บทที่ 2
วิธีการดำเนินการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง การทดลองที่ 1 เป็นการศึกษาผลของอุณหภูมิน้ำต่อค่าทางโลหิตวิทยา และ lipid peroxidation ที่ตับ และ ไต เพื่อเป็นการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำต่อการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยาและการเกิดอนุมูลอิสระในอวัยวะที่สำคัญต่อเมตาบอลิซึมและภูมิคุ้มโรค การทดลองที่ 2 เป็นการศึกษาผลของการเสริมวิตามินซีต่อปลาดุกลูกผสมในสภาวะน้ำที่อุณหภูมิต่ำ โดยเลือกการทดสอบอุณหภูมิน้ำต่ำที่มักจะเกิดขึ้นในฤดูหนาวในบางพื้นที่ เช่น ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และการทดลองที่ 3 เป็นการศึกษาผลของการเสริมวิตามินอีต่อปลาดุกลูกผสมในสภาวะน้ำอุณหภูมิต่ำ ทั้งสามการทดลองดำเนินการที่ฟาร์มหาวิทยาลัย แผนกสัตว์น้ำ (ฟาร์ม มทส.) และ อาคารศูนย์เครื่องมือ 1 และ 3

การทดลองที่ 1 ผลของอุณหภูมิน้ำต่อค่าทางโลหิตวิทยา และ ค่า Lipid peroxidation ที่ตับและไต

1. แผนการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้เป็นการเปรียบเทียบค่าทางโลหิตวิทยา และ ค่า Lipid peroxidation ของปลาดุกลูกผสมที่อุณหภูมิน้ำที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 26, 30 และ 34 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design) ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มทดลอง 3 กลุ่มทดลองที่อุณหภูมิน้ำแตกต่างกัน 3 ระดับ ดังนี้

กลุ่มทดลอง	อุณหภูมิน้ำ (^{o}C)
1	26
2	30
3	34

2. ปลาทดลอง และการทดสอบอุณหภูมิน้ำ

ปลาดุกที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นปลาดุกลูกผสม (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*) ได้จากฟาร์ม มทส. ขนาดประมาณ 50-60 กรัม เริ่มการทดลองโดยทำการเลี้ยงปลาในตู้ทดลอง เพื่อปรับสภาพ จำนวนตู้ละ 18 ตัว ตู้ทดลองที่ใช้ในครั้งนี้มีขนาด 60 * 30 * 45 ลูกบาศก์เซนติเมตร (กว้าง * ยาว * สูง) เลี้ยงปลาดุกลูกผสมแบบให้อากาศในน้ำตลอดเวลา เป็นระยะเวลา 1

เดือน ให้อาหารวันละ 2 ครั้งแบบ ให้กินแบบเต็มที่ ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำในตู้ปลาทุก ๆ 3 วัน ทำการบันทึกอุณหภูมิน้ำในระหว่างที่ทำการให้อาหาร อุณหภูมิน้ำตลอดการเลี้ยงอยู่ในช่วง 28-30 องศาเซลเซียส

หลังจากปรับสภาพการเลี้ยง นำปลามาทดสอบอุณหภูมิน้ำ ที่ 24, 30 หรือ 34 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างเลือดและอวัยวะเพื่อวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยาและค่า lipid peroxidation ที่เวลา 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง

-

3. การเก็บตัวอย่างเลือด และอวัยวะ

หลังจากที่ปลาของแต่ละกลุ่มทดลองผ่านการทดสอบอุณหภูมิน้ำ แล้วทำการสลบปลาด้วยการนำปลาไปแช่ในน้ำที่มี phenoxy ethanol ที่ระดับความเข้มข้น 300 mg/L ทำการเก็บตัวอย่างเลือดปลา โดยใช้เข็มขนาด 21 g เจาะเลือดที่เส้นเลือด dorsal aorta ใส่ในหลอดที่มี 15 % Na_2EDTA ในปริมาตร 2.0 % ของปริมาณเลือดเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยา จากนั้นทำการผ่าช่องท้องปลาเพื่อเก็บตับและไต

4. การวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยา

การวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยาทำในตัวอย่างเลือดที่มี EDTA

4.1 การนับจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด (Total red blood cell count)

ทำการเจือจางเลือดแดงให้ได้สัดส่วน 1:200 แล้วหยดสารละลายเลือดลงใน Hemocytometer แล้วทิ้งไว้สักครู่หนึ่งจนสารละลายเซลล์เม็ดเลือดหยุดนิ่ง ทำการนับจำนวนเม็ดเลือดแดง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยนับจากสี่เหลี่ยมจัตุรัส 5 ช่อง (medium-sized square) คำนวณจำนวนเม็ดเลือดแดงต่อ 1 ไมโครลิตรของเลือด (mm^3) ได้เท่ากับ จำนวนเม็ดเลือดแดงที่นับได้ x 10,000

4.2 การวิเคราะห์ค่าฮีโมโกลบิน (Hemoglobin concentration; Hb)

วิเคราะห์ค่าฮีโมโกลบินในเลือดโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ Advia® 60 hematology system (Bayer Healthcare, NY)

4.3 การวิเคราะห์ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Pack cell volume)

ใช้หลอด microcapillary tube ดูดเลือดตัวอย่าง แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วอ่านค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%) ด้วย microhematocrit reader

4.4 การคำนวณค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดง

ด้วยสูตรการคำนวณที่รายงานใน (Rodak et al., 2007) ดังนี้

ค่าดัชนีเม็ดเลือด	หน่วย	การคำนวณ
Mean corpuscular volume (MCV)	femtoliters (fL)	ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%) x (10/จำนวนเม็ดเลือดแดง ($x10^{12}$/L))
Mean corpuscular hemoglobin (MCH)	Picogram (pg)	ฮีโมโกลบิน (g/dL) x (10/จำนวนเม็ดเลือดแดง($x10^{12}$/L))
Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)	g/dL	ฮีโมโกลบิน (g/dL) x (100/ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%))

5. การวิเคราะห์ Nitroblue tetrazolium (NBT)

เป็นการวิเคราะห์ superoxide anion (O_2^-) ที่เกิดขึ้นจากกิจกรรม Respiratory burst ของเม็ดเลือดขาว ตามวิธีของ Taoka et al. (2006) การวัดจะเป็นการวัดค่าการลดลงของ nitroblue tetrazolium:NBT ซึ่งถูกเปลี่ยนเป็น formazan โดย superoxide anion (O_2^-) ที่เกิดขึ้น

ผสมเลือดตัวอย่าง 100 ไมโครลิตรกับสารละลาย 0.2 % NBT 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วดูดสารลายผสมของเลือดและ NBT 100 ไมโครลิตรใส่ในหลอดแก้วที่มี dimethyl formamide (DMF) 2.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วอ่านการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ DMF เป็น blank

6. การวิเคราะห์ค่า Lipid peroxidation ในตับและไต ของปลาดุกลูกผสม

ชั่งตัวอย่างเนื้อเยื่อตับหรือไต แล้วเติมบัฟเฟอร์ 20 mM PBS pH 7.4 ที่แช่เย็นลงในตัวอย่างตับหรือไต ในอัตราส่วน 10 มิลลิลิตรต่อเนื้อเยื่อตัวอย่าง 1 กรัม แล้วเติม 0.5 M BHT ในอัตราส่วน 10 ไมโครลิตรต่อ1 มิลลิลิตรของบัฟเฟอร์ที่ผสมกับเนื้อเยื่อ เพื่อป้องกันการเกิดออกซิเดชัน ทำการบดตัวอย่างเนื้อเยื่อในน้ำแข็ง

จากนั้นนำสารสกัดไปปั่นเพื่อแยกตะกอนเนื้อเยื่อ แยกเอาส่วนใสของสารสกัดมาวัดค่าความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้ชุดทดสอบ Colorimetric Lowry micro-method (Sigma) เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ค่า lipid peroxidation

การศึกษาครั้งนี้ใช้การวิเคราะห์ค่า lipid peroxidation โดยการวิเคราะห์ malondialdehyde (MDA) และ 4-hydroxyalkenals (HAE) โดยการใช้ชุดทดสอบ Lipid Peroxidiation Microplate Assay Kit (Oxford Biomedical Research) ค่าที่ได้แสดงในรูปของ (nmol/mg protein)

7. การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติในครั้งนี้ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for windows, version 10 (SPSS Inc, Chicago, IL) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มทดลองโดยวิธี Duncan 's multiple range test และยอมรับผลความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$

การทดลองที่ 2 ผลของการเสริมวิตามินซีต่อค่าทางโลหิตวิทยาและภูมิต้านทานโรคแบบไม่จำเพาะเจาะจงในสภาวะน้ำอุณหภูมิต่ำ

1. แผนการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design) ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มทดลอง 5 กลุ่มทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมวิตามินซีที่แตกต่างกัน 5 ระดับ แต่ละกลุ่มทดลองประกอบด้วยจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ โดยมีการจัดกลุ่มทดลองตามระดับวิตามินซี ดังนี้

กลุ่มทดลอง	ระดับวิตามินซีที่เสริมในอาหาร (mg/kg)
1	250
2	500
3	1000
4	1500
5	2000

2. อาหารทดลอง

อาหารทดลองในครั้งนี้ผลิตที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี แผนกสัตว์น้ำ (ฟาร์ม มทส.) วัตถุดิบที่ใช้ในการทำผลิตอาหาร แสดงดังตารางที่ 2.1 โดยจัดซื้อจากแหล่งจำหน่ายวัตถุดิบอาหาร ในจังหวัดนครราชสีมา ทำการชั่งวัตถุดิบอาหารตามสัดส่วนที่แสดงในตารางที่ 2.1

แล้วนำมาบด ด้วยเครื่องบดวัตถุดิบแบบแห้ง นำเข้าเครื่องผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหารแบบลอยน้ำ ตรวจสอบการลอยน้ำของเม็ดอาหาร จากนั้นนำอาหารเม็ดเข้าอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีในอาหาร

ตารางที่ 2.1 สัดส่วนของวัตถุดิบในอาหารปลาดุกลูกผสม และองค์ประกอบทางเคมี

วัตถุดิบอาหาร	เปอร์เซ็นต์
ปลาป่น	36.0
กากถั่วเหลือง	25.0
ปลายข้าว	14.5
รำข้าว	12.0
มันเส้น	10.0
น้ำมันถั่วเหลือง	2.5
องค์ประกอบทางเคมี	
วัตถุแห้ง	91.85
โปรตีน	28.29
ไขมัน	8.41
เถ้า	10.37
ไฟเบอร์	3.55
Nitrogen free extract[ก]	31.23
พลังงานรวม[ข] (kcal/kg)	4241.69

[ก]Nitrogen free extract (NFE) (%) =

100 - (ความชื้น (%) + โปรตีน (%) + ไขมัน (%) + เถ้า (%) + ไฟเบอร์ (%))

[ข]พลังงานรวม (kcal/kg) (NRC, 1993) =

10 x (โปรตีน x 5.65 (kcal/g)) + (ไขมัน x 9.45 (kcal/g)) + (NFE x 4.11 (kcal/g))

นำอาหารเม็ดที่ใช้ในการทดลองมาเสริมวิตามินตามระดับที่ได้กำหนดไว้ โดยวิตามินซีที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ จะอยู่ในรูปของ L-ascorbyl-2-monophosphate (Stay C-35, Hofmann-La Roche, Basel, Switzerland) โดยการละลาย L-ascorbyl-2-monophosphate ตามระดับที่กำหนดในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 60 มิลลิลิตรต่ออาหารปลา 1 กิโลกรัม ผสมคลุกเคล้าให้ทั่ว แล้วนำมาเคลือบเม็ดอาหารด้วยน้ำมันพืช (น้ำมันถั่วเหลือง) ในอัตรา 2.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการตรวจสอบระดับ

วิตามินซีในอาหาร ผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 2.2โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC อาหารที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จะเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 2.2 ระดับการเสริมอนุพันธ์วิตามินซี L-ascorbyl-2-monophosphate และปริมาณที่วิเคราะห์ได้ในอาหารปลาดุกลูกผสมของแต่ละกลุ่มทดลอง

กลุ่มทดลอง	ระดับวิตามินซีที่เสริมในอาหาร (mg/kg)	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ในอาหาร (mg/kg)
1	250	276.50
2	500	574.57
3	1000	1191.60
4	1500	1492.51
5	2000	2014.54

3. ปลาทดลอง ระบบการเลี้ยงปลา และการให้อาหารในระหว่างการทดลอง

ปลาดุกที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นปลาดุกลูกผสม (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*) ได้จากฟาร์ม มทส. ขนาดประมาณ 14-16 กรัม เริ่มการทดลองโดยทำการสุ่มปลาทดลองลงในตู้ทดลอง จำนวนตู้ละ 18 ตัว ตู้ทดลองที่ใช้ในครั้งนี้มีขนาด 60 * 30 * 45 ลูกบาศก์เซนติเมตร (กว้าง * ยาว * สูง) เลี้ยงปลาดุกลูกผสมแบบให้อากาศในน้ำตลอดเวลา

ทำการเลี้ยงปลาเพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ด้วยอาหารพื้นฐานที่ไม่ได้เสริมวิตามินซี แล้วจึงเริ่มเลี้ยงปลาด้วยอาหารตามสูตรที่กำหนด โดยให้อาหารวันละ 2 ครั้งแบบ ให้กินแบบเต็มที่ ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำในตู้ปลาทุก 3 วัน ทำการบันทึกอุณหภูมิน้ำในระหว่างที่ทำการให้อาหาร อุณหภูมิน้ำตลอดการเลี้ยงอยู่ในช่วง 28-30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการเลี้ยงปลาทดลอง 8 สัปดาห์ โดยทำการบันทึกน้ำหนักปลา และน้ำหนักอาหารที่ปลาได้รับเมื่อสิ้นสุดสัปดาห์ที่ 4 และสัปดาห์ที่ 8 ตลอดระยะเวลาการทดลอง ถ้าพบปลาตายนำออกและทำการบันทึกข้อมูล

4. การวิเคราะห์วิตามินซี

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินในอาหารปลาทดลองและในตับของตัวอย่างปลาที่ได้รับอาหารทดลอง

4.1 การสกัดวิตามินซีจากอาหารปลาทดลอง

การสกัดวิตามินซีในอาหารได้ทำตามวิธีการวิเคราะห์ที่ได้รายงานโดยบริษัทผู้ผลิต Stay C-35 (Roche) โดยมีการดัดแปลงให้เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการดังรายละเอียดต่อไปนี้ นำอาหารที่ต้องการวิเคราะห์มาประมาณ 5 กรัม ชั่งให้ได้น้ำหนักแน่นอน บดให้ละเอียดแล้วนำไปสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (388 mM phosphate buffer pH 3.0) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารสกัดไปปั่นที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที นำสารละลายส่วนใสมากรองผ่าน syringe filter (0.45 µm) ก่อนนำไปวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีด้วยเครื่อง HPLC

4.2 การสกัดวิตามินซีจากตัวอย่างตัวปลา

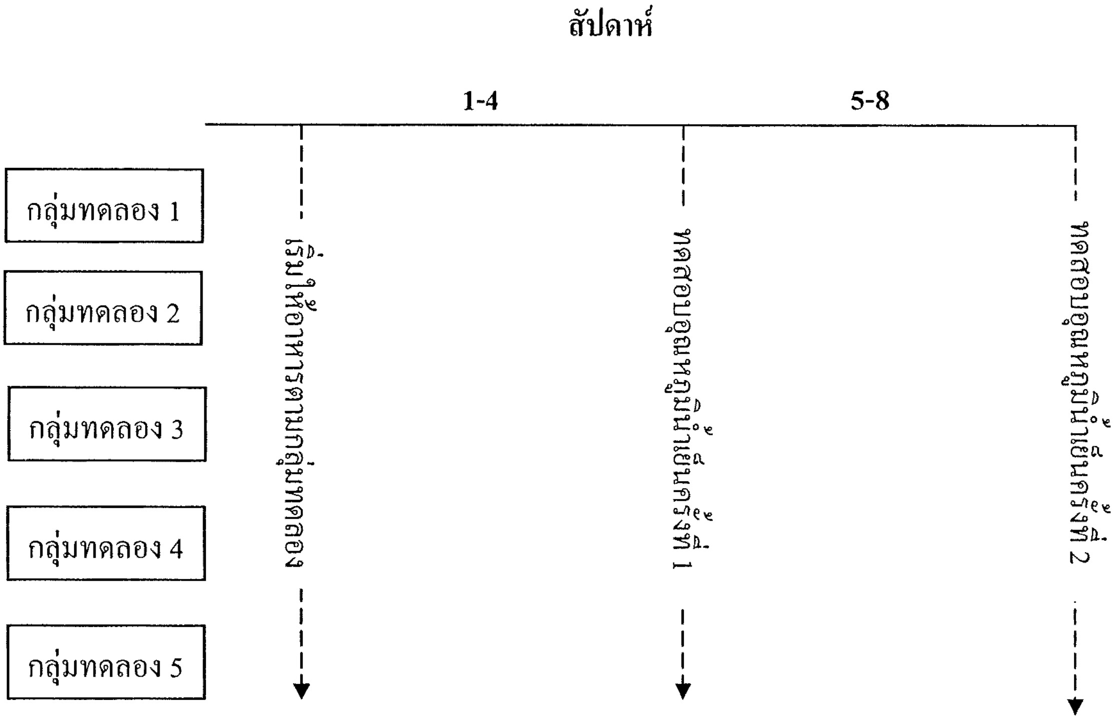
ทำการเก็บตัวอย่างตับปลาสำหรับวิเคราะห์วิตามินซี หลังจากปลาทดลองได้รับอาหารของแต่ละกลุ่มทดลองเป็นเวลา 20, 40 และ 60 วัน โดยทำการสุ่มปลาครั้งละ 3 ตัวต่อซ้ำของกลุ่มทดลอง นำตับปลาออกมาจากตัวอย่างปลาที่สุ่ม ชั่งน้ำหนัก แล้วบดตับตัวอย่างในบัฟเฟอร์ (388 mM phosphate buffer pH 3.0) ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อตับปลา 1 กรัม ในน้ำแข็ง แล้วนำไป sonication 3 นาที ในน้ำแข็ง จากนั้นนำสารสกัดไปปั่นที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที นำสารละลายส่วนใสมากรองผ่าน syringe filter (0.45 µm) ก่อนนำไปวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีด้วยเครื่อง HPLC

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีด้วยเครื่อง HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี ทำโดยใช้ reverse phase HPLC (HP 1100) C18 column (4.6 mm ID x 250 mm) วิเคราะห์ด้วย UV-detector (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร) mobile phase ได้แก่ สารละลายผสมของ Eluent1/Eluent2 ในอัตราส่วน 3:7 (Eluent 1 : 79 mM potassium dihydrogen phosphate, 0.2 % 1,5-dimethylhexylamine, pH3; Eluent 2: 98 ml Acetonitrile, 42 ml ethanol)

5. การทดสอบปลาดุกในสภาวะที่น้ำอุณหภูมิต่ำ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาผลของการเสริมวิตามินซีในอาหารต่อปลาดุกเมื่ออยู่ในสภาพที่อุณหภูมิน้ำ 19 องศาเซลเซียส โดยสุ่มปลาดุกลูกผสมจากแต่ละตู้ทดลอง (ซ้ำ) จำนวน 3 ตัวต่อตู้ทดลอง แล้วนำปลาดุกลูกผสมมาทดสอบในน้ำอุณหภูมิ 19 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นการนำปลาดุกลูกผสมมาผ่านการลดอุณหภูมิน้ำอย่างรวดเร็ว (อัตราการเปลี่ยนอุณหภูมิ 0.1 องศาเซลเซียสต่อนาที) การศึกษาครั้งนี้ทำการทดสอบ 2 ครั้ง ได้แก่หลังจากเลี้ยงด้วยอาหารของแต่ละกลุ่มทดลองเป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ ดังแผนภาพดังนี้



6. การเก็บตัวอย่างเลือด

หลังจากที่ปลาของแต่ละกลุ่มทดลองผ่านการทดสอบอุณหภูมิน้ำ แล้วทำการสลบปลาด้วยการนำปลาไปแช่ในน้ำที่มี phenoxy ethanol ที่ระดับความเข้มข้น 300 mg/kg ทำการเก็บตัวอย่างเลือดปลา โดยใช้เข็มขนาด 21 g เจาะเลือดที่เส้นเลือด dorsal aorta แล้วแบ่งเลือดเป็นสองส่วน ส่วนที่หนึ่งใส่ในหลอดที่มี 15 % Na_2EDTA ปริมาตร 2.0 % ของปริมาณเลือดเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยาและเก็บตัวอย่างพลาสมา อีกส่วนหนึ่งใส่ในหลอดทดลองสำหรับเก็บซีรัมเพื่อให้เลือดแข็งตัว เก็บตัวอย่างพลาสมาโดยการปั่นที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที และเก็บตัวอย่างซีรัมโดยการปั่นที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง10 นาที ตัวอย่างพลาสมาและซีรัมจะเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

7. การวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยา

ทำการวิเคราะห์ จำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด ปริมาณฮีโมโกลบิน ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และคำนวณค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดง เช่นเดียวกับวิธีการที่อธิบายไว้ในข้อ 4 ของการทดลองที่ 1

ห้องสมุดงานวิจัย กรมการวิจัยฯ

7.5 การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว

นำตัวอย่างเลือดมาสเมียร์บนแผ่นสไลด์ แล้วย้อมด้วยสี Wright's Giemsa stain ทำการนับเม็ดเลือดขาวแบบแยกแยะชนิดเม็ดเลือดขาว (Monocyte, Neutrophil, Lymphocyte) จำนวน 100 เซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

8. การวิเคราะห์ค่าทางภูมิคุ้มกัน

8.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเลือด และ total immunoglobulin

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในพลาสมาทำโดยใช้ชุดทดสอบ colorimetric Lowry micro-method (Sigma) การวัดค่าปริมาณ total immunoglobulin ทำตามวิธีการที่ได้รายงานไว้ใน Siwicki et al. (1994) โดยการวิเคราะห์ทำโดยการตกตะกอนของ total immunoglobulin ด้วยสารละลาย 12 % polyethylene glycol แล้ววัดปริมาณโปรตีนของสารละลายหลังตกตะกอน ปริมาณ total immunoglobulin หาได้จากค่าความแตกต่างระหว่างปริมาณโปรตีนก่อนตกตะกอนและปริมาณโปรตีนหลังตกตะกอน

8.2 การวิเคราะห์ค่าการทำงานของไลโซไซม์

การวิเคราะห์ค่าการทำงานเอ็นไซม์ไลโซไซม์ตามวิธีการของ Kumari และ Sahoo (2006) ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบค่าการย่อยเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก *Micrococcus lysodeikticus* โดยตัวอย่างซีรัม กับการย่อยแบคทีเรีย *M. lysodeikticus* ด้วยสารละลายมาตรฐานไลโซไซม์ (hen egg white lysozyme (Sigma, St Louis, MO) ที่รู้ค่าความเข้มข้น ดังนี้

เตรียมสารละลายไลโซไซม์มาตรฐานในบัฟเฟอร์ 0.1 M phosphate citrate buffer (pH 5.8) ให้มีความเข้มข้น เท่ากับ 0, 2.5, 5, 7.5, 10.0, 12.5, และ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *M. lysodeikticus* ให้มีความเข้มข้น 75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในบัฟเฟอร์ 0.1 M phosphate citrate buffer (pH 5.8)

การสร้างกราฟมาตรฐานของระดับเอ็นไซม์ ทำได้โดยดูดสารละลายมาตรฐานไลโซไซม์ตามความเข้มข้นที่เตรียมไว้ 25 ไมโครลิตรลงในไมโครเพลท หรือหยดซีรัมตัวอย่าง 25 ไมโครลิตรลงในไมโครเพลทแต่ละช่อง จากนั้นหยดสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *M. lysodeikticus* 175 ไมโครลิตร ลงไปผสมกับสารละลายมาตรฐานหรือ ซีรัม จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ทุก ๆ 15 นาที แล้วเปรียบเทียบระดับไลโซไซม์ในซีรัมกับค่าการทำงานของสารละลายมาตรฐานไลโซไซม์

8.3 การวิเคราะห์ค่า alternative complement pathway

การวิเคราะห์ค่า alternative complement pathway ทำตามวิธีการของ Montero et al. (1998) ดังนี้ นำเม็ดเลือดแดงกระต่ายมาล้างด้วยสารละลาย GVB-EGTA (Gelatin Veranol Buffer; 10 mM batbital, 145 mM NaCl, 0.1 % gelatin, 0.5 mM $MgCl_2$, 10 mM EGTA, pH 7.3-7.4) 3 ครั้ง แล้วปรับความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงให้เท่ากับ 2 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในบัฟเฟอร์เดิม

ทำการเจือจางซีรัมของปลาดุกลูกผสมด้วย GVB-EGTA ให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 250 ไมโครลิตร ที่ระดับ 10 %, 5 %, 2.5 %, 1.25 % และ 0.625 % ใช้ GVB-EGTA ในหลอดที่จัดเป็นกลุ่ม spontaneous lysis และใช้น้ำกลั่นเป็นหลอดที่มีการ haemolysis 100 %

เติมสารละลายเม็ดเลือดแดงที่ปรับความเข้มข้นแล้ว 100 ไมโครลิตร ในหลอดที่มีซีรัม หลอดที่มีบัฟเฟอร์อย่างเดียว และหลอดที่มีน้ำกลั่นอย่างเดียว ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 90 นาที แล้วเติมสารละลาย NaCl 0.9 % ลงไปทุกหลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายข้างบนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

การคำนวณ hemolytic titer ดังนี้

OD'_{540} ของซีรัมที่แต่ละระดับการเจือจาง = ค่า OD_{540} ของซีรัม - ค่า OD_{540} ของ "spontaneous lysis"

OD'_{540} ของ "100 % hemolysis" = ค่า OD_{540} ของ "100 % hemolysis" - ค่า OD_{540} ของ "spontaneous

คำนวณ Percent lysis (y) ของแต่ละปฏิกิริยา

$$y = \frac{OD'_{540} \text{ ของแต่ละปฏิกิริยา}}{OD'_{540} \text{ ของ “100 \% hemolysis”}}$$

คำนวณ y/ (1-y) ของแต่ละปฏิกิริยา

- สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า y/(1-y) และ ปริมาตรของซีรัม
- หาค่า 1 CH_{50} คือค่าของปริมาตรของซีรัมที่ทำให้ได้ 50 % lysis (หรือ y/(1-y) = 1)

8.4 การวิเคราะห์ Nitroblue tetrazolium (NBT)

เป็นการวิเคราะห์ superoxide anion (O_2^-) ที่เกิดขึ้นจากกิจกรรม Respiratory burst ของเม็ดเลือดขาว ตามวิธีของ Taoka et al. (2006) การวัดจะเป็นการวัดค่าการลดลงของ nitroblue tetrazolium:NBT ซึ่งถูกเปลี่ยนเป็น formazan โดย superoxide anion (O_2^-) ที่เกิดขึ้น

ผสมเลือดตัวอย่าง 100 ไมโครลิตรกับสารละลาย 0.2 % NBT 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วดูดสารลายผสมของเลือดและ NBT 100 ไมโครลิตรใส่ในหลอดแก้วที่มี dimethyl formamide (DMF) 2.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วอ่านการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ DMF เป็น blank

9. การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติในครั้งนี้ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for windows, version 10 (SPSS Inc, Chicago, IL) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจากทุกกลุ่มทดลอง โดยรวมด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มทดลองโดยวิธี Duncan 's multiple range test ใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบ polynomial regression ในการวิเคราะห์แนวโน้มของปริมาณวิตามินซีต่อค่าทดสอบต่าง ๆ ในแบบเชิงเส้นตรง linear และ quadratic และยอมรับผลความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$

การทดลองที่ 3 ผลของการเสริมวิตามินอีในอาหารต่อค่าทางโลหิตวิทยาและภูมิคุ้มกันโรคแบบไม่จำเพาะเจาะจงในปลาดุกลูกผสมที่ถูกทดสอบด้วยสภาวะน้ำอุณหภูมิต่ำ

1. แผนการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ใช้แผนการทดลองแบบ split plot ในการจัดสิ่งทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Split Plot in Completely randomized design) โดย whole plot คือ ระดับวิตามินอีที่เสริมในอาหารที่แตกต่างกัน 4 ระดับ และมี subplot เป็นปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงอยู่ที่อุณหภูมิปกติ และปลาดุกลูกผสมที่ถูกทดสอบด้วยสภาวะน้ำอุณหภูมิต่ำ แต่ละกลุ่มทดลองประกอบด้วยจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ โดยมีแผนภาพแผนการทดลอง ดังนี้

Whole plot (ระดับวิตามินอี)	**0 mg/kg**		**125 mg/kg**		**250 mg/kg**		**500 mg/kg**	
Subplot อุณหภูมิน้ำ	อุณหภูมิปกติ	อุณหภูมิต่ำ	อุณหภูมิปกติ	อุณหภูมิต่ำ	อุณหภูมิปกติ	อุณหภูมิต่ำ	อุณหภูมิปกติ	อุณหภูมิต่ำ

2. อาหารทดลอง

อาหารทดลองในครั้งนี้ผลิตที่ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี แผนกสัตว์น้ำ (ฟาร์ม มทส.) วัตถุดิบที่ใช้ในการทำผลิตอาหาร แสดงดังตารางที่ 2.1 โดยจัดซื้อจากแหล่งจำหน่ายวัตถุดิบอาหาร ในจังหวัดนครราชสีมา และผลิตอาหารดังรายละเอียดในข้อ 2 ของการทดลองที่ 1 ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง แสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง

องค์ประกอบทางเคมี	เปอร์เซนต์
วัตถุแห้ง	92.02
โปรตีน	39.78
ไขมัน	8.70
เถ้า	10.61
ไฟเบอร์	3.61
Nitrogen free extract[ก]	29.32
พลังงานรวม[ข] (kcal/kg)	4274.77

[ก]Nitrogen free extract (NFE) (%) =

100 - (ความชื้น (%) + โปรตีน (%) + ไขมัน (%) + เถ้า (%) + ไฟเบอร์ (%))

[ข]พลังงานรวม (kcal/kg) (NRC, 1993) =

10 x (โปรตีน x 5.65 (kcal/g)) + (ไขมัน x 9.45 (kcal/g)) + (NFE x 4.11 (kcal/g))

นำอาหารเม็ดที่ใช้ในการทดลองมาเสริมวิตามินอีตามระดับที่ได้กำหนดไว้ โดยวิตามินอีที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ จะอยู่ในรูปของ tocopheryl acetate (Rovimix E 50, Hofmann-La Roche, Basel, Switzerland) โดยการละลาย tocopheryl acetate ตามระดับที่กำหนดในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 60 มิลลิลิตรต่ออาหารปลา 1 กิโลกรัม ผสมคลุกเคล้าให้ทั่ว แล้วนำมาเคลือบเม็ดอาหารด้วยน้ำมันพืช (น้ำมันถั่วเหลือง) ในอัตรา 2.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการตรวจสอบระดับวิตามินอีในอาหารโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC อาหารที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จะเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การวิเคราะห์วิตามินอีในอาหารทดลอง

3.1 การสกัดวิตามินอีจากอาหารปลาทดลอง

การสกัดวิตามินอีในอาหารได้ทำตามวิธีการวิเคราะห์ที่ได้รายงานไว้ใน Ruperez et al. (1999) โดยมีการดัดแปลงให้เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการดังรายละเอียดต่อไปนี้ นำอาหารที่

ต้องการวิเคราะห์มาประมาณ 2 กรัม ชั่งให้ได้น้ำหนักแน่นอน บดให้ละเอียด เติม 0.1 % BHT in ethanol (Butylated hydroxytoluene) 20 มิลลิลิตร และเติม Hexane 10 มิลลิลิตร ผสมสารสกัดให้เข้ากัน 5 นาที แล้วเติม 0.01 mM EDTA 5 มิลลิลิตร ผสมสารสกัดให้เข้ากัน 5 นาที จากนั้นดูดชั้นของ Hexane ไปยังหลอดใหม่ แล้วเติม Hexane ลงไปสารสกัดอีก 5 มิลลิลิตร ผสมสารสกัดให้เข้ากัน 5 นาที จากนั้นดูดชั้นของ Hexane ไปรวมกับหลอดที่มี Hexane ที่ย้ายไป ทำการระเหย Hexane ภายใต้แก๊สไนโตรเจน แล้วทำการละลายน้ำมันหลังจากระเหยด้วยสารผสม methanol : Chloroform (1:1) เพื่อจะนำไปวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี ด้วยเครื่อง HPLC

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอีด้วยเครื่อง HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอี ทำโดยใช้ reverse phase HPLC (HP 1100) C18 column Hypersil ODS 5 μm (4.0 x 250 mm) วิเคราะห์ด้วย fluorescence detector (excited 295 nm, emission 327 nm) mobile phase ได้แก่ สารละลายผสมของ methanol/water ในอัตราส่วน 98:2 ปริมาณ tocopheryl acetate ในอาหารทดลองแสดงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ระดับการเสริมอนุพันธ์วิตามินอี (tocopheryl acetate) และปริมาณที่วิเคราะห์ได้ในอาหารปลาดุกลูกผสมของแต่ละกลุ่มทดลอง

กลุ่มทดลอง	ระดับอนุพันธ์วิตามินอีที่เสริมในอาหาร (mg/kg)	ปริมาณ tocopherol ที่วิเคราะห์ (mg/kg)	ปริมาณ tocopheryl acetate ที่วิเคราะห์ (mg/kg)
1	0	9.20	0.00
2	125	8.42	122.67
3	250	8.92	214.89
4	500	10.22	483.78

4. ปลาทดลอง ระบบการเลี้ยงปลา และการให้อาหารในระหว่างการทดลอง

ปลาดุกที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นปลาดุกลูกผสม (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*) ได้จากฟาร์ม มทส. เริ่มการทดลองโดยทำการสุ่มปลาทดลองจำนวน 20 ตัว ลงในตู้ทดลอง ตู้ทดลองที่ใช้ในครั้งนี้มีขนาด 60 * 30 * 45 ลูกบาศก์เซนติเมตร (กว้าง * ยาว * สูง) เลี้ยงปลาดุกลูกผสมแบบให้อากาศในน้ำตลอดเวลา

ทำการเลี้ยงปลาเพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ด้วยอาหารพื้นฐานที่ไม่ได้เสริมวิตามินอี แล้วจึงเริ่มเลี้ยงปลาด้วยอาหารตามสูตรที่กำหนด โดยให้อาหารวันละ 2 ครั้งแบบ ให้กินแบบเต็มที่ ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำในตู้ปลาทุก 3 วัน ทำการบันทึกอุณหภูมิน้ำในระหว่างที่ทำการให้

อาหาร อุณหภูมิน้ำตลอดการเลี้ยงอยู่ในช่วง 28-30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการเลี้ยงปลาทดลอง 8 สัปดาห์ โดยทำการบันทึกน้ำหนักปลา และน้ำหนักอาหารที่ปลาได้รับเมื่อสิ้นสุดสัปดาห์ที่ 4 และสัปดาห์ที่ 8 ตลอดระยะเวลาการทดลอง ถ้าพบปลาตายนำออกและทำการบันทึกข้อมูล

5. การทดสอบปลาดุกลูกผสมในสภาวะที่น้ำอุณหภูมิต่ำ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาผลของการเสริมวิตามินอีในอาหารต่อปลาดุกเมื่ออยู่ในสภาพที่อุณหภูมิน้ำ 19 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเดียวกันที่อุณหภูมิปกติ การศึกษาครั้งนี้ทำการทดสอบเพื่อเปรียบเทียบ 2 ครั้ง ได้แก่หลังจากเลี้ยงด้วยอาหารของแต่ละกลุ่มทดลองเป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

เมื่อเลี้ยงปลาได้ 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ ทำการสุ่มปลาดุกลูกผสมจากแต่ละตู้ทดลอง (ซ้ำ) จำนวน 3 ตัว เพื่อเก็บตัวอย่างเลือด ด้วยวิธีการที่ได้อธิบายไว้ในการทดลองที่ 2 ข้อที่ 6 แล้วจึงนำปลาดุกลูกผสมมาทดสอบในน้ำอุณหภูมิ 19 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นการนำปลาดุกลูกผสมมาผ่านการลดอุณหภูมิน้ำอย่างรวดเร็ว (อัตราการเปลี่ยนอุณหภูมิ 0.1 องศาเซลเซียสต่อนาที) แล้วทำการเก็บตัวอย่างเลือดหลังจากผ่านการทดลองสอบอุณหภูมิน้ำ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

6. การวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยา

การวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยาทำในตัวอย่างเลือดที่มี EDTA ทำตามวิธีการที่ได้อธิบายไว้ในการทดลองที่ 2 ข้อ 4

7. การวิเคราะห์ค่าทางภูมิคุ้มกัน

7.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเลือด และ total immunoglobulin

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในพลาสมาทำโดยใช้ชุดทดสอบ colorimetric Lowry micro-method (Sigma) การวัดค่าปริมาณ total immunoglobulin ทำตามวิธีการที่ได้อธิบายไว้ในการทดลองที่ 2 ข้อ 8.1

7.2 การวิเคราะห์ค่าการทำงานของไลโซไซม์

การวิเคราะห์ค่าการทำงานเอ็นไซม์ไลโซไซม์ตามรายละเอียดวิธีการที่ได้อธิบายไว้ในข้อที่ 8.2 ของการทดลองที่ 2

7.3 การวิเคราะห์ Nitroblue tetrazolium (NBT)

เป็นการวิเคราะห์ superoxide anion (O_2^-) ที่เกิดขึ้นจากกิจกรรม Respiratory burst ของเม็ดเลือดขาว ตามวิธีของ Taoka et al. (2006) การวัดจะเป็นการวัดค่าการลดลงของ nitroblue tetrazolium:NBT ซึ่งถูกเปลี่ยนเป็น formazan โดย superoxide anion (O_2^-) ที่เกิดขึ้น ดังรายละเอียดวิธีการที่ได้รายงานไว้ในข้อ 8.4 ของการทดลองที่ 2

8. การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติในครั้งนี้ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for windows, version 10 (SPSS Inc, Chicago, IL) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจากทุกกลุ่มทดลองโดยรวมด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) ในแผนการทดลองแบบ split plot in completely randomized design และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่เป็นผลเนื่องมาจากระดับวิตามินอีในอาหารด้วย ANOVA ตามด้วยการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan 's multiple range test ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่เป็นผลเนื่องจากการทดสอบด้วยอุณหภูมิน้ำ ด้วย Student 's t-test ยอมรับผลความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$