บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 สัตว์ทดลองและอุปกรณ์สำหรับเตรียมการทดลอง

2.1.1 ปลาดุกพันธุ์ผสม ขนาด 15±2 เซนติเมตร

2.1.2 ตู้กระจก ขนาด 60×36×36 เซนติเมตร

2.1.3 อาหารปลาสำเร็จรูปชนิดเม็ดขนาดเล็ก

2.1.4 หัวทราย และ air pump

2.2 เครื่องมือ

2.2.1 UV-visible recording spectrophotometer (UV-160A, Shimadsu)

2.2.2 Tissue grinder (Wheaton)

2.2.3 Standard pH meter (EA 920, Orion Research)

2.2.4 Spectronic.26 (Bausch & Lomb)

2.2.5 Coulter mixer (Northwell Drive, Luton, Beds, LU3 3RH England)

2.2.6 Magnetic stirrer (RC-2, Tokyo Rikakikai Co. Ltd.)

2.2.7 Hemocytometer 0.1 mm. OEET (Brigth line)

2.2.8 เครื่องชั่งละเอียด (A 200S, Sartorius)

2.2.9 กล้องจุลทรรศน์ลำแสงธรรมดา (Model CH2, Olympus Optica)

2.3 สารเคมี

2.3.1 Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) (Merck)

2.3.2 Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (Merck)

2.3.3 5:5 dithiobis-(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) (Sigma)

2.3.4 Acetylthiocholine iodide (Sigma)

2.3.5 Bovine erythrocyte cholinesterase 0.35 u/mg. (Sigma)

2.3.6 Ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) (Farmitalia Carlo Erba)

2.3.7 SGOT-SGPT kit (Clinaq)

2.3.8 Wright's stain (Clinaq)

2.3.9 Brilliant cresyl blue (Merck)

2.3.10 Sodium citrate (Vidhyasom Co.Ltd.)

2.3.11 Daitaphos (50% dichlorvos, DDVP) (เจียไต๋ จำกัด)

2.3.12 Formalin 37% (Merck)

2.3.13 Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)

2.4 การเตรียมสารเคมี

2.4.1 สารละลาย phosphate buffer 0.1 M, pH 8.0

เตรียมโดยการผสมสารละลาย Na_2HPO_4 0.1 M (14.2 g/liter) จำนวน 475 ml. กับสารละลาย KH_2PO_4 0.1 M (13.6 g/liter) โดยค่อยๆเติมเพื่อปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 8.0 สารละลายบัฟเฟอร์นี้เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C ได้นาน 14 วัน

2.4.2 สารละลาย phosphate buffer 0.1 M, pH 7.0

เตรียมสารละลาย Na_2HPO_4 0.1 M (14.2 g/liter) 100 ml ผสมกับสารละลาย KH_2PO_4 0.1 M (13.6 g/liter) โดยค่อยๆเติมเพื่อปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7.0 สารละลายบัฟเฟอร์นี้เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C ได้นาน 14 วัน

2.4.3 Substrate acetylthiocholine iodide

เตรียมโดยการชั่ง acetylthiocholine iodide 0.5418 กรัม แล้วนำมาละลายด้วยน้ำกลั่น 25 ml สารละลายนี้เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C ได้นาน 14 วัน

2.4.4 Dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB) 0.01 M

เตรียมโดยการชั่ง DTNB 0.396 กรัม และ sodium bicarbonate 0.15 กรัม แล้วนำสารทั้ง 2 ชนิดมาละลายในสารละลาย phosphate buffer pH 7.0 จำนวน 100 ml สารละลายนี้เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C ได้นาน 14 วัน

2.4.5 Enzyme bovine cholinesterase (0.35 unit/mg)

เตรียมโดยการชั่ง bovine erythrocyte cholinesterase 0.1 กรัม แล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นจำนวน 10 ml จะได้ปริมาณเอนไซม์ 0.35 IU ต่อ 1 ml นำไปเจือจางต่อด้วยน้ำกลั่นเพื่อทำเป็น serial dilution ให้ได้ความเข้มข้น 0.175 IU, 0.0875 IU, 0.0438 IU และ 0.0219 IU

2.4.6 Rees-Ecker solution (Wedemeyer and Yasutake, 1977)

เตรียมโดยชั่ง sodium citrate 3.8 กรัม และ brilliant cresyl blue 0.5 กรัมนำสารทั้ง 2 ตัวไปละลายใน formalin 37% จำนวน 0.2 ml แล้วละลายต่อในน้ำกลั่น 100 ml นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง No.40 ใส่สารละลายนี้ในขวดสีชาเก็บในตู้เย็น

2.5 การเตรียมตัวอย่าง

2.5.1 การเตรียมเลือด

ดูดเลือดปลาดุกพันธุ์ผสมกลุ่มละ 2 ตัว โดยดูดที่ caudal dorsal aorta สูงขึ้นมาจากโคนหางประมาณ 1-1.5 นิ้ว นำเลือดปลา 2 ตัวมา pool กันให้ได้ประมาณ 3 ml แบ่งเลือดเป็น 2 ส่วน ใส่เลือด 1 ml ในขวดที่มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งตัว และใส่เลือด 2 ml ในหลอดที่ไม่มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งตัว

2.5.2 การเตรียมซีรั่ม

นำเลือดที่แข็งตัวในหลอดที่ไม่มี EDTA ไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 รอบ นาน 10 นาทีเพื่อแยกซีรั่ม นำซีรั่มที่ได้แบ่งใส่ใน microtube 0.4 ml เพื่อใช้ในการศึกษาการทำงานของตับ และ

ส่วนที่เหลือเก็บใส่ในขวดสะอาดเพื่อใช้ศึกษาการทำงานของเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรสต่อไป นำทั้ง 2 ส่วนแช่แข็งที่อุณหภูมิ -10°C จนกว่าจะนำมาศึกษา

2.5.3 การเตรียมสมอง

ตัดกระโหลกปลาดุกพันธุ์ผสมกลุ่มละ 2 ตัวด้วยกรรไกรตัดกระดูก เปิดออกแล้วนำสมองของปลาทั้ง 2 ตัวมาบดรวมกันให้เป็นเนื้อเดียวใน phosphate buffer pH 8.0 ด้วยอัตราส่วนเนื้อสมอง : บัฟเฟอร์คือ 10 mg : 2 ml แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -10°C จนกว่าจะนำมาศึกษา

2.6 การวัดการทำงานของเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรสในสมองและซีรั่ม

วัดการทำงานของเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรสจากสมองและซีรั่มที่เตรียมไว้ โดยประยุกต์ใช้วิธีการของ Ellman et al. (1961) มีขั้นตอนการวัดดังนี้

2.6.1 การวัดการทำงานของเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรสในสมอง

2.6.1.1 ใช้ปิเปตดูดสมองที่บดผสมใน phosphate buffer pH 8.0 จำนวน 0.5 ml ใส่ใน cuvettes 2 อัน กำหนดให้เป็น sample และ blank

2.6.1.2 เติม phosphate buffer pH 8.0 จำนวน 2.5 ml ใน cuvettes ทั้ง 2 อัน

2.6.1.3 เติม DTNB 100 µl ลงใน cuvettes ทั้ง 2 อัน

2.6.1.4 นำ cuvette ทั้ง 2 อันไปวางในเครื่อง spectrophotometer แล้วปรับความยาวคลื่นแสงที่ 412 nm

2.6.1.5 เติม substrate acetylthiocholine iodide 20 µl ลงใน sample

2.6.1.6 บันทึกการเปลี่ยนแปลงของค่า opical density (Δ A) ภายในเวลา 6 นาที

2.6.2 การวัดการทำงานของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในซีรั่ม

2.6.2.1 นำซีรั่มที่เตรียมไว้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น โดยใช้อัตราส่วนที่เหมาะสม ในที่นี้ใช้อัตราส่วนซีรั่ม : น้ำกลั่นเป็น 1 : 6

2.6.2.2 ใช้ปิเปตดูดซีรั่มที่เจือจางแล้วมา 0.5 ml ใส่ลงใน cuvettes ทั้ง 2 อัน โดยกำหนด sample และ blank เช่นเดียวกับสมอง

2.6.2.3 เติม phosphate buffer pH 8.0 จำนวน 2.5 ml ใน cuvettes ทั้ง 2 อัน

2.6.2.4 เติม DTNB 100 µl ลงใน cuvettes ทั้ง 2 อัน

2.6.2.5 นำ cuvettes ทั้ง 2 อันไปวางใน spectrophotometer แล้วปรับความยาวคลื่นแสงที่ 412 nm

2.6.2.6 เติม substrate acetylthiocholine iodide 20 µl ลงใน sample คนให้เข้ากัน

2.6.2.7 บันทึกการเปลี่ยนแปลงค่า optical density (Δ A) ภายในเวลา 6 นาที

2.6.3 การคำนวณค่าการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity)

การคำนวณการทำงานของเอนไซม์ในสมองและซีรั่ม

$$R = \frac{\Delta A}{1.36 \times 10^{4}} \times \frac{1}{(500/3120)\, C_o}$$

$$= 4.59 \times 10^{2} \times \frac{\Delta A}{C_o}$$

เมื่อ R (brain) = rate in micromoles substrate hydrolyzed/min/g

R (serum) = rate in micromoles substrate hydrolyzed/min/ml

ΔA = change in absorbance/min

C_o (brain) = original concentration of tissue (mg/ml)

C_o (serum) = dilution factor

2.6.4 การทำ standard curve

2.6.4.1 นำสารละลาย phosphate buffer pH 8.0 ใส่ใน cuvettes ทั้ง 2 อัน อันละ 3 ml กำหนดให้เป็น sample และ blank

2.6.4.2 เติม DTNB. 100 µl และ substrate acetylthiocholine iodide 20 µl ลงใน cuvettes ทั้ง 2 อัน

2.6.4.3 นำ cuvettes ทั้ง 2 อันไปวางในเครื่อง spectrophotometer แล้วปรับความยาวคลื่นแสงที่ 412 nm

2.6.4.4 นำสารละลายมาตรฐานของ bovine erythrocyte cholinesterase ที่ความเข้มข้นต่างๆจำนวน 50 µl ใส่ใน sample คนให้เข้ากัน

2.6.4.5 บันทึกการเปลี่ยนแปลงค่า optical density (ΔA) ภายในเวลา 6 นาที

2.6.4.6 เขียนกราฟระหว่างค่า opical density (ΔA) ที่เปลี่ยนแปลงต่อ 1 นาที (แกน y) กับจำนวน unit ของเอนไซม์ (แกน x)

2.6.4.7 สมการที่ได้ $C = K.ABS + B$

คำนวณหาค่าคงที่ $= 1/K$

ค่ามาตรฐานจากรายงานของ Ellman et al (1961) คือ 0.102

2.7 การหาค่าทางโลหิตวิทยา

หาค่าทางโลหิตวิทยาจากเลือดที่เตรียมไว้ โดยประยุกต์ใช้วิธีการของ Benjamin (1961) ดังนี้

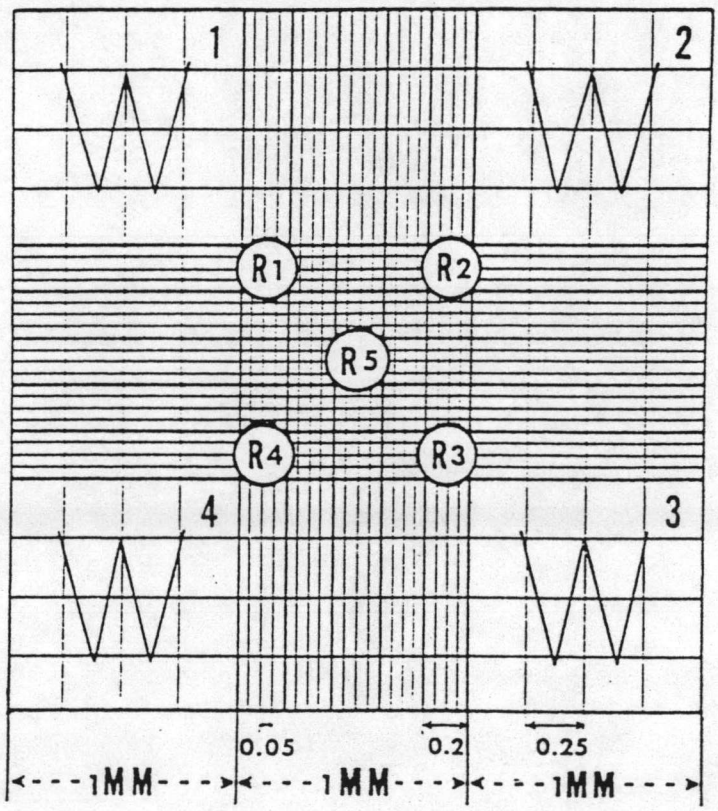
2.7.1 การตรวจนับเม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดง

2.7.1.1 นำเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งตัว ในที่นี้คือ EDTA ดูดเลือดโดยใช้ red blood cell pipette แล้วดูดน้ำยา Rees-Ecker solution (Wedemeyer and Yasutake, 1977) ตามเพื่อเจือจางเลือดให้ได้อัตราส่วนเลือด : solution เท่ากับ 1 : 200

2.7.1.2 นำ red blood cell pipette ไปเขย่าผสมให้เข้ากัน ปล่อยส่วนปลายซึ่งผสมไม่เข้ากันทิ้งเล็กน้อย

2.7.1.3 นำเลือดที่เข้ากันดีหยดลงใน hemocytometer 0.1 mm แล้วปิดด้วย cover slip

2.7.1.4 ตรวจนับเม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดง โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ลำแสงธรรมดากำลังขยาย 40 × 10 เท่า โดยนับดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 แสดงบริเวณที่นับเม็ดเลือดบน hemocytometer เมื่อ W คือบริเวณที่นับเม็ดเลือดขาว และ R คือบริเวณที่นับเม็ดเลือดแดง (Medway, Prier and Wilkinson, 1969)

2.7.1.5 การคำนวณจำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC)

$WBC/mm^3 = (C)(D) \times 1.25$

เมื่อ C = number of cells counted × 4

D = dilution factor ในที่นี้เท่ากับ 200

2.7.1.6 การคำนวณจำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC)

$RBC/mm^3 = (C)(D) \times 50$

เมื่อ C = number of cells counted × 5

D = dilution factor ในที่นี้เท่ากับ 200

2.7.2 การหาค่าฮีมาโตคริทและฮีโมโกลบิน

2.7.2.1 ใช้ hematocrit tube ดูดเลือดที่มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งตัว ให้ปริมาณของเลือดสูงไม่ต่ำกว่า 2/3 ของความยาว tube แล้วกดลงบนดินน้ำมันเพื่อกันไม่ให้เลือดไหลออกจาก tube

2.7.2.2 นำ hemotocrit tube ไปปั่นด้วย microcentrifuge นาน 3 นาที แล้วนำไปเทียบจากค่าสากล

2.7.2.3 ค่าฮีมาโตคริทที่ได้จากค่าสากลหารด้วย 3 จะได้ค่าฮีโมโกลบิน

2.7.3 การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว

2.7.3.1 นำเลือดที่มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งตัวหยดลงบนแผ่นสไลด์

2.7.3.2 smear เลือดบนแผ่นสไลด์ แล้วย้อมด้วย Wright's stain

2.7.3.3 ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำมาตรวจนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวด้วยกล้องจุลทรรศน์ลำแสงธรรมดากำลังขยาย 100 × 10 เท่า

2.8 การวัดการทำงานของตับ

วัดการทำงานของตับจากซีรั่มที่เตรียมไว้ โดยใช้ SGOT-SGPT kit จากบริษัท Clinaq โดยประยุกต์ใช้วิธีการของ Benjamin (1961) ดังนี้

2.8.1 นำซีรั่มที่เตรียมไว้ใน microtube จำนวน 0.4 ml แบ่งซีรั่มตรวจ SGOT และ SGPT โดยมีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การวัดการทำงานของตับโดยใช้ SGOT-SGPT kit

Test	SGOT	SGPT
Substrate	1.0 ml	1.0 ml
Incubate	37°C, 5 min	37°C, 5 min
Serum	0.2 ml	0.2 ml
Incubate	37°C, 60 min	37°C, 30 min
Phenylhydrazine	1.0 ml	1.0 ml
Room temperature นาน	20 min	20 min
0.4N NaOH	10 ml	10 ml
Room temperature นาน	5 min	5 min
Optical density	512 nm	512 nm
Blank	water	water

2.8.2 การคำนวณหาค่า SGOT-SGPT

นำค่า optical density ที่วัดได้ไปคำนวณหาค่า โดยเปรียบเทียบกับ standard curve ซึ่งได้จากการทำ calibration curve

2.8.3 การทำ calibration curve

2.8.3.1 ทำโดยการเปลี่ยนแปลงจำนวนของ standard pyruvate และ substrate ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การทำ calibration curve

Tube No.	Pyruvate (ml)	Substrate (ml)	H_2O (ml)	GOT activity SF units/ml	GPT activity SF units/ml
1	0.0	1.0	0.2	0	0
2	0.1	0.9	0.2	20	25
3	0.2	0.8	0.2	55	50
4	0.3	0.7	0.2	95	83
5	0.4	0.6	0.2	148	126
6	0.5	0.5	0.2	215	-

2.8.3.2 เติม phenylhydrazine 1 ml ทุกหลอด ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที

2.8.3.3 เติม 0.4N NaOH 10 ml ทุกหลอด ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

2.8.3.4 นำไปวัด optical density ที่ 520 nm ด้วยเครื่อง spectrotonic .26 โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank

2.8.3.5 plot curve ระหว่าง OT unit หรือ PT unit กับค่า optical density ของแต่ละค่า

2.9 วิธีการทดลอง

2.9.1 การเลี้ยงปลา

ปลาดุกพันธุ์ผสมจากฟาร์มซ้งพันธุ์ปลาขนาด 15 ± 2 เซนติเมตร เลี้ยงในตู้กระจกขนาด 60× 36 × 36 เซนติเมตร โดยใช้น้ำประปา pH 7.0-8.0 ความหนาแน่นของปลา 1 ตัวต่อน้ำ 2.5 ลิตร มีหัวทรายและ air pump ช่วยเพิ่มออกซิเจนแก่ปลา ให้อาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดขนาดเล็กวันละ 1 ครั้งในช่วงเช้า เลี้ยงปลาก่อนทดลองจริงประมาณ 2 อาทิตย์ เพื่อให้ปลาคุ้นเคยกับสภาพแวดล้อม

2.9.2 การหาค่า median lethal concentration ในเวลา 96 ชั่วโมง (LC_{50}, 96 hr.)

2.9.2.1 แบ่งปลาออกเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว

2.9.2.2 ให้ DDVP แก่ปลาทั้ง 6 กลุ่ม ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ppm โดยเตรียมจาก 50% dichlorvos

2.9.2.3 สังเกตอาการปลาทั้ง 6 กลุ่มจนครบ 96 ชั่วโมง บันทึกพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงของปลา นับจำนวนปลาที่ตายในแต่ละกลุ่มเพื่อนำมาหาค่า LC_{50} โดยวิธีการของ Litchfield and Wilcoxon (1949) (รายละเอียดและการคำนวณดูในผลการทดลอง)

2.9.2.4 ทำซ้ำ 2 ครั้ง

2.9.2.5 อ่านค่า sublethal dose ของ DDVP จากกราฟ LC_{50} แล้วนำค่าที่ได้มาใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2.9.3 การหาค่า % recovery ของเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรสในซีรั่ม

2.9.3.1 เตรียมซีรั่มจากเลือดปลาดุกพันธุ์ผสม

2.9.3.2 เตรียมหลอดทดลอง 2 หลอด ใส่สารเคมีดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนสารเคมีที่เติมในหลอดทดลองเพื่อหา % recovery

สารเคมี	Blank	Serum
DTNB	4.0 ml	4.0 ml
serum	20 µl	20 µl
bovine erythrocyte ChE	-	50 µl
acetylthiocholine iodide	20 µl	-

2.9.3.3 bovine erythrocyte ChE ที่ใช้เตรียมความเข้มข้นตั้งแต่ 0.125, 0.25, 0.5 และ 1.00 unit ตามลำดับ

2.9.3.4 นำสารทั้ง 2 หลอดใส่ใน cuvettes 2 อัน วางบน spectrophotometer ปรับความยาวคลื่นแสงที่ 412 nm

2.9.3.5 วัดค่า optical density ที่เปลี่ยนแปลงใน 6 นาที

2.9.3.6 คำนวณ % recovery ดังนี้

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{Determined value}}{\text{Theoretical value}} \times 100$$

2.9.3.7 ทำซ้ำ 10 ครั้งแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

2.9.4 การประเมินหาค่าความคงตัว (stability) ของเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรสในซีรั่ม

2.9.4.1 นำซีรั่มจากปลาดุกพันธุ์ผสม 10 ตัว (pooled serum) เก็บใส่ในหลอดทดลอง 3 ชุด ชุดละ 6 หลอด

2.9.4.2 นำหลอดทดลองทั้ง 3 ชุดแช่แข็งที่อุณหภูมิ -10°C

2.9.4.3 นำตัวอย่างมาวัดค่าการทำงานของเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรส ในซีรั่มปลาดุกทุกสัปดาห์ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 6 เพื่อดูความเปลี่ยนแปลงของการทำงานของเอนไซม์ตามเวลาที่เปลี่ยนไป

I17318130

2.9.5 การศึกษาผลของ DDVP ในขนาดที่ไม่ทำให้ปลาตาย (sublethal dose)

2.9.5.1 แบ่งปลาเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว เลี้ยงในตู้กระจกนาน 2 สัปดาห์ เพื่อปรับสภาพปลา

2.9.5.2 วันทำการทดลอง แช่ปลากลุ่มควบคุมในน้ำสะอาดจำนวน 50 ลิตร และแช่ปลากลุ่มทดลองในน้ำที่มี DDVP ในขนาดที่ไม่ทำให้ปลาตายซึ่งผสมอยู่ในน้ำ 50 ลิตร นาน 1 ชั่วโมง

2.9.5.3 เมื่อครบ 1 ชั่วโมง ย้ายปลาทั้ง 2 กลุ่มใส่ในตู้กระจกที่มีน้ำสะอาดจำนวน 50 ลิตร

2.9.5.4 เก็บตัวอย่างปลาทั้ง 2 กลุ่ม โดยการสุ่มตัวอย่างกลุ่มละ 2 ตัวที่เวลา 0, 1, 2, 4, 7, 14 และ 21 วัน พร้อมทั้งสังเกตพฤติกรรมและ lesion ภายนอกที่อาจเกิดขึ้นในแต่ละวัน

2.9.5.5 นำตัวอย่างปลามาดูดเลือด และเอาสมองมาตรวจการทำงานของเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรส ตรวจหาค่าทางโลหิตวิทยา และการทำงานของตับ ตามวิธีการที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น

2.9.5.6 ทำซ้ำ 10 ครั้ง

สถิติที่ใช้ในการทดลอง

1. หาค่า median lethal concentration โดยใช้วิธีของ Litchfield and Wilcoxon (1949) นำข้อมูลมาสร้างกราฟ LC_{50} ทำการทดสอบค่าที่ได้จากการทดลอง และค่าที่ควรจะเป็นโดยใช้ chi square test

2. เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยใช้ student "t" test $p<0.01$ (เติมศรี ชำนิจารกิจ, 2531)