

การดำเนินการทดลอง



1. การเลี้ยงและระวังรักษาสัตว์ทดลอง

เลือกหนูพันธุ์ซีเชอร์-วิลตาร์ ใช้แต่ตัวผู้ที่อยู่ในวัยที่จะผสมพันธุ์ได้ อายุ 90-120 วัน มีน้ำหนักเริ่มต้น 200-300 กรัม เลี้ยงในห้องทดลองของเรือนเลี้ยงสัตว์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ให้กินอาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ด (อาหารมาตรฐาน) ซึ่งสั่งจากบริษัท F.E. Zeullig (Gold Coil Mills) และมีน้ำประปาให้ดื่มตลอดเวลา

2. การเตรียมสารเคมี

2.1 การเตรียมสารละลายตะกั่วอะซิเตทสำหรับบ่อน้ำให้สัตว์ทดลอง

ซึ่งตะกั่วอะซิเตทด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า ซึ่งอ่านละเอียดถึง 0.1 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นชนิดไม่มีไอออนที่ต้มเดือดใหม่ ๆ ให้มีความเข้มข้นของสารละลายตะกั่ว 0.2% และ 1.0% ทิ้งไว้ให้เป็นก่อนจะทำการบ่อน้ำให้สัตว์ทดลอง และเตรียมสารละลายตะกั่วนี้ใหม่ทุกครั้งที่ทำกรบ่อน้ำให้สัตว์ทดลองแต่ละครั้ง

2.2 การเตรียมสารละลายแคลเซียมไดออกไซด์เทียมเอดิเตท สำหรับฉีดเข้าช่องท้องสัตว์ทดลอง

ซึ่งแคลเซียมไดออกไซด์เทียมเอดิเตทด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าละลายในน้ำเกลือ 0.9% ให้มีความเข้มข้น 1.5% เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องตลอดเวลาที่ใช้ในการทดลอง

2.3 การเตรียมสารละลายไนโตรโซเดียมไนไตรโรไลโตรอะซิเตท

ทำแบบเดียวกับการเตรียมสารละลายแคลเซียมไดออกไซด์เทียมเอดิเตท

2.4 การเตรียมสต็อกของสารละลายตะกั่วไนเตรทสำหรับเตรียมสารละลายตะกั่วไนเตรทมาตรฐาน

ซึ่งตะกั่วไนเตรท (E. Merck A.G. Darmstadt) ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า

1.598 กรัม ละลายในกรดไนตริก 10% 4 ลิตร จะได้สารละลายตะกั่วในเตรท 1,000 ppm (µg/ml) เป็นสต็อคมาตรฐาน

2.5 การเตรียมสารละลายตะกั่วใน เตรทมาตรฐาน เพื่อทำ เส้นโค้งมาตรฐาน (Standard curve)

ใช้สต็อคของสารละลายตะกั่วในเตรท 1,000 ppm 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จะได้สารละลายตะกั่วในเตรทมาตรฐาน 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 ppm ตามลำดับ เก็บไว้ในขวดโพลีเอธิลีน และไม่ควรรีเตรียมสารละลายตะกั่วใน เตรทมาตรฐาน เกิน 2 สัปดาห์ขณะที่ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ ตะกั่วในสารละลายตัวอย่าง

3. การเตรียมท่อ (stomach tube) สำหรับป้อนสารละลายตะกั่วให้สัตว์ทดลอง

ใช้ท่ออินทราเวคิกโพลีเอธิลีนมีเบอร์ 100 ซึ่งตัดยาวประมาณ 8.0 ซม. สวมเข้ากับเข็มฉีดยาเบอร์ 20 ให้แน่นพอดี แล้วนำไปสวมติดกับไซริงจ์ขนาด 5 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปติดสารละลายตะกั่วอะซี เดท เพื่อนำไปป้อนให้แก่สัตว์ทดลอง ท่อโพลีเอธิลีนที่มีรอยสัตว์ทดลองแทะหรือกัดจะต้อง เปลี่ยนใหม่ทุกครั้ง

4. การสลบและฆ่าสัตว์ทดลอง เพื่อ เจาะ เลือดและเก็บ เนื้อ เยื่อ

การสลบสัตว์ทดลองใช้วิธีดมด้วยอีเทอร์แล้ว เปิดหน้าอกออกเป็นช่องกว้าง ทำการเจาะเลือดจากหัวใจโดยใช้ไซริงจ์ขนาด 5 มิลลิลิตรและเข็มฉีดยาเบอร์ 20 ซึ่งได้ดูดสารละลายโปแตสเซียมออกซาเลท 10% ไว้ก่อนแล้วประมาณ 0.1 มิลลิลิตร (2 มิลลิลิตรโปแตสเซียมออกซาเลทต่อเลือด 1 มิลลิลิตร) เจาะเลือดจนได้ 5 มิลลิลิตรแล้วจึงเก็บไว้ในขวดแก้วเล็ก ๆ ซึ่งมีฝาปิด ตัดเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น ตับ ไต กล้ามเนื้อน่อง กระดูกหน้าแข้ง พร้อมทั้งแกะสมองออกจากตัวสัตว์ทดลอง ตัดขนาดชิ้นเล็ก ๆ แล้วทำการชั่งสัดทั้งหมดด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้าที่อ่านได้ละเอียดถึง 0.01 กรัม ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 0.70 - 1.06 กรัม ห่อเนื้อเยื่อแต่ละชิ้นด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์แล้วห่อหุ้มด้วยถุงพลาสติกอีกชั้นหนึ่ง แล้วจึงนำเลือดและเนื้อ เยื่อ เหล่านี้ไปแช่แข็งจนกว่าจะนำมาย่อย เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณตะกั่วใน เนื้อ เยื่อ เหล่า นั้น

5. การย่อย เนื้อ เยื่อ และ เสียด โดยวิธีย่อย เปียก (Wet-ashed Method)

วิธีการย่อยเนื้อเยื่อแบบย่อยเปียก โดยนำเสียดและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ที่เก็บรวบรวมไว้ มาใส่ในบีกเกอร์ขนาด 40 มิลลิลิตร เติมน้ำในบีกเกอร์ให้เต็มแล้วใส่เนื้อเยื่อลงไปในแต่ละบีกเกอร์ในปริมาณ

มิลลิลิตรใช้กระดาษกรองปิดที่ปากบีกเกอร์แล้วจึงนำไปอุ่นบนเตาที่วางในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 70-80°C จนได้สารละลายสีเหลืองใสแล้วจึงเอาระจกนาฬิกาออก อุณหภูมิของสารละลายในบีกเกอร์เหลือเพียงครึ่งหนึ่งประมาณ 1.0 มิลลิลิตร จึงยกออกจากเตาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ทำให้กรดเจือจางลงโดยเติมน้ำกลั่นชนิดไม่มีไอออนจนได้ปริมาตรประมาณ 15 มิลลิลิตร นำไปอุ่นต่อจนสารละลายงวดลงเหลือ 5-10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นแล้วอุ่นต่ออีกครั้งให้เหลือน้อยกว่า 10 มิลลิลิตรเล็กน้อยขณะที่สารละลายเย็น ใช้ปิเปตดูดสารละลายจากบีกเกอร์ใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียว แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดฝาและเขย่าเก็บไว้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณตะกั่วในสารละลายตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง สำหรับแบบลวด ทำวิธีเดียวกันแต่ไม่ใส่เนื้อเยื่อหรือเสียด

6. การวิเคราะห์หาปริมาณตะกั่วในสารละลายตัวอย่าง

ในการวิเคราะห์หาปริมาณตะกั่วในสารละลายตัวอย่างแต่ละครั้งนั้น จะต้องนำสารละลายตะกั่วในเตรหมาตรฐานที่เตรียมไว้ไปวัดหาค่าแอมซอบแนนซ์ (absorbance) ที่ความยาวช่วงคลื่น 217 nm. โดยใช้อะตอมมิคแอนซอบซัน สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ชนิดใช้เปลวไฟ (Varian Techtron Model AA-5) แล้วจึงนำค่าแอมซอบแนนซ์ที่อ่านได้กับค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไปเขียนกราฟ ก็จะได้เส้นโค้งมาตรฐานของสารละลายตะกั่วในเตรหมาตรฐาน เมื่อได้ค่าเส้นโค้งที่คงที่และเป็นเส้นตรงแล้ว จึงทำการวัดหาค่าแอมซอบแนนซ์ของสารละลายตัวอย่างแต่ละหลอดที่ความยาวคลื่นเดียวกัน ค่าแอมซอบแนนซ์ของสารละลายตัวอย่างที่วัดได้ต้องหักออกด้วยค่าเบี่ยงเบนค่าก่อนทุกครั้งที่จะนำไปเทียบหาค่าความเข้มข้นของปริมาณตะกั่วตัวอย่างจาก เส้นโค้งมาตรฐานแต่ละครั้ง

7. การวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง

ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง นำมาวิเคราะห์หาความแปรปรวนโดยวิธีเกรซซันหาความสัมพันธ์และความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test

8. การทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้ใช้หนูเพศผู้จำนวน 230 ตัว โดยแบ่งการทดลองเป็นสองระยะคือ ระยะแรกเป็นการศึกษาเพื่อดูการสะสมของสารตะกั่วในอวัยวะต่าง ๆ ของหนูในระยะเวลาที่ ได้รับสารตะกั่วต่าง ๆ กัน ส่วนระยะหลังเป็นการศึกษาเพื่อดูการกำจัดสารตะกั่วออกจากอวัยวะต่าง ๆ เหล่านั้น หลังจากหยุดให้สารละลายตะกั่ว แต่ให้สารละลายแคลเซียมไโดโซเดียม เอดีเตท หรือไทรโซเดียมไนโตรโล ไตรอะซีเตทหรือน้ำเกลือต่อไป ระหว่างการทดลองทำการ **ตรวจดูลักษณะอาการภายนอกและพฤติกรรมของหนู**ด้วย การทดลองระยะแรกโดยการป้อนตะกั่วให้หนูในขนาด 2 และ 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 100 กรัม ในรูปของสารละลายตะกั่วอะซีเตท วันเว้นวันตลอด 8 สัปดาห์ เก็บเลือดและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของหนูทุก 2 สัปดาห์คือ เมื่อครบ สัปดาห์ที่ 2, 4, 6 และ 8 การทดลองระยะหลังให้หนูกลุ่มที่ได้รับตะกั่วในขนาด 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 100 กรัมได้รับแคลเซียมไโดโซเดียม เอดีเตท หรือไทรโซเดียมไนโตรโล ไตรอะซีเตท หรือน้ำเกลือ โดยการฉีดเข้าช่องท้อง วันเว้นวันจนครบสัปดาห์ที่ 16 เก็บเลือดและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของหนูเช่นเดียวกับระยะแรก คือเมื่อครบสัปดาห์ที่ 10, 12, 14 และ 16 เลือด และเนื้อเยื่อต่าง ๆ ที่ได้จากการทดลองแต่ละครั้งนำมาแช่แข็งจนกว่าจะถึง เวลาย่อยเนื้อเยื่อ เหล่านั้น เนื้อเยื่อที่ทำการย่อยเป็นสารละลายแล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณตะกั่วโดยวิธีอะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโตรสโคปีใช้เปลวไฟ (flame method atomic absorption spectroscopy) เทียบกับสารละลายตะกั่วมาตรฐานจากเส้นโค้งมาตรฐาน

1. การสะสมสารตะกั่วในร่างกายของหนู

เป็นการศึกษาเพื่อดูการสะสมสารตะกั่วในเลือด ตับ ไต สมอง กล้ามเนื้อ และกระดูกของหนู แบ่งหนูเป็นกลุ่ม ๆ ดังนี้

กลุ่มที่ 1.1 เป็นกลุ่มเปรียบเทียบก่อนการทดลองซึ่งหนูไม่ได้รับน้ำกลั่นหรือสารละลายอื่น ๆ แต่อย่างใด ทำการเจาะเลือดและเก็บเนื้อเยื่อจากสัตว์ทดลองใช้หนู 6 ตัว

กลุ่มที่ 1.2 ป้อนสารละลายให้หนูวันเว้นวันระหว่างเวลา 9.00 - 10.00 น. จนครบ 2 สัปดาห์ เจาะเลือดและเก็บเนื้อเยื่อจากหนูในวันรุ่งขึ้น

ก. ป้อนน้ำกลั่นในขนาด 1 มิลลิตรต่อน้ำหนักหนู 100 กรัม เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ ใช้หนู 8 ตัว

ข. ป้อนสารละลายตะกั่วอะซิเตท 0.2% 1 มิลลิลิตร (2 มิลลิกรัม)

ต่อน้ำหนักหนู 100 กรัม ใช้หนู 8 ตัว

ค. ป้อนสารละลายตะกั่วอะซิเตท 1.0% 1 มิลลิลิตร (10 มิลลิกรัม)

ต่อน้ำหนักหนู 100 กรัม ใช้หนู 8 ตัว

กลุ่มที่ 1.3 ทำเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1.1 (ก, ข และ ค) แต่ป้อนสารจนครบ 4 สัปดาห์

กลุ่มที่ 1.4 ทำเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1.1 (ก, ข และ ค) แต่ป้อนสารจนครบ 6 สัปดาห์

กลุ่มที่ 1.5 ทำเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1.1 (ก, ข และ ค) แต่ป้อนสารจนครบ 8 สัปดาห์

2. ศึกษาผลของสารเคมีเลขบางตัวที่มีต่อการกำจัดสารตะกั่วออกจากร่างกายของหนู

เป็นการศึกษาเพื่อดูการกำจัดสารตะกั่วที่มีอยู่ในเลือดและเนื้อเยื่อบางอย่างของ

หนู ... หลังจากป้อนสารละลายตะกั่วอะซิเตทในปริมาณต่าง ๆ จนครบ 8 สัปดาห์ แบ่งการ

ทดลองเป็นกลุ่ม ๆ ดังนี้

กลุ่มที่ 2.1 ฉีดสารให้แก้สัตว์ทดลอง โดยฉีดเข้าช่องท้อง ฉีดวันเว้นวัน ระหว่าง

เวลา 9.00-10.00 น. โดยเริ่มฉีดในวันรุ่งขึ้นหลังจากหยุดให้สารละลายตะกั่ว ฉีดจนครบ

2 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 10 หลังจากเริ่มทำการทดลอง) จึงเจาะเลือดและเก็บเนื้อเยื่อในวันรุ่งขึ้น

ก. ฉีดน้ำเกลือ 0.9% เข้าช่องท้องในขนาด 0.5 มิลลิลิตรต่อน้ำหนัก

หนู 100 กรัม เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ ใช้หนู 8 ตัว

ข. ฉีดสารละลายแคลเซียมโอดีเตท 1.5% ในขนาด 0.5

มิลลิลิตร (7.5 มิลลิกรัม) ต่อน้ำหนักหนู 100 กรัม ใช้หนู 8 ตัว จากกลุ่มที่ได้รับตะกั่ว 10 มิลลิกรัม

ค. ฉีดสารละลายโซเดียมไนโตรโอดีโรอะซิเตท 1.5% ในขนาด 0.5

มิลลิลิตร (7.5 มิลลิกรัม) ต่อน้ำหนักหนู 100 กรัม ใช้หนู 8 ตัว จากกลุ่มที่ได้รับตะกั่ว 10 มิลลิกรัม

กลุ่มที่ 2.2 ทำเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 2.1 (ก, ข และ ค) แต่ฉีดจนครบ 4 สัปดาห์

กลุ่มที่ 2.3 ทำเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 2.1 (ก, ข และ ค) แต่ฉีดจนครบ 6 สัปดาห์

กลุ่มที่ 2.4 ทำเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 2.1 (ก, ข และ ค) แต่ฉีดจนครบ 8 สัปดาห์