# บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### สัตว์ทดลอง เครื่องมือ และสารเคมี

1. **สัตว์ทดลองและอุปกรณ์สำหรับเตรียมสัตว์ทดลอง** (Experimental animals)
   1.1 ปลานิล อายุ 3 เดือน ขนาดความยาวประมาณ 10-13 ซ.ม. น้ำหนักประมาณ 25-50 กรัม
   1.2 ตู้กระจกขนาด 36x36x60 ซม$^3$
   1.3 อาหารปลาสำเร็จรูปชนิดเม็ดใหญ่ (บริษัทลีอาหารสัตว์)
   1.4 Air pump และหัวทราย
   1.5 น้ำกรองสะอาด pH 6.0-7.0

2. **เครื่องมือ** (Instruments)
   2.1 Analytical balance (B.P 610, Sartorius)
   2.2 Haematocrit centrifuge (24, Hettich)
   2.3 Magnetic stirer (Labnet., USA)
   2.4 Oxygen meter (model 57, YSI incoporated Co, Inc., USA)
   2.5 Spectrafuge microcentrifuge (16 M, Labnet., USA)
   2.6 Standard pH meter (CG840, Schott)
   2.7 1 ml, Tuberlulin Syringe with needle
   2.8 Thermometer
   2.9 UV-visible recording spectrophotometer (UV-160A, Shimadsu)
   2.10 UV-visible recording spectrophotometer (Genesys$^{tm}$5, Bec thai Equipment & Chemical Co., Ltd.)
   2.11 กล้องจุลทรรศน์ลำแสงธรรมดา (model CH2, Olypus Optical Co., Ltd.)

3. **สารเคมี** (Reagent)
   3.1 Absolute methanol (J.T. Baker)
   3.2 Acetylthiocholine iodine (Sigma Chemical company)
   3.3 Disodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4$) (E. Merck)
   3.4 5:5 dithiobis-(2- nitrobenzoic) acid (DTNB) (Sigma Chemical Company)

I19450643

3.5 Enzyme bovine erytrocyte cholinesterase (Sigma Chemical Company)

3.6 95% Ethyl alcohol (J.T. Baker)

3.7 100% Formalin (E. Merck)

3.8 Giemsa stain (E. Merck)

3.9 May-Grunwald stain (Sigma Chemical Company)

3.10 Monopotassium hydrogen phosphate ($KH_2PO_4$) (E. Merck)

3.11 Monosodium hydrogen phosphate ($NaH_2PO_4$) (E. Merck)

3.12 Protein color reagent (Clinag Co. Ltd.)

3.13 Sodium Bicarbonate ($NaHCO_3$) (E. Merck)

3.14 Standard protein albumins (Clinag Co. Ltd.)

3.15 Tricaine methanesulfonate (Fisheries Chemical Division)

4. **อุปกรณ์** (Materials)

4.1 Automatic Pipetts (adjustable volume) 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Gilson) พร้อม Tips

4.2 Cover glass ขนาด 22x30 นิ้ว (Menzel glaser)

4.3 Microscope slide ขนาด 1x3 นิ้ว (Snail Brand)

4.4 Silica Cuvettes (path length 1 cm, Shimadsu)

4.5 Sterile eppendrof tube ขนาด 2.5 มล.

4.6 Cylinder ขนาด 100, 250, 1000 มล. (Pyrex)

4.7 Flask 50, 500, 1000 มล. (Pyrex)

4.8 Aluminium tray

4.9 Testtube ขนาด 13x100 มม. (Pyrex)

5. **การเตรียมสารเคมี**

5.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) 0.1 M, pH 8.0

เตรียมโดยการผสมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 M (14.2 กรัม/ลิตร) จำนวน 475 มล. กับสารละลายโมโนโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 M (13.2 กรัม/ลิตร) จำนวน 25 มล. แล้วค่อยๆเติมสารละลายโมโนโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 M ลงไปเพื่อปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 8.0 สารละลายนี้เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 14 วัน

5.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) 0.1 M, pH 7.0

เตรียมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 M (14.2 กรัม/ลิตร) จำนวน 50 มล. กับสารละลายโมโนโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 M (13.2 กรัม/ลิตร) จำนวน 40 มล. โดยค่อยๆเติมสารละลายโมโนโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 M ลงไป เพื่อปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 7.0 สารละลายนี้เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 14 วัน

5.3 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) 0.1 M, pH 7.2

เตรียมโดยการผสมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 M (1.21 กรัม/ลิตร) จำนวน 72 มล. กับสารละลายโมโนโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 M (8.75 กรัม/ลิตร) จำนวน 28 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นจำนวน 900 มล. เพื่อให้ปริมาตรรวมเท่ากับ 1000 มล. แล้วค่อยๆเติมโมโนโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เพื่อปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 7.2 สารละลายนี้เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 14 วัน

5.4 สารละลายสับสเตรท (Substarte acetylthiocholine iodide solution)

เตรียมโดยการละลาย Acetylthiocholine iodide 0.2167 กรัม ในน้ำกลั่น 10 มล. สารละลายนี้เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 14 วัน

5.5 สารละลาย Dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB) 0.01 M

เตรียมโดยการละลาย DTNB 0.396 กรัม และโซเดียมไบคาร์บอเนต 0.15 กรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M, pH 7.0 จำนวน 100 มล. สารละลายนี้เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 14 วัน

5.6 การเตรียม 10% ฟอร์มารีน

เตรียมโดยนำ 100% ฟอร์มารีน 100 มล. ใส่ในน้ำกลั่น 900 มล.

**วิธีการดำเนินการทดลอง**

1. **การเตรียมน้ำสำหรับทำการทดลอง**

น้ำที่ใช้เป็นน้ำที่ผ่านการกรอง ปราศจากคลอรีน และได้ทำการตรวจสอบค่าพารามิเตอร์ต่างๆ คือ ความเป็นกรด-ด่าง (pH = 7.73), อุณหภูมิ (Temperature = 29 °C), ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO = 5.8 ppm), Alkalinity (= 77 ppm), Hardness (= 6 ppm) ก่อนและหลังทำการทดลอง

2. **การเตรียมสัตว์ทดลอง**

ปลานิล ที่ใช้มีอายุประมาณ 3 เดือน ขนาด 10-13 ซ.ม. น้ำหนัก 25-50 กรัม โดยได้รับจากศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยทำการเลี้ยงในถังพลาสติก ขนาดความจุ 1000 ลิตร จำนวน 3 ถัง โดยแต่ละถังมีปลานิล จำนวน 100 ตัว ให้อาหารเม็ดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซ.ม.วันละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน ก่อนทำการทดลองเพื่อให้ปลาสามารถปรับตัวให้อยู่ในสภาพห้องทดลองได้ดี

3. **การศึกษาพิษเฉียบพลันของสารไพรีทรอยด์ต่อปลานิล**

การทดสอบพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity) ของสารไพรีทรอยด์ต่อปลานิล กำหนดการหาระดับความเข้มข้นของสารไพรีทรอยด์ที่ทำให้ปลานิล ตายร้อยละ 50 ของประชากรปลานิลทั้งหมด ในชั่วเวลาที่ได้รับสัมผัสสาร 96 ชั่วโมง โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ขั้นตอน

3.1 **การทดสอบขั้นเริ่มต้น** (Preliminary test) เพื่อหาระดับความเข้มข้นของสารไพรีทรอยด์ที่ทำให้ปลานิลตายร้อยละ 0-100 ในช่วงเวลา 96 ชั่วโมง ในการทดลองนี้จะเตรียมความเข้มข้นของสารไพรีทรอยด์ในระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยครั้งแรกใช้ความเข้มข้น 150 และ 75 ไมโครกรัมต่อลิตร มีชุดควบคุม 1 ชุด ต่อมานำช่วงความเข้มข้นที่ได้จากครั้งที่ 1 มาจำแนกให้ละเอียดขึ้นเพื่อทำการทดลองครั้งที่ 2 โดยจำแนกความเข้มข้นออกเป็น 30 45 60 75 90 ไมโครกรัมต่อลิตร มีชุดควบคุม 1 ชุด อัตราการตายของการทดสอบขั้นเริ่มต้นทั้ง 2 ชุด แสดงไว้ในภาคผนวก ค

3.2 **การทดลองขั้นละเอียด** (Full scale test) เป็นการหาระดับความเข้มข้นของสารไพรีทรอยด์ที่ทำให้ปลานิลตายร้อยละ 50 ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง โดยนำช่วงความเข้มข้นที่ได้จากช่วงการทดลองขั้นเริ่มต้นมากำหนดความเข้มข้นของสารไพรีทรอยด์ 5 ระดับ คือ 50 75 100 125 และ 150 ไมโครกรัมต่อลิตร และชุดควบคุม 1 ชุด ทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ

3.3 วิธีการทดลอง

การทดลองทั้ง 2 ขั้นตอนนี้ใช้วิธีการทดสอบแบบวิธีชีววิทยาในน้ำนิ่งแบบเปลี่ยนน้ำทุก 24 ชั่วโมง ทำการทดลองในตู้กระจกขนาด 36x36x60 ซม$^3$ ใส่น้ำปริมาตร 50 ลิตร ใส่ปลานิล จำนวน 10 ตัวต่อตู้ โดยทำการซุ่มปลานิลจากบ่อเลี้ยงรวม งดให้อาหาร 24 ชั่วโมงก่อนเริ่มทดลองให้สารไพรีทรอยด์ ให้แสงสว่างในห้องทดลองโดยการเปิดไฟ 12 ชั่วโมง และปิดไฟ 12 ชั่วโมง (12L:12D)

สังเกตอาการของปลานิลในกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารไพรีทรอยด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน จนครบ 96 ชั่วโมง บันทึกตัวตายในแต่ละกลุ่มจนครบ 96 ชั่วโมง เพื่อนำอัตราการตายมาหาค่า (Median lethal concentration) เก็บปลาที่ตายออกโดยทันที สุ่มตัวอย่างจากปลาที่รอดชีวิตเมื่อเวลา 96 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อของปลา เช่น เหงือก กล้ามเนื้อ และตับ ดองใน 10% ฟอร์มารีน เพื่อนำไปศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาต่อไป

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ในการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันนั้น นำน้ำที่ใช้ทดลองมาตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทั้งก่อนและหลับทำการทดลอง ดังนี้

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของน้ำ

วิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่างของน้ำ โดยใช้ พีเฮชมิเตอร์ (pH meter)

วิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ โดยใช้ ดีโอมิเตอร์ (DO meter)

วิเคราะห์ความกระด้างของน้ำ โดยใช้ (EDTA Tritimetric method)

วิเคราะห์แอลคาลินิตี้ (Alkalinity) โดยใช้ (Titration method)

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางฟิสิกส์ของน้ำ

วัดอุณหภูมิของน้ำ โดยใช้เทอโมมิเตอร์ (Thermometer)

**4 การศึกษาพิษรองเฉียบพลันของสารกลุ่มไพรีทรอยด์ในปลานิล**

การศึกษาพิษรองเฉียบพลันของสารไพรีทรอยด์ในปลานิล ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่มดังนี้

**กลุ่มที่ 1** ทดลองใส่สารไพรีทรอยด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน เมื่อครบ 30 วัน ทำการเจาะเลือดปลา เพื่อนำไปศึกษาสมรรถนะของเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรส และเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเพื่อนำไปศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพทางจุลกายวิภาค โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

ศึกษาความเป็นพิษโดยวิธีชีววิทยา น้ำนิ่งแบบเปลี่ยนน้ำทุก 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 30 วัน ทำการเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 36x36x60 ซม$^3$ ใส่น้ำสะอาด 50 ลิตร ใส่ปลานิล 10 ตัวต่อตู้ โดยทำการสุ่มจับปลานิลจากบ่อรวม ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง ให้แสงสว่างโดยการเปิดไฟ 12 ชั่วโมงและปิดไฟ 12 ชั่วโมง (12L:12D) เลี้ยงปลาในตู้กระจกเป็นเวลา 3 วันก่อนเริ่มการทดลอง และงดให้อาหาร 24 ชั่วโมงก่อนเริ่มการทดลอง

ปลานิล 3 กลุ่มจะได้รับสารไพรีทรอยด์ความเข้มข้น 7.5 15 และ 30 ไมโครกรัมต่อลิตร มีกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม สังเกตลักษณะอาการของปลานิลในกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารไพรีทรอยด์ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ถ้ามีปลาตายให้เก็บขึ้นจากน้ำและจดบันทึกอัตราการตายและลักษณะความผิดปกติของปลา หลังจากครบ 30 วัน ทำการเจาะเลือดปลาเพื่อนำมาศึกษาค่าสมรรถนะของเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรส ค่าโลหิตวิทยาต่างๆ สุ่มตัวอย่างจากปลาที่รอดชีวิตเมื่อสัมผัสสารครบ 30 วัน โดยเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อของปลา เช่น เหงือก กล้ามเนื้อ และตับ ดองใน 10% ฟอร์มารีน เพื่อนำไปศึกษาลักษณะของพยาธิสภาพทางจุลกายวิภาคต่อไป ทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ

**กลุ่มที่ 2** ศึกษาพฤติกรรมของเอ็นไซม์โมลีนเอสเทอเรส เมื่อใส่สารไพรีทรอยด์ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน ทำการเจาะเลือด 2 ครั้ง นำมาวัดค่าสมรรถนะของเอนไซม์ โมลีนเอสเทอเรส รวมทั้งเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเพื่อนำไปศึกษาลักษณะพยาธิสภาพทางจุลกายวิภาค โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

ศึกษาพฤติกรรมของเอ็นไซม์โมลีนเอสเทอเรส โดยทดลองแบบชีววิทยาน้ำนิ่งแบบเปลี่ยนน้ำทุก 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 30 วัน โดยมีวิธีการทดลองเหมือนกับข้อ 4.1 แต่ต่างกันตรงระยะเวลาในการเจาะเลือด เพื่อนำมาวัดค่าทางโลหิตวิทยาต่างๆ ซึ่งในการทดลองนี้จะทำการเจาะเลือด 2 ครั้ง โดยในครั้งแรกจะทำการเจาะเลือดปลาที่สัมผัสสารไพรีทรอยด์ครบ 14 วัน และนำไปวัดค่าทางโลหิตวิทยาต่างๆ หลังจากนั้นนำปลาดังกล่าวกลับไปเลี้ยงในตู้กระจกและใส่สารไพรีทรอยด์ความเข้มข้นเท่าเดิม อีกจนครบ 30 วัน เมื่อครบ 30 วัน ทำการเจาะเลือดครั้งที่ 2 เพื่อนำไปวัดค่าทางโลหิตวิทยาต่างๆ และสุ่มตัวอย่างปลาที่รอดชีวิตเมื่อสัมผัสสารครบ

1 เดือน โดยเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อของปลา เช่น เหงือก กล้ามเนื้อ และตับ ดองใน 10% ฟอร์มา-รีน เพื่อนำไปศึกษาลักษณะของพยาธิสภาพทางจุลกายวิภาคต่อไป ทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ

**5. วิธีการวัดสมรรถนะของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในซีรัมของปลานิล ประยุกต์ใช้วิธีการของ Ellman และคณะ (1961)**

**1. การเตรียมตัวอย่าง**

**1.1 การเจาะเลือด**

1.1.1 นำปลาตัวอย่างใส่ลงในถังน้ำที่มี สาร Tricaine methanesulfonate (MS 222) ผสมอยู่ 0.01 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร เพื่อให้ปลาซึม

1.1.2 เมื่อปลาเริ่มซึม สังเกตจากลักษณะการว่ายน้ำอยู่กับที่ นำปลามาวางที่ถาดอะลูมิเนียมที่มีผ้าขนหนูชุบน้ำเปียกวางอยู่

1.1.3 เจาะเลือดตรงบริเวณเส้นข้างลำตัว (Lateral line) ก่อนโคนหางประมาณ 1-2 นิ้ว ดูดเลือดประมาณ 0.7-0.8 ซีซี. ใส่ลงไปในหลอด (Sterile eppendrof tube) ขนาด 2.5 มล. ที่เขียนหมายเลขไว้แล้ว (สามารถแยกซีรัมได้ 350-400 ไมโครลิตร/เลือด 0.7-0.8 ซี.ซี.)

1.1.4 นำหลอดเลือดตัวอย่างแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งคืน เพื่อให้ไฟบรินจับตัวกับเม็ดเลือด ซีรัมแยกตัวอยู่ด้านบน

**2.1 การเตรียมซีรัมตัวอย่าง**

2.1.1 นำหลอดเลือดที่แช่ตู้เย็นไว้ 1 คืน มาปั่นแยกซีรัม (Spectrafuge microcentrifuge 16 M, Labnet., USA) ที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

2.1.2 ใช้ปิเปตดูดซีรัมที่มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองใสด้านบน ใส่ลงในหลอด (Sterile eppendrof tube) ขนาด 2.5 มล. ระวังการปนเปื้อนจากเม็ดเลือด

2.2.3 เก็บซีรัมไว้ในตู้เย็น –20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการตรวจสมรรถนะของเอ็นไซม์โฆลีนเอสเทอเรสและค่าทางโลหิตวิทยาต่างๆ ต่อไป โดยทำการตรวจภายใน 14 วัน หลังจากเก็บตัวอย่าง

2. **การวัดสมรรถนะของเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรสในซีรัม**

วัดสมรรถนะของเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรสในซีรัม โดยประยุกต์ใช้วิธีการของ Ellman และคณะ (1961) มีขั้นตอนการวัดดังนี้

2.1 ใช้ปิเปตดูดสารละลายฟอสเฟตบัปเฟอร์ pH 8.0 ใส่ลงในคิวเวตต์ (cuvette) 2 หลอด หลอดละ 3 มิลลิลิตร โดยกำหนดให้หลอดหนึ่งเป็นหลอดตัวอย่าง (sample) และอีกหลอดเป็นแบลงค์ (blank)

2.2 ใช้ปิเปตดูดซีรัมที่เตรียมไว้ตามวิธีข้อ (1.2 ) ใส่ลงในคิวเวตต์ทั้ง 2 หลอด หลอดละ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.3 เติม DTNB 100 ไมโครลิตร ลงในคิวเวตต์ทั้ง 2 ผสมให้เข้ากัน

2.4 นำคิวเวตต์ทั้ง 2 หลอด ไปวางในช่องวัดของเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-160A, Shimadsu) ปรับความยาวคลื่นแสงอยู่ที่ 412 นาโนเมตร ปรับค่าเริ่มต้นที่ 0

2.5 เติมสารละลายสับสเตรท (Acetylthiocholine iodine) 20 ไมโครลิตร ลงในหนึ่งคิวเวตต์ซึ่งอ่านผลเป็นคิวเวตต์ตัวอย่าง ผสมสารละลายให้เข้ากัน

2.6 บันทึกการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (Optical density) ภายในเวลา 6 นาที หาค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนคลื่นแสงที่เปลี่ยนไปต่อนาที ($\Delta A$) แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าสมรรถนะของเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรสในซีรัม

การคำนวณหาค่าสมรรถนะของเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรสในซีรัม ประยุกต์ใช้วิธีการของ Ellman และคณะ (1961) และวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Winsten และคณะ (1965)

$$\text{rate (moles/l.per min)} = \frac{\Delta \text{ absorbance/min}}{1.36 \times 10^{-4}}$$

ChE activity = unit/mg of serum protein

Unit = μmoles of substrate hydrolyzed/min/ml serum

3. **การวัดปริมาณโปรตีนในซีรัม**

การตรวจหาปริมาณโปรตีนในซีรัมโดยประยุกต์ใช้วิธีการของ Winsten และคณะ (1965) มีขั้นตอนดังนี้

3.1 **วิธีการทำกราฟมาตรฐาน** (Standard curve)

3.1.1 ใช้ปิเปตดูดสารละลายคอปเปอร์ 4000 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลอง 5 หลอด โดยกำหนดให้หลอดหนึ่งเป็นแบลงค์ (blank) และอีก 4 หลอดเป็น standard สำหรับแต่ละความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนตัวอย่าง (Protein albumin)

3.1.2 ในแต่ละหลอดทดลอง เตรียมความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนตัวอย่างจำนวน 100 ไมโครลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

หลอด 1 ความเข้มข้น 0 g% (เติมน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร )

หลอด 2 ความเข้มข้น 2 g%

หลอด 3 ความเข้มข้น 4 g%

หลอด 4 ความเข้มข้น 6 g%

หลอด 5 ความเข้มข้น 8 g%

3.1.3 หลังจาก 20 นาที ใช้ปิเปตดูดสารละลายในหลอดทดลอง ใส่ลงในหลอดคิวเวตต์และนำหลอดคิวเวตต์ไปวางในช่องวัดของเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ปรับความยาวคลื่นแสงที่ 550 นาโนเมตร ปรับค่าเริ่มต้นที่ 0 บันทึกค่าดูดกลืนคลื่นแสง (Optical density) วัดค่าการดูดกลืนแสง ภายใน 30 นาที นำค่า OD ที่ได้ มาเขียนกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ·

3.2 การวัดค่าโปรตีนในซีรัมตัวอย่าง

3.2.1 ใช้ปิเปตดูดสารละลายคอปเปอร์ 4000 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลอง และดูดซีรัมตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ใส่ลงไปผสมแล้วเขย่าตั้งทิ้งไว้ 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

3.2.2 เมื่อครบ 20 นาที ใช้ปิเปตดูดสารละลายแต่ละหลอดใส่ลงในคิวเวตต์

3.2.3 อ่านผลโดยวิธีเดียวกับการอ่านค่าสารละลาย โปรตีนตัวอย่าง

3.2.4 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาแทนในสมการของกราฟมาตรฐาน (standard curve) เพื่อหาค่าปริมาณโปรตีนในซีรัม

4 การหาค่าทางโลหิตวิทยา

การหาค่าทางโลหิตวิทยาจากเลือด ได้ประยุกต์ใช้วิธีการของ Benjamin (1961) อ้างถึงใน ภัทรา (2536) ในการวัดฮีมาโตคริต (Haematocrit)

5 **การศึกษาลักษณะและรูปร่างของเม็ดเลือด**

การศึกษาลักษณะและรูปร่างของเม็ดเลือด ได้ประยุกต์ใช้วิธีการของ Wongtavatchai et al., (1994) ในการย้อมสีเม็ดเลือดเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเม็ดเลือดชนิดต่างๆ โดยมีขั้นตอนดังนี้

5.1 **การเตรียมสไลด์เลือด**

5.1.1 หยดเลือดตัวอย่างลงบนแผ่นกระจกสไลด์ แล้วใช้ กระจกปิดสไลด์ smear เลือดให้แผ่ออกเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

5.1.2 นำสไลด์ที่แห้งมาฟิกส์ (fix) ใน 100% methanol เป็นเวลา 5 นาที แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

5.2 **การย้อมสีเม็ดเลือด**

5.2.1 เรียงสไลด์บนถาดย้อม

5.2.2 หยดสี May-Grünwald ลงบนสไลด์ให้ท่วมทั้งแผ่น ทิ้งไว้ 7 นาที

5.2.3 ล้างสี May-Grünwald โดยนำแผ่นสไลด์จุ่มผ่าน สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2

5.2.4 ผสมสี Giemsa กับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 ในอัตราส่วน (1: 4) แล้วหยดลงบนสไลด์ให้ท่วมทั้งแผ่น ทิ้งไว้ 10 นาที

5.2.5 นำสไลด์มาล้างสีออกด้วยน้ำ ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

5.2.6 นำสไลด์มาผ่านขบวนการดึงน้ำออก (Dehydration) ด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% เป็นเวลา 5 นาที ต่อด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100% เป็นเวลา 10 นาที และแช่ใน Xylene 10 นาที หลังจากนั้นหยด Pro-tex mounting medium และปิด cover slip

5.2.7 เก็บสไลด์ที่แห้งใส่กล่อง เพื่อรอการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ลำแสงธรรมดา

**6. ศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อเหงือก ตับ และกล้ามเนื้อ ที่เปลี่ยนแปลงไป**

6.1 การดองตัวอย่าง (Fixation)

ตัวอย่างทั้งหมดจะดองในน้ำยา 10% ฟอร์มารีน โดยให้น้ำยามีปริมาตร 10-20 เท่าของปริมาตรเนื้อเยื่อ

วิธีดอง

การเตรียมเนื้อเยื่อ นำปลานิลมาตัดเฉพาะส่วนที่ต้องการคือ เหงือก ตับ กล้ามเนื้อ โดยตัดให้มีความหนาของชิ้นเนื้อไม่เกิน 4 มม.

6.2 วิธีการทางเนื้อเยื่อวิทยา

6.2.1 นำชิ้นเนื้อมาบรรจุใน embedding cassette แล้วผ่านขั้นตอนดึงน้ำออก dehydration clearing และ infiltration ด้วยเครื่อง automatic tissue processor ตามวิธีมาตรฐานของ Humason (979) (อ้างถึงใน ภัทรา , 2536) จากนั้นนำชิ้นเนื้อมาทำให้เป็นแท่งด้วยพาราฟิน

6.2.2 นำแท่งตัวอย่างมาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนาประมาณ 5-6 ไมครอน แล้วนำไปลอยบนน้ำอุ่นอุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส เลือกตัวอย่างที่สมบูรณ์โดยการช้อนขึ้นจากน้ำด้วยสไลด์ นำไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมงถึงตลอดคืน

6.2.3 เนื้อเยื่อที่ติดสไลด์แล้วนำๆไปย้อมสีตามขั้นตอนดังนี้ คือ ละลายพาราฟินด้วย Xylene จากนั้นผ่านขบวนการดูดน้ำเข้า (hydration) ด้วยแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นสูงไปต่ำ แล้วย้อมสี Haematoxylin และ Eosin (H&E) ตามวิธีของ Humason (1979) (อ้างถึงใน ภัทรา , 2536) หลังจากนั้นนำมาผ่านขบวนการดึงน้ำออกอีกครั้ง (dehydration) ด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่ำไปสูง แช่ใน Xylene แล้วทำการเมาท์สไลด์ด้วยสาร permount

6.2.4 การอ่านผล

นำสไลด์ถาวรที่ได้ศึกษาดูลักษณะต่างๆ ของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ลำแสงธรรมดา บันทึกผลการทดลอง

**สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์**

1. ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS-PC ในการวิเคราะห์ Probit test ซึ่งจะรายงานค่า LC50 ในช่วงต่างๆ และช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งสร้างกราฟ

2. ใช้ one-way analysis of variance เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยใช้ unpaired student "t" test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %