บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง เครื่องมือ และสารเคมี

1. สัตว์ทดลอง และอุปกรณ์สำหรับการเตรียมสัตว์ทดลอง
   - 1.1 ปลากะพงขาว ขนาด 8.0-10.0 เซนติเมตร จากฟาร์มในจังหวัดสมุทรปราการ
   - 1.2 อ่างไฟเบอร์กลาสขนาด 59x58x59 ลูกบาศก์เซนติเมตร
   - 1.3 น้ำจืดกรองสะอาด pH 6.0-7.0
   - 1.4 อาหารปลา (artemia ตัวเต็มวัย)
   - 1.5 air pump และหัวทราย

2. เครื่องมือ
   - 2.1 UV visible recording spectrophotometer (UV-160 A, Shimadsu)
   - 2.2 Standard pH meter (EA 920, Orion research)
   - 2.3 เครื่องชั่งละเอียด (A 200S, Sartorious)
   - 2.4 กล้องจุลทรรศน์ลำแสงธรรมดา (model CH2, Olympus Optical Co., Ltd.)
   - 2.5 Magnetic stirrer (RC-2, Tokyo rikakikai Co., Ltd.)
   - 2.6 Tissue grinder (Wheaton Co.)
   - 2.7 Syringe with needle เบอร์ 18
   - 2.8 เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Arthur H. Thomas Co.)
   - 2.9 เครื่องอุ่นสไลด์ (Chicago Surgical & Electrical Co.)
   - 2.10 Automatic tissue processor (Lipshaw manufacturing Co.)

I17192481

2.11 Paraffin dispenser (Lipshaw manufacturing Co.)

2.12 Automatic pipettes (adjustable volume) 1-100 µl (Gilson) พร้อม tips

2.13 Automatic pipettes (adjustable volume) 5-20 µl (Eppendorf) พร้อม tips

3. สารเคมี

3.1 Acetylthiocholine iodide (Sigma Chemical Co.)

3.2 Bovine cholinesterase enzyme (Sigma Chemical Co.)

3.3 5:5 dithiobis - (2-nitrobenzoic) acid (DTNB) (Sigma Chemical Co.)

3.4 Sodium bicarbonate (E. Merck)

3.5 Disodium hydrogen phosphate (May & Baker)

3.6 Monopotassium hydrogen phosphate (May & Baker)

3.7 100% formalin (E. Merck)

3.8 Monosodium glutamate (Sigma Chemical Co.)

3.9 Carbaryl (Sevin®) Commercial grade

4. เครื่องแก้ว

4.1 ขวดชมพู่ขนาด 10, 50, 500, 1,000 มล. (Pyrex)

4.2 กระบอกตวงขนาด 100 มล. (Pyrex)

4.3 หลอดทดลองขนาด 13x100 มม. (Elkay Products, Inc.)

4.4 Silica Cuvettes (path length 1 cm., Shimadsu)

4.5 Microscope slide ขนาด 1x3 นิ้ว (Snoail Brand)

4.6 Cover glass ขนาด 22x30 นิ้ว (Menzel glaser)

การเตรียม Reagent

1. สารละลาย phosphate buffer 0.1 M., pH 8.0

เตรียมโดยการผสมสารละลาย Na_2HPO_4 0.1 M. (14.2 g/litre) จำนวน 475 มล. กับสารละลาย KH_2PO_4 0.1 M. (13.6 g/litre) 25 มล. ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 โดยใช้สารละลาย KH_2PO_4 0.1 M. สารละลายบัฟเฟอร์นี้เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นาน 2 สัปดาห์

2. สารละลาย phosphate buffer 0.1 M., pH 7.0

เตรียมโดยใส่สารละลาย Na_2HPO_4 0.1 M. (14.2 g/litre) จำนวน 5 มล. ลงไปในสารละลาย KH_2PO_4 0.1 M. (13.6 g/litre) 4 มล. ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 โดยใช้สารละลาย Na_2HPO_4 0.1 M. สารละลายบัฟเฟอร์นี้เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นาน 2 สัปดาห์

3. Substrate Acetylthiocholine iodide

ละลาย Acetylthiocholine iodide 21.67 มก. ในน้ำกลั่น 1 มล. สารละลายนี้สามารถคงตัวอยู่ได้นาน 2 สัปดาห์ เมื่อเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C

4. Dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB) 0.01 M.

ละลาย DTNB 39.6 มก. และ sodium bicarbonate 15 มก. ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M., pH 7.0 จำนวน 10 มล. เก็บสารละลายนี้ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C ได้นาน 2 สัปดาห์

5. การเตรียม 10% formalin

เตรียมโดยนำ 100% formalin มา 100 มล. ใส่ในน้ำกลั่น 900 มล.

6. Enzyme Bovine Cholinesterase (0.44 Unit/mg)

ชั่งเอนไซม์ Bovine Cholinesterase 10 มก. มาละลายด้วยน้ำกลั่น 2 มล. จะได้ปริมาณเอนไซม์ต่อ 1 มล. เท่ากับ 2.2 IU นำไปเจือจางต่อด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 1.1, 0.55, 0.275 และ 0.1375 IU

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาหาค่า Median Lethal Concentration ในเวลา 96 ชั่วโมง (LC_{50}, 96 ชั่วโมง) โดยการนำปลากะพงขาวที่มีสุขภาพแข็งแรงขนาด 8.0-10.0 เซนติเมตร นำมาเลี้ยงในน้ำกรองสะอาดเป็นเวลา 5 วัน เพื่อปรับสภาพของปลา จากนั้นแบ่งปลากะพงขาวออกเป็น 8 กลุ่ม ๆละ 50 ตัว แยกเลี้ยงในอ่างไฟเบอร์กลาสขนาด 59x58x59 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่มีน้ำกรองสะอาดจำนวน 100 ลิตร, pH 6.0-7.0 ใส่หัวทรายเพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนในน้ำให้เพียงพอกับความต้องการของปลา โดยปลากะพงขาวทั้ง 8 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับคาร์บาริล และได้รับคาร์บาริลที่ขนาดความเข้มข้น 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 ppm

สังเกตอาการของปลากะพงขาวในกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับคาร์บาริลในความเข้มข้นต่าง ๆกัน บันทึกจำนวนปลาที่ตายในแต่ละกลุ่มจนครบ 96 ชั่วโมง เพื่อนำมาหาค่า Median Lethal Concentration เก็บปลาที่ตายโดยทันทีและปลาที่เสร็จจากการทดลองแล้วมาแยกสมองและกล้ามเนื้อเก็บไว้ใน phosphate buffer pH 8 และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0°C เพื่อศึกษาหาค่าเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสและปลาบางตัวในแต่ละกลุ่มมาดองใน 10%formalin เพื่อศึกษาพยาธิสภาพของตับ เหงือก และกล้ามเนื้อ

2. ศึกษาความเป็นพิษของคาร์บาริลในความเข้มข้นที่ไม่ทำให้ปลาตายในเวลา 15 วัน โดยใช้ปลาขนาด 8.0-10.0 เซนติเมตร นำมาเลี้ยงในน้ำสะอาดก่อนการทดลองเป็นเวลา 5 วัน เพื่อปรับสภาพปลา จากนั้นแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ๆละ 60 ตัว ในอ่างไฟเบอร์กลาสขนาด 59x58x59 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่น้ำกรอง 120 ลิตร pH 6.0-7.0 ใส่หัวทรายเพื่อเพิ่มออกซิเจน ปลากะพงขาว 4 กลุ่ม จะได้รับคาร์บาริลในขนาดความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ppm. และอีกกลุ่มกำหนดให้เป็นกลุ่มควบคุม สังเกตอาการของปลาภายใน 15 วัน โดยเก็บปลาขึ้นมาครั้งละ 10 ตัว ที่เวลา 15 นาที และในวันที่ 1, 2, 4, 8 และ 15 ของการทดลอง สังเกตอาการของปลากะพงขาวในกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับคาร์บาริลในความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลาต่างกัน นำปลาที่เก็บขึ้นมาแยกส่วนสมองและกล้ามเนื้อเพื่อศึกษาหาสมรรถนะของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสและปลาบางตัวในแต่ละกลุ่มมาดองใน 10% formalin เพื่อศึกษาพยาธิสภาพของตับ เหงือก และกล้ามเนื้อ

3. การศึกษาการแก้ไขความเป็นพิษของคาร์บาริล โดยเลือกใช้ความเข้มข้นที่ทำให้ปลาตาย 50% ภายใน 96 ชั่วโมง (Median Lethal Concentration)จากการทดลองที่ 1 เท่ากับ 2.95 ppm. โดยก่อนการทดลองนำปลากะพงขาวที่มีสุขภาพแข็งแรงขนาด 8.0-10.0 เซนติเมตร มาเลี้ยงในน้ำกรองสะอาด pH 6.0-7.0 ใส่หัวทรายเพื่อเพิ่มออกซิเจนให้แก่ปลาเป็นเวลา 5 วัน เพื่อปรับสภาพของปลา หลังจากนั้นนำมาแยกเลี้ยงในอ่างไฟเบอร์กลาสขนาด 59x58x59 ลูกบาศก์เซนติเมตร แบ่งปลาออกเป็น 6 กลุ่ม ๆละ 100 ตัว แล้วให้คาร์บาริลในความเข้มข้น LC_{50}, 96 ชั่วโมง(2.95 ppm) ลงไป หลังจากนั้น 30 นาที ทำการแก้ไขความเป็นพิษโดย

กลุ่มที่ 1 ไม่มีการเปลี่ยนน้ำ

กลุ่มที่ 2 เปลี่ยนน้ำ 1/4 ของปริมาณน้ำทั้งหมด

กลุ่มที่ 3 เปลี่ยนน้ำ 1/2 ของปริมาณน้ำทั้งหมด

กลุ่มที่ 4 เปลี่ยนน้ำทั้งหมด

กลุ่มที่ 5 ให้สารแก้ไขความเป็นพิษ 0.01% Monosodium glutamate โดยไม่เปลี่ยนน้ำ

กลุ่มที่ 6 ให้สารแก้ไขความเป็นพิษ 0.001% Monosodium glutamate โดยไม่เปลี่ยนน้ำ

เก็บปลาขึ้นมากลุ่มละ 10 ตัว ตามช่วงเวลาที่กำหนดดังนี้ คือที่ 15 นาที 1, 2, 4, 10, 24, 36, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

สังเกตอาการของปลากะพงขาวทั้ง 6 กลุ่ม บันทึกจำนวนปลาตายและไม่ตายตามช่วงเวลาต่าง ๆ ปลาที่เก็บขึ้นมานำมาแยกส่วนของสมองและกล้ามเนื้อ ศึกษาหาค่าเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรส และนำมาดองใน 10% formalin เพื่อศึกษาพยาธิสภาพของตับ เหงือก และกล้ามเนื้อ

4. วิธีการวัดสมรรถนะของเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรสในสมอง และกล้ามเนื้อของปลากะพงขาว ประยุกต์ใช้วิธีของ Ellman และคณะ (1961)

4.1 การเตรียมสมองและกล้ามเนื้อ ผ่าเปิดหัวปลา โดยใช้เข็มเบอร์ 18 เจาะเอาสมองมา 10 มก.เก็บใน phosphate buffer pH 8 จำนวน 2 มล. สำหรับกล้ามเนื้อตัดจากกล้ามเนื้อท้องบริเวณครีบหลัง มาจำนวน 20 มก. เก็บใน phosphate buffer pH 8 จำนวน 1 มล. แยกบดสมองและกล้ามเนื้อจนละเอียดด้วย tissue grinder นำส่วนของสมองและกล้ามเนื้อมาอย่างละ 1 มล.ทำให้เจือจาง โดยเติม phosphate buffer pH8 ในสมองและกล้ามเนื้อจำนวน 3 และ 1 มล. ตามลำดับ นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 0°C เพื่อรอวัดสมรรถนะของเอนไซม์ต่อไป

4.2 วัดสมรรถนะเอนไซม์โพลีนเอสเทอเรสในสมองและกล้ามเนื้อ

- นำสารละลาย phosphate buffer 0.1 M.pH 8 ใส่ลงใน cuvettes 2 อัน ๆละ 2.5 มล. กำหนดให้หลอดหนึ่งเป็น sample และอีกหลอดเป็น blank

- เติมสมองหรือกล้ามเนื้อที่ผ่านการบดจนละเอียดแล้ว จำนวน 0.5 มล.และ DTNB 100 µl ลงในแต่ละ cuvettes

- นำ cuvettes ทั้งสองไปวางในเครื่อง spectrophotometer ปรับความยาวคลื่นแสงไว้ที่ 412 nm.

- เติม substrate acetylthiocholine iodide 20 µl ลงใน sample คนให้เข้ากัน

- เริ่มบันทึกการเปลี่ยนแปลงค่า optical density (ΔA) ภายในเวลา 6 นาที

หมายเหตุ ทำการวัดแต่ละตัวอย่างอย่างน้อย 2 ครั้ง เพื่อผลการทดลองที่แน่นอน แล้วหาค่าเฉลี่ยของ ΔA

4.3 วิธีการทำ standard curve

4.3.1 นำสารละลาย phosphate buffer pH 8 ใส่ใน cuvettes ทั้ง 2 อัน ๆละ 3 มล.

4.3.2 เติม DTNB 100 µl และ substrate acetylthiocholine iodide 20 µl ใน cuvettes ทั้ง 2 อัน นำไปวางใน spectrophotometer ปรับความยาวคลื่นแสงที่ 412 nm.

4.3.3 นำสารละลายมาตรฐานของ Bovine erythrocyte cholinesterase จำนวน 50 µl ใส่ในหลอดของ sample คนให้เข้ากัน

4.3.4 เริ่มบันทึกการเปลี่ยนแปลงค่า optical density ในเวลา 6 นาที

4.3.5 เขียนกราฟระหว่างค่า optical density ที่เปลี่ยนแปลงต่อ 1 นาที (แกน Y) กับจำนวนยูนิตของเอนไซม์ (แกน X)

4.3.6 คำนวณหาค่าคงที่ ($K = \frac{1}{\text{slope}}$)

5. ศึกษาจุลพยาธิสภาพของเหงือก ตับ และกล้ามเนื้อที่เปลี่ยนแปลงไป

5.1 การดองตัวอย่าง (Fixation)

ตัวอย่างทั้งหมดจะดองในน้ำยา 10% formalin โดยให้น้ำยามีปริมาณ 10-20 เท่าของปริมาตรเนื้อเยื่อ

วิธีดอง

แยกตัดตับ เหงือก และกล้ามเนื้อออก แช่ลงในน้ำยาดอง หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำยาดองประมาณ 24-72 ชั่วโมง เก็บไว้ได้นานในอุณหภูมิห้อง

5.2 วิธีการทางเนื้อเยื่อวิทยา

5.2.1 การเตรียมชิ้นเนื้อ ในปลาที่มีขนาดใหญ่ตัดเฉพาะส่วนที่ต้องการศึกษาคือ เหงือก ตับ และกล้ามเนื้อ โดยตัดให้มีความหนาของชิ้นเนื้อไม่เกิน 4 มม.

5.2.2 นำชิ้นเนื้อมาบรรจุใน embedding cassette แล้วผ่านขั้นตอนดึงน้ำออก clearing และ infiltration ด้วยเครื่อง automatic tissue processor ตามวิธีมาตรฐานของ Humason (1979) จากนั้นนำชิ้นเนื้อมาทำให้เป็นแท่งด้วยพาราฟิน

5.2.3 นำแท่งตัวอย่างมาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนาประมาณ 5-6 ไมครอน แล้วนำไปลอยบนน้ำอุ่นอุณหภูมิ 40-45°C เลือกตัวอย่างที่สมบูรณ์โดยการช้อนขึ้นจากน้ำด้วยสไลด์ นำไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 40-45°C ทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมง ถึงตลอดคืน

5.2.4 เนื้อเยื่อที่ติดสไลด์ดีแล้วนำไปย้อมสีตามขั้นตอนดังนี้ คือ ละลายพาราฟินด้วยไซลีน จากนั้นผ่านขบวนการดูดน้ำเข้า (hydration) ด้วยแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นสูงไปต่ำ แล้วย้อมสี หลังจากนั้นนำมาผ่านขบวนการดึงน้ำออกอีกครั้ง (dehydration) ด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่ำไปสูง แช่ในไซลีน แล้วทำการ mount สไลด์ด้วย permount

5.2.5 นำมาย้อมสี Hematoxylin และ Eosin (H & E) ตามวิธี Humason (1979)

5.2.6 การอ่านผล

นำสไลด์ถาวรที่ได้ศึกษาดูลักษณะต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ลำแสงธรรมดา บันทึกผลการทดลอง

วิธีการคิดคำนวณสมรรถนะของเอนไซม์ (Enzyme activity)

การคำนวณสมรรถนะของเอนไซม์ในสมองและกล้ามเนื้อ

$$R = \frac{\Delta A \times Y}{1.36 \times 10^{4} \ (500/3120)} = 4.59 \times 10^{2} \times \frac{\Delta A}{Co} \times Y$$

$$R \text{ (สมอง)} = \Delta A \times Y \times 91.8$$

$$R \text{ (กล้ามเนื้อ)} = \Delta A \times Y \times 22.9$$

โดย R = Rate, จำนวน substrate เป็นไมโครโมลที่ถูก hydrolyzed/นาที/กรัม ของเนื้อเยื่อ

ΔA = การเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงต่อนาที (change in absorbance per min)

Co = ปริมาณของเนื้อเยื่อในบัฟเฟอร์ (สมอง, กล้ามเนื้อ) มก/มล. เมื่อเริ่มต้น
สมอง = 5 มก/มล กล้ามเนื้อ = 20 มก/มล

Y = dilution factor ในกล้ามเนื้อ = 2
dilution factor ในสมอง = 4

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. หาค่า LC_{50} โดยวิธีของ Litchfield และ Wilcoxon (1949) โดยนำข้อมูลมาสร้างกราฟ ทำการทดสอบค่าที่ได้จากการทดลอง และค่าที่ควรจะเป็น โดยทำ Chi-Square test

2. ใช้ ANOVA ชนิด oneway หาความแตกต่างของกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธี Duncan's new multiple range test

3. เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองโดยใช้ Student's t test ที่ $p < 0.05$