

การศึกษาผลของการให้น้ำมันรำข้าวต่อระดับโคเอนไซม์คิวเทน, ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสและการเคลื่อนไหวของไขมันระดับโมเลกุลในหนูปกติและหนูธาลัสซีเมียชนิดเบต้า

Effect of rice bran oil on CoQ10, superoxide dismutase and lipid fluidity of normal and β -thalassemic mice

กนิฐ ธีระตันติกานนท์ (Kanin Teeratantikanon)* ประไพศรี ศิริจักรวาล (Prapa Sri Sirichakwal)

** สุทัศน์ ฟูเจริญ (Suthat Fucharoen)*** เอกราช เกตวัลห์ (Aikkarach Kettawan)

**** นพวรรณ ภูมालา มอราเลส (Noppawan Phumala Morales)

***** อชิรญา คำจันทร์สุกสิน (Achiraya Kamchansuppasin)

***** รามณียา นิธิพงษ์วนิช (Ramaneeya Nithipongvanitch) *****

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของการให้น้ำมันรำข้าวไรซ์เบอรี่ต่อภาวะระดับโคเอนไซม์คิวเทน, ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสและการเคลื่อนไหวของไขมันระดับโมเลกุลในหนูปกติ และหนูธาลัสซีเมียชนิดเบต้า ภายหลัง 2 เดือนของการได้รับน้ำมันรำข้าว พบว่าการเคลื่อนไหวของไขมันในบริเวณ hydrophobic region ของผนังเม็ดเลือดแดงซึ่งตรวจวัดโดย 16-DS พบว่าค่า h0/h-1 ในกลุ่มหนูธาลัสซีเมียที่ได้รับน้ำมันรำข้าวในปริมาณต่ำ (TL) มีค่าต่ำลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับน้ำมันรำข้าว (TC) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ระดับโคเอนไซม์คิวเทน (CoQ10) ในพลาสมา หนูกลุ่ม TC ต่ำกว่าหนูปกติ (NC) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) ระดับ CoQ10 ในหนู ทั้งกลุ่มที่ได้รับน้ำมันรำข้าวในปริมาณต่ำ (TL) และกลุ่มที่ได้รับน้ำมันรำข้าวในปริมาณสูง (TH) เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (NC) ในขณะที่ Superoxide Dismutase ในหนูทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน

ABSTRACT

This research was to study the effect of riceberry bran oil on CoQ10 level, Superoxide Dismutase and lipid fluidity of normal mice and β -thalassemic mice. After 2 months of rice bran oil supplementation, lipid fluidity in the area of hydrophobic region of red blood cell membrane which measured by 16-DS showed h0/h-1 in thalassemic mice receiving low dose (TL) was lower than that of control thalassemic mice (TC) significantly ($P<0.05$). The CoQ10 level in plasma of TC group was lower than NC group significantly ($P<0.01$), while CoQ10 level increased in the both of TL and TH (thalassemic mice receiving high dose) groups close to NC group. There was not significantly difference on Superoxide Dismutase between normal and thalassemic group.

คำสำคัญ : น้ำมันรำข้าวไรซ์เบอรี่ หนูธาลัสซีเมีย ออกซิเดทีฟสเตรส

Key Words: riceberry bran oil, thalassemic mice, oxidative stress

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโภชนาการ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี และสถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล** รองศาสตราจารย์ สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล

*** ศาสตราจารย์ สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

**** อาจารย์สถาบัน โภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล

***** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

***** นักวิจัยสถาบัน โภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล

***** นักวิจัยสถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

บทนำ

ธาลัสซีเมีย เป็นภาวะที่มีความผิดปกติของการสร้างฮีโมโกลบิน มีสาเหตุมาจากพันธุกรรม ปกติฮีโมโกลบินประกอบด้วยสายโกลบิน 4 สาย คือ แอลฟา-โกลบิน 2 สายและเบต้า-โกลบิน 2 สาย ผู้ที่เป็นธาลัสซีเมียมีการสร้างโกลบินบางสายลดลงหรือไม่มีการสร้างเลย ทำให้เกิดความไม่สมดุลของสายโกลบิน (Joshi et al, 1983) ธาลัสซีเมียแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ เบต้า และ แอลฟา-ธาลัสซีเมีย พบมากในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งประเทศไทย (จินตนา, 2547)

เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย มีความไวต่อภาวะ oxidative stress เพราะภาวะที่มีสายโกลบินที่จับกลุ่มกัน จะเกิดภาวะออกซิเดชันได้ นอกจากนี้สายโกลบินที่เหลือ ทำให้เกิดการสร้าง methemoglobin เพิ่มขึ้น ธาลัสซีเมียมีฮีโมโกลบินต่ำทำให้ไม่สามารถกำจัดภาวะออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในเซลล์ได้ นอกจากนี้การสร้างเม็ดเลือดแดงที่ไม่เพียงพอและภาวะเหล็กเกินนำไปสู่การลดลงของสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่าการเกิดออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) ในซีรัมมีความสัมพันธ์กับสภาวะเหล็กเกินในร่างกายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ธาตุเหล็กสามารถเร่งปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระออกซิเจนที่มีความไวสูงโดยปฏิกิริยา Fenton-Haber Weiss ในเลือดผู้ป่วยธาลัสซีเมียนำไปสู่การลดลงของสารต้านออกซิเดชัน (Halliwell et al, 1984) มีรายงานพบว่า การเกิดออกซิเดชันของไขมันและโปรตีนที่ผนังเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียเนื่องจากเม็ดเลือดแดงเหล่านี้มี activated oxygen มากกว่าปกติ (Carrel et al, 1975, Rachmilewitz et al, 1985) จากปัจจัยโดยรวมสรุปได้ว่าผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีภาวะออกซิเดชันมากผิดปกติ เม็ดเลือดแดงแตกง่ายส่งผลให้เม็ดเลือดแดงอายุสั้น

สารต้านอนุมูลอิสระ อาจเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่จะมีบทบาทในการป้องกันการเกิด Oxidative hemolysis ปกป้องเม็ดเลือดแดงและช่วยให้เม็ดเลือด

แดงมีอายุยืนยาวขึ้นในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย (Rund et al, 2000)

สารต้านอนุมูลอิสระที่มีผลโดยตรงต่อการต้านการเกิด lipid peroxidation ทั้งในการศึกษาแบบ *in vitro* และ *in vivo* คือ วิตามินอี (Niki et al, 2004, Qureshi et al, 2000)

ผลการศึกษาหลายงานที่ผ่านมาพบว่า น้ำมันรำข้าวเป็นแหล่งที่ดีของวิตามินอีและสารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ เช่น เบต้าแคโรทีน, แกมมาออไรซานอล (γ -oryzanol), โคเอนไซม์คิวเทน (CoQ10), โพลีฟีนอล (Polyphenol) (Diack et al, 1994, Hu et al, 1996, Lloyd et al, 2000, Ramasarma et al, 1985, Zigoneanu et al, 2008, Chotimakorn et al, 2008)

Kongkachuichai และคณะ (2007) ศึกษาว่าข้าวไรซ์เบอร์รี่ของศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านการปรับปรุงพันธุ์ข้าวแนวอณูวิธและการพัฒนาผลิตภัณฑ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน จังหวัดนครปฐม พบว่ามีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูง และมีสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ วิตามินอี, เบต้าแคโรทีน, แกมมาออไรซานอล (γ -oryzanol), โคเอนไซม์คิวเทน (CoQ10) และโพลีฟีนอล (Polyphenol) สูงเมื่อเปรียบเทียบกับรำข้าวชนิดอื่นๆ

เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้ ยังไม่มีการศึกษาใดที่นำน้ำมันรำข้าวมาใช้ในการต้านอนุมูลอิสระและออกซิเดทีฟสเตรสในผู้ที่เป็ธาลัสซีเมีย ดังนั้น การศึกษานี้จึงทำการศึกษาในหนูทดลองก่อนที่จะนำมาศึกษาในมนุษย์ โดยได้รับความร่วมมือจากโครงการวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล ในการให้หนูทดลองซึ่งเป็นหนูธาลัสซีเมียชนิดเบต้า เนื่องจากหนูชนิดนี้มีการเปลี่ยนแปลงพยาธิสรีรวิทยาที่เห็นได้ชัด การเกิดพยาธิสภาพกับเม็ดเลือดแดง คล้ายคลึงกับที่เกิดในผู้ที่เป็นธาลัสซีเมียเบต้าชนิด intermedia และนิยมนำมาใช้เป็นโมเดลในการศึกษาเกี่ยวกับธาลัสซีเมีย และได้รับความร่วมมือจากศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านการปรับปรุงพันธุ์ข้าวแนวอณูวิธและการพัฒนาผลิตภัณฑ์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ในการผลิตน้ำมันรำข้าวไรซ์เบอร์รี่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลการให้น้ำมันรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ในหนูธาลัสซีเมีย ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับน้ำมันรำข้าวปริมาณต่ำ (Low dose), กลุ่มที่ได้รับน้ำมันรำข้าวปริมาณสูง (High dose), กลุ่มที่ไม่ได้รับน้ำมันรำข้าว รวมทั้งในหนูปกติ ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับน้ำมันรำข้าวและกลุ่มที่ไม่ได้รับน้ำมันรำข้าว ต่อภาวะระดับโคเอนไซม์คิวเทน, ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (SOD) และการเคลื่อนไหวของไขมันระดับโมเลกุล (Lipid Fluidity)

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

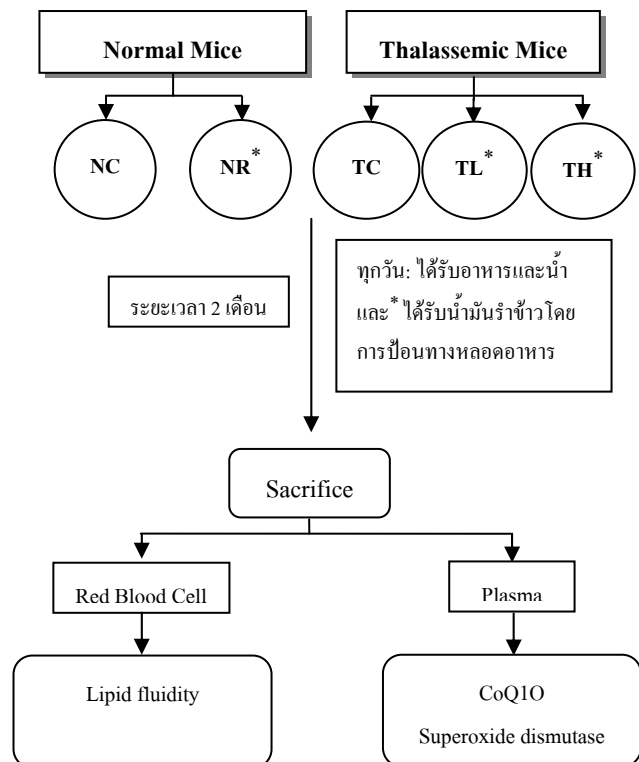
หนู Wild type (หนูปกติ) จำนวน 18 ตัวและหนูธาลัสซีเมียชนิดเบต้า จำนวน 20 ตัว น้ำหนักตัวละประมาณ 20 กรัม ได้รับจากโครงการวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล และถูกเลี้ยง ณ ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล โดยอุณหภูมิห้องอยู่ระหว่าง 25 ± 1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 40-50% ช่วงเวลาของแสงสว่างและมืด 12 :12 ชั่วโมงต่อวัน มีระบบระบายอากาศและเสียงในกรงที่มีวัสดรจนอนเป็นขี้เลื่อยสะอาด โดยหนูทุกตัวถูกชั่งน้ำหนักทุกๆ 2 วัน

ข้อมูลน้ำมันรำข้าวไรซ์เบอร์รี่

น้ำมันรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ ผลิตโดยศูนย์ความเป็นเลิศทางการปรับปรุงพันธุ์ข้าวแนวอณูวิธีและการพัฒนาผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน จังหวัดนครปฐม โดยการสกัดน้ำมันจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ซึ่งเป็นข้าวที่ได้รับการคัดเลือกและพัฒนาจากข้าวเจ้าหอมนิล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พันธุ์พ่อ) กับข้าวขาวดอกมะลิ 105 สถาบันวิจัยข้าว (พันธุ์แม่) ด้วยวิธี supercritical fluid extraction (SFE) และ

ตรวจสอบด้วยวิธี LC-ESI-MS/MS เพื่อตรวจสอบสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระในน้ำมันรำข้าว วิธีการดังกล่าวได้รับการเตรียมอย่างมีคุณภาพ ไม่มีการเติมสารใดๆ จึงไม่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของสารเคมีใดๆ สารต้านอนุมูลอิสระที่มีในน้ำมันรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ ได้แก่ แกมมาโอไรซานอล 14 มก./ก. เบต้าแคโรทีน 22.94 มก./ก., ลูทีน 14.64 มก./ก., วิตามินอี 0.92 มก./ก., โพลีฟีนอล 0.046 มก./ก.และ โคเอนไซม์คิวเทน 20 มก./ก.

วิธีดำเนินการวิจัย



หนูปกติ ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มที่ไม่ได้รับน้ำมันรำข้าว (NC) และกลุ่มที่ได้รับน้ำมันรำข้าวในปริมาณสูง (น้ำมันรำข้าว 36 มก./วัน) (NR) (เทียบได้เท่ากับ 1.82 กรัม ต่อ น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) ส่วนหนูธาลัสซีเมียชนิดเบต้า ประกอบด้วย 3 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มที่ไม่ได้รับน้ำมันรำข้าว (TC), กลุ่มที่ได้รับน้ำมันรำข้าวในปริมาณต่ำ (น้ำมันรำข้าว 17 มก./วัน) (TL) (เทียบได้เท่ากับ 0.83 กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม)

หรือ เมื่อเทียบกับคนจะเท่ากับ 50 กรัม ต่อ น้ำหนักตัว 60 กิโลกรัม ซึ่งไม่เกินปริมาณที่แนะนำให้คนบริโภค น้ำมันในแต่ละวัน คือไม่เกินวันละ 65 กรัม) และกลุ่มที่ได้รับน้ำมันรำข้าวในปริมาณสูง (น้ำมันรำข้าว 36 มก.ก./วัน) (TH) โดยปริมาณน้ำมันรำข้าวที่ใช้ทั้ง 2 ปริมาณนี้ ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ (Suzuki et al, 1970, Raghuram et al, 1989, Tsuji et al, 1989, Lichtenstein et al, 1994) และผลจากการศึกษาเบื้องต้น (Preliminary Study) หนูทุกตัวที่ได้รับน้ำมันรำข้าวไรซ์เบอรี่จะได้รับโดยวิธีการป้อนอาหารทางหลอด (Gavage) เป็นระยะเวลา 2 เดือน การศึกษานี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาด้านจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยมหิดล

การเตรียมพลาสมา (Plasma) และเม็ดเลือดแดง (Red Blood Cell)

หนูทั้งหมดจะถูกทำให้สลบ โดยการฉีด Zoletil 100 (Tiletamine และ Zolazepam) ขนาด 30 มก./กก. เข้าบริเวณช่องท้อง (Intraperitoneal injection) และเลือดจากหัวใจจะถูกเก็บใน heparin-coated microcentrifuge tube ซึ่งพลาสมาจะถูกแยกจากเม็ดเลือดแดงโดยการปั่นด้วยแรงเหวี่ยง 2,300g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาทีและเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -70 °C ก่อนนำมาวิเคราะห์

การตรวจวิเคราะห์ Lipid fluidity ของ Red blood cell plasma membrane ด้วยวิธีการ Electron Spin Resonance (ESR) spin labeling

การเคลื่อนไหวของไขมันระดับโมเลกุล (Lipid fluidity) บนผนังเซลล์ของเม็ดเลือดแดง ตรวจวัดโดย Electron Spin Resonance (ESR) spectroscopy และเทคนิค spin labeling โดยใช้สาร spin probe สองชนิด ได้แก่ 5-doxyl stearic acid (5-DS) และ 16-doxyl stearic acid (16-DS) ซึ่งมีโครงสร้างประกอบด้วย โมเลกุลของ nitroxide stable radical ติดอยู่ที่โมเลกุลของ stearic acid ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 5 และ 16

ตามลำดับ และเมื่อโมเลกุลของสาร spin probe นี้เข้าไปอยู่ในชั้นผนังพลาสมา ส่วนของ nitroxide stable radical จะอยู่ในบริเวณพื้นผิว (surface) ใกล้ตำแหน่งของ phospholipids polar group และตำแหน่งที่ลึกเข้าไปใน ส่วนของ hydrophobic region ของผนังเม็ดเลือดแดง การหมุนของส่วน nitroxide stable radical นี้จะ สอดคล้องกับการเคลื่อนไหวของโมเลกุลไขมันใน ตำแหน่งนั้นๆ

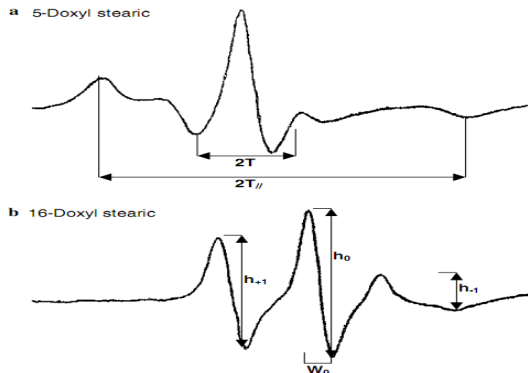
วิธีการโดยนำสารละลาย hexane ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ของ 5-doxyl stearic acid (5-DS) และ 16-doxyl stearic acid (16-DS) (Sigma, ST. Louis, MO) ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. ทำให้แห้งด้วยไนโตรเจนที่อยู่ในหลอดทดลองที่สะอาด เดิมเม็ดเลือดแดงที่ล้างด้วย normal saline และปรับความเข้มข้นเม็ดเลือดแดง ประมาณ 50% hematocrit แล้วปริมาณ 50 ไมโครลิตร ที่ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำตัวอย่าง เม็ดเลือดแดงที่ติดด้วยสาร spin probe นี้ใส่ capillary tube สำหรับวัด ESR ซึ่งแถบแสง ESR ถูกบันทึกโดยใช้ X-band ESR (JEOL RX-2) spectrometer ซึ่งติดตั้ง ร่วมกับ TE011 cavity คลื่นความถี่ถูกตั้งไว้ที่ 9.4 GHz และกำลังงานที่ 5 mW ค่าแอมพลิจูดของ 100 kHz มีการปรับเปลี่ยนที่ 0.25 และ 0.125 mT สำหรับ 5-DS และ 16-DS ตามลำดับ คลื่นสนามแม่เหล็กภายนอกมี อัตราการสแกนที่ 5 mT/min แถบแสง ESR ของ 5-DS ให้ค่า the order parameter (S) ที่แสดงให้เห็นถึง motional anisotropy ของตำแหน่งการหมุนใกล้กับ polar head group ของชั้นฟอสโฟลิปิด โดย order parameter สามารถคำนวณได้ตามสูตร $S = 1.732 \times (T_{//} - T_{-C}) / (T_{//} + 2T_{+2C})$; $C = 1.4 - 0.053(T_{//} - T)$ ซึ่ง $T_{//}$ และ T สามารถวัดได้ดังรูป 1a ส่วน 16-DS ให้ค่า h_0/h_{-1} และ ค่า the rotation correlation times โดยสามารถวัดออกมา เป็นค่า τ_B และ τ_C ซึ่งแสดงถึงการเคลื่อนที่ในทิศทาง แนวตั้งและแนวขนานของแกนตามยาวของโมเลกุล ไขมันในไฮโดรคาร์บอนของชั้นฟอสโฟลิปิดที่ลึก โดย the rotation correlation times สามารถคำนวณได้ตาม สูตร

$$\tau_B = K\Delta W_0 \left[(h_0/h_{+1})^{1/2} - (h_0/h_{-1})^{1/2} \right],$$

$$\tau_C = K\Delta W_0 \left[(h_0/h_{+1})^{1/2} - (h_0/h_{-1})^{1/2} - 2 \right],$$

ซึ่ง h_{+1} , h_0 , h_{-1} และ W_0 สามารถวัดจากแถบแสงของ

ESR ดังรูปที่ 1b (Morales et al, 2006)



รูป 1 แถบแสง ESR ของ 5-doxyl stearic acid (a) และ 16-doxyl stearic acid (b) บนผนังของเม็ดเลือดแดง

การตรวจวิเคราะห์ระดับโคเอนไซม์คิวเทน (CoQ10) ในพลาสมา (plasma)

ระดับโคเอนไซม์คิวเทนทั้งหมด (ผลรวมของโคเอนไซม์คิวเทนที่ถูกออกซิไดซ์และถูกรีดิวซ์) จะถูกวิเคราะห์โดยใช้ HPLC-electrochemical detector จากวิธีการของ Okamoto และคณะ (Okamoto et al, 1988)

การตรวจวิเคราะห์ค่า Superoxide Dismutase Activity (SOD)

ค่า Superoxide Dismutase ถูกวิเคราะห์โดยใช้ enzymatic assay kits (Biovision Laboratory, Switzerland)

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)
2. วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองต่างๆ และกลุ่มควบคุมโดยใช้ One-way analysis of variance (ANOVA)
3. เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม โดยใช้

Least significant different test

4. กำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติ (Significant level) น้อยกว่า 0.05 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

จำนวนหนูที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดทั้งสิ้น 38 ตัว จำแนกเป็นหนูปกติ ทั้งหมด 18 ตัว แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มที่ไม่ได้รับน้ำมันรำข้าว (NC) 9 ตัว และกลุ่มที่ได้รับน้ำมันรำข้าวในปริมาณสูง (NR) 9 ตัว ส่วนหนูธาลัสซีเมียชนิดเบต้า ทั้งหมด 20 ตัว แบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มที่ไม่ได้รับน้ำมันรำข้าว (TC) 6 ตัว, กลุ่มที่ได้รับน้ำมันรำข้าวในปริมาณต่ำ (TL) 7 ตัว และกลุ่มที่ได้รับน้ำมันรำข้าวในปริมาณสูง (TH) 7 ตัว

ตารางที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าการเคลื่อนไหวของไขมัน (lipid fluidity) ที่ตำแหน่งต่างกันบนผนังของเม็ดเลือดแดงและระดับโคเอนไซม์คิวเทน (CoQ10) ในพลาสมา (plasma) ในหนูปกติ และหนูธาลัสซีเมีย

ลักษณะ/กลุ่ม	หนูปกติ		หนูธาลัสซีเมียชนิดเบต้า		
	NC (N=9)	NR (N=9)	TC (N=6)	TL (N=7)	TH (N=7)
Order parameter (S)	0.71 ± 0.01	0.71 ± 0.01	0.71 ± 0.01	0.71 ± 0.01	0.72 ± 0.01
$\tau_B (\times 10^{-10} \text{ s})$	18.49 ± 1.36	18.07 ± 1.2	18.09 ± 1.04	18.03 ± 1.18	17.84 ± 0.97
$\tau_C (\times 10^{-10} \text{ s})$	22.67 ± 1.40	22.27 ± 0.92	23.18 ± 1.28	22.52 ± 1.24	22.35 ± 1.05
h_0/h_{-1}	4.42 ± 0.21	4.41 ± 0.17	4.70 ^b ± 0.04	4.52 ^a ± 0.19	4.61 ± 0.18
CoQ10	25.91 ± 4.50	32.02 ^b ± 4.29	17.64 ^b ± 2.91	21.17 ± 3.58	22.03 ^a ± 3.92

*ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (N = 6 – 9)

NC=หนูปกติกลุ่มที่ไม่ได้รับน้ำมันรำข้าว; NR=หนูปกติกลุ่มที่ได้รับน้ำมันรำข้าว; TC= หนูธาลัสซีเมีย กลุ่มที่ไม่ได้รับน้ำมันรำข้าว; TL= หนูธาลัสซีเมีย กลุ่มที่ได้รับน้ำมันรำข้าวในปริมาณต่ำ; TH= หนูธาลัสซีเมีย กลุ่มที่ได้รับน้ำมันรำข้าวในปริมาณสูง

^a แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ กับ กลุ่ม TC

^b แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.01$ กับ กลุ่ม NC

การเคลื่อนไหวของไขมัน (lipid fluidity) สามารถเปลี่ยนแปลงโดยกระบวนการ oxidative stress ในการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไขมันและในส่วนประกอบของผนังเม็ดเลือดแดง ซึ่งการเพิ่มขึ้นของ lipid fluidity นั้นอาจจะเป็นผลจาก oxidative damage ต่อพันธะคู่ (double bonds) ในโครงสร้างของไขมัน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือการสูญเสียพันธะคู่ (double bond) ดังกล่าว อาจส่งผลให้เกิด free rotation ของ acyl chain และเพิ่มค่าของ lipid fluidity (Schreier et al, 1978) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ในไลโปโปรตีน (lipoprotein) พบว่า ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย มีการเพิ่มขึ้นของ lipid fluidity ในตำแหน่ง hydrophobic region อย่างชัดเจน ในขณะที่พบว่าตำแหน่งพื้นผิวผนังเม็ดเลือดแดง มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ดังนั้นตำแหน่ง hydrophobic ของไลโปโปรตีน (lipoprotein) ของผู้ป่วยธาลัสซีเมียเป็นตำแหน่งเป้าหมายของการเกิด oxidative damage

จากตารางที่ 1 ซึ่งเป็นการแสดงผลการวิเคราะห์ค่า lipid fluidity ที่ตำแหน่งต่างกันบนผนังเม็ดเลือดแดงในหนูปกติ และหนูธาลัสซีเมีย การเคลื่อนไหวของไขมันบริเวณใกล้ phospholipids head group ซึ่งตรวจวัดโดย 5-DS นั้นค่า order parameter (S) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มต่างๆ และระหว่างกลุ่มหนูปกติ และหนูธาลัสซีเมีย สำหรับการเคลื่อนไหวของไขมันในบริเวณ hydrophobic region ของผนังเม็ดเลือดแดงซึ่งตรวจวัดโดย 16-DS พบว่าค่า h0/h-1 ในหนูธาลัสซีเมียมีค่าที่ดีขึ้นหลังจากได้รับน้ำมันรำข้าว กล่าวคือหนูธาลัสซีเมีย (TC) มีค่า h0/h-1 (4.70 ± 0.04) ซึ่งมีค่าต่ำกว่า (อีกนัยหนึ่งคือมี fluidity สูงขึ้น) เมื่อเทียบกับหนูปกติ (NC) (4.42 ± 0.21) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) และหลังจากได้รับน้ำมันรำข้าว มีค่า h0/h-1 ของ TL และ TH เท่ากับ 4.52 ± 0.19 และ 4.61 ± 0.18 ตามลำดับซึ่งเห็นว่าค่า h0/h-1 เพิ่มขึ้นเข้าใกล้เคียงกับหนูในกลุ่มควบคุม (NC) นอกจากนี้ ในหนูธาลัสซีเมียในกลุ่ม TC มีค่า h0/h-1 ซึ่งมีค่าต่ำกว่า

กลุ่ม TL อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กล่าวคือ มีค่าที่ดีขึ้นภายหลังจากที่หนูธาลัสซีเมียได้รับน้ำมันรำข้าวในปริมาณต่ำ (TL) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม TC ส่วนพารามิเตอร์อื่นๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิเคราะห์ระดับโคเอนไซม์คิวเทน (CoQ10) ในพลาสมา (plasma) พบว่า กลุ่ม TC (17.64 ± 2.91 ng/ml) มีระดับของ CoQ10 ต่ำกว่ากลุ่มหนูปกติ (NC) (25.91 ± 4.50 ng/ml) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ขณะที่การให้น้ำมันรำข้าวมีผลต่อการเพิ่มของระดับ CoQ10 ในหนูปกติกลุ่ม NR (32.02 ± 4.29 ng/ml) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (NC) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ในทำนองเดียวกันเมื่อให้น้ำมันรำข้าวในหนูธาลัสซีเมีย พบว่ามีระดับโคเอนไซม์คิวเทนที่เพิ่มขึ้นทั้งในกลุ่ม TL (21.17 ± 3.58 ng/ml) และ กลุ่ม TH (22.03 ± 3.92 ng/ml) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม TC นอกจากนี้ในกลุ่ม TH ยังพบว่ามีการเพิ่มของระดับ CoQ10 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม TC ($P < 0.05$) โดยที่ทั้งกลุ่ม TL และ TH มีระดับของ CoQ10 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มหนูปกติ (NC) ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่า หนูธาลัสซีเมียมีระดับ CoQ10 ต่ำกว่าหนูปกติ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kalpravidh และคณะ (2005) ที่พบว่าระดับของ CoQ10 ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียต่ำกว่าคนปกติ ดังนั้น หนูธาลัสซีเมียชนิดเบต้าที่ใช้ในการศึกษานี้ น่าจะเป็นโมเดลที่ดีในการศึกษาเกี่ยวกับภาวะธาลัสซีเมียและสารต้านอนุมูลอิสระ ในการศึกษาครั้งนี้ เราพบว่า การให้น้ำมันรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ซึ่งประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ CoQ10 ระดับต่ำในหนู มีผลทำให้ระดับ CoQ10 ในเลือดให้ใกล้เคียงกับภาวะปกติ ซึ่งน่าจะเป็นผลดีต่อการต้านออกซิเดทีฟสเตรสในภาวะธาลัสซีเมีย

ตารางที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณ Superoxide Dismutase ในพลาสมา (plasma) ของหนูปกติ และหนูธาลัสซีเมีย

ลักษณะ/ กลุ่ม	หนูปกติ		หนูธาลัสซีเมียชนิดเบต้า		
	NC (N=6)	NR (N=6)	TC (N=4)	TL (N=4)	TH (N=4)
SOD (U/ml)	9.17 ± 5.85	7.5 0 ± 6.89	16.25 ± 4.79	18.75 ± 2.50	12.50 ± 8.66

*ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (N = 4 - 6)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Superoxide Dismutase พบว่า
ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่าง
กลุ่มหนูปกติด้วยกัน และระหว่างกลุ่มหนูธาลัสซีเมีย
ด้วยกัน (ตารางที่ 2)

สรุปผลการวิจัย

การให้น้ำมันรำข้าวไรซ์เบอรี่ มีผลทำให้ระดับ
ของสารต้านอนุมูลอิสระโคเอนไซม์คิวเทนในพลาสมา
เพิ่มขึ้น ทั้งในกลุ่มหนูปกติ และกลุ่มหนูธาลัสซีเมีย ใน
ขณะเดียวกัน Superoxide Dismutase ในหนูทุกกลุ่มไม่มี
ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การ
เคลื่อนไหวของไขมันในบริเวณ hydrophobic region
ของผนังเม็ดเลือดแดงของหนูธาลัสซีเมียที่ได้รับน้ำมัน
รำข้าวลดลงเทียบกับเมื่อไม่ได้รับน้ำมันรำข้าว

ข้อเสนอแนะ

1. จำนวนหนูที่ใช้ในการศึกษา ควรมีจำนวน
มากกว่านี้ เพื่อให้เห็นความแตกต่างระหว่างกลุ่ม
การศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่การศึกษานี้
มีข้อจำกัดเนื่องจากหนูธาลัสซีเมียเป็นหนูที่เกิด
จากการขาดหายไปของสายเบต้าโกลบินทำให้
หนูไม่แข็งแรง หนูที่เกิดขึ้นใน 1 ครอกจึงมีอัตรา
การรอดต่ำ
2. การศึกษาต่อไป ควรใช้ระยะเวลาในการศึกษา
นานกว่านี้ อาจจะทำให้เห็นผลชัดเจนยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และ
ขอขอบคุณนางสาวทัศนีย์ ฝ่ายซ้ายครามและนางสาว

ฉันทิภา จันทร์ภักพัฒนา ห้องปฏิบัติการสัตว์ทดลอง
สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

เอกสารอ้างอิง

- จินตนา ศิรินาวัน, ชนินทร์ ล่มวงศ์, พรพิมล เรืองวุฒิเลิศ
เสถียร สุขพนิชนันท์, วันชัย วะชีวนาวัน, วร
วรรณ ดันไพจิตร.2547 ความรู้พื้นฐานธาลัสซี
เมีย เพื่อการป้องกันและควบคุมโรค.
สำนักพิมพ์หมอชาวบ้าน.พิมพ์ครั้งที่ 1.
กรุงเทพฯ: 7.
- Carrel RW, Winterbourn CC, Rachmilewitz EA. 1975.
Activated oxygen and hemolysis. Br J Haemat.
30: 259-64.
- Chotimakorn C., Benjakulb S., Silalac N. 2008.
Antioxidant components and properties of five
long-grained rice bran extracts from
commercial available cultivars in Thailand.
Food Chemistry. 111(3):636-641.
- Diack K., Saska M. 1994. Separation of vitamin E and
gamma-oryzanols from rice bran by normal-
phase chromatography. Journal of the
American Oil Chemists' Society. 71:1211-17.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1984. Oxygen toxicity,
oxygen radicals, transition metals and disease.
Biochem J. 219: 1-14.
- Hu W, Wells J.H., Shin T.S. 1996. Comparison of
isopropanol and hexane for extraction of
vitamin E and oryzanols from stabilized rice
bran. J Am Oil Chem Soc. 73: 1653-6.
- Joshi W, Leb L, Piotrowski J, Fortier N, Synder LM.
1983. Increased sensitivity of isolated alpha
subunits of normal human hemoglobin to
oxidative damage and crosslinkage with
spectrin. J Lab Clin Med. 102:46-52.

- Kalpravidh R, Wichit A, Siritanaratkul N, Fucharoen S. 2005. Effect of coenzyme Q₁₀ as an antioxidant in β -thalassemia/Hb E patients. 25: 225-234.
- Kongkachuichai R., Chanphrom P., Sungpuag P. 2007. Antioxidants and antioxidant activities of pigmented rice varieties and rice bran. (M.Sc.Thesis in Nutrition). Nakhon Pathom: Faculty of Graduate Studies, Mahidol University.
- Lichtenstein, A.H., Ausman, L.M., Carrasco, W., Gualtieri, L.J., Jenner, J.L., Ordovas, J.M., Nicolosi, R.J., Goldin, B.R., Schaefer, E.J.1994. Rice bran oil consumption and plasma lipid levels in moderately hypercholesterolemic humans. *Arteriosclerosis and Thrombosis*. 14: 549-556.
- Lloyd B.J., Siebenmorgen T.J., Beers K.W. 2000. Effects of commercial processing on antioxidants in rice bran. *Cereal Chem* 77: 551-5.
- Morales NP, Charlarmchoung C, Luechapudiporn R, Yamanont P, Fucharoen S, Chantharaksri U. 2006. Lipid fluidity at different regions LDL and HDL of β -thalassemia/Hb E patients. *Biochem Biophys Res Commun*: 698-703.
- Niki E., Noguchi N. 2004 Dynamic of antioxidant action of vitamin E. *American Chemistry Society: Accounts of Chemical Research*. 37: 45-51.
- Okamoto T, Fukunaga, Y, Ida Y, and Kishi, T. 1988. Determination of reduced and total ubiquinones in biological materials by liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr*: 430, 11-19.
- Qureshi AA, Mo H, Packer L, Peterson DM. 2000. Isolation and identification of novel tocotrienols from rice bran with hypocholesterolemic, antioxidant and antitumor properties. *J Agri Food Chem*. 48: 3130-40.
- Rachmilewitz EA, Shinar E, Shalev O, Galili U, Schrier SL. 1985 Erythrocyte membrane alterations in beta-thalassemia. *Clinics Haematol*. 14: 163-83.
- Raghuram T, Brahmaji G, Rukmini C. 1989. Studies on hypolipidemic effects of dietary rice bran oil in human subject. *Nutr Rep Int*. 35: 889-895.
- Ramasarma T. 1985 Natural occurrence and distribution of coenzyme Q. in: Lenaz G, Ed. *Biochemistry, biogenetics and clinical applications of ubiquinone*. New York. 67-81.
- Rund D., Rachmilewitz E. 2000. New trends in the treatment of beta-thalassemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 33: 105-18.
- Schreier S, Polnaszek C, Smith I. 1978. Spin labels in membranes. *Biochim Biophys Acta*. 515: 375-436.
- Suzuki, S., Oshima, S. 1970. Influence of blending of edible fats and oils on human serum cholesterol level (Part 1-2). *J Nutr*. 28: 3-9.
- Tsuji E, Itoh H, Itakura H. 1989. Comparison of effects of dietary saturated and polyunsaturated fats on the serum lipids levels. *Clin Ther Cardiovasc*. 8: 149-151.
- Zigoneanu I.G., Williams L., Xu Z. 2008. Determination of antioxidant components in rice bran oil extracted by microwave-assisted method. *Bio resource Technology* 99: 4910-18.