



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาผลเฉียบพลันของสารสกัดกระชายดำต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้ การดูดซึมน้ำตาล
กลูโคส และการขนส่งน้ำและไอออนผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กในหนูขาว
**Evaluation of the acute effects of *Kaempferia parviflora* extract on the intestinal motility,
glucose absorption, and ion transport properties of the mouse intestinal epithelium**

โดย

ดร.สุภาพร พันธุ์ธีรานุรักษ์
ศ.ดร.นทีทิพย์ กฤษณามระ
รศ.ดร.ฉัตรศรี เดชะปัญญา

เมษายน 2556

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาผลเฉียบพลันของสารสกัดกระชายดำต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้ การดูดซึมน้ำตาล กลูโคส และการขนส่งน้ำและไอออนผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กในหนูขาว

Evaluation of the acute effects of *Kaempferia parviflora* extract on the intestinal motility, glucose absorption and ion transport properties of the mouse intestinal epithelium

ผู้วิจัย

ดร.สุภาพร พันธุ์ธีรานุรักษ์
ศ.ดร.นทีทิพย์ ฤกษ์งามระ
รศ.ดร.ฉัตรศรี เดชะปัญญา

สังกัด

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	5
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	6
สารบัญตาราง	7
สารบัญรูปภาพ	8-9
บทนำ	10-13
วิธีการทดลอง	14-21
ผลการทดลอง	22-40
บทวิจารณ์	41-44
เอกสารอ้างอิง	45-46

รหัสโครงการ : MRG5280156

ชื่อโครงการ : การศึกษาผลเฉียบพลันของสารสกัดกระชายดำต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้ การดูดซึมน้ำตาลกลูโคส และการขนถ่ายน้ำและออสโมผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กในหนูขาว

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน : ดร.สุภาพร พันธุ์ธีรานุรักษ์

E-mail Address : supapornpun@nu.ac.th

กระชายดำ (*Kaempferia parviflora*) เป็นพืชสมุนไพรไทยที่นิยมใช้เป็นยาอายุวัฒนะ และรักษาโรคมาแต่โบราณ แต่ข้อมูลสนับสนุนทางวิทยาศาสตร์โดยเฉพาะอย่างยิ่งเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารนั้นยังมีน้อย งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาผลของสารสกัดกระชายดำต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้โดยวิธีการประเมินการขับถ่ายผงถ่านที่ปนมากับอุจจาระ และวิธีการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของผงถ่านออกจากกระเพาะอาหาร นอกจากนี้ยังศึกษาผลของสารสกัดกระชายดำต่อการขนถ่ายออสโมผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ส่วนต่างๆ ด้วยเทคนิคออสโมมิเตอร์ ผลการศึกษาจากการประเมินการขับถ่ายผงถ่านที่ปนมากับอุจจาระ พบว่าสารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้น 30, 60 และ 120 มก./กก. น้ำหนักตัว มีผลเฉียบพลันในการลดระยะเวลาการขับถ่าย แต่ไม่มีผลใดเมื่อให้สารสกัดกระชายดำเป็นเวลานานขึ้น คือ 7, 14 และ 21 วัน แสดงว่าสารสกัดกระชายดำมีผลเฉียบพลันกระตุ้นการขับถ่ายอุจจาระ ส่วนผลการศึกษาจากวิธีการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของผงถ่านออกจากกระเพาะอาหาร พบว่าสารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้น 60 มก./กก. น้ำหนักตัว ลดระยะทางการเคลื่อนที่ของผงถ่านออกจากกระเพาะอาหาร แสดงว่ามีผลลดการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็ก ในการศึกษาผลของสารสกัดกระชายดำต่อการขนถ่ายออสโมผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ส่วนต่างๆ พบว่า เมื่อให้สารสกัดกระชายดำทางด้านโพรงลำไส้ (luminal membrane) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กส่วนกลางและส่วนปลาย มีการเปลี่ยนแปลงค่าศักย์ไฟฟ้าและค่ากระแสไฟฟ้าเป็นบวกเพิ่มขึ้น ไม่มีผลใดในลำไส้ใหญ่ส่วนต้น แต่มีผลทำให้ค่าศักย์ไฟฟ้าและค่ากระแสไฟฟ้าเป็นลบเพิ่มขึ้นในลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย เมื่อให้สารสกัดกระชายดำทางด้านเลือด (basolateral membrane) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ มีผลทำให้ค่าศักย์ไฟฟ้าและค่ากระแสไฟฟ้าเป็นลบเพิ่มขึ้นในลำไส้เล็กส่วนปลาย ลำไส้ใหญ่ส่วนต้นและส่วนปลาย แต่ไม่มีผลใดในลำไส้เล็กส่วนต้น แสดงให้เห็นว่าสารสกัดกระชายดำมีผลต่อการทำงานของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ส่วนต่างๆ แตกต่างกัน นอกจากนี้เมื่อศึกษาผลของสารสกัดกระชายดำต่อการดูดซึมโซเดียมหรือการขนถ่ายคลอไรด์ในลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย โดยการให้สารยับยั้งการดูดซึมโซเดียม (amiloride) และให้สารกระตุ้นการขนถ่ายคลอไรด์ (IBMX and Forskolin) ในภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดกระชายดำ พบว่า สารสกัดกระชายดำไม่มีผลต่อการดูดซึมโซเดียม แต่มีผลลดการขนถ่ายคลอไรด์ออกสู่โพรงลำไส้ จากการศึกษาสรุปได้ว่า สารสกัดกระชายดำมีผลเฉียบพลันกระตุ้นการขับถ่าย มีผลลดการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็ก มีผลต่อการทำงานของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ส่วนต่างๆ แตกต่างกัน โดยไม่มีผลต่อการดูดซึมโซเดียม แต่มีผลลดการขนถ่ายคลอไรด์ในลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย

Keywords : สารสกัดกระชายดำ การเคลื่อนไหวของลำไส้ การขนถ่ายน้ำและออสโม เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้

Abstract

Project Code : MRG5280156

Project Title : Evaluation of the acute effects of *Kaempferia parviflora* extract on the intestinal motility, glucose absorption, and ion transport properties of the mouse intestinal epithelium

Investigator : Dr.Supaporn Puntheeranurak

E-mail Address : supapornpun@nu.ac.th

Kaempferia parviflora has been used for centuries as a traditional medicine; however, scientific supported evidence especially regarding effects on the gastrointestinal system are less. This study investigated the effect of *Kaempferia parviflora* extract (KPE) on the intestinal motility by observing the charcoal evacuation time and by examining the charcoal propulsion in small intestine; and on the ions transport properties of intestinal epithelia by using the modified perfused-Ussing chamber technique. KPE (30, 60 and 120 mg/kg BW) had acutely reduced the charcoal evacuation time when compare to control. In contrast, there were no statistical different among groups when treated with KPE sub-chronically. Suggesting that, KPE had acutely stimulated the feces evacuation. The evaluation of KPE on the small intestinal propulsion was also performed. KPE (60 mg/kg) significantly decreased the small intestinal propulsion when compare to control which means that KPE decreased the motility of small intestine. Results of the effects of KPE on ions transports of intestinal epithelia showed that when applied KPE at luminal side the transepithelial voltage (V_{te}) changed to be more positive with positive values of the difference in transepithelial current (ΔI_{sc}) in jejunum and ilium. In contrast, the V_{te} changed to be more negative with negative values of ΔI_{sc} in distal colon and had no effect in proximal colon. When applied KPE at basolateral side the V_{te} did not change in jejunum and caused more negative in the V_{te} with negative values of ΔI_{sc} in ilium, proximal and distal colon. To study the effect of KPE on colonic Na^{2+} absorption and Cl^- secretion, amiloride which is an inhibitor of Na^{2+} channels, and IBMX and Forskolin which are stimulators of cAMP-activated Cl^- channels, were applied to the colonic epithelia with or without KPE. Found that KPE had no any effect on Na^{2+} absorption but could reduce the cAMP-activating Cl^- secretion in distal colon. These results could be interpreted that KPE had acute effect on the feces evacuation, decreased small intestinal motility. KPE also had variety effect on intestinal epithelia of the different segment of intestine. Furthermore, KPE had no effect on Na^{2+} absorption but reduced Cl^- secretion in distal colon.

Keywords : *Kaempferia parviflora* extract, intestinal motility, ion transport, intestinal epithelia

สารบัญตาราง

ตารางที่	รายละเอียด	หน้า
1	ผลของสารสกัดกระชายดำแบบเฉียบพลันต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็กโดยวิธีการประเมินเวลาการขับถ่ายผงถ่าย (the charcoal evacuation time)	22
2	ผลของสารสกัดกระชายดำแบบระยะสั้นต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็กโดยวิธีการประเมินเวลาการขับถ่ายผงถ่าย (the charcoal evacuation time)	23
3	ผลของสารสกัดกระชายดำต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็กโดยวิธีการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของผงถ่าย (the small intestinal propulsion)	25
4	แสดงการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum)	28
5	แสดงการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กส่วนปลาย (ilium)	31
6	แสดงการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (proximal colon)	34
7	แสดงการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal colon)	37

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	รายละเอียด	หน้า
1	กราฟแสดงผลเจียบพลันและระยะสั้น (7, 14 และ 21 วัน) ของสารสกัดกระชายดำต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้โดยวิธีการประเมินเวลาการขับถ่ายผงถ่าน (the charcoal evacuation time)	24
2	กราฟแสดงผลของการบ่อนสารสกัดกระชายดำเพียงครั้งเดียวต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็กโดยวิธีการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของผงถ่าน (the small intestinal propulsion)	26
3	แสดงค่าความแตกต่าง (ΔI_{sc}) ของค่ากระแสไฟฟ้าก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายทางด้านโพรงลำไส้ (luminal membrane) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum)	29
4	แสดงค่าความแตกต่าง (ΔI_{sc}) ของค่ากระแสไฟฟ้าก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายทางด้านเลือด (basolateral membrane) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum)	29
5	แสดงค่าความแตกต่าง (ΔI_{sc}) ของค่ากระแสไฟฟ้าก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายทางด้านโพรงลำไส้ (luminal membrane) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กส่วนปลาย (ilium)	32
6	แสดงค่าความแตกต่าง (ΔI_{sc}) ของค่ากระแสไฟฟ้าก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายทางด้านเลือด (basolateral membrane) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กส่วนปลาย (ilium)	32
7	แสดงค่าความแตกต่าง (ΔI_{sc}) ของค่ากระแสไฟฟ้าก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายทางด้านโพรงลำไส้ (luminal membrane) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (proximal colon)	35
8	แสดงค่าความแตกต่าง (ΔI_{sc}) ของค่ากระแสไฟฟ้าก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายทางด้านเลือด (basolateral membrane) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (proximal colon)	35
9	แสดงค่าความแตกต่าง (ΔI_{sc}) ของค่ากระแสไฟฟ้าก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายทางด้านโพรงลำไส้ (luminal membrane) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal colon)	38
10	แสดงค่าความแตกต่าง (ΔI_{sc}) ของค่ากระแสไฟฟ้าก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายทางด้านเลือด (basolateral membrane) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal colon)	38

รูปที่	รายละเอียด	หน้า
11	แสดงค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc}) ที่เปลี่ยนแปลงเมื่อให้สาร amiloride 20 μ M ทางด้านโพรงลำไส้ (amil, lu) เมื่อให้สารสกัดกระชายความเข้มข้น 100 mg/ml พร้อมกับสาร amiloride 20 μ M ทางด้านโพรงลำไส้ (KPE, lu + amil, lu) และเมื่อให้สารสกัดกระชายความเข้มข้น 100 mg/ml ทางด้านเลือดพร้อมกับสาร amiloride 20 μ M ทางด้านโพรงลำไส้ (KPE, ba + amil, lu) ผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal colon)	39
12	แสดงค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc}) ที่เปลี่ยนแปลงเมื่อให้สาร IBMX 100 μ M และ Forskolin 2 μ M ทางด้านโพรงลำไส้ (IBMX + Fors, lu) เมื่อให้สารสกัดกระชายความเข้มข้น 100 mg/ml พร้อมกับสาร IBMX 100 μ M และ Forskolin 2 μ M ทางด้านโพรงลำไส้ (IBMX + Fors, lu + KPE, lu) และเมื่อให้สารสกัดกระชายความเข้มข้น 100 mg/ml ทางด้านเลือดพร้อมกับสาร IBMX 100 μ M และ Forskolin 2 μ M ทางด้านโพรงลำไส้ (IBMX + Fors, lu + KPE, ba) ผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal colon)	40

เนื้อหางานวิจัย

บทนำ

กระชายดำมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae เป็นพืชสมุนไพรไทยที่นิยมใช้เป็นยาอายุวัฒนะ และรักษาโรคต่างๆ มาแต่โบราณ สารสำคัญที่พบในเหง้ากระชายดำ ได้แก่ น้ำมันหอมระเหย และ สารในกลุ่ม flavonoids (1) รายงานการวิจัยล่าสุดพบว่า สารสกัดกระชายดำ ประกอบไปด้วยสารในกลุ่ม flavonoids ถึง 11 ชนิด โดยมี 5,7-dimethoxyflavone และ 5,7,4'-trimethoxyflavone เป็นส่วนประกอบหลัก (2) มีรายงานการศึกษาผลของสาร flavonoids ที่พบในเหง้ากระชายดำ เช่น 5,7,4'-trimethoxyflavone และ 5,7,3,4-tetramethoxyflavone พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Plasmodium falciparum* ที่เป็นสาเหตุของไข้มาลาเรีย (1) แต่ผลของสาร flavonoids ที่พบในเหง้ากระชายดำ ต่อระบบอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อระบบทางเดินอาหาร เช่น การเคลื่อนไหวของลำไส้ และการทำงานของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ ยังไม่มีการศึกษาวิจัย

มีรายงานผลการวิจัยของสารกลุ่ม flavonoid ที่พบในพืชชนิดอื่นๆ ว่ามีผลเกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ เช่น สาร methylated flavones เช่น 7-methoxyflavone, 7,4'-dimethoxyflavone, 5,7-dimethoxyflavone, and 5,7,4'-trimethoxyflavone มีผลเพิ่มการดูดซึมสารผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ (Caco-2 cells) (3) แต่สาร flavonoids ที่พบใน cocoa ยับยั้งการหลั่งคลอไรด์ผ่านทาง CFTR-Chloride channel ผ่านเซลล์เยื่อบุลำไส้ใหญ่ (T84 human colon epithelia) (4) ในขณะที่สาร flavonol quercetin ที่มักพบในอาหารกระตุ้นการหลั่งคลอไรด์ในลำไส้ใหญ่ของหนู rat (5) เป็นต้น

อาหารที่ร่างกายได้รับจะถูกย่อยเป็นโมเลกุลเล็ก เช่น น้ำตาลกลูโคส ซึ่งจะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดเพื่อนำไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของร่างกายโดยผ่านทางเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กเป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ลำไส้เล็กส่วน jejunum และบางส่วนของ ileum การดูดซึมน้ำตาลกลูโคสเป็นขบวนการที่อาศัยโซเดียม (sodium dependent mechanism) โดยน้ำตาลกลูโคสส่วนใหญ่จะถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กพร้อมกับโซเดียมโดยตัวขนส่ง sodium-dependent glucose cotransporter 1 (SGLT1) บนเยื่อชั้นโพรงลำไส้ (mucosal membrane) จากนั้นจะถูกขนส่งเข้าสู่กระแสเลือดโดยตัวขนส่ง glucose transporter 2 (GLUT2) บนเยื่อชั้นเลือด (serosal membrane) (6) เป็นที่ทราบกันดีว่าหากอาหารที่เหลือจากการดูดซึม จะเคลื่อนเข้าสู่ลำไส้ใหญ่ (proximal and distal colon) ซึ่งจะเป็นบริเวณที่มีการดูดซึมน้ำและอิเล็กโทรไลต์ที่สำคัญกลับเข้าสู่ร่างกายก่อนที่จะถูกขับทิ้ง เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่จะดูดซึมไอออนที่สำคัญคือโซเดียมและคลอไรด์กลับสู่กระแสเลือด พร้อมทั้งขนส่งถ่ายโพแทสเซียมและไบคาร์บอเนตจากกระแสเลือดเข้าสู่โพรงลำไส้ใหญ่ โดยถูกควบคุมด้วยฮอร์โมน

หลายชนิด เช่น ฮอร์โมนจากต่อมหมวกไต เช่น mineralocorticoids and glucocorticoids (7) และสารอื่นๆ เช่น VIP, somatostatin และ acetylcholine (8) การขนถ่ายน้ำเข้าสู่โพรงลำไส้ใหญ่จะเกิดตามแรงดันออสโมติกที่เกิดจากการขนถ่ายไอออนโดยเฉพาะอย่างยิ่ง คลอไรด์ เข้าสู่โพรงลำไส้ เนื่องจากคลอไรด์มีประจุเป็นลบ เมื่อถูกขนถ่ายสู่โพรงลำไส้จะทำให้เกิดความแตกต่างทางประจุไฟฟ้า (electrochemical gradient) ซึ่งจะดึงไอออนที่มีประจุบวกเคลื่อนที่ตามเข้าสู่โพรงลำไส้ด้วย การเคลื่อนที่ของไอออนเหล่านี้ทำให้เกิดแรงดันออสโมติกในโพรงลำไส้ใหญ่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีการเคลื่อนที่ของน้ำตามเข้าสู่โพรงลำไส้ใหญ่ได้ การขนถ่ายคลอไรด์ ไอออนที่เซลล์เยื่อบุลำไส้ใหญ่นี้เกิดขึ้นผ่าน cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) chloride channels บนเยื่อบุด้านโพรงลำไส้ ซึ่งถูกกระตุ้นโดยตรงจากการเพิ่มของ cAMP ภายในเซลล์ (9) หรืออีกทางหนึ่งถูกกระตุ้นได้โดยการเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียมภายในเซลล์ และการกระตุ้นผ่าน calcium activated K^+ channels (16) และ Ca^{2+} -dependent chloride channels

จะเห็นว่าการเคลื่อนที่ของไอออนที่สำคัญต่างๆ เช่น โซเดียม คลอไรด์ และ โพแทสเซียม มีความสำคัญ และสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดถึงการดูดซึมสารอาหาร น้ำ และอิเล็กโทรไลต์ต่างๆ ของลำไส้ได้ การเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนที่ของไอออนเหล่านี้เป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางไฟฟ้าของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงใช้เทคนิคคูล์ซิง (Ussing chamber technique) ซึ่งเป็นเทคนิคพิเศษเหมาะสมสำหรับการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับกลไกการเคลื่อนที่ของสารต่างๆ และ/หรือ อิเล็กโทรไลต์ ผ่านเซลล์เยื่อบุ (epithelial cells) ในการศึกษาทางานวิจัยนี้

เทคนิคคูล์ซิง (Ussing chamber technique) เป็นระบบที่ถูกคิดค้นขึ้นโดย Hans H. Ussing และ Zerahn ในปี 1951 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ศึกษาการขนส่งไอออนแบบอาศัยพลังงานผ่านเซลล์เยื่อบุ (epithelial cells) รวมทั้งเพื่อศึกษาคุณสมบัติทางไฟฟ้าของเซลล์เยื่อบุ ในระยะต่อมาได้มีการพัฒนาระบบให้เหมาะสมกับการศึกษาแต่ละประเภทมากขึ้น แต่ยังมีหลักการพื้นฐานเหมือนเดิม คือระบบจะประกอบด้วย chamber 2 ชั้น ที่แยกจากกัน และสามารถยึดลำไส้ไว้ตรงกลางระหว่าง chamber ได้ ดังนั้นสารละลายใน chamber จะถูกแบ่งออกเป็น 2 ด้านเพื่อจำลองให้ด้านหนึ่งเป็นด้านเลือด (serosal side) และอีกด้านหนึ่งเป็นด้านโพรงลำไส้ (mucosal side) ใน chamber ทั้งสองด้านนี้สามารถใส่สารที่ต้องการศึกษา เช่น ยา ฮอร์โมน หรือน้ำตาล และ กรดอะมิโนที่จะใช้ศึกษาในโครงการนี้ เป็นต้น เพื่อดูผลของสารเหล่านั้นต่อการขนส่งไอออนต่างๆ ในระบบนี้จะมี electrode 2 คู่ คู่หนึ่งคือ voltage electrodes ใช้สำหรับวัดการเปลี่ยนแปลงของศักย์ไฟฟ้าระหว่าง 2 ด้านของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ โดยต่อเข้ากับเครื่องมือ volt meter และอีกคู่คือ electrical electrodes ใช้สำหรับวัดกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นระหว่าง 2 ด้านของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ โดยต่อกับเครื่องวัดกระแสไฟฟ้า (ampere meter) ซึ่งค่ากระแสไฟฟ้านี้เป็นค่าที่ใช้แทนการเคลื่อนที่ของไอออนผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ หรือสามารถใช้

electrical electrodes ต่อกับเครื่องสร้างกระแสไฟฟ้า (current generator) สำหรับผ่านกระแสไฟฟ้าที่กำหนดปริมาณเข้าไปในระบบ เพื่อคำนวณหาค่าความต้านทานของผนังเยื่อบุผนังลำไส้ได้ตามหลักการของ Ohm's law ค่าทางไฟฟ้าต่างๆ เหล่านี้จะแสดงถึงคุณสมบัติของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ในขบวนการขนส่งสารอาหาร น้ำ และไอออนต่างๆ ซึ่งสามารถแปลผลถึงการดูดซึมและการคัดหลั่งสารอาหาร น้ำ และไอออนที่เกิดขึ้นในลำไส้ได้

นอกจากนั้น เมื่อรับประทานอาหารตามปกติ อาหารจะผ่านขบวนการย่อยและดูดซึมสารอาหารที่สำคัญตามที่กล่าวไปข้างต้นก่อนถูกขับออกนอกร่างกาย ถ้ามีการกระตุ้นหรือยับยั้งการเคลื่อนไหวของลำไส้ จะส่งผลให้อาหารนั้นถูกขับออกเร็วหรือช้ากว่าปกติได้ มีรายงานวิจัยถึงเทคนิคใหม่ที่ใช้ศึกษาการเคลื่อนไหวของลำไส้ โดยใช้วิธีประเมินเวลาในการขับถ่ายผงถ่าน (the charcoal evacuation time) (10, 11) เทคนิคนี้จะนำไปตามหลัก 3Rs (replacement, reduction, and refinement) คือจะอดอาหารหนูทดลองประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นให้สารอาหารที่ต้องการศึกษาโดยป้อนทางปาก (oral gavage) ที่ใช้เวลาประมาณ 90 นาทีจึงป้อนสารแขวนลอยของผงถ่าน และหลังจากนั้นอีก 60 นาที สามารถให้หนูทดลองกินอาหารได้ตามปกติ โดยให้สังเกตอุจจาระที่ขับถ่ายออกมาทุก 5 นาที จนถึง 450 นาที ว่ามีผงถ่านติดมาด้วยหรือไม่ จดบันทึกเวลาที่ผงถ่านติดออกมากับอุจจาระ เทคนิคใหม่นี้ต่างจากเทคนิคเดิม (12, 13) ที่ใช้แพร่หลายทั่วไปคือไม่ต้องอดอาหารหนูทดลอง 18 – 24 ชั่วโมงก่อนการทดลองซึ่งทำให้เกิดความเครียดได้ และไม่ต้องฆ่าหนูทดลองเพื่อตัดเอาลำไส้ทั้งหมดออกมาประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของก้อนผงถ่านจากกระเพาะอาหารถึงลำไส้ใหญ่ เทคนิคใหม่นี้ใช้วิธีสังเกตลักษณะอุจจาระที่มีผงถ่านติดมาด้วย จึงสามารถนำหนูทดลองกลับมาใช้ศึกษาได้ใหม่หลังจากพักเป็นเวลา 3-4 วัน เทคนิคนี้จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่ใช้ศึกษาการเคลื่อนไหวของลำไส้ได้

เนื่องจากในปัจจุบันมีการบริโภคนวัตกรรมสัปดาห์ละครั้งมากขึ้น จึงควรมีข้อมูลเกี่ยวกับผลของกระชวยดำต่อการทำงานของลำไส้ เช่น มีผลต่อการเคลื่อนไหว เพิ่มการดูดซึมสารอาหารต่างๆ เช่น น้ำตาลกลูโคส และกรดอะมิโนต่างๆ ในลำไส้เล็ก และ/หรือ มีผลต่อการขนถ่ายน้ำและอิเล็กโทรไลต์ในลำไส้ใหญ่หรือไม่ แต่จากการสืบค้นข้อมูลงานวิจัยยังไม่พบรายงานการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับผลของสารสกัดกระชวยดำต่อการทำงานของลำไส้ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลของสารสกัดกระชวยดำต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้โดยใช้เทคนิคการประเมินการขับถ่ายผงถ่าน (the charcoal evacuation time) และศึกษาผลต่อการทำงานของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ในหนูขาว โดยใช้เทคนิค continuously perfused micro-Ussing chamber ซึ่งเป็นเทคนิคพิเศษเหมาะสมสำหรับการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการเคลื่อนที่ของสารต่างๆ และ/หรือ อิเล็กโทรไลต์ ผ่านเซลล์เยื่อบุ (epithelium)

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาผลของสารสกัดกระชายดำต่อการทำงานของระบบทางเดินอาหาร ดังต่อไปนี้

1. การเคลื่อนไหวของลำไส้
2. ผลเฉียบพลันต่อการทำงานของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่
3. การขนถ่ายน้ำและอิเล็กโทรไลต์ผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่

วิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

การทดลองนี้ใช้ หนูเม้าส์ สายพันธุ์ ICR อายุ 8 สัปดาห์ จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาเลียมมหาวิทยาลัยมหิดล

หลังจากได้รับหนูจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ จะทำการพัก 10-14 วัน ก่อนเริ่มทำการทดลอง โดยให้อาหาร และ น้ำ ad libitum และอยู่ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 20-25°C ความชื้นสัมพัทธ์ 50-60 % และควบคุมแสง 12 ชั่วโมง มีด และ 12 ชั่วโมง สว่าง

หลังเสร็จสิ้นการทดลอง ซากสัตว์ทดลองจะถูกเก็บไว้ในที่ -20°C จนกว่าจะนำไปทำลาย

สารสกัดกระชายดำ

นำเหง้ากระชายดำสดมาล้างน้ำจนสะอาดและผึ่งลมให้แห้ง หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้ววางแผ่กระจายบนถาด นำเข้าเตาอบที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 3 วัน หรือจนกว่าจะแห้ง แล้วบดให้ละเอียด จากนั้นนำมาสกัดด้วย Ethanol บริสุทธิ์ สารสกัดกระชายดำที่ได้จะถูกเก็บไว้ในที่ -20 °C จนกว่าจะนำมาใช้

การสลบหนู mouse ด้วย CO₂ และการทำ cervical dislocation

ทำการสลบหนู mouse ด้วย 100 % CO₂ โดยเติมปริมาณก๊าซ CO₂ เพียง 50% ของปริมาตรภาชนะที่ใช้ (เป็นวิธีการสลบหนูด้วยการดมก๊าซ ตามมาตรฐานสากล) โดยสังเกตจากอาการของหนู mouse ที่สงบนิ่งแต่ยังหายใจอยู่ จากนั้นจึงทำ cervical dislocation เพื่อให้ตายอย่างสงบ

การเตรียมเนื้อเยื่อลำไส้ (Tissue preparation) สำหรับ Ussing Technique

หลังจากทำให้หนูทดลองสลบด้วย CO₂ และทำให้ตายอย่างสงบโดย cervical dislocation จากนั้นผ่าตัดเปิดช่องท้อง ตัดลำไส้ส่วนที่ต้องการศึกษาออกจากตัวหนู และแช่ทันทีในสารละลาย physiological solution (ประกอบด้วย NaCl, KH₂PO₄, K₂HPO₄·3H₂O, Glucose, MgCl₂·6H₂O, Ca-Gluconate ในความเข้มข้น 145, 0.4, 1.6, 5, 1 และ 1.3 mmol / liter ตามลำดับ ค่าออสโมลาริตีประมาณ 300 mOsm และค่า pH ที่ 7.4) หรือเรียกว่า สารละลาย Ringer ซึ่งจะวางอยู่บนน้ำแข็งเพื่อรักษาอุณหภูมิของสารละลายให้เย็นตลอดเวลา จากนั้นนำลำไส้มาวางบนแผ่นพาราฟินที่วางอยู่บน

น้ำแข็ง ตัดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและเส้นเลือดออกจากลำไส้อย่างนุ่มนวลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กล้องชั้น กล้ามเนื้อออก (strip muscle layer) ตัดลำไส้ตามขนาดที่ต้องการโดยให้ความยาวประมาณ 1 ซม. แล้วตัดลำไส้ตามแนวยาวและแผ่ออกเป็นแผ่นผนังลำไส้ นำไปวางบนรูเปิด (exposure area 0.078 mm²) ตรงกลางของ removable dice จากนั้นนำไปสอดระหว่างกลางของ modified Ussing chambers ที่มีขนาดปริมาตรข้างละ 1 ml และมีสารละลาย Ringer ไหลผ่านทั้งสองด้านของแผ่นเซลล์เยื่อบุผนัง ลำไส้ตลอดเวลา เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้จะถูก incubate นานประมาณ 15 –20 นาที ก่อนเริ่มการทดลอง

การทดลองโดยเทคนิคคูลูสซิง (The continuously perfused micro-Ussing chamber technique)

เทคนิคนี้เป็นการทดลองแบบ *in vitro* ที่ประกอบด้วย modified Ussing chamber ภาชนะ สำหรับใส่สารละลายและท่อนำสารละลายต่างๆ รวมทั้งอุปกรณ์สำหรับบันทึกสัญญาณที่ประกอบด้วย electrodes 2 คู่ สำหรับให้กระแสไฟฟ้าเข้าระบบ และ สำหรับวัดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า เครื่อง Current generator สำหรับให้กระแสไฟฟ้าเข้าสู่ระบบ และ PowerLab A/D converter (Chart V4; A.D. Instruments, Castle Hill, Australia) ที่ต่อเข้ากับเครื่องคอมพิวเตอร์ PC เพื่อวิเคราะห์ประมวลผล

เมื่อสอด removable dice ที่มีแผ่นผนังลำไส้ส่วนที่ต้องการศึกษา ลงไประหว่าง modified Ussing chamber half ทำให้สารละลายที่ไหลผ่าน modified Ussing chamber ถูกแบ่งออกเป็นสอง ด้าน คือ ด้านโพรงลำไส้ (mucosal or luminal side) และด้านเลือด (serosal or basolateral side) สารละลาย Ringer ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น physiological solution (ประกอบด้วย NaCl, KH₂PO₄, K₂HPO₄·3H₂O, Glucose, MgCl₂·6H₂O, Ca-Gluconate ในความเข้มข้น 145, 0.4, 1.6, 5, 1 และ 1.3 mmol/liter ตามลำดับ ค่าออสโมลาริตีประมาณ 300 mOsm และค่า pH ที่ 7.4) ที่ถูกเก็บไว้ในภาชนะที่สูงกว่า modified Ussing chamber ประมาณ 30 ซม. นั้น จะสามารถไหลผ่านท่อ (Polyethylene tubes) เข้าสู่ทั้งสองด้านของ modified Ussing chamber ได้ตลอดระยะเวลาทำการทดลอง โดยอาศัยหลัก Hydrostatic pressure และไหลออกจาก modified Ussing chamber ทางท่อที่ต่อออกจาก chamber สำหรับทิ้ง

ส่วนสารต่างๆ ที่ต้องการศึกษา เช่น สารสกัดกระชายดำ (*Kaempferia parviflora* extract, KPE) เป็นต้นนั้น สามารถผสมในสารละลาย Ringer และให้ไหลผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ด้านใดด้านหนึ่ง หรือทั้งสองด้านตามความเหมาะสมของการทดลอง ผลของสารเหล่านั้นจะทำให้หมดไปได้ โดยการหยุดให้สารเหล่านั้นและเปลี่ยนเป็นให้สารละลาย Ringer ไหลผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้แทน จนกว่าจะเห็นค่าความต่างศักย์ไฟฟ้ากลับสู่ค่าปกติก่อนให้สารนั้น หรือมีค่าคงที่ จากนั้นค่อยเติมสารใหม่เพื่อการทดสอบตามขั้นตอนที่กล่าวมา ขั้นตอนเหล่านี้สามารถทำซ้ำได้จนกว่าจะเสร็จสิ้นการทดลอง ด้วยวิธีการ

นี้จะทำให้สามารถทดสอบผลของสารหลายชนิดได้ ภายใน tissue ชั้นเดียวกัน และยังเป็นการควบคุมผลการทดลองแบบภายใน (internal control) อีกด้วย สารละลายที่ใช้ในการทดลองจะถูกควบคุมอุณหภูมิให้มีค่าประมาณ 37 °C ด้วยระบบ water jacket ที่หล่อด้วยน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิด้วยเครื่อง circulating water bath ตลอดเวลาการทดลอง และระบบ Ussing chambers system ที่จะใช้นี้เป็นระบบ continuous perfusion ดังนั้นเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้จะได้รับปริมาณออกซิเจนที่เพียงพอตลอดเวลาการทดลอง

สถิติที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จะอยู่ในรูป mean $\pm$ SEM การเปรียบเทียบข้อมูลระหว่าง 2 ชุด จะใช้ Student' t-test และ การเปรียบเทียบข้อมูลมากกว่า 2 ชุดจะใช้ One-way analysis of variance (ANOVA) และ $p < 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ระเบียบวิธีวิจัย

วิธีวิจัยจะแบ่งตามวัตถุประสงค์ คือ

วัตถุประสงค์ที่ 1 ต้องการศึกษาผลของสารสกัดกระชายดำต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้ จากสรรพคุณของกระชายดำตามคำกล่าวอ้างแต่โบราณว่าใช้เป็นยารักษาโรคต่างๆ เช่น โรคลม จุกเสียด แน่นท้อง และแก้อาการปวดท้อง ท้องเดิน เป็นไปได้ว่า กระชายดำอาจมีผลต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้ เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาว่าความเข้มข้นใดของสารสกัดกระชายดำมีผลต่อการทำงานของลำไส้ มีเพียงรายงานการวิจัยเกี่ยวกับผลของสารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้น 30, 60 และ 120 mg/kg ช่วยเพิ่มการหลั่งสารเมือกในกระเพาะอาหาร (6) ดังนั้น จึงศึกษาผลของสารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 30, 60 และ 120 mg/kg โดยทำศึกษา 2 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 เป็นการประเมินเวลาในการขับถ่ายผงถ่าย (the charcoal evacuation time) หลังจากได้รับสารสกัดกระชายดำเป็นเวลา 1, 7, 14, 21 และ 28 วัน ส่วนการทดลองที่ 2 เป็นการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของผงถ่ายจากกระเพาะอาหารผ่านลำไส้เล็กหลังจากได้รับสารสกัดกระชายดำ 1 ครั้ง (the small intestinal propulsion)

วัตถุประสงค์ที่ 2 และ 3 ใช้เทคนิคอุสซิง (Ussing chamber technique) เพื่อศึกษาผลเฉียบพลันของสารสกัดกระชายดำต่อการทำงานของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ส่วนต่างๆ และศึกษาผลของสารสกัดกระชายดำต่อการดูดซึมน้ำและอิเลคโตรไลต์ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ จากสรรพคุณของสารสกัดกระชายดำที่ใช้เป็นยาบำรุงกำลังมาแต่โบราณ รักษาโรคลม จุกเสียดแน่นท้อง และแก้อาการปวดท้อง ท้องเดิน เป็นไปได้ว่า กระชายดำอาจมีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ส่วนต่างๆ และอาจมีผลการขับถ่ายน้ำและอิเลคโตรไลต์ที่เกิดขึ้นในลำไส้ใหญ่ โดยปกติเซลล์เยื่อบุผนัง

ลำไส้ใหญ่จะดูดซึมโซเดียมจากโพร่งลำไส้เข้าสู่กระแสเลือด (sodium absorption) และขนถ่ายคลอไรด์ออกสู่โพร่งลำไส้ (chloride secretion) เป็นส่วนใหญ่ จึงศึกษาผลของสารสกัดกระชายดำต่อการดูดซึมโซเดียมเข้าสู่เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ และศึกษาผลของสารสกัดกระชายดำต่อการขนถ่ายคลอไรด์ออกสู่โพร่งลำไส้

ส่วนที่ 1.

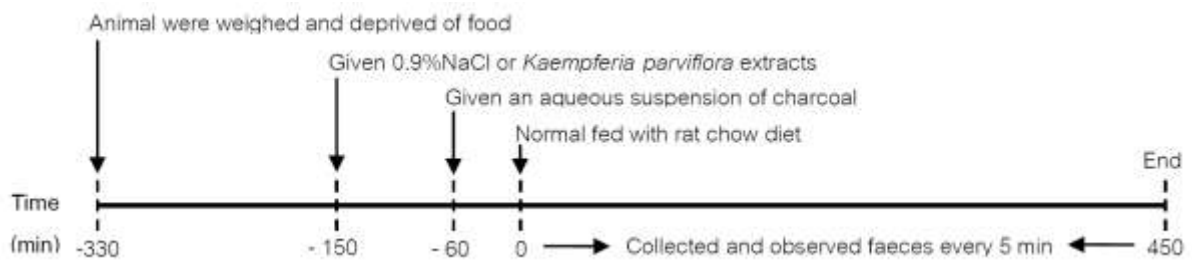
ศึกษาผลของสารสกัดกระชายดำต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้โดยวิธีการประเมินเวลาในการขับถ่ายผงถ่าย (the charcoal evacuation time)

หนูทดลองเพศเมีย วัยเจริญพันธุ์ ได้รับการป้อนสารสกัดกระชายดำทั้งชนิดเจียบพลัน (1 วัน) และแบบระยะสั้น (7, 14, 21 และ 28 วัน) การศึกษาแบบเจียบพลันมีขั้นตอน คือ อดเฉพาะอาหารนาน 3 ชั่วโมงก่อนเริ่มการทดลอง ป้อนสารสกัดกระชายดำหรือ 0.9 % NaCl (10 ml/kg) ทิ้งไว้ 90 นาที จากนั้นป้อน 0.3 ml ของสารแขวนลอยผงถ่าย (5 % ผงถ่าย ใน 10 % น้ำ) ทุกกลุ่ม อีก 60 นาทีต่อมาให้หนูทดลองกินอาหารได้ตามปกติ ทำการเก็บอุจจาระทุกๆ 5 นาทีจนถึง 450 นาที แล้วนำมาส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ สังเกตว่ามีผงถ่ายติดมากับอุจจาระหรือไม่ บันทึกเวลาที่เห็นผงถ่ายขับถ่ายติดออกมา กับอุจจาระ ส่วนการศึกษาแบบระยะสั้นนั้นทำโดยป้อนสารสกัดกระชายดำเป็นเวลา 7, 14 และ 21 วัน ก่อนที่จะเริ่มขั้นตอนเหมือนการศึกษาแบบเจียบพลัน

หนูทดลองถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

- | | |
|------------|--|
| กลุ่มที่ 1 | ป้อน (oral gavage) 10 ml/kg ของ 0.9 % NaCl (กลุ่มควบคุม) |
| กลุ่มที่ 2 | ป้อน (oral gavage) 10 ml/kg ของสารสกัดกระชายดำ (30 mg/kg) |
| กลุ่มที่ 3 | ป้อน (oral gavage) 10 ml/kg ของสารสกัดกระชายดำ (60 mg/kg) |
| กลุ่มที่ 4 | ป้อน (oral gavage) 10 ml/kg ของสารสกัดกระชายดำ (120 mg/kg) |

เปรียบเทียบระยะเวลาที่พบผงถ่ายปนมากับอุจจาระระหว่างกลุ่มต่างๆ ถ้าพบอุจจาระที่ปนด้วยผงถ่ายในระยะเวลาสั้นกว่ากลุ่มควบคุม แสดงว่าลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่มีการเคลื่อนไหวมากกว่าปกติ แต่ถ้าพบอุจจาระที่ปนด้วยผงถ่ายในระยะเวลาที่ยาวนานกว่ากลุ่มควบคุม แสดงว่าลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่มีการเคลื่อนไหวน้อยกว่าปกติ



รูปแสดงขั้นตอนต่างๆ ของวิธีการประเมินเวลาในการขับถ่ายผงถ่าน (the charcoal evacuation time)

ส่วนที่ 2.

ศึกษาผลของสารสกัดกระชายดำต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็กโดยวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของผงถ่าน (the small intestinal propulsion)

หนูทดลองเพศเมีย วัยเจริญพันธุ์ ถูกอดเฉพาะอาหารนาน 12- 14 ชั่วโมงก่อนป้อนสารสกัดกระชายดำ หรือ 0.9 % NaCl ปริมาณ 10 ml/kg เพียงครั้งเดียว ทั้งไว้ 60 นาที จึงป้อน 0.2 ml ของสารแขวนลอยผงถ่าน (5 % ผงถ่าน ใน 10 % น้ำ) ให้กับหนูทดลอง อีก 30 นาทีถัดมา หนูทดลองจะถูกทำให้ตายอย่างสงบ จากนั้นเปิดช่องท้องและตัดส่วนกระเพาะอาหารจนถึงลำไส้เล็กทั้งหมดออกมาอย่างรวดเร็ว วัดระยะทางจาก pylorus ของกระเพาะอาหาร ถึงตำแหน่งที่เห็นผงถ่าน และวัดความยาวทั้งหมดของลำไส้เล็ก จากนั้นคำนวณผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของระยะทางจาก pylorus ของกระเพาะอาหารถึงตำแหน่งรอยต่อระหว่างลำไส้เล็กส่วนปลายกับลำไส้ส่วนซีกัม (ileocaecal junction)

หนูทดลองถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

- กลุ่มที่ 1 ป้อน (oral gavage) 10 ml/kg ของ 0.9 % NaCl (กลุ่มควบคุม)
- กลุ่มที่ 2 ป้อน (oral gavage) 10 ml/kg ของสารสกัดกระชายดำ (30 mg/kg)
- กลุ่มที่ 3 ป้อน (oral gavage) 10 ml/kg ของสารสกัดกระชายดำ (60 mg/kg)
- กลุ่มที่ 4 ป้อน (oral gavage) 10 ml/kg ของสารสกัดกระชายดำ (120 mg/kg)

เปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์ของระยะทางจาก pylorus ของกระเพาะอาหารถึงตำแหน่งรอยต่อระหว่างลำไส้เล็กส่วนปลายกับลำไส้ส่วนซีกัม (ileocaecal junction) ระหว่างกลุ่มต่างๆ ถ้าผลค่าเปอร์เซ็นต์มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุม แสดงว่าลำไส้เล็กมีการเคลื่อนไหวเร็วกว่าปกติ แต่ถ้าค่าเปอร์เซ็นต์มีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุม แสดงว่าลำไส้เล็กมีการเคลื่อนไหวช้ากว่าปกติ

ส่วนที่ 3.

ศึกษาผลเฉียบพลันของสารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางไฟฟ้าของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่

อาหารและยาทุกชนิดที่รับประทานเข้าไป จะต้องถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด หรือ อาจออกฤทธิ์ที่บริเวณลำไส้ได้โดยตรง จากสรรพคุณของกระชายดำตามคำกล่าวอ้างแต่โบราณว่าใช้เป็นยาบำรุงกำลัง ยาอายุวัฒนะนั้น อาจเป็นไปได้ว่า กระชายดำมีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็ก เช่น การดูดซึมน้ำตาลกลูโคส เป็นต้น และจากสรรพคุณของสารสกัดกระชายดำที่ใช้รักษาโรคลม จุกเสียดแน่นท้อง และแก้อาการปวดท้อง ท้องเดิน เป็นไปได้ว่ากระชายดำอาจมีผลเปลี่ยนแปลงการขนถ่ายน้ำและอิเล็กโตรไลต์ที่เกิดขึ้นในลำไส้ใหญ่ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้สามารถวัดได้จากการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางไฟฟ้าของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ ดังนั้น การทดลองนี้จึงศึกษาผลเฉียบพลันของสารสกัดกระชายดำ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 5, 10, 50, 100, และ 500 $\mu\text{g/ml}$ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้ศึกษาผลของสารสกัดกระชายดำในการทดลองต่อไป และเนื่องจากกว่ายังไม่มีรายงานการศึกษาว่าสารสกัดกระชายดำนั้นออกฤทธิ์ทางด้านใดของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ จึงทำการศึกษาผลทั้งสองด้าน โดยใส่สารสกัดกระชายดำในสารละลายทางด้านโพรงลำไส้ (luminal solution) หรือ ทางด้านเลือด (basolateral solution) ของลำไส้ส่วนต่าง ๆ คือ ลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum) ลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) ลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (proximal colon) และลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal colon) โดยมีขั้นตอนดังนี้

เมื่อเตรียมแผ่นลำไส้ที่ต้องการศึกษาเสร็จแล้ว นำมาใส่ใน continuously perfused micro-Ussing chambers และ incubate นานประมาณ 10-15 นาทีที่เรียบร้อยแล้ว ให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ ทางด้านโพรงลำไส้ (luminal solution) เป็นเวลาประมาณ 3 นาที จากนั้นล้างออกโดยการให้สารละลาย Ringer ประมาณ 10 นาที หรือจนกว่า ค่าการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าจะกลับสู่ค่าเดิมก่อนการให้สารนั้น หรือมีค่าคงที่ จึงจะให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นเดิม (5 $\mu\text{g/ml}$) ทางด้านเลือด (basolateral solution) เป็นเวลาประมาณ 3 นาที แล้วทำการล้างผลของสารเหล่านั้นด้วยสารละลาย Ringer ประมาณ 10 นาที หรือจนกว่า ค่าการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าจะกลับสู่ค่าเดิมก่อนการให้สารนั้น หรือมีค่าคงที่ จากนั้นทดสอบสารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นอื่นๆ เหมือนขั้นตอนที่กล่าวมา ซึ่งจะทำซ้ำเช่นนี้จนเสร็จสิ้นการทดลอง

ค่าการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้า เช่น ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า ค่ากระแสไฟฟ้า และค่าความต้านทาน เป็นต้น จะถูกวัดและบันทึกตลอดการทดลอง เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ค่าทางไฟฟ้า ณ เวลาก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นหนึ่งๆ จะนำมาคำนวณและแปลผลเปรียบเทียบกับนอกจากนั้นผลสารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ จะนำมาเปรียบเทียบกัน

ส่วนที่ 4.

ศึกษาผลเฉียบพลันของสารสกัดกระชายดำต่อการขนถ่ายน้ำและอิเล็กโตรไลต์ผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ (distal colonic epithelium)

จากสรรพคุณของสารสกัดกระชายดำที่ใช้รักษาโรคลม จุกเสียดแน่นท้อง และแก้อาการปวดท้องท้องเดิน เป็นไปได้ว่ากระชายดำอาจมีผลเปลี่ยนแปลงการขนถ่ายน้ำและอิเล็กโตรไลต์ที่เกิดขึ้นในลำไส้ใหญ่ ในภาวะปกติเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่จะดูดซึมโซเดียมจากโพรงลำไส้เข้าสู่กระแสเลือด (sodium absorption) และขนถ่ายคลอไรด์ออกสู่โพรงลำไส้ (chloride secretion) เป็นส่วนใหญ่ จึงแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ส่วนย่อย คือ ศึกษาผลของสารสกัดกระชายดำต่อการดูดซึมโซเดียม และศึกษาผลของสารสกัดกระชายดำต่อการขนถ่ายคลอไรด์ออกสู่โพรงลำไส้

4.1. ศึกษาผลของสารสกัดกระชายดำต่อการดูดซึมโซเดียม (sodium absorption)

เนื่องจากในภาวะปกติ เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่จะทำหน้าที่ดูดซึมโซเดียมอย่างเต็มที่อยู่แล้ว ฉะนั้น การศึกษาผลของการดูดซึมโซเดียม จะศึกษาโดยการให้ตัวยับยั้งการดูดซึมโซเดียม (sodium channel inhibitor, amiloride) ในภาวะที่ไม่มีและมีการเติมสารสกัดกระชายดำในสารละลาย

ขั้นตอน

ตัวยับยั้งการดูดซึมโซเดียม (sodium channel inhibitor, amiloride) ที่ความเข้มข้น $20\ \mu\text{M}$ จะถูกเติมในสารละลายด้านโพรงลำไส้ (mucosal solution) เป็นเวลาประมาณ 2 นาที จากนั้นล้างออกโดยการให้สารละลาย Ringer ประมาณ 15 นาที หรือจนกว่าค่าการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าจะกลับสู่ค่าเดิม หรือมีค่าคงที่ จากนั้นทดสอบโดยให้สารสกัดกระชายดำในสารละลายด้านโพรงลำไส้ก่อน แล้วจึงให้ตัวยับยั้งการดูดซึมโซเดียมพร้อมสารสกัดกระชายดำในด้านโพรงลำไส้ แล้วทำการล้างผลของสารเหล่านั้นด้วยสารละลาย Ringer ประมาณ 15 นาที หรือจนกว่าค่าการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าจะกลับสู่ค่าเดิม หรือมีค่าคงที่ จากนั้นทดสอบโดยให้สารสกัดกระชายดำในสารละลายด้านเลือดก่อนแล้วจึงให้ตัวยับยั้งการดูดซึมโซเดียมพร้อมสารสกัดกระชายดำในด้านโพรงลำไส้

ผลที่ได้จะนำมาเปรียบเทียบดูผลว่ากระชายดำมีผลเปลี่ยนแปลงการดูดซึมโซเดียมหรือไม่อย่างไร

4.2. ศึกษาผลของกระชายดำต่อการขนถ่ายคลอไรด์ (chloride secretion)

เนื่องจากเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้จะขนถ่ายคลอไรด์ออกสู่โพรงลำไส้ จากการกระตุ้นของ cAMP ดังนั้นการศึกษาผลของการขนถ่ายคลอไรด์ จะศึกษาโดยการให้ cyclic AMP เพื่อกระตุ้นให้เกิดการขนถ่ายคลอไรด์ในภาวะที่ไม่มีและมีการเติมสารสกัดกระชายดำในสารละลาย

ขั้นตอน

สาร IBMX และ Forskolin ที่ความเข้มข้น $100\ \mu\text{M}$ และ $2\ \mu\text{M}$ จะเติมในสารละลายด้านโพรงลำไส้ (mucosal solution) เป็นเวลาประมาณ 5 นาที เพื่อเพิ่มระดับ cAMP ภายในเซลล์ ซึ่งจะกระตุ้นการหลั่งคลอไรด์ (cAMP-dependent chloride secretion) จากนั้นล้างออกโดยการให้สารละลาย Ringer ประมาณ 15 นาที หรือจนกว่าค่าการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าจะกลับสู่ค่าเดิม หรือมีค่าคงที่ จากนั้นเติมสาร IBMX และ Forskolin ที่ความเข้มข้น $100\ \mu\text{M}$ และ $2\ \mu\text{M}$ ในสารละลายด้านโพรงลำไส้ พร้อมกับให้สารสกัดกระชายดำในสารละลายด้านโพรงลำไส้ เป็นเวลาประมาณ 5 นาที ทำการล้างออกโดยการให้สารละลาย Ringer ประมาณ 15 นาที หรือจนกว่าค่าการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าจะกลับสู่ค่าเดิม หรือมีค่าคงที่ จากนั้นเติมสาร IBMX และ Forskolin ที่ความเข้มข้น $100\ \mu\text{M}$ และ $2\ \mu\text{M}$ ในสารละลายด้านโพรงลำไส้ พร้อมกับให้สารสกัดกระชายดำในสารละลายด้านเลือด เป็นเวลาประมาณ 5 นาที อีกครั้ง

ผลที่ได้จะนำมาเปรียบเทียบดูว่ากระชายดำมีผลยับยั้งการหลั่งคลอไรด์ชนิดต้องกระตุ้นด้วย cAMP (cAMP-dependent chloride secretion) หรือไม่ อย่างไร

ผลการทดลอง

ผลการทดลองส่วนที่ 1.

ศึกษาผลของสารสกัดกระชายดำต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้โดยวิธีการประเมินเวลาในการขับถ่ายผงถ่าย (the charcoal evacuation time)

ทำการศึกษาผลของสารสกัดกระชายดำทั้งแบบเฉียบพลัน คือประเมินการขับถ่ายผงถ่ายทันทีหลังให้สารสกัดกระชายดำ และแบบระยะสั้น คือให้สารสกัดกระชายดำเป็นเวลา 7 14 และ 21 วัน จึงทำการประเมินการขับถ่ายผงถ่าย

ผลการศึกษาแบบเฉียบพลัน

จากการทดลอง จะเห็นว่าระยะเวลาการขับถ่ายผงถ่ายที่ปนมากับอุจจาระในกลุ่มที่ได้รับการป้อนสารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 30, 60 และ 120 mg/kg น้ำหนักตัว นั้น มีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 1

ตารางที่ 1 ผลของสารสกัดกระชายดำแบบเฉียบพลันต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็กโดยวิธีการประเมินเวลาการขับถ่ายผงถ่าย (the charcoal evacuation time)

Treatment	the charcoal evacuation time (min)
Control	225.33 $\pm$ 18.02
KPE 30 mg/kg	176.56 $\pm$ 14.15 *
KPE 60 mg/kg	153.00 $\pm$ 9.55 *
KPE 120 mg/kg	158.44 $\pm$ 12.36 *

แสดงผลเป็นค่า mean $\pm$ S.E.M, KPE หมายถึง สารสกัดกระชายดำ (*Kaempferia parviflora* extract),

* P < 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, one-way ANOVA with LSD : Post Hoc Test.

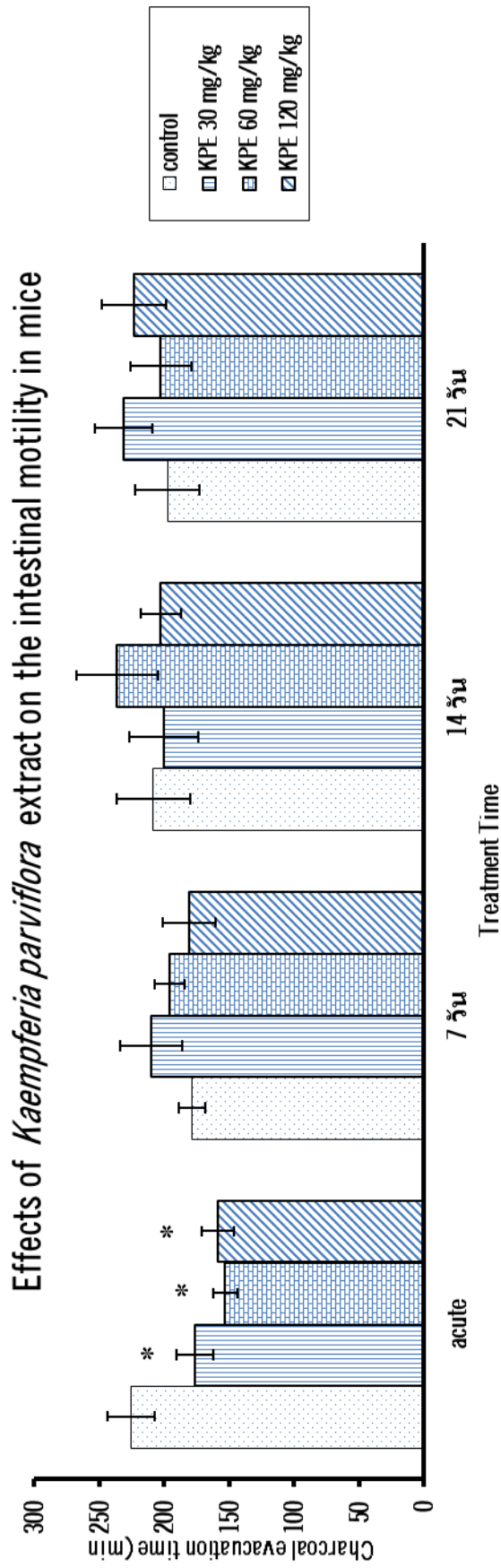
ผลการศึกษาแบบระยะสั้น

ผลการทดลองไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของระยะเวลาขับถ่ายผงถ่ายระหว่างกลุ่มการทดลอง หลังจากหนูทดลองได้รับสารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 30, 60 และ 120 mg/kg น้ำหนักตัว เป็นเวลานาน 7, 14 และ 21 วัน ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 1

ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดกระชายดำแบบระยะสั้นต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็กโดยวิธีการประเมินเวลาการขับถ่ายผงถ่าย (the charcoal evacuation time)

Treatment	the charcoal evacuation time (min)		
	7 วัน	14 วัน	21 วัน
Control	178.46 $\pm$ 10.12	208.08 $\pm$ 28.05	197.31 $\pm$ 24.75
KPE 30 mg/kg	210.00 $\pm$ 23.75	200.00 $\pm$ 26.78	231.07 $\pm$ 22.34
KPE 60 mg/kg	195.77 $\pm$ 11.91	236.15 $\pm$ 31.15	202.50 $\pm$ 23.14
KPE 120 mg/kg	180.63 $\pm$ 20.58	202.31 $\pm$ 15.27	223.46 $\pm$ 24.84

แสดงผลเป็นค่า mean $\pm$ S.E.M, KPE หมายถึง สารสกัดกระชายดำ (*Kaempferia parviflora* extract), one-way ANOVA with LSD : Post Hoc Test.



รูปที่ 1

กราฟแสดงผลเฉียบพลันและระยะสั้น (7, 14 และ 21 วัน) ของสารสกัดกระชายดำต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้โดยวิธีการประเมินเวลาการขับถ่ายผงถ่าน (the charcoal evacuation time) ในหนูเมาส์ แสดงผลเป็นค่า mean $\pm$ S.E.M, KPE หมายถึง สารสกัดกระชายดำ (*Kaempferia parviflora* extract), สถิติที่ใช้คือ one-way ANOVA with LSD Post Hoc Test

ผลการทดลองส่วนที่ 2.

ศึกษาผลเฉียบพลันของสารสกัดกระชายดำต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็กโดยวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของผงถ่าน (the small intestinal propulsion)

ผลการทดลองพบว่าสารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้น 60 mg/kg น้ำหนักตัว มีผลทำให้ ระยะทางการเคลื่อนที่ของผงถ่านออกจากกระเพาะอาหารชั้นลง (วัดจากตำแหน่ง pylorus ของกระเพาะอาหารถึงตำแหน่งที่พบผงถ่าน) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดกระชายดำ และเมื่อคำนวณเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ระยะทางการเคลื่อนที่ (Distance traveled) มีค่าสั้นกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 3 และรูปภาพที่ 2 ด้านล่าง

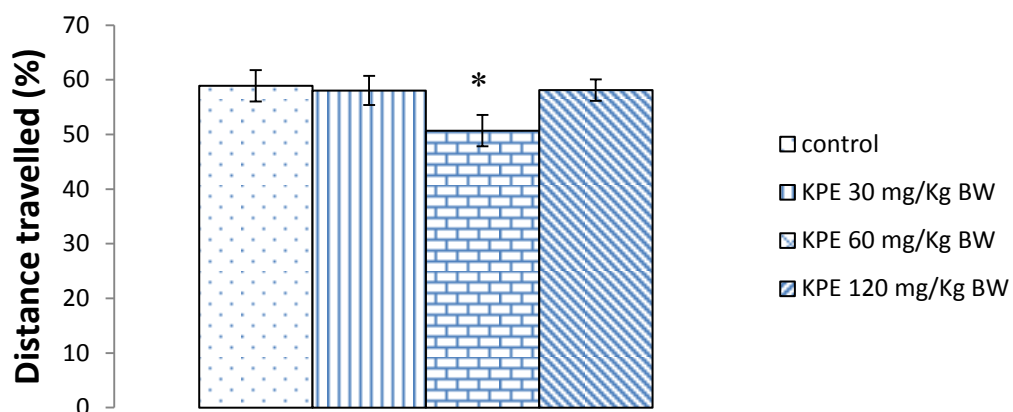
ตารางที่ 3 ผลของสารสกัดกระชายดำต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็กโดยวิธีการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของผงถ่าน (the small intestinal propulsion)

Treatment	Intestinal length (cm)	Distance moved by charcoal (cm)	Distance traveled (%)
Control	48.08 $\pm$ 0.75	28.25 $\pm$ 1.37	58.92 $\pm$ 2.86
KPE 30 mg/kg	47.81 $\pm$ 0.46	27.75 $\pm$ 1.29	58.06 $\pm$ 2.66
KPE 60 mg/kg	49.00 $\pm$ 0.47	24.94 $\pm$ 1.52	50.69 $\pm$ 2.87 *
KPE 120 mg/kg	48.85 $\pm$ 0.46	28.35 $\pm$ 0.93	58.13 $\pm$ 1.98

แสดงผลเป็นค่า mean $\pm$ S.E.M, KPE หมายถึง สารสกัดกระชายดำ (*Kaempferia parviflora* extract),

* P < 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, one-way ANOVA with LSD : Post Hoc Test.

Effects of *Kaempferia parviflora* extract on small intestine propulsion in mice



รูปที่ 2 กราฟแสดงผลของการป้อนสารสกัดกระชายดำเพียงครั้งเดียวต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็ก โดยวิธีการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของผงถ่าน (the small intestinal propulsion) ในหนูเมาส์ (KPE หมายถึง สารสกัดกระชายดำ, * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, one-way ANOVA with LSD : Post Hoc Test.

ผลการทดลองส่วนที่ 3.

ศึกษาผลยับยั้งของสารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางไฟฟ้าของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่

3.1. ผลศึกษาในลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum)

เมื่อให้สารสกัดกระชายดำความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ ไหลผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กส่วน jejunum ทางด้านโพรงลำไส้ (luminal membrane) เป็นเวลา 3 นาที พบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่บันทึก (transepithelial potential, V_{te}) เมื่อเทียบกับค่า V_{te} เริ่มต้นก่อนให้สารสกัดกระชายดำ และเมื่อคำนวณหาค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc} , equivalent short circuit current) ตามกฎของโอห์ม ($V = I \times R$) จากค่า V_{te} และค่าความต้านทานของแผ่นผนังลำไส้ (transmembrane resistance, R_{te}) ที่วัดได้นั้น พบว่าค่า I_{sc} ไม่แตกต่างจากค่า I_{sc} เริ่มต้นก่อนให้สารสกัดกระชายดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1) ซึ่งค่า I_{sc} นี้ใช้แสดงถึงการเคลื่อนที่ของไอออนผ่านเข้าหรือออกจากเซลล์ผนังเยื่อบุลำไส้ได้ จากผลข้างต้นชี้ให้เห็นว่าเมื่อให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ ทางด้านโพรงลำไส้ (luminal membrane) ไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของไอออนผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กส่วน jejunum และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดกระชายดำเป็น 10 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ ผลพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่า V_{te} และค่า I_{sc} เมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้นก่อนให้สารสกัดกระชายดำ (ตารางที่ 4) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดกระชายดำเป็น 100 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าค่า V_{te} และค่า I_{sc} มีค่าเป็นบวกมากขึ้น โดยมีความแตกต่างของค่ากระแสไฟฟ้าก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำ (ΔI_{sc}) เป็น 9.53 ± 5.10 และ 23.24 ± 14.48 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ (รูปที่ 3)

เมื่อให้สารสกัดกระชายดำความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 5, 10, 50, 100 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ ไหลผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กส่วน jejunum ทางด้านเลือด (basolateral membrane) เป็นเวลา 3 นาที ผลการศึกษาไม่พบการเปลี่ยนแปลงค่า V_{te} และค่า I_{sc} เมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้นก่อนให้สารสกัดกระชายดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4 และรูปที่ 4) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดกระชายดำไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของไอออนผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กส่วน jejunum เมื่อให้ทางด้าน basolateral membrane

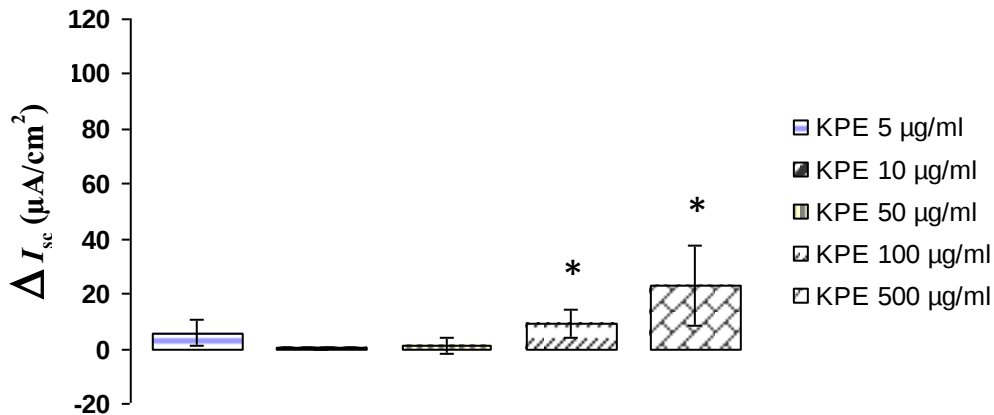
ตารางที่ 4

แสดงการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum)

ความเข้มข้นของสารสกัด กระชายดำ	I_{sc} ก่อนให้สาร สกัด ($\mu A/cm^2$)	I_{sc} หลังให้สารสกัด ($\mu A/cm^2$)	ΔI_{sc} ($\mu A/cm^2$)
KPE 5 $\mu g/ml$, luminal	-302.10 ± 52.01	-296.25 ± 47.10	5.86 ± 4.91
KPE 5 $\mu g/ml$, basolateral	-148.67 ± 28.68	-149.61 ± 27.70	-0.93 ± 0.98
KPE 10 $\mu g/ml$, luminal	-190.90 ± 26.14	-190.79 ± 25.75	0.12 ± 0.36
KPE 10 $\mu g/ml$, basolateral	-171.67 ± 34.60	-166.86 ± 31.19	-1.66 ± 3.07
KPE 50 $\mu g/ml$, luminal	-147.07 ± 54.26	-146.05 ± 51.11	1.02 ± 3.15
KPE 50 $\mu g/ml$, basolateral	-123.31 ± 43.89	-124.61 ± 46.41	-1.30 ± 2.52
KPE 100 $\mu g/ml$, luminal	-138.15 ± 34.93	$-128.62 \pm 30.90 *$	9.53 ± 5.10
KPE 100 $\mu g/ml$, basolateral	-116.73 ± 24.95	-117.04 ± 27.93	-1.31 ± 3.48
KPE 500 $\mu g/ml$, luminal	-126.15 ± 38.83	$-102.91 \pm 24.35 *$	23.24 ± 14.48
KPE 500 $\mu g/ml$, basolateral	-94.86 ± 19.49	-93.46 ± 20.99	1.40 ± 1.50

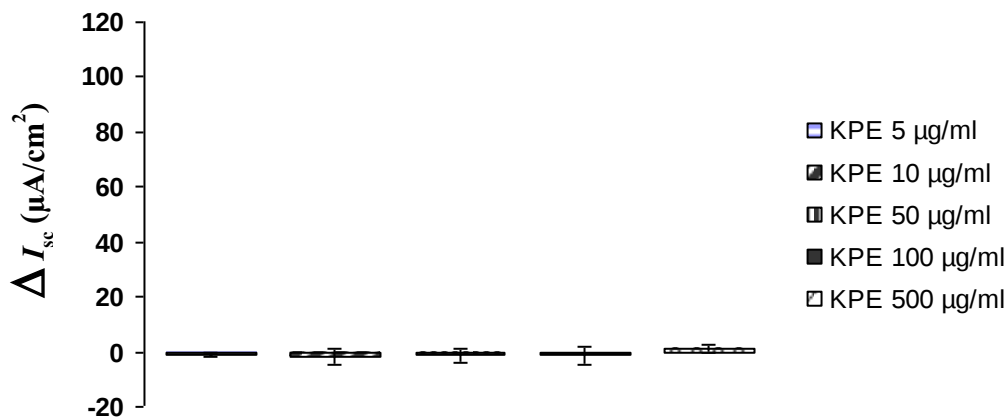
ค่าตัวเลขที่แสดงในตารางเป็นค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc}) ก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าความแตกต่างของกระแสไฟฟ้า (ΔI_{sc}) โดยแสดงเป็นค่า MEAN $\pm$ SEM, $*P < 0.05$ เมื่อเทียบกับค่า I_{sc} ก่อนให้สารโดย pair-Student T-test

Jejunum, apply KPE at luminal side



รูปที่ 3 แสดงค่าความแตกต่าง (ΔI_{sc}) ของค่ากระแสไฟฟ้าก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายทางด้านโพรงลำไส้ (luminal membrane) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum) ในหนู mouse วัยเจริญพันธุ์, * $P < 0.05$ เมื่อ ΔI_{sc} เป็นตัวเลขที่มีค่าแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่า I_{sc} ก่อนให้และหลังให้สารสกัดกระชายดำโดย pair-Student T-test

Jejunum, apply KPE at basolateral side



รูปที่ 4 แสดงค่าความแตกต่าง (ΔI_{sc}) ของค่ากระแสไฟฟ้าก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายทางด้านเลือด (basolateral membrane) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum) ในหนู mouse วัยเจริญพันธุ์, * $P < 0.05$ เมื่อ ΔI_{sc} เป็นตัวเลขที่มีค่าแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่า I_{sc} ก่อนให้และหลังให้สารสกัดกระชายดำโดย pair-Student T-test

3.2. ผลศึกษาในลำไส้เล็กส่วนปลาย (ilium)

เมื่อให้สารสกัดกระชายดำความเข้มข้น 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ไหลผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กส่วน ilium ทางด้านโพรงลำไส้ (luminal membrane) เป็นเวลา 3 นาที ผลพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่า V_{te} และค่า I_{sc} เมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้นก่อนให้สารสกัดกระชายดำ (ตารางที่ 5) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดกระชายดำเป็น 50, 100 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าค่า V_{te} และค่า I_{sc} มีค่าเป็นบวกมากขึ้น โดยมีความแตกต่างของค่ากระแสไฟฟ้าก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำ (ΔI_{sc}) เป็น 8.66 ± 2.66 , 30.33 ± 1.84 และ 55.04 ± 10.04 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ (รูปที่ 5)

เมื่อให้สารสกัดกระชายดำความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ไหลผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กส่วน ilium ทางด้านเลือด (basolateral membrane) เป็นเวลา 3 นาที ผลการศึกษาไม่พบการเปลี่ยนแปลงค่า V_{te} และค่า I_{sc} เมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้นก่อนให้สารสกัดกระชายดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดกระชายดำเป็น 50, 100 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าค่า V_{te} และค่า I_{sc} มีค่าเป็นลบมากขึ้น โดยมีความแตกต่างของค่ากระแสไฟฟ้าก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำ (ΔI_{sc}) เป็น -9.00 ± 1.90 , -6.87 ± 3.01 และ -47.26 ± 7.26 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ (รูปที่ 6)

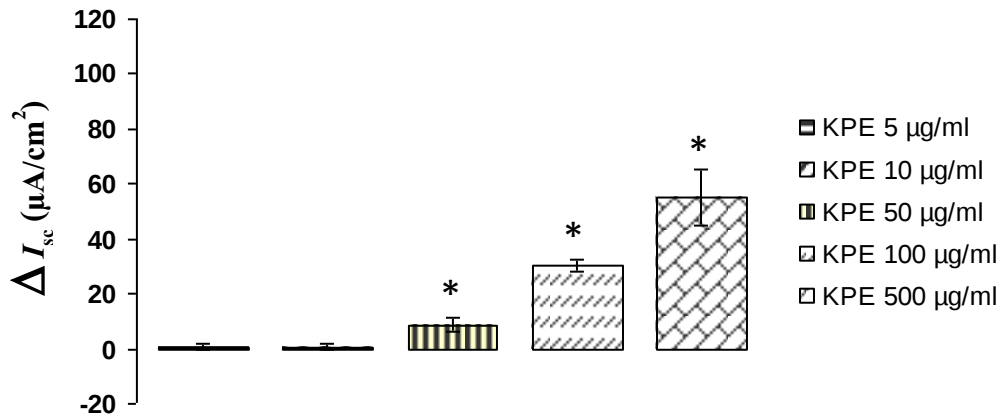
ตารางที่ 5

แสดงการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กส่วนปลาย (ilium)

ความเข้มข้นของสารสกัด กระชายดำ	I_{sc} ก่อนให้สารสกัด ($\mu A/cm^2$)	I_{sc} หลังให้สารสกัด ($\mu A/cm^2$)	ΔI_{sc} ($\mu A/cm^2$)
KPE 5 $\mu g/ml$, luminal	-289.88 ± 62.26	-289.19 ± 63.26	0.69 ± 1.00
KPE 5 $\mu g/ml$, basolateral	-305.25 ± 94.20	-306.46 ± 93.17	-1.21 ± 1.03
KPE 10 $\mu g/ml$, luminal	-248.01 ± 99.96	-247.34 ± 100.99	0.68 ± 1.04
KPE 10 $\mu g/ml$, basolateral	-275.69 ± 78.66	-278.33 ± 80.09	-2.64 ± 1.74
KPE 50 $\mu g/ml$, luminal	-351.51 ± 90.25	$-347.33 \pm 83.11 *$	8.66 ± 2.66
KPE 50 $\mu g/ml$, basolateral	-324.67 ± 69.89	$-333.68 \pm 71.79 *$	-9.00 ± 1.90
KPE 100 $\mu g/ml$, luminal	-277.70 ± 85.94	$-247.37 \pm 84.38 *$	30.00 ± 1.84
KPE 100 $\mu g/ml$, basolateral	-242.52 ± 64.82	$-244.11 \pm 69.70 *$	-6.87 ± 3.01
KPE 500 $\mu g/ml$, luminal	-263.15 ± 157.03	$-218.39 \pm 136.71 *$	55.04 ± 10.04
KPE 500 $\mu g/ml$, basolateral	-267.54 ± 146.49	$-295.15 \pm 173.39 *$	-47.26 ± 7.26

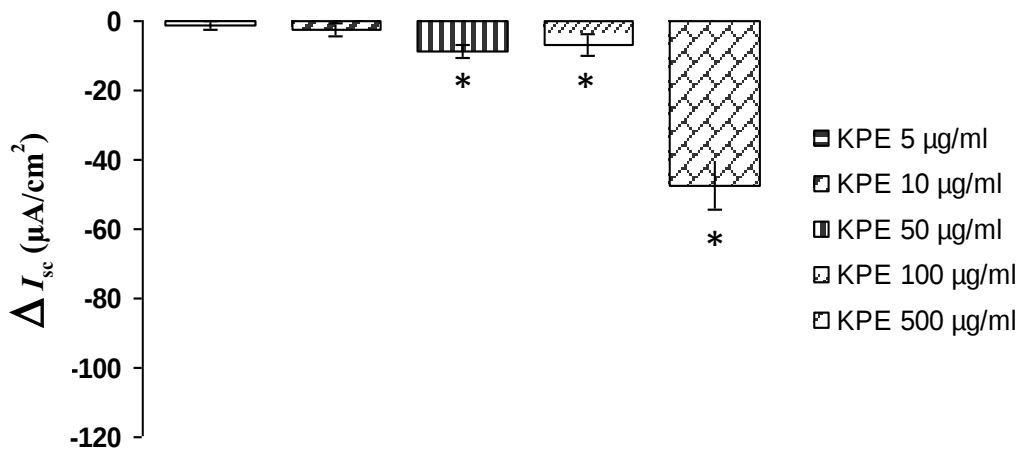
ค่าตัวเลขที่แสดงในตารางเป็นค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc}) ก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าความแตกต่างของกระแสไฟฟ้า (ΔI_{sc}) โดยแสดงเป็นค่า $MEAN \pm SEM$, $n = 5$, $*P < 0.05$ เมื่อเทียบกับค่า I_{sc} ก่อนให้สารโดย pair-Student T-test

Ilium, apply KPE at luminal side



รูปที่ 5 แสดงค่าความแตกต่าง (ΔI_{sc}) ของค่ากระแสไฟฟ้าก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายทางด้านโพรงลำไส้ (luminal membrane) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กส่วนปลาย (ilium) ในหนู mouse วัยเจริญพันธุ์, * $P < 0.05$ เมื่อ ΔI_{sc} เป็นตัวเลขที่มีค่าแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่า I_{sc} ก่อนให้และหลังให้สารสกัดกระชายดำโดย pair-Student T-test

Ilium, apply KPE at basolateral side



รูปที่ 6 แสดงค่าความแตกต่าง (ΔI_{sc}) ของค่ากระแสไฟฟ้าก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายทางด้านเลือด (basolateral membrane) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กส่วนปลาย (ilium) ในหนู mouse วัยเจริญพันธุ์, * $P < 0.05$ เมื่อ ΔI_{sc} เป็นตัวเลขที่มีค่าแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่า I_{sc} ก่อนให้และหลังให้สารสกัดกระชายดำโดย pair-Student T-test

3.3. ผลศึกษาในลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (proximal colon)

เมื่อให้สารสกัดกระชายดำความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 5, 10, 50, 100 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ ไหลผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (proximal colon) ทางด้านโพรงลำไส้ (luminal membrane) เป็นเวลา 3 นาที ผลการศึกษาไม่พบการเปลี่ยนแปลงค่า V_{te} และค่า I_{sc} เมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้นก่อนให้สารสกัดกระชายดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 6 และรูปที่ 7) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดกระชายดำไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของไอออนผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (proximal colon) เมื่อให้ทางด้าน luminal membrane

เมื่อให้สารสกัดกระชายดำความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 5, 10 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ ไหลผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (proximal colon) ทางด้านเลือด (basolateral membrane) เป็นเวลา 3 นาที ผลการศึกษาไม่พบการเปลี่ยนแปลงค่า V_{te} และค่า I_{sc} เมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้นก่อนให้สารสกัดกระชายดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 6) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดกระชายดำเป็น 100 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าค่า V_{te} และค่า I_{sc} มีค่าเป็นลบมากขึ้น โดยมีความแตกต่างของค่ากระแสไฟฟ้าก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำ (ΔI_{sc}) เป็น -61.52 ± 29.98 และ -66.21 ± 21.45 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ดังแสดงในรูปภาพที่ 8)

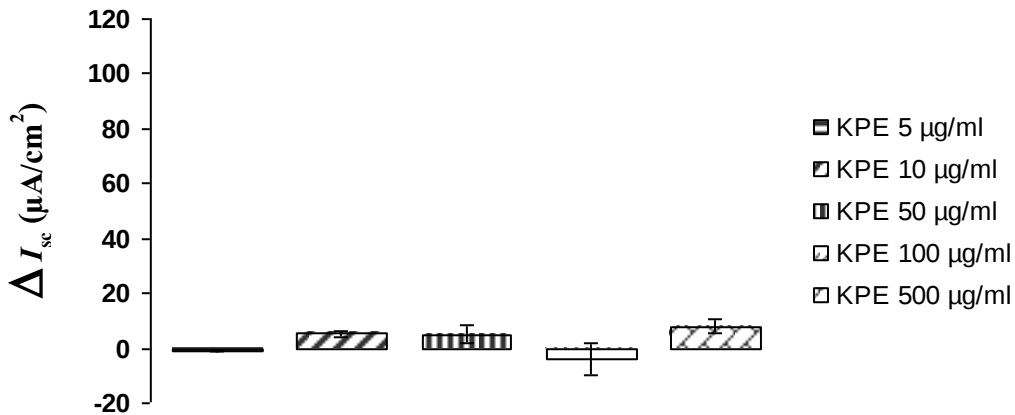
ตารางที่ 6

แสดงการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (proximal colon)

ความเข้มข้นของสารสกัด กระชายดำ	I_{sc} ก่อนให้สารสกัด ($\mu A/cm^2$)	I_{sc} หลังให้สารสกัด ($\mu A/cm^2$)	ΔI_{sc} ($\mu A/cm^2$)
KPE 5 $\mu g/ml$, luminal	-279.24 ± 67.75	-280.42 ± 67.96	-1.18 ± 0.21
KPE 5 $\mu g/ml$, basolateral	-277.89 ± 65.81	-276.98 ± 67.77	0.91 ± 1.95
KPE 10 $\mu g/ml$, luminal	-171.48 ± 50.95	-166.31 ± 52.11	5.18 ± 1.17
KPE 10 $\mu g/ml$, basolateral	-156.39 ± 72.78	-160.25 ± 81.07	-2.58 ± 4.96
KPE 50 $\mu g/ml$, luminal	-92.29 ± 12.97	-87.43 ± 16.24	4.87 ± 3.28
KPE 50 $\mu g/ml$, basolateral	-179.81 ± 116.65	-179.75 ± 123.23	2.06 ± 6.58
KPE 100 $\mu g/ml$, luminal	-89.73 ± 36.09	-93.28 ± 46.43	-4.10 ± 5.90
KPE 100 $\mu g/ml$, basolateral	-166.41 ± 68.95	$-227.93 \pm 94.14 *$	-61.52 ± 29.98
KPE 500 $\mu g/ml$, luminal	-104.89 ± 43.80	-96.92 ± 41.13	7.98 ± 2.67
KPE 500 $\mu g/ml$, basolateral	-98.74 ± 45.64	$-164.94 \pm 67.10 *$	-66.21 ± 21.45

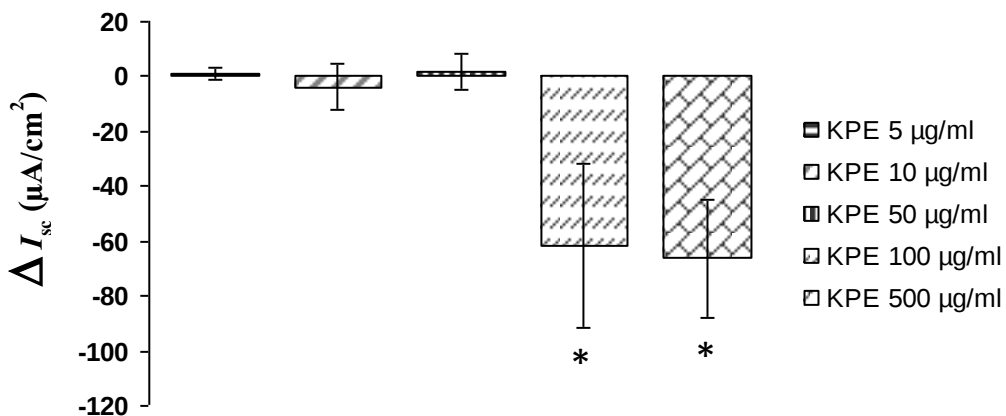
ค่าตัวเลขที่แสดงในตารางเป็นค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc}) ก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าความแตกต่างของกระแสไฟฟ้า (ΔI_{sc}) โดยแสดงเป็นค่า MEAN $\pm$ SEM, $*P<0.05$ เมื่อเทียบกับค่า I_{sc} ก่อนให้สารโดย pair-Student T-test

Proximal Colon, apply KPE at luminal side



รูปที่ 7 แสดงค่าความแตกต่าง (ΔI_{sc}) ของค่ากระแสไฟฟ้าก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายทางด้านโพรงลำไส้ (luminal membrane) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (proximal colon) ในหนู mouse วัยเจริญพันธุ์, * $P < 0.05$ เมื่อ ΔI_{sc} เป็นตัวเลขที่มีค่าแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่า I_{sc} ก่อนให้และหลังให้สารสกัดกระชายดำโดย pair-Student T-test

Proximal Colon, apply KPE at basolateral side



รูปที่ 8 แสดงค่าความแตกต่าง (ΔI_{sc}) ของค่ากระแสไฟฟ้าก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายทางด้านเลือด (basolateral membrane) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (proximal colon) ในหนู mouse วัยเจริญพันธุ์, * $P < 0.05$ เมื่อ ΔI_{sc} เป็นตัวเลขที่มีค่าแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่า I_{sc} ก่อนให้และหลังให้สารสกัดกระชายดำโดย pair-Student T-test

3.4. ผลศึกษาในลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal colon)

เมื่อให้สารสกัดกระชายดำความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ไหลผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal colon) ทางด้านโพรงลำไส้ (luminal membrane) เป็นเวลา 3 นาที ผลการศึกษาไม่พบการเปลี่ยนแปลงค่า V_{te} และค่า I_{sc} เมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้นก่อนให้สารสกัดกระชายดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดกระชายดำเป็น 50, 100 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าค่า V_{te} และค่า I_{sc} มีค่าเป็นลบมากขึ้น โดยมีความแตกต่างของค่ากระแสไฟฟ้าก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำ (ΔI_{sc}) เป็น $-11.74 \pm 3.95 \mu\text{g/ml}$ และ $-22.95 \pm 9.49 \mu\text{g/ml}$ และ $-26.66 \pm 6.45 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 7 และ รูปที่ 9

เมื่อให้สารสกัดกระชายดำความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ไหลผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal colon) ทางด้านเลือด (basolateral membrane) เป็นเวลา 3 นาที ผลการศึกษาไม่พบการเปลี่ยนแปลงค่า V_{te} และค่า I_{sc} เมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้นก่อนให้สารสกัดกระชายดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดกระชายดำเป็น 50, 100 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าค่า V_{te} และค่า I_{sc} มีค่าเป็นลบมากขึ้น โดยมีความแตกต่างของค่ากระแสไฟฟ้าก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำ (ΔI_{sc}) เป็น $-6.95 \pm 1.40 \mu\text{g/ml}$ และ $-17.56 \pm 6.29 \mu\text{g/ml}$ และ $-31.18 \pm 13.38 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ตารางที่ 7 และ รูปที่ 10

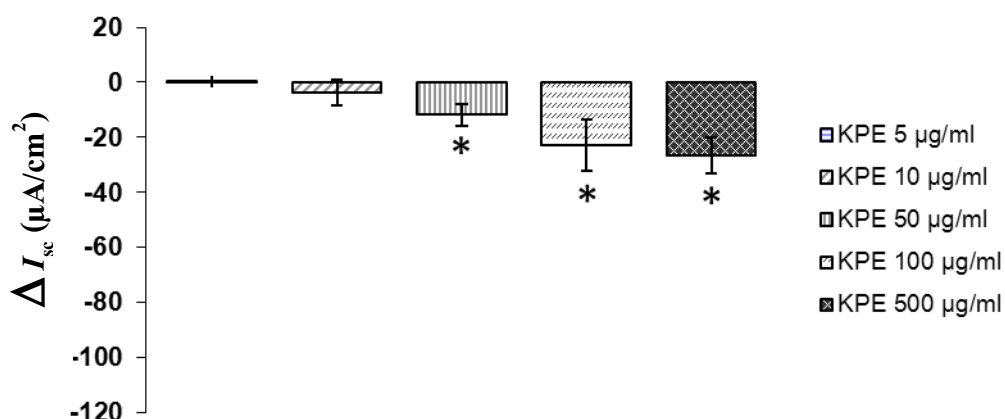
ตารางที่ 7

แสดงการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal colon)

ความเข้มข้นของสารสกัด กระชายดำ	I_{sc} ก่อนให้สารสกัด ($\mu A/cm^2$)	I_{sc} หลังให้สารสกัด ($\mu A/cm^2$)	ΔI_{sc} ($\mu A/cm^2$)
KPE 5 $\mu g/ml$, luminal	-76.50 ± 16.60	-76.50 ± 15.52	0.44 ± 2.11
KPE 5 $\mu g/ml$, basolateral	-57.08 ± 9.03	-59.61 ± 9.65	-2.53 ± 1.90
KPE 10 $\mu g/ml$, luminal	-72.42 ± 14.19	-76.12 ± 12.25	-3.69 ± 4.49
KPE 10 $\mu g/ml$, basolateral	-74.35 ± 12.37	-74.14 ± 12.65	0.22 ± 2.75
KPE 50 $\mu g/ml$, luminal	-83.44 ± 11.55	-95.18 ± 11.82	$-11.74 \pm 3.95^*$
KPE 50 $\mu g/ml$, basolateral	-67.82 ± 11.19	-74.77 ± 10.61	$-6.95 \pm 1.40^*$
KPE 100 $\mu g/ml$, luminal	-98.49 ± 10.77	-121.44 ± 15.38	$-22.95 \pm 9.49^*$
KPE 100 $\mu g/ml$, basolateral	-82.94 ± 12.55	-100.50 ± 10.17	$-17.56 \pm 6.29^*$
KPE 500 $\mu g/ml$, luminal	-74.00 ± 12.00	-100.67 ± 12.68	$-26.66 \pm 6.45^*$
KPE 500 $\mu g/ml$, basolateral	-70.47 ± 13.78	-101.65 ± 15.78	$-31.18 \pm 13.38^*$

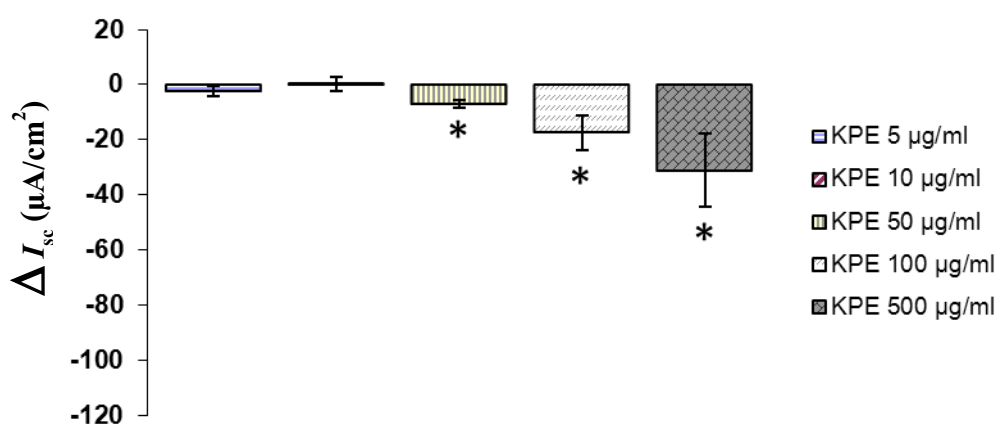
ค่าตัวเลขที่แสดงในตารางเป็นค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc}) ก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าความแตกต่างของกระแสไฟฟ้า (ΔI_{sc}) โดยแสดงเป็นค่า MEAN $\pm$ SEM, $*P < 0.05$ เมื่อเทียบกับค่า I_{sc} ก่อนให้สารโดย pair-Student T-test

Distal Colon, Apply KPE in luminal solution



รูปที่ 9 แสดงค่าความแตกต่าง (ΔI_{sc}) ของค่ากระแสไฟฟ้าก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายทางด้านโพรงลำไส้ (luminal membrane) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal colon) ในหนู mouse วัยเจริญพันธุ์, * $P < 0.05$ เมื่อ ΔI_{sc} เป็นตัวเลขที่มีค่าแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่า I_{sc} ก่อนให้และหลังให้สารสกัดกระชายดำโดย pair-Student T-test

Distal Colon, apply KPE at basolateral side



รูปที่ 10 แสดงค่าความแตกต่าง (ΔI_{sc}) ของค่ากระแสไฟฟ้าก่อนและหลังให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายทางด้านเลือด (basolateral membrane) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal colon) ในหนู mouse วัยเจริญพันธุ์, * $P < 0.05$ เมื่อ ΔI_{sc} เป็นตัวเลขที่มีค่าแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่า I_{sc} ก่อนให้และหลังให้สารสกัดกระชายดำโดย pair-Student T-test

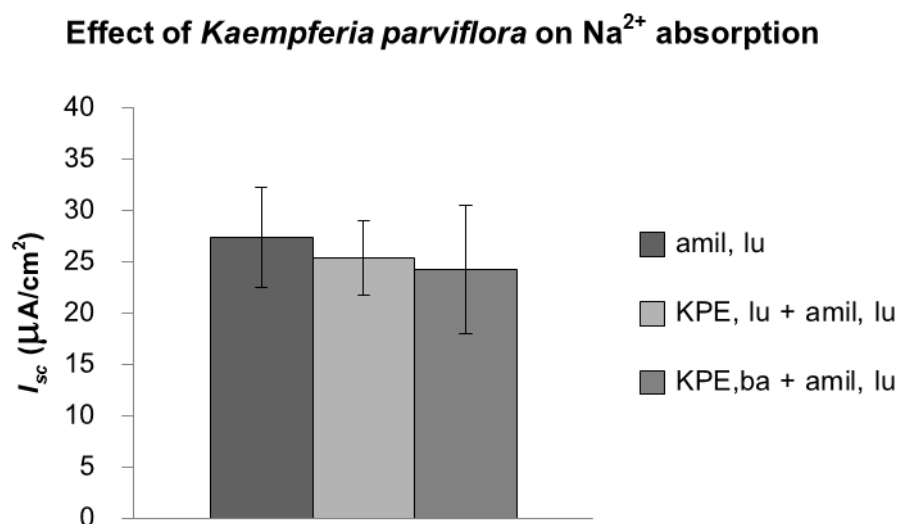
ผลการทดลองส่วนที่ 4.

ศึกษาผลเฉียบพลันของสารสกัดกระชายดำต่อการขนถ่ายน้ำและอิเล็กโตรไลต์ผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ (distal colonic epithelium)

4.1. ศึกษาผลของสารสกัดกระชายดำต่อการดูดซึมโซเดียม (sodium absorption)

เมื่อให้สารละลาย Ringer ที่มีสาร amiloride (amil) ปริมาณ 20 μM ซึ่งเป็นสารยับยั้งการดูดซึมโซเดียมผ่านทางช่องโซเดียม (Epithelial Na Channel, ENaC) ทางด้านโพรงลำไส้ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความต่างศักย์ (transepithelial voltage) คือมีค่าเป็นบวกมากขึ้น และเมื่อคำนวณตาม ohm's law ได้ค่ากระแสไฟฟ้า (short circuit current, I_{sc}) มีค่าเป็นบวกมากขึ้น เมื่อเทียบกับก่อนให้สาร ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการยับยั้งการดูดซึมโซเดียมเกิดขึ้น ดังแสดงในรูปภาพที่ 9 แท่งกราฟด้านซ้าย

เมื่อให้สารละลาย Ringer ที่มีสาร amiloride (amil) ปริมาณ 20 μM และมีสารสกัดกระชายดำความเข้มข้น 100 mg/ml ทางด้านโพรงลำไส้ (แท่งกราฟกลาง) หรือ ทางด้านเลือด (แท่งกราฟด้านขวา) ผลการทดลองพบว่า ค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc}) ที่เกิดขึ้น ไม่แตกต่างจากค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดจากการให้ amiloride เพียงอย่างเดียว

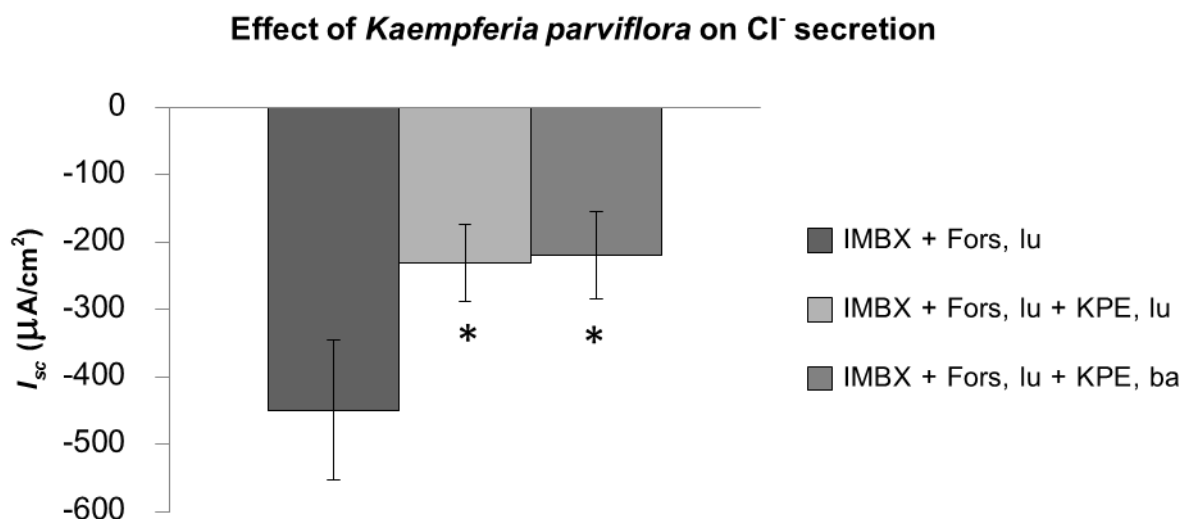


รูปที่ 11 แสดงค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc}) ที่เปลี่ยนแปลงเมื่อให้สาร amiloride 20 μM ทางด้านโพรงลำไส้ (amil, lu) เมื่อให้สารสกัดกระชายความเข้มข้น 100 mg/ml พร้อมกับสาร amiloride 20 μM ทางด้านโพรงลำไส้ (KPE, lu + amil, lu) และเมื่อให้สารสกัดกระชายความเข้มข้น 100 mg/ml ทางด้านเลือด พร้อมกับสาร amiloride 20 μM ทางด้านโพรงลำไส้ (KPE, ba + amil, lu) ผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal colon) ในหนู mouse วัยเจริญพันธุ์

4.2. ศึกษาผลของกระชายดำต่อการขนส่งคลอไรด์ (chloride secretion)

เมื่อให้สารละลาย Ringer ที่มีสาร IBMX 100 μM และ Forskolin 2 μM ทางด้านโพรงลำไส้ (IBMX + Fors, lu) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความต่างศักย์ (transepithelial voltage) คือมีค่าเป็นลบมากขึ้น และเมื่อคำนวณตาม ohm's law ได้ค่ากระแสไฟฟ้า (short circuit current, I_{sc}) มีค่าเป็นลบมากขึ้น เมื่อเทียบกับก่อนให้สาร ซึ่งแสดงว่ามีการขนส่งคลอไรด์ออกสู่โพรงลำไส้ ดังกราฟทางด้านซ้าย ในรูปภาพที่ 10

เมื่อให้สารละลาย Ringer ที่มีสาร IBMX 100 μM และ Forskolin 2 μM ทางด้านโพรงลำไส้ และมีสารสกัดกระชายดำความเข้มข้น 100 mg/ml ทางด้านโพรงลำไส้ (แท่งกราฟกลาง) หรือ ทางด้านเลือด (แท่งกราฟด้านขวา) ผลการทดลองพบว่า ค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc}) ที่เกิดขึ้นมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดจากการให้สาร IBMX 100 μM และ Forskolin 2 μM เพียงอย่างเดียว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 12 แสดงค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc}) ที่เปลี่ยนแปลงเมื่อให้สาร IBMX 100 μM และ Forskolin 2 μM ทางด้านโพรงลำไส้ (IBMX + Fors, lu) เมื่อให้สารสกัดกระชายดำความเข้มข้น 100 mg/ml พร้อมกับสาร IBMX 100 μM และ Forskolin 2 μM ทางด้านโพรงลำไส้ (IBMX + Fors, lu + KPE, lu) และเมื่อให้สารสกัดกระชายดำความเข้มข้น 100 mg/ml ทางด้านเลือดพร้อมกับสาร IBMX 100 μM และ Forskolin 2 μM ทางด้านโพรงลำไส้ (IBMX + Fors, lu + KPE, ba) ผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal colon) ในหนู mouse วิจัยเจริญพันธุ์ * $P < 0.05$ เมื่อ I_{sc} เป็นตัวเลขที่มีค่าแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่า I_{sc} เมื่อให้สาร IBMX 100 μM และ Forskolin 2 μM ทางด้านโพรงลำไส้ (IBMX + Fors, lu) โดย pair-Student T-test

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการศึกษาในส่วนที่ 1 ศึกษาผลของสารสกัดกระชายดำต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้โดยวิธีการวัดการประเมินเวลาในการขับถ่ายผงถ่าน (the charcoal evacuation time) นั้น พบว่าเมื่อให้สารสกัดกระชายดำแบบเฉียบพลันที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 30, 60 และ 120 mg/kg น้ำหนักตัว ระยะเวลาการขับถ่ายผงถ่านที่ปนมากับอุจจาระในกลุ่มที่ได้รับการป้อนสารสกัดกระชายดำ มีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดกระชายดำ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แปลความหมายได้ว่า สารสกัดกระชายดำมีผลเฉียบพลันทำให้หนูทดลองขับถ่ายผงถ่านได้เร็วกว่าปกติ โดยมีผลเพิ่มการเคลื่อนไหวของลำไส้โดยรวม ทำให้เกิดการขับถ่ายเร็วขึ้น ระยะเวลาในการขับถ่ายอุจจาระจะนานหรือเร็วนั้น ส่วนหนึ่งขึ้นกับการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ ถ้าลำไส้มีการเคลื่อนไหวมากจะส่งผลให้เกิดการขับถ่ายได้เร็วขึ้น ในทางกลับกัน ถ้าลำไส้เกิดเคลื่อนไหวน้อย จะมีผลให้อาหารและกากอาหารเคลื่อนที่ผ่านลำไส้ได้ช้าและส่งผลให้การขับถ่ายช้าลงได้ แต่เมื่อให้สารสกัดกระชายดำเป็นเวลานานขึ้นในระยะสั้น คือ 7, 14 และ 21 วันนั้น ผลการทดลองไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของระยะเวลารับถ่ายผงถ่านระหว่างกลุ่มการทดลอง แสดงว่าเมื่อให้สารสกัดกระชายดำเป็นเวลานานขึ้นในระยะสั้นๆ นั้น ไม่มีผลต่อการขับถ่ายของหนูทดลอง ซึ่งอาจแปลความหมายได้ว่าสารสกัดกระชายดำคงไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนไหวของลำไส้โดยรวมเมื่อได้รับสารสกัดกระชายดำในระยะสั้น

จากผลการศึกษาในส่วนที่ 2 ศึกษาผลเฉียบพลันของสารสกัดกระชายดำต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็กโดยวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของผงถ่าน (the small intestinal propulsion) ผลการทดลองพบว่าสารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้น 60 mg/kg น้ำหนักตัว มีผลทำให้ ระยะทางการเคลื่อนที่ของผงถ่านออกจากกระเพาะอาหารสั้นลง (วัดจากตำแหน่ง pylorus ของกระเพาะอาหารถึงตำแหน่งที่พบผงถ่าน) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดกระชายดำ และเมื่อคำนวณเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ระยะทางการเคลื่อนที่ (Distance traveled) มีค่าสั้นกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งหมายความว่า สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้น 60 mg/ml มีผลลดการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็ก ส่วนสารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้น 30 และ 120 mg/ml ไม่มีผลต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็ก

จากผลการศึกษานี้ สรุปได้ว่าสารสกัดกระชายดำมีผลเฉียบพลันทำให้ขับถ่ายเร็วขึ้น โดยมีผลลดการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็ก ดังนั้นเป็นไปได้ว่าอาจมีผลกระตุ้นการการขับถ่ายโดยเพิ่มการเคลื่อนไหวของลำไส้ใหญ่แทน

การศึกษาในส่วนที่ 3 เป็นการศึกษาผลเฉียบพลันของสารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางไฟฟ้าของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ เพื่อประเมินว่าสาร

สารสกัดกระชายดำมีผลอย่างไรต่อการทำงานของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ส่วนต่างๆ จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดกระชายดำมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าศักย์ไฟฟ้า (V_{te}) และค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc}) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ส่วนต่างๆ แตกต่างกัน คือ

ในลำไส้เล็กส่วน jejunum สารสกัดกระชายดำไม่มีผลใดต่อค่าศักย์ไฟฟ้า (V_{te}) และค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc}) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ เมื่อให้สารสกัดทางด้าน basolateral membrane และเมื่อให้สารสกัดทางด้าน luminal membrane เฉพาะที่ความเข้มข้นสูง คือ 100 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ สารสกัดกระชายดำมีผลให้ค่าศักย์ไฟฟ้า (V_{te}) และค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc}) เป็นบวกมากขึ้น

ในลำไส้เล็กส่วน ileum การให้สารสกัดกระชายดำทางด้าน basolateral membrane หรือทางด้าน luminal membrane ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าศักย์ไฟฟ้า (V_{te}) และค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc}) แตกต่างกัน คือเมื่อให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ ทางด้าน luminal membrane มีผลให้ค่าศักย์ไฟฟ้า (V_{te}) และค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc}) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เป็นบวกมากขึ้น แต่เมื่อให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ ทางด้าน basolateral membrane มีผลให้ค่าศักย์ไฟฟ้า (V_{te}) และค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc}) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เป็นลบมากขึ้น

ในลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (proximal colon) เมื่อให้สารสกัดกระชายดำทางด้าน luminal membrane ไม่ว่าที่ความเข้มข้นใดใด ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าศักย์ไฟฟ้า (V_{te}) และค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc}) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ แต่เมื่อให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นสูง คือ 100 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ ทางด้าน basolateral membrane ส่งผลให้ค่าศักย์ไฟฟ้า (V_{te}) และค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc}) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เป็นลบมากขึ้น

ในลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal colon) สารสกัดกระชายดำมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าศักย์ไฟฟ้า (V_{te}) และค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc}) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เหมือนกัน ไม่ว่าจะให้สารสกัดกระชายดำทางด้าน luminal membrane หรือ ทางด้าน basolateral membrane คือ เมื่อให้สารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้น 50 100 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ มีผลให้ค่าศักย์ไฟฟ้า (V_{te}) และค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc}) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เป็นลบมากขึ้น

การที่ค่าศักย์ไฟฟ้า (V_{te}) และค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc}) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เป็นบวกหรือเป็นลบมากขึ้นนั้น สามารถบ่งบอกถึงการเคลื่อนที่ของไอออนที่มีประจุบวก และ/หรือ ประจุลบ ได้หลายกรณี คือ ถ้าค่าศักย์ไฟฟ้า (V_{te}) และค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc}) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เป็นบวกมากขึ้น แสดงถึงการขนส่งไอออนที่มีประจุบวก เช่น โพแทสเซียม ออกซิฟรอนลำไส้มากขึ้น หรือ มีการยับยั้งการขนส่ง

ลำไส้เล็กส่วน jejunum และ ileum ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีหน้าที่ในการดูดซึมสารอาหารสำคัญๆ เข้าสู่ร่างกาย เช่น น้ำตาลกลูโคส กรดอะมิโน และวิตามินบี 12 เป็นต้น และการดูดซึมสารอาหาร เหล่านั้น ส่วนมากมักถูกดูดซึมพร้อมกับโซเดียม จากผลการศึกษาที่พบว่าสารสกัดกระชายดำมีผลให้ค่า ศักย์ไฟฟ้า (V_{te}) และค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc}) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ส่วน jejunum และ ileum เป็นบวก มากขึ้นเมื่อให้ทางดำโนพรงลำไส้ นั้น อาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดกระชายดำมีผลลดการดูดซึมสารอาหาร หรือ มีผลลดการขนส่งถ่ายคลอไรด์ออกสู่โพรงลำไส้ ส่วนผลการศึกษาที่พบว่าสารสกัดกระชายดำมีผลให้ ค่าศักย์ไฟฟ้า (V_{te}) และค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc}) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ส่วน ileum เป็นลบมากขึ้นเมื่อให้ ทางดำโนเล็ดนั้น อาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดกระชายดำมีผลเพิ่มการดูดซึมสารอาหาร หรือ มีผลเพิ่มการ ขนถ่ายคลอไรด์ออกสู่โพรงลำไส้ ซึ่งผลที่แน่ชัดนั้นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

จากผลการศึกษาในส่วนที่ 4 ศึกษาผลเฉียบพลันของสารสกัดกระชายดำต่อการขนส่งน้ำและอิเลคโตรไลต์ผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ (distal colonic epithelium) นั้น ผลการทดลองพบว่า เมื่อให้สารยับยั้งการดูดซึมโซเดียมทางด้าน luminal membrane เพียงอย่างเดียว (amiloride 20 μM) หรือเมื่อให้สารยับยั้งการดูดซึมโซเดียมทางด้าน luminal membrane พร้อมกับสารสกัดกระชายดำ ไม่ว่าจะให้ทางด้าน luminal membrane หรือด้าน basolateral membrane นั้น ไม่ทำให้ค่ากระแสไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงไปนั้น แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สรุปได้ว่า สารสกัดกระชายดำไม่มีผลต่อการดูดซึมโซเดียมเข้าสู่เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย ส่วนการทดลองเมื่อให้สาร IBMX 100 μM และ Forskolin 2 μM ทางด้านโพรงลำไส้ จะทำให้ระดับ cAMP ภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เกิด

การกระตุ้นการขนส่งคลอไรด์ออกสู่โพรงลำไส้ เห็นได้จากการเปลี่ยนแปลงค่ากระแสไฟฟ้า (I_{sc}) ที่เป็นลบมากขึ้น และเมื่อให้สาร IBMX 100 μM และ Forskolin 2 μM พร้อมกับสารสกัดกระชายดำไม่ว่าให้ทางด้าน luminal membrane หรือ ด้าน basolateral membrane ผลพบว่า ค่ากระแสไฟฟ้ามีค่าเป็นลบลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากระแสไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงจากการให้สาร IBMX 100 μM และ Forskolin 2 μM เพียงอย่างเดียว เป็นไปได้ว่าสารสกัดกระชายดำมีผลยับยั้งการขนส่งคลอไรด์ออกสู่โพรงลำไส้ หรือ อาจมีผลกระตุ้นการหลั่งโปแทสเซียมออกสู่โพรงลำไส้ทำให้เห็นผลว่ามีค่ากระแสไฟฟ้าเป็นลบลดลง แต่จากการศึกษาในส่วนที่ 3 ที่เมื่อให้สารสกัดกระชายดำต่อเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ส่วนปลายโดยตรงแล้วพบว่าผลทำให้ค่ากระแสไฟฟ้าเป็นลบมากขึ้น จึงสรุปได้ว่า สารสกัดกระชายดำน่าจะมีผลยับยั้งการขนส่งคลอไรด์ออกสู่โพรงลำไส้ มากกว่ามีผลกระตุ้นการหลั่งโปแทสเซียมเข้าสู่โพรงลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย

จากผลการศึกษาวิจัยนี้ สรุปได้ว่าสารสกัดกระชายดำมีผลยับยั้งการขนส่งคลอไรด์ออกสู่โพรงลำไส้ มีผลลดการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็ก มีผลต่อการทำงานของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ส่วนต่างๆ แตกต่างกัน โดยไม่มีผลต่อการดูดซึมโซเดียม แต่มีผลลดการขนส่งคลอไรด์ในลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย

เอกสารอ้างอิง

1. Yenjai C, Prasanphen K, Daodee S, Wongpanich V, Kittakoop P. Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. *Fitoterapia* 75: 89-92, 2004.
2. Sutthanut K, Sripanidkulchai B, Yenjai C, Jay M. Simultaneous identification and quantitation of 11 flavonoid constituents in *Kaempferia parviflora* by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1143: 227–233, 2007.
3. Wen X, Walle T. Methylated Flavonoids Have Greatly Improved Intestinal Absorption and Metabolic Stability. *Drug Metabolism and Disposition*. 2006.
4. Schuier M, Sies H, Illek B, Fischer H. Cocoa-Related Flavonoids Inhibit CFTR-Mediated Chloride Transport across T84 Human Colon Epithelia. *The Journal of Nutrition*. 135: 2320–2325, 2005.
5. Cermak R, Follmer U, Wolfram S. Dietary flavonol quercetin induces chloride secretion in rat colon. *American Journal of Physiology (Gastrointestinal and Liver Physiology)*. 38: G1166–G1172, 1998.
6. Stumpel F, Scholtka B, Hunger A. Enteric glucagon 37 rather than pancreatic glucagon 29 stimulates glucose absorption in rat intestine. *Gastroenterol* 115:1163–1171, 1998
7. Binder HJ, McGlone F, Sandle GI. Effects of corticosteroid hormones on the electrophysiology of rat distal colon: implications for Na^+ and K^+ transport. *The Journal of Physiology*. 410: 425-441, 1989.
8. Chang EB, Rao MC. Intestinal water and electrolyte transport. In *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 3rd ed., Vol. II, ed. Johnson LR, Raven Press, New York pp. 2231-2252.
9. Greger R. Role of CFTR in the colon. *Annual Review of Physiology*. 62: 467-491, 2000.
10. Warth R, Hamm K, Bleich M, Kunzelmann K, vonHahn T, Schreiber R, Ullrich E, Mengel M, Trautmann N, Kindle P, Schwab A, Greger R. Molecular and functional characterization of the small Ca^{2+} -regulated K^+ channel (rSk4) of colonic crypts. *Pflugers Arch*. 438: 437-444, 1999.
11. Marona HR, Lucchesi MB. Protocol to refine intestinal motility test in mice. *Laboratory Animals*. 38: 257-260, 2004.
12. De Oliveira GM, de Melo Medeiros M, da Silva Batista W, Santana R, Araujo-Jorge TC, de Souza AP. Applicability of the use of charcoal for the evaluation of intestinal motility in murine model of *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology Research*. 102: 747-750, 2008.

13. Wong CL, Way MK. Effect of aspirin and paracetamol on naloxone reversal of morphine-induced inhibition of gastrointestinal propulsion in mice. *European Journal of Pharmacology*. 73: 11-19, 1981.
14. Salah AM, Gathumbi J, Vierling W. Inhibition of intestinal motility by methanol extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) in rats. *Phytochemistry Research*. 16: 283-285, 2002.