จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2539

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดในกระแสโลหิตของปลาดุก ด้วยกล้องจุลทัศน์แสงสว่างและกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน

Identification of Peripheral Blood Leucocytes and thrombocytes of Catfish (Clarias batrachus) : Light and Electron Microscopy

โดย

สุมลยา กาญจนะพังคะ

597.49
ส842ก

กันยายน 2541
ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดในกระแสโลหิตของปลาดุก ด้วยกล้องจุลทัศน์แสงสว่างและกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงผ่าน

Identification of peripheral blood leucocytes and thrombocytes of catfish (Clarias batrachus) : Light and electron microscopy

บทคัดย่อ

ศึกษารายละเอียดโครงสร้างเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดในกระแสโลหิตของปลาดุก (Clarias batrachus) ด้วยกล้องจุลทัศน์แสงสว่าง และกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงผ่าน พบเกล็ดเลือดมีลักษณะโครงสร้างต่างกัน 3 ชนิด พบเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte monocyte และ neutrophil neutrophil เป็น granular leucocyte เพียงชนิดเดียวที่พบ มีทั้งชนิดที่เจริญเต็มที่และยังเจริญไม่เต็มที่ monocyte เกือบทุกเซลล์มีโครงสร้างที่มีลักษณะเฉพาะคือ microfilamentous structure อยู่ชิดรอยหยักของนิวเคลียสในเซลล์ การศึกษาครั้งนี้ได้บรรยายถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเกล็ดเลือดและ granulocyte ในกระบวนการแข็งตัวของเลือดปลาดุกไว้ด้วย

คำสำคัญ: เม็ดเลือดขาว เกล็ดเลือด การแข็งตัวของเลือด ปลาดุก (Clarias batrachus)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I18377806 27 มี.ค. 2542

Abstract

The leucocytes and thrombocytes of the blood of catfish (Clarias batrachus) were examined morphologically under the light and transmission electron microscope. Three morphologically different types of thrombocytes were identified in addition to lymphocytes, monocytes and one type of granular leucocyte, the neutrophils. Neutrophils displayed in 2 forms: mature and immature neutrophils. Almost all monocytes found have a specific structure, the microfilamentous structure, located adjacent to the indentation of the nucleus. Participation and alteration of thrombocytes and granular leucocyte in clotting were elaborated.

Keywords : Leucocytes , thrombocytes, clotting , catfish (Clarias batrachus)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

ระบบหมุนเวียนโลหิตของปลาจะไวต่อการกระตุ้นจากสิ่งเร้าภายนอกมาก และผลของการตอบสนองต่อสิ่งเร้าจะปรากฏให้เห็นได้จากการเปลี่ยนแปลงจำนวนและชนิดของเม็ดเลือดในกระแสโลหิต Weinreb (1958) และ Ellis *et al.* (1978) พบว่าความเครียดเป็นสิ่งเร้าที่กระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil และ lymphocyte รวมทั้งเกล็ดเลือดด้วย (blood platelets, thrombocytes) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้ควบคุมโดยต่อมใต้สมองและต่อมหมวกไต นอกจากนี้ Jakowska (1956) และ Gardner and Yevich (1969) ยังพบว่าเม็ดเลือดขาวชนิด eosinophil จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อและเมื่อเกิดสภาวะเครียดในสิ่งแวดล้อม

ปัจจุบันนี้อากาศแหล่งน้ำและภาวะแวดล้อมรอบตัวเรามีมลภาวะปนเปื้อน เนื่องจากการตกค้างของสารพิษและสารเคมี ปลาเป็นสัตว์ที่ไวต่อมลภาวะมาก ความเปลี่ยนแปลงของปลาจึงใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ (Toxicological screening) ถึงมลภาวะของสิ่งแวดล้อมได้ดี (Hawkins and Mawdesley-Thomas , 1972) Weinreb (1958) และ Ellis et al.(1978) ได้รายงานว่าจำนวนและชนิดของเม็ดเลือดในกระแสโลหิตปลาจะไวต่อสิ่งเร้าภายนอกมาก ดังนั้นการศึกษาลักษณะโครงสร้างปกติของเม็ดเลือดในปลาจะช่วยเป็นพื้นฐานการใช้ปลาเป็นสัตว์ทดลองวัดผลกระทบของการตกค้างของสารพิษและสารเคมีที่เกิดขึ้นในสิ่งแวดล้อมรอบ ๆ ตัวเรา

การเลี้ยงปลาเป็นอุตสาหกรรมผลิตโปรตีนที่มีราคาค่อนข้างต่ำ (เมื่อเทียบกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ) ที่แพร่หลายมากทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ ปลาดุกที่เลี้ยงไว้บริโภคในเมืองไทยเป็นปลาดุกสกุล Clarias batrachus (walking catfish) ซึ่งได้เกิดโรคระบาดทำความสูญเสียอย่างมากแก่ผู้เลี้ยงปลาเมื่อปลายปี 2525-2527 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนและชนิดเม็ดเลือดในกระแสโลหิตจะช่วยในการวิเคราะห์และทำนายโรคได้ถูกต้องและรวดเร็วยิ่งขึ้น ทั้งอาจเป็นการช่วยชี้แนวทางการป้องกันโรคให้ลดน้อยลงหรือไม่เกิดขึ้นได้ ปัญหาที่เกิดขึ้นในปัจจุบันคือความสับสนในการจำแนกชนิดเม็ดเลือดในกระแสโลหิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งเม็ดเลือดขาว Williams and Warner (1976) รายงานว่าพบเม็ดเลือดขาวชนิด monocyte ในกระแสเลือดของปลาดุก (Ictalurus punctatus) ซึ่งค้านกับรายงานของ Grizzle and Rogers (1976) ที่ว่าไม่มี monocyte ในกระแสเลือดของปลาดุกสกุลนี้ เซลล์เม็ดเลือดขาวที่เข้าใจว่าเป็น monocyte นั้นอาจเป็น neutrophil , hemoblast หรือ lymphocyte ขนาดใหญ่ จุดมุ่งหมายของการวิจัยนี้เพื่อจำแนกลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ และเกล็ดเลือดในกระแสโลหิตปลาดุก (C. batrachus) โดยใช้กล้องจุลทัศน์แสงสว่างและกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงผ่าน

วัสดุและวิธีการ

1. นำปลาดุก (C. batrachus) จำนวน 20 ตัว มาเลี้ยงในตู้ปลาเป็นเวลา2 อาทิตย์ก่อนทำการทดลอง เพื่อให้คุ้นเคยกับภาวะแวดล้อมของห้องทดลองและมั่นใจว่าปลาดุกอยู่ในสภาพปกติ
2. ตัวอย่างเลือดจะเก็บโดยใช้เข็มเจาะเข้าหัวใจ
   2.1 เลือดสด (ไม่ใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด) จะถูกนำมาป้ายทำฟิลม์เลือดบางบนแผ่นกระจกสไลด์ตัวอย่างละ 3 แผ่น ย้อมด้วยสี Wright Giemsa (WG) แล้วศึกษาด้วยกล้องจุลทัศน์แสงสว่าง (L/M)
   2.2 เลือดจะถูกบรรจุเข้า heparinized microhematocrit tubes ที่มี 4% glutaraldehyde ใน cacodylate buffer บรรจุอยู่ ½ ของหลอด ผนึกหลอดด้วยดินน้ำมันแล้วผสมให้เลือดเข้ากับน้ำยาดองโดยการคว่ำหลอด 2-3 ครั้ง นำ microhematocrit tube ที่บรรจุเลือดแล้วไปเหวี่ยงที่ 3000 rpm 3 นาที นำก้อนเม็ดเลือดขาวออกจาก microhematocrit tube แช่ต่อใน 4% glutaraldehyde อีก 2 ชม. แล้วตัดออกเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 1x1 มม. แล้วล้างด้วย 0.1 M cacodylate buffer

<u>การเตรียมก้อนเม็ดเลือดขาวเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงผ่าน</u>

ก้อนเม็ดเลือดขาวจะถูก postfix ใน 2% osmium tetroxide แล้ว ดึงน้ำออกด้วย ethanol ที่เพิ่มความเข้มข้นให้สูงขึ้นเรื่อย ๆ ต่อจากนั้นนำชิ้นตัวอย่างแช่ใน propylene oxide แล้วฝังใน Epon 812 ใช้ ultramicrotome LKB Utratome ตัด thick section (1-2 um) แล้วย้อมด้วย toluidine blue เพื่อเลือกบริเวณที่ต้องการ หลังจากนั้นตัด ultrathin sections (600-900°A) แล้วย้อมใน 1% uranyl acetate 20 นาที และ ใน Reynold's lead citrate 3 นาที แล้วนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงผ่าน (TEM) JEM-200 CX

<u>ผลการทดลอง</u>

กล้องจุลทัศน์แสงสว่าง (L/M)

1. **เกล็ดเลือด** (thrombocyte , blood platelet) มีขนาด 4-5 μm ซึ่งเล็กกว่าเม็ดเลือดแดง นิวเคลียส (nucleus) มีรูปร่างกลมรี อาจพบรอยหยักกลางนิวเคลียสด้วย (T1) สำหรับเซลล์ที่มีนิวเคลียสรียาวจะเห็นรอยหยักชัดเจน (T2) (รูปที่ 1ข , 2 และ3ค) บางเซลล์มีนิวเคลียสยาวเป็นท่อนและคอดเป็นหลายพู (lobes) (T3 ในรูปที่ 1ค และ 3ก) ไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ปริมาณน้อย ย้อมติดสีชมพูจางอยู่ล้อมรอบนิวเคลียส ไซโตพลาสซึมอาจมีรูปร่างหัวและท้ายแหลม

2. Agranular leucocytes

2.1 Lymphocyte (รูปที่ 2) มีขนาดเล็ก (5-7 μm) ใกล้เคียงกับเกล็ดเลือดพวกที่มีนิวเคลียสกลมรี จึงทำให้อาจสับสนกันได้ นิวเคลียสของ lymphocyte อยู่เอียงไปข้างหนึ่ง(eccentric) ย้อมติดสีม่วงเข้ม มีไซโตพลาสซึมปริมาณน้อยมากย้อมติดสีน้ำเงินจางอยู่ที่ขอบข้างใดข้างหนึ่ง

2.2 Monocyte (รูปที่ 3ก) เซลล์มีขนาดใหญ่ (10-14 μm)นิวเคลียสย้อมติดสีม่วงเข้มมีรูปร่างไม่แน่นอน อาจเป็นรูปรีที่มีรอยหยักหรือเป็นก้อนหลายก้อน ไซโตพลาสซึมมีปริมาณมากติดสีน้ำเงิน พบลักษณะคล้ายช่องว่างหรือเป็นฟองในไซโตพลาสซึมของ monocyte บางเซลล์ (รูปที่ 3ข) และบางเซลล์พบ granules ขนาดเล็กติดสีม่วงแดงกระจายอยู่ในไซโตพลาสซึม (รูปที่ 3ค)

3. Granular leucocyte

พบเพียงชนิดเดียวเท่านั้น คือ neutrophil แบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ

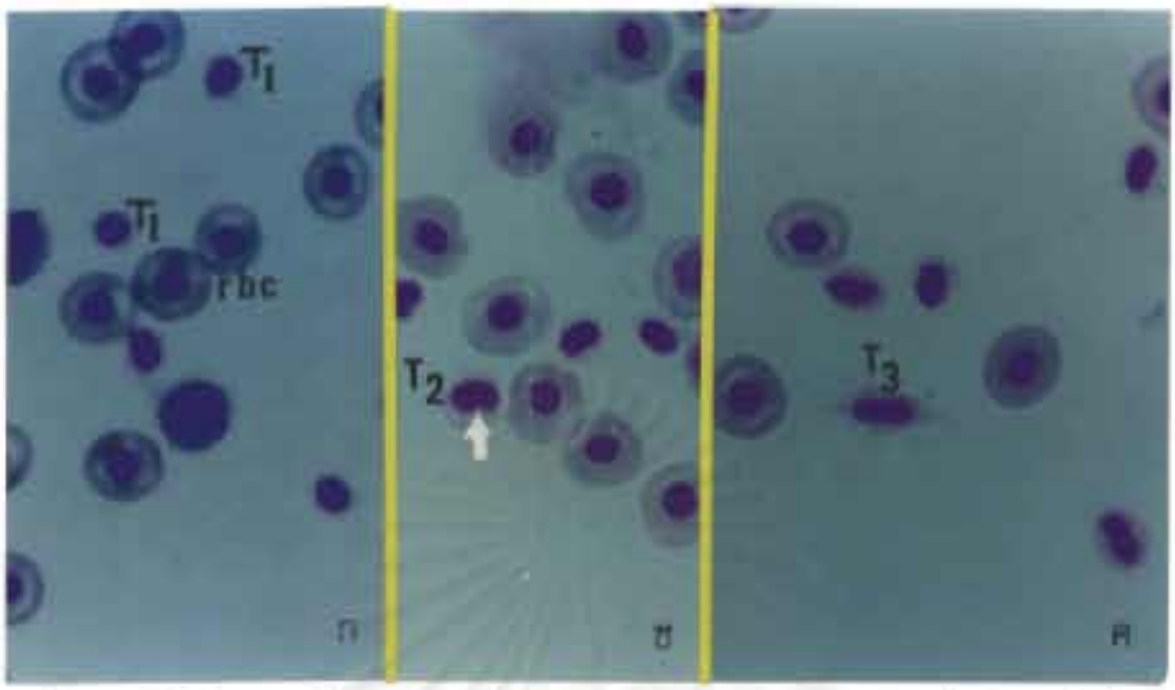
3.1 Mature neutrophil (รูปที่ 3ค และ 4ก) มีขนาดใกล้เคียงกับ monocyte คือ (10-12 μm) นิวเคลียสมีลักษณะเป็นก้อนยาว 2 ก้อน (bilobed) ไซโตพลาสซึมติดสีชมพูอ่อน มี granules เล็กละเอียดมากกระจายทั่วในไซโตพลาสซึม

3.2 Immature neutrophil (รูปที่ 3ค และ 4ข) นิวเคลียสรูปกลมรี ย้อมติดสีม่วงเข้มอยู่เอียงไปข้างหนึ่ง ไซโตพลาสซึมไม่เรียบ มีลักษณะคล้ายมี granules ที่ย้อมไม่ติดสีอยู่เต็ม

กล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงผ่าน (TEM)

1. เกล็ดเลือด (รูปที่ 5ก ,ข , ค และ ง) มีขนาดเล็ก นิวเคลียสมีหลายรูปร่าง มี electron dense heterochromatin อยู่แน่น สลับกับบริเวณสีจางของ euchromatin นิวเคลียสรูปรีมีรอยหยักตรงกลาง (รูปที่ 5ก) เทียบได้กับ T1 เมื่อศึกษาด้วย L/M ไซโตพลาสซึมปริมาณน้อยหุ้มอยู่รอบนิวเคลียส เกล็ดเลือดบางเซลล์มีรอยหยักลึกมาก (รูปที่ 5ข) เทียบได้กับ T2 เมื่อศึกษาด้วย L/M มี organelles ในไซโตพลาสซึมไม่มากนัก เกล็ดเลือดพวกที่มีนิวเคลียสเป็นท่อนยาวและคอดเป็นหลายพู(รูปที่ 5ค) เทียบได้กับ T3 เมื่อศึกษาด้วย L/M ก็พบได้ทั่วไป พบ granules และ vesicles ในไซโตพลาสซึมด้วย ส่วนพวกที่มีไซโตพลาสซึมแหลมหัวและท้ายเซลล์ (รูปที่ 5ง) พบไม่มากนัก

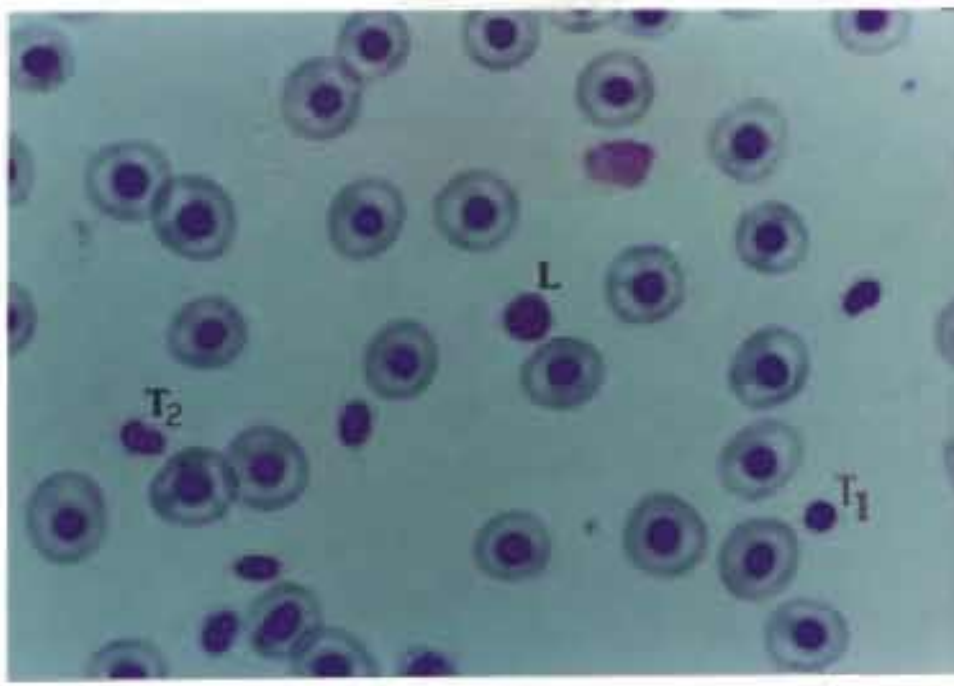
พบเกล็ดเลือดมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปในกระบวนการแข็งตัว (clotting) ของเลือด (รูปที่ 6ก และ 6ข) โดยเริ่มจากเกล็ดเลือดบวมพอง nuclear chromatinเป็นสีจางลงทั่วทั้งนิวเคลียส nuclear pores ขยายใหญ่ และปล่อย nuclear content ออกสู่ไซโตพลาสซึม (ระยะที่ I) ระยะที่ II nuclear membrane จะถูกทำลายมากขึ้น nuclear content ออกมาปนกับไซโตพลาสซึมทำให้ electron density ของนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมเท่ากัน ผนังเซลล์บางส่วนเริ่มถูกทำลาย nuclear membrane จะโดนทำลายทั้งหมด เซลล์เกล็ดเลือดจะบวมพอง



รูปที่ 1 ก. เกล็ดเลือดปลาดุกที่มีนิวเคลียสกลมสี (T1) อาจพบรอยหยัก (ลูกศร) กลางนิวเคลียสด้วย เม็ดเลือดแดง (rbc) รูปร่างกลม มีนิวเคลียสกลมอยู่กลางเซลล์ (WG , 100x)

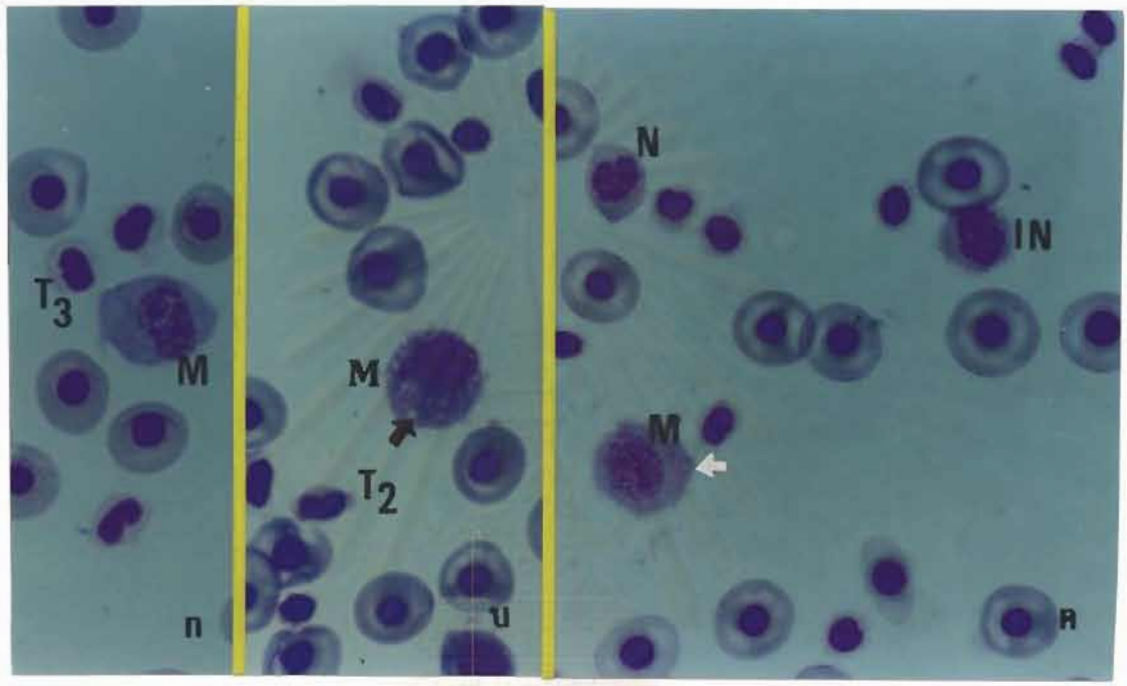
ข. เกล็ดเลือดปลาดุกพวกที่มีนิวเคลียสรียาว (T2) จะพบรอยหยัก (ลูกศร) กลางนิวเคลียสชัดเจน (WG ,100X)

ค. เกล็ดเลือดปลาดุกพวกที่มีนิวเคลียสเป็นท่อนยาว (T3) มีรอยคอดเป็นหลายพู ไซโตพลาสซึมปริมาณน้อยย้อมติดสีชมพูจาง หุ้มอยู่รอบนิวเคลียส (WG , 100x)



รูปที่ 2 Lymphocyte (L) : มีขนาดเล็ก พบน้อย นิวเคลียสติดสีม่วงเข้มอยู่เยื้องไปข้างหนึ่ง ไซโตพลาสซึมมีปริมาณน้อยมากติดสีน้ำเงินจางอยู่ที่รอบของเซลล์ T1 คือเกล็ดเลือดที่มี นิวเคลียสกลม T2 คือเกล็ดเลือดที่มีนิวเคลียสรูปร่างรียาวและมีรอยหยักตรงกลาง (WG, 100x)

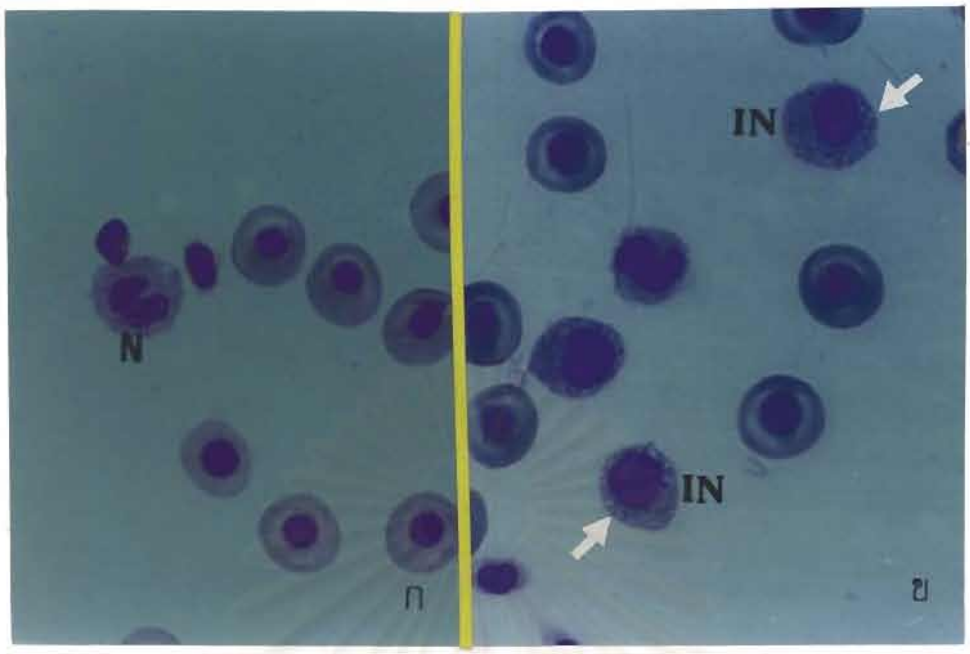
ห้องสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 ก. Monocyte (M): มีขนาดใหญ่ นิวเคลียส(n) ติดสีม่วงเข้มมีรูปร่างไม่แน่นอน ไซโตพลาสซึมมีปริมาณมากย้อมติดสีน้ำเงิน T3 คือ เกล็ดเลือดที่มีนิวเคลียสเป็นแท่งและคอดเป็น หลายก้อน (WG , 100x)

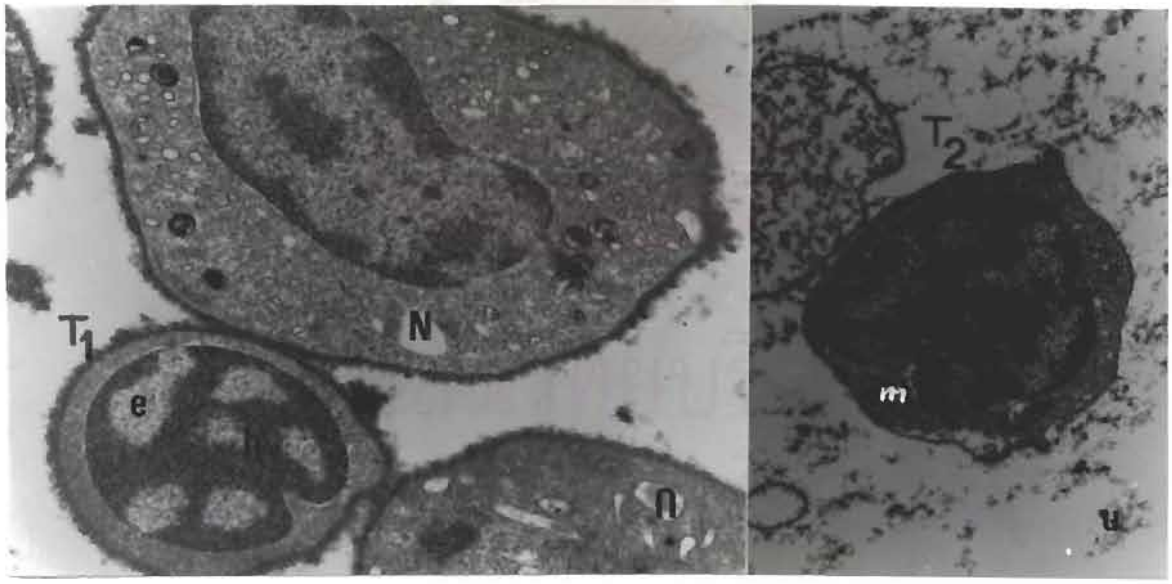
ข. Monocyte(M): ไซโตพลาสซึม ติดสีน้ำเงิน มีรูพรุน (ลูกศร) คล้ายฟอง T2 คือเกล็ดเลือดที่มีนิวเคลียสรียาวและมีรอยหยัก (WG , 100x)

ค. เซลล์ล่างคือ monocyte (M) มีขนาดใหญ่ นิวเคลียสรูปรีมีรอยคอดตรงกลาง ไซโตพลาสซึมติดสีฟ้า และมี granules ติดสีม่วงแดง(ลูกศร) เซลล์บนมีขนาดเล็กกว่า คือ neutrophil (N) ที่เจริญเต็มที่แล้ว ไซโตพลาสซึมติดสีชมพูอ่อน เซลล์ขวาบนคือ immature neutrophil (IN) นิวเคลียสสีม่วงเข้มรูปรีเอียงไปข้างหนึ่ง (WG, 100x)



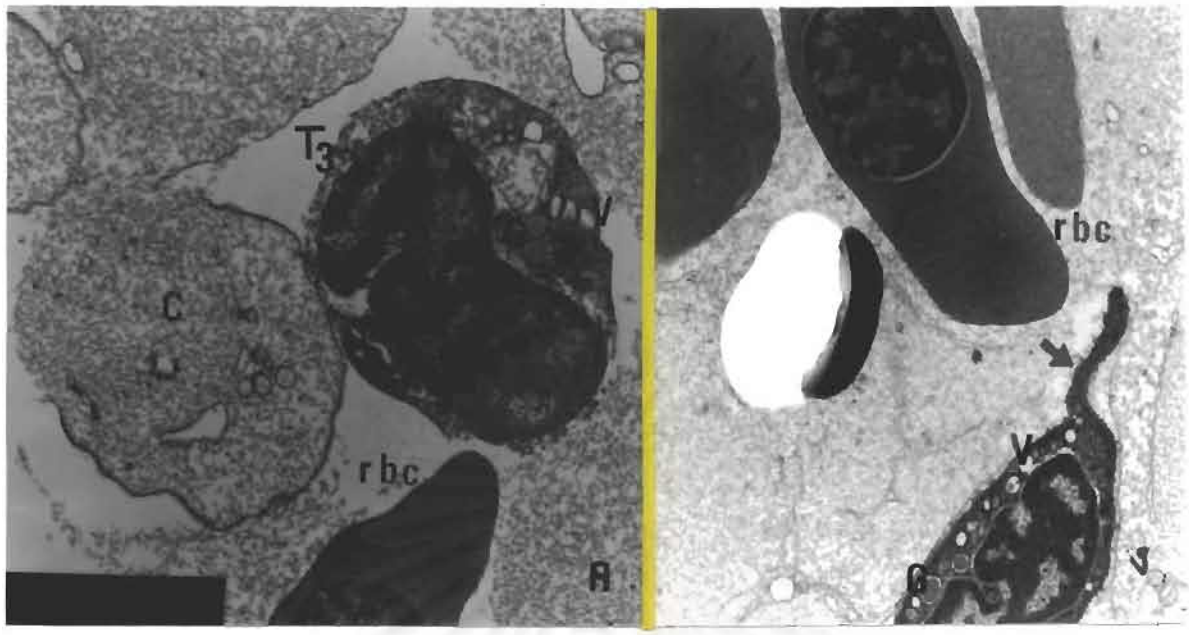
รูปที่ 4 ก. Mature neuttrophil(N): นิวเคลียสติดสีม่วงเข้มมีรูปร่างเป็นพูยาว 2 พูติดกัน ไซโตพลาสซึมติดสีชมพูอ่อน มี granules เล็กละเอียดมากกระจายอยู่ทั่ว (WG, 100x)

ข. Immature neutrophil (IN): มีนิวเคลียสติดสีม่วงเข้มรูปร่างรีอยู่เอียงไปข้างหนึ่งของเซลล์ ไซโตพลาสซึมไม่เรียบ มีลักษณะเหมือนมี granules ขนาดใหญ่ที่ไม่ติดสีอยู่เต็ม (ลูกศร) (WG, 100x)



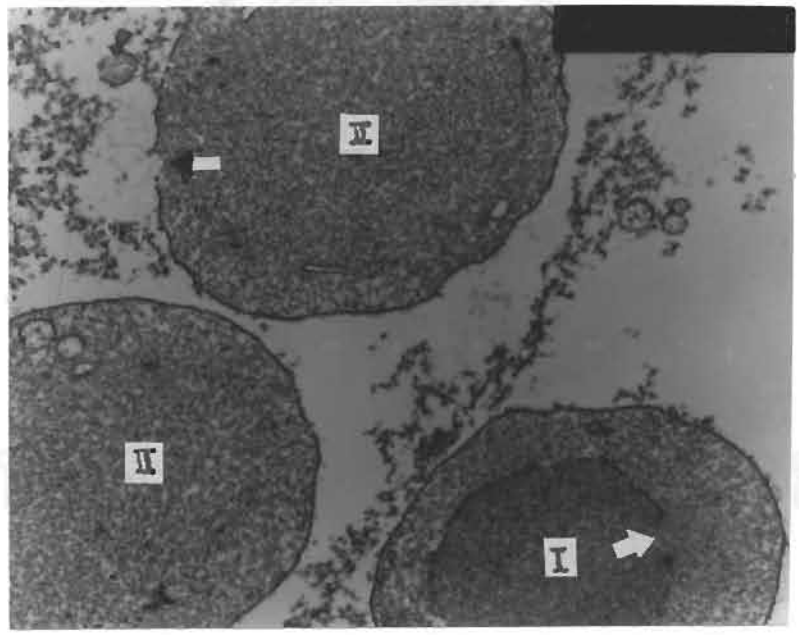
รูปที่ 5 ก. เกล็ดเลือดพวกที่มีนิวเคลียสรูปร่างกลมและมีรอยหยักกลาง (T1 เมื่อศึกษาด้วย L/M) มี heterochromatin (h)สีเข้มอยู่แน่น สลับกับบริเวณสีจางของ euchromatin (e) ไซโตพลาสซึมมีปริมาณน้อยมากและเกือบไม่พบ organelles ต่าง ๆเลย เซลล์ใหญ่ด้านบนคือ mature neutrophil (N) (11,000x)

ข. เกล็ดเลือดพวกที่มีรอยหยักลึกชัดเจน (T2 เมื่อศึกษาด้วย L/M) พบ organellesในไซโตพลาสซึมไม่มากนัก m คือ mitrochondria (9,000x)

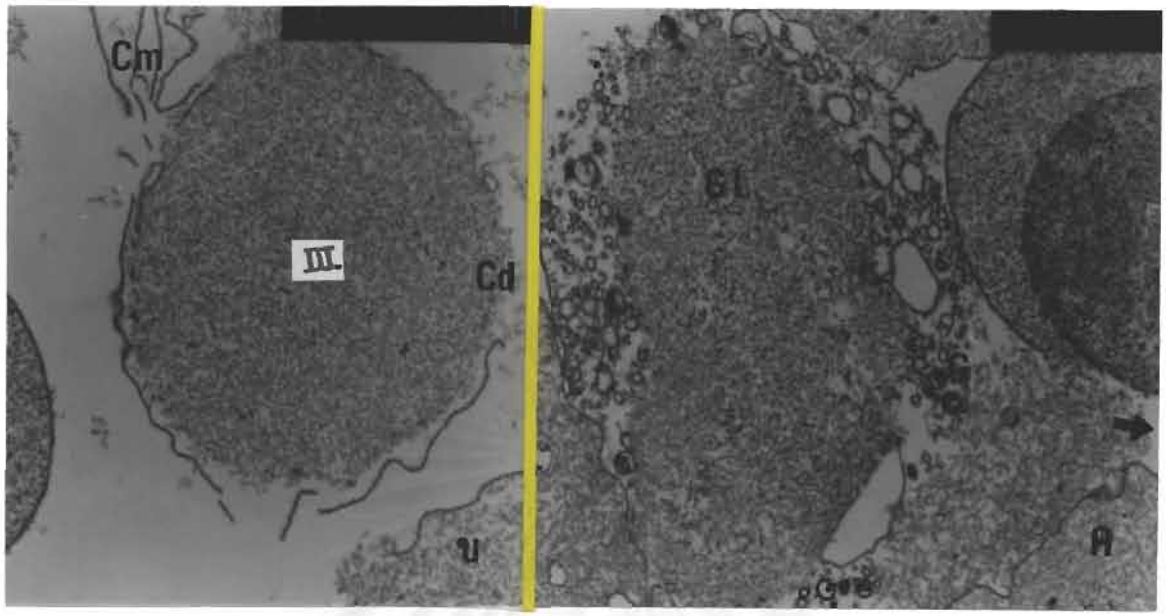


รูปที่ 5 ค. เกล็ดเลือดบางเซลล์มีนิวเคลียสเป็นท่อนยาวและคอดเป็นหลายก้อน(T3เมื่อศึกษาด้วยL/M) พบgranules (G) สีจาง และ vesicles (V) ในไซโตพลาสซึมด้วย C คือเกล็ดเลือดที่เปลี่ยนแปลงรูปร่างไปในกระบวนการแข็งตัวของเลือด (9,000x)

ง. เกล็ดเลือดเซลล์นี้มีไซโตพลาสซึมเรียวแหลม (ลูกศร) G คือ granules และ V คือ vesicle เซลล์บนคือ เม็ดเลือดแดง (rbc) (9,000x)

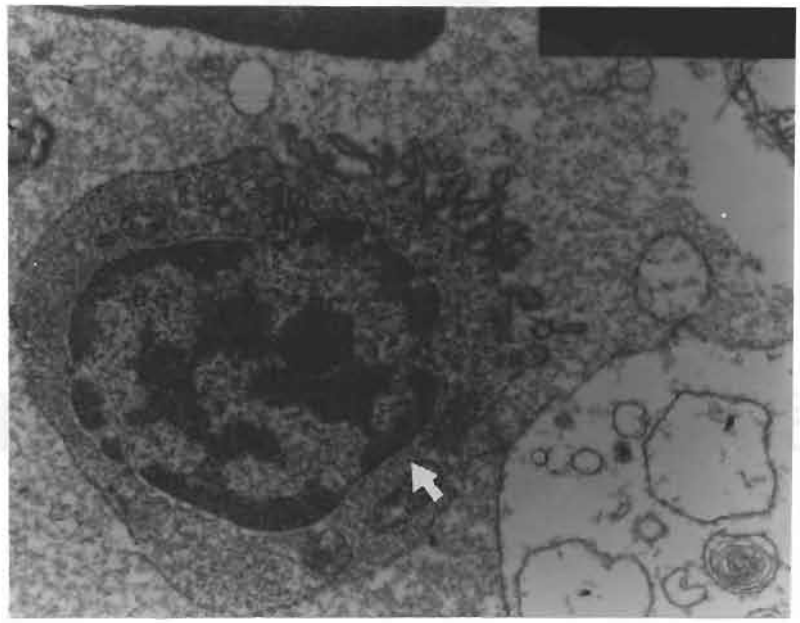


รูปที่ 6 ก. เกล็ดเลือดในกระบวนการแข็งตัวของเลือด ระยะที่ I เซลล์บวมพอง nuclear chromatin เป็นสีจาง nuclear pores ขยายใหญ่และปล่อย nuclear content ออกสู่ไซโตพลาสซึม (ลูกศร) ระยะที่ II nuclear membrane ถูกทำลายมากขึ้น electron density ของนิวเคลียส และไซโตพลาสซึมเท่ากัน ผนังเซลล์บางส่วนถูกทำลาย (หัวลูกศรดำ) (9,000x)

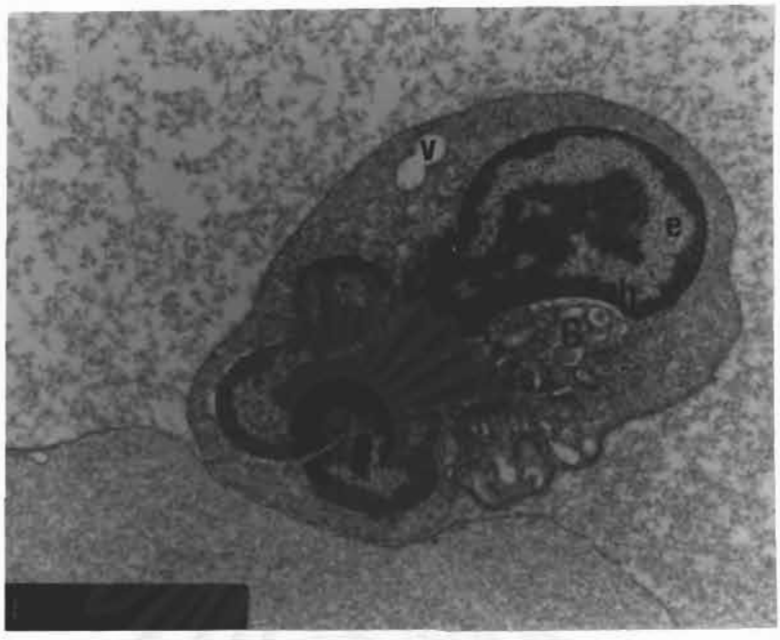


<u>รูปที่ 6</u> ข. เกล็ดเลือดในกระบวนการแข็งตัวของเลือด <u>ระยะที่ III</u> nuclear membrane เสียหายหมด ผนังเซลล์ส่วนใหญ่ถูกทำลายลอกหลุดออก (Cm) ปล่อย cellular debris (cd) ออกมานอกเซลล์ (9,000x)

ค. ในกระบวนการแข็งตัวของเลือดมี granular leucocyte (GL) ที่ภายในเซลล์มี granules (G) และ organelles เกี่ยวข้องด้วย nuclear membrane และผนังหุ้มเซลล์ถูกทำลาย ปล่อย nuclear content และ cellular debris ออกมาภายนอก (ลูกศร) (9,000x)

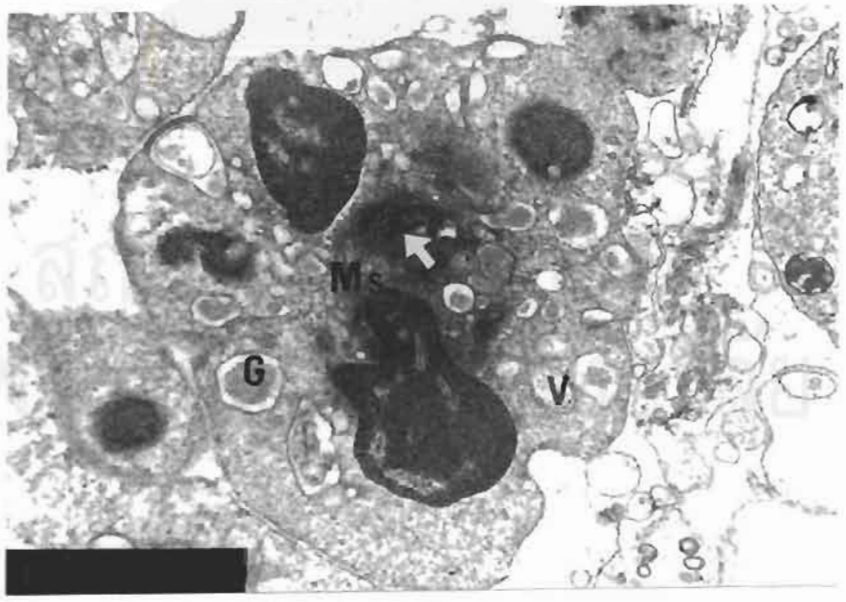


<u>รูปที่ 7</u> Lymphocyte: นิวเคลียสมี heterochromatin (h) สีเข้มจัดตัวแน่นสลับกับ euchromatin (e) สีจาง เห็น nucleolus (nc) ชัดเจน ไซโตพลาสซึมมีปริมาณน้อยมาก มี mitochondria (m) และ rER (ลูกศร) อยู่พอสมควร เห็น pseudopodia ชัดเจน (11,000x)

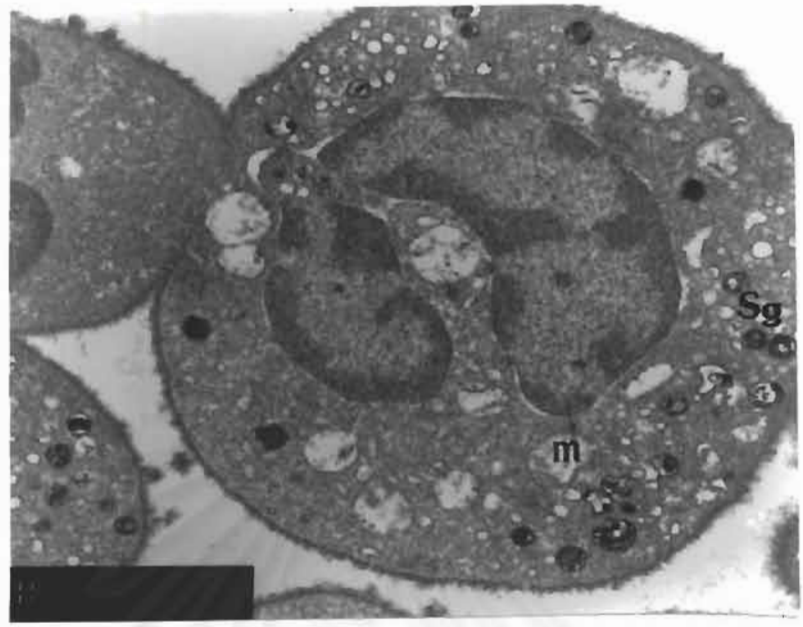


สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

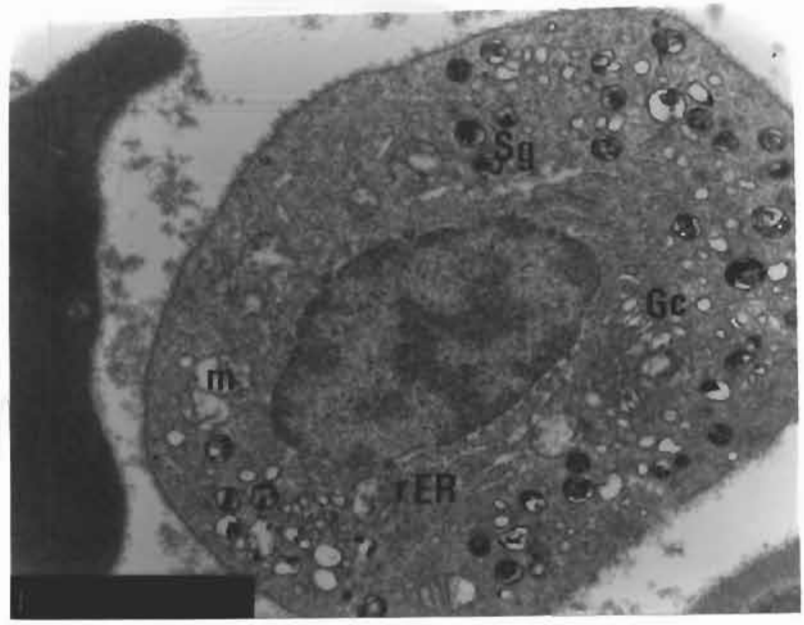
รูปที่ 8 ก. Monocyte: นิวเคลียสมี heterochromatin (h) สีเข้มจัดตัวแน่นรอบขอบนิวเคลียส นิวเคลียสมีรูปร่างเป็นเกือกม้าที่คอดเป็นหลายพู พบ granules (G) และ vesicle (V) มากในไซโตพลาสซึมและพบโครงสร้างที่มีลักษณะเฉพาะคือ microfilamentous structure (MS) ด้วย (11,000x



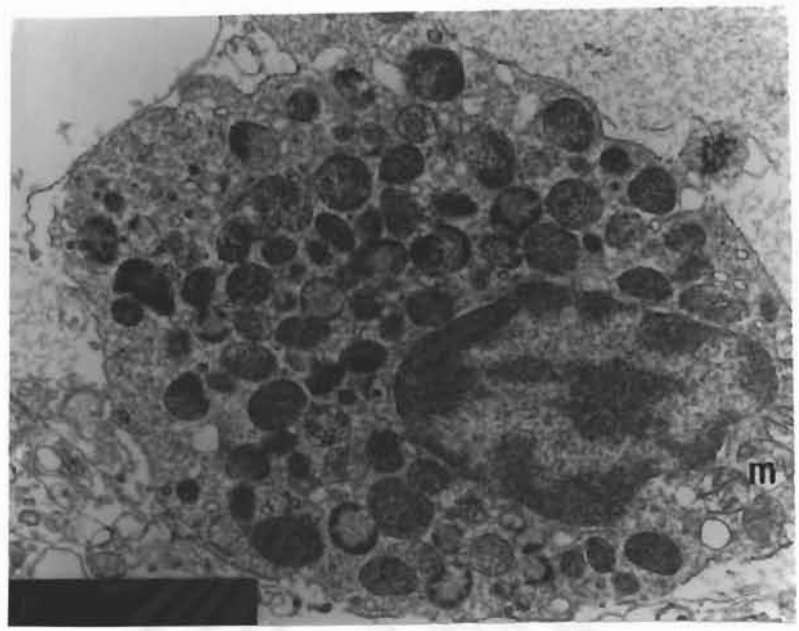
รูปที่ 8 ข. Monocyte : พบ microfilaments (ลูกศร) ใน microfilamentous structure (MS) เรียงอยู่อย่างไม่เป็นระเบียบ G คือ granules และ V คือ vesicle (15,000x)



รูปที่ 9 ก. Mature neutrophil: นิวเคลียสเป็นแท่ง 2 แท่งต่อกัน พบ mitochondria (m) และ specific granules (Sg) จำนวนมากในไซโตพลาสซึม (11,000x)



รูปที่ 9 ข. Mature neutrophil: บางเซลล์มีนิวเคลียสรูปรี ภายในมี mitochondria (m) และ specific granules (Sg) จำนวนมาก พบ Golgi complex (Gc) และ rER ชัดเจน (11,000x)



รูปที่ 9 ค. Immature neutrophil: มีนิวเคลียสรูปรีเอียงซิดขอบเซลล์ พบ granules (G) ขนาดใหญ่ที่มีความเข้มหลายระดับอยู่แน่น mitochondria (m) กระจายตามขอบเซลล์ (11,000x)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มากขึ้น ระยะสุดท้าย (III) ผนังเซลล์จะถูกทำลายแล้วปล่อย cellular debris ออกมาภายนอกเซลล์ พบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มี granules และ organelles ภายในเซลล์มาก (granular leucocyte) ก็มีส่วนในกระบวนการแข็งตัวของเลือดด้วย (รูปที่ 6ค) โดยมีระยะต่าง ๆ คล้ายกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเกล็ดเลือด

2. Agranular leucocytes

2.1 Lymphocyte (รูปที่ 7) คล้ายกับเกล็ดเลือดพวกที่มีนิวเคลียสกลมรีมาก แต่ lymphocytes จะมี pseudopodia ยื่นออกมา และพบ organelles เช่น mitochondria และ rER ในไซโตพลาสซึมมากกว่าในเกล็ดเลือด

2.2 Monocyte (รูปที่ 8ก และ ข) นิวเคลียสมีรูปร่างหลายแบบมี heterochromatin สีเข้มอยู่แน่นมากโดยรอบขอบของนิวเคลียส มักพบนิวเคลียสมีรูปร่างเป็นเกือกม้าที่คอดเป็นหลายก้อน ไซโตพลาสซึมมี granules และ vesicles มากมาย พบโครงสร้างที่มีลักษณะเฉพาะในเกือบทุก เซลล์คือ microfilamentous structure ซึ่งมีmicrofilaments เรียงตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบและมีกลุ่มสารที่มี electron density สูงล้อมรอบ อยู่ชิดรอยคอดของนิวเคลียส

3. Granular leucocyte

พบ granular leucocyte เพียงชนิดเดียวคือ neutrophil ซึ่งแบ่งเป็น 2 ระยะ คือ

3.1 Mature neutrophil พบมีนิวเคลียสทั้งที่เป็น 2 พูต่อกัน (รูปที่ 9ก) และนิวเคลียสรูปรี (รูปที่ 9ข) ภายในมี mitochondria และ specific granules จำนวนมาก มี rER และ Golgi apparatus ชัดเจน

3.2 Immature neutrophil (รูปที่ 9ค) อาจพบ neutrophil ที่ยังเจริญไม่เต็มที่ในกระแสโลหิตด้วย เซลล์มีนิวเคลียสรีเอียงชิดขอบเซลล์ ภายในมี granules ขนาดใหญ่ที่มี electron density ต่างกันไปอยู่หนาแน่น พบ mitochondria กระจายอยู่ตามขอบเซลล์ด้วย

วิจารณ์

การศึกษาโครงสร้างของเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ และเกล็ดเลือดปลาดุกด้วย L/M และ TEM ให้ผลสอดคล้องกันดังนี้

เกล็ดเลือด พบเกล็ดเลือดที่มีนิวเคลียสรูปร่างต่างกันไป 3 แบบ (T1, T2 และ T3) ทั้งเมื่อศึกษาด้วย L/M (รูปที่ 1ก,1ข,1ค, 2, 3ก และ 3ข)และTEM (รูปที่ 5ก,5ข และ 5ค) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานรูปร่างของเกล็ดเลือดในปลา channel catfish(Ictalurus punctatus) โดย Williams and Warner (1976) และในปลาช่อน (สุปราณีและคณะ,2536)เกล็ดเลือดที่มีนิวเคลียสกลมอาจสับสนกับนิวเคลียสของเม็ด

เลือดแดงได้ รวมทั้งอาจสับสนกับ lymphocyte ด้วยเมื่อศึกษาด้วยTEM อาจใช้ข้อสังเกตุที่ว่า เกล็ดเลือดจะมีปริมาณไซโตพลาสซึมน้อยและมี organelles ไม่มากนัก เกล็ดเลือดอาจมี granules หรือไม่มีก็ได้ เนื่องจากวิธีการเก็บเลือดปลาดุกในการทดลองครั้งนี้มิได้ใส่สารกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) จึงสามารถศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเกล็ดเลือดในกระบวนการแข็งตัวของเลือดปลาดุกได้ด้วย เป็นไปได้ว่า granules ในเกล็ดเลือด (รูปที่ 6ก และ 6ข)เกี่ยวข้องกับกระบวนการแข็งตัวของเลือด(Ferguson,1976) เช่นเดียวกับ granules จาก granulocyte (neutrophil) (รูปที่ 6ค, 9ก และ 9ข) ลักษณะการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเกล็ดเลือดและ neutrophil ในกระบวนการแข็งตัวของเลือดปลาดุกคล้ายกับในกุ้งกุลาดำมาก (Kanchanapangka *et al.*, 1994) โดย granules ใน hyaline cell และ semi – granular cell ของ crustaceans จะหลั่ง coagulogen ซึ่งจะเปลี่ยนเป็น coagulin เมื่อโดนกระตุ้นโดย prothrombin และCa^{++} ต่อจากนั้น granulocyte ก็จะเข้ามาร่วมในกระบวนการจับตัวเป็นวุ้นของเลือดด้วย (Soderhall and Cerenius,1992) พบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ granulocyte ปลาดุกคล้ายกับเกล็ดเลือดมาก คือ เซลล์จะปล่อย granules ออกมาเหลือเป็น vacuoles เปล่าในไซโตพลาสซึม(รูปที่ 6ค)เซลล์จะบวมพองยอมให้น้ำเข้าไปในไซโตพลาสซึมและนิวเคลียส จนกระทั่ง nuclear content มี electron density เท่ากันทั้งนิวเคลียส ต่อมา nuclear pores จะขยายขนาดใหญ่ขึ้นและปล่อย nuclear content ออกไปในไซโตพลาสซึมในที่สุดผนังเซลล์จะลอกหลุดออก ปล่อย cellular debris ออกนอกเซลล์ Bauchau (1978)รายงานว่าบทบาทของ granulocytes ในกระบวนการจับตัวเป็นวุ้นของเลือด crustacean เป็นไปอย่างช้าๆ แต่คงอยู่นาน

Agranular leucocytes

Lymphocytes เป็นเม็ดเลือดขาวที่ไม่มี granules ในไซโตพลาสซึม มีขนาดเล็กใกล้เคียงกับเกล็ดเลือด มักสับสนได้ง่ายกับเกล็ดเลือดเมื่อศึกษาด้วย L/M lymphocytesมักมีนิวเคลียสเอียงไปข้างหนึ่ง ไซโตพลาสซึมมีปริมาณน้อยมาก (รูปที่ 2) เมื่อศึกษาด้วย TEM พบ nucleolus ชัดเจนและมี organelles ในไซโตพลาสซึมมากกว่าเกล็ดเลือด (รูปที่ 7) มักพบ pseudopodia หลายขนาดเมื่อศึกษาด้วย TEM สอดคล้องกับรายงานการพบ pseudopods ของ lymphocytes ใน channel catfish (Williams and Warner , 1976) และใน Clarias gariepinus (Boomker,1981a) ดังนั้นอาจใช้โครงสร้างดังกล่าวข้างต้นเป็นข้อสังเกตในการจำแนก lymphocyte และเกล็ดเลือดได้

จากระดับ L/M พบ granules สีม่วงแดงกระจายอยู่ในไซโตพลาสซึมของmonocyte (รูปที่ 3 ค) ซึ่งจะพบ granules เหล่านี้ได้เช่นกันเมื่อศึกษาด้วย TEM (รูปที่ 8ก และ 8ข) Ellis (1976) สรุปว่า monocyte ในปลามีโครงสร้างและหน้าที่คล้าย monocyte ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และ granul ให้ปฏิกิริยา acid phosphatase^{+} เคยมีรายงาน(Williams and Warner ,1976 และ Boomker ,1981a)

การพบลักษณะคล้ายฟองในไซโตพลาสซึมของ monocyte เมื่อศึกษาด้วย L/M (รูปที่ 3ข) เมื่อศึกษาด้วย TEM พบ vesicles มากมาย (รูปที่ 8กและ 8ข) ซึ่งอาจทำให้เกิดลักษณะคล้ายฟองในไซโตพลาสซึมได้ พบโครงสร้างที่มีลักษณะเฉพาะใน monocytes เกือบทุกเซลล์ คือ microfilamentous structure อยู่ชิดรอยหยักของนิวเคลียส Boomker (1981a) รายงานถึงโครงสร้างที่เรียกว่า "Hof" ซึ่งเป็นบริเวณที่มี centriole ที่รอยหยักของนิวเคลียส monocyte บริเวณ Hof มีลักษณะคล้ายเป็นร่างแห (reticular appearance) เนื่องจากมี cytoplasmic strands พาดผ่าน ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบโครงสร้างของ centriole ที่ microfilamentous structure

Granular leucocyte

ในการศึกษานี้พบ granular leucocyte เพียงชนิดเดียวคือ neutrophil (mature และ immature) เมื่อศึกษาด้วย L/M (รูปที่ 3ค, 4กและ 4ข) และTEM (รูปที่ 9ก, 9ขและ 9ค) ไม่พบทั้ง eosinophilic และ basophilic leucocyte ในกระแสโลหิตปลาดุก (C. batrachus) ซึ่งพ้องกับรายงานของ Ellis (1976) และ Boomker (1981a,b) แต่ขัดกับรายงานการพบ eosinophil และ/หรือ basophil ด้วยในปลาดุกและปลาชนิดอื่น (Weinberg *et al.* ,1963, Weinreb, 1963, Williams and Warner,1976 และ Alexander *et al* .,1980)

Neutrophil นกระแสโลหิตพบทั้งพวกที่เจริญเต็มที่แล้วและยังอ่อนอยู่ (Weinberg *et al.*,1963 Boomker ,1981b และ Chinabut *et al.*,1991) การศึกษาด้วย L/M พบ neutrophil ที่ยังเจริญไม่เต็มที่มีไซโตพลาสซึมติดสีน้ำเงิน (รูปที่ 4ข) และมีลักษณะคล้ายมี granules ที่ไม่ติดสี อยู่กันอย่างหนาแน่นในไซโตพลาสซึม เมื่อศึกษาด้วย TEM พบ immature neutrophil มีนิวเคลียสรูปรีอยู่เอียงชิดขอบเซลล์ และมี granules ขนาดใหญ่ที่มี electron density หลายระดับอยู่กันแน่น (รูปที่ 9ค) Boomker (1981b) ก็พบ immature neutrophil ที่มีนิวเคลียสรูปรีอยู่ชิดขอบเซลล์ และมี granules ขนาดใหญ่อยู่กันแน่นเมื่อศึกษา mesonephros ของปลาดุก (C. gariepinus) ด้วย TEM

สำหรับ mature neutrophil มักมีนิวเคลียสเป็นก้อน 2 ก้อนที่เชื่อมติดกัน (bilobed)(รูปที่ 9ก) และพบ granules ขนาดเล็กจำนวนมากในไซโตพลาสซึม เมื่อศึกษาด้วย TEM granules เหล่านี้ส่วนมากจะมีไม่เต็ม vesicles ยังไม่สามารถอธิบายการเปลี่ยนจากโครงสร้างของ granules ใน immature neutrophil ไปเป็น vesicles ใน mature neutrophil ได้ อาจเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของสารใน granules เมื่อ neutrophil เจริญเต็มที่แล้ว นอกจากนี้ยังพบว่า mature neutrophil น่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการแข็งตัวของเลือดปลาดุกดังวิจารณ์แล้ว

สรุปผล

การศึกษาเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดในกระแสโลหิตของปลาดุก (C. batrachus , walking catfish) เมื่อศึกษาโดยใช้กล้องจุลทัศน์แสงสว่างและกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงผ่าน ได้ผลสอดคล้องกันดังนี้

1. พบเม็ดเลือดขาวชนิด agranular leucocytes 2 ชนิด คือ lymphocyte และ monocyte จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงผ่านพบว่า monocyte เกือบทุกเซลล์มีโครงสร้างที่มีลักษณะเฉพาะคือ microfilamentous structure อยู่ชิดรอยหยักของนิวเคลียส ยังไม่ทราบหน้าที่ของโครงสร้างนี้

2. ส่วน granular leucocyte พบเพียงชนิดเดียว คือ neutrophil และพบทั้งชนิดที่เจริญเต็มที่แล้วและพวกที่ยังเจริญไม่เต็มที่ พวกที่ยังเจริญไม่เต็มที่มักมีนิวเคลียสรูปกลมรีเอียงชิดขอบเซลล์ และมี granules ขนาดใหญ่ที่มีสารที่มีความเข้มหลายระดับปนกันอยู่ granules เหล่านี้เห็นได้ชัดเจนเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงผ่าน

3. สำหรับเกล็ดเลือดพบว่ามีรูปร่างและขนาดใกล้เคียงกับ lymphocyte มาก อาจทำให้สับสนได้ง่าย อาจใช้ข้อสังเกตที่ว่า lymphocyte จะมี nucleolus ชัดเจน มีจำนวน organelles ในไซโตพลาสซึมมากกว่า และมักพบ pseudopodia ด้วย เกล็ดเลือดที่พบมีรูปร่างต่าง ๆ กันไปได้ 3 แบบ คือ นิวเคลียสกลมหรือมีรอยหยักกลางเซลล์เล็กน้อย แบบที่สองจะมีนิวเคลียสยาวรีมีรอยคอดตรงกลางชัดเจน และแบบสุดท้ายมีนิวเคลียสยาวเป็นแท่งและมีรอยคอดตรงกลางหลายตำแหน่ง อาจพบไซโตพลาสซึมที่ยาวออกเป็นรูปกระสวยคลุมอยู่หัวท้ายนิวเคลียสของเกล็ดเลือด

4. จากการศึกษาพบว่าเกล็ดเลือดเกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการแข็งตัวของเลือดปลาดุก โดยเซลล์จะบวมพองขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่ออยู่นอกเส้นเลือด ในที่สุดผนังนิวเคลียสและผนังเซลล์จะโดนทำลายแล้วปล่อย nuclear content และ cellular debris ออกมา ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิดการแข็งตัวของเลือด granulocyte ก็เกี่ยวข้องกับกระบวนการนี้ด้วย แต่คาดว่าการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ granulocyte จะเกิดขึ้นหลังเกล็ดเลือด อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานว่า granulocyte เกี่ยวข้องกับกระบวนการแข็งตัวของเลือดปลาดุกมาก่อน

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ทุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2530 ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬา ฯ ที่สนับสนุนเครื่องมือและสถานที่ และเจ้าหน้าที่ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬา ฯ ที่ช่วยจัดพิมพ์

เอกสารอ้างอิง

สุปราณี ชินบุตร กัลยา จำเริญรัตน์ และชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2536. เนื้อเยื่อของปลาช่อน (Histology of snakehead fish (Chana striata) . p50-55 .

Alexander,N., Laurs, R.M., McIntosh, A. and Russel S.W. 1980. Haematological charactreistics of albacore, Thunnus alalunga (Bonnaterre), and skipjack, Katsuwanus pelamis (Linnaeus) . J. Fish Biol., 9:491-497

Bauchau , A. G. 1981. Arthropods to urochordates , invertebrates and vertebrates compared. In: Invertebrate blood cells. Vol 2. N.A. Ratcliffe and A.F. Rowley (ed.) London. Academic Press. p 386-420.

Boomker, J. 1981a . The haemocytology and histology of the haemopoietic organs of South African freswater fish . III . The leucocytes , plasma cells and macrophages of Clarias gariepinus and Sarotherodon mossambicus. Ondeostepoort. J.Vet.Res., 48:185-193

Boomker, J.1981b. The haemocytology and histology of the haemopoietic organs of South African freshwater fish. IV. Ultrastructure of some cells of Clarias gariepinus and Sarotherodon mossambicus. Onderstepoort J. Vet. Res.,48:195-205

Chinabut, S., Limsuwan , C. and Kitsawat , P. 1991. Histology of the walking catfish (Clarias batrachus) . p 38-44 .

Ellis, A.E.1976. Leucocytes and related cells in the plaice Pleuronectus platessa. J. Fish Biol., 8 :143-156.

Ellis , A.E., Munnroe, A.L.S. , and Roberts , R.J. 1976. Defence mechanisms in fish . I .A study of the phagocytic system and the fate of intraperitoneally injected particulate material in the plaice (Pleuronrctus platessa) .J. Fish. Biol., 8:67-78.

Ellis, A.E., Roberts, R.J. and Tytler, P.1978. The anatomy and physiology of Teleosts. In : Fish Pathology . R.J. Roberts (Ed) . Bailliere Tindall . London. . p 13-54.

Ferguson, H.W. 1976. The ultrastructure of plaice (Pleuronectus platessa) leucocytes.J. Fish . Biol.,8: 139-142.

Gardner, G.R. ,and Yevich , P.P. 1969. Studies on the blood morphology of three estuarine cyprinodonteform fishes. J. Fish. Res. Bd. Can., 26: 433-477.

Grizzle , J.M., and Rogers, W.A. 1976. Anatomy and histology of the channel catfish. Auburn University. Agricultural Experiment Station. Auburn, Alabama, U.S. A.

Hawkins, R.I., and Mawdesley-Thoman, L.E. 1972. Fish Haematology . A bibliography. J. Fish Biol.,4:193-232

Jakowska , S. 1956. Morphologic et nomemclature des cellules du sang des teleosteens. Revue Hemat. 11: 519 – 539.

Kanchanapangka, S.,Tangtrongpiros, J., Chansue, N., Chaisiri, N., Srichairat,S., Panichkriengkrai, V., Ruttanaphani, R., Tavatsin, A., Koeypudsa, W., and Ruantongdee, .1994 . Ultrastructure of shrimp (Penaeus monodon) hemocytes during clotting . J. of Electron Microscopy Society of Thailand , 8(2) :65.

Soderhall, K. and Cerenius, L.1992. Crustacean immunity . Annual Rev. of Fish Diseases . Pergamont Press. . p 3-23.

Weinberg, S.R., Siegel, C.D. , Nigrelli, P.F., and Gordon, A.S. 1963. The hematological paramenters and blood cell morphology of the brown bullhead catfish, Ictarulus nebulosus (Le Sueur). New York Zoo. Soc. Zoologica. p71 – 78.

Weinreb, E.L. 1958. Studies on the histology and histopathology of the rainbow trout, Salmo gairdneri irideus. I. Hematology: Under normal and experimental conditons of inflammation. Zoologica, 43: 145 – 153.

Weinreb , E.L. 1963. Studies on the fine structure of teleost blood cells. I. Peripheral blood. Anat. Rec. 147:219-225.

Williams, R.W., and Warner, M.C. 1976. Some observations on the stained blood cellular elements of channel catfish (Ictalurus punctatus).