บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. สัตว์ทดลอง

ปลาดุกบิ๊กอุย อายุ 3 เดือน ขนาด 20 - 25 cm. น้ำหนัก 200 - 250 กรัม

2. สารเคมี

2.1 แคดเมียมในรูป $CdCl_2$

2.2 Neutral Buffer Formalin Solution

2.3 Formic Acid - Sodium Citrate Solution

2.4 Ethanol

2.5 Xylene

2.6 Paraffin

2.7 Harris's Hematoxylin

2.8 Eosin

2.9 Permount

3. เครื่องมือ และ อุปกรณ์

3.1 Thermometer

3.2 pH Meter

3.3 DO Meter

3.4 Automatic Tissue Processor

3.5 Microtome

3.6 Water Bath

3.7 เครื่องอุ่นสไลด์

3.8 เครื่องแก้วต่าง ๆ

3.9 ถังน้ำ 250 ลิตร พร้อมหัวทราย

3.10 ตู้กระจกขนาด 40 x 60 x 40 cm.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การเตรียมน้ำ

น้ำที่ใช้ในการทดลองเป็นน้ำจืดที่ได้จากระบบน้ำประปาของมหาวิทยาลัยบูรพา เตรียมโดยการกรองน้ำผ่านถุงกรองน้ำเพื่อกำจัดตะกอนและกำจัดสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก แล้วให้อากาศอย่างแรงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำปลาดุกบิ๊กอุยเพศผู้ อายุ 3 เดือน ขนาด 20 - 25 cm.ที่ได้มาจากซังพันธุ์ปลา อ.แปลงยาว จังหวัดฉะเชิงเทรา มาใส่ในตู้กระจกเพื่อปรับสภาพปลาและเปลี่ยนน้ำถ่ายน้ำทุก ๆ 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน

ให้อาหารด้วยอาหารเม็ดทุกวัน วันละ 1 มื้อ และงดให้อาหาร 1 วันก่อนทำการทดลอง

การเตรียมสารละลายแคดเมียม

ละลาย $CdCl_2 \cdot 2H_2O$ 2.03 g. ในน้ำ Deionized ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 ml. สารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้นเท่ากับ 1000 mg/l

ระบบการทดลอง

ระบบในการทดลองจะเป็นระบบเปิดที่มีการไหลผ่านของน้ำเข้าและออกตลอด 24 ชั่วโมง โดยจะมีอัตราการไหลของน้ำเท่ากับ 4 ml/min (≈10 % ของปริมาณน้ำในตู้กระจกต่อวัน) ซึ่งจะประกอบด้วย ตู้กระจกขนาด 40 x 60 x 40 ซม. (96 ลิตร) โหลแก้วกลมขนาด 10 ลิตร และกะบะพลาสติกขนาด 10 ลิตร (ภาพที่ 7)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาพที่ 7 แสดงการไหลของน้ำในระบบการทดลอง

การทดลอง

ในการทดลองจะแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

1. การทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน
2. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะเนื้อเยื่อของปลาดุกบิ๊กอุย

การทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน

การทดลองในตอนนี้เป็นการทดสอบระดับความเป็นพิษของแคดเมียมที่อยู่ในรูปของแคดเมียมคลอไรด์ ($CdCl_2$) ซึ่งจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ การหาค่า 96 h – LC_{50} และค่า LOEL โดยวิธีการแช่ปลาดุกในสารละลายแคดเมียม และการหาค่า 96 h – LD_{50} และค่า LOEL โดยวิธีการฉีดแคดเมียมเข้าภายในช่องท้องของปลาดุกบิ๊กอุย ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1. การหาค่า 96 h – LC_{50} โดยวิธีการแช่ปลาดุกบิ๊กอุยในสารละลายแคดเมียม

1.1 ชุดทดลอง - นำน้ำที่ผ่านการปรับสภาพ ใส่ลงในตู้กระจก แล้วใส่แคดเมียมโดยให้ในแต่ละตู้มีความเข้มข้นเท่ากับ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 ppm. และ ไม่ใส่แคดเมียมเพื่อเป็นชุดควบคุม

1.2 ทำการสุ่มปลาดุกบิ๊กอุยมาใส่ในชุดทดลอง ชุดละ 10 ตัว บันทึกอัตราการตายของปลาเมื่อเวลาครบ 3 , 6 , 9 , 12 , 24 , 36 , 48 , 72 และ 96 ชั่วโมง ปลาที่ตายแล้วจะนำออกจากชุดทดลองทุกครั้งที่ตรวจพบ โดยหลักเกณฑ์ในการตัดสินว่าปลาดุกตายแล้วคือปลาไม่แสดงอาการตอบสนองเมื่อใช้แท่งแก้วแตะถูกตัวและแผ่นปิดเหงือกไม่ทำงาน

2. การหาค่า 96 h–LD_{50} โดยวิธีการฉีดแคดเมียมเข้าที่ช่องท้องปลาดุกบิ๊กอุย

ทำการฉีดแคดเมียมเข้าที่บริเวณช่องท้อง ในปริมาณ 0.5, 1.0, 2.0,3.0 และ 4.0 mg /kg และ ฉีดน้ำกลั่นเพื่อเป็นชุดควบคุม ทำการฉีดความเข้มข้นละ 10 ตัว บันทึกอัตราการตายของปลาเมื่อเวลาครบ 3 , 6 , 9 , 12 , 24 , 36 , 48 , 72 และ 96 ชั่วโมง ปลาที่ตายแล้วจะนำออกจากชุดทดลองทุกครั้งที่ตรวจพบ โดยหลักเกณฑ์ในการตัดสินว่าปลาดุกตายแล้วคือปลาไม่แสดงอาการตอบสนองเมื่อใช้แท่งแก้วแตะถูกตัวและแผ่นปิดเหงือกไม่ทำงาน

3. การวิเคราะห์ข้อมูลหาระดับความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน

วิเคราะห์หาค่า 96 h – LC_{50} และค่า LOEL จากวิธีการแช่ปลาดุกบิ๊กอุยในสารละลายแคดเมียม และ 96 h–LD_{50} และค่า LOEL จากวิธีการฉีดแคดเมียมเข้าที่ช่องท้องปลาดุกบิ๊กอุย ตามวิธีการวิเคราะห์ความเป็นพิษของสารที่มีต่อสัตว์น้ำโดยวิธีโปรบิท (ปรีชา สมมณี, 2520)

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะเนื้อเยื่อของปลาดุกบิ๊กอุย

ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะเนื้อเยื่อของปลาดุกบิ๊กอุย จะทำการศึกษาที่ระดับความเป็นพิษ 2 ระดับ คือการสัมผัสแคดเมียมระดับความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน (Acute) และระดับความเป็นพิษแบบกึ่งเฉียบพลัน (Subacute) โดยในแต่ละระดับความเป็นพิษ จะทำการศึกษาถึงอิทธิพลของรูปแบบของการได้รับแคดเมียมคือ การได้รับแคดเมียมจากการแช่ในสารละลายแคดเมียมและการได้รับแคดเมียมจากการฉีดเข้าช่องท้อง โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. การสัมผัสแคดเมียมในระดับความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน (Acute)

ในการศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน (Acute) จะใช้ความเข้มข้นของสารละลายแคดเมียมในการทดลอง โดยคำนวณจาก 50% ของค่า 96 h – LC_{50} และ ค่า96 h – LD_{50} เป็นความเข้มข้นในการทดลอง ซึ่งในระหว่างการทดลอง จะงดให้อาหารปลาดุก

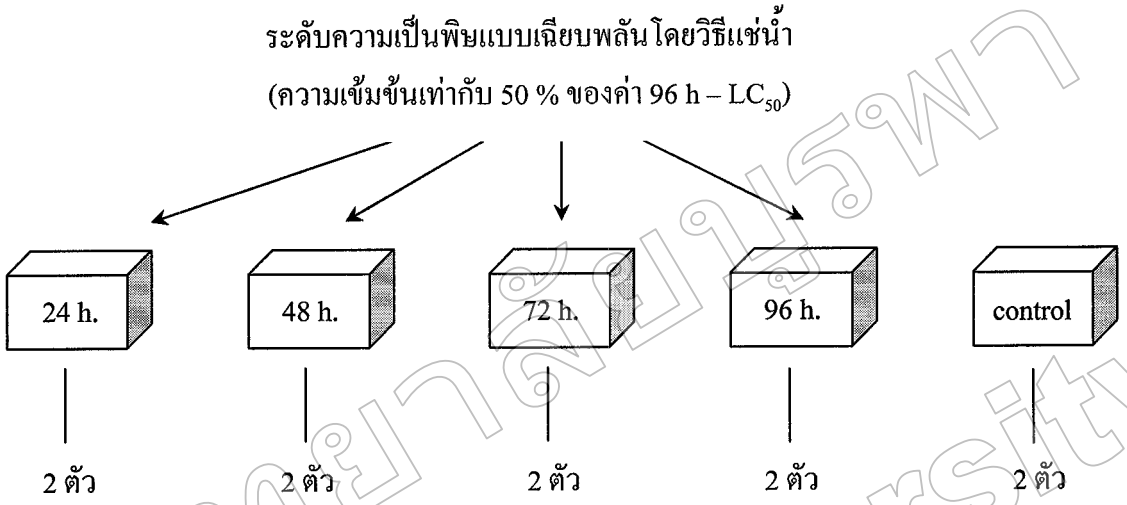
1.1 การได้รับแคดเมียมจากการแช่ในสารละลายแคดเมียม

1.1.1 นำน้ำที่ผ่านการปรับสภาพ ใส่ลงในตู้กระจก แล้วใส่แคดเมียมโดยให้ในตู้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

กระจกให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 50 % ของค่า 96 h – LC_{50} จำนวน 4 ตู้

1.1.2 นำปลาดุกมาใส่ในตู้กระจกที่ใส่สารละลายแคดเมียม ตู้ละ 2 ตัว ทำการเก็บตัวอย่างปลาครั้งละ 2 ตัว ตามระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

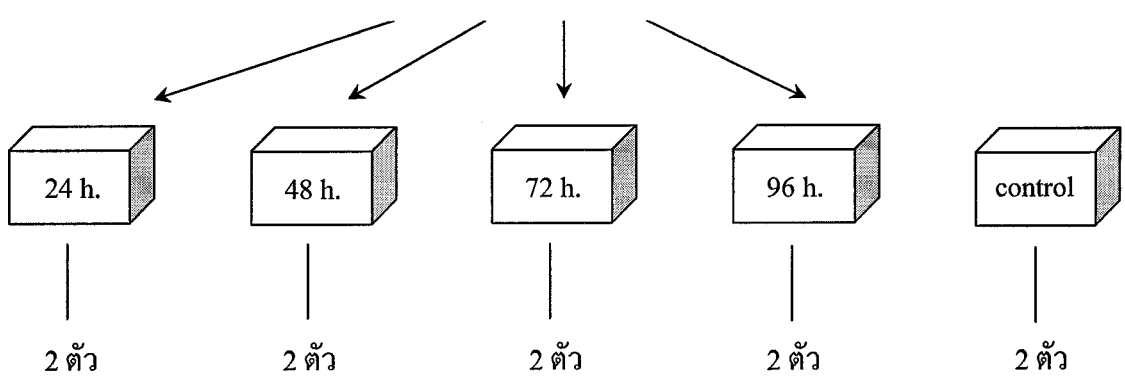


ภาพที่ 8 ระดับความเป็นพิษแบบเฉียบพลันโดยวิธีแช่น้ำ

1.2 การได้รับแคดเมียมจากการฉีดเข้าช่องท้อง

1.2.1 นำน้ำที่ผ่านการปรับสภาพใส่ลงในตู้กระจก จำนวน 4 ตู้

1.2.2 ทำการฉีดสารละลายแคดเมียมเข้าทางช่องท้องของปลาดุกในความเข้มข้นเท่ากับ 50% ของค่า 96 h – LD_{50} (จาก 1.2) ทำการเก็บตัวอย่างปลาครั้งละ 2 ตัว ตามระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง



ภาพที่ 9 ระดับความเป็นพิษแบบเฉียบพลันโดยวิธีฉีด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

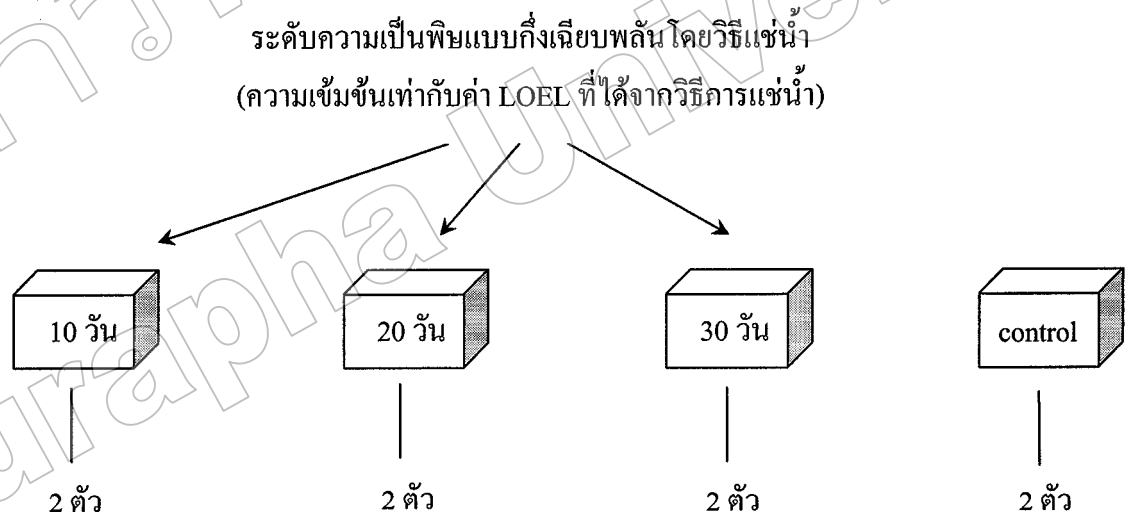
2. การสัมผัสแคดเมียมในระดับความเป็นพิษแบบกึ่งเฉียบพลัน (Subacute)

ในการศึกษาความเป็นพิษแบบกึ่งเฉียบพลัน (Subacute) จะใช้ความเข้มข้นของสารละลายแคดเมียมเท่ากับระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ทำให้สัตว์ทดลองแสดงอาการตอบสนอง หรือ Lowest Observed Effect Level (LOEL) ซึ่งคำนวณได้จากการหาค่าระดับความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน เป็นระดับความเข้มข้นในการทดลอง ในระหว่างการทดลอง จะให้อาหารปลาดุกทุกวัน วันละ 1 มื้อ และจะเก็บอาหารออกเมื่อปลาดุกไม่กินอาหารแล้ว

2.1 การได้รับแคดเมียมจากการแช่ในสารละลายแคดเมียม

2.1.1 นำน้ำที่ผ่านการปรับสภาพ ใส่ลงในตู้กระจก แล้วใส่แคดเมียมโดยให้ในตู้กระจกให้มีความเข้มข้นเท่ากับ LOEL จำนวน 3 ตู้

2.1.2 นำปลาดุกมาใส่ในตู้กระจกที่ใส่สารละลายแคดเมียมไว้แล้วตู้ละ 2 ตัว ทำการเก็บตัวอย่างปลาครั้งละ 2 ตัว ตามระยะเวลา 10, 20และ30 วัน และมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ 10% ทุกวัน (น้ำที่ทำการเปลี่ยนถ่ายเข้าไปจะเป็นน้ำที่มีความเข้มข้นของแคดเมียม LOEL ด้วย)



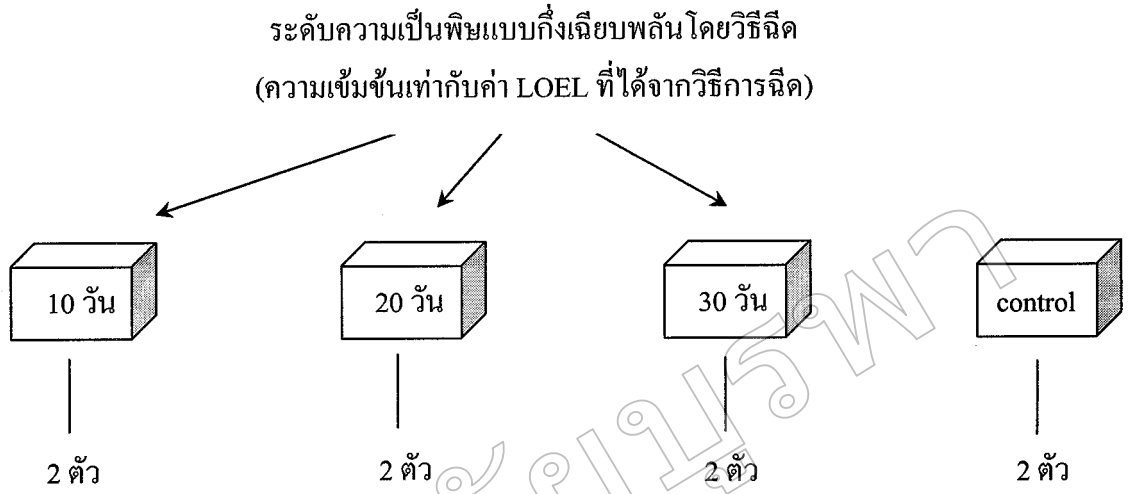
ภาพที่ 10 ระดับความเป็นพิษแบบกึ่งเฉียบพลันโดยวิธีแช่น้ำ

2.2 การได้รับแคดเมียมจากการฉีดเข้าช่องท้อง

2.2.1 นำน้ำที่ผ่านการปรับสภาพใส่ลงในตู้กระจก จำนวน 3 ตู้

2.2.2 ทำการฉีดสารละลายแคดเมียมเข้าทางช่องท้องของปลาดุกในความเข้มข้นเท่ากับ LOEL และทำการเก็บตัวอย่างปลาครั้งละ 2 ตัว ตามระยะเวลา 10, 20และ30 วัน และทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำ 10% ทุกวัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 11 ระดับความเป็นพิษแบบกึ่งเฉียบพลันโดยวิธีฉีด

3. การเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อของปลาดุก

ในการศึกษาเนื้อเยื่อปลาดุกจะมีกระบวนการการเตรียมสไลด์หลายขั้นตอน ตั้งแต่ การเก็บเนื้อเยื่อ การคงสภาพ การล้าง การขจัดน้ำ การขจัดแอลกอฮอล์และทำให้เนื้อเยื่อใส การแทรกซึม การฝังเนื้อเยื่อ การตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบาง การย้อมสี จนถึงการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการศึกษาด้านเนื้อเยื่อ โดยมีขั้นตอนดังนี้ (Humason, 1967; เวคิน นพนิตย์, 2524; ศุภลักษณ์ โรมรัตนพันธ์, 2545; ประกอบ ศรีจันทร์, 2529; ปภาศิริ กาญจโนภาศ, 2528; ปวีณา กิจสวัสดิ์, 2530)

3.1 เมื่อเก็บตัวอย่างปลาดุกจากการทดลองขั้นต่าง ๆ แล้วทำการผ่าช่องท้องแล้วตัดชิ้นเนื้อใส่ในน้ำยา Neutral Buffer Formalin Solution โดยเริ่มจากตับ ไตและเหงือก ตามลำดับ ซึ่งการตัดชิ้นเนื้อนั้นต้องทำการตัดอย่างรวดเร็ว โดยขนาดของชิ้นเนื้อที่ใส่ในน้ำยา Neutral Buffer Formalin Solution นี้ไม่มากกว่า 4 mm. ถ้าชิ้นเนื้อมีเลือดติดมา ให้นำชิ้นเนื้อล้างในน้ำยา Neutral Buffer Formalin solution ก่อน แล้วค่อยนำไปใส่ในน้ำยา Neutral Buffer Formalin Solution ชุดใหม่โดยให้มีปริมาตรของน้ำยาประมาณ 20 – 25 เท่าของเนื้อเยื่อ ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง โดยรายละเอียดการเตรียมน้ำยาจะอยู่ในภาคผนวก

3.2 นำตัวอย่างที่แช่น้ำยา Neutral Buffer Formalin Solution ครบ 24 ชั่วโมง มาผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ทางการศึกษาเนื้อเยื่อโดยใช้เครื่องมือ Automatic Tissue Processor ตามวิธีมาตรฐาน (Humason, 1967; เวคิน นพนิตย์, 2524; ศุภลักษณ์ โรมรัตนพันธ์, 2545; ประกอบ ศรีจันทร์, 2529; ปภาศิริ กาญจโนภาศ, 2528; ปวีณา กิจสวัสดิ์, 2530) ในกรณีเนื้อเยื่อที่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบ เช่น เหงือก จะต้องทำการขจัดแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อ เสียก่อน โดยทำการแช่ลงในน้ำยา

Decalcified นาน 3 ชั่วโมง เพื่อให้กระดูกอ่อนตัว แล้วล้างในน้ำไหลประมาณ 15 นาที ก่อนนำเข้าเครื่อง Automatic Tissue Processor โดยรายละเอียดการเตรียมน้ำยาต่าง ๆ และกระบวนการการเตรียมเนื้อเยื่อของเครื่อง Automatic Tissue Processor จะอยู่ในภาคผนวก

3.3 นำตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการจากเครื่อง Automatic Tissue Processor แล้วมาเข้ากระบวนการฝังเนื้อเยื่อลงในพาราฟินด้วยเครื่อง Disperser แล้วนำไปวางบน Cool Plate จนเป็นบล็อกแข็ง

3.4 นำบล็อกมาตัดแต่งเสียก่อน โดยตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมู แล้วนำไปตัดด้วยเครื่อง Microtome ให้มีความหนาประมาณ 3 – 4 ไมครอน แล้ววางบนสไลด์ที่หยดด้วย 50% Ethanol แล้วค่อย ๆ นำไปลอยในอ่างน้ำอุ่น 45 – 50 องศาเซลเซียส รอจนกระทั่งเนื้อเยื่อมีการแผ่ตัวดีแล้วจึงใช้แผ่นสไลด์ที่ผ่านการทำความสะอาดแล้วช้อนขึ้นมาวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ ทิ้งไว้ข้ามคืน

3.5 นำสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อติดแน่นมาผ่านกระบวนการละลายพาราฟินโดยใช้ Xylene จากนั้นผ่านกระบวนการดูดน้ำเข้า แล้วย้อมสี Hematoxylene และ Eosin หลังจากนั้นจึงผ่านกระบวนการดูดน้ำออกแล้ว ปิดสไลด์ด้วย Permount ทิ้งไว้ข้ามคืนบนเครื่องอุ่นสไลด์ ตามวิธีของ Humason (1967) ซึ่งรายละเอียดการย้อมอยู่ในภาคผนวก

3.6 นำสไลด์ถาวรที่ได้มาทำการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ ทางเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์

4. การประเมินการเปลี่ยนแปลงของพยาธิสภาพ

ในการประเมินการเปลี่ยนแปลงของพยาธิสภาพจะใช้เกณฑ์การให้คะแนน ซึ่งจะมีช่วงคะแนนตั้งแต่ – ถึง +++ ดังนี้

-	หมายถึง	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง
+	หมายถึง	มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย (น้อยกว่า 30%)
++	หมายถึง	มีการเปลี่ยนแปลงเล็กปานกลาง (ระหว่าง 30% - 70%)
+++	หมายถึง	มีการเปลี่ยนแปลงมาก (มากกว่า 70%)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University