารถป้องกันสารออกซิเดชันและอนุมูลอิสระมิให้ทำลายสารชีวโมเลกุล

เช่น โปรรีน ไขมัน และ DNA ได้ นอกจากนี้ยังมีผลเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งบางชนิดหยุดการเจริญเติบโตรวมถึงลดระดับ Oxidative stress ภายในเซลล์และเพิ่มการแสดงออกของยีน LDLR ในเซลล์ตับซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการรับ LDL เข้าเซลล์

ข้อเสนอแนะ

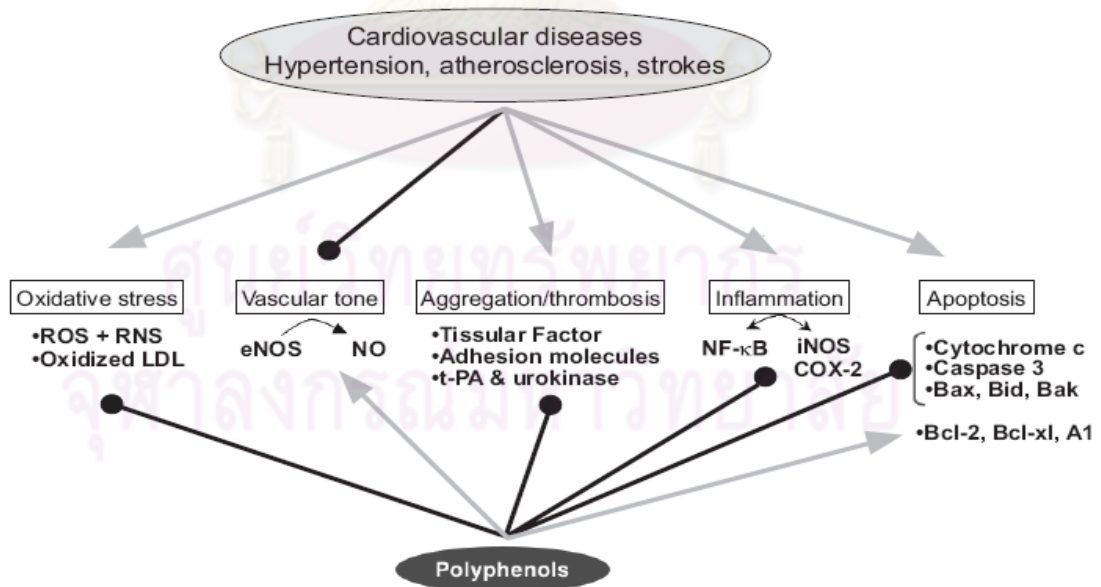
1. สารสกัดข้าวเหนียวดำมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ปกป้องเซลล์จากภาวะเป็นพิษต่างๆ แต่จากการทดสอบมาทั้งหมดจะเห็นได้ว่าฤทธิ์ของสารสกัดข้าวเหนียวดำเป็นแบบ Biphasic effect นั่นคือ ณ ความเข้มข้นต่ำจะมีประโยชน์ต่อเซลล์ แต่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นจะแสดงความเป็นพิษ งานวิจัยลำดับต่อไปควรจะทำการศึกษาทดสอบในสัตว์ทดลองเพื่อหาระดับมีประโยชน์ ระดับที่เป็นพิษและพบได้จริงในร่างกาย เนื่องจากพบว่าสารแอนโทไซยานินสีดุดซึมแพร่กระจายได้ในปริมาณต่ำมาก เช่นเมื่อผู้รับประทานผงสกัดราสเบอร์รี่ 45 กรัมจะพบแอนโทไซยานินสีในพลาสมาช่วงระหว่าง 0.004 ถึง 0.038 μM เท่านั้น⁽¹⁵⁰⁾ และ 0.115 μM หลังจากรับประทานผลเคอร์เรนดำเป็นเวลา 1.25 – 1.75 ชั่วโมงปริมาณ 3.58 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม

2. ข้าวเหนียวดำ มีปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระสูงมาก ส่วนข้าวแดง และข้าวดำมีปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระรองลงมาและน้อยที่สุด ตามลำดับ ซึ่งก็เหมาะที่จะเป็นอาหารหลักใช้ในการบริโภคแทนข้าวขาว นอกจากจะได้สารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตแล้วยังได้สารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ แอนโทไซยานินสี, โพลีฟีนอล, γ -Oryzanol, Quinolone alkaloid และวิตามินอี เป็นต้น⁽³⁴⁰⁾ จากการวิจัยอื่นๆ พบว่าแอนโทไซยานินสีในข้าวดำ ส่วนใหญ่คือ Cyanidin 3-glucoside และ Peonidin 3-glucoside สามารถกระตุ้นเอนไซม์ superoxide dismutase และ catalase⁽³⁴¹⁾ ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในร่างกายให้ทำหน้าที่ดีขึ้นและยับยั้ง nitric oxide radical และ reactive oxygen species ในการทำลายสารชีวโมเลกุล⁽³⁴²⁾ การให้สารที่สกัดจากข้าวดำเป็นอาหารเสริมกับคนไข้โรคหัวใจและหลอดเลือด สามารถช่วยปรับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในการต้านการอักเสบได้ดีขึ้น⁽³⁴³⁾ สามารถยับยั้งการเกิด atherosclerotic plaque ในหลอดเลือดของสัตว์ทดลอง กระจาย และ หนูที่มีพันธุกรรม apolipoprotein (apo) E บกพร่อง^(14,192-193) โดยการให้อาหารเสริมด้วยสารที่สกัดจากข้าวดำนั้นสามารถดักจับอนุมูลอิสระ oxygen free radicals ที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย⁽³⁴⁴⁾ และพบว่า สารประกอบ Cyanidin 3-glucoside และ Peonidin 3-glucoside ยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอกได้⁽¹⁵⁾

ปัจจุบันมีงานวิจัยมากมายเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระใน ผัก ผลไม้ และสมุนไพร เพราะเป็นที่นิยมใช้ทำเป็นอาหารสุขภาพ เครื่องดื่มสุขภาพ เครื่องสำอาง ตลอดจนการใช้สมุนไพรในการป้องกันและรักษาโรคที่เน้นในเรื่องสารสกัดธรรมชาติ ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีปลอดภัยกว่าการใช้ยาจากการแพทย์แผนปัจจุบัน สารต้านอนุมูลอิสระที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพในการป้องกันโรคที่เกิดจากความเสื่อมของร่างกาย สารต้านอนุมูลอิสระจากพืชส่วนใหญ่เป็นโพลีฟีนอลหรือฟลาโวนอยด์ซึ่งมีมากกว่า 5000 ชนิด อีกทั้งฟลาโวนอยด์เป็นสารที่ทำให้ต้นไม้ ดอกไม้ และผลไม้มีสีต่างๆ เป็นสารที่ทำให้ต้นไม้มีภูมิคุ้มกันจากโรคต่างๆ และสามารถทนต่อปฏิกิริยา photooxidation ในขณะที่สังเคราะห์แสง

จากผลการวิจัยนี้ เราอาจนำสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดจากข้าวเหนียวดำมาใช้ประโยชน์ ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่ใช้ ในการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากความเสื่อมที่เกิดจากการทำลายของอนุมูลอิสระ เช่นเดียวกับสารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่กำลังเป็นที่นิยมในต่างประเทศ อย่างไรก็ตามควรมีการ ทดสอบทาง พิษวิทยาในเบื้องต้นเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค แต่หากใช้ในปริมาณที่เท่ากับการบริโภคเฉลี่ยในแต่ละวัน ก็อาจไม่พบพิษข้างเคียงก็เป็นไปได้ นอกจากนี้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในข้าวแต่ละชนิดยังขึ้นอยู่กับ กระบวนการผลิต การเพาะปลูก ฤดูกาล อุณหภูมิ วิธีเก็บเกี่ยว ตลอดจนการเก็บรักษาก่อนการจำหน่าย

สมุนไพรหลายชนิดมีการนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน โดยมีจุดประสงค์เพื่อการ รักษาโรค (herbal remedy) และ/หรือ เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (dietary supplement) ซึ่งหากมีการนำมาใช้ ร่วมกับยาโดยไม่ทราบข้อมูลความปลอดภัยในการใช้ร่วมกันแล้ว อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพและอาจร้ายแรง ถึงแก่ชีวิตได้⁽³⁴⁵⁾ มีรายงานมากมายที่ว่าสมุนไพรหากมีปริมาณสูงจะมีฤทธิ์เป็นพิษต่อร่างกาย เช่น ใบ Kava สมุนไพรที่นิยมใช้ในการรักษาภาวะวิตกกังวล มีฤทธิ์เป็นพิษต่อไมโทคอนเดรียทำให้เกิดผลข้างเคียงโดยเฉพาะ กับเซลล์ตับจากการใช้สมุนไพรชนิดนี้⁽³⁴⁶⁾ สำหรับสารฟลาโวนอยด์ส์ก็มีการรายงานแล้วว่า มีฤทธิ์เป็นพิษแม้จะ มีความเข้มข้นต่ำกระทั่งกับเซลล์ปกติ เช่น Chrysin ซึ่งเป็นฟลาโวนอยด์ตัวหนึ่ง⁽³⁴⁷⁾ และอาจขัดขวางการดูดซึม สารอาหารเรียกว่าเป็น antinutrients อาจทำให้ร่างกายขาดสารอาหารได้ ตัวอย่างเช่น แทนนินหรือโพลีฟีนอลมวลโมเลกุลสูงๆ ขัดขวางร่างกายไม่ให้เกิดการดูดซึมโปรตีนและแร่ธาตุเนื่องจากสารโพลีฟีนอลสามารถจับ โลหะและเมื่อโพลีฟีนอลต่อกันเป็นโพลิเมอร์ 3 ตัวขึ้นไปจะสามารถตกตะกอนโปรตีน⁽³⁴⁸⁾ จึงควรนำสารสกัด มาทดสอบกับสัตว์ทดลองต่อไป สารต้านอนุมูลอิสระมีผลดีต่อสุขภาพหัวใจหลายประการ สามารถสรุปได้ด้วย ภาพที่ 5.5



ภาพที่ 5.5: สรุปกลไกของโพลีฟีนอลที่มีประโยชน์ ช่วยส่งเสริมสุขภาพ จากกลไกหลายอย่างเช่นการกำจัด ภาวะ oxidative stress, ควบคุมจังหวะการบีบตัวของหลอดเลือด, ขัดขวางก่อเกิดลิ่มเลือด, ลด ภาวะอักเสบ, ปกป้องมิให้เซลล์หลอดเลือดตาย

รายการอ้างอิง

- (1) Valko M., Rhodes C.J., et al. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions 160: 1-40.
- (2) Halliwell B., Gutteridge JMC. 2001. Free Radicals in Biology and Medicine Thomson Press (India): Oxford Science Publication. Ltd. 617-854
- (3) Rice-Evans CA., Packer L. (edition) 1998. Flavonoids in Health and disease New York, USA. : Marcell Dekker, Inc. 447-516.
- (4) Sangkitikomol W. 2003. Comparison of Polyphenolics and Antioxidant content in Vegetables and fruits. Journal Allied Health Science 3(1): 91-99.
- (5) Sangkitikomol W. 2000. The preventive effect of antioxidants in vegetables and Thai herbs on Heinz bodies formation in red blood cells induced by oxidant agent : Acetylphenylhydrazine. Journal Allied Health Science 1(2): 46-54.
- (6) Sangkitikomol W. 2003. Comparison of total antioxidant activities and total phenolics in tea extracts. Journal Allied Health Science 3(1): 100-108.
- (7) Tuntayapriluang P., Tisalum S., Sangkitikomol W. Pre-Study: Comparison of Thai herb extracts in prevention of Mononuclear cell's DNA damage by Comet Assay (Single Cell Gel Electrophoresis) Poster Presentation in Chulavichagard exhibition Chulalongkorn university date 23-27 November 2005.
- (8) Singh NP., McCoy Mt., et al. 1998. A simple technique for quantitative of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research 175: 184-191.
- (9) Niering P., Michels G., et al. 2005. Protective and detrimental effects of kaempferol in rat H4IIE cells: Implication of oxidative stress and apoptosis. Toxicology & Applied Pharmacology 209(2): 114-122.
- (10) Adachi A., K. Morita, et al. 2006. Efficiency of Rice Bran for the Removal of Fe³⁺ from Solution. Journal Health Science 52: 455-458.
- (11) Han S.J., Ryu S.N., et al. 2004. A New 2-Arylbenzofuran with Antioxidant Activity from the Black Colored Rice (Oryza sativa L.) Bran. Chem Pharm Bull 52: 1365-1366.
- (12) Kaneda I., Kubo F., et al. 2006. Antioxidative Compounds in the Extracts of Black Rice Brans. Journal of Health Science 52: 495-511.
- (13) Lila MA. 2004. Anthocyanins and human health: an *in vitro* investigative approach. Journal of biomedicine & biotechnology 5: 306-313.
- (14) Ling WH., Cheng QX., et al. 2001. Red and Black Rice Decrease Atherosclerotic Plaque Formation and Increase Antioxidant Status in Rabbits. American Society of Nutrition 131: 1421-1426.
- (15) Chen PN., Chu SC., et al. 2005. Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis in vitro and suppress tumor growth in vivo. Lawrence Earlbaum 53: 232-243.
- (16) Chen PN., Kuo WH., et al. 2006. Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of

- MMPs and u-PA expression. Chemico-Biological Interactions 163: 218-229.
- (17) Hu C., Cai YZ., et al. 2007. Anthocyanin characterization and bioactivity assessment of a dark blue grained wheat (*Triticum aestivum* L. cv. *Hedong Wumai*) extract. Food Chemistry 104(3): 955-961.
- (18) Hou DX., Yanagita T., et al. 2005. Anthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-evoked macrophages: Structure-activity relationship and molecular mechanisms involved. Biochemical Pharmacology 70(3): 417-425.
- (19) Osman HE., Maalej N., et al. 1998. Grape juice but not orange or grapefruit juice inhibits platelet activity in dogs and monkeys (*Macaca fascicularis*). Journal of Nutrition 2307-2312.
- (20) Demrow HS., Slane pR., et al. 1995. Administration of wine and grape juice inhibit in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. Circulation 91: 1182-1188..
- (21) Kamei H., Kojima T., et al. 1995. Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro. Cancer Investigations 13: 590-594.
- (22) Zhang Y., Vareed SK., et al. 2005. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. Life Sciences 76(13): 1465-1472.
- (23) Chen PN., Chu SC., et al. 2006. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. Cancer Letters 235(2): 248-259.
- (24) Fimognari C., Berti F., et al. 2004. Induction of apoptosis in two human leukemia cell lines as well as differentiation in human promyelocytic cells by cyanidin-3-O-[beta]-glucopyranoside. Biochemical Pharmacology 67(11): 2047-2056.
- (25) Bendia E., Benedetti A., et al. 2005. Effect of cyanidin 3-O-[beta]-glucopyranoside on hepatic stellate cell proliferation and collagen synthesis induced by oxidative stress. Digestive and Liver Disease 37(5): 342-348.
- (26) Jang, YP., Zhou J., et al. 2005. Anthocyanins Protect Against A2E Photooxidation and Membrane Permeabilization in Retinal Pigment Epithelial Cells. American Society for Photobiology 81: 529-536.
- (27) Shih PH., Yeh CT., et al. 2005. Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. Food and Chemical Toxicology 43(10): 1557-1566.
- (28) Pinent M., Blay M., Blade' MC., et al. 2004. Grape seed-derived proanthocyanins have an antihyperglycemic effect in insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. Endocrinology. 145: 4985-4990.
- (29) Frank T., Netzel M., Strass G., et al. 2003. Bioavailability of anthocyanidin-3-glycosides following consumption of red wine and red grape juice. Canada Journal of Physiological and Pharmacology 81(5): 423-435.
- (30) Wang Z., Zou J., Cao K., et al. 2005. Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol

- suppress atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels. Int Journal of Molecular Medicine 16: 533-540.
- (31) Prior RL., Wu X., Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 4290-302.
- (32) Huang D., Ou B., Prior RL. 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 1841-1856.
- (33) Davalos A., Gomez-Cordoves C., et al. 2004. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 48-54.
- (34) Singleton VL., Orthofer R., et al. 1999. Analysis of total phenols and other substrate and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Method in Enzymology. 299: 152-178.
- (35) Sun B., Ricardo-da-Silva JM., Spranger I. 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46: 4267-4274.
- (36) Abdel-Aal ES., Young JC., et al. 2006. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 4696-4704.
- (37) Ischiropoulos H., Gow A., Thom SR., et al. 1999. Detection of reactive nitrogen species using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine. Methods in Enzymology 301: 367-373.
- (38) Kaul D., Shukla AR., et al. 2005. Effect of herbal polyphenols on atherogenic transcriptome Molecular Cell Biochemistry 278: 177-184.
- (39) Chmielewski M., Sucajtys E., et al. 2003. Contribution of increased HMG-CoA reductase gene expression to hypercholesterolemia in experimental chronic renal failure. Molecular Cell Biochemistry 246: 187-191.
- (40) Halliwell B. 2006. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. American Society Plant Biochemistry 141: 312-322 .
- (41) Halliwell B., Gutteridge JMC.. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Journal of Biochemistry 219: 1-14.
- (42) Halliwell B. 1989. Tell me about free radicals, doctor: a review. Royal Society of Medicine Press 82: 747.
- (43) Halliwell B., Cross CE. 1994. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. Environmental Health Perspectives 102: 5-12.
- (44) McCord JM. 1993. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. Clinical Biochemistry 26: 351-7.
- (45) Leeuwenburgh C., Heinecke JW. 2001. Oxidative Stress and Antioxidants in Exercise. Cuvent Medicinal Chemistry 8: 829 – 838.
- (46) Finkel T. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. Nature(London) 408: 239-248.
- (47) Davies KJA. 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement

- systems. IUBMB Life 50: 279–289.
- (48) Halliwell B., Hoult JR., et al. 1988. Oxidants, inflammation, and anti-inflammatory drugs. FASEB 2: 2867-2873.
- (49) Leclercq IA. 2004. Antioxidant defence mechanisms: new players in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. Clinical science 106: 235-237.
- (50) Wiseman H., Halliwell B. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. Journal of Biochemistry 313: 17-29.
- (51) Fedoroff N. 2006. Redox Regulatory Mechanisms in Cellular Stress Responses. Annals of Botany 98: 289-300.
- (52) Chandra J., Samali A., et al. 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine 29(3-4): 323-333.
- (53) Osseni RA., Rat P., et al. 2000. Evidence of prooxidant and antioxidant action of melatonin on human liver cell line HepG2. Life Sciences 68(4): 387-399.
- (54) Ou B., Huang D., et al. 2003. When east meets west : the relationship between yin-yang and antioxidation-oxidation. FASEB Journal 17:1 27-29.
- (55) Halliwell B., Grootveld M. 1987. The measurement of free radical reactions in humans. Some thoughts for future experimentation. Federation of European Biochemical Societies 213: 9-14.
- (56) Elroy-Stein O., Bernstein Y., Groner Y. 1986. Overproduction of human Cu/Zn-superoxide dismutase in transfected cells: Extenuation of paraquat-mediated cytotoxicity and enhancement of lipid peroxidation. EMBO Journal 5: 615-22.
- (57) Ceballos I., Delabar JM., Nicole A., et al. 1988. Expression of transfected human CuZn superoxide dismutase gene in mouse L cells and NS20Y neuroblastoma cells induces enhancement of glutathione peroxidase activity. Biochim Biophys Acta 949: 58-64.
- (58) Kedziora J., Bartosz G. 1988. Down's syndrome: A pathology involving the lack of balance of reactive oxygen species. Free Radical Biology and Medicine 4: 317-30.
- (59) Vendemiale G., I. Grattagliano, et al. 1999. An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. International Journal of Clinical Laboratory Research 29: 49-55.
- (60) Lahouel M., Boulkour S., et al. 2004. Protective effect of flavonoids against the toxicity of vinblastine, cyclophosphamide and paracetamol by inhibition of lipid peroxidation and increase of liver glutathione. Haema 7: 59–67.
- (61) Lone IA., Kaur G., et al. 2007. Protective effect of *Rumex patientia* (English Spinach) roots on ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) induced hepatic oxidative stress and tumor promotion response. Food and Chemical Toxicology 45(10): 1821-1829.
- (62) Svobodova A., Zdarilova A., et al. 2007. Attenuation of UVA-induced damage to human keratinocytes by silymarin. Journal of Dermatological Science 46(1): 21-30.

- (63) El-Beshbishy H. A. 2005. Hepatoprotective Effect of Green Tea (*Camellia sinensis*) Extract against Tamoxifen-induced Liver Injury in Rats. Biochemical Society of the Republic of Korea 38: 563.
- (64) Hsieh CL., Ho YIC., et al. 2002. Inhibitory Effect of Carnosine and Anserine on DNA Oxidative Damage Induced by Fe^{2+} , Cu^{2+} and H_2O_2 in Lymphocytes. Journal of Food & Drug Analysis 10(1): 47-54.
- (65) Caballaro B., Allen L., Prentice A. 2005. Encyclopedia of Human Nutrition. 2 edition ELSEVIER academic Press.
- (66) Fahey JW., Zhang Y., Talalay P. 1997. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94:10367-72.
- (67) Ho SS., Pal S. 2005. Margarine phytosterols decrease the secretion of atherogenic lipoproteins from HepG2 liver and Caco2 intestinal cells. Atherosclerosis 182(1): 29-36.
- (68) Omenn GS., Goodman GE., et al. 1996. Effects of a combination of beta-carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. New England Journal of Medicine 1996: 1150-1155
- (69) Hennekens CH., Buring JE., et al. 1996. Effects of a combination of beta-carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. New England Journal of Medicine 334: 1145-1149.
- (70) The Alpha-Tocopherol B-CCPSG. 1994. The effect of vitamin E and beta-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. New England Journal of Medicine 330:1029-1035.
- (71) Paolini M., Abdel-Rahman SZ., et al. 2003. β -Carotene: a cancer chemopreventive agent or a co-carcinogen? Elsevier. Mutation Research 543: 195-200.
- (72) Morin B., Narbonne JF., et al. 2008. Effect of dietary fat-soluble vitamins A and E and proanthocyanidin-rich extract from grape seeds on oxidative DNA damage in rats. Food and Chemical Toxicology 46(2): 787-796.
- (73) Podmore ID., Griffiths HR., et al. 1998. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. (Letter). Nature 392:559.
- (74) Halliwell B., Whiteman M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? British Journal of Pharmacology 142: 231-255.
- (75) Bagchi D., Bagchi M., et al. 2000. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. Toxicology 148: 187-197.
- (76) Mishra A., Bapat MM., et al. 2006. Antioxidant activity of *Garcinia indica*(kokam) and its syrup. Current Science Association 91: 90-93.
- (77) Morais Sargio A.L., Nascimento Evandro A., et al. 1999. Studies on polyphenols and lignin of *Astronium urundeuva* wood. Journal Brazil Chemical Society 10: 447-452.
- (78) Madhujith T., Naczki M., et al. 2004. Antioxidant Activity of common beans (*PHASEOLUS VULGARIS L.*). Blackwell Synergy. Journal of Food Lipids 11: 220-233.

- (79) Harish R., Shivanandappa T. 2006. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*. Food Chemistry 95(2): 180-185.
- (80) Ardestani A., Yazdanparast R. 2007. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. Food Chemistry 104(1): 21-29.
- (81) Ishige K., Schubert D., et al. 2001. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. Free Radical Biology and Medicine 30(4): 433-446.
- (82) Knakt P., Kumpulainen J., Jarvinen R., et al. 2002. Flavonoid intake and risk of chronic disease. American Journal of Clinical Nutrition 76: 560 – 568.
- (83) Paganga G., Miller N., Rice-Evans CA. 1999. The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute? Free Radical Biology and Medicine 30: 153–162.
- (84) Ferguson LR. 2001. Role of plant polyphenols in genomic stability. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 475(1-2): 89-111.
- (85) Moon YJ., Wang X., et al. 2006. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. Toxicology in Vitro 20(2): 187-210.
- (86) Tapiero H., Tew KD., et al. 2002. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? Biomedicine Pharmacotherapy 56: 200-207.
- (87) Walle T. 2004. Absorption and metabolism of flavonoids. Free Radical Biology and Medicine 36(7): 829-837.
- (88) Scalbert A., Williamson G. 2000. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. American Society of Nutrition 130: 2073-2085.
- (89) Kampa M., Alexaki VI., et al. 2004. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. Breast Cancer Research 6: R63-R74.
- (90) Bouayed J., Rammal H., et al. 2007. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. Journal of the Neurological Sciences 262(1-2): 77-84.
- (91) Guengerich FP., Chun YJ., Kim D., et al. 2003. Cytochrome P450 1B1: a target for inhibition in anticarcinogenesis strategies. Mutation Research 523(524): 173–182.
- (92) Taylor LP., Grotewold E. 2005. Flavonoids as developmental regulators. Current Opinion in Plant Biology 8(3): 317-323.
- (93) McClain RM., Wolz E., Davidovich A., et al. 2006. Acute, subchronic and chronic safety studies with genistein in rats. Food and Chemical Toxicology 44: 56–80.
- (94) Maffei F., Tarozzi A., et al. 2007. Relevance of apple consumption for protection against oxidative damage induced by hydrogen peroxide in human lymphocytes Cambridge University Press 97: 921-927.
- (95) Yoo KM., Lee CH., et al. 2008. Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. Food

Chemistry 106(3): 929-936.

- (96) Cherng JM., Chiang W., et al. 2008. Immunomodulatory activities of common vegetables and spices of Umbelliferae and its related coumarins and flavonoids. Food Chemistry 106(3): 944-950.
- (97) Rosenkranz S., Knirel D., et al. 2002. Inhibition of the PDGF receptor by red wine flavonoids provides a molecular explanation for the French paradox. FASEB Journal express article
- (98) Martin S., Andriambelason E., et al. 2002. Red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: a basis to elucidate signalling pathways leading to nitric oxide production. British Journal of Pharmacology 135: 1579-1587.
- (99) Williams RJ., Spencer JPE., et al. 2004. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? Free Radical Biology and Medicine 36(7): 838-849.
- (100) Peterson J., Dwyer J. 1998. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. Nutrition Research 18(12): 1995-2018.
- (101) Beecher GR. 2003. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. American Society of Nutrition 133: 3248-3254.
- (102) Mertens-Talcott SU., Talcott ST., et al. 2003. Low Concentrations of Quercetin and Ellagic Acid Synergistically Influence Proliferation, Cytotoxicity and Apoptosis in MOLT-4 Human Leukemia Cells. American Society of Nutrition 133: 2669-2674.
- (103) Chaudhuri S., Banerjee A., et al. 2007. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects. International Journal of Biological Macromolecules 41(1): 42-48.
- (104) Vali B., Rao LG., El-Soehy A. 2007. Epigallocatechin-3-gallate increases the formation of mineralized bone nodules by human osteoblast-like cells. Journal of Nutritional Biochemistry 18: 341-347.
- (105) Chung MJ., Sung NJ., et al. 2008. Antioxidative and hypocholesterolemic activities of water-soluble puerarin glycosides in HepG2 cells and in C57 BL/6J mice. European Journal of Pharmacology 578(2-3): 159-170.
- (106) Sung JH., Choi SJ., et al. 2004. Isoflavones Found in Korean Soybean Paste as 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors. J-STAGE 68: 1051-1058.
- (107) Wilcox LJ., Borradaile NM., et al. 2001. Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP. Journal of Biological Chemistry 42: 725-734.
- (108) Henning SM., Niu Y., Lee NH., et al. 2004. Bioactivity and antioxidant activity of two flavonols after consumption of green tea, black tea or green tea extract supplement. American Journal of Clinical Nutrition 80:1558-1564.
- (109) Noda C., He J., et al. 2007. Induction of apoptosis by epigallocatechin-3-gallate in human lymphoblastoid B cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 362(4): 951-957.

- (110) Shimizu M., Shirakami Y., et al. EGCG inhibits activation of the insulin-like growth factor (IGF)/IGF-1 receptor axis in human hepatocellular carcinoma cells. Cancer Letters In Press Corrected Proof.
- (111) Vali B., Rao LG., et al. 2007. Epigallocatechin-3-gallate increases the formation of mineralized bone nodules by human osteoblast-like cells. Journal of Nutritional Biochemistry 18(5): 341-347.
- (112) Huang Q., Wu LJ., et al. 2005. (+)-Catechin, an Ingredient of Green Tea, Protects Murine Microglia From Oxidative Stress-Induced DNA Damage and Cell Cycle Arrest. J-STAGE 98: 16-24.
- (113) Doss MX., Potta SP., et al. 2005. Trapping of growth factors by catechins: a possible therapeutical target for prevention of proliferative diseases. Journal of Nutritional Biochemistry 16(5): 259-266.
- (114) Ueda H., Yamazaki C., Yamazaki M. 2004. A Hydroxyl Group of Flavonoids Affects Oral Anti-inflammatory Activity and Inhibition of Systemic Tumor Necrosis Factor- γ Production. Bioscience Biotechnology Biochemistry 68: 119-125.
- (115) Ziyang L., Yongmei Z., et al. 2007. Evaluation of the anti-inflammatory activity of luteolin in experimental animal models. Planta Medicine 73: 221-6.
- (116) Hertog MGL., Kromhout D., Aravanis C., et al. 1995. Flavonoid intake and long term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study. Archives International of Medicine 155: 381-386.
- (117) Hertog MGL., Hollman PC., Katan MB., et al. 1993. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. Nutritional Cancer 20: 21-29.
- (118) Zampini IC., Villarini M., et al. 2008. Evaluation of genotoxic and antigenotoxic effects of hydroalcoholic extracts of *Zuccagnia punctata* Cav. Journal of Ethnopharmacology 115(2): 330-335.
- (119) Lu, Y., W. Z. Zhao, et al. 2004. Procyanidins from grape seeds protect against phorbol ester-induced oxidative cellular and genotoxic damage. Acta Pharmacologica Sinica 25: 1083-9.
- (120) Colitti M., Sgorlon S., et al. 2007. Grape polyphenols affect mRNA expression of PGHS-2, TIS11b and FOXO3 in endometrium of heifers under ACTH-induced stress. Theriogenology 68(7): 1022-1030.
- (121) Kong JM., Chia LS., et al. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochemistry 64(5): 923-933.
- (122) Sakata K., Saito N., et al. 2006. Ab initio study of molecular structures and excited states in anthocyanidins. Tetrahedron 62(15): 3721-3731.
- (123) Cooper-Driver, GA., et al., 1998. Role of phenolics in plant evolution. Phytochemistry 49 (5): 1165-1174.
- (124) Watanabe M. 2007. An Anthocyanin Compound in Buckwheat Sprouts and Its Contribution to Antioxidant Capacity. J-STAGE 701120270.
- (125) Prata E., Oliveira LS. 2007. Fresh coffee husks as potential sources of anthocyanins. Swiss Society of Food Science and Technology 40: 1555-1560.
- (126) Galvano F., La Fauci L., et al. 2004. Cyanidins: metabolism and biological properties. Journal of Nutritional Biochemistry 15(1): 2-11.

- (127) Passamonti S., Vrhovsek U., Vanzo A., et al. 2003. The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. Federation of European Biochemical Societies Letters 544: 210–213.
- (128) Tsuda T., Horio F., Osawa T., 1999. Absorption and metabolism of cyanidin 3-O-beta-D-glucoside in rats. Federation of European Biochemical Societies Letters 449: 179–182.
- (129) Lotito SB., Frei B. 2006. Consumption of flavonoid-rich foods and increase plasma antioxidant capacity in human: Cause, consequence, or epiphenomenon. Free Radical Biology and Medicine 41: 1727-1746.
- (130) Kay CD., Mazza G., et al. 2005. Anthocyanins Exist in the Circulation Primarily as Metabolites in Adult Men. American Society of Nutrition 135: 2582-2588.
- (131) McDougall GJ., Fyffe S., et al. 2005. Anthocyanins from red wine -Their stability under simulated gastrointestinal digestion. Phytochemistry 66(21): 2540-2548.
- (132) Felgines C., Talavera S., et al. 2003. Strawberry Anthocyanins Are Recovered in Urine as Glucuro- and Sulfoconjugates in Humans. American Society of Nutrition 133: 1296-1301.
- (133) Wu X., Pittman HE., et al. 2005. Aglycones and Sugar Moieties Alter Anthocyanin Absorption and Metabolism after Berry Consumption in Weanling Pigs. American Society of Nutrition 135: 2417-2424.
- (134) Lazz MC., Savio M., et al. 2004. Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. Oxford University Press 25: 1427-1433.
- (135) Wang H., Cao G., et al. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45: 304-309.
- (136) Heim KE., Tagliaferro AR., Bobilya DJ. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure – activity relationships. Journal of Nutritional Biochemistry 13: 572–584.
- (137) Noda Y., Kaneyuki T., Mori A., et al. 2002. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins delphin-idin, cyanidin, and pelargonidin. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 166–171.
- (138) Sarma AD., Sreelakshmi Y., Sharma R. 1971. Antioxidant Ability of Anthocyanins Against Ascorbic Acid Oxidation. Phytochemistry 45: 671–674.
- (139) Zhweng W., Wang SY. 2003. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries and lingonberries. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 502–509.
- (140) Smyk B., Pliszka B., et al. 2008. Interaction between Cyanidin 3-glucoside and Cu(II) ions. Food Chemistry 107(4): 1616-1622.
- (141) Cabrita L., Fossen T., Andersen ØM. 2000. Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. Food Chemistry 68: 101–107.
- (142) Francis FJ. 1989. Food colorants: Anthocyanins. Critical Reviews. Food Science and Nutrition 28: 273–314.
- (143) Jackman RL., Yada RY., Tung MA., et al. 1987. Anthocyanins as food colorants. Journal of Food

Biochemistry. 11: 201–247.

- (144) Kopjar N., Zeljezic D., et al. 2006. Evaluation of DNA damage in white blood cells of healthy human volunteers using the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. Acca Biochimica Polonica 53: 321-36.
- (145) Kaneko T., Tahara S., et al. 2003. Inhibition of Linoleic Acid Hydroperoxide-induced Toxicity in Cultured Human Fibroblasts by Anthocyanidins. J-STAGE 67: 1391-1393.
- (146) Torskangerpoll K., Andersen OM. 2005. Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. Food Chemistry 89(3): 427-440.
- (147) Borkowski T., Szymusiak H., et al. 2005. The effect of 3-O-[beta]-glucosylation on structural transformations of anthocyanidins. Food Research International 38(8-9): 1031-1037.
- (148) Rubinskiene M., Viskelis P., et al. 2005. Impact of various factors on the composition and stability of black currant anthocyanins. Food Research International 38(8-9): 867-871.
- (149) Soriano A., Perez-Juan PM., et al. 2007. Determination of anthocyanins in red wine using a newly developed method based on Fourier transform infrared spectroscopy. Food Chemistry 104(3): 1295-1303.
- (150) Hecht SS., Huang C., et al. 2006. Identification of cyanidin glycosides as constituents of freeze-dried black raspberries which inhibit anti-benzo [a] pyrene-7, 8-diol-9, 10-epoxide induced NF {kappa} B and AP-1 activity. Oxford University Press 27: 1617.
- (151) Serafino A., Sinibaldi-Vallebona P., et al. 2004. Differentiation of human melanoma cells induced by cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside. FASEB Journal express artical
- (152) Ding M., Feng R., et al. 2006. Cyanidin-3-glucoside, a Natural Product Derived from Blackberry, Exhibits Chemopreventive and Chemotherapeutic Activity. Journal of Biological Chemistry 281: 17359.
- (153) Guo H., Ling W., et al. 2008. Cyanidin 3-glucoside protects 3T3-L1 adipocytes against H₂O₂- or TNF-[alpha]-induced insulin resistance by inhibiting c-Jun NH₂-terminal kinase activation. Biochemical Pharmacology 75(6): 1393-1401.
- (154) Xu JW., Ikeda K., et al. 2004. Upregulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Cyanidin-3-Glucoside, a Typical Anthocyanin Pigment. American Heart Association 44: 217-222.
- (155) Pergola C., Rossi A., et al. 2006. Inhibition of nitric oxide biosynthesis by anthocyanin fraction of blackberry extract. Nitric Oxide 15(1): 30-39.
- (156) Choi EH., Chang HJ., et al. 2007. Cytoprotective effect of anthocyanins against doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cardiomyocytes in relation to their antioxidant activities. Food and Chemical Toxicology 45(10): 1873-1881.
- (157) Martin S., Giannone G., et al. 2003. Delphinidin, an active compound of red wine, inhibits endothelial cell apoptosis via nitric oxide pathway and regulation of calcium homeostasis. British Journal of Phramacology 139: 1095-1102.

- (158) Xu JW., Ikeda K., et al. 2007. Inhibitory effect of polyphenol cyanidin on TNF-[alpha]-induced apoptosis through multiple signaling pathways in endothelial cells. Atherosclerosis 193(2): 299-308.
- (159) Nam SH., Choi SP., et al. 2006. Antioxidative activities of bran extracts from twenty one pigmented rice cultivars. Food Chemistry 94: 613-620.
- (160) Gerhardt AL., Gallo NB. 1998. Full-Fat Rice Bran and Oat Bran Similarly Reduce Hypercholesterolemia in Humans. American Society of Nutrition 128: 865-869.
- (161) Cheng HH., Lai MH. 2000. Fermentation of Resistant Rice Starch Produces Propionate Reducing Serum and Hepatic Cholesterol in Rats. American Society of Nutrition 130: 1991-1995.
- (162) Chen CW., Cheng HH. 2006. A rice bran oil diet increases LDL-receptor and HMG-CoA reductase mRNA expressions and insulin sensitivity in rats with streptozotocin/nicotinamide-induced type 2 diabetes. Journal of Nutrition 136: 1472-1476.
- (163) Ross IV. 2005. Medical Plants of the world volume 3. Humana Press.
- (164) Bidlack WR., Omaye St., Meskin MS., Topham DKW. 2000. Phytochemicals as Bioactive Agents. CRC Press.
- (165) Deepa G., Singh V., et al. 2008. Nutrient composition and physicochemical properties of Indian medicinal rice - Njavara. Food Chemistry 106(1): 165-171.
- (166) Kaneda I., Kubo F., et al. 2007. Relationship between trace metal concentration and antioxidative activity of ancient rice bran (red and black rice) and a present-day rice bran (Koshihikari). Journal of trace Element in Medicine & Biology 21: 43-51.
- (167) Panigati M., Falciola L., et al. 2007. Determination of selenium in Italian rices by differential pulse cathodic stripping voltammetry. Food Chemistry 105: 1091-1098.
- (168) Bird AR., Hayakawa T., et al. 2000. Coarse brown rice increases fecal and large bowel short-chain fatty acids and starch but lowers calcium in the large bowel of pigs. Journal of Nutrition 130: 1780-1787.
- (169) Zeven AC. 1991. Wheats with purple and blue grains: a review. Euphytica 56: 243-258.
- (170) Huang X., Dai J., Fournier J., Ali AM., et al. 2002. Ferrous ion autoxidation and its chelation in iron-loaded human liver HepG2 cells. Free Radical Biology and Medicine 32(1): 84-92.
- (171) Ichikawa H., Ichiyangi T., Xu B., et al. 2001. Antioxidant activity of anthocyanin extract from purple black rice. Journal of Medicinal Food 4(4): 211-218.
- (172) Ryu SN., Park SZ., Ho CT. 1998. High performance liquid chromatographic determination of anthocyanin pigments in some varieties of black rice. Journal of Food and Drug Analysis 6: 729-736.
- (173) Hyun JW., Chung HS. 2004. Cyanidin and malvidin from *Oryza sativa* cv. Heungjinjubyeo mediate cytotoxicity against human monocytic leukemia cells by arrest of G(2)/M phase and induction of apoptosis. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 2213-2217.
- (174) Oki T., Matsuda M., Kobayashi M., et al. 2002. Polymeric procyanidins as radical-scavenging components in red-hulled rice. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 7524-7529.

- (175) Asamarai AM., Addis PB., Epley RJ., et al. 1996. Wild rice hull antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry 44: 126–130.
- (176) Goffman FD., Bergman CJ. 2004. Rice kernel phenolic content and its relationship with antiradical efficiency. Journal of the Science of Food and Agriculture 84: 1235–1240.
- (177) Lee SC., Kim JH., Jeong SM., et al. 2003. Effect of far-infrared radiation on the antioxidant activity of rice hulls. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 4400–4403.
- (178) Miyazawa M., Oshima T., Koshio K., et al. 2003. Tyrosinase inhibitor from black rice bran. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 6953–6956.
- (179) Tian S., Nakamura K., Kayahara H. 2004. Analysis of phenolic compounds in white rice, brown rice, and germinated brown rice. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 4808–4813.
- (180) Parrado J., Miramontes E., Jover M., et al. 2003. Prevention of brain protein and lipid oxidation elicited by water-soluble oryzanol enzymatic extract derived from rice bran. European Journal of Nutrition 42: 307–314.
- (181) Chung HS., Woo WS. 2001. A quinolone alkaloid with antioxidant activity from the aleurone layer of anthocyanin-pigmented rice. Journal of Natural Products 64(12): 1579–1580.
- (182) Hudson EA., Dinh PA., Kokubun T., et al. 2000. Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. Cancer Epidemiological Biomarkers PreV 9: 1163-1170.
- (183) Das PK., Chaudhuri A., Kaimal TNB., et al. 1998. Isolation of -Oryzanol through Calcium Ion Induced Precipitation of Anionic Micellar Aggregates. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46: 3073-3080.
- (184) Singh RP., Khanna RK., Mathur A., et al. 2000. Isolation of oryzanol concentrate from rice bran oil. Journal of Oil Technology Association India 32: 55-58.
- (185) Yawadio R., Tanimori S., et al. 2007. Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rices and their aldose reductase inhibitory activities. Food Chemistry 101: 1616-1625.
- (186) Morimitsu Y., Kubota K., Tashiro T., et al. 2002. Inhibitory effect of anthocyanins and colored rice on diabetic cataract formation in the rat lens. International Congress Series 1245: 503-508.
- (187) Lee SH., Sohn YS., et al. 2006. Inhibitory Effect of DA-9201, an Extract of *Oryza sativa* L., on Airway Inflammation and Bronchial Hyperresponsiveness in Mouse Asthma Model. J-STAGE 29: 1148-1153.
- (188) Nam SH., Choi SP., et al. 2005. Bran extracts from pigmented rice seeds inhibit tumor promotion in lymphoblastoid B cells by phorbol ester. Food & Chemical Toxicology 43: 741-745.
- (189) Guo H., Ling W., et al. 2007. Effect of Anthocyanin-Rich Extract from Black Rice (*Oryza sativa* L. indica) on Hyperlipidemia and Insulin Resistance in Fructose-Fed Rats. Plant Foods for Human Nutrition 62: 1-6.
- (190) Chung HS., Shin JC. 2007. Characterization of antioxidant alkaloids and phenolic acids from anthocyanin-

- pigmented rice (*Oryza sativa* cv. Heugjinjubyeo). Food Chemistry 104: 1670-1677.
- (191) Okai Y., Eksttikul T., et al. 1993. Antitumor Activity in an Extract of Thai Rice Seedlings. Journal of Fermentation & Bioengineering 76(5): 367-370.
- (192) Ling WH., Wang LL., et al. 2002. Supplementation of the Black Rice Outer Layer Fraction to Rabbits Decreases Atherosclerotic Plaque Formation and Increases Antioxidant Status. American Society of Nutrition 132: 20-26.
- (193) Xia M., Ling WH., et al. 2003. Supplementation of Diets with the Black Rice Pigment Fraction Attenuates Atherosclerotic Plaque Formation in Apolipoprotein E Deficient Mice. American Society of Nutrition 133: 744-751.
- (194) Somogyi A., Ruzicska E., et al. 2005. Insulin treatment decreases the antioxidant defense mechanism in experimental diabetes. Medical Science Monit 11(7): BR206-BR211.
- (195) Curin Y. R. Andriantsitohaina 2005. Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. Pharmacological Report 57: 97-107.
- (196) Holtzman JL. 2008. Atherosclerosis and Oxidant Stress: A new Perspective. Springer.
- (197) Chow CK. 2008. Fatty acid in Foods and their Health Implication. 3 edition CRC Press.
- (198) Peluso MR. 2006. Flavonoids Attenuate Cardiovascular Disease, Inhibit Phosphodiesterase, and Modulate Lipid Homeostasis in Adipose Tissue and Liver. SEBM 231: 1287.
- (199) Marcil V., Delvin E., et al. 2006. Oxidative stress influences cholesterol efflux in THP-1 macrophages: Role of ATP-binding cassette A1 and nuclear factors. Cardiovascular Research 72: 473-482
- (200) Xia M., Hou M., Zhu H., et al. 2005. Anthocyanins Induce Cholesterol Efflux from Mouse Peritoneal Macrophages THE ROLE OF THE PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR γ -LIVER X RECEPTOR α -ABCA 1 PATHWAY. Journal of Biological Chemistry 280(44): 36792-367801.
- (201) Pak YK., Kanuck MP., et al. 1996. Activation of LDL receptor gene expression in HepG2 cells by hepatocyte growth factor. Journal of Biological Chemistry 37: 985-998.
- (202) Sorci-Thomas M., Hendricks CL., et al. 1992. HepG2 cell LDL receptor activity and the accumulation of apolipoprotein B and E in response to docosahexaenoic acid and cholesterol. Journal of Biological Chemistry 33: 1147-1156.
- (203) Goldstein JL., Brown MS. 1984. Progress in understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. Journal of Biological Chemistry 25: 1450-1461.
- (204) Pramfalk C., Angelin B., et al. 2007. Cholesterol regulates ACAT2 gene expression and enzyme activity in human hepatoma cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 364(2): 402-409.
- (206) Mullen E., Brown RM., et al. 2004. Soy Isoflavones Affect Sterol Regulatory Element Binding Proteins (SREBPs) and SREBP-Regulated Genes in HepG2 Cells. American Society of Nutrition 134: 2942-2947.

- (207) Smith JR., Osborne TF., Goldstein JL, et al. 1990. Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene. Journal of Biological Chemistry 265: 2306-2310.
- (208) Sato , R., Takano T. 1995. Regulation of Intracellular Cholesterol Metabolism. Cell structure & Function 20: 421-427.
- (209) Shimano H., Horton JD., Shimomura I., et al. 1997. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. Journal Clinical Investigation 99: 846–854.
- (210) Egea M., Meton I., et al. 2008. Role of Sp1 and SREBP-1a in the insulin-mediated regulation of glucokinase transcription in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). General and Comparative Endocrinology 155(2): 359-367.
- (211) Pallottini V., Martini C., et al. 2006. Rat HMGCoA reductase activation in thioacetamide-induced liver injury is related to an increased reactive oxygen species content. Journal of Hepatology 44(2): 368-374.
- (212) Draijer R., Volger OL., et al. 2002. HOE 402 lowers serum cholesterol levels by reducing VLDL-lipid production, and not by induction of the LDL receptor, and reduces atherosclerosis in wild-type and LDL receptor-deficient mice. Biochemical Pharmacology 63(9): 1755-1761.
- (213) Tobin KA. R., Ulven SM., et al. 2002. Liver X Receptors as Insulin-mediating Factors in Fatty Acid and Cholesterol Biosynthesis. Journal of Biological Chemistry 277: 10691-10697.
- (214) Cao G., Liang Y., et al. 2003. Antidiabetic Action of a Liver X Receptor Agonist Mediated By Inhibition of Hepatic Gluconeogenesis. Journal of Biological Chemistry 278: 1131-1136.
- (215) Repa JJ., et al. 2000. Regulation of absorption and ABC 1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. Science 289: 1524–1529.
- (216) Costet P., Luo Y., Wang N., et al. 2000. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 pro-moter by the liver X receptor/retinoid X receptor. Journal of Biological Chemistry 275: 28240–28245.
- (217) Venkateswaran A., et al. 2000. Human white/ murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. Journal of Biological Chemistry 275: 14700–14707.
- (218) Sabol SL., Brewer HB. Jr., Santamarina-Fojo S. 2005. The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver. Journal of Lipid Research 46: 2151–2167.
- (219) Kennedy M.A., et al. 2001. Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein. Journal of Biological Chemistry 276: 39438–39447.
- (220) Repa JJ., et al. 2002. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. Journal of Biological Chemistry 277: 18793–18800.

- (221) Berge KE., et al. 2002. Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8. Journal of Lipid Research 43: 486–494.
- (222) Cha JY., Repa JJ. 2007. The Liver X Receptor (LXR) and Hepatic Lipogenesis: THE CARBOHYDRATE-RESPONSE ELEMENT-BINDING PROTEIN IS A TARGET GENE OF LXR. Journal of Biological Chemistry 282: 743.
- (223) Whitney KD., Watson MA., et al. 2001. Liver X Receptor (LXR) Regulation of the LXR Gene in Human Macrophages. Journal of Biological Chemistry 276: 43509-43515.
- (224) Zelcer N., Tontonoz. 2006. Liver X receptor as integrators of metabolic and inflammatory signaling. Journal of Clinical Investigation 116(3): 607-614.
- (225) Joseph SB., McKilligin E., et al. 2002. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. National Academy of Sciences 99: 7604.
- (226) Kalaany NY., Gauthier KC., et al. 2005. LXRs regulate the balance between fat storage and oxidation. Cell Metabolism 1: 231-244.
- (227) Ji W., Gong BQ. 2007. Hypolipidemic effects and mechanism of *Panax notoginseng* on lipid profile in hyperlipidemic rats. J Ethno. 113: 318-324.
- (228) Kersten S., et al. 2001. The peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates amino acid metabolism. FASEB Journal 15: 1971–1978.
- (229) Goto T., Takahashi N., et al. 2005. Phytol directly activates peroxisome proliferator-activated receptor [alpha] (PPAR[alpha]) and regulates gene expression involved in lipid metabolism in PPAR[alpha]-expressing HepG2 hepatocytes. Biochemical and Biophysical Research Communications 337(2): 440-445.
- (230) Patsouris D., Mandard S., et al. 2004. PPAR γ governs glycerol metabolism. American Society for Clinical Investigation 114: 94.
- (231) Kersten S., Seydoux J., et al. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. American Society for Clinical Investigation 103: 1489.
- (232) Boden G., Lebed B., Schatz M., et al. 2001. Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects. Diabetes 50: 1612–1617.
- (233) Kuhlmann J., et al. 2003. Intramyocellular lipid and insulin resistance: a longitudinal in vivo 1H-spectroscopic study in Zucker diabetic fatty rats. Diabetes 52: 138–144.
- (234) Duez H., et al. 2002. Reduction of atherosclerosis by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist fenofibrate in mice. Journal of Biological Chemistry 277: 48051–48057.
- (235) Rubins HB., et al. 1999. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. N English Journal of Medicine 341: 410–418.
- (236) Tontonoz P., Nagy L., Alvarez JG., et al. 1998. PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and

uptake of oxidized LDL. Cell 93: 241–252.

- (237) Nagy L., Tontonoz P., Alvarez JG., et al. 1998. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ . Cell 93: 229–240.
- (238) Kliewer S., Lenhard J., Willson TM., et al. 1995. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor γ and promotes adipocyte differentiation. Cell 83: 813–819.
- (239) Theocharis S., Kanelli H., et al. 2002. Expression of peroxisome proliferator activated receptor-gamma in non-small cell lung carcinoma: correlation with histological type and grade. Lung Cancer 36: 249-55.
- (240) Laurora S., Pizzimenti S., Bbiatore F., et al 2003. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Ligands Affect Growth-Related Gene Expression in Human Leukemic Cells. Journal of Phramacological Exp Theraphy 305: 932-942.
- (241) Weng JR., Chen CY., et al. 2006. Beyond peroxisome proliferator-activated receptor γ signaling: the multifacets of the antitumor effect of thiazolidinediones. Society of Endocrinology 13: 401-413.
- (242) Chui PC., Guam HP., Lehrke M., et al. 2005. PPAR γ regulate adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1. Journal of Clinical Invastigation 115(8): 2244-2256.
- (243) Jiang JG., Johnson C., et al. 2001. Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ -mediated Transcriptional Up-regulation of the Hepatocyte Growth Factor Gene Promoter via a Novel Composite cis-Acting Element. Journal of Biological Chemistry 276: 25049-25056.
- (244) Glass CK. 2006. Going nuclear in metabolic and cardiovascular disease. Journal of Clinical Invastigation 116(3): 556-560.
- (245) Chiang JYL. 2004. Regulation of bile acid synthesis: pathways nuclear receptors, and mechanisms. Journal of Hepatology 40: 539–551.
- (246) Bianchi A., Dewailly E., et al. 2004. Decrease of human hepatoma cell growth by arachidonic acid is associated with an accumulation of derived products from lipid peroxidation. Biochimie 86(9-10): 633-642.
- (247) Yusuf S, Dagenais G., Pogue J., et al. 2000. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high – risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. N English Journal of Medicine 2000: 154–160 .
- (248) Kushi LH., Folsom AR., Prineas RJ., et al. 1996. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. N English Journal of Medicine 334: 1156–1162 .
- (249) Kohlmeier L., Hastings HB. 1995. Epidemiologic evidence of a role of carotenoids in cardiovascular disease prevention. American Journal of Clinical Nutrition 62(suppl): 1370s-6s.
- (250) Mbata TI. Antioxidant Nutrients: Beneficial or Harmful. Internet Journal of Food Safety 7: 29-33.
- (251) Vivekananthan DP., Penn MS., et al. 2003. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. Lencet 36: 2017-2023.
- (252) Stephens NG., Parsons A., Schofield PM., et al. 1996. Randomised controlled trial of vitamin E in

- patients with coronary disease : Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). Lancet 374: 781–786 .
- (253) Fang JC., Kinlay S., Beltrame J., et al. 2002. Effect of vitamin C and E on progression of transplant-associated arterosclerosis :a randomized trial. Lancet 359: 1108-13.
- (254) Steiner M., Glantz M., Lekos A. 1995. Vitamin E plus aspirin compared with aspirin alone in patients with transient ischemic attacks. American Journal of Clinical Nutrition 62(suppl): 1381s-4s.
- (255) stamper MJ., Rimm EB. 1995. Epidemiologic evidence for vitamin E in prevention of cardiovascular disease. American Journal of Clinical Nutrition 62(suppl): 1365s-9s.
- (256) Enstrom JE., Kanim LE., Klein MA. 1992. Vitamin C intake and mortality among a sample of the United States population. Epidemiology 3: 194–202 .
- (257) Maron DJ., Lu GP., Cai NS., et al. 2003. Cholesterol – lowering effect of thioflavin enriched green tea extract. Arch International Medicine 163: 1448–1458.
- (258) Hennekens CH. 1997. Current knowledge and future directions for research on antioxidant vitamins in prevention of cancer, cardiovascular and eye diseases. Pure & Application Chemistry 69: 2141–2144.
- (259) Narasimha A., Watanabe J., et al. 2007. A novel anti-atherogenic role for COX-2 potential mechanism for the cardiovascular side effects of COX-2 inhibitors. Prostaglandins & Other Lipid Mediators 84(1-2): 24-33.
- (260) Becker EM., Nissen LR., et al. 2004. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. Eur Food Research Technology 219: 561-571.
- (261) Wu X., Gu L., et al. 2004. Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. Journal of Food Composition & Analysis 17: 407-422.
- (262) Hoelzl C., Bichler J., et al. 2005. Methods for the detection of antioxidants which prevent age related diseases: a critical review with particular emphasis on human intervention studies. Journal of Physiology & Phramacology 56: 49-64.
- (263) Cao, G., H. M. Alessio, et al. 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. Free Radical Biology and Medicine 14: 303-311.
- (264) Huang DJ., Ou BX., et al. 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. American Chemical Society Washington, USA. 50: 4437-4444.
- (265) Prior R L., Hoang H., et al. 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC FL)) of plasma and other biological and food samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 3273-3279.
- (266) Huang D., Ou B., et al. 2002. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated beta-cyclodextrin as the solubility enhancer.

Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 1815-1821.

- (267) Gedik CM., Boyle SP., et al. 2002. Oxidative stress in humans: validation of biomarkers of DNA damage. Oxford University Press 23: 1441-1446.
- (268) Tice RR., Agurell E., et al. 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environmental & Molecular Mutagenesis 35: 206-221.
- (269) Miwa M., Hongo Y. 2000. Application of a Single-cell Gel Electrophoresis (Comet) Assay to Screen the Antimutagenic Activity in Foods. J-STAGE 64: 1292-1294.
- (270) Collins AR. 2004. The comet assay for DNA damage and repair. Molecular Biotechnology 26: 249-261.
- (271) Masters JRW. 2000. Animal Cell Culture: practical approach 3 edition Oxford Univer. Press.
- (272) Zhuge J., Cederbaum AI. 2006. Serum deprivation-induced HepG2 cell death is potentiated by CYP2E1. Free Radical Biology & Medicine 40: 63-74.
- (273) Berridge MV., Tan AS., et al. 1996. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. Biochemica 4: 14-19.
- (274) Talorete TPN., Bouaziz M., et al. 2006. Influence of medium type and serum on MTT reduction by flavonoids in the absence of cells. Cytotechnology 52: 189-198.
- (275) Helgason CD., Miller CL. Basic cell culture Protocols: Method in Molecular Biology Volume 290 3 edition Humana Press.
- (276) Zhang SZ., Lipsky MM., et al. 1990. Neutral red (NR) assay for cell viability and xenobiotic-induced cytotoxicity in primary cultures of human and rat hepatocytes. Cell Biology and toxicology. 6: 219-234.
- (277) Gabriel C., Camins A., et al. 1997. Determination of nitric oxide generation in mammalian neurons using dichlorofluorescein diacetate and flow cytometry. Journal of Phramacological and Toxicological Method 38: 93-98.
- (278) Jakubowski W., Bartosz G. 2000. 2, 7-DICHLOROFLUORESCIN oxidation and reactive oxygen species: What does it measure? Cell Biology International 24: 757-760.
- (279) Myhre O., Andersen JM., et al. 2003. Evaluation of the probes 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. Biochemical Phramacology 65: 1575-1582.
- (280) Afzal M., Matsugo S., et al. 2003. Method to overcome photoreaction, a serious drawback to the use of dichlorofluorescein in evaluation of reactive oxygen species. Biochemical and Biophysical Research Communications 304: 619-624.
- (281) Ou BX., Hampsch-Woodill M., et al. 2002. Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. American Chemical Society Washington, USA. 50: 2772-2777.
- (282) Lo YMD., Chiu RWK., Chan CKA. 2006. Clinical Applications of PCR : Method in Molecular Biology Volume 336. 2 edition Humana Prass.

- (283) Chirinos R., Rogez H., Campos D., et al. 2007. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavon) tubers. Separation and Purification Technology 55: 2 17–225.
- (284) Perva-Uzunalic A., Skerget M., Knez Z., et al. 2006. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. Food Chemistry 96: 597–605.
- (285) Silva EM., Rogez H., Larondelle Y. (2007a) Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. Separation and Purification Technology 55: 381–387.
- (286) Mukai R., Fukuda I., et al. 2005. Anthocyanins Fail to Suppress Transformation of Aryl Hydrocarbon Receptor Induced by Dioxin. J-STAGE 69: 896-903.
- (287) Kaneda I., Iwai K., Kubo H., et al. 2004. Antioxidative property of extract from ancient rice bran. Food Science and Technology Research 10: 374-382.
- (288) Vermeris W., Nicholson R. 2006. Phenolic Compound Biochemistry. Springer.
- (289) Kelm MA., Hammerstone JF., et al. 2005. Identification and quantitation of flavanols and proanthocyanidins in foods: How good are the datas? Informa Healthcare 12: 35-41.
- (290) Jiang L., Cao J., et al. 2007. Genotoxicity of acrylamide in human hepatoma G2 (HepG2) cells. Toxicology in Vitro 21: 1486-1492.
- (291) Cavallo D., Ursini CL., et al. 2003. Evaluation of oxidative damage and inhibition of DNA repair in an in vitro study of nickel exposure. Toxicology in Vitro 17: 603-607.
- (292) Mas T., Susperregui J., Berke B., et al. 2000. DNA triplex stabilization property of natural anthocyanins. Phytochemistry 53: 679–687.
- (293) Ramirez-Tortosa C., Andersen OM., Gardner PT., et al. 2001. Anthocyanin-rich extract decreases induces of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. Free Radical Biology and Medicine 31: 1033–1037.
- (294) Austin CA., Patel S., Ono K., et al. 1992. Site-specific DNA cleavage by mammalian topoisomerase II induced by novel flavone and catechin derivatives. Biochem J 282: 883–889.
- (295) V. Abalea J., Cillard MP., Dubos O., et al. 1999. Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures. Free Radical Biology and Medicine 26: 1457–1466.
- (296) Watjen W., Michels G., et al. 2005. Low Concentrations of Flavonoids Are Protective in Rat H4IIE Cells Whereas High Concentrations Cause DNA Damage and Apoptosis. American Journal of Clinical Nutrition 135: 525-531.
- (297) Michels G., Watjen W., et al. 2005. Pro-apoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells. Toxicology 206(3): 337-348.
- (298) Imanishi H., Sasaki YF., Matsumoto K., et al. 1990. Suppression of 6-TG-resistant mutations in V79 cells and recessive spot formations in mice by vanillin. Mutation Research 243: 151–158.

- (299) Sasaki YF., Matsumoto K H., Imanishi M. et al. 1990. In vivo anticlastogenic and antimutagenic effects of tannic acid in mice. Mutation Research 244: 43–47.
- (300) Fahrig R. 1996. Anti-mutagenic agents are also co-recombinogenic and can be converted into co-mutagens. Mutation Research 350: 59–67.
- (301) Alvi NK., Rizvi RY., Hadi S.M. 1986. Interaction of quercetin with DNA. Bioscience Report 6: 861–868.
- (302) Fang JL., Vaca, CE., Valsta, LM., et al. 1996. Determination of DNA adducts of malondialdehyde in humans: effects of dietary fatty acid composition. Carcinogenesis 17: 1035– 1040.
- (303) Nair J., Vaca, CE., Velic I., et al. 1997. High dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids drastically increase the formation of etheno-DNA base adducts in white blood cells of female subjects. Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev. 6: 597–601
- (304) Das S., Vasisht S., et al. 2000. Correlation between total antioxidant status and lipid peroxidation in hypercholesterolemia. Current Science 78: 486-490.
- (305) Kitagawa S., Sakamoto H., & Tano, H. 2004. Inhibitory effects of flavonoids on free radical-induced hemolysis and their oxidative effects on hemoglobin. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 52: 999–1001.
- (306) Vitrac X., Desmouliere A., Brouillaud B., et al. 2003. Distribution of [¹⁴C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. Life Science 72: 2219–2233.
- (307) Schramm DD., Collins HE., et al. 1999. Flavonoid transport by mammalian endothelial cells. Journal of Nutritional Biochemistry 10(4): 193-197.
- (308) Gryglewski RJ, Korbut R., Robak J. et al. 1987. On the mechanism of antithrombotic action of avonoids. Biochemistry Pharmacology 36: 317-322.
- (309) Long LH., Clement MV., Halliwell B. 2000. Artifacts in culture: Rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)epigallocatechin, (-)epigallocatechin gallate, (+)-catechin and quercetin to commonly used cell culture media. Biochemical and Biophysical Research Communications 273: 50–53.
- (310) Joo JH., Wang S., Chen JG., et al. 2005. Different signaling and cell death roles of heterotrimeric G protein alpha and beta subunits in the Arabidopsis oxidative stress response to ozone. The Plant Cell 17: 957–970.
- (311) Stone JR. 2004. An assessment of proposed mechanisms for sensing hydrogen peroxide in mammalian systems. Archives of Biochemistry and Biophysics 422: 119–124.
- (312) Çimen MYB. 2008. Free radical metabolism in human erythrocytes : Invited critical review. Clinica Chimica Acta 390 : 1-11.
- (313) Dierickx PJ. 2002. Formation of reactive oxygen species in rat hepatoma-derived Fa32 cells to predict human toxicity. Toxicology in Vitro 16: 725-730.
- (314) Westerink WMA., Schoonem WGEJ. 2007. Cytochrome P450 levels in HepG2 cells and cryopreserved

- primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. Toxicology in Vitro 21: 1581-1591.
- (315) Shoelson SE., Lee J., et al. 2006. Inflammation and insulin resistance. American Society for Clinical Investigation 116: 1793-1801.
- (316) Kanduc D., Mittelman A., et al. 2002. Cell death: apoptosis versus necrosis. International Journal of Oncology 21: 165-170.
- (317) Morley KL., Ferguson PJ., et al. 2007. Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells. Cancer Letters 251(1): 168-178.
- (318) Robaszekiewicz, A., Balcerczyk A., et al. 2007. Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. Cell Biology International 31(10) : 1245-1250.
- (319) Wang X., Thomas B., et al. 2006. Mechanism of arylating quinone toxicity involving Michael adduct formation and induction of endoplasmic reticulum stress. National Acad Sciences 103: 3604-3609.
- (320) Tiwari AK. 2001. Imbalance in antioxidant defence and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. Current Science 81: 1179-1187.
- (321) Valcic S., Muders A., Jacobsen NE., Liebler DC., et al. 1999. Antioxidant chemistry of green tea catechins: identification of products of the reaction of (-)-epigallocatechin gallate with peroxy radicals. Chemistry Research Toxicology 42: 382-396.
- (322) Yang CS., Maliakal P., Meng X., 2002. Inhibition of carcinogenesis by tea. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 42: 25-54.
- (323) Min K., Ebeler SE. 2008. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. Food and Chemical Toxicology 46(1): 96-104.
- (324) Rice-Evans C. 2004. Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism, and bioactivity. Free Radical Biology and Medicine 36(7): 827-828.
- (325) Halliwell B. 2007. Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health? Cardiovascular Research 73: 341-347.
- (326) Benito S., Buxaderas S., et al. 2004. Flavonoid metabolites and susceptibility of rat lipoproteins to oxidation. American Physiological Society 287: 2819-2824.
- (327) Engler MB., Engler MM., et al. 2004. Flavonoid-Rich Dark Chocolate Improves Endothelial Function and Increases Plasma Epicatechin Concentrations in Healthy Adults. American Collage of Nutrition 23: 197-204.
- (328) Lee WYW., Chiu LCM., et al. 2008. Cytotoxicity of major tanshinones isolated from Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) on HepG2 cells in relation to glutathione perturbation. Food and Chemical Toxicology 46(1): 328-338.
- (329) Chiarugi P., Fiaschi T. 2007. Redox signalling in anchorage-dependent cell growth. Cell Signal 19: 672-682.
- (330) Lee YM., Choi JS., et al. 2006. Effects of dietary genistein on hepatic lipid metabolism and mitochondrial function in mice fed high-fat diets. Nutrition 22(9): 956-964.

- (331) Abidi P., Chen W., et al. 2006. The medicinal plant goldenseal is a natural LDL-lowering agent with multiple bioactive components and new action mechanisms. Journal of Biological Chemistry 47: 2134.
- (332) Chung MJ., Kang AY., et al. 2007. The effect of essential oils of dietary wormwood (*Artemisia princeps*), with and without added vitamin E, on oxidative stress and some genes involved in cholesterol metabolism. Food and Chemical Toxicology 45(8): 1400-1409.
- (333) Jung UJ., Lee MK., et al. 2006. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. International Journal of Biochemistry & Cell Biology 38: 1134-1145.
- (334) Sharma B., Balomajumder C., et al. 2008. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. Food and Chemical Toxicology 46 : 2376-2383.
- (335) Sevov M., Elfineh L., et al. 2006. Resveratrol regulates the expression of LXR α in human macrophages. Biochemical & Biophysical Research Communications 348: 1047-1054.
- (336) Liang CY., Tsai SH., Tsai DC., et al. 2001. Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ by flavonoids in mouse macrophage. FEBS Letters 496: 12-18.
- (337) Jimenez-Lopez JM., Carrasco MP., et al. 2006. Hexadecylphosphocholine disrupts cholesterol homeostasis and induces the accumulation of free cholesterol in HepG2 tumour cells. Biochemical Pharmacology 71(8): 1114-1121.
- (338) Brusselmans K., Vrolix R., et al. 2005. Induction of Cancer Cell Apoptosis by Flavonoids Is Associated with Their Ability to Inhibit Fatty Acid Synthase Activity. Journal of Biological Chemistry 280: 5636.
- (339) Noguchi N., Niki E. 2000. Phenolic antioxidants: A rationale for design and evaluation of novel antioxidant drug for atherosclerosis. Free Radical Biology and Medicine 28(10) : 1538-1546.
- (340) Knowledge Management by the Rice Science Center (RSC) Thailand. 2007. Rice for the Future. 2(2): 1-2. <http://dna.kps.ku.ac.th>.
- (341) Chiang AN., Wu HL., Yeh HI., et al. 2006. Antioxidant effects of black rice extract through the induction of superoxide dismutase and catalase activities. Lipids 41(8): 797-803.
- (342) Hu C., Zawistowski J., Ling W., et al. 2003. Black Rice (*Oryza sativa* L. indica) Pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric chemical and biological model systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 5271-5277.
- (343) Wang Q., Han P., Zhang M., et al. 2007. Supplementation of black rice pigment fraction improves antioxidant and anti-inflammatory status in patients with coronary heart disease. Asia Pacific Journal of Clinina Nutrition 16 (Suppl1): 295-301.
- (344) Ricardo da Silva JM., Darmon N., Fernandez Y., Mitjavila S. 1991. Oxygen free radical scavenger capacity

in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 39: 1549-1552.

- (345) นริศา คำแก่น. 2004. ปฏิกริยาระหว่างยาและสมุนไพร SWU Journal of Phramacological Scieance (9)1: 93-104.
- (346) Lude S., Torok M., et al. 2008. Hepatocellular toxicity of kava leaf and root extracts. Phytomedicine 15(1-2): 120-131.
- (347) Tsuji PA., Walle T. 2008. Cytotoxic effects of the dietary flavones chrysin and apigenin in a normal trout liver cell line. Chemico-Biological Interactions 171(1): 37-44.
- (348) Drewnowski A., Gomez-Carneros C. 1994. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. American Society for Clinical Nutrition 72: 1424-1435.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



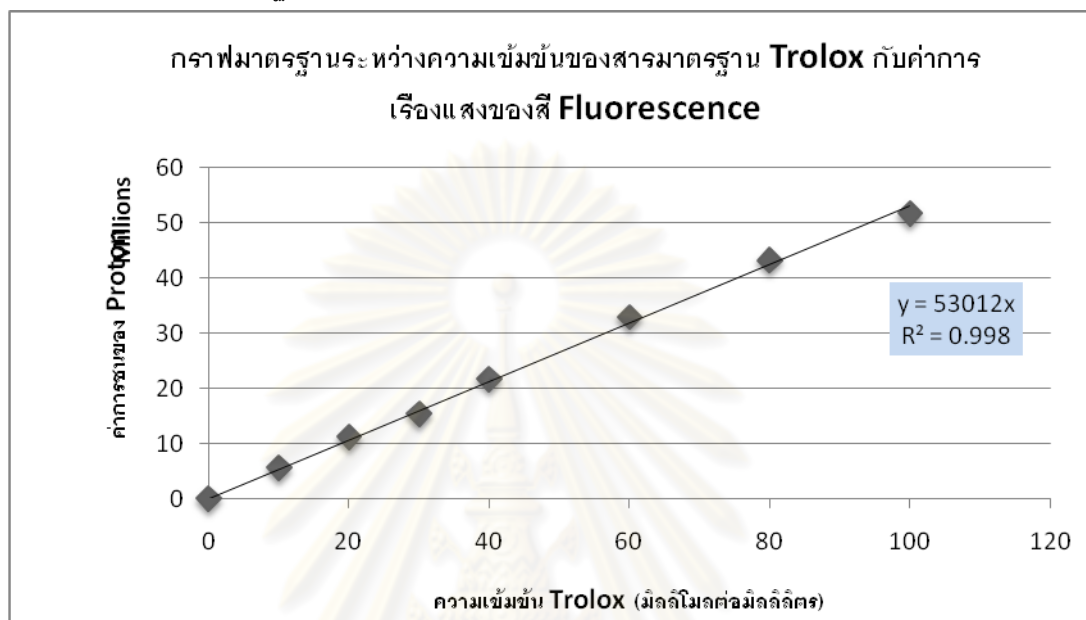
ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก
ข้อมูลจากการทดลอง

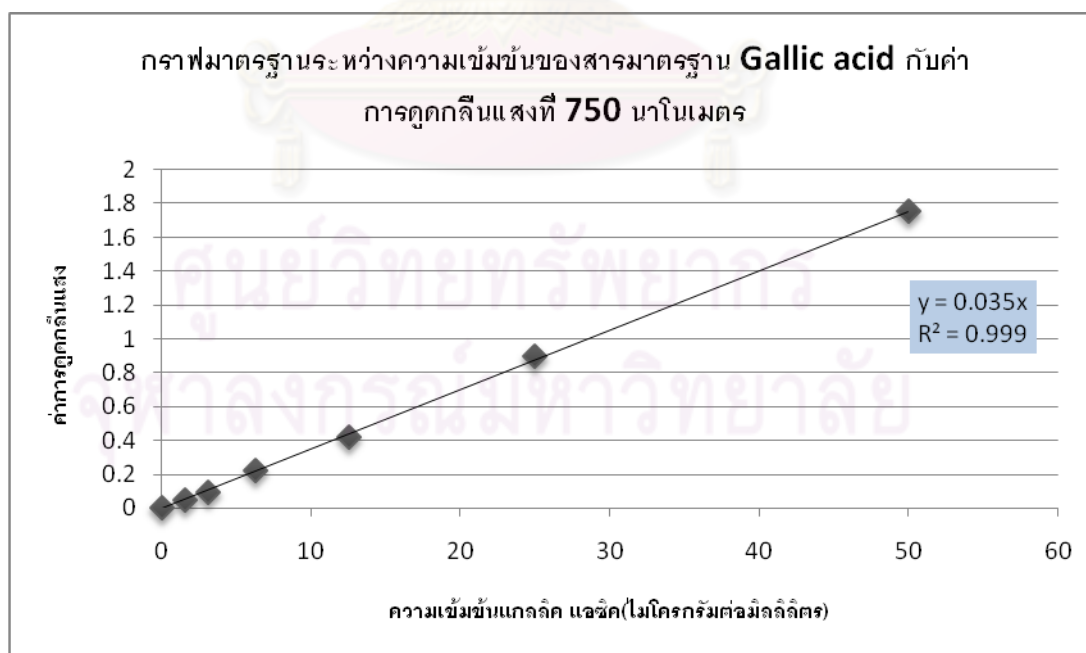
1. กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากข้าวเมล็ดสี

1.1 กราฟมาตรฐานจากการทดสอบด้วยวิธี ORAC assay



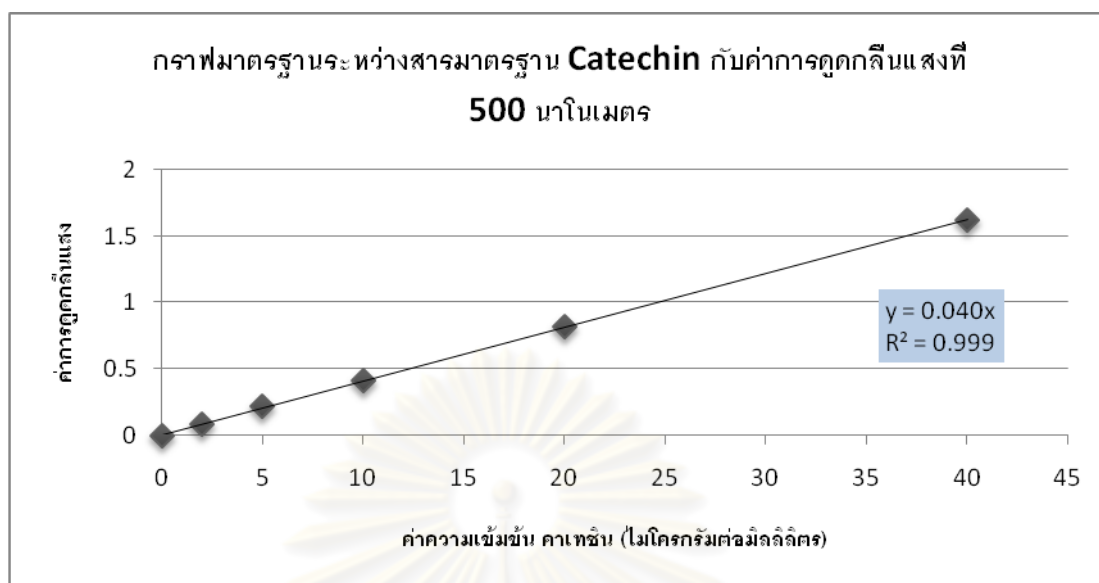
ทำการทดสอบสารมาตรฐานทุกครั้งควบคู่ไปกับการตรวจวัดค่าสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดข้าวเมล็ดสี

1.2 กราฟมาตรฐานจากการทดสอบด้วยวิธี FRC assay



ทำการทดสอบสารมาตรฐานทุกครั้งควบคู่ไปกับการตรวจวัดค่าสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดข้าวเมล็ดสี

1.3 กราฟมาตรฐานจากการทดสอบด้วยวิธี Vanillin assay



ทำการทดสอบสารมาตรฐานทุกครั้งควบคู่ไปกับการตรวจวัดค่าสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดข้าวเมธิดี

2. ค่าที่ได้จากการทดสอบสารสกัดข้าวเหนียวดำกับเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อตรวจวัดผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำ ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อเซลล์

2.1 ค่าความอยู่รอดของเซลล์เมื่อทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ โดยตรวจสอบด้วยวิธีการ MTT assay

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1: ค่าการอยู่รอดของเซลล์ Jurkat, HepG2 และ PBMCs เมื่อทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นตั้งแต่ 50 ถึง 1000 $\mu\text{g/ml}$ ตามเวลาที่กำหนดและตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay

Cells treatment	Jurkat		HepG2		PBMC	
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	29 ชั่วโมง	58 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
ไม่ได้รับสารใดๆ	100	100	100	100	100	100
ตัวทำละลาย PBS	96.8±7.05 (p=0.989)	94.6±4.34 (p=0.142)	91.9±4.51 (p=0.120)	90.9±7.05 (p=0.998)	91.9±8.25 (p=0.242)	93.43±3.41 (p=0.096)
สารสกัดข้าวเหนียวดำ ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$	103.7±3.49 (p=0.392)	91.7±8.78 (p=0.824)	97.1±4.97 (p=1.000)	110.6±10.68 (p=0.465)	89.8±9.80 (p=1.000)	74.4±19.35 (p=0.169)
สารสกัดข้าวเหนียวดำ ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$	103.4±11.34 (p=1.000)	106.5±8.30 (p=0.344)	97.7±9.13 (p=1.000)	115.4±9.30** (p=0.011)	86.5±11.76 (p=0.996)	84.5±13.93 (p=0.373)
สารสกัดข้าวเหนียวดำ ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$	116.9±12.83 (p=0.077)	113.4±12.29 (p=0.066)	102.0±5.88 (p=1.000)	111.6±7.96** (p=0.003)	85.7±11.46 (p=0.988)	83.8±10.35 (p=0.068)
สารสกัดข้าวเหนียวดำ ความเข้มข้น 400 $\mu\text{g/ml}$	131.6±12.07** (p=0.000)	127.4±11.66** (p=0.000)	109.7±10.75 (p=0.644)	134.46±13.46** (p=0.000)	92.4±14.3 (p=1.000)	82.9±9.0* (p=0.033)
สารสกัดข้าวเหนียวดำ ความเข้มข้น 600 $\mu\text{g/ml}$	123.7±12.03** (p=0.01)	124.7±9.55** (p=0.01)	117.2±14.18 (p=0.266)	115.3±20.57 (p=0.968)	90.4±19.59 (p=1.000)	80.0±11.33* (p=0.033)
สารสกัดข้าวเหนียวดำ ความเข้มข้น 800 $\mu\text{g/ml}$	116.4±9.78** (p=0.016)	110.6±14.81 (p=0.994)	110.3±9.36 (p=0.566)	106.6±9.45 (p=0.758)	91.7±11.35 (p=1.000)	46.6±10.85* (p=0.000)
สารสกัดข้าวเหนียวดำ ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/ml}$	110.8±10.43 (p=0.336)	95.3±13.91 (p=1.000)	102.3±11.37 (p=1.000)	107.9 ±5.95 (p=0.166)	88.5±8.86 (p=1.000)	35.4±3.83* (p=0.000)
สารสกัดข้าวเหนียวดำ ความเข้มข้น 1500 $\mu\text{g/ml}$	109.4±9.09 (p=0.596)	84.3±6.99* (p=0.000)	101.4±10.08 (p=1.000)	92.5±16.16 (p=1.000)	-	-
สารสกัดข้าวเหนียวดำ ความเข้มข้น 2000 $\mu\text{g/ml}$	101.3±11.01 (p=1.000)	80.0±9.96* (p=0.000)	101.7±7.89 (p=1.000)	83.3±9.36* (p=0.005)	-	-
สารสกัดข้าวเหนียวดำ ความเข้มข้น 3000 $\mu\text{g/ml}$	84.3±9.87* (p=0.013)	65.5±7.78* (p=0.000)	102.9±5.70 (p=1.000)	76.1±8.00* (p=0.000)	-	-
H ₂ O ₂ ความเข้มข้น 25 mM	3.44±4.87* (p=0.00)	0.8±9.04* (p=0.000)	3.90±5.07* (p=0.000)	9.05±4.82* (p=0.000)	2.56±2.82* (p=0.000)	29.23±3.41* (p=0.034)

ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้งจำนวน 3 ครั้งการทดลอง

* % Viability ระดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

** % Viability เพิ่มระดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

2.2 ค่าความอยู่รอดของเซลล์ HepG2 เมื่อทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ โดยตรวจสอบด้วยวิธีการ Neutral Red assay

ตารางที่ 2: ค่าความอยู่รอดของเซลล์ HepG2 เมื่อทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำเป็นเวลา 29-58 ชั่วโมงโดยวิธี Neutral red assay

Reagent	HepG2	
	29 ชั่วโมง	58 ชั่วโมง
ไม่ได้รับสารใดๆ	100	100
ตัวทำละลาย PBS	99.95±6.33 (<i>p</i> =1.000)	97.43±4.17 (<i>p</i> =0.990)
สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 50 µg/ml	101.3±9.76 (<i>p</i> =1.000)	107.0±9.11 (<i>p</i> =0.484)
สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 100 µg/ml	95.4±8.14 (<i>p</i> =1.000)	91.5±6.08 (<i>p</i> =0.072)
สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 200 µg/ml	95.6±8.15 (<i>p</i> =1.000)	91.3±10.08 (<i>p</i> =0.618)
สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 400 µg/ml	86.8±8.28 (<i>p</i> =0.943)	98.6±4.73 (<i>p</i> =1.000)
สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 600 µg/ml	96.8±10.60 (<i>p</i> =1.000)	94.3±6.08 (<i>p</i> =0.999)
สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 800 µg/ml	88.8±10.84 (<i>p</i> =0.985)	77.7±10.08* (<i>p</i> =0.001)
สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 1000 µg/ml	80.2±4.87 (<i>p</i> =0.449)	77.2±6.13* (<i>p</i> =0.000)
สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 1500 µg/ml	77.5±9.42 (<i>p</i> =0.305)	69.25±8.25* (<i>p</i> =0.000)
สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 2000 µg/ml	74.3±14.34 (<i>p</i> =0.078)	57.50±4.81* (<i>p</i> =0.000)
การสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 3000 µg/ml	69.5 ±7.08* (<i>p</i> =0.010)	34.50±10.60* (<i>p</i> =0.000)
H ₂ O ₂ ความเข้มข้น 25 mM	17.0±5.15* (<i>p</i> =0.000)	9.7±2.70* (<i>p</i> =0.000)

* % Viabilityลดระดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *p* < 0.05

2.3 ค่าความอยู่รอดของเซลล์ Jurkat เมื่อทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ โดยตรวจสอบด้วยวิธีการ Trypan Blue dye Exclusion

ตารางที่ 3: ผลการทดสอบสารสกัดข้าวเหนียวดำต่อการอยู่รอดของเซลล์ Jurkat โดยวิธี Trypan Blue dye Exclusion

เวลา	Jurkat								
	Negative control	PRE 50 $\mu\text{g/ml}$	PRE 100 $\mu\text{g/ml}$	PRE 200 $\mu\text{g/ml}$	PRE 400 $\mu\text{g/ml}$	PRE 600 $\mu\text{g/ml}$	PRE 800 $\mu\text{g/ml}$	PRE1000 $\mu\text{g/ml}$	Positive control
24 ชั่วโมง	100 ^a	100.00	100.60	91.62	96.40	74.25	58.68	27.54	0
48 ชั่วโมง	100	103.08	83.08	80.77	66.15	48.46	40.00	16.92	0
72 ชั่วโมง	100	78.46	66.15	33.08	30.77	7.69	2.30	1.54	0

ทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้งและเลือกนับแบบสุ่มทั้งหมด 100 เซลล์ต่อ 1 กลุ่มตัวอย่างที่ทำการทดสอบ แสดงในหน่วย % live cell

2.4 ค่าระดับ Oxidative stress ภายในเซลล์เมื่อทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ โดยตรวจสอบด้วยวิธีการ DCFHDA assay

ตารางที่ 4: %Oxidative stress ภายในเซลล์ Jurkat และ HepG2 เมื่อทดสอบกับสารสกัดข้าวเหนียวดำ

Culture media	Jurkat		HepG2	
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	29 ชั่วโมง	58 ชั่วโมง
ไม่ได้รับสารใด ๆ	100	100	100	100
ตัวทำละลาย PBS	108.77 \pm 0.00 (p = 1.000)	93.99 \pm 3.16 (p = 1.000)	100.22 \pm 26.15 (p = 1.000)	86.92 \pm 3.34 (p = 0.147)
สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$	86.40 \pm 26.15 (p = 1.000)	79.48 \pm 3.59 (p = 0.924)	94.82 \pm 8.81 (p = 1.000)	81.01 \pm 17.13 (p = 0.987)
สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$	99.90 \pm 4.48 (p = 1.000)	78.54 \pm 3.93 (p = 0.897)	91.41 \pm 4.81 (p = 0.748)	76.72 \pm 15.45 (p = 0.879)
สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$	89.32 \pm 10.30 (p = 1.000)	78.77 \pm 2.75 (p = 0.897)	86.24 \pm 10.58 (p = 0.951)	71.21 \pm 11.65 (p = 0.438)
สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 400 $\mu\text{g/ml}$	93.77 \pm 6.92 (p = 1.000)	77.10 \pm 2.92 (p = 0.837)	76.58 \pm 6.66 (p = 0.192)	67.55 \pm 9.23 (p = 0.192)
สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 600 $\mu\text{g/ml}$	84.57 \pm 9.90 (p = 0.987)	81.56 \pm 6.39 (p = 0.982)	68.25 \pm 2.65* (p=0.006)	63.03 \pm 7.15 (p = 0.067)
สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 800 $\mu\text{g/ml}$	85.05 \pm 3.59 (p = 0.493)	77.43 \pm 5.17 (p=0.869)	63.27 \pm 4.96* (p=0.024)	60.43 \pm 5.99* (p = 0.033)
สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/ml}$	78.77 \pm 10.64 (p = 0.938)	84.84 \pm 6.64 (p=0.998)	64.07 \pm 5.35* (p=0.032)	55.09 \pm 3.11* (p = 0.033)
H ₂ O ₂ ความเข้มข้น 0.025 mM	-	-	150.62 \pm 19.90** (p=0.000)	135.23 \pm 11.79** (p=0.000)

ทำการทดสอบแต่ละกลุ่มตัวอย่างซ้ำ 4 ครั้งจำนวน 3 ครั้งการทดลอง ค่าทั้งหมดแสดงในหน่วย %Mean \pm S.D

* %Oxidative stress ลดระดับภายในเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ p< 0.05

** %Oxidative stress เพิ่มระดับภายในเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ p<0.05

2.5 ค่าความสามารถในสารสกัดข้าวเหนียวดำที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ ในการป้องกันภาวะ Oxidative Stress ที่เพิ่มขึ้นภายในเซลล์HepG2 ที่เกิดจากการได้รับ H₂O₂ โดยตรวจสอบด้วยวิธีการ DCFHDA assay

ตารางที่ 5: แสดงผลของสารสกัดข้าวเหนียวดำในการป้องกันเซลล์ HepG2 จากภาวะ Oxidative stress ที่เกิดจาก H₂O₂

Culture media	HepG2	
	29 ชั่วโมง	58 ชั่วโมง
H ₂ O ₂ ความเข้มข้น 0.025 mM	100	100
ตัวทำละลาย PBS	86.79±0.46 (p=0.760)	100.21±20.71(p=1.000)
สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 50 µg/ml	90.01±6.15(p=0.135)	98.12±4.58(p=0.999)
สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 100 µg/ml	91.05±12.32(p=0.355)	98.79±5.08(p=1.000)
สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 200 µg/ml	91.77±7.36*(p=0.024)	97.05±7.37(p=0.998)
สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 400 µg/ml	81.93±8.42*(p=0.000)	93.82±8.28(p=0.318)
สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 600 µg/ml	76.45±11.82*(p=0.000)	91.33±6.77*(p=0.009)
สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 800 µg/ml	75.68±11.30*(p=0.000)	91.99±6.82*(p=0.019)
สารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 1000 µg/ml	71.50±11.10*(p=0.000)	89.19±6.40*(p=0.000)

ทำการทดสอบแต่ละกลุ่มตัวอย่างซ้ำ 4 ครั้งจำนวน 3 ครั้งการทดลอง

* %Oxidative stress ลดระดับภายในเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p< 0.05)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข
น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ

1 ORAC assay

1. สารละลาย AAPH ความเข้มข้น 153 mM

AAPH 0.1414 กรัมละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 75 mM (pH 7.4)

โดยเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทำการทดลองและอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2. สี fluorescein stock solution 40 ไมโครโมล

Fluorescein dye 1.4532 กรัมละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 75 มิลลิโมล (pH 7.4)

เก็บในที่มืดอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเก็บใช้ได้นาน 2 สัปดาห์ ก่อนการทดสอบให้เตรียมใหม่ทุกครั้งโดยนำสตีอกโซลูชันดังกล่าวเจือจางกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1000

3. สารละลาย Trolox 2.5 mM

Trolox 0.01564 กรัม

ละลายในเอทานอลก่อน 0.5 มิลลิลิตรแล้วเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นตัวทำละลายที่ 2 ไปจนครบ 25 มิลลิลิตร เก็บที่ -80 องศาเซลเซียสได้นานหลายเดือน ก่อนการทดสอบให้เตรียมสารมาตรฐานใหม่ทุกครั้ง

2 Folin Ciocalteu's Phenol Reagent assay

1. Folin Ciocalteu's Phenol Reagent

Reagent 1 ส่วนผสมกับน้ำกลั่น 9 ส่วน

2. Sodium carbonate (Na₂CO₃) 1 M

Na₂CO₃ 5.2995 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร กรองตะกอนออกก่อนใช้

3. Gallic acid Standard stock solution

Gallic acid 0.5 กรัม ละลายในน้ำ 50 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดเก็บที่ -20 องศา

3 Vanillin assay

1. Vanillin reagents 1%

Vanillin 1 กรัมละลายใน 70% H₂SO₄ เตรียมก่อนทำการทดสอบไม่เกิน 30 นาที

4 Comet assay

1. Phosphate buffer saline, pH 7.4

KH₂PO₄ 69.4 มิลลิกรัม

K₂HPO₄ 598 มิลลิกรัม

NaCl 8.78 กรัม

ละลายในน้ำจนครบ 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.4

2. 1% Normal melting point agarose Gel (NMP) coated Slide

NMA 10 มิลลิกรัม ละลายใน PBS 10 มิลลิลิตร

อุณหภูมิเดือดแล้วนำมา 100 ไมโครลิตรแล้วใช้ปลายที่ป้อนปาดจนบางเป็นเนื้อเดียว ปล่อยให้แห้งแล้วเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสใช้ได้หลายเดือน

3. 1% Low melting point agarose gel (LMP)

LMA 5 มิลลิกรัม ละลายใน PBS 5 มิลลิตร

แบ่งเก็บเป็นหลอดเล็กขนาด 75 ไมโครลิตรและ 120 ไมโครลิตรเก็บที่ -20 องศาเซลเซียสใช้ได้หลายเดือน ก่อนใช้อุณหภูมิเป็นน้ำใส ตั้งที่ 37 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้

4. High-Salt Lysis Solution, pH 10

NaCl 14.61 กรัม

Tris base 0.12 กรัม

EDTA (Na3) 3.72 กรัม

ละลายในน้ำจนครบ 89 มิลลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 10 แล้วเติม Triton-X 100 1 มิลลิตรและ DMSO 10 มิลลิตรจนครบ 100 มิลลิตรผสมก่อนใช้ไม่เกิน 24 ชั่วโมง

5. Alkaline Electrophoresis buffer, pH >13

10 M NaOH 30 มิลลิตร

200 mM EDTA 5 มิลลิตร

เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร ปรับจนได้ pH 13 ก่อนทดลองไม่เกิน 24 ชั่วโมง

6. Neutralization buffer, pH 7.5

Tris base 48.5 กรัม

เติมน้ำจนได้ปริมาตร 800 มิลลิตรแล้วปรับ pH เป็น 7.5 แล้วจึงเติมน้ำจนครบ 1 ลิตร

7. EtBr stain solution 10x

Ethidium Bromide 10 มิลลิกรัม

H₂O 50 มิลลิตร

ผสมผงสีกับฟอสเฟตบัพเฟอร์จนได้ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

8. H₂O₂ 0.1 M

H₂O₂ 11.5 ไมโครลิตร

เติมลงในน้ำ 1 มิลลิตร เก็บในตู้แช่แข็ง นานไม่เกิน 1 สัปดาห์

5 Heinz body inhibition assay

1. APHZ 100 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ในฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่ประกอบด้วย KH₂PO₄ เข้มข้น 1/15 โมล 1.3 ส่วนและ Na₂HPO₄ เข้มข้น 1/15 โมล 8.7 ส่วน, pH 7.4

2. กลูโคส 200 mg% โดยละลายกลูโคส 200 มิลลิกรัมใน PBS 100 มิลลิตร

2. คลิสต์ลไวโอเล็ต 1 กรัมเปอร์เซ็นต์ (w/v) ใน 0.73 เปอร์เซ็นต์ NaCl โดยละลายคลิสต์ลไวโอเล็ต 1 กรัมในสารละลาย NaCl 100 มิลลิตร

6 Hemolysis inhibition assay

1. AAPH ความเข้มข้น 200 มิลลิโมล ละลายในฟอสเฟตบัพเฟอร์ pH 7.4

7 MTT assay

1. MTT stock solution reagents 5 mg/ml

MTT dye 5 มิลลิกรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 7.5, 1 มิลลิลิตร

แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 μm เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อและแยกตะกอนเล็กๆ ที่ยังละลายไม่ได้ออก เก็บที่ 2-8 องศา เมื่อจะใช้ให้ dilute 1:2 ด้วย PBS, pH 7.4

2. solution สำหรับ MTT crystal

100% Ethanol 1 ส่วน

DMSO 1 ส่วน

8 Neutral red accumulation assay

1. Neutral Red reagent 4 mg/ml

Neutral Red dye 4 มิลลิกรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 7.5, 1 มิลลิลิตร

กรอง filter ขนาด 0.22 μm เก็บที่ 2-8 องศา เมื่อจะใช้ให้เจือจาง 1:40 ด้วย PBS, pH 7.4 แล้วตั้งไว้ที่ 37 องศา เซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีโดยเตรียมใหม่ทุกครั้งแล้วปั่นที่ 1500 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาทีเพื่อตกตะกอนคริสตัลที่ไม่ละลาย

2. Washing solution สำหรับ NR

37 % Formaldehyde 6.5 มิลลิลิตร

10% CaCl₂ 50 มิลลิลิตร

H₂O 445 มิลลิลิตร

3. Lysis solution สำหรับ NR

Garcial Acetic acid 4.75 มิลลิลิตร

95% ethanol 250 มิลลิลิตร

H₂O 245 มิลลิลิตร

9 DCFH-DA assays

1. DCFH-DA stock solution 10 มิลลิโมล

DCFH-DA dye 48.73 มิลลิกรัม ละลายใน absolute Ethanol 1 มิลลิลิตร

ก่อนใช้ เจือจางกับ PBS, pH 7.4 ในอัตราส่วน 1:100 จนได้ความเข้มข้น 100 μM เก็บที่ -20 องศาได้นาน 1 เดือน

10 RT-PCR

1. RNase Free water

เติมน้ำกลั่น 1 ลิตรใส่ขวดขนาด 1000 มิลลิลิตรแล้วเติม Diethylpyrocarbonate (DEPC) ลงไป 100 μl (0.01 %) ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงแล้ว autoclave

11 Cell Culture

1. Heat inactivation Fetal Bovine Serum

นำซีรัมแก้วใน waterbath อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที แล้วกรองผ่าน filter ขนาด 0.22 μm เก็บที่ -20 องศา เมื่อต้องการนำมาใช้ให้นำมาตั้งที่ 4 องศาเซลเซียสก่อน 1 วันเพื่อให้ซีรัมละลาย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค
ข้อมูลที่มีประโยชน์อื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

1. ค่าข้อมูล Molarity และ Specific gravity ของกรดเข้มข้นที่ใช้ในการทดลอง

Acid/base	Molecular weight	% by weight	Molarity (approx.)	Specific gravity	1 M Solution (ml/liter)
Acetic acid(glacial)	60.05	99.6	17.4	1.05	57.5
Formic acid	46.03	90	23.6	1.205	42.4
		98	25.9	1.22	38.5
Hydrochloric acid	36.46	36	11.6	1.18	85.9
Sulfuric acid	98.07	98	18.3	1.835	54.5

2. ความหนาแน่นของ apolipoprotein แต่ละชนิด

	Chylomicrons	VLDL	LDL	HDL
Density / g cm ⁻³	0.93	<1.006	1.019-1.063	1.063-1.21
Protein / %	2	9	20	45
Phospholipid / %	8	20	20	25
Free cholesterol / %	1	7	10	5
Triacylglycerols / %	85	55	10	8
Cholesterol esters / %	2	10	35	15
Apolipoproteins	B-48, C, E	A, B-100, C, E	B-100	A, C, D, E

3. ค่าไขมันในกระแสเลือดปกติ

Lipid component	Concentration
Total cholesterol / mmol dm ⁻³	<5.2
LDL cholesterol / mmol dm ⁻³	<3.6
HDL cholesterol / mmol dm ⁻³	Female
	Male
Triacylglycerols / mmol dm ⁻³	>1.2 >0.9 0.4-1.8

4. ข้อมูลของ apoprotein หลักที่พบได้ในพลาสมาชนิดต่างๆ

Designation	No. residues	Mass (kDa)	Source	Functions
A-I	243	29		Major HDL protein
A-II	-	17.4	Liver & intestine	
A-IV	376	44.5		
B-100	4536	513	Liver	VLDL formation; ligand for LDL receptor
B-48	2152	241	Intestine	Chylomicron formation ligand for liver chylomicron receptor
C-I	57	6.6		
C-II	79	8.9	Liver	Cofactor for lipoprotein lipase
C-III	79	8.8		
D	-	31	Many tissues	A lipocalin
E	299	34	Liver, VLDL	Ligand for LDL receptor
(a)	Variable			Ligand for liver chylomicron receptor

5. ค่าแอนโทไซยานินส์ทั้งหมดที่ได้ทำการตรวจวัดจากข้าวเมล็ดสีพันธุ์ต่างๆ ในต่างประเทศ ค่าแสดงเป็น มิลลิกรัมของแอนโทไซยานินส์ต่อข้าว 100 กรัม

Varieties	Cyanidin-3-Glucoside	Peonidin-3-glucoside	Total	Cyanidin-3-glucoside (%)
Sawon #415	470	23	493	95
Kilimheugmi	240	26	266	90
Sawon #425	206	40	246	Varieties
Heugjinmi	200	32	232	86
Sanghaehyeolla	50	5	55	91
Hongmi	30	6	36	83
Sawon #405	16	4	20	80
Sawon #420	10	Not detected	10	100
Jawangdo	10	Trace	10	100

ภาคผนวก ง
ใบยินยอมบริจาคน้ำลายเพื่อวิจัย

ข้าพเจ้ายินดีให้เลือดเพื่อการวิจัยในโครงการ 1. สารต้านอนุมูลอิสระในข้าวดำ ข้าวเหนียวดำ และข้าวแดง: การป้องกันการทำลายเซลล์และสารพันธุกรรมจากอนุมูลอิสระ (Antioxidants in Black Rice, Black Sticky Rice and Red Rice: Protective Effect on Cytotoxicity and DNA Damage by Free Radicals) หรือ 2. สีจากเม็ดสีข้าวควบคุมความเครียดจากภาวะออกซิเดทีฟและการถอดรหัสทางพันธุกรรมใน HepG2 เซลล์ (Rice Pigments Control Oxidative Stress and Gene Expression in HepG2 Cells) โดยมีหัวหน้าโครงการวิจัยคือ รศ.ดร. วาริน แสงกิติโกมล ผู้ร่วมวิจัย ผศ.ดร. เทวิน เทนคำเนาว์ และนางสาวอชิตยา โจรจนสโรช นิสิตปริญญาโท สาขาเวชศาสตร์คลินิกและอณูพันธุศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยจะใช้เลือดของผู้บริจาคเพื่อเป็นตัวแทนของกลุ่มคนไทยที่มีสุขภาพดี โดยจะบริจาคน้ำลายประมาณ 3 มิลลิลิตร เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการค้นคว้าวิจัยต่อไป

ชื่อ.....ผู้บริจาค

(.....)

วันที่.....

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว อชิตยา โรจนสโรช สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับ 2 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี 2548 และได้เข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย