รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ลักษณะทางคาริโอไทป์ ชีววิทยาโลหิต และ ไซโตเคมี ระดับมหภาค และระดับจุลทรรศน์อิเลคตรอนของเม็ดเลือดในเต่าบัว (*Hieremys annandalii*) ของประเทศไทยเพื่อการอนุรักษ์

Karyotyping, hematological biology, and cytochemical studies of gross and ultrastucture of blood cell of adult Yellow-headed temple turtle (*Hieremys annandalii*) in Thailand for conservation purposes

โดย

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้วิจัย

รศ. สพ.ญ.ดร. นันทริกา ชันซื่อ (หัวหน้าโครงการ)

รศ. สพ.ญ. ดร. อัจฉริยา ไศละสูต

รศ. ดร. สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช

สพ.ญ. นงนุช อัศววงศ์เกษม

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล

พ.ศ. 2552

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2552

ขอขอบพระคุณอย่างสูงต่อคณะกรรมการพิจารณาและประเมินโครงการที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ และแนวทางในการปรับปรุงโครงการวิจัยให้มีความเหมาะสม และสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รศ. สพ.ญ. ดร.เฉลียว ศาลากิจ หัวหน้าภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งให้คำแนะนำ และข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณอาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเจ้าหน้าที่สวนสัตว์ดุสิตทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือ ช่วยเหลือในการออกปฏิบัติงาน และเก็บตัวอย่างเต่าบัวตลอดโครงการนี้

ขอขอบคุณนายสุประดิษฐ์ หวังในธรรม นักวิทยาศาสตร์ ห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และนางสาวเจนจิรา สกุลครู นักวิจัย ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือด้านเทคนิคทางห้องปฏิบัติการอย่างดียิ่งตลอดการดำเนินโครงการวิจัยนี้

ขอขอบคุณนางสาวศิริเพ็ญ เวชชการัณย์ และนายบุญเหลือ เงาถาวรชัย เจ้าหน้าที่ฝ่ายวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน และนางรุจิพร ประทีปเสน เจ้าหน้าที่ฝ่ายวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรร์มหาวิทยาลัย รวมทั้งนางวรรณีต ขอเจริญพร และนางนุชศรา ช่อมณี เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ศิริราช ที่อำนวยความสะดวกในการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และท้ายที่สุดคณะผู้วิจัยขอขอบคุณเต่าทุกตัวที่ผู้วิจัยได้นำเลือดมาเป็นตัวอย่างในการศึกษาจนสำเร็จตามวัตถุประสงค์

ภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย ลักษณะทางคาริโอไทป์ ชีววิทยาโลหิต และ ไซโตเคมี ระดับมหภาค และระดับจุลทรรศน์อิเลคตรอนของเม็ดเลือดในเต่าบัว *(Hieremys annandalii)* ของประเทศไทย เพื่อการอนุรักษ์

ชื่อผู้วิจัย รศ. สพ.ญ.ดร. นันทริกา ชันซื่อ (หัวหน้าโครงการ) รศ. สพ.ญ. ดร. อัจฉริยา ไศละสูต รศ. ดร. สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช และ สพ.ญ. นงนุช อัศววงศ์เกษม

เดือน และปีที่ทำวิจัยเสร็จ มกราคม 2553

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดคอในเต่าบัวโตเต็มวัย (*Hieremys annandalii*) ในธรรมชาติ เพศละ 20 ตัว พบค่าเฉลี่ยของเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 2.75±0.94x10^5 เซลล์/มคล. เม็ดเลือดขาวทั้งหมด 11.66±6.59 x 10^3 เซลล์/มคล. แบ่งเป็น 5 ชนิด เรียงจากมากไปน้อยคือ เฮเทอโรฟิล (26.40±6.88%) อิโอสิโนฟิล (23.69±5.30%) เบโซฟิล (21.23±1.90%) ลิมโฟไซต์ (14.81±5.88%) และโมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิล (10.73±5.29%) เม็ดเลือดแดงติด peroxidase เข้ม ธรอมโบไซต์มีหลายรูปร่าง สี periodic acid-Schiff ไม่สามารถแยกธรอมโบไซต์ออกจากลิมโฟไซต์ โครงสร้างจุลทรรศน์อิเล็กตรอนคล้ายเกล็ดเลือดสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เฮเทอโรฟิล และอีโอสิโนฟิลมีโครงสร้างและไซโตเคมีคล้ายสัตว์เลื้อยคลานทั่วไป เบโซฟิลโครงสร้างคล้ายสัตว์ปีก ลิมโฟไซต์ และโมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิลมีโครงสร้าง และไซโตเคมีคล้ายสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ค่า MCHC เม็ดเลือดขาวทั้งหมด โมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิล และ ALT ในเพศผู้สูงกว่าเพศเมีย และค่า MCV ของเต่าเพศผู้มีความสัมพันธ์ในเชิงผกผันกับน้ำหนักตัว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*p<0.05*)

เต่าบัวไม่มีโครโมโซมเพศ มีจำนวนโครโมโซมในเซลล์ร่างกาย 2n = 52 จำแนกเป็นแมคโครโครโมโซม 14 คู่ (เมทาเซนทริก 2 คู่ ซับเมทาเซนทริก 7 คู่ และทีโลเซนทริก 5 คู่) และไมโครโครโมโซม12 คู่ ข้อมูลจากการศึกษานี้เป็นประโยชน์ในการนำจัดจำแนกชนิดพันธุ์เต่า และจัดการสุขภาพ เพื่ออนุรักษ์ประชากรเต่าเหล่านี้ในประเทศไทยต่อไปในอนาคต

ภาษาอังกฤษ

Project title Karyotyping, hematological biology, and cytochemical studies of gross and ultrastucture of blood cell of adult Yellow-headed temple turtle (*Hieremys annandalii*) in Thailand for conservation purposes

Name of the investigators Assoc. Prof. Dr. Nantarika Chansue, Assoc. Prof. Dr. Achariya Sailasuita, Assoc. Prof. Dr. Somsak Apisitvanit, and Miss. Nongnut Assawawongkasem

Year January 2010

Abstract

Blood samples were collected from the jugular vein of 20 male and 20 female adult yellow headed temple turtles (YHTT). The average total red blood cell count was $2.75\pm0.94x10^5$ cells/ μL., the average total white blood cell count was$11.66\pm6.59 \times 10^3$ cells/μL. The results of this study indicated that their white blood cells can be classified into 5 catagories, namely, heterophil (29.40±6.88%), eosinophil (23.69±5.30%), basophil (21.23±1.90%), lymphocytes (14.81±5.88%), and monocytic-like azurophils (10.73±5.29%), respectively. Red blood cells were stained dark red by peroxidase. Thrombocytes consisted of various morphologies and cytochemically staining. Therefore, periodic acid-schiff stain could not be used to differentiate thrombocytes from lymphocytes. The ultrastructure was also similar to the mammals' thrombocytes. Heterophils and eosinophils had similar in structure and cytochemical staining to other reptiles. Basophils structure was similar to avian. Lymphocytes and monocytic-like azurophils had similar staining and morphology to mammals. In male turtles, MCHC values, total monocytic-like azurophils, and ALT levels were statistically significant higher than that of female turtles ($p<0.05$). MCV value of male turtles had a negative relationship with body weight. though there was no difference in other blood values.

Not find sex chromosome in YHTT. The autosome was determined 2n = 52. The karyotype consisted of 14 pairs macrochromosome (2 pairs metacentric, 7 pairs submetacentric and 5 pairs telocentric chromosome) and 12 pairs microchromosomes. The obtained result from this study is important on basic cytogenetic knowledge of chelonians and contribute the health monitoring for the conservation purposes of YHTT populations in Thailand.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ……..	2
บทคัดย่อภาษาไทย……..	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……	4
สารบัญ……	5
สารบัญตาราง……	6
สารบัญรูป……...	6
บทที่ 1 บทนำ……..	8
บทที่ 2 การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง……	13
บทที่ 3 วิธีการวิจัย……..	27
บทที่ 4 ผลการวิจัย……..	36
บทที่ 5 การอภิปรายผล……..	73
เอกสารอ้างอิง……	94
ภาคผนวก……	107

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์เม็ดเลือดเป็นไมโครเมตร (mean $\pm$ SD) เปรียบเทียบในเต่าบัวโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย	66
4.2	สีพื้นฐานที่ย้อมติดเซลล์ได้ดี และรูปแบบการติดสีปฏิกิริยาเคมีของเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดในเต่าบัวตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย	66
4.3	ค่าโลหิตวิทยาและเคมีโลหิต (mean+SD) ของเต่าบัวโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย	67
4.4	แสดงน้ำหนัก และความยาวระดองหลังในเต่าบัวโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย	69
4.5	ความสัมพันธ์ของน้ำหนัก และความยาวของกระดองหลังต่อค่าโลหิตวิทยา โดยใช้ Spearman rank correlation coefficient ในเต่าบัวโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย	69

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
4.1	สีพลาสมาในเต่าบัวโตเต็มวัย	36
4.2	ลักษณะรูปร่างของ Hemogregarine ในเต่าบัว	37
4.3	แสดงลักษณะเม็ดเลือดเต่าบัวในภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง	40
4.4	เม็ดเลือดแดงในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	41
4.5	เม็ดเลือดแดงที่รูปร่างผิดปกติภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	42
4.6	เม็ดเลือดแดงในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	43
4.7	แสดงลักษณะธรอมโบไซต์เต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง	45
4.8	ธรอมโบไซต์ในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	46
4.9	ธรอมโบไซต์ในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	47
4.10	เฮเทอโรฟิลในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง	50

รูปที่		หน้า
4.11	เฮเทอโรฟิลในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	52
4.12	เฮเทอโรฟิลในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	52
4.13	อีโอสิโนฟิลในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง	54
4.14	อีโอสิโนฟิลในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด	55
4.15	อีโอสิโนฟิลในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	55
4.16	เบโซฟิลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง	57
4.17	เบโซฟิลในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศอิเล็กตรอนแบบส่องกราด	58
4.18	เบโซฟิลในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	58
4.19	ลิมโฟไซต์ในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง	61
4.20	ลิมโฟไซต์ในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	62
4.21	ลิมโฟไซต์ในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน	62
4.22	โมโนไซติก-ไลต์ อะซูโรฟิลในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง	64
4.23	โมโนไซติก-ไลต์ อะซูโรฟิลในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด	65
4.24	โมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิลในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน	65
4.25	โครโมโซมในระยะเมทาเฟสของเต่าบัว	71
4.26	คาริโอไทป์เต่าบัว	71
4.27	คาริโอแกรมเต่าบัว	72

บทที่ 1
บทนำ

ได้มีการประเมินจากนักวิชาการทั่วโลกว่าเกิดอัตราการสูญพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตประมาณวันละ 1 ชนิด ในปี ค.ศ. 1970 ว่า และในปี ค.ศ. 1980 เพิ่มเป็นชั่วโมงละ 1 ชนิด และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในแต่ละทศวรรษ ซึ่งการสูญเสียสิ่งมีชีวิตไปในแต่ละครั้งมีผลกระทบต่อความหลากหลายทางชีวภาพในเชิงลบทั้งสิ้น โดยทุกครั้งที่เกิดการสูญพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต 1 ชนิด ไม่เพียงทำความหลากหลายลดลงตามเพียง 1 ส่วน แต่กลับทำให้เกิดการลดลงของความหลากหลายชนิดต่างๆ ตามมาอีกหลายส่วน เพราะสิ่งมีชีวิตทุกชนิดในระบบนิเวศน์ต่างมีความเกี่ยวข้องกันเป็นสายใย โดยเฉพาะสัตว์เลื้อยคลานที่มีวิวัฒนาการผูกพันกับระบบนิเวศในธรรมชาติมากว่าล้านปี และจัดได้ว่าเป็นสัตว์ที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์ทั้งโดยทางตรงและทางอ้อม รวมถึงเต่า ที่กล่าวได้ว่าเป็นกลุ่มสัตว์ที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์มากที่สุดประเภทหนึ่ง

เต่าบัว (Yellow-headed temple turtle; *Hieremys annandalii*) เป็นเต่าน้ำจืดพื้นเมืองของไทยที่จัดอยู่ในกลุ่มสัตว์ป่าคุ้มครอง ตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่าตั้งแต่ พ.ศ. 2535 และอยู่ในความคุ้มครองตามกฎหมายอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดพันธุ์สัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora : CITES) ในกลุ่ม Appendix II รวมทั้งตั้งแต่ในปี 2543 (ค.ศ. 2000) สมัชชาการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมโลก หรือ IUCN (International Union for The Conservation of Nature and Natural Resources) ได้ประกาศให้เต่าบัวเป็นสัตว์หายากและมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์จนกระทั่งถึงในปัจจุบัน ซึ่งมีสถานภาพเชิงอนุรักษ์จัดอยู่ในบัญชีแดงรายชื่อสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ (Endangered) ของหลายประเทศ โดยในสถานะเชิงประชากรของเต่ายังไม่เป็นที่ทราบจำนวนที่แน่นอน แต่เป็นที่คาดการณ์ว่ามีจำนวนลดลงอย่างต่อเนื่อง และมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ไปในอนาคตอันใกล้ (IUCN, 2006)

การศึกษาข้อมูลพื้นฐานในเต่าบัวตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันยังมีอยู่น้อยมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านสัตวแพทย์ ในทางสัตวแพทย์ข้อมูลทางโลหิตวิทยา และเคมีในโลหิต เป็นส่วนสำคัญทางพยาธิวิทยาทางคลินิค (clinical pathology) ที่นำมาใช้ในการวินิจฉัยโรค การประเมินสุขภาพ และความผิดปกติที่สำคัญ ด้วยสาเหตุต่างๆ รวมทั้งในเต่า ซึ่งในปัจจุบันมีเต่าบัวจำนวนมากที่ประชาชนเก็บนำมารักษาที่ศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยจากใบบันทึกรายงาน

สัตว์ป่วยในปี 2548-2549 มีจำนวนเต่าบัวป่วยที่นำมารักษา 55 ราย และมีแนวโน้มที่เพิ่มมากขึ้นในแต่ละปี โดยสาเหตุของการตายและความเจ็บป่วยที่พบมากได้แก่ การประสบอุบัติเหตุรถทับ ไข่ค้าง ภาวะแทรกซ้อนจากการมีพยาธิภายนอก และพยาธิภายในจำนวนมาก เช่น พยาธิในเม็ดเลือด ภาวะขาดน้ำ และสารอาหารอย่างรุนแรง การติดเชื้อที่กระดอง (shell rot) การเกิดฝีที่ผิวหนัง หรืออวัยวะภายในเป็นต้น ซึ่งวิธีการตรวจ และติดตามการเกิดโรคโดยใช้เทคนิคทางด้านโลหิตวิทยาและเคมีในโลหิตของเต่าบัวยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษา และมีการศึกษาในเต่าน้ำจืดอยู่น้อย ตลอดจนมีความแตกต่างกันของข้อมูลที่รายงานเป็นอย่างมาก เช่น ชนิดของเม็ดเลือดขาว จำนวน และค่าดัชนีในโลหิตต่างๆ ด้วยปัจจัยดังกล่าวทำให้การนำข้อมูลทางโลหิตวิทยา และเคมีในโลหิตของเต่าต่างชนิดกันมาใช้เป็นอุปสรรคต่อการศึกษาวิจัยและวินิจฉัยสาเหตุของโรคที่ถูกต้อง รวมทั้งทำให้การประเมินสุขภาพเต่าชนิดนี้ก่อนปล่อยสู่ธรรมชาติทำได้ลำบาก

การศึกษาพันธุศาสตร์ของเซลล์ (cytogenetics) คือ การศึกษาลักษณะของโครโมโซม ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่อยู่ในนิวเคลียสของสัตว์ทุกชนิด ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการช่วยจำแนกสัตว์ตามอนุกรมวิธาน (cytotaxonomy) เนื่องจากโครโมโซมเป็นโครงสร้างที่ประกอบด้วยด้วยโปรตีน และสารพันธุกรรม (DNA) และสัตวแต่ละชนิด (species) มีจำนวนลักษณะของโครโมโซม และการจัดรูปแบบของโครโมโซมไม่เหมือนกัน การจัดรูปแบบของโครโมโซมที่เรียกว่าคาริโอไทป์ (karyotype) ทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถจำแนกสัตว์ที่มีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกันได้ และยังสามารถศึกษาความสัมพันพันธุ์เชิงวัฒนาการของสัตว์ที่อยู่ในวงศ์ (genus) เดียวกันได้อีกด้วย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ อย่างมากต่อการเป็นการเป็นข้อมูลชีววิทยาพื้นฐานของสิ่งมีชีวิต (สมศักดิ์, 2538) การศึกษาโครโมโซม และคาริโอไทป์ หรือการศึกษาพันธุศาสตร์ของเซลล์มีการทำกันอย่างกว้างขวางทั้งในมนุษย์ และในสัตว์หลายชนิด การจัดจำแนกทางเซลล์พันธุศาสตร์จัดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพของธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาโครโมโซมในสัตว์เลื้อยคลานซึ่งมีความหลากหลายสูงของขนาด รูปร่าง และลักษณะที่เป็น bimodal หรือ asymmetric karyotypes ซึ่งประกอบไปด้วยโครโมโซมขนาดใหญ่ (macrochromosome) และขนาดเล็ก (microchromosome) อย่างไรก็ตามการศึกษาโครโมโซม และคาริโอไทป์ในเต่ายังมีอยู่จำกัด เนื่องจากสัตว์เหล่านี้เป็นสัตว์ที่มีสถานภาพอนุรักษ์ การใช้วิธีศึกษาคาริโอไทป์ที่ดังเดิมต้องเตรียมจากม้าม ไต หรือลำไส้ หรือทำการเพาะเลี้ยงจาก fibroblast ของหัวใจและผิวหนังเป็นเรื่องที่ทำได้ยาก เพราะต้องทำการศึกษาในสัตว์ที่เสียชีวิตหรือทำให้

สัตว์อยู่ในภาวะไม่ปลอดภัย (Baker et al., 1971; Bickham, 1975) แต่อย่างไรก็ตามปัจจุบันเริ่มมีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยง fibroblast จากเม็ดเลือดขาวในสัตว์เลื้อยคลานขึ้น ซึ่งเป็นวิธีที่การศึกษานี้เลือกใช้ เพื่อให้สัตว์มีความปลอดภัยและไม่ทำให้เกิดความเจ็บปวด (Rohilla et al., 2006)

จากสาเหตุและรายละเอียดดังข้างต้นคณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นความสำคัญเป็นอย่างยิ่งของการศึกษา “ลักษณะทางคาริโอไทป์ ชีววิทยาโลหิต และ ไซโตเคมี ระดับมหภาค และระดับจุลทรรศน์อิเลคตรอน ของเต่าบัว (*Hieremys annandalii*) ของประเทศไทยเพื่อการอนุรักษ์” ซึ่งยังไม่มีผู้ใดเคยทำการศึกษามาก่อน เพื่อจะเป็นประโยชน์ต่อการวิจัยในเชิงพันธุศาสตร์เพื่อการอนุรักษ์ และการเพาะขยายพันธุ์ และช่วยในการประเมินสภาวะสุขภาพ วินิจฉัยโรค และใช้เป็นข้อมูลในการอ้างอิงใช้ในการศึกษาค้นคว้าเชิงวิทยาศาสตร์ ที่เป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มจำนวนประชากรของสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ที่มีคุณค่าของประเทศไทยเหล่านี้ในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษา และวิจัยโครโมโซม และคาร์ริโอไทป์ในเต่าบัว ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจำแนกชนิดสัตว์ที่ชัดเจนมากขึ้น
2. เพื่อประโยชน์ในข้อมูลจากพันธุกรรมเต่าบัว ในเชิงอนุรักษ์และขยายพันธุ์เต่าไทยที่ใกล้สูญพันธุ์
3. เพื่อเพิ่มศักยภาพในการประเมินและวินิจฉัยโรคในเต่า โดยการศึกษาลักษณะรูปร่าง และการย้อมติดสีทางไซโตเคมีของเซลล์เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือด ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงสว่าง และโครงสร้างอย่างละเอียดของเซลล์เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือด ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน และแบบส่องกราด
4. เพื่อศึกษาและรวบรวมข้อมูลค่าทางโลหิตวิทยาและเคมีโลหิตในเต่าบัวโตเต็มวัยที่ปกติ และเต่าบัวที่แสดงอาการป่วย ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นมาตรฐานด้านการจัดการสุขภาพ เพื่อป้องกันและเฝ้าระวังโรคในเต่าบัว
5. เพื่อนำผลงานวิจัยเผยแพร่ต่อสาธารณชน อันเป็นองค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์ที่สามารถนำไปประยุกต์และพัฒนาต่อไปในอนาคต

ขอบเขตของการวิจัย

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างเต่าบัวโตเต็มวัย ในประเทศไทย
2. ศึกษาจำนวนโครโมโซม และจัดทำคาริโอไทป์โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว แล้วย้อมสีโครโมโซมในเต่าบัวโตเต็มวัย
3. ศึกษาลักษณะเม็ดเลือด และจำแนกลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดต่างๆในกระแสเลือด รวมทั้งการศึกษาลักษณะโครงสร้างอย่างละเอียดของเม็ดเลือดแต่ละชนิด โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนทั้งชนิดส่องกราด และชนิดส่องผ่าน ประกอบกับการย้อมสีทางไซโตเคมี และค่าทางเคมีโลหิตที่สำคัญทางคลินิกในเต่าบัวโตเต็มวัย

ทฤษฎี สมมติฐาน และหรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย

เต่าบัว (Yellow-headed temple turtle; *Hieremys annandalii*) อยู่ใน Order Chelonia อันดับย่อย Suborder Cryptodira เป็นเต่าน้ำจืดพื้นเมืองของไทย ที่จัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง ตามพ.ร.บ. สงวนและคุ้มครองสัตว์ป่าตั้งแต่ พ.ศ. 2535 และอยู่ในความคุ้มครองตามกฎหมายอนุสัญญา CITES ในกลุ่ม Appendix II รวมทั้งตั้งแต่ในปี 2543 IUCN ได้ประกาศให้เต่าบัวเป็นสัตว์หายากและมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์จนกระทั่งถึงในปัจจุบัน ซึ่งมีสถานภาพเชิงอนุรักษ์จัดอยู่ในบัญชีแดงรายชื่อสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ (Endangered) ของหลายประเทศ และมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ไปในอนาคตอันใกล้ (IUCN, 2006)

เนื่องจากความสำคัญในเชิงอนุรักษ์ดังที่กล่าวข้างต้นจึงเป็นเหตุผลที่สำคัญอย่างยิ่งในการศึกษาข้อมูลทางด้านพันธุศาสตร์ของเซลล์ เพื่อการอนุรักษ์ และการศึกษาชีววิทยาของโลหิตที่มีความสำคัญต่อการประเมินสุขภาพ และรักษา ป้องกันโรคในเต่าบัว ซึ่งยังไม่มีผู้ใดเคยทำการศึกษามาก่อน โดยการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของสัตว์ เป็นศาสตร์หนึ่งที่ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม ว่าด้วยการศึกษาจำนวน รูปร่างลักษณะของโครโมโซม และคาริโอไทป์ ซึ่งช่วยจำแนกสัตว์ บอกความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตได้ละเอียดยิ่งขึ้น ซึ่งใช้วิธีการเตรียมจากการเพาะเลี้ยงเม็ดเลือดขาว (Rohilla et al., 2006) โดยข้อมูลและความรู้พื้นฐานที่ได้มีความจำเป็นในการนำไปประยุกต์ใช้กับการอนุรักษ์พันธุ์ และการนำไปใช้ประโยชน์การศึกษาทางด้านวิทยาศาสตร์และพันธุศาสตร์ของสัตว์ป่าต่อไป (อมรา, 2541; Sumner; 1990) และการศึกษาลักษณะรูปร่าง ไซโตเคมี โครงสร้างอย่างละเอียดทางโลหิตวิทยา และการศึกษาค่า

ทางโลหิตวิทยาและเคมีโลหิตที่สำคัญ จะสามารถใช้เป็นข้อมูลในการอ้างอิง เพื่อประเมินสภาวะสุขภาพ วินิจฉัยโรค (Campbell, 2004) และใช้ในการศึกษาค้นคว้าเชิงวิทยาศาสตร์ อันจะเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มจำนวนประชากรของสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ที่มีคุณค่าของประเทศไทยเหล่านี้ในอนาคตต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ข้อมูลพื้นฐานทางเซลล์พันธุศาสตร์ที่ได้ นำไปประยุกต์ใช้ในการจัดการและการอนุรักษ์พันธุ์ของเต่าบัวต่อไป
2. สามารถแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวของเต่าบัวโตเต็มวัยได้อย่างชัดเจน และทราบถึงลักษณะปกติของเม็ดเลือด อันเป็นการเพิ่มศักยภาพในการประเมินและวินิจฉัยโรคในเต่า
3. ค่าทางโลหิตวิทยาและเคมีโลหิตที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลมาตรฐานอ้างอิงในการวินิจฉัยทางคลินิก เพื่อหาสาเหตุของโรค หรือประเมินสุขภาพเต่าบัว ที่รักษาในสถานพยาบาลได้อย่างถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น
4. เป็นข้อมูลพื้นฐานทางโลหิตวิทยาและเคมีโลหิตของเต่าบัว ที่สามารถใช้เป็นใช้เป็นมาตรฐานด้านการจัดการสุขภาพ เพื่อป้องกันและเฝ้าระวังโรคของเต่าบัวในธรรมชาติได้
5. ข้อมูลลักษณะโครงสร้างโดยละเอียด และการย้อมติดสีพิเศษของเม็ดเลือด สามารถนำมาใช้ในจำแนกชนิดหรือเปรียบเทียบกับสัตว์ในกลุ่มเดียวกัน หรือสัตว์ชนิดอื่นที่ใกล้เคียง
6. คาริโอไทป์ และลักษณะชีววิทยาของโลหิตในเต่าบัวเป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ประชาชน บุคคกรทางวิชาการ และองค์กรด้านการอนุรักษ์ สามารถนำไปประยุกต์และพัฒนาในการศึกษาวิจัยระดับสูงต่อไป

บทที่ 2
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1) ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเต่าน้ำจืดและเต่าบัว

เต่าเป็นสัตว์เลื้อยคลานอยู่ใน Class Reptilia, Order Chelonia หรือ Testudines จากการค้นพบหลักฐานทางวิวัฒนาการ มีการสันนิษฐานว่าสัตว์เลื้อยคลานใน Order Chelonia ซึ่งลักษณะทั่วไปของสัตว์ในกลุ่มนี้ คือ ร่างกายมีสิ่งห่อหุ้มเป็นแผ่นกระดูกจากชั้นผิวหนังแท้ (Dermis) ขากรรไกรไม่มีฟัน แต่เป็น horny sheath กระดูกสันหลังและซี่โครงเชื่อมกันเป็นกระดองภายใน ทวารหนักเป็นช่องตามยาว ซึ่ง Order Chelonia แบ่งได้เป็น 2 อันดับย่อย คือ Suborder Pleurodira และ Suborder Cryptodira

1. Suborder Pleurodira

ประกอบด้วยเต่าเพียงกลุ่มเดียว คือ กลุ่มที่มีคอยาวและเก็บหัวและคอโดยการพับเข้าด้านข้างของกระดอง (side-necked turtles)

2. Suborder Cryptodira

ในอันดับนี้จะประกอบไปด้วยเต่าที่สามารถหดหัวเข้าไปในกระดองได้ และพวกหัวใหญ่ ที่ไม่สามารถหดหัวเข้าไปกระดองได้ทั้งหมด สามารถแบ่งได้เป็น 10 ครอบครัว (Family) ซึ่งรวมถึงเต่าบก (tortoise) และเต่าน้ำจืดที่มีกระดองแข็ง (terrapin) เต่าพวกที่อาศัยอยู่ใต้น้ำที่เป็นโคลน (mask and mud turtles) เต่าทะเล (sea turtles) และตะพาบ (soft shell turtle)

โดยเต่าบัว *(Hieremys annandalii)* จะอยู่ในครอบครัว Emydidae ซึ่งเป็นเต่าน้ำจืด เต่าในครอบครัวนี้มีกระดองกลมรี เป็นเต่าที่อาศัยในน้ำจืด หรือครึ่งบกครึ่งน้ำ แต่มีบางชนิดที่อาศัยอยู่บนบกมากกว่าอยู่ในน้ำ โดยเฉพาะช่วงอากาศที่มีความชื้นสูงจะไม่ลงน้ำเลย อาศัยตามที่ลุ่ม หนอง บึง แม่น้ำต่างๆ ทะเลสาบ เต่าในครอบครัวนี้ เมื่อโตเต็มวัยจะกินทั้งพืชและสัตว์ เป็นอาหาร ยกเว้นสกุล Emydoidea และ Deirochelys จะเป็นนักล่าที่กินสัตว์เป็นอาหาร ได้แก่พวกเต่านา ที่กินหอยและปู ส่วนสกุล Pseudemys เมื่อโตขึ้นจะกินเฉพาะพืชเท่านั้น ในวงศ์นี้มีทั้งหมด 140 ชนิด (วิโรจน์, 2543) ตัวอย่างเต่าที่อยู่ในวงศ์นี้นอกเหนือจากเต่าบัว ได้แก่ เต่าจักร *(Heosemys spinosa)* เต่าหวาย *(Heosemys grandis)* เต่ากระอาน *(Batagur baska baska)* เต่าจัน *(Pyxidea mouhotii)* เต่าจาน

(Batagur baska ranongensis) เต่าดำ *(Siebenrockiella crassicollis)* เต่าหับ *(Cuora amboinensis)* เต่านา *(Malayemys subtrijuga)* และเต่าญี่ปุ่น *(Trachemys scripta elegans)* (บพิธ และนันทพร, 2540) เป็นต้น

1.1 ลักษณะทางอนุกรมวิธานของเต่าบัว (Taxonomic Theory) (IUCN, 2006; วิโรจน์, 2543)

Kingdom Animalia

Phylum Chordata

Class Reptilia

Order Chelonia

Suborder Cryptodira

Family Emydidae

Genus *Hieremys*

Species *H. annandalii*

Scientific name: *Hieremys annandalii*

Synomyms: *Cyclemys annandalii* Boulenger (1903)

English common name: Yellow-headed temple turtle

ชื่อสามัญหรือชื่อท้องถิ่น: เต่าบัว เต่าหม้อ เต่าหัวเหลือง เต่าวัด

1.2 ลักษณะภายนอก (Morphological character) ของเต่าบัว

กระดองในเต่าบัวขนาดเล็กจะมีความกว้างใกล้เคียงกับความยาว แบนกลม และมีสันสีเหลืองที่แผ่นเกล็ดสันหลังมีส่วนอ่อนอยู่ใจกลางกระดอง ส่วนล่าง ซึ่งมีสีเหลืองสม่ำเสมอ และมีเส้นสีเหลืองบนหัวสีดำ

ในเต่าบัวตัวเต็มวัยกระดองจะมีลักษณะยกสูงและยาวไม่มีสันนูน หัวมีสีเทาและมีจุดประสีเหลืองและดำเล็กๆและมีกรามสีเหลือง โดยจุดและแถบสีเหลืองที่หัว และการที่เต่าบัวจะไม่มีเส้นรัศมีบนกระดองส่วนล่างและไม่มีสันนูนกลางกระดองจะทำให้สามารถแยกเต่าบัวออกจากเต่าหวายได้ง่ายยิ่งขึ้น กระดองส่วนล่างของเต่าบัวจะมีสีเหลือง และแต้มสีดำบนแผ่นเกล็ดและมีลักษณะเหมือนรอยเปื้อน แต่กระดองจะเป็นสีดำทั้งหมดเมื่ออายุเพิ่มขึ้น (Stuart et al., 2001)

1.3 แหล่งอาศัยและขอบเขตการกระจายในภาคพื้นที่ที่ทราบ

ตามธรรมชาติเต่าบัวอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำ หนองน้ำ บ่อน้ำ และแหล่งน้ำอื่นๆที่มีน้ำไหลช้าหรือน้ำนิ่งในบริเวณที่ราบและสามารถอยู่รอดได้ในบริเวณน้ำกร่อย มีการกระจายตัวของประชากรบริเวณที่ราบต่ำในภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคใต้บนแผ่นดินใหญ่ของประเทศไทย พบได้ในบางบริเวณของประเทศลาว เวียดนาม กัมพูชา และคาดว่าอาจพบได้ในมาเลเซียและพม่า (Stuart et al., 2001)

1.4 กฎหมายคุ้มครองและสถานภาพเชิงอนุรักษ์

ปัจจุบันเต่าบัวจัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 ของประเทศไทย ซึ่งคุ้มครองเต่าทุกชนิดที่เป็นพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทยให้พ้นจากการคุกคามและจากการค้า โดยอยู่ในความคุ้มครองตามกฎหมายอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศ ซึ่งชนิดพันธุ์สัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora : CITES) ในกลุ่ม Appendix II ซึ่งกำหนดว่าการค้าเต่าชนิดนี้สามารถทำได้ในระหว่างประเทศสมาชิกแต่ต้องอยู่ภายใต้การควบคุม และต้องมีการติดตามข้อมูลโดยผ่านกระบวนการออกใบอนุญาตเท่านั้น (UNEP-WCMC. 2006) นอกจากนี้ยังจัดเป็นสัตว์หายากและมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ตามประกาศของสมัชชาการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมโลก หรือ IUCN (International Union for The Conservation of Nature and Natural Resources) ในปี พ.ศ.2543 ซึ่งมีสถานภาพเชิงอนุรักษ์จัดอยู่ในบัญชีแดงรายชื่อสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ (Endangered) ของหลายประเทศ หมายถึงสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในหมวดนี้แม้ว่าจะไม่อยู่ในสถานะที่กำลังจะสูญพันธุ์ไปในทันทีทันใดแต่ก็มีความเสี่ยงสูงมากต่อการสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติในอนาคตอันใกล้ (IUCN, 2006) โดยในสถานะเชิงประชากรของเต่าบัวประเทศไทยยังไม่เป็นที่ทราบจำนวนที่แน่นอน แต่เป็นที่คาดการณ์ว่ามีจำนวนลดลงอย่างต่อเนื่องในพื้นที่ส่วนใหญ่เนื่องจากการถูกจับเพื่อนำไปทำเป็นอาหาร การลดลงและถูกรุกรานถิ่นอาศัยและวางไข่ และผลจากมลพิษในสิ่งแวดล้อม (van Dijk et al., 2000)

2) ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับการศึกษาทางโลหิตวิทยา และเคมีโลหิตในเต่า

ระบบหมุนเวียนโลหิตของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะสัตว์เลือดเย็น จะไวต่อสิ่งกระตุ้นจากสิ่งเร้าภายนอกมาก และผลตอบสนองต่อสิ่งเร้าจะปรากฏให้เห็นได้จากจำนวนและชนิดของเม็ดเลือด และค่าทางเคมีโลหิต ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญในการใช้วินิจฉัยประกอบกับการประเมินสภาวะทางกายภาพใน

ประชากรสัตว์เลื้อยคลาน (Campbell, 2004) การเปลี่ยนแปลงจำนวนเม็ดเลือด และค่าทางเคมีโลหิตสามารถบ่งบอกความผิดปกติทางสรีรวิทยา และความผิดปกติทางพยาธิวิทยา เนื่องจากเมื่อเต่าได้รับความเครียด หรืออยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จะทำให้เกิดการกระตุ้นให้มีการเพิ่มของคอร์ติซอล (cortisol) และแคททีโคลามีน (catecholamine) ในกระแสเลือด ซึ่งโน้มนำให้มีการเพิ่มขึ้นของอัตราเมแทบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดต่างๆในระบบหมุนเวียนโลหิตและค่าทางเคมีโลหิตในเลือดชนิดต่างๆ รวมถึงปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลทำให้ค่าทางโลหิตวิทยา และค่าทางเคมีโลหิตเปลี่ยนแปลง ได้แก่ ชนิด อายุ เพศ ภาวะทางโภชนาการ อุณหภูมิ ฤดูกาล การจับบังคับ การวางยา วิธีการตรวจ วิธีการเก็บรักษาตัวอย่าง การมีพยาธิภายนอก การได้รับสารพิษ และโรค (Wilkinson, 2004) ดังนั้นการศึกษาลักษณะโครงสร้างปกติของเม็ดเลือด และค่าพิสัยอ้างอิง (reference values) ทางโลหิตวิทยา และเคมีโลหิตในเลือด รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงจะช่วยในการวิเคราะห์และพยากรณ์โรคได้อย่างถูกต้องและรวดเร็วยิ่งขึ้น

2.1 การศึกษาทางโลหิตวิทยา

การตรวจลักษณะทางโลหิตวิทยาในสัตว์เลื้อยคลาน เป็นประโยชน์ในการประเมินภาวะโลหิตจาง (anemia) การอักเสบ (inflammation) ปรสิตในเลือด (parasitemias) ความผิดปกติในการสร้างเม็ดเลือด (hematopoietic disorders) และความผิดปกติของการควบคุมสมดุลเลือด (hemeostatic alterations) (Campbell, 2004) แต่อย่างไรก็ตามปัจจุบันค่าทางโลหิตวิทยาของสัตว์เลื้อยคลานยังมีการศึกษาอยู่เป็นจำนวนน้อย รวมทั้งมีความสับสนเกี่ยวกับการจำแนกชนิดเม็ดเลือดในกระแสโลหิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งเม็ดเลือดขาว เช่น Casal and Orós (2006) ได้รายงานการศึกษาลักษณะและการย้อมติดสีทางไซเคมีของเม็ดเลือดในลูกเต่าหัวค้อน (*Caretta caretta*) เพื่อใช้ช่วยในการจำแนกชนิดของเม็ดเลือดขาว โดยใช้ benzidine peroxidase, chloroacetate esterase, alpha-naphthyl butyrate esterase (ชนิดมีและไม่มี sodium fluoride), acid phosphatase (ชนิดมีและไม่มี tartaric acid), sudan black B, periodic Acid-Schiff และ toluidine blue ซึ่งทำให้สามารถจำแนกชนิดของเม็ดเลือดขาวในเต่าหัวค้อนได้เป็น 6 ชนิด คือ heterophils, eosinophils, basophils, lymphocytes, monocytes และ thrombocytes จากที่มีคุณสมบัติในการย้อมติดสีที่แตกต่างกัน โดยไม่พบ azurophilis ซึ่งแตกต่างจากรายงานการศึกษาของ Smith et al. (2000) และ Keller et al. (2004) ที่ทำการศึกษาจำนวนและชนิดของ

เม็ดเลือดขาวเพื่อประเมินภาวะสุขภาพในเต่าหัวค้อน และลูกเต่าหัวค้อนตามลำดับ รายงานว่าสามารถพบ azurophilis ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (total white blood cell count)

หรือในการศึกษาของ Work et al. (1998) ได้ทำการศึกษาลักษณะและการย้อมติดสีทางเคมีของเม็ดเลือดในเต่าตนุ (*Chelonia mydas*) โดยใช้สีพิเศษในการจำแนกชนิดของเม็ดเลือดขาวในเต่าตนุได้เป็น 6 ชนิดเช่นเดียวกัน คือ heterophils, eosinophils, basophils, lymphocytes, monocytes และ thrombocytes ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Aguirre et al. (1995) และ Wood and Ebank (1984) ที่ทำการศึกษาค่าทางโลหิตวิทยาในลูกเต่าตนุ แต่ไม่พบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocytes ในลูกเต่าตนุในทั้งสองรายงาน

ความแตกต่างของข้อมูลจากรายงานการศึกษาในเต่าที่มีข้างต้น อาจเกิดเนื่องจากวิธีที่ใช้ในการแบ่งชนิดเซลล์ของผู้วิจัยแต่ละคนแตกต่างกัน หรือเพราะรูปลักษณ์ และจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวในสัตว์เลื้อยคลานที่มักมีความแตกต่างกันไปในแต่ละชนิด ฤดูกาล และช่วงอายุ (Wilkinson, 2004) ซึ่งทำให้มีการใช้เทคนิคการย้อมสีพิเศษ หรือสีไซโตเคมี (cytochemical stain) ซึ่งเป็นสีที่ใช้ในการศึกษาเพื่อตรวจเซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือดขาวเพื่อการวินิจฉัยโรคที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับเม็ดเลือด หรือแยกแยะชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวในมนุษย์ (Raskin and Valenciano, 2000) ซึ่งในปัจจุบันนำมาใช้ช่วยในการจำแนกลักษณะเม็ดเลือดในสัตว์ป่า โดยเฉพาะในสัตว์เลื้อยคลานที่มีลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดที่ค่อนข้างแตกต่างกัน แม้อยู่ใน order เดียวกัน (Alleman et al., 1999) โดยปฏิกิริยาเคมีของสีกับเซลล์มีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยลักษณะเซลล์ที่แยกออกได้ไม่ชัดเจน (undifferentiated) ดูจากคุณสมบัติการติดสีของเอนไซม์ที่อยู่ภายในเม็ดเลือดแต่ละชนิด ซึ่งจะมีลักษณะการติดสีที่แตกต่างกันไปตามชนิดเม็ดเลือด และชนิดของสัตว์ชนิดนั้นๆ โดยเซลล์เม็ดเลือด อาจติดจำเพาะกับสีชนิดใดชนิดหนึ่งหรือติดกับสีหลายชนิด ซึ่งการแปลผลการย้อมไซโตเคมีควรคำนึงถึงการย้อมติดสี ความเข้ม และรูปแบบ (pattern) ในการติดสี มากกว่าดูเพียงย้อมติดสีหรือไม่ (Raskin and Valenciano, 2000) มาใช้ประกอบกับการย้อมสีเซลล์แบบปกติในกลุ่ม Romanowsky-type stain การจำแนกชนิดและจำนวนเม็ดเลือด และการย้อมสีไซโตเคมียังใช้เพื่อศึกษาเปรียบเทียบดูลักษณะการติดสีของเซลล์เม็ดเลือดขาวของสัตว์แต่ละชนิด เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานของสัตว์ชนิดนั้นๆ เช่น สัตว์ในกลุ่มปลา ได้แก่ ปลาดุกออร์มอส (*Hoplosternum littorale*) (Tavares-Dias and Barcellos, 2005) ปลาแฟนซีคาร์พ (*Cyprinus carpio*) (Tripathi et al., 2004) ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) (UEDA et al., 2001) ปลาเทอร์บอต (*Psetta*

maxima L.) (Burrows et al., 2001) ในกลุ่มสัตว์เลื้อยคลาน ได้แก่ ตัวสแควมาต้า (squamata) (*Tupinambis merianae*) (Carvalho et al., 2006) ตะกวด (*Gallotia simonyi*) (Martinez-Silvestre et al., 2005) งูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) (Salakij et al., 2002) อีกัวน่าเขียว (*Iguana iguana*) (Harr et al., 2001) ซึ่งรวมไปถึงการศึกษาในเต่าชนิดต่างๆ ได้แก่ เต่าดาวอินเดีย (*Geochelone elegans*) (Sailasuta et al., 2006a) เต่าหัวค้อน (*Caretta caretta*) (Casal and Orós, 2006) เต่าบกทะเลทราย (*Gopherus agassizii*) (Alleman et al., 1992; Garner et al.,1996) เต่าหญ้า (*Lepidochelys kempi*) (Cannon, 1992) เต่าตนุ (*Chelonia mydas*) (Work et al., 1998)

สีย้อมไซโตเคมีที่ใช้ได้แก่ สี peroxidase, non-specific esterase, acid phosphatase, sudan black B, periodic acid-schiff, bata-glucuronidase, alkaline phosphatase และ toluidine blue ซึ่งจำแนกคุณสมบัติในการย้อมติดสี สีย้อม peroxidase เช่น benzidine peroxidase และ myeloperoxidase จะติดสีเซลล์เม็ดเลือดที่มีเอนไซม์ peroxidase โดยให้สีน้ำเงินอมม่วง ซึ่งโดยส่วนใหญ่เอนไซม์นี้จะอยู่ในเซลล์แกรนูโลไซต์ (granulocyte) สีย้อม alpha-naphthyl butyrate esterase เป็นสีจำเพาะกับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte ในมนุษย์ สีย้อม Sudan black B ย้อมติดไขมัน เช่น ฟอสโฟไลปิด (phospholipids) ไขมันธรรมชาติ (natural fat) และสเตอรอล (sterol) หรือสีย้อม toluidine blue ซึ่งย้อมติดสีสารฮีสตามีน ซึ่งใช้จำแนก mast cell ในมนุษย์ สี periodic acid-Schiff ใช้ย้อมสารไกลโคเจน (Raskin and Valenciano, 2000) เป็นต้น

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron microscopy) เป็นเครื่องมือที่ใช้ศึกษาตัวอย่างได้หลายชนิด เป็นกล้องที่ใช้ลำแสงของอิเล็กตรอน วิ่งผ่านวัตถุที่ต้องการจะดู ทำให้เกิดการหักเหของลำแสงที่จะตกลงบนจอรับภาพเรืองแสง ทำให้เกิดภาพขึ้น มีกำลังขยายสูงมาก ถึง 500,000 เท่า หรือมากกว่า แต่ตัวอย่างต้องสามารถทนอยู่ได้ในสภาวะสุญญากาศและทนต่อลำแสงอิเล็กตรอนที่มากระทบโดยตรง เนื่องจากแหล่งกำเนิดแสงอิเลคตรอน คือ ปืนยิงอิเลคตรอน (Electron gun) ซึ่งเป็นขดลวดทังสเตน ดังนั้นการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนจึงต้องมีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดภาพที่ดีและถูกต้อง การเตรียมตัวอย่างมีหลายวิธีขึ้นกับชนิดของตัวอย่างและวัตถุประสงค์ของการศึกษา (รุจิพร, 2541)

กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ *กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission electron microscope, TEM)* ใช้ในการศึกษาโครงสร้างภายในของเซลล์โดยลำแสงอิเลคตรอนจะส่องผ่านเซลล์ หรือตัวอย่างที่ศึกษา ภาพเป็น 2 มิติ ตัวอย่างต้องผ่านกระบวนการตัด

เนื้อเยื่อในพาราฟินก่อน มองผ่าน fluorescence screen และ*กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM)* ใช้ศึกษาผิวของเซลล์หรือผิวของตัวอย่างวัตถุที่นำมาศึกษา โดยลำแสงอิเลคตรอนจะส่องกราดไปบนผิวของวัตถุ ทำให้ได้ภาพซึ่งมีลักษณะเป็นภาพ 3 มิติ ตัวอย่างไม่ต้องผ่านกระบวนการตัดเนื้อเยื่อในพาราฟิน แต่กำลังขยายต่ำกว่า TEM ภาพผ่าน Detector มามองเห็นที่จอภาพ

การศึกษาทางโลหิตวิทยา โดยการแยกชนิดเม็ดเลือดผ่านทางกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนนั้น พิจารณาประกอบจากจำนวนเซลล์ ขนาด รูปร่าง การกระจายของแกรนูล และรูปร่างของนิวเคลียส โดยลักษณะโครงสร้าง และองค์ประกอบในเซลล์จะมีความสัมพันธ์กับหน้าที่ของเม็ดเลือดแต่ละชนิด และสามารถนำมาอธิบายการทำงาน และลักษณะการย้อมติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงได้ค่อนข้างชัดเจน (Tripathi et al., 2004) ซึ่งใช้ในการศึกษาเม็ดเลือดของสัตว์หลายชนิดร่วมกับการศึกษาทางโลหิตวิทยาเบื้องต้นอื่นๆ เช่น การย้อมสีธรรมดา และการย้อมสีทางไซโตเคมี โดยเฉพาะการศึกษาเพื่อจำแนกลักษณะโดยละเอียดทางโครงสร้างของเม็ดเลือดขาว เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานของสัตว์ชนิดนั้นๆ และทำเพื่อเปรียบเทียบกับในสัตว์อื่น เช่น ปลาแฟนซีคาร์พ (*Cyprinus carpio*) (Tripathi et al., 2004) ตัวสแควมาต้า (squamata) (*Tupinambis merianae*) (Carvalho et al., 2006) ตะกวด (*Gallotia simonyi*) (Martinez-Silvestre et al., 2005) งูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) (Salakij et al., 2002) เต่าหัวค้อน (*Caretta caretta*) (Casal and Orós, 2006) เต่าดาวอินเดีย (*Geochelone elegans*) (Sailasuta et al., 2006 a) กวางเรนเดียร์ (*Rangifer tarandus*) (Henkel et al., 1999) โลมาอิระวดี (*Orcaella brevirosris*) (Sailasuta et al., 2006b) เป็นต้น

2.2 การศึกษาทางเคมีโลหิต

ข้อมูลของค่าเคมีโลหิต มักนำมาใช้เพื่อประเมินภาวะสุขภาพในสัตว์เลื้อยคลานที่มีปัญหาสุขภาพ อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับข้อมูลทางเคมีโลหิตที่ได้ยังคงมีความแตกต่างอยู่มาก เนื่องจากค่าทางเคมีโลหิตในเต่าและสัตว์เลื้อยคลานทั่วไปมักมีค่าในช่วงปกติที่ค่อนข้างกว้าง เนื่องจากกลไกเมแทบอลิซึมในเลือดขึ้นกับอุณหภูมิ ฤดูกาลเป็นสำคัญ อีกทั้งยังมีความแตกต่างในเต่าแต่ละชนิด อายุ เพศ ภาวะทางโภชนาการ สภาวะทางกายภาพ และการจัดการ โดย Wilkinson (2004) กล่าวว่าในเต่าตัวเมียจะมีการเปลี่ยนแปลงของค่าเคมีโลหิตเลือดตามวงรอบชีวิตของแต่ละฤดูกาลที่มากกว่าเต่าตัวผู้ เป็นต้น การใช้ค่ามาตรฐานอ้างอิงจึงมีข้อจำกัดในการใช้อยู่มากกว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ถึงแม้ว่าจะมี

ปัจจัยภายนอกดังกล่าว สามารถทำให้ค่าเคมีโลหิตผันแปรได้เช่นเดียวกันในสัตว์อื่นๆ แต่ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำที่เป็นสัตว์เลือดเย็น (ectotherm) ปัจจัยภายนอกจะมีอิทธิพลเป็นอย่างมากกับความปกติทางกายภาพและสุขภาพเมื่อเทียบกันกับในสัตว์เลือดอุ่น (endotherm) (Campbell, 2004) นอกจากนั้น ความแตกต่างทางเทคนิคของผู้ตรวจก็เป็นปัจจัยที่สำคัญ โดยเฉพาะค่าเอนไซม์ในเลือด เช่น alkaline phosphatase (AP) aspartate aminotransferase (AST) และ lactate dehydrogenase (LDH) ซึ่งเปลี่ยนแปลงได้ง่าย ขึ้นกับ วิธีการเก็บ เวลา สารที่ใช้ในการกันเลือดแข็งตัว (Wilkinson, 2004) และตำแหน่งที่ใช้เจาะเก็บเลือด (López-Olvera et al., 2003) เป็นต้น

การศึกษาค่าทางเคมีโลหิตในเต่าที่มีการรายงาน เช่น การตรวจค่าพิสัยอ้างอิงปกติ (normal reference values) ทางเคมีโลหิตในพลาสม่าของเต่าบึงยุโรป (*Emys orbicularis*) โดยแบ่งกลุ่มตามเพศ (Metin et al., 2006) เต่าบกรัสเซีย (*Agrionemys horsfieldi*) (Knotkovà et al., 2002) เต่าบกทะเลทราย (Dickinson et al., 2002) เต่าตนุ (*Chelonia mydas*) โดยแบ่งกลุ่มตามเพศ และความแตกต่างของความยาวกระดอง (Bolten and Bjorndal, 1992) และเต่าบกรัศมี (*Geochelone radiate*) โดยแบ่งกลุ่มตามเพศ และฤดูกาล (Zaias et al., 2006) อีกทั้งการศึกษาอื่นๆที่เกี่ยวกับค่าทางเคมีโลหิต อีกหลายรายงาน เช่น การศึกษาค่าทางเคมีโลหิตปกติเปรียบเทียบกับเมื่อเต่าได้รับยาถ่ายพยาธิชนิด Fenbendazole ในเต่าบกเมดิเตอร์เรเนียน (*Testudo Hermanni*) (Neiffer et al., 2005) หรือ การศึกษาผลของการฉีดยาเจนตาไมซินเข้ากล้ามเนื้อในเต่าหับตะวันออก (*Terrapene caralina carolina*) (Beck et al.,1995) เป็นต้น ซึ่งรายงานข้างต้นที่กล่าวมาค่าทางเคมีโลหิตต่างๆที่ได้ส่วนใหญ่มีค่าที่แตกต่างกันไป หรือมีค่าที่ผันแปรในค่าเคมีโลหิตแต่ละตัวเป็นอย่างมาก การใช้ในทางคลินิกจึงมีการแนะนำให้ใช้ค่าเคมีโลหิตในเต่าชนิดเดียวกัน หรือทำการเปรียบเทียบตามลำดับช่วงเวลาในเต่าตัวเดียวกัน โดยใช้ค่ามาตรฐานอ้างอิงในเต่าที่ใกล้เคียงกันที่สุดเป็นตัวช่วยในการประกอบการวิเคราะห์ (Wilkinson, 2004)

ค่าทางเคมีโลหิตที่สำคัญ ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์สภาวะร่างกายในเต่า ได้แก่ total protein (TP), albumin, globulin, glucose, uric acid, cholesterol, calcium, phosphorus, potassium และ sodium รวมทั้งค่าการทำงานของเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) และ alkaline phosphatase (ALP) โดยค่า blood urea nitrogen (BUN) และ creatinine ในพลาสม่าของสัตว์เลื้อยคลาน รวมทั้งเต่าไม่นิยมใช้เนื่องจากไม่สามารถบอกการทำงานของไตได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่ค่า uric acid ที่เพิ่มขึ้นจะเป็นค่าที่น่าเชื่อถือมากกว่าในการบ่งบอกถึงความเสียหายที่

เกิดขึ้นของไตในสัตว์เลื้อยคลาน (Divers et al., 1996; Kölle and Hoffman, 2001) เนื่องจากไตของเต่ามีหน่วยไต (nephrons) จำนวนน้อยกว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ประกอบด้วย glomerulus ที่สั้นมี proximal tubule ที่หนาและยาว และส่วน distal tubule ที่สั้นและบาง และไม่มี loop of Henle ซึ่งส่งผลให้ไม่สามารถทำให้ปัสสาวะมีความเข้มข้นได้ และไม่มีกรวยไต (renal pelvis) ท่อไตจะส่งของเสียจะเข้าสู่กระเพาะปัสสาวะที่มีขนาดใหญ่มี 2 พู ผนังบาง เพื่อดูดน้ำกลับแทน โดยหน้าที่ของไตในเต่า คือ ควบคุมการซึมผ่าน (osmoregulation) สมดุลน้ำ ขับของเสีย และสร้างฮอร์โมน ส่วนกระเพาะปัสสาวะของเต่าสามารถหลั่งอิเล็กโตไลท์ ตกตะกอนยูเรตและดูดกลับน้ำ ซึ่งทำให้การวัดความถ่วงจำเพาะหรือการวัด clearance เพื่อดูภาวะการทำงานของไตทำได้ยาก กระเพาะปัสสาวะจะยอมเลือกผ่าน (Permeable) แต่ยูเรีย ไม่เลือกผ่านยูเรต ดังนั้นการเพิ่มขึ้นสูงของยูเรียจะบ่งบอกถึงการเพิ่มขึ้นของเมแทบอลิซึมของโปรตีนและภาวะขาดน้ำ (dehydrate) ร่วมกัน ในเต่าที่มีภาวะขาดน้ำเพียงอย่างเดียวจะไม่มีการเพิ่มขึ้นของยูเรียในกระแสเลือด ดังนั้นค่ายูเรียจึงไม่มีความชี้เฉพาะถึงพยาธิสภาพของไต หรือ การเกิดไตวาย (Wilkinson, 2004) อย่างไรก็ตามค่า uric acid จะไม่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหากไม่มีความเสียหายที่รุนแรงต่อไต ซึ่งจำเป็นให้ควรมีการตรวจค่าอื่นเพิ่มเติมเพื่อประเมินภาวะไตวายก่อนถึงระยะที่รุนแรง โดยค่าที่สามารถบ่งบอกถึงความผิดปกติของไต ได้แก่ การเพิ่มขึ้นของค่า phosphorus ในกระแสเลือด (hyperphosphataemia) (Miller, 1998) หรือค่า phosphorus- calcium ratio ซึ่งจัดเป็นค่าที่มีความไว (sensitive parameter) ต่อการวินิจฉัยพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นที่ไตได้ตั้งแต่ระยะแรกๆ (early detection) ของการเกิดโรค (Kölle and Hoffman, 2001)

3) ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับการศึกษาเซลล์พันธุ์ศาสตร์ (cytogenetics)

การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของสัตว์ เป็นศาสตร์หนึ่งที่ศึกษาจำนวน รูปร่างลักษณะของโครโมโซม รวมถึงคาริโอไทป์ของสัตว์ โดยศึกษาจากโครโมโซมระยะเมตาเฟตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเป็นระยะที่โครโมโซมมีการหดตัวมากที่สุดทำให้มองเห็นแท่งของโครโมโซมชัดเจน โดยในสัตว์แต่ละชนิดจะมีชุดของโครโมโซมเฉพาะตัวที่แตกต่างกันไป ทั้งจำนวน และรูปร่าง (ดวงสมร, 2542) การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์นี้สามารถใช้จำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ละเอียดยิ่งขึ้น ใช้ศึกษาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ยังใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต

ได้ (อมรา, 2541; Sumner, 1990) ในการศึกษาโครโมโซมแต่ละครั้งได้ทำการจำแนกรูปร่างของโครโมโซมระยะเมตาเฟสโดยอาศัยตำแหน่งเซนโตรเมียร์ แบ่งออกได้4 แบบได้แก่

1. เมตาเซนตริกโครโมโซม (metacentric chromosome) โครโมโซมที่มีตำแหน่งเซนโตรเมียร์อยู่กึ่งกลาง ทำให้แขนทั้งสองข้างของโครโมโซมมีความยาวเท่ากันหรือใกล้เคียงกันมาก
2. ซับเมตาเซนตริกโครโมโซม (submetacentric chromosome) โครโมโซมที่มีตำแหน่งเซนโตรเมียร์ห่างจากกึ่งกลางออกไป ทำให้แขนทั้งสองข้างของโครโมโซมมีแขนสั้น (แขนข้างสั้นของโครโมโซมเรียกว่า p) และแขนยาว (แขนข้างยาวของโครโมโซมเรียกว่า q) ยาวไม่เท่ากัน
3. อโครเซนตริกโครโมโซม (acrocentric chromosome) โครโมโซมที่มีตำแหน่งเซนโตรเมียร์อยู่ใกล้ปลายข้างหนึ่ง ทำให้แขนทั้งสองข้างของโครโมโซมมีความยาวต่างกันมาก และอาจพบแขนด้านสั้นคอดแต่ตรงปลายโป่งเรียกว่า satellite
4. เทโลเซนตริกโครโมโซม (telocentric chromosome) โครโมโซมที่มีตำแหน่งเซนโตรเมียร์อยู่ที่ปลายข้างหนึ่ง ทำให้มีแขนของโครโมโซมอยู่ทางฝั่งเดียวกัน

เมื่อนำภาพเซลล์ที่ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งมีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟส (metaphase) โครโมโซมมีขนาดใหญ่สั้น หนา และมีการกระจายของโครโมโซมดีมาจัดทำคาริโอไทป์ โดยนำเอาโครโมโซมที่เป็นคู่กัน (homologous chromosome) มาจัดเรียงกันตามลำดับ ไม่เฉพาะแต่ขนาดใหญ่ไปจนถึงขนาดเล็ก ยังรวมไปถึงการจัดเรียงลำดับรูปร่างของโครโมโซมจาก metacentric submetacentric acrocentric และ telocentric ตามลำดับ ดังนั้นการจัดลำดับโครโมโซมตามขนาดและรูปร่างแบบนี้เรียกว่า คาริโอไทป์ (เตือนใจ, 2540)

การศึกษาพันธุศาสตร์ของมีการทำกันอย่างกว้างขวางทั้งในมนุษย์ และในสัตว์หลายชนิดทั่วโลก อย่างไรก็ตามการศึกษาโครโมโซม และคาริโอไทป์ของเต่ายังมีอยู่จำกัด และมีความหลากหลายเฉพาะตัวในเต่าแต่ละชนิดเป็นอย่างมาก เนื่องจากโครโมโซมในสัตว์เลื้อยคลานมีความหลากหลายสูงของขนาด รูปร่าง และลักษณะที่เป็น bimodal หรือ asymmetric karyotypes ซึ่งประกอบไปด้วยโครโมโซมขนาดใหญ่ (macrochromosome) และขนาดเล็ก (microchromosome) อย่างไรก็ตามเนื่องจากสัตว์เหล่านี้เป็นสัตว์ที่มีสถานภาพอนุรักษ์ การใช้วิธีศึกษาคาริโอไทป์ที่ดังเดิมต้องเตรียมจากม้าม ไต หรือลำไส้ หรือทำการเพาะเลี้ยงจาก fibroblast ของหัวใจและผิวหนังเป็นเรื่องที่ทำได้ยาก เพราะต้องทำการศึกษาในสัตว์ที่เสียชีวิตหรือทำให้สัตว์อยู่ในภาวะไม่ปลอดภัย (Baker et al., 1971;

Bickham, 1975) แต่อย่างไรก็ตามปัจจุบันเริ่มมีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยง fibroblast จากเม็ดเลือดขาวในสัตว์เลื้อยคลานขึ้น ซึ่งเป็นวิธีที่การศึกษานี้เลือกใช้ เพื่อให้สัตว์มีความปลอดภัยและไม่ทำให้เกิดความเจ็บปวด (Rohilla et al., 2006)

ในประเทศไทยจากอดีตถึงปัจจุบันยังไม่พบการรายงานเรื่องการศึกษาคาริโอไทป์ในเต่าหรือแม้แต่สัตว์เลื้อยคลานอื่นๆยังพบว่ามีอยู่น้อยมาก ซึ่งสามารถรวบรวมงานวิจัยที่เกี่ยวข้องๆได้ดังนี้ การศึกษาเปรียบเทียบโครโมโซมเพศของกบนา *Rana rugulosa* ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (เพลินพิศ, 2543) การศึกษาจำนวนโครโมโซม และคาริโอไทป์ของอึ่งปากขวด (*Glypholossus molossus* Gunther) และปาดบ้าน (*Rhacophorus leucomystax* kuhl) (ถาวรและคณะ, 2535) การศึกษาจำนวนโครโมโซม และคาริโอไทป์มาตรฐานของตะพาบน้ำ (*Trionyx cartilageneus*, Boddart) (ถาวรและเอก, ม.ป.ป.) การศึกษาคาริโอไทป์ของจระเข้น้ำจืด จระเข้น้ำเค็ม และจระเข้ลูกผสม โดยวิธีธรรมดา และการใช้เทคนิคแบนดิ้ง (วิวัฒน์ และคณะ, 2541) การศึกษาจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์ของเขียดจิก และเขียดอีโม่ (ถาวร และคณะ, 2534) จำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์ของอึ่งขาดำ (*Microhyla pulchra* Holowell) และอึ่งก้นขีด (*Kaloula mediolineata* Smith) (ถาวร และคณะ, 2537) การวิเคราะห์โครโมโซมที่ย้อมแถบซี (c-banding) ในอึ่งปากขวดและอึ่งบ้าน (ถาวร, 2541) การศึกษาการเจริญเติบโตและคาริโอไทป์ของกบ อึ่งอ่าง และคางคกไทย (นงลักษณ์, 2518)

4) การศึกษาคาริโอไทป์ของเต่า

Carr et al. (1981) ได้ทำการศึกษาคาริโอไทป์ของเต่าจากแม่น้ำในแถบอเมริกากลาง (Dermatemys mawii) โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์หัวใจของเต่าเพศผู้ พบว่า *D. mawii* มีโครโมโซมเท่ากับ 2n = 56 ซึ่งสามารถจำแนกเป็น macrochromosome 12 คู่ ได้แก่ โครโมโซมเมทาเซนทริก (metacentric chromosome) หรือโครโมโซมซับเมทาเซนทริก (submetacentric chromosome) 7 คู่ และโครโมโซมทีโลเซนทริก (telocentric chromosome) หรือโครโมโซมซับทีโลเซนทริก (subtelocentric chromosome) 5 คู่ และ microchromosome 16 คู่

McBee et al. (1985) ได้ทำการศึกษาคาริโอไทป์ของเต่าในสกุล Platemys (Testudines: Pleurodira) 5 ชนิด โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์หัวใจในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งประกอบด้วย Medium 199 และ fetal calf serum ความเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ พบว่า *Platemys platycephala* มีโครโมโซมเท่ากับ

2n = 64, P. macrocephala มีโครโมโซมเท่ากับ 2n = 48 และ *P. pallidipectoris, P. radiolata* และ *P. spixii* มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 2n = 50

Carr and Bickham (1986) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเต่าในวงศ์ย่อย Batagurinae จากการทำคาริโอไทป์ พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของม้ามแล้วพบว่าเต่าในกลุ่มโครโมโซมเชิงซ้อน Batagur และ Geoemyda ส่วนใหญ่มีโครโมโซมเท่ากับ 2n = 52 ยกเว้น *Malayemys subtrijuga* (Batagur complex) ที่มีโครโมโซมเท่ากับ 2n = 50 และ *Rhinoclemmys punctularia* (Geoemyda complex) ที่มีโครโมโซมเท่ากับ 2n = 56 สำหรับกลุ่มโครโมโซมเชิงซ้อน Heosemys และ Orlitia มีโครโมโซมเท่ากับ 2n = 52 และ 2n = 50 ตามลำดับ

Noleto et al. (2005) ได้ทำการศึกษาคาริโอไทป์ของเต่าจากประเทศบราซิล (*Hadromedusa tectifera*) จำนวน 26 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นเพศผู้ 11 ตัว ตัวเมีย 11 ตัว และไม่สามารถระบุเพศได้ 4 ตัว พบว่าจากการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว H. tectifera ทั้ง 26 ตัวอย่าง มีโครโมโซมเท่ากับ 2n = 58 ซึ่งประกอบด้วย macrochromosome 22 แท่ง และ microhhromosome 36 แท่ง

Rohilla et al. (2006) ได้ทำการศึกษาคาริโอไทป์ของเต่าน้ำจืดประเทศอินเดีย (*Lissemys punctata* และ *Geoclemys hamiltoni*) โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย RPMI-1640, fetal calf serum ความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์, phytohaemagglutinin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, Streptomycin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ penicillin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสจนครบ 72 ชั่วโมง จึงเติม colcemid ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วบ่มต่อจนครบ 84 ชั่วโมง พบว่า *L. punctata* มีโครโมโซมเท่ากับ 2n = 66 และ *G. hamiltoni* มีโครโมโซมเท่ากับ 2n = 52 โดยใน *L. punctata* มีจำนวนโครโมโซมทีโลเซนทริกและ microchromosome มากกว่าใน *G. hamiltoni*

Cleiton และ Giuliano-Caetano (2008) ได้ทำการศึกษาคาริโอไทป์ของเต่า *Trachemys dorbigni* จำนวน 9 ตัวอย่าง และ *Trachemys scripta elegans* จำนวน 4 ตัวอย่าง โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว พบว่าทั้ง *T. dorbigni* และ *T. scripta* elegans มีโครโมโซมเท่ากับ 2n = 50 ซึ่งสามารถจำแนกเป็น macrochromosome 13 คู่ ได้แก่ โครโมโซมเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ (large metacentric chromosome) หรือโครโมโซมซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ (large submetacentric chromosome) 2 คู่ โครโมโซมเมทาเซนทริกขนาดกลาง (medium metacentric chromosome) หรือ

โครโมโซมซับเมทาเซนทริกขนาดกลาง (medium submetacentric chromosome) 6 คู่ และโครโมโซมอโครเซนทริก (acrocentric chromosome) 5 คู่ และ microchromosome 12 คู่

Lopez et al. (2008) ได้ทำการศึกษาคาริโอไทป์ของเต่าหัวค้อน (*Caretta caretta*) จากทะเลแคริบเบียนแถบประเทศโคลัมเบีย จำนวน 47 ตัวอย่าง โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว พบว่าเต่าหัวค้อนมีโครโมโซมเท่ากับ 2n = 56 ซึ่งประกอบด้วย macrochromosome 32 แท่ง และ microhhromosome 24 แท่ง

Martinez et al. (2009) ได้ทำการศึกษาคาริโอไทป์ของเต่าจากประเทศอาร์เจนติน่า (*Trachemys dorbigni* และ *Chelonoidis (Geochelone) donosobarrosi*) โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวในอาหาร PbMAX ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า T. dorbigni มีโครโมโซมเท่ากับ 2n = 50 ซึ่งประกอบด้วย macrochromosome 26 แท่ง และ microchromosome 24 แท่ง และ C. donosobarrosi มีโครโมโซมเท่ากับ 2n = 52 ซึ่งประกอบด้วย macrochromosome 22 แท่ง และ microchromosome 30 แท่ง

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

ทำการสุ่มเลือกเต่าบัวโตเต็มวัย (Yellow-headed Temple Turtle; *Hieremys annandalii*) จากแหล่งน้ำต่างๆ ในกรุงเทพ และเขตปริมณฑล (ภาคผนวก ก) เลือกตัวอย่างเต่าที่ดูปกติจากการสังเกตลักษณะทางกายภาพ กินอาหาร มีพฤติกรรมที่ปกติ ไม่มีภาวะขาดน้ำ โดยประเมินตามนันทริกา (2549) แบ่งเพศผู้ และเพศเมีย เพศละ 20 ตัว แยกเพศตามลักษณะรูปร่างภายนอก โดยอ้างอิงจากข้อมูลของเพ็ญศรี (2536) โดยเลือกใช้เต่าที่มีน้ำหนักมากกว่า 5 กิโลกรัมขึ้นไป บันทึกข้อมูลน้ำหนัก และวัดความยาวเส้นตรงของกระดองหลัง (straight carapace length: SCL) เต่าทุกตัว รวมทั้งตำแหน่งของพื้นที่ที่พบเต่า ลักษณะสิ่งแวดล้อม และอุณหภูมิ รวมทั้งบันทึกเดือนที่ทำการเก็บตัวอย่าง โดยในแต่ละเพศจะแบ่งเป็นกลุ่มตามช่วงความยาวเส้นตรงของกระดองหลัง ซึ่งจะแบ่งกลุ่มในภายหลังจากการวิเคราะห์ข้อมูล

2. การเก็บตัวอย่างเลือด

ทำการเจาะเก็บเลือดเต่าในช่วงเช้าถึงบ่าย ทำการจับบังคับเต่าโดยไม่ใช้ยาหรือสารเคมีในการทำให้ซึมหรือสลบ โดยการยืดคอเต่าออก และบิดคอเล็กน้อย ทำการเจาะเลือดด้วยเข็มเบอร์ 21 G จากตำแหน่งเส้นเลือดดำใหญ่ที่คอ (jugular vein) เนื่องจากเป็นตำแหน่งเก็บเลือดตำแหน่งเดียวที่มีการปนเปื้อนน้ำเหลืองน้อยที่สุด เพื่อลดปัจจัยที่อาจทำให้เกิดผลต่อค่าทางโลหิตวิทยาและเคมีโลหิตได้ โดยเก็บเลือดไม่เกิน 1-2 มิลลิลิตร/เต่าน้ำหนัก 1 กิโลกรัม (Wilkinson, 2004) ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ซึ่งในการทดลองนี้จะเก็บตัวอย่างเต่าที่มีน้ำหนัก 5 กิโลกรัมขึ้นไป จึงสามารถเก็บเลือดได้ประมาณ 5 มิลลิลิตร/ตัว และทำการสังเกตอาการเต่าให้มีการฟื้นตัวที่ปกติก่อนปล่อยลงแหล่งน้ำ

เลือดของทุกตัวแบ่งเป็นสองส่วน ส่วนหนึ่งเก็บไว้ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งตัวชนิดลิเธียมเฮปาริน (Lithium heparin) และอีกส่วนหนึ่งเก็บในโซเดียมซิเตรท เพื่อนำมาตรวจวัดค่ากลูโคสในเลือด เลือดที่เหลือนำมาทำการสเมียร์แผ่นเลือด (blood smear) ด้วยเทคนิค slide and coverglass method (เฉลียว, 2548) ทันที จำนวน 2 แผ่น ยกเว้นเต่าบัวเพศผู้ และเพศเมีย เพศละ 5 ตัวอย่างที่ทำการสุ่มเลือกแล้ว จะทำการเสมียร์เลือด จำนวน 9 แผ่น เพื่อไปย้อมสีทางไซโตเคมีของเซลล์ การเสมียร์เลือดทันที เพื่อไม่ให้เกิดผลข้างเคียงของการเปลี่ยนแปลงสีเซลล์เม็ดเลือดจากสารต้านการแข็งตัวของเลือด (Campbell, 2004)

3. การตรวจทางโลหิตวิทยา

3.1 การศึกษาลักษณะรูปร่าง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

เลือดเต่าทั้งหมด 40 ตัว ที่ได้ทำการสเมียร์เลือดแล้วจำนวน 2 แผ่น นำ 1 แผ่นมาทำการตรึงสภาพทันทีด้วย methanol (fixation) เป็นเวลา 1 นาที และย้อมด้วยสี Diff-Quick อีก 1 แผ่นทำการย้อมด้วยสี Wright's Giemsa stain โดยมีการประยุกต์ขั้นตอนให้สีติดดีขึ้นดังนี้

- หยดด้วยสี Wright's stain ให้ท่วมแผ่น 3 นาที
- หยด buffer pH 7 ผสมในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ทิ้งไว้ 15 นาที
- ย้อมทับด้วยสี Giemsa stain นาน 20 นาที

เลือดที่ย้อมด้วยสี Wright's Giemsa stain แล้วจึงนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ทำการสังเกตและบันทึกลักษณะรูปร่าง แกรนูล หรือองค์ประกอบภายในต่างๆ และทำการวัดความยาวของเม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด 20 เซลล์ โดยใช้เส้นมาตราวัดที่เลนส์ตาของกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

3.2 การย้อมติดสีไซโตเคมีพิเศษภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

เลือดของเต่าบัวเพศผู้ และเพศเมีย เพศละ 5 ตัวอย่าง ที่มีแผ่นสเมียร์เลือดเหลืออีก 7 แผ่น จะนำไปย้อมสีไซโตเคมี พร้อมกับใช้ส่วน buffy coat ของเลือด โดยทำการแบ่งเลือดที่เก็บอยู่ในลิเธียมเฮปารินด้วย hematocrit tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้ได้ชั้น buffy coat เพื่อนำมาตัด และทำ buffy coat smear บนแผ่นสไลด์ ต่อมาจึงนำมาผ่านกระบวนการตามขั้นตอนในการย้อมสีพิเศษไซโตเคมีแต่ละชนิดภายใน 1-2 ชั่วโมงหลังจากเก็บเลือด เนื่องจากจะทำให้สีติดได้ดีกว่า (เฉลียว, 2548) ดังนั้นในเต่าที่สุ่มเลือก 1 ตัวจะมีแผ่นสไลด์ที่ทำการย้อมสีทางไซโตเคมีทั้งหมด 14 แผ่น (สเมียร์เลือด 7 แผ่น และสเมียร์ buffy coat 7 แผ่น โดยย้อมสีพิเศษทั้งหมด 7 สี ดังนี้

1) สีพิเศษ Sudan black B: SBB (Sigma, Procedure No.380) โดยการเตรียมสารละลาย Glutaraldehyde fixation solution โดยใส่ Reagent grade acetone 25 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย Glutaraldehyde 75 มิลลิลิตร เก็บให้พ้นแสง ที่ 2-6 องศาเซลเซียสนาน 1 นาที แกว่งสไลด์เบาๆ จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง นำแผ่นสไลด์มาจุ่มลงในสารย้อมสี Sudan black B นาน 5 นาที นำแผ่นสไลด์ไปจุ่มในเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ จุ่ม 3 ครั้ง หรือจนสีถูกชะล้างออกจนหมด แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ย้อมทับด้วยสารละลาย Hematoxylin solution นาน 5 นาทีจากนั้นล้างสไลด์โดยให้น้ำไหลผ่าน ทิ้งแผ่นสไลด์ให้แห้งแล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยใช้ xylene based mounting medium

2) สีพิเศษ peroxidase : PER (Sigma, Procedure No.391) ทำการตรึงสภาพสไลด์ที่ อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส ในสารละลาย Glutaraldehyde-acetone fixative solution ล้างออกด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 30 วินาที บ่มสไลด์ที่ตรึงสภาพแล้วด้วยการเติม 1% hydrogen peroxide 0.5 มิลลิลิตรใน สารละลาย diaminodenzidine 1 ขวด ซึ่งผสมกับสารละลาย Trizmul working 50 มิลลิลิตร นาน 45 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 30 วินาที จุ่มสารละลายในสารละลาย copper nitrite นาน 2 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 30 วินาที จุ่มสไลด์ในสารละลาย Hematoxylin grill หมายเลข 3 นาน 8 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 5 วินาที จุ่มสไลด์ในสารละลาย Scot tape water substitute working นาน 12 วินาทีล้างออกด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 5 วินาที จุ่มสไลด์ลงในสารละลาย grill modified EA นาน 1 นาที ล้างออกด้วยเอทานอลเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ครั้งละ 3 วินาที ล้างออกด้วยเอทานอลเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ครั้งละ 3 วินาที ล้างออกด้วย xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 3 วินาที ทิ้งแผ่นสไลด์ให้แห้งแล้วปิดทับกระจกปิดสไลด์ โดยใช้ xylene based mounting medium

3) สีพิเศษ acid phosphatase : AcP (Sigma, Procedure No.181) อุ่นน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสก่อนใช้ นำสารละลาย sodium nitrate solution 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย fast garnet GBC solution 1 มิลลิลิตร นำมาคนให้เข้ากัน 2-5 นาที นำสารละลายดังกล่าวผสมกับน้ำอุ่นปริมาณ 38 มิลลิลิตร เติมสารละลาย acetate solution 5 มิลลิลิตร และสารละลาย Naphtol AS-BI acid solution ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายสีเหลือง แล้วจึงเทลงใน coplin jar นำสไลด์เสมียร์เลือดมาตรึงสภาพด้วย Citrate acetone formaldehyde fixation นาน 30วินาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างน้ำเป็นเวลา 45-60 วินาที ระวังอย่าให้สไลด์แห้ง แล้วนำมาแช่ในสารละลาย Naphtol AS-BI acid solution อีกเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และนำมาล้างในน้ำไหลนาน 2 นาที ทิ้งสไลด์ให้แห้ง อย่างน้อย 15 นาทีก่อนนำมาย้อมทับด้วย methylene blue จึงล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งแผ่นสไลด์ให้แห้งแล้วปิดทับกระจกปิดสไลด์ โดยใช้ xylene based mounting medium

4) สีพิเศษ alpha-naphthyl acetate esterase : ANAE (Sigma, Procedure No.90) ตรึงสภาพเซลล์ในแผ่นสเมียร์เลือดด้วยสารละลาย Citrate acetone methanol fixation นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (18-26 องศาเซลเซียส) ล้างออกด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้งอย่างน้อย 20 นาที เตรียมสารละลาย Trizmal buffer solution ที่ pH 7.6 โดยเจือจางสารละลาย Trizmal 7.6 buffer concentrate ด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:9 อุ่นสารละลาย Trizmal buffer solution 50 มิลลิลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเกลือ Fast blue RR salt จำนวน 1 แคปซูล ทำการเตรียมสารละลาย alpha-naphthyl aectate esterase โดย

ละลายแคปซูลของสารดังกล่าวจำนวน 1 แคปซูลใน ethylene glycol monomethyl ether 2 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำสารละลาย alpha-naphthyl aectate esterase เทผสมลงในสารละลาย Trizmal buffer solution pH 7.6 ที่เติมเกลือ Fast blue RR salt แล้ว จะพบว่าสารละลายที่ได้จะมีลักษณะขุ่นเล็กน้อย จากนั้นเทลงใน coplin jar ที่หุ้มด้วยกระดาษตะกั่วเพื่อป้องกันแสง ทำการจุ่มสไลด์ที่ตรึงสภาพแล้วลงไปนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ล้างออกด้วยน้ำกลั่นนาน 3 นาที จุ่มสไลด์ในสารละลาย Mayer's hematoxylin solution จากนั้นล้างออกโดยให้น้ำไหลผ่านตลอด 2 นาที ทิ้งแผ่นสไลด์ให้แห้งแล้วปิดทับกระจกปิดสไลด์ โดยใช้ xylene based mounting medium

5) สีพิเศษ alkaline phosphatase : ALP (Sigma, Procedure No.8) เตรียมสารละลายเกลือของ diazonium โดยการเติมสารละลาย sodium nitrate solution 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย Fast red violate - Alkaline solution ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 2 นาที นำสารละลายที่เตรียมได้เทผสมลงในน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง (18-26 องศาเซลเซียส) จากนั้นผสมสารละลาย Naphtol AS-BI alkaline solution เพื่อเจือจางสารละลายเกลือของ diazonium ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงใน coplin jar นำแผ่นสเมียร์เลือดมาตรึงสภาพด้วย Citrate acetone formaldehyde fixation ซึ่งเตรียมจากสารละลาย citrate solution 25 มิลลิลิตร acetone 65 มิลลิลิตร และ formaldehyde เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ทำการแช่ในสารละลายดังกล่าว 30วินาที จากนั้นล้างน้ำ 45 วินาที แล้วจึงนำสไลด์มาจุ่มแช่ในสารละลายที่เตรียมไว้นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 18-26 องศาเซลเซียส หลีกให้พ้นแสง แล้วจึงนำไปล้างด้วยน้ำกลั่น 2 นาที ระวังอย่าให้สไลด์แห้ง ย้อมทับด้วยสารละลาย Hematoxylin solution นาน 2 นาทีจากนั้นล้างสไลด์โดยให้น้ำไหลผ่าน ทิ้งแผ่นสไลด์ให้แห้งแล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยใช้ xylene based mounting medium

6) สีย้อม Periodic acid –Schiff : PAS (เฉลียว, 2548) ตั้งแผ่นสเมียร์เลือดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน แล้วจึงทำการตรึงสภาพเซลล์ด้วย absolute methanol 10 นาที ล้างในน้ำกลั่น 3-4 ครั้ง แช่ใน periodic acid 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยน้ำกลั่น 3-4 ครั้ง และบ่มใน Schiff's reagent 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างใน potassium metabisulfite-water 2 ครั้ง ครั้งละ 15 วินาที ต่อมาจึงนำมาแช่ในน้ำกลั่น 5 นาที และย้อมด้วยสี methyl green 8 นาที สุดท้ายจึงล้างด้วยน้ำไหลผ่านตากแห้ง แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยใช้ xylene based mounting medium

7) สีย้อม toluidine blue (TB) (อัจฉริยา และคณะ, 2549) ทำการตรึงสภาพเซลล์ในแผ่นสเมียร์เลือดด้วย absolute methanol นาน 1 นาที ปล่อยให้สไลด์แห้ง จึงนำแผ่นสไลด์มาจุ่มลงในสี toluidine blue นาน 1-2 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกโดยการผ่านน้ำไหล ตากให้แห้ง จึงนำมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.3 การศึกษาลักษณะ และโครงสร้างอย่างละเอียด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ในการศึกษากล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแต่ละชนิด จะจัดส่งตัวอย่างเต่าบัวเพศผู้และเต่าบัวเพศเมีย เพศละ 2 ตัวอย่าง

ก) การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) ส่งทั้งตัวอย่างเลือด และตัวอย่างที่เป็น buffy coat โดยใช้ hematocrit tube ที่ใช้ปั่นหาค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Pack cell volume) ใส่ลงใน 1% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer 10 มิลลิลิตร ที่ 4 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง เพื่อทำการตรึงสภาพเซลล์เม็ดเลือดทันทีที่เก็บตัวอย่างเลือดได้แล้วส่งดำเนิการต่อในการเตรียมตัวอย่างต่อไป และอ่านด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนส่องกราดที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยทำการสังเกตเม็ดเลือดทั้งหมด พิจารณาความเป็น uniformity ของเม็ดเลือดอย่างน้อย 100 เม็ด และบันทึกลักษณะสามมิติ และพื้นผิวของเม็ดเลือดแต่ละชนิด ชนิดละ 10 เม็ด

ข) การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission electron microscope, TEM) ส่งทั้งตัวอย่างเลือด และตัวอย่างที่เป็น buffy coat โดยใช้ hematocrit tube ที่ใช้ปั่นหาค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ใส่ลงใน 2.5% glutaraldehyde ใน phosphate buffer แช่ที่ 4 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 1 วัน ส่งตัวอย่างเพื่อทำกระบวนการต่อไป และอ่านด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนส่องผ่านที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนส่องผ่าน ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล โดยทำการสังเกตและบันทึกลักษณะของเม็ดเลือดทั้งหมด ศึกษาโครงสร้างนิวเคลียส แกรนูล และปริมาณขององค์ประกอบภายในต่างๆ และทำการวัดความกว้าง-ยาว (maximum– minimum lengths) ของเม็ดเลือดแต่ละชนิด ชนิดละ 2-10 เม็ดโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์

3.4 การศึกษาค่าทางโลหิตวิทยา (Complete blood count; CBC)

ในการศึกษาค่าทางโลหิตวิทยา และเคมีโลหิต ใช้ตัวอย่างเลือดเต่าทั้ง 40 ตัว

ก) ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Pack cell volume; PCV) ด้วยวิธี microhematocrit method โดยการนำเลือดมาใส่ใน hematocrit tube และปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาวัดค่า PCV ด้วย microhematocrit reader อ่านค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ (%)

ข) ค่าฮีโมโกลบิน (Hemoglobin concentration; Hb) ด้วยวิธี Cyanmethemoglobin method เริ่มด้วยใส่ Drabkin's reagent ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอด cuvetle ขนาด 10 มิลลิลิตร และใส่เลือด

2 ไมโครลิตร ตามลงไป เขย่าหลอดให้เลือดผสมกันด้วย vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที จากนั้นนำไปอ่านค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นฮีโมโกลบิน (gm%) จากสูตร

$$\text{Hb (gm\%) ตัวอย่าง} = \frac{\text{OD.ตัวอย่าง x ค่าความเข้มข้นของ Hb มาตรฐาน}}{\text{OD. มาตรฐาน}}$$

โดยที่ห้องปฏิบัตินี้การค่าความเข้มข้นของ Hb มาตรฐาน = 14.35 gm%

ค) การนับจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด (TRBC count) โดยดูดเลือดให้ถึงขีด 0.5 ของ RBC pipette จากนั้นดูดน้ำยา Natt – Herrick's solution ให้จนถึงขีด 101 เขย่าเบาๆนาน 1 นาที จะได้สารละลายเม็ดเลือด 1:200 จากนั้นนำไปหยดใน hemocytometer หรือ Neubauer counting chamber โดยทิ้งไว้สักครู่ก่อน เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดอยู่นิ่ง การนับจำนวนเม็ดเลือดแดง ให้นับที่หัวกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างที่กำลังขยาย 40x โดยนับจากสี่เหลี่ยมจตุรัส 5 ช่อง (medium size square) ซึ่งเม็ดเลือดแดงจะไม่ติดสี นำจำนวนที่นับได้คูณด้วย 10,000 จะได้ค่าจำนวนเม็ดเลือดแดงต่อ 1 ไมโครลิตร (Campbell, 2004)

ง) ค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดง (RBC indices) มี 3 ชนิด ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ประโยชน์ในการแยกชนิดของโลหิตจาง (Campbell, 2004) ได้แก่

- ปริมาตรของเม็ดเลือดแดงโดยเฉลี่ย (Mean corpuscular volume; MCV) โดยคำนวณจากสูตร $\frac{\text{\%PCV x 10}}{\text{RBC count } (10^6/\mu l)} = \text{MCV (femtoliter, fL)}$
- ปริมาตรเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (Mean corpuscular hemoglobin concentration; MCHC) โดยคำนวณจากสูตร $\frac{\text{Hb (g/dL) x 100}}{\text{\%PCV}} = \text{MCHC (g/dL)}$
- ปริมาตรเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงหนึ่งเซลล์ (Mean corpuscular hemoglobin; MCH) โดยคำนวณจากสูตร $\frac{\text{Hb (g/dL) x 10}}{\text{RBC count } (10^6/\mu l)} = \text{MCH (pictogram, pg)}$

จ) การนับจำนวนเรติคูโลไซต์ (reticulocyte; %) โดยใช้สี New Methylene Blue stain (NMB) ด้วยวิธี wet preparation คือ หยดเลือด 1 หยดผสมกับ สี NMB 1 หยด ผสมให้เข้ากันในหลอดแก้วขนาดเล็ก ทิ้งไว้ 15-20นาที สเมียร์บนสไลด์ ทิ้งให้แห้ง นับแยกร้อยละของเรติคูโลไซต์จากเม็ดเลือดแดง 1,000 เซลล์ แล้วนำมาคำนวนดังนี้ % reticulocyte = จำนวนเรติคูโลไซต์ที่นับได้ x 0.1

ฉ) การนับจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (TWBC count) และจำนวนธรอมโบไซต์ ทำตามวิธีของ McCracken (2005) โดยใช้ RBC pipette และสาร Natt and Herrick's solution เช่นเดียวกันกับการนับเม็ดเลือดแดง โดยนับเม็ดเลือดขาว และธรอมโบไซต์ร่วมกันใน hemocytometer เนื่องจากแยกความแตกต่างกันได้ยาก โดยเซลล์ทั้งสองจะติดสีน้ำเงินเข้ม หรือเห็นเป็นแกรนูลอัดแน่นอยู่ในไซโตพลาสซึม ทำการนับใน counting chamber สี่เหลี่ยมจตุรัสทั้ง 9 ช่อง แล้วคำนวณจำนวนรวมของเม็ดเลือดขาวและธรอมโบไซต์จากสูตร

TWBC + thrombocyte count/ µL = (จำนวนทั้งหมดที่นับได้ของ WBCs และธรอมโบไซต์ทั้งหมด 9 ช่อง + 10% ของจำนวนทั้งหมดที่นับได้) x 200

เมื่อทำการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว ทำการนับจำนวนธรอมโบไซต์ที่พบต่อการพบเม็ดเลือดขาว 100 เซลล์ ซึ่งนำมาใช้คำนวนได้ทั้งค่าจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด และจำนวนธรอมโบไซต์ดังนี้

Thrombocyte count (cells/ µL)

$$= \frac{\text{TWBC+ thrombocyte count x จำนวนธรอมโบไซต์ที่พบต่อการพบเม็ดเลือดขาว 100 เซลล์}}{\text{จำนวนธรอมโบไซต์ที่พบ + 100}}$$

TWBC count (cells/ µL) = TWBC+ Thrombocyte count - Thrombocyte count

ช) การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว (Differential count) และจำนวนจริงของเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด (absolute count) นำแผ่นสเมียร์เลือด ที่ย้อมด้วยสี Wright's Giemsa stain ทำการนับเม็ดเลือดขาวทั้งหมด 100 เซลล์ โดยแยกแยะชนิด ภายใต้เลนส์ 100x ตามวิธีของ Campbell and Ellis (2007) ซึ่งได้ค่าเป็นร้อยละ แล้วนำมาคำนวณเป็นค่าจำนวนจริง (absolute) จากสูตร

$$\text{ค่าจำนวนจริงของเม็ดเลือดขาวชนิดใดชนิดหนึ่ง} = \frac{\text{ค่าร้อยละของเม็ดเลือดขาวนั้น x TWBC}}{100}$$

ซ) อัตราส่วนของเม็ดเลือดขาวชนิด heterophil:lymphocyte (H:L ratio) นำค่าจำนวนจริงของเม็ดเลือดขาวชนิด heterophils และ lymphocyte มาคำนวน โดยใช้วิธีการตัดทอนของเศษส่วนมาทำให้อัตราส่วนนั้นเป็นอัตราส่วนอย่างต่ำ

ฌ) การตรวจหาปรสิตในเลือด (blood parasite; cells/ slide) ทำการนับปรสิตที่พบในเลือดจากแผ่นสเมียร์เลือดที่ย้อมด้วยสี Wright's Giemsa stain โดยทำการตรวจทั่วทั้งแผ่นสไลด์

3.5 การศึกษาค่าทางเคมีโลหิต

นำตัวอย่างเลือดเต่าทั้ง 40 ตัว ที่เก็บไว้ด้วยสารกันแข็งตัวของเลือดชนิด lithium heparin มาปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ที่ 3,000 rpm นาน 10 นาที ภายใน 4-6 ชั่วโมง (Metin et al., 2006) และนำพลาสม่าที่ได้มาทำการวิเคราะห์ค่าทางเคมีโลหิต โดยการใช้เครื่องตรวจทาง spectrophotometer ซึ่งให้หน่วย SI units ได้แก่ ค่าการทำงานของเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), total protein, albumin, globulin, glucose, uric acid, blood urea nitrogen, calcium, phosphorus และ creatinine ในพลาสม่า แล้วบันทึกข้อมูล

4. การศึกษาจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์

4.1 การเก็บและเตรียมตัวอย่างเลือด

สุ่มเลือกเต่าบัวเพศผู้และเพศเมียโตเต็มวัย เพศละ 3 ตัว มาเจาะเลือดด้วยอุปกรณ์ และเทคนิคปลอดเชื้อ เก็บเลือดประมาณ 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารลิเธียมเฮปาริน จากนั้นนำเลือดที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อนำกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวมาเพาะเลี้ยง

4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว

เตรียมหลอดเลี้ยงเซลล์ขนาด 15 มิลลิลิตรที่ปลอดเชื้อ ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งประกอบด้วย RPMI medium-1640 4 มิลลิลิตร fetal calf serum 1 มิลลิลิตร phytohaemagglutinin 120 ไมโครลิตรเพื่อกระตุ้นให้ลิมโฟไซท์แบ่งตัว ใส่ยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการติดเชื้อ คือ penicillin-streptomycin 50 ไมโครลิตร และ 5% enrofloxacin 25 ไมโครลิตร จากนั้นใส่กลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาว 150 ไมโครลิตร เขย่าหลอดเลี้ยงเซลล์ให้เลือดและสารละลายต่างๆเข้ากัน นำไปใส่ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วเติม colchicine ความเข้มข้น 0.05 % ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วบ่มต่ออีก 10 นาที

4.3 การเก็บเกี่ยวเซลล์

- นำหลอดเลี้ยงเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์

- ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งไปโดยให้เหลือประมาณ 1 มิลลิลิตร ล้างด้วย Hank's balance salt solution (HBSS) ปริมาตร 6 มิลลิลิตรบนเครื่องเขย่า (vortex) เบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจายตัวไม่จับเป็นก้อน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
- ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ใส่สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร โดยสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์เป็น hypotonic solution ช่วยทำให้เซลล์พองตัว ผสมให้เข้ากับเซลล์เม็ดเลือดขาวบนเครื่องเขย่าเบาๆ ทิ้งไว้ 10 นาทีจากนั้นใส่น้ำยาคงสภาพเซลล์ (fixative solution) ซึ่งประกอบด้วย MeOH 3 ส่วน และ acetic acid 1 ส่วน โดยค่อยๆเติมลงไปทีละหยดจนครบ 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบนเครื่องเขย่าเบาๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
- ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ใส่น้ำยาคงสภาพเซลล์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตรบนเครื่องเขย่าเบาๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทำซ้ำข้อ 3.4 อีก 1-2 ครั้ง จนพบว่าตะกอนสีขาวที่ก้นหลอดทดลองสะอาด ซึ่งก็คือกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ต้องการศึกษา
- เติมน้ำยาคงสภาพเซลล์อีกครั้งหนึ่งเพื่อปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้เหมาะสม

4.4 การเตรียมสไลด์เพื่อศึกษาโครโมโซม

ทำความสะอาดสไลด์ด้วยน้ำยาล้างแก้ว เช็ดให้แห้งแล้วนำไปแช่ต่อใน MeOH เช็ดด้วยผ้าขาวบางสะอาด หยดเซลล์เม็ดเลือดขาวลงบนสไลด์ 1-2 หยด ถ้าสไลด์สะอาดเซลล์ที่หยดจะกระจายตัวออกเป็นวงกลมอย่างรวดเร็ว เมื่อสไลด์แห้งจึงนำออกมาตรวจดูจำนวนเมทาเฟสและการกระจายของโครโมโซม

4.5 การย้อมสีโครโมโซม

นำสไลด์ที่แห้งแล้วไปย้อมสีโครโมโซมโดยใช้ Giemsa ความเข้มข้น 4 % เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำสไลด์มาล้างด้วยน้ำกลั่นตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง และนำไปตรวจวิเคราะห์โครโมโซมใต้กล้องจุลทรรศน์ต่อไป

4.6 การตรวจวิเคราะห์ โครโมโซม

เลือกสไลด์ที่โครโมโซมกระจายไม่มากหรือน้อยเกินไป โดยเริ่มจากกำลังขยายต่ำก่อน (X 10 objective) เพื่อหาตำแหน่งของเมทาเฟส แล้วจึงขยายด้วย X 100 oil immersion objective เลือกตรวจเมทาเฟสที่เห็นเส้นโครมาติดของโครโมโซมชัดเจน แล้วนับจำนวนโครโมโซม

5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ (Statistic data analysis)

ความกว้าง-ยาว (maximum – minimum lengths) ของเม็ดเลือดแต่ละชนิด นำมาคำนวณค่า mean, variance และ Standard Deviation (SD) ค่าต่ำสุด (Minimum) ค่าสูงสุด (Maximum)

คำนวนหาค่า mean, variance และ standard deviation (SD) โดยใช้โปรแกรม SPSS® for Window™ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ $p< 0.05$ โดยวิเคราะห์ค่าการกระจายตัวปกติของข้อมูล (normally distributed data) ที่ 95% ของประชากรทั้งหมด (95% confidence interval) ด้วย independent t- test ในปัจจัยเปรียบเทียบค่าโลหิตวิทยาและเคมีโลหิตของเต่าบัวโตเต็มวัยระหว่างเพศผู้กับเพศเมีย และหาความสัมพันธ์ของน้ำหนัก และช่วงความยาวกระดองหลังกับค่าโลหิตวิทยาและเคมีโลหิตต่างๆ โดยใช้ Spearman rank correlation coefficient ($p<0.05$)

6. การขออนุญาตใช้สัตว์ป่าคุ้มครอง

ดำเนินการตามระเบียบกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ว่าด้วยการอนุญาตให้ทางราชการกระทำการล่า เพาะพันธุ์ ครอบครอง นำเข้าส่งออก หรือนำผ่าน ซึ่งสัตว์ป่าหรือซากของสัตว์ป่า การเก็บ ทำอันตราย หรือมีไว้ครอบครองซึ่งรังของสัตว์ป่า และการเก็บและชำระค่าใช้จ่าย ค่าบริการ หรือค่าตอบแทนและราคาสัตว์ป่า พ.ศ. 2540 ตามหลักการและข้อบังคับกรมประมง

7. ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical consideration)

ปฏิบัติตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ สภาวิจัยแห่งชาติ ที่ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการทดลองนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนหลัก คือ

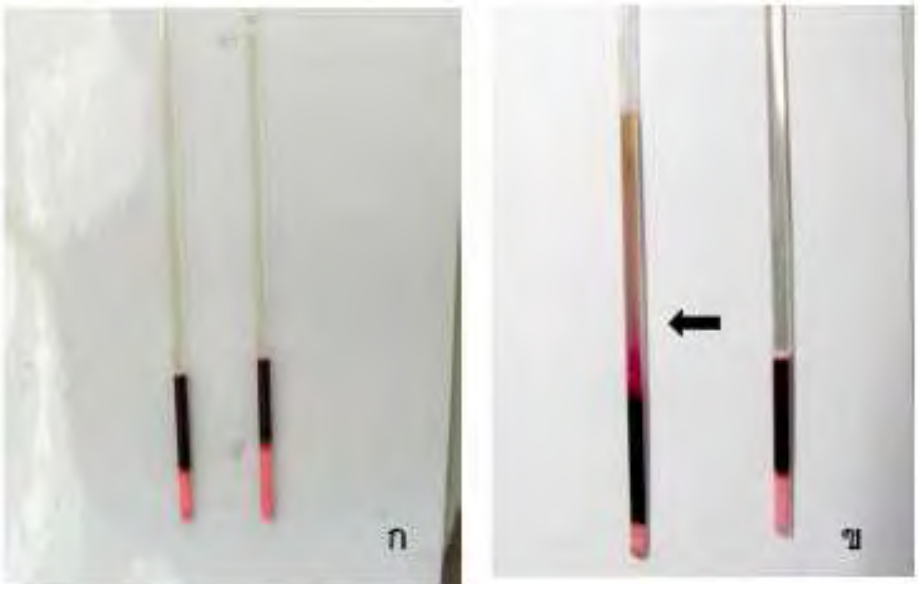
4.1 **ชีววิทยาโลหิต และไซโตเคมี ระดับมหภาค และระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเซลล์เม็ดเลือดในเต่าบัว**

4.2 **โครโมโซมและคาริโอไทป์ของเซลล์เม็ดเลือดในเต่าบัว**

4.1 ชีววิทยาโลหิต และไซโตเคมี ระดับมหภาค และระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเซลล์เม็ดเลือดในเต่าบัว

- **โลหิตวิทยา : มีลักษณะรูปร่าง โครงสร้างอย่างละเอียดและการย้อมติดสีทางไซโตเคมีของเซลล์เม็ดเลือดในเต่าบัว**

ลักษณะทางกายภาพของพลาสม่าที่เจาะจากเต่าบัวตัวอย่างทุกตัวมีสีเหลืองอ่อนและใส ชั้น buffy coat ในเต่าบัวที่มีสุขภาพปกติเป็นสีขาวหนามองเห็นได้ง่าย (รูปที่ 4.1 ก) เลือดที่เก็บไว้นานกว่า 1 วันโดยไม่ได้เข้าตู้เย็น มักเกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงได้ง่าย (รูปที่ 4.1 ข)

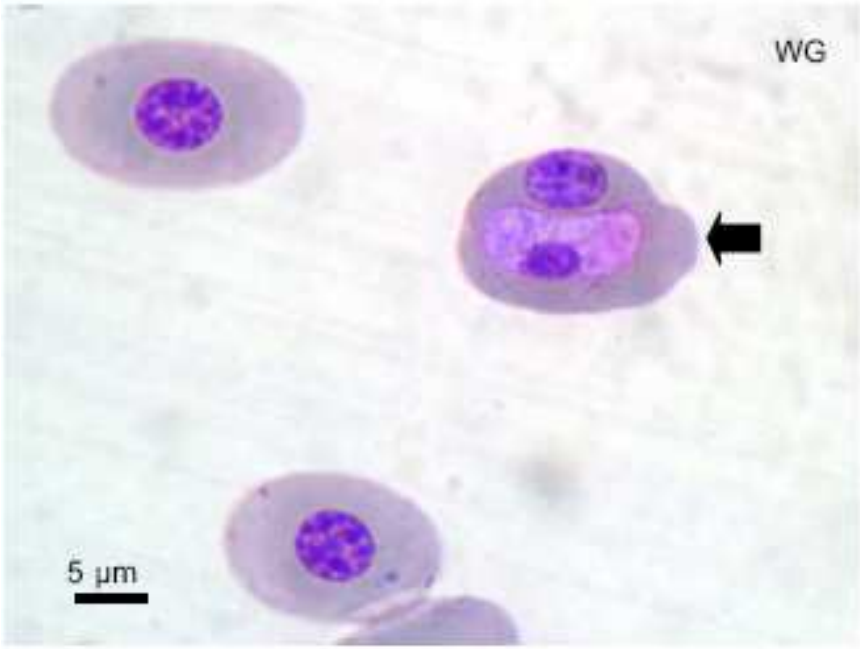


รูปที่ 4.1 สีพลาสมาในเต่าบัวโตเต็มวัย ก) ปกติอกสีเหลืองอ่อน ใส ข) พลาสมาสีแดง (ลูกศร) เกิดจากการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) จากความผิดพลาดทางเทคนิค เปรียบเทียบกับสีพลาสมาปกติ

การศึกษาโลหิตวิทยาในเต่าบัวโตเต็มวัย จำนวน 40 ตัว (เพศผู้และเพศเมีย อย่างละ 20 ตัว) โดยวัดขนาดเม็ดเลือด และศึกษารูปแบบการติดสีองปฏิกิริยาเคมีในเซลล์ (สรุปไว้ในตารางที่ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ) ลักษณะรูปร่างของเซลล์เม็ดเลือดแดงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน รวมทั้งปฏิกิริยาเคมีของเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดมีรายละเอียดดังนี้

1. **เม็ดเลือดแดง** (Erythrocyte)

เม็ดเลือดแดงเต่าบัว มีลักษณ เป็นวงรี หรือรูปไข่ (elliptic) มีนิวเคลียสตรงกลางเซลล์ เม็ดเลือดแดงจะมีลักษณะการติดสีค่อนข้างสม่ำเสมอ แต่มีขนาดและรูปร่างที่ค่อนข้างแตกต่างกัน (poikilocytosis) นิวเคลียสมีขนาดเล็กเป็นรูปกลมหรือรี พบการติดสีเป็นจุดสีฟ้าในไซโตพลาสซึม (basophilic inclusion)ได้มากกว่าร้อยละ 50 ของเม็ดเลือดแดง (รูปที่ 4.3 ก) พบเม็ดเลือดแดงที่มีหาง (รูปที่ 4.3 ข) และพบเม็ดเลือดที่กำลังแบ่งตัวได้บ้าง ไม่พบเม็ดเลือดที่มีรู (cytoplasmic hole)เม็ดเลือดที่ติดเชื้อ Hemogregarine ส่วนใหญ่จะมีขนาดใหญ่กว่าปกติ แกมอนต์รูปกล้วยจะเบียดนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงเอียงไปด้านใดด้านหนึ่งโดยอาจทำให้เม็ดเลือดยาวขึ้น หรือกลมขึ้น ขึ้นกับตำแหน่งที่ปรสิตแทรกอยู่ (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.2 ลักษณะรูปร่างของ Hemogregarine ในเต่าบัว (ลูกศร) ประกอบด้วยหนึ่งแกมอนต์ต่อหนึ่งเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยแกมอนต์มีขนาด 13x5µm ในเม็ดเลือดแดงที่มีขนาด 18x11µmย้อมด้วยสี Wright's-iemsa (WG)

พบลักษณะการปนด้วยเม็ดเลือดแดงอ่อน (polychromatic erythrocyte) ได้บ้างแต่น้อยโดยในเม็ดเลือดแดงที่มีค่อนข้างกลมมักมีการติดสีที่ยังโตไม่เต็มที่ เม็ดเลือดแดงอ่อนชนิดเรติคูโรไซต์จะมีไซโตพลาสซึมค่อนข้างกลม ขนาดและการติดสีไม่สม่ำเสมอ นิวเคลียสมีขนาดใหญ่กว่าและติดสีโครมาตินในนิวเคลียสจางกว่าเม็ดเลือดแดงปกติ พบได้มากกว่าเม็ดเลือดแดงอ่อนชนิดรูบิไซต์ (rubicyte) ซึ่งพบได้น้อยมากหรืออาจไม่พบเลย เม็ดเลือดแดงอ่อนชนิดรูบิไซต์มีรูปร่างกลม นิวเคลียสมีขนาดใหญ่กว่าเม็ดเลือดแดงปกติ 2-3 เท่า ติดสีเข้มของโครมาตินเป็นร่างแห นิวเคลียสมักวางตัวอยู่กลางเซลล์ มีไซโตพลาสซึมน้อย ติดสีน้ำเงินเข้ม (รูปที่ 4.3 ข)

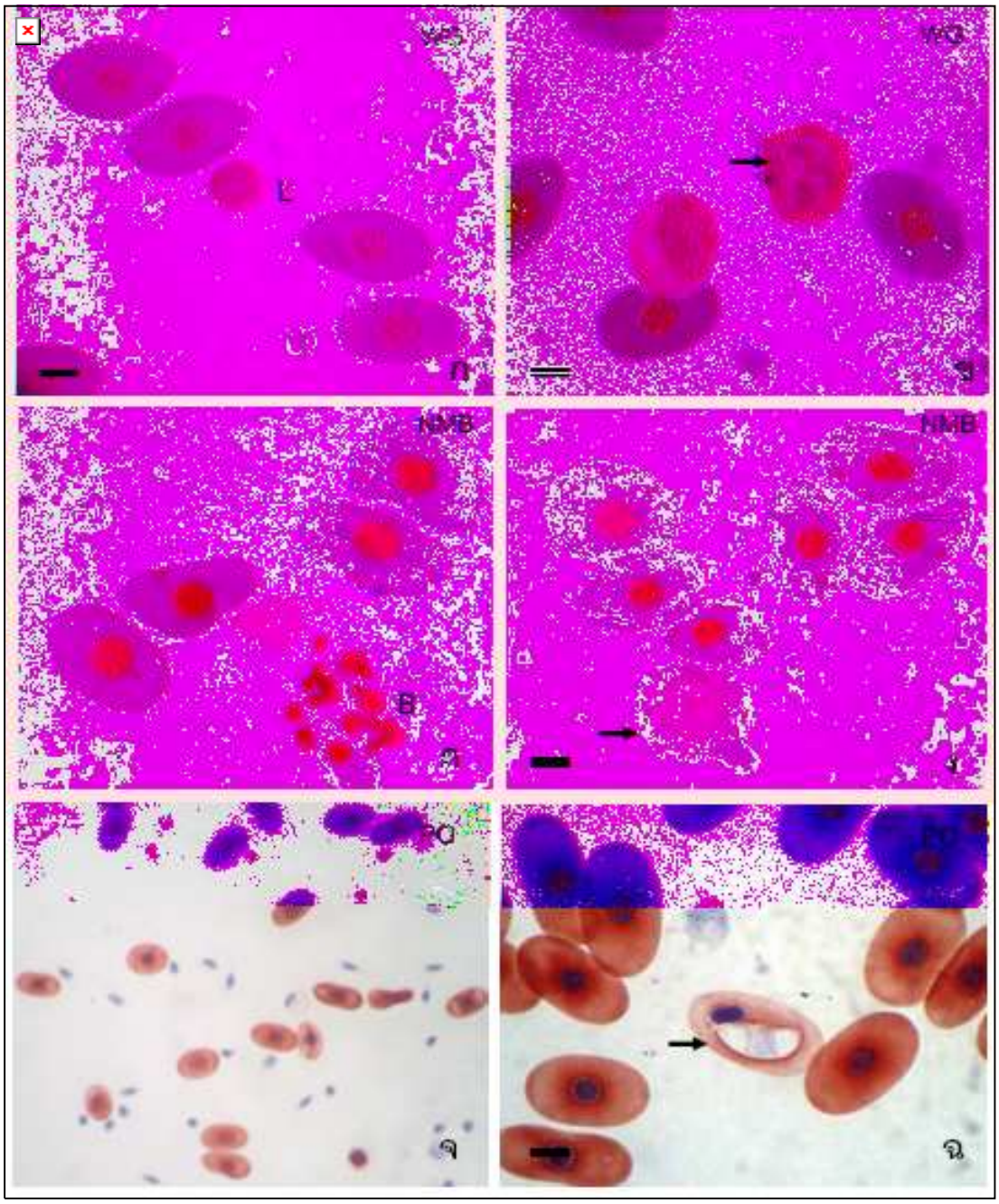
เมื่อทำการย้อมสีเม็ดเลือดแดงอ่อนด้วยสี NMB (new methylene blue) พบว่าเม็ดเลือดแดงอ่อนและเม็ดเลือดแดงโตเต็มวัยมีการติดสีเป็นจุดเล็กๆ กระจายในไซโตพลาสซึม แบบ punctuate reticulocyte เกือบทุกเม็ดในบริมาณการติดสีที่ไม่แน่นอน โดนที่เม็ดเลือดแดงที่มีสีนิวเคลียสจาง หรือเม็ดเลือดแดงที่อ่อนกว่าจะมีการติดสี NMB มากกว่าเม็ดเลือดแดงโตเต็มวัยโดยไม่ขึ้นกับขนาดและรูปร่าง (รูปที่ 4.3 ค และ ง)

เม็ดเลือดแดงให้ปฏิกิริยาติดสีไซโตเคมี (ตารางที่ 4.2) พบการติดเข้มของ PO (peroxidase) ในไซโตพลาสซึม (รูปที่ 4.3 จ และ ฉ)

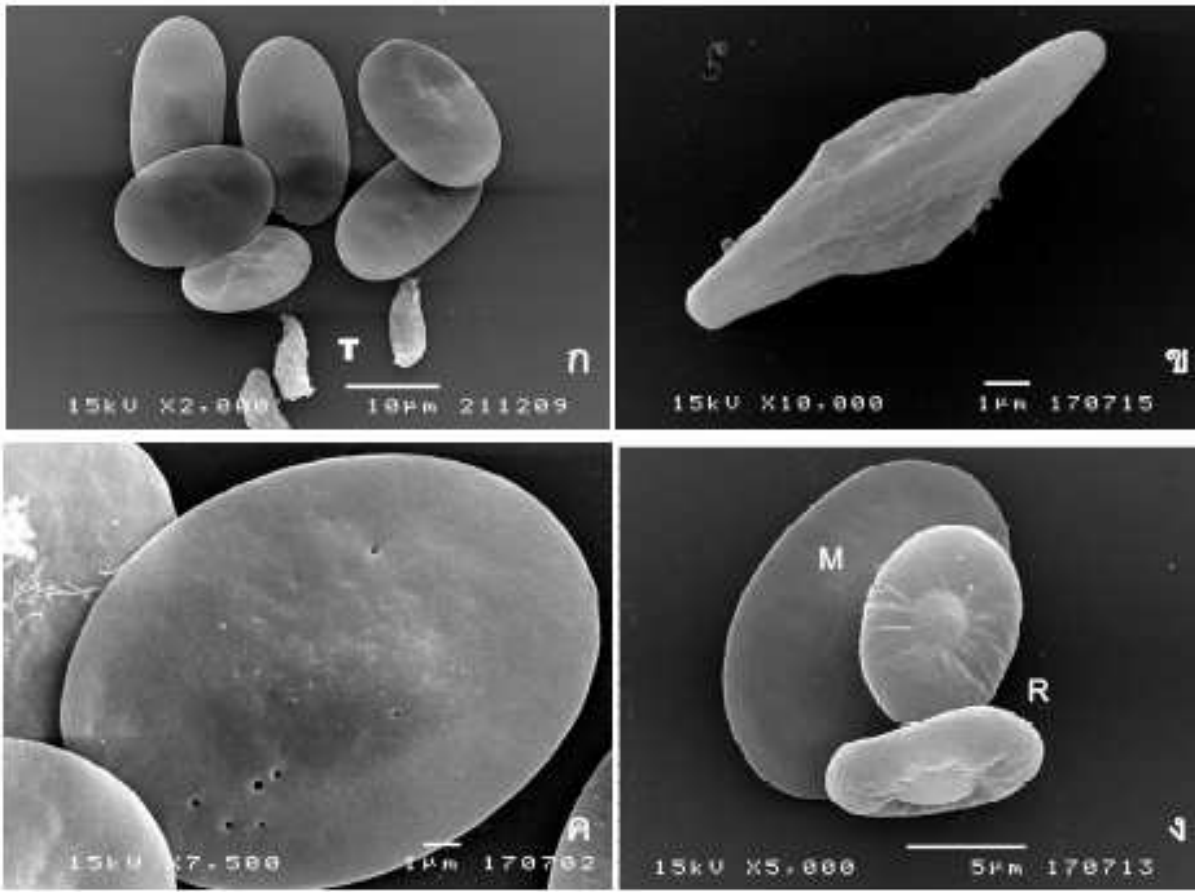
จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด เม็ดเลือดแดงมีรูปร่างแบนรี ผิวเซลล์ค่อนข้างเรียบ ส่วนใหญ่ไม่เห็นรอยนูนของนิวเคลียส (รูปที่ 4.4 ก-ข) มีรูเล็กหลายรูที่บริเวณกลางเซลล์ที่เป็นตำแหน่งของนิวเคลียสทุกเซลล์ และรูขนาดใหญ่ (cytoplasmic hole) ที่รอบผิวเซลล์บางเซลล์ (รูปที่ 4.4 ค) เม็ดเลือดแดงอ่อนจะมีขนาดเซลล์เล็ก มีรอยนูนของนิวเคลียสกลางเซลล์ชัดเจน ผิวเซลล์ขรุขระกว่าเม็ดเลือดแดงโตเต็มวัย (รูปที่ 4.4 ง) และสามารถพบเม็ดเลือดที่มีรูปร่างผิดปกติในแบบต่างๆได้ (รูปที่ 4.5 ก-ฉ)

เมื่อทำการวัดขนาดของเม็ดเลือดแดงภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (ตารางที่ 4.1) ความกว้างและความยาวโดยรวมเฉลี่ยของทั้งสองเพศ (n=20) เท่ากับ 10.01$\pm$1.54 ไมครอน และ 15.81$\pm$2.56 ไมครอน ตามลำดับ โดยขนาดความกว้างของเม็ดเลือดแดงในเต่าบัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย (n=10) มีค่าเท่ากับ 1021$\pm$1.40 ไมครอนและ 9.55$\pm$1.94 ไมครอนตามลำดับ และขนาดความยาวของเม็ดเลือดแดงในเต่าบัวโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียมีค่าเท่ากับ 14.86$\pm$2.33 ไมครอนและ 16.25$\pm$2.62 ไมครอน ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$)

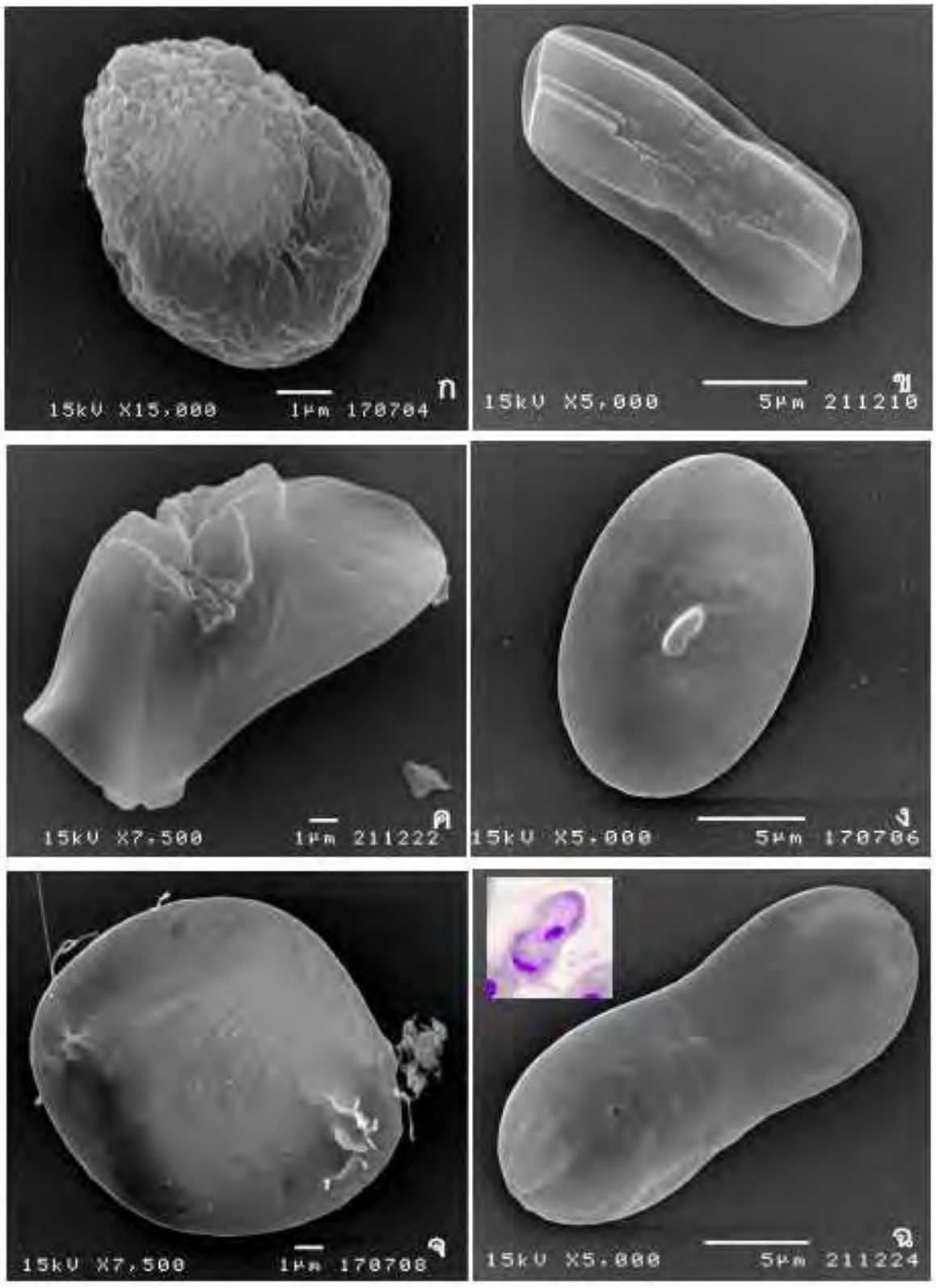
เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน เม็ดเลือดแดงมีนิวเคลียสแน่นไปด้วยฮีโมโกลบิน (dense hemoglobin) ซึ่งเห็นเป็นสีเข้มเนียนเรียบในเซลล์ (high density) มีช่องว่างระหว่างไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสชัดเจน (รูปที่ 4.6 ก) เห็นออแกลแนลที่ติดสีเข้มของอิเล็กตรอนชัดเจนและเม็ดเลือดแดงส่วนใหญ่มีไมโตรคอนเดรียกระจายอยู่ทั่วไซโตพลาสซึมในปริมาณที่แตกต่างกัน (รูปที4.6 ข) เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ Homogregarine มีฮีโมโกลบินแตกกระจาย มีความเข้มของอิเล็กตรอนต่ำ เห็นสีจางเป็นจุดกระจายในเซลล์ แกมอนต์อยู่ในช่องว่างภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์เม็ดเลือดแดง ไม่พบถุง parasitophorous vacuolemembrane (PVM) ในแกมอนต์ประกอบด้วย microneme แกรนูลที่ติดสีเข้มของอิเล็กตรอน (densed granule) และองค์ประกอบที่เปน loose electron density กระจายอยู่ภายใน (รูปที่ 4.6 ค) และสามารถพบผลึกของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงที่ติดสีแทบแสงได้ (รูปที่ 4.6 ง)



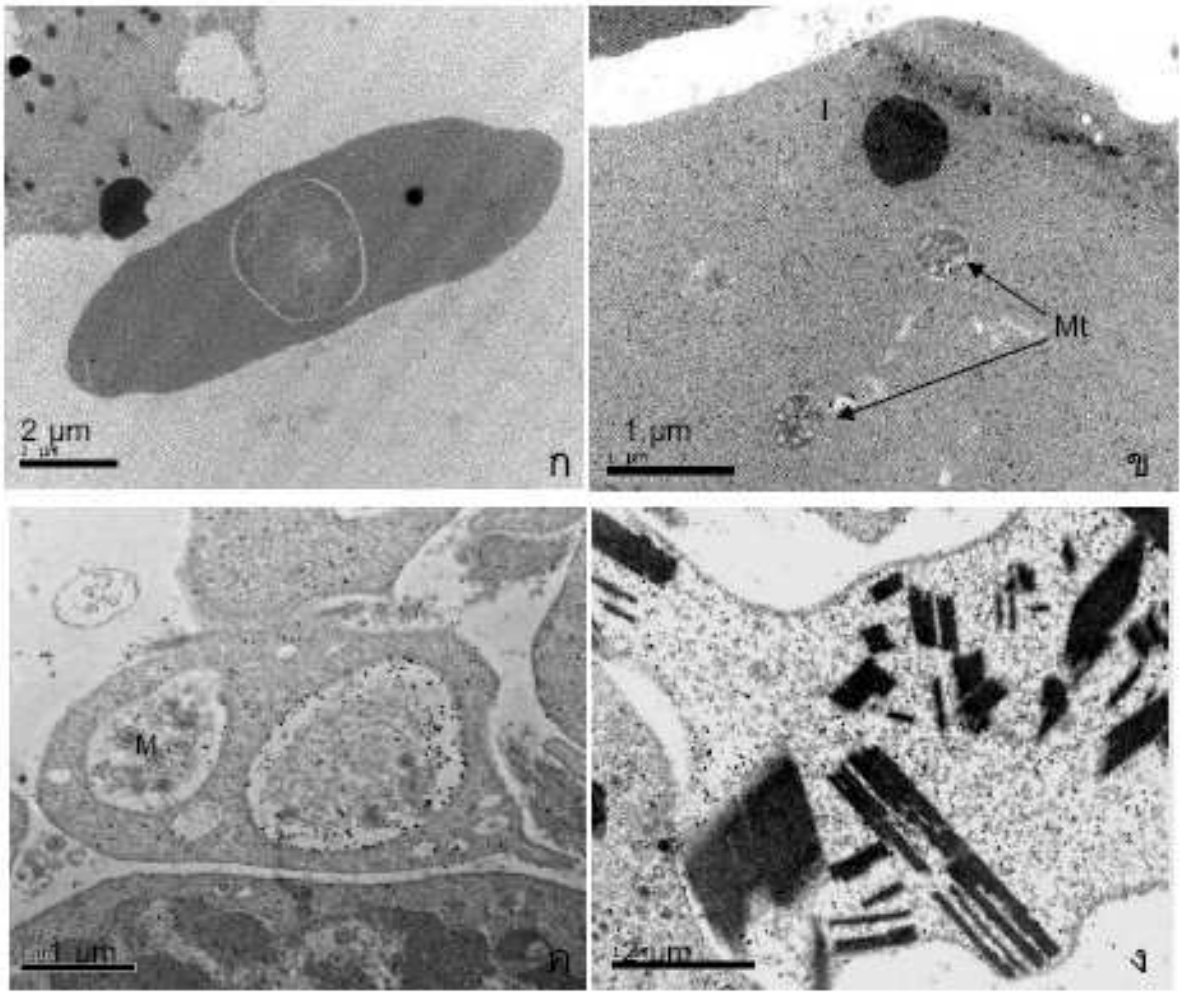
รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะเม็ดเลือดเต่าบัวในภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ก) การติดสีแบบ inclusion ในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดง WG ข) เม็ดเลือดแดงอ่อนชนิด basophilic rubricyte (ลูกศร) ที่มีสีน้ำเงินเข้มกว่าลิมโฟไซต์ (L) WG ค) ลักษณะติดสี NMB ของเม็ดเลือดแดงโตเต็มวัยและการติดสีในแกรนูลของเบโซฟิล (B) ชัดเจน ง) ลักษณะติดสี NMB ของเม็ดเลือดแดงอ่อน (ลูกศร) จ) ปฏิกิริยาเคมีของเซลล์เม็ดเลือดแดงต่อสี PO ฉ) เม็ดเลือดแดงที่มีปรสิตภายใน (ลูกศร) จะติดสี PO ที่อ่อนกว่า. L = ลิมโฟไซต์. Bar = 5 μm



รูปที่ 4.4 เม็ดเลือดแดงในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ก) ขนาดที่หลากหลายของเม็ดเลือดแดงโตเต็มวัยเปรียบเทียบกับขนาดของธรอมโบไซด์ทางด้านล่าง (T) ข) ลักษณะรอยนูนของนิวเคลียสเม็ดเลือดแดงมองในมุมข้าง ค) ลักษณะพื้นผิวตรงกลางเซลล์ที่เป็นตำแหน่งของนิวเคลียส พบรูขนาดเล็กจำนวนมาก และบริเวณรอบๆเป็นรูขนาดใหญ่กว่า ง) เม็ดเลือดแดงอ่อน (R) จะมีขนาดเซลล์เล็กมีรอยนูนของนิวเคลียสตรงกลางเซลล์ชัดเจน ผิวเซลล์ขรุขระกว่าเม็ดเลือดแดงโตเต็มวัย (M)



รูปที่ 4.5 เม็ดเลือดแดงที่รูปร่างผิดปกติภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ก) เซลล์เม็ดเลือดแดงที่เสื่อมสลาย ข) – ค) เม็ดเลือดแดงที่มีลักษณะเปลี่ยนแปลงคล้ายผลึกภายในเซลล์ ง)- จ) เม็ดเลือดแดงที่มีติ่งยื่นออกมาจากไซโตพลาสซึม ฉ) เม็ดเลือดแดงขนาดใหญ่ที่สันนิษฐานว่าอาจมี Hemogregarine อยู่ภายใน



รูปที่ 4.6 เม็ดเลือดแดงในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ก) เม็ดเลือดแดงที่แน่นไปด้วยฮีโมโกลบินเห็นติดสีเข้มของอิเล็กตรอนเนียนเรียบในเซลล์และจุดสีเข้มของ Basophilic inclusion ภายในไซโตพลาสซึม ข) จุดสีเข้มในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดงมีลักษณะติดสีไม่เรียบเนียน (I) และพบไมโตคอนเดรีย (Mt) จำนวนมาก ค) ลักษณะของแกมอนต์อยู่ในช่องว่างภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์เม็ดเลือดแดง ไม่พบถุง PVM ในแกมอนต์ประกอบด้วย microneme (M) ลักษณะผลึกของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง

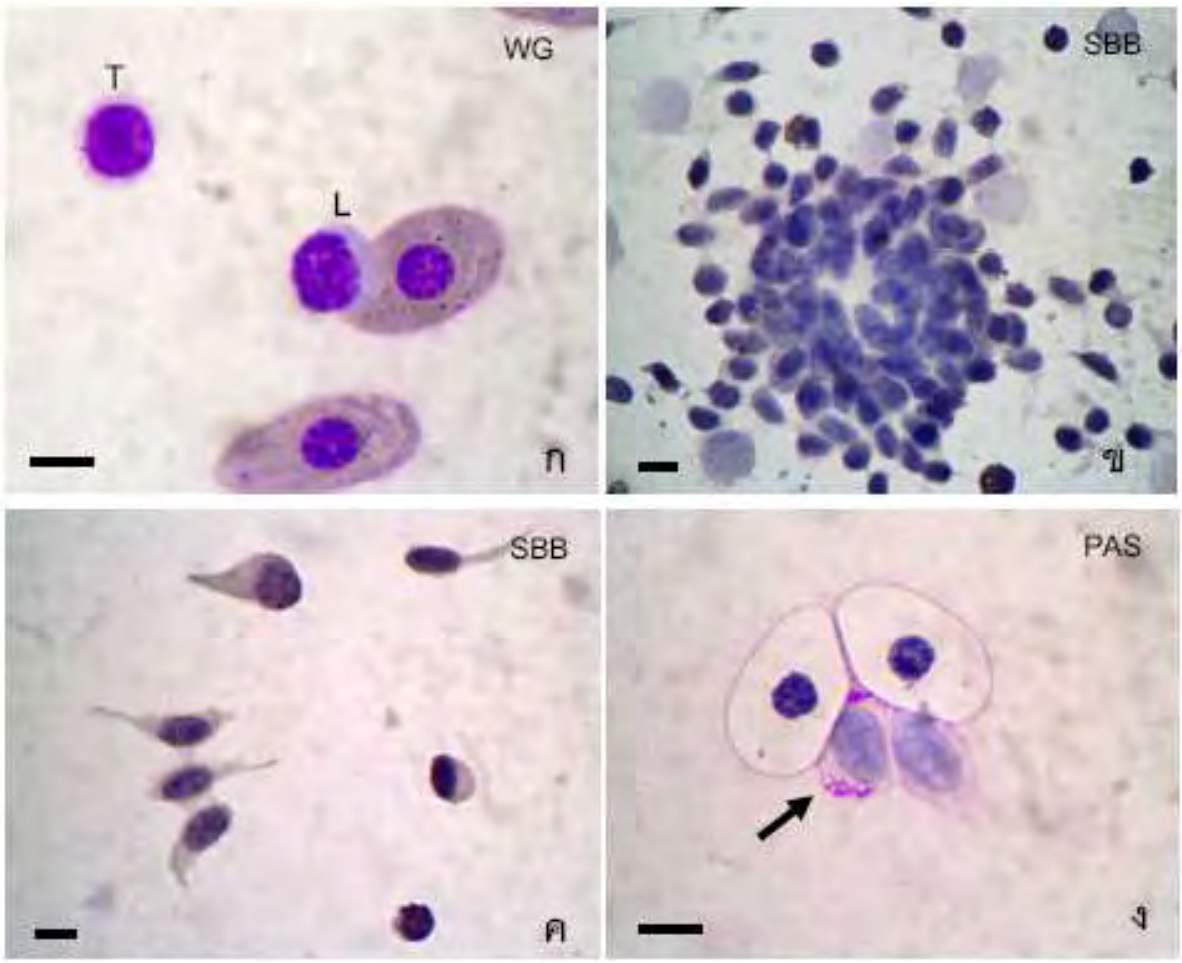
2. ธรอมโบไซต์หรือเกล็ดเลือด (Thrombocyte)

ธรอมโบไซต์ในเต่าบัวมีรูปร่างหลากหลาย ได้แก่ กลม รี รูปกระสวยมีปลายไซโตพลาสซึมแหลม หรือมีลักษณะของไซโตพลาสซึมที่ยื่นออกมาคล้ายเท้าเทียม (pseudopodia) เนื่องจากรูปร่างที่หลากหลายทำให้ไม่สามารถวัดขนาดได้ ธรอมโบไซต์มีอัตราส่วนระหว่างนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม (N:C ratio) สูง โดยเฉพาะธรอมโบไซต์ที่มีรูปร่างกลม โดยจะมีขนาดเล็กกว่า หรือ ใกล้เคียงกับเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ เมื่อย้อมด้วยสี Wright's Giemsa ไซโตพลาสซึมของธรอมโบไซต์จะติดสีม่วง และใสกว่าเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ที่มีไซโตพลาสซึมติดสีฟ้า (basophilic) มากกว่า นิวเคลียสของธรอมโบไซต์ค่อนข้างกลมและติดสีเข้มของโครมาตินที่อัดแน่น (densed chromatin) เหมือนนิวเคลียสในเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (รูปที่ 4.7 ก) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างสามารถพบธรอมโบไซต์ที่มีช่องว่างภายในเซลล์ (cytoplasmic vacuole) ซึ่งธรอมโบไซต์ที่มีช่องว่างนี้จะมีสีไซโตพลาสซึมที่เข้มขึ้นกว่าธรอมโบไซต์ทั่วไป พบการเกาะกลุ่มกันของธรอมโบไซต์ (รูปที่ 4.7 ข)

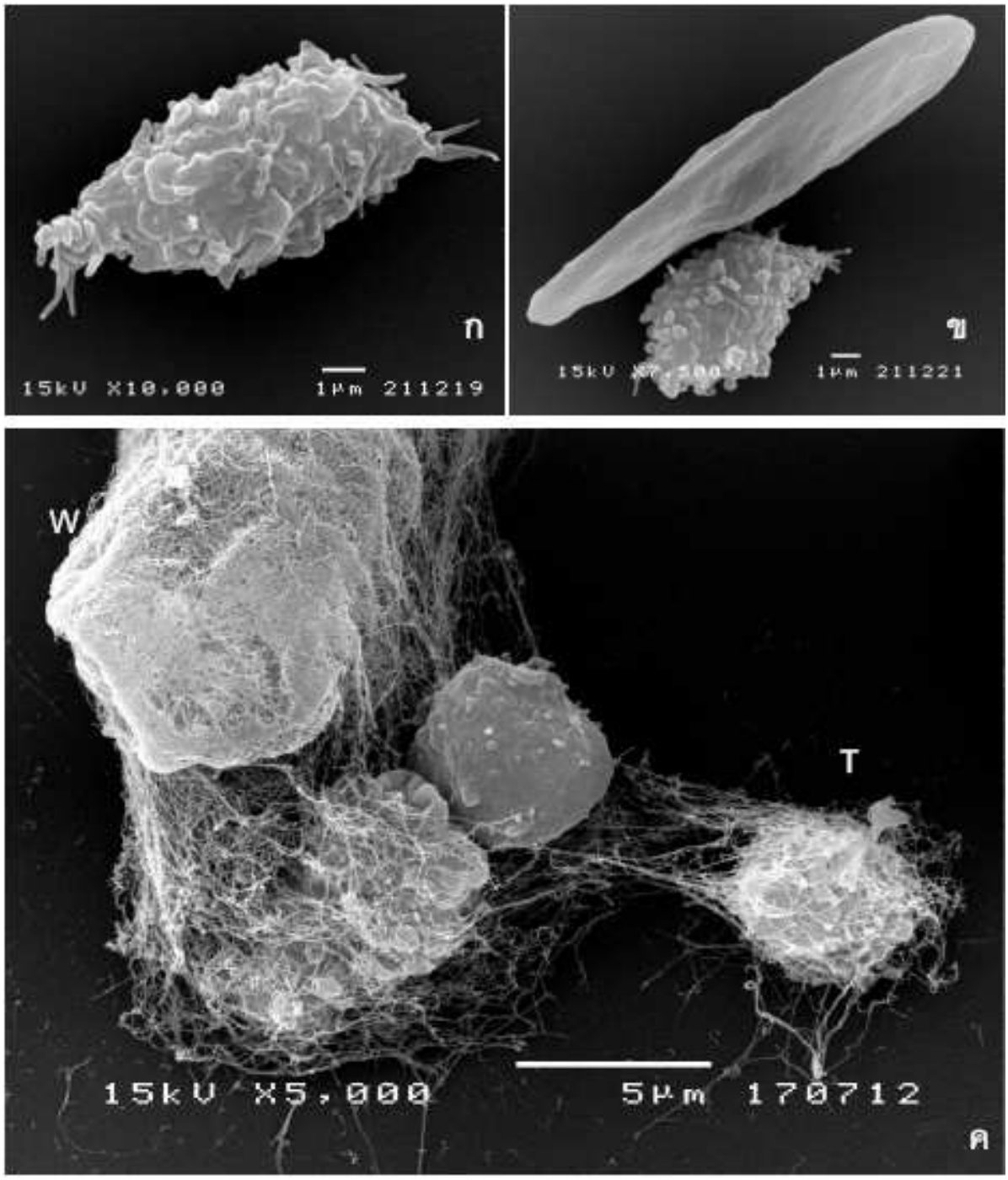
ธรอมโบไซต์ให้ปฏิกิริยาติดสีไซโตเคมี โดยพบการติดเข้มสม่ำเสมอต่อ SBB (Sudan black B) ในไซโตพลาสซึม (รูปที่ 4.7ค) และติดสีจางไม่สม่ำเสมอต่อ PAS (Periodic Acid-Schiff) แต่จะติดสีเข้มชัดเจนในธรอมโบไซต์ที่มีแวคูลโอล (รูปที่ 4.7 ง) ให้ผลลบต่อการย้อมด้วย PO, ALP (alkaline phosphatase), ANAE (alpha-napthyl-butylate esterase), NMB, AcP (acid phosphatase) และ TB (toluidine blue) ดังตารางที่ 4.2

จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ธรอมโบไซต์ส่วนใหญ่มีลักษณะรี เป็นรูปกระสวย มี pseudopodia ยื่นออกมาจากผิวเซลล์มาก มีขนาดเล็กกว่าเม็ดเลือดแดงประมาณครึ่งหนึ่ง ความกว้าง 1.5-3 ไมครอน ความยาว 7-10 ไมครอนโดยประมาณ (รูปที่ 4.8 ก-ข) มักพบการจับกลุ่มกันของเซลล์ธรอมโบไซต์ด้วยกันเอง หรือ เกาะกับเม็ดเลือดขาว โดยมีสายไฟบรินติดกับเซลล์ที่เกาะกลุ่มกัน ซึ่งธรอมโบไซต์ที่เกาะกันนี้จะมีลักษณะกลมกว่าที่แยกตัวอยู่เดี่ยวๆ (รูปที่ 4.8 ค)

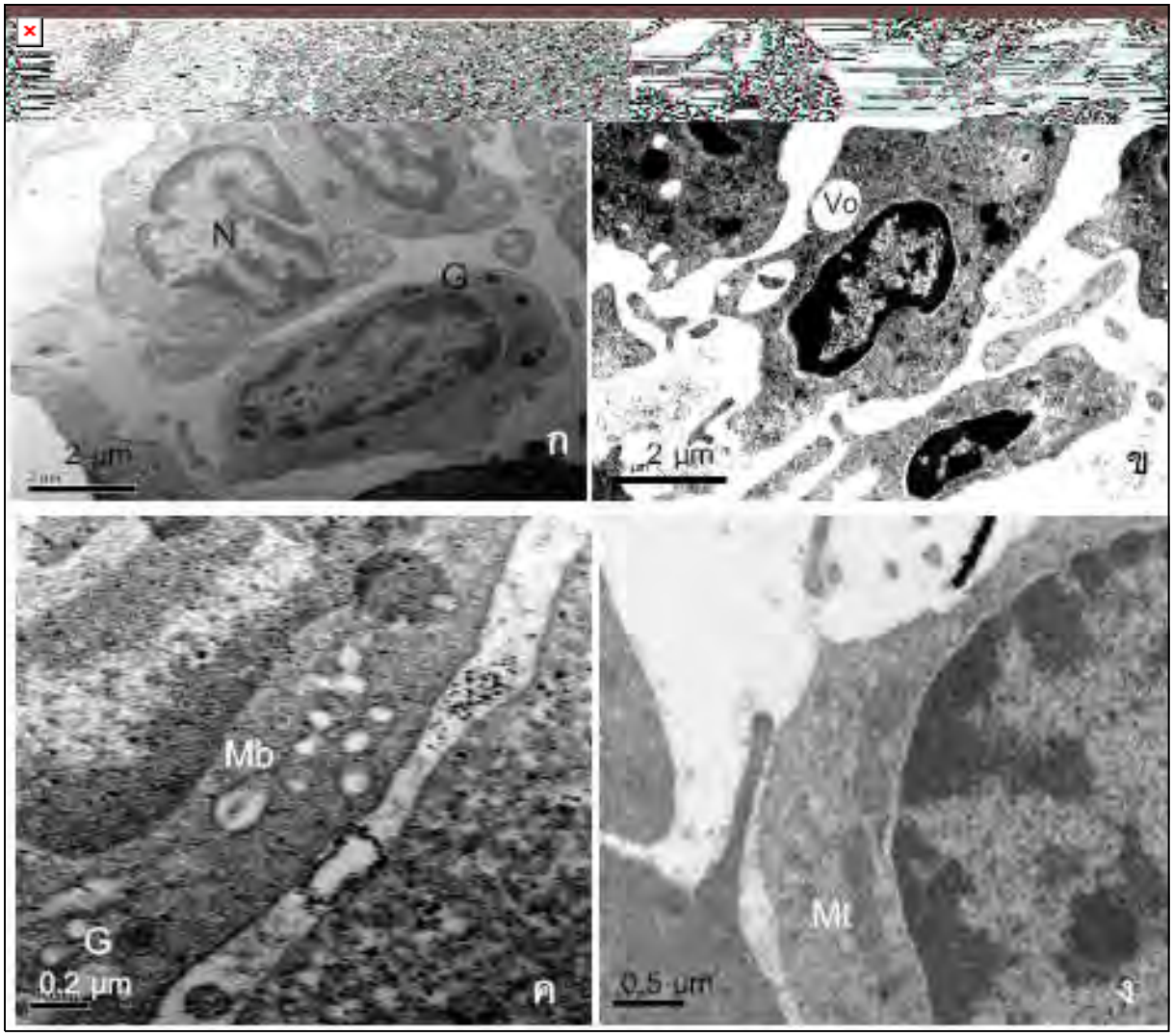
จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ธรอมโบไซต์ นิวเคลียสไม่กลม มองเห็นเป็นพู (lobulated nuclei) มี heterochromatin ทำให้เห็นเป็นสีเข้มของอิเล็กตรอน ไซโตพลาสซึมน้อยและมีติ่งหรือส่วนยื่นออกไปจากขอบเซลล์คล้ายเท้าเทียม มีแกรนูลกลมใหญ่ติดสีเข้มทึบของอิเล็กตรอนกระจายอยู่เล็กน้อยลีแวคูลโอลหลายขนาด พบไมโครตอนเดรียรูปร่างกลมหรือยาวรีขนาดหลากหลายจำนวนหลายอันและแนวขอบของไมโครทูบูล (marginal band of microtubule) ในไซโตพลาสซึม (รูปที่ 4.9 ก- ง)



รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะธรอมโบไซต์เต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ก) ธรอมโบไซต์แบบกลม (T) ที่มีขนาดใกล้เคียงกับเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (L) โดยไซโตพลาสซึมของธรอมโบไซต์จะติดสีม่วง และใสกว่าเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ ที่มีไซโตพลาสซึมติดสีฟ้ามากกว่า WG ข) การเกาะกลุ่มกันของธรอมโบไซต์ SBB ค) ปฏิกิริยาเคมีในเซลล์ธรอมโบไซต์แบบกลม และ แบบกระสวย ต่อสี SBB ง) ปฏิกิริยาเคมีในเซลล์ธรอมโบไซต์ต่อสี PAS โดยเซลล์ธรอมโบไซต์ที่มีแวคูลโอลมาก (ลูกศร) จะติดสีเข้มชัดเจนกว่าธรอมโบไซต์ที่ไม่มีแวคูลโอล. Bar = 5 μm



รูปที่ 4.8 ธรอมโบไซต์ในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ก) ธรอมโบไซต์ที่มีลักษณะรี เป็นรูปกระสวย มี pseudopodia ยื่นออกจากผิวเซลล์มาก ข) เปรียบเทียบขนาดของธรอมโบไซต์ที่มีขนาดเล็กกว่าเม็ดเลือดแดงประมาณครึ่งหนึ่ง ค) ธรอมโบไซต์ (T) ที่จับกลุ่มและมีไฟบรินจำนวนมากจับอยู่รอบๆและเชื่อมติดกับเม็ดเลือดขาว (W)



รูปที่ 4.9 ธรอมโบไซต์ในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ก) กลุ่มของธรอมโบไซต์นิวเคลียสขนาดใหญ่ และบางเซลล์เห็นเป็นพู (N) มี heterochromatin ทำให้เห็นเป็นสีเข้มของอิเล็กตรอนและ euchromatin ที่ติดสีจางอยู่ภายใน ข) ไซโตพลาสซึมมีติ่ง หรือส่วนที่ยื่นออกไปจากขอบเซลล์ คล้ายเท้าเทียมมีแวคูลโอลขนาดใหญ่ในไซโตพลาสซึม (Vo) ค) แกรนูลทึบแสง (G) และแนวขอบไมโครทูบูล (Mb) ในไซโตพลาสซึม ง) ไมโตคอนเดรียรูปร่างกลม หรือยาวรีหลายขนาดจำนวนมากในไซโตพลาสซึม (Mt)

3. เม็ดเลือดขาว (Leukocyte)

เม็ดเลือดขาวในเต่าบัวแบ่งออกเป็น 5 ชนิด คือ เม็ดเลือดขาวชนิด เฮเทอโรฟิล (Heterophil) อีโอสิโนฟิล (eosinophil) เบโซฟิล (basophil) ลิมโฟไซต์ (lymphocyte) และโมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิล (monocytic-like arurophil)

เม็ดเลือดขาวชนิดที่พบได้มากที่สุดคือ เฮเทอโรฟิล รองลงมาคือ อีโอสิโนฟิล เบโซฟิล ลิมโฟไซต์ และโมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิล จากมากไปน้อยตามลำดับ โดยในเต่าบัวเพศผู้และเพศเมีย (n=20) มีค่าเม็ดเลือดขาวเกือบทุกชนิดไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ยกเว้นเม็ดเลือดขาวชนิด โมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิล ในเต่าบัวตัวเต็มวัยเพศผู้ ($1.55\pm0.99x10^3$ /µl) ที่มีค่ามากกว่าเพศเมีย (0.90 ± 10^3 /µl) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 4.4)

เส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเลือดขาวที่ทำการวัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง มีค่าดังตารางที่ 4.1 โดยเม็ดเลือดขาวทุกชนิดในเต่าบัวเพศผู้และเพศเมียไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ก. เฮเทอโรฟิล (Heterophil)

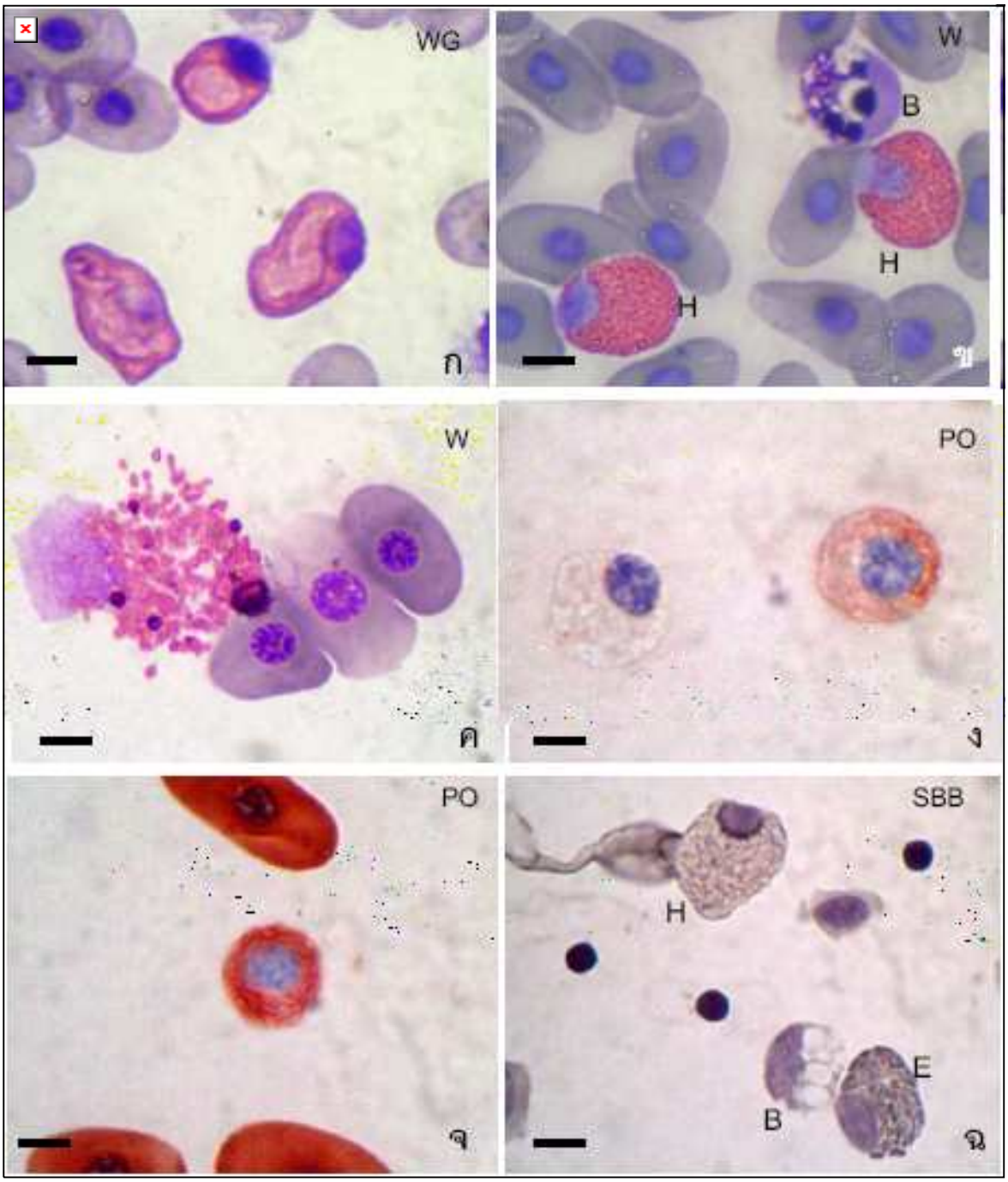
เฮเทอโรฟิลของเต่าบัวมีขนาดเซลล์ใกล้เคียงหรือเล็กกว่าเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ซึ่งเป็นเม็ดเลือดขาวที่มีขนาดใหญ่ที่สุด เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์โดยรวม (n=40) เท่ากับ 13.66 ± 1.73 ไมครอน โดยในเต่าบัวเพศผู้และเพศเมียไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติ ($p>0.05$) โดยในเต่าเพศผู้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 13.75 ± 1.80 ไมครอน (n=20) ซึ่งเป็นเม็ดเลือดที่มีขนาดค่อนข้างสม่ำเสมอ แต่รูปร่างอาจมีได้หลายแบบ แกรนูลเป็นแท่ง สั้นป้อม (fusiform cytoplasmic granules)

เมื่อย้อมด้วยสี Wright's Giemsa แกรนูลของเฮเทอโรฟิลจะติดแดง แต่ไม่เห็นรูปร่างของแกรนูลที่ชัดเจนและมักมีรอยจมลงของไซโตพลาสซึม เมื่อย้อมด้วยสี Wright's stain แกรนูลจะติดสีส้มเห็นเป็นรูปร่างเป็นแท่งอัดดันแน่นในไซโตพลาสซึม นิวเคลียสเอียงอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (eccentric) (รูปที่ 4.10 ก-ข) เฮเทอโรฟิลส่วนใหญ่นิวเคลียสไม่เป็นพู เซลล์ที่มีนิวเคลียสสองพูพบได้บ้าง เมื่อย้อมด้วยสี Diff-Quick แกรนูลของเฮเทอโรฟิลจะไม่ติดสี เห็นเพียงขอบเขตของเซลล์เป็นสีเทา สามารถพบเฮเทอโรฟิลที่แตกต่างได้ปานกลาง เซลล์ที่แตกนี้จะทำให้เห็นลักษณะแท่งของแกรนูลได้ชัดเจน (รูปที่ 4.10 ค) เฮเทอโรฟิลให้ปฏิกิริยาติดสีไซโตเคมี (ตารางที่ 4.2) โดยพบการติดสีของเอนไซม์ดังนี้

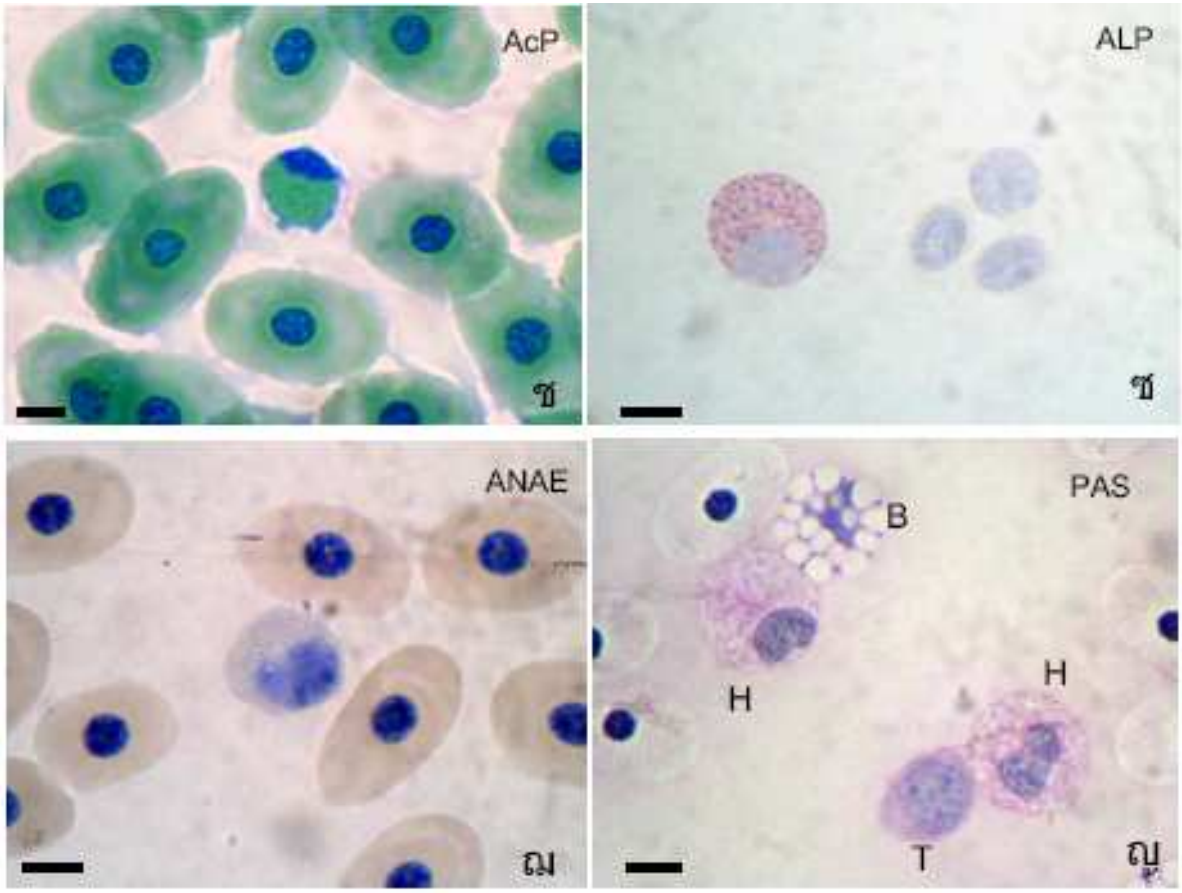
- เมื่อย้อมด้วยสี PO พบแกรนูลติดสีหลากหลาย ตั้งแต่สีแดงเข้ม ติดสีจาง จนถึงไม่ติดสี (รูปที่4.10 ง-จ)
- เมื่อย้อมด้วย SBB ระหว่างแกรนูลติดสีดำจาง (รูปที่ 4.10 ฉ)
- เมื่อย้อมด้วย AcP ระหว่างแกรนูลติดสีน้ำตาลแดง (รูปที่ 4.10 ช)
- เมื่อย้อมด้วยสี ALP ระหว่างแกรนูลติดสีแดง (รูปที่ 4.10 ซ)
- เมื่อย้อมด้วย ANAE ระหว่างแกรนูลติดสีดำ (รูปที่ 4.10 ฌ)
- เมื่อย้อมด้วย PAS ระหว่างแกรนูลติดสีติดสีชมพูจาง (รูปที่ 4.10 ญ)
- เมื่อย้อมด้วย NMB และ TB เซลล์ไม่ติดสี

จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเฮเทอโรฟิลมีขนาดใหญ่ มีแกรนูลจำนวนมาก ขนาดและรูปร่างหลากหลายเป็นรอยนูนออกมาที่ผิวเซลล์ โดยบางเซลล์อาจมีผิวตึงทำให้เห็นแกรนูลได้ชัดเจน (รูปที่ 4.11) แต่ส่วนใหญ่อาจมีผิวเซลล์มาก ทำให้แยกได้ไม่ชัดเจน

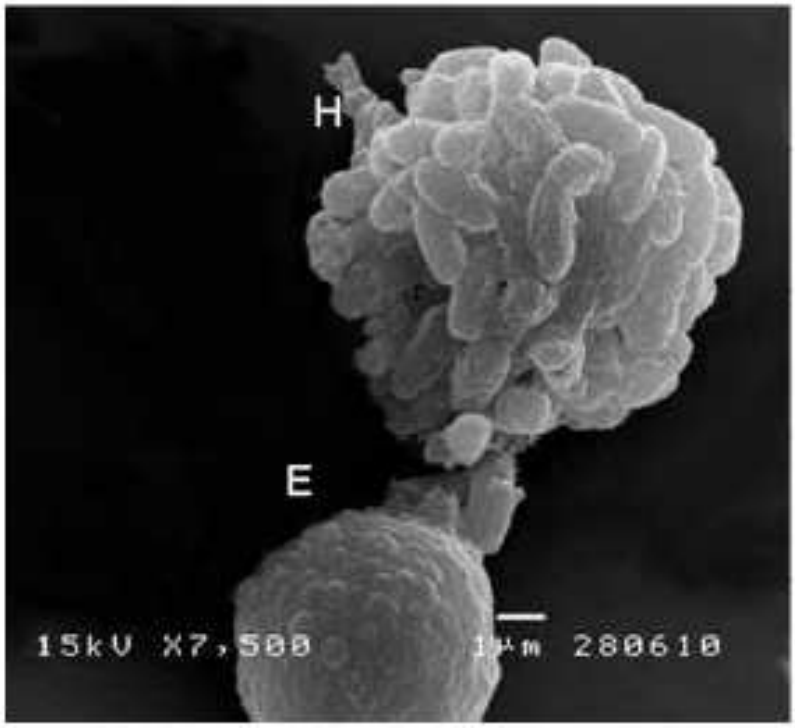
จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน เฮเทอโรฟิลมีแกรนูลจำนวนมาก ขนาดค่อนข้างใหญ่ มีรูปร่างหลายแบบ แต่โดยส่วยใหญ่เป็นรูปแท่งกระสวย ติดสีอิเล็กตรอนเข้มทึบและความเข้มของสีแตกต่างกันไป (variable electron density) โดยแกรนูลที่วงในมีความเข้มมากกว่าบริเวณขอบด้านนอก และติดสีไม่เนียนเรียบ (non homogeneous electron density) นิวเคลียสประกอบด้วย euchromatin ติดสีจางของอิเล็กตรอน มีไรโบโซมที่มีขนาดเล็กติดสีจางเนียนเรียบกว่าแกรนูลในไซโตพลาสซึม ไม่พบแวควิโอล (รูปที่ 4.12 ก-ข)



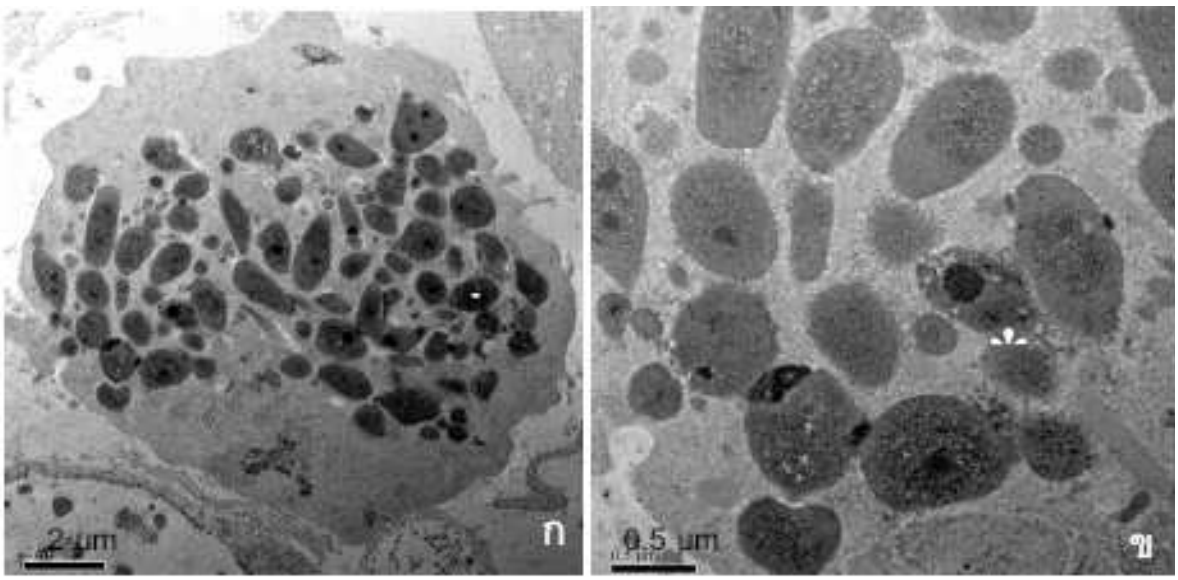
รูปที่ 4.10 เฮเทอโรฟิลในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ก) รูปร่างหลากหลาย มักมีรอยจมลงของไซโตพลาสซึม และเห็นขอบขอเซลล์หนาชัดเจน แต่ทำให้เห็นแกรนูลไม่ชัดเจนเท่าเม็ดเลือดขาวชนิดอีสิโนฟิล WG ข) แกรนูลติดสีส้มสวางอัดกันแน่นไซโตพลาสซึม เมื่อย้อมด้วยสี Wright's Stain ค) เฮเทอโรฟิลที่แตกต่างทำให้เห็นลักษณะแท่งของแกรนูลไดชัดเจน ง-จ จ) ปฏิกิริยาไซโตเคมีของแกรนูลให้ทั้งผลบวกและผลลบต่อสี PO ฉ) ผลบวกต่อ SBB เป็นสีน้ำตาลระหว่างแกรนูล (H) เปรียบเทียบกับอีโอสิโนฟิลที่ติดสีเข้มในแกรนูล (E) H = เฮเทอโรฟิล E = อีโอสีโนฟิล B = เบโซฟิล. Bar = 5 μm



รูปที่ 4.10 **(ต่อ)** เฮเทอโรฟิลในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (ต่อ) ช) ผลบวกเล็กน้อยต่อสี AcP เป็นสีน้ำตาลแดงที่ระหว่างแกรนูล ซ) ผลบวกต่อสี ALP แดงชัดเจนในระหว่างแกรนูล ฌ) ผลวกต่อสี ANAE เป็นสีน้ำตาลระหว่างแกรนูล ญ) ผลบวกต่อ PAS ที่ระหว่างแกรนูล H = เฮเทอโรฟิล B =เบโซฟิล Bar = 5 µm



รูปที่ 4.11 เฮเทอโรฟิลในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เฮเทอโรฟิล (H) มีขนาดใหญ่ มีแกรนูลจำนวนมาก รูปร่างและขนาดหลากหลายเป็นรอยนูนออกมาที่ผิวเซลล์ ติดกับอีโอสิโนฟิล (E)



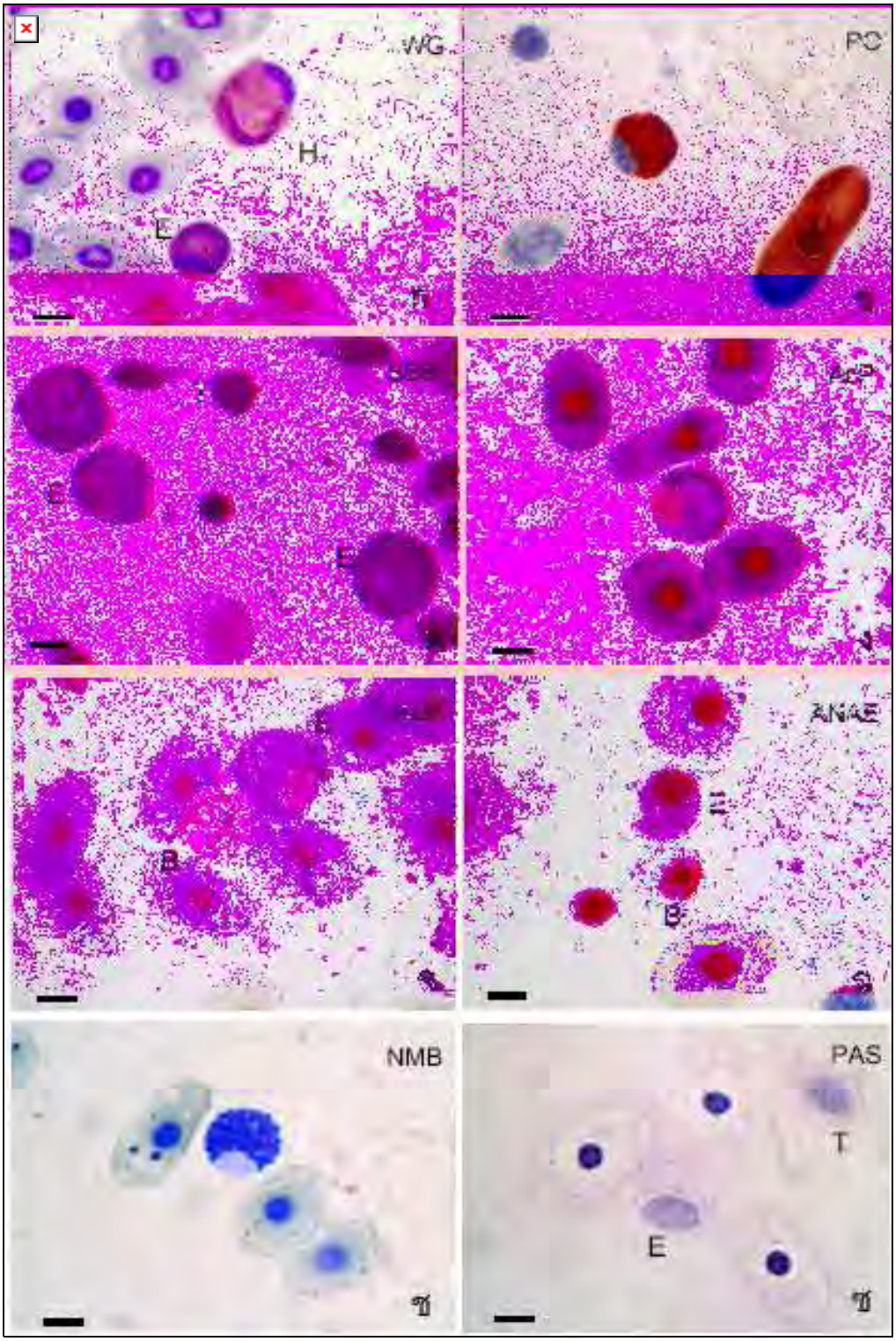
รูปที่ 4.12 เฮเทอโรฟิลในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ก) แกรนูลขนาดค่อนข้างใหญ่ มีรูปร่างหลายแบบ แต่โดยส่วนใหญ่เป็นรูปแท่งกระสวย มีลักษณะอิเล็กตรอนเข้มทึบ นิวเคลียสประกอบด้วย euchromatin ที่ติดสีจางของอิเล็กตรอน ไม่พบแวควิโอล และพบไมโครวิไลเล็กๆยื่นออกจากขอบไซโตพลาสซึม ข) แกรนูลที่วงในมีความเข้มมากกว่าบริเวณขอบด้านนอก และติดสีไม่เนียนเรียบ บางแกรนูลมีลักษณะทึบเป็นก้อนยาว (dense core (*)) ในไซโตพลาสซึม

ข. อีโอสิโนฟิล (Eosinophil)

อีโอสิโนฟิลในเต่าบัวเป็นเม็ดเลือดขาวที่พบได้มากเป็นอันดับสองรองจากเฮเทอโรฟิล เซลล์มีรูปร่างค่อนข้างกลมสม่ำเสมอ แต่มีหลากหลายขนาด ตั้งแต่ 9-13 ไมครอน โดยทั่วไปมีขนาดเล็กกว่าเฮเทอโรฟิล และโมโนไซต์ แต่มีขนาดใหญ่กว่าเบโซฟิล และ ลิมโฟไซต์ เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์โดยรวม (n=40) เท่ากับ 10.61 $\pm$ 1.22 ไมครอน โดยในเต่าบัวเพศผู้และเพศเมียไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในเต่าบัวเพศผู้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอีโอสิโนฟิลเท่ากับ 10.65 $\pm$ 1.09 ไมครอน (n=20) และเต่าเพศเมียมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 10.30 + 1.53 ไมครอน (n=20) ดังตารางที่ 4.1 โดยแกรนูลของอีโอสิโนฟิลมีลักษณะกลม อัดแน่นอยู่ภายในไซโตพลาสซึม เมื่อย้อมด้วยสี Wright's Giemsa แกรนูลจะติดสีม่วงน้ำเงิน (basophilic) มากกว่าแกรนูลของเฮเทอโรฟิลที่แกรนูลออกสีส้ม (รูปที่ 4.13 ก) แต่เมื่อยอมด้วยสี Diff-Quick แกรนูลจะติดสีแดงส้ม (eosinopilic) นิวเคลียสกลมอยู่เอียงด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (รูปที่ 4.13 ข) อีโอสิโนฟิลให้ปฏิกิริยาติดสีไซโตเคมี (ตารางที่ 4.2) โดยพบการติดสีของเอนไซม์ดังนี้

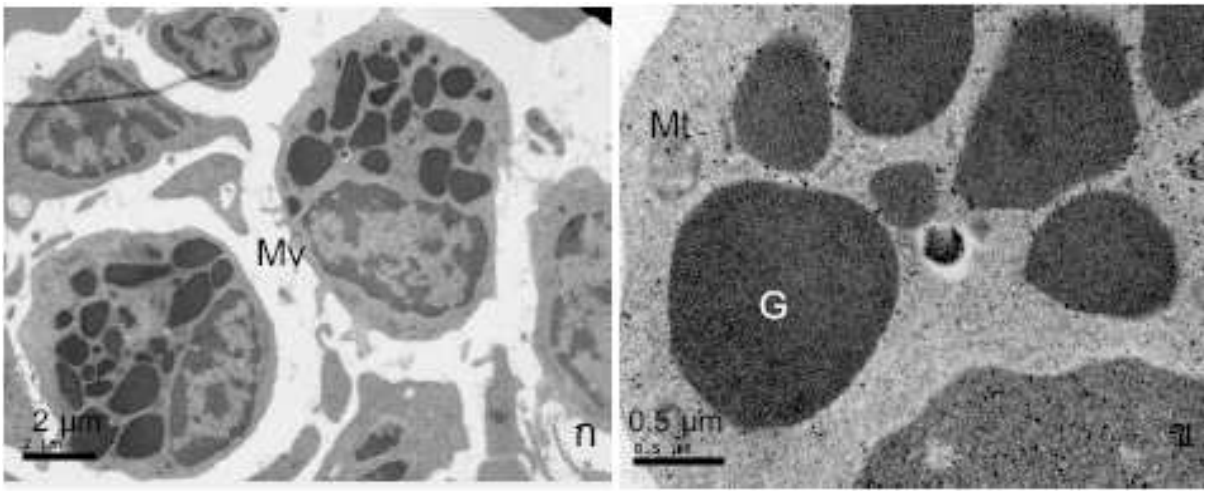
- เมื่อย้อมด้วยสี PO พบแกรนูลติดสีแดงเข้ม (รูปที่ 4.13 ค)
- เมื่อย้อมด้วย SBB เซลล์ติดสีน้ำตาลดำที่ตำแหน่งของแกรนูลอย่างชัดเจน (รูปที่ 4.13 ง)
- เมื่อย้อมด้วย AcP เซลล์ติดสีน้ำตาลเข้มที่แกรนูลบางตำแหน่ง (รูปที่ 4.13 จ)
- เมื่อย้อมด้วย ALP เซลล์ติดสีแดงที่ตำแหน่งระหว่างแกรนูล (รูปที่ 4.13 ฉ)
- เมื่อย้อมด้วย ANAE ติดสีน้ำตาลจางที่แกรนูลสม่ำเสมอทั่วทั้งเซลล์ (รูปที่ 4.13 ช)
- เมื่อย้อมด้วยสี NMB แกรนูลติดสีฟ้าเข้มชัดเจน (รูปที่ 4.13 ซ)
- เมื่อย้อมด้วยสี PAS เซลล์ติดสีชมพูอ่อนระหว่างแกรนูล (รูปที่ 4.13 ฌ) และ TB เซลล์ไม่ติดสี

จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด อีโอสิโนฟิลเป็นเซลล์กลม มีรอยนูนของแกรนูลออกมาที่ผิวเซลล์ที่เล็กและตื้น อาจพบตุ่มยื่นออกมาของแกรนูลที่ผิวเซลล์ได้บ้าง (bulging out of the granule contour) (รูปที่ 4.14) จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน อีโอสิโนฟิลมีแกรนูลจำนวนน้อยกว่าในเฮเทอโรฟิล ขนาดแกรนูลใหญ่ มีรูปร่างค่อนข้างกลม ติดสีอิเล็กตรอนเข้มทึบกว่าแกรนูลของเฮเทอโรฟิล และติดสีเสมอกันในทุกแกรนูล (homogeneous population of electron density) นิวเคลียสประกอบด้วย heterochromatin ที่ติดสีเข้มของอิเล็กตรอน มีไมโครวิไลเล็กๆยื่นออกจากขอบ ไซโตพลาสซึม มีไรโบโซมที่มีขนาดเล็กจำนวนน้อยและพบการแทรกของโตรคอนเดรีย ไม่พบแวควิโอล (รูปที่ 4.15 ก-ข)



รูปที่ 4.13 อีโอสิโนฟิล (E) ในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ก) แกรนูลมีลักษณะกลม อัดแน่นอยู่ภายในไซโตพลาสซึม ติดสีม่วงน้ำเงินกว่าเฮเทอโรฟิล (H) ข) ปฏิกิริยาไซโตเคมีของแกรนูลให้ผลบวกต่อสี PO ชัดเจน ค) ผลบวกต่อ SBB ในแกรนูล ง) ผลบวกชัดเจนต่อสี AcP เข้มบางบริเวณแกรนูล จ) ผลบวกต่อสี ALP ชัดเจนระหว่างแกรนูล ฉ) ผลบวกต่อสี ANAE ที่แกรนูลสม่ำเสมอทั่วทั้งเซลล์และ ช) ผลบวกต่อ NMB ที่แกรนูลชัดเจน ซ) ผลลบต่อสี PAS B= เบโซฟิล T= ธรอมโบไซต์. Bar= 5 µm

รูปที่ 4.14 อีโอสิโนฟิลในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด อีโอสิโนฟิล (E) เป็นเซลล์กลม มีรอยนูนของแกรนูลออกมาที่ผิวเซลล์ที่เล็กและตื้น อาจพบตุ่มยื่นออกมาของแกรนูลที่ผิวเซลล์ R= เม็ดเลือดแดง



รูปที่ 4.15 อีโอสิโนฟิลในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ก) มีแกรนูลจำนวนน้อย ขนาดแกรนูลใหญ่ มีรูปร่างค่อนข้างกลม นิวเคลียสประกอบด้วย heterochromatin ที่ติดสีเข้มของอิเล็กตรอน ไม่พบแวควิโอล มีไมโครวิไลเล็กๆยื่นออกจากขอบไซโตพลาสซึม (Mv) ข) แกรนูลติดสีอิเล็กตรอนเข้มทึบเสมอกัน (G) และไมโตรคอนเดรีย (Mt) ในไซโตพลาสซึม

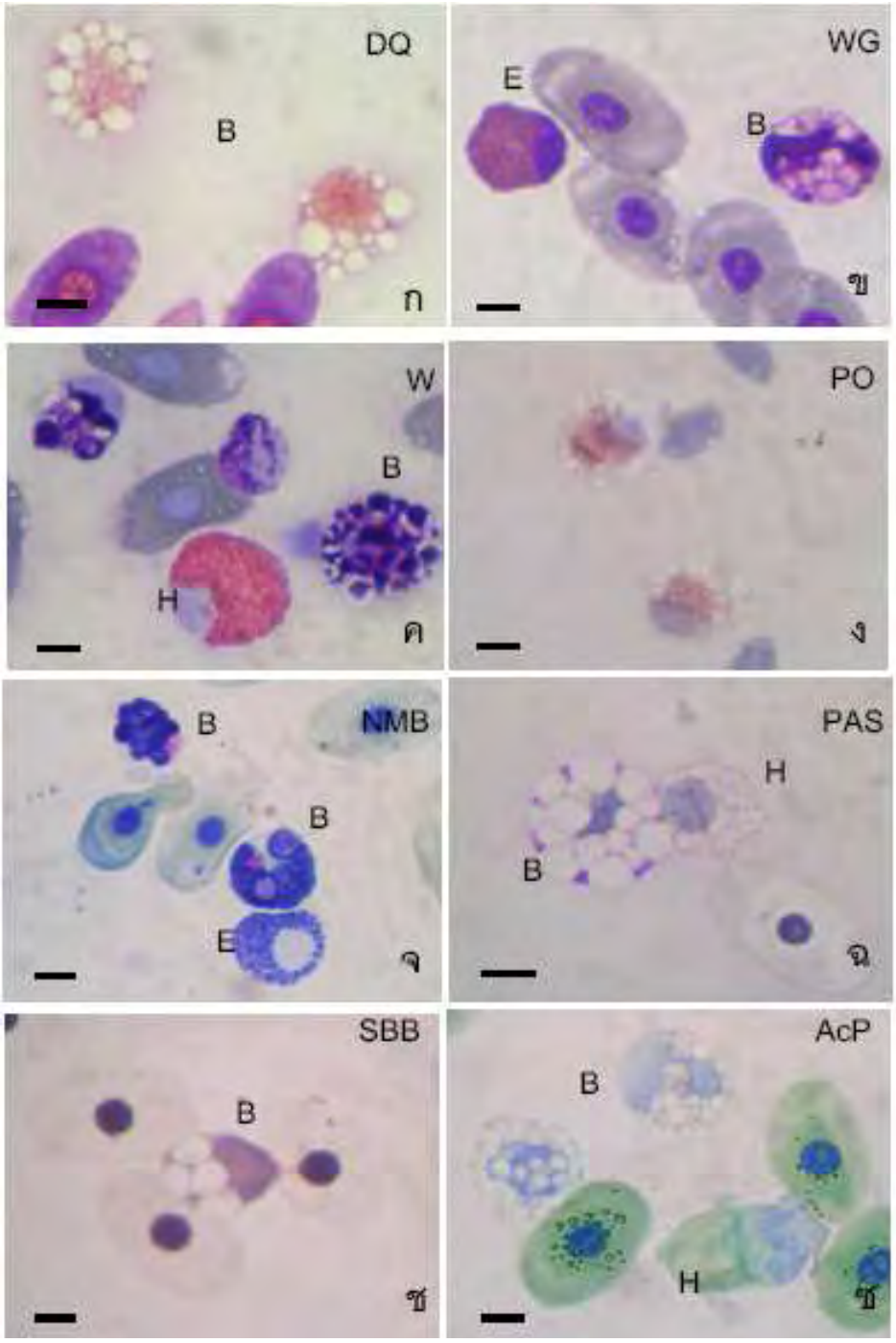
ค. เบโซฟิล (basophil)

เบโซฟิลในเต่าบัวเป็นเม็ดเลือดที่มีจำนวนมากเป็นอันดับสามของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด มีขนาดหลากหลายขึ้นกับขนาดและจำนวนของแกรนูล เซลล์ค่อนข้างกลม เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์เบโซฟิลโดยรวม (n= 40) เท่ากับ 12.87 $\pm$ 6.2 ไมครอน โดยในเต่าบัวเพศผู้และเพศเมียไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยในเต่าเพศผู้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 12.56 + 4.8 ไมครอน (n=20) (ตารางที่ 4.1)

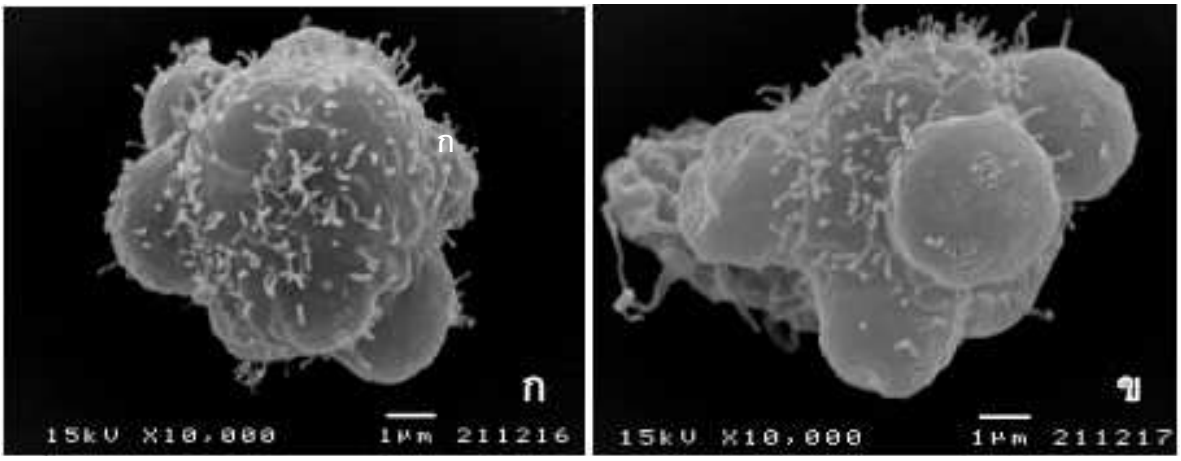
เบโซฟิลแกรนูลมีลักษณะและการติดสีที่แตกต่างกันไปตามสีที่ย้อม โดยหากย้อมย้อมด้วยสี Diff-Quick แกรนูลและนิวเคลียสจะไม่ติดสี เซลล์มีลักษณะเป็นสีฟ้าเทา แกรนูลคล้ายแวคคูโอลขนาดใหญ่ (รูปที่ 4.16 ก) เมื่อย้อมด้วยสี Wright's Giemsa นิวเคลียสจะติดสีม่วงแดง แกรนูลไม่ติดสี (รูปที่ 4.16 ข) แต่เมื่อย้อมด้วยสี Wright's แกรนูลจะติดสีตรงกลางช่องว่างเป็นสีน้ำเงินข้มจนถึงม่วงดำ นิวเคลียสไม่ติดสี (รูปที่ 4.16 ค) นิวเคลียสมักถูกบังคับด้วยแกรนูลทำให้ไม่เห็นรูปร่างที่ชัดเจน เบโซฟิลให้ปฏิกิริยาติดสีไซโตเคมี (ตารางที่ 4.2) โดยพบการติดสีของเอนไซม์ดังนี้

- เมื่อย้อมด้วยสี PO พบติดสีแดงจางระหว่างแกรนูล บริเวณกลางเซลล์เป็นส่วนใหญ่ (รูปที่ 4.16ง) บางเซลล์ไม่ติดสีเลย
- เมื่อย้อมด้วย NMB แกรนูลติดสีฟ้าสด ถึงน้ำเงินเข้ม โดยในทุกเซลล์จะมีแกรนูลสีชมพูแดงใต้แกรนูลสีฟ้า นิวเคลียสย้อมไม่ติดสี (รูปที่ 4.16 จ)
- เมื่อย้อมด้วย PAS ระหว่างแกรนูลติดสีม่วงเข้มชัดเจน (รูปที่ 4.16 ฉ)
- เมื่อย้อมด้วย SBB, ANAE (รูปที่ 4.16 ช-ซ), AcP, ALP และ TB เซลล์ไม่ติดสี

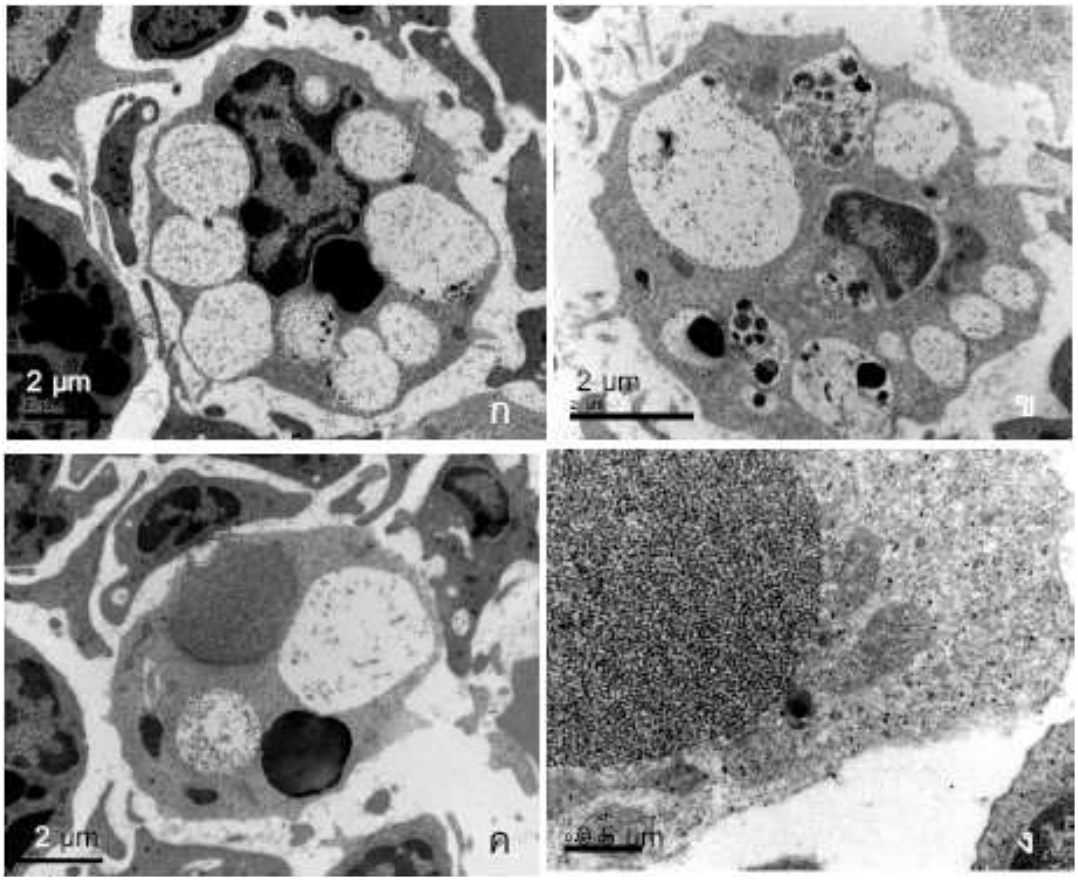
จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เบโซฟิลมีรูปร่างหลากหลาย มีลักษณะจำนวนจำเพาะที่ผิวเซลล์มีการโป่งออกของแกรนูลทรงกลมขนาดใหญ่มากกว่าในอีโอสิโนฟิล จนทำให้รูปร่างของเซลล์ไม่เป็นทรงกลมและมีไมโครวิลไลเป็นติ่งที่เล็ก ยื่นออกมาจากผิวเซลล์เป็นจำวนมาก (รูปที่ 4.17 ก-ข) จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน เบโซฟิลมีรูปร่างหลากหลายและขนาดแตกต่างกันไป มีลักษณะจำนวนจำเพาะที่ในหนึ่งเซลล์จะประกอบไปด้วยแวคูลโอลขนาดใหญ่ ซึ่งบางแวคูลโอลจะบรรจุแกรนูลสีเข้มทึบอยู่ภายใน นิวเคลียสติดสีเข้มของheterochromatin เป็นส่วนใหญ่ ในหนึ่งเซลล์จะมีอะซูโรฟิลลิกแกรนูล (azurophilic granule) และมี fine lamellar granule ขนาดใหญ่ มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 ใน 3 ถึงครึ่งหนึ่งของเซลล์ เซลล์ประกอบด้วยไมโตคอนเดรียขนาดใหญ่จำนวนมาก (รูปที่ 4.18 ก-ง)



รูปที่ 4.16 เบโซฟิล (B) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ก) ย้อมด้วย Diff-Quick เซลล์มีลักษณะเป็นสีฟ้าเทาไม่ติดสี ข) ย้อมด้วย Wright's Giemsa นิวเคลียสจะติดสีม่วงแดง แกรนูลไม่ติดสี ค) ย้อมด้วย Wright's แกรนูลจะติดสีตรงกลางช่องว่างเป็นสีม่วงดำ นิวเคลียสไม่ติดสี ง) ปฏิกิริยาไซโตเคมีของแกรนูลให้ผลบวกต่อสี PO พบติดสีแดงจาง ใต้แกรนูลบริเวณกลางเซลล์ จ) ผลบวกต่อสี NMB แกรนูลติดสีฟ้าสดถึงน้ำเงินเข้ม โดยในทุกเซลล์จะมีแกรนูลสีชมพูแดงทุกเซลล์ นิวเคลียสย้อมไม่ติดสี ฉ) ผลบวกต่อสี PAS ช่องว่างระหว่างแกรนูลติดสีม่วงเข้มชัดเจน ช) ผลลบต่อสี SBB ซ) และ AcP ตามลำดับ H= เฮเทอโรฟิล E= อีโอสิโนฟิล Bar= 5 µm



รูปที่ 4.17 เบโซฟิลในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศอิเล็กตรอนแบบส่องกราด ก) ผิวเซลล์ขรุขระมีการโป่งออกจากแกรนูลทรงกลมขนาดใหญ่มากกว่าและมีไมโครวิลไลเป็นติ่งที่เล็ก ยื่นออกมาจากผิวเซลล์จำนวนมาก ข) เซลล์มีรูปร่างหลากหลาย มีการยื่นออกมาของแกรนูลจากเยื่อหุ้มเซลล์



รูปที่ 4.18 เบโซฟิลในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ก) เซลล์ประกอบไปด้วยแวคูลโอลขนาดใหญ่ นิวเคลียสติดสีเข้มของ heterochromatin และอะซูโรฟิลลิกแกรนูลติดสีเข้ม ข) ช่องว่างภายในเซลล์บรรจุแกรนูล ลักษณะหลากหลายหรือ phagocytic vacuole ภายใน ค) ภาพตัดผ่าเซลล์เห็นแวคูลโอลขนาดใหญ่ fine lamellar granule และอะซูโรฟิลลิกแกรนูล ง) ภาพขยายส่วนของ fine lamellar granule ที่เป็นชั้นๆภายในไซโตพลาสซึมมีไมโตคอนเดรียจำนวนมาก

ง. ลิมโฟไซต์ (Lymphocyte)

ลิมโฟไซต์ในเต่าบัว เป็นเม็ดเลือดขาวชนิดไม่มีแกรนูล เป็นเม็ดเลือดขาวที่พบได้มากเป็นอันดับที่สี่รองจาก เฮเทอโรฟิล แลพอีโอสิโนฟิล เซลล์มีรูปร่างค่อนข้างกลม แต่มีหลากหลายขนาด ตั้งแต่ 5.5-8 ไมครอน ส่วนใหญ่เป็นลิมโฟไซต์ขนาดไม่เกิน 7 ไมครอน เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ลิมโฟไซต์โดยรวม (n=40) เท่ากับ 6.41±0.61 ไมครอน โดยในเต่าบัวเพศผู้และเพศเมียไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยในเต่าเพศผู้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลิมโฟไซตเท่ากับ 6.66±0.66 ไมครอน (n=20) และเต่าเพศเมียมีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6.28±0.57 ไมครอน (n=20) ดังตารางที่ 4.1

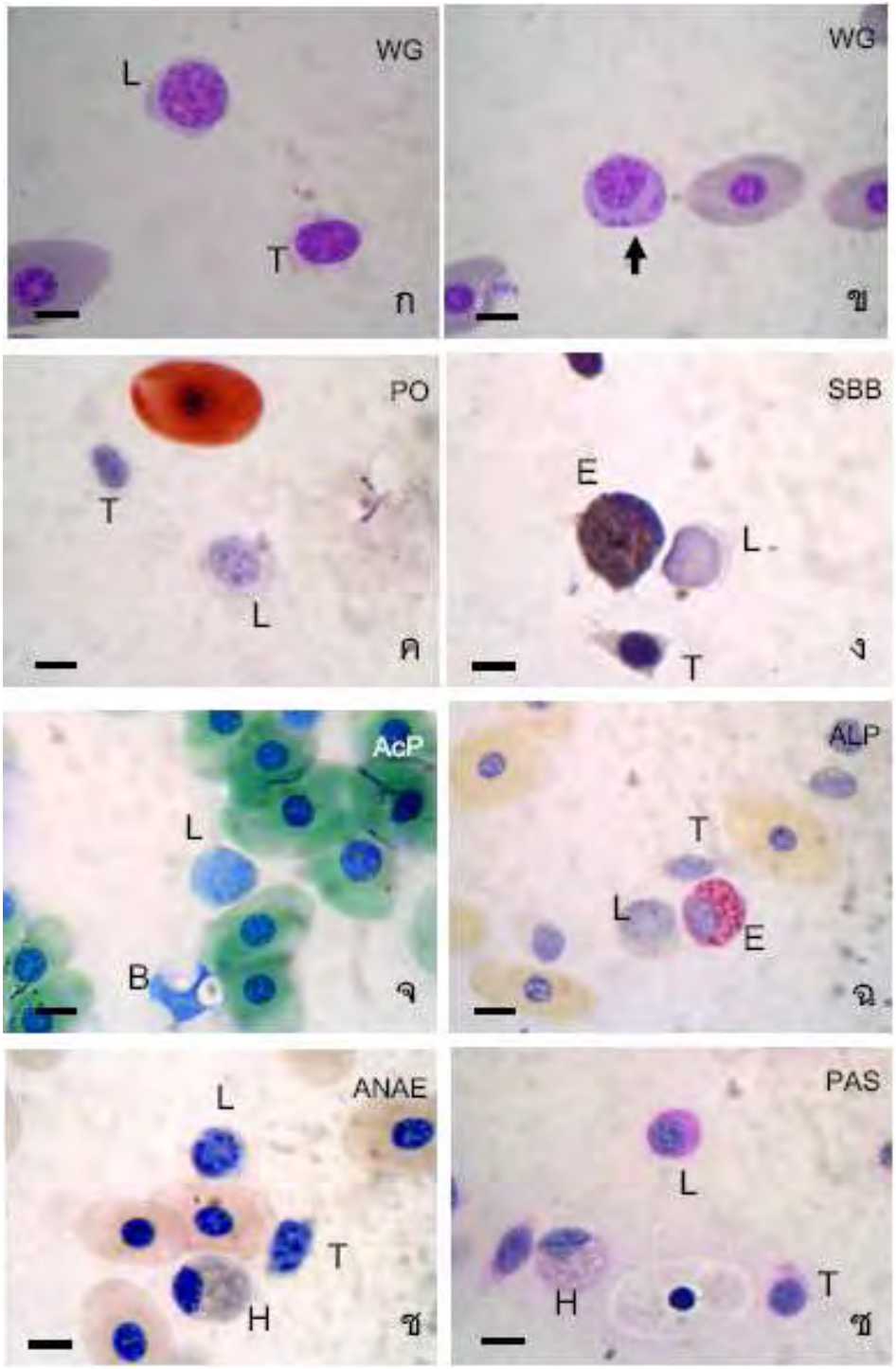
ลิมโฟไซต์มีนิวเคลียสกลมใหญ่ เกือบเต็มไซโตพลาสซึม ติดอยู่กับขอบเซลล์ด้านใดด้านหนึ่ง ไซโตพลาสซึมติดสีฟ้าจาง หรือน้ำเงินอ่อนในบางเซลล์ มีลักษณะคล้ายธรอมโบไซต์ที่มีรูปร่างกลม โดยไซโตพลาสซึมของลิมโฟไซต์ทั่วไปจะติดสีฟ้าเข้มกว่า และสีไม่เนียนเรียบเท่าธรอมโบไซต์ นิวเคลียสติดสีเข้มของโครมาติน เห็นการเกาะกลุ่มของโครมาตินชัดเจน (chromatin clump) มีสัดส่วน N:C ratio สูง (รูปที่ 4.19 ก) นิวเคลียสของลิมโฟไซต์อาจมีขนาดใหญ่หรือเล็กกว่าธรอมโบไซต์ขึ้นกับขนาดของเซลล์ ในลิมโฟไซต์บางเซลล์ที่มีไซโตพลาสซึมจะติดสีเข้มขึ้นเล็กน้อย มักมีบริเวณที่อ่อนกว่าข้างนิวเคลียสซึ่งอาจจำแนกเป็น immunocyte ในลิมโฟไซต์บางเซลล์อาจพบอะซูโรฟิลลิกแกรนูล ขนาดเล็กที่ไม่ติดสีสม่ำเสมอรอบไซโตพลาสซึม หรือเป็น reactive lymphocyte (รูปที่ 4.19 ข) ซึ่งพบได้น้อยมาก และสามารถพบติ่งเล็กสั้นยื่นออกจากไซโตพลาสซึมได้

ลิมโฟไซต์ให้ปฏิกิริยาติดสีไซโตเคมี (ตารางที่ 4.2) โดยพบการติดสีของเอนไซม์ดังนี้

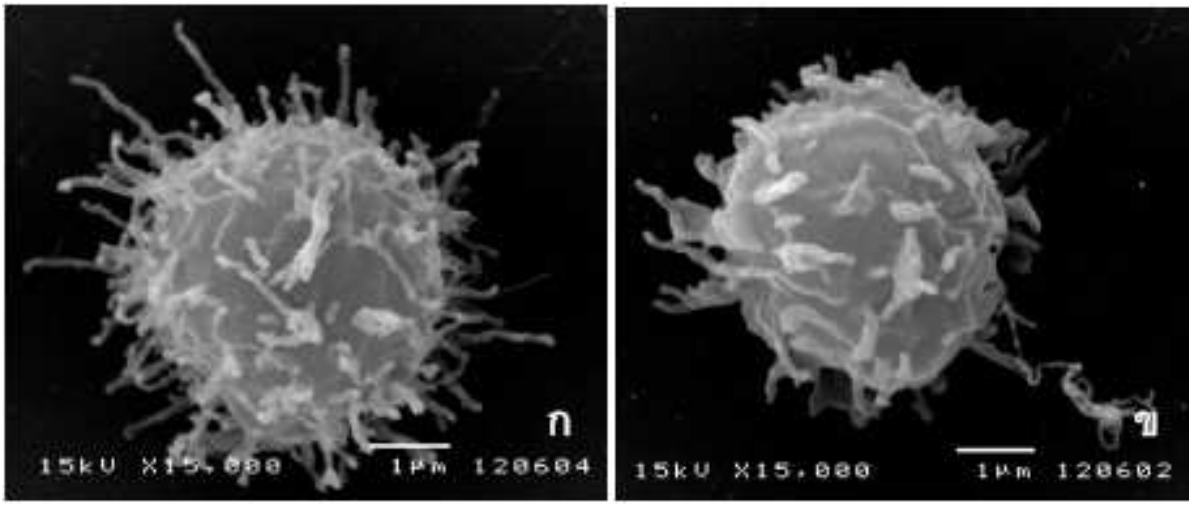
- เมื่อย้อมด้วยสี PO เซลล์ไม่ติดสี (รูปที่ 4.19 ค)
- เมื่อย้อมด้วย SBB เซลล์ไม่ติดสี (รูปที่ 4.19 ง)
- เมื่อย้อมด้วย AcP เซลล์ติดสีน้ำตาลจางที่รอบนิวเคลียสบางตำแหน่ง (รูปที่ 4.19 จ)
- เมื่อย้อมด้วยสี ALP เซลล์ไม่ติดสี (รูปที่ 4.19 ฉ)
- เมื่อย้อมด้วย ANAE บางเซลล์ ติดสีน้ำตาลจางเป็นจุดใหญ่ (large focal dot) ที่บางตำแหน่งในไซโตพลาสซึม (รูปที่ 4.19 ช)
- เมื่อย้อมด้วยสี PAS ติดสีชมพูชัดเจนทั่วทั้งไซโตพลาสซึม บางเซลล์ติดสีที่ตำแหน่งของขอบไซโตพลาสซึม (รูปที่ 4.19 ซ)
- เมื่อย้อมด้วยสี NMB และ TB เซลล์ไม่ติดสี

จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ลิมโฟไซต์ที่มีขนาดเล็กที่สุดเป็นเซลล์กลม มีผิวเซลล์ค่อนข้างขรุขระ พบมี 2 ลักษณะ คือคล้าย ไมโครวิลไลเป็นติ่งเล็กๆยื่นออกมาจากผิวเซลล์จำนวนมาก (รูปที่ 4.20 ก) และเป็นส่วนยื่นที่ใหญ่กว่าไมโครวิลไลที่ผิวเซลล์ (cell membrance blebs) (รูปที่ 4.20 ข) โดยที่เซลล์มีขนาดใกล้เคียงกัน

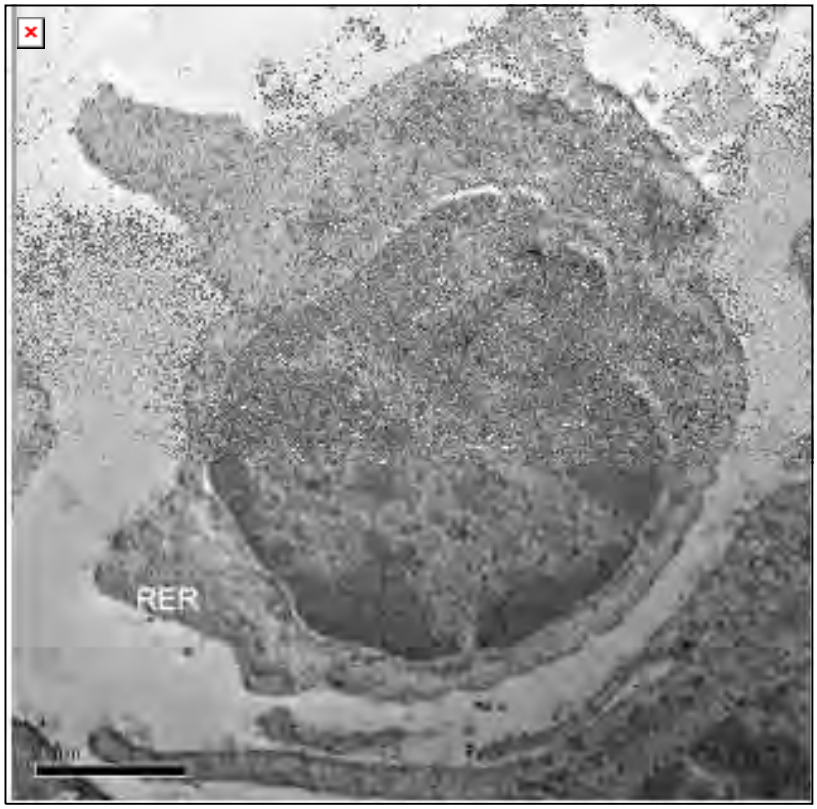
จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ลิมโฟไซต์มีไซโตพลาสซึมน้อย ไม่พบแกรนูล ขอบเซลล์ไม่เรียบ มักพบส่วนยื่นออกไปจากเซลล์ มีไมโตคอนเดรียขนาดใหญ่จำนวนมาก พบเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมชนิดหยาบ (RER) และไรโบโซมอิสระ (ribosome) ภายในนิวเคลียสค่อนข้างกลม มี heterochromatin มากชัดเจนอยู่ที่ขอบนิวเคลียส (รูปที่ 4.21)



รูปที่ 4.19 ลิมโฟไซต์ในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ก) ลิมโฟไซต์ (L) มีนิวเคลียสกลมใหญ่ติดสีเข้มของ chromatin clump ไซโตพาสซึมติดสีฟ้า เปรียบเทียบกับธรอมโบไซต์ (T) ที่ไซโตพลาสซึมโปร่งแสงกว่า ข) ลิมโฟไซต์ที่มีอะซูโรฟิลลิกแกรนูล ค) ปฏิกิริยาไซโตเคมีของแกรนูลให้ผลลบต่อสี PO ง) ผลลบต่อสี SBB จ) ผลบวกต่อสี AcP เป็นสีน้ำตาลจางที่บางตำแหน่ง ฉ) ผลลบต่อสี ALP ช) ผลบวกต่อสี ANAE เป็นสีน้ำตาลจางเป็นจุดใหญ่คล้ายแกรนูลกลมที่บางตำแหน่ง (ลูกศร) ซ) ผลบวกต่อ PAS (L) ติดสีชมพูชัดเจนทั่วไซโตพลาสซึม. H= เฮเทอโรฟิล B= เบโซฟิล E=อีโอสิโนฟิล. Bar= 5 µm



รูปที่ 4.20 ลิมโฟไซต์ในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เซลล์มีขนาดประมาณ 3-4 ไมครอน มีผิวเซลล์ขรุขระ พบมี 2 ลักษณะ คือ ก) มีไมโครวิลไลเป็นติ่งเล็กยื่นออกมาจากผิวเซลล์จำนวนมาก ข) มีส่วนยื่นของผิวเซลล์ หรือ cell membrance blebs



รูปที่ 4.21 ลิมโฟไซต์ในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน ไซโตพลาสซึมน้อย ขอบเซลล์มีส่วนยื่นออกไป มีไมโตรคอนเดรีย (Mt) ขนาดใหญ่จำนวนมาก พบเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมชนิดหยาบ (RER) นิวเคลียสค่อนข้างกลม มี heterochromatin จำนวนมากชัดเจนอยู่ที่ขอบนิวเคลียส

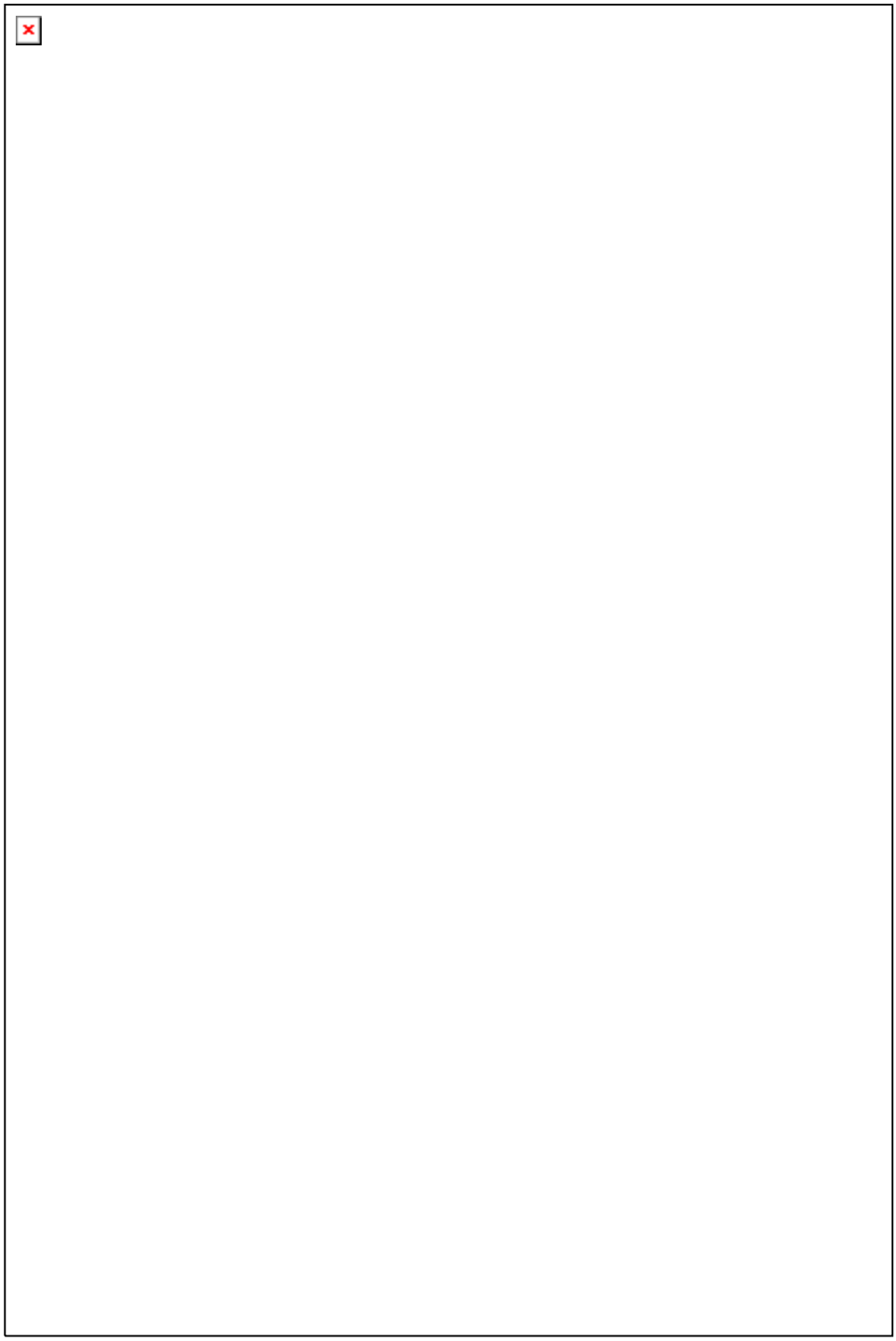
จ. โมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิล (Monocytic-like azurophil)

โมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิลในเต่าบัว เป็นเม็ดเลือดขาวในเต่าบัวที่พบได้น้อยที่สุด มีลักษณะรูปร่างเหมือนโมโนไซต์ แต่ติดสีม่วงแดงมากกว่าคล้ายอะซูโรฟิล มีขนาดใหญ่สุดในกลุ่มเม็ดเลือดขาวทั้งหมด มีขนาดและรูปร่างหลากหลาย โดยส่วนใหญ่เป็นทรงค่อนข้างกลม มีขนาดตั้งแต่ 10-17 ไมครอน บางเซลล์มีขนาดใกล้เคียง หรือ เล็กกว่าเฮเทอโรฟิลเล็กน้อย เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์โมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิล โดยรวม (n=40) เท่ากับ 14.32 $\pm$2.19 ไมครอน โดยในเต่าบัวเพศผู้และเพศเมียไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยในเต่าเพศผู้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิล เท่ากับ 13.88$\pm$2.06 ไมครอน (n=20) และเต่าเพศเมียมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 17.63$\pm$22.09 ไมครอน (n=20) ดังตารางที่ 4.1

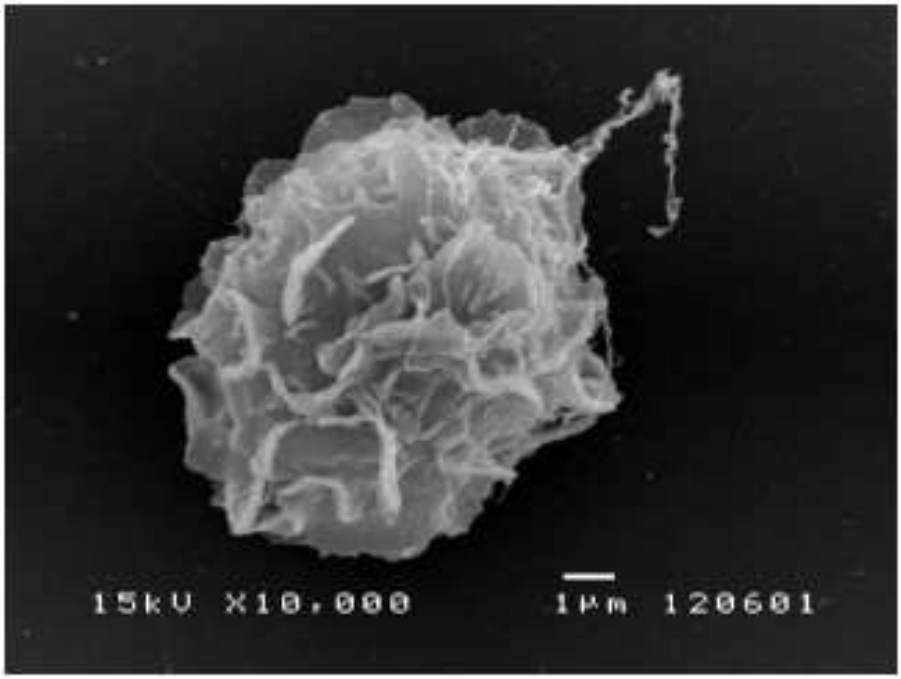
โมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิล ที่ย้อมด้วยสี Wright's Gimsa ไซโตพลาสซึมติดสีเทาปนม่วง (รูปที่ 4.22 ก) ส่วนการย้อมด้วย Wright's ไซโตพลาสซึมจะออกสีน้ำเงิน (basophilic) กว่า (รูปที่ 4.22 ข) โมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิล เป็นเซลล์ที่มีปริมาณไซโตพลาสซึมมาก มีแวคคูโอลเล็กละเอียดอยู่ภายใน ทำให้เห็นเนื้อไซโตพลาสซึมแบบไม่แน่น (foamy) ไม่เห็นแกรนูลจากกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง มักพบส่วนยื่นของเซลล์เป็นเท้าเทียมออกจากเซลล์ นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ รูปร่างหลากหลาย นิวเคลียสติดสีจางกว่าลิมโฟไซต์นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ติดอยู่ที่ขอบเซลล์ด้านใดด้านหนึ่งอาจมีรูปร่างกลม หรือเว้า (notched) บางครั้งเป็นรูปไต ภายในนิวเคลียสติดสีอ่อน โครมาตินเป็นร่างแห ไม่พบการเกาะกลุ่มของโครมาติน

โมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิล ให้ปฏิกิริยาติดสีไซโตเคมี (ตารางที่ 4.2) ต่อการย้อมด้วย AcP เท่านั้น โดยให้สีน้ำตาลจางเป็นปื้น ที่บางตำแหน่งของไซโตพลาสซึม (รูปที่ 4.22 ค) และให้ผลลบต่อการย้อมด้วย PO, SBB, ALP, ANAE, NMB, PAS และ TB (รูปที่ 4.22 ง-ซ)

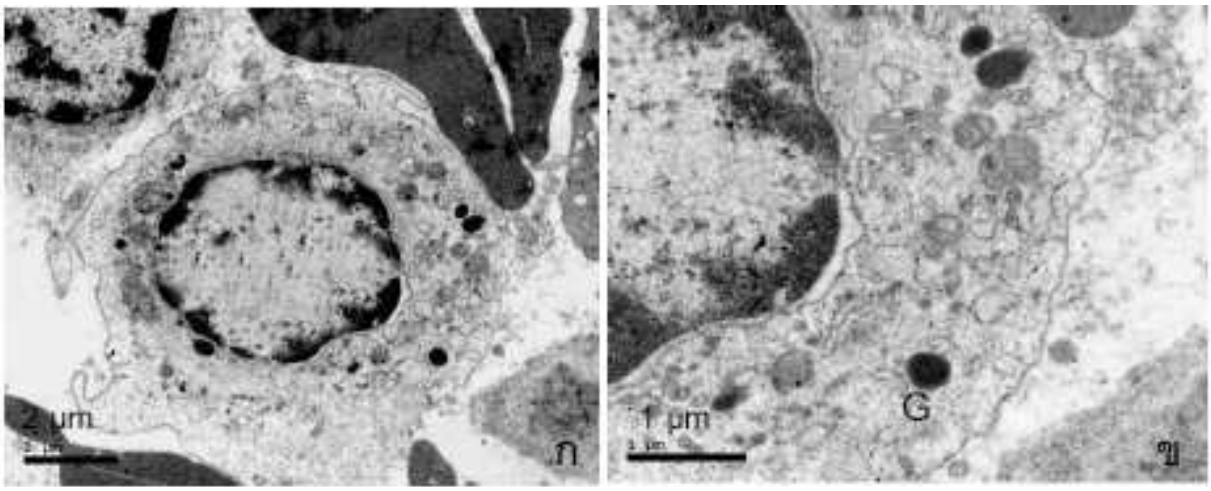
จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิลมีขนาดใหญ่ รูปร่างไม่แน่นอน มีรอยพับ หรือรอยเว้าของผิวเซลล์ลึกจำนวนมาก ทำให้เห็นตัวพื้นผิวเซลล์ไม่ชัดเจน (รูปที่ 4.23) จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน โมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิล มีขนาดใหญ่ รูปร่างค่อนข้างกลม ไซโตพลาสซึมมาก นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ อาจค่อนข้างกลมหรือเว้าเล็กน้อย ภายในนิวเคลียสประกอบด้วย heterochromatin ทึบแสงจำนวนน้อยเป็นหย่อมๆที่ขอบนิวเคลียส ภายในไซโตพลาสซึมมีเอนโดพลาสมิกเรทิคิวลัมชนิดหยาบ ไมโตคอนเดรียรูปร่างกลมมีอะซูโรฟิลลิกแกรนูลขนาดเล็กทึบแสงขนาด 0.3-0.4 ไมครอน และไลโซโซมจำนวนมาก อาจพบเซลล์ที่มีแวควิโอลขนาดใหญ่ และมีเท้าเทียม สั้นยาวแตกต่างกันไปหลายเซลล์ (รูปที่ 4.24 ก-ข)



รูปที่ 4.22 โมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิล (M) ในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ก) ไซโตพลาสซึมติดสีฟ้าเทาไซโตพลาสซึมแบบไม่แน่น (foamy) เมื่อย้อมด้วยสี WG ข) ไซโตพลาสซึมจะออกสีน้ำเงินเข้มเมื่อย้อมด้วยสี Wright's นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ติดอยู่ที่ขอบเซลล์ด้านใดด้านหนึ่ง ภายในติดสีอ่อน โครมาตินเป็นร่างแห ค) ปฏิกิริยาไซโตเคมีของแกรนูลให้ผลบวกต่อสี AcP เป็นสีน้ำตาลจางเป็นหย่อมไซโตพลาสซึมบางตำแหน่ง และให้ผลลบต่อสี ง) PO จ) SBB ฉ) ALP ช) ANAE และ ซ) PAS ตามลำดับ H= เฮเทอโรฟิล B= เบโซฟิล E= อีโอสิโนฟิล L= ลิมโฟไซต์ R= เม็ดเลือดแดง. Bar= 5 µm



รูปที่ 4.23 โมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิลในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด เซลล์มีขนาดใหญ่ มีส่วนยื่นป็นรอยพับเว้าของผิวเซลล์จำนวนมาก ทำให้เห็นตัวพื้นผิวเซลล์ไม่ชัดเจน



รูปที่ 4.24 โมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิลในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน ก) เซลล์มีขนาดใหญ่ ค่อนข้างกลม ไซโตพลาสซึมมากนิวเคลียสค่อนข้างกลมมีขนาดใหญ่ ภายในนิวเคลียสประกอบด้วย heterochromatin ทึบแสงจำนวนน้อย เป็นหย่อมๆ ที่ขอบนิวเคลียส ข) ภายในไซโตพลาสซึมมีเอน-โดพลาสมิกเรทิคิวลัมชนิดหยาบ ไมโตคอนเดรียรูปร่างกลม อะซูโรฟิลลิกแกรนูล (G) ขนาดเล็กทึบแสง และไลโซโซมจำนวนมาก

ตารางที่ 4.1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์เม็ดเลือดเป็นไมโครเมตร (mean ± SD) เปรียบเทียบในเต่าบัวโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย

เซลล์เม็ดเลือดแดง	n	รวม 2 เพศ	n	เต่าบัวเพศผู้	n	เต่าบัวเพศเมีย
เม็ดเลือดแดง : กว้าง*	20	10.01 ± 1.54	10	10.21 ± 1.40	10	9.55 ± 1.94
เม็ดเลือดแดง : ยาว*	20	15.81 ± 2.56	10	14.86 ± 2.33	10	16.25 ± 2.62
เฮเทอโรฟิล	40	13.66 ± 1.73	20	13.75 ± 1.80	20	13.60 ± 1.35
อีโอสิโนฟิล	40	10.61 ± 1.22	20	10.65 ± 1.09	20	10.30 ± 1.53
เบโซฟิล	40	12.87 ± 6.2	20	13.24 ± 6.6	20	12.56 ± 4.8
ลิมโฟไซต์	40	6.41 ± 0.61	20	6.66 ± 0.66	20	6.28 ± 0.57
โมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิล	40	14.32 ± 2.19	20	13.88 ± 2.06	20	14.63 ± 2.09

*วัดจากเซลล์เม็ดเลือดแดงภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

n= จำนวนเม็ดเลือดที่วัดขนาด

a,b ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

ตารางที่ 4.2 สีพื้นฐานที่ย้อมติดเซลล์ได้ดี และรูปแบบการติดสีปฏิกิริยาเคมีของเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดในเต่าบัวตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย

	Eryth *	Throm *	Het *	Eos *	Baso *	Lym *	Mo *
Basic stain	all	WG	W	WG	W	WG	WG
PO	+	-	+/-	+	+ inter	-	-
SBB	-	+	+ inter	+	-	-	-
AcP	-	-	+ inter	+	-	+	+
ALP	-	-	+ inter	+ inter	-	-	-
ANAE	-	-	+ inter	+	-	+	-
PAS	-	+	+ inter	+ inter	+ inter	+	-
TB	-	-	-	-	-	-	-
NMB	-	-	-	+	+	-	-

* Inter = intergranular, Eryth = erythrocyte, Throm = thrombocyte, Het = heterophil,

Eos = Eosinophil, Baso = basophile, Lym = lymphocyte, MO =monocytic-like azurophillic,

WG = Wright's Giemsa, W= Wright's, DQ = diff quick

4.2 ค่าโลหิตวิทยาและเคมีโลหิตในเต่าบัวโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียที่สุขภาพปกติ

โลหิตวิทยาและเคมีโลหิตของเต่าบัวเพศผู้และเพศเมีย ที่เจาะเก็บในช่วงเดือนตุลาคม ถึงเดือนกุมภาพันธ์ มีค่าดังตารางที่ 4.4 และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเพศพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าในเต่าบัวโตเต็มวัยเพศผู้ มีค่าปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (MCHC) เท่ากับ 47.10±11.93 g/dL จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดเท่ากับ 10.71±5.86x10^3 เซลล์/µl จำนวนเม็ดเลือดขาว โมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิล เท่ากับ 1.550±0.99x10^3 เซลล์/µl และเอนไซม์ ALT (alanine aminotransferase) เท่ากับ 7.37±4.36 U/L ซึ่งสูงกว่าในเต่าบัวโตเต็มวัยเพศเมียที่มีค่าปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินเม็ดเลือดแดง เท่ากับ 38.59±9.95 g/dL จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดเท่ากับ 7.59+3.64x10^3 เซลล์/µl จำนวนเม็ดเลือดชนิดโมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิล เท่ากับ 0.90±0.52x10^3 เซลล์/µl และเอนไซม์ ALT เท่ากับ 4.80±1.77 U/L อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ค่าโลหิตวิทยาและเคมีโลหิต (mean+SD) ของเต่าบัวโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย

	รวม 2 เพศ (n=40)	**เต่าบัวเพศผู้ (n=20)**	**เต่าบัวเพศเมีย (n=20)**
ค่าโลหิตวิทยา			
PCV (%)	14.90 ± 3.48	14.10 ± 2.88	15.70 ± 3.91
Hb (g/dL)	6.08 ± 1.12	6.41 ± 1.20	5.74 ± 0.95
TRBC (10^5/µL)	2.75 ± 0.94	2.93 ± 1.09	2.58 ± 0.77
MCV (fL)	595.33±209.49	547.27±212.20	643.39±200.48
MCH (pg)	245.86±91.53	248.46±98.53	243.27±86.45
MCHC (g/dL)	42.85 ± 11.67	47.10 ± 11.93	38.59 ± 9.95*
TWBC (10^3/µL)	11.66±6.59	13.62± 7.61	9.70±4.81*
Heterophil (10^3/µL)	3.43 ± 2.30	3.98 ± 2.48	2.88 ± 2.01
Eosinophil (10^3/µL)	2.84 ± 1.89	3.30 ± 2.25	2.38 ± 1.36
Basophil (10^3/µL)	2.51±1.55	2.91±1.79	2.11±1.19

Lymphocyte ($10^3/\mu L$)	1.63 ± 1.06	1.85 ± 1.36	1.42 ± 0.60
Monocytic-like azurophil ($10^3/\mu L$)	1.23 ± 0.85	1.55 ± 0.99	0.90 ± 0.52*
Heterophil (%)	29.40±6.88	30.7±7.09	28.73±6.77
Eosinophil (%)	23.69±5.30	23.09±5.26	24.28±5.41
Basophil (%)	21.23±1.90	21.27±1.92	21.20±1.92
Lymphocyte (%)	14.81±5.88	13.90±6.45	15.73±5.24
Monocytic-like azurophil (%)	10.73±5.29	11.47±5.82	9.98±4.74
Thrombocyte ($10^3/\mu L$)	10.97 ± 5.40	12.31 ± 6.12	9.63 ± 4.31
Hemogregarine (/slide)	3.03 ± 4.82	3.55 ± 5.55	2.50 ± 4.05
ค่าเคมีโลหิต			
AST (U/L)	59.89 ± 39.25	60.79 ± 38.18	58.99 ± 41.27
ALT (U/L)	6.091 ± 3.53	7.37 ± 4.36	4.80 ± 1.77*
AP (U/L)	95.10 ± 54.11	103.40 ± 69.06	86.79 ± 33.103
TP (g/dl)	4.17 ± 1.11	4.11 ± 1.15	4.24 ± 1.09
Albumin (g/dl)	0.39 ± 0.27	0.36 ± 0.28	0.42 ± 0.25
Globulin (g/dl)	3.79 ± 0.98	3.75 ± 0.94	3.82 ± 1.04
Uric acid (mg/dl)	1.46 ± 1.46	1.08 ± 1.25	1.84 ± 1.57
Creatinine (mg/dl)	<0.2	<0.2	<0.2
BUN (mg/dl)	14.18 ± 10.36	16.73 ± 12.76	11.64 ± 6.64
Blood glucose (mg/dl)	39.80 ± 19.24	37.36 ± 20.95	42.24 ± 17.5 7
Calcium(mg/dl)	7.98 ± 1.80	7.64 ± 1.24	8.32 ± 2.20
Phosphorus (mg/dl)	3.75 ± 1.26	3.65 ± 1.46	3.86 ± 1.05

* แสดงถึงความแตกต่างกันของค่าที่ทำการเปรียบเทียบอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

4.3 ความสัมพันธ์ของน้ำหนัก และความยาวกระดองหลังกับค่าโลหิตวิทยาในเต่าบัวโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียที่มีสุขภาพปกติ

น้ำหนักและความยาวของเต่าบัวตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียที่ทำการเก็บตัวอย่าง แสดงในตารางที่ 4.4 พบว่าน้ำหนักเต่าบัวตัวอย่างทั้งสองเพศไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่ในเต่าบัวโตเต็มวัยเพศผู้ มีความยาวช่วงกระดองหลังที่มากกว่า (41.00$\pm$4.55 เซนติเมตร) เต่าบัวโตเต็มวัยเพศเมีย (37.45$\pm$2.13 เซนติเมตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ความสัมพันธ์ของน้ำหนักและความยาวกระดองหลังกับค่าโลหิตวิทยา โดยใช้ Spearman rank correlation coefficient แสดงในตารางที่ 4.5 พบว่าน้ำหนักที่แตกต่างกันในเต่าบัวโตเต็มวัยเพศผู้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ของค่าโลหิตวิทยา ยกเว้นปริมาตรของเม็ดเลือดแดงโดยเฉลี่ย (mean corpuscular volume; MCV) ที่มีค่าแปรผกผัน (negative correlation) กับน้ำหนักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) โดยทั้งในเต่าบัวโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียมีความยาวกระดองหลังไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับความเปลี่ยนแปลงค่าโลหิตวิทยาทุกค่า

ตารางที่ 4.4 แสดงน้ำหนัก และความยาวระดองหลังในเต่าบัวโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย

	เต่าบัวเพศผู้ (n=20)	**เต่าบัวเพศเมีย** (n=20)
Weight (kg)	8.31 $\pm$ 2.96	7.22 $\pm$ 1.35
SCL (cm)	41.00 $\pm$ 4.55	37.45 + 2.13*

*แสดงถึงความแตกต่างกันของค่าที่ทำการเปรียบเทียบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p<0.05$

ตารางที่ 4.5 ความสัมพันธ์ของน้ำหนัก และความยาวของกระดองหลังต่อค่าโลหิตวิทยา โดยใช้ Spearman rank correlation coefficient ในเต่าบัวโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย

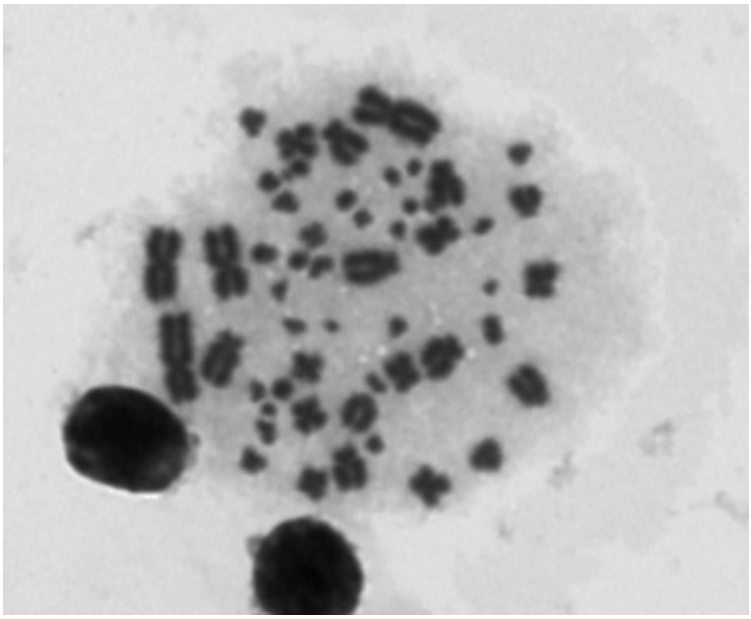
	น้ำหนัก (กก.)		**ความยาวกระดองหลัง (ซม.)**	
	เพศผู้ (n=20)	**เพศเมีย** (n=20)	**เพศผู้** (n=20)	**เพศเมีย** (n=20)
PCV (%)	-0.238	-0.031	-0.107	-0.244
Hb (g/dL)	0.054	-0.034	-0.173	0.031
TRBC (10^5/ μL)	0.427	0.257	0.205	0.227

MCV (fL)	-0.611*	-0.296	-0.315	-0.423
MCH (pg)	-0.417	-0.311	-0.210	-0.248
MCHC (g/dL)	0.260	0.057	-0.021	0.208
TWBC (10^3/ μL)	0.278	-0.159	0.140	-0.151
Heterophil (10^3/ μL)	0.063	-0.218	-0.045	-0.245
Eosinophil (10^3/ μL)	0.284	-0.001	0.125	-0.020
Basophil (10^3/μL)	0.132	-0.134	-0.095	-0.222
Lymphocyte (10^3/ μL)	-0.125	-0.037	-0.103	-0.142
Monocytic-like azurophil (10^3/ μL)	0.427	0.050	0.313	0.232
Heterophil (%)	-0.220	-0.424	-0.211	-0.377
Eosinophil (%)	0.310	0.269	0.138	0.322
Basophil (%)	-0.112	-0.079	0.129	0.213
Lymphocyte (%)	-0.340	0.299	-0.138	0.108
Monocytic-like azurophil (%)	0.300	0.019	0.381	0.310
Thrombocyte (10^3/ μL)	0.120	-0.053	0.096	0.142
Hemogregarine (RBC cells)	-0.158	-0.034	0.190	-0.079

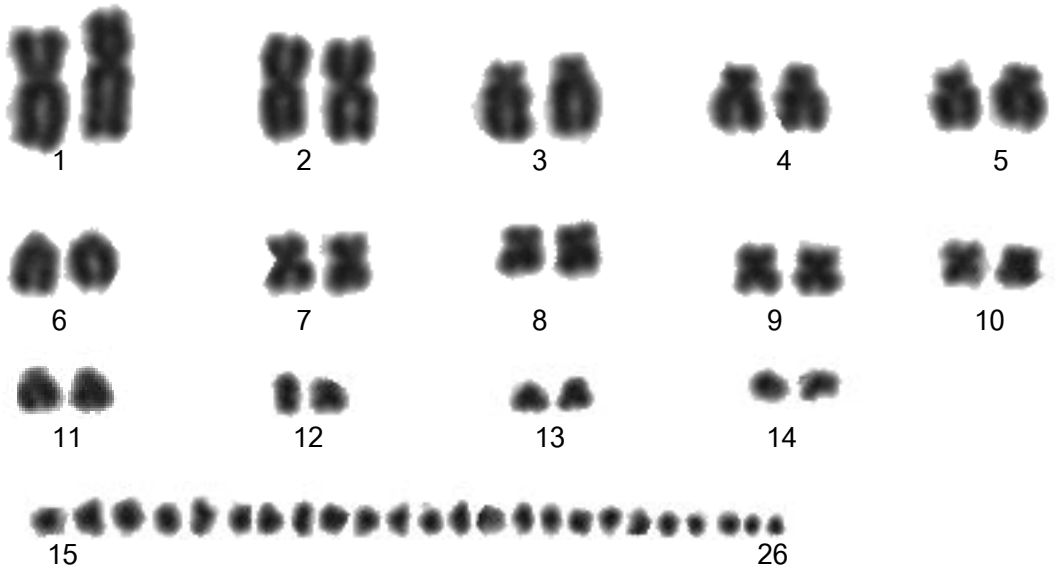
* ความสัมพันธ์มีนัยสำคัญทางสถิติ $p<0.01$

4.2 โครโมโซมและคาริโอไทป์ของเซลล์เม็ดเลือดในเต่าบัว

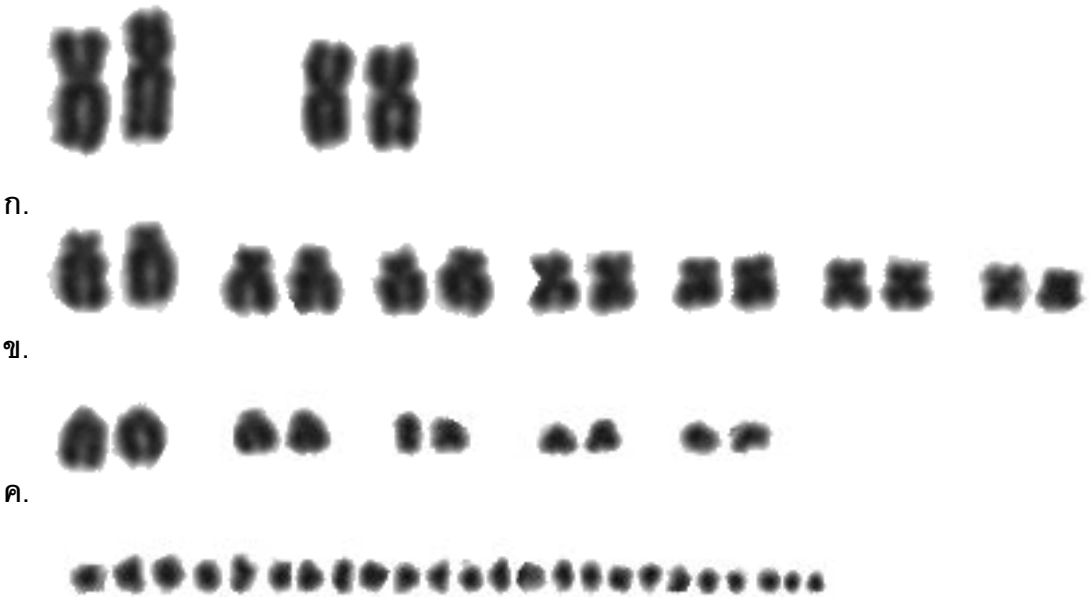
จากผลการทดลองพบว่าเต่าบัวไม่มีโครโมโซมเพศ มีจำนวนโครโมโซมในเซลล์ร่างกาย (2n) = 52 (รูปที่ 4.25) โดยเบื้องต้นสามารถจำแนกเป็น macrochromosome 14 คู่ ได้แก่ โครโมโซมเมทาเซนทริก (metacentric chromosome) 2 คู่ โครโมโซมซับเมทาเซนทริก (submetacentric chromosome) 7 คู่ และโครโมโซมทีโลเซนทริก (telocentric chromosome) 5 คู่ และ microchromosome 12 คู่



รูปที่ 4.25 โครโมโซมในระยะเมทาเฟสของเต่าบัวซึ่งย้อมด้วย Giemsa ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.26 คาริโอไทป์เต่าบัว



รูปที่ 4.27 คาริโอแกรมเต่าบัว ก) โครโมโซมเมทาเซนทริก (metacentric chromosome) 2 คู่ ข) โครโมโซมซับเมทาเซนทริก (submetacentric chromosome) 7 คู่ ค) โครโมโซมทีโลเซนทริก (telocentric chromosome) 5 คู่ และ ง) microchromosome 12 คู่

บทที่ 5
อภิปรายผลการวิจัย บทสรุป และข้อเสนอแนะ

ก) อภิปรายผลการวิจัย

5.1 ชีววิทยาโลหิต และไซโตเคมี ระดับมหภาค และระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเซลล์เม็ดเลือดในเต่าบัว

5.1.1 โลหิตวิทยา: ลักษณะรูปร่าง โครงสร้างอย่างละเอียด และการย้อมติดสีทางไซโตเคมีของเซลล์เม็ดเลือดในเต่าบัว

- **เม็ดเลือดแดง**

ลักษณะทางกายภาพของพลาสมาที่เก็บได้จากเต่าบัวทุกตัวมีลักษณะใสสีเหลืองอ่อน เช่นเดียวกันกับที่พบในสัตว์เลื้อยคลานทั่วไป (Campbell and Ellis, 2007) ชั้น buffy coat ในเต่าบัวที่มีสุขภาพปกติเป็นสีขาวหนามองเห็นได้ง่าย ซึ่งสัมพันธ์กับค่าจำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ในเต่าบัวที่มีค่าสูงกว่าในเต่าหับน้ำจืดตะวันออก (*Terrapene caralina)* (Beck et al., 1995) และเต่าบกเมดิเตอร์เรเนียน (*Testudo Hermanni*) (Neiffer et al., 2005) เต่าตนุ (*Chelonia mydas*) (Bolten and Bjorndal, 1992)

เม็ดเลือดแดงที่พบในเต่าบัวมีลักษณะโดยทั่วไปเหมือนในเต่าบก เต่าทะเล และเต่าน้ำจืด ที่มีรายงาน มีลักษณะเด่นที่นิวเคลียสมีขนาดค่อนข้างเล็ก เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดไซโตพลาสซึม แต่ในเต่าบัวมีลักษณะของขอบนิวเคลียสเรียบ และค่อนข้างมีความสม่ำเสมอของขนาด และการติดสีมากกว่าเต่าอื่นๆ ข้างต้นที่เม็ดเลือดแดงมีลักษณะนิวเคลียสที่ขอบไม่เรียบ และรูปร่างหลากหลาย (Casal and Orós, 2006; Work et al., 1998; Bradley et al., 1998; Alleman et al.,1992)

ในเต่าบัวพบลักษณะการติดสีน้ำเงินเป็นย่อม หรือจุดในไซโตพลาสซึม (basophilic inclusion) ของเม็ดเลือดแดงได้มากกว่าร้อยละ 50 ของเม็ดเลือดแดงทั้งหมดและจากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านสอดคล้องกับการพบออแกลแนลที่ติดสีเข้มของอิเล็กตรอนแบบไม่เนียนเรียบชัดเจน ภายในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดง โดยจุดสีน้ำเงินนี้พบได้ในเต่าตนุ (Work et al., 1998) เต่าบึงยุโรป (Metin et al., 2006) และเต่าบกทะเลทราย (Alleman et al., 1992) ที่มีอาการทางคลินิก ซึ่งรายงานว่าเป็นจุดของ degenerate organelles เช่น กลุ่มก้อนของเอนโดพลาสมิกเรติคูลลัม (Alleman et al., 1992; Clark et al., 2001) ซึ่ง Heard et al. (2004) กล่าวว่าสามารถพบได้ในเต่าที่มีสุขภาพปกติ โดยการเกิดจุด หรือขนาดที่ใหญ่ขึ้นของจุดอินคลูชันชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับความเพิ่มขึ้นของอายุเม็ดเลือด

แดง (Davis and Holcomb, 2008) อย่างไรก็ตามใน Metin et al.(2006) และ Matson et al. (2005) รายงานว่าจุดนี้คือการเกิด micronucleus (MN) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ทางชีววิทยา (biomarker) ในเม็ดเลือดแดงถึงความเสียหายของโครโมโซมจากการสัมผัสและปนเปื้อนของสารที่ทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซม (clastogen) หรือสารที่เป็นพิษต่อสารพันธุกรรม (genotoxic) เช่น polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) สารกัมมันตภาพรังสี (radionuclides) และสารฆ่าแมลงบางชนิด โดยที่สัตว์อาจไม่แสดงอาการ มีรายงานในเต่าบึงยุโรป (*Emys orbicularis*) ที่เลี้ยงภายในฟาร์มสามารถตรวจพบเม็ดเลือดแดงที่มี MN อยู่เพียง 0.3-1.6 เซลล์ในหนึ่งพันเซลล์ของเม็ดเลือดแดงที่นับ (Metin et al., 2006) ขณะที่ในเต่าน้ำจืดชนิดเดียวกัน ที่สุ่มตัวอย่างมากจากแหล่งน้ำธรรมชาติที่ตรวจพบ PAHs และปรอทปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ตรวจพบ MN ได้ถึง 6.0-9.7 เซลล์ในหนึ่งพันเซลล์ของเม็ดเลือดแดงที่นับ (Matson et al., 2005) แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของ MN ในเต่ามีนัยสำคัญต่อการบ่งบกถึงความเสียหายของโครโมโซมได้เช่นกัน

การเกิดจุดวาวใส (refractile clear area) ในเซลล์เม็ดเลือดแดง เป็นภาพลวง (artifact) ที่สามารถพบมากในการย้อมสี Wright's stain และ AcP ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งสามารถพบได้บ้างเป็นปกติในสัตว์เลื้อยคลาน และเกิดได้จากเทคนิคการเตรียมแผ่นฟิล์มเลือดที่ทำให้แห้งช้าเกินไป (Campbell and Ellis, 2007)

ในเต่าบัวสามารถพบความแตกต่างของขนาดเม็ดเลือดแดง (anisocytosis) ได้ แต่มีความแตกต่างของรูปร่างเม็ดเลือดแดง (poikilocytosis) น้อย รวมทั้งมีความแตกต่างของการติดสี (polychromasia) หรือเม็ดเลือดแดงอ่อนได้น้อย โดยเฉพาะเม็ดเลือดแดงอ่อนชนิดรูบิไซต์ (rubricyte) ที่พบได้น้อยมาก ซึ่งการพบเม็ดเลือดแดงอ่อนในปริมาณไม่มากนักในกระแสเลือด พบได้เป็นปกติในสัตว์เลื้อยคลานที่ไม่มีอาการเจ็บป่วย (Campbell, 2006; Hawkey and Dennett,1989)

การย้อมด้วยสี NMB (new methylene blue) ที่เป็นสีที่ย้อมติดเซลล์ที่มีชีวิต (vital stain) ซึ่งจะให้ผลบวกในการติดสีในเม็ดเลือดแดงที่ยังไม่โตเต็มวัย (Campbell and Ellis, 2007) พบว่าในเต่าบัวเม็ดเลือดแดงเกือบทุกเซลล์มีการติดสีเป็นจุดเล็กๆ กระจายในไซโตพลาสซึม (punctate reticulocyte) แบบไม่แน่นอน อย่างไรก็ตามสังเกตว่าเม็ดเลือดแดงที่มีสีนิวเคลียสใหญ่ สีจาง ที่เป็นเม็ดเลือดแดงอ่อน จะมีการติดสี NMB มากกว่าเม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียสเล็กติดสีเข้มที่เป็นเม็ดเลือดแดงปกติ มีปริมาณการติดสีจุดสีที่กระจายอยู่ในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดงม่มีความสัมพันธ์กับขนาด และรูปร่างของเม็ดเลือดแดง โดยการติดสีในเม็ดเลือดแดงเกือบทุกเซลล์นี้อาจบ่งบอกถึงการพัฒนาของเซลล์เม็ดเลือดอย่างช้าๆหรือการมีชีวิตยาวนานของเม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียส เนื่องจากในสัตว์เลื้อยคลานมีการสร้างเม็ดเลือดทดแทนที่ช้า

กว่าเปรียบเทียบกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เม็ดเลือดแดงมีอายุเพียง 120 วัน แต่ในสัตว์เลื้อยคลานบางชนิดเม็ดเลือดแดงสามารถมีชีวิตอยู่ในกระแสเลือดนานถึง 600-800 วัน (Sypek and Borysenko, 1988; Frye, 1991) โดยเม็ดเลือดแดงที่หมดอายุขัยจะเข้าสู่ programmed cell death ทำให้เกิดการ apoptosis ของเซลล์ตามมา (Miyamoto et al., 2005) ดังนั้นการย้อมสีด้วย NMB จึงไม่สามารถใช้แยกเม็ดเลือดแดงอ่อนในเต่าบัวได้ แต่เมื่อพิจารณาจากภาพถ่ายทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเห็นได้ชัดเจนว่าเม็ดเลือดแดงอ่อนจะมีขนาดเล็กกว่าเม็ดเลือดแดงที่โตเต็มวัย เหมือนในสัตว์เลื้อยคลานอื่นที่เม็ดเลือดแดงอ่อนจะมีขนาดเล็กกว่าเม็ดเลือดแดงปกติ ตรงกันข้ามกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เม็ดเลือดแดงอ่อนมีขนาดใหญ่กว่าเม็ดเลือดแดงที่โตเต็มวัย (Nicole et al., 2007) และจากภาพถ่ายทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน การย้อมสีติด NMB มีความสอดคล้องกับการพบไมโตคอนเดรียกระจายอยู่ในไซโตพลาสซึม

ไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดงในเต่าบัวให้ปฏิกิริยาไซโตเคมีติดสีเข้มของ PO (Peroxidase) แสดงว่ามีเอนไซม์นี้ในเม็ดเลือดแดง โดยปกติเอนไซม์ PO จะพบในแกรนูลหรือไลโซโซมของเม็ดเลือดขาวที่ทำหน้าที่ในการฆ่าจุลชีพ ด้วย peroxidase activity และทำหน้าที่ในกระบวนการ oxidative burst (Raskin and Valenciano, 2000; Harr et al., 2001) ซึ่งปกติจะไม่พบการติดสี PO ในเม็ดเลือดแดง (Casal and Orós, 2006, Mateo et al., 1984) อย่างไรก็ตามมีรายงานการติดสีของ PO ในเม็ดเลือดแดงได้ในไขกระดูก (erythroid cell) ของเต่าบกทะเลทราย (Garner et al., 1996) และในเม็ดเลือดแดงในกระแสเลือดของ rainbow lizard (*Agama agama*) (Caxton-Martins and Nganwuchu, 1978) ซึ่งอธิบายว่าการติดสีในเม็ดเลือดแดงนี้อาจมีความสัมพันธ์ของการติดสีในเม็ดเลือดแดงที่ยังไม่โตเต็มที่ (Caxton-Martins and Nganwuchu, 1978) สอดคล้องกับผลการย้อมติดสี NMB ในเต่าบัวที่บ่งบอกว่าเม็ดเลือดแดงส่วนใหญ่ยังมีลักษณะของเม็ดเลือดที่เจริญเติบโตไม่เต็มที่

ลักษณะโครงสร้าง และขนาดของเม็ดเลือดแดงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดและส่องผ่าน ส่วนใหญ่มีลักษณะใกล้เคียงกับรายงานในเต่า และสัตว์เลื้อยคลานอื่นๆ (Campbell and Ellis, 2007, Harr et al., 2001; Casal et al., 2007) โดยขนาดของเม็ดเลือดแดงเต่าบัวโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) มีขนาดรวมโดยเฉลี่ยเท่ากับ ด้วยกันเม็ดเลือดในเต่าบัวมีขนาดเล็กกว่าเม็ดเลือดแดงในเต่าตนุที่มีความยาวอยู่ระหว่าง 17-20 ไมครอน (Work et al., 1998) เต่าหัวค้อนที่ 19.05$\pm$1.35 x 12.85+1.25 ไมครอน (Casal and Orós, 2006) เต่าบึง *Emy orbicularis hellenica* ที่ 21.73$\pm$1.01 x 12.53+0.98 ไมครอน และเต่าบึง *Mauremys rivulata* ที่

20.16±0.84 x 11.64+0.63 ไมครอน (Ugurtas et al., 2003) และเมื่อเปรียบเทียบกับในสัตว์เลื้อยคลาน นก และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ เต่าเป็นสัตว์ที่มีเม็ดเลือดแดงใหญ่ที่สุด แต่มีจำนวนเม็ดเลือดแดงน้อยที่สุดตามลำดับเช่นกัน (Campbell and Ellis, 2007) ซึ่งเป็นการทดแทนตามธรรมชาติ เนื่องจากความแตกต่างของขนาดนี้มีผลสัมพันธ์กับความจุของฮีโมโกลบินที่เป็นปัจจัยสำคัญในการทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจนเข้าและนำคาร์บอนไดออกไซด์ออกแลกเปลี่ยนกับเนื้อเยื่อ ฮีโมโกลบินจึงมีผลต่อความสามารถในการขนส่งออกซิเจน (oxygen affinity) ของเม็ดเลือดแดง (R.cknagel and Braunitzer, 1988) อีกทั้งขนาดเม็ดเลือดแดงในเต่าที่มากขึ้น มีผลสัมพันธ์กับความต้องการออกซิเจนในอากาศที่น้อยกว่า หรือความสามารถในการดำน้ำในเต่าที่มียาวนานกว่าในสัตว์เลื้อยคลาน นก และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ เนื่องจากเม็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่จะสามารถบรรจุฮีโมโกลบินที่เป็นส่วนสำคัญในการขนส่งออกซิเจนได้มากกว่า (Samour et al., 1998)

การพบเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ Hemogregarine ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านพบแกมอนต์ที่มี microneme ชัดเจนบรรจุอยู่ภายในช่องว่างของไซโตพลาสซึมเซลล์เม็ดเลือดแดง คล้ายกับที่พบในเชื้อ Hemogregarine ที่คาดว่าเป็น *Hepatozoon* ในงูจงอาง (Salakijet al., 2002a) แต่ไม่พบถุง parasitophorous vacuole membrane (PVM) และช่องว่างใส (electron.lucent space) ระหว่าง PVM ของแกมอนต์และไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดงเหมือนในงูจงอาง ซึ่งอาจเป็นลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดระยะแรกของการติดเชื้อปรสิต โดยทั่วไปในเต่าน้ำการติดเชื้อ Hemogregarine มักพบในสกุล *Hemogregarina* ส่วนในงูบกและงูน้ำพบได้บ่อยในสกุล *Hepatozoon* (Frye, 1991) อย่างไรก็ตามการจำแนกปรสิตในสกุลนี้ไม่สามารถทำได้โดยการดูจากเม็ดเลือดเพียงอย่างเดียว (Telford, 1984)

- **ธรอมโบไซต์**

ธรอมโบไซต์ในเต่าบัวมีรูปร่างหลากหลาย ได้แก่ กลม รี รูปกระสวยมีปลายไซโตพลาสซึมแหลมเหมือนที่พบในสัตว์เลื้อยคลานส่วนใหญ่ (Campbell and Ellis, 2007) และมีลักษณะของธรอมโบไซต์แบบกลมที่แยกได้ยากจากลิมโฟไซต์ เหมือนกับใน eastern diamondback rattle snakes (Alleman et al., 1999) เต่าบกทะเลทราย (Alleman et al., 1992) งู yellow rat snake (Bounous et al., 1996) แตกต่างจากธรอมโบไซต์ในงูจงอางที่ยาว รี และมีลักษณะของ perinuclear vacuolation ที่ทำให้แยกลิมโฟไซต์ได้ง่าย (Salakij et al., 2002a) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการย้อมธรอมโบไซต์ด้วยสี Wright's Giemsa และ Diff-Quick ย้อมติดสีไซโตพลาสซึมของธรอมโบไซต์ได้ดีกว่าการย้อมสีด้วย Wright's ทำให้ช่วยในการแยก

ออกจากเซลล์ลิมโฟไซต์ได้ดีกว่า ซึ่งมีการแนะนำว่าการใช้สี May-GrÜnwald-Giemsa stain เป็นสีที่ดีที่สุดในการแยกธรอมโบไซต์จากเซลล์ลิมโฟไซต์ในสัตว์เลื้อยคลาน แต่ในทางปฏิบัติไม่นิยมใช้เนื่องจากมีขั้นตอนมากและใช้เวลานาน (Muro et al., 1998)

สามารถพบธรอมโบไซต์ที่ได้รับการกระตุ้น (Inactivated thrombocyte) ที่มีอะซูโรฟิลลิกแกรนูลขนาดเล็กภายในไซโตพลาสซึม (Nicole et al., 2007) และการเกาะกลุ่มกันของธรอมโบไซต์ รวมทั้งธรอมโบไซต์ที่มีลักษณะของไซโตพลาสซึมยื่นออกมาคล้ายเท้าเทียม (pseudopodia) ได้มาก อันเกิดได้จากกระบวนการเตรียมแผ่นฟิล์มเลือดที่สามารถกระตุ้นให้ธรอมโบไซต์ activated ได้ง่าย การเกิด activated ของธรอมโบไซต์เหมือนกับในเกล็ดเลือดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมคือ มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เกิดการเกาะกลุ่มกัน และอาจพบการเกิดเท้าเทียม หรือมีไซโตพลาสซึมที่ขอบเขตไม่แน่นอน และมีแวคูโอลภายใน (Campbell and Ellis, 2007) การเกิดการเกาะกลุ่มของธรอมโบไซต์ แม้ทำให้การนับจำนวนของธรอมโบไซต์เกิดความคลาดเคลื่อน แต่เป็นผลดีในการช่วยแยกธรอมโบไซต์ที่เกาะตัวกันออกจากลิมโฟไซต์ได้ง่ายขึ้น (Nicole et al.,2007)

ปฏิกิริยาไซโตเคมีของธรอมโบไซต์ในเต่าบัว ให้ผลบวกต่อสี PAS (periodic acid-Shiff) และ SBB (Sudan black B) เท่านั้น การติดสี PAS สอดคล้องกับในเต่าบก และเต่าทะเลที่มีรายงาน (Alleman et al., 1992; Casal and Orós, 2006) โดยในเต่าบัวพบการติดสี PAS ที่เข้มขึ้นในธรอมโบไซต์ที่มีแวคูโอล หรือเซลล์ที่ activated แสดงถึงว่าในเซลล์ที่ activated อาจมีแวคูโอลบรรจุไปด้วยสารที่มีคาร์โบไฮเดรต ไกลโคเจน หรือไกลโคโปรตีน (Raskin and Valenciano, 2000) มากกว่าเซลล์ธรอมโบไซต์ปกติ

พบการติดสีเข้มของ SBB ในธรอมโบไซต์ไม่พบการรายงานในสัตว์อื่นๆ ซึ่งทั่วไป SBB พบในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที่มีแกรนูล ซึ่งส่วนใหญ่ใช้เป็นตัวแทนของการติดสี PO บ่งบอกการทำหน้าที่ในการกลืนทำลาย หรือทำลายเชื้อโรคที่มีความเกี่ยวข้องกับขบวนการกระตุ้นให้เซลล์มีการเคลื่อนตัว (trigger migration) และขบวนการกลืนทำลาย (phagocytic activity) (Carvalho et al., 2006) แต่ในกรณีของธรอมโบไซต์ในเต่าบัวที่ให้ผลบวกต่อ SBB ให้ผลบต่อ PO น่าจะเกิดจากโครงสร้างของเซลล์มีส่วนประกอบของไขมัน หรือ phospholipid หรือ sterol (Raskin and Valenciano, 2000) โดยอาจไม่มีความเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ในกระบวนการกลืนทำลาย ส่วนลักษณะของโครงสร้างที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง และจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่พบเท้าเทียมจำนวนมาก มีแกรนูล และแวคูโอลที่ชัดเจน สอดคล้องกับลักษณะของเซลล์ธรอมโบไซต์ที่ได้รับการกระตุ้นให้มีการเกาะกลุ่มกันมากกว่าเป็นลักษณะของเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการกลืนทำลาย

จากการศึกษาธรอมโบไซต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และส่องผ่าน พบว่ามีลักษณะส่วนใหญ่ที่คล้ายคลึงกับในเต่าบก *Geoclemys reevesii* มากคือ นิวเคลียสไม่กลม หรือเป็นพู มีแนวขอบของไมโครทูบูล (marginal band of microtubule) มีแกรนูล อินคลูชันกลมใหญ่ ไมโตคอนเดรีย และไลโซโซมในไซโตพลาสซึม ที่เป็นโครงข่ายพื้นผิวที่ติดต่อไปกับ canalicular system ต่างกันตรงที่ในเต่าบกไม่มีแวคูโอลขนาดใหญ่ภายในเซลล์ (Daimon et al.,1987) ไมโครทูบูลในธรอมโบไซต์มีหน้าที่หลักในการทำให้ธรอมโบไซต์สามารถคงรูปทรงทั้งในธรอมโบไซต์แบบกลมหรือกระสวยได้ (Behnke, 1970; Kenney and Linck, 1985) อีกทั้งพื้นผิวที่ต่อไปกับ canalicular system มีส่วนสำคัญในการทำให้มีการปรับเปลี่ยนพื้นผิวของ plasmalemma ให้ออแกลแนลมีประสิทธิภาพในการแลกเปลี่ยนสารเมตาบอไลต์ระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ (intra-extracellular space) (Daimon and Uchida, 1985) อีกทั้ง canalicular system ยังเป็นช่องทางการขับหลั่งสารภายในเซลล์เพื่อกระตุ้นการตอบสนองในการเกาะกลุ่มกันของธรอมโบไซต์ (Stenberg et al., 1984) ซึ่ง canalicular system พบได้ในสัตว์เลื้อยคลานหลายชนิด เช่น เต่าหัวค้อน (Casal et al., 2007) เต่าตนุ (Work et al., 1998) รวมทั้งพบได้เช่นกันในเกล็ดเลือดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Jain, 1986)

ลักษณะแวคูโอลขนาดใหญ่ภายในเซลล์ธรอมโบไซต์ที่พบในเต่าบัว ไม่พบรายงานในเต่าบกภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Daimon et al., 1987) รวมทั้งไม่พบในการตรวจด้วยวิธี fluorescence histochemistry ในกบและปลา (Daimon and Mizuhira, 1980) แต่เป็นลักษณะที่คล้ายกับที่พบในนกและงู ซึ่งรายงานว่าแวคูโอลขนาดใหญ่ภายในเซลล์นี้บรรจุด้วยแกรนูลของ serotonin หรือเทียบเท่ากับส่วนประกอบของเซลล์ที่บรรจุด้วย monoamine ในเกล็ดเลือดสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Daimon and Uchida, 1982; Daimon and Mizuhira, 1980) โดยเมื่อเกิดการ activated ทำให้มีการสร้างและหลั่ง serotonin ออกมาจากแอลฟ่าแกรนูล เป็นผลให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของธรอมโบไซต์ (Oxholm and Winther, 1986) แสดงถึงว่าธรอมโบไซต์ในเต่าบัวอาจมีพัฒนาการของการสะสม serotonin ภายใน สอดคล้องกับการพบเซลล์ ธรอมโบไซต์ที่มีเกาะกลุ่มกันมากละพบเซลล์ที่มีแวคูโอลได้บ่อยในแผ่นฟิล์มเลือดของเต่าบัว ซึ่งการเกาะกลุ่มและเกิดแวคูโอลแสดงถึงการกระตุ้นธรอมโบไซต์ได้เช่นกัน (Campbell, 1995)

- **เม็ดเลือดขาว**

เม็ดเลือดขาวในเต่าบัวแบ่งออกเป็น 5 ชนิด คือ เม็ดเลือดขาวชนิดเฮเทอโรฟิล อีดอสิโนฟิล เบโซฟิล ลิมโฟไซต์ และโมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิล เหมือนกันในเต่าบัวเพศผู้และเต่าบัวเพศเมียแตกต่างจาก

ในสัตว์เลื้อนคลานส่วนใหญ่ที่ไม่พบเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ (Wilkinson, 2004) อย่างไรก็ตามการไม่พบเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ มีความสอดคล้องกับรายงานในลูกเต่าตนุ (Aguirre et al., 1995; Wood and Ebank, 1984) และเต่าหญ้า Kemp s ridley turtle (Cannon, 1992) ที่ไม่พบเม็ดเลือดชนิดนี้เลย และในเต่าหัวค้อน และงูจงอาง ที่สามารถพบโมโนไซต์ได้น้อยมากประมาณ 0-1% ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Casal and Orós, 2006; Salakij et al., 2002)

ก. เฮเทอโรฟิล (Heterophil)

เฮเทอโรฟิลในสัตว์เลื้อยคลาน และนกมีหน้าที่เปรียบเทียบได้กับนิวโทรฟิลในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Montali, 1988; Brooks et al., 1996) ทำหน้าที่สำคัญในการกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอม (phogocytosis) ฆ่าเชื้อจุลชีพ (microbiocidal activity) และเป็นเม็ดเลือดขาวหลักในการตอบสนองต่อการอักเสบในร่างกาย (Azevedo and Lunardi, 2003; Montali, 1988; Sypek and Borysenko, 1988)

การศึกษาครั้งนี้ไม่พบเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลในเต่าบัว ซึ่งสอดคล้องว่านิวโทรฟิลไม่พบในสัตว์เลื้อยคลานส่วนใหญ่ (Campbell and Ellis, 2007) ยกเว้นในทัวทารา (Tuatara) (*Sphenodon punctatus*) (Desser, 1978) เต่าหัวค้อน (George, 1997) และเต่าตนุ (Wood and Ebanks, 1984; Aguirre et al., 1995) ที่พบเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลในกระแสเลือดได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาในเต่าหัวค้อน และเต่าตนุข้างต้นไม่สอดคล้องกับการรายงานของ Casal and Orós (2006) และ Work et al. (1998) ที่ทำการศึกษาเพิ่มเติมด้วยการย้อมสีไซโตเคมีและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านว่าเต่าทะเลทั้งสองชนิดไม่มีนิวโทรฟิล และอธิบายว่าอาจสับสนลักษณะของนิวโทรฟิลกับอีโอสิโนฟิลที่ปล่อยแกรนูลขนาดใหญ่ออกมา (large degranulated eosinophil)

เฮเทอโรฟิลของเต่าบัวในการย้อมสี Romanowsky stain มีลักษณะเหมือนเต่าส่วนใหญ่คือ มีนิวเคลียส รี กลม อันเดียว เอียงไปด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ พบนิวเคลียสที่เป็นพูได้บ้าง (Nicole et al., 2007) แกรนูลในเต่าบัวออกสีส้มและเป็นรูปกระสวยอัดแน่น เช่นเดียวกับในเต่าหัวค้อน แต่เต่าหัวค้อนมีการติดสีส้มอ่อน (Casal and Orós, 2006) ส่วนความเข้มในการติดสีของแกรนูลขึ้นกับระยะพัฒนาแต่ละอายุของเซลล์ (Egami and Sasso, 1988)

ปฏิกิริยาติดสีไซโตเคมีของเฮเทอโรฟิลในเต่าบัว แกรนูลให้ผลบวกไม่แน่นอนต่อสี PO อย่างเดียว ส่วนการย้อมติดสีในบริเวณระหว่างแกรนูล (intergranular staining) สามารถติดสีหลากหลาย ได้แก่ SBB, AcP, ALP, ANAE และ PAS แตกต่างจากเฮเทอโรฟิลในสัตว์เลื้อยคลานทั่วไปที่มาให้ผลบวกต่อเอนไซม์ PO และ ALP (Campbell and Ellis, 2007) ซึ่งการติดสีต่อ PO และ SBB บ่งบอกว่าเฮเทอโรฟิล มี

ความสามารถในการฆ่าจุลชีพและทำหน้าที่ในกระบวนการ oxidative burst เหมือนกับนิวโทรฟิลของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Caxton-Martin and Nganwuchu, 1978; Harr et al., 2001) โดยในเต่าหัวค้อนให้ผลการติดสีใกล้เคียงกันคือ ติดสี PO, SBB, AcP และ CAE (Casal and Orós,2006) ในเต่าตนุติดสี ANAE และPAS (Work et al., 1998) และเต่าบกทะเลทรายที่ติดสี AcP และ ALP (Alleman et al., 1992) แสดงถึงเอนไซม์ในเซลล์เฮเทอโรฟิลในกลุ่มเต่าที่มีความแตกต่างกันไป ซึ่งสามารถบอกถึงหน้าที่ของเซลล์ได้

ในเต่าน้ำจืด *Chrysemys dorbignih* ที่พบเม็ดเลือดขาวที่แกรนูลสีแดง (eosinophilic) ที่มีลักษณะคล้ายกันโดยการใช้ปฏิกิริยาเคไซโตเคมี พบว่าเซลล์ที่มีแกรนูลเป็นรูปกลม (เดิมจัดแยกเป็นเซลล์ type I) และเซลล์ที่มีแกรนูลยาว (type II) มีการติดสีบางชนิดที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถแยกได้ว่าเซลล์ที่มีแกรนูลเป็นรูปกลมคือ อีโอสิโนฟิล เซลล์ที่มีแกรนูลยาวคือเฮเทอโรฟิล แต่ในการศึกษานี้ แม้ลักษณะแกรนูลของเฮเทอโรฟิล และอีโอสิโนฟิลในเต่าบัวจะมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน แต่การติดสีไซโตเคมีไปในทิศทางเดียวกัน ต่างกันเพียงการติดสีที่แกรนูล กับการติดสีที่ระหว่างแกรนูล (ยกเว้นการติดสี PAS) ซึ่งน่าจะเป็นไปได้ว่า เฮเทอโรฟิลและอีโอสิโนฟิลอาจเป็นเซลล์ชนิดเดียวกัน ซึ่งทำหน้าที่เหมือนกัน แต่อยู่ในระยะต่างกันของการพัฒนาของเซลล์ (difference stage of maturation) เช่นเดียวกับใน inland bearded dragon (*Pogona vitticeps*) (Eliman, 1997)

จากการศึกษาเฮเทอโรฟิลในเต่าบัวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและส่องผ่าน พบว่าสามารถแยกจากอีโอสิโนฟิล โดยมีแกรนูลมากกว่า และขนาดไม่สม่ำเสมอ ส่วนใหญ่เป็นแบบกระสวยและแกรนูลที่วงในมีความเข้มมากกว่าบริเวณขอบด้านนอก และไม่เนียนเรียบ นิวเคลียสมี heterochromatin น้อยกว่าอย่างชัดเจน ทำให้เห็นนิวเคลียสติดสีจาง เช่นเดียวกับที่พบในเต่าตนุ (Work et al., 1998) เต่าหัวค้อน (Casal et al., 2007) โดยเฮเทอโรฟิล ที่พบในเต่าบัวมีเพียงลักษณะดังกล่าวเพียงแบบเดียว ต่างกับใน งู ต่างๆ ที่พบว่าเฮเทอโรฟิลมี 2 ลักษณะคือ เฮเทอโรฟิลที่มีแกรนูลแบบสีสม่ำเสมอ และแบบสีไม่สม่ำเสมอ ซึ่งอาจเป็นเซลล์เฮเทอโรฟิลที่มีอายุแตกต่างกันในกระแสเลือด (Bounous et al., 1996; Alleman et al., 1999; Salakijet al., 2002a)

ข. อีโอสิโนฟิล (Eosinophil)

จากผลการศึกษาพบว่าอีโอสิโนฟิลในเต่าบัว เป็นเม็ดเลือดขาวที่พบได้มากเป็นอันดับสองรองจากเฮเทอโรฟิล เซลล์มีรูปร่างกลม มีหลายขนาด มีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 9-13 ไมครอน เช่นเดียวกับที่พบได้ในเต่าตนุฮาวาย (Hawaiian green turtle) (Work et al., 1998) และเต่าหญ้า (Kemp's ridley turtle) ซึ่ง

สามารถพบอีโอสิโนฟิล ได้ตั้งแต่ขนาดเล็ก (small eosinophil) (Cannon, 1992) ถึงขนาดใหญ่ (large eosinophil) ซึ่ง Work et al. (1998) ได้ให้ข้อสังเกตว่าอีโอสิโนฟิลที่ขนาดใหญ่ เป็นเซลล์ activated ที่แกรนูลภายในเกิด degranulated และติดสีจาง จากการตอบสนองต่อการติดเชื้อปรสิตหรือกระตุ้นโดยการอักเสบอื่นๆ

แกรนูลของอีโอสิโนฟิลในเต่าบัว มีลักษณะกลมอัดแน่น เมื่อย้อมด้วยสี Romanowsky stain แกรนูลจะติดสีม่วงน้ำเงิน (basophilic) มากกว่าแกรนูลของเฮเทอโรฟิลที่แกรนูลออกสีส้มทำให้สามารถจำแนกได้ง่าย ซึ่งแตกต่างจากในสัตว์เลื้อยคลานอื่นๆที่ติดสีส้มแดง (Nicole et al.,2007) อย่างไรก็ตามการติดสีแกรนูลของอีโอสิโนฟิลสามารถมีลักษณะเฉพาะแตกต่างกันไปตามชนิดของสัตว์ เช่นในอีกัวน่าเขียว อีโอสิโนฟิลมีแกรนูลสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียว (bluish green) เมื่อย้อมด้วยสี Romanowsky-type stain ซึ่งเรียกว่า green eosinophil (Heard et al., 2004; Harr et al.,2001) หรือในงูจงอางที่แกรนูลของอีโอสิโนฟิลติดสีน้ำเงินจาง (Salakij et al., 2002a)

ปฏิกิริยาทางไซโตเคมีของอีโอสิโนฟิลในเต่าบัว แสดงให้เห็นว่าแกรนูลจะย้อมสีให้ผลบวกต่อ PO, SBB, AcP, ANAE และ NMB ระหว่างแกรนูลให้ผลบวกต่อ ALP และ PAS แต่ให้ผลลบต่อ และ TB โดยในเต่าบัวการติดสี PO พบทั้งในอีโอสิโนฟิลและเฮเทอโรฟิล แตกต่างจากในเต่าบกทะเลทรายและเต่าน้ำจืด ที่อีโอสิโนฟิลให้ผลบวก และเฮเทอโรฟิลให้ผลลบต่อ PO (Allerman et al., 1992; Sypek and Borysenko, 1988) แต่มีความคล้ายคลึงกับอีกัวน่าเขียว และจระเข้อเมริกันอะลิเกเตอร์ ที่ย้อมติดสีทั้ง อีโอสิโนฟิล และเฮเทอโรฟิล โดยอีโอสิโนฟิลติดสี PO ที่เด่นชัดกว่าในเฮเทอโรฟิล (Harr et al., 2001; Mateo et al.,1984) ในเม็ดเลือดขาวชนิดที่มีแกรนูลการติดสี PO และ SBB มักไปในทิศทางเดียวกัน เนื่องจากเซลล์ทั้งสองอาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอมและทำลายเชื้อโรค (Carvalho et al., 2006) อีกทั้งการติดสี AcP พบในอีโอสิโนฟิลของมนุษย์ (Parmley and Spicer, 1975) สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและตัวทัวทารา (Jain, 1986; Desser, 1978) เช่นเดียวกับ การติดสี ALP ของอีโอสิโนฟิลพบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์เลื้อยคลาน (Jain, 1986; Mateo et al., 1984; เฉลียว, 2548) แสดงถึงการพัฒนาการที่ดีของอีโอสิโนฟิลระบบภูมิคุ้มกันของเต่าบัว ส่วนการติดสี ANAE ในอีโอสิโนฟิลทีโดยทั่วไปมีความจำเพาะกับโมโนไซต์และลิมโฟไซต์บางชนิดเท่านั้น (Ranki et al., 1980) อาจบ่งบอกหน้าที่ของเซลล์อีโอสิโนฟิลที่มีความแตกต่างไปจากสัตว์อื่น หรือเกิดจากการบ่มสไลด์ในสี (incubation) ที่นานเกินไป (Mateo et al., 1984)

จากการศึกษาอีโอสิโนฟิลในเต่าบัวด้วกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และส่องผ่าน พบว่าอีโอสิโนฟิลมีแกรนูลจำนวนน้อยกว่าในเฮเทอโรฟิล ขนาดแกรนูลใหญ่ มีรูปร่างค่อนข้างกลม ติดสี

อิเล็กตรอนเข้มทึบ และติดสีสม่ำเสมอ (uniform) ภายในแกรนูลไม่มีโครงสร้างผลึก (crystalline structure) เช่นเดียวกับในเต่าทะเล กิ่งก่า จิ้งจก และงู (Casal et al., 2007; Work et al., 1998; Martinez-Slivestre et al., 2005; Salakij et al., 2002a) แต่แตกต่างจากกิ้งก่าสแควมาต้าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดที่สามารถพบโครงสร้างผลึกในแกรนูลของอีโอสิโนฟิลได้ (Carvalho et al., 2006; เฉลียว, 2548)

ค. เบโซฟิล (Basophil)

เบโซฟิลในเต่าบัวมีลักษณะเด่นที่แกรนูลติดสีน้ำเงินเข้มมีลักษณะกลมและใหญ่ทำให้ภายในเซลล์บรรจุแกรนูลได้น้อย การย้อมสีด้วย Wright's ทำให้เห็นโครงสร้างและแกรนูลที่ไม่เกิด degranulate ของเบโซฟิลได้ง่ายทำให้จำแนกเซลล์ได้ชัดเจน เช่นเดียวกับในงูจงอาง (Salakij et al., 2002a) ดีกว่าการย้อมด้วยสี Diff-Quick. ที่ทำให้เห็นแต่ส่วนช่องว่างใสของเบโซฟิล ซึ่งการแตกของแกรนูลนี้เกิดขึ้นได้ง่ายจากการใช้สีย้อมที่ละลายในน้ำ (water-based stain) (Campbell, 2006) และพบได้ในการย้อมด้วยสี Rowanowsky-type stains ซึ่งตรึงเซลล์ด้วยแอลกอฮอล์ (Nicole et al., 2007)

ปฏิกิริยาทางไซโตเคมีของเบโซฟิลในเต่าบัว แกรนูลติดสี NMB ส่วนระหว่างแกรนูลติดสี PO และ PAS แต่ให้ผลลบต่อ SBB, AcP, ALP, ANAE และ TB แตกต่างจากในเต่าตนุฮาวาย (Work et al., 1998) เต่าบกทะเลทราย (Alleman et al., 1992) และเต่าหัวค้อน (Casal and Orós, 2005) ที่ให้ผลบวกต่อสี TB เพียงอย่างเดียว โดยการติดสี PO และ PAS ระหว่างแกรนูลของเบโซฟิลในเต่าบัว อาจเกิดจากการติดสีที่อะซูโรฟิลลิกแกรนูลที่ถูกบดบังรูปร่างโดยแกรนูลขนาดใหญ่ได้

เบโซฟิลให้ผลลบต่อ TB แตกต่างจากในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Raskin and Valenciano,2000) และสัตว์เลื้อยคลานส่วนใหญ่ เช่น เต่าบก เต่าทะเล จระเข้น้ำเค็ม และกิ้งก่า (Alleman et al., 1992; Work et al., 1998; Casal and Orós, 2005; Mateo et al., 1984; Martinez-Silvestreet al., 2005) โดยสี TB จะให้ผลบวกที่จำเพาะ ต่อเมตาโครมาตินแกรนูลของแมสเซลล์ (mast cell) และเบโซฟิลที่ทำหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ surface immunoglobulins และทำหน้าที่หลักในการปลดปล่อยฮีสตามีน (histamine) กระตุ้นให้เกิดการอักเสบเฉียบพลัน และปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันแบบไวเกิน (Mead et al., 1983; Sypek et al., 1984 ; Sypek and Borysenko, 1988) อย่างไรก็ตามในอีกัวน่าเขียวเบโซฟิลให้ผลลบต่อ TB ได้เช่นกัน (Harr et al., 2001) ซึ่งเป็นไปได้ว่า ในเต่าบัวและอีกัวน่าเขียว เบโซฟิลอาจไม่มีแกรนูลที่ใช้บรรจุฮีสตามีน เหมือนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์เลื้อยคลานส่วนใหญ่

จากการศึกษาเบโซฟิลในเต่าบัวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แยกจากเม็ดเลือดขาวที่มีแกรนูล ชนิด เฮเทอโรฟิล และอีโอสิโนฟิล โดยลักษณะของแกรนูลที่นูนออกมาและจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านจะพบว่าลักษณะเด่นของเบโซฟิลคือ มีแกรนูลที่บรรจุอยู่ในถุงแวคูลโอลขาดใหญ่หลายถุง ขยาดแตกต่างกันไป คล้ายกับในนกกาบบัว (เฉลียว, 2548) ในแวคลูโอลส่วนใหญ่เห็นเพียงช่องว่างที่มีเศษแกรนูลเล็กน้อย ที่เกิดจากองค์ประกอบที่ละลายน้ำได้หายไประหว่างขั้นตอนการเตรียมเลือด (Campbell and Ellis, 2007) เบโซฟิลประกอบด้วยอะซูโรฟิลลิกแกรนูล และมี fine lamellar granule ที่คล้ายกับในนกหลายชนิด (เฉลียว, 2548) ซึ่งไม่พบในสัตว์เลื้อยคลานทั่วไป (Bounous et al., 1996; Salakij et al., 2002a; Carvalho et al.,2006) ซึ่งเป็นไปได้ว่าเบโซฟิลในเต่าบัวมีพัฒนาการที่แตกต่างจากสตว์เลื้อยคลานอื่น หรืออาจมีพัฒนาการของบทบาทหน้าที่เซลล์มากขึ้น เนื่องจากเป็นเม็ดเลือดที่พบได้เป็นหลัก และมีจำนวนใกล้เคียงกับอีโอสิโนฟิล และเฮเทอโรฟิลในกระแสเลือด

ง. ลิมโฟไซต์ (Lymphocyte)

ลิมโฟไซต์ในเต่าบัว มีลักษณะเหมือนในสัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์เลี้ยงลูกดวยนมทั่วไป ซึ่งมีหลายขนาด (Campbell and Ellis, 2007) แต่ในเต่าบัวลิมโฟไซต์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดมีขนาดไม่เกิน 8 ไมครอน จึงไม่สามารถแยกเป็นลิมโฟไซต์ขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5-10 μm) และลิมโฟไซต์ขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 10- 15 μm) ได้ (Campbell and Ellis, 2007)

ลิมโฟไซต์ในเต่าบัวมีลักษณะคล้ายกับธรอมโบไซต์แบบกลม เช่นเดียวกับใน eastern diamondback rattle snakes (Alleman et al., 1999) เต่าบกทะเลทราย (Alleman et al., 1992) และงู yellow rat snake (Bounous et al., 1996) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการย้อมด้วยสี Wright's Giemsa และ Diff- Quick ย้อมติดสีไซโตพลาสซึมของธรอมโบไซต์ได้ดีกว่าย้อมด้วยสี Wright's ทำให้ช่วยจำแนกออกจากเซลล์ลิมโฟไซต์ได้ดีกว่า

ในเต่าบัวสามารถพบ reactive lymphocyte ได้เล็กน้อยซึ่งมีลักษณะใหญ่กว่าลิมโฟไซต์ปกติ พบแวลคูโอลเล็กๆ หรืออะซูโรฟิลลิกแกรนูลซึ่งมีขนาดเล็กรอบไซโตพลาสซึม โดยใน African spur-thighed tortoise (*Geochelone sulcata*) พบ reactive lymphocyte ที่มีลักษณะเป็น azurophilic กลมเล็กเป็นรูปแท่ง ซึ่งการเกิดลักษณะของลิมโฟไซต์ดังกล่าวสามารถบ่งบอกถึงการเกิดการกระตุ้นจากแอนติเจนในร่างกาย (antigenic stimulation) (Nicole et al., 2007)

ปฏิกิริยาไซโตเคมีของลิมโฟไซต์ในเต่าบัวให้ผลบวกเล็กน้อยต่อสี AcP, ANAE และ PAS แต่ให้ผลลบต่อ PO, SBB, ALP, NMB และ TB ซึ่งการติดสี PAS ทั้งในลิมโฟไซต์ และธรอมโบไซต์ของเต่าบัว มีความแตกต่างจากในสัตว์เลื้อยคลานอื่น เช่น eastern diamondback rattlesnake (Alleman et al., 1999) เต่าบกทะเลทราย (Alleman et al., 1992) และงูจงอาง (Salakijet al., 2002a) ที่สี PAS สามารถช่วยในการแยกลิมโฟไซต์จากธรอมโบไซต์ได้ โดยลิมโฟไซต์จะให้ผลลบ ส่วนธรอมโบไซต์จะให้ผลบวกต่อ PAS แต่ในจระเข้อเมริกันอะลิเกเตอร์ ผลจะตรงกันข้ามคือ ลิมโฟไซต์ให้ผลบวก ส่วนธรอมโบไซต์ให้ผลลบต่อ PAS (Mateo et al., 1984) ดังนั้นในเต่าบัวจึงไม่สามารถใช้ความแตกต่างของการติดสี PAS ใช้ในการลิมโฟไซต์จากธรอมโบไซต์ได้

ลิมโฟไซต์ในสัตว์เลื้อยคลานแบ่งออกเป็น T-lymphocyte และ B-lymphocyte เช่นเดียวกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดย T-cell จะตอบสนองด้วยการสร้าง immunoglobulin (Sypek and Borsenko, 1988) และสี ANAE สามารถใช้เป็นตัวชี้จำเพาะต่อ T-lymphocyte ในมนุษย์ และในสัตว์เลี้ยง (Ranki et al., 1980) การที่เต่าบัวมีการติดสี ANAE ในบางเซลล์ อาจบ่งบอกถึงการแบ่งแยกชนิดของ T และ B – lymphocyte เช่นเดียวกับในจระเข้อเมริกันอะลิเกเตอร์ (Mateo et al., 1984) และ giant lizard (Martinez-Silvestre et al., 2005)

จากการศึกษาลิมโฟไซต์ในเต่าบัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนบบส่องกราดและส่องผ่าน พบว่ามีขนาดเล็ก เป็นเซลล์กลม มีผิวเซลล์ค่อนข้างขรุขระ มีเท้าเทียมมาก มี N:C ratio มาก ไม่พบแกรนูล มีไมโตคอนเดรียขนาดใหญ่ จำนวนมาก พบเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมชนิดหยาบ และไรโบโซมอิสระภายในนิวเคลียสค่อนข้างกลม มี heterochromatin มากชัดเจนอยู่ที่ขอบนิวคลียสคล้ายกับในเต่า (Casal et al., 2007; Work et al., 1998) สัตว์เลื้อยคลาน (Alleman et al., 1999;Salakij et al., 2002a; Bounous et al., 1996) และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (เฉลียว, 2548)

จ. โมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิล (Monocytic-like azurophil)

ในเต่าบัวเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิล มีลักษณะรูปร่าง ที่เห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และการติดสีไซโตเคมีของเซลล์นี้แตกต่างจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของสัตว์อื่นๆที่มีรายงาน โดยลักษณะรูปร่างและโครงสร้างจากกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างที่มีรูปร่างไม่แน่นอน ไซโตพลาซึมมีลักษณะฟ่ามมองไม่เห็นแกรนูล และจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าเซลล์มีไซโตพลาสซึมมาก มี heterochromatin น้อยอยู่รอบขอบในนิวเคลียส ออแกลแนลภายในมาก ได้แก่ เอนโดพลาสมิกเรทิคัวลัม

ชนิดหยาบ ไมโตคอนเดรีย และไลโซโซม ซึ่งสัมพันธ์กับหน้าที่ในกระบวนการกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอม คล้ายกับในโมโนไซต์ (Alberio et al., 2005; Taylor et al., 1963; Sypek and Borysenko, 1988) และมีโครงสร้างโดยทั่วไป (ยกเว้นอะซูโรฟิลลิกแกรนูล) คล้ายคลึงกับโมโนไซต์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นก และสัตว์เลื้อยคลาน อื่นๆ (Campbell and Ellis, 2007) แต่เมื่อย้อมสี Wright's Giemsa พบการติดสีไม่สม่ำเสมอของสีเทาปนม่วงในไซโตพลาสซึมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง และอะซูโรฟิลลิกแกรนูลขนาดเล็กที่เห็นได้อย่างชัดเจนภายในไซโตพลาสซึม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ซึ่งเป็นลักษณะที่มีความคล้ายคลึงกับอะซูโรฟิล เช่นกัน ดังที่พบในเต่าบกทะเลทราย (Alleman et al., 1992) เต่าหัวค้อน (Smith et al., 2000; Keller et al., 2004) งู กิ้งก่า และจระเข้ (Salakij et al., 2002a, Dotson et al., 1995; Hawkey and Dennett, 1989; Harr et al., 2001) อย่างไรก็ตามในเต่าบัวไม่สามารถจำแนกว่าเซลล์ที่พบนี้เป็นเซลล์อะซูโรฟิลได้ชัดเจน เนื่องจากผลการย้อมติดสีไซโตเคมีให้ผลบวกต่อสี AcP เท่านั้น แต่ให้ผลลบต่อการย้อมด้วย PO, SBB, ALP, ANAE, NMB, PAS และ TB ซึ่งแตกต่างจากในงู eastern diamondback rattlesnakes ที่อะซูโรฟิลให้ผลบวกต่อสี PO, SBB และ PAS ใกล้เคียงกับนิวโทรฟิลในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Alleman et al., 1999) ซึ่งการเกิดผลบวกต่อสีดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าอะซูโรฟิล ในสัตว์เหล่านี้มีหน้าที่เป็นเซลล์กลืนทำลายสิ่งแปลกปลอม (phagocyte cell) โดยขบวนการ oxidative burst คล้ายกับในนิวโทรฟิลของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Head et al., 2004) ซึ่งโมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิล ในเต่าบัวของการศึกษาครั้งนี้ให้ผลลบต่อสีดังกล่าว คล้ายกับในอีกัวน่า หรือสัตว์อื่นในกลุ่มกิ้งก่า แสดงถึงว่าอะซูโรฟิลอาจมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์กลุ่ม monocytoid cell ซึ่งอาจจัดเป็นกลุ่มของโมโนไซต์ หรือเป็นโมโนไซต์ที่มีลักษณะแบบอะซูโรฟิล (azurophilic monocyte) (Harr et al.,2001; Heard et al., 2004) สอดคล้องกับการติดสี AcP ที่สามารถพบได้ในโมโนไซต์ของ นก สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และสัตว์เลื้อยคลานหลายชนิด (Mateo et al., 1984; Caxton-Martins and Nganwuchu, 1978)

ในเต่าบัวนั้นโมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิล มีประมาณร้อยละ 9-12 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด ซึ่งเป็นเม็ดเลือดขาวที่พบได้น้อยที่สุดในเต่าบัว โดยในสัตว์เลื้อยคลานอื่นๆเช่น เต่าน้ำจืด เต่าบก กิ้งก่า และจระเข้น้ำเค็ม จะมีโมโนไซต์ประมาณ 10-20% ของจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Sypek and Borsenko, 1988; Pienaar, 1962; Alleman et al., 1992; Harr et al., 2001; Mateo et al.,1984) แตกต่างกับในงูจงอางและเต่าหัวค้อนที่พบโมโนไซต์ได้น้อยมากประมาณ 0-1% ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Salakij et al., 2002a; Casal and Orós, 2006) และไม่พบเม็ดเลือดชนิดนี้เลยในลูกเต่าตนุ (Aguirre et al. 1995; Wood and Ebank, 1984) และเต่าหญ้า Kemp's ridley turtle (Cannon, 1992) ส่วนอะซูโรฟิลที่พบได้ใน

Bornean river turtle (Orlitia borneensis) มีประมาณร้อยละ 6.6-7.5 ของจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Knotkovà et al., 2005) เต่าตนุสามารถพบอะซูโรฟิลประมาณร้อยละ 13 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Samour et al., 1998) เต่าหัวค้อน และลูกเต่าหัวค้อน (*Caretta caretta*) พบอะซูโรฟิลประมาณร้อยละ 5 ของจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Smith et al., 2000; Keller et al., 2004) และไม่พบเม็ดเลือดชนิดนี้เลยในเต่าน้ำจืดหลายชนิดที่อยู่ในครอบครัว Emydidae เช่น northern red-bellied cooters (*Pseudemys rubriventris*) (Innis et al., 2007), bog turtles (*Clemmys muhlenbergii*) (Brenner et al., 2002), painted turtles (*Chrysemys picta*) (Mussachia and Sievers, 1956; Rapatz and Mussachia, 1957) และเต่าแก้มแดง (*T. s. elegans*) (Crawshaw and Holz, 1996)

5.1.2 ค่าโลหิตวิทยาและเคมีโลหิตในเต่าบัวโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียที่สุขภาพปกติ

ค่าโลหิตวิทยาและเคมีโลหิตเปรียบเทียบระหว่างเต่าบัวเพศผู้และเพศเมียในการทดลองนี้ พบว่าค่าโลหิตวิทยาและเคมีโลหิตเกือบทุกค่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเพศอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ค่าจำนวนเม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ในเต่าบัวทั้งสองเพศมีค่าเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกัน แต่มีค่าที่ต่ำกว่าในเต่าน้ำจืดหลายชนิดที่อยู่ในครอบครัว Emydidae เช่นกัน เช่น northern red-bellied cooters (*Pseudemys rubriventris*) (Innis et al., 2007), bog turtles (*Clemmys muhlenbergii*) (Brenner et al., 2002), painted turtles (*Chrysemys picta*) (Mussachia and Sievers, 1956; Rapatz and Mussachia, 1957) และเต่าแก้มแดง (*T. s.elegans*) (Crawshaw and Holz, 1996) (ตารางที่ 2.1) ซึ่งเต่าบัวที่เก็บตัวอย่างทุกตัวเป็นเต่าที่ไม่มีอาการทางคลินิก ความแตกต่างของค่าเม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดแดงอัดแน่น อาจเกิดได้จากความแตกต่างของปัจจัยภายใน และภายนอกของเต่าแต่ละชนิดที่แตกต่างกันไป แต่ในเต่าบัวมีค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินที่ใกล้เคียงกันกับในเต่า และสัตว์เลื้อยคลานอื่นๆ ที่ทั่วไป คือ มีค่าตั้งแต่ 5.5-12 g/dL (Sypek and Borsenko, 1988) ทำให้ค่าปริมาตรของเม็ดเลือดแดงโดยเฉลี่ย (MCV) ปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (MCHC) และปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงหนึ่งเม็ด (MCH) มีค่าที่ใกล้เคียงหรือสูงกว่าในเต่าชนิดอื่นๆ เล็กน้อย

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเพศค่าเม็ดเลือดแดง และดัชนีของเม็ดเลือดแดงทั้งสองเพศไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ยกเว้นค่าปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงในเต่าเพศผู้ที่มีค่าสูงกว่าในเต่าเพศเมียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เนื่องจากเต่าบัวเพศผู้มีแนวโน้ม

ของค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินที่สูงกว่า ซึ่งอาจเกิดจากการที่เต่าเพศผู้มีเมทาบอลิสมในเซลล์ที่สูง ทำให้มีความต้องการออกซิเจน และการสร้างฮีโมโกลบินที่มากกว่าเต่าเพศเมีย โดยความแตกต่างของเม็ดเลือดแดงระหว่างเพศเมีย มีการรายงานในสัตว์เลื้อยคลานหลายชนิด พบรายงานว่า New Guinea snapping turtle (*Elseya novaeguinae*) และ grass snake (*Natrix natrix*) เพศผู้มีค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และบิลิรูลิน (bilirubin) ที่สูงกว่าเพศเมียอย่างมีนัยสำคัญ (Anderson et al., 1997; Wojtaszek, 1991) และในกิ้งก่าอีกัวน่าเขียวเพศเมียจะมีค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และ ปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงสูงกว่าเพศผู้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Harr et al.,2001) การที่เต่าเพศผู้มีแนวโน้มของค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นที่ต่ำกว่าตัวเมียอาจเป็นความผิดปกติจากการแตกของเม็ดเลือดแดง (โดยอาจเกิดภายใน หรือภายนอกร่างกาย) ทำให้ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นต่ำลง (เฉลียว, 2548)

จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดโดยรวมของทั้งสองเพศในเต่าบัว มีค่าที่ใกล้เคียงกับใน northern red-bellied cooters (Innis et al., 2007) New Guinea snapping turtle (Anderson et al., 1997) แต่มีค่าที่สูงกว่าใน bog turtles (Brenner et al., 2002) เต่าหับน้ำจืดตะวันออก (Beck et al.,1995) โดยเฉพาะอย่างยิ่งจำนวนเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดในเต่าบัวมีความแตกต่างจากเต่าอื่นๆ ที่โดยมีการจำแนกชนิดของเม็ดเลือดขาวพบเฮเทอโรฟิลที่มากที่สุด รองลงมาเป็นอีโอสิโนฟิล เบโซฟิล ลิมโฟไซต์ และโมโนไซติก คล้ายอะซูโรฟิล ตามลำดับ (ค่าร้อยละของจำนวนเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดโดยเฉลี่ยทั้งสองเพศมีค่าร้อยละ 29.40$\pm$6.88, 23.69$\pm$5.30, 21.23$\pm$1.90, 14.81$\pm$5.88 และ 10.73$\pm$5.29 ตามลำดับ) ซึ่งแตกต่างจากใน northern red-bellied cooters, snapping turtle, painted turtles และเต่าแก้มแดง ที่มีจำวนเบโซฟิลที่มากที่สุด รองลงมาเป็นลิมโฟไซต์ เฮเทอโรฟิล อีโอสิโนฟิล และโมโนไซต์ ตามลำดับ (Innis et al., 2007; Mead et al., 1983; Michels, 1923;Taylor and Kaplan, 1961) หรือใน bog turtle ที่มีจำนวนลิมโฟไซต์มากที่สุด รองลงมาเป็นเฮเอโรฟิล เบโซฟิล โมโนไซต์ และอีโอสิโนฟิล ตามลำดับ (Brenner et al., 2002) หรือเต่าบกเมดิเตอร์เรเนียน ที่มีจำนวนลิมโฟไซต์มากที่สุด รองลงมาเป็นเฮเทอโรฟิล เบโซฟิล อะซูโรฟิล โมโนไซต์ และอีโอสิโนฟิล ตามลำดับ (Neiffer et al., 2005) หรือในเต่าตนุที่มีจำนวนอีโอสิโนฟิลมากที่สุด รองลงมาเป็นเฮเทอโรฟิล โมโนไซต์ อะซูโรฟิล เบโซฟิล และลิมโฟไซต์ ตามลำดับ (Samour et al.,1998) โดยจำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้อาจมีความแตกต่างกันได้จากความแตกต่างทางสรีรวิทยาในสัตว์แต่ละชนิด (Nicole et al., ly,2007) หรือเทคนิคในการนับที่ไม่เหมือนกัน ซึ่งวิธีที่แตกต่างกันจะมีค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรผัน (coefficients of variability) ที่แตกต่างกันไปได้มากกว่าร้อยละ 10 (Russo et al.,

1986) อย่างไรก็ตามในเต่าบัวเพศผู้มีจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดและจำนวนจริงของโมโนไซติก คล้ายอะซูโรฟิลมากกว่าเต่าเพศเมียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ที่อาจเกิดจากความแตกต่างตามธรรมชาติระหว่างเพศ แตกต่างจากในสัตว์เลื้อยคลานทั่วไปที่เพศจะมีอิทธิพลต่อจำนวนของลิมโฟไซต์ โดยในสัตว์เพศเมียมีจำนวนลิมโฟไซต์มากกว่าในเพศผู้ เนื่องจากปัจจัยทางด้านฮอร์โมน (Campbell, 2006) ซึ่งแตกต่างกันได้จากความแตกต่างทางสรีรวิทยาในสัตว์แต่ละชนิดเช่นกัน

ในเต่าบัวพบจำนวนเบโซฟิลมากเป็นอันดับสาม หรือประมาณร้อยละ 21 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด ซึ่งมีรายงานการพบเบโซฟิลจำนวนมากในกระแสเลือดได้เช่นกันในเต่าน้ำจืดที่มีสุขภาพปกติบางชนิด เช่น northern red-bellied cooters (Innis et al., 2007) bog turtles (Brenner et al., 2002), snapping turtle (*Clelydra serpentine*) (Mead et al., 1983), painted turtles (Michels, 1923) เต่าบึงยุโรป เต่าน้ำจืด Reeve's turtles (*Chinemys reevesi*) (Rosskopf, 2000) และเต่าแก้มแดง (Taylor and Kaplan, 1961) โดยเฉพาะใน northern red- bellied cooters, snapping turtle, painted turtles และเต่าแก้มแดง สามารถพบเบโซฟิลร้อยละ 50-60 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด รวมทั้งในเต่าบกทะเลทรายสามารถพบเบโซฟิลร้อยละ 30 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Alleman et al., 1992) อย่างไรก็ตามในสัตว์เลื้อยคลานและเต่าส่วนใหญ่ รวมทั้งในเต่าน้ำจืดอีกหลายชนิดจะมีเบโซฟิลจำนวนน้อยมาก หรืออาจไม่พบเลยก็ได้ (Casal and Orós, 2005; Salakij et al., 2002a; Work et al., 1998; Anderson et al., 1997;Kumer and Maiti, 1981) จำนวนของเบโซฟิลจะหลากหลายขึ้นกับชนิดของสัตว์และอิทธิพลของฤดูกาล ตำแหน่งที่อยู่อาศัยและอายุของสัตว์ (Work et al., 1998)

ความแตกต่างของค่าเคมีโลหิตระหว่างเพศผู้และเพศเมีย (sex-dependent differences) ในเต่าบัวพบเพียงค่าเอนไซม์ ALT (alanine aminotransferase) ในเต่าเพศเมียมีค่าต่ำกว่าในเต่าเพศผู้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สอดคล้องกับรายงานในเต่าบึงยุโรปที่มีสุขภาพปกติโดยเต่าเพศเมียมีค่าเอนไซม์ ALT ที่ต่ำกว่าในเต่าเพศผู้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเพียงค่าเดียวเช่นกัน (Metin et al., 2006) แต่แตกต่างจากเต่าบึงเมดิเตอร์เรเนียน (*Mauremys leprosa*) ที่เต่าเพศเมียมีค่าแคลเซียม ฟอสฟอรัส กลูโคส คอเรสเตอรอล โปรตีนทั้งหมด กรดยูริค โซเดียม โพแทสเซียม เอนไซม์ AST (aspartate aminotransferase), CK (Creatinine kinase), ALP (alkaline phosphatase) และ creatinine สูงกว่าในเต่าเพศผู้ (Hidalgo-Vila et al.,2007) ยกเว้น LDH (lactate dehydrogenase) ซึ่งค่าที่สูงของแคลเซียม ฟอสฟอรัส และ คอลเรสเตอรอล พบได้เป็นปกติในสัตว์เลื้อยคลานเพศเมียที่อยู่ระหว่างการพัฒนาไข่ และมีกระบวนการ vitellogenesis ดำเนินอยู่ (Dessauer, 1970; Campbell and Ellis, 2007)

โดยค่าเคมีโลหิตเฉลี่ยของเต่าบัวในการศึกษานี้มีความแตกต่างไปจากเต่าน้ำจืดหลายชนิด ได้แก่ northern red-bellied cooters (Innis et al., 2007) เต่าแก้มแดง (Crawshaw and Holz, 1996) เต่าบึงยุโรป (Metin et al., 2006) และ bog turtles (Brenner et al., 2002) ซึ่งอาจเกิดจากค่าเคมีโลหิตของเต่าและสัตว์เลื้อยคลานทั่วไปมักมีค่าในช่วงปกติที่ค่อนข้างกว้าง เนื่องจากกระบวนการเมแทบอลิซึมในเลือดขึ้นกับอุณหภูมิ และฤดูกาลเป็นสำคัญ อีกทั้งยังมีความแตกต่างในเต่าแต่ละชนิด อายุ เพศ ภาวะทางโภชนาการ สภาวะทางกายภาพ และการจัดการ (Wilkinson, 2004) การใช้ค่ามาตรฐานอ้างอิงจึงมีข้อจำกัดในการใช้อยู่มากกว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมถึงแม้ว่าสัตว์อื่นๆจะมีปัจจัยภายนอกดังกล่าว ทำให้ค่าเคมีโลหิตผันแปรได้เช่นเดียวกัน แต่ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำที่เป็นสัตว์เลือดเย็น (ectotherm) ปัจจัยภายนอกจะมีอิทธิพลเป็นอย่างมากกับความปกติทางกายภาพและสรีรวิทยาเมื่อเปรียบเทียบกันกับในสัตว์เลือดอุ่น (endotherm) (Campbell, 2004) นอกจากนั้นความแตกต่างทางเทคนิคของผู้ตรวจก็เป็นปัจจัยที่สำคัญโดยเฉพาะค่าเอนไซม์ในเลือด เช่น AP, AST และ LDH ซึ่งเปลี่ยนแปลงได้ง่าย ขึ้นกับ วิธีการเก็บ เวลา สารที่ใช้ในการกันเลือดแข็งตัว (Wilkinson, 2004) และตำแหน่งที่ใช้เจาะเก็บเลือด (López-Olvera et al., 2003) อีกทั้งการปนเปื้อนของน้ำเหลือง มีผลต่อความคลาดเคลื่อนของค่าที่ได้ เช่น ทำให้เกิดการลดลงของค่าโปรตีนในพลาสม่า และโปแทสเซียมจากความเป็นจริงอย่างมีนัยสำคัญ (Gottdenker and Jacobson, 1995; Crawshaw and Holz, 1996) เป็นต้น

หากเปรียบเทียบกับค่าเคมีโลหิตของเต่าบัวกับเต่าน้ำจืดชนิดอื่นที่อยู่ในครอบครัว Emydidae ด้วยกัน เช่น northern red-bellied cooters (Innis et al., 2007) และเต่าบึงเมดิเตอร์เรเนียน (Hidalgo-Vila et al., 2007) จะพบว่า เต่าบัวมีค่าโปรตีน อัลบูมิน แคลเซียม และฟอสฟอรัสที่ต่ำกว่า และมีค่าโปรตีนโกลบูบิน โปรตีนทั้งหมด BUN และเอนไซม์ AP ที่สูงกว่า โดยมีค่าเอนไซม์ AST กลูโคส กรดยูริค และ creatinine ที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งผลที่แตกต่างนี้อาจเกิดจากปัจจัยภายนอก และภายในของเต่าแต่ละชนิดและช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตาม ภาวะแคลเซียมในเลือดต่ำเกิน (hypocalcemia) ในสัตว์เลื้อยคลานส่วนใหญ่เกิดขึ้นเมื่อมีค่าแคลเซียมในเลือดต่ำกว่า 8 mg/dL และฟอสฟอรัสในเลือดต่ำกว่า 1-5 mg/dL (Stein, 2006) อาจเกิดจากสาเหตุของแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่ไม่สมดุล (Campbell, 2006) ภาวะเลือดเป็นด่าง (alkalosis) อัลบูมินในเลือดต่ำ (hypoalbuminemia) หรือภาวะ hypoparathyroidism โดยการเกิดภาวะ secondary nutritional hyperparathyroidism เป็นความผิดปกติที่พบได้บ่อยในสัตว์เลื้อยคลานที่กินพืช (Boyer, 2006;Donoghue and Langenberg, 2006) ร่วมกับการเพิ่มขึ้นของค่าเอนไซม์ AP อาจสามารถบ่งบอกถึงความผิดปกติของ osteoblastic activity

(Campbell, 2004) และการเกิดภาวะโปรตีนโกลบูลินสูงเกิน (hyperglobulinemia) จะสัมพันธ์กับการอักเสบเรื้อรัง และโรคติดเชื้อ รวมทั้งค่า BUN ที่สูงขึ้นสามารถบ่งบอกถึงภาวะขาดน้ำของเต่าน้ำจืด เนื่องจากเต่าน้ำจืดมีการขับของเสียปริมาณมากในรูปของยูเรียและแอมโมเนีย อีกทั้งมีค่าออสโมลาลิตี้ในพลาสมาใกล้เคียงกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ทำให้ค่า BUN สามารถใช้ร่วมกับค่าเคมีโลหิตอื่นๆในการประเมินภาวะโรคไตได้ (Campbell, 2006; Nicole et al., 2007)

อย่างไรก็ตามวิธีในการตรวจทางห้องปฏิบัติการ การเจาะเลือดในตำแหน่งที่ต่างกัน และ ฤดูกาล มีผลต่อค่าโลหิตวิทยาและเคมีโลหิตวิทยาในเต่าที่แตกต่างเช่นกัน (Anderson et al., 1997; Arnold, 1994; Crawshaw and Holz, 1996; Gottdenker and Jacobson, 1995, Campbell and Ellis, 2007) เช่น การนับเม็ดเลือดขาวด้วยวิธี Natt-Herrick's กับ Eosinophil Unopette ที่ให้ค่าเม็ดเลือดขาวแตกต่างกันในเต่าหัวค้อน (Arnold, 1994) การปนเปื้อนน้ำเหลืองในเลือดของเต่าที่เจาะเก็บจาก dorsal coccygeal vein, subcarapace vessel หรือ post-occipital venous plexus ทำให้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทั้งค่าโลหิตวิทยาและเคมีโลหิต (Crawshaw and Holz, 1996; Gottdenker and Jacobson, 1995; Hernandez-Diver et al., 2002) ซึ่งในการทดลองนี้ได้เลือกทำการเจาะเลือดที่ตำแหน่งเส้นเลือดดำที่คอ (Jugular vein) ที่เป็นตำแหน่งที่มีโอกาสปนเปื้อนน้ำเหลืองได้น้อยที่สุด แต่เป็นตำแหน่งที่ทำการจับบังคับได้ยาก (Nicole et al., 2007) ทำให้ในงานวิจัยเกี่ยวกับเลือดในเต่าส่วนใหญ่ทำการเจาะเลือดที่ตำแหน่งอื่นๆบวกกับปัจจัยอื่นๆที่กล่าวข้างต้นที่อาจทำให้ค่าโลหิตวิทยาและเคมีโลหิตในการศึกษาครั้งนี้มีค่าบางตัวที่สูงหรือต่ำกว่าในรายงานอื่นๆที่เคยมีมา

5.1.3 ความสัมพันธ์ของน้ำหนัก และความยาวกระดองหลังกับค่าโลหิตวิทยาในเต่าบัวโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียที่สุขภาพปกติ

เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักและความยาวกระดองหลังของเต่าบัวเพศผู้และเพศเมียโตเต็มวัยพบว่าในเต่าที่น้ำหนักใกล้เคียงกันเต่าบัวเพศผู้มีความยาวกระดองหลังที่มากกว่าในเต่าเพศเมียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งตรงกับลักษณะสันฐานวิทยาที่แตกต่างกันระหว่างเพศของเต่าบัว ที่เต่าบัวเพศผู้จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและขยายขนาดไปในแนวกว้าง และขนาดเล็กกว่าเต่าเพศผู้อย่างชัดเจนเมื่อมีการเติบโตมากขึ้น (เพ็ญศรี, 2536)

ค่าโลหิตวิทยาของเต่าบัวในการศึกษานี้มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเท่านั้น โดยไม่มีความเกี่ยวข้องกับความยาวกระดองหลัง โดยในเต่าบัวเพศผู้

ปริมาณของเม็ดเลือดแดงโดยเฉลี่ยจะมีแนวโน้มที่ลดลงเมื่อเต่ามีน้ำหนักมากขึ้น อาจเกิดเนื่องจากที่มีขนาดที่มากขึ้น ทำให้มีจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดที่มากขึ้น ส่งผลให้การคำนวณค่า MCV ที่ได้มีค่าต่ำลดลง คล้ายคลึงกับในเต่าแก้มแดงที่พบว่าขนาดและน้ำหนักตัวมีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกันกับปริมาณเลือด แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับเม็ดเลือดแดงอัดแน่นและความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (Hutton, 1961) อย่างไรก็ตามคาวมสัมพันธ์นี้ไม่พบในเต่าบัวเพศเมีย อาจเกิดเนื่องจากเต่าเพศเมียมีเมแทบอลิซึมของการสร้างเม็ดเลือดแดงที่คงที่กว่า หรือ เนื่องจากเต่าเพศเมียมีอัตราการขยายขนาดที่น้อยกว่าในเต่าเพศผู้ (เพ็ญศรี,2536) ซึ่งความสัมพันธ์เหล่านี้เป็นค่าปกติที่เกิดขึ้น และอาจแปรผันไปตามฤดูกาล สิ่งแวดล้อมที่เต่าอาศัย หรืออาหารที่เต่าได้รับ ทำให้ค่าเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับขนาดน้ำหนักในเต่าบัว อย่างไรก็ตามการศึกษาในส่วนนี้สามารถเป็นตัวบ่งบอกอย่างหยาบว่าค่าโลหิตวิทยา และเคมีโลหิตอาจไม่มีอิทธิพลจากความแตกต่างระหว่างเต่าแต่ละอายุ (ซึ่งดูได้จากขนาด หรือความยาวของกระดองหลัง)

5.2 โครโมโซมและคาริโอไทป์ของเซลล์เม็ดเลือดในเต่าบัว

จากผลการทดลองพบว่าเต่าบัวไม่มีโครโมโซมเพศ มีจำนวนโครโมโซมในเซลล์ร่างกาย (2n) = 52 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Carr และ Bickham (1986) ซึ่งได้ศึกษาจำนวนโครโมโซมของเต่าบัวในระยะ juvenile โดยใช้เนื้อเยื่อของม้ามมาทำการเพาะเลี้ยง รวมทั้งเต่าชนิดอื่นๆใน วงศ์ย่อย Batagurinae (Testudines: Emydidae) ซึ่งอยู่ในรายงานวิจัยเดียวกัน เช่น *Callagur borneoensis*, *Chinemys kwangtungensis*, *Cuora ambionensis*, *Cyclemys dentate*, *Heosemys grandis*, *Mauremys japonica*, *Melanochelys trijuga*, *Notochelys platynata*, *Ocadia sinensis*, *Pyxidea mouhotii*, *Rhinoclemmys areolata* และ *Sacalia bealei* นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rohilla *et al*. (2006) (*Geoclemys* hamiltoni) และ Martinez *et al*. (2009) ซึ่งได้ทำการศึกษาคาริโอไทป์ของเต่าในวงศ์ Testudinidae (*Chelonoidis* (*Geochelone*) donosobarrosi) โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งทั้งหมดนี้พบว่าเต่ามีโครโมโซมเท่ากับ 2n = 52 และจัดอยู่ใน Superfamily Testudinoidea เดียวกันกับในรายงานข้างต้น

ข) บทสรุป และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษานี้พบได้ว่าลักษณะรูปร่าง จุลทรรศน์อิเล็กตรอน และไซโตเคมีของเม็ดเลือดค่าโลหิตวิทยาและเคมีโลหิตของเต่าบัวโตเต็มวัย ทำให้สามารถทราบลักษณะ และจำแนกชนิดเม็ดเลือดของเต่าบัวมีความจำเพาะจากเต่าชนิดอื่นๆ และสัตว์เลื้อยคลานทั่วไปที่มีรายงานมาก่อน โดยเม็ดเลือดแดงมีความ

คล้ายคลึงกับในเต่าทั่วไป แต่พบจุดที่ย้อมติดสีน้ำเงินในไซโตพลาสซึม (basophilic inclusion) ได้ร้อยละ 50 ของเม็ดเลือดแดง ซึ่งมากกว่าที่พบในรายงานของเต่าและสัตว์เลื้อยคลานชนิดอื่นๆ และการใช้สี NMB ในการตรวจสอบเม็ดเลือดแดงไม่สามารถทำได้เนื่องจากมีการติดสีในไมโตคอนเดรียที่มีมากในเม็ดเลือดแดงเกือบทุกเซลล์ สอดคล้องกับติดสีเข้มของ PO ที่บ่งบอกถึงวงชีวิตที่ยาวนานของเม็ดเลือดแดงในกระแสเลือดของเต่าบัว ธรอมโบไซต์ในเต่าบัวมีหลายรูปร่าง ปฏิกิริยาการติดสี PAS ไม่สามารถแยกใช้แยกธรอมโบไซต์ออกจากลิมโฟไซต์ได้ และจากโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงถึงวิวัฒนาการที่มีความคล้ายคลึงกันกับเกล็ดเลือดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เม็ดเลือดขาวในเต่าบัวแบ่งออกเป็น 5 ชนิด แบ่งเป็นชนิดที่มีแกรนูล คือ เฮเทอโรฟิล อีโอสิโนฟิล และเบโซฟิล ซึ่งเฮเทอโรฟิลและอีโอสิโนฟิล มีลักษณะโครงสร้างการติดสีไซโตเคมีคล้ายกับในเต่าและสัตว์เลื้อยคลานทั่วไป โดยที่เบโซฟิลมีการพัฒนาของโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับในสัตว์ปีก แต่ไม่ติดสี TB ซึ่งอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของหน้าที่เซลล์ส่วนเม็ดเลือดขาวที่ไม่มีแกรนูลคือ ลิมโฟไซต์ และโมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิล มีพัฒนาการของโครงสร้างส่วนใหญ่และการติดสีไซโตเคมีคล้ายคลึงกับลิมโฟไซต์ และโมโนไซต์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมตามลำดับ โดยเม็ดเลือดขาวเฮเทอโรฟิลมีจำนวนมากที่สุดในเต่าบัว รองลงมาเป็น อีโอสิโนฟิล เบโซฟิล ลิมโฟไซต์ และโมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิล ตามลำดับ (ค่าร้อยละของจำนวนเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดโดยเฉลี่ยทั้งสองเพศมีค่าเท่ากับ 29.40$\pm$6.88, 23.69$\pm$5.30, 21.23$\pm$1.90, 14.81$\pm$5.88 และ 10.73$\pm$5.29 ตามลำดับ)

เพศมีอิทธิพลต่อค่าโลหิตวิทยาและเคมีโลหิตบางปัจจัยในเต่าบัวโตเต็มวัย คือ MHCH จำนวนในเม็ดเลือดขาวทั้งหมด จำนวนจริงของโมโนไซติก คล้าย อะซูโรฟิล และเอนไซม์ ALT ของเพศผู้มีค่าสูงกว่าในเพศเมียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยที่ค่า MCV ของเต่าเพศผู้ และค่าโปรตีนโกลบูลินในเต่าเพศเมียมีความสัมพันธ์ในเชิงแปรผกผันกับน้ำหนักตัว ซึ่งอาจเกิดจากอิทธิพลของเพศ ฤดูกาล และอาหารที่ได้รับ

จำนวนโครโมโซมในเซลล์ร่างกาย และคาริโอไทป์ของเต่าในวงศ์ Testudinidae (*Chelonoidis (Geochelone) donosobarrosi*) รวมทั้งเต่าบัวมีลักษณะเหมือนกัน ไม่มีโครโมโซมเพศ โดยข้อมูลดังกล่าวเป็นข้อมูลด้านพันธุศาสตร์ของเต่าบัวครั้งแรก ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยอื่นๆ ต่อไป

จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ได้ข้อมูลในการอ้างอิงที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งทางด้านพันธุศาสตร์เบื้องต้น และนำมาวินิจฉัย เปรียบเทียบ เพื่อประเมินสุขภาพของเต่าบัวในประเทศไทยได้ อีกทั้งข้อมูลเปรียบเทียบค่าโลหิตวิทยา และเคมีโลหิตของเต่าบัวป่วยในสถานพยาบาลเป็นตัวบ่งบอกในการปรับเปลี่ยนการดูแลรักษาสัตว์เหล่านี้ให้เหมาะสม อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาต่อยอดในเชิงโลหิตวิทยา

และพยาธิวิยาคลินิกของเต่าบัวเพิ่มเติม ในด้านปัจจัยต่างที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าเหล่านี้ หรือค่าที่สามารถใช้ในการเป็นตัวบ่งชี้พยาธิสภาพ หรือโรคที่มีความจำเพาะในเต่าบัวมากขึ้น รวมทั้งศึกษาร่วมไปกับเต่าพื้นเมืองชนิดต่างๆในประเทศไทย ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่อการดูแลจัดการ เพื่อส่งเสริมสุขภาพ และเพิ่มจำนวนประชากรของสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ที่มีคุณค่าของประเทศไทยเหล่านี้ในอนาคต

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เฉลียว ศาลากิจ. 2548. โลหิตวิทยาทางสัตวแพทย์. นครปฐม: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 31-251.

นันทริกา ชันชื่อ. 2549. โรคเต่า: อายุรศาสตร์และคลินิกปฏิบัติ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โฮลิสติก พับลิชชิ่ง. 65 -104.

บพิธ จารุพันธ์ และนันทพร จารุพันธ์. 2540. สัตว์เลื้อยคลาน. สัตววิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 363-384.

เพ็ญศรี ศรีกัญหา. 2536. การเปลี่ยนแปลงรูปร่างและความแตกต่างทางเพศของเต่าบัว. วิทยานิพนธ์ปริญญบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รุจิพร ประทีปเสน. 2541. การเตรียมตัวอย่างสำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.กรุงเทพฯ: ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2-19

วิโรจน์ นุตพันธุ์. 2543. เต่าในประเทศไทย. สำนักงานเสริมสร้างเอกลักษณ์ของชาติ สำนักเลขาธิการนายกรัฐมนตรี, กรุงเทพฯ. 31-142.

อัจฉริยา ไศละสูต วิจิตร บรรลุนารา และสมพร เตชะงามสุวรรณ. 2549. ภาคปฏิบัติการ เซลล์วิทยาวินิจฉัย. ใน พยาธิวิทยาคลินิกทางสัตวแพทย์. อัจฉริยา ไศละสูต นพดล พิฬารัตน์ และสุประดิษฐ์ หวังในธรรม (บก.). กรุงเทพฯ : ปอยท์ กราฟิค. 78-80.

ภาษาอังกฤษ

Aguirre, A.A., Balazs, G.H., Spraker, T.R. and Gross, T.S. 1995. Adrenal and hematological responses to stress in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomas. Physiol. Zool. 68: 831.854.

Alberio, S.O., Diniz, J.A., Silva, E.O., de Souza, W. and DaMatta, R.A. 2005. Cytochemical and functional characterization of blood and inflammatory cells from the lizard *Ameiva ameiva*. Tissue and cell. 37: 193-202.

Alleman, A.R., Jacobson, E.R. and Raskin, R.E. 1999. Morphologic, cytochemical, and ultrastructural characteristics of blood cells from eastern diamondback rattlesnakes (*Crotalus adamanteus*), Am. J. Vet. Res. 60: 507.514.

Alleman, A.R., Jacobson, E.R. and Raskin, R.E. 1992. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from the desert tortoise (*Gopherus agassizii*). Am. J. Vet. Res. 53:1645.1651.

Anderson, N.L., Wack, R. F. and Hatcher, R. 1997. Hematology and clinical chemistry reference ranges for clinically normal, captive New Guinea snapping turtle (*Elseya novaeguineae*) and the effects of temperature, sex, and sample type. J. Zoo Wildl. Med. 28: 394.403.

Arnold, J. 1994. White blood cell count discrepancies in Atlantic loggerhead sea turtles: Natt-Herrick vs. Eosinophil Unopette. Proc. Assoc. Zoo. Vet. Tech. 15-22.

Azevedo, A. and Lunardi, L.O. 2003 Cytochemical characterization of eosinophilic leukocytes circulating in the blood of the turtle (*Chrysemys dorbignih*), Acta Histochem. 105: 99-105.

Beck, K., Loomis, M., Lewbart, G., Spelman, L. and Papich, M. 1995. Preliminary comparison of plasma concentrations of gentamicin injected into the cranial and caudal limb musculature of the eastern box turtle (*Terrapene carolina Carolina*). J. Zoo Wildl. Med. 26: 265-268.

Behnke, O. 1970. Microtubules in disk-shaped blood cells. Inter. Review Exp. Pathol.9: 1-92.

Bolten, A.B. and Bjorndal, K.A. 1992. Blood profiles for a wild population of green turtles (*Chelonia mydas*) in the southern Bahamas: size-specific and sex-specific relationships. J. Wild. Dis. 28: 407-413.

Bounous, D.I., Dotson, T.K., Brooks, R.L. and Ramsay, E.C. 1996. Cytochemical staining and ultrastructural characteristics of peripheral blood leucocytes from the yellow rat sanke (*Elaphe obsoleta quadrivitatta*), Comp. Haem. Int. 6: 86-91.

Boyer, T. H. 2006. Metabolic Bone Disease. In: Reptile Medicine and Surgery. D.R. Mader (ed). 2nd ed. W.B. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania. 385-392.

Bradley, T.A., Norton, T.M. and Latimer, K.S. 1998. Hemogram values, morphological characteristics of blood cells and morphometric study of loggerhead sea turtles, *Caretta Caretta*, in the first year of life. Proc. ARAV. 8 (3): 8-16.

Brenner, D., Lewbart, M., Stebbin, M. and Herman, D. 2002. Health survey of wild and captive bog turtles (Clemmys muhlenbergii) in North Carolina and Virginia. J. Zoo Wildl. Med. 33: 311-316.

Brooks, R.L., Bounous, D.L. and Andreasen, C.B. 1996. Functional comparison of avian heterophils with human and canine neutrophils. Comp. Haematol. Int. 6:153-159.

Burrows, A.S., Fletcher, T.C. and Manning, M.J. 2001. Haematology of the turbot, *Psetta maxima* (L.): ultrastuctural, cytochemical and morphological properties of peripheral blood leucocytes. J. Appl. Ichthyol. 17: 77-84.

Campbell, T. W. 1995. Avian hematology and cytology, 2nd Edition, Iowa State University Press, Ames, Iowa, 7-11.

Campbell, T.W. 2004. Hematology of reptiles. In: Veterinary hematology and clinical chemistry. M.A. Thrall, D.C. Balcer, T.W. Campbell et al. (eds.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 259-498.

Campbell, T.W. 2006. Clinical pathology of reptiles. In: Reptile Medicine and Surgery. D.R. Mader (ed). 2nd ed. W.B. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania. 453-470.

Campbell, T.W. and Ellis, C.K. 2007. Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology. 3rd edition. Iowa: Blackwell Publishing. 51-82.

Cannon, M.S. 1992. The morphology and cytochemistry of the blood leukocytes of Kemp's ridley sea turtle (*Lepidochelys kempi*). Can. J. Zool. 70: 1336.1340.

Carr, J.L., J.W. Bickham and R.H. Dean. 1981. The karyotype and chromosomal banding patterns of the Central American river turtle Dermatemys mawii. Herpetologica. 37(2): 92-95.

Carr, J.L. and J.W. Bickham. 1986. Phylogenetic implications of karyotypic variation in the Batagurinae (Testudines: Emydidae). Genetica. 70: 89-106.

Carvalho, R.L., Antoniazzi, M.M., Jared, C., Silva, A. M. J., Santos, A.A. and Egami, M.I. 2006. Morphological, cytochemical, and ultrastructural observations on the blood cells of reptile *Tupinambis merianae* (Squamata). Comp. Clin. Pathol. 15: 169-174.

Casal, A. B., Freire, F., Bautista-Harris, G., Arencibia, A. and Orós, J. 2007. Ultrastructural Characteristics of Blood Cells of Juvenile Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*) Anatomia, Histologia, Embryologia: J. Vet. Med. 36C (5): 332-335.

Casal, A.B. and Orós, J. 2006. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells of juvenile loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). Res. Vet. Sci. 82 (2):158-165.

Caxton-Matin, A.E. and Nganwuchu, A.M. 1978. A cytochemical study of the blood of the rainbow lizard (*Agama agama*). J. Anat. 125: 477-480.

Clark, P., Johnstone, A.C., Ellison, R. and Goold, M. 2001. Inclusions in. the erythrocytes of eastern water dragons (*Physignathus. lesueurii*). Aust. Vet. J. 79 (1): 61-62.

Cleiton, F. and L. Giuliano-Caetano. 2008. Cytogenetic characterization of two turtle species: *Trachemys dorbigni* and *Trachemys scripta elegans*. Caryologia. 61(3): 253-257.

Crawshaw, G.J. and Holz, P. 1996. Comparison of plasma biochemical values in blood and blood-lymph mixtures from red-eared sliders, *Trachemys scripta elegans*. Bull. Assoc. Rept. Amphib. Vet. 6: 7-9.

Daimon, T., Gotoh, Y. and Uchida, K. 1987. Electron microscopic and cytochemical studies of thrombocyte of the tortoise (*Geoclemys reevesii*). J. Anat. 153: 185-190.

Daimon, T. and Mizuhira, V. 1980. Amine-storing organelles of submammalian thrombocytes. 6th International Histochemistry and Cytochemistry Congress, Brighton, p. 79.

Daimon, T., and Uchida, K. 1985. Ultrastructural evidence of the existence of the surface connected canalicular system in the thrombocyte of the shark (*Triakis scyllia*). J. Anat. 141: 193-200.

Davis, A.K. and Holcomb, K.L. 2008. Intraerythrocytic inclusion bodies in painted turtles (*Chrysemys picta picta*) with measurements of affected cells. Comp. Clin. Pathol. 17(1): 51-54.

Dessauer, H.C. 1970. Blood chemistry of reptiles: physiological and evolutionary aspects. In: Biology of the Reptilia. Vol. III. C. Gans and T.S. Parsons (eds). Academic Press, London. 1.72.

Desser, S.S. 1978. Morphological, cytochemical, and biochemical observations on the blood of the tuatara, *Sphenodon punctatus*. NZ. J. Zool. 5: 503-508.

Dickinson, V.M., Jarchow, J.L. and Trueblood, M.H. 2002. Hematology and plasma biochemistry reference range values for free-ranging desert tortoises in Arizona. J. Wildl. Dis. 38: 143-153.

Divers, S.J., Redmayne, G. and Aves, E.K. 1996. Haematological andbiochemical values of 10 green iguanas (*Iguana iguana*). Vet. Record. 138: 203-205.

Donoghue, S. and Langenberg, J. 2006. Nutrition. In: Reptile Medicine and Surgery. D.R. Mader (ed). 2nd ed. W.B. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania. 148-174.

Dotson, T.K., Ramsay, E.C. and Bounous, D.J. 1995. A color atlas of the blood cells of yellow rat snake. Compend. Cantin. Educ. Pract. Vet. 17: 1013-1026.

Egami, M.I. and Sasso, W.S. 1988. Cytochemical observations of blood cells of *Bothrops jararaca* (Reptilia Squamata). Rev. Brasil. Biol. 48:155.159.

Eliman, M.M. 1997. Hematology and plasma chemistry of the Inland. Bearded Dragon, *Pogona vitticeps*. Bull. Assoc. Reptil. Amphib. Vet. 7(4):10-12.

Frye, F.L. 1991. Biomedical and surgical aspects of captive reptile husbandry. Krieger Publishing, Malabar, Florida. 7- 637.

Garner, M.M., Homer, B.L., Jacobson, E.R., Raskin, R.E., Hall, B. J., Weis, W.A. and Berry, K.H. 1996. Staining and morphologic features of bone marrow hematopoietic cells in desert tortoises. AJVR. 57 (11): 1608-1615.

George, R.H. 1997. Health problems and disease of sea turtles. In: The biology of sea turtle. P.L. Lutz and J.A. Musick (eds.). CRC Press. Florida: 363-385.

Gottdenker, N.L. and Jacobson, E.R., 1995. Effects of venipuncture sites on hematologic and clinical biochemical values in desert tortoises (*Gopherus aggassizzi*). Am. J. Vet. Res. 56: 19.21.

Harr, K.E., Alleman, A.R., Dennis, P.M., Maxwell, L.K., Lock, B.A., Bennett, R.A. and Jacobson, E.R. 2001. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells and hematologic and plasma biochemical reference ranges in green iguanas. J. Am. Vet. Med. Assoc. 218: 915.921.

Hawkey, C.M. and Dennett, T.B. 1989. Color atlas of comparative veterinary hematology. Iowa State University Press, Ames, Iowa. 9-192.

Heard, D., Harr, K. and Wellehan, J. 2004. Diagnostic Sampling and Laboratory Tests. In: BSAVA Manual of Reptiles. 2nd ed. S.J. Girling and P. Raiti (eds.). British Small Animal Veterinary Association. 71-86.

Henkel, K.A., Sweson, C.L., Richardson, B. and Common, R. 1999. Morphology, Cytochemistry staining and Ultrastructural Characteristics of Reindeer (*Rangifer tarandus*) Leukocytes. Vet. Clin. Path. 28 (1): 8-15.

Hernandez-Divers, S.M., Hernandez-Divers, S.J. and Wyneken, J. 2002. Angiographic, anatomic, and clinical technique descriptions of a subcarapacial venipuncture site for chelonians. J. Herpetol. Med. Surg. 12:32-37.

Hidalgo-Vila, J., Diaz-Paniagua, C., Perez-Santigosa, N., Plaza, A., Camacho, I. and Recio, F. 2007. Hematologic and biochemical reference intervals of Free-living Mediterranean pond turtles (*Mauremys leprosa*). J. Wildl. Dis. 43 (4): 798-801.

Hutton, K.E. 1961. Blood volume, corpuscular constants, and shell weight in turtles. Am. J. Physiol. 200: 1004-1006.

Innis, C.J., Tlusty, M. and Wunn, D. 2007. Hematologic and plasma biochemical analysis of juvenile head-started northern red-bellied cooters (*Pseudemys rubriventris*). J. Zoo Wildl. Med. 38 (3): 425-432.

IUCN, 2006. *H2006 IUCN Red List of Threatened Species.M* [Online]. Available: http://www.iucnredlist.org.

Jain, N.E. 1986. cytochemistry of normal and leukemic leukocytes. In: Schalm's Veterinary Hematology. 4th ed. N.C. Jain (ed.). Lea & Febiger. Philadelphia. 909-934.

Keller, J.M., Kucklick, J.R., Stamper, M.A., Harms, C.A. and McClellan-Green, P.D. 2004. Associations between organochlorine contaminant concentrations and clinical health parameters in loggerhead sea turtles from North Carolina, USA. Env. Health Perspec. 112: 1074.1079.

Kenney, D. M. and Linck, R. W. 1985. The cytoskeleton of unstimulated blood platelets: structure and composition of the isolated marginal microtubular band. J. Cell Sci. 78: 1-22.

Knotkovà, Z., Doubek, J., Knotek, Z. and H.jkov., P. 2002. Blood cell morphology and Plasma Biochemistry in Russian Tortoises (*Agrionemys horsfieldi*). ACTA VET. BRNO. 71: 191-198.

Knotkovà, Z., Mazanek, S., Hovorka, M., Sloboda, M. and Knotek, Z. 2005. Haematology and plasma chemistry of Bornean River turtles suffering from shell necrosis and haemogregarine parasite. Vet. Med.-Czech. 50 (9): 421-426.

Kumer, D.T. and Maiti, B.R. 1981. Differential leucocyte count in both sexes of an Indian soft-shelled turtle (*Lissemys punctata punctata*). Z. Mikrosk. Anat. Forsch. 95: 1065-1069.

López-Olvera, J.R., Montan., J., Marco, I., Martinez-Silvestre, A., Soler, J. and Lavin, S. 2003. Effect of venipuncture site on hematologic and serum biochemical parameter in marginated tortoise (*Testudo marginata*). J. Wildl. Dis. 39: 830-836.

Lopez, E.A., J. Hernandez-Fernandez and J. Bernal-Villegas. 2008. Lymphocyte culture and partial karyotype of the marine turtle *Caretta caretta* (Testudines: Cheloniidae) in Santa Marta, Columbian Caribbean. Revista de biologia tropical. 56(3): 1459-1469.

Martinez, P.A., J.M. Boeris, J. Sanchez, M.C. Pastori, A.D. Bolzan and M.A. Ledesma. 2009. Karyotypic characterization of Trachemys dorbigni (Testudines: Emydidae) and Chelonoidis (Geochelone) donosobarrosi (Testudines: Testudinidae) two species of Cryptodiran turtles from Argentina. Genetica doi: 10.1007/s 10709-009-9377-8.

Martinez-Silvestre, A., Marco, I., Rodriguez-Dominguez, M.A., Lavin, S. and Cuenca, R. 2005. Morphology, Cytochemistry staining and Ultrastructural Characteristics of blood cells of the giant lizard of El Hierro (*Gallotia simonyi*). Res. Vet. Sci. 78: 127-134.

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.

Matson, C.W., Palatnikov, G., Islamzadeh, A., McDonold, T.J., Autenrieth, R.L., Donnelly, K.C. and Bickham, J.W. 2005. Chromosome damage in two species of aquatic turtles (*Emys orbicularis* and *Mauremys caspica*) inhabiting contaminated sites in Azerbaijan. Ecotoxicol. 513-525.

McBee, K., J.W. Bickham, A.G.J. Rhodin and R.A. Mittermeier. 1985. Karyotypic variation in the Genus Platemys (Testudines: Pleurodira). Copeia. 2: 445-449.

McCracken, H. 2005. Avian and Reptilian Haematology and Biochemistry. Melbourne Zoo, Australia. 32-62.

Mead, K.F., Borysenko. M. and Findlay, S.R. 1983. Naturally abundant basophils in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*, posses. cytophilic surface antibody with reaginic function. J. Immunol. 130: 334-340.

Metin, K., T.rkozan, O., Kargin, F., Basimoglukoca, Y., Taskavak, E. and Koca, S. 2006. Blood cell Morphology and Plasma Biochemistry of the Captive European Pond Turtle *Emys orbicularis*. ACTA VET. BRNO. 75: 49-55.

Michels, N.A. 1923. The mast cell in the lower vertebrates. Cellule 33:338-462.

Miller, H.A. 1998. Urinary disease of reptiles. Semin. Avian Exo. Pet. Med. 7: 93-103.

Miyamoto, M., Vidal, B.C. and Mello, M.L.S. 2005. Chromatin supraorganization, DNA fragmentation, and cell death in snake erythrocytes. Biochem. Cell Biol. 83:15-27.

Montali, R.J. 1988. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds, and mammals). J. Comp. Pathol. 99:1-26.

Muro, J., Cuenca, R., Pastor, J., Vinas, L. and Lavin, S. 1998. Effects of lithium heparin and tripotassium EDTA haematologic values of Hermann s tortoises (*Testudo hermanni*). J. Zoo Wildl. Med. 29: 40-44.

Mussachia, X.J. and Sievers, M.L. 1956. Effects of induced cold torpor on blood of *Chryseyms picta*. Am. J. Physiol. 187: 99-102.

Neiffer, D.L., Lydick, D., Burks, K. and Doherty, D. 2005. Hematologic and Plasma biochemical changes associated with Fenbendazole administration in Hermann' s Tortoises (*Testudo hermanni*). J. Zoo Wildl. Med. 36 (4): 661-672.

Nicole, I.S., Alleman, A.R. and Harr, K.E. 2007. Circulating inflammatory cells. In: Infectious Diseases and Pathology of Reptiles: Color Atlas and Text. E. R. Jacobson (ed). CRC press, London. 167-218.

Noleto, R.B., D.L.Z. Kantek, A.C. Swarca, A.L. Dias, A.S. Fenocchio and M.M. Cestari. 2006. Karyotypic characterization of *Hydromedusa tectifera* (Testudines: Pleurodira) from the upper Iguaca River in the Brazilian State of Parana. Gene. Mol. Biol. 29(2): 263-266.

Oxholm, P. and Winther, K. 1986. Thrombocyte involvement in immune inflammatory reactions. Allergy 41: 1.10.

Parmley, R.T. and Spicer, S.S. 1975. Altered tissue eosinophils in Hodgkin's disease. Exp. Mol. Pathol. 23:70-82.

Pienaar, U.V. 1962. Hematology of some South African Reptiles. Witwatersr and University Press, Johannesburg, South Africa. 1-299.

Ranki, A., Reitamo, S., Konttinen, Y.T. and Hayry, P. 1980. Histochemical identification of human T lymphocytes from paraffin sections J. Histochem. Cytochem. 28: 704-707.

Rapatz, G.L. and Mussachia, X.J. 1957. Metabolism of *Chrysemys picta* during fasting and during cold torpor. Am. J. Physiol. 188: 456-460.

Raskin, R.E. and Valenciano, A. 2000. Cytochemistry of normal leucocytes. In: Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed. B.F. Feldman, J.G. Zinkl and N.C. Jain (eds.). Baltimore: Lippincott Williams& Wilkins. 337-345.

Rohilla, M.S., R.J. Rao and P.K.Tiwari. 2006. Use of peripheral blood lymphocyte culture in the karyological analysis of Indian freshwater turtles, *Lissemys punctata* and *Geoclemys hamiltoni*. Curr. Sci. 90(8): 1130-1134.

Rosskopf Jr., W. J. 2000. Disorders of reptilian leucocytes and erythrocytes. In: Laboratory Medicine: Avian and Exotic Pets. A. M. Fudge. (ed.). W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pennsylvania. 198–203.

Russo, E. A., McEntee, L., Applegate, L. and Baker, J.S. 1986. Comparison of two methods for determination of white blood cell counts in macaws. J. Am. Vet. Med. Assoc. 189: 1013-1016.

Rücknagel, K.P. and Braunitzer, G. 1988. The primary structure of the major and minor hemoglobin component of adult western painted turtle (*Chrysemys picta bellii*). Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 369:123-131.

Sailasuta, A., Wangnaitham, S. and Chansue, N. 2006a. Mophology, cytochemistry and ultrastructural characteristics of Indian star tortoise (*Geochelone elegans*) blood cells. In: Proceeding of AZWMP 2006, Chulalongkorn University, Faculty of Veterinary Science, Bangkok, Thailand, October 26-29: 49.

Sailasuta, A., Wangnaitham, S., Sutanonpaiboon, C. and Chansue, N. 2006b. Mophology, cytochemistry and ultrastructural characteristics of Irrawady river dolphin (*Orcaella brevirostris*) blood cells. In: Proceeding of AZWMP 2006, Chulalongkorn University, Faculty of Veterinary Science, Bangkok, Thailand, October 26-29: 52.

Salakij, C., Salakij, J., Apibal, S., Narkkong, N., Chanhome, L. and Rochanapat, N. 2002a. Hematology, Morphology, Cytochemistry staining, and Ultrastructural Characteristics of Blood cells in King Cobras (*Ophiophagus Hannah*). Vet. Clin. Path. 31 (3): 116-126.

Salakij, C., Salakij, J., Suthunmapinunta, P. and Chanhome, L. 2002b. Hematology, morphology and ultrastructure of blood cells and blood Parasite from Puff-face Watersnake (*Homalopsis buccata*). Kasetsart J. (Nat. Sci.) 36:35-43.

Samour, H. Howlett, J.c. Silvanose, C., Hasbun, C.R. and Al-Ghais, S.M. 1998. Normal haematology of free-living green sea turtles (*Chelonia mydas*) from the United Arab Emirates. Comp. Haematol. Int. 8: 102-107.

Sheeler, P. and Barber, A.A. 1965. Reticulocytosis and iron incorporation in the rabbit and turtle: a comparative study. Comp. Biochem. Physiol. 16: 63-76.

Smith, C.R., Hancock, A.L., Turnbull, B.S., 2000. Comparison of white blood cell counts in cold-stunned and subsequently rehabilitated loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). In: Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians and International Association for Aquatic Animal Medicine Joint Conference, New Orleans, Lousiana, September 17.21: 50-53.

Stein, G. 2006. Hematologic and blood chemistry values in reptiles. In: Reptile Medicine and Surgery. 2nd ed. D.R. Mader (ed.). W.B. Saunders, Philadelphia. 473-483.

Stenberg, R. E., Schuman, M.A., Levine, S.P. and Bainton, D.F. 1984. Redistribution of alpha-granules and their contents in thrombin stimulated platelets. J. Cell Biol. 98: 748-790.

Stuart, L.B., Dijk, P.P and Hendrie, D.B. 2001. Photographic Guide to the Turtles of Thailand, Laos, Vietnam and Cambodia. Cambodia: Design group. 28-29.

Sypek, J.P. and Borysenko, M. 1988. Reptiles. In: Vertebrate blood cells. A.F. Rowley and N.A. Ratcliffe (eds). Cambridge University Press, Cambridge. 211-256.

Sypek, J.P., Borysenko, M. and Findlay, S.R. 1984. Anti-immunoglobulin induced histamine release from naturally abundant basophils in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. Dev. Comp. Immunol. 8:359-366.

Tavares-Dias, M. and Barcellos, J. F. M. 2005. Peripheral blood cells of the armored catfish *(Hoplosternum littorale)* Hancock, 1828: A morphological and cytochemical study. Braz. J. Morphol. Sci. 22 (4): 215-220.

Taylor, K. and Kaplan, H.W. 1961. Light microscoscopy of blood cells of Pseudemyd turtles. Herpetolocopy of the blood cells of *Pseudemyd* turtles. Herpetologica 17: 186-192.

Taylor, K.W., Kaplan, H.W. and Hitano, T. 1963. Electron microscope study of turtle blood cells. Cytologia 28: 248-256.

Telford, S.R. 1984. Reptilian hemoparasites. In: Diseases of Amphibians and Reptiles. G.L. Hoff, F.L. Frye and E.R. Jacobson (eds.). Plenum Publishing Corporation, New York. 385-517.

Tripathi, N. K., Latimer, K. S. & Burnley, V. V. 2004. Hematologic reference intervals for koi (*Cyprinus carpio*), including blood cell morphology, cytochemistry, and ultrastructure. Vet. Clin. Path. 33 (2): 74-83.

UEDA, I.K., Egami, M.I., Sasso, W.S. and Matushima, E.R. 2001. Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis (Tilapia) niloticus*. (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei)- Parte II. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 38 (6): 273-277.

Ugurtas, I.H., Sevin., M. and Yildirimhan, H.S. 2003. Erythrocyte size and morphology of some tortoises and turtles from Turkey. Zool. Stud. 42: 173-178.

UNEP-WCMC. 2006. .*UNEP-WCMC Species Database: CITES-Listed SpeciesM* [Online]. Available:http://www.unep-wcmc.org/isdb/CITES/Taxonomy/tax-gssearch2.cfm?displaylanguage=eng&GenName=Hieremys+&SpcName=annand alii

van Dijk , Paul, P and Palasuwan,T. 2000. Conservation status, trade and management of tortoises and freshwater turtle in Thailand. Chelonia Res. Monographs. 2: 137-144.

Wilkinson, R. 2004. Clinical pathology. In: Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles. S. Mcarthur, R. Wilkinson and J. Meyer (eds.). Oxford: Blackwell Publishing Ltd. 141-186.

Wojtaszek, J.S. 1991. Hematology of the grass snake *Natrix natrix natrix* L. Comp. Biochem. Physiol. 100A: 805-812.

Wood, F.E and Ebanks, K. 1984. Blood cytology and haematology of the green sea turtle, *Chelonia mydas*. Herpetologica. 40: 331.336.

Work, T.M., Raskin, R. E., Batazs, G.B. and Whittaker, S.D. 1998. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from Hawaiian green turtles. Am. J. Vet. Res. 59: 1252.1257.

Zaias, J., Norton, T., Fickel, A., Spratt, J. Altman, N.H. and Cray, C. 2006. Biochemical and hematologic values for 18 clinically healthy radiated tortoises (*Geochelone radiata*) on St Catherines Island, Georgia. Vet. Clin. Path. 35 (3): 321-325.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. แสดงแหล่งที่ทำการสุ่มตัวอย่าง อุณหภูมิน้ำ จำนวน และเพศของเต่าบัวโตเต็มวัยที่ทำการเก็บเลือดในการทดลอง

แหล่ง	**อุณหภูมิน้ำ (C° องศา)**	**จำนวน (ตัว)**		**อาการทางคลินิก**
		ผู้	**เมีย**	
สระน้ำพุ จุฬาลงกรณ์	28.0	0	4	-
บ่อภายในวัดบวรนิเวศวรวิหาร กทม.	27.5	1	5	-
บ่อภายในวัดบางปะกอก กทม.	28.5	1	7	-
สวนสัตว์ดุสิต	27.5	18	4	-
รวม		**20**	**20**	