บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุวิธีการวิจัย (Materials and methods)

1. สัตว์ทดลอง และอุปกรณ์สำหรับการเตรียมสัตว์ทดลอง
   1.1 ปลานิล ขนาดน้ำหนักตัว 20-35 กรัม
   1.2 ตู้กระจกขนาด 36x36x60 ลูกบาศก์เซนติเมตร
   1.3 air pump และหัวทราย
   1.4 อาหารปลาสำเร็จรูปชนิดเม็ด

2. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง
   2.1 UV-visible recording spectrophotometer (UV-160A, Shimadzu)
   2.2 เครื่องชั่งละเอียด (CG 840, Schott)
   2.3 กล้องจุลทรรศน์ลำแสงธรรมดา (Olympus CH2)
   2.4 magnetic stirrer (Labnet)
   2.5 microcentrifuge (Biofuge 22 R, Heraeus sepatech)
   2.6 cuvette ขนาด 3 ml
   2.7 เข็มและ syringe
   2.8 tissue grinder
   2.9 เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Arthur H. Thomas Co.)
   2.10 เครื่องอุ่นสไลด์ (Chicago surgical and electrical Co.)
   2.11 automatic tissue processor (Lipshaw manufacturing Co.)
   2.12 paraffin dispensor (Lipshaw manufacturing Co.)
   2.13 spectrafuge microcentrifuge 16 M (Labnet)

3. สารเคมี
   3.1 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(Di-sodium hydrogen phosphate) (E.Merck)
   3.2 โมโนโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate) (E.Merck)
   3.3 โซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium bicarbonate) (E.merck)
   3.4 อะซีทิลไธโอโมลีนไอโอไดด์ (Acetylthiocholine iodide) (Sigma Chemical Company)
   3.5 5:5 dithiobis-(2-nitrobenzoic)acid (DTNB) (Sigma Chemical Company)

3.6 Bovine erythrocyte cholinesterase (Sigma Chemical Company)

3.7 Meron® (60%Methamidophos)%w/v (บริษัทไบเออร์ไทย)

3.8 Methanol (Baker)

3.9 10% ฟอร์มาลิน (10%formalin) (E.Merck)

3.10 Permout (Scientific Co.)

3.11 Xylene (Scientific Co.)

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) 0.1 M pH 8.0

   เตรียมโดยผสมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 M (14.2กรัม/ลิตร) จำนวน 475 มล. กับสารละลายโมโนโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 M (13.6 กรัม/ลิตร) 25 มล. ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 โดยค่อยๆ เติมด้วยสารละลายโมโนโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 M สารละลายนี้เก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C ได้นาน 10-14 วัน

2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M pH 7.0

   เตรียมโดยผสมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 M (14.2กรัม/ลิตร) จำนวน 50 มล. แล้วค่อยๆ เติมสารละลายโมโนโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 M (13.6 กรัม/ลิตร) ลงไป เพื่อปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 สารละลายนี้เก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C ได้นาน 10-14 วัน

3. สารละลายสับสเตรท (substrate acetylthiocholine iodide)

   ละลายอะซิทิลไธโอโฆลีนไอโอไดด์ (acetylthiocholine iodide) จำนวน 0.2167 กรัม ในน้ำกลั่น 10 มล. (0.0075 M) สารละลายนี้เก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C ได้นาน 7 วัน

4. สารละลาย dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB)

   ละลาย DTNB 0.396 กรัม และ โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate) 0.15 กรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M, pH 7.0 จำนวน 100 มล. (0.001 M) สารละลายนี้เก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C ได้นาน 10-14 วัน

5. สารละลายเอนไซม์มาตราฐาน (standard solution)

เตรียมสารละลายเอนไซม์มาตราฐานของ bovine erythrocyte cholinesterase ความเข้มข้น 1.8, 0.9, 0.45 และ 0.225 หน่วยสากล/มล. โดยการทำ 2 fold-dilution (ภาคผนวก ก.)

6. การเตรียม 10% ฟอร์มาลิน (formalin)

เตรียมโดยนำ 100 % ฟอร์มาลินมา 100 มล. เติมน้ำกลั่น 900 มล.

7. การเตรียมเมธามิโดฟอสจาก Meron® (60%Methamidophos%w/v)

เมธามิโดฟอส ที่ความเข้มข้น 10 ppm = 10 มก./ลิตร ดังนั้นจะต้องใช้เมธา-มิโดฟอส 600 มก. หรือ 1 มล. ของ Meron® ต่อน้ำ 60 ลิตร (ตู้ปลามีความจุ 60 ลิตร)

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 การเจาะเลือด

1.1.1 นำปลาตัวอย่างใส่ลงในถังที่มีสารละลาย benzocain ความเข้มข้น 1 มก./10 มล. ผสมอยู่เพื่อให้ปลาซึม

1.1.2 เมื่อปลาเริ่มซึมสังเกตจากการลักษณะการว่ายน้ำอยู่กับที่ นำปลามาวางที่ถาดที่มีผ้าเปียกชุบน้ำรองอยู่

1.1.3 เจาะเลือดบริเวณ caudal vessel โดยกำหนดตำแหน่งจากเส้นข้างลำตัว (lateral line) ก่อนโคนหางประมาณ 1- 2 นิ้ว ดูดเลือดใส่ลงในหลอด eppendorf tube

1.1.4 นำหลอดเลือดตัวอย่างแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซสเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อให้ไฟบรินจับตัวกับเม็ดเลือด ซีรั่มจะแยกอยู่ด้านบน

1.2 การเตรียมซีรั่ม

1.2.1 ปั่นแยกซีรั่มจากตัวอย่างเลือดในข้อ 1.1.4 (Biofuge 22 R) ที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

1.2.2 ใช้ปิเปตดูดซีรั่มที่มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองใสด้านบน ใส่ลงในหลอด eppendorf tube ระวังการปนเปื้อนจากเม็ดเลือด

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2.3 เก็บซีรั่มที่ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการตรวจวัดสมรรถนะของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสต่อไป (ภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากการเตรียมตัวอย่าง)

1.3 การเตรียมสมอง

ผ่าเปิดบริเวณกะโหลกของปลานิลเลาะเอาสมองมาชั่งให้ได้ 10 มก. บดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M, pH 8.0 จำนวน 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอวัดสมรรถนะของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสต่อไป (ภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากการเตรียมตัวอย่าง)

2. วิธีวัดสมรรถนะของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในซีรั่มและสมองของปลานิล

ประยุกต์ใช้วิธีของ Ellman และคณะ (1961) โดยอาศัยปฏิกิริยาดังนี้

$$\text{acetylthiocholine} + H_2O \xrightarrow{\text{cholinesterase enzyme}} \text{thiocholine} + \text{acetate}$$

$$\text{thiocholine} + \text{DTNB} \longrightarrow \text{2-nitro-5-mercaptobenzoate (yellow color)}$$

DTNB = dithiobisnitrobenzoic acid

2.1 การวัดสมรรถนะของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในซีรั่มและสมอง

วัดสมรรถนะของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในซีรั่มและสมองมีขั้นตอนการวัดดังนี้

1. ใช้ปิเปตดูดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M, pH 8.0 ใส่ลงใน คิวเวตต์ 2 หลอด หลอดละ 3 มล. กำหนดให้หลอดหนึ่งเป็นตัวอย่าง (sample) และอีกหลอดหนึ่งเป็นแบลงค์ (blank)
2. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างซีรั่มหรือสมองที่เตรียมไว้ตามวิธี 1.2 และ 1.3 ใส่ลงในคิวเวตต์ทั้งสองหลอด จำนวนหลอดละ 50 ไมโครลิตร
3. ใช้ปิเปตเติมสารละลาย DTNB จำนวน 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละคิวเวตต์ ผสมให้เข้ากัน
4. นำคิวเวตต์ทั้งสองวางในช่องวัดของเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ปรับค่าเริ่มต้นที่ 0

5. เติมสารละลายสับสเตรท (acetylthiocholine iodide) จำนวน 20 ไมโครลิตร ลงในคิวเวตต์ตัวอย่างและเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M, pH 8.0 ใส่ลงในคิวเวตต์แบลงค์ 20 ไมโครลิตรคนสารละลายให้เข้ากัน
6. เริ่มบันทึกการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่นแสง 412 นาโนเมตร ในเวลา 6 นาที หาค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปต่อนาที (ΔA) แล้วนำไปคำนวณหาสมรรถนะของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในซีรั่มและในสมอง

2.2 วิธีการคิดคำนวณสมรรถนะของ enzyme activity ในซีรั่มของปลานิล

$$R = \frac{\Delta A}{1.36 \times 10^4} \times \frac{1}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง/ปริมาตรทั้งหมด}} \times \frac{1}{C_0}$$

$$R = \frac{\Delta A}{1.36 \times 10^4} \times \frac{1}{50/3170} \times 1$$

R	enzyme activity มีหน่วย μmoles substrate hydrolyzed/min/ml
ΔA	ค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงใน 1 นาที
1.36×10^4	extinction coefficient of yellow anion
50	ปริมาตรตัวอย่างที่ใส่ลงใน cuvette เพื่อวัดสมรรถนะของ เอนไซม์
3170	ปริมาตรของสารทั้งหมดใน cuvette ประกอบด้วย -buffer 3000 ไมโครลิตร -DTNB 100 ไมโครลิตร -sample 50 ไมโครลิตร -substrate 20 ไมโครลิตร
C_0	dilution factor ของตัวอย่างซีรั่ม = 1

2.3 วิธีการคิดคำนวณสมรรถนะของ enzyme activity ในสมองของปลานิล

$$R = \frac{\Delta A}{1.36 \times 10^4} \times \frac{1}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง/ปริมาตรทั้งหมด}} \times \frac{1}{C_0}$$

$$R = \frac{\Delta A}{1.36 \times 10^4} \times \frac{1}{50/3170} \times \frac{1}{10}$$

R	enzyme activity มีหน่วย μmoles substrate hydrolyzed/min/g of tissue	
ΔA	ค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงใน 1 นาที	
$1.36x10^4$	extinction coefficient of yellow anion	
50	ปริมาตรตัวอย่างที่ใส่ลงใน cuvette เพื่อวัดสมรรถนะของเอนไซม์	
3170	ปริมาตรของสารทั้งหมดใน cuvette ประกอบด้วย	-buffer 3000 ไมโครลิตร
		-DTNB 100 ไมโครลิตร
		-sample 50 ไมโครลิตร
		-substrate 20 ไมโครลิตร
C_0	dilution factor ของตัวอย่างสมอง = 1/10	

3. การหาความเที่ยงตรงของการตรวจวัดสมรรถนะของเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรสในซีรั่มและในสมองของปลานิล

ทำการวัดสมรรถนะของเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรสในซีรั่มและในสมองของปลานิล โดยนำซีรั่มและสมองของปลานิลหลายๆ ตัวมารวมกัน ทำการวัดทั้งหมด 20 ครั้ง นำค่าที่คำนวณได้มาหาค่าเฉลี่ย ความคาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย และค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปร (%CV)

4. การหา% recovery ของวิธีการตรวจวัดสมรรถนะของเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรสในซีรั่มและสมองของปลานิล

วิธีการคำนวณแสดงไว้ในภาคผนวก ก.

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{ค่า } \Delta A \text{ ที่วัดได้}}{\text{ค่า } \Delta A \text{ ที่ควรจะเป็น}} \times 100$$

ขั้นตอนการทดลอง

1. การศึกษาพิษเฉียบพลันของเมธามิโดฟอสในปลานิล

ศึกษาหาค่า median lethal concentration ในเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง โดยนำปลานิลน้ำหนัก 20-35 กรัม มาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 36x36x60 ซม. ตู้ละ 10 ตัว เลี้ยงก่อนทำการทดลอง 1 เดือนเพื่อปรับสภาพให้คุ้นกับสภาพห้องทดลอง ในแต่ละตู้ใส่น้ำ 60 ลิตร มีหัวทรายและ air pump คุณภาพของน้ำในการทดลองและระหว่างการทดลองแสดงในตารางที่ 3 ปลาทั้ง 5 กลุ่มจะได้รับเมธามิโดฟอสในระบบน้ำนิ่งแบบเปลี่ยนน้ำทุกวัน ความเข้มข้น 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 ppm โดยเตรียมจากเมธามิโดฟอส 60%W/V และกลุ่มควบคุมอีก 1 กลุ่มซึ่งไม่ได้รับสารเมธามิโดฟอส

สังเกตและบันทึกอาการของปลานิลในกลุ่มที่ได้รับเมธามิโดฟอสที่ความเข้มข้นต่างๆ และกลุ่มควบคุมจนครบ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง บันทึกจำนวนปลาที่ตายในแต่ละกลุ่มเพื่อนำมาคำนวณหาค่า LC_{50} ที่ชั่วโมงต่างๆทำการทดลองซ้ำอีกสองครั้ง

2. การศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันของเมธามิโดฟอสในปลานิล

ศึกษาความเป็นพิษของเมธามิโดฟอสในขนาดความเข้มข้นที่ทำให้เกิดพิษกึ่งเฉียบพลันในเวลา 24, 48, 72, 96 ชั่วโมง และ 30 วัน นำปลานิลน้ำหนัก 20-35 กรัม มาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 36x36x60 ซม. เลี้ยงก่อนทำการทดลอง 1 เดือน เพื่อปรับสภาพให้คุ้นกับสภาพห้องทดลอง แบ่งปลาเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว โดยมีกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม และกลุ่มทดลอง 5 กลุ่ม ในแต่ละตู้ใส่น้ำ 60 ลิตร มีหัวทราย และ air pump คุณภาพของน้ำที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 3 ปลาในกลุ่มทดลองทั้ง 5 กลุ่มจะได้รับเมธามิโดฟอสที่ความเข้มข้น 10 ppm ทำการทดลองซ้ำทั้งสิ้น 3 ครั้ง ดังนี้

สังเกตอาการของปลาในเวลา 24, 48, 72, 96 ชั่วโมง และ 30 วัน ของแต่ละกลุ่มเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อครบกำหนดนำปลาขึ้นมาเก็บเลือดและสมองเพื่อวัดค่าสมรรถนะของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรส และเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตับ เหงือกและกล้ามเนื้อแช่ใน 10 % ฟอร์มาลินเพื่อศึกษาจุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ เหงือก และกล้ามเนื้อต่อไป

ตารางที่ 3 แสดงคุณภาพน้ำระหว่างทำการทดลอง

ปัจจัยทางกายภาพของน้ำ	ค่าก่อนการทดลอง	ค่าหลังการทดลอง
อุณหภูมิ °C	26-27.6	26.8-28
ค่าการละลายของออกซิเจน mg/l	5.5-5.9	5.4-5.7
ค่าความเป็นกรด-ด่าง pH	6-7	7-7.38

3. ศึกษาจุลพยาธิวิทยาของตับ เหงือกและกล้ามเนื้อ

3.1 การดองตัวอย่าง (fixation)

นำตัวอย่างทั้งหมดดองในน้ำยา 10 %ฟอร์มาลิน โดยให้น้ำยามีปริมาตร 10-20 เท่าของปริมาณเนื้อเยื่อ

3.2 วิธีทางเนื้อเยื่อวิทยา

1. เตรียมชิ้นเนื้อ ตัดชิ้นเนื้อส่วนที่ต้องการศึกษาคือ ตับ เหงือก และกล้ามเนื้อ โดยตัดให้มีขนาดความหนาของชิ้นเนื้อไม่เกิน 4 มม.
2. นำชิ้นเนื้อบรรจุใน embedding cassette แล้วผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออก clearing และ infiltration ด้วยเครื่อง automatic tissue processer ตามวิธีมาตรฐานของ Humaron (1979) จากนั้นนำชิ้นเนื้อมาทำเป็นแท่งด้วยพาราฟิน
3. นำแท่งตัวอย่างมาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ ให้มีความหนาประมาณ 5-6 ไมครอน แล้วนำไปลอยบนน้ำอุ่น อุณหภูมิ 40-45° เลือกตัวอย่างที่สมบูรณ์โดยการช้อนขึ้นมาจากน้ำด้วยสไลด์ นำไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 40-45° ทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมงถึงตลอดคืน
4. เนื้อเยื่อที่ติดสไลด์แล้ว นำไปย้อมสีตามขั้นตอนดังนี้ คือ ละลายพาราฟินด้วยไซลีน จากนั้นผ่านขั้นตอนการดูดน้ำเข้า (hydration) ด้วยแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นสูงไปต่ำแล้วย้อมสี Haematoxylin และ Eosin (H&E) ตามวิธีการของ Humason (1979) จากนั้นนำไปผ่านขบวนการดึงน้ำออกอีกครั้ง (dehydration) ด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นต่ำไปสูงแช่ในไซลีนแล้วทำการเมาท์สไลด์ด้วยสาร permount

5. อ่านผล นำสไลด์ถาวรที่ได้มาศึกษาลักษณะต่าง ๆของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ลำแสงธรรมดา และบันทึกผลการทดลอง

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS ในการวิเคราะห์ Probit test ซึ่งจะรายงานค่า LC_{50} ในช่วงต่าง ๆ และช่วงความเชื่อมั่น 95 %

2. เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยใช้ one way ANOVA โดยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%