

# รายงานฉบับสมบูรณ์

## โครงการวิจัย

EFFECT OF BLACK STICKY RICE EXTRACTS ON RAT UROLITHIASIS MODEL

ผลของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำต่อการเกิดนิ่วในไตในหนูขาว

## คณะผู้วิจัย

นางสาวทิษฎยา	เสมาเงิน	หัวหน้าโครงการ
นายวิฑูร	ชาวสุข	ผู้ร่วมโครงการ
นางสาวปริญญาพร	หนูอุไร	ผู้ร่วมโครงการ

สนับสนุนโดย มหาวิทยาลัยบูรพา และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

งบประมาณแผ่นดินประจำปี ๒๕๕๗

## บทคัดย่อ

โรคนิ่วในไตเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญในหลายประเทศทั่วโลก สามารถเป็นซ้ำได้ นิ่วในไตเกิดจากการตกผลึกของแคลเซียมออกไซด์กับออกซาเลตไอออนบริเวณท่อไตส่วนปลาย ตกผลึกซ้ำๆ มีขนาดใหญ่ขึ้น (Growth) มีการเกาะเกี่ยว (Aggregation) และเกาะจับ (Adhesion) กับเซลล์เยื่อบุท่อไต จนมีขนาดใหญ่ขวางกั้นทางเดินปัสสาวะทำให้ผู้ป่วยปัสสาวะติดขัดและแสดงอาการ ชนิดของนิ่วที่พบมากที่สุดคือ นิ่วแคลเซียมออกซาเลต (Calcium oxalate, CaOx) การเกาะจับของผลึกกับเซลล์เยื่อบุท่อไตเป็นขั้นตอนวิกฤต ผลึกถูกนำเข้าสู่เซลล์เหนียวทำให้เกิดการอักเสบ มีการสร้างอนุมูลอิสระจำนวนมาก เซลล์เยื่อบุท่อไตเปลี่ยนแปลง เกิด Oxidative stresses เซลล์เสียหายและ apoptosis

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญและเป็นอาหารหลักของคนไทย มีหลายชนิดโดยเฉพาะกลุ่มเมล็ดข้าวที่มีสี เช่น ข้าวเหนียวดำ มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวขาว ได้แก่ แอนโทไซยานิน สารประกอบฟีนอล เป็นต้น ดังนั้นจึงน่าสนใจอย่างยิ่งว่า สารสกัดจากข้าวเหนียวดำอาจจะสามารถยับยั้งหรือป้องกันกลไกการเกิดนิ่วในไตได้ โดยเฉพาะการลดภาวะ oxidative stresses อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาสารสกัดจากข้าวเหนียวดำในการยับยั้งการเกิดโรคนิ่วในไตมาก่อน การศึกษาในครั้งนี้นำข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและแกลบ สกัดด้วย 75% เอทานอล นำสารสกัดไปวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power assay และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH method นำสารสกัดไปทดสอบการยับยั้งการเกิดผลึกนิ่วแบบ in vitro และทดสอบในหนูทดลองที่ถูกเหนียวทำให้เกิดนิ่วในไตด้วย 0.5% ethylene glycol เปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด เก็บไตทั้งสองข้างนำไปศึกษาการสะสมของผลึกบริเวณท่อไต ศึกษาการแสดงออกของอนุมูลอิสระ 8-OHdG ด้วยวิธี immunofluorescence และ immunoperoxidase ศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระสองตัวคือ catalase และ superoxide dismutase 1 ด้วยวิธี immunoblotting assay

ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดที่ได้ของเมล็ดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำ คิดเป็นร้อยละ 0.379 มีปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ย  $23.823 \pm 0.863$   $\mu\text{g/g}$  rice ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเฉลี่ย  $0.558 \pm 0.022$  mg gallic acid/g rice ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฉลี่ย  $0.416 \pm 0.033$  mg ascorbic acid/g rice และค่า  $\text{IC}_{50}$  ของการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 0.16 mg/ml ในขณะที่แกลบข้าวเหนียวดำมีร้อยละของสารสกัดคือ 2.274 มีปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ย  $26.501 \pm 4.770$   $\mu\text{g/g}$  ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเฉลี่ย  $5.473 \pm 0.760$  mg gallic acid/g ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฉลี่ย  $1.578 \pm 0.165$  mg ascorbic acid/g และค่า  $\text{IC}_{50}$  ของการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 0.24 mg/ml ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งกลไกการเกิดนิ่ว in vitro พบว่าสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำมีความสามารถในการลดการเติบโต การเกาะเกี่ยวของผลึก COM และลดการจับของผลึก COM กับเซลล์ MDCK แบบ dose dependent เมื่อ

ศึกษาเนื้อเยื่อไตของหนูทดลองพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดมีลักษณะของ renal epithelial cells และหน่วยไตปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ไม่ได้รับสารสกัดมีความเสียหายของเซลล์ท่อไตและมีการแสดงออกของอนุมูลอิสระ 8-OHdG หลายตำแหน่ง เมื่อศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดมีการแสดงออกของ catalase และ SOD1 มากกว่าหนูกลุ่มควบคุม 2.298 และ 2.610 เท่าตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม จะมีความสามารถในการเป็นสาร antioxidant สูงกว่าในสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำ แต่เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดแล้ว พบว่าสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำมีความสามารถในการเป็น antioxidant และยับยั้งการเกิดผลึกได้ดีกว่า การศึกษาในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อการศึกษาเพิ่มเติมและอาจนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพทางการแพทย์เพื่อเป็นทางเลือกในการนำไปใช้ในการป้องกันการเกิดโรคนี้ได้ในอนาคต

คำสำคัญ : ข้าวกล้องข้าวเหนียวดำ, เมล็ดข้าวเหนียวดำ, สารต้านอนุมูลอิสระ, แคลเซียมออกซาเลต, นิ่ว

## กิตติกรรมประกาศ

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

ดร. ทิษฎยา เสมาเงิน

หัวหน้าโครงการวิจัย

## สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารประกอบการวิจัย	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	27
บทที่ 4 ผลการทดลอง	38
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย	59
บรรณานุกรม	63
ภาคผนวก	70
การเตรียมสารเคมี	
การเผยแพร่ผลงานวิจัยแบบปากเปล่า	

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสดงรูปร่างผลึกแคลเซียมออกซาลेट	4
2.2 ภาพแสดงการยึดจับของผลึก CaOx กับโมเลกุลบนผิวเซลล์ distal collecting duct	4
2.3 แสดง proposed model การตอบสนองของเซลล์เยื่อบุท่อไตต่อการเกิด oxidative stresses	7
2.4 ลักษณะและองค์ประกอบของเมล็ดข้าว	11
2.5 แสดงโครงสร้างทางเคมีของแอลฟาแคโรทีน และเบต้าแคโรทีน	23
2.6 แสดงโครงสร้างของแอนโทไซยานินที่ pH ต่างๆ	24
2.7 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Gallic acid	25
4.1 การศึกษา dilution factor ที่เหมาะสมของสารสกัดในการวัดปริมาณแอนโทไซยานิน	39
4.2 ปริมาณแอนโทไซยานินจากสารสกัดจากเมล็ดข้าวและแกลบข้าวเหนียวดำ	39
4.3 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid	40
4.4 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดจากเมล็ดข้าวและแกลบข้าวเหนียวดำ ที่ความเข้มข้นต่างๆ	41
4.5 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดจากเมล็ดข้าวและแกลบข้าวเหนียวดำ ต่อน้ำหนักแห้งของผงข้าว 1 กรัม	42
4.6 แสดงกราฟมาตรฐานของ ascorbic acid ความเข้มข้นต่างๆ ในการรีดิวซ์เหล็ก	43
4.7 แสดงความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กของสารสกัดจากเมล็ดข้าวและแกลบข้าวเหนียวดำ ที่ความเข้มข้นต่างๆ	44
4.8 แสดงความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กของสารสกัดจากเมล็ดข้าวและแกลบข้าวเหนียวดำ ต่อน้ำหนักแห้งของผงข้าว 1 กรัม	44
4.9 แสดงความสามารถของสารมาตรฐาน ascorbic acid ในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ 50%	45
4.10 แสดงความสามารถของสารสกัดในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ 50%	46
4.11 แสดง IC <sub>50</sub> ของสารมาตรฐาน ascorbic acid เปรียบเทียบกับสารสกัด	46
4.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ ascorbic acid และ ค่าเฉลี่ยร้อยละของความสามารถในการกำจัด hydrogen peroxide	47

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ ascorbic acid และค่าเฉลี่ยร้อยละของความสามารถในการกำจัด hydrogen peroxide	47
4.14 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ phase contrast แสดงขนาดผลึก CaOx ในสภาวะที่มีสารสกัดข้าวเหนียวดำ	49
4.15 กราฟแสดงจำนวนผลึก COM เฉลี่ยในสภาวะที่มีสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำ	50
4.16 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ phase contrast แสดงการเกาะเกี่ยวผลึก CaOx ในสภาวะที่มีสารสกัดข้าวเหนียวดำ	51
4.17 กราฟแสดงจำนวน aggregated form ของ COM เฉลี่ยในสภาวะที่มีสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำ	52
4.18 รูปร่างพื้นฐานของผลึก COM แบบหกเหลี่ยม	53
4.19 ภาพจาก phase contrast microscope แสดงการจับของผลึก COM กับเซลล์ MDCK	54
4.20 กราฟแสดงค่ารอดชีวิตของเซลล์ที่ป่มกับสารสกัดเมล็ดข้าวเหนียวดำ	55
4.21 แสดงผลการแสดงออกของอนุมูลอิสระ 8-OHdG ด้วยวิธี immunofluorescence	56
4.22 แสดงผลการแสดงออกของ 8-OHdG ด้วยวิธี immunoperoxidase	57
4.23 การแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ catalase และ SOD1 ด้วยวิธี western blot	58

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงปริมาณสารอาหารในข้าวชนิดต่างๆ 100 กรัมข้าวสาร	13
4.1 แสดงปริมาณสารสกัดหยาบจากเมล็ดข้าวเหนียวดำ และแกลบข้าวเหนียวดำ	38



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำงานวิจัย

โรคนิ่วในไต (Kidney stone) เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญในหลายประเทศทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย สาเหตุของโรคเกิดจากหลายปัจจัย ได้แก่ ความผิดปกติของไต พันธุกรรม สภาพภูมิอากาศ โภชนาการ และพฤติกรรม เป็นต้น พบว่าเพศชายเป็นโรคนิ่วมากกว่าเพศหญิง ผู้ป่วยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปัสสาวะติดขัด ปวดบริเวณเอว ปัสสาวะขุ่นมีเลือดปน อาจเกิดการติดเชื้อ ทำให้ไตวายได้ ผู้ที่เคยเป็นนิ่วในไตแล้วมักจะเกิดเป็นซ้ำอีกในเจ็ดถึงสิบปี สำหรับก้อนนิ่วที่พบมากที่สุดของผู้ป่วยประมาณร้อยละ 80 คือ นิ่วแคลเซียมออกซาเลต (Calcium oxalate, CaOx) ชนิดโมโนไฮเดรต (Calcium oxalate monohydrate, COM) กลไกการเกิดโรคนิ่วในไตอธิบายโดย Free particle model ระบุว่าก้อนนิ่วเริ่มเกิดจากการตกผลึกของแคลเซียมไอออนกับออกซาเลตไอออนซึ่งมีความเข้มข้นสูงแบบยิ่งยวด (Supersaturation) บริเวณท่อไตส่วนปลาย (Distal collecting duct) โดยผลึกที่เกิดขึ้นในครั้งแรกจะทำหน้าที่เป็นแกน (Nucleation) เมื่อเกิดการตกผลึกซ้ำๆ ทำให้ก้อนผลึกมีขนาดใหญ่ขึ้น (Growth) มีการเกาะเกี่ยวกัน (Aggregation) และไปเกาะจับ (Adhesion) กับเซลล์เยื่อบุท่อไต จนมีขนาดใหญ่ขวางกั้นทางเดินปัสสาวะทำให้ผู้ป่วยปัสสาวะติดขัดและแสดงอาการ มีการศึกษาพบว่าการเกาะจับของผลึก COM กับเซลล์เยื่อบุท่อไตส่วนปลายนั้นเป็นขั้นตอนวิกฤตสำคัญในการเกิดนิ่วในไต โดยผลึก COM จะเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้างอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species) จำนวนมาก ทำให้เซลล์เยื่อบุท่อไตเปลี่ยนแปลง เกิดภาวะเครียด (Oxidative stresses) เซลล์เกิดความเสียหายและ apoptosis ในที่สุด รวมทั้งเกิดการอักเสบซึ่งส่งเสริมการเกิดโรคนิ่วในไตให้รุนแรงขึ้นอีกด้วย การรักษาผู้ป่วยโรคนิ่วในไต ในกรณีก้อนนิ่วมีขนาดเล็กสามารถหลุดปนออกมาทางปัสสาวะได้เอง หากก้อนนิ่วมีขนาดใหญ่ มักใช้วิธีการผ่าตัดหรือใช้เครื่องสลายนิ่ว (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 น้ำ

ผลไม้ที่มีซีตรัสสูง ได้แก่ น้ำมะนาว, น้ำส้ม และน้ำมะเขือเทศ เป็นต้น ยังไม่มีการศึกษาในข้าวมาก่อน ดังนั้น ผู้ทำวิจัยจึงสนใจที่จะศึกษา เนื่องจากข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย มีหลายชนิด เช่น ข้าวแดง, ข้าวดำ, ข้าวม่วงและรำข้าว โดยข้าวที่มีสีมีสารต้านอนุมูลอิสระปริมาณสูงกว่าข้าวขาว เช่น วิตามินอี, แกมมาโอไลโซนอล, ฟลาโวนอยด์และแอนโทไซยานิน มีรายงานว่าสารสกัดจากข้าวเหนียวดำหรือข้าวชนิดมีแอนโทไซยานินในปริมาณที่สูงกว่าข้าวแดงและข้าวดำ สามารถลดการเกิดอนุมูลอิสระและลดอัตราการตายของเซลล์มะเร็งระดับเพาะเลี้ยงได้อย่างมีนัยสำคัญ

ดังนั้นจึงเป็นหลักฐานที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่า สารสกัดจากข้าวเหนียวดำอาจจะสามารถยับยั้งกลไกการเกิดเนื้องอกได้ โดยเฉพาะการลดภาวะ oxidative stresses ที่เกิดขึ้นจากความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์ COM ซึ่งเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดความเสียหายและส่งเสริมการเกิดเนื้องอกให้รุนแรงขึ้น หากพบว่าสารสกัดจากข้าวเหนียวดำสามารถลดการเกิดเนื้องอกของหนูทดลองได้ อาจนำไปสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันการเกิดโรคหรือใช้ในการลดการเกิดซ้ำของโรคนีื้องอก ต่อไปในอนาคต อีกทั้งเป็นการส่งเสริมการพัฒนาผลิตภัณฑ์สร้างมูลค่าเพิ่มให้กับข้าวโดยการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง

## 2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาปริมาณแอนโทไซยานิน สารประกอบฟีนอลรวม และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวเหนียวดำ
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำในการยับยั้งกลไกการเกิดโรคนีื้องอกในไตในหลอดทดลอง
3. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำในการยับยั้งกลไกการเกิดโรคนีื้องอกในไตในหนูขาว

## 3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำที่มีสารต้านอนุมูลอิสระจำนวนมากต่อกลไกการเกิดโรคนีื้องอกในไต ซึ่งอาจนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในการป้องกันการเกิดโรคนีื้องอกในไตได้ในอนาคต นำสารสกัดข้าวเหนียวดำมาศึกษาปริมาณแอนโทไซยานิน สารประกอบฟีนอลรวมและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ทดสอบความสามารถในการยับยั้งกลไกการเกิดโรคนีื้องอกในไตในหลอดทดลอง ได้แก่ การตกผลึก การเติบโต การเกาะกลุ่ม และการจับของผลิตภัณฑ์กับเซลล์ท่อไตส่วนปลาย MDCK ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยการทำ MTS assay จากนั้น ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการป้องกันการเกิดเนื้องอกในไตของหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคนีื้องอกในไตด้วย polyethelene glycol นำเนื้อเยื่อไตของหนูมาวิเคราะห์การสะสมของผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีย้อมสี hematoxylin และ eosin ศึกษาการการแสดงออกของสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี immunohistochemistry และศึกษาการแสดงออกของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Western immunoblotting

## บทที่ 2

### เอกสารประกอบการทำวิจัย

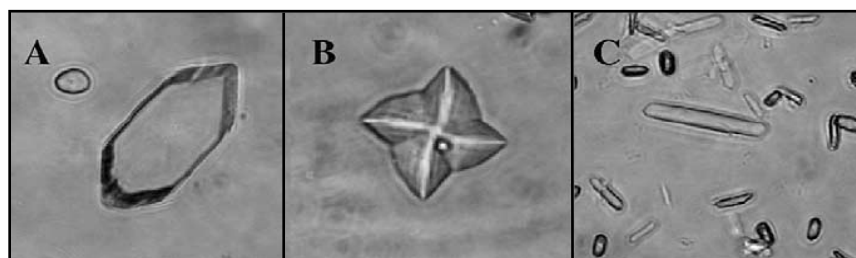
#### กลไกการเกิดโรคนิ่วในไต

กลไกการเกิดนิ่วในไตอธิบายโดย 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 จนกลายเป็นก้อนนิ่วขนาดใหญ่อุดกั้นทางเดินปัสสาวะทำให้ผู้ป่วยปัสสาวะติดขัดหรือปัสสาวะไม่ออก (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)

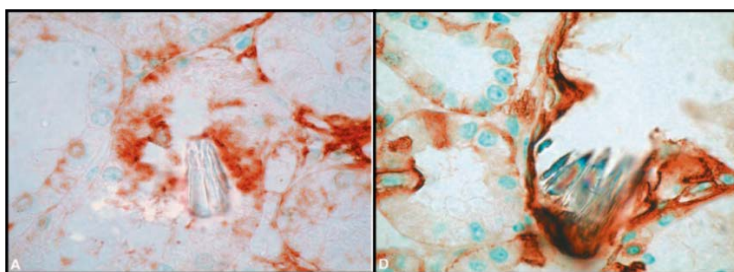
#### ลักษณะและคุณสมบัติของผลึกแคลเซียมออกซาเลต

ก้อนนิ่วที่แยกได้จากผู้ป่วย ประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึกคริสตัล 80 เปอร์เซ็นต์ อีก 2-5 เปอร์เซ็นต์เป็น Organic matrices ที่แทรกอยู่ในเนื้อผลึก ประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน ไกลโคอะมีโนไกลแคนและแร่ธาตุ (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 จะถูกเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนรูปร่างไปเป็นผลึก 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 มีความแรงในการยึดจับ (Adhesion force) สูงกว่าผลึก COD ถึง 15 เท่า (11) ทั้งนี้เนื่องมาจากการเรียงตัวของแคลเซียมและออกซาเลตไอออนบนผิวหน้าของผลึกที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นเหตุผลสำคัญสนับสนุนว่าผลึก COM นั้นมีความรุนแรงในการก่อโรคนิ่วในไต โดย COM สามารถจับกับโมเลกุลบนผิวเซลล์เยื่อบุท่อไตด้วย adhesion force มากกว่า COD จากการศึกษาค้นพบว่าผลึกคริสตัลนั้นมีประจุบวกของแคลเซียมไอออนที่ผิวหน้าซึ่งสามารถ 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** เมื่อนำชิ้นเนื้อไตของหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นนิ่วในไตมาข้อมด้วยเทคนิค immunohistochemistry จะเห็นว่าที่บริเวณ distal collecting duct มีการเกาะจับของผลึก CaOx กับไฮยาลูโรแนนและ CD44 โมเลกุล



**ภาพที่ 2.2** ภาพแสดงการยึดจับของผลึก CaOx กับโมเลกุลบนผิวเซลล์ distal collecting duct ของหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นนิ่วในไต **A.** ไฮยาลูโรแนน **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 มีการศึกษาพบว่าผู้ป่วยโรคนี้ในไตนั้นมีการแสดงออกของ stone inhibitors น้อยกว่าคนปกติ ทำให้เกิดการตกผลึกจำนวนมากและพัฒนามาเป็นโรคนิ่ว โดยโมเลกุลที่จัดเป็น stone promoters สำคัญ ได้แก่ calcium และ oxalate ions ซึ่งหากมีปริมาณสูง จะทำให้โอกาสเกิดการตกผลึกสูงขึ้นตามไปด้วย (21, 22)

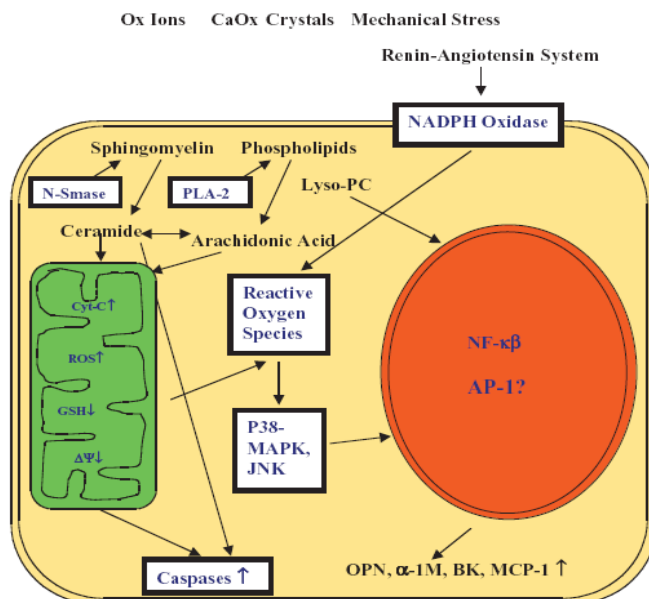
โมเลกุล Stone inhibitors นั้นมักมีประจุลบเพื่อจะ interact กับผลึกคริสตัลที่มีประจุบวกที่ผิวหน้า ตัวอย่างโมเลกุลที่พบในปัสสาวะของคนปกติคือ citrate ions, Nephrocalcin, OPN, Inter-alpha-trypsin inhibitor (ITI), Bikunin, Urinary prothrombin fragment 1 (UPTF1), Tamm-Horsfall protein (THP), Orosomucoid และ 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 แต่ส่งเสริมการเกิด adhesion เป็นต้น (34) และมีรายงานว่า Cell membranes ของ MDCK สามารถยับยั้ง crystal growth แต่ส่งเสริม crystal aggregation (35)

## การตอบสนองของเซลล์เยื่อท่อไตในภาวะที่มีการเกาะจับของผลึก CaOx

การจับของผลึก COM กับเซลล์เยื่อท่อไตนั้นเป็นขั้นตอนวิกฤตที่จะนำไปสู่การแสดงอาการของโรคนิ่วในไต (36) โดยเมื่อเกิดการยึดจับของผลึก COM กับเซลล์นั้น ผลึกจะถูก internalized ผ่านกระบวนการ endocytosis และถูกย่อยด้วยเอนไซม์ภายในถุง endolysosome (37, 38) ผลึกบางส่วนสามารถผ่าน renal epithelial layer โดยกระบวนการ transcytosis หรือ exotubulosis ทำให้เกิดการคั่งสะสมของผลึก ตัวผลึกมีความเป็นพิษต่อเซลล์ จากผลการศึกษาทั้ง *In vitro* และ *In vivo* พบว่าทำให้ cell damage มีการเสียสภาพ

ของ 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 ( $O_2^{\bullet-}$ ) 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- $\kappa$ 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) โมเดลการตอบสนองของเซลล์เยื่อหุ้มต่อไตต่อการเกิด oxidative stresses ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยผลึก COM อธิบายใน **ภาพที่ 2.3**

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



**ภาพที่ 2.3** แสดง Proposed model การตอบสนองของเซลล์เยื่อหุ้มต่อไตต่อการเกิด 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- $\kappa$ B และ AP-1 ทำให้มีการแสดงออกของ immediate early genes และมีการผลิต modulators เช่น OPN, bikunin,  $\alpha$ -1-microglobulin and MCP-1 เพิ่มขึ้น (40, 50)

### การศึกษาสมุนไพรที่ยับยั้งการเกิดโรคนิ้วในไต

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้ให้ความสนใจสารสกัดจากธรรมชาติที่มีประวัติการใช้ในการรักษาโรคนิ้วในไต เพื่อนำมาทดลองหาฤทธิ์ในการรักษาหรือยับยั้งการเกิดโรคนิ้วในไต (51) Grases และคณะทำการศึกษา

สมุนไพรเจ็ดชนิดของยุโรป คือ นางตั้งล้าง (*Verbena officinalis*), *Lithospermum officinale*, แตนดีไลออน (*Taraxacum officinale*), หญ้าถอดปล้อง (*Equisetum arvense*), *Arctostaphylos uva-ursi*, โกโบ้ (*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 และคณะทำการศึกษาศาสตร์สกัดจากต้นลูกใต้ใบ (*Phyllanthus niruri*) พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้ง crystal growth และ aggregation และยับยั้ง endocytosis ของผลึกคริสตัลเข้าสู่เซลล์ (55) Al-Ghamdi และคณะทำการศึกษาศาสตร์สกัดจากตะไคร้ โดยให้หนูทดลองที่เกิด oxalate nephrotoxicity ต้มสารสกัดพบว่าอาการดีขึ้นในขณะที่หนูที่ไม่ได้ต้มสารสกัดนั้นตาย 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) Akae และคณะศึกษาศาสตร์สกัดจากหญ้าหนวดแมว (*Orthosiphon grandiflorum*) พบว่าสามารถลดการบาดเจ็บของเซลล์จากความเป็นพิษของ oxalate และยับยั้งการคั่งของผลึกที่ท่อไตของหนูทดลองได้ (58) การเกิดนิ่วในไตนั้นสามารถป้องกันได้เช่นกัน หากเพิ่มปริมาณ Stone inhibitors ในปัสสาวะได้ ตัวอย่างเช่น การเพิ่มปริมาณ Citrate excretion โดยให้ผู้ป่วยดื่มน้ำผลไม้ที่มี citrus เช่น น้ำมะนาว น้ำส้ม, น้ำมะเขือเทศ (59, 60)

สำหรับการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากข้าวตอกกลไกในการก่อโรคนิ่วในไตนั้นมีน้อยมาก อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าส่วนของรำข้าว (Rice bran) ซึ่งมีคุณค่าทางอาหารสูงและมีสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ เช่น วิตามินบี วิตามินอี, Tocopherol, Tocotrienol และ Gamma-oryzanol สามารถป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง, hyperlipidemia, fatty liver, ภาวะแคลเซียมในปัสสาวะสูง (hypercalciuria), โรคนิ่วในไต และโรคหัวใจได้ (61) โดยพบว่ารำข้าวสามารถลดการเกิดนิ่วแคลเซียมออกซาลेटซ้ำในผู้ป่วยที่มีภาวะ hypercalciuria และลด calcium excretion ในปัสสาวะได้ (62, 63) สำหรับข้าวเหนียวดำนั้นมีสีม่วงแดงของ Anthocyanin pigments เป็นเอกลักษณ์ มีสารอาหารและมีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือมี Anthocyanin สูง



กว่าข้าวดำและข้าวแดง (64) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง ลดระดับไขมันในเลือด และ hypoglycemic effects (65-72)

อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงความสามารถของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำในการลดหรือยับยั้งกลไกการเกิดโรคนี้ในไตมาก่อน การศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นครั้งแรก โดยศึกษาความสามารถในการยับยั้ง การเติบโต การเกาะกลุ่ม และการยึดจับของผลิตภัณฑ์เซลล์ท่อไตส่วนปลาย MDCK และความสามารถในการป้องกันการเกิดนิ่วในไตของหนูทดลองที่ถูกเหนียวน้ำให้เป็นโรคนี้ในไตอีกด้วย

## ข้าวและพันธุ์ข้าว

ข้าวเป็นอาหารหลักของประชากรไทย สามารถปลูกขึ้นได้ง่ายมีความทนทานต่อทุกสภาพภูมิประเทศ จากการศึกษาของนักโบราณคดีพบว่า 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 ในเมืองไทยนิยมเพาะปลูกข้าวอินดิกานบริเวณที่ราบลุ่มตอนใต้ของแม่น้ำเจ้าพระยา ซึ่งคนไทยสมัยนั้นเรียกข้าวอินดิกาที่มาจากต่างประเทศว่า “ข้าวของเจ้า” แล้วเรียกกันสั้นลงเหลือเพียง “ข้าวเจ้า” มาถึงทุกวันนี้

### 2. ข้าวจาปอนิกา (Japonica)

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

### 3. ข้าวจาวานิกา (Javanica)

ข้าวลักษณะเมล็ดป้อมใหญ่สันนิษฐานว่า เป็นข้าวพันธุ์ผสม ระหว่าง ข้าวอินดิกาและจาปอนิกา นิยมเพาะปลูกใน อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน หมู่เกาะริวกิว และญี่ปุ่น แต่ไม่ค่อยได้รับความนิยมนักเพราะให้

ผลผลิตต่ำ ประเทศต่างๆในโลกต่างก็มีการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวใหม่ เพิ่มพื้นที่การเพาะปลูกข้าวและวิธีการปลูกข้าวให้ได้ปริมาณผลผลิตเพิ่มขึ้นในขณะที่ยานานเกี่ยวกับข้าวของแต่ละชาติต่างก็มีประวัติศาสตร์อันยาวนาน

### 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 ประกอบไปด้วย โปรตีน ไขมัน เส้นใย คาร์โบไฮเดรต เถ้า สารซิลิกา แคลเซียม ฟอสฟอรัส ลิกันิน 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

- คาร์โบไฮเดรตหรือแป้งข้าว (Starch) ข้าวจะมีแป้งอยู่ 90% ของน้ำหนักแห้ง อยู่ชั้นในสุดของเมล็ด แป้งในเมล็ดข้าวมี 2 ชนิด คือ
  - อะไมโลส (amylose) เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของกลูโคสจำนวนมากเป็นสายยาวด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,4- glycosidic bond โดยพบว่าในข้าวเหนียวจะมีอะไมโลสอยู่ประมาณ 0-2% ที่เหลือเป็นอะไมโลเพคติน ส่วนข้าวเจ้าจะมีอะไมโลสมากกว่าประมาณ 7-33% ของน้ำหนักข้าวสาร
  - อะไมโลเพคติน (amylopectin) เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของกลูโคสเป็นสายยาวด้วยพันธะ  $\alpha$  -1,4- glycosidic bond และมีการแตกกิ่งสาขาด้วยพันธะ  $\alpha$  -1,6- glycosidic bond
- โปรตีน เมล็ดข้าวมีส่วนประกอบของโปรตีนอยู่ประมาณ 9.5% เป็นอันดับสองรองจากแป้ง ปริมาณโปรตีนที่พบในเมล็ดข้าวมีความแปรปรวนขึ้นอยู่กับการปลูก และสภาพแวดล้อม โปรตีนในเมล็ดข้าวสามารถแบ่งเป็น 4 ชนิดตามคุณสมบัติในการละลายได้แก่
  - อัลบูมิน (Albumin) มีคุณสมบัติละลายได้ในน้ำ (Water soluble protein)
  - โกลบูลิน (Globulin) มีคุณสมบัติละลายได้ในน้ำเกลือ (Salt soluble protein)
  - โปรลามิน (Prolamin) มีคุณสมบัติละลายได้ในแอลกอฮอล์ (Alcohol soluble protein)
  - กลูเตลิน (Glutelin) มีคุณสมบัติละลายได้ในกรดหรือด่าง (Acid or alkali soluble protein)
- ไขมัน ไขมันที่อยู่ในเมล็ดข้าวมักจะอยู่ในสภาพเป็นหยดไขมันเล็ก ๆ ขนาดเล็กกว่า 1.5 ไมครอนอยู่บริเวณเยื่อหุ้มผิวเมล็ด (รำหยาบและรำละเอียด) และจมูกข้าว เมล็ดข้าวมีไขมัน 1.6–2.8 % ไขมันที่ได้จากข้าวเป็นไขมันชนิดที่มีคุณภาพดี มีกรดไขมันอิ่มตัว 18% กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsaturated Fatty Acid: MUFA) 45% กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated Fatty Acid: PUFA) 37% น้ำมันรำข้าว

เหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการลดคอเลสเตอรอลที่ไม่ดี (LDL-C) เพราะมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Linoleic acid, Oleic acid และ Palmitic acid) มีสาร  $\gamma$ -oryzanol ช่วยในการควบคุมระดับคอเลสเตอรอลในเส้นเลือด

4. สารต้านอนุมูลอิสระสำคัญที่อยู่ในเมล็ดข้าว ได้แก่  $\gamma$ -oryzanol โทโคฟีรอล (Tocopherol) โทโคไตรอีนอล (Tocotrienol) และ anthocyanin

จากการวิจัยเปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการของข้าว พบว่า ข้าวเหนียวดำมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด และมีปริมาณไขมันต่ำที่สุด ข้าวเจ้าวงสังข์หยดพัทลุงมีปริมาณสังกะสีสูงที่สุด และให้พลังงานต่ำที่สุด (ผาณิต รุจิรพิสิฐ และคณะ, 2555)

### ชนิดของข้าว

ข้าวสามารถแบ่งตามองค์ประกอบทางเคมีในเมล็ดข้าวสารได้ 2 ชนิด (ธัญพีช, 2543) คือ **1. ข้าวเจ้า** ประกอบด้วยแป้งประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแป้งมีองค์ประกอบสองส่วนคือ amylose เป็นโพลีเมอร์ของ D-glucose ที่ต่อกันเป็น linear chain และ amylopectin เป็นโพลีเมอร์ของ D-glucose ที่ต่อกันเป็น 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 ข้าวเหนียวที่มีสีข้าวและข้าวเหนียวดำ ประโยชน์ของข้าวเหนียวนอกจากจะมีประโยชน์ทางด้านอาหารแล้ว ยังมีประโยชน์ต่อร่างกายด้วย เช่น บำรุงร่างกาย ช่วยขับลมในร่างกาย สร้างสารอาหาร เสริมสมรรถภาพกระเพาะอาหาร และบำรุงผิวพรรณ (คุณค่าของข้าวเหนียว, 2554)

### การศึกษางานวิจัยเกี่ยวกับข้าว

ข้าวที่มีสารอาหารอยู่ครบถ้วน (**ตารางที่ 2.1**) ต้องเป็นข้าวกล้องที่มีจมูกข้าวและรำข้าวติดอยู่รอบเมล็ดในปริมาณที่มาก มีรายงานการวิจัยฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของข้าวขาว ข้าวกล้อง และข้าวกล้องอกในหนูที่ถูกเหนียวนำไปเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 พบว่าข้าวกล้องและข้าวกล้องอกสามารถปรับระดับของภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ภาวะ serum creatinine และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าในข้าวขาว (Imam et al., 2012) จากการศึกษาของไมตรี สุทธิจิตต์ และคณะ (คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา, 2555) ได้ทำการศึกษาลักษณะข้าวกล้องสูตรอารีซีชนิดผง 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 พบว่าข้าวกล้องอารีซี ช่วยให้ผู้ป่วยเบาหวานสามารถควบคุมน้ำตาล

ได้ 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 ด้านอนุมูลอิสระจึงทำให้ระบบการเผาผลาญทำงานเป็นปกติ ช่วยลดน้ำหนัก ลดความเสี่ยงต่อการเป็นเบาหวานชนิดที่ 2 ด้านมะเร็ง ลดความเสี่ยงต่อการเป็นนิ่วในถุงน้ำดี และโรคหอบหืด

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบว่าเมล็ดข้าวมีปริมาณสารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง ซึ่งปริมาณความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอล แอลฟา-โทโคฟีรอล โทโคฟีรอล นั้นจะพบในปริมาณมากบริเวณส่วนชั้นนอกของเมล็ดข้าว คือ รำข้าว และแกลบ ซึ่งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าในส่วนของแป้ง ในเมล็ดสีของข้าวยังเป็นแหล่งสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ แอนโทไซยานิน แสดงให้เห็นว่าข้าวมีสีที่มีสารแอนโทไซยานิน จะมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าข้าวที่ไม่มีสี ซึ่งจากการศึกษาแอลฟา-โทโคฟีรอลจากรำข้าว 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
ข้าวเหนียว	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 ช่วยควบคุมการขนส่งสารอาหารต่างๆ ไปทั่วร่างกาย จำเป็นต่อการป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจ และอัมพาต ลดการอักเสบของโรคไขข้อเสื่อมรูมาตอยด์ ลดอาการปวดหัวไมเกรน และปวดประจำเดือน เพิ่มภูมิคุ้มกันร่างกาย และลดอาการของโรคภูมิแพ้ ลดระดับ cholesterol ลดระดับ triglyceride และเพิ่ม HDL ในเลือด บำรุงสมอง ทำให้เกิดเลือดไม่แข็งตัวง่าย

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.  $\gamma$ -oryzanol มีประสิทธิภาพในการลดระดับ cholesterol และ triglyceride ทั้งในเลือดและในอวัยวะต่าง ๆ ทำให้หลอดเลือดไม่มีไขมันอุดตัน ไม่เป็นโรคหัวใจ โรคสมองเสื่อม โรคอัมพฤกษ์ และโรคชาตามมือ 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 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการมองเห็นเวลา

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

### การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับข้าวเหนียวดำ

เนื่องจากข้าวกล้องของข้าวเหนียวดำมีปริมาณสาร  $\gamma$ -oryzanol และสามารถสังเคราะห์สาร anthocyanin ได้มากกว่าข้าวขาว ในทางการแพทย์จึงได้มีการนำคุณสมบัตินี้มาใช้ประโยชน์โดยพบว่าสาร  $\gamma$ -oryzanol จะช่วยกระตุ้น growth Hormone ทำให้ร่างกายทำงานได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ร่างกายจึงสร้างภูมิคุ้มกันต้านต่อโรคต่าง ๆ หรือนำบำบัดอาการของโรคเรื้อรังต่าง ๆ ด้วยตัวเอง โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวกับความเสื่อม ต้านมะเร็ง อัมพฤกษ์ โรคหัวใจ ความดันโลหิต ไขมัน cholesterol เส้นเลือดตีบ โรคเก๊าท์ ไมเกรน ลดความเครียด ช่วยให้นอนหลับ แก้ปัญหาวัยทอง ปวดประจำเดือน และสมรรถภาพเพศชาย (ธวัชชัย แถวธำทำ, 2547) ในต่างประเทศได้มีการนำสาร GABA ที่พบในข้าวกล้องของข้าวเหนียวดำมาใช้ในวงการแพทย์เพื่อรักษาโรคเกี่ยวกับประสาท เช่น โรควิตกกังวล โรคนอนไม่หลับ และโรคลมชัก เพราะสาร GABA จัดอยู่ในกลุ่มกรดโปรตีนที่ช่วยบำรุงเซลล์ประสาท ทำให้สมองเกิดการผ่อนคลายป้องกันการทำลายสมอง ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคสูญเสียความทรงจำหรืออัลไซเมอร์ และสาร anthocyanin ชนิด cyanidin-3-glucoside ที่พบในข้าวเหนียวดำยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด สารสกัดในข้าวเหนียวดำยังมีคุณสมบัติช่วยสร้างเม็ดเลือดแดง สร้าง villi ในผนังลำไส้เล็กทำให้ร่างกายสามารถดูดซึมสารอาหารได้มากขึ้น ส่งผลให้ร่างกายเจริญเติบโตและแข็งแรงยิ่งขึ้น (วรรณุช ศรีเจษฎารักษ์, 2550) คุณค่าทางโภชนาการข้าวเหนียวดำ (หมูภุธร, 2008) รายงานว่าให้พลังงาน 361.00 kcal มีโปรตีน 8.20 กรัม ไขมัน 3.00 กรัม คาร์โบไฮเดรต 75.20 กรัม ไฟเบอร์ 0.90 กรัม แคลเซียม 26.00 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 65.00 มิลลิกรัม วิตามินบีหนึ่ง 0.04 มิลลิกรัม วิตามินบีสอง 0.83 มิลลิกรัม และไนอาซีน 0.60 มิลลิกรัม

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบว่าเมล็ดข้าวมีปริมาณสารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง ซึ่งปริมาณความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอล แอลฟา-โทโคฟีรอล โทโคฟีรอล นั้นจะพบในปริมาณมากบริเวณส่วนชั้นนอกของเมล็ดข้าว คือ รำข้าว และแกลบ ซึ่งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าในส่วนของแป้ง (เมล็ดข้าวที่ผ่านการขัดขาว) (Butsat and Siriamornpun, 2011) ซึ่งในเมล็ดสีของข้าวยังเป็นแหล่งสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ แอนโทไซยานิน แสดงให้เห็นว่าข้าวมีสีที่มีสารแอนโทไซยานิน จะมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าข้าวที่ไม่มีสี ซึ่งจากการศึกษาแอลฟา-โทโคฟีรอลจากรำข้าว พบว่าสามารถจำกัดอนุมูลอิสระ ปกป้องโปรตีนจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน และ lipid peroxidation ในเซลล์ แบบ *ex vivo* ได้ (Shao et al., 2011)

## อนุมูลอิสระ

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

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

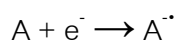
อนุมูลอิสระสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ที่อยู่รอบข้างในทันทีที่ถูกสร้างขึ้น ยังผลให้เกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ภายในร่างกาย ไม่ว่าจะเป็น การทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ การเปลี่ยนสภาพโปรตีนตลอดจนไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ หรือการสร้างพันธะโควาเลนต์กับโปรตีนหรือเอนไซม์บางชนิดจนทำให้การทำงานของโปรตีนหรือเอนไซม์นั้นๆ ผิดปกติไป เป็นต้น

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

1. การแตกของพันธะโควาเลนต์แบบโฮโมลิติกัล (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) และเรียกสารที่ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนนี้ว่า ตัวออกซิไดซ์ (oxidizing agent) โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันมักจะเกี่ยวข้องกับออกซิเจน นอกจากนี้ ออกซิเดชันยังหมายถึงการเสียไฮโดรเจนอะตอมออกจากโมเลกุลอีกด้วย ปฏิกิริยาออกซิเดชันและอนุมูลอิสระนั้นมีความเกี่ยวข้อง เนื่องจากปฏิกิริยานี้ทำให้เกิดอนุมูลอิสระของสารต่างๆ ได้มากมายหลายชนิด และอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารอื่นๆ เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไป

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

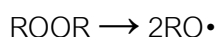
#### ขั้นอินิทิเอชัน (chain initiation)

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

##### 1. Bond homolysis

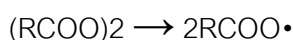
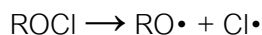
โมเลกุลของสารอินทรีย์ที่มีอิเล็กตรอนวงนอกสุด (valence electron) เป็นจำนวนคู่แล้วในทางทฤษฎีสามารถแยกออกจากกันให้ผลลัพธ์เป็นอนุมูลอิสระได้ โดยในสภาวะที่อุณหภูมิปกติ การที่อิเล็กตรอนคู่ในพันธะโควาเลนต์สามารถแยกจากกันไปให้อะตอมแต่ละตัวได้นั้น ต้องเป็นโมเลกุลที่มีพลังงานระหว่างพันธะที่

อ่อนมาก เช่น disulfide และการเกิดปฏิกิริยาจะมีอัตราที่ช้ามาก จึงคาดว่าไม่น่าจะเกิดในระบบของสิ่งมีชีวิตได้ ตัวอย่าง Bond homolysis แสดงได้ดังสมการต่อไปนี้



## 2. Photolysis

เป็นการแตกพันธะของโมเลกุลจากการดูดพลังงานแสง เช่น แสงอุลตราไวโอเล็ต ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น ที่พบมากคือการแตกพันธะของ hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) กลายเป็นอนุมูล hydroxyl ( $\text{HO}\cdot$ ) โดยในสิ่งมีชีวิตพลังงานแสงจะถูกดูดโดยโมเลกุลที่มีความไวต่อแสง เช่น รงควัตถุและสารอะโรมาติกคาร์บอนบางชนิด หลังดูดพลังงานแสงแล้วจะทำให้โมเลกุลอยู่ในสถานะที่ตื่นตัว (excited state) จึงต้องมีการปลดปล่อยพลังงานออกมาเพื่อให้โมเลกุลกลับเข้าสู่สถานะพื้น (ground state) ดังเดิม และวิธีหนึ่งของการคายพลังงานคือ การแตกพันธะของโมเลกุลเกิดเป็นอนุมูลอิสระ 2 ตัว ดังนี้



## 3. Radiolysis

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

## 4. ปฏิกิริยารีดอกซ์

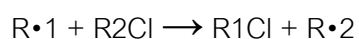
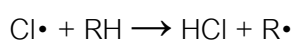
ปฏิกิริยารีดอกซ์หรือเรียกอีกอย่างว่า ปฏิกิริยาออกซิเดชันรีดักชัน เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทั่วไปในระบบทางชีววิทยา ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันบางชนิดมีประโยชน์ แต่มีปฏิกิริยาออกซิเดชันบางชนิดก่อให้เกิดความเสียหาย โดยสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระได้ ที่สำคัญคือโมเลกุลของอนุมูล superoxide ( $\text{O}_2^-\cdot$ ) ซึ่งเป็นสารตัวกลาง (intermediate) ในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรียและเยื่อหุ้มนิวเคลียส นอกจากนี้ปฏิกิริยารีดอกซ์ของไอออนโลหะในร่างกาย ก็จัดเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญในการเกิดอนุมูลอิสระเช่นกัน โดยเฉพาะเหล็ก ( $\text{Fe}^{2+}$ ) และทองแดง ( $\text{Cu}^{2+}$ ) โดยไอออนโลหะเปรียบเสมือนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยารีดอกซ์

### ขั้นพรอพาเกชัน (chain propagation)

เป็นขั้นที่อนุมูลอิสระมีการทำปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระของสารอื่น ซึ่งปฏิกิริยาจะดำเนินต่อกันไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ ได้อนุมูลอิสระชนิดใหม่ออกมาตลอดเวลา จัดเป็นการเปลี่ยนตำแหน่งของอิเล็กตรอนที่ไม่เข้าคู่ (unpaired electron) ซึ่งสามารถแบ่งกลไกของปฏิกิริยาในขั้นพรอพาเกชันได้ 3 ชนิด ที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบทางชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิต คือ

1. การถ่ายทอดอะตอมหรือกลุ่มของอะตอม (atom or group transfer)

จัดเป็นกลไกที่เกิดมากที่สุดในลำดับของพรอพาเกชัน โดยปฏิกิริยาจะเกี่ยวข้องกับการดึงไฮโดรเจนดั่งสมการ

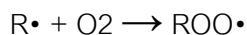


2. การถ่ายทอดอิเล็กตรอน (electron transfer)

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

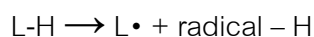
3. การเติมอนุมูลอิสระ (addition of radicals)

เป็นการเติมกลุ่มอนุมูลอิสระเข้าไปในโมเลกุลต่างๆ ดังสมการ

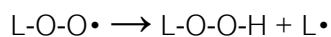
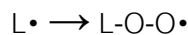


ตัวอย่างของปฏิกิริยานี้ ได้แก่ การเติมอนุมูลอิสระของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ปฏิกิริยาออกซิเดชัน โมเลกุลของไขมัน (Lipid peroxidation) แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันแสดงได้ดังสมการ

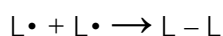
Chain initiation



Chain propagation



Chain termination

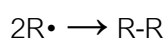
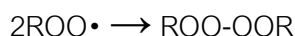
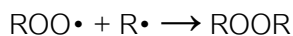


### ขั้นเทอร์มิเนชัน (chain termination)

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. การถ่ายทอดอิเล็กตรอน (Electron transfer)

เป็นการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่ของอนุมูลอิสระออกจากโมเลกุล หรือเป็นการรับเอาอิเล็กตรอน 1 ตัวจากภายนอกมาเข้ากับอิเล็กตรอนเดิมที่ยังมีที่ว่างอยู่ในโมเลกุล ทำให้สภาวะการเป็นอนุมูลอิสระหมดไป เช่น อนุมูล superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ) เกิดการถ่ายทอดอิเล็กตรอนกลายเป็นโมเลกุลออกซิเจนปกติ ( $O_2$ ) เป็นต้น

## สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือสารที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระออกจากร่างกาย ร่างกายมีระบบต้านออกซิเดชัน แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ ประเภทแรกป้องกันการเกิดสารอนุมูลอิสระ ได้แก่ เอนไซม์ superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, peroxidase, cytochrome C peroxidase ทองแดง สังกะสี ซีเลเนียม โปรตีนซึ่งมีทองแดงอยู่ในโมเลกุล (ceruloplasmin) ส่วนอีกประเภทหนึ่งคือ สารต้านอนุมูลอิสระ ในกลุ่มที่ทำลายปฏิกิริยาถูกไข่นี้ได้แก่ วิตามินอี เบต้า-แคโรทีน วิตามินซี ubiquinone, uric acid, bilirubin, albumin, sulfhydryl groups ในกรดอะมิโน cysteine ซึ่งมีอยู่ในโปรตีน เช่น เนื้อสัตว์ นอกจากนี้วิธีนี้ยังมีสารประกอบฟีนอลิก

(phenolic compounds) และสารกลุ่ม flavanoids ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่น่าสนใจอีกด้วย (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

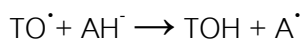
### ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิด

#### วิตามินเอ

ในธรรมชาติวิตามินเอจะพบเฉพาะในสัตว์เท่านั้น แต่ในพืชจะมีสารประกอบแคโรทีนอยด์ที่สามารถเปลี่ยนเป็นวิตามินเอได้ จัดเป็น Precursor ของวิตามินเอ เรียกว่า โปรวิตามินเอ มักพบในพืชผักใบเขียว ผัก และผลไม้ที่มีสีเหลือง หรือสีส้มแดง [25]

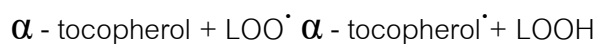
#### วิตามินซี

มีชื่อทางเคมีว่า กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) เป็นวิตามินที่ละลายได้ในน้ำ จะสลายตัวเมื่อถูกความร้อนหรือทิ้งไว้ในอากาศที่มีความชื้น วิตามินซีมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อนุมูล hydroxyl และอนุมูล peroxyyl นอกจากนี้วิตามินซีสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระแล้ว ยังทำหน้าที่เป็นตัวส่งเสริมประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอีด้วย โดยทำให้อนุมูล  $\alpha$ -tocopherol $\cdot$  (TO $\cdot$ ) เปลี่ยนกลับไปเป็น  $\alpha$ -tocopherol (TOH) ดังเดิม ดังสมการ

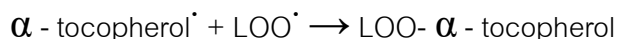


#### วิตามินอี

เป็นวิตามินที่ละลายได้ในไขมันเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ โดยวิตามินอีทำงานร่วมกับสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่นๆ เช่น วิตามินซีและซิลิเนียมเป็นต้น วิตามินอีช่วยปรับให้ร่างกายสามารถนำเอาวิตามินเอมาใช้ ซึ่งจะช่วยในการป้องกันสารที่เป็นพิษที่มีผลมาจากโลหะ เช่น ตะกั่ว ในธรรมชาติมีวิตามินอีอยู่หลายชนิด ปัจจุบันแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ โทโคฟีรอล และ โทโคโทอินอล แต่ละกลุ่มยังแยกเป็นวิตามินย่อยๆ อีก 4 ชนิด ได้แก่ อัลฟา ( $\alpha$ -) เบต้า ( $\beta$ -) แกมมา ( $\gamma$ -) และเดลต้า ( $\delta$ -) วิตามินอีทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูล peroxyyl ดังสมการ



อนุมูล  $\alpha$  - tocopherol<sup>•</sup> ที่เกิดขึ้น สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูล peroxy ด้วอื่นทำให้ได้สารที่มีความเสถียร (LOO-  $\alpha$  - tocopherol) ดังสมการ เป็นผลให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันหยุดลง



### ซิลิเนียม ทองแดง และสังกะสี

เป็นสารต้านอนุมูลอิสระทางอ้อม เนื่องจากเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มีการศึกษาวิจัยที่แสดงว่าการใช้ซิลิเนียม และวิตามินอีร่วมกันช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งบางชนิด ซึ่งพบได้ในอาหารตามธรรมชาติ เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระมีหน้าที่หลายอย่าง เช่น ทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) เป็นตัวจับไล่อนุมูลอิสระจับกับไอออนโลหะที่เร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ด้วยหน้าที่ต่างๆเหล่านี้ จึงทำให้มีผลต่อการชะลอหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือสามารถหยุดปฏิกิริยาได้ และทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร หรือเป็นสารที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันอีกต่อไป หรือเป็นสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ (non-radical product) (Packer, L, 1999)

### แคโรทีนอยด์

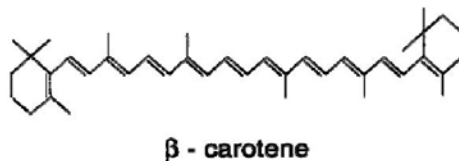
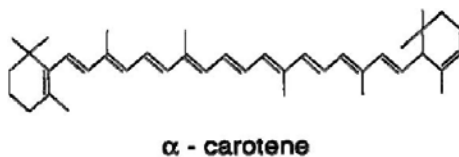
แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่พบทั่วไปในธรรมชาติ จะถูกสังเคราะห์ขึ้นในคลอโรพลาสต์ของพืช และพบมากในผักและผลไม้สุก โครงสร้างพื้นฐานของแคโรทีนอยด์ประกอบด้วยโครงสร้างหลักที่เรียกว่า tetraterpene skeleton ซึ่งอาจมีวงแหวนที่บริเวณปลายด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้านของโมเลกุล วงแหวนนี้อาจเป็นวงแหวนห้าหรือหกเหลี่ยมก็ได้แคโรทีนอยด์สามารถแบ่งออกเป็น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

### แคโรทีน (Carotene)

เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนเท่านั้น เช่น เบต้า-แคโรทีน ( $\beta$ -carotene) อัลฟา-แคโรทีน ( $\alpha$ -carotene) แกมมา-แคโรทีน ( $\gamma$ -carotene) ไลโคปีน (lycopene) เป็นต้น และซึ่ง เบต้า-แคโรทีน เป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ การเปลี่ยนรูปจากเบต้า-แคโรทีนไปเป็นวิตามินเอโดยการแตกพันธะคู่ที่ตำแหน่งกึ่งกลางของโมเลกุล โดยเอนไซม์ carotene deoxygenase เมื่อเบต้า-แคโรทีน สามารถดักจับอนุมูลอิสระเข้าไปในโมเลกุลแล้ว โมเลกุลของเบต้า-แคโรทีนจะอยู่ในลักษณะที่มีความเสถียร

#### 1. ออกโซแคโรทีนอยด์ (oxocarotenoid) หรือ แซนโทฟิลล์ (xanthophyll)

เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุลบริเวณวงแหวนประกอบด้วยกลุ่มอื่นนอกเหนือจากคาร์บอนและไฮโดรเจน เช่น เบต้า-คริปโทแซนทิน ( $\beta$ -cryptoxanthin) และลูทีน (lutein) (Packer, L, 1999)



**ภาพที่ 2.5** แสดงโครงสร้างทางเคมีของ อัลฟา-แคโรทีน ( $\alpha$ -carotene) และเบต้า-แคโรทีน ( $\beta$ -carotene)

(Agriculture and Consumer Protection, 1995)

### สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds)

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

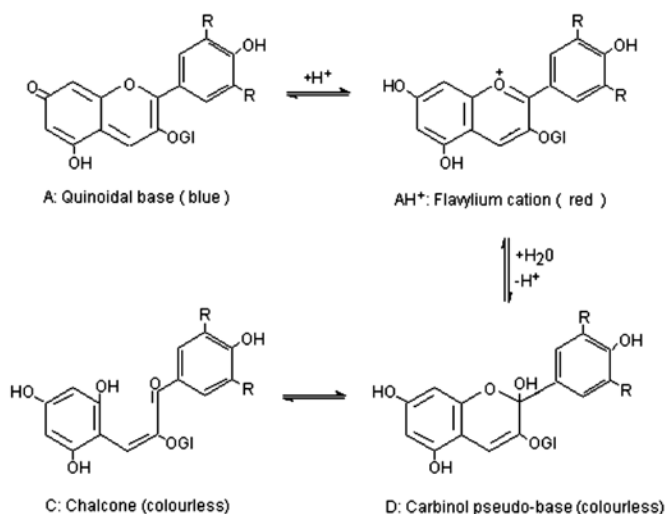
นอกจากนี้บางการศึกษาพบว่าสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และ แทนนิน เป็นต้น สารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่เป็นตัวจับไล่อนุมูลอิสระที่สำคัญคือ อนุมูล peroxy โดยมีกลไก 2 แบบคือ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นต่ำเมื่อเทียบกับสารออกซิไดซ์ สารประกอบฟีนอลิกจะป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจะถูกทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร ดังนั้นจึงสามารถป้องกันการเกิดชั้นตอเนพลอปาเกชันได้ นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังทำหน้าที่เป็นสารคีเลต ดักจับไอออนของโลหะเข้าไว้ในโมเลกุล เช่น เควอซิทิน (quercetin)

สารประกอบฟีนอลิกยังทำหน้าที่ทั้งเป็นสารให้อิเล็กตรอน หรือเป็นตัวให้อิโคโนเจน และกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอกทีฟ ด้วยหน้าที่ต่างๆ ดังกล่าวจึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ที่สำคัญชนิดหนึ่งในพืชทั่วไป

## แอนโทไซยานิน (anthocyanin)

แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่พบในผัก ผลไม้ ดอกไม้ ให้สีม่วงแดงไปจนถึงสีน้ำเงิน ละลายอยู่ใน vacuole sap ของพืช (Vacuole sap เป็นส่วนหนึ่งที่เห็นได้ชัดที่สุดในเซลล์พืชที่มีอายุมาก โครงสร้างจะมีเนื้อเยื่อหุ้ม และภายในมีของเหลวบรรจุอยู่) ละลายน้ำได้แต่ไม่ละลายใน non-hydroxyl solvents เช่น อีเทอร์ อะซีโตน คลอโรฟอร์ม และเบนซีน

แอนโทไซยานินเป็นสารประกอบในกลุ่ม flavonoids ซึ่งมีโครงสร้างพื้นฐานในโมเลกุล ประกอบด้วยวงแหวนเบนโซไพแรน (benzopyran) 2 วงต่อกับวงแหวนฟีล (phenyl ring) เป็นอนุพันธ์ของเกลือเฟลเวิลียม (flavylium salt) แสดงใน **ภาพที่ 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



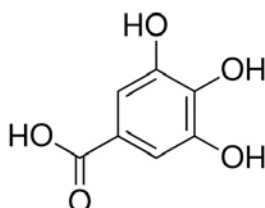
**ภาพที่ 2.6** แสดงโครงสร้างของแอนโทไซยานินที่ pH ต่างๆ [33]

## สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

สารต้านอนุมูลอิสระที่พัฒนาสังเคราะห์ขึ้นส่วนใหญ่จะออกแบบให้มีโมเลกุลขนาดเล็ก และใช้โครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระ ที่มีในธรรมชาติ นำมาดัดแปลงให้มีคุณสมบัติทางเคมีและมีฤทธิ์ที่ดีขึ้น เช่น สารต้านอนุมูลอิสระที่พัฒนาจากสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ โดยพัฒนามาจากโครงสร้างของวิตามินอี และโครงสร้างสารโพลีฟีนอล



**Gallic acid** หรือ 3, 4, 5-hydroxybenzoic acid เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ  $C_7H_6O_5$  Gallic acid เป็นส่วนประกอบของแทนนิน พบมากในองุ่น ใบชา เปลือกไม้โอ๊ค และพืชอื่นๆ โดยทั่วไปจะใช้เกี่ยวกับอุตสาหกรรมทางยา คุณสมบัติของ Gallic acid คือ สามารถยับยั้งเชื้อรา เชื้อไวรัส และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี



**ภาพที่ 2.7** แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Gallic acid

### สารต้านอนุมูลอิสระที่สร้างขึ้นในร่างกายมนุษย์

โดยปกติจะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในเซลล์และร่างกายหลายชนิด มีทั้งที่เป็นประโยชน์และให้โทษ ซึ่งเซลล์ในร่างกายจะเป็นอันตรายและเสียหายหากมีอนุมูลอิสระในปริมาณมากเกินไป ดังนั้นเซลล์และร่างกายจึงมีกลไกเพื่อควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระไม่ให้สูงจนเกิดอันตราย โดยกลไกดังกล่าวจะทำหน้าที่ลดผลกระทบที่เป็นอันตรายของอนุมูลอิสระต่อเซลล์ ในสภาวะปกติกลไกเหล่านี้สามารถควบคุมอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้ อย่างไรก็ตามหากเกิดภาวะผิดปกติที่ทำให้กลไกการป้องกัน เหล่านี้บกพร่องจะนำไปสู่การเกิดภาวะที่มีอนุมูลอิสระมากเกินไป (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 จะมีทองแดงอยู่บริเวณ active site บริเวณศูนย์กลางโครงสร้างเชื่อมต่อกับโลหะสังกะสี เอนไซม์ CuZnSOD มีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่ต้านอนุมูลโดยเร่งปฏิกิริยาดิสมิวเตชัน นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์ SOD ไอโซฟอร์มอื่นอีกหลายไอโซฟอร์ม

ซึ่ง SOD ทุกชนิดจะมีโลหะทรานซิชันที่ active site ซึ่งทำหน้าที่โดยการออกซิไดส์และรีดิวซ์แบบย้อนกลับได้นอกจากนี้ SOD ยังทำหน้าที่ป้องกันเอนไซม์กลุ่มดีไฮเดรส ไม่ให้เอนไซม์เหล่านี้ถูกอนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์อิออนทำลาย

### **เอนไซม์เปอร์ออกซิรีดอกซิน (peroxiredoxin, PRX)**

Non-heme peroxidase เป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั่วไปภายในเซลล์โดยสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มหลักๆ ได้แก่เอนไซม์ peroxiredoxin (PRXs) และเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPXs) peroxiredoxin พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดและจัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม thiol-dependent peroxidase โดยจะเร่งปฏิกิริยารีดักชันของ hydrogen peroxide, alkylhydroperoxides และ peroxinitrite ให้กลายเป็นน้ำ รวมถึงแอลกอฮอล์ และไนไตรท์ ตามลำดับ peroxiredoxin สามารถจัดจำแนกได้ 4 ประเภท ได้แก่ 2-cys PRX, 1-cys PRX, PRX-Q และ type II PRX (PRXII) โดยจะมีกลไกในการทำปฏิกิริยาร่วมกันที่บริเวณกรดอะมิโนซิสเทอีน เรียกว่า peroxidatic cysteine โดยจะถูกออกซิไดส์โดย hydrogen peroxide กลายเป็น sulfenic acid และภายหลังจากนั้นจะถูกเปลี่ยนกลับมาอยู่ในรูปรีดิวซ์โดยรับ reducing equivalent ที่แตกต่างกัน เช่น thioredoxin (TR(SH)<sub>2</sub>), glutaredoxin (GRX) หรือ glutathione ขึ้นกับประเภทของ PRX

### **เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase, GPx)**

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

## บทที่ 3

### การดำเนินการวิจัย

#### 1. วัตถุประสงค์

เมล็ดข้าวเหนียวดำพันธุ์พื้นเมืองจากจังหวัดพัทลุง

#### 2. วัสดุและอุปกรณ์

เครื่องชั่งสาร

เครื่องปั่น (blender)

เครื่องเขย่าสารแบบปรับอุณหภูมิ

เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบปรับอุณหภูมิ

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer; UV-1601)

เครื่องแยกขนาดโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า

เครื่องย้ายโปรตีนลงเมมเบรน

เครื่องควบคุมแรงดันสารที่ความดันต่ำ

ตู้อบแบบปรับอุณหภูมิ

ตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์อุณหภูมิ 37°C

อ่างน้ำวนแบบปรับอุณหภูมิ

Rotary evaporator

Cell culture flask ขนาด 25 cm<sup>3</sup>, 75 cm<sup>3</sup>

6- well plate

24- well plate

96- well plate

ชุดเครื่องแก้ว: ขวด พลาสติก หลอดทดลอง กระบอกตวง

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<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)

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

Horseradish peroxidase (HRP)

5% Sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

0.2 M Sodium phosphate buffer, pH6.6

1% Potassium ferricyanide

10% Trichloroacetic acid

0.1% Ferric chloride (FeCl<sub>3</sub>)

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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

0.1 M Potassium phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 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 การสกัด water soluble material จากข้าวเหนียวดำ

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 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน และ centrifuge ที่ 3000 rpm นาน 15 นาที แล้วนำ supernatant ไป ระเหยแอลกอฮอล์ออกด้วย vacuum rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และทำให้แห้งด้วย freeze dryer แล้วเก็บสารสกัดที่ได้ที่ -80 องศาเซลเซียส

##### 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 น้ำกลั่น เป็น control (การวัดค่าการดูดกลืนแสงควรวัดภายใน 20-50 นาที) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงไปหาค่า total anthocyanin content ที่แสดงในรูปของ cyanidin-3-glucoside equivalent ซึ่งคำนวณได้จากสมการ

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

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

$$DF = \text{dilution factor}$$

$$MW \text{ (molecular weight)} = 449.2 \text{ g/mol สำหรับ cyanidin-3-glucoside (cyd-3-glu)}$$

$$l = \text{pathlength in cm}$$

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

$$10^3 = \text{factor for conversion from g to mg.}$$

### 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% เมทิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม 20% sodium bicarbonate ปริมาตร 2 ml น้ำกลั่น 2 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 755 nm โดยปริมาณของ total phenolic compound ที่พบในสารสกัด จะแสดงในรูปของ mg ของ gallic acid equivalent (mg GAE/ 100g dry weight ของสารสกัด) การทดลอง ทำซ้ำ 2 ซ้ำ

### 4.4 ศึกษาความสามารถของสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระ

#### 4.4.1 Scavenging effect on DPPH radicals

การทดลองในครั้งนี้อ้างอิงตามวิธีการของ Kuo et al. (74) โดยนำ 1,1- Diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical (DPPH) มาละลายใน 100% เมทิลแอลกอฮอล์ ให้ได้ความเข้มข้น 400  $\mu\text{M}$  หลังจากนั้นนำสารสกัด 50  $\mu\text{l}$  (ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-12,000  $\mu\text{g/ml}$ , อย่างน้อย 5 ความเข้มข้น) ผสมกับสารละลาย DPPH ที่ละลายใน เมทิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 150  $\mu\text{l}$  ใน microtiter plate หลังจากนั้นเก็บไว้ในที่มืดนาน 90 นาที แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วย microtiter plate reader โดยใช้สารสกัดที่ผสมกับเมทิลแอลกอฮอล์ที่เป็น blank และใช้เมทิลแอลกอฮอล์ที่ผสมกับ DPPH เป็น negative control และใช้ ascorbic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็น standard ทำซ้ำทั้งหมด 4 ครั้งแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย นำค่า OD เฉลี่ยที่ได้มา คำนวณหา % inhibition ดังสมการ

$$\% \text{ inhibition} = (\text{Ac-As}/\text{Ac}) \times 100$$

Ac = ค่าการดูดกลืนแสง (OD517) ของ negative control

As = ค่าการดูดกลืนแสง (OD517) ของสกัด

นำค่า % inhibition มา plot กราฟต่อความเข้มข้นของสารสกัด (อย่างน้อย 5 ความเข้มข้น) และนำมาหาค่า EC50 ซึ่งแสดงถึง Molar ratio ของ antioxidant ในสารสกัดที่สามารถลด DPPH radical ได้ 50% จากความเข้มข้นของ DPPH radical เริ่มต้น

#### 4.4.2 Reducing power

Reducing power ศึกษาตาม Oyaizu (75) หรือ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) โดยนำสารสกัดมา 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 mg/ml ผสมกับ 2 M phosphate buffer pH 6.6 ปริมาตร 5 ml และ 1% potassium ferricyanide ปริมาตร 5 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไป incubate ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นเติม 10% trichloro acetic acid ปริมาตร 5 ml และนำไป centrifuge ที่ 650 g เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วน solution ด้านบน ปริมาตร 5 ml ไปผสมกับน้ำกลั่น ปริมาตร 5 ml และ 0.1% ferric chloride ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย นำค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงไป plot กราฟต่อค่าความเข้มข้นของสารสกัด โดยใช้ ascorbic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็น standard ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงการเพิ่มขึ้นของ reducing power

#### 4.4.3 Hydrogen peroxide scavenging activity

การตรวจหา hydrogen peroxide ทำได้โดยใช้ horseradish peroxidase assay โดยนำสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 mg/ml ความเข้มข้นละ 1 ml ผสมกับ 4 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  ปริมาตร 400  $\mu\text{l}$  และ

phenol red solution (7.5 mM phenol red + 500 µg HRP ที่ละลายใน 100 mM phosphate buffer) ปริมาตร 600 µl ผสมให้เข้ากัน แล้ว incubate เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 nm ค่าการดูดกลืนแสงจะถูกเปลี่ยนเป็น mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standard curve โดยใช้ปฏิกิริยาที่ไม่สืสารสกัดเป็นกลุ่ม control แล้วนำไปคำนวณหา % scavenging effect ดังสมการ

$$\% \text{ Scavenging effect} = 1 - (\text{OD}_{610} \text{ ของสารสกัด} / \text{OD}_{610} \text{ ของ control}) \times 100$$

นำ % Scavenging effect ที่พบได้ในสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มา plot กราฟต่อค่าความเข้มข้น โดยใช้ ascorbic acid เป็น positive control และนำมาหาค่า EC<sub>50</sub> ซึ่งแสดงถึง Molar ratio ของ antioxidant ในสารสกัดที่สามารถลด H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ได้ 50% จากความเข้มข้นของ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> เริ่มต้น

#### 4.5 ทดสอบสารสกัดจากข้าวเหนียวดำต่อการเติบโตของผลึกคริสตัล COM (Growth)

ทำการเตรียมผลึกคริสตัล COM ใน 24-well plate ที่ใช้สำหรับเลี้ยงเซลล์โดยนำ 10 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O มาผสมกับ 10 mM Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 mM และ 0.5 mM ตามลำดับ ใน 10 mM Tris buffer ที่มีเกลือ 90 mM NaCl (pH 7.3) โดยให้หลุมปฏิกิริยาที่ไม่มีการเติมสารสกัดจากข้าวเหนียวดำเป็น control ส่วนหลุมที่มีการเติมสารสกัดจากข้าวเหนียวดำนั้นจะทำการ Vary concentration ของสารสกัดในปฏิกิริยา การทดลองแต่ละความเข้มข้นจะทำ 3 ซ้ำ จากนั้นทำการบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาข้ามคืน เมื่อครบเวลานำไปดูผลด้วยกล้อง Scanning Electron microscope (SEM) ถ่ายรูปผลการทดลองที่ได้ นำมานับจำนวนผลึกและวัดขนาดของผลึกในแต่ละสภาวะการทดลอง นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับ p<0.05 ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

#### 4.6 ทดสอบสารสกัดจากข้าวเหนียวดำต่อการเกาะเกี่ยวกันของผลึกคริสตัล COM (Aggregation)

ทำการเตรียมผลึกคริสตัล COM ใน 24-well plate โดยเลือกใช้สภาวะที่รายงานโดย Thongboonkerd (2006) ว่าให้รูปร่างของผลึกในแบบเกาะกลุ่มหรือ Aggregated form โดยนำ 10 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O มาผสมกับ 10 mM Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O เป็น 5 mM และ Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 1 mM ใน Artificial Urine ที่ประกอบด้วย 23.1mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O และ 127.4 mM KCl (pH 6.5)

โดยให้หลุมที่ไม่มีการเติมสารสกัดจากข้าวเหนียวดำเป็น control ส่วนหลุมที่มีการเติมสารสกัดจากข้าวเหนียวดำนั้นจะทำการ Vary concentration ในปฏิกิริยา การทดลองแต่ละความเข้มข้นจะทำ 3 ซ้ำ จากนั้นทำการบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาข้ามคืน เมื่อครบเวลานำไปดูผลด้วยกล้อง SEM ถ่ายรูปผลการ



ทดลองที่ได้ นำมานับจำนวนผลึกและวัดขนาดของผลึกในแต่ละสภาวะการทดลอง นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับ  $p < 0.05$  ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

#### 4.7 เตรียมผลึกแคลเซียมออกซาลเลต 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  $37^\circ\text{C}$  ข้ามคืน นำผลึกคริสตัล COM ที่เตรียมได้ไปตรวจสอบรูปร่างลักษณะ (morphology) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูความบริสุทธิ์ของผลึกที่เตรียมได้ เก็บที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะนำไปใช้

#### 4.8 ทดสอบสารสกัดจากข้าวเหนียวดำต่อการเกาะจับของผลึก COM กับเซลล์ MDCK (Adhesion)

เลี้ยงเซลล์ MDCK จำนวน  $1 \times 10^4$  เซลล์ ใน 6 well plate ด้วย Complete MEM นำผลึกคริสตัล COM ที่เตรียมไว้มาตาก UV light เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปทำการทดลองกับเซลล์เพื่อป้องกันการปนเปื้อนล้างเซลล์ MDCK ก่อนทำการทดลองด้วย plain MEM หลุมที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากข้าวเหนียวดำให้เป็น control ทำการ Precoat เซลล์ MDCK ด้วยสารสกัดจากข้าวเหนียวดำความเข้มข้นต่างๆ แต่ละความเข้มข้นทำ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาดูดสารสกัดออกแล้วเติมผลึก COM ความเข้มข้น 200  $\mu\text{g/ml}$  ที่ผสมอยู่ใน complete MEM ลงไป นำไปบ่มใน humidified incubator  $37^\circ\text{C}$  ที่มี 5%  $\text{CO}_2$  เมื่อครบ 30 นาที นำเซลล์มาล้างด้วย MEM 3 ครั้ง เพื่อให้เหลือเฉพาะผลึกคริสตัลที่มี adhesion กับเซลล์อย่างจำเพาะเท่านั้น ดูผลด้วยกล้อง phase-contrast microscope ถ่ายรูปผลการทดลองที่ได้ นับจำนวนผลึกนำค่าที่ได้มาคำนวณหาความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับ  $p < 0.05$  ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

#### 4.9 ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำต่อการตายของเซลล์ MDCK

MTS Cell Proliferation Assay Kit ทดสอบโดยเลี้ยงเซลล์ MDCK จำนวน  $2 \times 10^4$  เซลล์ใน 96-well plate นำไปบ่มใน incubator  $37^\circ\text{C}$  ที่มี 5%  $\text{CO}_2$  เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง เติมสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 10, 20, 50, 100, 200 และ 400  $\mu\text{g/ml}$  ลงในหลุมเซลล์โดยหลุม

สุดท้ายเติม Incomplete MEM (Control) และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดสารสกัดข้าวออก และเติม Incomplete MEM ลงไปพร้อมกับเติม MTS reagent 20 µl และบ่มใน humidified incubator 37°C ที่มี 5% CO<sub>2</sub> จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD 490 nm ที่เวลา 30 นาที จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (Relative Ratio) โดยแทนค่าตามสมการ

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

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

#### 4.10 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำในสัตว์ทดลองที่เหนียวทำให้เกิดภาวะนิ่วในไต

การทดลองนี้ใช้หนูแรทเพศผู้ จำนวน 18 ตัว สายพันธุ์ Sprague-Dawley อายุ 7 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 180-200 กรัม มาเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเพื่อปรับสภาพให้เกิดความเคยชินเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นแบ่งการทดลองเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว กลุ่มที่ 1 หนูถูกเหนียวน้ำให้เกิดภาวะนิ่วในไต คือมีการสะสมผลึกแคลเซียมออกซาลेट (CaOx) ในเนื้อไตโดยการดื่มน้ำที่ผสมกับ 0.5% ethylene glycol (EG) (v/v) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นให้ดื่มน้ำอีกเป็นเวลา 2 สัปดาห์ กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ให้หนูกิน potassium citrate (KCit) ปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม โดยใช้ gastric intubation วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นเหนียวน้ำให้มีการสะสมผลึก CaOx โดยดื่มน้ำที่ผสมกับ 0.5% EG (v/v) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่ให้หนูกินสารสกัดจากข้าวเหนียวสังข์หยด ปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม โดยใช้ gastric intubation วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นเหนียวน้ำให้มีการสะสมผลึก CaOx โดยดื่มน้ำที่ผสมกับ 0.5% EG (v/v) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง หนูแต่ละกลุ่มถูกทำให้ตายอย่างสงบ จากนั้นทำการเก็บเนื้อเยื่อไตเพื่อนำมาศึกษาการสะสมผลึก CaOx ด้วยวิธีการย้อมสี hematoxylin และ eosin ศึกษาการแสดงออกของสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี immunohistochemistry และศึกษาการแสดงออกของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Western immunoblotting

#### 4.11 ศึกษาปริมาณการสะสมผลึก CaOx ด้วยวิธีการย้อมสี hematoxylin และ eosin

เนื้อเยื่อไตนำมารักษาสภาพด้วย 4% paraformaldehyde ที่ละลายใน 0.1 M PBS, pH 7.4 เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย 0.1 M PBS, pH 7.4 จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วนำตัวอย่างที่ได้มาขจัดน้ำออกด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 70%, 80%, 90%, 95% (2 ครั้ง), 100% (3 ครั้ง) ตามลำดับขั้นตอนละ 30 นาที จากนั้นทำการ clearing โดยใช้ xylene (2 ครั้ง) ครั้งละ 30 นาที infiltrate และฝังเนื้อเยื่อ

ลงใน paraffin จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปตัดด้วยเครื่อง microtome ความหนาประมาณ 5  $\mu\text{m}$  จากนั้นนำแผ่นชิ้นเนื้อไปขจัด paraffin ออกด้วย xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และเข้าสู่ขั้นตอนการเติมน้ำ (rehydrate) ในแผ่นชิ้นเนื้อด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นจากสูงไปต่ำ ดังนี้ 100% (3 ครั้ง), 95% (2 ครั้ง), 90%, 80%, 70% ตามลำดับ ขั้นตอนละ 5 นาที จากนั้นนำไปแช่น้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที แล้วย้อมด้วยสี hematoxylin เป็นเวลาประมาณ 2-3 นาที ล้างด้วยน้ำประปา แล้วจุ่มลงใน 1% acid alcohol ประมาณ 10 วินาที จากนั้นนำแผ่นชิ้นเนื้อแช่ลงใน 90% และ 95% ตามลำดับ ขั้นตอนละประมาณ 10 วินาที แล้วย้อมด้วยสี eosin เป็นเวลาประมาณ 5-10 นาที แล้วนำแผ่นชิ้นเนื้อมาขจัดน้ำออกด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 90%, 95% (2 ครั้ง), 100% (3 ครั้ง) ตามลำดับ ขั้นตอนละ 5 นาที จากนั้นทำการ clearing โดยใช้ xylene (2 ครั้ง) ครั้งละ 5 นาที แล้วปิด mount สไลด์ด้วย per mount จากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง แล้วนับจำนวนผลึก CaOx ในบริเวณที่สนใจ และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image J

#### 4.12 ศึกษาการแสดงออกของอนุมูลอิสระด้วยวิธี Immunofluorescence

เก็บเนื้อเยื่อไตข้างซ้ายมา Fix ด้วย 4% Paraformaldehyde 1 คืน จึงเปลี่ยนไปเก็บใน 30% Sucrose ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นตัดเนื้อเยื่อไตด้วยวิธี Cryosections ความหนา 7 ไมครอน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เลือกว่าตัวอย่างของแผ่นเนื้อเยื่อไตที่จะนำมาศึกษา จากนั้นนำแผ่นเนื้อเยื่อไตมาวางตากให้แห้งแล้วนำไปขจัด OCT และทำการกำจัด endogenous peroxidase ด้วย Acetone ที่แช่เย็นใน -30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแช่ใน 0.1 M PBS pH 7.4 เป็นเวลา 5 นาที ต่อมาแช่เนื้อเยื่อด้วย 0.1% glycine ใน 0.1 M PBS pH 7.4 เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นบ่มแผ่นเนื้อเยื่อด้วย 4% BSA ที่ละลายอยู่ใน 4% NGS ผสมกับ 0.1 M PBST pH 7.4 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.1 M PBST pH 7.4 (tween-20) จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ต่อมานำแผ่นเนื้อเยื่อมาบ่มด้วย primary antibody (anti-8 Hydroxyguanosine Mouse monoclonal antibody) อัตราส่วน 1:500 ที่ละลายใน 2% BSA ผสมกับ 2% NGS ใน 0.1 M PBST pH 7.4 เป็นเวลา 12 – 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วล้างด้วย 0.1 M PBST pH 7.4 จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นนำแผ่นเนื้อเยื่อมาบ่มต่อด้วย secondary antibody (Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488)) อัตราส่วน 1:500 ใน 0.1 M PBST pH 7.4 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และย้อม Nucleus ด้วย VECTASHIELD Antifade Mounting Medium with Propidium Iodide (PI) 1 หยด แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ จากนั้นนำไปศึกษาภายใต้กล้อง Fluorescence Microscope

#### 4.13 ศึกษาการแสดงออกของสารอนุมูลอิสระ 8 Hydroxyguanosine (8-oHdG) ด้วยวิธี immunohistochemistry

นำแผ่นชิ้นเนื้อเยื่อไตแช่ใน ice-cold acetone เป็นเวลา 10 นาที กำจัด Endogenous peroxidases โดยแช่ใน 0.3% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ในเมทานอลเป็นเวลา 30 นาที ทำการล้าง 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ด้วย 0.1 M PBS, pH 7.4 ที่มี 0.4% Triton X-100 (PBST) และบ่มใน 0.1% glycine ใน 0.1 M PBS เป็นเวลา 15 นาที ทำการป้องกัน Non-specific antibody binding โดยแช่ใน blocking solution (4% bovine serum albumin; BSA, 4% Normal goat serum; NGS and PBST) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม primary antibody (8-oHdG mouse monoclonal antibody) ใน diluent solution (2% BSA, 2% NGS and PBST) ความเข้มข้น 1:200 ที่ 4°C เป็นเวลา 12 – 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการล้าง 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และบ่มด้วย HRP-conjugated goat anti-mouse IgG containing PBST solution ความเข้มข้น 1:500 เป็นเวลา 100 นาที หลังจากล้างเติม 3',3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) substrate และ counterstained ด้วย Mayer's hematoxylin เพื่อสังเกตนิวเคลียส นำเนื้อเยื่อไปดูภายใต้กล้อง Nikon Eclipse E600 microscope ที่ต่อกับกล้อง Nikon digital camera DXM1200 ทำการถ่ายภาพและทำการวิเคราะห์ต่อไป

#### 4.14 ศึกษาการแสดงออกของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Western immunoblotting

##### 4.14.1 การสกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อไต

นำเนื้อเยื่อไตมาทำการบดให้ละเอียดในสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, และ 1% SDS จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นนำ supernatant ไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford

##### 4.14.2 แยกตัวอย่างโปรตีนด้วยวิธี Sodium Dodesylsulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และ western blotting

นำโปรตีนที่ผ่านการวัดปริมาณแล้วปริมาณ 10 µg ผสมกับ loading dye (7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 120 mM DTT, 40 mM Tris-base, bromophenol blue) นำไปต้มประมาณ 5 นาที แล้วนำไปแยกด้วย 12.5% SDS-PAGE หลังจากนั้นย้ายโปรตีนลงบนแผ่น nitrocellulose membrane ด้วยวิธี semidried transfer

#### 4.14.3 Immunoblotting

นำแผ่น nitrocellulose membrane มาล้างด้วย PBS จากนั้นนำไป block nonspecific binding ด้วย 5% Skimmed milk ที่ละลายใน TBS ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำแผ่น nitrocellulose membrane บ่มด้วย primary antibody ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า ซึ่งการทดลองในครั้งนี้ใช้ antibody anti-superoxide dismutase (anti-SOD) และ anti-catalase หลังจากนั้นล้างด้วย TBS-Tween 20 จำนวน 3 ครั้ง แล้วบ่มใน secondary antibody (horseradish peroxidase-conjugated antibody) นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TBS-Tween 20 จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำแผ่น nitrocellulose มา develop ด้วยชุดน้ำยา chemiluminescence จากนั้นนำแผ่น nitrocellulose ประคบกับฟิล์ม x-ray ในห้องมืด แล้วนำฟิล์มไป develop แล้วนำฟิล์มไป scan เพื่อตรวจดูตำแหน่งและปริมาณของโปรตีน SOD และ catalase

#### 4.15 การวิเคราะห์ทางสถิติ

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

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### ปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดเมล็ดข้าวและแกลบข้าวเหนียวดำ

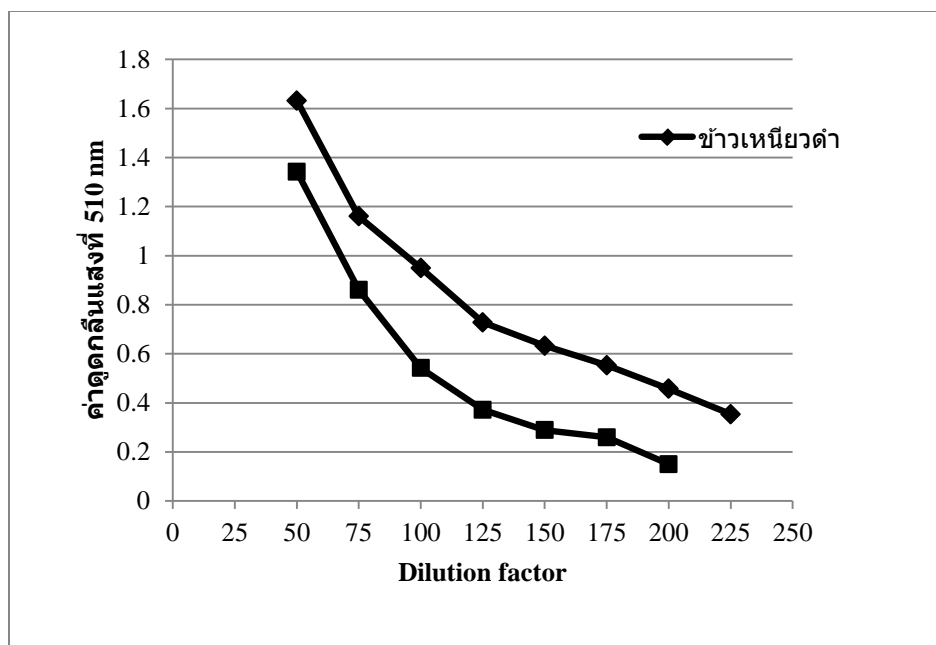
จากการสกัดเมล็ดข้าวเหนียวดำบดละเอียด 375 กรัม ด้วย 75% เอทานอล พบว่าหลังการระเหยแห้งได้สารสกัดลักษณะเป็นผงสีม่วงเข้มน้ำหนัก 1.423 กรัม สามารถคำนวณร้อยละของการสกัดได้เท่ากับ 0.379 จากการสกัดแกลบข้าวเหนียวดำบดละเอียด 50 กรัม ด้วย 75% เอทานอล พบว่าหลังการระเหยแห้งได้สารสกัดลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลอมม่วง น้ำหนัก 1.137 กรัม คิดเป็นร้อยละของการสกัดได้เท่ากับ 2.274

#### ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณสารสกัดหยาบจากเมล็ดและแกลบข้าวเหนียวดำ

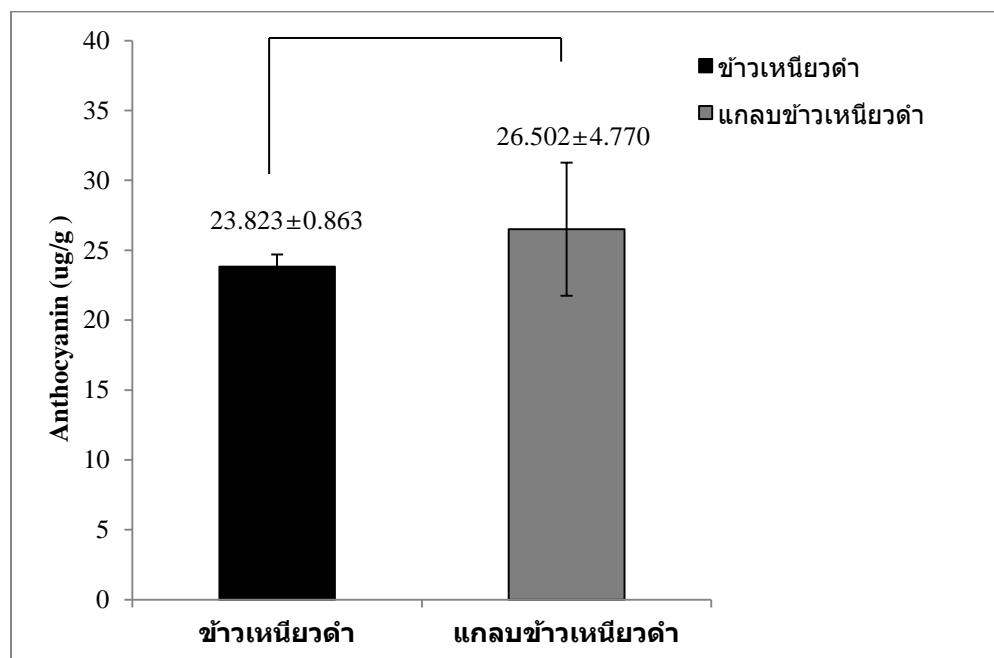
สายพันธุ์ข้าว	ชนิดของตัวอย่างข้าว	น้ำหนักสารสกัด (g)	ร้อยละของสารสกัดหยาบที่ได้เทียบกับน้ำหนักดิบก่อนสกัด (% yield dry weight)
ข้าวเหนียวดำ	เมล็ดข้าว	1.423	0.379
	แกลบ	1.137	2.274

#### ปริมาณแอนโทไซยานินในสารสกัด

นำสารสกัดหยาบของเมล็ดข้าวและแกลบมาทำการศึกษาด้านอนุโมลอิสระแอนโทไซยานิน โดยวิธี pH differential method จากการเจือจางสารสกัดจากเมล็ดข้าว และแกลบข้าวเหนียวดำเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนการนำไปวัดปริมาณแอนโทไซยานินพบว่า dilution ที่เหมาะสมของสารสกัดทั้งสองคือ 1:75 (ภาพที่ 4.1) จากนั้นทำการเจือจางสารสกัดทั้งสองและนำไปวัดปริมาณแอนโทไซยานินที่ความยาวคลื่น 510 nm โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ผลการคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินพบว่าสารสกัดจากเมล็ดข้าวมีปริมาณแอนโทไซยานินต่อน้ำหนักแห้งของผงตัวอย่าง 1 g เฉลี่ย  $23.823 \pm 0.863 \mu\text{g}$  และสารสกัดจากแกลบมีปริมาณแอนโทไซยานินต่อน้ำหนักแห้งของผงตัวอย่าง 1 g เฉลี่ย  $26.501 \pm 4.770 \mu\text{g}$  โดยสารสกัดจากแกลบมีปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ยมากกว่าสารสกัดจากเมล็ดข้าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$  จากการวิเคราะห์ด้วย Independent-Samples T-Test (ภาพที่ 4.2)



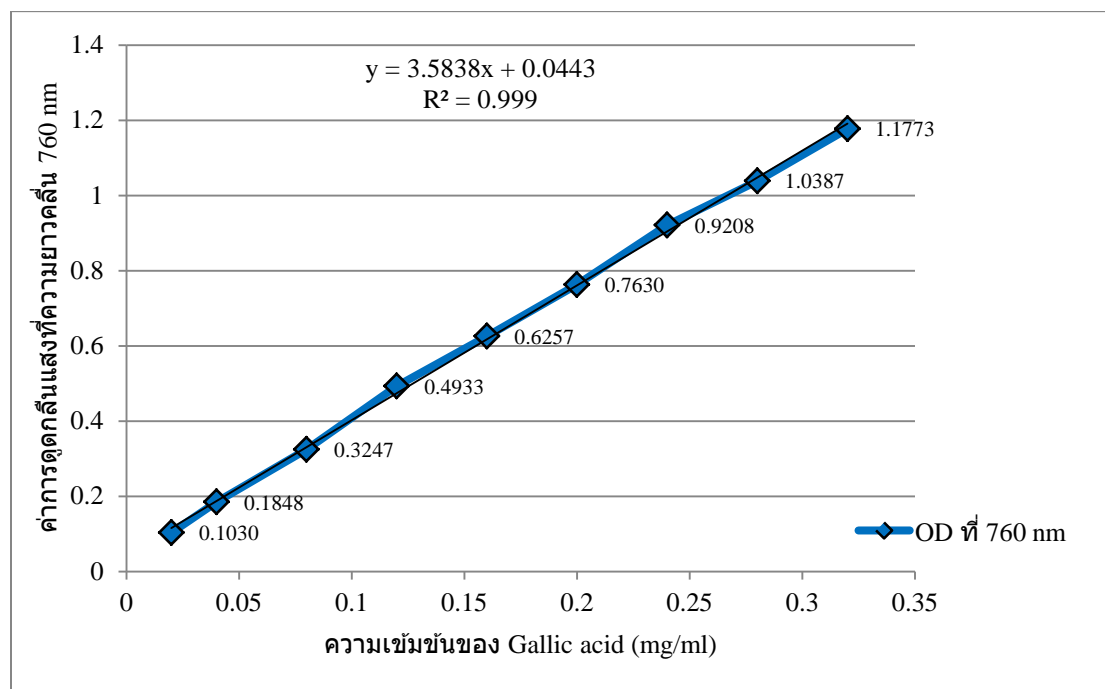
**ภาพที่ 4.1** จากการศึกษา dilution factor ที่เหมาะสมในการนำสารสกัดจากเมล็ดข้าวและแกลบเพื่อไปวัดปริมาณแอนโทไซยานิน ที่ความยาวคลื่นแสง 510 นาโนเมตร (n=3 ในแต่ละกลุ่ม)



**ภาพที่ 4.2** ปริมาณแอนโทไซยานินของสารสกัดจากเมล็ดและแกลบข้าวเหนียวดำ (n=3 ในแต่ละกลุ่ม) พบว่าสารสกัดจากแกลบมีปริมาณโทไซยานินมากกว่าสารสกัดจากข้าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  จากการวิเคราะห์ด้วย Independent-Samples T-Test)

### ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในสารสกัด

ทำการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมซึ่งเป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระ เช่นเดียวกับแอนโทไซยานิน โดยใช้วิธี Follin Ciocalteu reagent assay เริ่มจากการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ความเข้มข้น 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09 และ 0.10 mg/ml วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm ได้ค่า  $R^2 = 0.9999$  และได้สมการในการนำไปวิเคราะห์กับสารสกัดตัวอย่างคือ  $y = 3.5838x + 0.0443$  กำหนดให้ค่า  $y$  คือค่าการดูดกลืนแสง และค่า  $x$  คือ Gallic acid equivalents (ภาพที่ 4.3)

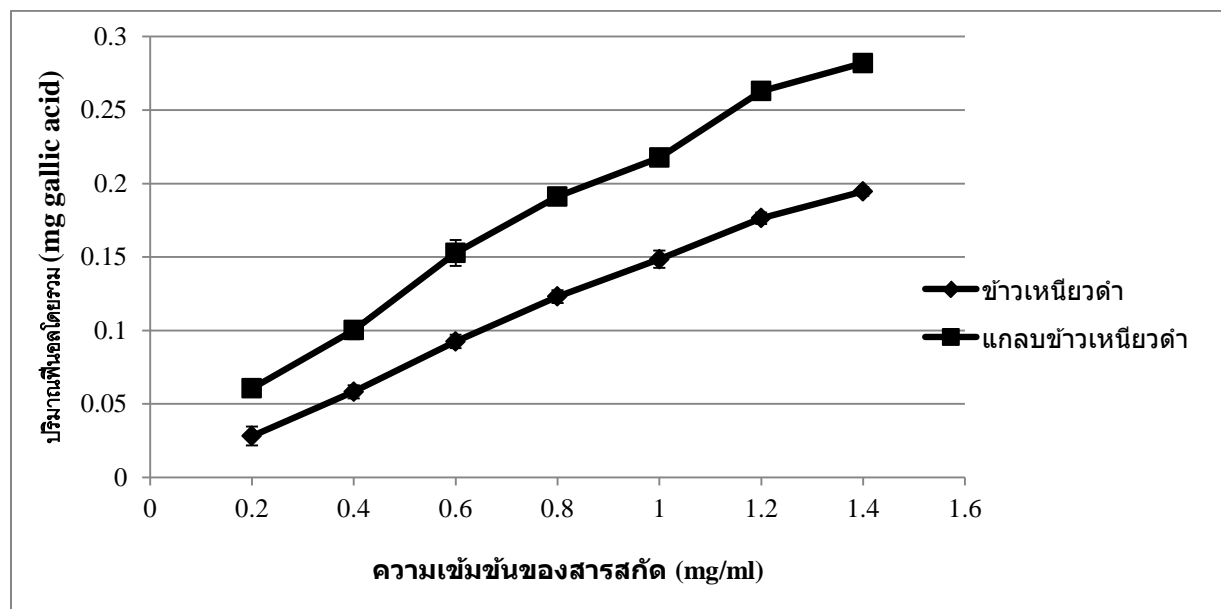


ภาพที่ 4.3 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

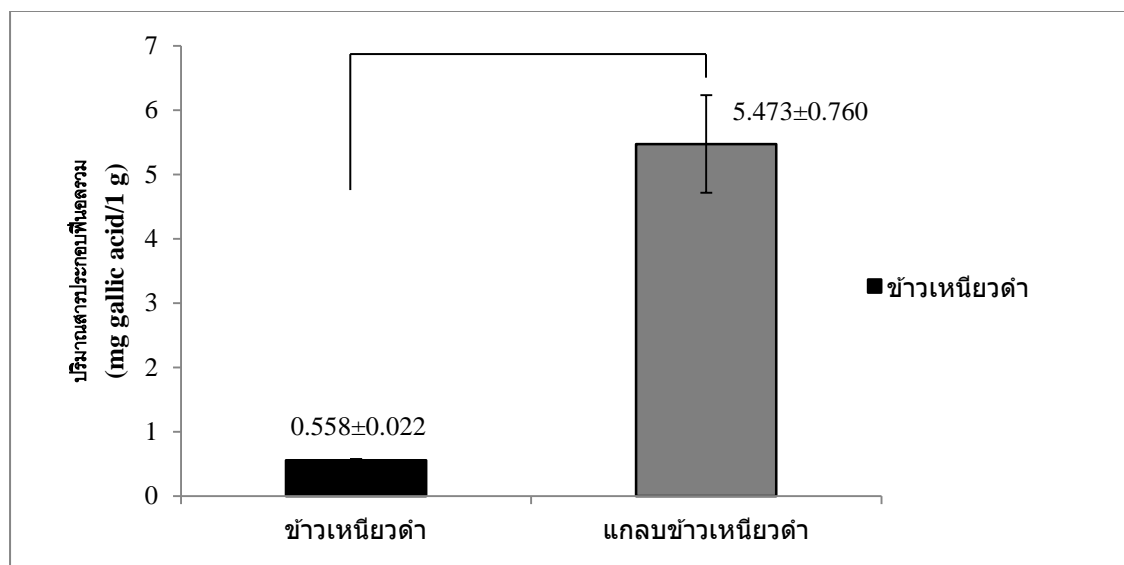
จากการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดจากข้าวและแกลบที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 และ 1.4 mg/ml พบว่าสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเฉลี่ย คือ  $0.028 \pm 0.006$ ,  $0.058 \pm 0.004$ ,  $0.092 \pm 0.004$ ,  $0.123 \pm 0.004$ ,  $0.148 \pm 0.006$ ,  $0.176 \pm 0.004$ ,  $0.195 \pm 0.003$  mg Gallic acid ตามลำดับ และสารสกัดจากแกลบข้าวเหนียวดำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเฉลี่ย  $0.061 \pm 0.006$ ,  $0.100 \pm 0.006$ ,  $0.153 \pm 0.009$ ,  $0.191 \pm 0.001$ ,  $0.218 \pm 0.003$ ,  $0.263 \pm 0.003$ ,  $0.282 \pm 0.002$  mg Gallic acid ตามลำดับ (ภาพที่ 4.4) เมื่อดำเนินการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเฉลี่ยต่อหน้าหนัก



ข้าวเหนียวดำและแกลบข้าวเหนียวดำ 1 กรัม พบว่าในเมล็ดข้าวเหนียวดำ 1 กรัม มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเฉลี่ย  $0.558 \pm 0.022$  mg/g rice ซึ่งน้อยกว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเฉลี่ยของแกลบข้าวเหนียวดำ  $5.473 \pm 0.760$  mg/g husk อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$  จากการวิเคราะห์ด้วย Independent-Samples T-Test (ภาพที่ 4.5)



**ภาพที่ 4.4** แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดจากเมล็ดข้าว และสารสกัดจากแกลบข้าวเหนียวดำที่ความเข้มข้นต่างๆ

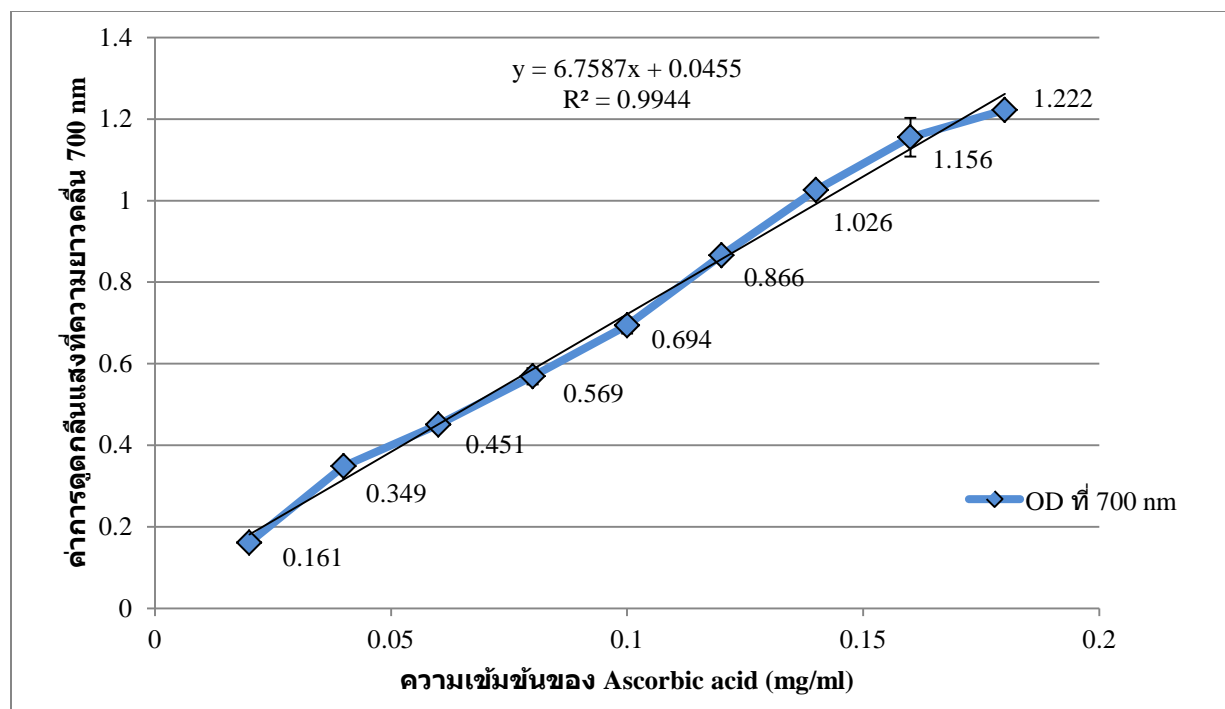


**ภาพที่ 4.5** แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดจากเมล็ดข้าว และแกลบข้าวเหนียวดำต่อน้ำหนักแห้งของผงข้าว 1 g (n=3 ในแต่ละกลุ่ม) โดยสารสกัดจากเมล็ดข้าวมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเฉลี่ยน้อยกว่าสารสกัดจากแกลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$  จากการวิเคราะห์ห้ด้วย Independent-Samples T-Test

#### ทดสอบความสามารถของสารสกัดในการเป็น Antioxidant

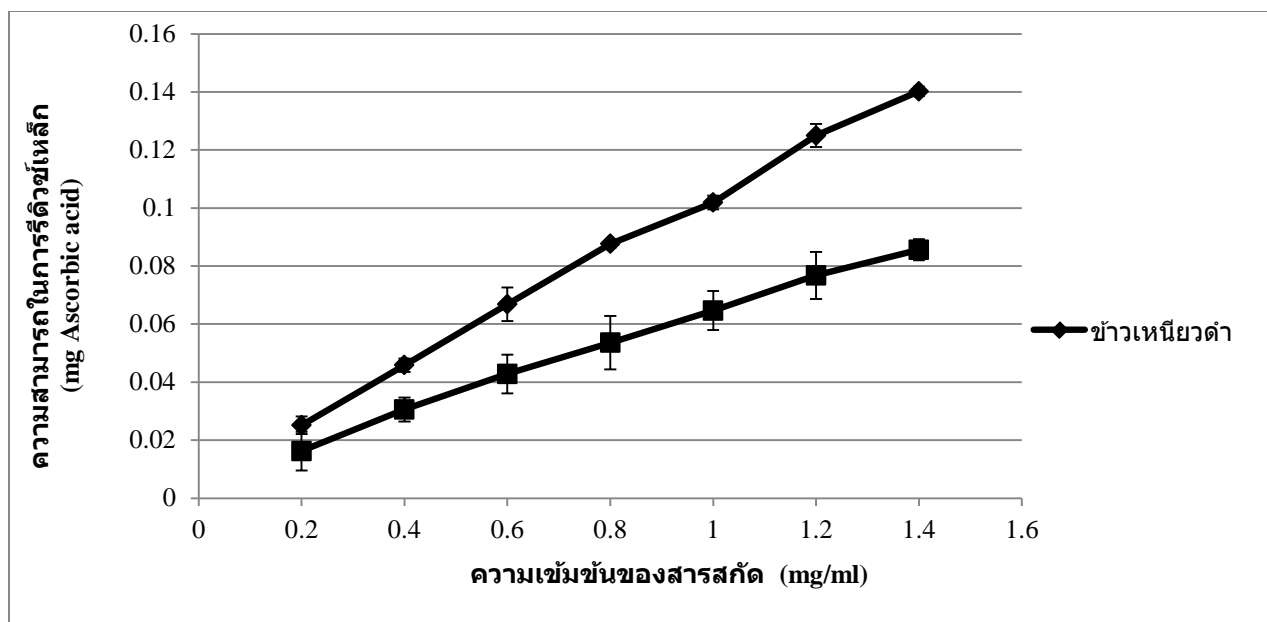
##### 1. ทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กด้วยวิธี FRAP assay

ทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid ด้วยวิธี FRAP assay โดยดัดแปลงจากวิธีการทดลองของ Hyun และคณะ จากการทดสอบสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09 และ 0.10 mg/ml วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 nm ได้กราฟมาตรฐาน  $R^2 = 0.9944$  และได้สมการคือ  $y = 6.7588x + 0.0455$  กำหนดให้ค่า y คือค่าการดูดกลืนแสง และค่า x คือ Ascorbic acid equivalents (ภาพที่ 4.6)

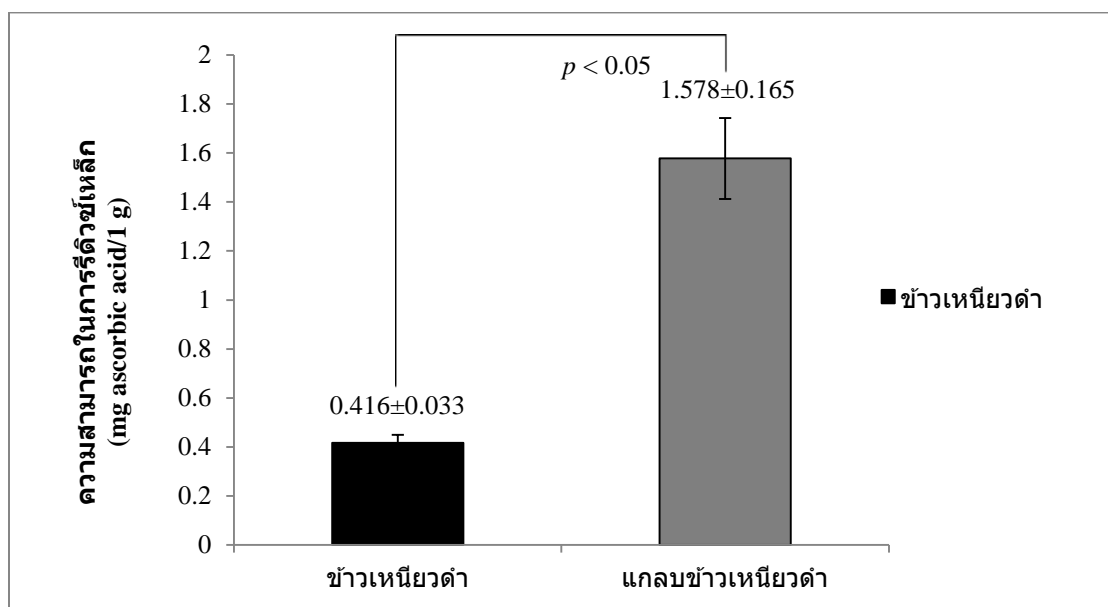


**ภาพที่ 4.6** แสดงกราฟมาตรฐานของ Ascorbic acid ความเข้มข้นต่างๆ ในการรีดิวซ์เหล็ก

จากการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กของสารสกัดตัวอย่างทั้งสองที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 และ 1.4 mg/ml พบว่าสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำมีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กคือ  $0.025 \pm 0.003$ ,  $0.046 \pm 0.002$ ,  $0.067 \pm 0.006$ ,  $0.088 \pm 0.001$ ,  $0.102 \pm 0.002$ ,  $0.125 \pm 0.004$ ,  $0.140 \pm 0.002$  mg Ascorbic acid และสารสกัดจากแกลบข้าวเหนียวดำมีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฉลี่ย  $0.016 \pm 0.007$ ,  $0.031 \pm 0.004$ ,  $0.043 \pm 0.007$ ,  $0.054 \pm 0.009$ ,  $0.065 \pm 0.007$ ,  $0.077 \pm 0.008$ ,  $0.086 \pm 0.004$  mg Ascorbic acid ตามลำดับ (ภาพที่ 4.7) โดยสารสกัดจากเมล็ดข้าวมีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฉลี่ย  $0.416 \pm 0.033$  mg/g rice ซึ่งน้อยกว่าความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฉลี่ยของสารสกัดจากแกลบซึ่งมีค่า  $1.578 \pm 0.165$  mg/g husk อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$  (ภาพที่ 4.8)



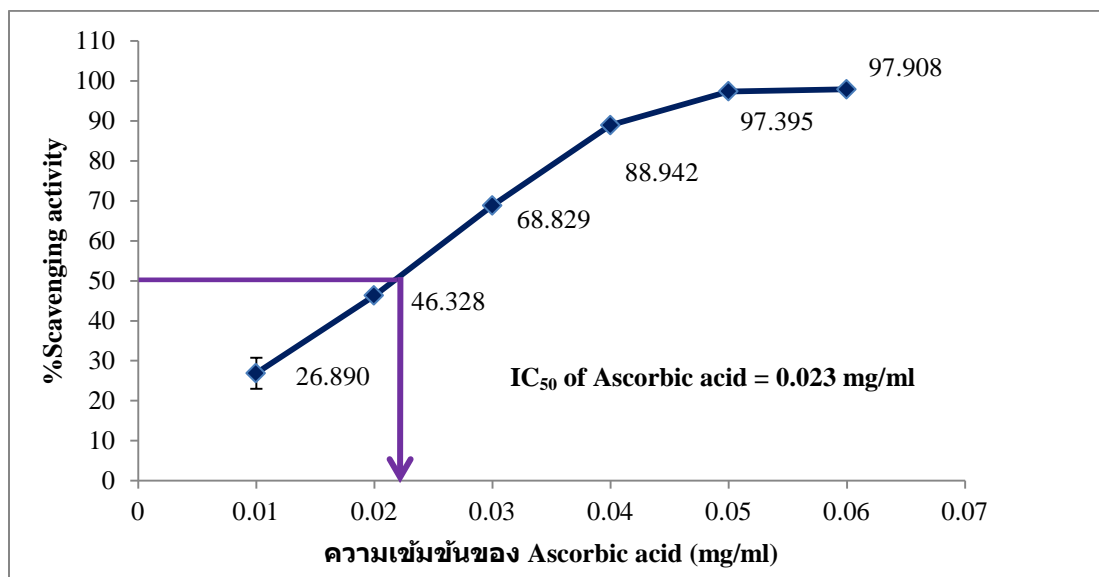
**ภาพที่ 4.7** แสดงความสามารถในการรีดิวซ์เหล็ก ของสารสกัดจากเมล็ดข้าวและแกลบข้าวเหนียวดำที่ความเข้มข้นต่างๆ



**ภาพที่ 4.8** แสดงความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กของสารสกัดจากเมล็ดข้าวและแกลบข้าวเหนียวดำต่อน้ำหนักแห้งของผงข้าว 1 g (n=3 ในแต่ละกลุ่ม) โดยสารสกัดจากเมล็ดข้าวมีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเจ็ลี่ยน้อยกว่าสารสกัดจากแกลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$  จากการวิเคราะห์ด้วย Independent-Samples T-Test

## 2. ทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH method

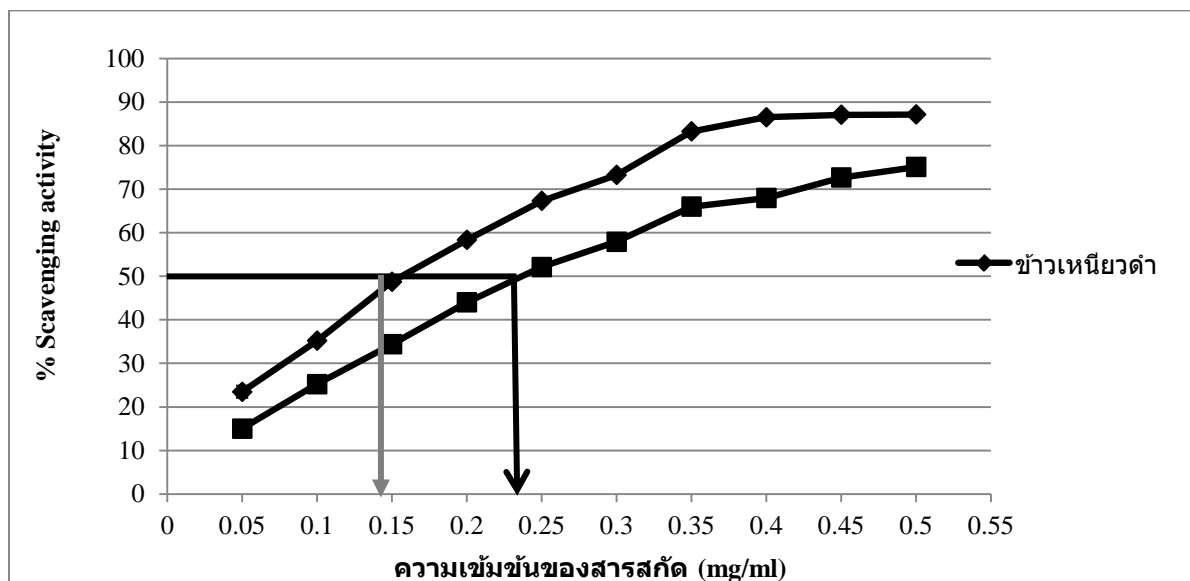
จากการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH method ของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid ความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 และ 0.06 mg/ml เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ( $IC_{50}$ ) ของอนุมูลอิสระเริ่มต้น โดยพบว่าค่า  $IC_{50}$  ของ Ascorbic acid คือ 0.023 mg/ml



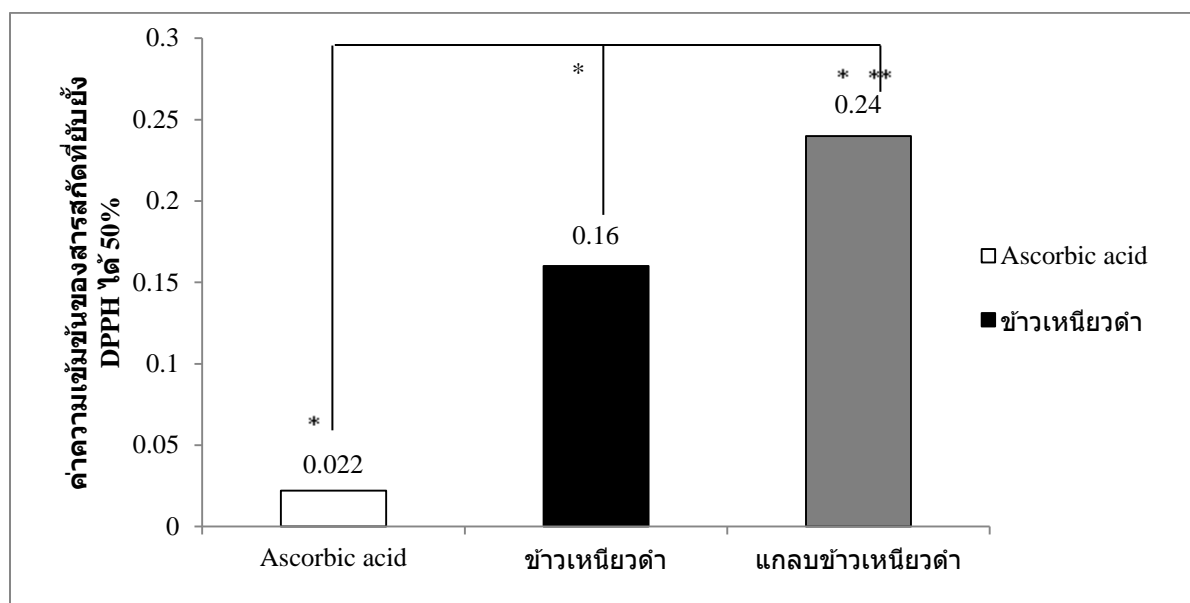
**ภาพที่ 4.9** แสดงความสามารถของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid ในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ 50% ( $IC_{50}$ ) ของอนุมูลอิสระเริ่มต้น

จากการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH method ของสารสกัดจากข้าวและเกลบที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 mg/ml พบว่า %Scavenging activity เฉลี่ยของสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำคือ  $23.468 \pm 1.392$ ,  $35.198 \pm 0.549$ ,  $48.730 \pm 0.774$ ,  $58.334 \pm 0.497$ ,  $67.304 \pm 0.719$ ,  $73.259 \pm 0.910$ ,  $83.247 \pm 0.406$ ,  $86.503 \pm 0.419$ ,  $87.055 \pm 0.131$ ,  $87.141 \pm 0.070$  ตามลำดับ และ %Scavenging activity ของสารสกัดจากเกลบข้าวเหนียวดำคือ  $15.042 \pm 0.382$ ,  $25.256 \pm 0.231$ ,  $34.401 \pm 0.347$ ,  $44.018 \pm 0.524$ ,  $52.137 \pm 0.520$ ,  $57.948 \pm 0.648$ ,  $65.982 \pm 0.382$ ,  $67.948 \pm 0.467$ ,  $72.650 \pm 0.253$ ,  $75.085 \pm 0.490$  ตามลำดับ (ภาพที่ 4.10) ค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำ คือ 0.16 mg/ml และค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดจากเกลบคือ 0.24 mg/ml เมื่อเปรียบเทียบ  $IC_{50}$  ของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid กับสารสกัดจากเมล็ดข้าวและสารสกัดจากเกลบข้าวเหนียวดำจะเห็นได้ว่า มีความ

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$  และสารสกัดจากเมล็ดข้าวมี  $IC_{50}$  น้อยกว่าสารสกัดจากแกลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$  เช่นกัน (ภาพที่ 4.11)



ภาพที่ 4.10 แสดงความสามารถของสารสกัดจากเมล็ดข้าวและสารสกัดจากแกลบข้าวเหนียวดำในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ 50% ( $IC_{50}$ ) ของอนุมูลอิสระเริ่มต้น

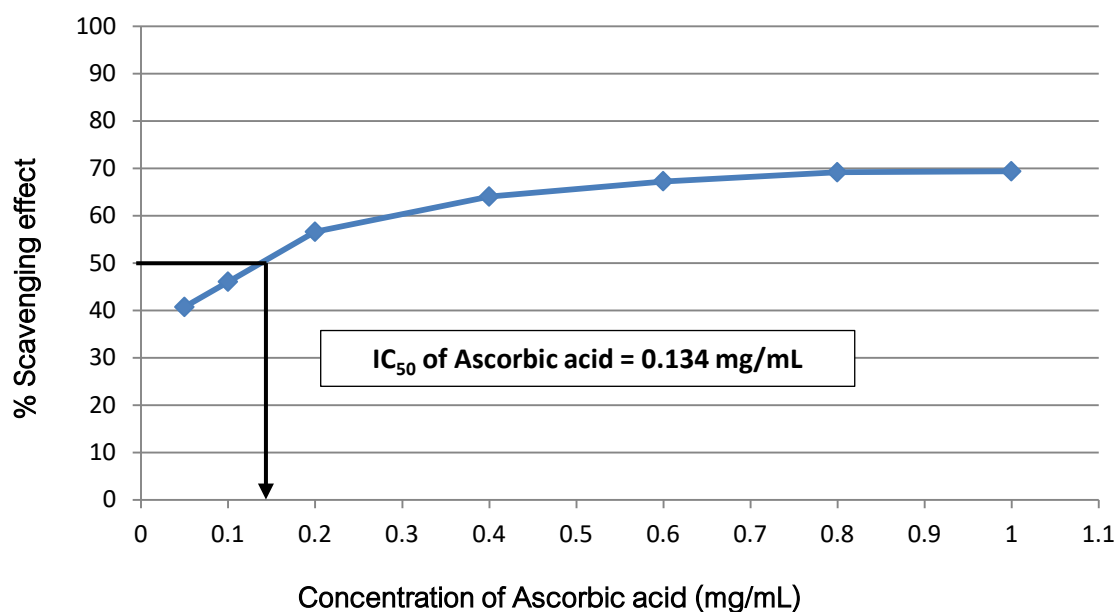


ภาพที่ 4.11 แสดง  $IC_{50}$  ของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid เปรียบเทียบกับสารสกัดจากเมล็ดข้าว และแกลบข้าวเหนียวดำ (\*, \*\* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$  จากการวิเคราะห์ด้วย Independent-Samples T-Test)

## 4.2 Hydrogen peroxide scavenging activity

### 4.2.1 การทดสอบการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้วิธี Horseradish peroxidase assay ของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid

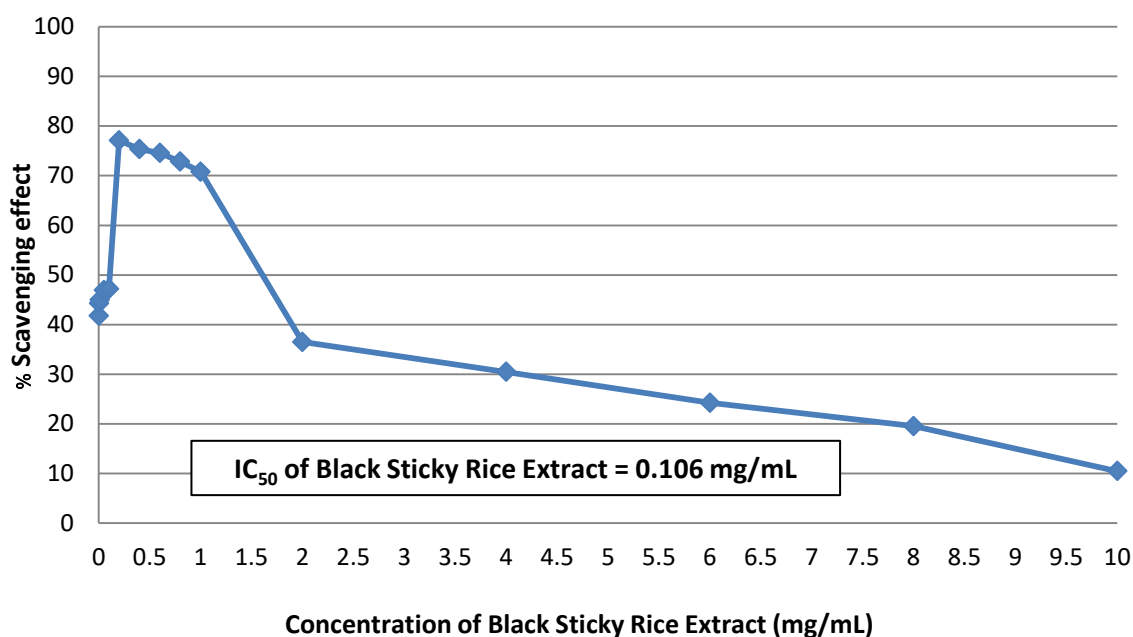
นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 nm ที่วัดได้จากสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 mg/mL แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยร้อยละของความสามารถในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (% Scavenging effect) พบว่า % Scavenging effect ของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid เฉลี่ยคือ 40.72, 46.01, 56.58, 64.02, 67.24, 69.15 และ 69.39 ตามลำดับ จากนั้นนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟโดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % scavenging effect และความเข้มข้นของ Ascorbic acid (ภาพที่ 4.12) เพื่อหาความเข้มข้นที่สามารถกำจัดได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 50% ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เริ่มต้น ( $IC_{50}$ ) จากกราฟพบว่าค่า  $IC_{50}$  ของ Ascorbic acid มีค่าเท่ากับ 0.134 mg/mL



**ภาพที่ 4.12** กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Ascorbic acid และค่าเฉลี่ยร้อยละของความสามารถในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (% Scavenging effect) และค่า  $IC_{50}$

#### 4.2.3 การทดสอบการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยใช้วิธี Horseradish peroxidase assay ของสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำ

นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 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 ที่ความยาวคลื่น 610 nm มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยร้อยละของความสามารถในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (% Scavenging effect) พบว่า % Scavenging effect ของสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำเฉลี่ยคือ 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 เมื่อนำค่าเฉลี่ยมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % scavenging effect และความเข้มข้นของสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำ (ภาพที่ 4.13) สารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 mg/mL มี % scavenging effect เพิ่มขึ้น และสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 mg/mL มี % scavenging effect ลดลงเมื่อเทียบกับความเข้มข้น 0.1 mg/mL ( $p \leq 0.05$ ) หาค่าความเข้มข้นของสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำที่สามารถกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ 50% ( $IC_{50}$ ) มีค่าเท่ากับ 0.106 mg/mL



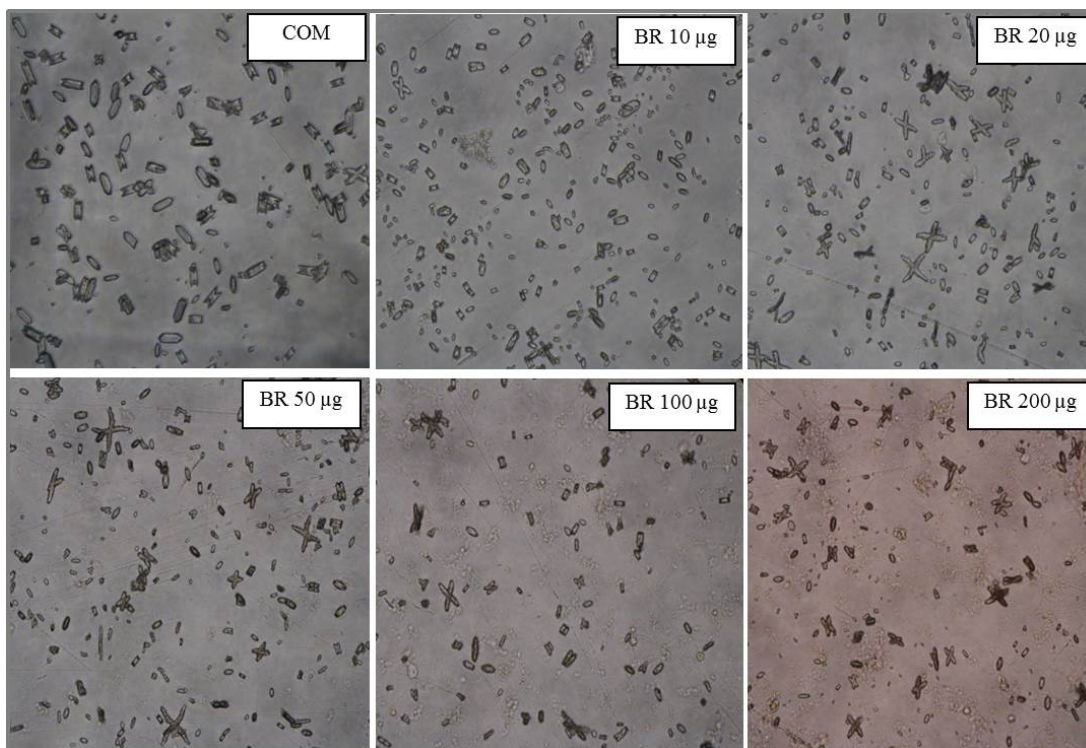
ภาพที่ 4.13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดข้าวกล้องข้าวเหนียวดำและค่าเฉลี่ยร้อยละของความสามารถในการกำจัด Hydrogen peroxide (% Scavenging effect) และค่า  $IC_{50}$



## ทดสอบความสามารถในการลดหรือยับยั้งการเกิดนิวไโตของสารสกัดด้วยการทดสอบ in vitro

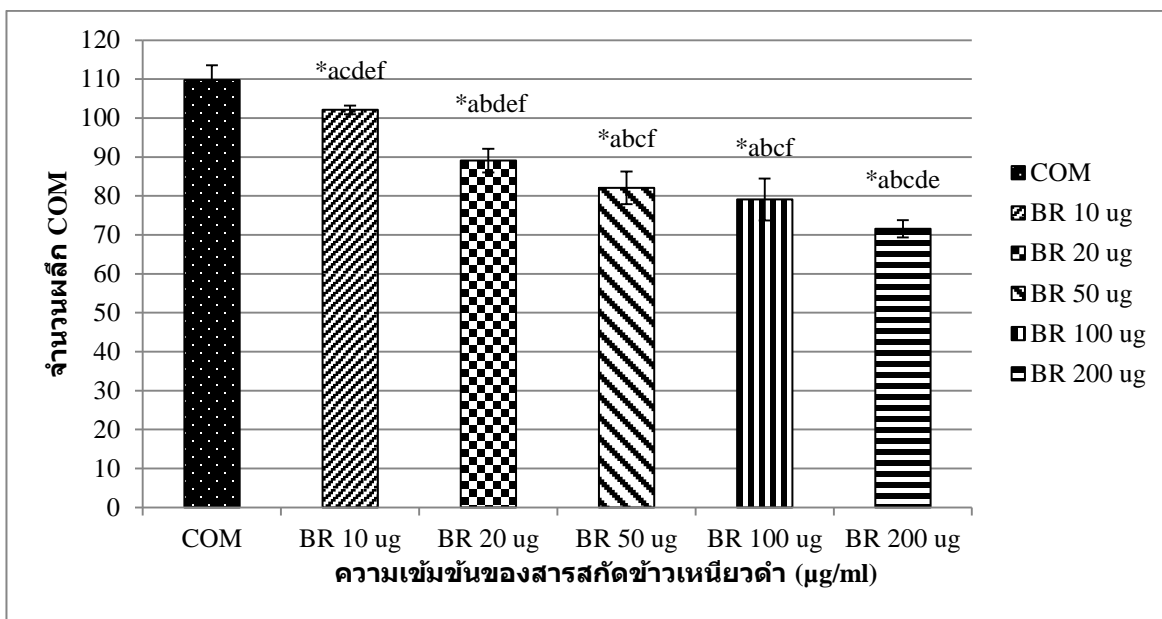
### 1. ทดสอบสารสกัดจากข้าวเหนียวดำต่อการเติบโตของผลึก COM

จากการทดสอบสารสกัดจากข้าวเหนียวดำที่ความเข้มข้น 10, 20, 50, 100 และ 200  $\mu\text{g}$  ต่อการเติบโตของผลึกแคลเซียมออกซาเลตโมโนไฮเดรต (COM) ใน 24-well plate เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมสารสกัด (จำนวน 3 ซ้ำ ในแต่ละกลุ่มการทดลอง) นำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ phase contrast แล้วนับจำนวนผลึกแบบสุ่มในแต่ละสถานะ (จำนวน 30 HPF) ที่กำลังขยาย 40 เท่า นำค่าเฉลี่ยมาคำนวณทางสถิติพบว่า กลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมสารสกัดมีผลึก COM จำนวนมากลักษณะรูปร่างหกเหลี่ยมเป็นผลึกเดี่ยว และจับกันเป็นกลุ่มผลึก มีจำนวนเฉลี่ย  $109.77 \pm 3.76$  กลุ่มที่เติมสารสกัดจากข้าวเหนียวดำ (BR) 10  $\mu\text{g}$  มีจำนวนผลึก  $102.13 \pm 1.11$  กลุ่ม BR 20  $\mu\text{g}$  มีจำนวนผลึก  $89.13 \pm 3.05$  กลุ่ม BR 50  $\mu\text{g}$  มีจำนวนผลึก  $82.08 \pm 4.20$  กลุ่ม BR 100  $\mu\text{g}$  มีจำนวนผลึก  $79.11 \pm 5.39$  และกลุ่ม BR 200  $\mu\text{g}$  มีจำนวนผลึก  $71.57 \pm 2.20$  (ภาพที่ 4.14)



**ภาพที่ 4.14** ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ phase contrast แสดงขนาดของผลึก COM ในสถานะที่มีสารสกัดจากข้าวเหนียวดำที่ความเข้มข้น BR 10  $\mu\text{g}$ , BR 20  $\mu\text{g}$ , BR 50  $\mu\text{g}$ , BR 100  $\mu\text{g}$  และ BR 200  $\mu\text{g}$  เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม COM กำลังขยาย 40 เท่า

เมื่อนำค่าเฉลี่ยที่ได้มาคำนวณหาความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS โดยใช้ One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post hoc test พบว่าในสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำ (BR) ที่ความเข้มข้น 10  $\mu\text{g}$ , 20  $\mu\text{g}$ , 50  $\mu\text{g}$ , 100  $\mu\text{g}$  และ 200  $\mu\text{g}$  ทำให้จำนวนผลึก COM ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม COM ที่ไม่มีการเติมสารสกัด ที่  $p < 0.05$  โดยสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำที่ความเข้มข้น 200  $\mu\text{g}$  ทำให้จำนวนผลึกลดลงมากที่สุด (ภาพที่ 4.15)

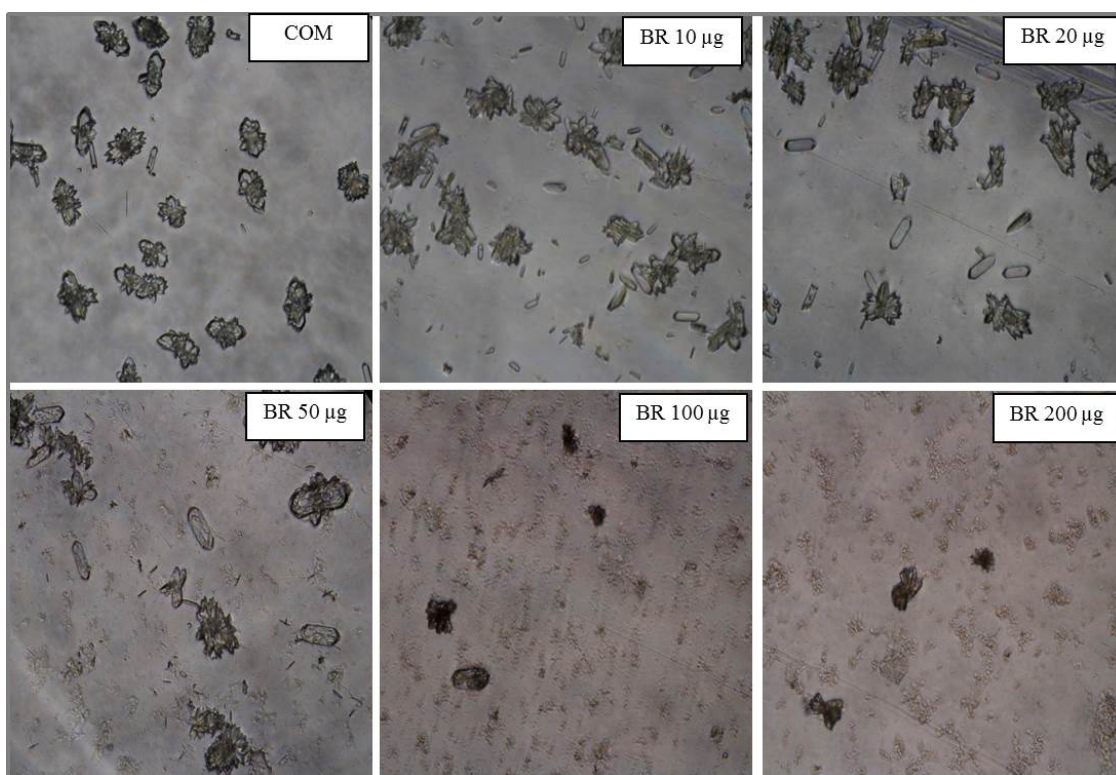


**ภาพที่ 4.15** กราฟแสดงจำนวนผลึก COM เฉลี่ยในสภาวะที่มีการเติมสารสกัดจากข้าวเหนียวดำที่ความเข้มข้น 10, 20, 50, 100 และ 200  $\mu\text{g}$  เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการเติมสารสกัด COM (\* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ; a มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม, b มีความแตกต่างกับ BR 10  $\mu\text{g}$ , c มีความแตกต่างกับ BR 20  $\mu\text{g}$ , d มีความแตกต่างกับ BR 50  $\mu\text{g}$ , e มีความแตกต่างกับ BR 100  $\mu\text{g}$  และ f มีความแตกต่างกับ BR 200  $\mu\text{g}$ )

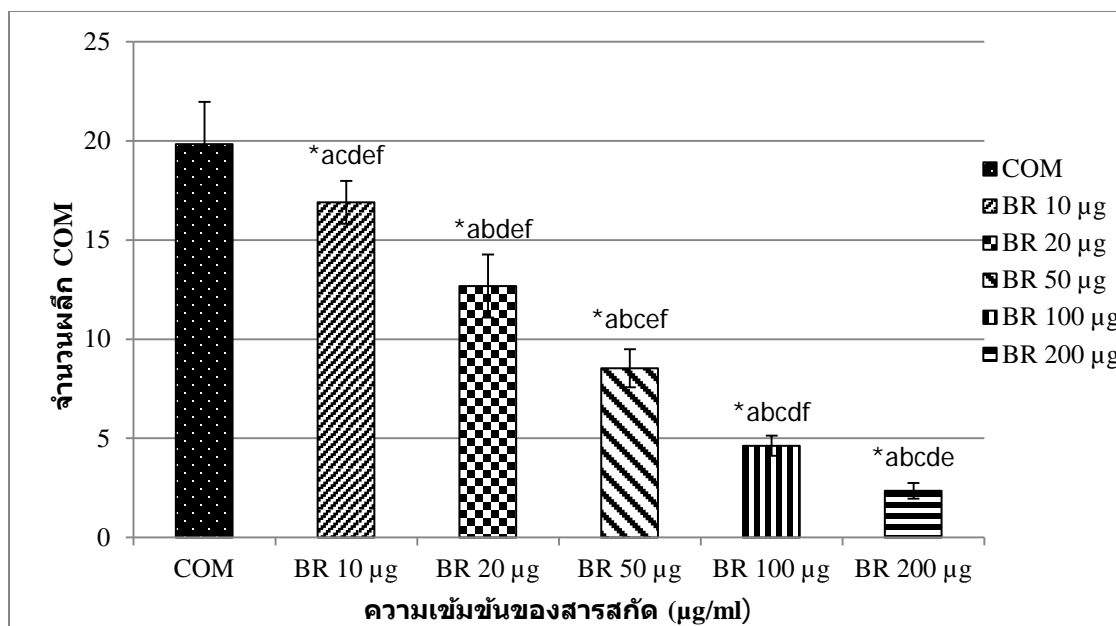
## 2. ทดสอบสารสกัดจากข้าวเหนียวดำต่อการเกาะกลุ่มของผลึก COM (Crystal aggregation)

จากการทดสอบสารสกัดจากข้าวเหนียวดำที่ความเข้มข้น 10, 20, 50, 100 และ 200  $\mu\text{g}$  ที่มีผลต่อการเกาะกลุ่มของผลึก COM ใน 24-well plate เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม COM ที่ไม่มีการเติมสารสกัด ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ในแต่ละกลุ่มการทดลอง นำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ phase contrast แล้วนับจำนวนผลึกแบบสุ่มในแต่ละสภาวะ ที่กำลังขยาย 40 เท่า นำค่าเฉลี่ยมาคำนวณทางสถิติ พบว่าในกลุ่มควบคุม

COM มีจำนวนผลึกที่อยู่ในรูป aggregate form เป็นจำนวนมาก โดยเมื่อนับจำนวนผลึกในรูป aggregate form ในแต่ละสภาวะ จำนวน 30 HPF พบว่าแต่ละกลุ่มมีจำนวนผลึกเฉลี่ย ดังนี้ คือ กลุ่มควบคุม COM มีจำนวนผลึก  $19.83 \pm 2.13$  กลุ่ม BR 10  $\mu\text{g}$  มีจำนวนผลึก  $16.9 \pm 1.08$  กลุ่ม BR 20  $\mu\text{g}$  มีจำนวนผลึก  $12.68 \pm 1.59$  กลุ่ม BR 50  $\mu\text{g}$  มีจำนวนผลึก  $8.53 \pm 0.96$  กลุ่ม BR 100  $\mu\text{g}$  มีจำนวนผลึก  $4.62 \pm 0.51$  และกลุ่ม BR 200  $\mu\text{g}$  มีจำนวนผลึก  $2.36 \pm 0.39$  (ภาพที่ 4.16) เมื่อนำจำนวนผลึกเฉลี่ยที่ได้มาคำนวณหาความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS โดยใช้ One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post hoc test พบว่าสารสกัดจากข้าวเหนียวดำ ที่ความเข้มข้น 10  $\mu\text{g}$ , 20  $\mu\text{g}$ , 50  $\mu\text{g}$ , 100  $\mu\text{g}$  และ 200  $\mu\text{g}$  ทำให้จำนวนผลึกในรูป aggregated form ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม ควบคุม COM ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยความเข้มข้นของสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำ 200  $\mu\text{g}$  ทำให้จำนวนผลึกที่เกาะเกี่ยวกันลดลงมากที่สุด (ภาพที่ 4.17)



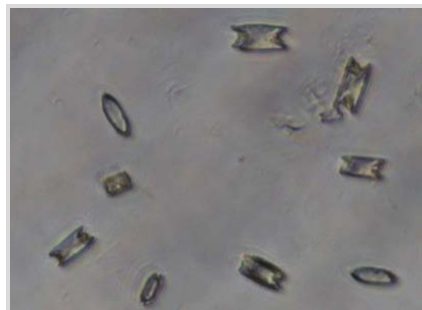
**ภาพที่ 4.16** ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ phase contrast แสดงจำนวน aggregated form ของผลึก COM ในสภาวะที่มีสารสกัดจากข้าวเหนียวดำความเข้มข้น BR 10  $\mu\text{g}$ , BR 20  $\mu\text{g}$ , BR 50  $\mu\text{g}$ , BR 100  $\mu\text{g}$  และ BR 200  $\mu\text{g}$  เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม COM กำลังขยาย 40 เท่า



**ภาพที่ 4.17** กราฟแสดงจำนวน aggregated form ของผลึก COM เฉลี่ยในสภาวะที่มีการเติมสารสกัดจากข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 10, 20, 50, 100 และ 200 µg เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีสารสกัด COM (\* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ; a มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม, b มีความแตกต่างกับ BR 10 µg, c มีความแตกต่างกับ BR 20 µg, d มีความแตกต่างกับ BR 50 µg, e มีความแตกต่างกับ BR 100 µg และ f มีความแตกต่างกับ BR 200 µg

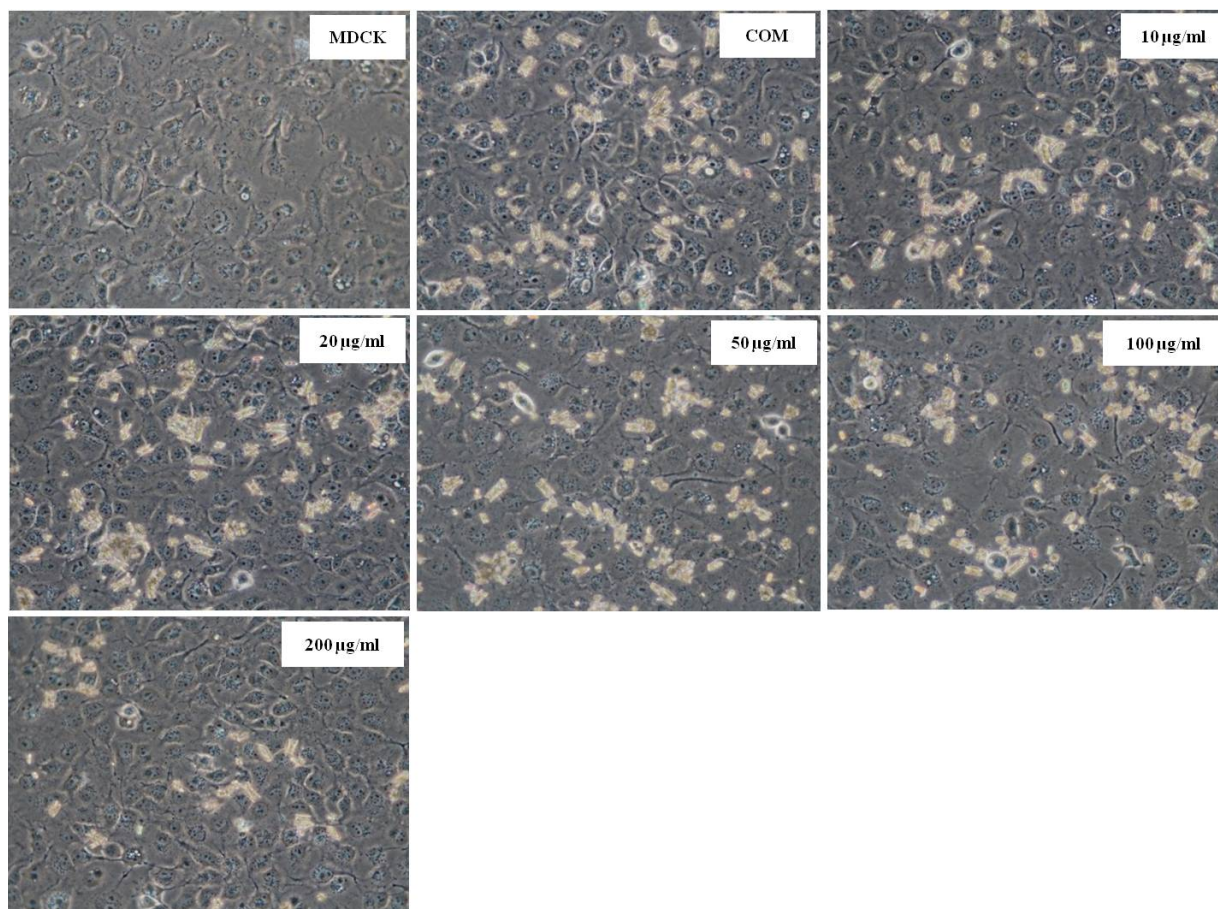
### 3. ทดสอบสารสกัดจากข้าวเหนียวดำต่อการจับของผลึกกับเซลล์เพาะเลี้ยงท่อไตส่วนปลาย MDCK

เตรียมผลึกแคลเซียมออกซาลेटโมโนไฮเดรตเพื่อใช้ในการทดสอบ โดยผสมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์และโซเดียมออกซาลेटให้ได้ความเข้มข้น 5 และ 0.5 mM ตามลำดับ นำผลึกที่เตรียมได้ไปอบแห้ง นำมาศึกษารูปร่างด้วยกล้องจุลทรรศน์ phase contrast พบว่าผลึก COM ที่เตรียมได้มีรูปร่างเป็นหกเหลี่ยม (Hexagonal shape) ซึ่งเป็น typical morphology ของ COM โดยผลึก COM มีความสำคัญคือมีความรุนแรงในการก่อโรคนี้ในไต มากกว่าผลึกแคลเซียมออกซาลेटชนิดอื่นๆ เนื่องจากมีความคงตัว (stable) และมีแรงในการยึดจับกับเซลล์ท่อไต (adhesive force) มากกว่าผลึกชนิดอื่น (ภาพที่ 4.18)



**ภาพที่ 4.18** รูปร่างพื้นฐานของผลึก COM แบบหกเหลี่ยม เมื่อวิเคราะห์ด้วย phase contrast microscope (กำลังขยาย 40 เท่า)

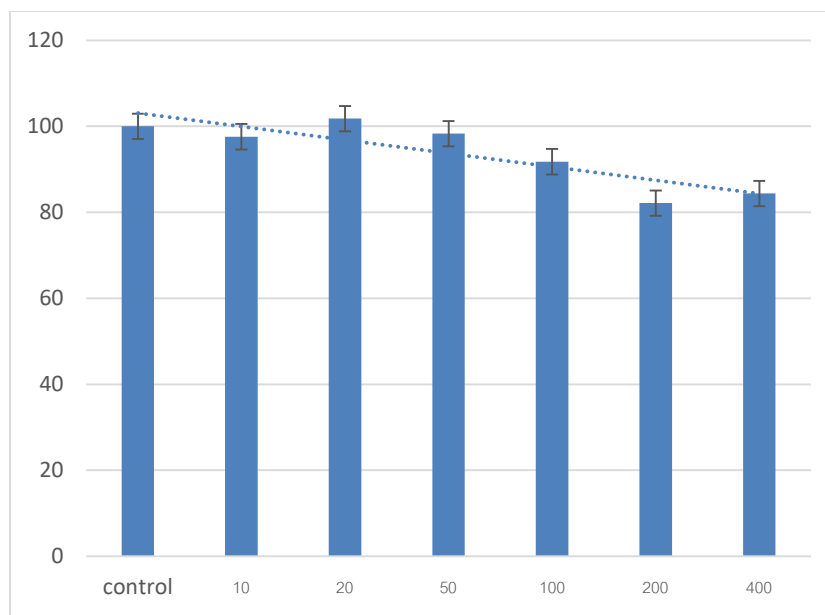
การจับของผลึก COM กับเซลล์ท่อไตจัดเป็นขั้นตอนวิกฤตของการเกิดนิ่วในไต เพราะผลึกที่เกาะจับจะมีขนาดโตขึ้นเรื่อยๆ และใหญ่จนอุดตันทางเดินปัสสาวะ ทำให้ผู้ป่วยเกิดพยาธิสภาพขึ้น จากการทดสอบสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำ ความเข้มข้น 10  $\mu\text{g}$ , 20  $\mu\text{g}$ , 50  $\mu\text{g}$ , 100  $\mu\text{g}$  และ 200  $\mu\text{g}$  ในการยับยั้งการจับกันระหว่างผลึก COM กับเซลล์ MDCK เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีเพียงผลึก COM (positive control) และกลุ่มควบคุมที่มีการเติมเพียงสารสกัด (negative control) ทำการถ่ายภาพด้วยกล้อง phase contrast microscope กำลังขยาย 40 เท่า (**ภาพที่ 4.19**) ทำการนับจำนวนผลึก COM ที่จับกับเซลล์ MDCK ในแต่ละสภาวะจำนวน 30 HPF โดยกลุ่ม positive control ที่เติมเพียง COM ในปฏิกิริยา มีจำนวนผลึก  $102.33 \pm 12.05$  กลุ่มที่มีสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำ ความเข้มข้น 10  $\mu\text{g}$ , 20  $\mu\text{g}$ , 50  $\mu\text{g}$ , 100  $\mu\text{g}$  และ 200  $\mu\text{g}$  มีจำนวนผลึกเฉลี่ย  $100.07 \pm 12.30$ ,  $99.03 \pm 11.02$ ,  $91.8 \pm 9.64$ ,  $79.03 \pm 10.37$  และ  $68.5 \pm 9.02$  ตามลำดับ



**ภาพที่ 4.19** ภาพจากกล้อง phase contrast microscope แสดงการจับของผลึก COM กับเซลล์ MDCK ในสถานะที่มีสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำ ความเข้มข้น 10 µg, 20 µg, 50 µg, 100 µg และ 200 µg ที่กำลังขยาย 40 เท่า

#### ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดข้าวเหนียวดำต่อเซลล์ท่อไตส่วนปลาย MDCK

จากการทดสอบสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้น 10, 20, 50, 100, 200 และ 400 µg/ml ต่อเซลล์ MDCK เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมสารสกัดจากข้าว (n= 3) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 nm ด้วยเครื่อง ELISA Reader พบว่าสารสกัดจากข้าวเหนียวดำไม่มีผลกระทบต่อการมีชีวิตของเซลล์ MDCK เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังภาพที่ 4.20



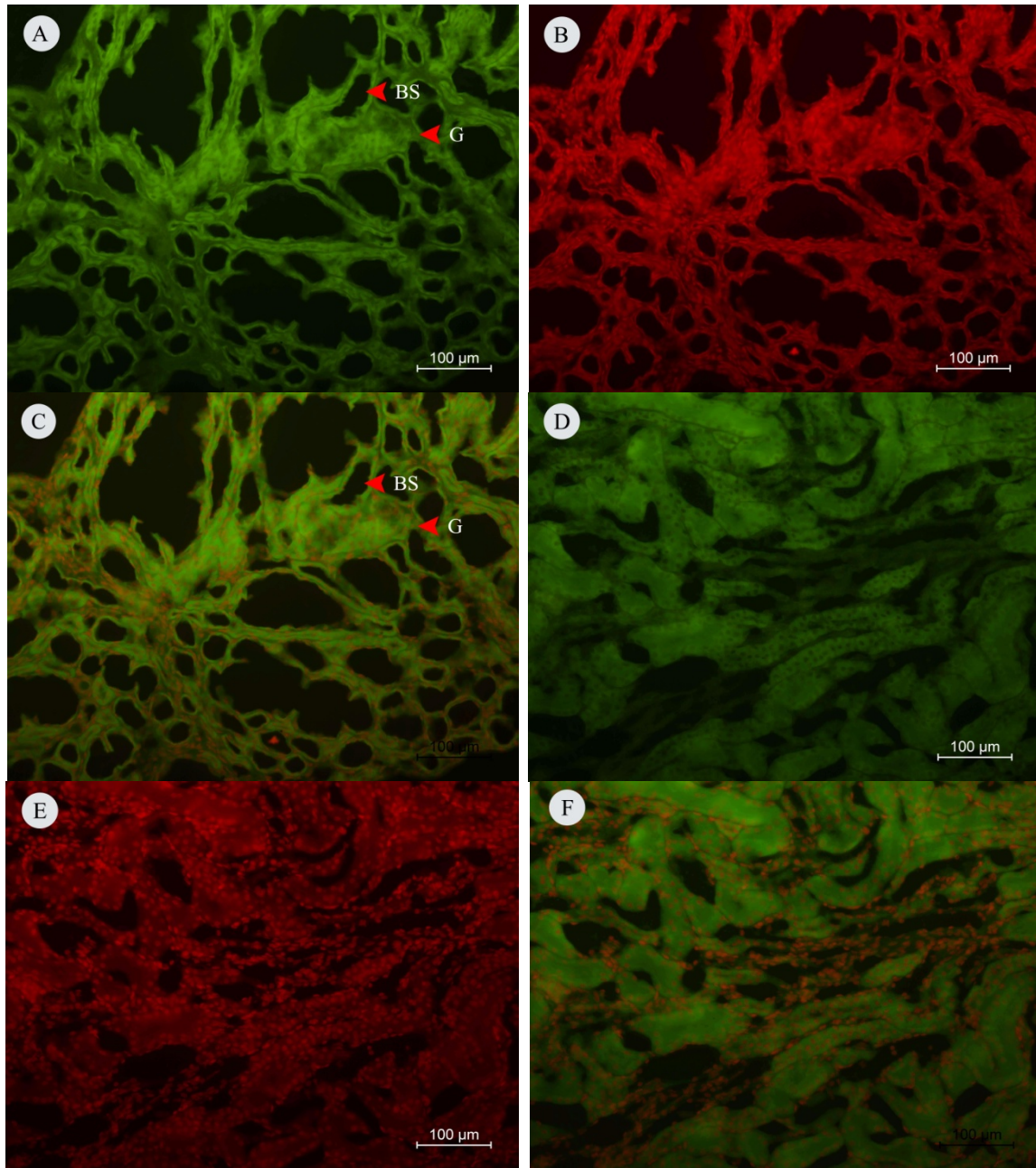
**ภาพที่ 4.20** กราฟแสดงค่ารอดชีวิตของเซลล์ (True relative ratio) ที่ป่มกับสารสกัดข้าวเหนียวดำความเข้มข้นต่างๆ

### ผลของสารสกัดจากข้าวเหนียวดำในการป้องกันการเกิดนิ่วในไตในหนูทดลอง

จากการให้หนูทดลองได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำ โดยใช้ gastric intubation วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนเหนียวนำให้เป็นนิ่วด้วย 0.5% Ethylene glycol เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดจากข้าวเหนียวดำและเหนียวนำให้เป็นนิ่ว เมื่อครบเวลาทำการเก็บเนื้อเยื่อไตมาศึกษา

#### 1. การแสดงออกของสารอนุมูลอิสระ 8-oHdG ด้วยวิธี immunofluorescence

ผลการศึกษาพบว่าเนื้อเยื่อของหนูกลุ่มควบคุมมีความเสียหายเกิดขึ้นมากกว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัด โดยพบการติดสีเรืองแสงบริเวณไซโตพลาสซึมมากกว่าหนูในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำ และมีการติดสี Propidium Iodide บริเวณนิวเคลียสในหนูทั้ง 2 กลุ่ม และหนูกลุ่มควบคุมมีลักษณะของเนื้อเยื่อที่ไม่เป็นระเบียบ Glomerulus มีรูปร่างผิดปกติ มีการฉีกขาดของหลอดเลือดฝอยทำให้ผนังชั้น visceral layer ของ Bowman's capsule เสื่อมรูปร่าง Bowman's space และ Lumen กว้างขึ้น และพบการฉีกขาดของ Distal และ Proximal tubule มากกว่าในหนูที่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำ (ภาพ 4.21)

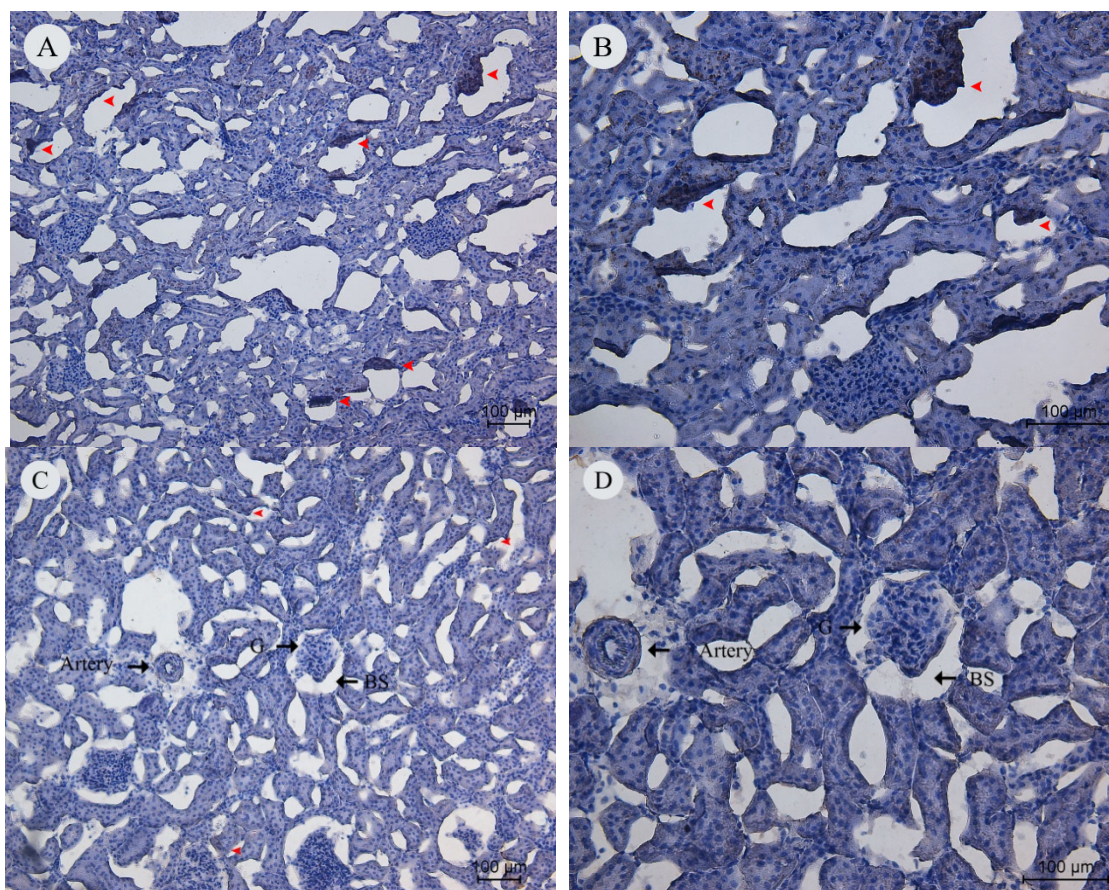


**ภาพที่ 4.21** แสดงผลการแสดงออกของอนุมูลอิสระ 8-OHdG ด้วยวิธี Immunofluorescence  
 (A-C) ภาพแสดงลักษณะเนื้อเยื่อวิทยาไตซ้ายในหนูกลุ่มควบคุม กำลังขยาย 20X  
 (D-F) ภาพแสดงลักษณะเนื้อเยื่อวิทยาไตซ้ายในหนูที่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำ กำลังขยาย 20X



## 2. ผลการศึกษาการแสดงผลของอนุมูลอิสระชนิด 8-OHdG ด้วยวิธี Immunoperoxidase

จากการนำเนื้อเยื่อไตซ้ายของหนู 2 กลุ่ม คือ หนูกลุ่มควบคุมและหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำ มาศึกษาพบว่าในหนูกลุ่มควบคุมมีลักษณะของเนื้อเยื่อที่ไม่เป็นระเบียบ Glomerulus มีรูปร่างผิดปกติ มีการฉีกขาดของหลอดเลือดฝอยทำให้ผนังชั้น visceral layer ของ Bowman's capsule เสียรูปร่าง Bowman's space และ Lumen กว้างขึ้น และพบการฉีกขาดของ Distal และ Proximal tubule มากกว่าในหนูที่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำ และเนื้อเยื่อของหนูกลุ่มควบคุมมีการติดสีของ DAB substrate ที่ Epithelial cells บริเวณ Renal tubule มากกว่าหนูในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำ (ภาพ 4.22)

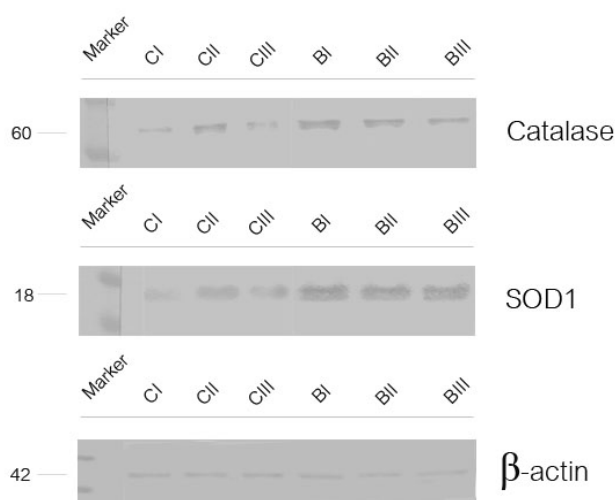


**ภาพที่ 4.22** แสดงผลการศึกษาอนุมูลอิสระชนิด 8-OHdG ด้วยวิธี Immunoperoxidase

- (A, B) แสดงลักษณะเนื้อเยื่อวิทยาไตซ้ายในหนูกลุ่มควบคุม บริเวณที่มีการติดสีของ DAB substrate ที่ epithelial cell (ลูกศรสีแดง) กำลังขยาย 10X และ 20X ตามลำดับ
- (C, D) แสดงลักษณะเนื้อเยื่อวิทยาไตซ้ายในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำ การติดสีของ DAB substrate ที่ Epithelial cell (ลูกศรสีแดง) กำลังขยาย 10X และ 20X ตามลำดับ

### 3. การแสดงออกของสารต้านอนุมูลอิสระชนิด Catalase และ SOD1 ด้วยวิธี western blot

จากการศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ Catalase น้ำหนักโมเลกุล 60 kDa และ SOD1 น้ำหนักโมเลกุล 18 kDa ด้วยวิธี Western blot พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำทั้งสามตัวอย่าง (BI, BII, BIII) มีการแสดงออกของแถบโปรตีนมากกว่าหนูกลุ่มควบคุมทั้งสามตัวอย่าง (CI, CII, CIII) และเมื่อวัดความเข้มของแถบโปรตีนด้วยโปรแกรม Image J พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำมีการแสดงออกของแถบโปรตีน catalase และ SOD มากกว่าหนูกลุ่มควบคุมประมาณ 2.298 เท่า และ 2.610 เท่า ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (ภาพที่ 4.23)



**ภาพที่ 4.23** การแสดงออกของเอนไซม์ Catalase และ SOD1 ด้วยวิธี Western blot ในเนื้อเยื่อไตของหนูกลุ่มควบคุม และหนูที่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำ

## บทที่ 5

### สรุปผลและอภิปรายผลการวิจัย

จากผลการศึกษาร้อยละของสารสกัดพบว่า แกลบข้าวเหนียวดำมีร้อยละของสารสกัดหยาบ 2.274 ซึ่งมากกว่าสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำถึง 7.5 เท่า ปริมาณสารสกัดที่ได้อาจแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลาย เช่น เอทานอล อะซิโตน และเมทานอล เป็นต้น เวลาในการสกัด และอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (Jun, H.I., Song, G.S., Yang, E.I., Youn, Y., 2012) จากการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระแอนโทไซยานินซึ่งเป็นเม็ดสี สะสมอยู่บริเวณเปลือกข้าวหรือส่วนของรำข้าว ทำให้ปรากฏเป็นสีต่างๆ กล่าวคือข้าวสีดำ สีน้ำตาล และสีแดงประกอบด้วยสารหลักของแอนโทไซยานินคือ cyanidin-3-glucoside (C3G) และ penonidin-3-glucoside (P3G) โดย C3G มีปริมาณถึง 93% ของแอนโทไซยานินทั้งหมด ความแตกต่างของปริมาณสารแอนโทไซยานินขึ้นอยู่กับความแตกต่างทางพันธุกรรม ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด และปัจจัยอื่นๆ เช่น แสงแดด เป็นต้น (Ryu, S.N., 1998; Abdel-AI, E.M., 2006; Abdel-Aal, E.M., 2003) ข้าวสีดำมีปริมาณแอนโทไซยานินและสารประกอบฟีนอลในปริมาณมากกว่าข้าวสีขาว และสีแดง (Ryu, S.N., 1998; Zhang, M., 2006) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากแกลบข้าวเหนียวดำมีปริมาณแอนโทไซยานินและสารประกอบฟีนอลรวมปริมาณมากกว่าสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีรายงานว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีเข้มจะมีใยอาหาร ธาตุแคลเซียม สารโพลีฟีนอล และสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีอ่อน โดยเฉพาะข้าวที่มีสีแดงเข้มเกือบดำจะมีธาตุเหล็ก สารโพลีฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวสายพันธุ์อื่นๆ (Ardiansyah, 2007) เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการต้านหรือกำจัดอนุมูลอิสระพบว่าสารสกัดจากแกลบข้าวเหนียวดำสามารถรีดิวซ์เหล็กได้ดีกว่าสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน เมื่อทดสอบหาร้อยละของการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (% DPPH scavenging activity) พบว่าสารสกัดจากข้าวเหนียวดำมีค่า  $IC_{50}$  น้อยกว่าสารสกัดจากแกลบข้าวเหนียวดำ ทั้งนี้ค่า  $IC_{50}$  คือความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้อนุมูล DPPH ลดลงครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นเริ่มต้น สรุปได้ว่าสารสกัดจากเมล็ดข้าวมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดจากแกลบข้าวเหนียวดำ แต่อย่างน้อยกว่า ascorbic acid มีรายงานวิจัยของ Munthana และคณะ พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมีน้อยที่สุดในรำข้าวสีขาว (ข้าวหอมไชยา) โดยมีค่า  $IC_{50}$  0.2582

กลไกการเกิดนิวไนโตประกอบด้วยกระบวนการ crystallization, crystal growth, crystal aggregation และ crystal adhesion ขั้นตอนวิกฤตคือการจับกันระหว่างผลึกแคลเซียมออกซาเลตโมโนไฮเดรต (COM) ซึ่งเป็นผลึกนิวไนโตที่มีความรุนแรงและมีแรงยึดจับกับเซลล์ท่อไตมากกว่าผลึกชนิดไดไฮเดรต มักพบ

ปนออกมากับปัสสาวะจำนวนมาก (crystalluria) ในผู้ป่วยนิ่วในไต โดยผลึกที่ยึดจับกับเซลล์ท่อไตจะมีขนาดใหญ่ขึ้นจนอุดกั้นทางเดินปัสสาวะทำให้ผู้ป่วยแสดงอาการปัสสาวะไม่ออกและมีเลือดออกปนมากับปัสสาวะ จากการศึกษาความสามารถของสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำในการยับยั้งกระบวนการดังกล่าวข้างต้น พบว่าสารสกัดสามารถลดการเติบโตของก้อนผลึกและการเกาะเกี่ยวของผลึก COM อย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ทั้งใน *In Vitro* และ *In Vivo* พบว่าสารสกัดจากลูกใต้ใบ มีสารที่มีคุณสมบัติในการป้องกันและรักษาโรคนี้ สามารถยับยั้งการเกิดนิ่วในระยะ Growth และ Aggregation และลดการเกาะเกี่ยวระหว่างผลึกกับเซลล์ท่อไต ทำให้การติดค้างของผลึกบริเวณท่อไตลดลง ( Barros ME SN, Boim MA, 2010; Boim MA HI, Schor N., 2010 ) นอกจากนี้ จากการทดสอบพบว่าสารสกัดจากเมล็ดข้าวเหนียวดำ สามารถลดการจับกันระหว่างผลึก COM กับเซลล์เพาะเลี้ยงท่อไตส่วนปลาย MDCK ได้อย่างมีนัยสำคัญ

ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาลดหรือยับยั้งการเกิดนิ่วในไตในหนูทดลอง โดยเหนี่ยวนำให้หนูทดลองเป็นนิ่วด้วยการใช้ 0.5% ethylene glycol และทำการศึกษาระดับออกของสารอนุมูลอิสระ 8-OHdG โดยวิธี Immunofluorescence และ วิธี Immunoperoxidase ในเนื้อเยื่อไตของหนู โดยกลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมได้รับน้ำและอาหารปกติ กลุ่มที่ 2 คือกลุ่มที่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำ ผลการศึกษาเนื้อเยื่อบริเวณท่อไต ไม่พบการเกาะจับของผลึกบริเวณ renal tubule ในหนูทั้งสองกลุ่ม ผลการแสดงผลของสารอนุมูลอิสระ 8-OHdG วิธี Immunofluorescence พบว่าเนื้อเยื่อของหนูกลุ่มควบคุมมีการติดสีเรืองแสงบริเวณไซโตพลาสซึมมากกว่าหนูในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำ และจากการทดสอบวิธี Immunoperoxidase พบว่าเนื้อเยื่อของหนูกลุ่มควบคุมมีการติดสีของ DAB substrate ที่ Epithelial cells บริเวณ Renal tubule มากกว่าหนูในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำ สามารถชี้ให้เห็นว่าสารอนุมูลอิสระ 8-OHdG มีความเกี่ยวข้องในเนื้อเยื่อไตที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดนิ่วในไต และสารสกัดข้าวเหนียวดำ มีผลช่วยลดการบาดเจ็บของเซลล์ที่เกิดจาก Oxidative stress ได้ 8-OHdG เป็นโปรตีนที่เป็นอันตรายต่อดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นผลจากการเกิด Oxidative stress และสามารถพบได้บริเวณนิวเคลียสของเซลล์ที่ถูกทำลาย ดังนั้นการศึกษาทางพยาธิสภาพจึงนิยมใช้ 8-OHdG เป็นตัวชี้วัดการเกิด Oxidative stress ในการวิจัยก่อนหน้าได้มีการทดลองในสัตว์ทดลองโดยให้ Oxalate ในปริมาณสูง เพื่อเพิ่มการสร้างผลึกแคลเซียมออกซาเลต ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของก้อนนิ่ว พบเอนไซม์ 8-OHdG เกี่ยวข้องกับการบาดเจ็บของเซลล์ โดยพบที่บริเวณเยื่อหุ้มของท่อไตที่ได้รับการบาดเจ็บ (Schrier SE, 2000; Tsujihata, M., 2008) มีงานวิจัยที่มีการเก็บตัวอย่างของผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้ไตเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อไตบริเวณที่ไม่ได้เกิดมะเร็งซึ่งได้จากผู้ป่วยโรคมะเร็งไต พบว่าผู้ป่วยมีการอักเสบ มีประสิทธิภาพในการทำงานของไตลดลง และยังพบการแสดงผลของ 8-OHdG สูงขึ้นด้วย (Uraivan Waiwijit) และในงานวิจัยผลของสารสกัดเมล็ดข้าวเหนียวดำต่อการเกิดผลึกในปัสสาวะของหนูเมื่อเปรียบเทียบกับพยาธิสภาพเนื้อเยื่อไตของหนูที่

ไม่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำกับหนูที่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำที่ถูกเหนียวนำไปเกิดผลึกด้วย EG พบพยาธิสภาพมีการรวมกลุ่มกันของ glomerulus และ glomerular space กว้างขึ้น proximal และ distal tubule มี epithelium บาง และไม่สามารถแยก proximal convoluted tubule และ distal tubule ออกจากกันได้ มีการคั่งของเลือดในเนื้อไตของเนื้อเยื่อไตหนูที่ไม่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำแต่ไม่พบพยาธิสภาพในหนูที่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำ จะเห็นได้ว่าเมื่อเกิดผลึกในเนื้อเยื่อไตแล้วจะส่งผลให้เยื่อบุท่อไตถูกทำลาย และทำให้เกิดการอักเสบในบริเวณท่อไต และยังมีงานวิจัยที่ศึกษากลไกการเกิดนิ่วในสัตว์ทดลอง พบว่าเซลล์บุท่อไตที่อยู่รอบบริเวณที่มีผลึกเกาะติดถูกทำลายและตาย โดยพบเซลล์บวม แตก และหลุดออกจากฐานเซลล์ ที่สำคัญพบเซลล์อักเสบ (inflammatory cells) เช่น monocytes, macrophages, lymphocytes และ polymorphonuclear leukocytes ปริมาณมากบริเวณ renal interstitium และรอบผลึกจะพบเซลล์ macrophages ห้อมล้อมอยู่จำนวนมาก แสดงให้เห็นว่าการอักเสบมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดนิ่วไต (ชาญชัย บุญหล้า, 2550)

เมื่อเกิดอนุมูลอิสระเหล่านี้แล้ว ร่างกายจะมีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระดังกล่าวซึ่งเรียกว่า ระบบการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant system) เพื่อเป็นการลดภาวะเครียดออกซิเดชัน ระบบการต้านอนุมูลอิสระประกอบไปด้วยระบบที่เป็นเอนไซม์เช่น เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GPx) เป็นต้น และระบบที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น glutathione, วิตามิน A, E และ C และโคเอนไซม์ต่าง ๆ เป็นต้น โดยเฉพาะระบบที่เป็นเอนไซม์จะมีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระกล่าวคือเมื่อเกิดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion,  $O_2^{\cdot-}$ ) ขึ้นภายในเซลล์ เอนไซม์ SOD จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยนอนุมูลอิสระดังกล่าวเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ ) และจะถูกเปลี่ยนไปเป็นออกซิเจน ( $O_2$ ) และน้ำ ( $H_2O$ ) ด้วยเอนไซม์ Catalase และ GPx (ทินกร เหล่าทอง, 2556) ดังนั้นจากการศึกษาการแสดงออกของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Western blot ในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ Catalase และ เอนไซม์ SOD1 ในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากข้าวเหนียวดำมีความเข้มข้นของแถบโปรตีนมากกว่าหนูในกลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของแถบเอนไซม์ Catalase ในเนื้อเยื่อไตของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำด้วยโปรแกรม Image J พบความแตกต่างต้นประมาณ 2.298 เท่า ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของเอนไซม์ SOD1 ในเนื้อเยื่อไตของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำด้วยโปรแกรม Image J พบค่าความแตกต่างประมาณ 2.610 เท่า ( $p < 0.05$ ) จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทำการสกัด Huangshukuihua หรือ *Flos Abelmoschus manihot* ได้สารกลุ่มฟลาโวนโกลโคไซด์ คือ เควอซีทิน Quercetin และ ไฮเปอร์โรไซด์ hyperoside (QH) นำมาทดลองในหนู 3 กลุ่ม โดย กลุ่มที่ 1 ไม่ได้รับ QH, กลุ่มที่ 2 ได้รับ QH และกลุ่มที่ 3 ได้รับ potassium citrate (KCit) ในสัปดาห์สุดท้ายเหนียวนำหนูให้เป็นนิ่วโดย EG พบว่า ในหนูกลุ่มที่ได้รับ QH มีปริมาณเอนไซม์ Catalase และ

SOD เพิ่มขึ้นมากกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น ( Wei Z,2014) แสดงให้เห็นว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้จากพืชบางชนิดมีอาจฤทธิ์ในการกระตุ้นกลไกการสร้างเอนไซม์ SOD และ Catalase ซึ่งมีผลในการต้านอนุมูลอิสระและเป็นกลไกส่วนหนึ่งที่เกิดจากการควบคุมภายในสิ่งมีชีวิตเมื่อเซลล์ได้รับความเครียดจากสารเคมีหรือสิ่งแปลกปลอม (Hattaya J,2558) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองเมื่อเหนี่ยวนำไตของหนูโดยใช้ ethylene glycol (EG) และ ammonium chloride ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) ให้เกิดผลึกทำให้มีการสร้างสารอนุมูลอิสระ 8-OHdG ขึ้น เมื่อมีสารอนุมูลอิสระในปริมาณมากเกินกว่าที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้ส่งผลให้หนูเกิดสภาวะเครียดออกซิเดชันซึ่งจะไปทำลายเซลล์เยื่อหุ้มไต เมื่อเกิดการสะสมผลึกเป็นเวลานานทำให้เกิดเป็นก้อนนิ่วเกิดขึ้น ส่งผลให้เกิดโรคนี้วในไตดังนั้นร่างกายจึงมีกลไกกำจัดสารอนุมูลอิสระซึ่งเกิดจากการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระต่าง ๆ ได้แก่ เอนไซม์ SOD1 และ Catalase เพื่อควบคุมอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับสมดุล ดังนั้นการได้รับสารสกัดจากข้าวเหนียวดำจึงไปส่งผลให้ร่างกายเพิ่มกลไกในการป้องกันหรือยับยั้งสารอนุมูลอิสระและปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในไตหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดนิ่วไตได้

### 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 anthocyanins-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.

## 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 (ปรับค่า pH จนได้ค่า 7.4)	70	ml
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 (Protein 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  $\mu$ l

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

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

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

ซังสาร $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.028	g
ซังสาร $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (anhydrous)	1.902	g
ซังสาร NaCl	17	g
เติม ddH <sub>2</sub> O	150	ml
(ปรับค่า pH จนถึง 7.2)		
เติม ddH <sub>2</sub> O ให้ครบ	200	ml

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

ซังสาร SDS (sodium dodecyl sulfate)	10	g
เติม ddH <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> O จนครบ	1000	ml

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

ชั่งสาร Tris	30.2	g
ชั่งสาร Glycine	144	g
ชั่งสาร SDS (sodium dodecyl sulfate)	10	g
(ปรับค่า pH จนถึง 8.3)		
แล้วเติม ddH <sub>2</sub> O จนครบ	1000	ml

**4.5 การเตรียม Sepaeating gel buffer, pH 8.8 ปริมาตร 200 ml**

ชั่งสาร Tris	36.3	g
แล้วเติม ddH <sub>2</sub> O	150	ml
(ปรับค่า pH ด้วย HCl จนถึง 8.8)		
แล้วเติม ddH <sub>2</sub> O จนครบ	200	ml

**4.6 การเตรียม Stacking gel buffer, pH 6.8 ปริมาตร 200 ml**

ชั่งสาร Tris	12.11	g
แล้วเติม ddH <sub>2</sub> O	150	ml
(ปรับค่า pH ด้วย HCl จนถึง 6.8)		
แล้วเติม ddH <sub>2</sub> O จนครบ	200	ml

**4.7 การเตรียม 10% Ammonium persulfate (APS)**

ชั่งสาร APS	0.1	g
แล้วเติม ddH <sub>2</sub> O	1	ml

**4.8 การเตรียม Coomassie blue ปริมาตร 1000 ml**

ซ้ํงสาร Coomassie Brilliant blue R250	0.25	g
Methanol	400	ml
Glacial acetic acid	70	ml
แล้ํวเด็ม ddH <sub>2</sub> O จนครบ	1000	ml

**4.9 การเตรียม Destain I ปริมาตร 1000 ml**

Methanol	400	ml
Glacial acetic acid	70	ml
แล้ํวเด็ม ddH <sub>2</sub> O จนครบ	1000	ml

**4.10 การเตรียม Destain II ปริมาตร 1000 ml**

Methanol	50	ml
Glacial acetic acid	70	ml
แล้ํวเด็ม ddH <sub>2</sub> 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
แล้ํวเด็ม ddH <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> O	400	ml

(ปรับค่า pH จนถึง 7.9)

เติม ddH <sub>2</sub> O จนครบ	1000	ml
<b>5.2 การเตรียม 0.1% Glycine ปริมาตร 100 ml</b>		
ผง Glycine	0.1	g
0.1 M PBS	100	ml