การเตรียมเนื้อเยื่อของหนูตะเภา

วิธีการทั่วไป หนูตะเภาที่ใช้ไม่จำกัดเพศ น้ำหนักระหว่าง 400-570 กรัม หนูตะเภาจะถูกทำให้เป็นอัมพาตโดยวิธีจับก้านคอสะบัดอย่างแรง เพื่อให้กระดูกก้านคอหักหรือหลุด หนูตะเภาจะอยู่ในลักษณะอัมพาต ใช้กรรไกตัดเส้นเลือดแดงคอมมอนคาร์โรติด จากนั้นเปิดช่องอกเพื่อแยกเอาหัวใจออกมา เลาะหนังและกล้ามเนื้อบริเวณลำคอเพื่อแยกเอาหลอดลม นำเนื้อเยื่อทั้งสองมาไว้ในจานแก้วซึ่งบรรจุสารละลาย Krebs-Hanseleit เนื้อเยื่อทั้งสองจะถูกตัดแต่งจนกระทั่งได้เนื้อเยื่อที่เหมาะสม (ดูรายละเอียดข้างล่าง) จากนั้นนำไปแช่ในหลอดทดลองสำหรับแช่เนื้อเยื่อ เนื้อเยื่อจะถูกแช่ในสารละลาย Krebs-Hanseleit ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้: (10^{-3} โมลาร์) NaCl, 118.0; $NaHCO_3$, 24.9; KCl, 4.7; $MgSO_4.7H_2O$, 1.2; $CaCl_2$, 1.9; KH_2PO_4, 1.2 และ glucose, 11.1 สารละลายจะถูกพ่นด้วยฟองอากาศ ซึ่งประกอบด้วยออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ในสัดส่วน 95:5 (ดูรูปที่ 1) อุณหภูมิของสารละลายจะถูกรักษาไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ก่อนจะทำการทดสอบใดๆ เนื้อเยื่อจะถูกแช่อยู่ในสารละลายนานประมาณ 30 นาที เพื่อให้เนื้อเยื่อปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ ในช่วงเวลาดังกล่าวจะมีการเปลี่ยนสารละลาย Krebs-Hanseleit ทุกๆ 5-10 นาที

การเตรียมหัวใจส่วนเอเตรียคู่ หัวใจทั้งอันที่ถูกแยกออกมาจากหนูตะเภา จะถูกนำมาแช่ในสารละลาย Krebs-Hanseleit ที่อุณหภูมิห้อง สารละลายจะถูกพ่นด้วยฟองอากาศ ซึ่งประกอบด้วยออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ในสัดส่วน 95:5 ใช้กรรไกตัดหัวใจส่วนอื่นๆ และเลาะเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทั้งหลายที่ติดอยู่กับหัวใจส่วนเอเตรียออกให้หมด จนกระทั่งได้หัวใจส่วนเอเตรียคู่ที่สะอาดหมดจด หัวใจส่วนเอเตรียคู่นี้จะเต้นได้เองตลอดเวลา เนื่องจากมีเซลบริเวณ เอส เอ โหนด เป็นตัวสร้างสัญญาณไฟฟ้า เซลดังกล่าวอยู่บนเอเตรียข้างขวา ซึ่งจะสังเกตได้จากรูปร่างที่เรียวแหลมกว่าเอเตรียข้างซ้าย ใช้

เข็มร้อยด้ายแทงเอเตรียข้างซ้ายผูกด้ายให้เป็นห่วงสำหรับไว้คล้องกับตะขอแก้ว ใช้เข็มร้อยด้ายแทงหัวใจเอเตรียข้างขวา ผูกให้แน่นปล่อยปลายไว้ให้ยาวพอประมาณ เพื่อจะนำไปผูกกับ Grass Force Displacement Transducer (Model FT03 C) จากนั้นนำเอเตรียคู่ไปแช่ในหลอดทดลองสำหรับแช่เนื้อเยื่อขนาดความจุ 20 มล. ปรับแรงตึงบนเอเตรียคู่ ประมาณ 2 กรัม ความแรงในการบีบตัวของเอเตรียคู่จะถูกถ่ายทอดจาก Grass Force Displacement Transducer ผ่านไปยัง Grass Preamplifier (Model 7P1) และบันทึกผลลงบน Grass Polygraph Recorder อัตราเร็วในการบีบตัวของเอเตรียคู่ จะถูกบันทึกโดยผ่านทาง Grass Tachograph โดยอาศัยสัญญาณกระตุ้นที่มาจาก Grass Preamplifier (Model 7P1)

การเตรียมเนื้อเยื่อหลอดลม หลอดลมที่ถูกตัดออกจากหนูตะเภา จะถูกนำมาแช่ในสารละลาย Krebs-Hanseleit ที่อุณหภูมิห้อง สารละลายจะถูกพ่นด้วยฟองอากาศ ซึ่งประกอบด้วยออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ในสัดส่วน 95:5 ใช้กรรไกตัดเลาะเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทั้งหลายที่ติดอยู่กับหลอดลมออกให้หมด จนเห็นหลอดลมเป็นท่อสีขาว จากนั้นจึงใช้กรรไกตัดตามยาวของหลอดลม โดยตัดกระดูกอ่อนในแนวตรงข้ามกับแนวกล้ามเนื้อเรียบของหลอดลม แบะหลอดลมออกเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า จากนั้นตัดหลอดลมตามแนวขวาง (แนวระหว่างกระดูกอ่อน) สลับด้านกันซ้ายและขวา ความกว้างของระยะที่ตัดประมาณ 3 ช่วงของแนวกระดูกอ่อน ใช้ด้ายผูกเนื้อเยื่อหลอดลมด้านหนึ่งแล้วผูกเป็นห่วง สำหรับคล้องกับตะขอแก้ว ผูกอีกด้านหนึ่งของเนื้อเยื่อด้วยด้ายให้แน่น ปล่อยเชือกไว้ให้ยาวพอประมาณเพื่อนำไปผูกกับ Grass Force Displacement Transducer (Model FT03C) จากนั้นนำเนื้อเยื่อหลอดลมไปแช่ในหลอดทดลองสำหรับแช่เนื้อเยื่อ ขนาดความจุ 20 มล. ปรับความตึงของเนื้อเยื่อหลอดลมประมาณ 2 กรัม การหดตัวหรือคลายตัวของเนื้อเยื่อหลอดลมจะถูกถ่ายทอดผ่าน Force Displacement Transducer และบันทึกผลลงบน Grass Polygraph Recorder

การทดสอบฤทธิ์ต่อหัวใจ หลังจากได้เอเตรียคู่แช่อยู่ในหลอดทดลองสำหรับแช่เนื้อเยื่อ ซึ่งบรรจุสารละลาย Krebs-Hanseleit เป็นเวลาประมาณ 30 นาทีแล้ว การทดสอบฤทธิ์ของน้ำสกัดหยาบสมุนไพร กระทำโดยการเติมน้ำสกัดลงไปในหลอดทดลองสำหรับแช่เนื้อเยื่อ การเติมน้ำสกัดลงไปในหลอดทดลองจะเป็นแบบสะสม ปริมาณของน้ำสกัดที่เติมลงไปในหลอดทดลองครั้งที่ 1 คือ 0.1 มล. รอสังเกตุผลที่เกิดกับเอเตรียคู่ เมื่อเกิดการตอบสนองสูงสุด หรือไม่เกิดการตอบสนองใดๆในเวลาอันสมควร (1-3 นาที) จึงเติมน้ำสกัดเพิ่มลงไปอีก 0.2 มล. รอสังเกตผลเช่นเดียวกัน จากนั้นก็เติมน้ำสกัดหยาบลงไปอีก 0.4 มล. หากแนวโน้มในการตอบสนองของเนื่อเยื่อยังดี ก็อาจเติมน้ำสกัดหยาบของสมุนไพรลงไปอีก 0.4 มล.ดังนั้นจะมีการเติมน้ำสกัดหยาบสมุนไพร 3 - 5ครั้ง ดังที่กล่าวมาแล้วขั้นต้น

รวมปริมาตรของน้ำสกัดสมุนไพรที่เติมลงไปในหลอดทดลอง เท่ากับ 1 - 2 มล. ในบางกรณีหากเนื้อเนื่อยังตอบสนองได้ดีและมีแนวโน้มที่จะตอบสนองได้มากขึ้นอีก ก็จะมีการเติมน้ำสกัดหยาบของสมุนไพรลงไปอีกไม่เกิน 1.0 มล.

การทดสอบฤทธิ์ต่อหลอดลม หลังจากให้เนื้อเยื่อหลอดลมแช่อยู่ในหลอดทดลอง สำหรับแช่เนื้อเยื่อ ซึ่งบรรจุสารละลาย Krebs-Hanseleit เป็นเวลาประมาณ 30 นาทีแล้ว ก่อนการทดสอบฤทธิ์ของน้ำสกัดสมุนไพรต่อเนื้อเยื่อหลอดลม เนื้อเยื่อหลอดลมจะถูกทำให้หดตัวก่อน โดยใช้ยาคาร์บาคอลในขนาดความเข้มข้น 5.4 X 10^{-6} โมลาร์ เมื่อเติมยาลงไปในหลอดทดลอง สำหรับแช่เนื้อเยื่อ เนื้อเยื่อหลอดลมจะค่อยๆหดตัว จะต้องใช้เวลาประมาณ 15-20 นาทีหลังจากเติมยาลงไป เนื้อเยื่อหลอดลมจึงจะอยู่ในสภาพหดตัวสูงสุด และจะคงสภาพการหดตัวดังกล่าวไปเรื่อยๆไปจนถึงเวลาที่ต้องการจะทดสอบฤทธิ์ของยาใดๆ จากนั้นจึงเติมน้ำสกัดหยาบสมุนไพรลงไปในหลอดทดลอง และสังเกตุผลที่เกิดขึ้นกับเนื้อเยื่อหลอดลมว่าหลอดลมจะคลายตัวหรือไม่ ในการทดลองครั้งนี้สารสกัดถูกเติมลงไปในหลอดทดลอง ในลักษณะเดียวกันกับที่กล่าวไว้ในการทดสอบฤทธิ์ต่อหัวใจ

การทดสอบการยับยั้งการออกฤทธิ์ต่อหัวใจโดยโปรปรานอลอล เมื่อผลการทดสอบเบื้องต้น แสดงว่าน้ำสกัดหยาบของสมุนไพร สามารถกระตุ้นหัวใจได้ และต้องการจะทดสอบต่อไปว่า การที่สมุนไพรนั้นสามารถกระตุ้นหัวใจได้ เกิดจากการที่สารออกฤทธิ์ในน้ำสกัดหยาบสมุนไพร ไปกระตุ้นรีเซพเตอร์ อะดรีเนอร์จิก-เบต้า(หนึ่ง) ที่หัวใจหรือไม่ สามารถทดสอบได้โดยใช้ยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของรีเซพเตอร์ อะดรีเนอร์จิก-เบต้า (Beta- adrenergic receptor blocking drugs) คือ โปรปรานอลอล ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของทั้ง เบต้า (หนึ่ง) และ เบต้า (สอง) รีเซพเตอร์ได้

วิธีการทดลองเริ่มต้นด้วยการเติมน้ำสกัดหยาบสมุนไพร ลงไปในหลอดทดลองในความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการกระตุ้นหัวใจที่เหมาะสม เมื่อการตอบสนองถึงจุดสูงสุด และอยู่ในระดับคงที่แล้ว ให้ล้างน้ำสกัดหยาบสมุนไพรออกให้หมด ด้วยสารละลาย Krebs - Hanseleit 2 - 4 ครั้ง จนกระทั่งหัวใจกลับไปอยู่ในสภาพปกติอีกครั้ง จากนั้นเติมโปรปรานอลอลลงไป (ในความเข้มข้นที่ทดสอบมาก่อนแล้ว ว่าสามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของไอโซโปรเทอรีนอลที่ความเข้มข้น ที่ทำให้เกิดการตอบสนองในหัวใจเท่ากับ 80 % ของการตอบสนองสูงสุดที่ไอโซโปรเทอรีนอลสามารถทำให้เกิดได้ (ดูรูปที่ 3) ทิ้งไว้ 3 - 5 นาที แล้วจึงเติมน้ำสกัดหยาบในความเข้มข้นเดียวกันกับที่เติมลงไป ก่อนหน้านี้

การทดสอบการยับยั้งการออกฤทธิ์ต่อหลอดลมโดยโปรปรานอลอล เมื่อผลการทดสอบเบื้องต้น แสดงว่าน้ำสกัดหยาบของสมุนไพร สามารถทำให้หลอดลมคลายตัวได้ และต้องการจะ

ทดสอบต่อไปว่า การที่สมุนไพรนั้นสามารถทำให้หลอดลมคลายตัวได้ เกิดจากการที่สารออกฤทธิ์ในน้ำสกัดหยาบสมุนไพร ไปกระตุ้นรีเซพเตอร์ อะดรีเนอร์จิก-เบต้า(สอง) ที่กล้ามเนื้อเรียบของหลอดลมหรือไม่ สามารถทดสอบได้โดยใช้ยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของรีเซพเตอร์ อะดรีเนอร์จิก-เบต้า (Beta- adrenergic receptor blocking drugs) คือ โปรปรานอลลอล ซึ่งยาตัวนี้จะยับยั้งการทำงานของทั้ง เบต้า (หนึ่ง) และ เบต้า (สอง)

วิธีการทดลองเริ่มต้นด้วยการเติมคาร์บาคอล เพื่อทำให้หลอดลมอยู่ในสภาพหดตัวก่อน จากนั้นจึงเติมน้ำสกัดหยาบสมุนไพร ลงไปในหลอดทดลองในความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดลมที่เหมาะสม เมื่อการตอบสนองถึงจุดสูงสุด และอยู่ในระดับคงที่แล้ว ให้ล้างน้ำสกัดหยาบสมุนไพรออกให้หมด ด้วยสารละลาย Krebs - Hanseleit 2 - 4 ครั้ง จนกระทั่งหลอดลมกลับไปอยู่ในสภาพปกติอีกครั้ง เติมคาร์บาคอลลงไปอีกครั้ง เมื่อหลอดลมหดตัวคงที่แล้ว จึงเติมโปรปรานอลลอลลงไป (ในความเข้มข้นเดียวกันกับที่กล่าวไว้ข้างต้น) ทิ้งไว้ 3 – 5 นาที แล้วจึงเติมน้ำสกัดหยาบในความเข้มข้นเดียวกันกับที่เติมลงไป ก่อนหน้านี้