



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

ANTI-INFLAMMATION OF THAI BLACK STICKY RICE AND SANGYOD STICKY
RICE EXTRACTS TO KIDNEY STONE FORMATION

การลดการอักเสบของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยด ต่อการเกิดโรคนิ่วในไต

คณะผู้วิจัย

นางสาวทิษฎฐยา	เสมาเงิน	หัวหน้าโครงการ
นายวิฑูร	ชาวสุข	ผู้ร่วมโครงการ
นางสาวปริญญาพร	หนูอุไร	ผู้ร่วมโครงการ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ1654.....

สัญญาเลขที่ 207/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

ANTI-INFLAMMATION OF THAI BLACK STICKY RICE AND SANGYOD STICKY RICE EXTRACTS TO KIDNEY STONE FORMATION

การลดการอักเสบของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยด ต่อการเกิดโรคนิ่วในไต

คณะผู้วิจัย

นางสาวทิษฏญา	เสมาเงิน	หัวหน้าโครงการ	คณะสหเวชศาสตร์
นายวิฑูร	ชาวสุข	ผู้ร่วมโครงการ	คณะสหเวชศาสตร์
นางสาวปริญญาพร	หนูอุไร	ผู้ร่วมโครงการ	คณะสหเวชศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สัญญาเลขที่ 207/2561

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยบูรพาและสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติเป็นอย่างสูง ที่ให้โอกาสและสนับสนุนทุนวิจัยเรื่อง “ผลของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำต่อการเกิดนิ่วในไตในหนูขาว” เป็นระยะเวลาหนึ่งปีงบประมาณ ขอขอบพระคุณในความอนุเคราะห์ของ คณะสหเวชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้การสนับสนุนการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ทำให้การดำเนินการวิจัยบรรลุวัตถุประสงค์และสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ดร. ทิษฐา เสมาเงิน

หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

โรคผิวหนังไต้เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญในหลายประเทศทั่วโลก เป็นซ้ำได้ เกิดจากการตกผลึกของแคลเซียมกับออกซาเลตไอออนบริเวณท่อไตส่วนปลาย เกิดเป็นผลึกแคลเซียมออกซาเลต (CaOx) ผลึกยึดจับกับเซลล์เยื่อบุท่อไตจนมีขนาดใหญ่กั้นทางเดินปัสสาวะทำให้ผู้ป่วยปัสสาวะติดขัดและแสดงอาการ การยึดจับของผลึกกับเซลล์เยื่อบุท่อไตเป็นขั้นตอนวิกฤต ผลึกถูกนำเข้าสู่เซลล์มีการสร้างอนุมูลอิสระจำนวนมาก เซลล์เยื่อบุท่อไตเปลี่ยนแปลง เสียหาย ตาย และเหนียวนำเม็ดเลือดขาวมาช่วยกำจัดทำลาย ทำให้พยาธิสภาพรุนแรงเกิดการอักเสบขึ้น

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญมีหลายชนิดโดยเมล็ดข้าวที่มีสี เช่น ข้าวเหนียวดำ ข้าวเหนียวสังข์หยด มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวขาว ได้แก่ แอนโทไซยานิน สารประกอบฟีนอล เป็นต้น จึงน่าสนใจว่าสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยดอาจจะสามารถยับยั้งการเกิดโรคไตและลดการอักเสบได้ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษามาก่อน การศึกษาในครั้งนี้นำข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยดสกัดด้วยเอทานอล นำไปทดสอบการยับยั้งการยึดจับระหว่างผลึกกับเซลล์ท่อไต การกำจัด Hydrogen peroxide และปริมาณเซลล์ตาย ศึกษาการยับยั้งการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจในการสร้าง TNF- α , TNFR1 และการสร้าง pro-inflammatory cytokine MCP-1 ของเซลล์ไตด้วยวิธี Western blotting

ผลการศึกษาพบว่าได้สารสกัดข้าวเหนียวดำร้อยละ 0.379 สารสกัดข้าวเหนียวสังข์หยดร้อยละ 0.589 โดยสารสกัดจากข้าวเหนียวดำมีปริมาณแอนโทไซยานินและสารประกอบฟีนอลรวมสูงกว่าสารสกัดข้าวเหนียวสังข์หยด ความสามารถในการยับยั้งการเกาะจับของผลึก CaOx กับเซลล์ท่อไตของข้าวทั้งสองชนิดเป็นแบบ dose - dependent manner ความสามารถในการกำจัด hydrogen peroxide ที่เซลล์ผลิตออกมาพบว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำสามารถกำจัดได้ดีกว่าสารสกัดข้าวเหนียวสังข์หยด ประมาณ 20 เท่า โดยสารสกัดข้าวเหนียวดำมีค่า IC₅₀ 0.106 mg/mL ในขณะที่ข้าวเหนียวสังข์หยดมีค่า IC₅₀ 20.661 mg/mL ไม่พบการแสดงออกของ TNF- α ในขณะที่พบการแสดงออกของ TNFR1 ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม ผลการแสดงออกของ MCP-1 ในเซลล์ไตลดลงอย่างชัดเจน ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยด

การศึกษานี้จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากข้าวเหนียวดำมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวเหนียวสังข์หยดและมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระสูงกว่า อย่างไรก็ตามสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยดสามารถลดการเกาะจับของผลึก และลดการอักเสบได้ไม่แตกต่างกัน การศึกษานี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อศึกษาเพิ่มเติมและอาจนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพทางการแพทย์เพื่อเป็นทางเลือกในการนำไปใช้ในการป้องกันการเกิดโรคไตต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ : ข้าวเหนียวดำ, ข้าวเหนียวสังข์หยด, สารต้านอนุมูลอิสระ, แคลเซียมออกซาเลต, ไต้

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารประกอบการศึกษา	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	31
บทที่ 4 ผลการทดลอง	39
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	54
บรรณานุกรม	58
ภาคผนวก	68
ประวัตินักวิจัยและผู้ร่วมวิจัย	73

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสดงรูปร่างผลึกแคลเซียมออกซาลेट	5
2.2 ภาพแสดงการยึดจับของผลึก CaOx กับโมเลกุลบนผิวเซลล์ distal collecting duct	6
2.3 แสดง proposed model การตอบสนองของเซลล์เยื่อบุท่อไตต่อการเกิด oxidative stresses	8
2.4 ลักษณะและองค์ประกอบของเมล็ดข้าว	12
2.5 แสดงโครงสร้างทางเคมีของแอลฟาแคโรทีน และเบต้าแคโรทีน	27
2.6 แสดงโครงสร้างของแอนโทไซยานินที่ pH ต่างๆ	28
2.7 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Gallic acid	29
4.1 แสดงรูปร่างพื้นฐานของผลึก COM แบบหกเหลี่ยม	40
4.2 ภาพจากกล้อง phase contrast microscope แสดงการเกาะจับของผลึก COM กับ MDCK สภาวะที่มีสารสกัดข้าวเหนียวดำ	41
4.3 ภาพจากกล้อง phase contrast microscope แสดงการเกาะจับของผลึก COM กับ MDCK สภาวะที่มีสารสกัดข้าวเหนียวสังข์หยด	42
4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ ascorbic acid และค่าเฉลี่ยร้อยละความสามารถในการกำจัด ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	43
4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของข้าวเหนียวดำและค่าเฉลี่ยร้อยละความสามารถในการกำจัด ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	44
4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของข้าวเหนียวสังข์หยดและค่าเฉลี่ยร้อยละความสามารถในการกำจัด ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	45
4.7 แสดงค่า % relative ratio ของเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีสารสกัดจากข้าวเหนียวดำ	46
4.8 แสดงค่า % relative ratio ของเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีสารสกัดจากข้าวเหนียวสังข์หยด	47
4.9 แสดงค่า % relative ratio ของเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและผลึก	48
4.10 แสดงค่า % relative ratio ของเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีสารสกัดจากข้าวเหนียวสังข์หยดและผลึก	48
4.11 ลักษณะของเซลล์ macrophage cell line Raw264.7 ในสภาวะต่างๆ	50
4.12 แสดงความเข้มข้นของแถบโปรตีนที่เหมาะสมในการทำ western blotting	49
4.13 ผลการแสดงผลของโปรตีน TNF receptor I ด้วยวิธี western blotting	51

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.14 ผลการแสดงผลของโปรตีน TNF- α	52
4.15 ผลการแสดงผลของโปรตีน MCP-1	53

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงปริมาณสารอาหารในข้าวชนิดต่างๆ 100 กรัมข้าวสาร	15
4.1 แสดงปริมาณสารสกัดหยาบจากเมล็ดข้าวเหนียวดำ และแกลบข้าวเหนียวดำ	39

สารบัญย่อ

CaOx	Calcium Oxalate
COM	Calcium Oxalate Monohydrate
COD	Calcium Oxalate Dihydrate
ESRD	End stage renal disease
HDN	Hydronephrosis
HDL	High density lipoprotein
IL	Interleukin
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
mRNA	Messenger ribonucleic acid
mTNF- α	Membrane tethered form TNF- α
ROS	Reactive oxygen species
sTNF- α	Secretory form TNF- α
TNF	Tumor necrosis factor
UTI	Urinary tract infection

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำงานวิจัย

โรคนิ่วในไต (Kidney stone) เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญในหลายประเทศทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย สาเหตุของโรคเกิดจากหลายปัจจัย ได้แก่ ความผิดปกติของไต พันธุกรรม สภาพภูมิอากาศ โภชนาการ และพฤติกรรม เป็นต้น พบว่าเพศชายเป็นโรคมมากกว่าเพศหญิง ผู้ป่วยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปัสสาวะติดขัด ปวดบริเวณเอว ปัสสาวะขุ่นมีเลือดปน อาจเกิดการติดเชื้อ ทำให้ไตวายได้ ผู้ที่เคยเป็นนิ่วในไตแล้วมักจะเกิดเป็นซ้ำอีกในเจ็ดถึงสิบปี สำหรับก้อนนิ่วที่พบมากที่สุดของผู้ป่วยประมาณร้อยละ 80 คือ นิ่วแคลเซียมออกซาลेट (Calcium oxalate, CaOx) ชนิดโมโนไฮเดรต (Calcium oxalate monohydrate, COM) กลไกการเกิดโรคนิ่วในไตอธิบายโดย Free particle model ใ้ว่าก้อนนิ่วเริ่มเกิดจากการตกผลึกของแคลเซียมไอออนกับออกซาลेटไอออนซึ่งมีความเข้มข้นสูงแบบยิ่งยวด (Supersaturation) บริเวณท่อไตส่วนปลาย (Distal collecting duct) โดยผลึกที่เกิดขึ้นในครั้งแรกจะทำหน้าที่เป็นแกน (Nucleation) เมื่อเกิดการตกผลึกซ้ำๆ ทำให้ก้อนผลึกมีขนาดใหญ่ขึ้น (Growth) มีการเกาะเกี่ยวกัน (Aggregation) และไปเกาะจับ (Adhesion) กับเซลล์เยื่อบุท่อไต จนมีขนาดใหญ่ขวางกั้นทางเดินปัสสาวะทำให้ผู้ป่วยปัสสาวะติดขัดและแสดงอาการ มีการศึกษาพบว่า การเกาะจับของผลึก COM กับเซลล์เยื่อบุท่อไตส่วนปลายนั้นเป็นขั้นตอนวิกฤตสำคัญในการเกิดนิ่วในไต โดยผลึก COM จะเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้างอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species) จำนวนมาก ทำให้เซลล์เยื่อบุท่อไตเปลี่ยนแปลง เกิดภาวะเครียด (Oxidative stresses) เซลล์เกิดความเสียหายและ apoptosis ในที่สุด รวมทั้งเกิดการอักเสบซึ่งส่งเสริมการเกิดโรคนิ่วในไตให้รุนแรงขึ้นอีกด้วย การรักษาผู้ป่วยโรคนิ่วในไต ในกรณีก้อนนิ่วมีขนาดเล็กสามารถหลุดป้อนออกมาทางปัสสาวะได้เอง หากก้อนนิ่วมีขนาดใหญ่มักใช้วิธีการผ่าตัดหรือใช้เครื่องสลายนิ่ว (Extracorporeal shock wave lithotripsy/ESWL)

อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้ให้ความสนใจสารสกัดจากธรรมชาติหรือสมุนไพรเพื่อนำมาหาฤทธิ์ในการรักษาหรือป้องกันการเกิดโรค โดยเฉพาะสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Anti-oxidant) เนื่องจากอนุมูลอิสระเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดภาวะ oxidative stresses ทำให้เซลล์เสื่อมถอยและส่งเสริมการเกิดโรคหลายชนิด เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ, โรคมะเร็ง, โรคหลอดเลือดสมอง และโรคชรา เป็นต้น สมุนไพรที่มีการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดนิ่วในไต เช่น *Verbena officinalis*, *Lithospermum*

officinale, *Taraxacum officinale*, *Equisetum arvense*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Arctium lappa*, *Silene saxifraga*, *Herniaria hirsuta*, ต้นลูกใต้ใบ (*Phyllanthus niruri*), หญ้าหนวดแมว (*Orthosiphon grandiflorum*) เป็นต้น น้ำผลไม้ที่มีฤทธิ์สูง ได้แก่ น้ำมะนาว, น้ำส้ม และน้ำมะเขือเทศ เป็นต้น ยังไม่มีการศึกษาในข้าวมาก่อน ดังนั้นผู้ทำวิจัยจึงสนใจที่จะศึกษา เนื่องจากข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย มีหลายชนิด เช่น ข้าวแดง, ข้าวดำ, ข้าวม่วงและรำข้าว โดยข้าวที่มีสีมีสารต้านอนุมูลอิสระปริมาณสูงกว่า ข้าวขาว เช่น วิตามินอี, แกมมาโอไลฟิน, ฟลาโวนอยด์และแอนโทไซยานิน มีรายงานว่าสารสกัดจากข้าวเหนียวดำหรือข้าวนิลมีแอนโทไซยานินในปริมาณที่สูงกว่าข้าวแดงและข้าวดำ สามารถลดการเกิดอนุมูลอิสระและลดอัตราการตายของเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยงได้อย่างมีนัยสำคัญ

ดังนั้นจึงเป็นหลักฐานที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่า สารสกัดจากข้าวเหนียวดำอาจจะสามารถยับยั้งกลไกการเกิดเนื้องอกในไตได้ โดยเฉพาะการลดภาวะ oxidative stresses ที่เกิดขึ้นจากความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์ COM ซึ่งเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดความเสียหายและส่งเสริมการเกิดเนื้องอกให้รุนแรงขึ้น หากพบว่าสารสกัดจากข้าวเหนียวดำสามารถลดการเกิดเนื้องอกในไตของหนูทดลองได้ อาจนำไปสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันการเกิดโรคหรือใช้ในการลดการเกิดซ้ำของโรคนีื้องอกในไต ต่อไปในอนาคต อีกทั้งเป็นการส่งเสริมการพัฒนาผลิตภัณฑ์สร้างมูลค่าเพิ่มให้กับข้าวโดยการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยดในการลดการเกาะจับของผลิตภัณฑ์ COM กับเซลล์เพาะเลี้ยงท่อไตส่วนปลาย MDCK และลดการเกิด oxidative stresses
2. เพื่อศึกษาสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยดในการลดการสร้าง MCP-1 chemokine จากเซลล์ท่อไตส่วนปลาย MDCK ที่มีการเกาะจับของผลิตภัณฑ์ COM
3. เพื่อศึกษาสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยดในการลดการอักเสบ ของ human macrophage cell line U937 ที่มีการเกาะจับของผลิตภัณฑ์ COM ในการสร้าง tumor necrosis factor และ IL-1 inflammatory cytokines

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยดที่มีสารต้านอนุมูลอิสระจำนวนมากในการลดการเกาะจับของผลึก COM กับเซลล์ท่อไตส่วนปลาย MDCK ซึ่งเป็นขั้นตอนวิกฤตของการเกิดนิ่วในไต ทดสอบความสามารถในการลดจำนวนเซลล์ตายจากพิษของผลึก ด้วยวิธี MTS cell proliferation assay ทำการศึกษาความสามารถในการลดการอักเสบโดยศึกษาการแสดงออกของ MCP-1 chemokine ที่เป็นไซโตไคน์สำคัญในการเรียกเม็ดเลือดขาวมายังบริเวณที่มีการสะสมของผลึกที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพ และศึกษาความสามารถของสารสกัดในการลดการสร้างและหลั่ง inflammatory cytokines ได้แก่ Tumor necrosis factor และ IL-1 ของ human macrophage cell line U937 ที่มีการเกาะจับของผลึก COM ด้วยวิธี PCR และ ELISA

4. ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายหลักคือ มุ่งเน้นที่จะศึกษาความสามารถของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยดที่มีสารต้านอนุมูลอิสระจำนวนมากและมีความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระในการลดหรือยับยั้งกลไกการเกิดนิ่วในไต ได้แก่ ลดการจับของผลึกนิ่ว COM กับเซลล์ท่อไตส่วนปลาย ซึ่งเป็นขั้นตอนวิกฤตของการสะสมให้เกิดก้อนนิ่วขนาดใหญ่ขึ้นและก่อให้เกิดพยาธิสภาพ โดยผลึก COM จะเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการสร้างอนุมูลอิสระจำนวนมาก เซลล์ท่อไตสร้างและหลั่ง MCP-1 เพื่อเรียกเม็ดเลือดขาวมายังบริเวณที่มีการสะสมของผลึก ส่งเสริมให้เกิดพยาธิสภาพของโรคที่รุนแรง โดยเม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจเข้ามาเพื่อกำจัดและทำลายจะสร้างและหลั่งไซโตไคน์ที่ส่งเสริมการอักเสบ ได้แก่ tumor necrosis factor และ IL-1 โดยส่งเสริมให้เกิดพยาธิสภาพที่รุนแรงขึ้น

สารสกัดจากข้าวเหนียวดำพบว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ ได้แก่ วิตามินอี, แกมมาออริซานอล, ฟลาโวนอยด์และ anthocyanins เป็นต้น ซึ่งหากสารสกัดจากข้าวเหนียวดำสามารถลดการอักเสบและป้องกันการเกิดนิ่วในไตได้ อาจเป็นนิมิตหมายที่ดีในการนำสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยดไปพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้ในการรักษาหรืออาจพัฒนาเป็นอาหารเสริมบำรุงร่างกายต่อไปในอนาคต

บทที่ 2

เอกสารประกอบการทำวิจัย

กลไกการเกิดโรคนิ่วในไต

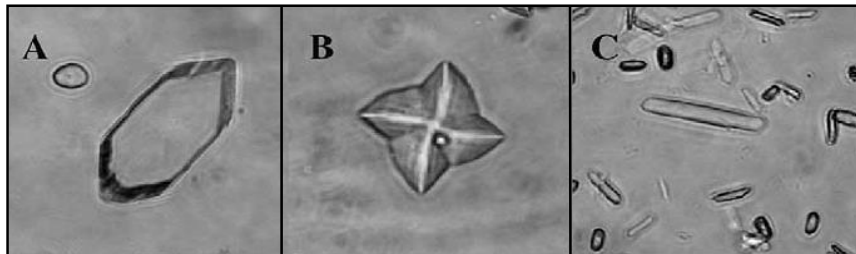
กลไกการเกิดโรคนิ่วในไตอธิบายโดย Free particle model (1) ว่าเริ่มมาจากการตกผลึกของแคลเซียมกับออกซาเลตไอออน (Nucleation) ที่มีความเข้มข้นสูงแบบยิ่งยวด (Supersaturation) บริเวณท่อไตส่วนปลาย Distal collecting duct เพราะเป็นบริเวณที่มีการดูดน้ำกลับของหน่วยไต โดย nuclei ที่เกิดขึ้นนั้นมีแนวโน้มที่จะโตขึ้น (Growth) และจับกลุ่มกัน (Aggregation) ในสภาวะ hypertonic ของ tubular fluid ซึ่งจะไปจับกับผิวเซลล์ (Adhesion) ติดอยู่ในส่วนที่แคบของท่อไตทำให้ไม่สามารถหลุดออกไปกับปัสสาวะได้ เมื่อคริสตัลจับกับผิวเซลล์แล้วยังคงโตต่อไปเรื่อยๆ จนกลายเป็นก้อนนิ่วขนาดใหญ่ อุดกั้นทางเดินปัสสาวะทำให้ผู้ป่วยปัสสาวะติดขัดหรือปัสสาวะไม่ออก (2, 3)

Schulz และคณะ อธิบายไว้ว่า โดยปกติ Tubular fluid จะใช้เวลาในการไหลผ่านหน่วยไตในเวลา 3-4 นาที ซึ่งมีโอกาสน้อยมากที่ผลึกคริสตัลจะโตพอที่จะอุดกั้นทางเดินปัสสาวะได้ ดังนั้นการคั่งของผลึกคริสตัลในระบบทางเดินปัสสาวะน่าจะเกิดจากในท่อไตมี dead zones คือบริเวณที่ทำให้การไหลของ tubular fluid ช้าลง เช่นบริเวณส่วนโค้งงอของท่อไต (4, 5) หรืออาจเกิดจากโครงสร้างของหน่วยไตบริเวณที่เป็น sharp twists คือส่วน V-turns หรือ Z-turns (6)

ลักษณะและคุณสมบัติของผลึกแคลเซียมออกซาเลต

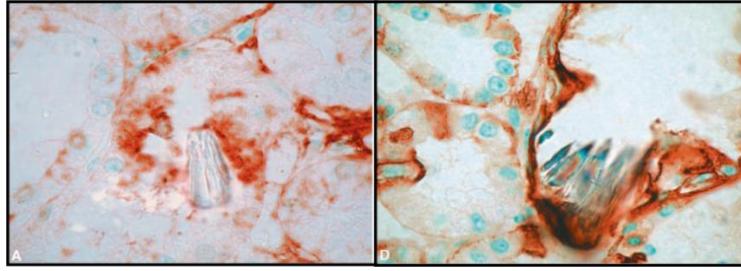
ก้อนนิ่วที่แยกได้จากผู้ป่วย ประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึกคริสตัล 80 เปอร์เซ็นต์ อีก 2-5 เปอร์เซ็นต์ เป็น Organic matrices ที่แทรกอยู่ในเนื้อผลึก ประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน ไกลโคโอะมิโนไกลแคนและแร่ธาตุ (7) ผลึกคริสตัลที่พบในก้อนนิ่วมากที่สุดคือ แคลเซียมออกซาเลต (CaOx) โดยปกติผลึก CaOx มีโครงสร้างสามแบบตามปริมาณโมเลกุลของน้ำที่มีอยู่ในโมเลกุล ได้แก่ ชนิดโมโนไฮเดรต (COM หรือ whewellite) ซึ่งมีรูปร่างหกเหลี่ยม, ชนิดไดไฮเดรต (COD หรือ weddellite) มีรูปร่างเป็นพีระมิดสองอันประกบกัน, และชนิดไตรไฮเดรต (COT or caoxite) มีรูปร่างคล้ายเข็ม (8) (ภาพที่ 2.1) COM เป็นผลึกที่พบในก้อนนิ่วมากที่สุดและพบมากในปัสสาวะของผู้ป่วย ในขณะที่ผลึก COD มักจะพบในปัสสาวะของคนปกติและแทบจะไม่พบผลึก COT ในก้อนนิ่วหรือในปัสสาวะเลย ผลึก COM นั้นมีความคงตัวมากที่สุดในสภาวะที่มี Stone inhibitors เช่นในปัสสาวะของคนปกติ ผลึก COM จะถูกเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนรูปร่างไป

เป็นผลึก COD ซึ่งมีความรุนแรงในการก่อโรคน้อยกว่า (9) ดังจะเห็นได้จากคุณสมบัติในการยึดจับของผลึกคริสตัล



ภาพที่ 2.1 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสดงรูปร่างผลึกแคลเซียมออกซาเลต A. ชนิดโมโนไฮเดรต รูปร่างหกเหลี่ยม (Hexagonal) B. ชนิดไดไฮเดรต มีรูปร่างเป็นพีระมิดสองอันประกบกัน (tetragonal bipyramidal) และ C. ชนิดไตรไฮเดรต มีรูปร่างคล้ายเข็ม (needle) (10)

จากการวัดความสามารถในการยึดจับ (Adsorptive capabilities) ของผลึกคริสตัลด้วยวิธี Atomic force microscopy พบว่าผลึก COM มีความรุนแรงในการยึดจับ (Adhesion force) สูงกว่าผลึก COD ถึง 15 เท่า (11) ทั้งนี้เนื่องมาจากการเรียงตัวของแคลเซียมและออกซาเลตไอออนบนผิวหน้าของผลึกที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นเหตุผลสำคัญสนับสนุนว่าผลึก COM นั้นมีความรุนแรงในการก่อโรคนิวไนด์ โดย COM สามารถจับกับโมเลกุลบนผิวเซลล์เยื่อหุ้มท่อไตด้วย adhesion force มากกว่า COD จากการศึกษพบว่าผลึกคริสตัลนั้นมีประจุบวกของแคลเซียมไอออนที่ผิวหน้าซึ่งสามารถ interact กับโมเลกุลในระบบทางเดินปัสสาวะที่แสดงประจุลบ (Anionic molecule) ได้แก่ โปรตีนที่มี acidic amino acids เช่น aspartic acid (Asp) และ glutamic acid (Glu) หลายโมเลกุล หรือโมเลกุลที่มีหมู่ phosphate, sulfate, sulfonate, carboxylate-enriched polysaccharides และ phospholipids (12, 13) ผลึกคริสตัลมีการจับกับโมเลกุลบนผิวเซลล์อย่างจำเพาะ ได้แก่ ไฮยาลูโรแนน, CD44, Osteopontin (OPN), Annexin II, Nucleolin-related protein, Phosphatidylserine และ Sialic acid-containing glycoprotein เป็นต้น (14-18) ดังใน **ภาพที่ 2.2** เมื่อนำชิ้นเนื้อไตของหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นนิวไนด์มาย้อมด้วยเทคนิค immunohistochemistry จะเห็นว่าที่บริเวณ distal collecting duct มีการเกาะจับของผลึก CaOx กับไฮยาลูโรแนนและ CD44 โมเลกุล



ภาพที่ 2.2 ภาพแสดงการยึดจับของผลึก CaOx กับโมเลกุลบนผิวเซลล์ distal collecting duct ของหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นนิ่วในไต A. ไฮยาโลโรแนน B. CD44 โมเลกุล (19)

Modulators ของการเกิดผลึก CaOx

การเกิดนิ่วในไตนั้นเกิดได้จากหลายปัจจัย ได้แก่ โครงสร้างของไตผิดปกติทำให้การไหลของ Tubular fluid ไม่ดี ง่ายต่อการคั่งของผลึกคริสตัล, การทานอาหารที่มีออกซาเลตไอออนสูง, อากาศร้อนทำให้ปัสสาวะมีความเข้มข้นมากส่งเสริมการตกผลึก, ความผิดปกติทางพันธุกรรม เช่น primary hyperoxaluria, primary calciuria, renal tubular acidosis เป็นต้น (20) อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาพบว่าในปัสสาวะนั้นมีโมเลกุลที่เรียกว่า Stone modulators แบ่งออกเป็น Stone promoters คือโมเลกุลที่ช่วยส่งเสริมการเกิดนิ่ว โดยส่งเสริมให้มีการตกผลึกคริสตัลหรือส่งเสริมการ growth หรือ aggregation หรือ adhesion อีกกลุ่มหนึ่งคือ Stone inhibitors คือโมเลกุลที่ช่วยยับยั้งกระบวนการเกิดนิ่ว ได้แก่ ยับยั้งการเกิดผลึกคริสตัลหรือยับยั้งการ growth หรือ aggregation หรือ adhesion รวมทั้งทำให้เกิดการ transformation ของผลึกจาก COM ไปเป็น COD ที่มีความรุนแรงน้อยกว่า มีการศึกษาพบว่าผู้ป่วยโรคนิ่วในไตนั้นมีการแสดงออกของ stone inhibitors น้อยกว่าคนปกติ ทำให้เกิดการตกผลึกจำนวนมากและพัฒนามาเป็นโรคนิ่ว โดยโมเลกุลที่จัดเป็น stone promoters สำคัญ ได้แก่ calcium และ oxalate ions ซึ่งหากมีปริมาณสูง จะทำให้โอกาสเกิดการตกผลึกสูงขึ้นไปด้วย (21, 22)

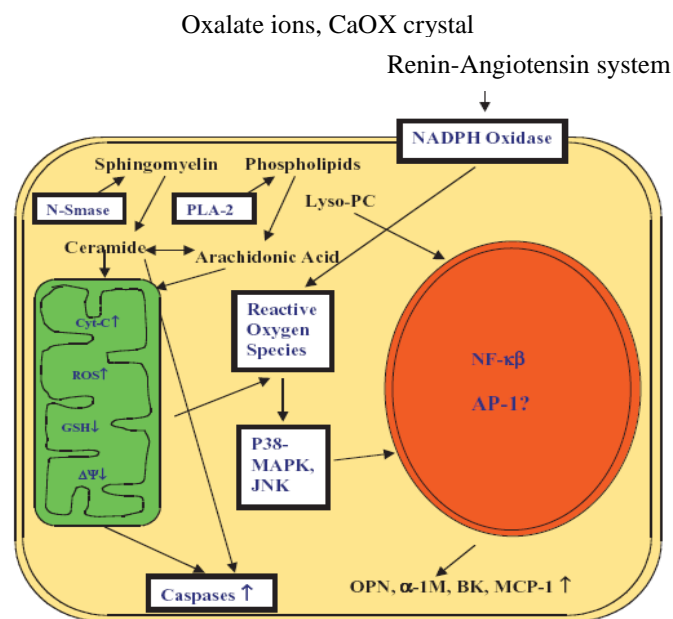
โมเลกุล Stone inhibitors นั้นมักมีประจุลบเพื่อจะ interact กับผลึกคริสตัลที่มีประจุบวกที่ผิวหน้า ตัวอย่างโมเลกุลที่พบในปัสสาวะของคนปกติคือ citrate ions, Nephrocalcin, OPN, Inter-alpha-trypsin inhibitor (ITI), Bikunin, Urinary prothrombin fragment 1 (UPTF1), Tamm-Horsfall protein (THP), Orosomuroid และ Trefoil factor 1 (TFF1) (23-30) Nephrocalcin เป็นไกลโคโปรตีน สามารถยับยั้งการเกิด nucleation, growth, aggregation และ adhesion ได้ citrate, OPN และ Bikunin จับบนผิวผลึก COM และป้องกันการ adhesion ของผลึกกับเซลล์ท่อไต (31-33) บางโมเลกุลมีบทบาทเป็นทั้ง promoter และ inhibitor ขึ้นกับระยะของการเกิดนิ่วในไต เช่น THP ยับยั้งการ aggregation แต่ส่งเสริม

การเกิด adhesion เป็นต้น (34) และมีรายงานว่า Cell membranes ของ MDCK สามารถยับยั้ง crystal growth แต่ส่งเสริม crystal aggregation (35)

การตอบสนองของเซลล์เยื่อหุ้มไตในภาวะที่มีการเกาะจับของผลึก CaOx

การจับของผลึก COM กับเซลล์เยื่อหุ้มไตนั้นเป็นขั้นตอนวิกฤตที่จะนำไปสู่การแสดงอาการของโรคนี้ไว้ในไต (36) โดยเมื่อเกิดการยึดจับของผลึก COM กับเซลล์นั้น ผลึกจะถูก internalized ผ่านกระบวนการ endocytosis และถูกย่อยด้วยเอนไซม์ภายในถุง endolysosome (37, 38) ผลึกบางส่วนสามารถผ่าน renal epithelial layer โดยกระบวนการ transcytosis หรือ exotubulosis ทำให้เกิดการค้างสะสมของผลึก ตัวผลึกมีความเป็นพิษต่อเซลล์ จากผลการศึกษาทั้ง *In vitro* และ *In vivo* พบว่าทำให้ cell damage มีการเสียสภาพของ Cell membrane (39) เกิดการรั่วไหลของ Cytosolic enzymes ออกสู่ภายนอก ได้แก่ lactate dehydrogenase (LDH), GGTP and N-acetyl-glucosaminidase (NAG) และ lysozyme เป็นต้น (40) อีกทั้งพบว่าผลึกคริสตัลนั้นเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดภาวะเครียด (oxidative stress) เนื่องจากมีการสร้างอนุมูลอิสระจำนวนมากภายในเซลล์ ได้แก่ reactive oxygen species (ROS) ได้แก่ superoxide ($O_2 \cdot^-$) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) เป็นต้น (41) โดยอนุมูลอิสระเหล่านี้จะทำให้เกิดการถูกทำลายของโมเลกุล Phospholipids ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญของ Cell membrane เรียกกระบวนการนี้ว่า Lipid peroxidation สังเกตจากปริมาณ 8-isoprostane (8-IP) ที่เพิ่มขึ้น (42, 43) และเกิดการ flip flop ของ cell membrane ทำให้เซลล์เสียหายและเกิด apoptosis นอกจากนี้พบว่าอนุมูลอิสระเป็น mediator เหนี่ยวนำหลาย Signal transduction pathway เช่น protein kinase C (PKC), c-Jun N-terminal kinase (JNK) (44), p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) (45) ส่งผลให้สรีรวิทยาของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง มีการกระตุ้น Transcription factors ได้แก่ NF- κ B และ activated protein-1 (AP-1) ทำให้มีการแสดงออกของยีนและโปรตีนบางตัวเพิ่มขึ้น เช่น Immediate early genes (เช่น c-myc และ egr-1), osteopontin, bikunin และ clusterin เป็นต้น (40) การเกาะจับของผลึกคริสตัล COM ยังเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการสร้างและหลั่ง Inflammatory mediators ได้แก่ Cytokines และ Chemokines หลายชนิด ที่สำคัญคือ monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) ทำหน้าที่เรียกเม็ดเลือดขาว Monocytes และ Macrophages จำนวนมากให้เคลื่อนที่มายังบริเวณที่มีการเกาะจับของผลึกคริสตัลทำให้บริเวณนั้นเกิดการอักเสบส่งเสริมการเกิดโรคให้รุนแรงขึ้น (46) โมเดลการตอบสนองของเซลล์เยื่อหุ้มไตต่อการเกิด oxidative stresses ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยผลึก COM อธิบายใน **ภาพที่**

นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาการตอบสนองของเซลล์เยื่อบุท่อไตที่มีการเปลี่ยนแปลงในภาวะที่มีการเกาะจับของผลึก COM ด้วยเทคนิค highthroughput คือ 2-DE analysis พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนจำนวนมากนอกเหนือจากที่ได้กล่าวมาแล้ว ซึ่งมีบทบาทการทำงานที่หลากหลาย ยกตัวอย่างเช่น โปรตีนโครงสร้างของเซลล์, เอนไซม์ในขบวนการเมตาบอลิซึม, chaperones, โปรตีนที่ควบคุม transcription และ translation, โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ signal transduction, โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างและทำลายโปรตีนภายในเซลล์ เป็นต้น ซึ่งบทบาทของโปรตีนในกลไกการเกิดโรคนี้ว่านั้นยังไม่ทราบแน่ชัด (47-49)



ภาพที่ 2.3 แสดง Proposed model การตอบสนองของเซลล์เยื่อบุท่อไตต่อการเกิด oxidative stresses ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซาลาเลตไอออนในระดับสูงหรือเหนี่ยวนำด้วยผลึก CaOx หรือจาก mechanical stress อันเกิดจากการคั่งของผลึกคริสตัล โดยไตจะมีการผลิตโมเลกุลที่ทำงานใน rennin-angiotensin system ได้แก่ angiotensinogen และ angiotensin converting enzyme (ACE) และ renin โดย renin นั้น catalyzes การผลิต angiotensin I เปลี่ยนไปเป็น angiotensin II (Ang II) โดยการทำงานของ the ACE โดย Ang II ควบคุม physiological reactions หลายอย่างภายในเซลล์ เช่นควบคุมสมดุลของน้ำและเกลือแร่, การหลั่ง aldosterone, ควบคุมความดันเลือด นอกจากนี้ Ang II ยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับภาวะ oxidative stress โดยกระตุ้น membrane-bound NADH/NADPH oxidase ซึ่งทำให้เกิดการเพิ่มของ superoxide โดย ROS จะถูกผลิตจากการกระตุ้นของ phospholipase A2 (PLA-2) และ neutral sphingomyelinase (N-Smase) มีผลต่อ mitochondria ทำให้มีการสร้าง ROS และ cytochrome-C (Cyt-C) เพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้ membrane potential ของไมโทคอนเดรียเสียไปและลดการสร้างกลูตาไธโอน GSH ซึ่งจะไปกระตุ้นกระบวนการของเอนไซม์ caspases ทำให้เซลล์เกิด apoptosis

นอกจากนี้ ROS จะกระตุ้น p38MAPK signal transduction pathways ซึ่งกระตุ้น transcription factors NF- κ B และ AP-1 ทำให้มีการแสดงออกของ immediate early genes และมีการผลิต modulators เช่น OPN, bikunin, α -1-microglobulin and MCP-1 เพิ่มขึ้น (40, 50)

การศึกษาสมุนไพรที่ยับยั้งการเกิดโรคนิ่วในไต

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้ให้ความสนใจสารสกัดจากธรรมชาติที่มีประวัติการใช้ในการรักษาโรคนิ่วในไต เพื่อนำมาทดลองหาฤทธิ์ในการรักษาหรือยับยั้งการเกิดโรคนิ่วในไต (51) Grases และคณะทำการศึกษาศัตรูพืชชนิดของยุโรป คือ นางตั้งล่าง (*Verbena officinalis*), *Lithospermum officinale*, แตนดิไลออน (*Taraxacum officinale*), หญ้าถอดปล้อง (*Equisetum arvense*), *Arctostaphylos uva-ursi*, โกโบ (*Arctium lappa*) และ *Silene saxifraga* พบว่าสมุนไพรเหล่านี้ สามารถลดภาวะความเสี่ยงที่ส่งเสริมการเกิดนิ่วได้ เช่น citraturia, calciuria, phosphaturia และ diuresis (51) และพบว่าสามารถป้องกันการเกาะจับของผลึกที่บริเวณท่อไตได้ ในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นนิ่ว (52) Atmani และ Khan ศึกษาสารสกัดจากต้น *Herniaria hirsute* พบว่าสารสกัดส่งเสริมการตกผลึกของคริสตัล แต่ผลึกที่เกิดขึ้นนั้นมีขนาดเล็กและเป็นชนิด COD ซึ่งไม่มีความรุนแรงในการก่อโรค และพบว่าในสารสกัดนั้นมีสารที่สามารถยับยั้งการ aggregation ของผลึกคริสตัลได้ (53, 54) Barros และคณะทำการศึกษาศัตรูพืชจากต้นลูกใต้ใบ (*Phyllanthus niruri*) พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้ง crystal growth และ aggregation และยับยั้ง endocytosis ของผลึกคริสตัลเข้าสู่เซลล์ (55) Al-Ghamdi และคณะทำการศึกษาศัตรูพืชจากตะไคร้ โดยให้หนูทดลองที่เกิด oxalate nephrotoxicity ดื่มสารสกัดพบว่าอาการดีขึ้นในขณะที่หนูที่ไม่ได้ดื่มสารสกัดนั้นตาย โดยสารสกัดจากตะไคร้ (*Cymbopogon schoenanthus*) นั้นมีฤทธิ์ในการขับปัสสาวะ (56) Woottisin และคณะ ศึกษาพบว่าสารสกัดกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa*) ช่วยลดปริมาณของ oxalate ในซีรัมของหนูทดลองที่มีภาวะ hyperoxaluria ได้ และพบว่าสารสกัดลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*) ช่วยเพิ่มปริมาณของ citrate ที่ทำหน้าที่ stone inhibitor ในปัสสาวะของหนูทดลองได้ และเมื่อทำการตัดชิ้นเนื้อบริเวณท่อไตของหนูทดลองมาตรวจดูการเกิดนิ่วพบว่าสารสกัดกระเจี๊ยบแดงและลูกใต้ใบนั้นสามารถลดการเกาะจับของผลึกคริสตัลที่เกิดขึ้นกับเซลล์ท่อไตได้เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (57) Akanai และคณะศึกษาสารสกัดจากหญ้าหนวดแมว (*Orthosiphon grandiflorum*) พบว่าสามารถลดการบาดเจ็บของเซลล์จากความเป็นพิษของ oxalate และยับยั้งการคั่งของผลึกที่ท่อไตของหนูทดลองได้ (58) การเกิดนิ่วในไตนั้นสามารถป้องกันได้เช่นกัน หากเพิ่มปริมาณ Stone inhibitors ในปัสสาวะได้

ตัวอย่างเช่น การเพิ่มปริมาณ Citrate excretion โดยให้ผู้ป่วยดื่มน้ำผลไม้ที่มี citrus เช่น น้ำมะนาว น้ำส้ม, น้ำมะเขือเทศสด (59, 60)

สำหรับการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากข้าวตอกกลไกในการก่อโรคหัวใจในไตนั้นมึ้น้อยมาก อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าส่วนของรำข้าว (Rice bran) ซึ่งมีคุณค่าทางอาหารสูงและมีสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ เช่น วิตามินบี วิตามินอี, Tocopherol, Tocotrienol และ Gamma-oryzanol สามารถป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง, hyperlipidemia, fatty liver, ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง (hypercalciuria), โรคหัวใจในไต และโรคหัวใจได้ (61) โดยพบว่ารำข้าวสามารถลดการเกิดนิ่วแคลเซียมออกซาเลตซ้ำในผู้ป่วยที่มีภาวะ hypercalciuria และลด calcium excretion ในปัสสาวะได้ (62, 63) สำหรับข้าวเหนียวดำนั้นมีสีม่วงแดงของ Anthocyanin pigments เป็นเอกลักษณ์ มีสารอาหารและมีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือมี Anthocyanin สูงกว่าข้าวดำและข้าวแดง (64) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง ลดระดับไขมันในเลือด และ hypoglycemic effects (65-72)

อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงความสามารถของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำในการลดหรือยับยั้งกลไกการเกิดโรคหัวใจในไตมาก่อน การศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นครั้งแรก โดยศึกษาความสามารถในการยับยั้ง การเติบโต การเกาะกลุ่ม และการยึดจับของผลิตภัณฑ์ต่อไตส่วนปลาย MDCK และความสามารถในการป้องกันการเกิดนิ่วในไตของหนูทดลองที่ถูกเหนียวนำไปเป็นโรคหัวใจในไตอีกด้วย

ข้าวและพันธุ์ข้าว

ข้าวเป็นอาหารหลักของประชากรไทย สามารถปลูกขึ้นได้ง่ายมีความทนทานต่อทุกสภาพภูมิประเทศจากการศึกษาของนักโบราณคดีพบว่า ประเทศจีน คือ แหล่งกำเนิดของการปลูกข้าว เพราะได้พบร่องรอยของข้าวป่าที่มีอายุถึง 16,000 ปี และข้าวที่ปลูกอายุกว่า 9,000 ปี สายพันธุ์ของพืชตระกูลข้าวที่มีอยู่บนโลกนี้มีมากถึง 120,000 สายพันธุ์ แต่พันธุ์ที่รู้จักและนำมาปลูกสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดคือ *Oryza Savita* ที่นิยมเพาะปลูกในทวีปเอเชีย และ *Oryza glaberrina* ที่นิยมเพาะปลูก ในทวีปแอฟริกา แต่ข้าวที่ปลูกและซื้อขายกันในตลาดโลกเกือบทั้งหมดจะเป็นข้าวจากทวีปเอเชีย แบ่งเป็น 3 กลุ่มตามลักษณะและพื้นที่ปลูกได้ดังนี้

1. ข้าวอินดิกา (Indica) หรือข้าวเจ้า

เป็นข้าวที่มีลักษณะเมล็ดเรียวยาวรี ลำต้นสูง ค้นพบครั้งแรกในประเทศอินเดีย เป็นข้าวที่นิยมเพาะปลูกในทวีปเอเชียเขตร้อน ตั้งแต่ จีน เวียดนาม ฟิลิปปินส์ ไทย อินโดนีเซีย ไปจนถึงอินเดียและศรีลังกา ต่อมาแพร่ขยายเพาะปลูกในทวีปอเมริกา ในเมืองไทยนิยมเพาะปลูกข้าวอินดิกันบริเวณที่ราบลุ่มตอนใต้ของแม่น้ำเจ้าพระยา ซึ่งคนไทยสมัยนั้นเรียกข้าวอินดิกันที่มาจากต่างประเทศว่า "ข้าวของเจ้า" แล้วเรียกกันสั้นลงเหลือเพียง "ข้าวเจ้า" มาถึงทุกวันนี้

2. ข้าวจาปอนิกา (Japonica)

ข้าวเหนียวเมล็ดป้อม กลมรี มีแหล่งกำเนิดจากทางภาคเหนือ แล้วผ่านมาจากลุ่มแม่น้ำโขง ในสมัยก่อนพุทธศตวรรษที่ 20 หลังจากนั้นลดจำนวนลงไปแพร่หลาย ในเขตอบอุ่นที่ญี่ปุ่น เกาหลี รัสเซีย ยุโรป และอเมริกา

3. ข้าวจาวานิกา (Javanica)

ข้าวลักษณะเมล็ดป้อมใหญ่สันนิษฐานว่า เป็นข้าวพันธุ์ผสม ระหว่าง ข้าวอินดิกันและจาปอนิกา นิยมเพาะปลูกใน อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน หมู่เกาะริวกิว และญี่ปุ่น แต่ไม่ค่อยได้รับความนิยมนัก เพราะให้ผลผลิตต่ำ ประเทศต่างๆในโลกต่างก็มีการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวใหม่ เพิ่มพื้นที่การเพาะปลูกข้าว และวิธีการปลูกข้าวให้ได้ปริมาณผลผลิตเพิ่มขึ้นในขณะที่ตำนานเกี่ยวกับข้าวของแต่ละชาติต่างก็มีประวัติศาสตร์อันยาวนาน

การจำแนกอนุกรมวิธานของข้าว (Taxonomic classification)

Class : Angiospermae

Subclass : Monocotyledoneae

Order : Graminales

Family : Gramineae

Sub-family : Pooideae

Tribe : Oryzeae

Genus : Oryza

species : sativa

Scientific name : Oryza sativa L.

Common name : Rice

คุณลักษณะของข้าว

ข้าวจัดเป็นพืชล้มลุกตระกูลหญ้า สกุล *Oryza* สามารถเจริญเติบโตได้ในพื้นที่ที่มีระดับน้ำสูงกว่า 4 เมตร หรือไม่ต้องมีน้ำขัง ข้าวที่ปลูกในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นชนิด *Oryza sativa* ชนิดย่อย indica เมล็ดข้าวประกอบด้วย (ภาพที่ 2.4)

1. เปลือกหุ้มเมล็ดหรือแกลบ (Husk) คือ เปลือกส่วนภายนอกสุดที่ห่อหุ้มเมล็ดข้าว ประกอบด้วย โปรตีน ไขมัน เส้นใย คาร์โบไฮเดรต เถ้า สารซิลิกา แคลเซียม ฟอสฟอรัส ลิกลินิน เซลลูโลส เพนโตแซน เฮมิเซลลูโลส และอื่นๆ

2. เมล็ดข้าว ประกอบด้วย จมูกข้าว (Embryo หรือ Germ) รำข้าว และเมล็ดข้าวสาร (Endosperm) เมื่อนำข้าวกล้องมาขัดเอาผิวออกจะได้รำหยาบและจมูกข้าว (5-8%), รำละเอียดและจมูกข้าว (2-3%) และเมล็ดข้าวสาร (60-73%)



ภาพที่ 2.4 ลักษณะและองค์ประกอบของเมล็ดข้าว

ส่วนประกอบของเมล็ดข้าว

1. คาร์โบไฮเดรตหรือแป้งข้าว (Starch) ข้าวจะมีแป้งอยู่ 90% ของน้ำหนักแห้ง อยู่ชั้นในสุดของเมล็ด แป้งในเมล็ดข้าวมี 2 ชนิด คือ

- อะไมโลส (amylose) เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของกลูโคสจำนวนมากเป็นสายยาวด้วยพันธะ α -1,4- glycosidic bond โดยพบว่าในข้าวเหนียวจะมีอะไมโลสอยู่ประมาณ 0-2% ที่เหลือเป็นอะไมโลเพคติน ส่วนข้าวเจ้านั้นจะมีอะไมโลสมากกว่าประมาณ 7-33% ของน้ำหนักข้าวสาร

- อะไมโลเพคติน (amylopectin) เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของ
กลูโคสเป็นสายยาวด้วยพันธะ α -1,4- glycosidic bond และมีการแตกกิ่งสาขาด้วยพันธะ α -1,6-
glycosidic bond

2. โปรตีน เมล็ดข้าวมีส่วนประกอบของโปรตีนอยู่ประมาณ 9.5% เป็นอันดับสองรองจากแป้ง
ปริมาณโปรตีนที่พบในเมล็ดข้าวมีความแปรปรวนขึ้นอยู่กับสถานที่ปลูก และสภาพแวดล้อม โปรตีนในเมล็ด
ข้าวสามารถแบ่งเป็น 4 ชนิดตามคุณสมบัติในการละลายได้แก่

- อัลบูมิน (Albumin) มีคุณสมบัติละลายได้ในน้ำ (Water soluble protein)
- โกลบูลิน (Globulin) มีคุณสมบัติละลายได้ในน้ำเกลือ (Salt soluble protein)
- โปรลามิน (Prolamin) มีคุณสมบัติละลายได้ในแอลกอฮอล์ (Alcohol soluble protein)
- กลูเทลิน (Glutelin) มีคุณสมบัติละลายได้ในกรดหรือด่าง

3. ไขมัน ไขมันที่อยู่ในเมล็ดข้าวมักจะอยู่ในสภาพเป็นหยดไขมันเล็ก ๆ ขนาดเล็กกว่า 1.5 ไมครอน
อยู่บริเวณเยื่อหุ้มผิวเมล็ด (รำหยาบและรำละเอียด) และจมูกข้าว เมล็ดข้าวมีไขมัน 1.6–2.8 % ไขมันที่ได้
จากข้าวเป็นไขมันชนิดที่มีคุณภาพดี มีกรดไขมันอิ่มตัว 18% กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว
(Monounsaturated Fatty Acid: MUFA) 45% กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated Fatty Acid:
PUFA) 37% น้ำมันรำข้าวเหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการลดคอเลสเตอรอลที่ไม่ดี (LDL-C) เพราะมีปริมาณกรด
ไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Linoleic acid, Oleic acid และ Palmitic acid) มีสาร γ -oryzanol ช่วยในการควบคุม
ระดับคอเลสเตอรอลในเส้นเลือด

4. สารต้านอนุมูลอิสระสำคัญที่อยู่ในเมล็ดข้าว ได้แก่ γ -oryzanol โทโคฟีรอล (Tocopherol) โทโค
ไตรอีนอล (Tocotrienol) และ anthocyanin

จากการวิจัยเปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการของข้าว พบว่า ข้าวเหนียวดำมีปริมาณโปรตีนสูง
ที่สุด และมีปริมาณไขมันต่ำที่สุด ข้าวเจ้าสังข์หยดพัทลุงมีปริมาณสังกะสีสูงที่สุด และให้พลังงานต่ำที่สุด
(ผาณิต รุจิรพิสิฐ และคณะ, 2555)

ชนิดของข้าว

ข้าวสามารถแบ่งตามองค์ประกอบทางเคมีในเมล็ดข้าวสารได้ 2 ชนิด (ธัญพืช, 2543) คือ

1. **ข้าวเจ้า** ประกอบด้วยแป้งประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแป้งมีองค์ประกอบสองส่วนคือ amylose
เป็นโพลิเมอร์ของ D-glucose ที่ต่อกันเป็น linear chain และ amylopectin เป็นโพลิเมอร์ของ D-glucose ที่

ต่อกันเป็น branch chain โดยในข้าวเจ้าจะมี amylose ประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ และ amylopectin ประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์

2. **ข้าวเหนียว** ประกอบด้วย amylopectin สูงประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ และมี amylose น้อยมาก ซึ่งข้าวเหนียวมีอยู่ด้วยกันหลายสายพันธุ์ แต่ที่คนส่วนใหญ่รู้จักและนิยมบริโภคมีอยู่สองสี คือ ข้าวเหนียวที่มีสีขาว และข้าวเหนียวดำ ประโยชน์ของข้าวเหนียวนอกจากจะมีประโยชน์ทางด้านอาหารแล้ว ยังมีประโยชน์ต่อร่างกายด้วย เช่น บำรุงร่างกาย ช่วยขับลมในร่างกาย สร้างสารอาหาร เสริมสมรรถภาพ กระเพาะอาหาร และบำรุงผิวพรรณ (คุณค่าของข้าวเหนียว, 2554)

การศึกษางานวิจัยเกี่ยวกับข้าว

ข้าวที่มีสารอาหารอยู่ครบถ้วน (ตารางที่ 2.1) ต้องเป็นข้าวกล้องที่มีจมูกข้าวและรำข้าวติดอยู่รอบเมล็ดในปริมาณที่มาก มีรายงานการวิจัยฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของข้าวขาว ข้าวกล้อง และข้าวกล้องงอกในหนูที่ถูกเหนียวนำไปเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 พบว่าข้าวกล้องและข้าวกล้องงอกสามารถปรับระดับของภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ภาวะ serum creatinine และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าในข้าวขาว (Imam et al., 2012) จากการศึกษาของไมตรี สุทธิจิตต์ และคณะ (คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา, 2555) ได้ทำการศึกษาผลิตภัณฑ์ข้าวกล้องสูตรอารีชนิดผง ซึ่งประกอบด้วย ข้าวกล้อง ข้าวกล้องเหนียว และข้าวมันปู อย่างละ 16.67% และข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี ลูกเดือย ลูกบัว และข้าวโอ๊ต อย่างละ 8.34% โดยให้ผู้ป่วยเบาหวานทานโดยการชง 4 ช้อนโต๊ะ ต่อน้ำร้อนประมาณ 250 ซีซี ต่อการบริโภค 1 ครั้ง ทานก่อนอาหาร 3 มื้อ ทุกวัน รวมระยะเวลา 2 เดือน พบว่าข้าวกล้องอารี ช่วยให้ผู้ป่วยเบาหวานสามารถควบคุมน้ำตาลได้ 55.6% ควบคุมระดับ cholesterol ได้ 94.4% ควบคุมระดับ triglyceride ได้ 77.8% ควบคุมระดับของตัวส่งไขมันชนิด LDL-cholesterol ได้ 44.4% และควบคุมระดับของตัวส่งไขมันชนิด HDL-cholesterol ได้ 66.7% นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตและสุขภาพที่ดีขึ้น นอกจากนี้ข้าวกล้องยังมีสรรพคุณในการเสริมสร้างพลังงาน ต้านอนุมูลอิสระจึงทำให้ระบบการเผาผลาญทำงานเป็นปกติ ช่วยลดน้ำหนัก ลดความเสี่ยงต่อการเป็นเบาหวานชนิดที่ 2 ต้านมะเร็ง ลดความเสี่ยงต่อการเป็นนิ่วในถุงน้ำดี และโรคหอบหืด

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบว่าเมล็ดข้าวมีปริมาณสารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง ซึ่งปริมาณความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอล แอลฟา-ไรโอซานอล โทโคฟีรอล นั้นจะพบในปริมาณมากบริเวณส่วนชั้นนอกของเมล็ดข้าว คือ รำข้าว และแกลบ ซึ่งมี

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าในส่วนของแป้ง ในเมล็ดสีของข้าวยังเป็นแหล่งสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ แอนโทไซยานิน แสดงให้เห็นว่าข้าวที่มีสีที่มีสารแอนโทไซยานิน จะมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าข้าวที่ไม่มีสี ซึ่งจากการศึกษาแอลฟา-ไลโปซานอลจากรำข้าว พบว่าสามารถจำกัดอนุมูลอิสระ ปกป้องโปรตีนจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน และ lipid peroxidation ในเซลล์ แบบ *ex vivo* ได้ (Shao et al., 2011)

ตารางที่ 2.1 แสดงปริมาณสารอาหารในข้าวชนิดต่างๆ 100 กรัมข้าวสาร (ดวงกมล เริ่มตระกูล, 2008)

ประเภท	พลังงาน	โปรตีน	ไขมัน	วิตามินบี 1	วิตามินบี 2	ใยอาหาร
	(แคลอรี)	(กรัม)	(กรัม)	(มิลลิกรัม)	(มิลลิกรัม)	(กรัม)
ข้าวเหนียว	259	8.4	1.6	0.16	0.06	0.8
ข้าวเหนียวไม่ขัดสี	360	7.4	2.1	0.3	0.12	0.8
ข้าวเหนียวหมัก	164	1.8	0.1	0.01	0.03	0.3
ข้าวเจ้าขัดสี	353	6.6	1.1	0.11	0.02	0.8
ข้าวกล้อง	352	7.8	3.4	0.61	0.15	3.4
ข้าวหนึ่ง	364	6.7	1	0.2	0.08	-

ข้าวเหนียวดำ (Black sticky rice)

ข้าวเหนียวดำ คือข้าวเหนียวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงแดงจนถึงสีดำรวมทั้งการที่มีรงควัตถุที่ปรากฏในส่วนต่าง ๆ ของต้นข้าว ซึ่งเป็นลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวชนิดนี้ รงควัตถุที่มีสีส่วนใหญ่พบในส่วนของลำต้น ใบ และเกือบทุกส่วนของช่อดอก ยกเว้น embryo หรือ endosperm ลักษณะเด่นของข้าวเหนียวดำ คือการติดกันเหมือนกาวของเมล็ดข้าวที่สุกแล้ว และมีสารอาหารที่เป็นประโยชน์มากกว่าข้าวเหนียวขาว

องค์ประกอบ และคุณค่าทางโภชนาการของข้าวเหนียวดำ (ประโยชน์ของข้าวเหนียวดำ และข้าวกล้อง , 2012)

1. Omega-3 (Linolenic Acid) เป็นกรดไขมันที่ช่วยบำรุงสุขภาพ ช่วยควบคุมการขนส่งสารอาหารต่าง ๆ ไปทั่วร่างกาย จำเป็นต่อการป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจ และอัมพาต ลดการอักเสบของโรคไขข้อเสื่อมรูมาตอยด์ ลดอาการปวดหัวไมเกรน และปวดประจำเดือน เพิ่มภูมิคุ้มกันร่างกาย และลด

อาการของโรคภูมิแพ้ ลดระดับ cholesterol ลดระดับ triglyceride และเพิ่ม HDL ในเลือด บำรุงสมอง ทำให้เกล็ดเลือดไม่แข็งตัวง่าย

2. Omega-6 (Linoleic Acid) ช่วยป้องกันการเกิดโรคหัวใจ ลดการแข็งตัวของเลือด ลดอัตราการเกิดโรคความดันโลหิตสูง ลดการขยายตัวของเซลล์มะเร็ง ช่วยบำรุงตับ ป้องกันโรคสมองเสื่อมหรือโรคอัลไซเมอร์ ลดระดับ cholesterol และ triglyceride แต่เพิ่มระดับ HDL ในเลือด

3. Omega-9 (Oleic Acid) หรือ lecitin มีหน้าที่สำคัญคือ ลด cholesterol โดยรวม ทำให้เส้นเลือดไม่อุดตัน ไม่เป็นโรคหัวใจ บำรุงสมอง ช่วยให้ความจำดี ไม่เป็นโรคสมองเสื่อม ไม่เป็นโรคพาร์กินสัน และยังช่วยลดความอ้วนได้ดีด้วย

4. Niacin (วิตามินบี 3 หรือ Nicotinic Acid) มีความจำเป็นใน lipid metabolism, tissue respiration และ glycogenolysis ดังนั้น Nicotinic Acid ในปริมาณสูง ๆ จึงสามารถลดระดับ cholesterol ในเลือดได้

5. Vitamin E (Alpha-Tocopherol) Tocopherol และ Tocotrienol เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จึงช่วยลดภาวะเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งได้ และยังช่วยลด cholesterol ที่อุดตันในเส้นเลือด ในกลุ่มเส้นเลือดไปเลี้ยงไต กรดไขมัน ยูริกในเลือดลดลง ลดเลือดคั่งตามเท้า

6. γ -oryzanol มีประสิทธิภาพในการลดระดับ cholesterol และ triglyceride ทั้งในเลือดและในอวัยวะต่าง ๆ ทำให้หลอดเลือดไม่มีไขมันอุดตัน ไม่เป็นโรคหัวใจ โรคสมองเสื่อม โรคอัมพฤกษ์ และโรคขาตามมือ ตามเท้า รวมทั้งโรคหย่อนสมรรถภาพทางเพศในชายและหญิงด้วย

7. Phytate คือเกลือของ phytic acid หรือ hexainositol phosphoric acid โดยธรรมชาติกรดไฟติกจะมีความสามารถในการจับกับสังกะสี และธาตุเหล็กสูง

8. ธาตุเหล็ก ป้องกันโรคโลหิตจาง มีความจำเป็นมากสำหรับเด็กที่กำลังเจริญเติบโต และสตรีมีครรภ์ เด็กที่ขาดธาตุเหล็กจะมีพัฒนาการทางร่างกายลดลง สมานธิและสติปัญญาในการเรียนรู้ต่ำ การจัดระดับปริมาณธาตุเหล็กที่วิเคราะห์ได้จากเมล็ดข้าว ถ้ามีธาตุเหล็กต่ำกว่า 10 ppm จัดว่าอยู่ในระดับต่ำ 10-20 ppm ระดับปานกลาง และมากกว่า 20 ppm คือ ระดับสูง

9. Anthocyanin เป็นสารประกอบกลุ่ม flavonoid ที่ประกอบไปด้วยสาร cyanidin มีสีม่วงเข้ม และสาร peonidin ซึ่งมีสีชมพูอ่อน พบว่าสาร anthocyanin สามารถช่วยลดการอักเสบของเนื้อเยื่อ ช่วยลดไขมันอุดตันในเส้นเลือดที่หัวใจและสมอง บรรเทาโรคเบาหวาน ช่วยบำรุงสายตา เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการ

มองเห็นเวลามองตอนกลางคืน สาร cyanidin มีประสิทธิภาพในการ antioxidation ได้ดีกว่าวิตามินอี และยับยั้งการเจริญเติบโตของ epidermal growth factor receptor ในเซลล์มะเร็ง

การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับข้าวเหนียวดำ

เนื่องจากข้าวกล้องของข้าวเหนียวดำมีปริมาณสาร γ -oryzanol และสามารถสังเคราะห์สาร anthocyanin ได้มากกว่าข้าวขาว ในทางการแพทย์จึงได้มีการนำคุณสมบัตินี้มาใช้ประโยชน์โดยพบว่าสาร γ -oryzanol จะช่วยกระตุ้น growth Hormone ทำให้ร่างกายทำงานได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ร่างกายจึงสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคต่าง ๆ หรือบำบัดอาการของโรคเรื้อรังต่าง ๆ ด้วยตัวเอง โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อม ต้านมะเร็ง อัมพฤกษ์ โรคหัวใจ ความดันโลหิต ลด cholesterol เส้นเลือดตีบ โรคเก๊าท์ ไมเกรน ลดความเครียด ช่วยให้นอนหลับ แก้ปัญหาวัยทอง ปวดประจำเดือน และสมรรถภาพเพศชาย (ธวัชชัย แถวธำ, 2547) ในต่างประเทศได้มีการนำสาร GABA ที่พบในข้าวกล้องอกของข้าวเหนียวดำมาใช้ในวงการแพทย์เพื่อรักษาโรคเกี่ยวกับประสาท เช่น โรควิตกกังวล โรคนอนไม่หลับ และโรคลมชัก เพราะสาร GABA จัดอยู่ในกลุ่มกรดโปรตีนที่ช่วยบำรุงเซลล์ประสาท ทำให้สมองเกิดการผ่อนคลายป้องกันการทำลายสมอง ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคสูญเสียความทรงจำหรืออัลไซเมอร์ และสาร anthocyanin ชนิด cyanidin-3-glucoside ที่พบในข้าวเหนียวดำ ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด สารสกัดในข้าวเหนียวดำยังมีคุณสมบัติช่วยสร้างเม็ดเลือดแดง สร้าง villi ในผนังลำไส้เล็กทำให้ร่างกายสามารถดูดซึมสารอาหารได้มากขึ้น ส่งผลให้ร่างกายเจริญเติบโตและแข็งแรงยิ่งขึ้น (วรรณุช ศรีเจษฎารักษ์, 2550) คุณค่าทางโภชนาการข้าวเหนียวดำ (หภูมิ ภูธร, 2008) รายงานว่าให้พลังงาน 361 kcal มีโปรตีน 8.20 กรัม ไขมัน 3 กรัม คาร์โบไฮเดรต 75.20 กรัม ไฟเบอร์ 0.9 กรัม แคลเซียม 26.00 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 65 มิลลิกรัม วิตามินบีหนึ่ง 0.04 มิลลิกรัม วิตามินบีสอง 0.83 มิลลิกรัม และไนอาซิน 0.60 มิลลิกรัม

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบว่าเมล็ดข้าวมีปริมาณสารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง ซึ่งปริมาณความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอล แอลฟา-โทโคฟีรอล นั้นจะพบในปริมาณมากบริเวณส่วนชั้นนอกของเมล็ดข้าว คือ รำข้าว และแกลบ ซึ่งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าในส่วนของแป้ง (เมล็ดข้าวที่ผ่านการขัดขาว) (Butsat and Siriamornpun, 2011) ซึ่งในเมล็ดสีของข้าวยังเป็นแหล่งสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ แอนโทไซยานิน แสดงให้เห็นว่าข้าวมีสีที่มีสารแอนโทไซยานิน จะมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าข้าวที่ไม่

มีสี ซึ่งจากการศึกษาแอลฟา-โรอิซานอลจากรำข้าว พบว่าสามารถจำกัดอนุมูลอิสระ ปกป้องโปรตีนจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน และ lipid peroxidation ในเซลล์ แบบ ex vivo ได้ (Shao et al., 2011)

ข้าวเหนียวสังข์หยด

ข้าวสังข์หยดเป็นข้าวเจ้าพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้ ปลูกเฉพาะในจังหวัดพัทลุง ลักษณะต้นสูง 140 เซนติเมตร ใต้ออแสง ทรงกอตั้งใบเขียว รวงแน่น คอรวงยาว ลักษณะเมล็ดเรียวยาว อายุเบา ปริมาณ amylose ต่ำประมาณ 14.25% มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงข้าวจากรวงเดียวกันเมื่อขัดสีแล้วบางเมล็ดมีสีขาวใส แต่ส่วนใหญ่มีลักษณะขาวขุ่น เยื่อหุ้มเมล็ดจะมีสีแดงถึงแดงเข้ม เมื่อหุงสุกแล้วเมล็ดข้าวจะนุ่ม ยังคงนุ่มอยู่เมื่อเย็นตัวลง และจับตัวกันคล้ายข้าวเหนียว นิยมบริโภคในรูปแบบข้าวซ้อมมือ จมูกข้าว (จังหวัดพัทลุง, 2556)

ประโยชน์คุณค่าทางโภชนาการของข้าวสังข์หยด

เป็นข้าวที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ช่วยป้องกันโรคเหน็บชา โรคโลหิตจาง มีกากใยอาหารสูงกว่าข้าวพันธุ์อื่น ๆ จึงมีประโยชน์ต่อระบบขับถ่าย มีวิตามินอีสูง ช่วยชะลอความแก่ของเซลล์ร่างกาย มีโปรตีน ฟอสฟอรัส ธาตุเหล็กสูง จึงมีประโยชน์ในการบำรุงร่างกายให้แข็งแรงและป้องกันโรคความจำเสื่อม มีวิตามินไนอาซินสูง ซึ่งมีความสำคัญต่อระบบผิวหนัง และยังพบสาร anthocyanin ซึ่งมีประโยชน์ในการส่งเสริมสุขภาพ ภาวะเครียดจากออกซิเดทีฟ มีบทบาทสำคัญต่อพยาธิสภาพของโรคความเสื่อมของร่างกายที่มีสาเหตุจากสารอนุมูลอิสระ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคลมปัจจุบัน โรคมะเร็ง และความชรา (อมรรัตน์ ถนนวนแก้ว, 2552) คุณค่าทางโภชนาการข้าวเหนียวสังข์หยด ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี ปี 2007 รายงานว่าให้พลังงาน 364.22 kcal มีโปรตีน 7.30 กรัม ไขมัน 2.42 กรัม คาร์โบไฮเดรต 78.31 กรัม ไฟเบอร์ 4.81 กรัม วิตามินบีหนึ่ง 0.32 มิลลิกรัม และไนอาซิน 6.4 มิลลิกรัม

สำหรับการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากรำข้าวต่อกลไกในการก่อโรคนิวไนไตน์นั้นน้อยมาก อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าส่วนของรำข้าว (Rice bran) ซึ่งมีคุณค่าทางอาหารสูงและมีสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ เช่น วิตามินบี วิตามินอี, Tocopherol, Tocotrienol และ Gamma-oryzanol สามารถป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง, hyperlipidemia, fatty liver, ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง, โรคนิวไนไต และโรคหัวใจได้ (61) โดยพบว่ารำข้าวสามารถลดการเกิดนิวไคลเซียมออกซาเลตซ้ำในผู้ป่วยที่มีภาวะ hypercalciuria และลด calcium excretion ในปัสสาวะได้ (62, 63) สำหรับข้าวเหนียวดำนั้นมีสีม่วงแดงของ Anthocyanin

pigments เป็นเอกลักษณ์ มีสารอาหารและมีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือมี Anthocyanin สูงกว่าข้าวดำและข้าวแดง (64) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง ลดระดับไขมันในเลือด และ hypoglycemic effects (65-72)

อนุมูลอิสระ

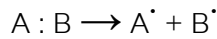
อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นสารที่มีอิเล็กตรอนอิสระ (unpaired electron) อยู่ในวงนอกของอะตอมหรือโมเลกุล สิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ออกซิเจนจะมีอนุมูลอิสระของออกซิเจนเกิดขึ้น เช่น hydroxyl radical (OH^\cdot), superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hydroperoxyl radical (HOO^\cdot) และ alkoxy radical (RO^\cdot) ซึ่งเป็นผลจากการใช้ออกซิเจนในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ของเซลล์ที่เกิดขึ้นตลอดเวลา ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ได้แก่ รังสียูวี โอโซน ควันจากท่อไอเสียรถยนต์ และควันบุหรี่ ยาต้านจุลชีพและต้านมะเร็งบางชนิดสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นภายในร่างกายได้เช่นกัน

อนุมูลอิสระส่วนใหญ่มีความไม่คงตัว และไวต่อการทำปฏิกิริยา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง hydroxyl radical ซึ่งจัดเป็นสารออกซิไดส์แรงสูง ที่มีความว่องไวสูงสุด อนุมูลอิสระมีความสามารถในการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่น สามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามอุณหภูมิ pH และความชื้น เป็นต้น อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาวะที่เป็นกลางทางไฟฟ้า และสภาวะที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูลอิสระ คือ อิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล R^\cdot แทนอะตอมหรือโมเลกุลของอนุมูลอิสระที่ไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นประจุบวก (R^+) เช่น อนุมูล pyridinyl (NAD^+) และประจุลบ (R^-) เช่น อนุมูล superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$) หรือเป็นกลาง เช่น อนุมูล peroxy (ROO^\cdot) หรืออนุมูล thiyl (RS^\cdot) เป็นต้น

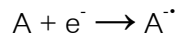
อนุมูลอิสระสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ที่อยู่รอบข้างในทันทีที่ถูกสร้างขึ้น ยังผลให้เกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ภายในร่างกาย ไม่ว่าจะเป็น การทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ การเปลี่ยนสภาพโปรตีนตลอดจนไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ หรือการสร้างพันธะโควาเลนต์กับโปรตีนหรือเอนไซม์บางชนิดจนทำให้การทำงานของโปรตีนหรือเอนไซม์นั้นๆ ผิดปกติไป เป็นต้น

อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ Hydroxyl radical (HO^\cdot), Superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) เป็นต้น อนุมูลเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก การเกิดอนุมูลอิสระมีได้หลายกลไกที่แตกต่างกัน ดังนี้

1. การแตกของพันธะโควาเลนต์แบบโฮโมไลซิส (Homolysis)



2. การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัว ให้แก่อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า



3. การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัว จากอะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า



อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องต่างๆ ในทางชีววิทยาที่สามารถเป็นตัวตั้งต้นที่ทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระได้อีกหลายชนิด สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive nitrogen species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive chlorine species, RCS) สารบางชนิดสามารถจัดอยู่ได้ 2 กลุ่ม เช่น เปอร์ออกซีไนไตรท์ (peroxynitrite)

ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation)

ปฏิกิริยาที่โมเลกุลหรืออะตอมมีการสูญเสียอิเล็กตรอนจากวงโคจรให้กับโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน เรียกว่าสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนว่า ตัวรีดิวซ์ (reducing agent) และเรียกดสารที่ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนนี้ว่า ตัวออกซิไดซ์ (oxidizing agent) โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันมักจะเกี่ยวข้องกับออกซิเจน นอกจากนี้ ออกซิเดชันยังหมายถึงการเสียไฮโดรเจนอะตอมออกจากโมเลกุลอีกด้วย ปฏิกิริยาออกซิเดชันและอนุมูลอิสระนั้นมีความเกี่ยวข้อง เนื่องจากปฏิกิริยานี้ทำให้เกิดอนุมูลอิสระของสารต่างๆ ได้มากมายหลายชนิด และอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารอื่นๆ เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไป

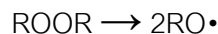
อนุมูลอิสระจะเกิดปฏิกิริยาที่เป็นแบบปฏิกิริยาลูกโซ่ แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกเป็นขั้นที่อนุมูลอิสระถูกสร้างหรือผลิตขึ้น เรียกขั้นตอนนี้ว่าขั้นตอนอินิทิเอชัน (initiation step) ขั้นที่สองเป็นขั้นที่อนุมูลอิสระถูกเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลอิสระตัวอื่นต่อกันไป เรียกว่าขั้นพรอพาเกชัน (propagation step) และขั้นสุดท้าย เรียกว่า ขั้นเทอร์มิเนชัน (termination step) เป็นขั้นหยุดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระเป็นขั้นตอนที่มีการรวมกันของอนุมูลอิสระ 2 อนุมูล ได้เป็นสารที่มีความเสถียร โดยทั่วไปการที่โมเลกุลหรืออะตอมของสารที่มีอิเล็กตรอนเข้าคู่กันครบเสียอิเล็กตรอนไปกลายเป็นอนุมูลอิสระได้นั้น ต้องอยู่ในสภาวะอุณหภูมิสูง แต่ก็มีโมเลกุลอีกหลายชนิดที่กลายเป็นอนุมูลอิสระได้เมื่ออยู่ในสภาวะปกติ ซึ่งรวมถึงสารชีวโมเลกุลต่างๆ ที่พบในสิ่งมีชีวิตด้วย ซึ่งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระที่มักพบในสภาวะปกติของสิ่งมีชีวิตมีดังนี้

ขั้นอินิทิเอชัน (chain initiation)

อนุมูลอิสระเกิดมาจากกลไกต่างๆกันได้หลายวิธี คือ การแตกพันธะของโมเลกุลที่เรียกว่า Homolysis หรือการแตกพันธะเนื่องจากแสง (photolysis) หรือผลของรังสี (radiolysis) หรือมาจากปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox) ซึ่งปฏิกิริยาทั้ง 4 จัดเป็นกลไกพื้นฐานในการสร้างอนุมูลอิสระจากสารอินทรีย์

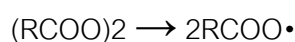
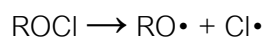
1. Bond homolysis

โมเลกุลของสารอินทรีย์ที่มีอิเล็กตรอนวงนอกสุด (valence electron) เป็นจำนวนคู่แล้วในทางทฤษฎีสามารถแยกออกจากกันให้ผลลัพธ์เป็นอนุมูลอิสระได้ โดยในสภาวะที่อุณหภูมิปกติ การที่อิเล็กตรอนคู่ในพันธะโควาเลนต์สามารถแยกจากกันไปให้อะตอมแต่ละตัวได้นั้น ต้องเป็นโมเลกุลที่มีพลังงานระหว่างพันธะที่อ่อนมาก เช่น disulfide และการเกิดปฏิกิริยาจะมีอัตราที่ช้ามาก จึงคาดว่าไม่น่าจะเกิดในระบบของสิ่งมีชีวิตได้ ตัวอย่าง Bond homolysis แสดงได้ดังสมการต่อไปนี้



2. Photolysis

เป็นการแตกพันธะของโมเลกุลจากการดูดพลังงานแสง เช่น แสงอุลตราไวโอเล็ต ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น ที่พบมากคือการแตกพันธะของ hydrogen peroxide (H_2O_2) กลายเป็นอนุมูล hydroxyl ($\text{HO}\cdot$) โดยในสิ่งมีชีวิตพลังงานแสงจะถูกดูดโดยโมเลกุลที่มีความไวต่อแสง เช่น รงควัตถุและสารอะโรมาติกคาร์บอนบางชนิด หลังดูดพลังงานแสงแล้วจะทำให้โมเลกุลอยู่ในสถานะที่ตื่นเต้นตัว (excited state) จึงต้องมีการปลดปล่อยพลังงานออกมาเพื่อให้โมเลกุลกลับเข้าสู่สถานะพื้น (ground state) ดั้งเดิม และวิธีหนึ่งของการคายพลังงาน คือ การแตกพันธะของโมเลกุลเกิดเป็นอนุมูลอิสระ 2 ตัว ดังนี้



3. Radiolysis

พลังงานจากรังสีชนิดต่างๆ เช่น รังสีแกมมา รังสีเอกซ์ และอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูงสามารถทำให้เกิดการแตกพันธะโควาเลนต์ของโมเลกุลสารได้ โดยเฉพาะโมเลกุลน้ำจะให้อนุมูลประจุบวก ($\text{H}_2\text{O}^{+\cdot}$) และอนุมูล hydroxyl ($\text{HO}\cdot$) ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้เป็นตัวที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์สูงทำให้เกิดอนุมูลอิสระออกมามากมาย นอกจากนี้รังสียังทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้โดยตรงจากสารองค์ประกอบเคมีของเซลล์อีกด้วย โดยเฉพาะสามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันไม่อิ่มตัวในร่างกายสิ่งมีชีวิต ซึ่งปฏิกิริยานี้ นับเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญของปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ

4. ปฏิกิริยารีดอกซ์

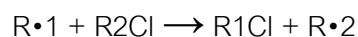
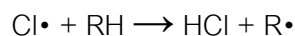
ปฏิกิริยารีดอกซ์หรือเรียกอีกอย่างว่า ปฏิกิริยาออกซิเดชันรีดักชัน เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทั่วไปในระบบทางชีววิทยา ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันบางชนิดมีประโยชน์ แต่มีปฏิกิริยาออกซิเดชันบางชนิดก่อให้เกิดความเสียหาย โดยสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระได้ ที่สำคัญคือโมเลกุลของอนุมูล superoxide ($O_2^{\cdot-}$) ซึ่งเป็นสารตัวกลาง (intermediate) ในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรียและเยื่อหุ้มนิวเคลียส นอกจากนี้ปฏิกิริยารีดอกซ์ของไอออนโลหะในร่างกาย ก็จัดเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญในการเกิดอนุมูลอิสระเช่นกัน โดยเฉพาะเหล็ก (Fe^{2+}) และทองแดง (Cu^{2+}) โดยไอออนโลหะเปรียบเสมือนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยารีดอกซ์

ขั้นพรอพาเกชัน (chain propagation)

เป็นขั้นที่อนุมูลอิสระมีการทำปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระของสารอื่น ซึ่งปฏิกิริยาจะดำเนินต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ ได้อนุมูลอิสระชนิดใหม่ออกมาตลอดเวลา จัดเป็นการเปลี่ยนตำแหน่งของอิเล็กตรอนที่ไม่เข้าคู่ (unpaired electron) ซึ่งสามารถแบ่งกลไกของปฏิกิริยาในขั้นพรอพาเกชันได้ 3 ชนิดที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบทางชีววิทยาที่เกี่ยวกับสิ่งมีชีวิต คือ

1. การถ่ายทอดอะตอมหรือกลุ่มของอะตอม (atom or group transfer)

จัดเป็นกลไกที่เกิดมากที่สุดในระดับของพรอพาเกชัน โดยปฏิกิริยาจะเกี่ยวข้องกับการดึงไฮโดรเจนดังสมการ

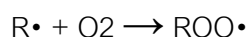


2. การถ่ายทอดอิเล็กตรอน (electron transfer)

เป็นการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจากอนุมูลอิสระที่เป็นกลางหรือมีประจุลบไปให้โมเลกุลที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ (non-radical molecule) ซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญของปฏิกิริยาออกซิเดชันไขมันในสิ่งมีชีวิต (Lipid peroxidation)

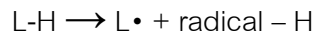
3. การเติมอนุมูลอิสระ (addition of radicals)

เป็นการเติมกลุ่มอนุมูลอิสระเข้าไปในโมเลกุลต่างๆ ดังสมการ

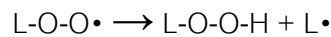
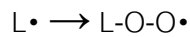


ตัวอย่างของปฏิกิริยานี้ ได้แก่ การเติมอนุมูลอิสระของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ปฏิกิริยาออกซิเดชันโมเลกุลของไขมัน (Lipid peroxidation) แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันแสดงได้ดังสมการ

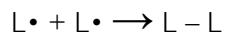
Chain initiation



Chain propagation



Chain termination

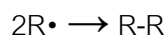
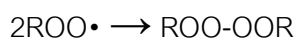
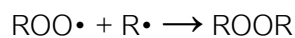


ขั้นเทอร์มิเนชัน (chain termination)

เป็นขั้นหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ ประกอบด้วย กลไกหลัก 3 ชนิด คือ

1. การรวมตัวกันของอนุมูลอิสระ (Homolinking and cross-linking of radicals)

เป็นการรวมตัวกันของอนุมูลอิสระ 2 โมเลกุล โดยการนำอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ของแต่ละโมเลกุลอนุมูลอิสระมาสร้างพันธะกัน ได้เป็นสารโมเลกุลใหม่ที่มีพันธะร่วมกัน หากเป็นการรวมตัวกันระหว่างอนุมูลอิสระ 2 โมเลกุลที่เป็นชนิดเดียวกัน เรียกโมเลกุลสารใหม่ที่ได้ว่า homodimer แต่ถ้าเป็นการรวมตัวของอนุมูลอิสระต่างชนิดกันเรียก heterodimer ซึ่งกลไกนี้เป็นปฏิกิริยาที่สำคัญในการสร้างสารชีวโมเลกุลที่มีความเสถียรขึ้นมาใหม่ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก และไขมัน เป็นต้น การรวมตัวกันของอนุมูลอิสระแสดงได้ดังนี้



2. การกำจัดอนุมูลอิสระ (Radical scavenging)

คำว่า Scavenge หมายถึงการกำจัดเอาขยะและสิ่งที่ไม่ต้องการออกไป ซึ่งในกรณีนี้เปรียบอนุมูลอิสระได้กับสิ่งที่ไม่ต้องการ ซึ่งการกำจัดออกจะกระทำโดยสารกลุ่มหนึ่งที่เรียกว่า scavenger หรือสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เช่น สารประกอบฟีนอลิกซึ่งจัดเป็น radical scavenger ที่มีประสิทธิภาพ รวมทั้งวิตามินซี วิตามินอี วิตามินเอ เป็นต้น

3. การถ่ายทออดีเล็กตรอน (Electron transfer)

เป็นการถ่ายทออดีเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่ของอนุมูลอิสระออกจากโมเลกุล หรือเป็นการรับเอา อีเล็กตรอน 1 ตัวจากภายนอกมาเข้าคู่กับอีเล็กตรอนเดิมที่ยังมีที่ว่างอยู่ในโมเลกุล ทำให้สภาวะการเป็น อนุมูลอิสระหมดไป เช่น อนุมูล superoxide ($O_2^{\cdot-}$) เกิดการถ่ายทออดีเล็กตรอนกลายเป็นโมเลกุลออกซิเจน ปกติ (O_2) เป็นต้น

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือ สารที่สามารถจับอนุมูลอิสระออกจากร่างกาย ร่างกายมีระบบต้านออกซิเดชัน แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ ประเภทแรกป้องกันการเกิดสารอนุมูลอิสระ ได้แก่ เอนไซม์ superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, peroxidase, cytochrome C peroxidase ทองแดง สังกะสี ซีเลเนียม โปรตีนซึ่งมี ทองแดงอยู่ในโมเลกุล (ceruloplasmin) ส่วนอีกประเภทหนึ่งคือ สารต้านอนุมูลอิสระ ในกลุ่มที่ทำลาย ปฏิกิริยาถูกไขนี้ได้แก่ วิตามินอี เบต้า-แคโรทีน วิตามินซี ubiquinone, uric acid, bilirubin, albumin, sulfhydryl groups ในกรดอะมิโน cysteine ซึ่งมีอยู่ในโปรตีน เช่น เนื้อสัตว์ นอกจากนี้วิธีนี้ยังมี สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) และสารกลุ่ม flavanoids ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ น่าสนใจอีกด้วย (Basu, T. K.,1999)

สารต้านอนุมูลอิสระ สามารถแบ่งตามกลไกการยับยั้งได้เป็น 3 ชนิด ดังนี้ (Strain, J. J.,1999)

1. Preventive antioxidant ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ
2. Scavenging antioxidant ทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น
3. Chain breaking antioxidant ทำให้ลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง

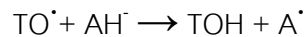
ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิด

วิตามินเอ

ในธรรมชาติวิตามินเอจะพบเฉพาะในสัตว์เท่านั้น แต่ในพืชจะมีสารประกอบแคโรทีนอยด์ที่สามารถเปลี่ยนเป็นวิตามินเอได้ จัดเป็น Precursor ของวิตามินเอ เรียกว่า โปรวิตามินเอ มักพบในพืชผัก ใบเขียว ผักและผลไม้ที่มีสีเหลือง หรือสีส้มแดง

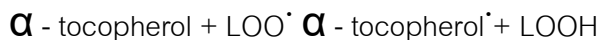
วิตามินซี

มีชื่อทางเคมีว่า กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) เป็นวิตามินที่ละลายได้ในน้ำ จะสลายตัวเมื่อถูกความร้อนหรือทิ้งไว้ในอากาศที่มีความชื้น วิตามินซีมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อนุมูล hydroxyl และอนุมูล peroxy นอกจากนี้วิตามินซีสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระแล้ว ยังทำหน้าที่เป็นตัวส่งเสริมประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอีด้วย โดยทำให้อนุมูล α -tocopherol \cdot (TO \cdot) เปลี่ยนกลับไปเป็น α -tocopherol (TOH) ดังเดิม ดังสมการ

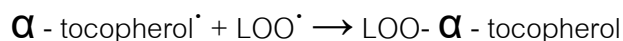


วิตามินอี

เป็นวิตามินที่ละลายได้ในไขมันเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ โดยวิตามินอีทำงานร่วมกับสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่นๆ เช่น วิตามินซีและซีลีเนียมเป็นต้น วิตามินอีช่วยปรับให้ร่างกายสามารถนำเอาวิตามินเอมาใช้ ซึ่งจะช่วยในการป้องกันสารที่เป็นพิษที่มีผลมาจากโลหะ เช่น ตะกั่ว ในธรรมชาติมีวิตามินอีอยู่หลายชนิด ปัจจุบันแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ โทโคฟีรอล และ โทโคโทอินอล แต่ละกลุ่มยังแยกเป็นวิตามินย่อยๆ อีก 4 ชนิด ได้แก่ อัลฟา (α -) เบต้า (β -) แกมมา (γ -) และเดลต้า (δ -) วิตามินอีทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก้อนุมูล peroxy ดังสมการ



อนุมูล α -tocopherol \cdot ที่เกิดขึ้น สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูล peroxy ตัวอื่นทำให้ได้สารที่มีความเสถียร (LOO- α -tocopherol) ดังสมการ เป็นผลให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันหยุดลง



ซีลีเนียม ทองแดง และสังกะสี

เป็นสารต้านอนุมูลอิสระทางอ้อม เนื่องจากเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มีการศึกษาวิจัยที่แสดงว่าการใช้ซีลีเนียม และวิตามินอีร่วมกันช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งบางชนิด ซึ่งพบได้ในอาหารตามธรรมชาติ เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระมีหน้าที่หลายอย่าง เช่น ทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) เป็นตัวขจัดอนุมูลอิสระจับกับไฮดรอกซิลที่เร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ด้วยหน้าที่ต่างๆเหล่านี้ จึงทำให้มีผลต่อการชะลอหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ และทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร หรือเป็นสารที่

ไม่ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันอีกต่อไป หรือเป็นสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ (non-radical product) (Packer, L, 1999)

แคโรทีนอยด์

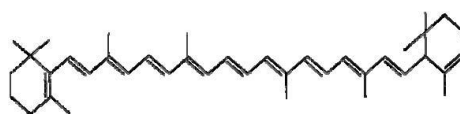
แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่พบทั่วไปในธรรมชาติ จะถูกสังเคราะห์ขึ้นในคลอโรพลาสต์ของพืช และพบมากในผักและผลไม้สุก โครงสร้างพื้นฐานของแคโรทีนอยด์ประกอบด้วยโครงสร้างหลักที่เรียกว่า tetraterpene skeleton ซึ่งอาจมีวงแหวนที่บริเวณปลายด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้านของโมเลกุล วงแหวนนี้อาจเป็นวงแหวนห้าหรือหกเหลี่ยมก็ได้ แคโรทีนอยด์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามองค์ประกอบของโครงสร้างในโมเลกุลดังนี้ (Packer, L, 1999)

แคโรทีน (Carotene)

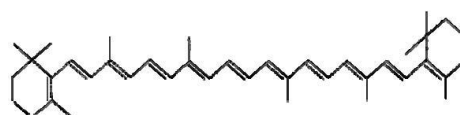
เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนเท่านั้น เช่น เบต้า-แคโรทีน (β -carotene) อัลฟา-แคโรทีน (α -carotene) แกมมา-แคโรทีน (γ -carotene) ไลโคปีน (lycopene) เป็นต้น และซึ่ง เบต้า-แคโรทีน เป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ การเปลี่ยนรูปจากเบต้า-แคโรทีนไปเป็นวิตามินเอโดยการแตกพันธะคู่ที่ตำแหน่งกึ่งกลางของโมเลกุล โดยเอนไซม์ carotene deoxygenase เมื่อเบต้า-แคโรทีน สามารถดักจับอนุมูลอิสระเข้าไปในโมเลกุลแล้ว โมเลกุลของเบต้า-แคโรทีนจะอยู่ในลักษณะที่มีความเสถียร

1. ออกซิแคโรทีนอยด์ (oxocarotenoid) หรือ แซนโทฟิลล์ (xanthophyll)

เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุลบริเวณวงแหวนประกอบด้วยกลุ่มอื่นนอกเหนือจากคาร์บอนและไฮโดรเจน เช่น เบต้า-คริปโทแซนทิน (β -cryptoxanthin) และลูทีน (lutein) (Packer, L, 1999)



α - carotene



β - carotene

ภาพที่ 2.5 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ อัลฟา-แคโรทีน (α -carotene) และเบต้า-แคโรทีน (β -carotene)

(Agriculture and Consumer Protection, 1995)

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่านั้น สามารถละลายน้ำได้ ที่พบในพืชมักจะรวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycosides) และพบได้ในส่วนของช่องว่างภายในเซลล์ (cell vacuole) สารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด มีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบจะเป็นสารประกอบพอลิฟลาโวนอยด์ (flavonoids) นอกจากนี้ยังมีสารประกอบต่างๆ เช่น simple monocyclic phenol, phenyl propanoid, phenolic quinine และ polyphenolic ซึ่งได้แก่พวก lignin, tannin เป็นต้น รวมทั้งยังพบว่ามีการประกอบที่มีกลุ่มฟีนอล (phenolic unit) รวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีนอัลคาลอยด์ (alkaloid) และเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) เป็นต้น

นอกจากนี้บางการศึกษาพบว่าสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และ แทนนิน เป็นต้น สารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่เป็นตัวจับไล่อนุมูลอิสระที่สำคัญคือ อนุมูล peroxy โดยมีการเกิด 2 แบบคือ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นต่ำเมื่อเทียบกับสารออกซิไดซ์ สารประกอบฟีนอลิกจะป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจะถูกทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร ดังนั้นจึงสามารถป้องกันการเกิดชั้นตอเนอพลอพาเกินได้ นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังทำหน้าที่เป็นสารคีเลต ดักจับไอออนของโลหะเอาไว้ในโมเลกุล เช่น เคอร์ซีทิน (quercetin)

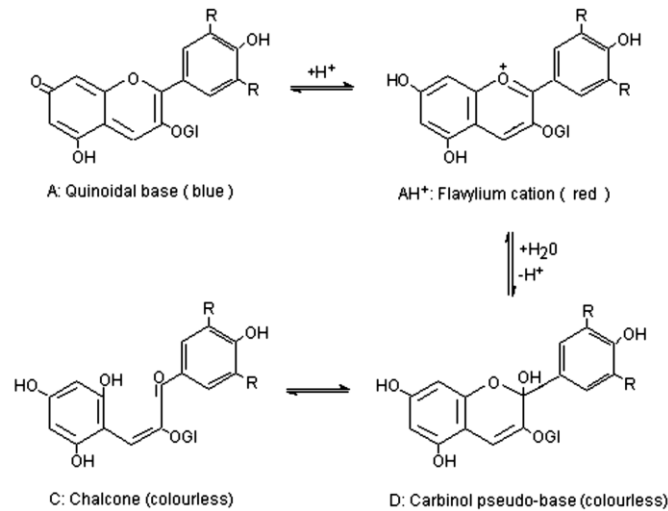
สารประกอบฟีนอลิกยังทำหน้าที่ทั้งเป็นสารให้อิเล็กตรอน หรือเป็นตัวให้ไฮโดรเจน และกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอกทีฟ ด้วยหน้าที่ต่างๆ ดังกล่าวจึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญชนิดหนึ่งในพืชทั่วไป

แอนโทไซยานิน (anthocyanin)

แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่พบในผัก ผลไม้ ดอกไม้ ให้สีม่วงแดงไปจนถึงสีน้ำเงิน ละลายอยู่ใน vacuole sap ของพืช (Vacuole sap เป็นส่วนหนึ่งที่เห็นได้ชัดที่สุดในเซลล์พืชที่มีอายุมาก โครงสร้างจะมีเนื้อเยื่อหุ้ม และภายในมีช่องเหลวบรรจุอยู่) ละลายน้ำได้แต่ไม่ละลายใน non-hydroxyl solvents เช่น อีเทอร์ อะซิโตน คลอโรฟอร์ม และเบนซิน

แอนโทไซยานินเป็นสารประกอบในกลุ่ม flavonoids ซึ่งมีโครงสร้างพื้นฐานในโมเลกุลประกอบด้วยวงแหวนเบนโซไพแรน (benzopyran) 2 วงต่อกับวงแหวนฟีล (phenyl ring) เป็นอนุพันธ์ของเกลือฟลาวิลียม (flavylium salt) แสดงใน ภาพที่ 2.6 ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เป็น aglycone

(anthocyanidin) และน้ำตาล 1 หรือ 2 ตัว โดยปกติจะพบ free aglycone ในอาหารน้อยมาก ยกเว้นในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายตัว (degradation) ส่วนของน้ำตาลที่พบมาก มีอยู่ 5 ชนิด คือ glucose, rhamnose, galactose, xylose, arabinose

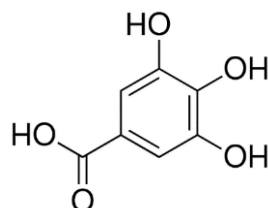


ภาพที่ 2.6 แสดงโครงสร้างของแอนโทไซยานินที่ pH ต่างๆ

สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

สารต้านอนุมูลอิสระที่พัฒนาสังเคราะห์ขึ้นส่วนใหญ่จะออกแบบให้มีโมเลกุลขนาดเล็ก และใช้โครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระ ที่มีในธรรมชาติ นำมาดัดแปลงให้มีคุณสมบัติทางเคมีและมีฤทธิ์ที่เข้มข้น เช่น สารต้านอนุมูลอิสระที่พัฒนาจากสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ โดยพัฒนามาจากโครงสร้างของวิตามินอี และโครงสร้างสารโพลีฟีนอล

Gallic acid หรือ 3, 4, 5-hydroxybenzoic acid เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ C₇H₆O₅ Gallic acid เป็นส่วนประกอบของแทนนิน พบมากในองุ่น ใบชา เปลือกไม้ไผ่ และพืชอื่นๆ โดยทั่วไปจะเกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมทางยา คุณสมบัติของ Gallic acid คือ สามารถยับยั้งเชื้อรา เชื้อไวรัส และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี



ภาพที่ 2.7 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Gallic acid

สารต้านอนุมูลอิสระที่สร้างขึ้นในร่างกายมนุษย์

โดยปกติจะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในเซลล์และร่างกายหลายชนิด มีทั้งที่เป็นประโยชน์และให้โทษ ซึ่งเซลล์ในร่างกายจะเป็นอันตรายและเสียหายหากมีอนุมูลอิสระในปริมาณมากเกินไปเกินสมดุล ดังนั้นเซลล์และร่างกายจึงมีกลไกเพื่อควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระไม่ให้สูงจนเกิดอันตราย โดยกลไกดังกล่าวจะทำหน้าที่ลดผลกระทบที่เป็นอันตรายของอนุมูลอิสระต่อเซลล์ ในสภาวะปกติกลไกเหล่านี้สามารถควบคุมอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้ อย่างไรก็ตามหากเกิดภาวะผิดปกติที่ทำให้กลไกการป้องกัน เหล่านี้บกพร่องจะนำไปสู่การเกิดภาวะที่มีอนุมูลอิสระมากเกินไปเกินสมดุล (oxidative stress) และเกิดโรคต่างๆ ขึ้นในร่างกายกลไกสำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุลได้แก่เอนไซม์ต้านออกซิเดชัน (antioxidative enzyme)

เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase; SOD)

เอนไซม์ SOD จะทำหน้าที่ขจัดอนุมูลอิสระ คือ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($O_2^{\cdot-}$) โดยเร่งปฏิกิริยาดิสมิวเตสในการเปลี่ยนอนุมูล $O_2^{\cdot-}$ ให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกกำจัดต่อไปโดยเอนไซม์คาตาเลส (catalase) และเอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) CuZnSOD เป็นเอนไซม์ที่มีโลหะทองแดงและสังกะสีเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ พบในเซลล์ที่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (eukaryotic cell) ทั้งหมดเช่น ยีสต์ พืช และสัตว์ แต่ไม่พบในแบคทีเรีย หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ภายในโครงสร้างของ CuZnSOD จะมีทองแดงอยู่ในบริเวณ active site บริเวณศูนย์กลางโครงสร้างเชื่อมต่อกับโลหะสังกะสี เอนไซม์ CuZnSOD มีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระโดยเร่งปฏิกิริยาดิสมิวเตสขึ้น นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์ SOD ไอโซฟอร์มอื่นอีกหลายไอโซฟอร์ม ซึ่ง SOD ทุกชนิดจะมีโลหะทรานซิชันที่ active site ซึ่งทำหน้าที่โดยการออกซิไดส์และรีดิวซ์แบบย้อนกลับได้ นอกจากนี้ SOD ยังทำหน้าที่ป้องกันเอนไซม์กลุ่มดีไฮเดรส ไม่ให้เอนไซม์เหล่านี้ถูกอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนทำลาย

เอนไซม์เปอร์ออกซิรีดอกซิน (peroxiredoxin, PRX)

Non-heme peroxidase เป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั่วไปภายในเซลล์โดยสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มหลักๆ ได้แก่ เอนไซม์ peroxiredoxin (PRXs) และ เอนไซม์ glutathione peroxidase (GPXs) peroxiredoxin พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดและจัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม thiol-dependent peroxidase โดยจะเร่งปฏิกิริยารีดักชันของ hydrogen peroxide, alkylhydroperoxides และ peroxinitrite ให้กลายเป็นน้ำ รวมถึงแอลกอฮอล์ และไนโตรท์ ตามลำดับ peroxiredoxin สามารถจัดจำแนกได้ 4 ประเภท ได้แก่ 2-cys

PRX, 1-cys PRX, PRX-Q และ type II PRX (PRXII) โดยจะมีกลไกในการทำปฏิกิริยาร่วมกันที่บริเวณกรดอะมิโนซิสเทอีน เรียกว่า peroxidatic cysteine โดยจะถูกออกซิไดซ์โดย hydrogen peroxide กลายเป็น sulfenic acid และภายหลังจากนั้นจะถูกเปลี่ยนกลับมาอยู่ในรูปรีดิวซ์โดยรับ reducing equivalent ที่แตกต่างกัน เช่น thioredoxin (TR(SH)₂), glutaredoxin (GRX) หรือ glutathione ขึ้นกับประเภทของ PRX

เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase, GPx)

ทำงานร่วมกับธาตุซีลีเนียมและกลูตาไทโอน (GSH) โดยเร่งปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ได้แก่ ลิพิดเปอร์ออกไซด์ (ROOH) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและกลูตาไทโอนไดซัลไฟด์ (GSSG) นอกจากนี้สามารถสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้

บทที่ 3
การดำเนินการวิจัย

1. วัตถุประสงค์

เมล็ดข้าวเหนียวดำพันธุ์พื้นเมือง จากจังหวัดพัทลุง

เมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยดพันธุ์พื้นเมือง จากจังหวัดพัทลุง

2. วัสดุและอุปกรณ์

เครื่องชั่งสาร

เครื่องปั่น (blender)

เครื่องเขย่าสารแบบปรับอุณหภูมิ

เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบปรับอุณหภูมิ

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer; UV-1601)

เครื่องแยกขนาดโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า

เครื่องย้ายโปรตีนลงเมมเบรน

เครื่องควบแน่นสารที่ความดันต่ำ

ตู้อบแบบปรับอุณหภูมิ

ตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์อุณหภูมิ 37°C

อ่างน้ำวนแบบปรับอุณหภูมิ

Rotary evaporator

Cell culture flask ขนาด 25 cm³, 75 cm³

6- well plate

24- well plate

96- well plate

ชุดเครื่องแก้ว: ขวด พลาสติก หลอดทดลอง กระจกตวง

Microcentrifuge tube 1.5 ml

Autopipette ขนาด 10, 100, 200, 1000 µl

กระดาษกรอง เบอร์ 1

พาราฟิล์ม

กระดาษฟอยด์

Rack

Vortex

Seropipettes ขนาด 5 และ 10 ml

Counting chamber

Cornical tube ขนาด 15 และ 50 ml

Phase contrast microscope

Immunofluorescence microscope

3. สารเคมี

Acetone

Methanol

Absolute ethanol

0.025 M Potassium chloride buffer, pH 1.0 (KCl)

0.4 M Sodium acetate buffer, pH 4.5 ($C_2H_3NaO_2$)

Follin Ciocalteu's phenol reagent (FCR) (Carlo Erba)

Horseshoe peroxidase (HRP)

5% Sodium carbonate (Na_2CO_3)

0.2 M Sodium phosphate buffer, pH6.6

1% Potassium ferricyanide

10% Trichloroacetic acid

0.1% Ferric chloride ($FeCl_3$)

1, 1 Diphenyl-2-picryl-hydrazyl-hydrate (DPPH) (Sigma Aldrich)

Gallic acid (3, 4, 5-trihydroxybenzoic acid)

Ascorbic acid

Distilled water

4 mM Hydroperoxide (H_2O_2)

0.1 M Potassium phosphate (KH_2PO_4) pH6.0

7.5 mM Phenol red

100 mM Phosphate-buffered saline

MEM medium cell culture

Fetal bovine serum

Penicillin- streptomycin

Trypan blue

Calcium chloride

Sodium oxalate

Sodium chloride

Antibodies

4. การดำเนินการวิจัย

4.1 การสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยด

นำเมล็ดข้าวเหนียวดำมาแกะเปลือก บดให้ละเอียด แล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 60 mesh และนำไปสกัดตามวิธีของ Sangkitikomol (73) โดยนำผงข้าวเหนียว 100 กรัม ผสมกับ 70% เอธิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 2 ลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 75-78°C นาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปแช่ใน ultrasonic bath นาน 30 นาที แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4-8°C นาน 7 วัน และ centrifuge ที่ 3000 rpm นาน 15 นาที แล้วนำ supernatant ไป ระเหยแอลกอฮอล์ออกด้วย vacuum rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 50°C และทำให้แห้งด้วย freeze dryer แล้วเก็บสารสกัดที่ได้ที่ -80°C

4.2 ศึกษาปริมาณแอนโทไซยานิน (Total anthocyanin content)

การหา Total anthocyanin content ทำโดยวิธี pH differential method (spectrometric method) นำสารสกัดมาหา dilution factor โดยนำสารสกัดที่ dilution ต่าง ๆ ผสมกับ 0.025 M potassium chloride buffer pH 1.0 และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm แล้วเลือกค่า dilution ที่อยู่ใน linear range (OD520 ประมาณ 0.2 – 1.4) มาศึกษาต่อไป

นำสารสกัดตาม dilution ที่ได้ผสมกับ 0.025 M potassium chloride buffer pH 1.0 และ 0.4 M sodium acetate pH 4.5 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 nm โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น control (การวัดค่าการดูดกลืนแสงควรวัดภายใน 20-50 นาที) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงไปหาค่า total anthocyanin content ที่แสดงในรูปแบบของ cyanidin-3-glucoside equivalent ซึ่งคำนวณได้จากสมการ

Anthocyanin content (cyanidin-3-glucoside equivalents, mg/L) = $A \times MW \times DF \times 10^3 / \epsilon \times l$

$A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH 1.0}} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH 4.5}}$

DF = dilution factor

MW (molecular weight) = 449.2 g/mol สำหรับ cyanidin-3-glucoside (cyd-3-glu)

l = pathlength in cm

$\epsilon = 26\,900$ molar extinction coefficient, in $L \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, for cyd-3-glu

10^3 = factor for conversion from g to mg.

4.3 ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (Total phenolic compound)

การหา total phenolic compound ทำได้โดยการทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent และใช้ Gallic acid ที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 mg/ml เป็น standard โดยนำ Folin-Ciocalteu reagent มาละลายในน้ำ อัตราส่วน 1:10 แล้วนำมา 5 ml ผสมกับสารสกัดที่ละลายใน 100% เมธิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม 20% sodium bicarbonate ปริมาตร 2 ml น้ำกลั่น 2 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 755 nm โดยปริมาณของ total phenolic compound ที่พบในสารสกัดจะแสดงในรูปแบบของ mg ของ gallic acid equivalent (mg GAE/ 100g dry weight ของสารสกัด) การทดลองทำซ้ำ 2 ซ้ำ

4.4 เตรียมผลึกแคลเซียมออกซาเลต โมโนไฮเดรต (COM) เพื่อใช้ในการทดลอง

นำ 10 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ มาผสมกับ 10 mM $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ในหลอดทดลองขนาด 50 ml ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ เป็น 5 mM และ $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 0.5 mM ใน 10 mM Tris buffer ที่มีเกลือ 90 mM NaCl (pH 7.3) จากนั้นนำไป vortex แล้วบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการเก็บผลึก COM โดยนำหลอดทดลองมาปั่นตกด้วยเครื่อง centrifuge ด้วยความเร็ว 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่

Supernatant เก็บตะกอนของคริสตัลมาปั่นล้างด้วย methanol จำนวนสองครั้ง รอบสุดท้ายทิ้ง methanol แล้วปล่อยให้ผลึกคริสตัลแห้งโดยบ่มที่ 37°C ซ้ำมคืน นำผลึกคริสตัล COM ที่เตรียมได้ไปตรวจสอบรูปร่าง ลักษณะ (morphology) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูความบริสุทธิ์ของผลึกที่เตรียมได้ เก็บที่อุณหภูมิห้อง จนกว่าจะนำไปใช้

4.5 ทดสอบสารสกัดจากข้าวเหนียวดำต่อการเกาะจับของผลึก COM กับเซลล์ MDCK (Adhesion)

เลี้ยงเซลล์ MDCK จำนวน 1×10^4 เซลล์ ใน 6 well plate ด้วย Complete MEM นำผลึกคริสตัล COM ที่เตรียมไว้มาตาก UV light เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปทำการทดลองกับเซลล์เพื่อป้องกันการปนเปื้อน ล้างเซลล์ MDCK ก่อนทำการทดลองด้วย plain MEM หลุมที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากข้าวเหนียวดำ ให้เป็น control ทำการ Precoat เซลล์ MDCK ด้วยสารสกัดจากข้าวเหนียวดำความเข้มข้นต่างๆ แต่จะความเข้มข้นทำ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาดูดสารสกัดออกแล้วเติมผลึก COM ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ ที่ผสมอยู่ใน complete MEM ลงไป นำไปบ่มใน humidified incubator 37°C ที่มี 5% CO_2 เมื่อครบ 30 นาที นำเซลล์มาล้างด้วย MEM 3 ครั้ง เพื่อให้เหลือเฉพาะผลึกคริสตัลที่มี adhesion กับเซลล์อย่างจำเพาะเท่านั้น ดูผลด้วยกล้อง phase-contrast microscope ถ่ายรูปผลการทดลองที่ได้ นับจำนวนผลึกนำค่าที่ได้มาคำนวณหาความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับ $p < 0.05$ ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.6 ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำต่อการตายของเซลล์ MDCK

MTS Cell Proliferation Assay Kit ทดสอบโดยเลี้ยงเซลล์ MDCK จำนวน 2×10^4 เซลล์ใน 96-well plate นำไปบ่มใน incubator 37°C ที่มี 5% CO_2 เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง เติมสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 10, 20, 50, 100, 200 และ 400 $\mu\text{g/ml}$ ลงในหลุมเซลล์โดยหลุมสุดท้ายเติม Incomplete MEM (Control) และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO_2 เป็นเวลาข้ามคืน เมื่อครบเวลาดูดสารสกัดข้าวออก และเติม Incomplete MEM ลงไปพร้อมกับเติม MTS reagent 20 μl และบ่มใน humidified incubator 37°C ที่มี 5% CO_2 จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD 490 nm ที่เวลา 30 นาที จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (Relative Ratio) โดยแทนค่าตามสมการ

$$\% \text{ Relative Ratio} = (\text{mean OD treatment} / \text{mean OD control}) \times 100$$

% True Relative Ratio = (mean OD treatment – OD Blank / mean OD control – OD Blank) x 100

4.7 ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากข้าวเหนียวต่อการเกิดภาวะเครียดของเซลล์

4.7.1 ทดสอบสารสกัดจากข้าวเหนียวต่อการเกิด oxidative stress

ทำการ Pre-coat เซลล์ MDCK ด้วยสารสกัดจากข้าวเหนียวความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมผลึกคริสตัล COM ความเข้มข้น 100 µg/ml ที่ผสมอยู่ในอาหารลงไป แล้ว incubate ใน humidified incubator 37°C ที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 1, 2, 4, 6 และ 12 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างที่ช่วงเวลาต่างๆ ไปวัด Hydrogen peroxide (H₂O₂)

4.7.2 การวัดระดับ Hydroperoxide ใน culture medium

การวัดปริมาณ H₂O₂ ใช้วิธี Fox assay ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บมาจากช่วงเวลาต่าง ๆ โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เวลาต่างๆ มา centrifuge ที่ 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อเอาผลึกคริสตัลและเศษเซลล์ออก จากนั้นนำ supernatant ไปวัดปริมาณ H₂O₂ ด้วย Hydrogen Peroxidase Assay kit แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเป็นปริมาณ H₂O₂ ในสารสกัด โดยแทนค่าในกราฟมาตรฐาน H₂O₂ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.8 ศึกษาการแสดงออกของ MCP-1 protein ด้วยวิธี Western blotting

ทำการเก็บอาหารที่ใช้เลี้ยง MDCK cells ในสภาวะต่างๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อเอาเศษเซลล์ออก จากนั้นนำ supernatant ไปทำการวิเคราะห์ด้วย ELISA kit

4.9 ศึกษาการแสดงออกของไซโตไคน์ TNF และ IL-1 ของ murine macrophage cell line Raw264.7 ที่มีการเกาะจับของผลึก COM

4.9.1 เพาะเลี้ยง murine macrophage cell line Raw264.7 ในภาวะที่มีการเกาะจับ COM

เลี้ยงเซลล์ Raw264.7 โดยเลี้ยง 1 × 10⁴ เซลล์ ใน 6 well plate ด้วย Complete DMEM นำผลึกคริสตัล COM ที่เตรียมไว้มาตาก UV light เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปทำการทดลองกับเซลล์เพื่อป้องกันการปนเปื้อน ล้างเซลล์ก่อนทำการทดลองด้วย plain DMEM หลุมที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากข้าวเหนียวให้เป็น control ทำการ Precoat เซลล์ด้วยสารสกัดจากข้าวเหนียวความเข้มข้นต่างๆ แต่ละความเข้มข้นทำ 3 ซ้ำ นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาดูดสารสกัดออกแล้วเติมผลึก COM ความเข้มข้น 200 µg/ml ที่ผสมอยู่ใน Complete DMEM ลงไป นำไปปั่นใน humidified incubator 37°C ที่มี

5% CO₂ เมื่อครบ 30 นาที นำเซลล์มาล้างด้วย DMEM 3 ครั้ง เพื่อให้เหลือเฉพาะผลึกคริสตัลที่มี adhesion กับเซลล์อย่างจำเพาะเท่านั้น เป็นเวลา 3, 6, 12, 24 ชั่วโมง

4.9.2 ศึกษาการแสดงออกของ TNF และ IL-1 mRNA ด้วยวิธี PCR

ทำการเก็บ Raw264.7 ในสภาวะต่างๆ บั่นล้างด้วย DMEM จำนวน 2 ครั้ง เติมสาร Trizol ลงใน pellet ทำการ vortex แล้วนำมาปั่นที่ความเร็ว 12000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เก็บสารละลาย ส่วนบนและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม choloform เขย่าประมาณ 15 วินาทีแล้ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 นาที จากนั้นนำมาปั่นที่ความเร็ว 12000 g เป็นเวลา 15 นาที ที่ อุณหภูมิ 4°C แล้วดูสารละลายส่วนบน ที่มีลักษณะใส จากนั้นทำการตกตะกอน RNA ด้วยการเติม isopropyl alcohol ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาปั่นที่ความเร็ว 12000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ทิ้งสารละลายส่วนบน จะเหลือตะกอนของ RNA อยู่บริเวณก้นหลอด ทำการล้าง ตะกอน RNA ด้วยการเติม 75% ethanol เขย่าแล้วนำมาปั่นที่ความเร็ว 7500 g เป็นเวลา 5 นาที ที่ อุณหภูมิ 4°C ทิ้งสารละลายส่วนบน และตาก RNA ให้แห้ง จากนั้นทำการวัดปริมาณ RNA ทั้งหมดด้วย เครื่อง spectrophotometer ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร

4.9.3 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TNF และ IL-1 ด้วยวิธี Western blotting

นำ cell pellet บ่มกับ 0.5 M EDTA 200 µl แล้ว resuspend เบบ่า ๆ เป็นเวลา 15 นาที เพื่อละลาย ผลึก เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 rpm เพื่อตกตะกอนเซลล์ บั่นล้างด้วย 0.1 M PBS 3 ครั้ง หลังจากนั้นเติม trisol 200 µl แล้วใช้ sonitor เพื่อช่วยแตกเซลล์จนไม่เห็นตะกอนเซลล์ นำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 rpm เก็บ supernatant นำไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยเครื่อง Nanodrop

นำตัวอย่างโปรตีนที่เตรียมไว้มาแยกด้วยวิธี Sodium Dodesylsulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) โดยโหลดโปรตีน 10 µg ผสมกับ loading dye (7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 120 mM DTT, 40 mM Tris-base, bromophenol blue) นำไปต้ม 95°C ประมาณ 5 นาที แล้วนำไปแยกด้วย 12.5% SDS-PAGE จากนั้นย้ายโปรตีนลงบนแผ่น nitrocellulose membrane ด้วยวิธี semidried transfer

นำแผ่น nitrocellulose membrane ล้างด้วย PBS เติม 5% Skimmed milk ที่ละลายใน TBS ที่ อุณหภูมิห้องเพื่อ block nonspecific binding 1 ชั่วโมง นำแผ่น nitrocellulose membrane บ่มด้วย primary antibody ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า การทดลองในครั้งนี้ใช้ antibody TNF receptor I และ anti-TNF α จากนั้นล้างด้วย TBS-Tween20 จำนวน 3 ครั้ง แล้วบ่ม secondary

antibody (horseradish peroxidase–conjugated antibody) 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TBS-Tween20 จำนวน 3 ครั้ง นำแผ่น nitrocellulose มาทำปฏิกิริยากับ substrate จับเวลา แล้วสังเกตแถบโปรตีนที่เกิดขึ้น

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 12 ค่าจริงที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับค่ากลางบวกหรือลบด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่ากลางเป็น (\pm S.E.M.) จากนั้นนำค่ามาหาค่าความเชื่อมั่นทางสถิติด้วยวิธี one-way analysis of variance (ANOVA) โดยใช้การทดสอบของ Turkey-HSD multiple comparison tests ที่ระดับ $p < 0.05$ ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดเมล็ดข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยด

การสกัดเมล็ดข้าวเหนียวดำบดละเอียด 375 กรัม ด้วย 75% เอทานอล พบว่าหลังการระเหยแห้ง ได้สารสกัดลักษณะเป็นผงสีม่วงเข้มน้ำหนัก 1.423 กรัม สามารถคำนวณร้อยละของการสกัดได้เท่ากับ 0.379 จากการสกัดเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยดบดละเอียด 425 กรัม ด้วย 75% เอทานอล พบว่าได้สารสกัดลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลเหลืองน้ำหนัก 2.504 กรัม สามารถคำนวณร้อยละของการสกัดได้เท่ากับ 0.589

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณสารสกัดหยาบจากเมล็ดข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยด

สายพันธุ์ข้าว	น้ำหนักสารสกัด (g)	ร้อยละของสารสกัดหยาบที่ได้เทียบกับน้ำหนักดิบก่อนสกัด (% yield dry weight)
ข้าวเหนียวดำ	1.423	0.379
ข้าวเหนียวสังข์หยด	2.504	0.589

ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระแอนโทไซยานินและสารประกอบฟีนอลรวมในสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยด

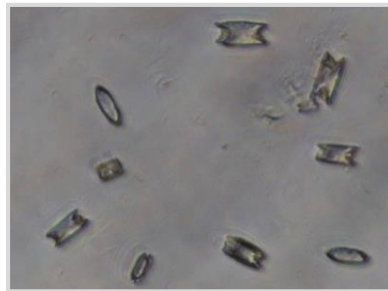
นำสารสกัดหยาบของเมล็ดข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยด มาทำการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระแอนโทไซยานิน โดยวิธี pH differential method ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำมีปริมาณแอนโทไซยานิน $23.823 \pm 0.863 \mu\text{g}$ ส่วนสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยดมีปริมาณแอนโทไซยานิน $19.566 \pm 1.269 \mu\text{g}$ ต่อน้ำหนักแห้งของผงตัวอย่าง 1 g

เมื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยดด้วยวิธี Follin Ciocalteu reagent assay เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Gallic acid พบว่าเมล็ดข้าวเหนียวดำ 1 กรัม มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเฉลี่ย $0.558 \pm 0.022 \text{ mg}$ ในขณะที่เมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยด 1 กรัม มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเฉลี่ย $0.295 \pm 0.040 \text{ mg}$

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแอนโทไซยานินและสารประกอบฟีนอลรวมจะเห็นได้ว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำมีปริมาณมากกว่าข้าวเหนียวสังข์หยดอย่างมีนัยสำคัญ

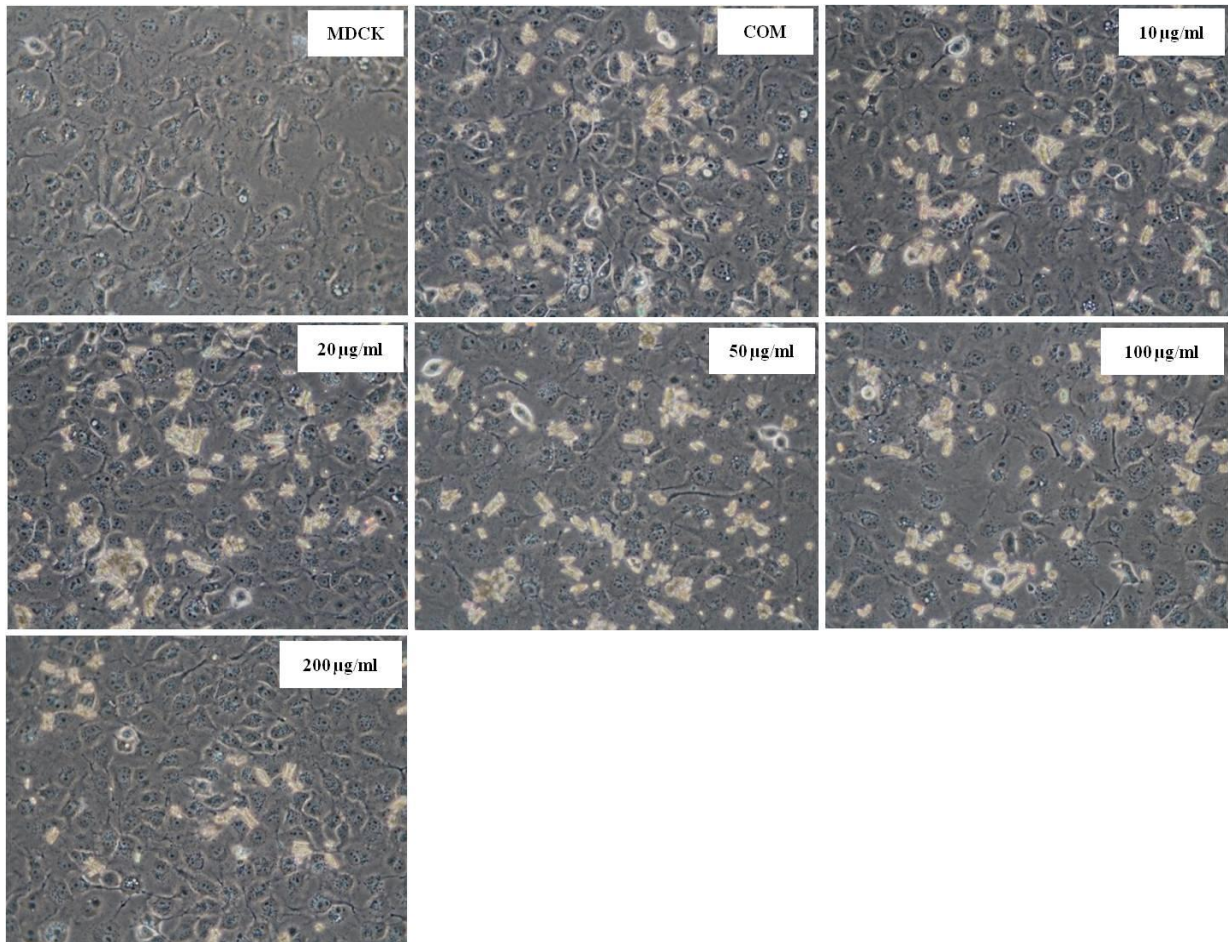
ทดสอบสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยดต่อการจับของผลึกกับเซลล์เพาะเลี้ยงท่อไตส่วนปลาย MDCK

เตรียมผลึกแคลเซียมออกซาลेटโมโนไฮเดรต โดยผสมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์และโซเดียมออกซาลेटให้ได้ความเข้มข้น 5 และ 0.5 mM ตามลำดับ นำผลึกไปอบแห้ง นำมาศึกษารูปร่างด้วยกล้องจุลทรรศน์ phase contrast พบว่าผลึก COM ที่เตรียมได้มีรูปร่างหกเหลี่ยมซึ่งเป็น typical morphology ของ COM โดยผลึก COM มีความรุนแรงในการก่อโรคในไต มากกว่าผลึกแคลเซียมออกซาลेटชนิดอื่นๆ เนื่องจากมีความคงตัวและมีแรงในการยึดจับกับเซลล์ท่อไต (adhesive force) มากที่สุด (ภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 รูปร่างพื้นฐานของผลึก COM แบบหกเหลี่ยม เมื่อวิเคราะห์ด้วย phase contrast microscope (กำลังขยาย 40 เท่า)

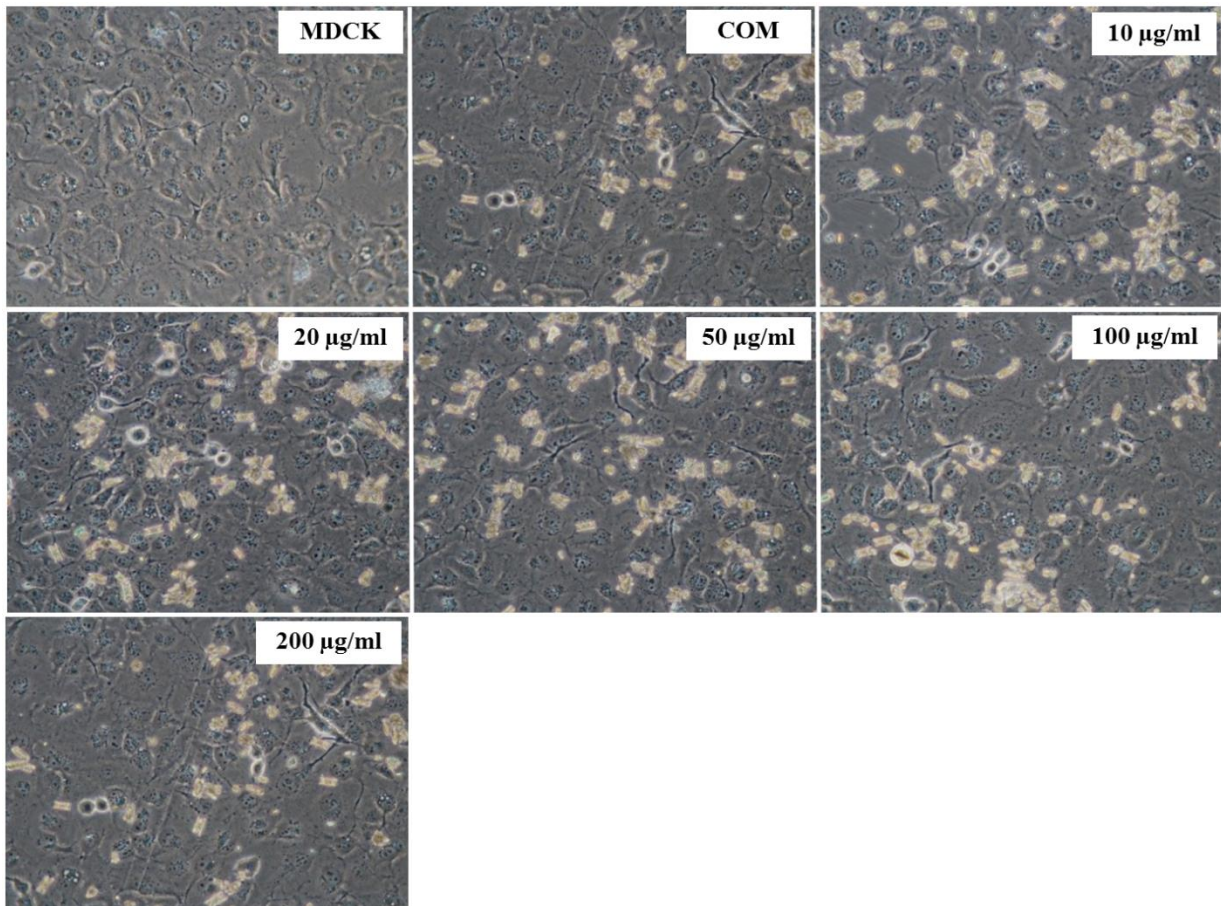
กลไกการเกิดนิ่วในไตประกอบด้วยกระบวนการ crystallization, crystal growth, crystal aggregation และ crystal adhesion ขั้นตอนวิกฤตคือการจับกันระหว่างผลึก COM ซึ่งเป็นผลึกที่มีความรุนแรงและมีแรงยึดจับกับเซลล์ท่อไตมากกว่าผลึกชนิด COD มักพบปนออกมากับปัสสาวะจำนวนมาก (crystalluria) ในผู้ป่วยนิ่วในไต โดยผลึกที่ยึดจับกับเซลล์ท่อไตจะมีขนาดใหญ่ขึ้นจนอุดตันทางเดินปัสสาวะทำให้ผู้ป่วยแสดงอาการปัสสาวะไม่ออกและมีเลือดออกปนมากับปัสสาวะ จากการทดสอบสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำ ความเข้มข้น 10 µg, 20 µg, 50 µg, 100 µg และ 200 µg ในการยับยั้งการจับกันระหว่างผลึก COM กับเซลล์ MDCK เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีเพียงผลึก COM (positive control) และกลุ่มควบคุมที่มีการเติมเพียงสารสกัด (negative control) ทำการถ่ายภาพด้วยกล้อง phase contrast microscope กำลังขยาย 40 เท่า (ภาพที่ 4.2) ทำการนับจำนวนผลึก COM ที่จับกับเซลล์ MDCK ในแต่ละสภาวะจำนวน 30 HPF โดยกลุ่ม positive control ที่เติมเพียง COM ในปฏิบัติการ มีจำนวนผลึก 102.33 ± 12.05 กลุ่มที่มีสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำ ความเข้มข้น 10 µg, 20 µg, 50 µg, 100 µg และ 200 µg/ml มีจำนวนผลึกเฉลี่ย 100.07 ± 12.30 , 99.03 ± 11.02 , 91.8 ± 9.64 , 79.03 ± 10.37 และ 68.5 ± 9.02 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.2 ภาพจากกล้อง phase contrast microscope แสดงการจับของผลึก COM กับเซลล์ MDCK ในสถานะที่มีสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 10, 20, 50, 100 และ 200 µg/ml ที่กำลังขยาย 40เท่า

ทดสอบสารสกัดจากข้าวเหนียวสังข์หยดต่อการจับของผลึกกับเซลล์เพาะเลี้ยงท่อไตส่วนปลาย MDCK

ทำการนับจำนวนผลึก COM ที่จับกับเซลล์ MDCK ในแต่ละสถานะจำนวน 30 HPF โดยกลุ่ม positive control ที่เติมเพียง COM ในปฏิกิริยา มีจำนวนผลึก 112.03 ± 20.15 กลุ่มที่มีสารสกัดจากข้าวเหนียวสังข์หยดความเข้มข้น 10 µg, 20 µg, 50 µg, 100 µg และ 200 µg/ml มีจำนวนผลึกเฉลี่ย 110.07 ± 15.40 , 105.03 ± 21.02 , 96.1 ± 20.17 , 89.34 ± 14.37 และ 76.25 ± 18.02 ตามลำดับ



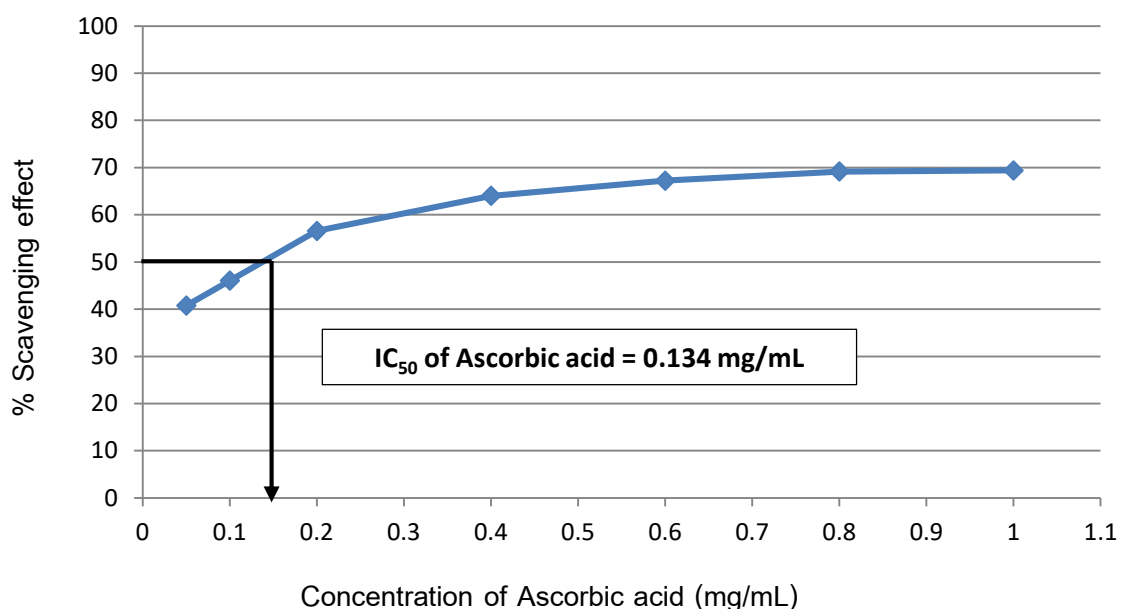
ภาพที่ 4.3 ภาพจากกล้อง phase contrast microscope แสดงการจับของผลึก COM กับเซลล์ MDCK ในสถานะที่มีสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวสังขยัดความเข้มข้น 10, 20, 50, 100 และ 200 µg/ml ที่กำลังขยาย 40 เท่า

ทดสอบความสามารถของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังขยัดในการกำจัด Hydrogen peroxide (H₂O₂) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่เป็นพิษต่อเซลล์ (cell damaging agents) ด้วยวิธี Hydrogen peroxide scavenging activity

ในภาวะปกติจะมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งจัดเป็นอนุมูลอิสระในกลุ่ม reactive oxygen species (ROS) เกิดขึ้นปริมาณหนึ่งจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ ในกรณีที่เซลล์มีความเครียด (oxidative stress) มากขึ้น เช่น จากการเกาะจับของผลึกนิวเคลียสออกซาเลตก็จะมีการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมามากขึ้น ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบความสามารถของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังขยัดซึ่งมีสารต้านอนุมูลอิสระจำนวนมาก ในการลดหรือกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้น โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานวิตามินซี (Ascorbic acid)

1. การกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 nm ของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 mg/mL มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยร้อยละของความสามารถในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (% Scavenging effect) พบว่า มีค่าเฉลี่ย 40.72, 46.01, 56.58, 64.02, 67.24, 69.15 และ 69.39 ตามลำดับ นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟโดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % scavenging effect และความเข้มข้นของ Ascorbic acid เพื่อหาความเข้มข้นที่สามารถกำจัดได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ 50% ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เริ่มต้น (IC_{50}) จากกราฟพบว่าค่า IC_{50} ของ Ascorbic acid มีค่าเท่ากับ 0.134 mg/mL (ภาพที่ 4.4)

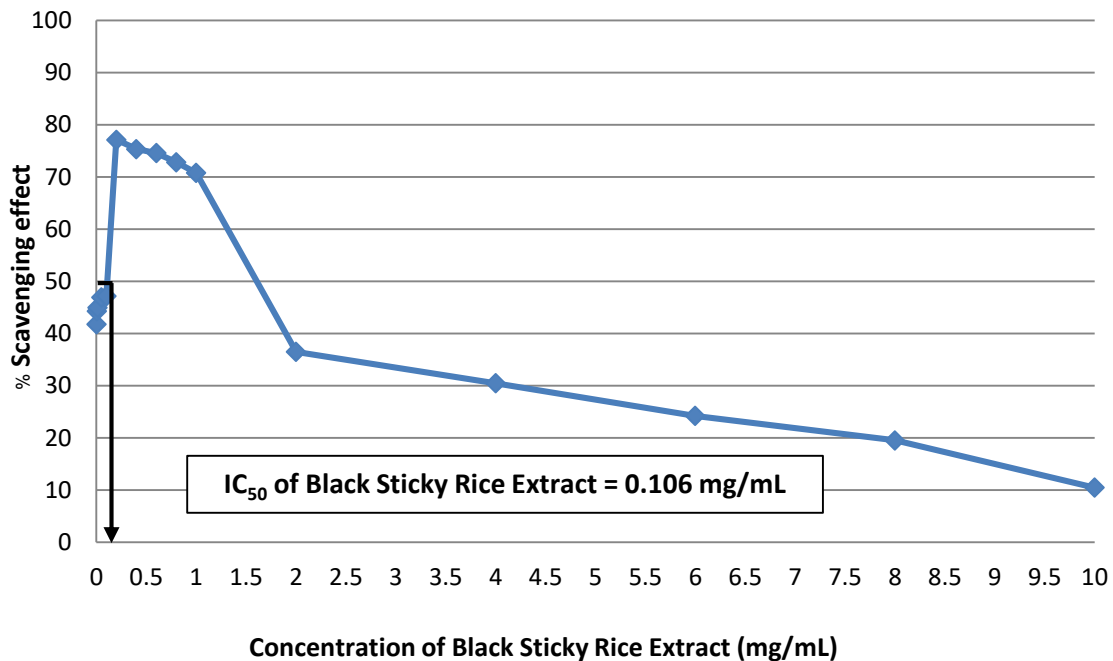


ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Ascorbic acid และค่าเฉลี่ยร้อยละของความสามารถในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (% Scavenging effect) และค่า IC_{50}

2. การกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดข้าวเหนียวดำ

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 nm ของสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 mg/mL มาคำนวณหาค่า % Scavenging effect พบว่ามีค่าเฉลี่ย 41.77, 44.27, 44.97, 46.93, 47.20, 77.10, 75.35, 74.58, 72.82, 70.78, 36.48, 30.46, 24.23, 19.51 และ 10.47 ตามลำดับ เมื่อนำค่าเฉลี่ยที่ได้มาเขียนกราฟ พบว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 mg/mL มีค่า % scavenging effect เพิ่มขึ้น

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับความเข้มข้น 0.1 mg/mL ($p \leq 0.05$) และสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 mg/mL มีค่า % scavenging effect ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้น 0.1 mg/mL ($p \leq 0.05$) เมื่อคำนวณความเข้มข้นของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่สามารถกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ 50% (IC_{50}) พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.106 mg/mL (ภาพที่ 4.5)

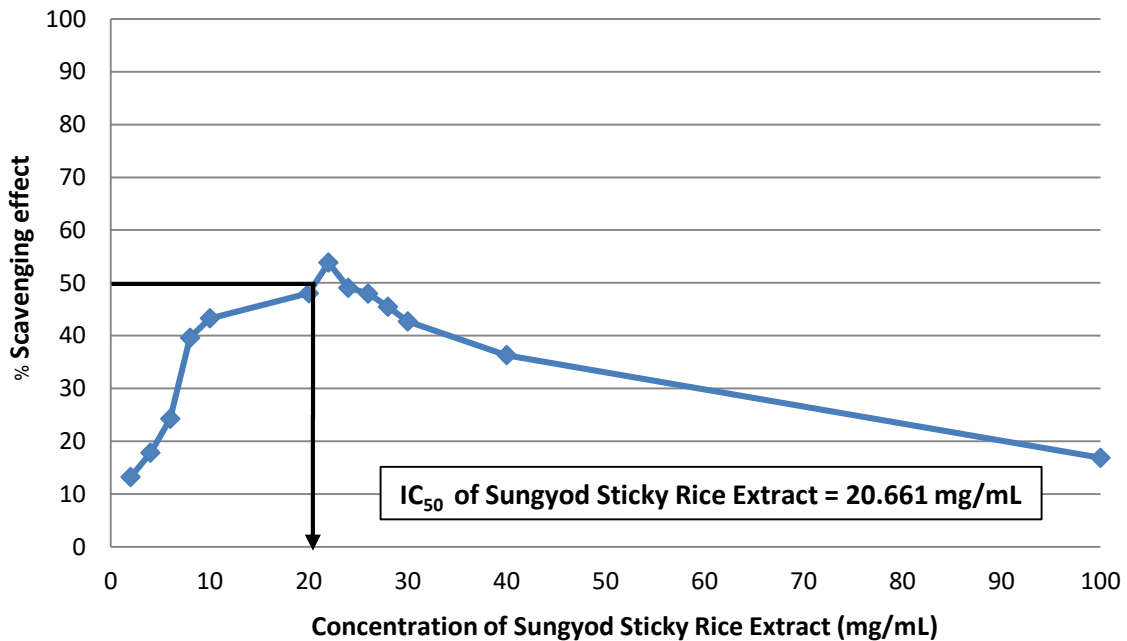


ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดข้าวเหนียวดำและค่าเฉลี่ยร้อยละของความสามารถในการกำจัด Hydrogen peroxide (% Scavenging effect) และค่า IC_{50}

3. การกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดข้าวเหนียวสังข์หยด

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 nm ของสารสกัดข้าวเหนียวสังข์หยดความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, 10, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40 และ 100 mg/mL มาคำนวณหา % Scavenging effect พบว่ามีค่าเฉลี่ย 13.21, 17.79, 24.24, 39.60, 43.26, 48.04, 53.84, 49.07, 47.97, 45.48, 42.70, 36.29 และ 16.85 ตามลำดับ เมื่อนำค่าเฉลี่ยมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % scavenging effect และความเข้มข้นของสารสกัดข้าวเหนียวสังข์หยด พบว่าที่ความเข้มข้น 8, 10, 20, 22, 24, 26, 28, 30 และ 40 mg/mL มีการเพิ่มขึ้นของ % scavenging effect อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับความเข้มข้น 2 mg/mL ($p \leq 0.05$) และที่ความเข้มข้น 40 และ 100 mg/mL มีค่า % scavenging effect ลดลงอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับความเข้มข้น 22 mg/mL ($p \leq 0.05$) ค่า IC_{50} ของสารสกัดข้าวเหนียวสังข์
หยดมีค่าเท่ากับ 20.661 mg/mL (ภาพที่ 4.6)



ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดข้าวเหนียวสังข์หยดและค่าเฉลี่ยร้อยละของความสามารถในการกำจัด Hydrogen peroxide (% Scavenging effect) และค่า IC_{50}

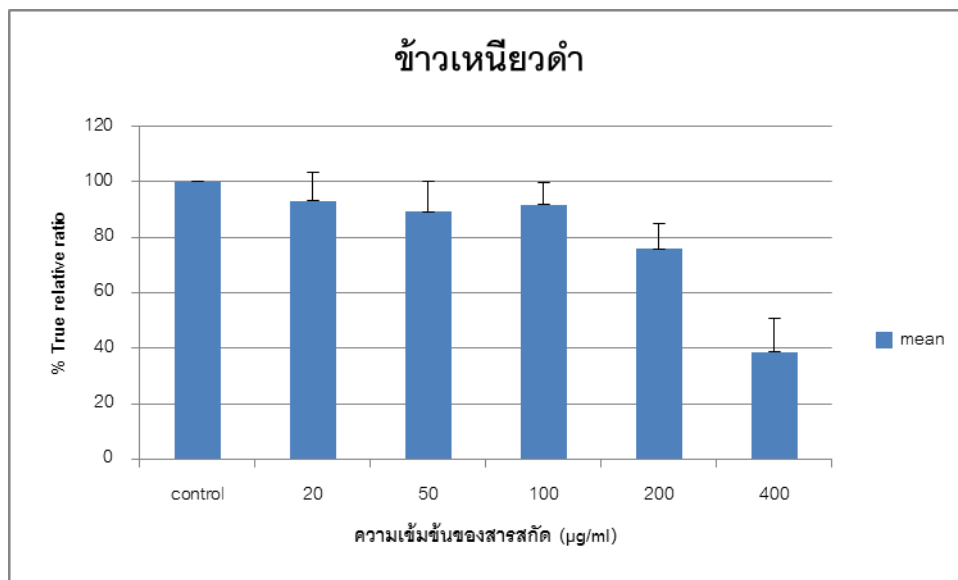
จากการศึกษาผลของการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยด จะเห็นได้ว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำสามารถกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ดีกว่าสารสกัดข้าวเหนียวสังข์หยด พิจารณาจากค่า IC_{50} สารสกัดข้าวเหนียวดำมีค่า 0.106 mg/mL ซึ่งน้อยกว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดข้าวเหนียวสังข์หยดที่มีค่า 20.661 mg/mL เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid ซึ่งมีค่า IC_{50} 0.134 mg/mL ดังนั้น จะเห็นได้ว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำสามารถกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้มากกว่าสารสกัดข้าวเหนียวสังข์หยด ประมาณ 20 เท่า และสามารถกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ใกล้เคียงกับ Ascorbic acid

ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยดต่อการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงท่อไตส่วนปลาย MDCK

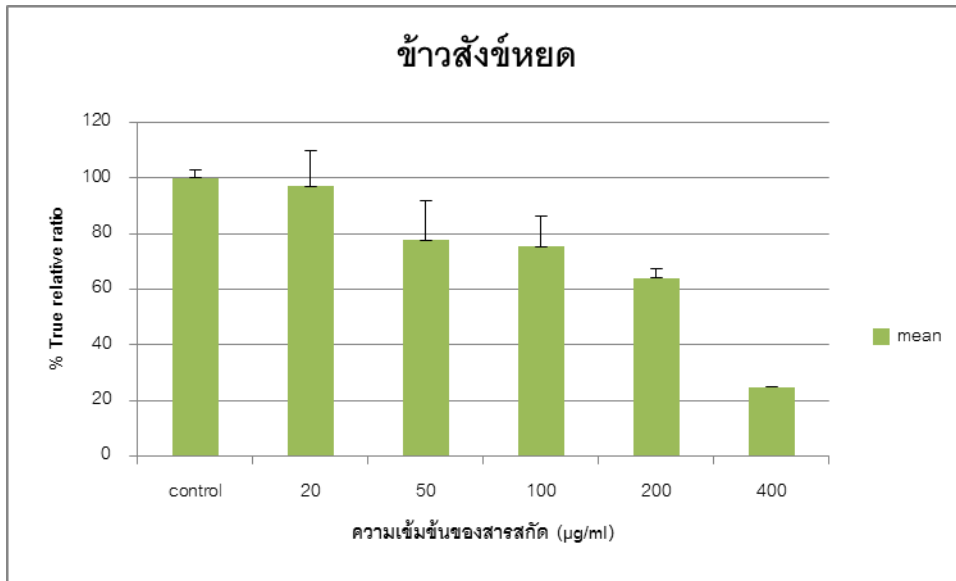
ในงานวิจัยที่ศึกษาสารสกัดจากธรรมชาติเพื่อนำมาใช้ในมนุษย์นั้น จำเป็นต้องทำการศึกษาหา toxic dose หรือปริมาณสารสกัดที่เป็นพิษกับเซลล์ ทั้งนี้เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมกับการนำไปศึกษาต่อในสัตว์ทดลองก่อนนำไปใช้ในคน ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาปริมาณของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยดที่เหมาะสม และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ท่อไตส่วนปลาย MDCK ด้วยวิธี MTS assay โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 nm แล้วนำมาคำนวณหาค่าร้อยละการมีชีวิตรอดสัมพันธ์ (% relative ratio)

$$\% \text{ relative ratio} = [\text{O.D treatment} / \text{O.D control}] \times 100$$

จากการทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยดความเข้มข้น 20, 50, 100, 200 และ 400 µg/ml กับเซลล์ MDCK พบว่า สารสกัดข้าวเหนียวดำที่ความเข้มข้น 200 และ 400 µg/ml ทำให้เซลล์มีชีวิตรอดน้อยกว่า 80% (ภาพที่ 4.7) ในขณะที่สารสกัดข้าวเหนียวสังข์หยดความเข้มข้น 50, 100, 200 และ 400 µg/ml ทำให้เซลล์มีชีวิตรอดน้อยกว่า 80% (ภาพที่ 4.8) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมคือเซลล์ MDCK ในอาหารเลี้ยงปกติ จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากข้าวเหนียวสังข์หยดมีความเป็นพิษกับเซลล์ท่อไตส่วนปลายมากกว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำ



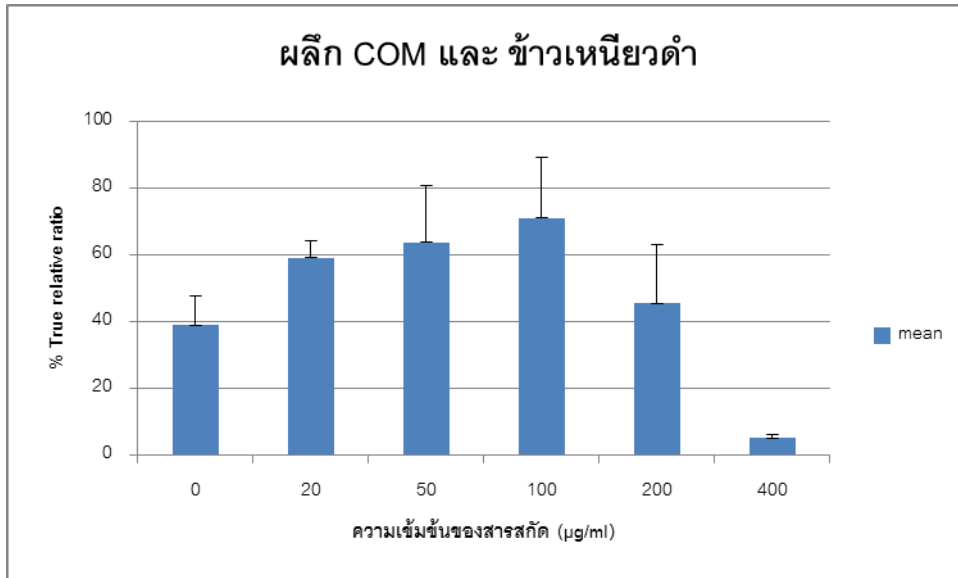
ภาพที่ 4.7 แสดงค่า % relative ratio หรือการมีชีวิตรอดสัมพันธ์ของเซลล์เพาะเลี้ยง MDCK ในสภาวะที่มีสารสกัดจากข้าวเหนียวดำความเข้มข้นต่างๆ



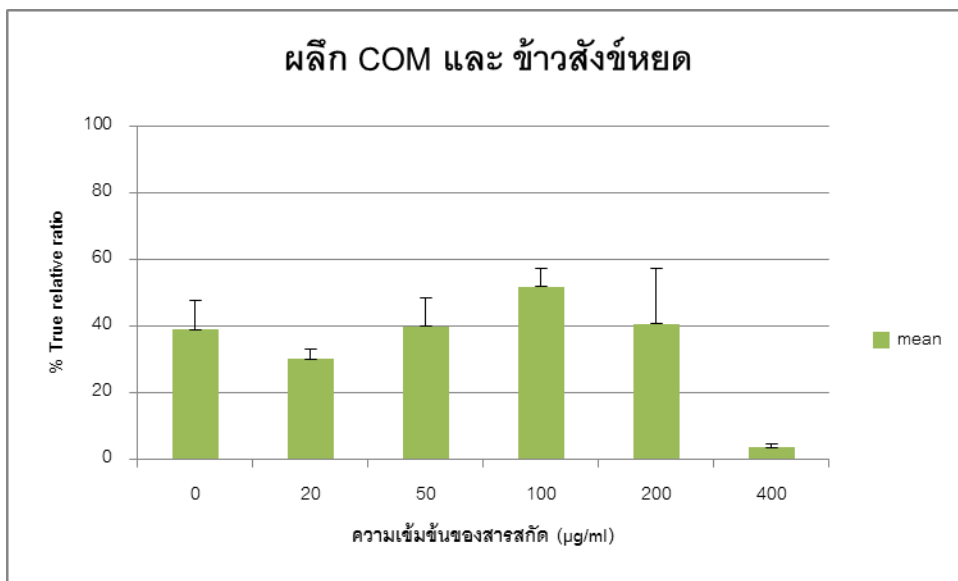
ภาพที่ 4.8 แสดงค่า % relative ratio หรือการมีชีวิตรอดสัมพันธ์ของเซลล์เพาะเลี้ยง MDCK ในสภาวะที่มีสารสกัดจากข้าวเหนียวสังข์หยดความเข้มข้นต่างๆ

ทดสอบความสามารถของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยดในการลดการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงท่อไตส่วนปลาย MDCK ในสภาวะที่มีการเกาะจับของผลึก COM

ทำการทดสอบสารสกัดข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยดความเข้มข้น 20, 50, 100, 200 และ 400 µg/ml ในการป้องกันเซลล์ MDCK จากพิษที่เกิดจากการเกาะจับของผลึก COM 200 µg/ml เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมคือ MDCK ที่มีผลึก COM แต่ไม่มีสารสกัด ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดข้าวเหนียวดำที่ 20, 50, 100, 200 µg/ml (**ภาพที่ 4.9**) และความเข้มข้นของสารสกัดข้าวเหนียวสังข์หยดที่ 100, 200 µg/ml (**ภาพที่ 4.10**) สามารถป้องกันการตายของเซลล์ท่อไตส่วนปลายจากพิษของผลึกได้ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสารสกัดจากข้าวเหนียวดำมีความสามารถในการป้องกันการตายของเซลล์ท่อไตส่วนปลายจากพิษของผลึก COM ได้ดีกว่าสารสกัดข้าวเหนียวสังข์หยด



ภาพที่ 4.9 แสดงค่า % relative ratio หรือการมีชีวิตรอดสัมพันธ์ของเซลล์เพาะเลี้ยง MDCK ในสถานะที่มีสารสกัดจากข้าวเหนียวสังข์หยดความเข้มข้นต่างๆ



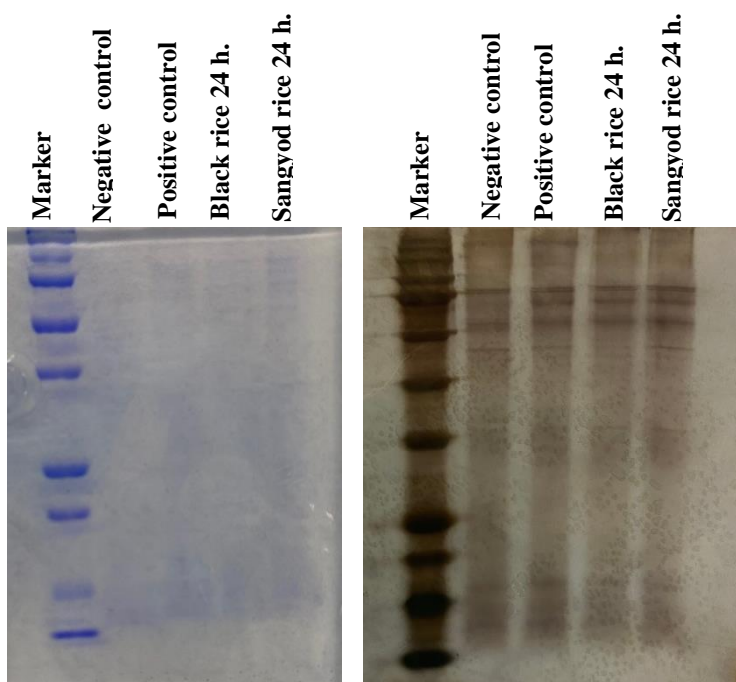
ภาพที่ 4.10 แสดงค่า % relative ratio หรือการมีชีวิตรอดสัมพันธ์ของเซลล์เพาะเลี้ยง MDCK ในสถานะที่มีสารสกัดจากข้าวเหนียวสังข์หยดความเข้มข้นต่างๆ

ศึกษาการแสดงออกของไซโตไคน์ TNF และ TNF receptor ของ murine macrophage cell line Raw264.7 ในภาวะที่มีการเกาะจับของผลึก COM

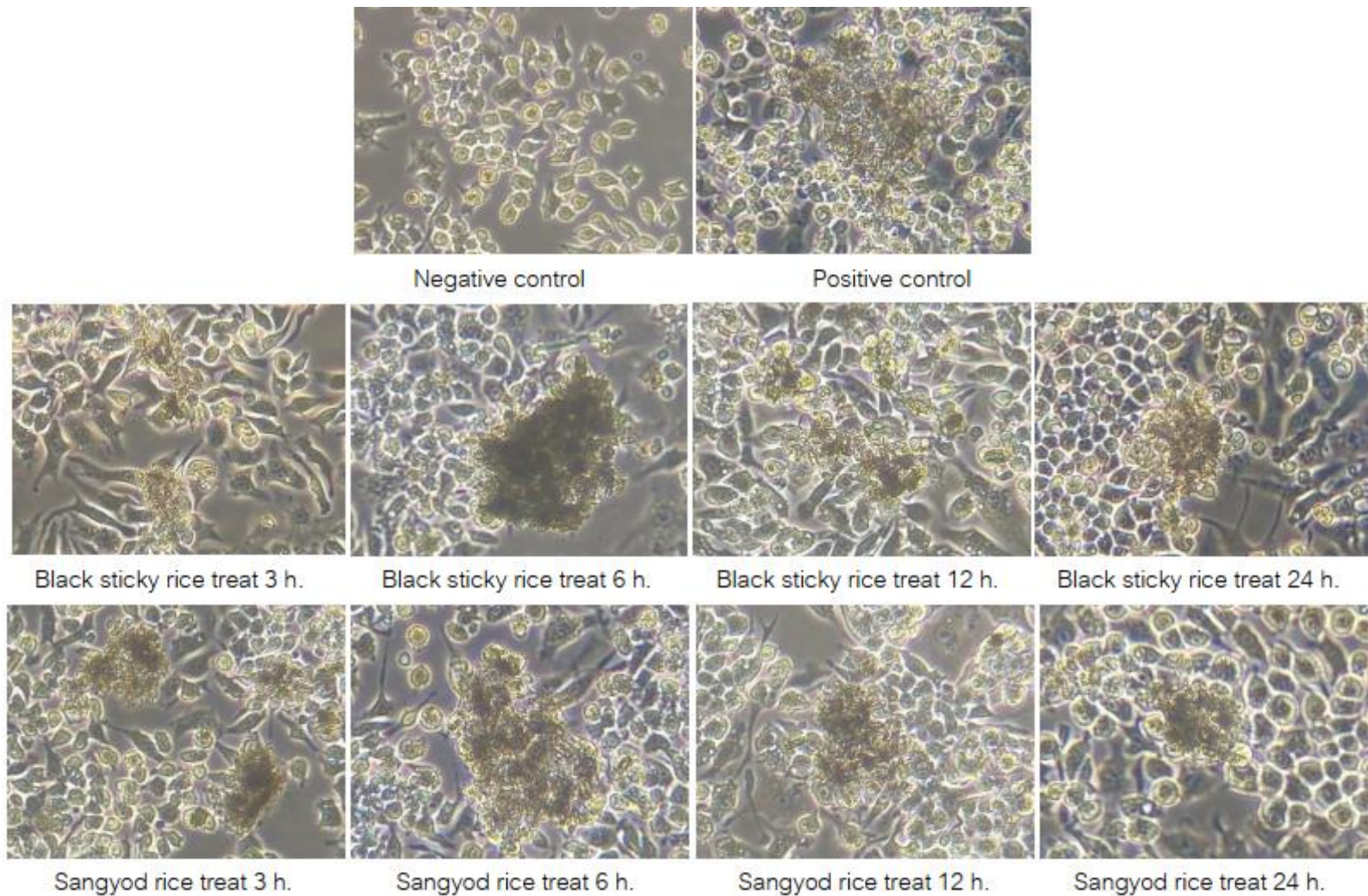
ทดสอบสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยด ในการลดการแสดงออกของไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์แมคโครฟาจ Raw264.7 ในสภาวะที่มีการอักเสบจากการเหนี่ยวนำของผลึกแคลเซียมออกซาลเลต ที่เวลา 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง

ผลการศึกษาลักษณะของเซลล์แมคโครฟาจ Raw264.7 ที่สภาวะต่างๆ พบว่าลักษณะของ เซลล์เพาะเลี้ยงที่ 24 ชั่วโมง มีรูปร่างลักษณะเปลี่ยนไปคือกลมมีการเจริญแบบซ้อนทับกันและมีการหลุดลอยเหมือนกลุ่ม positive control ซึ่งเป็นเซลล์แมคโครฟาจ Raw264.7 ที่บ่มกับผลึก COM เท่านั้น (ภาพที่ 4.11)

จากการทดลองหาปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมเพื่อทำ western blot พบว่า ปริมาณของโปรตีนที่สามารถใช้ในการทำ western blot และเห็นแถบของโปรตีนชัดเจนคือ 15 μ g ผสมกับ loading dye อัตราส่วน 1:5 แล้วย้อมด้วยสี coomassie blue และ silver stain ได้ผลการทดลองดังนี้ (ภาพที่ 4.12)



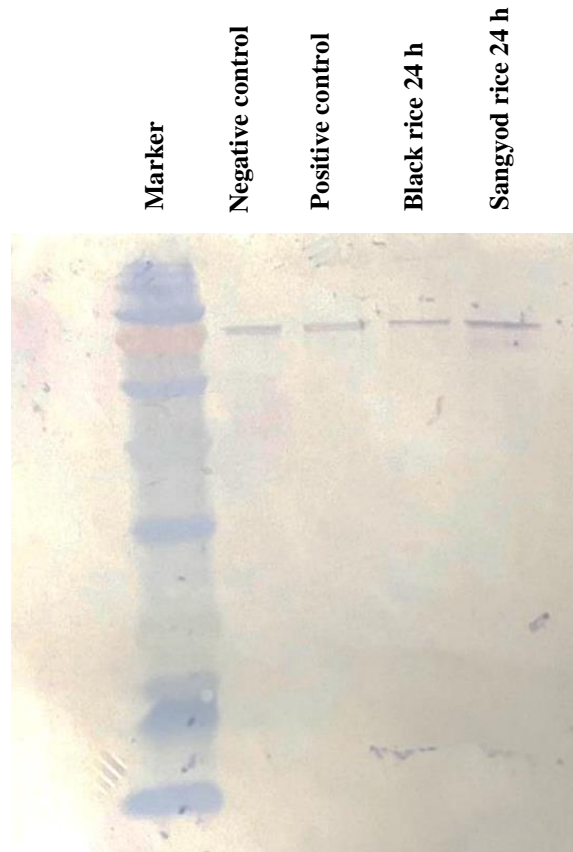
ภาพที่ 4.12 แสดงความเข้มข้นของแถบโปรตีนที่เหมาะสมในการทำ Western blotting ด้วยการทำให้ SDS-PAGE ย้อมด้วย Coomassie blue และ Silver staining



ภาพที่ 4.11 ลักษณะของ macrophage cell line Raw264.7 ในสถานะที่มีสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยดร่วมกับผลึก COM ที่เวลา 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่กำลังขยาย 400 เท่า

ผลการศึกษาการแสดงออกของ TNF receptor I (TNFR1)

โดย TNFR1 เป็นตัวรับของ TNF cytokine มีการแสดงออกบนผิวเซลล์ ผลการศึกษาด้วยวิธี western blot พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน TNFR1 ขนาด 55 กิโลดาลตัน ในกลุ่ม negative control , positive control, กลุ่มที่ป้อนกับสารสกัดข้าวเหนียวดำ 24 ชม. และกลุ่มที่ป้อนกับสารสกัดข้าวเหนียวสังข์หยด 24 ชม. จะเห็นได้ว่ากลุ่มที่ป้อนกับสารสกัดจากข้าวเหนียวสังข์หยดมีการแสดงออกของ TNFR1 เพิ่มขึ้น



ภาพที่ 4.13 ผลการแสดงออกของโปรตีน TNF receptor I ด้วยวิธี Western blot

ผลการศึกษาการแสดงออกของ TNF-alpha (TNF- α)

TNF- α เป็น pro-inflammatory cytokine ขนาด 17.4 กิโลดาลตัน ที่ถูกสร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์ activated monocytes หรือ macrophages ซึ่งจะจับกับตัวรับบนผิวเซลล์คือ TNFR1 และ TNFR2 ผลการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TNF- α จาก cell lysate ของ Raw264.7 พบว่าไม่มีการแสดงออกของโปรตีนในทุกสภาวะ

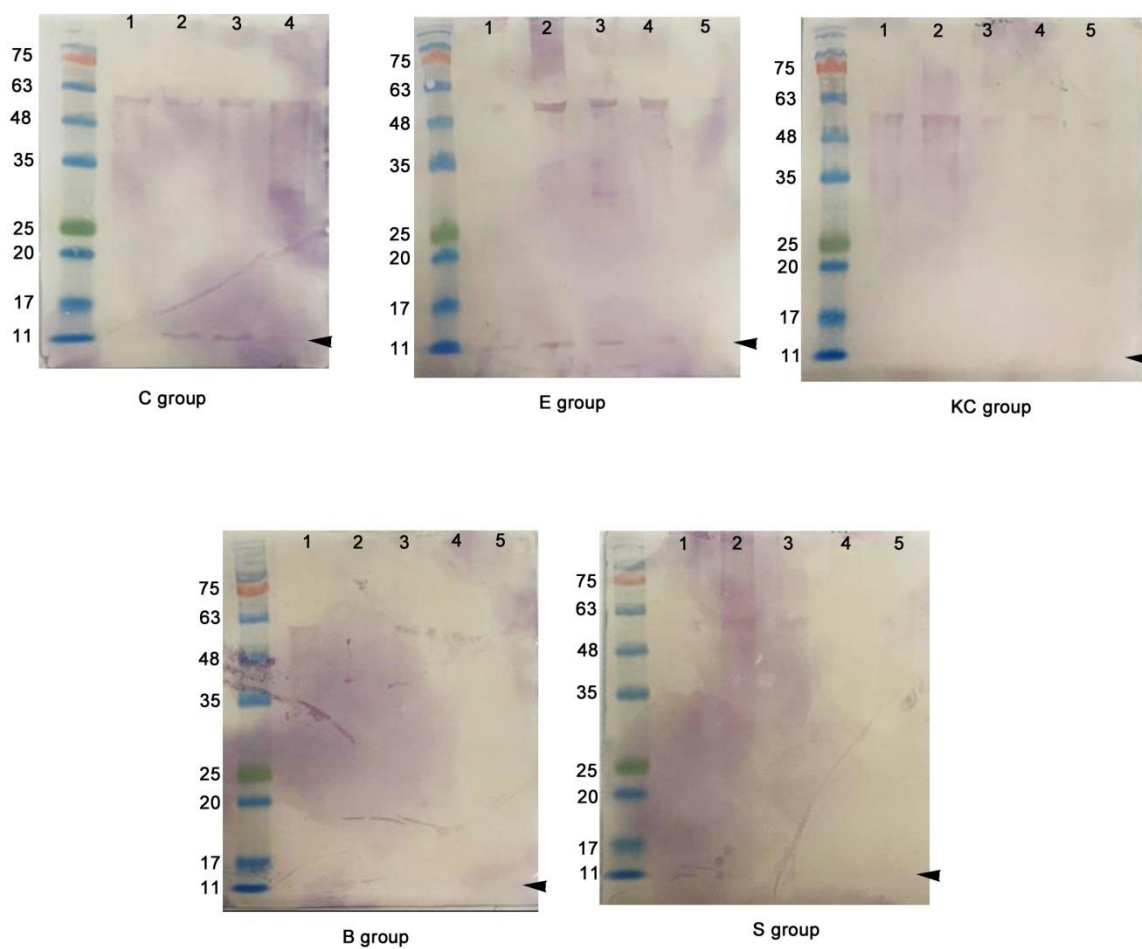


ภาพที่ 4.14 ผลการแสดงออกของโปรตีน TNF- α ด้วยวิธี Western blot

ผลการศึกษาการแสดงผลของ MCP-1 protein ด้วยวิธี Western blotting

จากการศึกษาของ ปริญญาพร วิฑูร และทิษฏยา เรืองสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยดลดการอักเสบของหนูที่ถูกเหนียวน้ำให้เป็นนิวโมโต โดยทำการแบ่งหนูทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุมหนูปกติ (C), กลุ่มที่ถูกเหนียวน้ำให้เป็นนิวด้วย ethylene glycol (E), กลุ่มที่ให้ potassium citrate แล้วให้ ethylene glycol (KC), กลุ่มที่ให้สารสกัดจากข้าวเหนียวดำแล้วให้ ethylene glycol (B), กลุ่มที่ให้สารสกัดจากข้าวเหนียวสังข์หยดแล้วให้ ethylene glycol (S)

ทำการเก็บเนื้อเยื่อไตของหนูมาศึกษาการแสดงผลของโปรตีน Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) ด้วย western blotting ผลการทดลองพบว่าการแสดงผลของโปรตีน MCP-1 ที่มีขนาด 11 กิโลดาลตัน ในกลุ่ม KC, B และ S มีการแสดงออกลดลงอย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับกลุ่ม E (ภาพที่ 4.15)



ภาพที่ 4.15 ผลการแสดงผลของโปรตีน MCP-1 ด้วยวิธี Western blot (n=5)

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

ผลการสกัดสารสำคัญจากเมล็ดข้าวเหนียวดำ ลักษณะผงสีม่วงเข้ม คิดเป็นร้อยละของการสกัดเท่ากับ 0.379 ร้อยละของสารสกัดเมล็ดข้าวเหนียวสังข์หยด ผงสีน้ำตาลแดง คิดเป็นร้อยละ 0.589 ปริมาณสารสกัดที่ได้อาจแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลาย เช่น เอทานอล อะซิโตน และเมทานอล, เวลาในการสกัด และอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (Jun, H.I., Song, G.S., Yang, E.I., Youn, Y., 2012)

ข้าวมีสารต้านอนุมูลอิสระสำคัญ คือแอนโทไซยานินซึ่งเป็นเม็ดสีหรือรงควัตถุ สะสมอยู่บริเวณเปลือกข้าวหรือรำข้าว ทำให้ปรากฏเป็นสีต่างๆ โดยเมล็ดข้าวที่มีสีดำ สีน้ำตาล และสีแดงประกอบด้วยสารหลักของแอนโทไซยานินคือ cyanidin-3-glucoside (C3G) และ penonidin-3-glucoside (P3G) โดย C3G มีมากถึง 93% ของแอนโทไซยานินทั้งหมด ความแตกต่างของปริมาณสารแอนโทไซยานินขึ้นอยู่กับความแตกต่างทางพันธุกรรม ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด และปัจจัยอื่นๆ เช่น แสงแดด เป็นต้น (Ryu, S.N., 1998; Abdel-AI, E.M., 2006; Abdel-Aal, E.M., 2003) จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากข้าวเหนียวดำมีปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ย $23.823 \pm 0.863 \mu\text{g}$ และสารประกอบฟีนอลรวม $0.558 \pm 0.022 \text{ mg}$ มากกว่าสารสกัดข้าวเหนียวสังข์หยด ที่มีปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ย $19.566 \pm 1.269 \mu\text{g}$ และสารประกอบฟีนอลรวม $0.295 \pm 0.040 \text{ mg}$ ต่อน้ำหนักแห้งของผงตัวอย่าง 1 g ทั้งนี้ข้าวสีดำมีปริมาณแอนโทไซยานินและสารประกอบฟีนอลในปริมาณมากกว่าข้าวสีขาว และสีแดง (Ryu, S.N., 1998; Zhang, M., 2006) ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีเข้มจะมีใยอาหาร แคลเซียม และสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีอ่อน (Ardiansyah, 2007)

การเกิดนิ่วในไตเริ่มจากการตกผลึกของแคลเซียมกับออกซาเลตไอออนใน distal collecting duct จนผลึกมีขนาดโตเกาะเกี่ยวกันและจับกับโมเลกุลบนผิวเซลล์ท่อไตส่วนปลาย เช่น CD44, sialic acid-containing glycoprotein, osteopontin เป็นต้น (14-18) ขั้นตอนวิกฤตคือการจับกันระหว่างผลึก COM ซึ่งเป็นผลึกที่มีความรุนแรงและมีแรงยึดจับกับเซลล์ท่อไตมากกว่าผลึกชนิดไดไฮเดรต COD ถึง 15 เท่า (11) มักพบปนออกมากับปัสสาวะจำนวนมาก (crystalluria) ในผู้ป่วยนิ่วในไต โดยผลึกที่ยึดจับกับเซลล์ท่อไตจะมีขนาดใหญ่ขึ้นจนอุดกั้นทางเดินปัสสาวะทำให้ผู้ป่วยแสดงอาการปัสสาวะไม่ออกและมีเลือดออกปนมากับปัสสาวะ จากการศึกษาด้วยวิธี *in vitro* พบว่าสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยดสามารถลดการตกผลึก การขยายขนาด การเกาะเกี่ยว และการยึดจับกับเซลล์โพวเลียงท่อไตได้แบบ

dose-dependent เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของสารสกัดจากลูกใต้ใบ ทั้งใน *In Vitro* และ *In Vivo* พบว่า สามารถยับยั้งการเกิดนิวไทรอยต์ในระยะ Growth และ Aggregation และลดการเกาะเกี่ยวระหว่างผลึกกับเซลล์บุท่อไต ทำให้การติดค้างของผลึกบริเวณท่อไตลดลง (Barros ME SN, Boim MA, 2010; Boim MA HI, Schor N., 2010) สารสกัดจากเปลือกสมอเทศ (*Terminalia arjuna*) พบว่าสามารถยับยั้งการสะสมของผลึกแคลเซียมฟอสเฟตและแคลเซียมออกซาเลตได้ (Chaudhary A, 2010)

การเกาะจับของผลึก COM กับเซลล์เยื่อบุท่อไตเป็นขั้นตอนวิกฤต สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดความเครียดสร้างอนุมูลอิสระออกมาจำนวนมาก ได้แก่ superoxide anion radical, hydrogen peroxide และ hydroxyl radical (Khan, 2004) โดยอนุมูลอิสระมีคุณสมบัติที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเนื่องจากความไม่เสถียรของโมเลกุลทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ง่ายจึงเป็นอันตรายต่อร่างกาย การเกิดของเสียในกระบวนการเมตาบอลิซึมทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย เซลล์แตกและตายในที่สุด นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังเป็นสาเหตุของการอักเสบ เซลล์เสื่อมสภาพเร็วขึ้น ผลการทดสอบความสามารถของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยดในการกำจัด Hydrogen peroxide ในสภาวะที่มีการเกาะจับของผลึก COM กับ MDCK cells พบว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำสามารถกำจัด Hydrogen peroxide ได้ดีกว่าสารสกัดข้าวเหนียวสังข์หยด ประมาณ 20 เท่า เนื่องจากสารสกัดข้าวเหนียวดำมีค่า IC_{50} 0.106 mg/mL ในขณะที่ IC_{50} ของสารสกัดข้าวเหนียวสังข์หยดที่มีค่า 20.661 mg/mL โดยสามารถกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ใกล้เคียงกับ Ascorbic acid ซึ่งมีค่า IC_{50} 0.134 mg/mL เมื่อศึกษาปริมาณเซลล์ตายพบว่าสารสกัดจากข้าวเหนียวดำสามารถป้องกันการตายของเซลล์ท่อไตส่วนปลายจากพิษของผลึก COM ได้ดีกว่าสารสกัดข้าวเหนียวสังข์หยด จากการศึกษานี้ของ ธิษฏยาและคณะปี 2557 และ 2560 พบว่าสารสกัดข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยด สามารถลดการแสดงออกของอนุมูลอิสระ 8-OHdG ภายในเซลล์ ซึ่งอันตรายต่อ DNA ในเนื้อเยื่อไตของหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นนิวไตด้วยการให้หนูกิน 0.5% ethylene glycol และสารสกัดจากข้าวทั้งสองมีผลช่วยเพิ่มการแสดงออกของสารต้านอนุมูลอิสระ Catalase และ SOD1 อีกด้วย เอนไซม์ SOD จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยนอนุมูลอิสระดังกล่าวเป็น hydrogen peroxide และจะถูกเปลี่ยนไปเป็นออกซิเจน (O_2) และน้ำ (H_2O) ด้วยเอนไซม์ Catalase

จะเห็นได้ว่าเมื่อเกิดผลึกในเนื้อเยื่อไตแล้วจะส่งผลให้เยื่อบุท่อไตถูกทำลาย ทำให้เกิดการอักเสบ เซลล์บุท่อไตที่อยู่รอบบริเวณที่มีผลึกเกาะติดถูกทำลาย พบเซลล์บวม แตก และหลุดออกจากฐานเซลล์ ที่สำคัญคือพบเม็ดเลือดขาวจำนวนมาก เช่น monocytes, macrophages, lymphocytes และ neutrophil บริเวณ renal interstitium แสดงให้เห็นว่าการอักเสบมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดนิวไต (ชาญชัย บุญหล้า,

2550) จากการศึกษาเซลล์ macrophage Raw264.7 ที่มีการเกาะจับของผลึก COM ในสภาวะที่มีสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยด พบว่าเซลล์เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างมีการเกาะกันเป็นกลุ่มและโตเป็นแนวสูง เกิดจากเซลล์ macrophage เคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่มีผลึกแคลเซียมออกซาลเลตแล้วล้อมรอบผลึกเพื่อกำจัดทำลายด้วยกระบวนการ phagocytosis ผ่านการจับของ CD44 กับ osteoponin และ fibronectin ช่วยในการกำจัดและย่อยสลายผลึกแคลเซียมออกซาลเลต (Okada, Yasui et al. 2010) เมื่อเกิดกระบวนการ phagocytosis เซลล์ macrophage จะมีการหลั่งสาร pro-inflammatory cytokines ได้แก่ TNF- α , IL-1 β , IL-8 และ IL-10 ภายในเวลา 1 ชั่วโมง TNF- α มีขนาด 17.4 กิโลดาลตัน ถูกสร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์ได้หลายชนิด ได้แก่ adipocytes, activated monocytes, macrophages, B cells, T cells และ fibroblasts ซึ่งจะจับกับตัวรับบนผิวเซลล์คือ TNFR1 และ TNFR2 จากการศึกษาด้วยวิธี western blotting พบการแสดงออกของ TNFR1 ในเซลล์ macrophage Raw264.7 ที่ป่มร่วมกับสารสกัดข้าวทั้งสองไม่แตกต่างกันเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามควรทำการวิเคราะห์ intensity ของแถบโปรตีนเพื่อความชัดเจน แต่การศึกษา TNF- α จาก cell lysate กลับไม่พบการแสดงออกเลยแม้แต่กลุ่มเดียว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณของไซโตไคน์ที่แสดงออกมามีปริมาณน้อยมากทำให้ไม่สามารถตรวจเจอ หรือเวลาที่เหมาะสม ในการตรวจหา โดยปริมาณการหลั่งขึ้นอยู่กับจำนวนของผลึกแคลเซียมออกซาลเลต (Dominguez-Gutierrez, Kusmartsev et al. 2018) โปรตีน TNF- α มี 2 isoform ได้แก่ membrane tethered form (mTNF- α) ขนาด 26 kDa หรือ secretory form (sTNF- α) ขนาด 17 kDa (Ardestani, Li et al. 2013) นอกจากนี้พบว่า เซลล์เยื่อบุไตในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากข้าว ก่อนได้รับ 0.5% ethylene glycol มีการแสดงออกของโปรตีน MCP-1 ลดลง สอดคล้องกับผลของ Umekawa, 2003 (Umekawa, Chegini et al. 2003) โดย MCP-1 เป็น chemokine สำคัญ ช่วยในการเคลื่อนที่ของ monocyte หรือ macrophage ให้เคลื่อนที่ผ่านผนังหลอดเลือด ไปยังเนื้อเยื่อที่เกิดการบาดเจ็บหรือเสียหายเพื่อตอบสนองต่อการอักเสบ (Deshmane, Kremlev et al. 2009)

ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นตอนต่อไปตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลการวิจัยที่ได้

ผลการศึกษาในครั้งนี้ช่วยเพิ่มความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารประกอบสำคัญภายในสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยด ซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นและพืชทางเศรษฐกิจสำคัญของไทย ได้แก่ แอนโทไซยานิน สารประกอบฟีนอล วิตามินต่างๆ และแกมมาออริซานอล เป็นต้น โดยสารเหล่านี้สามารถลด ยับยั้ง หรือป้องกันการเกิดโรคนี้ในไตตลอดจนลดความรุนแรงของพยาธิสภาพที่เกิดจากผลึกนิ่วแคลเซียมออกซาเลต ซึ่งเป็นนิ่วที่พบบ่อยในประชากรสูงถึงร้อยละ 80 โดยโรคนี้ในไตเป็นโรคที่พบบ่อยในประชากรไทยและประชากรทั่วโลก อย่างไรก็ตาม การศึกษาในครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาโดยใช้ *in vitro* model เท่านั้น คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาเพิ่มเติมในสัตว์ทดลองหรือ *in vivo* model ทั้งนี้เพื่อความใกล้เคียงกับการเกิดโรคนี้ในไตของมนุษย์ อีกทั้งเห็นว่าคุณสมบัติการแยกสารประกอบที่มีฤทธิ์โดยตรง ในการป้องกันโรคนี้ในไตออกมาให้ได้ปริมาณมากและมีความบริสุทธิ์ ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมป้องกันโรคนี้ในไตได้ และอาจพัฒนาเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคนี้ในไตได้โดยไม่ต้องผ่าตัด ในกลุ่มผู้สูงอายุ หรือผู้ที่มีอาการโรคอื่นๆ พร้อมกัน

ผลผลิต (output)

ปี	ผลสำเร็จที่คาดว่าจะได้รับ	ประเภท
2561	ผลจากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นผลสำเร็จเบื้องต้น (Preliminary results) ในการเพิ่มข้อมูลความรู้เกี่ยวกับความสามารถในการเป็น antioxidant ของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยด ที่สามารถยับยั้งกลไกการเกิดนิ่วในไตได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งขั้นตอนวิกฤตของการเกิดนิ่วในไตคือ การเกาะจับของผลึกคริสตัลกับเซลล์เยื่อบุท่อไต และลดการอักเสบ ในอนาคตมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการที่จะต้องศึกษาต่อเพื่อแยกสารสำคัญ	Primary Result
2562	มีการศึกษาการเพิ่มปริมาณของสารสำคัญนั้นๆ ด้วยวิธีทาง genetic engineering หลังจากนั้นจะพัฒนาสารสกัดที่ได้ให้เป็นผลิตภัณฑ์และมีการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเกิดนิ่วในไตของผู้ป่วยโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญต่อไป ซึ่งถือได้ว่าเป็นผลสำเร็จในขั้นสุดท้าย (goal results) เมื่อแผนการวิจัยในครั้งนี้ประสบความสำเร็จ จะได้สารสกัดตัวใหม่ที่ใช้ในการบำบัดรักษาหรือป้องกันการเกิดนิ่วในไต ทำให้ประชากรมีสุขภาพแข็งแรง เป็นผลให้คุณภาพชีวิตของประชาชนในประเทศดีขึ้น ซึ่งจะสอดคล้องกับแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 11 (พ.ศ. 2555-2559)	Intermediate Result

บรรณานุกรม

1. Finlayson B, Reid F. The expectation of free and fixed particles in urinary stone disease. *Invest Urol.* 1978 May;15(6):442-8.
2. Bushinsky DA. Nephrolithiasis: site of the initial solid phase. *J Clin Invest.* 2003 Mar;111(5):602-5.
3. Kok DJ, Papapoulos SE, Bijvoet OL. Crystal agglomeration is a major element in calcium oxalate urinary stone formation. *Kidney Int.* 1990 Jan;37(1):51-6.
4. Schulz E. Studies on the influence of the flow field in the pelvi-calyceal system (PCS) on the formation of urinary calculi. *Urol Res.* 1987;15(5):281-6.
5. Schulz E, Hengst E, Brundig P, Haerting R, Pirlich W, Gunther H. Disturbed urinary transport in the pelvi-calyceal system in calcium-oxalate stone patients. *Urol Res.* 1987;15(2):109-13.
6. Graves FT. An experimental study of the anatomy of the tubules of the human kidney and its relation to calculus formation. *Br J Urol.* 1982 Dec;54(6):569-74.
7. Khan SR, Glenton PA, Backov R, Talham DR. Presence of lipids in urine, crystals and stones: implications for the formation of kidney stones. *Kidney Int.* 2002 Dec;62(6):2062-72.
8. Ogbuji LU, Finlayson B. Crystal morphologies in whewellite stones: electron microscopy. *Invest Urol.* 1981 Nov;19(3):182-6.
9. Burns JR, Finlayson B. Changes in calcium oxalate crystal, morphology as a function of concentration. *Invest Urol.* 1980 Sep;18(2):174-7.
10. Thongboonkerd V, Semangoen T, Chutipongtanate S. Factors determining types and morphologies of calcium oxalate crystals: molar concentrations, buffering, pH, stirring and temperature. *Clin Chim Acta.* 2006 May;367(1-2):120-31.
11. Tomazic BB, Nancollas GH. The dissolution of calcium oxalate kidney stones. A kinetic study. *J Urol.* 1982 Jul;128(1):205-8.

12. Sheng X, Jung T, Wesson JA, Ward MD. Adhesion at calcium oxalate crystal surfaces and the effect of urinary constituents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jan 11;102(2):267-72.
13. Sheng X, Ward MD, Wesson JA. Crystal surface adhesion explains the pathological activity of calcium oxalate hydrates in kidney stone formation. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Jul;16(7):1904-8.
14. Asselman M, Verhulst A, De Broe ME, Verkoelen CF. Calcium oxalate crystal adherence to hyaluronan-, osteopontin-, and CD44-expressing injured/regenerating tubular epithelial cells in rat kidneys. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Dec;14(12):3155-66.
15. Bigelow MW, Wiessner JH, Kleinman JG, Mandel NS. Surface exposure of phosphatidylserine increases calcium oxalate crystal attachment to IMCD cells. *Am J Physiol*. 1997 Jan;272(1 Pt 2):F55-62.
16. Kumar V, Farell G, Deganello S, Lieske JC. Annexin II is present on renal epithelial cells and binds calcium oxalate monohydrate crystals. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Feb;14(2):289-97.
17. Sorokina EA, Wesson JA, Kleinman JG. An acidic peptide sequence of nucleolin-related protein can mediate the attachment of calcium oxalate to renal tubule cells. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Aug;15(8):2057-65.
18. Verkoelen CF, van der Boom BG, Kok DJ, Romijn JC. Sialic acid and crystal binding. *Kidney Int*. 2000 Mar;57(3):1072-82.
19. Verkoelen CF, Van Der Boom BG, Romijn JC. Identification of hyaluronan as a crystal-binding molecule at the surface of migrating and proliferating MDCK cells. *Kidney Int*. 2000 Sep;58(3):1045-54.
20. Coe FL, Evan A, Worcester E. Kidney stone disease. *J Clin Invest*. 2005 Oct;115(10):2598-608.
21. Ryall RL. Urinary inhibitors of calcium oxalate crystallization and their potential role in stone formation. *World J Urol*. 1997;15(3):155-64.

22. Hess B, Nakagawa Y, Coe FL. Inhibition of calcium oxalate monohydrate crystal aggregation by urine proteins. *Am J Physiol.* 1989 Jul;257(1 Pt 2):F99-106.
23. Atmani F, Khan SR. Role of urinary bikunin in the inhibition of calcium oxalate crystallization. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Nov;10 Suppl 14:S385-8.
24. Chutipongtanate S, Nakagawa Y, Sritippayawan S, Pittayamateekul J, Parichatikanond P, Westley BR, et al. Identification of human urinary trefoil factor 1 as a novel calcium oxalate crystal growth inhibitor. *J Clin Invest.* 2005 Dec;115(12):3613-22.
25. Grover PK, Resnick MI. Evidence for the presence of abnormal proteins in the urine of recurrent stone formers. *J Urol.* 1995 May;153(5):1716-21.
26. Grover PK, Ryall RL. Inhibition of calcium oxalate crystal growth and aggregation by prothrombin and its fragments in vitro: relationship between protein structure and inhibitory activity. *Eur J Biochem.* 1999 Jul;263(1):50-6.
27. Hess B. The role of Tamm-Horsfall glycoprotein and Nephrocalcin in calcium oxalate monohydrate crystallization processes. *Scanning Microsc.* 1991 Sep;5(3):689-95; discussion 96.
28. Hoyer JR. Uropontin in urinary calcium stone formation. *Miner Electrolyte Metab.* 1994;20(6):385-92.
29. Mo L, Huang HY, Zhu XH, Shapiro E, Hasty DL, Wu XR. Tamm-Horsfall protein is a critical renal defense factor protecting against calcium oxalate crystal formation. *Kidney Int.* 2004 Sep;66(3):1159-66.
30. Ryall RL, Grover PK, Stapleton AM, Barrell DK, Tang Y, Moritz RL, et al. The urinary F1 activation peptide of human prothrombin is a potent inhibitor of calcium oxalate crystallization in undiluted human urine in vitro. *Clin Sci (Lond).* 1995 Nov;89(5):533-41.
31. Ebisuno S, Nishihata M, Inagaki T, Umehara M, Kohjimoto Y. Bikunin prevents adhesion of calcium oxalate crystal to renal tubular cells in human urine. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Nov;10 Suppl 14:S436-40.

32. Okuyama M, Yamaguchi S, Yachiku S. Identification of bikunin isolated from human urine inhibits calcium oxalate crystal growth and its localization in the kidneys. *Int J Urol*. 2003 Oct;10(10):530-5.
33. Wesson JA, Johnson RJ, Mazzali M, Beshensky AM, Stietz S, Giachelli C, et al. Osteopontin is a critical inhibitor of calcium oxalate crystal formation and retention in renal tubules. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Jan;14(1):139-47.
34. Knorle R, Schnierle P, Koch A, Buchholz NP, Hering F, Seiler H, et al. Tamm-Horsfall glycoprotein: role in inhibition and promotion of renal calcium oxalate stone formation studied with Fourier-transform infrared spectroscopy. *Clin Chem*. 1994 Sep;40(9):1739-43.
35. Chutipongtanate S, Thongboonkerd V. Renal tubular cell membranes inhibit growth but promote aggregation of calcium oxalate monohydrate crystals. *Chem Biol Interact*. Dec 5;188(3):421-6.
36. Lieske JC, Deganello S, Toback FG. Cell-crystal interactions and kidney stone formation. *Nephron*. 1999;81 Suppl 1:8-17.
37. Fleming DE, Van Riessen A, Chauvet MC, Grover PK, Hunter B, van Bronswijk W, et al. Intracrystalline proteins and urolithiasis: a synchrotron X-ray diffraction study of calcium oxalate monohydrate. *J Bone Miner Res*. 2003 Jul;18(7):1282-91.
38. Grover PK, Thurgood LA, Fleming DE, van Bronswijk W, Wang T, Ryall RL. Intracrystalline urinary proteins facilitate degradation and dissolution of calcium oxalate crystals in cultured renal cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Feb;294(2):F355-61.
39. Khan SR. Renal tubular damage/dysfunction: key to the formation of kidney stones. *Urol Res*. 2006 Apr;34(2):86-91.
40. Khan SR. Crystal-induced inflammation of the kidneys: results from human studies, animal models, and tissue-culture studies. *Clin Exp Nephrol*. 2004 Jun;8(2):75-88.
41. Huang HS, Ma MC, Chen J, Chen CF. Changes in the oxidant-antioxidant balance in the kidney of rats with nephrolithiasis induced by ethylene glycol. *J Urol*. 2002 Jun;167(6):2584-93.

42. Selvam R. Calcium oxalate stone disease: role of lipid peroxidation and antioxidants. *Urol Res.* 2002 Mar;30(1):35-47.
43. Selvam R, Kalaiselvi P. Studies on calcium oxalate binding proteins: effect of lipid peroxidation. *Nephron.* 2001 Jun;88(2):163-7.
44. Chaturvedi LS, Koul S, Sekhon A, Bhandari A, Menon M, Koul HK. Oxalate selectively activates p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun N-terminal kinase signal transduction pathways in renal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2002 Apr 12;277(15):13321-30.
45. Koul HK, Menon M, Chaturvedi LS, Koul S, Sekhon A, Bhandari A, et al. COM crystals activate the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in renal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2002 Sep 27;277(39):36845-52.
46. de Water R, Leenen PJ, Noordermeer C, Nigg AL, Houtsmuller AB, Kok DJ, et al. Cytokine production induced by binding and processing of calcium oxalate crystals in cultured macrophages. *Am J Kidney Dis.* 2001 Aug;38(2):331-8.
47. Thongboonkerd V, Semangoen T, Sinchaikul S, Chen ST. Proteomic analysis of calcium oxalate monohydrate crystal-induced cytotoxicity in distal renal tubular cells. *J Proteome Res.* 2008 Nov;7(11):4689-700.
48. Semangoen T, Sinchaikul S, Chen ST, Thongboonkerd V. Proteomic analysis of altered proteins in distal renal tubular cells in response to calcium oxalate monohydrate crystal adhesion: Implications for kidney stone disease. *Proteomics Clin Appl.* 2008 Jul;2(7-8):1099-109.
49. Semangoen T, Sinchaikul S, Chen ST, Thongboonkerd V. Altered proteins in MDCK renal tubular cells in response to calcium oxalate dihydrate crystal adhesion: a proteomics approach. *J Proteome Res.* 2008 Jul;7(7):2889-96.
50. Agarwal R. Proinflammatory effects of oxidative stress in chronic kidney disease: role of additional angiotensin II blockade. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003 Apr;284(4):F863-9.
51. Grases F, Melero G, Costa-Bauza A, Prieto R, March JG. Urolithiasis and phytotherapy. *Int Urol Nephrol.* 1994;26(5):507-11.

52. Grases F, Prieto RM, Gomila I, Sanchis P, Costa-Bauza A. Phytotherapy and renal stones: the role of antioxidants. A pilot study in Wistar rats. *Urol Res.* 2009 Feb;37(1):35-40.
53. Atmani F, Farell G, Lieske JC. Extract from *Herniaria hirsuta* coats calcium oxalate monohydrate crystals and blocks their adhesion to renal epithelial cells. *J Urol.* 2004 Oct;172(4 Pt 1):1510-4.
54. Atmani F, Khan SR. Effects of an extract from *Herniaria hirsuta* on calcium oxalate crystallization in vitro. *BJU Int.* 2000 Apr;85(6):621-5.
55. Barros ME, Schor N, Boim MA. Effects of an aqueous extract from *Phyllanthus niruri* on calcium oxalate crystallization in vitro. *Urol Res.* 2003 Feb;30(6):374-9.
56. Al-Ghamdi SS, Al-Ghamdi AA, Shammah AA. Inhibition of calcium oxalate nephrotoxicity with *Cymbopogon schoenanthus* (Al-Ethkher). *Drug Metab Lett.* 2007 Dec;1(4):241-4.
57. Woottisin S, Hossain RZ, Yachantha C, Sriboonlue P, Ogawa Y, Saito S. Effects of *Orthosiphon grandiflorus*, *Hibiscus sabdariffa* and *Phyllanthus amarus* extracts on risk factors for urinary calcium oxalate stones in rats. *J Urol.* Jan;185(1):323-8.
58. Akanae W, Tsujihata M, Yoshioka I, Nonomura N, Okuyama A. *Orthosiphon grandiflorum* has a protective effect in a calcium oxalate stone forming rat model. *Urol Res.* Apr;38(2):89-96.
59. Goldfarb DS, Coe FL. Beverages, diet, and prevention of kidney stones. *Am J Kidney Dis.* 1999 Feb;33(2):398-400; discussion 1-3.
60. Touhami M, Laroubi A, Elhabazi K, Loubna F, Zrara I, Eljahiri Y, et al. Lemon juice has protective activity in a rat urolithiasis model. *BMC Urol.* 2007;7:18.
61. Jariwalla RJ. Rice-bran products: phytonutrients with potential applications in preventive and clinical medicine. *Drugs Exp Clin Res.* 2001;27(1):17-26.
62. Ebisuno S, Morimoto S, Yoshida T, Fukatani T, Yasukawa S, Ohkawa T. Rice-bran treatment for calcium stone formers with idiopathic hypercalciuria. *Br J Urol.* 1986 Dec;58(6):592-5.

63. Ohkawa T, Ebisuno S, Kitagawa M, Morimoto S, Miyazaki Y, Yasukawa S. Rice bran treatment for patients with hypercalciuric stones: experimental and clinical studies. *J Urol.* 1984 Dec;132(6):1140-5.
64. Kim MK, Kim HA, Koh K, Kim HS, Lee YS, Kim YH. Identification and quantification of anthocyanin pigments in colored rice. *Nutr Res Pract.* 2008 Spring;2(1):46-9.
65. Guo H, Ling W, Wang Q, Liu C, Hu Y, Xia M, et al. Effect of anthocyanin-rich extract from black rice (*Oryza sativa* L. indica) on hyperlipidemia and insulin resistance in fructose-fed rats. *Plant Foods Hum Nutr.* 2007 Mar;62(1):1-6.
66. Hou Z, Qin P, Ren G. Effect of anthocyanin-rich extract from black rice (*Oryza sativa* L. Japonica) on chronically alcohol-induced liver damage in rats. *J Agric Food Chem.* Mar 10;58(5):3191-6.
67. Hui C, Bin Y, Xiaoping Y, Long Y, Chunye C, Mantian M, et al. Anticancer activities of an anthocyanin-rich extract from black rice against breast cancer cells in vitro and in vivo. *Nutr Cancer.*62(8):1128-36.
68. Ichikawa H, Ichianagi T, Xu B, Yoshii Y, Nakajima M, Konishi T. Antioxidant Activity of Anthocyanin Extract from Purple Black Rice. *J Med Food.* 2001 Winter;4(4):211-8.
69. Koide T, Kamei H, Hashimoto Y, Kojima T, Hasegawa M. Antitumor effect of hydrolyzed anthocyanin from grape rinds and red rice. *Cancer Biother Radiopharm.* 1996 Aug;11(4):273-7.
70. Xia X, Ling W, Ma J, Xia M, Hou M, Wang Q, et al. An anthocyanin-rich extract from black rice enhances atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein E-deficient mice. *J Nutr.* 2006 Aug;136(8):2220-5.
71. Yang Y, Andrews MC, Hu Y, Wang D, Qin Y, Zhu Y, et al. Anthocyanin extract from black rice significantly ameliorates platelet hyperactivity and hypertriglyceridemia in dyslipidemic rats induced by high fat diets. *J Agric Food Chem.* Jun 22;59(12):6759-64.

72. Sangkitikomol W, Tencomnao T, Rocejanasaroj A. Effects of Thai black sticky rice extract on oxidative stress and lipid metabolism gene expression in HepG2 cells. *Genet Mol Res.* 9(4):2086-95.
73. Sangkitikomol W, Tencomnao T and Rocejanasaroj A. Antioxidant effects of anthocyanin-rich extract from black sticky rice on human erythrocytes and mononuclear leukocytes. *African J Biotechnol.* 2010; 9(48): 8222-8229.
74. Kuo CC, Chiang WC, Liu GP, Chien YL, Chang JY, Lee CK, Lo JM, Huang SL, Shih MC, Kuo, YH. 2, 2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical-scavenging active components from adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) hulls. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 5850–5855.
75. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucose-amine. *Jpn. J. Nutr.* 1986; 44: 307–315.

งบประมาณของโครงการวิจัยที่ได้รับการจัดสรร

ปี	ประเภทงบประมาณ	รายละเอียด	จำนวน (บาท)
2561	งบบุคลากร	ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัย เดือนละ 2000 x 12	24,000
2561	งบดำเนินการ : ค่าตอบแทน	ค่าตอบแทนผู้วิจัย 3 คน (คนละ 20,500)	61,500
2561	งบดำเนินการ : ค่าใช้สอย	ค่าเบี้ยเลี้ยง ค่าเช่าที่พัก ค่าพาหนะ และ ค่าลงทะเบียนในการนำเสนอผลงานใน การประชุมวิชาการ	30,000
2561	งบดำเนินการ : ค่าใช้สอย	ค่าอาหารเลี้ยงเซลล์ fetal bovine serum, culture media MEM, RPMI1640, antibiotic, 0.25% trypsin, PBS buffer ค่าข้าว, ค่าสารเคมี เช่น alcohol, calcium chloride, sodium oxalate, NaCl, Tris buffer, สารเคมีวิเคราะห์ Fox assay, chloroform, isopropyl alcohol - ค่า MTS assay kit - ค่าใช้สอยทำ PCR - ค่าชุดทดสอบ ELISA ได้แก่ MCP-1, TNF และ IL-1	300,000
2561	งบดำเนินการ : ค่าวัสดุ	- วัสดุวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องแก้ว, culture plate, flasks, pipet tips, disposable pipette, eppendorf tube - วัสดุสำนักงาน	138,000
	รวม		553,500
2561	งบดำเนินการ : ค่าธรรมเนียม อุดหนุนสถาบัน	ค่าธรรมเนียมอุดหนุนสถาบัน 10%	61,500
	รวม		61500
	รวมตลอดโครงการ		615,000

รายงานงบประมาณของโครงการวิจัย 12 เดือน

ปี	ประเภทงบประมาณ	รายละเอียด	จำนวน (บาท)
2561	งบบุคลากร	ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัย เดือนละ 2,000 x 12	24,000
2561	งบดำเนินการ : ค่าตอบแทน	ค่าตอบแทนผู้วิจัย 3 คน (คนละ 20,500)	61,500
2561	งบดำเนินการ : ค่าใช้สอย	ค่าเบี้ยเลี้ยง ค่าเช่าที่พัก ค่าพาหนะ และ ค่าลงทะเบียนในการนำเสนอผลงานใน การประชุมวิชาการ	-
2561	งบดำเนินการ : ค่าใช้สอย	ค่าอาหารเลี้ยงเซลล์ fetal bovine serum, culture media MEM, RPMI1640, antibiotic, 0.25% trypsin, PBS buffer ค่าข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวสังข์หยด, ค่าสารเคมี เช่น alcohol, calcium chloride, sodium oxalate, NaCl, Tris buffer, สารเคมีในการวิเคราะห์, chloroform, isopropyl alcohol - ค่า MTS assay kit	221,150
2561	งบดำเนินการ : ค่าวัสดุ	- วัสดุวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องแก้ว, culture plate, flasks, pipet tips, disposable pipette, appendorf tube - วัสดุสำนักงาน เช่น กระดาษ สมุด ก่อ่ง เก็บวัสดุอุปกรณ์ ฯลฯ	138,000
	รวม		444,650
2561	งบดำเนินการ : ค่าธรรมเนียม อุดหนุนสถาบัน	ค่าธรรมเนียมอุดหนุนสถาบัน 10%	55,350
	รวมตลอดโครงการ		500,000

ภาคผนวก

1. การเตรียมสารเคมี สำหรับการเก็บเนื้อเยื่อไต

1.1 การเตรียม 4% Paraformaldehyde ใน 0.01 PBS, pH 7.4, ปริมาตร 100 ml

ชั่งสาร Paraformaldehyde	4	g
เติม 0.01 PBS	70	ml
(ปรับค่า pH จนได้ค่า 7.4)		
เติม 0.01 PBS ลงไปให้ถึง	100	ml

กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง ก่อนเก็บที่ 4°C

1.2 การเตรียม 10% Sucrose ใน 0.1 PBS, pH 7.4, ปริมาตร 600 ml

ชั่งสาร Sucrose	60	g
เติม 0.1 PBS	600	ml

ทำการต้มจนสารละลาย

1.3 การเตรียม 30% Sucrose ใน 0.1 PBS, pH 7.4, ปริมาตร 600 ml

ชั่งสาร Sucrose	180	g
เติม 0.1 PBS	600	ml

ทำการต้มจนสารละลาย

2. การเตรียมสารเคมี สำหรับสกัดเนื้อเยื่อไตขวา

2.1 การเตรียม Lysis buffer (Protien homogenizing buffer), pH 7.6, ปริมาตร 100 ml

ชั่งสาร Tris-HCL (25mM)	0.394	g
ชั่งสาร NaCl (150 mM)	0.8766	g
Ethylene glycol	1	ml
1 mM EDTA		
(Ethylene diamine tetra-acetic acid)	1	ml
1% SDS	1	ml
PMSF inhibitor 0.1 g ละลายในเมทานอล	1	ml

3. การเตรียมสารเคมี สำหรับการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford

3.1 การเตรียม Serial dilution BSA

จาก BSA 1.26 mg ปริมาตร 1 ml ความเข้มข้น 1 mg/ml ให้ได้ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 50, 100, 200, 400, 800 และ 1000 ปริมาตรละ 50 µl

Serial dilution	โปรตีน BSA (μ l)	Distilled water (μ l)
50	2.5 μ l	47.5 μ l
100	5 μ l	45 μ l
200	10 μ l	40 μ l
400	20 μ l	30 μ l
800	40 μ l	10 μ l
1000	50 μ l	0 μ l

4. การเตรียมสารเคมี สำหรับวิธี (SDS-PAGE) และ Western blotting

4.1 การเตรียม 10X PBS 0.1M, pH 7.2 ปริมาตร 200 ml

ชั่งสาร $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.028	g
ชั่งสาร Na_2HPO_4 (anhydrous)	1.902	g
ชั่งสาร NaCl	17	g
เติม ddH ₂ O	150	ml
(ปรับค่า pH จนถึง 7.2)		
เติม ddH ₂ O ให้ครบ	200	ml

4.2 การเตรียม 10% SDS (sodium dodecyl sulfate) ปริมาตร 100 ml

ชั่งสาร SDS (sodium dodecyl sulfate)	10	g
เติม ddH ₂ O	100	ml
(ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง)		

4.3 การเตรียม 1X Transfer buffer, pH 9.2 ปริมาตร 1000 ml

ชั่งสาร Tris	5.81	g
ชั่งสาร Glycine	2.93	g
ชั่งสาร SDS (sodium dodecyl sulfate)	0.375	g
เติม Methanol	200	ml
(ปรับค่า pH จนถึง 9.2)		
แล้วเติม ddH ₂ O จนครบ	1000	ml

4.4 การเตรียม 10X Running buffer, pH 8.3 ปริมาตร 1000 ml

ชั่งสาร Tris	30.2	g
--------------	------	---

ซิงสาร Glycine	144	g
ซิงสาร SDS (sodium dodecyl sulfate)	10	g
(ปรับค่า pH จนถึง 8.3)		
แล้วเติม ddH ₂ O จนครบ	1000	ml
4.5 การเตรียม Sepaeating gel buffer, pH 8.8 ปริมาตร 200 ml		
ซิงสาร Tris	36.3	g
แล้วเติม ddH ₂ O	150	ml
(ปรับค่า pH ด้วย HCl จนถึง 8.8)		
แล้วเติม ddH ₂ O จนครบ	200	ml
4.6 การเตรียม Stacking gel buffer, pH 6.8 ปริมาตร 200 ml		
ซิงสาร Tris	12.11	g
แล้วเติม ddH ₂ O	150	ml
(ปรับค่า pH ด้วย HCl จนถึง 6.8)		
แล้วเติม ddH ₂ O จนครบ	200	ml
4.7 การเตรียม 10% Ammonium persulfate (APS)		
ซิงสาร APS	0.1	g
แล้วเติม ddH ₂ O	1	ml
4.8 การเตรียม Coomassie blue ปริมาตร 1000 ml		
ซิงสาร Coomassie Brilliant blue R250	0.25	g
Methanol	400	ml
Glacial acetic acid	70	ml
แล้วเติม ddH ₂ O จนครบ	1000	ml
4.9 การเตรียม Destain I ปริมาตร 1000 ml		
Methanol	400	ml
Glacial acetic acid	70	ml
แล้วเติม ddH ₂ O จนครบ	1000	ml
4.10 การเตรียม Destain II ปริมาตร 1000 ml		
Methanol	50	ml
Glacial acetic acid	70	ml
แล้วเติม ddH ₂ O จนครบ	1000	ml

4.11 การเตรียม Loading buffer (6x) ปริมาตร 10 ml

0.5 M Tris-Cl, pH 6.8	7	ml
ซ้ํงสาร SDS	1	g
Glycerol	3	ml
DTT (dithiothreitol)	0.93	g
Bromophenol blue	1.2	mg

4.12 การเตรียม 0.1% Ponceau S ใน 5% Acetic acid ปริมาตร 20 ml

ซ้ํงสาร Ponceau S	0.02	g
Acetic acid	1	ml
แล้ํวเติม ddH ₂ O จนครบ	20	ml

5. การเตรียมสารเคมี สําหรับวิธี Immunofluorescence และ Immunoperoxidase

5.1 การเตรียม 10X TBS, pH 7.9 ปริมาตร 1000 ml

ซ้ํงสาร Tris	12.1	g
ซ้ํงสาร NaCl	87.6	g
ddH ₂ O	400	ml
(ปรับคํา pH จนถึง 7.9)		
แล้ํวเติม ddH ₂ O จนครบ	1000	ml

5.2 การเตรียม 0.1% Glycine ปริมาตร 100 ml

ซ้ํงสาร Glycine	0.1	g
0.1 M PBS	100	ml