บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ระยะเมตาเซอร์คาเรีย

พยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ระยะเมตาเซอร์คาเรียได้จากการย่อยเนื้อปลาในตระกูลปลาตะเพียน (cyprinoid fish) ได้แก่ ปลาขาวน้อย (*Cyclocheilichthys apogon*) ปลาตะเพียนทราย (*Puntius leiacanthus*) และปลากระสูบจุด (*Hampala dispar*) ซึ่งได้จากแหล่งระบาดในจังหวัดขอนแก่น นำปลาที่ได้มาบดด้วยเครื่องบดเนื้อ ปั่นละเอียดด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ นำเนื้อปลาไปย่อยด้วย pepsin 0.25% (BDH, England) HCl solution (ภาคผนวก ข.15) ใน shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าเนื้อปลาจะถูกย่อย แล้วนำมากรองผ่านตะแกรงที่มีขนาดรู 850, 300 และ 250 ไมโครเมตร เพื่อแยกกากขนาดใหญ่ออก จากนั้นนำมากรองด้วยตะแกรงซึ่งมีความถี่ขนาด 106 ไมโครเมตร ส่วนที่ค้างบนตะแกรง 106 ไมโครเมตร รวมทั้ง เมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* (ขนาดของเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ประมาณ 200 x 167 ไมโครเมตร) นำไปตกตะกอนในน้ำเกลือ (NaCl solution 0.85%) ใน sedimentation jar หลายๆ รอบ จนกระทั่งน้ำเกลือใส จึงนำมาคัดแยกเอาเฉพาะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ตามลักษณะที่บรรยายโดย Vajrasthira และคณะ (1961) ซึ่งจะเห็น oral sucker, ventral sucker เด่นชัดเจน ภายในลำตัวมีเม็ดสีน้ำตาลกระจายอยู่โดยทั่วไป และ excretory bladder มีแกรนูลเล็กๆ สีดำ ระยะตัวอ่อนพยาธิเคลื่อนไหวอย่างรุนแรงอยู่ภายในซีสต์ ทำการคัดเลือกเมตาเซอร์คาเรียภายใต้กล้องสามมิติ (stereoscope) ที่กำลังขยาย 40 เท่า แล้วเก็บไว้ในน้ำเกลือใน petri-dish ขนาดเล็ก จากนั้นนำไปย่อยผนังหุ้มโดยใช้สารละลาย trypsin solution ความเข้มข้น 1% ประมาณ 30 นาที เมื่อตัวอ่อนพยาธิออกจากผนังหุ้มแล้ว ล้างด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้ง แล้วนำมาเก็บไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบผลกระทบของ trypsin solution 1% (ภาคผนวก ข.16) ต่อตัวอ่อนที่ออกจากผนังหุ้ม ทำโดยการเปรียบเทียบการ excystation ของระยะตัวอ่อนเมตาเซอร์คาเรีย ที่ใช้วิธีการเจาะด้วยเข็มปลายแหลม ตัวอ่อนจะดันออกมาจากผนังหุ้มตรงรอยที่มีการฉีกขาด นำตัวอ่อนไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด นำตัวอ่อนพยาธิที่ออกจากถุงหุ้มไปศึกษาดังนี้

(1) การเรียงตัวและลักษณะรูปร่างของ sensory papilla ด้วยการย้อม silver nitrate และศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope) โดยใช้ตัวอ่อนพยาธิใบไม้ตับจำนวน 20 ตัว

(2) รูปร่างและลักษณะของ sensory papilla ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope: SEM) โดยใช้พยาธิใบไม้ตับจำนวน 20 ตัว

(3) ลักษณะภายในของ sensory papilla ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope: TEM) โดยใช้พยาธิจำนวน 40 ตัว

2. การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาการจัดเรียงตัวของ sensory papilla ด้วยการย้อม silver nitrate

3.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาการจัดเรียงตัวของ papilla โดยการย้อม silver nitrate มีดังนี้ นำพยาธิ 20 ตัวแช่ใน อัลกอฮอล์ 50% เป็นเวลา 10 นาที แล้วเปลี่ยนเป็น อัลกอฮอล์ 5% เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ก่อนนำไปย้อมด้วย silver nitrate 0.1% เป็นเวลา 10-30 นาที ล้างพยาธิด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว 3 ครั้ง จากนั้นนำพยาธิมาแช่ใน formalin 10% และเติม glycerline ตามลงไป ทิ้งไว้จน formalin 10% ระเหยหมดจึงนำตัวพยาธิวางบน แผ่นกระจก และปิดด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์นำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และเลือกบันทึกภาพทั้งด้านหลัง (dorsal) และด้านท้อง (ventral) ที่ต้องการ โดยมี oral sucker และ ventral sucker เป็นจุดสังเกตในการบันทึกภาพ (ภาพที่ 3-1)

3.2 นำตัวอย่างมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาที่ต่อด้วย camera lucida วาดตำแหน่งที่พบ papilla มีลักษณะเป็นเม็ดกลม ติดสีจางที่ตรงกลางเม็ด วาดรูปลงในกระดาษ รวบรวมข้อมูล โดยนำภาพที่ได้จากการวาดตำแหน่งการกระจายตัวของ sensory papilla ของพยาธิแต่ละตัวมาเทียบตำแหน่งของ sensory papilla ที่ปรากฏซ้ำกัน แต่ละจุดที่เลือกต้องพบซ้ำกันในพยาธิอย่างน้อย 4 ตัว

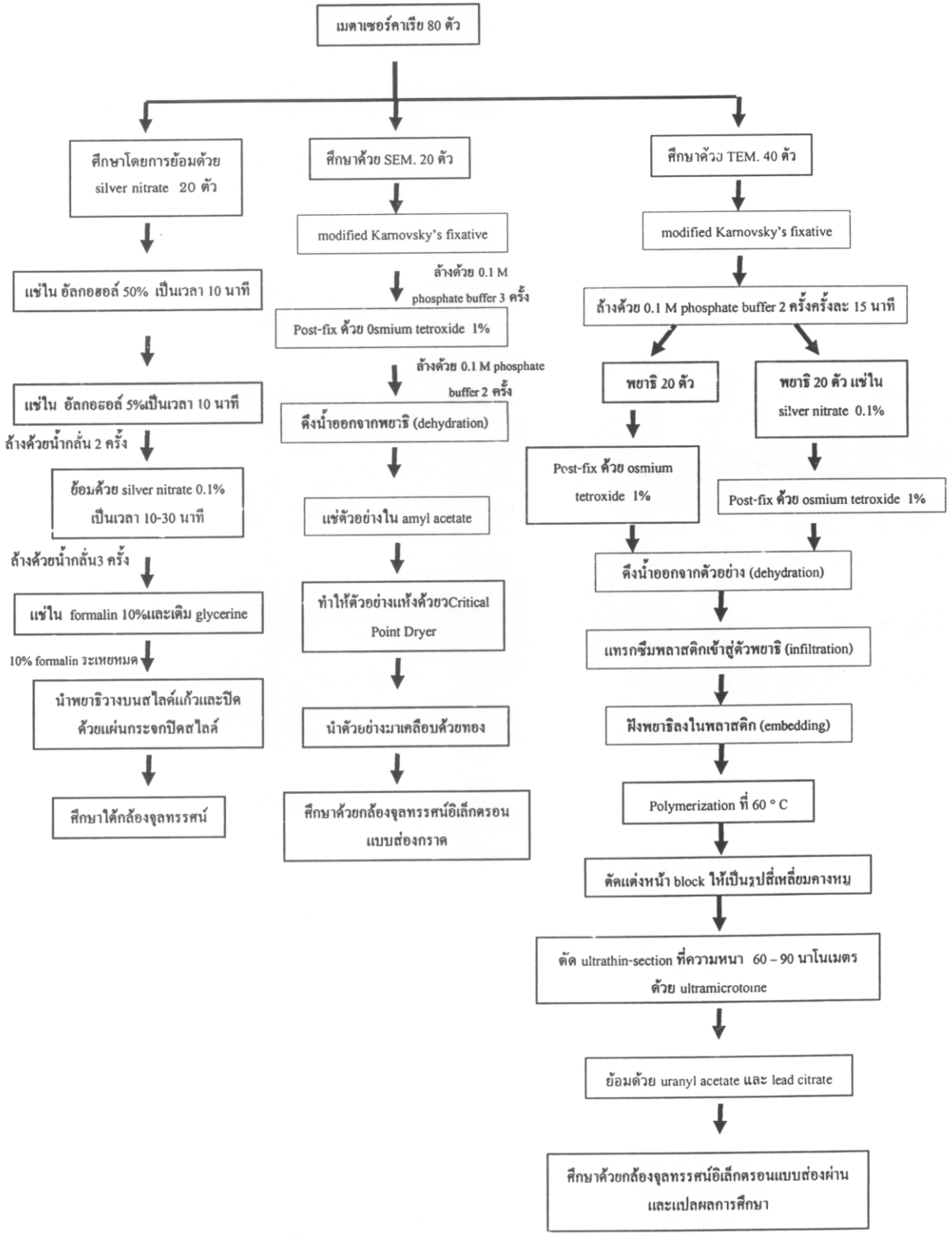
3. การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

3.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วย SEM

นำพยาธิกลุ่มที่ 2 จำนวน 20 ตัวที่แช่ใน modified Karnovsky's fixative อย่างน้อย 24 ชั่วโมง มาล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer จากนั้น postfix ด้วย osmium tetroxide 1% ใน 0.1 M phosphate buffer (ภาคผนวก ข. 3) อย่างน้อย 2 ชั่วโมง ก่อนล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer ทำการดึงน้ำออกจากตัวอย่าง (dehydration) ด้วยอัลกอฮอล์ครั้งละ 15 นาที โดยเริ่มจาก 50%, 70%, 80%, 90%, 95% และ 100% (2 ครั้ง) ตามลำดับ แช่ตัวอย่างใน amyl acetate จากนั้นทำให้ตัวอย่างแห้งด้วยเครื่อง HITACHI HCP-2 Critical Point Dryer (CPD) (Hitachi Koki, Japan) โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเป็นตัวกลาง แล้วจึงนำตัวอย่างติดบน metal stub ด้วยกาว 2 หน้า และติดมุมด้วย silver paint นำตัวอย่างมาเคลือบด้วยทองโดยใช้เครื่อง ion coater Eiko IB3 (Eiko Engineering Co, Ltd, Japan) หนาประมาณ 20-50 นาโนเมตร นำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่ accelerating voltage 10 kv. ด้วยเครื่อง HITACHI S-3000N, S-3200N (Hitachi Ltd, Japan) เลือกบันทึกภาพ และอัดภาพ นำภาพที่ได้มาศึกษารูปร่างลักษณะและการจัดเรียงตัวของ sensory papilla ดังแผนภาพแสดงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วย SEM (ภาพที่ 3-1)

3.2 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วย TEM

นำพยาธิกลุ่มที่ 3 ทั้ง 40 ตัวที่แช่ใน modified Karnovsky's fixative (ภาคผนวก ข.1) อย่างน้อย 24 ชั่วโมง มาล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer จากนั้นแบ่งพยาธิออกเป็นสองกลุ่ม โดยกลุ่มแรก 20 ตัว postfix ด้วย osmium tetroxide 1% ใน 0.1 M phosphate buffer อย่างน้อย 2 ชั่วโมง ก่อนล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer และนำพยาธิกลุ่มที่สอง (20 ตัวที่เหลือ) มาแช่ใน 0.1% silver nitrate เป็นเวลา 10 นาทีและย้อมด้วย osmium tetroxide 1% ใน 0.1 M phosphate buffer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำพยาธิทั้งสองกลุ่มมาทำการดึงน้ำออก (dehydration) ด้วยอัลกอฮอล์ โดยเริ่มจาก 50%, 70%, 80%, 90%, 95% และ 100% (2 ครั้ง) ครั้งละ 20 นาที ตามลำดับ จากนั้นนำพยาธิมา infiltration ด้วย araldite (Electron Microscopy Sciences, WA) โดยนำพยาธิแช่ลงใน araldite ที่ผสมแล้วโดยเริ่มจากอัตราส่วน araldite : propylene oxide, 1 : 3 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, araldite: propylene oxide , 1 : 1 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และ araldite: propylene oxide , 3 : 1 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและ pure araldite เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาฝัง (embed) ในพลาสติก (araldite) ใส่ตัวอย่าง ใน flat mold หรือ beem capsule และอบในตู้อบ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 48 ชั่วโมง ให้ araldite แข็งตัว นำ block เนื้อเยื่อมาตัดแต่งหน้า block ให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมูแล้วตัดด้วย ultramicrotome โดยตัดแบบ semithin และทำการย้อมสองครั้งด้วย 1% toluidine blue และ 1% basic fushin ก่อนเพื่อหาตำแหน่งที่ต้องการ จากนั้นทำการตัดโดยปรับให้ section มีความบาง 60 - 90 นาโนเมตร เก็บตัวอย่างด้วย copper grid ทำการย้อมด้วย uranyl acetate เป็นเวลา 30 นาที และ lead citrate เป็นเวลา 30 นาที ในกลุ่มแรก ส่วนกลุ่มที่สองซึ่งย้อม silver nitrate มาก่อน นำมาย้อมด้วย uranyl acetate เพียงอย่างเดียวเป็นเวลา 30 นาที แล้วศึกษาและถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านด้วยเครื่อง HITACHI H 600 electron microscope (Hitachi Ltd, Japan) ที่ accelerating voltage 75 kv. (ภาพที่ 3-1) นำฟิล์มที่เลือกไปล้าง และอัดภาพ เพื่อนำมาศึกษา



ภาพที่ 3-1 แผนภาพขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยการย้อมด้วย silver nitrate, SEM. และ TEM.

4. การคำนวณความกว้างหรือความยาว

การคำนวณความกว้างหรือความยาวที่แท้จริงของโครงสร้างในภาพคำนวณได้จาก

$$\text{ความยาวจริงของโครงสร้างในภาพ} = \frac{\text{ความยาวของโครงสร้างที่วัดในภาพ x ความยาวจริงของ scale bar}}{\text{ความยาวของ scale bar ที่วัดได้ในภาพ}}$$