บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

1. วัสดุ สัตว์ทดลอง และเครื่องมือ

1.1 สัตว์ทดลอง

-หนูขาว (rat) พันธุ์ Wistar เพศผู้ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม

-กระต่าย (rabbit) จากสถานเพาะเลี้ยง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

-หนูตะเภา (guinea-pig) จากฟาร์มผู้เลี้ยง

1.2 เครื่องมือ

-ชุด isolated organ bath ของบริษัท C.P.Palmer thermoregulating water pump churchill type ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิได้ 37±5 °C

-เครื่องมือวัดการหดเกร็ง isotonic,isometric transducer ของบริษัท Havard

-เครื่องบันทึกผลการทดลอง (Oscillographrecorder) ของบริษัท Havard

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

1.3 สารเคมี

-สารสกัดคูมารินจากต้นหัสคุณและต้นชะลูดจาก รศ.นิจศิริ เรืองรังษี ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

-Acetylcholine,Noradrenaline,Histamine Hydrochloride, Verapamil,5-Hydroxytryptamine,Atropine,Phenylephrine Hydrochloride จากบริษัท Sigma

-Barium chloride จากบริษัท May & Baker

-Calcium chloride,Absolute ethanal จากบริษัท Merck

2. วิธีทำการวิจัย

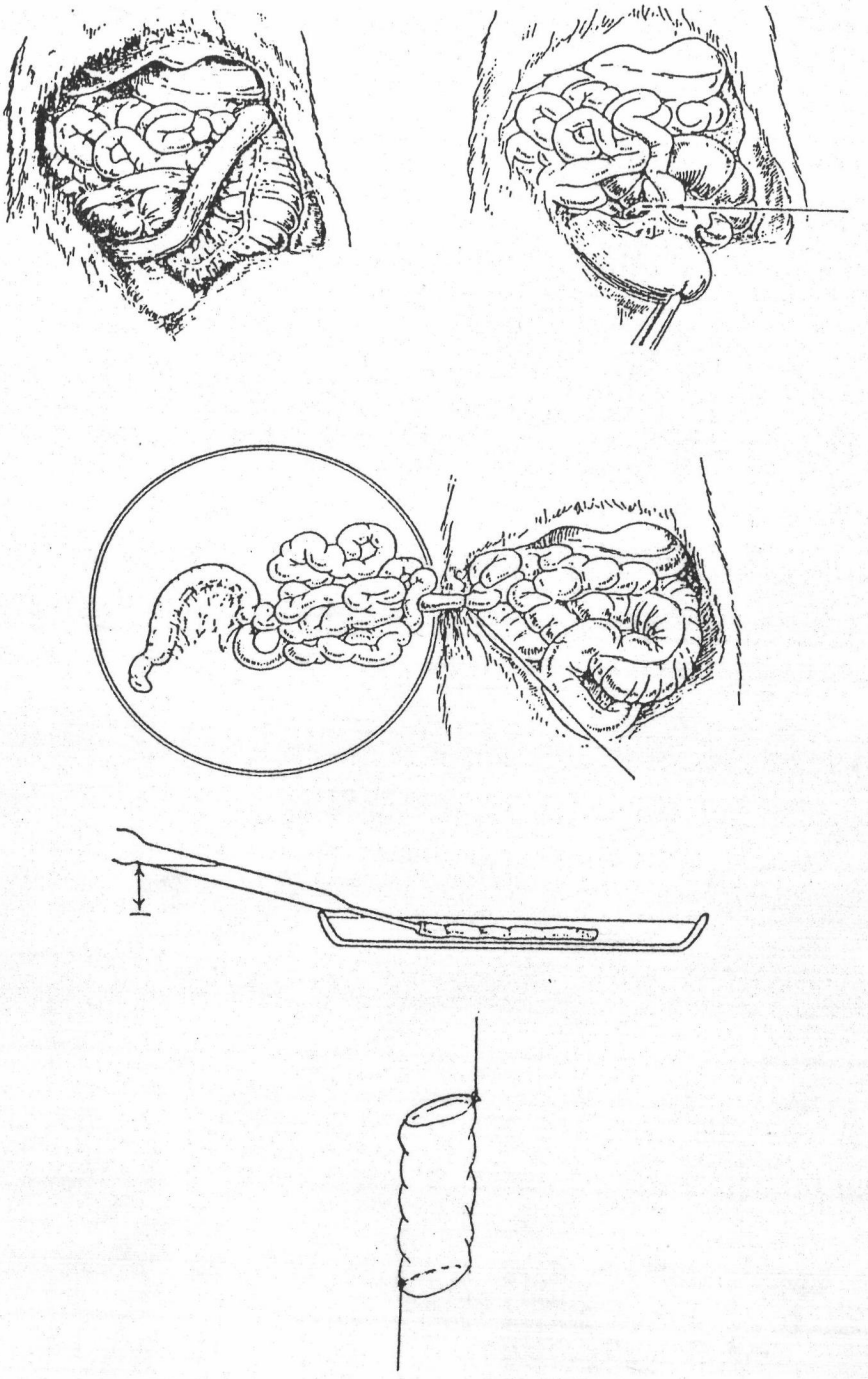
2.1 การเตรียมสารละลายคูมาริน

ชั่ง coumarin 40 mg. และ 21 mg. microminutin 40 mg. แต่ละตัวละลายใน alcohol 83.33 % จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น $4.5x10^{-4}$ M, $2.45x10^{-4}$ M และ $2.45x10^{-4}$ M ตามลำดับ (เป็น final concentation ใน chamber)ใส่ขวดสีชาปิดฝาให้สนิท เก็บในตู้เย็น

2.2 ศึกษาผลเบื้องต้นของ สารละลายคูมารินต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็ก (jejunum) กระต่าย

2.2.1 ศึกษาผลต่อการหดเกร็งที่เกิดขึ้นเอง(spontaneous contraction

ใช้กระต่ายเพศผู้น้ำหนักประมาณ 1.5-2.0 kg อดอาหารก่อนทดสอบประมาณ 16 ชั่วโมง ให้แต่น้ำ ทำให้สลบโดยการทำลายกระดูกบริเวณรอยต่อระหว่างคอและหัว ผ่าท้องเอาลำไส้เล็กส่วน jejunum นำมาใส่ใน beaker ที่มีสารละลาย Tyrode(ส่วนประกอบแสดงในตาราง 1) ซึ่งมีก๊าซ (carbogen) ผ่านตลอด ตัดไขมันและเนื้อ



รูปที่4 แสดงการตัดและผูกลำไส้เล็ก

เยื่อออก ใช้ syringe 10 ml. สำหรับล้างลำไส้ด้านในด้วยสารละลาย Tyrode ตัดแบ่งลำไส้เป็นท่อนยาว 1.5-2.0 cm. ใช้ด้ายผูกปลายทั้งสองด้านโดยให้ปลายทั้งสองเปิด เพื่อให้สารละลาย Tyrode ผ่านได้ (รูปที่ 4) ผูกปลายด้านหนึ่งติดกับแท่งพลาสติก นำไปใส่ในกระเปาะแก้วสองชั้น ซึ่งภายในบรรจุสารละลาย Tyrode 20 ml. ควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำที่ไหลผ่านตลอดจากwater-batsที่37°C ภายในกระเปาะแก้วมีก๊าซไหลผ่านตลอด ส่วนปลายด้ายอีกด้านผูกกับ isometric หรือ isotonic transducer ซึ่งต่อกับ recorder โดยจะปรับให้ลำไส้มีความตึงตัว (tension)1-2 g.(รูปที่ 7) incubate ประมาณ 30-40 นาที ในระหว่างที่ incubate ล้างลำไส้ด้วยสารละลาย Tyrode ทุก 15 นาที เมื่อลำไส้มีการหดเกร็งสม่ำเสมอแล้วจึงเริ่มทำการทดลอง โดยบันทึกการหดเกร็งในสภาพปกติ จากนั้นใส่สารละลายคูมารินแต่ละชนิดลงใน organ bath ดูฤทธิ์ลดการหดเกร็งที่เกิดขึ้นเองของลำไส้กระต่าย ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ความเข้มข้นของ coumarin $2.45X10^{-4}$ M, $4.5X10^{-4}$ M และ microminutin $2.45X10^{-4}$ M

2.2.2 ศึกษาผลต่อการหดเกร็งที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย acetylcholine

เตรียมลำไส้กระต่ายตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว หลังจาก incubate ในสารละลาย Tyrode จนลำไส้มีการหดเกร็งสม่ำเสมอ ใส่สารละลาย acetylcholine 10^{-7} M ลงใน organ bath บันทึกการหดเกร็งประมาณ 5 นาที ใส่สารละลายคูมารินแต่ละชนิด (coumarin$2.45X10^{-4}$ M, microminutin $2.45X10^{-4}$ M) บันทึกการหดเกร็งประมาณ 5 นาที ใส่ acetylcholine 10^{-7} M ลงใน organ bath อีกครั้ง เปรียบเทียบการหดเกร็งของลำไส้ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย acetylcholine ก่อนและหลังจากที่ได้รับสารละลายคูมาริน

2.2.3 ศึกษาผลต่อการหดเกร็งที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย 5-hydroxytryptamine

ขั้นตอนการทดลอง ใช้วิธีการเดียวกับการทดลองผลของสารละลาย

คูมารินต่อการหดเกร็งของลำไส้ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย acetylcholine โดยใช้ 5-hydroxytryptamine $6X10^{-5}$ M กระตุ้นแทน

2.2.4 ศึกษาผลต่อการหดเกร็งที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย histamine

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการศึกษาผลของสารละลายคูมาริน ต่อการหดเกร็งของลำไส้ ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย acetylcholine โดยการใช้ histamine $5X10^{-5}$ M กระตุ้นแทน

2.2.5 ศึกษาผลต่อการหดเกร็งที่เกิดจากการกระด้วย barium chloride

เตรียมลำไส้เล็กกระต่ายตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น หลังจาก incubate จนลำไส้มีการหดเกร็งสม่ำเสมอแล้ว ใส่สารละลาย barium chloride $6.25X10^{-4}$ M ลงใน organ bath บันทึกการหดเกร็งประมาณ 10 นาที แล้วใส่สารละลายคูมารินแต่ละชนิด (coumarin $2.45X10^{-4}$ M และ microminutin $2.45X10^{-4}$ M) บันทึกการหดเกร็งของลำไส้ต่อไปอีกประมาณ 10 นาที เปรียบเทียบการหดเกร็งของลำไส้ก่อนและหลังจากที่ได้รับสารละลายคูมาริน

2.3 ศึกษาผลเบื้องต้นต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็ก (ileum) หนูตะเภา

2.3.1 ศึกษาผลต่อการหดเกร็งที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยacetylcholine

ใช้หนูตะเภาเพศผู้น้ำหนักประมาณ 300-400 g. อดอาหารประมาณ 16 ชั่วโมง โดยให้แต่น้ำ ทำให้สลบโดยการทำลายกระดูกบริเวณรอยต่อระหว่างคอและหัว ผ่าบริเวณท้องตัดเอาลำไส้เล็กส่วน ileum ที่อยู่เหนือ ileocaecal junction ประมาณ 10 cm. นำมาใส่ใน petri-dish ที่มีสารละลาย Tyrode ซึ่งมีก๊าซ (carbogen) ผ่านตลอด แล้วทำต่อตามวิธีเดียวกับการเตรียมลำไส้กระต่าย (รูปที่ 4) incubate จนมีความ

ติงตัวคงที่ ใส่ acetylcholine 10^{-7} M กระตุ้นให้ลำไส้เกิดการหดเกร็ง บันทึกผลประมาณ 10 นาที ใส่สารละลายคูมารินแต่ละชนิด (coumarin $2.45X10^{-4}$ M, $4.5X10^{-4}$ M และmicrominutin $2.45X10^{-4}$ M) ลงใน organ bath หลังจากนั้น 5 นาที ใส่ acetylcholine 10^{-7} M กระตุ้นการหดเกร็งอีกครั้งหนึ่ง

2.3.2 ศึกษาผลต่อการหดเกร็งที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย barium chloride

เตรียมลำไส้เล็กหนูตะเภาตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น หลังจาก incubate ในสารละลาย tyrode จนมีความติงตัวคงที่ กระตุ้นการหดเกร็งด้วย $BaCl_2$ $6.25x10^{-4}$ M บันทึกผลประมาณ 5 นาที ใส่สารละลายคูมารินแต่ละชนิด (coumarin $2.45X10^{-4}$ M และ microminutin $2.45X10^{-4}$ M) ลงใน organ bath บันทึกการหดเกร็งของลำไส้เปรียบเทียบกันก่อนที่จะได้รับสารละลายคูมาริน

2.4 ศึกษาผลของสารละลายคูมาริน ต่อการหดเกร็งของหลอดเลือดแดงใหญ่ (arota) หนูขาว

2.4.1 ศึกษาผลต่อหลอดเลือดที่มีเยื่อบุหลอดเลือด(with endothelium)

เตรียมหลอดเลือดแดงใหญ่หนูขาว โดยใช้ส่วนของ thoracic arota ตามวิธีของ Perry (1968) ใช้หนูขาวเพศผู้น้ำหนัก 200-250 g. ทำให้สลบโดยการทำลายกระดูกบริเวณรอยต่อระหว่างคอและหัว แล้วรีบตัดคอให้เลือดออกโดยเร็ว เปิดบริเวณทรวงอก เลาะเอาหลอดเลือดส่วน thoracic arota ให้ยาวประมาณ 2-3 cm. นำมาใส่ petri-dish ซึ่งมีสารละลาย Krebs Henseleit และมีก๊าซ (carbogen) ไหลผ่านตลอด เลาะเอาเนื้อเยื่อรอบ ๆ หลอดเลือดออกให้หมดแล้วตัดหลอดเลือดแบบแนวเฉียง หนาประมาณ 2-3 cm. ยาวประมาณ 4-5 cm.(รูป 5) จากนั้นตัดแบ่งเป็นสองท่อน แต่ละท่อนผูกปลายทั้งสองด้วยเส้นด้าย นำปลายด้านหนึ่งผูกกับแท่งพลาสติก แล้วนำไปใส่กระเปาะแก้วสองชั้น ซึ่งมีสารละลาย Krebs Henseleit อยู่ 20 ml. ควบคุมอุณหภูมิ 37 °C มีก๊าซไหลผ่านตลอด

018201

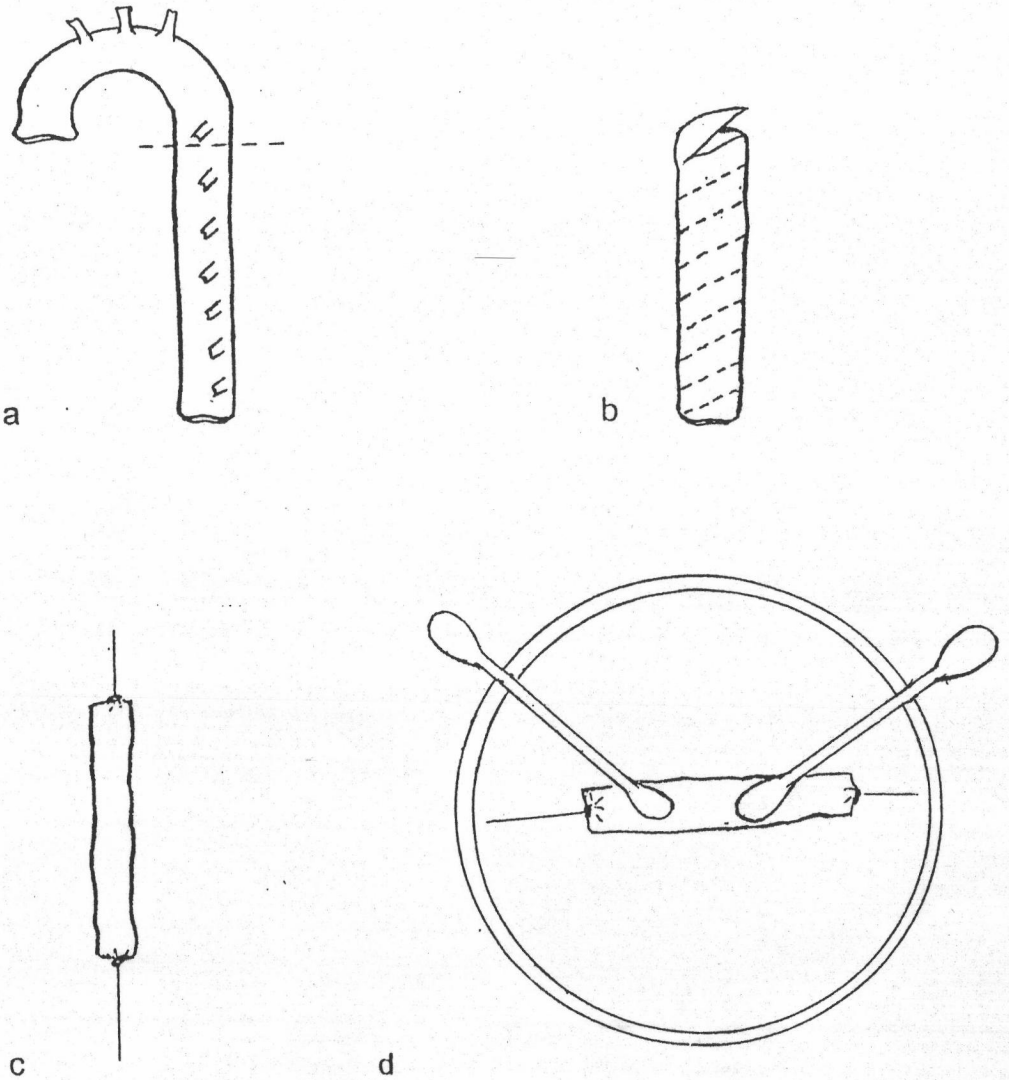
ผูกปลายด้ายอีกด้านหนึ่งกับ isometric transducer ด้วยแรงดึง (tension) 1 g. incubate นานประมาณ 60 นาที โดยล้างหลอดเลือดด้วยสารละลาย Krebs Henseleit ทุก 15นาที กระตุ้นหลอดเลือดด้วย phenylephrine10^{-6} M จากนั้นใช้ acetylcholine ขนาดความเข้มข้น 10^{-7} M ลงใน organ bath เพื่อทดสอบว่าหลอดเลือดนั้นยังมีเยื่อบุหลอดเลือดอยู่ จากนั้นล้างหลอดเลือดด้วยสารละลาย Krebs Henseleit 3-5 ครั้ง incubate จนมีความตึงตัวคงที่ กระตุ้นหลอดเลือดให้หดเกร็งด้วย phenylephrine 10^{-6} M แล้วใส่สารละลายคูมารินแต่ละชนิด (coumarin $2.45X10^{-4}$ M, $4.5X10^{-4}$ M และ microminutin $2.45X10^{-4}$M)ลงในorganbathดูผลการลดการหดเกร็ง ล้างหลอดเลือดแล้ว incubate ทำการทดลองซ้ำ แต่ให้ atophine ขนาดความเข้มข้น 10^{-5} M ลงใน organ bath ก่อนกระตุ้นด้วย phenylephrine เพื่อทดสอบการออกฤทธิ์ของสารละลายคูมารินว่าสามารถยับยั้งด้วย atropine ได้หรือไม่

2.4.2 ศึกษาผลต่อหลอดเลือดที่ไม่มีเยื่อบุหลอดเลือด (without endothelium)

หลังจากทดสอบฤทธิ์ต่อหลอดเลือดที่มีเยื่อบุหลอดเลือด(ข้อ 2.4.1) แล้วนำหลอดเลือดออกมาวางใน petri-dish ที่มีสารละลาย Krebs Henseleit และมีก๊าซ (carbogen) ไหลผ่านตลอด ใช้ไม้พันสำลีขูดเบา ๆ ตลอดเส้นเลือด 15-20 ครั้งเพื่อทำลายเยื่อบุหลอดเลือด นำกลับไปใส่ใน organ bath แล้ว incubate ประมาณ 60 นาที จนมีความตึงตัวคงที่ กระตุ้น หลอดเลือดด้วย phenylephrine 10^{-6} M เมื่อการหดเกร็งสูงสุดจึงใส่ acetylcholine 10^{-7}M เพื่อทดสอบว่ายังมีเยื่อบุหลอดเลือดอยู่หรือไม่ (acetylcholine จะออกฤทธิ์ผ่านเยื่อบุหลอดเลือด ดังนั้นถ้าหลอดเลือดคลายตัวหลังจากใส่ acetylcholine ใน organ bath แสดงว่าหลอดเลือดนั้นยังคงมีเยื่อบุหลอดเลือดเหลืออยู่ ต้องนำมาขูดด้วยไม้พันสำลีใหม่) จากนั้นล้างหลอดเลือดด้วยสารละลาย Krebs Henseleit 3-5 ครั้ง incubate แล้วกระตุ้นการหดเกร็งด้วย phenylephrine 10^{-6} M เมื่อได้การหดเกร็งสูงสุดใส่สารละลายคูมารินแต่ละชนิด (coumarin 2.45×10^{-4} M, 4.5×10^{-4} M และ microminutin 2.45×10^{-4} M) ลงใน organ bath ดูฤทธิ์ลดการหดเกร็งเปรียบเทียบกับเมื่อมีเยื่อบุหลอดเลือดอยู่

2.4.3 ศึกษาการยับยั้งฤทธิ์แคลเซียม

การทดสอบการยับยั้งฤทธิ์แคลเซียม ของคูมารินโดยเตรียมหลอดเลือดตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น หลังจาก incubate หลอดเลือดจน มีความตึงตัวคงที่ แล้วเปลี่ยนสารละลายจาก Krebs Henseleit เป็น potassium-depolarizing Tyrode (ส่วนประกอบ แสดงในตาราง 1) incubate ต่อประมาณ 20 นาที จากนั้นทำ dose-response curve ของ $CaCl_2$ ใช้เทคนิคการทำ cumulative dose response curve ของ Van Rossum (1963)โดยเติมสารละลาย $CaCl_2$ ลงใน organ bath ทุก 3 นาที บันทึกการหดเกร็งของหลอดเลือดทุกครั้ง ที่เติมสารละลาย $CaCl_2$ ทำเช่นนี้จนได้การหดเกร็งสูงสุด (maximum contraction) หลังจากนั้นล้างหลอดเลือดด้วยสารละลาย



รูปที่5 a แสดงหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) หนูขาวที่เลาะออกมา
b แสดงการตัดหลอดเลือดแบบแนวเฉียง
c แสดงการผูกหลอดเลือด
d แสดงการขูดหลอดเลือด

Krebs Henseleit 3-5 ครั้ง incubate ประมาณ 60 นาที จนมีความตึงตัวคงที่ เปลี่ยนสารละลายจาก Krebs Henseleit เป็น potassium-depolarizing Tyrode แล้ว incubate ต่อประมาณ 20 นาที ใส่สารละลายคูมาริน ชนิดต่าง ๆ (ขนาดความเข้มข้นที่ใช้ coumarin 2.45×10^{-4} M, 4.5×10^{-4} M และ microminutin 4.5×10^{-4} M) ลงใน organ bath ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที จึงให้ $CaCl_2$ แบบcumulative ตามวิธี และขนาดความเข้มข้นเดียวกับครั้งแรก เปลี่ยนหลอดเลือดเป็นชิ้นใหม่ ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้างต้น แต่ใช้ verapamil ขนาดความเข้มข้น 2.5×10^{-8} M แทนสารละลายคูมาริน

2.5 ศึกษาผลของสารละลายคูมารินต่อการหดเกร็งของท่อนำอสุจิ (vas deferen) หนูขาว

ใช้หนูขาวเพศผู้น้ำหนัก 200-250 g. ทำให้หนูขาวสลบโดยการทำลายกระดูกบริเวณรอยต่อระหว่างคอและหัว ผ่าตัดเปิดหน้าท้องเพื่อเอาท่อนำอสุจิทั้งสองข้าง ออกมาใส่ใน petri-dish ซึ่งมีสารละลาย Krebs Henseleit และมีก๊าซ (Carbogen) ไหลผ่านตลอด ตัดแยกเอาเนื้อเยื่อและหลอดเลือดออกให้หมด จะเห็นท่อนำอสุจิแบ่งเป็นสองส่วน คือ prostatic และ epididymal halves การทดลองนี้จะใช้ทั้งส่วน prostatic และส่วนที่เป็นรอยต่อของ prostatic และ epididymal ขึ้นอยู่กับการตอบสนองต่อสารที่ใช้กระตุ้น ใช้ด้ายผูกที่ปลายทั้งสองด้าน แต่ให้ปลายทั้งสองเปิด (รูป 6) ปลายด้ายด้านหนึ่งผูกติดกับแท่งพลาสติก แล้วนำไปใส่ในกระเปาะแก้วสองชั้น ซึ่งมีสารละลาย Krebs Henseleit บรรจุอยู่ 20 ml มีก๊าซ (Carbogen) ไหลผ่านตลอด และควบคุมด้วยน้ำจาก water bath ให้มีอุณหภูมิ 37°C ปลายอีกด้านหนึ่งของเส้นด้ายผูกกับ isometric หรือ isotonic transducer ปรับให้ท่อนำอสุจิมีความตึงตัว 1 g. จากนั้น incubate ไว้ประมาณ 30-45 นาที จนมีความตึงตัวคงที่ โดยที่ระหว่างนั้นเปลี่ยนสารละลาย Krebs Henseleit ทุก 15 นาที จึงเริ่มทำการทดลองดังนี้

2.5.1 ศึกษาผลต่อการหดเกร็งที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย KCl

การทดลองนี้ใช้ส่วน prostatic halves ผูกต่อกับ isometric

transducer หลังจาก incubate แล้วกระตุ้นให้ท่อนำอสุจิหดเกร็งด้วย KCl 50mM บันทึกผลประมาณ 20 นาที ล้างและ incubate ด้วยสารละลาย Krebs Henseleit จนมีความตึงตัวคงที่ ใส่สารละลายคูมาริน (coumarin $2.45x10^{-4}$ M, $4.5x10^{-4}$M และ microminutin ($4.5x10^{-4}$ M) ใน organ bath ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที จึงใส่ KCl 50 mM กระตุ้นการหดเกร็ง

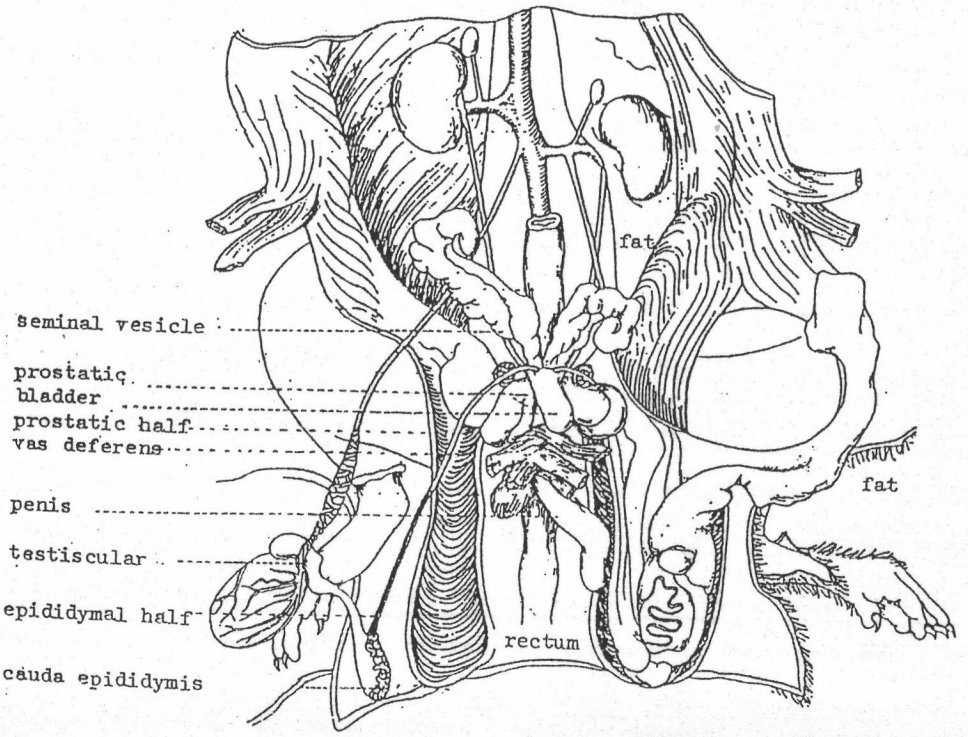
2.5.2 ศึกษาผลต่อการหดเกร็งที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย $BaCl_2$

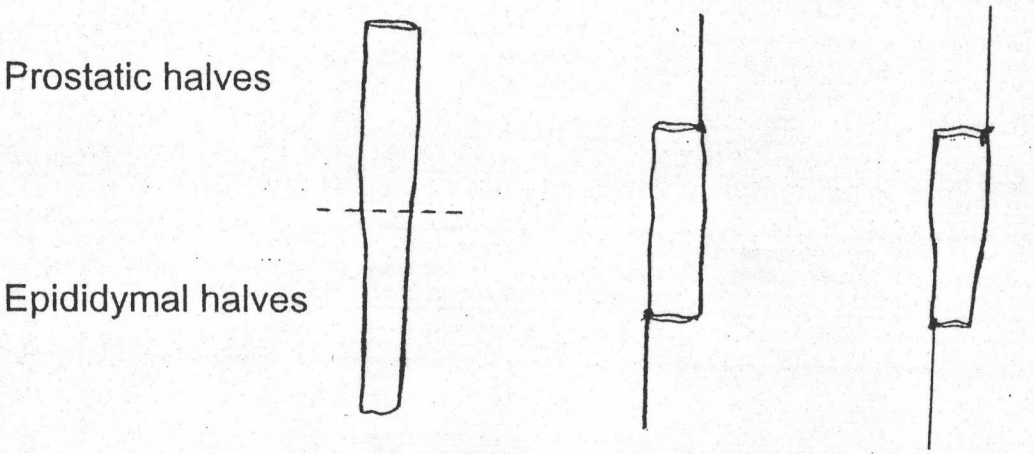
ใช้ท่อนำอสุจิส่วน prostatic halves ผูกต่อกับ isometric transducer หลังจาก incubate จนมีความตึงตัวคงที่ในสารละลาย Krebs Henseleit แล้วกระตุ้นการหดเกร็งด้วย $BaCl_2$ $6.25x10^{-4}$ M บันทึกผลประมาณ 20 นาที ล้างท่อนำอสุจิด้วยสารละลาย Krebs Henseleit 3-5 ครั้ง incubate จนมีความตึงตัวคงที่ ใส่สารละลายคูมารินชนิดต่าง ๆ (coumarin ขนาดความเข้มข้น $2.45x10^{-4}$ M, $4.5x10^{-4}$ M และ microminutin $2.45X10^{-4}$ M) ใน organ bath ก่อนประมาณ 10 นาที จึงกระตุ้น ด้วย $BaCl_2$ $6.25x10^{-4}$ M

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้างต้น แต่ใช้ db-cAMP ขนาดความเข้มข้น 10^{-5} และ 10^{-4} M แทนสารละลายคูมาริน

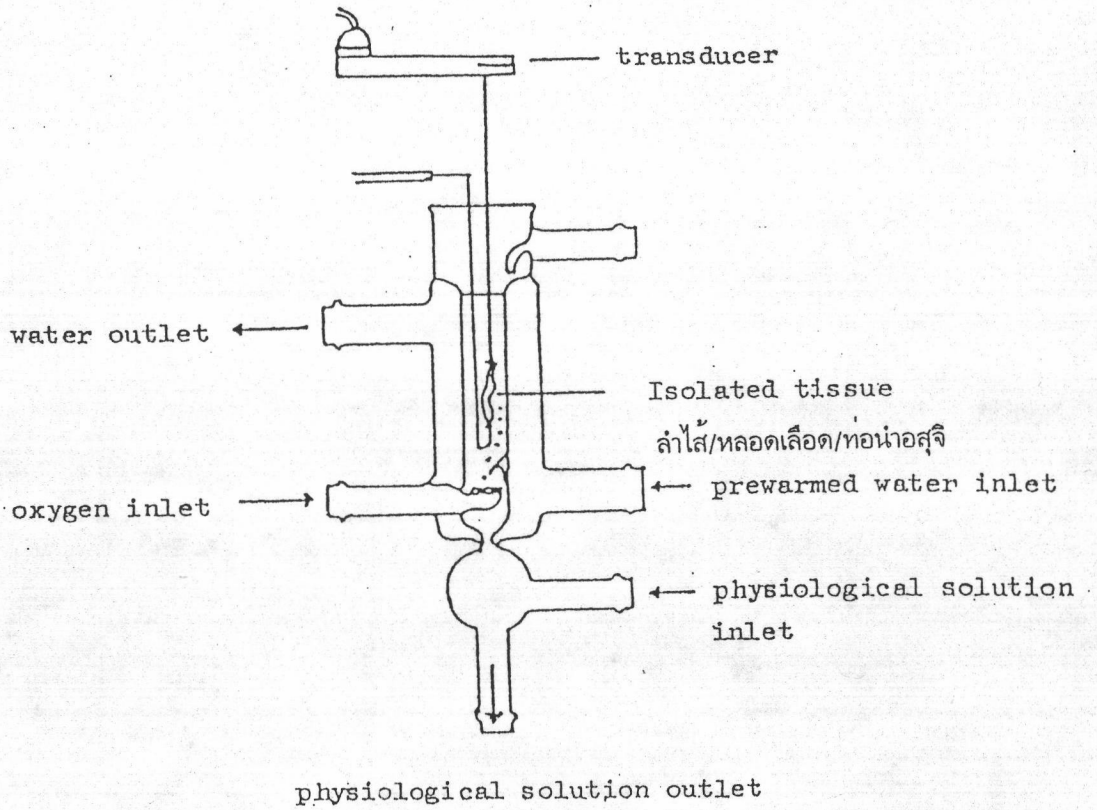
2.5.3 ศึกษาผลต่อการหดเกร็งที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย noradrenaline

เตรียมท่อนำอสุจิโดยใช้ส่วน prostatic ต่อกับ epididymal ผูกต่อกับ isotonic transducer หลังจาก incubate แล้วเปลี่ยนสารละลาย จาก Krebs Henseleit เป็น potassium-depolarizing Tyrode แล้ว incubate ต่อประมาณมาณ 20 นาที ใส่ noradrenaline $3x10^{-5}$ M ลงใน organ bath บันทึกการหดเกร็ง จากนั้นล้างท่อนำอสุจิด้วยสารละลาย Krebs Henseleit 3-5 ครั้ง incubate จนมีความตึงตัวคงที่ เปลี่ยนสารละลายจาก Krebs Henseleit เป็น potassium-





รูปที่6 แสดงการตัดและผูกท่ออสุจิหนูขาว



รูปที่7 Organ bath แสดงการจัดเครื่องมือสำหรับทดลอง

depolarizing Tyrode แล้ว incubate ต่อประมาณ 20 นาที ใส่สารละลายคูมารินลงใน organ bath ประมาณ 5 นาที จึงใส่ noradrenaline $3x10^{-5}$ M กระตุ้นการหดเกร็งของท่อนำอสุจิ

เปลี่ยนท่อนำอสุจิเป็นชิ้นใหม่ (เป็นส่วนต่อระหว่าง prostatic และ epididymal halves เช่นเดียวกัน) ผูกต่อกับ isometric transducer แล้ว incubate ในสารละลาย Krebs Henseleit ประมาณ 30-45 นาที จน มีความตึงตัวคงที่ กระตุ้นการหดเกร็งด้วย noradrenaline $3x10^{-5}$ M บันทึกผลประมาณ 20 นาที ล้างด้วยสาร ละลาย Krebs Henseleit 3-5 ครั้ง incubate จน มีความตึงตัวคงที่ ใส่สารละลายคูมารินแต่ละชนิด (coumarin $2.45x10^{-4}$ M ,$4.5x10^{-4}$ M และ microminutin $2.45x10^{-4}$ M) ลงใน organ bath ก่อนประมาณ 10 นาที แล้วจึงกระตุ้นการหดเกร็งของท่อนำอสุจิด้วย noradrenaline $3x10^{-5}$ M

ทำการทดลองซ้ำแต่ใช้ db-cAMP ขนาดความเข้มข้น 10^{-5} M และ 10^{-4} M แทนสารละลายคูมาริน

2.5.4 ศึกษาฤทธิ์ต่อการหดเกร็งที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย caffeine

การทดลองนี้ใช้ท่อนำอสุจิส่วน prostatic ผูกต่อกับ isometric transducer หลังจาก incubate ในสารละลาย Krebs Henseleit จนมีความตึงตัวคงที่ เปลี่ยนสารละลายเป็น Krebs Henseleit ที่ไม่มี $CaCl_2$ incubate ต่อประมาณ 20 นาที ใส่ caffeine 50 mM กระตุ้นการ contracture จากนั้นล้างท่อนำอสุจิด้วยสารละลาย Krebs Henseleit 3-5 ครั้ง incubate จนมีความตึงตัวคงที่ ใส่สารละลายคูมารินชนิดต่าง ๆ (coumarin $4.5x10^{-4}$ M และ microminutin $4.5x10^{-4}$ M) ลงใน organ bath ก่อนประมาณ 10 นาที จึงใส่ caffeine 50 mM กระตุ้นการ contracture

ตารางที่1 แสดงส่วนประกอบของเกลือชนิดต่างๆ ใน Physiological Solution ที่ใช้ทดลอง (gm./lit)

Physiological Solution	NaCl	KCl	$CaCl_2$	$MgCl_2$	$MgSO_4$	$NaHCO_3$	NaH_2PO_4	KH_2PO_4	Glucose	Gas
Tyrode	8.0	0.2	0.2	1.0	-	1.0	0.05	-	1.0	$95\%O_2+5\%CO_2$
Krebs-Henscleit	6.92	0.35	0.28	-	0.14	2.09	-	0.16	2.1	$95\%O_2+5\%CO_2$
Potassium-depolarizing Tyrode's solution	1.58	7.46	--	0.11	-	1.26	-	-	1.98	$95\%O_2+5\%CO_2$

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. ใช้ค่าร้อยละ หาเปอร์เซ็นการลดการหดเกร็งของสารละลายคูมาริน เมื่อให้สารกระตุ้นให้เกิดการหดเกร็ง

2. ค่าเฉลี่ย และความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ standard error of the mean)

3. Unpaired t-test เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง และ paired t-test เปรียบเทียบความแตกต่างก่อนและหลังการให้สารสมุนไพร พิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p<0.05$)

4. การคำนวณ drug parameter ค่า logarithm ของ affinity ของ noncompetitive antagonist แสดงในรูป PD_2' Values ซึ่งก็คือค่าของ negative logarithm ของความเข้มข้นของ noncompatitive antagonist ในหน่วยโมลซึ่งทำให้ maximum respons ที่เกิดจาก agonist ลดลง 50 % PD_2 Value คำนวณจากสมการ

$$PD_2' = -\log(B) + \log\left(\frac{E_{Am}}{E_{AmB}} - 1\right)$$

B คือ ความเข้มข้นของ noncompetitive antagonist ในหน่วยโมล

E_{Am}, E_{AmB} คือ maximum contraction ที่เกิดจาก agonist เมื่อไม่มี antagonist และมี antagonist ตามลำดับ