ลักษณะรูปร่าง และไซโตเคมีของเซลล์เม็ดเลือด โลหิตวิทยา และชีวเคมีของปลากระเบนราหู (*Himantura chaophraya*) ในประเทศไทย

นางสาวเยาประภา มาฐุระ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

MORPHOLOGICAL AND CYTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF BLOOD CELLS, HEMATOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF GIANT FRESHWATER STINGRAY (*Himantura chaophraya)* IN THAILAND

Miss Yaoprapa Mathura

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Medicine
Department of Veterinary Medicine
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2011
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ลักษณะรูปร่าง และไซโตเคมีของเซลล์เม็ดเลือด โลหิตวิทยา และชีวเคมีของปลากระเบนราหู (*Himantura chaophraya*) ในประเทศไทย
โดย	นางสาวเยาประภา มาธุระ
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์สัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.นันทริกา ชันซื่อ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.อัจฉริยา ไศละสูต

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.มงคล เตชะกำพุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.นันทริกา ชันซื่อ)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.อัจฉริยา ไศละสูต)

.... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร.วีณา เคยพุดซา)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.เจนจิต คูดำรงสวัสดิ์)

เยาประภา มาธุระ: ลักษณะรูปร่าง และไซโตเคมีของเซลล์เม็ดเลือด โลหิตวิทยา และชีวเคมีของปลากระเบนราหู (*Himantura chaophraya*) ในประเทศไทย (MORPHOLOGICAL AND CYTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF BLOOD CELLS, HEMATOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF GIANT FRESHWATER STINGRAY (*Himantura chaophraya)* IN THAILAND) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.สพ.ญ.ดร.นันทริกา ชันซื่อ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ.สพ.ญ.ดร.อัจฉริยา ไศลสูต, 145 หน้า.

ศึกษาลักษณะรูปร่างและไซโตเคมีของเซลล์เม็ดเลือด โลหิตวิทยา และชีวเคมีของปลากระเบนราหู (*Himantura chaophraya*) ซึ่งเป็นปลากระเบนน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในโลก จากตัวอย่างปลากระเบนโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย กลุ่มละ 27 ตัวอย่าง จากแม่น้ำแม่กลอง จ.สมุทรสงคราม ในช่วงเดือน มี.ค. 2552 - ก.พ. 2553 บันทึกข้อมูลด้านสุขภาพเบื้องต้นและวัดขนาดลำตัวจากทุกตัวอย่างรวมทั้งการวิเคราะห์คุณภาพน้ำจากแหล่งน้ำที่ปลาอาศัยอยู่ ผลการศึกษาพบว่าปลากระเบนทุกตัวมีสุขภาพดีไม่พบพยาธิภายนอก โดยปลากระเบนเพศเมียมีความยาวลำตัวรวมหาง ความยาวลำตัว และความกว้างลำตัว ยาวกว่าปลากระเบนเพศผู้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างเพศต่ออัตราส่วนความกว้างลำตัวต่อความยาวลำตัว ในส่วนของค่าโลหิตวิทยาพบว่าปลากระเบนเพศผู้มีจำนวนเม็ดเลือดขาวโดยรวมสูงกว่าปลากระเบนเพศเมียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งสามารถจำแนกชนิดของเม็ดเลือดขาวในปลากระเบนราหูได้เป็น 5 ชนิด ตามปริมาณการพบ คือ ลิมโฟไซต์ (65.54±3.79%) โมโนไซต์ (2.91±0.83%) และแกรนูโลไซต์อีก 3 ชนิดย่อย ได้แก่ อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวย(15.74±2.70%) อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลกลม (4.35±1.14%) และเฮเทอโรฟิลที่แกรนูลติดสีเป็นกลางหรือนิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิล (11.52±2.20%) ผลการศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนและปฏิกิริยาการติดสีทางไซโตเคมีพบว่าปลากระเบนราหูมีลักษณะของเม็ดเลือดแดง ลิมโฟไซต์ โมโนไซต์และทรอมโบไซต์ที่คล้ายคลึงกับในปลากระดูกอ่อนและปลากระดูกแข็งชนิดอื่น ในขณะที่อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวยมีคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกับเฮเทอโรฟิลและอิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลกลมมีคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกับอิโอสิโนฟิลในสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์ปีก ส่วนนิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิลมีคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกับนิวโทรฟิลในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ผลการศึกษาทางชีวเคมีพบว่าปลากระเบนเพศผู้มีปริมาณแมกนีเซียมและคลอไรด์ในซีรัมสูงกว่าปลากระเบนเพศเมียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนปลากระเบนเพศเมียมีปริมาณเอ็นไซม์ Creatinine Kinase ที่สูงกว่าปลากระเบนเพศผู้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เช่นกัน การศึกษาครั้งนี้ถือเป็นรายงานด้านสุขภาพครั้งแรกในปลากระเบนราหู ซึ่งเป็นสัตว์ที่มีคุณค่าสูงในเชิงอนุรักษ์และมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในอนาคตอันใกล้ (IUCN Red list species)

ภาควิชา อายุรศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต ____________________

สาขาวิชา อายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ____________________

ปีการศึกษา 2554 ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ____________________

5075578231: MAJOR VETERINARY MEDICINE
KEY WORDS: HEMATOLOGY / BIOCHEMISTRY / CYTOCHEMISTRY / GIANT FRESHWATER STINGRAY (*Himantura chaophraya)* / THAILAND

YAOPRAPA MATHURA: MORPHOLOGICAL AND CYTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF BLOOD CELLS, HEMATOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF GIANT FRESHWATER STINGRAY (*Himantura chaophraya)* IN THAILAND. ADVISOR: ASSOC. PROF. NANTARIKA CHANSUE, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. ACHARIYA SAILASUTA, Ph.D., 145 pp.

Morphological and cytochemical characteristic of blood cells, hematological and serum biochemical were determined in wild 27 males and 27 females of adult Giant freshwater stingray (*Himantura chaophraya),* the world recorded largest freshwater stingray. The samples were collected from Maklong River, Samutsongkram province, Thailand during March, 2009 - February, 2010. Physical examination and size measurement were also performed. Water quality parameters were also investigated. All stingrays were in good physical condition and apparently healthy. No incidence of ectoparasite has been found in this species. Total length, girdle length and disc width in female stingrays were significantly higher than males (p<0.05), but there was no difference of disc width: girdle length ratio among sex. There was no statistical differences in hematology except total white blood cell count in male stingrays was significantly higher than female (p<0.05). The results of white blood cells in this study can be classified into 5 catagories; lymphocytes (65.54±3.79%), monocytes (2.91±0.83%) and 3 characteristics of granulocytes composed of elongated granule-eosinophilic heterophils (15.74±2.70%), round granule-eosinophilic heterophils (4.35±1.14%) and neutrophilic-heterophils (11.52±2.20%), respectively. Ultrastructural and cytochemical characteristic of blood cells; erythrocytes, lymphocytes, monocytes and thrombocytes show the characteristics similar to other Chondrichthyes and Osteichthyes species. In addition, elongated granule-eosinophilic heterophils are resembled in heterophils and round granule-eosinophilic heterophils are resembled in eosinophils in Reptiles and Avians while neutrophilic-heterophils are resembled in neutrophils in Mammals. Biochemical study male stingrays show significantly higher level of Magnesium and Chloride in serum than females (p<0.05) while Creatinine Kinase in females was found higher than males (p<0.05). This is the first report on health assessment of *H. chaophraya* which is one of the valuable and critically endangered species (IUCN Red list species).

Department : Veterinary Medicine   Student's signature ______________________

Field of Study : Veterinary Medicine   Advisor's signature ______________________

Academic Year 2011   Co-advisor's signature ______________________

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีโดยมี รศ.สพ.ญ.ดร.นันทริกา ชันซื่อ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักและ รศ.สพ.ญ.ดร.อัจฉริยา ไศละสูต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือในการทำวิจัย และแรงสนับสนุนอย่างดียิ่งตลอดระยะเวลาการทำวิทยานิพนธ์ การศึกษาครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์อย่างสูงในการเก็บตัวอย่างปลากระเบนราหู จาก ร.ท.พัชโรดม อุนสวรรณ นายกเทศมนตรี อ.อัมพวา จ.สมุทรสงคราม และทีมงานบริษัทฟิชสยามจำกัด นำโดยนายวุฒิชัย เขื่อนสุวรรณ และคณะ ขอขอบพระคุณ รศ.น.สพ.ดร.นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย ผศ.ดร.วีณา เคยพุดซา อาจารย์ ดร.เจนจิต คูดำรงสวัสดิ์ รศ.น.สพ.ดร.จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ รศ.สพ.ญ.ดร.เฉลียว ศาลากิจ ดร.อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล และ รศ.น.สพ.ตุลยวรรธ สุทธิแพทย์ ซึ่งให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณ สพ.ญ.พนมพร แสนประเสิรฐ สพ.ญ.นงนุช อัศววงศ์เกษม นางสาวกฤติมา อเนกธนกุล ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ และนายสุประดิษฐ์ หวังในธรรม เจ้าหน้าที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างและขั้นตอนการศึกษาวิจัย ในด้านความช่วยเหลือและความสะดวกในการศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ข้าพเจ้าขอขอบคุณนางสาวศิริเพ็ญ เวชชการัณย์ นายบุญเหลือ เงาถาวรชัย นางรุจิพร ประทีปเสน และนางวรรณีต ขอเจริญพร ขอขอบพระคุณ นพ.เอกวรรณ ชันซื่อ ที่สนับสนุนการทำวิจัยครั้งนี้ ครอบครัวมาธุระ และพนักงานบริษัทอควาวอร์ค ที่เป็นแรงผลักดันและกำลังใจตลอดระยะเวลาที่ทำวิทยานิพนธ์ ท้ายที่สุดข้าพเจ้าขอขอบคุณปลากระเบนราหูทุกตัวที่ข้าพเจ้าได้นำมาใช้เพื่อเป็นตัวอย่างในการศึกษาอันเป็นประโยชน์ครั้งนี้

ทุกท่านที่ได้กล่าวมาข้างต้น มีส่วนสำคัญอย่างยิ่งในการผลักดันให้การศึกษาครั้งนี้บรรลุวัตถุประสงค์สำเร็จลงได้ ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.. ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.. จ

กิตติกรรมประกาศ... ฉ

สารบัญ.. ช

สารบัญตาราง.. ฌ

สารบัญภาพ.. ญ

บทที่ 1 บทนำ.. 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.. 3

1.3 สมมติฐานในการวิจัย... 3

1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดของงานวิจัย... 4

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.. 4

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.. 5

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับปลากระเบนและปลากระเบนราหู................................ 5

2.2 ความรู้ทั่วไปในการศึกษาทางด้านโลหิตวิทยาในปลากระดูกแข็ง (Ostricthyes) และปลากระดูกอ่อน (Chondrichthyes).. 13

2.3 การเก็บตัวอย่างเลือดในปลากระดูกแข็งและปลากระดูกอ่อนเพื่อการตรวจวิเคราะห์ทางด้านโลหิตวิทยา และชีวเคมี.. 14

2.4 คุณลักษณะทางโลหิตวิทยาในปลากระดูกแข็งและปลากระดูกอ่อน.............. 19

2.5 การตรวจวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาในปลา.. 29

2.6 เทคนิคพิเศษในการศึกษาทางด้านโลหิตวิทยา.. 33

2.7 คุณลักษณะทางชีวเคมีในปลา.. 34

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย... 52

3.1 สัตว์ทดลอง... 52

3.2 การจับบังคับสัตว์... 52

3.3 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ.. 53

หน้า

3.4 การเก็บตัวอย่างเลือด... 53
3.5 การตรวจทางโลหิตวิทยา... 53
3.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ... 61
3.7 การขออนุญาตจับสัตว์น้ำ... 62
3.8 ปัญหาทางจริยธรรม... 62
บทที่ 4 ผลการทดลอง... 63
4.1 โลหิตวิทยา: ลักษณะรูปร่าง โครงสร้างอย่างละเอียด และการย้อมติดสี
ทางไซโตเคมีของเซลล์เม็ดเลือดในปลากระเบนราหูโตเต็มวัย............................ 63
1. เม็ดเลือดแดง... 64
2. ทรอมโบไซต์... 68
3. เม็ดเลือดขาว... 73
4.2 ค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมีในปลากระเบนราหูโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย............ 95
4.3 เปรียบเทียบความยาวลำตัวรวมหาง ความยาวลำตัว ความกว้างลำตัว และ
อัตราส่วนความกว้างลำตัวต่อความยาวลำตัวระหว่างปลากระเบนราหูโตเต็มวัย
เพศผู้และเพศเมีย... 98
4.4 ค่าคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำที่เก็บตัวอย่างปลากระเบนราหู................................ 100
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย บทสรุป และข้อเสนอแนะ.. 101
5.1 อภิปรายผลการวิจัย... 101
5.2 บทสรุป และข้อเสนอแนะ... 118
รายการอ้างอิง 120
ภาคผนวก... 138
ภาคผนวก ก วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย... 139
ภาคผนวก ข แสดงหนังสืออนุญาตจับสัตว์น้ำจากกรมประมง.............................. 142
ภาคผนวก ค แสดงใบอนุญาตการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานวิจัย จากคณะกรรมการ
จรรยาบรรณการใช้สัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.... 143
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์... 145

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์เม็ดเลือดเป็นไมโครเมตร (mean±SD) ในปลากระเบนราหูโตเต็มวัย และเปรียบเทียบระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย 94

ตารางที่ 4.2 รูปแบบการติดสีปฏิกิริยาไซโตเคมีของเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดในปลากระเบนราหูโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย.. 95

ตารางที่ 4.3 ค่าโลหิตวิทยา (mean±SD) ในปลากระเบนราหูโตเต็มวัย และเปรียบเทียบระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย.. 96

ตารางที่ 4.4 ค่าชีวเคมี (mean±SD) ในปลากระเบนราหูโตเต็มวัย และเปรียบเทียบระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย……………………………………………….……….. 97

ตารางที่ 4.5 แสดงความยาวลำตัวรวมหาง ความยาวลำตัว ความกว้างลำตัว และอัตราส่วนของความกว้างลำตัวต่อความยาวลำตัวเป็นเซนติเมตร (mean±SD) ในปลากระเบนราหูโตเต็มวัย และเปรียบเทียบระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย……………………………………………………...…. 99

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าคุณภาพน้ำ (mean±SD) ในแม่น้ำแม่กลอง ต. อัมพวา อ.อัมพวา จ.สมุทรสงคราม ระหว่างวันที่ 17 มีนาคม พ.ศ. 2552 - 7 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553……………………………………………………………………... 100

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	ฟอสซิลของปลากระเบน *H. radians*..	7
2.2	ปลากระเบนราหู (*H. chaophraya*)..	9
2.3	เงี่ยงแหลมที่ปกคลุมด้วยต่อมพิษของหางปลากระเบนราหู (*H. chaophraya*)……..	10
2.4	เงี่ยงพิษในปลากระเบนราหู ที่ขอบทั้ง 2 ด้านมีลักษณะคล้ายใบเลื่อย....................	10
2.5	ท่อนำน้ำเชื้อ (Claspers) ที่บริเวณใต้โคนหางในปลากระเบนราหูเพศผู้..................	11
2.6	ตำแหน่งในการเจาะเลือดจาก Caudal vein ที่บริเวณหางในปลากระเบนราหู..........	18
3.1	แสดงการนับจำนวนเม็ดเลือดแดงใน hemocytometer……………...……………….	59
4.1	ลักษณะเลือดในปลากระเบนราหู..	64
4.2	เม็ดเลือดแดงในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง...........................	66
4.3	เม็ดเลือดแดงในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด...	67
4.4	เม็ดเลือดแดงในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน....	67
4.5	ทรอมโบไซต์ในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง............................	70
4.6	ทรอมโบไซต์ในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราด.....................	71
4.7	ทรอมโบไซต์ในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องผ่าน.......................	72
4.8	ลิมโฟไซต์ในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง................................	75-76
4.9	ลิมโฟไซต์ปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด............	77
4.10	ลิมโฟไซต์ปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน............	77
4.11	อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวยในปลากระเบนราหู ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง..	80-81
4.12	อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวยในปลากระเบนราหู ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด..	82
4.13	อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวยในปลากระเบนราหู ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน..	82
4.14	อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลกลมในปลากระเบนราหูภายใต้ กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง……...	84-85
4.15	อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลกลมในปลากระเบนราหูภายใต้ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด..	86

รูปที่ **หน้า**

4.16 อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลกลมในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน.. 86
4.17 นิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิลในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง............ 88-89
4.18 นิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิลในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด.. 90
4.19 นิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิลในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน.. 90
4.20 โมโนไซต์ในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง................................. 92
4.21 โมโนไซต์ในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด......... 93
4.22 แสดงโมโนไซต์ในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน... 93

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลากระเบนราหูหรือปลากระเบนเจ้าพระยา (Giant fresh water stingray; *Himantura chaophraya)* เป็นปลาในกลุ่มปลากระดูกอ่อนซึ่งอยู่ลำดับชั้นย่อย (Subclass) Elasmobranchii เช่นเดียวกับปลาฉลาม และปลาฉนาก (Skate fish) (Hamlett, 1999) เป็นปลากระเบนน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในโลกและมีขนาดใหญ่เป็นอันดับสองรองจากปลากระเบนแมนตา (Manta ray; *Manta birostris*) หรือปลากระเบนราหูน้ำเค็มซึ่งเป็นปลากระเบนที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในโลกมีรายงานการค้นพบปลากระเบนราหูครั้งแรกที่ลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยาของประเทศไทย โดยถูกอนุกรมวิธาน (Taxonomy) ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2533 โดย ศ.ดร.สุภาพ มงคลประสิทธิ์ อดีตคณบดีคณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และ ดร.ไทสัน โรเบิร์ตส์ แห่งสถาบันกองทุนสัตว์ป่าโลก (WWF) ซึ่งระบุว่าปลากระเบนราหูขนาดใหญ่ที่สุดที่เคยมีรายงานการค้นพบ มีน้ำหนักประมาณ 600 กิโลกรัม และมีความกว้างของลำตัว (disc width) ประมาณ 240 เซนติเมตร (Monkolprasit and Roberts, 1990)

ปลากระเบนราหูเป็นปลาพื้นเมืองของประเทศไทยที่พบได้โดยทั่วไปในตามแม่น้ำสายหลัก ได้แก่ แม่น้ำเจ้าพระยา น่าน แม่กลอง บางปะกง ท่าจีน โขง และแม่น้ำตาปี ส่วนในต่างประเทศมีรายงานว่าพบปลากระเบนชนิดนี้ในลุ่มแม่น้ำ Mahakam ในเกาะกลิมันตัน ประเทศอินโดนีเซีย แม่น้ำ Kinabatangan ในรัฐซาบาห์ ประเทศมาเลเซีย ลุ่มแม่น้ำ Fly ที่นิวกีนี แม่น้ำ Gilbert ในรัฐ Queensland แม่น้ำ Daly และแม่น้ำ South Alligator ในรัฐ Northern Territory แม่น้ำ Pentecost และแม่น้ำ Ord ในรัฐ Western Australia ประเทศออสเตรเลีย ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีการยืนยันว่าปลากระเบนราหูจากแต่ละแหล่งเป็นสายพันธุ์เดียวกันทั้งหมดหรือเป็นชนิดพันธุ์เชิงซ้อนที่คล้ายกัน (species complex) แม้ปลากระเบนชนิดนี้จะเป็นปลาที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำจืด แต่สามารถพบในเขตน้ำกร่อยบริเวณปากแม่น้ำได้เช่นกัน (Compagno and Roberts,1982) ปลากระเบนราหูสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดถึงความสมบูรณ์ของทรัพยากรและระบบนิเวศในแหล่งน้ำได้เป็นอย่างดี เนื่องจากมีความทนทานต่อมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมต่ำและมีความไวต่อความเป็นพิษจากแอมโมเนียและไนไตรท์เป็นอย่างมาก จึงพบเฉพาะในแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีความสมบูรณ์และมลพิษต่ำ (นันทริกา, 2554)

ปัจจุบันจำนวนประชากรของปลากระเบนราหูในแหล่งน้ำของประเทศไทยมีการลดลงไปอย่างรวดเร็วจากการล่า การทำประมง ถูกรุกรานถิ่นอาศัย และผลจากมลพิษในสิ่งแวดล้อม ตั้งแต่

ปี 2000 เป็นต้นมา สมัชชาการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมโลกหรือ IUCN (International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources) ได้ประกาศให้ปลากระเบนราหูอยู่ในบัญชีแดงของ IUCN (IUCN Red List of Threatened Species) โดยจัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในสถานภาพมีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ (vulnerable species) มีระดับความเสี่ยงขั้นอันตรายต่อการสูญพันธุ์จากถิ่นอาศัยตามธรรมชาติ ในสถานะเชิงประชากรของปลากระเบนราหูยังไม่เป็นที่ทราบจำนวนที่แน่นอน แต่เป็นที่คาดการณ์ว่ามีจำนวนลดลงอย่างต่อเนื่อง และมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ไปในอนาคตอันใกล้ (Taylor, 2000; Pogonoski et al., 2002) ทั้งนี้กฎหมายที่เกี่ยวข้องกับการคุ้มครองปลาชนิดนี้ในประเทศไทยมีเพียงพระราชบัญญัติการประมง ปี พ.ศ.2490 ซึ่งมีรายละเอียดอยู่ใน **หมวดที่** 1 *ที่จับสัตว์น้ำ* **มาตราที่** 8-9 ที่ระบุห้ามมิให้บุคคลใดทำการประมงหรือเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในที่รักษาพืชพันธุ์ เว้นแต่จะได้รับอนุญาตจากอธิบดี (ที่รักษาพืชพันธุ์ คือที่จับสัตว์น้ำซึ่งอยู่ในบริเวณพระอารามหรือ ปูชนียสถาน หรือติดกับเขตสถานที่ดังกล่าวแล้ว บริเวณประตูน้ำ ประตูระบายน้ำ ฝาย หรือทำนบ หรือที่ซึ่งเหมาะแก่การรักษาพืชพันธุ์สัตว์น้ำ)

การศึกษาวิจัยในปลากระเบนราหูตั้งแต่ในอดีตจนถึงปัจจุบันยังมีอยู่อย่างจำกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาทางด้านสัตวแพทยศาสตร์ ซึ่งข้อมูลพื้นฐานทางโลหิตวิทยาและชีวเคมีถือเป็นส่วนสำคัญทางพยาธิวิทยาทางคลินิก (Clinical pathology) ช่วยในการประเมินสภาพทางสรีรวิทยาและสุขภาพของสัตว์ ค่าต่างๆ เหล่านี้ยังมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับการตอบสนองของปลากระเบนต่อสภาพแวดล้อม ใช้เป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพของแหล่งน้ำที่อาศัยอยู่และการตอบสนองต่อปัจจัยที่ทำให้เกิดความเครียดและส่งผลต่อสุขภาพของปลาได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถให้ข้อมูลที่จำเป็นต่อการวินิจฉัยโรคและการประเมินสุขภาพในปลาได้ (Vazquez and Guerrero, 2007)

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่างและโครงสร้างอย่างละเอียดทางโลหิตวิทยา อันจะเป็นประโยชน์ต่อการแบ่งแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือด รวมทั้งทำการศึกษาค่าทางโลหิตวิทยาและชีวเคมีที่สำคัญในปลากระเบนราหูน้ำจืด ที่ยังไม่มีผู้ใดเคยทำการศึกษามาก่อน ซึ่งจะสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการอ้างอิง เพื่อประเมินสภาวะสุขภาพ วินิจฉัยโรค และใช้ในการศึกษาค้นคว้าเชิงวิทยาศาสตร์ โดยจะเป็นประโยชน์ต่อการส่งเสริมสุขภาพ และแนวทางในการเพิ่มจำนวนประชากรของสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ที่มีคุณค่าของประเทศไทยเหล่านี้ต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาค่าทางโลหิตวิทยาและชีวเคมีของปลากระเบนราหูโตเต็มวัยในแหล่งน้ำธรรมชาติของประเทศไทย
2. เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่างและโครงสร้างอย่างละเอียดของเซลล์เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ และทรอมโบไซต์ ของปลากระเบนราหูโตเต็มวัยในแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทย ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านและส่องกราด
3. เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่าง และการย้อมติดสีทางไซโตเคมีของเซลล์เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ และทรอมโบไซต์ ของปลากระเบนราหูโตเต็มวัยในแหล่งน้ำธรรมชาติของประเทศไทย ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสงสว่าง

คำสำคัญ ชีวเคมี ไซโตเคมี ปลากระเบนราหู โลหิตวิทยา ประเทศไทย

Key Words Biochemistry, Cytochemistry, Giant freshwater stingray *(Himantura chaophraya)*, Hematology, Thailand

1.3 สมมติฐานในการวิจัย

1. การศึกษาลักษณะรูปร่าง โครงสร้างอย่างละเอียด และการย้อมติดสีทางไซโตเคมีของเซลล์เม็ดเลือดและทรอมโบไซต์ ทำให้ทราบถึงลักษณะพื้นฐานในการจำแนกชนิดเซลล์เม็ดเลือด และลักษณะปกติของเซลล์เม็ดเลือดในปลากระเบนราหูโตเต็มวัยในแหล่งน้ำธรรมชาติของประเทศไทย
2. เพศเป็นปัจจัยที่มีผลต่อค่าทางโลหิตวิทยา และชีวเคมีในปลากระเบนราหูโตเต็มวัยในแหล่งน้ำธรรมชาติของประเทศไทย
3. ค่าทางโลหิตวิทยา และชีวเคมีในปลากระเบนราหูน้ำโตเต็มวัย สามารถใช้ประเมินสภาวะสุขภาพในปลากระเบนราหูในแหล่งน้ำธรรมชาติของประเทศไทยได้

1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดของงานวิจัย

การศึกษารูปร่างลักษณะเซลล์เม็ดเลือด และจำแนกลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดต่าง ๆ ในกระแสเลือดโดยใช้วิธีการทางโลหิตวิทยาเพื่อหาค่า Complete Blood Count (CBC) ซึ่งประกอบด้วยค่าเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น ค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน จำนวนเม็ดเลือดแดงโดยรวม จำนวนเม็ดเลือดขาวโดยรวม จำนวนทรอมโบไซต์ ค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดง และการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว รวมทั้งการศึกษาลักษณะโครงสร้างอย่างละเอียดของเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านและชนิดส่องกราด ประกอบกับการย้อมสีทางไซโตเคมี และตรวจค่าทางชีวเคมีที่สำคัญทางคลินิกในปลากระเบนราหูโตเต็มวัย

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถทราบถึงรูปร่างลักษณะปกติของเซลล์เม็ดเลือดต่าง ๆ และทรอมโบไซต์ และจำแนกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาวในปลากระเบนราหูโตเต็มวัยได้
2. ข้อมูลลักษณะโครงสร้างโดยละเอียด และการย้อมสีทางไซโตเคมีของเซลล์เม็ดเลือดสามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดหรือเปรียบเทียบกับสัตว์ในกลุ่มเดียวกันหรือสัตว์ชนิดอื่นที่ใกล้เคียงกันได้
3. ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางโลหิตวิทยาและชีวเคมีในปลากระเบนราหูโตเต็มวัย
4. ค่าทางโลหิตวิทยาและชีวเคมีที่ได้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลมาตรฐานอ้างอิงในการวินิจฉัยทางคลินิก เพื่อหาสาเหตุของโรค และใช้ประเมินสุขภาพของปลากระเบนราหูโตเต็มวัย
5. ผลการศึกษาที่ได้สามารถที่จะนำไปใช้เป็นข้อมูลในการดำเนินการอนุรักษ์และเพิ่มจำนวนประชากรปลากระเบนราหูในแหล่งน้ำธรรมชาติของประเทศไทยต่อไป

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับปลากระเบนและปลากระเบนราหู

ปลากระเบนจัดอยู่ในกลุ่มปลากระดูกอ่อน (Class Chondrichthyes, Subclass Elasmobranchii) ซึ่งเป็นปลาในกลุ่มเดียวกับปลาฉลามและปลาฉนาก ส่วนปลากระเบนราหูหรือปลากระเบนเจ้าพระยา *(Himantura chaophraya)* เป็นหนึ่งในปลากระเบนน้ำจืดจากวงศ์ Dasyatidae ซึ่งหมายถึงปลากระเบนชนิดที่มีหางเรียวยาวเหมือนแส้ (Whiptail stingray) ประกอบด้วย 8 สกุลย่อย คือ *Dasyatis, Himantura, Makararaja, Neotrygon, Pastinachus, Pteroplatytrygon, Taeniura* และ *Urogymnus* มีรายงานการค้นพบทั้งหมด 88 สายพันธุ์ (Long, 1995) โดยหากแบ่งปลากระเบนในวงศ์นี้ตามแหล่งน้ำที่อาศัยอยู่ สามารถแบ่งได้เป็น

1. ปลากระเบนที่มีแหล่งอาศัยในน้ำจืด อาทิเช่น ปลากระเบนกิตติพงศ์ (Kittipong stingray; *H. kittipongi*) ปลากระเบนแม่โขง (Mekong stingray; *Dasyatis laosensis*) ปลากระเบนหางวัว (Cowtail stingray; *Pastinachus sephen*) (Compagno and Roberts,1982) เป็นต้น

2. ปลากระเบนที่มีแหล่งอาศัยในน้ำกร่อยหรือน้ำทะเล อาทิเช่น ปลากระเบนขนุน (Porcupine ray; *Urogymnus asperrimus*) ปลากระเบนจุดฟ้า (Blue-spotted stingray; *Neotrygon kuhlii*) ปลากระเบนหางแส้ (Mangrove whipray; *H. granulata*) ปลากระเบนมังกร (Dragon stingray; *H. draco*) ปลากระเบนแคริบเบียนหางแส้ (Chupare stingray or Caribbean whiptail stingray; *H. schmardae)* เป็นต้น

โดยนอกเหนือจากปลากระเบนราหู ในประเทศไทยมีรายงานพบปลากระเบนจากวงศ์ Dasyatidae ที่อาศัยในแหล่งน้ำจืดอีก 4 ชนิดคือ ปลากระเบนธงหรือปลากระเบนชายธง (*Hypolophus sephen*) ปลากระเบนลายเสือ (*H. krempfi*) ปลากระเบนขาว (*H. signifier*) และปลาฝาไล (ปลาฝาหางหรือปลากระเบนลาว) (*D. laosensis*) (Compagno and Roberts, 1982; Roberts and Karnasuta, 1987)

สำหรับปลากระเบนราหู เป็นปลากระเบนน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในโลก มีรายงานการค้นพบครั้งแรกในแม่น้ำเจ้าพระยาและแม่น้ำแม่กลอง ของประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2526 ตามรายงานระบุว่ามีน้ำหนักประมาณ 300 กิโลกรัม (Monkolprasit and Roberts, 1990) แต่ทั้งนี้ปลากระเบนราหูถูกอนุกรมวิธาน (Taxonomy) ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2533 (ค.ศ. 1990) โดย ศ.ดร.สุภาพ มงคลประสิทธิ์ อดีตคณบดีคณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และ ดร.ไทสัน โรเบิร์ตส์ แห่งสถาบันกองทุนสัตว์ป่าโลก (WWF) โดยระบุว่าปลากระเบนราหูที่มีขนาดใหญ่ที่สุดที่เคยมี

รายงานการค้นพบ คือ มีน้ำหนักประมาณ 600 กิโลกรัม และมีความกว้างของลำตัวประมาณ 240 เซนติเมตร ถูกพบที่บริเวณแม่น้ำเจ้าพระยา ทั้งนี้ในอดีตได้มีการรายงานที่ผิดพลาดเกี่ยวกับปลากระเบนชนิดนี้ว่าเป็นปลากระเบนสายพันธุ์เดียวกับ *D. fluviorum* ซึ่งพบในบริเวณปากแม่น้ำในประเทศออสเตรเลีย และปลากระเบน *H. polylepis* ซึ่งพบในประเทศอินโดนีเซีย (Compagno and Roberts, 1982)

2.1.1 ลักษณะทางอนุกรมวิธานของปลากระเบนราหู

การจัดอนุกรมวิธานของปลากระเบนราหูเป็นดังนี้ (Monkolprasit and Roberts, 1990; Taylor, 2000)

Kingdom Animalia

Phylum Chordata

Subphylum Vertebrata

Class Chondrichthyes

Subclass Elasmobranchii

Order Myliobatiformes

Family Dasyatidae

Genus *Himantura*

Species *H. chaophraya*

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Himantura chaophraya*

English common name: Freshwater Whipray, Giant Freshwater Stingray, Giant Freshwater Whip Ray, Giant Freshwater Whipray, Giant Stingray (Taylor, 2000; Pogonoski et al., 2002)

ชื่อสามัญหรือชื่อท้องถิ่น: ปลากระเบนราหู ปลากระเบนเจ้าพระยา (Wongrat, 1998)

2.1.2 วิวัฒนาการของปลากระเบน

วิวัฒนาการของปลากระเบนมีหลักฐานว่าเริ่มขึ้นในตอนปลายยุค Triassic ในช่วงเวลาเดียวกันกับปลาฉลาม Palaeospinax ซึ่งจัดเป็นปลาฉลามยุคปัจจุบันรุ่นแรกๆ มีรูปร่างคล้ายกับปลาฉลามในกลุ่มปลาฉลามแมว (Catshark or Dogfish) อาศัยอยู่ในทะเลแถบรอบแนวชายฝั่งของมหาทวีปแพนเจีย ส่วนปลากระดูกอ่อนอีกกลุ่มหนึ่งที่มีรายงานการค้นพบในตอนต้นของยุคจูราสสิค (Jurassic) คือ ปลาฉนากหรือปลากีตาร์ (Guitar fishes) ซึ่งเป็นปลาที่มีรูปร่างผสมระหว่างปลาฉลามและปลากระเบน คือมีครีบหลัง (dorsal fin) และครีบหาง (tail fin) คล้ายปลาฉลาม แต่มีแผ่นเปิดเหงือก (operculum) อยู่ทางด้านท้องเหมือนปลากระเบน ส่วนหัวมีส่วนของครีบอก (pectoral fin) แผ่คลุมเป็นวงกลมขนาดใหญ่คล้ายรูปร่างของกีตาร์ สันนิษฐานว่าปลากีตาร์เป็นรอยต่อของการวิวัฒนาการระหว่างปลาฉลามและปลากระเบน ภูมิประเทศที่พบปลากีตาร์ คือ บริเวณแนวชายฝั่งที่ตื้น ที่ปลาจะฝังตัวเพื่อหาอาหารในตะกอนทรายใต้ทะเล ซึ่งปลากระเบนในยุคแรกนี้มีลักษณะแตกต่างจากปลากระเบนในยุคปัจจุบันเล็กน้อย คือมีโครงสร้างของกระดูกคล้ายปลาฉลามและยังคงมีส่วนยื่นของครีบหลังอยู่ จึงเป็นการบ่งชี้ว่าปลากระเบนในยุคปัจจุบันทุกชนิดน่าจะมีวิวัฒนาการมาจากปลากีตาร์โบราณ โดยปลากระเบนจำพวกแรกในสายวิวัฒนาการนี้คือ ปลากระเบนชนิดที่มีหางเรียวยาว (stingray) ที่ถือกำเนิดขึ้นเมื่อกว่า 60 ล้านปีมาแล้ว โดยพบหลักฐานเป็นซากฟอสซิลปลากระเบน *Heliobatis radians* (รูปที่ 2.1) ซึ่งเป็นกลุ่มปลากระเบนในยุค Eocene ที่มีอายุราว 50 ล้านปี ถูกขุดพบที่เขตแม่น้ำ Green มลรัฐ Wyoming ประเทศสหรัฐอเมริกา จัดเป็นปลากระเบนรุ่นแรกที่มีขนาดเล็ก มีความยาวลำตัวรวมหาง (total length) 278 มิลลิเมตร และความกว้างลำตัว (disc width) 138 มิลลิเมตร มีลักษณะรูปร่างคล้ายกับปลากระเบนในกลุ่ม stingray ในยุคปัจจุบัน ปลากระเบนกลุ่มนี้พบได้ทั้งในเขตศูนย์สูตรและเขตน้ำอุ่นใกล้ภาคพื้นทวีป (Carrier et al., 2004)

รูปที่ 2.1 ฟอสซิลของปลากระเบน *Heliobatis radians*

2.1.3 ลักษณะภายนอก (Morphological characteristic) **และข้อมูลพื้นฐานทางด้านชีววิทยา** (Biological information) **ของปลากระเบนราหู**

ปลากระเบนราหู ได้ชื่อว่า "ราหู" เนื่องจากขนาดลำตัวที่ใหญ่และสีลำตัวที่ดำมืดเหมือนราหูอมจันทร์ตามคติของคนโบราณ ลักษณะลำตัวเกือบเป็นรูปทรงกลม รูปร่างคล้ายใบโพธิ์ เนื่องจากมีลักษณะส่วนปลายหัวบริเวณส่วนหน้าเหนือปากยื่นออกมาเป็นรูปสามเหลี่ยมเห็นได้ชัด (รูปที่ 2.2) มีตาขนาดเล็กอยู่ในช่วง 1.7-3.0 เซนติเมตร อยู่ทางด้านบนส่วนหน้าของลำตัว มีช่องเหงือก 4-7 ช่อง ส่วนปากและช่องเหงือกอยู่บริเวณด้านล่างของลำตัว บนเพดานปากมีแถวของ papillae หรือตุ่มนูนขนาดเล็ก ตามขวางจำนวน 4-8 อัน ประกอบด้วย papillae ขนาดใหญ่ 2-4 อันอยู่ตรงกลาง และขนาดเล็กจำนวน 1-2 อัน อยู่ในด้านข้างแต่ละด้าน ถัดจากแถวของ papillae นี้เข้าไปเป็นสัน (ridge) จำนวน 5 แนว ส่วนฟันของปลากระเบนราหูเป็นชนิดฟันบดซึ่งมีความแข็งแรงมาก แต่ละซี่มีรอยหยัก ส่วนหางยาวไม่มีริ้วหนัง ยาวประมาณ 1.8-2.5 เท่าของความยาวลำตัว และไม่มีสันหรือครีบที่หาง มีเงี่ยงแหลมที่ถูกปกคลุมด้วยเมือกพิษที่โคนหางตั้งแต่ 1 เงี่ยงขึ้นไป (รูปที่ 2.3) ตัวเงี่ยงสีขาวที่มีซี่เล็กๆ คล้ายใบเลื่อยที่ขอบเงี่ยงทั้ง 2 ด้าน (รูปที่ 2.4) ปลากระเบนใช้เงี่ยงเป็นอาวุธโดยการตวัดหางเพื่อให้เงี่ยงทิ่มแทงศัตรู เงี่ยงพิษนี้อาจมีความยาวได้ถึงประมาณ 15 นิ้ว (38 เซนติเมตร) ตามขนาดของปลากระเบน โดยเมื่อหักแล้วสามารถงอกขึ้นมาใหม่ได้ สีลำตัวด้านบนเป็นสีเทาเข้มหรือน้ำตาลนวล ด้านล่างของลำตัวเป็นสีขาวนวล (Wongrat, 1998) ที่ด้านล่างของลำตัวมีเม็ดสี (pigment) รวมตัวเป็นแถบสีดำ และจุดสีดำขนาดเล็กๆ ตามบริเวณขอบลำตัว (Last and Compagno, 1999) พื้นผิวด้านบนของลำตัว ครีบท้อง (pelvic fin) และหางส่วนต้นปกคลุมโดยตลอดด้วยตุ่มสากขนาดเล็ก (tubercles) ส่วนปลายของหางซึ่งมีลักษณะเรียวลงเป็นเส้นด้านบนและด้านข้างปกคลุมด้วยตุ่มสากเช่นกัน แต่ตุ่มมีขนาดเล็กกว่าและมีความละเอียดซึ่งจะมีความสากคมมากขึ้นในส่วนหางถัดจากเงี่ยงออกไป แต่ด้านล่างของปลายหางมีความเรียบ สามารถแยกเพศในปลากระเบนราหูได้จากลักษณะภายนอกเช่นเดียวกับปลากระดูกอ่อนชนิดอื่นๆ คือ ในปลาเพศผู้จะมีท่อนำน้ำเชื้อ (claspers) 2 ท่อ มีลักษณะเป็นแท่งยาว อยู่ใต้ลำตัวที่บริเวณโคนหาง (รูปที่ 2.5) ขนาด claspers ในปลากระเบนราหูเพศผู้ที่โตเต็มที่ยาวประมาณ 4.6 x 20.9 เซนติเมตร (Monkolprasit and Roberts, 1990)

ตามรายงานของ Taylor ในปี คศ.2000 เกี่ยวกับปลากระเบนราหูที่พบในประเทศออสเตรเลีย กล่าวว่าปลากระเบนราหูโตเต็มวัยจะมีความกว้างของลำตัวมากกว่า 1 เมตรขึ้นไป ปลากระเบนเพศผู้มีความกว้างของลำตัวประมาณ 1.1 เมตร ส่วนปลากระเบนเพศเมียมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้หลายเท่า และลูกปลาแรกเกิดมีความกว้างของลำตัวประมาณ 30 เซนติเมตร แต่ยังไม่มีข้อมูลที่แน่ชัดเกี่ยวกับช่วงอายุสูงสุดของปลากระเบนชนิดนี้ในธรรมชาติ ปลากระเบนราหูมีการสืบพันธุ์แบบ Ovoviviparous คือออกลูกเป็นตัวครั้งละ 6-12 ตัว (Dulvy and Reynolds,

1997) ซึ่งปลากระเบนเพศเมียที่ถูกจับได้ขณะคลอดลูกมีความกว้างของลำตัว 4.30 เมตร ลูกปลากระเบนแรกเกิดมีขนาดลำตัวกว้าง x ยาวโดยเฉลี่ยเท่ากับ 34 x 50 เซนติเมตร และมีปลอกหุ้มเงี่ยงที่โคนหางเอาไว้เพื่อป้องกันอันตรายต่อแม่ปลากระเบน (Last and Compagno, 1999) ส่วนรายงานในประเทศไทยปลากระเบนราหูที่พบในแม่น้ำบางปะกงมักเป็นปลาเพศผู้ที่มีความกว้างของลำตัวตั้งแต่ 0.50-1.40 เมตร มีขนาดเล็กกว่าปลาเพศเมียอย่างมาก โดยปลากระเบนเพศเมียขนาดใหญ่สุดที่มีรายงานมีความกว้างของลำตัว 2.4 เมตร และปลากระเบนเล็กที่สุดที่พบในแม่น้ำบางปะกงเป็นลูกปลาแรกคลอดที่มีความกว้างของลำตัวประมาณ 30 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 1.5 กิโลกรัม ตามปกติปลากระเบนราหูมักหากินเพียงลำพัง มีการจับคู่เฉพาะในช่วงฤดูผสมพันธุ์ในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคมของทุกปี ปลากระเบนเพศเมีย 1 ตัว อาจจับคู่ผสมกับปลากระเบนเพศผู้เกือบ 10 ตัว นอกจากนี้ยังพบว่าปลากระเบนเพศเมียที่พบบริเวณแม่น้ำบางปะกงในช่วงเดือนมกราคมถึงมีนาคมมักเป็นปลาที่ตั้งท้องเป็นส่วนใหญ่ (Wongrat, 1998)

อาหารของปลากระเบนราหูได้แก่ ปลาหน้าดินและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จำพวก กุ้ง ปู และหอย โดยปลากระเบนราหูมีวิธีการตรวจจับเหยื่อผ่านกระบวนการ Electroreceptive จาก Ampulla of Lorenzini เช่นเดียวกับปลากระเบนในกลุ่ม stingray ชนิดอื่น ๆ (Semeniuk et al., 2009)

รูปที่ 2.2 ปลากระเบนราหู (*H. chaophraya*)

รูปที่ 2.3 เงี่ยงแหลมที่ปกคลุมด้วยต่อมพิษของหางปลากระเบนราหู

รูปที่ 2.4 เงี่ยงพิษในปลากระเบนราหู ที่ขอบทั้ง 2 ด้านมีลักษณะคล้ายใบเลื่อย

รูปที่ 2.5 ท่อนำน้ำเชื้อ (claspers) ที่บริเวณใต้โคนหางในปลากระเบนราหูเพศผู้

2.1.5 แหล่งอาศัยและพื้นที่ที่มีรายงานการค้นพบปลากระเบนราหู

ปลากระเบนราหูเป็นปลาพื้นเมืองของประเทศไทยที่พบได้โดยทั่วไปในตามแม่น้ำสายหลัก ได้แก่ แม่น้ำเจ้าพระยา น่าน แม่กลอง บางปะกง ท่าจีน โขง และแม่น้ำตาปี ส่วนในต่างประเทศมีรายงานว่าพบปลากระเบนชนิดนี้ในลุ่มแม่น้ำ Mahakam ในเกาะกลิมันตัน ประเทศอินโดนีเซีย แม่น้ำ Kinabatangan ในรัฐซาบาห์ ประเทศมาเลเซีย ลุ่มแม่น้ำ Fly ที่นิวกีนี แม่น้ำ Gilbert ในรัฐ Queensland แม่น้ำ Daly และแม่น้ำ South Alligator ในรัฐ Northern Territory แม่น้ำ Pentecost และแม่น้ำ Ord ในรัฐ Western Australia ประเทศออสเตรเลีย ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีการยืนยันว่าปลากระเบนราหูจากแต่ละแหล่งเป็นสายพันธุ์เดียวกันทั้งหมดหรือเป็นชนิดพันธุ์เชิงซ้อนที่คล้ายกัน (Species complex) แม้ปลากระเบนชนิดนี้จะเป็นปลาที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำจืด แต่สามารถพบในเขตน้ำกร่อยบริเวณปากแม่น้ำได้เช่นกัน (Vidthayanon, 1997)

2.1.5 สถานภาพเชิงอนุรักษ์ของปลากระเบนราหู

แม้ปลากระเบนราหูจะเป็นปลาที่มีความสำคัญอย่างมากในเชิงอนุรักษ์ คือ เป็นปลากระเบนน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในโลกและเป็นปลาพื้นเมืองของไทย แต่กฎหมายที่เกี่ยวข้องกับการคุ้มครองปลาชนิดนี้ในประเทศไทยมีเพียงพระราชบัญญัติการประมง ปี พ.ศ. 2490 ซึ่งมีรายละเอียดอยู่ใน **หมวดที่** 1 *ที่จับสัตว์น้ำ* **มาตราที่** 8-9 ที่ระบุห้ามมิให้บุคคลใดทำการประมงหรือ

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในที่รักษาพืชพันธุ์ เว้นแต่จะได้รับอนุญาตจากอธิบดี (ที่รักษาพืชพันธุ์ คือ ที่จับสัตว์น้ำซึ่งอยู่ในบริเวณพระอารามหรือ ปูชนียสถาน หรือติดกับเขตสถานที่ดังกล่าวแล้ว บริเวณประตูน้ำ ประตูระบายน้ำ ฝาย หรือทำนบ หรือที่ซึ่งเหมาะแก่การรักษาพืชพันธุ์สัตว์น้ำ) ทั้งนี้ในปัจจุบันมีการลดจำนวนลงของประชากรอย่างรวดเร็วเนื่องจากการล่า การทำประมง ถูกรุกรานถิ่นอาศัย และผลจากมลพิษในสิ่งแวดล้อม และตั้งแต่ปี 2000 เป็นต้นมา สมัชชาการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมโลกหรือ IUCN (International Union for The Conservation of Nature and Natural Resources) ได้ประกาศให้ปลากระเบนราหูเป็นสัตว์หายากและมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์จนกระทั่งถึงในปัจจุบัน โดยในสถานะเชิงประชากรของปลากระเบนราหูยังไม่เป็นที่ทราบจำนวนที่แน่นอน แต่เป็นที่คาดการณ์ว่ามีจำนวนลดลงอย่างต่อเนื่อง และมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ไปในอนาคตอันใกล้ (Vulnerable species) ร่วมกับปลากระเบนชนิดอื่นๆ ในกลุ่มเดียวกัน (Taylor, 2000; Pogonoski et al., 2002)

สถานการณ์ของปลากระเบนราหูในประเทศไทย คือ เป็นปลาที่มักถูกจับหรือล่าเพื่อเกมส์กีฬา แต่บ่อยครั้งที่ถูกจับขึ้นมาโดยบังเอิญจากการทำประมงโดยใช้สายเบ็ดที่ยาวและอวนตาถี่ และแม้จะเป็นปลาที่มนุษย์ไม่นิยมบริโภค แต่ยังคงถูกฆ่าหรือถูกทำร้ายให้พิการหรือบาดเจ็บจากชาวประมง (Wongrat, 1998) ปัจจุบันสถานภาพเชิงประชากรของปลากระเบนราหูในประเทศไทยถูกประเมินให้เป็นสายพันธุ์มีความเสี่ยงสูงต่อการสูญพันธุ์ (Critically endangered) อีกทั้งผลพวงจากการตัดไม้ทำลายป่า การก่อสร้างเขื่อน การขยายตัวของชุมชน และการพัฒนาด้านอุตสาหกรรมได้เป็นการทำลายและเปลี่ยนแปลงสภาพแม่น้ำที่เคยเป็นถิ่นที่อยู่อาศัยของปลากระเบนชนิดนี้ (Taylor, 2000) การสร้างเขื่อนยังทำให้สัดส่วนในการเลือกจับคู่ผสมพันธุ์ของปลากระเบนหลายชนิดที่อาศัยในแม่น้ำ เช่น *H. chaophraya*, *H. oxyryncha (krempfi)*, *H. signifier* และ *D. laosensis* ลดลง ส่งผลทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมในปลากระเบนทุกชนิดเหล่านี้ลดลงจากการถูกล่าและแหล่งที่อยู่อาศัยถูกรุกรานดังกล่าวทำให้ปลากระเบนราหูมีจำนวนประชากรลดลงไปเป็นจำนวนมากจากแม่น้ำเจ้าพระยา (Vidthayanon, 1997) ตั้งแต่ปี พ.ศ.2533 กรมประมงของประเทศไทยได้เริ่มแผนการขยายพันธุ์ปลากระเบนราหูในสถานที่เพาะเลี้ยงเพื่อส่งเสริมการอนุรักษ์และเพิ่มจำนวนประชากรของปลากระเบนสายพันธุ์นี้และสายพันธุ์อื่นในกลุ่มเดียวกันและเป็นการรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลากระเบนดังกล่าว ร่วมกับการฟื้นฟูถิ่นที่อยู่อาศัยที่ถูกทำลายลง อย่างไรก็ตามแผนการดังกล่าวจำเป็นต้องมีการดำเนินการอย่างต่อเนื่อง (Vidthayanon, 1997)

2.2 ความรู้ทั่วไปในการศึกษาทางด้านโลหิตวิทยาในปลากระดูกแข็ง (Ostricthyes) และปลากระดูกอ่อน (Chondrichthyes)

ระบบหมุนเวียนเลือดของปลากระดูกอ่อนและปลากระดูกแข็ง โดยเลือดเป็นองค์ประกอบเชิงซ้อนของเซลล์กลุ่มต่างๆ ในพลาสมาซึ่งประกอบด้วยโปรตีน สารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (non-protein nitrogen compounds) คาร์โบไฮเดรต ไขมัน กรดและเกลืออินทรีย์และอนินทรีย์ เลือดเป็นตัวกลางในการขนส่งสารต่างๆ และมีบทบาทหน้าที่ที่สำคัญในการช่วยการทำงานของร่างกายหลายประการ คือ แลกเปลี่ยนออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่างเนื้อเยื่อกับเหงือก นำของเสียจากขบวนการเมทาบอลิซึมไปยังไต นำสารอาหารที่ได้จากการดูดซึมจากกระเพาะและลำไส้ไปเลี้ยงเนื้อเยื่อและอวัยวะทั่วร่างกาย รักษาสมดุลการกระจายตัวของน้ำและอิออนให้เหมาะสมทำให้เกิดสมดุลทางสรีรวิทยา เป็นตัวกลางในระบบบัฟเฟอร์เป็นผลให้ปฏิกิริยาต่างๆ ในเลือดและเนื้อเยื่อยังคงรักษาระดับปกติไว้ได้ ขนส่งฮอร์โมนที่หลั่งออกมาจากเนื้อเยื่อของต่อมไร้ท่อไปยังบริเวณเป้าหมาย ปกป้องร่างกายจากเชื้อโรค และเลือดยังมีความสามารถในการเกิดการแข็งตัวเพื่อช่วยป้องกันร่างกายจากการเสียปริมาณเลือดมากเกินไปจากการได้รับบาดเจ็บ (Walsh and Luer, 2004)

ลักษณะพื้นฐานของเม็ดเลือดและคุณสมบัติทางด้านโลหิตวิทยาในปลากระดูกอ่อนและปลากระดูกแข็งมีความคล้ายคลึงกัน จึงสามารถใช้หลักเกณฑ์เดียวกันในการประเมินและการศึกษา ปลามีเม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดที่มีนิวเคลียส เม็ดเลือดขาวประกอบด้วยลิมโฟไซต์ แกรนูลโลไซต์และโมโนไซต์ เช่นเดียวกับในสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์ปีก แต่แตกต่างกันที่สัดส่วนของปริมาณเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด ลักษณะปรากฏของแกรนูลภายในเซลล์ ขนาดและรูปร่างของเซลล์ และมีความแตกต่างกันในปลาแต่ละสายพันธุ์ ทั้งนี้การเรียกชื่อเพื่อใช้อธิบายถึงเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดในปลาจึงเป็นสิ่งที่ทำได้ไม่ง่ายนัก และยังไม่มีมาตรฐานชัดเจน ขึ้นอยู่กับเกณฑ์ของผู้วิจัยเป็นหลัก ด้วยเหตุจึงได้มีการนำวิธีการศึกษาทาง immunocytochemistry และ cytochemistry มาช่วยในการศึกษาโครงสร้างของเซลล์ของเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ในปลา (Burrows et al., 2001) ค่าทางโลหิตวิทยาที่สำคัญในสัตว์ตระกูลปลาคล้ายคลึงกับในสัตว์ชนิดอื่น; การตรวจหาปริมาณเม็ดเลือดแดงรวม (Total erythrocyte count; RBC) ปริมาณเม็ดเลือดขาวรวม (Total white blood cell count; WBC) ค่าเม็ดเลือดอัดแน่น (Hematocrit หรือ packed cell volume; PCV) ความเข้มข้นของ Hemoglobin (Hb) ค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดง 3 ค่า ได้แก่ ปริมาตรของเม็ดเลือดแดงโดยเฉลี่ย (Mean corpuscular volume; MCV) ปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (Mean corpuscular hemoglobin concentration; MCHC) และปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงหนึ่งเม็ด (Mean corpuscular hemoglobin; MCH) ปริมาณเม็ดเลือดขาวจำแนกตามชนิด ปริมาณทรอมโบไซต์หรือเกล็ดเลือด (Thrombocytes) และการประเมินแผ่นฟิล์มของเลือดที่ย้อมสี แต่ทั้งนี้

วิธีการศึกษาอาจมีความแตกต่างจากวิธีที่ใช้ในสัตว์ชั้นสูง และมีความจำเป็นที่จะต้องทราบค่าพื้นฐานในปลาแต่ละสายพันธุ์ก่อนที่จะนำไปใช้ประเมินสภาวะสุขภาพได้ (Blaxhall and Daisley, 1973; Vazquez and Guerrero, 2007)

การศึกษาทางด้านโลหิตวิทยาในปลามีประโยชน์ในการบ่งชี้ถึงสภาวะทางสรีรวิทยา สุขภาพ สภาวะภูมิคุ้มกันของร่างกาย เป็นเครื่องมือสำคัญทางสัตวแพทย์และทางอายุรศาสตร์คลินิกในการช่วยวินิจฉัยโรคเช่นเดียวกับในสัตว์ชนิดอื่นๆ ทั้งนี้ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำ เช่น ปลา สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ สัตว์เลื้อยคลาน และนก การเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม ความเครียดหรือภาวะโรค มีผลอย่างมากต่อค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมี (Tavares-Dias et al., 2008; Motlagh et al., 2010) ความสำคัญของค่าทางโลหิตวิทยาต่อสภาวะสุขภาพในปลา เช่น ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน และขนาดของเม็ดเลือดแดง สามารถใช้บ่งชี้ถึงความสามารถในการนำออกซิเจนของเม็ดเลือดแดง โดยค่าดัชนีดังกล่าวเบื้องต้นมีความแปรปรวนสูงและขึ้นอยู่กับชนิดของปลา ปริมาณฮีโมโกลบินที่ใช้ในการเข้าจับกับออกซิเจนแบบชั่วคราว บ่งชี้ถึงความสามารถในการสกัดออกซิเจนออกจากน้ำ และการขนส่งออกซิเจนไปยังเนื้อเยื่อของร่างกาย โดยค่าที่แตกต่างกันในปลาแต่ละชนิด จะเป็นข้อมูลด้านสุขภาพและสะท้อนถึงรูปแบบกิจกรรมการดำรงชีวิตของปลาตามแหล่งที่อยู่อาศัย (Tavares-Dias et al., 2008) ในด้านเศรษฐกิจและสิ่งแวดล้อม การศึกษาทางโลหิตวิทยาในปลามีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงปลาและใช้ประเมินมลภาวะในแหล่งน้ำที่ปลาอาศัยอยู่ (Kori-Siakpere et al., 2005)

2.3 การเก็บตัวอย่างเลือดในปลากระดูกแข็งและปลากระดูกอ่อนเพื่อการตรวจวิเคราะห์ทางด้านโลหิตวิทยา และชีวเคมี

2.3.1 การเก็บตัวอย่างเลือดในปลากระดูกแข็ง

2.3.1.1 หลักการทั่วไปในการเก็บตัวอย่างเลือดในปลากระดูกแข็ง

การเก็บตัวอย่างเลือดที่มีความปลอดภัยในปลาสามารถทำได้กับปลาที่มีขนาดความยาวมากกว่า 3 นิ้ว (8 เซนติเมตร) การเก็บตัวอย่างเลือดควรทำให้เสร็จในเวลาน้อยกว่า 30 วินาที เนื่องจากปลาที่ถูกนำขึ้นมาจากน้ำเป็นเวลานานจะเป็นอันตรายจากการหายใจติดขัด และการสูญเสียสมดุลของอิเล็กโทรไลต์ และการใช้เวลาเก็บตัวอย่างเลือดน้อยสามารถลดการเปลี่ยนแปลงของค่าทางชีวเคมีในพลาสมา เช่น อิเล็กโทรไลต์ต่างๆ และแอมโมเนีย การเปลี่ยนแปลงในความเข้มข้นของอิเล็กโทรไลต์ในพลาสมาเป็นผลมาจากการเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มของ H^+, Na^+, Cl^-, และน้ำ ซึ่งอาจเป็นไปอย่างต่อเนื่องจนกว่าเม็ดเลือดแดงและพลาสมาถูกแยกจากกัน ระดับของการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ผันแปรโดยตรงกับเวลาในการจับบังคับ และเวลาที่ใช้ในการเก็บเลือดและวิเคราะห์ การเปลี่ยนแปลงหลังการเก็บเลือดนี้สามารถทำให้ลดน้อยลงได้โดยการแยกพลาสมาออก

จากเม็ดเลือดแดงให้เร็วที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้หลังจากได้รับตัวอย่างเลือดแล้ว เลือดที่ใช้ในการตรวจประเมินทางโลหิตวิทยาควรจะต้องเก็บในสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิดเฮปาริน (Heparin) หรือ Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) ข้อเสียของเฮปาริน คือ ทำให้เกิดแนวโน้มที่เม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดจะมารวมกลุ่มกันมากขึ้น และเกิดเป็นแต้มสีน้ำเงินกับแผ่นฟิล์มของเลือดกับการย้อมสีโดยวิธี Romanowsky นอกจากนี้ถ้าตัวอย่างเลือดมีก้อนเลือดขนาดเล็กเฮปารินอาจไม่ช่วยป้องกันการแข็งตัวของเลือดตั้งแต่เริ่มต้น ส่วนข้อเสียของ EDTA ได้แก่การเกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง (Hemolysis) ในปลาบางชนิด ซึ่งการแตกของเม็ดเลือดแดงอาจเกิดจากการใช้ Tricaine ในการวางยาซึมหรือวางยาสลบ แต่การเก็บตัวอย่างเลือดที่อุณหภูมิ 25°C และการเตรียมแผ่นฟิล์มของเลือดอย่างรวดเร็ว สามารถทำให้การแตกของเม็ดเลือดแดงจากการใช้ Tricaine ลดลงได้ ในการเก็บเลือดปลาเพื่อตรวจทางชีวเคมีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดที่เป็นที่นิยม คือ ลิเธียมเฮปาริน (Lithium heparin) เพื่อแยกพลาสมา และสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาได้ในคราวเดียวกัน ตามปกติปริมาณตัวอย่างเลือดที่เก็บได้จากปลามักมีปริมาณน้อยโดยเฉพาะในปลาขนาดเล็ก ดังนั้นสัตวแพทย์จึงควรวางแผนอย่างรัดกุมก่อนเก็บตัวอย่างเลือดว่าต้องการทดสอบค่าใดบ้างเพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุดในการประเมินสุขภาพปลา ตัวอย่างการทดสอบทางชีวเคมีของเลือดที่มีประโยชน์ในการประเมินสุขภาพปลา อาทิเช่น ปริมาณโปรตีนโดยรวม กลูโคส aspartate aminotransferase (AST) แอมโมเนีย creatinine แคลเซียม โซเดียม คลอไรด์ โพแทสเซียม และไบคาร์บอเนต (Thrall et al., 2004)

<u>2.3.1.2 ตำแหน่งในการเก็บตัวอย่างเลือดในปลากระดูกแข็ง</u>

- **การเจาะเก็บเลือดจากบริเวณหาง** (Caudal vertebral vein **หรือ** Caudal vertebral artery)

เส้นเลือด Caudal vertebral vein หรือ Caudal vertebral artery ที่บริเวณ 1 ใน 3 ของส่วนท้ายของลำตัวปลา เป็นตำแหน่งที่นิยมในการเก็บตัวอย่างเลือดในปลากระดูกแข็ง การจับบังคับเพื่อเก็บตัวอย่างสามารถทำได้ทั้งวิธีทางกายภาพ (physical restraint) หรือการวางยาสลบ (chemical restraint) และสามารถแทงเข็มเข้าถึงเส้นเลือด ทั้งจากด้านล่าง (ventral) และด้านข้าง (lateral) ของตัวปลา ในกรณีที่เก็บเลือดจากด้านล่างของตัวปลาให้แทงเข็มผ่านใต้เกล็ดที่ทอดตามแนว ventral midline ใกล้กับฐานของ caudal peduncle เมื่อแทงเข็มลงไปแล้วให้เดินปลายเข็มตรงไปยังกระดูกสันหลังส่วนหาง เมื่อปลายเข็มถึงกระดูกสันหลังแล้ว ให้ถอนเข็มเพียงเล็กน้อยไปทางด้านล่างและด้านข้างในขณะที่แรงดันภายในไซริงจ์จะต้องเป็นลบ เมื่อปลายเข็มแทงเข้าในเส้นเลือด เลือดจะไหลเข้าสู่ไซริงจ์ อาจต้องหมุนเข็มเพียงเล็กน้อยเพื่อปรับตำแหน่งของปลายเข็มในเส้นเลือดช่วยให้เก็บเลือดได้ง่ายขึ้น ส่วนในกรณีที่เก็บเลือดจากด้านข้างของตัวปลาให้แทงเข็มตรงตำแหน่ง

ประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ต่ำกว่าแนว lateral line ใกล้กับฐานของ caudal peduncle แล้วเดินปลายเข็มตรงไปยังแนวกลางลำตัวและอยู่ใต้กระดูกสันหลังส่วนหาง และเลือดจะไหลเข้าสู่ไซริงจ์เช่นเดียวกันกับวิธีแรก (Thrall et al., 2004)

- **การเจาะเก็บเลือดจากหัวใจหรือ Bulbus arteriosus**

วิธีการเก็บเลือดจากหัวใจหรือ Bulbus arteriosus จากทางด้านล่างของตัวปลาโดยปลายเข็มจะถูกแทงเข้าไปยังส่วนยอดดอกของร่องรูปตัว V ตรงระหว่างแผ่นปิดเหงือก (operculum) กับ isthmus แล้วเดินปลายเข็มตรงต่อไปยังหัวใจ ในขณะที่ภายในไซริงจ์มีสุญญากาศเพียงเล็กน้อย เลือดจะไหลเข้าในไซริงจ์เมื่อปลายเข็มเข้าไปในหัวใจ การจัดปลาให้อยู่ในท่า anterolateral ผ่านการเปิดแผ่นปิดเหงือกจะช่วยให้เข็มเข้าสู่ตำแหน่งของหัวใจง่ายขึ้น ตำแหน่งที่แทงเข็มให้นับจากทางด้านท้ายลำตัวจากจุด 1 ใน 3 ของระยะระหว่างขอบด้านล่างของช่องเหงือกและด้านติดลำตัว (medial) กับผนังด้านท้ายของ opercular cavity แล้วแทงส่วนปลายเข็มตรงเข้าไปยังหัวใจ แต่การเก็บเลือดจากหัวใจมีความเสี่ยงสูงต่อการที่ปลาจะเสียชีวิตมากกว่าการเก็บเลือดจากเส้นเลือด caudal vertebral vein หรือ caudal vertebral artery (Thrall et al., 2004)

2.3.2 การเก็บตัวอย่างเลือดในปลากระดูกอ่อน

2.3.2.1 หลักการทั่วไปในการเก็บตัวอย่างเลือดในปลากระดูกอ่อน

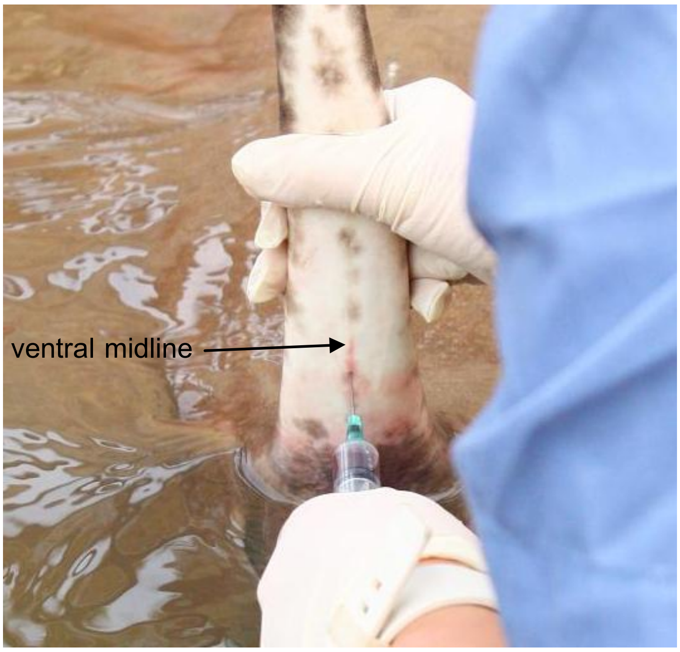
เนื่องจากในปลากระดูกอ่อนส่วนใหญ่ กระบวนการการแข็งตัวของเลือดเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและเกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงได้ค่อนข้างง่าย ดังนั้นจึงควรเคลือบไซริงจ์และเข็มด้วยสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดก่อนการเก็บตัวอย่างเลือด การแตกของเม็ดเลือดแดงอาจมีสาเหตุจากภาวะช๊อคจากแรงดันออสโมติก (osmotic shock) จึงมีข้อแนะนำว่าสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดที่ใช้ในปลากระดูกอ่อนควรมีความสมดุลกับแรงดันออสโมติก (osmolarity) เช่น สารป้องกันการแข็งตัวของเลือดที่มีส่วนผสมของเฮปาริน และ EDTA หรือสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดที่ประกอบด้วยกรดซิตริก (citric acid) โซเดียมซิเตรท (sodium citrate) และน้ำตาลเด็กโทรส (Dextrose) ซึ่งรู้จักในชื่อสารละลาย ACD “A” ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างเลือดสำหรับการถ่ายเลือดในมนุษย์ (Walsh and Luer, 2004)

การเก็บเลือดจากปลาฉลามขนาดใหญ่ซึ่งไม่สามารถจับบังคับได้ อาจใช้การวางยาสลบอย่างอ่อนโดยใช้ MS-222 (tricaine methanesulfonate) ส่วนในปลากระเบนเกือบทุกสายพันธุ์สามารถใช้วิธีการจับบังคับทางกายภาพได้ แต่ควรมีการพันเงี่ยงพิษที่หางเพื่อความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงาน

2.3.2.2 ตำแหน่งในการเก็บตัวอย่างเลือดในปลากระดูกอ่อน

- **การเจาะเก็บเลือดจากบริเวณหาง** (Caudal vertebral vein)

วิธีการตามปกติที่ใช้กันมากในการเก็บเลือดจากปลาฉลามขนาดเล็กถึงขนาดกลางคือ การเก็บเลือดจากหาง โดยเส้นเลือด caudal vein จะวางตัวอยู่ทางด้านล่างของ caudal artery และเส้นเลือดทั้งสองเส้นนี้ถูกหุ้มอยู่ใน hemal arch ของกระดูกสันหลังส่วนหาง ตัวปลาควรถูกจับให้ด้านล่าง (ท้อง) หงายขึ้นโดยไม่ให้เกิดอันตรายต่อบริเวณเหงือก ในขณะที่จับยึดส่วนหางให้มั่นไว้ด้วยมือข้างเดียว ควรแทงเข็มตรงๆ เข้าส่วนหางตรง ventral midline ให้ปลายเข็มชิดอยู่กับตำแหน่งแนวกลางระหว่างการเดินเข็มผ่านกล้ามเนื้อจนกระทั่งปลายเข็มชนกับกระดูกสันหลังส่วนหาง ให้ดันปลายเข็มเล็กน้อยทะลุกระดูกสันหลังจะเจอเส้นเลือด caudal vein สำหรับปลาฉลามขนาดเล็กและขนาดกลางสามารถใช้เข็มเบอร์ 18-20 ความยาว 38 มิลลิเมตร ในการเก็บตัวอย่างเลือดได้ (Stoskopf, 1993) ส่วนการเก็บตัวอย่างเลือดในปลากระเบนหรือปลากลุ่ม Skate ใช้หลักการเดียวกับการเจาะเลือดในสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Ruminant) เส้นเลือด caudal artery และ caudal vein ในปลากลุ่มนี้จะอยู่รวมกันคล้ายแอ่งเลือด ตำแหน่งเส้นเลือดที่พบได้ง่ายที่สุดคือที่บริเวณด้าน ventral ของหางตามแนว ventral midline ถัดจากโคนหางลงมาเล็กน้อยประมาณ 3-5 นิ้ว ขึ้นกับขนาดของปลากระเบน ทั้งนี้ต้องทำการจับบังคับบริเวณหาง โดยยกหางงอขึ้นทำมุมประมาณ 60 องศากับลำตัวปลากระเบน และมีผ้าหรือสิ่งป้องกันอันตรายจากการโดนทำร้ายด้วยเงี่ยงพิษ ส่วนลำตัวปลาต้องไม่อยู่เหนือน้ำซึ่งจะทำให้ปลาหายใจไม่ได้ โดยอาจใช้ตาข่ายขนาดใหญ่หรือแผ่นผ้าใบพลาสติกในการจับบังคับส่วนลำตัวเพื่อลดการเคลื่อนไหว การแทงเข็มเพื่อเก็บตัวอย่างเลือดใช้หลักการเดียวกับการเก็บเลือดปลาฉลาม คือ แทงตรงทำมุม 90 องศา ที่ตำแหน่งของ ventral midline จนกระทั่งปลายเข็มชนกับส่วนของกระดูกสันหลัง จากนั้นดันเข็มช้าๆ จนทะลุส่วนของ Intervertebral spaces แล้วถอยเข็มออกเล็กน้อยจะพบตำแหน่งของเส้นเลือดที่ฝังตัวอยู่ระหว่าง hemal arch (รูปที่ 2.6) แต่วิธีนี้ไม่สามารถใช้กับกลุ่มปลากระเบนที่มีหางเรียวเล็กคล้ายแส้ เช่น ปลากระเบนนก (*Aetobatus narinari*) ปลากระเบนจมูกวัว (*Rhinoptera bonasus*) เนื่องจากขนาดหางที่เล็กมากทำให้เลือดที่ไหลเวียนมาเลี้ยงยังบริเวณนี้ลดลง เส้นเลือดอยู่ในสภาพที่เล็กตีบมากจึงไม่นิยมเจาะจากตำแหน่งนี้ (Rosenzweig, 1988)



รูปที่ 2.6 ตำแหน่งในการเจาะเลือดจาก caudal vein ที่บริเวณหางในปลากระเบนราหู

- **การเจาะเก็บเลือดจากฐานด้านหลังของครีบหลัง** (dorsal fin)

วิธีการนี้เป็นการเก็บตัวอย่างจากแอ่งเลือดซึ่งอยู่บริเวณฐานด้านหลังของครีบหลัง (dorsal fin) ใช้ได้เฉพาะในกลุ่มปลาฉลาม และมีข้อจำกัดหลายประการ คือ ตำแหน่งที่ถูกต้องของแอ่งเลือดและขนาดของแอ่งเลือดนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของปลา เหมาะกับปลาฉลามที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่ เนื่องจากปริมาณเลือดที่ได้ค่อนข้างน้อยและขึ้นอยู่กับประสบการณ์ของผู้ปฏิบัติงาน (Rosenzweig, 1988)

- **การเจาะเก็บเลือดจากหัวใจ** (Caudal artery)

วิธีการเจาะเก็บเลือดจากหัวใจในใช้กับปลากระดูกอ่อนพวกในอับดับใหญ่ (Superorder) Batoidea ซึ่งได้แก่ Sawfishes, Sharkfin, Guitarfish, Shovelnose Guitarfishes, Electric Ray, Skate และ Stingray ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีรูปร่างลำตัวแบนปานกลางถึงแบนมาก มีช่องเหงือกและปากอยู่ด้านล่างของลำตัว เข็มที่แนะนำให้ใช้คือเข็มเบอร์ 23-24 ความยาว 25.5 มิลลิเมตร ตำแหน่งที่แทงเข็มจะคล้ายกับในปลากระดูกแข็ง คือ ตำแหน่งของช่องหัวใจ (pericardial cavity) ที่อยู่ทางด้านท้องของลำตัวบริเวณกึ่งกลางระหว่างแผ่นปิดช่องเหงือก (external gill slits) สองด้านของลำตัว โดยหัวใจจะวางตัวอยู่เหนือบริเวณที่ฐานของกระดูกครีบอก (scapulocoracoid cartilage) มาบรรจบกัน บนแนวของเส้น ventral midline ทำให้การเจาะจากตำแหน่งนี้ต้องแทงเข็มทะลุกระดูกอ่อนก่อนจึงจะเจอหัวใจ ทั้งนี้ควรวางยาสลบปลาก่อนทำการเจาะเก็บเลือด เนื่องจากวิธีนี้ก่อให้เกิดความเครียดสูงและมีความเสี่ยงที่จะเกิดอันตรายต่อหัวใจได้ อีกทั้งยังต้องอาศัยความ

ชำนาญและความรู้ทางด้านกายวิภาคศาสตร์ของผู้ปฏิบัติงาน การเก็บเลือดจากหัวใจในปลากระดูกอ่อนจึงเป็นวิธีที่จะเลือกปฏิบัติเมื่อวิธีการอื่นๆ ไม่สามารถปฏิบัติได้ (Rosenzweig, 1988; Walsh and Luer, 2004)

2.4 คุณลักษณะทางโลหิตวิทยาในปลากระดูกแข็งและปลากระดูกอ่อน

2.4.1 คุณลักษณะทางโลหิตวิทยาในปลากระดูกแข็ง

2.4.1.1 เม็ดเลือดแดง (Erythrocytes; Red blood cells)

ในแผ่นฟิล์มของเลือดที่ย้อมสีด้วยวิธี Romanowsky เม็ดเลือดแดงปกติที่เจริญเต็มที่ในปลากระดูกแข็งมีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือรูปวงรี (elliptic) มีไซโตพลาสซึมที่ติดสีออกแดง (eosinophilic cytoplasm) ที่มีสีจางมาก และมีนิวเคลียสรูปไข่หรือรูปวงรีอยู่ตรงกลางเซลล์ แกนตามยาวของนิวเคลียสจะขนานตามเซลล์ ยกเว้นปลาบางชนิดมีนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงรูปร่างกลม นิวเคลียสในเม็ดเลือดแดงของปลาสามารถมีขนาดใหญ่ถึง 1 ใน 4 หรือมากกว่าของปริมาตรเซลล์ เส้นใยโครมาตินในนิวเคลียสมีการรวมกลุ่มกันอย่างหนาแน่นและติดสีม่วงเข้ม ไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดงมักมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน แต่อาจมีบริเวณที่ติดสีจางหรือพบแวคิวโอลแตกต่างกันไปตามการเสื่อมสลายของ organelles ต่าง ๆ ขนาดและจำนวนของเม็ดเลือดแดงมีความผันแปรไปในระหว่างชนิดของปลาและขึ้นอยู่กับสภาวะทางสรีรวิทยาหรือแม้แต่ในปลาชนิดเดียวกัน ตัวอย่างเช่น เม็ดเลือดแดงของปลาในชั้น Chondrichthyes (ปลากระดูกอ่อน) มีขนาดใหญ่กว่าของปลาในชั้น Osteichthyes (ปลากระดูกแข็ง) ในปลาบางชนิดเม็ดเลือดแดงที่เจริญเต็มที่มีลักษณะโค้งนูนออกทั้งสองด้าน (biconvex) และนูนตรงกลางซึ่งเป็นตำแหน่งของนิวเคลียส หรือมีลักษณะแบบและเว้าเข้าทั้งสองด้าน (biconcave) สามารถพบสภาวะที่เม็ดเลือดแดงมีขนาดไม่เท่ากัน (anisocytosis) และติดสีหลากหลาย (polychromasia) ในระดับเล็กน้อยถึงปานกลางได้เป็นปกติในปลากระดูกแข็ง เนื่องจากขบวนการสร้างเม็ดเลือดแดง (erythropoiesis) ในกลุ่มปลาเกิดขึ้นในกระแสเลือดทั่วร่างกายซึ่งแตกต่างจากในสัตว์ชั้นสูงที่การสร้างเม็ดลือดแดงเกิดขึ้นในไขกระดูก (bone marrow) จึงสามารถพบเม็ดเลือดแดงเซลล์อ่อนในแผ่นฟิล์มของเลือดปลาได้เป็นปกติ โดยเซลล์เม็ดเลือดแดงวัยอ่อน เช่น Rubriblasts, Prorubriblasts และ Rubricytes จะมีขนาดใหญ่กว่านิวเคลียสมีความหนาแน่นน้อยกว่าและมีสัดส่วนของไซโตพลาสซึมน้อยกว่าเม็ดเลือดแดงที่เจริญเต็มที่ ทั้งนี้สัดส่วนและความเข้มของการติดสีเบส (basophilic) ของไซโตพลาสซึมในเม็ดเลือดแดงวัยอ่อนจะแปรผกผันกับระยะการเจริญของเซลล์ กล่าวคือยิ่งอายุเซลล์น้อยจะยิ่งมีสัดส่วนของไซโตพลาสซึมที่น้อยแต่มีการติดสีเบสที่เข้มกว่า นอกจากนี้ยังสามารถพบกระบวนการแบ่งเซลล์แบบ Mitosis ในเม็ดเลือดแดงจากแผ่นฟิล์มของเลือดปลาได้เป็นปกติ โดยจากการศึกษาโครงสร้าง

ต่ำกว่าระดับเซลล์พบว่าเม็ดเลือดแดงที่เจริญเต็มที่ของปลามีแกรนูลในไซโตพลาสซึมซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดเล็กละเอียด (finely granular cytoplasm) ในขณะที่เม็ดเลือดแดงวัยอ่อนจะมี mitochondria golgi complex และแวคิวโอลขนาดเล็กอยู่ในไซโตพลาสซึม (Thrall et al., 2004)

<u>2.4.1.2 ทรอมโบไซต์หรือเกล็ดเลือด (Thrombocytes)</u>

เลือดของปลากระดูกแข็งมีการเกิดกระบวนการแข็งตัวเพื่อตอบสนองต่อการได้รับบาดเจ็บเหมือนกับในสัตว์มีกระดูกสันหลังประเภทอื่น แต่ความเร็วและประสิทธิภาพในการแข็งตัวของเลือดในปลามีความแตกต่างกันมากในแต่ละชนิดของปลา เช่น การแข็งตัวของเลือดในปลากระดูกแข็งจะเกิดขึ้นรวดเร็วมากภายในเวลา 5 นาที ในขณะที่การแข็งตัวของเลือดในปลากระดูกอ่อนอาจใช้เวลาถึง 20 นาทีหรือนานกว่า (Thrall et al., 2004)

ทรอมโบไซต์ของปลามีขนาดเล็กกว่าเซลล์เม็ดเลือดทุกชนิด มีรูปร่างที่หลากหลาย เช่น กลม รี รูปไข่ หรือรูปกระสวยที่มีปลายไซโตพลาสซึมยืดยาวออกทั้งสองด้าน (Fange, 1987) โดยรูปร่างของทรอมโบไซต์ขึ้นอยู่กับระยะการเจริญของเซลล์และระดับการตอบสนองต่อปฏิกิริยาต่างๆ ของร่างกาย ทรอมโบไซต์ที่มีรูปร่างยืดยาวออกมากๆ มักเป็นชนิดที่มีอายุเซลล์มากและไม่มีการตอบสนองต่อปฏิกิริยาต่างๆ ส่วนทรอมโบไซต์ที่มีรูปร่างเป็นแบบรีหรือกระสวยเป็นชนิดที่มีการตอบสนองต่อการทำงานในปฏิกิริยาต่างๆ ของร่างกายได้ดี จึงมักพบการเกาะกลุ่มแบบเป็นร่างแหของทรอมโบไซต์ชนิดนี้ เซลล์ทรอมโบไซต์ที่ยังไม่เจริญเต็มที่ในปลากระดูกแข็งมักมีรูปร่างกลม ไซโตพลาสซึมของทรอมโบไซต์ในปลาอาจไม่มีสีหรือเป็นสีน้ำเงินจางโดยจะสังเกตเห็นเป็นเพียงขอบสีจางรอบนิวเคลียส นิวเคลียสติดสีม่วงเข้มมีรูปร่างตามรูปร่างของเซลล์และมีเส้นใยโครมาตินเกาะรวมกลุ่มกันหนาแน่น (Walsh and Luer, 2004) อาจพบแกรนูลที่ติดสี eosine ในไซโตพลาสซึมได้เช่นเดียวกับทรอมโบไซต์ในสัตว์ปีกและสัตว์เลื้อยคลาน บางครั้งอาจแยกทรอมโบไซต์ชนิดที่มีรูปร่างกลมกับลิมโฟไซต์ขนาดเล็กในปลาได้ยาก เนื่องจากมีอัตราส่วนของนิวเคลียสต่อไซโตพลาสซึมที่สูงมากเช่นเดียวกัน แต่ไซโตพลาสซึมของลิมโฟไซต์จะมีปริมาณมากกว่าเล็กน้อยและติดสีที่เป็นเบสน้อยกว่า และนิวเคลียสมักมีขนาดใหญ่กว่าแต่มีความหนาแน่นน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับนิวเคลียสของทรอมโบไซต์ ทรอมโบไซต์ของปลาให้ผลบวกอย่างอ่อนและผลบวกต่อการติดสีของ PAS และ AcP (Thrall et al., 2004)

<u>2.4.1.3 เม็ดเลือดขาว (Leucocytes; White blood cells)</u>

เม็ดเลือดขาวในปลากระดูกแข็งโดยเฉพาะเม็ดเลือดขาวชนิดมีแกรนูลหรือแกรนูโลไซต์ (Granulocyte) มีความผันแปรในด้านลักษณะที่ปรากฏแตกต่างกันไปในปลาแต่ละชนิด เช่น จากการศึกษาโครงสร้างระดับต่ำกว่าเซลล์และทางไซโตเคมีในปลา Channel catfish *(Ictalurus punctatus)* สามารถระบุชนิดของเม็ดเลือดขาว ได้เป็น เฮเทอโรฟิล (Heterophils) เบโซฟิล (Basophils) ลิมโฟไซต์ (Lymphocytes) และโมโนไซต์ (Monocytes) (Ellsaesser and Chem,

1986) ในปลาทอง (*C. auratus*) พบเม็ดเลือดขาวชนิด เฮเทอโรฟิล อิโอสิโนฟิล (Eosinophils) ลิมโฟไซต์ โมโนไซต์ และเบโซฟิล ซึ่งเบโซฟิลเป็นชนิดที่พบในปริมาณน้อยที่สุด แต่หากจัดจำแนกเม็ดเลือดขาวในปลาทองจากข้อมูลพื้นฐานของปฏิกิริยาทางไซโตเคมีจะสามารถจำแนกได้เพียง 3 ชนิด คือ ลิมโฟไซต์ นิวโทรฟิล (Neutrophils) หรือเฮเทอโรฟิล และโมโนไซต์ (Watson et al., 1963; Weinreb, 1963) ซึ่งคล้ายคลึงกับในกลุ่มปลากะพง (Bass) เช่น ปลากระพงลาย *(Morone saxatilis)* ที่สามารถจำแนกชนิดของเม็ดเลือดขาวได้เป็น ลิมโฟไซต์ นิวโทรฟิล และโมโนไซต์ (Courtois, 1976) ในปลา Chinese sturgeon *(Acipenser sinensis*) พบเม็ดเลือดขาว 4 ชนิดคือ ลิมโฟไซต์ นิวโทรฟิล โมโนไซต์ และอิโอสิโนฟิล (Zexia et al., 2007) ทั้งนี้การศึกษาปฏิกิริยาทางไซโตเคมีมีประโยชน์อย่างมากในการจำแนกชนิดของเม็ดเลือดขาวในปลา โดยใช้หลักเกณฑ์ในการจัดจำแนกเช่นเดียวกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งโดยสรุปแล้วชนิดของเม็ดเลือดขาวที่มีรายงานในปลากระดูกแข็งส่วนใหญ่ ได้แก่ นิวโทรฟิลหรือเฮเทอโรฟิล อิโอสิโนฟิล ลิมโฟไซต์ และโมโนไซต์ ส่วนเบโซฟิลเป็นชนิดที่พบได้น้อยมากและอาจไม่พบในปลาบางชนิด (Saunders, 1966; Ellis, 1977) ซึ่งลักษณะของเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดในปลากระดูกแข็งเป็นดังนี้

(1) **นิวโทรฟิล** ในปลากระดูกแข็งมีลักษณะและคุณสมบัติคล้ายคลึงกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือ เป็นเม็ดเลือดขาวชนิดมีแกรนูล เซลล์รูปร่างกลมจนถึงรูปไข่เล็กน้อยมีนิวเคลียสเอียงไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ มีลักษณะนิวเคลียสที่หลากหลายขึ้นกับระยะของเซลล์ เช่น เซลล์นิวโทรฟิลวัยอ่อนชนิด Metamyelocytes ที่มีนิวเคลียสเป็นรูปไต หรือเซลล์ระยะถัดมา คือ banded neutrophil ที่นิวเคลียสเริ่มเป็นท่อนยืดยาวออก ส่วนเซลล์นิวโทรฟิลที่เจริญเต็มที่นิวเคลียสจะมีลักษณะเป็นพู (segmented neutrophil) ซึ่งตามปกติในปลากระดูกแข็งจะพบประมาณ 2-3 พู เส้นใยโครมาติน ของนิวเคลียสมีการรวมกลุ่มกันอย่างหยาบ ๆ และติดสีน้ำเงินหรือม่วงในแผ่นฟิล์มของเลือดที่ย้อมสีด้วยวิธี Romanowsky ไซโตพลาสซึมมีปริมาณมากและติดสีแบบ neutrophilic คือสีเทาหรืออาจติดสีที่เป็นกรดเล็กน้อย แกรนูลในไซโตพลาสซึมมีขนาดเล็กละเอียด โดยการติดสีของแกรนูลจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของปลาหรือการเจริญของเซลล์ ตั้งแต่สีเทา สีน้ำเงินหรือสีแดงอ่อน (Ezzat et al., 1974) พบในปริมาณตั้งแต่ 10-40% และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์อยู่ในช่วง 10-18 ไมครอน ขึ้นอยู่กับชนิดของปลากระดูกแข็ง (Tavares-Dias, 2008) แต่ในปลากระดูกแข็งหลายชนิดมักพบแกรนูโลไซต์ที่มีรูปร่างและลักษณะคล้ายนิวโทรฟิลแต่มีรูปแบบการติดสีพื้นฐาน ปฏิกิริยาการติดสีทางไซโตเคมีและลักษณะของแกรนูลที่แตกต่างจากนิวโทรฟิลในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งเซลล์ชนิดนี้มักถูกจำแนกเป็นเฮเทอโรฟิล เนื่องจากมีลักษณะคล้ายคลึงกับเฮเทอโรฟิลที่พบในสัตว์ปีกและสัตว์เลื้อยคลาน (Campbell and Ellis, 2007) ทั้งนี้สามารถใช้การศึกษาปฏิกิริยาทางไซโตเคมีเพื่อแยกความแตกต่างของนิวโทรฟิลและเฮเทอโรฟิลในปลากระดูก

แข็งเนื่องจากนิวโทรฟิลให้ผลบวกต่อการติดสี PO ในขณะที่เฮเทอโรฟิลให้ผลลบต่อการติดสีนี้ (Meseguer et al., 1994)

ในปลาบางชนิด เช่น ปลาทอง (*Carassius auratus*) และปลาแฟนซีคาร์พ (*Cyprinus carpio*) ได้จัดจำแนกแกรนูโลไซต์ที่มีแกรนูลติดสีที่เป็นกรดเล็กน้อยแต่ไซโตพลาสซึมไม่มีสีและนิวเคลียสแบ่งเป็นพูเอียงไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์จากการย้อมสีด้วยวิธี Romanowsky โดยเรียกชื่อเป็นเฮเทอโรฟิล แม้ว่าจะมีคุณสมบัติทางไซโตเคมีคล้ายกับนิวโทรฟิลในปลาชนิดอื่นก็ตาม เซลล์เฮเทอโรฟิลดังกล่าวนี้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 ไมครอน ให้ผลบวกต่อสี PO และสี SBB เมื่อแกรนูลภายในเซลล์ยังไม่เจริญเต็มที่ แต่ให้ผลลบต่อสี PO ในเซลล์ที่เจริญเต็มที่แล้ว (Watson et al., 1963; Tripathi et al., 2004) เช่นเดียวกับในปลา Channel catfish ที่พบแกรนูโลไซต์ที่แกรนูลเป็นรูปแท่งติดสีออกแดง (eosinophilic granules) และให้ผลบวกต่อสี PO ซึ่งคล้ายกับเฮเทอโรฟิลในสัตว์ปีก (Williams and Warner, 1976) เซลล์ที่มีความคล้ายคลึงกันนี้ยังพบได้ในปลากระดูกแข็งชนิดอื่นๆ อาทิเช่น กลุ่มปลาแซลมอน เช่น ปลา Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) และปลา Coho salmon (*O. kisutch*) (Thrall et al., 2004)

(2) **อิโอสิโนฟิล** เป็นแกรนูโลไซต์ที่พบได้ในปริมาณค่อนข้างน้อยตั้งแต่ 3-10% และอาจไม่พบในปลากระดูกแข็งบางชนิด เช่น ในปลาปล้องอ้อยลายขวาง *(Leporinus macrocephalus*) (Tavares-Dias et al, 2008) อิโอสิโนฟิลจัดเป็นเม็ดเลือดขาวขนาดปานกลางถึงขนาดใหญ่ แยกได้ยากจากเฮเทอโรฟิลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง มีแกรนูลติดสีส้มหรือแดงชัดเจนและมีไซโตพลาสซึมสีน้ำเงินจางหรือไม่ติดสี รูปร่างของแกรนูลที่พบส่วนใหญ่มักเป็นรูปร่างกลมขนาดใกล้เคียงกันและมีจำนวนแกรนูลน้อยกว่าเมื่อเทียบกับเฮเทอโรฟิล นิวเคลียสมีรูปร่างเป็นแท่งยืดยาวหรือแบ่งเป็นพูเช่นเดียวกับที่พบในเฮเทอโรฟิลหรือนิวโทรฟิล การจำแนกอิโอสิโนฟิลออกจากเฮเทอโรฟิลที่มีแกรนูลติดสี eosine เช่นเดียวกันในปลากระดูกแข็ง จำเป็นต้องใช้การศึกษาคุณสมบัติการติดสีทางไซโตเคมีและโครงสร้างระดับต่ำกว่าเซลล์ประกอบ เนื่องจากในปลายังขาดข้อมูลเกี่ยวกับ crystalloids ซึ่งใช้เป็นหลักฐานสำคัญสำหรับการจำแนกอิโอสิโนฟิลในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Campbell and Murru, 1990) โดยส่วนใหญ่แล้วมีรายงานการพบอิโอสิโนฟิลในปลากระดูกแข็งเกือบทุกชนิดในลักษณะที่คล้ายกันคือเซลล์มีรูปร่างค่อนข้างกลมขนาดใกล้เคียงกับเฮเทอโรฟิล มีแกรนูลรูปกลมหรือแท่งติดสี eosine ในไซโตพลาสซึมจากการย้อมสีด้วยวิธี Romanowsky แกรนูลมีปริมาณน้อยกว่าอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับในสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีนิวเคลียสเป็นรูปไตหรือเป็นพูเอียงไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ เช่น ในปลาช่อนอเมซอน *(Arapima gigas)* (Tavares-Dias et al., 2007) ปลาทอง *(C. auratus)* (Watson et al, 1963) ปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus)* (Doggett et al., 1987) ปลา Chinese sturgeon *(A. sinensis*) (Gao et al., 2007) และปลาแฟนซีคาร์พ *(C. carpio)* (Tripathi et al.,

2004) ซึ่งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอิโอสิโนฟิลที่พบในปลากระดูกแข็งมีค่าเฉลี่ยประมาณ 7.5-14 ไมครอน โดยมีขนาดใกล้เคียงหรือเล็กกว่าเฮเทอโรฟิลเล็กน้อย (Thrall et al., 2004)

(3) **เบโซฟิล** พบได้ในปริมาณน้อยมากในปลากระดูกแข็ง คือพบในปริมาณไม่เกิน 1% ของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด และมีปลาหลายชนิดที่ไม่พบเม็ดเลือดขาวชนิดนี้ (Saunders, 1966; Ellis, 1977) เช่น ในปลาในกลุ่มแซลมอน (Salmonoids) (McCarthy et al., 1975) ปลากระพงลาย *(M. saxatilis)* (Courtois, 1976) และปลา Chinese sturgeon *(A. sinensis)* (Zexia et al., 2007) เบโซฟิลในปลากระดูกแข็งเป็นเซลล์รูปร่างกลมลักษณะคล้าย Mast cell ไซโตพลาสซึมมีแกรนูลรูปร่างกลมติดสีที่เป็นเบสอยู่ในไซโตพลาสซึมและมักบดบังส่วนของนิวเคลียสไว้ นิวเคลียสของเบโซฟิลมีขนาดใหญ่รูปร่างกลมและเอียงไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ เส้นใยโครมาตินในนิวเคลียสมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน ทั้งนี้กระบวนการย้อมสีแผ่นฟิล์มเลือดปลากระดูกแข็งมีผลต่อเซลล์เบโซฟิลอย่างมากและบ่อยครั้งที่ทำให้เกิดการติดสีที่ผิดปกติและส่งผลกระทบต่อการจำแนกชนิดเม็ดเลือดขาว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเบโซฟิลในปลากระดูกแข็งวัดได้อยู่ในช่วง 10-20 ไมครอน (Campbell and Ellis, 2007)

(4) **ลิมโฟไซต์** จัดเป็น Agranulocyte หรือเม็ดเลือดขาวที่ไม่มีแกรนูลอยู่ภายในไซโตพลาสซึม มีขนาดเล็กที่สุดแต่พบในปริมาณมากที่สุดที่ประมาณ 30-70% ของปริมาณเม็ดเลือดขาวทั้งหมด มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์อยู่ในช่วง 5-8 ไมครอน แต่ลิมโฟไซต์เซลล์อ่อนอาจมีขนาดใหญ่กว่านี้ได้ ลิมโฟไซต์ในปลากระดูกแข็งมีลักษณะคล้ายคลึงกับในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นๆ เซลล์มีรูปร่างกลมมีอัตราส่วนของนิวเคลียสต่อไซโตพลาสซึมสูงมาก คือนิวเคลียสกลมใหญ่เต็มเซลล์จนแทบมองไม่เห็นส่วนของไซโตพลาสซึม ติดสีเบสเข้มภายในมีเส้นใยโครมาตินรวมกลุ่มกันอย่างหนาแน่น ไซโตพลาสซึมที่มีอยู่น้อยมากของลิมโฟไซต์ติดสีน้ำเงินจางและเป็นเนื้อเดียวกัน ในปลากระดูกแข็งบางครั้งอาจพบลิมโฟไซต์ชนิดที่มีแกรนูลติดสี azure (azurophilic granules) อยู่ในไซโตพลาสซึมได้บ้าง (Campbell and Ellis, 2007)

(5) **โมโนไซต์** โมโนไซต์ในปลากระดูกแข็งส่วนใหญ่มีลักษณะที่คล้ายคลึงกับในสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์ปีก เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีขนาดใหญ่ที่สุดแต่พบได้ค่อนข้างน้อยที่ประมาณ 1-3% ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์อยู่ในช่วง 8-20 ไมครอน แตกต่างกันไปตามชนิดของปลา นิวเคลียขนาดค่อนข้างใหญ่รูปร่างคล้ายไตหรือแบ่งเป็นสองพู (bilobate) และโดยทั่วไปมีขนาดน้อยกว่า 50% ของปริมาตรเซลล์ เส้นใยโครมาตินในนิวเคลียสของโมโนไซต์มักเกาะรวมกลุ่มกันแบบหลวมๆ ไม่หนาแน่นเหมือนในนิวเคลียสของลิมโฟไซต์ ไซโตพลาสซึมติดสีเทาอมน้ำเงินไม่มีแกรนูลอยู่ภายใน แต่อาจพบแวคิวโอลที่ขอบของไซโตพลาสซึมซึ่งอาจมองเห็นได้ไม่ชัดเจนหรือมีลักษณะเป็นริ้ว รูปร่างของเซลล์ไม่แน่นอนเนื่องจากมักมีส่วนที่ยื่นออกไปของไซโตพลาสซึมคล้ายเท้าเทียม (pseudopodia) การจำแนกโมโนไซต์กับ

เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ (Macrophage) ในปลาเป็นเรื่องที่ทำได้ยากและบางครั้งมักถูกเรียกรวมเป็นชนิดเดียวกันเนื่องจากโมโนไซต์ของปลามีลักษณะรูปร่างและคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกับแมคโครฟาจ โดยมีหลายรายงานในปลากระดูกแข็งที่เรียกเซลล์ชนิดนั้นว่าโมโนไซต์ในกรณีที่พบเซลล์ดังกล่าวในกระแสเลือด และเรียกว่าแมคโครฟาจในกรณีที่พบเซลล์ดังกล่าวในอวัยวะอื่นๆ ของร่างกาย ทั้งนี้สามารถจำแนกโมโนไซต์ในปลากระดูกแข็งออกจากเซลล์ลิมโฟไซต์และแกรนูโลไซต์เซลล์อ่อน โดยใช้คุณสมบัติการติดสีทางไซโตเคมีที่โมโนไซต์ให้ผลบวกต่อเอนไซม์ esterase (Campbell and Ellis, 2007)

2.4.2 คุณลักษณะทางโลหิตวิทยาในปลากระดูกอ่อน

2.4.2.1 เม็ดเลือดแดง (Erythrocytes; Red blood cells)

เม็ดเลือดแดงในปลากระดูกอ่อนมีลักษณะเช่นเดียวกับปลากระดูกแข็ง คือ เมื่อย้อมแผ่นฟิล์มของเลือดด้วยวิธี Romanowsky เช่น สี Wright, Leishmann, May-Grunwald, Giemsa และอื่นๆ เซลล์เม็ดเลือดแดงที่เจริญเต็มที่แล้วจะเป็นเซลล์รูปไข่หรือรูปวงรี มีนิวเคลียสรูปร่างกลมหรือรีเล็กน้อยอยู่ตรงกลางเซลล์และติดสีน้ำเงินหรือสีม่วงเข้ม แต่ปริมาณไซโตพลาสซึมของเซลล์เม็ดเลือดแดงในปลากระดูกอ่อนจะมีมากกว่าและติดสีติดสีส้ม-แดงจางหรือสีม่วงอมน้ำเงินจางๆ ขึ้นกับชนิดของปลา พบแวคิวโอลได้ทั่วไปในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือด และพบเม็ดเลือดแดงเซลล์อ่อนได้ทั่วไป โดยลักษณะของเม็ดเลือดแดงเซลล์อ่อนมีรูปแบบและคุณสมบัติเดียวกับที่พบในกลุ่มปลากระดูกแข็ง (Zapata and Carrato, 1981; Walsh and Luer, 2004)

เม็ดเลือดแดงในปลากระดูกอ่อนและปลากระดูกแข็งมีความแตกต่างกันในด้านของขนาด คือ ในปลากระดูกอ่อนเม็ดเลือดแดงจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ใหญ่กว่า หรือมีขนาดประมาณ 2 เท่าครึ่งของเม็ดเลือดแดงในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ตัวอย่างการศึกษาขนาดเม็ดเลือดแดงในกลุ่มปลาฉลาม Wobbegong (Orectolobidae) 3 สายพันธุ์ โดย Old และ Huveneers ในปี 2006 พบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยอยู่ที่ 16-27x10-16 ไมครอน ส่วนในรายงานของ Snyder และ Sheafor ในปี 1999 ได้ระบุถึงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยในปลากระดูกอ่อนจาก 25 สายพันธุ์ ว่ามีขนาดเท่ากับ 20.10±4.20x14.90±0.20 ไมครอน ในขณะที่ปลากระดูกแข็งจาก 33 สายพันธุ์ ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดเลือดแดงมีค่าเท่ากับ 12.00±0.20x8.50±1.60 ไมครอน ซึ่งปลากระดูกอ่อนมีขนาดเม็ดเลือดแดงที่ใหญ่กว่าปลากระดูกแข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

<u>2.4.2.2 ทรอมโบไซต์หรือเกร็ดเลือด (Thrombocytes)</u>

ลักษณะรูปร่างและหน้าที่ของทรอมโบไซต์ในปลากระดูกอ่อน เป็นลักษณะเช่นเดียวกับที่พบในปลากระดูกแข็งซึ่งอธิบายไว้ในหัวข้อ 2.4.1.2 โดยชนิดของทรอมโบไซต์ที่พบมากที่สุดจะเป็นเซลล์รูปร่างคล้ายกระสวยที่มีส่วนของไซโตพลาสซึมยืดยาวออกจากด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้านของเซลล์และมักอยู่รวมกันเป็นร่างแห (Walsh and Luer, 2004) ทั้งนี้การแข็งตัวของเลือดในปลากระดูกอ่อนจะใช้กระบวนการ extrinsic pathway เป็นหลัก โดยมีการใช้ประโยชน์จากลักษณะทางกายภาพและสิ่งแวดล้อมหรือปัจจัยอื่นๆ ภายนอกร่างกายช่วยกระตุ้นกระบวนการแข็งตัวของเลือด เช่น อิเล็กโทรไลท์ (electrolyte) ต่างๆ ที่ช่วยปรับแรงดันออสโมติกในกระแสเลือดของปลา เมือกที่ปกคลุมร่างกายช่วยให้เกิดการแข็งตัวของเลือดได้อย่างรวดเร็ว รวมทั้งการมีผิวหนังและเกล็ดที่หนาเพื่อช่วยป้องกันอันตรายจากการบาดเจ็บ เป็นต้น (Thrall et al., 2004)

<u>2.4.2.3 เม็ดเลือดขาว (Leucocytes; White blood cells)</u>

เซลล์เม็ดเลือดขาวในปลาชั้น Chondrichthyes หรือกลุ่มปลากระดูกอ่อน สามารถจำแนกได้เป็น 3 ชนิดหลักคือ แกรนูโลไซต์ ลิมโฟไซต์ และโมโนไซต์ (Thrall et al., 2004)

(1) **แกรนูโลไซต์** หรือ Granulocytic leucocytesเป็นเม็ดเลือดขาวที่มีความหลากหลายอย่างมากในด้านขนาด รูปร่าง และคุณสมบัติการติดสีของแกรนูลภายในเซลล์ของปลากระดูกอ่อน จึงยังไม่มีหลักเกณฑ์ที่แน่นอนในการระบุชื่อแกรนูโลไซต์ชนิดต่างๆ (Campbell and Murru, 1990) ความยุ่งยากในการแปลผลแกรนูโลไซต์มีสาเหตุหลักมาจากคุณลักษณะที่ไม่ชัดเจนเหมือนกับแกรนูโลไซต์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งแม้แต่ในปลากระดูกอ่อนกลุ่มเดียวกันก็ยังพบลักษณะของแกรนูโลไซต์ที่แตกต่างกัน (Old and Huveneers, 2006) ทั้งนี้ในปัจจุบันการจัดจำแนกแกรนูโลไซต์ในปลามักใช้วิธีการศึกษาทั้งทางด้านโครงสร้างระดับต่ำกว่าเซลล์ การย้อมติดสีและคุณสมบัติทางไซโตเคมีมาประกอบ และใช้หลักเกณฑ์การเรียกชื่อตามหลักโลหิตวิทยาในสัตว์ปีกหรือสัตว์เลื้อยคลานที่มีความใกล้เคียงมากกว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Campbell, 1995)

แกรนูโลไซต์ชนิดที่พบได้มากที่สุดในปลากระดูกอ่อน เป็นเซลล์ที่ตามหลักทางโลหิตวิทยาในสัตว์ที่ไม่ใช่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจัดเป็น Heterophilic granulocytes หรือเฮเทอโรฟิล พบที่ประมาณ 10-30% ของปริมาณเม็ดเลือดขาวทั้งหมด มีบทบาทหน้าที่คล้ายกับนิวโทรฟิลในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่สาเหตุที่ใช้ชื่อเฮเทอโรฟิลเนื่องจากมีคุณลักษณะการย้อมติดสีที่แตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของสัตว์ เฮเทอโรฟิลมีไซโตพลาสซึมที่ไม่มีสีภายในมีแกรนูลที่มีรูปร่างหลากหลายตั้งแต่รูปกระสวย รูปท่อนเรียวคล้ายเข็ม รูปหยดน้ำหรือรูปทรงกลม แกรนูลเหล่านี้มักติดสีอมส้มหรือชมพูจากการย้อมสีด้วยวิธี Romanowsky โดยรูปร่าง ขนาด และความเข้มในการติดสีของแกรนูลมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของปลาและระยะในการเจริญพัฒนาของเซลล์ นิวเคลียสของเฮเทอโรฟิลมักถูกบดบังไปบางส่วนโดยแกรนูลในไซโตพลาสซึม เฮเทอโรฟิลที่เจริญเต็มที่แล้วจะมี

นิวเคลียสที่แบ่งเป็นหลายพู (segmented nuclei) ซึ่งตามปกติมี 2-3 พู เอียงไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์เช่นเดียวกับนิวโทรฟิล โดยในนิวเคลียสประกอบด้วยเส้นใยโครมาตินที่รวมกลุ่มกันอย่างหยาบๆ ติดสีน้ำเงินหรือสีม่วง ส่วนเฮเทอโรฟิลเซลล์อ่อนที่เรียกว่า Heterophilic granuloblasts พบได้น้อยในกระแสเลือดปลากระดูกอ่อน มีลักษณะที่แตกต่างจากเฮเทอโรฟิลที่เจริญเต็มที่คือรูปร่างของนิวเคลียสที่กลมหรือเว้าคล้ายไต หรือมีรูปร่างแบน รูปร่างของแกรนูลไม่ชัดเจน ย้อมติดสีส้มหรือชมพูมัวมองเห็นไม่ชัดเจน หน้าที่ของเฮเทอโรฟิลในปลากระดูกอ่อน คือ บทบาทในขบวนการ phagocytosis ซึ่งในสภาวะที่ร่างกายมีการติดเชื้อ และความเครียดจะส่งผลทำให้มีปริมาณเฮเทอโรฟิลเพิ่มสูงขึ้น (Walsh and Luer, 2004)

แกรนูโลไซต์ชนิดที่สองที่พบในกระแสเลือดของปลากระดูกอ่อนคือ อิโอสิโนฟิล ซึ่งมักพบในปริมาณน้อยกว่าเฮเทอโรฟิลตั้งแต่ 0-10% ของปริมาณเม็ดเลือดขาวทั้งหมด แตกต่างกันไปตามชนิดของปลา แกรนูลของอิโอสิโนฟิลจะติดสีส้มหรือชมพูจากการย้อมสีโดยวิธี Romanowsky แต่ติดสีเข้มและมีความคมชัดมากกว่าแกรนูลของเฮเทอโรฟิล ในปลากระดูกอ่อนส่วนใหญ่อิโอสิโนฟิลและเฮเทอโรฟิลมักมีขนาดใกล้เคียงกันและแยกได้ยากจากการศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง เนื่องจากนิวเคลียสที่มีลักษณะคล้ายกัน แกรนูลติดสี eosine เช่นเดียวกัน และรูปร่างแกรนูลของอิโอสิโนฟิลมีลักษณะที่แตกต่างตามชนิดของปลาเช่นเดียวกัน เช่น ในปลาฉลามขี้เซา (*Ginglymostoma cirratum*) แกรนูลเป็นรูปแท่งเรียวยาวคล้ายเม็ดข้าวสาร ในปลากระเบนจมูกวัว *(R. bonasus)* อิโอสิโนฟิลมีแกรนูลเป็นรูปแท่งเช่นกันแต่มีขนาดใหญ่กว่า ในปลาโรนันหัวใส (*Raja eglanteria*) แกรนูลมีรูปร่างกลมขนาดใหญ่และติดสีแดงอ่อนเมื่อย้อมด้วยสี Wright (Walsh and Luer, 2004) การจำแนกอิโอสิโนฟิลจากเฮเทอโรฟิลในปลากระดูกอ่อนจึงจำเป็นต้องใช้การศึกษาในระดับต่ำกว่าเซลล์และคุณสมบัติการติดสีไซโตเคมีร่วมด้วย ซึ่งในการศึกษาด้วยวิธี in vitro พบว่าอิโอสิโนฟิลในปลากระดูกอ่อน มีคุณสมบัติในการดักจับเชื้อแบคทีเรียและสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ได้เช่นกัน แต่ประสิทธิภาพด้อยกว่าเฮเทอโรฟิล (Ellis, 1977) ทั้งนี้อิโอสิโนฟิลในปลากระดูกอ่อนจะตอบสนองต่อการติดเชื้อปรสิตผ่านขบวนการ degranulation โดยปล่อยสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ของเชื้อปรสิตจากแกรนูล ซึ่งเป็นกลไกเดียวกับสัตว์มีกระดูกสันหลังประเภทอื่น ๆ (Walsh and Luer, 2004)

แกรนูโลไซต์ชนิดที่สามที่พบในปลากระดูกอ่อน คือ เบโซฟิลที่มีแกรนูลติดสีม่วงหรือน้ำเงิน (Basophilic granulocytes) เม็ดเลือดขาวชนิดนี้พบในปริมาณน้อยกว่า 1% ของปริมาณเม็ดเลือดขาวโดยรวม และอาจไม่พบในปลากระดูกอ่อนหลายชนิด (Fange, 1987) เช่น ปลาฉลาม Spiny dogfish (*Squalus acanthias*) (Sherburne, 1974) ปลาฉลาม Port Jackson (*Heterodontus portusjacksoni*) (Stokes and Firkin, 1971) และกลุ่มปลาฉลาม Wobbegong (Orectolobidae) (Old and Huveneers, 2006) เป็นต้น เซลล์เบโซฟิลที่มีรายงานในปลากระดูก

อ่อน เซลล์มีรูปร่างกลม มีนิวเคลียสที่แบ่งเป็นพูและอยู่ไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ นิวเคลียสของเซลล์ติดสีม่วงอ่อนหรือน้ำเงินและมักถูกบดบังโดยแกรนูลขนาดใหญ่ในไซโตพลาสซึมที่ติดสีม่วงหรือน้ำเงินเข้ม การติดสีที่เบสของแกรนูลทำให้สามารถแยกเบโซฟิลออกจากแกรนูโลไซต์ชนิดอื่นเมื่อทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง แกรนูลในเบโซฟิลมีรูปร่างกลมและมีปริมาณน้อยกว่าแกรนูลของเฮเทอโรฟิลหรืออิโอสิโนฟิล โดยมีข้อสันนิษฐานถึงหน้าที่ของเบโซฟิลในปลากระดูกอ่อนว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาภูมิแพ้ต่างๆ (hypersensitivity reactions) เช่นเดียวกับในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง

ทั้งนี้มีรายงานในปลากระดูกอ่อนบางชนิดว่าพบแกรนูโลไซต์ชนิดที่สี่ ซึ่งมีแกรนูลที่ติดสีเป็นกลางหรือไม่ติดสี (Neutrophilic granulocyte) นิวเคลียสของเซลล์เหล่านี้มีลักษณะเป็นพูในเซลล์ที่เจริญเต็มที่หรือเป็นแท่งยาวในเซลล์วัยอ่อน อยู่เอียงไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ซึ่งเป็นลักษณะที่คล้ายคลึงกับในนิวโทรฟิลของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Fange, 1987) เช่น ในปลาฉลาม Port Jackson (*H. portusjacksoni*) (Stokes and Firkin, 1971) แต่ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าเซลล์ดังกล่าวเป็นแกรนูโลไซต์อีกชนิดหนึ่งหรือเป็นนิวโทรฟิลเช่นเดียวกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม หรือเป็นเพียงผลมาจากภาพลวง (artifact) จากขบวนการเตรียมแผ่นฟิล์มเลือดและย้อมสี (Walsh and Luer, 2004)

วิธีการจำแนกแกรนูโลไซต์อีกวิธีหนึ่งในปลากระดูกอ่อน เป็นการจำแนกโดยยึดตามผลการศึกษาโครงสร้างต่ำกว่าระดับเซลล์และปฏิกิริยาทางไซโตเคมีในตัวอย่างเลือดจากปลาฉลามแมวจุดเล็ก (Small-spotted catshark or lesser spotted dogfish; *Scyliorhinus canicula*) ซึ่งถูกใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาด้านโลหิตวิทยาของปลากระดูกอ่อน โดยพบแกรนูโลไซต์ 3 ชนิด ดังนี้

- **แกรนูโลไซต์** G1 (type I) นิวเคลียสมีรูปร่างไม่แน่นอน ไม่มีการแบ่งเป็นพูและอยู่เอียงไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ มีแกรนูลรูปร่างกลมถึงรูปไข่ติดสีส้มหรือแดงอยู่ในไซโตพลาสซึม แต่ทั้งนี้อาจพบนิวเคลียสของแกรนูโลไซต์ G1 มีลักษณะเป็นพูในปลากระดูกอ่อนบางชนิด เซลล์เหล่านี้มีความคล้ายคลึงกับเฮเทอโรฟิลในสัตว์ปีกและเป็นแกรนูโลไซต์ที่พบมากที่สุดในปลากระดูกอ่อน
- **แกรนูโลไซต์** G2 (type II) มีนิวเคลียสที่แบ่งเป็นพู ไซโตพลาสซึมย้อมไม่ติดสีซึ่งภายในประกอบด้วยแกรนูลขนาดเล็กละเอียดคล้ายฝุ่นมองเห็นได้ชัดเจน เซลล์กลุ่มนี้คล้ายคลึงกับนิวโทรฟิลในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม
- **แกรนูโลไซต์** G3 (type III) รูปร่างของนิวเคลียสแตกต่างกันในแต่ละชนิดของปลา โดยอาจมีลักษณะเป็นพูหรือเป็นแท่งยาว หรือรูปร่างคล้ายไต ไซโตพลาสซึมสี

น้ำเงินจางและมีแกรนูลรูปกลมถึงรูปแท่ง ติดสีส้มหรือแดงเข้มอยู่ในไซโตพลาสซึม แกรนูโลไซต์ G3 ในปลากระดูกอ่อนมีความคล้ายคลึงกับอิโอสิโนฟิลในสัตว์ปีก ทั้งนี้ในการศึกษาเกี่ยวกับเม็ดเลือดในปลากระดูกอ่อนแกรนูโลไซต์ที่มีแกรนูลติดสีแดงมองเห็นได้ชัดเจน แกรนูลมีรูปร่างกลมหรือแท่ง และพบในปริมาณน้อยกว่าเฮเทอโรฟิลมักถูกจัดจำแนกเป็นอิโอสิโนฟิล (Thrall et al., 2004; Campbell and Ellis, 2007)

การศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติการย้อมติดสีทางไซโตเคมีในแกรนูโลไซต์ของปลากระดูกอ่อนพบว่ามักให้ผลบวกต่อการติดสีสำหรับเอนไซม์ Peroxidase, β-glucuronidase และ Sudan black B แต่ให้ผลลบต่อการติดสีสำหรับเอนไซม์ Acid phosphatase, Aryl sulfatase และ Acid naphthyl AS-D chloroacetate esterase แกรนูโลไซต์ที่ติดสี eosine คือ granulocytes G1 และ G3 ของปลากระดูกอ่อน มีคุณสมบัติทางด้านรูปร่างและการติดสีทางไซโตเคมีเพียงไม่กี่อย่างที่สอดคล้องกับอิโอสิโนฟิลในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม บทบาทหน้าที่และความสัมพันธ์ระหว่างกันของแกรนูโลไซต์ชนิดต่าง ๆ ในปลากระดูกอ่อนยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่อย่างไรก็ตามเซลล์เหล่านี้ได้ถูกแบ่งแยกตามชนิดของเซลล์มากกว่าระยะเวลาในการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ และไม่จำเป็นต้องพบแกรนูโลไซต์ทุกชนิดในปลากระดูกอ่อนแต่ละสายพันธุ์ ตัวอย่างเช่น ในปลาโรนันหลังหนาม (*R. clavata*) และปลาโรนันตาเล็ก (*R. microcellata*) พบเพียงแกรนูโลไซต์ชนิด G1 และ G3 เท่านั้น (Rowley, 1988)

(2) **ลิมโฟไซต์** เป็นเม็ดเลือดขาวที่พบในปริมาณมากที่สุดในปลากระดูกอ่อน พบในช่วง 50-75% ของปริมาณเม็ดเลือดขาวโดยรวม มีรูปร่างและคุณสมบัติเหมือนกับลิมโฟไซต์ในปลากระดูกแข็งและสัตว์มีกระดูกสันหลังประเภทอื่น คือมีนิวเคลียสกลมใหญ่เกือบเต็มเซลล์ติดสีน้ำเงินเข้ม เส้นใยโครมาตินในนิวเคลียสมีการรวมกลุ่มกันอย่างหนาแน่น ไซโตพลาสซึมมีปริมาณน้อยมากจนแทบมองไม่เห็น สามารถจำแนกลิมโฟไซต์ออกได้เป็น 2-3 กลุ่ม ตามขนาดที่พบซึ่งขึ้นอยู่กับระยะการเจริญของเซลล์ ลิมโฟไซต์ที่พบส่วนมากมักมีขนาดเล็กซึ่งเป็นเซลล์ที่เจริญเต็มที่แล้ว ส่วนเซลล์ขนาดกลางเป็นเซลล์ที่กำลังมีการเจริญเติบโต แต่ลิมโฟไซต์ขนาดใหญ่หรือเป็นเซลล์วัยอ่อนพบได้น้อยมากในแผ่นฟิล์มเลือดปลากระดูกอ่อน อัตราส่วนของนิวเคลียสต่อไซโตพลาสซึมของลิมโฟไซต์ (N:C ratio) ตามปกติมีค่าสูงมากแต่ผันแปรตามระยะการเจริญของเซลล์ โดยลิมโฟไซต์ที่เจริญเต็มที่แล้วจะมี N:C ratio สูงกว่าลิมโฟไซต์เซลล์อ่อน (Blaxhall and Daisley, 1973) ดังนั้นจึงมักมองไม่เห็นไซโตพลาสซึมในเซลล์ที่เจริญเต็มที่ (Walsh and Luer, 2004)

(3) **โมโนไซต์** พบในปริมาณค่อนข้างน้อยคือประมาณ 0-3% ของปริมาณเม็ดเลือดขาวทั้งหมดในปลากระดูกอ่อน และเป็นเม็ดเลือดขาวที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ถึงแม้ว่าตามปกติเซลล์โมโนไซต์จะมีรูปร่างกลมแต่อาจพบเซลล์ที่มีรูปร่างแบบไม่แน่นอนได้ เนื่องจากมีการยื่นออก

ของไซโตพลาสซึมคล้ายเท้าเทียมหรือ pseudopodia ลักษณะของโมโนไซต์ในปลากระดูกอ่อนจะคล้ายกับในปลากระดูกแข็ง คือ เซลล์มีขนาดใหญ่ มีนิวเคลียสรูปไตแบ่งเป็น 2 พู อยู่เอียงไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ เส้นใยโครมาตินในนิวเคลียสของโมโนไซต์ มีการเกาะรวมกลุ่มกันหนาแน่นน้อยกว่าลิมโฟไซต์ ภายในไซโตพลาสซึมของโมโนไซต์ มีแวคิวโอลวาวใสลักษณะคล้ายลูกปัด (glass beads) และเช่นเดียวกับในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูงที่โมโนไซต์ในกระแสเลือดจะเปลี่ยนแปลงเป็นแมคโครฟาจเมื่อมีการเคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆ (Abbas et al., 1991) โดยแมคโครฟาจมีบทบาทหน้าที่ในขบวนการ phagocytosis หรือหลั่ง cytokine ในขบวนการอักเสบ (Walsh and Luer, 2004)

2.5 การตรวจวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาในปลา

การตรวจวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาในปลาใช้หลักการตรวจวิเคราะห์คล้ายคลึงกับในสัตว์ปีกและสัตว์เลื้อยคลาน ซึ่งการประเมินค่าเม็ดเลือด (Complete blood count; CBCs) ที่สำคัญประกอบด้วยพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้ การนับจำนวนเม็ดเลือดแดงโดยรวม (Total red blood cell count; TRBC) ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (Hemoglobin concentration; Hb) ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Packed cell volume; PCV หรือ Hematocrit; Hct) การนับจำนวนทรอมโบไซต์ (Thrombocyte count) การนับจำนวนเม็ดเลือดขาวโดยรวม (Total white blood cell count) การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว (Differential count) ค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดง (RBC indices); ปริมาตรของเม็ดเลือดแดงโดยเฉลี่ย (Mean corpuscular volume; MCV) ปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (Mean corpuscular hemoglobin concentration; MCHC) ปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงหนึ่งเม็ด (Mean corpuscular hemoglobin; MCH) (เฉลียว, 2548)

ตัวอย่างเลือดที่เก็บได้ควรใส่ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งตัวชนิดลิเธียมเฮปารินเนื่องจากสามารถคงลักษณะรูปร่างของเซลล์เม็ดเลือดค่อนข้างดีกว่าโซเดียมเฮปาริน (sodium heparin) ส่วนการใช้ EDTA อาจทำให้เกิดการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ ซึ่งส่งผลให้มีความผิดพลาดต่อการหาค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นและค่าทางชีวเคมี ส่วนการเตรียมแผ่นฟิล์มเลือดควรใช้วิธี coverslip method เนื่องจากจะทำให้เกิดความเสียหายและการแตกของเซลล์เม็ดเลือดในปลาที่มีขนาดใหญ่และมีความเปราะได้น้อยกว่าวิธี slide-to-slide method และยังช่วยให้เม็ดเลือดกระจายตัวได้ดีกว่า ส่วนการทำให้แผ่นฟิล์มเลือดแห้งควรใช้วิธี rapid drying หรือการทำให้แห้งอย่างรวดเร็วโดยใช้การเป่าลมอุ่น เพื่อช่วยลดการเกิดภาพลวง (drying artifacts) ในเม็ดเลือดแดง (Cambell and Ellis, 2007)

สีย้อมที่ดีในการย้อมแผ่นฟิล์มเลือดในปลาคือสีในกลุ่ม Romanowsky stain เช่น Wright's-Giemsa, Wright's-Leishman's หรือ May-Grunwald เป็นต้น แต่สีที่นิยมใช้มักเป็นสี Wright's-Giemsa หรือ Wright เนื่องจากสามารถแยกความแตกต่างของเม็ดเลือดขาวได้ดี และใช้เวลาในการย้อมไม่นาน (Walsh and Luer, 2004)

2.5.1 การตรวจประเมินเม็ดเลือดแดงทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจหาค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (PCV หรือ Hct) เป็นวิธีที่ใช้กันโดยทั่วไปในการประเมินมวลเม็ดเลือดแดง ในปลาวิธีการหาค่า PCV เป็นวิธีเดียวกับที่เป็นที่นิยมใช้ในสัตว์ทั่วไป คือ Microhematocrit method วิธีการคือนำตัวอย่างเลือดมาใส่ใน microcapillary tube ประมาณ 3 ใน 4 ของหลอด แล้วกดปลายหลอดด้านที่มีเลือดลไปในดินน้ำมัน นำไปปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นนำมาอ่านค่า PCV ด้วย microhematocrit reader ค่าที่ได้จะเป็นเปอร์เซนต์ (%) ส่วนการหาค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินในเลือดปลา วิธี Cyanmethemoglobin เป็นวิธีที่ให้ค่าที่ถูกต้องมากที่สุด โดยใช้สารละลาย Drabkin's solution 5 มิลลิลิตร ผสมกับเลือด 20 ไมโครลิตร และใช้ Sahli pipette ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer ตั้งพักไว้ 10 นาที แล้ววัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร อ่านค่า optical density (OD) แล้วนำไปคำนวณค่าฮีโมโกลบิน ซึ่งสารละลาย Drabkin's solution จะช่วยกำจัดนิวเคลียสอิสระจากเม็ดเลือดแดงที่แตกสลาย เพื่อให้ได้ค่าความเข้มข้นของ hemoglobin ที่ถูกต้องแม่นยำ

การตรวจหาปริมาณเม็ดเลือดแดงโดยรวม (TRBC) สามารถทำได้โดยวิธีการตรวจนับด้วยตนเองโดยใช้ Hemocytometer หรือใช้เครื่องตรวจนับเซลล์แบบไฟฟ้า วิธีการตรวจนับด้วยตนเองเพื่อให้ได้ค่า TRBC ในเลือดปลามีอยู่ด้วยกัน 3 วิธีคือ Unopette system (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ) Natt-Herrick solution และ modified Dacie's solution ซึ่งวิธีของ Unopette system เป็นวิธีที่ง่ายที่สุดเพราะระดับการเจือจาง 1: 200 ของเลือดที่มีสารต้านการแข็งตัวของเลือดถูกเตรียมขึ้นโดยใช้ diluent ปิเปต และขวดขนาดเล็กสำหรับใช้ผสม (mixing vial) ซึ่งเตรียมมาแล้วในชุดทดสอบ วิธีการย้อมสีเม็ดเลือดของ Natt-Herrick และ modified Dacie จำเป็นต้องมีการเตรียม diluent หรือสารละลายที่ใช้ในการย้อมสี และใช้ปิเปตสำหรับการเจือจางเม็ดเลือดแดง (RBC pipette) โดยเลือดจะถูกดูดเข้า RBC pipette จนถึงที่ระดับขีด 0.5 แล้วดูด Natt-Herrick solution หรือสารละลายสีของ modified Dacie ขึ้นมาจนถึงที่ระดับขีด 101 ในการเตรียมระดับการเจือจาง 1: 200 ทั้งสองวิธีนี้เลือดที่ถูกเจือจางแล้วจะถูกปล่อยลงบน counting chamber ของ hemocytometer และรออย่างน้อย 5 นาทีก่อนตรวจนับ จากการย้อมด้วยสารละลายสีดังกล่าวนี้เม็ดเลือดแดงที่มีรูปร่างเป็นวงรีหรือรูปไข่ จะแสดงนิวเคลียสขนาดเล็กและติดสีน้ำเงินซึ่งถูกล้อมรอบด้วยไซโตพลาสซึมที่ไม่มีสีหรือมีสีชมพูอ่อนๆ ใช้การตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างที่

กำลังขยาย 400 เท่า โดยนับจำนวนเม็ดเลือดแดงในมุมทั้งสี่และตารางสี่เหลี่ยมตรงกลางของรูปสี่เหลี่ยมขนาดใหญ่ใน Neubauer-ruled counting chamber ปริมาณเม็ดเลือดแดงโดยรวมคำนวณได้โดยคูณจำนวนเม็ดเลือดแดงที่นับได้ด้วย 10,000 แต่ทั้งนี้วิธี Natt-Herrick solution เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมเนื่องจากสามารถแยกความแตกต่างของเม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดงได้ชัดเจนที่สุด (Thrall et al., 2004)

ค่าดัชนีต่าง ๆ ของเม็ดเลือดแดงเช่น ค่าปริมาตรโดยเฉลี่ยของเม็ดเลือดแดง (MCV) ค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของ hemoglobin ในเม็ดเลือดแดง (MCHC) และปริมาณเฉลี่ยของ hemoglobin ในเม็ดเลือดแดง 1 เซลล์ (MCH) สามารถคำนวณโดยใช้สูตรมาตรฐานทั่วไป แต่การตรวจวัดค่า MCV สามารถใช้การตรวจโดยตรงด้วยเครื่องตรวจวัดแบบใช้ไฟฟ้าที่ให้ความไวสูง และได้ค่าที่น่าเชื่อถือมากกว่าค่า MCV ที่ได้จากการคำนวณ (Thrall et al., 2004)

2.5.2 การตรวจประเมินเม็ดเลือดขาวทางห้องปฏิบัติการ

เนื่องจากในปลามีเม็ดเลือดแดงและทรอมโบไซต์ซึ่งมีนิวเคลียสจึงต้องวิธีการตรวจนับเพื่อหาปริมาณเม็ดเลือดขาวโดยรวมแบบทำด้วยตนเอง ซึ่งวิธีการตรวจนับโดยตรงนี้ใช้ Neubauer-ruled hemocytometer และการใช้สารละลายสำหรับการย้อมสีและการเจือจางชนิดต่างๆ โดยปกติจะใช้วิธีของ Natt and Herrick ซึ่งมีรายละเอียดตามการตรวจประเมินเม็ดเลือดแดงของปลากระดูกแข็งในข้อ 2.5.1 จากวิธีนี้เม็ดเลือดขาวจะติดสีน้ำเงินเข้มมากกว่าเม็ดเลือดแดงที่ย้อมสีด้วยวิธีเดียวกันนี้ (Natt and Herrick, 1952) อาจเป็นการยากในการแยกลิมโฟไซต์ที่เจริญเต็มที่แล้วและมีขนาดเล็กออกจากทรอมโบไซต์หากใช้การตรวจนับด้วยเลนส์ใกล้วัตถุที่กำลังขยายต่ำ จึงควรใช้การนับที่กำลังขยายตั้งแต่ 400 เท่าขึ้นไป จะสามารถแยกเซลล์สองชนิดนี้ออกจากกันได้ และการย้อมสีเป็นเวลา 60 นาทีใน Natt-Herrick solution อาจช่วยทำให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่าง ลิมโฟไซต์และทรอมโบไซต์ได้ดีขึ้น ข้อดีของวิธี Natt and Herrick คือ สามารถคำนวณหาปริมาณเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือดโดยใช้ Hemocytometer ในคราวเดียวกัน (Thrall et al., 2004)

การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว (Differential count) ใช้การนับด้วยตนเองจากแผ่นฟิล์มของเลือดที่ย้อมสีโดยวิธี Romanowsky ก่อนที่จะเริ่มการตรวจนับเม็ดเลือดแบบจำแนกตามชนิดให้ทำการตรวจแผ่นฟิล์มของเลือดคร่าวๆ ก่อนโดยใช้กำลังขยายต่ำที่ 100-200 เท่าเพื่อประเมินถึงคุณภาพการติดสีย้อมและการกระจายตัวของเซลล์ จากนั้นใช้กำลังขยายที่สูงกว่าคือ 400 เท่าเพื่อตรวจประเมินคุณลักษณะการติดสีของเซลล์แต่ละชนิด และทำการตรวจนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวที่กำลังขยาย 1,000 เท่า การเลือดพื้นที่ในการนับเม็ดเลือดขาววิธีที่แนะนำคือ Cross-sectional method คือ ตรวจดูในบริเวณแนวราบตามขอบของแผ่นฟิล์มของเลือดและให้ตรวจดูในลักษณะ

ซิกแซกขึ้น-ลงในบริเวณดังกล่าวเป็นวิธีที่ยอมรับกันในทางปฏิบัติ และให้ครอบคลุมพื้นที่ขนาดใหญ่ของแผ่นสไลด์เพื่อที่จะให้ได้ปริมาณเซลล์ที่เป็นตัวแทนที่มากที่สุด (Walsh and Luer, 2004)

Stoskopf (1993) แนะนำว่าในการการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวในปลาควรตรวจนับเม็ดเลือดให้ได้ 200 เซลล์ ยกเว้นในกรณีที่มีจำนวนเม็ดเลือดขาวในแผ่นฟิล์มของเลือดต่ำ อาจตรวจนับเพียงแค่ 100 เซลล์ก็เพียงพอ ส่วนวิธีที่ Walsh และ Luer (2004) ใช้คือ ตรวจนับเม็ดเลือดขาวที่เป็นตัวแทนต่อจำนวนเม็ดเลือดแดง 1,000 เซลล์ หลังจากที่ตรวจนับในบริเวณแผ่นฟิล์มของเลือดที่ตรวจนับเม็ดเลือดแดงได้ถึง 1,000 เซลล์ ให้คำนวนจำนวนของเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดเป็นร้อยละ หรือ % ของจำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ทั้งหมด ตัวอย่างเช่น หากตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดได้ 1,029 เซลล์ และนับจำนวนเม็ดเลือดขาวได้ทั้งหมด 61 เซลล์ ซึ่งประกอบด้วยแกรนูโลไซต์ 20 เซลล์ ลิมโฟไซต์ 40 เซลล์ และโมโนไซต์ 1 เซลล์ เมื่อทำการคำนวณเป็น % จะได้ค่า Differential count เป็นแกรนูโลไซต์ 32.8% ลิมโฟไซต์ 65.6% และโมโนไซต์ 1.6% เป็นต้น

2.5.3 การตรวจประเมินทรอมโบไซต์ทางห้องปฏิบัติการ

การหาปริมาณทรอมโบไซต์โดยรวมในปลากระดูกอ่อนและปลากระดูกแข็ง สามารถใช้วิธีการนับบน Hemocytometer จากตัวอย่างเลือดที่ผสมสาร Natt-Herrick solution ในคราวเดียวกับการหาปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวโดยรวม ซึ่งทรอมโบไซต์จะมีรูปร่างคล้ายกับเม็ดเลือดแดงแต่มีขนาดเล็กกว่า คือมีรูปร่างกลมไปจนถึงรูปไข่ และมีอัตราส่วนของนิวเคลียสต่อไซโตพลาสซึมที่สูงกว่าเม็ดเลือดแดง การนับทรอมโบไซต์จะนับจำนวนทั้งหมดจากทุกช่องสี่เหลี่ยมขนาดเล็กภายในรูปสี่เหลี่ยมขนาดใหญ่ที่อยู่ตรงกลางในทั้งสองด้านของ Hemocytometer จากนั้นนำมาหาปริมาณทรอมโบไซต์โดยรวมต่อไมโครลิตรของเลือด จากสูตรจำนวนทรอมโบไซต์ทั้งหมดที่นับได้จากรูปสี่เหลี่ยมขนาดใหญ่ 1 รูปของ hemocytometer หารด้วย 2,000 ส่วนวิธีอื่นที่นิยมในการตรวจนับจำนวนทรอมโบไซต์ในปลา คือ การนับจำนวนทรอมโบไซต์จากแผ่นฟิล์มเลือดเพื่อหาจำนวนทรอมโบไซต์ต่อเม็ดเลือดขาว 100 เซลล์ แต่เนื่องจากทรอมโบไซต์ในปลามักเกิดการเกาะตัวกันอย่างรวดเร็วจึงเป็นเรื่องยากที่จะตรวจนับให้ได้จำนวนทรอมโบไซต์ที่ถูกต้อง (Thrall et al., 2004; Walsh and Luer, 2004)

ในการศึกษาด้านโลหิตวิทยาในปลากระดูกอ่อน มีบางรายงานที่ระบุให้ทรอมโบไซต์เป็นเม็ดเลือดขาวอีกชนิดหนึ่ง เนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสเช่นเดียวกัน (Fange, 1994) แต่เนื่องจากทรอมโบไซต์ในปลามีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแข็งตัวของเลือดเช่นเดียวกับในสัตว์ชนิดอื่น การตรวจนับปริมาณทรอมโบไซต์แยกจากเม็ดเลือดขาวจึงให้ประโยชน์ในการแปรผลทางด้านโลหิตวิทยามากกว่า ซึ่งวิธีการตรวจหาปริมาณทรอมโบไซต์โดยรวมในปลากระดูกอ่อนใช้หลักการเดียวกับในปลากระดูกแข็ง (Stoskopf, 1993)

2.6 เทคนิคพิเศษในการศึกษาทางด้านโลหิตวิทยา

การใช้เทคนิคการย้อมสีพิเศษหรือสีไซโตเคมี (Cytochemical stain) ซึ่งเป็นสีที่ใช้ในการศึกษาเพื่อตรวจเซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือดขาวเพื่อการวินิจฉัยโรคที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับเม็ดเลือด หรือจำแนกชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวในมนุษย์ (Raskin and Valenciano, 2000) ซึ่งในปัจจุบันนำมาใช้ช่วยในการจำแนกลักษณะเม็ดเลือดในสัตว์ป่าและสัตว์น้ำ โดยการศึกษาในสัตว์น้ำพบว่ามีลักษณะของเม็ดเลือดที่ค่อนข้างแตกต่างกัน แม้จะอยู่ในวงศ์เดียวกัน (Doggett et al., 1987) ปฏิกิริยาเคมีของสีกับเซลล์มีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยลักษณะเซลล์ที่จำแนกชนิดยาก (Undifferentiated) โดยดูจากคุณสมบัติการติดสีของเอนไซม์ที่อยู่ภายในเม็ดเลือดแต่ละชนิด ซึ่งจะมีลักษณะการติดสีที่แตกต่างกันไปตามชนิดของเม็ดเลือด และชนิดของสัตว์ โดยเซลล์เม็ดเลือดอาจติดสีจำเพาะกับสีชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือติดสีหลายชนิด ซึ่งการแปลผลการย้อมสีไซโตเคมีควรคำนึงถึงการย้อมติดสี ความเข้ม และรูปแบบในการติดสี มากกว่าการดูเพียงว่าย้อมติดสีหรือไม่ (Raskin and Valenciano, 2000) มาใช้ประกอบกับการย้อมสีเซลล์แบบปกติในกลุ่ม Romanowsky-type stain การจำแนกชนิดและจำนวนเม็ดเลือด และการย้อมสีไซโตเคมียังใช้เพื่อศึกษาเปรียบเทียบ ดูลักษณะการติดสีของเซลล์เม็ดเลือดขาวของสัตว์แต่ละชนิด เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานของสัตว์ชนิดนั้นๆ ตัวอย่างการใช้สีไซโตเคมีเพื่อศึกษาลักษณะเม็ดเลือดในปลา เช่น ปลาดุกออร์มอส (*Hoplosternum littorale*) (Tavares-Dias and Barcellos, 2005) ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) (Ueda et al., 2001) ปลาเทอร์บอต (*Psetta maxima*) (Burrows et al., 2001) และจากรายงานของ Meseguer et al. (1994) ที่ศึกษาลักษณะของเม็ดเลือดในปลา Gilthead seabream (*Sparus aurata*) โดยดูการย้อมติดสีทางไซโตเคมีและการศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน สามารถจำแนกชนิดของเม็ดเลือดขาวได้เป็น 5 ชนิด คือ เฮเทอโรฟิล อีโอสิโนฟิล เบโซฟิล ลิมโฟไซต์ และโมโนไซต์ ซึ่งคล้ายคลึงกับในสัตว์ปีกและสัตว์เลื้อยคลาน

สีย้อมไซโตเคมีที่ใช้ในการจำแนกเม็ดเลือดขาวได้แก่ สี Sudan black B, Peroxidase, Acid phosphatase, Alpha-naphthyl acetate esterase, Alkaline phosphatase, Periodic acid –Schiff และ Toluidine blue ซึ่งจำแนกตามคุณสมบัติในการย้อมติดสี สีย้อม Peroxidase เช่น Benzidine peroxidase และ Myeloperoxidase จะติดสีเซลล์เม็ดเลือดที่มีเอนไซม์ Peroxidase โดยให้สีน้ำเงินอมม่วง ซึ่งโดยส่วนใหญ่เอนไซม์นี้จะอยู่ในเซลล์แกรนูโลไซต์ สีย้อม Alpha-naphthyl acetate esterase เป็นสีจำเพาะกับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ (Monocyte) ในมนุษย์ (Knowles et al., 1978) สีย้อม Sudan black B ย้อมติดไขมัน เช่น ฟอสโฟไลปิด (phospholipids) ไขมันธรรมชาติ (natural fat) และสเตอรอล (sterol) หรือสีย้อม Toluidine blue ย้อมติดสีสารฮีสตามีน (histamine) ใช้ในการจำแนกมาสต์เซลล์ (Mast cell) ในมนุษย์ ส่วนสี Periodic acid – schiff (PAS) ใช้ย้อมสารไกลโคเจน (glycogen) (Raskin and Valenciano, 2000)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron microscopy) เป็นเครื่องมือที่ใช้ศึกษารายละเอียดของเซลล์จากตัวอย่างได้หลายชนิด โดยอาศัยลำแสงอิเล็กตรอน ซึ่งมีวิธีการเตรียมตัวอย่างแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของตัวอย่างและวัตถุประสงค์ของการศึกษา (รุจิพร, 2541)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด ใช้เพื่อศึกษาผิวของเซลล์หรือผิวของตัวอย่างวัตถุที่นำมาศึกษา โดยลำแสงอิเล็กตรอนจะส่องกราดไปบนผิวของวัตถุ ทำให้ได้ภาพซึ่งมีลักษณะเป็นภาพ 3 มิติ และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน ใช้ในการศึกษาโครงสร้างภายในของเซลล์ โดยลำแสงอิเล็กตรอนจะส่องผ่านเซลล์หรือตัวอย่างที่ศึกษา ได้ภาพเป็น 2 มิติ

การศึกษาทางโลหิตวิทยาโดยการแยกชนิดของเม็ดเลือดผ่านทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนนั้น พิจารณาประกอบจากจำนวนเซลล์ ขนาด รูปร่าง การกระจายของแกรนูล และรูปร่างของนิวเคลียส โดยลักษณะโครงสร้าง และองค์ประกอบในเซลล์จะมีความสัมพันธ์กับหน้าที่ของเม็ดเลือดแต่ละชนิด และสามารถนำมาอธิบายการทำงาน และลักษณะการย้อมติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างได้ค่อนข้างชัดเจน (Tripathi et al., 2004) ซึ่งใช้ในการศึกษาเม็ดเลือดของสัตว์หลายชนิดร่วมกับการศึกษาทางโลหิตวิทยาเบื้องต้นอื่นๆ เช่น การย้อมสีธรรมดา และการย้อมสีทางไซโตเคมี โดยเฉพาะการศึกษาเพื่อจำแนกลักษณะโดยละเอียดทางโครงสร้างของเม็ดเลือดขาว เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานของสัตว์ชนิดนั้นๆ และทำเพื่อการเปรียบเทียบกับสัตว์อื่น เช่น ปลาแฟนซีคาร์พ (*C. carpio*) (Cenini, 1984; 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 Oros, 2006) เต่าดาวอินเดีย (*Geochelone elegans*) (Sailasuta et al., 2006a) เต่าบัว *(Hieremys annandlii)* (Chansue et al., 2011) กวางเรนเดียร์ (*Rangifer tarandus*) (Henkel et al., 1999) และโลมาอิระวดี (*Orcaella brevirosris*) (Sailasuta et al., 2006b) เป็นต้น

2.7 คุณลักษณะทางชีวเคมีในปลา

2.5.1 ค่าทางชีวเคมีในปลา

การตรวจประเมินค่าทางชีวเคมีในเลือดปลา มักเน้นความสำคัญไปที่ชนิดของปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเช่น ปลาในกลุ่ม Salmonids คือ ปลาแซลมอนและปลา Trout ปลาดุก และปลาในกลุ่ม Cyprinids คือปลาไน ปลาทอง และปลาแฟนซีคาร์พ (Thrall et al., 2004) ซึ่งการตรวจประเมินค่าทางชีวเคมีในเลือดปลาสามารถบ่งบอกความผิดปกติทางสรีรวิทยาและทางพยาธิวิทยา เนื่องจากเมื่อปลาได้รับความเครียดหรืออยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมจะทำให้เกิดการกระตุ้นให้มีการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนคอร์ติซอล (cortisol) และแคทติโคลามีน (catecholamine) ใน

กระแสเลือด ซึ่งจะโน้มนำให้มีการเพิ่มขึ้นของอัตราเมทาบอลิซึมของเซลล์และค่าทางชีวเคมีต่างๆ ในเลือด (Mazeaud and Donaldson, 1977) ดังนั้นค่าทางชีวเคมีเหล่านี้จึงนำมาใช้ในการประเมินสุขภาพปลาและความผิดปกติที่เกิดขึ้นได้ ปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลทำให้ค่าทางชีวเคมีมีการเปลี่ยนแปลง ได้แก่ ชนิด อายุ เพศ ความสมบูรณ์ อุณหภูมิ ความเค็ม การจับบังคับ การวางยา วิธีการตรวจ ผู้ตรวจ วิธีการเก็บรักษาตัวอย่าง การมีพยาธิภายนอก การได้รับสารพิษ และการป่วย (นันทริกาและสมหวัง, 2550)

ในการตรวจวิเคราะห์ทางชีวเคมีในปลานั้นควรใช้ตัวอย่างจากซีรัมจะให้ความถูกต้องมากมากกว่าพลาสมา แต่ในปลาที่มีขนาดเล็กหรือไม่สามารถการเก็บตัวอย่างเลือด 2 ตัวอย่างจากสัตว์เพียงครั้งเดียว สามารถใช้พลาสมาในการตรวจวิเคราะห์ได้เช่นกัน เนื่องจากจะได้ปริมาณมากกว่าซีรัมจากตัวอย่างเลือดที่ปริมาณเท่ากัน ทั้งนี้การใช้พลาสมาในการตรวจวิเคราะห์จำเป็นต้องคำนึงถึงชนิดของสารต้านการแข็งตัวของเลือดที่ใช้ว่ากระทบต่อค่าชีวเคมีที่ต้องการตรวจหรือไม่ ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดเจนคือ เกลือโซเดียมหรือโพแทสเซียมของ EDTA หรือเฮปารินมีอิทธิพลต่อระดับของโซเดียมหรือโพแทสเซียมในเลือด นอกจากนี้ EDTA ยังไปจับกับแคลเซียมทำให้ค่าที่วิเคราะห์ได้ลดลง ซึ่งสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดที่แนะนำในการเก็บตัวอย่างพลาสมาในปลาคือแอมโมเนียมเฮปารินหรือลิเธียมเฮปาริน เช่นเดียวกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วนการตรวจหาปริมาณกลูโคส ควรทำทันทีหลังจากเก็บตัวอย่างเลือดได้ โดยใช้ตัวอย่างเลือดสดที่ไม่ใส่สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด หรือปั่นแยกซีรัมแล้วตรวจทันที แต่หากต้องเก็บตัวอย่างนานกว่า 30 นาที ควรเก็บตัวอย่างเลือดในสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิด sodium fluoride (NaF) เพื่อทำให้ขบวนการ glycolysis ในเลือดช้าลง (Stoskopf, 1993)

การเก็บตัวอย่างที่ไม่เหมาะสมเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ไม่ถูกต้อง ทั้งนี้ตัวอย่างเลือดควรได้รับการตรวจภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากที่ทำการเก็บมาแล้ว ส่วนการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกซีรัมควรทำหลังจากทิ้งเลือดไว้ภายใต้อุณหภูมิห้อง 15-30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5-10 นาที ที่แรงปั่นเหวี่ยงสัมพัทธ์ (relative centrifugal force; RCF) เท่ากับ 1,000 (3,000 rpm) จะทำให้ได้ปริมาณซีรัมมากกว่าจากการใช้อุปกรณ์เครื่องแยกซีรัม ภาวะที่มีการแตกสลายของเม็ดเลือดแดง (Hemolysis) สามารถเกิดขึ้นได้ง่ายมากในตัวอย่างเลือดปลา ซึ่งจะส่งผลต่อความถูกต้องของการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีในซีรัม ทำให้ระดับเอนไซม์ Lactate dehydrogenase (LD), Aspartate aminotransferase (AST หรือ SGOT) และโพแทสเซียมเพิ่มสูงขึ้น วิธีลดการเกิด Hemolysis ในตัวอย่างเลือดปลา สามารถทำได้โดยหลีกเลี่ยงการให้เลือดสัมผัสกับน้ำหรือความชื้น ระมัดระวังในขั้นตอนการบรรจุเลือดลงในหลอดเก็บเลือด ไม่ควรเขย่ารุนแรงและห้ามฉีดดันเลือดอย่างรวดเร็วผ่านเข็ม (Stoskopf, 1993)

2.5.1.1 ค่าทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของไต เนื่องจากไตของสัตว์จำพวกปลามีการขับของเสียที่เป็นสารประกอบไนโตรเจนเพียงเล็กน้อย ทำให้การแปลผลความเข้มข้นของสารประกอบยูเรียไนโตรเจน กรดยูริก และ Creatinine ในซีรัม อาจไม่ใช่ค่าจำเพาะที่ใช้ในการประเมินภาวะความผิดปกติของไตในปลา (Thrall et al., 2004)

(1) **สารประกอบยูเรียไนโตรเจนในเลือด** (Blood urea nitrogen; BUN)

การตรวจประเมินสารประกอบยูเรียไนโตรเจนในซีรัมของปลา เป็นค่าที่มีความยุ่งยากในการแปลผลเนื่องจากมีความแตกต่างระหว่างชนิดปลาน้ำจืดและปลาน้ำเค็ม โดยปลาส่วนใหญ่สร้างยูเรียในปริมาณน้อย ยกเว้นในกลุ่มปลากระดูกอ่อน ปลาซีลาแคนธ์ (Coelacanth) ปลาปอด (Lung fishes) และในปลากระดูกแข็งชนิดที่อาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เนื่องจากยูเรียเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากขบวนการเมทาบอลิซึมของไนโตรเจนในชนิดปลาที่กล่าวข้างต้น (Thrall et al., 2004) เอนไซม์สองชนิดแรกที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรยูเรีย (urea cycle) คือ Carbamoyl phosphate synthetase และ Ornithine transcarbamoylase ที่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลังทั่วไปแต่ไม่พบในปลา โดยยูเรียในปลาเปลี่ยนแปลงมาจากกรดอะมิโน Arginine หรือ nucleotide ที่มี purine และกรดอะมิโนต่าง ๆ ที่เป็นสารตั้งต้นของ purine เช่น glutamine, serine และ glycine ซึ่งมาจากแหล่งต่างๆ ทั้งภายนอกและภายในร่างกายมากกว่าทางวัฏจักร Krebs-Henseleits ยูเรียส่วนมากในปลาถูกสร้างขึ้นที่ตับและถูกซึมผ่านไปตามเนื้อเยื่อต่างๆ อย่างรวดเร็ว จึงสามารถพบยูเรียในเนื้อเยื่อทุกชนิดของปลา ยูเรียในปลาถูกขับออกจากร่างกายผ่านไตในรูปของปัสสาวะในปริมาณเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับการขับสารประกอบไนโตรเจนผ่านทางเหงือกเป็นหลัก ดังนั้นในปลากระดูกแข็งมีค่าความเข้มข้นของ BUN เพิ่มสูงขึ้น อาจไม่ใช่ภาวะที่ใช้บ่งชี้ความผิดปกติของการทำงานของไต แต่อาจเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของ เหงือกหรือตับ (Stoskopf, 1993)

ในปลากระดูกแข็งน้ำจืดที่มีสุขภาพดีส่วนมากมักจะมีค่า BUN ในซีรัมค่อนข้างต่ำที่ประมาณไม่เกิน 10 mg/dl ส่วนปลากระดูกแข็งน้ำเค็มตามปกติมีค่า BUN อยู่ที่ประมาณ 5.0 mg/dl ในปลากระดูกแข็งการลดลงของค่า BUN สามารถสะท้อนถึงความผิดปกติของตับหรือการอดอาหาร แต่ในทางตรงกันข้ามปลาในกลุ่มปลากระดูกอ่อนจะมีค่าความเข้มข้นของ BUN ที่สูงมากเป็นปกติในช่วง 350-1,000 mg/dl เนื่องจากปลากลุ่มนี้ใช้ระดับยูเรียในการรักษาสมดุลแรงดันออสโมติกกับน้ำทะเล ซึ่งยูเรียจะถูกดูดซึมกลับโดยระบบท่อของหน่วยไตจากปัสสาวะร่วมกับการดูดซึมกลับของโซเดียม การลดลงของค่า BUN จึงบ่งชี้ถึงภาวะความผิดปกติของตับ การอดอาหาร หรือโรคไตได้ ปลาซีลาแคนธ์มีการดูดซึมกลับของยูเรียคล้ายกับในปลากระดูกอ่อน ถึงแม้ว่าปลากระดูกอ่อนจำเป็นที่จะต้องรักษาความเข้มข้นของยูเรียในกระแสเลือดไว้ในระดับสูง แต่กลับทนต่อพิษของยูเรียได้ค่อนข้างต่ำ และเหงือกมีบทบาทสำคัญกว่าไตในการเป็นอวัยวะหลักสำหรับขับถ่าย

ยูเรียในปลาส่วนใหญ่รวมทั้งในกลุ่มปลากระดูกอ่อนที่อาศัยอยู่ในทะเล ดังนั้นการที่ความเข้มข้นของยูเรียในกระแสเลือดเพิ่มสูงขึ้นอาจเป็นการบ่งชี้ถึงภาวะโรคเกี่ยวกับเยื่อบุเหงือก (branchial epithelial disease) มากกว่าโรคไต (Thrall et al., 2004)

ในปลากระดูกแข็งน้ำจืดที่อาศัยอยู่ในทะเลสาบที่มีค่า pH ของน้ำสูง จะมีความเข้มข้นของยูเรียในกระแสเลือดสูง จึงกล่าวได้ว่าค่า pH ของแหล่งน้ำที่อาศัยอยู่มีความสัมพันธ์กับการสร้างยูเรียในปลา ในกลุ่มปลาปอด (*Protopterus* spp.) ซึ่งสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้เมื่อไม่มีน้ำเป็นเวลานานโดยการจำศีลอยู่ในรูที่ปิดสนิทในฤดูแล้ง ปลาชนิดนี้เมื่ออาศัยอยู่ในน้ำจะขับของเสียในรูปแบบแอมโมเนีย แต่ในช่วงจำศีลในฤดูแล้งความเข้มข้นของแอมโมเนียในกระแสเลือดจะลดลงจนถึงระดับที่ตรวจไม่พบแต่ระดับยูเรียจะสูงขึ้น เนื่องจากปลาปอดเปลี่ยนแอมโมเนียให้อยู่ในรูปยูเรียเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดพิษจากแอมโมเนีย ในปลากลุ่ม cyprinids คือปลาตะเพียน ปลาแฟนซีคาร์พ และปลาทอง เมื่อได้รับแอมโนเนียในระดับสูงจะทำให้ความเข้มข้นของยูเรียเพิ่มขึ้น โดยค่า BUN ที่เพิ่มขึ้นในปลากระดูกแข็งน้ำจืดอาจบ่งชี้ภาวะเความผิดปกติเกี่ยวกับเหงือกเช่นเดียวกับในปลาทะเล (Nelson et al., 1999)

(2) **กรดยูริก** **(Uric acid)** ในปลากรดยูริกถูกสร้างขึ้นจาก nucleotides ที่มี purine จากทั้งภายในและภายนอกร่างกาย และจากขบวนการย่อยสลายโปรตีนในรูป purine ซึ่งกรดยูริกจะถูกเปลี่ยนแปลงเป็นยูเรียภายในตับเป็นหลักและที่ไตในปริมาณเล็กน้อย จากนั้นยูเรียจะถูกขับออกทางเหงือก ทั้งนี้ในปลามีการสร้างกรดยูริกเพียงปริมาณเล็กน้อย (Stoskopf, 1993)

(3) **Creatinine และ Creatine** ในปลา creatine จะมีปริมาณสูงกว่า creatinine โดย creatine ทั้งหมดจะถูกขับออกทางไต และเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่พบเกินครึ่งในปัสสาวะของปลาส่วนใหญ่ creatinine ในปลาเกิดขึ้นในขบวนการ cyclization แบบไม่ใช้เอนไซม์พร้อมกับ creatine และเมื่อสร้างขึ้นมาแล้วจะไม่มีการเมทาบอไลซ์ต่อไปแต่จะถูกขับออกทางไตในรูปเดิม ระดับของ creatinine ปกติในกระแสเลือดของปลาอยู่ในช่วง 0.5-2.0 mg/dl ซึ่งในปลาน้ำจืดจะมีค่าสูงกว่าปลาน้ำเค็ม (Stoskopf, 1993) แม้ว่าค่า creatinine อาจไม่ใช่ค่าที่จำเพาะในการชี้วัดสภาวะการทำงานของไตในปลา แต่อาจใช้ในการประเมินโรคไตประกอบกับค่าอื่นๆ ได้ ในปลาบางกลุ่ม เช่น ปลา English sole (*Paropphrys veturus*) ซึ่งเป็นกลุ่มปลาลิ้นหมามีความเข้มข้นของ creatinine เพิ่มสูงขึ้นในภาวะโรคไต โดยที่ยังมีระดับ BUN ปกติ (Thrall et al., 2004)

(4) **อิออนที่มีประจุไฟฟ้าเป็น** 2 (divalent ions) อิออนต่าง ๆ ที่มีประจุไฟฟ้าเป็น 2 และ 1 ที่มีปริมาณมากเกินไปในปลากระดูกแข็งน้ำเค็ม จะถูกขับออกหลังจากรับน้ำทะเลทางการกิน โดยไตทำหน้าที่ขับถ่ายอิออนที่มีประจุไฟฟ้าเป็น 2 เช่น แมกนีเซียมและซัลเฟต และการที่ความเข้มข้นของอิออนเหล่านี้ในพลาสมาเพิ่มสูงขึ้นอาจช่วยบ่งชี้ถึงภาวะโรคไตในปลากระดูกแข็งน้ำเค็มได้ (Thrall et al., 2004)

2.5.1.2 ค่าทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเยื่อบุเหงือก เหงือกของปลาเป็นอวัยวะสำคัญสำหรับรักษาสมดุลของแรงดันออสโมติก อิออน และกรด-เบส และกำจัดของเสียที่เป็นสารประกอบไนโตรเจน การเปลี่ยนแปลงในทางชีวเคมีของเลือดอาจสะท้อนถึงการความผิดปกติในการทำงานของเหงือก การที่เนื้อเยื่อเหงือกได้รับบาดเจ็บอาจส่งผลทำให้เยื่อบุเหงือกมีการหนาตัวมากขึ้นและเพิ่มระยะในการแลกเปลี่ยนสารจากกระแสเลือดสู่น้ำ ซึ่งส่งผลให้ความเข้มข้นของสารซึ่งตามปกติถูกขับออกไปโดยเยื่อบุเหงือกมีความเข้มข้นในพลาสมาสูงขึ้น เกิดภาวะความไม่สมดุลของกรด-เบสและอิเล็กโทรไลต์ และการเพิ่มขึ้นของปริมาณยูเรียและแอมโมเนียในกระแสเลือด (Thrall et al., 2004)

(1) **แอมโมเนีย** (Ammonia) เป็นของเสียหลักที่ถูกขับออกมาจากร่างกายของปลา ถูกเปลี่ยนแปลงมาจากขบวนการ deamination ของกรดอะมิโนและการสลายของ purine และ pyrimidine และถูกขับออกมาทางเหงือกเป็นหลักโดยขบวนการแพร่แบบ passive (passive diffusion) ตามความแตกต่างของความเข้มข้นแอมโมเนียจากกระแสเลือดสู่น้ำ และการแลกเปลี่ยนระหว่างโซเดียมอิออน (Sodium ion; Na^{+}) กับแอมโมเนียมอิออน (Ammonium ion; NH_4^{+}) (Thrall et al., 2004) อัตราการขับออกของแอมโมเนียในปลาจะเพิ่มขึ้นหลังจากการกินอาหารและช่วงที่ร่างกายปลามีกิจกรรมทางกายภาพโดยจะมีระดับสูงสุดหลังจากปลากินอาหารได้ประมาณ 4 ชั่วโมง ในกระแสเลือดของปลาแอมโมเนียถูกบัฟเฟอร์โดยกรดกลูตามิก (glutamic acid) และการทำงานของเอนไซม์ glutaminase ร่วมกับ glutamine synthetase ความเข้มข้นของสารประกอบแอมโมเนียไนโตรเจนในปลากระดูกแข็งจะอยู่ในช่วง 0.3-5.5 mg/dl (Stoskopf, 1993) แอมโมเนียเป็นผลิตภัณฑ์หลักสุดท้ายจากขบวนการเมทาบอลิซึมของไนโตรเจนในปลาส่วนใหญ่ยกเว้นในปลากระดูกอ่อนที่อาศัยอยู่ในทะเลที่ยูเรียเป็นของเสียหลัก กลไกขั้นต้นของการขับถ่ายแอมโมเนียในปลากระดูกแข็งน้ำจืดคือการขับออกทางเหงือก ส่วนในปลากระดูกแข็งน้ำเค็มจะขับถ่ายแอมโมเนียโดยการแพร่ของแอมโมเนียมอิออนตามความแตกต่างของประจุไฟฟ้า ซึ่งแอมโมเนีย 15% จะถูกขับออกทางไตและบางส่วนถูกขับทางผิวหนัง (Thrall et al., 2004)

การอักเสบของเหงือกและการสร้างเมือกปริมาณมากปกคลุมบริเวณเหงือก จะทำให้เวลาในการแลกเปลี่ยนสารระหว่างเลือดกับน้ำเพิ่มขึ้น รวมถึงสารพิษต่างๆ ที่มีผลต่อค่า pH ของน้ำและความเข้มข้นของแอมโมเนียในสภาพแวดล้อม หรือการติดเชื้อที่สร้างความเสียหายแก่เหงือกของปลา ล้วนส่งผลทำให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น โดยการเพิ่มขึ้นของ pH และความเข้มข้นของแอมโมเนียในสภาพแวดล้อมจะไปยับยั้งการแพร่ของแอมโมเนียจากเลือดสู่น้ำ ตำแหน่งที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างเลือดและระยะเวลาในการจับบังคับมีอิทธิพลต่อความเข้มข้นของแอมโมเนียในกระแสเลือดของปลา เลือดจากเส้นเลือดดำมีแอมโมเนียมากกว่าเลือดจากเส้นเลือด

แดงประมาณ 50-600% ในระหว่างการจับบังคับปลาจะปล่อยแอมโมเนียออกจากกล้ามเนื้อที่ขาดออกซิเจนและยังส่งผลรบกวนการขับถ่ายแอมโมเนียออกจากเหงือกปลา (Thrall et al., 2004)

2.5.1.3 ค่าทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับอิเล็กโทรไลต์ต่าง ๆ และสมดุลกรด-เบส

(1) **โซเดียมและคลอไรด์** (Sodium and Chloride) ในปลาค่าอิเล็กโทรไลต์มาตรฐานมีช่วงที่ค่อนข้างกว้างแปรผันตามชนิดและสภาพแวดล้อม ในปลากระดูกแข็งน้ำจืดระดับของโซเดียมและคลอไรด์ในพลาสมาอยู่ที่ประมาณ 150 และ 130 mEq/L ตามลำดับ ในปลากระดูกอ่อนน้ำจืดระดับของโซเดียมและคลอไรด์อาจสูงถึง 300 mEq/L (Stoskopf, 1993) ส่วนในปลากระดูกแข็งน้ำเค็มที่เหงือกมีความสามารถในการยอมให้เกลือผ่านได้สูงจึงส่งผลให้ระดับของโซเดียมและคลอไรด์สูงเป็น 10-50 เท่าของในปลากระดูกแข็งน้ำจืด โดยที่บริเวณเหงือกของปลากระดูกแข็งน้ำเค็มจะมี chloride cells ที่ช่วยควบคุมสมดุลย์ของอิออนต่างๆ ซึ่งส่วนมากมักเป็นการแลกเปลี่ยนระหว่างอิออน Na^{+}/H $[NH_4]^{+}$ และ Cl^{-}/HCO_3^{-} โดยทั่วไประดับโซเดียมและคลอไรด์ในพลาสมาจะลดลงเมื่อปลาเกิดภาวะติดเชื้อหรือการสูญเสียหน้าที่การทำงานของเหงือก (Thrall et al., 2004)

Rectal gland เป็นอวัยวะที่มีหน้าที่ขับเกลือในปลากระดูกอ่อนที่อาศัยอยู่ในทะเล ต่อมดังกล่าวผลิตสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นเท่ากับพลาสมาแต่สูงกว่าน้ำทะเล การทำงานของต่อมนี้มีความคล้ายคลึงกับระบบการขนส่งโซเดียมคลอไรด์ใน thick ascending limb ของ loop of Henle ในไตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เมื่อความเข้มข้นของสารละลายในพลาสมาสูงกว่าโซเดียมคลอไรด์จะกระตุ้นการทำงานของ rectal gland ในปลากระดูกอ่อนมีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในน้ำเค็มหรือน้ำจืดโดยใช้กลไกการควบคุมแรงดันออสโมติกและอิออน ทำให้ปลาสามารถรักษาความเข้มข้นของเกลือในพลาสมาและภายในเซลล์ให้อยู่ระดับปกติเท่ากับปริมาตรของเซลล์ ในขณะที่ไตเป็นอวัยวะที่ควบคุมแรงดันออสโมติกเป็นอันดับแรกของสัตว์มีกระดูกสันหลังที่อยู่บนบกแต่ปลาใช้อวัยวะอื่น เช่น เหงือก ลำไส้ หรือ rectal gland เป็นหลัก ส่วนไตมีความสำคัญในการควบคุมปริมาตรของเหลวและความเข้มข้นของเกลือเพียงเล็กน้อย ภาวะที่มีความเข้มข้นของโซเดียมในกระแสเลือดต่ำกว่าปกติ (hyponatremia) และภาวะที่มีความเข้มข้นของคลอไรด์ในกระแสเลือดต่ำกว่าปกติ (hypochloremia) ในปลาน้ำจืดสามารถเกิดขึ้นร่วมกับโรคเหงือกและโรคไต หรือในสภาพแวดล้อมที่น้ำมี pH หรือน้ำอ่อนที่มีค่า alkalinity ต่ำ (Thrall et al., 2004)

ภาวะเครียดแทบไม่มีผลต่อระดับความเข้มข้นของโซเดียมและคลอไรด์ในพลาสมาในปลาน้ำจืด (Soivio and Oikari, 1976) แต่มีผลอย่างมากต่อสมดุลของเกลือและน้ำในปลาทะเล ซึ่งเป็นผลให้มีการเพิ่มขึ้นของระดับโซเดียมและคลอไรด์ และค่า osmolarity ส่วนในปลากระดูกอ่อน

และปลาทะเลที่มีลำตัวแบน เช่น ปลาลิ้นหมา ความเครียดจะส่งผลให้มีการเคลื่อนที่ของน้ำออกจากเส้นเลือดเพื่อตอบสนองต่อระดับแลคเตททที่เพิ่มสูงขึ้นภายในเซลล์และการเพิ่มการนำเข้าโซเดียมในกระแสเลือด อีกทั้งยังพบระดับของโซเดียม คลอไรด์ และโพแทสเซียมที่เพิ่มขึ้นด้วย (Cliff and Thurman, 1994) ซึ่งโดยสรุปอาจกล่าวได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับโซเดียมและคลอไรด์ในพลาสมาปลามีอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อมภายนอกเป็นหลัก (Stoskopf, 1993)

(2) **โพแทสเซียม** (Potassium) ระดับโพแทสเซียมในปลาจะสัมพันธ์กับระดับแคลเซียมโดยจะลดลงในภาวะที่ร่างกายปลามีการติดเชื้อ ปลามีระดับโพแทสเซียมปกติอยู่ที่ประมาณ 3 mEq/L (Stoskopf, 1993) มากกว่า 95% ของโพแทสเซียมในปลาจะได้รับจากการกินโดยถูกดูดซึมที่ลำไส้ และส่วนที่เกินจะถูกขับออกในรูปของเมือกที่ปกคลุมลำตัว ภาวะที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมในกระแสเลือดต่ำกว่าปกติ (hypokalemia) อาจเกิดขึ้นร่วมกับภาวะเลือดเป็นเบส (alkalosis) การสูญเสียโพแทสเซียมในทางเดินอาหารหรือทางผิวหนัง หรือความเป็นพิษจากไนไตรท์ ส่วนภาวะที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมในกระแสเลือดสูงกว่าปกติ (hyperkalemia) อาจเกิดขึ้นร่วมกับภาวะเลือดเป็นกรด (acidosis) และการขับโพแทสเซียมทางไตลดลง (Thrall et al., 2004) เช่น การศึกษาในปลาฉลาม Caribbean reef (*Carcharhinus perezi*) ที่ถูกจับโดยแหชนิด long line net ที่พบระดับโพแทสเซียมอิออนในพลาสมาสูงขึ้นจากภาวะ intracellular acidosis และปลาเริ่มมีการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจที่ผิดปกติเมื่อระดับโพแทสเซียมสูงกว่า 7 mmol/L (Brooks et al., 2011) การจับบังคับและกักขังมีผลเปลี่ยนแปลงระดับของอิออนบวกต่างๆ ในกระแสเลือดของปลา นอกเหนือจากปริมาณไฮโดรเจน ความเข้มข้นของโพแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียมอิออนมีอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อปลาเกิดความเครียด เนื่องจากการรั่วของอิออนเหล่านี้ออกมาจากเซลล์กล้ามเนื้อที่เสียสมดุลในการทำหน้าที่ และการเสียความคงตัวของเยื่อหุ้มเซลล์จากภาวะ acidosis จากการหลั่งกรดแลคติกที่เพิ่มขึ้น (Cliff and Thurman, 1994) ในการศึกษาของ Soivio และ Oikari (1976) ในปลา Northern pike (*Esox lucius*) พบว่าปลามีระดับความเข้มข้นของโพแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียม เพิ่มขึ้นหลังจากถูกจับไปแล้ว 4 ชั่วโมง และระดับของสารทั้งสามชนิดนี้จะลดลงจนต่ำกว่าระดับเริ่มต้นเมื่อเวลาผ่านไปแล้ว 2 วัน ส่วน Fange (1976) รายงานว่าระดับโพแทสเซียมจะมีค่าสูงสุดในปลาชนิดที่มีการเคลื่อนไหวร่างกายอย่างรวดเร็วตลอดเวลา เช่น กลุ่มปลา Mackerel (Scombridea) และมีค่าต่ำสุดในปลาที่หากินตามหน้าดิน เช่น กลุ่มปลา Angler (Lophiidae)

โพแทสเซียมอิออน (K^+) ในปลาถูกหลั่งมาจากเซลล์กล้ามเนื้อ โดยมีฮอร์โมน catecholamines เป็นตัวกระตุ้นการหลั่ง (Wells et al., 1986) และค่าโพแทสเซียมที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์จะมีการลดลงในตัวอย่างเลือดที่เก็บไว้นาน โดยเฉพาะในสภาวะที่มีเซลล์ที่สร้าง catecholamine (Oikari and Soivio, 1975)

(3) **แมกนีเซียม** (Magnesium) ในปลาเกือบทั้งหมดจะถูกสะสมอยู่ในกระดูก ส่วนที่เหลือพบในเซลล์ของเนื้อเยื่ออ่อน ในเม็ดเลือดแดงของปลามีระดับแมกนีเซียมที่สูงกว่าและระดับแคลเซียมที่ต่ำกว่าในเม็ดเลือดแดงของมนุษย์ ภาวะ hemolysis สามารถทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นแบบหลอกของความเข้มข้นแมกนีเซียมในพลาสมาได้ (McDonald and Milligan, 1992) ในปลาน้ำจืดการลดลงของอัตราการกรองที่ glomerulus ไม่ว่าจากสาเหตุใดก็ตาม จะส่งผลให้มีการดูดซึมโซเดียมกลับลดลงและขับแมกนีเซียมเพิ่มขึ้นเพื่อช่วยเพิ่มปริมาณการขับน้ำออก ทำให้ระดับของโซเดียมและแมกนีเซียมในซีรัมมีการลดลง ส่วนในปลาทะเลการเสียหน้าที่การทำงานของไตจะลดการขับแมกนีเซียมและซัลเฟต ซึ่งเป็นสาเหตุให้ระดับแมกนีเซียมและซัลเฟตเพิ่มสูงขึ้น (Stoskopf, 1993) ความเข้มข้นของแคลเซียมและแมกนีเซียมมีบทบาทสำคัญในกลไกการรักษาสมดุลภายในร่างกายของปลา โดยระดับจะแปรผันตามฤดูกาล คือ ช่วงก่อนการวางไข่ ปลาจะมีความเข้มข้นของแคลเซียมและแมกนีเซียมที่เพิ่มขึ้น ในขณะช่วงการวางไข่และหลังการวางไข่แคลเซียมและแมกนีเซียมจะมีระดับที่ลดลง (Srivastava and Srivastava, 1994)

(4) **ฟอสฟอรัส** (Phosphorus) ในปลามีบทบาทสำคัญอย่างมากต่อขบวนการเมทาบอลิซึมและขบวนการ phosphorylation เพื่อกระตุ้นการทำงานของโปรตีนต่างๆ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเอนไซม์ และฮอร์โมนหลายชนิด เป็นองค์ประกอบในสารที่เป็นตัวกลางในการสร้างพลังงานให้แก่ร่างกายเช่น ATP, creatine phosphate และ inositol phosphate ช่วยรักษาสมดุลของกรด-เบสและสมดุลภายในร่างกายร่วมกับอิเล็กโตรไลต์อื่นๆ เช่น โซเดียม โพแทสเซียม และแคลเซียม นอกจากนี้ยังเป็นองค์ประกอบในสารพันธุกรรมคือ DNA และ RNA phospholipids ในเยื่อหุ้มเซลล์ และเป็นองค์ประกอบในกระดูก ฟัน และเนื้อเยื่ออ่อน (Viola et al., 1986) เนื่องจากความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในรูปฟอสเฟตในน้ำจืดและน้ำทะเลตามปกติมีค่าต่ำมาก แหล่งของฟอสฟอรัสที่ปลาได้รับจึงมาจากอาหารเป็นหลักและแปรผันตามอาหารที่ได้รับ สัดส่วนของแคลเซียม:ฟอสฟอรัสในอาหารของปลาโดยทั่วไปควรมีค่าเท่ากับ 1:2 เพื่อช่วยรักษาสมดุลของแคลเซียมและฟอสฟอรัสในร่างกายเป็นปกติ และช่วยให้ปลามีการเจริญเติบโตที่ดี (Sakamoto and Yone, 1973) การดูดซึมฟอสฟอรัสที่ลำไส้ในปลาจะทำควบคู่กับแคลเซียมเช่นเดียวกับในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ส่วนไตมีหน้าที่ในการขับออกและดูดซึมกลับฟอสฟอรัสในรูปฟอสเฟตบางส่วน (Abbink et al., 2004) ระดับฮอร์โมน ACTH ที่เพิ่มขึ้นในซีรัม (Cunha et al., 2000) และวิตามิน D_3 (Srivastav et al., 1997) จะกระตุ้นการเพิ่มระดับฟอสฟอรัสในกระแสเลือดให้สูงขึ้น โดยเพิ่มการสลายฟอสฟอรัสในรูปฟอสเฟตออกมาจากเนื้อเยื่ออ่อนหรือกระดูกเข้าสู่กระแสเลือด เพื่อนำฟอสฟอรัสไปใช้ตามความต้องการของร่างกาย

(5) **แคลเซียม** (Calcium) ระดับแคลเซียมปกติในปลามีค่าประมาณ 2-3 mmol/L และระดับจะเพิ่มสูงขึ้นในปลาเพศเมียที่อยู่ในช่วงวางไข่ แคลเซียมถือเป็นแร่ธาตุหลักอีกตัวหนึ่งใน

การรักษาสมดุล osmolarity ในร่างกายปลา ซึ่งแคลเซียมจะมีระดับลดลงเมื่อร่างกายอยู่ในภาวะ acidosis ซึ่งจะส่งผลให้ค่า osmolarity โดยรวมของซีรัมลดลงด้วย (Stoskopf, 1993) ระดับของแคลเซียมในร่างกายปลาจะขึ้นกับอาหารที่ปลาได้รับและแหล่งน้ำที่ปลาอาศัยอยู่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปลาทะเลที่มีความจำเป็นต้องรักษาระดับของแร่ธาตุต่างๆ ให้คงที่ตลอดเวลา โดยเมื่อระดับแคลเซียมในกระแสเลือดสูงเกินไป ปลาจะลดการดูดซึมแคลเซียมเข้าสู่ร่างกายจนกว่าระดับแคลเซียมในสิ่งแวดล้อมจะต่ำลง ซึ่งน้ำทะเลปกติจะมีความเข้มข้นของแคลเซียมประมาณ 10 mmol/L (Bjornssonet et al., 1999)

ในปลากระดูกแข็งน้ำจืดแคลเซียมถูกขนส่งโดย chloride cells ที่เหงือกโดยอาศัยความแตกต่างทางประจุไฟฟ้าผ่านทาง calcium channels ในส่วนปลายของเยื่อหุ้มเซลล์ (Thrall et al., 2004) การเปลี่ยนแปลงของระดับแคลเซียมและแมกนีเซียมภายนอกเซลล์อาจทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อและการส่งผ่านกระแสประสาทมายัง neuromascular junction เสียไป (Cliff and Thurman, 1994) ตัวอย่างการศึกษาเกี่ยวกับระดับแคลเซียมในปลา เช่น ปลาคอด (*Gadus macrocephalus*) ที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมในพลาสมาปกติอยู่ที่ประมาณ 2.6 mmol/L แต่ในระหว่างที่ถูกล่าเพื่อการกีฬาระดับแคลเซียมจะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 4.6-7.3 mmol/L (Farrell, 1984)

ปลามีการพัฒนาระบบควบคุมแคลเซียมซึ่งสามารถทำงานตอบสนองได้อย่างรวดเร็วต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแคลเซียมในสภาพแวดล้อม (Bjornssonet et al., 1999) ระบบต่อมไร้ท่อที่ควบคุมเมทาบอลิซึมของแคลเซียมในปลามีการหลั่งฮอร์โมน stanniocalcin ซึ่งมีฤทธิ์ทำให้เกิดภาวะ hypocalcemia โดยเมื่อปลามีระดับแคลเซียมที่สูงเกินไปจะกระตุ้นให้เกิดการหลั่งฮอร์โมนนี้ ซึ่งจะไปยับยั้ง calcium channels ที่เหงือกและลำไส้ทำให้ไม่ให้มีการไหลของแคลเซียมอิออนเข้าสู่กระแสเลือด (Wagner et al., 1998) เนื่องจากในปลาไม่มีต่อมพาราไทรอยด์ (parathyroid gland) และไม่มีฮอร์โมนที่คล้ายกับ parathormone (Thrall et al., 2004) ฮอร์โมน prolactin และโปรตีนที่สัมพันธ์กับ parathyroid hormone (PTHrP) จึงเป็นฮอร์โมนหลักที่ช่วยเพิ่มระดับแคลเซียมในกระแสเลือด ซึ่ง PTHrP จัดเป็นฮอร์โมนชนิดแรกๆ ที่สัตว์มีกระดูกสันหลังอยู่ในช่วงเปลี่ยนจากการอาศัยในน้ำขึ้นมาอยู่บนบก มีหน้าที่ทางสรีรวิทยาหลายอย่างเช่น ช่วยในการพัฒนากระดูก ขนส่งแคลเซียมผ่านรก และช่วยในการเจริญเติบโตพัฒนาของเซลล์ (Guerreiro et al., 2001) PTHrP พบในปลาหลายกลุ่ม เช่น ปลา Bream (*Sparus auratus* L.) ส่วนในปลาชนิดอื่นๆ จะมีฮอร์โมนอีกหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการรักษาสมดุลแคลเซียม เช่น calcitonin, growth hormone, วิตามิน D_3 และคอร์ติซอล (Abbink et al., 2004)

(6) เหล็ก (Iron) เหล็กและสารประกอบของเหล็กในปลามีบทบาทสำคัญในกระบวนการขนส่งออกซิเจนไปเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ และแลกเปลี่ยนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์กับก๊าซออกซิเจนที่เหงือก โดยเป็นส่วนประกอบหลักของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงเช่นเดียวกับใน

สัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น หน้าที่อื่นที่สำคัญของเหล็กได้แก่ กระบวนการเผาผลาญของเซลล์และเป็นปัจจัยร่วม (cofactor) ของเอนไซม์หลายชนิด ปริมาณของเหล็กในร่างกายต้องอยู่ในระดับที่เหมาะสมเพื่อให้ร่างกายสามารถทำหน้าที่ได้อย่างปกติ การสูญเสียสมดุลของกลไกที่ควบคุมการดูดซึมเหล็กในร่างกายมักเกิดขึ้นเนื่องจากโรคต่างๆ หรือการได้รับอาหารที่มีเหล็กในระดับสูงเป็นเวลานาน ในกรณีนี้เหล็กจะจับกับโปรตีนต่างๆ หรือกลายเป็นสารประกอบ iron phosphate (hemosiderin) ซึ่งจะสะสมในเนื้อเยื่อหลายแห่งโดยเฉพาะที่ตับ การดูดซึมและการทำงานในด้านเมทาบอลิซึมของเหล็กขึ้นอยู่กับอิทธิพลของแร่ธาตุชนิดอื่นหลายชนิด เช่น แคดเมียม แมงกานีส ตะกั่ว ส่วนสังกะสีจะมีฤทธิ์ขัดขวางการทำงานของเหล็ก ในกรณีของแร่ทองแดงจะมีหน้าที่เสริมการทำงานของเหล็กคือลดปริมาณของเหล็กในร่างกายโดยเปลี่ยนเป็นสารประกอบ iron phosphate (Kabata-Pendias and Pendias, 1999)

(7) ทองแดง (Copper) มีความสำคัญในขบวนการสร้างเม็ดเลือดแต่การมีระดับความเข้มข้นของทองแดงที่สูงร่วมกับโลหะชนิดอื่นๆ เช่น สังกะสี ปรอท แคดเมียมหรือตะกั่ว อาจทำให้เกิดภาวะโลหิตจาง (anemia) ในปลาได้ (Kazlauskiene and Vosyliene, 1995) เนื่องจากทองแดงส่งผลให้เกิดความผิดปกติต่อกระบวนการสร้างเม็ดเลือดของไต (Singh and Reddy, 1990) ทองแดงทำงานร่วมกับเหล็กในกระบวนการเผาผลาญของเซลล์และเป็นปัจจัยร่วม (cofactor) ของเอนไซม์หลายชนิด โดยมีส่วนสำคัญในกระบวนการ reductive-oxidative ทำให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มออกซิเดส ได้แก่ uricase, ascorbase, lysine oxidase, monoamine oxidases, cytochrome c oxidase, tyrosinase และ porphobilinogen synthase ซึ่งช่วยป้องกันความเสียหายของเซลล์จากอนุมูลอิสระของออกซิเจน (RFT/ROS) (Brucka-Jastrzebska et al., 2009)

(8) สังกะสี (Zinc) สังกะสีเป็นแร่ธาตุที่พบในปริมาณค่อนข้างน้อยในเนื้อเยื่อของปลา แต่พบในปริมาณสูงที่เหงือก เนื่องจากสังกะสีแทรกซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้น้อยกว่าโลหะชนิดอื่น (Hamlett, 1999) การเปลี่ยนแปลงของระดับสังกะสีในเนื้อเยื่อเป็นผลมาจากความชอบของสังกะสีในการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงและโปรตีนชนิดต่างๆ ในซีรัม (Bettger et al., 1987) ซึ่งมีความสำคัญในการขนส่งสังกะสี สังกะสีถูกขนส่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนหลักในรูปของ zinc-albumin และ zinc-macroglobulin และสังกะสีประมาณ 70-80% จะถูกขับออกทางอุจจาระ สังกะสีมีความเป็นพิษต่ำกับปลา การดูดซึมสังกะสีในปลาได้รับอิทธิพลจากคุณภาพของอาหาร และปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างสังกะสีกับแร่ธาตุอื่นๆ เช่น แคลเซียมและแมกนีเซียมที่มีผลลดปริมาณการดูดซึมสังกะสี (Brucka-Jastrzebska et al., 2009)

(9) ค่า Osmolarity เนื่องจากอิเล็กโทรไลต์ต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบในซีรัมของปลามีความซับซ้อนมากค่า osmolarity โดยรวมจึงมักถูกใช้เพื่อประเมินสุขภาพในปลา

ส่วนประกอบหลักของค่า osmolarity ในซีรัมของปลาคือ โซเดียมคลอไรด์และโปรตีนในซีรัม ภาวะความผิดปกติของเหงือกจะส่งผลต่อค่า osmolarity มากกว่าความบกพร่องของไต แม้ค่า osmolarity จะใช้อธิบายถึงสมดุลของอิเล็กโทรไลต์ในร่างกายปลาแต่ไม่สามารถใช้วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของอิเล็กโทรไลต์แต่ละชนิดได้ ทั้งนี้ควรทำการตรวจค่า osmolarity เมื่อพบกับการลดลงอย่างรวดเร็วของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ โพแทสเซียม แคลเซียม และโปรตีนโดยรวมในซีรัม ซึ่งค่า osmolarity ปกติของซีรัมในปลาน้ำจืดและปลาน้ำเค็มอยู่ที่ประมาณ 295 mOsmol/L และ 300-305 mOsmol/L ตามลำดับ แต่หากไม่สามารถตรวจค่า osmolarity ได้อาจใช้การประเมินอัตราส่วนของโพแทสเซียมต่อโซเดียมซึ่งควรมีค่าประมาณ 0.02 ในปลาสุขภาพปกติ (Stoskopf, 1993)

กลไกการรักษาสมดุลของแรงดันออสโมติก ในปลาน้ำจืดเนื่องจากร่างกายมีแรงดันออสโมติกในพลาสมาที่สูงกว่าในน้ำ วิธีการป้องกันน้ำเข้าสู่เซลล์ในปริมาณมากเกินไป คือ การมีผิวหนังและเกล็ดที่ป้องกันการแพร่เข้าของน้ำ การขับถ่ายปัสสาวะที่เจือจางและปริมาณมาก อีกทั้งมีการดูดซึมแร่ธาตุกลับโดยวิธี active transport ที่บริเวณเหงือกและดูดซึมบางส่วนผ่านทางเยื่อบุลำไส้ ส่วนในปลาน้ำเค็มกลไกจะตรงกันข้ามกับเนื่องจากร่างกายมีแรงดันออสโมติกต่ำกว่าน้ำทะเล ผิวหนังและเกล็ดของปลาจึงมีความหนาเพื่อช่วยป้องกันการดูดซึมแร่ธาตุเข้าสู่ร่างกายและมีการขับแร่ธาตุส่วนเกินออกทางเหงือกโดยวิธี active transport เช่นกัน แต่ทั้งนี้ร่างกายปลาก็ยังสูญสียน้ำเนื่องจากแรงดันออสโมติก ปลากระดูกแข็งน้ำเค็มจึงต้องกินน้ำทะเลเพื่อรักษาสมดุลแรงดันออสโมติกจากการสูญเสียน้ำผ่านเหงือก (Thrall et al., 2004)

ในปลากระดูกอ่อนน้ำเค็มกลไกการรักษาสมดุลของแรงดันออสโมติกจะแตกต่างจากปลากระดูกแข็ง โดยการเพิ่มระดับความเข้มข้นของยูเรีย Trimethylamine oxide (TMAO) และโซเดียมคลอไรด์ในพลาสมา จะช่วยเพิ่มแรงดันออสโมติกในร่างกายให้สูงกว่าน้ำทะเลเล็กน้อย ดังนั้นปลาจะไม่มีการสูญเสียน้ำผ่านทางเหงือก และได้รับน้ำสำหรับการสร้างปัสสาวะเพียงเล็กน้อย จึงไม่มีความจำเป็นต้องกินน้ำทะเล ทั้งนี้การลดลงของปริมาณยูเรียและค่า osmolarity ในปลากระดูกอ่อนอาจเกิดเนื่องจากการอดอาหารเป็นเวลานาน ส่งผลให้มีการสร้างยูเรียลดลง หรือในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มต่ำที่ทำทำให้มีการเพิ่มขึ้นของค่า urea clearance ของไต (Thrall et al., 2004)

(10) **สมดุลกรด-เบส** (Acid-base balancing) การควบคุมสมดุลกรด-เบสในปลามีความแตกต่างจากในสัตว์ที่อาศัยอยู่บนบก เนื่องจากองค์ประกอบของสารต่างๆ ในน้ำมีความผันแปรในระดับที่สูงกว่าอากาศ การเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วของระดับออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ความเข้มข้นของค่าอิเล็กโทรไลต์ต่างๆ และอุณหภูมิในน้ำ มีความสำคัญอย่างมากต่อการควบคุมกรด-เบสในปลา โดยเหงือกปลาเป็นบริเวณที่มีการแลกเปลี่ยนก๊าซและ

เป็นบริเวณหลักที่ใช้ควบคุมสมดุลอิออนในปลา ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบอิออนในน้ำจึงมีผลต่อขบวนการส่งผ่านอิออนทางเหงือก ซึ่งมีอิทธิพลต่อการควบคุมแรงดันออสโมติกและกรด-เบส ปลามีระดับความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในกระแสเลือดต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ที่อาศัยอยู่บนบก ซึ่งเป็นผลมาจากอัตราการขับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่สูงของเหงือกและความสามารถต่ำของน้ำในการทำละลายก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ระดับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในเลือดของปลากับในน้ำมีความแตกต่างที่น้อยมาก ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของระดับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จึงแทบไม่มีผลต่อการช่วยรักษาสมดุลกรด-เบสในปลา (Thrall et al., 2004)

แม้ว่าการควบคุมโดยระบบทางเดินหายใจมีส่วนในการรักษาสมดุลกรด-เบส ในร่างกายปลาเพียงเล็กน้อย แต่ปลาก็มีความสามารถในการส่งผ่านอิออนทางเยื่อบุต่างๆ มากกว่าการหายใจ และยังสามารถรับไบคาร์บอเนตจากสิ่งแวดล้อมเพื่อช่วยในการรักษาสมดุลกรด-เบส การลดลงของค่า pH ของเลือดดำ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดิ้นรนจากการจับบังคับจะส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นอย่างมากของความดันของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (pCO_2) ในกระแสเลือด เนื่องจากกล้ามเนื้อจะสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้น หรือการขัดขวางการหายใจและการไหลเวียนเลือดในร่างกายปลา (Cliff and Thurman, 1994)

<u>2.5.1.4 ค่าทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับภาวะเครียด</u>

(1) **คอร์ติซอล** (Cortisol) เป็นฮอร์โมนหลักที่เกี่ยวข้องกับความเครียดในปลา ระดับของคอร์ติซอลจะเพิ่มขึ้นจากขบวนการเมทาบอลิซึมต่างๆ มากกว่าขบวนการสืบพันธุ์ ตัวอย่างเช่น ในปลากะพงทะเลพบภาวะที่มีคอร์ติซอลและน้ำตาลในกระแสเลือดสูง (cortisolemia และ glycemia) จากการจับบังคับโดยมีการเพิ่มขึ้นถึง 100% ของระดับคอร์ติซอลในกระแสเลือด เนื่องจากคอร์ติซอลเป็นฮอร์โมนที่ตอบสนองต่อภาวะความเครียดทั้งทางกายภาพและทางเคมีในปลา จึงเป็นพารามิเตอร์ที่เหมาะสมในการตรวจวัดระดับความเครียดในประชากรปลาในสถานที่เพาะเลี้ยง (Roche and Boge, 1996) คอร์ติซอลเป็นสารประเภท glucocorticoid ผลิตจากเซลล์ steroidogenic ของเนื้อเยื่อระหว่างไต (interrenal tissue) ที่อยู่บริเวณส่วนต้นของไตซึ่งเทียบได้กับต่อมหมวกไต (adrenal gland) ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง การสร้างคอร์ติซอลถูกกระตุ้นโดยกลไกของ Hypothalamus-pituitary-interrenal-axis (HPI-axis) โดยเมื่อปลาเข้าสู่ภาวะเครียด สมองส่วน hypothalamus จะหลั่ง corticotrophin-releasing factor เข้าสู่กระแสเลือดไปกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมน adrenocorticotrophic (ACTH) ซึ่งจะไปกระตุ้นการหลั่งคอร์ติซอลที่เนื้อเยื่อระหว่างไต (Mommsen et al., 1999) การหลั่งคอร์ติซอลจะเกิดขึ้นช้ากว่าการหลั่งฮอร์โมน catecholamine แต่ให้ผลยาวนานกว่า ส่วนในปลากระดูกอ่อนนอกจากคอร์ติซอลแล้วยังมีการสร้างฮอร์โมน 1α-hydroxy corticosteroid ซึ่งมีฤทธิ์และหน้าที่เช่นเดียวกัน ในปลาคอร์ติซอลยังมี

หน้าที่กระตุ้นขบวนการสลายไกลโคเจน (glycogenolysis) กระบวนการสร้างกลูโคส (gluconeogenesis) กระตุ้นการหลั่งฮอร์โมน catecholamine ซึ่งไปเพิ่มขบวนการสลายไกลโคเจนให้มากขึ้น ส่งผลให้มีการกระตุ้นการทำงานของระบบหัวใจ หลอดเลือดและระบบทางเดินหายใจ ซึ่งจากขบวนการทั้งหมดนี้จะช่วยทำให้ระดับกลูโคสเพิ่มมากขึ้นเพื่อเป็นแหล่งพลังงานที่เพียงพอกับความต้องการของร่างกาย (Reid et al., 1998)

ความสามารถในการสืบพันธุ์ อายุ และความสมบูรณ์พันธุ์เป็นปัจจัยภายในที่ทำให้ระดับการหลั่งคอร์ติซอลเพิ่มขึ้นตามช่วงอายุและความสมบูรณ์พันธุ์ของปลา นั่นคือในปลาชนิดเดียวกันแต่มีช่วงอายุหรือระดับการเจริญเติบโตที่ต่างกัน จะมีการหลั่งคอร์ติซอลในระดับที่ต่างกันด้วย เช่น ในช่วงวางไข่ปลาเพศเมียจะมีระดับของคอร์ติซอลในซีรัมสูงกว่าปลาเพศผู้ เนื่องจากการกระตุ้นการหลั่งจากต่อมใต้สมองส่วนหน้า (anterior pituitary gland) แต่ภายหลังการตกไข่ระดับคอร์ติซอลจะลดลงอย่างรวดเร็ว (Metwally and Fouad, 2008) ส่วนปัจจัยภายนอกร่างกายมีหลายปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อระดับความเข้มข้นของคอร์ติซอลในกระแสเลือด เช่น ในปลา common seabream (*Pagrus pagrus*) ที่คุ้นเคยต่อการถูกเลี้ยงรวมกันอย่างหนาแน่นในถังสีดำจะมีระดับคอร์ติซอลสูงกว่าปลาชนิดเดียวกันที่เลี้ยงรวมกันในถังสีเทาและสีขาว นอกจากนี้อุณหภูมิของน้ำที่สูงขึ้นยังส่งผลให้มีการหลั่งคอร์ติซอลในระดับที่เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน (Rotllant et al., 2003) โดยปลาจากฟาร์มเพาะเลี้ยงมีระดับคอร์ติซอลที่สูงกว่าปลาในแหล่งน้ำธรรมชาติ ภาวะโภชนาการเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่อาจมีอิทธิพลต่อการตอบสนองต่อการหลั่งคอร์ติซอล เช่น ฮอร์โมน serotonin ซึ่งเป็นตัวควบคุมใน HIP-axis มีปริมาณการหลั่งมากขึ้นเมื่อปลาได้รับอาหารที่มี tryptophan หรือในปลาที่อยู่ในภาวะขาดอาหาร ได้รับมลภาวะทางสิ่งแวดล้อม ความเครียดจากภาวะโภชนาการและลักษณะทางกายภาพ อาจส่งผลทำให้มีการหลั่งคอร์ติซอลที่เพิ่มสูงขึ้น กลไกการกำจัดคอร์ติซอล (cortisol clearance) ในร่างกายปลา มีตับเป็นอวัยวะหลักในการขนถ่ายคอร์ติซอลผ่านระบบตับ-น้ำดี (hepato-biliary system) ประสิทธิภาพของขบวนการดังกล่าวสามารถเปลี่ยนแปลงได้จากหลายปัจจัยทั้งภายนอกและภายในร่างกายปลา เช่น ความเครียด ความเค็มของน้ำ ความสมบูรณ์ของร่างกาย และภาวะโภชนาการ เป็นต้น (Mommsen et al., 1999)

ในภาวะที่เกิดความเครียดแบบเฉียบพลันระดับของคอร์ติซอลในปลาจะเพิ่มสูงขึ้นมากอย่างรวดเร็วภายในเวลาสั้นๆ จากนั้นร่างกายจะมีกลไกการควบคุมเพื่อลดระดับคอร์ติซอลให้เข้าสู่ระดับปกติภายในเวลาไม่กี่ชั่วโมงหลังจากเกิดความเครียด โดยในปลาส่วนใหญ่ความเข้มข้นของคอร์ติซอลจะเพิ่มขึ้นถึงระดับสูงสุดภายใน 1 ชั่วโมง และจะกลับสู่ระดับพื้นฐานภายในเวลา 6 ชั่วโมงหลังจากเกิดภาวะความเครียด เพื่อหลีกเลี่ยงการถูกทำลายของเนื้อเยื่อ ตัวอย่างเช่นปลาในกลุ่มแซลมอน (*Oncoryhynchus* spp.) ซึ่งเสียชีวิตจากการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อเนื่องจากการมี

ระดับคอร์ติซอลที่สูงมากเกินไปเป็นเวลานานมากกว่า 4 ชั่วโมง ดังนั้นการทดสอบหาคอร์ติซอลจึงเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับความเครียดในปลาที่เกิดขึ้นแบบเฉียบพลัน แต่การตรวจวัดเพียงครั้งเดียวหรือการตรวจที่ล่าช้าอาจทำให้ค่าที่ได้มีความคลาดเคลื่อนหรือไม่ใช่ค่าที่แท้จริง และในปลาบางชนิดอาจพบว่าระดับของคอร์ติซอลเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยในภาวะที่มีความเครียดแบบเรื้อรัง ซึ่งอาจมีสาเหตุจากไม่มีการกระตุ้นให้มีการทำงานของระบบฮอร์โมน ปลาถูกกระตุ้นเป็นระยะเวลาที่ยาวนานเกินไป ปลามีความคุ้นเคยต่อสภาวะที่กระตุ้นให้เกิดความเครียด หรือ interrenal tissue ของปลามีความไวน้อยลงต่อฤทธิ์ของฮอร์โมน ACTH และฮอร์โมนอื่นๆ จากต่อมใต้สมอง (Martinez-Porchas et al., 2009)

(2) **แลคเตท** (Lactate) เป็นสารตั้งต้นสำหรับขบวนการ gluconeogenesis การเพิ่มขึ้นของระดับแลคเตทในกระแสเลือดภายหลังภาวะเครียดในปลาเกิดจากการที่กล้ามเนื้อมีการสร้างกรดแลคติกเพิ่มขึ้นและกรดถูกเคลื่อนย้ายเข้าสู่กระแสเลือด (Cowey and Walton, 1989) ในการศึกษาของ Black และคณะ (1966) พบการแพร่ของกรดแลคติกอย่างรวดเร็วจากกล้ามเนื้อเข้าสู่กระแสเลือดของปลาที่มีกิจกรรมทางกายภาพหนักๆ ระดับของแลคเตทยังเพิ่มสูงขึ้นในสภาวะที่ปลาเครียดจากสภาพการขาดอากาศ (hypoxic stress) แต่ระดับแลคเตทสามารถลดลงแบบทันทีจนเข้าสู่ระดับปกติเมื่อมีการให้ออกซิเจนและปลากลับเข้าสู่สภาพแวดล้อมที่ปกติ เนื่องจากเกิดการ oxidation ของแลคเตทเมื่อมีปริมาณก๊าซออกซิเจนเพียงพอ (Padmavathy and Ramanathan, 2010) ในปลากระดูกอ่อนจะพบปริมาณแลตเตทที่เพิ่มสูงถึง 15 mmol/L หรือมากกว่า หลังจากที่ปลาผ่านการว่ายน้ำหรืออยู่ในสถานที่กักขังเป็นเวลาหลายชั่วโมง (Wells et al., 1986)

ปริมาณแลคเตทที่สูงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ปลาเสียชีวิตจากภาวะ lactic acidosis แต่การเสียชีวิตจะเกิดขึ้นเพียงในบางช่วงเวลาหลังจากมีกิจกรรมทางกายภาพเท่านั้น (Wood et al.,1983) แต่ในปลา Black marlin (*Makaira indica*) กลับไม่พบระดับแลคเตทที่สูงขึ้นแม้ว่าจะถูกจับบังคับเป็นเวลาหลายชั่วโมง ส่วนในปลาฉลาม Spiny dogfish มีการขับแลคเตทออกเพียงเล็กน้อยทางเหงือก (Wells et al., 1986) ทั้งนี้ Kaneko (1983) พบว่าในปลาหมอเทศมีความเข้มข้นของแลคเตทในกล้ามเนื้อสูงกว่าในตับและกระแสเลือด และมีปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วงที่ร่างกายมีความต้องการในการใช้ออกซิเจนสูง ทั้งนี้ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำแลคเตทถูกสร้างขึ้นระหว่างกิจกรรมที่ก่อความเครียด แต่ยังไม่ทราบกลไกการตอบสนองที่ชัดเจน ส่วนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมกรดแลคติกที่สร้างขึ้นมาสามารถเปลี่ยนเป็นกลูโคสหรือถูกใช้โดยตรงเพื่อสร้างพลังงานในวัฏจักรกรดซิตริก (Bennett, 1978)

(3) **กลูโคส** (Glucose) เป็นน้ำตาลประเภทโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) เป็นแหล่งพลังงานสำคัญสำหรับการหายใจของเซลล์ (cellular respiration) ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด

ร่างกายจึงจำเป็นต้องรักษาระดับกลูโคสในพลาสมาให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมตลอดเวลา (Stoskopf, 1993) โดยอาศัยกระบวนการเปลี่ยนแปลงของไกลโคเจนภายในตับ และมีการสร้างกลูโคสบางส่วนจากแหล่งที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรตผ่านขบวนการ gluconeogenesis ภายในตับ (Aengwanich and Tanomtong, 2004) ระดับของกลูโคสในปลามีความผันแปรตามชนิด ขนาด อายุ สภาวะโภชนาการ และการสืบพันธุ์ และมีการเพิ่มขึ้นเมื่อปลาตอบสนองต่อความเครียดในภาวะที่มีการติดเชื้อหรือความผิดปกติของร่างกาย แต่ร่างกายปลาจะสามารถลดปริมาณกลูโคสให้ลงสู่ระดับปกติอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกับฮอร์โมนคอร์ติซอล ระดับกลูโคสในกระเลือดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอายุของปลา (McDonald and Milligan, 1992) และปัจจัยภายนอกที่ก่อให้เกิดความเครียดสามารถกระตุ้นการหลั่งกลูโคสในปลาได้ เช่น ในปลาฉลาม Spiny dogfish พบว่าฮอร์โมนคอร์ติซอลและ corticosterone ที่มาจากภายนอกร่างกายจะเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ hyperglycemia (Patent, 1970) หรือในปลากระพงและปลาลิ้นหมามีปริมาณกลูโคสเพิ่มขึ้นจาก 2 เป็น 5 mmol/L ภายหลังจากถูกจับ (Swift, 1983)

ระดับของกลูโคสปกติในปลากระดูกอ่อนจะอยู่ที่ประมาณ 5 mmol/L แต่เมื่อเกิดความเครียดปลาจะหลั่งกลูโคสเพิ่มขึ้นเนื่องจากการกระตุ้นของฮอร์โมน catecholamine ซึ่งยังส่งผลทำให้ค่า osmolarity ของเลือดเพิ่มขึ้นประมาณ 6% โดยระดับกลูโคสจะกลับสู่ระดับปกติภายในเวลา 3-4 วัน หลังจากปลาเกิดภาวะเครียด (Wardle, 1978; Cliff and Thurman, 1994) การเพิ่มขึ้นของกลูโคสในกระแสเลือดอาจเกิดขึ้นเพื่อขบวนการซ่อมแซมของเซลล์ โดยมีการเคลื่อนย้ายกลูโคสออกมาจากแหล่งสะสมไกลโคเจนในตับเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อ กลูโคสเหล่านี้จะถูกใช้เป็นวัตถุดิบและสร้างพลังงานสำหรับกระบวนการสร้างไกลโคเจนอีกครั้งในกล้ามเนื้อ (Hille, 1982) ในปลากระดูกอ่อนมักพบการเสียชีวิตหลังจากการถูกล่าหรือกักขังในอัตราที่ค่อนข้างสูง แต่กลับพบระดับกลูโคสในกระแสเลือดที่ต่ำมากในปลาเหล่านี้ เช่น การวัดระดับกลูโคสในปลาฉลาม Dusky (*Carcharhinus obscures)* 2 ตัวทันทีหลังเสียชีวิต ระดับกลูโคสในพลาสมามีค่าเพียง 2.9 และ 5.7 mmol/L โดยคาดว่าสาเหตุการตายเกิดจากการที่ปลาฉลามไม่สามารถเคลื่อนย้ายน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่จำเป็นของกล้ามเนื้อร่วมกับการเกิดภาวะ lactic acidosis (Cliff and Thurman, 1994)

<u>2.5.1.5 ค่าทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนในซีรัม</u> ระดับโปรตีนในซีรัมของปลาที่ต่ำลงมักเกี่ยวข้องกับการทำงานที่บกพร่องของไต โดยไม่จำเป็นต้องแปรผันตามการเพิ่มขึ้นของระดับโปรตีนในปัสสาวะ สาเหตุที่ทำให้ระดับโปรตีนโดยรวมลดลง (total protein) อาจเกิดจากการได้รับโปรตีนในอาหารลดลง ภาวะอดอาหาร การสร้างโปรตีนลดลงเนื่องจากความบกพร่องของตับ ภาวะการทำงานของร่างกายที่ทำให้เกิดการแทรกซึมผ่านเส้นเลือดฝอยของโปรตีนในพลาสมาในระดับที่เพิ่มขึ้น หรือการที่โปรตีนถูกย่อยสลายโดย proteolytic enzymes ที่หลั่งออกมาจากเซลล์

เยื่อบุเส้นเลือดที่ถูกทำลายโดยไวรัสหรือแบคทีเรีย การลดลงของ Immunoglobulin ในภาวะการติดเชื้อแบคทีเรีย เช่น เชื้อ *Aeromonas* spp. ในภาวะโรคตับจะพบระดับอัลบูมิน (albumin) และแคลเซียมที่ลดลงเนื่องจากอัลบูมินเป็นโปรตีนที่ช่วยในการขนส่งแคลเซียมในซีรัมของปลา (Stoskopf, 1993)

อัลบูมินเป็นโปรตีนที่มีปริมาณสูงสุดและมีบทบาทที่สำคัญในการรักษาแรงดันออสโมติกในกระแสเลือดของสัตว์มีกระดูกสันหลัง ปริมาณอัลบูมินในปลาที่ถูกล่าในเกมกีฬาจะมีระดับที่สูงมากอย่างเห็นได้ชัด (Poluhowich and Parks, 1972) ทั้งนี้การเพิ่มขึ้นของโปรตีนในพลาสมาในปลาที่มีกิจกรรมเป็นเวลานานอาจเนื่องจากภาวะที่เลือดมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น (Wood et al., 1983)

ปลาน้ำจืดในเขตศูนย์สูตร มีระดับโปรตีนรวมปกติในซีรัมอยู่ในช่วงประมาณ 2.8-8.2 g/dl ซึ่งในลูกปลามักมีปริมาณโปรตีนรวมที่ต่ำกว่าปลาโตเต็มวัย เช่น ในลูกปลาช่อนอะเมซอนและลูกปลากระพงลายมีค่าเฉลี่ยระดับโปรตีนโดยรวมในพลาสมาประมาณ 6.5 และ 7.5 g/dl ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าปลาโตเต็มวัยเล็กน้อย เนื่องจากปลาโตเต็มวัยมีความต้องการโปรตีนในปริมาณที่สูงกว่าเพื่อใช้ในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Tavares-Dias et al., 2007) และในปลากินเนื้อจะมีระดับโปรตีนรวมที่สูงกว่าในปลาที่กินทั้งพืชและสัตว์ เช่น ปลาช่อนอะเมซอนมีระดับโปรตีนรวมค่าสูงกว่าปลา South American trout (*Brycon amazonicus* และ *B. orbignyacus)* ปลา Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) และปลา South American catfish (*Rhamdia quelen*) (Tavares-Dias and Mataqueiro, 2004)

<u>2.5.1.6 ค่าทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับไขมันในกระแสเลือด</u> ไขมันเป็นสารอาหารที่ปลาใช้เป็นแหล่งพลังงานโดยเก็บสะสมตามอวัยวะต่างๆ ทั่วร่างกาย (Guijarro et al., 2003) ปริมาณไขมันและโคเลสเตอรอลในปลาจะแปรผันตามฤดูกาล ช่วงของการสืบพันธุ์ และลักษณะการดำรงชีวิตของปลา (Fange, 1976) นอกจากนี้ยังมีความแตกต่างกันตามอายุ สภาวะของร่างกาย และอาหารที่ปลากิน (Tavares-Dias et al., 2007) โดยในปลาที่โตเต็มวัยจำเป็นต้องใช้ไขมันในปริมาณมากในระหว่างขบวนการสืบพันธุ์ (McDonald and Milligan, 1992) โคเลสเตอรอลมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต่างๆ เป็นสารตั้งต้นของ steroid hormones เช่น progesterone, testosterone, estradiol และคอร์ติซอล (Aengwanich and Tanomtong, 2004) ในปลาบางชนิดอาจพบระดับโคเลสเตอรอลในซีรัมที่สูงขึ้นในภาวะเครียด เช่น ปลา Skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) (Bourke, 1983) แต่ไม่พบการเพิ่มขึ้นของโคเลสเตอรอลในปลากลุ่ม snapper (Wells et al., 1986) ระดับโคเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาของปลาช่อนอะเมซอนมีค่าอยู่ในช่วง 150.6-263.7 และ 154.6-622.7 mg/dl

ตามลำดับ (Tavares-Dias et al., 2007) ซึ่งมีค่าสูงกว่าในปลา Tench (*Tinca tinca*) (Guijarro et al., 2003) แต่ต่ำกว่าในปลา South American catfish *(Rhamdia quelen)* เพศผู้ (Tavares-Dias and Mataqueiro, 2004)

2.5.1.7 ค่าทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับสารสีในเลือด สารสีในน้ำดีของปลาส่วนใหญ่ได้แก่ bilirubin และ biliverdin ซึ่งพบในปริมาณที่แตกต่างกันในแต่ละชนิดของปลา ซีรัมของปลากระดูกแข็งตามปกติมีสีเหลืองอ่อนเนื่องจากมี bilirubin เป็นองค์ประกอบ แตกต่างจากในกลุ่มปลาไหลที่ซีรัมมีสีเขียวอมน้ำเงินจากการมี biliverdin เป็นองค์ประกอบ (Thrall et al., 2004) ตามปกติ bilirubin ในปลาจะถูกขับออกมาโดยเซลล์ตับในปริมาณและอัตราที่คงที่ ความบกพร่องในการทำงานของตับจึงส่งผลต่อระดับ bilirubin ในพลาสมา สาเหตุอื่นที่ส่งผลต่อค่า bilirubin ได้แก่ ภาวะที่ปลาถูกล่าหรือการมีกิจกรรมทางกายภาพสูงสามารถส่งผลทำให้ค่า bilirubin เพิ่มสูงขึ้นได้เช่นกัน (Wells et al., 1986)

2.5.1.8 ค่าทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ต่าง ๆ ในกระแสเลือด ระดับของเอนไซม์ต่างๆ ในเลือดปลาสามารถใช้บ่งบอกความผิดปกติหรือความเสียหายของอวัยวะที่สำคัญของร่างกายที่จำเพาะกับเอนไซม์ชนิดนั้นๆ ได้เช่นเดียวกับในสัตว์มีกระดูกสันหลังทั่วไป (Wells et al., 1986)

(1) **เอนไซม์ Alanine aminotransferase (ALT)** ในปลา ALT เป็นเอนไซม์ที่ผลิตจากตับเป็นหลัก และยังสามารถพบได้ที่หัวใจ เหงือก ไต และกล้ามเนื้อได้เช่นกัน (Stoskopf, 1993) แม้ ALT จะไม่ใช่เอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อหน้าที่การทำงานของตับ แต่กล่าวได้ว่ามีความจำเพาะเจาะจงมากกว่าเอนไซม์ AST การเพิ่มขึ้นของปริมาณ ALT จึงอาจช่วยบ่งชี้ภาวะความผิดปกติในตับได้เช่นกัน โดยปลาจะผลิต ALT จากตับเพิ่มขึ้นในภาวะเครียดหรือการเจ็บป่วยของร่างกาย แต่ในปลาแฟนซีคาร์พพบว่าระดับของเอนไซม์ ALT จะลดลงในภาวะที่ปลาติดเชื้อแบคทีเรีย นอกเหนือจากตับแล้วการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ ALT อาจใช้บ่งชี้ภาวะความผิดปกติหรือการถูกทำลายของเหงือกและกล้ามเนื้อหัวใจ เนื่องจาก ALT มีหน้าที่ในกระบวนการ oxidation ของอวัยวะดังกล่าว (Wells et al., 1986)

(2) **Aspartate aminotransferase (AST)** เป็นเอนไซม์ที่ถูกหลั่งควบคู่กับเอนไซม์ ALT จากตับ และอวัยวะอื่นๆ เช่น หัวใจ เหงือก ไต และกล้ามเนื้อ (Stoskopf, 1993) และทำหน้าที่ในกระบวนการ oxidation ในเหงือกและกล้ามเนื้อหัวใจเช่นเดียวกับเอนไซม์ ALT โดยในปลาทะเลจะพบเอนไซม์ AST ปริมาณมากที่สุดในตับ และพบว่าจะมีระดับสูงขึ้นในภาวะที่ปลาเกิดความเครียด (Wells et al., 1986) แม้เอนไซม์ AST จะทำงานควบคู่กับเอนไซม์ ALT แต่การศึกษา

ในปลาแซลมอนพบว่าในภาวะโรคตับชนิดที่มีการตายของเซลล์แบบเฉียบพลัน (acute liver necrosis) และการได้รับพิษจาก carbon tetrachloride พบเพียงการเพิ่มขึ้นของระดับเอนไซม์ AST ในขณะที่ภาวะโรคตับชนิดที่มีการตายของเซลล์แบบเรื้อรัง (chronic liver necrosis) หรือภาวะที่มีการสะสมของแคลเซียมในไต (nephrocalcinosis) กลับไม่พบการเพิ่มของเอนไซม์ชนิดนี้แต่อย่างใด แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ AST ไม่มีความจำเพาะต่อความผิดปกติของตับในปลา ส่วนในกลุ่มปลาตะเพียนและปลาแฟนซีคาร์พพบระดับเอนไซม์ AST ที่เพิ่มสูงขึ้นประมาณ 2 เท่าภายหลังการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Aeromonas* spp. ไปแล้ว 24 ชั่วโมง (Evenberg et al., 1986)

(3) **เอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP)** เช่นเดียวกับเอนไซม์ AST และ ALT เอนไซม์ ALP ในปลาทั่วไปจะถูกสร้างจากตับเป็นอวัยวะหลัก และสามารถสร้างจากอวัยวะอื่นๆ เช่น กระดูก กล้ามเนื้อ เป็นต้น ความผิดปกติของตับและกระดูกจึงส่งผลทำให้มีปริมาณเอนไซม์ ALP เพิ่มสูงขึ้น (Shahsavani et al., 2010) และยังมีรายงานการเพิ่มขึ้นในปลาที่มีภาวะความเครียดทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง (Cvancara and Conte, 1970) หรือภาวะที่เนื้อเยื่อของปลาถูกทำลายจากการล่าและภาวะเครียดชนิดรุนแรง เอนไซม์ ALP จึงสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดภาวะเครียดในปลาได้ (Wells et al., 1986)

(4) **เอนไซม์ Creatine kinase (CK)** เป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่มีความจำเพาะมากที่สุดต่อการทำงานของกล้ามเนื้อในปลา เอ็นไซม์ CK ประกอบด้วย CK1 ที่ผลิตจากสมอง CK2 ที่ผลิตจากหัวใจ และ CK3 ที่ผลิตจากกล้ามเนื้อ ระดับของเอนไซม์ CK ที่เพิ่มขึ้นอาจเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น การขนส่ง การถูกจับ การผ่าตัด และเหตุการณ์ที่ก่อความเครียดหรือความเสียหายต่อกล้ามเนื้อ (Cliff and Thurman, 1994; Shahsavani et al., 2010) แต่ในปลากลุ่ม snapper ที่มีความเครียดจากการถูกตกเพื่อเกมกีฬากลับไม่พบการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของเอนไซม์ชนิดนี้ (Wells et al., 1986)

(5) **เอนไซม์ Lactate dehydrogenase (LDH)** ในปลาเอนไซม์ LDH ทำหน้าที่ในกระบวนการเร่งการเปลี่ยนแปลงแลคเตทไปเป็นไพรูเวท ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญของการสร้างพลังงานในเซลล์ต่างๆ จึงสามารถพบเอ็นไซม์ LDH ในเซลล์เกือบทุกชนิดของร่างกาย อวัยวะที่มีเอนไซม์ LDH ในระดับสูงได้แก่ หัวใจ ไต ตับ และกล้ามเนื้อ ในปลาแซลมอนที่มีภาวะโลหิตจางที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อจะพบการเพิ่มขึ้นของระดับเอนไซม์ LDH ระดับของเอนไซม์ LDH ที่ได้จากการวิเคราะห์จากตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารต้านการแข็งตัวของเลือดชนิด EDTA หรือออกซาเลตจะมีปริมาณลดลง เนื่องจากสารทั้งสองตัวมีผลลดการทำงานของเอนไซม์ LDH (Shahsavani et al., 2010) นอกจากนี้เอนไซม์ LDH อาจช่วยบ่งชี้ถึงการถูกทำลายของเนื้อเยื่อหรือกล้ามเนื้อได้ โดยในปลาที่เกิดการหดเกร็งกล้ามเนื้อจากการถูกล่าหรือความพยายามดิ้นรนในการหนี จะมีระดับของเอนไซม์ LDH ที่สูงขึ้นมาก (Wells et al., 1986)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

สำรวจและเก็บตัวอย่างเลือดจากปลากระเบนราหูในแม่น้ำแม่กลอง ต.อัมพวา อ.อัมพวา จ.สมุทรสงคราม ในช่วงระหว่างวันที่ 17 มีนาคม พ.ศ. 2552 ถึงวันที่ 7 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553 เลือกตัวอย่างปลากระเบนราหูโตเต็มวัยที่ดูปกติจากการสังเกตลักษณะทางกายภาพ (สภาพร่างกายภายนอก การเคลื่อนไหว อัตราการหายใจ สีลำตัว และพฤติกรรมหรือการตอบสนองต่อสิ่งเร้า เป็นต้น) จำนวน 54 ตัว แบ่งเป็นเพศผู้และเพศเมียอย่างละ 27 ตัว แยกเพศตามลักษณะรูปร่างภายนอก บันทึกลักษณะทางกายภาพและอาการภายนอกของปลา เก็บตัวอย่างเมือกที่ผิวหนังและเหงือกเพื่อตรวจหาพยาธิภายนอก บันทึกข้อมูลความยาวลำตัว (girdle length) ความยาวลำตัวรวมหาง (total length) และความกว้างลำตัว (disc width) ทำเครื่องหมายโดยการฝังไมโครชิพ (Verichip™) ที่ใต้ผิวหนังบริเวณโคนหางด้านซ้ายให้กับปลากระเบนทุกตัวอย่างและใช้ยาปฏิชีวนะแบบครีมป้ายเพื่อปิดปากแผลจากการฝังไมโครชิพ ทั้งนี้ในทุกครั้งที่ได้ตัวอย่างปลากระเบนใหม่ จะทำการตรวจหาไมโครชิพโดยใช้เครื่องอ่าน (Verichip™) เพื่อให้มั่นใจว่าไม่ใช่ปลากระเบนตัวอย่างเดิม เมื่อเสร็จสิ้นขั้นตอนการเก็บตัวอย่างทำการบันทึกและสังเกตลักษณะทางกายภาพและพฤติกรรมการตอบสนองของปลากระเบนอีกครั้ง ก่อนปล่อยกลับคืนสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ

3.2 การจับบังคับสัตว์

การเก็บตัวอย่างปลากระเบนราหูในแหล่งน้ำธรรมชาติจะใช้วิธีการตกปลากระเบน โดยวางทุ่นที่ผูกติดกับเบ็ดที่มีเหยื่อล่อ เหยื่อที่ใช้ส่วนใหญ่มักเป็นสัตว์น้ำซึ่งเป็นอาหารของปลากระเบน เช่น ปลาดุก ปลาชะโด ปลาบู่ เป็นต้น ทั้งนี้ทุ่นและปลาเหยื่อจะจมอยู่ใต้พื้นน้ำ เมื่อปลากระเบนมากินเหยื่อจะทำให้เบ็ดเกี่ยวที่บริเวณปากปลา ทำให้สามารถดึงตัวปลาขึ้นมาจากพื้นน้ำได้ ทั้งนี้เบ็ดตกปลาที่ใช้ต้องเป็นชนิดที่มีความทนทานสูงและรับน้ำหนักได้มาก เมื่อสามารถดึงปลากระเบนขึ้นมาถึงผิวน้ำที่ระดับความลึกประมาณ 1 เมตร จะใช้ตาข่ายขนาดใหญ่ช้อนตัวปลาเอาไว้เพื่อให้ง่ายต่อการจับบังคับและป้องกันการหลบหนี จากนั้นใช้เศษผ้ามัดบริเวณเงี่ยงพิษที่โคนหางเพื่อป้องกันอันตราย ก่อนจะทำการขนย้ายปลากระเบนมาที่บริเวณริมฝั่งแม่น้ำหรือในกระชังที่เตรียมไว้เพื่อทำการเก็บตัวอย่างต่อไป หลังทำการเก็บตัวอย่าง

3.3 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

เก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำที่ปลากระเบนอาศัยอยู่ รวมทั้งบันทึกวันที่และเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างน้ำมาวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้ (วิรัช, 2544; Boyd, 1995)

3.1 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved oxygen; DO) (part per million; ppm) และอุณหภูมิของน้ำ (Temperature; T) (^{o}C) โดยอุปกรณ์ตรวจหาปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved oxygen meter) (YSI® รุ่น 57)

3.2 ค่าความเค็ม (Salinity) (part per thousand; ppt) โดยอุปกรณ์ตรวจวัดความเค็ม (Salinity refractometer)

3.3 ค่าความกระด้างรวม (Total hardness) (ppm) ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ค่าความเป็นด่าง (Alkalinity) (ppm) ปริมาณแอมโมเนียรวม (Total ammonia; NH_3) (ppm) ปริมาณไนไตรท์ (Nitrite; NO_2) (ppm) ปริมาณไนเตรท (Nitrate; NO_3) (ppm) ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide; H_2S) (ppm) ปริมาณคลอรีน (Chlorine) (ppm) ปริมาณแคลเซียม (Calcium; Ca) (ppm) และปริมาณแมกนีเซียม (Magnesium; Mg) (ppm) โดยชุดตรวจคุณภาพน้ำสำเร็จรูป (Red sea®)

3.4 การเก็บตัวอย่างเลือด

เจาะเก็บตัวอย่างเลือดปลากระเบนราหูทั้ง 54 ตัว โดยใช้เข็มเบอร์ 20 G หรือ 18 G จากตำแหน่งเส้นเลือดใหญ่ที่บริเวณโคนหาง (caudal vein) ปริมาณเลือดที่เก็บประมาณ 3-5 มิลลิลิตร/ตัว นำเลือดจำนวน 20-40 ไมโครลิตร ไปตรวจหาปริมาณกลูโคสโดยใช้ชุดตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดด้วยตนเอง Accu-Check Advantage (Roche®) จากนั้นทำสเมียร์เลือดแบบบาง (thin blood smear) ทันที จำนวน 9 แผ่น และทำให้แห้งอย่างรวดเร็วโดยใช้ลมอุ่นเป่า เลือดอีก 1 มิลลิลิตร เก็บในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งตัวชนิดลิเธียมเฮปาริน เลือดที่เหลือเก็บในหลอดเก็บเลือดแล้วนำไปปั่นแยกซีรัม เพื่อตรวจวิเคราะห์ทางชีวเคมี โดยตัวอย่างเลือดทั้งหมดจะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส และเก็บให้พ้นจากแสงสว่าง ระหว่างการขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการ

3.5 การตรวจทางโลหิตวิทยา

3.5.1 การศึกษาลักษณะรูปร่าง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

นำแผ่นสเมียร์เลือดที่ปล่อยให้แห้งแล้ว ของเลือดปลากระเบนราหูทั้งหมด 54 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 แผ่น มาทำการตรึงสภาพทันทีด้วย methanol (fixation) ย้อมด้วยสี Wright's Giemsa stain แล้วนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (Olympus, CX31, Japan) สังเกตและ

บันทึกลักษณะรูปร่าง แกรนูล หรือองค์ประกอบภายในต่างๆ และวัดขนาดของเม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด (Campbell and Ellis, 2007)

3.5.2 การศึกษาการย้อมติดสีไซโตเคมีพิเศษ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

สุ่มเลือดตัวอย่างเลือดของปลากระเบนราหูเพศผู้ และเพศเมีย เพศละ 5 ตัวอย่าง จากทั้ง 54 ตัวอย่าง ซึ่งมีแผ่นสเมียร์เลือดที่ปล่อยให้แห้งอีกตัวอย่างละ 7 แผ่น (จากข้อ 3) เพื่อนำมาทำ buffy coat smear ตัวอย่างละ 7 แผ่น โดยทำการแบ่งเลือดของปลากระเบนแต่ละตัวอย่างที่เก็บอยู่ในลิเธียมเฮปารินด้วยหลอด microcapillary แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้ได้ชั้น buffy coat ใช้มีดหรือกรรไกรตัดหลอด microcapillary เพื่อแยกส่วน buffy coat มาทำ buffy coat smear บนแผ่นสไลด์ ต่อมาจึงนำมาผ่านกระบวนการตามขั้นตอนในการย้อมสีไซโตเคมีแต่ละชนิดภายใน 1-2 ชั่วโมงหลังจากเก็บเลือด เนื่องจากติดสีได้ดีกว่าการทิ้งไว้เป็นเวลานาน (เฉลียว, 2548) ดังนั้นในปลากระเบนราหูที่ถูกสุ่มเลือก 1 ตัวอย่าง จะมีแผ่นสไลด์เพื่อย้อมสีทางไซโตเคมีทั้งหมด 14 แผ่น (แผ่นสเมียร์เลือด 7 แผ่น และแผ่นสเมียร์ buffy coat 7 แผ่น) ซึ่งจะนำมาย้อมสีพิเศษทางไซโตเคมีทั้งหมด 7 สี สีละ 2 แผ่น และทำการย้อมพร้อมกับเลือดสุนัขที่ใช้เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) โดยวิธีการในการย้อมสีไซโตเคมีแต่ละชนิด เป็นดังนี้

3.5.2.1 สีพิเศษ Sudan black B: SBB (Sigma Procedure No.380) เตรียมสารละลาย Glutaraldehyde fixation solution โดยใส่ Reagent grade acetone 25 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย Glutaraldehyde 75 มิลลิลิตร เก็บให้พ้นแสง ที่ 2-6 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที แกว่งสไลด์เบาๆ จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง นำแผ่นสไลด์มาจุ่มลงในสารย้อมสี Sudan black B นาน 5 นาที นำแผ่นสไลด์ไปจุ่มในเอทานอลเข้มข้น 70% จำนวน 3 ครั้ง หรือจุ่มจนกระทั่งสีถูกชะล้างออกจนหมด แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ย้อมทับด้วยสารละลาย Hematoxylin solution นาน 5 นาที จากนั้นล้างสไลด์โดยให้น้ำไหลผ่าน ทิ้งแผ่นสไลด์ให้แห้งแล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยใช้ Xylene based mounting medium

3.5.2.2 สีพิเศษ Peroxidase: PO (Sigma Procedure No.391) ทำการตรึงสภาพสไลด์ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ในสารละลาย Glutaraldehyde-acetone fixative solution ล้างออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 30 วินาที บ่มสไลด์ที่ตรึงสภาพแล้วด้วยการเติม 1% Hydrogen peroxide 0.5 มิลลิลิตร ในสารละลาย Diaminodenzidine 1 ขวด ซึ่งผสมกับสารละลาย Trizmul working 50 มิลลิลิตร นาน 45 วินาที 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 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 5 วินาที จุ่มสไลด์ลงในสารละลาย Grill modified EA นาน 1 วินาที ล้างออกด้วยเอทานอล

เข้มข้น 90% 2 ครั้ง ครั้งละ 3 วินาที ล้างออกด้วยเอทานอลเข้มข้น 100% 2 ครั้ง ครั้งละ 3 วินาที ล้างออกด้วย Xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 3 วินาที ทิ้งแผ่นสไลด์ให้แห้งแล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยใช้ Xylene based mounting medium

3.5.2.3 **สีพิเศษ** Acid phosphatase: AcP (Sigma Procedure No.181) อุ่นน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนใช้ จากนั้นนำสารละลาย Sodium nitrate solution 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย fast garnet GBC solution 1 มิลลิลิตร นำมาคนให้เข้ากัน เป็นเวลา 2-5 นาที นำสารละลายที่ผสมแล้วดังกล่าวมาผสมกับน้ำอุ่นปริมาตร 38 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Acetate solution 5 มิลลิลิตร และสารละลาย Naphtol AS-BI acid solution ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายสีเหลือง แล้วจึงเทลงใน coplin jar นำสไลด์แผ่นฟิล์มเลือดมาตรึงสภาพด้วย citrate acetone formaldehyde fixation นาน 30 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างน้ำเป็นเวลา 45-60 วินาที ระวังอย่าให้สไลด์แห้ง แล้วนำมาแช่ในสารละลาย Naphtol AS-BI acid solution อีกครั้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และนำมาล้างในน้ำไหล นาน 2 นาที ทิ้งแผ่นสไลด์ให้แห้งอย่างน้อย 15 นาที ก่อนนำมาย้อมทับด้วย Methylene blue ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นทิ้งแผ่นสไลด์ให้แห้ง แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยใช้ Xylene based mounting medium

3.5.2.4 **สีพิเศษ** Alpha-naphthyl acetate esterase: ANAE (Sigma Procedure No.90) ตรึงสภาพเซลล์ในแผ่นสเมียร์เลือดด้วยสารละลาย Citrate acetate 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 acetate esterase โดยละลายแคปซูลของสารดังกล่าว จำนวน 1 แคปซูลใน Ethylene glycol monomethyl ether 2 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำสารละลาย Alpha-naphthyl acetate esterase เทผสมลงในสารละลาย Trizmal buffer solution pH 7.6 ที่เติมเกลือ Fast blue RR salt แล้ว จะพบว่าสารละลายที่ได้จะมีลักษณะขุ่นเล็กน้อย จากนั้นเทลงใน coplin jar ที่หุ้มด้วยกระดาษเพื่อป้องกันแสง ทำการจุ่มสไลด์ที่ตรึงสภาพแล้วลงไปนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ล้างออกด้วยน้ำกลั่นนาน 3 นาที จุ่มสไลด์ในสารละลาย Mayer’s hematoxylin solution จากนั้นล้างออกโดยให้น้ำไหลผ่านตลอด 2 นาที ทิ้งแผ่นสไลด์ให้แห้งแล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยใช้ Xylene based mounting medium

3.5.2.5 **สีพิเศษ** Alkaline phosphatase: ALP (Sigma Procedure No.8) เตรียมสารละลายเกลือของ Diazonium โดยการเติมสารละลาย Sodium nitrate solution 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย Fast red violet-Alkaline solution ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 2 นาที นำสารละลายที่เตรียม

ได้เทผสมลงในน้ำกลั่น 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% ทำการแช่ในสารละลายดังกล่าว 30 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำ 45 วินาที แล้วจึงนำสไลด์มาจุ่มแช่ในสารละลายที่เตรียมไว้ นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 18-26 องศาเซลเซียส เก็บให้พ้นแสง แล้วจึงนำไปล้างด้วยน้ำกลั่น 2 นาที ระวังอย่าให้สไลด์แห้ง ย้อมทับด้วยสารละลาย Hematoxylin นาน 2 นาที จากนั้นล้างออกโดยให้น้ำไหลผ่านตลอด 2 นาที ทิ้งแผ่นสไลด์ให้แห้งแล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์โดยใช้ Xylene based mounting medium

3.5.2.6 **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 สุดท้ายจึงล้างด้วยน้ำไหลผ่าน นำไปตากแห้ง แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยใช้ Xylene based mounting medium

3.5.2.7 **สีย้อม** Toluidine blue (TB) (อัจฉริยา และคณะ, 2549) ทำการตรึงสภาพเซลล์ในแผ่นสเมียร์เลือดด้วย absolute methanol 1 นาที ปล่อยให้สไลด์แห้ง จึงนำแผ่นสไลด์มาจุ่มลงในสี Toluidine blue นาน 1-2 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกโดยการผ่านน้ำไหล ตากให้แห้ง แล้วนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.5.3 การศึกษาลักษณะ และโครงสร้างอย่างละเอียด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ในการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแต่ละชนิด จากตัวอย่างเลือดปลากระเบนราหูทั้งสิ้น 54 ตัวอย่าง จะสุ่มเลือกตัวอย่างจากปลากระเบนราหูเพศผู้และเพศเมีย เพศละ 2 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 4 ตัวอย่าง เพื่อทำการศึกษาดังต่อไปนี้

3.5.3.1 **การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด** (SEM) นำตัวอย่างเลือดปลากระเบนที่เก็บได้ อย่างน้อย 0.2 มิลลิลิตร มาทำการ fix เซลล์เม็ดเลือดทันทีหลังจากเก็บตัวอย่างได้ โดยไม่ใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเสียรูปร่างของเซลล์เม็ดเลือด (เฉลียว, 2548) จากนั้นเตรียมตัวอย่างตามวิธี conventional method (รุจิพร, 2541) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. หยดตัวอย่างเลือดลงบน cover slip หรือบนแผ่นกระจก 1 หยด แล้วป้ายให้ทั่วแผ่น
2. ล้างไฟบรินออกด้วย phosphate buffer 1 ครั้ง แล้วนำไปแช่ในน้ำยา 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 นาน 1 ชั่วโมง
3. ล้างน้ำยาออกด้วย phosphate buffer 1 ครั้ง แล้วตามด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง
4. Dehydrate ด้วย ethanol ที่ระดับความเข้มข้น 30%, 50%, 70% และ 90% ตามลำดับ ขั้นตอนละ 3 นาที และตามด้วย absolute ethanol 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที
5. นำไปทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤต ด้วยเครื่อง Critical Point Dryer (Bakzers®, model CPD 020)
6. ติดตัวอย่างลงบนแท่นวางตัวอย่าง (stub) ด้วยเทปกาวสองหน้า
7. นำไปฉาบทองด้วยเครื่อง Ion sputter (Bakzers®, model CPD 040)
8. นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (JEOL®, model JSM-5410LV) โดยทำการสังเกตเม็ดเลือดทั้งหมด พิจารณาความเป็น uniformity ของเม็ดเลือดอย่างน้อย 100 เม็ด และบันทึกลักษณะสามมิติ และพื้นผิวของเม็ดเลือดแต่ละชนิด (Chansue et al., 2011) ชนิดละ 5-10 เซลล์ ต่อ 1 ตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์

3.5.3.2 การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM) ทำการแบ่งเลือดของปลากระเบนแต่ละตัวอย่างด้วยหลอด microcapillary แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้ได้ชั้น buffy coat โดยเตรียมตัวอย่างทันทีหลังเจาะเก็บได้ และใช้เลือดที่ไม่ใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเสียรูปร่างของเซลล์เม็ดเลือด จากนั้นใช้ใบเลื่อยตัดหลอด microcapillary บริเวณเหนือและต่ำกว่าชั้น buffy coat แล้วใช้หลอดเป่าเลือดลงใน eppendorf ที่บรรจุ 2.5% glutaraldehyde ใน phosphate buffer เก็บให้พ้นแสง แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 1 คืน (เฉลียว, 2548) จากนั้นเตรียมตัวอย่างตามวิธี conventional method (ศิริเพ็ญและคณะ, 2535) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. ล้าง 0.1 M phosphate buffer ที่ 4 องศาเซลเซียส 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที
2. Postfix ด้วย 1% osmium tetroxide เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง บน Rotator
3. Dehydrate ด้วย acetone series ที่ระดับความเข้มข้น 30%, 50%, 70%, 90% และ 100% ตามลำดับ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที บน Rotator
4. Infiltrate ด้วย acetone: Spurr = 2: 1 และ 1: 2 ความเข้มข้นละ 1 ชั่วโมง บน Rotator
5. Penetrate ด้วย pure Spurr 3 ครั้ง

1) ข้ามคืน

2) 9-16 ชั่วโมง

3) ข้ามคืน

6. Embedding แล้วอบที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง
7. ตัดเนื้อเยื่อด้วย Ultramicrotome
8. ย้อมด้วย 5% Uranyl acetate 15-20 นาที
9. ย้อมด้วย Lead Stain 15 นาที
10. นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (JEOL, JEM-2100, Japan) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์กล้องจุลทรรศน์ส่องผ่าน ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล (JEOL, JEM-1230, Japan) โดยทำการสังเกตและบันทึกลักษณะของเม็ดเลือดทั้งหมด ศึกษาโครงสร้างนิวเคลียส แกรนูล และปริมาณขององค์ประกอบภายในต่างๆ และทำการวัดความกว้าง-ยาว (maximum– minimum lengths) ของเม็ดเลือดแต่ละชนิด (Chansue et al., 2011) ชนิดละ 5-10 เซลล์ ต่อ 1 ตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์

3.5.4 การศึกษาค่าทางโลหิตวิทยา

ในการศึกษาค่าทางโลหิตวิทยาและชีวเคมี ใช้ตัวอย่างเลือดปลากระเบนราหูทั้ง 54 ตัวอย่าง เพื่อทำการศึกษาดังนี้

3.5.4.1 ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Packed cell volume; PCV หรือ Hematocrit; Hct) ด้วยวิธี Microhematocrit method โดยการนำเลือดมาใส่ใน microcapillary tube ประมาณ ¾ ของหลอด แล้วกดปลายหลอดด้านที่มีเลือดลไปในดินน้ำมัน นำไปปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นก็นำมาวัดอ่านค่า PCV ด้วย microhematocrit reader อ่านค่าออกมาเป็น % (อัจฉริยา, 2547)

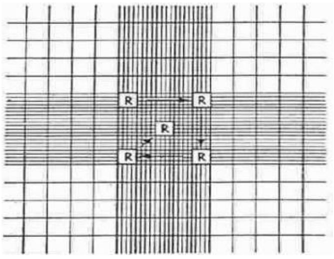
3.5.4.2 ค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (Hemoglobin concentration; Hb) ด้วยวิธี Cyanmethemoglobin method เริ่มด้วยดูดน้ำยา Drabkin’s solution 5 มิลลิลิตร ผสมกับเลือด 20 ไมโครลิตร โดยใช้ Sahli pipette ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer ตั้งพักไว้ 10 นาที แล้ววัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร อ่านค่า optical density (OD) แล้วนำไปคำนวณค่าฮีโมโกลบินจากสูตร

ค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (g/dL) ในตัวอย่าง

$$= \frac{\text{OD ตัวอย่าง x ค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินในสารละลายมาตรฐาน}}{\text{OD มาตรฐาน}}$$

3.5.4.3 **การนับจำนวนเม็ดเลือดแดงโดยรวม** (TRBC count) ดูดตัวอย่างเลือดให้ถึงขีด 0.5 ของ RBC pipette จากนั้นดูดน้ำยา Natt – Herrick's solution ให้จนถึงขีด 101 เขย่า pipette นาน 1 นาที จะได้สารละลายเม็ดเลือด 1:200 จากนั้นนำไปหยดใน Hemocytometer หรือ Neubauer counting chamber โดยทิ้งไว้สักครู่ก่อน เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดอยู่นิ่ง การนับจำนวนเม็ดเลือดแดง ให้นับที่หัวกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างที่กำลังขยาย 40x โดยนับจากสี่เหลี่ยมจตุรัส 5 ช่อง (medium-sized square) ซึ่งเม็ดเลือดแดงจะไม่ติดสี (Campbell, 1995) แล้วคำนวณจำนวนเม็ดเลือดแดงจากสูตร

RBC/µl = จำนวนของ RBCs ทั้งหมดที่นับได้ x 10,000



รูปที่ 3.1 แสดงการนับจำนวนเม็ดเลือดแดงใน hemocytometer

3.5.4.4 **การนับจำนวนเม็ดเลือดขาวโดยรวม** (TWBC count) **และจำนวนทรอมโบไซต์** (Thrombocyte count) โดยใช้วิธีการของ Campbell และ Ellis (2007) ซึ่งใช้ RBC pipette และน้ำยา Natt and Herrick's solution เช่นเดียวกับการนับจำนวนเม็ดเลือดแดง โดยนับเม็ดเลือดขาวและทรอมโบไซต์รวมกันใน Hemocytometer เนื่องจากเป็นเซลล์ที่แยกจากกันได้ยาก โดยจะมองเห็นเป็นเซลล์ที่ติดสีน้ำเงินเข้ม หรือเห็นเป็นแกรนูลอัดแน่นอยู่ในไซโตพลาสซึมทำการนับจำนวนใน Neubauer counting chamber ในช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสทั้ง 9 ช่อง แล้วนำมาคำนวณจำนวนเม็ดเลือดขาวและทรอมโบไซต์จากสูตร

TWBC + Thrombocyte count[1] **/µl** = จำนวนที่นับได้ของ WBCs และทรอมโบไซต์ทั้งหมด 9 ช่อง +10% ของจำนวนทั้งหมดที่นับได้ x 200

จากนั้นทำการนับจำนวนทรอมโบไซต์ที่พบต่อเม็ดเลือดขาว 100 เซลล์ ไปพร้อมกับขั้นตอนการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว บนแผ่นฟิล์มเลือด ซึ่งจะนำมาใช้คำนวณจำนวนเม็ดเลือดขาวรวมและจำนวนทรอมโบไซต์ได้ดังนี้

Thrombocyte count^2 (cell/μL) =

$$\frac{\text{(TWBC + Thrombocyte count) x จำนวนทรอมโบไซต์ที่พบต่อเม็ดเลือดขาว 100 เซลล์}}{\text{จำนวนทรอมโบไซต์ที่พบ +100}}$$

TWBC/μl = TWBC + Thrombocyte count^1- Thrombocyte count^2

3.5.4.5 **การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว** (Differential count) **และหาค่าร้อยละของเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด** นำแผ่นสเมียร์เลือด ที่ย้อมด้วยสี Wright's Giemsa stain ทำการนับเม็ดเลือดขาวทั้งหมด 100 เซลล์ โดยจำแนกชนิด ภายใต้เลนส์ 100x ตามวิธีของ Campbell and Ellis (2007)

3.5.4.6 **ค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดง** (RBC indices) เพื่อประโยชน์ในการแยกชนิดของภาวะโลหิตจาง ประกอบด้วย 3 ค่า (Thrall et al., 2004) ได้แก่

- ปริมาตรของเม็ดเลือดแดงโดยเฉลี่ย (Mean corpuscular volume; MCV) โดยคำนวณจากสูตร

$$\frac{\%PCV \times 10}{\text{RBC count } (10^6/\mu l)} = \text{MCV (femtoliter หรือ fL)}$$

- ปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (Mean corpuscular hemoglobin concentration; MCHC) โดยคำนวณจากสูตร

$$\frac{\text{Hb (g/dl)} \times 100}{\%PCV} = \text{MCHC (g/dl)}$$

- ปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงหนึ่งเม็ด (Mean corpuscular hemoglobin; MCH) โดยคำนวณจากสูตร

$$\frac{\text{Hb (g/dl)} \times 10}{\text{RBC count } (10^6/\mu l)} = \text{MCH (picrogram หรือ pg)}$$

3.5.5 การศึกษาค่าทางชีวเคมี

นำตัวอย่างเลือดปลากระเบนราหูที่เก็บมาแล้วไม่เกิน 4-6 ชั่วโมง มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm นาน 10 นาที และนำซีรัมที่ได้มาทำการวิเคราะห์ ดังนี้

3.5.5.1 การใช้เครื่อง Spectrophotometer (Reflotron plus®, Roche, Germany) **ในการตรวจวิเคราะห์**

1. เอ็นไซม์ Aspartate aminotransferase; AST หรือ SGOT (mg/dl)
2. เอ็นไซม์ Alanine aminotransferase; ALT หรือ SGPT (mg/dl)
3. เอ็นไซม์ Alkaline Phosphatase; ALP (U/L)
4. เอ็นไซม์ Creatinine kinase; CK (U/L)
5. Creatinine; Cr (mg/dl)
6. กรดยูริก (Uric Acid; UA) (mg/dl)
7. ยูเรียในกระแสเลือด (Blood urea nitrogen; BUN) (mg/dl)

3.5.5.2 การวิเคราะห์ระดับโปรตีนโดยวิธี Colorimetric (Integra800®, Roche, Germany)

1. ปริมาณโปรตีนรวม (Total protein) (g/dl)
2. ปริมาณอัลบูมิน (Albumin) (g/dl)
3. ปริมาณกลอบบูลิน (Globulin) (g/dl)

3.5.5.3 การใช้เครื่อง Spectrophotometer (Nova4 plus®, Roche, Germany) **ในการตรวจวิเคราะห์**

1. ปริมาณ Triglyceride (mg/dl)
2. ปริมาณ Total cholesterol (mg/dl)
3. กรดแลคติคหรือแลคเตท (Lactate) (nmol/L)
4. ฮอร์โมน Cortisol (nmol/L)
5. แคลเซียม (Calcium; Ca) (mg/dl)
4. อินออร์แกนิก ฟอสฟอรัส (Inorganic Phosphorus; P) (mg/dl)
5. แมกนีเซียม (Magnesium; Mg) (mg/dl)
6. โซเดียม (Sodium; Na) (mEq/L)
7. โพแทสเซียม (Potassium; K) (mEq/L)
8. คลอไรด์ (Chloride; Cl) (mEq/L)
9. เหล็ก (Iron; Fe) (ug/dl)

3.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ (Statistic data analysis)

ค่าคุณภาพน้ำทั้งหมด ได้แก่ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (Dissolved oxygen; DO) (ppm) อุณหภูมิน้ำ (Temperature; T) (^{o}C) ค่าความเค็ม (Salinity) (ppt) ค่าความกระด้างรวม (Total hardness)

(ppm) ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ค่าความเป็นด่าง (Alkalinity) (ppm) ปริมาณแอมโมเนียรวม (Total ammonia; NH_3) (ppm) ปริมาณไนไตรท์ (Nitrite; NO_2) (ppm) ปริมาณไนเตรท (Nitrate; NO_3) (ppm) ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide; H_2S) (ppm) ปริมาณคลอรีน (Chlorine) (ppm) ปริมาณแคลเซียม (Calcium; Ca) (ppm) และปริมาณแมกนีเซียม (Magnesium; Mg) (ppm) นำมาหาค่า mean, variance และ Standard Deviation (SD)

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS® for window™ เพื่อหาค่าสถิติเชิงพรรณนา ประกอบด้วย ค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าความแปรปรวน (Variance) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation) และวิเคราะห์ค่าการกระจายตัวปกติของประชากร (Normal Distribution) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (95% Confidence interval) และทดสอบสมมติฐานด้วยสถิติ Independent sample T-test (ทรงศักดิ์, 2551) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเพศของปัจจัยดังต่อไปนี้

- เปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดเลือดแต่ละชนิดระหว่างกระเบนราหูเพศผู้และเพศเมีย
- เปรียบเทียบค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมีระหว่างกระเบนราหูเพศผู้และเพศเมีย
- เปรียบเทียบความยาวลำตัวรวมหาง ความยาวลำตัว ความกว้างลำตัว และอัตราส่วนความกว้างลำตัวต่อความยาวลำตัวระหว่างปลากระเบนราหูโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย

3.7 **การขออนุญาตจับสัตว์น้ำ**

ดำเนินการตามระเบียบของพระราชบัญญัติการประมง พ.ศ. 2490 ว่าด้วยการขออนุญาตจากอธิบดีกรมประมงเพื่อทำการจับสัตว์น้ำในบริเวณที่รักษาพืชพันธุ์ ซึ่งหมายถึง ที่จับสัตว์น้ำซึ่งอยู่ในบริเวณพระอารามหรือ ปูชนียสถาน หรือติดกับเขตสถานที่ดังกล่าวแล้ว บริเวณประตูน้ำ ประตูระบายน้ำ ฝาย หรือทำนบ หรือที่ซึ่งเหมาะแก่การรักษาพืชพันธุ์สัตว์น้ำ (กรมประมง, 2490) โดยมีระยะเวลาการขอใบอนุญาตเป็นเวลา 2 ปี ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2552 ถึงกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2554

3.8 **ปัญหาทางจริยธรรม** (Ethical consideration)

ปฏิบัติตามหลักการและข้อบังคับว่าด้วยจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองที่ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ใบอนุญาตเลขที่ 11310061 วันที่ออกใบอนุญาต 26 กรกฎาคม 2554)

บทที่ 4
ผลการทดลอง

ในการทดลองนี้ ได้แบ่งผลการทดลองออกเป็น 4 ส่วน คือ

4.1 การศึกษาโลหิตวิทยา: ลักษณะรูปร่าง โครงสร้างอย่างละเอียด และการย้อมติดสีทางไซโตเคมีของเซลล์เม็ดเลือดในปลากระเบนราหูโตเต็มวัย

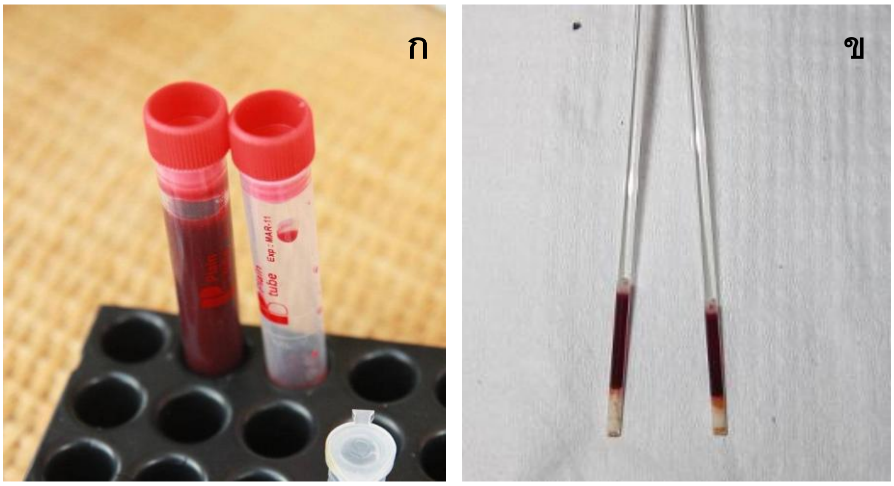
4.2 ค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมีเปรียบเทียบ ในปลากระเบนราหูโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย

4.3 ความยาวลำตัวรวมหาง ความยาวลำตัว ความกว้างลำตัว และอัตราส่วนของความกว้างลำตัวต่อความยาวลำตัวเปรียบเทียบ ในปลากระเบนราหูโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย

4.4 การวิเคราะห์ค่าคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำที่เก็บตัวอย่างปลากระเบนราหู

4.1 โลหิตวิทยา: ลักษณะรูปร่าง โครงสร้างอย่างละเอียด และการย้อมติดสีทางไซโตเคมีของเซลล์เม็ดเลือดในปลากระเบนราหูโตเต็มวัย

เลือดปลากระเบนราหูที่มีสุขภาพปกติจะมีลักษณะทางกายภาพคล้ายกับในปลากระดูกอ่อนทั่วไป คือมีสีแดงเข้ม มีความหนืด (รูปที่ 4.1 ก) เมื่อนำไปปั่นเหวี่ยงจะได้พลาสม่าใสไม่มีสี และชั้น buffy coat เป็นสีขาวหนามองเห็นได้ชัดเจน (รูปที่ 4.1 ข) ทั้งนี้เลือดปลากระเบนราหูจะเกิดกระบวนการแข็งตัวเร็วมากหลังเก็บตัวอย่าง และเกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงได้ง่ายแม้จะเป็นเลือดที่เก็บในสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิดลิเธียมเฮปารินก็ตาม



รูปที่ 4.1 ลักษณะเลือดในปลากระเบนราหู ก) สีเลือดปกติ ข) เมื่อนำไปปั่นเหวี่ยงได้พลาสมาใสไม่มีสี และชั้น buffy coat สีขาว

การศึกษาด้านโลหิตวิทยาในปลากระเบนราหูโตเต็มวัย จำนวนทั้งสิ้น 54 ตัว (แบ่งเป็นเพศผู้และเพศเมีย อย่างละ 27 ตัวอย่าง) โดยการวัดขนาดเซลล์เม็ดเลือด และการศึกษารูปแบบการติดสีของปฏิกิริยาไซโตเคมีในเซลล์ (สรุปไว้ในตารางที่ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ) การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์เม็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนรวมทั้งปฏิกิริยาไซโตเคมีของเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดมีรายละเอียดดังนี้

1. **เม็ดเลือดแดง** (Erythrocyte)

เซลล์เม็ดเลือดแดงที่เจริญเต็มที่ในปลากระเบนราหู มีขนาดค่อนข้างใหญ่เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ชนิดอื่น มีลักษณะเป็นรูปไข่หรือวงรี (elliptic) มีนิวเคลียสอยู่ตรงกลางเซลล์ รูปร่างของนิวเคลียสมีตั้งแต่ทรงกลมจนถึงรูปรี เมื่อย้อมด้วยสี Wright's Giemsa (WG) หรือ Wright (W) จะติดสีน้ำเงินเข้มหรือสีม่วง ไซโตพลาสซึมมีลักษณะการติดสีที่ค่อนข้างสม่ำเสมอแต่ย้อมติดสีจางกว่านิวเคลียสเป็นสีเทาหรือสีม่วงอ่อน สามารถพบแวคิวโอลในไซโตพลาสซึม (cytoplasmic vacuole) ได้เป็นปกติซึ่งเป็นแวคิวโอลชนิดไม่ใส พบความแตกต่างของขนาดเม็ดเลือดแดง (anisocytosis) และการติดสี (polychromasia) ได้เล็กน้อย และไม่พบพยาธิในเม็ดในทุกตัวอย่างที่ทำการศึกษา

เซลล์เม็ดเลือดแดงอ่อน (Immature erythrocyte/Reticulocyte) (รูปที่ 4.2 ก) เป็นเซลล์ชนิดที่พบได้บ้างเป็นปกติในแผ่นฟิล์มเลือดของปลากระเบนราหู และสามารถพบเซลล์เม็ดเลือดแดงอ่อนระยะอื่นๆ ได้เช่นกัน เช่น อิริโทรบลาส (Erythroblasts) (รูปที่ 4.2 ข) หรือโปรอิริโทรไซต์ (Proerythrocytes) แต่พบในปริมาณที่น้อยกว่าซึ่งเซลล์เม็ดเลือดแดงอ่อนในปลากระเบนราหูจะมี

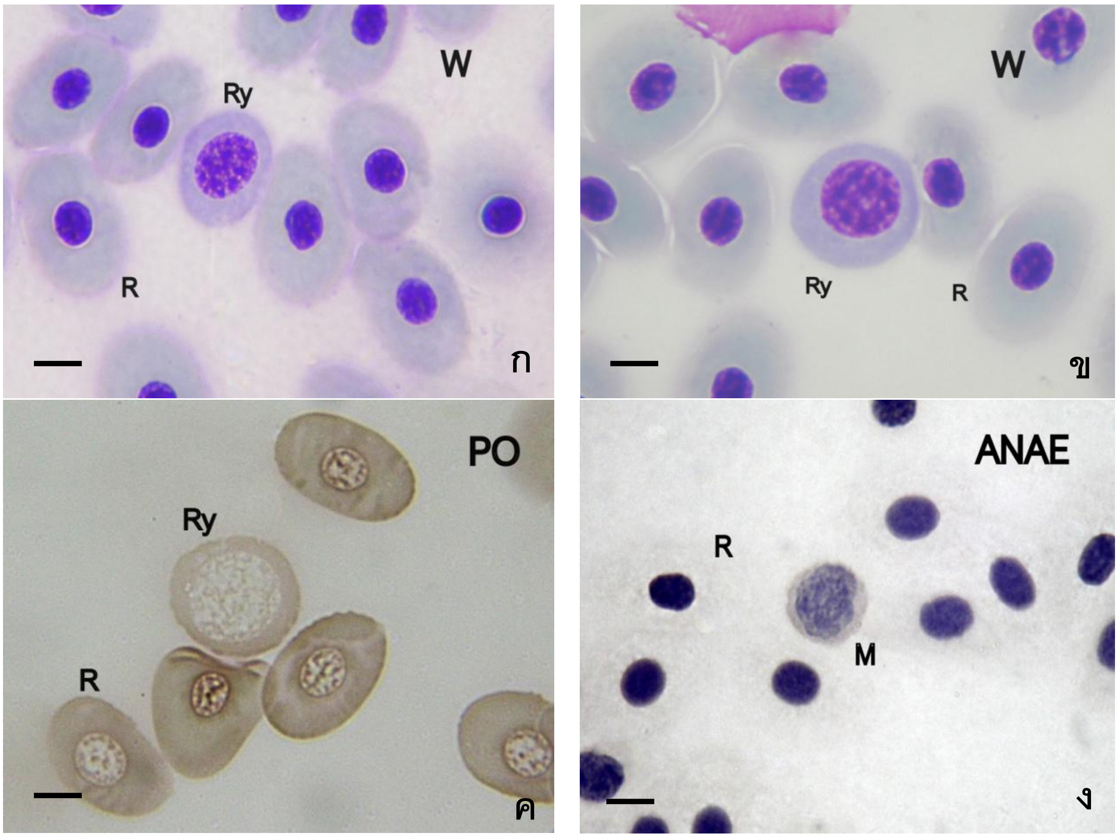
ขนาดใหญ่กว่าเม็ดเลือดแดงที่เจริญเต็มที่ เซลล์รูปร่างกลม นิวเคลียสกลมวางตัวอยู่กลางเซลล์มีขนาดใหญ่กว่านิวเคลียสเม็ดเลือดแดงที่เจริญเต็มที่ประมาณ 2-3 เท่า ติดสีน้ำเงินหรือม่วงเข้มของโครมาตินเป็นร่างแห มีปริมาณไซโตพลาสซึมน้อยและติดสี basophilic ที่เข้มกว่าเม็ดเลือดแดงที่เจริญเต็มที่ คือติดสีฟ้าหรือสีฟ้าอมเทาแตกต่างกันไปตามระยะการเจริญของเซลล์

เม็ดเลือดแดงให้ปฏิกิริยาการติดสีทางไซโตเคมี โดยให้ผลบวกต่อสี PO (Peroxidase) คือพบการติดสีน้ำตาลแดงสม่ำเสมอของ PO ในไซโตพลาสซึม ทั้งในเม็ดเลือดแดงที่เจริญเต็มที่และเม็ดเลือดแดงอ่อน (รูปที่ 4.2 ค) แต่ให้ผลลบต่อการย้อมด้วยสี SBB (Sudan black B), AcP (Acid phosphatase), ALP (Alkaline phosphatase), ANAE (Alpha-napthyl-butylate esterase) (รูปที่ 4.2 ง) PAS (Periodic acid –Schiff) และ TB (Toluidine blue)

การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด เม็ดเลือดแดงมีรูปร่างแบนรี ผิวเซลล์ค่อนข้างเรียบ มองเห็นปุ่มนูนของนิวเคลียสบริเวณกลางเซลล์ได้ชัดเจน พบรูบนผิวของไซโตพลาสซึมกระจายทั่วเซลล์ได้เป็นปกติ (รูปที่ 4.3 ก และ ข)

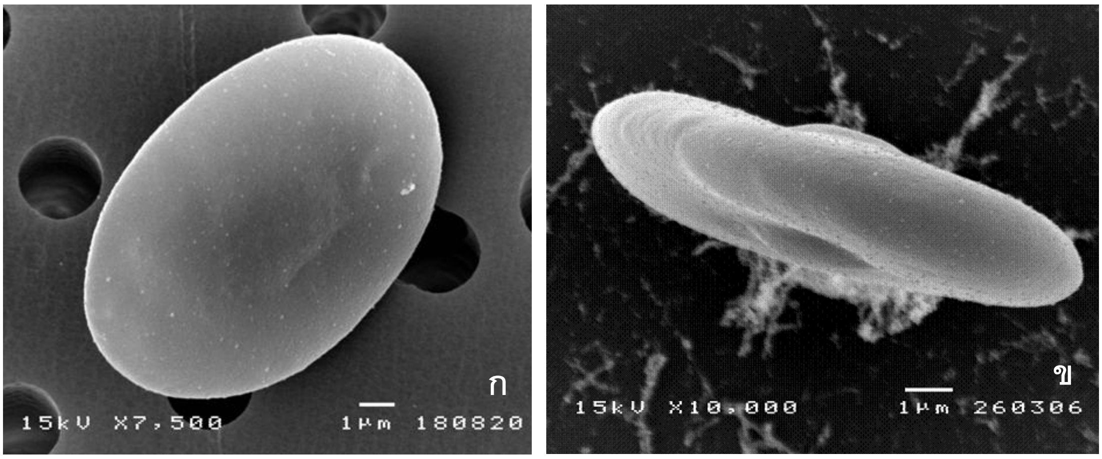
การวัดขนาดของเม็ดเลือดแดงภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่าเม็ดเลือดแดงของปลากระเบนราหูมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางกว้าง x ยาว โดยเฉลี่ยของทั้ง 2 เพศ (n=40) เท่ากับ 16.12±1.00x24.62±1.24 ไมครอน (mean±SD) โดยขนาดของเม็ดเลือดแดงในปลากระเบนเพศผู้ และเพศเมีย (n=20) มีค่าเท่ากับ 16.08±1.08x24.22±1.39 ไมครอน และ 16.16±0.93x25.03±0.92 ไมครอน ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน เม็ดเลือดแดงมีรูปร่างทรงรี นิวเคลียสอัดแน่นไปด้วยฮีโมโกลบิน (dense hemoglobin) ติดสีเข้มของอิเล็กตรอนเนียนเรียบ (homogeneous electron dense) มักพบไมโตคอนเดรีย (Mitochondria) กระจายอยู่บริเวณไซโตพลาสซึมและพบจุดสีเข้มติดสีไม่เนียนเรียบของ basophilic inclusion ในไซโตพลาสซึม (รูปที่ 4.4)

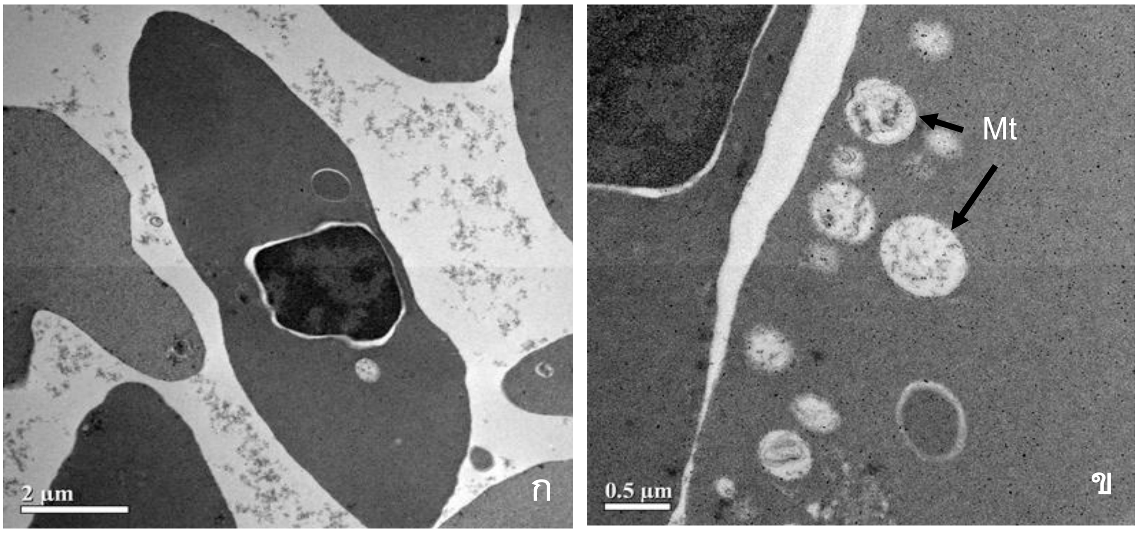


รูปที่ 4.2 แสดงเม็ดเลือดแดงในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ก) เม็ดเลือดแดงที่เจริญเต็มที่ (R) และเม็ดเลือดแดงเซลล์อ่อน (Immature erythrocyte) (Ry), W ข) เม็ดเลือดแดงเซลล์อ่อนชนิดอิริโทรบลาส (Ry), W ค) ปฏิกิริยาไซโตเคมีของเซลล์เม็ดเลือดแดงให้ผลบวกต่อสี PO ทั้งในเม็ดเลือดแดงที่เจริญเต็มที่และเม็ดเลือดแดงเซลล์อ่อน (Ry) ง) ผลลบต่อสี ANAE.

M = Monocyte, Bar= 5 μm



รูปที่ 4.3 ก), ข) แสดงเม็ดเลือดแดงในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด เซลล์รูปร่างแบนรี ผิวเซลล์ค่อนข้างเรียบ มองเห็นปุ่มนูนของนิวเคลียสบริเวณกลางเซลล์ได้ชัดเจน พบรูบนผิวไซโตพลาสซึมกระจายทั่วเซลล์ได้เป็นปกติ



รูปที่ 4.4 แสดงเม็ดเลือดแดงในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน ก) เม็ดเลือดแดงที่นิวเคลียสอัดแน่นไปด้วยฮีโมโกลบินที่ติดสีเข้มของอิเล็กตรอนเนียนเรียบ ข) ไมโตคอนเดรีย (Mt) กระจายอยู่บริเวณไซโตพลาสซึม

2. ทรอมโบไซต์หรือเกล็ดเลือด (Thrombocyte)

ทรอมโบไซต์ในปลากระเบนราหูมีลักษณะคล้ายกับในปลากระดูกอ่อนทั่วไป คือ มีรูปร่างหลากหลาย เช่น กระสวย (spindle-shaped) ทรงกลม (round) หรือรี (elliptical) เป็นต้น เมื่อย้อมด้วยสี Wright's Giemsa นิวเคลียสของทรอมโบไซต์มีลักษณะกลมย้อมติดสีน้ำเงินอมม่วงเข้มคล้ายกับเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์แต่ขนาดเล็กกว่าและติดสีเข้มกว่าเนื่องจากโครมาตินที่อัดแน่นอยู่ภายในนิวเคลียส ส่วนไซโตพลาสซึมติดสีได้ตั้งแต่สีเทาหรือฟ้าจางๆ จนถึงไม่ติดสี ในขณะที่ไซโตพลาสซึมของลิมโฟไซต์จะติดสีม่วงอ่อนหรือฟ้าเข้มกว่าเล็กน้อย มีอัตราส่วนระหว่างนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมสูง (N:C ratio) คือประมาณ 8:2 และมักพบการเกาะกลุ่มกันของทรอมโบไซต์ (รูปที่ 4.5 ก) เมื่อย้อมด้วยสี Wright เซลล์ทรอมโบไซต์จะติดสีออกม่วงแดงมากกกว่าทำให้มองเห็นนิวเคลียสของทรอมโบไซต์ติดสีอมม่วงและไซโตพลาสซึมติดสีม่วงอมแดง (รูปที่ 4.5 ข) ทรอมโบไซต์ชนิดกระสวยและรีสามารถแยกจากเซลล์อื่นได้ง่าย แต่แบบกลมอาจแยกได้ยากจากลิมโฟไซต์ขนาดเล็ก ทั้งนี้ต้องพิจารณาการติดสีของนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมเป็นหลัก (รูปที่ 4.5 ก)

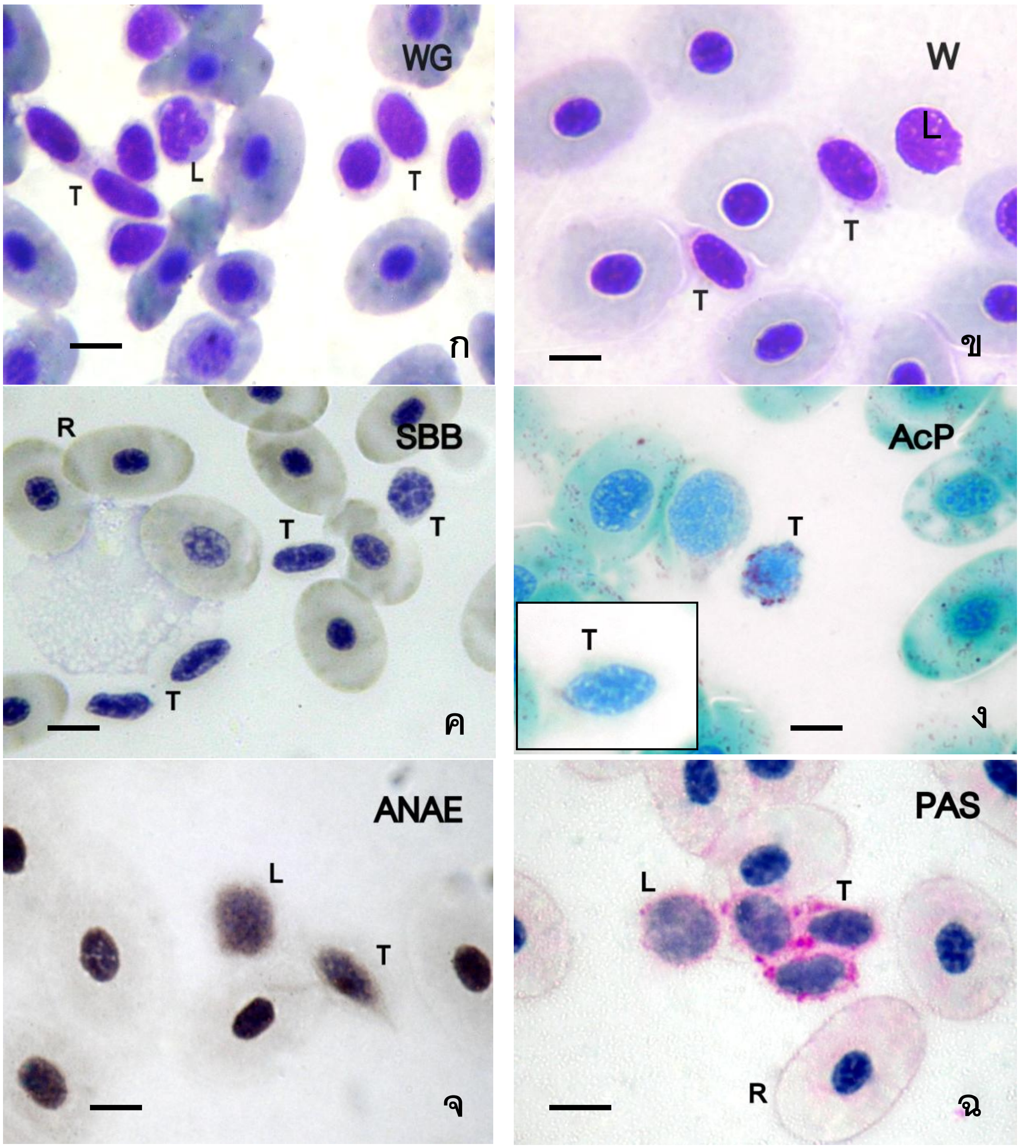
การวัดขนาดของทรอมโบไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางกว้าง x ยาว โดยเฉลี่ยของทั้ง 2 เพศ (n=20) เท่ากับ 3.40±0.73x7.43±0.61 ไมครอน (mean±SD) โดยขนาดของทรอมโบไซต์ในปลากระเบนเพศผู้และเพศเมีย (n=10) มีค่าเท่ากับ 3.43±0.70x7.53±0.60 ไมครอน และ 3.37±0.63x7.32±0.63 ไมครอน ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ทรอมโบไซต์ให้ปฏิกิริยาการติดสีทางไซโตเคมี คือ ให้ผลบวกต่อสี AcP, ANAE และ PAS โดยมีลักษณะการติดลีของแต่ละเอนไซม์ดังนี้

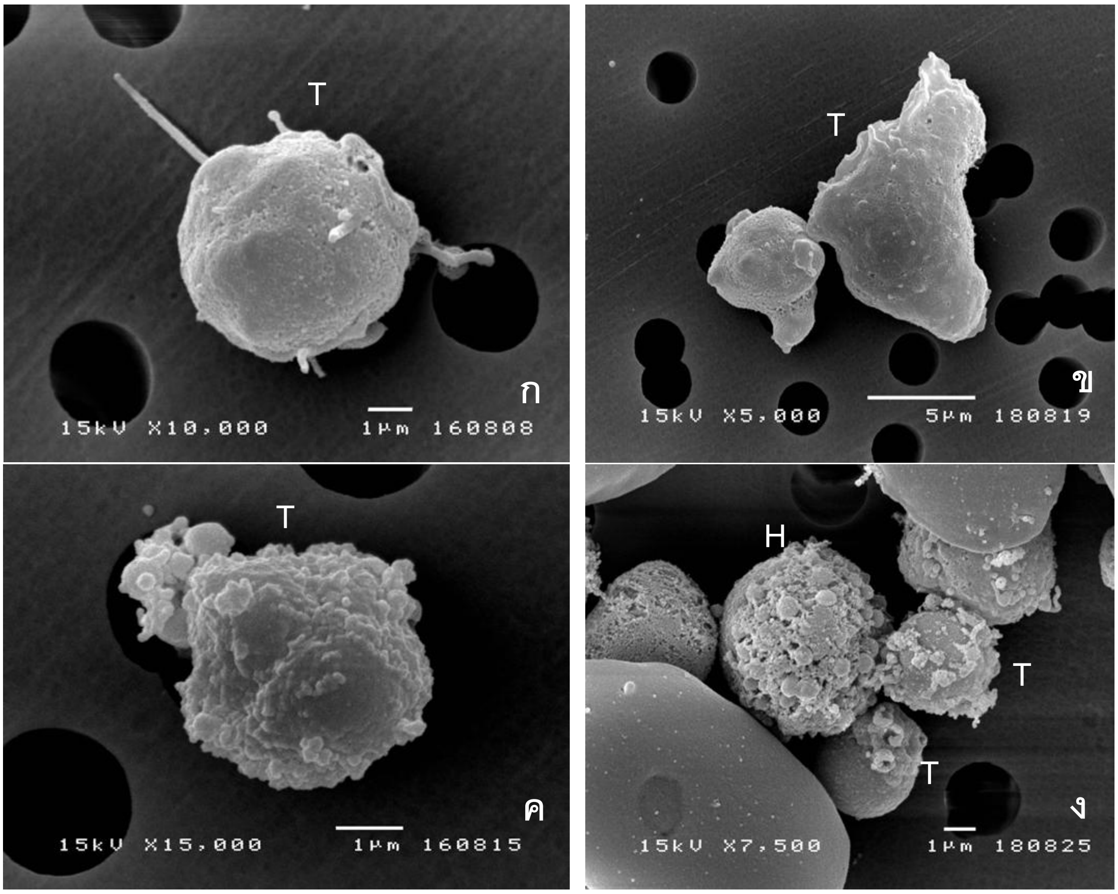
- ย้อมติดสี AcP คือ ติดสีน้ำตาลแดงเฉพาะเซลล์ที่มีแกรนูลภายใน และเป็นการติดสีแบบไม่สม่ำเสมอ (รูปที่ 4.5 ง)
- ย้อมติดสี ANAE คือ ไซโตพลาสซึมติดสีน้ำตาล และพบจุดสีน้ำตาลเข้มกระจายอยู่ภายในและบริเวณรอบๆ นิวเคลียส (รูปที่ 4.5 จ)
- ย้อมติดสี PAS คือ ไซโตพลาสซึมติดสีชมพูเข้ม และพบจุดสีชมพูบานเย็นกระจายอยู่ทั่วไซโตพลาสซึม (รูปที่ 4.5 ฉ)
- ทรอมโบไซต์ให้ผลลบต่อการย้อมด้วยสี PO, SBB (รูปที่ 4.5 ค), ALP และ TB

การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด ทรอมโบไซต์มีขนาดเล็กกว่าเม็ดเลือดแดงประมาณ 2-3 เท่า มักอยู่รวมกันเป็นร่างแหหรืออยู่ติดกับเซลล์อื่นๆ อาทิเช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว ส่วนใหญ่มักมีรูปร่างแบบกระสวย มีส่วนของไซโตพลาสซึมยื่นออกมาคล้ายขาหรือเท้าเทียม (pseudopodia) แสดงถึงภาวะ active ของทรอมโบไซต์ และมักปกคลุมด้วยร่างแหไฟบริน ไม่พบช่องว่างภายในเซลล์ (cytoplasmic vacuole) (รูปที่ 4.6)

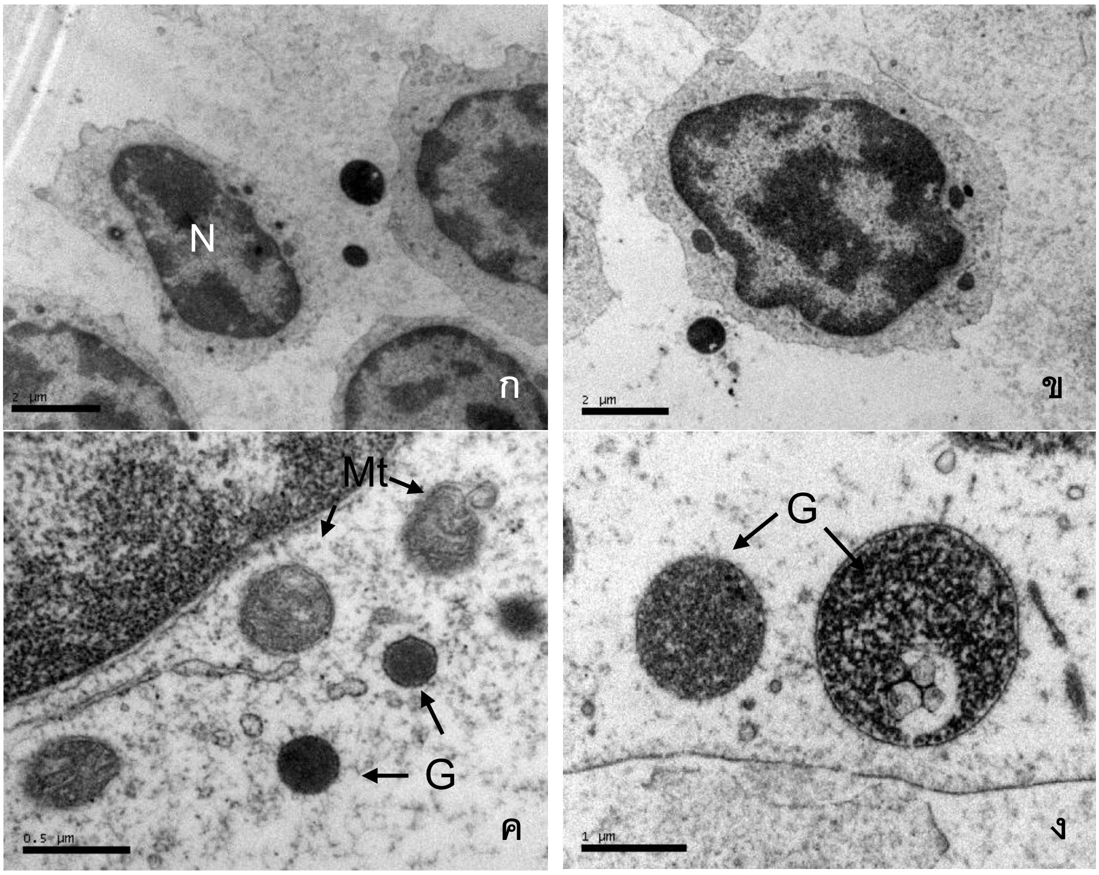
การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน ทรอมโบไซต์มีนิวเคลียสรูปร่างกลมหรือรี ภายในนิวเคลียสพบการติดสีเข้มของ heterochromatin สัดส่วนของไซโตพลาสซึมน้อยเมื่อเทียบกับขนาดนิวเคลียสและมีลักษณะคล้ายติ่งหรือเท้าเทียมยื่นออกไป พบไมโตคอนเดรียและไมโครทูบูลได้บ้าง พบแกรนูลเป็นเม็ดกลมขนาดเล็กติดสีต่างกันกระจายอยู่ทั่วไป (รูปที่ 4.7)



รูปที่ 4.5 แสดงทรอมโบไซต์ในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ก) การเกาะกลุ่มกันของทรอมโบไซต์ทั้งชนิดกระสวยและชนิดกลม โดยทรอมโบไซต์ชนิดกลม (T) จะมีขนาดใกล้เคียงกับลิมโฟไซต์ (L) แต่นิวเคลียสติดสีเข้มกว่าและไซโตพลาสซึมติดสีจางกว่า, WG ข) เปรียบเทียบการติดสีนิวเคลียสของทรอมโบไซต์และลิมโฟไซต์, W ค) ปฏิกิริยาไซโตเคมีในเซลล์ให้ผลลบต่อสี SBB ง) ปฏิกิริยาไซโตเคมีในเซลล์ให้ทั้งผลบวก (ภาพใหญ่) และผลลบ (ภาพเล็ก) ต่อสี AcP จ) ผลบวกต่อสี ANAE ติดสีน้ำตาลเข้มทั่วไซโตพลาสซึม ฉ) ผลบวกต่อสี PAS ติดสีชมพูบานเย็นกระจายทั่วไซโตพลาสซึม. R = Erythrocyte, Bar = 5 µm



รูปที่ 4.6 แสดงทรอมโบไซต์ในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราด ก) ทรอมโบไซต์ ที่มีเท้าเทียม (pseudopodia) ยื่นออกมาจากผิวเซลล์ ข), ค) รูปร่างที่หลากหลายของทรอมโบไซต์ ง) ทรอมโบไซต์ (T) ที่อยู่รวมกันเป็นร่างแหติดกับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเฮเทอโรฟิล (H)



รูปที่ 4.7 แสดงทรอมโบไซต์ในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน ก) กลุ่มของทรอมโบไซต์ที่มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ (N) ติดสีอิเล็กตรอนไม่สม่ำเสมอ ข) ทรอมโบไซต์ที่นิวเคลียสมีลักษณะเป็นพู พบแกรนูลขนาดเล็กติดสีเข้มทึบแสงภายในไซโตพลาสซึมและพบส่วนยื่นออกจากขอบเซลล์คล้ายเท้าเทียม ค) แกรนูล (G) และไมโตคอนเดรีย (Mt) ภายในไซโตพลาสซึม ง) ลักษณะแกรนูล (G) ที่กำลังขยายสูงขึ้น

3. เม็ดเลือดขาว (Leukocyte)

เม็ดเลือดขาวที่พบในปลากระเบนราหู สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดหลัก ตามลักษณะการติดสี รูปร่าง และแกรนูล คือ เม็ดเลือดขาวชนิดที่ไม่มีแกรนูล (agranulocyte) ได้แก่ ลิมโฟไซต์ (Lymphocyte) และโมโนไซต์ (Monocyte) และเม็ดเลือดขาวชนิดที่มีแกรนูล (granulocyte) คือ เฮเทอโรฟิล (Heterophil) ซึ่งเม็ดเลือดขาวชนิดที่พบได้มากที่สุดคือ ลิมโฟไซต์ รองลงมาคือ เฮเทอโรฟิล และโมโนไซต์ ตามลำดับ โดยในปลากระเบนเพศผู้มีจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด ($11.52\pm3.90\times10^3$µl) สูงกว่าในปลากระเบนเพศเมีย ($9.10\pm2.75\times10^3$µl) (n=27) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 4.3)

การวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด (n=20) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน มีค่าดังตารางที่ 4.1 โดยเมื่อเปรียบเทียบขนาดเม็ดเลือดขาวทุกชนิดระหว่างปลากระเบนเพศผู้และเพศเมีย พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

3.1 ลิมโฟไซต์ (Lymphocyte)

ลิมโฟไซต์เป็นเม็ดเลือดขาวที่พบในปริมาณมากที่สุด คือประมาณร้อยละ 66.93±4.26 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด มีขนาดตั้งแต่ 4-14 ไมครอน โดยประมาณ ทั้งนี้อาจสามารถแบ่งลิมโฟไซต์ในปลากระเบนราหูตามขนาดที่พบ ได้เป็น 3 ชนิดหลัก คือ เล็ก กลาง และใหญ่ ตามอายุของเซลล์ ขนาดของลิมโฟไซต์ทั้ง 3 ชนิด โดยการวัดขนาดภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ยของทั้ง 2 เพศ (n=20 เท่ากับ 5.55±1.74 ไมครอน 11.28±1.04 ไมครอน และ13.71±0.64 ไมครอน ตามลำดับ (mean±SD) โดยในปลากระเบนเพศผู้ (n=10) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลิมโฟไซต์ชนิดเล็ก กลาง และใหญ่มีค่าเท่ากับ 5.32±1.40 ไมครอน 11.39±1.19 ไมครอน และ 13.79±0.60 ไมครอน ตามลำดับ ส่วนในปลากระเบนเพศเมียมีขนาด 5.78±1.69 ไมครอน 11.15±0.90 ไมครอน และ 13.63±0.79 ไมครอน ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

เซลล์ลิมโฟไซต์ที่พบส่วนมากมักเป็นเซลล์ขนาดเล็กซึ่งเป็นลิมโฟไซต์ชนิดโตเต็มวัย (mature) (รูปที่ 4.8 ก) หรือลิมโฟไซต์ขนาดกลางซึ่งเป็นเซลล์กึ่งโตเต็มวัย (maturing) ในขณะที่ลิมโฟไซต์ขนาดใหญ่หรือลิมโฟไซต์เซลล์อ่อน (Lymphoblast) พบได้ค่อนข้างน้อย (รูปที่ 4.8 ง)

เซลล์ลิมโฟไซต์มีรูปร่างกลม นิวเคลียสกลมใหญ่เกือบเต็มเซลล์ชิดไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ และมักมองไม่เห็นไซโตพลาสซึม (รูปที่ 4.8 ข) แต่ทั้งนี้อาจพบแกรนูล (Azurophilic granule) ได้บ้างในบางเซลล์ แม้จะเป็นเม็ดเลือดขาวชนิดไม่มีแกรนูล (รูปที่ 4.8 จ) นิวเคลียสของลิมโฟไซต์ติดสีม่วงหรือน้ำเงินเข้มคล้ายกลับทรอมโบไซต์ แต่ติดสีจางกว่าเล็กน้อย ไซโตพลาสซึมติดสีเทาอมฟ้า และมีอัตราส่วนระหว่างนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมสูง (N:C ratio) คือ ประมาณ

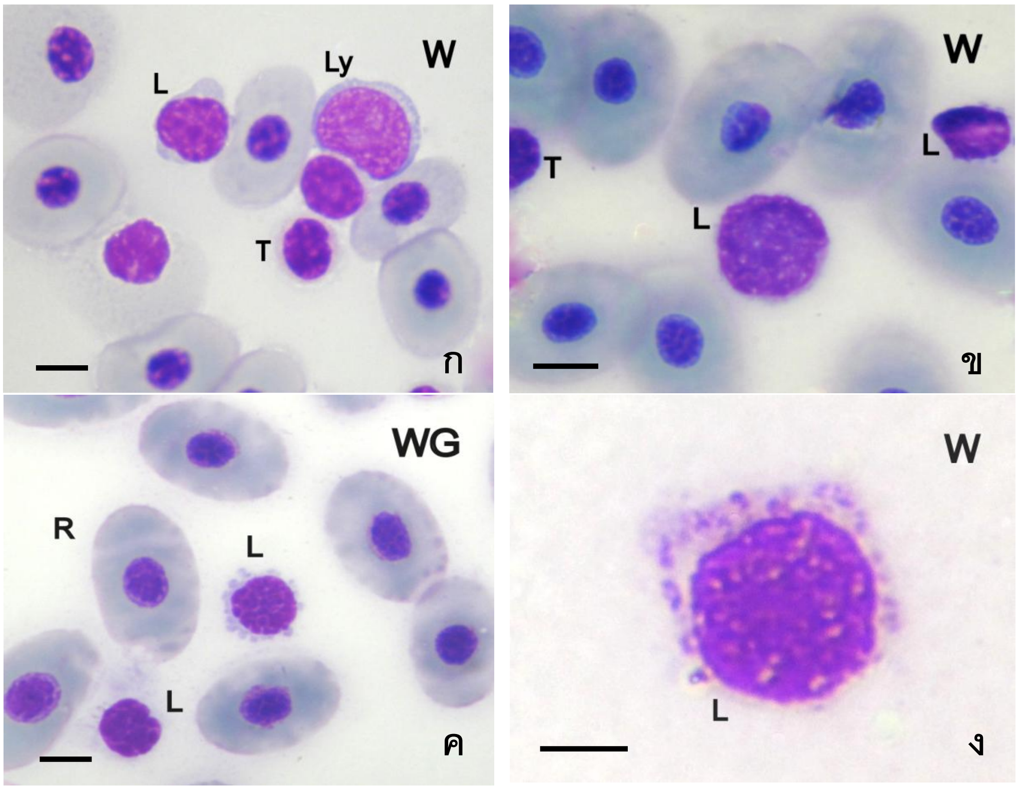
8:2 ในเซลล์วัยอ่อน และ 9:1 ในเซลล์ที่เจริญเต็มที่ แม้เซลล์ลิมโฟไซต์จะมีรูปร่างกลมแต่ในการเตรียมแผ่นฟิล์มเลือดมักเกิดการนูนหรือโป่งออกด้านใดด้านหนึ่งของไซโตพลาสซึม หรือที่เรียกว่า cytoplasmic projection (blebbing) (รูปที่ 4.8 ค)

ลิมโฟไซต์ให้ปฏิกิริยาการติดสีทางไซโตเคมี โดยให้ผลบวกต่อสี AcP, ANAE และ PAS โดยมีลักษณะการติดสีของแต่ละเอนไซม์ดังนี้

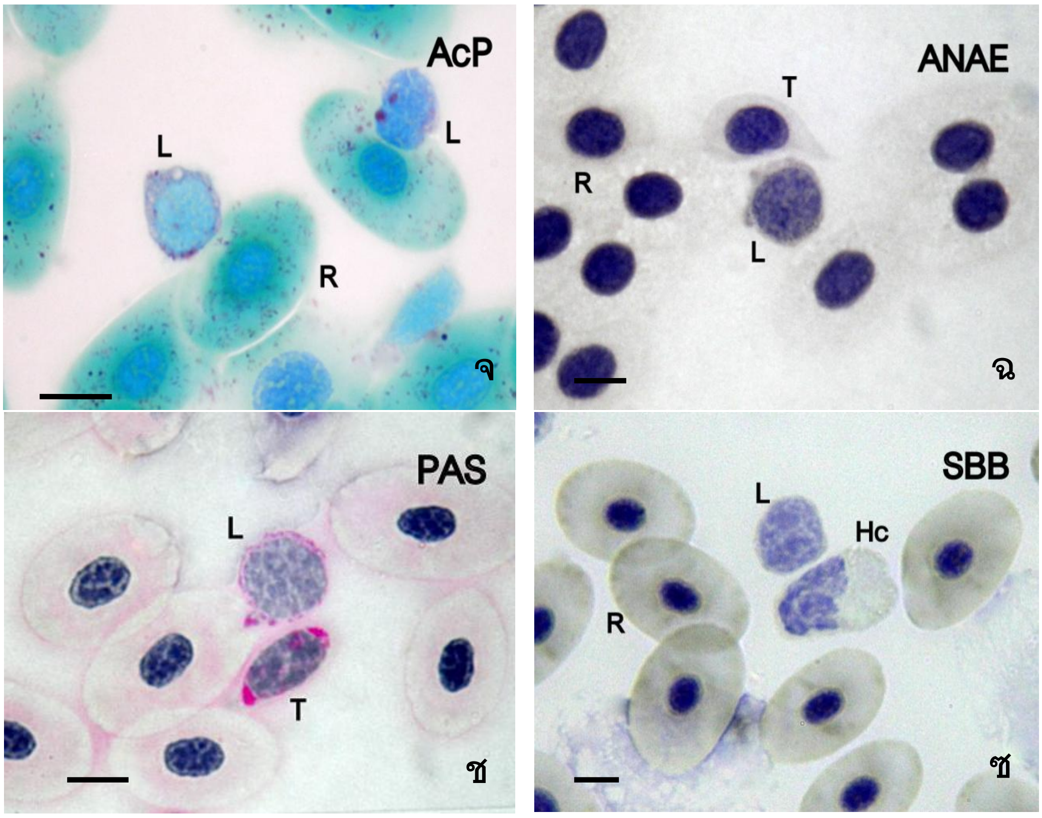
- ย้อมติดสี AcP คือ ติดสีม่วงแดงเฉพาะที่แกรนูล และพบมากบริเวณขอบของเซลล์ (รูปที่ 4.8 ฉ)
- ย้อมติดสี ANAE คือ ติดสีน้ำตาลอ่อนในไซโตพลาสซึม (รูปที่4.8 ช)
- ย้อมติดสี PAS คือ ไซโตพลาสซึมติดสีชมพูบานเย็นอย่างอ่อน (weak stain) และติดสีไม่สม่ำเสมอ (รูปที่4.8 ซ)
- ลิมโฟไซต์ให้ผลลบต่อการย้อมด้วยสี PO, SBB (รูปที่ 4.8 ซ), ALP และ TB

การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด เซลล์ลิมโฟไซต์ของปลากระเบนราหูมีรูปร่างกลม ขนาดประมาณครึ่งหนึ่งของเม็ดเลือดแดง ผิวเซลล์มีส่วนยื่นของไซโตพลาสซึมคล้ายไมโครวิลไลชนิดสั้น (short-microvilli) อยู่โดยรอบ (รูปที่ 4.9)

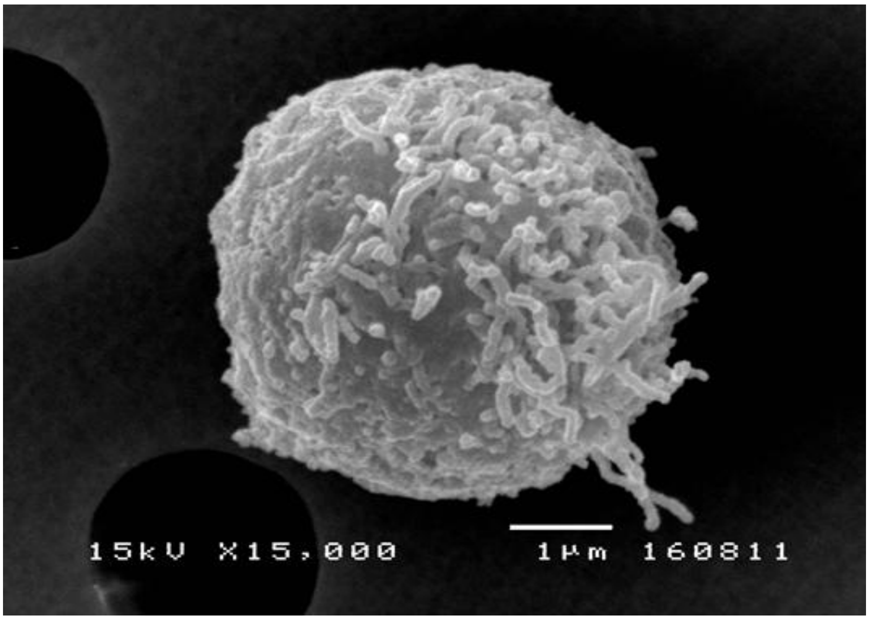
การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน ลิมโฟไซต์มีลักษณะเป็นเซลล์รูปร่างกลม แทบจะมองไม่เห็นส่วนของไซโตพลาสซึม นิวเคลียสกลมติดสีเข้มขนาดใหญ่ เบียดไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ พบไมโตคอนเดรียได้บ้างเล็กน้อย และพบไรโบโซมจำนวนมากในไซโตพลาสซึม (รูปที่ 4.10)



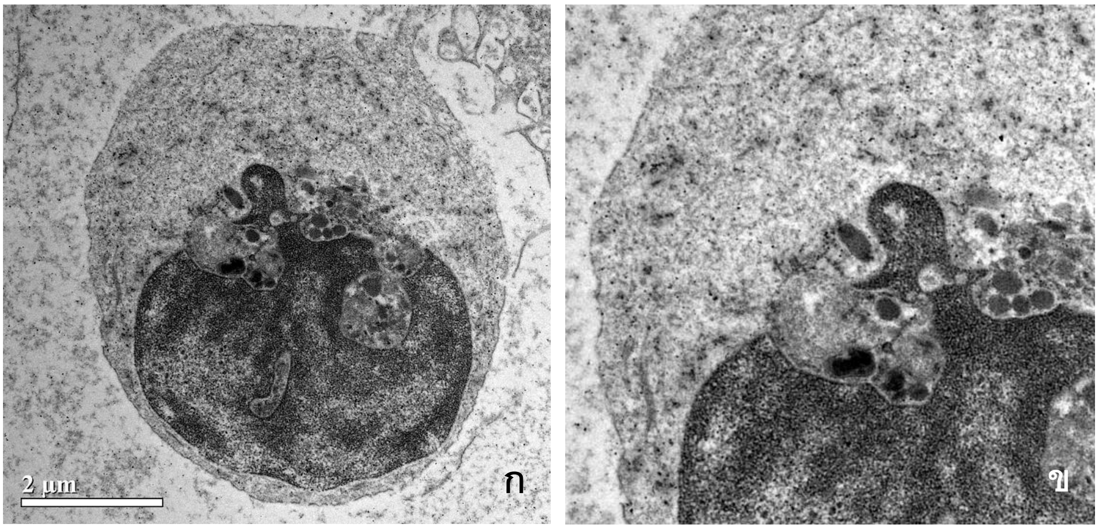
รูปที่ 4.8 แสดงลิมโฟไซต์ในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ก) เซลล์ลิมโฟไซต์ระยะต่างๆ เซลล์โตเต็มวัย (L) และเซลล์วัยอ่อน (Ly) ที่มีขนาดใหญ่, W ข) ลิมโฟไซต์ขนาดใหญ่ (L) ที่แทบมองไม่เห็นไซโตพลาสซึม เปรียบเทียบกับลิมโฟไซต์ขนาดเล็กทางด้านขวาที่มีขนาดใกล้เคียงกับทรอมโบไซต์ (T) ที่นิวเคลียสติดสีเข้มกว่า, W ค) เซลล์ลิมโฟไซต์ (L) ที่พบการนูนหรือโป่งออกของไซโตพลาสซึม (cytoplasmic blebbing), WG ง) ลิมโฟไซต์ (L) ที่พบอะซูโรฟิวลิกแกรนูล, W. R= Erythrocyte, T=Thrombocyte, Bar= 5 µm



รูปที่ 4.8 แสดงลิมโฟไซต์ปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (ต่อ) จ) ปฏิกิริยาไซโตเคมีของลิมโฟไซต์ให้ผลบวกต่อสี AcP ติดสีม่วงแดงในไซโตพลาสซึม ฉ) ผลบวกต่อสี ANAE ติดสีน้ำตาลจางในไซโตพลาสซึม ช) ผลบวกต่อสี PAS ติดสีชมพูอ่อนๆทั่วไซโตพลาสซึม ซ) ผลลบต่อสี SBB. R= Erythrocyte, T=Thrombocyte, Hc= Neutrophilic-heterophil, Bar= 5 μm



รูปที่ 4.9 แสดงลิมโฟไซต์ปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด เซลล์มีรูปร่างกลม ขนาดประมาณครึ่งหนึ่งของเม็ดเลือดแดง ผิวเซลล์มีส่วนยื่นของไซโตพลาสซึมคล้ายไมโครวิลไลชนิดสั้น (short-microvilli) อยู่โดยรอบ



รูปที่ 4.10 แสดงลิมโฟไซต์ปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน ก) นิวเคลียสกลมติดสีเข้มขนาดใหญ่ เบียดไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ข) ไมโตคอนเดรีย (Mt) ตามขอบของนิวเคลียส และไรโบโซมจำนวนมากในไซโตพลาสซึม

3.2 เฮเทอโรฟิล (Heterophil)

เฮเทอโรฟิลในปลากระเบนราหูเป็นเม็ดเลือดขาวชนิดมีแกรนูล (granulocyte) ที่มีลักษณะการติดสีและรูปร่างแกรนูลในไซโตพลาสซึมที่แตกต่างกัน โดยหากทำการจำแนกตามลักษณะการติดสีของแกรนูล อาจแบ่งเฮเทอโรฟิลออกได้เป็น 2 ชนิด คือ เฮเทอโรฟิลที่แกรนูลย้อมติดสี eosine (Eosinophilic-heterophil) และเฮเทอโรฟิลที่แกรนูลติดสีเป็นกลาง (Neutrophilic-heterophil) ซึ่งอิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลยังสามารถแบ่งได้เป็นอีก 2 ชนิดย่อย คือ อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวย (Elongated granule eosinophilic-heterophil) และ อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลกลม (Rounded granule eosinophilic-heterophil)

3.2.1 เฮเทอโรฟิลที่แกรนูลย้อมติดสี Eosine (Eosinophilic-heterophil)

อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลเป็นเม็ดเลือดขาวที่พบมากรองจากลิมโฟไซต์ เซลล์มีรูปร่างกลม มีขนาดใหญ่กว่าลิมโฟไซต์ ไซโตพลาสซึมย้อมไม่ติดสี แต่แกรนูลย้อมติดสีชมพูอมส้ม (Eosinophilic) ทั้งนี้สามารถแบ่งได้เป็นอีก 2 ชนิดย่อยตามรูปร่างของแกรนูล คือ

ก. อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวย (Elongated granule eosinophilic-heterophil)

เฮเทอโรฟิลชนิดนี้ เป็นเม็ดเลือดขาวที่พบมากรองลงมาจากลิมโฟไซต์ คือประมาณร้อยละ 15.78±2.69 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด มีขนาดค่อนข้างหลากหลายตามระยะการเจริญของเซลล์ โดยการวัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ยของทั้ง 2 เพศ (n=20) เท่ากับ 17.23±2.53 ไมครอน (mean±SD) โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในปลากระเบนเพศผู้และเพศเมีย (n=10) มีค่าเท่ากับ 17.17±2.85 ไมครอน และ 17.28±2.21 ไมครอน ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

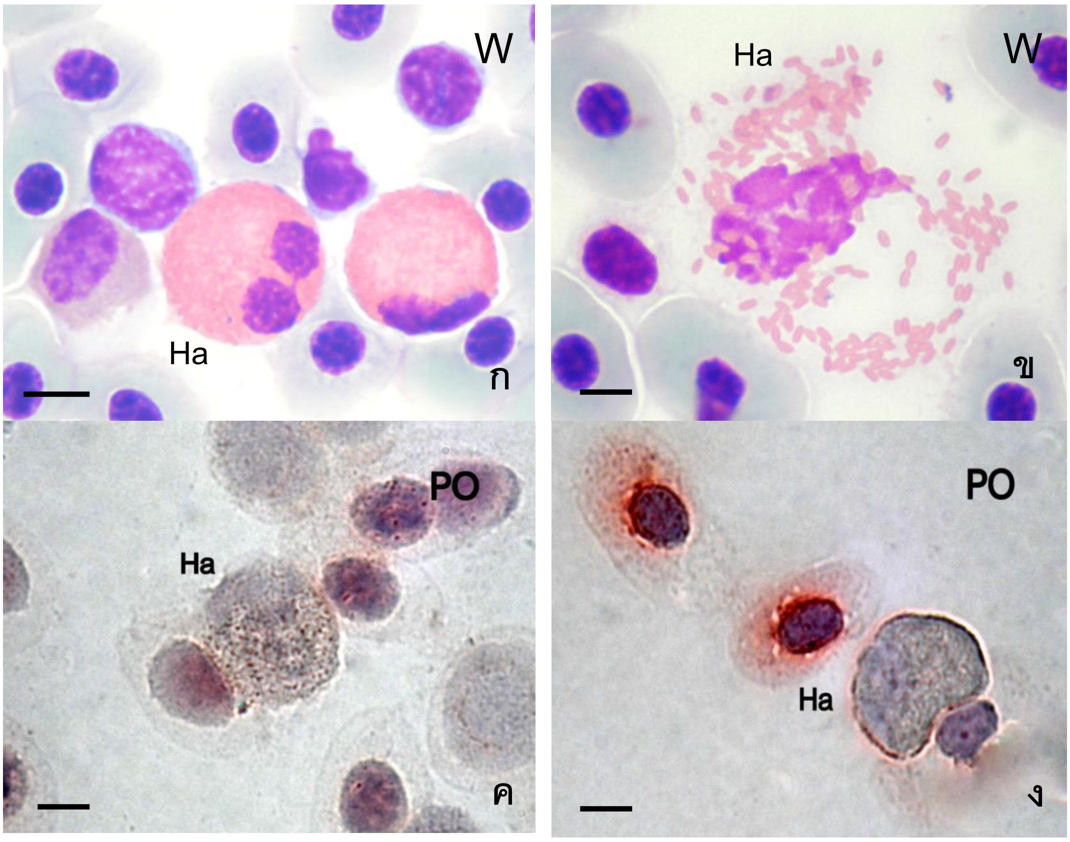
เซลล์อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวยมักเป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีรูปร่างกลม ขนาดค่อนข้างใหญ่ ไซโตพลาสซึมไม่ติดสี ภายในประกอบด้วยแกรนูลอัดแน่น ย้อมติดสีชมพูอมส้มเมื่อย้อมด้วยสี Romanowsky stain รูปร่างของแกรนูลเป็นรูปกระสวยหรือเป็นแท่ง (elongated) ซึ่งทำให้แยกออกจากแกรนูลโลไซต์ชนิดอื่นได้ ซึ่งปริมาณแกรนูลที่มากอาจทำของเฮเทอโรฟิลชนิดนี้ทำให้บางครั้งบดบังส่วนของนิวเคลียสและมองเห็นรูปร่างนิวเคลียสได้ไม่ชัดเจน โดยนิวเคลียสส่วนใหญ่ที่พบมีรูปร่างกลมหรือรี โดยมักมองเห็นเป็นนิวเคลียสกลมเล็กจำนวน 1-3 นิวเคลียส หรือเป็นรูปรี เบียดอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ส่วนนิวเคลียสที่เป็นพูจะพบได้น้อยมาก นิวเคลียสย้อมติดสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้ม ภายในพบกลุ่มของโครมาตินรวมตัวกันแบบหยาบๆ (รูปที่ 4.11 ก)

อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวยให้ปฏิกิริยาการติดสีทางไซโตเคมี โดยให้ผลบวกต่อสี PO, SBB, AcP, ALP, ANAE และ PAS โดยมีลักษณะการติดสีของแต่ละเอนไซม์ดังนี้

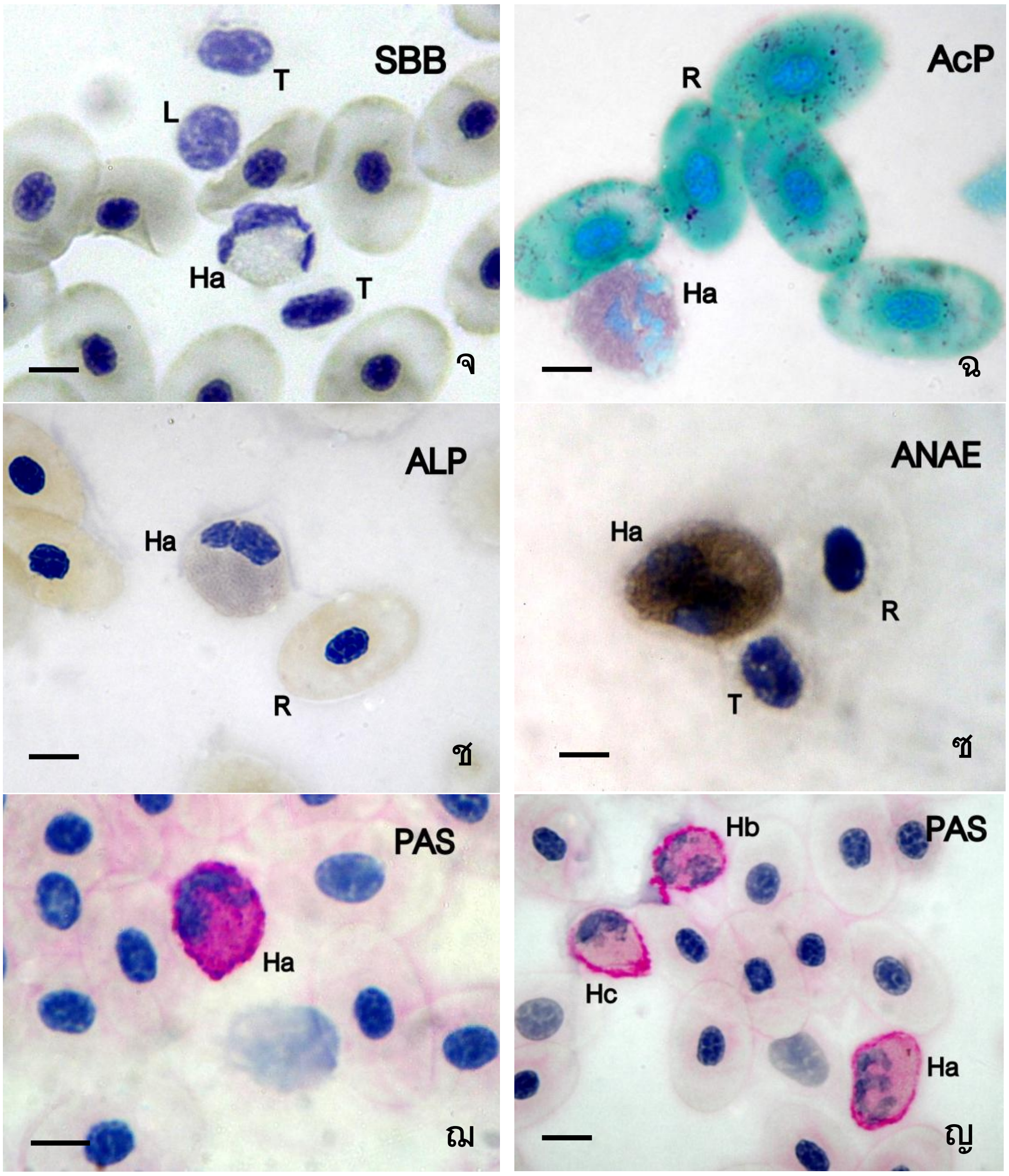
- ย้อมติดสี PO คือ แกรนูลติดสีหลายระดับตั้งแต่สีน้ำตาลแดงเข้ม สีแดงอ่อน หรือบางเซลล์ไม่ติดสีเลย (รูปที่ 4.11 ค และ ง)
- ย้อมติดสี SBB คือ ติดสีดำจางระหว่างแกรนูล (รูปที่ 4.11 จ)
- ย้อมติดสี AcP คือ ติดสีม่วงแดงอ่อนๆ (weak stain) ระหว่างแกรนูลเพียงบางเซลล์และเป็นการติดสีแบบไม่สม่ำเสมอ ซึ่งเซลล์ที่ติดสีนั้นนิวเคลียสย้อมติดสีน้ำเงิน (รูปที่ 4.11 ฉ)
- ย้อมติดสี ALP คือ ติดสีน้ำตาลอ่อน (weak stain) ระหว่างแกรนูลเพียงบางเซลล์และเป็นการติดสีแบบไม่สม่ำเสมอ (รูปที่ 4.11 ช)
- ย้อมติดสี ANAE คือ ติดสีน้ำตาลเข้มระหว่างแกรนูล (รูปที่ 4.11 ซ)
- ย้อมติดสี PAS คือ บางเซลล์ติดสีชมพูเข้มระหว่างแกรนูล (รูปที่ 4.11 ฌ) ขณะที่บางเซลล์ติดสีชมพูเข้มเฉพาะบริเวณขอบเซลล์ แต่ติดสีชมพูจางระหว่างแกรนูล (รูปที่ 4.11 ญ)
- อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวยให้ผลลบต่อการย้อมด้วยสี TB

การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวยเซลล์จะมีรูปร่างกลม ขนาดเล็กกว่าเม็ดเลือดแดงเล็กน้อย ภายในไซโตพลาสซึมมีแกรนูลรูปกระสวยที่มีขนาดหลากหลาย ปริมาณมากนูนออกมาจากผิวเซลล์ (รูปที่ 4.12)

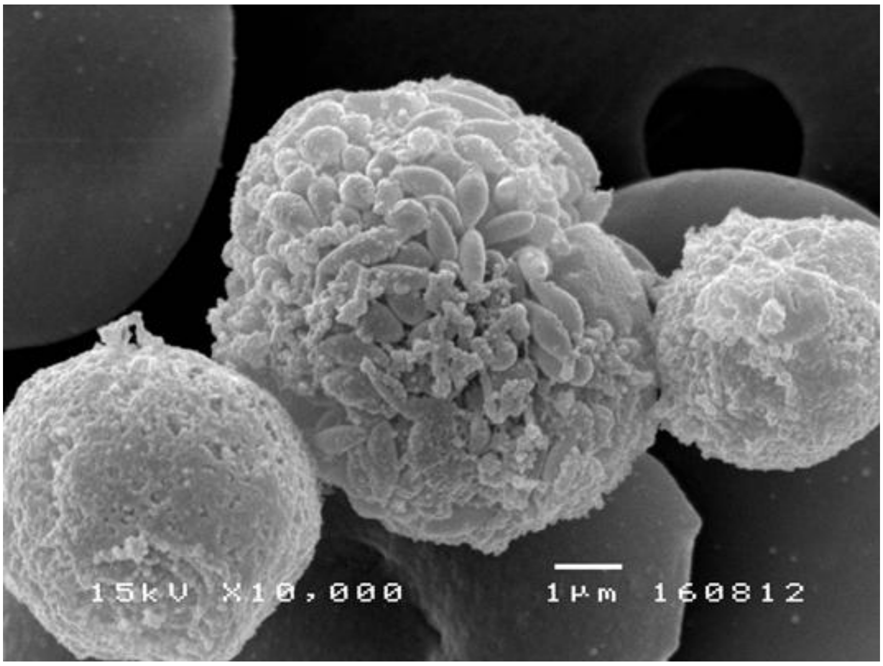
การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน พบแกรนูลจำนวนมากภายในไซโตพลาสซึมของอิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวย โดยแกรนูลมีขนาดค่อนข้างใหญ่ ส่วนใหญ่มีรูปร่างแบบแท่งกระสวย และพบแกรนูลแบบกลมรีได้บ้างเล็กน้อย (รูปที่ 4.13 ก) แกรนูลติดสีอิเล็กตรอนเข้มไม่สม่ำเสมอ และติดสีไม่เนียนเรียบ (non homogeneous electron density) (รูปที่ 4.13 ข) นิวเคลียสติดสีจางของอิเล็กตรอน ภายในประกอบด้วย euchromatin และไรโบโซมขนาดเล็ก โดยติดสีจางและเนียนเรียบกว่าแกรนูลในไซโตพลาสซึม และไม่พบแวคิวโอล



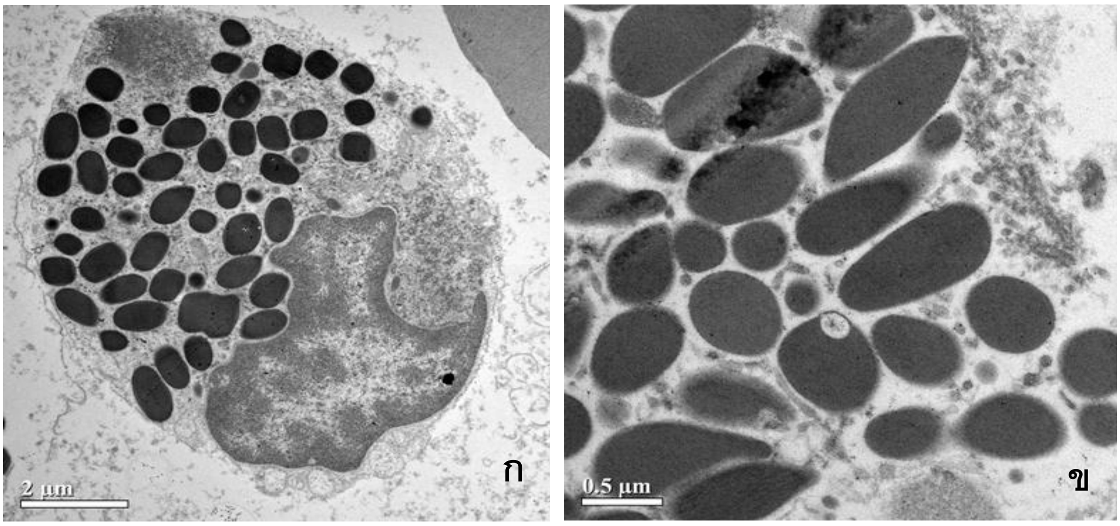
รูปที่ 4.11 แสดงอิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวยในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ก) เซลล์มีรูปร่างกลม นิวเคลียสรูปกลมหรือรีเบียดอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ย้อมติดสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้ม ภายในไซโตพลาสซึมอัดแน่นด้วยแกรนูลย้อมติดสีชมพูอมส้ม, W ข) แกรนูลรูปกระสวยที่มองเห็นได้ชัดเจนในเซลล์ที่แตกออก, W ค) ปฏิกิริยาไซโตเคมีของอิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวยให้ทั้งผลบวก ง) และผลลบต่อสี PO. Ha = Elongated granule eosinophilic-heterophil, Bar= 5 µm



รูปที่ 4.11 แสดงอิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวยในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (ต่อ) จ) ปฏิกิริยาไซโตเคมีให้ผลบวกต่อสี SBB ฉ) ผลบวกอย่างอ่อนต่อสี AcP ช) ผลบวกอย่างอ่อนต่อสี ALP ซ) ผลบวกต่อสี ANAE ฌ) ผลบวกต่อสี PAS ติดสีชมพูเข้มทั่วไซโตพลาสซึม ญ) ผลบวกต่อสี PAS แบบติดสีเข้มเฉพาะขอบเซลล์. Ha = Elongated granule eosinophilic-heterophil, Hc = Neutrophilic-heterophil, R = Erythrocyte, T = Thrombocyte, L = Lymphocyte, Bar= 5 µm



รูปที่ 4.12 แสดงอิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวยในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด เซลล์มีรูปร่างกลม มีแกรนูลขนาดใหญ่รูปกระสวยปริมาณมากนูนออกมาจากผิวเซลล์ โดยสามารถพบแกรนูลรูปกลมได้บ้างเล็กน้อย



รูปที่ 4.13 แสดงอิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวยในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน ก) แกรนูลรูปกระสวยจำนวนมากขนาดค่อนข้างใหญ่และมีขนาดที่หลากหลาย นิวเคลียสติดสีอิเล็กตรอนไม่สม่ำเสมอ ไม่พบแวคคลูโอล ข) แกรนูลที่ติดสีอิเล็กตรอนเข้มและทึบและติดสีสม่ำเสมอ

ข. อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลกลม (Rounded granule eosinophilic-heterophil)

อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลกลมมีลักษณะคล้ายคลึงกับอิโอสิโนฟิล (Eosinophil) ในสัตว์ชั้นสูง เป็นเม็ดเลือดขาวชนิดมีแกรนูลที่พบน้อยที่สุดในปลากระเบนราหู คือ ประมาณร้อยละ 4.93±1.43 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด ขนาดใกล้เคียงกับอิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวย การวัดขนาดภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ยของทั้ง 2 เพศ (n=20) เท่ากับ 17.24±1.44 ไมครอน (mean±SD) โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในปลากระเบนเพศผู้และเพศเมีย (n=10) มีค่าเท่ากับ 17.17±1.25 ไมครอน และ 17.30±1.70 ไมครอน ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลกลม มีลักษณะรูปร่างและการติดสีคล้ายกลับชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวยทำให้แยกจากกันได้ยากภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ซึ่งต้องใช้การศึกษาในกำลังขยายที่สูงเพื่อแยกลักษณะรูปร่างของแกรนูล เซลล์ของเฮเทอโรฟิลชนิดนี้มีรูปร่างกลมสม่ำเสมอ ไซโตพลาสซึมไม่ติดสี ภายในประกอบด้วยแกรนูลรูปกลมอัดแน่นย้อมติดสีชมพูอมส้มเมื่อย้อมด้วยสี Romanowsky stain นิวเคลียสมีรูปร่างกลมหรือรีโดยมักมองเห็นเป็นนิวเคลียสกลมเล็กจำนวน 1-3 นิวเคลียส หรือเป็นรูปรี เบียดอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ส่วนนิวเคลียสที่เป็นพูจะพบได้น้อยมาก นิวเคลียสย้อมติดสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้ม ภายในพบกลุ่มของโครมาติน เช่นเดียวกัน (รูปที่ 4.14 ก) ทั้งนี้พบว่าแกรนูลของเฮเทอโรฟิลชนิดนี้มักมีปริมาณน้อยกว่าแต่ติดสี Eosine ที่เข้มและมองเห็นได้ชัดเจนชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวย (รูปที่ 4.14 ข)

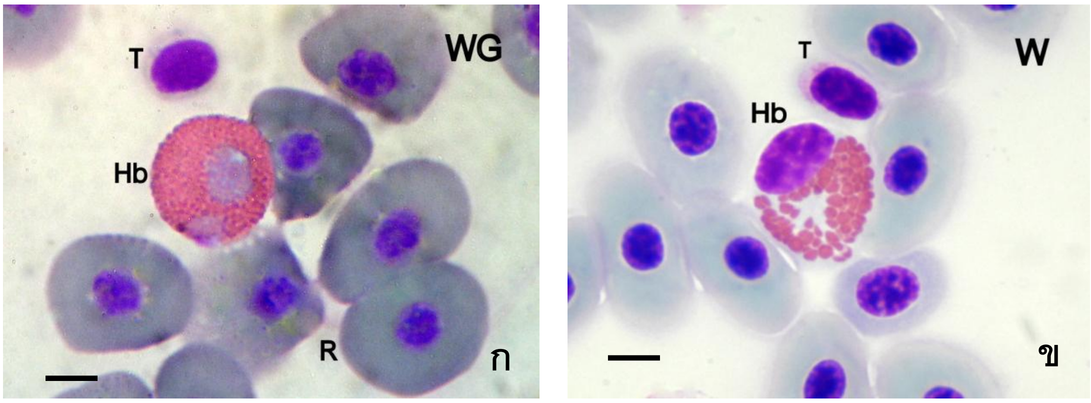
อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลกลมให้ปฏิกิริยาการติดสีทางไซโตเคมีเช่นเดียวกับชนิดแกรนูลรูปกระสวย โดยให้ผลบวกต่อสี PO, SBB, AcP, ALP, ANAE และ PAS โดยมีลักษณะการติดลีของแต่ละเอนไซม์ดังนี้

- ย้อมติดสี PO คือ แกรนูลติดสีหลายระดับตั้งแต่สีน้ำตาลแดงเข้ม สีแดงอ่อน หรือบางเซลล์ไม่ติดสีเลย (รูปที่ 4.14 ค)
- ย้อมติดสี SBB คือ ติดสีดำจางระหว่างแกรนูล (รูปที่ 4.14 ง)
- ย้อมติดสี AcP คือ ติดสีม่วงแดงอ่อนๆ (weak stain) ระหว่างแกรนูลเพียงบางเซลล์และเป็นการติดสีแบบไม่สม่ำเสมอ ซึ่งเซลล์ที่ติดสีนั้นนิวเคลียสย้อมติดสีน้ำเงิน (รูปที่ 4.14 จ)
- ย้อมติดสี ALP คือ ติดสีน้ำตาลอ่อน (weak stain) ระหว่างแกรนูลเพียงบางเซลล์และเป็นการติดสีแบบไม่สม่ำเสมอ (รูปที่ 4.14 ฉ)

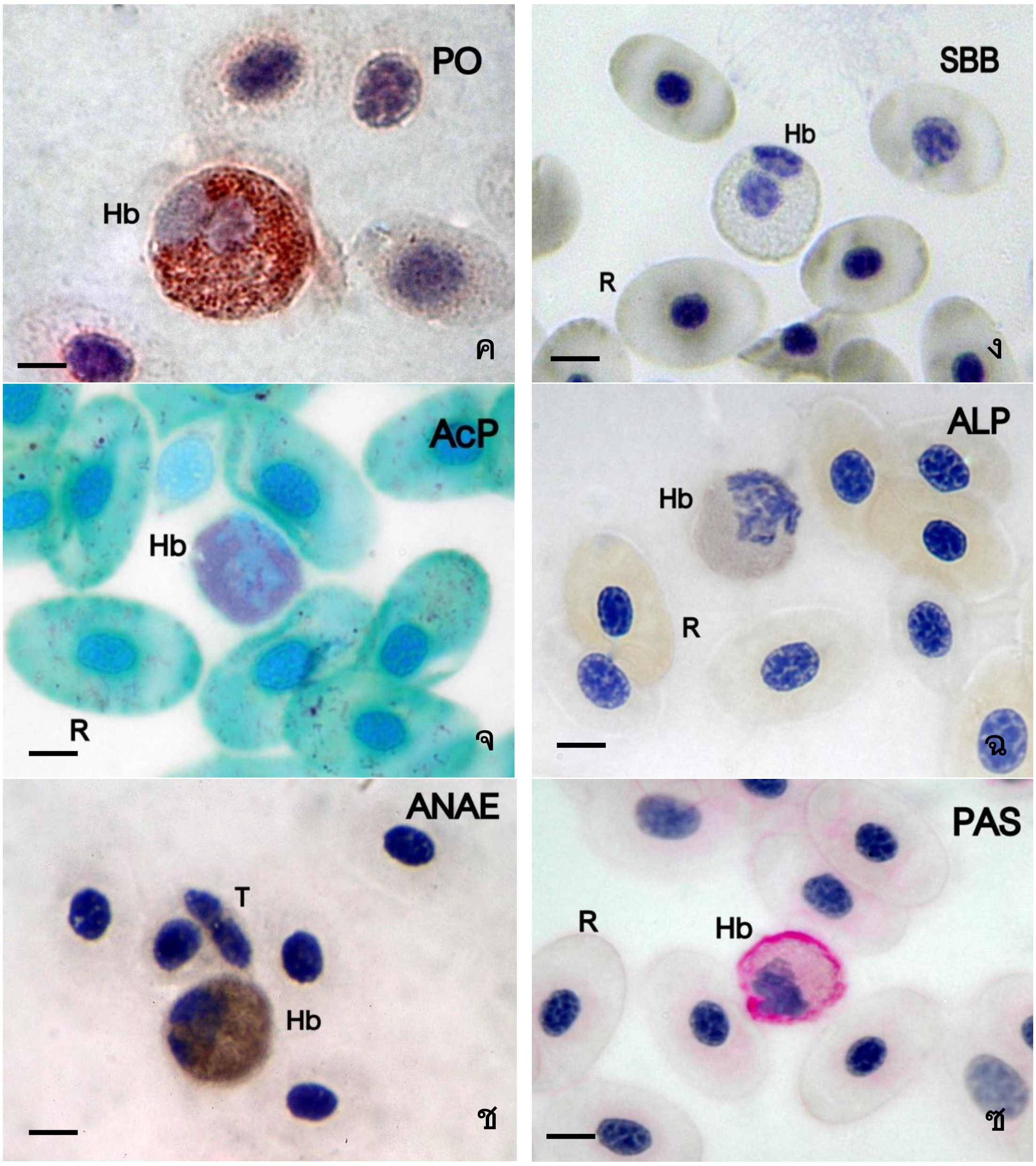
- ย้อมติดสี ANAE คือ ติดสีน้ำตาลเข้มระหว่างแกรนูล (รูปที่ 4.14 ช)
- ย้อมติดสี PAS คือ ติดสีชมพูจางระหว่างแกรนูล และติดสีชมพูเข้มเฉพาะบริเวณขอบเซลล์ (รูปที่ 4.14 ซ)
- อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลกลมให้ผลลบต่อการย้อมด้วยสี TB

การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลกลม เซลล์จะมีรูปร่างกลมขนาดใกล้เคียงกับชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวย ภายในไซโตพลาสซึมอัดแน่นไปด้วยแกรนูลที่มีรูปร่างกลมขนาดใกล้เคียงกันนูนออกมาจากผิวเซลล์ (รูปที่ 4.15)

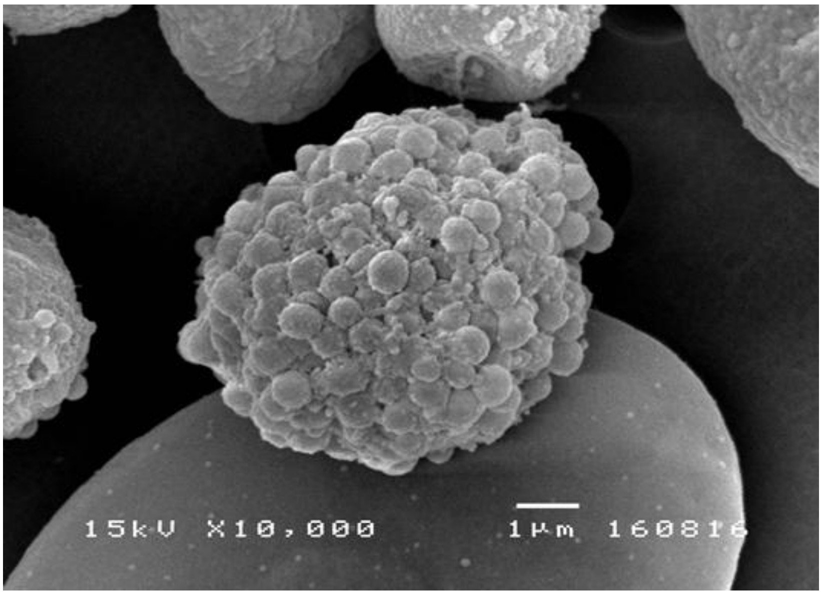
การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน พบแกรนูลกลมใหญ่ขนาดใกล้เคียงกัน กระจายทั่วเซลล์แต่จำนวนของแกรนูลมีจำนวนน้อยกว่าชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวย ติดสีอิเล็กตรอนทึบเข้ม นิวเคลียสติดสีเข้มของอิเล็กตรอน ภายในประกอบด้วย euchromatin และไรโบโซมขนาดเล็ก และไม่พบแวคิวโอล (รูปที่ 4.16)



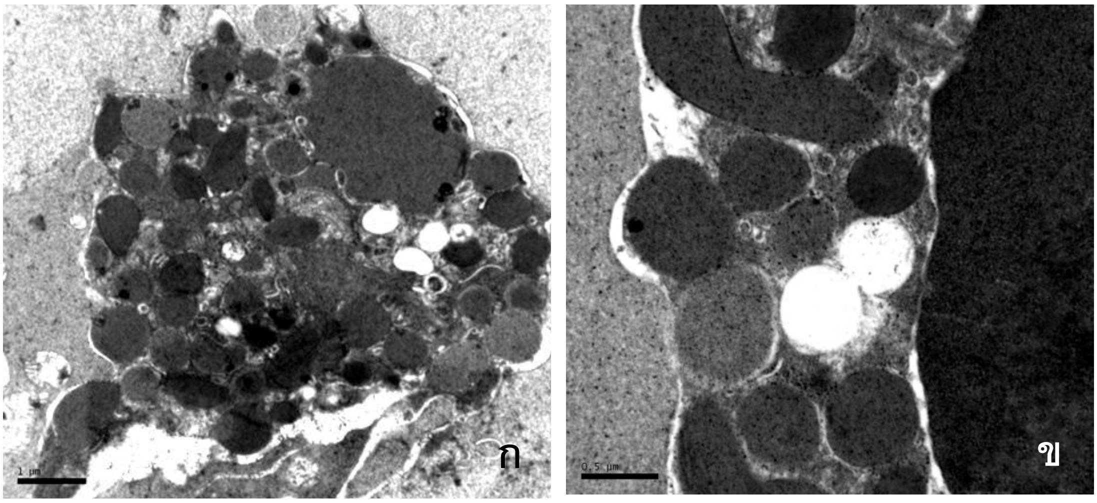
รูปที่ 4.14 แสดงอิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลกลมในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ก) เซลล์รูปร่างกลม นิวเคลียสกลมหรือรีเบียดไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ย้อมติดสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้ม ไซโตพลาสซึมอัดแน่นด้วยแกรนูลรูปร่างกลมย้อมติดสีชมพูอมส้ม, WG ข) เซลล์อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลที่มีขนาดเล็ก ภายในพบแกรนูลรูปร่างกลมติดสีชมพูอมส้มมองเห็นได้ชัดเจน, W. Hb = Rounded granule-eosinophilic-heterophil, R = Erythrocyte, T = Thrombocyte, Bar= 5 µm



รูปที่ 4.14 แสดงอิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลกลมในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (ต่อ) ค) ผลบวกต่อสี PO ง) ผลบวกต่อสี SBB จ) ผลบวกอย่างอ่อนต่อสี AcP ฉ) ผลบวกอย่างอ่อนต่อสี ALP ช) ผลบวกต่อสี ANAE ซ) ผลบวกต่อสี PAS ติดสีเข้มเฉพาะบริเวณขอบเซลล์. Hb = Rounded granule-eosinophilic-heterophil, R = Erythrocyte, T = Thrombocyte, Bar= 5 µm



รูปที่ 4.15 แสดงอิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลกลมในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด เซลล์มีรูปร่างทรงกลม มีแกรนูลรูปกลมขนาดใกล้เคียงกันปริมาณมากนูนออกมาจากผิวเซลล์



รูปที่ 4.16 แสดงอิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลกลมปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน ก) เซลล์มีรูปร่างกลม แกรนูลรูปกลมใหญ่และขนาดใกล้เคียงกัน นิวเคลียสกลมเบียดไปทางด้านหนึ่งของเซลล์ ข) แกรนูลติดสีอิเล็กตรอนทึบเข้ม

3.2.2 เฮเทอโรฟิลที่แกรนูลติดสีเป็นกลาง (Neutrophilic-heterophil)

นิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิล มีลักษณะรูปร่างและการติดสีคล้ายกับนิวโทรฟิล (Neutrophil) ในสัตว์ชั้นสูง เป็นเม็ดเลือดขาวที่พบมากรองลงมาจากลิมโฟไซต์และอิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปแท่ง คือประมาณร้อยละ 9.70±2.55 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด มีขนาดเล็กกว่าอิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลทั้งสองชนิดเล็กน้อย การวัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ยของทั้ง 2 เพศ (n=40) เท่ากับ 16.82±1.65 ไมครอน (mean±SD) โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในปลากระเบนเพศผู้และเพศเมีย(n=20) มีค่าเท่ากับ 16.72±1.40 ไมครอน และ 16.92±1.73 ไมครอน ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

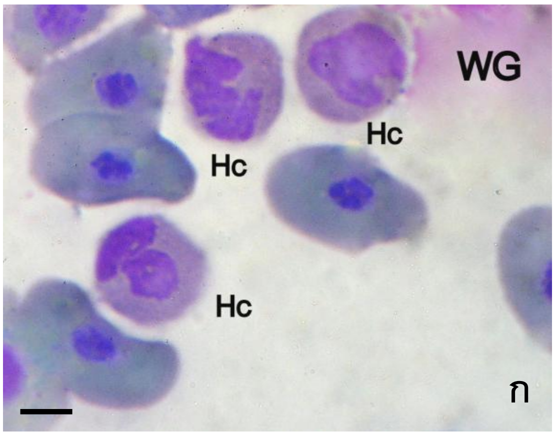
นิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิลในปลากระเบนราหูมีลักษณะจำเพาะที่ทำให้แยกได้จากเฮเทอโรฟิลชนิดอื่น คือ ไซโตพลาสซึมไม่ติดสี มีแกรนูลเล็กละเอียดคล้ายฝุ่น ย้อมติดสีม่วงอ่อนหรือสีเทา (cytoplasmic neutrophilia)ขอบเซลล์ไม่เรียบมองเห็นสัดส่วนของเซลล์ไม่ชัดเจน นิวเคลียสย้อมติดสีม่วงเข้มมีลักษณะเป็นพูชัดเจน (segmented) เชื่อมกันด้วยเส้นใยโครมาตินหรือบางครั้งอาจพบนิวเคลียสมีลักษณะเป็นแท่งยาว(banded) ซึ่งเป็นเซลล์วัยอ่อน ทั้งนี้คุณสมบัติที่กล่าวมาข้างต้นของนิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิลมีความคล้ายคลึงกับนิวโทรฟิลในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (รูปที่ 4.17 ก และ ข)

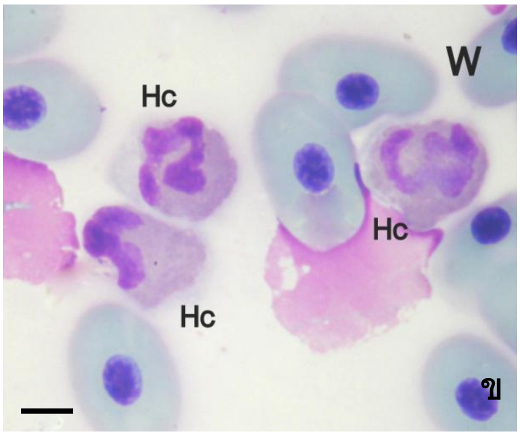
นิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิลให้ปฏิกิริยาการติดสีทางไซโตเคมี โดยให้ผลบวกต่อสี PO, SBB, AcP, ALP และ PAS โดยมีลักษณะการติดลีของแต่ละเอนไซม์ดังนี้

- ย้อมติดสี PO คือ ติดสีน้ำตาลแดงอ่อนๆ (weak stain) เพียงบางเซลล์และเป็นการติดสีแบบไม่สม่ำเสมอ (รูปที่ 4.17 ค)
- ย้อมติดสี SBB คือ ติดสีดำจางระหว่างแกรนูล (รูปที่ 4.14 ง)
- ย้อมติดสี AcP คือ ติดสีน้ำตาลแดงอ่อน (weak stain) ระหว่างแกรนูลเพียงบางเซลล์และเป็นการติดสีแบบไม่สม่ำเสมอ (รูปที่ 4.17 จ)
- ย้อมติดสี ALP คือ ติดสีน้ำตาลอ่อน ระหว่างแกรนูล (รูปที่ 4.17 ฉ)
- ย้อมติดสี PAS คือ ไซโตพลาสซึมติดสีชมพูเข้มหรือสีบานเย็น และติดเข้มมากบริเวณขอบเซลล์ (รูปที่ 4.17 ซ)
- นิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิลให้ผลลบต่อการย้อมด้วยสี ANAE (รูปที่ 4.17 ช) และ TB

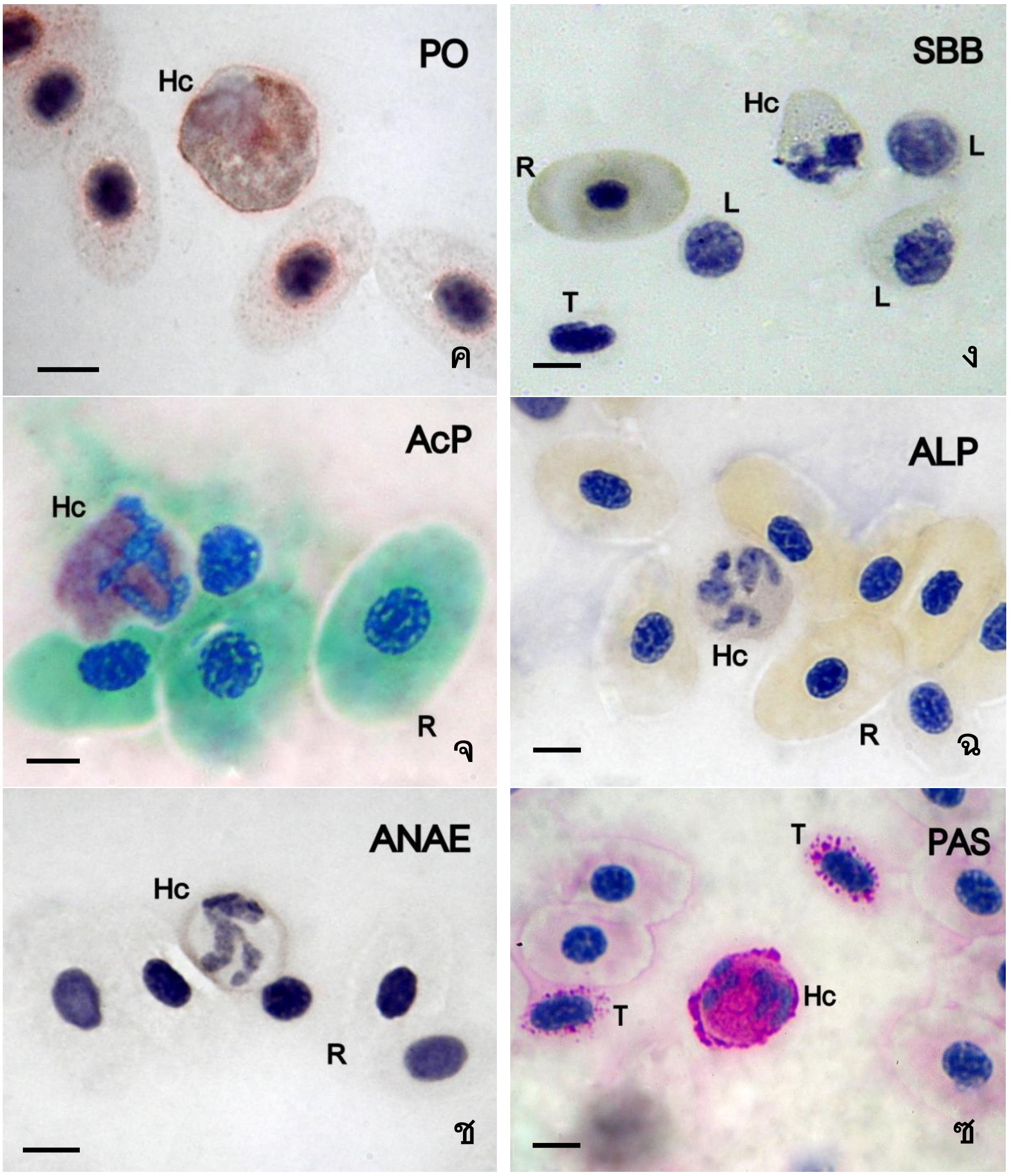
การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด นิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิลในปลากระเบนราหูเซลล์มีรูปร่างกลม ภายในไซโตพลาสซึมประกอบด้วยแกรนูลขนาดเล็กจำนวนมากอัดแน่นภายในเซลล์ ผิวเซลล์ขรุขระมีส่วนยื่นของไซโตพลาสซึมโดยรอบเซลล์ (รูปที่ 4.18)

การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน นิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิลในปลากระเบนราหูเซลล์มีรูปร่างกลมแต่มองเห็นขอบเขตของเซลล์ไม่ชัดเจน ไซโตพลาสซึมประกอบด้วยแกรนูลขนาดเล็ก รูปร่างหลายแบบและติดสีต่างกันทั้งชนิด heterochromatin และ euchromatin นิวเคลียสมีหลายพู รูปร่างไม่แน่นอน ภายในประกอบด้วย heterochromatin และไรโบโซมขนาดเล็ก สามารถพบไมโตคอนเดรียในไซโตพลาสซึมได้บ้าง (รูปที่ 4.19)

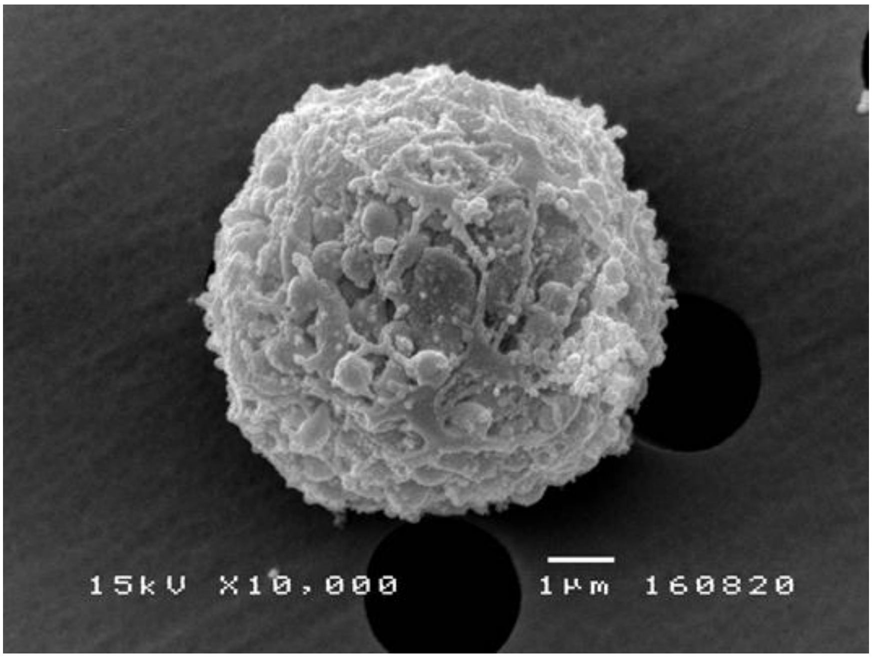




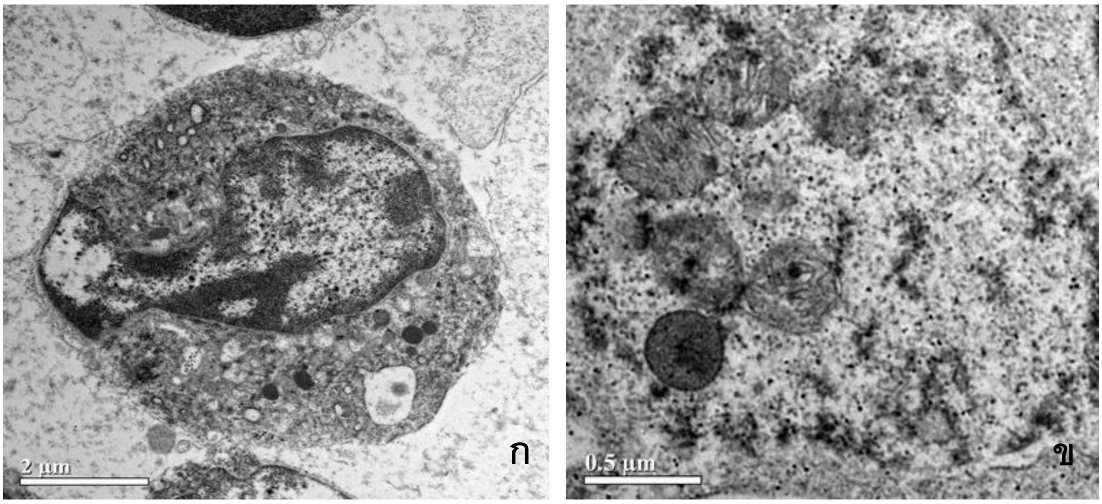
รูปที่ 4.17 แสดงนิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิลในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ก) เซลล์มีรูปร่างกลม ขอบเซลล์ไม่เรียบ นิวเคลียสติดสีม่วงเข้ม มีลักษณะเป็นพู (segmented) เชื่อมกันด้วยเส้นใยโครมาติน แกรนูลละเอียดคล้ายฝุ่นติดสีม่วงอ่อนหรือสีเทา (cytoplasmic neutrophilia), WG ข) นิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิล เมื่อย้อมด้วยสี Wright ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับการย้อมด้วยสี WG. Hc = Neutrophilic-heterophil, Bar= 5 µm



รูปที่ 4.17 แสดงนิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิลในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (ต่อ) ค) ปฏิกิริยาไซโตเคมีของนิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิลให้ผลบวกอย่างอ่อนต่อสี PO ง) ผลบวกต่อสี SBB จ) ผลบวกอย่างอ่อนต่อสี AcP ฉ) ผลบวกอย่างอ่อนต่อสี ALP ช) ผลลบต่อสี ANAE ซ) ผลบวกต่อสี PAS ติดสีชมพูเข้มทั่วไซโตพลาสซึม และติดสีเข้มมากที่บริเวณขอบเซลล์. Hc = Neutrophilic-heterophil, R = Erythrocyte, T = Thrombocyte, L = Lymphocyte, Bar= 5 µm



รูปที่ 4.18 แสดงนิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิลในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด เซลล์มีรูปร่างกลม มีแกรนูลขนาดเล็กจำนวนมากอัดแน่นภายในเซลล์ ผิวเซลล์ขรุขระมีส่วนยื่นของไซโตพลาสซึมโดยรอบเซลล์



รูปที่ 4.19 แสดงนิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิลในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน ก) เซลล์มีรูปร่างกลม ภายในไซโตพลาสซึมพบแกรนูลขนาดเล็กรูปร่างหลายแบบและติดสีต่างกันทั้งชนิด heterochromatin และ euchromatin นิวเคลียสเป็นพู รูปร่างไม่แน่นอนภายในประกอบด้วย heterochromatin และไรโบโซมขนาดเล็ก ข) ไมโตคอนเดรียในไซโตพลาสซึม

3.3 โมโนไซต์ (Monocyte)

โมโนไซต์เป็นเม็ดเลือดขาวที่มีขนาดใหญ่ที่สุด แต่พบในปริมาณน้อยที่สุดในปลากระเบนราหู คือประมาณร้อยละ 2.71±1.66 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด การวัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ยของทั้ง 2 เพศ (n=40) เท่ากับ 18.22±2.53 ไมครอน (mean±SD) โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในปลากระเบนเพศผู้และเพศเมีย (n=20) มีค่าเท่ากับ 18.17±2.61 ไมครอน และ 18.28±2.27 ไมครอน ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

เซลล์โมโนไซต์โดยส่วนใหญ่มักมีส่วนของไซโตพลาสซึมยื่นออกมา (Cytoplasmic protrusion) คล้ายกับเท้าเทียม (pseudopodia) ทำให้ขอบเซลล์ไม่เรียบ เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีขนาดใหญ่ที่สุด แต่ทั้งนี้อาจพบเซลล์ขนาดที่เล็กใกล้เคียงกับลิมโฟไซต์วัยอ่อนขนาดใหญ่ได้ ไซโตพลาสซึมติดสีเทาหรือน้ำเงินปนเทา มองเห็นแกรนูลไม่ชัดเจนจากกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง อาจพบแวคิวโอลใสขนาดเล็กได้บ้างภายในไซโตพลาสซึม นิวเคลียสขนาดใหญ่ รูปร่างกลมหรือเว้าเข้าตรงกลางคล้ายรูปไต เบียดอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ย้อมติดสีม่วงหรือสีน้ำเงิน ภายในพบกลุ่มของโครมาตินแต่ไม่หนาแน่นเท่ากับลิมโฟไซต์ ทำให้ดูคล้ายมีการติดสีที่จางกว่า (รูปที่ 4.20 ก และ ข)

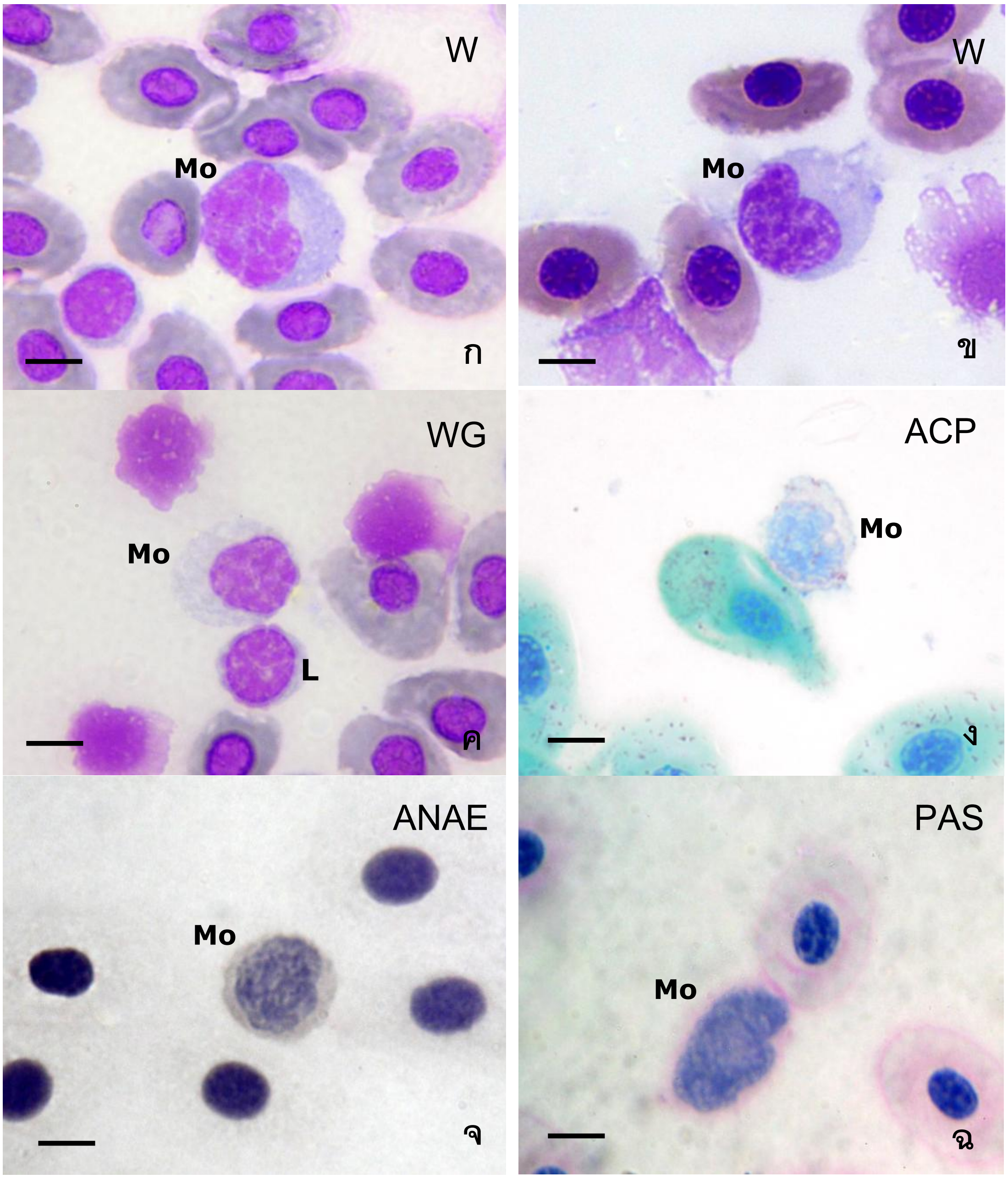
โมโนไซต์บางเซลล์มีแกรนูลเล็กละเอียดสีม่วงอมชมพู (Azurophilic granule) มีแวคิวโอลเล็กละเอียดจำนวนมาก ทำให้มองเห็นเนื้อไซโตพลาสซึมแบบไม่แน่น (Foamy) (รูปที่ 4.20 ค)

โมโนไซต์ให้ปฏิกิริยาการติดสีทางไซโตเคมี โดยให้ผลบวกต่อสี AcP, ANAE และ PAS โดยมีลักษณะการติดลีของแต่ละเอนไซม์ดังนี้

- ย้อมติดสี AcP คือ ติดสีม่วงแดงเฉพาะที่แกรนูล (รูปที่ 4.20 ง)
- ย้อมติดสี ANAE คือ ติดสีน้ำตาลอ่อนในไซโตพลาสซึม (รูปที่ 4.20 จ)
- ย้อมติดสี PAS คือ คือ ไซโตพลาสซึมติดสีชมพูบานเย็นอย่างอ่อน (weak stain) และติดสีไม่สม่ำเสมอ กระจายตามขอบเซลล์ (รูปที่ 4.20 ฉ)
- โมโนไซต์ให้ผลลบต่อการย้อมด้วยสี PO, SBB, ALP และ TB

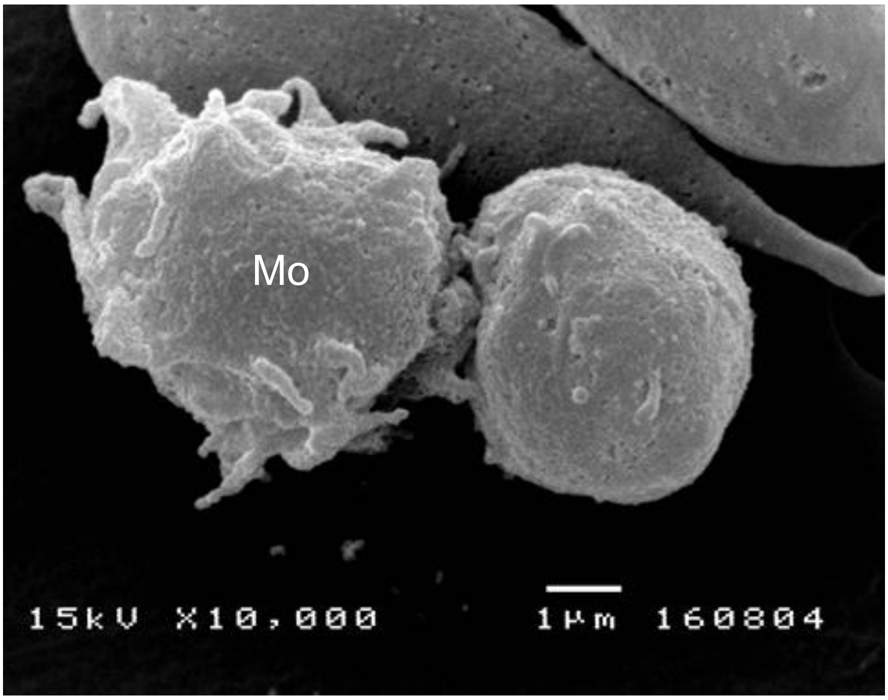
การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด เซลล์โมโนไซต์มีรูปร่างที่ไม่แน่นอนเนื่องจากมีส่วนของไซโตพลาสซึมยื่นออกมาคล้ายกับเท้าเทียมจำนวนมาก เซลล์มีขนาดใหญ่กว่าเม็ดเลือดขาวชนิดอื่น และไม่พบรูบนผิวเซลล์ (รูปที่ 4.21)

การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน เซลล์โมโนไซต์มีการยื่นของไซโตพลาสซึมยื่นออกมาคล้ายกับเท้าเทียม พบแกรนูลและแวคิวโอลได้บ้าง มีไมโตคอนเดรียและเอนโดพลาสมิกเรติคิวลัมชนิดหยาบบ้าง นิวเคลียสเป็นพูติดสีอิเล็กตรอนไม่สม่ำเสมอ (รูปที่ 4.22)

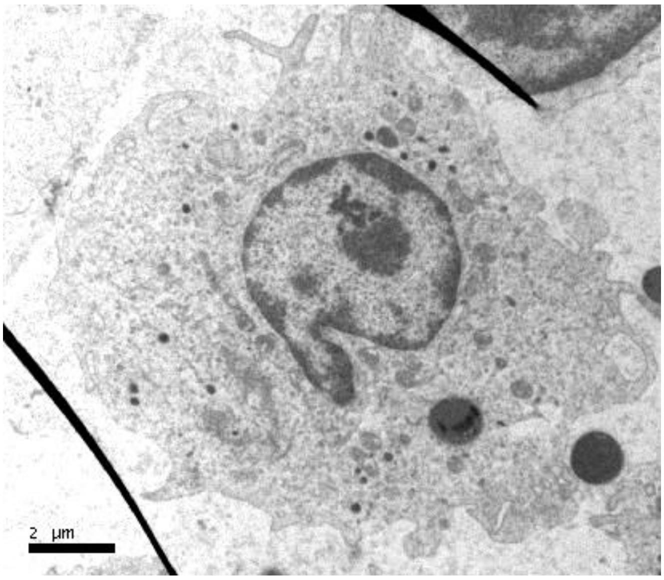


รูปที่ 4.20 แสดงโมโนไซต์ในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ก) ไซโตพลาสซึมติดสีน้ำเงินปนเทา นิวเคลียสรูปไตขนาดใหญ่ เบียดอยู่ทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ย้อมติดสีม่วงหรือสีน้ำเงินและภายในพบกลุ่มของโครมาติน, WG ข) โมโนไซต์เมื่อย้อมด้วยสี Wright มีลักษณะเช่นเดียวกับการย้อมด้วยสี WG ค) โมโนไซต์ที่มีแวคิวโอลในไซโตพลาสซึม ง) ปฏิกิริยาไซโตเคมีของโมโนไซต์ให้ผลบวกต่อสี AcP จ) ผลบวกอย่างอ่อนต่อสี ANAE ฉ) ผลบวกอย่างอ่อนต่อสี PAS.

M = Monocyte, L = Lymphocyte, Bar= 5 µm



รูปที่ 4.21 แสดงโมโนไซต์ในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด เซลล์โมโนไซต์ (Mo) มีรูปร่างไม่แน่นอนเนื่องจากมีไซโตพลาสซึมยื่นออกมาคล้ายกับเท้าเทียม เซลล์มีขนาดใหญ่กว่าเม็ดเลือดขาวชนิดอื่น ไม่พบรูบนผิวเซลล์



รูปที่ 4.22 แสดงโมโนไซต์ในปลากระเบนราหูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน ที่มีการยื่นของเท้าเทียมจำนวนมากออกมาจากผิวเซลล์ ภายในไซโตพลาสซึมพบแกรนูลและแวคิวโอลได้บ้าง มีไมโตคอนเดรียและเอนโดพลาสมิกเรติคิวลัมชนิดหยาบเล็กน้อย นิวเคลียสเป็นพูติดสีอิเล็กตรอนไม่สม่ำเสมอ

ตารางที่ 4.1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์เม็ดเลือดเป็นไมโครเมตร (mean±SD) ในปลากระเบนราหูโตเต็มวัย และเปรียบเทียบระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย

เซลล์เม็ดเลือด	n	**เฉลี่ย 2 เพศ**	n	**กระเบนราหู เพศเมีย**	n	**กระเบนราหู เพศผู้**
Eryth (กว้าง)*	40	16.12±1.00	20	16.16±0.93	20	16.08±1.08
Eryth (ยาว)*	40	24.62±1.24	20	25.03±0.92	20	24.22±1.39
Lym (S) *	20	5.55±1.74	10	5.78±1.69	10	5.32±1.40
Lym (M) *	20	11.28±1.04	10	11.15±0.90	10	11.39±1.19
Lym (L) *	20	13.71±0.64	10	13.63±0.79	10	13.79±0.60
E-Het *	20	17.23±2.53	10	17.28±2.21	10	17.17±2.85
R-Het *	20	17.24±1.44	10	17.30±1.70	10	17.17±1.25
N-Het *	20	16.82±1.65	10	16.92±1.73	10	16.72±1.40
Mo *	20	18.22±2.53	10	18.28±2.27	10	18.17±2.61
Throm (กว้าง) *	20	3.40±0.73	10	3.37±0.63	10	3.43±0.70
Throm (ยาว) *	20	7.43±0.61	10	7.32±0.63	10	7.53±0.60

* Eryth = Erythrocyte, Lym (S) = Small lymphocyte, Lym (M) = Medium lymphocyte, Lym (L) = Large lymphocyte, E-Het = Elongated granule-eosinophilic heterophil, R-Het = Rounded granule-eosinophilic heterophil, N-Het = Neutrophilic-heterophil, Mo = Monocyte, Throm = Thrombocyte.

n= จำนวนตัวอย่าง

**แสดงความแตกต่างกันของค่าที่ทำการเปรียบเทียบอย่างมีนัยสำคัญ p<0.05

ตารางที่ 4.2 รูปแบบการติดสีปฏิกิริยาไซโตเคมีของเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดในปลากระเบนราหูโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย

	Eryth*	Throm*	Lym*	E-Het*	C-Het*	N-Het*	Mo*
PO	$+++_{c}$	-	-	$++_{c}$, ir	$++_{c}$, ir	$+_{c}$, ir	-
SBB	-	-	-	$++_{I}$	$++_{I}$	$++_{I}$	-
AcP	-	$+_{c}$, ir	$+++_{c}$	$+_{c}$, ir	$+_{c}$, ir	$+_{c}$, ir	$++_{c}$
ALP	-	-	-	$+_{c}$, ir	$+_{c}$, ir	$+_{c}$, ir	-
ANAE	-	$+++_{c}$	$++_{c}$	$+++_{I}$	$+++_{I}$	-	$++_{c}$
PAS	-	$+++_{c}$	$+_{c}$	$+++_{I}$	$+++_{I}$	$+++_{I}$	$+_{c}$
TB	-	-	-	-	-	-	-

* Eryth = Erythrocyte, Throm = Thrombocyte, Lym = Lymphocyte, E-Het = Elongated granule-eosinophilic heterophil, R-Het = Rounded granule-eosinophilic heterophil, N-Het = Neutrophilic-heterophil, Mo = Monocyte.

+++ = ติดสีเข้ม, ++ = ติดสีปานกลาง, + = ติดสีอ่อน, ir = ติดสีไม่สม่ำเสมอ

C = ติดสีบริเวณไซโตพลาสซึม, I = ติดสีบริเวณระหว่างแกรนูล (Intergranular)

4.2 ค่าโลหิตวิทยา และชีวเคมีในปลากระเบนราหูโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย

ค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมีของปลากระเบนราหูโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียที่ทำการเก็บตัวอย่างในช่วงระหว่างวันที่ 17 มีนาคม พ.ศ. 2552 - 7 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553 มีค่าดังตารางที่ 4.3 และตารางที่ 4.4 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเพศพบค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) คือ ในปลากระเบนเพศผู้มีจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดเท่ากับ 11.52±3.90 x 10^3 µl สูงกว่าในปลากระเบนเพศเมียที่มีจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดเท่ากับ 9.10±2.75 x 10^3 µl ปริมาณแมกนีเซียมในซีรัม (Mg) ในปลากระเบนเพศผู้เท่ากับ 3.36±0.29 mg/dl สูงกว่าในปลากระเบนเพศเมียที่มีปริมาณแมกนีเซียมในซีรัม (Mg) เท่ากับ 3.16±0.41 mg/dl และปริมาณคลอไรด์ในซีรัม (Cl) ในปลากระเบนเพศผู้เท่ากับ 219.89±19.66 mEq/L สูงกว่าในปลากระเบนเพศเมียที่มีปริมาณคลอไรด์ในซีรัม (Cl) เท่ากับ 202.93±11.92 mEq/L อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ในขณะที่ปลากระเบนราหูเพศเมียมีค่าเอ็นไซม์ CK เท่ากับ 1062.00±631.05 U/L ซึ่งสูงกว่าในปลาเพศผู้ที่มีค่าเอ็นไซม์ CK เท่ากับ 743.11±289.83 U/L อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ตารางที่ 4.3 ค่าโลหิตวิทยา (mean±SD) ในปลากระเบนราหูโตเต็มวัย และเปรียบเทียบระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย

ค่าโลหิตวิทยา	**เฉลี่ย 2 เพศ** (n=54)	**กระเบนราหูเพศเมีย** (n=27)	**กระเบนราหูเพศผู้** (n=27)
Hct (%)	19.46±3.04	19.24±2.30	19.68±3.67
Hb (g/dL)	4.36±0.75	4.52±0.53	4.21±0.91
TRBC (10^6/µl)	0.37±0.07	0.36±0.06	0.37±0.09
TWBC (10^3 µl)	10.30±3.56	**9.10±2.75***	**11.52±3.90***
E-Het** (%)	15.74±2.70	15.19±2.88	16.30±2.43
R-Het** (%)	4.35±1.14	4.33±0.92	4.37±1.33
N-Het** (%)	11.52±2.20	11.22±2.47	11.81±1.90
Lymphocyte (%)	65.54±3.79	66.33±4.44	64.74±2.86
Monocyte (%)	2.91±0.83	2.89±0.80	2.92±0.87
MCV (fL)	542.92±123.48	542.41±112.33	543.42±135.88
MCH (pg)	122.19±31.18	127.00±27.19	117.39±34.56
MCHC(g/dL)	22.75±4.30	23.66±3.01	21.84±5.18
Thrombocyte (10^3/µl)	14.24±2.50	14.26±2.74	14.22±2.28

** E-Het = Elongated granule-eosinophilic heterophil, R-Het = Round granule-eosinophilic heterophil, N-Het = Neutrophilic-heterophil.

n= จำนวนตัวอย่าง

*แสดงความแตกต่างกันของค่าที่ทำการเปรียบเทียบอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

ตารางที่ 4.4 ค่าชีวเคมี (mean±SD) ในปลากระเบนราหูโตเต็มวัย และเปรียบเทียบระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย

ค่าชีวเคมี	**เฉลี่ย 2 เพศ** (n=54)	**กระเบนราหูเพศเมีย** (n=27)	**กระเบนราหูเพศผู้** (n=27)
AST (SGOT) (U/L)	46.66±35.94	48.13±39.45	45.19±32.74
ALT (SGPT) (U/L)	6.56±4.79	7.52±6.22	5.59±2.47
ALP (U/L)	20.91±6.46	21.37±5.33	20.44±7.50
Cr (mg/dl)	0.31±0.13	0.32±0.13	0.30±0.13
Uric acid (mg/dl)	0.16±0.11	0.15±0.11	0.17±0.11
BUN (mg/dl)	404.54±62.16	393.78±51.34	415.30±70.71
Blood glucose (mg/dl)	34.66±12.84	36.70±14.88	32.61±10.30
TP(g/dl)	2.82±0.47	2.90±0.42	2.74±0.51
Albumin (g/dl)	0.27±0.06	0.27±0.06	0.26±0.06
Globulin (g/dl)	2.55±0.47	2.63±0.39	2.48±0.53
TG (mg/dl)	39.98±10.23	39.67±11.09	40.30±9.49
Cholesterol (mg/dl)	63.44±11.95	65.30±12.90	61.59±10.84
Lactate (mmol/L)	1.43±0.50	1.40±0.53	1.47±0.49
Cortisol (ug)	0.25±0.08	0.25±0.08	0.26±0.07
Ca (mg/dl)	14.11±0.99	13.99±0.90	14.23±1.08
Phosphorus (mg/dl)	4.68±0.85	4.57±0.72	4.79±0.96
Mg (mg/dl)	3.26±0.36	**3.16±0.41***	**3.36±0.29***
Na (mEq/L)	226.89±30.46	228.37±10.85	225.41±42.07
K (mEq/L)	4.32±1.35	4.51±1.60	4.14±1.04
Cl (mEq/L)	211.41±18.23	**202.93±11.92***	**219.89±19.66***
Iron (ug/dl)	19.11±6.14	18.93±6.46	19.30±5.93
CK (U/L)	902.56±512.31	**1062.00±631.05***	**743.11±289.83***

n= จำนวนตัวอย่าง

*แสดงความแตกต่างกันของค่าที่ทำการเปรียบเทียบอย่างมีนัยสำคัญ p<0.05

4.3 เปรียบเทียบความยาวลำตัวรวมหาง ความยาวลำตัว ความกว้างลำตัว และอัตราส่วนของความกว้างลำตัวต่อความยาวลำตัวระหว่างปลากระเบนราหูโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย

ความยาวลำตัวรวมหาง ความยาวลำตัว และความกว้างลำตัวเป็นเซนติเมตร (mean±SD) ในปลากระเบนราหูโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียทั้ง 54 ตัว ที่ทำการเก็บตัวอย่าง แสดงในตารางที่ 4.5 พบว่าในปลากระเบนเพศเมียมีค่าความยาวทั้งสามค่าข้างต้นสูงกว่าปลากระเบนเพศผู้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยปลากระเบนเพศเมียมีความยาวลำตัวรวมหางเท่ากับ 274.56±98.72 เซนติเมตร ความยาวลำตัวเท่ากับ 111.96±41.77 เซนติเมตร และความกว้างลำตัวเท่ากับ 121.31±50.10 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ปลากระเบนเพศผู้มีความยาวลำตัวรวมหาง เท่ากับ 231.06±83.97 เซนติเมตร ความยาวลำตัวเท่ากับ 88.48±28.89 เซนติเมตร และความกว้างลำตัวเท่ากับ 96.37±30.43 เซนติเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปลากระเบนราหูโตเต็มวัยทั้งสองเพศมีลำตัวด้านกว้างยาวมากกว่าลำตัวด้านยาว และมีขนาดความยาวลำตัวรวมหางยาวเป็น 2.5 เท่าของความยาวลำตัวโดยประมาณ

เมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนของความกว้างลำตัวต่อความยาวลำตัว (disc width: girdle length) (mean±SD) เป็นเซนติเมตร ระหว่างปลากระเบนราหูโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย ดังแสดงในตารางที่ 4.5 พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) แต่ทั้งนี้ในปลากระเบนเพศผู้มีอัตราส่วนของความกว้างลำตัวต่อความยาวลำตัวมากกว่าปลากระเบนเพศเมียเล็กน้อย คือมีค่าอยู่ที่ 1.09±0.05 และ 1.08±0.09 ตามลำดับ ซึ่งอาจอธิบายได้ว่าปลากระเบนราหูเพศผู้มีความกว้างลำตัวมากกว่าเพศเมียเล็กน้อยเมื่อมีความยาวของลำตัวไม่รวมหางที่เท่ากัน

ตารางที่ 4.5 แสดงความยาวลำตัวรวมหาง ความยาวลำตัว ความกว้างลำตัว และอัตราส่วนของความกว้างลำตัวต่อความยาวลำตัวเป็นเซนติเมตร (mean±SD) ในปลากระเบนราหูโตเต็มวัยและเปรียบเทียบระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย

ความยาว (เซนติเมตร)	**เฉลี่ย 2 เพศ** (n=54)	**กระเบนราหูเพศเมีย** (n=27)	**กระเบนราหูเพศผู้** (n=27)
ความยาวลำตัวรวมหาง (total length)	252.71±93.39	274.56±98.72*	231.06±83.97*
ความยาวลำตัว (girdle length)	100.22±37.49	111.96±41.77*	88.48±28.89*
ความกว้างลำตัว (disc width)	108.84±42.94	121.31±50.10*	96.37±30.43*
disc width: girdle length	1.09±0.07	1.08±0.09	1.09±0.05

n= จำนวนตัวอย่าง

*แสดงความแตกต่างกันของค่าที่ทำการเปรียบเทียบอย่างมีนัยสำคัญ p<0.05

4.4 ค่าคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำที่เก็บตัวอย่างปลากระเบนราหู

ค่าคุณภาพน้ำที่สำคัญใน แม่น้ำแม่กลอง ต. อัมพวา อ. อัมพวา จ.สมุทรสงคราม ซึ่งเป็นแหล่งน้ำธรรมชาติที่ทำการเก็บตัวอย่างปลากระเบนราหู ในช่วงระหว่างวันที่ 17 มีนาคม พ.ศ. 2552 ถึงวันที่ 7 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553 แสดงในตารางที่ 4.6 ซึ่งพบว่าทุกพารามิเตอร์มีคุณภาพอยู่ในช่วงของค่ามาตรฐานที่ยอมรับได้และไม่มีผลต่อสุขภาพของปลากระเบน

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าคุณภาพน้ำ (mean±SD) ในแม่น้ำแม่กลอง ต. อัมพวา อ. อัมพวา จ.สมุทรสงคราม ระหว่างวันที่ 17 มีนาคม พ.ศ. 2552 - 7 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553

ค่าคุณภาพน้ำ	mean±SD
ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (Dissolved oxygen; DO) (ppm)	5.14±0.34
อุณหภูมิ (Temperature; T) (^{o}C)	25.14±0.39
ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)	7.11±0.13
ความเค็ม (Salinity) (ppt)	2.56±0.51
ปริมาณแอมโมเนียรวม (Total ammonia; NH_3) (ppm)	0.00±0.00
ปริมาณไนไตรท์ (Nitrite; NO_2) (ppm)	0.00±0.00
ปริมาณไนเตรท (Nitrate; NO_3) (ppm)	0.00±0.00
ความเป็นด่าง (Alkalinity) (ppm)	120±0.00
ค่าความกระด้างรวม (Total hardness) (ppm)	500±0.00
ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide; H_2S) (ppm)	0.00±0.00
ปริมาณคลอรีน (Chlorine) (ppm)	0.00±0.00
ปริมาณแคลเซียม (Calcium; Ca) (ppm)	160±0.00
ปริมาณแมกนีเซียม (Magnesium; Mg) (ppm)	40.50±0.75

บทที่ 5
อภิปรายผลการวิจัย บทสรุป และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการวิจัย

ส่วนที่ 1 โลหิตวิทยา: ลักษณะรูปร่าง โครงสร้างอย่างละเอียด และการย้อมติดสีทางไซโตเคมี ของเซลล์เม็ดเลือดในปลากระเบนราหู

5.1.1 เม็ดเลือดแดง

ลักษณะทางกายภาพของซีรัมในปลากระเบนราหูโตเต็มวัยทุกตัวอย่างจากงานวิจัยครั้งนี้มีลักษณะใสไม่มีสี เช่นเดียวกับที่มีรายงานในปลากระดูกอ่อนชนิดอื่น (Rosenzweig, 1988) ชั้น buffy coat เป็นสีขาวหนามองเห็นได้ง่าย ลักษณะและโครงสร้างของเม็ดเลือดแดงในปลากระเบนราหู คล้ายคลึงกับที่มีรายงานในปลากระดูกอ่อนและปลากระดูกแข็งชนิดอื่นๆ เช่น ในปลาฉลามหัวบาตร (*Carcharhinus leucas*) (Saunders, 1966; Walsh and Luer, 2004) ปลาฉลาม Port Jackson (*H. portusjacksoni*) (Stokes and Firkin, 1971) ปลาฉลามวาฬ (*Rhincodon typus*) (Dove et al., 2010) กลุ่มปลาฉลาม Wobbegong (Orectolobidae) (Old and Huveneers, 2006) และปลากระเบนจมูกวัว (*R. bonasus*) (Ferreira et al., 2010) ทั้งนี้จากการศึกษาพบว่าในปลากระเบนราหูที่มีสุขภาพดีจะมีรูปร่างและขนาดเม็ดเลือดแดงที่ค่อนข้างสม่ำเสมอ พบความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงได้น้อย แต่สามารถพบความแตกต่างของขนาด (anisocytosis) และการติดสี (polychromasia) ของเม็ดเลือดแดงได้บ้าง และเนื่องจากในปลากระดูกอ่อนการพัฒนาของเซลล์เม็ดเลือดเกิดในกระแสเลือดซึ่งแตกต่างจากในสัตว์ชั้นสูงที่การพัฒนาของเม็ดเลือดเกิดในไขกระดูก (Walsh and Luer, 2004) จึงพบเซลล์เม็ดเลือดแดงวัยอ่อน เช่น อีริโทรบลาส หรือโปรอีริโทรไซต์ และพบการแบ่งเซลล์แบบ mitosis ในระยะต่างๆ ของเม็ดเลือดแดงได้เป็นปกติในแผ่นฟิล์มเลือด เช่นเดียวกับที่มีรายงานในกลุ่มปลากระดูกอ่อนอื่นๆ (Saunders, 1966; Stokes and Firkin, 1971; Sherburne, 1974; Ellis, 1977; Zapata and Carrata, 1981) ลักษณะของเม็ดเลือดแดงเซลล์อ่อนในปลากระเบนราหู คือ เซลล์รูปร่างกลมและมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เจริญเต็มที่ นิวเคลียสกลมใหญ่เกือบเต็มเซลล์ ติดสีม่วงและวางตัวอยู่ในตำแหน่งกลางเซลล์ เม็ดเลือดแดงเซลล์อ่อนจะติดสี basophilic ที่เข้มกว่าเม็ดเลือดแดงที่เจริญเต็มที่ คือไซโตพลาสซึมติดสีน้ำเงินจางหรือสีน้ำเงินอมเทา ซึ่งเป็นลักษณะเดียวกับที่พบในปลากระดูกอ่อนและปลากระดูกแข็งอื่นๆ (Emery, 1986) ทั้งนี้ยิ่งเซลล์เม็ดเลือดแดงมีการเจริญเติบโต

หรือมีอายุของเซลล์มากขึ้นจะยิ่งมีปริมาณฮีโมโกลบินที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ไซโตพลาสซึมติดสีที่เป็นเบสน้อยลง (Zapata and Carrato, 1981; Walsh and Luer, 2004)

ลักษณะโครงสร้าง และขนาดของเม็ดเลือดแดงภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนมีลักษณะที่ใกล้เคียงกับที่มีการศึกษาในปลากระดูกอ่อนชนิดอื่นๆ เช่น ปลาฉลามขาว (*Carcharodon carcharias*) (Emery, 1985) ปลาฉลามเสือ (*Galiocerdo cuvieri)* ปลาฉลาม Dusky (*Carcharhinus obscures)* ปลาฉลามน้ำตาล *(Carcharhinus milberti)* ปลาฉลามเลมอน (*Negaprion brevirostris)* ปลาฉลามหัวบาตร *(C. leucas)* ปลาฉลามขี้เซา (*G. cirratum)* ปลาฉลามหัวค้อนยักษ์ (*Sphyrna mokarran)* ปลาฉลาม Bonnethead (*Sphyrma tiburo)* ปลาฉลาม Atlantic sharpnose (*Rhizoprionodon terraenovae* และปลาโรนันหัวใส (*R. eglanteria)* (Saunders, 1966) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มปลากระดูกแข็งพบว่ามีขนาดเม็ดเลือดแดงที่ใหญ่กว่ามากและมีจำนวนเม็ดเลือดแดงโดยรวมเฉลี่ยต่ำกว่าในปลากระดูกแข็ง เช่น ปลานิล (*Oreochromis niloticus)* ปลาสวาย *(Pangasius sutchi)* ปลาดุกพันธุ์ผสม *(Clarias* sp.) ปลากดเหลือง (*Mystus nemurus)* (Najiah et al.,2008) ปลาหมอสีมาลาวี (*Cichlasoma dimerus)* (Vazquez and Guerrero, 2007) ปลาแฟนซีคาร์พ *(C. carpio)* (Tripathi et al., 2004) ปลาช่อนอเมริกัน (*Parachanna obscura)* (Kori-Siakpere et al., 2005) ปลาทับทิม *(Oreochromis niloticus mossambicus)* (LeaMaster et al., 1990) และปลา Chinese sturgeon *(A. sinensis*) (Zexia et al., 2007) โดยในการศึกษาครั้งนี้เม็ดเลือดแดงที่เจริญเต็มที่ของปลากระเบนราหูมีขนาดกว้างxยาวโดยเฉลี่ยของทั้ง 2 เพศ (n=40) เท่ากับ 16.12±1.00x24.62±1.24 ไมครอน ซึ่งเพศไม่มีผลต่อทั้งในด้านของขนาดและลักษณะโครงสร้างเม็ดเลือดแดง ทฤษฎีที่อธิบายถึงขนาดของเม็ดเลือดแดงในปลากระดูกอ่อนที่มีขนาดใหญ่กว่าสัตว์จำพวกปลากระดูกแข็ง สัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในอดีตมีความเชื่อในเรื่องของวิวัฒนาการในสัตว์คือสัตว์ที่มีวิวัฒนาการสูงจะยิ่งมีขนาดเม็ดเลือดที่เล็กลงและนิวเคลียสของเม็ดเลือดจะหายไป แต่จากรายงานของ Snyder และ Sheafor ในปี1999 ที่กล่าวถึงขนาดเม็ดเลือดแดงในสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำในอันดับ Caudata และ Gymnophiona มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 48.10±13.30x30.80±11.10 ไมครอน และ 36.00±19.80x29.00±14.80 ไมครอน ตามลำดับ ซึ่งถือว่าเป็นสัตว์ที่มีขนาดเม็ดเลือดแดงใหญ่ที่สุดในโลกตั้งแต่มีรายงานมา โดย Snyder และ Sheafor ได้อธิบายถึงสาเหตุของขนาดเม็ดเลือดที่ต่างกันในสัตว์แต่ละชนิดว่าและเกี่ยวข้องกับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นเลือดฝอย (capillary diameter) ที่ต่างกัน และกระบวนการทดแทนตามธรรมชาติ เนื่องจากปลากระเบนเป็นสัตว์ที่ฝังตัวอยู่ตามพื้นน้ำซึ่งมีออกซิเจนที่ละลายน้ำต่ำ การมีเม็ดเลือดแดงที่มีขนาดใหญ่จึงช่วยให้ปลาสามารถบรรจุฮีโมโกลบินที่เป็นส่วนสำคัญในการขนส่งออกซิเจนได้มากกว่าโดยใช้ปริมาณออกซิเจนที่น้อยกว่าเพราะขนาดเม็ดเลือดแดงที่

มากขึ้นมีผลสัมพันธ์กับความต้องการออกซิเจนในอากาศที่น้อยลง (Hayhoe and Flemans, 1982; Samour et al., 1998) นอกจากนี้ในปลากระเบนราหูสามารถพบรูบนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงได้เป็นปกติ (cytoplasmic hole) โดยพบเป็นจุดวาวใสในไซโตพลาสซึมจากการย้อมด้วยสี Romanowsky stain และมองเห็นได้ชัดเจนจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด อีกทั้งยังสามารถพบแวคิวโอลในไซโทพลาสซึมของเม็ดเลือดแดงที่เจริญเต็มที่แล้ว ซึ่งคาดว่าเป็นส่วนที่หลงเหลือของไมโตครอนเดรียที่เสื่อมสลายไปแล้ว (Walsh and Luer, 2004) ทั้งนี้ในปลากระดูกอ่อนบางชนิดอาจพบแกรนูลในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดงซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดเล็ก ๆ ละเอียด (finely granular cytoplasm) ในขณะที่ในเม็ดเลือดแดงเซลล์อ่อนมักพบ mitochondria golgi complex และแวคิวโอลขนาดเล็กอยู่ในไซโตพลาสซึม (Zapata and Carrato, 1981; Thrall et al., 2004)

ปฏิกิริยาการติดสีทางไซโตเคมีของเม็ดเลือดแดงปลากระเบนราหูในการศึกษาครั้งนี้พบว่าให้ผลบวกต่อสี PO (Peroxidase) เพียงชนิดเดียว คือ พบการติดสีน้ำตาลแดงสม่ำเสมอของสี PO ในไซโตพลาสซึม ทั้งในเม็ดเลือดแดงที่เจริญเต็มที่และเม็ดเลือดแดงเซลล์อ่อน ซึ่งแตกต่างจากในปลากระเบนโมโตโร่ (*Potamotrygon motoro*) ที่ให้ผลบวกต่อสี PO และ ANAE (Chansue et al., 2010) ส่วนการศึกษาในปลา Armored catfish (*Hoplosternum littorale*) (Tavares-Dias and Barcellos, 2005) ใน Rainbow lizard (*Agama agama*) (Caxton-Matin and Nganwuchu, 1978) และในเต่าบัว (*Hieremys annandalii*) (Chansue et al., 2011) พบว่าเม็ดเลือดแดงให้ผลบวกเฉพาะสี PO เช่นกัน ขณะที่การศึกษาในตะกวด (*Gallotia simonyi*) เม็ดเลือดแดงให้ผลลบต่อสี PO เช่นเดียวกับเม็ดเลือดแดงในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Martinez-Silvestre, et al., 2005) ทั้งนี้ผลของปฏิกิริยาการติดสีทางไซโตเคมีนอกจากจะแตกต่างกันตามชนิดของสัตว์แล้ว ยังมีความแปรผันจากหลายปัจจัย อาทิเช่น อุณหภูมิ ระยะเวลาการย้อม และความเป็นกรดด่างของสารละลายที่ใช้ย้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง (Raskin and Valenciano, 2000) จากปฏิกิริยาทางไซโตเคมีในปลากระเบนราหูแสดงถึงการมีเอนไซม์ Peroxidase ในเม็ดเลือดแดง ซึ่งโดยทั่วไปในสัตว์ชั้นสูงเอนไซม์ Peroxidase จะพบในเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลเป็นหลัก ทำหน้าที่ผลิตสารเพื่อใช้ในกระบวนการ Respiratory burst ของนิวโทรฟิล อยู่ในรูปของ lysosomal protein ในอะซูโรฟิลิกแกรนูล ทั้งนี้ยังไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัดเกี่ยวกับหน้าที่ของเอนไซม์ Peroxidase ในเม็ดเลือดแดงในปลาหรือสัตว์ชนิดอื่นๆ แต่มีการอธิบายว่าอาจเกี่ยวข้องกับอายุขัยของเม็ดเลือดแดงหรือเซลล์เม็ดเลือดแดงวัยอ่อน (Caxton-Matin and Nganwuchu, 1978)

5.1.2 ทรอมโบไซต์

ทรอมโบไซต์เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุดในปลากระเบนราหู มีรูปร่างหลากหลายทั้งแบบกลม ยาวรี หรือกระสวย ซึ่งชนิดของทรอมโบไซต์ที่พบมากที่สุดจะเป็นเซลล์รูปร่างคล้ายกระสวยที่มีส่วนของไซโตพลาสซึมยืดยาวออกจากด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้านของเซลล์และมักอยู่รวมกันเป็นร่างแห โดยทรอมโบไซต์แบบกลมจะแยกได้ค่อนข้างยากจากเซลล์ลิมโฟไซต์ ซึ่งเป็นลักษณะเช่นเดียวกับที่พบในปลากระดูกอ่อนและปลากระดูกแข็งชนิดอื่น (Stokes and Firkin, 1971; Fange, 1987; Walsh and Luer, 2004) ในงานวิจัยครั้งนี้พบว่าทั้งสี Wright และ Wright's Giemsa รวมทั้งสี Diff-Quick® สามารถใช้แยกความแตกต่างของทรอมโบไซต์และลิมโฟไซต์ได้ดี คือมีการติดสีที่แตกต่างกันทั้งนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม โดยที่เมื่อย้อมสี Wright เซลล์จะติดสีออกม่วงแดงมากกกว่า ทำให้มองเห็นนิวเคลียสของทรอมโบไซต์และลิมโฟไซต์ติดสีอมม่วง ส่วนไซโตพลาสซึมติดสีม่วงอมแดง

ลักษณะโครงสร้างและขนาดของทรอมโบไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดและส่องผ่าน มีขนาดกว้างx ยาวเฉลี่ย เท่ากับ 3.40±0.73x7.43±0.61 ไมครอน ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าที่มีรายงานในปลากระดูกอ่อนชนิดอื่น เช่น ในปลากระเบนโมโตโร่ (*P. motoro*) (พุทธาพงศ์ และคณะ, 2551) กลุ่มปลาฉลาม Wobbegong (Orectolobidae) (Old and Huveneers, 2006) และปลาฉลามวาฬ (*R. typus*) (Dove et al., 2010) เป็นต้น แต่ทั้งนี้กลับพบว่ามีขนาดใกล้เคียงกับทรอมโบไซต์ที่มีรายงานในปลากระดูกแข็ง เช่น ในปลาทอง *(C. auratus)* (Watson et al, 1963) ปลา Antarctic icefish *(Chaenocephalus aceratus)* (Barber et al., 1981) และปลา Murray cod (*Maccullochella peelii*) (Shigdar et al., 2009) เป็นต้น ส่วนลักษณะโครงสร้างพบว่าทรอมโบไซต์มีรูปร่างหลากหลายทั้งแบบกลมและรี มีขนาดเล็กกว่าเม็ดเลือดแดงประมาณ 2-3 เท่า มักอยู่รวมกันเป็นร่างแหหรืออยู่ติดกับเซลล์อื่นๆ อาทิเช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว ส่วนใหญ่มักมีรูปร่างแบบกระสวย มีส่วนของไซโตพลาสซึมยื่นออกมาคล้ายขาหรือเท้าเทียม (Pseudopodia) แสดงถึงภาวะ active ของทรอมโบไซต์ และมักปกคลุมด้วยร่างแหไฟบริน ไม่พบแวคิวโอลในไซโตพลาสซึม ภายในนิวเคลียสพบการติดสีเข้มของ heterochromatin สัดส่วนของไซโตพลาสซึมน้อยเมื่อเทียบกับขนาดนิวเคลียส พบไมโตคอนเดรียและไมโครทูบูลได้บ้าง และพบแกรนูลเป็นเม็ดกลมขนาดเล็กติดสีต่างกันกระจายอยู่ทั่วไป ซึ่งแกรนูลนี้มองเห็นได้ไม่ชัดเจนจากการย้อมด้วยสี Romanowsky แต่เมื่อศึกษาจากปฏิริยาการติดสีทางไซโตเคมี ด้วยสี AcP และ PAS จะสามารถมองเห็นแกรนูลได้ชัดเจน

ปฏิกิริยาการติดสีทางไซโตเคมีของทรอมโบไซต์ในปลากระเบนราหูให้ผลบวกต่อการติดสี ANAE และ PAS และให้ผลบวกอย่างอ่อนต่อสี AcP แต่ให้ผลลบต่อสี SBB, PO, ALP และ TB ซึ่งสอดคล้องกับที่มีรายงานในปลาทั่วไปที่พบทรอมโบไซต์ส่วนใหญ่ติดสี AcP และ PAS (Rowley,

1988) สำหรับการติดสี ANAE สอดคล้องกับรายงานในเกล็ดเลือดของสุนัขและหนู rat (เฉลียว, 2548) โดยทั่วไปเอนไซม์ Esterase จะมีหน้าที่ในการไฮโดรไลซ์สารกลุ่มเอสเทอร์ภายในตับ (Raskin and Valenciano, 2000) สำหรับ PAS แสดงถึงโครงสร้างของทรอมโบไซต์อาจมีสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตหรือไกลโคเจนเป็นองค์ประกอบ ทั้งนี้การติดสี PAS ไม่สามารถช่วยแยกลิมโฟไซต์ออกจากทรอมโบไซต์แบบกลมได้ จากคุณสมบัติของปฏิกิริยาการติดสีทางไซโตเคมี อธิบายได้ว่าทรอมโบไซต์ของปลากระเบนราหูไม่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอม เนื่องจากให้ผลลบต่อสี SBB และ PO ซึ่งสอดคล้องกับที่มีรายงานในกลุ่มปลากระดูกอ่อนชนิดอื่นๆ (Hine and Wain, 1987a) แต่โครงสร้างของเซลล์ทรอมโบไซต์มีสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตหรือไกลโคเจนเป็นองค์ประกอบเนื่องจากให้ผลบวกต่อสี PAS (Raskin and Valenciano, 2000)

5.1.3 เม็ดเลือดขาว

ก. ลิมโฟไซต์

ลิมโฟไซต์ในปลากระเบนราหู เป็นเม็ดเลือดขาวชนิดที่พบในปริมาณมากที่สุด คือ ประมาณร้อยละ 66.93±4.26 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด มีขนาดหลากหลายอยู่ในช่วง 4-14 ไมครอน โดยประมาณ ซึ่งสามารถแบ่งตามขนาดที่พบ ได้เป็น 3 ชนิดหลัก คือ เล็ก กลาง และใหญ่ ตามอายุการเจริญของเซลล์ โดยเซลล์ที่พบส่วนมากมักเป็นเซลล์ขนาดเล็กหรือเซลล์โตเต็มวัย ที่มีรูปร่างเซลล์กลม นิวเคลียสติดสีน้ำเงินหรือม่วงเข้มกลมใหญ่เกือบเต็มเซลล์และอยู่ชิดไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ และมักมองไม่เห็นไซโตพลาสซึม โดยลิมโฟไซต์โตเต็มวัยมักมีความคล้ายคลึงกับทรอมโบไซต์ชนิดเซลล์กลมเช่นเดียวกับในสัตว์เลือดเย็นชนิดอื่น (Campbell and Ellis, 2007) ส่วนเซลล์ลิมโฟบลาสหรือเซลล์อ่อนของลิมโฟไซต์ สามารถพบได้ทั่วไปในแผ่นฟิล์มเลือดของปลากระเบนราหู เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่า นิวเคลียสกลมใหญ่ติดสีม่วงหรือน้ำเงินเข้มที่จางกว่าเซลล์ลิมโฟไซต์เล็กน้อย แต่ยังสามารถมองเห็นส่วนของไซโตพลาสซึมที่ติดสีเทาอมฟ้าได้บ้างเล็กน้อย ทั้งนี้ลักษณะและขนาดของลิมโฟต์ที่พบในปลากระเบนราหูมีความคล้ายคลึงกับที่มีรายงานในปลากระดูกอ่อนและปลากระดูกแข็งทั่วไป (Blaxhall and Daisley, 1973; Fange, 1987; Walsh and Luer, 2004) เช่น ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ปลาสวาย *(P. sutchi)* ปลาดุกพันธุ์ผสม *(Clarias* sp.) ปลากดเหลือง (*M. nemurus)* (Najiah et al.,2008) ปลาหมอสีมาลาวี (*C. dimerus)* (Vázquez and Guerrero, 2007) ปลาแฟนซีคาร์พ *(C. carpio)* (Tripathi et al., 2004) ปลาซ่อนอเมริกัน (*P. obscura)* (Kori-Siakpere et al., 2005) ปลาทับทิม *(O. niloticus mossambicus)* (LeaMaster et al., 1990) ปลา Chinese sturgeon *(A. sinensis*) (Zexia et al., 2007) ปลาแซลมอน (*Salmo trutta* L) (Blaxhall and Hood, 1985) ปลาทอง *(C. auratus)* (Watson et al, 1963) ปลา Antarctic icefish *(Chaenocephalus aceratus)* (Barber

et al., 1981) ปลา Bonnarerre (*Thunnus alalunga)* (Alexander et al.,1980) และสามารถพบอะซูโรฟิลิกแกรนูลในลิมโฟไซต์บางเซลล์ เช่นเดียวกับที่มีรายงานในปลาฉลามวาฬ (*R. typus*) (Dove et al., 2010) และกลุ่มปลาฉลาม Wobbegong (Orectolobidae) (Old and Huveneers, 2006) แต่ไม่พบแวคิวโอลใส ดังที่มีรายงานในเซลล์ลิมโฟไซต์ของปลากระเบนโมโตโร่ (*P. motoro*) (พุทธาพงศ์ และคณะ, 2551) ปลาบึก *(Pangasianodon gigas)* (ไพโรจน์, 2537) และปลาทอง *(C. auratus)* (Watson et al, 1963)

ปฏิกิริยาการติดสีทางไซโตเคมีพบว่าลิมโฟไซต์ให้ผลบวกต่อสี AcP และผลบวกอย่างอ่อนต่อสี ANAE และ PAS แต่ให้ผลลบต่อสี PO, SBB, ALP และ TB โดยในไลโซโซม (Lysosome) ของเซลล์ลิมโฟไซต์ในสัตว์มีกระดูกสันหลังทั่วไปสามารถพบเอ็นไซม์ AcP ได้เป็นปกติ ซึ่ง AcP เป็นไลโซโซมอลเอ็นไซม์ (Lysosomal enzyme) ที่มีหน้าที่ในการดึง phosphate ออกจากโมเลกุลของสารต่างๆ (Raskin and Valenciano, 2000) ส่วนสี ANAE ที่โดยทั่วไปจะใช้ในการจำแนกชนิดของลิมโฟไซต์ คือ T-lymphocyte ให้ผลบวกในขณะที่ B-lymphocyte จะให้ผลลบต่อสี ANAE (Knowles et al., 1978; Hine and Wan, 1987b) ทั้งนี้ในปลากระดูกอ่อนมีการพัฒนาของลิมโฟไซต์เป็นชนิด T และ B เซลล์ เช่นเดียวกับในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง (Miracle et al., 2001) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ลิมโฟไซต์ของปลากระเบนราหูให้ผลบวกต่อสี ANAE ทุกเซลล์ แม้จะเป็นปฏิริยาอย่างอ่อน แสดงให้เห็นว่าสี ANAE ไม่สามารถใช้ในการจำแนกชนิดของลิมโฟไซต์ในปลากระเบนราหูได้ ซึ่งผลการศึกษาคล้ายกับรายงานการศึกษาในปลากระดูกแข็งและสัตว์เลื้อยคลานหลายชนิด เช่น ในปลา Murray cod (*Maccullochella peelii*) (Shigdar et al., 2009) เต่าหัวค้อน (*Caretta caretta*) (Casal and Oros, 2006) และเต่าบัว *(H. annandlii)* (Chansue et al., 2011) ในขณะที่ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ลิมโฟไซต์ให้ผลลบต่อสี ANAE (Ueda et al., 2001) ส่วนปฏิกิริยาต่อสี PAS ซึ่งในสัตว์เลื้อยคลานสามารถใช้แยกลิมโฟไซต์ออกจากทรอมโบไซต์เช่นเดียวกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยลิมโฟไซต์ให้ผลลบต่อสี PAS ในขณะที่ทรอมโบไซต์ให้ผลบวกต่อสีนี้ (Salakij et al., 2002) แต่ในปลากระเบนราหูเซลล์ทั้งสองชนิดให้ผลบวกต่อสี PAS เช่นเดียวกับที่พบในปลาชนิดอื่น ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าสี PAS ไม่สามารถใช้จำแนกลิมโฟไซต์และทรอมโบไซต์ในปลาได้ (Hine and Wain, 1987a)

ส่วนการที่ลิมโฟไซต์ให้ผลลบต่อสี PO, SBB, ALP และ TB แสดงให้เห็นว่าลิมโฟไซต์ไม่มีหน้าที่เกี่ยวกับการกลืนทำลาย (Phagocytic activity) (Carvalho et al., 2006) เช่นเดียวกับรายงานในปลาแฟนซีคาร์พ (*C. carpio*) (Tripathi et al., 2004) จากปฏิกิริยาทางไซโตเคมีจะพบว่าลิมโฟไซต์ในปลากระเบนราหูมีสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต หรือไกลโคเจนเป็นองค์ประกอบ (Raskin and Valenciano, 2000) และไม่มีหน้าที่เกี่ยวกับขบวนการ Phagocytosis ซึ่งมีความ

คล้ายคลึงกับที่พบในปลาแฟนซีคาร์พ (*C. carpio*) (Tripathi et al., 2004) และปลาแซลมอน (*Salmo trutta* L) (Blaxhall and Hood, 1985)

จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดและส่องผ่านพบว่า ลิมโฟไซต์ส่วนมากมักเป็นเซลล์รูปร่างกลม มีขนาดเล็กประมาณครึ่งหนึ่งของเม็ดเลือดแดง ผิวเซลล์ค่อนข้างขรุขระและมีตุ่มนูนหรือแขนยื่นออกมาคล้ายเท้าเทียมโดยรอบเซลล์ ลิมโฟไซต์มีลักษณะเป็นเซลล์กลม แทบจะมองไม่เห็นไซโตพลาสซึม พบแกรนูลได้บ้างและพบลักษณะคล้ายแขนหรือเท้าเทียมยื่นออกมาจากผิวของไซโตพลาสซึม นิวเคลียสกลมติดสีเข้มขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์เบียดไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ มี heterochromatin มองเห็นได้ชัดเจนตามขอบของนิวเคลียส ซึ่งคล้ายกับในปลากระดูกอ่อน (Hyder, et al., 1983; Hine and Wain, 1987b) และปลากระดูกแข็งทั่วไป (Tripathi et al., 2004)

ข. เฮเทอโรฟิล

เฮเทอโรฟิลเป็นเม็ดเลือดขาวชนิดแกรนูโลไซต์ที่พบเพียงชนิดเดียวในปลากระเบนราหู โดยชื่อ เฮเทอโรฟิล นั้นใช้เรียกชื่อกลุ่มของเม็ดเลือดขาวชนิดแกรนูลโลไซต์ในสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์ปีกที่มีลักษณะคล้ายกับนิวโทรฟิลในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่มีคุณสมบัติติดสีและรูปร่างของแกรนูลในไซโตพลาสซึมที่หลากหลาย (Campbell and Ellis, 2007) การจำแนกแกรนูโลไซต์ในสัตว์จำพวกปลามีความยุ่งยากและไม่มีหลักเกณฑ์ที่แน่นอน เนื่องมาจากมีความหลากหลายอย่างมากในด้านขนาด รูปร่าง และคุณสมบัติการติดสีย้อมของแกรนูลภายในเซลล์ (Campbell and Murru, 1990) ผู้วิจัยมักเป็นผู้กำหนดหลักเกณฑ์ในการเรียกชื่อซึ่งจะมีรูปแบบที่แตกต่างกันไปในแต่ละการศึกษา ส่วนในการศึกษาครั้งนี้เมื่อทำการจัดจำแนกชนิดเฮเทอโรฟิลตามลักษณะการติดสีของแกรนูล จะสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดหลัก คือ เฮเทอโรฟิลที่แกรนูลย้อมติดสี eosine (Eosinophilic-heterophil) และเฮเทอโรฟิลที่แกรนูลติดสีเป็นกลาง (Neutrophilic-heterophil) โดยอิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลยังแบ่งได้เป็นอีก 2 ชนิดย่อยตามรูปร่างของแกรนูลที่พบ คือ อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวย (Elongated granule eosinophilic-heterophil) และอิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลกลม (Rounded granule eosinophilic-heterophil)

อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลในปลากระเบนราหู เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างกลม ไซโตพลาสซึมไม่ติดสี ภายในประกอบด้วยแกรนูลอัดแน่น ย้อมติดสีชมพูอมส้มมองเห็นได้ชัดเจน นิวเคลียสส่วนใหญ่ที่พบมีรูปร่างกลมหรือรี โดยมักมองเห็นเป็นนิวเคลียสกลมเล็กจำนวน 1-3 นิวเคลียส หรือเป็นรูปวงรีเบียดอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ มักไม่ค่อยพบนิวเคลียสที่มีลักษณะเป็นพู นิวเคลียสย้อมติดสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้ม พบแกรนูลในไซโตพลาสซึม 2 แบบ คือ แบบกระสวยและแบบกลม ซึ่ง

อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลทั้ง 2 แบบ มีขนาดที่ใกล้เคียงกัน คือ มีขนาดอยู่ในช่วง 14-20 ไมครอน แต่ทั้งนี้ชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวยจะพบในปริมาณมากกว่าแกรนูลกลม คือพบที่ประมาณร้อยละ 15.74±2.70 และ 4.35±1.14 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด ตามลำดับ ความแตกต่างของเฮเทอโรฟิลทั้งสองชนิดนี้ นอกจากรูปร่างของแกรนูลที่ต่างกันแล้ว ยังพบว่าชนิดที่มีแกรนูลกลมจะมีขนาดของแกรนูลที่ใหญ่กว่า จำนวนแกรนูลน้อยกว่าและมีขนาดใกล้เคียงกัน อีกทั้งจะย้อมติดสี Romanowsky ที่เข้มและชัดเจนกว่าชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวย

เฮเทอโรฟิลอีกชนิดที่พบในปลากระเบนราหู เป็นชนิดที่แกรนูลย้อมไม่ติดสีหรือติดสีที่เป็นกลาง ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จัดจำแนกเป็นนิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิล เฮเทอโรฟิลชนิดนี้มีลักษณะรูปร่างและการติดสีที่คล้ายกับนิวโทรฟิลในสัตว์ชั้นสูง เป็นเม็ดเลือดขาวชนิดที่พบมากเป็นอันดับที่สาม รองลงมาจากลิมโฟไซต์และอิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวย ประมาณร้อยละ 9.70±2.55 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด มีขนาดเล็กกว่าอิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลเล็กน้อย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ในช่วง 16.82±1.65 ไมครอน นิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิลในปลากระเบนราหูมีลักษณะที่ทำให้แยกได้จากเซลล์เฮเทอโรฟิลชนิดอื่นได้ คือ ไซโตพลาสซึมไม่ติดสี แกรนูลเล็กละเอียดคล้ายฝุ่น ติดสีม่วงอ่อนหรือสีเทา (cytoplasmic neutrophilia) ขอบเซลล์ไม่เรียบนิวเคลียสติดสีม่วงเข้มมีลักษณะเป็นพูชัดเจนเชื่อมกันด้วยเส้นใยโครมาติน ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกับนิวโทรฟิลในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Thrall et al., 2004)

เมื่อเปรียบเทียบแกรนูโลไซต์ที่มีรายงานในปลากระดูกอ่อนอื่นๆ พบว่ามีความหลากหลายทั้งลักษณะคุณสมบัติและปริมาณการพบ ซึ่งมีผลทั้งจากปัจจัยภายนอกและปัจจัยทางสรีรวิทยา (Rowley, 1988) โดยลักษณะเฮเทอโรฟิลในปลากระเบนราหูทั้งสามชนิดที่พบจากการศึกษาในครั้งนี้ มีความสอดคล้องกับชนิดของแกรนูโลไซต์ที่พบในปลาฉลามแมวจุดเล็ก (*S. canicula*) ที่ถูกใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาด้านโลหิตวิทยาของปลากระดูกอ่อน คือ อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวยมีลักษณะคล้าย Granulocyte G3 อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลกลมมีลักษณะคล้าย Granulocyte G1 และนิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิลมีลักษณะคล้าย Granulocyte G2 ตามลำดับ (Thrall et al., 2004; Campbell and Ellis, 2007) ส่วนในปลากระดูกอ่อนชนิดอื่น ลักษณะแกรนูโลไซต์ที่พบมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของปลา เช่น ในปลาฉลามขี้เซา (*G. cirratum*) พบแกรนูโลไซต์ 3 ชนิด คือ นิวโทรฟิล อิโอสิโนฟิลที่มีแกรนูลเป็นรูปเม็ดข้าวสาร และเบโซฟิล (Walsh and Luer, 2004) ในปลาฉลามวาฬ (*R. typus*) พบแกรนูโลไซต์ 4 ชนิด คือ เฮเทอโรฟิลที่มีแกรนูลรูปแท่ง นิวโทรฟิล อิโอสิโนฟิลที่มีแกรนูลกลม และเบโซฟิล (Dove et al., 2010) ในปลากระเบนโมโตโร่ (*P. motoro*) พบแกรนูโลไซต์ 3 ชนิด คือ เฮเทอโรฟิลที่มีแกรนูลรูปกระสวย อิโอสิโนฟิลที่มีแกรนูลกลม และเบโซฟิล (พุทธาพงศ์ และคณะ, 2551) ในกลุ่มปลาฉลาม Wobbegong (Orectolobidae) (Old and Huveneers, 2006) พบแกรนูโลไซต์ 3 ชนิด คือ

นิวโทรฟิล แกรนูโลบลาส (Granuloblast) และอิโอสิโนฟิลที่มีแกรนูลกลม ในปลากระเบนจมูกวัว *(R. bonasus)* พบแกรนูโลไซต์ 3 ชนิด คือ เฮเทอโรฟิลและอิโอสิโนฟิลที่มีแกรนูลเป็นรูปแท่ง และเบโซฟิล และในปลาโรนันหัวใส (*R. eglanteria*) พบแกรนูโลไซต์เพียง 2 ชนิด คือ เฮเทอโรฟิลที่มีแกรนูลรูปแท่ง และอิโอสิโนฟิลที่มีแกรนูลมีรูปร่างกลมขนาดใหญ่สีแดงอ่อน (Walsh and Luer, 2004) เป็นต้น โดยพบว่าในหลายรายงานที่ศึกษาเกี่ยวกับชนิดของเม็ดเลือดขาวในปลากระดูกอ่อนและปลากระดูกแข็ง อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวย มักถูกจัดจำแนกให้เป็นเฮเทอโรฟิล ส่วนอิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลกลมมักถูกจัดจำแนกให้เป็นอิโอสิโนฟิล และนิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิลมักถูกจัดจำแนกให้เป็นนิวโทรฟิล ซึ่งเป็นการระบุชื่อของเม็ดเลือดตามหลักโลหิตวิทยาในสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Thrall et al., 2004; Campbell and Ellis, 2007) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยทำการจำแนกชื่อแกรนูโลไซต์ที่พบในปลากระเบนราหูตามลักษณะโครงสร้างและคุณสมบัติทางไซโตเคมี ซึ่งเฮเทอโรฟิลแต่ละชนิดที่พบมีรูปแบบและคุณสมบัติที่แตกต่างกับอิโอสิโนฟิลและนิวโทรฟิลในสัตว์ชั้นสูง ทำให้ไม่สามารถระบุชื่อตามหลักเกณฑ์ข้างต้นได้

ผลของปฏิกิริยาการติดสีทางไซโตเคมีของเฮเทอโรฟิลในปลากระเบนราหูมีความแตกต่างกันระหว่างอิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลและนิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิล คือ อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลทั้งสองชนิดให้ผลบวกต่อสี PAS และ ANAE ให้ผลบวกอย่างอ่อนและเป็นการติดสีที่ไม่สม่ำเสมอต่อสี PO, SBB, AcP, และ ALP แต่ให้ผลลบต่อการย้อมด้วยสี TB ส่วนนิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิลให้ผลบวกต่อสี PAS ให้ผลบวกอย่างอ่อนและเป็นการติดสีที่ไม่สม่ำเสมอต่อสี PO, SBB, AcP และ ALP และให้ผลลบต่อการย้อมด้วยสี TB และ ANAE

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลจะให้ผลบวกต่อสี PO ที่บ่งบอกถึงความสามารถในการฆ่าจุลชีพและทำหน้าที่ในกระบวนการ oxidative burst (Shigdar et al., 2009) และในแกรนูลโลไซต์ของสัตว์ส่วนใหญ่การติดสี SBB มักเป็นไปในแนวทางเดียวกับสี PO (Carvalho et al., 2006) ส่วนสี AcP และ ALP มีรายงานว่ามีความจำเพาะต่อนิวโทรฟิลทั้งชนิดเซลล์อ่อน (Banded neutrophill) และเซลล์โตเต็มวัย (segmented neutrophils) ทั้งในสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Wetzel et al., 1967) ส่วนปฏิกิริยาการติดสีของอิโอสิโนฟิลในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นไปในแนวทางเดียวกับนิวโทรฟิล คือให้ผลบวกต่อสี PO, SBB, AcP และ ALP (Jain, 1986) แต่จากรายงานของเฉลียว (2548) พบว่านิวโทรฟิลในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะติดสี AcP และ PO ภายในแกรนูล แต่เบโซฟิลและอิโอสิโนฟิลจะติดเฉพาะสี PO จากคุณสมบัติในการติดสีไซโตเคมีของเฮเทอโรฟิลในปลากระเบนราหูสามารถอธิบายได้ว่า การติดสี PAS ที่บริเวณระหว่างแกรนูลแสดงถึงเซลล์มีสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตหรือไกลโคเจนเป็นองค์ประกอบ (Raskin and Valenciano, 2000) โดยสันนิษฐานว่าเซลล์ใช้สารกลุ่มนี้เป็นแหล่งพลังงาน ในกระบวนการ

เก็บกินสิ่งแปลกปลอม (Tavares-Dias and Barcellos, 2005) ส่วนผลบวกต่อสี PO, SBB, AcP, และ ALP เป็นไปในแนวทางเดียวกับคุณสมบัติในนิวโทรฟิลและอีโอสิโนฟิลในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม บ่งชี้ว่าเฮเทอโรฟิลในปลากระเบนราหูอาจมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการกลืนทำลาย (phagocytosis) และภายในเซลล์มีส่วนประกอบของไขมันจำพวกไตรกลีเซอไรด์เนื่องจากให้ผลบวกต่อสี SBB ส่วนผลบวกต่อสี ANAE ที่พบเฉพาะในอีโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลอาจบ่งชี้ถึงความเกี่ยวข้องในกระบวนการป้องกันตัวของเซลล์ (cellular defence mechanism) และคุณสมบัติการเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่กลืนทำลายสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) (Tavares-Dias and Barcellos, 2005) เช่นเดียวกับเฮเทอโรฟิลในปลากระเบนโมโตโร่ (*P. motoro*) (Chansue et al., 2010) ที่ให้ผลบวกต่อสี ANAE ส่วนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสี ANAE ให้ผลบวกต่อนิวโทรฟิลในหนู Rat หนูตะเภา แกะและแพะ รวมถึงอีโอสิโนฟิลของสุนัข (Osbaldiston and Sullivan, 1978)

ซึ่งปฏิกิริยาไซโตเคมีของเฮเทอโรฟิลในปลากระเบนราหูของสอดคล้องกับผลการศึกษาในปลา Murray cod (*M. peelii*) ที่พบว่าเฮเทอโรฟิลให้ผลบวกต่อสี ACP, ALP, ANAE, SBB, PAS และ PO (Shigdar et al., 2009) แต่เฮเทอโรฟิลจะให้ผลลบต่อสี ANAE ในปลาแฟนซีคาร์พ (*C. carpio*) (Tripathi et al., 2004) และปลาดุกด้าน (*H. littorale*) (Tavares-Dias and Barcellos, 2005) ผลของปฏิกิริยาไซโตเคมีในเฮเทอโรฟิลของปลากระเบนราหูที่พบในการศึกษาครั้งนี้แตกต่างจากที่มีรายงานในกลุ่มปลากระดูกอ่อนทั่วไป ที่ระบุว่าแกรนูโลไซต์ในปลาฉลามและปลากระเบนมักให้ผลบวกต่อการติดสี PO, β-glucuronidase และ SBB แต่ให้ผลลบต่อการติดสีสำหรับเอนไซม์ ACP, aryl sulfatase, และ ANAE (Thrall et al., 2004) ส่วนการติดสีต่อเอ็นไซม์ชนิดต่างๆ ไม่สม่ำเสมอในทุกเซลล์ เป็นลักษณะที่พบได้ในปลาหลายชนิด เช่น ปลาแฟนซีคาร์พ (*C. carpio*) (Tripathi et al., 2004) ปลา Murray cod (*M. peelii*) (Shigdar et al., 2009) เป็นต้น อาจมีสาเหตุมาจากอายุหรือช่วงการเจริญของเซลล์ที่แตกต่างกัน การไม่คงตัวของเอนไซม์ เทคนิคการย้อมสี และที่สำคัญที่สุดคือชนิดของสัตว์ (Egami and Sasso, 1988; Raskin and Valenciano, 2000)

การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด เซลล์อีโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลทั้งสองชนิด มีลักษณะใกล้เคียงกัน คือเซลล์มีรูปร่างกลม ขนาดเล็กกว่าเม็ดเลือดแดง ภายในไซโตพลาสซึมอัดแน่นไปด้วยแกรนูลปริมาณมากนูนออกมาจากผิวเซลล์ สามารถแยกความแตกต่างของเซลล์ทั้งสองชนิดได้อย่างชัดเจนจากรูปร่างของแกรนูลที่ต่างกัน ส่วนลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านอีโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวยจะมีแกรนูลจำนวนมากภายในไซโตพลาสซึม แกรนูลมีขนาดค่อนข้างใหญ่ ส่วนใหญ่มีรูปร่างแบบแท่งกระสวย ติดสีอิเล็กตรอนเข้มไม่สม่ำเสมอ และติดสีไม่เนียนเรียบ นิวเคลียสติดสีจางของอิเล็กตรอน ภายในประกอบด้วย euchromatin และไรโบโซมขนาดเล็ก โดยติดสีจางและ

เนียนเรียบกว่าแกรนูลในไซโตพลาสซึม และไม่พบแวคิวโอล ซึ่งคล้ายกับเฮเทอโรฟิลที่มีรายงานในปลากระดูกอ่อน เช่น ปลาฉลามขี้เซา (*G. cirratum*) (Hyder, et al., 1983) ปลาฉลาม Gummy *(Mustelus lenticulatus)* และปลาฉลาม Catshark *(Apristurus* spp.*)* (Hine and Wain, 1987b) ปลาฉลามแมวจุดเล็ก (*S. canicula*) (Thrall et al., 2004; Campbell and Ellis, 2007) และในปลากระดูกแข็ง เช่น ปลาแฟนซีคาร์พ (*C. carpio*) (Tripathi et al., 2004) ในขณะที่อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลกลม จะพบแกรนูลกลมใหญ่และใกล้เคียงกัน แต่มีปริมาณแกรนูลน้อยกว่าชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวย ซึ่งคล้ายกับลักษณะของอิโอสิโนฟิลที่พบในปลาโรนันหัวใส (*R. eglanteria*) (Walsh and Luer, 2004) ปลาแฟนซีคาร์พ (*C. carpio*) (Tripathi et al., 2004) และปลาทอง *(C. auratus)* (Watson et al., 1963)

ส่วนลักษณะของนิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิลจากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่ามีโครงสร้างและลักษณะที่แตกต่างจากอิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิล คือจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดเซลล์นิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิลในปลากระเบนราหูมีรูปร่างกลม มีแกรนูลขนาดเล็กจำนวนมากอัดแน่นภายในเซลล์ ผิวเซลล์ขรุขระมีส่วนยื่นของไซโตพลาสซึมโดยรอบเซลล์ และภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านเซลล์ประกอบด้วยแกรนูลขนาดเล็ก รูปร่างหลายแบบและติดสีต่างกันทั้งชนิด heterochromatin และ euchromatin เซลล์กลมแต่มองเห็นขอบเขตของเซลล์ไม่ชัดเจน นิวเคลียสเป็นพูรูปร่างไม่แน่นอน ภายในประกอบด้วย heterochromatin และไรโบโซมขนาดเล็ก สามารถพบไมโตคอนเดรียในไซโตพลาสซึมได้บ้างซึ่งลักษณะที่พบนี้คล้ายกับโครงสร้างของ Granulocyte G2 ที่พบในปลาฉลามแมวจุดเล็ก (*S. canicula)* (Thrall et al., 2004; Campbell and Ellis, 2007)

จากผลการศึกษาลักษณะโครงสร้างของเฮเทอโรฟิลในปลากระเบนราหูอาจสรุปได้ว่า อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปกระสวยมีลักษณะคล้ายกับเฮเทอโรฟิลในสัตว์ปีกและสัตว์เลื้อยคลาน ส่วนอิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปกลมมีลักษณะคล้ายกับอิโอสิโนฟิลในสัตว์ชนิดอื่นๆ ในขณะที่นิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิลมีลักษณะคล้ายนิวโทรฟิลในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่เมื่อนำมาประกอบกับผลของปฏิกิริยาการติดสีทางไซโตเคมีพบว่ามีความแตกต่างจากเซลล์ทั้งสามชนิดข้างต้นบ้างเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเกิดจากคุณสมบัติเฉพาะของเซลล์เม็ดเลือดขาวในปลากระเบนราหูเอง หรือเกิดจากขั้นตอนในการศึกษาวิจัย (Thrall et al., 2004)

ค. โมโนไซต์

โมโนไซต์ในปลากระเบนราหูมีลักษณะและรูปร่างคล้ายกับที่มีรายงานในปลากระดูกอ่อนทั่วไป (Hine and Wain, 1987b) เช่น ปลากระเบนจมูกวัว (*R. bonasus*) (Ferreira et al., 2010) ปลาฉลามวาฬ (*R. typus*) (Dove et al., 2010) ปลาฉลาม Spiny dogfish (*S. acanthias*) (Sherburne, 1974) กลุ่มปลาฉลาม Wobbegong (Orectolobidae) (Old and Huveneers, 2006) เป็นต้น คือเป็นเม็ดเลือดขาวที่มีขนาดใหญ่ที่สุด แต่พบในปริมาณน้อยที่สุด ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบโมโนไซต์ประมาณร้อยละ 2.71±1.66 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 18.22±2.53 ไมครอน เซลล์โมโนไซต์โดยส่วนใหญ่มักมีส่วนของไซโตพลาสซึมยื่นออกมาคล้ายกับเท้าเทียมทำให้ขอบเซลล์ไม่เรียบ มองเห็นขอบเขตของเซลล์ไม่ชัดเจน พบแวคิวโอลได้บ้างภายในไซโตพลาสซึม นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ รูปร่างกลมหรือเว้าเข้าตรงกลางคล้ายรูปไต เอียงอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ย้อมติดสีม่วงหรือสีน้ำเงิน ภายในพบกลุ่มของโครมาตินเกาะกลุ่มกันอย่างหยาบๆ เช่นเดียวกันกับในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง โมโนไซต์บางเซลล์มีแกรนูลเล็กละเอียดคล้ายฝุ่นสีม่วงชมพู (azurophilic granule) และมีแวคิวโอลเล็กละเอียดจำนวนมาก ทำให้เห็นเนื้อไซโตพลาสซึมแบบไม่แน่น โมโนไซต์ในปลาที่มีการเคลื่อนที่จากกระแสเลือดเข้าไปสู่อวัยวะต่างๆ ของร่างกายจะถูกเรียกชื่อเป็นแมคโครฟาจ (Abbas et al., 1991)

โมโนไซต์ในปลากระเบนราหูมีขนาดใกล้เคียงกับในปลาฉลามวาฬ (*R. typus*) (Dove et al., 2010) แต่มีขนาดใหญ่กว่าในกลุ่มปลาฉลาม Wobbegong (Orectolobidae) (Old and Huveneers, 2006) และเมื่อเทียบขนาดกับปลากระดูกแข็งน้ำจืดพบว่ามีขนาดใหญ่กว่าเช่นกันเช่น ในปลาหมอสีมาลาวี (*C. dimerus)* (Vazquez and Guerrero, 2007) ปลาบึก *(P. gigas)* (ไพโรจน์, 2537) และปลาหมอเทศ (*O. mossambicus)* (Doggett et al., 1987) เป็นต้น

ปฏิกิริยาการติดสีทางไซโตเคมีของโมโนไซต์ พบว่าให้ผลบวกปานกลางต่อสี AcP และ ANAE และให้ผลบวกอย่างอ่อนต่อสี PAS แต่ให้ผลลบต่อสี PO, SBB, ALP และ TB ซึ่งการให้ผลบวกต่อสี AcP อาจบ่งชี้ถึงหน้าที่ในการเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่กลืนทำลายสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic cell) โดยใช้ขบวนการ oxidative brust เช่นเดียวกับในโมโนไซต์ของสัตว์ชนิดอื่น (Heard et al., 2004) ส่วนผลบวกต่อสี ANAE สอดคล้องกับที่มีรายงานในสัตว์มีกระดูกสันหลังทั่วไปที่พบการทำหน้าที่ของเอ็นไซม์ esterase ได้ค่อนข้างสูงทั้งในเซลล์โมโนไซต์และโมโนบลาส (Monoblast) (ศรีประภา, 2534) เช่นเดียวกับในเซลล์เฮเทอโรฟิลการติดสี ANAE ของโมโนไซต์อาจใช้บ่งบอกถึงความเกี่ยวข้องในกระบวนการป้องกันตัวของเซลล์ (cellular defence mechanism) และคุณสมบัติการเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่กลืนทำลายสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) (Tavares-Dias and Barcellos, 2005) ทั้งนี้การพบผลบวกต่อสี AcP และ ANAE ของเซลล์โมโนไซต์สอดคล้องกับผลการศึกษาในปลาฉลาม Gummy (*M. lenticulatus*) ปลาฉลามแมว (*Apristurus* spp.)

(Hine and Wain, 1987a) และปลากระดูกแข็งทั่วไป (Shigdar et al., 2009) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่พบในเซลล์โมโนไซต์ปกติของสัตว์มีกระดูกสันส่วนใหญ่ (Hayhoe and Flemans, 1982; Heard et al., 2004) ส่วนผลบวกอย่างอ่อนต่อสี PAS แสดงถึงการมีเอ็นไซม์ Perioxidase หรือการที่โครงสร้างของเซลล์มีสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตหรือไกลโคเจนเป็นองค์ประกอบ (Raskin and Valenciano, 2000) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปลากระเบนโมโตโร่ (*P. motoro*) (Chansue et al., 2010) แต่แตกต่างจากผลการศึกษาในปลากระดูกแข็งทั่วไปที่โมโนไซต์จะให้ผลลบต่อสี PAS (Suzuki, 1983; Tripathi et al., 2004)

การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดและส่องผ่าน เซลล์โมโนไซต์ส่วนใหญ่มักมีส่วนของเท้าเทียมจำนวนมากยื่นออกมาจากผิวเซลล์ พบแกรนูลและแวคิวโอลได้บ้างมีไมโตคอนเดรียและเอนโดพลาสมิกเรติคิวลัมชนิดหยาบบ้าง นิวเคลียสเป็นพูติดสีอิเล็กตรอนไม่สม่ำเสมอ ซึ่งเป็นลักษณะที่คล้ายคลึงกับโมโนไซต์ที่พบในปลากระดูกอ่อนทั่วไป (Hine and Wain, 1987b)

ส่วนที่ 2 ค่าโลหิตวิทยา และชีวเคมีในปลากระเบนราหูโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย

ค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมีเปรียบเทียบระหว่างปลากระเบนราหูโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเกือบทุกค่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ปริมาณฮีโมโกลบิน ปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (MCHC) และปริมาณทรอมโบไซต์ โดยเฉลี่ยในปลากระเบนราหูเพศผู้และเพศเมียไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเหล่านี้ที่มีรายงานในกลุ่มปลากระดูกอ่อนชนิดอื่นๆ พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน เช่น ในปลากระเบนโมโตโร่ (*P. motoro*) (พุทธาพงศ์ และคณะ, 2551) ปลาฉลาม Sandbar (*Carcharhinus plumbeus)* (Arnold, 2005) ปลาฉลามวาฬ (*R. typus*) (Dove et al., 2010) และปลากระเบนจมูกวัว (*R. bonasus*) (Ferreira et al., 2010) แต่ทั้งนี้พบว่าในปลากระเบนราหูและปลากระเบนโมโตโร่มีปริมาณเม็ดเลือดแดงโดยรวมต่ำกว่าปลากระดูกอ่อนสายพันธุ์อื่น ในขณะที่ปริมาตรของเม็ดเลือดแดงโดยเฉลี่ย (MCV) และปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงหนึ่งเม็ด (MCH) มีค่าสูงกว่า ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเลือดแดงที่ใหญ่กว่าในปลากระเบนทั้งสองสายพันธุ์ทำให้ค่าที่คำนวณได้สูงกว่า และเมื่อเปรียบเทียบค่าทางโลหิตวิทยาทุกค่าข้างต้นในปลากระเบนราหูกับกลุ่มปลากระดูกแข็งน้ำจืดชนิดอื่นๆ เช่น ปลาหมอสีมาลาวี (*C. dimerus)* (Vázquez and Guerrero, 2007) ปลาแฟนซีคาร์พ *(C. carpio)* (Tripathi et al., 2004) ปลาซ่อนอเมริกัน (*P. obscura)* (Kori-Siakpere et al., 2005) ปลาทับทิม *(O. niloticus mossambicus)* (LeaMaster

et al., 1990) และปลา Chinese sturgeon *(A. sinensis*) (Zexia et al., 2007) เป็นต้น จะพบว่าปลากระเบนราหูมีค่าเฉลี่ยของค่าทางโลหิตวิทยาข้างต้นที่ต่ำกว่าปลาสายพันธุ์ต่างๆ ดังกล่าว

จากการศึกษาจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดในปลากระเบนราหูพบว่ามีค่าอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกับในปลากระดูกอ่อนชนิดอื่นๆ เช่น ปลาฉลามหัวบาตร (*C. leucas*) (Saunders, 1966; Walsh and Luer, 2004) ปลากระเบนโมโตโร่ (*P. motoro*) (พุทธาพงศ์ และคณะ, 2551) ปลาฉลาม Sandbar (*Carcharhinus plumbeus) (*Arnold, 2005) และปลากระเบนจมูกวัว (*R. bonasus*) (Ferreira et al., 2010) และมีค่าใกล้เคียงกับในกลุ่มปลากระดูกแข็งน้ำจืด เช่น ปลาแฟนซีคาร์พ (*C. carpio)* (Tripathi et al., 2004) ปลาหมอเทศ (*O. mossambicus)* (LeaMaster et al., 1990) และปลา Persian sturgeon (*A. persicus*) (Gao et al., 2007) แต่ทั้งนี้จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดในปลากระเบนราหูเพศผู้สูงกว่าในเพศเมียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยไม่พบความแตกต่างระหว่างเพศในค่าร้อยละของเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดเมื่อเปรียบเทียบปริมาณเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดที่พบมีจำนวนใกล้เคียงกันทั้งในปลากระเบนเพศผู้และปลากระเบนเพศเมีย ซึ่งแตกต่างกับผลการศึกษาในปลากระเบนโมโตโร่ (*P. motoro*) (พุทธาพงศ์ และคณะ, 2551) ที่พบว่าปลากระเบนเพศเมียมีจำนวนเม็ดเลือดขาวสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การที่ปลากระเบนเพศผู้มีจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดสูงกว่าปลากระเบนเพศเมียอาจเนื่องมาจากความแตกต่างตามธรรมชาติระหว่างเพศ หรือความแตกต่างของลักษณะทางสรีรวิทยาที่ปลากระเบนเพศผู้ซึ่งมีขนาดลำตัวที่เล็กกว่าอาจมีการตอบสนองต่อภาวะความเครียดจากการจับบังคับที่ไวกว่าปลากระเบนเพศเมียโดยการหลั่งฮอร์โมน corticosterone ซึ่งกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดขาวชนิดเฮเทอโรฟิล (Collazos et al., 1997) ทั้งนี้ในสัตว์เลือดเย็นเพศมีผลต่อจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ คือในเพศเมียจะมีปริมาณลิมโฟไซต์ที่สูงกว่าเนื่องมาจากปัจจัยทางด้านฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงฤดูผสมพันธุ์และตั้งท้อง (Leatherland and Woo, 2010)

ปริมาณของเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดโดยประมาณ ที่มีการศึกษาในปลากระดูกอ่อนส่วนใหญ่ คือ ลิมโฟไซต์ 50-75% เฮเทอโรฟิล 10-30% อิโอสิโนฟิลน้อยกว่า10% โมโนไซต์ 1-3% และเบโซฟิลน้อยกว่า 1% ตามลำดับ ปริมาณและชนิดของเม็ดเลือดขาวที่พบมีความผันแปรสูงในระหว่างชนิดของปลา (Walsh and Luer, 2004) ในการศึกษาครั้งนี้พบปริมาณร้อยละของเม็ดเลือดขาวในปลากระเบนราหูจากมากไปน้อย คือ ลิมโฟไซต์ 65.54±3.79% เฮเทอโรฟิล 31.61±2.01% โมโนไซต์ 2.91±0.83% และไม่พบเบโซฟิล ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากในปลากระเบนโมโตโร่ (*P. motoro*) ที่พบลิมโฟไซต์ในปริมาณสูงสุด รองลงมาคือ เฮเทอโรฟิล อิโอสิโนฟิล เบโซฟิล และโมโนไซต์ ตามลำดับ (พุทธาพงศ์ และคณะ, 2551) หรือในปลาฉลามวาฬ (*R. typus*) ที่พบลิมโฟไซต์ในปริมาณสูงสุด รองลงมาคือเฮเทอโรฟิล อิโอสิโนฟิล นิวโทรฟิล โมโนไซต์ และ

เบโซฟิล ตามลำดับ (Dove et al., 2010) ส่วนในปลากระดูกแข็ง มีการพบเม็ดเลือดขาวในปริมาณและชนิดที่แตกต่างไปเช่นกัน ตัวอย่างเช่น ปลาบึก *(P. gigas)* พบนิวโทรฟิลในปริมาณสูงสุด รองลงมาคือ โมโนไซต์ ลิมโฟไซต์ เบโซฟิล และอิโอสิโนฟิล ตามลำดับ (ไพโรจน์, 2537) ปลาแฟนซีคาร์พ *(C. carpio)* พบลิมโฟไซต์ในปริมาณสูงสุด รองลงมาคือ เฮเทอโรฟิล เบโซฟิล โมโนไซต์ และอิโอสิโนฟิล ตามลำดับ (Tripathi et al., 2004) โดยจำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้อาจมีความแตกต่างกันได้จากความแตกต่างทางสรีรวิทยาในสัตว์แต่ละชนิด (Campbell and Ellis, 2007) หรือเทคนิคในการนับที่ไม่เหมือนกัน ซึ่งวิธีที่แตกต่างกันจะมีค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรผัน (coefficients of variability) ที่แตกต่างกันไปได้มากกว่า 10% (Russo et al., 1986)

ในปลากระเบนราหูไม่พบเม็ดเลือดขาวชนิดเบโซฟิล เช่นเดียวกับที่มีรายงานในปลากระดูกอ่อนอีกหลายชนิด เช่น ปลาฉลาม Spiny dogfish (*S. acanthias*) (Sherburne, 1974) กลุ่มปลาฉลาม Wobbegong (Orectolobidae) (Old and Huveneers, 2006) และปลาฉลาม Port Jackson shark (*H. portusjacksoni*) (Stokes and Firkin, 1971) เป็นต้น โดยปกติเบโซฟิลเป็นเม็ดเลือดขาวชนิดที่พบได้น้อยที่สุดในปลากระดูกอ่อน คือ น้อยกว่า 1% ของปริมาณเม็ดเลือดขาวโดยรวม (Walsh and Luer, 2004) ทั้งนี้จำนวนของเบโซฟิลที่หลากหลายในปลากระดูกอ่อนแต่ละชนิดมีปัจจัยจากชนิดของสัตว์ แหล่งที่อยู่อาศัย ฤดูกาลและอายุของสัตว์ (Emery, 1986)

สำหรับค่าทางชีวเคมีพบเพียงปลากระเบนเพศผู้มีปริมาณแมกนีเซียมในพลาสม่า (Mg) และคลอไรด์ในพลาสม่า (Cl) ที่สูงกว่าปลากระเบนเพศเมียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ในขณะที่ปลากระเบนราหูเพศเมียมีค่าเอ็นไซม์ Creatinine kinase (CK) สูงกว่าในปลาเพศผู้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยปกติค่าอิเล็กโตรไลท์ต่างๆ จะมีความสำคัญต่อการรักษาสมดุลของแรงดันออสโมติกในปลาน้ำเค็มมากกว่าปลาน้ำจืด โดยทั่วไปการเปลี่ยนแปลงระดับอิเล็กโตรไลท์ในปลาน้ำจืดมักมาจากอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมภายนอกเป็นหลัก (Leatherland and Woo, 2010) ในส่วนของแมกนีเซียมจะทำงานสัมพันธ์กับแคลเซียม โดยแมกนีเซียมในปลาเกือบทั้งหมดจะถูกสะสมอยู่ในกระดูก ส่วนที่เหลือพบในเซลล์ของเนื้อเยื่ออ่อน ความเข้มข้นของแคลเซียมและแมกนีเซียมมีบทบาทสำคัญในกลไกการรักษาสมดุลภายในร่างกายของปลาและระดับจะแปรผันตามฤดูกาล คือ ช่วงก่อนการวางไข่ปลาจะมีความเข้มข้นของแคลเซียมและแมกนีเซียมที่เพิ่มขึ้น ในขณะช่วงการวางไข่และหลังการวางไข่แคลเซียมและแมกนีเซียมจะมีระดับที่ลดลง (Srivastava and Srivastava, 1994) การเปลี่ยนแปลงของระดับแมกนีเซียมในปลาน้ำจืดมักมีสาเหตุมาจากการลดลงของอัตราการกรองที่ glomerulus ของไตซึ่งจะส่งผลให้มีการดูดซึมโซเดียมกลับลดลงและขับแมกนีเซียมเพิ่มขึ้นเพื่อช่วยเพิ่มปริมาณการขับน้ำออก ทำให้ระดับของโซเดียมและแมกนีเซียมในซีรัมมีการลดลง ส่วนในปลาทะเลการเสียหน้าที่การทำงานของไตจะลด

การขับแมกนีเซียมและซัลเฟต เป็นสาเหตุให้ระดับแมกนีเซียมและซัลเฟตเพิ่มสูงขึ้น (Stoskopf, 1993) ส่วนคลอไรด์จะทำงานสัมพันธ์กับโซเดียม โดยในปลากระดูกอ่อนมีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในน้ำเค็มหรือน้ำจืดโดยใช้กลไกการควบคุมแรงดันออสโมติกและอิออน ทำให้ปลาสามารถรักษาความเข้มข้นของเกลือในพลาสมาและภายในเซลล์ให้อยู่ระดับปกติเท่ากับปริมาตรของเซลล์ ภาวะที่มีความเข้มข้นของโซเดียมในกระแสเลือดต่ำกว่าปกติ (hyponatremia) และภาวะที่มีความเข้มข้นของคลอไรด์ในกระแสเลือดต่ำกว่าปกติ (hypochloremia) ในปลาน้ำจืดสามารถเกิดขึ้นเนื่องจากการสูญเสียหน้าที่การทำงานของเหงือกหรือและโรคไต หรือในสภาพแวดล้อมที่น้ำมี pH ต่ำ หรือน้ำอ่อนที่มีค่า alkalinity ต่ำ (Thrall et al., 2004) การที่พบระดับอิเล็กโตรไลท์ทั้งสองค่าในปลากระเบนเพศผู้สูงกว่าเพศเมียอาจเนื่องมาจากความแตกต่างทางสรีรวิทยาในสัตว์แต่ละตัว หรือขั้นตอนการเก็บตัวอย่างและการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งฤดูกาล เพศ หรือสภาพแวดล้อมอาจไม่ใช่ปัจจัยที่ทำให้เกิดความแตกต่างของค่าอิเล็กโตรไลท์ดังกล่าว เนื่องจากไม่พบความแตกต่างในค่าชีวเคมีอื่นๆ ซึ่งมีความสัมพันธ์กัน อีกทั้งปลากระเบนราหูทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาเป็นปลาที่มีสุขภาพดีที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำเดียวกัน และมีค่าคุณภาพน้ำไม่แตกต่างกันตลอดช่วงปี

การพบระดับเอ็นไซม์ CK ในปลากระเบนราหูเพศเมียสูงกว่าในปลาเพศผู้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) มีปัจจัยที่เป็นไปได้ คือ ขนาดของตัวปลากระเบน ซึ่งในขั้นตอนของการตกปลาต้องใช้วิธีการดึงปลาที่ติดเบ็ดขึ้นมาจากพื้นท้องน้ำที่ปลาอาศัยอยู่หรือที่เรียกว่า “การเย่อ” การตกปลากระเบนเพศเมียที่มีขนาดใหญ่กว่าอย่างมากจึงมีความลำบากและใช้เวลานานกว่าปลาเพศผู้ ซึ่งระยะเวลาการจับบังคับที่ยาวนานกว่าอาจเป็นสาเหตุให้ปลากระเบนเพศเมียมีการหลั่งเอ็นไซม์ CK ในปริมาณที่สูงกว่า โดยเป็นที่ทราบกันดีว่าเอ็นไซม์ CK เป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่มีความจำเพาะมากที่สุดต่อการทำงานของกล้ามเนื้อ อวัยวะหลักที่ทำหน้าที่ผลิตเอ็นไซม์ CK ในปลา คือ กล้ามเนื้อ หัวใจ และสมอง ทั้งนี้ระดับของเอ็นไซม์ CK จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อกล้ามเนื้อมีการทำงานมากขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น การขนส่ง การถูกจับ การผ่าตัด และเหตุการณ์ที่ก่อความเครียดหรือความเสียหายต่อกล้ามเนื้อ (Cliff and Thurman, 1994; Shahsavani et al., 2010) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่พบในครั้งนี้

เมื่อเปรียบเทียบค่าชีวเคมีต่างๆ ในปลากระเบนราหูกับปลากระดูกอ่อนชนิดอื่นๆ เช่น ปลากระเบน Southern stingray *(Dasyatis americana)* (Cain and Harms, 2004) ปลากระเบนจมูกวัว (*R. bonasus*) (Ferreira et al., 2010) ปลาฉลาม Bonnethead (*S. tiburo)* (Harms and Segars, 2002) และปลาฉลามวาฬ (*R. typus*) (Dove et al., 2010) พบว่าค่าชีวเคมีบางค่าอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกัน แต่มีบางค่าที่มีความแตกต่างและมีความแปรผันสูง ซึ่งได้แก่ เอนไซม์ Alanine aminotransferase (ALT หรือ SGPT) เอนไซม์ Aspartate aminotransferase (AST หรือ SGOT) เอนไซม์ Alkaline Phosphatase (AP) ปริมาณกลูโคสในกระแสเลือด (Blood glucose)

ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ปริมาณคลอเรสเตอรอล (Cholesterol) เอ็นไซม์ CK ฮอร์โมนคอร์ติซอล ปริมาณแลคเตท ปริมาณโซเดียม และปริมาณคลอไรด์ ทั้งนี้ในปลากระดูกอ่อนมักมีค่าชีวเคมีในช่วงปกติที่ค่อนข้างกว้าง เนื่องจากปลาเป็นสัตว์เลือดเย็น ขบวนการเมแทบอลิซึมในเลือดขึ้นกับอุณหภูมิและฤดูกาลเป็นปัจจัยสำคัญอีกทั้งยังมีความแตกต่างในด้านของชนิด อายุ เพศ ภาวะทางโภชนาการ สภาวะทางกายภาพ สภาพทางสิ่งแวดล้อม และการจัดการมาเกี่ยวข้อง (Ellsaesser and Clem, 1986; Rao, 1969; Collazos, 1997; Luskova, 1998; Ekrem, 2004; Metwally and Fouad, 2008; Shahsavani, 2010)

ส่วนที่ 3 ความยาวลำตัวรวมหาง ความยาวลำตัว ความกว้างลำตัว และอัตราส่วนความกว้างลำตัวต่อความยาวลำตัวระหว่างปลากระเบนราหูโตเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย

จากลักษณะทางกายภาพ และการเก็บข้อมูลในด้านขนาดของลำตัว คือ ความยาวลำตัวรวมหาง ความยาวลำตัว และความกว้างลำตัว พบว่าปลากระเบนราหูโตเต็มวัยเพศเมียมีขนาดลำตัวที่ใหญ่กว่าปลากระเบนเพศผู้อย่างเห็นได้ชัดโดย เพศเมียมีขนาดลำตัวกว้าง x ยาว (ไม่รวมหาง) เท่ากับ 121.31±50.10x111.96±41.77 เซนติเมตร ในขณะที่เพศผู้มีขนาดเพียง 96.37±30.43x88.48±28.89 เซนติเมตร ทั้งนี้พบว่าปลากระเบนราหูจะมีลำตัวด้านกว้างยาวมากกว่าลำตัวด้านยาวเล็กน้อย ทำให้มีรูปร่างเกือบเป็นทรงกลม และมีขนาดความยาวลำตัวรวมหางเป็น 2.5 เท่า ของความยาวลำตัวโดยประมาณ ซึ่งในปลากระเบนชนิดอื่นๆ ทั้งกระเบนน้ำจืดและกระเบนน้ำเค็มเพศเมียมักมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้เช่นกัน โดยสาเหตุที่ปลากระเบนเพศเมียมีขนาดใหญ่กว่าเนื่องมาจากเหตุผลด้านการขยายพันธุ์ ปลาเพศเมียจำเป็นต้องมีขนาดลำตัวที่ใหญ่เพื่อสะสมสารอาหารและพลังงานไว้สำหรับการตั้งท้องและการเลี้ยงดูลูก ในภาวะปกติปลากระเบนจะมีการจับคู่หรืออยู่รวมกันมากกว่า 1 ตัว เฉพาะในช่วงฤดูผสมพันธุ์เท่านั้น จากนั้นปลาเพศเมียจะทำหน้าที่ตั้งท้องและเลี้ยงดูลูกอ่อน ซึ่งในช่วงนี้จะเป็นช่วงที่ปลากระเบนต้องอดอาหารเป็นเวลานาน (Carrier et al., 2004) อีกทั้งการมีรูปร่างขนาดใหญ่ยังช่วยเพิ่มความสามารถในการปกป้องลูกจากผู้ล่าและศัตรู เนื่องจากปลากระเบนเพศเมียมีพฤติกรรมซ่อนลูกอ่อนไว้ที่บริเวณใต้ลำตัวและฝังตัวอยู่ใต้พื้นดินบริเวณก้นแม่น้ำเพื่อซ่อนตัวจากศัตรู (Taylor, 2000)

เมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนของความกว้างลำตัวต่อความยาวลำตัว (disc width: girdle length) พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างเพศอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) แต่ในปลากระเบนเพศผู้มีแนวโน้มที่จะมีความกว้างลำตัวมากกว่าเพศเมียเมื่อมีขนาดความยาวของลำตัวไม่รวมหางที่เท่ากัน

ทั้งนี้ข้อมูลด้านขนาดลำตัวทั้งสามค่า และอัตราส่วนของความกว้างลำตัวต่อความยาวลำตัวที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเกี่ยวกับกลุ่มประชากร

หรือนิเวศวิทยาต่อไป ซึ่งในอนาคตควรทำการศึกษาเพื่อหาแนวทางในการทำนายหรือประมาณน้ำหนักตัวหรืออายุของปลาจากขนาดของลำตัว ดังเช่นในปลาชนิดอื่น เช่น ปลาฉลาม (Stoskopf, 1993; Carrier et al., 2004)

ส่วนที่ 4 ค่าคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำที่เก็บตัวอย่างปลากระเบนราหู

จากการเก็บข้อมูลด้านคุณภาพน้ำในบริเวณแม่น้ำแม่กลอง ต.อัมพวา อ.อัมพวา จ.สมุทรสงคราม ซึ่งเป็นแหล่งน้ำธรรมชาติที่เป็นแหล่งอาศัยหลักของปลากระเบนราหู ในช่วงระหว่างวันที่ 17 มีนาคม พ.ศ. 2552 ถึงวันที่ 7 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553 พบว่ามีค่าอยู่ในช่วงที่ของค่ามาตรฐานที่ยอมรับได้และไม่มีผลต่อสุขภาพของปลากระเบน (Mohan and Aiken, 2004) อาจกล่าวได้ว่าแม่น้ำแม่กลองในบริเวณ อ.อัมพวา จ. สมุทรสงคราม ยังเป็นแหล่งน้ำที่มีความเหมาะสมสำหรับการเป็นแหล่งอาศัยของสัตว์น้ำชนิดต่างๆ โดยบริเวณที่พบปลากระเบนราหูเป็นบริเวณใกล้ปากแม่น้ำที่จะไหลลงสู่อ่าวไทย มีค่าความเค็มอยู่ในช่วง 0-4 ppt แสดงให้เห็นว่าปลากระเบนราหูเป็นสัตว์ที่สามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งในน้ำจืดและในน้ำกร่อย เช่นเดียวกับที่มีรายงานในประเทศอินโดนีเซียและออสเตรเลีย (Compagno and Robert, 1982; Vidthayanon, 1997) ทั้งนี้ในปลาค่าคุณภาพน้ำของแหล่งที่อาศัยอยู่เป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อสุขภาพของปลาโดยตรง เนื่องจากปลากระเบนเป็นสัตว์ที่มีความทนทานต่อมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมต่ำและมีความไวต่อความเป็นพิษจากแอมโมเนียและไนไตรท์เป็นอย่างมาก จึงมักพบเฉพาะในแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีความสมบูรณ์และมีระดับมลพิษต่ำ (นันทริกา, 2554)

ข้อมูลด้านคุณภาพน้ำในแหล่งอาศัยของปลากระเบนราหูในประเทศไทยยังมีอยู่น้อยมาก แม้จะเป็นปลาที่พบได้ในแม่น้ำสายใหญ่ของประเทศไทยหลายสาย อาทิเช่น แม่น้ำเจ้าพระยา น่าน แม่กลอง บางปะกง ท่าจีน โขง และแม่น้ำตาปี (Taylor, 2000) ค่าคุณภาพน้ำที่มีรายงานส่วนมากมักเป็นข้อมูลพื้นฐานที่เก็บรวบรวมโดยกรมประมงเป็นหลัก การศึกษาเกี่ยวกับปลากระเบนราหูในอนาคตจึงควรพิจารณาถึงการศึกษาด้านคุณภาพน้ำประกอบเนื่องจากเป็นข้อมูลสำคัญในการชี้วัดคุณภาพชีวิตของสัตว์น้ำและภาวะมลพิษในสิ่งแวดล้อม

5.2 บทสรุป และข้อเสนอแนะ

การศึกษาลักษณะรูปร่างทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และไซโตเคมีของเซลล์เม็ดเลือด ค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมีในครั้งนี้ ทำให้ทราบลักษณะโครงสร้างและสามารถจำแนกเม็ดเลือดชนิดต่างๆ ในปลากระเบนราหูได้ ซึ่งแม้จะมีความคล้ายคลึงกับปลาในกลุ่มปลากระดูกอ่อนอื่นๆ แต่พบลักษณะที่จำเพาะ คือเม็ดเลือดแดงที่มีขนาดใหญ่มาก และชนิดของเม็ดเลือดขาวที่แตกต่างจากที่มีรายงานในปลากระดูกอ่อนชนิดอื่น ซึ่งการย้อมสี Wright's Giemsa และสี Wright สามารถแยก

ลักษณะรูปร่างของเม็ดเลือดชนิดต่างๆ ได้ ส่วนปฏิกิริยาการติดสีทางไซโตเคมีของเซลล์ไม่สามารถแยกชนิดของแกรนูโลไซต์ได้ชัดเจนแต่สามารถใช้บ่งบอกหน้าที่และองค์ประกอบของเซลล์เบื้องต้นได้ เมื่อนำไปประกอบกับการศึกษาลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนสามารถแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือด และอธิบายโครงสร้างภายในของเม็ดเลือดแต่ละชนิดได้อย่างชัดเจน ทั้งนี้ลักษณะของเม็ดเลือดแดงและทรอมโบไซต์ที่พบในปลากระเบนราหูมีลักษณะคล้ายคลึงกับที่พบในปลากระดูกอ่อนชนิดอื่น ส่วนเม็ดเลือดขาวในปลากระเบนราหูแบ่งออกเป็น 3 ชนิดหลัก ตามลักษณะการติดสี รูปร่าง และแกรนูล คือ ลิมโฟไซต์ เฮเทอโรฟิล และโมโนไซต์ โดยเม็ดเลือดขาวชนิดที่พบได้มากที่สุดคือ ลิมโฟไซต์ รองลงมาคือ เฮเทอโรฟิล และโมโนไซต์ ตามลำดับ ซึ่งลิมโฟไซต์และโมโนไซต์มีลักษณะและโครงสร้างรวมถึงปฏิกิริยาการติดสีทางไซโตเคมีที่คล้ายคลึงกับที่มีรายงานในปลากระดูกอ่อนและปลากระดูกแข็งชนิดอื่น ส่วนเฮเทอโรฟิลมีรูปร่างลักษณะที่หลากหลายซึ่งสามารถจัดจำแนกออกได้เป็น 3 ชนิดย่อยตามความแตกต่างของแกรนูลและการติดสี คือ อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลรูปแท่งที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับเฮเทอโรฟิลในสัตว์ปีกและสัตว์เลื้อยคลาน อิโอสิโนฟิลลิก-เฮเทอโรฟิลชนิดที่มีแกรนูลกลมมีลักษณะคล้ายคลึงกับอิโอสิโนฟิล และนิวโทรฟิลิก-เฮเทอโรฟิลที่แกรนูลติดสีเป็นกลางหรือไม่ติดสีมีลักษณะคล้ายคลึงกับนิวโทรฟิลในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยไม่พบเม็ดเลือดขาวชนิดเบโซฟิลในปลากระเบนราหูในการศึกษาครั้งนี้

เพศมีอิทธิพลต่อค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมีในปลากระเบนราหูน้อยมาก โดยพบเพียงจำนวนเม็ดเลือดขาวรวม ปริมาณแมกนีเซียม และปริมาณคลอไรด์ ในปลากระเบนเพศผู้ที่สูงกว่าปลาเพศเมีย ส่วนปลาเพศเมียพบเพียงเอนไซม์ CK ที่สูงกว่าปลาเพศผู้ ทั้งนี้ค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมีในปลากระเบนซึ่งเป็นสัตว์เลือดเย็นมีความผันแปรค่อนข้างสูง อีกทั้งปัจจัยในเรื่องเพศ สภาพแวดล้อม ฤดูกาล และอาหารยังมีอิทธิพลอย่างมากต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าเหล่านี้

ในการศึกษาด้านของขนาดลำตัวพบว่าปลากระเบนราหูเพศเมียมีขนาดใหญ่กว่าปลากระเบนเพศผู้อย่างมาก ซึ่งคล้ายกับในปลากระเบนสายพันธุ์อื่น ทั้งนี้ในอนาคตควรมีการศึกษาเพื่อหาแนวทางในการทำนายหรือประมาณน้ำหนักตัวจากขนาดของลำตัว ส่วนข้อมูลทางด้านคุณภาพน้ำพบว่าคุณภาพน้ำในแม่น้ำแม่กลอง อ.อัมพวา จ.สมุทรสงคราม ซึ่งเป็นแหล่งอาศัยหลักของปลากระเบนราหู มีค่าอยู่ในช่วงยอมรับได้ต่อการเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของสัตว์น้ำชนิดต่างๆ

การศึกษาครั้งนี้ทำให้ได้ข้อมูลทางด้านโลหิตวิทยาที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำมาวินิจฉัย เปรียบเทียบ เพื่อประเมินสุขภาพของปลากระเบนราหูได้อย่างถูกต้องแม่นยำมากขึ้น และเป็นข้อมูลอ้างอิงพื้นฐานในปลากระดูกอ่อนชนิดอื่นๆ อย่างไรก็ตามในอนาคตควรทำการศึกษาทางด้านโลหิตวิทยาในปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์อื่นๆ ที่พบในประเทศไทย รวมถึงการสำรวจ

จำนวนประชากรปลากระเบนราหูที่ยังคงเหลืออยู่ในแหล่งน้ำของประเทศไทย เพื่อส่งเสริมการอนุรักษ์และเพิ่มจำนวนในสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ที่มีคุณค่าของประเทศไทยต่อไปในอนาคต

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมประมง. 1947 (2490). พระราชบัญญัติการประมง พ.ศ. 2490 (รก. 2490/3/81/14 มกราคม 2490). กรุงเทพฯ: กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2-5.

เฉลียว ศาลากิจ. 2005 (2548). โลหิตวิทยาทางสัตวแพทย์. นครปฐม: โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรม การเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 31-251.

ทรงศักดิ์ ภูสีอ่อน. 2008 (2551). การประยุกต์ใช้ SPSS วิเคราะห์ข้อมูลงานวิจัย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กาฬสินธุ์: ประสานการพิมพ์. 107-364.

นันทริกา ชันซื่อ. 2011 (2554). ความหลากหลายทางชีวภาพกับวิถีพอเพียง: ปลากระเบนเจ้าพระยา ราหูน้ำจืด. จุฬาสัมพันธ์. 54: 3.

นันทริกา ชันซื่อ และสมหวัง พิมลบุตร. 2007 (2550). การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับค่าทางเคมีในเลือดของปลาน้ำจืดในวงศ์ปลาตะเพียนหรือปลาคาร์พ (Family Cyprinidae). สัตวแพทยสาร. 58: 22-30.

พุทธาพงศ์ เกียรติธรรมลาภ พณพงศ์ นาคธน เมธิรา เลิศหิรัญวงศ์ อัจฉริยา ไศละสูต และนันทริกา ชันซื่อ. 2008 (2551). การศึกษาลักษณะ ค่าทางโลหิตวิทยา การย้อมสีทางไซโตเคมี และค่าทางเคมีโลหิตของเลือดในปลากระเบนน้ำจืด (*Potamotrygon motoro*) ที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์. โครงการเสริมทักษะการวิจัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 39 หน้า.

ไพโรจน์ เติมเตชาติพงศ์. 1994 (2537). การศึกษาค่าโลหิตวิทยา และรูปร่างลักษณะเม็ดเลือดขาวของปลาบึกด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน. (วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 135 หน้า.

รุจิพร ประทีปเสน. 1998 (2541). การเตรียมตัวอย่างสำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด. กรุงเทพฯ: ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2-19.

วิรัช จิ๋วแหยม. 2001 (2544). ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับคุณภาพน้ำ และการวิเคราะห์คุณภาพในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 90-94.

ศิริเพ็ญ เวชชการัณย์ อรัญญา ตันติปัญจพร และวิรัช ธรรมวินิจฉัย. 1992 (2535). คู่มือหลักสูตรเร่งรัดจุลทรรศน์อิเล็กตรอน สำหรับงานวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. กรุงเทพฯ: ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 5-95.

ศรีประภา ชินประเสริฐศักดิ์. 1992 (2534). Questions and answers in cytochemistry of blood cells. กรุงเทพฯ: ชัยเจริญ. 35-49.

อัจฉริยา ไศละสูต. 2001 (2544). ข้อมูลพื้นฐานทางโลหิตวิทยา และค่าทางสรีรวิทยาของปลาเสือตอ (*Datnioides microlepis Bleeker*). ประมวลบทคัดย่อผลงานวิจัยปี 2545-2546. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 15-18.

อัจฉริยา ไศละสูต วิจิตร บรรลุนารา และสมพร เตชะงามสุวรรณ. 2006 (2549). ภาคปฏิบัติการเซลล์วิทยาวินิจฉัยในพยาธิวิทยาคลินิกทางสัตวแพทย์. ใน: พยาธิวิทยาคลินิกทางสัตวแพทย์. อัจฉริยา ไศละสูต นพดล พิฬารัตน์ และสุประดิษฐ์ หวังในธรรม (บรรณาธิการ) กรุงเทพฯ: ปอยท์ กราฟิค. 78-80.

ภาษาอังกฤษ

Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pober, J.S. 1991. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 340-378.

Abbink, W., Bevelander, G.S., Rotllant, J., Canario, A.V.M. and Flik, G. 2004. Calcium handling in Sparus auratus: effects of water and dietary calcium levels on mineral composition, cortisol and PTHrP levels. J. Exp. Biol. 207: 4077-4082.

Aengwanich, W. and Tanomtong, A. 2004. Hematological and serum biochemical values of white ibis (*Threskiornis melanocephalus*). Songklanakarin J. Sci. Technol. 26: 823-828.

Alexander, N., Laurs, R.M., McIntosh, A. and Russell, S.W. 1980. Hematological characteristics of albacore, *Thunnus alalunga* (Bonnarerre), and skipjack, *Katsuwonus pelamis*. J. Fish Biol. 16: 383-395.

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, W.G., Taylor, J.R., Good, J.P., Hazon, N. and Grosell, M. 2006. Body fluid volume regulation in elasmobranch fish. Comp. Biochem. Physiol. 148: 3–13.

Arnold, J.E. 2005. Hematology of the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*: Standardization of complete blood count techniques for elasmobranchs. Vet. Clin. Pathol. 34: 115-23.

Bahmani, M., Kazemi, R. and Donskaya, P. 2001. A comparative study of some hematological features in young reared sturgeons (*Acipenser persicus* and *Huso huso*). Fish Physiol. Biochem. 24: 135–140.

Ballantyne, J.S. and Robinson, J.W. 2010. Freshwater elasmobranchs: a review of their physiology and biochemistry. J. Comp. Physiol. 180: 475-493.

Barber, D.L., Westermann, J.E.M. and White, M.G. 1981. The blood cells of the Antarctic icefish, *Chaenocephalus aceratus*; Lönnberg: light and electron microscopic observations. J. Fish Biol. 19: 11-28.

Bettger, W.J., Spry, D., Cockell, K., Young, C.C. and Hilton, J. 1987. The distribution of zinc and copper in plasma, erythrocytes and erythrocytes membranes of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol. 87: 445-451.

Bennett, A.F. 1978. Activity metabolism of the lower vertebrates. Annu. Rev. Physiol. 400: 447-468.

Bjornsson, B.T., Persson, P., Larsson, D., Johannsson, S.H. and Sundell, K. 1999. Calcium balance in teleost fish: transport and endocrine control mechanism. In: Calcium metabolism. J. Danks, C. Dacke, G. Flik and D. Gay (eds). Comp. Endocr. 29-38.

Black, E.C., Bosomworth, N.J. and Docherty, C.E. 1966. Combined effects of starvation and exercise on glycogen metabolism of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish Res. Board Can. 23: 1461-1463.

Blaxhall, P.C. and Daisley, K.W. 1973. Routine hematological methods for use with fish blood. J. Fish Biol. 5: 771-781.

Blaxhall, P.C. and Hood, K. 1985. Cytochemical enzyme staining of fish lymphocytes separated on a Percoll gradient. J. Fish Biol. 27: 749-755.

Bourke, R.E. 1983. Causes of mortalities in skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) following capture stress. (M. Sc. Thesis). University of Hawii. 128 p.

Boyd, C.E. 1995. Bottom Soils, Sediment and Pond Aquaculture. New York: Chapman & Hall. 269-281.

Brill, R., Bushnell, P., Schroff, S., Seifert, R. and Galvin, M. 2008. Effects of anaerobic Exercise accompanying catch-and-release fishing on blood-oxygen affinity of the sandbar shark (*Carcharhinus plumbeus*, Nardo). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 354: 132–143.

Brooks, E.J., Mandelman, J.W., Sloman, K.A., Liss, S., Danylchuk, A.J., Cooke, S.J., Skomal, G.B., Philipp, D.P., Sims, D.W. and Suski, C.D. 2011. The physiological response of the Caribbean reef shark (*Carcharhinus perezi*) to longline capture. Comp. Biochem. Physiol. xx: xxx–xxx.

Brucka-Jastrzebska, E., Kawczuga, D., Rajkowska, M. and Protasowicki, M. 2009. Level of Microelements (Cu, Zn, Fe) and Macroelements (Mg, Ca) in Freshwater fish. J. Elementology. 14: 441-444.

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

Cain, D.K. and Harms, C.A. 2004. Plasma Biochemistry reference values of wild-caught Southern Stingray *(Dasyatis americana).* J. Zoo and Wildlife Med. 35: 471-476.

Campbell, T.W. 1995. Avian Hematology and Cytology. 2nd edition. Ames: Blackwell. 6-29.

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

Campbell, T.W. and Ellis, C.K. 2007. Avian and Exotic Animal Hematology and cytology 3rd edition. Oxford: Blackwell. 93-111.

Campbell, T. and Murru, F. 1990. An introduction to fish hematology. The Compendium. 12: 525-532.

Carrier, J.C., Musick, J.A. and Heithaus, M.R. 2004. Biology of Sharks and Their Relatives. Virginia: Terramare Partners Inc. 316-340.

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

Catia, M.P., Jared, C., Charvet-Almeida, P., Mauricio, P.A., Neto, D.G., Marcela, S.L., Hadded, V.J., Barbaro, K.C. and Antoniazzi, M.M. 2007. Morphological characterization of the venom secretory epidermal cells in the stinger of marine and freshwater stingrays. Toxicon. 50: 688-697.

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.

Cenini, P. 1984. The Ultrastructure of Leucocytes in carp, *Cyprinus carpio*. J. Zool. (Lond.). 204: 509-520.

Chansue, C., Tangtrongpiroj, J., Assawawongkasem, N. and Sailasuta, A. 2010. Blood Cytochemical Staining of Freshwater Stingray (*Potamotrygon spp.*). CU. Vet. Sci. Ann. Con. 9: 95.

Chansue, N., Sailasuta, A., Tangtrongpiros, J., Wangnaitham, S. and Asawawongkasem, N. 2011. Hematology and clinical chemistry of adult yellow-headed temple turtles (*Hieremys annandalii*) in Thailand. Vet. Clin. Pathol. 40: 174-184.

Cliff, G. and Thurman, G.D., 1994. Pathological and physiological effects of stress During capture and transport in the Juvenile dusky shark (*Carcharhinus obscurus*). Comp. Biochem. Physiol. 78A: 167-173.

Collazos, E.M., Ortega, E., Barriga, C. and Rodrìguez, B.A. 1997. Seasonal variation in haematological parameters in male and female Tinca tinca. Mol. Cell. Biol. 183: 165–168.

Compagno, L.J.V. and Roberts, T.R. 1982. Freshwater stingrays (Dasyatidae) of Southeast Asia and New Guinea, with description of a new species of *Himantura* and reports of unidentified species. Env. Biol. Fish. 7: 321–339.

Courtois, L.A. 1976. Hematology of juvenile striped bass, *Morone saxatilis (walbaum)*, acclimated to different environmental conditions. Comp. Biochem. Physiol. 54: 221-223.

Cowey, C.B. and Walton, M.J. 1989. Intermediary metabolism. In: Fish Nutrition. J.E. Harver (ed). San Diego: Academic Press. 259-329.

Cunha, D.F., Montiero, J.P., Santos, V.M., Oliveira, F.A. and Cunha, S.F. 2000. Hyponatremia in acute-phase response syndrome patients in general surgical wards. Am. J. Nephrol. 20: 37-40.

Cvancara, V.A. and Conte, F.P. 1970. Gill alkaline phosphatase activity during salt water adaptation of sockeye salmon (*Onchorhynchus nerka*) Walbaum. Int. J. Biochem. 1: 597-603.

Doggett, T.A., Wrathmell, A.B. and Harris, J.E. 1987. A cytochemical and light microscopical study of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicus*, Cichlidae. J. Fish Biol. 31: 147-153.

Dove, A.D.M., Arnold, J. and Clauss, T.M. 2010. Blood cells and serum chemistry in the world's largest fish: the whale shark (*Rhincodon typus)*. Aqua. Biol. 9: 177-183.

Dulvy, N.K. and Reynolds, J.D. 1997. Evolutionary transitions among egg-laying, live-bearing and maternal inputs in sharks and rays. Proc. R. Soc. Lond. 264: 1309-1315.

Egami, M.I. and Sasso, W.S. 1988. Cytochemical observations of blood cells of *Bothrops yararaca* (Reptilia Squamata). Rev. Bras. Biol. 48: 155-159.

Ellis, A.E. 1977. The leucocytes of fish: A review. J. Fish Biol. 11: 453-491.

Ellsaesser, C.K. and Chem, L.W. 1986. Haematological and immunological change in channel catfish stressed by handling and transport. J. Fish Biol. 28: 511-521.

Ekrem, S.C. 2004. Blood chemistry (electrolytes, lipoprotiens and enzymes) values of black scorpion fish (*Scorpaena porcus Linneaus*, 1758) in the Dardanelles, Turkey. J. Biol. Sci. 4: 716-719.

Emery, S.H. 1985. Hematology and cardiac morphology in the great white shark, *Carcharodon carcharias*. Southern California Acad. Sci. Memoirs. 9: 14-20.

Emery, S.H. 1986. Hematologic comparisons of Endothermic VS Ectothermic Elasmobranch fishes. Copeia. 86: 700-705.

Evenberg, D., de Graaff, P., Fleuren, W., van Muiswinkel, W.B. 1986. Blood changes in carp (*Cyprinuscarprio*) induced by ulcerative *Aeromonas salmonicida* infections. Vet. Immunol. Immunopathol. 12: 321-330.

Ezzat, A.A., Shaban, M.B. and Farghaly, A.M. 1974. Studies on the blood characteristic of *Tilapia zilli* (Gervais) I. Blood cells. J. Fish Biol. 6: 1-12.

Fange, R. 1976. The internal environment of marine fish. In: Comparative Physiology: Water, Ions and Fluid Mechanics. K. Schmidt-Nielsen, L. Bolis, and S.H.P. Maddrell (eds). Cambridge: Cambridge University Press. 239-245.

Fange, R. 1987. Lymphomyeloid system and blood cell morphology in elasmobranchs. Arch. Biol. 98: 187-208.

Fange, R. 1994. Blood cells, haemopoiesis and lymphomyeloid tissues in fish. Fish Shellfish Immunol. 4: 405-411.

Farrell, A.P. 1984. A review of cardiac performance in the teleost heart: intrinsic and humoral regulation. Can. J. Zool. 62: 523-536.

Ferreira, C.M., Field, C.L. and Tuttle, A.D. 2010. Hematological and plasma biochemical parameters of aquarium-maintained cownose rays. J. Aquat. Anim. Health. 22: 123-128.

Gao, Z.X., Wang, W.M, Abbas, K., Zhou, X.Y., Yang, Y., Diana, J.S., Wang, H.P., Wang, H.L., Li, Y. and Sun, Y.H. 2007. Haematological characterization of loach, *Misgurnus anguillicaudatus*: comparison among diploid, triploid and tetraploid specimens. Comp. Biochem. Physiol.147: 1001–1008.

Guerreiro, P.M., Fuentes, J., Power, D.M., Ingleton, P.M., Flik, G. and Canario, A.V.M. 2001. Parathyroid hormone-related protein: a calcium regulatory factor in sea bream (*Sparus auratus* L.) larvae. Am. J. Physiol. 281: 855-860.

Guijarro, A.I., Lopez-Patino, M.A., Pinillos, M.L., Isorna, E., De Pedro, N., Alonso-Gomez, A.L., Alonso-Bedate, M. and Delgado, M.J. 2003. Seasonal changes in haematology and metabolic resources in the tench. J. Fish Biol. 62: 803-815.

Hamlett, W.C. 1999. Sharks, skates, and rays: the biology of elasmobranch fishes. 1st edition. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. 36-45.

Hardig, J. and Hoglund, L.B. 1983. On accuracy in estimating fish blood variables. Comp. Biochem. Physiol. 75: 35-40.

Harikrishnan, R., Rani, N. and Balasundaram, M. 2003. Hemotological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture. 211: 1-4, 41-50.

Harms, C., Ross, T. and Segars, A. 2002. Plasma biochemistry reference values of wild bonnethead sharks, *Sphyrna tiburo*. Vet. Clin. Pathol. 31: 111-115.

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 bloodcells and hematologic and plasma biochemical reference ranges in green iguanas. J. Am. Vet. Med. Assoc. 218: 915.921.

Hayhoe, F.G.J. and Flemans, R.J. 1982. Color atlas of hematological cytology. 2nd edition. New York: Wiley. 235-240.

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

Heisler, N., Weitz, H. and Weitz, A.M. 1976. Extracellular and intracellular pH with changes of temperature in the dogfish *(Scyliorhinus stellaris).* Resp. Physiol. 26: 249-263.

Hélène, R. and Gérard, B. 1996. Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. Mar. Environ. Res. 41: 1, 27-43.

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. Pathol. 28: 8-15.

Hille, S. 1982. A literature review of the blood chemistry of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich. J. Fish Biol. 20: 535-569.

Hine, P.M. 1992. The granulocytes of fish. Fish Shellfish Immunol. 2: 79-98.

Hine, P.M. and Wain, J.M. 1987a. The enzyme cytochemistry and composition of elasmobranch granulocytes. J. Fish Biol. 30: 465–475.

Hine, P.M. and Wain, J.M. 1987b. Composition and ultrastructure of elasmobranch Granulocytes III. Sharks (Lamniformes). J. Fish Biol. 30: 567-576.

Hobby, A.C., Pankhurst, N.W. and Haddy, J.A. 2000. The effect of short term confinement stress on binding characteristics of sex steroid binding protein (SBP) in female black bream (*Acanthopagrus butcheri*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comp. Biochem. Physiol. 125: 85–94.

Houston, A.H. 1997. Review, are the classical hematological variables acceptable indicators of fish health? Trans. Am. Fish. Soc. 126: 879–893.

Hyder, S.L., Cayer, M.L. and Pettey, C.L. 1983. Cell types in peripheral blood of the nurse shark: An approach to structure and function. Tissue Cell.15: 437-455.

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

Kabata-Pendias, A. and Pendias, H. 1999. Biogeochemistry of trace element. Warszawa: Wyd. Nauk. PWN. 23-239.

Kaneko, J.J. 1983. An Investigation of a Monogenetic Trematode Infestation of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) in seawater. (M.Sc.Thesis). University of Hawaii. 75 p.

Kaziauskiene, N. and Vosyliene, M.Z. 1995. The effect of sublethal concentrations of copper on physiological indices of rainbow trout *Salmo gairdneri* [In Russian]. J. Ichthyol. 35: 412-416.

Knowles, D.M., Hoffman, T., Ferrarini, M. and Kunkel, H.G. 1978. The demonstration of acid alpha naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes usefulness as a T cell marker. Cell Immunol. 35: 112-123.

Knowles, S., Hrubec, T.C., Smith, S.A. and Bakal, R.S. 2006. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*). Vet. Clin. Pathol. 35: 434-440.

Korcock, D.E., Houston, A.H. and Gray, J.D. 1988. Effects of sampling conditions on selected blood variable of rainbow trout, *Salmo gairdneri Richardson*. J. Fish Biol. 33: 319-330.

Kori-Siakpere, O., Ake, J.E.G. and Idoge, E. 2005. Haematological characteristics of the African snakehead, *Parachanna obscura*. African J. Biotech. 4: 527-530.

Last, P.R. and Compagno, L.J.V. 1999. Myliobatiformes: Dasyatidae. In: FAO identification guide for fishery purposes, the living marine resources of the Western Central Pacific; Vol.3 Batoid fishes, chimaeras and bony fish part 1 (Elopidae to Linophrynidae). K.E. Carpenter and L.H. Niem (eds). Rome: Food Agricultural Organization of the United Nations. 123-128.

Leamaster, B.R., Brock, J.A., Fujioka, R.S. and Nakamura, R.M. 1990. Hematologic and blood chemistry values for *Sarotherodon melanotheron* and a red hybrid Tilapia in freshwater and seawater. Comp. Biochem. Physiol. 97: 525-529.

Leatherland, J.F. and Woo, P.T.K. 2010. Fish diseases and disorders, Volume 2: Non-infectious Disorder. 2nd edition. Oxford: CAB International. 85-101.

Long, J.A. 1995. The Rise of Fishes: 500 million years of evolution. Baltimore: Johns Hopkins University Press. 1-223.

Luskova, V. 1998. Factors Affecting Haematological Indices in Free-living Fish Populations. Acta Vet. Scand. 67: 249-255.

Martinez-Porchas, M., Martinez-Cordova, L.R. and Ramos-Enriquez, R. 2009. Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress? Pan-American J. Aquat. Sci. 4: 159-161, 165-167.

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.

Mazeaud, F. and Donaldson, E.M. 1977. Primary and secondary effects of stress on fish. Trans. Am. Fish. Soc. 106: 201-202.

McDonald, D.G. and Milligan, C.L. 1992. Chemical properties of the blood. In: Fish Physiology. W.S. Hoar, D.J. Randall and A.P. Farrell (eds). San Diego: Academic Press. 55-133.

Meseguer, J., Lopez-Ruiz, A. and Angeles-Esteban, M. 1994. Cytochemical characterization of leucocytes from the seawater teleost, gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Histochemistry. 102: 37–44.

Metwally, M.A.A. and Fouad, I.M. 2008. Some Biochemical Changes Associated with Injection of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) with Oviaprim and Pregnyl for Induction of Artificial Spawning. Global. Vet. 2: 320-326.

Metin, K., Türkozan, 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.

Mohan, P.J. and Aiken, A. 2004. Water Quality and Life Support Systems for Large Elasmobranch Exhibits. In: The Elasmobranch Husbandry Manual, Captive Care of Sharks, Ray and their Relatives. M. Smith, D. Warmolts, D. Thoney and R. Hueter (eds.). Columbus: Ohio Biological Survey. 69-88.

Mommsen, T.P., Vijayan, M.M. and Moon, T.W. 1999. Cortisol on teleost: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Rev. Fish Biol. Fish. 9: 211-268.

Monkolprasit, S and Roberts, T.R. 1990. *Himantura chaopraya*, a new giant freshwater stingray from Thailand. Jpn. J. Ichthyol. 37: 203-208.

Motlagh, S.P., Zarejabab, A.M., Nasrabadi, R.G., Ahmadifar, E. and Molaee, M. 2010. Harmatology, morphology and blood cells characteristics of male and female Siamese fighting fish (*Betta splendens*). Comp. Clin. Pathol. 45: 123-128.

Najiah, M., Nadirah, M., Marina, H., Lee, S.W. and Nazaha, W.H. 2008. Quantitative Comparisons of Erythrocyte Morphology in Healthy Freshwater Fish Species from Malaysia. Res. J. Fish. Hydrobiol. 3: 32-35.

Natt, M.P. and Herrick, C.A. 1952. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leukocytes of the chicken. Poult. Sci. 31: 735-738.

Nelson, K., Jones, J., Jacobson, S. and Reimschuessel, R. 1999. Elevated Blood Urea Nitrogen (BUN) Levels in Goldfish as an Indicator of Gill Dysfunction. J. Aquat. Anim. Health. 11: 52-60.

Oikari, A. and Soivio, A. 1975. Influence of sampling methods and anaesthetization on various haematological parameters of several teleosts. Aquaculture. 6: 171-180.

Old, J.M. and Huveneers, C. 2006. Morphology of the Blood Cells from Three Species of Wobbegong Sharks (*Orectolobus species*) on the East Coast of New South Wales. Zoo Biol. 25: 73–82.

Osbaldiston, G.W. and Sullivan, R.J. 1978. Cytochemical demonstration of esterases in peripheral blood leucocytes. Am. J. Vet. Res. 39: 683-685.

Padmavathy, P. and Ramanathan, N. 2010. Quantitative Changes of Glycogen and Lactate in Muscle, Blood, and Liver tissues of *Oreochromis mossambicus* under Hypoxia and Recovery. Tamilnadu J. Vet. Anim. Sci. 6: 54-56.

Patent, G.J. 1970. Comparison of some hormonal effects on carbohydrate metabolism in an elasmobranch (*Squalus acanthias*) and a holocephalan (*Hydrolagus colliei*). Gen. Comp. Endocr. 14: 215-242.

Pogonoski, J.J., Pollard, D.A. and Paxton, J.R. 2002. Conservation Overview and Action Plan for Australian Threatened and Potentially Threatened Marine and Estuarine Fishes. Canberra: Environment Australia. 111-112.

Poluhowich, J.J. and Parks, R.P. 1972. A comparative study of blood chemistry and respiration in marine and freshwater eels. Prog. Fish-Cult. 34: 33-38.

Rainboth, W.J. 1996. Fishes of the Cambodian Mekong, FAO identification guide for fishery purposes. Rome: Food Agricultural Organization of the United Nations. 26-55.

Rao, G.M.M. 1969. Effect of activity, salinity and temperature on plasma concentrations of rainbow trout. Can. J. Zool. 47: 131-134.

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

Reid, S.G., Bernier, N.J. and Perry, S.F. 1998. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. Comp. Biochem. Physiol. 120: 1-27.

Roberts, T.R. and Karnasuta, J. 1987. *Dasyatis laoensis*, a new whiptailed stingray (family Dasyatidae), from the Mekong River of Laos and Thailand. Environ. Biol. Fish. 20: 161-167.

Roche, H. and Boge, G. 1996. Fish Blood Parameters as a Potential Tool for Identification of Stress Caused by Environmental Factors and Chemical Intoxication. Mar. Environ. Res. 41: 27-43.

Rosenzweig, L.J. 1988. Anatomy of the shark, Text and Dissection Guide. Iowa: Brown Publisher. 11-81.

Rotllant, J., Tort, L., Montero, D., Pavlidis, M., Martinez, M., Wendelaar-Bonga, S.E. and Balm, P.H. 2003. Background colour influence on the stress response in cultured red porgy *Pagrus pagrus*. Aquaculture. 223: 129-139.

Rowley, A.F. 1988. Fish. In: Vertebrate blood cells. A.F. Rowley and N.A. Rateliffe (eds.). Cambridge: Cambridge University Press: 19-127.

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.

Sailasuta, A., Wangnaitham, S. and Chansue, N. 2006a. Mophology, cytochemistry and ultrastructural characteristics of Indian star tortoise (*Geochelone elegans*) blood cells. Proceeding of AZWMP 2006. 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. Proceeding of AZWMP 2006. Bangkok, Thailand. October 26-29: 52.

Sakamoto, S. and Yone, Y. 1973. Effect of dietary calcium/phosphorus ratio upon growth, feed efficiency and blood serum Ca and P level in red sea bream. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 39: 343-348.

Salakij, C., Salakij, J., Apibal, S., Narkkong, N., Chanhome, L. and Rochanapat, N. 2002. Hematology, morphology, cytochemistry staining, and ultrastructural characteristics of blood cells in King Cobras (*Ophiophagus Hannah*). Vet. Clin. Pathol. 31: 116-126.

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. Hematol. Int. 8: 102-107.

Saunders, D.C. 1966. Elasmobranch blood cells. Copeia. 66: 348-351.

Semeniuk, C.A.D., Bourgeon, S., Smith, S.L. and Rothley, K.D. 2009. Hematological Differences between stingrays at tourist and non-visited sites suggest physiological costs of wildlife tourism. Biol. Conserv. 142: 1818–1829.

Shahsavani, D., Mohri, M. and Gholipour, K.H. 2010. Determination of normal values of some blood serum enzymes in *Acipenser stellatus* Pallas. Fish Physiol. Biochem. 36: 39-43.

Sherburne, S.W. 1974. Occurrence of both heterophils and neutrophils in the blood of the spiny dogfish, *Squalus acanthias*. Copeia. 74: 259-261.

Shigdar, S., Harford, A. and Ward, A.C. 2009. Cytochemical characterisation of the leucocytes and thrombocytes from Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*, Mitchell). Fish Shellfish Immunol. 26: 731-736

Singh, H.S. and Reddy, T.V. 1990. Effect of copper sulfate on hematology, blood chemistry and hepato-somatic index of an Indian catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), and its recovery. Ecotoxicol. Environ. Saf. 20: 30-35.

Snyder, G. K. and Sheafor, B.A. 1999. Red Blood Cells: Centerpiece in the Evolution of the Vertebrate Circulatory System. Amer. Zool. 39: 189-198.

Soivio, A. and Oikari, A. 1976. Haematological effects of stress on a teleost, *Esox lucius* L. J. Fish Biol. 8: 397-411.

Srivastav, A.K., Srivastav, S.K., Sasayama, Y., Suzuki, N. and Norman, A.W. 1997. Vitamin D Metabolites Affect Serum Calcium and Phosphate in Freshwater Catfish, *Heteropneustes fossilis*. Zool. Sci. 14: 743-746.

Srivastava, S.J. and Srivastava, S.K. 1994. Seasonal changes in liver and serum proteins, serum calcium, inorganic phosphate and magnesium levels in relation to vitellogenesis in a freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). Ann. Endocrinol (Paris). 55: 197-202.

Stokes, E.E. and Firkin, B.G. 1971. Studies of the peripheral blood of the Port Jackson shark (*Heterodontus portusjacksoni*) with particular reference to the thrombocyte. Brit. J. Haematol. 20: 427-435.

Stoskopf, M.K. 1993. Clinical pathology. In: Fish Medicine. M.K. Stoskopf (ed.). Philadelphia: W.B. Saunders Company. 113-134.

Suzuki, K. 1983. A Light and Electron Microscope Study on the Phagocytosis of Leukocytes in Rockfish and Rainbow Trout. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 50: 1305-1315.

Swift, D.J. 1983. Blood component changes in the Atlantic mackerel (*Scomber scombrus* L.) subjected to capture, handling and confinement. Comp. Biochem. Physiol. 76: 795-802.

Tavares-Dias, M., Affonso, E.G., Oliveira, S.R., Marcon, J.L. and Egami, M.I. 2008. Comparative study on hematological parameters of farmed matrinxa, *Brycon amazonicus* Spix and Agassiz, 1829 (Characidae: Bryconinae) with others Bryconinae species. Acta Amazon. 38: 799-806.

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: 215-220.

Tavares-Dias, M., Barcellos, J.F.M., Marcon, J.L., Menezes, G.C., Ono, E.A. and Affonso, E.G. 2007. Hematological and Biochemical Parameters for the Pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Osteoglossiformes, Arapaimatidae) in Net Cage Culture. J. Ichthyol. 2: 61-68.

Tavares-Dias, M. and Mataqueiro, M.I. 2004. Caracteristics hematologicas, bioquimicas e biometricas de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) oriundos de cultivo intensive. Acta Scientiarum. 26: 157-162.

Tavares-Dias, M., Moraes, F.R. and Imoto, M.E. 2008. Hematological parameters in two Neotropical Freshwater Teleost, *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae) and *Prochilodus lineatus* (Prochilodontidae). J. Biol. 24: 96-101.

Taylor, H.C. 2000. IUCN Red List of Threatened Species. International Union for The Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN). Cambridge: IUCN Gland. 22-57.

Thrall, M.A., Balcer, D.C., Campbell, T.W., Denicola, D., Fettman, M.J., Lassen, E.D., Rebar, A. and Weiser, G. 2004. Veterinary Hemotology and Clinical Chemistry. Philadelphia: ALPpincott Williams & Wilkins. 259-498.

Tripathi, N. K., Latimer, K. S. and Burnley, V.V. 2004. Hematologic reference intervals for koi (*Cyprinus carpio*), including blood cell morphology, cytochemistry, and ultrastructure. Vet. Clin. Path. 33: 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 niloticus*. Part II. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 38: 273-277.

Vidthayanon, C. 1997. Elasmobranch Diversity and Status in Thailand. Proceedings of Elasmobranch Biodiversity,Conservation and Management, The IUCN Species Survival Commission International Seminar and Workshop. Sabah, Malaysia. July 27: 104-112.

Vazquez, G.R. and Guerrero, G.A. 2007. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Tissue Cell. 39: 151-160.

Viola, S., Zohar, G. and Arieli, Y. 1986. Requirements of phosphorus and its availability from different sources for intensive pond culture species in Israel, Part II. Carp culture. Bamidgeh. 38: 44-54.

Waagbo, R., Sandnes K., Espelid S. and Lie, O. 1988. Haematological and biochemical analyses of Atlantic salmon *(Salmo salar L.)* suffering from cold water vibriosis (Hitra disease). J. Fish. Dis. 11: 417-423.

Wagner, G.F., Jaworski, E.M. and Haddad, M. 1998. Stanniocalcin in the seawater salmon: structure, function, and regulation. Am. J. Physiol. 43: R1177-R1184.

Watson, L.J., Shecmeister, I.L. and Jackson, L.L. 1963. The hematology of goldfish, *Carassius auratus.* Cytologia. 28: 118-130

Walsh, C.J. and Luer, C.A. 1998. Comparative phagocytic and pinocytic activities of leukocytes from peripheral blood and lymphomyeloid tissues of the nurse shark (*Ginglymostoma cirratum* Bonaterre) and the clearnose skate (*Raja eglanteria* Bosc). Fish Shellfish Immunol. 8: 197-215.

Walsh, C.J. and Luer, C.A. 2004. Elasmobrach Hematology: Identification of Cell Types and Practical Applications. In: The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Ray and their Relatives. M. Smith, D. Warmolts, D. Thoney and R. Hueter (eds.). Columbus: Ohio Biological Survey. 307-324.

Wardle, C.S. 1978. Non-release of lactic acid from anaerobic swimming muscle of plaice *Pleuronectes platessa*, A stress reaction. J. Exp. Biol. 77: 141-155.

Weinreb, E.L. 1963. Studies on the fine structure of teleost blood cells, Peripheral Blood. Anat. Rec.147: 219–238.

Wells, R.M.G., McIntyre, R.H., Morgan, A.K. and Daviet, P.S. 1986. Physiological Stress Responses in Big Gamefish After Capture: Observations on Plasma Chemistry and Blood Factors. Comp. Biochem. Physiol. 84: 565-569.

Wetzel, B.K., Spicer, S.S. and Horn, R.G. 1967. Fine structural localization of Acid and Alkaline Phosphatase in cells of Rabbit blood and bone marrow. J. Histochem. Cytochem.15: 311-334.

Williams, R.W. and Warner, M.C. 1976. Some observations on the Stained blood cellular elements of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. J. Fish Biol. 9: 491-497.

Wongrat, P. 1998. Whip-tailed freshwater stingrays family Dasyatidae of Thailand. In: Adaptability and conservation of freshwater elasmobranchs. Bangkok: Report of Research Project, Grant-in-Aid for International Scientific Research (Field Research). 35-40.

Wood, C.M., Turner, J.D. and Graham, M.S. 1983. Why do fish die after severe exercise? J. Fish Biol. 22: 189-201.

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.

Zapata, A. and Carrato, A. 1981. Ultrastructure of elasmobranch and teleost erythrocytes. Acta Zoologica. 62: 129-135.

Zexia, G., Weimin, W., Yi, Y., Abbas, K., Dapeng, L., Guiwei, Z. and James S.D. 2007. Morphological studies of peripheral blood cells of the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. Fish Physiol. Biochem. 33: 213-222.

.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างเลือดและทำเครื่องหมาย

1.1 เข็มเบอร์ 21 G

1.2 เข็มเบอร์ 20 G

1.3 หลอดเก็บเลือดขนาด 5 มิลลิลิตร

1.4 สำลีแห้ง

1.5 กล่องใส่ตัวอย่างเลือดและแผ่นความเย็น (cool plate)

1.6 Microcapillary tube

1.7 หลอดเก็บตัวอย่างเลือดชนิด Plain tube

1.8 หลอดเก็บตัวอย่างเลือดชนิด Lithium heparin

1.9 ตลับเมตรขนาด 5 เมตร

1.10 เข็มไมโครชิพและเครื่องอ่าน (Verichip ™)

2. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด

2.1 Hemocytometer

2.2 เครื่อง Spectrophotometer

2.3 เครื่อง Hematocrit centrifuge และ PCV reading chart

2.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

2.5 เครื่อง Reflotron plus®

2.6 เครื่อง Nova4 plus®

2.7 เครื่อง Integra800®

2.8 Micropipette และ pipette tip

2.9 Slide และ cover slip

2.10 RBC pipette

2.11 WBC pipette

2.12 Coplin jar

2.13 กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ที่ต่อกับกล้องถ่ายภาพ

2.14 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและส่องผ่าน

2.15 ชุดตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดด้วยตนเอง Accu-Check Advantage (Roche®)

2.16 ใบเลื่อย

2.17 ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. สารเคมี

3.1 Lithium heparin

3.2 Glutaraldehyde

3.3 Absolute methanol

3.4 Absolute ethanol

3.5 0.1 M Phosphate buffer

3.5 Wright's Giemsa stain และ Buffer

3.7 สารมาตรฐานสำหรับการตรวจวัด Aspartate aminotransferase, Alanine aminotransferase, Alkaline phosphatase, Creatinine, Creatinine kinase, Cortisol, Total protein, Albumin, Globulin, Total cholesterol, Triglyceride, Blood glucose, Uric acid, Blood urea nitrogen, Lactate, Sodium, Potassium, Calcium, Chloride, Inorganic phosphorus, Magnesium และ Serum iron

3.8 สารละลาย Natt and Herrick's solution

3.9 ชุดสีย้อมพิเศษสำหรับการย้อมทางไซโตเคมี ได้แก่

3.9.1 สีพิเศษ Sudan black B: SBB (Sigma Procedure No.380)

3.9.2 สีพิเศษ Peroxidase: PO (Sigma Procedure No.391)

3.9.3 สีพิเศษ Acid phosphatase: AcP (Sigma Procedure No.181)

3.9.4 สีพิเศษ Alpha-naphthyl acetate esterase: ANAE (Sigma Procedure No.90)

3.9.5 สีพิเศษ Alkaline phosphatase: ALP (Sigma Procedure No.8)

3.9.6 สีย้อม Periodic acid –Schiff: PAS

3.9.7 สีย้อม Toluidine blue: TB

4. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

4.1 อุปกรณ์ตรวจวัดความเค็ม (Salinity Refractometer)

4.2 อุปกรณ์ตรวจหาปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved oxygen meter) และอุณหภูมิน้ำ (YSI®รุ่น 57)

4.3 ชุดตรวจคุณภาพน้ำสำเร็จรูป (Red sea®) ได้แก่

- ค่าความกระด้างรวม (Total hardness)
- ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)
- ค่าความเป็นด่าง (Alkalinity)
- ปริมาณแอมโมเนียรวม (Total ammonia; NH_3)
- ปริมาณไนไตรท์ (Nitrite; NO_2)
- ปริมาณไนเตรท (Nitrate; NO_3)
- ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide; H_2S)
- ปริมาณคลอรีน (Chlorine)
- ปริมาณแคลเซียม (Calcium; Ca)
- ปริมาณแมกนีเซียม (Magnesium; Mg)

5. อุปกรณ์สำหรับจับบังคับสัตว์

5.1 ชุดอุปกรณ์ตกปลา ซึ่งประกอบด้วย คันเบ็ด เอ็น และเบ็ดตกปลา

5.2 สวิงขนาดใหญ่

5.3 ตาข่ายขนาดใหญ่

5.4 ผ้าสำหรับผูกบริเวณเงี่ยงพิษ

5.5 ปลาเหยื่อ เช่น ปลาช่อน ปลาดุก ปลาชะโด

5.6 เรือยนต์สำหรับตกปลา

ภาคผนวก ข
แสดงหนังสืออนุญาตจับสัตว์น้ำจากกรมประมง

เลขที่ 12/2553

หนังสืออนุญาต
ให้เจ้าหน้าที่ทำการประมงเพื่อประโยชน์ทางวิชาการ

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา 9 แห่งพระราชบัญญัติการประมง พ.ศ. 2490 และประกาศกระทรวงเกษตร เรื่อง กำหนดฤดูปลามีไข่และกำหนดชนิด ขนาด และวิธีใช้เครื่องมือทำการประมง ลงวันที่ 17 เมษายน 2507 ซึ่งออกตามความในมาตรา 32 แห่งพระราชบัญญัติการประมง พ.ศ. 2490

อธิบดีกรมประมงจึงอนุญาตให้เจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทำการประมงเพื่อประโยชน์ทางวิชาการประกอบการจัดทำวิทยานิพนธ์ของนางสาวเยาว์ประภา มาธุระ เรื่อง "ลักษณะรูปร่าง และไซโตเคมีของเซลล์เม็ดเลือด โลหิตวิทยา และชีวเคมีของปลากระเบนเจ้าพระยา (*Himantura chaophraya*) ในประเทศไทย" โดยใช้เครื่องมือเบ็ดราว และอวน ทำการประมงในที่จับสัตว์น้ำประเภทที่รักษาพืชพันธุ์และที่สาธารณประโยชน์แม่น้ำแม่กลอง แม่น้ำบางปะกง แม่น้ำเจ้าพระยา และแม่น้ำโขง ในเขตท้องที่จังหวัดสมุทรสงคราม ฉะเชิงเทรา และจังหวัดที่แม่น้ำเหล่านี้ไหลผ่านได้ ทั้งนี้ นับตั้งแต่วันที่ได้รับอนุญาต ถึงวันที่ 30 เมษายน 2554

การอนุญาตให้ทำการประมงดังกล่าว ต้องอยู่ภายใต้การควบคุมดูแลของ รศ. สพ.ญ. ดร. นันทริกา ชันซื่อ และ ดร. อมรรัตน์ เสริมวัฒนกุล อย่างใกล้ชิด

อนุญาต ณ วันที่ [illegible] เมษายน พ.ศ. 2553

ภาคผนวก ค
แสดงใบอนุญาตการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานวิจัย จากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขที่.....11310061......

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ใบอนุญาตให้ใช้สัตว์ใน
งานวิจัย งานทดสอบ งานผลิตชีววัตถุ งานสอน และงานอื่น ๆ

ใบอนุญาตนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่าคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้พิจารณาโครงการวิจัยเรื่อง "ลักษณะรูปร่าง และไซโตเคมีของเซลล์เม็ดเลือด โลหิตวิทยา และชีวเคมีของปลากระเบนราหู (*Himantura chaophraya*) ในประเทศไทย" ซึ่งมีรองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.นันทริกา ชันซื่อ เป็นหัวหน้าหรือเจ้าของโครงการแล้วเห็นสมควรอนุญาตให้ดำเนินการตามโครงการนี้ได้ โดยมีเงื่อนไขว่าผู้ใช้สัตว์ในความรับผิดชอบของโครงการต้องปฏิบัติตามข้อมูลที่กรอกในแบบฟอร์มขออนุญาตใช้สัตว์ที่ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการวิจัยอย่างเคร่งครัด กรณีที่มีการปฏิบัติอย่างหนึ่งอย่างใด นอกเหนือจากที่ระบุในแบบฟอร์มขออนุญาตและเสนอในโครงการ คณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์จะดำเนินการงดใบอนุญาต ฯ นี้ และแจ้งหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทราบ

ลงนาม..
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.ฐานิสร์ ดำรงค์วัฒนโภคิน)
ประธานคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและ
การใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์

ลงนาม..
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.เบญจมาศ ปัทมาลัย)
รองคณบดีฝ่ายวิจัย

วันที่ออกใบอนุญาต...26........กรกฎาคม....2554.....
วันที่หมดอายุ..........26.........กรกฎาคม....2555.....

Chulalongkorn University Animal Care and Use Committee

Certificate of Project Approval	☑ Original ☐ Renew
Animal Use Protocol No. 11310061	**Approval No.** 11310061

Protocol Title

Morphological and Cytochemical characteristics of Blood cells, Hematology and Biochemistry of Giant Freshwater Stingray (*Himantura chaophraya*) in Thailand.

Principal Investigator

Assoc.Prof.Dr. Nantarika Chansue

Certification of Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)

This project has been reviewed and approved by the IACUC in accordance with university regulations and policies governing the care and use of laboratory animals. The review has followed guidelines documented in Ethical Principles and Guidelines for the Use of Animals for Scientific Purposes edited by the National Research Council of Thailand.

Date of Approval	Date of Expiration
July 26, 2011	July 26, 2012

Applicant Faculty/Institution

Faculty of Veterinary Science

Signature of Chairperson	Signature of Authorized Official
Name and Title	**Name and Title**
Asst. Prof. Dr. Thanis Damrongwatanapokin Chairman	Asst. Prof. Dr. Benjamas Patamalai Associate Dean (Research and Academic Service)

The official signing above certifies that the information provided on this form is correct. The institution assumes that investigators will take responsibility, and follow university regulations and policies for the care and use of animals.

This approval is subjected to assurance given in the animal use protocol and may be required for future investigations and reviews.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวเยาประภา มาธุระ เกิดเมื่อวันที่ 2 กรกฎาคม พ.ศ. 2523 จังหวัดลำปาง จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนลำปางกัลยาณี พ.ศ.2541 จบการศึกษาสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อปี พ.ศ. 2548 ได้รับทุนโครงการรับนักเรียนที่มีผลการเรียนดี ระหว่างปีการศึกษา 2542-2547 เมื่อจบการศึกษาได้ทำงานในตำแหน่งนายสัตวแพทย์ ณ โรงพยาบาลสัตว์เขลางค์ จ.ลำปาง เป็นเวลา 1 ปี หลังจากนั้นได้ย้ายมาทำงานในตำแหน่งหัวหน้าฝ่ายดูแลสุขภาพสัตว์ ณ พิพิธภัณฑ์แสดงสัตว์น้ำสยามโอเชียนเวิร์ล กรุงเทพฯ เป็นเวลาทั้งสิ้น 2 ปี และเนื่องจากมีความสนใจในด้านสัตว์น้ำและสัตว์ป่าจึงเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550