



การแยกชนิดเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำและการป้องกันตัว
Separation of the Haemocyte Populations of *Penaeus monodon*
and Defense Reactions

อุษณีย์ เอกปนิธานพงศ์
Ussanee Ekpanithanpong

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
Master of Science Thesis in Biological Sciences
Prince of Songkla University
2544

เลขที่ QL 111.033.019 2544

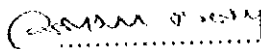
หน้า 2

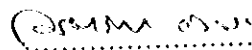
(1)


ชื่อวิทยานิพนธ์ การแยกชนิดเซลล์เม็ดเลือดของกิ้งกูดดำและการป้องกันตัว
ผู้เขียน นางอุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ


คณะกรรมการที่ปรึกษา

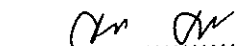
คณะกรรมการสอบ


 ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร.เมตตา องค์สกุล)

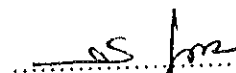
 ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร.เมตตา องค์สกุล)

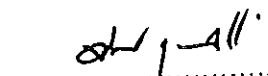
 กรรมการ
(อาจารย์ นพ.วิวิทย์ สมสานต์)

 กรรมการ
(อาจารย์ นพ.วิวิทย์ สมสานต์)


 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.กิจการ สุขุมชาติ)

 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.กิจการ สุขุมชาติ)

 กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธินี ภูวนาถ)

 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ จินตมาศ สุวรรณจรัส)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ


.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปิติ ทฤษฎิคุณ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การแยกชนิดเซลล์เม็ดเลือดของกิ้งกูดดำและการป้องกันตัว
ผู้เขียน นางอุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ
ปีการศึกษา 2544

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดกิ้งกูดดำ คือระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ฟาโกไซต์โทซิส, phenoloxidase และผลของซีรัมต่อฟาโกไซต์โทซิส จากการศึกษาทดสอบภาวะที่เหมาะสมของการเตรียม gradient ได้แก่ ความเข้มข้นของไซเตียมคลอไรด์ ความเร็วที่ใช้ในการเหวี่ยง, อุณหภูมิ และเวลา พบว่าสามารถแยกแถบชั้นเซลล์เม็ดเลือดกิ้งกูดดำ 2 แถบชั้น คือ แถบชั้นแกรนูลาร์และเคมีแกรนูลาร์เซลล์ และแถบชั้นไฮยาลินเซลล์ โดยวิธีการเตรียม gradient ของ 60% Percoll ใน 2.8% ไซเตียมคลอไรด์ เหวี่ยงด้วย angle-head rotor ที่ความเร็ว 10,697xg อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที และแยกแถบเซลล์โดยใช้ swing out rotor ที่ความเร็ว 1,700xg อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที จากการศึกษาต่อมาภายใต้กล้องจุลทรรศน์และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่ามีเม็ดเลือด 3 ชนิด จำแนกตามขนาดและจำนวนแกรนูล คือ แกรนูลาร์เซลล์ซึ่งมีแกรนูลขนาดใหญ่ เซลล์มีขนาดประมาณ 11.3-13.0 μm เคมีแกรนูลาร์เซลล์ขนาดประมาณ 7.7-13.5 μm ภายในไซโตพลาสซึมมีแกรนูลขนาดเล็ก และไฮยาลินเซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4.8-5.2 μm เมื่อทำการศึกษาการเกิดฟาโกไซต์โทซิสของเซลล์ที่แยกได้ โดยใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงแกะที่ดองด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (SRBC) พบว่าเซลล์เม็ดเลือดชนิดแกรนูลาร์และเคมีแกรนูลาร์มีค่า phagocytic activity มากกว่าไฮยาลินเซลล์ 2 เท่า และมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อใช้ซีรัมของกิ้งกูดดำในปฏิกิริยาซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุม นอกจากนี้ยังทดสอบ PO activating system พบ phenoloxidase activity ได้ในแกรนูลาร์และเคมีแกรนูลาร์เซลล์เท่านั้น แต่ไม่พบในไฮยาลินเซลล์

Thesis Title Separation of the Haemocyte Populations of *Penaeus monodon*
and Defense Reactions
Author Mrs. Ussanee Ekpanithanpong
Major Program Biological Sciences
Academic Year 2001

Abstract

The separation of shrimp haemocytes (*Penaeus monodon*), morphology and immunological functions, i.e., phagocytic activity, phenoloxidase activity and the opsonic effect of serum on phagocytic activity were studied. To prepare various continuous gradients of 60% Percoll concentration of NaCl, centrifugation speed at different time and temperature were varied. Two distinct bands of haemocytes were obtained when haemolymph was applied on the density gradient of 60% Percoll in 2.8% NaCl that was previously prepared by centrifugation in an angle-head rotor at 10,697xg for 30 minutes at 4°C followed by centrifuged in a swing out rotor at 1,700xg for 10 minutes at 4°C. The electron microscopic study demonstrated 3 types of haemocytes : granular cells were approximately 11.3-13.0 µm x 3.8-4.3 µm with abundant large granules. Semigranular cells were approximately 7.7-13.5 µm x 4.2-6.5 µm with small granules and hyaline cells were approximately diameter of 4.8-5.2 µm. The phagocytic activity of granular and semigranular haemocytes determined *in vitro* using glutaraldehyde-fixed sheep red blood cells (SRBC^f) was two times greater than that of hyaline cells and this activity was significantly increased when shrimp sera was treated compared to the control. Phenoloxidase activity can be detected in only granular and semigranular cells, but not hyaline cells.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร. เมตตา องค์สกุล ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ นพ. วิวิทย์ ศรีสานต์ และรองศาสตราจารย์ ดร.กิจการ ศุภมาตย์ กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำปรึกษาชี้แนะเกี่ยวกับการทำวิจัย ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธิณี ภูวนาถ กรรมการผู้แทนจากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และรองศาสตราจารย์ จินตมาศ สุวรรณจรัส กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.สิทธิ บุญรัตผลิน รองปลัดกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และดร.มะลิ บุญรัตผลิน ผู้เชี่ยวชาญด้านการจัดการทรัพยากรประมง กรมประมง ที่ให้การสนับสนุนและคำแนะนำช่วยเหลือในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณวิชัย วัฒนกุล คุณเจนจิตต์ คงกำเนิด คุณนเรศ ชวนยุก คุณยวิชัย สุขภาพส์ตรีน้ำ คุณจันทร์จิรา จอมสวัสดิ์ คุณโสภา พรหมดวง และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลฝั่งอ่าวไทย ที่ให้ความช่วยเหลือ ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณหน่วยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเตรียมตัวอย่างและการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และกรมประมงที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาและการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ น้อง ที่ให้ความอุปการะและเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่ง ขอขอบคุณคุณปรกรณ์ เอกปนิธานพงศ์ ดช. ณัฐชนน เอกปนิธานพงศ์ และดญ. อนันตญา เอกปนิธานพงศ์ ในความช่วยเหลือเสียสละและเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

อุษณีย์ เอกปนิธานพงศ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการตารางผนวก	(8)
รายการภาพ	(9)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(10)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	23
2 วิธีการวิจัย	24
วัสดุ	24
เครื่องมือและอุปกรณ์	26
วิธีการทดลอง	27
3 ผลการวิจัย	32
4 วิจารณ์	50
5 สรุปผล	55
เอกสารอ้างอิง	57
ภาคผนวก	63
ประวัติผู้เขียน	72

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดของเม็ดเลือด	5
2	ขนาดของเม็ดเลือด	6
3	ขนาดของแกรนูล	8
4	องค์ประกอบของกรดอะมิโนของ clotting protein บริสุทธิ์ที่แยกได้จากกุ้งขาว, crayfish, lobster และ sand crab	22
5	อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ สารเคมี สีย้อม และบริษัทผู้ผลิต	24
6	จำนวนแถบชั้นของเซลล์เม็ดเลือดในสภาวะที่เจือจาง Percoll ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 2.0% เหยียงที่อุณหภูมิ 4 °C และ 8 °C ด้วยความเร็วต่าง ๆ เป็นเวลา 20 และ 30 นาที	33
7	จำนวนแถบชั้นของเซลล์เม็ดเลือดในสภาวะที่เจือจาง Percoll ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 2.4% เหยียงที่อุณหภูมิ 4 °C และ 8 °C ด้วยความเร็วต่าง ๆ เป็นเวลา 20 และ 30 นาที	33
8	จำนวนแถบชั้นของเซลล์เม็ดเลือดในสภาวะที่เจือจาง Percoll ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 2.8% เหยียงที่อุณหภูมิ 4 °C และ 8 °C ด้วยความเร็วต่าง ๆ เป็นเวลา 20 และ 30 นาที	34
9	จำนวนแถบชั้นของเซลล์เม็ดเลือดในสภาวะที่เจือจาง Percoll ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 3.2% เหยียงที่อุณหภูมิ 4 °C และ 8 °C ด้วยความเร็วต่าง ๆ เป็นเวลา 20 และ 30 นาที	34
10	ชนิดและจำนวนเซลล์เม็ดเลือด(%)ที่แยกได้ในแถบชั้น	36
11	การเกิดฟาโกไซโทซิสเม็ดเลือดแดงเกาะที่ดองด้วยกลูตารัลดีไฮด์(SRBC') ของเซลล์เม็ดเลือด	44
12	ค่า PO activity เฉลี่ยของเซลล์เม็ดเลือด	46
13	การเกิดฟาโกไซโทซิสเม็ดเลือดแดงเกาะที่ดองด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (SRBC') และเม็ดเลือดแดงเกาะที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมของกุ้งกุลาดำ (serum-treated SRBC')	47

รายการตารางผนวก

ตารางผนวกที่	หน้า
ค1 ชนิดและจำนวนเซลล์เม็ดเลือดในชั้นที่ 1	69
ค2 ชนิดและจำนวนเซลล์เม็ดเลือดในชั้นที่ 2	69
ค3 เพอร์เซ็นต์ฟาโกไซต์โทซิส เม็ดเลือดแดงเกาะที่ดองด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (SRBC') ของเม็ดเลือดชนิดแกรนูโลลาร์เซลล์	70
ค4 เพอร์เซ็นต์ฟาโกไซต์โทซิส เม็ดเลือดแดงเกาะที่ดองด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (SRBC') ของเม็ดเลือดชนิดไฮยาไลน์เซลล์	70
ค5 เพอร์เซ็นต์ฟาโกไซต์โทซิส เม็ดเลือดแดงเกาะ (SRBC') ที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมของเม็ดเลือดชนิดแกรนูโลลาร์เซลล์	71
ค6 เพอร์เซ็นต์ฟาโกไซต์โทซิส เม็ดเลือดแดงเกาะ (SRBC') ที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมของเม็ดเลือดชนิดไฮยาไลน์เซลล์	71

รายการภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ขบวนการกระตุ้นในระบบ proPO	18
2 ขบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีโดย PO	19
3 ขบวนการกระตุ้น proPO ในร่างกาย	20
4 การเก็บตัวอย่าง hemolymph จากแองเงเลือดทางด้านท้องบริเวณขาเดินคู่ที่ 3 ของ กิ้งกูดำ	28
5 แถบชั้นของเซลล์เม็ดเลือดกิ้งกูดำที่ได้จากการแยกโดย percoll continuous density gradient centrifugation	35
6 ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดกิ้งกูดำ	37
7 เซลล์เม็ดเลือดชนิดไฮยาลินจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)	39
8 เซลล์เม็ดเลือดชนิดเฮมิแกรนูลาร์จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)	39
9 เซลล์เม็ดเลือดชนิดแกรนูลาร์จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)	40
10 เซลล์เม็ดเลือดชนิดไฮยาลินจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)	42
11 เซลล์เม็ดเลือดชนิดเฮมิแกรนูลาร์จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน(TEM)	43
12 เซลล์เม็ดเลือดชนิดแกรนูลาร์จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน(TEM)	43
13 การจับกิน (SRBC') ของเซลล์เม็ดเลือดกิ้งกูดำ จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด (SEM)	45
14 การเกิดฟาโกไซโทซิสเม็ดเลือดแดงแก่ที่ดองด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (SRBC') และ เม็ดเลือดแดงแก่ทำปฏิกิริยากับซีรัมกิ้งกูดำ (serum-treated SRBC')	47
15 การจับกินเม็ดเลือดแดงแก่ที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมกิ้งกูดำ (serum-treated SRBC') ของแกรนูลาร์เซลล์ จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)	48
16 การจับกินเม็ดเลือดแดงแก่ที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมกิ้งกูดำ (serum-treated SRBC') ของเฮมิแกรนูลาร์เซลล์ จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)	49
17 การจับกินเม็ดเลือดแดงแก่ที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมกิ้งกูดำ (serum-treated SRBC') จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)	49

ตัวย่อและสัญลักษณ์

g	=	กรัม
μ	=	ไมโครกรัม
mm	=	มิลลิเมตร
ml	=	มิลลิลิตร
L	=	ลิตร
Nm	=	นาโนเมตร
°C	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์
ppt	=	ส่วนในพัน
X	=	ค่าเฉลี่ย
SE	=	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลในประเทศไทย จัดเป็นอุตสาหกรรมชนิดหนึ่งที่ให้ผลตอบแทนสูง เนื่องจากความต้องการในด้านผลผลิตของตลาดโลกมีสูง ส่งผลให้ปริมาณการผลิตกุ้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในปี พ.ศ.2541 มีสูงถึง 252,731 ตัน จากพื้นที่การเลี้ยงกุ้งจำนวน 475,117 ไร่ คิดเป็นมูลค่าถึง 58,960 ล้านบาท ปริมาณการส่งออกกุ้งกุลาดำของไทยโดยเฉพาะกุ้งสดแช่เย็นแช่แข็งจัดเป็นสินค้าส่งออกที่นำรายได้เข้าประเทศมากที่สุด 10 อันดับแรก ติดต่อกันมาตั้งแต่ปี 2534 ในปี 2541 มูลค่าการส่งออกสินค้าประเภทกุ้งจำนวน 95,815.8 ล้านบาท คิดเป็นร้อยละ 54.34 ของมูลค่าการส่งออกสินค้าประมงและผลิตภัณฑ์ทั้งหมดรวม 176,311 ล้านบาท (กองเศรษฐกิจกรมประมง, 2543) ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากปริมาณการขยายตัวของการเพาะเลี้ยงกุ้งที่เป็นไปอย่างรวดเร็ว โดยนับตั้งแต่ พ.ศ. 2529 ที่ได้มีการเปลี่ยนแปลงระบบการเลี้ยงเพื่อเข้าสู่ระบบการเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ จนกระทั่งมีการพัฒนาระบบการเลี้ยงเป็นแบบพัฒนา (Intensive system) หรือระบบการเลี้ยงแบบหนาแน่น ซึ่งจะต้องให้อาหารที่มีโปรตีนสูง ทำให้เกิดปัญหาต่าง ๆ ทั้งในด้านสภาวะแวดล้อม คุณภาพน้ำ และโรค เชื้อโรคที่เป็นสาเหตุและสร้างความเสียหายให้แก่แหล่งเพาะเลี้ยง ได้แก่ เชื้อไวรัส และเชื้อแบคทีเรีย ปัจจุบันโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสยังไม่มีวิธีการรักษา แต่ใช้วิธีการป้องกันโดยการกำจัดพาหะของโรค สารเคมีและยาปฏิชีวนะจำนวนมากถูกใช้ในการป้องกันและรักษาโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย ก่อให้เกิดปัญหายาตกค้างทั้งในเนื้อกุ้งและในธรรมชาติ ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค และการส่งออก

ดังนั้นเพื่อลดปัญหาอันเนื่องมาจากการใช้ยาและสารเคมี การศึกษาเกี่ยวกับการป้องกันโรคกุ้งกุลาดำได้รับความสนใจมากขึ้น เช่น การศึกษาเกี่ยวกับวัคซีนในกุ้งกุลาดำและกุ้งクルマ (kuruma) (กิจการ สุภมาตย์ และสิทธิ บุญยรัตผลิน, 2538; Itami and Takahashi, 1991 ; Itami et al., 1992 a, b.) การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Boonyaratpalin et al., 1995) รวมทั้งระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) ของกุ้ง

สัตว์ในกลุ่มอาร์โทรพอด (Arthropod) เช่น กุ้ง ปู และแมลง มีระบบภูมิคุ้มกันแตกต่างกับสัตว์ชั้นสูงทั่วไป เนื่องจากไม่มีแอนติบอดี (antibody) และระบบกลไกการป้องกันตัวอาศัยเซลล์ (CMIR) แต่ให้เม็ดเลือด (haemocyte) เป็นเซลล์หลักในการทำงาน ซึ่งประกอบด้วยกระบวนการ

ต่างๆ เช่น ฟาโกไซโทซิส (phagocytosis), โนดูลฟอรัเมชันและกระบวนการกักล้อม (nodule formation and encapsulation), prophenoloxidase activating system (proPO activating system)(Paterson *et al.*,1976; Soderhall, 1982) ถึงแม้ว่ากุ้งกุลาดำจะเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และมีการศึกษาในด้านต่างๆ เพื่อพัฒนาการเพาะเลี้ยง แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์เศรษฐกิจชนิดอื่นๆ การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำยังมีน้อยมาก

การศึกษาในครั้งนี้เพื่อแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ และหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิด เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานทำให้มีความรู้และเข้าใจในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ สามารถนำไปสู่การพัฒนาในด้านต่างๆ เกี่ยวกับการเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ เช่น การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และการใช้วัคซีน

การตรวจเอกสาร

กุ้งกุลาดำมีชื่อเรียกภาษาอังกฤษทั่วไปว่า giant tiger prawn มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Penaeus monodon* Fabricius จัดเป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในวงศ์ปีนีไอดี (Penaeidae) ซึ่งอาจมีความยาวลำตัว (body length) ยาวถึง 270 mm มีน้ำหนักถึง 260 g และสามารถจัดลักษณะทางอนุกรมวิธานได้ดังนี้

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Order	Decapoda
Family	Penaeidae
Genus	<i>Penaeus</i>
Specy	<i>monodon</i> (Fabricius)

กุ้งกุลาดำสามารถอาศัยได้ในน้ำกร่อยและน้ำเค็ม ขึ้นกับช่วงชีวิตของกุ้ง ซึ่งในแต่ละแห่งก็มีสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน ดังนั้นจึงมีโอกาสที่กุ้งจะสัมผัสกับเชื้อโรคและปรสิตแตกต่างกัน ถึงแม้ว่ากุ้งจะมีโครงสร้างภายนอกที่แข็งแรงและมีคุณสมบัติพิเศษทางด้านเคมี เป็นตัวขวางกั้นในการเข้าทำลายของเชื้อโรค แต่ก็จำเป็นที่จะต้องมียระบบภูมิคุ้มกันในที่มีประสิทธิภาพ เพื่อกำจัดเชื้อโรคประเภทที่ฉวยโอกาส (opportunistic microorganism) เข้าไปในร่างกายในช่วงที่มีการลอกคราบ หรือในขณะที่เกิดบาดแผล ระบบกลไกการป้องกันตัวของกลุ่มครัสเตเชียน รวม

ถึงกึ่งอาศัยเซลล์เม็ดเลือด (haemocytes) เป็นเซลล์หลักในการทำงาน โดยเซลล์เม็ดเลือดนี้ จะกำจัดเซลล์แปลกปลอมออกจากร่างกาย โดยกระบวนการกลืนทำลาย หรือฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) และกระบวนการกักล้อม (encapsulation)

ในน้ำเลือด (haemolymph) ของกุ้งและปูมีโปรตีนประมาณ 80-95% และไขมันเล็กน้อย บางครั้งพบผลึกชนิดต่างๆ กัน โดยเฉพาะบริเวณท่อทางเดินอาหารส่วนท้าย เช่น ผลึกของกรดยูริค (uric acid) เป็นต้น และในระยะก่อนลอกคราบ ปริมาณแคลเซียมในเลือดจะเพิ่มมากขึ้น (Johnson, 1980) นอกจากนี้ ในน้ำเลือดยังพบฮีโมไซยานิน (haemocyanin) ซึ่งเป็น glycoprotein ที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบ (Cu-containing protein) สามารถทำปฏิกิริยากับ ออกซิเจนได้ ดังนั้น ฮีโมไซยานิน จึงทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซ ฮีโมไซยานินที่มีออกซิเจน หรือสภาพที่ถูกออกซิไดซ์ (Oxidized form) จะมีสีน้ำเงินอ่อนหรือฟ้า ส่วนในรูปที่ไม่มีออกซิเจน หรือสภาพที่ถูกรีดิวซ์ (reduced form) จะไม่มีสี เลือดของกุ้งและปูน้ำเค็มทั่วไป พบว่ามีความหนาแน่นประมาณ 1.025-1.052 g/ml. และความหนืดประมาณ 1.2-1.5 cps. ซึ่งสูงกว่าน้ำทะเล และค่าเหล่านี้จะแปรผันตามวงจรการลอกคราบ ปริมาณเลือดที่พบในกุ้งและปูส่วนใหญ่มีค่าประมาณ 10-48% ของน้ำหนักตัว (Bullock and Horridge, 1965)

ชนิดของเม็ดเลือด (The haemocyte type)

Toney (1958) แบ่งชนิดของเม็ดเลือดของกุ้งมังกร (*Homarus americanus*) ออกเป็น 4 ชนิด คือ 1) lymphoid cell 2) monocyte 3) explosive refractile granulocyte ชนิดที่มีแกรนูลขนาดเล็ก 4) explosive refractile granulocyte ชนิดที่มีแกรนูลขนาดใหญ่ ในกุ้งก้ามกรามชนิด *Macrobrachium rosenbergii* พบเม็ดเลือด 4 ชนิด โดย 3 ชนิดแรก มีรูปร่างกลม แต่มีขนาดต่างกัน และชนิดที่สี่ เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง (Eble and Blewett, 1979) Hose และ Martin (1989) ได้ศึกษาในกุ้ง Ridgeback (*Sicyonia ingentis*) และแบ่งเม็ดเลือดเป็น 4 ชนิด คือ 1) agranular 2) small granular with cytoplasmic deposit 3) small granular without cytoplasmic deposit 4) large granular haemocyte สำหรับในปู *Cancer magista* หรือ blue crab และครัสเตเชียอื่นอีกหลายชนิด พบเม็ดเลือด 3 ชนิด คือ 1) hyalin (hyalinocyte) 2) semi-granulated (intermediate, half granule hemocyte) 3) granulated (granulocyte, eosinophilic granulocyte) (Bauchau and Mengeot, 1978; Mix and Sparks, 1980) Toney (1958) ได้อธิบายว่าเม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิดนี้ เป็นระยะต่างๆ ของการพัฒนาของเม็ดเลือด โดยเม็ดเลือดชนิด hyalinocyte เป็นเม็ดเลือดระยะแรกที่จะพัฒนาเป็น semi-granulocyte และพัฒนาต่อไปเป็น granulocyte ซึ่งเป็นเซลล์ระยะสุดท้าย (terminal cell type) Mix และ Sparks (1980) พบว่าเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง hyalinocyte เริ่มแข็งตัว (clot) โดยยื่นเส้นใยบางๆ

หรือลักษณะคล้ายเท้าเทียม (pseudopodium) ออกมารอบเซลล์ เม็ดเลือดชนิด hyalinocyte นี้ คงจะทำหน้าที่เกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด นอกจากนี้ hyalinocyte ใน *Astacus leptodactylus* ยังอาจเปลี่ยนรูปเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน หรือ endothelial cell สร้างผนังเส้นเลือดแดง และเส้นเลือดฝอยเมื่อเกิดบาดแผล (Bullock and Horridge, 1965) กุ้งก้ามกราม *M. dayanum* พบเม็ดเลือดชนิดเดียวรูปร่างกลม หรือรูปไข่ เป็น amaeboid type ไม่มีแกรนูล (Srivatava และ Narain, 1985)

อนุตรา (2534) ได้ศึกษาชนิดของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ โดยจำแนกตาม Mix และ sparks (1980) ซึ่งได้ทำการแยกชนิดของเม็ดเลือดในปลูสกุล *Cancer magister* โดยพิจารณาลักษณะของเม็ดเล็ก ๆ หรือแกรนูล (granule) ในไซโตพลาสซึม และการติดสีย้อม Wright's stain ซึ่งแบ่งเม็ดเลือดออกเป็น 3 ชนิด 1) hyalinocyte หรือ agranulocyte 2) intermediate granulocyte หรือ semi-granulocyte 3) granulocyte หรือ eosinogranulocyte

ถึงแม้ว่าการจำแนกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดจะมีการเรียกชื่อต่าง ๆ กัน (ตารางที่ 1) แต่อย่างไรก็ตามนักวิจัยส่วนใหญ่มักจะจำแนกจากการศึกษาทางพยาธิวิทยา โดยการย้อมสีหรือการตัดเนื้อเยื่อเป็น ไฮยาลินเซลล์ เซมิแกรนูลาร์เซลล์ และแกรนูลาร์เซลล์ เซลล์เม็ดเลือดของสัตว์แต่ละชนิดจะมีขนาดแตกต่างกัน (ตารางที่ 2) รวมทั้งแกรนูลก็มีขนาดที่แตกต่างกันไปตามชนิดของสัตว์และเซลล์เม็ดเลือด (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 ชนิดของเม็ดเลือด

Type	Shape	Nucleus	Endoplasmic reticulum	Free ribosome	Golgi	Granules	Lysosomes	Mitochondria	Synonyms (authors)
Hyaline Cell	round to oval	Central, round and large	smooth, rough and scarce	present	0 or 1	0 or few		moderate	pale amoeboid cell (Halliburton, 1885) amibocyte hyaline (Cuenot, 1981) explosive corpuscle (Hardy, 1892) hyaline thigmocyte (Tait and Gunn, 1918) hyaline lymphoid cell (George and Nichols, 1948) leucocyte hyalin (Arvy, 1952) lymphoid cell (Toney, 1958) hyaline cell (Wood and Visentin, 1967; Bauchau and De Brouwer, 1972; Bodammer, 1978) gerinnungszellen (Stang-Voss, 1971) prohaemocyte (Ravindranath, 1974) prohyalocyte (Cornick and Stewart, 1978) phagocytic cell (Smith and Ratcliffe, 1978)
Semi-granular cell	Oval to spindle-shaped	central or eccentric, oval and lobed	smooth, rough and abundant	abundant	1 or more	moderate	present	abundant	undifferentiated hemocyte (Tsing, Arcier and Brehelin, 1989)
Granulocyte	oval	eccentric and kidney-shaped	smooth, rough and moderate	moderate	0 or 1	abundant	present	abundant	large granule hemocytes

ที่มา Bauchau, 1981

ตารางที่ 2 ขนาดของเม็ดเลือด (ไมโครเมตร)

Species	Hyaline	Semi- granular	Cell types		Authors
			Granulocyte	Lipo- protein	
<i>Helleria</i>	5-6	11-12	11-13		Hoarau (1976)
<i>brevicornis</i>					
<i>Orconectes</i>	7-10	9-18	18-35		Wood and Visentin (1967)
<i>virilis</i>					
<i>Astacus astacus</i>	max.30	max.30	max.50		Stang-Voss (1971)
<i>Cambarus</i>	8-11	7-9	15-18		Toney (1958)
<i>bartoni</i>					
<i>Homarus</i>	11-13	7-10.8	16.8-25.2		Toney (1958)
<i>americanus</i>			7.3-13.9		Hearing and Vernick (1967)
			(eosinophil)		
			8.4-11.5		
			(ovoid basophil)		
			9.3-14.4		

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Species	Hyaline	Semi-granular	Cell types Granulocyte (spindular basophil)	Lipo-protein	Authors
	8.4-8.5	8.6-20.9	9.1-24.8		Cornick and Stewart (1978)
<i>Callinectes</i>	6-7	6-7	14-14		Toney (1958)
<i>sapidus</i>	7-13	13.5-19.5	13.4-15.7		Bodammer (1978)
<i>Carcinus maenas</i>	5-6		10-12		Johnston <i>et al.</i> (1973)
	7	7	8-10	30-45	Sewell (1955)
			10-15		Chassard -Bouchaud and Hubert (1975)
<i>Carcinus</i>	6-7		10-13		Durand (1973)
<i>mediterraneus</i>					
<i>Eriocheir</i>	6-8		13-18	45	Bauchau and De Brouwer (1972)
<i>sinensis</i>					
<i>Pachygrapsus</i>	6.5-10	8-13	15		Arvy (1952)
<i>marmoratus</i>			8-12		Charmantier (1971)
<i>Macropipus</i>	4.5-6	6-7	7-10		Durand (1973)
<i>depurator</i>					

ที่มา Bauchau, 1981

ตารางที่ 3 ขนาดของแกรนูล (ไมโครเมตร)

Species	Hyaline	Semi-granular	Granulocyte	Authors
<i>Helleria brevicornis</i>		0.2-1.2	max.1.5	Hoarau (1976)
<i>Astacus astacus</i>	0.1-0.5		max.3	Stang-Voss (1971)
<i>Cambarus bartoni</i>			2	Toney (1958)
<i>Homarus americanus</i>			1	Toney (1958)
			0.53-0.74	Hearing and Vernick (1967)
<i>Callinectes sapidus</i>			0.7	Toney (1958)
	0.13-0.55	0.15-0.63	0.33-1.4	Bodammer (1978)
<i>Carcinus maenas</i>			0.1-1	Chassard-Bouchard and Hubert (1975)
<i>Carcinus</i>			0.8-1	Durand (1973)
<i>mediterraneus</i>				
<i>Eriocheir sinensis</i>	0.2-0.5	0.2-1.5	0.3-2.6	Bauchau and De Brouwer (1972)
			max.4	
<i>Pachygrapsus</i>			max.1.5	Arvy (1952)
<i>marmoratus</i>				
<i>Macropipus depurator</i>			0.8	Durand (1973)

ที่มา Bauchau, 1981

Soderhall และ Smith (1983) จำแนกชนิดของเม็ดเลือดกุ้ง *Carcinus maenas* และ เตคาปอด (decapod) อื่นๆ ด้วยวิธีการปั่นแยกสารที่มีลําดับความหนาแน่นต่างกัน (density gradient centrifugation) โดยใช้สารกันเลือดแข็งตัว (anticoagulant) ซึ่งประกอบด้วย EDTA citrate buffer (pH 4.6) และจำแนกชนิดของเม็ดเลือดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) และองค์ประกอบของ ไฮโดรพลาสม ได้ดังนี้

1. อะแกรนูโลไซท์ (agranulocyte) หรือ ไฮยาลินเซลล์ (hyaline cell) เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กที่สุดเมื่อเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดชนิดอื่นๆ มีรูปร่างคล้ายกระสวย หรือค่อนข้างกลม นิวเคลียสมีขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์ ไม่มีแกรนูล หรือมีแกรนูลจำนวนเล็กน้อยอยู่ในไฮโดรพลาสม แต่บางครั้งเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จะพบไฮโดรพลาสมิกอินคลูชัน (cytoplasmic inclusion) เซลล์ชนิดนี้สามารถเกาะและยึดตัวติดกระจกสไลด์ได้ มีความสามารถในการกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอม ขนาดและจำนวนของไฮยาลินเซลล์ของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนจะแตกต่างกัน เช่นใน *Penaeus japonicus* จะมีจำนวนไฮยาลินเซลล์ 10% ในระบบหมุนเวียนเลือดของร่างกาย ในขณะที่ไม่พบไฮยาลินเซลล์เลยใน *P. adspersus* และ *Macrobrachium rosenbergii* (Tsing et al., 1989)

2. เซมิแกรนูลาร์ ฮีโมไซท์ (semigranular haemocyte) เป็นชนิดของกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดอยู่ระหว่างไฮยาลินเซลล์และแกรนูโลไซท์ (granulocyte) (Bauchau and De Brouwer, 1972 อ้างโดย Bauchau, 1981) เซลล์กลุ่มนี้มีปริมาณแกรนูลน้อยและจำนวนแตกต่างกัน เซลล์ค่อนข้างเปราะบาง แตกง่ายเมื่อเซลล์ได้รับความกระทบกระเทือน โดยเฉพาะในห้องปฏิบัติการ และจะขับสารภายในเซลล์ออกมาอย่างรวดเร็ว (Soderhall and Cerenius, 1992) คาดว่าเซลล์ชนิดนี้จะทำหน้าที่ในการจดจำและตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาสู่ร่างกาย โดยช่วยย่อยสารที่อยู่ในแกรนูล และเข้าไปจับที่บริเวณสิ่งแปลกปลอม (Johansson and Soderhall, 1989) สังเกตพบว่ามีเพียงเซลล์ชนิดเซมิแกรนูลาร์ ฮีโมไซท์เท่านั้นที่เข้าทำปฏิกิริยากับสาร polysaccharide ของเชื้อโรค เช่น lipopolysaccharides และ β -1, 3-glucans โดยปล่อยสารที่อยู่ในแกรนูลและชักนำให้เกิดปฏิกิริยาการเกิดกระบวนการกักล้อมด้วย

หน้าที่หลักของเซลล์นี้ ในกุ้งน้ำจืดและกุ้งทะเลเป็นที่เก็บสะสม proPO activating system (prophenoloxidase activating system) โดยกลไกของระบบนี้จะหลั่งสารจากระบบเพื่อย่อยสลายเซลล์แปลกปลอม สาร polysaccharide ของจุลชีพไม่สามารถถูกกระตุ้นให้เกิดการย่อยสลายได้จากกลุ่มแกรนูลาร์เซลล์ ในขณะที่สามารถทำให้เซมิแกรนูลาร์เซลล์เกิดการหลั่งสารของระบบนี้ได้ (Johansson and Soderhall, 1989 อ้างโดย Soderhall and Cerenius, 1992)

3. แกรนูโลไซต์ (Granulocyte) เป็นกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่ที่สุดและมีแกรนูโลขนาดใหญ่ บางครั้งเรียก ลาร์จแกรนูโลลาร์ ฮีโมไซต์ (large granular hemocyte) หน้าที่ของเม็ดเลือดชนิดนี้ คาดว่าจะเป็นตัวหลักในปฏิกิริยา proPO activating system แต่จะไม่มีสารหลั่งสารในแกรนูโลเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสาร polysaccharide แต่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO system โดยจะทำปฏิกิริยากับ 76 KD และ β -1, 3 glucan binding protein เพื่อหลั่งสารในระบบ proPO system ออกมา

วิธีการแยกชนิดเซลล์เม็ดเลือด การคัดแยกเม็ดเลือดแต่ละชนิด สามารถกระทำได้โดยวิธีการต่างๆ ดังนี้

1. แยกเซลล์ไม่มีชีวิต (Dead cell)

1.1 การทดสอบเซลล์ที่มีชีวิต (viability test) สีย้อมบางชนิดไม่สามารถจะซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของมีชีวิต เช่น trypan blue, eosin Y, nigrosin ดังนั้นเซลล์ไม่มีชีวิตเท่านั้นที่ติดสีย้อมเหล่านี้ อย่างไรก็ตามสีย้อมบางชนิดจะติดเฉพาะบางเซลล์ที่มีชีวิต เช่น fluorescein diacetate

1.2 การกำจัดเซลล์ที่ไม่มีชีวิต วิธีการนี้จะอาศัยหลักการว่า เซลล์ไม่มีชีวิตจะติดแน่นกว่าเซลล์มีชีวิต ซึ่งจะแยกในอาหารที่มี ionic strength ต่ำ เพื่อลดผลของประจุไฟฟ้า (electrostatic) วิธีการแยกนี้ทำได้รวดเร็ว และสามารถแยกเซลล์มีชีวิตได้มากกว่า 95% แต่วิธีดังกล่าว ไม่สามารถนำไปใช้แยกเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์ไม่มีชีวิตในการเพาะเลี้ยงได้

2. การทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (lysis of erythrocytes) สามารถทำได้ 2 วิธี คือ วิธีที่หนึ่ง นำเซลล์เม็ดเลือดไปปั่นบน Metrizoate - Ficoll ซึ่งจะแยกเซลล์เม็ดเลือดของคนได้ คือ ลิมโฟไซต์ ประมาณ 30% โมโนไซต์ 1-3% และที่เหลือ คือ แกรนูโลไซต์ อีกวิธีหนึ่งคือการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกในสารละลาย isotonic ammonium chloride

3. การปั่นแยกสารที่มีลำดับความหนาแน่นต่างกัน (density gradient separation) สารตัวกลางที่ใช้ เช่น Metrizoate - Ficoll, colloidal silica (i.e. Percoll, Pharmacia) และ อัลบูมิน (albumin) มีรายงานการศึกษาการแยกชนิดเม็ดเลือด โดยใช้วิธีการดังกล่าว เช่น Boyum (1968) คิดค้นวิธีการแยก peripheral blood mononuclear cells (PBMC) จากเลือดคนโดยวิธีปั่นแยกสารที่มีลำดับความหนาแน่นต่างกัน สำหรับในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง มีรายงานการแยกชนิดเม็ดเลือดของกุ้ง *Carcinus maenas* และเตคาปอดอื่นๆ ได้แก่ *Cancer pagurus*, *Macropipus depurator* และ *Eupacurus bernhardus* โดยวิธีแยกสารที่มีลำดับความหนาแน่นต่างๆ

(continuous gradient) ของ 60% Percoll ใน 3.2% NaCl (Soderhall and Smith, 1983) นอกจากนี้ Kondo และคณะ (1992) ได้ใช้วิธีดังกล่าวในการแยกชนิดเม็ดเลือดและศึกษา phagocytic activity ของเซลล์เม็ดเลือดในกุ้ง kuruma

กระบวนการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมของกุ้งเมื่อมีสิ่งแปลกปลอม เช่น เชื้อแบคทีเรีย ปรสิตร และเชื้อไวรัสเข้าสู่ตัวกุ้ง จะเกิดการตอบสนองเป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific defense mechanism) ทั้งนี้เนื่องจากกุ้งและสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียมีระบบภูมิคุ้มกันที่แตกต่างจากสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง คือ ไม่มีการสร้างแอนติบอดี (antibody) หรือ CMIR แต่กลไกการป้องกันของกุ้งจะอาศัยเซลล์เม็ดเลือดเป็นหลัก

กระบวนการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ตัวกุ้งมีดังต่อไปนี้

1. การกลืนทำลายหรือ ฟาโกไซโทซิส (phagocytosis)
2. โนดูล์ฟอร์มเมชัน (nodule formation)
3. กระบวนการกักล้อม (encapsulation)
4. ไซโตท็อกซิกซิตี (cytotoxicity)
5. กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับเลกติน (lectin)
6. ระบบ prophenoloxidase activating system
7. กระบวนการแข็งตัวของเลือดและสมานบาดแผล (clotting and wound healing)

1. ฟาโกไซโทซิส

เป็นกระบวนการที่สำคัญที่สุดอย่างหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อโรคผ่านเข้ามาภายในร่างกาย ภายหลังจากที่เชื้อผ่านผิวหนังชั้นนอกเข้ามาแล้วโดยทั่วไป ถ้าไม่ทำการแยกชนิดของเม็ดเลือดออกจากกัน พบว่ากุ้งจะมีอัตราการเกิดฟาโกไซโทซิส 1 - 2% จนถึง 28% (Paterson *et al.*, 1976) เซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดต่างก็มีความสามารถในการจับกิน (phagocytose) สิ่งแปลกปลอมต่างกัน ในกุ้ง kuruma ศึกษาพบ phagocytic activity ในเซลล์เม็ดเลือดทั้งสามชนิด แต่แกรนูโลลาร์เซลล์มีค่า phagocytic activity สูงสุด (Kondo *et al.*, 1992) มีรายงานพบ phagocytic activity ในไฮยาลินเซลล์ และเฮมิแกรนูโลลาร์เซลล์ของ crayfishes; *Astacus astacus* และ *Pacifastacus leniusculus* (Smith and Soderhall, 1983) ในขณะที่ในปู *Carcinus maenas* จะพบ phagocytic activity เฉพาะในไฮยาลินเซลล์เท่านั้น (Soderhall *et al.*, 1986)

ในกลุ่ม vertebrate กระบวนการฟาโกไซโทซิสมีขั้นตอนต่างๆ ที่เกิดขึ้น ดังนี้ (สุทธิพันธ์และคณะ, 2537)

1. Adherence (attachment) คือการที่สิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพและฟาโกไซต์เข้ามาประชิดกันเป็นขั้นตอนแรกก่อนที่สิ่งแปลกปลอมจะถูกกลืนเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์ฟาโกไซต์ และถูกทำลายต่อไป ขั้นตอนนี้อาจเกิดขึ้นได้เอง หรืออาจจะอาศัยความช่วยเหลือของออปโซนิน (opsonin) ซึ่งมีบทบาทต่อฟาโกไซโทซิสโดยทำหน้าที่เชื่อมโยงสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพกับฟาโกไซต์ ซึ่งมีที่รับสำหรับออปโซนินอยู่บนผิว ทำให้เกิด adherence และ ingestion ต่อไป

2. Ingestion เมื่อฟาโกไซต์ได้สัมผัสกับสิ่งแปลกปลอม จะเกิด pseudopod ซึ่งยื่นออกไปเพื่อโอบล้อมสิ่งแปลกปลอม แล้วปลาย pseudopod 2 ข้างที่ยื่นออกไปจะประสานกัน เกิดเป็นถุงที่ภายในมีสิ่งแปลกปลอมอยู่ ถุงนี้เรียกว่า ฟาโกโซม (phagosome)

3. Degranulation เมื่อมีฟาโกโซม เกิดขึ้นในไซโตพลาสซึมแล้ว ไลโซโซม (lysosome) หรือแกรนูล (granule) ของฟาโกไซต์จะเคลื่อนมาอยู่รอบๆ ฟาโกโซม แล้วมีการเชื่อมต่อกันระหว่าง ฟาโกโซม และไลโซโซมเหล่านั้นกลายเป็นฟาโกไลโซโซม (phagolysosome)

4. Intracellular killing จุลชีพหรือสิ่งแปลกปลอมภายใน ฟาโกโซม และฟาโกไลโซโซม ถูกทำลายโดยกลไก 2 จำพวก คือ oxidative mechanism ซึ่งใช้ออกซิเจน และ non oxidative mechanism ซึ่งไม่ใช้ออกซิเจน

กลไกที่ใช้ออกซิเจน เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของฟาโกไซต์ได้สัมผัสกับสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพ (ในระยะ adherence) จะมีการเปลี่ยนแปลงใน oxidative metabolism ของเซลล์เป็นอย่างมาก การเปลี่ยนแปลงนี้เรียกว่า เรสไพราโทรี เบิร์สต์ (respiratory burst) ซึ่งประกอบไปด้วย การใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้น การเพิ่มขึ้นของกลูโคส ออกซิเดชัน (glucose oxidation) ซึ่งผ่านทาง hexose monophosphate shunt, HMS) การสร้างไฮโดรเจน เปอร็อกไซด์ (hydrogen peroxide :H₂O₂) เพิ่มขึ้น การสร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน (superoxide anion : O₂⁻) และอาจมีความหมายรวมไปถึงการเพิ่มรีดักชัน (reduction) ของสี่เตตราโซเลียม (tetrazolium) และการเกิดปรากฏการณ์ chemiluminescence

ในคริสต์ทศวรรษ Anderson และคณะ (1992) ทำการตรวจสอบการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนของเซลล์เม็ดเลือดของ *Crassostrea virginica* โดยสังเกตการเกิด NBT reduction พบว่า การเกิดฟาโกไซโทซิสที่เพิ่มขึ้นมีผลโดยตรงต่อการเกิด NBT reduction โดยสามารถสังเกตเห็นอนุภาคของ formasan มีการสะสมเพิ่มมากขึ้นในไซโตพลาสซึม และโดยเฉพาะที่บริเวณรอบๆ แวกคิวโอล (vacuole) ของเซลล์ที่เกิดฟาโกไซโทซิส ปริมาณการเกิด NBT reduction นี้เป็นตัววัดปริมาณการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนที่เกิดขึ้นในกระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอม Song

และ Hsieh (1994) รายงานการเกิด respiratory burst ในเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ และพบว่า β -glucan มีผลต่อการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดในการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กุ้งกุลาดำที่ได้รับการฉีดวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *Vibrio harveyi* ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) มีปริมาณการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนเพิ่มขึ้น (สาวิตรี, 2541)

การศึกษาในกุ้งน้ำจืด พบว่าประสิทธิภาพของการเกิดการจับกินแบคทีเรียที่เรื้อรังอยู่กับองค์ประกอบที่อยู่ในน้ำเลือด ในขณะที่ในปูทะเลจะไม่พบว่า opsonic factor มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดฟาโกไซโทซิสเชื้อโรค จึงไม่แน่ใจว่าประสิทธิภาพของการเกิดฟาโกไซโทซิสที่เพิ่มขึ้นมานั้นอาจมาจากผลโดยทางอ้อมของระบบ proPO system เนื่องจากเมื่อนำเซลล์เม็ดเลือดมาสัมผัสกับ β -1, 3-glucan ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของระบบ proPO system แล้ว จะทำให้อัตราการเกิดฟาโกไซโทซิสเพิ่มขึ้น 5-7 เท่า (Soderhall and Cerenius; 1992) และยังพบว่าอัตราการเกิดฟาโกไซโทซิสจะเพิ่มมากขึ้น 3 เท่าเมื่อทำการ opsonize ด้วย haemocyte lysate ซึ่งคาดว่าออกซิไนซินตัวนี้จะไม่ใช่สาร phenoloxidase โดยตรงแต่อาจเป็นตัวโปรตีนขนาด 76 KD ที่สามารถเพิ่มอัตราเร่งของการเกิดกระบวนการกักล้อมได้ด้วย และจากการศึกษาของ Goldenberg และคณะ (1984) พบว่าเมื่อทำการ opsonize เม็ดเลือดแดงแกะด้วยซีรัม (serum) สามารถกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดของกุ้ง american lobster (*Homerus americanus*) มีอัตราการเกิดฟาโกไซโทซิสเพิ่มมากขึ้น ซึ่งการทดลองในกุ้ง kuruma ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน (Kondo *et al.*, 1992) นอกจากนี้ยังมีรายงานผลการศึกษาว่า β -1, 3-glucan, peptidoglycan และวัคซีนที่เตรียมมาจากแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งที่เป็นโรค สามารถกระตุ้นระบบการป้องกันตัวในพวกครัสเตเชียและทำให้ค่า phagocytic activity เพิ่มขึ้น (Mckay and Jenkin, 1970; Paterson *et al.*, 1976; Smith and Soderhall 1983; Soderhall *et al.*, 1985; Itami *et al.*, 1989; Boonyaratpalin *et al.*, 1995)

2. โนดูลฟอร์มชัน (nodule formation)

เมื่อมีจุลชีพจำนวนมากเข้าสู่ร่างกาย กระบวนการฟาโกไซโทซิสไม่สามารถที่จะกำจัดจุลชีพนั้นได้หมด ดังนั้นจะมีกระบวนการสร้างโนดูล (nodule) ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่รวมตัวกันรอบสิ่งแปลกปลอม สามารถพบกระบวนการนี้ได้ในตัวไม่มีกระดูกสันหลังทั่วไป โดยรวมถึงกลุ่มครัสเตเชียด้วย ผลจากการเกิดโนดูลคือ พวงจุลชีพจะติดอยู่ที่บริเวณผิวชั้นต่างๆ ของเม็ดเลือด และต่อมากลุ่มโนดูลนั้นจะเปลี่ยนกลายเป็นสีดำ (melanized) เนื่องจากกระบวนการของเอนไซม์

phenoloxidase ในตัวกุ้ง แบคทีเรียจะมีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว จากระบบหมุนเวียนโลหิต และบริเวณที่เกิดการรวมตัวของเม็ดเลือดไปยังบริเวณเหงือก หรือบางครั้งก็ไปยังบริเวณท่อตับ (Smith and Ratcliffe, 1980) โดยเชื่อว่าเหงือกและตับจะเป็นบริเวณหลักที่เชื้อโรคเข้าไปอาศัยอยู่ แต่ก็อาจเกิดขึ้นในบริเวณอื่นด้วยเช่นกัน กิจการและคณะ (2543) ทดลองฉีดเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เข้าสู่กุ้งกุลาดำ และพบลักษณะของโนดูลฟอรัมเมชั่น กระจายอยู่ทั่วไปตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น ต่อมน้ำเหลือง ตับและตับอ่อน หัวใจ เหงือก และกระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมจะมีเซลล์เม็ดเลือดในระบบไหลเวียน และเซลล์จับกินกับที่ (fixed phagocyte) เข้ามาเกี่ยวข้องเป็นหลัก

3. กระบวนการกักล้อม (encapsulation)

เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่ เช่น ปรสิตต่าง ๆ บุกรุกเข้ามาในร่างกายซึ่งไม่สามารถกำจัดได้ด้วยกระบวนการฟาโกไซโทซิส ร่างกายจะกำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้นด้วยกระบวนการกักล้อม โดยที่ฮีโมไซท์หลายชนิดจะเข้ามาช่วยกัน ผลจากการพัฒนาเทคนิคการแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือด ทำให้สามารถจำแนกได้ว่าเซลล์เม็ดเลือดชนิดใดที่มีการตอบสนองต่อโมเลกุลของสิ่งแปลกปลอม ในกุ้งน้ำจืดมีเซลล์เม็ดเลือดชนิดเฮมิแกรนูโลลาร์ชนิดเดียวเท่านั้นที่เข้าจับกับโมเลกุลของสิ่งแปลกปลอมพวก β - 1, 3 - glucan จากราหรือกลุ่มเอนโดทอกซิน (endotoxin) และพวก lipopolysaccharide จากแบคทีเรีย โดยเซลล์ชนิดนี้จะเป็นเซลล์แรกที่เข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลสิ่งแปลกปลอมและเกิดกระบวนการกักล้อม โดยพบว่าโปรตีนขนาด 76 KD เป็นออปโซนิน และยังพบว่าโปรตีนชนิดนี้เข้ามามีส่วนช่วยในระบบ proPO system ในกุ้งน้ำจืด แต่กลไกยังไม่แน่ชัด โปรตีนชนิดนี้ยังทำหน้าที่หลายอย่าง เช่น ช่วยในการจับเชื้อ และเกิด degranulation ในแกรนูโลลาร์เซลล์และเฮมิแกรนูโลลาร์เซลล์ นอกจากนี้ยังช่วยกระตุ้นให้เกิดกระบวนการกักล้อมและอาจเป็นตัวกระตุ้นในการเกิดฟาโกไซโทซิสดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น (Soderhall and Cerenius, 1992)

4. ไซโทท็อกซิกซิตี (cytotoxicity)

มีการศึกษาถึงเซลล์ที่ทำให้เกิดไซโทท็อกซิกซิตีของสัตว์กลุ่มครัสเตเชียจำนวนมาก พบว่า กุ้งน้ำจืดในประเทศออสเตรเลียสามารถทำให้เกิดกระบวนการนี้ได้โดยการให้เซลล์ที่เป็นมะเร็งเป็นเซลล์เป้าหมาย (Tyson and Jenkin, 1973 อ้างโดย Soderhall and Cerenius, 1992) ส่วนกุ้งน้ำจืดในแถบทวีปยุโรป (*Astacus astacus*) เซลล์เม็ดเลือดทำการกำจัดทั้งเซลล์ปกติและเซลล์ที่เป็นมะเร็ง (Soderhall et al, 1985 อ้างโดย Soderhall and Cerenius, 1992) อย่างไรก็ตามก็

ตามในขณะนี้กำลังทำการจำแนกว่าเซลล์ใดที่ทำหน้าที่ตอบสนองในลักษณะนี้ . และกำลังทดลองว่าหน้าที่หลักในกระบวนการนี้ของเม็ดเลือดเป็นเช่นไร

5. กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับเลกติน (lectin)

เลกตินเป็นสารจำพวกโปรตีนหรือ glycoprotein ที่มีคุณสมบัติในการจับกับคาร์โบไฮเดรตได้อย่างจำเพาะเจาะจง เลกตินแต่ละชนิดจะมีการจับจำเพาะเจาะจงกับน้ำตาลได้แตกต่างกันออกไป โดยบางชนิดมีความจำเพาะเจาะจงกับน้ำตาลได้มากกว่า 1 ชนิด เลกตินมักมีจำนวน binding site มากกว่า 1 ขึ้นไป จึงทำหน้าที่เหมือนสะพานเชื่อมเซลล์จำนวนมากให้เกาะกลุ่ม (agglutination) กันได้ โดยจับกับคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์ เลกตินแต่ละชนิดจะจับกับเซลล์ชนิดต่างๆ ได้แตกต่างกันออกไป และการจับกันของเลกตินกับคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์ จะถูกยับยั้งได้โดยโมเลกุลของน้ำตาลที่จำเพาะเจาะจง

ในกลุ่มของแมลง การสังเคราะห์เอนโดจีนัสกาแลคโตส บายดิง เลกติน (endogeneous galactose-binding lectin) เกิดขึ้นใน 2 ช่วงเวลาคือ ระหว่างช่วงที่มีการพัฒนาในระยะตัวอ่อน และช่วงที่อยู่ในระยะดักแด้ (pupa) และอาจมีการสร้างเลกตินในช่วงที่ร่างกายมีการบาดเจ็บ ดังนั้นอาจสรุปได้ว่า เลกตินมีหน้าที่อย่างน้อย 2 อย่าง คือ ช่วยกำจัดเซลล์ที่ไม่ต้องการในระหว่างกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (metamorphosis) และทำหน้าที่ในการป้องกันการติดเชื้อต่างๆ (Takahashi et al., 1986) มีรายงานของ Jomori และคณะ (1990) ถึงหน้าที่การดักจับแบคทีเรียในน้ำเลือดของเลกตินที่แยกบริสุทธิ์จากแมลง

ในสัตว์จำพวกกุ้ง เลกตินอาจเป็นตัวการสำคัญในระบบการรับรู้ถึงการแทรกแซงของสิ่งแปลกปลอม (recognition system) (Ratcliffe et al., 1985 อ้างโดย Soderhall and Cerenius, 1992) เหตุผลสนับสนุนประการแรกคือ เลกตินทำให้จุลชีพเกาะกันเป็นก้อนได้ (agglutination) และประการที่สองสามารถที่จะช่วยเหลือในกระบวนการเชื่อมต่อระหว่างเม็ดเลือดกับสิ่งแปลกปลอมได้ คือทำหน้าที่เป็นออปโซนิมันตัวเอง การแยกเลกตินบริสุทธิ์ในปัจจุบันสามารถแยกได้จากซีรัมของกุ้งกุลาดำ (Ratanapo and Chulavatnatol, 1990), *Penaeus stylirostris* (Vargas-Albores et al., 1992) และ กุ้ง kuruma (Kondo et al., 1992) โดยเลกตินที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำ ซึ่งมีชื่อว่า โมโนดิน (monodin) มีน้ำหนักโมเลกุล 420 KD และมี 27 KD subunits มีความจำเพาะเจาะจงกับน้ำตาล N-acetylneuraminic acid (NANA) และน้ำตาลอื่นๆ เช่น N-acetylgalactosamine (GalNAc), N-acetylglucosamine (GlcNAc) และ N-acetylmannosamine (ManNAc) นอกจากนี้โมโนดิน ยังชักนำให้เซลล์ของแบคทีเรีย *Vibrio*

vulnificus เกาะกลุ่มกัน การเกาะกลุ่มนี้จะถูกยับยั้งอย่างเฉพาะเจาะจงโดยน้ำตาล NANA (Ratanapo และ Chulavatnatol, 1990)

สำหรับเลกตินที่แยกได้จาก *P. californiensis* นั้นสามารถถูกยับยั้งด้วยน้ำตาล monosaccharide (GalNAc, GlcNAc, ManNAc) และ glycoprotein (fetuin, submaxillary bovine mucin) เมื่อแยกบริสุทธิ์ พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 170-180 KD มี 4 subunits แต่ละ unit มีน้ำหนักโมเลกุล 41 KD สามารถทำให้แบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* เกาะกลุ่มกันได้ จากการศึกษาของ Kondo *et al.* (1992) พบว่า เลกตินบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกุ้ง kuruma นั้น มีน้ำหนักโมเลกุล 330 KD และมี subunits หนัก 33 KD เลกตินนี้ถูกยับยั้งด้วยน้ำตาล GlcNAc และทำหน้าที่เป็นออปโซนิน เมื่อทำการศึกษาฟาโกไซโทซิสของเม็ดเลือดกุ้ง kuruma ทั้ง 3 ชนิด โดยให้จับกับ glutaraldehyde-fixed sheep red blood cells (SRBC) และ opsonize ด้วยซีรัม กุ้ง พบว่ามีค่าฟาโกไซโทซิสสูงกว่า SRBC ที่ไม่ถูก opsonized ซึ่งเป็นผลมาจากเลกตินที่อยู่ใน ซีรัม opsonic activity ของเลกตินนี้ถูกยับยั้งด้วย GlcNAc แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วยความร้อน (อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 15 นาที) หรือเมื่อมี EDTA

๕. 6. Prophenoloxidase activating system

Prophenoloxidase activating system ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด ได้แก่ proteinases, proteinase inhibitors และ recognition molecules ซึ่งจะจดจำโครงสร้างของแบคทีเรียและรา หน้าที่ของ proPO activating system คือการสร้างออปโซนิน (opsonin) ก่อให้เกิดแคปซูล หรือ โนดูล เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด ช่วยในการทำลายจุลชีพและมีส่วนช่วยในการติดต่อสื่อสารกันระหว่างเซลล์เม็ดเลือด

Prophenoloxidase (monophenyl L-dopa : oxygen oxidoreductase) เป็นเอนไซม์ซึ่งมีหน้าที่สำคัญส่งผลให้เกิดกระบวนการเมลานไนเซชัน (melanization) ซึ่งพบได้บ่อยในปฏิกิริยาการตอบสนองของร่างกายต่อสิ่งแปลกปลอมหรือพยาธิสภาพต่าง ๆ prophenoloxidase (proPO) จะถูกสร้างในเซลล์เม็ดเลือด (Aspan *et al.*, 1995 อ้างโดย Saderhall and Cerenius, 1998) ใน crayfish จะสร้าง haemocyanin ใน hepatopancreas ระบบนี้จะถูกกระตุ้นโดย β -1, 3-glucan ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของผนังเซลล์ของราและแบคทีเรีย รวมทั้งพวก microbial polysaccharides ต่างๆ เช่น lipopolysaccharide และ peptidoglycan ดังนั้น prophenoloxidase activating system ทำหน้าที่เหมือนเป็นระบบความจำทั้งในการรับรู้และการป้องกันตัว สิ่งที่กำลังเป็นที่น่าสนใจขณะนี้คือ หน้าที่ของระบบ proPO system ในการติดต่อระหว่างเซลล์ในร่างกายของสัตว์

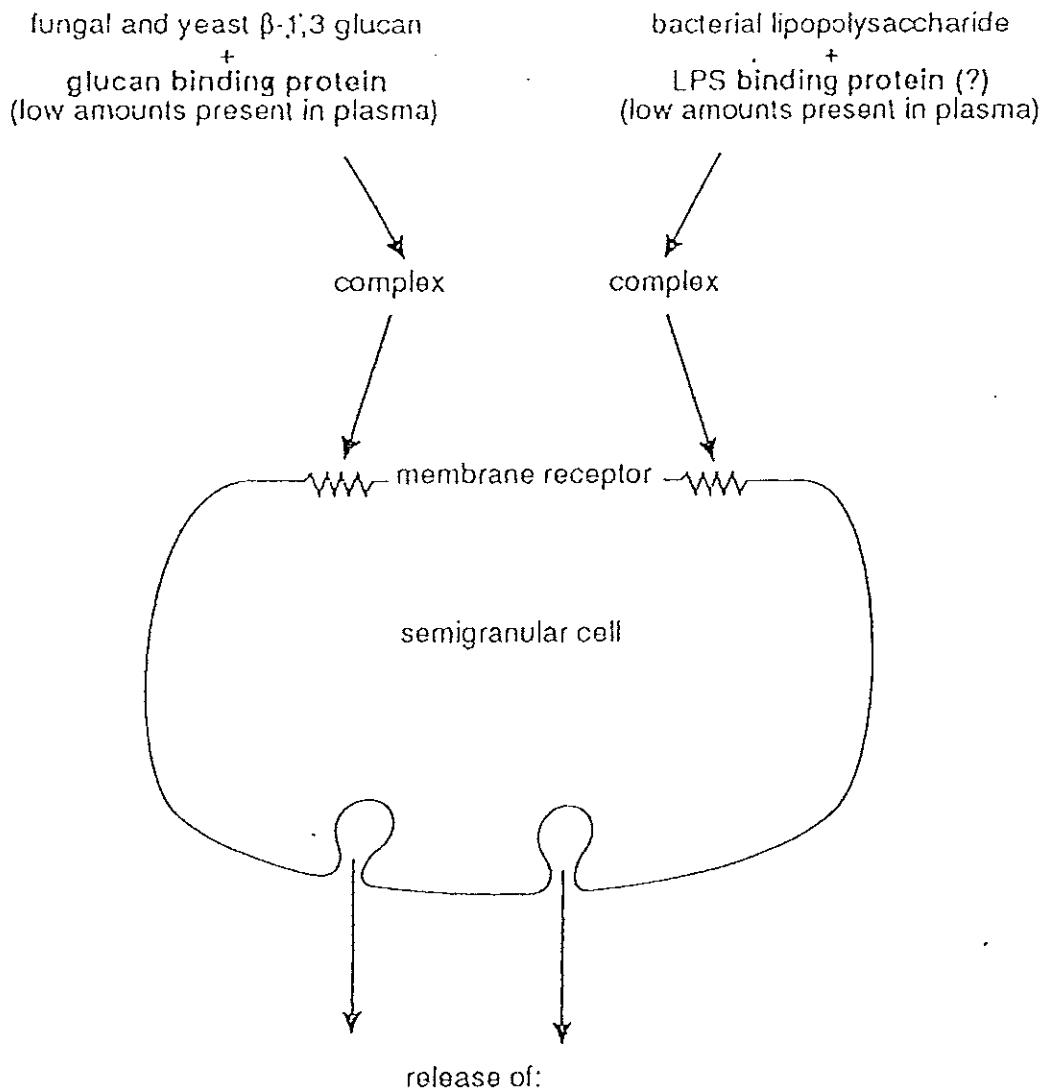
6.1 ชีวเคมีของระบบ proPO system

จากการแยกระบบ proPO ในแมลงพบว่ามีโปรตีน 2 ชนิด คือ prophenoloxidase และ β -1, 3-glucan binding protein โดย proPO มีน้ำหนัก 80 KD proPO จะถูกย่อยออกเป็นหน่วยเล็กๆ โดย commercial proteinase หรือจาก serine proteinase ที่แยกจาก cuticle ของแมลงชนิดนี้ ส่วน proPO บริสุทธิ์ที่แยกจากเม็ดเลือดของกิ้งก่ามีน้ำหนัก 76 KD เป็น polypeptide เมื่อใช้ serine proteinase ย่อย proPO จะได้เอนไซม์ phenoloxidase ขนาด 60 และ 62 KD แต่ถ้าถูกย่อยด้วย commercial trypsin จะได้เอนไซม์ phenoloxidase ขนาด 60 KD เท่านั้น ดังนั้นสรุปได้ว่า ระบบ proPO system ในสัตว์จำพวกกิ้งก่าจะมีการเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในรูปของ active form คือ proPO จะถูกย่อยให้กลายเป็นเอนไซม์ phenoloxidase โดย endogeneous serine proteinase.

ในสัตว์จำพวกกิ้งก่าระบบ proPO สามารถที่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นรูปแบบที่ active ได้เลย เมื่อระดับแคลเซียมไอออนในเลือดต่ำโดยปราศจาก microbial polysaccharide มากกระตุ้น ซึ่งคาดว่าจะจะเป็นประโยชน์เมื่อมีการเกิดบาดแผลและเกิดการแข็งตัวของเลือดขึ้น

6.2 กระบวนการกระตุ้นระบบ proPO

เริ่มต้นโดยเกิดการกระตุ้นระบบให้อยู่ในรูปแอคทีฟโดย microbial polysaccharide เช่น peptidoglycan, lipopolysacchhalide และ β -1, 3-glucan โดยสารคาร์โบไฮเดรตเหล่านี้จะกระตุ้นที่ฮีโมลิมป์ (haemolymph) จึงเกิดการเชื่อมต่อนของ β -1, 3-glucan และ β -1, 3-glucan binding protein เกิดเป็น complex ซึ่งจะไปที่กระตุ้นที่ membrane receptor ของเซมิแกรนูลาร์เซลล์ ทำให้เกิดการหลั่งสารออกมาหลายชนิดรวมทั้ง proPO (ภาพที่ 1) proPO จะออกซิไดส์ (oxidized) สารจำพวกฟีนอล (phenol) ให้เป็นควิโนน (quinone) แล้วจึงเกิด polymerization ไปเป็นเมลานิน (melanin) (ภาพที่ 2) ในที่สุดเมลานินจะทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อโรค นอกจากนี้สารที่หลั่งมาจากเซมิแกรนูลาร์อีกชนิดหนึ่ง คือ pro-adhesion and degranulating factor (pro-ADGF) จะเปลี่ยนเป็น adhesion and degranulating factor (ADGF) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการกระตุ้นเซมิแกรนูลาร์และแกรนูลาร์ให้มีการหลั่งสารในระบบ proPO system อย่างต่อเนื่อง (ภาพที่ 3) (Knaap,1993) Kondo และคณะ (1992)พบว่า serine protease และ copper enzyme ชักนำให้เกิดการหลั่งเอนไซม์อย่างต่อเนื่องของ activating system

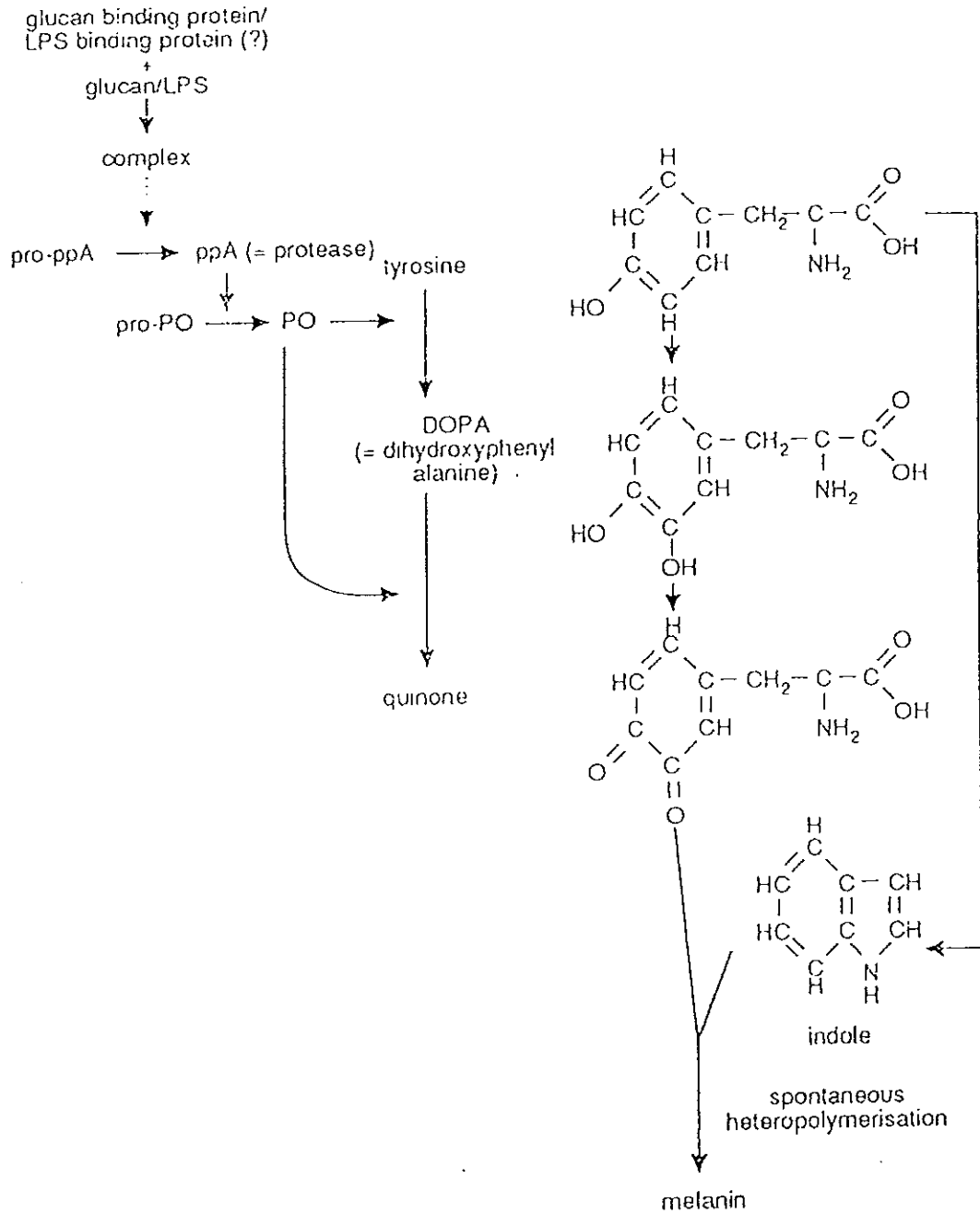


- substrate (= tyrosine = hydroxyphenyl alanine)
- pro-ppA (= pro-prophenol oxidase activating enzyme)
- pro-PO (= pro-phenol oxidase)
- pro-ADGF (= pro-adhesion and degranulating factor)
- glucan and LPS binding proteins (?)

(?) = molecule(s) must exist but has not yet been characterised

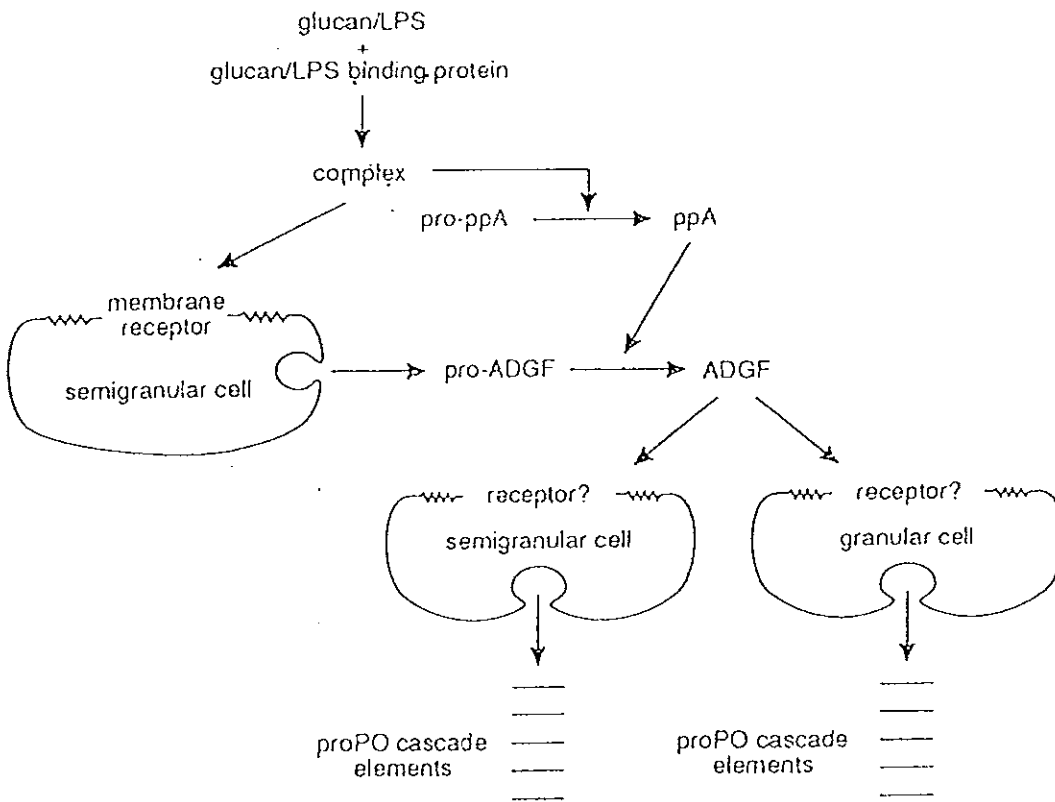
ภาพที่ 1 กระบวนการกระตุ้นในระบบ proPO

ที่มา : Knaap,1993



(?) = molecule must exist but has not yet been characterised

ภาพที่ 2 กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีโดย PO
ที่มา : Knaap,1993



ภาพที่ 3 กระบวนการกระตุ้น proPO ในร่างกาย

ที่มา : Knaap,1993

6.3 การควบคุม pro PO activating system

prophenoloxidase ส่วนใหญ่อยู่ในรูป zymogen ซึ่งอยู่ภายใน vesicles ในเซลล์เม็ดเลือด และ proteinase inhibitors จะควบคุม proPO activating system ตัวอย่างของ proteinase inhibitors ที่พบในกลุ่มอาร์โทพอด ได้แก่ serpins, kazal inhibitors และ macroglobulins รวมทั้ง pacifastin ที่พบใน crayfish ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 155 KD (Liang et al., 1995 อ้างโดย Thornqvist and Soderhall, 1997) จะเป็นตัวยับยั้งการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ

6.4 แอนติไมโครเบียล คอมพาวด์ (antimicrobial compound)

ขั้นตอนสุดท้ายของระบบ proPO system คือ การหลั่งเอนไซม์ phenoloxidase โดยเอนไซม์นี้จะออกซิไดส์ สารจำพวกฟีนอลให้เป็นควิโนนซึ่งเป็นรูปแบบหนึ่งของเมลานินที่จะไม่ได้รับการกระตุ้นจากเอนไซม์ใดๆ อีก เมลานินและสารตัวกลาง (intermediates) ของมัน เป็นสารประกอบที่เกิดปฏิกิริยาได้ (Soderhall, 1982 อ้างโดย Soderhall and Cerenius, 1992) เช่น ชัก นำให้เกิดการป้องกันการเจริญของจุลชีพโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่หลั่งออกมาจากจุลชีพ เช่น โปรตีเนส (proteinase) และ ไคติเนส (chitinase) (Kuo and Alexander, 1967 อ้างโดย Soderhall and Cerenius, 1992)

7. การแข็งตัวของเลือดและการสมานแผล (Clotting and wound healing)

7.1 การแข็งตัวของเลือด

การแข็งตัวของเลือด นับเป็นระบบการป้องกันตัวที่มีความจำเป็นสำหรับสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน เนื่องจากสามารถป้องกันการสูญเสียเลือดจากรอยเปิดของบาดแผลที่เปลือก และป้องกันเชื้อโรคต่างๆ เช่น แบคทีเรียสามารถผ่านเข้ามาได้ (Martin et al., 1993) กระบวนการแข็งตัวของเลือดถูกพอสสรุปว่าแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนของ plasma clot และส่วนของ clotting protein โดยในส่วนของ plasma clot จะมีสารคล้ายไฟบริโนเจน (fibrinogen) อยู่ในพลาสมา ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นไฟบริน (fibrin) และมีทรานส์กลูตามิเนส (transglutaminase) ที่ได้จากไฮยาไลน์เซลล์ และแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) เป็นส่วนสำคัญในการก่อให้เกิดการแข็งตัวของเลือด (Vargas-Albores et al., 1998)

ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน ได้มีการแยก clotting protein ให้บริสุทธิ์จาก spiny lobster; *Panulirus interruptus*, crayfish; *P. leniusculus* และในกุ้งขาว *P. vannamei* (Vargas-Albores et al., 1998) พบว่า clotting protein ทั้งหมดเป็น lipoglycoprotein ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 420 KD และประกอบด้วย 2 subunits เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์

(disulfide bond) นอกจากนี้ยังพบว่าองค์ประกอบของกรดอะมิโน (amino acid composition) ของ clotting protein ที่แยกได้จากสัตว์ในวงศ์เตี้ยนกลุ่มนี้ไม่แตกต่างกับ sand crab; *Ovalipes bipudtulatus* (Madaras *et al.*, 1991 อ้างโดย Vargas – Albores *et al.*, 1998) ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของกรดอะมิโนของ clotting protein บริสุทธิ์ที่แยกได้จากกุ้งขาว, crayfish, lobster และ sand crab

Amino acid	<i>Penaeus Vannamei</i>	<i>Pacifastacus Leniusculus</i>	<i>Panulirus interruptus</i>	<i>Ovalipes bipustulatus</i>
Asx	10.39	9.05	9.90	11.94
Thr	7.68	8.72	7.12	6.66
Ser	7.92	7.65	8.19	6.75
Gxl	11.61	12.30	10.91	12.22
Pro	5.64	4.99	5.25	5.74
Gly	7.17	5.84	6.17	7.40
Ala	5.44	5.72	5.46	6.01
Cys	n.d.	1.53	1.31	1.27
Val	6.97	6.48	6.90	6.66
Met	1.38	1.49	1.69	1.75
Ile	5.69	6.31	5.12	5.09
Leu	8.79	8.32	9.60	8.14
Tyr	3.28	3.13	3.18	2.31
Phe	4.65	5.19	4.10	3.98
His	3.77	3.18	4.16	3.61
Lys	5.02	6.28	4.18	5.64
Arg	4.56	3.84	4.75	4.81

ที่มา : Vargas-Albores *et al.*, 1998

n.d. not determined

7.2 การสमानแผล

กระบวนการนี้เริ่มจากแกรนูโลซาร์ ฮีโมไซท์ (granular haemocyte) เป็นเซลล์ที่รับรู้ถึงการถูกทำลายเนื้อเยื่อและมีการหลั่งสารเพื่อกระตุ้นเซลล์ชนิดอื่นให้ทำหน้าที่ในการสमानบาดแผล ระบบการควบคุมและกระบวนการทางชีวเคมียังไม่แน่ชัดนัก แต่มีการชักนำ coagulagen (clot-forming substance) คือ plasma coagulagen ซึ่งหลังจาก fat body และ haemocyte coagulagen ที่หลังจาก ไฮยาลินและเซมิแกรนูโลซาร์เซลล์ ในการเพิ่มการปิดบาดแผลมีการขนย้ายไขมันคือ ไลโปฟอริน โมเลกุล (lipophorine molecule) ซึ่งประกอบด้วย โปรตีน (protein) ที่สร้างจากไกลโคเปปไทด์ 2 ชนิด (250 KD และ 80 KD) และมี lipid moiety ล้อมรอบ (Ghidalia *et al.*,1981 อ้างโดย Vargas-Albores *et al.*,1998)

การสमानปิดบาดแผลเกิดขึ้นโดยมีการเพิ่มของการหลั่ง proPO อย่างต่อเนื่อง เกิด PO ซึ่งมีส่วนในการสร้างสารเมลานินมาปิดบาดแผล ดังนั้นจะพบเซลล์เม็ดเลือดกลุ่มแกรนูโลซาร์ในบริเวณที่มีการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดกึ่งโดยใช้เทคนิค

Continuous gradient centrifugation

2. เพื่อศึกษาชนิดและลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดในกึ่งกูดำ
3. เพื่อศึกษาการป้องกันตัวของกึ่งกูดำ
4. เพื่อศึกษาผลของซีรัมต่อการเกิดฟาโกไซท์โทซิส

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุ

1. สัตว์ทดลอง

กึ่งกุลาดำอายุ 3-4 เดือน น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 15-20 g เป็นกึ่งแข็งแรง และไม่มีประวัติการเป็นโรค รวบรวมจากฟาร์มเอกชน จังหวัดสงขลา และศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกึ่งทะเลฝั่งอ่าวไทย กรมประมง

2. เม็ดเลือดแดงแกะ

3. อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

K-199 องค์ประกอบของอาหาร ดังรายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ, สารเคมี และสื่ออม ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ สารเคมี สื่ออม และบริษัทผู้ผลิต

อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ สารเคมี สื่ออม	บริษัทผู้ผลิต
1. อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ	
Medium - 199	Gibco
2. สารเคมี	
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma
Calcium chloride ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Sigma
Copper sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	Riedel
Disodium hydrogen Phosphate (Na_2HPO_4)	Merck
Fetal bovine serum (FBS)	Gibco

ตารางที่ 5 (ต่อ)

อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี สีย้อม	บริษัทผู้ผลิต
Folin and Ciocalteu's reagent	Merck
Glycine	Merck
Glutaraldehyde 25% solution	Serva
Hydrochloric acid HCl	Merck
L – 3, 4, Dihydroxyphenyl alanine ($C_9H_{11}NO_4$, L - DOPA)	Sigma
L – cysteine	Sigma
L – glutamine	Gibco
Magnesiumchloride-6-hydrate ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	Riedel
Magnesium sulphate ($MgSO_4$)	Sigma
N – (2-hydroxyethyl) piperazine-N-2-ethanesulfonic acid (HEPES)	Sigma
Osmium tetroxide (OsO_4)	Sigma
Percoll	Sigma
Potassium chloride (KCl)	Sigma
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Merck
Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	Baker
Sodium cacodylate-trihydrate [$(CH_3)_2AsO_2Na \cdot 3H_2O$]	Fluka
Sodium chloride (NaCl)	Merck
Sodium dihydrogen phosphate ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)	Merck
Sodium hydroxide (NaOH)	Merck
Sodium tartrate	Baker
Tris – hydroxymethyl-methylamine hydrochloride	Sigma
Trypsin	RMC
3. สีย้อม	
Diff Quik	Baxter

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. กระดาษกรอง Whatman No.2
2. แผ่นกรอง Millipore ขนาดรู 0.22 μm
3. Tuberculin syringe พร้อม needle
4. Microtiter plates, Nunc
5. Micropipette ขนาด 20, 100, 200 และ 1,000 μL , Gilson, Japan
6. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave), Hirayama corporation, HA -300 MN, Japan
7. เครื่องเหวี่ยงตกตะกอน (centrifuge), Sigma, 2K15, Germany
8. เครื่องเหวี่ยงตกตะกอนควบคุมอุณหภูมิความเร็วสูง (Superspeed centrifuge) Kokusan - H200R, Japan
9. เครื่องชั่ง, Mettler, AB 204, Switzerland
10. เครื่องทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่องเสียง (Sonicator) Artek, Ultrasonic, U.S.A.
11. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter), Denver Instrument, 5,
12. เครื่องกวนสารละลายแม่เหล็กแบบให้ความร้อน (Magnetic hot plate stirrer), Ikamag, Rec-G, Germany.
13. เครื่องผสมสารเคมี (Mixer) Vortex, Genie, U.S.A.
14. ถังเก็บไนโตรเจนเหลว (Cryogenic equipment), Taylor - Wharton, 18 xt, U.S.A.
15. กล้องจุลทรรศน์, Olympus, Japan.
16. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน TEM Jeol, Model JEM 100 cx II
17. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด SEM Jeol, Model JSM-35CF
18. ตู้อบฆ่าเชื้อด้วยความร้อน (Oven), Memmert, 500, Germany.
19. ตู้เย็น -20°C , SR songsern, HF 201, Denmark.
20. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงของสาร (Spectrophotometer), Shimadzu. UV- 160 A, Japan

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกึ่งกลาดำที่มีน้ำหนักประมาณ 15-20 g นำมาพักไว้ในบ่อซิเมนต์ ซึ่งบรรจุน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน มีความเค็มระหว่าง 25-28 ppt อุณหภูมิน้ำระหว่าง 23-25 °C ซึ่งให้อากาศตลอดเวลา และให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป วันละ 4 มื้อ ดูดตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน ปรับสภาพกึ่งกลาดำเป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนนำมาทดลอง ทั้งนี้กึ่งกลาดำที่ใช้ในทุกการทดลอง เป็นกึ่งที่แข็งแรงและไม่มีการเป็นโรค และไม่พบการติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส

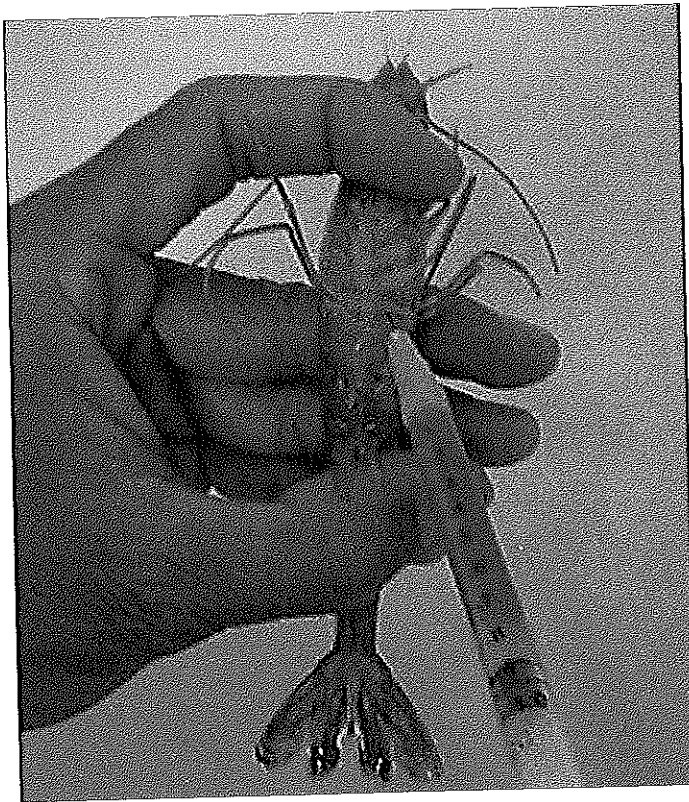
2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกเม็ดเลือด

2.1 การเตรียมชั้นของ Percoll (Percoll continuous gradient) ดัดแปลงจากวิธีของ Soderhall and Smith (1983) และ Kondo *et al.* (1992)

เตรียม 60% Percoll ในสารละลายไฮเดียมคลอไรด์ ให้มีความเข้มข้นของไฮเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ กันคือ 2.0, 2.4, 2.8 และ 3.2% แล้วแบ่ง Percoll ปริมาตร 7 ml ลงในหลอดโพลีคาร์บอเนต (polycarbonate tube) นำไปเหวี่ยงด้วยตัวหมุนแบบ fixed angle ที่ความเร็วต่าง ๆ กันคือ 8,800, 10,697, 13,000, 15,000, 16,500 และ 18,000xg ที่อุณหภูมิ 4 และ 8 °C เป็นเวลา 20 และ 30 นาที ตามลำดับ

2.2 การเตรียมตัวอย่างเลือด และการแยกเม็ดเลือดกึ่งกลาดำ

ดูด haemolymph จากแอ่งเลือดทางด้านท้อง บริเวณขาเดินคู่ที่ 3 ด้วยเข็มฉีดยาที่มีหัวเข็มขนาด 24 G ความยาว 12 mm ที่บรรจุสารกันเลือดแข็งตัว (K-199 ผสมกับ L-cysteine 50 mg/mL pH 7.6) (ภาพที่ 4) อัตราส่วนโดยปริมาตรสารกันเลือดแข็งตัว : haemolymph ประมาณ 3:1 แล้วค่อยๆ เติมลงส่วนบนของชั้นของ Percoll ที่เตรียมในแต่ละความเข้มข้นของไฮเดียมคลอไรด์ ความเร็ว และเวลาในการเตรียมต่าง ๆ กัน แล้วนำไปเหวี่ยงด้วยตัวหมุนแบบ swing out ที่ความเร็ว 1,700xg (3000 rpm) เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C สังเกตแถบชั้นของเซลล์ที่แยกได้ เก็บเซลล์เม็ดเลือดในแต่ละชั้นที่แยกได้ นำมาล้างด้วยอาหาร K-199 ที่มี 0.5% L-cysteine นำเซลล์เม็ดเลือดที่ได้ในแต่ละชั้น มาเลี้ยงบนสไลด์ และจำแนกชนิด โดยศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมในการแยกเซลล์ โดยที่สามารถแยกแถบชั้นของเซลล์แต่ละชนิดได้ชัดเจน และแต่ละแถบชั้นควรมีร้อยละของเซลล์ชนิดเดียวกันสูง



ภาพที่ 4 การเก็บตัวอย่าง haemolymph จากแ่งเลือดด้านท้องบริเวณขาเดินคู่ที่ 3
ของกุ้งกุลาดำ

3. การศึกษาชนิดของเม็ดเลือดกึ่งกลาดำ

3.1 การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เติมอาหาร K-199 ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS) ปริมาตร 1 ml ผสมกับเซลล์เม็ดเลือดที่แยกได้แต่ละชั้นตามวิธีการข้อ 2.2 แล้วเลี้ยงเซลล์บนสไลด์ (slide) ที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 45 นาที แล้วนำสไลด์ไปแช่ใน 0.125% กลูตาอัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ในอาหาร K-199 5 นาที ล้างเซลล์ด้วยอาหาร K-199 และย้อมสีด้วย Diff Quik นำมานับจำนวนของเม็ดเลือดแต่ละชนิด คำนวณเป็นร้อยละ

3.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

3.2.1 การศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy, SEM)

นำเซลล์เม็ดเลือดที่แยกได้แต่ละชั้นตามวิธีการ ข้อ 2.2 มาล้างด้วยอาหาร K-199 แล้วนำมาเลี้ยงใน 24-well microplate ที่มี cover glass วางอยู่ เพื่อเป็นที่เกาะของเซลล์เม็ดเลือดโดยเติม 10% FBS เพื่อให้เซลล์สามารถเกาะบนแผ่นแก้วและกระจายตัวได้ต่อไป ป่มเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 45 นาที นำมาดองในน้ำยา 0.125% กลูตาอัลดีไฮด์ ใน K-199 เป็นเวลา 10 นาที และเก็บในสารละลายคาโคไดเลตบัฟเฟอร์ (Cacodylate buffer, CAC buffer) pH 7.4 ในตู้เย็น 1 คืน ล้างด้วย CAC buffer (pH 7.4) 3 ครั้ง และนำมาผ่านการดองตัวอย่างขั้นที่สอง (post fixation) โดยแช่ใน 1% ออสเมียมเตตระออกไซด์ (1% OsO₄) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้องและล้างด้วย CAC buffer 3 ครั้ง ก่อนนำไปผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยใช้เอทิลแอลกอฮอล์ ทำตัวอย่างให้แห้งสนิทโดยนำไปเข้าเครื่อง critical point dryer (CPD) แล้วนำมาฉาบด้วยอนุภาคทอง และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

3.2.2 การศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy, TEM)

นำเซลล์เม็ดเลือดที่แยกได้แต่ละชั้นตามวิธีการ ข้อ 2.2 มาล้างด้วยอาหาร K-199 แล้วนำมาดองในน้ำยา 2.5% กลูตาอัลดีไฮด์ในสารละลาย pH 7.4 (Adam and Bonami, 1991) ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน ล้างด้วย CAC buffer 3 ครั้ง แล้วจึงนำมาผ่านการดองตัวอย่างขั้นที่สอง ใน 1% OsO₄ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อนำไปสู่ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างในการศึกษาด้วย TEM ด้วยวิธีการดังต่อไปนี้ หลังจากที่มีเม็ดเลือดผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ และผ่านโปรโพลีนออกไซด์ และฝังในเรซินสังเคราะห์ (Epon-812) ตัดให้มีความ

หนา 0.5-1 μm ด้วยไมโครโตม (microtome) และย้อมด้วยสีโทลูดีนบลู (toluidine blue) ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาเพื่อหาบริเวณที่ต้องการ และนำไปตัดอีกครั้งด้วยเครื่องอุลตราไมโครโตม (ultramicrotome) ให้มีความหนา 50-80 nm แล้วย้อมด้วยยูรานิล อะซิเตท (Uranyl acetate) และ เลด ซิเตรท (Lead citrate) นำมาตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ที่กำลังแรง 80 KV

4. การศึกษาการป้องกันตัวของกุ้งกุลาดำ (defense mechanism reactions)

4.1 ฟาโกไซโทซิส (ดัดแปลงจาก Kondo *et al.*, 1992)

นำเลือดกุ้งที่ได้แต่ละชั้นจากการแยกโดย Percoll continuous gradient ใส่ใน microtube เดิม K-199 ให้ได้ปริมาตรรวม 1.5 ml นำไปเหียงให้ตกตะกอนที่ 2,832.4xg ที่ อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เดิม K-199 0.5 ml แล้วผสมให้เข้ากัน แล้วดูดเลือด 50 μl ใส่ใน trypan blue นำไปนับจำนวนเซลล์ ด้วย hemacytometer ดูดเม็ดเลือดแต่ละชนิดใส่ 24 microwell ที่มี cell-disc อยู่ตัวอย่างละ 4 หลุม ให้มีปริมาณเม็ดเลือด 2×10^3 cell/ml เดิม glutaraldehyde-fixed sheep red blood cells (SRBC⁺) ให้ได้ 1×10^3 cell/ml โดยใช้ K-199 เป็นสารเจือจาง นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที แล้ว fix ในสารละลาย 0.125% กลูตาออลดีไฮด์ เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วย K-199 แล้วย้อมด้วยสีย้อม Diff-Quik แล้วนำไปตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดที่กิน SRBC⁺ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยแต่ละ slide จะนับจำนวน 200 เซลล์ นำผลที่ได้มาคำนวณร้อยละการกลืนกินจาก

$$\text{การกลืนกิน (ร้อยละ)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่จับกิน SRBC}^+ \times 100}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด (= 200)}}$$

นำร้อยละของการกลืนกินมาหาค่าเฉลี่ย วิเคราะห์ความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ

$p = 0.05$ ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์สถิติ Statistical Analysis (SAS) version 6.0 (SAS Institute, 1990)

4.2 ระบบ prophenoloxidase activating system การทดลองเพื่อดูความสามารถของ proPO ทำโดยวิเคราะห์ค่า phenoloxidase activity (ดัดแปลงจาก Soderhall *et al.*, 1988)

4.2.1 นำเลือดกุ้งที่ได้แต่ละชั้นจากการแยกโดย Percoll continuous gradient ใส่ใน microtube เดิม K-199 ให้ได้ปริมาตรรวม 1.5 ml นำเลือดกุ้งที่ได้ไปเหียงให้ตกตะกอน ความเร็ว

2,832xg ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นดูดส่วนเหลวทิ้ง เติม K-199 แล้วผสมให้เข้ากันเบา ๆ นำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ 2,832xg ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วเติม CAC buffer 1 ml นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C แล้วนำไปทำให้เซลล์เม็ดเลือดของกิ้งแตก โดยใช้โซนิเคเตอร์ (Sonicator) ที่ amplitude ระดับ 35 เป็นเวลา 5 วินาที นำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ 11,329xg ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสซึ่งเป็น haemocyte lysate (HLS) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

4.2.2 นำส่วนใส (HLS) ที่เตรียมได้ไปวัดค่า phenoloxidase activity โดยนำ HLS ที่เตรียมได้ปริมาตร 200 µl ผสมกับสารละลายทรอปซิน (trypsin) 200 µl แล้วเติมสารละลาย L - 3, 4, Dihydroxyphenyl alanine C₉H₁₁NO₄ (L - DOPA) 200 µl ทิ้งไว้ 2 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา แล้วจึงเติม CAC buffer 1,800 µl ทิ้งไว้ 2 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm โดยบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงทุก 2 นาที จนเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ โดยเปรียบเทียบกับสารละลายควบคุม (blank) ซึ่งใช้ CAC buffer แทน HLS

4.2.3 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ใน HLS เปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนมาตรฐานโดยวิธี Lowry *et al.* (1951) นำผลที่ได้มาคำนวณค่า phenoloxidase activity โดยมีหน่วยเป็น unit/min/mg protein จาก

$$1 \text{ หน่วยของฟีนอลออกซิเดส} = \Delta \text{OD}_{490} / \text{นาที} / \text{mg โปรตีน}$$

5. การศึกษาผลของซีรัมต่อกระบวนการฟาโกไซโทซิส

นำเซลล์กิ้งที่แยกได้แต่ละชั้นมาศึกษาฟาโกไซโทซิสเช่นเดียวกันกับวิธีการในข้อ 4.1 ให้จับกิน SRBC' ซึ่งได้บ่มรวมกับซีรัมของกิ้งกุลาดำ (serum-treated SRBC') ไว้แล้วเปรียบเทียบกับร้อยละของการกลืนกิน SRBC' ซึ่งไม่ได้เติมซีรัม วิเคราะห์ความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ

$p = 0.05$ ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์สถิติ Statistical Analysis (SAS) version 6.0 (SAS Institute, 1990)

บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกเม็ดเลือด

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำ โดยใช้สภาวะการเตรียมชั้นของ Percoll โดยเจือจางด้วยไซโตเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ กันคือ 2.0, 2.4, 2.8 และ 3.2% ที่อุณหภูมิ 4 และ 8°C เวลาในการเหวี่ยง 20 และ 30 นาที ที่อัตราความเร็วต่าง ๆ คือ 8,800, 10,697, 13,000, 15,000, 16,500 และ 18,000xg โดยใช้ fixed angle rotor แล้วนำ haemolymph ของกิ้ง มาแยกแถบชั้นเซลล์เม็ดเลือด โดยนำมาเหวี่ยงด้วย swing out rotor ที่ความเร็ว 1,700xg (3,000 rpm) เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ผลการทดลองพบว่า สภาวะการเตรียม gradient ของ Percoll ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของไซโตเดียมคลอไรด์ ให้ผลการแยกจำนวนแถบชั้นของเซลล์เม็ดเลือดแตกต่างกัน ในสภาวะที่เจือจาง Percoll ด้วย 2.0% ไซโตเดียมคลอไรด์ เหวี่ยงที่ความเร็ว 18,000xg อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที สามารถแยกแถบเซลล์เม็ดเลือดได้ชัดเจน 1 ชั้น (ตารางที่ 6) เช่นเดียวกันกับการใช้ไซโตเดียมคลอไรด์ 2.4% เหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว 15,000xg, 16,500xg และ 18,000xg เป็นเวลา 20 นาที เมื่อเพิ่มเวลาการเหวี่ยงเป็น 30 นาที พบว่าสามารถแยกแถบชั้นเป็น 1 หรือ 2 ชั้น แต่ไม่ชัดเจนในทุกความเร็วที่ใช้ (ตารางที่ 7)

ที่สภาวะการเตรียม 60% Percoll โดยเจือจางด้วยไซโตเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.8% เหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว 15,000 xg เป็นเวลา 20 นาที สามารถแยกแถบชั้นได้ 2 ชั้น แต่ไม่ชัดเจน เมื่อเพิ่มความเร็วเป็น 16,500xg และ 18,000xg สามารถแยกแถบชั้นที่ชัดเจนได้ 1 ชั้นเท่านั้น แม้ว่าจะเพิ่มเวลาการเหวี่ยงเป็น 30 นาที อย่างไรก็ตามสามารถแยกแถบเซลล์เม็ดเลือดได้ชัดเจน 2 ชั้น (ภาพที่ 5) เมื่อเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,697xg เป็นเวลา 30 นาที (ตารางที่ 8) ส่วนที่ความเข้มข้นของไซโตเดียมคลอไรด์ 3.2% ที่อุณหภูมิ 4°C ทุก ๆ ความเร็ว ยกเว้นที่ความเร็ว 8,800xg สามารถแยกแถบชั้นได้ 1 หรือ 2 แถบชั้น แต่เซลล์มีการแพร่กระจาย (ตารางที่ 9) นอกจากนี้ ยังพบว่าที่อุณหภูมิ 8°C ในทุกสภาวะไม่สามารถแยกแถบเซลล์เม็ดเลือดเป็นแถบชั้น (ตารางที่ 6-9)

ในขั้นตอนนี้ สามารถสรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมในการแยกเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำ

เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป คือ เตรียม 60% Percoll โดยเจือจางโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.8% เหยียงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 10,697xg ด้วย fixed angle rotor เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำ haemolymph ของกิ้ง มาแยกชั้นเซลล์เม็ดเลือด โดยนำมาเหยียงด้วย swing out rotor ที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 1,700xg เป็นเวลา 10 นาที

ตารางที่ 6 จำนวนแถบชั้นของเซลล์เม็ดเลือด ในสภาวะที่เจือจาง Percoll ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 2.0% เหยียงที่อุณหภูมิ 4 °C และ 8 °C ด้วยความเร็วต่าง ๆ เป็นเวลา 20 และ 30 นาที

	ความเร็ว(xg)					
	8,800	10,697	13,000	15,000	16,500	18,000
อุณหภูมิ 4 °C, 20 นาที	d	d	d	1(d)	1(d)	1(d)
อุณหภูมิ 4 °C, 30 นาที	d	d	d	1(d)	1(d)	1
อุณหภูมิ 8 °C, 20 นาที	d	d	d	d	d	d
อุณหภูมิ 8 °C, 30 นาที	d	d	d	d	d	d

d = diffuse

ตารางที่ 7 จำนวนแถบชั้นของเซลล์เม็ดเลือด ในสภาวะที่เจือจาง Percoll ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 2.4% เหยียงที่อุณหภูมิ 4 °C และ 8 °C ด้วยความเร็วต่าง ๆ เป็นเวลา 20 และ 30 นาที

	ความเร็ว(xg)					
	8,800	10,697	13,000	15,000	16,500	18,000
อุณหภูมิ 4 °C, 20 นาที	d	d	d	1(d)	1(d)	1
อุณหภูมิ 4 °C, 30 นาที	1(d)	d	2(d)	2(d)	1	1
อุณหภูมิ 8 °C, 20 นาที	d	d	d	d	d	d
อุณหภูมิ 8 °C, 30 นาที	d	d	d	d	d	d

d = diffuse

ตารางที่ 8 จำนวนแถบชั้นของเซลล์เม็ดเลือด ในสภาวะที่เจือจาง Percoll ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 2.8% เหยียงที่อุณหภูมิ 4 °C และ 8 °C ด้วยความเร็วต่าง ๆ เป็นเวลา 20 และ 30 นาที

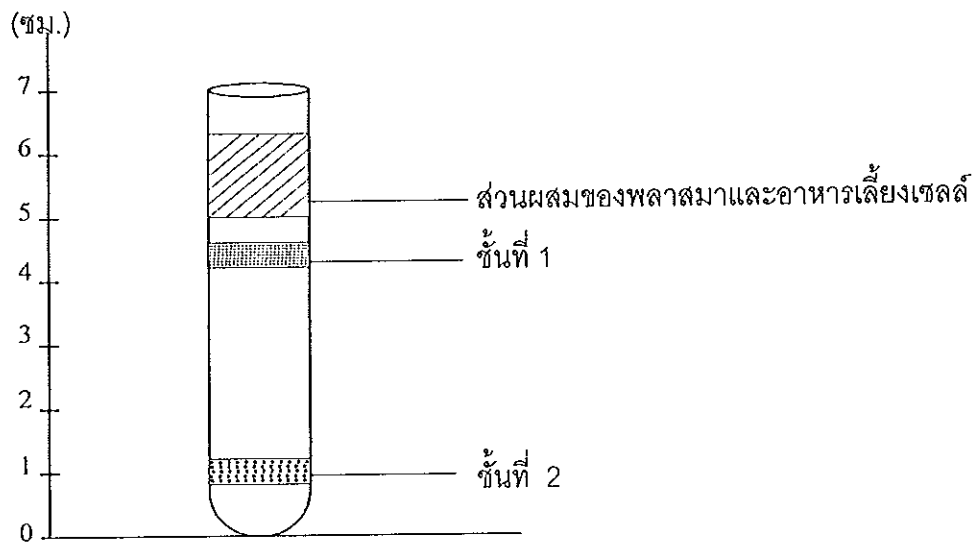
	ความเร็ว(xg)					
	8,800	10,697	13,000	15,000	16,500	18,000
อุณหภูมิ 4 °C, 20 นาที	d	d	d	2(d)	1	1
อุณหภูมิ 4 °C, 30 นาที	2(d)	2	2(d)	2(d)	1	1
อุณหภูมิ 8 °C, 20 นาที	d	d	d	d	d	d
อุณหภูมิ 8 °C, 30 นาที	d	d	d	d	d	d

d = diffuse

ตารางที่ 9 จำนวนแถบชั้นของเซลล์เม็ดเลือด ในสภาวะที่เจือจาง Percoll ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 3.2% เหยียงที่อุณหภูมิ 4 °C และ 8 °C ด้วยความเร็วต่าง ๆ เป็นเวลา 20 และ 30 นาที

	ความเร็ว(xg)					
	8,800	10,697	13,000	15,000	16,500	18,000
อุณหภูมิ 4 °C, 20 นาที	d	1(d)	1(d)	2(d)	1	1
อุณหภูมิ 4 °C, 30 นาที	d	2(d)	1(d)	2(d)	1	1
อุณหภูมิ 8 °C, 20 นาที	d	d	d	d	d	d
อุณหภูมิ 8 °C, 30 นาที	d	d	d	d	d	d

d = diffuse



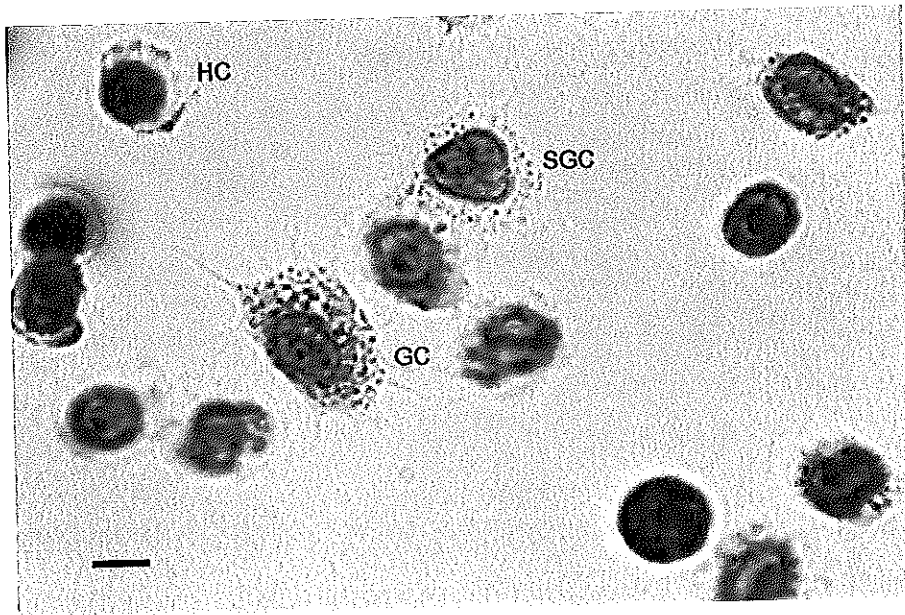
ภาพที่ 5 แถบชั้นของเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำที่ได้จากการแยก โดย Percoll continuous density gradient centrifugation

2. ผลการศึกษาชนิดของเม็ดเลือดกึ่งกลาดำภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

จากการศึกษา เมื่อทำการนับแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำที่แยกได้ในแต่ละแถบชั้น และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา โดยคำนวณเป็นร้อยละ พบว่า ในชั้นที่ 1 (แถบบน) เซลล์ส่วนใหญ่ประกอบด้วยเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดเล็ก ติดสีเข้ม ไม่พบแกรนูโล จำแนกเป็น ไฮยาลินเซลล์ (hyaline cell) 80.45% และเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่ แกรนูโลขนาดใหญ่ติดสีแดง จำนวนมากอยู่ในไซโตพลาสซึมจำแนกเป็นแกรนูลาร์เซลล์รวมทั้งเซลล์ที่มีขนาดของเซลล์ใหญ่กว่าไฮยาลินเซลล์ แต่เล็กกว่าแกรนูลาร์เซลล์ และมีแกรนูโลขนาดเล็กกว่าแกรนูลาร์เซลล์อยู่ในไซโตพลาสซึมเล็กน้อย (ภาพที่ 6) ซึ่งจำแนกเป็นเคมีแกรนูลาร์เซลล์ 19.55% ส่วนในแถบชั้นที่ 2 (แถบล่าง) จะประกอบด้วยแกรนูลาร์เซลล์รวมทั้งเคมีแกรนูลาร์เซลล์ 78.80% และไฮยาลินเซลล์ 21.20% (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ชนิดและจำนวนเซลล์เม็ดเลือด (%) ที่แยกได้ในแถบชั้น

แถบชั้นที่	จำนวนเซลล์ (%)	
	แกรนูลาร์และเคมีแกรนูลาร์เซลล์	ไฮยาลินเซลล์
1	19.55	80.45
2	78.80	21.20



ภาพที่ 6 ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำ HC: ไฮยาลินเซลล์,
GC: แกกรูลาร์เซลล์ SGC : เซมิแกกรูลาร์เซลล์ (Diff Quik)

3. ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

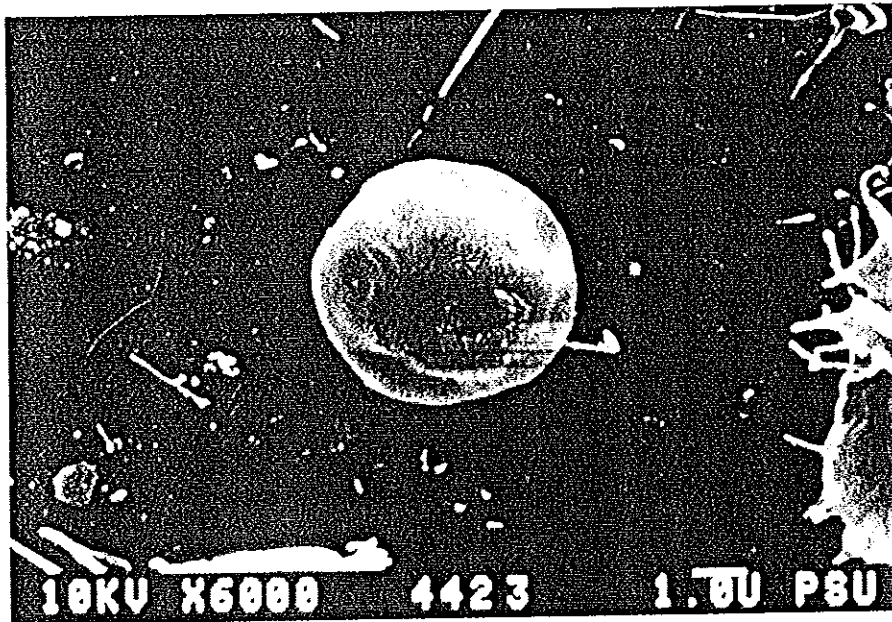
จากการศึกษาลักษณะเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าสามารถแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดได้ 3 ชนิด คือ ไฮยาลินเซลล์ เซมิแกรนูลาร์เซลล์ และแกรนูลาร์เซลล์ ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

3.1 การศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

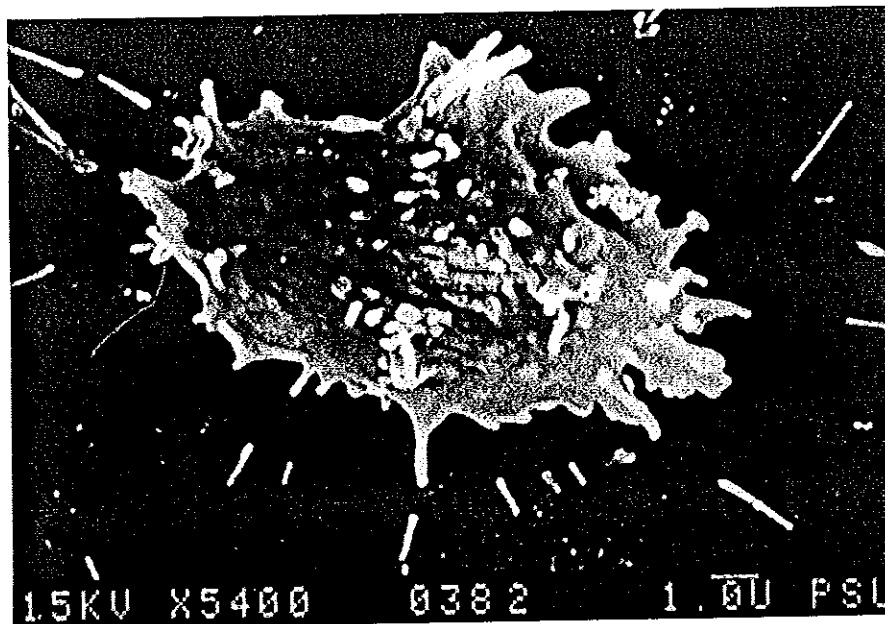
เซลล์เม็ดเลือดชนิดไฮยาลิน เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างกลมแบน หรือบางครั้งพบเป็นรูปกระสวย มีขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.8-5.2 μm ลักษณะผิวค่อนข้างเรียบ ไม่พบเท้าเทียมหรือชูโดโปเดีย (pseudopodia) (ภาพที่ 7)

เซมิแกรนูลาร์เซลล์ เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างรูปไข่ มีขนาดใหญ่กว่าไฮยาลินเซลล์ ขนาดของเซลล์กว้าง 4.2-6.5 μm และยาว 7.7-13.5 μm ที่ผิวเซลล์มีไมโครวิลไล (microvilli) เล็กน้อย พบเท้าเทียมมากทำให้สามารถยึดเกาะกับผิวแก้วได้ (ภาพที่ 8)

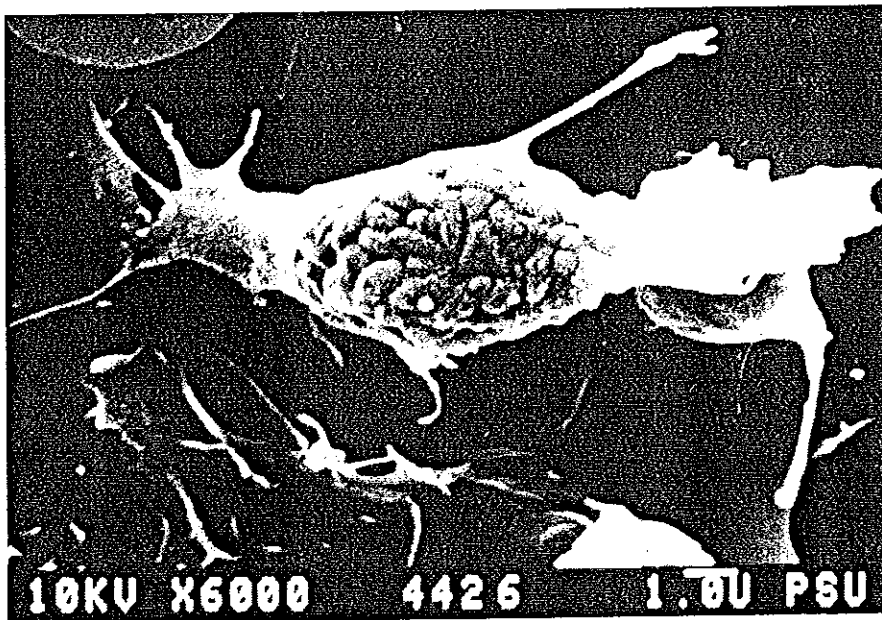
แกรนูลาร์เซลล์ เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด รูปร่างคล้ายเซมิแกรนูลาร์เซลล์ ขนาดของเซลล์กว้าง 3.8-4.3 μm และยาว 11.3-13.0 μm ที่ผิวของเซลล์มีไมโครวิลไลมาก พบเท้าเทียมที่ยื่นจากเซลล์ชัดเจน (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 7 เซลล์เม็ดเลือดชนิดไฮยาลิน จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)
(6,000x)



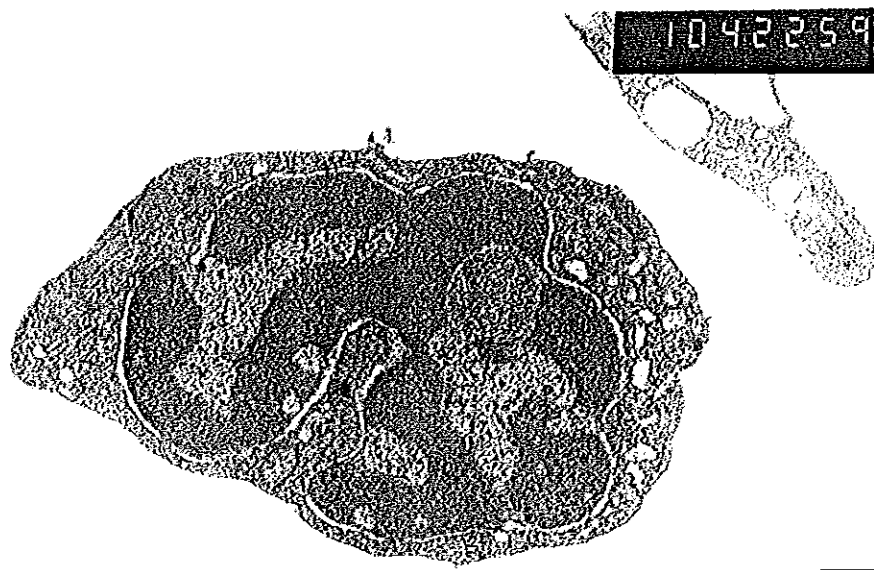
ภาพที่ 8 เซลล์เม็ดเลือดชนิดเฮมิแกรนูลาร์ จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
(SEM) (5,400x)



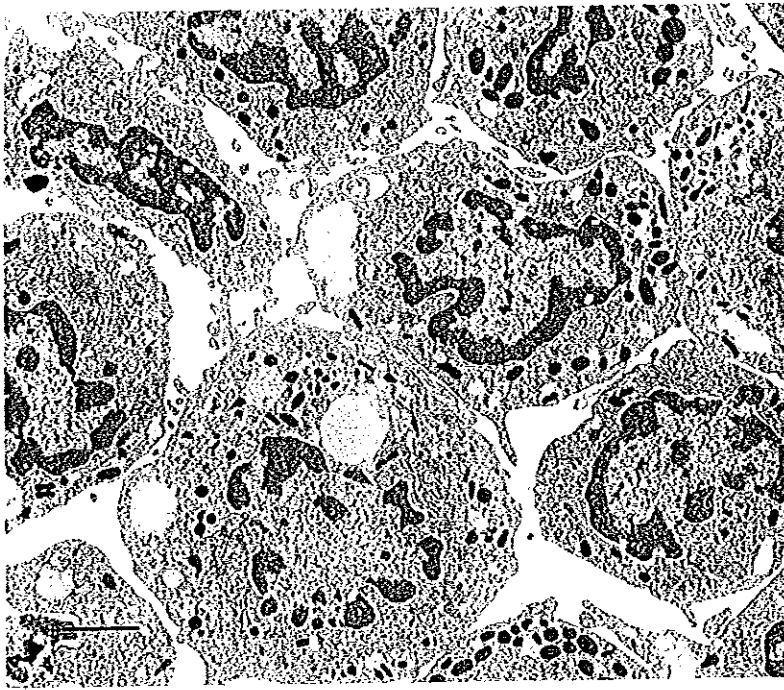
ภาพที่ 9 เซลล์เม็ดเลือดชนิดแกรนูลาร์ จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)
(6,000x)

3.2 การศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

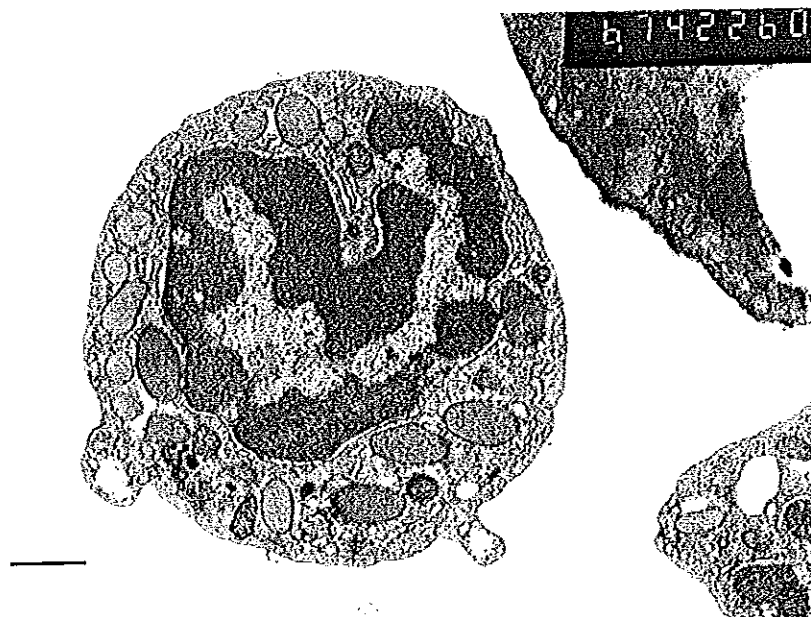
จากการศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์เม็ดเลือด โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่า ไฮยาลินเซลล์จะมีขนาดเล็กกว่าเซมิแกรนูลาร์เซลล์และแกรนูลาร์เซลล์ โดยมีความยาว $9.3 \mu\text{m}$ และกว้าง $5.3 \mu\text{m}$ นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ อัตราส่วนระหว่างไซโตพลาสซึมต่อนิวเคลียสน้อย พบไรโบโซมอิสระจำนวนมากภายในไซโตพลาสซึม แต่ตรวจพบเอนโดพลาสซึมิก เรติคูลัมทั้ง 2 ชนิด (smooth endoplasmic reticulum ; SER, rough endoplasmic reticulum ; RER) กอลจิบอดี (Golgi body) และไมโทคอนเดรีย (mitochondria) จำนวนน้อย ไม่พบแกรนูลหรือพบเพียง 1 แกรนูล (ภาพที่ 11) เซมิแกรนูลาร์เซลล์มีความกว้าง $4.0\text{-}6.0 \mu\text{m}$ และยาว $5.8\text{-}6.5 \mu\text{m}$ เซลล์มีเท้าเทียม ภายในไซโตพลาสซึมพบแกรนูลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง $0.3\text{-}1.0 \mu\text{m}$ กระจายอยู่ ตรวจพบไรโบโซมอิสระ, กอลจิบอดี, SER, RER และไมโทคอนเดรียจำนวนมากกว่าไฮยาลินเซลล์ (ภาพที่ 10) ส่วนแกรนูลาร์เซลล์มีรูปร่างกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง $10.8\text{-}11.3 \mu\text{m}$ นิวเคลียสมีขนาดเล็กกว่าไฮยาลินเซลล์และอัตราส่วนไซโตพลาสซึมต่อนิวเคลียสมาก ภายในไซโตพลาสซึมตรวจพบแกรนูลขนาดใหญ่จำนวนมาก ขนาดของแกรนูลมีเส้นผ่านศูนย์กลาง $0.7\text{-}1.2 \mu\text{m}$ พบไมโทคอนเดรียจำนวนมาก (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 10 เซลล์เม็ดเลือดชนิดไฮยาไลน์เซลล์ จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน
(TEM) (10,000) (bar = 1 μ m)



ภาพที่ 11 เซลล์เม็ดเลือดชนิดเฮมิแกรนูลาร์เซลล์ จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) (5,400 x) (bar = 1 μ m)



ภาพที่ 12 เซลล์เม็ดเลือดชนิดเฮมิแกรนูลาร์เซลล์ จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) (6,700 x) (bar = 1 μ m)

4. ผลการศึกษาการป้องกันตัวของกุ้งกุลาดำ

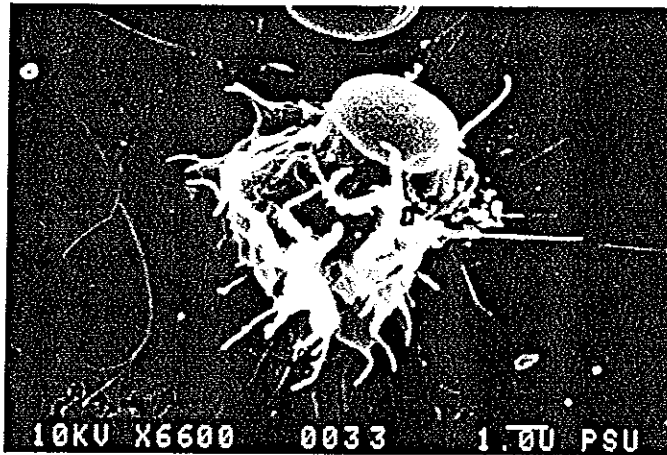
4.1 ฟาโกไซโทซิส

จากการศึกษาการเกิดฟาโกไซโทซิสของแถบชั้นเซลล์เม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์ และแถบชั้นแกรนูโลลาร์เซลล์รวมทั้งเซมิแกรนูโลลาร์เซลล์ พบว่า การเกิดฟาโกไซโทซิสของแถบชั้นแกรนูโลลาร์เซลล์และเซมิแกรนูโลลาร์เซลล์และแถบชั้นไฮยาลินเซลล์ มีค่า 16.56 และ 8.42 % ตามลำดับ (ตารางที่ 15) โดยแถบชั้นแกรนูโลลาร์เซลล์และเซมิแกรนูโลลาร์เซลล์มีค่า phagocytic activity มากกว่าไฮยาลินเซลล์ประมาณ 2 เท่า และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่า การจับกิน SRBC¹ ของเซลล์เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิด เกิดขึ้นโดยการยื่นเท้าเทียมโอบล้อมรอบ SRBC¹ (ภาพที่ 13)

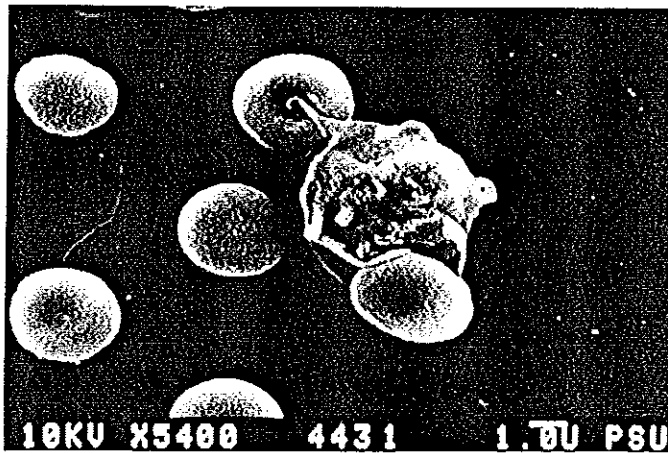
ตารางที่ 11 การเกิดฟาโกไซโทซิสเม็ดเลือดแดงแกะที่ดองด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (SRBC¹) ของเซลล์เม็ดเลือด

ชนิดเซลล์เม็ดเลือด	ฟาโกไซโทซิส (%)
ไฮยาลินเซลล์	8.42 ± 0.90 ^a
แกรนูโลลาร์เซลล์ และเซมิแกรนูโลลาร์เซลล์	16.56 ± 2.35 ^b

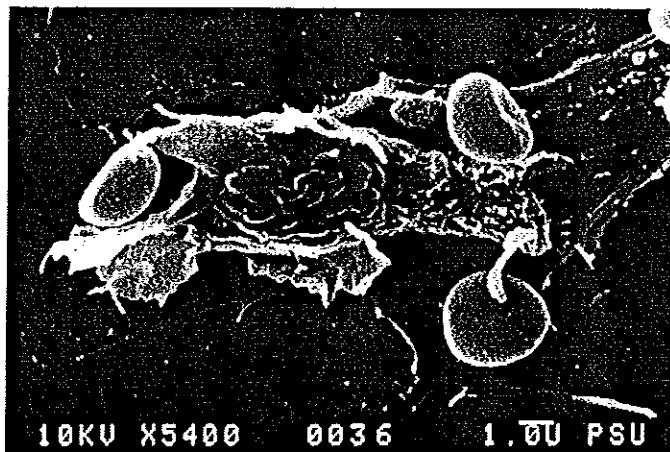
n = 5 ; ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



(a) ไฮยาลินเซลล์ (5,400 x)



(b) เซมิแกรนูลาร์เซลล์ (6,600 x)



(c) แกรนูลาร์เซลล์ (5,400 x)

ภาพที่ 13 การจับกิน SRBC¹ ของเซลล์เม็ดเลือดกึ่งภูลาดำ (a) ไฮยาลินเซลล์ (5,400 x)

(b) เซมิแกรนูลาร์เซลล์ (6,600 x) (c) แกรนูลาร์เซลล์ (5,400 x) จากกล้องจุลทรรศน์

4.2 Prophenoloxidase activating system

จากการศึกษา proPO activating system ของเม็ดเลือดกึ่งที่แยกได้ พบว่าแถบชั้นแกรนูโลลาร์เซลล์ และเซมิแกรนูโลลาร์มีค่า activity ของเอนไซม์ phenoloxidase เฉลี่ยเท่ากับ 140.09 unit ในขณะที่ไฮยาลินเซลล์ไม่พบ activity ของเอนไซม์ชนิดนี้ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ค่า PO activity เฉลี่ยของเซลล์เม็ดเลือด

ชนิดเซลล์เม็ดเลือด	ค่า PO activity (unit)
ไฮยาลินเซลล์	not detectable
แกรนูโลลาร์และเซมิแกรนูโลลาร์เซลล์	140.09

n = 5

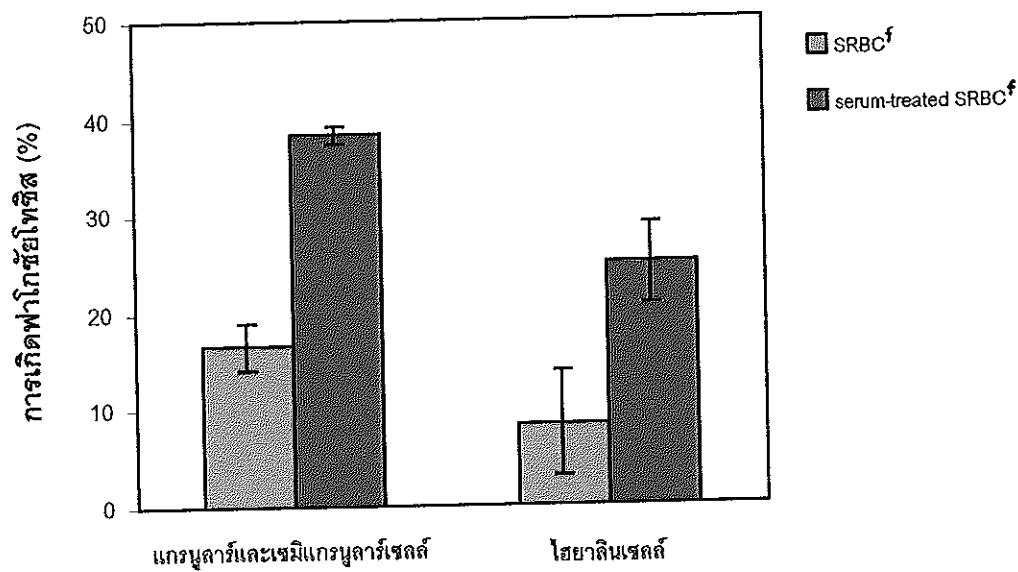
5. การศึกษาผลของซีรัมต่อการเกิดฟาโกไซโทซิส

จากการศึกษาผลของซีรัมต่อการเกิดฟาโกไซโทซิส พบว่า เซลล์เม็ดเลือดทั้งแถบชั้นแกรนูโลลาร์เซลล์และเซมิแกรนูโลลาร์เซลล์ และแถบชั้นไฮยาลินเซลล์ มีความสามารถในการจับกิน serum-treated SRBC¹ ได้ดีกว่า SRBC¹ และมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 13 และภาพที่ 14) ยิ่งไปกว่านั้นแถบชั้นแกรนูโลลาร์เซลล์และเซมิแกรนูโลลาร์เซลล์แสดงความสามารถในการจับกิน serum-treated SRBC¹ ได้ดีกว่าแถบชั้นไฮยาลินเซลล์และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 13) ส่วนการจับกิน serum-treated SRBC¹ เกิดขึ้นในลักษณะเดียวกับการจับกิน SRBC¹ ทั้งในแกรนูโลลาร์และเซมิแกรนูโลลาร์เซลล์ แต่มีจำนวน serum-treated SRBC¹ มากกว่า (ภาพที่ 15-17)

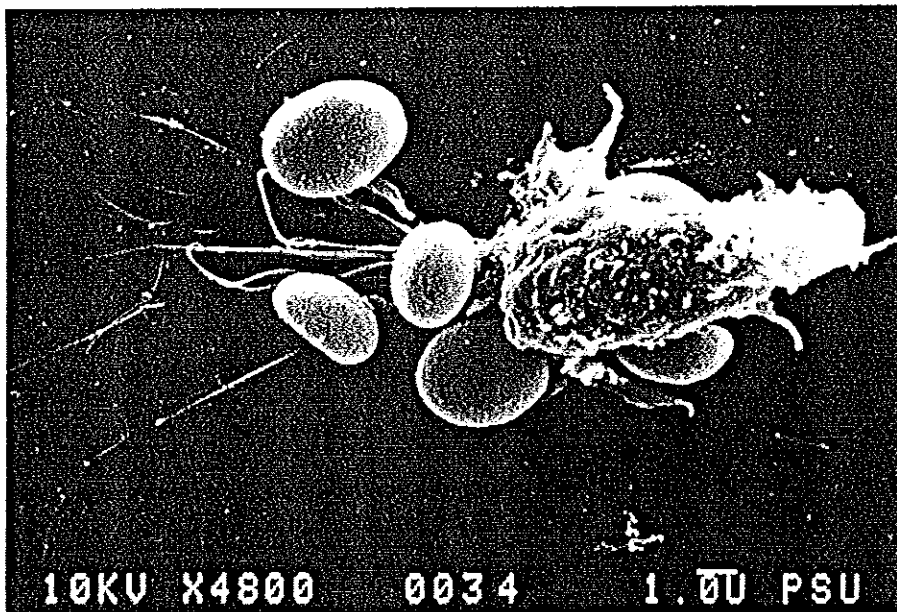
ตารางที่ 13 การเกิดฟาโกไซโทซิสเม็ดเลือดแดงแก่ที่ดองด้วยกฐตารัลดีไฮด์ (SRBC^f) และเม็ดเลือดแดงแก่ที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมกุ่มกุลาดำ (serum-treated SRBC^f)

ชุดการทดลอง	ฟาโกไซโทซิส (%)	
	แกรนูโลลาร์และเซมิแกรนูโลลาร์เซลล์	โซยาลินเซลล์
SRBC ^f	16.56 ± 2.5 ^a	8.42 ± 0.90 ^b
serum-treated SRBC ^f	38.30 ± 5.39 ^c	24.90 ± 4.20 ^d

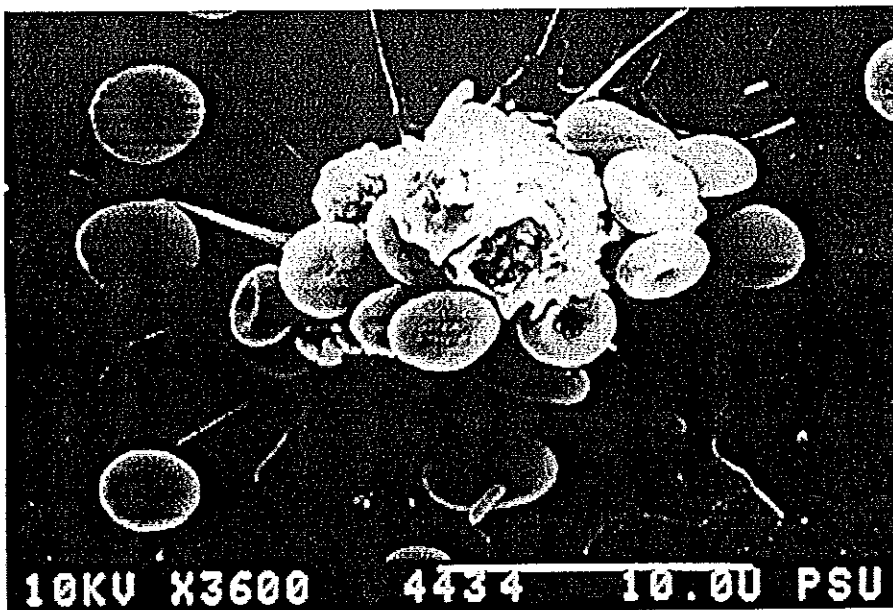
ตัวเลขที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 14 การเกิดฟาโกไซโทซิสเม็ดเลือดแดงแก่ที่ดองด้วยกฐตารัลดีไฮด์ (SRBC^f) และเม็ดเลือดแดงแก่ที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมกุ่มกุลาดำ (serum-treated SRBC^f)

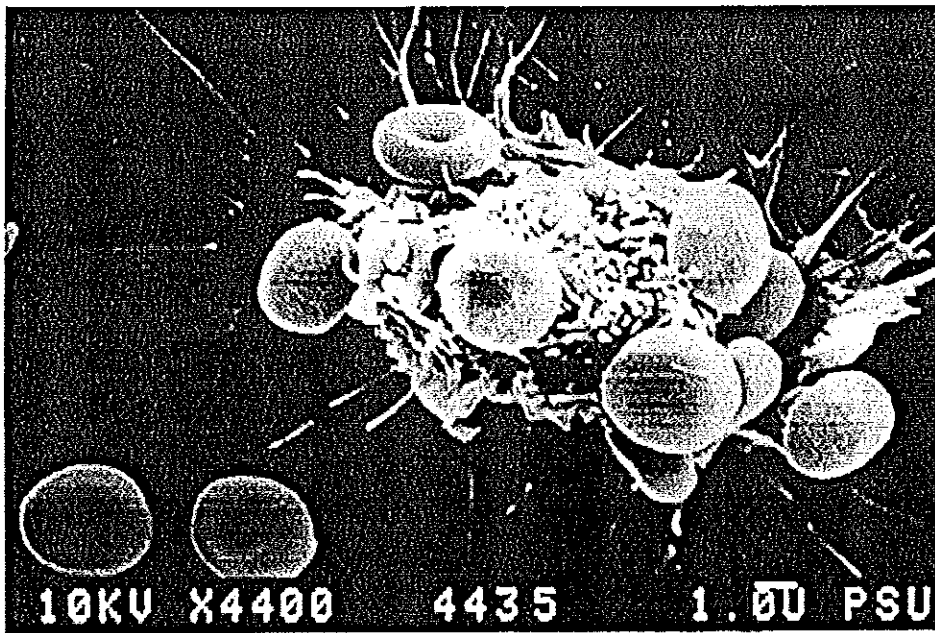


(a)

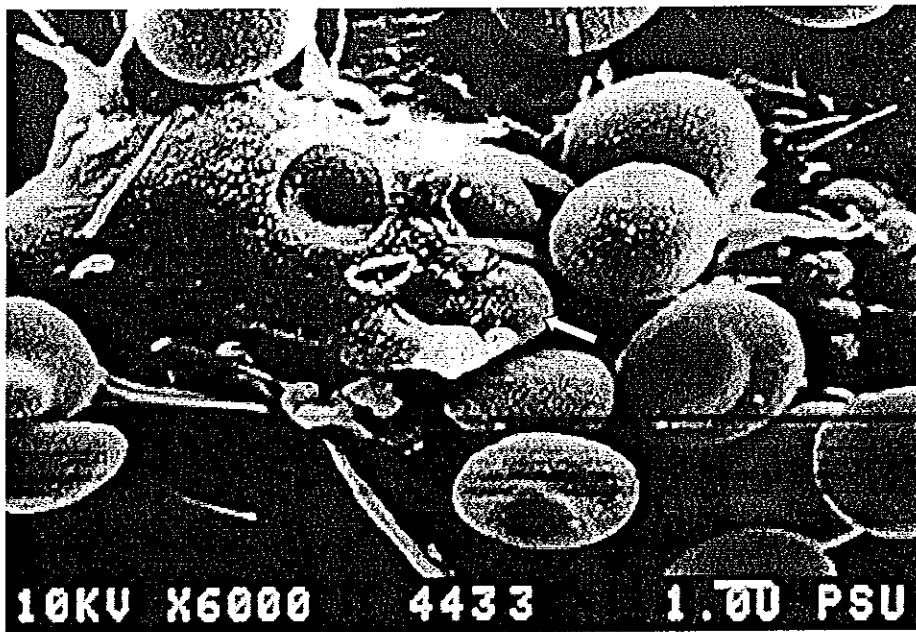


(b)

ภาพที่ 15 การจับกินเม็ดเลือดแดงแกะที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมกุ่มกุลาดำ (serum-treated SRBC) ของแกรนูลาร์เซลล์ (a) (4,800X), (b) (3,600X) จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)



ภาพที่ 16 การจับกินเม็ดเลือดแดงแกะที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมกุ่มกุลาดำ (serum-treated SRBC')
ของเคมีแกรนูลาร์เซลล์ จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)
(4,400X)



ภาพที่ 17 การจับกินเม็ดเลือดแดงแกะที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมกุ่มกุลาดำ (serum-treated SRBC')
(ลูกศร) แสดงการเกิด engulfment ของเซลล์เม็ดเลือดกุ่มกุลาดำ จากกล้องจุลทรรศน์
อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)(6,000X)

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการวิจัย

ผลการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำ พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ให้ผลการแยกดีที่สุดมีค่า 2.8% และสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียม gradient ของ Percoll ที่ให้ผลการแยกเซลล์เม็ดเลือดเป็นแถบชั้น ที่มีประชากรส่วนใหญ่เป็นเซลล์ชนิดเดียวกันและมีลักษณะสมบูรณ์ คือ การเตรียม gradient ของ Percoll โดยนำมาเหวี่ยงด้วยความเร็วที่ 10,697xg ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที ด้วย fixed angle rotor แล้วนำมาเหวี่ยงแยกแถบของเซลล์ โดยใช้ swing out rotor ที่ความเร็ว 1,700xg (3,000 rpm) ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของกิจการและคณะ (2543) ได้รายงานการแยกเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำโดยใช้ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 2.5% และการเตรียม gradient ของ Percoll โดยตกตะกอน Percoll ที่ความเร็ว 8,497xg เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ fixed angle และแยกแถบของเซลล์โดยใช้ swing out ที่ความเร็ว 85xg เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4°C ทั้งนี้อาจเนื่องจากความแตกต่างของความเค็มของน้ำที่ใช้เลี้ยงกึ่งทดลอง ทั้งนี้กิจการและคณะ (2543) ทำการเลี้ยงกึ่งทดลองที่ระดับความเค็ม 20 ppt ในขณะที่ในการศึกษาคั้งนี้เลี้ยงกึ่งทดลองที่ความเค็มของน้ำ 25-28 ppt จึงอาจมีผลให้ค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ใช้แตกต่างกัน

การศึกษากการแยกชนิดเลือดในสัตว์กลุ่มครึ่งเตเรียนอื่น ๆ ได้แสดงให้เห็นความแตกต่างของสภาวะที่ใช้ในการเตรียม gradient และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ เช่น การศึกษาของ Soderhall และ Smith (1983) ในการแยกเซลล์เม็ดเลือดของ *Carcinus maenas* โดยใช้โซเดียมคลอไรด์ 3.2 % ทำการเหวี่ยงตกตะกอนใน angle-head rotor ที่ความเร็ว 25,000xg เป็นเวลา 20 นาที อุณหภูมิ 7°C เพื่อให้แบ่งชั้นและทำการเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์เม็ดเลือดที่ความเร็ว 2,900xg เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 7°C การศึกษาของ Kondo และคณะ(1992) ในการแยกเซลล์เม็ดเลือดในกึ่ง kuruma โดยใช้ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 3.2% เหวี่ยงตกตะกอนด้วย angle-head rotor ความเร็ว 20,000xg เป็นเวลา 20 นาที และเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์เม็ดเลือดที่ความเร็ว 1,660xg เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4°C จะเห็นว่ากึ่ง kuruma และ *Carcinus maenas* อาศัยอยู่ในน้ำทะเลที่มีความเค็มตั้งแต่ 30 ppt เป็นต้นไป จึงอาจมีผลให้ค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ใช้แตกต่างกันตามความเค็มของน้ำที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับ Ferraris และคณะ

(1987) รายงานว่าค่าออสโมลาริตี (Osmolarity) และปริมาณคลอไรด์ในเลือดกึ่งฤดูลาดำจะผันแปรตามความเค็มน้ำในระบบการเลี้ยง

ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแยกแถบเซลล์เม็ดเลือด พบว่ามีค่าเท่ากับ 4°C สอดคล้องกับรายงานการทดลองอื่นๆ เช่น ในกึ่งฤดูลาดำ (Kondo et al, 1992), กึ่งฤดูลาดำ (กิจการและคณะ, 2543) แต่แตกต่างกับการศึกษาของ Soderhall และ Smith (1983) ที่ใช้อุณหภูมิ 7°C ในการแยกประชากรของเม็ดเลือดของ *Carcinus maenas* และเดคาปอดอื่นๆ อีก 3 ชนิด ในการทดลองครั้งนี้ได้ทดลองที่อุณหภูมิ 8°C เช่นเดียวกันแต่พบว่าในทุกสภาวะของการทดลอง แถบเซลล์เม็ดเลือดจะมีการแพร่กระจายเป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อใช้อุณหภูมิสูงขึ้นเม็ดเลือดจะเกาะอยู่ที่ผนังหลอดมากขึ้น

ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถแยกแถบชั้นของเซลล์เม็ดเลือดได้ชัดเจน 2 แถบชั้น โดยชั้นที่ 1 (แถบบน) เซลล์ส่วนใหญ่ประกอบด้วยไฮยาลินเซลล์ 80.45% และ ชั้นที่ 2 (แถบล่าง) ประกอบด้วยแกรนูลาร์เซลล์และเฮมิแกรนูลาร์เซลล์ 78.8% เช่นเดียวกันกับกิจการและคณะ (2543) ซึ่งแยกแถบเซลล์เม็ดเลือดเป็น 2 แถบ โดยเป็นไฮยาลินเซลล์ 86.20% ในแถบบนและเม็ดเลือดชนิดแกรนูลาร์ 69.40% ในแถบล่าง การที่สัดส่วนของเม็ดเลือดที่แยกได้แตกต่างกัน อาจเนื่องจากกึ่งฤดูลาดำอยู่ในระยะการลอกคราบที่แตกต่างกัน ทำให้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของชนิดเซลล์เม็ดเลือด โดยในระยะก่อนการลอกคราบ อวัยวะที่สร้างเม็ดเลือดจะมีการสะสมเซลล์ชนิดไฮยาลินมากขึ้น จากนั้นจึงส่งเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือด โดยเซลล์เม็ดเลือดที่มีอายุมากที่ไหลเวียนอยู่ในระบบหมุนเวียนเลือด จะถูกจับรวมกันอยู่ที่บริเวณผนังของเนื้อเยื่อ และฟาโกไซท์จะเข้ามาในระบบหมุนเวียนเลือดเพื่อกำจัดเซลล์เม็ดเลือดที่ตาย ทำให้จำนวนเม็ดเลือดระหว่างการลอกคราบมีการเปลี่ยนแปลงทั้งในแง่ของจำนวนและชนิดของเม็ดเลือด (Maynard, 1953 อ้างโดย Waterman, 1960) เมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนแถบชั้นและชนิดของเซลล์ที่แยกได้ในกึ่งฤดูลาดำกับการศึกษาของ Kondo และคณะ (1992) ซึ่งทดลองในกึ่งฤดูลาดำ และการศึกษาของ Soderhall และ Smith (1983) จะพบว่าสภาวะที่ใช้ในการแยกเซลล์เม็ดเลือดต่างกัน ซึ่งกิจการและคณะ (2543) รายงานว่าสภาวะที่ใช้ในการแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดที่ให้ผลดีโดยวิธี continuous gradient centrifugation จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเกลือ อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในขั้นตอนการเตรียม gradient นอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องอื่นๆ ทั้งภายนอกและภายในตัวกึ่งฤดูลาดำ ทั้งนี้เนื่องจากระบบสรีรวิทยาของกึ่งฤดูลาดำ มีปัจจัยทางด้านคุณภาพน้ำ (Hall and Van-Ham, 1998) อุณหภูมิ (Vargas-Albores et al., 1998 ;

Schmitt and Santos, 1999) และวงจรการลอกคราบ ซึ่งเป็นปัจจัยภายในตัวกุ้งเข้ามามีบทบาทต่อการเปลี่ยนแปลงต่างๆของร่างกาย(Le-Moullac *et al.*, 1997)

จากการศึกษาลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าไฮยาลินเซลล์เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็ก ย้อมติดสีเข้ม เซมิแกรนูลาร์เซลล์มีขนาดใหญ่กว่าไซโตพลาสซึมไฮยาลินเซลล์แต่เล็กกว่าแกรนูลาร์ ภายในไซโตพลาสซึมมีแกรนูลขนาดเล็ก และแกรนูลาร์เซลล์มีขนาดใหญ่ มีแกรนูลขนาดใหญ่จำนวนมาก ในการแยกเซลล์เม็ดเลือดของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนส่วนใหญ่ จะจำแนกโดยพิจารณาจากจำนวนของแกรนูลในเซลล์แต่ละชนิด (Bauchau and Mengeot, 1978) ซึ่งจำแนกเป็นไฮยาลินเซลล์ เซมิแกรนูลาร์เซลล์และแกรนูลาร์เซลล์ (Bauchau, 1981)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การจำแนกเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้หลักเกณฑ์ดังกล่าว ประสบปัญหาซึ่งยากแก่การตัดสินใจว่า เป็นเซลล์ชนิดใดระหว่างเซมิแกรนูลาร์เซลล์ และแกรนูลาร์เซลล์ ซึ่งในกระบวนการแยกแถบชั้นเซลล์เม็ดเลือดจะพบการขับแกรนูลออกมา (degranulation) ในเซลล์เม็ดเลือดที่มีแกรนูล เนื่องจากเซลล์มีความเปราะบาง ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเสนอหลักเกณฑ์การจำแนกชนิดเซลล์ โดยพิจารณาจากลักษณะขนาดและโครงสร้างของเซลล์ ตลอดจนขนาดและจำนวนแกรนูลตามวิธีการจำแนกของ Martin และ Graves(1985) ซึ่งศึกษาในกุ้ง *Sicyonia ingestis* และ *Penaeus californiensis* และจำแนกเซลล์เม็ดเลือดชนิดแกรนูลาร์เป็นลาร์จแกรนูลฮีโมไซท์และสมอลล์แกรนูลฮีโมไซท์

ผลจากการศึกษาลักษณะเซลล์เม็ดเลือดกุ้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนทั้งแบบส่องกราด (SEM) และแบบส่องผ่าน (TEM) สนับสนุนการจำแนกชนิดเซลล์เม็ดเลือดตามรายงานการศึกษาของ Martin และ Graves (1985) กล่าวคือ ขนาดของไฮยาลินเซลล์จะเล็กกว่าเซลล์เม็ดเลือดอีก 2 ชนิด นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ พบแกรนูลเพียง 1-2 แกรนูลเท่านั้น และพบไมโทคอนเดรียจำนวนน้อย เซมิแกรนูลาร์เซลล์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0-9.3 μm ภายในไซโทพลาสซึมพบแกรนูลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4-1 μm แกรนูลาร์เซลล์จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10.8-11.3 μm และมีแกรนูลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7-1.2 μm จำนวนมาก ซึ่งการจำแนกชนิดของเซลล์เม็ดเลือด โดยพิจารณาทั้งขนาดและจำนวนจะสามารถใช้จำแนกได้ทั้งการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และเพื่อเป็นการบอกลักษณะที่ชัดเจนของเซลล์ตามลักษณะที่ปรากฏ โดยพิจารณาจากขนาดของแกรนูล จึงน่าจะจำแนกเป็นไฮยาลินเซลล์ สมอลล์แกรนูลฮีโมไซท์ และลาร์จแกรนูลฮีโมไซท์

ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าการเกิดฟาโกไซโทซิสซึ่งเป็นหนึ่งในกลไกการป้องกันตัวของกุ้งกุลาดำเกิดขึ้นทั้งเม็ดเลือดชนิดที่มีแกรนูล ซึ่งประกอบด้วยแกรนูลาร์เซลล์และเฮมิแกรนูลาร์เซลล์ และเม็ดเลือดที่ไม่มีแกรนูล (ไฮยาลินเซลล์) โดยไฮยาลินเซลล์มีค่า phagocytic activity น้อยกว่าสอดคล้องกับการศึกษาในกุ้ง kuruma ของ Kondo และคณะ (1992) รายงานการเกิดฟาโกไซโทซิสในเม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิด โดยพบค่า phagocytic activity จากน้อยไปหามาก ในเม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์ เฮมิแกรนูลาร์เซลล์และแกรนูลาร์เซลล์ ได้มีการศึกษาการเกิดฟาโกไซโทซิสของเซลล์เม็ดเลือดของกลุ่มครัสเตเชียน โดย Smith และ Soderhall (1983) รายงานพบ phagocytic activity ในไฮยาลินเซลล์ และเฮมิแกรนูลาร์เซลล์ของ crayfishes ; *Astacus astacus* และ *Pacifastacus leniusculus* ในปี 1989 Hose และ Martin รายงานกลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมแบบฟาโกไซโทซิสในกุ้งทะเล *Sicyonia ingentis* เป็นหน้าที่ของเม็ดเลือดชนิดแกรนูลาร์โดยเฉพาะเฮมิแกรนูลาร์ และไม่พบกลไกดังกล่าวในเม็ดเลือดชนิดที่ไม่มีแกรนูล ในขณะที่ Soderdall และคณะ (1986) พบ phagocytic activity เฉพาะในไฮยาลินเซลล์ของปู *Carcinus maenus* เท่านั้น

ค่า phagocytic activity ของชั้นเม็ดเลือดชนิดแกรนูลาร์และเฮมิแกรนูลาร์มีค่า 16.56% ในขณะที่ไฮยาลินเซลล์มีค่าเท่ากับ 8.42% ทั้งนี้ Kondo และคณะ (1992) รายงานค่า phagocytic activity ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง kuruma ชนิดไฮยาลินเซลล์, เฮมิแกรนูลาร์ และแกรนูลาร์เซลล์มีค่าเท่ากับ 3.5, 6.5 และ 9.3% ตามลำดับ ซึ่งให้ผลทำนองเดียวกับ Paterson และคณะ (1976) รายงานว่า ถ้าไม่แยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดออกจากกัน กุ้งจะมีอัตราการเกิดฟาโกไซโทซิส 1-28% การที่ค่า Phagocytic activity แตกต่างกันอย่างนี้อาจเนื่องจากความแตกต่างของอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มชนิดของสัตว์และความจำเพาะของอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ (Hose and Martin, 1989)

จากการศึกษาสามารถตรวจพบกระบวนการฟาโกไซโทซิสเพียง 2 ขั้นตอน คือ adherence และลักษณะของ pseudopod ที่ยื่นออกไปโอบล้อม SRBC¹ ในขั้นตอนการเกิด ingestion ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการศึกษากายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน จึงไม่สามารถเห็นในขั้นตอนอื่น ๆ ได้ อย่างไรก็ตาม Hose และ Martin (1989) รายงานการเกิดฟาโกไซโทซิสในกุ้ง *Sicyonia ingentis* โดยเริ่มต้นจากแกรนูลาร์เซลล์ที่มีแกรนูลขนาดเล็ก ภายในไซโตพลาสซึมจะมี vesicle ขนาดเล็กจำนวนมาก ซึ่งประกอบด้วย acid phosphatase, esterase

และ β -glucuronidase (Hose et al, 1987 อ้างโดย Hose and Martin, 1989) ภายใน 1 ชั่วโมงจะพบการขับแกรนูลออกจากเซลล์ ส่วน vesicles และอาจจะรวมทั้งแกรนูลจะเชื่อมต่อกับฟาโกโซม แต่

ไม่พบการเชื่อมต่อของแกรนูโลอินลาร์จแกรนูลีสีโมไซท์ เชื่อว่าการหลั่งของ proPO จากแกรนูโลจะเป็นการเริ่มต้นกระบวนการภูมิคุ้มกันแบบไม่เฉพาะเจาะจงและกระตุ้นการเกิดฟาโกไซโทซิส (Soderhall *et al.*, 1986) และพบการเกิด respiratory burst ในเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกุลาดำ (Song and Hsieh, 1994) ดังนั้นขั้นตอนการเกิดฟาโกไซโทซิสในกึ่งกุลาดำ จึงน่าจะมีขั้นตอนเช่นเดียวกันกับสัตว์ในกลุ่ม vertebrate

จากการศึกษาฟาโกไซโทซิสกับ serum-treated SRBC¹ เซลล์เม็ดเลือดมีค่า phagocytic activity เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญสอดคล้องกับการทดลองในกึ่ง american lobster (*Homerus americanus*) และกึ่ง kuruma (Goldenberg *et al.* 1984; Kondo *et al.*, 1992) เลกตินในซีรัมกึ่ง kuruma มีผลทำให้เกิดฟาโกไซโทซิสเพิ่มมากขึ้น ค่า phagocytic activity ที่เพิ่มขึ้นนี้น่าจะเป็นผลมาจากสารออกซิโพนินในซีรัมกึ่งกุลาดำ (Kondo *et al.*, 1992) ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาผลของเลกตินบริสุทธิ์จากซีรัม อย่างไรก็ตาม Ratanapo และ Chulavatnatol (1990) สามารถแยกโมโนตินซึ่งเป็นเลกตินบริสุทธิ์จากซีรัมกึ่งกุลาดำ ดังนั้นค่า phagocytic activity ที่เพิ่มขึ้นน่าจะเป็นผลจากการ opsonize SRBC¹ ด้วยโมโนตินซึ่งเป็นเลกตินในซีรัมกึ่งกุลาดำ

การศึกษา proPO activating system ของเม็ดเลือดกึ่งกุลาดำพบ PO activity เฉพาะในแถบชั้นเม็ดเลือดชนิดแกรนูลาร์และเฮมิแกรนูลาร์เซลล์เท่านั้น ตรวจไม่พบ activity ของเอนไซม์นี้ในไฮยาไลน์เซลล์ สอดคล้องกับการทดลองใน *Carcinus maenas* (Soderhall and Smith, 1983) ที่รายงานพบ PO activity เฉพาะในแกรนูลาร์เซลล์ เช่นเดียวกันกับ Sung และคณะ (1996) และนอกจากนี้ยังพบว่า proPO ของกึ่งกุลาดำ, กึ่งก้ามกราม และกึ่งขาวส่วนใหญ่จะอยู่ในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดในกลุ่มแกรนูลาร์ (Parazzolo and Barracco, 1997) ซึ่งลาร์จแกรนูลีสีโมไซท์จะมี proPO มากกว่าสมอลล์แกรนูลีสีโมไซท์ (Hose and Martin, 1989)

ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถแยกประชากรของไฮยาไลน์เซลล์เฉลี่ยได้ประมาณ 80% อีก 20% เป็นเม็ดเลือดชนิดแกรนูลาร์และเฮมิแกรนูลาร์เซลล์ปะปนอยู่ การที่ตรวจไม่พบ PO activity อาจเนื่องมาจากว่าเอนไซม์มีค่า activity ต่ำจึงไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าว

บทที่ 5

สรุปผล

1. สภาวะที่เหมาะสมในการแยกเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำโดยวิธี Percoll continuous density gradient centrifugation พบว่าการที่เตรียม gradient ของ Percoll โดยเจือจางด้วยสารละลาย โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.8% นำมาเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,697xg เป็นเวลา 30 นาที ด้วย fixed angle rotor ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วนำมาเหวี่ยงแยกแถบของเซลล์เม็ดเลือดโดยใช้ swing out rotor ที่ความเร็ว 1,700xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C สามารถแยกเซลล์เม็ดเลือดได้ 2 แถบ โดยเซลล์เม็ดเลือดส่วนใหญ่เป็นเซลล์ชนิดเดียวกันและ เซลล์มีลักษณะสมบูรณ์

2. จากการศึกษาเมื่อทำการแยกเซลล์ชนิดของเซลล์เม็ดเลือดที่แยกได้ในแต่ละแถบ และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าแถบบนประกอบด้วยเซลล์เม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์จำนวน 80.45% แกรนูลาร์และเคมีแกรนูลาร์เซลล์ 19.55% แถบล่างประกอบด้วยแกรนูลาร์และเคมีแกรนูลาร์เซลล์ 78.80% และไฮยาลินเซลล์ 21.2%

3. ลักษณะที่ตรวจพบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เซลล์เม็ดเลือดชนิดแกรนูลาร์มีขนาดใหญ่ ภายในไซโตพลาสซึมมีแกรนูลขนาดใหญ่ติดสีแดงจำนวนมาก เคมีแกรนูลาร์เซลล์มีขนาดเล็กกว่าแกรนูลาร์เซลล์ ภายในไซโตพลาสซึมมีแกรนูลขนาดเล็กจำนวนมาก และไฮยาลินเซลล์ซึ่งมีขนาดเล็กที่สุด ไม่พบแกรนูลภายในไซโตพลาสซึม

4. จากการศึกษาลักษณะเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าเซลล์เม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเป็นเซลล์ที่มีรูปร่างกลมแบน หรือบางครั้งพบรูปกระสวย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.8-5.2 μm ลักษณะผิวค่อนข้างเรียบ ไม่พบเท้าเทียมหรือชูดิโอดีย ตรวจไม่พบแกรนูลหรือมี 1 แกรนูล เคมีแกรนูลาร์เซลล์มีรูปร่างรูปไข่ มีขนาดความกว้าง 4.2-6.5 μm และยาว 7.7-13.5 μm ผิวเซลล์มีไมโครวิลไลเล็กน้อย พบเท้าเทียมมากมีแกรนูลเล็กน้อย แกรนูลาร์เซลล์ เป็นเซลล์รูปไข่มีขนาดความกว้าง 3.8-4.3 μm ยาว 11.3-13.0 μm ผิวเซลล์มีไมโครวิลไลและเท้าเทียมมาก แกรนูลมีขนาดใหญ่ และมีเป็นจำนวนมากอยู่ภายในไซโตพลาสซึม

5. จากการศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่า ไฮยาลินเซลล์มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ ภายในไซโตพลาสซึมมีไรโบโซมอิสระจำนวนมาก, SER, กอลจิบอดีและไมโทคอนเดรียจำนวนน้อย พบ 1 แกรนูลหรือไม่พบ เซมิแกรนูลาร์เซลล์ นิวเคลียสมีขนาดเล็กกว่าไฮยาลินเซลล์ ภายในไซโตพลาสซึมมีแกรนูลขนาดเล็กผ่านศูนย์กลาง 0.3-1.0 μm พบไรโบโซมอิสระ, กอลจิบอดี, SER, RER และไมโทคอนเดรีย แกรนูลาร์เซลล์ นิวเคลียสมีขนาดเล็กกว่าไฮยาลินเซลล์ มีแกรนูลขนาดเล็กผ่านศูนย์กลาง 0.7-1.2 μm จำนวนมากและพบไมโทคอนเดรียจำนวนมาก

6. การศึกษาการป้องกันตัวของกึ่งกลาดำ

6.1 จากการศึกษาการเกิดฟาโกไซโทซิสของเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำ พบว่าแถบชั้นแกรนูลาร์และเซมิแกรนูลาร์ มีค่า phagocytic activity มากกว่าไฮยาลินเซลล์ประมาณ 2 เท่า และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

6.2 จากการศึกษา proPO activating system ของเซลล์เม็ดเลือด พบว่า แกรนูลาร์และเซมิแกรนูลาร์เซลล์มีค่า PO activity เฉลี่ยเท่ากับ 140.09 unit และตรวจไม่พบ activity ในไฮยาลินเซลล์

6.3 จากการศึกษาผลของซีรัมต่อการเกิดฟาโกไซโทซิสพบว่า การเกิดฟาโกไซโทซิสกับ serum-treated SRBC¹ ที่มีค่าเพิ่มขึ้นทั้งในแถบชั้นแกรนูลาร์และเซมิแกรนูลาร์เซลล์และแถบชั้นไฮยาลินเซลล์

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษา ค่าความตึงจำเพาะที่ใช้ในการแยกแถบเซลล์เม็ดเลือดเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการแยกด้วยวิธี discontinuous
2. ควรมีการศึกษาการเกิดฟาโกไซโทซิสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ซึ่งจะช่วยให้ทราบถึงขั้นตอนต่างๆในกระบวนการเกิดฟาโกไซโทซิสในกึ่ง
3. ควรมีการศึกษาปัจจัยที่อาจจะมีผลต่อการเกิดฟาโกไซโทซิส ได้แก่ ขนาดของสิ่งแปลกปลอม อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม และอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของซีรัมกับ SRBC¹ เป็นต้น
4. ควรมีการศึกษาผลของโมโนคิน (เลกตินบรียูซุทรี) ต่อการเกิดฟาโกไซโทซิส

เอกสารอ้างอิง

- กรมประมง. 2543. สถิติการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลปี 2541. กรุงเทพฯ : กองเศรษฐกิจการประมง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- กิจการ สุภมาตย์ และสิทธิ บุญยรัตผลิน. 2538. การศึกษาภูมิคุ้มกันโรคและแนวทางการใช้ วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัสในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*). รายงานการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. หน้า 1-17.
- กิจการ สุภมาตย์, อุษณีย์ เอกปนิธานพงศ์, Toshiaki Itami และ จิราพร เกษรจันทร์ 2543. ระบบ ภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ : I. เทคนิคในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบ เลือดในกุ้งกุลาดำ. ว.สงขลานครินทร์ วทท. 22 (ฉบับพิเศษ) : 567-580.
- สาวิตรี ศิลเกษ. 2541. "การผลิตวัคซีนจากเชื้อ *Vibrio harveyi* และการประยุกต์ใช้ในกุ้ง กุลาดำ (*Penaeus monodon Fabricius*)" วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุทธิพันธ์ สารสมบัติ, วิบูลย์ศรี พิมลพันธุ์, นวากร บานชื่น, ทศนีย์ สุโกศล, ธราภูล, ศัสนีย์ เสนาะวงษ์ และสิริฤกษ์ ทรงศิริไธ. 2537. อิมมูโนวิทยา. ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : เค.พี.พรีนติ้ง.
- อนุตรา อัครจามร. 2534. "การศึกษาทางเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำ" วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์การประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Adams, J.R. and Bonami, J.R. 1991. Atlas of Invertebrate Viruses. London : CRC press.
- Anderson, A.J. and Archibald, A.R. 1975. Poly (glucosylglycerol phosphate) teichoic acid in the walls of *Bacillus stearothermophilus* B65. Biochem. J. 151 : 115-120.
- Bauchau, A. G. 1981. Crustacean. In Invertebrate Blood Cells. (eds. Ratchiffe, N. A. and Fowley, A. F.) Vol. 2, pp. 385-421, New York/London : Academic Press.
- Bauchau, A. G. and Mengeot, J. C. 1978. Structure et fonction des hemocytes chez les crustaces. Arch. Zool. Exp. Gen. 119 : 227 - 248.
- Boonyaratpalin, S., Boonyaratpalin, M., Supamattaya, K. and Toride, Y. 1995. Effect of peptidoglycan (PG) on growth, survival, immune response, and tolerance to stress in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. In : Disease in Asian Aquaculture II. (eds. M. Shariff, J.R. Arthur, and R.P. Subasinghe), pp 469-477. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.

- Bullock, T.H. and Horridge, G.A. 1965. Structure and function in the nervous system of invertebrates. Vol I and II. San Francisco : W.H. Freeman.
- Eble, A.F. and Blewett, C. 1979. Cytology of hemocytes of the freshwater prawn. In Proc. 2nd Biennial Crustacean Health Workshop. pp. 38-54. Texas : A&M Uni.
- Ferraris, R.P., Parado-Esteva, F.D., Jesus, E.G. and Ladja, J.M. 1987. Osmotic and chloride regulation in the hemolymph of the tiger prawn *Penaeus monodon* during molting in various salinity. Mar.Biol. 95(3) : 377-385
- Goldenberg, P.Z., Huebner, E. and Greenberg, A.H. 1984. Activation of lobster hemocytes for Phagocytosis. J. Invertebr. 43 : 77-88.
- Hall, M.R. and Van-Ham, E.H. 1998. The effects of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. J. World. Aquacult. Soc. 29 (3) : 290-299
- Hose, J. E. and Matin, G.G. 1989. Defense reactions in the ridgeback prawn *Sicyonia ingensis*. J. Invertebr. Pathol. 53 : 335-346.
- Hunt, S.V. 1987. Preparation of lymphocytes and accessory cells. In Lymphocytes a practical approach, pp. 1-34. Klaus, G. G. B, eds. Oxford : IRL Press.
- Itami, T., Takahashi, Y. and Nakamura, Y. 1989. Efficacy of vaccination against vibriosis in cultured kuruma prawns *Penaeus japonicus*. J. Aquat. Anim. Health. 1 : 238-242.
- Itami, T. and Takahashi, Y. 1991. Survival of larval giant tiger prawn *Penaeus monodon* after addition of killed vibrio cells to a microencapsulated diet. J. Aquat. Anim. Health. 3 : 151-152.
- Itami, T., Yan, Y. and Takahashi, Y. 1992a. Study vaccination against vibriosis in cultured kuruma prawn *Penaeus japonicus* I : effect of vaccine concentration and duration of vaccination efficacy. J. Shimonoseki University of fisheries 40(2) : 83-87.
- Itami, T.; Yan, Y. and Takahashi, Y. 1992b. Study vaccination against vibriosis in cultured kuruma prawn *Penaeus japonicus* II : effect of different vaccine

- preparations and oral vaccination efficacy. J. Shimonoseki University of fisheries. 40(3) : 238-242.
- Johansson, M. W. and Soderhall, K. 1989. Cellular immunity in crustacean and the pro-Po system. Parasit. Today. 5 : 171-176.
- Johnson, P.T. 1980. Histology of the blue crab, *Callinectes sapidus*. New York : Praeger Publishers Division CBS, Inc.
- Jomori, T., Kubo, T., and Natori, S. 1990. Purification and characterization of lipopolysaccharide binding protein from haemolymph of American cockroach *Periplaneta americana*. Eur. J. Biochem. 190 : 201-206.
- Knaap, W. V.D. 1993. Defence in invertebrate in biotol (biotechnology) by open learning. Oxford : Butterworth - Heinemann LTD. Linnaese House, Jordan Hill.
- Kondo M., Matsuyama, H. and Yano, T. 1992. The opsonic effect of lectin on phagocytosis by hemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. J. Gyogyo Kenkyu. 27 : 217-222.
- Le-Moullac, G., Le-Groumellec, M., Ansguer, D., Froissard, S. and Levy, P. 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle : Protection against vibriosis. Fish. Shellfish Immunol. 7(4) : 227-234.
- Lis, H. and Sharon, N. 1986. Biological properties of lectins. In The lectins : properties, functions and applications in biology and medicine. pp. 265-291. Liener, I.E. Sharon, N. and Goldstein, I.J., ed. New York : Academic Press.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275.
- Martin, G. G. and Graves, J.L. 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. J. Morphol. 185(3) : 339-348.
- Martin, G. G., Poole, D., Poole, C., Huse, J.E., Arias, M., Reynolds, L., Mckrell, N. and Whang, A. 1993. Clearance of bacteria injected into the haemolymph of the penaeid shrimp, *Sicyonia ingensis*. J. Invertebr. Pathol. 62 : 308-315.

- Mckay, D. and Jenkin, C.R. 1970. Immunity in the invertebrate. The role of serum factors in phagocytosis of erythrocytes of the freshwater crayfish (*Parachaeraps bicarsinatus*). Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 48 : 139-150.
- Mix, M. C. and Sparks, A. K. 1980. Hemocyte classification and differential counts in the Dungeness crab, *Canan magister*. J. Invertebr. Pathol. 35 : 134-43.
- Parrazzo, L.M. and Barracco, M.A. 1997. The prophenoloxidase activating system of the shrimp of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. Dev. Comp. Immunol. Vol.21(5) : 385-395
- Paterson, W.D. and Stewart, J.E. 1974. *In vitro* phagocytosis by hemocytes of the American lobster (*Homarus americanus*). J. Fish. Res. Board Can. 31 : 1051-1056.
- Paterson, W.D., Stewart, J.E. and Zwicker, B.M. 1976. Phagocytosis as a cellular immune response mechanism in the American lobster, *Homarus americanus*. J. Invertebr. Pathol. 27 : 95-104.
- Ratanapo, S. and Chulavatnatol, M. 1990. Monodon, a new sialic acid-specific lectin from black tiger prawn (*Penaeus monodon*). Comp. Biochem. Physiol. 97B: 515-520.
- SAS Institute. 1990. SAS/STAT User's guide, Volume 2, GLM-VARCOMP. 4th ed. USA: Cary NC.
- Schmitt, A.S.C. and Santos, E.A. 1999. Haemolymph nitrogenous constituents and nitrogen efflux rates of juvenile shrimp, *Penaeus paulensis* (Perez-Farfante), exposed to ambient ammonia-N. Aquacult. Res. 30(1) : 1-11
- Smith, V.J. and Ratcliffe, N.A. 1978. Host defense reactions of the shore crab *Carcinus maenas* (L), *in vitro*. Uk.Biol. Assoc. 58 : 367-379.
- Smith, V.J. and Ratcliffe, N.A. 1980. Cellular defense reactions the shore crab. *Carcinus maenas*. J. Invertebr. Pathol. 35 : 65-74.
- Smith, V.J. and Soderhall, K. 1983. β 1, 3-glucan activation of crustacean hemocytes *in vitro* and *in vivo*. Biol. Bull. 164 : 299-314.

- Soderhall, K. 1982. Prophenoloxidase activating system and melanization-a recognition mechanism of arthropod. A review. *Dev. Comp. Immunol.* 6 : 601-611.
- Soderhall, K., and Cerenius, L. 1992. Crustacean immunity. *Annu. Rev. of Fish Dis.* 2 : 3-23.
- Soderhall, K., and Cerenius, L. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opi. Immunol.* 10 : 23-28.
- Soderhall, K., Rogener, W., Newton, R. P. and Ratcliffe, N. A. 1988. The properties and purification of a *Blaberus craniifer* plasma protein which enhances the activation of haemocyte prophenoloxidase by a β -1, 3-glucan. *Insect Biochem.* 18 : 322-330.
- Soderhall, K. and Smith, V. J. 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Dev. Comp. Immunol.* 7 : 227-239.
- Soderhall, K., Smith, V.J. and Johansson, M.W. 1986. Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans : evidence for cellular cooperation in the defence reactions of arthropods. *Cell Tissue Res.* 245 : 43-49.
- Soderhall, K., Wingren, A. Johansson, M.W. and Bertheussen, K. 1985. The cytotoxic reaction of hemocytes from the freshwater crayfish, *Astacus astacus*. *Cell Immunol.* 94 : 326-332.
- Song, Y.L. and Hsieht, Y.T. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances : analysis of reactive oxygen species. *Dev. Comp. Immunol.* 18 : 201-209.
- Srivatana, A.K. and Narain, A.S. 1985. Hemocytes of a freshwater shrimp. *Folia Morphologica.* 33(3) : 276-279.
- Sung, H.H., Kou, G.H. and Song, Y.L. 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) . *Fish Patho.* 29(1) : 11-17.
- Sung, H.H., Yang, Y.L. and Song, Y.L. 1996. Enhancement of microbicidal activity in the black tiger prawn *Penaeus monodon* via immunostimulation. *J. Crust. Biol.* 16(2) : 278-284.

- Takahashi, H., Komano, H., and Natori, S. 1986. Experiment of the lectin gene in *Sarcophaga peregrina* during normal development and under conditions where the defence mechanism inactivated. *J. Insect Physiol.* 32 : 771-779.
- Thornqvist, P.O. and Soderhall, K. 1997. Crustacean immune reaction, a short review. In T.W. Flegel and I.H. MacRae (eds.), *Diseases in Asian Aquaculture III. Fish Health Section*, Asian Fisheries Society. Manila.
- Toney, M.E. Jr.. 1958. Morphology of the blood cells of some crustacea. *Growth.* 22 : 35-50.
- Tsing, A., Jean, M.A. and Brehelin, M. 1989. Hemocyte of penaeid and palamonid shrimp : morphology, cytochemistry and hemogram. *J. Inver. Pathol.* 53: 64-77.
- Tyson, C.J. and Jenkin, C.R. 1973. The importance of opsonic factors in the removal of bacteria from the circulation of the crayfish (*Parachanna bicarinatus*). *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 51 : 609-615.
- Vargas – Albores, F., Guzmán-Murillo, M.A., Ochoa, J.L. 1992. Size-dependent haemagglutinating activity in the haemolymph from sub-adult blue shrimp (*Penaeus stylirostris* Stimpson). *Comp. Biochem. Physiol.* 103A : 487-491.
- Vargas – Albores, F., Hernández – López, J., Gollas – Galván, T., Montañaño – Pérez, K., Jiménez – Vega, F. and Yepiz – Plascencia, G. 1998. Activation of shrimp cellular defence functions by microbial products. In *Advances in shrimp biotechnology* (eds. T.W. Flegel), pp.161-166. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. Bangkok.
- Waterman, T.H. 1960. *The physiology of crustacean*. New York : Academic Press.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. สูตรอาหาร

1. K-199 100 ml (ดัดแปลงจาก Kondo *et al.*, 1992) ประกอบด้วย

M-199	50	ml
Hepes	0.238	g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.33	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3	g
NaCl	1.1	g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.09	g
L-glutamine	1	ml

เติมน้ำ deionized จนครบ 100 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.6 กรองด้วยกระดาษกรอง

ขนาด 0.22 μm เก็บไว้ในตู้เย็น

ภาคผนวก ข. การเตรียมสารเคมีและสื่อ

1. การศึกษาเม็ดเลือดกึ่งกลาดำ

การเตรียมสารกันเลือดแข็งตัว (5% L-cysteine)

ชั่ง L-cysteine 5 g ละลายในอาหาร K-199 100 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.6 ด้วย 6 N NaOH กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 μm

การเตรียม Vital staining (trypan blue solution 0.15%)

เตรียมใน solution 2.6 % โดยละลาย sodium chloride 2.6 g ในน้ำกลั่น 100 ml แล้วจึงเติม trypan blue 0.15 g ใช้แท่งแม่เหล็ก กวนให้ละลายประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วนำไปหมวนเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 6,703.9xg เป็นเวลา 10 นาที กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 μm ใส่มicrotube หลอดละ 450 ml เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

2. การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

การเตรียม 0.4 M Cacodylate

ชั่ง sodium cacodylate 8.74 g ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 10 ml ปรับ pH 7.4

การเตรียม Fixation

ผสมสารละลายต่อไปนี้

25% glutaraldehyde	2	ส่วน
0.4 M Cacodylate	5	ส่วน
10% NaCl	3.6	ส่วน
น้ำกลั่น	9.4	ส่วน

การเตรียม Washing buffer

ผสมสารละลายต่อไปนี้

0.4 M Cacodylate	5	ส่วน
10% NaCl	10	ส่วน
น้ำกลั่น	9.4	ส่วน

การเตรียมสารละลาย Post fix

4% OsO ₄	1	ส่วน
0.4 M Cacodylate	1	ส่วน
10% NaCl	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

3. การศึกษาฟาโกซัยโทซิส

การเตรียม AIsver's solution

ชั่ง dextrose จำนวน 20.50 g, sodium citrate dihydrate จำนวน 8 g, citric acid monohydrate) จำนวน 0.55 g และ NaCl จำนวน 4.2 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ml ผสมให้เข้ากัน นำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 10 นาที เก็บที่ อุณหภูมิ 4 °C

การเตรียม Phosphate Buffer Saline (PBS pH 7.2-7.4)

ชั่ง NaCl จำนวน 6.8 g, Na₂HPO₄ จำนวน 1.48 g และ KH₂PO₄ จำนวน 0.43 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 ml ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วย 5N HCl ให้เป็น pH 7.2-7.4 เติมน้ำกลั่นให้ได้ ปริมาตร 1L นำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เก็บที่ อุณหภูมิ 4 °C

การเตรียม 1 M glycine-buffer (pH 7.2)

ซึ่ง glycine จำนวน 7.51 g, NaCl จำนวน 8.50 g และ Na_2N_3 จำนวน 1.0 g ละลายใน น้ำกลั่นปริมาตร 800 ml ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วย 5N HCl ให้เป็น pH 7.2 เติมน้ำกลั่นให้ได้ ปริมาตร 1 L

การเตรียมซีรัมกึ่งกลาดำ

ดูด haemolymph จากแอ่งเลือดทางด้านท้อง ที่งูที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ให้เลือดแข็งตัว นำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 xg เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วนำไปกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 μm เก็บซีรัมที่อุณหภูมิ -20 °C

การเตรียม Tris-Buffer saline solution (TBS) pH 7.6

ซึ่ง Tris จำนวน 6.03 g, NaCl จำนวน 29.22 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 ml ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วย 5N HCl ให้เป็น pH 7.6 เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 L จะได้ความเข้มข้นของสารละลายเป็น 50 mM Tris และ 500 mM NaCl pH 7.6 เก็บที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียม fixed sheep red blood cells (SRBC')

นำเม็ดเลือดแดงแกะ ซึ่งเก็บในสารกันเลือดแข็งตัว Alsever's solution อุณหภูมิ 4 °C มาล้างด้วย phosphate-buffered saline (PBS) 3 ครั้ง ปรับเม็ดเลือดแกะให้ได้ 2% ใน PBS เติม 2.5% กลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ซึ่งเจือจางด้วย PBS ปริมาตร 50 ml ลงในเซลล์เม็ดเลือดแกะปริมาตร 500 ml ปมไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง เติม 1 M glycine-buffer (pH 7.2) 25 ml ตั้งไว้ 1 คืน แล้วนำมาเหวี่ยงให้ตกตะกอน นำเม็ดเลือดแดงแกะที่ได้มาล้างด้วย Tris-buffered saline (TBS) pH 7.6 จำนวน 5 ครั้ง เก็บเม็ดเลือดแดงแกะ (SRBC') ความเข้มข้น 10% ใน TBS ที่อุณหภูมิ 5 °C

การเตรียม serum-treated SRBC¹

นำ SRBC¹ ที่เก็บใน TBS มาล้างด้วยอาหาร K-199 เติมน้ำซีรัมกึ่ง 1 ml ลงใน SRBC¹ จำนวน 5×10^8 เซลล์ ปั่นไว้ที่อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ส่วนใสทิ้ง แล้วนำเซลล์มาล้างด้วยอาหาร K-199 3 ครั้ง ปรับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดให้ได้ 1×10^7 เซลล์/ml ในอาหาร K-199

4. การศึกษา Prophenoloxidase activity

การเตรียม cacodylate buffer (CAC) buffer

ละลาย sodium – cacodylate 1.07 g ในน้ำ deionized ที่ปราศจากเชื้อ 500 ml เติมน้ำ calcium chloride 0.37 g ผสมให้ละลาย แล้วจึงเติม magnesium chloride 5.08 g ปรับ pH ให้ได้ 7.0 เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

การเตรียม trypsin

ละลาย trypsin 0.001 g ใน CAC buffer 1 ml

การเตรียม L-3, 4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)

ละลาย L-DOPA 0.003 g ใน CAC buffer 1 ml

5. การหาปริมาณโปรตีนโดยประยุกต์วิธีของ Lowry และคณะ (1951)

การเตรียมสารละลายแอลคาไลน์

สารละลายแอลคาไลน์ เตรียมจากการผสมสารละลาย A, สารละลาย B และสารละลาย C ในอัตราส่วน 50 : 1 : 1

สารละลาย A : ชั่ง Na_2CO_3 หนัก 1 g, NaOH 2 g ละลายในน้ำกลั่น 80 ml ละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 ml

สารละลาย B : ชั่งโซเดียมทาร์เตรท (sodium tartrate) จำนวน 0.1 g ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 10 ml จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1 %

สารละลาย C : ชั่ง $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ จำนวน 0.05 g ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 10 ml จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

การเตรียม 0.1 เท่า Folin – ciocalteu's reagent

ทำโดยการเจือจาง Folin – ciocalteu's reagent ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10

ภาคผนวก ค. ตารางผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ ค1 ชนิดและจำนวนเซลล์เม็ดเลือดในชั้นที่ 1

ตัวที่	แกรนูโลลาร์และเซมิ-แกรนูโลลาร์เซลล์	ไฮยาลินเซลล์
1	84	316
2	100	300
3	58	342
4	85	315
5	64	336
x =	78.2	321.8

ตารางภาคผนวกที่ ค2 ชนิดและจำนวนเซลล์เม็ดเลือดในชั้นที่ 2

ตัวที่	แกรนูโลลาร์และเซมิ-แกรนูโลลาร์เซลล์	ไฮยาลินเซลล์
1	325	75
2	332	68
3	299	101
4	304	96
5	316	84
x =	315.2	84.8

ตารางภาคผนวกที่ ค3 เปอร์เซ็นต์ฟาโกซัยโทซิส เม็ดเลือดแดงเกาะที่ดองด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (SRBC) ของแถบเม็ดเลือดชนิดแกรนูลาร์เซลล์และเฮมิแกรนูลาร์เซลล์

ตัวที่	จำนวนฟาโกซัยโทสเซลล์ (จำนวนเซลล์ที่จับกับ SRBC)	ฟาโกซัยโทซิส (%)
1	33	16.5
2	29	14.5
3	32	16.0
4	41	20.5
5	31	15.5

$$\bar{x} \pm SE = 16.56 \pm 2.349$$

ตารางภาคผนวกที่ ค4 เปอร์เซ็นต์ฟาโกซัยโทซิส เม็ดเลือดแดงเกาะที่ดองด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (SRBC) ของแถบเม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์

ตัวที่	จำนวนฟาโกซัยโทสเซลล์ (จำนวนเซลล์ที่จับกับ SRBC)	ฟาโกซัยโทซิส (%)
1	17	8.5
2	20	10.0
3	16	8.0
4	15	7.5
5	16	8.0

$$\bar{x} \pm SE = 8.42 \pm 0.901$$

ตารางภาคผนวกที่ ค5 เปอร์เซ็นต์ฟาโกซัยโทซิส เม็ดเลือดแดงแกะ (SRBC') ที่ทำปฏิกิริยากับ
ซีรัมของแถบเม็ดเลือดชนิดแกรนูลาร์เซลล์และเซมิแกรนูลาร์เซลล์

ตัวที่	จำนวนฟาโกซัยโทสเซลล์ (จำนวนเซลล์ที่จับกับ SRBC')	ฟาโกซัยโทซิส (%)
1	60	30.0
2	87	43.5
3	83	41.5
4	72	36.0
5	81	40.5

$$\bar{x} \pm SE = 38.302 \pm 5.392$$

ตารางภาคผนวกที่ ค6 เปอร์เซ็นต์ฟาโกซัยโทซิส เม็ดเลือดแดงแกะ (SRBC') ที่ทำปฏิกิริยากับ
ซีรัมของแถบเม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์

ตัวที่	จำนวนฟาโกซัยโทสเซลล์ (จำนวนเซลล์ที่จับกับ SRBC')	ฟาโกซัยโทซิส (%)
1	41	20.5
2	47	23.5
3	44	22.0
4	61	30.5
5	56	28.0

$$\bar{x} \pm SE = 24.90 \pm 4.204$$

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางอุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์

วัน เดือน ปีเกิด 20 มกราคม 2504

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2526

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

นักวิชาการประมง 7 ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลฝั่งอ่าวไทย ต.พะวง อ.เมือง
จ.สงขลา