บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

- หนูขาวสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนักระหว่าง 250 - 300 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม
- หนูตะเภา เพศผู้ น้ำหนักระหว่าง 250 - 300 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม
- กระต่ายสายพันธุ์ New Zealand เพศผู้ น้ำหนักระหว่าง 2 - 3 กิโลกรัม จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

2.1 Organ bath แบบ Double Walled Harvard Type ซึ่งประกอบด้วยหลอดแก้วสองชั้น ชั้นในบรรจุสารละลายหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความจุ 20 ml. และมีช่องเปิดให้แก๊ส carbogen (95%O_2 + 5%CO_2) ผ่านเข้าได้ ชั้นนอกมีน้ำไหลเวียนซึ่งมาจาก Water bath โดยมี Thermoregulating Water Pump ทำหน้าที่ควบคุมอุณหภูมิของหลอดแก้วชั้นในให้คงที่ที่ 37 ^{o} C ตลอดเวลาทำการทดลอง (ดังแสดงในรูปที่ 12 และ 13)

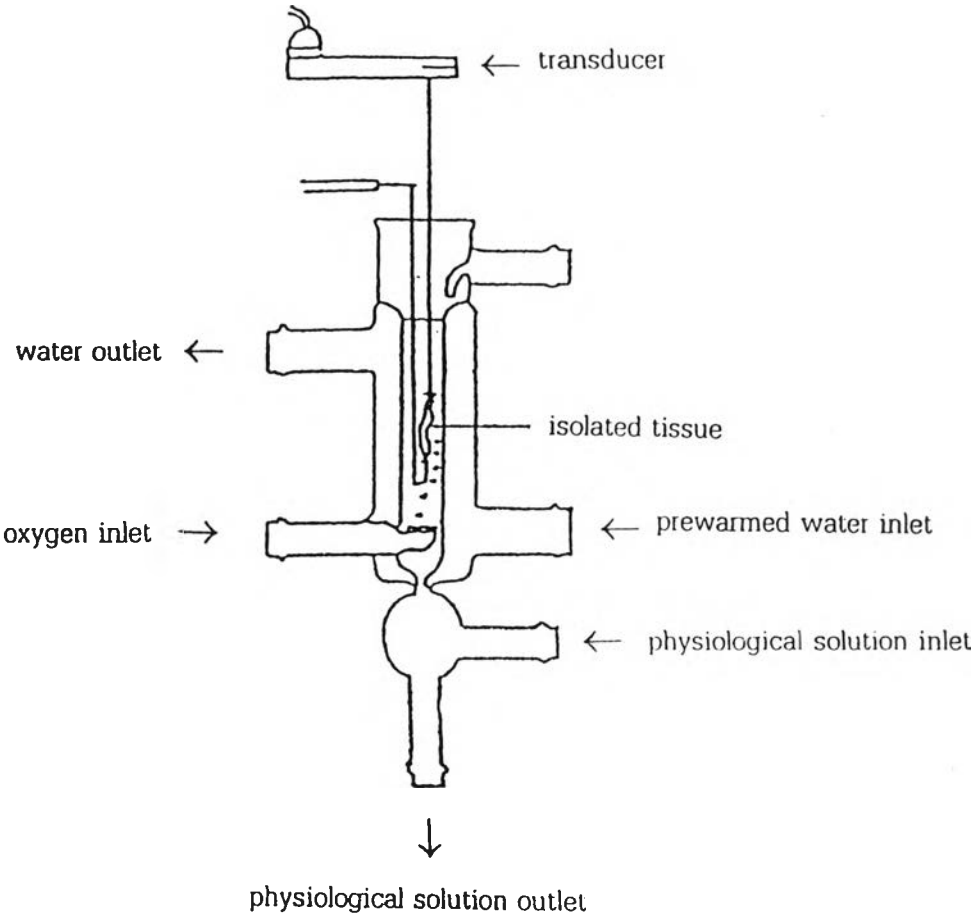
2.2 Water bath ชนิด Thermo Bath model SCBI พร้อม Thermoregulating Water Pump Model 2E - NY

2.3 Force or Isometric transducer (โดยให้ใช้คาน 1 แผ่น) สำหรับแปลงแรงของการหดตัวไปเป็นสัญญาณไฟฟ้า เพื่อส่งไปยังเครื่องบันทึก

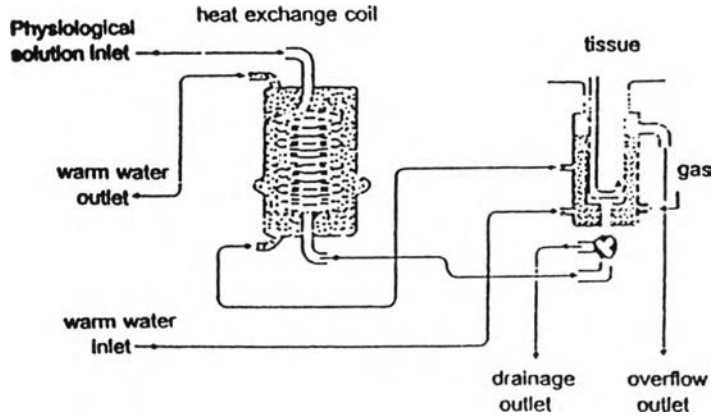
2.4 เครื่องแปลงสัญญาณ Maclab / 4e^{TM}

2.5 เครื่องปรับแต่งสัญญาณ Maclab ^{TM} Bridge Amp

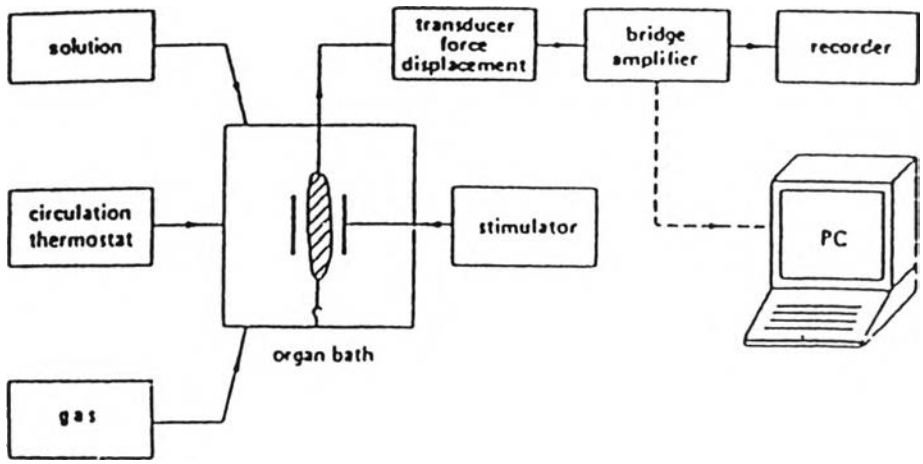
2.6 เครื่องบันทึกสัญญาณและแสดงผลไมโครคอมพิวเตอร์ Macintosh $^{®}$ รุ่น LC 475 (ดังแสดงในรูปที่ 14)



รูปที่ 12 แสดงลักษณะของ organ bath



รูปที่ 13 แสดงวงจรการควบคุมอุณหภูมิภายใน organ bath



รูปที่ 14 แสดงวงจรการทดลอง , การแปลผลและการบันทึกผลการทดลอง

2.7 เครื่องกระตุ้นไฟฟ้า (stimulator) Model S 101 และ Platinum electrode

2.8 เครื่องชั่งละเอียด Metler AJ 180

2.9 ชุดเครื่องมือผ่าตัดเล็ก (minor surgery instrument)

2.10 ลูกตุ้มน้ำหนัก 1 กรัม

2.11 Microsyringes ขนาดต่าง ๆ

3. สารเคมี

3.1 สารทดลอง

- Bergenin (Sigma chemical)

3.2 สารมาตรฐาน

- Caffeine (Sigma chemical)
- Norepinephrine (Sigma chemical)

3.3 สารที่ใช้เป็นส่วนประกอบในสารละลาย Krebs Solution ในอัตราส่วนกรัมต่อลิตร (G/L)

-	Sodium chloride	5.54	G/L
-	Potassium chloride	0.35	G/L
-	Magnesium sulfate	0.29	G/L
-	Calcium chloride	0.28	G/L
-	Sodium bicarbonate	0.16	G/L
-	Potassium dibasic phosphate	2.10	G/L
-	Glucose	2.10	G/L

3.4 สารที่ใช้เป็นส่วนประกอบในสารละลาย Tyrode 's Solution ในอัตราส่วนกรัมต่อลิตร (G/L)

-	Sodium chloride	8.00	G/L
-	Potassium chloride	0.20	G/L
-	Magnesium sulfate	0.10	G/L
-	Calcium chloride	0.20	G/L

-	Sodium bicarbonate	1.00	G/L
-	Potassium dibasic phosphate	0.05	G/L
-	Glucose	1.00	G/L

3.5 Gas

- Carbogen (95% O_2 + 5% CO_2) จากบริษัท TIG

4. วิธีดำเนินการวิจัย

4.1 การเตรียมหัวใจห้องบนขวาและซ้ายของหนูขาวและหนูตะเภา

ทำหนูให้สลบโดยการตีบริเวณรอยต่อระหว่างต้นคอและศีรษะแล้วดึงกระดูกคอให้หลุด (cervical dislocation) หลังจากนั้นผ่าตัดโดยเปิดเข้าสู่ทางช่องท้องเพื่อผ่านเข้าสู่ช่องอกแล้วตัดแยกหัวใจออกมาโดยตัดบริเวณเส้นเลือดใหญ่ Aorta กระตุ้นให้หัวใจบีบตัวเพื่อไล่เลือดภายในหัวใจห้องบนออกให้หมดในภาชนะที่มีสารละลาย Krebs Solution อยู่ แล้วจึงนำมาใส่ใน Petri dish ที่มีสารละลาย Krebs Solution และ gas carbogen ผ่านตลอด แล้วจึงตัดแยกหัวใจด้านล่างออกรวมทั้งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ติดอยู่ออกจนหมดหลังจากนั้นจึงตัดแยกหัวใจห้องบนขวาและซ้ายออกจากกัน

4.1.1 การแขวนเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนขวา

- ผูกปลายเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนขวาทั้งสองด้านด้วยด้าย โดยให้มีทิศทางตามแนวการบีบตัวของเนื้อเยื่อหัวใจ
- ปลายข้างหนึ่งผูกเป็นห่วงขนาดพอควร นำลงไปเกี่ยวกับตะขอที่ด้านล่างของ organ bath ด้านใน
- ปลายอีกข้างหนึ่งผูกกับ force transducer
- ปรับเนื้อเยื่อหัวใจให้มีความตึงตัว (tension) พอเหมาะประมาณ 1 กรัม
- เนื้อเยื่อหัวใจห้องบนขวานี้ใช้ศึกษาอัตราการเต้นของหัวใจ โดยมีหน่วยวัดเป็นครั้งต่อนาที (beat per minute ; BPM) (ดังแสดงในรูปที่ 15)

4.1.2 การแขวนเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนซ้าย

- ผูกปลายของเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนซ้ายด้านหนึ่งด้วยด้าย แล้วนำไปผูกกับ force transducer

- ปลายอีกด้านหนึ่งของเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนซ้าย เกี่ยวด้วยแท่ง Platinum electrode ตามแนวการบีบตัวของเนื้อเยื่อหัวใจแล้วนำลงไปใน organ bath อีกอันหนึ่ง

- ทำการต่อแท่ง Platinum electrode กับเครื่องกระตุ้นไฟฟ้าโดยใช้ขนาดศักดาไฟฟ้า 5 โวลต์ (v) ช่วงระยะเวลาการกระตุ้นแต่ละครั้งเท่ากับ 5 มิลลิวินาที (msec) ความถี่ของการกระตุ้น 250 ครั้งต่อนาที (BPM) (สำหรับหนูขาว) และความถี่ของการกระตุ้น 230 ครั้งต่อนาที (BPM) (สำหรับหนูตะเภา)

- ปรับเนื้อเยื่อหัวใจให้มีความตึงตัว (tension) พอเหมาะประมาณ 1 กรัม

- เนื้อเยื่อหัวใจห้องบนซ้ายนี้ใช้ศึกษาแรงบีบตัวของหัวใจโดยหน่วยวัดเป็นกรัม (gram ; g)

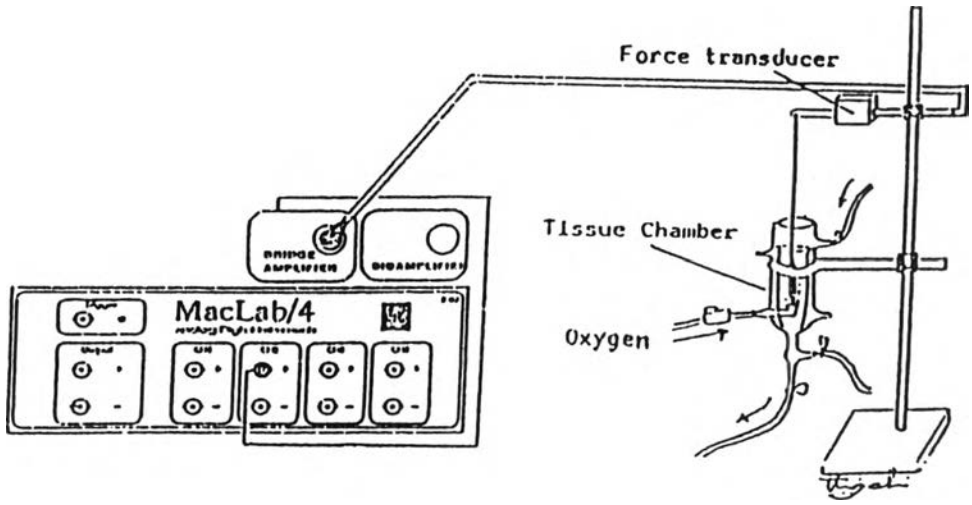
- เมื่อแขวนเนื้อเยื่อหัวใจเรียบร้อยแล้วก่อนทำการทดลองทุกครั้งต้องปรับให้เนื้อเยื่อหัวใจอยู่ในสภาวะที่คงที่ก่อนจึงเริ่มทำการทดลอง (ดังแสดงในรูปที่ 16)

4.2 การเตรียมลำไส้เล็กของกระต่าย

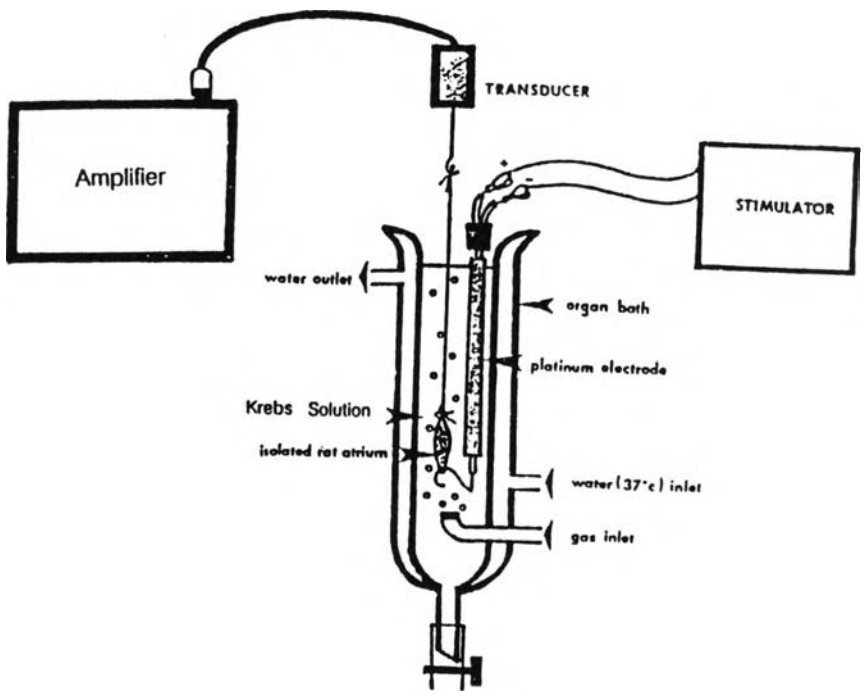
- อดอาหารกระต่ายไม่ต่ำกว่า 12 ชั่วโมง (1 คืน) ก่อนการทดลองโดยให้แต่น้ำ

- ทำกระต่ายให้สลบโดยการตีบริเวณรอยต่อระหว่างต้นคอและศีรษะ แล้วดึงกระดูกคอให้หลุด (cervical dislocation)

- ทำการผ่าตัดเปิดบริเวณหน้าท้องออก สังเกตหาลำไส้เล็กส่วน Jejunum ซึ่งอยู่ใต้กระเพาะอาหารประมาณ 5 - 10 เซนติเมตร ตัดส่วน Jejunum ออกจากตัวสัตว์ทดลองให้ยาวที่สุด ใส่ลงใน Beaker ที่มี Tyrode's Solution อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C และให้ gas carbogen ตลอดเวลา



รูปที่ 15 แสดงการแขวนเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนขวา พร้อมการจัดเครื่องมือในการทดลอง

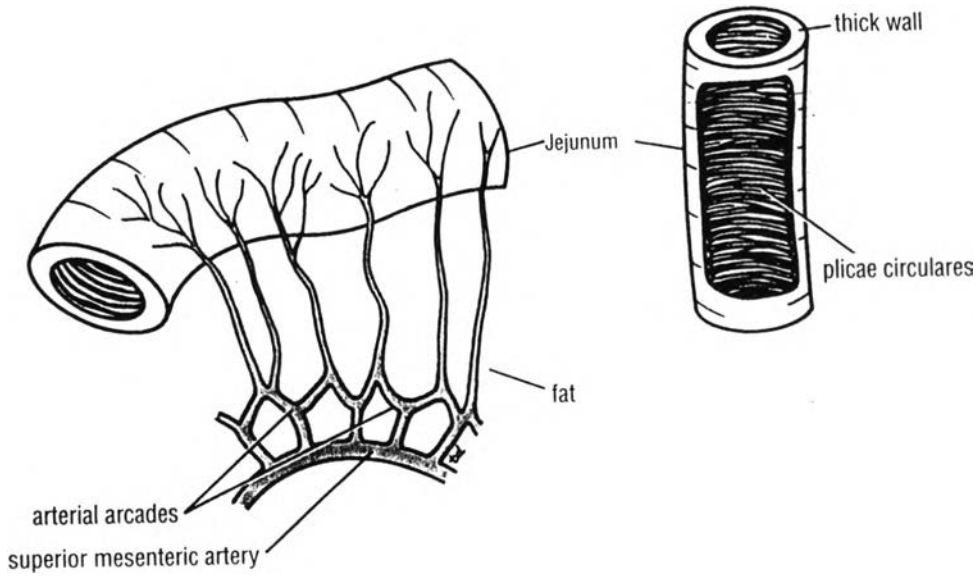


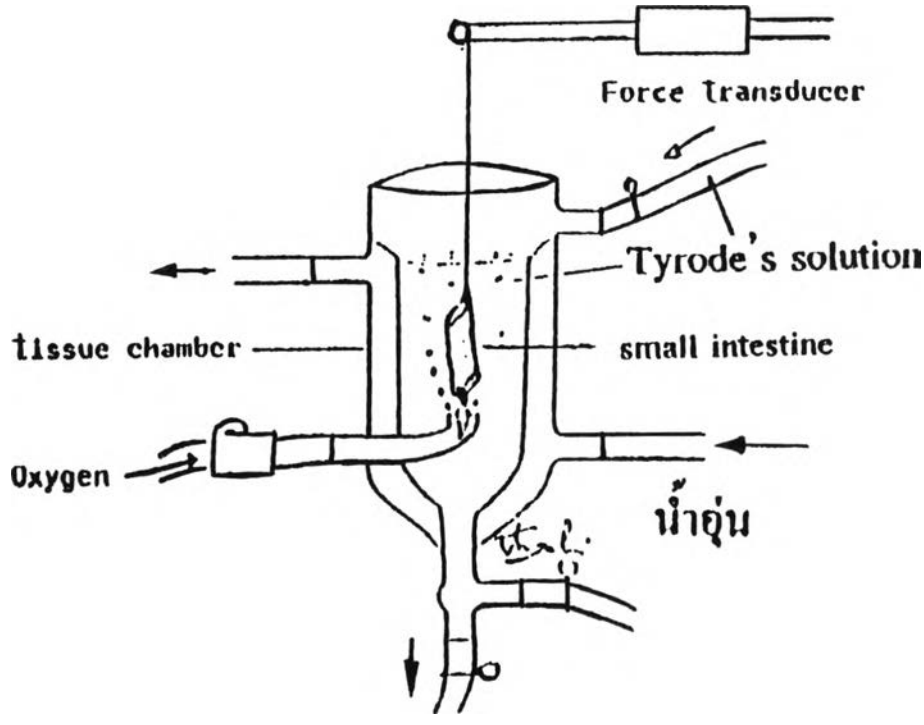
รูปที่ 16 แสดงการแขวนเนื้อเยื่อหัวใจห้องบนซ้าย พร้อมการจัดเครื่องมือในการทดลอง

- ทำการล้างของเหลือที่ติดค้างอยู่ในลำไส้ออกให้หมด โดยใช้ปากคีบจับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ติดอยู่แล้วตัดลำไส้เล็กออกยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ใส่ลงใน Beaker ที่มี Tyrode's Solution อุณหภูมิ 37 °C และให้ gas carbogen ตลอดเวลา
- ผูกปลายของเนื้อเยื่อทั้งสองด้านด้วยด้ายแบบทะแยงมุม ปลายข้างหนึ่งผูกเป็นห่วงขนาดพอควรนำลงเกี่ยวกับตะขอที่ด้านล่างของ organ bath ด้านใน ปลายอีกข้างหนึ่งผูกกับ force transducer โดยจัดให้ด้ายมีความตึง (tension) พอเหมาะประมาณ 1 กรัมและอยู่ตรงกลาง chamber
- ใน chamber จะมี Tyrode's Solution ที่มีอุณหภูมิ 37 °C และให้ gas carbogen ตลอดเวลา
- Incubate เนื้อเยื่อประมาณ 60 นาที จนกระทั่งเนื้อเยื่อมีความตึงตัวคงที่จึงเริ่มทำการทดลอง (ดังแสดงในรูปที่ 17)

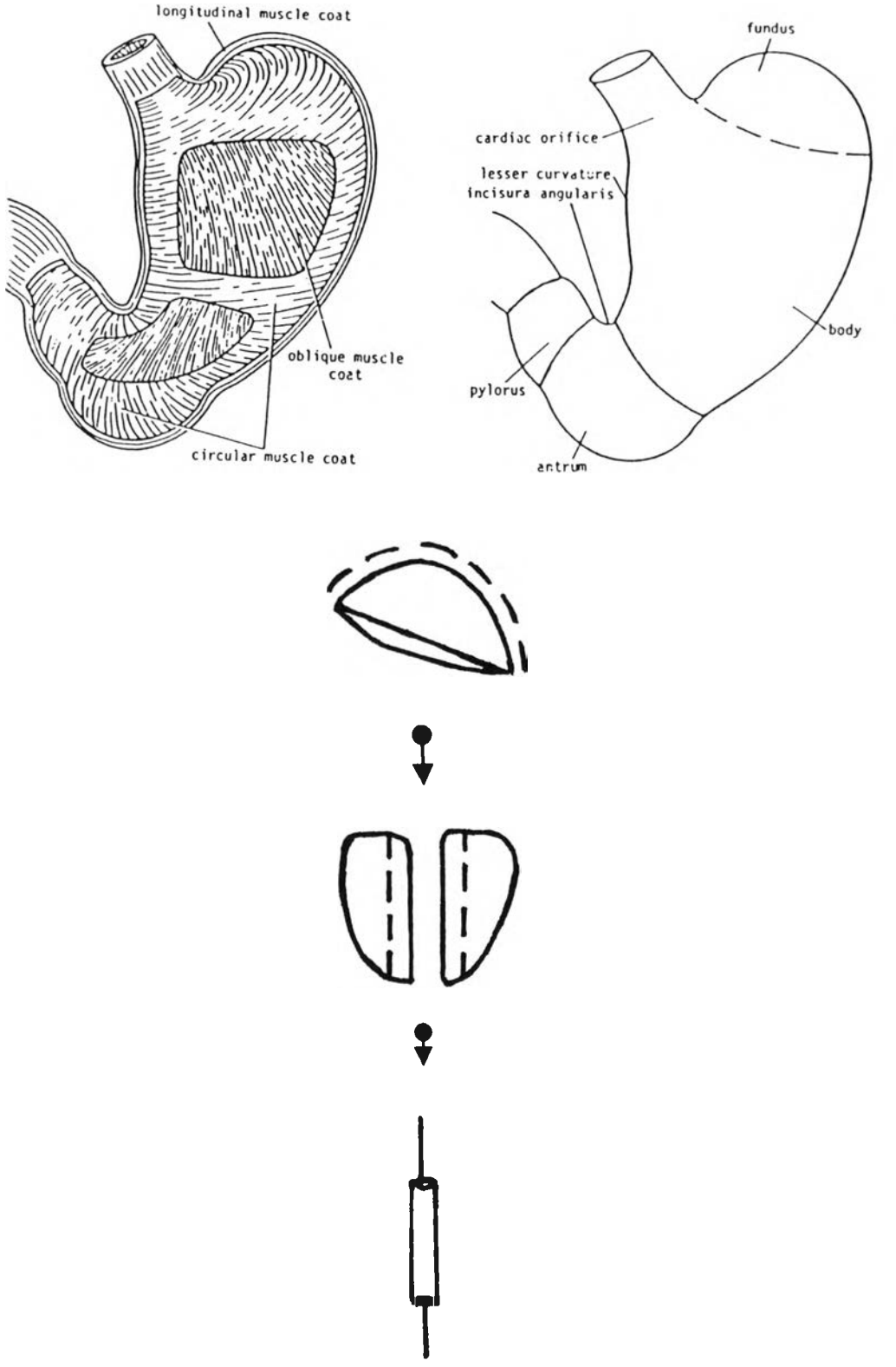
4.3 การเตรียมกล้ามเนื้อเรียบกระเพาะอาหารหนูขาว

- อดอาหารหนูขาวไม่ต่ำกว่า 12 ชั่วโมงก่อนการทดลอง โดยให้แต่น้ำ
- ทำหนูให้สลบโดยตีบริเวณรอยต่อระหว่างต้นคอและศีรษะแล้วดึงกระดูกคอให้หลุด (cervical dislocation)
- ทำการผ่าตัดโดยเปิดช่องท้องแล้วตัดกระเพาะอาหารส่วนฟันดัสออกแช่ไว้ใน Tyrode's Solution อุณหภูมิ 37 °C และให้ gas carbogen ตลอดเวลา
- ตัดกระเพาะอาหารส่วนฟันดัสออกเป็น 2 ส่วน โดยตัดกึ่งกลางตามความโค้ง หลังจากนั้นตัดแต่ละส่วนออกเป็น longitudinal strips ขนาด 3 x 15 mm. โดยขนานกับกึ่งกลางตามความโค้งที่ตัดไว้
- ผูกปลายเนื้อเยื่อทั้งสองด้านด้วยด้าย โดยปลายข้างหนึ่งนำไปเกี่ยวกับตะขอที่ด้านล่างของ organ bath ด้านใน ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งผูกกับ force transducer
- ปรับเนื้อเยื่อให้มีความตึงตัว (tension) พอเหมาะประมาณ 1 กรัม
- Incubate เนื้อเยื่อประมาณ 60 นาที จนกระทั่งเนื้อเยื่อมีความตึงตัวคงที่จึงเริ่มทำการทดลอง (ดังแสดงในรูปที่ 18)





รูปที่ 17 แสดงวิธีการเตรียมกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กของกระต่ายและวิธีการแขวนเนื้อเยื่อเข้ากับ force transducer



รูปที่ 18 แสดงวิธีการเตรียมกล้ามเนื้อเรียบกระเพาะอาหารหนูขาว

4.4 ศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ Bergenin ต่อการทำงานของหัวใจห้องบนขวาและซ้ายที่แยกจากหนูขาวและหนูตะเภา

4.4.1 ศึกษาผลการทำงานของหัวใจห้องบนขวาและซ้ายในสภาวะปกติที่แยกจากหนูขาว

เมื่อทำการ incubate หัวใจจนกระทั่งหัวใจห้องบนขวาและซ้ายมีการเต้นที่คงที่แล้วบันทึกผลเป็น control 30 วินาที แล้วบันทึกผลต่ออีก 15 นาที

incubate ---------- control ---------- บันทึกผล
30 - 45 นาที 30 วินาที 15 นาที

4.4.2 ศึกษาผลของ Ethanol 5 µl ต่อการทำงานของหัวใจห้องบนขวาและซ้ายที่แยกจากหนูขาว

เมื่อทำการ incubate หัวใจจนกระทั่งหัวใจห้องบนขวาและซ้ายมีการเต้นที่คงที่แล้วบันทึกผลเป็น control 30 วินาที จึงให้ Ethanol ขนาด 5 µl แล้วบันทึกผลต่อ 15 นาที

incubate ---------- control ---------- Ethanol & บันทึกผล
30 - 45 นาที 30 วินาที 5 µl 15 นาที

4.4.3 ศึกษาผลของ Bergenin 0.5×10^{-5} M ต่อการทำงานของหัวใจห้องบนขวาและซ้ายที่แยกจากหนูขาวเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ Ethanol ขนาด 5 µl

เมื่อทำการ incubate หัวใจจนกระทั่งหัวใจห้องบนขวาและซ้ายมีการเต้นที่คงที่แล้วบันทึกผลเป็น control 30 วินาที จึงให้ Bergenin ขนาด 0.5×10^{-5} M แล้วบันทึกผลต่อ 15 นาที

incubate ---------- control ---------- Bergenin & บันทึกผล
30 - 45 นาที 30 วินาที 0.5×10^{-5} M 15 นาที

4.4.4 ศึกษาผลของ Ethanol 10 μl ต่อการทำงานของหัวใจห้องบนขวาและซ้ายที่แยกจากหนูขาว

เมื่อทำการ incubate หัวใจจนกระทั่งหัวใจห้องบนขวาและซ้ายมีการเต้นที่คงที่แล้วบันทึกผลเป็น control 30 วินาที จึงให้ Ethanol ขนาด 10 μl แล้วบันทึกผลต่อ 15 นาที

incubate ---------- control ---------- Ethanol & บันทึกผล

30 - 45 นาที 30 วินาที 10 μl 15 นาที

4.4.5 ศึกษาผลของ Bergenin 1 x 10^{-5} M ต่อการทำงานของหัวใจห้องบนขวาและซ้ายที่แยกจากหนูขาวเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ Ethanol ขนาด 10 μl

เมื่อทำการ incubate หัวใจจนกระทั่งหัวใจห้องบนขวาและซ้ายมีการเต้นที่คงที่แล้วบันทึกผลเป็น control 30 วินาที จึงให้ Bergenin ขนาด 1 x 10^{-5} M แล้วบันทึกผลต่อ 15 นาที

incubate ---------- control ----------Bergenin & บันทึกผล

30 - 45 นาที 30 วินาที 1 x10^{-5} M 15 นาที

4.4.6 ศึกษาผลของ Bergenin 1 x 10^{-5} M ต่อการทำงานของหัวใจห้องบนขวาและซ้ายที่แยกจากหนูตะเภาเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูขาวที่ได้รับ Bergenin ขนาดเท่ากัน

เมื่อทำการ incubate หัวใจจนกระทั่งหัวใจห้องบนขวาและซ้ายมีการเต้นที่คงที่แล้วบันทึกผลเป็น control 30 วินาที จึงให้ Bergenin ขนาด 1 x 10^{-5} M แล้วบันทึกผลต่อ 15 นาที

incubate ---------- control ---------- Bergenin & บันทึกผล

30 - 45 นาที 30 วินาที 1 x 10^{-5} M 15 นาที

4.4.7 ศึกษาผลของ NE 1×10^{-8} M ต่อการทำงานของหัวใจห้องบนขวาและซ้ายที่แยกจากหนูขาวเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูขาวที่ได้รับ Bergenin ขนาด 1×10^{-5} M

เมื่อทำการ incubate หัวใจจนกระทั่งหัวใจห้องบนขวาและซ้ายมีการเต้นที่คงที่แล้วบันทึกผลเป็น control 30 วินาที จึงให้ NE ขนาด 1×10^{-8} M แล้วบันทึกผลต่อ 15 นาที

incubate	control	NE & บันทึกผล
30 - 45 นาที	30 วินาที	1×10^{-8} M 15 นาที

4.5 ศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของ Bergenin ต่อ intracellular calcium ใน SR ของหัวใจห้องบนซ้ายของหนูขาวที่กระตุ้นด้วยไฟฟ้า

4.5.1 ศึกษาผลของ Caffeine 1×10^{-4} M ต่อ intracellular calcium ใน SR ของหัวใจห้องบนซ้ายของหนูขาว

เมื่อทำการ incubate หัวใจจนกระทั่งหัวใจห้องบนซ้ายมีแรงบีบตัวที่คงที่แล้ว บันทึกผลเป็น control 30 วินาที แล้วหยุดกระตุ้นหัวใจด้วยไฟฟ้า 5 นาที แล้วกระตุ้นหัวใจด้วยไฟฟ้าอีกครั้ง บันทึกผลการทดลอง 30 วินาที หลังจากนั้นทำการ incubate หัวใจใหม่จนกระทั่งมีการทำงานที่คงที่แล้ว ให้สาร Caffeine ขนาด 1×10^{-4} M เป็นเวลา 30 วินาที แล้วหยุดกระตุ้นหัวใจด้วยไฟฟ้า 5 นาที จึงกระตุ้นหัวใจด้วยไฟฟ้าอีกครั้ง บันทึกผลเป็นเวลา 30 วินาที

incubate	control	หยุดกระตุ้น	กระตุ้น
30 นาที	30 วินาที	5 นาที	30 วินาที

พัก	Caffeine 1×10^{-4} M	หยุดกระตุ้น	กระตุ้น
10 - 15 นาที	30 วินาที	5 นาที	30 วินาที

4.5.2 ศึกษาผลของ Bergenin 1 x 10^{-5} M ต่อ intracellular calcium ใน SR ของหัวใจห้องบนซ้ายของหนูขาวที่กระตุ้นด้วยไฟฟ้า (กลุ่มที่ 1 และ กลุ่มที่ 2)

เมื่อทำการ incubate หัวใจจนกระทั่งหัวใจห้องบนซ้ายมีแรงบีบตัวที่คงที่แล้ว บันทึกผลเป็น control 30 วินาที แล้วหยุดกระตุ้นหัวใจด้วยไฟฟ้า 5 นาที แล้วกระตุ้นหัวใจด้วยไฟฟ้าอีกครั้ง บันทึกผลการทดลอง 30 วินาที หลังจากนั้นทำการ incubate หัวใจใหม่จนกระทั่งมีการทำงานที่คงที่แล้ว ให้สาร Bergenin ขนาด 1 x 10^{-5} M เป็นเวลา 30 วินาที แล้วหยุดกระตุ้นหัวใจด้วยไฟฟ้า 5 นาที จึงกระตุ้นหัวใจด้วยไฟฟ้าอีกครั้ง บันทึกผลเป็นเวลา 30 วินาที

incubate ---------- control -------- หยุดกระตุ้น ---------- กระตุ้น ---------->>
30 นาที 30 วินาที 5 นาที 30 วินาที

<<---------- พัก -------- Bergenin 1 x 10^{-5} M ---------- หยุดกระตุ้น ---------- กระตุ้น
10 - 15 นาที 30 วินาที 5 นาที 30 วินาที

4.6 ศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ Bergenin ต่อการทำงานของลำไส้เล็กกระต่ายที่ตัดแยกจากกาย

4.6.1 ศึกษาผลของ Ethanol แบบสะสมขนาดความเข้มข้น (5 , 10 และ 15 µl ตามลำดับ) ต่อการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กของกระต่าย

เมื่อทำการ incubate ลำไส้จนกระทั่งเนื้อเยื่อมีความตึงตัวคงที่แล้ว บันทึกผลเป็น control 3 นาที จึงให้ Ethanol ขนาด 5 µl นาน 3 นาที แล้วตามด้วย Ethanol ขนาด 10 µl นาน 3 นาที หลังจากนั้นให้ Ethanol ขนาด 15 µl แล้วบันทึกผลต่อ 15 นาที

incubate -------- control -------- Ethanol 5 µl -------- Ethanol 10 µl --------- Ethanol 15 µl
60 นาที 3 นาที 3 นาที 3 นาที 15 นาที

I 20123103

4.6.2 ศึกษาผลของ Bergenin แบบสะสมขนาดความเข้มข้น (0.5×10^{-5} M , 1×10^{-5} M และ 1.5×10^{-5} M ตามลำดับ) ต่อการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กของกระต่าย

เมื่อทำการ incubate ลำไส้จนกระทั่งเนื้อเยื่อมีความตึงตัวคงที่แล้วบันทึกผลเป็น control 3 นาที จึงให้ Bergenin ขนาด 0.5×10^{-5} M นาน 3 นาที แล้วตามด้วย Bergenin ขนาด 1×10^{-5} M นาน 3 นาที หลังจากนั้นให้ Bergenin ขนาด 1.5×10^{-5} M แล้วบันทึกผลต่อ 15 นาที

incubate --- control ---- Bergenin 0.5×10^{-5} M ---- Bergenin 1×10^{-5} M ---- Bergenin 1.5×10^{-5} M
60 นาที 3 นาที 3 นาที 3 นาที 15 นาที

4.7 ศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ Bergenin ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบกระเพาะอาหารของหนูขาว

4.7.1 ศึกษาผลของ Ethanol แบบสะสมขนาดความเข้มข้น (5 , 10 และ 15 µl ตามลำดับ) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบกระเพาะอาหารของหนูขาว

เมื่อทำการ incubate เนื้อเยื่อจนกระทั่งกล้ามเนื้อมีความตึงตัวคงที่แล้วบันทึกผลเป็น control 3 นาที จึงให้ Ethanol ขนาด 5 µl นาน 3 นาที แล้วตามด้วย Ethanol ขนาด 10 µl นาน 3 นาที หลังจากนั้นให้ Ethanol ขนาด 15 µl แล้วบันทึกผลต่อ 15 นาที

incubate -------- control -------- Ethanol 5 µl -------- Ethanol 10 µl -------- Ethanol 15 µl
60 นาที 3 นาที 3 นาที 3 นาที 15 นาที

4.7.2 ศึกษาผลของ Bergenin แบบสะสมขนาดความเข้มข้น (0.5×10^{-5} M , 1×10^{-5} M และ 1.5×10^{-5} M ตามลำดับ) ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบกระเพาะอาหารของหนูขาว

เมื่อทำการ incubate เนื้อเยื่อจนกระทั่งกล้ามเนื้อมีความตึงตัวคงที่แล้วบันทึกผลเป็น control 3 นาที จึงให้ Bergenin ขนาด 0.5×10^{-5} M นาน 3 นาที แล้วตามด้วย Bergenin ขนาด 1×10^{-5} M นาน 3 นาที หลังจากนั้นให้ Bergenin ขนาด 1.5×10^{-5} M แล้วบันทึกผลต่อ 15 นาที

incubate --- control ---- Bergenin 0.5×10^{-5} M ---- Bergenin 1×10^{-5} M ---- Bergenin 1.5×10^{-5} M

60 นาที 3 นาที 3 นาที 3 นาที 15 นาที

5. **การวิเคราะห์ข้อมูล**

- ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ยร้อยละ ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (% response ± standard error of mean)

- การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลภายในกลุ่มระหว่างก่อนและหลังการทดลองใช้ Student ' s paired t - test ส่วนการเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองใช้ Student ' s unpaired t - test โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P < 0.05$) และ 99 % ($P < 0.01$)

- ในแต่ละการศึกษาจะใช้จำนวนสัตว์ทดลองไม่น้อยกว่า 5 ตัว ($n \geq 5$)