โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ โลหิตวิทยาของเขียดงูเกาะเต่า *Ichthyophis kohtaoensis* Taylor, 1960 ในพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่

ชื่อนิสิต นางสาวรุ้งลาวัลย์ ชาภักดี **เลขประจำตัว** 6032051023

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โลหิตวิทยาของเขียดงูเกาะเต่า *Ichthyophis kohtaoensis* Taylor, 1960 ในพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่

Hematology of *Ichthyophis kohtaoensis* Taylor, 1960 in the Huai Hong Khrai Royal Development Study Center, Chiang Mai Province

นางสาวรุ้งลาวัลย์ ชาภักดี

อาจารย์ที่ปรึกษา
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรารัช กิตนะ

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิเชฏฐ์ คนซื่อ

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก
โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	: โลหิตวิทยาของเขียดงูเกาะเต่า *Ichthyophis kohtaoensis* Taylor, 1960 ในพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	: นางสาวรุ้งลาวัลย์ ชาภักดี
อาจารย์ที่ปรึกษา	: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรารัช กิตนะ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิเชฏฐ์ คนซื่อ
ภาควิชา	: ชีววิทยา

บทคัดย่อ

เขียดงูเกาะเต่า *Ichthyophis kohtaoensis* จัดเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่พบกระจายตัวทั่วประเทศไทย โดยอาศัยอยู่ในพื้นที่ชื้น รายงานการศึกษาโลหิตวิทยาในเขียดงูชนิดนี้ที่ผ่านมายังมีข้อมูลพื้นฐานไม่เพียงพอ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาโลหิตวิทยาของ *I. kohtaoensis* ในพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่ โดยใช้ตัวอย่างเลือดจากเขียดงูตัวเต็มวัยไม่แยกเพศ จำนวน 3 ตัว นำมาเตรียมสไลด์เลือดเกลี่ยบาง ย้อมสี Giemsa's แล้วศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ผลการศึกษาสัณฐานวิทยา สามารถจำแนกเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดแดงระยะ mature erythrocyte และระยะ immature erythrocyte ผลการวิเคราะห์สัดส่วนของนิวเคลียสต่อไซโทพลาซึม พบว่า immature erythrocyte มีค่าเฉลี่ยของสัดส่วนมากกว่าระยะ mature erythrocyte อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เซลล์เม็ดเลือดขาวประกอบด้วย ลิมโฟไซต์ เซลล์มีรูปร่างกลม นิวเคลียสกลม ขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ (เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 18.90 ± 2.60 ไมโครเมตร) โมโนไซต์ เซลล์มีรูปร่างกลม นิวเคลียสรีหรือคล้ายไต วางตัวเอียงไปด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 18.91 ± 2.04 ไมโครเมตร) นิวโทรฟิล เซลล์มีรูปร่างกลม นิวเคลียสมีหลายพู วางตัวกลางเซลล์ (เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 18.50 ± 2.00 ไมโครเมตร) และอิโอซิโนฟิล เซลล์มีรูปร่างกลม แกรนูลย้อมติดสีแดงกระจายทั่วไซโทพลาซึม (เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 18.50 ± 1.81 ไมโครเมตร) ทรอมโบไซต์ เซลล์มีรูปร่างรีหรือคล้ายกระสวย นิวเคลียสรูปร่างรี (ความยาวและความกว้างเฉลี่ย 21.57 ± 2.57 และ 11.97 ± 1.28 ไมโครเมตร ตามลำดับ) พิสัยของค่าเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น เท่ากับ 22.0 – 23.0 % ผลการนับแยกชนิดเซลล์เม็ดเลือดขาว พบว่าลิมโฟไซต์มีสัดส่วนมากที่สุด (90.17%) รองลงมาคือ โมโนไซต์ (4.30%) นิวโทรฟิล (3.67%) และอิโอซิโนฟิล (1.83%) ตามลำดับ ไม่พบเบโซฟิลจากตัวอย่างเลือดที่ศึกษาในครั้งนี้ ส่วนทรอมโบไซต์ มีจำนวนเฉลี่ย 71 เซลล์ ต่อ 2,000 เซลล์เม็ดเลือดแดง ข้อมูลทางด้านโลหิตวิทยาจากการศึกษาในครั้งนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการประเมินสุขภาวะเบื้องต้นของ *I. kohtaoensis* และสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดใกล้เคียงกันในอนาคตต่อไป

คำสำคัญ: เขียดงูเกาะเต่า ค่าทางโลหิตวิทยา เซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์เม็ดเลือดแดง ทรอมโบไซต์ สัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือด

Research Title	: Hematology of *Ichthyophis kohtaoensis* Taylor, 1960 in the Huai Hong Khrai Royal Development Study Center, Chiang Mai Province
Student name	: Ms. Runglawan Charpugdee
Advisor	: Assistant Professor Jirarach Kitana, Ph.D.
Co-Advisor	: Assistant Professor Wichase Khonsue, Ph.D.
Department of	: Biology

Abstract

Koh Tao Island Caecilian *Ichthyophis kohtaoensis* is a species of amphibian found throughout Thailand. Its natural habitats are humid areas. The basic knowledge of hematology of this caecilian in previous study is still limited. Therefore, in this research, we studied the hematology of *I. kohtaoensis* collected form the Huai Hong Khrai Royal Development Study Center, Chiang Mai Province. Blood samples were collected from three adults without sex specifying. Then they were smeared on the slides, stained with Giemsa's solution and studied through a microscope. Morphology results showed different types of blood cells. Erythrocytes included mature and immature stages. The result of nucleus to cytoplasm ratio analysis showed that the ratio of immature erythrocyte was significantly higher than that of the mature erythrocyte. Lymphocyte was round-shaped with large and round-shaped nucleus (mean diameter: 18.90 ± 2.60 µm). Monocyte was round-shaped with eccentric oval or kidney-shaped nucleus locating at the rim of the cell (mean diameter: 18.91 ± 2.04 µm). Neutrophil was round-shaped with multiple-lobed nucleus (mean diameter: 18.50 ± 2.00 µm). Eosinophil was round-shaped with eosinophilic granules distributed throughout the cytoplasm (mean diameter: 18.50 ± 1.81 µm). Thrombocyte was elliptical to spindle in shape with an elliptical nucleus (mean length and width: 21.57 ± 2.57 and 11.97 ± 1.28 µm, respectively). Packed cell volume ranged between 22.0 - 23.0 %. Differential leukocyte count showed that lymphocyte has largest proportion (90.17%), followed by monocyte (4.30%), neutrophil (3.67%) and eosinophil (1.83%), respectively. In this study basophil was not found in all blood samples. Thrombocytes were found at an average number of 71 cells per 2,000 erythrocytes. The data from this study will be useful as the basic information for hematology and health assessment of *I. kohtaoensis* and other amphibians in this group in the future.

Keywords: blood cell morphology, erythrocyte, hematological parameter, *Ichthyophis kohtaoensis,* leukocyte, thrombocyte

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์หรืองานวิจัยในครั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย จึงทำให้โครงการสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรารัช กิตนะ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิเชฎฐ์ คนซื่อ รวมทั้งอาจารย์ท่านอื่น ๆ ได้แก่ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพดล กิตนะ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรวีร์ พรหมโชติ และอาจารย์ดร.ภาณุพงศ์ ธรรมโชติ ที่ให้ความกรุณาสนับสนุน ให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือและความอนุเคราะห์ในการปฏิบัติงาน การวิเคราะห์ข้อมูล ตลอดจนการตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล ทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร.ธงชัย ธิติภูรี (พี่นุ) ดร.ธฤษวรรณ ไตรจิตต์ (พี่จิ๊บ) นายสุธิโรจน์ มีสวัสดิ์ (พี่นิว) นายรชตะ มณีอินทร์ (พี่กล้า) รวมทั้งพี่ ๆ ในห้องปฏิบัติการ Microtechnique และ Histology ทุกคนที่คอยให้การสนับสนุน ความช่วยเหลือ ตลอดจนคำติเตือนและคำปรึกษาที่ดีมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ชัย ดำรงโรจนวัฒนา อ. ดร.เกรียง กาญจนวตี และอ. ดร.มารุต เฟื่องอาวรณ์ ผู้ประสานงานรายวิชาโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาคการศึกษาปลาย ปีการศึกษา 2563 ที่คอยให้คำแนะนำให้คำปรึกษา ความอนุเคราะห์ รวมทั้งให้ข้อมูลต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์เกี่ยวกับองค์ประกอบและเอกสารต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

ขอขอบคุณคณาจารย์และบุคลากรทุก ๆ ท่าน ในภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยอบรมสั่งสอน ให้คำปรึกษา ให้วิชาความรู้ รวมทั้งคอยแนะนำและชี้ทางในสิ่งที่ดีและถูกต้องเสมอมา

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการ Microtechnique และ Histology ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการปฏิบัติงาน ตลอดจนอุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำโครงการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการนำตัวอย่างเลือดเขียดงูเกาะเต่า *I. kohtaoensis* มาใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณทุนวิจัยจากโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ที่สนับสนุนเงินทุนในการทำวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัว รวมทั้งเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกคน ที่คอยให้กำลังใจ คำแนะนำ และคำปรึกษาที่ดีเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ก
Abstract ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญภาพ ..... ช
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ 1
1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ 3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม 4
2.1. เขียดงูเกาะเต่า 4
2.2. ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่ 6
2.3. โลหิตวิทยาในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 7
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการ 10
3.1. สัตว์ทดลอง 10
3.2. การเก็บตัวอย่างเลือด 10
3.3. การเตรียมสไลด์เลือดเกลี่ยบาง (Blood smear) และการย้อมสี Giemsa's stain 11
3.4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวัดขนาดเซลล์เม็ดเลือด 11
3.4.1. การจำแนกชนิดของเซลล์เม็ดเลือด 11
3.4.2. การวัดขนาดของเซลล์เม็ดเลือด 12
3.5. การศึกษาค่าทางโลหิตวิทยา 12
3.5.1. การหาค่าจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น 12
3.5.2. การนับแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาว 13
3.5.3. การนับทรอมโบไซต์ 13
3.6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 13
บทที่ 4 ผลการศึกษา 14
4.1. สัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือด 14
4.2. ค่าทางโลหิตวิทยา 19
4.2.1. ค่าจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น 19

4.2.2. การนับแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาว 19
4.2.3. การนับทรอมโบไซต์ 19
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการศึกษา 20
เอกสารอ้างอิง 23
ภาคผนวก 26

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4-1 ข้อมูลการวัดเชิงสัณฐานวิทยา (Morphometric data) ของเซลล์เม็ดเลือดแดงระยะ mature erythrocyte และ immature erythrocyte ในเขียดงูเกาะเต่า *I. kohtaoensis* 15

ตารางที่ 4-2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดในเขียดงูเกาะเต่า *I. kohtaoensis* 16

ตารางที่ 4-3 ค่าการนับแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาวในเขียดงูเกาะเต่า *I. kohtaoensis* 19

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2-1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของเขียดงูเกาะเต่า *I. kohtaoensis*.....4
ภาพที่ 2-2 การกระจายตัวของเขียดงูเกาะเต่าในพื้นที่ต่าง ๆ.....5
ภาพที่ 2-3 ตำแหน่งและพื้นที่ป่าอนุรักษ์ในศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจาก พระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่.....6
ภาพที่ 3-1 การเจาะเลือดเขียดงูจากบริเวณหัวใจ..... 10
ภาพที่ 3-2 ขั้นตอนการทำ Blood smear และย้อมสี Giemsa's stain..... 11
ภาพที่ 3-3 การอ่านค่าเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นด้วย PCV reading chart 13
ภาพที่ 4-1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ในเขียดงูเกาะเต่า *I. kohtaoensis* 18

บทที่ 1
บทนำ

1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

เขียดงูเกาะเต่า มีชื่อสามัญ คือ Koh Tao Island Caecilian และมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Ichthyophis kohtaoensis* Taylor, 1960 จัดเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังจำพวกสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในอันดับ Gymnophiona วงศ์ Ichthyophiidae และสกุล *Ichthyophis* จัดเป็นสัตว์ที่มีความเสี่ยงต่ำต่อการสูญพันธุ์ในบัญชีแดงของสหภาพเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติหรือ IUCN (van Dijk et al., 2004) ในปัจจุบันเขียดงูเกาะเต่ามีการกระจายตัวอยู่ในหลายประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ประเทศกัมพูชา ลาว เมียนมาร์ตอนใต้ เวียดนาม และไทย โดยประเทศไทยตั้งอยู่ในพื้นที่ที่มีสภาพอากาศร้อนชื้น ดังนั้นจึงสามารถพบเขียดงูเกาะเต่ากระจายตัวในทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ (จารุจินต์ นภีตภัฏ และพิชัย จุลฤกษ์, 2528) รวมทั้งทางภาคเหนือของประเทศไทย พบเขียดงูเกาะเต่ากระจายตัวในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเป็นพื้นที่ที่ได้รับการฟื้นฟูมาจากพื้นที่เสื่อมโทรมจากการบุกรุกเพื่อการทำกิน ปัจจุบันพื้นที่ดังกล่าวค่อนข้างมีความอุดมสมบูรณ์ทางด้านชนิดพันธุ์ของพืชและสัตว์เป็นอย่างมาก รวมทั้งได้รับการพัฒนาเพื่อเป็นศูนย์ในการวิจัย ทดลอง และอนุรักษ์ชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต อีกทั้งพื้นที่ในจังหวัดเชียงใหม่นั้นมีสภาพทางภูมิศาสตร์เป็นที่ราบเชิงเขา รวมทั้งพื้นที่ราบลุ่มส่วนใหญ่ของจังหวัดเป็นพื้นที่ราบลุ่มแม่น้ำปิง ดังนั้นจึงทำให้สภาพภูมิอากาศมีความร้อนชื้น (ศูนย์ภูมิอากาศ กองพัฒนาอุตุนิยมวิทยา, 2563) ซึ่งเหมาะแก่การดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ รวมทั้งสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในกลุ่มเขียดงู เพราะเขียดงูเกาะเต่านั้นมักอาศัยในบริเวณที่มีความชื้น เช่น ลำธาร และป่าดิบชื้น เป็นต้น โดยอาจอาศัยอยู่ใต้ดิน บนพื้นดิน หรืออาจอาศัยบริเวณใต้ซากใบไม้ขึ้นกับสภาพภูมิอากาศในพื้นที่นั้น ๆ ที่เขียดงูเกาะเต่าอาศัยอยู่ โดยประเทศไทยในช่วงฤดูร้อนจะพบเขียดงูเกาะเต่าอาศัยอยู่บริเวณใต้ดินเนื่องจากมีความชื้นที่มากกว่าบริเวณผิวดิน ส่วนในฤดูฝนจะพบอาศัยอยู่บริเวณใต้ซากใบไม้ (van Dijk et al., 2004) โดยสภาพพื้นที่ถิ่นอาศัยที่สัตว์ดำรงชีวิตอยู่นั้น เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อสุขภาวะของสัตว์ นอกเหนือไปจากภาวะความเครียด และการเกิดโรค โดยสุขภาวะ ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกสามารถประเมินและวินิจฉัยได้โดยใช้ข้อมูลพื้นฐานทางด้านโลหิตวิทยา (Allender and Fry, 2008) ซึ่งนำไปสู่แนวทางในการอนุรักษ์และการวางแผนการจัดการสัตว์ด้วยกระบวนการที่เหมาะสมต่อไป

ข้อมูลพื้นฐานทางด้านโลหิตวิทยาของสัตว์ นับว่ามีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้หรือใช้ประเมินสุขภาวะเบื้องต้นของสัตว์ได้ ซึ่งนำไปสู่การวินิจฉัยและ

การลดอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคในสัตว์ อีกทั้งเอื้อต่อการวางแผนในการอนุรักษ์และการจัดการสุขภาวะของสัตว์ชนิดนั้น ๆ เช่น ในอดีตได้มีรายงานการใช้ข้อมูลทางโลหิตวิทยาเพื่อประเมินความเครียดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในกลุ่มซาลาแมนเดอร์ โดยพบว่า ความเครียดมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว (Davis and Maerz, 2008) ซึ่งข้อมูลทางโลหิตวิทยาของสัตว์ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมนั้น สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ภาวะไม่ปกติของสุขภาพสัตว์ได้ นอกจากนี้ยังคงมีการรายงานข้อมูลพื้นฐานทางด้านโลหิตวิทยาในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดอื่น ๆ เช่น ในปี ค.ศ. 1997 Paillot และคณะ ได้รายงานการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดของเขียดงูชนิด *Typhlonectes compressicaudus* และชนิด *Typhlonectes natans* และในปี ค.ศ. 2008 Robson และคณะ ได้รายงานการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแกรนูโลไซต์ในเขียดงูชนิด *Siphonops annulatus* เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันยังคงมีสัตว์หลายกลุ่มที่ขาดข้อมูลพื้นฐานทางด้านโลหิตวิทยา รวมทั้งเขียดงูเกาะเต่า ซึ่งเขียดงูเกาะเต่านั้นนับว่าเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอีกหนึ่งกลุ่มที่มีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับโลหิตวิทยาค่อนข้างน้อย โดยในปี ค.ศ. 1982 Zapata และคณะ ได้รายงานการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เม็ดเลือดขาว และทรอมโบไซต์ในเขียดงูเกาะเต่า แต่จากการศึกษาดังกล่าวนี้ไม่ได้มีการรายงานค่าทางโลหิตวิทยาอื่น ๆ เช่น ค่าเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น ค่าสัดส่วนของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว และค่าการนับทรอมโบไซต์ เป็นต้น ดังนั้นจึงทำให้ในปัจจุบันข้อมูลทางด้านโลหิตวิทยาของเขียดงูเกาะเต่ามีค่อนข้างน้อยและไม่เพียงพอต่อการนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านการประเมินสุขภาวะและการวินิจฉัยการเกิดโรค เพราะพารามิเตอร์หรือตัวแปรที่นิยมนำมาใช้ในการประเมินสุขภาวะของสัตว์นั้น ได้แก่ ค่าเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดง จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว และค่าสัดส่วนของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว (เฉลียว ศาลากิจ, 2548; Meesawat et al., 2016) แต่จากการรายงานการศึกษาของ Zapata และคณะ พารามิเตอร์หรือตัวแปรดังที่กล่าวมานั้นยังไม่ได้ทำการศึกษาและรายงานในเขียดงูเกาะเต่า ด้วยเหตุนี้ผู้ศึกษาจึงมีความสนใจที่จะศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดและค่าทางโลหิตวิทยาของเขียดงูเกาะเต่า *I. kohtaoensis* ซึ่งพบได้ในพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ เพื่อให้มีข้อมูลพื้นฐานทางด้านโลหิตวิทยาในการใช้ประเมินสุขภาวะและการเกิดโรคในเขียดงู รวมทั้งใช้ในการต่อยอดการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับโลหิตวิทยาในเขียดงูและสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในกลุ่มที่ใกล้เคียงต่อไปในอนาคต

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานและจำแนกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดของเขียดงูเกาะเต่า *I. kohtaoensis* ในพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่
2. หาค่าทางโลหิตวิทยาของเขียดงูเกาะเต่า *I. kohtaoensis* ในพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

2.1 เขียดงูเกาะเต่า

เขียดงูเกาะเต่ามีชื่อสามัญ คือ Koh Tao Island Caecilian และมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Ichthyophis kohtaoensis* Taylor, 1960 จัดเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังจำพวกสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก จัดอยู่ในอันดับ Gymnophiona วงศ์ Ichthyophiidae และสกุล *Ichthyophis* ลำตัวมีลักษณะเรียวยาวคล้ายงู ด้านหลังและด้านท้องมีสีมวงอมน้ำตาลเข้ม รองระหว่างปล้องมีสีจางกว่าเล็กน้อย ส่วนหัวและส่วนหางมีขนาดเล็กกว่าลำตัว ส่วนปลายสุดของหางมีลักษณะแบน มีแถบสีเหลืองอยู่บริเวณด้านข้างของลำตัว ซึ่งแถบสีเหลืองนี้จะปรากฏตั้งแต่บริเวณริมฝีปากบนและริมฝีปากล่างทอดตามแนวยาวไปตามความยาวของลำตัวจนถึงส่วนปลายหาง ณ บริเวณรูเปิดของทวารร่วม มีร่องที่ทอดตัวตามแนวขวางของลำตัวจำนวน 362-366 ร่อง ซึ่งในแต่ละร่องจะมีเกล็ดที่เจริญมาจากชั้นหนังแท้ (dermal scale) ฝังตัวอยู่ โดยเกล็ดจะเรียงตัวภายในร่องจากส่วนหัวไปจนถึงส่วนหาง และมีขนาดเล็กไปจนถึงขนาดใหญ่ตามลำดับ อีกทั้งยังมีหนวด (tentacle) จำนวน 1 คู่ วางตัวอยู่ระหว่างตาและช่องเปิดรูจมูก มีตาขนาดเล็กและมีแถบสีครีมล้อมรอบดวงตา มีโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับฟันอยู่บริเวณขากรรไกรบนและขากรรไกรล่าง ซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน (Taylor, 1960)

ภาพที่ 2-1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของเขียดงูเกาะเต่า *Ichthyophis kohtaoensis*
ภาพจาก: https://fineartamerica.com/featured/southeast-asian-caecilian-dante-fenolio.html

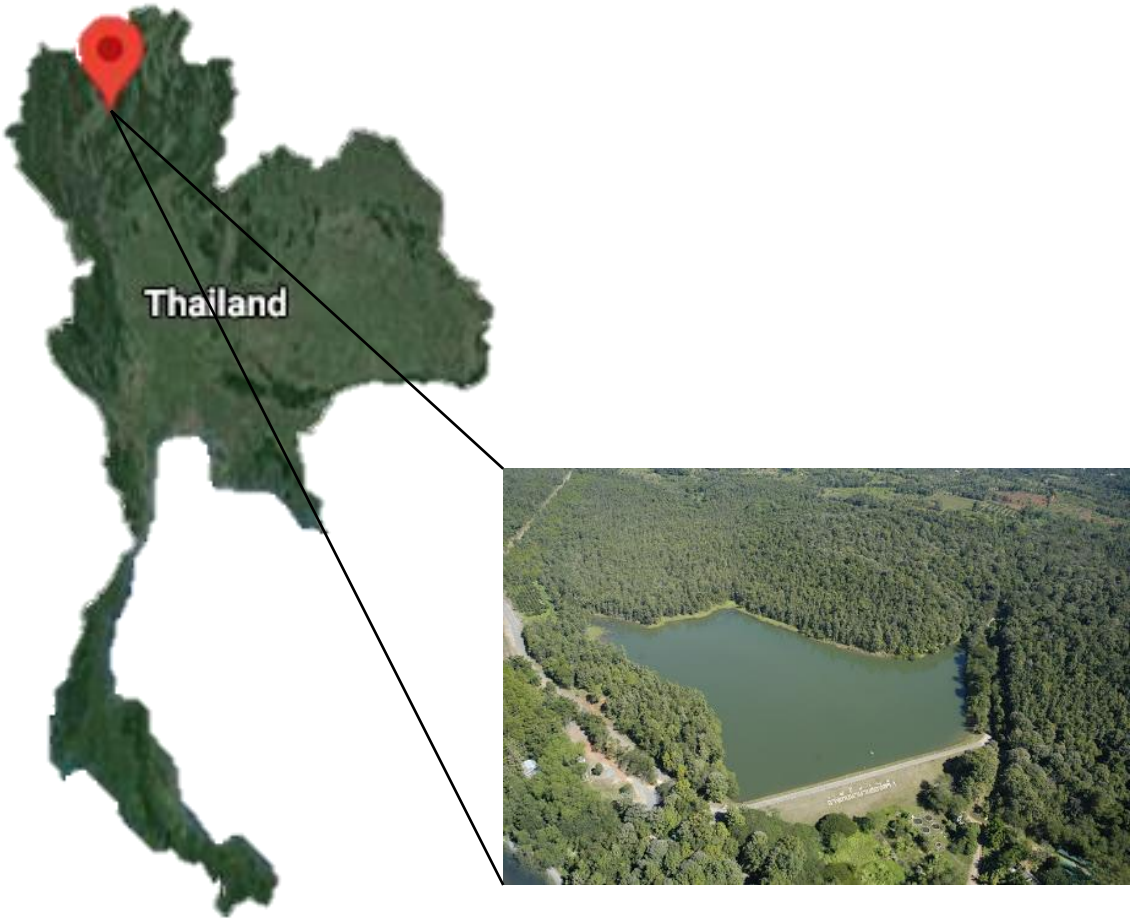
เขียดงูเกาะเต่ามักอาศัยอยู่บริเวณพื้นที่ที่มีความชื้น เช่น ลำธาร ป่าดิบชื้น และใต้ซากใบไม้เป็นต้น แต่โดยปกติมักอาศัยอยู่บริเวณใต้โพรงดินเป็นหลัก จึงทำให้เขียดงูเกาะเต่าเป็นสัตว์ที่สามารถพบเห็นได้ยาก (ณัฐกรณ์ เตียวเจริญ และปรวีร์ พรหมโชติ, 2019) เขียดงูเกาะเต่ามีการกระจายตัวในหลายประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ประเทศกัมพูชา ลาว เมียนมาร์ตอนใต้ เวียดนาม และไทย (van Dijk et al., 2004) ซึ่งประเทศไทยตั้งอยู่ในพื้นที่ที่มีสภาพอากาศร้อนชื้น จึงพบการกระจายตัวของเขียดงูในทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ ตั้งแต่ระดับน้ำทะเลไปจนถึงระดับความสูง 1,800 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล ซึ่งคือบนดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ (จารุจินต์ นภีตภัฏ และพิชัย จุลฤกษ์, 2528) นอกจากนี้เขียดงูเกาะเต่ายังจัดเป็นสัตว์ที่มีความเสี่ยงต่ำต่อการสูญพันธุ์ในบัญชีแดงของสหภาพเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติหรือ IUCN (van Dijk et al., 2004) และไม่จัดเป็นสัตว์ป่าสงวนและสัตว์ป่าคุ้มครองตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2562

แถบสีส้มแสดงการกระจายตัวของเขียดงูเกาะเต่า *I. kohtaoensis*

ภาพที่ 2-2 การกระจายตัวของเขียดงูเกาะเต่าในพื้นที่ต่าง ๆ
ภาพจาก: www.iucnredlist.org

2.2 ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่

ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่ ตั้งอยู่บริเวณป่าสงวนแห่งชาติป่าขุนแม่กวง อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ ถูกจัดตั้งขึ้นเพื่อเป็นศูนย์กลางในการศึกษา ทดลอง วิจัย และอนุรักษ์ทรัพยากรทางธรรมชาติ ทั้งทรัพยากรดิน น้ำ ป่าไม้ และชนิดพันธุ์ของพืชและสัตว์ เป็นพื้นที่ต้นน้ำลำธารซึ่งเอื้อต่อการศึกษาและวิจัยด้านการประมงบริเวณอ่างเก็บน้ำ อีกทั้งส่งเสริมการศึกษาและการทำการเกษตร ปศุสัตว์ และโคนม และเนื่องมาจากในอดีตพื้นที่แห่งนี้มีสภาพเสื่อมโทรมจากการถูกบุกรุกเพื่อการทำกิน หลังจากนั้นจึงได้รับการฟื้นฟูที่เหมาะสม ทำให้ในปัจจุบันศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่ มีความอุดมสมบูรณ์ขึ้น และมีความหลากหลายทางด้านชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตรวมทั้งสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในกลุ่มเขียดงู



ภาพที่ 2-3 ตำแหน่งและพื้นที่ป่าอนุรักษ์ในศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่

ภาพจาก: https://www.google.com/maps/place/Huai+Hong+Khrai/@18.854465,99.2162647,16z และ http://km.rdpb.go.th

2.2 โลหิตวิทยาในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

การศึกษาทางด้านโลหิตวิทยา เป็นการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และพยาธิวิทยาของเลือด โดยปกติแล้วมักเริ่มจากการศึกษาสัณฐานวิทยาเป็นสิ่งแรก เนื่องจากจะทำให้ทราบถึงรูปร่าง ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิด และสามารถนำข้อมูลเหล่านี้ไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาต่อ ๆ ไป โดยการศึกษาทางด้านโลหิตวิทยาในสิ่งมีชีวิตนั้นนับว่ามีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากสามารถนำข้อมูลเหล่านี้ไปประยุกต์ใช้ในการประเมินสุขภาวะเบื้องต้น รวมทั้งประเมินการเกิดโรคของสัตว์ได้ เพื่อนำไปสู่การวางแผนเพื่อการอนุรักษ์และการจัดการสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ๆ (Campbell, 2015; Meesawat et al., 2016) เพื่อให้สิ่งมีชีวิตมีสุขภาวะที่ดี โดยเฉพาะสิ่งมีชีวิตที่มีความเสี่ยงสูงต่อการสูญพันธุ์

เลือดจัดเป็นเนื้อเยื่อที่มีลักษณะเป็นของเหลว และเป็นส่วนหนึ่งของระบบไหลเวียนโลหิต โดยในสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางกลุ่ม คือ หมึก และไส้เดือนดิน เลือดจะมีการไหลเวียนอยู่ภายในหลอดเลือดตลอดเวลา (ศุภณัฐ ไพโรหกุล, 2559) และมีหัวใจเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่ในการสูบฉีดเพื่อนำเลือด ซึ่งทำหน้าที่หลักในการขนส่งแก๊สออกซิเจน แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ สารอาหาร ฮอร์โมน ของเสีย และสสารต่าง ๆ ไปแลกเปลี่ยนยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย อีกทั้งยังทำหน้าที่ในการรักษาสมดุลร่างกายโดยการเป็นบัฟเฟอร์ และทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Reech et al., 2016) โดยเลือดจะประกอบไปด้วยส่วนของน้ำเลือดหรือพลาสมา และเซลล์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือด (ยุทธนา หมั่นดี, 2551) ซึ่งเกล็ดเลือดจะเป็นองค์ประกอบที่สามารถพบได้ในกลุ่มของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมเท่านั้น แต่สัตว์มีกระดูกสันหลังในกลุ่มอื่น ๆ ได้แก่ สัตว์ปีก สัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก จะพบทรอมโบไซต์ (Ariken and Cicek, 2014) โดยแต่ละองค์ประกอบภายในเลือดจะมีสัดส่วนและหน้าที่ที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งสัดส่วนที่มากสุดไปจนถึงน้อยสุดเรียงตามลำดับเป็นดังต่อไปนี้ พลาสมามีองค์ประกอบหลัก คือ น้ำ สารอาหาร ของเสีย ฮอร์โมน แอนติบอดี และเอนไซม์ (Seiverd, 1972) ซึ่งสารต่าง ๆ เหล่านี้จะถูกขนส่งและเกิดการแลกเปลี่ยนที่บริเวณเนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ ภายในร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดแดง ทำหน้าที่ในการขนส่งแก๊สออกซิเจน โดยอาศัยโปรตีนฮีโมโกลบินที่อยู่ในไซโทพลาซึมของเซลล์ (Foxon, 1964) เซลล์เม็ดเลือดขาว สามารถจำแนกได้ 2 กลุ่ม คือ อแกรนูโลไซต์ (agranulocyte) ได้แก่ โมโนไซต์ (monocyte) และลิมโฟไซต์ (lymphocyte) และแกรนูโลไซต์ (granulocyte) ได้แก่ นิวโทรฟิล (neutrophil) อิโอสิโนฟิล (eosinophil) และเบโซฟิล (basophil) (Campbell, 2015) เซลล์เม็ดเลือดขาวมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยโมโนไซต์ นิวโทรฟิล และอิโอสิโนฟิล ทำหน้าที่หลักในการกำจัดเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมโดยอาศัยกระบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) เบโซฟิล ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอาการภูมิแพ้ และลิมโฟไซต์ ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immune system)

(Reech et al., 2016) กล่าวคือ ระบบภูมิคุ้มกันที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของเชื้อโรค มีการจดจำเชื้อโรคที่เข้ามาตั้งแต่ครั้งแรกและจะมีการตอบสนองที่รุนแรงขึ้นในครั้งต่อ ๆ ไป (Chaplin, 2010) ส่วนเกล็ดเลือดนั้น ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมจะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด โดยหน้าที่ดังกล่าวนี้จะมีความคล้ายคลึงกับหน้าที่ของทรอมโบไซต์ที่พบในสัตว์ปีก สัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก อีกทั้งยังมีหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย (Campbell, 2015; Ferdous and Scott, 2015)

ในปัจจุบันการศึกษาทางด้านโลหิตวิทยาในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกนั้นยังมีไม่มากนัก โดยการศึกษาทางด้านโลหิตวิทยาที่เคยมีการรายงาน จะเน้นทำการศึกษาด้านสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดและค่าทางโลหิตวิทยาต่าง ๆ โดยในอดีตได้มีรายงานการศึกษาในสัตว์หลากชนิดในกลุ่มสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ซึ่งพบว่า โดยส่วนใหญ่แล้วสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในแต่ละกลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม Anuran (Order Anura) ประกอบด้วย กบ เขียด ปาด คางคก และอึ่ง กลุ่มเขียดงู (Order Gymnophiona) และกลุ่ม Urodelan (Order Urodela) ประกอบด้วย กะท่างน้ำและซาลาแมนเดอร์ จะมีลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดที่คล้ายคลึงกัน แต่ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดนั้น จะพบลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดที่แตกต่างออกไป เช่น ในซาลาแมนเดอร์ชนิด *Batrachoceps attenuates* จะไม่พบนิวเคลียสภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง (Cohen, 1982) โดยเซลล์เม็ดเลือดของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกนั้นประกอบไปด้วย เซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เม็ดเลือดขาว และทรอมโบไซต์ ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดจะมีลักษณะและรูปร่างที่แตกต่างกันออกไปดังต่อไปนี้

เซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกนั้นมีขนาดใหญ่ที่สุดเมื่อเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์มีกระดูกสันหลังในกลุ่มอื่น ๆ (Ariken and Cicek, 2014) และมีความแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Glomski et al., 1997) อีกทั้งสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกนั้น อาจมีเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีความแตกต่างกันได้ในกลุ่มเดียวกัน เช่น สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในอันดับ Anura จะมีขนาดเซลล์และนิวเคลียสของเซลล์เม็ดเลือดแดงเล็กกว่าสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในอันดับ Urodela (Atatür et al., 1999) โดยลักษณะทางสัณฐานทั่วไปของเซลล์เม็ดเลือดแดงนั้น รูปร่างของเซลล์และนิวเคลียสจะมีลักษณะรี นิวเคลียสวางตัวบริเวณกลางเซลล์ และเซลล์เม็ดเลือดชนิดนี้มีสัดส่วนมากที่สุดเมื่อเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดชนิดอื่น ๆ

เซลล์เม็ดเลือดขาว สามารถจำแนกได้ 2 กลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ อแกรนูโลไซต์ โดยลักษณะทั่วไปของเซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่มนี้ คือ นิวเคลียสไม่แบ่งพู และไม่พบแกรนูลกระจายตัวภายในไซโทพลาสซึม (Campbell, 2015) อีกทั้งมักพบในสัดส่วนที่มากกว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแกรนูโลไซต์ (Arikan and Cicek, 2014) โดยประกอบด้วย ลิมโฟไซต์ เซลล์และนิวเคลียสมีรูปร่างกลม นิวเคลียสมีขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ สังเกตเห็นไซโทพลาซึมในปริมาณน้อย และ

โมโนไซต์ เซลล์มีรูปร่างกลม นิวเคลียสมีรูปร่างกลมหรืออาจคล้ายถั่วหรือเกือกม้า วางตัวเอียงไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ และอีกหนึ่งกลุ่ม คือ แกรนูโลไซต์ ลักษณะทั่วไปของเซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่มนี้ คือ นิวเคลียสมีมากกว่า 1 พู และมีแกรนูลกระจายตัวในไซโทพลาซึม ประกอบด้วย นิวโทรฟิล เซลล์มีรูปร่างกลม นิวเคลียสมีหลายพู ไซโทพลาซึมใส สังเกตเห็นแกรนูลได้ไม่ชัดเจน อิโอซิโนฟิล เซลล์มีรูปร่างกลม นิวเคลียสแบ่งเป็นพูประมาณ 1-2 พู นิวเคลียสวางตัวเอียงไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ แกรนูลมีรูปร่างกลมหรือรีและมีขนาดใหญ่ ติดสีย้อมสีส้มแดงกระจายตัวทั่วไซโทพลาซึม และเบโซฟิล เซลล์และนิวเคลียสมีรูปร่างกลม แกรนูลมีขนาดใหญ่ สังเกตเห็นนิวเคลียสได้ไม่ชัดเจน เนื่องจากแกรนูลติดสีย้อมสีม่วงเข้มและกระจายตัวทั่วไซโทพลาซึม (Campbell, 2015) ซึ่งขนาดและโครงสร้างของแกรนูลในเซลล์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดนั้นจะมีความแตกต่างกัน

ทรอมโบไซต์ เซลล์มีรูปร่างรีหรือรูปร่างคล้ายกระสวย นิวเคลียสมีรูปร่างรีขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ สามารถสังเกตเห็นไซโทพลาสซึมได้ในปริมาณเล็กน้อย โดยเซลล์ชนิดนี้จะมีความคล้ายคลึงกับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (Ariken and Cicek, 2014)

ค่าทางโลหิตวิทยาของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่นิยมทำการศึกษา ได้แก่ ค่าเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดง จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว ค่าสัดส่วนของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว (เฉลียว ศาลากิจ, 2548; Meesawat et al., 2016) ซึ่งในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแต่ละชนิดจะมีค่าทางโลหิตวิทยาที่แตกต่างกันขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ เช่น อายุ น้ำหนักตัว เพศ ฤดูกาล และสิ่งแวดล้อม เป็นต้น (Glomski et al., 1997) โดยในอดีตได้มีรายงานการศึกษาเพื่อประเมินสุขภาวะของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกโดยใช้ค่าทางโลหิตวิทยา และใช้การตรวจวัดระดับของฮอร์โมนคอร์ติซอลในพลาสมา และในปัจจุบันนิยมทำการประเมินสุขภาวะ รวมทั้งประเมินภาวะการเกิดโรคของสัตว์โดยใช้ค่าทางโลหิตวิทยา เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสุขภาพหรือความเครียดของสัตว์ในกลุ่มนี้ อาจส่งผลต่อจำนวนและสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดได้ (Davis and Maerz, 2008) เช่น การศึกษาภาวะความเครียดที่มีผลต่อโลหิตวิทยาในซาลาแมนเดอร์ชนิด *Ambystoma talpoideum* ซึ่งทำการศึกษาโดย Davis และ Maerz ในปี ค.ศ. 2008 ได้ทำการทดลองโดยจับและแบ่งซาลาแมนเดอร์ออกเป็น 2 กลุ่ม ซึ่ง 2 กลุ่มนี้จะทำการกักขังไว้ในจำนวนวันที่แตกต่างกัน โดยพบว่า ซาลาแมนเดอร์กลุ่มที่ถูกกักขังในจำนวนวันที่มากกว่านั้น จะมีจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล และลิมโฟไซต์เพิ่มขึ้นและลดลงตามลำดับ อีกทั้งมีอัตราส่วนระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์มากกว่ากลุ่มที่ถูกกักขังในจำนวนวันที่น้อยกว่า ซึ่งจากการทดลองดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่า ความเครียดหรือสุขภาวะของสัตว์ที่เปลี่ยนแปลงไปนั้น จะส่งผลต่อค่าทางโลหิตวิทยารวมทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดได้

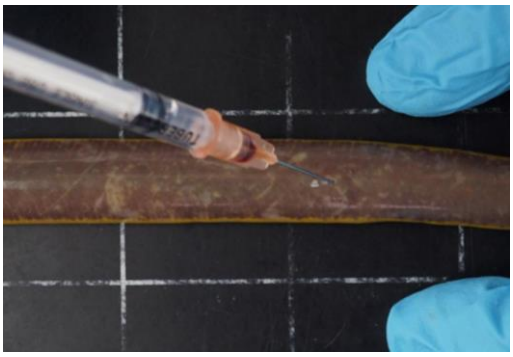
บทที่ 3
วิธีการดำเนินการ

3.1 สัตว์ทดลอง

เขียดงูเกาะเต่า *Ichthyophis kohtaoensis* ไม่แยกเพศ และมีการเจริญอยู่ในระยะตัวเต็มวัย จำนวน 3 ตัว มีความยาวเฉลี่ยของลำตัว 33.17 เซนติเมตร ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่

3.2 การเก็บตัวอย่างเลือด

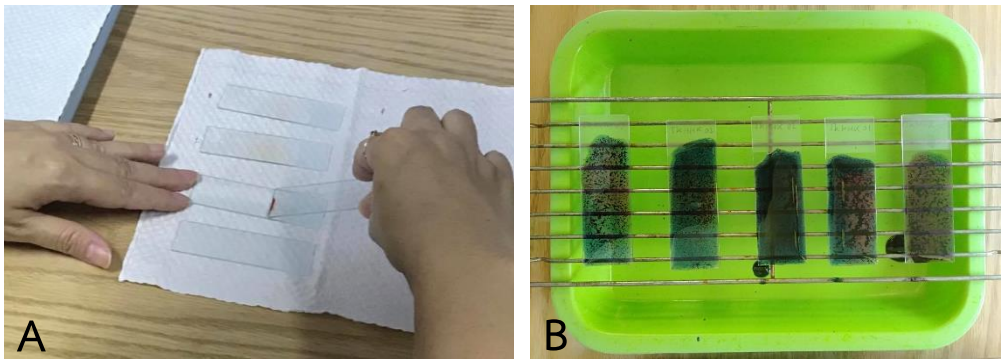
งานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดเขียดงู จากศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งดำเนินการเก็บตัวอย่างโดยนักวิจัยของศูนย์ โดยทำการวางยาสลบเขียดงูเกาะเต่าโดยทำการแช่ในสารละลาย Tricaine methanesulfonate (MS-222) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (% w/v) เมื่อเขียดงูเกาะเต่าสลบทำการเก็บตัวอย่างเลือด โดยใช้เข็มขนาด 25Ga และกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ที่กลั้วด้วย Lithium heparin ซึ่งช่วยในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด ทำการเจาะและดูดเลือดจากบริเวณหัวใจของเขียดงู (Forzan et al., 2012) โดยเจาะและดูดเลือดครั้งละไม่เกิน 0.5 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว (USGS, 2001) หลังจากนั้นทำการเก็บเลือดไว้ในหลอดเก็บตัวอย่าง และเก็บไว้ในอุปกรณ์ให้ความเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อไม่ให้เลือดเกิดการเสื่อมสภาพ และมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้สำหรับการศึกษาต่อไป



ภาพที่ 3-1 การเจาะเลือดเขียดงูจากบริเวณหัวใจ
ภาพจาก: นายรชตะ มณีอินทร์

3.3 การเตรียมสไลด์เลือดเกลี่ยบาง (Blood smear) และการย้อมสี Giemsa's stain

ทำการหยดเลือดปริมาตร 4 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ ใช้สไลด์แก้วเกลี่ยเลือดให้เป็นลักษณะฟิล์มบาง แล้วทิ้งให้แห้งในอากาศ หลังจากนั้นนำไปรักษาสภาพด้วย Absolute methanol เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงนำไปย้อมด้วยสีย้อม Giemsa's solution (Merck, USA) ตามวิธีมาตรฐาน (Presnell and Schreibman, 1997) โดยย้อมเป็นเวลา 20 นาที ซึ่งทำการเตรียมสีย้อมโดยการผสม Giemsa's solution และ Phosphate buffer pH 7.0 ในอัตราส่วน 5:1 ทำการล้างสีย้อมด้วย Phosphate buffer pH 7.0 แล้วนำสไลด์ไปแกว่งน้ำประปา เพื่อให้ตะกอนของสีย้อมหลุด ทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศ หลังจากนั้นนำไปทำสไลด์ถาวร โดยนำสไลด์ไปแช่ใน Butanol และ Xylene ตามลำดับ แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์โดยใช้ Permount media แล้วทิ้งให้แห้งเพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 3-2 (A) ขั้นตอนการเตรียมสไลด์เลือดเกลี่ยบาง และ (B) การย้อมสี Giemsa's stain

3.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวัดขนาดของเซลล์เม็ดเลือด

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจำแนกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดจากสไลด์เลือดที่ทำการย้อมสีแล้ว โดยทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า หลังจากนั้นทำการบันทึกภาพของเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เม็ดเลือดขาว และทรอมโบไซต์ ด้วยโปรแกรม EOS Utility (Canon, USA) และทำการวัดขนาดของเซลล์ด้วยโปรแกรม Image Pro Plus version 6.0 (Media Cybernetics, USA) โดยใช้หน่วยไมโครเมตร

3.4.1 การจำแนกชนิดของเซลล์เม็ดเลือด

ทำการศึกษาสัณฐานวิทยา เพื่อแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เม็ดเลือดขาว และทรอมโบไซต์ โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวนั้นประกอบด้วยอแกรนูโลไซต์ ได้แก่ ลิมโฟไซต์และโมโนไซต์ และแกรนูโลไซต์ ได้แก่ นิวโทรฟิล อิโอซิโนฟิล และเบโซฟิล แต่จากการศึกษาในครั้งนี้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเบโซฟิลนั้นไม่สังเกตพบ ทำการศึกษาโดยสังเกตการติดสีย้อมและลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการที่มีความจำเพาะในแต่ละชนิดของเซลล์เม็ดเลือด

และใช้งานวิจัยที่มีการรายงานการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดในเขียดงู โดย Zapata และคณะ ในปี ค.ศ. 1982 Robson และคณะ ในปี ค.ศ. 2008 และ Paillot และคณะในปี ค.ศ. 1997 เป็นงานวิจัยหลักในการอ้างอิงการจำแนก รวมทั้งนำข้อมูลที่ได้นี้ไปใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

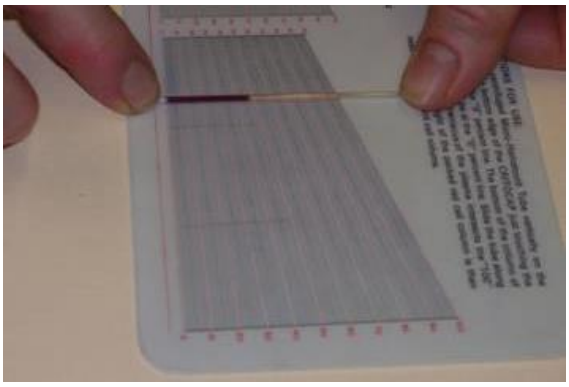
3.4.2 การวัดขนาดของเซลล์เม็ดเลือด

ทำการวัดขนาดของเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เม็ดเลือดขาว และทรอมโบไซต์ ด้วยโปรแกรม Image Pro Plus version 6.0 โดยทำการวัดสัณฐานของเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งหมด 7 ลักษณะ ได้แก่ ความยาวเซลล์สูงสุด ความกว้างเซลล์สูงสุด ขนาดพื้นที่ของเซลล์ (ความกว้างของเซลล์ x ความยาวของเซลล์ x π/4) ความยาวนิวเคลียสสูงสุด ความกว้างนิวเคลียสสูงสุด ขนาดพื้นที่ของนิวเคลียส (ความกว้างของนิวเคลียส x ความยาวของนิวเคลียส x π/4) และสัดส่วนนิวเคลียสต่อไซโทพลาซึม (ขนาดพื้นที่ของนิวเคลียส / ขนาดพื้นที่ของเซลล์เม็ดเลือดแดง) โดยทำการวัดเซลล์เม็ดเลือดแดงจำนวนทั้งสิ้น 100 เซลล์ต่อเขียดงู 1 ตัว นอกจากนี้ยังทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางสูงสุดของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง 4 ชนิด โดยทำการวัดชนิดละ 30 เซลล์ต่อเขียดงู 1 ตัว และทำการวัดความกว้างและความยาวของทรอมโบไซต์ จำนวนทั้งสิ้น 100 เซลล์ต่อเขียดงู 1 ตัว (Meesawat et al., 2016)

3.5 การศึกษาค่าทางโลหิตวิทยา

3.5.1 การหาค่าจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Packed cell volume; PCV)

เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ของเซลล์เม็ดเลือดแดงต่อปริมาตรเลือดทั้งหมด จะนำเลือดส่วนหนึ่งที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างเลือดมาใส่ใน capillary hematocrit tube หลังจากนั้นอุดปลายด้านหนึ่งของ capillary ด้วย critoseal wax นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 xg เป็นเวลา 5 นาที และนำออกมาอ่านค่าร้อยละของปริมาตรเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นต่อปริมาตรเลือดทั้งหมดด้วย PCV reading chart (Bain, 2012)



ภาพที่ 3-3 การอ่านค่าเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นด้วย PCV reading chart
ภาพจาก: www.sonopath.com

3.5.2 การนับแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Differential leukocyte count)

นำสไลด์เลือดที่ย้อมสี Giemsa's stain แล้ว มาทำการนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด 200 เซลล์ (เฉลียว ศาลากิจ, 2548) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า ด้วยเครื่อง manual cell counter และทำการเทียบสัดส่วนเพื่อหาจำนวนร้อยละของเซลล์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด โดยทำการนับเซลล์เม็ดเลือดขาว 1 สไลด์ต่อเขียดงู 1 ตัว

3.5.3 การนับทรอมโบไซต์ (Thrombocyte count)

นำสไลด์เลือดที่ย้อมสี Giemsa's stain มาทำการนับจำนวนทรอมโบไซต์ต่อจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดง 2,000 เซลล์ (Davis et al., 2008) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยทำการนับทรอมโบไซต์ 1 สไลด์ต่อเขียดงู 1 ตัว

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการวัดขนาดของเซลล์เม็ดเลือดและค่าทางโลหิตวิทยา มาทำการคำนวณค่าทางสถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) และพิสัย (range) รวมทั้งทำการทดสอบทางสถิติ เพื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของนิวเคลียสต่อไซโทพลาซึมของเซลล์เม็ดเลือดแดงระยะ mature erythrocyte และระยะ immature erythrocyte โดยใช้สถิติ Student's *t*-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS version 22 (IBM, USA) ซึ่งมีการตั้งสมมติฐานทางสถิติดังต่อไปนี้

H_0 = สัดส่วนของนิวเคลียสต่อไซโทพลาซึมของเซลล์เม็ดเลือดแดงระยะ mature erythrocyte และระยะ immature erythrocyte ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

H_1 = สัดส่วนของนิวเคลียสต่อไซโทพลาซึมของเซลล์เม็ดเลือดแดงระยะ mature erythrocyte และระยะ immature erythrocyte มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4
ผลการศึกษา

4.1 สัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือด

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เม็ดเลือดขาว และทรอมโบไซต์ในเขียดงูเกาะเต่า โดยใช้สไลด์สเมียร์เลือดที่ทำการย้อมสี Giemsa's stain และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า พบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงสามารถจำแนกได้ 2 ระยะ ได้แก่ mature erythrocyte ซึ่งเซลล์และนิวเคลียสมีรูปร่างรี ไซโทพลาซึมใส นิวเคลียสติดสีย้อมสีม่วงเข้ม แสดงดังภาพ 4-1A รวมทั้งมีความยาวและความกว้างเฉลี่ยของเซลล์ 29.94 ± 2.43 และ 17.40 ± 1.88 ไมโครเมตร ตามลำดับ มีพื้นที่ของเซลล์ 409.35 ± 59.95 ตารางไมโครเมตร มีความยาวและความกว้างเฉลี่ยของนิวเคลียส 13.45 ± 1.37 และ 7.42 ± 0.93 ไมโครเมตร ตามลำดับ มีพื้นที่นิวเคลียสเฉลี่ย 78.69 ± 14.78 ตารางไมโครเมตร และมีสัดส่วนของนิวเคลียสต่อไซโทพลาซึมเฉลี่ย 0.19 ± 0.04 และ immature erythrocyte มีลักษณะรูปร่างของเซลล์และนิวเคลียสแตกต่างจากเซลล์เม็ดเลือดแดงชนิด mature erythrocyte กล่าวคือ เซลล์และนิวเคลียสมีรูปร่างรีและมีขนาดใหญ่กว่า mature erythrocyte ไซโทพลาซึมใส นิวเคลียสติดสีย้อมสีม่วง แสดงดังภาพ 4-1B รวมทั้งมีความยาวและความกว้างเฉลี่ยของเซลล์ 31.93 ± 3.31 และ 21.16 ± 3.37 ไมโครเมตร ตามลำดับ มีพื้นที่ของเซลล์เฉลี่ย 534.89 ± 122.64 ตารางไมโครเมตร มีความยาวและความกว้างเฉลี่ยของนิวเคลียส 16.30 ± 1.59 และ 10.55 ± 1.35 ไมโครเมตร ตามลำดับ มีพื้นที่นิวเคลียสเฉลี่ย 135.62 ± 25.72 ตารางไมโครเมตร และมีสัดส่วนของนิวเคลียสต่อไซโทพลาซึมเฉลี่ย 0.26 ± 0.06 ดังแสดงในตารางที่ 4-1 โดยหากนำค่าของสัดส่วนนิวเคลียสต่อไซโทพลาซึมของเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้ง 2 ระยะ มาทำการเปรียบเทียบด้วยสถิติ Student's *t*-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสัดส่วนของนิวเคลียสต่อไซโทพลาซึมของเซลล์เม็ดเลือดแดงระยะ mature erythrocyte และระยะ immature erythrocyte แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยเซลล์เม็ดเลือดแดงระยะ immature erythrocyte มีสัดส่วนของนิวเคลียสต่อไซโทพลาซึมมากกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงระยะ mature erythrocyte

ตารางที่ 4-1 ข้อมูลการวัดเชิงสัณฐานวิทยา (Morphometric data) ของเซลล์เม็ดเลือดแดงระยะ mature erythrocyte และ immature erythrocyte ของเขียดงูเกาะเต่า *I. kohtaoensis*

Characters	Mean	SD	Range
Mature erythrocyte length (μm)	29.94	2.43	21.51 - 39.98
Mature erythrocyte width (μm)	17.40	1.88	12.00 - 29.47
Mature erythrocyte area (EA: μm^2)	409.35	59.95	258.50 - 706.83
Mature erythrocyte nuclear length (μm)	13.45	1.37	9.75 - 18.56
Mature erythrocyte nuclear width (μm)	7.42	0.93	5.43 - 10.17
Mature erythrocyte nuclear area (NA: μm^2)	78.69	14.78	49.17 - 133.24
Mature erythrocyte nucleocytoplasmic ratio (NA/EA)	0.19	0.04	0.10 - 0.38
Immature erythrocyte length (μm)	31.93	3.31	22.33 - 41.54
Immature erythrocyte width (μm)	21.16	3.37	13.00 - 30.33
Immature erythrocyte area (EA: μm^2)	534.89	122.64	273.83 – 951.78
Immature erythrocyte nuclear length (μm)	16.30	1.59	10.43 – 20.13
Immature erythrocyte nuclear width (μm)	10.55	1.35	6.06 - 15.08
Immature erythrocyte nuclear area (NA: μm^2)	135.62	25.72	71.74 – 215.70
Immature erythrocyte nucleocytoplasmic ratio (NA/EA)	0.26	0.06	0.14 – 0.47

เมื่อทำการจำแนกเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยอาศัยขนาด รูปร่าง การกระจายตัวของแกรนูลภายในไซโทพลาซึม และการติดสีย้อมบริเวณนิวเคลียสและไซโทพลาซึม ทำให้สามารถจำแนกเซลล์เม็ดเลือดขาวได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ แกรนูโลไซต์ ประกอบด้วย ลิมโฟไซต์ และโมโนไซต์ และอแกรนูโลไซต์ ประกอบด้วย นิวโทรฟิล และอิโอซิโนฟิล ส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเบโซฟิลนั้นไม่สามารถสังเกตพบจากการศึกษาในครั้งนี้

ลิมโฟไซต์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 18.90 ± 2.60 ไมโครเมตร เซลล์มีรูปร่างกลม นิวเคลียสมีรูปร่างกลมหรือคล้ายไต นิวเคลียสมีขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ และติดสีย้อมสีม่วงเข้ม ไซโทพลาซึมใสติดสีย้อมสีม่วงอ่อน อีกทั้งสังเกตเห็นไซโทพลาซึมได้ในสัดส่วนที่น้อยเมื่อเทียบกับสัดส่วนของนิวเคลียส แสดงดังภาพที่ 4-1C และ 4-1D

โมโนไซต์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 18.91 ± 2.04 ไมโครเมตร เซลล์มีรูปร่างกลม นิวเคลียสมีรูปร่างรีหรือคล้ายเกือกม้า ติดสีย้อมสีม่วงเข้ม วางตัวเอียงไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ไซโทพลาซึมใส และติดสีย้อมสีม่วงอ่อน แสดงดังภาพที่ 4-1E และ 4-1F

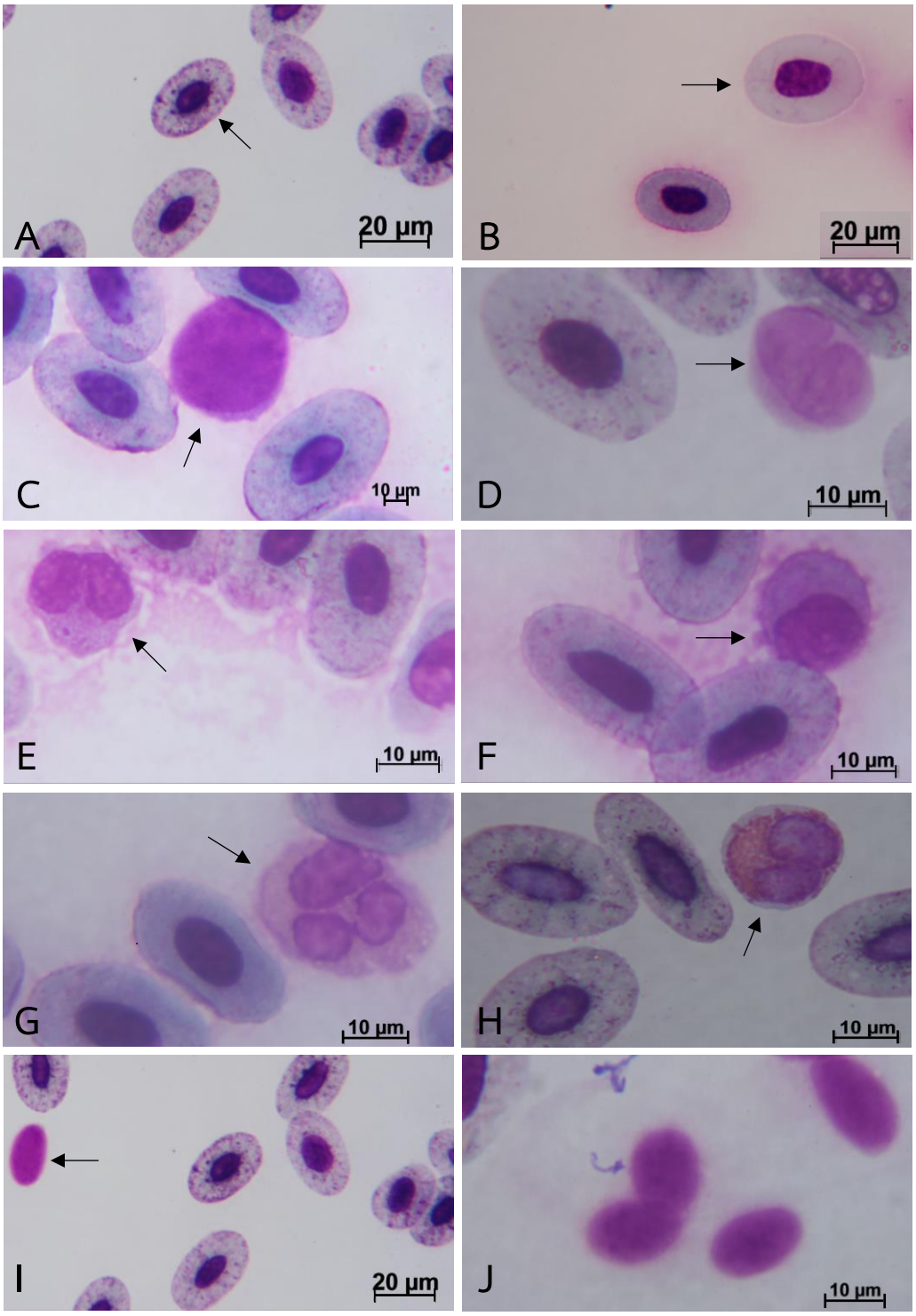
นิวโทรฟิล มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 18.50 ± 2.00 ไมโครเมตร เซลล์มีรูปร่างกลม นิวเคลียสมีหลายพู วางตัวอยู่บริเวณกลางเซลล์ และติดสีย้อมสีม่วงเข้ม ไซโทพลาซึมใส ติดสีย้อมสีม่วงอ่อน และไม่สามารถสังเกตเห็นแกรนูลที่กระจายตัวอยู่บริเวณไซโทพลาซึมได้อย่างชัดเจน แสดงดังภาพที่ 4-1G

อิโอซิโนฟิล มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 18.50 ± 1.81 ไมโครเมตร เซลล์มีรูปร่างกลม นิวเคลียสมี 2 พู ติดสีย้อมสีม่วงเข้ม ไซโทพลาซึมใส ติดสีย้อมสีม่วงอ่อน สามารถสังเกตเห็นแกรนูลได้อย่างชัดเจน เนื่องจากแกรนูลมีขนาดใหญ่และติดสีย้อมสีแดงกระจายตัวทั่วไซโทพลาซึม แสดงดังภาพที่ 4-1H

ตารางที่ 4-2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดในเขียดงูเกาะเต่า *I. kohtaoensis*

Types	Diameter	
	Mean ± SD	Range
Lymphocyte (μm)	18.90 ± 2.60	13.33 - 25.21
Monocyte (μm)	18.91 ± 2.04	14.99 - 24.35
Neutrophil (μm)	18.50 ± 2.00	14.46 - 24.39
Eosinophil (μm)	18.50 ± 1.81	14.55 - 21.77

เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทรอมโบไซต์ โดยทำการวัดขนาด รวมทั้งสังเกตลักษณะรูปร่าง และการติดสีย้อมบริเวณนิวเคลียสและไซโทพลาซึม พบว่า มีความยาวและความกว้างเฉลี่ย 21.57 ± 2.57 และ 11.97 ± 1.28 ไมโครเมตร ตามลำดับ เซลล์มีรูปร่างรีหรืออาจคล้ายกระสวย นิวเคลียสมีรูปร่างรีขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ ติดสีย้อมสีชมพูม่วง ไซโทพลาซึมใส สังเกตเห็นไซโทพลาซึมในสัดส่วนที่น้อยเมื่อเทียบกับสัดส่วนของนิวเคลียส แสดงดังภาพที่ 4-1I และ 4-1J



ภาพที่ 4-1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ในเขียดงูเกาะเต่า *I. kohtaoensis* (A) เซลล์เม็ดเลือดแดงระยะ mature erythrocyte (ลูกศรชี้), (B) เซลล์เม็ดเลือดแดงระยะ immature erythrocyte (ลูกศรชี้), (C, D) ลิมโฟไซต์ (ลูกศรชี้), (E, F) โมโนไซต์ (ลูกศรชี้), (G) นิวโทรฟิล (ลูกศรชี้), (H) อิโอซิโนฟิล (ลูกศรชี้), (I) ทรอมโบไซต์ (ลูกศรชี้) และ (J) การรวมกลุ่มของทรอมโบไซต์

4.2 ค่าทางโลหิตวิทยา (Hematological parameter)

4.2.1 ค่าจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Packed cell volume; PCV)

ผลการหาค่าเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นของเขียดงูเกาะเต่าจำนวน 3 ตัว พบว่ามีพิสัยเท่ากับ 22.0 – 23.0 เปอร์เซ็นต์

4.2.2 การนับแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Differential leukocyte count)

ผลการนับแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ลิมโฟไซต์ โมโนไซต์ นิวโทรฟิล และอิโอซิโนฟิล ของเขียดงูเกาะเต่าจำนวน 3 ตัว พบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดมีสัดส่วนที่แตกต่างกัน โดยลิมโฟไซต์เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีสัดส่วนสูงสุด รองลงมาคือ โมโนไซต์ และนิวโทรฟิลตามลำดับ ส่วนอิโอซิโนฟิลเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่พบสัดส่วนน้อยที่สุดจากการศึกษาในครั้งนี้ แสดงดังตารางที่ 4-3

ตารางที่ 4-3 ค่าการนับแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาวในเขียดงูเกาะเต่า *I. kohtaoensis*

Parameters	Mean ± SD	Range
Differential lymphocyte (%)	90.17 ± 3.18	86.50 – 92.00
Differential Monocyte (%)	4.33 ± 0.58	4.00 – 5.00
Differential Neutrophil (%)	3.67 ± 0.76	3.00 – 4.50
Differential Eosinophil (%)	1.83 ± 2.75	0.00 - 5.00

4.2.3 การนับทรอมโบไซต์ (Thrombocyte count)

ผลการนับทรอมโบไซต์จากสไลด์สเมียร์เลือดของเขียดงูเกาะเต่าจำนวน 3 ตัว พบว่าจำนวนทรอมโบไซต์มีค่าเฉลี่ย 71 เซลล์ ต่อ 2,000 เซลล์เม็ดเลือดแดง

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาโลหิตวิทยาของเขียดงูเกาะเต่า *Ichthyophis kohtaoensis* ที่อาศัยในพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ โดยได้ทำการบันทึกการจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เม็ดเลือดขาว และทรอมโบไซต์ ทำการวัดขนาดของเซลล์เม็ดเลือด รวมทั้งทำการศึกษาค่าทางโลหิตวิทยา ได้แก่ ค่าเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น การนับแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาว และการนับทรอมโบไซต์ พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดแดงของเขียดงูเกาะเต่า มีความคล้ายคลึงและสอดคล้องกับการรายงานการศึกษาโลหิตวิทยาที่มีมาก่อนหน้าในเขียดงูเกาะเต่า กบนา กระท่างน้ำชนิด *Tylototriton verrucosus* และกระท่างน้ำชนิด *Ommatotriton ophryticus* ซึ่งรายงานโดย Zapata และคณะ ในปี ค.ศ. 1982 Meesawat และคณะ ในปี ค.ศ. 2016 กชนันท์ บรรเจิดลักษณ์ ในปี พ.ศ. 2561 และ Tosunoglu และคณะ ในปี ค.ศ. 2011 ตามลำดับ อีกทั้งสัดส่วนของนิวเคลียสต่อไซโทพลาซึมของเซลล์เม็ดเลือดแดงระยะ mature erythrocyte และ immature erythrocyte มีค่าเฉลี่ย 0.19 ± 0.04 และ 0.26 ± 0.06 ไมโครเมตร ตามลำดับ โดยที่ค่าสัดส่วนของ mature erythrocyte มีค่าน้อยกว่า immature erythrocyte อย่างมีนัยสำคัญทางสิติ และมีค่าใกล้เคียงกับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในกลุ่มกระท่างน้ำ ซึ่งจัดอยู่ในอันดับ Urodela และกลุ่มกบ ซึ่งจัดอยู่ในอันดับ Anura กล่าวคือ กระท่างน้ำชนิด *Tylototriton verrucosus* มีสัดส่วนของนิวเคลียสต่อไซโทพลาซึม 0.21 ± 0.04 ไมโครเมตร (กชนันท์ บรรเจิดลักษณ์, 2561) และในกลุ่มกบนานั้น สัดส่วนของนิวเคลียสต่อไซโทพลาซึมของเซลล์เม็ดเลือดแดงระยะ mature erythrocyte ในเพศเมียและเพศผู้มีค่าเฉลี่ย 0.15 ± 0.04 และ 0.17 ± 0.07 ไมโครเมตร ตามลำดับ และระยะ immature erythrocyte ในเพศเมียและเพศผู้มีค่าเฉลี่ย 0.26 ± 0.13 และ 0.27 ± 0.17 ไมโครเมตร ตามลำดับ (สุธิโรจน์ มีสวัสดิ์, 2558) ซึ่งสัดส่วนของนิวเคลียสต่อไซโทพลาซึมนี้ สามารถสะท้อนถึงความสามารถในการแลกเปลี่ยนแก๊สของเซลล์เม็ดเลือดแดงในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดนั้น ๆ ได้ โดยหากมีค่าน้อยจะบ่งบอกถึงความสามารถที่สูงในการแลกเปลี่ยนแก๊ส รวมทั้งขนาดของเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแต่ละชนิดนั้นอาจมีความแตกต่างกัน ขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ เช่น น้ำหนักตัว ขนาดตัว และสภาวะแวดล้อมของถิ่นที่อยู่อาศัยที่สิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ๆ อาศัยอยู่ เป็นต้น (Vernberg, 1955) เช่น ในปี ค.ศ. 1989 Ruiz และคณะ ได้รายงานการศึกษาขนาดเซลล์เม็ดเลือดแดงของคางคกชนิด *Bufo spinulosus* ที่อาศัยในบริเวณพื้นที่ที่มีความสูงแตกต่างกัน โดยพบว่า คางคกที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่สูงกว่านั้นจะมีขนาดของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เล็กกว่า รวมทั้งมีจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดแดงมากกว่าคางคกที่อาศัยในพื้นที่ที่ระดับความสูงต่ำกว่า ดังนั้นจากรายงานการศึกษาดังกล่าวนี้

แสดงให้เห็นว่า ตำแหน่งพื้นที่หรือสภาวะแวดล้อมของถิ่นที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิตนั้น มีความสัมพันธ์กับขนาดและจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดแดง

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง 4 ชนิดที่พบในเขียดงูเกาะเต่า ได้แก่ ลิมโฟไซต์ โมโนไซต์ นิวโทรฟิล และอิโอซิโนฟิล มีความคล้ายคลึงกับเซลล์เม็ดเลือดขาวของเขียดงูชนิด *Siphonops annulatus* ซึ่งมีการรายงานโดย Robson และคณะ ในปี ค.ศ. 2008 และเขียดงูชนิด *Typhlonectes compressicaudus* และ *Typhlonectes natans* ซึ่งรายงานโดย Paillot และคณะ ในปี ค.ศ. 1997 นอกจากนี้เซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง 4 ชนิดนี้ ยังมีความคล้ายคลึงกับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในกลุ่มอื่น ๆ เช่น มีความคล้ายคลึงกับกบชนิด *Megophrys nasuta* (Heatley and Johnson, 2009) กบนา *Hoplobatrachus rugulosus* (Meesawat et al., 2016) และกระท่างน้ำชนิด *Tylototriton verrucosus* (กชนันท์ บรรเจิดลักษณ์, 2561) รวมทั้งค่าเฉลี่ยและพิสัยของเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดในเขียดงูเกาะเต่านั้น มีค่าใกล้เคียงกับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในอันดับ Urodela มากกว่าอันดับ Anura ซึ่งมีการรายงานโดยกชนันท์ บรรเจิดลักษณ์ ในปี พ.ศ. 2561 และสุทธิโรจน์ มีสวัสดิ์ ในปี พ.ศ. 2558 ตามลำดับ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทรอมโบไซต์ในเขียดงูเกาะเต่ามีความคล้ายคลึงกับเขียดงูเกาะเต่าที่มีการรายงานมาก่อนหน้าโดย Zapata และคณะ ในปี ค.ศ. 1982 อีกทั้งคล้ายคลึงกับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในกลุ่มอื่น ๆ (Arikan and Cicek, 2014; Campbell, 2015; Meesawat et al., 2016; Tosunoglu et al., 2011) รวมทั้งค่าเฉลี่ยและพิสัยของความกว้างและความยาวของทรอมโบไซต์ในเขียดงูเกาะเต่านั้น มีค่าใกล้เคียงกับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในอันดับ Urodela มากกว่าอันดับ Anura ซึ่งมีการรายงานโดยกชนันท์ บรรเจิดลักษณ์ ในปี พ.ศ. 2561 และสุทธิโรจน์ มีสวัสดิ์ ในปี พ.ศ. 2558 ตามลำดับ

ค่าทางโลหิตวิทยา ได้แก่ ค่าเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น ค่าสัดส่วนของเซลล์เม็ดเลือดขาวและจำนวนทรอมโบไซต์นั้น ในอดีตยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาในเขียดงู แต่ได้มีการรายงานการศึกษาในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในกลุ่มอื่น ๆ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นงานแรกที่ทำการศึกษาค่าดังกล่าวในเขียดงูชนิดนี้

ค่าเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น ในเขียดงูเกาะเต่ามีพิสัยเท่ากับ 22.0 – 23.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความสอดคล้องกับการรายงานในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในอันดับ Anura ได้แก่ กบนา และกบทูด ซึ่งมีการรายงานโดยสุทธิโรจน์ มีสวัสดิ์ ในปี พ.ศ. 2558 และสุวิสาข์ ชอบจิตต์ ในปี พ.ศ. 2560 ตามลำดับ โดยค่าเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นนั้นสามารถบ่งบอกถึงปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีอยู่ในน้ำเลือด (Allender and Fry, 2008) อีกทั้งบ่งบอกถึงความสมบูรณ์หรือความผิดปกติของเลือด ซึ่งสามารถที่จะใช้เป็นข้อมูลในการประเมินสุขภาวะหรือการเกิดโรคของเขียดงูเกาะเต่าได้ ทั้งนี้

ค่าเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นนั้น จะขึ้นกับปัจจัยทางด้านฤดูกาล เพศ ถิ่นที่อยู่อาศัย และธรรมชาติพื้นฐานของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (Meesawat et al., 2016)

จากผลการศึกษาค่าสัดส่วนของเซลล์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด พบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์มีสัดส่วนมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกส่วนใหญ่ สัดส่วนของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่พบรองลงมา คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ นิวโทรฟิล และอิโอซิโนฟิล ตามลำดับ ทั้งนี้จากการศึกษาในครั้งนี้ไม่สังเกตพบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเบโซฟิล ซึ่งบ่งบอกถึงการปรากฏที่ค่อนข้างน้อยของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนี้ และสอดคล้องกับการรายงานการศึกษาในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดอื่น ๆ ได้แก่ กบนา โดยสุทธิโรจน์ มีสวัสดิ์ ในปี พ.ศ. 2558 และกระท่างน้ำชนิด *Tylototriton verrucosus* โดยกชนันท์ บรรเจิดลักษณ์ ในปี พ.ศ. 2561 ทั้งนี้สัดส่วนของเซลล์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดในแต่ละสิ่งมีชีวิตนั้นจะขึ้นกับปัจจัยหลากหลายด้าน เช่น เพศ อายุ ฤดูกาล และนิเวศวิทยา เป็นต้น (Ariken and Cicek, 2014)

ผลการศึกษาจำนวนทรอมโบไซต์ พบว่าเขียดงูเกาะเต่ามีจำนวนทรอมโบไซต์เฉลี่ย 71 เซลล์ต่อ 2,000 เซลล์เม็ดเลือดแดง โดยหน้าที่หลักของทรอมโบไซต์นั้น มีความคล้ายคลึงกับเกล็ดเลือดของสัตว์มีกระดูกสันหลังที่มีวิวัฒนาการสูง นั่นคือมีความเกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด อีกทั้งเกี่ยวข้องกับการอักเสบและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (Campbell, 2015; Ferdous and Scott, 2015) โดยจากการศึกษาค่าทางโลหิตวิทยาของเขียดงูและสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในกลุ่มอื่น ๆ ในอดีตยังไม่พบการรายงานการนับจำนวนทรอมโบไซต์ ดังนั้นผลการศึกษาการนับจำนวนทรอมโบไซต์ในครั้งนี้จึงถือเป็นรายงานแรกที่สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญ รวมทั้งนำไปประยุกต์ใช้ในการประเมินสุขภาวะสัตว์เบื้องต้นในอนาคตได้

งานวิจัยนี้ ได้มีการรายงานข้อมูลพื้นฐานทางด้านโลหิตวิทยาของเขียดงูเกาะเต่า ทั้งข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เม็ดเลือดขาว และทรอมโบไซต์ รวมทั้งข้อมูลทางค่าโลหิตวิทยา ได้แก่ ค่าเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น ค่าสัดส่วนชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาว และจำนวนของทรอมโบไซต์ ซึ่งข้อมูลทางค่าโลหิตวิทยานี้ ในอดีตยังไม่เคยมีการรายงานการศึกษาในเขียดงูเกาะเต่า *I. kohtaoensis* ดังนั้นข้อมูลพื้นฐานทางด้านโลหิตวิทยาเหล่านี้ จึงเอื้อต่อการนำไปใช้ในการต่อยอดงานวิจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาทางด้านโลหิตวิทยา อีกทั้งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการประเมิน คาดการณ์ และวินิจฉัยการเกิดโรคในเขียดงู รวมทั้งสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในกลุ่มใกล้เคียงในอนาคตต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กชนันท์ บรรเจิดลักษณ์. 2561. การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดและพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยาของกะท่างน้ำ *Tylototriton verrucosus* Anderson, 1871. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ปีการศึกษา 2561, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จารุจินต์ นภีตะภัฏ และพิชัย จุลฤกษ์. 2528. เอกสารการสัมมนาสัตว์ป่าเมืองไทยครั้งที่ 6 เรื่องเขียดงูหรืองูดินในประเทศไทย, หน้า 52–64. 26–27 ธันวาคม 2528 ณ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ณัฐกรณ์ เตียวเจริญ และปรวีร์ พรหมโชติ. 2019. การศึกษาสัณฐานวิทยาเชิงปริมาณของเขียดงูบางชนิดที่พบในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 1: 414–429.

ยุทธนา หมั่นดี. 2551. เลือดและผลิตภัณฑ์ของเลือด. วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2: 53–61.

ศุภณัฐ ไพโรหกุล. 2559. Biology. กรุงเทพมหานคร: บริษัท แอคทีฟ พริ้นท์ จำกัด.

ศูนย์ภูมิอากาศ กองพัฒนาอุตุนิยมวิทยา. 2563. ภูมิอากาศจังหวัดเชียงใหม่. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://climate.tmd.go.th/data/province/ [9 มิถุนายน 2564]

เฉลียว ศาลากิจ. 2548. โลหิตวิทยาทางสัตวแพทย์. นครปฐม: โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุทธิโรจน์ มีสวัสดิ์. 2558. สัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดและพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยาของกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1834). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุวิสาข์ ชอบจิตต์. 2560. ค่าทางโลหิตวิทยาของกบทูด *Limnonectes blythii* (Boulenger, 1920) ในพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ปีการศึกษา 2560, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Allender, M.C. and Fry, M.M. 2008. Amphibian hematology. Exotic Animal Practice 11: 463–480.

Arikan, H. and Cicek, K. 2014. Haematology of amphibians and reptiles: a review. North-Western Journal of Zoology 10: 190–209.

Atatür, M.K., Arikan, H. and Mermer, A. 1999. Erythrocyte sizes of some urodeles from Turkey. Turkish Journal of Zoology 22: 89–91.

Campbell T. W. 2015. Exotic Animal Hematology and Cytology, 4th ed. Singapore: Wiley-Blackwell Press.

Chaplin, D.D. 2010. Overview of the immune response. Allergy and Clinical Immunology 125: 1–41.

Cohen, W.D. 1982. The cytomorphic system of anucleate non-mammalian erythrocytes. Protoplasma 113: 23–32.

Davis, A.K. and Maerz, J.C. 2008. Comparison of hematological stress indicators in recently captured and captive paedomorphic mole salamanders, *Ambystoma talpoideum*. Copeia 3: 613–617.

Davis, A.K., Maney, D.L. and Maerz, J.C. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrate: A review of ecologists. Functional Ecology 22: 760–772.

Forzan, M.J., Vanderstichel, R., Ogbuah, C.T., Barta, J.R. and Smith, T.G. 2012. Blood collection from the facial (maxillary)/ musculo-cutaneous vein in true frogs (Family Ranidae). Wildlife Diseases 48: 176–180.

Foxon, G.E.H. 1964. Blood and respiration. Physiology of the Amphibia. New York: Academic press.

Ferdous, F. and Scott, T.R. 2015. A comparative examination of thrombocyte/platelet immunity. Immunology Letters 163: 32–39

Glomski, C.A., Tamburlin, J., Hard, R. and Chainani, M. 1997. The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. IV. The amphibians. Histol Histopathol 12: 147–170.

Heatley, J.J. and Johnson, M. 2009. Clinical technique: amphibian hematology: a practitioner's guide. Exotic Pet Medicine 18: 14–19.

Presnell, J.K. and Schreibman, M.P. 1997. Humason's animal tissue techniques, 5th ed. America: Johns Hopkins university press.

Meesawat, S., Kitana, N. and Kitana, J. 2016. Hematology of wild caught *Hoplobatrachus rugulosus* in Northern Thailand. Asian Herpetological Research 7: 131–138.

Paillot, R., Estabel, J. and Exbrayat, J.M. 1997. Organes hématopoïétiques et cellules sanguines chez Typhlonectes compressicaudus et Typhlonectes natans (Amphibien, Gymnophione). Bulletin Mensuel de la Société Linnéenne de Lyon 66: 124–134.

Robson, C.G., Egami, M.I., Marta, M.A. and Jared, C. 2008. Cytochemistry and morphology of granulocytes of the caecilian *Siphonops annulatus* (Amphibia, Gymnophiona). Comparative Clinical Pathology 17: 221–228.

Reech, J.B., Urry, L.A., Michael, L.C., Steven, A.W., Peter, V.M. and Robert, B.J. 2016. Campbell Biology, 11th ed. USA: Pearson Education, Inc.

Ruiz, G., Rosemann, M. and Veloso, A. 1989. Altitudinal distribution and blood velues in the toad, *Bufo spinulosus* Wiegmann. Comparative Biochemistry Physiology 94: 643-646.

Seiverd, C.E. 1972. Hematology for Medical Technologists, 4th ed. Philadelphia: Lea and Febiger Press.

Taylor, E.H. 1960. On the Caecilian Species *Ichthyophis glutinosus* and *Ichthyophis monochrous*. Kansas: Kansas University Press.

Tosunoglu, M., Tok, C.V., Olgun, K., Ozdemir, N. and Gul, C. 2011. Hematology of Northern banded newt, *Ommatotriton ophryticus* (Amphibia: Urodela), from North Anatolia. Herpetology 18: 59-64.

USGS. 2001. Collection of blood sample from adult amphibians. Standard Operating Procedure ARMI SOP No.101 [Online]. Available from: http://www.nwhc.usgs.gov/publication/amphibian-research-procedures/blood-samble.jsp [11 Jan 2021]

van Dijk, P.P., Wilkinson, M., Gower, D. and Kupfer, A. 2004. *Ichthyophis kohtaoensis*. The IUCN Red List of Threatened Species [Online]. Available from: https://www.iucnredlist.org/species/59623/11970469#habitat-ecology [15 Jan 2021]

Vernberg, J.F. 1955. Hematological studies on salamanders in relation to their ecology. Herpetologica 11: 129-133.

Zapata, A., Gomariz, R.P., Garrido, E. and Cooper, E.L. 1982. Lymphoid organ and blood cells of the caecilian *Ichthyophis kohtaoensis*. Acta Zoologica 63: 11-16.

ภาคผนวก
สารเคมีสำหรับการย้อมสีสไลด์เลือด

1. Giemsa's stain stock solution (Merck, USA)

2. Phosphate buffer pH 7.0

Solution A

Sodium phosphate dibasic, anhydrous (Na_2HPO_4)	9.5	g
Distilled water	1,000.0	ml

Solution B

Potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4)	9.7	g
Distilled water	1,000.0	ml

Working solution

Solution A	61.1	ml
Solution B	38.9	ml
Distilled water	900.0	ml

ปรับ pH และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. **การเตรียมสีสไลด์เลือด**

Phosphate buffer pH 7.0	5.0	ml
Giemsa's stain (จาก stock solution)	1.0	ml