บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันประเทศไทยอยู่ในภาวะการณ์แข่งขันสูงและอยู่ในภาวะเศรษฐกิจถดถอย ทำให้ประชากรในประเทศต้องเผชิญกับสภาวะความเครียดและความกดดันซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งในการก่อให้เกิดโรคต่างๆ มากมายหลายชนิด โรคมะเร็งถือเป็นโรคร้ายแรงที่คร่าชีวิตคนไทยและทำให้เกิดการสูญเสียอย่างใหญ่หลวงแก่ประชาชนทุกชาติ โดยในแต่ละประเทศจะพบชนิดของมะเร็งที่แตกต่างกันไปอันเนื่องมาจากประชาชนของแต่ละประเทศมีโอกาสได้รับรังสี มลพิษทางอากาศ ความเครียด สารเคมี รวมทั้งพฤติกรรมการบริโภคซึ่งเป็นปัจจัยกระตุ้นในการก่อมะเร็งที่แตกต่างกัน จากรายงานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ในปี พ.ศ.2550 พบว่าในเพศชายอุบัติการณ์มะเร็งปอดและหลอดลมสูงสุดที่ร้อยละ 17.1 ตามมาด้วยมะเร็งตับที่ร้อยละ 14.8 และมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่ร้อยละ 14.2 ส่วนในเพศหญิงอุบัติการณ์มะเร็งเต้านมและทรวงอกสูงสุดที่ร้อยละ 40.0 ตามมาด้วยมะเร็งปากมดลูกที่ร้อยละ 18.6 และมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่ร้อยละ 6.2 ปัจจุบันพบว่าอุบัติการณ์ของมะเร็งมีอัตราสูงขึ้นเรื่อยๆ อาจเนื่องมาจากพฤติกรรมการบริโภคของคนไทยได้เปลี่ยนแปลงไปเป็นอาหารสำเร็จรูปมากขึ้น รวมทั้งโอกาสที่ได้รับตัวกระตุ้นการก่อมะเร็งมีมากขึ้น ทำให้รัฐบาลต้องสูญเสียงบประมาณด้านสาธารณสุขเป็นจำนวนมากในการบำบัดรักษาโรคดังกล่าว ดังนั้นหากสามารถยับยั้งหรือป้องกันกระบวนการก่อมะเร็งได้ จะส่งผลให้สามารถลดอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งได้ ทั้งยังช่วยลดอัตราการเสียชีวิตจากมะเร็งได้อีกด้วย

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจและเป็นอาหารหลักของคนไทย ประเทศไทยและประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นผู้ผลิตข้าวแหล่งใหญ่ที่ส่งออกไปจำหน่ายยังประเทศต่างๆ ทั่วโลก จากรายงานวิจัยพบว่ามีการศึกษาการแยกสกัดโอไรซานอลจากรำข้าวซึ่งเป็นส่วนเหลือทิ้งและสกัดจากข้าวที่ไม่ได้ขัดสี ซึ่งในปัจจุบันเป็นแหล่งวัตถุดิบที่สำคัญของกระบวนการแยกสกัดโอไรซานอล โอไรซานอลเป็นสารที่มีคุณประโยชน์ต่อร่างกายมากมาย เช่น ลดโคเลสเตอรอล (Gerhardt and Gallo, 1998) ยับยั้งการเกิด Platelet Aggregation (Seetharamaiah *et al.*, 1990) และต้านออกซิเดชัน (Xu *et al.*, 2001) เป็นต้น โดยเฉพาะแกมม่า-โอไรซานอล (Gamma-Oryzanol) ซึ่งเป็นรูปแบบที่มีฤทธิ์ดีที่สุด โดยมีการประเมินประสิทธิภาพของรำข้าวในการป้องกันมะเร็งลำไส้ในหนูทดลอง พบว่าหนูทดลองที่กินรำข้าวสามารถลดจำนวน Intestinal adenoma ได้ถึงร้อยละ 51 เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (Verschoyle *et al.*, 2007) จากรายงานทาง

วิชาการพบว่าภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) และการอักเสบ (Inflammation) มีความสัมพันธ์กับการก่อมะเร็ง ซึ่งภาวะเครียดออกซิเดชันเป็นภาวะที่มีการผลิตอนุมูลอิสระมากเกินกว่าที่ Antioxidant defenses system ของร่างกายจะขจัดออกไปได้ โดยเฉพาะ Reactive oxygen species (ROS) และ Reactive nitrogen species (RNS) อนุมูลอิสระดังกล่าวสามารถเข้าทำลายสารชีวโมเลกุลในร่างกาย เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โดยเฉพาะเข้าทำลายดีเอ็นเอซึ่งเป็นสารพันธุกรรมทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ DNA bases เกิด DNA strand break และ DNA fragmentation ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) และก่อให้เกิดมะเร็งได้ และยังพบว่าอนุมูลอิสระเหล่านั้นมีบทบาทสำคัญในกระบวนการก่อมะเร็งในระยะต่างๆ เช่น Initiation, Promotion และ Progression เป็นต้น สำหรับการอักเสบเรื้อรัง (Chronic inflammation) มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งโดยเฉพาะมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง มีการศึกษาวิจัยพบว่ายาที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ Cyclooxygenase-2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ Prostaglandin (PGs) จาก Arachidonic acid ได้แก่ ยากลุ่มแอสไพรินและ Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) เป็นสารที่สามารถป้องกันการก่อมะเร็งในโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงได้ (Chun and Surh, 2004)

คณะผู้วิจัยเห็นว่าประเทศไทยมีพันธุ์ข้าวหลากหลายสายพันธุ์และยังไม่มีการศึกษาถึงความสามารถเป็นสารป้องกันการก่อมะเร็ง (Chemoprepentive agents) ผ่านกลไกภาวะเครียดออกซิเดชันและการอักเสบ คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวสายพันธุ์ท้องถิ่นภาคเหนือที่คัดเลือกจากศูนย์วิจัยข้าวในเขตพื้นที่ภาคเหนือจำนวนอย่างน้อย 5 สายพันธุ์ จากนั้นนำมาทดสอบฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ป้องกันการทำลายดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระและฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงจากภาวะเครียดออกซิเดชันโดยการศึกษากระตุ้นเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรส (Sulfotransferase, SULT) ซึ่งเป็นเอนไซม์ Phase II ที่มีบทบาทในการกำจัดฤทธิ์ (Detoxification) ของสารหรืออนุมูลว่องไวปฏิกิริยาให้หมดฤทธิ์และช่วยขับออกจากร่างกาย การเพิ่มการทำงานของเอนไซม์นี้จะลดโอกาสการเกิดปฏิกิริยาของสารก่อมะเร็ง ฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนส-1 (Hemeoxygenase-1, HO-1) ซึ่งเป็นเอนไซม์ต่อต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง Tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) และเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2) ซึ่งจะป้องกันขั้นตอน Tumor promotion ด้วยการชักนำให้วัฏจักรของเซลล์หยุด (Cell Cycle Arrest) ทำให้เซลล์ตาย (Apoptosis) และยับยั้งการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่ทำให้เพิ่มจำนวนเซลล์ เปรียบเทียบกับสารแกมม่า-โอไรซานอลเปรียบเทียบ ทั้งนี้ข้อมูลที่ได้จะทำให้ทราบกลไกและเป็นการสนับสนุนฤทธิ์ป้องกันการก่อมะเร็งจากภาวะเครียดออกซิเดชันและการอักเสบของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่สกัดจากข้าว

สายพันธุ์ในเขตพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย ทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของข้าวสายพันธุ์ไทยและยังสามารถส่งเสริมการบริโภคเพื่อเป็นทางเลือกในป้องกันการก่อมะเร็งได้อีกทางหนึ่ง รวมทั้งช่วยลดงบประมาณรายจ่ายด้านสาธารณสุขของประเทศได้อีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลของข้าวสายพันธุ์ไทยที่คัดเลือกจากศูนย์วิจัยข้าวในเขตพื้นที่ภาคเหนือจำนวนอย่างน้อย 5 สายพันธุ์
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์และไนตริกออกไซด์ ฤทธิ์ยับยั้งการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันและความสามารถในการป้องกันการทำลายดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวสายพันธุ์ไทยที่มีปริมาณสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลสูงสุดจากข้อ 1 เปรียบเทียบกับแกมม่า-โอไรซานอลมาตรฐานโดยทำการศึกษาแบบ *In vitro*
3. เพื่อศึกษาถึงฤทธิ์ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวสายพันธุ์ไทยในการป้องกันการเกิดมะเร็งจากกลไกภาวะเครียดออกซิเดชันและการอักเสบโดยศึกษาถึงความสามารถในการกระตุ้นเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรสและฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนส-1 ฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้น TNF-α รวมทั้งฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส-2 ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวสายพันธุ์ไทยที่มีปริมาณสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลสูงสุดจากข้อ 1 เปรียบเทียบกับแกมม่า-โอไรซานอลมาตรฐานโดยทำการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง (Cell-based assay)

1.3 ทฤษฎี สมมุติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

สารป้องกันการก่อมะเร็ง (Chemopreventive agents) คือ สารที่สามารถยับยั้งหรือเปลี่ยนแปลงกระบวนการก่อมะเร็ง (Carcinogenesis) และถือเป็นส่วนประกอบสำคัญในการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งปฐมภูมิ (Primary prevention) โดยการป้องกันการเกิดมะเร็ง (Chemoprevention) เป็นหลักการหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการป้องกันการเกิดมะเร็งและลดอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งซึ่งนับวันจะมีอัตราการพบสูงขึ้นเรื่อยๆ โดยสารป้องกันการเกิดมะเร็งนั้นสามารถได้มาจากธรรมชาติ (Natural substance) จากการสังเคราะห์ (Synthetic compound) หรืออาจเป็นสารผสม (Mixture) ที่ไม่มีความเป็นพิษ โดยส่วนใหญ่แล้วจะพบในอาหารที่เราบริโภคเป็นประจำทุกวัน โดยเฉพาะจากผักผลไม้และตำรับยาพื้นบ้าน (Surh, 2003)

กลไกหนึ่งของการเกิดมะเร็งคือ สภาวะเครียดออกซิเดชันและกลไกการอักเสบ จากรายงานทางวิชาการพบว่าสภาวะเครียดออกซิเดชันถูกกระตุ้นได้จากทั้งปัจจัยภายใน ตัวอย่างเช่น ขบวนการเผาผลาญในร่างกายของมนุษย์โดยเฉพาะระบบการหายใจ ความเครียด เมแทบอลิซึม

ของไมโทคอนเดรียและระบบภูมิต้านทานที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อ เป็นต้น และปัจจัยภายนอกร่างกาย ตัวอย่างเช่น มลพิษทางอากาศ การได้รับรังสี ยาบางชนิด เป็นต้น ซึ่งภาวะเครียดออกซิเดชันจะทำให้เกิด Reactive oxygen species (ROS) และ Reactive nitrogen species (RNS) ในปริมาณสูงเกินที่ Antioxidant defenses system จะทำการขจัดได้หมด อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมักจะไม่มีความเสถียร ดังนั้นจึงสามารถเข้าทำลายสารชีวโมเลกุลต่างๆ ทั้งไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ โดยการแย่งอิเล็กตรอนจากโมเลกุลเหล่านั้นมาเพื่อให้อยู่สภาวะเสถียรมากขึ้น หรืออาจทำปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระด้วยกันสร้างอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่มีความแรงมากกว่าตัวเดิม มีรายงานวิจัยพบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างอัตราการตายจากมะเร็งกับการบริโภคไขมันและน้ำมัน (Kushi and Giovanucci, 2002) โดยศึกษาในผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 55 ปีที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งเต้านม มะเร็งมดลูกและมะเร็งลำไส้ตรง สามารถสรุปว่าการเกิดมะเร็งของผู้ป่วยเหล่านี้อาจเนื่องมาจากการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันที่มากกว่าปกติ จึงมีความเป็นไปได้ว่าการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันที่ผนังลำไส้ใหญ่จากภาวะเครียดออกซิเดชันอาจนำไปสู่การเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงได้ อนุมูลอิสระยังสามารถเข้าทำลายดีเอ็นเอ ทำให้เกิด DNA fragmentation, DNA strand break, DNA-protein cross links รวมทั้ง Base modification นำไปสู่การกลายพันธุ์ (Mutation) และการเกิดมะเร็ง (Carcinogenesis) ได้เช่นกัน ถึงแม้ว่ากลไกการเกิดมะเร็งจากภาวะเครียดออกซิเดชันนั้นอาจต้องใช้ระยะเวลานานหลายปี ซึ่งเชื่อว่าเกิดจากดีเอ็นเอถูกทำลาย (Tsao et al., 2004) ซึ่งตามปกติแล้วโครมาตินจะมีขบวนการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันที่นำไปสู่การทำลายดีเอ็นเอและมีขบวนการซ่อมแซมที่ทำหน้าที่ป้องกันและแก้ไขความผิดปกติที่เกิดขึ้น แต่หากภาวะเครียดออกซิเดชันเกิดขึ้นนานและรุนแรงก็สามารถเอาชนะกลไกเหล่านั้นและนำไปสู่การก่อมะเร็งได้ สำหรับกลไกการอักเสบนั้นพบว่าการอักเสบเรื้อรังมีความสัมพันธ์กับการก่อมะเร็งเช่นกัน (Das et al., 2007) โดยพบว่าสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส-2 (เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ Prostaglandins จาก Arachidonic acid) ซึ่งได้แก่ ยากลุ่มแอสไพรินและ NSAIDs เป็นสารที่สามารถป้องกันการก่อมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ นอกจากนี้จากรายงานทางวิชาการแสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Phase II จะช่วยลดโอกาสการทำปฏิกิริยาของสารก่อมะเร็ง อย่างเช่น ซัลโฟทรานสเฟอเรส (SULT) กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส (Glutathione S-transferase, GST) เป็นต้น นอกจากนี้การยับยั้งสารก่อมะเร็งอาจทำได้ด้วยการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนส-1 (HO-1) ที่เป็นเอนไซม์ต่อต้านออกซิเดชัน (Lai *et al.*, 2009) จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะศึกษาความสัมพันธ์ถึงกลไกการป้องกันการก่อมะเร็งผ่านการศึกษาภาวะเครียดออกซิเดชันและการอักเสบ

จากหลักฐานการวิจัยพบว่าโอไรซานอลที่สกัดจากข้าวและรำข้าวมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีเมื่อการทดสอบด้วยวิธี Free-radical scavenging activity on DPPH$^{\bullet}$, Ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay และ Inhibition on linoleic acid peroxidation (Lai *et al.*, 2009; Butsat and Siriamornpun, 2010) จากข้อมูลการศึกษาแบบ *In vitro* ดังกล่าว ทางคณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะเปรียบเทียบปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลที่สกัดจากข้าวสายพันธุ์ไทยที่คัดเลือกจากศูนย์วิจัยข้าวในเขตพื้นที่ภาคเหนือ จากนั้นนำสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากสายพันธุ์ที่มีปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลสูงสุดมาทดสอบฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์และไนตริกออกไซด์ ความสามารถป้องกันการทำลายดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ จากนั้นจะทดสอบฤทธิ์ป้องกันการก่อมะเร็งจากภาวะเครียดออกซิเดชันและการอักเสบในเซลล์เพาะเลี้ยง

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลในข้าวสายพันธุ์ไทยจำนวนอย่างน้อย 5 สายพันธุ์ที่คัดเลือกศูนย์วิจัยข้าวในเขตพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย

2. ทดสอบฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์และไนตริกออกไซด์ ฤทธิ์ยับยั้งการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันและความสามารถในการป้องกันการทำลายดีเอ็นเอของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวสายพันธุ์ไทยที่มีปริมาณสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลสูงสุดจากข้อ 1 เปรียบเทียบกับแกมม่า-โอไรซานอลมาตรฐาน โดยทำการศึกษาใน *In vitro* study

3. ทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันการก่อมะเร็งจากภาวะเครียดออกซิเดชันโดยศึกษาฤทธิ์ในการกระตุ้นเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรส (SULT) และฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนส-1 (HO-1) ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวสายพันธุ์ไทยที่มีปริมาณสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลสูงสุดจากข้อ 1 เปรียบเทียบกับแกมม่า-โอไรซานอลมาตรฐานในเซลล์มะเร็งตับ Hep G2

4. ทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันการก่อมะเร็งจากภาวะเครียดออกซิเดชันโดยศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง TNF-α และเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส-2 (COX-2)ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวสายพันธุ์ไทยที่มีปริมาณสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลสูงสุดจากข้อ 1 เปรียบเทียบกับแกมม่า-โอไรซานอลมาตรฐานในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง HT-29