Thesis Title Mechanistic Studies of Glutinous Purple Rice Extracts (*Oryza sativa* L. var. *indica*) on Diethylnitrosamine Induced Mutagenesis in Rats

Author Miss Paweena Sankam

Degree Master Degree of Science (Biochemistry)

Thesis Advisor Asst. Prof. Dr. Rawiwan Wongpoomchai

ABSTRACT

Purple rice (*Oryza sativa* L. var. *indica*) contains high amounts of nutrients and phytochemicals and shows pharmacological properties. In our previous studies, the methanol extract of Kum Doisaket glutinous purple rice (MES) variety and the dichloromethane extract of rice hull (DCEH) presented strong antimutagenicity in Salmonella mutation assay. The acidified methanol extract of rice hull (ACEH) exhibited both antimutagenicity and mutagenicity in this test. Thus, this study was aimed to investigate the genotoxicity and antigenotoxicity of the glutinous purple rice extracts using rat liver micronucleus test. The amounts of phenolic compounds in ACEH, DCEH and MES were 95.55±4.20, 174.00±5.50 and 95.25±4.40 mg GAE/g extract, respectively. The total flavonoid contents of ACEH, DCEH and MES were 51.68±4.28, 220±7.48 and 63.11±3.91 mg CE/g extract, respectively. The anthocyanins contents of ACEH and MES were 6.30±1.07 and 11.72±2.17 mg C3G/g extract, respectively. The amount of γ- oryzanol in DCEH was 23.6±0.1 mg/g extract. The highest amount of tocols found in DCEH was δ- tocopherol.

Acute toxicity study of the extracts was performed in rats by oral administration of a single dose of 2000 mg/kg bw following the OECD guideline 425 protocol. All of the extracts were was non-toxic and safe in female rats. The mutagenicity of the glutinous purple rice extracts ranged from 100-1000 mg/kg bw showed that the number of micronucleated hepatocytes in rats were not statistically difference form their control group.

Antimutagenicity test in rats found that the administration of glutinous purple rice extracts for 28 days significantly inhibited diehylnitrosamine-induced micronucleus formation in the livers of rats. The ACEH presented the strongest anticlastoginicity in rat liver. Therefore, the effect of ACEH treatment was further evaluated on xenobiotic metabolizing enzymes which are involved in the initiation of hepatocarcinogenesis. The low dose of ACEH, 100 mg/kg bw, significantly induced the activities of xenobiotic metabolizing enzymes including cytochrome P450 reductase, NADP(H) quinone oxidoreductase, glutathione *S*-transferase and heme oxygenase, but the medium and high doses of the extract had no effect on these enzyme activities. However, the medium and high doses of the ACEH significantly enhanced the activities of NADP(H) quinone oxidoreductase, glutathione *S*-transferase and UDP-glucuronyltransferase in diethylnitrosamine-initiated rats. The ACEH also modulated the expression of glutathione *S*-transferase alpha and cytochrome P450 isoform 2E1 in liver of diethylnitrosamine treated rats.

In conclusion, the glutinous purple rice extracts were non-toxic and had no clastogenicity in rat liver. The purple rice extracts exhibited antigenotoxic effect in the liver of diethylnitrosamine-induced rats. The inhibitory mechanism of the acidified methanol extract of glutinous purple rice hull, the most potent anticlastogenic rice extract, on diethylnitrosamine-induced mutagenesis in rat might be due to enhancement of some detoxifying enzymes and inactivation of some specific cytochrome P450 system.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การศึกษากลไกของสารสกัดข้าวก่ำต่อการกลายพันธุ์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไดเอธิลไนโตรซามีนในหนู

ผู้เขียน นางสาวปวีณา แสนคำ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร. รวิวรรณ วงศ์ภูมิชัย

บทคัดย่อ

ข้าวก่ำเป็นข้าวที่มีคุณค่าทางอาหารและสารพฤกษเคมีสูงและมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย จากการศึกษาของกลุ่มวิจัย พบว่า สารสกัดจากเมล็ดข้าวก่ำสายพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ดที่สกัดด้วยเมทานอลและสารสกัดจากเปลือกข้าวก่ำที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน มีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ในแบคทีเรียซัลโมเนลลาได้ดีที่สุด ส่วนสารสกัดจากเปลือกข้าวที่สกัดด้วยกรดในเมทานอลมีทั้งฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และต้านการกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย ดังนั้น ในงานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และต้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดข้าวก่ำโดยทดสอบการเกิดไมโครนิวเคลียสในตับหนูขาว

ปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดจากเปลือกข้าวก่ำด้วยกรดในเมทานอลและไดคลอโรมีเทน และสารสกัดจากเมล็ดข้าวก่ำด้วยเมทานอลเท่ากับ 95.55±4.20, 174.00±5.50 และ 95.25±4.40 มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ส่วนปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดเท่ากับ 51.68±4.28, 220±7.48 และ 63.11±3.91 มิลลิกรัมเทียบเท่าคาทิชินต่อกรัมสารสกัดตามลำดับ ปริมาณแอนโทไซยานินในสารสกัดจากเปลือกข้าวก่ำที่สกัดด้วยกรดในเมทานอลและสารสกัดจากเมล็ดข้าวก่ำที่สกัดด้วยเมทานอลเท่ากับ 6.38±1.07 และ11.72±2.17 มิลลิกรัมเทียบเท่าไซยานิดิน-3-กลูโคไซน์ต่อกรัมสารสกัดตามลำดับ ปริมาณแกมมาออไรซานอลในสารสกัดเปลือกข้าวก่ำที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนเท่ากับ 23.6±0.1 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัด และพบว่าแกมมาโทโคฟีรอลเป็นสารในกลุ่มโทคอลที่พบมากที่สุด

การศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสารสกัด โดยให้สารทดสอบทางปากความเข้มข้น 2000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ซึ่งทำการทดลองตามโออีซีดี 425 พบว่า สารสกัดจากข้าวก่ำทุกชนิดไม่มีความเป็นพิษแบบเฉียบพลันและมีความปลอดภัยในหนูขาว การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากข้าวก่ำความเข้มข้น 100-1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว พบว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากข้าวก่ำ มีจำนวนไมโครนิวเคลียสในเซลล์ตับไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษาฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ในหนูขาว พบว่าการได้รับสารสกัดจากข้าวก่ำเป็นเวลา 28 วัน ร่วมกับสารไดเอธิลไนโตรซามีน สามารถลดจำนวนไมโครนิวเคลียสในตับได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สารสกัดจากเปลือกข้าวก่ำที่สกัดด้วยกรดในเมทานอลสามารถยับยั้งการเกิดไมโครนิวเคลียสในตับหนูขาวได้ดีที่สุด ดังนั้น จึงศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกข้าวก่ำที่สกัดด้วยกรดในเมทานอลต่อเอนไซม์กำจัดสารพิษในตับซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญต่อกระบวนการเกิดโรคมะเร็งตับในระยะเริ่มต้น สารสกัดความเข้มข้นต่ำสามารถเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์กำจัดสารพิษบางชนิด ได้แก่ ไซโทโครม พี 450 รีดักเทส, เอนเอดีพี(เอช) คิวโนน ออกซิโด รีดักเทส, กลูต้าไทโอน เอสทรานสเฟอเรส และฮีมออกซีจีเนส ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่สารสกัดความเข้มข้นขนาดกลางและสูงไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ แต่อย่างไรก็ตาม สารสกัดความเข้มข้นปานกลางและสูง สามารถเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์กำจัดสารพิษ เอนเอดีพี(เอช) คิวโนน ออกซิโดรีดักเทส, กลูต้าไทโอน เอสทรานสเฟอเรส และ ยูดีพี กลูคิวโรนิลทรานเฟอรเรสในตับหนูที่ได้รับไดเอธิลไนโตรซามีนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและสารสกัดเปลือกข้าวก่ำที่สกัดด้วยกรดในเมทานอลมีผลต่อการแสดงออกในระดับโปรตีนของเอนไซม์กลูต้าไทโอน เอสทรานสเฟอเรส ชนิดแอลฟาและไซโทโครม พี 450 ชนิด 2อี1 ในตับหนูที่ได้รับไดเอธิลไนโตรซามีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

โดยสรุปสารสกัดจากข้าวก่ำมีความปลอดภัยและไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในตับหนูขาว ซึ่งสารสกัดจากข้าวก่ำมีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ในตับหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไดเอธิลไนโตรซามีน โดยกลไกการยับยั้งการกลายพันธุ์ของสารสกัดจากเปลือกข้าวก่ำที่สกัดด้วยกรดในเมทานอลอาจเกิดจากการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์กำจัดสารพิษและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครม พี450 ที่กระตุ้นให้สารพิษออกฤทธิ์