

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

1. สัตว์ทดลองและอุปกรณ์ป้อนสัตว์ทดลอง

- 1.1 หนูขาวใหญ่ (*Rattus norvegicus*) เพศผู้ อายุ 4-6 สัปดาห์ (ภาพที่ 9)
 - จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพุทธมณฑลสาย 4 อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม
 - การดูแลรักษาสัตว์ทดลองภายใต้จรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองในโครงการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ รหัส Re 002/06
- 1.2 ปลาเข็ม (*Dermogenus pusillus*) จากคูเมืองเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ (ภาพที่ 6-7)
- 1.3 กรงเลี้ยงหนูทดลองขนาดกว้าง 9 นิ้ว ยาว 14 นิ้ว สูง 6 นิ้ว (แยกเลี้ยง 1 กรงต่อหนูทดลอง 1 ตัว)
- 1.4 อาหารเลี้ยงสัตว์ทดลองเบอร์ 082 บริษัท โภคภัณฑ์ฟีด จำกัด
- 1.5 จี๊เลี้ยง
- 1.6 Syringes และเข็มเบอร์ 21

2. ยาถ่ายพยาธิไปไม้

ยาถ่ายพยาธิ Praziquantel 600 มิลลิกรัม (Zentozide®) (ภาพที่ 8)

3. พืชสมุนไพรและอุปกรณ์ที่ใช้เตรียมสารสกัดพืชสมุนไพร

- 3.1 แก่นมะหาดและผงปวกหาด จากอำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
- 3.2 ต้นขี้เหล็ก จากตลาดค้าเหียง อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
- 3.3 กระดาษกรองยี่ห้อ Whatman เบอร์ 1 และ 5
- 3.4 เตาต้มสาร ยี่ห้อ Gallenkamp (England)
- 3.5 Beaker ขนาด 500 มล
- 3.6 แท่งแก้วคนสาร
- 3.7 กรวยแก้ว
- 3.8 เครื่อง Freeze ยี่ห้อ Labconco รุ่น AT-BOON

4. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้เตรียมตัวอย่างหนอนพยาธิ

- 4.1 เครื่องปั่นละเอียด
- 4.2 Shaker Water bath ยี่ห้อ Memmert รุ่น Schutzart DIN 40050 (Germany)
- 4.3 ตะแกรงกรองขนาด 60 80 และ 100 μm
- 4.4 Beaker ขนาด 500 มล
- 4.5 1% pepsin (Sigma, Germany)
- 4.6 0.85% NaCl solution (UNIVAR, Australia)

5. อุปกรณ์และสารเคมีในการตรวจอุจจาระหนูโดยวิธี Modified Formalin Ether Concentration

Technique (MFECT)

- 5.1 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ Olympus Model CH-2
- 5.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ยี่ห้อ SANYO (Japan)
- 5.3 หลอดพลาสติกกันแหลมขนาด 15 มล
- 5.4 Beaker ขนาด 50 มล
- 5.5 ฝ้ายก๊อส์
- 5.6 Pasteur pipette
- 5.7 Petri dish
- 5.8 0.85% NaCl solution (UNIVAR, Australia)
- 5.9 10% formalin (USM, Thailand)
- 5.10 Ether (BDH, England)

6. อุปกรณ์และสารเคมีในการผ่าสัตว์ทดลอง

- 6.1 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ Olympus Model SZ-ST
- 6.2 ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด
- 6.3 Beaker ขนาด 100, 200 และ 500 มล
- 6.4 ชุดอุปกรณ์ Bearman's apparatus
- 6.5 ถุงมือ
- 6.6 Chloroform (LABSCAN, Thailand)
- 6.7 0.85% NaCl solution (UNIVAR, Australia)

7. สารเคมีในการทำสไลด์ถาวร (Permanent slide)

- 7.1 5% formalin
- 7.2 Ethyl alcohol ความเข้มข้น 10, 20, 30, 50, 70, 85 และ 95%
- 7.3 Buthanol (LABSCAN, Thailand)
- 7.4 Xylene (LABSCAN, Thailand)
- 7.5 Permount (Fisher ChemAlert® Guide, USA.)
- 7.6 1% de-stain (Hydrochloric acid 1 ml + Ethyl alcohol 70% 99 มล)
- 7.7 สีช้อม Haematoxylin (Riedel-de Haen), Borax carmine (BDH, England)

8. สารเคมีและอุปกรณ์ในการศึกษาทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

8.1 สารเคมี

- 8.1.1 2.5% Glutaraldehyde (Sigma, Germany)
- 8.1.2 1% Osmium tetroxide (Sigma, Germany)
- 8.1.3 0.1 M Phosphate buffer (pH 7.3) (Sigma, Germany)
- 8.1.4 Acetone (Scharlau Chemie S.A., European Union)
- 8.1.5 Ethyl alcohol (10, 20, 30, 50, 70, 85, 95 และ absolute)
- 8.1.6 0.2 M Sodium phosphate monobasic buffer
- 8.1.7 0.2 M Sodium phosphate dibasic buffer

8.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 8.2.1 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ Olympus Model SZ-ST (Japan)
- 8.2.2 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด JEOL-JSM-5910LV (Japan)
- 8.2.3 เครื่อง Critical Point Dryer, Polaron Model CPD7501 (Japan)
- 8.2.4 เครื่อง Fine Coater, SPI-MODULE (Japan)
- 8.2.5 แท่นทองเหลืองวางตัวอย่าง (stub)
- 8.2.6 คาร์บอนเทป

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมสารสกัดด้วยน้ำจากพืชสมุนไพร และยาถ่ายพยาธิ

มะหาด

ใช้ส่วนผงของมะหาดที่เรียกว่า ปวกหาด จำนวน 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล ใช้แท่งแก้วคนให้ผงปวกหาดละลายจนหมด นำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 ได้สารสกัดด้วยน้ำของมะหาด นำไปทำให้แห้งโดยผ่านเครื่อง Freeze drying

ขี้เหล็ก

นำส่วนรากของต้นขี้เหล็ก น้ำหนัก 100 กรัม ล้างด้วยน้ำจนสะอาด หั่นรากขี้เหล็กเป็นท่อนๆ นำไปต้มในน้ำกลั่นปริมาตร 300 มล เคี่ยวบนไฟอ่อนๆ จนปริมาตรน้ำเหลือ 150 มล ตั้งทิ้งไว้จนเย็น กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 ได้สารสกัดด้วยน้ำของรากขี้เหล็ก นำไปทำให้แห้งโดยผ่านเครื่อง Freeze drying

สารสกัดด้วยน้ำจากพืชสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด เมื่อนำไปทำให้แห้งโดยผ่านเครื่อง Freeze drying แล้ว ได้สารสกัดด้วยน้ำจากพืชสมุนไพรที่เป็นผงแห้ง นำมาเตรียมเป็นสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อป้อนสัตว์ทดลองต่อไป โดยให้ความเข้มข้นของสารละลายที่ป้อนสัตว์ทดลองมีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อน้ำหนักสัตว์ทดลอง 1 กิโลกรัม

ยาถ่ายพยาธิ Praziquantel

นำยาถ่ายพยาธิโบไม้ 1 เม็ด ซึ่งประกอบด้วยตัวยา Praziquantel 600 มก มาบดให้เป็นผงละเอียด นำไปละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มล เมื่อนำไปป้อนในสัตว์ทดลองจะปรับความเข้มข้นต่างๆ ให้มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักสัตว์ทดลอง 1 กิโลกรัม

2. การเตรียมตัวอย่างพยาธิ *Stellantchasmus falcatus* ระยะ metacercaria

- 2.1 นำปลาเข็ม (*D. pusillus*) ที่จับได้จากบริเวณคูเมืองเชียงใหม่ มาป้อนให้ละอียดโดยใช้ปลาทั้งตัว
- 2.2 นำเนื้อปลาที่ป้อนแล้วไปใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มล ใส่สารละลาย 1% pepsin ให้สารละลายพอท่วมเนื้อปลา
- 2.3 นำไปใส่ในเครื่อง shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที เพื่อให้สารละลาย pepsin ย่อยเนื้อปลาที่มีพยาธิ *S. falcatus* ระยะ metacercariae ที่ฝังอยู่ในบริเวณกล้ามเนื้อต่างๆ ของปลาออกมา
- 2.4 นำเนื้อปลาที่ถูกย่อยแล้วล้างด้วย 0.85% NaCl solution กรองด้วยตะแกรงขนาด 60 และ 100 μm ตามลำดับ เพื่อแยกจากตะกอนขนาดใหญ่ออกไปก่อนจนสารละลายใส

- 2.4 นำไปคัดแยก metacercariae ออกจากเศษเนื้อปลาอีกครั้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ เพื่อรวบรวมพยาธิระยะ metacercariae
- 2.5 นับจำนวน metacercariae 1,000 metacercariae นำไปป้อนให้หนูขาว (*R. norvegicus*) 1 ตัว

3. การทดสอบประสิทธิภาพของยาถ่ายพยาธิ praziquantel และสารสกัดด้วยน้ำของปวกหาดและรากขี้เหล็กในหนูขาว

- 3.1 นำพยาธิระยะ metacercariae จำนวน 1,000 metacercariae ป้อนให้หนูทดลองที่เลี้ยงแยกไว้ 1 กรงต่อหนูทดลอง 1 ตัว โดยแต่ละชุดการทดลองจะแบ่งหนูทดลองออกเป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ป้อนด้วยสารสกัดด้วยน้ำจากปวกหาด กลุ่มที่ป้อนด้วยสารสกัดด้วยน้ำจากรากขี้เหล็ก และกลุ่มที่ป้อนด้วยยาถ่ายพยาธิ praziquantel
- 3.2 ป้อนยาถ่ายพยาธิ Praziquantel สารสกัดด้วยน้ำของปวกหาดและรากขี้เหล็ก ที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากป้อนพยาธิระยะ metacercariae ครบ 3 วัน (ซึ่งเป็นระยะเวลาที่พยาธิจะออกจาก cyst และเจริญเป็นระยะตัวเต็มวัยในลำไส้หนูทดลอง) โดยในหนูทดลองกลุ่มควบคุมจะป้อนน้ำกลั่นแทน
- 3.3 เมื่อครบระยะเวลาต่างๆ ที่กำหนด (6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากที่ป้อนสารสกัดด้วยน้ำจากพืชสมุนไพร ยา praziquantel และน้ำกลั่น) นำหนูทดลองแต่ละตัวมาสลบด้วย chloroform ทำการผ่าเปิดช่องท้อง แยกทางเดินอาหารส่วนของลำไส้เล็กออกเป็น 3 ส่วนคือ duodenum, jejunum, ileum เพื่อนำไปตรวจสอบหาพยาธิต่อไป
- 3.4 นำลำไส้แต่ละส่วนแช่ใน 0.85% NaCl solution ใช้เข็มเย็บฉีกเปิดลำไส้ ออก นำไปคัดแยกพยาธิด้วยชุด Bearmann's apparatus (ภาพที่ 10) หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบนับพยาธิภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ
- 3.5 เมื่อทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมในการกำจัดพยาธิของสารสกัดด้วยน้ำจากปวกหาดและรากขี้เหล็กแล้ว ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง เพื่อยืนยันผลการศึกษา
- 3.6 ในระหว่างการทดลองจะทำการตรวจอูจาระของหนูทดลองทุกตัวทุกวันด้วยวิธี Modified Formalin Ether Concentration Technique (MFECT) ตั้งแต่วันแรกที่ป้อน metacercariae จนกว่าจะถึงกำหนดเวลาที่จะผ่าเปิดช่องท้อง เพื่อตรวจสอบหาพยาธิที่จะถูกขับถ่ายออกมาทางอุจจาระ

- 3.7 เมื่อได้ผลการศึกษาถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมและจำนวนหนอนพยาธิที่พบแล้ว นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับความแตกต่างทางสถิติ เพื่อยืนยันผลการศึกษาและนำไปศึกษาพื้นผิวภายใต้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

4. การตรวจอุจจาระหนูทดลองด้วยวิธี MFECT

- 4.1 ชั่งอุจจาระหนูทดลองประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มล เติมน้ำ 0.85% NaCl solution ปริมาตร 10 มล ตั้งทิ้งไว้สักครู่จนก้อนอุจจาระอ่อน ใช้แท่งแก้วยี่อุจจาระหนูทดลองให้แตก
- 4.2 นำอุจจาระกรองผ่านผ้าก๊อซ 2 ชั้น ลงในหลอดพลาสติกกันแหลมขนาด 15 มล
- 4.3 นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ความเร็ว 1500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวด้านบนทิ้ง
- 4.4 เติมน้ำ 3 มล และ 10% formalin ปริมาตร 7 มล เขย่าให้เข้ากัน
- 4.5 นำไปปั่นอีกครั้ง ด้วยความเร็ว 1500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที จะได้สารละลายที่แยกออกเป็นชั้นๆ 4 ชั้น ชั้นบนคือ ether ชั้นที่ 2 คือไขมัน ชั้นที่ 3 คือ formalin และชั้นที่ 4 คือตะกอนที่มีไข่ของพยาธิปนอยู่
- 4.6 ใช้ไม้เจาะชั้นไขมัน วนไปรอบๆ หลอดพลาสติก แล้วเทสารละลายออกเบาๆ
- 4.7 นำตะกอนที่เหลือมาเติม 10% formalin ปริมาตร 1-2 มล ใช้ Pasteur pipette ดูดสารละลายให้เข้ากันดี นำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ

5. การศึกษาผลกระทบของยาถ่ายพยาธิ praziquantel และสารสกัดด้วยน้ำจากปวกหาดและรากขี้เหล็กต่อพื้นผิวพยาธิ *S. falcatus* ในสภาพทดลอง (in vivo)

- 5.1 หลังจากยืนยันผลการทดลองความเข้มข้นที่เหมาะสมในการกำจัดพยาธิของยาถ่ายพยาธิ praziquantel สารสกัดด้วยน้ำจากปวกหาดและรากขี้เหล็กแล้ว ทำการศึกษาผลกระทบของยาถ่ายพยาธิ praziquantel และสารสกัดด้วยน้ำจากปวกหาดและรากขี้เหล็กต่อพื้นผิวพยาธิ *S. falcatus* ในสัตว์ทดลอง (in vivo) โดยทำการป้อนยาถ่ายพยาธิและสารสกัดด้วยน้ำจากปวกหาดและรากขี้เหล็กที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วผ่าหนูเพื่อรวบรวมหนอนพยาธิที่เหลืออยู่ในลำไส้ นำตัวอย่างพยาธิไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงของพื้นผิวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM)
- 5.2 เตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาพื้นผิวพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

- 5.2.1 นำหนองพยาธิที่ได้จากลำไส้หนูทดลองกลุ่มต่างๆ มาล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer (pH 7.3) 1-2 รอบ เพื่อล้างสิ่งสกปรกต่างๆ ที่ติดอยู่บนพื้นผิวของหนองพยาธิออก
- 5.2.2 fixed หนองพยาธิด้วย 2.5% glutaraldehyde เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °c นาน 24 ชั่วโมง
- 5.2.3 นำหนองพยาธิมาล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer (pH 7.3) 1-2 รอบ
- 5.2.4 post fixed ด้วย 1% Osmium tetroxide นาน 2 ชั่วโมง
- 5.2.5 dehydrate ตัวอย่างหนองพยาธิด้วย ethyl alcohol ความเข้มข้นต่างๆ และ acetone โดยแต่ละขั้นตอนใช้เวลาประมาณ 30 นาที
- 5.2.6 นำตัวอย่างหนองพยาธิไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Critical Point Dryer (Polaron CPD 7501) เป็นการทำให้ตัวอย่างหนองพยาธิให้แห้งโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวถึงความร้อนออกจากตัวอย่างหนองพยาธิ (transition fluid)
- 5.2.7 นำตัวอย่างหนองพยาธิไปติดบนแท่งโลหะทองเหลือง (stub) ด้วยคาร์บอนเทป
- 5.2.8 นำไปฉาบผิวตัวอย่างด้วยทองโดยเครื่อง SPI-MODULE Sputter Coater
- 5.2.9 นำตัวอย่างหนองพยาธิที่ได้ไปศึกษาพื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด JEOL-JSM-5910LV ที่กำลังขยายต่างๆ

6. การทำสไลด์ถาวร (Permanent slide)

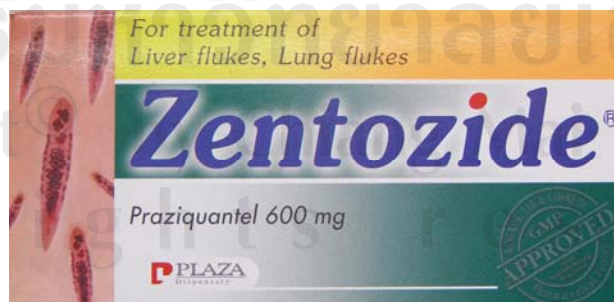
- 6.1 นำหนองพยาธิที่ได้จากกลุ่มควบคุมบางส่วนมาล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง เพื่อทำความสะอาด นำไป fixed ด้วย 5% formalin โดยกดทับหนองพยาธิให้แบนด้วยแผ่น cover slips
- 6.2 นำตัวอย่างหนองพยาธิที่ fixed แล้วมาล้างด้วยน้ำสะอาด
- 6.3 ย้อมสี Haematoxylin หรือ Borax carmine
- 6.4 Dehydration ด้วย ethanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ (10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 85%, 95%, absolute buthanol)
- 6.5 ทำตัวอย่างหนองพยาธิให้ใสด้วย Xylene และ Mount ด้วย Permount
- 6.6 วาดรูปตัวอย่างหนองพยาธิและอธิบายส่วนต่างๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบและ Drawing tube



ภาพที่ 6 คูเมืองเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่



ภาพที่ 7 ปลาเข็ม (*Dermogenus pusillus*)



ภาพที่ 8 ยาถ่ายพยาธิ Praziquantel



ภาพที่ 9 หนูขาวใหญ่ (*Rattus norvegicus*)



ภาพที่ 10 ชุดอุปกรณ์ Bearman's apparatus