วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเม็ดเลือดกุ้งเพื่อเตรียมเป็นเนื้อเยื่อชั้นต้นของกุ้งกุลาดำด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สังเคราะห์ L-15 ที่เตรียมเข้มข้น 2 เท่าของสูตรอาหารปกติผสมรวมกับ กลูโคส 1% เกลือแกง 0.5% และ FBS 20% และยาปฏิชีวนะพบว่าเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกลาดำไม่มีการเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเซลล์สังเคราะห์ดังกล่าว เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sequeira และคณะ (1996) ที่พบว่าเม็ดเลือดของกุ้งคุรุมาที่ทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหารสังเคราะห์ L-15 เพิ่มขึ้นสูงสุดเพียง 1-2% ใน 2 วันแรกเท่านั้น และจำนวนเม็ดเลือดลดลงในวันหลังๆ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้แม้ว่าเซลล์เม็ดเลือดไม่มีคุณสมบัติที่สามารถนำมาใช้เป็นเซลล์เริ่มต้นในสูตรอาหาร L-15 เพื่อการผลิตเป็นเซลล์ไลน์ในอนาคต แต่ก็ทำให้ทราบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีคุณสมบัติที่สามารถนำมาใช้รักษาสภาพของเซลล์เม็ดเลือดให้มีชีวิตอยู่ได้เป็นระยะเวลานานขึ้น ซึ่งน่าจะมีประโยชน์ในการประยุกต์ใช้เก็บรักษาสภาพเซลล์เม็ดเลือดเพื่อการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีภายในเซลล์ (cytochemical) หรือคุณสมบัติต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (immunological) ได้ชัดเจนและแม่นยำขึ้น เนื่องจากสามารถยืดระยะเวลาในการวิเคราะห์ และทำซ้ำได้หลายๆ ครั้งจากตัวอย่างชุดเดียวกัน จากการศึกษาของ Walton และ Smith (1999) พบว่าอาหารสังเคราะห์ L-15 สามารถรักษาสภาพของเซลล์เม็ดเลือดปู *Liocarcinus depuratus* และ *Caarcinus meanas* ให้มีชีวิตรอด 72.0 และ 84.3% ตามลำดับในระยะเวลา 14 วัน และพบว่าการเก็บรักษาเซลล์เม็ดเลือดในอาหารเลี้ยงเซลล์ดังกล่าว เม็ดเลือดยังสามารถมีกิจกรรมในกระบวนการฟาโกซัยโตซิสได้ไม่แตกต่างจากเม็ดเลือดที่เก็บใหม่ๆ จึงสามารถใช้ประโยชน์ของเซลล์ดังกล่าวได้มากขึ้น สำหรับการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำเพื่อการประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ยังจำเป็นต้องทำการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำที่เก็บในอาหารเลี้ยงเซลล์สูตรดังกล่าวนานต่างๆ กันว่ามีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางทางเคมีและชีวภาพของเซลล์อย่างไรบ้าง

ส่วนการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์จากอวัยวะอื่นๆ นอกจากเม็ดเลือดแล้ว พบว่าเซลล์ต่อมน้ำเหลืองสามารถเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนได้ดีกว่าเนื้อเยื่อหัวใจค่อนข้างชัดเจน ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าด้วยคุณสมบัติของเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองที่เซลล์ส่วนใหญ่มีลักษณะแบบเยื่อบุผิว (epithelial like cell) สามารถเจริญเติบโตในอาหารสังเคราะห์ชนิดดังกล่าวได้ดีกว่าเซลล์แบบรูปกระสวย (fibroblast like cell) ที่พบมากในเนื้อเยื่อหัวใจ สอดคล้องกับการศึกษาของ Nadala และคณะ (1993) ที่ว่าเซลล์เนื้อเยื่อประสาทของกุ้ง *P.stylirostris* ที่มีลักษณะเซลล์ส่วนใหญ่แบบรูปกระสวยที่มีการเจริญออกรอบๆ ชิ้นเนื้อเท่านั้น ในขณะที่เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองซึ่งมีลักษณะเซลล์ส่วนใหญ่แบบเซลล์บุผิวมีการกระจายออกไปทั่วพื้นฟลาสก์ และเจริญเป็น monolayer ได้เร็วกว่า สอดคล้องกับการทดลองของ Maeda และคณะ (2003) ที่พบเซลล์เนื้อเยื่อที่เตรียมจากรังไข่สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วในอาหารสังเคราะห์ โดยเซลล์ส่วนใหญ่มีลักษณะแบบเยื่อบุผิว จากการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองมีความเหมาะสมกว่าเซลล์อื่นๆ สำหรับนำมาใช้

เพาะเลี้ยงเป็นเซลล์เริ่มต้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่าเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำ (Chen *et al.*, 1986; Loh *et al.*, 1993; Nadala *et al.*, 1993; Hsu *et al.*, 1995) และกุ้งคุรุมา (Itami *et al.*, 1989) สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าเซลล์อื่นๆ

เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อจากต่อมน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำขนาด 25 และ 125 กรัม พบว่าต่อมน้ำเหลืองของกุ้งขนาด >100 กรัม สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าเนื้อเยื่อชนิดเดียวกันจากกุ้งขนาด 20- 25 กรัม สอดคล้องกับการศึกษาของเรวัตร (2546) ที่พบต่อมน้ำเหลืองกุ้งกุลาดำขนาด 125 กรัม เจริญในอาหารสังเคราะห์ได้ดีกว่าต่อมน้ำเหลืองของกุ้งขนาด 25 กรัม จากข้อมูลดังกล่าวจึงอาจบ่งชี้ให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากต่อมน้ำเหลืองจากกุ้งกุลาดำที่จัดเป็นสัตว์ที่มีวิวัฒนาการต่ำ น่าจะใช้เซลล์เริ่มต้นของต่อมน้ำเหลืองจากสัตว์ทดลองขนาดใหญ่ที่มีความสมบูรณ์ และมีพัฒนาการของเซลล์สมบูรณ์กว่าสัตว์ขนาดเล็ก ซึ่งต่างจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลาที่พบว่าเนื้อเยื่อที่ได้จากสัตว์ทดลองวัยอ่อนสามารถแบ่งตัว และเพิ่มจำนวนได้ดีกว่าเซลล์จากสัตว์ทดลองขนาดใหญ่ อย่างไรก็ตามในกุ้งกุลาดำหรือครัสเตเชียอื่นๆ ยังไม่มีรายงานการวิจัยเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อโดยการใช้เซลล์เริ่มต้นที่กำลังเจริญเช่นจากตัวอ่อนระยะต่างๆ หรือจากเนื้อเยื่อที่กำลังงอกใหม่เป็นต้น ซึ่งคณะผู้วิจัยจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

ส่วนผลการศึกษาปัจจัยร่วมแต่ละชนิดที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต่อมน้ำเหลืองกุ้งกุลาดำในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าการเติมพบว่า MEM vitamin solution 2% หรือ lactalbumin hydrolysate 5% อย่างใดอย่างหนึ่ง หรือทั้ง 2 อย่างพร้อมกันไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารพื้นฐาน ในขณะที่การเติมน้ำเลือดกุ้ง 10% ยังสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่า และผลการทดลองก็บ่งชี้ได้ชัดเจนยิ่งขึ้นเมื่อสารอาหารพร้อมกันคือ น้ำเลือดกุ้ง 10% lactalbumin hydrolysate 5% และ MEM vitamin solution 2% ทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดีที่สุด และสามารถถ่ายเลี้ยงต่อได้เป็นระยะเวลานานถึง 43 วันในขณะที่สูตรอาหารพื้นฐานเซลล์เจริญได้ช้าลงหลังจากเพาะเลี้ยงนานขึ้น และมีชีวิตอยู่ได้พียง 7-10 วัน โดยไม่สามารถถ่ายเลี้ยงได้ แสดงว่าในน้ำเลือดกุ้ง lactalbumin hydrolysate และ MEM vitamin solution เป็นสารอาหารที่จำเป็นซึ่งไม่มีหรือมีไม่พอในสูตรอาหารพื้นฐาน นอกจากนั้นการเติมสารดังกล่าวลงไปพร้อมกันอาจทำให้สภาพแวดล้อมของเนื้อเยื่อมีความเหมาะสมยิ่งขึ้น เนื่องจากพบว่าสารประกอบดังกล่าวสามารถปรับสภาพของอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีค่าออสโมลาลิตี้สูงขึ้นถึง 740 mOsmole/kg ซึ่งใกล้เคียวกับค่าที่วัดได้จากน้ำเลือดกุ้งกุลาดำที่มีค่าเฉลี่ย 778 mOsmole/kg (กิจการ และ คณะ , 2443) และสอดคล้องกับ Luedeman และ Lightner (1992) ที่ทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์รังไข่ (ovarian cell) ของกุ้ง *Penaeus styliorostris* และ *P. vannamei* ในอาหารเลี้ยงเซลล์สูตรต่างๆ พบว่า อาหารเลี้ยงเซลล์ Grace' Insect medium ที่เติม 10% Hybridoma fetal bovine serum (FBS) ทำให้อาหารมีค่าออสโมลาลิตี้ประมาณ 700-750 mmol/kg พบเซลล์ของ กุ้ง *P. styliorostris* และ กุ้ง *P. vannamei* สามารถเจริญโดยแผ่ออกเป็น monolayer บนพื้นฟลาสก์ได้ถึง 80% และ 75% ภายในระยะเวลาเพียง

48 ชั่วโมง และสามารถเก็บรักษาเซลล์ได้ 10 วันโดยเปลี่ยนอาหารทุก 3 วัน นอกจากนั้นอาจเป็นไปได้ว่าสารบางประเภทในน้ำเลือดกุ้งอาจเป็นปัจจัยจำกัดทำให้เซลล์ต่อมน้ำเหลืองกุ้งกุลาดำสามารถใช้ประโยชน์จากวิตามินคือ MEM vitamin solution หรือ lactalbumin hydrolysate ได้มากขึ้นเซลล์จึงเจริญได้ดีขึ้น ซึ่งส่งผลต่อการใช้สารอาหารต่างๆ เพื่อการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ให้สมบูรณ์มากขึ้นด้วย การศึกษาของ Adams (1980) ที่พบว่าการเลี้ยงเซลล์แมลงในสภาพนอกร่างกายโดยวิธีการเลียนแบบองค์ประกอบของสารอาหารภายในร่างกาย ควรคำนึงถึงองค์ประกอบของเกลืออนินทรีย์ กรดอะมิโน และวิตามิน ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่จำเป็นในเลือด ซึ่งเมื่อพิจารณาจากคุณสมบัติดังกล่าวทั้งการปรับระดับของค่าออสโมลาลิตี้ และสภาพแวดล้อมอื่นๆ รวมทั้งการเติมปัจจัยที่จำเป็นลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ใกล้เคียงกับสภาพภายในของตัวสัตว์ จึงน่าจะเป็นปัจจัยหลักที่จำเป็นต้องการศึกษาวิจัยให้ชัดเจนมากขึ้น เพื่อความสำเร็จในการผลิตเซลล์ไลน์จากกุ้งต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าสารอาหารใน L-15 สูตรพื้นฐาน มีไม่เพียงพอสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเบื้องต้นของกุ้งกุลาดำ

สำหรับผลการทดสอบการยอมรับเชื้อไวรัสของเซลล์เพาะเลี้ยงขั้นต้นที่ผลิตได้ พบว่าเซลล์ดังกล่าวยอมรับเชื้อ YHV ได้เป็นอย่างดี สอดคล้องผลการทดลองของ Kasornchandra และคณะ (1999) Lu และ คณะ (1995) ที่พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงขั้นต้นจากต่อมน้ำเหลืองกุ้งกลาดำยอมรับเชื้อ YHV ได้ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่พบลักษณะเซลล์ที่ถูกทำลายจากเชื้อ WSSV ในระยะเวลา 7 วัน ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Kasornchandra และคณะ (1998) ที่ว่าเซลล์เพาะเลี้ยงเบื้องต้นจากต่อมน้ำเหลืองยอมรับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้โดยเซลล์ถูกทำลายหมดภายใน 4-5 วัน ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้นอาจจะเป็นไปได้ว่าปริมาณของ FBS ที่ใช้ในการศึกษาของ Kasornchandra และคณะ (1998) เข้มข้นเพียง 15 % เช่นเดียวกับ Maeda และคณะ (2003) ที่พบว่าเชื้อ WSSV สามารถเจริญในเซลล์เบื้องต้นซึ่งเตรียมจากรังไข่กุ้งคุรุมาในอาหารสูตรปรับปรุง L-15 ที่มี FBS อยู่ 10% ในขณะที่การศึกษานี้ใช้ FBS เข้มข้นสูงถึง 20 % ทั้งในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์และหลังการเติมเชื้อซึ่งปริมาณดังกล่าวอาจเป็นปัจจัยที่มีผลไปยับยั้งไม่ให้ไวรัส WSSV เข้าทำลายเซลล์ ซึ่งถ้าเป็นไปตามข้อสันนิษฐานข้างต้นแสดงว่าโปรตีนหรือสารบางชนิดใน FBS เข้มข้น 20% สามารถยับยั้งเชื้อ WSSV ได้ แต่ไม่มีผลยับยั้งการเข้าทำลายเซลล์ของไวรัสหัวเหลืองซึ่งอาจเป็นเหตุผลที่สอดคล้องกับการเกิดโรคระบาดของเชื้อไวรัสทั้งในสภาพแวดล้อมจริง และจากการทดลองที่พบว่าไวรัสหัวเหลืองก่อโรคได้รุนแรงกว่าเชื้อไวรัส WSSV และยังพบว่าน้ำเลือดกุ้งสามารถลดค่าไตเตอร์ของเชื้อไวรัส WSSV ได้มากกว่า YHV (จรีพร, 2546)

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาทำให้ทราบถึงปัจจัยหลายชนิดที่เกี่ยวกับการเจริญของเซลล์กุ้งกุลาดำในอาหารสังเคราะห์แม้ว่าในการทดลองดังกล่าวสามารถเลี้ยงและถ่ายเซลล์ได้นานเพียง 43 และเซลล์ที่ได้ยังคงเป็นเซลล์เบื้องต้นเท่านั้น ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อปรับสูตรอาหารและปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องให้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำเลือดกุ้งมากที่สุด อาจทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงขั้นต้น

ดังกล่าวพัฒนาเป็นเซลล์ไลน์ ซึ่งมีประโยชน์อย่างยิ่งต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลในอนาคต โดยเฉพาะการศึกษาระบบภูมิคุ้มกัน และการป้องกันโรคติดเชื้อต่างๆ