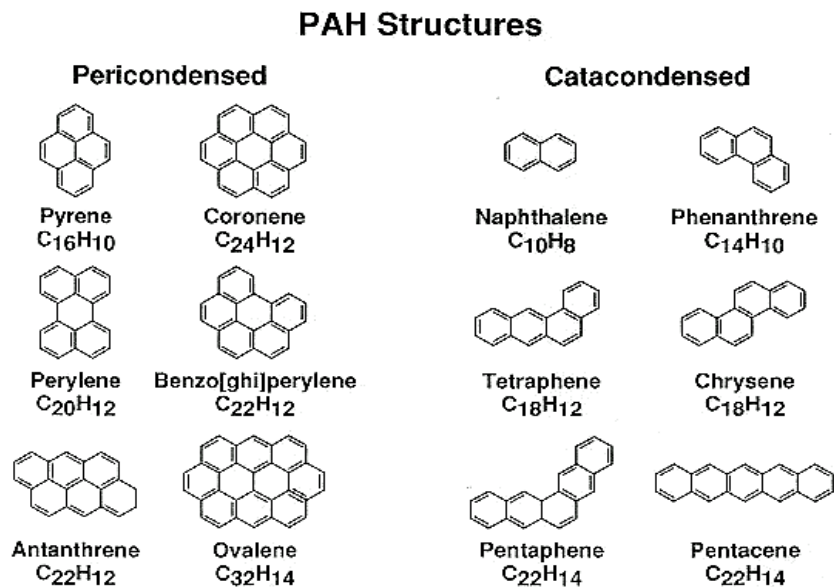


ภาคผนวก

1. โครงสร้างของ PAHs



ภาพผนวกที่ 1 โครงสร้างของ PAHs บางชนิด

ที่มา: Furton and Pentzke (1998)

2. สถานีเก็บตัวอย่างปลาจากแม่น้ำโขง



ภาพผนวกที่ 2 สถานีเก็บตัวอย่างปลาจากแม่น้ำโขง

3. ตัวอย่างปลาจากแม่น้ำโขง

ตัวอย่างปลาทั้งปลาไม่มีเกล็ดและปลามีเกล็ด จำนวนทั้งสิ้น 117 ตัว 31 ชนิด ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ จำแนกชนิดตาม ชวลิต และคณะ (2540) รายละเอียด ดังนี้

ตารางผนวกที่ 1 ชนิด จำนวน และความยาวของปลาจากแม่น้ำโขงในฤดูหนาวและฤดูร้อน

ฤดู	สถานที่เก็บ ตัวอย่าง	ชนิดปลาตัวอย่าง	จำนวน (ตัว)	ความยาว (เซนติเมตร)
หนาว	อ.เชียงแสน จ.เชียงราย	ปลาไม่มีเกล็ด		
		ปลาแค้ <i>Bagarius bagarius</i> (Hamilton, 1822)	2	-
	อ.เชียงคาน จ.เลย	ปลาไม่มีเกล็ด		
		ปลากด <i>Hemibagrus nemurus</i> (Val.in Cuv. & Val., 1839)	2	-
	อ.เมือง จ.นครพนม	ปลาไม่มีเกล็ด		
		ปลาเทพา <i>Pangasius sanitwongsei</i> (Smith, 1931)	2	-
		ปลาค้าง <i>Hemibagrus wyckioides</i> (Chaux & Fang, 1949)	1	-
ร้อน	อ.เชียงแสน จ.เชียงราย	ปลาไม่มีเกล็ด		
		ปลาเค้า <i>Wallago attu</i> (Schneider, 1801)	2	48.0, 48.0
		ปลาสร้อย <i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (Sauvage, 1878)	1	40.0
		ปลาค้าง <i>H. wyckioides</i>	1	41.0
		ปลาแค้ <i>B. bagarius</i>	1	31.0
		ปลาเนื้ออ่อน <i>Ompok hypophthalmus</i> (Bleeker, 1846)	1	-
		ปลากด <i>H. nemurus</i>	1	12.0

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ) ชนิด จำนวน และความยาวของปลาจากแม่น้ำโขงในฤดูหนาวและฤดูร้อน

ฤดู	สถานที่เก็บ ตัวอย่าง	ชนิดปลาดังกล่าว	จำนวน (ตัว)	ความยาว (เซนติเมตร)
ร้อน	อ.เชียงแสน จ.เชียงราย	ปลาไม่มีเกล็ด		
		ปลาตะเพียน <i>Barbodes gonionotus</i> (Bleeker, 1850)	1	-
	อ.เชียงคาน จ.เลย	ปลาไม่มีเกล็ด		
		ปลาทราย <i>P. hypophthalmus</i>	2	-
		ปลาเผา <i>Pangasius conchophilus</i> (Roberts & Vidthayanon, 1991)	2	47.7, -
		ปลาคัง <i>H. wyckioides</i>	2	31.4, -
		ปลาบู่ <i>Oxyeleotris marmorata</i> (Bleeker, 1858)	3	20.3,22.0,22.5
		ปลาไม่มีเกล็ด		
		ปลาปากหนวด <i>Hypsibarbus vernayi</i> (Norman, 1925)	3	41.0,43.5,44.3
		ปลาขี้สกลไทย <i>Probarbus jullieni</i> (Suavage, 1880)	6	24.5,24.8,27.8, 28.4,36.2,38.2
		ปลาไน <i>Cyprinus caprio</i> (Linnaeus, 1758)	2	36.5,37.2
		ปลาลูกแก <i>Cirrhinus chinensis</i> (Gunther, 1868)	3	21.9,22.3,24.0
		ปลาตะเพียน <i>B. gonionotus</i>	5	26.8,29.0,29.4, 30.0,32.3
		ปลาตะเพียนทอง <i>Barbodes altus</i> (Gunther, 1868)	3	20.9,23.0,23.3
		ปลากาดำ <i>Morulius chrysophekadian</i> (Bleeker, 1850)	3	28.4,31.3,33.5

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ) ชนิด จำนวน และความยาวของปลาจากแม่น้ำโขงในฤดูหนาวและฤดูร้อน

ฤดู	สถานที่เก็บ ตัวอย่าง	ชนิดปลาดังกล่าว	จำนวน (ตัว)	ความยาว (เซนติเมตร)
ร้อน	อ.บึงกาฬ จ.หนองคาย	ปลาไม่มีเกล็ด		
		ปลาขบ <i>Belodontichthys truncatus</i> (Bleeker, 1935)	1	56.3
		ปลาสวายหนู <i>Helicophagus waandersii</i> (Bleeker, 1858)	3	30.1,30.6,32.2
		ปลาคัง <i>H. wyckioides</i>	1	76.2
	อ.เมือง จ.นครพนม	ปลาไม่มีเกล็ด		
		ปลายาง <i>Panganius bocourti</i> (Sauvage, 1880)	7	21.3,22.2,22.3,25.6, 30.6,30.7,32.0
		ปลาคัง <i>H. wyckioides</i>	5	30.2,30.7,35.5, 39.6,45.6
		ปลานาง <i>Micronema apogon</i> (Bleeker, 1851)	2	24.7,24.7
		ปลายอน <i>Pteropangasius pleurotaenia</i> (Sauvage, 1878)	7	19.8,20.3,20.4,21.7, 21.8,21.9,22.3
		ปลาเทพา <i>P. sanitwongsei</i>	2	28.1,35.0
		ปลาไม่มีเกล็ด		
		ปลาตะเพียน <i>B. gonionotus</i>	4	20.1,20.9,23.5,23.9
		ปลาตะเพียนทอง <i>B. altus</i>	1	18.4
		ปลากาดำ <i>M. chrysophekadian</i>	1	22.5
	อ.โขงเจียม จ.อุบลราชธานี	ปลาไม่มีเกล็ด		
		ปลาแค้ <i>B. bagarius</i>	1	21.2
		ปลาเทโพ <i>Pangasius larnaudii</i> (Bocourt, 1866)	1	26.0
		ปลายอน <i>P. pleurotaenia</i>	1	22.6

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ) ชนิด จำนวน และความยาวของปลาจากแม่น้ำโขงในฤดูหนาวและฤดูร้อน

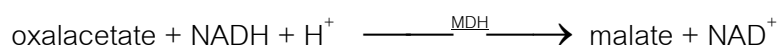
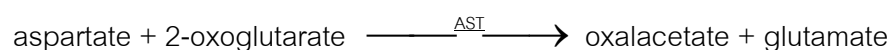
ฤดู	สถานที่เก็บ ตัวอย่าง	ชนิดปลาดตัวอย่าง	จำนวน (ตัว)	ความยาว (เซนติเมตร)
ร้อน	อ.โขงเจียม จ.อุบลราชธานี	ปลาไม่มีเกล็ด (ต่อ)		
		ปลาเทพา <i>P. sanitwongsei</i>	3	13.6,13.8,21.8
		ปลากด <i>H. nemurus</i>	3	14.8,22.4,25.9
		ปลาหมอหางแดง <i>Botia eos</i> (Taki, 1972)	2	14.6,16.8
		ปลาหมอสี <i>Botia helodes</i> (Sauvage, 1876)	3	14.5,16.8, -
		ปลาไม่มีเกล็ด		
		ปลาตะเพียน <i>B. gonionotus</i>	4	16.6,17.8,15.9,14.6
		ปลาขี้สกไทย <i>P. jullieni</i>	1	13.3
		ปลาสร้อย <i>Henicorhynchus siamensis</i> (Sauvage, 1881)	3	13.7,18.4,18.4
		ปลาสนาก <i>Raiamus guttatus</i> (Day, 1869)	4	14.9,15.2,17.2,21.8
		ปลาตะเพียนทอง <i>B. altus</i>	2	16.7,14.5
		ปลากะทิงเหว <i>Xenentodon cancila</i> (Hamilton, 1822)	1	22.8
		ปลาสร้อยข้างลาย <i>Labiobarbus siamensis</i> (Sauvage, 1881)	1	14.1
		ปลากทราย <i>Chitala ornata</i> (Gray, 1831)	1	41.3
		ปลาเสือพ่นน้ำ <i>Toxotes chatareus</i> (Hamilton, 1822)	1	18.0
		ปลาเลื้อย <i>Datnioides undecimradiatus</i> (Roberts & Kottelat, 1994)	2	15.4,15.5

หมายเหตุ : - ไม่ได้วัดความยาวของตัวอย่างปลา

4. วิธีการตรวจสอบแอกติวิตีของเอนไซม์

4.1 Glutamic oxalacetic transaminase (GOT) (IFCC, 1986a)

หลักการ คือ GOT เคลื่อนย้ายกรดอะมิโนจาก 2-oxoglutarate ได้ oxalacetate และ oxalacetate ถูก reduce เป็น malate วัดหา NADH ที่ลดลงจากปฏิกิริยา



สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

4.1.1 สารเคมี

tris	121.00 mmol/L
L-aspartate	362.00 mmol/L
malate dehydrogenase	>460.00 U/L
lactate dehydrogenase	>660.00 U/L
pH	7.8

4.1.2 สารเคมี

NADH	1.3 mmol/L
2-ketoglutarate	75.0 mmol/L
sodium azide	0.95 g/dL

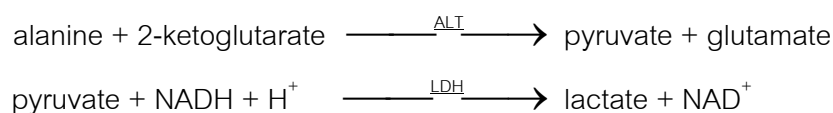
วิธีการตรวจสอบแอกติวิตีของเอนไซม์ทำได้โดยนำ working reagent ซึ่งเตรียมจากสารเคมีในข้อ 4.1.1 และ 4.1.2 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เติมลงใน cuvette set blank ด้วย working reagent เท่ากับ 0 วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer จากนั้นดูดซีรัมเฉพาะส่วนที่ใส่ไว้ใน cuvette ผสมกับ working reagent ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงมาคำนวณหาแอกติวิตีของเอนไซม์ต่อหน่วย

$$\text{concentration (U/L)} = \frac{\Delta A / \text{min} \times TV \times 1000}{6.3 \times SV \times P}$$

เมื่อ ΔA = ค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลง
 TV = ปริมาตรของสารละลายทั้งหมด (ml)
 SV = ปริมาตรของซีรัม (ml)
 EF = Extinction coefficient of NADH at 340 nm = 6.3
 P = ความกว้างของ cuvette

4.2 Glutamic pyruvic transaminase (GPT) (IFCC, 1986b)

หลักการ คือ GPT เคลื่อนย้ายกรดอะมิโนจาก 2-ketoglutarate ได้ pyruvate และ pyruvate ถูก reduce เป็น lactate วัดหา NADH ที่ลดลงจากปฏิกิริยา



สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

4.2.1 สารเคมี

tris	150.00 mmol/L
L-alanine	750.00 mmol/L
lactate dehydrogenase	>1350.00 U/L
pH	7.3

4.2.2 สารเคมี

NADH	1.3 mmol/L
2-ketoglutarate	75.0 mmol/L
sodium azide	0.95 g/dL

วิธีการตรวจสอบแอกติวิตีของเอนไซม์ทำได้โดยนำ working reagent ซึ่งเตรียมจากสารเคมีในข้อ 4.2.1 และ 4.2.2 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เติมลงใน cuvette

set blank ด้วย working reagent เท่ากับ 0 วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer จากนั้นดูดซึ้ร้่มเฉพาะส่วนที่ใส่ไว้ใน cuvette ผสมกับ working reagent ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร นำค่าการดูดแสงที่ เปลี่ยนแปลงมาคำนวณหาแอกติวิตีของเอนไซม์ต่อมาที่

$$\text{concentration (U/L)} = \frac{\Delta A / \text{min} \times TV \times 1000}{6.3 \times SV \times P}$$

เมื่อ	ΔA	= ค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลง
	TV	= ปริมาตรของสารละลายทั้งหมด (ml)
	SV	= ปริมาตรของซึ้ร้่ม (ml)
	EF	= Extinction coefficient of NADH at 340 nm = 6.3
	P	= ความกว้างของ cuvette

5. การเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อผ่านขั้นตอนทางพาราฟินเทคนิค (Humason, 1979)

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
1	70 % alcohol	5
2	70 % alcohol	2
3	80 % alcohol	1
4	80 % alcohol	1
5	95 % alcohol	1
6	95 % alcohol	1
7	100 % alcohol	1
8	100 % alcohol	1
9	xylene I	1
10	xylene II	1
11	paraplast I	1.5
12	paraplast II	1.5

6. การเตรียมสารเคมี และวิธีการย้อมสีทางพาราฟินเทคนิค

6.1 น้ำยาคงสภาพ

น้ำยาล้างเนื้อเยื่อก่อนคงสภาพ

normal saline (NaCl) 0.9 เปอร์เซนต์

น้ำยาคงสภาพ neutral buffered formalin solution (Drury *et al.*, 1967)

formalin (30-40 เปอร์เซนต์ formaldehyde) 100.00 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 900.00 มิลลิลิตร

sodium phosphate monobasic (NaH_2PO_4) 4.00 กรัม

sodium phosphate dibasic (anhydrous) (Na_2HPO_4) 6.50 กรัม

ผสมเข้าด้วยกัน

คุณสมบัติ : เป็นที่นิยมใช้กันทั่วไปตามห้องปฏิบัติการ เหมาะสำหรับการรักษาสภาพเนื้อเยื่อทั่วไป ทั้งที่ต้องการย้อมสีธรรมดาและสีพิเศษ formalin เป็นตัวคงสภาพโปรตีนในไซโทพลาซึม ระยะเวลาในการรักษาสภาพประมาณ 24 ชั่วโมง หรือถ้าจำเป็นต้องรักษาสภาพไว้นานกว่านี้ก็ยังใช้ได้ ล้างออกด้วยน้ำไหลประมาณ 6 ชั่วโมง (Humason, 1979)

6.2 สีย้อม Harris's hematoxylin และ Eosin (Luna, 1960)

6.2.1 Harris's hematoxylin

hematoxylin crystal 5.00 กรัม

absolute alcohol 50.00 มิลลิลิตร

ammonium alum 100.00 กรัม

mercuric oxide (red) 2.50 กรัม

น้ำกลั่น 1000.00 มิลลิลิตร

ต้มน้ำกลั่นในปิกเกอร์ขนาด 1,500 มิลลิลิตร ให้เดือด เติม ammonium หรือ potassium alum คนให้ละลาย ละลายผง hematoxylin ใน absolute alcohol ในปิกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเติมลงในสารละลาย ammonium หรือ potassium alum ที่กำลังเดือด คนให้เข้ากัน ต้มต่อไป

อีก 30 วินาที ยกลงแช่ในน้ำเย็น และเติม mercuric oxide ลงไปอย่างช้า ๆ ที่ละน้อย ไม่ควรเติมที่เดียวหมด เพราะจะกระเด็นซึ่งอาจเกิดอันตรายได้เนื่องจากเกิดปฏิกิริยารุนแรง คนสารละลายให้เข้ากัน จนกระทั่งได้สารละลายสีม่วงน้ำเงินเข้ม ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเทใส่ขวดสีน้ำตาล เก็บไว้นาน 1 สัปดาห์ หรือใช้ได้เลยหลังจากที่สารละลายเย็นแล้ว สารละลายนี้เก็บไว้ได้นานประมาณ 6 เดือน ในที่มีด ก่อนใช้เติม glacial acetic acid 2-4 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย 100 มิลลิลิตร เพื่อช่วยให้ hematoxylin เปลี่ยนเป็น hematein อย่างช้า ๆ ทำให้นิวเคลียสติดสีดีขึ้น

6.2.2 การเตรียม Eosin

ก. 1% stock alcohol Eosin

Eosin Y	1.00 กรัม
น้ำกลั่น	20.00 มิลลิลิตร
ละลายเข้าด้วยกันแล้วจึงเติม 95% alcohol	80.00 มิลลิลิตร

ข. working Eosin solution

Eosin stock solution	1 ส่วน
80% alcohol	3 ส่วน

ก่อนใช้ให้เติม glacial acetic acid 1-1.5 มิลลิลิตร ต่อสี 100 มิลลิลิตร แล้วคนให้เข้ากัน เพื่อการติดสีของ Eosin ที่จับกับไซโทพลาซึม

6.2.3 acid alcohol 1%

70% alcohol	1000.00 มิลลิลิตร
hydrochloric acid	10.00 มิลลิลิตร

6.2.4 ammonium water 0.2%

tap water	1000.00 มิลลิลิตร
ammonium hydroxide 28%	2.00 มิลลิลิตร

7. วิธีย้อมสี Harris's hematoxylin-Eosin (Luna, 1960)

นำ paraffin section ผ่านขั้นตอนการย้อมสีดังนี้

- 7.1 deparaffinized โดยจุ่มใน xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
- 7.2 hydration ใน 100%alcohol, 95%alcohol, 70%alcohol และน้ำกลั่นครั้งละ 2 นาที
- 7.3 ย้อมสี Harris's hematoxylin 5 นาที
- 7.4 ล้างในน้ำประปาที่ไหลจนแผ่นเนื้อเยื่อเป็นสีน้ำเงิน 5-10 นาที
- 7.5 differentiate ใน acid alcohol 1% โดยจุ่ม (dip) 1-2 ครั้ง
- 7.6 แช่ในน้ำประปาที่ไหล 5 นาที
- 7.7 จุ่มใน ammonium water solution 1 นาที
- 7.8 แช่ในน้ำประปาที่ไหล 5 นาที
- 7.9 ย้อมสี Eosin นาน 1-2 นาที
- 7.10 differentiate ใน 70%alcohol แล้วยกขึ้นอย่างรวดเร็ว
- 7.11 dehydrate ใน 95%alcohol, 100%alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที เพื่อขจัดน้ำ
- 7.12 clearing ใน xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
- 7.13 ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ผืนกให้แน่นด้วยน้ำยา permount ทิ้งไว้ให้แห้ง ก่อนที่จะ

นำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพต่อไป

ผล : นิวเคลียส ย้อมติดสีม่วงน้ำเงิน หรือน้ำเงิน

ไซโทพลาซึม ย้อมติดสีชมพูถึงส้มแดง