ประสิทธิภาพของสารสกัดรำข้าวต่อการป้องกันการเกิดมะเร็งผิวหนังจากการกระตุ้นของ UVA

โดย

นางสาวณิชนันทน์ จันทนู

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ประสิทธิภาพของสารสกัดรำข้าวต่อการป้องกันการเกิดมะเร็งผิวหนังจากการกระตุ้น
ของ UVA

โดย
นางสาวณิชนันทน์ จันทนู

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

EFFICIENCY OF RICE BRAN EXTRACT ON PREVENTION OF SKIN CANCER INDUCED BY UVA

By

MISS Nitchanan JANTANU

A Thesis Submitted in partial Fulfillment of Requirements

for Master of Science (BIOTECHNOLOGY)

Department of BIOTECHNOLOGY

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2017

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ	ประสิทธิภาพของสารสกัดรำข้าวต่อการป้องกันการเกิดมะเร็งผิวหนังจากการกระตุ้นของ UVA
โดย	ณิชนันทน์ จันทนู
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ธารทัศนวงศ์)

พิจารณาเห็นชอบโดย

.... ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร. ชลเทพ อุสาคู)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร. กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ ดร. นวลอนงค์ จิระกาญจนากิจ)

.... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก

(อาจารย์ ดร. วีรวัฒน์ ตีรณะชัยดีกุล)

58401204 : เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
คำสำคัญ : รำข้าว, UVA, มะเร็งผิวหนัง, Micronuclei assay, Apoptosis

นางสาว ณิชนันทน์ จันทนู: ประสิทธิภาพของสารสกัดรำข้าวต่อการป้องกันการเกิดมะเร็งผิวหนังจากการกระตุ้นของ UVA อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รองศาสตราจารย์ ดร. กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์

รังสี UVA สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันจากการทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ส่งผลให้เกิดการทำลายเซลล์ผิวหนังและนำไปสู่การพัฒนาเป็นมะเร็งได้ สารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระจึงมีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ป้องกันผิวหนังจากแสงแดด การวิจัยนี้เป็นการศึกษาสารสกัดจากรำข้าว 2 ชนิดซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งมาใช้ให้เกิดประโยชน์ ได้แก่รำข้าวหอมแดงและก่ำดอยสะเก็ด ผลการทดลองพบว่าหอมแดงมีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระดีกว่าก่ำดอยสะเก็ด ทั้งจากวิธีวิเคราะห์ DPPH, ABTS และ FRAP assay และเมื่อศึกษาผลของสารสกัดรำข้าวกับความมีชีวิตของเซลล์ผิวหนัง (A375 cell line) ที่ได้รับรังสี UVA ที่ระดับต่ำๆ (12 J/cm^2) พบว่าหอมแดงสามารถฟื้นเซลล์ให้มีชีวิตได้ดีกว่าก่ำดอยสะเก็ด อย่างไรก็ตาม การได้รับรังสี UVA ที่ระดับสูงขึ้น (20 J/cm^2) พบว่าสารสกัดรำข้าวทั้งสองชนิดทำให้เซลล์เกิด apoptosis มากขึ้น โดยสารสกัดรำข้าวหอมแดงสามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิด apoptosis ได้ดีทั้งก่อนและหลังรับรังสี UVA แต่สารสกัดรำข้าวก่ำดอยสะเก็ดให้ผลได้เฉพาะเมื่อได้รับสารสกัดรำข้าวก่อนการรับรังสี UVA นอกจากนี้พบว่าเซลล์ที่บ่มกับสารสกัดรำข้าวหอมแดง มีเปอร์เซ็นต์การเกิด micronuclei ที่เป็นผลจากการได้รับ UVA ลดลง และเมื่อศึกษาค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดรำข้าวและปริมาณ ROS ในเซลล์ที่ได้รับรังสี UVA พบว่าสารสกัดรำข้าวทั้งสองมีสมบัติเป็น photosensitizer ที่ก่อให้เกิด ROS ขึ้นภายในเซลล์ โดยสมบัติการเป็น photosensitizer และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรำข้าวมีบทบาทร่วมกันในการป้องกันและลดความเสี่ยงการเกิดมะเร็งผิวหนัง ผ่านการกระตุ้นให้เซลล์ที่ได้รับรังสี UVA เกิด apoptosis และมีเปอร์เซ็นต์การเกิด micronuclei ลดต่ำลง ดังนั้น สารสกัดรำข้าวหอมแดงจึงเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้เป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอางป้องกันแดดที่สามารถช่วยฟื้นฟูเซลล์ให้เจริญแข็งแรง และลดความเสี่ยงการเกิดมะเร็งผิวหนังจากรังสี UVA ได้ดีกว่าก่ำดอยสะเก็ด

58401204 : Major (BIOTECHNOLOGY)

Keyword : Rice bran, UVA, Skin cancer, Micronuclei assay, Apoptosis

MISS NITCHANAN JANTANU : EFFICIENCY OF RICE BRAN EXTRACT ON PREVENTION OF SKIN CANCER INDUCED BY UVA THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR KANYANEE JIRASRIPONGPUN, PH.D.

UVA irradiation could induce oxidative stress, leading to accumulation of free radical and subsequently skin damaged and cancer development. Thus, antioxidant compound would be feasible to use as pharmaceutical additive in the product for skin protection from sun light. The present work was aimed to verify the agricultural waste of rice bran i.e., Hom Dang and Kam Doi Saked as antioxidant materials. It was observed that Hom Dang had a higher antioxidant activity than Kam Doi Saked, based on DPPH, ABTS and FRAP assay. Additionally, Hom Dang extract could revive viability of 12 J/cm^2 UVA treated cells, better than Kam Doi Saked. However, at the higher dose of UVA treatment at 20 J/cm^2, both rice bran extracts stimulated more apoptotic cells. The additional of Hom Dang prior to, and after UVA exposure induce more apoptosis than the control UVA treated cell. However, Kam Doi Saked could induce apoptosis only when apply before the UVA treatment. Besides, Hom Dang extract reduced the percentage of micronuclei in UVA treated cells. Testing on the light absorption of rice bran extracts revealed photosensitizer property which resulted in induction of intracellular ROS. Thus, these characteristics of rice bran extract could play major role in preventing and reducing the risk of skin cancer. Consequently, Hom Dang rice bran extract is a remarkable choice of antioxidant source to apply as a cosmetic ingredient for it regenerating healthy cells, and reducing the risk of skin cancer from UVA rays better than Kam Doi Saked.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์ และอาจารย์ ดร. นวลอนงค์ จิระกาญจนากิจ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำ ชี้แนะในการทำวิจัย ช่วยสนับสนุนและแก้ไขปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างทำวิจัย ตลอดจนตรวจแก้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ชลเทพ อุสาคู ที่ให้ความกรุณาเป็นคณะกรรมการสอบหัวข้อวิทยานิพนธ์และสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำเพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. วีรวัฒน์ ตีรณะชัยดีกุล ที่ให้ความกรุณาเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำเพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.ภญ. มาลิน จุลศิริ จากบริษัท เอส แอนด์ เจ อินเตอร์เนชั่นแนล เอนเตอร์ไพรส์จากัด (มหาชน) ที่สนับสนุนสารสกัดรำข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์และข้อมูลต่างๆที่เอื้อต่องานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ภายใต้โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม-พวอ ระดับปริญญาโท (MSD58I0130)

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ให้ความรู้ อบรมสั่งสอน ตลอดจนเพื่อน และพี่ที่คอยให้คำปรึกษาและกำลังใจ

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี ตลอดจนให้ความสะดวกในการดำเนินการด้านเอกสารต่างๆในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณพี่สุรัตน์ ปุณยหทัยกุล ที่ให้คำแนะนำและการช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ พี่ชาย และน้องสาว สำหรับแรงผลักดันและกำลังใจ จนทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ณิชนันทน์ จันทนู

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... จ

กิตติกรรมประกาศ....... ฉ

สารบัญ .... ช

สารบัญภาพ .... ฎ

สารบัญตาราง .... ฑ

บทที่ 1 บทนำ....... 1

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา....... 1

2. วัตถุประสงค์ของการศึกษา 2

3. ขอบเขตการศึกษา....... 2

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง....... 3

1. เซลล์และชั้นผิวหนังมนุษย์....... 3

2. รังสีอัลตราไวโอเลตและผลกระทบต่อผิวหนัง 4

2.1 รังสี UVA 5

2.2 รังสี UVB 5

2.3 รังสี UVC 5

3. การหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ (cell cycle arrest) 8

4. การซ่อมแซม DNA (DNA repair)....... 9

4.1 Base excision repair (BER) 9

4.2 Nucleotide excision repair (NER) 10

5. โปรแกรมการตายของเซลล์ (Programmed cell death/ apoptosis) 11
6. การตรวจสอบความเสียหายของ DNA ภายในเซลล์ 12
7. มะเร็งผิวหนัง 13
7.1 Basal cell carcinoma 13
7.2 Squamous cell carcinoma 13
7.3 Cutaneous malignant melanoma 13
8. แนวทางการป้องกัน 14
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 18
1. เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมี 18
1.1 เครื่องมือ 18
1.2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องแก้ว 18
1.3 สารเคมี 19
2. เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัยและการเพาะเลี้ยง 20
3. ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย 20
4. ระเบียบวิธีวิจัย 21
4.1 การทดสอบความสามารถต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) 21
4.1.1 DPPH assay (DPPH radical scavenging assay) 21
4.1.2 ABTS assay (ABTS radical cationdecolorization assay) 21
4.1.3 FRAP assay (ferric reducing antioxidant power assay) 22
4.2 การวัดปริมาณความมีชีวิตของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA ทั้งในสภาวะก่อนและหลังรับสารสกัดรำข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี MTT assay และ Neutral red uptake assay (NR assay) 22
4.2.1 การศึกษาระดับความเข้มของรังสี UVA ต่อความมีชีวิตของเซลล์ 22

4.2.2 การวัดปริมาณความมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดรำข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ก่อนถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA 23

4.2.3 การวัดปริมาณความมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดรำข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ หลังจากถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA 23

4.3 การวัดปริมาณการเกิด apoptosis ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA ทั้งในสภาวะก่อนและหลังรับสารสกัดรำข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ....................23

4.3.1 การศึกษาลักษณะการตายแบบ apoptosis....................23

4.3.2 การศึกษาผลของสารสกัดรำข้าวต่อการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ที่ได้รับสารก่อนถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA....................24

4.3.3 การศึกษาผลของสารสกัดรำข้าวต่อการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ที่ได้รับสารหลังถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA 24

4.4 การวัดปริมาณความถี่การเกิด Micronuclei ของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA ทั้งในสภาวะก่อนและหลังรับสารสกัดรำข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ....................25

4.5 การวัดปริมาณ ROS ภายในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA ทั้งในสภาวะก่อนและหลังรับสารสกัดรำข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ....................26

4.6 การศึกษาอายุการเก็บรักษาสารสกัดรำข้าว....................27

4.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ....................27

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง....................28

1. ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรำข้าว ด้วยวิธีวิเคราะห์ทางเคมี 28

1.1 DPPH radical scavenging assay (DPPH assay) 28

1.2 ABTS radical cation decolorization assay (ABTS assay) 29

1.3 Ferric ion reducing antioxidant power assay (FRAP assay)....................30

2. ปริมาณความมีชีวิตของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA ทั้งก่อนและหลังรับสารสกัดรำข้าวที่ระดับเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี MTT assay และ Neutral red uptake assay....................31

2.1 ระดับความเข้มของรังสี UVA ต่อความมีชีวิตของเซลล์....................32

2.2 ปริมาณความมีชีวิตของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA ที่ระดับ IC_{30} (12 J/cm^2) ทั้งก่อนและหลังรับสารสกัดรำข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ....35

3. ปริมาณเซลล์ที่เกิด apoptosis ของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA ทั้งก่อนและหลังรับสารสกัดรำข้าวที่ระดับเข้มข้นต่างๆ....36

3.1 ผลของรังสี UVA ต่อการตายของเซลล์แบบ apoptosis 37

3.2 ผลของสารสกัดรำข้าวต่อการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA38

4. ปริมาณความถี่การเกิด Micronuclei ของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA ทั้งก่อนและหลังรับสารสกัดรำข้าวที่ระดับเข้มข้นต่างๆ 41

5. ความสามารถดูดกลืนแสงในช่วง UVA ของสารสกัดรำข้าว และปริมาณ ROS ภายในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA ทั้งก่อนและหลังรับสารสกัดรำข้าวที่ระดับเข้มข้นต่างๆ 43

6. การตรวจติดตามความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารที่ระยะเวลาเก็บต่างๆ เพื่อประเมินอายุการเก็บสารสกัดรำข้าว 45

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ....47

1. สรุปผลการทดลอง 47

2. ข้อเสนอแนะ 48

บรรณานุกรม 49

ประวัติผู้เขียน 55

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 โครงสร้างของชั้นผิวหนัง (Macgill, 2016) 4

ภาพที่ 2 ความยาวคลื่นของรังสียูวี และผลกระทบทางชีวภาพต่อผิวหนัง (D'Orazio et al., 2013) 5

ภาพที่ 3 (A); การก่อตัวของ cyclobutane-pyrimidine dimer (CPDs) และ (B); (6-4)-pyrimidine-pyrimidone photoproduct กับ Dewar isomers หลังการดูดซับพลังงานจากรังสี UVB *(Svobodova et al.*, 2006) 7

ภาพที่ 4 กลไกความเสียหายที่ถูกกระตุ้นด้วย UV และการก่อตัวของ ROS (Sen คือ photosensitizer, Sen* คือ Excited photosensitizer, R คือ DNA base/aromatic amino acid (protein) และ Me+ คือ metal cation): (A) คือ Type 1, (B) คือ Type 2 (Svobodova et al., 2006) 7

ภาพที่ 5 ความเสียหายหลักของ DNA ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยภาวะเครียดออกซิเดชันจากรังสี UV: dR คือ deoxyribose (Svobodova *et al*., 2006) 8

ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่าง DNA damage กับ Cell cycle (Subramanian et al., 2013) 9

ภาพที่ 7 ลักษณะการเกิด Micronucleated binucleated cell (Aardema และ Kirsch-Volders, 2001) 12

ภาพที่ 8 ลักษณะการเกาะแผ่ของเซลล์ A375 (กำลังขยาย 10X) 20

ภาพที่ 9 ลักษณะสารสกัดรำข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ 20

ภาพที่ 10 % DPPH radicals scarvenging activity ของสารสกัดรำข้าวพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด และหอมแดง 28

ภาพที่ 11 % ABTS radicals scarvenging activity ของสารสกัดรำข้าวพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด และหอมแดง 29

ภาพที่ 12 ค่า EC_{50} ของสารสกัดรำข้าวพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด และหอมแดง (จำนวน 3 ซ้ำ) โดยอักษร a b c และ d ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ($P < 0.01$) 30

ภาพที่ 13 ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารสกัดรำข้าวพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด และหอมแดง เทียบกับปริมาณ Trolox (จำนวน 3 ซ้ำ) โดยอักษร a และ b ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ($P < 0.01$) 31

ภาพที่ 14 ระดับความเข้มแสงของรังสี UVA (J/cm^2) ต่อความมีชีวิตของเซลล์ เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay และ NR assay ที่เวลา 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมงหลังสิ้นสุดการฉายรังสี (จำนวน 8 ซ้ำ) โดยอักษร a b c และ d ที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูล หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P < 0.05) 32

ภาพที่ 15 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์หลังได้รับรังสี UVA 6 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (20X) โดย a คือ control ส่วน b c d e และ f คือ ลักษณะเซลล์หลังได้รับรังสี UVA ที่ความเข้มแสง 5, 10, 20, 30 และ 40 J/cm^2 33

ภาพที่ 16 ค่า IC_{50} ของความเข้มรังสี UVA (J/cm^2) ที่มีผลต่อเซลล์ เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay และ NR assay ที่เวลา 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมงหลังสิ้นสุดการฉายรังสี (จำนวน 8 ซ้ำ) โดยอักษร a และ b ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P < 0.05) จากการตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์หลังการรับ UVA ที่เวลาต่างกัน 35

ภาพที่ 17 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ก่อนและหลังรับสารสกัดรำข้าวพันธุ์หอมแดง (A, B) และก่ำดอยสะเก็ด (C, D) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี MTT และ NR assay (จำนวน 6 ซ้ำ) โดยอักษร a และ b ที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูล หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P < 0.05) 36

ภาพที่ 18 ลักษณะเซลล์ A375 cell line ที่ย้อมด้วย Hoechst 33258 37

ภาพที่ 19 เปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis หลังสิ้นสุดการฉายรังสีเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง (จำนวน 12 ซ้ำ) โดยอักษร a, b, c, d และ e ที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูล หมายถึง เปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P < 0.05) 38

ภาพที่ 20 เปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis ในเซลล์ที่ได้รับสารสกัดรำข้าวก่อนฉายรังสี UVA (Pre-treatment) แล้วบ่มในอาหารปกติ 6 ชั่วโมง (จำนวน 9 ซ้ำ) โดยสัญลักษณ์ที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูล หมายถึง เปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosisที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P < 0.05) 39

ภาพที่ 21 เปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis ในเซลล์ที่ได้รับสารสกัดรำข้าวหลังฉายรังสี UVA (Post-treatment) แล้วบ่มในอาหารปกติ 6 ชั่วโมง (จำนวน 9 ซ้ำ) โดยสัญลักษณ์ที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูล หมายถึง เปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P < 0.05) 40

ภาพที่ 22 ลักษณะการเกิด Mononucleus (Mono), Binucleus (BN) และ Micronucleus (MN) ของเซลล์ A375 cell line จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี CBMN assay 41

ภาพที่ 23 ค่าการดูดกลืนแสงในช่วงรังสี UVA ของสารสกัดรำข้าวหอมแดงและก่ำดอยสะเก็ด 43

ภาพที่ 24 ระดับของ ROS ในเซลล์ที่ได้รับสารสกัดรำข้าวก่ำดอยสะเก็ดและหอมแดงในสภาวะก่อน (A, B) และหลัง (C, D) สัมผัสรังสี UVA ที่ระดับ 20 และ 40 J/cm^2, (K1, K2, K3: สารสกัดรำข้าวก่ำดอยสะเก็ดเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 mg/ml และ H1, H2, H3: สารสกัดรำข้าวหอมแดงเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 mg/ml ตามลำดับ 45

ภาพที่ 25 กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรำข้าวเทียบกับสารมาตรฐาน Ascorbic acid จากวิธี DPPH assay (จำนวน 3 ซ้ำ) โดยอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูล แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P < 0.01) 46

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 Chromophore ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ (endogenous chromophores) และที่ได้รับจากภายนอก (exogenous chromophores) และความยาวคลื่นที่ดูดซับ (Huang et al., 2009) 6

ตารางที่ 2 กระบวนการซ่อมแซมความเสียหายของ DNA แบบต่างๆ ที่เกิดขึ้นในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (ปิยะ เต็มวิริยะนุกุล, 2557)....................10

ตารางที่ 3 ชนิดและคุณสมบัติของสารเรืองแสงในการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มและการย้อมติดนิวเคลียสของเซลล์ (ปกป้อง ประยงค์ et al., 2007)....................11

ตารางที่ 4 สารกันแดดที่ได้รับอนุมัติจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (Balk et al., 2011) 15

ตารางที่ 5 สารโพลีฟีนอลในอาหาร (Etcheverry et al., 2012) 16

ตารางที่ 6 สรุปผลการตรวจสอบปริมาณความถี่การเกิด micronuclei ของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA (20 J/cm^2) ทั้งก่อนและหลังรับสารสกัดรำข้าวที่ระดับเข้มข้นต่างๆ โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูลหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) 42

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 1
บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

รำข้าว เป็นของเสียที่เกิดจากกระบวนการสีข้าว ซึ่งอุดมไปด้วยคุณค่าทางอาหารรวมถึงสารต้านอนุมูลอิสระที่หลากหลาย ทำให้รำข้าวกลายเป็นแหล่งวัตถุดิบที่น่าสนใจในการนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เพื่อเพิ่มมูลค่าให้สูงขึ้น การนำสารสกัดรำข้าวมาใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตผลิตภัณฑ์กันแดด เพื่อลดความเสี่ยงการเกิดมะเร็งผิวหนัง จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากมะเร็งผิวหนังมีความเสี่ยงเกิดขึ้นได้ทั้งจาก UVA และ UVB แต่ UVA (95%) มีปริมาณมากกว่า UVB (5%) และมีความเข้มรังสีไม่แตกต่างกันตลอดวันทั้งปี ทั้งยังสามารถแทรกผ่านเมฆและกระจกได้ดี ที่สำคัญคือ มีความยาวคลื่นที่สั้นกว่าแสง (visible light) ซึ่งเป็นภัยลุกลามที่มองไม่เห็น จึงก่อความรุนแรงทำลายผิวหนังในเชิงลึกมากกว่า รวมทั้งผลิตภัณฑ์กันแดดทั่วไป มักเน้นการป้องกัน UVB จึงเพิ่มโอกาสให้ปริมาณ UVA ลงผ่านชั้นผิวหนังได้มากขึ้น และลงลึกไปมีผลต่อเซลล์ทุกระดับชั้นของผิวหนังมากกว่า UVB (Gasparro, 2000) โดย UVA สามารถไปกระตุ้น chromophores ภายในเซลล์ให้สร้างอนุมูลอิสระกลุ่ม Reactive oxygen species (ROS) ที่มีผลให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ก่อให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอทั้งสายเดี่ยวและสายคู่ให้แตกหัก แล้วอาจสะสมจนก่อเกิดเป็นมะเร็งผิวหนังได้ ซึ่งสัมพันธ์กับข้อมูลที่พบว่าบุคคลที่ไปทำผิวสีแทน ซึ่งได้รับ UVA มักมีความเสี่ยงเป็นมะเร็งชนิด basal cell carcinoma (BCC), squamous cell carcinoma (SCC) และ melanoma เพิ่มสูงขึ้น (Shorrocks *et al.*, 2008) แม้ในสภาวะปกติเซลล์ในร่างกายสามารถป้องกันอันตรายจากรังสี UV ด้วยการสร้างเมลานินร่วมกับการซ่อมแซมดีเอ็นเอของเซลล์ อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการซ่อมแซมดีเอ็นเอของเซลล์มักมีประสิทธิภาพลดลงเมื่อมีอายุมากขึ้น ดังนั้น หากมีผลิตภัณฑ์กันแดดที่มีประสิทธิภาพก็จะช่วยลดความเสี่ยงการเกิดมะเร็งผิวหนังได้ดีในสภาวะที่มีแดดแรงมากขึ้นอย่างเช่นทุกวันนี้

การเลือกสารสกัดรำข้าวที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน มาศึกษาผลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อความมีชีวิตของเซลล์ การเกิด apoptosis และความถี่การเกิด micronuclei ของเซลล์ที่ได้รับรังสี UVA ในสภาวะการให้สารสกัดรำข้าวก่อนและหลังรับรังสี UVA รวมทั้งวิเคราะห์ความสามารถดูดกลืนแสงของสารสกัดรำข้าว และวิเคราะห์ระดับ ROS ภายในเซลล์ร่วมด้วย อาจให้ข้อมูลตอบโจทย์กลไกความสามารถของสารสกัดรำข้าวต่อการป้องกันความเสี่ยงการเกิดมะเร็งผิวหนังจาก UVA และสามารถเลือกชนิดของสารสกัดรำข้าวที่เหมาะสมในการนำมาใช้

เป็นองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ ช่วยให้ความมั่นใจถึงประสิทธิภาพทั้งก่อนและหลังสัมผัสแสงได้ดียิ่งขึ้น

2. วัตถุประสงค์ของการศึกษา

ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดรำข้าวและความสามารถในการป้องกันและลดผลภาวะเครียดในเซลล์ที่ได้รับ UVA ที่อาจนำไปสู่การเกิดมะเร็งผิวหนัง

3. ขอบเขตการศึกษา

3.1 ตรวจสอบประสิทธิภาพความสามารถต้านอนุมูลอิสระและอายุการเก็บรักษาสารสกัดรำข้าวด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay

3.2 ศึกษาผลของสารสกัดรำข้าวต่อความมีชีวิตของเซลล์ การเกิด Apoptosis และความถี่การเกิด Micronuclei ทั้งในสภาวะการให้สารสกัดรำข้าวก่อนและหลังรับรังสี UVA

3.3 วิเคราะห์ความสามารถดูดกลืนแสงของสารสกัดรำข้าว และวัดระดับ ROS ภายในเซลล์ที่ได้รับสารสกัดรำข้าวทั้งในสภาวะก่อนและหลังรับรังสี UVA

3.4 ตรวจสอบอายุการเก็บรักษาสารสกัดรำข้าวด้วยวิธี DPPH assay

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถเลือกชนิดวัตถุดิบที่เป็นสารสกัดจากรำข้าวของไทย ซึ่งเป็นของเสียจากกระบวนการผลิตข้าวมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์กันแดด เพื่อเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งจากภาคการเกษตรของประเทศ อีกทั้งเป็นการสนับสนุนและสร้างชื่อเสียงให้กับผลิตภัณฑ์จากข้าวไทย

มหาวิทยาลัยศิลปากร

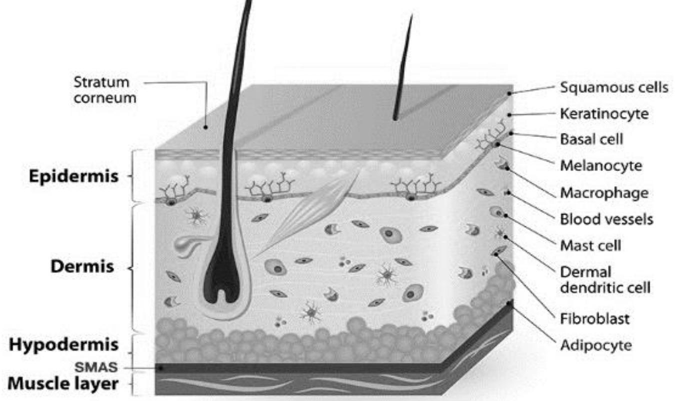
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. เซลล์และชั้นผิวหนังมนุษย์

ส่วนประกอบของร่างกายที่มีขนาดใหญ่สุดก็คือ ผิวหนัง ซึ่งมีหน้าที่ในการห่อหุ้มร่างกาย เพื่อรักษาสมดุลน้ำ อุณหภูมิในร่างกาย และป้องกันอันตรายจากสภาวะแวดล้อมภายนอก ผิวหนังประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่อยู่ด้านบน เรียกว่า ชั้นหนังกำพร้า (Epidermis) และส่วนที่อยู่ลึกลงไป เรียกว่า ชั้นหนังแท้ (Dermis)

ผิวชั้นหนังกำพร้า มีความหนาโดยเฉลี่ยประมาณ 0.4 ถึง 1.5 มิลลิเมตร มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นเซลล์ที่เรียกว่า keratinocytes เซลล์เหล่านี้เกิดจากการแบ่งตัวของ basal cells ซึ่งเป็นเซลล์ที่อยู่ชั้นล่างสุดของชั้นหนังกำพร้า เมื่อเจริญเติบโต และมีการพัฒนามากขึ้นก็จะเคลื่อนตัวขึ้นชั้นบนเรื่อยๆ โดยเซลล์จะมีขนาดใหญ่ขึ้นและแบนราบลง มีการเปลี่ยนแปลงของระบบ metabolism ของเซลล์ มีการสร้างโปรตีนและไขมันที่มีลักษณะเฉพาะ มีการเปลี่ยนแปลงของ cell membrane มีการสลายตัวของ nucleus และสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ ซึ่งสุดท้ายของการเปลี่ยนแปลงนี้ คือ จะได้เซลล์ keratinocytes ที่ตายแล้ว จึงเรียกชื่อใหม่ว่า corneocytes ซึ่งจะมีเฉพาะโปรตีนและไขมันอยู่ที่ cell membrane เท่านั้น จะไม่มี nucleus หรือ organells อื่นๆ หลังจากนี้ corneocytes ก็จะลอกหลุดออกไปกลายเป็นขี้ไคล ซึ่งลักษณะการเปลี่ยนแปลงและเคลื่อนตัวขึ้นชั้นบนของเซลล์ keratinocytes ทำให้สามารถแบ่งย่อยชั้นหนังกำพร้าได้ตามระยะต่างๆ ของการเปลี่ยนแปลง ดังนี้ คือ (1) Stratum germinativum หรือชั้น Basal cell layer ชั้นนี้จะอยู่ล่างสุด ประกอบไปด้วย basal cells ที่เรียงตัวกันชั้นเดียว เซลล์ชนิดนี้มีความสามารถในการแบ่งตัวสูงและแบ่งตัวตลอดเวลา มีรูปร่างเซลล์เป็น columnar - shaped และมี nucleus ขนาดใหญ่ เมื่อ basal cell แบ่งตัวให้กำเนิด keratonocytes และเคลื่อนที่ขึ้นไปชั้นเหนือกว่าจะกลายเป็นชั้นที่มีชื่อเรียกว่า (2) Stratum spinosum หรือชั้น Squamous cell layer ซึ่งประกอบไปด้วยเซลล์ keratinocytes ที่มีรูปร่างขนาดใหญ่ หลายเหลี่ยม คล้ายมีหนามยื่นออกมาจากผิวเซลล์เรียงตัวกันหนาประมาณ 5-10 ชั้น ถัดขึ้นไปจะเป็นชั้น (3) Stratum granulosum หรือ Granular cell layer ชั้นนี้จะพบเซลล์ที่มีรูปร่างค่อนข้างแบนเรียงซ้อนกันประมาณ 3-5 ชั้น จากนั้นเซลล์ keratinocytes ก็จะเปลี่ยนแปลงไปเป็น corneocytes อยู่ในชั้นบนสุดที่เรียกว่า (4) Stratum corneum หรือ Horny layer เซลล์ในชั้นนี้จะมีขนาดใหญ่สุด และมีหน้าที่ปกป้องผิวจากอันตรายภายนอก รวมทั้งป้องกันการสูญเสียน้ำไปจากผิวหนัง และเป็นทางผ่านทางของยาหรือสารต่างๆ จากภายนอก นอกจากเซลล์ keratinocytes แล้ว ในชั้นหนังกำพร้ายังมีเซลล์อีกกลุ่ม คือ Dendritic cells ซึ่งมีรูปร่างคล้ายดาว ประกอบไปด้วยเซลล์

3 ชนิด คือ (1) Melanocyte เป็นเซลล์สร้างเม็ดสี (2) Markel cell เป็นเซลล์เกี่ยวกับการรับความรู้สึก และ (3) Langerhans cell เป็นเซลล์เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน ส่วนผิวชั้นหนังแท้จะอยู่ด้านล่างต่อจากชั้นหนังกำพร้า มีความหนาประมาณ 1-2 มิลลิเมตร มีหน้าที่ทำให้ผิวหนังมีความยืดหยุ่น ทนแรงยืดผิวหนังได้ รวมทั้งอุ้มน้ำไว้เพื่อควบคุมสมดุลความร้อนของร่างกาย และเป็นประสาทรับสัมผัสต่างๆ ผิวชั้นนี้มีต้นกำเนิดมาจาก mesoderm ซึ่งประกอบไปด้วย เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ระบบเส้นเลือด และเส้นประสาท เป็นที่อยู่ของ mast cells, fibroblasts cells, macrophages cells และเซลล์ของระบบเลือด เช่น lymphocytes และ plasma cells เป็นต้น และยังเป็นแหล่งกำเนิดของ skin derivatives ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เจริญพัฒนามาจากผิวหนัง เช่น ขน เล็บ ต่อมเหงื่อ และต่อมน้ำมัน ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างของชั้นผิวหนัง (Macgill, 2016)

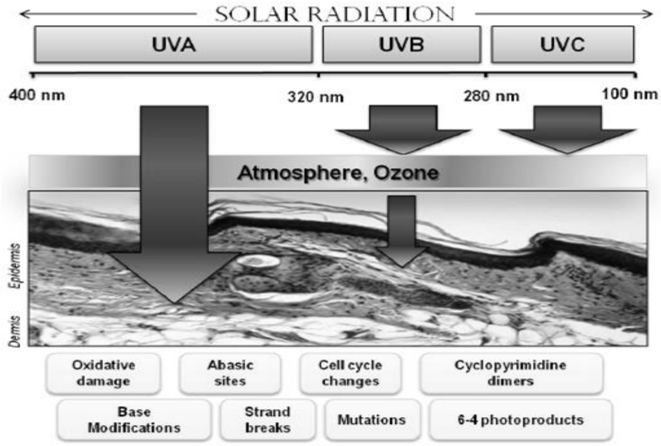
2. รังสีอัลตราไวโอเลตและผลกระทบต่อผิวหนัง

รังสีอัลตราไวโอเลต หรือ รังสี UV เป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่เกิดจากการแผ่ของดวงอาทิตย์ ซึ่งมีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 100 - 400 นาโนเมตร สามารถแบ่งออกได้เป็น รังสี UVA, UVB และ UVC รังสี UV จากแสงแดดในช่วงเที่ยงวันทั่วโลกประกอบไปด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ ของ UVA และ 5 เปอร์เซ็นต์ ของ UVB ขณะที่รังสี UVC จะถูกกักโดยโอโซนในชั้นบรรยากาศ ทำให้เหลือเพียงรังสี UVA และ UVB เท่านั้นที่แผ่มาถึงพื้นโลก และก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตบนโลกโดยเฉพาะมนุษย์ เนื่องจากรังสี UVA และ UVB มีความยาวคลื่นอยู่ในช่วงที่สามารถทะลุผ่านชั้นผิวหนังของมนุษย์ จึงก่อให้เกิดผลกระทบทางชีวภาพต่อผิวหนัง ดังแสดงในภาพที่ 2

2.1 รังสี UVA อยู่ในช่วงความยาวคลื่น 315 - 400 นาโนเมตร แบ่งออกเป็น รังสี UVA 1 (340 - 400 นาโนเมตร) และ UVA 2 (315 - 340 นาโนเมตร) รังสี UVA มีระดับพลังงานต่ำสุด แต่สามารถทะลุผ่านกระจก และแทรกซึมผ่านชั้นหนังกำพร้า หนังแท้ และหลอดเลือด ก่อให้เกิดการทำลายเซลล์ทางอ้อมผ่านการดูดซับของ Chromophores ที่อยู่ภายในเซลล์ (ตารางที่ 1) (Jaszewska *et al.*, 2013)

2.2 รังสี UVB อยู่ในช่วงความยาวคลื่น 280 - 315 นาโนเมตร มีอยู่ประมาณ 4-5 เปอร์เซ็นต์ของรังสี UV ที่แผ่มายังโลก ก่อให้เกิดความเสียหายที่ผิวหนังชั้นนอก (epidermis) และมีความเข้มสูงในช่วงเวลา 11:00 น. ถึง 13:00 น. ตลอดทั้งปี (Svobodova *et al.*, 2006) รังสี UVB ถูกดูดซับด้วย DNA โดยตรง จึงก่อให้เกิดความเป็นพิษโดยตรงต่อสารพันธุกรรม (Aoki-Yoshida *et al.*, 2013)

2.3 รังสี UVC อยู่ในช่วงความยาวคลื่น 100 - 280 นาโนเมตร และมีระดับพลังงานสูงสุด แต่ไม่สามารถแผ่มายังโลกได้ เนื่องจากประสิทธิภาพของชั้นโอโซนที่ดูดซับรังสี UV ได้ถึง 310 นาโนเมตร ทำให้รังสี UVC ทั้งหมด และ UVB 95 เปอร์เซ็นต์ ถูกดูดซับไว้ (Svobodova *et al.*, 2006)



ภาพที่ 2 ความยาวคลื่นของรังสียูวี และผลกระทบทางชีวภาพต่อผิวหนัง (D'Orazio *et al.*, 2013)

เมื่อผิวหนังโดนแสงแดดหรือแสง UV ภายในระยะเวลาสั้นๆ จะทำให้เกิดผิวหนังไหม้แดงจากแสงแดด หรือผิวหนังมีสีคล้ำลง เนื่องจากมีการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานิน และเมื่อโดนแสงแดดซ้ำๆ ระยะยาว ก็จะทำให้เกิดผิวหนังเสื่อมสภาพ เช่น เกิดรอยเหี่ยวย่น ผิวชั้นหนังกำพร้าบางลง เส้นเลือดขยาย เกิดรอยฝ้า และตกกระ นอกจากนี้การที่ผิวหนังสัมผัสกับแสงแดดยังนำไปสู่ความเสี่ยงทำให้เกิดเนื้องอกและมะเร็งผิวหนังได้ เนื่องจากรังสี UV สามารถชักนำให้เกิดความเสียหายแก่โมเลกุลขนาดใหญ่ภายในเซลล์ โดยเฉพาะ DNA ผ่าน 2 กลไกที่แตกต่างกัน คือ กลไก

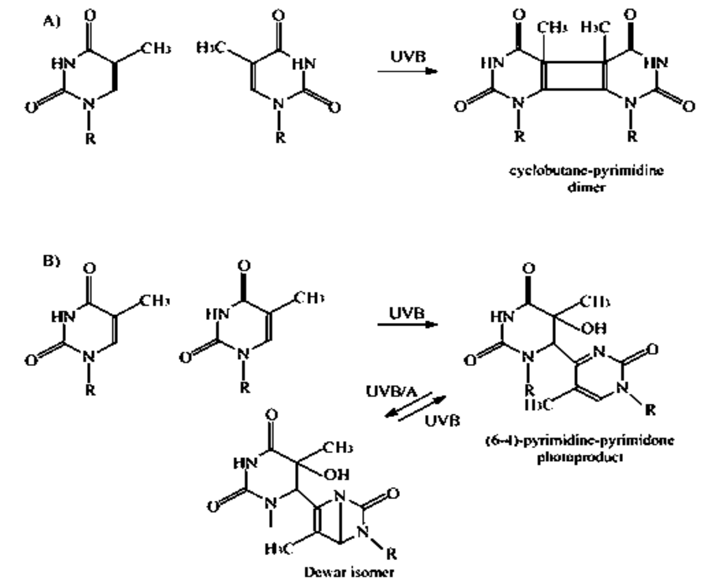
การดูดซับโฟตอนของโมเลกุลภายในเซลล์ที่เรียกว่า chromophore และกลไกทางอ้อมที่เกิดผ่าน photosensitizer

ตารางที่ 1 Chromophore ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ (endogenous chromophores) และที่ได้รับจากภายนอก (exogenous chromophores) และความยาวคลื่นที่ดูดซับ (Huang *et al.*, 2009)

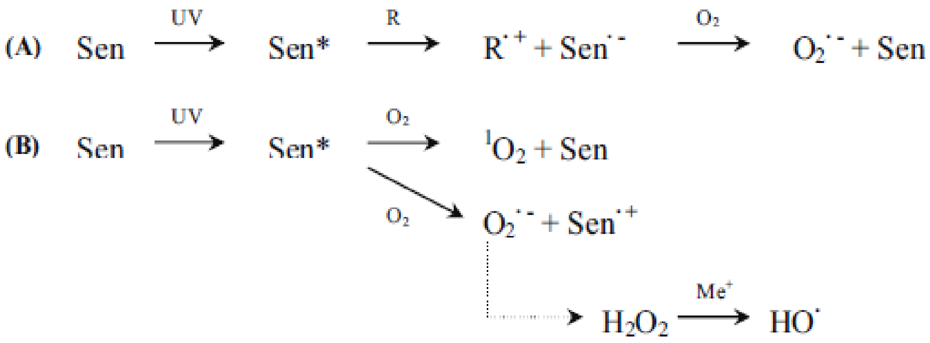
Endogenous	Wavelength	Exogenous	Wavelength
Nucleic acid	260-280 nm	Psoralens	340-370 nm
Protein	280-300 nm	India ink	400-800 nm
Hemoglobin	400, 542, 554, 576 nm	Indocyanine green	805 nm
Melanin	400-800 nm	Porphyrins	400, 630 nm
Water	1400-10000 nm	Chlorins	650-690 nm
Lipid		Bacteriochlorins	720-780 nm
Flavins	420-500 nm	Phthalocyanines	670-740 nm
Porphyrins	400, 630 nm	Methylene blue	660 nm
Cytochrome c oxidase	620-900 nm	Rose Bengal	540 nm

การดูดซับโฟตอนจากรังสี UV โดยตรงของ chromophore ภายในเซลล์ โดยเฉพาะกรดนิวคลีอิค ซึ่งจัดเป็น chromophore สำคัญในผิวหนังที่สามารถดูดซับพลังงานโฟตอนในช่วงของรังสี UVB ก่อให้เกิด Photoproducts ระหว่างเบส Pyrimidine 2 ตัวที่อยู่ติดกันในสายเดียวกัน เรียกว่า Cyclobutane-Pyrimidine Dimer (CPDs) และ (6-4)-Pyrimidine-Pyrimidone photoproduct ((6-4)-PP) ดังแสดงในภาพที่ 3 ขณะเดียวกันทั้งรังสี UVA และ UVB สามารถเปลี่ยน (6-4)-PP ไปเป็น Dewar isomers ได้อย่างรวดเร็ว และสามารถเปลี่ยนกลับมาเป็น (6-4)-PP ได้อีกเมื่อสัมผัสกับรังสี UVB (Pattison และ Davies, 2006) ส่วนกลไกทางอ้อมที่เกิดผ่าน photosensitizer จะก่อให้เกิดความเสียหายผ่าน 2 pathway ที่แตกต่างกัน คือ Type 1 และ Type 2 ดังแสดงในภาพที่ 4 โดย Type 1 เป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับการลดทอนพลังงานของ excited sensitizer ด้วยการถ่ายโอนอิเล็กตรอนให้กับสารชีวโมเลกุลอื่นโดยตรง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับชั้นของพลังงานที่กระตุ้นการก่อตัวของ superoxide radicals ($O_2^{\cdot -}$) และ Type 2 เป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายโอนพลังงานจาก excited sensitizer ไปยังโมเลกุลของออกซิเจน ซึ่งจะนำไปสู่การผลิตอนุมูลอิสระในกลุ่ม reactive oxygen species (ROS) ส่วนใหญ่ คือ singlet oxygen ที่มีอายุยาวนานและมีความสามารถในการ oxidant สูง นอกจากนี้ ยังก่อให้เกิด superoxide anion และ hydrogen peroxide (H_2O_2) ซึ่ง H_2O_2

จัดเป็นอนุมูลอิสระที่มีความเสถียร ไม่ก่อให้เกิดความเสียหาย แต่เมื่อมี metal cation จะทำให้เกิด hydroxyl radicals ($HO^{\bullet}$) ผ่าน Fenton reaction ($Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + {}^{\bullet}OH + OH^{-}$)

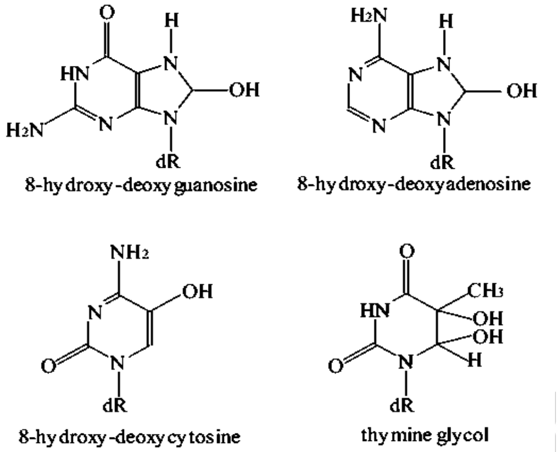


ภาพที่ 3 (A); การก่อตัวของ cyclobutane-pyrimidine dimer (CPDs) และ (B); (6-4)-pyrimidine-pyrimidone photoproduct กับ Dewar isomers หลังการดูดซับพลังงานจากรังสี UVB *(Svobodova et al.*, 2006)



ภาพที่ 4 กลไกความเสียหายที่ถูกกระตุ้นด้วย UV และการก่อตัวของ ROS (Sen คือ photosensitizer, Sen* คือ Excited photosensitizer, R คือ DNA base/aromatic amino acid (protein) และ Me+ คือ metal cation): (A) คือ Type 1, (B) คือ Type 2 (Svobodova *et al.*, 2006)

ในผิวหนังปกติอนุมูลอิสระ ROS จะถูกกำจัดออกอย่างรวดเร็วด้วยสารต้านอนุมูลอิสระทั้งที่เป็นเอนไซม์ (catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), reductase thiredoxin, กลูตาไธโอน peroxidase (GPx) และกลูตาไธโอน reductase) และสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ (วิตามินซี, โทโคฟีรอล, ubiquinol และกลูตาไธโอน (GSH)) อย่างไรก็ตาม เมื่อผิวหนังสัมผัสกับรังสี UV จะก่อให้เกิดการผลิตอนุมูลอิสระ ROS ที่มากกว่าสภาวะปกติ ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระลดลง จนเกิดสภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ส่งผลให้มีการทำลายสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ โดยเฉพาะ DNA (ภาพที่ 5) และเพื่อให้เซลล์สามารถดำรงอยู่ได้อย่างปกติจึงมีการหยุดวงจรชีวิตเซลล์ (cell cycle arrest) เพื่อให้มีเวลาในการซ่อมแซม DNA ที่ชำรุด (Kadsanit *et al.*, 2011)

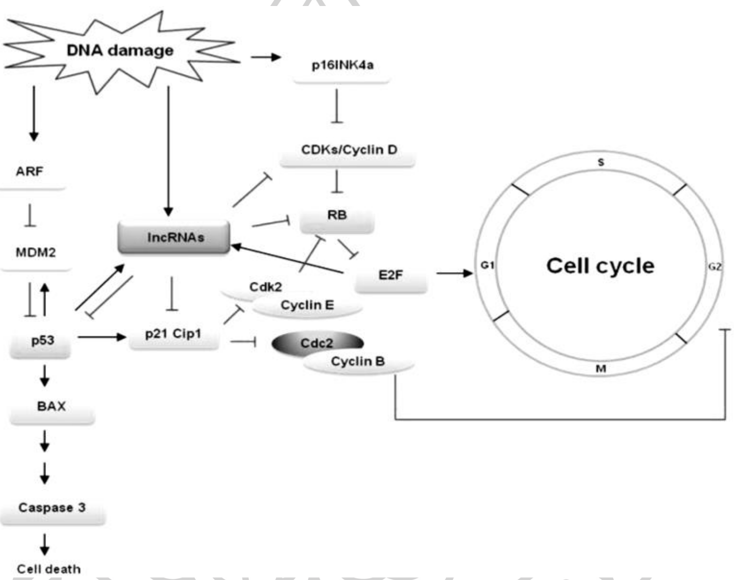


ภาพที่ 5 ความเสียหายหลักของ DNA ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยภาวะเครียดออกซิเดชันจากรังสี UV: dR คือ deoxyribose (Svobodova *et al.*, 2006)

3. การหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ (cell cycle arrest)

การแบ่งตัวของเซลล์ปกติจะมี 4 ระยะ คือ (1) G1 phase เป็นระยะที่เซลล์เตรียมพร้อมที่จะเข้าสู่การสังเคราะห์ DNA (2) S phase เป็นระยะจำลอง DNA (3) G2 phase เป็นระยะที่เซลล์เตรียมพร้อมเข้าสู่การแบ่งตัว และ (4) M phase เป็นระยะที่เซลล์มีการแบ่งตัว โดยการดำเนินเข้าสู่ระยะต่างๆ ของวัฏจักรเซลล์นั้นจะต้องอาศัยการทำงานของ cyclins กับ cyclin dependent kinases (CDKs) ซึ่งจะมีการจับกันอย่างจำเพาะในแต่ละระยะ เพื่อให้เซลล์สามารถแบ่งตัวได้ถูกต้องตามลำดับ ในสภาวะที่ DNA เกิดความเสียหาย เซลล์จะถูกสั่งให้หยุดการแบ่งตัวอยู่ในระยะ G1 เพื่อ

ป้องกันไม่ให้มีการจำลอง DNA ที่ผิดปกติ และให้มีกระบวนการซ่อมแซม DNA เกิดขึ้น (Kadsanit *et al.*, 2011) โดยโปรตีน p53 และ retinoblastoma (RB) เป็นตัวควบคุมการตอบสนองต่อ DNA ที่เสียหาย ซึ่ง RB จะส่งเสริมการหยุดวัฏจักรเซลล์ในระยะ G1 และควบคุมการเข้าสู่ S phase โดยการยับยั้ง E2Fs ซึ่งเป็น transcription factor ส่วน p53 เป็นตัวกลางก่อให้เกิดผลกระทบหลายอย่าง รวมทั้งการหยุดวัฏจักรเซลล์ในระยะ G1, G2 และส่งเสริมการตายแบบ apoptosis นอกจากนี้ lncRNAs (long non-coding RNAs) ที่เกิดจาก DNA เสียหายยังควบคุมการแสดงออกของ cyclins-CDKs, CKIs, pRB, E2F และ p53 ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมวัฏจักรเซลล์ด้วย (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่าง DNA damage กับ Cell cycle (Subramanian *et al.*, 2013)

4. การซ่อมแซม DNA (DNA repair)

หลังจากเซลล์ถูกสั่งให้หยุดการแบ่งตัว กระบวนการซ่อมแซม DNA ที่เสียหายก็จะเริ่มขึ้น โดยความเสียหายของ DNA ภายในเซลล์จากการรับรังสี UV มี 2 รูปแบบหลัก คือ การเหนี่ยวนำให้เกิด Pyrimidine dimer ที่ทำให้สาย DNA มีการบิดเกลียว และการกระตุ้นให้เกิด ROS ที่มีความไวต่อการเข้าทำปฏิกิริยากับเบสของ DNA ทำให้เบสเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งความเสียหายที่เกิดขึ้นสามารถซ่อมแซมได้โดยอาศัยกระบวนการซ่อมแซม DNA ภายในเซลล์ ที่เรียกว่า Base excision repair (BER) และ Nucleotide excision repair (NER) เพื่อให้เซลล์สามารถดำรงอยู่ได้อย่างปกติ

4.1 Base excision repair (BER) เป็นการซ่อมแซมโดยการตัดออกของเบส ซึ่งเบสของ DNA ที่เสียหายจะถูกจดจำตำแหน่งและตัดออกด้วยเอนไซม์ DNA glycosylase ซึ่งทำหน้าที่สลาย

พันธะไกลโคไซด์ที่ยึดระหว่างเบสและโมเลกุลของน้ำตาล จากนั้นตำแหน่งที่เบสหายไปจะถูกซ่อมแซมโดยกระบวนการการเติมเบสเพิ่มเข้ามา และเชื่อมต่อสาย DNA ด้วยเอ็นไซม์ DNA ligase

4.2 Nucleotide excision repair (NER) เป็นการซ่อมแซมโดยการตัดออกของนิวคลีโอไทด์ ซึ่งจะประกอบไปด้วย 5 ขั้นตอนหลัก คือ (1) จดจำตำแหน่ง DNA ที่ผิดพลาดหรือเสียหาย (2) แยก DNA สายคู่ที่ผิดพลาดออกเป็น DNA สายเดี่ยว (3) ตัด DNA สายเดี่ยวที่มีลำดับผิดพลาด (4) สังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ใหม่ที่ถูกต้อง และ (5) เชื่อมต่อชิ้นส่วน DNA ให้เป็นสายเดียวกัน

ตารางที่ 2 กระบวนการซ่อมแซมความเสียหายของ DNA แบบต่างๆ ที่เกิดขึ้นในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (ปิยะ เต็มวิรินะนุกุล, 2557)

ชื่อกระบวนการ	DNA adducts ที่จะถูกกำจัด	โปรตีนที่สำคัญในกระบวนการ
Base excision repair (BER)	8-oxo-G และ alkylated bases เช่น 7-methyladenine และ 3-methylguanine	DNA glycosylase, XRCC1 และ AP endonuclease
Nucleotide excision repair (NER)	CPD, (6-4)PP, aflatoxin adduct, benzo[a]pyrene adduct, cisplatin adduct และ HNE adduct	XPA, XPB, XPC, XPD, XPG, ERCC1, CSA และ CSB
Mismatch repair (MMR)	abnormal base pairing	Msh2, Msh6, Pms2 และ Mlh1
Non-homologous end joining (NHEJ)	Double-strand break	ATM, Ku70, Ku80, DNA-PK และ Lig4
Homologous recombination (HR)	Double-strand break	ATM, Rad50, Rad51, Rad52 BRCA1, BRCA2, Mre11 และ Nbs1

อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาพบว่าความเสียหายของ DNA ที่ไม่ถูกกำจัดจะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์อีกกลุ่มที่ชื่อว่า Translesion synthesis DNA polymerase (TLS polymerase) เอนไซม์กลุ่มนี้สามารถสังเคราะห์ DNA ผ่าน DNA ที่เสียหายแบบไม่มีความจำเพาะ จึงมีโอกาสเติมเบสผิดพลาด ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ และยังพบอีกว่า TLS polymerase มีโอกาสเติมเบสผิดมากกว่า DNA polymerase ถึง 1,000 เท่า (ปิยะ เต็มวิรินะนุกุล, 2557) ดังนั้น โปรแกรมการตายของเซลล์ จึงมีความสำคัญในการกำจัดเซลล์ที่ DNA เสียหาย เพื่อป้องกันการเกิดเซลล์ที่มีสารพันธุกรรมผิดปกติและมีการสะสมความผิดปกตินั้นจนพัฒนาเป็นมะเร็ง

5. โปรแกรมการตายของเซลล์ (Programmed cell death/ apoptosis)

โปรแกรมการตายของเซลล์ หรือ apoptosis เป็นการตายรูปแบบหนึ่งที่ถูกควบคุมโดยยีนเพื่อพัฒนาและรักษาสมดุลของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ โดยเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis จะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะที่สำคัญ คือ เซลล์จะหดตัว (cell shrinks) และโครมาติดอัดกันแน่น (pyknosis) DNA ถูกย่อยเป็นชิ้นเล็กๆ ส่วนของ nuclear membrane และ plasma membrane เกิดการบวม (blebbing) และห่อหุ้มชิ้นส่วน DNA เรียกว่า apoptotic bodies ซึ่งจะถูกกำจัดด้วยเซลล์ macrophages ในระบบภูมิคุ้มกัน จึงไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อเซลล์ข้างเคียง การตรวจ apoptosis โดยทั่วไปนิยมใช้สารเรืองแสงเพื่อตรวจรูปสัณฐานของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยคุณสมบัติที่แตกต่างกันของสารเรืองแสง (ตารางที่ 3) จึงจำแนกการตายของเซลล์ได้จากลักษณะการย้อมติดสี DNA หรือ RNA ที่ต่างกัน โดยปกติเซลล์มีชีวิตจะไม่ยอมให้สารเรืองแสงแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์จึงไม่ติดสีย้อม หรือติดสีอ่อน เว้นแต่หากมีการย้อมนานเกินไป (Studzinski, 1999)

ตารางที่ 3 ชนิดและคุณสมบัติของสารเรืองแสงในการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มและการย้อมติดนิวเคลียสของเซลล์ (ปกป้อง ประยงค์ *et al.*, 2007)

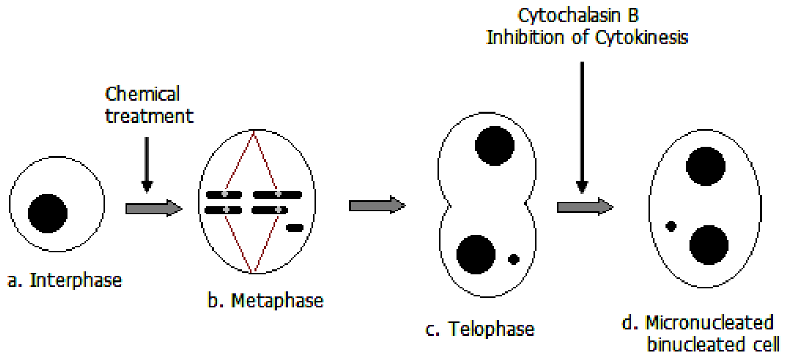
สารเรืองแสงที่ใช้ย้อม	การแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์		การย้อมติดนิวเคลียส	
	เซลล์มีชีวิต	เซลล์ไม่มีชีวิต	Nucleus (DNA)	Cytoplasm (RNA)
Acridine orange	ผ่าน	ผ่าน	เขียว	แดง-ส้ม
Hoechst 33342	ผ่าน	ผ่าน	ฟ้า	ไม่ติดสี
Hoechst 33258	ไม่ผ่าน	ผ่าน	ฟ้า	ไม่ติดสี
DAPI	ไม่ผ่าน	ผ่าน	ฟ้าสว่าง	ไม่ติดสี
Ethidium bromide	ไม่ผ่าน	ผ่าน	ส้ม	ค่อนข้างแดง
Propidium iodide	ไม่ผ่าน	ผ่าน	แดง	ไม่ติดสี

จากการศึกษาพบว่า Hoechst 33258 เป็นหนึ่งในสารเรืองแสงที่นิยมใช้ตรวจ apoptosis เนื่องจากไม่สามารถซึมผ่านเมมเบรนของเซลล์ที่มีชีวิต แต่สามารถซึมผ่านเซลล์ที่ตายทั้งแบบ apoptosis และ necrosis แล้วย้อมติดสีของ nucleic acid โดยเข้าจับบริเวณ AT rich ของ dsDNA เกิดเป็นสีฟ้าเรืองแสงในลักษณะที่แตกต่างกัน สำหรับเซลล์มีชีวิตจะไม่ติดสี หรืออาจติดสีฟ้าอ่อนหากใช้ระยะเวลาในการย้อมนานเกินไป ส่วนเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis จะสังเกตพบลักษณะการขดแน่นของโครโมโซม และชิ้นส่วนการแตกหักของ DNA ได้ชัดเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง ขณะเดียวกันจะสังเกตพบเซลล์ที่มีชิ้นส่วนของโครมาตินที่แตกหักและมีขนาดแตกต่างกันกระจายอยู่ภายในไซโตพลาสซึม โดยที่เซลล์ยังคงเกาะติดอยู่กับพื้นผิว ซึ่งแสดงถึงลักษณะของเซลล์ที่ตายแบบ necrosis (Rello *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตาม การตรวจวัด apoptosis จำเป็นต้องคำนึงถึง

ระยะเวลาที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้อง ซึ่งโดยทั่วไปเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้น จะเข้าสู่กระบวนการตายแบบ apoptosis ภายใน 5 - 10 ชั่วโมง (Sundquist *et al.*, 2006)

6. การตรวจสอบความเสียหายของ DNA ภายในเซลล์

แม้ว่าการซ่อมแซม DNA และการเกิด apoptosis จะเป็นกลไกที่ช่วยป้องกันการเกิดเซลล์ผิดปกติเนื่องจาก DNA เสียหายในสิ่งมีชีวิต แต่ในขณะเดียวกันหากเซลล์ที่มี DNA เสียหาย ไม่ได้รับการซ่อมแซม หรือได้รับการซ่อมแซมแบบผิดปกติ รอดจากโปรแกรมการตายแบบ apoptosis และมีการเจริญเพิ่มจำนวนแล้วถ่ายทอดความผิดปกตินั้นไปยังเซลล์รุ่นลูก ก่อให้เกิดการสะสมของเซลล์ที่ผิดปกติจนพัฒนาเป็นมะเร็งได้ ดังนั้น การประเมินความเสียหายของ DNA ในระดับเซลล์ลูกจึงมีความสำคัญต่อการพิจารณาความเสี่ยงการเกิดมะเร็งจากรังสี UV ซึ่งโดยทั่วไปนิยมใช้วิธี Comet assay และวิธี Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay (CBMN) ในการตรวจสอบการแตกหักของ DNA



ภาพที่ 7 ลักษณะการเกิด Micronucleated binucleated cell (Aardema และ Kirsch-Volders, 2001)

Comet Assay เป็นเทคนิคที่ใช้วัดการขาดของสาย DNA ที่อยู่ในโครโมโซม ด้วยการหล่อเซลล์ที่ศึกษาเข้าไว้ใน agarose จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลายด่าง แล้วนำไปทำ electrophoresis จะสังเกตเห็น DNA ที่ขาดเป็นชิ้นเล็กๆ เคลื่อนที่ออกมาจากเซลล์ เมื่อย้อมสีแล้ว จะเห็นเป็นหางยาวชี้ไปทางขั้วบวก ถ้าหางยิ่งยาวและใหญ่ แปลว่ายิ่งมีความเสียหายของ DNA มาก ซึ่งวิธีนี้อาจไม่สะท้อนความเสียหายของ DNA ในระดับเซลล์ลูก เพื่อประเมินความเสี่ยงการเกิดมะเร็งได้ดีเท่าวิธี Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay ที่ตรวจสอบการแตกหักของ DNA หรือโครโมโซมด้วยการตรวจไมโครนิวเคลียส เนื่องจากไมโครนิวเคลียสเป็นนิวเคลียสขนาดเล็กที่เกิดขึ้นในระยะเมทาเฟส (metaphase) ถึงระยะแอนาเฟส (anaphase) เป็นผลจากการแตกหักของ

โครโมโซม ซึ่งเกิดในเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว และสามารถตรวจพบได้ใน binucleated cell โดยอาศัยการยับยั้งกระบวนการ cytokinesis ด้วย Cytochalasin B (Cyt-B) ส่งผลให้เซลล์ที่อยู่ในวัฏจักรเซลล์และผ่านการจำลอง DNA มาแล้วมี 2 นิวเคลียส ใน 1 เซลล์ (ภาพที่ 7) ซึ่งมีหลักเกณฑ์ในการจำแนก คือ micronuclei ต้องมีขนาดระหว่าง 1/3-1/9 ของขนาดนิวเคลียสหลักของเซลล์ และต้องไม่เชื่อมกับนิวเคลียสหลัก แต่อาจเกิดการสัมผัสกับนิวเคลียสหลักได้โดยไม่เกิด overlap และต้องติดสีย้อมในระดับที่มีความเข้มระดับเดียวกับนิวเคลียสหลัก (Fenech, 2000) แล้วแปรผลเป็นจำนวนเซลล์ที่เกิดไมโครนิวเคลียสต่อ 1000 binucleated cell นอกจากนี้ การคำนวณค่า NDI และ Fold ยังช่วยในการประเมินผลอีกด้วย โดยค่า NDI หรือ Nuclear Division Index เป็นค่าบ่งบอกการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในระหว่างการเกิด cytokinesis-block หากค่า NDI เป็น 1 แสดงว่า เซลล์ไม่เกิดการแบ่งตัวในระหว่างการเกิด cytokinesis-block จึงพบเซลล์จำนวนมากเป็น 1 นิวเคลียส ส่วนค่า Fold จะบ่งบอกความเสี่ยงในการถ่ายทอด DNA ที่เสียหายไปสู่เซลล์รุ่นลูก

7. มะเร็งผิวหนัง

แสงแดดเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการสังเคราะห์วิตามิน D ในผิวหนัง แต่รังสี UV จากแสงแดดอาจเป็นอันตราย เนื่องจากการสัมผัสกับรังสี UV มากเกินไปทำให้เกิดมะเร็งผิวหนังและผลกระทบต่อสุขภาพด้านอื่นๆ โดยรังสี UV ก่อให้เกิดมะเร็งผิวหนังที่สำคัญ 3 ชนิด คือ basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma และ cutaneous malignant melanoma (Balk *et al.*, 2011)

7.1 Basal cell carcinoma เป็นมะเร็งผิวหนังในกลุ่ม non-melanoma skin cancer มีจุดเริ่มต้นอยู่ในผิวหนังชั้น basal cell layer มักเกิดขึ้นกับคนผิวขาวและเกิดในบริเวณที่สัมผัสกับแสงแดดบ่อยๆ โดยเฉพาะใบหน้า

7.2 Squamous cell carcinoma เป็นมะเร็งผิวหนังอีกชนิดหนึ่งที่จัดอยู่ในกลุ่ม non-melanoma skin cancer มีจุดเริ่มต้นอยู่ในผิวหนังชั้น squamous cell layer ซึ่งมักพบในคนที่มีผิวคล้ำ มะเร็งชนิดนี้จะเกิดขึ้นในบริเวณที่ไม่ได้สัมผัสกับแสงแดดโดยตรง เช่น ขา หรือ เท้า อย่างไรก็ตาม ในคนผิวขาวที่ต้องสัมผัสกับแสงแดดบ่อยๆ อาจพบมะเร็งชนิดนี้เกิดขึ้นบริเวณศีรษะ ใบหน้า หู และลำคอ ได้เช่นกัน

7.3 Cutaneous malignant melanoma เป็นมะเร็งผิวหนังในกลุ่ม melanoma skin cancer เกิดจากเซลล์ melanocytes หรือเซลล์สร้างเม็ดสี ซึ่งอาจเกิดขึ้นบริเวณใดก็ได้ โดยในเพศชายมักพบบริเวณศีรษะ ลำคอ หรือระหว่างไหล่กับสะโพก ส่วนในเพศหญิงมักพบบริเวณขาส่วนล่าง หรือระหว่างไหล่กับสะโพก

มะเร็งผิวหนังต่างจากไฝ เพราะมะเร็งผิวหนังสามารถแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อปกติข้างเคียงได้ และสามารถแพร่กระจายได้ทั่วร่างกาย โดยเฉพาะชนิด melanoma ซึ่งมีโอกาสแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกายได้มากที่สุด รองลงมาคือ Squamous cell carcinoma ส่วน Basal cell carcinoma นั้นมีโอกาสแพร่กระจายน้อยมาก (U.S. Department of Health and Human Services, 2010) อย่างไรก็ตาม สถาบันมะเร็งแห่งชาติระบุว่าในประเทศไทยพบมะเร็งผิวหนังได้น้อย ประมาณร้อยละ 5 ของมะเร็งทั้งหมด ซึ่งมักพบในผู้ที่มีอายุมากกว่า 40 ปี และพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง โดยปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความเสี่ยงเกิดมะเร็งผิวหนังเป็นอย่างมาก คือ โครงสร้างของเม็ดสีในชั้นผิวหนังและการสัมผัสกับรังสี UV

8. แนวทางการป้องกัน

รังสี UVA และ UVB เป็นสาเหตุหลักที่ชักนำให้เกิดมะเร็งผิวหนังชนิดต่างๆ ด้วยการทำลาย DNA ผ่านกลไกที่แตกต่างกัน โดยรังสี UVB สามารถเข้าทำลาย DNA ได้โดยตรง ขณะที่รังสี UVA สามารถเข้าทำลาย DNA ทางอ้อมผ่านการก่อให้เกิดอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น แม้ว่าไม่มีคำอธิบายกลไกการเกิดที่ชัดเจนแต่มีงานวิจัยระบุว่า ผิวหนังที่สัมผัสกับรังสี UVA เกี่ยวข้องกับการผลิตอนุมูลอิสระ ROS ซึ่งอาจเป็นขั้นแรกของความเสียหายต่างๆ ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA (Darr และ Fridovich, 1994) ดังนั้น การพัฒนากลยุทธ์ที่มีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระสูงจึงมีบทบาทสำคัญต่อการป้องกันความเสียหายของ DNA ที่เป็นผลมาจากรังสี UVA ซึ่งอาจนำไปสู่การกลายพันธุ์เป็นมะเร็งได้

รูปแบบหลักสำหรับการป้องกันแสงแดดที่คนทั่วไปนิยมใช้ในปัจจุบัน คือ การทาครีมกันแดด เนื่องจากครีมกันแดดช่วยลดความเข้มของรังสี UV ที่มีผลกระทบต่อผิวชั้นหนังกำพร้า จึงป้องกันการเกิดผื่นแดงและผิวไหม้จากแสงแดด ซึ่งสารกันแดดที่ได้รับการอนุมัติจากองค์การอาหารและยาส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์ที่ดูดซับรังสีในช่วง UVB (ตารางที่ 4) จึงจำเป็นต้องผสมสารเคมี คือ Titanium dioxide และ Zinc oxide เพื่อเพิ่มความสามารถในการดูดซับรังสี UVA ด้วย (Balk *et al.*, 2011) และเนื่องจากสารกันแดดสามารถออกฤทธิ์ได้หลายวิธี คือ (1) สามารถดูดซับแสงหรือกรองแสง UV ไว้ในผิวชั้นหนังกำพร้าโดยเฉพาะชั้นขี้ไคลที่อยู่บนสุดของผิวหนัง เพื่อไม่ให้แสงผ่านเข้าไปในชั้นหนังกำพร้าและหนังแท้ (2) ทำให้แสงแดดกระจัดกระจายไม่เป็นแนวเดียวกัน (3) สารกันแดดชนิดเคลือบผิวสามารถสะท้อนแสงออกไปได้ และ (4) สามารถทำลายอนุมูลอิสระที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ที่เกิดขึ้นในผิวหนังเมื่อโดนแสงแดด จึงส่งผลให้เกิดการวิจัยเพื่อปรับปรุงและพัฒนาผลิตภัณฑ์กันแดดอย่างต่อเนื่อง ปัจจุบันงานวิจัยส่วนใหญ่มุ่งเน้นศึกษาสาร

องค์ประกอบจากธรรมชาติที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระสูง เพื่อพัฒนากลยุทธ์ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันผลกระทบจากแสงแดด โดยเฉพาะรังสี UVA

ตารางที่ 4 สารกันแดดที่ได้รับอนุมัติจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (Balk *et al.*, 2011)

Sunscreen	Range of protection	Comments
Organic		
PABA derivatives	UVB	—
PABA[a]		
Padimate O (octyl dimethyl PABA)		
Cinnamates	UVB	—
Octinoxate (octyl methoxycinnamate)		
Cinoxate		
Salicylates	UVB	—
Octisalate (octyl salicylate)		
Homosalate		
Trolamine salicylate[a]		
Benzophenones	UVB, UVA2	Penetrates skin; estrogenicity in animal studies
Oxybenzone (benzophenone 3)		
Sulisobenzone (benzophenone 4)		
Dioxybenzone (benzophenone 8)[a]		
Others		
Octocrylene	UVB	In combination with other sunscreen agents, improves product photostability
Ensulizole (phenylbenzimidazole sulfonic acid)	UVB	—
Avobenzone (butyl methoxybenzoyl methane, Parsol 1789)	UVA1, UVA2	Photolabile; efficacy decreases by ~60% after 60 min of exposure
Ecamsule (terephthalylidene dicamphor sulfonic acid)	UVB, UVA2	Photostable; particularly effective for UVA2; approved by the FDA in 2007
Meradimate (menthyl anthranilate)[a]	UVA2	—
Inorganic		
Titanium dioxide	UVB, UVA2/UVA1	—
Zinc oxide	UVB, UVA2/UVA1	—

Note that other agents are approved for use in the European Union.
[a] These agents are rarely used in sunscreen formulations.

จากการศึกษาพบว่าสารประกอบในกลุ่มโพลีฟีนอล โดยเฉพาะฟีนอลิค และฟลาโวนอยด์ เป็นสารที่มีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระสูง มักพบในพืช ผัก และผลไม้หลากหลายชนิด (ตารางที่ 5) สามารถป้องกันความเสียหายของ DNA จากการก่อตัวของอนุมูลอิสระ ROS ป้องกันมะเร็งผิวหนังที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยรังสี UVA/B ช่วยปรับสมดุลของวัฏจักรเซลล์ กระตุ้นการซ่อมแซม DNA โดยเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการซ่อมแซม DNA ช่วยลดระดับการผลิต ROS และการเกิด lipid peroxidation อีกทั้งช่วยลดการเกิด apoptosis ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA (Choi *et al.*, 2002; Jaszewska *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2010; Rossella และ Laura, 2014; Silva *et al.*, 2008; Slamenova *et al.*, 2002; Svobodova *et al.*, 2006) ด้วยคุณสมบัติข้างต้น จึงเป็น

ทางเลือกที่น่าสนในการนำพืชที่มีสารประกอบโพลีฟีนอลมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์กันแดดหรือเครื่องสำอางที่ช่วยปกป้องผิวจากแสงแดด เพื่อลดปัจจัยเสี่ยงที่จะก่อให้เกิดมะเร็งผิวหนังตามมา

ตารางที่ 5 สารโพลีฟีนอลในอาหาร (Etcheverry *et al*., 2012)

Polyphenol	Compounds	Examples	Food sources
Flavonoids	Flavonols	Kaempferol, quercetin, myricetin	Onions, kale, broccoli, apples, cherries, fennel sorrel, berries, tea
	Flavones	Apigenin, luteolin, diosmetin	Parsley, thyme, celery, sweet red pepper
	Isoflavones	Daidzein, genistein	Soya bean, legumes
	Flavanones	Naringenin, eriodictyol, hesperidin	Citrus fruits, prunes
	Anthocyanidins	Pelargonidin, cyanidin, delphinidin, petunidin, malvidin	Cherries, grapes
	Flavanols	Catechins, gallocatechin	Tea, apple, cocoa
Phenolic acids	Hydroxybenzoic acid	Protocatechuic acid, gallic acid, p-hydroxybenzoic acid	Blackberry, raspberry, black currant, strawberry
	Hydroxycinnamic acids	Coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid, synaptic acid, chlorogenic acid	Blueberry, kiwi, cherry, aubergine, apple, pear chicory, artichoke, potato, corn flour, cider, coffee
Lignans		Secoisolariciresinol	Linseed, lentils, garlic, asparagus, carrots, pears prunes
Stillbenes		Resveratrol	Grapes, pomegranate, groundnut

งานวิจัยนี้เลือกศึกษาสารสกัดจากรำข้าว ที่เป็นของเสียจากกระบวนการสีข้าวซึ่งประกอบไปด้วยส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ด และคัพภะ หรือ จมูกข้าว โดยรำข้าวสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ รำหยาบ ที่ได้จากการขัดสีข้าวกล้อง และรำละเอียด ที่ได้จากการขัดขาวหรือขัดมัน รำข้าวอุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการที่หลากหลาย ทั้งโปรตีน ไขมัน เกลือแร่ และวิตามิน ส่วนของวิตามินที่พบมากในรำข้าว คือ วิตามินบี และโทโคฟีรอล (Luh *et al*., 1991) อีกทั้งมีสารประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ แกมมาออริซานอล โทโคฟีรอล โทโคไตรอีนอล โพลิฟีนอล ไฟโตสเตอรอล และแคโรทีนอยด์ ซึ่งจะทำงานร่วมกันเพื่อส่งเสริมสุขภาพที่ดี (Rohman *et al*., 2014) โดยสารเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน จึงสามารถช่วยลดอนุมูลอิสระในร่างกายที่เป็นสาเหตุการเกิดโรคเรื้อรังหลายชนิด เช่น โรคหลอดเลือด โรคเบาหวาน และโรคมะเร็ง ปัจจุบันมีการนำรำข้าวมาประยุกต์เพื่อใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้าน ทั้งผสมในอาหารสัตว์ ทำเป็นอาหารเสริม หรือสกัดเป็นน้ำมันรำข้าวสำหรับใช้ในทางเภสัชกรรม นอกจากนี้ยังพบว่ามีการนำสารสกัดจากข้าวไปใช้ในการผลิตเครื่องสำอางต้านริ้วรอย และผลิตภัณฑ์ดูแลตัวเอง หรือ personal care ซึ่งมีรายงานว่าออริซานอลในข้าวสามารถป้องกันผลของ lipid peroxidation ที่เกิดจากรังสี UV ได้ ส่วน ferulic acid สามารถป้องกันการเกิดริ้วรอยของผิวหนัง และ โทโคไตรอีนอล สามารถรักษาระดับของอนุมูลอิสระในผิวหนัง รวมทั้งป้องกันและซ่อมแซมความเสียหายของผิวหนังหลังการสัมผัสกับรังสี UV ได้ (Nagendra Prasad *et al*., 2011) นอกจากนี้ การศึกษาสารองค์ประกอบหลักในรำข้าวที่

มีสี 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ก่ำดอยสะเก็ด หอมแดง หอมกุหลาบแดง และหอมดำสุโขทัย 2 ด้วยการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิคทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ พบว่ารำข้าวพันธุ์หอมแดงมีปริมาณฟีนอลิคทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด รองลงมา คือ หอมกุหลาบแดง ก่ำดอยสะเก็ด และหอมดำสุโขทัย 2 ตามลำดับ ส่งผลให้สารสกัดรำข้าวพันธุ์หอมแดงมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระสูงสุดจากการตรวจสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS assay (กิตติมา บุตรจันทร์, 2557) ดังนั้น การศึกษาประสิทธิภาพการป้องกันการเกิดมะเร็งผิวหนังจากรังสี UVA ของสารสกัดรำข้าวที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน อาจให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์กันแดด เครื่องสำอาง หรือโลชัน เพื่อปกป้องผิวจากแสงแดด และลดปัจจัยเสี่ยงเกิดมะเร็งผิวหนังจากรังสี UVA อีกทั้งช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้งจากภาคการเกษตร และเป็นการสนับสนุนและสร้างชื่อเสียงให้กับผลิตภัณฑ์จากข้าวไทย

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมี

1.1 เครื่องมือ

1.1.1 กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope, Oympus)

1.1.2 กล้องจุลทรรศน์ รุ่น BX_{51}/BX_{52} (Oympus)

1.1.3 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance Sartorius, Precisa)

1.1.4 เครื่องนึ่งความดันไอ (Autoclave, Tommy)

1.1.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge, Universal 32R HeHich CENTRIFUGEN)

1.1.6 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer, TECHNE)

1.1.7 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH Meter, Ultra basic)

1.1.8 เครื่องอบความร้อนแห้ง (Hot air oven, Binder)

1.1.9 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 ºC (Deep freezer, Electrolux)

1.1.10 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิและคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 Incubator, NuAire)

1.1.11 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow Class II, NuAire)

1.1.12 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, SPC group digital heat)

1.1.13 Autometic pipette ขนาด 20, 100, 200 และ 1000 μl (Gilson)

1.1.14 Hemocytometer (Levy Ultra Plane)

1.1.15 Microcentrifuge (Eppendorf)

1.1.16 Micro plate reader (TECAN AUSTRIA GmbH)

1.1.17 Multichannel pipette (Biopette)

1.1.18 Spectrophotometer (ThermoSpectronic)

1.2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องแก้ว

1.2.1 ขวด Duran Schott

1.2.2 ชุดกรองอาหาร Corning

1.2.3 เข็มและหลอดฉีดยา Nipro

1.2.4 ตัวกรองขนาด 0.22 μm Corning

1.2.5 ปิเปตและบีกเกอร์ขนาดต่างๆ Pyrex

1.2.6 หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 ml Corning

1.2.7 Cover slip Menzel

1.2.8 Petri dishes ขนาด 50 mm Anumbra

1.2.9 Tissue culture flask ขนาด 25 และ 75 cm^2 Corning

1.2.10 96 well cell culture plate Corning

1.2.11 96 well EIA/RIA plate Nunc

1.3 สารเคมี

1.3.1 Aluminium chloride ($AlCl_3$) Sigma

1.3.2 Absolute ethanol ACL labscan

1.3.3 Absolute methanol ACL labscan

1.3.4 ABTS [2, 2’-Azino-bis Sigma (3-ethylbenzothizoline-6-sulfonic acid)]

1.3.5 Acetic acid ACL labscan

1.3.6 Cytochalasin B (Cyt-B) Sigma

1.3.7 Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Amresco

1.3.8 Dulbecco Minimum essential Medium (DMEM) Gibco

1.3.9 DPPH (2, 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) Sigma

1.3.10 Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid (EDTA) Sigma

1.3.11 Fetal bovine serum (FBS) Hyclone

1.3.12 Gallic acid Sigma

1.3.13 Giemsa Merck

1.3.14 Hoechst 33258 Sigma

1.3.15 Hydrogen peroxide (H_2O_2) Merck

1.3.16 Phosphate buffer saline (PBS) Sigma

1.3.17 Trypsin powder Gibco

1.3.18 Trypan blue Fluka

1.3.19 MTT [4, 5-dimethyl (thiazol-2-yl)-3, 5-diphenyl] Invitrogen tetrazolium bromide

1.3.20 Sodium pyruvate Gibco

1.3.21 Sodium acetate buffer Fluka

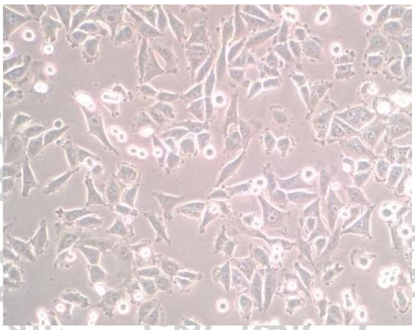
1.3.22 Sodium hydroxide (NaOH) Fluka

1.3.23 α-tocopherol Sigma

1.3.24 Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) Fluka

2. เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัยและการเพาะเลี้ยง

A375 (Human skin malignant melanoma cell line) เป็นเซลล์ผิวหนัง ซึ่งมีลักษณะเป็น Adherent cell line ดังแสดงในภาพที่ 8 เลี้ยงในอาหาร Dulbecco Minimum essential Medium (DMEM) ที่เสริมด้วย 10% Fetal bovine serum (FBS) และ 1 mM Pyruvate ถ่ายเลี้ยงสัปดาห์ละ 1 ครั้ง อัตราการถ่ายเลี้ยง 1:5



ภาพที่ 8 ลักษณะการเกาะแผ่ของเซลล์ A375 (กำลังขยาย 10X)

3. ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

สารสกัดรำข้าวที่ใช้ในการทดสอบได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท เอส แอนด์ เจ อินเตอร์ เนชั่นแนล เอนเตอร์ไพรส์ จำกัด (มหาชน) ในรูปสารละลาย จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ สารสกัดรำข้าวก่ำดอยสะเก็ด และสารสกัดรำข้าวหอมแดง

ภาพที่ 9 ลักษณะสารสกัดรำข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์

4. ระเบียบวิธีวิจัย

4.1 การทดสอบความสามารถต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity)

4.1.1 DPPH assay (DPPH radical scavenging assay)

ผสมสารละลาย DPPH : Sample/Standard (Ascorbic acid) ในอัตราส่วน 180 µl : 20 µl ใน 96 well plate ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 30 นาที วัดสีด้วย Micro plate reader ที่ความยาวคลื่น 517 nm คำนวณหา % DPPH inhibition จากสมการ

$$\%\text{inhibition} = \left[\frac{A_{control} - \left(A_{sample} - A_{\text{samplealone}}\right)}{A_{control}}\right] \times 100$$

เมื่อ	A_{control}	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม
	A_{sample}	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างในปฏิกิริยา
	$A_{\text{sample alone}}$	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

นำค่า % inhibition ที่ได้จากการคำนวณไปสร้างกราฟโดยกำหนดให้ % inhibition เป็นแกน Y และความเข้มข้นของสารทดสอบ (mg/ml) เป็นแกน X เพื่อหาค่า Effective concentration 50 (EC_{50}) ซึ่งเป็นค่าแสดงถึงความเข้มข้นของสารทดสอบที่ทำให้ $DPPH^{\bullet}$ ลดลง 50 %

4.1.2 ABTS assay (ABTS radical cationdecolorization assay)

ผสมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ reagent: Sample/Standard (α-tocopherol) ในอัตราส่วน 490 µl : 10 µl ผสมให้เข้ากันในที่มืดและบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer คำนวณหา % inhibition จากสมการ

$$\%\text{inhibition} = \left[\frac{A_{control} - \left(A_{sample} - A_{\text{Sample alone}}\right)}{A_{control}}\right] \times 100$$

เมื่อ	A_{control}	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม
	A_{sample}	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างในปฏิกิริยา
	$A_{\text{sample alone}}$	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

นำค่า % inhibition ที่ได้จากการคำนวณไปสร้างกราฟโดยกำหนดให้ % inhibition เป็นแกน Y และ ความเข้มข้นของสารทดสอบ (mg/ml) เป็นแกน X เพื่อหาค่า Effective concentration 50 (EC_{50}) ซึ่งเป็นค่าแสดงความเข้มข้นของสารทดสอบที่ทำให้ $ABTS^{\bullet+}$ ลดลง 50 %

4.1.3 FRAP assay (ferric reducing antioxidant power assay)

ผสมสารละลาย FRAP reagent: Sample/Standard (Trolox) ในอัตราส่วน 180 µl: 20 µl ผสมให้เข้ากันในที่มืดและบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 8 นาที วัดสีด้วย Micro plate reader ที่ความยาวคลื่น 593 nm นำค่าที่ได้เทียบกับความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารมาตรฐาน Trolox และรายงานผลในหน่วย µg Trolox/mg sample

4.2 การวัดปริมาณความมีชีวิตของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA ทั้งในสภาวะก่อนและหลังรับสารสกัดรำข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี MTT assay และ Neutral red uptake assay (NR assay)

4.2.1 การศึกษาระดับความเข้มของรังสี UVA ต่อความมีชีวิตของเซลล์

เตรียมเซลล์ A375 ให้มีความหนาแน่นเริ่มต้น 1.8×10^5 cell/ml ใน 24 well plate บ่มเลี้ยงที่ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 ºC นาน 24 ชั่วโมง นำไปฉายด้วยรังสี UVA ที่ระดับความเข้ม 5-40 J/cm^2 โดยใช้สภาวะการฉายรังสีภายใต้สารละลาย PBS จากนั้นเปลี่ยนอาหารใหม่แล้วบ่มเลี้ยงต่อที่ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 ºC นาน 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง แล้ววัดความมีชีวิตของเซลล์ด้วย MTT assay และ Neutral red uptake assay สำหรับวิธี MTT assay ทำโดยการเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 300 µl/well แล้วบ่มในตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 ºC นาน 4 ชั่วโมง (บ่มในที่มืด) เมื่อครบ 4 ชั่วโมง ให้ดูดสารละลายออกจนหมด แล้วละลายผลึก Formazan ด้วย DMSO ปริมาตร 500 µl/well แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ด้วยเครื่อง Micro plate reader ส่วนวิธี Neutral red uptake assay ทำโดยการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS จากนั้นเติมสารละลาย NR ความเข้มข้น 50 µg/ml ปริมาตร 300 µl/well แล้วบ่มในตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 ºC นาน 4 ชั่วโมง (บ่มในที่มืด) เมื่อครบ 4 ชั่วโมง ให้ดูดสารละลาย NR ออกจนหมด จากนั้นล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS อีกครั้ง ก่อนเติมสารละลายกรดปริมาตร 500 µl/well แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ด้วยเครื่อง Micro plate reader จากนั้นนำข้อมูลของทั้ง 2 วิธีมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ เพื่อคำนวณ % viability และหาค่า IC_{50} จากสมการ

$$\% \text{ viability} = \left(\frac{OD_{tests}}{OD_{control}} \right) \times 100$$

เมื่อ OD_{tests} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

$OD_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม

4.2.2 การวัดปริมาณความมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดรำข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ก่อนถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA

เตรียมเซลล์ A375 ให้มีความหนาแน่นเริ่มต้น 1.8 × 10^5 cell/ml ใน 24 well plate บ่มเลี้ยงที่ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 ºC นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดรำข้าวเข้มข้น 2.5 – 10 mg/ml บ่มต่ออีก 2 ชั่วโมง แล้วจึงล้างเซลล์ด้วย PBS และนำไปฉายด้วยรังสี UVA ที่ระดับความเข้ม 12 J/cm^2 ภายใต้สารละลาย PBS หลังสิ้นสุดการฉายรังสีให้ดูดสารละลาย PBS ออก แล้วเติมอาหารใหม่ปริมาตร 1 ml/well บ่มเลี้ยงต่อที่ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 ºC นาน 6 ชั่วโมง แล้ววัดความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay และ Neutral red uptake assay

4.2.3 การวัดปริมาณความมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดรำข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ หลังจากถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA

เตรียมเซลล์ A375 ให้มีความหนาแน่นเริ่มต้น 1.8 × 10^5 cell/ml ใน 24 well plate บ่มเลี้ยงที่ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 ºC นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS และนำไปฉายด้วยรังสี UVA ที่ระดับความเข้ม 12 J/cm^2 ภายใต้สารละลาย PBS หลังสิ้นสุดการฉายรังสีให้ดูดสารละลาย PBS ออก แล้วเติมอาหารที่มีสารสกัดรำข้าวเข้มข้น 2.5 – 10 mg/ml บ่มต่ออีก 2 ชั่วโมง ดูดอาหารเก่าออกและล้างเซลล์ด้วย PBS อีกครั้ง จากนั้นเติมอาหารใหม่ปริมาตร 1 ml/well บ่มเลี้ยงต่อที่ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 ºC นาน 6 ชั่วโมง แล้ววัดความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay และ Neutral red uptake assay

4.3 การวัดปริมาณการเกิด apoptosis ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA ทั้งในสภาวะก่อนและหลังรับสารสกัดรำข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

4.3.1 การศึกษาลักษณะการตายแบบ apoptosis

เตรียมเซลล์ A375 ให้มีความหนาแน่นเริ่มต้น 1.8 × 10^5 cell/ml ปริมาตร 1 ml/well ใน 24 well plate ที่มี cover slips บ่มที่ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 ºC นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นแทนที่อาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 1 ml/well แล้วนำไปฉายด้วยรังสี UVA (ระดับความเข้มแสง 20 - 60 J/cm^2) ส่วนตัวควบคุมบ่มในที่มืด จากนั้นเปลี่ยนอาหารใหม่และบ่มเลี้ยงต่อที่ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 ºC นาน 6 ชั่วโมง นำ cover slips ล้างด้วย

PBS แล้วนำไปย้อมด้วย Hoechst 33258 ความเข้มข้น 3 μg/ml ตรวจดูลักษณะการตายของเซลล์ด้วยกล้อง fluorescent โดยเซลล์ที่มีการตายแบบ apoptosis จะติดสีน้ำเงินของ Hoechst 33258 ส่วนเซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสี นับจำนวนเซลล์ แล้วสร้างกราฟเปอร์เซ็นต์ apoptosis ที่ระดับความเข้มแสงต่างๆ เทียบกับเซลล์ทั้งหมด

4.3.2 การศึกษาผลของสารสกัดรำข้าวต่อการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ที่ได้รับสารก่อนถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA

เตรียมเซลล์ A375 ให้มีความหนาแน่นเริ่มต้น 1.8 × 10^5 cell/ml ปริมาตร 1 ml/well ใน 24 well plate ที่มี cover slips บ่มที่ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 ºC นาน 24 ชั่วโมง เติมสารสกัดรำข้าวที่ความเข้มข้น 2.5 - 10 mg/ml แล้วบ่มต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นแทนที่อาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 1 ml แล้วนำไปฉายด้วยรังสี UVA ที่ระดับ 20 และ 40 J/cm^2 ส่วนตัวควบคุมบ่มในที่มืด จากนั้นเปลี่ยนอาหารใหม่ที่ไม่มีสารสกัดข้าว แล้วบ่มเลี้ยงต่อที่ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 ºC นาน 6 ชั่วโมง นำ cover slips ล้างด้วย PBS แล้วนำไปย้อมด้วย Hoechst 33258 ความเข้มข้น 3 μg/ml ตรวจดูลักษณะการตายของเซลล์ด้วยกล้อง fluorescent โดยเซลล์ที่มีการตายแบบ apoptosis จะติดสีน้ำเงินของ Hoechst 33258 ส่วนเซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสี นับจำนวนเซลล์ แล้วสร้างกราฟเปอร์เซ็นต์ apoptosis ที่ระดับความเข้มแสงต่างๆ เทียบกับเซลล์ทั้งหมด

4.3.3 การศึกษาผลของสารสกัดรำข้าวต่อการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ที่ได้รับสารหลังถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA

เตรียมเซลล์ A375 ให้มีความหนาแน่นเริ่มต้น 1.8 × 10^5 cell/ml ปริมาตร 1 ml/well ใน 24 well plate ที่มี cover slips บ่มที่ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 ºC นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นแทนที่อาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 1 ml แล้วนำไปฉายด้วยรังสี UVA ที่ระดับ 20 และ 40 J/cm^2 ส่วนตัวควบคุมบ่มในที่มืด หลังสิ้นสุดการฉายรังสีให้ดูดสารละลาย PBS ออก แล้วเติมอาหารที่มีสารสกัดรำข้าวที่ความเข้มข้น 2.5 - 10 mg/ml และบ่มต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารใหม่ที่ไม่มีสารสกัดข้าว แล้วบ่มเลี้ยงต่อที่ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 ºC นาน 6 ชั่วโมง นำ cover slips ล้างด้วย PBS แล้วนำไปย้อมด้วย Hoechst 33258 ความเข้มข้น 3 μg/ml ตรวจดูลักษณะการตายของเซลล์ด้วยกล้อง fluorescent โดยเซลล์ที่มีการตายแบบ apoptosis จะติดสีน้ำเงินของ Hoechst 33258 ส่วนเซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสี นับจำนวนเซลล์ แล้วสร้างกราฟเปอร์เซ็นต์ apoptosis ที่ระดับความเข้มแสงต่างๆ เทียบกับเซลล์ทั้งหมด

4.4 การวัดปริมาณความถี่การเกิด Micronuclei ของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA ทั้งในสภาวะก่อนและหลังรับสารสกัดรำข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

กรณีตรวจสอบความถี่การเกิด Micronuclei ในเซลล์ที่ได้รับสารก่อนถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA ให้เตรียมเซลล์ A375 ให้มีความหนาแน่นเริ่มต้น 1×10^5 cell/ml ปริมาตร 1 ml/well ใน 24 well plate ที่มี cover slips บ่มที่ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 มีอุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดรำข้าวที่ความเข้มข้น 2.5 - 10 mg/mL บ่มเลี้ยงต่อนาน 2 ชั่วโมง แทนที่อาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 1 ml แล้วนำไปฉายด้วยรังสี UVA ที่ระดับ 20 และ 40 J/cm^2 ส่วนตัวควบคุมบ่มในที่มืด หลังสิ้นสุดการฉายรังสีให้ดูดสารละลาย PBS ออก แล้วเติมอาหาร DMEM + Cyt-B (3 µg/ml) ในปริมาตร 1 ml/well นำไปบ่มต่อในตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 ºC นาน 48 ชั่วโมง เพื่อให้ Cyt-B ยับยั้งการแบ่ง cytoplasm ของเซลล์

กรณีตรวจสอบความถี่การเกิด Micronuclei ในเซลล์ที่ได้รับสารหลังถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA ให้เตรียมเซลล์ A375 ให้มีความหนาแน่นเริ่มต้น 1×10^5 cell/ml ปริมาตร 1 ml/well ใน 24 well plate ที่มี cover slips บ่มที่ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 มีอุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแทนที่อาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 1 ml แล้วนำไปฉายด้วยรังสี UVA ที่ระดับ 20 และ 40 J/cm^2 ส่วนตัวควบคุมบ่มในที่มืด หลังสิ้นสุดการฉายรังสีให้ดูดสารละลาย PBS ออก แล้วเติมอาหารที่มีสารสกัดรำข้าวเข้มข้น 2.5 - 10 mg/ml บ่มเลี้ยงต่อนาน 2 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายออกให้หมด แล้วล้างด้วย PBS และเติมอาหาร DMEM + Cyt-B (3 µg/ml) ในปริมาตร 1 ml/well นำไปบ่มต่อในตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 ºC นาน 48 ชั่วโมง เช่นเดียวกัน

จากนั้นตรวจสอบความถี่การเกิด Micronuclei ทั้ง 2 กรณี โดยการนำ cover slips มาแช่ใน 0.075 M KCl นาน 8 นาที และตรึงเซลล์ด้วย 1% Fixative (1% acetic acid ในเมทานอล) ที่อุณหภูมิ 4ºC นาน 5 นาที แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นย้อมด้วย 5% Giemsa ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น นำสไลด์ไปตรวจผลดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X โดยนับจำนวนเซลล์ที่มีนิวเคลียส 1-4 นิวเคลียสต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมด และจำนวน micronuclei (MN) ต่อ 1,000 binucleus cells (BN) และบันทึกความผิดปกติของ nucleus ที่พบตามวิธีของ Michael, (2000) ซึ่ง micronucleus ต้องมีขนาด 1/3-1/9 เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของนิวเคลียสหลัก และต้องติดสีเข้มในระดับเดียวกับนิวเคลียส โดยต้องแยกออกเป็นอิสระจากนิวเคลียส แล้วคำนวณ % MN frequency per 1,000 binucleus, Nuclear Division Index (NDI) และ Fold ตามสมการ

% MN frequency per 1,000 binucleus = (MN/ 1000 BN)*100

$$\text{NDI} = \left(\frac{M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4}{N}\right)$$

$$\text{Fold} = \frac{MN_{test}}{MN_{control}}$$

เมื่อ	M_1, M_2, M_3 และ M_4	คือ	จำนวนเซลล์ที่มี 1, 2, 3 และ 4 นิวเคลียส ตามลำดับ
	N	คือ	จำนวนเซลล์ทั้งหมด
	MN_{test}	คือ	% MN frequency per 1,000 binucleus ของตัวอย่าง
	$MN_{control}$	คือ	% MN frequency per 1,000 binucleus ของตัวควบคุม

4.5 การวัดปริมาณ ROS ภายในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA ทั้งในสภาวะก่อนและหลังรับสารสกัดรำข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

การวัดปริมาณ ROS ในเซลล์ที่ได้รับสารก่อนถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA ทำโดยเตรียมเซลล์ A375 ให้มีความหนาแน่นเริ่มต้น 1.3×10^5 cell/ml ปริมาตร 1 ml/well ใน 24-well plates บ่มที่ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 มีอุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดรำข้าวที่ความเข้มข้น 2.5 - 10 mg/ml บ่มเลี้ยงต่อนาน 2 ชั่วโมง แทนที่อาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 1 ml/well แล้วนำไปฉายด้วยรังสี UVA ที่ระดับ 20 และ 40 J/cm^2 ส่วนตัวควบคุมบ่มในที่มืด หลังสิ้นสุดการฉายรังสีให้เทสารละลาย PBS ออก แล้วเติม 20 µM DCFH-DA ในปริมาตร 500 µl/well นำไปบ่มต่อในตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 ºC นาน 30 นาที แตกเซลล์และดูดส่วนใสใส่ใน black 96-well plates 200 µl/well เพื่อวัดสีเรืองแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 485 nm $_{ex}$/530 nm $_{em}$

การวัดปริมาณ ROS ในเซลล์ที่ได้รับสารหลังถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA ทำโดยเตรียมเซลล์ A375 ให้มีความหนาแน่นเริ่มต้น 1.3×10^5 cell/ml ปริมาตร 1 ml/well ใน 24-well plates บ่มที่ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 มีอุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นแทนที่อาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 1 ml/well แล้วนำไปฉายด้วยรังสี UVA ที่ระดับ 20 และ 40 J/cm^2 ส่วนตัว

ควบคุมบ่มในที่มืด หลังสิ้นสุดการฉายรังสีให้เทสารละลาย PBS ออก แล้วเติมอาหารที่มีสารสกัดรำข้าวเข้มข้น 2.5 - 10 mg/ml บ่มเลี้ยงต่อนาน 2 ชั่วโมง เทสารละลายออกจนหมดและล้างเซลล์ด้วย PBS อีกครั้ง แล้วเติม 20 μM DCFH-DA ในปริมาตร 500 μl/well นำไปบ่มต่อในตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 30 นาที แตกเซลล์และดูดส่วนใสใส่ใน black 96-well plates 200 μl/well เพื่อวัดสีเรืองแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 485 nm $_{ex}$/530 nm $_{em}$

4.6 การศึกษาอายุการเก็บรักษาสารสกัดรำข้าว

สารสกัดรำข้าวที่ใช้ในการศึกษาบรรจุอยู่ในหลอดฝาเกลียวปิดสนิทพร้อมหุ้มฟอยล์ และเก็บในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาทั้งหมด 15 เดือน ซึ่งจะมีการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ทั้งหมด 4 ครั้ง คือ เดือนที่ 1, 6, 11 และ 15 โดยการตรวจติดตามความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรำข้าวที่ระยะเวลาเก็บต่างๆ ด้วยวิธี DPPH assay เพื่อประเมินอายุการเก็บรักษาที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

4.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์เปรียบเทียบผลทางสถิติโดยการใช้ One-Way ANOVA และ post-hoc test ด้วย Least Significant different (LSD) หรือ Dunnett’s T3 ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.01$ และ $P < 0.05$

มหาวิทยาลัยศิลปากร

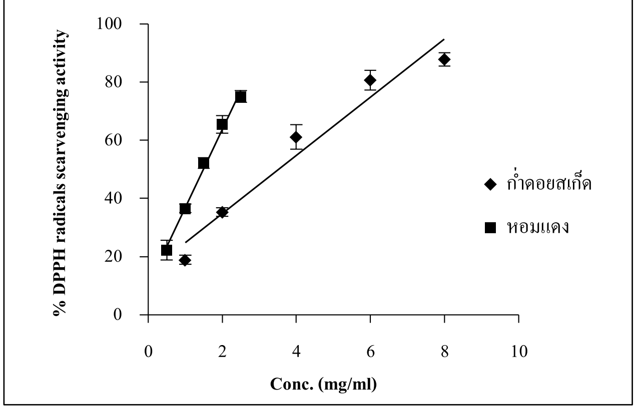
บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรำข้าว ด้วยวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

วิธีวิเคราะห์ทางเคมี 3 วิธี คือ DPPH radical scavenging assay, ABTS radical cation decolorization assay และ ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay ได้นำมาใช้วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรำข้าวพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด และหอมแดง จากการหาค่า EC_{50} (effective concentration 50%) หรือความเข้มข้นสารที่มีผลกำจัดอนุมูลอิสระได้ 50% เพื่อประเมินประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรำข้าวทั้งสองชนิด

1.1 DPPH radical scavenging assay (DPPH assay)

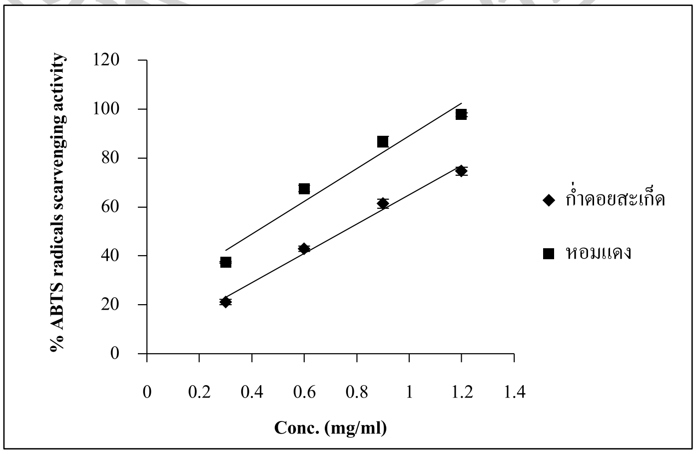
ผสมสารสกัดรำข้าวกับสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH ที่มีสีม่วง แล้วบ่มในที่มืดเวลาเป็น 30 นาที ก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เป็นวิธีวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระอย่างง่าย ที่สารซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้สีม่วงของสารละลาย DPPH จางลงหรือเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน จากภาพที่ 10 พบว่าสารสกัดรำข้าวทั้ง 2 ชนิด มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากขึ้น เมื่อความเข้มข้นสารเพิ่มขึ้น โดยสารสกัดรำข้าวพันธุ์หอมแดงมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด และให้ค่า EC_{50} ที่ต่ำกว่าดังแสดงในภาพที่ 12 ดังนั้น อาจสรุปได้ว่าสารสกัดรำข้าวพันธุ์หอมแดงมีสารต้านอนุมูลอิสระ ที่มีศักยภาพกำจัดอนุมูล DPPH ได้ดีกว่าพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด หรืออีกนัยหนึ่งคือสารสกัดรำข้าวพันธุ์หอมแดงมีความสามารถให้ไฮโดรเจนอะตอมได้ดีกว่าพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด



ภาพที่ 10 % DPPH radicals scarvenging activity ของสารสกัดรำข้าวพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด และหอมแดง

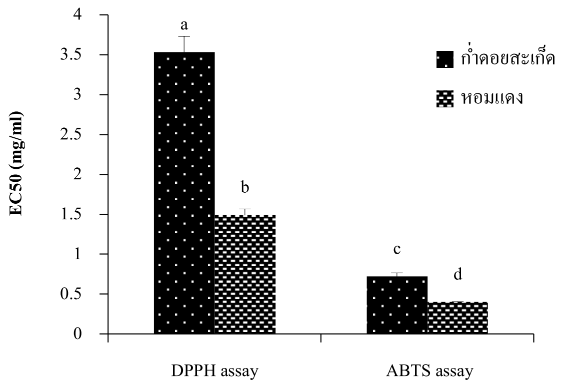
1.2 ABTS radical cation decolorization assay (ABTS assay)

ABTS (2, 2 – Azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ที่ถูกออกซิไดซ์ให้เป็นอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ เป็นสารละลายสีฟ้าอมเขียว ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร 0.700 ± 0.02 ซึ่งหากสารมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ จะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ลดลง หรือเปลี่ยนสารละลายจากสีฟ้าอมเขียวให้จางลงได้ ภาพที่ 11 แสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะมีค่ามากขึ้นตามความเข้มข้นสารที่เพิ่มขึ้น โดยสารสกัดรำข้าวพันธุ์หอมแดงมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด ซึ่งสอดคล้องกับวิธี DPPH assay และให้ค่า EC_{50} ตามภาพที่ 12 อาจเป็นเพราะสารสกัดรำข้าวพันธุ์หอมแดงมีส่วนประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นสารประกอบฟีนอลิคในปริมาณที่มากกว่าพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด (กิตติมา บุตรจันทร์, 2557) ซึ่งสารประกอบฟีนอลิคมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอย่างสูง ฉะนั้นถ้ามีสารประกอบฟีนอลิคสูงก็มีผลให้ค่าความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นได้ (นันท์นภัส เติมวงศ์, 2551) ขณะเดียวกันยังพบว่าสารสกัดรำข้าวทั้ง 2 ชนิด มีความไวต่อการตรวจสอบด้วยวิธี ABTS assay มากกว่า จากการให้ค่า EC_{50} ที่ต่ำกว่าวิธี DPPH assay ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสารสกัดจากรำข้าวประกอบไปด้วยสารที่มีคุณสมบัติเป็นทั้ง hydrophilic และ hydrophobic ที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ได้ดี อีกทั้งยังสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง จึงมีผลให้สารสกัดรำข้าวทำให้ EC_{50} ในวิธี ABTS assay ต่ำกว่า DPPH assay (Pellegrini *et al.*, 1999)



ภาพที่ 11 % ABTS radicals scarvenging activity ของสารสกัดรำข้าวพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด และหอมแดง

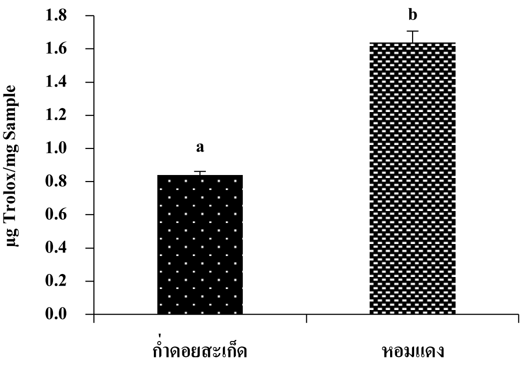
ความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรำข้าวพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด และหอมแดงจากค่า EC_{50} ดังภาพที่ 12 พบว่า สารสกัดรำข้าวพันธุ์หอมแดง (รำสีแดง) มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด (รำสีดำ) จากผลค่า EC_{50} ที่ต่ำกว่า และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shao *et al.* (2014) ที่พบว่าสารสกัดรำข้าวสีแดงมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระสูงกว่ารำข้าวสีดำและขาว ตามลำดับ จากการทดสอบด้วยวิธี DPPH assay และ ORAC assay และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Muntana และ Prasong (2010) ที่รายงานว่าสารสกัดรำข้าวสีแดงมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระสูงกว่ารำข้าวสีดำและขาว ตามลำดับ จากการทดสอบด้วยวิธี DPPH assay



ภาพที่ 12 ค่า EC_{50} ของสารสกัดรำข้าวพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด และหอมแดง (จำนวน 3 ซ้ำ) โดยอักษร a b c และ d ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ($P < 0.01$)

1.3 Ferric ion reducing antioxidant power assay (FRAP assay)

ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์ ferrictripyridyltriazine (Fe^{3+}-TPTZ) ให้อยู่ในรูป Fe^{2+} วัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร เทียบกับความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารมาตรฐาน Trolox และแสดงผลเป็น μg Trolox/mg sample ดังแสดงในภาพที่ 13 ซึ่งพบว่าสารสกัดรำข้าวพันธุ์หอมแดงมีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกได้ดีกว่าพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด แสดงถึงสารสกัดรำข้าวพันธุ์หอมแดงมีคุณสมบัติเป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่ดีกว่าสารสกัดจากพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด



ภาพที่ 13 ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารสกัดรำข้าวพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด และหอมแดง เทียบกับปริมาณ Trolox (จำนวน 3 ซ้ำ) โดยอักษร a และ b ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ($P < 0.01$)

จากการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรำข้าวด้วยวิธี DPPH,ABTS และ FRAP assay พบว่าสารสกัดรำข้าวทั้ง 2 ชนิด แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้โดยการให้ไฮโดรเจนอะตอม และการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ซึ่งทั้ง 3 วิธี มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ สารสกัดรำข้าวพันธุ์หอมแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด อย่างไรก็ตาม ผลทั้งหมดที่กล่าวมานั้นเป็นผลที่เกิดจากการศึกษาโดยอาศัยอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ซึ่งไม่พบในสิ่งมีชีวิต ทำให้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นเพียงปฏิกิริยาเคมีที่ไม่เกี่ยวข้องกับสภาวะภายในร่างกาย ดังนั้น การศึกษากับเซลล์น่าจะให้ผลความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรำข้าวที่นำไปประยุกต์กับสิ่งมีชีวิตได้ดีกว่า จึงจำเป็นต้องศึกษาผลกระทบของ UVA ต่อเซลล์ผิวหนัง A375 ก่อน เพื่อให้ได้ข้อมูลนำไปศึกษาความสามารถของสารสกัดรำข้าวต่อเซลล์ที่ได้รับ UVA ต่อไป

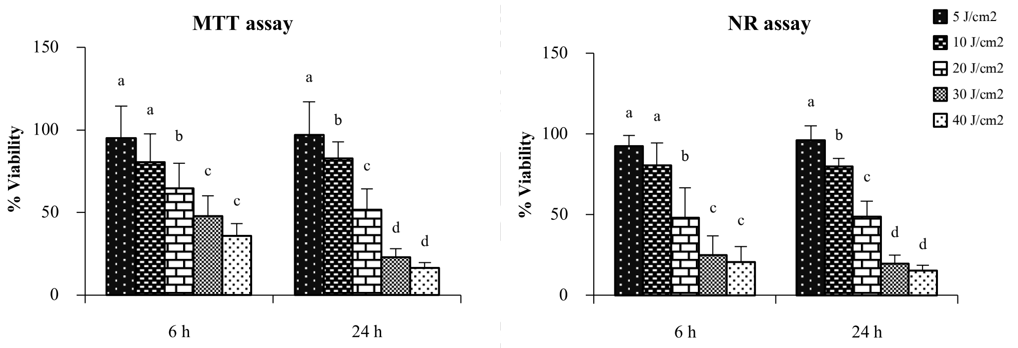
2. ปริมาณความมีชีวิตของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA ทั้งก่อนและหลังรับสารสกัดรำข้าวที่ระดับเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี MTT assay และ Neutral red uptake assay

UV มีผลให้เกิดการทำลาย DNA ทั้งสายเดี่ยวและสายคู่ภายในเซลล์ตามปริมาณ UV ที่เพิ่มขึ้น แล้วส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ได้ทั้งสามแบบคือ necrosis, immediate apoptosis และ delayed apoptosis (หรือ programmed cell death) ความเสียหายของ DNA ที่เกิดจาก UV ภายในเซลล์ ยังสามารถก่อความเสี่ยงให้เกิดเป็นมะเร็งได้ ดังนั้น การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดรำข้าวต่อการป้องกันการเกิดมะเร็งกับเซลล์ จึงควรศึกษากับความเข้ม UVA ที่ระดับให้เกิด

apoptosis และหลีกเลี่ยงการตายของเซลล์แบบ necrosis ซึ่งในงานวิจัยนี้จะศึกษาประเมินความมีชีวิตของเซลล์หลังได้รับ UVA ที่ความเข้มต่างๆ ด้วยวิธี MTT assay และ NR assay

2.1 ระดับความเข้มของรังสี UVA ต่อความมีชีวิตของเซลล์

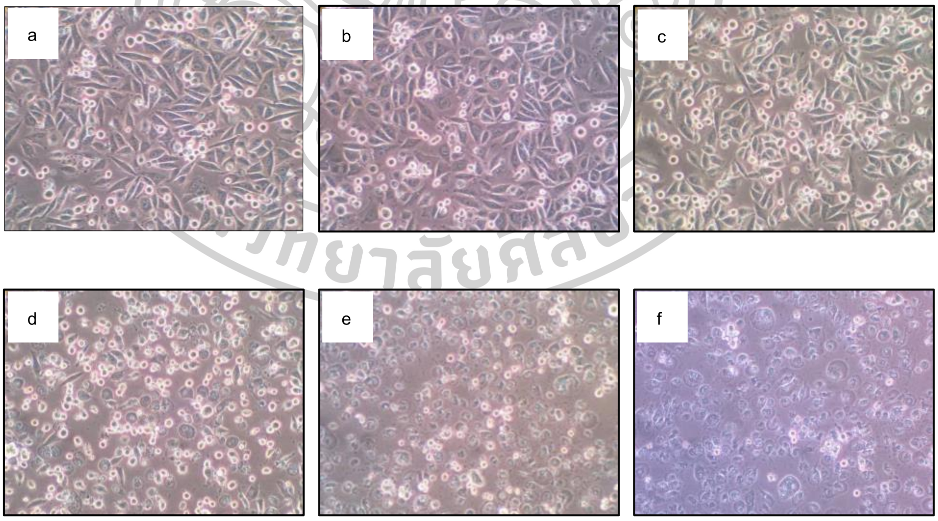
การตรวจสอบระดับความเข้มของรังสี UVA ที่มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ ทำได้โดยการฉายรังสี UVA ที่มีความเข้มแสง 5 - 40 J/cm^2 ให้กับเซลล์ที่แช่อยู่ในสารละลาย PBS ใน 24 well plate เทียบกับสภาวะควบคุมที่เซลล์ไม่ได้รับรังสี UVA แต่แช่อยู่ในสารละลาย PBS ในที่มืด แล้วตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT และ NR assay หลังสิ้นสุดการฉายรังสีเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 14 ระดับความเข้มแสงของรังสี UVA (J/cm^2) ต่อความมีชีวิตของเซลล์ เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay และ NR assay ที่เวลา 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมงหลังสิ้นสุดการฉายรังสี (จำนวน 8 ซ้ำ) โดยอักษร a b c และ d ที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูล หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

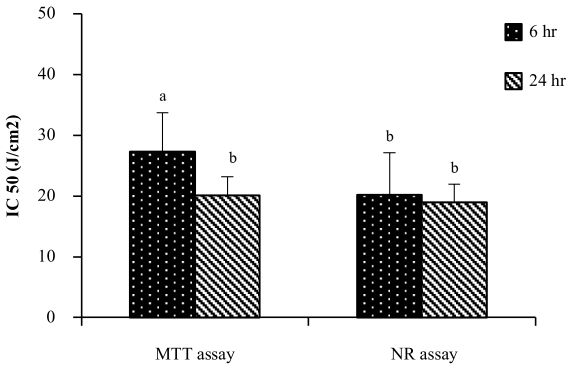
MTT assay วัดความมีชีวิตของเซลล์ได้โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ succinate dehydrogenase ของเซลล์ที่มีชีวิต ที่เปลี่ยนสารละลาย MTT สีเหลืองให้เป็นผลึก formazan สีม่วง แล้วจึงละลายผลึก formazan และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ส่วนวิธี NR assay วัดความมีชีวิตของเซลล์ได้โดยอาศัย lysosome ของเซลล์ที่มีชีวิต ที่ทำให้เกิด pH gradient ให้ Neutral red ซึมผ่านเข้าไป และสะสมอยู่ใน lysosome ขณะที่เซลล์ตายจะไม่เกิดกิจกรรมนี้ จากนั้นจึงทำการแตกเซลล์ด้วยสารละลายกรด และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากผลดังภาพที่ 14 พบว่าทั้ง 2 วิธี ให้ผลเหมือนกัน คือ เมื่อความเข้มแสงของรังสี UVA เพิ่มขึ้นมีผลให้ความมีชีวิตของเซลล์ลดลง โดย UVA ไปกระตุ้น sensitizer ภายในเซลล์ทำให้เกิด

การส่งถ่ายและส่งถ่ายพลังงานไปยังโมเลกุลของออกซิเจน แล้วก่อให้เกิดอนุมูลอิสระชนิด reactive oxygen species (ROS) ขึ้น โดยปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นในระดับต่ำๆ จะมีส่วนช่วยในกระบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ขณะเดียวกันปริมาณ ROS ที่มากเกินไปจะก่อความเสียหายแก่โมเลกุลขนาดใหญ่ภายในเซลล์ เช่น โปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิก เป็นต้น (Stadtman, 1993) โดยความเสียหายต่อเซลล์ที่ได้รับการฉายรังสี UVA ที่ระดับต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (กำลังขยาย 20X) จะเห็นลักษณะของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงไป โดย ภาพ 15a เป็นลักษณะเซลล์กลุ่มควบคุม ซึ่งไม่ได้รับการฉายรังสี UVA จึงเห็นเซลล์ในลักษณะเกาะแผ่เป็นกระสวย และเซลล์บางส่วนที่เพิ่งแบ่งตัวจะมีลักษณะกลมวาวใส ส่วนภาพ 15b ถึง 15f เป็นเซลล์ที่ได้รับรังสี UVA ที่ความเข้มแสง 5, 10, 20, 30 และ 40 J/cm^2 ตามลำดับ สังเกตเห็นเซลล์สูญเสียการแผ่ให้เซลล์ลักษณะโค้งมนแทนที่เป็นกระสวยที่ระดับความเข้มแสงต่ำๆ (15b และ 15c) ส่วนที่ระดับความเข้มแสงที่เพิ่มสูงขึ้น มีผลทำลายเซลล์อย่างเห็นได้ชัด โดยที่ความเข้มแสง 20 J/cm^2 (15d) สามารถทำให้เซลล์สูญเสียการแผ่ได้เกือบร้อยเปอร์เซ็นต์ แต่ก็ยังมีเซลล์กลมวาวใส ซึ่งบางเซลล์จะหดกลมเล็กลง บางเซลล์อ้วนกลมเป็น giant cells และมีลักษณะ ghost cell ปรากฏให้เห็น ส่วนที่ระดับความเข้มแสง 30 และ 40 J/cm^2 (15e และ 15f) นั้นมีความรุนแรงต่อเซลล์มาก โดยเห็นเซลล์ลักษณะกลมวาวใสน้อยมาก รวมทั้งพบเซลล์หดกลมเล็กและ giant cells



ภาพที่ 15 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์หลังได้รับรังสี UVA 6 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (20X) โดย a คือ control ส่วน b c d e และ f คือ ลักษณะเซลล์หลังได้รับรังสี UVA ที่ความเข้มแสง 5, 10, 20, 30 และ 40 J/cm^2

เมื่อคำนวณค่า IC_{50} ของความเข้มแสงที่มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay และ NR assay หลังสิ้นสุดการฉายรังสีเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง พบว่า วิธี MTT assay ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 27.30 ± 6.36 และ 20.11 ± 3.09 J/cm^2 ที่ 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนวิธี NR assay ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 20.18 ± 6.94 และ 18.95 ± 2.98 J/cm^2 ที่ 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 16 สังเกตเห็นว่าวิธี NR assay จะมีความไวในการตรวจสอบมากกว่าเนื่องจากให้ค่า IC_{50} ต่ำกว่าเมื่อเวลาผ่านไปที่ 6 ชั่วโมง ขณะที่พบค่า IC_{50} ใกล้เคียงกันกับผลจาก MTT assay ที่ 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่า NR assay สามารถตรวจความมีชีวิตของเซลล์จากการทำลายของ UVA ได้ตั้งแต่ระยะแรกภายใน 6 ชั่วโมงที่ศึกษา และให้ผลค่า IC_{50} ไม่แตกต่างกันในทั้งสองวิธีที่ 24 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากอนุมูลอิสระ ROS ที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นด้วยรังสี UVA เข้าไปทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของไขมัน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ไวกว่าโมเลกุลอื่นๆ จึงทำให้การตรวจวัดด้วยวิธี NR assay ที่อาศัยการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ของ lysosome มีความไวมากกว่าวิธี MTT assay ที่อาศัยการทำงานของเอนไซม์ในไมโตคอนเดรีย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chiba *et al.* (1998) ที่มีการประเมินผลความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี NR assay และ MTT assay กับเซลล์ชนิดเดียวกัน ปรากฏว่าวิธี NR assay ให้ค่า IC_{50} ต่ำกว่า ส่วนผล IC_{50} ที่ไม่แตกต่างกันที่เวลาบ่มหลังการรับ UVAที่ 24 ชั่วโมง อาจเป็นไปได้ว่าที่เวลานานขึ้น ROS ที่เข้าทำปฏิกิริยากับไขมันในเมมเบรน ทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จาก lipid-peroxidation แล้วทำให้เกิดอนุมูลอิสระมากขึ้น ทำให้เกิดผลทำลายเซลล์ทั้งไขมัน โปรตีน และดีเอนเอให้เสียหาย แล้วทำให้เซลล์ตายในที่สุด จึงทำให้ค่า IC_{50} จากสองวิธีไม่แตกต่างที่เวลานานขึ้น สอดคล้องกับผลที่ว่า UVA ที่มากขึ้น ทำให้เกิด TBAR จากเซลล์มากขึ้น (Merwald *et al.*, 2005) นอกจากนี้ ยังมีงานวิจัยอีกหลากหลายที่กล่าวถึงความไวในการตรวจสอบที่แตกต่างกันระหว่างวิธี NR และ MTT assay ซึ่งผลที่ได้จะขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ตรวจสอบ รวมถึงกลไกการออกฤทธิ์ที่แสดงความเป็นพิษต่อเป้าหมายภายในเซลล์ที่แตกต่างกัน ทำให้งานวิจัยส่วนใหญ่จำเป็นต้องใช้วิธีที่หลากหลายในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ และต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาตอบโจทย์ ซึ่งในงานวิจัยนี้ จะเลือกใช้ระยะเวลาหลังบ่ม 6 ชั่วโมงในการตรวจประเมินศักยภาพของสารสกัดข้าวต่อไป

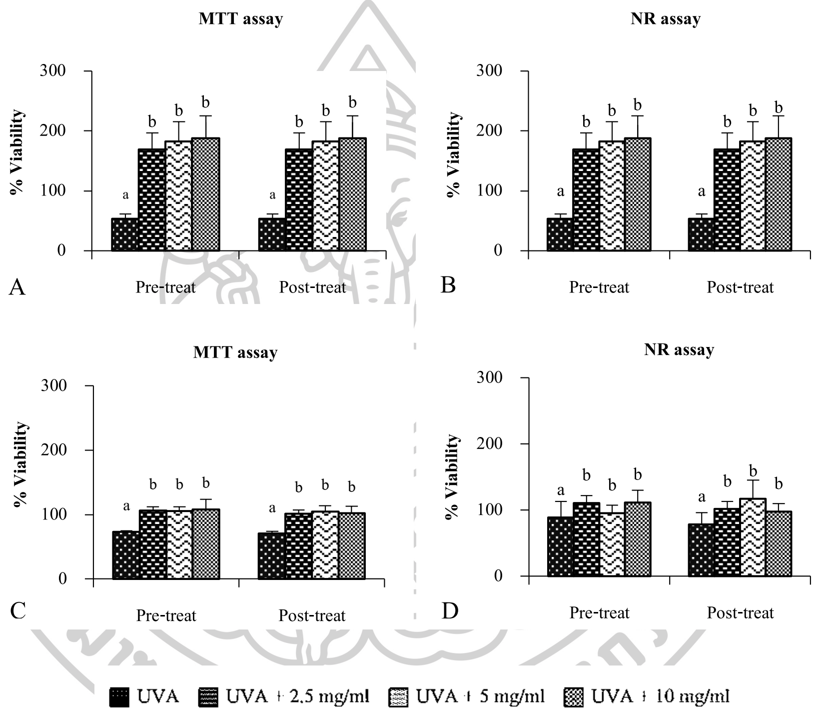


ภาพที่ 16 ค่า IC_{50} ของความเข้มรังสี UVA (J/cm^2) ที่มีผลต่อเซลล์ เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay และ NR assay ที่เวลา 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมงหลังสิ้นสุดการฉายรังสี (จำนวน 8 ซ้ำ) โดยอักษร a และ b ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$) จากการตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์หลังการรับ UVA ที่เวลาต่างกัน

2.2 ปริมาณความมีชีวิตของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA ที่ระดับ IC_{30} (12 J/cm^2) ทั้งก่อนและหลังรับสารสกัดรำข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

จากผลการทดสอบระดับความเข้มของรังสี UVA ต่อความมีชีวิตของเซลล์ พบว่าที่ความเข้ม 12 J/cm^2 ที่ให้ IC_{30} น่าเป็นระดับที่เหมาะสมในการศึกษาผลของสารสกัดรำข้าวต่อความมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับรังสี UVA เนื่องจากเป็นระดับที่ให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงและเซลล์ไม่ได้ถูกทำลายจาก UVA มาก และอาจเป็นระดับที่น่าตรวจพบการเกิด apoptosis ที่จะศึกษาหาความสัมพันธ์กับสารข้าวต่อไปได้ โดยจะทำการบ่มเซลล์กับสารข้าวนาน 2 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบผลของสารสกัดรำข้าวทั้งก่อนและหลังการฉายรังสี UVA ที่ความเข้ม 12 J/cm^2 ด้วยวิธี MTT assay และ NR assay เพื่อประเมินความสามารถของสารในการป้องกันการตายของเซลล์ หรือการฟื้นตัวของเซลล์ภายหลังจากการได้รับรังสี UVA เทียบกับสภาวะที่เซลล์ไม่ได้รับสารสกัด พบว่าให้ผลดังแสดงในภาพที่ 17 ซึ่งมีการเปรียบเทียบระหว่างการให้สารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆแก่เซลล์ทั้งก่อนและหลังการฉายรังสี UVA ที่ประเมินผลด้วยวิธีเดียวกัน จากผลพบว่าสารสกัดรำข้าวทั้ง 2 ชนิดสามารถช่วยเพิ่มระดับความมีชีวิตของเซลล์ทั้งก่อนและภายหลังการได้รับรังสี UVA แสดงถึงสารข้าวช่วยป้องกันการตายของเซลล์จาก UVA ได้ ไม่ว่าจะให้สารข้าวก่อนหรือให้หลังการรับ UVA อย่างไรก็ตาม สารสกัดรำข้าวพันธุ์หอมแดงให้ความมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับ UVA ได้สูงกว่าก่ำดอยสะเก็ด อาจเป็นผลมาจากประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรำข้าวพันธุ์หอมแดงที่ดีกว่า และอาจเป็นผลจากการกระตุ้นการเจริญของสารข้าวพันธุ์หอมแดงที่มีมากกว่าก่ำดอยสะเก็ด

ร่วมเสริมให้ความมีชีวิตของเซลล์สูงกว่าก่ำดอยสะเก็ด โดยจะเห็นผลความมีชีวิตของเซลล์สูงขึ้นเล็กน้อยแปรตามปริมาณสารข้าวพันธุ์หอมแดง ขณะที่ไม่เห็นผลแปรตามกันเมื่อทดสอบกับก่ำดอยสะเก็ด แสดงถึงการรอดชีวิตของเซลล์ที่ได้รับ UVA จากสารสกัดรำข้าว น่าจะเป็นผลความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรำข้าว ซึ่งในที่นี้พบว่าสารสกัดรำข้าวพันธุ์หอมแดงมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้สูงกว่า โดยมีความสามารถทั้งให้ไฮโดรเจนอะตอม และให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระตามผลข้างต้นที่กล่าวมาแล้ว



ภาพที่ 17 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ก่อนและหลังรับสารสกัดรำข้าวพันธุ์หอมแดง (A, B) และก่ำดอยสะเก็ด (C, D) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี MTT และ NR assay (จำนวน 6 ซ้ำ) โดยอักษร a และ b ที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูล หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

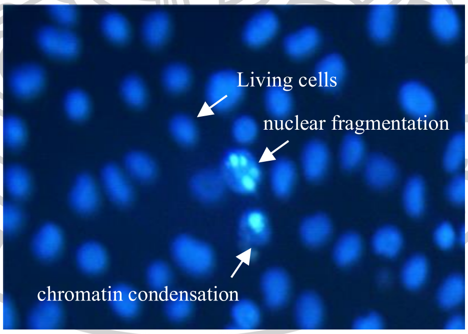
3. ปริมาณเซลล์ที่เกิด apoptosis ของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA ทั้งก่อนและหลังรับสารสกัดรำข้าวที่ระดับเข้มข้นต่างๆ

Apoptosis เป็นการตายรูปแบบหนึ่งของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ ซึ่งมีความสำคัญต่อการควบคุมสมดุลระหว่างการแบ่งตัวและการตายของเซลล์ ในการเกิด apoptosis เซลล์จะมีลักษณะ

เหี่ยว โครมาตินขดแน่น DNA แตกหัก เกิดเป็น apoptotic bodies และจะถูกกำจัดอย่างรวดเร็วโดยเซลล์ macrophage จึงไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อข้างเคียงและหากมีการเหนี่ยวนำหรือยับยั้ง apoptosis จนเสียสมดุลจะก่อให้เกิดโรคต่างๆ มากมาย เช่น โรคมะเร็ง ซึ่งเป็นผลมาจากความผิดปกติในการยับยั้ง apoptosis ทำให้เซลล์มะเร็งสามารถแบ่งตัวผ่านวัฏจักรเซลล์และเพิ่มจำนวนอย่างไม่สิ้นสุด ดังนั้น การตรวจสอบปริมาณเซลล์ที่เกิด apoptosis ในงานวิจัยนี้จึงมีความสำคัญต่อการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดรำข้าวต่อการเกิดมะเร็ง โดยอาศัยสีย้อม Hoechst 33258

3.1 ผลของรังสี UVA ต่อการตายของเซลล์แบบ apoptosis

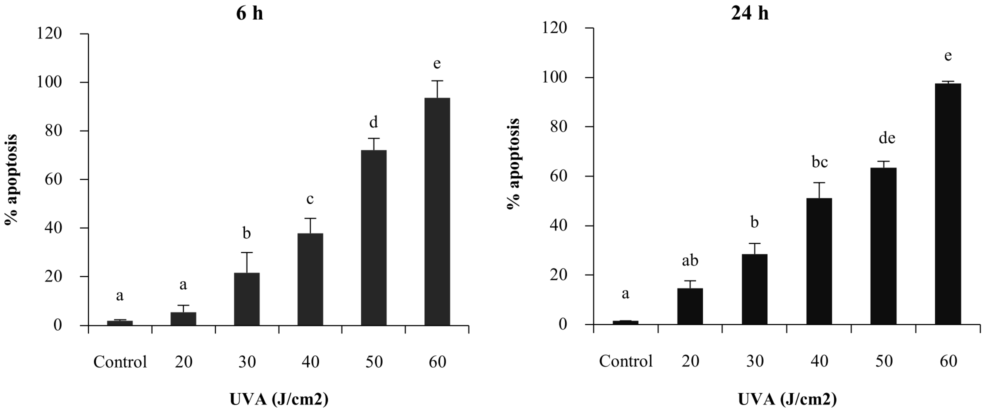
การตรวจสอบปริมาณเซลล์ที่เกิด apoptosis สามารถทำได้โดยการฉายรังสี UVA ให้กับเซลล์ที่แช่อยู่ในสารละลาย PBS ใน 24 well plate เทียบกับสภาวะควบคุมที่เซลล์ไม่ได้รับรังสี UVA แต่แช่อยู่ในสารละลาย PBS ในที่มืด แล้วตรวจสอบปริมาณเซลล์ที่เกิด apoptosis ด้วยสีย้อม Hoechst 33258 หลังสิ้นสุดการฉายรังสีเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง โดย Hoechst 33258 เป็นสีย้อมที่ไม่สามารถซึมผ่านเมมเบรนของเซลล์ที่มีชีวิต แต่สามารถซึมผ่านเซลล์ที่ตายทั้งแบบ apoptosis และ necrosis แล้วย้อมติดสีของ nucleic acid โดยเข้าจับบริเวณ AT rich ของ dsDNA เกิดเป็นสีฟ้าเรืองแสง ดังภาพที่ 18



ภาพที่ 18 ลักษณะเซลล์ A375 cell line ที่ย้อมด้วย Hoechst 33258

จากผลการทดลองพบว่า ระดับความเข้มของรังสี UVA ที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อปริมาณการเกิด apoptosis ทั้งที่ 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 19 เนื่องจากรังสี UVA สามารถทะลุผ่านชั้นหนังกำพร้า หนังแท้ และหลอดเลือด แล้วก่อให้เกิดการทำลายเซลล์ทางอ้อมโดยกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระ ROS เช่น superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) และ hydroxyl radical ($HO^{\cdot}$) เพิ่มมากขึ้น (Jaszewska *et al.*, 2013) จึงนำไปสู่ความเสียหายออกซิเดชันของผิวหนัง (oxidative damage) ที่เกิดผ่านกระบวนการออกซิเดชันไขมัน (lipid peroxidation) โปรตีน (protein

peroxidation) และที่สำคัญสุดคือ ความเสียหายที่เกิดจากการออกซิเดชัน DNA (oxidative DNA damage) ซึ่งจะก่อให้เกิด 8-oxoguanine (Cooke *et al.*, 2000) แล้วไปกระตุ้น p53 นำไปสู่การตายแบบ apoptosis ด้วยการกระตุ้น pro-apoptotic เช่น *Bcl-2* family (Rastogi *et al.*, 2009) และเมื่อพิจารณาค่า IC_{50} (ความเข้มของ UVA ที่มีผลทำให้เซลล์ตาย 50 %) พบว่าที่ 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 46.66 ± 2.61 J/cm^2 และ 43.98 ± 0.18 J/cm^2 ตามลำดับ ค่าที่แตกต่างกันแสดงถึงระยะเวลาบ่มเซลล์ในอาหารปกติหลังจากเซลล์ได้รับรังสี UVA มีผลต่อการเกิด apoptosis โดยระยะเวลาบ่มที่นานขึ้นก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ส่งผลต่อการทำลายเซลล์ อีกทั้งก่อให้เกิด ROS มากขึ้น เนื่องจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง H_2O_2 ที่เสถียรกับธาตุ Fe^{2+} ในอาหารเลี้ยงเซลล์ผ่าน Fenton reaction ($Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + {}^{\bullet}OH + OH^{-}$) ก่อให้เกิด $HO^{\bullet}$ ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis มากขึ้น

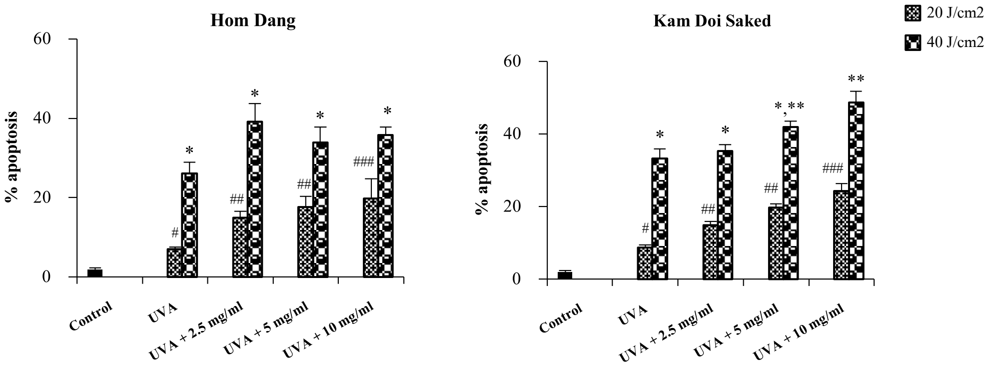


ภาพที่ 19 เปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis หลังสิ้นสุดการฉายรังสีเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง (จำนวน 12 ซ้ำ) โดยอักษร a, b, c, d และ e ที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูล หมายถึง เปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

3.2 ผลของสารสกัดรำข้าวต่อการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA

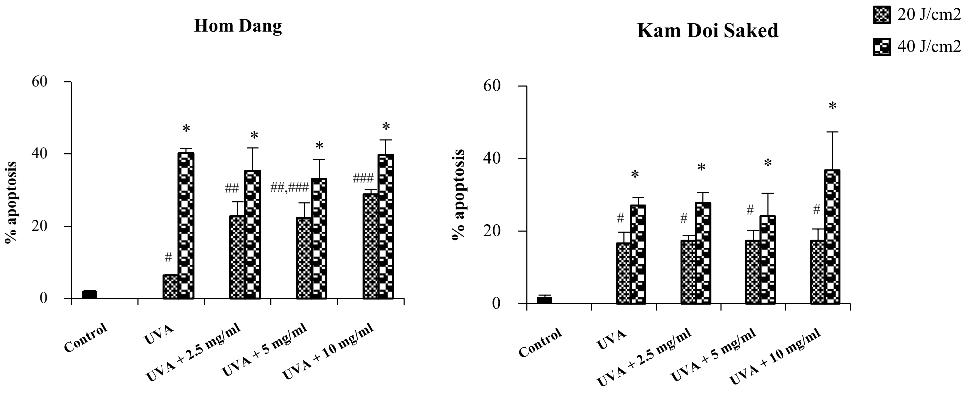
จากการศึกษาผลของรังสี UVA ต่อการเกิด apoptosis โดยใช้ความเข้มของรังสี UVA ที่ระดับ 12 J/cm^2 ซึ่งเป็นค่า IC_{30} ที่ได้จากการวัดความมีชีวิตของเซลล์ พบว่าส่งผลให้เซลล์เกิด apoptosis เทียบเท่ากับสภาวะ control คือ 3 - 5 % ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเพิ่มระดับรังสี UVA เป็น 20 J/cm^2 (เกิด apoptosis $\leq$ 20 %) และ 40 J/cm^2 (เกิด apoptosis $\geq$ 50 %) เพื่อให้เห็นผลของสารสกัดรำข้าวต่อเซลล์ที่สัมผัสกับรังสี UVA ได้ชัดเจน โดยบ่มเซลล์กับสารสกัดรำข้าวนาน 2 ชั่วโมง ทั้งก่อนและหลังสัมผัสกับรังสี UVA ที่ระดับ 20 และ 40 J/cm^2 ในสภาวะที่เซลล์แช่อยู่ในสารละลาย PBS เทียบ

กับสภาวะควบคุม (control) ซึ่งไม่ได้รับสารสกัดและไม่ฉายรังสี และสภาวะ UVA treatment ซึ่งไม่ได้รับสารสกัด แต่ฉายรังสี UVA ที่ระดับ 20 และ 40 J/cm^2 แล้ววัด apoptosis ด้วยสีย้อม Hoechst 33258 แสดงผลดังภาพที่ 20 คือ ในสภาวะที่เซลล์ได้รับสารสกัดรำข้าวก่อนฉายรังสี UVA (Pre-treatment) ที่ระดับ 20 J/cm^2 พบว่าสารสกัดรำข้าวทั้ง 2 ชนิด ส่งผลให้เซลล์เกิด apoptosis เพิ่มขึ้นในลักษณะแปรผันตามความเข้มข้นของสารที่ได้รับ เนื่องจากคุณสมบัติการเป็น chromophore ของสารสกัดรำข้าวที่สามารถดูดซับรังสีในช่วง UVA แล้วกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์มากขึ้นจนเกิดภาวะเครียด จึงเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้น และเมื่อให้เซลล์ได้รับรังสี UVA ที่ระดับ 40 J/cm^2 พบว่าเซลล์ที่ได้รับสารสกัดรำข้าวหอมแดงมีเปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่เซลล์ซึ่งได้รับสารสกัดรำข้าวก่ำดอยสะเก็ดยังคงส่งผลให้เกิด apoptosis เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารที่ได้รับ ซึ่งเห็นได้ชัดที่ระดับความเข้มข้น 10 mg/ml อาจเป็นเพราะสารสกัดรำข้าวทั้ง 2 ชนิด มีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระและความสามารถดูดซับรังสีในช่วง UVA แตกต่างกัน โดยหอมแดงมีประสิทธิต้านอนุมูลอิสระสูงและมีความสามารถดูดซับรังสีในช่วง UVA ต่ำกว่าก่ำดอยสะเก็ด จึงช่วยกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA ได้ดีกว่า ขณะที่ก่ำดอยสะเก็ดซึ่งมีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระต่ำ แต่สามารถดูดซับรังสีในช่วง UVA ได้ดีกว่าหอมแดง จึงกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระ ROS ที่เหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis เพิ่มขึ้นในสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารสกัดรำข้าวก่ำดอยสะเก็ดสูงขึ้น



ภาพที่ 20 เปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis ในเซลล์ที่ได้รับสารสกัดรำข้าวก่อนฉายรังสี UVA (Pre-treatment) แล้วบ่มในอาหารปกติ 6 ชั่วโมง (จำนวน 9 ซ้ำ) โดยสัญลักษณ์ที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูล หมายถึง เปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosisที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

และจากการตรวจสอบในสภาวะที่ให้เซลล์ได้รับสารสกัดรำข้าวหลังฉายรังสี UVA (Post-treatment) แสดงผลดังภาพที่ 21 ซึ่งพบว่าที่ระดับ 20 J/cm^2 สารสกัดรำข้าวหอมแดงส่งผลให้เซลล์เกิด apoptosis เพิ่มขึ้นแบบมีแนวโน้มแปรผันตามความเข้มข้นของสารที่ได้รับ แต่เซลล์ที่ได้รับสารสกัดรำข้าวก่ำดอยสะเก็ดมีเปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทุกระดับความเข้มข้น อาจเป็นเพราะสารประกอบที่อยู่ในรำข้าวหอมแดงมีคุณสมบัติกระตุ้นให้เซลล์ที่ดีเอ็นเอเสียหายจากการสัมผัสกับรังสี UVA เกิด apoptosis โดยอาจไปกระตุ้นการทำงานของโปรตีนในกลุ่ม Pro-apoptotic เช่น P53 และ Bcl-2 รวมทั้งกระตุ้นการทำงานของ caspase ส่งผลให้เซลล์ที่ได้รับ UVA ระดับ 20 J/cm^2 และได้รับสารสกัดรำข้าวหอมแดงมีการตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้น และเมื่อให้เซลล์ได้รับสารสกัดรำข้าวทั้ง 2 ชนิด หลังฉายรังสี UVA ที่ระดับ 40 J/cm^2 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด (UVA treatment) อาจเป็นเพราะระดับความเข้ม 40 J/cm^2 ของรังสี UVA ที่ใช้ในการทดลองนี้ก่อให้เกิดความเสียหายแก่เซลล์มากเกินไป จึงไม่เห็นผลของสารสกัดรำข้าวในสภาวะที่ให้เซลล์ได้รับหลังสัมผัสกับรังสี UVA



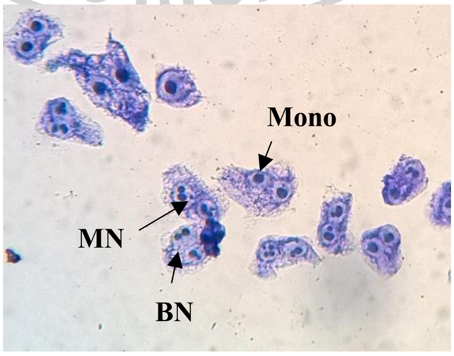
ภาพที่ 21 เปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis ในเซลล์ที่ได้รับสารสกัดรำข้าวหลังฉายรังสี UVA (Post-treatment) แล้วบ่มในอาหารปกติ 6 ชั่วโมง (จำนวน 9 ซ้ำ) โดยสัญลักษณ์ที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูล หมายถึง เปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

จากผลการวัดปริมาณเซลล์ที่เกิด apoptosis ทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า สารสกัดรำข้าวทั้ง 2 ชนิด ส่งผลกระทบต่อความมีชีวิตของเซลล์ โดยการลดระดับความมีชีวิตและเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิด apoptosis เพิ่มขึ้นในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร ระดับความเข้มของรังสี UVA รวมถึง

ระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบ ทั้งนี้คาดว่าผลที่เกิดขึ้นนั้นมาจากสารประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรำข้าวโดยเฉพาะโพลีฟีนอล ซึ่ง Rodríguez *et al.* (2013) รายงานว่าสารประกอบโพลีฟีนอล เช่น resveratrol, EGCG ((-)-epigallocatechin-3-gallate), curcumin และ pterostilbene สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ได้ทั้งแบบ extrinsic และ intrinsic apoptosis ในเซลล์มะเร็งที่ต่างชนิดกัน โดยอาศัยกลไกสำคัญ คือ เพิ่มการควบคุม pro-apoptotic proteins ลดการควบคุม anti-apoptotic proteins และการเหนี่ยวนำ Nf-kB รวมถึงการกระตุ้น p53 ซึ่ง Lo *et al.* (2011) ได้สังเกตกลไกการเกิด apoptosis ในระดับโมลกุลในเซลล์ A375.S2 โดยใช้ Gallic acid (GA) เป็นตัวเหนี่ยวนำ พบว่า GA ช่วยเพิ่มการควบคุม pro-apoptotic เช่น Bax และเหนี่ยวนำ caspase cascade activity แต่ลดการควบคุม anti-apoptotic proteins เช่น Bcl-2 จึงสามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิด apoptosis เพิ่มขึ้นได้

4. ปริมาณความถี่การเกิด Micronuclei ของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA ทั้งก่อนและหลังรับสารสกัดรำข้าวที่ระดับเข้มข้นต่างๆ

การตรวจสอบความถี่การเกิด Micronuclei (MN) เป็นการประเมินการแตกหักของ DNA ด้วยการตรวจไมโครนิวเคลียสซึ่งสามารถสะท้อนให้เห็นความเสียหายในระดับเซลล์ลูกต่อไปได้ จึงใช้ประเมินความเสี่ยงเป็นมะเร็งได้ดี การศึกษาครั้งนี้อาศัยเกณฑ์การจำแนกของ Fenech (2000) เพื่อประเมินผล ซึ่งลักษณะของ micronuclei นั้นต้องมีขนาดระหว่าง 1/3-1/9 ของขนาดนิวเคลียสหลักของเซลล์ และต้องไม่เชื่อมกับนิวเคลียสหลัก แต่อาจเกิดการสัมผัสกับนิวเคลียสหลักได้โดยไม่เกิด overlap และต้องติดสีย้อมในระดับที่มีความเข้มระดับเดียวกับนิวเคลียสหลัก ดังภาพที่ 22



ภาพที่ 22 ลักษณะการเกิด Mononucleus (Mono), Binucleus (BN) และ Micronucleus (MN) ของเซลล์ A375 cell line จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี CBMN assay

ผลการทดลองเซลล์ที่ได้รับสารสกัดรำข้าวที่ระดับเข้มข้นต่างๆ ก่อนและหลังการรับรังสี UVA ที่ระดับ 20 J/cm^2 และบ่มกับ Cyt-B นาน 48 ชั่วโมง ก่อนตรึงและย้อมเซลล์ด้วย Giemsa พบว่าค่า Nuclear Division Index (NDI) ในทุกสภาวะการทดลองมีค่า NDI มากกว่า 1 (ตารางที่ 6) แสดงถึงเซลล์ที่ใช้ทดสอบอยู่ในระหว่างการแบ่งเซลล์ ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบ MN และจากการคำนวณ % MN/1000 BN พบว่าเซลล์ A375 cell line ในสภาวะปกติมีปริมาณ Micronuclei สูงที่ 19.974 ± 4.346 % /1000 BN cells แสดงถึงลักษณะเฉพาะของเซลล์มะเร็งที่มีความผิดปกติของสารพันธุกรรมอยู่ จึงมีผลให้ได้ค่าความถี่ปริมาณ MN สูง ดังรายงานของ Sangle *et al.* (2016) ที่พบว่าปริมาณความถี่การเกิด MN ในเซลล์ปกติจะมีค่าต่ำ ขณะที่เซลล์มะเร็งและระดับความรุนแรงของมะเร็งจะมีผลให้ปริมาณ MN สูงขึ้น ดังนั้น ค่าความถี่ปริมาณ MN จึงใช้เป็นค่าในการประเมินความเสี่ยงมะเร็งได้ และสภาวะที่ใส่ colchicine ซึ่งเป็นสารก่อการกลายพันธุ์ชนิดแอนิวเจน (aneugen) ทำให้เซลล์เกิด MN ได้มากขึ้นกว่าสภาวะปกติ (control)

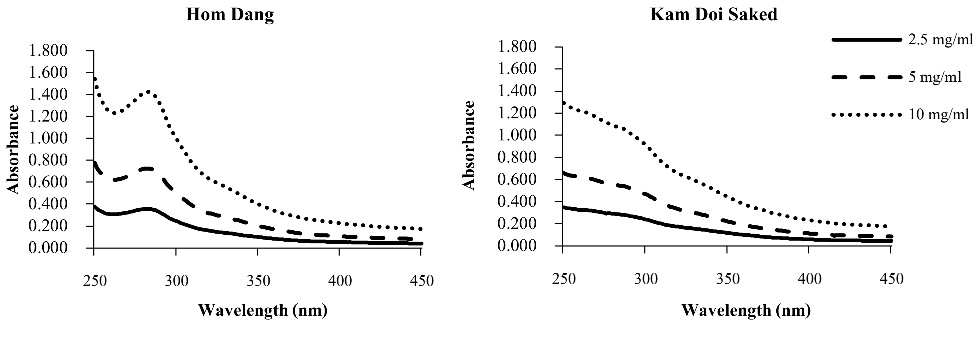
ตารางที่ 6 สรุปผลการตรวจสอบปริมาณความถี่การเกิด micronuclei ของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA (20 J/cm^2) ทั้งก่อนและหลังรับสารสกัดรำข้าวที่ระดับเข้มข้นต่างๆ โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูลหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

Condition	NDI	% MN/1000BN	Fold
Control	1.447	19.974 ± 4.346^{a}	1.000^{a}
Colchicine (0.08 μg/ml)	1.454	36.234 ± 1.065^{b}	1.814^{b}
Pre-treatment			
UVA	1.424	25.940 ± 3.632^{ab}	1.299^{ab}
UVA + Hom 2.5 mg/ml	1.402	26.265 ± 1.601^{ab}	1.315^{ab}
UVA + Hom 5 mg/ml	1.469	20.742 ± 3.305^{ab}	1.038^{a}
UVA + Hom 10 mg/ml	1.411	19.866 ± 3.307^{a}	0.995^{a}
UVA + Kam 2.5 mg/ml	1.508	29.269 ± 5.009^{ab}	1.465^{ab}
UVA + Kam 5 mg/ml	1.483	25.366 ± 4.135^{ab}	1.270^{ab}
UVA + Kam 10 mg/ml	1.489	25.374 ± 5.668^{ab}	1.270^{ab}
Post-treatment			
UVA	1.526	25.195 ± 5.156^{ab}	1.261^{ab}
UVA + Hom 2.5 mg/ml	1.562	21.245 ± 0.961^{ab}	1.064^{ab}
UVA + Hom 5 mg/ml	1.569	22.381 ± 0.594^{ab}	1.121^{ab}
UVA + Hom 10 mg/ml	1.521	19.395 ± 2.273^{a}	0.971^{a}
UVA + Kam 2.5 mg/ml	1.597	24.053 ± 0.723^{ab}	1.204^{ab}
UVA + Kam 5 mg/ml	1.568	22.558 ± 0.810^{ab}	1.129^{ab}
UVA + Kam 10 mg/ml	1.564	23.046 ± 4.604^{ab}	1.154^{ab}

สภาวะ Pre-treatment หรือ การให้เซลล์ได้รับสารสกัดรำข้าวก่อนได้รับ UVA พบว่าเซลล์ที่ได้รับ UVA มีปริมาณความถี่การเกิด MN เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ แสดงถึงการรับ UVA มีผลให้ DNA ของเซลล์เสียหายมากขึ้น และพบว่าสารสกัดรำข้าวหอมแดงสามารถลดความถี่การเกิด MN ลงแปรตามความเข้มข้นของสาร ส่วนสภาวะ Post-treatment พบว่ารังสี UVA กระตุ้นให้เซลล์เกิด micronuclei สูงกว่าสภาวะ control เช่นกัน และเมื่อให้เซลล์ได้รับสารสกัดรำข้าว พบว่าเฉพาะสารสกัดรำข้าวหอมแดงที่ความเข้มข้น 10 mg/ml สามารถลด %MN/1000BN ลงจนเกือบเทียบเท่ากับเซลล์ในสภาวะปกติ แสดงถึงสารสกัดรำข้าวหอมแดงที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระสูงกว่ากำดอยสะเก็ดสามารถลดการแตกหักของ DNA ในเซลล์ที่สัมผัสกับรังสี UVA ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ระบุว่า รังสี UVA สามารถกระตุ้นให้เกิด DNA double-strand breaks (dsbs) ผ่านการเกิด ROS ใน human keratinocytes cells และเมื่อเซลล์ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสามารถลดการแตกหักของ DNA จากการกระตุ้นด้วย UVA ได้ (Greinert *et al.*, 2012)

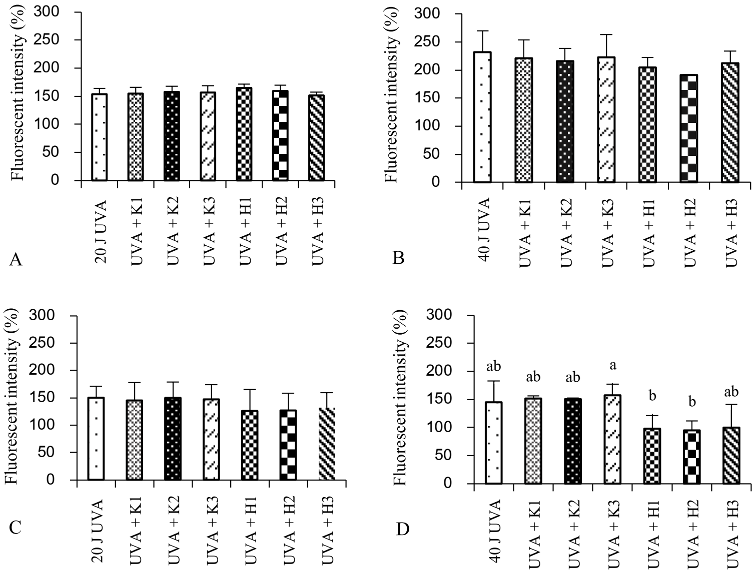
5. ความสามารถดูดกลืนแสงในช่วง UVA ของสารสกัดรำข้าว และปริมาณ ROS ภายในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA ทั้งก่อนและหลังรับสารสกัดรำข้าวที่ระดับเข้มข้นต่างๆ

การวัดความสามารถดูดกลืนแสงของสารสกัดรำข้าวในช่วง 250-450 nm พบว่าสารสกัดรำข้าวหอมแดงและกำดอยสะเก็ดที่ระดับความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 mg/ml สามารถดูดกลืนแสงในช่วง UVA ได้ โดยค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ (315-400 nm) แปรผันตามความเข้มข้นของสาร และสารสกัดรำข้าวหอมแดงยังสามารถดูดกลืนแสงในช่วงต่ำกว่า UVA (280-300 nm) ได้ดีกว่ากำดอยสะเก็ดเล็กน้อย (ภาพที่ 23) แสดงถึงสารสกัดรำข้าวทั้งสองมีสมบัติเป็น Chromophore ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วง UV-Visible (200-800 nm) ได้



ภาพที่ 23 ค่าการดูดกลืนแสงในช่วงรังสี UVA ของสารสกัดรำข้าวหอมแดงและกำดอยสะเก็ด

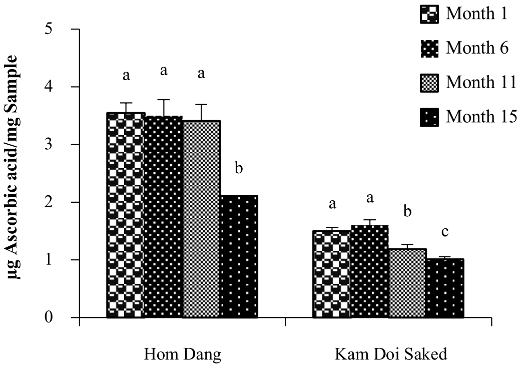
การตรวจปริมาณ ROS ภายในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA ระดับ 20 J/cm^2 โดยอาศัย Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) พบว่าสารสกัดรำข้าวทั้งสองมีสมบัติเป็น photosensitizer ที่กระตุ้นให้เกิด ROS โดยปริมาณการเกิด ROS ไม่ได้สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารสกัดรำข้าว ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรำข้าวที่ร่วมกำจัด ROS ที่เกิดขึ้นด้วย (ไม่แสดงผล) การตรวจวัดปริมาณ ROS ในสภาวะก่อนและหลังรับ UVA ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 24 พบว่าในสภาวะ Pre-treatment ก่อให้เกิด ROS เพิ่มขึ้นตามความเข้มของ UVA ซึ่งการให้เซลล์ได้รับสารสกัดรำข้าวก่ำดอยสะเก็ดและหอมแดงที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ก่อนสัมผัสกับรังสี UVA ไม่สามารถช่วยเพิ่มหรือลด ROS ที่เกิดขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ UVA control ซึ่งผลที่ได้ไม่สะท้อนให้เห็นถึงคุณสมบัติการเป็น Chromophore ของสารสกัดรำข้าวที่ชัดเจน ขณะที่สภาวะ Post-treatment ส่งผลให้ระดับ ROS ในเซลล์ที่ได้รับรังสี UVA ที่ระดับ 20 และ 40 J/cm^2 ไม่แตกต่างกัน และเมื่อให้เซลล์ได้รับสารสกัดรำข้าวทั้ง 2 ชนิด พบว่าหอมแดงมีแนวโน้มช่วยลดระดับ ROS ที่เกิดขึ้นแบบแปรผันตามความเข้มข้นเมื่อเทียบกับ UVA control ซึ่งจะเห็นว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์ที่ได้รับรังสี UVA ที่ระดับ 40 J/cm^2 แสดงถึงคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรำข้าวหอมแดงสามารถช่วยกำจัด ROS ที่เกิดจากรังสี UVA ได้ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jaszewska *et al.* (2013) ที่ตรวจสอบกิจกรรมการป้องกันรังสี UVA ของสารสกัดจากเมล็ด *O. paradoxa* ที่มีการสกัดแยกไขมันออก แล้วพบว่าสารดังกล่าวมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่สามารถช่วยลดระดับ ROS ภายในเซลล์ เนื่องจากสามารถออกฤทธิ์กำจัด $O_2^{\cdot -}$ และ H_2O_2 oxygen species ได้ (Kiss *et al.*, 2010)



ภาพที่ 24 ระดับของ ROS ในเซลล์ที่ได้รับสารสกัดรำข้าวก่ำดอยสะเก็ดและหอมแดงในสภาวะก่อน (A, B) และหลัง (C, D) สัมผัสรังสี UVA ที่ระดับ 20 และ 40 J/cm^2, (K1, K2, K3: สารสกัดรำข้าวก่ำดอยสะเก็ดเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 mg/ml และ H1, H2, H3: สารสกัดรำข้าวหอมแดงเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 mg/ml ตามลำดับ

6. การตรวจติดตามความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารที่ระยะเวลาเก็บต่างๆ เพื่อประเมินอายุการเก็บสารสกัดรำข้าว

การวิเคราะห์ศึกษาความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรำข้าวด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP assay พบว่าทั้ง 3 วิธีมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ สารสกัดรำข้าวหอมแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าก่ำดอยสะเก็ด ดังนั้น จึงเลือกใช้เพียงวิธี DPPH assay ซึ่งเป็นวิธีที่นิยม มีความสะดวกและรวดเร็วที่สุดในการศึกษาความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสาร โดยในที่นี้จะศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรำข้าวที่เก็บที่เวลาต่างๆ เพื่อประเมินอายุการเก็บสารสกัดรำข้าวที่เก็บในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 15 เดือน ซึ่งได้ผลดังแสดงในภาพที่ 25 ที่พบว่าสารสกัดรำข้าวหอมแดงมีความสามารถต้านอนุมลอิสระสูงกว่าก่ำดอยสะเก็ดตลอดระยะเวลาการเก็บ



ภาพที่ 25 กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรำข้าวเทียบกับสารมาตรฐาน Ascorbic acid จากวิธี DPPH assay (จำนวน 3 ซ้ำ) โดยอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูล แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.01$)

เมื่อนำความสามารถต้านอนุมูลอิสระมาประเมินอายุการเก็บสารสกัดรำข้าวโดยอาศัยปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง จากสมการของอาร์รีเนียส (Arrhenius equation) เพื่อคำนวณหา Half-life ของสารทั้ง 2 ชนิด จะได้ Half-life ($t_{1/2}$) = 0.693/k เมื่อ k คือ ความชันที่ได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ln (µg Ascorbic acid/mg Sample) กับ เวลา (เดือน) ซึ่งพบว่าสารสกัดรำข้าวหอมแดงมี Half-life สั้นกว่าเล็กน้อย คือ 21.39 เดือน ขณะที่ก่ำดอยสะเก็ดมี Half-life คือ 22.35 เดือน ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการที่สารสกัดรำข้าวทั้งสองมีสารองค์ประกอบที่แตกต่างกัน โดยสารสกัดจากรำข้าวที่มีสีดำ จะมีปริมาณแอนโทไซยานินมากกว่ารำข้าวที่มีสีแดง (Sompong *et al.*, 2011) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ กิตติมา บุตรจันทร์ (2557) ที่พบว่า สารสกัดรำข้าวก่ำดอยสะเก็ดซึ่งเป็นรำข้าวที่มีสีดำมีปริมาณแอนโธไซยานินสูงกว่าสารสกัดรำข้าวหอมแดงที่มีรำสีแดง โดยแอนโทไซยานินจัดเป็นสารกลุ่มโพลีฟีนอลที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ และมีโครงสร้างหลากหลายแบบ จึงมีความคงตัวและสลายตัวในสภาวะที่แตกต่างกันได้ช้ากว่า ดังนั้น สารที่มีแอนโทไซยานินเป็นองค์ประกอบในปริมาณมากจึงเสื่อมสภาพได้ช้ากว่าสารที่มีแอนโทไซยานินน้อยกว่า

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรำข้าวทั้งสองจะคงอยู่ได้ดี เมื่อเก็บรักษาสารสกัดรำข้าวหรือผลิตภัณฑ์ที่มีสารสกัดรำข้าวในสภาวะมืด ที่อุณหภูมิห้อง ในเวลาเก็บไม่เกิน 1 ปี

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการทดลอง

สารสกัดรำข้าวหอมแดงมีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระดีกว่าก่ำดอยสะเก็ด และสามารถป้องกันเซลล์ได้ดีเมื่อได้รับรังสี UVA ต่ำๆ โดยสารสกัดรำข้าวหอมแดงมีฤทธิ์ส่งเสริมเซลล์ให้เจริญได้ดีกว่าก่ำดอยสะเก็ด เมื่อให้เซลล์ได้รับรับรังสี UVA ที่ระดับ 20 J/cm^2 พบว่าสารสกัดรำข้าวทั้ง 2 ชนิด มีผลให้เซลล์เกิด apoptosis มากขึ้น โดยสารสกัดรำข้าวหอมแดงสามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิด apoptosis เพิ่มขึ้นทั้งในสภาวะก่อนและหลังรับรังสี UVA แต่สารสกัดรำข้าวก่ำดอยสะเก็ดให้ผลได้เฉพาะเมื่อได้รับสารสกัดรำข้าวก่อนการรับรังสี UVA นอกจากนี้พบว่าเซลล์ที่ได้รับสารสกัดรำข้าวหอมแดงมีเปอร์เซ็นต์การเกิด micronuclei ลดลง และจากการศึกษาค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดรำข้าวและปริมาณ ROS ภายในเซลล์ที่ได้รับรังสี UVA พบว่าสารสกัดรำข้าวทั้งสองมีสมบัติเป็น photosensitizer ที่ก่อให้เกิด ROS ขึ้นภายในเซลล์ โดยคุณสมบัติการเป็น photosensitizer และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรำข้าวมีบทบาทร่วมกันในการป้องกันและลดความเสี่ยงการเกิดมะเร็งผิวหนังผ่านการกระตุ้นให้เซลล์ที่ได้รับรังสี UVA เกิด apoptosis และมีเปอร์เซ็นต์การเกิด micronuclei ลดลง ดังนั้นสารสกัดรำข้าวหอมแดงจึงเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้เป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอางป้องกันแดดที่สามารถช่วยฟื้นฟูเซลล์ให้เจริญแข็งแรง และลดความเสี่ยงการเกิดมะเร็งผิวหนังจากรังสี UVA ได้ดีกว่าก่ำดอยสะเก็ด

มหาวิทยาลัยศิลปากร

2. ข้อเสนอแนะ

2.1 การศึกษาการเกิด apoptosis ด้วยสีย้อม Hoechst 33258 อาจไม่เพียงพอจะบอกสาเหตุที่ทำให้เกิด apoptosis เพื่อที่จะเลือกวิธีในการศึกษาแนวทางป้องกันได้ถูกต้อง อาจต้องใช้วิธีการทดสอบอื่นๆ เช่น การตรวจวัดระดับของ caspases, DNA fragmentation และการเปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มเซลล์

2.2 การตรวจสอบเปอร์เซ็นต์เกิด apoptosis ของ A375 cell line ที่สัมผัสกับรังสี UVA ด้วย Hoechst 33258 ควรเลือกใช้ UVA ที่ระดับ 20 J/cm^2 เป็นอย่างน้อย เนื่องจากระดับที่ต่ำกว่านี้จะให้ค่าที่ใกล้เคียงกับสภาวะ control จึงไม่สามารถนำข้อมูลไปวิเคราะห์ผลต่อได้

2.3 การประเมินอายุการเก็บรักษาสารสกัดรำข้าวเพื่อคงคุณสมบัติของสารด้วยการตรวจติดตามความสามารถต้านอนุมูลอิสระที่ระยะเวลาต่างๆ ของการเก็บ อาจให้ข้อมูลไม่ชัดเจนต่อการออกฤทธิ์ของสารในระบบสิ่งมีชีวิต จึงควรมีการเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ มาทดสอบกับเซลล์โมเดลร่วมด้วย

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บรรณานุกรม

Aardema, M. J. and Kirsch-Volders, M. (2001). The In Vitro Micronucleus Assay. In W. N. Choy (Ed.), *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment*.

Aoki-Yoshida, A., Akoki, R. and Takayama, Y. (2013). Protective Effect of Pyruvate Against UVB-Induced Damage in HaCaT Human Keratinocytes. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 115*(4), 442-448.

Balk, S. J., Council on Environmental, H. and Section on, D. (2011). Ultraviolet radiation: a hazard to children and adolescents. *Pediatrics, 127*(3), e791-817. doi:10.1542/peds.2010-3502

Chiba, K., Kawakami, K. and Tohyama, K. (1998). Simultaneous Evaluation of Cell Viabilityby Neutral Red, MTT and Crystal Violet Staining Assays of the Same Cells. *Toxicology in Vitro, 12*, 251-258.

Choi, C. W., Kim, S. C., Hwang, S. S., Choi, B. K., Ahn, H. J., Lee, M. Y., Park, S. H. and Kim, S. K. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science, 163*, 1161-1168.

Cooke, M., Mistry, N., Ladapo, A., Herbert, K. and Lunec, J. (2000). Immunochemical quantitation of UV induced oxidative and dimeric DNA damage to human keratinocytes. *Free Radical Research, 33*, 369-381.

D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A. and Scott, T. (2013). UV radiation and the skin. *International Journal of Molecular Sciences, 14*(6), 12222-12248. doi:10.3390/ijms140612222

Darr, D. and Fridovich, I. (1994). Free Radicals in Cutaneous Biology. *Journal of Investigative Dermatology, 102*(5), 671-675. doi:10.1111/1523-1747.ep12374036

Etcheverry, P., Grusak, M. A. and Fleige, L. E. (2012). Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B(6), B(12), D, and E. *Front Physiol, 3*, 317. doi:10.3389/fphys.2012.00317

Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research, 455*, 81-95.

Gasparro, F. P. (2000). Sunscreens, Skin Photobiology, and Skin Cancer: The Need for UVA

Protection and Evaluation of Efficacy. *Environmental Health Perspectives, 108*, 71-78.

Greinert, R., Volkmer, B., Henning, S., Breitbart, E. W., Greulich, K. O., Cardoso, M. C. and Rapp, A. (2012). UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages. *Nucleic Acids Research*, 1-11.

Huang, Y., Mroz, P. and Hamblin, M. R. (2009). Basic photomedicine.

Jaszewska, E., Soin, M., Filipek, A. and Naruszewicz, M. (2013). UVA-induced ROS generation inhibition by Oenothera paradoxa defatted seeds extract and subsequent cell death in human dermal fibroblasts. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 126*, 42-46. doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.07.001

Kadsanit, S., Pinitsoontorn, C., Loilome, W. and Yongvanit, P. (2011). Adverse Effects Caused by Adaptive Imbalance to Genotoxic Stress After Infection and Inflammation. *Srinagarind medical journal, 26*(2), 127-135.

Kiss, A. K., Filipek, A., Czerwin, M. and ska, M. (2010). Naruszewicz, Oenothera paradoxa defatted seeds extract and its bioactive component penta-O-galloyl-b-Dglucose decreased production of reactive oxygen species and inhibited release of leukotriene B4, interleukin-8, elastase, and myeloperoxidase inhuman neutrophils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*, 9960-9966.

Lo, C., Lai, T. Y., Yang, J. S., Yang, J. H., Ma, Y. S., Weng, S. W., Lin, H. Y., Chen, H. Y., Lin, J. G. and Chung, J. G. (2011). Gallic acid inhibits the migration and invasion of A375.S2 human melanoma cells through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and Ras. *Melanoma Research, 21*(4), 267-273. doi:10.1097/CMR.0b013e3283414444

Luh, B. S., Barber, S. and deBarger, C. B. (1991). Rice Utilization. *In B.S. Luh, ed. Vol. II. New York: Van Nostrand Reinhold.*

Macgill, M. (2016). Carcinoma: Basal Cell and Squamous Cell Carcinoma. Retrieved from https://www.medicalnewstoday.com/articles/300871.php

Merwald, H., Klosner, G., Kokesch, C., Der-Petrossian, M., Ho¨nigsmann, H. and Trautinger, F. (2005). UVA Induced oxidative damage and cytotoxicity depend on the mode of exposure. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 79*, 197-207.

Muntana, N. and Prasong, S. (2010). Study on Total Phenolic Contents and their Antioxidant of Thai White, Red and Black Rice Bran Extracts. *Pakistan Journal of Biological Sciences,*

13(4), 170-174.

Nagendra Prasad, M. N., Sanjay, K. R., Shravya Khatokar, M., Vismaya, M. N. and Nanjunda Swamy, S. (2011). Health Benefits of Rice Bran - A Review. *Journal of Nutrition & Food Sciences, 1*(3).

Pattison, D. I. and Davies, M. J. (2006). Actions of ultraviolet light on cellular structures. *96*, 131-157. doi:10.1007/3-7643-7378-4_6

Pellegrini, R. R., Proteggente, N., Pannala, A., Yang, A. M. and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine, 26*, 1231-1237.

Ramos, A. A., Azqueta, A., Pereira-Wilson, C. and Collins, A. R. (2010). Polyphenolic Compounds from Salvia Species Protect Cellular DNA from Oxidation and Stimulate DNA Repair in Cultured Human Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*, 7465-7471.

Rastogi, R. P., Richa and Sinha, R. P. (2009). Apoptosis: Molecular Mechanisms and Pathogenicity. *Experimental and Clinical Sciences, International Online Journal for Advances in Sciences, 8*, 155-181.

Rello, S., Stockert, J. C., Moreno, V., G´amez, A., Pacheco, M., Juarranz, A., M., C. n. and Villanueva, A. (2005). Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. *Apoptosis, 10*, 201-208.

Rodríguez, M. L., Estrela, J. M. and Ortega, A. L. (2013). Natural Polyphenols and Apoptosis Induction in Cancer Therapy. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*. doi:10.4172/2157-2518.s6-004

Rohman, A., Helmiyati, S., Hapsar, i. and Setyaningrum, D. L. (2014). Rice in health and nutrition. *International Food Research Journal, 21*(1), 13-24.

Rossella, C. and Laura, M. (2014). Protective effect of Vaccinium myrtillus extract against UVA- and UVB-induced damage in a human keratinocyte cell line (HaCaT cells). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 132*, 27-35.

Sangle, V. A., Bijjaragi, S., Shah, N., Kangane, S., Ghule, H. M. and Rani, S. A. (2016). Comparative study of frequency of micronuclei in normal, potentially malignant diseases and oral squamous cell carcinoma. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine, 7*(1), 33-38. doi:10.4103/0976-9668.175049

Shao, Y., Xu, F., Sun, X., Bao, J. and Beta, T. (2014). Identification and quantification of phenolic acids and anthocyanins as antioxidants in bran, embryo and endosperm of white, red and black rice kernels (Oryza sativa L.). *Journal of Cereal Science, 59*(2), 211-218. doi:10.1016/j.jcs.2014.01.004

Shorrocks, J., Paul, N. D. and McMillan, T. J. (2008). The dose rate of UVA treatment influences the cellular response of HaCaT keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology, 128*(3), 685-693. doi:10.1038/sj.jid.5701037

Silva, J. P., Gomes, A. C. and Coutinho, O. P. (2008). Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells. *European Journal of Pharmacology, 601*, 50-60.

Slamenova, D., Kuboskova, K., Horvathova, E. and Robichova, S. (2002). Rosemary stimulated reduction of DNA strand breaks and FPGsensitive sites in mammalian cells treated with H2O2 or visible light-excited Methylene Blue. *Cancer Letters, 177*, 145-153.

Sompong, R., Siebenhandl-Ehn, S., Linsberger-Martin, G. and Berghofer, E. (2011). Physicochemical and antioxidative propoties of red and black rice varieties from Thailand, China and Sri Lanka. *Food Chemistry, 124*, 132-140.

Stadtman, E. R. (1993). Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annual Review of Biochemistry, 62*, 797-821.

Studzinski, G. P. (1999). *Apoptosis apractical approach*. USA: New York: Oxford University Press.

Subramanian, M., Jones, M. F. and Lal, A. (2013). Long Non-Coding RNAs Embedded in the Rb and p53 Pathways. *Cancers (Basel), 5*(4), 1655-1675. doi:10.3390/cancers5041655

Sundquist, T., Moravec, R., Niles, A., O'brien, M. and Riss, T. (2006). Timing-your-apoptosis-assays. *Cell Notes*(16), 18-21.

Svobodova, A., Walterova, D. and Vostalova, J. (2006). Ultraviolet-light-induced-alteration-to-the-skin. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia Republic, 150*(1), 25–38.

U.S. Department of Health and Human Services. (2010). *Melanoma and Other Skin Cancers* (Vol. 10).

กิตติมา บุตรจันทร์. (2557). การศึกษาผลของสารสกัดข้าวดำและข้าวแดงต่อดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็งผิวหนังที่ถูกทำลายด้วยรังสี *UVA*. (วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต), มหาวิทยาลัยศิลปากร.

นันท์นภัส เติมวงศ์. (2551). ความสัมพันธ์ของสารประกอบฟีโนลิกส์กับความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระในพืช. ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์, *8*(2).

ปกป้อง ประยงค์, นาถธิดา วีระปรียากูร and สหพัฒน์ บรัศว์รักษ์. (2007). อะพอพโทซิส: วิถีและการตรวจวัด. วารสารงานวิจัยเกี่ยวกับสุขภาพ, *21*(3), 227-238.

ปิยะ เต็มวิรินะนุกุล. (2557). ความเสียหายของดีเอ็นเอและภาวะชราก่อนกำหนด. พิษวิทยาไทย, *29*(1-2), 70-80.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ณิชนันทน์ จันทนู
วัน เดือน ปี เกิด	22 พฤศจิกายน 2535
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2553 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนกาญจนาภิเษกวิทยาลัย สุราษฎร์ธานี อ.ไชยา จ.สุราษฎร์ธานี พ.ศ. 2557 สำเร็จการศึกษาระดับระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม พ.ศ. 2558 ศึกษาต่อในระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม
ที่อยู่ปัจจุบัน	277 ม.11 ต.พ่วงพรมคร อ.เคียนซา จ.สุราษฎร์ธานี 84260
ผลงานตีพิมพ์	“ผลของสารสกัดรำข้าวต่อเซลล์มะเร็งผิวหนัง (A375) ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVA” (poster presentation และ proceeding) การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 55 : ระหว่างวันที่ 31 มกราคม – 3 กุมภาพันธ์ 2560 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

มหาวิทยาลัยศิลปากร