

อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

ก. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

ในการวิจัยใช้สัตว์ทดลองหลายชนิด ทั้งเพศผู้และเมีย น้ำหนักแตกต่างกันในแต่ละการวิจัย และทำการวิจัยทั้งในสภาพที่ปกติ สภาพที่สลบ และนำอวัยวะบางอย่างออกมาวิจัย โดยใช้หนูถีบจักร (mice) พันธุ์ Swiss Albino และหนูขาว (rat) พันธุ์ Wistar จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม หนูตะเภาและกระต่าย จากฟาร์มหลายแห่ง สัตว์ทดลองเลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปของ Gold Coin Mills ประเทศสิงคโปร์ และน้ำประปากรุงเทพฯ

2. เครื่องมือ

เนื่องจากการวิจัยได้ทำหลายระบบ จึงแยกใช้เครื่องมือหลายชนิด ดังนี้

- ชุด isolated organ bath เป็นชนิดที่ทำเองในประเทศไทย ประกอบด้วย 2 ชั้น ส่วนชั้นในมีความจุ 20 มิลลิลิตร เป็นส่วนที่ใช้บรรจุ perfusion medium และอวัยวะที่แยกออกมาจากกายสัตว์ทดลอง ส่วนชั้นนอกจะเป็นส่วนที่มีการหมุนเวียนของน้ำอุ่น 37°C จาก Thermo bath ซึ่งทำให้ perfusion medium ในส่วนชั้นในมีอุณหภูมิ $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ตลอดการทดลอง

- Thermo Bath model SCBI สามารถกำหนดอุณหภูมิได้ตามต้องการ

- วัดแรงหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้ กระเพาะอาหาร และหลอดเลือดใช้ Oscellograph recorder, isotonic, isometric transducer ของบริษัท Harvard Apparatus และขยายแรงหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบโดยใช้บันทึกใน Gilson Recorder N 2.

- วัดความดันเลือด, วัดอัตราการเต้นของหัวใจ และแรงบีบตัวของหัวใจในหนูขาว ใช้ pressure transducer ของ Washington Transducer บันทึกผลการทดลองโดย Polygraph Recorder ของ Washington 400 MD. 2c และกระตุ้นหัวใจ โดยใช้ Stimulator S101A

- เครื่องวัดอุณหภูมิทางทวารหนัก Elektrolaboratoriet ของบริษัท Copenhagen

3. สารเคมี

- สารสกัดหยาบหนาวเดือนห้า สกัดโดย รศ.ดร. รพีพล ภาโววาท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- Atropine sulfate (Sigma); Cyproheptadine hydrochloride (Sigma); Verapamil hydrochloride (Knoll); L-phenylephrine hydrochloride (Sigma); Heparine hydrochloride (Sigma)

- สารเคมีที่ใช้ทำสารละลายสำหรับเลี้ยงอวัยวะต่าง ๆ ที่แยกออกมาจากสัตว์ทดลอง ได้แก่ NaCl, KCl, NaHCO₃, CaCl₂, MgCl₂, NaHPO₄ (จาก Merk), d-Glucose (จาก BHD Chemical Ltd.), MgSO₄·7H₂O (May and Baker Ltd.) และ KH₂PO₄ (จาก Mallinckrodt)

ข. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย และแสดงค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean \pm standard error of the means) เปรียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง โดยใช้ student's paired t-test พิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P < 0.05) ทุกการทดลอง ยกเว้นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบหนาวเดือนห้าต่อการบีบตัวของลำไส้หนูถีบจักรที่มีสภาพปกติ ซึ่งวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ student's unpaired t-test พิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P < 0.05)

ค. วิธีการวิจัย

การเตรียมสารสกัดหยาบหนาวเดือนห้า

สารสกัดหยาบหนาวเดือนห้า (Methanol Extract) สกัดโดย ผศ.ดร. รพีพล ภาโววาท มีลักษณะเป็นก้อนเหนียวสีน้ำตาล-ดำ ใส่สารสกัดในขวดปิดฝาสนิทเก็บไว้ในที่มืดแสง เมื่อทำการวิจัยนำสารสกัดหยาบหนาวเดือนห้ามาชั่ง 2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จำนวน 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายไปกรองด้วยกระดาษกรอง ได้สารละลายสีน้ำตาลใส เติมน้ำกลั่นในสารละลายจนกระทั่งมีความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (คิดความเข้มข้นของสารโดยนำสารที่กรองได้ไปหักออกจากน้ำหนัก 2 กรัม) เก็บสารละลายใส่ขวดสีน้ำตาลเก็บในตู้เย็น สารละลายที่เตรียมเก็บไว้จะไม่นานเกิน 1 เดือน และจะเตรียมใหม่

1. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบหนาวเดือนห้าต่ออุณหภูมิกระต่าย

ใช้กระต่ายเพศผู้และเมีย น้ำหนัก 2-2.6 กิโลกรัม จำนวน 5 ตัว restrained กระต่าย และใส่ probe temp ซึ่งสำหรับวัดอุณหภูมิทางทวารหนักทุกตัว รอให้สัตว์ทดลองสงบเป็นเวลา 30 นาที เริ่มทำการวัดอุณหภูมิตัวละ 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 5 นาที ครบ 15 นาที จึงให้สารสกัดหยาบหนาวเดือนห้าขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทาง marginal vein ทุกตัว บันทึกอุณหภูมิ พฤติกรรม และอาการแสดง

2. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบหนาวเดือนห้าต่อการหดเกร็งของลำไส้หนูตะเภาที่แยกออกจากกาย

ใช้หนูตะเภาเพศผู้และเมีย น้ำหนัก 250-350 กรัม อดอาหารประมาณ 14-16 ชั่วโมงก่อนการทดลองโดยให้แต่น้ำอย่างเดียว ทำให้สลบโดยการทุบบริเวณรอยต่อระหว่างต้นคอและหัว แล้วผ่าเปิดหน้าท้องเพื่อตัดเอาส่วน ileum โดยตัดให้ห่างจาก ileocaecal junction ประมาณ 10 เซนติเมตร นำส่วนที่ตัดได้มาใส่ใน petridish ที่มีสารละลาย Tyrode (ส่วนประกอบตามตารางที่ 1) อยู่พร้อมด้วยก๊าซผสม (95% O₂ + 5% CO₂) ผ่านตลอดเวลา ตัดไขมันและเนื้อเยื่อออกตามวิธีของ Perry W.L.M. (1968) ใช้ syringe ส้างลำไส้ด้านในด้วยสารละลาย Tyrode แล้วตัดแบ่งลำไส้ออกเป็นท่อน ๆ ละ ประมาณ 1-2 เซนติเมตร ใช้ด้ายผูกปลายทั้ง 2 ด้าน ให้ปลายทั้งสองเปิดเพื่อให้สารละลาย Tyrode ผ่านได้ ผูกปลายด้านหนึ่งติดกับแท่งพลาสติก นำไปใส่ในกระเปาะแก้ว 2 ชั้น ซึ่งภายในบรรจุสารละลาย Tyrode 20 มิลลิลิตร โดยควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำที่ไหลผ่านตลอดจาก water bath ที่ 37 °C และภายในกระเปาะแก้วมีก๊าซผสมไหลผ่านตลอด ปลายอีกด้านหนึ่งของลำไส้ไปผูกกับ isotonic transducer ซึ่งต่อกับ recorder ปรับลำไส้ให้มีความตึงตัว (tension) 1 กรัม incubate ประมาณ 30 นาที เมื่อลำไส้มีการหดเกร็งสม่ำเสมอแล้ว ให้สารสกัดหยาบหนาวเดือนห้าในขนาดต่าง ๆ แบบ Cumulative doses บันทึกการหดเกร็งของลำไส้หนูตะเภาที่เกิดขึ้น

ล้างลำไส้หนูตะเภาขึ้นเดิมด้วยสารละลาย Tyrode 3-5 ครั้ง incubate นาน 30 นาที เมื่อลำไส้มีการหดเกร็งสม่ำเสมอแล้ว ให้สารที่ยับยั้งการหดเกร็งของลำไส้ ได้แก่ atropine, cyproheptadine, verapamil แล้วจึงใส่สารสกัดหยาบหนาวเดือนห้าในขนาดต่าง ๆ เท่าเดิม บันทึกการหดเกร็งของลำไส้หนูตะเภาที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับผลการทดลองข้างต้น เพื่อศึกษาว่าสาร 3 ตัว คือ atropine, cyproheptadine และ verapamil มีผลยับยั้งฤทธิ์ของสารสกัดหยาบหนาวเดือนห้าต่อการหดเกร็งของลำไส้หนูตะเภาได้หรือไม่

3. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบหนาวเดือนฟ้าต่อการหดเกร็งของลำไส้ กระต่ายที่แยกออกจากกาย

ใช้กระต่ายเพศผู้-เมีย น้ำหนัก 2-2.5 กิโลกรัม อดอาหารประมาณ 14-16 ชั่วโมงก่อนการทดลองให้แต่น้ำ เตรียมลำไส้กระต่ายวิธีเดียวกับลำไส้หนูตะเภา เปิดหน้าท้องตัดเอาลำไส้เล็กส่วน jejunum นำมาใส่ใน beaker ที่มีสารละลาย Tyrode และก๊าซ (95% O₂ + 5% CO₂) ผ่านตลอด ตัดไขมันและเนื้อเยื่อออก ล้างลำไส้ ตัด และผูกวิธีเดียวกับลำไส้หนูตะเภา incubate นาน 30 นาที เมื่อลำไส้มีการหดเกร็งสม่ำเสมอแล้วให้สารสกัดหยาบหนาวเดือนฟ้าในขนาดต่าง ๆ แบบ cumulative doses บันทึกการหดเกร็งของลำไส้กระต่าย

ล้างลำไส้กระต่ายขึ้นเดิมด้วยสารละลาย Tyrode 3-5 ครั้ง incubate นาน 30 นาที เมื่อลำไส้มีการหดเกร็งสม่ำเสมอแล้วให้ atropine ก่อนให้สารสกัดหยาบหนาวเดือนฟ้า ในขนาดต่าง ๆ เช่นเดิม บันทึกการหดเกร็งของลำไส้กระต่ายเปรียบเทียบกับเมื่อให้สารสกัดหยาบหนาวเดือนฟ้าเพียงอย่างเดียว

4. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบหนาวเดือนฟ้าต่อการหดเกร็งของกระเพาะ อาหารหนูขาวที่แยกออกจากกาย

ใช้หนูขาว (rat) เพศผู้ น้ำหนัก 250-350 กรัม อดอาหารประมาณ 14-16 ชั่วโมงก่อนการทดลองให้แต่น้ำ ทำให้สลบโดยทุบบริเวณรอยต่อระหว่างต้นคอและหัว เปิดหน้าท้องตัดเอากระเพาะอาหารออกมาทั้งหมดใส่ลงใน petri-dish ซึ่งมีสารละลาย Krebs (ส่วนประกอบตามตารางที่ 1) มีก๊าซผสม (95% O₂ + 5% CO₂) ผ่านตลอด การวิจัยจะศึกษาเฉพาะกล้ามเนื้อส่วน longitudinal ทำตามวิธีของ Perry W.L.M. (1968) ตัดกระเพาะอาหารแยกออกมาจะพบส่วน fundus และ pyloric antrum ชัดเจน ในการวิจัยนี้จะใช้ส่วน fundus ตัดแยกส่วน fundus ออกมา แล้วนำมาล้างด้วยสารละลาย Krebs หลาย ๆ ครั้ง ตัด fundus ตามยาวเพื่อศึกษาเฉพาะกล้ามเนื้อส่วน longitudinal ขึ้นหนึ่งมีความกว้าง 0.5 เซ็นติเมตร ยาว 2 เซ็นติเมตร ผูกปลายด้านหนึ่งของขึ้นเนื้อกับแท่งพลาสติกนำไปใส่ในกระเพาะแก้ว 2 ชั้น ซึ่งภายในบรรจุสารละลาย Krebs ที่มีก๊าซผสมผ่านตลอด และควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C ปลายอีกด้านหนึ่งผูกกับเส้นด้าย แล้วไปผูกกับ isometric transducer ซึ่งต่อกับเครื่องบันทึก polygraph ปรับให้กล้ามเนื้อมีความตึงประมาณ 1 กรัม incubate นาน 1 ชั่วโมง แล้วใส่สารสกัดหยาบหนาวเดือนฟ้าในขนาดต่าง ๆ แบบ cumulative doses บันทึกการหดเกร็งของกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารหนูขาว

ล้างกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารหนูขาวขึ้นเดิมด้วยสารละลาย Krebs 3-5 ครั้ง incubate นาน 30-45 นาที จนกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารกลับคืนสภาพเดิม (ลงถึง base line เดิม) จึงให้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการหดเกร็งของกระเพาะอาหาร คือ atropine, cyproheptadine ก่อนแล้วจึงให้สารสกัดหยาบหนาวเดือนห้าในขนาดต่าง ๆ เท่าเดิม บันทึกการหดเกร็งของกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารหนูขาวเปรียบเทียบกับ การทดลองข้างต้น

5. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบหนาวเดือนห้าต่อการบีบตัวของกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารทั้งกระเพาะของหนูถีบจักรที่แยกออกมาจากกาย

ใช้หนูถีบจักรเพศผู้ น้ำหนัก 20-25 กรัม อดอาหารให้แต่น้ำก่อนการทดลอง 14-16 ชั่วโมง ฆ่าโดยดิ่งทางให้กระดูกสันหลังเคลื่อน ผ่าเปิดหน้าท้องแยกเอากระเพาะอาหารทั้งกระเพาะออกมาล้างเศษอาหารภายในให้หมด โดยการฉีดสารละลาย Krebs สอดสายโพลีเอธิลีนซึ่งภายในบรรจุสารละลาย Krebs ใส่เข้าไปในกระเพาะอาหารทางส่วนที่ต่อกับลำไส้ ผูกเชือกให้แน่น ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งของสายโพลีเอธิลีนต่อกับ three-way ซึ่งต่อกับ pressure transducer สำหรับวัดแรงดันภายในกระเพาะอาหาร ฉีดสารละลาย Krebs ผ่านทาง three-way เพื่อบรรจุสารละลายลงไปในกระเพาะอาหาร ไม่ให้มีฟองอากาศอยู่ภายในรีบผูกปลายอีกด้านของกระเพาะส่วนที่ต่อกับหลอดอาหาร นำกระเพาะอาหารมาแช่ในกระเปาะแก้ว 2 ชั้น incubate กระเพาะอาหาร 1 ชั่วโมง แล้วใส่สารสกัดหยาบหนาวเดือนห้าขนาดต่างๆ ในกระเปาะแก้ว 2 ชั้น บันทึกการบีบตัวของกล้ามเนื้อกระเพาะอาหาร

ล้างกระเพาะอาหารหนูถีบจักรขึ้นเดิมด้วยสารละลาย Krebs 3-5 ครั้ง incubate นาน 30-45 นาที จนกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารกลับคืนสภาพเดิม (ลงถึง base line เดิม) จึงใส่สารยับยั้งการบีบตัวของกระเพาะอาหารบางตัว คือ atropine, cyproheptadine, veramil ก่อนใส่สารสกัดหยาบหนาวเดือนห้า บันทึกการบีบตัวของกระเพาะอาหารหนูถีบจักร เปรียบเทียบกับใส่สารสกัดหยาบหนาวเดือนห้าเพียงอย่างเดียว

6. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบหนาวเดือนห้าต่อการบีบตัวของลำไส้หนูถีบจักรสภาพปกติ

การวิจัยนี้อาศัยการเคลื่อนที่ของผงถ่านเป็นตัววัดการบีบตัวของลำไส้หนูถีบจักรที่มีสภาพปกติ วิธีการทดลองทำตามวิธีของ Macht และ Barba-Gose (1931) การเตรียม charcoal meal เตรียมโดยใช้ tragacanth 2 กรัม เป็นสารช่วย

แขวนตะกอนผงถ่าน โดยบด tragacanth กับผงถ่านให้เข้ากันทีละน้อย ๆ พร้อมเติมน้ำ บดต่อไปพร้อมเติมน้ำครบ 130 มิลลิลิตร

การวิจัยใช้หนูถีบจักรเพศผู้ น้ำหนัก 20-22 กรัม อุดอาหารเป็นเวลา 14-16 ชั่วโมงก่อนการทดลองโดยให้แต่น้ำ แบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละประมาณ 10-15 ตัว การจัดกลุ่มหนูจะเลือกน้ำหนักหนูกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมใกล้เคียงกัน

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ฉีดน้ำเกลือ (0.9% Normal saline) 0.1 มล. เข้าช่องท้องหนูเว้นระยะ 15 นาที แล้วให้ผงถ่านที่เตรียมเข้าทางปาก ปริมาตร 0.3 มล. เมื่อครบ 30 นาที ฆ่าหนูทุกตัวพร้อมกัน วัดระยะทางการเคลื่อนไปของผงถ่านในลำไส้

กลุ่มที่ 2 ฉีดสารสกัดหยาบหนวดเดือนห้า 10 มก./กก. เข้าช่องท้องหนูเว้นระยะ 15 นาที แล้วให้ผงถ่านที่เตรียมเข้าทางปาก ปริมาตร 0.3 มล. เมื่อครบ 30 นาที ฆ่าหนูทุกตัวพร้อมกัน วัดระยะทางการเคลื่อนไปของผงถ่านในลำไส้

กลุ่มที่ 3 ฉีดสารสกัดหยาบหนวดเดือนห้า 100 มก./กก. เข้าช่องท้องหนูเว้นระยะ 15 นาที แล้วให้ผงถ่านที่เตรียมเข้าทางปาก ปริมาตร 0.3 มล. เมื่อครบ 30 นาที ฆ่าหนูทุกตัวพร้อมกัน วัดระยะทางการเคลื่อนไปของผงถ่านในลำไส้

กลุ่มที่ 4 ให้อาหารสกัดหยาบหนวดเดือนห้า 100 มก./กก. เข้าทางปากหนูเว้นระยะ 15 นาที แล้วให้ผงถ่านที่เตรียมเข้าทางปาก ปริมาตร 0.3 มล. เมื่อครบ 30 นาที ฆ่าหนูทุกตัวพร้อมกัน วัดระยะทางการเคลื่อนไปของผงถ่านในลำไส้

นำเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนของผงถ่านในกลุ่ม 2, 3, 4 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 1

7. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบหนวดเดือนห้าต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด

7.1 ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบหนวดเดือนห้าต่อความดันเลือดหนูขาวที่สลบ

ใช้หนูขาวเพศผู้ น้ำหนักประมาณ 330-380 กรัม ทำให้สลบโดยฉีด Pentobarbital sodium เข้าช่องท้องขนาด 50 มก./กก. ผ่าตัดเปิดบริเวณ

คอหอยหลอดเลือด carotid artery เพื่อวัดความดันเลือดโดยใช้สายโพลีเอทิลีน (เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร) ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งจะต่อกับ pressure transducer ซึ่งบรรจุเต็มด้วยน้ำเกลือที่มี heparin อยู่ 100 i.u. ต่อมิลลิลิตร จากนั้นผ่าตัดบริเวณขาหน้าหลังเพื่อสอดท่อโพลีเอทิลีน (เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร) เข้าหลอดเลือดดำ ส่วนปลายอีกข้างจะติดกับเข็มซึ่งต่อกับ three-way stop-cock และกระบอกฉีดบรรจุน้ำเกลือซึ่งมี heparin อยู่ 100 i.u. ต่อมิลลิลิตร เช่นกัน การวัดความดันเลือดจะวัดค่าบน (systolic) และค่าล่าง (diastolic) หนักนุประมาณ 20 นาที วัดความดันเลือดขณะที่ยังไม่ได้รับสารใดๆ เป็นค่าเปรียบเทียบ จากนั้นจึงฉีดสารสกัดหยาบหนาวเดือนห้าขนาด 0.06 มก./กก., 0.6 มก./กก. และ 6 มก./กก. ทางหลอดเลือดดำ บันทึกค่าความดันเลือดที่เปลี่ยนแปลงขณะให้สารสกัดหยาบหนาวเดือนห้าในขนาดต่าง ๆ ดังกล่าว จากนั้นจึงให้ atropine 3 มก./กก. ทางหลอดเลือดดำ ประมาณ 5 นาที ต่อมาจึงให้สารสกัดหยาบหนาวเดือนห้าในขนาดต่าง ๆ เท่าเดิม ทางหลอดเลือดดำ เปรียบเทียบค่าความดันเลือดหนุขาวขณะให้สารสกัดหยาบหนาวเดือนห้าเพียงอย่างเดียวกับเมื่อให้ atropine ก่อนให้สารสกัดหยาบหนาวเดือนห้า

7.2 ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบหนาวเดือนห้าต่อการหดเกร็งของหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนุขาวที่แยกออกมาจากกาย

ใช้หนุขาวเพศผู้น้ำหนักประมาณ 330-380 กรัม ทำให้หนุสลบโดยตีบริเวณรอยต่อของคอกับหัว แล้วรีบตัดคอให้เลือดออกโดยเร็ว เปิดบริเวณทรวงอกเลาะเอาหลอดเลือดส่วน thoracic aorta ให้ยาวประมาณ 4 เซ็นติเมตร นำมาใส่ petridish ซึ่งมีสารละลาย Krebs โดยมีก๊าซผสม (95% O₂ + 5% CO₂) ไหลผ่านตลอด เลาะเอาเนื้อเยื่อรอบ ๆ เส้นเลือดออกให้หมด แล้วตัดเส้นเลือดแบบแนวเฉียงหนาประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 2 เซ็นติเมตร มัดปลายทั้งสองด้วยเส้นด้ายโดยนำปลายด้านหนึ่งผูกแท่งพลาสติก นำไปใส่ในกระเปาะแก้ว 2 ชั้น ซึ่งมีสารละลาย Krebs อยู่ 20 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 37 °C มีก๊าซ (95% O₂ + 5% CO₂) ผ่านตลอด ผูกปลายอีกด้านหนึ่งกับ isotonic transducer และดึงหลอดเลือดให้มีแรงดึงประมาณ 1 กรัม incubate นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นกระตุ้นหลอดเลือดแดง aorta ด้วย L-phenylephrine 1×10^{-6} โมล แล้วจึงใส่สารสกัดหยาบหนาวเดือนห้า 2 มก./มล. บันทึกการหดเกร็งของหลอดเลือดแดง aorta

7.3 ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบหนาวเดือนห้าต่อแรงบีบตัว และอัตราการเต้นของหัวใจห้องบนซ้าย-ขวา ที่แยกออกมาจากหนูขาว

ใช้หนูขาวเพศผู้ น้ำหนักประมาณ 240-270 กรัม ทำให้สลบโดยตีบริเวณรอยต่อหัวกับคอ ตัดคอให้เลือดไหลออกมากที่สุด รีบเปิดอกตัดเอาหัวใจออกมาใส่ใน petridish ที่มีสารละลาย Ringer-Locke และมีก๊าซ O_2 ไหลผ่านตลอด รีบตัดแยกเอาส่วน auricle ออก แล้วตัดแยกออกเป็น auricle ด้านขวาและด้านซ้าย ใช้ด้ายผูกหัวใจด้านขวาโดยผูกปลายด้านหนึ่งกับแท่งพลาสติก นำไปใส่กระเปาะแก้ว 2 ชั้น ภายในมีสารละลาย Ringer-Locke ที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 °C มีก๊าซ O_2 ผ่านตลอด ปลายด้ายอีกด้านนำไปผูกกับ transducer เพื่อบันทึกอัตราการเต้นโดยดึงด้วยแรงประมาณ 0.5 กรัม incubate นาน 45 นาที จนอัตราการเต้นคงที่ จึงเริ่มทดลอง

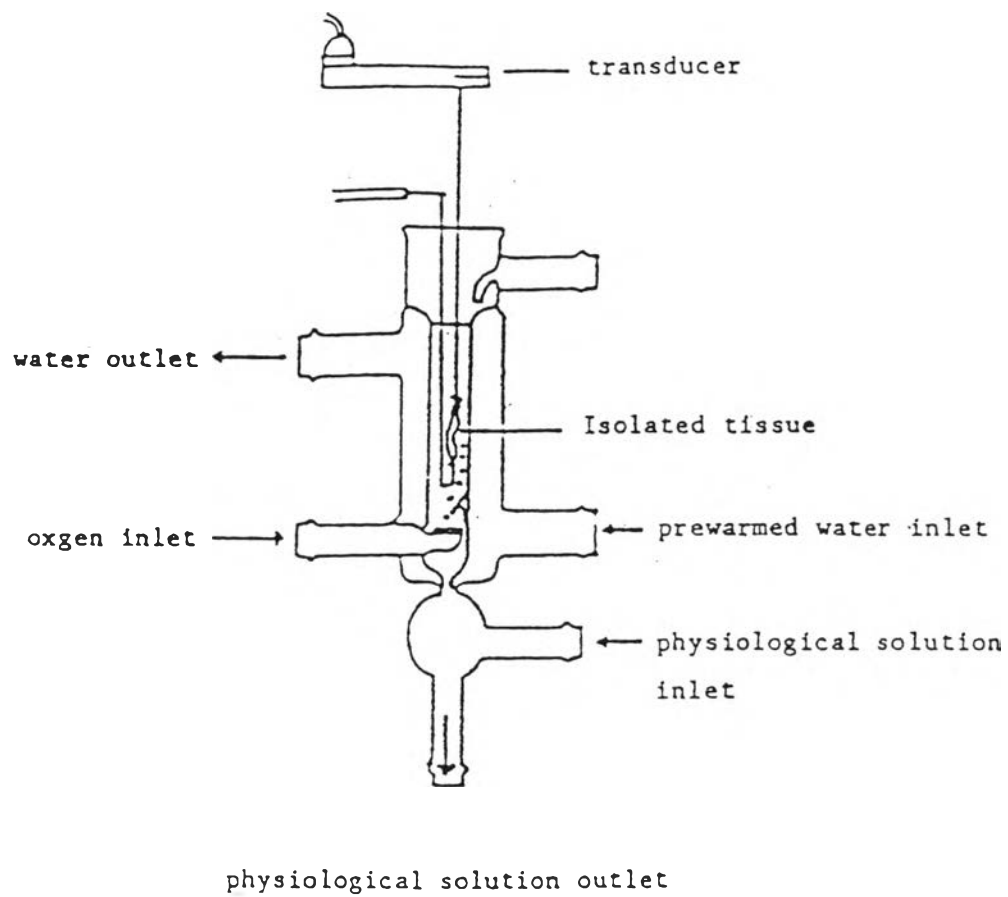
ส่วนหัวใจห้องบนซ้ายใช้ platinum wire electrode เกี่ยวเนื้อเยื่อด้านหนึ่ง ส่วนปลายอีกด้านตรงข้ามผูกด้วยเส้นด้ายเพื่อเป็นผูกกับ force transducer โดยมีแรงดึงประมาณ 0.5 กรัม หัวใจด้านซ้ายจะใช้ศึกษาแรงหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ ซึ่งควบคุมอัตราการเต้นคงที่ด้วยเครื่องกระตุ้นไฟฟ้า (duration 9 msec. ความถี่ 240 ครั้งต่อนาที กระตุ้นด้วยแรงประมาณ 6-7 volts) นำหัวใจห้องบนซ้ายไปใส่ในกระเปาะแก้ว 2 ชั้น มีสารละลายและสภาพต่าง ๆ เช่นเดียวกับด้านขวา incubate นาน 45 นาที จนกระทั่งแรงบีบตัวคงที่จึงเริ่มทำการทดลอง

การทดลองจะใส่สารสกัดหยาบหนาวเดือนห้าลงไปในกระเปาะแก้ว 2 ชั้น ในขนาดเท่าเดิม แล้วบันทึกผลต่ออัตราการเต้น และลักษณะการเกิด arrhythmias ในหัวใจห้องบนขวา และศึกษาผลต่อแรงหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ ในหัวใจห้องบนซ้าย

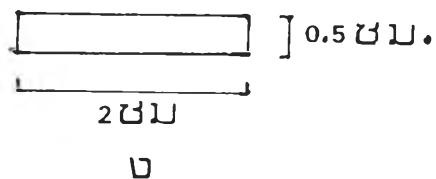
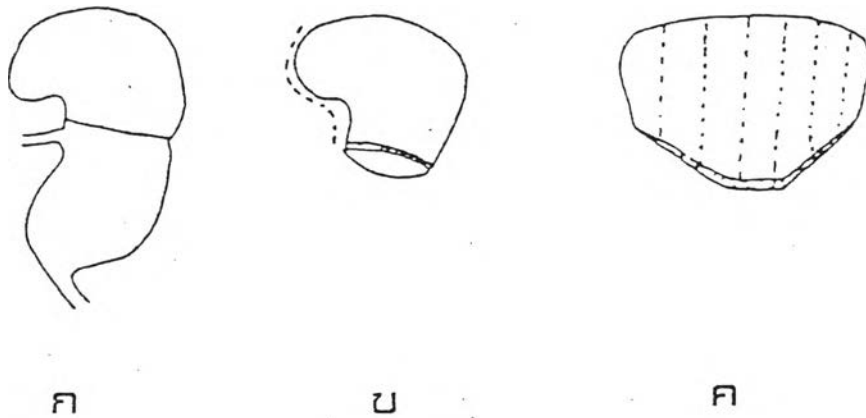
จากนั้นจึงล้างหัวใจทั้งสองด้านด้วยสารละลาย Ringer-Locke 3 ครั้ง และ incubate เป็นเวลา 45 นาที เริ่มทดลองใหม่โดยใช้ atropine ก่อนให้สารสกัดหยาบหนาวเดือนห้า แล้วสังเกตอัตราการเต้น, ลักษณะการเต้น และแรงหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจเปรียบเทียบกับเมื่อให้สารสกัดหยาบหนาวเดือนห้าเพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 1 ตารางแสดงส่วนประกอบของเกลือชนิดต่าง ๆ ใน Physiological Solution ที่ใช้ทดลอง (กรัม/ลิตร)

Physiological Solution	NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	MgSO ₄	NaHCO ₃	NaH ₂ PO ₄	KH ₂ PO ₄	Glucose	Gas
Tyrode	8.0	0.2	0.2	0.1	-	1.0	0.05	-	1.0	95% O ₂ + 5% CO ₂
Krebs	6.92	0.35	0.28	-	0.14	2.09	-	0.16	2.1	95% O ₂ + 5% CO ₂
Ringer-Locks	9.2	0.42	0.23	-	-	0.5	-	-	1.0	100% O ₂



รูปที่ 1 แสดงการจัดเครื่องมือสำหรับการทดลองกับอวัยวะที่แยกออกจากสัตว์ทดลอง



- รูปที่ 2 แสดงขั้นตอนการตัดกระเพาะอาหารหนูขาวให้อยู่ในรูป Fundus strip
- ก. กระเพาะอาหารหนูขาวทั้งกระเพาะ ส่วนบนเป็นส่วนพื้นดัส
 - ข. เปิดพื้นดัสโดยตัดส่วนที่เป็น Lesser curvature (เส้นประ)
 - ค. เมื่อตัดตามเส้นประ ดังรูป
 - ง. fundus strip