บทที่ 2

อุปกรณ์ และ วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง เครื่องมือและสารเคมี

1. สัตว์ทดลอง

- หนูขาวพันธุ์ Wistar rat เพศผู้ น้ำหนัก 200-300 กรัม
- หนูตะเภาสายพันธุ์ Dunkin Hartley เพศผู้ น้ำหนัก 250-350 กรัม

จากสำนักงานสัตว์ทดลองแห่งชาติมหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม ซึ่งสัตว์ทดลองดังกล่าวจะถูกนำมาเลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองของศูนย์สัตว์ทดลองตึกสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 25 $\pm$1°C มีแสงสว่างพอเหมาะ และเลี้ยงในกรงที่มีวัสดุรองนอนเป็นขี้เลื่อยสะอาด ก่อนนำมาทำการทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้สัตว์ทดลองได้ปรับสภาพร่างกายและสิ่งแวดล้อม เลี้ยงดูสัตว์ทดลองด้วยอาหารสำเร็จรูป CP 082 mice feed และ น้ำสะอาดอย่างเพียงพอตามความต้องการของสัตว์ทดลอง

2. เครื่องมือ

- Organ bath แบบ double walled Harvard type ประกอบด้วยผนังแก้ว 2 ชั้น ชั้นในบรรจุสารละลายที่ใช้หล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อ (physiological solution) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สำหรับแช่เนื้อเยื่อที่แยกจากกายมาทดลอง และมีช่องเปิดให้ก๊าซ carbogen($O_2$95 % + $CO_2$5 %) ผ่านเข้ามาได้ ชั้นนอกของ Organ bath มีน้ำไหลเวียน เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37 $\pm$ 0.5 °C ตลอดการทดลอง โดยมีเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermoregulating water pump) เป็นตัวส่งน้ำและควบคุมอุณหภูมิ (ภาพที่ 7)

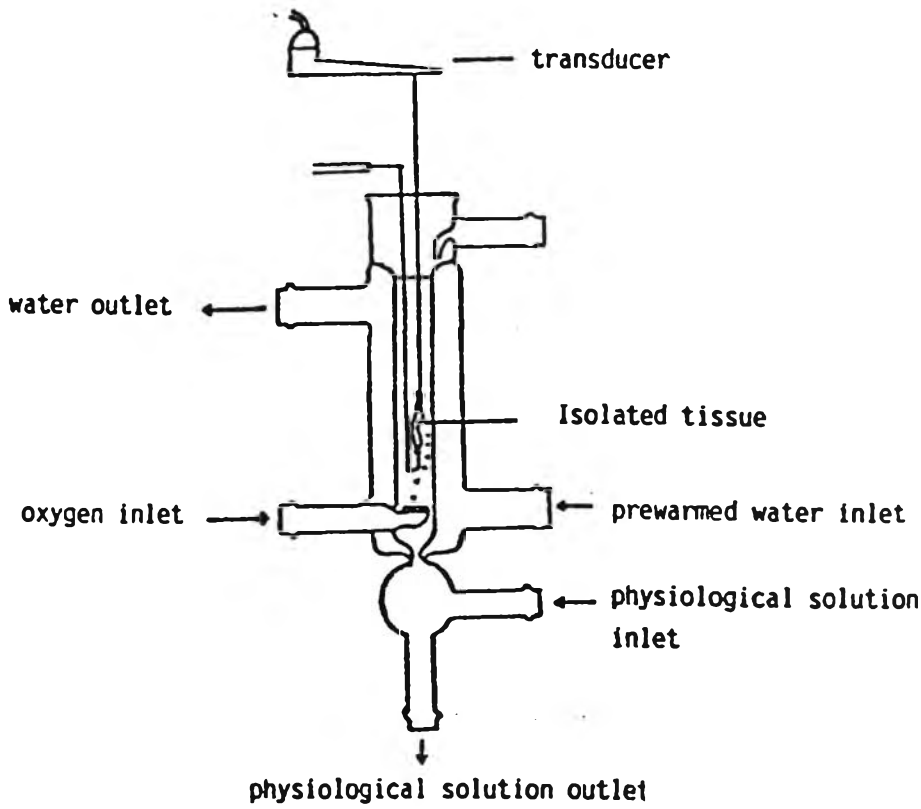
- เครื่องบันทึกผล (Recorder) รุ่น Biopac Lab Pro MP30

ประกอบด้วย - Computer

- Transducer SS รุ่น 12LA

- MP30
- Biopac student lab PRO version 3.6.2

- Water bath พร้อม Thermoregulating water pump
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด
- ก๊าซ carbogen (O_2 95% + CO_2 5%) ของบริษัท Thai Industrial Gas (TIG)
- ชุดผ่าตัดเล็ก



ภาพที่ 7 แสดงเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบต่างๆ ที่แยกจากกาย (organ bath)

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้เตรียมสารละลาย Krebs-Henseleit จากบริษัท Sigma Chemical Co.,St Louis, U.S.A.

- Glucose
- Sodium chloride (NaCl)

- Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
- Potassium chloride (KCl)
- Magnesium sulphate ($MgSO_4$)
- Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)
- Calcium chloride ($CaCl_2$)

3.2 สารมาตรฐาน (Standard) จากบริษัท Sigma Chemical Co.,St Louis, U.S.A.

- Acetylcholine
- Histamine
- Norepinephrine
- Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5–HT)
- Cacium chloride ($CaCl_2$)
- Barium chloride ($BaCl_2$)
- Potassium chloride (KCl)
- Propranolol

3.3 สารทดสอบ (Test compound)

1. การเตรียมน้ำมันระเหยจากเหง้าของว่านสาวหลง โดยวิธีกลั่นด้วยไอน้ำ ทำ finger print และตรวจองค์ประกอบด้วยวิธี Gas chromatography-mass spectrometry (GC/ MS) ดำเนินการโดย รศ. ดร.นิจศิริ เรืองรังษี ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การเตรียมน้ำมันระเหยสำหรับการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 2.5×10^{-5} % v/v, 1.25×10^{-4} % v/v, 6.25×10^{-4} % v/v, 3.13×10^{-3} % v/v, 1.56×10^{-2} % v/v และ 7.81×10^{-2} % v/v โดยใช้ 0.1% tween 60 เป็นตัวทำละลาย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. **การเตรียมกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมของหนูตะเภา**

- นำหนูตะเภามาทำ cervical dislocation หลังจากนั้นผ่าตัดเปิดช่องคอจนถึงช่องอก ตัดแยกเอาหลอดลมออกมา โดยตัดให้ต่ำกว่ากล่องเสียงประมาณ 5 มิลลิเมตร และตัดให้มีความยาวของหลอดลมประมาณ 1.5 - 2 เซนติเมตร นำหลอดลมที่แยกออกมาใส่ใน petri dish ที่มีสารละลาย Krebs-Henseleit solution (KHS) และมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา

- ตัดแยกเอาเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้หมด แล้วแบ่งหลอดลมออกเป็น 2 ท่อน ยาวประมาณท่อนละ 1 เซนติเมตร สามารถใช้ทดลองได้ 2 ครั้ง

- ตัดหลอดลมเป็นแบบซิกแซก (ภาพที่ 8) แล้วใช้ด้ายผูกปลายทั้งสองด้าน โดยปลายด้านหนึ่งผูกติดกับแท่งพลาสติก แล้วนำไปแช่ไว้ใน organ bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 $\pm$ 0.5 °C และบรรจุสารละลาย KHS ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลาที่ทำการทดลอง ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ transducer ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องขยายสัญญาณและเครื่องบันทึกผลการทดลอง

- ปรับหลอดลมให้มีความตึงตัวคงที่ในขณะพัก (resting tension) ประมาณ 1 กรัม แล้ว incubate หลอดลมนานประมาณ 45-60 นาที โดยเปลี่ยนสารละลาย KHS ทุก 15 นาที

2. **การเตรียมหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) ของหนูขาว**

- นำหนูขาวมาทำ cervical dislocation หลังจากนั้นผ่าตัดเปิดช่องอกแล้วเคลื่อนย้ายเอาหัวใจและปอดออกจะเห็นหลอดเลือดแดงใหญ่ติดอยู่กับกระดูกสันหลัง ใช้ด้ายผูกหลอดเลือดแดงใหญ่และใช้กรรไกรเลาะหลอดเลือดแดงใหญ่ในช่องอกตัดเอามาใส่ใน petri dish ที่มีสารละลาย Krebs-Henseleit solution (KHS) และมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา

- ตัดแยกเอาเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกเหลือเพียงกล้ามเนื้อเรียบ ล้างเลือดที่อยู่ภายในหลอดเลือด ออกให้หมดด้วยสารละลาย KHS

- ตัดหลอดเลือดเป็นเกลียว (spiral) (ภาพที่ 9) จะได้ชิ้นหลอดเลือดมีลักษณะสี่เหลี่ยมผืนผ้า แล้วตัดแบ่งเป็นท่อนยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ใช้ด้ายผูกปลายทั้งสองด้าน ด้านหนึ่งผูกกับแท่งพลาสติกแล้วนำไปแช่ไว้ใน organ bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 $\pm$ 0.5 °C และบรรจุสารละลาย KHS ปริมาตร 25 ml โดยมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ transducer ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องขยายสัญญาณและเครื่องบันทึกผลการทดลอง

- ปรับหลอดเลือดแดงใหญ่ให้มีความตึงตัวคงที่ในขณะพัก (resting tension) ประมาณ 1 กรัม แล้ว incubate หลอดเลือดแดงใหญ่นานประมาณ 45-60 นาที โดยเปลี่ยนสารละลาย KHS ทุก 15 นาที

3. **การเตรียมกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูขาว**

- เตรียมหนูขาว โดยงดอาหารก่อนทำการทดลอง 14-16 ชั่วโมง ให้เพียงแต่ดื่มน้ำ หลังจากนั้นนำหนูขาวมาทำ cervical dislocation และผ่าตัดเปิดช่องท้องเอาลำไส้เล็กส่วน ileum ออกมาใส่ใน petri dish ที่มีสารละลาย Krebs - Henseleit solution (KHS) และมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา

- ตัดแยกเอาไขมันและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้หมด ล้างลำไส้ด้านในด้วยสารละลาย KHS

- ตัดแบ่งลำไส้เล็กเป็นท่อนยาวประมาณ 1 เซนติเมตร (ภาพที่ 10) ใช้ด้ายผูกปลายทั้ง 2 ด้าน โดยให้ปลายทั้งสองด้านเปิด เพื่อให้สารละลาย KHS ผ่านได้ และผูกปลายอีกด้านหนึ่งกับแท่งพลาสติก แล้วนำไปแช่ไว้ใน organ bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$C และบรรจุสารละลาย KHS ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยมีก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลาที่ทำการทดลอง ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ transducer ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องขยายสัญญาณและเครื่องบันทึกผลการทดลอง

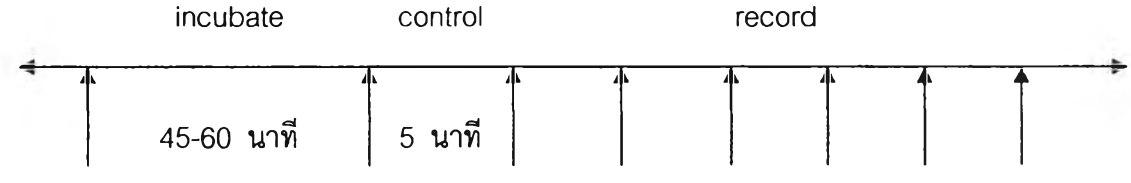
- ปรับให้ลำไส้มีแรงตึงตัวคงที่ในขณะพัก (resting tension) ประมาณ 1 กรัม แล้ว incubate ลำไส้นานประมาณ 45-60 นาที โดยเปลี่ยนสารละลาย KHS ทุก 15 นาที

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลง เมื่อให้น้ำมันระเหยแบบสะสม (cumulative dose) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมของหนูตะเภาที่แยกออกจากกาย(isolated trachea) (n=6) (Aqel M.B., 1991)

1.1 ศึกษาผลของตัวทำละลาย (0.1% Tween 60 ในน้ำ) แบบสะสมต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมที่แยกจากกายหนูตะเภา

ศึกษา cumulative dose ของตัวทำละลาย 0.1% Tween 60 โดยหลังจาก incubate หลอดลมที่เตรียมไว้จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ในสารละลาย Krebs-Henseleit แล้ว บันทึกผล 5 นาที เป็นค่า control แล้วจึงให้ตัวทำละลาย 0.1% Tween 60 ขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath ทุก 5 นาที จำนวน 6 ครั้ง บันทึกผลการทดลองทุกครั้งที่เติม 0.1% Tween 60 นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง

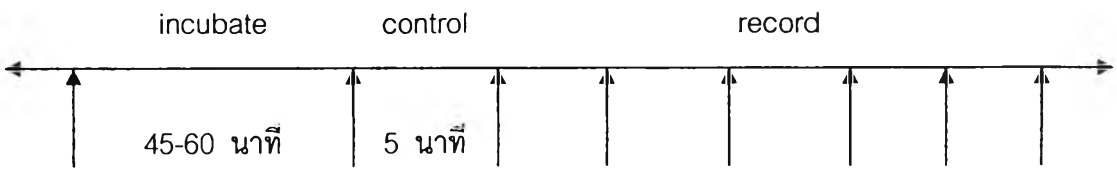


เตรียมเนื้อเยื่อ 0.1% Tween 60 ขนาด 0.1 ml ทุก 5 นาที

1.2 ศึกษาผลของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงแบบสะสมที่ละลายใน 0.1% Tween 60 ในน้ำ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมที่แยกจากกายหนูตะเภา

ศึกษา cumulative dose ของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงที่ละลายใน 0.1% Tween 60 ในน้ำ โดยหลังจาก incubate หลอดลมที่เตรียมไว้จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ในสารละลาย Krebs-Henseleit แล้ว บันทึกผล 5 นาทีเป็นค่า control แล้วจึงให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงที่ความเข้มข้น 2.5×10^{-5}, 1.25×10^{-4}, 6.25×10^{-4}, 3.13×10^{-3}, 1.56×10^{-2} และ 7.81×10^{-2} % v/v ในขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath ทุก 5 นาที บันทึกผลการทดลองทุกครั้งที่เติมน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงที่ละลายใน 0.1% Tween 60 ในน้ำ นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



เตรียมเนื้อเยื่อ น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลง 2.5 x 10^{-5} - 7.81 x 10^{-2} % v/v แบบสะสม ทุก 5 นาที

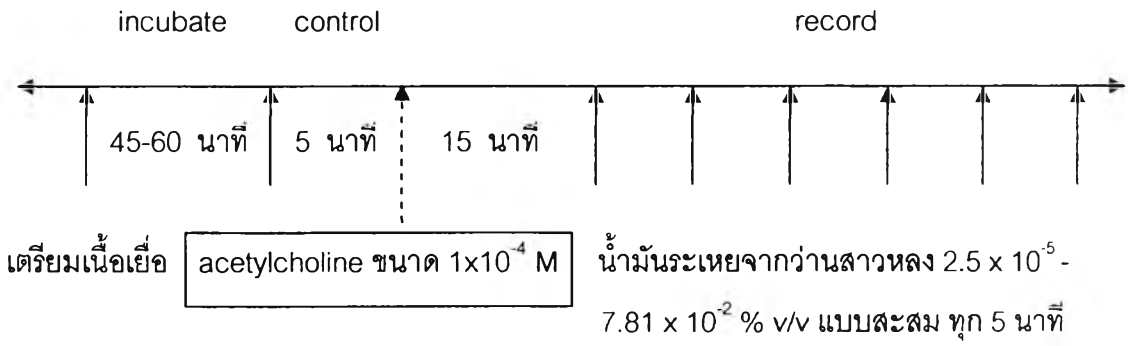
1.3 ศึกษาผลของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงแบบสะสมที่ละลายใน 0.1% Tween 60 ในน้ำ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมที่แยกจากกายหนูตะเภา เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว Histamine

ศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมเมื่อกระตุ้นด้วย histamine แล้วจึงให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงแบบสะสม โดยหลังจาก incubate หลอดลมที่เตรียมไว้จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ในสารละลาย Krebs-Henseleit แล้ว บันทึกผล 5 นาทีเป็นค่า control แล้วกระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมด้วย histamine ความเข้มข้น 1x10^{-4} M รอให้กล้ามเนื้อเรียบหลอดลมมีการหดตัวคงที่ จึงให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงความเข้มข้น 2.5x10^{-5}, 1.25x10^{-4}, 6.25x10^{-4}, 3.13x10^{-3}, 1.56x10^{-2} และ 7.81x10^{-2} % v/v ขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath ทุก 5 นาที บันทึกผลทุก 5 นาที นำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบกับการให้ histamine ความเข้มข้น 1x10^{-4} M อย่างเดียว ในเวลา 45 นาที

เตรียมเนื้อเยื่อ | histamine ขนาด 1x10^{-4} M | น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลง 2.5 x 10^{-5} - 7.81 x 10^{-2} % v/v แบบสะสม ทุก 5 นาที

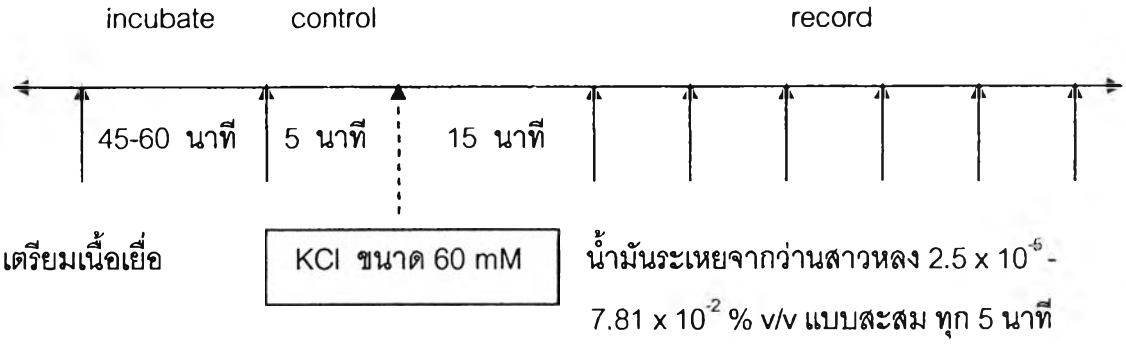
1.4 ศึกษาผลของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงแบบสะสมที่ละลายใน 0.1% Tween 60 ในน้ำ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมที่แยกจากกายหนูตะเภา เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว Acetylcholine

ศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมเมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine แล้วจึงให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงแบบสะสม โดยหลังจาก incubate หลอดลมที่เตรียมไว้จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ในสารละลาย Krebs-Henseleit แล้ว บันทึกผล 5 นาทีเป็นค่า control แล้วกระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมด้วย acetylcholine ความเข้มข้น $1x10^{-4}$ M รอให้กล้ามเนื้อเรียบหลอดลมมีการหดตัวคงที่ จึงให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงความเข้มข้น $2.5x10^{-5}$, $1.25x10^{-4}$, $6.25x10^{-4}$, $3.13x10^{-3}$, $1.56x10^{-2}$ และ $7.81x10^{-2}$ % v/v ขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath ทุก 5 นาที บันทึกผลทุก 5 นาที นำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบกับการให้ acetylcholine ความเข้มข้น $1x10^{-4}$ M อย่างเดียว ในเวลา 45 นาที



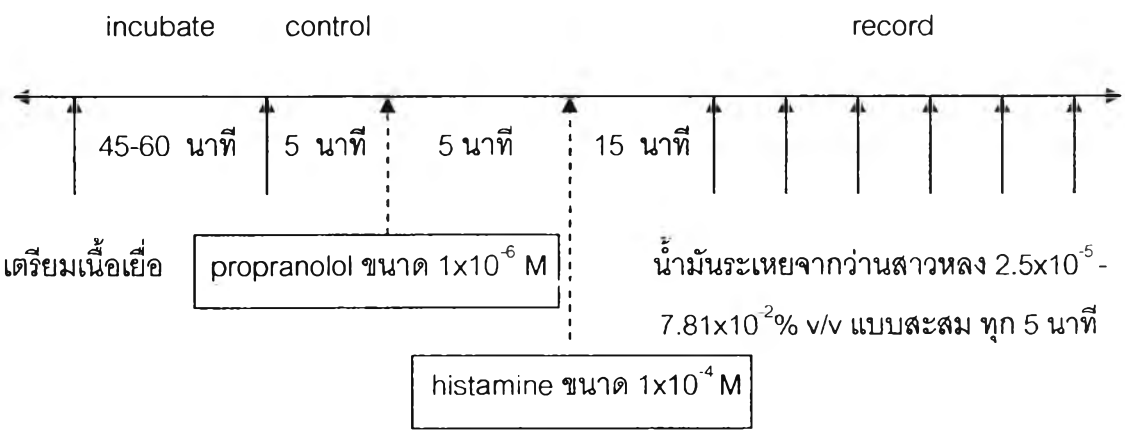
1.5 ศึกษาผลของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงแบบสะสมที่ละลายใน 0.1% Tween 60 ในน้ำ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลม เมื่อกระตุ้นด้วย KCl

ศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมเมื่อกระตุ้นด้วย KCl แล้วจึงให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงแบบสะสม โดยหลังจาก incubate หลอดลมที่เตรียมไว้จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ในสารละลาย Krebs-Henseleit แล้ว บันทึกผล 5 นาทีเป็นค่า control แล้วกระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมด้วย KCl ความเข้มข้น 60 mM รอให้กล้ามเนื้อเรียบหลอดลมมีการหดตัวคงที่ จึงให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงความเข้มข้น $2.5x10^{-5}$, $1.25x10^{-4}$, $6.25x10^{-4}$, $3.13x10^{-3}$, $1.56x10^{-2}$ และ $7.81x10^{-2}$ % v/v ขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath ทุก 5 นาที บันทึกผลทุก 5 นาที นำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบกับการให้ KCl ความเข้มข้น 60 mM อย่างเดียว ในเวลา 45 นาที



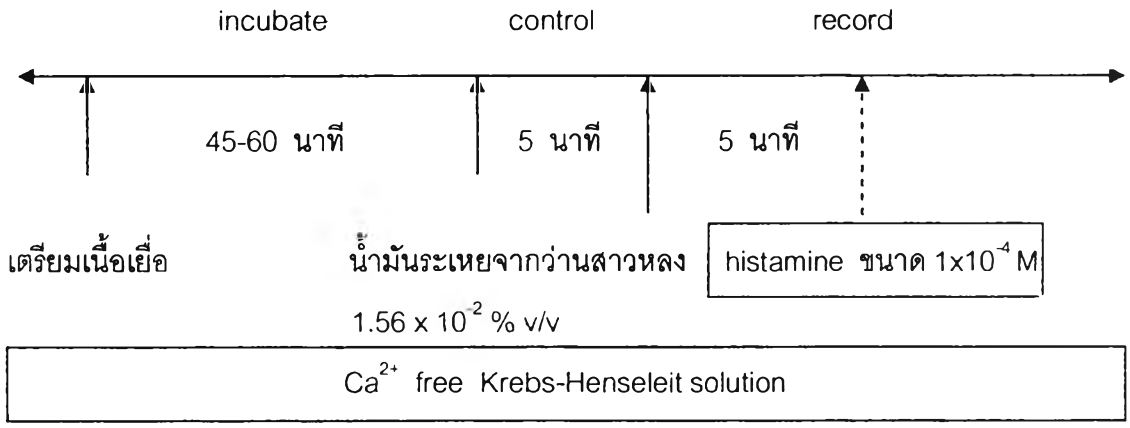
1.6 ศึกษาผลของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงแบบสะสมที่ละลายใน 0.1% Tween 60 ในน้ำ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมที่แยกจากกายหนูตะเภา เมื่อให้ propranolol ก่อนการกระตุ้นการหดตัวด้วยสารมาตรฐาน Histamine (Jyh-Fei Liao et.al., 1997)

ศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมเมื่อได้รับ propranolol ซึ่งเป็น β-adrenoceptor antagonist ก่อนการกระตุ้นการหดตัวด้วยสารมาตรฐาน histamine แล้วจึงให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงแบบสะสม โดยหลังจาก incubate หลอดลมที่เตรียมไว้จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ในสารละลาย Krebs-Henseleit แล้ว บันทึกผล 5 นาทีเป็นค่า control แล้วให้ propranolol ความเข้มข้น $1x10^{-6}$ M ก่อน 5 นาที หลังจากนั้นกระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมด้วย histamine ความเข้มข้น $1x10^{-4}$ M รอให้กล้ามเนื้อเรียบหลอดลมมีการหดตัวคงที่ จึงให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงความเข้มข้น $2.5x10^{-5}$, $1.25x10^{-4}$, $6.25x10^{-4}$, $3.13x10^{-3}$,$1.56x10^{-2}$ และ $7.81x10^{-2}$ % v/v ขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath ทุก 5 นาที บันทึกผลการทดลอง แล้วนำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบกับการให้ histamine ความเข้มข้น $1x10^{-4}$ M ร่วมกับน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงแบบสะสม



1.7 ศึกษาผลของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงความเข้มข้น $1.56x10^{-2}$ %v/v ที่ละลายใน 0.1% Tween 60 ในน้ำ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลม เมื่อกระตุ้นด้วย Histamine ใน Ca^{2+} free Krebs-Henseleit solution เพื่อดูผลของสารต่อ calcium ภายในเซลล์

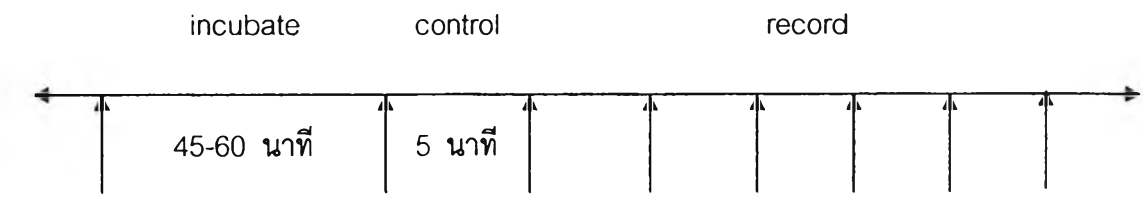
ศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมในสารละลายที่ปราศจาก calcium เพื่อดูผลของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงที่มีต่อการเปลี่ยนแปลง calcium ที่ปล่อยออกจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ (sarcoplasmic reticulum, SR) ทดลองโดยเมื่อ incubate หลอดลมที่เตรียมไว้จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ในสารละลายที่ปราศจาก calcium แล้ว บันทึกผล 5 นาทีเป็นค่า control จากนั้นให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงความเข้มข้น $1.56x10^{-2}$ % v/v ขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath นาน 5 นาที หลังจากนั้นกระตุ้นด้วย histamine ความเข้มข้น $1x10^{-4}$ M นำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบกับการให้ histamine ความเข้มข้น $1x10^{-4}$ M อย่างเดียว ในสารละลายที่ปราศจาก calcium เช่นเดียวกัน



การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลง เมื่อให้น้ำมันระเหยแบบสะสม (cumulative dose) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาวที่แยกออกจากกาย (isolated aorta) (n=6) (Rosario Jimenez, 2002)

2.1 ศึกษาผลของตัวทำละลาย (0.1% Tween 60 ในน้ำ) แบบสะสมต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกออกจากกายหนูขาว

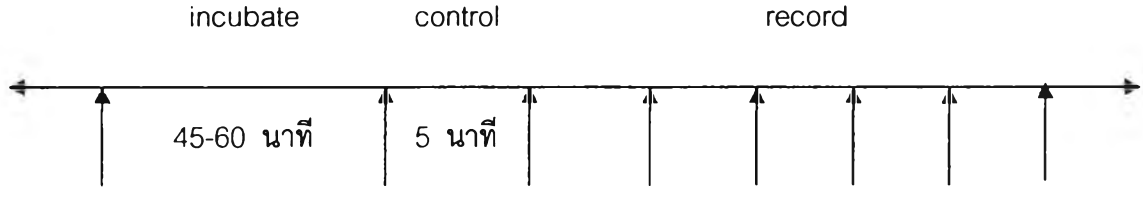
ศึกษา cumulative dose ของตัวทำละลาย 0.1% Tween 60 โดยหลังจาก incubate หลอดเลือดแดงใหญ่ที่เตรียมไว้จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ในสารละลาย Krebs-Henseleit แล้ว บันทึกผล 5 นาที เป็นค่า control แล้วจึงให้ตัวทำละลาย 0.1% Tween 60 ขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath ทุก 5 นาที จำนวน 6 ครั้ง บันทึกผลการทดลองทุกครั้งที่เติม 0.1% Tween 60 นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง



เตรียมเนื้อเยื่อ 0.1% Tween 60 ขนาด 0.1 ml ทุก 5 นาที

2.2 ศึกษาผลของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงแบบสะสมที่ละลายใน 0.1% Tween 60 ในน้ำ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกออกจากกายหนูขาว

ศึกษา cumulative dose ของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงที่ละลายใน 0.1% Tween 60 ในน้ำ โดยหลังจาก incubate หลอดเลือดแดงใหญ่ที่เตรียมไว้จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ในสารละลาย Krebs-Henseleit แล้ว บันทึกผล 5 นาทีเป็นค่า control แล้วจึงให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงที่ความเข้มข้น $2.5x10^{-5}$, $1.25x10^{-4}$, $6.25x10^{-4}$, $3.13x10^{-3}$, $1.56x10^{-2}$ และ $7.81x10^{-2}$ % v/v ในขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath ทุก 5 นาที บันทึกผลการทดลองทุกครั้งที่เติมน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงที่ละลายใน 0.1% Tween 60 ในน้ำ นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง

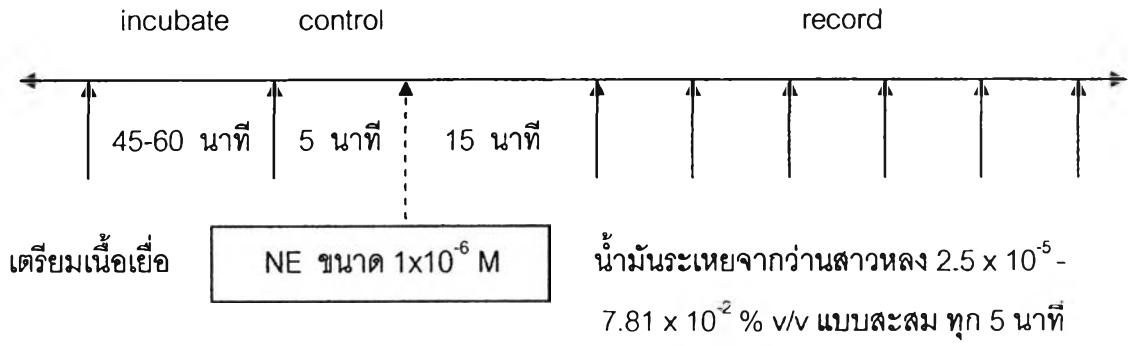


เตรียมเนื้อเยื่อ น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลง 2.5×10^{-5} - 7.81×10^{-2} % v/v แบบสะสม ทุก 5 นาที

2.3 ศึกษาผลของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงแบบสะสมที่ละลายใน 0.1% Tween 60 ในน้ำ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกออกจากกายหนูขาว เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว Norepinephrine

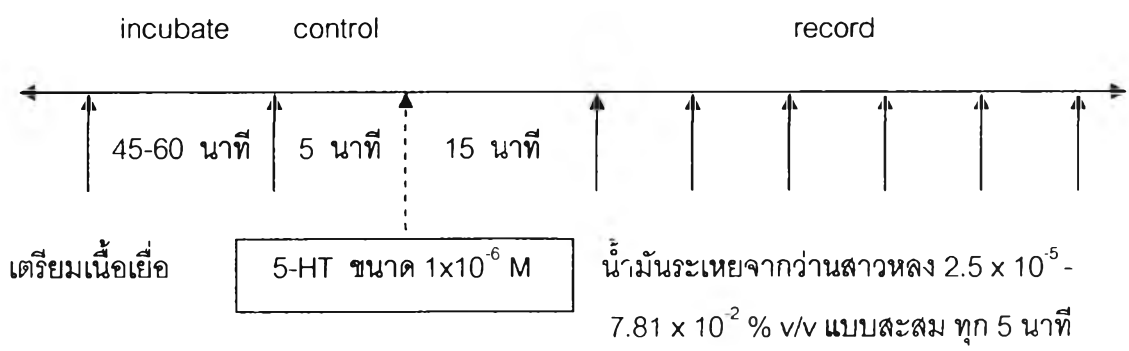
ศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่เมื่อกระตุ้นด้วย norepinephrine แล้วจึงให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงแบบสะสม โดยหลังจาก incubate หลอดเลือดแดงใหญ่ที่เตรียมไว้จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ในสารละลาย Krebs-Henseleit แล้ว บันทึกผล 5 นาทีเป็นค่า control แล้วกระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ด้วย norepinephrine ความเข้มข้น $1x10^{-6}$ M รอให้กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่มีการหดตัวคงที่ จึงให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงความเข้มข้น $2.5x10^{-5}$, $1.25x10^{-4}$, $6.25x10^{-4}$,$3.13x10^{-3}$, $1.56x10^{-2}$ และ $7.81x10^{-2}$ % v/v ขนาด

0.1 ml ลงใน organ bath ทุก 5 นาที บันทึกผลทุก 5 นาที นำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบกับการให้ norepinephrine ความเข้มข้น $1x10^{-6}$ M อย่างเดียว ในเวลา 45 นาที



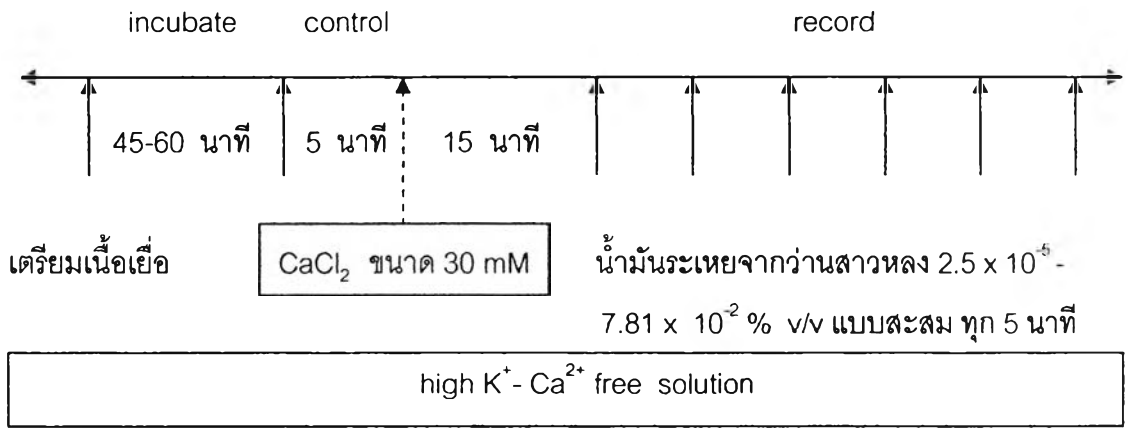
2.4 ศึกษาผลของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงแบบสะสมที่ละลายใน 0.1% Tween 60 ในน้ำ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกออกจากกายหนูขาว เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว 5-HT

ศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่เมื่อกระตุ้นด้วย 5-HT แล้วจึงให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงแบบสะสม โดยหลังจาก incubate หลอดเลือดแดงใหญ่ที่เตรียมไว้จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ในสารละลาย Krebs-Henseleit แล้ว บันทึกผล 5 นาทีเป็นค่า control แล้วกระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ด้วย 5-HT ความเข้มข้น $1x10^{-6}$ M รอให้กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่มีการหดตัวคงที่ จึงให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงความเข้มข้น $2.5x10^{-5}$, $1.25x10^{-4}$, $6.25x10^{-4}$,$3.13x10^{-3}$, $1.56x10^{-2}$ และ $7.81x10^{-2}$ % v/v ขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath ทุก 5 นาที บันทึกผลทุก 5 นาที นำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบกับการให้ 5-HT ความเข้มข้น $1x10^{-6}$ M อย่างเดียว ในเวลา 45 นาที



2.5 ศึกษาผลของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงแบบสะสมที่ละลายใน 0.1% Tween 60 ในน้ำ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ เมื่อกระตุ้นการหดตัวด้วย $CaCl_2$ ในสารละลาย high K^+- Ca^{2+} free solution

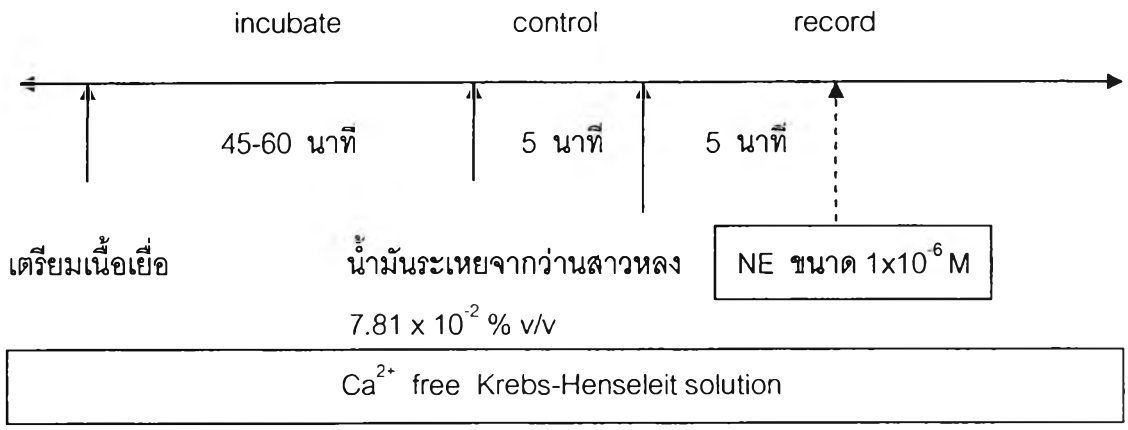
ศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ในสารละลายที่ปราศจาก calcium ที่มี potassium สูง ทดลองโดยเมื่อ incubate หลอดเลือดแดงใหญ่ที่เตรียมไว้จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ในสารละลายที่ปราศจาก calcium ที่มี potassium สูง แล้ว บันทึกผล 5 นาทีเป็นค่า control จากนั้นกระตุ้นด้วย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 30 mM รอให้กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่หดตัวคงที่ก่อน จึงให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงความเข้มข้น $2.5x10^{-5}$, $1.25x10^{-4}$, $6.25x10^{-4}$, $3.13x10^{-3}$, $1.56x10^{-2}$ และ $7.81x10^{-2}$ % v/v ขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath ทุก 5 นาที บันทึกผลทุก 5 นาที นำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบกับการให้ $CaCl_2$ ความเข้มข้น 30 mM อย่างเดียว ในเวลา 45 นาที ในสารละลายที่ปราศจาก calcium ที่มี potassium สูง เช่นเดียวกัน



2.6 ศึกษาผลของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงความเข้มข้น $7.81x10^{-2}$ %v/v ที่ละลายใน 0.1% Tween 60 ในน้ำ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ เมื่อกระตุ้นด้วย norepinephrine ใน Ca^{2+} free Krebs-Henseleit solution เพื่อดูผลของสารต่อ calcium ภายในเซลล์

ศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ในสารละลายที่ปราศจาก calcium เพื่อดูผลของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงที่มีต่อการเปลี่ยนแปลง calcium ที่ปล่อยออกจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ (sarcoplasmic reticulum, SR) ทดลองโดยเมื่อ incubate หลอดเลือดแดงใหญ่ที่เตรียมไว้จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ในสารละลายที่ปราศจาก calcium แล้ว บันทึกผล 5 นาทีเป็นค่า control จากนั้นให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงความเข้มข้น $7.81x10^{-2}$ % v/v ขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath นาน 5 นาที หลังจากนั้นกระตุ้นด้วย norepinephrine

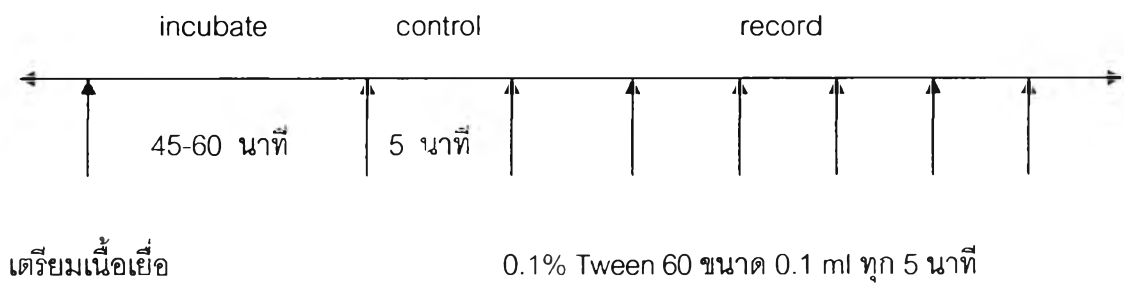
ความเข้มข้น $1x10^{-6}$ M นำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบกับการให้ norepinephrine ความเข้มข้น $1x10^{-6}$ M อย่างเดียว ในสารละลายที่ปราศจาก calcium เช่นเดียวกัน



การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลง เมื่อให้น้ำมันระเหยแบบสะสม (cumulative dose) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ที่แยกออกจากกายหนูขาว (isolated ileum) (n=6) (Agozzino, 1975)

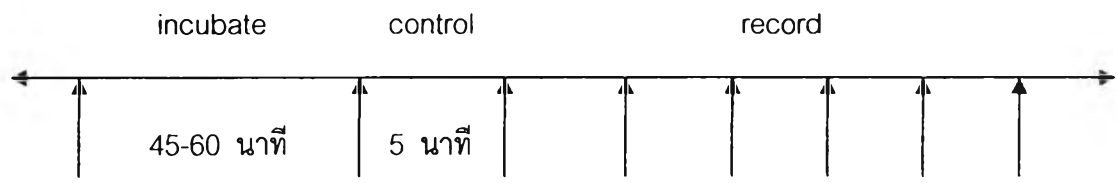
3.1 ศึกษาผลของตัวทำละลาย (0.1% Tween 60 ในน้ำ) แบบสะสมต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ที่แยกจากกายหนูขาว

ศึกษา cumulative dose ของตัวทำละลาย 0.1% Tween 60 โดยหลังจาก incubate ลำไส้เล็กส่วน ileum ที่เตรียมไว้จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ในสารละลาย Krebs-Henseleit แล้ว บันทึกผล 5 นาที เป็นค่า control แล้วจึงให้ตัวทำละลาย 0.1% Tween 60 ขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath ทุก 5 นาที จำนวน 6 ครั้ง บันทึกผลการทดลองทุกครั้งที่เติม 0.1% Tween 60 นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง



3.2 ศึกษาผลของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงแบบสะสมที่ละลายใน 0.1% Tween 60 ในน้ำ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ที่แยกจากกายหนูขาว

ศึกษา cumulative dose ของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงที่ละลายใน 0.1% Tween 60 ในน้ำ โดยหลังจาก incubate ลำไส้เล็กส่วน ileum ที่เตรียมไว้จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ในสารละลาย Krebs-Henseleit แล้ว บันทึกผล 5 นาทีเป็นค่า control แล้วจึงให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงที่ความเข้มข้น $2.5x10^{-5}$, $1.25x10^{-4}$, $6.25x10^{-4}$, $3.13x10^{-3}$,$1.56x10^{-2}$ และ $7.81x10^{-2}$ % v/v ในขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath ทุก 5 นาที บันทึกผลการทดลองทุกครั้งที่เติมน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงที่ละลายใน 0.1% Tween 60 ในน้ำ นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง

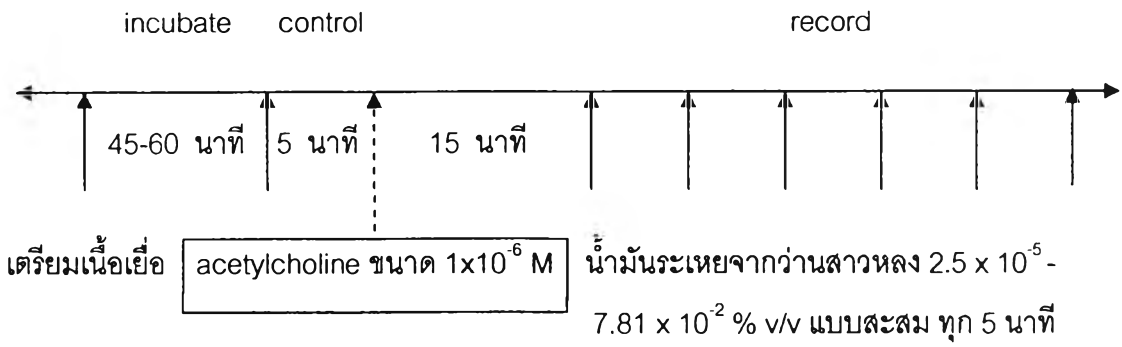


เตรียมเนื้อเยื่อ

น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลง 2.5×10^{-5} - 7.81×10^{-2} % v/v แบบสะสม ทุก 5 นาที

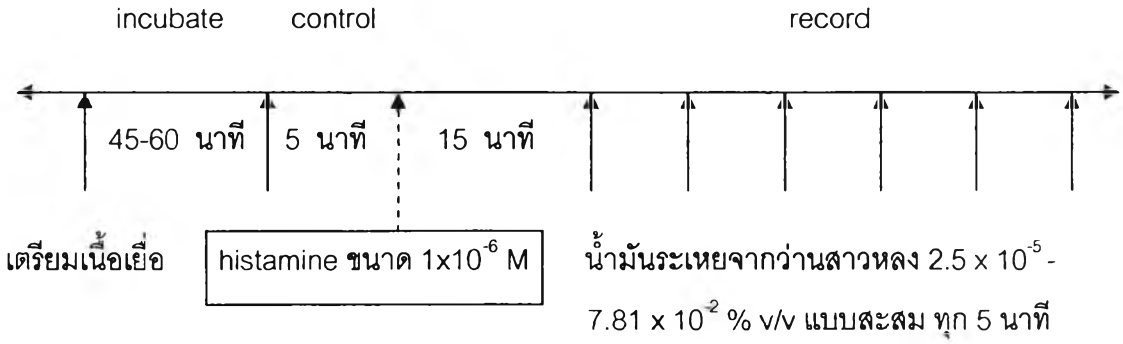
3.3 ศึกษาผลของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงแบบสะสมที่ละลายใน 0.1% Tween 60 ในน้ำต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ที่แยกจากกายหนูขาว เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว Acetylcholine

ศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum เมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine แล้วจึงให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงแบบสะสม โดยหลังจาก incubate ลำไส้เล็กส่วน ileum ที่เตรียมไว้จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ในสารละลาย Krebs-Henseleit แล้ว บันทึกผล 5 นาทีเป็นค่า control แล้วกระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ด้วย acetylcholine ความเข้มข้น $1x10^{-6}$ M รอให้กล้ามเนื้อเรียบมีการหดตัวคงที่ จึงให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงความเข้มข้น $2.5x10^{-5}$, $1.25x10^{-4}$, $6.25x10^{-4}$, $3.13x10^{-3}$,$1.56x10^{-2}$ และ $7.81x10^{-2}$ % v/v ขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath ทุก 5 นาที บันทึกผลทุก 5 นาที นำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบกับการให้ acetylcholine ความเข้มข้น $1x10^{-6}$ M อย่างเดียว ในเวลา 45 นาที



3.4 ศึกษาผลของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงแบบสะสมที่ละลายใน 0.1% Tween 60 ในน้ำ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ที่แยกจากกายหนูขาว เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว Histamine

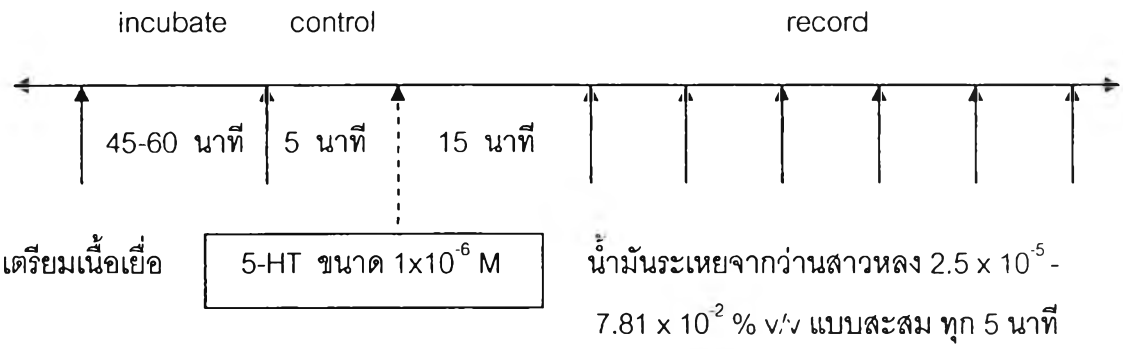
ศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum เมื่อกระตุ้นด้วย histamine แล้วจึงให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงแบบสะสม โดยหลังจาก incubate ลำไส้เล็กส่วน ileum ที่เตรียมไว้จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ในสารละลาย Krebs-Henseleit แล้ว บันทึกผล 5 นาทีเป็นค่า control แล้วกระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ด้วย histamine ความเข้มข้น $1x10^{-6}$ M รอให้กล้ามเนื้อเรียบมีการหดตัวคงที่ จึงให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงความเข้มข้น $2.5x10^{-5}$, $1.25x10^{-4}$,$6.25x10^{-4}$,$3.13x10^{-3}$, $1.56x10^{-2}$ และ $7.81x10^{-2}$ % v/v ขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath ทุก 5 นาที บันทึกผลทุก 5 นาที นำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบกับการให้ histamine ความเข้มข้น $1x10^{-6}$ M อย่างเดียว ในเวลา 45 นาที



3.5 ศึกษาผลของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงแบบสะสมที่ละลายใน 0.1% Tween 60 ในน้ำ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ที่แยกจากกายหนูขาว เมื่อให้สารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว 5-HT

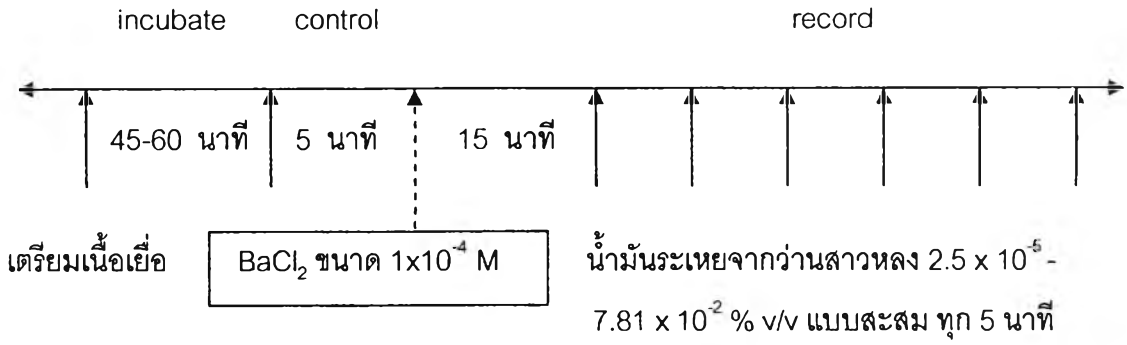
ศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum เมื่อกระตุ้นด้วย 5-HT แล้วจึงให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงแบบสะสม โดยหลังจาก incubate ลำไส้เล็กส่วน ileum ที่เตรียมไว้

จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ในสารละลาย Krebs-Henseleit แล้ว บันทึกผล 5 นาทีเป็นค่า control แล้วกระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ด้วย 5-HT ความเข้มข้น $1x10^{-6}$ M รอให้กล้ามเนื้อเรียบมีการหดตัวคงที่ จึงให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงความเข้มข้น $2.5x10^{-5}$,$1.25x10^{-4}$,$6.25x10^{-4}$,$3.13x10^{-3}$, $1.56x10^{-2}$ และ $7.81x10^{-2}$ % v/v ขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath ทุก 5 นาที บันทึกผลทุก 5 นาที นำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบกับการให้ 5-HT ความเข้มข้น $1x10^{-6}$ M อย่างเดียว ในเวลา 45 นาที



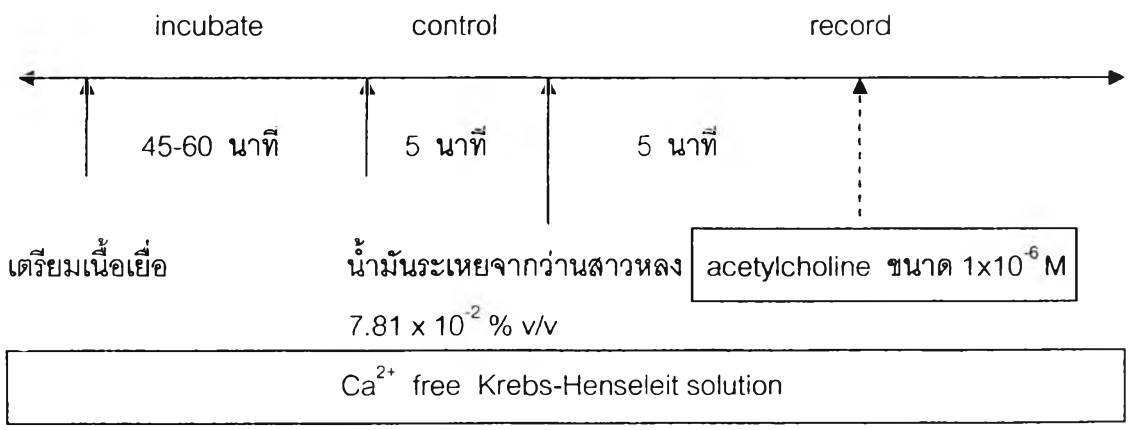
3.6 ศึกษาผลของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงแบบสะสมที่ละลายใน 0.1% Tween 60 ในน้ำ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ที่แยกจากกายหนูขาว เมื่อให้สารกระตุ้นการหดตัว $BaCl_2$

ศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum เมื่อกระตุ้นด้วย $BaCl_2$ แล้วจึงให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงแบบสะสม โดยหลังจาก incubate ลำไส้เล็กส่วน ileum ที่เตรียมไว้จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ในสารละลาย Krebs-Henseleit แล้ว บันทึกผล 5 นาทีเป็นค่า control แล้วกระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ด้วย $BaCl_2$ ความเข้มข้น $1x10^{-4}$ M รอให้กล้ามเนื้อเรียบมีการหดตัวคงที่ จึงให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงความเข้มข้น $2.5x10^{-5}$,$1.25x10^{-4}$, $6.25x10^{-4}$,$3.13x10^{-3}$, $1.56x10^{-2}$ และ $7.81x10^{-2}$ % v/v ขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath ทุก 5 นาที บันทึกผลทุก 5 นาที นำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบกับการให้ $BaCl_2$ ความเข้มข้น $1x10^{-4}$ M อย่างเดียว ในเวลา 45 นาที



3.7 ศึกษาผลของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงความเข้มข้น $7.81x10^{-2}$ % ที่ละลายใน 0.1% Tween 60 ในน้ำ ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum เมื่อกระตุ้นด้วย acetylcholine ใน Ca^{2+} free Krebs-Henseleit solution เพื่อดูผลของสารต่อ calcium ภายในเซลล์

ศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum ในสารละลายที่ปราศจาก calcium เพื่อดูผลของน้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงที่มีต่อการเปลี่ยนแปลง calcium ที่ปล่อยออกจากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ (sarcoplasmic reticulum, SR) ทดลองโดยเมื่อ incubate ลำไส้เล็กส่วน ileum ที่เตรียมไว้จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่ในสารละลายที่ปราศจาก calcium แล้ว บันทึกผล 5 นาทีเป็นค่า control จากนั้นให้น้ำมันระเหยจากว่านสาวหลงความเข้มข้น $7.81x10^{-2}$ % v/v ขนาด 0.1 ml ลงใน organ bath นาน 5 นาที หลังจากนั้นกระตุ้นด้วย acetylcholine ความเข้มข้น $1x10^{-6}$ M นำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบกับการให้ acetylcholine ความเข้มข้น $1x10^{-6}$ M อย่างเดียว ในสารละลายที่ปราศจาก calcium เช่นเดียวกัน



การวัดผลและการนำเสนอผลการวิจัย

1. การวัดผลการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลม

วัดผลการหดตัวของกล้ามกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมเป็นกรัม แล้วคำนวณเป็นร้อยละของการหดตัว (% contraction) โดยให้การหดตัวสูงสุด (maximum contraction) เท่ากับ 100%

นำเสนอเป็น cumulative dose-response curve ในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± standard error of mean)

2. การวัดผลการหดตัวของกล้ามกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่

วัดผลการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่เป็นกรัม แล้วคำนวณเป็นร้อยละของการหดตัว (% contraction) โดยให้การหดตัวสูงสุด (maximum contraction) เท่ากับ 100%

นำเสนอเป็น cumulative dose-response curve ในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± standard error of mean)

3. การวัดผลการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum

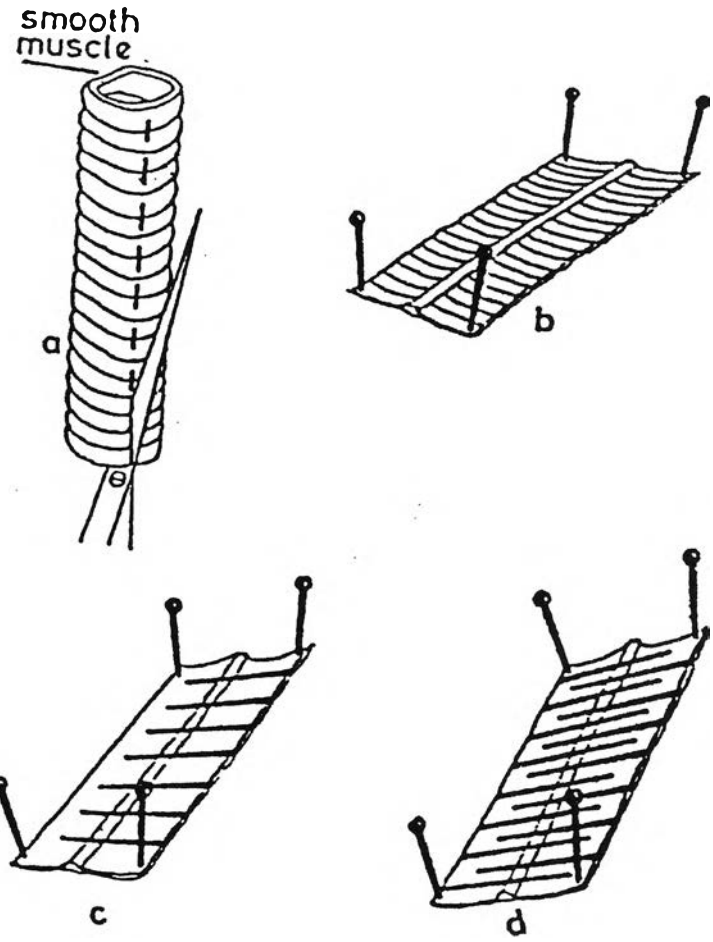
วัดผลการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum เป็นกรัม แล้วคำนวณเป็นร้อยละของการหดตัว (%contraction) โดยให้การหดตัวสูงสุด (maximum contraction) เท่ากับ 100%

นำเสนอเป็น cumulative dose-response curve ในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± standard error of mean)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

1. การวิเคราะห์ผลทางสถิติในการศึกษาผลของน้ำมันระเหยจากเหง้าของว่านสาวหลง (*Amomum biflorum* Jack.) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบอวัยวะต่างๆ ที่แยกจากกาย โดยทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารมาตรฐานกระตุ้นการหดตัว ใช้สถิติ Independent sample t – test (unpaired t-test) โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p<0.05$)

2. การวิเคราะห์ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงแรงหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบในกลุ่มเดียวกัน เมื่อเทียบกับค่าสูงสุดของการหดตัวที่เวลาเริ่มต้น ใช้สถิติ Repeated measures ANOVA โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p<0.05$)



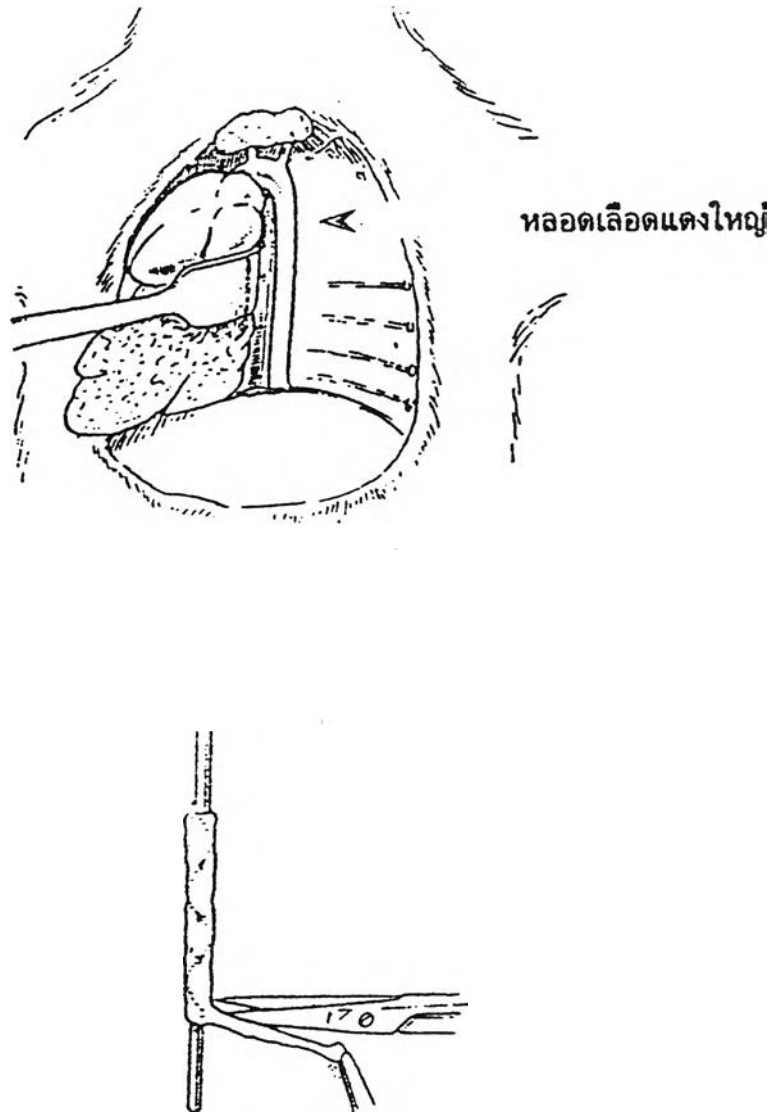
a = ตัดหลอดลมตามแนวเส้นปะ

b = หลอดลมที่ตัดตามแนวยาวแล้วนำมากางออก

c = ตัดด้านข้างตามแนวตัด

d = ตัดอีกข้างหนึ่งให้เยื้องกับข้างเดิม

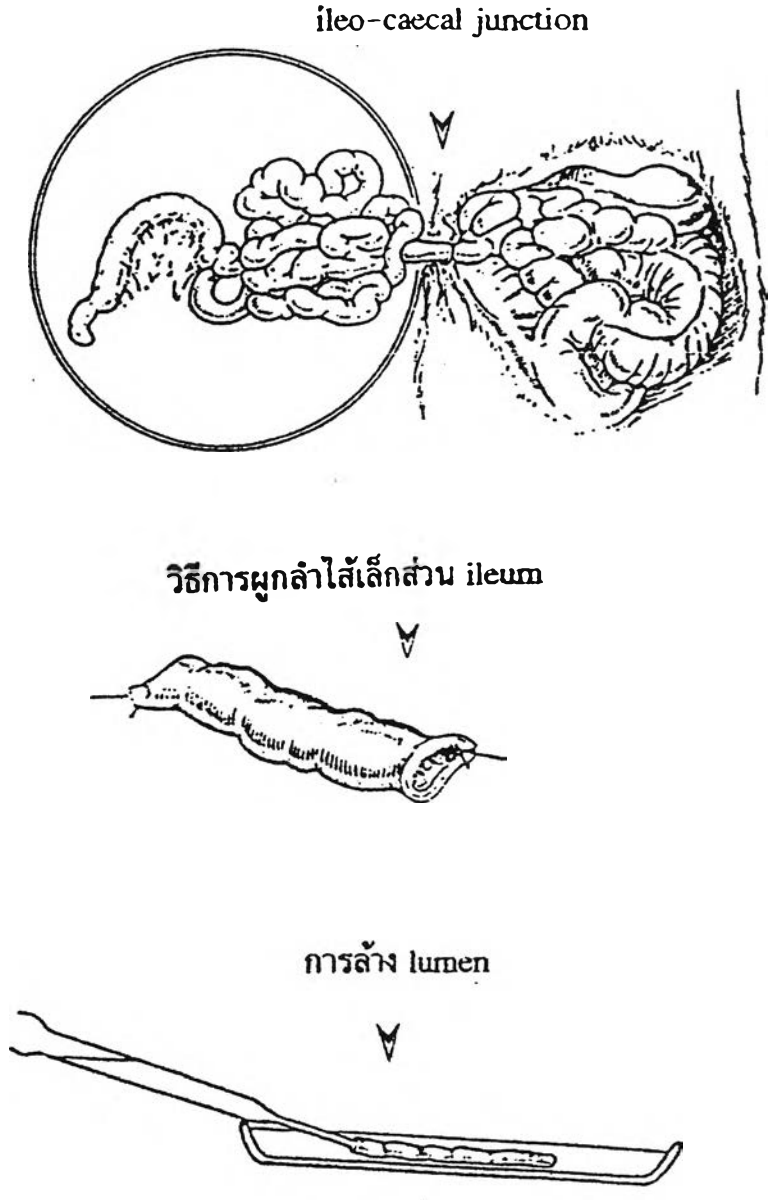
ภาพที่ 8 แสดงวิธีการเตรียมกล้ามเนื้อเรียบหลอดลม โดยการตัดแบบซิกแซก (zigzag)



<u>วิธีการตัดแบบเกลียว</u> (spiral)

ภาพที่ 9 แสดงตำแหน่งหลอดเลือดแดงใหญ่ (Thoracic aorta) และวิธีการเตรียมกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ โดยการตัดแบบเกลียว (spiral)

I22461188



ภาพที่ 10 แสดงตำแหน่งลำไส้เล็กส่วน ileum และวิธีการเตรียมกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วน ileum