หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

ใช้ Syrian golden hamsters (Mesocricetus suratus) อายุ 2 เดือน จำนวน 34 ตัว โดยใช้เป็นกลุ่มควบคุม 6 ตัว กลุ่มทดลอง 28 ตัว ซึ่งได้รับมาจากหน่วยสัตว์ทดลองภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ภาพที่ 2)

2. metacercaria ของ O.viverrini

metacercaria ได้มาจากปลาในตระกูล Cyprinoid ซึ่งได้รับมาจากภาควิชาอายุรศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล นำปลามาแยกหา metacercaria โดยวิธีกดทับด้วยแผ่นกระจกแล้วตรวจหาและเก็บเกี่ยว metacercaria โดยวิธีเขี่ยภายใต้กล้อง stereo-microscope

3. ยาพราซิควอนเทล (Praziquantel)

ยา praziquantel เป็นสารสังเคราะห์จำพวก Isochinolin-parazine derivative ยาชนิดนี้เป็นผงสีขาว ไม่มีกลิ่น มีรสขมเล็กน้อย ละลายได้ดีใน chloroform dimethyl-sulfoxide เม็ดยาจะละลายในน้ำย่อยของกระเพาะอาหาร ภายในระยะเวลา 5 นาที สูตรโมเลกุลคือ $C_{19}H_{24}N_2O_2$ 1 เม็ดประกอบด้วยตัวยา 600 มิลลิกรัม ซึ่งยาที่ใช้ในการศึกษานี้ได้รับความช่วยเหลือจากบริษัทไบเออร์ เยอรมนี hamsters ที่ใช้ทำการศึกษาจะได้รับยาขนาด 200 mg/kg body weight

4. วัสดุและอุปกรณ์

4.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยง hamsters ได้แก่ กรงขนาด 20 x 26 x 15 รวม 34 กรง อาหารสำเร็จรูป กระดาษตัดฝอย ขวดน้ำ

ภาพที่ 2 Syrian golden hamster

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2. วัสดุและอุปกรณ์ในการแยก metacercaria ออกจากเนื้อปลา ได้แก่

- กระจกกดทับ 2 บาน
- Syringe ขนาด 1ml.
- เข็มฉีดยาขนาด 21 G
- มีดผ่าตัด
- Block glass
- 0.85% NaCl (NSS)
- Stereo-microscope
- Counter

4.3 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการป้อน metacercaria และ ยา praziquantel ได้แก่

sterile syringe ขนาด 5 ml.
เข็มฉีดยาขนาด 21G ฝนปลายให้ทู่
polyethylene tube ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 mm.
ขวดโหลพร้อมฝาปิด และสำลี
ether

4.4 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้นับจำนวนไข่ของพยาธิใบไม้ตับด้วยวิธี Modified Stoll's dilution egg count technique ได้แก่

เครื่องชั่ง
ขวดแก้วพร้อมฝาปิด
sterile syringe ขนาด 10 ml.
Stoll's pipette
glass beads ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 mm.
slide และ coverslips ขนาด 22 x 40 mm.
0.85% NaCl (NSS)
กล้องจุลทรรศน์แสง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 วัสดุและอุปกรณ์ในการตรวจหาไข่พยาธิโดยวิธี Formalin-Ether Sedimentation Technique ได้แก่

centrifuge apparatus

test tube ขนาด 15 ml. พร้อมจุกยาง

0.85% NaCl (NSS)

10% formalin

ether

ผ้ากอซและไม้สำหรับเขี่ยอุจจาระ

4.6 วัสดุและอุปกรณ์ในการตรวจหาตัวพยาธิใบไม้ตับใน hamsters ได้แก่

กรรไกรผ่าตัด

forceps

เข็มเขี่ย, มีดผ่าตัด

กระจกกดทับ 2 บาน

พู่กัน

stereo-microscope

ether

ขวดโหลพร้อมฝาปิด และสำลี

NSS

4.7 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการย้อม Semichon's acetic Carmine stain ได้แก่

AFA (Acetic Formalin Alcohol)

Semichon's carmine stock solution

0.2% Malachite green

70, 80, 95 และ 100% ethyl alcohol

70% acidified alcohol

Xylene

permount

4.8 <u>วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนแบบสแกน</u> (scanning electron microscope : SEM)

2.5% Glutaraldehyde

Phosphate buffer pH 7.4

35, 50, 70, 80, 95 และ 100% ethyl alcohol

คาร์บอนไดออกไซด์เหลว

ทองคำ 99% ชนิดแผ่น

stub

กล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนแบบสแกน ของ JEOL รุ่น JSM-20

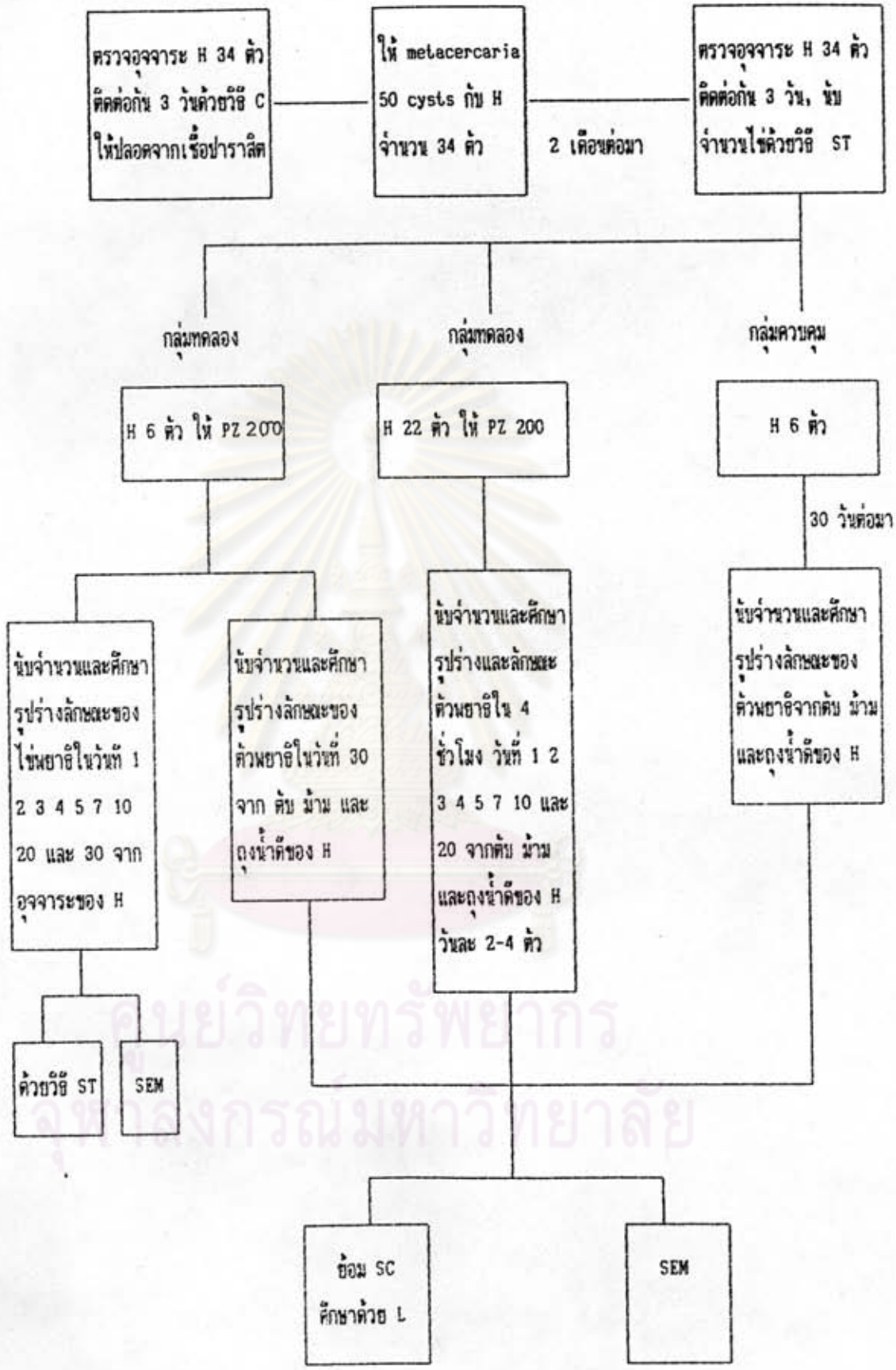
เครื่องทำให้ตัวอย่างแห้ง ณ จุดวิกฤต (critical point dryer) ของ Tousimis รุ่น Samdry-780

เครื่องฉาบโลหะ (ion sputter) ของ JEOL รุ่น JEC-1100

อุปกรณ์อื่น ๆ เข็มเขี่ย ปากคีบ Petri dish กระดาษกรอง เทปกาว 2 หน้า (double-sticky tape)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

017430



แผนภูมิที่ 1 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

H = Hamsters

C = Concentration Formalin Ether Technique

ST = Modified Stoll's dilution egg count technique

PZ_{200} = Praziquantel 200 mg/kg body weight

SC = Semichon's acetic Carmine Stain

L = Light microscope

SEM = Scanning Electron Microscope

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. วิธีการดำเนินการวิจัย

5.1. การแยก metacercaria ออกจากเนื้อปลา

5.1.1. นำปลามาแยกเนื้อ หัว ครีบ หาง ออกเป็นส่วน ๆ แล้วแล่เป็นชิ้นบาง ๆ

5.1.2. นำชิ้นเนื้อปลามาวางไว้บนกระจก และใช้กระจกอีกบานหนึ่งกดทับให้เนื้อปลานั้นบางลงอีก แล้วตรวจหา metacercaria

5.1.3. แยก metaceria ออกด้วยการเขี่ยด้วยปลายเข็มภายใต้ stereo-microscope

5.1.4. นำ metacercaria ที่แยกได้มาใส่ใน block glass ๆ ละ 50 cysts และเติม NSS ให้ท่วม metacercaria

5.1.5. โดยนับด้วย counter

5.2. การติดเชื้อพยาธิ O.viverrini ใน hamsters

5.2.1. ตรวจอุจจาระ hamsters ก่อนที่จะทำการทดลอง 3 วันติดต่อกัน เพื่อให้แน่ใจจริง ๆ ว่าเป็น hamsters ที่ปลอดจากเชื้อปาราสิต

5.2.2. นำ hamsters แต่ละตัวมาป้อน metacercaria 50 cysts ทำให้ hamsters สลบด้วย ether แล้วใช้ syringe สวมติดกับเข็มขนาด 21G ที่ต่อติดกับ polyethylene tube ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 mm. ดูด metacercaria เข้าไปอยู่ในท่อ สอดท่อนี้ผ่านเข้าทางปากจนถึงกระเพาะอาหาร ค่อย ๆ ดัน syringe ให้ metacercariaเข้าไปในกระเพาะอาหาร จากนั้นถอด syringe ออก ดูดน้ำเข้าไปประมาณ 0.5 ml ใส่ syringe ต่อกับท่อนี้อีกที แล้วดันน้ำจาก syringe เพื่อล้าง tube อีกทีเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มี metacercaria เหลืออยู่

5.2.3. เลี้ยง hamsters นี้ไว้ประมาณ 2 เดือน แล้วตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระของ hamsters Formalin Ether Concentration Technique ก่อนที่จะตรวจนับไข่โดยวิธี Modified Stoll's dilution egg count technique เพื่อนับจำนวนไข่พยาธิใน hamsters แต่ละตัวและบันทึกผล

5.2.4. แบ่ง hamsters ออกเป็น 2 กลุ่ม เป็นกลุ่มควบคุมจำนวน 6 ตัว และกลุ่มทดลองจำนวน 28 ตัว

5.3. การให้ praziquantel แก่ hamsters ที่ติดเชื้อพยาธิ O.viverrini

5.3.1. นำ hamsters กลุ่มทดลอง 28 ตัว แต่ละตัวมาชั่งน้ำหนัก แล้วคำนวณหาปริมาณยา praziquantel 200 mg/kg body weigh ที่จะใช้พอดีกับแต่ละตัว

5.3.2. นำยา praziquantel มาบดให้ละเอียดแล้วนำไปละลายในน้ำกลั่น

5.3.3. นำ hamsters แต่ละตัวมาป้อนยา praziquantel ตามขนาดน้ำหนักของ hamster แต่ละตัว โดยทำให้ hamster สลบด้วย ether แล้วป้อน praziquantel เช่นเดียวกับวิธีการป้อน matacercaria

5.4. การนับจำนวนและศึกษารูปร่างลักษณะตัวแก่และไข่พยาธิใบไม้ตับหลังให้ยา praziquantel

5.4.1. เก็บอุจจาระของ hamsters 6 ตัว หลังจากให้ยา praziquantel ในวันที่ 1,2,3,4,5,7,10,20,30 มาทำ Modified Stoll's egg count technique และ Concentration Formalin Ether Technique เพื่อนับจำนวนไข่ บันทึกผลและถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง และศึกษารูปร่างลักษณะของไข่โดยละเอียด

5.4.2. เก็บไข่พยาธิ O. viverrini จากอุจจาระของ hamsters หลังให้ยา praziquantel ในวันที่ 1,2,3,4,5 โดยใช้ pasteur pipette ดูดไข่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสง แล้วนำไป fixed 2.5% glutaraldehyde ศึกษารูปร่างลักษณะที่เปลี่ยนแปลงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนแบบสแกน บันทึกผลและถ่ายภาพ

5.4.3. นำ hamsters หลังจากให้ยา praziquantel 4 ชั่วโมงและในวันที่ 1,2,3,4,5,7,10,20,30 มาทำให้สลบจนกระทั่งตายด้วย ether แยกตับ ม้าม และถุงน้ำดีมาตรวจหาตัวพยาธิด้วยวิธีกดทับด้วยแผ่นกระจก และค่อย ๆ ตรวจหาตัวพยาธิภายใต้ Stereo-microscope นับจำนวนตัวพยาธิและดูรูปร่างลักษณะด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง บันทึกผลพร้อมถ่ายภาพ

5.4.4. นำตัวพยาธิที่ได้จาก hamsters แต่ละวันหลังให้ยา praziquantel มา fixed ใน AFA (Acetic-Formalin-Alcohol) แล้วนำไปย้อมใน Semichon's acetic Carmine stain เพื่อศึกษารายละเอียดของตัวพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงต่อไป บันทึกผลพร้อมถ่ายภาพ

5.4.5. นำตัวพยาธิที่ได้จาก hamsters แต่ละตัวหลังให้ยา praziquantel มา fixed ใน 2.5% Glutaraldehyde เพื่อศึกษารายละเอียดของตัวพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนแบบสแกน บันทึกผลพร้อมถ่ายภาพ

5.5. Modified Stoll's dilution egg count technique

5.5.1. ชั่งอุจจาระของ hamsters 0.5 กรัม ใส่ในขวด

5.5.2. ใส่ 0.85% NaCl (NSS) 7 ml ลงในขวด 5.5.1

5.5.3. ใส่ลูกแก้ว 4-5 ลูกปิดจุกขวด เขย่าขวดอย่างแรงเพื่อให้อุจจาระแตกตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2-3 ชั่วโมง ในระหว่างที่ตั้งทิ้งไว้ก็เขย่าขวดเป็นระยะ ๆ

5.5.4. ใช้ Stoll's pipette ดูดส่วนผสมนี้ 0.15 ml ใส่ในสไลด์ (Glass beads slide) และปิดด้วย Coverslip ขนาด 22 x 40 mm

5.5.5. นับจำนวนไข่ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง

5.5.6. คำนวณหาจำนวนไข่/กรัม ของพยาธิแต่ละตัว

5.6. Formalin-Ether Sedimentation Technique

5.6.1. นำอุจจาระของ hamster ประมาณ 0.5 กรัม ละลายใน NSS 10 ml แล้วกรองผ่านผ้ากอซสองชั้นใส่ใน tube ขนาด 15 ml

5.6.2. นำ tube ใส่ในเครื่องปั่น โดยใช้ความเร็ว 1500-2000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที รินสารละลายใสข้างบนทิ้ง แล้วเติม NSS ลงไปในหลอดแก้วอีกคนให้ทั่วและนำไปปั่นด้วยความเร็วและเวลาเท่าเดิม

5.6.3. เติม 10% formalin ลงในหลอด 10 ml คนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที

5.6.4. เติม ether 3 ml ใช้จุกปิดปาก tube แล้วเขย่าอย่างแรงจนทั่วทั้งหลอดประมาณ 20-30 วินาที ค่อยเปิดจุกออก

5.6.5. นำหลอดแก้วไปปั่นด้วยความเร็วและเวลาเดียวกับข้อ 2

5.6.6. ใช้ไม้เขี่ยกากอุจจาระโดยแซะไปรอบ ๆ แล้วรินส่วน ether กาก และ formalin ทิ้ง

5.6.7. นำส่วนตะกอนที่เหลือไปตรวจหาไข่พยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง

5.7. การย้อม Semichon's acetic Carmine stain

5.7.1. Fixation

นำตัวพยาธิที่ fixed ใน AFA ออก แล้วนำมาใส่ 70% ethylalcohol ประมาณ 3-4 ชั่วโมง

5.7.2. Staining

ผสม Semichon's Carmine stock solution กับ 70% ethyl alcoholในอัตราส่วนเท่ากัน แล้วนำตัวพยาธิแช่ในสีที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ประมาณ 3-4 ชั่วโมง (ตัวพยาธิติดสีเข้มพอ)

5.7.3. Destaining

- นำตัวพยาธิที่ติดสีมาล้างด้วย 70% ethyl alcohol หลาย ๆ ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

- ล้างสีส่วนเกินออกด้วย 70% acidefied alcohol จนกระทั่งตัวพยาธิติดสีชมพู

- ล้างด้วย 70% ethyl alcohol ครั้งละ 30 นาที หลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งสีชมพูไม่เปลี่ยนแปลง

5.7.4. Dehydration

ดึงน้ำออกจากตัวพยาธิด้วย 80% 90% และ 100% ethyl alcohol ขั้นตอนละ 30 นาทีตามลำดับ

5.7.5. Counter stain

0.2% Malachite green ผสมกับ 100% ethyl alcohol(ให้เป็นสีเขียวอ่อน ๆ) แล้วนำตัวพยาธิแช่สีนี้เป็นเวลาประมาณ 1 นาที

5.7.6. Clearing

ทำให้ใสโดยแช่ใน 100% ethyl alcohol ผสมกับ Xylene ในอัตราส่วนเท่ากัน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วแช่ใน Xylene อีกครั้ง

5.7.7. Mounting

ด้วย permount บน slide ปิด coverslip แล้วตั้งทิ้งไว้ในแนวนอนจนกระทั่ง permount แห้ง

5.8. การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนแบบสแกน

5.8.1. Specimen

การเตรียมไข่พยาธิใบไม้ตับ

นำไข่พยาธิใบไม้ตับที่ได้จากข้อ 5.3.2 มาล้างด้วย NSS 3 ครั้ง โดยใช้เครื่องปั่นขนาดความเร็ว 1500-2000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที (Sedimentation method) เพื่อทำความสะอาดสิ่งปลอมปนจากอุจจาระ hamster

การเตรียมตัวพยาธิใบไม้ตับ

นำตัวพยาธิที่ได้จากข้อ 5.3.3. มาล้างด้วย phosphate buffer pH 7.4 3 ครั้ง เพื่อทำความสะอาดตัวพยาธิก่อนที่จะทำการศึกษาในขั้นต่อไป

5.8.2. Fixation

- นำไข่และตัวพยาธิมา Fixed ในสารละลาย 2.5% glutaraldehyde ใน phosphate buffer pH 7.4 นานอย่างน้อย 3 ชั่วโมง

- ล้าง Fixative ออกด้วย phosphate buffer pH 7.4 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที

5.8.3. Dehydration

Dehydration ด้วย ethyl alcohol จากความเข้มข้นต่าง ๆ กันโดยนำไข่และตัวพยาธิแช่ลงใน 35%, 50%, 70%, 95% ขั้นตอนละ 15 นาที ตามลำดับแล้วจึงเปลี่ยนเป็น Absolute ethyl alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที (ถ้ายังไม่สามารถนำตัวอย่างมาดำเนินในขั้นต่อไปได้จะดำเนินถึงขั้น 70% ethyl alcohol แล้วเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่ 4°C)

นำไข่และตัวพยาธิมาห่อด้วยกระดาษกรอง ระหว่างนี้ตัวอย่าง

แผนภูมิที่ 2 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาด้วย SEM

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จะต้องแช่อยู่ใน Absolute ethyl alcohol ตลอด

5.8.4. Drying

การทำตัวอย่างให้แห้งด้วยวิธี critical point drying (CPD) โดยนำตัวอย่างมาใส่เครื่อง CP Drier เติม Absolute ethyl alcohol ให้ท่วม แล้วค่อย ๆ ให้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเข้าไปแทนที่ ปรับความดันและอุณหภูมิให้ถึงจุดวิกฤติ(อุณหภูมิ 37°C และความดัน 73.8 bar.) ตัวอย่างจะแห้งและยังคงโครงสร้างที่เหมือนเดิม

5.8.5. Mounting

นำ Stub มาติดด้วยเทปกาว 2 หน้า แล้วนำไปติดกับไข่และตัวพยาธิ ภายใต้ stereo-microscope โดยให้ด้านที่ไม่ต้องการศึกษาเป็นส่วนที่ถูกยึดติดกับ stub

5.8.6. Coating

นำตัวอย่างมาฉาบด้วยทองคำ 99% ให้มีความหนาประมาณ 10-20 นาโนเมตร ด้วย ion sputtering device.

5.8.7. Observation

ศึกษาตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน บันทึกผลพร้อมถ่ายภาพ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย