รายงานผลการวิจัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

เรื่อง

การศึกษาเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเพอรอคซิเดส ในเม็ดเลือดขาวจระเข้

(Crocodylus siamensis C. porosus และ **crossbred)**

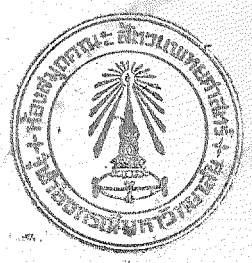
วิจัย
SF81
.ส784
2538

โดย

สุมลยา กาญจนะพังคะ
บัญญา ยังประภากร
กมล พิพัฒน์ภานุกุล
นิฐิ คงถาวร
สุจจิจพร กรอบแป้น

2538

B 1429581



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การศึกษาเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเพอรอคซิเดสในเม็ดเลือดขาวจระเข้

(Crocodylus siamensis C.porosus และ crossbred)

ห้องสมุด
คณะสัตวแพทยศาสตร์
ได้รับความร่วมมือเพื่อจาก

โดย

สุมลยา กาญจนะพังคะ
ปัญญา ยังประภากร
กมล พิพัฒน์ภานุกุล
นิฐิ คงถาวร
สุจจิจพร กรอบแป้น

เลขที่รับ 316
วันที่ 9 เมษายน 2539

กุมภาพันธ์ 2538

QF81
.A24S4
1538

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณฟาร์มจระเข้และสวนสัตว์สมุทรปราการ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สพ.ญ. จิตราภรณ์ ชาญราชกิจ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ฟาร์มฯ ที่กรุณาให้ความเอื้อเฟื้อและอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างเป็นอย่างดียิ่ง และขอขอบพระคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเป็นอย่างยิ่งที่เอื้อทุนสนับสนุนจากทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ทำให้การดำเนินการวิจัยสำเร็จลงได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเพอรอคซิเดสในเม็ดเลือดขาวจระเข้ (Crocodylus siamensis C.porosus และ crossbred)

สุนอลา กาญจนะพังคะ* กมล ทิพัตน์ภานุกุล***
ปัญญา ธังประภากร** นิธิ คงถาวร***
สุจจิจนร กรอบแก้ว***

กุมภาพันธ์ 2538

บทคัดย่อ

การจำแนกเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆจากเลือดจระเข้ 3 พันธุ์(น้ำจืด น้ำเค็มและพันธุ์ผสม) จำนวน 54 ตัว ย้อมด้วยสีไรท์-จิมซา (Wright Giemsa) และย้อมตรวจหาเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) และเพอรอคซิเดส (peroxidase) พบเม็ดเลือดขาวชนิดมีแกรนูล 4 ชนิด คือ เฮตเทโรฟิล (heterophil) อีโอซิโนฟิล(eosinophil) เบโซฟิล (basophil) และเม็ดเลือดขาวที่มีลักษณะเหมือนอซูโรฟิล(azurophil) เฮตเทโรฟิล มีขนาด 9 - 10 ไมโครเมตร นิวเคลียสรี เรียงติดขอบเซลล์ แกรนูลรูปหัวท้ายแหลม พบมีบ้างที่เป็นรูปรีเหมือนหยดน้ำตา มีเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเพอรอคซิเดส อีโอซิโนฟิล มีขนาด 8 -9 ไมโครเมตร นิวเคลียสกลมหรือรี เรียงติดขอบเซลล์ มีแกรนูลรูปร่างกลมและแท่งรี พบบ้างที่มีรูปร่างหยดน้ำตาและหัวท้ายแหลม ไม่พบเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสแต่พบเอนไซม์เพอรอคซิเดส เบโซฟิลมีขนาด 9-11 ไมโครเมตร นิวเคลียสกลมอยู่กลางเซลล์ แกรนูลมีรูปร่างกลมหลายขนาด ไม่พบทั้งเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเพอรอคซิเดส ส่วนเม็ดเลือดขาวที่มีแกรนูลติดสีอซูโรฟิลิค (อซูโรฟิล) มีขนาด 8 - 10 ไมโครเมตร นิวเคลียสกลม รูปไข่หรือรูปไตอยู่กลางเซลล์ แกรนูลเล็กละเอียด จะพบมีเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส แต่ไม่มีเอนไซม์เพอรอคซิเดส

ส่วนเม็ดเลือดขาวชนิดไม่มีแกรนูลพบ 2 ชนิด คือ โมโนไซท์ (monocyte) และลิมโฟไซท์ (lymphocyte) เซลล์ทั้งสองชนิดมีนิวเคลียสรีหรือรูปไตอยู่เอียงไปข้างหนึ่ง ไซโตพลาสซึมติดสีฟ้าอมเทาและมีลักษณะเป็นฟอง แต่ไซโตพลาสซึมของโมโนไซท์มีปริมาณมากกว่าลิมโฟไซท์มากและลิมโฟไซท์ (6-7 μm) มีขนาดเซลล์เล็กกว่าโมโนไซท์(10-16 μm) อาจสับสนลิมโฟไซท์กับทรอมโบไซต์ (thrombocyte) (5-6 μm)ได้ ไม่พบเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเพอรอคซิเดสในเซลล์ทั้งสามชนิด

---

* ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
** ฟาร์มจระเข้และสวนสัตว์สมุทรปราการ จังหวัดสมุทรปราการ
*** นิสิตชั้นปีที่ 6 ปีการศึกษา 2537 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Alkaline phosphatase and peroxidase in crocodilians leukocytes (Crocodylus siamensis, C.porosus and crossbred)

Sumolya Kanchanapangka*
Panya Youngprapakorn**
Kamol Pipatpanukul***
Nithi Kongthaworn***
Sutchiporn Krobpan***

February 1995

Abstract

Blood smear from 54 crocodiles (Crocodylus siamensis, C. porosus and crossbred) are examined after Wright-Giemsa staining. Detection of 4 granulocytes are distinguished: heterophil, eosinophil, basophil and azurophil-liked leukocyte. Heterophil with the size of 9-10 μm has oval, eccentric nucleus with mostly spiculate granules and a few tear drop-shaped granules. Heterophil contains both alkaline phosphatase and peroxidase. Eosinophil with the size of 8-9μm has round or oval eccentric nucleus. The round, rod and few tear drop-shaped and spiculate granules are packed in the cytoplasm. Eosinophil is strongly peroxidase positive but devoided of alkaline phosphatase. Basophil is 9-11 μm with centrally located round nucleus. Its cytoplasm is full of round various sizes granules and contains neither alkaline phosphatase nor peroxidase activity. Another granulocyte (8-10 μm) has centrally located round, oval or kidney shaped nucleus with small amount of fine azurophilic granules. The cytoplasm of this cell gives very strong alkaline phosphatase activity but no peroxidase is detected. Morphological and physiological characteristics of this questionable leukocyte, suggest the possibility that this cell is azurophil.

Both monocyte (8-10 μm) and lymphocyte (6-7 μm) have eccentric oval or kidney-shaped nucleus with blue-grey cytoplasm. Monocyte cytoplasm is abundant and foamy. The nucleated thrombocyte is small (5-6 μm), round cell and often confused with lymphocyte. Neither alkaline phosphatase nor peroxidase is detected in monocyte, lymphocyte or thrombocyte.

---

* Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University

** Samutprakan farm and zoo, Samutprakan 10280, Thailand.

*** Sixth year students(1994), Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทคัดย่อภาษาไทย	II
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
สารบัญ	IV
รายการตารางประกอบ	V
รายการภาพประกอบ	VI
รายการสัญญลักษณ์	VII
บทนำ	1
การวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
วิธีการวิจัย	5
ผลการวิจัย	10
อภิปรายผล	14
ข้อสรุป	21
ข้อเสนอแนะ	22
เอกสารอ้างอิง	31

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

			หน้า
ตารางที่	1	แสดงพันธุ์ เพศ ชนิดและจำนวนจระเข้ที่ใช้ทดลอง	5
ตารางที่	2	แสดงลักษณะโครงสร้างของเซลล์และคุณสมบัติการมี/ไม่มีเอนไซม์ alkaline phosphatase และ peroxidase ของเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ และเกล็ดเลือดในจระเข้	23
ตารางที่	3	แสดงจำนวนของเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ เมื่อย้อมด้วย W-G และทดสอบปฏิกิริยา alkaline phosphatase และ peroxidase	24

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

หน้า

รูปที่ 1-7 การย้อมด้วยสี Wright-Giemsa 25-26

รูปที่ 8-14 การย้อมตรวจหา alkaline phosphatase 27-28

รูปที่ 15-22 การย้อมตรวจหา peroxidase 29-30

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการสัญญลักษณ์

L = Lymphocyte

M = Monocyte

N = Nucleus

T = Thrombocyte

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

การควบคุมป้องกันและการรักษาโรค จะได้ผลดีขึ้นอยู่กับการวินิจฉัยโรคที่ถูกต้องแม่นยำและรวดเร็ว การพัฒนาทางด้านการวินิจฉัยโรคจึงเป็นสิ่งสำคัญในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ทุกชนิด เพื่อก่อให้เกิดการเลี้ยงที่ให้ผลผลิตสูงสุด การตรวจเลือดจากห้องปฏิบัติการ เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงจำนวนและชนิดของเม็ดเลือดขาวในกระแสโลหิต จะช่วยให้การวินิจฉัยโรคเป็นไปได้อย่างถูกต้องรวดเร็ว ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการตัดสินใจให้การรักษาและการป้องกันโรคที่ถูกต้องและเหมาะสม และยังช่วยในการทำนายความเป็นไปของโรคในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงจระเข้ ซึ่งเป็นอุตสาหกรรมที่ก่อให้เกิดรายได้และส่งเสริมเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก ปัจจุบันการพัฒนาทางด้านการวินิจฉัยโรคยังมีไม่มากเท่าที่ควร การตรวจเลือดจากห้องปฏิบัติการยังไม่สามารถทำได้ เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาจำแนกเม็ดเลือดขาวของจระเข้อย่างจริงจังนัก มีเพียงการจำแนกเม็ดเลือดขาวเป็นภาพรวมในสัตว์เลื้อยคลาน และจะจำแนกโดยอิตเอาชนิดเม็ดเลือดขาวในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นหลัก โดยมิได้คำนึงถึงหน้าที่และจุดกำเนิดของเซลล์ (Frye, 1973 ;Frye,1977 ;Frye,1991 และ Hawkey and Dennett,1989) ทำให้เกิดความสับสนในการจำแนกเม็ดเลือดขาวในสัตว์เลื้อยคลานแต่ละชนิดได้

การเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาวขึ้นสูงมากกว่าปกติในจระเข้โดยเฉพาะอย่างยิ่ง heterophil มีความสำคัญคล้ายกับการเพิ่มจำนวนของ neutrophil ในกระแสโลหิตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Dellman and Brown, 1987 และ Hawkey and Dennett, 1989) ด้วยเหตุที่เซลล์นี้จะทำหน้าที่กำจัดเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่เข้าไปในร่างกาย โดยใช้เอนไซม์ภายในเซลล์ย่อยสลายสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้น ดังนั้นจำนวน heterophil ที่เพิ่มขึ้นสูงมากกว่าปกติจะช่วยบ่งชี้ถึงภาวะการติดเชื้อจากบักเตรีหรือเชื้อรา การเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อ โรคในกระบวนการสันดาป มะเร็งเม็ดเลือดขาวหรือภาวะเครียดได้ นอกจากนี้หากพบ nucleus ของ heterophil ในสัตว์เลื้อยคลานที่มีลักษณะเป็นพูจะบ่งชี้ถึงการติดเชื้อได้ หรือการพบลักษณะผิดปกติอื่น ๆ ของแกรนูโลไซต์ได้แก่ ความผิดปกติในการติดสี การพบฟองอากาศในไซโตพลาสซึม ลักษณะแกรนูลที่ผิดปกติไป ฯลฯ ความผิดปกติเหล่านี้จะช่วยในการวินิจฉัยโรคทั้งสิ้น การจำแนกชนิดต่าง ๆ ของเม็ดเลือดขาวจึงเป็นสิ่งที่ควรกระทำเป็นอย่างยิ่ง โดยเฉพาะการตรวจนับเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil/heterophil ออกจากเม็ดเลือดขาวชนิดอื่น จากการศึกษาของคณะผู้วิจัย (Kanchanapangka and Youngprapakorn, 1994) พบว่าบางครั้ง heterophil และ

eosinophil ของจระเข้มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกันมากอาจทำให้สับสนได้ การตรวจหาเอนไซม์ alkaline phosphataseและ peroxidase ในเซลล์เม็ดเลือดขาวจระเข้น่าจะเป็นข้อบ่งชี้ช่วยในการจำแนก heterophil ได้ นอกจากนี้การศึกษาเอนไซม์ 2 ชนิดข้างต้นภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวยังช่วยบ่งชี้สภาวะการเกิดโรคบางโรคได้โดยปริมาณของ alkaline phosphatase จะเพิ่มมากขึ้นหรือลดลงตามจำนวนเม็ดเลือดขาวที่เพิ่มสูงขึ้นหรือลดต่ำกว่าปกติในสภาวะการเกิดโรคต่างๆ เช่น เพิ่มขึ้นในโรค polycytemia vera และ multiple myeloma หรือลดต่ำลงในโรค myelocytic leukemia สำหรับปริมาณที่เพิ่มขึ้นหรือลดต่ำลงของเอนไซม์ peroxidase นั้นจะช่วยบ่งชี้โรค acute nonlymphocytic leukemia และ acute nonmyelocytic leukemia ได้

การใช้เทคนิคฮิสโตเคมีตรวจหาเอนไซม์ alkaline phosphatase และ peroxidase ของเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆของจระเข้ เพื่อใช้คุณสมบัติดังกล่าวที่แตกต่างกันของแกรนูโลไซต์แต่ละชนิด ร่วมกับลักษณะโครงสร้างของเซลล์และ differential count ของเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดเป็นข้อบ่งชี้ช่วยในการจำแนกเม็ดเลือดขาวแกรนูโลไซต์ชนิดต่างๆในจระเข้ได้ถูกต้องยิ่งขึ้น จะช่วยทำให้การวินิจฉัยโรคเป็นไปได้อย่างถูกต้องรวดเร็ว รวมทั้งสามารถทำนายความเป็นไปของโรค อันจะนำไปสู่ความสำเร็จในการรักษาและป้องกันโรคต่อไป

การวิจัยที่เกี่ยวข้อง

รายงานการจำแนกเม็ดเลือดขาวในสัตว์เลื้อยคลาน ยังไม่ชัดเจนและสับสนอยู่มาก โดย Frye (1973, 1977, 1991) ได้รายงานว่าในสัตว์เลื้อยคลานจะพบทั้ง neutrophil และ heterophil โดยที่ neutrophil จะมีทั้งเอนไซม์ alkaline phosphatase และ peroxidase ขณะที่อีกหลายรายงานรายงานว่า จะไม่พบ neutrophil ในสัตว์เลื้อยคลาน แต่จะมีเพียง heterophil ซึ่งเทียบเคียงได้กับ neutrophil ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม(Caxton-Martin,1977;Desser,1978;Hawkey and Dennett ,1989 และ Pienaar,1962) และอาจพบหรือไม่พบ alkaline phosphatase และ peroxidase ใน heterophil ของสัตว์เลื้อยคลานก็ได้(Caxton - Martin,1977;Desser,1978 และ Pienaar,1962) จากรายงานของ Humason (1979) พบว่า เอนไซม์ alkaline phosphatase จะพบใน neutrophil ของสัตว์ทุกชนิด ยกเว้นในหนูถีบจักรและไก่ แต่ก็มีรายงานว่าจะไม่พบเอนไซม์ alkaline phosphatase ใน neutrophil ของสุนัขและแมวด้วยเช่นกัน (Bell and Thomas, 1962 ;Kaplow,1968 และ Moloney,1958)

การศึกษาเกี่ยวกับ eosinophil ในสัตว์ชนิดต่างๆ พบว่า จะมีลักษณะไม่แตกต่างกันมาก และพบมีเอนไซม์ peroxidase ในแกรนูล (Archer,1963) ซึ่งตรงกับรายงานการพบเอนไซม์ peroxidase ใน eosinophil ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Buys et al.,1981 และ Kaplow,1965) และในสัตว์เลื้อยคลาน (Frye,1991) และมีรายงานพบ alkaline phosphatase ใน eosinophil ของม้า,วัว,แกะ,แพะ (Bell and Thomas,1962) หนูขาว,ลา และวัวตัวผู้ที่ตอนแล้ว (Moloney,1958) ส่วนการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติการมี หรือไม่มีเอนไซม์ในเม็ดเลือดขาวชนิดแกรนูโลไซต์อื่น ๆ ในสัตว์เลื้อยคลาน ยังไม่มีการกล่าวถึงมากนัก

ในการจำแนกเม็ดเลือดขาวชนิดแกรนูโลไซต์ในสัตว์ปีก และสัตว์เลื้อยคลานจะจำแนกคล้ายกัน คือ แยกเป็น heterophil ,eosinophil และ basophil ซึ่งแม้จะมีความแตกต่างกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั้งด้านรูปร่างและการเรียกชื่อ แต่ก็เป็นไปได้ว่าจะมีหน้าที่เหมือนกัน โดย heterophil จะเทียบเคียงได้กับ neutrophil ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในสัตว์เลื้อยคลานยังมีเม็ดเลือดขาวอีกชนิดหนึ่งที่พบเฉพาะในสัตว์เลื้อยคลานเท่านั้น คือ azurophil(Duguy,1970;Hawkey and Denett,1989;Jacobson and Kollias,1988 และ Pienaar,1962) แต่ยังไม่มีการศึกษาอย่างชัดเจนถึงต้นกำเนิดและหน้าที่ของ azurophil ทำให้เกิดความไม่แน่นอนว่า จะจัดอยู่ในเม็ดเลือดขาวชนิดแกรนูโลไซต์หรือในกลุ่มของเม็ดเลือดขาวที่ไม่มีแกรนูล แต่เนื่องจากหน้าที่ของ azurophil เกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองต่อการอักเสบ และจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อ (Hawkey and Dennett,1989) จึงอาจเป็นไปได้ว่า azurophil จะจัดเป็นเม็ดเลือดขาวชนิดแกรนูโลไซต์ และจากรายงานการจำแนกเม็ดเลือดขาวเฉพาะในจระเข้พบว่า มีเม็ดเลือดขาวที่มีแกรนูลอีกชนิดหนึ่งนอกจาก heterophil, eosinophil และ basophil คือ azurophil (Kanchanapangka and Youngprapakorn, 1994)

ความแตกต่างในรูปร่างและขนาดของเซลล์ นิวเคลียสและไซโตพลาสซึม ลักษณะการติดสีของส่วนประกอบของเซลล์ และลักษณะแกรนูลในไซโตพลาสซึมสามารถใช้จำแนกเม็ดเลือดขาวชนิดแกรนูโลไซต์ของจระเข้ได้ แต่ยังมีปัญหาอยู่มากในการจำแนก heterophil และ eosinophil ซึ่งเซลล์ทั้งสองจะมีนิวเคลียสที่มีรูปร่างรีเอียงไปข้างใดข้างหนึ่งของเซลล์เหมือนกัน โดยที่ heterophil บางเซลล์จะพบเฉพาะแกรนูลรูปหัวท้ายแหลม (spiculate) เท่านั้น ขณะที่บางเซลล์พบทั้งแกรนูลที่มีรูปหัวท้ายแหลมและรูปรีเหมือนหยดน้ำตา (tear-drop liked)อยู่ปนกัน อาจทำให้สับสนกับ eosinophil

ซึ่งเป็นเม็ดเลือดขาวที่มีแกรนูลรูปร่างหลายชนิด คือ รูปร่างกลม แท่งรี หรือหยดน้ำตา โดยเฉพาะเมื่อแกรนูลของ heterophil อัดแน่นและไม่มีแกรนูลเด่นๆให้เห็น (Kanchanapangka and Youngprapakorn,1994) วิธีการหนึ่งที่เสนอโดย Hawkey และ Dennett (1989) เพื่อแยก heterophil ออกจาก eosinophil คือ การแช่ (fix)เม็ดเลือดในน้ำยาดอง (fixative) เป็นเวลาสั้นๆ จะทำให้แกรนูลของ heterophil และ basophil ละลาย หรือใช้น้ำยาดองที่มีส่วนผสมเป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งจะทำให้แกรนูลของทั้ง heterophil และ basophil ละลายเช่นกัน แต่แกรนูลของ eosinophil จะยังคงอยู่ (Kanchanapangka and Youngprapakorn,1994) แต่วิธีการดังกล่าวให้ผลไม่แน่นอน กล่าวคือ บางครั้งยังพบว่า แกรนูลของ heterophil และ basophil ไม่ละลายและยังคงอัดแน่นอยู่ในเซลล์ ทำให้เกิดความสับสนในการแยก heterophil ออกจาก eosinophil

เม็ดเลือดขาวชนิดไม่มีแกรนูล คือ monocyte และ lymphocyte พบทั้งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม, สัตว์ปีกและสัตว์เลื้อยคลาน Hawkey and Dennett (1986)ได้จัด azurophil เป็นเม็ดเลือดขาวพวกที่ไม่มีแกรนูล monocyte มักมีนิวเคลียสเป็นรูปไต หรือรี ไซโตปลาสซึมสีฟ้า-เทา อาจพบแกรนูลติดสีจาง ๆ ปนอยู่ด้วย monocyte ในกระแสเลือดมีจำนวนน้อยมาก ยกเว้นในช้างซึ่งมีมาก หน้าที่สำคัญของmonocyte คือหุ้มกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือโครงสร้างที่เสื่อมแล้ว นอกจากนี้ monocyte ยังรวบรวมแอนติบอดี้ (antibody) และทำงานร่วมกับ lymphocyte ด้วย lymphocyte มีขนาดเล็กกว่า monocyte นิวเคลียสกลมหรือรีอยู่กลางเซลล์หรือเอียงไปข้างหนึ่งอาจพบ azurophilic หรือ basophilic granules ภายในเซลล์ ในสัตว์ปีกและสัตว์เลื้อยคลานมักจะสับสนกับธรอมโบไซต์ หรือเม็ดเลือดแดงเซลล์แตกที่เหลือแต่นิวเคลียส ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีก lymphocyte จะทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน

ทรอมโบไซต์ในสัตว์ปีกและสัตว์เลื้อยคลานจะเรียกว่า thrombocyte เนื่องจากมีขนาดใหญ่กว่าทรอมโบไซต์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและมีนิวเคลียส thrombocyte อาจมีรูปร่างรี กระสวย หรือกลม นิวเคลียสอาจรีหรือกลม อาจพบ basophilic granules ในไซโตพลาสซึมสีฟ้า-เทาขนาดเล็กด้วย (Hawkey & Dennett, 1989)

วิธีการวิจัย

สัตว์ทดลอง

ตัวอย่างเลือดจากจระเข้ทั้งหมด 54 ตัว อายุ 6-7 ปี แยกเป็นจระเข้น้ำจืด (Crocodylus siamensis) จำนวน 38 ตัว จระเข้น้ำเค็ม (C.porosus) 8 ตัว และพันธุ์ผสม 8 ตัว (crossbred) โดยแต่ละพันธุ์จะแยกเป็นจระเข้เพศเมียและเพศผู้อย่างละเท่า ๆ กัน (ตารางที่ 1) และตัวอย่างเลือดหนูขาว (rat) 2 ตัว เป็น positive control สำหรับการย้อมตรวจหา alkaline phosphatase

ตารางที่ 1 แสดงพันธุ, เพศ, ชนิดและจำนวนจระเข้ที่ใช้ทดลอง

ประเภทจระเข้ / เพศ	น้ำจืด	น้ำเค็ม	พันธ์ผสม	รวม (ตัว)
เพศผู้	19	4	4	27
เพศเมีย	19	4	4	27
รวม (ตัว)	38	8	8	54

หนูขาว 2 ตัว เป็น positive control สำหรับการตรวจหา alkaline phosphatase

สารเคมีและอุปกรณ์

1. ชุดทดสอบสำเร็จรูปสำหรับตรวจหาเอนไซม์ alkaline phosphatase ในเม็ดเลือดขาว*
2. ชุดทดสอบสำเร็จรูปสำหรับตรวจหาเอนไซม์ peroxidase ในเม็ดเลือดขาว*
3. สีย้อม Wright's stain with Giemsa stain(W-G stain)**
4. กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

---

* Sigma diagnostics , Sigma Chemical company, USA

** Clinag Co. Ltd.,BKK

วิธีการ

การเตรียมตัวอย่างเลือด

1. เก็บตัวอย่างเลือดของจระเข้ โดยเจาะเลือดจากแองเลือดที่อยู่ระหว่างส่วนท้ายของกระโหลกศีรษะและกระดูกคอ เข้าในหลอดที่มี heparin เป็นสารกันเลือดแข็งตัว

2. ปั่นเลือดที่ 2,500-3,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที จะได้ชั้นเม็ดเลือดขาวอยู่ข้างบน

3. ป้ายเม็ดเลือดขาวจากจระเข้แต่ละตัวลงบนสไลด์ 6 แผ่นผึ่งให้แห้ง โดยแยกเป็นการย้อม W-G stain การย้อมตรวจหา alkaline phosphatase และการย้อมตรวจหาperoxidase อย่างละ 2 แผ่น

การย้อม Wright-Giemsa stain (W-G stain)

นำสไลด์ที่ป้ายเลือดแล้ว มาย้อมด้วย W-G stain โดยมีขั้นตอนการย้อมดังนี้

1. หยดสี W-G stain ให้ท่วมสไลด์ ทิ้งไว้ประมาณ 4 นาที

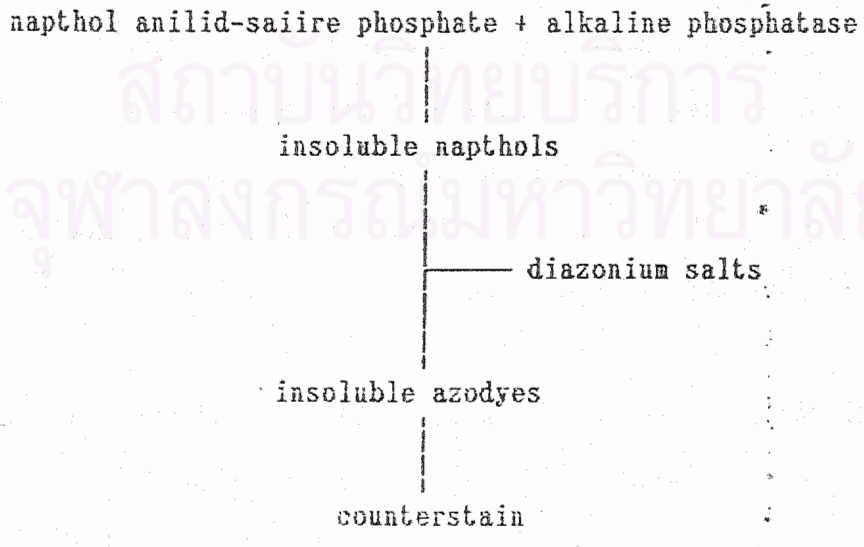
2. เทสี W-G stain ทิ้ง แล้วหยด phosphate buffer ให้ท่วมสไลด์ทิ้งไว้ 7 นาที

3. ล้างด้วยน้ำไหล

4. รอให้แห้ง แล้วนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

การย้อมตรวจหา alkaline phosphatase โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป

นำสไลด์ที่ป้ายเลือดแล้วมาย้อมตรวจหา alkaline phosphatase โดยใช้หลักการ azo-coupling (Humason,1979 และ Kaplow,1968) ซึ่งมีหลักการดังนี้



ในการทดลองนี้ได้เลือกใช้ stable diazonium salt ของ fast red violet LB base, sodium nitrite และ stable solution napthol AS-BI phosphate โดยใช้ hematoxylin เป็นสี counterstain ซึ่งบริเวณแหล่งที่มี alkaline phosphatase จะปรากฏเป็นสีแดง โดยมีสารเคมีที่ใช้ และขั้นตอนการตรวจหา ดังนี้

สารเคมี

1. Naphthol AS-BI alkaline solution (Naphthol AS-BI phosphate 4 mg/ml,in AMPD buffer , 2 mol/L , pH 9.5)

2. FRV-alkaline solution (Fast red violet LB base 5 mg/ml, in hydrochloric acid,0.4 mol/L , with stabilizer)

3. Sodium nitrite solution (Sodium nitrite, 0.1 mol/L)

4. Citrate solution (citric acid 18 mmol/L ,sodium citrite 9 mmol/L ,sodium chloride 12 mmol/L with surfactant ,buffered at pH 3.6)

5. Hematoxylin solution (Hematoxylin ,certified 6.0 g/L, sodium iodate 0.6 g/L และ aluminum sulphate 52.8 g/L with stabilizer)

6. Citrate-acetone-formaldehyde fixative(citrate solution 25 ml , acetone 65 ml , formaldehyde 37 % 8 ml)

ขั้นตอน

1. ตวงน้ำกลั่น 45 ml ปรับอุณหภูมิให้ได้ 18-26 องศาเซลเซียส

2. เตรียม diazonium salt solution โดยการเติม sodium nitrite solution 1 ml ลงใน FRV alkaline phosphatase solution 1 ml ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที

3. นำ diazonium salt solution ที่เตรียมได้ ใส่ลงในน้ำกลั่นที่ปรับอุณหภูมิแล้ว

4. เติม naphthol AS-BI alkaline solution 1 ml เพื่อเจือจาง diazonium salt solution ผสมให้เข้ากัน จะได้ alkaline-dye mixture เทใส่ coplin jar

5. อุ่น citrate-acetone-formaldehyde ให้ได้อุณหภูมิ 18-26 องศาเซลเซียส จุ่มสไลด์ใน fixative solution นาน 30 วินาที แล้วรินน้ำกลั่นล้างซ้ำๆ นาน 45 วินาที อย่าให้สไลด์แห้ง

6. ใส่สไลด์ใน alkaline-dye mixture และทิ้งไว้ที่ 18-26 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที อย่าให้สไลด์โดนแสง และทิ้ง alkaline-dye mixture หลังจากใช้

7. เมื่อทิ้งไว้ 15 นาทีแล้ว เอาสไลด์ออกมาแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น นาน 2 นาที อย่าให้สไลด์แห้ง

8. counterstain ด้วย hematoxylin solution นาน 2 นาที

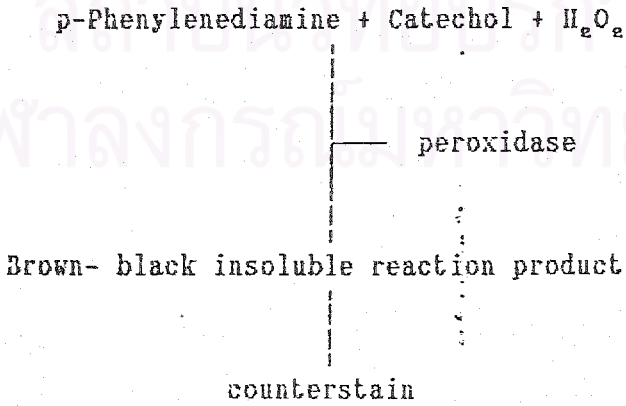
9. ล้างสไลด์ด้วยน้ำก๊อกและผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์-ธรรมดา

สไลด์ควบคุม

ในการทดลองนี้ใช้เลือดหนูขาวเป็น positive control เนื่องจากใน segmented neutrophil ของหนูขาวจะมี alkaline phosphatase อยู่มาก (Bell and Thomas,1962;Humason,1979;Kaplow,1968 และ Moloney,1958) โดยเตรียมตัวอย่างเลือดเช่นเดียวกับเลือดจระเข้และย้อมหา alkaline phosphatase ตามขั้นตอนข้างต้น

การย้อมตรวจหา peroxidase โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป

นำสไลด์ที่ป้ายเลือดแล้วมาย้อมตรวจหา peroxidase โดยใช้วิธีของ Hanker และคณะ(1977) ซึ่งมีหลักการดังนี้



ในการทดลองนี้ใช้ acid hematoxylin เป็นสี counterstain บริเวณแหล่งที่มี peroxidase จะปรากฏสีน้ำตาลดำ สารเคมีที่ใช้และขั้นตอนการตรวจหามีดังนี้

สารเคมี

1. Trizmal buffer concentrate, pH 6.3 (trizmal maleate 200 mmol/l ใส่ chloroform เป็น preservative)

2. Peroxidase indicator reagent (p-phenylenediamine diHCl 1 ส่วนและ catechol 2 ส่วน)

3. Acid hematoxylin solution (hematoxylin, certified 1 g/l pH 3.3 ที่ 25 องศาเซลเซียส)

4. Fixative solution (formaldehyde 37% 5 ml, ethanol 95% 45 ml)

5. Hydrogen peroxide 3% ใน phosphate buffered-saline solution (hydrogen peroxide 30% 1 ส่วน , phosphate buffered-saline solution 9 ส่วน)

ขั้นตอน

1. จุ่มแผ่นสไลด์ที่ป้ายเลือดแล้วลงใน fixative solution นาน 30 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง

2. ล้างด้วยน้ำไหลเบาๆ 2 นาที แล้วปล่อยให้แห้งในที่มืด 10 นาที

3. อุ่น trizmal diluted buffer 50 ml ในน้ำอุ่น 37 องศาเซลเซียส

4. ผสม peroxidase indicator reagent 1 ขวด กับ hydrogen peroxide 3% 0.2 ml ลงใน trizmal diluted buffer ที่อุ่นไว้ ใช้แล้วทิ้ง

5. จุ่มสไลด์ใน peroxidase indicator reagent solution ที่เตรียมไว้นาน30 นาที ในน้ำอุ่น 37 องศาเซลเซียส ในที่มืด

6. ล้างด้วยน้ำไหลเบาๆ 15-30 วินาที แล้วปล่อยให้แห้ง

7. counterstain ด้วย acid hematoxylin solution 10 นาที

8. ล้างด้วยน้ำกลั่น 15-30 วินาที ปล่อยทิ้งให้แห้งแล้วนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

สไลด์ควบคุม

ใช้ความร้อนทำลายเอนไซม์ peroxidase ในเม็ดเลือดขาวจะเข้า เป็น negative control (Humason, 1979) โดยป้ายเม็ดเลือดขาวจะเข้ลงบนสไลด์แล้วนำมาจุ่มใน fixative solution นำไปอบในตู้อุณหภูมิ 100° C ความชื้น 70-80 % นาน 30 นาที เพื่อให้ความร้อนทำลายการทำงานของ peroxidase ในเม็ดเลือดขาว

จระเข้ สไลด์ที่นำออกจากตู้อบจะนำไปทำการตรวจหา peroxidase ตามขั้นตอนข้างต้น

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

สไลด์ทั้งหมดจากการย้อมทั้ง 3 แบบ มาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา การจำแนกเม็ดเลือดขาวจะจำแนกตามความแตกต่างของโครงสร้างของเซลล์คือขนาดและลักษณะของเซลล์ รูปร่างและตำแหน่งของนิวเคลียสและการติดสีของไซโตพลาสซึม(ลักษณะการติดสีของส่วนประกอบของเซลล์) รูปร่างและสีของแกรนูล(หากมี) หลังจากจำแนกแล้วจะตรวจนับจำนวนของเม็ดเลือดขาวเฉพาะชนิดแกรนูโลไซต์ที่พบ

ในการย้อมตรวจหา alkaline phosphatase บริเวณที่ติดสีแดง จะบ่งถึงว่าเป็นบริเวณที่มี alkaline phosphatase อยู่

ส่วนในการย้อมตรวจหา peroxidase บริเวณที่ติดสีน้ำตาลหรือน้ำตาลดำ จะเป็นบริเวณที่มีเอนไซม์ peroxidase

แบ่งระดับของการติดสีออกเป็น 0 ถึง +3 ซึ่งจะบ่งถึงปริมาณของเอนไซม์ด้วยดังนี้

0 : ไม่ติดสี

+1 : ติดสีเป็นจุดๆในไซโตพลาสซึม

+2 : ติดสีกระจายเป็นหย่อมในไซโตพลาสซึม

+3 : ติดสีเข้มเต็มไซโตพลาสซึม

ลักษณะโครงสร้างและจำนวนของเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ จากการย้อม W-G stain จะใช้เป็นหลักในการจำแนกเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ ที่พบในการย้อมตรวจหา alkaline phosphatase และ peroxidase หลังจากนั้นจะต้องเปรียบเทียบจำนวนแกรนูโลไซต์แต่ละชนิดของตัวอย่างเลือดจระเข้ตัวเดียวกันจากการย้อมทั้ง 3 แบบ ซึ่งในเลือดจระเข้ตัวเดียวกัน ควรมีจำนานแกรนูโลไซต์แต่ละชนิดใกล้เคียงกัน ไม่ว่าจะเป็นการย้อม W-G stain alkaline phosphatase หรือ peroxidase การเปรียบเทียบดังกล่าวจะช่วยสนับสนุนผลการจำแนกแกรนูโลไซต์ชนิดต่างๆของจระเข้ได้แม่นยำขึ้น

ผลการวิจัย

การย้อม Wright-Giemsa stain (ตารางที่ 2 และ 3)

พบเม็ดเลือดขาวชนิด granulocytes (4 ชนิด) agranulocytes (2 ชนิด) และกรอมโบโซต์มีลักษณะโครงสร้างดังนี้

Granulocytes

1. Heterophil (รูปที่ 1) เซลล์มีลักษณะกลมหรือรีเด็กน้อย ขนาด 8-10 μm

นิวเคลียสติดสีน้ำเงินจางมีรูปร่างรี เรียงชิดขอบเซลล์ มีแกรนูลรูปหัวท้ายแหลม (spiculate) ติดสีชมพูเข้ม(acidophilic) จำนวนมากอัดแน่นในไซโตพลาสซึม จากการตรวจดู heterophil ที่พนังเซลล์แตก (รูปที่ 2) จะพบแกรนูลติดสี acidophilic รูปหัวท้ายแหลมจำนวนมาก และพบรูปรีคล้ายหยดน้ำตาปนอยู่เล็กน้อย อัตราส่วนของนิวเคลียสะไซโตพลาสซึม เท่ากับ 1:2-2.5 จะพบ heterophil เป็นจำนวนมากที่สุดเฉลี่ยประมาณ 51.2% (41-59) ของแกรนูโลไซต์ทั้งหมด ในกรณีที่แกรนูลอยู่กันอัดแน่นมากทำให้บางครั้งสับสนกับ eosinophil เนื่องจากไม่สามารถบอกรูปร่างแกรนูลได้

2. Eosinophil (รูปที่ 3) เซลล์มีลักษณะกลมขนาด 8-9 μm นิวเคลียสติดสีน้ำเงินมีรูปร่างกลมหรือรี มักพบอยู่เรียงไปด้านหนึ่งของเซลล์ แต่บางครั้งก็อาจพบอยู่กลางเซลล์ได้ มีแกรนูลรูปแท่งรีและกลม (rod and round) ติดสีแดงเข้ม(acidophilic) อัดแน่นในไซโตพลาสซึม จากการตรวจดู eosinophil ที่พนังเซลล์แตก (รูปที่ 4) จะพบแกรนูลติดสี acidophilic เข้ม รูปร่างกลมและแท่งรีจำนวนมาก และพบแกรนูลรูปหยดน้ำตาและรูปหัวท้ายแหลมปนอยู่เล็กน้อย อัตราส่วนนิวเคลียสะไซโตพลาสซึมเท่ากับ 1:2.5-3 จะพบ eosinophil มีจำนวนไม่มากนักเฉลี่ยประมาณ 6.6%(2-10) ของแกรนูโลไซต์ทั้งหมด

3. Basophil(รูปที่ 5,6) เซลล์มีลักษณะกลม ขนาด 8-11 μm นิวเคลียสติดสีน้ำเงินจางมีรูปร่างกลมอยู่กลางเซลล์ มีแกรนูลรูปร่างกลมหลายขนาดย้อมติดสีม่วงเข้มอัดแน่นอยู่เต็มเซลล์ บางครั้งทำให้มองเห็นนิวเคลียสไม่ชัดเจน อัตราส่วนของนิวเคลียสะไซโตพลาสซึมเท่ากับ 1:1 จะพบ basophil เฉลี่ยประมาณ 31.7%(23-39) ของแกรนูโลไซต์ทั้งหมด

4. เซลล์ A (รูปที่ 7) เซลล์มีลักษณะกลม ขนาด 8-9 μm นิวเคลียสติดสีน้ำเงินจางถึงเข้มมีรูปร่างกลม ไข่ หรือรูปไตอยู่กลางเซลล์ แกรนูลเล็กละเอียดติดสีม่วงแดง(azurophilic)กระจายอยู่ในไซโตพลาสซึมที่ย้อมติดสีน้ำเงิน อัตราส่วนของนิวเคลียสะไซโตพลาสซึม เท่ากับ 1:0.8-1 จะพบเซลล์ A เฉลี่ยประมาณ 10.5%(5-15) ของแกรนูโลไซต์ทั้งหมด

Agranulocyte และทรอมโบไซต์

Agranulocytes 2 ชนิดคือ monocyte(10-16 μm) และ lymphocyte (รูปที่ 7) เซลล์ทั้งสองชนิดมีนิวเคลียสรีหรือรูปไต มักเรียงไปข้างหนึ่ง ไซโตพลาสซึมของ monocyte สีฟ้าเทามีปริมาณมาก และอาจเห็นลักษณะเป็นฟองได้ชัดเจน lymphocyte มีขนาดเล็ก (6-7 μm) และมีไซโตพลาสซึมน้อย อาจสับสนกับทรอมโบไซต์ซึ่งมีขนาด

5-6 μm (รูปที่ 7) ได้ง่าย

การย้อมตรวจหา alkaline phosphatase (ตารางที่ 2 และ 3)

สไลด์ควบคุม (positive control): พบว่า neutrophil ของหนูขาวซึ่งมีแกรนูลเล็กละเอียดอยู่เต็มเซลล์เกิดปฏิกิริยา alkaline phosphatase ($Al\text{-}P^{+++}$) คือ ติดสีแดงเข้มทั่วไซโตพลาสซึม (รูปที่ 8)

Granulocytes

1. เซลล์ B(รูปที่ 9)เซลล์มีลักษณะกลมหรือรีเล็กน้อย ขนาด 10-11 μm***เกิดปฏิกิริยา alkaline phosphatase($Al\text{-}P^{+}$) ติดสีแดงกระจายเป็นจุดๆในไซโตพลาสซึม นิวเคลียสติดสีน้ำเงินมีรูปร่างรีเอียงชิดขอบเซลล์ แกรนูลบางส่วนติดสีแดง กระจายอยู่ภายในไซโตพลาสซึม อัตราส่วนนิวเคลียสะไซโตพลาสซึมเท่ากับ 1:2.5-3 จะพบมีจำนวนมากที่สุดเฉลี่ย 52.5%(40-64) ของแกรนูโลไซต์ทั้งหมด

2.เซลล์ C (รูปที่ 10) เซลล์มีลักษณะกลม ขนาด 9-10 μm*** เกิดปฏิกิริยา alkaline phosphatase($Al\text{-}P^{+++}$) ติดสีแดงเข้มเต็มไซโตพลาสซึม นิวเคลียสติดสีน้ำเงินจางมีรูปร่างกลม รูปไข่ หรือรูปไตอยู่กลางเซลล์ แกรนูลเล็กละเอียดติดสีแดง อัดแน่นเต็มไซโตพลาสซึม อัตราส่วนของนิวเคลียสะไซโตพลาสซึม เท่ากับ 1:1-1.2 จะพบมีเฉลี่ยประมาณ 13% (5-21)ของแกรนูโลไซต์ทั้งหมด

3. เซลล์ D(รูปที่ 11)เซลล์มีลักษณะกลม ขนาด 9-10 μm*** ไม่เกิดปฏิกิริยา alkaline phosphatase ($Al\text{-}P^{-}$) นิวเคลียสติดสีน้ำเงินมีรูปร่างกลมหรือรี มักพบเอียงชิดขอบเซลล์ แกรนูลรูปกลมไม่ติดสีอัดแน่นในไซโตพลาสซึม จากการตรวจดูเซลล์ C ที่พังเซลล์แตก(รูปที่ 12) พบแกรนูลรูปกลมและแท่งรีจำนวนมาก และพบมีรูปหยดน้ำตาและหัวท้ายแหลมปนอยู่บ้าง อัตราส่วนของนิวเคลียสะไซโตพลาสซึม เท่ากับ 1:2 จะพบเฉลี่ยประมาณ 6.5% (2-10)ของแกรนูโลไซต์ทั้งหมด

4. เซลล์ E(รูปที่ 13)เซลล์มีลักษณะกลม ขนาด 9-11 μm*** ไม่เกิดปฏิกิริยา alkaline phosphatase ($Al\text{-}P^{-}$) นิวเคลียสติดสีน้ำเงินมีรูปร่างกลม แกรนูลกลมหลายขนาดไม่ติดสี อัดแน่นเต็มไซโตพลาสซึม อัตราส่วนของนิวเคลียสะไซโตพลาสซึมเท่ากับ 1:1 จะพบประมาณ 28%(18-38) ของแกรนูโลไซต์ทั้งหมด

Agranulocytes และทรอมโบไซต์

ไม่พบ alkaline phosphatase ใน monocyte (รูปที่ 9,14) และทรอมโบไซต์ (รูปที่ 10) ส่วนใน lymphocyte (รูปที่ 14) พบปฏิกิริยา alkaline phosphatase แต่อ่อนมาก ($Al\text{-}P^{-}$)

การย้อมตรวจหา peroxidase (ตารางที่ 2 และ 3)

การตรวจหา peroxidase ใน granulocytes agranulocytes และกรอมโบโซด์มีดังนี้

Granulocytes

1.เซลล์ F (รูปที่ 15) เซลล์มีลักษณะกลมหรือรีเล็กน้อย ขนาด 9-10 μm^{***} เกิดปฏิกิริยา peroxidase (P^{++}) ติดสีน้ำตาลดำกระจายเป็นหย่อมในไซโตพลาสซึม นิวเคลียสติดสีม่วงมีรูปร่างรีเอียงชิดขอบเซลล์ พบแกรนูลรูปหัวท้ายแหลมติดสีน้ำตาลดำชัดเจน อัตราส่วนของนิวเคลียสะไซโตพลาสซึม เท่ากับ 1:2-2.5 พบเซลล์ชนิดนี้มากที่สุด เฉลี่ยประมาณ 49.5%(41-59) ของแกรนูโลไซต์ทั้งหมด

2. เซลล์ G (รูปที่ 16) เซลล์มีลักษณะกลม ขนาด 9-10 μm^{***} เกิดปฏิกิริยา peroxidase (P^{+++}) ติดสีน้ำตาลเข้มไซโตพลาสซึม นิวเคลียสติดสีม่วงมีรูปร่างกลมหรือรีเอียงชิดขอบเซลล์ แกรนูลกลมใหญ่ติดสีน้ำตาลเข้มอัดแน่นเต็มไซโตพลาสซึม จากการตรวจดูเซลล์ G ที่ผนังเซลล์แตก (รูปที่ 17) จะพบว่ามีแกรนูลรูปร่างกลมและแท่งรีเป็นส่วนใหญ่ พบบ้างที่มีรูปหยดน้ำตาและหัวท้ายแหลม อัตราส่วนของนิวเคลียสะไซโตพลาสซึม เท่ากับ 1 : 2-2.5 พบเซลล์นี้เฉลี่ยประมาณ 7.1% (2-11) ของแกรนูโลไซต์ทั้งหมด

3. เซลล์ H (รูปที่ 18) เซลล์มีลักษณะกลม ขนาด 9-11 μm^{***} ไม่เกิดปฏิกิริยา peroxidase(P^{-}) นิวเคลียสกลมอยู่กลางเซลล์ แกรนูลกลมหลายขนาดไม่ติดสีอัดแน่นภายในไซโตพลาสซึม อัตราส่วนของนิวเคลียสะ ไซโตพลาสซึม เท่ากับ 1:1-1.5 จะพบเฉลี่ยประมาณ 29.3%(21-39) ของแกรนูโลไซต์ทั้งหมด

4. เซลล์ I(รูปที่ 19)เซลล์มีลักษณะกลม ขนาด 9-10 μm^{***} ไม่เกิดปฏิกิริยา peroxidase(P^{-}) นิวเคลียสกลม,รูปไข่ หรือรูปไตอยู่กลางเซลล์ ไซโตพลาสซึมไม่ติดสีเทา มองเห็นแกรนูลไม่ชัดเจน อัตราส่วนนิวเคลียสะไซโตพลาสซึม เท่ากับ 1: 0.8-1 จะพบเซลล์นี้เฉลี่ยประมาณ 14.1%(9-19) ของแกรนูโลไซต์ทั้งหมด

Agranulocytes และกรอมโบโซด์

ไม่พบ peroxidase (P^{-}) ใน monocyte และ lymphocyte (รูปที่ 20) รวมทั้งไม่พบ peroxidase (P^{-}) ในกรอมโบโซด์ด้วย (รูปที่ 15)

สไลด์ควบคุม

negative control : พบว่า เซลล์ที่มีลักษณะโครงสร้างเหมือนเซลล์ F(รูปที่ 21) คือ มีลักษณะกลมหรือรีเล็กน้อยขนาด 9-10 μm^{***} นิวเคลียสรูปรีเอียงชิดขอบเซลล์ และเซลล์ที่มีลักษณะโครงสร้างคล้ายเซลล์ G (รูปที่ 22) คือ มีลักษณะกลม ขนาด

9-10 µm*** นิวเคลียสกลมหรือรี เรียงชิดขอบเซลล์แกรนูลรูปกลมและแท่งรี เซลล์ทั้งสองชนิดนี้ให้ปฏิกิริยา P

อภิปรายผล

การจำแนกเม็ดเลือดขาวของจระเข้จากการย้อม W-G stain ในการศึกษานี้จะพบเม็ดเลือดขาวที่มีแกรนูลอยู่ 4 ชนิด คือ heterophil, eosinophil, basophil และ azurophil (A) และเม็ดเลือดขาวไม่มีแกรนูล 2 ชนิดคือ monocyte และ lymphocyte รวมทั้งพบกรอมโบโซด์ที่มีนิวเคลียสด้วย ซึ่งลักษณะโครงสร้างของ heterophil,eosinophil และ basophil ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ ตรงกับรายงานที่เคยรายงานไว้ (Frye, 1973; Frye, 1977; Frye, 1991; Hawkey and Dennett,1989 และ Kanchanapangka and Youngprapakorn, 1994) สำหรับโครงสร้างของ azurophilในภาพรวมของสัตว์เลื้อยคลานนั้น มีรายงานว่าอาจมีลักษณะคล้าย monocyte (monocytoid appearance)หรือ lymphocyte ก็ได้ และเมื่อย้อมด้วย Romanovsky stain ไซโตพลาสซึมของ azurophil จะมี metachromic reaction เซลล์ชนิดนี้มีนิวเคลียสกลม รูปไตหรือเป็นพูอยู่กลางเซลล์ azurophil เป็นเซลล์ที่มีบทบาทเกี่ยวกับการตอบสนองการอักเสบในสัตว์เลื้อยคลาน ภาวะที่พบว่ามี azurophil สูงขึ้นในกระแสโลหิต (azurophilia)และ/หรือมีการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติในลักษณะโครงสร้างของเซลล์จะใช้บ่งว่าเกิดการติดเชื้อขึ้น (Hawkey and Dennett, 1989) ซึ่งลักษณะโครงสร้างของ azurophil ดังกล่าวนั้นมีความคล้ายคลึงกับลักษณะโครงสร้างของ neutrophil ของสัตว์เลื้อยคลานที่รายงานโดย Frye(1991)ที่รายงานถึงลักษณะของ neutrophil ว่า มีลักษณะโครงสร้างผสมกันระหว่าง monocyte และ neutrophil ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบนิวเคลียสไม่เป็นพูแต่อาจมีหลักเล็กน้อย ไซโตพลาสซึมติดสีฟ้าเทา และมี azurophilic granules อยู่ภายใน จึงเรียกว่า azurophilic cellหรือ azurophilic neutrophilหรือเรียกสั้นๆว่า neutrophil ซึ่งเซลล์นี้จะเพิ่มสูงในกระแสโลหิตเมื่อมีการติดเชื้อแบคทีเรียหรือเกิดมีเนื้อตาย และมักจะจำแนกผิดเป็น monocyte หรือ lymphocyte เนื่องจากมีลักษณะคล้ายเซลล์ดังกล่าวจากลักษณะโครงสร้างและหน้าที่ของ neutrophil นี้เป็นไปได้มากว่า azurophilic

---

*** หมายเหตุ : โปรดสังเกตว่า เซลล์ทุกชนิดมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ที่มีลักษณะโครงสร้างเหมือนกันเมื่อย้อมด้วย W-G stain

neutrophil จากรายงานของ Fyre (1991) จะเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเดียวกับ azurophil ที่รายงานโดย Hawkey and Dennett(1989)

ลักษณะโครงสร้างของเซลล์ A ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ ตรงกับลักษณะของ azurophil ที่เคยรายงานไว้ (Hawkey and Dennett,1989) แต่นิวเคลียสที่พบไม่มีรูปร่างเป็นพู ซึ่งเป็นลักษณะนิวเคลียสของ azurophil ที่พบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประเภทอื่น แต่จะพบว่า เซลล์ A ของจระเข้ (ตารางที่ 2) จะมีนิวเคลียสกลม รูปไข่ หรือรูปไต และพบมีแกรนูลเล็กละเอียดติดสีม่วงแดง (azurophilic) ในไซโตพลาสซึมที่ติดสีน้ำเงิน น่าจะมีการตรวจสอบ metachromic reaction ของ azurophilic granules ด้วย toluidene blue ซึ่งเป็น thiazine dye ในโอกาสต่อไป ซึ่งลักษณะโครงสร้างของเซลล์ A ดังกล่าวก็ตรงกับลักษณะของ azurophilic neutrophil ที่เคยรายงานโดย Fyre (1991) เช่นกัน จึงเป็นข้อบ่งชี้ว่า เซลล์ A คือ azurophil หรือ azurophilic neutrophil นั่นเอง แต่ azurophil ของจระเข้มีรูปร่างนิวเคลียสต่างจากเซลล์ azurophil ในภาพรวมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การเรียกชื่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนี้ว่า azurophil หรือazurophilic neutrophil จำเป็นต้องมีการศึกษาถึงเซลล์ต้นกำเนิด หน้าที่ และคุณสมบัติเฉพาะของ neutrophil และ azurophil ให้ละเอียดเสียก่อน หากมีการตรวจสอบ acid hydrolytic enzymes และ lysozymes ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ตรวจพบได้ใน azurophilic granules โดยทั่วไป (Weiss, 1988) ก็จะเป็นประโยชน์ในการสรุปผลการจำแนก granulocytes ชนิดต่าง ๆ ให้แน่นอนยิ่งขึ้น ในการศึกษาครั้งนี้จะสรุปว่าเซลล์ A คือ azurophil เนื่องจากในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมี heterophil ซึ่งเทียบเคียงได้กับ neutrophil อยู่แล้ว การเรียกเซลล์ A ว่า azurophilic neutrophil อาจทำให้เกิดความสับสนได้

Heterophil เป็นแกรนูโลไซต์ที่พบได้ในสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อาจจัด heterophil เทียบเคียงได้กับ neutrophil ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่เนื่องจากมีแกรนูลเป็นรูปหัวท้ายแหลม (spiculate)จำนวนมาก ติดสี acidophilic อยู่ในไซโตพลาสซึมจึงเรียกว่า heterophil ดูจะมีความเหมาะสมกว่า neutrophil heterophil ของสัตว์ปีกจะมีความแตกต่างกันน้อยมากในระหว่างชนิดของสัตว์ปีก ขณะที่ heterophil ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีความแตกต่างกันมากทางด้านรูปร่างในระหว่างชนิดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจำพวกงู จระเข้และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีกระดอง จะพบว่านิวเคลียสมีลักษณะกลมหรือรูปไข่ไม่แบ่งออกเป็นพู นิวเคลียสจะเอียงไปข้างใดข้างหนึ่งของเซลล์ และมีแกรนูลรูปหัวท้ายแหลมอยู่เต็มไซโตพลาสซึม ในขณะที่ heterophil ของ

สัตว์เลื้อยคลานพวกจิ้งจก ตุ๊กแก กิ้งก่า และแลน จะมีบางชนิดที่มีนิวเคลียสกลมและบางชนิดมีนิวเคลียสแบ่งเป็นพูคล้ายกับพวกสัตว์ปีก รวมทั้งการติดสีของแกรนูลก็มีความแตกต่างกันโดยจะพบว่าในสัตว์เลื้อยคลานพวกจิ้งจก ตุ๊กแก กิ้งก่า และแลน แกรนูลจะติดสีส้มแดง ยกเว้นที่ในพวกจระเข้จะมี heterophil ที่มีแกรนูลติดสีแดงอิฐ (Hawkey and Dennett, 1989) จะเห็นได้ว่า การจำแนกเม็ดเลือดขาวในสัตว์เลื้อยคลานที่ผ่านมาจะเป็นลักษณะภาพรวม มิได้เจาะจงสัตว์ชนิดใดชนิดหนึ่งโดยเฉพาะ จึงอาจทำให้เกิดความสับสนในการจำแนกเม็ดเลือดขาวในสัตว์เลื้อยคลานแต่ละชนิดได้

จากการนับจำนวนแกรนูโลไซต์ทั้ง 4 ชนิดในการศึกษาครั้งนี้พบว่า heterophil เป็นแกรนูโลไซต์ที่พบมากที่สุดพบโดยเฉลี่ย 51.2% (ตารางที่ 2 และ 3)ซึ่งตรงกับรายงานของ Hawkey และ Dennett(1989)และ Kanchanapangka และ Youngprapakorn(1994) จะพบ basophil จำนวนมาก(เฉลี่ย 31.7%)เมื่อเทียบกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งต้องกับรายงานว่า จะพบ basophil ได้มากในสัตว์เลื้อยคลาน(Fyre,1977) จำนวนของ azurophil จะพบได้เฉลี่ย 10.5% eosinophil มีจำนวนน้อยที่สุดในบรรดาแกรนูโลไซต์ของจระเข้ คือ พบเฉลี่ย 6.6% ซึ่งในตัวอย่างเลือดจระเข้บางตัวจะพบมี basophil,eosinophil หรือ azurophil สูงมากผิดปกติ ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากความแตกต่างของเพศ ฤดูกาล อาหาร ภาวะติดหนอนพยาธิ หรือสภาวะร่างกายที่ผิดปกติแต่ยังไม่แสดงอาการออกมาอย่างชัดเจน การนับจำนวนแกรนูโลไซต์ในการศึกษาครั้งนี้ค่าที่ได้อาจไม่ใช่ค่าที่แน่นอนของค่าเลือดปกติของจระเข้ เนื่องจากเป็นการนับจากการป้ายเม็ดเลือดขาวจากตัวอย่างเลือดที่นำมาปั่น จึงอาจยังมีความคลาดเคลื่อนอยู่ แต่ก็จะสามารถใช้ประมาณจำนวนแกรนูโลไซต์แต่ละชนิดอย่างคร่าวๆได้ และเมื่อร่วมกับลักษณะโครงสร้างของเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ เมื่อย้อมด้วย W-G stain สามารถใช้เป็นแนวทางในการจำแนกชนิดของแกรนูโลไซต์ ในการย้อมตรวจหาเอนไซม์ alkaline phosphatase และ peroxidase ได้ด้วย

สำหรับเม็ดเลือดขาวชนิดไม่มีแกรนูลนั้น lymphocyte มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับที่มีผู้เคยรายงานไว้ในจระเข้มิสซิซิปปี (American alligator) และจระเข้(Mateo et al, 1984 และ Kanchanapangka and Youngprapakorn, 1994) เป็นที่น่าสังเกตว่า monocyte ในจระเข้มิสซิซิปปีมีขนาดและลักษณะโครงสร้างคล้ายกับ azurophilในการศึกษาครั้งนี้ สำหรับทรอมโบไซต์ของจระเข้ทั้ง 3 พันธุ์ก็แตกต่างจากจระเข้มิสซิซิปปี กล่าวคือทรอมโบไซต์จระเข้มิสซิซิปปีมีรูปร่างเป็นกระสวย และมีร่องยาวเห็นชัดเจนในนิวเคลียส

จากการศึกษาครั้งนี้มีข้อสังเกตว่า หากจำแนกเม็ดเลือดขาวโดยใช้ขนาดของเซลล์เป็นหลัก อาจเกิดความคลาดเคลื่อนได้ เนื่องจากในการย้อมตรวจหาเอนไซม์ alkaline phosphatase และ peroxidase จะพบการบวมของเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งคาดว่าเกิดเนื่องจากขั้นตอนการตรวจหาเอนไซม์ alkaline phosphatase และ peroxidase ซึ่งต้องแช่ลงในสารเคมีเป็นเวลานาน ทำให้ permeability ของผนังเซลล์เม็ดเลือดเสียไป จึงเกิดการบวมของเซลล์ขึ้น

การย้อมตรวจหาเอนไซม์ alkaline phosphatase

การย้อมตรวจหา alkaline phosphatase พบว่ามีแกรนูโลไซต์ที่ติดสีแดง ซึ่งบ่งชี้ถึงการมีเอนไซม์ alkaline phosphatase อยู่ 2 เซลล์คือ เซลล์ B และ C แต่เซลล์ D เซลล์ E agranulocytes (monocyte และ lymphocyte) รวมทั้งเกล็ดเลือดไม่มี alkaline phosphatase

เซลล์ B มีลักษณะกลมหรือรีเล็กน้อย นิวเคลียสรี เยื่องชิดขอบเซลล์ แกรนูลบางส่วนเกิดปฏิกิริยา alkaline phosphatase ($Al\text{-}P^{+}$) ติดสีแดงกระจายเป็นจุด ๆ ในไซโตพลาสซึม เป็นแกรนูโลไซต์ที่พบมากที่สุด (เฉลี่ย 52.5%) ซึ่งจากลักษณะโครงสร้างของเซลล์ดังกล่าวและจากจำนวนที่พบเมื่อเทียบกับการย้อม W-G stain น่าจะสรุปได้ว่า เซลล์ B คือ heterophil เนื่องจาก heterophil ในสัตว์เลื้อยคลานเทียบเคียงได้กับ neutrophil ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การพบเอนไซม์ alkaline phosphatase ใน heterophil ของจระเข้จึงคล้ายกับการพบ alkaline phosphatase ในจระเข้มิสซิซิปปีซึ่งรายงานโดย Mateo และคณะ (1984) รวมทั้งการพบ alkaline phosphatase ใน neutrophil ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด (Bell and Thomas, 1962; Fyre, 1977; Humason, 1979; Kaplow, 1968; Moloney, 1958 และ Vergnes et al., 1990) จึงเป็นไปได้มากว่า เอนไซม์นี้จะเกี่ยวข้องกับการทำงานของแกรนูโลไซต์ชนิดนี้ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า ในไก่และนกพิราบซึ่งมีเม็ดเลือดแดงรูปรีและมีนิวเคลียส รวมทั้งมี heterophil เหมือนกับจระเข้ จะตรวจไม่พบเอนไซม์ alkaline phosphatase ใน heterophil ของไก่และนกพิราบ (Bell and Thomas, 1962 และ Kaplow, 1958) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า แม้ลักษณะโครงสร้างของเซลล์ heterophil ในสัตว์ปีกและสัตว์เลื้อยคลานจะมีความคล้ายคลึงกันมาก แต่ก็อาจมีความแตกต่างในคุณสมบัติการมีหรือไม่มีเอนไซม์ชนิดต่างๆได้

จากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ alkaline phosphatase ใน neutrophil พบว่า จะพบเอนไซม์ชนิดนี้ในแกรนูลบางชนิดของ neutrophil เท่านั้น

(Kaplow,1968) Wetzel และคณะ (1963) รายงานว่า ใน neutrophil ของกระต่ายจะพบแกรนูล 3 ชนิด แต่จะมีแกรนูลขนาดกลางเพียงชนิดเดียวที่มีเอนไซม์ alkaline phosphatase ซึ่งสามารถนำรายงานดังกล่าวมาอธิบายถึงการพบแกรนูลบางส่วนของ heterophil ที่ติดสีแดงกระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม นั่นก็คือ ใน heterophil ของจระเข้จะมีแกรนูลเพียงบางชนิดเท่านั้นที่ให้ปฏิกิริยา alkaline phosphatase เป็นบวก จึงทำให้การติดสีแดงของแกรนูลกระจายตัวและไม่ติดสีหนาแน่นทั่วไซโตพลาสซึม หรืออาจเป็นไปได้ว่ามีแกรนูลบางส่วนของ heterophil ละลายไป จึงพบการติดสีแดง (Al-P^{+})กระจายอยู่เฉพาะในแกรนูลที่ยังคงอยู่เท่านั้น

เซลล์ C ที่พบจากการตรวจหา alkaline phosphatase จะมีลักษณะกลมนิวเคลียสกลม รูปไข่หรือรูปไตอยู่กลางเซลล์ แกรนูลละเอียดชัดแน่นเต็มไซโตพลาสซึม เกิดปฏิกิริยา alkaline phosphatase (Al-P^{+++}) ติดสีแดงเข้มเต็มไซโตพลาสซึม พบเฉลี่ย 13 % จากลักษณะโครงสร้างของเซลล์ โดยเฉพาะลักษณะนิวเคลียส แกรนูล และจำนวนที่พบเมื่อเปรียบเทียบกับการย้อม W-G stain แล้ว น่าจะสรุปได้ว่า เซลล์ C คือ เซลล์ชนิดเดียวกันกับเซลล์ A ใน W-G stain ซึ่งก็คือ azurophil ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานใดกล่าวถึงคุณสมบัติการมีเอนไซม์ alkaline phosphatase ของ azurophil มาก่อน แต่จากการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ alkaline phosphatase ในสัตว์ พบว่า alkaline phosphatase ไม่ได้มีจำกัดอยู่แค่ใน neutrophil เท่านั้น แต่จะพบในเม็ดเลือดแดงของกบ และใน eosinophil ของสัตว์หลายชนิด (Kaplow, 1968) ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า azurophil ของจระเข้มีเอนไซม์ alkaline phosphatase อยู่จำนวนมาก โดยพบการติดสีแดงเด่นไซโตพลาสซึม

เซลล์ D ที่พบจากการย้อมตรวจหา alkaline phosphatase จะมีลักษณะกลมนิวเคลียสกลมหรือรี มักพบเรียงชิดขอบเซลล์ แกรนูลมีทั้งรูปร่างกลม แท่งรี รวมทั้งรูปหยดน้ำตาและหัวท้ายแหลม (จำนวนน้อย) ย้อมแน่นในไซโตพลาสซึม ไม่เกิดปฏิกิริยา alkaline phosphatase (Al-P^{-}) ไม่พบการติดสีแดงภายในเซลล์ พบเฉลี่ย 6.5 % จากลักษณะโครงสร้างของเซลล์ โดยเฉพาะลักษณะรูปร่างของแกรนูลที่พบ และจำนวนที่พบเมื่อเปรียบเทียบกับการย้อม W-G stain แล้ว อาจสรุปได้ว่า เซลล์ D คือ eosinophil ซึ่งต่างกับ eosinophil ของม้า วัว แกะและแพะ(Bell and Thomas, 1962) หนูถีบ ลา และวัวตัวผู้ที่ตอนแล้ว (Moloney,1958) รวมทั้งจระเข้มีสชิชิปปี (Mateo et al.,) 1984 ที่ตรวจพบเอนไซม์ alkaline phosphatase ภายในเซลล์ จากการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่า eosinophil ของจระเข้ไม่มีเอนไซม์ alkaline phospha-

tase จะเป็นประโยชน์ในการจำแนกเม็ดเลือดขาวชนิด heterophil กับ eosinophil ออกจากกัน ซึ่งเม็ดเลือดขาวทั้ง 2 ชนิดนี้จำแนกออกจากกันได้ยากเมื่อย้อมด้วย W-G stain เนื่องจากต่างก็มีแกรนูลสีแดงแน่นในไซโตพลาสซึม จนบางครั้งไม่สามารถบอกถึงรูปร่างของแกรนูลได้ (Hawkey and Dennett,1989 และ Kanchanapangka and Youngprapakorn,1994)

เซลล์ E ที่พบจากการย้อมตรวจหา alkaline phosphatase จะมีลักษณะกลม นิวเคลียสกลมอยู่กลางเซลล์ แกรนูลกลมหลายขนาด สีแน่นเต็มไซโตพลาสซึม ไม่เกิดปฏิกิริยา alkaline phosphatase ($Al\text{-}P^-$) ไม่พบการติดสีแดงภายในเซลล์ พบเฉลี่ย 28 % จากลักษณะโครงสร้างของเซลล์ และจำนวนเซลล์ที่พบเมื่อเปรียบเทียบกับการย้อม W-G stain อาจจะสรุปได้ว่า เซลล์ E คือ basophil ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายกับ basophil ของจระเข้มิสซิซิปปีที่ว่าไม่มี alkaline phosphatase เช่นกัน (Mateo et al, 1984)

สำหรับทรอมโบไซต์และเม็ดเลือดขาวชนิดที่ไม่มีแกรนูลนั้นตรวจไม่พบ alkaline phosphatase ในเซลล์ แต่ lymphocyte ให้ปฏิกิริยา $Al\text{-}P^+$ อ่อนมากอาจนับเป็น $Al\text{-}P^-$ ได้ Pienaar (1962) และ Caxton-Martins (1977) พบปฏิกิริยา alkaline phosphatase และ peroxidase อ่อนมากหรือไม่มีเลยใน monocyte สัตว์เลื้อยคลานหลายชนิด น่าสังเกตว่า Mateo et al. (1984) พบทั้ง alkaline และ acid phosphatases ใน monocyte ของจระเข้มิสซิซิปปีเนื่องจาก monocyte ของจระเข้มิสซิซิปปีมีลักษณะโครงสร้างและ $Al\text{-}P^+$ คล้ายกับ azurophil ในจระเข้ เพื่อตรวจสอบความสับสนที่อาจเกิดขึ้นระหว่าง monocyte และ azurophil น่าจะมีการตรวจหา acid phosphatase และ nonspecific esterase ซึ่งมีปฏิกิริยาเจาะจงแสดง lysozyme และ monocyte ในเม็ดเลือดจระเข้ในอนาคต

การย้อมตรวจหาเอนไซม์ peroxidase

การย้อมตรวจหา peroxidase จะพบว่า มีแกรนูโลไซต์ที่ติดสีน้ำตาล ซึ่งบ่งชี้ถึงการมีเอนไซม์ peroxidase อยู่ 2 เซลล์คือ เซลล์ F และเซลล์ G ส่วนเซลล์ H เซลล์ I agranulocytes และทรอมโบไซต์ไม่พบ peroxidase

เซลล์ F มีลักษณะกลมหรือรีเล็กน้อย นิวเคลียสรี เลื่องชิดขอบเซลล์แกรนูลรูปหัวท้ายแหลม เกิดปฏิกิริยา peroxidase (P^{++}) ติดสีน้ำตาลดำกระจายเป็นหย่อมในไซโตพลาสซึม พบปริมาณมากที่สุดเฉลี่ย 49.5 % จากลักษณะโครงสร้างของเซลล์และจำนวนที่พบมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการย้อม W-G stain อาจสรุปได้ว่า เซลล์ F คือ

heterophil จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า heterophil มีเอนไซม์ peroxidase อยู่ภายในเซลล์จะต้องกับรายงานของ Kaplow (1965) ที่พบ peroxidase ใน neutrophilและ eosinophil ของคน เป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อ Mateo et al (1984) ใช้ benzidine(BZ)เป็น substrate จะตรวจไม่พบ peroxidase ใน heterophil ของตะโขง แต่เมื่อใช้ 3-amino-9 elhyl carbasole (3A9E) เป็น substrate จะตรวจพบ peroxidase ในแกรนนูลของ heterophils การศึกษาครั้งนี้ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป Sigma Diagnostics ตรวจหาเอนไซม์ peroxidase โดยใช้ p-phenyl-enediamine เป็น substrate ก็สามารถตรวจพบ peroxidase ในแกรนนูลของ heterophilsได้เช่นกัน จะเห็นได้ว่าการใช้ substrate ต่างชนิดกันมีผลกับการตรวจพบหรือไม่พบ peroxidase ได้

เซลล์ G มีลักษณะกลม นิวเคลียสกลมหรือรีส่วนมากเอียงชิดขอบเซลล์ แกรนูลมีทั้งกลม แท่งรี หัวท้ายแหลม และรูปหยดน้ำตาอัดแน่นในไซโตพลาสซึม เกิดปฏิกิริยา peroxidase(P^{+++}) ติดสีน้ำตาลกระจายเต็มไซโตพลาสซึม เป็นแกรนูลไลโซโซมที่พบน้อยที่สุดเฉลี่ย 7.1 % จากลักษณะโครงสร้างของเซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่งลักษณะของแกรนูลและจำนวนที่พบเมื่อเปรียบเทียบกับการย้อม W-G stain อาจจะสรุปได้ว่า เซลล์ G คือ eosinophil ซึ่งจะต้องกับรายงานที่พบว่า eosinophil มีเอนไซม์ peroxidase อยู่เป็นจำนวนมากในเซลล์ โดยจะย้อมติดสีน้ำตาลดำหรือเขียวดำทั่วไซโตพลาสซึมในการย้อมโดยใช้ benzidine dihydrochloride (Buys et al.,1981 ; Fyre,1991 Kaplow,1965) Mateo et al, (1984) และ Frye (1991)ได้รายงานเพิ่มเติมว่าพบเอนไซม์ peroxidase ในแกรนูลรูปกลม แต่ไม่พบในแกรนูลรูปกระสวย (fusiform) ใน eosinophil ของสัตว์เลื้อยคลาน แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า แกรนูลของ eosinophil ของจระเข้ทั้งรูปร่างกลม แท่งรี หัวท้ายแหลมและหยดน้ำตา จะพบเอนไซม์ peroxidase ในแกรนูลทั้งสิ้น

เซลล์ H มีลักษณะกลม นิวเคลียสกลมอยู่กลางเซลล์ แกรนูลกลมหลายขนาดอัดแน่นในไซโตพลาสซึม ไม่เกิดปฏิกิริยา peroxidase(P^{-}) ไม่พบการติดสีน้ำตาลภายในเซลล์ พบเฉลี่ย 29.3% จากลักษณะโครงสร้างและจำนวนที่พบเมื่อเปรียบเทียบกับการย้อม W-G stain แล้ว อาจสรุปได้ว่า เซลล์ H คือ basophil ซึ่งต้องกับรายงานที่ไม่พบเอนไซม์ peroxidase ใน basophil (Kaplow,1965) Mateo และคณะ (1984)ก็ตรวจไม่พบ peroxidaseใน basophil ของจระเข้มิสซิซิปปีเช่นกัน เมื่อใช้ทั้ง BZ และ 3A9E เป็น substrates

เซลล์ I มีลักษณะกลม นิวเคลียสกลม รูปไข่ หรือรูปไตอยู่กลางเซลล์ ไซโตพลาสซึมติดสีเทาฟ้า มองเห็นแกรนูลไม่ชัดเจน ไม่เกิดปฏิกิริยา peroxidase (P^-) ไม่พบการติดสีน้ำตาลภายในเซลล์ พบเฉลี่ย 14.1% จากลักษณะโครงสร้างของเซลล์ และจำนวนที่พบเมื่อเปรียบเทียบกับการย้อม W-G stain แล้ว อาจสรุปได้ว่า เซลล์ I คือ เซลล์ชนิดเดียวกับเซลล์ A ใน W-G stain ซึ่งก็คือ azurophil นั่นเอง Mateo et al (1984) มิได้จำแนก azurophils ในเลือดจระเข้มิสซิซิปปี้ จึงไม่มีข้อเปรียบเทียบการพบเอนไซม์ peroxidase ในเซลล์ชนิดนี้ เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่า azurophilic granules มักจะมีเอนไซม์ peroxidase ด้วย (นอกเหนือจาก acid hydrolytic enzymes และ lysozymes) โดยที่จะพบเอนไซม์นี้ในโครงสร้างที่เรียกว่า microbodies หรือ peroxisomes ซึ่งมักมีทั้ง oxidases และ catalase (Ghadially, 1982) อยู่ด้วยกัน oxidases จะสร้าง hydrogen peroxide ซึ่งมีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์ได้ จึงมักมี catalase ซึ่งคอยสลายhydrogen peroxide ให้เป็นน้ำอยู่ด้วย จึงเป็นไปได้ว่าการที่ตรวจไม่พบ peroxidase ในเซลล์นี้ อาจเนื่องจากไม่มี peroxidase หรือมีทั้ง peroxidase และ catalase อยู่ด้วยกันก็ได้

ตรวจไม่พบ peroxidase ทั้งใน monocyte lymphocyte และทรอมโบไซต์

สรุป

การศึกษาโดยใช้เทคนิคฮิสโตเคมีในการตรวจหาเอนไซม์ alkaline phosphatase และ peroxidase ในเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ และทรอมโบไซต์ในจระเข้ (ตารางที่ 2 และ 3) สรุปได้ว่า

1. Heterophil พบเอนไซม์ alkaline phosphatase ($Al\text{-}P^+$) ในแกรนูลบางส่วน และยังพบเอนไซม์ peroxidase (P^{++})ด้วย

2. Eosinophil พบมีเอนไซม์ peroxidase จำนวนมาก (P^{+++}) แต่จะไม่มีเอนไซม์ alkaline phosphatase ($Al\text{-}P^-$)

3. Basophil จะไม่มีทั้งเอนไซม์ alkaline phosphatase($Al\text{-}P^-$)และ peroxidase(P^-)

4. Azurophil พามีเอนไซม์ alkaline phosphatase มาก ($Al\text{-}P^{+++}$) แต่ไม่พบ peroxidase ภายในเซลล์ (P^-)

5. Monocyte lymphocyte และทรอมโบไซต์ไม่มี alkaline phosphatase และ peroxidase

จากคุณสมบัติการมี/ไม่มีเอนไซม์ 2 ชนิดดังกล่าวของเม็ดเลือดขาวแกรนูโลไซต์ชนิดต่างๆของจระเข้ จะช่วยให้การจำแนกเม็ดเลือดขาวชนิดแกรนูโลไซต์ของจระเข้ถูกต้องและแม่นยำขึ้นกว่าการจำแนกโดยดูลักษณะโครงสร้างเพียงอย่างเดียว

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันของเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ และทรอมโบไซต์ในจระเข้พันธุ์น้ำจืด พันธุ์น้ำเค็ม และพันธุ์ผสม ทั้งลักษณะโครงสร้างของเซลล์และคุณสมบัติการมี/ไม่มีเอนไซม์ alkaline phosphatase และ peroxidase

ข้อเสนอแนะ

ควรทำการศึกษาเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ในเม็ดเลือดขาวจระเข้ต่อไป เพื่อใช้ช่วยจำแนกเม็ดเลือดขาวชนิด azurophil (ข้อ 1 และ 2) heterophil (ข้อ 3) และ monocyte (ข้อ 4)

1. ตรวจ สอบ metachromic reaction ของ azurophilic granules ด้วย toluidene blue ซึ่งเป็น thiazine dye

2. ตรวจสอบ acid hydrolytic enzymes, และ lysozymes ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ตรวจพบได้ใน azurophilic granulesโดยทั่วไป

3. ตรวจหา acid phosphatase ในเม็ดเลือดจระเข้

4. ตรวจหา nonspecific esterase

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะโครงสร้างของเซลล์และคุณสมบัติการมี/ไม่มีเอนไซม์ alkaline phosphatase และ peroxidase ของเม็ดเลือดขาวแกรนูโลไซต์ชนิดต่างๆในจระเข้

ชนิดของแกรนูโลไซต์	ขนาด (µm)	ลักษณะเซลล์	ลักษณะนิวเคลียส	ลักษณะแกรนูล/ปริมาณไซโตพลาสซึม	แกรนูลติดสี W-G stain	การมีเอนไซม์ Alkaline phosphatase	การมีเอนไซม์ Peroxidase
Granulocytes							
Heterophil	9-10	กลมหรือรี เล็กน้อย	รี เอียงชิดขอบเซลล์ *	ส่วนมากหัวท้ายแหลม พบบ้างที่มีรูปรีคล้ายหยดน้ำตา	ชมพูเข้ม (acidophilic)	Al-P $^{+}$	P $^{++}$
Eosinophil	8-9	กลม	กลมหรือรี เอียงชิดขอบเซลล์ *	ส่วนมากรูปกลมและแท่งรี พบบ้างที่มีรูปหยดน้ำตาและหัวท้ายแหลม	แดงเข้ม (acidophilic)	Al-P $^{-}$	P $^{+++}$
Basophil	9-11	กลม	กลม อยู่กลางเซลล์ **	กลม พลาธนาด	ม่วงเข้ม (basophilic)	Al-P $^{-}$	P $^{-}$
Azurophil (A)	8-10	กลม	กลม รูปไข่ หรือรูปไต อยู่กลางเซลล์ **	เล็กละเอียด	ม่วงแดง (azurophilic)	Al-P $^{+++}$	P $^{-}$
Agranulocytes							
Monocyte	10-16	กลม	รูปไต เอียงชิดขอบเซลล์	มาก	-	Al-P $^{-}$	P $^{-}$
Lymphocyte	6-7	กลม	รูปไต เอียงชิดขอบเซลล์	น้อย	-	Al-P $^{-}$	P $^{-}$
Thrombocyte	5-6	กลม	กลม รี	เล็กละเอียด	-	Al-P $^{-}$	P $^{-}$

* พบบ้างที่มีนิวเคลียสอยู่กลางเซลล์ แต่พบน้อยมาก

** พบบ้างที่มีนิวเคลียสอยู่เอียงชิดขอบเซลล์ แต่พบน้อยมาก

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนของเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ เมื่อย้อมด้วย W-G stain และทดสอบปฏิกิริยา alkaline phosphatase และ peroxidase

	W-G Stain	Al-P	P
Heterophil	51.2% (41-59)	B 52.5% (40-64)	F 49.5% (41-59)
Basophil	31.7% (23-39)	E 28.0% (18-38)	H 29.3% (21-39)
Azurophil	10.5% (5-15)	C 13.0% (5-21)	I 14.1% (9-19)
Eosinophil	6.6% (2-10)	D 6.5% (2-10)	G 7.1% (2-11)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การย้อมด้วยสี Wright-Giemsa

รูปที่ 1 แสดงลักษณะโครงสร้างของheterophil นิวเคลียส(N) รูปรี อยู่เยื้องขอบเซลล์ แกรนูลรูปหัวท้ายแหลมติดสี acidophilic(ลูกศร) อัดแน่นในไซโตพลาสซึม(3600x, W-G stain)

รูปที่ 2 แสดง heterophil ที่พบเซลล์แตก จะพบแกรนูลรูปหัวท้ายแหลม(ลูกศรใหญ่) จำนวนมาก และพบแกรนูลรูปรีคล้ายหยดน้ำตา (ลูกศรเล็ก) ปนอยู่เล็กน้อย (3600x, W-G stain)

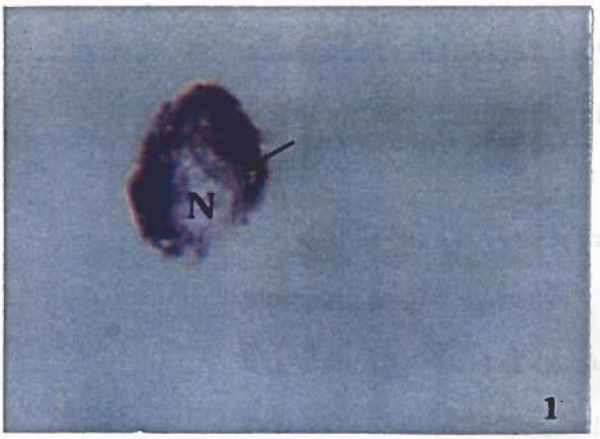
รูปที่ 3 แสดงลักษณะโครงสร้างของ eosinophil นิวเคลียส(N)รูปรี อยู่เยื้องขอบเซลล์ แกรนูลรูปกลมและแท่งรีติดสี acidophilic เข้ม(ลูกศร)อัดแน่นในไซโตพลาสซึม (3600x, W-G stain)

รูปที่ 4 แสดง eosinophil ที่พบเซลล์แตก จะพบแกรนูลรูปกลม (หัวลูกศร) และแท่งรี (ในกรอบสี่เหลี่ยม) จำนวนมาก และพบแกรนูลรูปหยดน้ำตา (ลูกศร) และหัวท้ายแหลม (ลูกศรใหญ่) ปนอยู่เล็กน้อย (3600x, W-G stain)

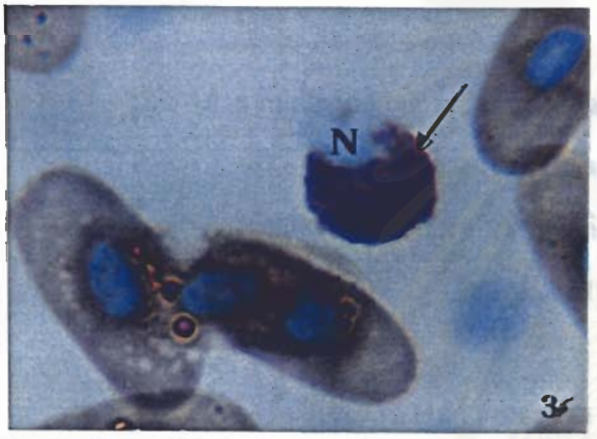
รูปที่ 5 แสดงลักษณะโครงสร้างของ basophil nucleus (N) กลมอยู่กลางเซลล์ แกรนูลรูปกลมหลายขนาดติดสี basophilic อัดแน่นอยู่เต็มเซลล์ (3600x, W-G stain)

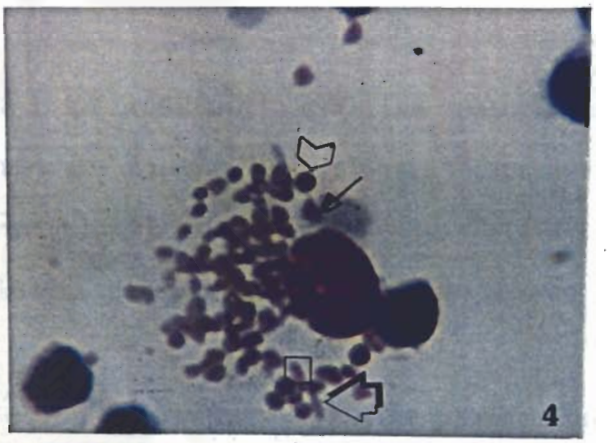
รูปที่ 6 Basophil ที่พบเซลล์แตก ทำให้เห็นแกรนูลกลมหลายขนาดกระจายออกไป (3600x, W-G stain)

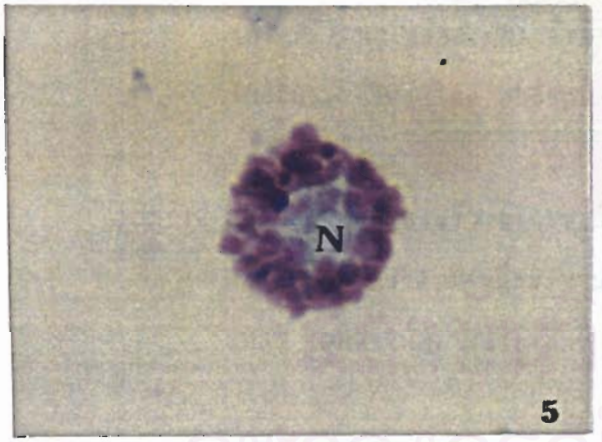
รูปที่ 7 แสดงลักษณะโครงสร้างของเซลล์ A 2 เซลล์ นิวเคลียส (N) รูปไข่อยู่กลางเซลล์ แกรนูลเล็กละเอียดติดสีม่วงแดง (azurophilic) กระจายในไซโตพลาสซึมที่ย้อมติดสีน้ำเงิน ; monocyte(M)อยู่ทางมุมบนซ้าย ไซโตพลาสซึมปริมาณมากมีลักษณะเป็นฟอง (ลูกศร) มุมบนขวามีเกล็ดเลือด (T) และมุมล่างขวาเป็น lymphocyte (L) (3600x, W-G stain)

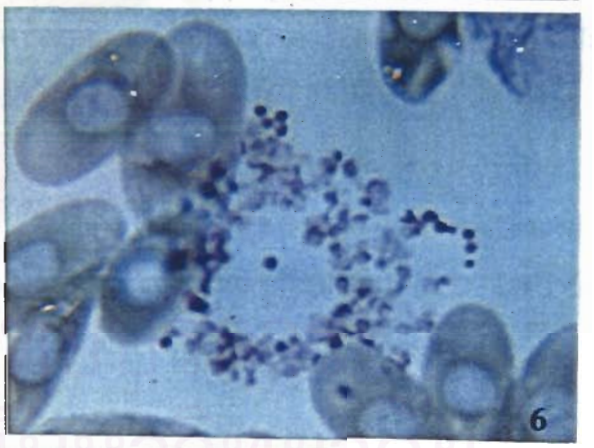

N
1

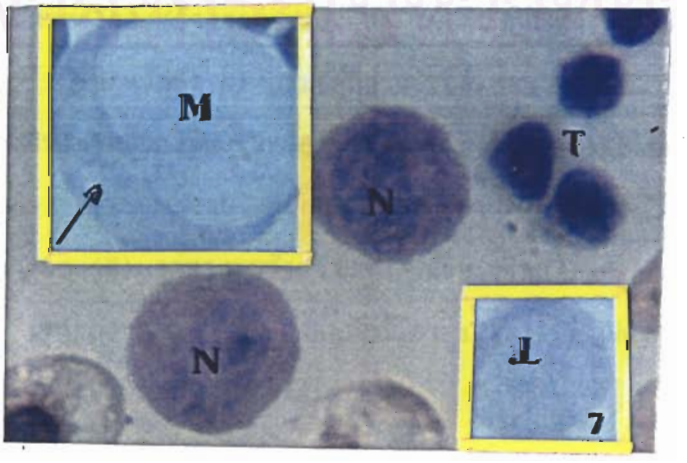
2


N
3


4


N
5


6


M
N
T
N
L
7

การย้อมตรวจหา Alkaline phosphatase

รูปที่ 8 Alkaline phosphatase positive control: neutrophil ของหนูขาว เกิดปฏิกิริยา alkaline phosphatase ($Al\text{-}P^{+++}$) ติดสีแดงเด่นไซโตพลาสซึม นิวเคลียส (N) เป็นพูอยู่กลางเซลล์ (3600x, alkaline phosphatase)

รูปที่ 9 แสดงลักษณะโครงสร้างของเซลล์ B แกรนูลบางส่วนเกิดปฏิกิริยา alkaline phosphatase ($Al\text{-}P^{+}$) ติดสีแดงกระจายเป็นจุด ๆ ในไซโตพลาสซึม (ลูกศร) นิวเคลียส (N) รีเรียงชิดขอบเซลล์ ไม่พบ alkaline phosphatase ($Al\text{-}P^{-}$) ใน monocyte (M) (3600x, alkaline phosphatase)

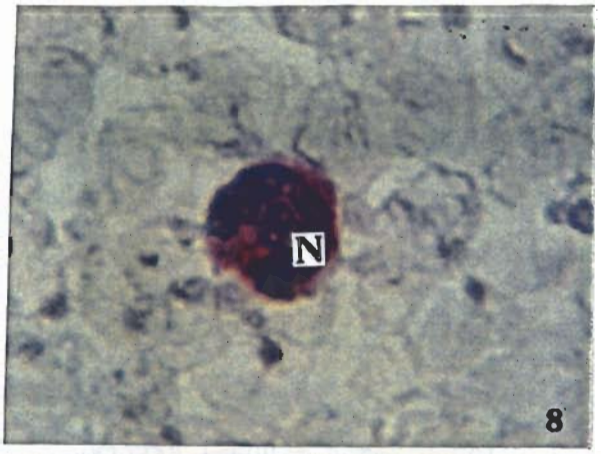
รูปที่ 10 แสดงลักษณะโครงสร้างของเซลล์ C เกิดปฏิกิริยา alkaline phosphatase ($AL\text{-}P^{+++}$) ติดสีแดงเด่นไซโตพลาสซึม นิวเคลียส (N) รูปไข่อยู่กลางเซลล์ แกรนูลเล็กละเอียดติดสีแดง ไม่พบปฏิกิริยา alkaline phosphatase ในเกล็ดเลือด (T) ซึ่งอยู่ใกล้เซลล์ C (3600x, alkaline phosphatase)

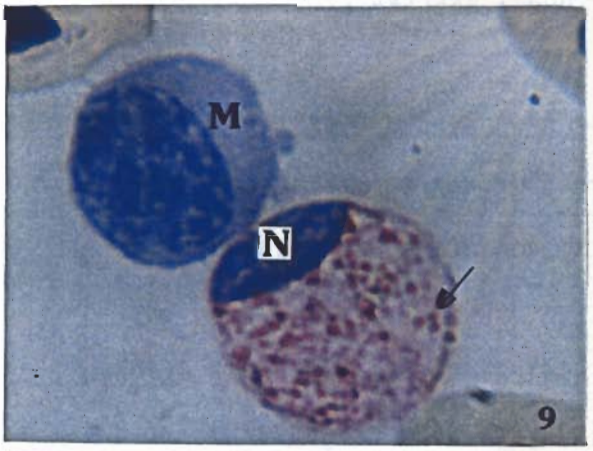
รูปที่ 11 แสดงลักษณะโครงสร้างของเซลล์ D ไม่เกิดปฏิกิริยา alkaline phosphatase ($Al\text{-}P^{-}$) นิวเคลียส (N) รีเรียงชิดขอบเซลล์ แกรนูลไม่ติดสีอัดแน่นในไซโตพลาสซึม (3600x, alkaline phosphatase)

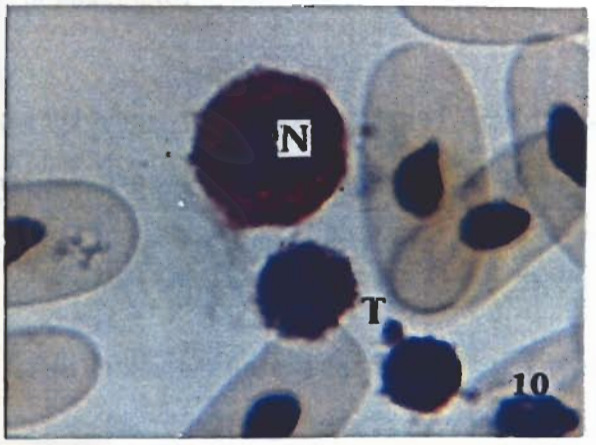
รูปที่ 12 แสดงลักษณะโครงสร้างของเซลล์ D ที่ผนังเซลล์แตก พบแกรนูลรูปกลม (หัวลูกศร) และแท่งรี(ในกรอบสีเหลี่ยม)จำนวนมาก และพบแกรนูลรูปหยดน้ำ (ลูกศร) และหัวท้าแหลม (ลูกศรใหญ่) ปนอยู่เล็กน้อย (3600x, alkaline phosphatase)

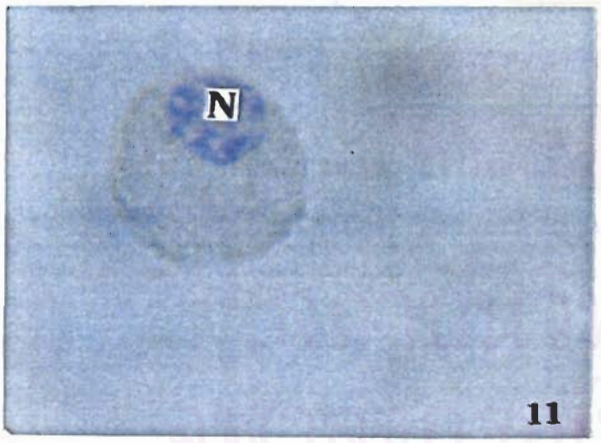
รูปที่ 13 แสดงลักษณะโครงสร้างของเซลล์ E ไม่เกิดปฏิกิริยา alkaline phosphatase ($Al\text{-}P^{-}$) นิวเคลียส (N) กลมอยู่กลางเซลล์ แกรนูลกลมหลายขนาด (ลูกศร) ไม่ติดสีอัดแน่นในไซโตพลาสซึม (3600x, alkaline phosphatase)

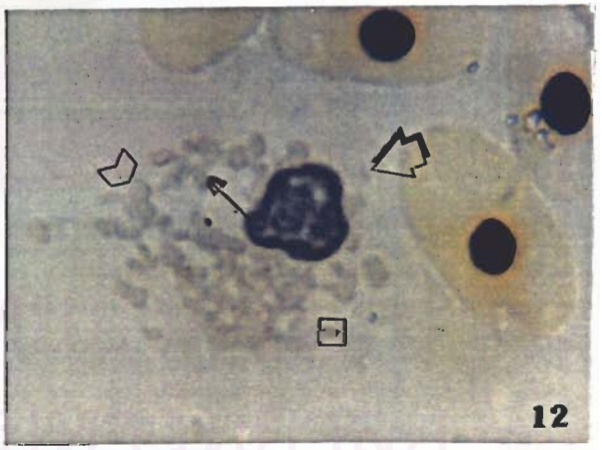
รูปที่ 14 Monocyte (M) อยู่ทางมุมซ้ายของรูป ไม่พบ alkaline phosphatase ภายในเซลล์ ส่วน lymphocyte (L) เกิดปฏิกิริยา alkaline phosphatase อ่อนมาก (3600x, alkaline phosphatase)

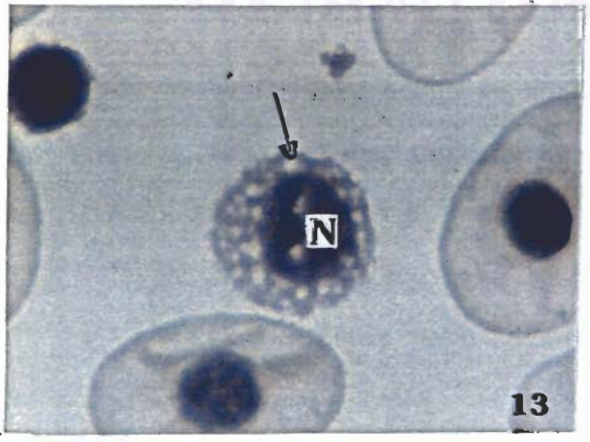

N
8

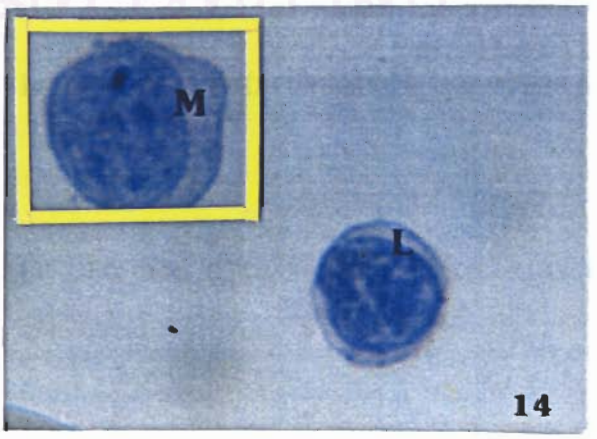

M
N
9


N
T
10


N
11


12


N
13


M
L
14

การย้อมตรวจหา peroxidase

รูปที่ 15 แสดงลักษณะโครงสร้างของเซลล์ F เกิดปฏิกิริยา peroxidase (P^{++}) ติดสีน้ำตาลเป็นหย่อมในไซโตพลาสซึม นิวเคลียส (N) รูปรีเอียงชิดขอบเซลล์ ไม่พบ peroxidase (P^{-}) ในเกล็ดเลือด (T) (3600x, peroxidase)

รูปที่ 16 แสดงลักษณะโครงสร้างของเซลล์ G เกิดปฏิกิริยา peroxidase (P^{+++}) ติดสีน้ำตาลเต็มไซโตพลาสซึม นิวเคลียส (N) รีเอียงชิดขอบเซลล์ แกรนูลรูปกลมติดสีน้ำตาลอัดแน่นในไซโตพลาสซึม (3600x, peroxidase)

รูปที่ 17 แสดงเซลล์ G ที่ผนังเซลล์แตก พบแกรนูลรูปกลม (หัวลูกศร) และแท่งรี (ในกรอบสี่เหลี่ยม) จำนวนมากและพบมีแกรนูลรูปหยดน้ำตา (ลูกศร) และหัวท้ายแหลม (ลูกศร) ปนอยู่เล็กน้อย (3600x, peroxidase)

รูปที่ 18 แสดงลักษณะโครงสร้างของเซลล์ H ไม่เกิดปฏิกิริยา peroxidase (P^{-}) นิวเคลียส (N)กลมอยู่กลางเซลล์ แกรนูลกลมหลายขนาด ไม่ติดสีอัดแน่นในไซโตพลาสซึม (3600x, peroxidase)

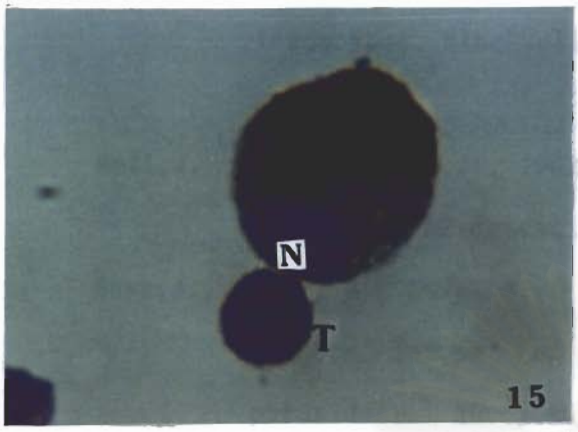
รูปที่ 19 แสดงลักษณะโครงสร้างของเซลล์ I ไม่เกิดปฏิกิริยา peroxidase นิวเคลียส(N) รูปไข่อยู่กลางเซลล์ แกรนูลเห็นไม่ชัดเจน ไซโตพลาสซึมติดสีเทา(3600x, peroxidase)

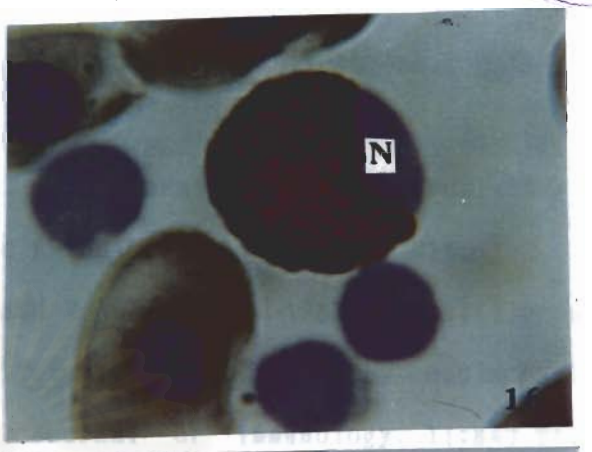
รูปที่ 20 ไม่พบ peroxidase (P^{-}) ทั้งใน monocyte (M) และlymphocyte (L)(3600x, peroxidase)

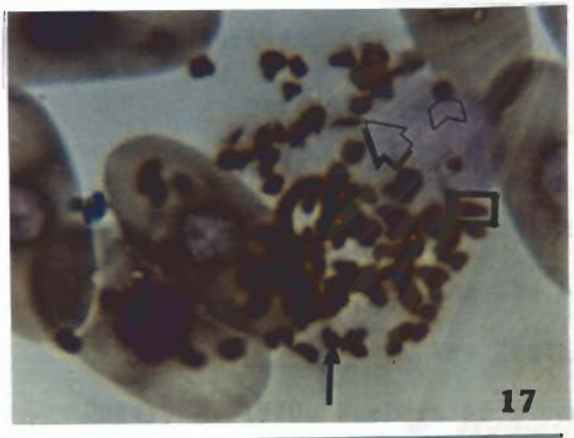
รูปที่ 21 Peroxidase negative control: แสดงเซลล์ F ไม่เกิดปฏิกิริยา peroxidase (P^{-}) (3600x, peroxidase)

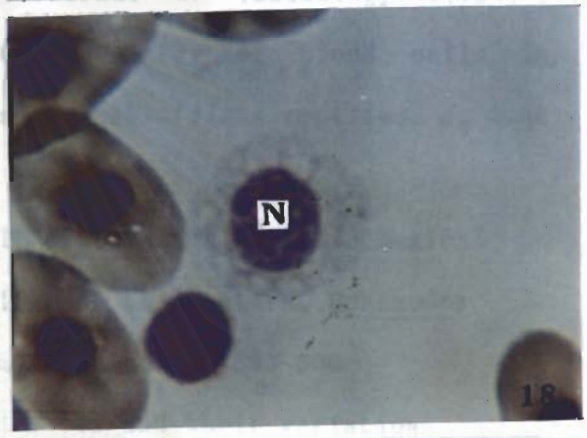
รูปที่ 22 Peroxidase negative control: แสดงเซลล์ G ไม่เกิดปฏิกิริยา peroxidase (P^{-}) (3600x, peroxidase)

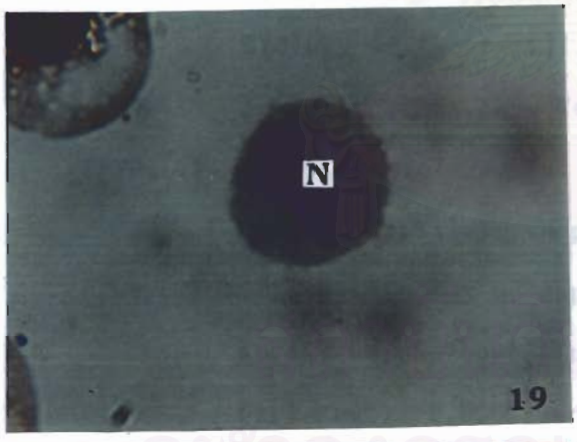
30

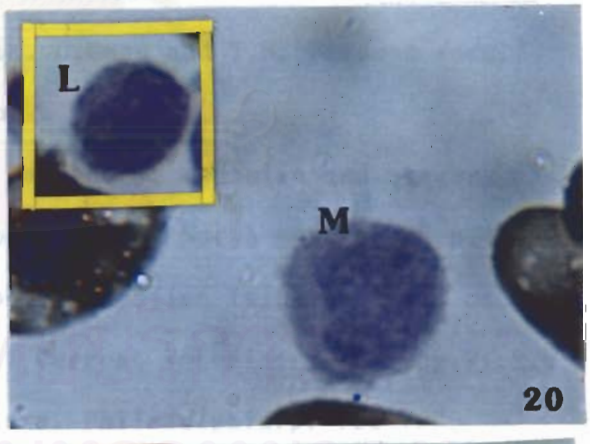


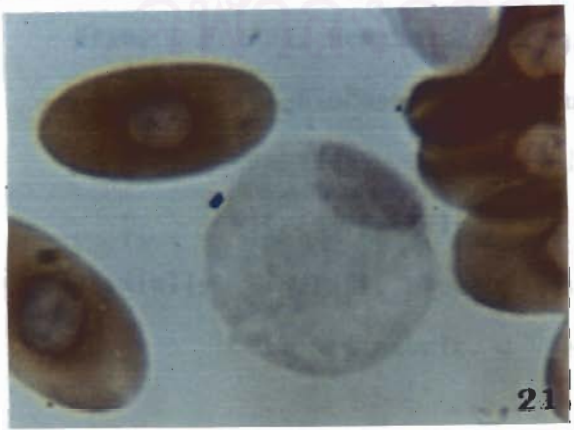


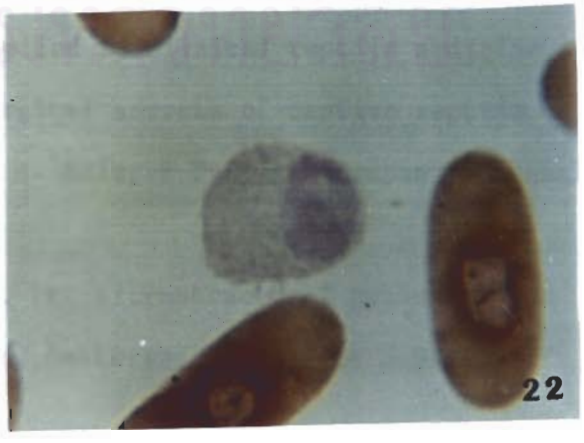












เอกสารอ้างอิง

Archer, R. K. 1963. The structure of eosinophils. In: The Eosinophil leucocytes. Blackwell Scientific Publications. Oxford. p. 161-162.

Bell,J. and Thomas, Jr. 1962. Histochemistry of the circulating leucocytes of domestic animals. Anat. Rec. 142:214.

Buys,J., Wever, R., Stigt,R.V. and Ruitenburg,J. 1981, The killing of newborn larvae of Trichinella spiralis by eosinophil peroxidase. European Journal of Immunology. 11:843-845

Caxton-Martins, A. E. 1977. Cytochemistry of blood cells in peripheral smears of some West African reptiles. J. Anat. 124:393-400

Desser, S.S. 1978. Morphological, cytochemical and biochemical observations on the blood of the tautara, Sphenodon punctatus. New Zealand. J. Zool. 5:503-508

Duguy, R. 1970. Numbers of blood cells and their variation. In: Biology of the reptilia. C.Gans and T.S. Parsons (eds.) Academic press. New York. p. 103.

Frye,L.F. 1973. Hematology. In: Husbandry, medicine and surgery in captive reptiles. VM publishing. North Nettleton. p.49-51.

Frye,L.F 1977. Hematology of captive reptiles (with emphasis on normal morphology). In: Current Veterinary Therapy VI.R.W Kirk (ed.). W.B. Saunders. Philadelphia.p. 792-798.

Frye, L.F.1991. Hematology as applied to clinical reptile medicine. In: Biochemical and surgical aspects of captive reptile husbandry. 2nd ed. Vol 1. Krieger Publish Company. Malabar, Florida.p. 211-221

Ghadially, F.N.1982. Microbodies. In: ultrastructural pathology the cell and matrix. 2nd ed. Butterworths. London p.581-594

Hanker, J.S.,Yates, P.E., Metz, C.B. and Rustioni,A. 1977. A new specific sensitive and non-carcinogenic reagent for the demonstration of horseradish peroxidase. Histochem.9:789.

Hawkey,C.M.and Dennett, T.B.1989.Normal and abnormal granulocytes. In: A colour atlas of comparative veterinary hematology. Wolfe publication. Ipswich. p.58-59,107-108,133-137.

Humason,G.L. 1979. Alkaline phosphatase, peroxidase method. In: Animal tissue techniques.4th ed. W.H. Freeman and company. San Francisco. p.399-405, 420-422

Jacobson,E.R. and Kollias,G.V.Jr. 1988. Leukocyte formulas of various south African reptiles. In:Exotic animals.Vol.9. Churchill Livingstone. New York. p.10.

Kanchanapangka, S. and Youngprapakorn, P. 1994. Differential morphology of crocodilian leukocytes. In: Crocodiles, Proceedings of the 12th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group of Species Survival Commission of IUCN -The World Conservation Union, Pattaya, Thailand, 2-6 May 1994. p.63-66.

Kaplow,L.S. 1965.Simplified myeloperoxidase stain using benzidine dihydrochloride. Blood. 26:215-219

Kaplow,L.S. 1968. Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: Applications and methods. Ann.N.Y. Acad.Sci.155:911-947.

Mateo,M.R., Roberts, E.D., and Enright, F.M.1984. Morphologic, cytochemical, and functional studies of peripheral blood cells of young healthy American alligators (Alligator mississippiensis) .Am.J.Vet.Res.45(5):1046-1053

Moloney, W.C. 1958. Leukocyte alkaline phosphatase activity in the rat. Ann.N.Y. Acad. Sci. 15:31-36.

De Pienaar U.U. 1962. Leukocyte formulas of various south African reptiles. In: Hematology of some African reptiles. Witwatersrand Univervity press. Johannesburg.p.183.

Vergnes,H.A., Courdoughji,M.K., Guelfi, J.F. and Grozdea,J.G. 1990. Effect of zinc deficiency in lamb on plasma and neutrophil alkaline phosphatase. Small Ruminant Research 3:167-177.

Weiss,L. 1988. The structure of blood cells in Romanovsky-stained smear. In:Cell and Tissue Biology:A textbook of Histology. 6th ed. Urban and Schwarzenberg. Baltimore.p.427-458.

Wetzel,B.K., Horn, R.G. and Spicer, S.S. 1963. Cytochemical localization of non- specific phosphatase activity in rabbit myeloid elements.J.Histochem. Cytochem. 11:812-814.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย