บทที่ 5
วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

การทดลองที่ 1 การเสริมอาหารด้วยไคโตซาน เข้มข้นร้อยละ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 ของน้ำหนักอาหาร ต่อการเจริญเติบโตและระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลากะพงขาว

1.1 ด้านการเจริญเติบโตของปลากะพงขาว

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า น้ำหนักเฉลี่ยของปลากะพงขาวที่ได้รับการเสริมไคโตซานปริมาณร้อยละ 0.5, 1.0 และ 1.5 ของน้ำหนักอาหาร เป็นเวลา 47 วัน ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Cha et al. (2008) ซึ่งพบว่าปลา Olive flounder (*P. olivaceus*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเคลือบไคโตซานเข้มข้นร้อยละ 1.0 ของน้ำหนักอาหาร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ มีน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้ายไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ในขณะที่การเสริมไคโตซานปริมาณร้อยละ 1.0 ของน้ำหนักอาหาร เป็นเวลา 45-90 วัน ทำให้น้ำหนักสุดท้ายของปลาคาร์พ (*C. carpio*) เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (Gopalakannan & Arul, 2006) สำหรับการศึกษาผลของไคโตซานที่มีต่อพารามิเตอร์ด้านการเจริญเติบโตของปลาแต่ละชนิดนั้นพบว่าแตกต่างกันไป กล่าวคือ ผลการศึกษาในปลากะพงขาวครั้งนี้พบว่า ADG, WGR, SGR และ FCR ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ซึ่งขัดแย้งกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ของอนวัช บุญญภักดี และคณะ (2550) ที่พบว่าเมื่อทดลองเสริมไคโตซานปริมาณร้อยละ 0.04 ของน้ำหนักอาหาร เลี้ยงปลาคาร์พ (*C. carpio*) นาน 45 วัน ทำให้ ADG เพิ่มขึ้นและ FCR ลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) ขณะเดียวกันผลการศึกษาในปลา Red sea bream (*Pagrus major*), Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*), Japanese eel (*Anguilla japonica*) และปลานิลกลับให้ผลตรงกันข้าม โดยพบว่าการเสริมไคโตซานในอาหารปริมาณร้อยละ 10.0 ของน้ำหนักอาหารให้กับปลา Red sea bream, Yellowtail และ Japanese eel เป็นเวลา 30 วัน มีผลให้ WGR ลดลง (Kono et al., 1987) สอดคล้องกับการศึกษาของ Shiau and Yu (1999) ซึ่งพบว่าเมื่อเสริมไคโตซานในอาหารปริมาณร้อยละ 2.0, 5.0 และ10.0 ของน้ำหนักอาหาร ใช้เลี้ยงปลานิล (*O. niloticus* x *O. aureus*) นาน 8 สัปดาห์ มีผลให้ค่า WGR ลดลงและ FCR เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และผลการศึกษาของ Saensawath et al. (2009) ซึ่งพบว่าการเสริมไคโตซานในอาหารเลี้ยงปลานิล (*O. niloticus*) ปริมาณร้อยละ 1.5 และ 2.0 ของน้ำหนักอาหาร นาน 12 สัปดาห์ ทำให้

SGR ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ข้อมูลบ่งชี้ถึงผลของการเสริมไคโตซานจะมีต่อการเจริญเติบโตหรือไม่ขึ้นอยู่กับชนิดของปลาในกลุ่มปลากินพืชและปลากินเนื้อ

ปลาบางชนิด เช่น Red sea bream, Yellowtail และ Japanese eel ไม่มีเอนไซม์ Chitosanase ในกระเพาะอาหาร จึงทำให้ปลาเหล่านี้ไม่สามารถย่อยและดูดซึมไคโตซานที่เสริมในอาหารได้ (Kono et al., 1987) อย่างไรก็ดี ไคโตซานสามารถช่วยเพิ่มการดูดซึมสารอาหารทางลำไส้ได้โดยเพิ่ม Permeability ของเซลล์เยื่อบุลำไส้ (Artursson et al., 1994; Kotzé et al., 1998) การเสริมไคโตซานในอาหารยังมีผลกระทบโดยตรงต่อการย่อยและการดูดซึมไขมันของปลาบางชนิด เช่น ปลานิล โดยไคโตซานในอาหารจะลดการย่อยและดูดซึมไขมันในทางเดินอาหาร ทำให้ไขมันสะสมในตัวปลาได้น้อยและส่งผลให้น้ำหนักปลาลดลง (Hirano et al., 1990; Muzzarelli, 1996; Shiau & Yu, 1999) ดังนั้น การเสริมไคโตซานเพื่อเร่งการเจริญเติบโตของปลาจึงต้องพิจารณาเสริมไคโตซานในปริมาณที่เหมาะสมให้กับปลาแต่ละชนิด

1.2 ด้านภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลากะพงขาว

1.2.1 ปริมาณเม็ดเลือดขาวรวมในเลือด

ผลของการเสริมไคโตซานในอาหารต่อการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดขาวรวมของปลาแต่ละชนิดพบว่าให้ผลแตกต่างกันไป โดยการศึกษาของ Siwicki et al. (1994) พบว่าจำนวนเม็ดเลือดขาวรวมในเลือดของปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) ที่ได้รับการเสริมอาหารด้วยไคโตซานร้อยละ 0.5 ของน้ำหนักอาหาร นาน 1 สัปดาห์ ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) สอดคล้องกับการศึกษาของ Gopalakannan and Arul (2006) ซึ่งพบว่า จำนวนเม็ดเลือดขาวรวมในเลือดของปลาคาร์พ (*C. carpio*) ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเสริมไคโตซานปริมาณร้อยละ 1.0 ของน้ำหนักอาหาร เป็นเวลา 30-90 วัน สำหรับผลการทดลองครั้งนี้พบว่าปลากะพงขาวกลุ่มที่เสริมไคโตซานในปริมาณร้อยละ 1.5 ของน้ำหนักอาหาร เป็นเวลา 26 และ 36 วัน มีปริมาณเม็ดเลือดรวมในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่การเสริมไคโตซานปริมาณร้อยละ 0.5-2.0 ของน้ำหนักอาหาร เลี้ยงปลานิล (*O. niloticus*) นาน 6 สัปดาห์ขึ้นไป พบว่าจำนวน Phagocyte ในตับมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามปริมาณและระยะเวลาที่เสริมไคโตซาน (Saensawath et al., 2009) จึงเป็นไปได้ว่า การเสริมไคโตซานปริมาณร้อยละ 1.5-2 ของน้ำหนักอาหาร เป็นเวลานานอาจทำให้จำนวนเม็ดขาวรวมในเลือดลดลงแต่กลับเพิ่มการสะสมเม็ดเลือดขาวไปที่เนื้อเยื่อแทน

ความเครียดที่เกิดจากการจับบังคับหรือลำเลียงมีผลให้เม็ดเลือดขาวรวมของปลาบางชนิดเพิ่มสูงขึ้นหรือไม่เปลี่ยนแปลงเลยก็ได้ (Gbore et al., 2006) สำหรับปริมาณเม็ดเลือดขาวรวมในเลือดของปลากะพงขาวที่เพิ่มสูงขึ้นในทุกชุดการทดลอง ณ วันที่ 26 และ 36 ของการทดลอง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

นั้น อาจเป็นการตอบสนองทางสรีรวิทยาของปลากะพงขาวต่อสภาพการเลี้ยงและการจับบังคับในการทดลอง สอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ของ Sasmita (2009) ซึ่งพบว่า จำนวนเม็ดเลือดขาวรวมในเลือดของปลากะพงขาวกลุ่มควบคุมเพิ่มสูงขึ้นในช่วงวันที่ 7 ถึง 35 ของการทดลองเช่นกัน

เห็นได้ว่า ปลาแต่ละชนิดตอบสนองต่อการเสริมไคโตซานในอาหารโดยมีผลต่อจำนวนเม็ดเลือดขาวรวมในเลือดหรือเนื้อเยื่อต่างกันไป ดังนั้น การใช้จำนวนเม็ดเลือดขาวรวมเป็นตัวชี้วัดทางภูมิคุ้มกันสำหรับการศึกษาในอนาคตนั้น ควรติดตามและพิจารณาจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งที่อยู่ในเลือดและในเนื้อเยื่ออื่น ๆ เช่น ตับ ม้าม ไตส่วนหน้า เป็นต้น ควบคู่กันไปซึ่งเชื่อว่าน่าจะให้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันปลากะพงขาวในความเป็นจริงมากที่สุด

1.2.2 ชนิดของเม็ดเลือดขาวที่พบ

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte (SL และ LL) นั้นมีมากที่สุด ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วย SL รองลงมาได้แก่ Neutrophil (N) และ Monocyte (M) ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาองค์ประกอบเลือดปกติในปลากะพงขาวโดย Supamataya et al. (1987) สำหรับการเสริมไคโตซานในอาหารเลี้ยงปลากะพงขาวพบว่ามีผลต่อสัดส่วนของ SL และ LL ในประชากรเม็ดเลือดขาวในเลือดแปรผกผันกัน กล่าวคือ เมื่อเสริมไคโตซานให้ปลากะพงขาวมากขึ้น สัดส่วน SL จะเพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณไคโตซานในขณะที่สัดส่วน LL จะลดลง สัดส่วนของ M ในประชากรเม็ดเลือดขาวในเลือดพบว่าเปลี่ยนแปลงในรูปแบบที่ใกล้เคียงกับ LL กล่าวคือ การเสริมไคโตซานในอาหารเลี้ยงปลากะพงขาวมีผลให้สัดส่วนของ M ลดน้อยลงตามปริมาณไคโตซานที่เพิ่มขึ้นเมื่อเสริมนาน 7 และ 16 วัน

เซลล์เม็ดเลือดขาวที่พบปลานั้นมีหลายชนิด ได้แก่ Lymphocyte, Monocyte, Granulocytes และ Thrombocyte สำหรับ Lymphocyte นั้นเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีจำนวนมากที่สุดในเลือด นิยมแบ่งเป็น 2 กลุ่มตามขนาดที่พบ ได้แก่ SL และ LL (Claver & Quaglia, 2009) โครงสร้างระดับเซลล์หน้าที่ และการตอบสนองของเซลล์ Lymphocyte ในปลาคล้ายคลึงกับ T cell, B cell และ Natural killer (NK) cell ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Lanfranchi & Fabiani, 1995; Miller et al., 1998; Nakanishi et al., 2002) อย่างไรก็ดี การจำแนกชนิดของเซลล์ lymphocyte ที่พบนั้นนิยมใช้เทคนิค ELISA ในการทดสอบและติดตามการแสดงออกของ Membrane Immunoglobulin (mIg) บนผิวเซลล์ จึงสามารถระบุได้ว่า Lymphocyte ที่พบนั้นเป็น T lymphocyte-liked cell (mIg^-) หรือ B lymphocyte-liked cell (mIg^+) (Miller et al., 1998) ดังนั้น การสรุปผลของการเสริม

ไคโตซานในอาหารปลากะพงขาวที่มีต่อจำนวน Lymphocyte ที่เปลี่ยนแปลงครั้งนี้จึงต้องพิจารณาร่วมกับการทดสอบ TPIg ซึ่งเป็นผลผลิตจาก B lymphocyte-liked cell ร่วมด้วย (เพิ่มเติมในหัวข้อที่ 1.2.4)

การเสริมไคโตซานให้ปลากะพงขาวอาจทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Monocyte เคลื่อนย้าย (Migration) ออกจากกระแสเลือดและเกิดการระดม (Recruitment) เข้าสู่เนื้อเยื่อมากขึ้น ดังแสดงในผลการทดลองของ Saensawath et al. (2009) ซึ่งพบว่าการเสริมไคโตซานช่วยเพิ่มการสะสม Phagocyte ที่ตับ ในขณะที่การเสริมไคโตซานให้ปลากะพงขาวอาจส่งผลต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophil ในแง่การส่งเสริมประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ (Siwicki et al., 1994) มากกว่าส่งเสริมการเคลื่อนย้ายหรือการระดมอย่าง Monocyte (เพิ่มเติมในหัวข้อที่ 1.2.5)

1.2.3 ปริมาณโปรตีนในเลือด (Total plasma protein; TPP)

TPP ของปลาประกอบไปด้วยโปรตีนชนิด Albumin และ Globulin (Nakagawa et al., 1976) สำหรับ TPP ของปลากะพงขาวในการทดลองครั้งนี้พบว่าส่วนใหญ่ใกล้เคียงกับผลการศึกษาค่าชีวเคมีในเลือดของปลากะพงขาวสุขภาพปกติ (Supamataya et al., 1987) และในปลาชนิดอื่น (Nakagawa et al., 1976; Gbore et al., 2006) การเสริมไคโตซานปริมาณร้อยละ 0.5 ของน้ำหนักอาหารในปลากะพงขาวเป็นเวลา 7 วัน พบว่าทำให้ระดับ TPP ของปลากะพงขาวมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัด สอดคล้องกับผลการเสริมไคโตซานในปริมาณดังกล่าวให้แก่ปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) ซึ่งพบว่าไคโตซานมีผลให้ Total serum protein (TSP) เพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในระยะเวลา 7 วันเหมือนกัน (Siwicki et al., 1994) ดังนั้น การเสริมไคโตซานปริมาณร้อยละ 0.5 ของน้ำหนักอาหารเมื่อเลี้ยงปลากะพงขาวและปลาอื่น ๆ อาจเหนี่ยวนำให้ปริมาณโปรตีนในเลือดเปลี่ยนแปลงได้ในช่วงต้นของการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (ประมาณ 1 สัปดาห์แรกของการเสริมอาหาร) ในขณะที่การตอบสนองของ TPP ในปลาต่อการเสริมไคโตซานหรือสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันอื่น ๆ ในระยะยาว (2-6 สัปดาห์ขึ้นไป) พบว่าเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Cuesta et al., 2004)

ค่า TPP ที่สูงกว่าค่าปกติอาจเกิดขึ้นได้จากตัวอย่างเลือดที่มีเม็ดเลือดแดงแตกและภาวะขาดน้ำ (Dehydration) ในพลาสมาซึ่งอาจเป็นผลทางสรีรวิทยาของร่างกายสัตว์ในขณะเก็บเลือด หรือเกิดขึ้นจากการสูญเสียน้ำระหว่างการเก็บรักษาพลาสมาและขณะทำการทดสอบ (Nakagawa et al., 1976; Roman et al., 2009) ในขณะที่ค่า TPP ที่ต่ำกว่าปกติอาจบ่งชี้ถึงระดับภูมิคุ้มกันของปลาที่ลดต่ำลงอันเนื่องมาจากการหลั่งสาร cathecolamine ออกสู่กระแสเลือดเพิ่มขึ้นเพื่อตอบสนองต่อความเครียดที่เกิดขึ้น (Gbore et al., 2006)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปัญหาที่พบในการตรวจวัด TPP ครั้งนี้ คือ ตัวอย่างเลือดปลากะพงขาวจำนวนมากเกิดปัญหาเม็ดเลือดแดงแตก (Hemolysis) ทำให้เหลือตัวอย่างจากการเก็บแต่ละครั้งที่นำมาตรวจหา TPP โดยเฉลี่ยเพียง 4 ตัวอย่างต่อชุดการทดลองเท่านั้น ผลของค่า TPP ที่ได้จึงมีโอกาสคลาดเคลื่อนและแปรปรวนได้มาก แนวทางป้องกันปัญหาดังกล่าวในอนาคต เช่น ไม่ควรดูดเลือดแรงเกินไประหว่างเจาะเก็บเลือด ระยะเวลาดูดเลือดควรใช้ระยะเวลาสั้นที่สุด และการขนย้ายตัวอย่างหลอดเก็บเลือดจนถึงการปั่นแยกพลาสมาควรเก็บในกล่องที่ไม่โดนแสง เป็นต้น

1.2.4 ปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน ในเลือด (Total plasma immunoglobulin; TPIg)

อิมมูโนโกลบูลินเป็นแอนติบอดีซึ่งมีบทบาททางภูมิคุ้มกันในสัตว์มีกระดูกสันหลัง สร้างขึ้นจาก B lymphocytes อิมมูโนโกลบูลินในปลาที่สำคัญคือ IgM (Pilström & Bengtén, 1996; Morrison & Nowak, 2002) ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า TPIg ของปลากะพงขาวมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณไคโตซานที่เสริมให้ตั้งแต่ระยะเวลา 7-47 วัน สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งพบว่าปริมาณอิมมูโนโกลบูลินในซีรั่ม (Total serum immunoglobulin; TSIg) เพิ่มขึ้นเมื่อปลาได้รับการเสริมไคโตซานหรือสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันอื่น ๆ ในอาหาร โดยผลการศึกษาในเวลาต่อมาพบว่า TSIg ที่เพิ่มขึ้นดังกล่าวแปรผันตามปริมาณสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและระยะเวลาที่เสริมให้ ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงของ TSIg จะมากหรือน้อยขึ้นกับชนิด ขนาด อายุ ความเครียดจากสภาพการเลี้ยง และประเภทของโรคในปลาตัวนั้น ๆ (Siwicki et al., 1994; Zilberg & Klesius, 1997; Cuesta et al., 2004)

เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของ SL และ TPIg จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่ามีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือ ทั้ง SL และ TPIg เพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณไคโตซานและระยะเวลาที่เสริมอาหาร สันนิษฐานได้ว่าไคโตซานสามารถช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาวได้โดยการเพิ่มจำนวน B lymphocyte-liked cell จึงทำให้เกิดการสร้าง TPIg ออกสู่กระแสเลือดมากขึ้น การศึกษาในอนาคตควรตรวจวัดปริมาณ Ig ในเมือกที่ผิวหนัง เหงือก และทางเดินอาหารของปลากะพงขาว ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันด่านสำคัญต่อการต้านทานเชื้อโรคจากสิ่งแวดล้อมร่วมด้วย เพื่อให้ทราบถึงผลที่ชัดเจนและการใช้ประโยชน์ที่สูงสุดจากการเสริมไคโตซานในอาหารในการใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาว

1.2.5 ประสิทธิภาพการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว (Phagocytic activity)

ไคโตซานมีผลต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเก็บกินทั้งที่อยู่ในเลือด (Neutrophil) และในเนื้อเยื่อ (มาโครฟาจ) โดยช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการจับกินสิ่งแปลกปลอม (PP และ PI) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวในปลา Rainbow trout (*O. mykiss*), ปลานิล (*O. niloticus*) และรวมถึงปลากะพงขาว

(*L. calcarifer*) ในการศึกษาครั้งนี้ด้วย โดยพบว่าการเสริมไคโตซานในปริมาณร้อยละ 0.5 ของน้ำหนักอาหารแก่ปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) เป็นเวลา 7 วัน ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการจับกินสิ่งแปลกปลอมของ Neutrophil ในเลือด ขณะเดียวกันการเสริมไคโตซานในปริมาณร้อยละ 1.0 ของน้ำหนักอาหารปลา เป็นเวลา 6-8 สัปดาห์ กลับช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเก็บกินที่ตับของปลานิล (*O. niloticus*) (Siwicki et al., 1994; Saensawath et al., 2009) กลไกของการดูดซึมและแพร่กระจายของไคโตซานเข้าสู่กระแสเลือดและเพิ่มประสิทธิภาพระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายปลาโดยผ่านวิธีกิน (Oral administration) นั้นยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจน แต่อาจสรุปได้ดังนี้

เมื่อไคโตซานที่เสริมในอาหารถูกย่อยโดย Lysozyme ที่ผลิตจากตัวปลาเองร่วมกับ Chitinase และ Chitosanase ซึ่งผลิตได้จากแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่บางจำพวก เช่น *Bacillus* spp., *Clostridium* spp. เป็นต้น กลายเป็น Chito-oligosaccharide และถูกนำเข้าสู่เซลล์เยื่อบุลำไส้ Chito-oligosaccharide จะแพร่กระจายเข้าสู่เนื้อเยื่อบริเวณลำไส้ (Gut-associated lymphoid tissue; GALT) ซึ่งมีเซลล์เม็ดเลือดขาวต่าง ๆ ได้แก่ Lymphocyte, plasma cell, macrophage และ granulocyte ก่อนจะแพร่กระจายเข้าสู่เนื้อเยื่อและอวัยวะสร้างเม็ดเลือดที่สำคัญคือ ม้ามและไต (Hirano et al., 1990; Okamoto et al., 2001; Hovda et al., 2007; Šimunek et al., 2008; Fuglem et al., 2010; Kean & Thanou, 2010) ไคโตซานสามารถกระตุ้นมาโครฟาจผ่านทาง Mannose receptor (Macrophage activation) ทำให้มาโครฟาจสร้างสารสื่อระหว่างเซลล์เช่น TNF-α มากขึ้น (Mori et al., 2005; Han et al., 2005) สารสื่อระหว่างเซลล์ดังกล่าวพบได้ในปลาเช่นเดียวกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Secombes et al., 2001; Zou et al., 2003) TNF-α ที่พบในปลามีคุณสมบัติเหนี่ยวนำการอักเสบ (Proinflammatory factor) โดยการดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเก็บกินออกจากเส้นเลือดเพื่อระดมเม็ดเลือดขาว (Phagocytic granulocytes recruitment) การเก็บกินและทำลายสิ่งแปลกปลอมด้วยกระบวนการ Phagocytosis และการสร้างสารซุปเปอร์ออกไซด์ของเซลล์เม็ดเลือดขาว การสร้าง granulopoiesis ที่ไตส่วนหน้า การเพิ่มจำนวน Lymphocyte และมีส่วนร่วมในการกำจัดเซลล์ปกติที่เสื่อมสภาพ (Homeostasis) (Wolpe et al., 1989; Zou et al., 2003; Garcia-Castillo et al., 2004; Aoki et al., 2008; Roca et al., 2008)

เมื่อพิจารณาตามกลไกข้างต้นจะเห็นได้ว่า ไคโตซานอาจส่งเสริมให้เกิดการเคลื่อนย้ายของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophils และ Monocyte ออกจากกระแสเลือดมาสะสมที่เนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่ทางภูมิคุ้มกัน จึงเป็นเหตุให้สัดส่วนในเลือดของเซลล์เม็ดเลือดขาวดังกล่าวลดลง และยังช่วยกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเก็บกินให้มีประสิทธิภาพในการทำลายสิ่งแปลกปลอมได้

เป็นสำคัญ โดยเฉพาะเซลล์มาโครฟาจซึ่งเป็นหัวใจของภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ด่านแรกและตัวเชื่อมระหว่างระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและแบบจำเพาะ (Neumann et al., 2001; Aoki et al., 2008)

1.2.6 Respiratory burst activity ของเม็ดเลือดขาว

ผลการศึกษา Respiratory burst activity ของเซลล์เม็ดเลือดขาว (NR) ที่เพิ่มขึ้นจากทุกชุดทดลองที่เสริมไคโตซานในงานวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้า โดยการศึกษาของ Siwicki et al. (1994) พบว่า NR ของเซลล์ Neutrophil ในปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) ที่ได้รับการเสริมอาหารด้วยไคโตซานร้อยละ 0.5 ของน้ำหนักอาหาร นาน 1 สัปดาห์ แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ต่อมาผลการศึกษาของ Hoffman et al. (1997) พบว่า ไคโตซานมีผลให้เซลล์เม็ดเลือดขาวที่ไตของปลา Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) ผลิตสารซุปเปอร์ออกไซด์เพิ่มสูงขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) ในการทดลองแบบ *in vitro* เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Gopalakannan and Arul (2006) และ Cha et al. (2008) ซึ่งพบว่า การเสริมอาหารเลี้ยงปลาคาร์พ (*C. carpio*) และปลา Olive flounder (*P. olivaceus*) ด้วยไคโตซานปริมาณร้อยละ 1.0 ของน้ำหนักอาหาร มีผลให้ Neutrophil respiratory burst activity เพิ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

เมื่อพิจารณาจากกลไกการเข้าสู่ระบบภูมิคุ้มกันของไคโตซานแล้ว (ดูรายละเอียดในข้อ 1.2.5) แสดงว่าไคโตซานสามารถช่วยเพิ่ม Respiratory burst activity ของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งในเนื้อเยื่อและในเลือดได้ โดยผ่านการทำงานของ TNF-α ที่ได้จากการกระตุ้นมาโครฟาจ ช่วยเพิ่มกระบวนการ Phagocytosis ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและส่งเสริมการเกิด Respiratory burst ของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ไตส่วนหน้า (Jang et al., 1995)

ผลการทดลองที่ 2 การเสริมอาหารด้วยไคโตซาน เข้มข้นร้อยละ 0 และ 1.0 ของน้ำหนักอาหาร ต่ออัตราการเจริญเติบโตและอัตรารอดของลูกปลากะพงขาวหลังได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* (Challenge test)

2.1 ด้านการเจริญเติบโตของลูกปลากะพงขาว

การเสริมไคโตซานเข้มข้นร้อยละ 1.0 ของน้ำหนักอาหาร เป็นเวลา 49 วัน ช่วยเร่งการเจริญเติบโตในลูกปลากะพงขาวขนาดเล็กได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ 1 ที่เสริมไคโตซานเข้มข้นเท่ากัน ผลการทดลองที่แตกต่างกันอาจเกิดขึ้นเนื่องจากลูกปลากะพงขาวในชุดการทดลองที่ 1 ต้องถูกจับบังคับเพื่อเจาะเลือดทุก 10 วัน ทำให้ลูกปลาในการทดลองที่ 1 เกิดความเครียดมากกว่าเมื่อเทียบกับลูกปลาในการทดลองที่ 2 ส่งผลต่อการเจริญเติบโตหลังการเสริมอาหารด้วยไคโตซานน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการทดลองที่ 2 ทั้งนี้จากการศึกษาของ Braun et al.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(2010) พบว่าความเครียดจากการจับบังคับอย่างต่อเนื่องมีผลให้การเจริญเติบโตของปลา Dourado (*Salminus brasiliensis*) ลดลง นอกจากนี้ขนาดปลาเริ่มต้นและความถี่ในการให้อาหารต่อวันที่แตกต่างกันมีผลให้การเจริญเติบโตของปลากะพงขาวต่างกัน โดยพบว่าปลากะพงขาวขนาดใหญ่มีอัตราการเจริญเติบโตมากกว่าปลากะพงขาวขนาดเล็ก ขณะเดียวกันอัตราการเจริญเติบโตของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารบ่อยครั้งมากกว่าในแต่ละวันมีแนวโน้มสูงกว่าปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารน้อยครั้งกว่าในแต่ละวัน (Glencross, 2006) สำหรับผลการทดลองเสริมไคโตซานที่ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตในลูกปลากะพงขาวในการทดลองที่ 2 นี้พบว่า สอดคล้องกับผลการศึกษาในปลาคาร์พ ซึ่งพบว่าการเสริมไคโตซานปริมาณร้อยละ 0.04-1.0 ของน้ำหนักอาหาร เป็นเวลา 45-90 วัน ช่วยเร่งอัตราการเจริญเติบโตได้ดีเช่นกัน (Gopalakannan & Arul, 2006; อนันวัช บุญญภักดี และคณะ, 2550) ขณะเดียวกันผลการศึกษาในปลา Red sea bream (*P. major*), Yellowtail (*S. quinqueradiata*), Japanese eel (*A. japonica*) และปลานิล (*O. niloticus* x *O. aureus*) กลับให้ผลตรงกันข้าม โดยพบว่าการเสริมไคโตซานในอาหารปริมาณร้อยละ 2.0 ของน้ำหนักอาหารขึ้นไป เป็นเวลา 4-12 สัปดาห์ ทำให้การเจริญเติบโตของปลาลดลง (Kono et al., 1987; Shiau & Yu, 1999; Saensawath et al., 2009) อย่างไรก็ดี การเสริมไคโตซานไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของปลา Olive flounder (*P. olivaceus*) (Cha et al., 2008)

ไคโตซานช่วยเพิ่มการดูดซึมสารอาหารทางลำไส้ได้โดยเพิ่ม Permeability ของเซลล์เยื่อบุลำไส้ได้ (Artursson et al., 1994; Kotzé et al., 1998) ส่งเสริมให้สารอาหารต่าง ๆ เข้าสู่เซลล์ได้ดีขึ้น ร่างกายปลาจึงใช้ประโยชน์จากสารอาหารได้เต็มที่ ทำให้ปลาเจริญเติบโตดี

2.2 อัตราตายของลูกปลากะพงขาวหลังได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* (Challenge test)

ผลการทดลองครั้งนี้พบว่า การเสริมอาหารปลากะพงขาวด้วยไคโตซานปริมาณร้อยละ 1.0 ของน้ำหนักอาหาร เป็นเวลา 49 วัน มีแนวโน้มว่าปลากะพงขาวสามารถต้านทานเชื้อก่อโรค เพราะสามารถช่วยลดอัตราตายหลังถูกฉีดเข้าช่องท้องด้วยเชื้อแบคทีเรียชนิด *V. harveyi* โดยมี RPS สูงถึงร้อยละ 75 แบคทีเรียชนิด *V. harveyi* ที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้เป็นสายพันธุ์ที่ก่ออัตราการตายในปลากะพงขาวได้ถึงร้อยละ 100 (Sasmita, 2009) ผลการทดลองต้านทานเชื้อโรคในปลากะพงขาวสอดคล้องกับการศึกษาในปลาชนิดอื่น ๆ ซึ่งพบว่าการเสริมไคโตซานให้แก่ปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) และปลาคาร์พ (*C. carpio*) ลดอัตราการตายจากการทดสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas salmonicida* และ *A. hydrophila* ได้อย่างมีนัยสำคัญ ภายหลังการเสริมไคโตซานปริมาณร้อยละ 0.5 และ 1.0 ของน้ำหนักอาหาร เป็นเวลา 7 วันและ 45 วัน ตามลำดับ (Siwicki et al., 1994; Gopalakannan & Arul, 2006)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เมื่อพิจารณาจากผลการทดลองที่ 1 จะเห็นได้ว่าการเสริมไคโตซานมีผลต่อประสิทธิภาพที่เพิ่มขึ้นของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลากะพงขาว โดยการศึกษาของ Ellis (1999) และ Tort et al. (2003) รายงานไว้ว่า การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อแบคทีเรียของร่างกายปลาเกิดขึ้นผ่านกลไกชนิดที่เป็นสารน้ำและชนิดพึ่งเซลล์ (Humoral and cellular mechanisms) โดยมีเซลล์ Neutrophil และเซลล์มาโครฟาจซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเก็บกินที่สำคัญเป็นตัวกลางของกลไกดังกล่าว การส่งเสริมประสิทธิภาพของกระบวนการเก็บกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์มาโครฟาจโดยไคโตซานดังแสดงในผลการทดลองที่ 1 จึงช่วยให้ร่างกายปลาตอบสนองต่อการทดสอบการติดเชื้อแบคทีเรียได้ดียิ่งขึ้น สามารถกำจัดเชื้อออกจากร่างกายและพัฒนาภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะด้วยการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อแบคทีเรียนั้น ๆ ได้มากขึ้น ช่วยลดอัตราป่วยและตายจากโรคติดเชื้อได้ในที่สุด

สรุปผลการวิจัย

1. ไคโตซานเป็นสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติ มีคุณสมบัติโดดเด่นและมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) การใช้ไคโตซานเป็นสารเร่งอัตราการเจริญเติบโตและสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำแบบปลอดสารเคมี

2. การเสริมไคโตซานช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลากะพงขาว ด้วยการเพิ่มประสิทธิภาพการเก็บกินสิ่งแปลกปลอมและ Respiratory burst activity ของเซลล์มาโครฟาจที่ไตส่วนหน้าได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) หลังรับการเสริมไคโตซานปริมาณร้อยละ 1.0 ของน้ำหนักอาหาร ต่อเนื่องเป็นเวลา 47 วัน

3. การเสริมไคโตซานในอาหารปริมาณร้อยละ 1.5 ของน้ำหนักอาหารเป็นเวลา 7-36 วัน มีแนวโน้มว่าสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะของปลากะพงขาวได้เช่นกัน โดยมีผลเพิ่มปริมาณอิมมูโนโกลบูลินรวมในกระแสเลือดให้สูงขึ้น

4. การเสริมไคโตซานปริมาณร้อยละ 1.0 ของน้ำหนักอาหาร ต่อเนื่องเป็นเวลา 49 วัน ช่วยเร่งการเจริญเติบโตของลูกปลากะพงขาวได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และมีแนวโน้มว่าช่วยลดอัตราการตายหลังทดลองฉีดเชื้อ *V. harveyi* เข้าช่องท้อง และเพิ่มประสิทธิภาพความคุ้มโรคได้ถึงร้อยละ 75

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ข้อเสนอแนะ

1. งานวิจัยในอนาคตควรมีการทดสอบ PP, PI และ NR ในแต่ละสัปดาห์หลังการเสริมไคโตซาน และหาระยะเวลาการเสริมไคโตซานที่น้อยที่สุดที่สามารถกระตุ้นให้เซลล์มาโครฟาจจากไตส่วนต้นของปลากะพงขาวมี PP, PI และ NR สูงสุด เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการใช้ไคโตซานเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในช่วงเวลาที่ต้องการได้เหมาะสม เช่น ช่วงก่อนการขนย้ายลูกปลากะพงขาว เป็นต้น

2. จากผลการทดลองครั้งนี้ที่พบว่าการเสริมไคโตซานในอาหารปลากะพงขาวมีแนวโน้มว่าช่วยเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะได้ ดังนั้น การทดลองเพิ่มเติมในอนาคตอาจศึกษาผลของการเสริมไคโตซานในอาหารปลากะพงขาวหรือปลาอื่น ๆ ที่มีต่อประสิทธิผลของวัคซีนที่ให้ เพื่อเป็นการต่อยอดให้เกิดการใช้ประโยชน์ของการเสริมอาหารปลาด้วยไคโตซานอย่างสูงสุด

3. เพื่อป้องกันความผิดพลาดจากการตรวจวัด TPP และ TPIg ในตัวอย่าง ควรเพิ่มความระมัดระวังในการเจาะเก็บเลือดปลากะพงขาวและการปั่นแยกพลาสมาให้มากขึ้น

4. การทดสอบการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยการบ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวกับ Heat killed yeast ในหลอดก้นกรวยขนาด 15 ml ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก เยาวนิตย์ คนยดล และคณะ (2543) เป็นวิธีการที่สามารถปรับประยุกต์ให้เหมาะสมกับแต่ละชนิดปลาและความพร้อมของแต่ละห้องปฏิบัติการได้ โดยพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนเซลล์ยีสต์ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็น 8:1 และเพิ่มเวลาการบ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวกับยีสต์ในหลอดก้นกรวยเป็น 30 นาทีแล้ว ช่วยให้ผลการทดสอบครั้งนี้มีความชัดเจนมากขึ้น นอกจากนี้การบ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวกับเซลล์ยีสต์บนสไลด์แก้วในกล่องความชื้นที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 °C) จะช่วยลดจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวตายได้มากกว่าการบ่มในลักษณะเดียวกันที่อุณหภูมิ 30 °C

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University