บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันโดยการหาค่า median lethal concentration ในเวลา 96 ชั่วโมง (LC_{50} - 96 hr.)

การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันโดยการหาค่า LC_{50} ใช้เพื่อประเมินความเป็นพิษของสารที่ทดสอบต่อสุขภาพสัตว์ทดลองในระยะเวลาสั้น โดยวัดปริมาณสารที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 50 เปอร์เซ็นต์ในระยะเวลาที่กำหนด ค่าจะแตกต่างไปตามชนิดสารเคมี สัตว์ทดลอง เพศ อายุ จำนวน และปริมาณสารที่ใช้รวมถึงระยะเวลาวัดผล สำหรับการศึกษา LC_{50} ในสัตว์น้ำ นิยมวัดภายในระยะเวลา 96 ชั่วโมง (Ecobichon, 1992)

การออกแบบการทดลองและสัตว์ทดลอง

การทดลองแบ่งเป็น 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 ใช้ปลาจำนวน 150 ตัว โดยนำปลากะพงขาวความยาวเฉลี่ย 10 เซนติเมตร น้ำหนักเฉลี่ย 20 กรัม อายุประมาณ 1 เดือน จากฟาร์มเลี้ยงปลาในจังหวัดฉะเชิงเทรา ปรับสภาพในห้องทดลองนาน 3 วัน ในอ่างไฟเบอร์สี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 50x60x100 เซนติเมตร ความหนาแน่น 150 ตัวในปริมาตรน้ำ 200 ลิตร ความเค็ม 5 ส่วนในพัน pH 7.5-8.0 อุณหภูมิ 28-30 °C ให้เนื้อปลาทูสับละเอียดเป็นอาหารวันละ 1 ครั้ง เมื่อครบ 3 วัน แยกปลาออกเป็น 10 ตู้ ขนาดตู้ 27x33x51 เซนติเมตร ปริมาตรน้ำ 20 ลิตร ตู้ละ 10 ตัว เพื่อทดลองหา LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง ของเมทิลพาราไธออนชนิด 92.4 % โดยไม่เปลี่ยนถ่ายน้ำตลอดการทดลอง

ครั้งที่ 2 ใช้ปลากะพงขาวจากแหล่งเดิม มีความยาวและน้ำหนักเฉลี่ยใกล้เคียงกัน ทำการปรับสภาพให้คุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมรวมถึงการเลี้ยงด้วยวิธีการเดียวกันกับปลาชุดที่ 1 แต่ใช้จำนวนปลารวม 450 ตัว เมื่อปรับสภาพแล้วเป็นเวลา 3 วัน จึงแบ่งปลาออกเป็น 15 ตู้ ขนาดตู้ 60x35x30 เซนติเมตร ปริมาตรน้ำ 50 ลิตร ความหนาแน่นตู้ละ 20 ตัว ทดลองหา LC_{50}ของเมทิลพาราไธออนชนิด 92.4 % นาน 96 ชั่วโมง ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำตลอดการทดลอง

การเตรียมเมทิลพาราไธออน

เมทิลพาราไธออนที่ใช้สำหรับทำการทดลองหา LC_{50} มี 2 ชนิด โดยได้จากแหล่งต่างกัน 2 แหล่ง และมีความเข้มข้นแตกต่างกัน

เมทิลพาราไธออนชนิดแรก เป็นชนิดเข้มข้น 98 % (Chemscience Co.,Ltd.) มีลักษณะเป็นเกล็ดสีขาวเป็น laboratory grade ทำการเตรียมโดยนำเมทิลพาราไธออน 510 mg ละลายในเมทานอล 100 ml ได้เป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 50,000 mg/l

ชนิดที่สองเข้มข้น 92.4% (Bayer Co.,Ltd.) มีลักษณะเป็นของเหลวใส เป็นชนิด technical grade ที่ใช้เป็นสารเข้มข้นสำหรับทำส่วนผสมเพื่อการจำหน่าย เตรียมโดยปีเปตสาร 5.42 ml เติมเมทานอลเป็น 500 ml ได้สารละลายเข้มข้น 10,000 mg/l สารละลายเริ่มต้นทั้ง 2 ชนิดเมื่อเตรียมเสร็จแล้วจะถูกเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการทดลอง โดยชนิดแรกใช้ทดสอบ LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมงของปลากะพงขาวที่เตรียมไว้ครั้งที่ 1 และชนิดที่สองใช้สำหรับทดสอบ LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมงของปลาที่เตรียมไว้ชุดที่ 2 รวมทั้งการทดสอบผลของเมทิลพาราไธออนต่อ phagocytic activity และ chemotactic activity ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการทดลอง

การทดสอบ LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมงของเมทิลพาราไธออนต่อปลากะพงขาว ทำการทดลองโดยนำสารตั้งต้นทั้งสองชนิดมาเติมลงในตู้ปลาที่เตรียมไว้ สารตั้งต้นชนิดแรกมีความเข้มข้น 50,000 mg/l เติมลงในตู้ปลาที่ระดับความเข้มข้นของเมทิลพาราไธออน 0, 1, 2, 3 และ 4 mg/l โดยใช้ปริมาณสาร 0, 4, 8, 12 และ 16 ml ตามลำดับ (การ ทดลองมี 2 ซ้ำ) ส่วนสารตั้งต้นชนิดที่สองเตรียมไว้ที่ความเข้มข้น 10,000 mg/l เติมลง ในตู้ปลาที่ระดับความเข้มข้นเดียวกับการทดลองชุดแรก โดยใช้ปริมาตรสารที่เติม 0, 5, 10, 15 และ 20 ml (การทดลองมี 3 ซ้ำ) ควบคุมสภาพแวดล้อมโดยให้เวลารับแสง 12 ชั่วโมง ให้อากาศผ่านหัวทรายตลอดเวลา ประเมินผลโดยสังเกตดูอาการของปลาทุกวัน แยก ปลาที่ตายออก และนับจำนวนปลาตายทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

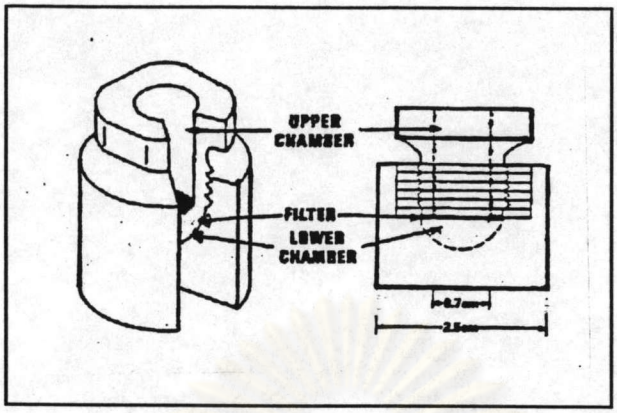
การวิเคราะห์ผล LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ผล LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง ใช้วิธีการวิเคราะห์ตามแบบ Miller และ Tainter (1994)

ผลของเมทิลพาราไธออนต่อ phagocytic activity และ chemotactic activity

การวัด chemotactic activity ใช้วิธีการของ Boyden (1962) ที่ดัดแปลงโดย Mathews et al. (1990) โดยใช้ Boyden's double-chamber เป็นอุปกรณ์ทำการศึกษา มีรูปร่างลักษณะดังนี้ (รูปที่5)

I16659533



รูปที่ 5 ส่วนประกอบของ Boyden's double-chamber (Mathews et al., 1990)

phagocyte ที่ใส่ลงใน chamber บนจะเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนไปยังด้านล่างของ chamber ซึ่งมี opsonized antigen อยู่ จากนั้นยุติการเคลื่อนที่โดยนำเมมเบรนออกมาผ่านขั้นตอนการย้อมเซลล์ อ่านผลโดยนับจำนวนเซลล์ที่อยู่ด้านบน และด้านล่างของเมมเบรนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเซลล์ที่อยู่ด้านล่างคือเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารเคมีที่ผิวของ antigen ให้เกิดการเคลื่อนที่จากด้านบนผ่านรูของของเมมเบรนมายังด้านล่าง ในขณะที่เซลล์ที่อยู่ด้านบนเป็นกลุ่มเซลล์ที่ไม่เคลื่อนที่ (Weeks et al., 1990)

การศึกษา phagocytic activity ใช้วิธีการนับจำนวน phagocyte ที่จับ antigen เข้าไปในเซลล์เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่จับ antigen ไว้ภายใน โดยทำการทดสอบบนกระจกสไลด์ผิวเรียบตามวิธีของ Bodhipaksha (1994)

การศึกษาครั้งนี้ได้ใช้แบคทีเรียชนิด *Escherichia coli* เป็น antigen ในการกระตุ้นให้เกิด chemotaxis และ phagocytosis ของ macrophage ที่แยกจากไตส่วนต้นของปลากะพงขาว โดยทำการ opsonize ด้วย serum ที่แยกจากเลือดปลากะพงขาวที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 250 กรัม แต่ในกรณีที่ไม่สามารถเตรียม serum จากสัตว์ชนิดเดียวกันได้ สามารถใช้ serum ที่แยกจากสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นๆได้ เช่น serum จากไก่ หรือ กระต่าย เป็นต้น

สัตว์ทดลอง

ใช้ปลากะพงขาวขนาดที่กล่าวแล้วในการทดลองครั้งแรก แยกปลากะพงขาวที่ผ่านการปรับสภาพในห้องทดลองแล้วเป็นเวลา 3 วัน เลี้ยงในตู้กระจกขนาด 60x35x30 เซนติเมตร ปริมาตรน้ำ 50 ลิตร ความเค็ม 5 ส่วนในพัน(ppt) ความหนาแน่นตู้ละ 20 ตัว

วิธีการทดลอง

การทดลองส่วนนี้ใช้เมทิลพาราไธออนชนิด 92.4 % เพียงชนิดเดียว เติมลงในตู้ปลาที่จัดไว้ตามความเข้มข้นที่ทดลอง คือ 0, 0.6, 1.2, 1.8 และ 2.4 mg/l ความเข้มข้นละ 2 ตู้ ทำการทดลองแบบ complete block design จำนวน 2 ชุด โดยทำการทดลองชุดละ 2 ซ้ำ ระยะเวลาทดลองแต่ละชุดห่างกัน 1 สัปดาห์ ปลากะพงขาวที่ใช้เป็นปลาจากฟาร์มเดียวกันแต่มีพ่อแม่พันธุ์ต่างกัน ระหว่างการศึกษาจะทำการตรวจวัดอุณหภูมิ pH และ dissolved oxygen (DO) สังเกตอาการปลา และนับจำนวนปลาตายทุกวันนาน 4 วัน โดยไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำตลอดการทดลอง เมื่อครบ 4 วัน นำปลาที่มีชีวิตมาทำการศึกษาภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ โดยแยก phagocyte จากไตส่วนต้นมาทดสอบ phagocytic activity chemotactic activity และศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับและเหงือก

การเตรียมสารเคมีสำหรับแยก phagocyte

การทดลองนี้ ใช้ Percoll (Pharmacia Chemical Co., Ltd.) เป็นสารเคมีสำหรับแยก phagocyte ของปลากะพงขาว Percoll เป็น colloidal polyvinyl pyrolidone coated silica ที่สามารถใช้ในการแยกเซลล์ชนิดต่างๆ ที่มีความหนาแน่นไม่เท่ากันได้ โดยใช้ Hank's Balance Salt Solution (HBSS)(ภาคผนวกที่1) Percoll และน้ำกลั่นตามอัตราส่วน (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 อัตราส่วน Percoll , HBSS และน้ำกลั่นที่ความถ่วงจำเพาะต่าง ๆ (Mathews et al., 1990)

ความถ่วงจำเพาะ	Percoll (ml)	HBSS (ml)	น้ำกลั่น (ml)
1.040	13.9	5	31.1
1.050	17.8	5	27.2
1.060	21.6	5	23.4
1.070	25.4	5	19.6

นำสารที่เตรียมได้มาทำการปรับ pH ให้เป็น 7.4 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริค (1N HCl) จากนั้นเติมลงในหลอดทดลองทีละชั้นเรียงตามลำดับความถ่วงจำเพาะจากมากไปน้อยตั้งแต่ 1.070-1.040 ชั้นละ 1 ml โดยชั้นล่างสุดมีความถ่วงจำเพาะมากที่สุด และชั้นบนสุดมีความถ่วงจำเพาะน้อยที่สุด

การแยกและศึกษา phagocyte

เมื่อปลาได้รับเมทิลพาราไธออนครบ 96 ชั่วโมง นำปลามาตัดแยกไตส่วนต้นซึ่งอยู่บริเวณด้านล่างของกระดูกสันหลังค่อนไปทางส่วนหัวด้วยวิธีปลอดเชื้อ โดยแต่ละความเข้มข้นใช้ปลาจำนวน 8 ตัว แยกไตส่วนต้นรวมกัน 2 ตัว เป็น 1 ตัวอย่าง (ได้ความเข้มข้นละ 4 ตัวอย่าง) เมื่อแยกได้แล้ว นำเนื้อเยื่อไตมาล้างด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS)(ภาคผนวกที่ 1) โดยล้างเบาๆ 3 ครั้ง จากนั้นนำมาเกลี่ยด้วยใบมีดผ่าตัดบนตะแกรงลวดแสตนเลสที่วางอยู่บนจานแก้ว จนเนื้อเยื่อไตผ่านรูตะแกรงหมด เติม PBS 2 ml ทิ้งให้ตกตะกอนนาน 2 นาที จากนั้นนำส่วนใสเติมลงใน Percoll ที่เตรียมไว้ ปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์ม นำไปปั่นแยกเซลล์ด้วย high speed refrigerated centrifuge (Kubota 7820 ; Kubota Corporation) ความเร็ว 3,000 g นาน 20 นาที อุณหภูมิ 4 °C

จากนั้นใช้ปิเปตดูดแยก band ที่ได้ระหว่างชั้น 1.050-1.060 ใส่ในหลอดทดลอง เติม PBS 2 ml แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 1,300 g นาน 10 นาที ทำการปั่นล้าง 2 ครั้ง ปรับความเข้มข้นของเซลล์เป็น 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำเซลล์ที่แยกได้ไปทำการทดสอบ phagocytic activity และ chemotaxis assay ทันที

การทดสอบ viability ของเซลล์

การทดลองนี้วัด viability ของเซลล์ ด้วยวิธี dye exclution test โดยใช้สี trypan blue หลักการ คือ เยื่อหุ้มเซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ยอมให้สารที่ไม่ใช่อิเล็กโตรไลท์แพร่ผ่านเข้าในเซลล์ ดังนั้นเซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสีน้ำเงินของ trypan blue ส่วนเซลล์ตายจะติดสีน้ำเงิน (Hudson and Hay, 1989) ทดสอบโดยหยดเซลล์ 200 ไมโครลิตร และ trypan blue 200 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

การเตรียมแอนติเจนและ opsonization

opsonization คือ การที่เชื้อแบคทีเรีย หรือ antigen ถูกจับด้วยสาร opsonin เพื่อให้เซลล์ phagocyte สามารถเก็บกินแอนติเจนนั้นๆได้ง่ายขึ้น สารที่มีคุณสมบัติเป็น opsonin ได้ มี 2 ชนิด คือ complement และ antibody ที่พบใน serum

เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวชนิด Tryptic Soy Broth (Diffco) ปริมาตร 100 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ที่อุณหภูมิ 30°C เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ทำให้เชื้อตายด้วยฟอร์มาลิน 2% ปริมาตร 50 ml ปิดปากขวดแล้วตั้งเขย่าด้วยความเร็วต่ำ บนเครื่อง shaker (Yamato shaker model SA 31) อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งเชื้อแบคทีเรียออกเป็น 10 หลอดทดลอง หลอดละ 10 ml นำมาปั่นที่ความเร็ว 1,300 g เป็นเวลา 10 นาที แยกน้ำใสส่วนบนออก ล้างเซลล์ที่ตกตะกอน

ด้วยสารละลาย PBS 2 ครั้ง เติมซีรั่มปลากะพงขาว 1 ml ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วเติมสารละลาย PBS ในอัตราส่วนปริมาณเซลล์ต่อสารละลาย 1 : 5 เก็บไว้ที่ 4°C ตลอดการทดลอง

การศึกษา phagocytic activity

นำ phagocyte ที่แยกได้จากไตส่วนต้นของปลากะพงขาว ปริมาตร 200 ไมโครลิตร หยดลงบนกระจกสไลด์ ทิ้งไว้ในกล่องเก็บความชื้น 10 นาที เพื่อให้เซลล์ยึดติดสไลด์ จากนั้น หยดแอนติเจน 200 ไมโครลิตร ผสมเบา ๆ ทิ้งไว้ 20 นาที กำจัดเซลล์ส่วนเกินที่ไม่เกาะติดสไลด์ออกโดยการล้างเบาๆ ด้วย PBS 2 ครั้ง จากนั้นหยดฟอร์มาลิน 10% ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อ fixed cell นาน 10 นาที แล้วจึงเทฟอร์มาลินออก นำสไลด์มาย้อมสี Eosin-Methylene blue (quick stain for malaria in blood smear; Arnaparn Co.,Ltd.) นำมาอ่านผลใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยนับจำนวนเซลล์ที่กินและไม่กินแบคทีเรียใน 1 หน่วยพื้นที่ และคำนวณ%phagocytosis ในแต่ละความเข้มข้น โดยนับ 4 สไลด์ สไลด์ละ 3 field รวมจำนวน n ในแต่ละความเข้มข้นเท่ากับ 24 คำนวณโดยใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{ phagocytosis} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่กินแบคทีเรียใน 1 field}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดใน 1 field}} * 100$$

การศึกษา chemotactic activity

เตรียม Boyden' double chamber ในกล่องเก็บความชื้น หยดแอนติเจนที่เตรียมไว้ลงใน chamber ล่าง 200 ไมโครลิตร ปิดด้วย polycarbonated membrane filter (Nucleopore) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร ขนาดรู 0.5 ไมโครเมตร จากนั้นปิดด้วย chamber ส่วนบน เติม phagocyte ที่เตรียมไว้ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็น

เวลา 20 นาที เมื่อครบเวลาใช้ปากคีบจับส่วน membrane ออก ปล่อยให้แห้ง fixed ด้วยเมทานอล แล้วย้อมสี Eosin - Methylene blue เสร็จแล้ววาง membrane filter บนกระจกสไลด์ นำมาอ่านผลใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยนับจำนวนเซลล์ที่อยู่ด้านบนและด้านล่างของ membrane ใน 1 หน่วยพื้นที่ และคำนวณ %chemotaxis ในแต่ละความเข้มข้น โดยนับ 4 สไลด์ สไลด์ละ 3 field (แต่ละความเข้มข้นมีจำนวนหน่วยทดลองเท่ากับ 24 n=24) คำนวณโดยใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{ chemotaxis} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่อยู่ด้านล่างของ membrane 1 field}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดใน 1 field}} * 100$$

การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำผลของ % chemotaxis และ % phagocytosis ที่ได้ในปลาทดลองแต่ละความเข้มข้นมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง dose, field, block และวัดระดับความเชื่อมั่นทางสถิติโดยใช้ Analysis of variance และ Duncan's new multiple range test

<u>การศึกษาจุลพยาธิสภาพของตับและเหงือก</u>

แยกเนื้อเยื่อตับ และเหงือกออกจากตัวปลาทดลอง ตัดเป็นชิ้นเล็กขนาดประมาณ 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร แช่ลงในฟอร์มาลินเข้มข้น 10 % นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยาโดยมีลำดับขั้นดังนี้

1. การเตรียมชิ้นเนื้อ ตัดเหงือกและตับปลาให้มีชิ้นเล็กลงโดยตัดเล็มด้วยใบมีดผ่าตัดให้ได้ขนาดความหนาไม่เกิน 4 มิลลิเมตร

2. นำชิ้นเนื้อมาบรรจุใน embedding cassette แล้วผ่านขั้นตอนดึงน้ำออก clearing และ infiltration ด้วยเครื่อง automatic tissue processor จากนั้นนำชิ้นเนื้อมาฝังลงในพาราฟิน

3. นำแท่งตัวอย่าง มาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ ให้มีความหนา 5-6 ไมโครเมตร แล้วนำไปลอยบนน้ำอุ่นอุณหภูมิ 40-45°C เลือกตัวอย่างที่สมบูรณ์ ช้อนขึ้นจากน้ำด้วยสไลด์ นำไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 40-45 °C ทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมง

4. เนื้อเยื่อที่ติดสไลด์ดีแล้วนำไปผ่านขั้นตอนการละลายพาราฟินด้วยไซลีน จากนั้นผ่านขบวนการดูดน้ำเข้า (hydration) ด้วยแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นสูงไปต่ำ แล้วย้อมสี Hematoxylin-Eosin (H & E) หลังจากนั้นนำมาผ่านขบวนการดึงน้ำออกอีกครั้ง (dehydration) ด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่ำไปสูง แช่ในไซลีน แล้วทำการ mount สไลด์ด้วย permount

5. การอ่านผล นำสไลด์ที่ได้มาศึกษาลักษณะต่างๆ ที่เปลี่ยนแปลงไปด้วยกล้องจุลทรรศน์ลำแสงธรรมดากำลังขยาย 40-400 เท่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย