

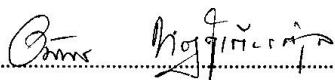
การศึกษาการกระจายของเซโรโทนินและโคเลซีสโตโคนิน ในทางเดินอาหารของ
ปลาถิ่นหมา (*Synaptura commersonii*) โดยใช้วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตี

อรณิชา เลี่ยนชอบ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
มิถุนายน 2561
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

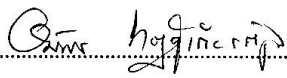
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ อรณิชา เลียนชอบ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

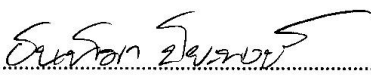
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์



.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัมพร ทองกู้เกียรติกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

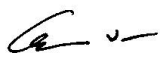

.....ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.อุดมศรี ไชว์พิทรพรชัย)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัมพร ทองกู้เกียรติกุล)


.....กรรมการ
(ดร.จันทิมา ปิยะพงษ์)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิญญิต มั่นทะจิตร์)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษาของมหาวิทยาลัยบูรพา


.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)
วันที่...๕...เดือน...มิถุนายน...พ.ศ. 2561

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัมพร ทองคู่เกียรติกุล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

เนื่องจากงานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์จากโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) โดยสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) ผู้วิจัยจึงขอขอบคุณ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่ทำให้กำลังใจและสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูแด่เวทิตาแด่บุพการี บูรพาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน ทั้งในอดีตและปัจจุบันที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

อรณิชา เลียนชอบ

56920157: สาขาวิชา: ชีววิทยาศึกษา; วท.ม. (ชีววิทยาศึกษา)

คำสำคัญ: คอเลซิสโตไคนิน/ เซโรโทนิน/ ทางเดินอาหารปลาถิ่นหมา/ อิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี

อรณิชา เลียนชอบ: การศึกษาการกระจายของเซโรโทนินและโคเลซิสโตไคนิน

ในทางเดินอาหารของปลาถิ่นหมา (*Synaptura commersonii*) โดยใช้วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี

(IMMUNOHISTOCHEMISTRY STUDY OF DISTRIBUTION OF SEROTONIN AND CHOLECYSTOKININ IN DIGESTIVE TRACT OF *Synaptura commersonii*)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: อัมพร ทองกู่เกียรติกุล, ปร.ค. 52 หน้า ปี พ.ศ. 2561.

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษามิถุวิทยาของทางเดินอาหาร ของ

S. commersonii พบว่า ทางเดินอาหารแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร และลำไส้ แต่แต่ละส่วนประกอบด้วยชั้น มิวโคซา ชั้นมิวโคซา ชั้นกล้ามเนื้อ และชั้นซีโรซา โดยชั้นมิวโคซาของหลอดอาหารเป็นเยื่อบุผิวชนิดสตราติไฟด์สแควมัส กระเพาะอาหารรูปร่างตรง ชั้นมิวโคซา เป็นเยื่อบุผิวชนิดซิมเปลคอลลิมนาร์ ภายในชั้นลามินาร์โพรเพรียพบต่อมแกสตริก ลำไส้ปลาถิ่นหมาแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ลำไส้ส่วนต้นและลำไส้ส่วนปลาย ลำไส้ส่วนต้นมีวิลไลยาวกว่าลำไส้ส่วนปลาย ชั้นมิวโคซาเป็นเยื่อบุผิวชนิดซิมเปลคอลลิมนาร์ การศึกษาการกระจายของเซโรโทนินและโคเลซิสโตไคนินในทางเดินอาหารของปลา *S. commersonii* ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรีพบเซลล์ที่ข้อมติเซโรโทนินและโคเลซิสโตไคนิน ที่กระเพาะอาหารและลำไส้แต่ไม่พบที่หลอดอาหาร เซลล์ที่ข้อมติเซโรโทนินและโคเลซิสโตไคนิน มี 2 ชนิด คือ เซลล์รูปร่างปิรามิดและชนิดโคลสไทป์ นอกจากนี้โคเลซิสโตไคนินยังข้อมติบริเวณด้านล่างของต่อมและข้อมติเซลล์กลอบเบรทและ บรีชบอร์เดอร์

56920157: MAJOR: BIOLOGY EDUCATION; M.Sc. (BIOLOGY EDUCATION)

KEYWORDS: CHOLECYSTOKININ/ SEROTONIN/ DIGESTIVE TRACT OF

Synaptura commersonii/ IMMUNOHISTOCHEMISTRY

ONNICA LIENCHOB: IMMUNOHISTOCHEMISTRY STUDY OF DISTRIBUTION OF SEROTONIN AND CHOLECYSTOKININ IN DIGESTIVE TRACT OF *Synaptura commersonii*. ADVISORY COMMITTEE: AMPORN THONGKUKJATKUL, Ph.D. 52 P. 2018.

The aim of this research was to study the histological of digestive tract of *S.commersonnii*. Digestive tract was divided into 3 part; esophagus, stomach and intestine. Each part was composed of mucosa, submucosa, muscularis and serosa. For the mucosa epithelium of esophagus, it was stratified squamous epithelium. The stomach was straight and mucosa epithelium was simple columnar. It contained was found that the gastric gland in lamina propria. The intestine has two parts, anterior and posterior. Villi of anterior intestine longer than posterior. The mucosa of intestine was simple columnar epithelium. To study distribution of serotonin and cholecystokinin producing cells by using immunohistochemistry of digestive tract of *S.commersonnii*. Serotonin and cholecystokinin immunoreactive endocrine cells were not found in esophagus but were found in stomach and intestine. Serotonin and cholecystokinin immunoreactive cell had 2 types, they were in pyramid shape and close type. In addition cholecystokinin immunoreactive cell was found basal of gastric gland, goblet cell and brush border.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ญ
บทที่	
1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
ปลาลิ้นหมาทะเล	3
การจำแนกประเภทของปลาตามชนิดอาหารที่กิน	3
ลักษณะทางเดินอาหารของปลาทั่วไป	4
อวัยวะช่วยในการทำงานของระบบทางเดินอาหาร	4
โครงสร้างเนื้อเยื่อวิทย์ทางเดินอาหารของปลา	5
เซโรโทนิน (Serotonin)	6
โคเลซิสโตไคนิน (Cholecystokinin หรือ CCK)	6
ทฤษฎีและหลักการวิธีการทำอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี	7
Histological technique	9
3 วิธีดำเนินการวิจัย	11
วัสดุอุปกรณ์	11
สารเคมี	11
สัตว์ทดลอง	12
ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ	12

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
ขั้นตอนการข้อมสืมาทอกไซลิน-อีโอซินเพื่อศึกษาลักษณะ โครงสร้าง ทางเดินอาหารของปลาลิ้นหมา	15
ขั้นตอนการศึกษา ตำแหน่งเซลล์ที่สร้างเซโรโทนิน โดยใช้วิธี อิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี	17
ขั้นตอนการศึกษา ตำแหน่งเซลล์ที่สร้างโคเลซิสโตไคนิน โดย อิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี	18
4 ผลการวิจัย	21
กายวิภาคทางเดินอาหารของปลาลิ้นหมา	21
โครงสร้างจุลกายวิภาคหลอดอาหาร	22
โครงสร้างจุลกายวิภาคของกระเพาะอาหาร	24
โครงสร้างจุลกายวิภาคของลำไส้	27
การตรวจหาตำแหน่งฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนิน ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี.....	30
การตรวจหาตำแหน่งฮอร์โมนเซโรโทนิน ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี	33
5 สรุปผลการวิจัย.....	37
โครงสร้างหลอดอาหารของปลาลิ้นหมา	37
โครงสร้างกระเพาะอาหารของปลาลิ้นหมา.....	37
โครงสร้างลำไส้ของปลาลิ้นหมา.....	38
ลักษณะรูปร่างเซลล์ และตำแหน่งเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนิน	39
ลักษณะรูปร่างเซลล์ และตำแหน่งเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนเซโรโทนิน.....	40
สรุปผลการวิจัย.....	41
บรรณานุกรม	43
ภาคผนวก	48
ภาคผนวก ก.....	49
ประวัติย่อของผู้วิจัย	52

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4-1	
สรุปตำแหน่ง รูปร่างเซลล์ ที่สร้างฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนินและเซโรโทนิน ในทางเดินอาหารปลาทั้งหมด.....	33
5-1	
ตำแหน่งที่พบฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนินในทางเดินอาหารปลา.....	39
5-2	
ตำแหน่งที่พบฮอร์โมนเซโรโทนินในทางเดินอาหารปลา	40

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 แผนผังปฏิกิริยาการย้อมเนื้อเยื่อด้วยแอนติบอดีจำเพาะ โดยใช้ระบบ Avidin-biotin peroxidase complex.....	8
2-2 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสีอีมาทอกไซลีน	10
2-3 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสีอีโอซิน	10
3-1 ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ	14
3-2 ขั้นตอนการย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีอีมาทอกไซลีน-อีโอซิน	16
3-3 ขั้นตอนการศึกษาโดยใช้วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี	10
4-1 โครงสร้างกายวิภาคทางเดินอาหารปลาเลี้ยงหมา	21
4-2 โครงสร้างเนื้อเยื่อหลอดอาหารตัดตามยาว (Longitudinal sections).....	23
4-3 โครงสร้างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารตัดตามขวาง	25
4-4 โครงสร้างเนื้อเยื่อลำไส้ตัดตามขวาง.....	28
4-5 ตำแหน่งของโคเลซิสโตไคนินแอนติบอดีบริเวณกระเพาะอาหาร	30
4-6 ตำแหน่งของโคเลซิสโตไคนินแอนติบอดีบริเวณลำไส้	32
4-7 ตำแหน่งของเซโรโทนินแอนติบอดีบริเวณกระเพาะอาหาร	34
4-8 ตำแหน่งของเซโรโทนินแอนติบอดีบริเวณลำไส้	35

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลาลิ้นหมา (*Synaptura commersonii*) เป็นปลากระดูกแข็งในกลุ่มปลาที่มีก้านครีบ มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางบริเวณตะวันตกเฉียงเหนือของมหาสมุทรอินโด-แปซิฟิกตะวันตก รวมทั้งบริเวณอ่าวไทย เกาะบอร์เนียว อินโดนีเซีย แต่ไม่ถึงฟิลิปปินส์ ปาปัวนิวกินี หรือออสเตรเลีย ไปทางตะวันตกไปยังประเทศอินเดียและปากีสถาน ในน่านน้ำไทยพบได้ทั้งอ่าวไทยและทะเลอันดามันเป็นปลาที่มีคุณค่าทางโภชนาการมาก นิยมนำมารับประทาน ประชากรปลาลิ้นหมา ในธรรมชาติมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็ว จึงเริ่มมีการเพาะเลี้ยงปลาลิ้นหมาขึ้นในแถบยุโรป ส่วนในประเทศไทยนั้นปลาลิ้นหมาจัดเป็นปลาทะเลเศรษฐกิจนิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย แต่การเพาะเลี้ยงปลาลิ้นหมาในประเทศไทยยังไม่ประสบความสำเร็จหรือเพาะเลี้ยงได้ยาก อีกทั้งยังไม่สามารถเพาะลูกพันธุ์เชิงพาณิชย์ได้ นอกจากนี้ปลาลิ้นหมายังมีประโยชน์สามารถใช้บอกถึงคุณภาพน้ำทะเลได้ โดยเมื่อเกิดเหตุการณ์คุณภาพน้ำผิดปกติ เช่น มีปริมาณออกซิเจนต่ำ ปริมาณแอมโมเนียสูง จะพบปลาลิ้นหมาวายขึ้นมาบริเวณผิวน้ำก่อนปลาชนิดอื่น ๆ

การทำงานของระบบย่อยอาหารในสัตว์มีกระดูกสันหลังเกี่ยวข้องกับฮอร์โมนหลายชนิด เช่น แกสตริน (Gastrin) โคลเลซิสโตไคนิน (Cholecystokinin หรือ CCK) ซีครีติน (Secretin) โมติลิน (Motilin) เซโรโทนิน (Serotonin) โซมาโตสแตติน (Somatostatin) เป็นต้น ฮอร์โมนในทางเดินอาหารสร้างมาจากกลุ่มเซลล์ที่สร้างฮอร์โมน (Enteroendocrine cell) ซึ่งจะกระจายอยู่ในชั้นมิวโคซา (Mucosa) เซโรโทนินเป็นฮอร์โมนและสารสื่อประสาทที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็นโมโนเอมีน (Monoamine) พบในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังทุกชนิด ทั้งในระบบประสาทส่วนกลางและระบบทางเดินอาหาร ทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมการเคลื่อนที่ของทางเดินอาหาร (Olsson & Holmgren, 2001) ส่วนโคลเลซิสโตไคนิน เป็นเปปไทด์ฮอร์โมนซึ่งมีจำนวนกรดอะมิโนตั้งแต่ 4-83 โมเลกุล สร้างจากลำไส้เล็กมีหน้าที่หลัก 3 ชนิด คือ กระตุ้นให้ตับอ่อนหลั่งน้ำย่อย กระตุ้นให้ถุงน้ำดีหลั่งน้ำดีออกมา และทำให้กระเพาะอาหารปล่อยอาหารลงมาที่ลำไส้เล็กช่วง

การตรวจหาคำแหน่งของเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนในทางเดินอาหารปลาใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี (Immunohistochemistry) ซึ่งอาศัยหลักการทำปฏิกิริยากันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่มีความคงตัว แล้วติดฉลากแอนติบอดีด้วยเอนไซม์ พบว่า ทางเดินอาหารของปลาแต่ละชนิดมีกลุ่มเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนแตกต่างกัน ได้แก่

ปลากระดูกอ่อนที่พบกลุ่มเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนกลูคาگونในกระเพาะอาหาร (Tagliafierro, Farina, Faraldi, Roossi, & Vacchi, 1989) ปลา *Ictalurus punctatus* (ปลากดอเมริกััน) ตรวจพบเซโรโทนินตลอดทางเดินอาหารซึ่งเหมือนกับปลาชนิดอื่น ๆ (He, Wang, & Zhang, 2009) แต่ปัจจุบันพบว่า 3 ยังไม่มีงานวิจัยที่ศึกษาลักษณะโครงสร้างทางเดินอาหาร รวมถึงกลุ่มเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างฮอร์โมนของปลาลิ้นหมา ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษา ตำแหน่งที่สร้างฮอร์โมนเซโรโทนินรวมทั้งฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนิน ภายในทางเดินอาหารของปลาลิ้นหมาโดยใช้วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาลักษณะรูปร่างเซลล์ ตำแหน่งที่สร้างเซโรโทนินของปลาลิ้นหมา ภายในทางเดินอาหาร โดยใช้วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี
2. ศึกษาลักษณะรูปร่างเซลล์ ตำแหน่งที่สร้างโคเลซิสโตไคนินของปลาลิ้นหมา ในทางเดินอาหาร โดยใช้วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. สามารถระบุลักษณะรูปร่างเซลล์ ตำแหน่งที่สร้างเซโรโทนินและโคเลซิสโตไคนินของปลาลิ้นหมา ภายในทางเดินอาหารได้
2. ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงการพัฒนาสูตรอาหาร

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาคำแหน่งที่พบเซโรโทนินและโคเลซิสโตไคนิน ภายในทางเดินอาหารของปลาลิ้นหมา ตัวเต็มวัย ซึ่งนำมาจากอ่าวไทย ใช้วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปลาลิ้นหมาทะเล

ปลาลิ้นหมาเป็นปลากระดูกแข็งในกลุ่มปลาที่มีก้านครีบจัดในอันดับปลาซีกเดียว (Pleuronectiformes) วงศ์ปลาลิ้นหมา (Soleidae) ปลาลิ้นหมามีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่น ปลาขอดมวง ปลาลิ้นควาย หรือปลาใบไม้ มีชื่อสามัญว่า Tongue fishes พบประมาณ 137 ชนิด อยู่ทั่วโลก แพร่กระจายทั่วไปทั้งอ่าวไทยและทะเลอันดามัน ปลาลิ้นหมามีลำตัวแบนราบ ด้านท้องมีสีขาว ส่วนอีกด้านหนึ่งมีสีน้ำตาลดำ เกิดมีลักษณะเป็นแบบโค้งมน (Cycloid) หรือมีขอบเป็นหยัก (Ctenoid) หัวมีลักษณะโค้งมน หางแหลม เมื่อยังเป็นตัวอ่อนมีตา 2 ข้าง อยู่ทั้ง 2 ข้างของลำตัว เหมือนปลาชนิดอื่น แต่เมื่อโตเต็มวัยตาข้างหนึ่งย้ายไปรวมกับอีกด้านหนึ่งของกะโหลก ครีบหลังและครีบหางมีฐานครีบยาว ปลาในวงศ์นี้ออกหากินในเวลากลางวัน และมีการพรางตัวเพื่อประโยชน์ในการจับเหยื่อ จึงมีความสามารถในการปรับเม็ดสีที่ผิวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม ปลาลิ้นหมาทะเลมีแหล่งที่อยู่อาศัยคือ พื้นทะเล หรือพื้นท้องน้ำ ว่ายน้ำโดยขนานกับพื้นและปลิวตัวตามแนวขึ้นลง สามารถดูดใต้พื้นทรายหรือโคลนได้เวลาตกใจ ปลาลิ้นหมาจัดเป็นปลากินเนื้อ (Carnivore) ดังนั้นอาหารส่วนใหญ่ ได้แก่ สัตว์หน้าดินขนาดเล็ก (Zoobenthos) ลูกกุ้ง ลูกปู แอมฟิพอด (Amphipods) ปลาขนาดเล็ก แพลงก์ตอนสัตว์ เช่น โคพีพอด (Copepods)

การจำแนกประเภทของปลาตามชนิดอาหารที่กิน

ปลาแบ่งเป็นประเภทต่าง ๆ ตามชนิดของอาหารที่ปลากิน ดังนี้

1. ปลากินเนื้อ ชอบกินเนื้อปลาหรือสัตว์อื่นเป็นอาหาร เช่น ปลาช่อน ปลากะสูบ ปลากะพง ปลากะรัง และปลาฉลาม เป็นต้น
2. ปลากินพืช (Herbivorous fish) ชอบกินพืชผัก หญ้า สาหร่ายเป็นอาหาร เช่น ปลาดู ปลาตะเพียนขาว ปลานิล ปลาไน ปลาจีน เป็นต้น
3. ปลากินทั้งพืชและสัตว์ (Omnivorous fish) เป็นปลาที่กินทั้งพืชและสัตว์ เช่น ปลาแรด ปลาสวาย ปลาเทโพ เป็นต้น
4. ปลากินซากเน่าเปื่อยตามพื้นท้องน้ำ (Scavenger) ชอบกินซากพืชหรือสัตว์ที่ตาย กำลังเน่าเปื่อย (Detritus) เช่น ปลาไหล เป็นต้น

5. ปลาที่กินแพลงก์ตอน (Plankton feeder) เป็นปลาที่กรองแพลงก์ตอนกินเป็นอาหาร เช่น ปลาทุบ ปลาปลั่ง

6. ปลาที่กินแบบตัวเบียน (Parasite fish) เป็นปลาที่กินโดยการดูดเลือดของเหลวจากปลาหรือสัตว์อื่นเป็นอาหาร เช่น ปลาปากกลม

ลักษณะทางเดินอาหารของปลาทั่วไป

ทางเดินอาหารของปลาที่กินพืช และกินสัตว์ มีลักษณะแตกต่างกัน โดยปลาที่กินสัตว์จะมีทางเดินอาหารส่วนลำไส้ที่สั้นกว่า เนื้อเยื่อได้เร็วในกระเพาะอาหาร แต่ผนังทางเดินอาหารแข็งแรงกว่าปลาที่กินพืช ระบบทางเดินอาหารของปลาประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้

1. หลอดอาหาร (Esophagus) เป็นทางผ่านของอาหารขนาดใหญ่ เพื่อนำอาหารไปสู่กระเพาะอาหาร (พิชญา ณรงค์พงศ์, 2555)

2. กระเพาะอาหาร (Stomach) อยู่ต่อมาจากหลอดอาหารทำหน้าที่เก็บอาหาร และกระเพาะอาหารมีชั้นกล้ามเนื้อที่หนาเพื่อช่วยในการย่อยอาหารก่อนที่จะลำเลียงไปยังลำไส้ การย่อยอาหารและการดูดซึมสารอาหารจะเริ่มที่ส่วนของกระเพาะ

3. ไส้ติ่ง (Pyloric caeca) เป็นหลอดปลายตัน อยู่ระหว่างกระเพาะอาหารและลำไส้ ส่วนหน้ามีจำนวนแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของปลา (พิชญา ณรงค์พงศ์, 2555) หน้าที่ของไส้ติ่งคือเป็นตัวแบ่งเขตทางกายภาพของทางเดินอาหารตอนกลาง (Abowei & Ekubo, 2011) ช่วยกระเพาะอาหารและลำไส้ในการย่อยอาหาร ดูดซึมคาร์โบไฮเดรตและไขมัน ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวของทางเดินอาหาร

4. ลำไส้ส่วนต้น (Anterior intestine) ทำหน้าที่ย่อยและดูดซึมสารอาหาร โดยลำไส้ส่วนต้นจะทำหน้าที่ย่อยและดูดซึมสารอาหารที่ได้จากการย่อยโปรตีนและลิพิด แต่ลำไส้ส่วนท้ายจะดูดซึมน้ำและเกลือแร่ต่าง ๆ

5. ไส้ตรง (Rectum) เป็นส่วนสุดท้ายของลำไส้อยู่ทางด้านหน้าของครีบก้น (Anal fin) มีขนาดสั้น ทำหน้าที่เป็นทางผ่านของอุจจาระออกจากร่างกายของปลา

อวัยวะช่วยในการทำงานของระบบทางเดินอาหาร

เป็นอวัยวะทำหน้าที่เพื่อช่วยย่อยอาหารที่ปลาที่กินเข้าไป ได้แก่ ตับ ถุงน้ำดี ตับอ่อน

ตับ (Liver) เป็นอวัยวะขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับขนาดของช่องท้อง มีสีน้ำตาลเหลือง หรือดำปนแดง แล้วแต่ชนิดของปลา มีลักษณะเป็นพู แต่ละพูมีความยาวไม่เท่ากัน ปลาที่กินเนื้อจะมีตับใหญ่กว่าปลาที่กินพืช โดยตับปลาที่มีหน้าที่สะสมอาหารพวกน้ำตาลและไขมันไว้ใช้ในยามขาดแคลน

ช่วยสร้างน้ำย่อยส่งไปยังลำไส้เล็ก แต่ยังไม่ทราบชนิดที่แน่นอน สร้างน้ำดีเก็บไว้ที่ถุงน้ำดีและ
ส่งไปยังลำไส้เล็กทำให้ลำไส้เล็กย่อยไขมันได้ดีขึ้น

ถุงน้ำดี (Gall bladder) มีลักษณะเป็นถุงกลมหรือยาวรี สีเขียวเข้ม ผนังบางใส น้ำดีทำ
หน้าที่ทำให้โมเลกุลของไขมันแตกตัวเล็กลง เหมาะแก่การย่อยของน้ำย่อยต่อไป นอกจากนี้ น้ำดียัง
ทำให้ความเป็นกรดต่างพอเหมาะแก่การย่อยอาหารภายในลำไส้เล็กอีกด้วย

ตับอ่อน (Pancreas) ในปลากระดูกอ่อนจะเห็นได้ชัด โดยตั้งอยู่บริเวณส่วนท้ายของ
กระเพาะอาหาร มีสีครีม ส่วนในปลากระดูกแข็งตับอ่อนจะกระจัดกระจายอยู่บริเวณส่วนต้นลำไส้
เล็กหรือบริเวณไส้ตั้งตรงส่วนท้ายกระเพาะอาหาร ใกล้เคียงกับตำแหน่งของม้าม และมีบางส่วน
แนบอยู่กับตับ ตับอ่อนจะมีท่อไปเปิดสู่ลำไส้เล็กบริเวณใกล้กับท่อน้ำดี หน้าที่ของตับอ่อนคือ
สร้างน้ำย่อย 3 ชนิด คือ อะมายเลส (Amylase หรือ Amylopsin) ช่วยย่อยแป้ง ทริปซิน (Trypsin)
ย่อยโปรตีน สเตปซิน (Steapsin) ย่อยไขมัน นอกจากนี้ยังผลิตอินซูลินควบคุมปริมาณน้ำตาล
ในเลือด

โครงสร้างเนื้อเยื่อวิทยาทางเดินอาหารของปลา

ลักษณะทางเดินอาหารของปลาสามารถบ่งบอกถึงอนุกรมวิธาน ความแตกต่างนิสัย
การกิน รูปร่าง ขนาดและเพศของปลาได้ (Kapoor, Smith, & Verighina, 1975) ปลา *Rhamdia*
quelen (ปลาตุ๊ก) (Hernandez, Gianeselli, & Domitrovic, 2009b) มีหลอดอาหารสั้น โครงสร้างของ
หลอดอาหารปลาประกอบด้วย 4 ชั้น ได้แก่ 1. ชั้นมิวโคซา (Mucosa) ประกอบด้วยเยื่อบุผิว
สเตทตีไฟด์สควอมาส และมีเซลล์มิวคัส (Mucous cells) แทรก แต่ปลา *Lates calcarifer* (ปลากระพง)
ชั้นมิวโคซาเป็นเนื้อเยื่อบุผิวชนิดซิมเพลคอลัมน์ (Simple columnar epithelium) (Purushothaman
et al., 2016) 2. ชั้นซับมิวโคซา (Submucosa) ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดแน่น
(Dense connective tissue) มีเส้นใยคอลลาเจน 3. ชั้นกล้ามเนื้อ (Muscularis) ประกอบด้วย
มัดกล้ามเนื้อหลายซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชั้นย่อย คือ ชั้นในเป็นกล้ามเนื้อตามยาวและชั้นนอกเป็น
กล้ามเนื้อวง (Hernandez et al., 2009b) 4. ชั้นซีโรซา (Serosa) พบบริเวณด้านนอก มีเส้นเลือดแทรก

โครงสร้างกระเพาะอาหาร ปลาแต่ละชนิดมีรูปร่างกระเพาะต่างกัน เช่น รูปตัวยู
(U shape) หรือ รูปตัวเจ (J shape) ซึ่งพบในปลาทั่วไป เช่น ปลา *Schizodon knerii*
(Santos et al., 2015) และปลา *I. punctatus* (Sis et al., 1979) และ *R. quelen* (Hernandez et al.,
2009b) และ รูปร่างตรง (Straight shape) พบน้อยมาก เช่น ปลา *Esox lucius* (ปลาไฟค์) (Buke,
1971) ซึ่งโครงสร้างกระเพาะอาหารปลาประกอบด้วยชั้นมิวโคซา ชั้นซับมิวโคซา ชั้นกล้ามเนื้อ
และชั้นซีโรซา โดยชั้นมิวโคซาเป็นเนื้อเยื่อบุผิวชนิดซิมเพลคอลัมน์ พบแกสตริกพิธ

(Gastric pits) และต่อม (Gastric gland) มีเซลล์มีวักส์แทรกอยู่ ชั้นชั้นมิวโคซาเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดหลวม (Loose connective tissue) (Hernandez et al., 2009b) ชั้นกล้ามเนื้อและชั้นซีโรซา เหมือนกับที่พบในหลอดอาหาร

โครงสร้างลำไส้ ปลาแต่ละชนิดมีความยาวลำไส้ที่แตกต่างกัน ปลากินพืชมีลำไส้ที่ยาวกว่าปลากินสัตว์ โครงสร้างลำไส้ของปลามี 4 ชั้น เหมือนกับหลอดอาหารและกระเพาะชั้นมิวโคซาของลำไส้เป็นเนื้อเยื่อบุผิวชนิดซิมเพิลคอลัมน์าร์ ซึ่งพบบริชบอร์ดอร์ (Brush border) และเซลล์กลอบเบรท (Albrecht et al., 2001) ชั้นชั้นมิวโคซา เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดหลวม มีเส้นใยคอลลาเจน เส้นเลือด ท่อน้ำเหลือง ชั้นกล้ามเนื้อ เป็นกล้ามเนื้อเรียบ 2 ชั้น คือ ชั้นในเป็นกล้ามเนื้อวงและชั้นนอกเป็นกล้ามเนื้อตามยาว ชั้นซีโรซา ด้านนอกสุด ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบาง ๆ และมีเซลล์มีเซนทีเลียล (Mesothelial cells) เรียงชั้นเดียวอยู่นอกสุด (Silva, Natali, & Hahn, 2012)

ในทางเดินอาหารพบเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อบุผิว และต่อมภายในกระเพาะอาหาร โดยชนิดของฮอร์โมนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมีหลายชนิดและมีบทบาทสำคัญต่อสรีรวิทยาของทางเดินอาหาร (Ku, Lee, & Lee, 2004) เช่น ฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนิน มีผลต่อการเคลื่อนไหวของกระเพาะอาหารปลา (Olsson & Holmgren, 2001) ฮิสตามีนทำให้กล้ามเนื้อเรียบบีบตัวและกระตุ้นการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร (Ku, Lee, & Lee, 2004)

เซโรโทนิน (Serotonin)

เซโรโทนิน (Serotonin หรือ 5-Hydroxytryptamine หรือ 5-HT) เป็นสารสื่อประสาทที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็นโมโนอะมีน (Monoamine neurotransmitter) ประมาณ 10-20% นั้นถูกสังเคราะห์ในระบบประสาทส่วนกลาง เพื่อควบคุมความหิว อารมณ์ และความโกรธ แต่ส่วนมากประมาณ 80-90% พบมากในระบบทางเดินอาหารของสัตว์มีกระดูกสันหลังหลายชนิด เช่น ปลา สัตว์ครึ่งน้ำครึ่งบก สัตว์เลื้อยคลาน นก และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เป็นต้น เซโรโทนินในปลาพบในทางเดินอาหารทุกส่วน (Danielle et al., 2013) ช่วยในการเคลื่อนไหวของทางเดินอาหารและการไหลเวียนของเลือดโดยกระตุ้นให้หลอดเลือดเกิดการบีบตัว (Egginton, Forster, & Davision, 2001)

โคเลซิสโตไคนิน (Cholecystokinin หรือ CCK)

โคเลซิสโตไคนินเป็นเปปไทด์ฮอร์โมนซึ่งมีจำนวนกรดอะมิโนตั้งแต่ 4-83 โมเลกุล พบในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ เช่น สัตว์เลื้อยคลาน ปลา และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Danielle et al., 2013) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนั้นพบโคเลซิสโตไคนินในสมอง ทำหน้าที่กระตุ้นศูนย์อิ่ม ทำให้เกิด

การอยากอาหารน้อยลง โคลเลซิสโตไคนินสร้างจากส่วนต่าง ๆ ในทางเดินอาหารแตกต่างกันแล้วแต่ชนิดของปลา เช่น ปลา *Oligosarcus hepsetus* (ปลาแอฟริกันไพค์) พบในลำไส้ส่วนท้าย แต่ในปลา *Mugil saliens* (ปลากระบอก) และปลา *R. quelen* พบมากบริเวณลำไส้ (Hernandez et al., 2012) สร้างมาจากเซลล์ไอ (I cell) ของลำไส้เล็ก มีหน้าที่ดังนี้ การกระตุ้นให้ตับอ่อนหลั่งเอนไซม์กระตุ้นให้ถุงน้ำดีหลั่งน้ำดี และยับยั้งกระเพาะอาหารทำให้กระเพาะอาหารปล่อยอาหารลงมาที่ลำไส้เล็กช้าลง (Delay gastric emptying) นอกจากนี้ยังพบว่า อาหารที่เข้าสู่ลำไส้กระตุ้นให้เซลล์หลังฮอร์โมนโคลเลซิสโตไคนินเข้ากระแสเลือดกระตุ้นการเคลื่อนไหวของลำไส้แบบเพอริสทอลซิส (Peristalsis) (Einarsson et al., 1997; Rajjo et al., 1988) โดยบริเวณกระเพาะของปลายังไม่มีรายงานว่าพบตำแหน่งที่สร้างฮอร์โมน โคลเลซิสโตไคนิน

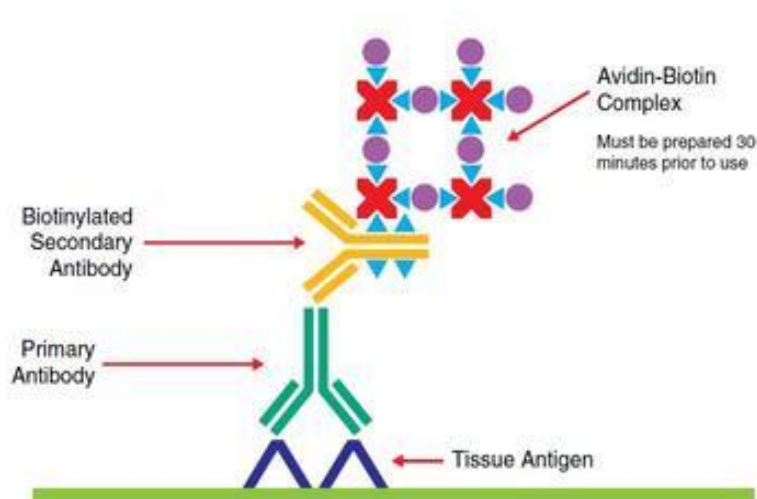
ทฤษฎีและหลักการวิธีการทำอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี

วิธีการอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี เป็นวิธีที่ตรวจหาแอนติเจนในเนื้อเยื่อ เป็นวิธีที่ไม่ทำลายเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ซึ่งอาศัยหลักการทำปฏิกิริยากันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่มีความคงตัว โดยใช้วิธีการติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ (สำหรับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้แสง) หรือสารเรืองแสง (Immunofluorescence) สำหรับการตรวจด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์ วิธีการนี้จะทำให้ทราบตำแหน่งของแอนติเจนที่จะตรวจหาว่าอยู่ในบริเวณใดของเซลล์หรือของเนื้อเยื่อ เช่น อยู่ในไซโตพลาสซึมบริเวณนิวเคลียส หรือที่เยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น และเมื่อย้อมแล้วอาจวัดผลในเชิงกึ่งปริมาณ (Semi-quantitative) ได้ (Pongchareon et al., 2004) หรืออาจใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ต่อเชื่อมการทำงานกับกล้องจุลทรรศน์ช่วยในการวัดเชิงปริมาณได้ (Matkowskyj et al., 2000)

วิธีการอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี แบ่งเป็น 2 แบบใหญ่ ๆ ดังนี้คือ

1. แบบไดเร็กต์ (Direct method) ใช้แอนติบอดีจำเพาะที่ติดฉลาก (Conjugate) ด้วยเอ็นไซม์ เช่น เอ็นไซม์ฮอสรดิช เพอร์ออกซิเดส (Horseradish peroxidase) หรือเอ็นไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเทส (Alkaline phosphatase) เพื่อตรวจหาแอนติเจนในเนื้อเยื่อ เมื่อเอ็นไซม์ทำปฏิกิริยากับซับสเตรท (Substrate) ก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีสีซึ่งวิธีการนี้จะมีควาไว (Sensitivity) น้อย
2. แบบอินไดเร็กต์ (Indirect method) ทำโดยใช้แอนติบอดีสองชนิด ชนิดแรกเรียกว่าแอนติบอดีปฐมภูมิ (Primary antibody) ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่จะตรวจหาในเนื้อเยื่อและอีกชนิดหนึ่งเรียกว่าแอนติบอดีทุติยภูมิ (Secondary antibody) ที่มีความจำเพาะกับแอนติบอดีปฐมภูมิ ซึ่งแบบนี้มีการติดฉลากที่แอนติบอดีทุติยภูมิ ด้วยสารไบโอติน (Biotin) จึงเรียกว่าไบโอตินเลทเชกกันบอดี (Biotinylated secondary antibody) ซึ่งจะจับกับอะวิดิน (Avidin) หรือ

สเตรปตาวิดิน (Streptavidin) ที่ถูกคิดค้นลากไว้กับเอ็นไซม์ การตรวจโดยวิธีนี้มีความไวในการตรวจ
มาก



ภาพที่ 2-1 แผนผังปฏิกิริยาการข้อมเนื้อเยื่อด้วยแอนติบอดีจำเพาะโดยใช้ระบบ Avidin-biotin
peroxidase complex (Protocol, n.d.)

เอ็นไซม์และซับสเตรท

สำหรับการข้อมเนื้อเยื่อโดยอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรีโดยใช้เอ็นไซม์นั้น บางครั้งอาจเรียกว่า
Immunoenzymatic labeling หรือ Immunoenzymatic staining เอ็นไซม์ที่นิยมใช้ในการติดฉลาก
แอนติบอดีในปัจจุบัน ได้แก่ เอ็นไซม์ฮอสเรดิซเพอร์ออกซิเดส หรือเอ็นไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเทส
ซึ่งเอ็นไซม์ทั้งสองชนิดนี้จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของซับสเตรท แต่ละชนิดที่เติมลงไปให้เกิด
สีที่มองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (Bulmer & Johnson, 1985; Wongweragiat et al.,
2001) โดยทั่วไปแล้วซับสเตรทที่ใช้สำหรับเอ็นไซม์ ฮอสเรดิซ เพอร์ออกซิเดส ที่นิยมใช้คือ
3, 3'-ไดอะมิโนเบนซาดีน (Diaminobenzidine หรือ DAB) ซึ่งจะถูกรอกซิไดซ์ แล้วเปลี่ยนเป็น
สีน้ำตาล ส่วนซับสเตรทสำหรับเอ็นไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเทส ที่นิยมใช้คือ 5-โบโรโม-4 คลอโร-
3-อินโดลฟอสเฟต ร่วมกับ ไนโตรบลูเตตราโซเลียม (Nitroblue tetrazolium) หรือเรียกย่อว่า BCIP/
NBT ซึ่งจะถูกรอกซิไดซ์ให้เป็นสีน้ำเงินเข้มหรือสีม่วง (Murphy et al., 2008)

Histological technique

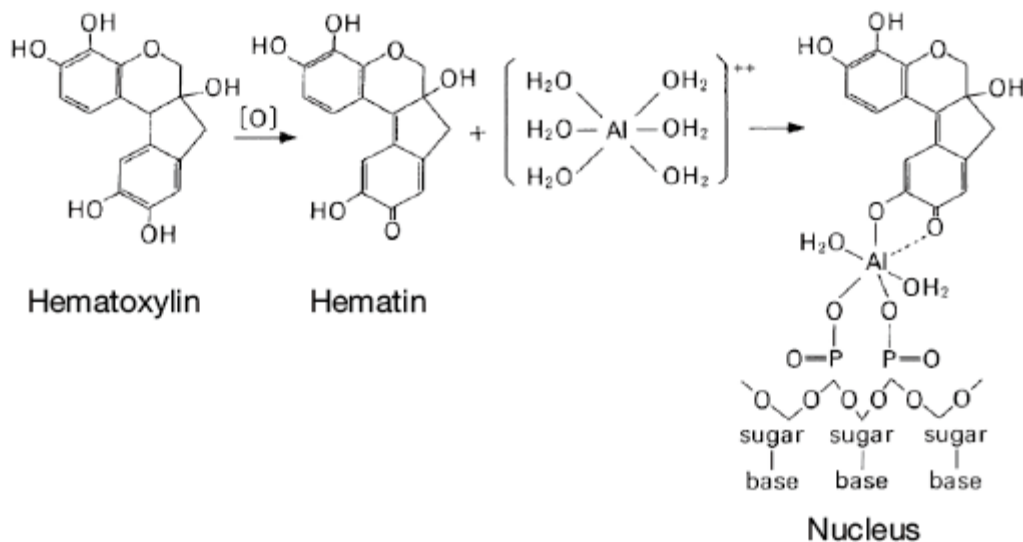
เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาลักษณะ โครงสร้างและส่วนประกอบของเนื้อเยื่อด้วยการย้อมสี (Bancroft & Cook, 1994) โดยสีที่นิยมใช้คือ สีฮีมาทอกไซลิน-อีโอซิน (Hematoxylin and eosin: H&E)

สีฮีมาทอกไซลิน

สีฮีมาทอกไซลิน เป็นสีเบส (Basic dye) มีสูตรโครงสร้างคือ $C_{16}H_{14}O_6$ สกัดได้จาก เนื้อไม้ของต้น *Haematoxylon campechianum* ซึ่งมีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศเม็กซิโก สีฮีมาทอกไซลิน ไม่สามารถนำมาย้อมเนื้อเยื่อได้ทันทีที่ต้องนำไปออกซิไดซ์ให้ได้ฮีมาติน (Hematein) ก่อน จึงสามารถนำไปใช้ย้อมเนื้อเยื่อได้ ซึ่งการออกซิไดซ์ฮีมาทอกไซลินนั้นสามารถทำได้ 2 วิธี ดังนี้

1. การออกซิไดซ์ทางธรรมชาติ โดยการนำไปตั้งทิ้งไว้ในที่กลางแจ้งและโดนอากาศ ซึ่งการออกซิไดซ์ด้วยวิธีนี้จะใช้เวลานาน โดยอาจนานถึง 3-4 เดือน แต่ผลลัพธ์ที่ได้ก็คือ สีที่ได้ นั้นสามารถเก็บไว้ได้เป็นเวลานาน เช่น การเตรียมสีฮีมาทอกไซลินด้วยวิธีของ Ehrlich's and Delafield'

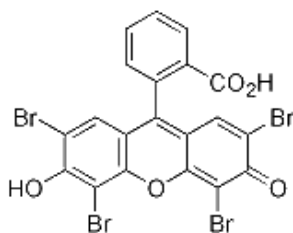
2. การออกซิไดซ์ด้วยสารเคมี การใช้สารเคมีในการออกซิไดซ์ฮีมาทอกไซลินให้ เปลี่ยนเป็นฮีมาตินอย่างเฉียบพลัน ซึ่งสีที่ได้นั้นสามารถนำไปใช้ได้ทันทีหลังจากเตรียมเสร็จ สีจะมีอายุการใช้งานสั้นกว่าสีฮีมาทอกไซลินที่เตรียมจากการออกซิไดซ์ด้วยวิธีทางธรรมชาติ โดยฮีมาตินที่ได้นั้นไม่สามารถยัดจับนิวเคลียสได้ไม่แข็งแรงมากนัก จำเป็นต้องใช้มอร์แดนท์ (Mordants) ซึ่งมอร์แดนท์ที่ใช้สำหรับสีฮีมาทอกไซลินนั้น ได้แก่ เกลือของอลูมิเนียม (Salt of aluminium) เหล็ก (Iron) และทังสเตน (Tungsten) โดยมอร์แดนท์เหล่านี้จะทำให้สีมีประจุบวกช่วย ในการจับกับเนื้อเยื่อที่มีประจุลบ เช่น เส้นใยโครมาตินในนิวเคลียส โดยมอร์แดนท์จะช่วยให้ สีฮีมาทอกไซลินจับกับเนื้อเยื่อได้ดีขึ้น



ภาพที่ 2-2 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสีสีมาทอกไซลีน (Pathology Research 2013, n.d.)

สีไอโชนิน

สีไอโชนิน เป็นสีกรด ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์และน้ำ มักใช้ย้อมคู่กับสีสีมาทอกไซลีน เพื่อใช้ในการแสดงโครงสร้างทั่วไปของเนื้อเยื่อ ตลอดจนช่วยในการแสดงความแตกต่างของไซโทพลาซึมในเซลล์แต่ละชนิด และแสดงความแตกต่างระหว่างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแต่ละชนิดโดยการติดสีที่แตกต่างกันคือ สีแดง สีส้ม และสีชมพู (Bancroft & Gamble, 2008)



ภาพที่ 2-3 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสีไอโชนิน (PhotoChemCAD Chemicals, n.d.)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องควบคุมความร้อน (Hot plate) จำนวน 1 เครื่อง
2. เครื่องตัดเนื้อเยื่อ (Microtome)
3. แผ่นสไลด์ (Microscope slide)
4. ภาชนะใส่สีย้อม (Staining jar)
5. กระจกปิดสไลด์ (Cover slip)
6. เครื่องอุ่นแผ่นสไลด์ (Slide warmer)
7. ออโต้ปิเปต (Pipette auto)
8. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscopy)
9. เครื่องชั่งสารเคมี (Balance)

สารเคมี

1. ฟอรัมาลิน (Formalin)
2. กรดกลacial acetic acid (Glacial acetic acid)
3. เอทานอล (Ethanol)
4. ไดออกเซน (Dioxane)
5. พาราพลาสติก (Paraplast)
6. เจลาติน Gelatin)
7. สีอีมาทอกไซลิน
8. อลูมิเนียม โพแทสเซียม ซัลเฟต (Aluminium potassium sulfate)
9. โซไดอ ไอโอดेट (Sodium iodate)
10. สีอีโอซิน วาย
11. ไซลีน (Xylene)
12. บิวทานอล (n-butanol)
13. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30%
14. โบไวน์ ซีรัมอะบูมิน (Bovine serum albumin หรือ BSA)

15. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid)
16. เซโรโทนินแรบบิทแอนติบอดี (Serotonin Rabbit antibody S5545 Sigma-Aldrich, Inc., United States)
17. โคลเลซิสโตไคนินแรบบิทแอนติบอดี (Cholecystokinin Rabbit antibody C2581 Sigma-Aldrich, Inc., United States)
18. ไบโอดีนเลทเซคันบอดี (Biotinylated second antibody)
19. สเตรปตาวิคิน เพอร์รอกซิเดสคอมเพล็กซ์ (Streptavidin-peroxidase complex)
20. แดปโครโมเจน (DAB chromogen)
21. เปอร์เม้าท์ (Permount)

สัตว์ทดลอง

ปลาลิ้นหมาที่มีชีวิต ตัวเต็มวัยขนาดความยาว 25-30 เซนติเมตร เพศเมีย จำนวน 5 ตัว โดยนำมาจากทะเลอ่าวไทย

ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ (ดัดแปลงจาก Humason, 1972)

1. กระบวนการคงสภาพเนื้อเยื่อ (Fixation)

นำปลาลิ้นหมาตัวเต็มวัยมาสลบด้วย MS-222 (Tricaine methanesulfonate) ในปริมาณที่เกินขนาด แล้วผ่าบริเวณช่องท้องตัดส่วนทางเดินอาหารออกมา จากนั้นนำชิ้นเนื้อมาแช่ในน้ำยา คงสภาพสารละลายตัวเอง นาน 24 ชั่วโมง
2. กระบวนการดึงน้ำออก (Dehydration)

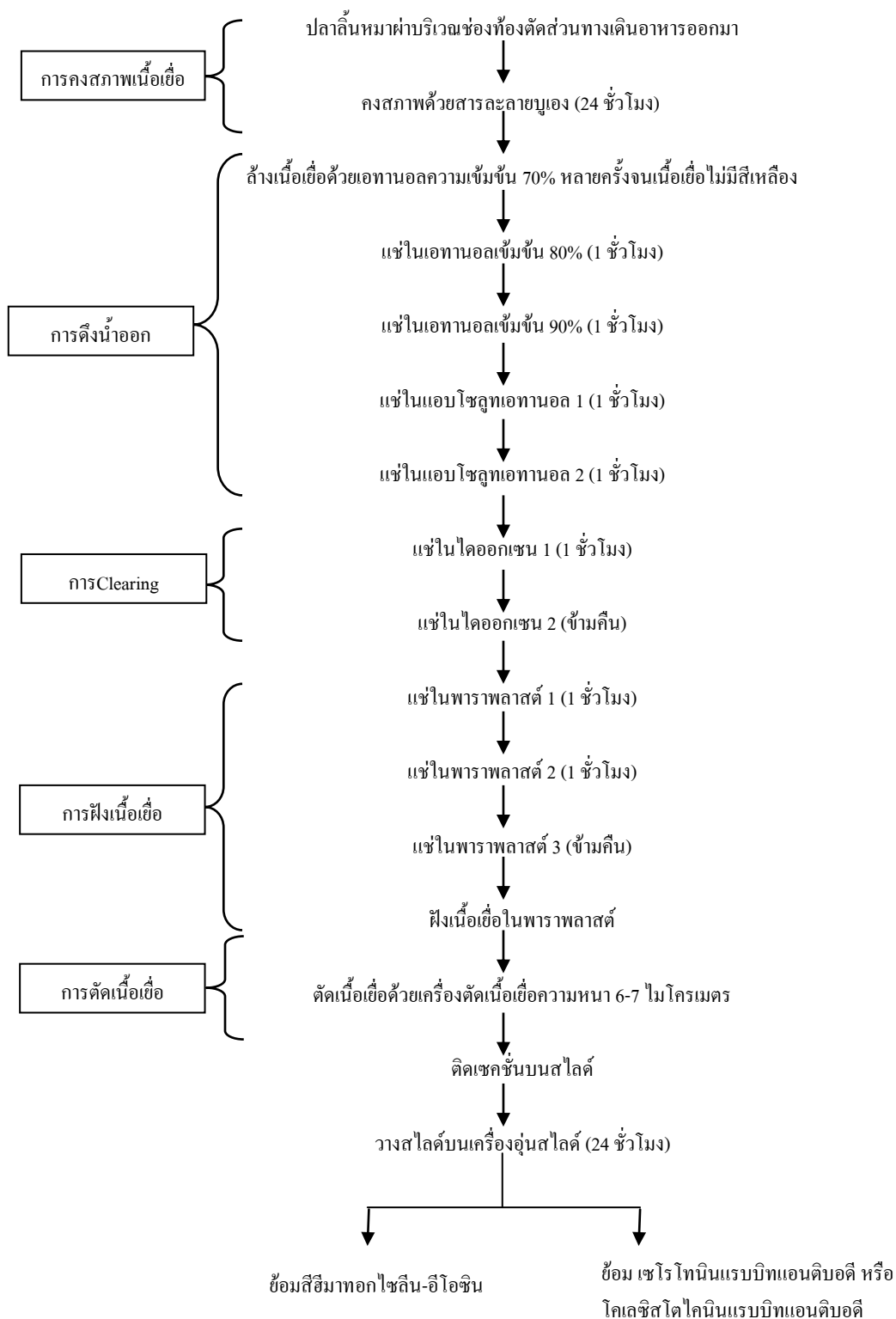
ขั้นตอนนี้เป็นการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ โดยใช้เอทานอลความเข้มข้นต่ำไปยังเอทานอล ความเข้มข้นสูง ซึ่งจะเริ่มจากล้างเนื้อเยื่อด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70% หลายครั้งจนเนื้อเยื่อไม่มี สีเหลือง แล้วแช่ในเอทานอลความเข้มข้น 80% และ 90% ขั้นตอนละ 1 ชั่วโมง จากนั้นแช่ใน แอปโซลูทเอทานอลจำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 1 ชั่วโมง
3. กระบวนการเคลียร์ (Clearing)

นำไปแช่ในไดออกเซน 2 ครั้ง โดยครั้งแรกแช่นาน 1 ชั่วโมง และครั้งที่ 2 แช่ทิ้งไว้ข้ามคืน
4. กระบวนการฝังเนื้อเยื่อ (Embedding)

แช่เนื้อเยื่อลงในพาราฟลาสต์ 3 ครั้ง ครั้งละ 1 ชั่วโมง และฝังเนื้อเยื่อในพาราฟลาสต์

5. การตัดเนื้อเยื่อ

ตัดเซกชันหนา 6-7 ไมครอน แล้วติดเซกชันบนสไลด์ นำสไลด์ที่ได้ไปย้อมสี
อีมาทอกไซลีน-อีโอซิน หรือทำเทคนิคอิมมูโนไซโตเคมีสทรี



ภาพที่ 3-1 ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ

ขั้นตอนการย้อมสีฮีมาทอกไซลิน-อีโอซินเพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างทางเดินอาหารของปลาลิ้นหมา

1. กระบวนการดื่มน้ำเข้าเซกชัน (Rehydration)

นำสไลด์ที่ติดเซกชันแล้ว แช่ในไซลีน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นแช่ในแอบโซลูทเอทานอลและเอทานอลที่ความเข้มข้น 90% และ 70% ตามลำดับ ขึ้นละ 5 นาที สุดท้ายนำมาแช่ในน้ำกลั่น 5 นาที

2. กระบวนการย้อมสี (Staining)

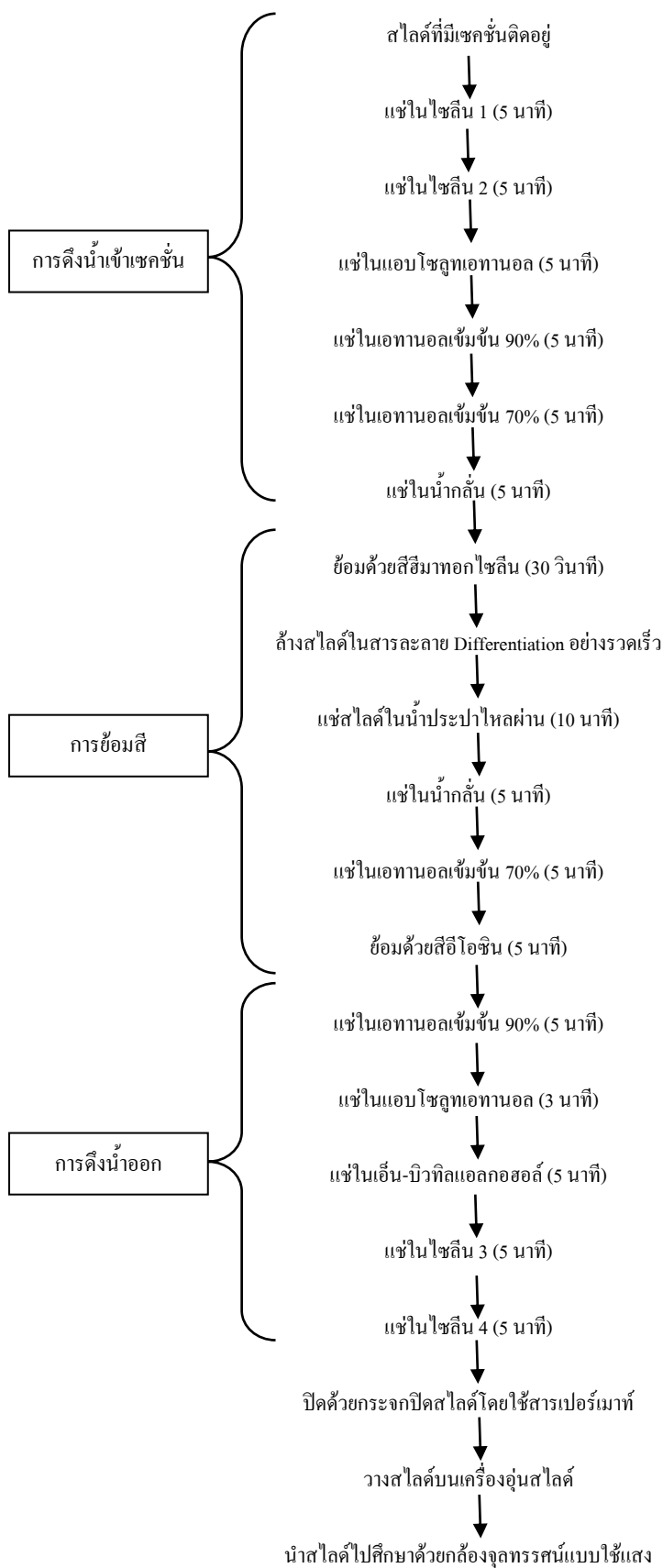
นำสไลด์จากข้อ 1. ย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลินนาน 30 วินาที จากนั้นล้างสไลด์ในสารละลายเพื่อทำ Differentiation อย่างรวดเร็ว นำไปสไลด์ล้างในประปาที่ไหลผ่านนาน 10 นาที แช่ในน้ำกลั่น 5 นาที จากนั้นแช่ในเอทานอลที่มีความเข้มข้น 70% นาน 5 นาที และย้อมด้วยสีอีโอซิน นาน 5 นาที

3. กระบวนการดื่มน้ำออก

นำสไลด์จากข้อ 2 แช่ในเอทานอลที่ความเข้มข้น 95% นาน 5 นาที แช่ในแอบโซลูทเอทานอล นาน 5 นาที เอ็น-บิวทิลแอลกอฮอล์ นาน 5 นาที และแช่ในไซลีนอีก 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

4. การปิดกระจกสไลด์และนำไปศึกษา

นำสไลด์จากข้อ 3 ปิดด้วยกระจกสไลด์โดยใช้สารเปอร์เมท แล้วนำมาวางบนเครื่องอุ่นสไลด์นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสไลด์ที่ได้ไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง



ภาพที่ 3-2 ขั้นตอนการย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีอีมาทอกไซลีน-อีโอซิน

ขั้นตอนการศึกษา ตำแหน่งเซลล์ที่สร้างเซโรโทนิน โดยใช้วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี

นำสไลด์ที่มีเซกชั่นของเนื้อเยื่อหลอดอาหาร กระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก มาทำขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. กระบวนการดึงน้ำเข้าเซกชั่น

นำสไลด์ที่ติดเซกชั่นแล้ว แช่ในไซลีน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นแช่ในแอบโซลูทเอทานอลและเอทานอลที่ความเข้มข้น 90%, 80% และ 70% ตามลำดับ ขึ้นละ 5 นาที สุดท้ายนำมาแช่ในน้ำกลั่น 5 นาที

2. วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี

2.1 แช่สไลด์จากข้อ 1 ในสารละลายฟอสเฟต (Phosphate buffer pH 7.4) 5 นาที เพื่อปรับสภาพเนื้อเยื่อ

2.2 ทำการยับยั้งเอนไซม์เอนโดจีนัสเพอร์ออกซิเดส (Endogenous peroxidase) ด้วยการแช่สไลด์ใน 3% ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในเมทานอล 10 นาที

2.3 แช่สไลด์ในสารละลายฟอสเฟต 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เพื่อล้างไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์

2.4 เดิมบีเอสเอ ลงบนเซกชั่นเนื้อเยื่อ โดยให้ทั่วบริเวณของเซกชั่น ทิ้งไว้ 30 นาที

2.5 ล้างบีเอสเอออกจากสไลด์เนื้อเยื่อ

2.6 เดิมแอนติบอดีตัวที่ 1 คือ เซโรโทนินแรบบิทแอนติบอดี โดยเจือจางในฟอสเฟตอัตราส่วน 1:2,000 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ซ้ำคืน

2.7 ล้างเซโรโทนินแรบบิทแอนติบอดี ที่เป็นส่วนเกินออกโดยแช่สไลด์ในน้ำยาฟอสเฟต 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

2.8 เดิมแอนติบอดีตัวที่ 2 คือ ไบโอดินเลทเซคันบอดี บนเซกชั่น ทิ้งไว้ 10 นาที

2.9 เดิมสเตรปตาวิคิน เพอร์ออกซิเดสคอมเพล็กซ์ สไลด์ละ 2 หยด ทิ้งไว้ 10 นาที

2.10 เดิมแคบโครโมเจน ซึ่งเป็นซับสเตรท ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น

2.11 ซ้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลีนนาน 45 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่านตลอดเวลานาน 10 นาที

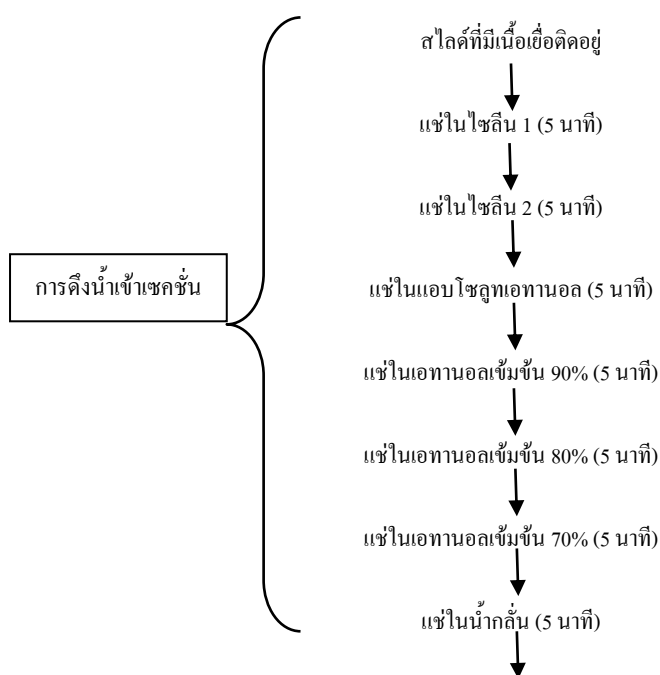
2.12 นำสไลด์แช่ในเอทานอลที่ความเข้มข้น 90% นาน 5 นาที แช่ในแอบโซลูทเอทานอล นาน 10 นาที บิวทานอล นาน 15 นาที และแช่ในไซลีนอีก 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

2.13 ปิดด้วยกระจกสไลด์โดยใช้สารเปอร์เมาท แล้วนำมาวางบนเครื่องอุ่นสไลด์นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสไลด์ที่ได้ไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

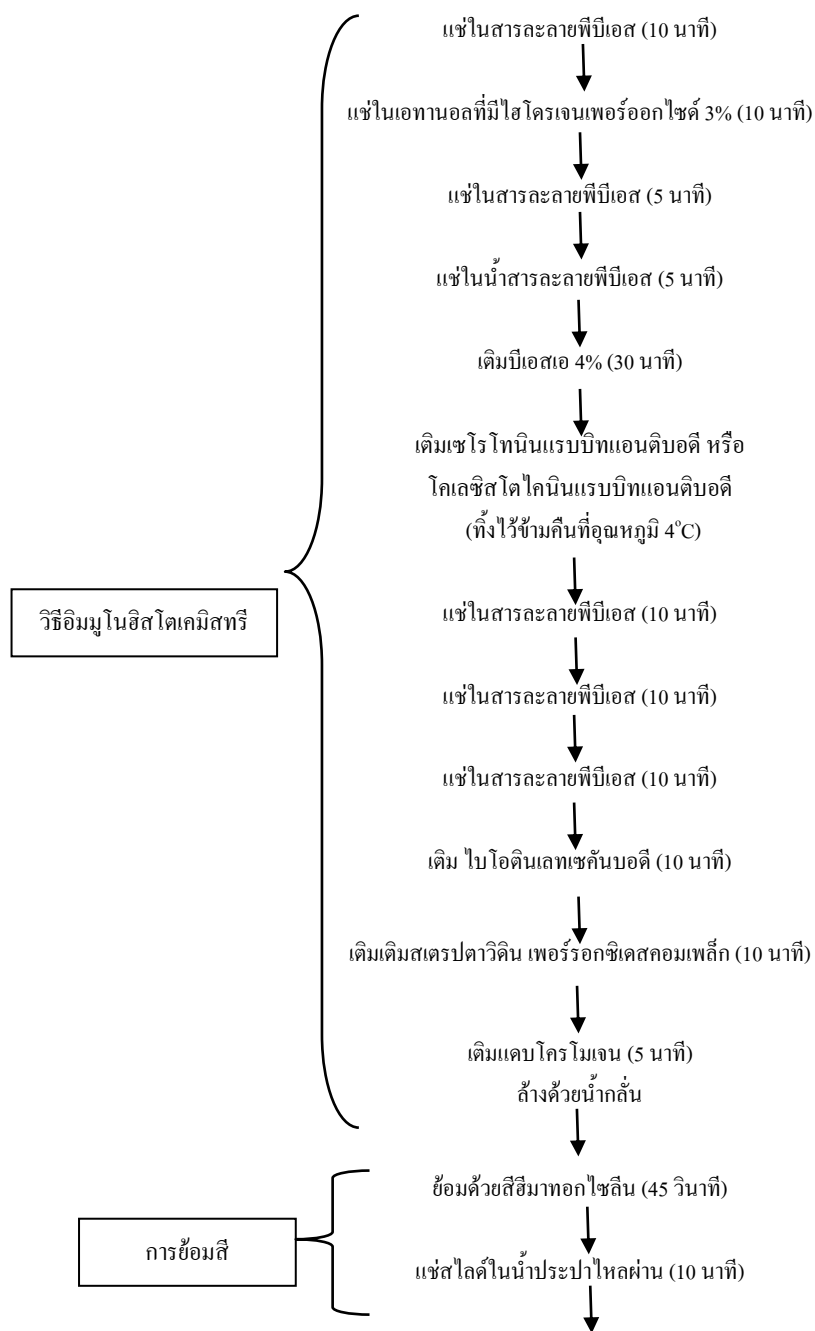
ขั้นตอนการศึกษา ตำแหน่งเซลล์ที่สร้างโคเลสเตโรลโคโคลินโดย ใช้วิธี

อิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี

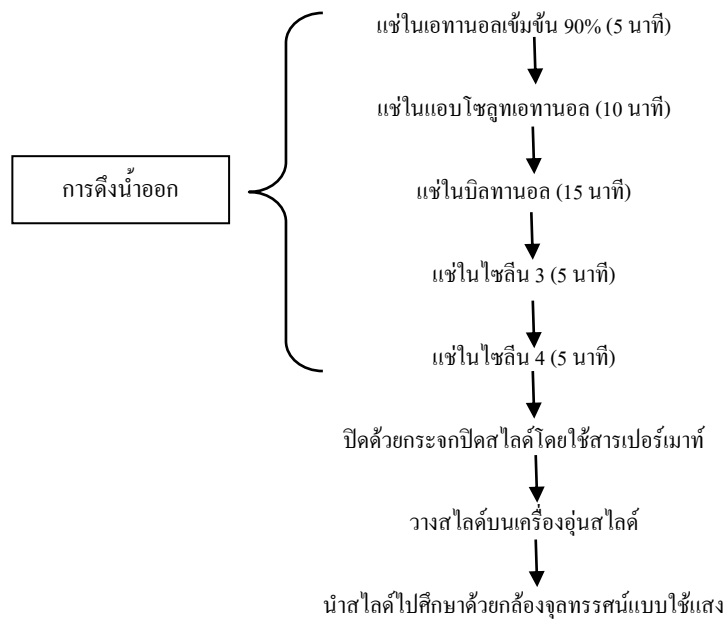
ขั้นตอนการศึกษาตำแหน่งเซลล์ที่สร้างโคเลสเตโรลโคโคลินนั้นทำเหมือนกับขั้นตอนการศึกษาตำแหน่งเซโรโทนินตั้งแต่ขั้นตอนที่ 1 ถึง 2 แต่เปลี่ยนแอนติบอดีตัวที่ 1 เป็นโคเลสเตโรลโคโคลินแรบบิทแอนติบอดี



ภาพที่ 3-3 ขั้นตอนการศึกษาโดยใช้วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี



ภาพที่ 3-3 (ต่อ)



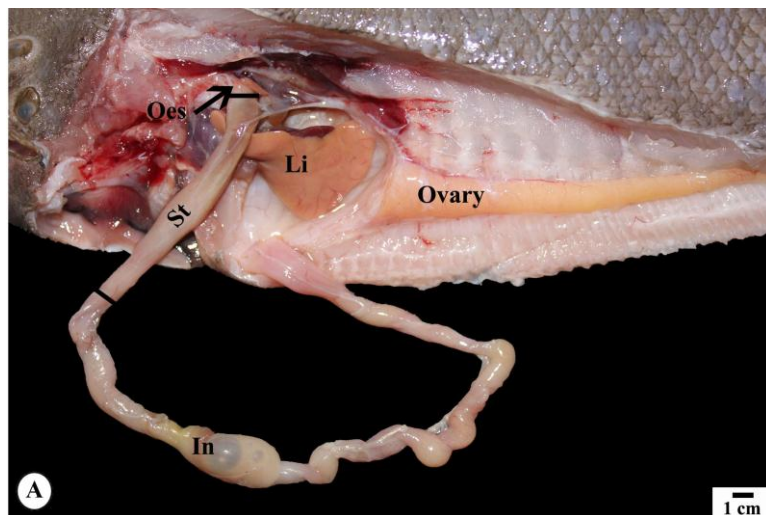
ภาพที่ 3-3 (ต่อ)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

กายวิภาคทางเดินอาหารของปลาลิ้นหมา

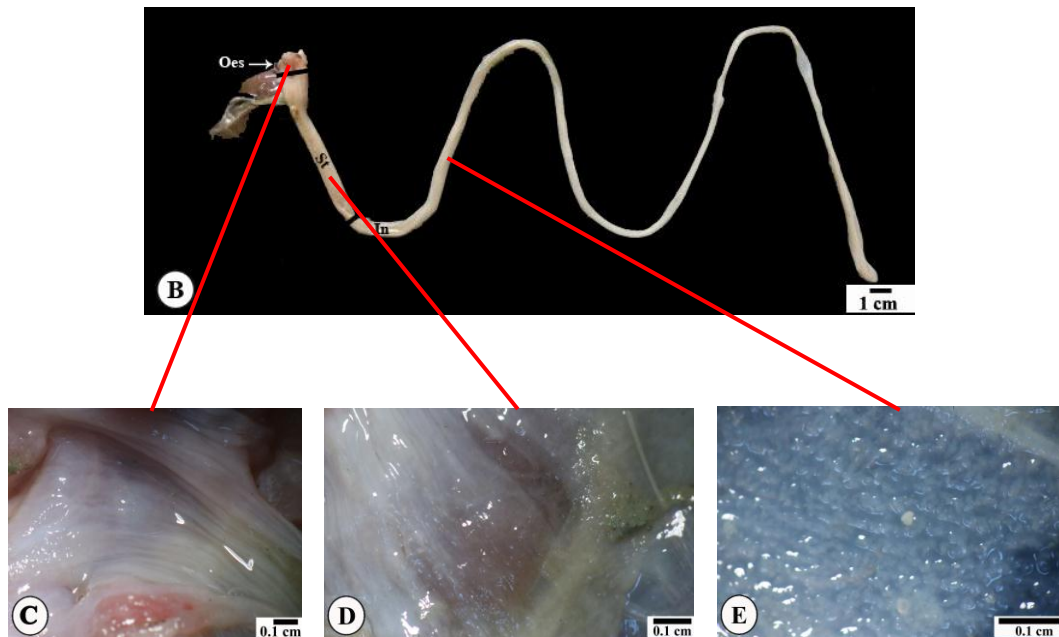
ปลาลิ้นหมามีปากอยู่ทางด้านล่าง หลอดอาหารสั้น ติดกับเพดานปาก กระเพาะอาหารมีลักษณะตรง ลำไส้มีความยาวเท่ากับความยาวลำตัว ลำไส้ขดกันภายในช่องท้องแล้วเปิดออกทางด้านหน้าใกล้กับปาก และไม่พบไส้ตั้ง (ภาพที่ 4-1 A, B) เมื่อผ่าด้านในทางเดินอาหารพบมีวโคซอล โฟล (Mucosal folds) โดยที่หลอดอาหารและกระเพาะอาหารมีวโคซอล โฟลต่ำตามแนวยาว (ภาพที่ 4-1 C, D) ที่ลำไส้พบแนวมีวโคซอล โฟลสูงตามแนวยาว ลักษณะซิกแซก (ภาพที่ 4-1 E)



หมายเหตุ A, B โครงสร้างกายวิภาคทางเดินอาหารปลาลิ้นหมา

- Oes หลอดอาหาร,
- St กระเพาะอาหาร
- In ลำไส้
- Li ตับ

ภาพที่ 4-1 โครงสร้างกายวิภาคทางเดินอาหารปลาลิ้นหมา



- หมายเหตุ C ภาพขยายด้านในหลอดอาหาร
D ภาพขยายด้านในกระเพาะอาหาร
E ภาพขยายด้านในลำไส้

ภาพที่ 4-1 (ต่อ)

โครงสร้างจุลกายวิภาคหลอดอาหาร

ลักษณะโครงสร้างหลอดอาหารของปลาลิ้นหมาล้อมด้วยสี่ฮีมาทอกไซลินและสี่อีโอซิน (ภาพที่ 4-2 A, B) มีมิวโคซอลโฟลต์ค่า โครงสร้างประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 4 ชั้น คือ

1. ชั้นมิวโคซา ประกอบด้วย ชั้นต่าง ๆ ดังนี้

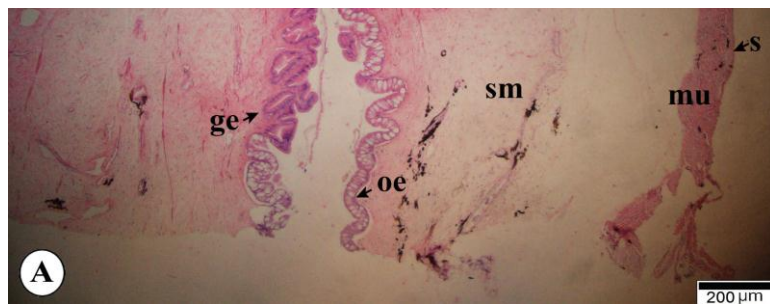
1.1 ชั้นเนื้อเยื่อบุผิว เยื่อบุผิวเป็นชนิดสตราติไฟด์สแควมัส ประกอบด้วยเซลล์รูปร่างแบนเรียงซ้อนกันหลายชั้น (ภาพที่ 4-2 B) และพบเซลล์มีคัส มีรูปร่างทรงไข่ ไฮโทพลาสซึมล้อมไม่ติดสี่อีโอซิน นิวเคลียสรูปร่างกลมแบนพบที่ฐานของเซลล์ เซลล์ชนิดนี้พบจำนวนมาก แทรกระหว่างเซลล์บุผิว (ภาพที่ 4-2 B)

1.2 ชั้นลามินาร์โพรเพรีย (Lamina propria) เป็นชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดแน่น

2. ชั้นซับมิวโคซา ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดแน่น เรียงตัวกันไม่เป็นระเบียบ ชั้นนี้มีรงควัตถุกระจายอยู่ทั่วไป (ภาพที่ 4-2 B)

3. ชั้นกล้ามเนื้อ ประกอบด้วยกล้ามเนื้อลาย (ภาพที่ 4-2 A)

4. ชั้นซีโรซา เป็นชั้นบาง ๆ หุ้มด้านนอกสุด (ภาพที่ 4-2 A)



- หมายเหตุ A ภาพกำลังขยายต่ำ บริเวณที่หลอดอาหารติดกับกระเพาะอาหาร
- ge แสดงเยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร
- oe แสดงเยื่อบุผิวหลอดอาหาร
- sm แสดงชั้นซับมิวโคซา
- mu แสดงชั้นกล้ามเนื้อ
- s แสดงชั้นซีโรซา

ภาพที่ 4-2 โครงสร้างเนื้อเยื่อหลอดอาหารตัดตามยาว (Longitudinal sections)



- หมายเหตุ** B ภาพกำลังขยายสูง โครงสร้างเนื้อเยื่อของหลอดอาหาร
- mc แสดงเซลล์มิวคัส
- sm แสดงชั้นชั้นมิวโคซา
- lp แสดงลามินาร์โพรเพรีย
- mt แสดงรงควัตถุ
- n แสดงนิวเคลียสของเซลล์เมือก
- se แสดงเยื่อบุผิวชนิดสตราติไฟด์สแควมัส
- mf แสดงมิวโคซอลโฟลด์

ภาพที่ 4-2 (ต่อ)

โครงสร้างจุลกายวิภาคของกระเพาะอาหาร

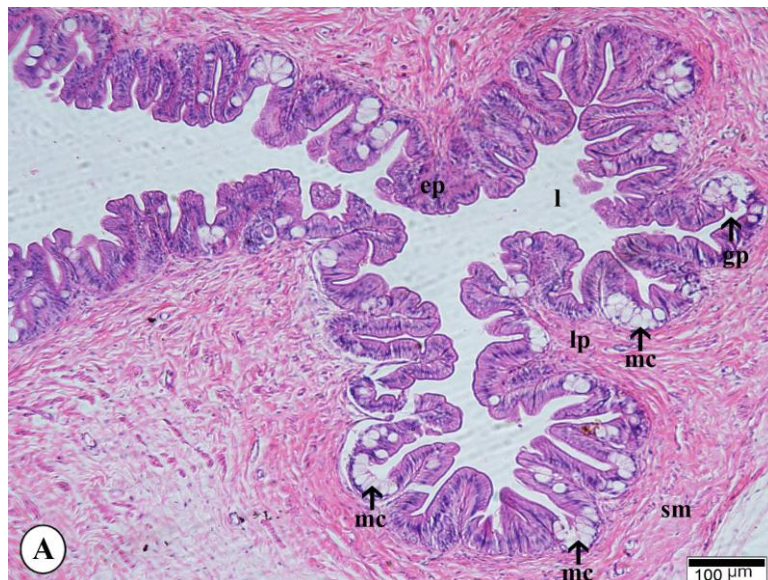
โครงสร้างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของปลาลิ้นหมา เมื่อย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซิน (ภาพที่ 4-3 A-C) ประกอบด้วย 4 ชั้น คือ

1. ชั้นมิวโคซา ซึ่งประกอบด้วย

1.1 ชั้นเนื้อเยื่อบุผิว เยื่อบุผิวชั้นนี้เป็นซิมเปิลคอลัมน์าร์ ประกอบด้วยเซลล์ทรงสูงเรียงเป็นชั้นเดียว นิวเคลียสรูปรีอยู่บริเวณกลางเซลล์ และพบเซลล์มิวคัส รูปร่างเป็นรูปถ้วย โดยพบเซลล์มิวคัสแทรกกระหว่างคอลัมน์าร์ หรือรวมเป็นต่อมและเปิดเข้าแกสตริกพิท และมีเซลล์ออกซินติโคเปปติก (Oxynticopeptic cells) มีรูปร่างลูกบาศก์ นิวเคลียสค่อนข้างกลมอยู่กลางของเซลล์ นอกจากนี้ยังพบเซลล์ชนิดโคลส ไทป์ (Close type) รูปร่างแบน อยู่บริเวณฐานมิวโคซอลโฟลด์

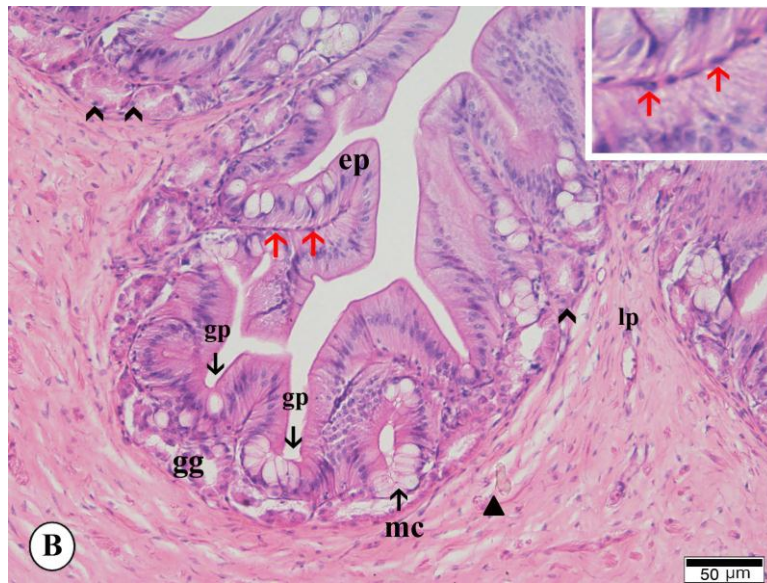
มีมัดกล้ามเนื้อเรียบตามแนวยาว (ภาพที่ 4-3 B)

- 1.2 ชั้นลามินาร์โพรเพรีย เป็นชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดแน่น มีเส้นใยคอลลาเจนจำนวนมากและภายในชั้นนี้ยังพบต่อมชนิดซิมเพิล อาซีนาร์ (Simple acinar) (ภาพที่ 4-3 B)
2. ชั้นซับมิวโคซา ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดแน่น (ภาพที่ 4-3 A)
3. ชั้นกล้ามเนื้อ ประกอบด้วย กล้ามเนื้อเรียบ เรียงกัน 2 ชั้น คือ ชั้นในเรียงตามวงและชั้นนอกเรียงตามยาว พบหลอดเลือดฝอยแทรก ชั้นในหนากว่าชั้นนอกมาก (ภาพที่ 4-3 C)
4. ชั้นซีโรซา พบอยู่ชั้นด้านนอกสุด ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบาง ๆ เหมือนที่พบในหลอดอาหาร (ภาพที่ 4-3 A, C)

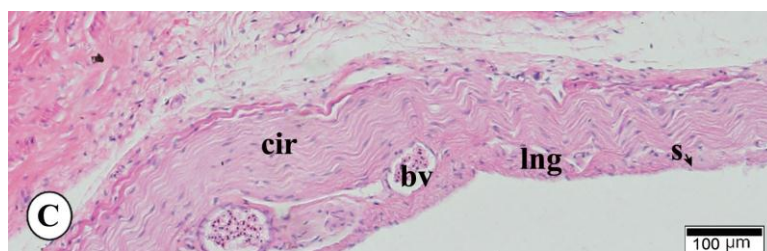


- หมายเหตุ**
- A ภาพกำลังขยายต่ำ โครงสร้างเนื้อเยื่อของกระเพาะอาหาร
 - ep แสดงชั้นเนื้อเยื่อบุผิว
 - sm แสดงชั้นซับมิวโคซา
 - lp แสดงลามินาร์โพรเพรีย
 - l แสดงลูเมน
 - gp แสดงแกสตริกพิท
 - mc แสดงเซลล์มีวคัส

ภาพที่ 4-3 โครงสร้างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารตัดตามขวาง



- หมายเหตุ B ภาพกำลังขยายสูง โครงสร้างเนื้อเยื่อของกระเพาะอาหาร
- ep แสดงชั้นเนื้อเยื่อบุผิว
- lp แสดงลามินาร์โพรเรีย
- mc แสดงเซลล์มีวักัส
- gg แสดงต่อม
- gp แสดงแกสตริกพิท
- ▲ แสดงเซลล์ออกซินติโคเปปติก
- แสดงเซลล์ชนิดโคลอสไทป์
- ▲ แสดงกล้ามเนื้อเรียบ



- หมายเหตุ C ภาพกำลังขยายสูง ชั้นกล้ามเนื้อของกระเพาะอาหาร
- s แสดงชั้นซีโรซา
- cir แสดงชั้นกล้ามเนื้อตามวง
- lng แสดงชั้นกล้ามเนื้อตามยาว
- bv แสดงหลอดเลือด

ภาพที่ 4-3 (ต่อ)

โครงสร้างจุลกายวิภาคของลำไส้

เมื่อศึกษาโครงสร้างเนื้อเยื่อลำไส้พร้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลีนและอีโอซิน พบว่า โครงสร้างลำไส้ของปลาฉลามแบ่งเป็น 2 ส่วน คือลำไส้ส่วนต้นและลำไส้ส่วนปลาย ต่างกันที่ ความยาวของของวิลโล (Villi) ลำไส้ส่วนต้นมีวิลโลยาวกว่าลำไส้ส่วนปลาย (ภาพที่ 4-4 A, B) โครงสร้างเนื้อเยื่อของลำไส้ทั้ง 2 ส่วน แบ่งออกเป็น 4 ชั้น ดังนี้

1. ชั้นมิวโคซา ประกอบด้วย

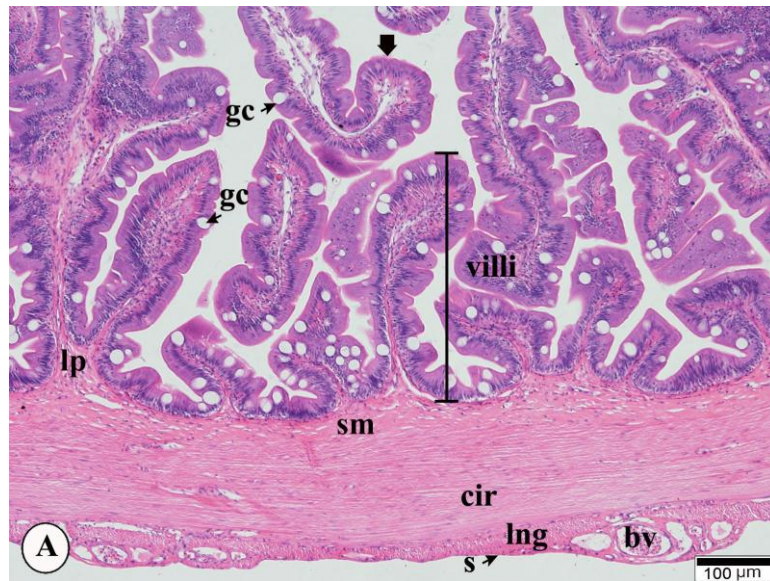
1.1 ชั้นเนื้อเยื่อบุผิว มีลักษณะเป็นสันนูนสูง เรียกว่าวิลโล ซึ่งเซลล์ซิมเพิลคอลลัมน์ (ภาพที่ 4-4 A, B) และพบเซลล์กลอบเบรท เซลล์มีรูปร่างเป็นรูปถ้วย ไซโทพลาสซึมยื่นออกมาติดกับอีโอซิน เซลล์กลอบเบรทกระจายอยู่ระหว่างเซลล์ซิมเพิลคอลลัมน์ ไม่เป็นระเบียบ โดยพบเซลล์กลอบเบรทที่ลำไส้ส่วนปลายปริมาณมากกว่าลำไส้ส่วนต้น (ภาพที่ 4-4 A, B) นอกจากนี้บริเวณด้านบนชั้นมิวโคซาที่ติดกับลูเมนยังพบบริชบอร์เตอร์ด้วย (ภาพที่ 4-4 A, B)

1.2 ชั้นลามินาร์โพรเพรีย เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดแน่นทึบ (ภาพที่ 4-4 A, B)

2. ชั้นซับมิวโคซา เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดแน่นทึบ (ภาพที่ 4-4 A, B)

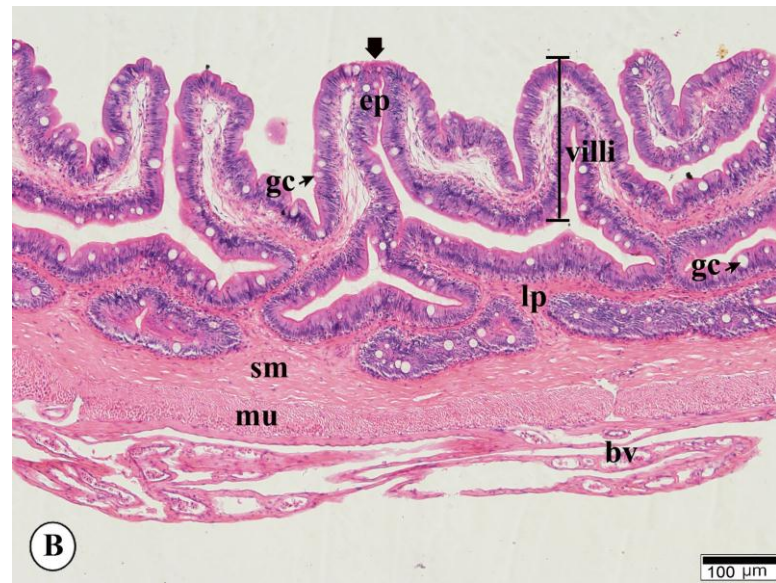
3. ชั้นกล้ามเนื้อ ประกอบด้วยกล้ามเนื้อเรียบ เรียงกัน 2 ชั้น คือ ชั้นในเป็นกล้ามเนื้อตามวงและชั้นนอกเป็นกล้ามเนื้อตามยาว (ภาพที่ 4-4 A)

4. ชั้นซีโรซา เป็นชั้นบาง ๆ ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดโปร่งบาง (ภาพที่ 4-4 A)



- หมายเหตุ A แสดงเนื้อเยื่อลำไส้ส่วนต้นตัดตามขวาง
- sm แสดงชั้นซับมิวโคซา
- s แสดงชั้นซีโรซา
- lp แสดงลามินาร์โพรเพรีย
- cir แสดงชั้นกล้ามเนื้อตามวง
- lng แสดงชั้นกล้ามเนื้อตามยาว
- bv แสดงหลอดเลือด
- gc แสดงเซลล์กลอบเบรท
- ↓ แสดงบริซบอร์เคอร์

ภาพที่ 4-4 โครงสร้างเนื้อเยื่อลำไส้ตัดตามขวาง

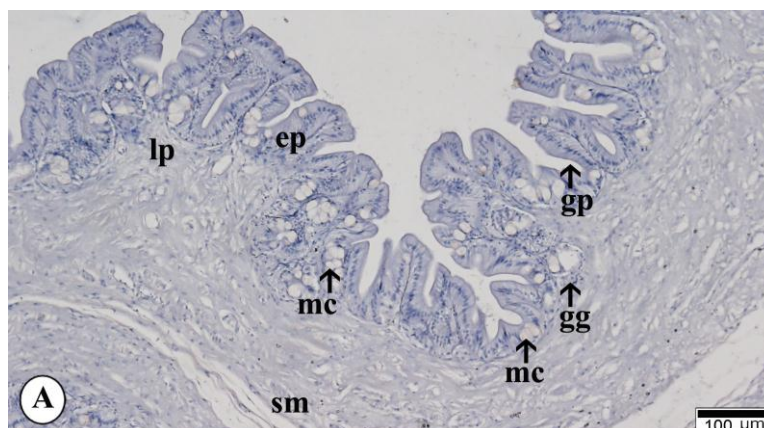


- หมายเหตุ B แสดงเนื้อเยื่อลำไส้ส่วนปลายตัดตามขวาง
- ep แสดงชั้นเนื้อเยื่อบุผิว
- sm แสดงชั้นชั้นมีวโคซา
- mu แสดงชั้นกล้ามเนื้อ
- s แสดงชั้นซีโรซา
- lp แสดงลามินาร์โพรเฟเรีย
- bv แสดงหลอดเลือด
- gc แสดงเซลล์กลอบเบรท
- ↓ แสดงบริซบอร์ดอร์

การตรวจหาตำแหน่งฮอร์โมนโคเลซิสโตโคไนน ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี

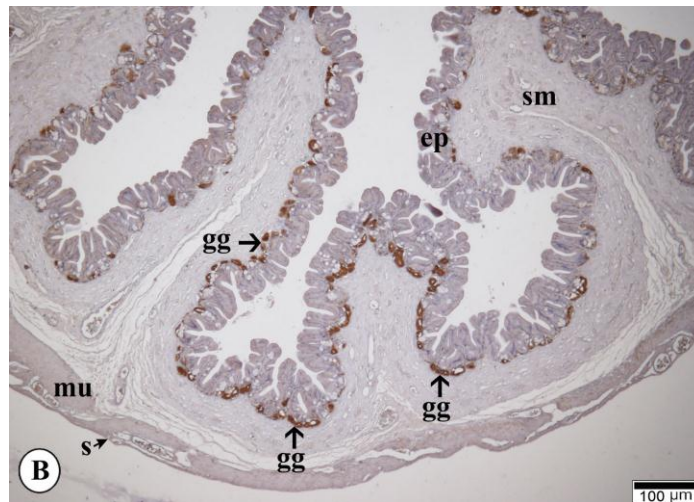
ทางเดินอาหารปลาดิ้นหมาแบ่งเป็นหลอดอาหาร กระเพาะอาหาร และลำไส้ โดยที่หลอดอาหาร ไม่พบตำแหน่งที่สร้างฮอร์โมนโคเลซิสโตโคไนน แต่ตรวจพบตำแหน่งของฮอร์โมนโคเลซิสโตโคไนน ที่กระเพาะและลำไส้ ในกระเพาะอาหารพบการกระจายของฮอร์โมนโคเลซิสโตโคไนน ในชั้นมิวโคซา โดยพบ 2 บริเวณคือ ที่ฐานของมิวโคซอลโฟล เป็นเซลล์ชนิดโคลสโทปี เซลล์รูปร่างแบนขนาดเล็ก (ภาพที่ 4-5 C) ด้านบนไม่ติดกับผิวมิวโคซา นอกจากนี้ฮอร์โมนโคเลซิสโตโคไนน ตรวจพบที่เซลล์ของต่อมในชั้นลามินาร์โพรเพรีย โดยพบกระจายทั่วทั้งต่อมของกระเพาะอาหาร (ภาพที่ 4-5 C)

ในลำไส้พบการกระจายของฮอร์โมนโคเลซิสโตโคไนน ในชั้นมิวโคซา โดยพบที่เซลล์กลอบเบรท เป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างเป็นรูปถ้วย เซลล์เหล่านี้กระจายระหว่างเยื่อบุผิวซิมเพิลคอล์มาร์ และพบการกระจายของฮอร์โมนโคเลซิสโตโคไนน ที่บริชชอร์เตอร์ ของลำไส้ (ภาพที่ 4-6 B)

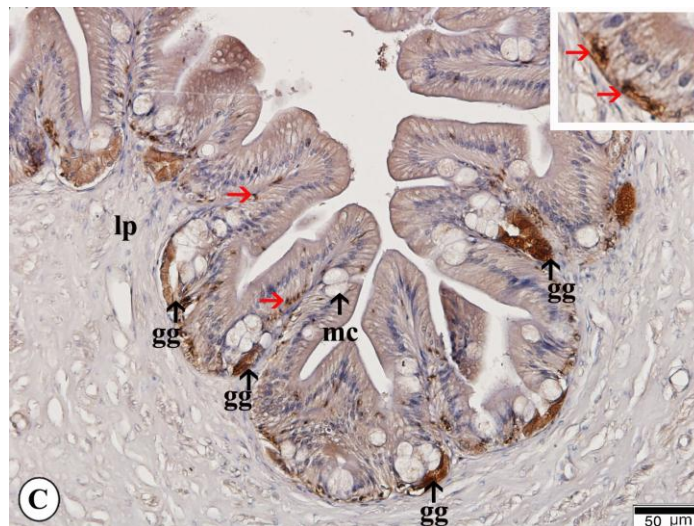


หมายเหตุ	A	ภาพกลุ่มควบคุม
	ep	แสดงชั้นเนื้อเยื่อบุผิว
	sm	แสดงชั้นซับมิวโคซา
	lp	แสดงลามินาร์โพรเพรีย
	gp	แสดงแกสตรีกพิท
	mc	แสดงเซลล์มิวคัส
	gg	แสดงต่อม

ภาพที่ 4-5 ตำแหน่งของโคเลซิสโตโคไนนแอนติบอดีบริเวณกระเพาะอาหาร

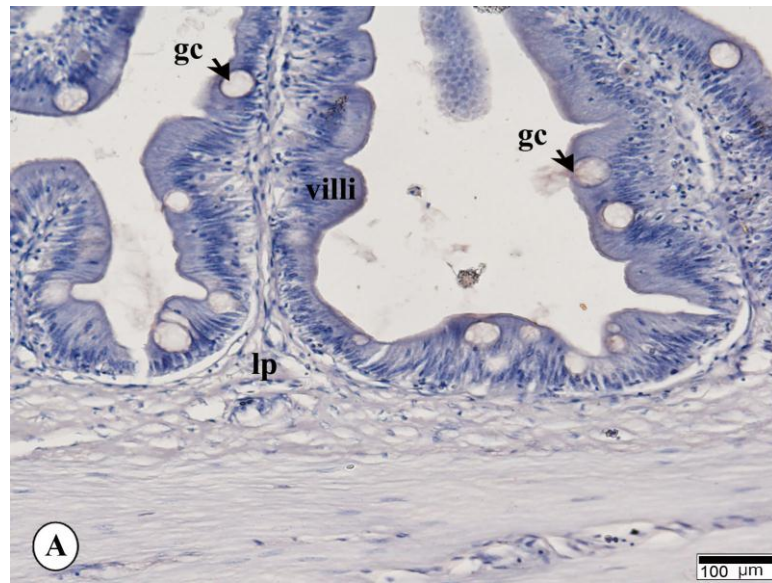


- หมายเหตุ B การติดของโคเลซิสโตไคนินที่บริเวณต่อม
- ep แสดงชั้นเนื้อเยื่อบุผิว
- sm แสดงชั้นซับมิวโคซา
- mu แสดงชั้นกล้ามเนื้อ
- s แสดงชั้นซีโรซา
- gg แสดงต่อม

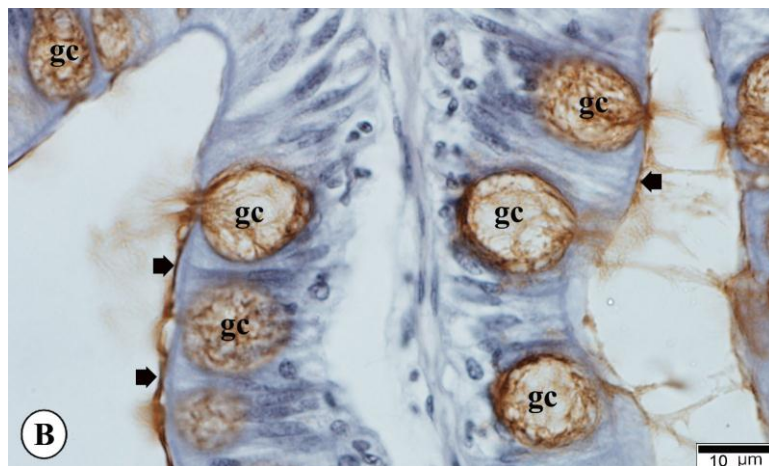


- หมายเหตุ C การติดของโคเลซิสโตไคนินที่บริเวณต่อมและเซลล์โคลสไทป์
- lp แสดงลามินาร์โพรเพรีย
- mc แสดงเซลล์มีวักัส
- gg แสดงต่อม
- แสดงเซลล์ชนิดโคลสไทป์

ภาพที่ 4-5 (ต่อ)



หมายเหตุ A ภาพกลุ่มควบคุม
lp แสดงลามินาร์โพรเพรีย
gc แสดงเซลล์กลอบเบรท



หมายเหตุ B แสดงการติดของโคเลซิสโตไคนินที่เซลล์กลอบเบรท
gc แสดงเซลล์กลอบเบรท
➡ แสดงบริชบอร์ดอร์

ภาพที่ 4-6 ตำแหน่งของโคเลซิสโตไคนินแอนติบอดีบริเวณลำไส้

การตรวจหาตำแหน่งฮอร์โมนเซโรโทนิน ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี

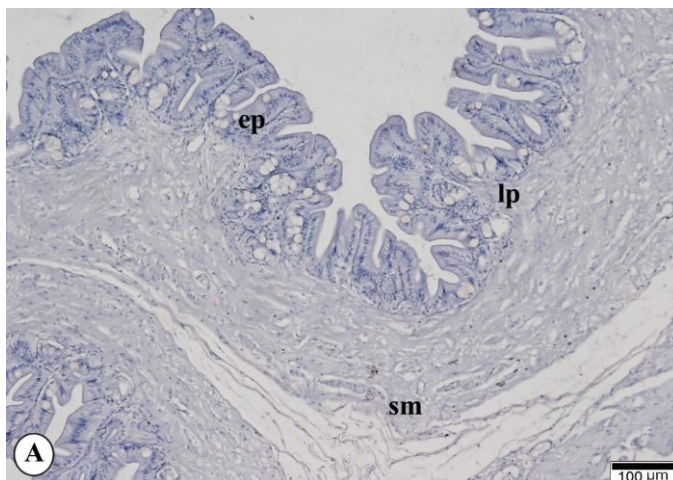
ทางเดินอาหารปลาลิ้นหมาบริเวณหลอดอาหารไม่พบตำแหน่งที่สร้างฮอร์โมนเซโรโทนิน แต่ตรวจพบตำแหน่งของฮอร์โมนเซโรโทนินที่กระเพาะอาหารในชั้นมิวโคซา โดยพบกระจายอยู่ทั่วไปในบริเวณนี้ ซึ่งมีรูปร่าง 2 แบบ คือ รูปร่างปิรามิด โดยแทรกอยู่ในเยื่อผิวซิมเพิลคอลัมน์นาร์ (ภาพที่ 4-7 C) และรูปร่างกลม จัดเป็นเซลล์ชนิดโคลสไทป์ ด้านบนไม่ติดกับผิวของชั้นมิวโคซา พบอยู่บริเวณฐานของชั้นมิวโคซา (ภาพที่ 4-7 B)

ที่ลำไส้พบตำแหน่งฮอร์โมนเซโรโทนิน ที่บริเวณฐานของเซลล์ซิมเพิลคอลัมน์นาร์ (ภาพที่ 4-8 B) โดยลักษณะเซลล์เหมือนกับที่พบบริเวณกระเพาะอาหาร คือชนิด โคลสไทป์ รูปร่างไข่ นอกจากนี้พบตำแหน่งฮอร์โมนเซโรโทนินแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ซิมเพิลคอลัมน์นาร์ โดยเซลล์มีรูปร่างยาว มีรูปร่างคล้ายปิรามิด (ภาพที่ 4-8 B)

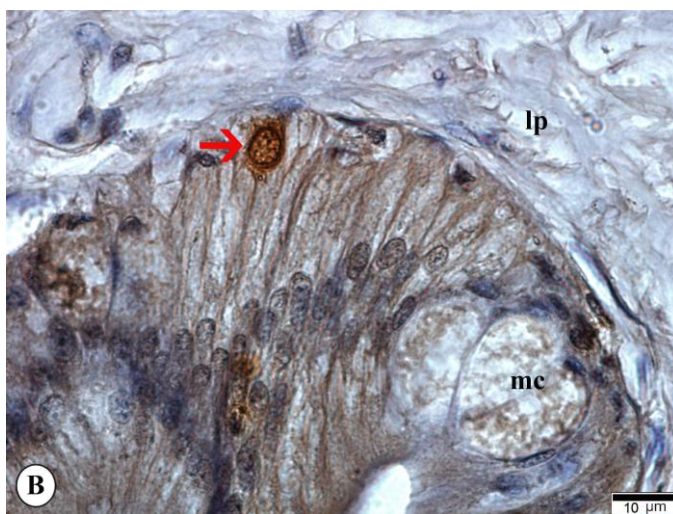
กล่าวโดยสรุปการตรวจหาตำแหน่ง รูปร่างเซลล์ ที่สร้างฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนินและเซโรโทนินในทางเดินอาหารปลาลิ้นหมาสรุปได้ดังตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 สรุปตำแหน่ง รูปร่างเซลล์ ที่สร้างฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนินและเซโรโทนินในทางเดินอาหารปลาลิ้นหมา

	หลอดอาหาร	กระเพาะอาหาร	ลำไส้
โคเลซิสโตไคนิน	ไม่พบ	1. พบที่ฐานของมิวโคซอลโฟล เป็นเซลล์ชนิดโคลสไทป์ 2. พบที่ต่อมในชั้นลามินาร์โพรเพรีย	1. พบที่เซลล์กลอบเบรท 2. พบที่บริชบอร์ดอร์
เซโรโทนิน	ไม่พบ	1. พบในชั้นมิวโคซา รูปร่างปิรามิดแทรกในเยื่อผิว และรูปร่างกลม เป็นเซลล์ชนิดโคลสไทป์ อยู่ที่ฐานชั้นมิวโคซา	เหมือนที่พบในกระเพาะอาหาร

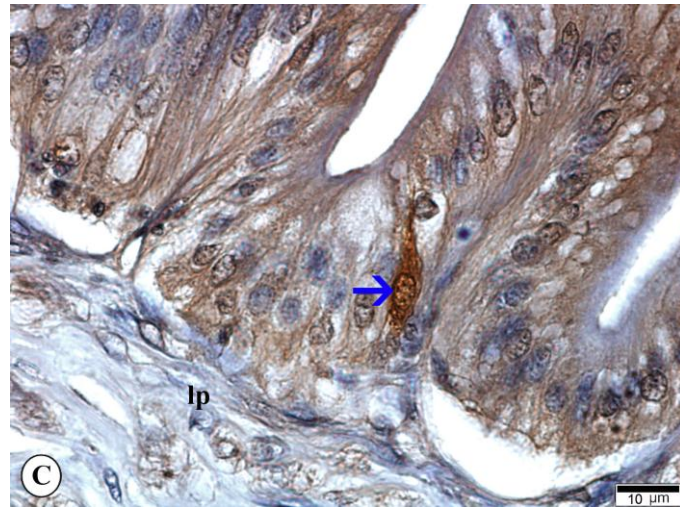


- หมายเหตุ A ภาพกลุ่มควบคุม
- ep แสดงชั้นเนื้อเยื่อบุผิว
- sm แสดงชั้นซับมิวโคซา
- lp แสดงลามินาร์โพรเพรีย



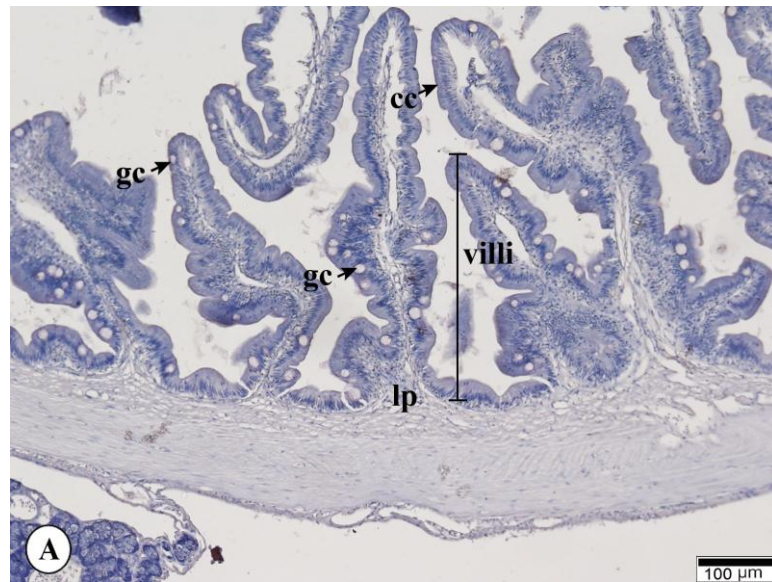
- หมายเหตุ B การติดของเซโรโทนินที่เซลล์ชนิดโคลสท์ไพบ์
- lp แสดงลามินาร์โพรเพรีย
- mc แสดงเซลล์มีวักัส
- แสดงเซลล์ชนิดโคลสท์ไพบ์

ภาพที่ 4-7 ตำแหน่งของเซโรโทนินแอนติบอดีบริเวณกระเพาะอาหาร



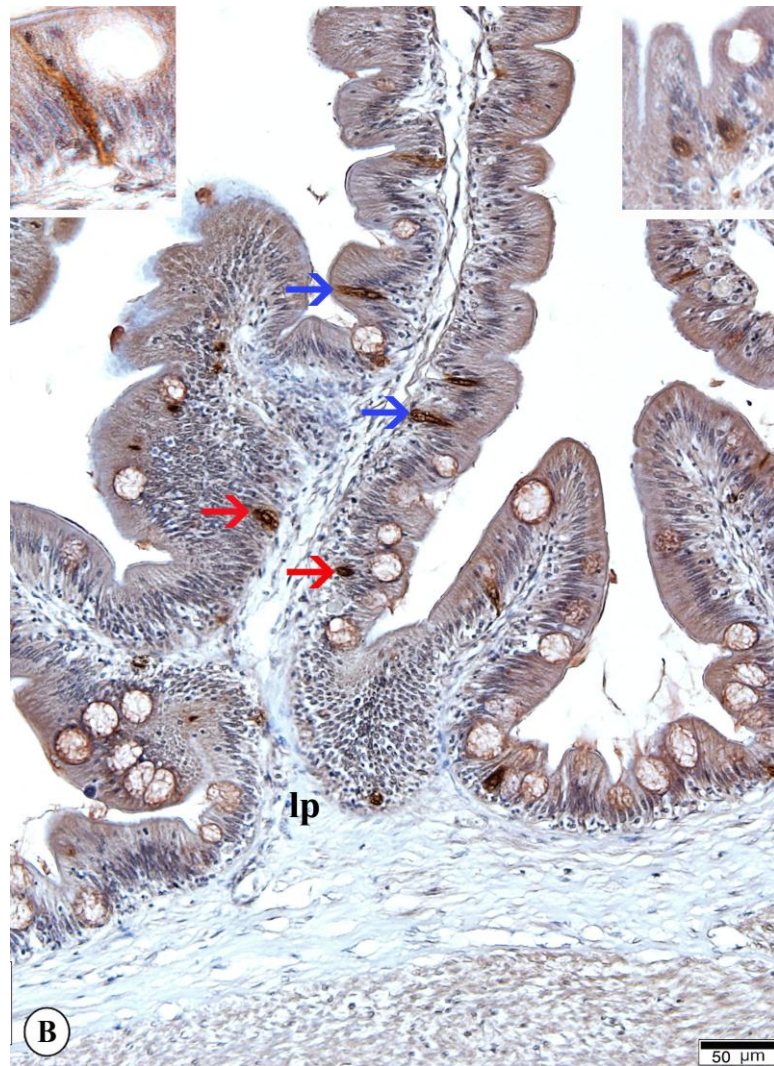
- หมายเหตุ C การติดของเซโรโทนินที่เซลล์รูปร่างคล้ายปิรามิด
lp แสดงลามินาร์โพรเพรีย
➔ แสดงเซลล์รูปร่างคล้ายปิรามิด

ภาพที่ 4-7 (ต่อ)



- หมายเหตุ A ภาพกลุ่มควบคุม
gc แสดงเซลล์กลอบเบรท
cc แสดงเซลล์ซิมเพิลคอตัมนาร์
lp แสดงลามินาร์โพรเพรีย

ภาพที่ 4-8 ตำแหน่งของเซโรโทนินแอนติบอดีบริเวณลำไส้



หมายเหตุ B ภาพขยายแสดงการติดเซโรโทนินที่เซลล์ชนิดโคลสไทป์และเซลล์รูปร่างปิรามิด

lp แสดงลามินาร์โพพรเรีย

→ แสดงเซลล์ชนิดโคลสไทป์

→ แสดงเซลล์รูปร่างคล้ายปิรามิด

ภาพที่ 4-8 (ต่อ)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

โครงสร้างหลอดอาหารของปลาลิ้นหมา

โครงสร้างหลอดอาหารปลาลิ้นหมากลายกับปลาชนิดอื่น เช่น ปลา *L. friderici* และ *L. taeniofasciatus* (Albrecht et al., 2001) ปลา *E. lucius* (Buke, 1971) และปลา *Oreochromis niloticus* (ปลานิล) (Morrison & Wright, 1999) ชั้นมีวโคซา พบเซลล์มีวคัส รูปร่างคล้ายทรงไข่จำนวนมาก แทรกระหว่างเซลล์มีวโคซา ปลาลิ้นหมากินปลาและกุ้งขนาดเล็ก จึงต้องหลังเมือกเพื่อป้องกันการเกิดบาดแผลหรือติดเชื้อที่เยื่อเมือกด้านในของหลอดอาหาร (Ghosh & Chakrabarti, 2015) เมือกช่วยหล่อลื่นหลอดอาหารระหว่างการกลืนอาหาร (Xiong et al., 2011) ชั้นชั้นมีวโคซา ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดแน่นและชั้นนี้มีรงควัตถุกระจายอยู่ทั่วไป ซึ่งคล้ายรงควัตถุที่พบในกระเพาะอาหารของปลาสกุล *Saurida* ซึ่งปลาอาจเกิดความเครียดจากสภาพแวดล้อมที่มีแสงน้อยจึงทำให้มีการผลิต α -MSH (Melanin stimulating hormone) (Thody, 1999) ชั้นกล้ามเนื้อ ประกอบด้วยกล้ามเนื้อลาย ชั้นซีโรซา เป็นชั้นบาง ๆ หุ้มด้านนอกสุด

โครงสร้างกระเพาะอาหารของปลาลิ้นหมา

กระเพาะอาหารของปลาทำหน้าที่เก็บสะสมอาหารและย่อยอาหาร (Stroband & Van Der Veen, 1981) มีรูปร่างแตกต่างกันในปลาแต่ละชนิด เช่น รูปตัวยู หรือ รูปตัวเจ ซึ่งพบในปลาทั่วไป เช่น ปลา *S. knerii* (Santos et al., 2015) ปลา *I. punctatus* (Sis et al., 1979) และปลา *R. quelen* (Hernández et al., 2009b) รูปตัววาย พบในปลา *Anguilla Anguilla* L. (ปลาไหลยุโรป) (Clarke & Whitcomb, 1980) และ รูปร่างตรง พบน้อยมาก เช่น ปลา *E. lucius* (Buke, 1971) ปลา *O. niloticus* (Morrison & Wright, 1999) กระเพาะอาหารของปลาลิ้นหมา มีลักษณะตรง โครงสร้างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของปลาลิ้นหมา ประกอบด้วย 4 ชั้น คือ ชั้นมีวโคซา ชั้นชั้นมีวโคซา ชั้นกล้ามเนื้อ และชั้นซีโรซา เช่นเดียวกับปลาชนิดอื่น กระเพาะอาหารของปลาลิ้นหมาสามารถแบ่งได้ 2 ส่วน คือ ส่วนที่มีต่อมและไม่มีต่อม ในชั้นมีวโคซา พบเซลล์มีวคัส แทรกระหว่างเซลล์ทรงสูง ซึ่งทำหน้าที่หลังเมือกเพื่อปกป้องชั้นมีวโคซา ในกระเพาะอาหาร (Su, Chen, & Chen, 2004) นอกจากนี้ยังช่วยปรับสภาพให้เหมาะสมต่อการดูดซึมกลับสารประเภท ไคแซคคาไรด์และกรดอะมิโนสายสั้น (Hernández et al., 2009b) ชั้นลามินาร์โพเรเรีย พบต่อมซึ่งเป็นชนิดอะไซนาร์ แทรกอยู่ในชั้นนี้จำนวนมาก แต่ละต่อมประกอบด้วยเซลล์เอ็กโซโครัย คือ

เซลล์ออกซินติโคเปปติกมีรูปร่างทรงปิรามิด นิวเคลียสอยู่ที่ฐานของเซลล์ คล้ายกับที่พบใน กระเพาะอาหารปลา *Schilbe mystus* โดยเซลล์ออกซินติโคเปปติกจะหลั่งกรดไฮโดรคลอริกและ เอนไซม์ในกระเพาะอาหาร (Naguib, Shabaka, & Ashour, 2011) ชั้นกล้ามเนื้อ ประกอบด้วย กล้ามเนื้อเรียบ เรียงกัน 2 ชั้น คือ ชั้นในเรียงตามวงและชั้นนอกเรียงตามยาว ชั้นในหนากว่าชั้นนอก เช่นเดียวกับปลา *Monopterus albus* (ปลาไหลบึง) (Dai, Shu, & Fang, 2007) ชั้นกล้ามเนื้อใน กระเพาะอาหารช่วยย่อยอาหารที่อยู่ในกระเพาะให้มีขนาดเล็กลง ก่อนที่จะถูกส่งไปที่ลำไส้ซึ่งคล้าย กับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Xiong et al., 2011)

โครงสร้างลำไส้ของปลาลิ้นหมา

ลำไส้ปลาแต่ละชนิดมีความยาวที่แตกต่างกัน ปลากินสัตว์ลำไส้สั้นที่สุด ปลากินทั้งพืช และสัตว์ความยาวลำไส้ขึ้นอยู่กับสัดส่วนของอาหารที่กิน ปลากินพืชมีลำไส้ยาวเพื่อให้เกิดการย่อย พืชซึ่งเป็นอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตได้นาน (Albrecht et al., 2001) ปลาลิ้นหมาเป็นปลาที่กิน สัตว์จึงมีลำไส้สั้น จากการศึกษาสามารถแบ่งลำไส้เป็น 2 ส่วน คือ ลำไส้ส่วนต้นและส่วนปลาย ตามความยาวของวิลไล โดยลำไส้ส่วนต้นมีความยาวของวิลไลยาวกว่าลำไส้ส่วนปลาย เนื่องจาก ลำไส้ส่วนต้นจะเป็นตำแหน่งที่มีการย่อยและดูดซึมสารอาหารเช่นเดียวกับปลากินสัตว์ชนิดอื่น ๆ (Rodrigues et al., 2009) โครงสร้างลำไส้ของปลาลิ้นหมาเหมือนปลาชนิดอื่น แบ่งออกเป็น 4 ชั้น คือ ชั้นมิวโคซา ประกอบด้วย ชั้นเนื้อเยื่อผิวหนัง ประกอบด้วยเนื้อเยื่อผิวหนังเรียงตัวชั้นเดียว และพบ เซลล์กลอบเบรท เป็นเซลล์เดี่ยวกระจายอยู่ระหว่างเซลล์ผิวหนัง เซลล์กลอบเบรทมีรูปร่างเป็นรูปถ้วย ซึ่งเหมือนเซลล์กลอบเบรทในลำไส้ปลา *Pleuronectes americanus* และปลา *Clarias batrachus* (ปลาดุก) (Scoco, Menghi, & Ceccarelli, 1997) แต่ต่างจากปลา *L. calcarifer* (Purushothaman et al., 2016) ที่เซลล์กลอบเบรทเป็นทรงกระบอก เมื่อกินในลำไส้ช่วยหล่อลื่นลำไส้และช่วยขนส่ง โปรตีน (Kozaric et al., 2007) ในลำไส้ปลาลิ้นหมาพบเซลล์กลอบเบรทในลำไส้ส่วนปลายมากกว่า ลำไส้ส่วนต้น เช่นเดียวกับปลาชนิดอื่น เช่น *L. calcarifer* (Purushothaman et al., 2016) เนื่องจาก เมื่อกินที่ถูกสร้างจะช่วยปกป้องเยื่อผิวหนังลำไส้และช่วยขับอุจจาระ (Machado et al., 2013) นอกจากนี้ เซลล์กลอบเบรทยังพบบริซบอร์เดอร์ โดยบริซบอร์เดอร์ช่วยดูดซึมสารอาหาร

ลักษณะรูปร่างเซลล์ และตำแหน่งเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนิน

จากการศึกษาของ Rodrigues et al. (2009) สามารถแบ่งเซลล์ที่หลังฮอร์โมน เป็น 2 ชนิด คือ เซลล์โอเพ่นไทป์ (Open type) และเซลล์โคลสไทป์ ซึ่งโอเพ่นไทป์ เป็นเซลล์ที่มีด้านบนติดกับผิวของชั้นมีวโคซา จึงถูกกระตุ้นโดยสารเคมีหรือการเปลี่ยนแปลง pH ภายในช่องว่างของทางเดินอาหาร และโคลสไทป์เป็นเซลล์ที่มีด้านบนไม่ติดกับผิวมีวโคซาจึงตอบสนองกับฮอร์โมนในกระแสเลือดหรือการดึงของผิวมีวโคซา ที่เกิดจากการขยายตัวของทางเดินอาหาร เซลล์ที่สร้างฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนิน ในทางเดินอาหารในปลาแต่ละชนิดจะพบแตกต่างกัน ดังตารางที่ 5-1

ตารางที่ 5-1 ตำแหน่งที่พบฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนินในทางเดินอาหารปลา

ชื่อปลา	ตำแหน่งที่พบฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนิน
<i>Amia calva</i>	พบในลำไส้
<i>Lepomis macrochirus</i>	พบในลำไส้
<i>Epinephelus fasciatus</i>	พบในลำไส้
<i>Gadus morhua</i>	พบในลำไส้
<i>Cyprinus carpio</i>	ไม่พบ
<i>R. quelen</i>	พบในลำไส้

เซลล์ที่สร้างฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนิน ในกระเพาะอาหารของปลาลิ้นหมา พบที่บริเวณต่อมและพบบริเวณมีวโคซอลโพล เซลล์มีรูปร่างแบน ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดโคลสไทป์ ยังไม่มีรายงานว่าปลาชนิดใดพบตำแหน่งเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนินที่ต่อมฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนิน บริเวณนี้มีความสำคัญต่อการทำงานของทางเดินอาหารของปลา (Webb et al., 2010) โดยฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนิน ทำหน้าที่กระตุ้นการเคลื่อนไหวแบบเพริสทอลซิส เพื่อผลักดันอาหารไปยังลำไส้ (Ronnestad et al., 2000b, 2007) รวมทั้งมีผลต่อการเคลื่อนไหวของกระเพาะอาหาร (Olsson et al., 1999) แต่ตำแหน่งเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนิน แตกต่างจากปลา *Amia calva* (ปลาโบว์ฟิน), ปลา *Lepomis macrochirus* (ปลากะพงปากกว้าง) (Rajio, Vigna, & Crim, 1988) ปลา *Epinephelus fasciatus* (ปลาเก๋าแดง) (Hur et al., 2013) ที่พบเซลล์ที่สร้างฮอร์โมน CCK เฉพาะในลำไส้ เซลล์ที่สร้างฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนิน ในปลาลิ้นหมานอกจากพบในกระเพาะอาหาร ยังพบเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนิน ที่เซลล์กลอบเบรท ซึ่งจะต้องทำวิจัยต่อไปว่า เซลล์เมือกเกี่ยวข้องกับฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนินอย่างไร นอกจากนี้ยังพบว่า ฮอร์โมน

โคเลซิสโตไคนิน ที่หลั่งออกมาจากเซลล์กอลบเบรท มีรูปร่างเป็นรูปถ้วย และถูกปล่อยออกไปยังช่องว่างของลำไส้จึงพบฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนินบริเวณบรัชบอร์ดอร์ของลำไส้ เซลล์ที่สร้างฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนิน พบในลำไส้เหมือนที่พบในปลาชนิดอื่น เช่น ปลา *Gadus morhua* (ปลาค็อดแอตแลนติก) (Kamisaka et al., 2003) ปลา *R. quelen* (Hernandez et al., 2012) อาหารที่เข้าสู่ลำไส้กระตุ้นให้เซลล์หลั่งฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนิน เข้ากระแสเลือดไปกระตุ้นการหลั่งเอนไซม์จากตับอ่อน กระตุ้นการหดตัวของถุงน้ำดีและกระตุ้นการเคลื่อนไหวของลำไส้แบบเพอริสทอลซิส (Einarsson et al., 1997; Rajjo et al., 1988) แต่ต่างจากปลา *Cyprinus carpio* ที่ทางเดินอาหารไม่พบเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนิน (Pan & Fang, 1993) โดยตำแหน่งที่พบฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนิน มีความแตกต่างกันจะสัมพันธ์กับนิสัยการกินของปลาเพราะฮอร์โมนโคเลซิสโตไคนิน และแกสตรินจะสัมพันธ์โดยตรงกับการสร้างและหลั่งเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยอาหาร (Lee et al., 2004)

ลักษณะรูปร่างเซลล์ และตำแหน่งเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนเซโรโทนิน

ตำแหน่งและปริมาณเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนเซโรโทนินจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของปลา (Lee, Ku, Park, & Lee, 2004) เซลล์ที่สร้างฮอร์โมนเซโรโทนินในทางเดินอาหารปลาแต่ละชนิดจะพบแตกต่างกัน ดังตารางที่ 5-2

ตารางที่ 5-2 ตำแหน่งที่พบฮอร์โมนเซโรโทนินในทางเดินอาหารปลา

ชื่อปลา	ตำแหน่งที่พบฮอร์โมนเซโรโทนิน
<i>Garra rufa</i>	หลอดอาหารและลำไส้
<i>Salmo trutta</i>	กระเพาะอาหาร
<i>Carassius auratus</i>	ไม่พบ
<i>O. hepsetus</i>	ต่อมในกระเพาะอาหาร และลำไส้
<i>I. punctatus</i>	ไมเอ็นเทอริกเพลิกซ์ (Menteric plexus) ที่ลำไส้
Korean aucha perch	ต่อมในกระเพาะอาหาร และลำไส้

จากตารางที่ 5-2 *Carassius auratus* (ปลาทอง) ไม่พบเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนเซโรโทนินในทางเดินอาหาร (Pederzoli et al., 1996) ปลา *Garra rufa* ที่พบบริเวณหลอดอาหารและลำไส้ (Kuru et al., 2010) ปลา *Salmo trutta* พบที่กระเพาะอาหาร (Barrenechea et al., 1994)

ปลา *O. hepsetus* (Danielle et al., 2013) และปลา Korean aucha perch (Lee et al., 2004) พบเซลล์ที่สร้างฮอร์โมน เซโรโทนินในกระเพาะอาหารบริเวณต่อมและชั้นมิวโคซา เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ทางเดินอาหารของปลาลิ้นหมาพบเซลล์สร้างฮอร์โมนเซโรโทนิน ที่กระเพาะอาหารและลำไส้ ซึ่งเหมือนกับปลา *I. punctatus* (He, Wang, & Hang, 2009) โดยที่กระเพาะอาหารพบเซลล์รูปร่าง 2 แบบคือ รูปร่างปิรามิด โดยแทรกอยู่ระหว่างเยื่อบุผิวชั้นเปิดคอลัมน์และรูปร่างกลม พบที่ฐาน ในปลาลิ้นหมาไม่พบเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนเซโรโทนินที่ต่อม ซึ่งต่างจากปลา Korean aucha perch (Lee et al., 2004) และปลา *O. hepsetus* (Danielle et al., 2013) ลักษณะ และรูปร่างเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนเซโรโทนินที่พบในปลาลิ้นหมา จะคล้ายกับปลาชนิดอื่น เช่น ปลา *I. punctatus* (He et al., 2009) โดยหน้าที่หลักของฮอร์โมนเซโรโทนินจะยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารและทำให้กล้ามเนื้อเรียบในทางเดินอาหารบีบตัว (Gyton, 1988) ในลำไส้ ปลาลิ้นหมาพบตำแหน่งฮอร์โมน เซโรโทนินในชั้นมิวโคซาบริเวณฐานเซลล์ชั้นเปิดคอลัมน์ ซึ่งจะเหมือนกับปลาโดยส่วนใหญ่ เช่น ปลา Korean aucha perch (Lee et al., 2004)

ปลา *G. rufa* (Kuru et al., 2010) เป็นต้น แต่จะต่างกับปลา *I. punctatus* (He et al., 2009) ที่พบเซลล์สร้างฮอร์โมนเซโรโทนินบริเวณไมเอ็นเทอติกเพล็กซัสด้วย ลักษณะ และรูปร่างเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนเซโรโทนินที่พบในลำไส้ของปลาลิ้นหมาจะคล้ายกับที่พบในกระเพาะ คือ รูปร่างคล้ายปิรามิด ซึ่งจะเหมือนกับที่พบในปลา *I. punctatus* (He et al., 2009) และปลา *G. rufa* (Kuru et al., 2010) ฮอร์โมนเซโรโทนินช่วยในการเคลื่อนไหวของทางเดินอาหาร (Olsson & Holmgren, 2001) ช่วยการไหลเวียนเลือดเมื่อหลอดเลือดหดตัวในปลา (Egginton, Forster, & Davision, 2001)

สรุปผลการวิจัย

ปลาลิ้นหมา (*S. commersonii*) มีทางเดินอาหารส่วนลำไส้สั้น และมีเซลล์สร้างเมือกตลอดทางเดินอาหาร แสดงถึงการปรับสภาพให้เหมาะสมกับลักษณะอาหารที่กินและช่วยปกป้องทางเดินอาหารตลอดจนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซึมสารอาหารได้ดียิ่งขึ้น ลักษณะของเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนโคเลซิสโตโคนินที่พบ มีความแตกต่างจากกลุ่มปลากระดูกแข็งชนิดอื่น ๆ จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาลักษณะของเซลล์และตำแหน่งของเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนชนิดอื่น ๆ ต่อไป ซึ่งงานวิจัยนี้จะช่วยเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับสรีรวิทยาทางเดินอาหารปลาลิ้นหมาและอาจเป็นข้อมูลพื้นฐานที่ใช้วินิจฉัยโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหารในกลุ่มปลากระดูกแข็งชนิดอื่น ๆ ได้

บรรณานุกรม

- กลุ่มวิชาการ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงทะเล. (ม.ป.ป.). ปลาถิ่นหมาขอบครีบน้ำว. เข้าถึงได้จาก http://www.fisheries.go.th/marine/MTI/%E0%B9%80%E0%B8%A1%E0%B8%A9%E0%B8%B2%E0%B8%A2%E0%B8%99_55.pdf
- พิชญา ณรงค์พงศ์. (2555). *มีนวิทยา (Ichthyology)*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Abowei, J. F. N., & Ekubo, A. T. (2011). Some principles and requirement in fish nutrition. *British Journal of Phamacology and Toxicology*, 2(4), 163-178.
- Albercht, M. P., Ferreira, M. F. N., & Caramasch, E. P. (2001). Anatomical features and histology of the digestive tract of two related neotropical omnivorous fishes (Characiformes; Anostomidae). *Journal of fish biology*, 58, 419-430.
- Bancroft, J. D., & Cook, H. C. (1994). *Manual of histological techniques and their diagnostic application*. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Bancroft, J. D., & Gamble, M. (2008). *Theory and practice of histological techniques*. USA: Elsevier.
- Barrenechea, M., Lopez, J., & Martinez, A. (1994). Regulatory peptides in gastric endocrine cells of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: general distribution and colocalization. *Tissue and Cell*, 26, 309-321.
- Buke, D. (1971). The anatomy and histology of carnivorous fish the poke *Esox lucius* L. *Journal of fish biology*, 31, 421-431.
- Bulmer, J. N., & Johnson, P. M. (1985). Immunohistological characterization of the decidual leucocytic infiltrate related to endometrial gland epithelium in early human pregnancy. *Immunology*, 55, 35-44.
- Clarke, A. J., & Witcomb, D. M. (1980). A study of the digestive tract of the common eel (*Anguilla Anguilla*). *Journal of Fish Biology*, 16, 159-170.
- Danielle, A. V. L., Nadja, L. P., Armando, V., & Francisco, G. A. (2013). Immunohistochemical study of the digestive tract of *Oligosarcus hepsetus*. *World J Gastroenterol*, 19(12), 1919-1929.

- Egginton, S., Forster, M. E., & Davison, W. (2001). Control of vascular tone in notothenioid fishes is determined by phylogeny not environmental temperature. *Am J physiol Regul Integr Comp Physiol*, 280, R1197-R1205.
- Einarsson, S., Davies, P. S., & Talbot, C. (1997). Effect of exogenous cholecystokinin on the discharge of the gallbladder and secretin of trypsin and chymotrypsin from pancreas of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 117, 63-67.
- Facciola, C. K., Renata, A. C., & Antônio, C. A. (2014). Morphology and histochemistry of the digestive tract in carnivorous freshwater *Hemisorubim platyrhynchos* (Siluriformes: Pimelodidae). *Micron*, 64, 1019.
- Ghosh, S. K., & Chakrabarti, P. (2015). Histological and histochemical characterization on stomach of *Mystus carasius* (Hamilton), *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) and *Guadusia chapra* (Hamilton): Comparative study. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 70, 16-24.
- He, M., Wang, K., & Zhang, Y. (2009). Immunocytochemical Identification and Localization of Diffuse Neuroendocrine System (DNES) Cells in Gastrointestinal Tract of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). *Agricultural Sciences in China*, 8(2), 238-243.
- Hernández, D. R., Gianeselli, M. P., & Domitrovic, H. A. (2009b). Morphology, histology and histochemistry of the digestive system of South American catfish (*Rhamdia quelen*). *International Journal Molecular Science*, 27, 105-111.
- Hernandez, D. R., Vigliano, F. A., Sanchez, S., Bermudez, R., Domitrovic, H. A., & Quiroga, M. I. (2012). Neuroendocrine system of the digestive tract in *Rhamdia quelen* juvenile: an immunohistochemical study. *Tissue cell*, 44, 220-226.
- Humanson, L.G. (1972). *Animal tissue technique*. USA: W. H. Freeman and company.
- Hur, S. W., Lee, C. H., Lee, S. H., Kim, B. H., Kim, H. B., & Baek, H. J. (2013). Characterization of Cholecystokinin-producing cells and mucus-secreting goblet cells in the blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus*. *Tissue and cell*, 45, 153-157.

- Kamisaka, Y., Fujii, Y., Yamamoto, S., Kurokawa, T., Rønnestad, I., Toland, G. K., Tagawa, M., & Tanaka, M. (2003). Distribution of cholecystokinin-immunoreactive cells in the digestive tract of the larval teleost, ayu. *Plecoglossus altivelis*. *General and Comparative Endocrinology*, 134, 116-121.
- Kapoor, B.G., Smith, H., & Verighina, I. A. (1975). The alimentary canal and digestion in teleosts. *Advances in Marine Biology*, 13, 109-211.
- Kozaric, Z., Kužir, S., Petrinc, Z., Gjurcevic, E., & Baturina, N. (2007). Histochemistry of complex glycoproteins in the digestive tract mucosa of Atlantic blue fin tuna (*Thunnus thynnus* L.). *Veterin Arski Arhiv*, 5, 441-452.
- Kenan, C., Nurgal, S., & Rust, O. M. (2006). Immunohistochemical study on distribution of endocrine cells in gastrointestinal tract of flower fish (*Pseudophoxinus antalyase*). *World Journal of Gastroenterology*, 12(42), 6874-6878.
- Kuru, N., Cinar, K., Senol, N., Demirbag, E., & Diler, D. (2010). Endocrine Cells in the Gastrointestinal Tract of *Garra rufa*. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 235-241.
- Ku, S. K., Lee, J. H., & Lee, H. S. (2004). Immunohistochemical study on the endocrine cells in the gut of stomachless teleost, Zacco platypus (Cyprinidae). *Anat Histol*, 33, 212-219.
- Lee, J. H., Ku, S. K., Park, K. D., & Lee, H. S. (2004). Immunohistochemical study of the gastrointestinal endocrine cells in the Korean aucha perch. *Journal of Fish Biology*, 65, 170-181.
- Marchado, M. R. F., Souza, H. O., Souza, V. L., Azevedo, A., Goitein, R., & Nobre, A. D. (2013). Morphological and anatomical characterization of the digestive tract of *Centropomus parallelus* and *C. undecimalis*. *Acta Scientiarum*, 4, 467-474.
- Matkowskyj, K. A., Schonfeld, D., & Benya, R. V. (2000). Quantitative Immunohistochemistry by measuring cumulative signal strength using commercially available software Photoshop and Matlab. *J Histochem Cytochem*, 48, 303-311.
- Morrison, C. M., & Wright, J. R. (1999). A study of the histology of the digestive tract of the Nile tilapia. *Journal of fish biology*, 54, 597-606.
- Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. (2008). *Janeway's Immunobiology* (7th ed.). New York: Garland Science, Taylor and Francis Group.

- Murry, H. M., Wright, G. M., & Goff, G. P. (1996). A comparative histological and histochemical study of the post-gastric alimentary canal from three species of pleurobectids, the Atlantic halibut, the yellowtail flounder and the winter flounder. *Journal of fish biology*, 48, 187-206.
- Naguib, S. A. A., EI-Shabaka, H. A., & Ashour, F. (2011). Comparative Histological and Ultrastructural Studies on the Stomach of *Schilbe mystus* and the Intestinal Swelling of *Labeo niloticus*. *Journal of American Science*, 7, 251-262.
- Neuhau, H. M., Van Der Marel, N., Caspari, W., Meyer, M. L., & Steinhagen, D. (2007). Biochemical and histochemical study on the intestinal mucosa of the common carp *Cyprinus carpio* L., with special consideration of mucin glycoproteins. *Journal of fish biology*, 70, 1523-1534.
- Olsson, C., Aldman, G., Larsson, A., & Holmgren, S. (1999). Cgolecystokinin affects gastric emptying and stomach motility in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *The Journal of Experimental Biology*, 202, 161-170.
- Olsson, C., & Holmgren, S. (2001). The control of gut motility. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 128, 481-483.
- Pan, Q. S., & Fang, Z. P. (1993). An immunocytochemical study of endocrine cells in the gut of a stomachless teleost fish, grass carp, Cyprinidae. *Cell Transplantation*, 2, 419-427.
- Pathology Research 2013*. (n.d.). Retrieved from <http://www.wako-chem.co.jp/english/labchem/journals/pathology2013/index.html>
- PhotoChemCAD Chemicals*. (n.d.). Retrieved from <http://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/>
- Pongcharoen, S., Bukmer, J. N., & Searle, R. F. (2004). No evidence for apoptosis of decidual leucocytes in normal and molar pregnancy: implications for immune privilege. *Clin Exp Immunol*, 138, 330-336.
- Protocol*. (n.d.). Retrieved from <http://ihcgroup2.wikispaces.com/Protocol>
- Purushothaman, K., Lau, D., Saju, J. M., Lunny, D. P., Vij, S., & Orban, L. (2016). Morpho-histological characterization of the alimentary canal of an important food fish, Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Pearl J.*, 4, e2377.

- Rajio, I. M., Vigna, S. R., & Crim, J. W. (1988). Cholecystokinin immunoreactivity in the digestive tract of bowfin (*Amia calva*), bluegill (*Lepomis macrochirus*), and bullfrog (*Rana catesbeiana*). *General and Comparative Endocrinology*, 70, 133-144.
- Rodrigues, A. P. O., Pauletti, P., Kindlein, L., Cyrino, J. E. P., Delgado, E. F., & Machado-Neto, R. (2009). Intestinal morphology and histology of the striped catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766) fed dry diets. *Aquacult Nutr*, 15, 559-563.
- Rønnestad, I., Rojas-Garcia, C. R., & Skadal, J. (2000b). Retrograde peristalsis, a possible mechanism for filling the pyloric caecae. *Journal of fish biology*, 56, 216-218.
- Rønnestad, I., Kamisaka, Y., Conceição, L. E. C., Morais, S., & Tonheim, S. K. (2007). Digestive physiology of marine fish leave: hormonal control and processing capacity for protein, peptides and amino acids. *Aquaculture*, 268, 82-97.
- Santos, M., Arantes, F. P., Santiago, K. B., & Dos Santos, J. E. (2015). Morphological characteristics of the digestive tract of *Schizodon knerii* (Steindachner, 1875), (Characiformes: Anostomidae): An anatomical, histological and histochemical study. *Annals of the Brazilian Academy of Science*, 87(2), 867-878.
- Scocco, P., Menghi, G., & Ceccarelli, P. (1997). Histochemical differentiation of glycoconjugates occurring in the tilapine intestine. *Journal of fish biology*, 51, 848-857.
- Silva, M. R., Natal, M. R. M., & Hahn, N. S. (2012). Histology of the digestive tract of *Satanoperca pappaterra* (Osteichthyes, Cichlidae). *Acta Scientiarum*, 34, 319-326.
- Sis, R. F., Ives, P. J., Jones, D. M., Lewis, D. H., & Haensly, W. E. (1979). The microscopic anatomy of the oesophagus, stomach and intestine of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of fish biology*, 14, 179-186.
- Su, Z., Chen, X. W., & Chen, Q. S. (2004). Ultrastructure of mucous membrane and glandular epithelium of in soft-shelled turtle, *Trionyx sinensis*. *Journal Nanjong Aric. Univ*, 27, 139-141.
- Tagliaferro, G., Farina, L., Faraldi, G., Rossi, G. G., & Vacchi, M. (1989). Distribution of somatostatin and glucagon immunoreactive cells in the gastric mucosa of some cartilaginous fishes. *General and Comparative Endocrinology*, 75, 1-9.

- Thody, A. J. (1999). Alpha-MSH and the regulation of melanocyte function. *PubMed*, 885, 217-229.
- Webb, K. A., Khan, I. A., Nunez, B. S., Rønnestad, I., & Holt, G. J. (2010). Cholecystokinin: molecular cloning and immunohistochemical localization in the gastrointestinal tract of larval red drum, *Sciaenops ocellatus* (L). *General and Comparative Endocrinology*, 166, 152-159.
- Wongweragiat (Pongcharoen), S., Searle, R. F., & Bulmer, J. N. (2001). Expression of Fas/Fas ligand by decidual leucocytes in hydatidiform mole. *Biol Reprod*, 64, 784-789.
- Xiong, D., Zhang, L., Yu, H., Xie, C., Kong, Y., Zeng, Y., Hua, B., & Liu, Z. (2011). A study of morphology and histology of the alimentary tract of *Glyptosternum maculatum* (Sisoridae, Siluriformes). *Acta Zoologica (Stockholm)*, 92, 161-169.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารละลาย

การเตรียมสารเคมี**อีมาทอกไซลีน (50 ml)****Stock I**

Aluminium potassium sulfate (alum)	0.5 g
Distilled water	50 ml
Mixture, heat 80 °C	

Stock II

Absolute alcohol	5 ml
Haematoxylin	0.5 g
Sodium Iodate	0.1 g
Glacial acetic acid	4 ml

1. ละลาย Haematoxylin ใน Absolute alcohol (Stock II)
2. ละลาย Aluminium potassium sulfate ในน้ำอุ่น (Stock I)
3. ผสม Stock I และ Stock II เข้าด้วยกันจากนั้นต้มให้เดือดอย่างรวดเร็ว
4. ค่อย ๆ เติม Sodium Iodate ลงในสารละลายที่ได้
5. นำสารละลายที่ได้ในข้อ 2. แช่ในน้ำแข็ง
6. เมื่อสารละลายเย็นจึงเติม Glacial acetic acid

อีโอซิน (100 ml)

Eosin Yellowish	0.5 g
70% ethanol alcohol	100 ml
Glacial acetic acid	5 ml

การเตรียมสารเพื่อคงสภาพเนื้อเยื่อ**สารละลายบูอง (Bouin's fluid)**

สารละลายอิมตัวของกรดพิคริกในน้ำ	75 ml
ฟอร์มาลิน	25 ml
กรดแอซีติกกลั่น	5 ml

1. ชั่งกรดพิคริก จำนวน 1.2 g ละลายในน้ำ 100 ml
2. คนให้ละลาย ตวงมาใช้เพียง 75 ml
3. เติมฟอร์มัลลิน จำนวน 25 ml และกรดแอสติกลั่น จำนวน 5 ml ลงไปตามลำดับ