พิษเฉียบพลันและพิษกึ่งเฉียบพลันของผงคีเฟอร์จากน้ำนมข้าวกล้องขาวดอกมะลิ 105

Acute and Sub-acute Toxicities of Kefir Powder from KhaoDawk Mali 105 Brown Rice Milk

สุภาพร ชื่นชม[1*], ศิริรัตน์ ดีศีลธรรม[2], ชูศรี ตลับมุข[3]
Supaporn Chunchom[1*], Sirirat Deeseenthum[2], Chusri Talubmook[3]

บทคัดย่อ

การศึกษาพิษเฉียบพลันของผงคีเฟอร์จากน้ำนมข้าวกล้องขาวดอกมะลิ 105 (KDML105KP) โดยการป้อนKDML105KP ขนาด 1,000, 2,000 และ 4,000 mg/kg ครั้งเดียวจากนั้นสังเกตอาการของพิษภายใน 24 ชั่วโมง และสังเกตอาการต่อเนื่อง14 วัน การศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันโดยการป้อน KDML105KP ขนาด 500, 1,000 และ2,000 mg/kg ทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน ไม่พบการตายหรืออาการของพิษแต่พบว่าหนูที่ได้รับ KDML105KP ตั้งแต่1,000 mg/kg ขึ้นไป ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 14 วัน มีค่า น้ำตาลในเลือด (BS) ลดลง แต่aspartate aminotransferase (AST)และ ไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำ (LDL)เพิ่มขึ้น หนูที่ได้รับ KDML105KPตั้งแต่ 2,000 mg/kg ขึ้นไป มีโกลบูลิน(Glob)และ lymphocytesเพิ่มขึ้น แต่neutrophils ลดลง ในขณะที่หนูที่ได้รับ KDML105KP 4,000 mg/kg มี BS, Glob, คอเลสเตอรอล (CHO), ไตรกลีเซอไรด์ (TG) และไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นสูง (HDL)เพิ่มขึ้น

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ผงคีเฟอร์จากน้ำนมข้าวกล้องขาวดอกมะลิ 105 ปริมาณสูงมีผลต่อการทำงานของตับและไต และยังทำให้ปริมาณ neutrophils และ lymphocytes เปลี่ยนแปลงซึ่งส่งผลต่อ globulin และนำไปสู่การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

คำสำคัญ: ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผงคีเฟอร์ พิษเฉียบพลัน พิษกึ่งเฉียบพลัน

Abstract

The aim of this study was to determine acute and sub-acute toxicities of kefir powder from KhaoDawk Mali 105 brown rice milk (KDML105KP) in male Wistar rats. Acute toxicity study, KDML105KP at the doses of 1,000, 2,000 and 4,000 mg/kg were once administered to the rats orally. Symptoms of toxicity and mortality of the rats were observed within 24 h and over a further period for 14 days. Moreover, sub-acute toxicity study, KDML105KP at the doses of 500, 1,000 and 2,000 mg/kg were given orally to the rats every 2 days for 14 days. The results showed that all the doses of KDML105KP did not produce any symptom or mortality of the rats. The rats received KDML105KP at and above a dose of 1,000mg/kgfor 14 days produced blood sugar (BS) decreasing while aspartate aminotransferase (AST) and low density lipoprotein (LDL) increasing. In addition, the rats received KDML105KP at and above a dose of 2,000 mg/kg produced globulin (Glob) and lymphocytes increasing while neutrophils decreasing. However, the rats received KDML105KP at a doses 4,000 mg/kg produced BS,Glob, cholesterol (CHO), triglycerides (TG) and high density lipoprotein (HDL) increasing.

These results indicatedthat high dose application of kefir powder from KhaoDawk Mali 105 brown rice milk can affect renal and hepatic functions and also hematological values. Interestingly, its activity on decreasing neutrophils and increasing lymphocytes results in an increase globulin and leads to improve immunomodulatory activity.

Keywords: KhaoDawk Mali 105 (KDML 105), kefir powder, acute toxicity, sub-acute toxicity

---

[1] *นิสิตปริญญาเอก,[3]ผู้ช่วยศาสตราจารย์, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ [2]ผู้ช่วยศาสตราจารย์, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150*

[1] *Graduate student, [3]Assist Prof, Biology, Faculty of Science; [2]Assist Prof, Biotechnology, Faculty of Technology, Kantharawichai District, MahaSarakham44150, Thailand.*

* *Corresponding author: SupapornChunchom, Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, MahaSarakham 44150, Thailand.*

บทนำ

จากอดีตจนถึงปัจจุบันข้าวถือเป็นอาหารและสินค้าการเกษตรที่มีความสำคัญอันดับต้นๆ ของประเทศไทย ในปัจจุบันประเทศไทยมีความสามารถในการผลิตข้าว (*Oryza sativa*, L.) ได้มากเป็นอันดับ 5 ของโลก[1] ผลการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีองค์ประกอบที่ส่งเสริมฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายชนิดสูงกว่าในข้าวขัดขาว ได้แก่ α-tocopherol, γ-aminobutyric acid (GABA) และ total phenolics compounds (TPC)[2-3] สารประกอบดังกล่าวมีรายงานฤทธิ์การยับยั้งและป้องกันอาการของโรคได้หลายชนิด เช่น ป้องกันภาวะ hypo adiponectinemiaในผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2[4] ควบคุมการเผาผลาญไขมันในตับให้ดีขึ้นและลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจและหลอดเลือดอุดตัน[5] ทั้งนี้เป็นผลอันเนื่องมาจาก α-tocopherol, GABA และ TPC มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ[6]

นอกจากนี้ยังพบว่า คีเฟอร์ที่หมักในน้ำนมข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าคีเฟอร์ที่หมักด้วยนมวัว[7] คีเฟอร์ หรือบัวหิมะ ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม เช่น นมเปี้ยว และโยเกิร์ตมาเป็นเวลาช้านาน จากรายงานวิจัยพบว่าก้อนคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักมีการสร้างและหลั่งสาร water-soluble branched glucogalactanหรือ kefiranออกมาละลายในน้ำนมที่ใช้หมัก[8] ซึ่งสาร kefiranนี้ มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่างที่น่าสนใจ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเนื้องอก[9] ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ[10-11] ฤทธิ์ต้านเบาหวาน[12] ฤทธิ์ต้านการอักเสบ[13] และฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน[14-15] ซึ่งอาหารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับสูงจะส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันทำให้ผู้บริโภคมีภาวะเสี่ยงต่อการเกิดโรคน้อยลง[16]

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรต้องคำนึงถึงความปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้บริโภค ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพิษเฉียบพลันและพิษกึ่งเฉียบพลันของผงคีเฟอร์จากน้ำนมข้าวกล้องขาวดอกมะลิ105 (KDML105KP) เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจในการเลือกใช้คีเฟอร์ได้อย่างปลอดภัย และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ KDML105KP ต่อไป

วิธีการดำเนินงานวิจัย

การเตรียมข้าวกล้องขาวดอกมะลิ 105

ในการทดลองครั้งนี้ใช้ข้าวกล้องสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่เก็บเกี่ยวในปี 2556-2557 จากกลุ่มเกษตรกรอำเภอเสลภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด นำข้าวที่ได้มาคัดเลือกสิ่งปลอมปนและอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำข้าวที่ได้มาชั่งน้ำหนักและแช่ข้าวในน้ำกลั่น (1:5, w:v) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำข้าวที่แช่น้ำจนอ่อนนุ่มมาปั่นรวมกับน้ำที่ใช้แช่ให้เป็นเนื้อเดียวกัน กรองเอากากออกเพื่อให้ได้น้ำนมข้าว นำน้ำนมข้าวใส่ในขวดรูปชมพูและนำไปพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีแล้วนำไปแช่ในตู้ 4 องศาเซลเซียสทันที เป็นเวลา 30 นาที

วิธีการหมักข้าว

เตรียมหัวเชื้อคีเฟอร์ในอาหารเหลว *Lactobacilli* de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) โดยใช้ผงคีเฟอร์DT 5001 ปริมาณ 0.2 กรัม เลี้ยงในขวดรูปชมพูขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว MRS ปริมาณ 200 มิลลิลิตร จากนั้นทำการบ่มเชื้อในสภาวะไร้อากาศ (anaerobic condition) ที่อุณหภูมิ 30องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำอาหารเหลวที่เลี้ยงเชื้อไว้มาปั่นเหวี่ยงที่ 5000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งเพื่อเก็บเซลล์ แล้วนำเซลล์ที่ได้มาล้างและละลายด้วยโซเดียมคลอไรด์0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเซลล์ที่เก็บได้เขย่าให้เข้ากันเทเซลล์ที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ลงในน้ำนมข้าวที่เตรียมไว้ในอัตราส่วน 10:100 (v:v)ทำการบ่มเชื้อในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงได้เชื้อคีเฟอร์เริ่มต้น (Kefir starter) เพื่อใช้ในการหมักต่อไป ต่อจากนั้นทำการหมักอีกครั้งโดยใช้เชื้อคีเฟอร์เริ่มต้นที่ได้เลี้ยงในนมข้าวที่เติมน้ำตาลซูโครส 2.5 เปอร์เซ็นต์ในอัตราส่วน 100:1000 (v:v) แล้วบ่มเชื้อในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24ชั่วโมง หลังจากครบ 24 ชั่วโมง จะได้คีเฟอร์นมข้าวที่มีค่า pH ประมาณ 4.8-4.9

การเตรียมผงคีเฟอร์จากน้ำนมข้าวกล้องขาวดอกมะลิ 105 (KDML105KP)

นำคีเฟอร์นมข้าวที่ได้จากการหมักไปผ่านกระบวนการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-dried) แล้วนำมาบดให้เป็นผงละเอียด จากนั้นนำผงคีเฟอร์ที่ได้บรรจุในขวดสีชาที่มีฝาปิดสนิทและเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำออกมาใช้ในการทดลอง

สัตว์ทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้ใช้หนูขาวสายพันธุ์ Wistar เพศผู้น้ำหนักระหว่าง 280-300กรัม ที่ซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ทำการเลี้ยงหนูทดลองก่อนทำการทดสอบเป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้หนูได้ปรับสภาพเข้ากับสภาวะของห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 23±2องศาเซลเซียสความชื้นสัมพัทธ์ 50-55 เปอร์เซ็นต์ และให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเลี้ยงสัตว์ทดลองในกรงสแตนเลสที่มี

ตะแกงปิดด้านบน ให้อาหารเม็ดสูตรมาตรฐาน (Perfect Companion Group Co., Ltd.)และน้ำแบบไม่จำกัด ซึ่งทุกขั้นตอนของการทดลองได้ปฏิบัติอยู่ภายใต้จริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองแห่งชาติ และผ่านการอนุมัติการใช้สัตว์ทดลองจากกรรมการพิจารณาจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

การศึกษาพิษเฉียบพลัน

ทำการชั่งน้ำหนักหนูทดลองและสุ่มหนูทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว ดังนี้ กลุ่มที่ 1 คือ หนูที่ได้รับ phosphate buffered saline; PBS (กลุ่มควบคุม)กลุ่มที่ 2-4 คือหนูที่ได้รับ KDML105KP ขนาด 1,000, 2,000และ4,000mg/kgตามลำดับ ทำการป้อนสิ่งทดสอบครั้งเดียว จากนั้นสังเกตอาการความเป็นพิษ เช่น ชัก ท้องเสีย อาเจียน และ/หรือเดินเซ อย่างใกล้ชิดในชั่วโมงแรกและสังเกตอาการดังกล่าวทุกๆ 2 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการสังเกตอาการต่อเนื่องจนครบ 14 วันระหว่างการทดลองทำการชั่งอาหารที่เหลือทุกวันและชั่งน้ำหนักของหนูทุกๆ 7 วัน เมื่อครบ 14 วัน ทำให้หนูอดอาหารเป็นเวลา 8-12 ชั่วโมงแล้วทำให้หนูตายอย่างสงบด้วยคลอโรฟอร์ม จากนั้นทำการผ่าตัดและเก็บเลือดจากหัวใจเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ค่าชีวเคมีโลหิต และค่าโลหิตวิทยา จากนั้นตัดแยกเอาอวัยวะภายใน ได้แก่ ตับ ปอด หัวใจ ไต และม้าม ไปชั่งน้ำหนักเพื่อนำไปคำนวณหาน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะ

การศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลัน

ทำการชั่งน้ำหนักหนูทดลองและสุ่มหนูทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว ดังนี้ กลุ่มที่ 1 คือ หนูที่ได้รับ PBS (กลุ่มควบคุม) กลุ่มที่ 2-4 คือ หนูที่ได้รับ KDML105KP 500, 1,000และ2,000mg/kg ตามลำดับ ป้อนKDML105KPและPBSทุกๆ 2 วัน เป็นระยะเวลา 14 วัน ระหว่างการทดลองทำการชั่งอาหารที่เหลือทุกวันและชั่งน้ำหนักของหนูทุกๆ 7 วัน เมื่อครบ 14 วันทำให้หนูอดอาหารเป็นเวลา 8-12 ชั่วโมงแล้วทำให้หนูตายอย่างสงบด้วยคลอโรฟอร์ม จากนั้นทำการผ่าตัด และเก็บเลือดจากหัวใจเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ค่าชีวเคมีโลหิต และค่าโลหิตวิทยา และชั่งน้ำหนักอวัยวะภายใน ได้แก่ ตับ ปอด หัวใจ ไต และม้าม เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณหาน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะ

น้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะและอัตราการแลกเนื้อ

การคำนวณหาน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะ(relative organ weight: ROW)คำนวณหาน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะของสัตว์ทดลองแต่ละตัว จากสมการ

$$\mathrm{ROW} = \frac{\text{Absolute organ weight (g)}}{\text{Body weight of rat (g)}} x100$$

การคำนวณหาอัตราการแลกเนื้อ (feed conversion ratio: FCR) คำนวณหาอัตราการแลกเนื้อของสัตว์ทดลองแต่ละตัว จากสมการ

$$\mathrm{FCR} = \frac{\text{Food intake (g)}}{\text{Body weight gain (g)}}$$

การวิเคราะห์ค่าชีวเคมีโลหิตและค่าโลหิตวิทยา ทำการแยกเลือดตัวอย่างออกเป็น 2 หลอด ได้แก่ หลอดที่ 1 ไม่ได้เติมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (non-heparinized) และหลอดที่ 2 เติมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (heparinized) นำเลือดตัวอย่างในหลอดที่1 ไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 g เป็นเวลา10นาที เพื่อแยกเอาเซรั่ม นำเซรั่มที่ได้มาวิเคราะห์ค่าชีวเคมีโลหิตได้แก่ โปรตีนรวม (TP), น้ำตาลในเลือด (BS), ยูเรียไนโตรเจนในเลือด (BUN), ครีเอตินิน (Crea), กรดยูริค (UA), คอเลสเตอรอล (CHO), ไตรกลีเซอไรด์ (TG), ไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นสูง (HDL), ไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำ (LDL), อัลบูมิ (Alb), โกลบูลิน (Glob), บิลิรูบินรวม (TB), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) และ alkaline phosphatase (ALP) นำเลือดตัวอย่างที่เก็บในหลอดที่ 2 มาวิเคราะห์หาค่าโลหิตวิทยา โดยทำการวิเคราะห์ค่าต่างๆ ได้แก่ จำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC), จำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC), ฮีมาโทคริต (Hct), ฮีโมโกลบิน (Hgb), ปริมาตรของเม็ดเลือดแดงโดยเฉลี่ย(MCV), ปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง(MCH), ความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง(MCHC), เกล็ดเลือด (Plt), เปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (Neu) และเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยต์ (Lym)

การวิเคราะห์สถิติ

ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ นำเสนอในรูปแบบค่าเฉลี่ย±ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานเฉลี่ย(mean±SEM) โดยวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูลด้วย one-way ANOVA และวิเคราะห์ความ แตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test ที่ค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p<0.05)

ผลการทดลอง

พิษเฉียบพลัน

หนูที่ได้รับKDML105KP ทุกขนาดตลอดการทดลองไม่มีการตายหรือแสดงอาการความเป็นพิษ นอกจากนี้หนูที่ได้รับ KDML105KP ขนาด 1,000 mg/kg มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น การกินอาหาร และอัตราการแลกเนื้อไม่แตกต่างกันและไม่แตก

ต่างจากหนูกลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตามหนูที่ได้รับ KDML105KP ขนาด 2,000 และ 4,000 mg/kg มีการกินอาหารเพิ่มมากขึ้น (p<0.05) แต่กลับให้อัตราแลกเนื้อที่ไม่แตกต่างกันและไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุม(Figure1A–1C)แต่อย่างไรก็ตามน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะของหนูที่ได้รับ KDML105KP ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (Table1)

จากการวิเคราะห์ค่าชีวเคมีโลหิตของหนูที่ได้รับ KDML105KP ขนาด 1,000, 2,000 และ 4,000 mg/kg (Table2) พบว่าหนูที่ได้รับ KDML105KP ขนาด 1,000 mg/kg มีค่าชีวเคมีโลหิตไม่แตกต่างกันและไม่แตกต่างจากกลุ่มหนูควบคุม ยกเว้นปริมาณ Glob ที่เพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ส่วนหนูที่ได้รับ KDML105KP ขนาด 2,000 mg/kg มีปริมาณ BS, Glob และ TG เพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) และหนูที่ได้รับ KDML105KP ขนาด 4,000 mg/kg มีปริมาณ BS, Glob, CHO, TG และ HDL เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

Table 3 แสดงให้เห็นว่า WBC, RBC, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC และ Pltในหนูที่ได้รับ KDML105KP ทุกขนาดไม่แตกต่างกันและไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณร้อยละของ Neuลดลง(p<0.05) ในขณะที่ Lymเพิ่มขึ้น (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม

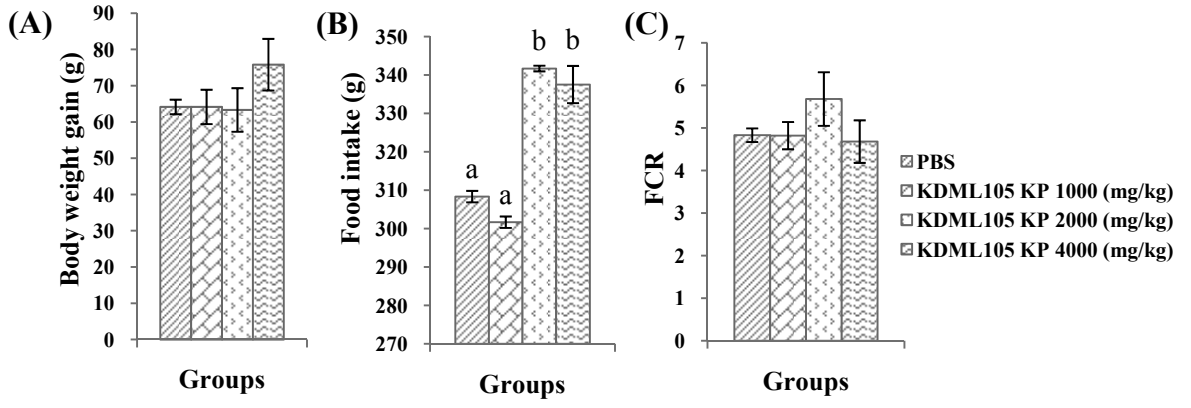

Figure 1 Body weight gain (A), food intake (B) and FCR (C) in rats treated with KDML105 KP and PBS from acute toxicity study at the end experiments (mean±SEM). Mean values with different letters are significantly different, Duncan's test at p<0.05.

Table 1 Relative organ weight in rats treated with KDML105KPand PBS from acute toxicity study at the end experiment (mean±SEM).

Visceral organs	PBS	KDML105KP (mg/kg)		
		1,000	2,000	4,000
Liver	3.55±0.13	3.55±0.12	3.79±0.07	3.79±0.08
Lung	0.46±0.01	0.45±0.01	0.43±0.01	0.44±0.01
Heart	0.43±0.01	0.42±0.01	0.44±0.02	0.44±0.01
Kidneys	0.68±0.01	0.63±0.01	0.66±0.02	0.64±0.01
Spleen	0.27±0.04	0.24±0.00	0.24±0.01	0.25±0.01

Table 2 Blood biochemistry in rats treated with KDML105KP and PBS from acute toxicity study (mean±SEM).

Blood biochemistry	PBS	KDML105KP (mg/kg)		
		1,000	2,000	4,000
BS (mg/dl)	174.00±6.19[a]	189.50±11.84[ab]	200.50±6.99[b]	213.83±7.98[b]
BUN (mg/dl)	20.17±0.48	20.65±0.32	20.08±0.46	20.28±0.33
CREA (mg/dl)	0.91±0.03	0.81±0.03	0.82±0.02	0.83±0.18
UA (mg/dl)	3.74±0.19	3.25±0.19	3.50±0.20	3.30±0.17
TP (g/dl)	5.65±0.11	5.85±0.06	5.93±0.03	6.00±0.18
Alb (g/dl)	3.47±0.04	3.50±0.04	3.52±0.03	4.03±0.59
Glob (g/dl)	2.20±0.06[a]	2.40±0.06[b]	2.43±0.042[b]	2.45±0.043[b]
TB (mg/dl)	0.11±0.01	0.13±0.01	0.14±0.01	0.14±0.01
AST (U/L)	147.67±3.95	136.33±5.29	148.33±5.98	144.50±3.95
ALP (U/L)	124.33±3.06	127.33±2.24	127.50±3.27	129.50±1.43
ALT (U/L)	39.33±1.17	42.33±1.69	40.67±1.23	41.83±1.30
CHO (mg/dl)	53.67±1.28[a]	57.67±1.78[ab]	58.67±1.56[ab]	59.67±2.17[b]
TG (mg/dl)	130.00±2.62[a]	124.17±8.61[a]	152.50±5.32[b]	161.50±10.62[b]
HDL (mg/dl)	16.48±0.27[a]	17.10±0.15[a]	16.95±0.13[a]	19.85±0.91[b]
LDL (mg/dl)	32.50±2.11	36.33±2.11	33.67±1.45	31.50±1.80

Mean values within each row with different superscripts are significantly different, Duncan's test at $p< 0.05$. PBS= phosphate buffered saline; BS = blood sugar; BUN = blood urea nitrogen; CREA = creatinine; UA= uric acid; TP = total serum protein; Alb = albumin; Glob = globulin; TB= total bilirubin; AST = serum aspartate aminotransferase; ALT = serum alanine aminotransferase; ALP = alkaline phosphatase; CHO = Cholesterol; TG = triglycerides; HDL = high density lipoprotein; LDL = low density lipoprotein.

Table 3 Hematological values in rats treated with KDML105KP and PBS from acute toxicity study (mean±SEM).

Hematological values	PBS	KDML105 KP (mg/kg)		
		1,000	2,000	4,000
WBC (10^3 cell/mm^3)	5.93±0.16	6.18±00.22	5.90±0.16	6.38±0.17
RBC (10^6 cell/mm^3)	8.87±0.13	8.88±0.12	8.29±0.34	8.32±0.22
Hb (g/dl)	17.07±0.40	17.18±0.11	16.08±0.60	16.45±0.27
Hct (%)	53.83±0.87	52.17±0.70	51.17±1.49	51.17±1.01
MCV (fl)	58.33±0.88	59.50±0.22	59.67±1.02	59.67±0.42
MCH (pg)	19.60±0.08	19.50±0.19	19.73±0.05	19.70±0.32
MCHC (g/dl)	32.33±0.34	32.65±0.26	32.45±0.08	32.87±0.57
Plt (10^3 cell/mm^3)	943.17±27.15	830.00±53.83	812.67±50.67	851.33±46.61
Neu (%)	8.50±0.22[b]	8.17±0.31[b]	5.67±0.67[a]	4.67±0.61[a]
Lym (%)	91.00±1.21[a]	90.33±2.04[ab]	94.33±0.67[bc]	95.50±0.62[c]

Mean values within each row with different superscripts are significantly different, Duncan's test at $p< 0.05$. PBS= phosphate buffered saline; WBC = white blood cells; RBC = red blood cells; Hb = hemoglobin; Hct = hematocrit; MCV = mean corpuscular volume; MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; Plt = platelets; Neu = neutrophils; Lym = lymphocytes.

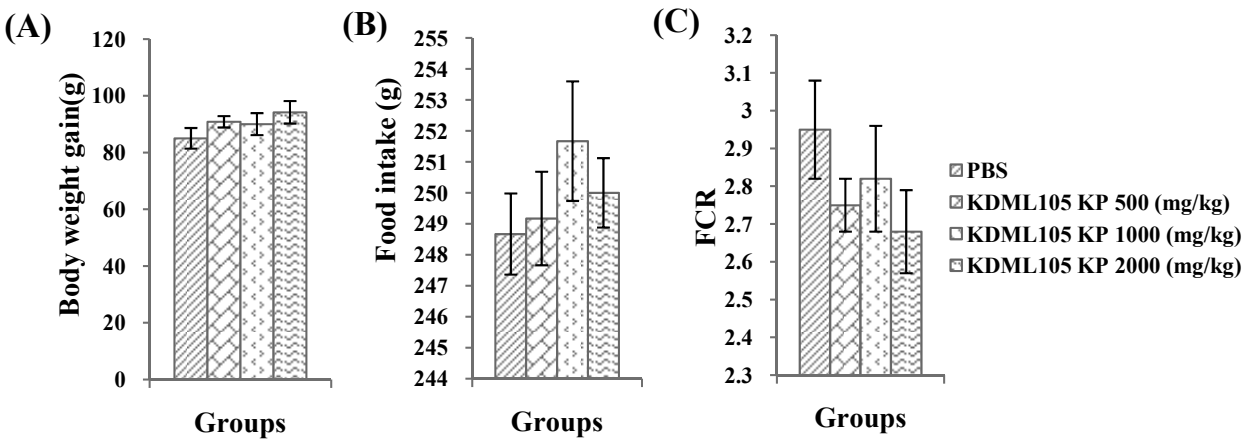

Figure 2 Body weight gain (A), food intake (B) and FCR (C) in rats treated with KDML105KP and PBS from sub-acute toxicity study at the end experiments (mean±SEM). Mean values were not significant different, Duncan's test at $p< 0.05$.

Table 4 Relative organ weight in rats treated with KDML105KP and PBS from sub-acute toxicity study at the end experiment (mean±SEM).

Visceral organs	PBS	KDML105KP (mg/kg)		
		500	1,000	2,000
Liver	3.66±0.10	3.54±0.07	3.67±0.05	3.76±0.07
Lung	0.51±0.01	0.54±0.03	0.54±0.02	0.52±0.01
Heart	0.40±0.02	0.37±0.01	0.37±0.00	0.37±0.01
Kidneys	0.72±0.02	0.71±0.01	0.70±0.02	0.71±0.03
Spleen	0.29±0.00	0.25±0.01	0.26±0.01	0.26±0.01

Table 5 Blood biochemistry in rat treated with KDML105KP and PBS from sub-acute toxicity (mean±SEM).

Blood biochemistry	PBS	KDML105KP (mg/kg)		
		500	1,000	2,000
BS (mg/dl)	195.83±7.25^{c}	176.83±7.78^{bc}	160.67±7.53^{ab}	139.83±8.95^{a}
BUN (mg/dl)	20.45±1.12	21.10±1.03	20.12±0.91	20.07±0.59
CREA (mg/dl)	0.82±0.03	0.87±0.02	0.80±0.02	0.80±0.04
UA (mg/dl)	2.65±0.34	2.72±0.36	2.28±0.14	2.20±0.36
TP (g/dl)	5.72±0.13	5.92±0.10	5.77±0.12	5.70±0.14
Alb (g/dl)	3.28±0.06	3.25±0.08	3.22±0.08	3.12±0.05
Glob (g/dl)	2.48±0.09^{a}	2.60±0.06^{ab}	2.72±0.17^{ab}	2.85±0.04^{b}
TB (mg/dl)	0.07±0.02^{ab}	0.09±0.01^{b}	0.04±0.01^{ab}	0.04±0.00^{a}
AST (U/L)	104.00±1.53^{a}	114.67±5.13^{ab}	117.33±3.56^{b}	144.67±4.52^{c}
ALP (U/L)	132.83±4.66	137.50±3.82	133.33±3.05	131.00±3.47
ALT (U/L)	49.17±1.66	51.33±2.58	51.00±3.13	50.50±1.38
CHO (mg/dl)	54.50±5.42	57.33±2.48	52.33±2.30	50.67±2.01
TG (mg/dl)	135.33±7.54	147.17±3.81	123.00±6.51	122.33±6.16
HDL (mg/dl)	22.55±1.04	22.00±0.48	19.70±1.39	19.87±0.94
LDL (mg/dl)	29.17±1.01^{a}	31.83±1.68^{ab}	35.67±2.22^{b}	36.67±2.36^{b}

Mean values within each row with different superscripts are significantly different, Duncan's test at p<0.05.PBS= phosphate buffered saline;BS= blood sugar; BUN = blood urea nitrogen; CREA = creatinine; UA= uric acid; TP = total serum protein; Alb = albumin; Glob = globulin; TB= total bilirubin; AST = serum aspartate aminotransferase; ALT = serum alanine aminotransferase; ALP = alkaline phosphatase; CHO = Cholesterol; TG = triglycerides; HDL = high density lipoprotein; LDL = low density lipoprotein.

Table 6 Hematological values in rats treated with KDML105KP and PBS from sub-acute toxicity study (mean±SEM).

Hematological values	PBS	KDML105KP (mg/kg)		
		500	1,000	2,000
WBC (10^3 cell/mm^3)	6.42±0.28	6.93±0.44	6.95±1.10	8.63±0.74
RBC (10^6 cell/mm^3)	8.76±0.13	8.46±0.20	8.40±0.13	8.37±0.13
Hb (g/dl)	17.52±0.23	16.78±0.32	16.95±0.32	16.90±0.27
Hct (%)	53.33±0.76	51.83±0.87	51.50±0.76	51.83±0.87
MCV (fl)	59.33±0.49^{ab}	59.00±0.26^{a}	59.67±0.33^{ab}	60.50±0.43^{b}
MCH (pg)	19.98±0.28	19.85±0.31	19.97±0.17	20.60±0.17
MCHC (g/dl)	33.72±0.35	33.68±0.47	33.47±0.28	34.02±0.25
Plt (10^3 cell/mm^3)	923.17±24.11	882.83±4.82	888.33±8.35	922.83±14.71
Neu (%)	8.83±1.01^{bc}	8.00±0.58^{b}	6.50±0.56^{b}	3.67±0.56^{a}
Lym (%)	90.83±1.25^{ab}	89.83±1.22^{a}	93.17±0.79^{b}	95.50±0.81^{c}

Mean values within each row with different superscripts are significantly different, Duncan's test at p<0.05. PBS= phosphate buffered saline; WBC = white blood cells; RBC = red blood cells; Hb = hemoglobin; Hct = hematocrit; MCV = mean corpuscular volume; MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; Plt = platelets; Neu = neutrophils; Lym = lymphocytes.

พิษกึ่งเฉียบพลัน

หนูที่ได้รับ KDML105KP ทุกขนาดตลอดการทดลองไม่มีการตายหรืออาการความเป็นพิษเช่นเดียวกับการศึกษาพิษเฉียบพลัน และนอกจากนี้หนูที่ได้รับ KDML105KP มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น การกินอาหาร และอัตราการแลกเนื้อไม่แตกต่างกันและไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุม(Figure 2A-2C)

แต่อย่างไรก็ตาม น้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะของหนูที่ได้รับ KDML105KP ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (Table4)

จากการวิเคราะห์ค่าชีวเคมีโลหิตของหนูที่ได้รับ KDML105KP ขนาด 500, 1,000 และ 2,000 mg/kg เป็นระยะเวลา 14 วัน (Table5) พบว่าหนูที่ได้รับ KDML105KP ขนาด 500 mg/kg มีค่าชีวเคมีโลหิตไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุม หนูที่ได้รับ KDML105KPขนาด 1,000 mg/kg มีค่า BS ลดลง ในขณะที่ค่า ASTและ LDL เพิ่มขึ้น (p<0.05) ส่วนหนูที่ได้รับ KDML105KPขนาด2,000 mg/kg มีค่า BS ลดต่ำลง ในขณะที่ค่า Glob, AST และ LDL เพิ่มสูงขึ้น (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม

จากการวิเคราะห์ค่าต่างๆ ได้แก่ WBC, RBC, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC และ Pltในหนูที่ได้รับ KDML105KP ไม่แตกต่างกันและไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณของเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophils ในหนูที่ได้รับ KDML105KP ขนาด 2,000 mg/kg ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ในขณะที่เม็ดเลือดขาวชนิดlymphocytes เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Table 6)

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าคีเฟอร์มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่างและยังเป็นแหล่งโภชนาการที่สำคัญอีกด้วย[9-16]มีรายงานวิจัยที่ระบุว่าข้าวกล้องขาวดอกมะลิ105 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารพฤษเคมีสูงกว่าในข้าวขัดขาว[2]ผลจากการวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า KDML105KP ขนาด 1,000mg/kg และ 500 mg/kg ไม่ก่อให้เกิดพิษเฉียบพลันและพิษกึ่งเฉียบพลันตามลำดับ อีกทั้งไม่ทำให้หนูทดลองตาย KDML105KP ขนาดดังกล่าวจึงมีความเหมาะสมในการนำไปพัฒนาเป็นอาหารเสริมและยารักษาโรคได้ แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากการวิเคราะห์ชีวเคมีโลหิต พบว่าหนูที่ได้รับ KDML105KP ขนาด 2,000 และ 4,000 mg/kg ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงBS และ Glob ในขณะที่หนูที่ได้รับ KDML105KP ขนาด 1,000 และ 2,000 mg/kg เป็นระยะเวลานานส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงBS, Glob และ AST ซึ่งระดับของ BS เป็นตัวชีวัดการทำงานของไต ขณะที่AST เป็นตัวชีวัดการทำงานของตับ[17-18] โดยระดับของ BS ในเลือดที่สูงขึ้นอาจเป็นผลจากการได้รับแป้งหรือน้ำตาลซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่พบในข้าวในปริมาณสูงกกว่ากลุ่มควบคุมจึงอาจกล่าวได้ว่าการได้รับ KDML105KP ในปริมาณสูงเป็นระยะเวลานานมีผลต่อการทำงานของตับและไตจากการวิเคราะห์ไขมันในเลือดพบว่าหนูที่ได้รับ KDML105KP ขนาด 4,000mg/kg มีค่า CHO, TG และ HDL เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งการเพิ่มขึ้นดังกล่าวมีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะหลอดเลือดตีบตัน (atherosclerosis) ที่นำไปสู่การเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery disease: CAD)[19]แต่อย่างไรก็ตามการได้รับ KDML105KP ขนาด 1,000 และ 2,000 mg/kg เป็นระยะเวลานานไม่ทำให้ระดับของ CHO, TG และ HDL เพิ่มขึ้น แต่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของ LDL ที่สำคัญคือ พบว่าระดับของเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophils ลดลง ในขณะที่เม็ดเลือดขาวชนิดlymphocytes เพิ่มขึ้น และการเพิ่มขึ้นดังกล่าวยังสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของ Glob ซึ่งผลจากการเพิ่มขึ้นดังกล่าวนำไปสู่การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory activity)[14-15]

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้ความอนุเคราะห์ผงหัวเชื้อคีเฟอร์DT 5001 ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณนิสิตภาควิชาชีววิทยาที่ทำงานวิจัยในสัตว์ทดลองที่ให้ความร่วมมือในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. FAOSTAT, 2014.Food and agricultural organization from the United Nations.Retrieved from: http://faostat.fao.org/site/339/d efault.aspx.(Accessed on: 01/05/2014)
2. Moongngarm A, Daomukda N, Khumpika S. Chemical compositions, phytochemicals, and antioxidant capacity of rice bran, rice bran layer, and rice germ. APCBEE Procedia 2012;2:73-79.
3. Moongngarm A, Saetung N. Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated rough rice and brown rice. Food Chem 2010;122:782-788.
4. Islam MS, Nagasaka R, Ohara K, *et al*. Biological abilities of rice bran-derived antioxidant phytochemicals for medicaltherapy. Current Topics Med Chem 2011;11(4):1847-1853.

5. Imam J, Alam S, Mandal NP, Variar M, Shukla P. Molecular screening for identification of blast resistance genes in North East and Eastern Indian rice germplasm (*Oryza sativa* L.) with PCR based makers. Euphytica2014;196:199–211.
6. Burlando B, Cornara L. Therapeutic properties of rice constituents and derivatives (*Oryza sativa* L.): A review update. Trends Food SciTechnol2014;40:82-98.
7. Deeseenthum S, Pejovic J. Bacterial inhibition and antioxidant activity of kefir produced fromThai Jasmine rice milk. Biotechnol2010;9(3):332-337.
8. Micheli L, Uccelletti D, Palleschi C, Crescenzi V. Isolation and characterization of a ropy lactobacillus strain producing the exopolysaccharide quefiran. ApplMicrobiolBiotechnol 1999;53:69-74.
9. Moreno de LeBlanc A, Matar C, Farnworth E, Perdigon G. Study of immune cells involved in the antitumor effect of kefir in a murine breast cancer model. J Dairy Sci 2007;90:1920-1928.
10. Kesenkas H, Dinkçi N, Seçkin K, Kinik O, Gönç S. Antioxidant properties of kefir produced from different cow and soy milk mixtures. J AgriSci 2011;17:253-259.
11. Liu JR, Chen MJ, Lin CW. Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. J Agri Food Chem 2005;53(7):2467-2474
12. Punaro GR, Maciel FR, Rodrigues AM, Rogero MM, Bogsan CSB, Oliveira MN, Ihara SSM, Araujo SRR, Sanches TRC, Andrade LC, Higa EMS. Kefir administration reduced progression of renal injury in STZ-diabetic rats by lowering oxidative stress. Nitric Oxide 2014;37:53–60.
13. Lee MY, Ahna KS, Kwon OK, Kim MJ, Kim MK, Lee IY, Oh SR, Lee HK. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model.Immunobiol2007;212:647–654.
14. Vinderola CG, Duarte J, Thangavel D, Perdigon G, Farnworth E, Matar C. Immunomodulating capacity of kefir. J Dairy *Res* 2005;72:195–202.
15. Vinderola CG, Duarte J, Thangavel D, Perdigon G, Farnworth E, Matar C. Effects of kefir fractions on innate immunity. Immunobiol2006;211:149-156.
16. Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease.J Am Oil ChemSoc 1998;75:199-212.
17. Liju VB, Jeena K, Kuttan R. Acute and subchronic toxicity as well as mutagenic evaluation of essential oil from turmeric (*Curcuma longa* L.). Food Chem-Toxicol 2013;53:52–61.
18. Ramaiah SK. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. Food ChemToxicol 2007;45:1551–1557.
19. Fuster V, Eric J, Nabel EG. Pathobiology of asymptomatic arthrosclerosis leading to symptomatic artherothrombosis.J Am Cardiol2005;46:937–941.