บทที่ 2

อุปกรณ์ และ วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง เครื่องมือและสารเคมี

1. สัตว์ทดลอง จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ต. ศาลายา กิ่ง อ. พุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม

หนูขาวพันธุ์ Wistar rat เพศผู้	น้ำหนัก	170 - 220	กรัม
หนูตะเภา เพศใดก็ได้	น้ำหนัก	250 - 300	กรัม
หนูถีบจักร เพศผู้	น้ำหนัก	20 - 25	กรัม

ให้หนูตะเภาและหนูถีบจักรอดอาหารก่อนทำการทดลอง 14 - 16 ชั่วโมง ให้น้ำเพียงอย่างเดียว

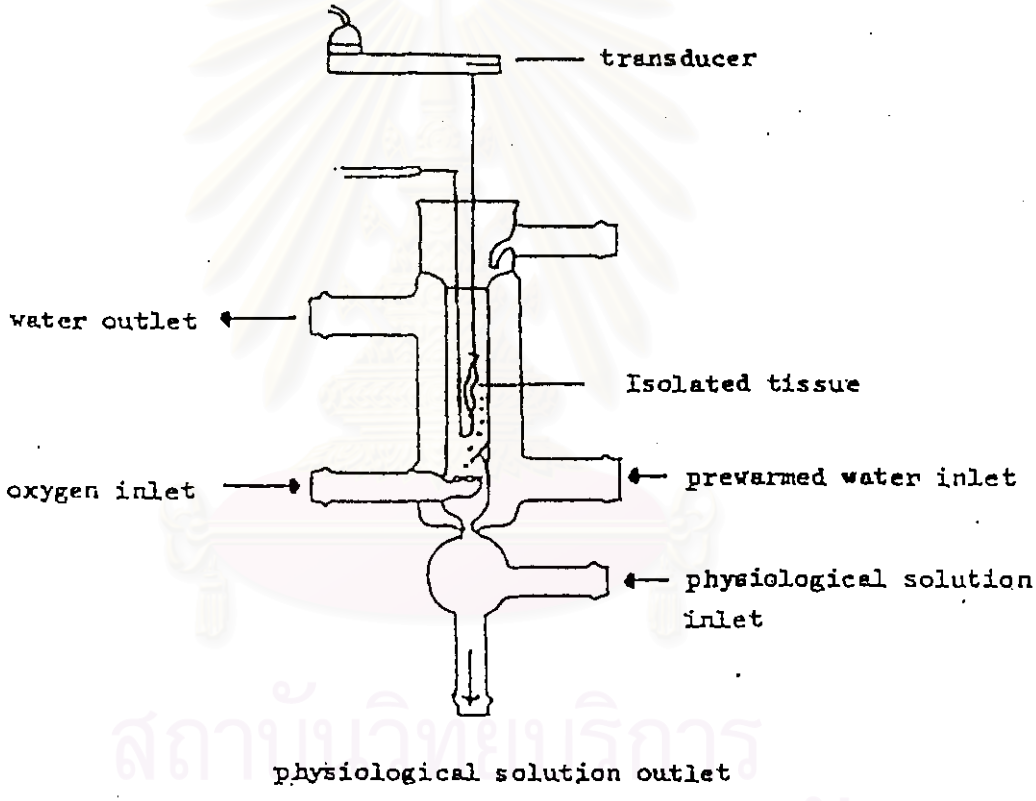
2. เครื่องมือ

- Organ bath แบบ double walled Harvard type ประกอบด้วยผนังแก้ว 2 ชั้น ชั้นในบรรจุน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Physiological solution) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สำหรับแช่เนื้อเยื่อที่แยกมาทดลอง และมีช่องเปิดให้ก๊าซ Carbogen (O_2 95% + CO_2 5%) ผ่านเข้ามาได้ ชั้นนอกของ Organ bath มีน้ำไหลเวียน เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37 $\pm$ 0.5 องศาเซลเซียส โดยมี Thermoregulating water pump เป็นตัวส่งน้ำ และควบคุมอุณหภูมิ ดังภาพที่ 9

- เครื่องมือวัดการหดตัวของกล้ามเนื้อ (isometric transducer) ของบริษัท Nacro Bio-systems. A.Heal.Thadyne company.

- Water bath พร้อม Thermoregulating water

- เครื่องบันทึกผล (recorder) ของบริษัท Nacro Bio-systems, INC
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด
- ถังบรรจุก๊าซ carbogen (O_2 95% + CO_2 5%)



ภาพที่ 9 แสดงเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่แยกจากกาย (Isolated organ)

3. สารเคมี

3.1. น้ำมันระเหยจากผลมะแข่น เตรียมโดยภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2. สารเคมีจากบริษัท Sigma Chemical Co.,St Louis , U.S.A.

Norepinephrine hydrochloride (NE)

Verapamil sulfate

Cyproheptadine hydrochloride

Atropine

Chlorpheniramine

Prazosin

EGTA

3.3. สารเคมีจากบริษัท Fluka AG , Buchs , Switzerland.

Calcium chloride dihydrate

Potassium chloride

Magnesium chloride

Barium chloride dihydrate

3.4. สารเคมีจากบริษัท E. Merck , Darmstadt , Germany.

Sodium chloride

D(+) - glucose monohydrate

Sodium hydrogen carbonate

Potassium dihydrogen phosphate

Magnesium sulfate

3.5. บริษัท Baker Analyzed Reagent , U.S.A.

Sodium dihydrogen phosphate

3.6. Tween 80

วิธีการเตรียมสารละลายน้ำมันระเหย

1. สารที่ใช้ละลายน้ำมันระเหยจากผลมะแข่นในการศึกษาครั้งนี้ คือ 0.1% tween 80

2. เตรียมความเข้มข้นของน้ำมันระเหย 5%, 3% และ 0.2% ใน 0.1% tween 80 ในน้ำ

<u>ตัวอย่างการคำนวณความเข้มข้นของน้ำมันระเหย</u>

ในตัวทำละลาย 100 μl มีน้ำมันระเหย (3 %) 3 μl

นำมาใช้ทดสอบ 8 μl จึงมีน้ำมันระเหย = (3 μl x 8 μl) / 100 μl = 0.24 μl

<u>จากสูตร</u> $N_1V_1 = N_2V_2$

$(0.24\ \mu l)(8\ \mu l) = N_2\ (25\ ml)$

$N_2 = (0.24\ \mu l)(8\ \mu l) / (25{,}000\ \mu l)$

$= 7.68 \times 10^{-5}\ \mu l$ ใน organ bath 25 ml

โดย N_1 = ความเข้มข้นของน้ำมันระเหยที่นำมาใช้

V_1 = ปริมาตรของน้ำมันระเหยที่เตรียมในตัวทำละลาย

N_2 = ความเข้มข้นของน้ำมันระเหยใน organ bath (25 ml)

V_2 = ปริมาตรของน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อใน organ bath (25 ml)

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเตรียมกล้ามเนื้อเรียบจากอวัยวะต่างๆ

<u>การเตรียมหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของหนูขาว</u>

ทำให้หนูขาวสลบโดยการตีบริเวณรอยต่อระหว่างคอและหัว ผ่าตัดเปิดช่องอกแล้วเคลื่อนย้ายเอาหัวใจ ปอด (ส่วนที่บังหลอดเลือดแดงใหญ่) ออกจะเห็นหลอดเลือดแดงใหญ่ติดอยู่กับ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กระดูกสันหลัง ดังภาพที่ 10 ใช้ด้ายผูกหลอดเลือดแดงใหญ่และใช้กรรไกรเฉาะหลอดเลือดแดงใหญ่ในช่องอก ตัดมาใส่ใน petri dish ที่มีสารละลาย Krebs-Henseleit อยู่ และมีก๊าซ Carbogen ผ่านตลอดเวลา ค่อยๆเฉาะเอาเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้หมด ล้างเลือดที่อยู่ภายในหลอดเลือดออกให้หมดด้วยสารละลาย Krebs-Henseleit ตัดผนังหลอดเลือดเป็นเกลียว (spiral) แล้วตัดแบ่งเป็นท่อนยาว ประมาณ 1 เซนติเมตร ใช้ด้ายผูกปลายทั้งสองด้าน โดย ผูกปลายด้านหนึ่งกับแท่งพลาสติก แล้วนำไปแช่ไว้ใน Organ bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37±0.5 องศาเซลเซียส และบรรจุสารละลาย Krebs-Henseleit ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยมีก๊าซ Carbogen ผ่านตลอดการทดลอง ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ tranducer ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องขยายสัญญาณและเครื่องบันทึกผลการทดลอง ปรับให้หลอดเลือดมีแรงตึงตัวคงที่ในขณะพัก แล้ว incubate หลอดเลือดนานประมาณ 45-60 นาที โดยเปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit ทุก 15 นาที

<u>การเตรียมท่ออสุจิ (vas deferens) ของหนูขาว</u>

ทำให้หนูขาวสลบโดยการดึบริเวณรอยต่อระหว่างคอและหัว ผ่าตัดเปิดช่องท้อง พบว่าท่ออสุจิทั้งสองข้างจะอยู่ระหว่าง epididymis และ prostate gland ตัดท่ออสุจิมาใส่ใน petri dish ที่มีสารละลาย Krebs-Henseleit อยู่ และมีก๊าซ Carbogen ผ่านตลอดเวลา ตัดแยกไขมันและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้หมด แล้วตัดท่ออสุจิแบ่งออกเป็นสองส่วนคือส่วนของ prostatic halves และ epididymal halves ดังภาพที่ 11

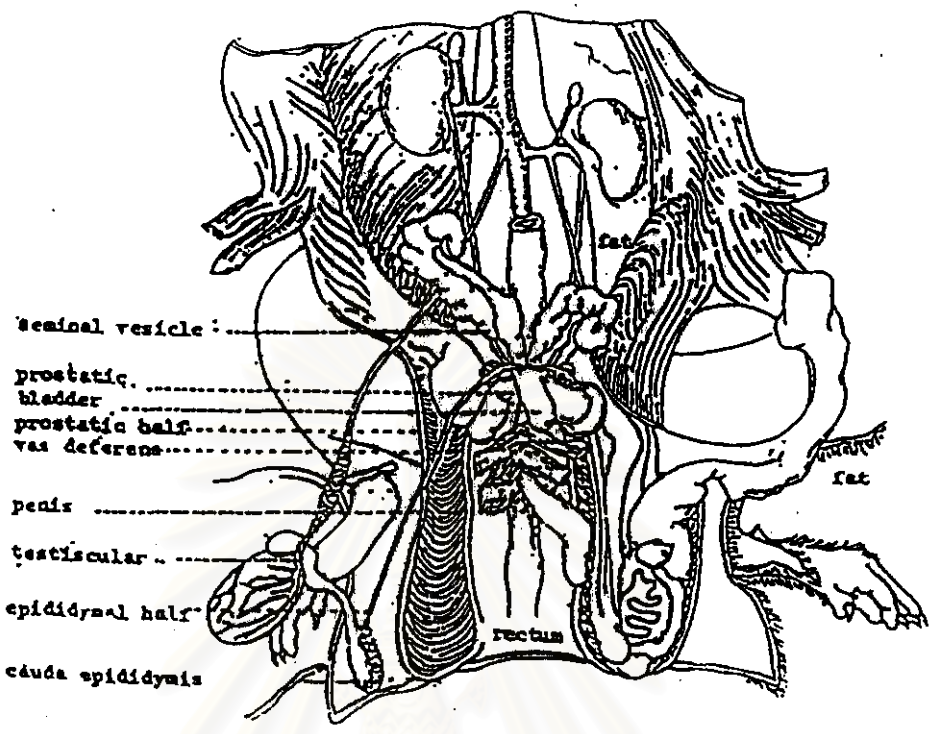
ในการวิจัยครั้งนี้ ส่วนของ prostatic halves นำไปศึกษาผลที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย potassium chloride และ barium chloride โดยพบว่า potassium และ barium กระตุ้นให้ท่ออสุจิส่วน prostatic halves บีบตัวได้ดีกว่าส่วน epididymal halves เนื่องจากส่วน prostatic halves เป็นส่วนที่มีการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลเซียมได้ชัดเจน (Hay และ Wadsworth, 1984) และส่วนของ epididymal halves นำไปศึกษาผลที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย noradrenaline เนื่องจากส่วนของ epididymal halves มีการกระจายของ α_1 - adrenoreceptor มากกว่าส่วน prostatic halves ทำให้ส่วนของ epididymal halves สามารถตอบสนองต่อการถูกกระตุ้นด้วย noradrenaline ได้ชัดเจนและดีกว่าส่วน prostatic halves (Hay และ Wadsworth, 1983) ตัดแบ่งท่ออสุจิให้ยาวประมาณ 1 - 2 เซนติเมตร ใช้ด้ายผูกปลายทั้งสองด้าน โดยให้ปลายทั้งสองด้านเปิด เพื่อให้สารละลาย Krebs-Henseleit ผ่านได้ และผูกปลายด้านหนึ่งกับแท่งพลาสติกแล้วนำไปแช่ไว้ใน Organ bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37±0.5 องศาเซลเซียส และ

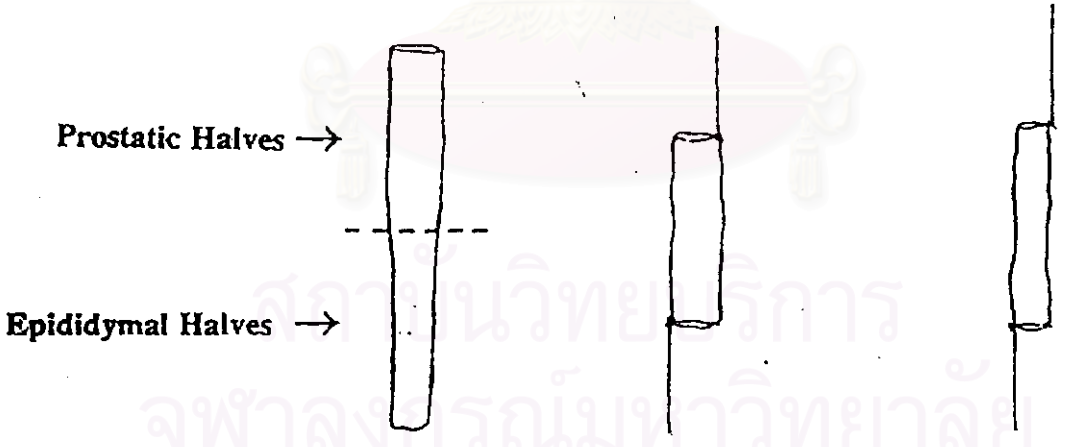
บรรจุสารละลาย Krebs-Henseleit ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยมีก๊าซ Carbogen ผ่านตลอดการทดลอง ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ tranducer ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องขยายสัญญาณและเครื่องบันทึกผลการทดลอง ปรับให้ท่ออสุจิมีแรงตึงตัวคงที่ในขณะพัก แล้ว incubate ท่ออสุจินานประมาณ 30 นาที โดยเปลี่ยนสารละลาย Krebs-Henseleit ทุก 15 นาที

<u>การเตรียมลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภา</u>

เตรียมหนูตะเภาโดยให้อดอาหารก่อนการทดลอง 14 - 16 ชั่วโมงให้แต่น้ำ ทำให้สลบโดยการตี บริเวณรอยต่อระหว่างคอและหัว ผ่าท้องเอาลำไส้เล็กส่วน ileum ดังภาพที่ 12 มาใส่ใน petri dish ที่มีสารละลาย Tyrode อยู่ และมีก๊าซ Carbogen ผ่านตลอดเวลา ตัดแยกเอาไขมันและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้หมด ล้างลำไส้ด้านในด้วยสารละลาย Tyrode ตัดแบ่งลำไส้เป็นท่อนยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ใช้ด้ายผูกปลายทั้งสองด้าน โดยให้ปลายทั้งสองด้านเปิดเพื่อให้สารละลาย Tyrode ผ่านได้ ผูกปลายด้านหนึ่งกับแท่งพลาสติกแล้วนำไปแช่ไว้ใน Organ bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37±0.5 องศาเซลเซียส และบรรจุสารละลาย Tyrode ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยมีก๊าซ Carbogen ผ่านตลอดการทดลอง ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ tranducer ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องขยายสัญญาณและเครื่องบันทึกผลการทดลอง ปรับให้ลำไส้มีแรงตึงตัวคงที่ในขณะพัก แล้ว incubate ลำไส้นานประมาณ 30 นาที โดยเปลี่ยนสารละลาย Tyrode ทุก 15 นาที

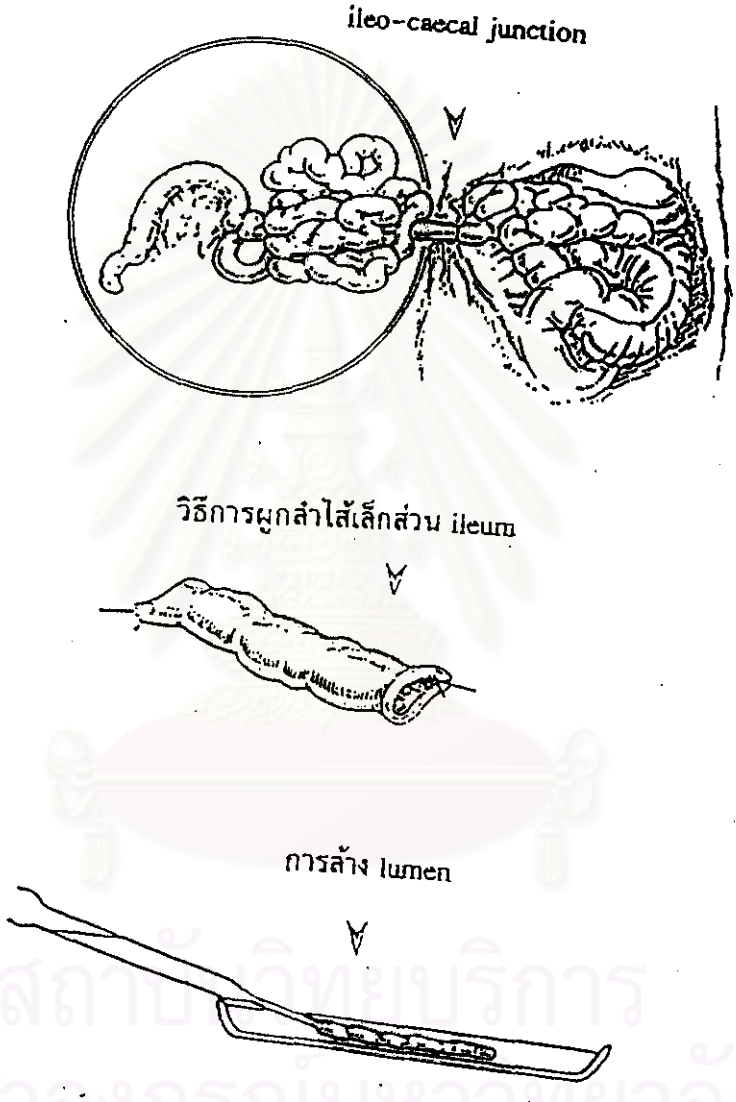
ภาพที่ 10 แสดงตำแหน่งหลอดเลือดแดงใหญ่ (Thoracic aorta) และวิธีการเตรียมกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาว





ส่วน Prostatic Halves ส่วน Epididymal Halves

ภาพที่ 11 แสดงตำแหน่งท่ออสุจิ (vas deferens) และวิธีการเตรียมกล้ามเนื้อเรียบท่ออสุจิหนูขาว



ภาพที่ 12 แสดงตำแหน่งลำไส้เล็กส่วน ileum และการเตรียมกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum หนูตะเภา

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของน้ำมันระเหยจากผลมะแข่นเมื่อให้น้ำมันระเหยแบบสะสม (cumulative dose) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาวที่แยกออกจากกาย

1.1. ศึกษาผลของตัวทำละลาย (0.1% tween80 ในน้ำ) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่

ศึกษา cumulative dose-response curve โดยให้ตัวทำละลาย 0.1 % tween 80 ในน้ำ เข้มข้น 2.56×10^{-6} , 5.76×10^{-6} , 1.29×10^{-5} , 2.91×10^{-5} , 6.4×10^{-5} µl / 25 ml ลงใน organ bath ที่มีหลอดเลือดทุกๆ 2 นาที บันทึกผลการหดตัวทุกครั้งที่เติม 0.1 % tween 80

↑

0.1% tween 80 ในน้ำ

(cumulative dose) ทุก 2 นาที

1.2. ศึกษาผลของน้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1% tween 80 ในน้ำ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ ในสารละลาย Calcium free Krebs-Henseleit solution

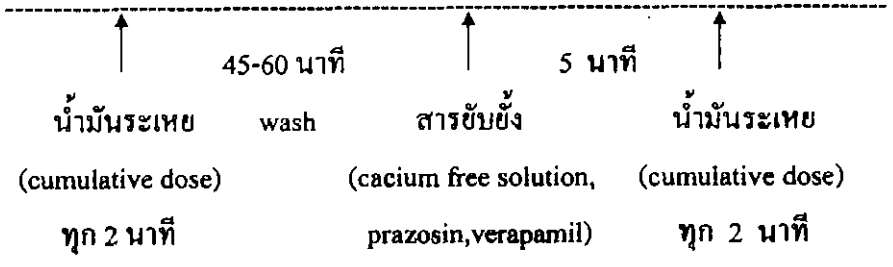
ศึกษา cumulative dose-response curve โดยให้น้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1 % tween 80 ในน้ำ เข้มข้น 7.68×10^{-5} , 1.73×10^{-4} , 3.88×10^{-4} , 8.75×10^{-4} , 1.92×10^{-3} µl/25 ml ลงใน organ bath ที่มีหลอดเลือดทุกๆ 2 นาที บันทึกผลการหดตัวทุกครั้งที่เติมน้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1 % tween 80 หลังจากนั้นล้างออกด้วย Krebs-Henseleit solution หลายๆ ครั้ง incubate 45 -60 นาที โดยเปลี่ยน Krebs-Henseleit solution ทุกๆ 15 นาที เพื่อให้หลอดเลือดได้พักเต็มที่ ทำการศึกษาต่อในสารละลาย Calcium free Krebs-Henseleit solution ให้น้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1% tween 80 ในน้ำ ความเข้มข้น เหมือนตอนแรก เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการทดลอง

1.3. ศึกษาผลของน้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1% tween 80 ในน้ำ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ เมื่อให้ร่วมกับ prazosin 1 x 10^{-7} M

ศึกษา cumulative dose-response curve โดยให้น้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1 % tween 80 ในน้ำ เข้มข้น 7.68 x 10^{-5} , 1.73 x 10^{-4} , 3.88 x 10^{-4} , 8.75 x 10^{-4} , 1.92 x 10^{-3} µl/25 ml ลงใน organ bath ที่มีหลอดเลือดทุกๆ 2 นาที บันทึกผลการหดตัวทุกครั้งที่เติมน้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1 % tween 80 หลังจากนั้นล้างออกด้วย Krebs-Henseleit solution หลายๆ ครั้ง incubate 45 -60 นาที โดยเปลี่ยน Krebs-Henseleit solution ทุกๆ 15 นาที เพื่อให้หลอดเลือดได้พักเต็มที่ ทำการศึกษาต่อโดยให้ prazosin เข้มข้น 1 x 10^{-7} M นาน 5 นาที หลังจากนั้นให้น้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1% tween 80 ในน้ำ ความเข้มข้นเหมือนตอนแรก เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการทดลอง

1.4. ศึกษาผลของน้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1% tween 80 ในน้ำ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ เมื่อให้ร่วมกับ verapamil 1 x 10^{-7} M

ศึกษา cumulative dose-response curve โดยให้น้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1 % tween 80 ในน้ำ เข้มข้น 7.68 x 10^{-5} , 1.73 x 10^{-4} , 3.88 x 10^{-4} , 8.75 x 10^{-4} , 1.92 x 10^{-3} µl/25 ml ลงใน organ bath ที่มีหลอดเลือดทุกๆ 2 นาที บันทึกผลการหดตัวทุกครั้งที่เติมน้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1 % tween 80 หลังจากนั้นล้างออกด้วย Krebs-Henseleit solution หลายๆ ครั้ง incubate 45 -60 นาที โดยเปลี่ยน Krebs-Henseleit solution ทุกๆ 15 นาที เพื่อให้หลอดเลือดได้พักเต็มที่ ทำการศึกษาต่อโดยให้verapamil เข้มข้น 1 x 10^{-7} M นาน 5 นาที หลังจากนั้นให้น้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1% tween 80 ในน้ำ ความเข้มข้นเหมือนตอนแรก เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการทดลอง



การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของน้ำมันระเหยจากผลมะแข่นเมื่อให้น้ำมันระเหยแบบสะสม (cumulative dose) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภา ที่แยกออกจากกาย

2.1. ศึกษาผลของตัวทำละลาย (0.1% tween 80 ในน้ำ) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภา

ศึกษา cumulative dose-response curve โดยให้ตัวทำละลาย 0.1 % tween 80 เข้มข้น 1×10^{-6} , 4×10^{-6} , 1.6×10^{-5} , 6.4×10^{-5} , 2.56×10^{-4} µl/25 ml ซึ่งเท่ากับปริมาตรของตัวทำละลายของน้ำมันระเหยที่ใช้ในการศึกษา ลงใน organ bath ที่มีลำไส้เล็กทุกๆ 30 วินาที บันทึกผลการหดตัวทุกครั้งที่เติม 0.1 % tween 80

↑

0.1% tween 80 ในน้ำ

(cumulative dose) ทุก 30 วินาที

2.2. ศึกษาผลของน้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1 %tween80 ในน้ำต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum เมื่อให้ร่วมกับ chlorpheniramine 1×10^{-7} M

ศึกษา cumulative dose-response curve โดยให้น้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1 % tween 80 ในน้ำ เข้มข้น 2×10^{-6} , 8×10^{-6} , 3.2×10^{-5} , 12.8×10^{-5} , 5.12×10^{-4} µl/25 ml ลงใน organ bath ที่มีลำไส้เล็กทุกๆ 30 วินาที บันทึกผลการหดตัวทุกครั้งที่เติมน้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1 % tween 80 หลังจากนั้นล้างออกด้วย Tyrode solution หลายๆ ครั้ง incubate 30-45 นาที โดยเปลี่ยน Tyrode solution ทุกๆ 15 นาที เพื่อให้ลำไส้เล็กได้พักเต็มที่ ทำการศึกษาต่อโดยให้ chlorpheniramine เข้มข้น 1×10^{-7} M นาน 5 นาที หลังจากนั้นให้น้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1% tween 80 ในน้ำ ความเข้มข้นเหมือนตอนแรก เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการทดลอง

2.3. ศึกษาผลของน้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1% tween 80 ในน้ำ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum เมื่อให้ร่วมกับ cyproheptadine 1×10^{-7} M

ศึกษา cumulative dose-response curve โดยให้น้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1 % tween 80 ในน้ำ เข้มข้น 2×10^{-6} , 8×10^{-6} , 3.2×10^{-5} , 12.8×10^{-5} , 5.12×10^{-4} µl/25 ml ลงใน organ bath ที่มีลำไส้เล็กทุกๆ 30 วินาที บันทึกผลการหดตัวทุกครั้งที่เติมน้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1 % tween 80 หลังจากนั้นล้างออกด้วย Tyrode solution หลายๆ ครั้ง incubate 30-45 นาที โดยเปลี่ยน Tyrode solution ทุกๆ 15 นาที เพื่อให้ลำไส้เล็กได้พักเต็มที่ ทำการศึกษาต่อโดยให้ cyproheptadine เข้มข้น 1×10^{-7} M นาน 5 นาที หลังจากนั้นให้น้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1% tween 80 ในน้ำ ความเข้มข้นเหมือนตอนแรก เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการทดลอง

2.4. ศึกษาผลของน้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1% tween 80 ในน้ำต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum เมื่อให้ร่วมกับ atropine 1×10^{-7}

ศึกษา cumulative dose-response curve โดยให้น้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1 % tween 80 ในน้ำ เข้มข้น 2×10^{-6} , 8×10^{-6} , 3.2×10^{-5} , 12.8×10^{-5} , 5.12×10^{-4} µl/25 ml ลงใน organ bath ที่มีลำไส้เล็กทุกๆ 30 วินาที บันทึกผลการหดตัวทุกครั้งที่เติมน้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1 % tween 80 หลังจากนั้นล้างออกด้วย Tyrode solution หลายๆ ครั้ง incubate 30-45 นาที โดยเปลี่ยน Tyrode solution ทุกๆ 15 นาที เพื่อให้ลำไส้เล็กได้พักเต็มที่ ทำการศึกษาต่อโดยให้ atropine เข้มข้น 1×10^{-7} M นาน 5 นาที หลังจากนั้นให้น้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1% tween 80 ในน้ำ ความเข้มข้นเหมือนตอนแรก เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการทดลอง

2.5. ศึกษาผลของน้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1% tween 80ในน้ำ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum เมื่อให้ร่วมกับ verapamil 1×10^{-7}

ศึกษา cumulative dose-response curve โดยให้น้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1 % tween 80 ในน้ำ 2×10^{-6} , 8×10^{-6} , 3.2×10^{-5} , 12.8×10^{-5} , 5.12×10^{-4} µl/25 ml ลงใน organ bath ที่มี

ลำไส้เล็กทุกๆ 30 วินาที บันทึกผลการหดตัวทุกครั้งที่เติมน้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1 % tween 80 หลังจากนั้นล้างออกด้วย Tyrode solution หลายๆ ครั้ง incubate 30-45 นาที โดยเปลี่ยน Tyrode solution ทุกๆ 15 นาที เพื่อให้ ลำไส้เล็กได้พักเต็มที่ ทำการศึกษาต่อโดยให้ verapamil เข้มข้น 1 x 10^{-7} M นาน 5 นาที หลังจากนั้นให้น้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1% tween 80 ในน้ำ ความเข้มข้นเหมือนตอนแรก เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการทดลอง

น้ำมันระเหย (cumulative dose) ทุก 30 วินาที	30-45 นาที wash	สารยับยั้ง (chlorpheniramine, verapamil, cyproheptadine, atropine)	5 นาที	น้ำมันระเหย (cumulative dose) ทุก 30 วินาที

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของน้ำมันระเหยจากผลมะแข่นต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบท่ออสุจิของหนูขาว ที่แยกออกจากกาย

3.1. ศึกษาผลของตัวทำละลาย (0.1% tween 80ในน้ำ) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบท่ออสุจิ

ศึกษาผลของตัวทำละลาย โดยให้ 0.1% tween 80 ในน้ำ เข้มข้น 1.6 x 10^{-5} µl/25 ml ซึ่งเท่ากับปริมาตรของตัวทำละลายของน้ำมันระเหยที่ใช้ศึกษา ลงใน organ bath ที่มีท่ออสุจิที่เตรียมไว้บันทึกผลการหดตัว

สารกระตุ้น (NE, KCl, $BaCl_2$)	30-45 นาที wash	0.1% tween80 1.6 x 10^{-5} µl/25 ml	10 นาที	สารกระตุ้น (NE,KCl, $BaCl_2$)

3.2. ศึกษาผลของน้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1% tween 80 ในน้ำ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบท่ออสุจิ เมื่อให้ NE 1×10^{-6} M

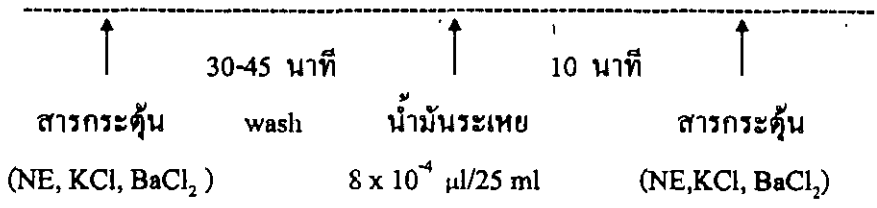
ศึกษาผลของน้ำมันระเหยโดยให้ NE เข้มข้น 1×10^{-6} M บันทึกผลการหดตัว 5 นาที หลังจากนั้นล้างออกด้วย Krebs-Henseleit solution หลายๆ ครั้ง incubate 30 - 45 นาที โดยเปลี่ยน Krebs-Henseleit solution ทุกๆ 15 นาที เพื่อให้ท่ออสุจิได้พักเต็มที่ ทำการศึกษาต่อโดยให้น้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1 % tween 80 ในน้ำ เข้มข้น 8×10^{-4} µl/25 ml ลงใน organ bath ที่มีท่ออสุจิปล่อยไว้นาน 10 นาที หลังจากนั้นให้ NE ความเข้มข้นเท่าเดิม บันทึกผลการหดตัวนาน 5 นาที เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการทดลอง

3.3. ศึกษาผลของน้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1% tween 80 ในน้ำ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบท่ออสุจิ เมื่อให้ $BaCl_2$ 1 mM

ศึกษาผลของน้ำมันระเหยโดยให้ $BaCl_2$ เข้มข้น 1 mM บันทึกผลการหดตัว 5 นาที หลังจากนั้นล้างออกด้วย Krebs-Henseleit solution หลายๆ ครั้ง incubate 30 - 45 นาที โดยเปลี่ยน Krebs-Henseleit solution ทุกๆ 15 นาที เพื่อให้ท่ออสุจิได้พักเต็มที่ ทำการศึกษาต่อโดยให้น้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1 % tween 80 ในน้ำ เข้มข้น 8×10^{-4} µl/25 ml ลงใน organ bath ที่มีท่ออสุจิปล่อยไว้นาน 10 นาที หลังจากนั้นให้ $BaCl_2$ ความเข้มข้นเท่าเดิม บันทึกผลการหดตัวนาน 5 นาที เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการทดลอง

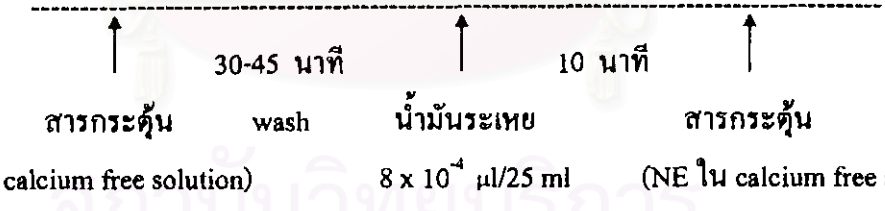
3.4. ศึกษาผลของน้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1% tween 80 ในน้ำ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบท่ออสุจิ เมื่อให้ KCl 50 mM

ศึกษาผลของน้ำมันระเหยโดยให้ KCl เข้มข้น 50 mM บันทึกผลการหดตัว 5 นาที หลังจากนั้นล้างออกด้วย Krebs-Henseleit solution หลายๆ ครั้ง incubate 30 - 45 นาที โดยเปลี่ยน Krebs-Henseleit solution ทุกๆ 15 นาที เพื่อให้ท่ออสุจิได้พักเต็มที่ ทำการศึกษาต่อโดยให้น้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1 % tween 80 ในน้ำ เข้มข้น 8×10^{-4} µl/25 ml ลงใน organ bath ที่มีท่ออสุจิปล่อยไว้นาน 10 นาที หลังจากนั้นให้ KCl ความเข้มข้นเท่าเดิม บันทึกผลการหดตัวนาน 5 นาที เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการทดลอง



3.5. **ศึกษาผลของน้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1% tween 80 ในน้ำ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบท่อออสุจิ เมื่อให้ NE 1 x 10^{-6} M ใน calcium free Krebs-Henseleit solution**

ศึกษาผลของน้ำมันระเหยโดยให้ NE เข้มข้น 1 x 10^{-6} M ใน calcium free Krebs-Henseleit solution บันทึกผลการหดตัว 5 นาทีหลังจากนั้นล้างออกด้วย Krebs-Henseleit solution หลายๆ ครั้ง incubate 30 - 45 นาที โดยเปลี่ยน Krebs-Henseleit solution ทุกๆ 15 นาที เพื่อให้ท่อออสุจิได้พักเต็มที่ ทำการศึกษาต่อโดยให้น้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1 % tween 80 ในน้ำ เข้มข้น 8 x 10^{-4} µl/25 ml ลงใน organ bath ที่มีท่อออสุจิ ใน calcium free Krebs-Henseleit solution ปล่อยไว้นาน 10 นาที หลังจากนั้นให้ NE ความเข้มข้นเท่าเดิม บันทึกผลการหดตัวนาน 5 นาที เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างก่อนและหลังการทดลอง



การทดลองที่ 4 การศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันระเหยจากผลมะแข่นต่อการบีบตัวของลำไส้หนูถีบจักรในสภาพปกติ

ใช้หนูถีบจักร (mice) พันธุ์ Swiss Albino น้ำหนัก 20 - 25 กรัม ที่ได้อดอาหาร เป็นเวลา 14 -16 ชั่วโมงก่อนการทดลองโดยให้แต่น้ำ แบ่งหนูเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 15 ตัว

<u>กลุ่มที่ 1</u> เป็นกลุ่มควบคุม ป้อน 0.1% tween 80 ขนาด 10 ml/kg เว้นระยะ 15 นาที แล้วให้น้ำหมึกสีดำ (ink) ปริมาตร 0.1 ml เข้าทางปาก เมื่อครบ 30 นาที ฆ่าหนูทุกตัวพร้อมกัน วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของน้ำหมึกในลำไส้ โดยวัดจาก duodenum ถึงลำไส้เล็กส่วน ileo-caecal junction เทียบกับความยาวทั้งหมดของลำไส้เล็กในหนูแต่ละตัว

<u>กลุ่มที่ 2</u> เป็นกลุ่มทดลอง ป้อนน้ำมันระเหยที่ละลายใน 0.1% tween 80 ขนาด 10 ml / kg เว้นระยะ 15 นาที แล้วให้น้ำหมึกสีดำ (ink) ปริมาตร 0.1 ml เข้าทางปาก เมื่อครบ 30 นาที ฆ่าหนูทุกตัวพร้อมกัน วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของน้ำหมึกในลำไส้ โดยวัดจาก duodenum ถึงลำไส้เล็กส่วน ileo-caecal junction เทียบกับความยาวทั้งหมดของลำไส้เล็กในหนูแต่ละตัว

นำค่าเฉลี่ยระยะการเคลื่อนที่ของน้ำหมึกในลำไส้ของ กลุ่มที่ 1 เปรียบเทียบกับ กลุ่มที่ 2

การวัดผลและการนำเสนอผลการวิจัย

1. การวัดผลการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่

วัดปริมาณการหดตัวของหลอดเลือดแดงเป็นมิลลิเมตร แล้วคำนวนเป็นเปอร์เซนต์ของการหดตัว (% contraction) โดยให้ maximum contraction = 100 % และนำเสนอเป็น Dose-response curve ในรูปเปอร์เซนต์ของการหดตัว (% contraction)

2. การวัดผลการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum

วัดปริมาณการหดตัวของลำไส้เล็กเป็นมิลลิเมตร แล้วคำนวนเป็นเปอร์เซนต์ของการหดตัว (% contraction) โดยให้ maximum contraction = 100 % และเสนอเป็น Dose-response curve ในรูปเปอร์เซนต์ของการหดตัว (% contraction)

3. การวัดผลการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบท่อออฤจิ

วัดการหดตัวของท่อออฤจิทั้ง phasic และ tonic contraction เป็นมิลลิเมตร แล้วคำนวนเป็นเปอร์เซนต์ของการหดตัว (% contraction) โดยให้ maximum contraction = 100 % และนำเสนอผลการวิจัยในรูปเปอร์เซนต์ของการหดตัว (% contraction)

วัดความถี่ของการบีบตัวของท่อออฤจิแบบ rhythmic คือจำนวนครั้งของการบีบตัวในช่วงนาทีที่ 2 - นาทีที่ 5 แล้วคำนวนเป็นเปอร์เซนต์ของจำนวนครั้งของการบีบตัว (% contraction) และนำเสนอผลการวิจัยเป็นเปอร์เซนต์ของจำนวนครั้งของการบีบตัวในช่วงเวลานาทีที่ 2 - นาทีที่ 5

4. การวัดผลของการเคลื่อนที่ของน้ำหมึกในลำไส้ของหนูถีบจักรในสภาพปรกติ

วัดระยะการเคลื่อนที่ของน้ำหมึกในลำไส้ของหนูถีบจักรเทียบกับความยาวทั้งหมดของลำไส้ของหนูแต่ละตัวเป็นเซนติเมตร และนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ยระยะการเคลื่อนที่ของน้ำหมึกในลำไส้ของหนูถีบจักรแต่ละกลุ่ม

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

ผลการทดลองรายงานเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± Standard Deviation)

ใช้สถิติ Student ' s paired t - test เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างผลการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด , ลำไส้ และการบีบตัวของท่อออฤจิก่อนและหลังการทดลอง โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ใช้สถิติ Student ' s unpaired t - test เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองจากผลของระยะทางการเคลื่อนที่ของน้ำหมึกในลำไส้สภาพปกติ โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%