บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างปลาที่ใช้ศึกษาและการเลี้ยง

ทำการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD-completely randomized design) โดยใช้ปลาดุกลูกผสม (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*) น้ำหนักเฉลี่ย 50 กรัมต่อตัว แบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมได้รับอาหารไม่ผสมเมลามีน กลุ่มที่ 2-6 ได้รับอาหารผสมเมลามีนที่ระดับความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ16 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 ทำการทดลองที่ความหนาแน่น 1 ตัวต่อน้ำ 10 ลิตร ทำการทดลองเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ ให้ปลากินอาหารวันละ 3 เวลา และให้อาหารปลาทุกตัวกินจนอิ่ม (ad libitum) การทดลองนี้ได้ปฏิบัติตามกฎระเบียบและข้อปฏิบัติในการใช้สัตว์ทดลองของสภาวิจัยแห่งชาติอย่างเคร่งครัด

ตารางที่ 1 แสดงการแบ่งกลุ่มการทดลองของปลาดุกลูกผสม ในการวิจัยทั้งหมด 6 กลุ่มตามระดับของสารเมลามีนที่ได้รับแตกต่างกัน

กลุ่มที่	รายละเอียดของการทดลอง
1	กลุ่มควบคุม (อาหารไม่ผสมเมลามีน)
2	อาหารผสมเมลามีน 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักอาหาร
3	อาหารผสมเมลามีน 2 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักอาหาร
4	อาหารผสมเมลามีน 4 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักอาหาร
5	อาหารผสมเมลามีน 8 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักอาหาร
6	อาหารผสมเมลามีน 16 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักอาหาร

2. การเตรียมอาหาร

เป็นอาหารที่เตรียมขึ้นเองโดยเตรียมให้มีค่าร้อยละของโปรตีนประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ โดยเตรียมจาก น้ำมันพืช วิตามิน แร่ธาตุ รำข้าว ปลาป่น กากถั่วเหลือง และสารเมลามีน (2, 4, 6 – triamino - 1, 3, 5 triazine) ที่ความเข้มข้นต่างกันต่อน้ำหนักของอาหาร โดยสั่งซื้อสารเมลามีนจาก

บริษัทบราฟท์ (Braft) จำกัด และนำส่วนผสมไปเตรียมอาหารที่ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3. การเตรียมวัคซีนและแอนติเจน

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในเตรียมแอนติเจน และวัคซีนเพื่อใช้ทดสอบระดับของแอนติบอดีไตเตอร์ โดยทำให้เป็นวัคซีนเชื้อตายโดยเตรียมมาจากเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ใช้อาหาร brain heart infusion agar (BHIA) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วนำมาเลี้ยงในอาหาร BHIB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้มาปั่นล้างด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วประมาณ 2,500 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเชื้อที่ได้ด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว 3 ครั้ง เติมน้ำเกลือเพื่อปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้มีค่าประมาณ 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และทดสอบว่าเชื้อตายหรือไม่โดยการนำไปเลี้ยงบน BHIA

การเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้ในการวัดค่าแอนติบอดีไตเตอร์โดยวิธีการเกาะกลุ่มแบบตรง(direct agglutination) มีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมวัคซีน แต่ใช้ความเข้มข้นของแบคทีเรียซึ่งมีค่าความเข้มข้นประมาณ 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (นิลุบล กิจอันเจริญ, 2534)

4. การให้วัคซีนปลา

ให้วัคซีนปลาโดยการฉีดวัคซีนข้าทางช่องท้อง (intraperitonium injection) ซึ่งพบว่าการฉีดเข้าช่องท้องเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากและทราบปริมาณวัคซีนที่แน่นอน (พุทธชาด อิ่มใจ, 2550) ใช้วัคซีนเชื้อตายโดยเตรียมมาจากเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ที่ความเข้มข้น 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักปลา 100 กรัม ฉีดวัคซีนในวันที่ 28 และฉีดเชื้อซ้ำอีกครั้งในวันที่ 42 นับจากวันแรกที่เริ่มทำการทดลอง ทำการฉีดวัคซีนทุกกลุ่มและทุกตัวที่ทำการทดลอง

5. การเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

เก็บตัวอย่างเลือดในวันที่ 56 ของการทดลอง นับจากวันแรกที่เริ่มทำการทดลอง ทำการสลบปลาด้วย clove oil (sigma, USA) 100 พีพีเอ็ม ก่อนเจาะเก็บตัวอย่างเลือดบริเวณโคนหาง ปริมาตร 3-5 มิลลิลิตร ส่วนหนึ่งเก็บในขวดเก็บเลือดที่เคลือบด้วยสารเฮปาริน (heparin) เพื่อไปตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวและปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น อีกส่วนหนึ่งเก็บในขวดเพื่อนำไป

ประเมินระดับยูเรียไนโตรเจน ครีเอทีนิน เอนไซม์แอสพาเทตอะมิโนทรานสเฟอเรสและสัดส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียม

ตรวจดูลักษณะภายนอกสังเกตความผิดปกติแล้วผ่าเปิดช่องท้องปลาเพื่อดูรอยโรคและเก็บตัวอย่างจากอวัยวะภายในได้แก่เนื้อเยื่อตับ ม้าม และไต แช่ใน 10 เปอร์เซ็นต์บัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน (ศุภลักษณ์ โรมรัตนพันธ์, 2545) ผ่านกรรมวิธีการไล่น้ำในไอโซโพรพานอล (isopropanol) และตรึงเนื้อเยื่อด้วยพาราฟินแล้วตัดชิ้นเนื้อด้วยเครื่องไมโครโตม (microtome) ทำการย้อมสีด้วยฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน (heamatoxylin and eosin) (ศุภลักษณ์ โรมรัตนพันธ์, 2545) ก่อนนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

6. การวัดการเจริญเติบโต

วัดการเจริญเติบโตของปลาโดยดูจากน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นในวันสุดท้ายของการทดลอง โดยใช้เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง โดยงดให้อาหารปลาในวันที่ชั่งน้ำหนัก

7. การทดสอบวัดระดับของภูมิคุ้มกัน

การวัดค่าแอนติบอดีไตเตอร์ ใช้วิธีการทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่ม ตกตะกอนระหว่างแอนติเจน และแอนติซีรั่มของปลา ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างเลือดซึ่งเก็บในวันที่ 56 นับจากวันแรกที่เริ่มทำการทดลอง โดยมีหลักการดังนี้

Insoluble antigen + specific antibody $\rightleftharpoons$ Ag-Ab complex clumping

แอนติบอดีไตเตอร์ เป็นการบอกระดับหรือปริมาณของแอนติบอดีอย่างคร่าว ๆ โดยบอกเป็นระดับความเจือจางที่เรียกว่าไดลูชั่น (dilution) หรือ ไตเตอร์ (titer) ตัวอย่างของการบอกค่าแอนติบอดีไตเตอร์ (antibody titer) การเจือจางแอนติบอดีโดยใช้น้ำเกลือหรือบัฟเฟอร์ทีละ 2 เท่าต่อเนื่องไปเรื่อย ๆ หมายความว่า ระดับความเจือจางจะเริ่มจาก 1: 2, 1: 4, 1: 8 ..... สำหรับ 1: 2 หมายความว่าเจือจางแอนติบอดี 2 เท่า นั่นคือทั้งหมดในส่วนสารละลาย 2 ส่วนจะมีบัฟเฟอร์ทีละ 2 เท่าเป็น 1: 4 ทำได้โดยนำแอนติบอดีที่เจือจาง 1: 2 ในหลอดที่ 1 มา 1 ส่วน (เช่น 1 มิลลิลิตร) ผสมกับบัฟเฟอร์ 1 ส่วน (เช่น 1 มิลลิลิตร) ก็จะได้แอนติบอดีเจือจางเป็น 1: 4 ในหลอดที่ 2 และทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆ ก็จะเป็นหลอดที่ 3 มีระดับการเจือจางเป็น 1: 8 เป็นต้น

เมื่อเจือจางแอนติบอดีแล้วตรวจสอบแอนติบอดี โดยให้ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนตัวอย่างการทดสอบปฏิกิริยา เช่น การเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดง เมื่อแอนติบอดีทำปฏิกิริยากับแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดง แล้วอ่านผลความเจือจางสุดท้ายที่ยังเกิดผลบวกของปฏิกิริยาหรือการเกาะกลุ่มของ

เม็ดเลือดแดงอยู่ ก็อ่านค่า แอนติบอดีไตเตอร์ (antibody titer) นั้น เช่น อ่านผลบวกได้ตั้งแต่ 1: 2, 1: 4, 1: 8, 1: 16, 1: 32 แต่อ่านผลลบได้ในการเจือจาง 1:64 ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ (antibody titer) เท่ากับ 32 (กฤษณา จรรยาพูน, 2548) โดยปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination) เป็นวิธีการทดสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีโดยอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาซึ่งเกิดจากการเชื่อมโยงของแอนติเจนที่เป็นอนุภาค (particle) กับแอนติบอดี เป็นสารประกอบเชิงซ้อน และเกิดการเกาะกลุ่ม ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบที่ใช้กันอย่างแพร่หลายและถูกนำมาประยุกต์ใช้ได้หลายแบบ สามารถทำได้ในหลอดทดลองในไมโครเพลท (micro plate) หรือบนสไลด์ (slide) การทดสอบนี้ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารให้แน่ชัดได้เป็นการทดสอบในแบบ เชิงปริมาณ (qualitative) แต่เป็นการทดสอบที่ให้ผลรวดเร็วและทำได้ง่าย นิยมช่วยในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อต่าง ๆ เช่น การติดเชื้อแบคทีเรีย ในส่วนของวิธีเกาะกลุ่มแบบตรง (direct agglutination) หมายถึงปฏิกิริยาที่เกิดกับแอนติเจนซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะและเกิดการเกาะกลุ่มขึ้น ตัวอย่างเช่น เซลล์ของแบคทีเรียที่เกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มเมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนบนผิวเซลล์ชองเม็ดเลือดแดงหรือการเกาะกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงเมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีจำเพาะ (กฤษณา จรรยาพูน, 2548) โดยการทดสอบหาแอนติบอดีไตเตอร์มีวิธีการ ดังนี้

7.1 เตรียมไมโครเพลต 96 หลุม (1 แถวมี 12 หลุม)โดยการฉีดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วเช็ดออกด้วยสำลีสะอาด

7.2 เติมน้ำเกลือ (NaCl) ซึ่งเตรียมในอัตราส่วน 0.85 กรัม/100 มิลลิลิตร ตั้งแต่หลุมที่ 2 ถึงหลุมที่ 12 ในปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร

7.3 เติมซีรั่มของปลา ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 1 และ 2 ของแต่ละแถว ให้ 1 แถวต่อ 1 ตัวอย่างเลือด

7.4 ทำการเจือจางซีรั่มลำดับส่วนแบบสองเท่า ตั้งแต่หลุมที่ 2 ถึง 12 โดยให้ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร

7.5 เติมแอนติเจนลงตั้งแต่หลุมที่ 1 ถึงหลุมที่ 12 ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร

7.6 เขย่าสารละลายให้เข้ากันโดยทำการเคาะทางด้านข้างของเพลตทั้ง 4 ด้าน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7.7 ทำการบันทึกผลโดยเปรียบเทียบกับ positive control ในหลุมที่ 1 ซึ่งมีแอนติเจนและซีรั่ม

8. การศึกษาเกี่ยวกับค่าโลหิตวิทยา

การศึกษาเกี่ยวกับค่าโลหิตวิทยาของปลาดุกสามารถบ่งบอกถึงความผิดปกติทางสรีรวิทยาและทางพยาธิวิทยา ดังนั้นค่าเลือดจึงนำมาใช้ในการประเมินสุขภาพปลา (Biaxhall and Daisley, 1973) และความผิดปกติที่เกิดขึ้น ในการวิจัยครั้งนี้มีการประเมินค่าต่างๆ เช่น ค่าเม็ดเลือดแดงที่อัดแน่น (hematocrit) นับจำนวนเม็ดเลือดขาว (white blood cell count) นอกจากนี้ยังได้มีการประเมินค่าอื่นๆในเลือดเพื่อสนับสนุนการและวินิจฉัยการทำงานของตับและไต ได้แก่ ระดับยูเรียไนโตรเจนในเลือด (BUN) ครีเอทินิน (cre) สัดส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียม (Na^+/K^+ratio) แอสพาเทสอะมิโนทรานสเฟอร์เรส (AST)

8.1 การนับเม็ดเลือดขาว (white blood cell count)

เก็บตัวอย่างเลือดในวันที่ 56 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลอง โดยการนับเซลล์เม็ดเลือดขาวมีหลักการโดยใช้น้ำยาผสมกับเลือดเพื่อเจือจางและทำลายเม็ดเลือดแดง แต่คงสภาพเม็ดเลือดขาวไว้นับจำนวนเม็ดเลือดขาวโดยใช้เคาว์ติ้ง แชมเบอร์ (counting chamber) แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณค่าเม็ดเลือดขาวต่อ 1 ลูกบาศก์มิลลิลิตร (นฤดี โภไคสรรย์, 2549) มีวิธีการทำดังนี้

1. ใช้ปิเปตสำหรับเม็ดเลือดขาวดูดเลือดถึงขีด 0.5 โดยให้ปิเปตอยู่ในลักษณะเกือบเป็นแนวราบ
2. ดูดสารละลายเจือจาง (turk's dilution) ตามให้ถึงขีด 11 พอดีให้ดูดขึ้นอย่างเดียว ดังนั้นการเจือจางเลือดในกระเปาะเท่ากับ 1: 20โดยลักษณะของปิเปตอยู่ในแนวตั้ง
3. จับปิเปตให้อยู่ในแนวราบใช้นิ้วชี้ปิดปลายปิเปตแล้วจึงถอดสายยางออก
4. จับปิเปตโดยปิดปลายทั้งสองข้างด้วยนิ้วหัวแม่มือ ใช้นิ้วชี้เขย่าปิเปตไปมาในแนวนอนเป็นเวลาประมาณ 3-5 นาที
5. หยดสารละลายในปิเปตออกไปก่อน 2-3 หยด เพราะสารละลายส่วนนี้เป็นส่วนที่ไม่ได้ผสมกับเลือด
6. หยดสารละลายต่อไปลงบนร่องบนของเคาว์ติ้ง แชมเบอร์ (counting chamber) ที่ปิดด้วยโคลเวอร์ แชมเบอร์ (clover chamber) แล้ว โดยนิ้วชี้ที่ปิดด้านบนของปิเปตจะเป็นตัวควบคุมการปล่อยส่วนผสมลงในเคาว์ติ้ง แชมเบอร์ (counting chamber)
7. ตั้งเคาว์ติ้ง แชมเบอร์ (counting chamber) ทิ้งไว้ 2-3 นาทีในเพททิดิช (petidish) ที่มีกระดาษชุบน้ำวางอยู่เพื่อให้เม็ดเลือดขาวหยุดนิ่ง
8. นับจำนวนเม็ดเลือดขาวด้วยเลนส์วัตถุกำลังขยายต่ำ ในช่องที่นับที่มุมทั้ง 4 ของเคาว์ติ้ง แชมเบอร์ (counting chamber) นำมารวมกันแล้วคำนวณดังนี้

จำนวนเม็ดเลือดขาว/ลูกบาศก์มิลลิเมตร = $\frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ x ไดลูติ้ง แฟกเตอร์}}{\text{ปริมาตรทั้งหมดที่นับเม็ดเลือดขาว}}$

การเจือจางเลือด ในการนับเม็ดเลือดขาวใช้เลือด 0.5 ส่วนแล้วดูดสารละลายเจือจาง(dilution factor)จนถึงขีด 11 แต่เลือดผสมกับสารละลายเจือจาง (dilution factor)ในกระเปาะปิเปตจริงเพียง 10 ส่วนเท่านั้น ดังนั้นไดลูชั่น (dilution) จึงถูกเจือจางไป 0.5: 10 = 1/20

ปริมาตรไดลูติ้ง แฟกเตอร์ (dilution factor) = 20

ปริมาตรทั้งหมดที่นับเม็ดเลือดขาว = พื้นที่บนเคาว์ติง แชมเบอร์ x ความลึก x จำนวนช่องที่นับ

= (1 x 1) x 0.1 x 4

= 0.4 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

ค่าทั้งสองคือไดลูติ้ง แฟกเตอร์ (dilution factor) และปริมาตรทั้งหมดที่นับเม็ดเลือดขาว จะคงที่เสมอ เมื่อแทนค่าในสูตรจะได้แฟกเตอร์ (factor) ที่คงที่ คือ 20/0.4 = 50

ดังนั้น จำนวนเม็ดเลือดขาว/ลูกบาศก์มิลลิเมตร = จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ x 50 (จิราพร สิทธิถาวร และคณะ, 2527)

8.2 การประเมินค่าฮีมาโตคริต (hematocrit)

การประเมินค่าฮีมาโตคริตโดยใช้วิธีดัดแปลงของ Braxhall และ Daisley (1973) ใช้ตัวอย่างเลือดที่เก็บในวันที่ 56 นับจากวันแรกที่เริ่มทำการทดลอง และทำการวิเคราะห์ค่าฮีมาโตคริตมีหลักการนำเลือดไปปั่นทำให้เกิดการแพค (pack) มากที่สุดของเม็ดเลือดแดง เทียบกับความสูงของระดับเลือดทั้งหมด รายงานเป็นเปอร์เซ็นต์หรือสัดส่วน (นฤดี โภไคศรรย์, 2549) มีวิธีการทำดังนี้

1. เจาะเลือดปลาจากเส้นเลือด บริเวณหาง (caudal vein)ในปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยใส่สารป้องกันเลือดแข็งตัว (heparin) เคลือบที่ผิวหลอดเก็บตัวอย่างเลือด
2. ดูดเลือดเข้าหลอดแคปปิลารี (capillary tube) โดยการจุ่มหลอดแคปปิลารี (capillary tube) ลงในหลอดเก็บตัวอย่างเลือด โดยเอียงหลอดเล็กน้อยเลือดจะไหลเข้าสู่หลอดเองด้วยแรงดึงดูดหลอดให้ได้ประมาณ ¾ ของความยาวหลอด จำนวน 2 หลอด ต่อ 1 ตัวอย่าง
3. ปิดปลายด้านหนึ่งของหลอดด้วยดินน้ำมัน โดยกดปลายหลอดตรงๆลงบนดินน้ำมันให้ดินน้ำมันเข้าไปอุดปากหลอด ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ
4. นำหลอดหลอดแคปปิลารี (capillary tube) ไปปั่นในไมโครเซนติฟิว (microhematocrit centrifuge) ที่ระดับความเร็ว 3,000 รอบ / วินาทีเป็นเวลา 10 นาที โดยการปั่นอาศัยแรงเหวี่ยงทำให้เม็ดเลือดแพคเมื่อนำเลือดไปปั่นพาร์ทิเคิล (particle) ที่หนักสุดจะอยู่ส่วนล่างสุด ที่เบากว่าจะอยู่ชั้นเหนือกว่า สำหรับเลือดหลังปั่นแล้วเม็ดเลือดแดงจะอยู่ใต้สุด ชั้นถัดมา

เป็นบับฟี โคท (buffy coat) ซึ่งเป็นพวก เซลล์เม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือด ชั้นบนสุดเป็นพลาสมา หลังจากนั้นจึงนำมาอ่านค่าฮีมาโตคริตด้วยฮีมาโตคริต รีดเดอร์ (hematocrit reader) โดยกำหนดปลายล่างสุดของคอลัมน์เลือดที่ติดมากับดินน้ำมันเป็น 0 ด้านบนสุดของชั้นพลาสมาเป็น 100 จุดต่อระหว่างพลาสมากับชั้นเม็ดเลือดแดงต้องกำหนดใต้ชั้นบับฟี โค้ท (buffy coat) เป็นจุดอ่าน (นฤดี โภไคศรรย์, 2549)

8.3 การประเมินค่าเคมีในเลือด

นำเลือดจากตัวอย่างปลาดุกลูกผสมทุกกลุ่มการทดลองโดยเก็บวันที่ 56 ของการทดลอง แยกพลาสมา (plasma) (Hrubec and Smith, 1999) ปั่นแยกด้วยเครื่องไมโครฮีมาโตรคริต เซ็นติฟิว (microhematocrit centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบ / วินาทีเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำพลาสมาส่งตรวจด้วยเครื่องตรวจทางเคมีในเลือดที่หน่วยเคมีคลินิก ห้องปฏิบัติการ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น โดยทำการตรวจระดับยูเรียไนโตรเจนในเลือด (BUN) ครีเอทินิน (cre) สัดส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียม (Na^+/ K^+ratio) แอสพาเทสอะมิโนทรานสเฟอร์เรส (AST)

9. การศึกษาทางพยาธิวิทยา

วันสุดท้ายของการทดลองทำการเก็บเนื้อเยื่อจากปลาดุกลูกผสมในการทดลอง เพื่อนำมาเตรียมการตรวจวิเคราะห์ทางพยาธิวิทยา โดยตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เก็บ ได้แก่ ตับ ไต และม้าม การเตรียมเพื่อการตรวจวิเคราะห์ทางพยาธิวิทยาใช้วิธีการตามมานิต ศรีประโมทย์ (2535) โดยจะเป็นการเตรียมเนื้อเยื่อตัวอย่างเพื่อนำมาตัด และนำมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ส่องสว่างโดยจะมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

9.1 การดองเนื้อ (fixation) โดยการแช่ในฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5ชั่วโมง

9.2 การทำให้แห้ง (dehydration) เป็นการดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อที่ดองแล้วโดยการใช้สารที่เป็น organic solvent ซึ่งรวมกันได้กับน้ำและจะเข้าไปแทนที่น้ำได้ทั้งในและนอกเซลล์ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้ เอททิล แอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) โดยใช้ระดับแอลกอฮอล์เริ่มจากสัดส่วนต่ำไปหาสัดส่วนสูง คือ 70 เปอร์เซ็นต์ 95 เปอร์เซ็นต์ 95 เปอร์เซ็นต์ 95 เปอร์เซ็นต์ และแช่ในแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ อีก 3 ขั้นตอน โดยในแต่ละขั้นตอนจะแช่เนื้อเยื่อขั้นตอนละ 1 ชั่วโมง

9.3 การทำให้ใส (clearing) การทำใสจะเป็นการดึงแอลกอฮอล์ (alcohol) ออกจากเนื้อเยื่อโดยการใช้ clearing agent เข้าไปแทนที่ สารที่ใช้ในการศึกษานี้คือ ไซลีน (xylene) โดยนำเนื้อเยื่อมาแช่ใน ไซลีน (xylene) 2 ขั้นตอน ขั้นตอนละ 1 ชั่วโมง

9.4 การซึมผ่าน (infiltration, impregnation) เป็นขั้นตอนการนำสารเข้าไปในช่องว่างของชิ้นเนื้อเพื่อที่จะรักษาสภาพเดิมของชิ้นเนื้อไว้ ใช้ขี้ผึ้งพาราฟินที่ทำให้ร้อนจนหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 56-58 องศาเซลเซียส ทำ 2 ครั้ง ครั้งละ 1 ชั่วโมง

9.5 การลงฝัง (embedding, blocking) เป็นการทำให้เนื้อเยื่อแข็งพอที่จะตัดเป็นแผ่นบางๆ ทำได้โดยนำเนื้อเยื่อที่ผ่านขั้นตอนการซึมผ่านมาแล้ว ใส่ลงไปในเบ้าแล้วจึงเติมขี้ผึ้งเหลวลงไปจากนั้นจึงทำให้เย็นลงทันที

9.6 การตัดบาง (section, cutting) โดยการใช้เครื่อง อัลตร้า ไมโครโตม (ultra-microtome) ในการตัดบล็อกพาราฟิน โดยใช้พู่กันแตะชิ้นเนื้อที่ตัดได้มาวางบนสไลด์นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสเพื่อละลายขี้ผึ้งส่วนหนึ่งออก และช่วยให้แผ่นชิ้นเนื้อติดสไลด์ได้ดียิ่งขึ้น

9.7 การย้อมสี โดยใช้สีฮีมาท็อกซิลินและอีโอซิน (heamatoxylin and eosin)

10. การวิเคราะห์ข้อทูลทางสถิติ

จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว ปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ระดับยูเรียไนโตรเจน ครีเอทีนิน เอนไซม์แอสพาเทตอะมิโนทรานสเฟอเรสและสัดส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียม โดยในแต่ละกลุ่มทดลองนำมาเปรียบเทียบความแตกต่าง โดยการวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนโดยใช้ analysis of variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่ม Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรม SPSS version 11.5 และทำการวิเคราะห์ทางพยาธิสภาพโดยดูความเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับ ม้าม และไตในกลุ่มที่ได้รับอาหารปนเปื้อนเมลามีนความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมการทดลอง