รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง
โครงสร้างและคุณสมบัติเชิงเคมีของเนื้อเยื่อและเซลล์เข็มพิษในแมงกะพรุน *Sanderia malayensis* และ *Rhopilema hispidum* และกลไกการปล่อยเข็มพิษ

(Structure and histochemical properties of tissue and nematocyst in jellyfishes *Sanderia malayensis* and *Rhopilema hispidum*, and mechanism of nematocyst discharge)

หัวหน้าโครงการ: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิน กิ่งทอง
คณะผู้วิจัย: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แวววลี โชคแสวงการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาคภูมิ พระประเสริฐ
นางสาวสุภัททา เฉื่อยฉ่ำ
นางสาววิไลวรรณ พวงสันเทียะ
นางสาวศิริวรรณ ชูศรี

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 59991
สัญญาเลขที่ 45.9/2562

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง
โครงสร้างและคุณสมบัติเชิงเคมีของเนื้อเยื่อและเซลล์เข็มพิษในแมงกะพรุน *Sanderia malayensis* และ *Rhopilema hispidum* และกลไกการปล่อยเข็มพิษ
(Structure and histochemical properties of tissue and nematocyst in jellyfishes *Sanderia malayensis* and *Rhopilema hispidum*, and mechanism of nematocyst discharge)

หัวหน้าโครงการ: **ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิน กิ่งทอง[1]**
คณะผู้วิจัย: **ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แวววลี โชคแสวงการ[1]**
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาคภูมิ พระประเสริฐ[1]
นางสาวสุภัททา เฉื่อยฉ่ำ[1]
นางสาววิไลวรรณ พวงสันเทียะ[2]
นางสาวศิริวรรณ ชูศรี[2]

[1]คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
[2]สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหวิทยาลัยบูรพา

มกราคม 2563

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ รหัสโครงการ 59991 เลขที่สัญญา 45.9/2562

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรีที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

มกราคม 2563

คณะผู้วิจัย

โครงสร้างและคุณสมบัติเชิงเคมีของเนื้อเยื่อและเซลล์เข็มพิษในแมงกะพรุน *Sanderia malayensis* และ *Rhopilema hispidum* และกลไกการปล่อยเข็มพิษ

บทคัดย่อ

ปัจจุบันเกิดภาวะโลกร้อน ทำให้แมงกะพรุนมีการจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จึงเกิดปัญหาต่าง ๆ ตามมาโดยเฉพาะด้านการท่องเที่ยว ส่งผลให้นักท่องเที่ยวได้รับอันตรายจากการโดนแมงกะพรุนต่อยจำนวนมาก เนื่องจากตามอวัยวะต่าง ๆ ของแมงกะพรุนบรรจุเข็มพิษที่มีลักษณะเป็นกระเปาะ โดยสามารถถูกกระตุ้นให้ปล่อยออกมาเพื่อป้องกันตัวจากผู้ล่า ซึ่งพิษของแมงกะพรุนมีระดับความรุนแรงที่แตกต่างกัน มีการใช้น้ำส้มสายชูและผักบุ้งทะเล มาใช้ในการปฐมพยาบาลเบื้องต้น แต่มีรายงานว่า น้ำส้มสายชูมีผลกระตุ้นต่อการปล่อยพิษของเข็มพิษ แมงกะพรุนบางชนิดให้มากขึ้น อย่างไรก็ดีความรู้พื้นฐานด้านชีววิทยาและกลไกการปล่อยเข็มพิษของแมงกะพรุนยังไม่เป็นที่ทราบดีนัก ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาสัณฐานและการกระจายของเข็มพิษของแมงกะพรุนไฟมาเลเซีย *Sanderia malayensis* โดยทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และนับจำนวนเข็มพิษเพื่อหาความหนาแน่นของเข็มพิษในหนวด แขนรอบปาก และร่ม พบว่าเข็มพิษมีรูปร่างเป็นกระเปาะและท่อกลวงขดอยู่ภายใน โดยพบเข็มพิษอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม แต่ละกลุ่มอาจมีขนาดแตกต่างกัน บริเวณหนวดพบเข็มพิษได้มากที่สุด จากนั้นทำการทดสอบการกระตุ้นการปล่อยเข็มพิษด้วยสารเคมีชนิดต่าง ๆ พบว่า น้ำทะเลที่ความเข้มข้น 30 ppt และ ผักบุ้งทะเลบดในน้ำทะเล สามารถยับยั้งการปล่อยเข็มพิษ แต่น้ำส้มสายชูจะกระตุ้นการปล่อยเข็มพิษในแมงกะพรุนชนิดนี้ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อแมงกะพรุนไฟมาเลเซียภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบเข็มพิษภายในเซลล์สร้างเข็มพิษ (nematocyte) เข็มพิษมีลักษณะเป็นกระเปาะที่มีแคปซูลหนา ภายในเซลล์สร้างเข็มพิษพบเยื่อเอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัมชนิดขรุขระ (RER) จำนวนมาก คาดว่ามีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเข็มพิษ

คำสำคัญ: แมงกะพรุน, เข็มพิษ, พิษวิทยา, จุลกายวิภาค, กะพรุนไฟ

Structure and histochemical properties of tissue and nematocyst in jellyfishes *Sanderia malayensis* and *Rhopilema hispidum*, and mechanism of nematocyst discharge

Abstract

Current global warming is causing the jellyfish to grow rapidly. This has become a problems, especially for tourism as many tourists are being stung by venomous jellyfish. Various organs of jellyfish contain nematocyst which can be discharged to protect itself from predators. The nematocyst of jellyfish has different severity levels. Vinegar and morning glory are being used in first aid but reports show vinegar has a stimulating effect on the nematocyst of the venom thread in some type of jellyfish. However, basic knowledge of biology and mechanism of nematocyst discharge are not fully understood. Therefore the propose of this current work were to study morphology and distribution of the nematocyst in Malasian jellyfish *Sanderia malayensis* under a light microscope in order to calculate nematocyst density in tentacles, oral arms and umbrella. Results showed that the nematocyst has a bulbous shape and a hollow tube inside. Nematocysts are found within nematocyst groups. Each groups may differ in size. Nematocysts are most abundant in the tentacle. Additionally, effect of various chemicals on nematocyst discharge were also tested. The result showed that seawater at concentration of 30 ppt and morning glory extract in seawater inhibited the nematocyst discharge while vinegar stimulated the nematocyst discharge in this species. Moreover, ultrastructure of nematocyst was also studied by using a transmission electron microscope. The result showed that nematocysts were found in nematocyte. Nematocysts composed of a bulb which surrounding by a thick capsule wall. A large number of rough endoplasmic reticulum (RER) was distributed in cytoplasm of nematocyte indicating that this may related to the production of toxin proteins in nematocyst capsule.

Keywords: jellyfish, nematocyst, toxicity, ultrastructure, *Sanderia malayensis*

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่	
1 บทนำ	1
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
3 วิธีดำเนินการวิจัย	20
4 ผลการวิจัย	26
5 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย	43
บรรณานุกรม	46
ประวัติย่อผู้วิจัย	48

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า
4-1 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเข็มพิษและจำนวนกลุ่มเข็มพิษต่อกลุ่มและพื้นที่หน่วยตารางมิลลิเมตร 32
4-2 ผลการกระตุ้นการปล่อยเข็มพิษด้วยสารเคมีชนิดต่าง ๆ 40

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 ลักษณะทั่วไปและการจำแนกกลุ่มสัตว์ในไฟลัมไนดาเดีย (Cnidaria)	8
2-2 ลักษณะสัณฐานภายนอกของแมงกะพรุนไฟมาเลเซีย *Sanderia malayensis*	9
2-3 ลักษณะสัณฐานภายนอกของแมงกะพรุนแท้	10
2-4 สัณฐานภายในของแมงกะพรุนแท้	11
2-5 วงชีวิตของแมงกะพรุนแท้	12
2-6 องค์ประกอบต่างๆของเซลล์สร้างเข็มพิษ และการปล่อยออกมาของเข็มพิษ	12
2-7 การพัฒนาของเข็มพิษชนิดต่างๆในบริเวณ Battery Cell	13
2-8 ชนิดของเข็มพิษโดยจัดจำแนกตามสัณฐานวิทยา	15
2-8 ชนิดของเข็มพิษโดยจัดจำแนกตามสัณฐานวิทยา (ต่อ)	16
2-9 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	18
2-10 เปรียบเทียบส่วนประกอบต่าง ๆ ของกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบประกอบและ	19
3-1 แผนผังขั้นตอนการรักษาสภาพตัวอย่างหนวดของแมงกะพรุนไฟมาเลเซีย	23
3-2 แผนผังการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	24
4-1 สัณฐานของเข็มพิษที่เรียงตัวเป็นกลุ่มภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	26
4-2 สัณฐานของเข็มพิษซึ่งถูกปล่อยออกมา ประกอบด้วยแคปซูลและท่อกลวง	27
4-3 สัณฐานของกลุ่มเข็มพิษที่ประกอบด้วยแภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	27
4-4 ลักษณะการกระจายตัวของกลุ่มเข็มพิษบริเวณหนวด	29
4-5 ลักษณะการกระจายตัวของกลุ่มเข็มพิษบริเวณแขนรอบปาก	30
4-6 ลักษณะการกระจายของกลุ่มเข็มพิษแบบสุ่มบริเวณร่ม	31
4-7 กราฟการเปรียบเทียบค่าความหนาแน่นเฉลี่ยหรือจำนวนเข็มพิษต่อพื้นที่เฉลี่ย	32
4-8 โครงสร้างจุลกายภาพ (SEM) ของเนื้อเยื่อในแมงกะพรุนไฟ	34
4-9 โครงสร้างจุลกายภาพ (SEM) ของ nematocyst ในแมงกะพรุนไฟ	34
4-10 โครงสร้างจุลกายภาพ (SEM) ของเนื้อเยื่อแมงกะพรุนไฟ	35
4-11 โครงสร้างจุลกายภาพ (SEM) ของ nematocyst แมงกะพรุนไฟ	35
4-12 การวางตัวของเซลล์สร้างเข็มพิษและเข็มพิษภายใต้กล้องจุลทรรศน์ TEM	36
4-13 โครงสร้างจุลกายภาพของเข็มพิษในแมงกะพรุนไฟ *Sanderia malayensis* (TEM)	37
4-14 โครงสร้างจุลกายภาพของเซลล์สร้างเข็มพิษ (nematocyte) ในแมงกะพรุนไฟ	37
4-15 โครงสร้างจุลกายภาพของเซลล์สร้างเข็มพิษในแมงกะพรุนไฟ	38
4-16 โครงสร้างจุลกายภาพบริเวณ cell junction ของเซลล์สร้างเข็มพิษ (nematocyte)	38
4-17 พื้นผิวภายนอกของแมงกะพรุนหนัง *Rhopilema hispidum*	41
4-18 เข็มพิษที่พบในแมงกะพรุนหนัง *Rhopilema hispidum*	42

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมามีรายงานการบูมของแมงกระพรุน (Jellyfish boom) รวมถึงแมงกะพรุนพิษเพิ่มขึ้นในหลายภูมิภาคทั่วโลกรวมถึงในเขตน่านน้ำไทยโดยเฉพาะในฤดูมรสุม ซึ่งสาเหตุเกิดจากการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมในปัจจุบันรวมถึงการเปลี่ยนแปลงสารอาหารในน้ำที่เพิ่มสูงขึ้นจากกิจกรรมต่างๆ ของมนุษย์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของห่วงโซ่อาหาร พบผู้ผลิตและผู้บริโภคขั้นต้นเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการบูมของแมงกะพรุนตามมา เมื่อถึงฤดูมรสุมก็มีการพัดพาแมงกะพรุนต่างถิ่นเข้ามาบริเวณชายฝั่งได้ สำหรับประเทศไทยมีรายงานการสำรวจตัวอย่างแมงกะพรุนพิษ โดยกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งระหว่างปี 2553–2560 เบื้องต้นพบแมงกะพรุนพิษกลุ่มแมงกะพรุนกล่องและแมงกะพรุนไฟหลายชนิดแพร่กระจายในพื้นที่ชายฝั่ง โดยพบแมงกะพรุนกล่อง (Cubozoa) จำนวน 11 ชนิด (เป็นแมงกะพรุนพิษหรือสงสัยว่ามีพิษ 7 ชนิด) แมงกะพรุนกลุ่มไซโฟซัว (Scyphozoa) ประมาณ 15 ชนิด (เป็นแมงกะพรุนไฟ 2 ชนิด) และแมงกะพรุนกลุ่มไฮโดรซัว (Hydrozoa) 3 ชนิด (เป็นแมงกะพรุนพิษ 1 ชนิด) ซึ่งในจำนวนนี้มีหลายชนิดที่มีรายงานอันตรายรุนแรงถึงชีวิต แมงกะพรุนแต่ชนิดมีความรุนแรงของการเกิดพิษและกลไกการเกิดพิษที่แตกต่างกัน การเกิดพิษจากแมงกะพรุนเกิดจากเข็มพิษหรือนีมาโตซิสต์ (Nematocyst) ซึ่งมีลักษณะเป็นแคปซูลที่ผลิตขึ้นจากเซลล์สร้างเข็มพิษ (Cnidocyte) พิษของแมงกะพรุนเกิดจากเมื่อผิวหนังสัมผัสกับแมงกะพรุนนีมาโทซีสต์ที่อยู่ภายในเซลล์เข็มพิษก็จะติดอยู่กับผิวหนังของเหยื่อ เมื่อแคปซูลเข็มพิษถูกกระตุ้นก็จะปล่อยเข็มพิษพุ่งออกมาพร้อมกับการฉีดพิษเข้าไปในผิวหนังของเหยื่อ การกระตุ้นเกิดได้หลายสาเหตุ เช่น แรงกระทบกระเทือนจากภายนอก สัมผัสกับน้ำจืดซึ่งมีเกลือต่ำ ความร้อน หรือสารเคมี แต่กลไกการกระตุ้นให้ปล่อยเข็มพิษในแมงกระพรุนแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ดังนั้นแนวทางปฏิบัติและวิธีการศึกษาก็ต้องแตกต่างกันออกไป แต่เป็นที่น่าแปลกใจว่าพบข้อมูลการศึกษาโครงสร้างของเซลล์ คุณลักษณะเชิงเคมี รวมถึงกลไกการกระตุ้นการปล่อยเข็มพิษพบได้น้อยมาก ปัจจุบันมีการประชาสัมพันธ์การพยาบาลเบื้องต้นโดยใช้น้ำส้มสายชูเพื่อลดการแตกของเข็มพิษที่ติดมากับผิวหนังของผู้ป่วย แต่รายงานวิจัยในปัจจุบันพบว่าน้ำส้มสายชูไม่ได้ช่วยรักษาพิษแมงกะพรุนได้ทุกชนิด ตรงกันข้ามน้ำส้มสายชูอาจกระตุ้นให้อาการเกิดพิษเพิ่มมากขึ้น สำหรับแมงกะพรุนบางชนิด เช่น แมงกะพรุนโนะมุระ (*Nemopilema nomurai*) ซึ่งพบว่าน้ำส้มสายชูกระตุ้นให้เกิดการปล่อยของเข็มพิษจากเซลล์เข็มพิษทำให้การเกิดพิษรุนแรงมากขึ้น ดังนั้นการศึกษาข้อมูลชีววิทยา โครงสร้าง และกลไกการทำงานของเซลล์เข็มพิษและการปล่อยเข็มพิษจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการแฐมพยาบาลและการรักษา ซึ่งยังขาดข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญหลายประการ เช่น เซลล์สร้างเข็มพิษในแมงกะพรุนชนิดที่พบในชายฝั่งจังหวัดชลบุรีมีลักษณะอย่างไร เซลล์สร้างเข็มพิษมีการเรียงตัวในเนื้อเยื่ออย่างไร เซลล์สร้างเข็มพิษมีการกระจายตัวอยู่ในส่วนใดของร่างกายบ้าง มีคุณสมบัติเชิงเคมีอย่างไร แมงกะพรุนแต่ละชนิดมีจำนวนเซลล์เข็มพิษแตกต่างกันอย่างไร พิษของแมงกระพรุนถูกเก็บอยู่ที่ส่วนใดของเซลล์สร้างเข็มพิษ เมื่อถูกกระตุ้นแมงกระพรุนจะ

ปล่อยเข็มพิษออกมาอย่างไร พิษของแมงกะพรุนเป็นสารประกอบชนิดใด เมื่อนักท่องเที่ยวสัมผัสกับแมงกะพรุนจะทำอย่างไรจึงจะลดอาการเกิดพิษในเบื้องต้นได้ เป็นต้น สำหรับชายฝั่งจังหวัดชลบุรี เช่น ชายหาดบางแสน และชายหาดพัทยา สามารถพบแมงกะพรุนหนัง *Rhopilema hispidum* ได้มากซึ่งเป็นแมงกะพรุนที่ใช้เป็นอาหาร แต่ก็เป็นแมงกะพรุนที่ทำให้เกิดพิษได้เช่นกัน ดังนั้นเพื่อให้เข้าใจพิษและกลไกการเกิดพิษของแมงกะพรุนชนิดนี้มากขึ้น โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโครงสร้างของเข็มพิษ (nematocyst) ตำแหน่ง การกระจายตัว และปริมาณของเข็มพิษในเนื้อเยื่อ รวมถึงลักษณะเนื้อเยื่อที่เป็นองค์ประกอบของอวัยวะต่าง ๆ ของแมงกะพรุน และกลไกการกระตุ้นให้เข็มพิษแตกตัว (discharge mechanism) เพื่อเป็นองค์ความรู้แก่ประชาชน นักท่องเที่ยว และผู้สนใจ อีกทั้งยังมีความจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการพัฒนาต่อยอดไปสู่การปฐมพยาบาลและการรักษาที่ถูกวิธี

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาโครงสร้างของเนื้อเยื่อและเซลล์สร้างเข็มพิษในอวัยวะส่วนต่างๆ ของแมงกะพรุนหนัง *Rhopilema hispidum* และแมงกะพรุนไฟ *Sanderia malayensis*
2. เพื่อศึกษาปริมาณและการกระจายตัวเซลล์สร้างเข็มพิษในอวัยวะต่าง ๆ ของแมงกะพรุนหนัง *Rhopilema hispidum* และแมงกะพรุนไฟ *Sanderia malayensis*
3. เพื่อศึกษาคุณลักษณะเชิงเคมีบางประการของเนื้อเยื่อและเซลล์สร้างเข็มพิษที่พบในแมงกะพรุนหนัง *Rhopilema hispidum* และแมงกะพรุนไฟ *Sanderia malayensis*
4. เพื่อศึกษาโครงสร้างภายในของเซลล์สร้างเข็มพิษในแมงกะพรุนหนัง *Rhopilema hispidum* และแมงกะพรุนไฟ *Sanderia malayensis*
5. เพื่อศึกษาการกระตุ้นการปล่อยเข็มพิษของแมงกระพรุนพรุนหนัง *Rhopilema hispidum* และแมงกะพรุนไฟ *Sanderia malayensis* ด้วยสารเคมีชนิดต่างๆ

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

พิษของแมงกะพรุนเกิดจากเข็มพิษ (Nematocyst) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่พบในเซลล์สร้างเข็มพิษ (Cnidocytes หรือ Nematocyte) ภายใน Nematocyst จะพบสารประกอบที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพิษ ความรุนแรงของพิษขึ้นอยู่กับชนิดของแมงกะพรุน แต่กลไกการเกิดพิษ สารออกฤทธิ์ และความรุนแรงของพิษ ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด และวิธีการปฐมพยาบาลที่เหมาะสมเพื่อลดอาการเจ็บปวดและการเกิดพิษในแมงกะพรุนแต่ละชนิดก็ยังไม่เป็นที่ราบแน่ชัด ปัจจุบันการปฐมพยาบาลส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปที่หลักการยับยั้งไม่ให้ Nematocyst แตกออกมาซึ่งจะยับยั้งไม่ให้สารพิษปล่อยออกมาด้วย ปัจจุปันวิธีการที่เป็นแนวปฏิบัติทั่วไปคือการใช้น้ำส้มสายชูล้างบริเวณที่มีการสัมผัสกับแมงกะพรุน อย่างไรก็ดีวิธีการดังกล่าวสามารถลดอาการเจ็บปวดได้บางส่วนและยังไม่สามารถใช้กับแมงกะพรุนพิษได้ทุกชนิด ดังนั้นเพื่อให้เข้าใจกลกลการทำงานของเซลล์เข็มพิษของแมงกะพรุนแต่ละชนิด จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องทราบถึงโครงสร้างเซลล์สร้างของเข็มพิษ เข็มพิษ และตำแหน่งในเนื้อเยื่อ รวมถึงการกระจายตัวของเซลล์สร้างเข็มพิษในแต่ละอวัยวะของแมงกะพรุนแต่ละชนิด พร้อมทั้งคุณสมบัติเชิง

เคมีพื้นฐานของเนื้อเยื่อและเซลล์สร้างเข็มพิษ นอกจากนี้การศึกษาโครงสร้างภายในโดยละเอียดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) น่าจะเผยให้เห็นโครงสร้างโดยละเอียดของเข็มพิษและตำแหน่งที่มีการเก็บสารพิษภายในเซลล์สร้างสารพิษได้อีกทางหนึ่ง รายงานการศึกษาในปัจจุบันพบว่าเข็มพิษในแมงกะพรุนต่างชนิดกัน มีกลไกการการกระตุ้นให้มีการปล่อยเข็มพิษแตกต่างกัน ดังนั้นการศึกษากลไกการกระตุ้นการปล่อยเข็มพิษในแมงกะพรุนแต่ละชนิดจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากจะเป็นพื้นฐานที่สำคัญในการพัฒนาวิธีการปฐมพยาบาลที่ถูกต้อง รวมไปถึงการพัฒนาเวชภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการปล่อยเข็มพิษและอาการเกิดพิษในผู้ป่วยที่สัมผัสแมงกะพรุนพิษได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. นำไปใช้ในการพัฒนาและส่งเสริมความรู้ความเข้าใจที่ถูกต้องให้กับประชาชนในการปฐมพยาบาลผู้ป่วยที่ได้รับพิษจากแมงกะพรุน

2. นำไปใช้ในการพัฒนานวัตกรรมในการป้องกันและเสริมสร้างสุขภาพสำหรับนักท่องเที่ยวหรือประชาชนในชุมชนริมชายฝั่งทะเลที่ได้รับผลกระทบจากพิษแมงกะพรุน

3. เป็นองค์ความรู้สำหรับการสกัดพิษจาก nematocyst เพื่อระบุชนิดและวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ การนำไปใช้ประโยชน์ในด้านสังคมและชุมชน ประชาชน และนักท่องเที่ยวทราบแนวทางปฏิบัติที่เหมาะสมในการปฐมพยาบาลเบื้องต้นผู้ป่วยที่ได้รับพิษจากแมงกะพรุนที่ถูกต้องตามหลักวิชาการ ซึ่งจะส่งผลให้ประชาชนและนักท่องเที่ยวกล้าลงเล่นน้ำทะเลมากขึ้น มาเที่ยวทะเลมากขึ้น เป็นการส่งเสริมการประกอบอาชีพที่เกี่ยวข้องกับชายฝั่งทะเลได้มากขึ้น หน่วยงานภาครัฐลดความสูญเสียทางด้านทรัพยากรบุคคล เวลาและค่าใช้จ่ายในการรักษาผู้ป่วยที่ได้รับพิษจากแมงกะพรุน

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างแมงกะพรุนในระยะเมดูซา 2 ชนิด ได้แก่ แมงกะพรุนไฟ *Sanderia malayensis* และ แมงกะพรุนหนัง *Rhopilema hispidum* โดยใช้ตัวอย่างแมงกะพรุนจากโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

2. ศึกษาโครงสร้างของเนื้อเยื่อและเซลล์สร้างเข็มพิษในอวัยวะต่างๆ ของแมงกะพรุนโดยใช้เทคนิคมิญชวิทยาย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลินและอิโอซิน

3. ศึกษาคุณลักษณะเชิงเคมีของเนื้อเยื่อ และเซลล์สร้างเข็มพิษที่พบในแมงกะพรุน *Sanderia malayensis* และ *Rhopilema hispidum* โดยใช้เทคนิคการย้อมสีพิเศษ (Histochemistry) โดยใช้สีสีย้อม Periodic Acid Schiff (PAS), Alcian Blue

4. ศึกษาโครงสร้างภายในของเซลล์สร้างเข็มพิษในแมงกะพรุนหนัง *Rhopilema hispidum* และแมงกะพรุนไฟ *Sanderia malayensis* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

5. ศึกษากลไกการปล่อยเข็มพิษของแมงกระพรุนหนัง *Rhopilema hispidum* และแมงกะพรุนไฟ *Sanderia malayensis* โดยการกระตุ้นด้วยสารละลายต่างชนิด

บทที่2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แมงกะพรุนเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ในไฟลัมไนดาเรีย (Phylum Cnidaria) หรือไฟลัมซีเลนเทอราตา (Phylum Coelenterata) สมาชิกในไฟลัมนี้ ได้แก่ ปะการัง กัลปังหา ดอกไม้ทะเล ไฮดรา ส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในทะเล พบอาศัยในน้ำจืดเล็กน้อย เช่น ไฮดรา และแมงกะพรุนน้ำจืด

ลักษณะสำคัญของแมงกะพรุนคือมีสมมาตรแบบรัศมี (Radial symmetry) มีเนื้อเยื่อ 2 ชั้น คือ เนื้อเยื่อชั้นนอกทำหน้าที่เป็นผิวลำตัวเรียกว่า เอพิเดอร์มิส (Epidermis) และเนื้อเยื่อชั้นในทำหน้าที่เป็นเยื่อบุทางเดินอาหารเรียกว่า แกสโทรเดอร์มิส (Gastrodermis) ระหว่างเนื้อเยื่อชั้นนอกและเนื้อเยื่อชั้นในมีสารซึ่งมีลักษณะคล้ายวุ้น แทรกอยู่เรียกว่าชั้นโซเกลีย (Mesoglea) ทางเดินอาหารเป็นแบบถุงไม่สมบูรณ์มีปากแต่ไม่มีทวารหนักช่อง ทางเดินอาหารนี้อยู่กลางลำตัวทำหน้าที่เป็นทั้งทางเดินอาหารและ ระบบหมุนเวียน เรียกว่าแกสโทรวาสคูลาร์ คาวิตี (Gastrovascular cavity) มีเข็มพิษหรือนีมาโทซีสต์ (Nematocyst) ใช้ในการป้องกันและฆ่าเหยื่อ การกระจายตัวของเนมาโทซีสต์มักพบหนาแน่นที่บริเวณหนวด (Tentacle) ซึ่งอยู่รอบปากมากกว่าบริเวณอื่นๆ ช่วยในการหาอาหารและการต่อสู้กับศัตรู ไม่มีอวัยวะจำเพาะที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบหายใจ ระบบหมุนเวียนโลหิต และระบบขับถ่าย โดยทั่วไปอาศัยการแพร่ของก๊าซและของเสียต่างๆ ระหว่างน้ำที่อยู่รอบๆ ตัวกับผิวลำตัวโดยตรง หรือมีเซลล์ชนิดพิเศษเช่นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยอาหาร (nutritive cell) ช่วยทำหน้าที่ ย่อยและดูดซึมสามอาหาร เพื่อส่งอาหารไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของร่างกายต่อไป ระบบประสาทเป็นแบบข่ายใยประสาท (Nerve net) แผ่กระจายทั่วตัว ไม่มีการรวมกลุ่มของเซลล์ประสาทเป็นสมอง พบเซลล์ประสาทหนาแน่นบริเวณหนวด ดังนั้นเมื่อสัมผัสที่ส่วนใดส่วนหนึ่งของแมงกะพรุนจะเกิดการตอบสนองพร้อมกันทั้งตัว แมงกะพรุนมีรูปร่างเป็น 2 แบบ คือ รูปร่างแบบต้นไม้เรียกว่า โพลิป (Polyp) และรูปร่างคล้ายร่มหรือกระดิ่งคว่ำ เรียกว่า เมดูซา (Medusa) การสืบพันธุ์ มีทั้งแบบอาศัยเพศและแบบไม่อาศัยเพศแบบอาศัยเพศ โดยการสร้างเซลล์สืบพันธุ์มาผสมกันส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อหรือการแบ่งตัว และมีการสืบพันธุ์แบบสลับ (Alternative of generation) โดยมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยการแบ่งตัวหรือ แตกหน่อกับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศด้วยการสร้างเซลล์สืบพันธุ์มาผสมกัน ลำตัวของแมงกะพรุนประกอบด้วยวุ้นเป็นส่วนใหญ่ซึ่งมีน้ำเป็นองค์ประกอบมากถึงร้อยละ 95 มักพบในทะเลเขตร้อนหรือเขตอบอุ่น พบได้ตั้งแต่บริเวณผิวน้ำจนถึงทะเลลึก มีเพียงบางชนิดที่พบอาศัยอยู่ในน้ำจืด แมงกะพรุนมีจำนวนประมาณ 10,000 ชนิด (species) และมีประมาณ 100 ชนิดที่มีรายงานว่ามีพิษต่อมนุษย์ (Williamson et al., 1996; Kramp, 1961)

การเกิดพิษของแมงกะพรุน

พิษของแมงกะพรุนบรรจุอยู่ในแคปซูล (capsule) เรียกว่า นีมาโตซีส (nematocyst) ซึ่งกระจายอยู่ทั่วไปในทุกส่วนของแมงกะพรุน โดยพบมากที่บริเวณหนวด (tentacle) การสัมผัสทำให้บาดเจ็บได้ในหลายระดับขึ้นอยู่กับขนิดของแมงกะพรุน ปริมาณพิษที่ได้รับ และความต้านทานของแต่ละบุคคล ทั้งนี้บริเวณที่สัมผัสมีอาการได้หลากหลาย ตั้งแต่รู้สึกคัน มีผื่นเล็กน้อย ปวดแสบปวดร้อนบริเวณที่สัมผัสหรือได้รับพิษ ไปจนถึงทำให้หัวใจหรือระบบหายใจล้มเหลว แมงกะพรุนที่มีพิษและเป็นที่รู้จักทั่วไป ได้แก่ แมงกะพรุนกล่องบางชนิดในกลุ่ม Cubozoa และแมงกะพรุนไฟในกลุ่ม Scyphozoa และ Hydrozoa (สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเลและป่าชายเลน, 2560)

พิษของแมงกะพรุนเกิดจาก เมื่อผิวหนังสัมผัสกับแมงกะพรุนนีมาโทซีสต์ที่อยู่ภายในเซลล์เข็มพิษก็จะติดอยู่กับผิวหนังของเหยื่อ เมื่อแคปซูลเข็มพิษถูกกระตุ้นก็จะปล่อยเข็มพิษพุ่งออกมาพร้อมกับการฉีดพิษเข้าไปในผิวหนังของเหยื่อ ในตอนแรกเข็มพิษบางส่วนเท่านั้นที่ถูกปล่อยออกมา (Yanagihara et al., 2016) แต่เมื่อถูกกระตุ้นเข็มพิษที่เหลือจะถูกปล่อยออก การกระตุ้นเกิดได้หลายสาเหตุ เช่น แรงกระทบกระเทือนจากภายนอก สัมผัสกับน้ำจืดซึ่งมีเหลือต่ำ ความร้อน หรือการโดนสารบางชนิดที่ทำให้ผนังแคปซูลแตกออก เป็นต้น (Wilcox et al., 2016; Yanagihara et al., 2016)

การเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมและสถาณการณ์การแพร่กระจายของแมงกะพรุน

รายงานวิจัยในปัจจุปันชี้ให้เห็นว่ามีสถิติการพบการบูมของแมงกะพรุน (Jellyfish boom) และสถานภาพการแพร่กระจายต่างถิ่นเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และสามารถพบได้ทั่วไปตามภูมิภาคต่างๆ ของโลก เนื่องจากปัจจัยสำคัญคือการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น การปล่อยน้ำเสียหรือสารสารเคมีปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำ การท่องเที่ยว การขนส่งทางน้ำ การประมง เป็นต้น สาเหตุเหล่านี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม ทำให้สภาพแวดล้อมทางน้ำเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม และนอกจากนี้ผลกระทบจากโลกร้อนก็เป็นสาเหตุสำคัญอีกประการหนึ่ง (Purcell, 2005; Wolanski et al., 2006; Nastav et al., 2013; Halpern et al., 2008) โดยสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปนี้มีความเหมาะสมและเอื้อต่อการกระจายตัวของแมงกะพรุนบางชนิดมากขึ้น เนื่องจากปริมาณอาหาร ปริมาณอาหารที่สูงขึ้นในน้ำ (Anthophogenic) ประกอบกับอุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้ผู้ผลิตในระบบนิเวศชายฝั่งเพิ่มขึ้น ผู้บริโภคขั้นต้นในห่วงโซ่อาหารรวมถึงกลุ่มที่เป็นอาหารของแมงกะพรุนก็เพิ่มขึ้นด้วยเหตุนี้จึงทำให้สามารถพบแมงกะพรุนต่างถิ่นเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ยกตัวอย่างเช่น การพบแมงกะพรุนชนิด *Mnemiopsis leidyi* ในเขตทะเลดำ ทะเลแคสเปี้ยน เมดิเตอร์เรเนียน และทะเลเหนือ (Graham and Bayha, 2008) พบการแพร่กระจายของแมงกะพรุนชนิด *Phyllorhiza punctata* ในแถบตะวันตกของประเทศออสเตรเลีย ฮาวาย ซานดิเอโก ประเทศสหรัฐอเมริกา ทะเลแคริเบียน ทะเลเมดิเตอเรเนียน และอ่าวเมกซิโก (Graham and Bayha, 2008) พบการแพร่กระจายของแมงกะพรุนไฟชนิด *Sanderia malayensis* บริเวณปากแม่น้ำแยงซี ประเทศจีน (Xian et al.,

2005) พบการแพร่กระจายของแมงกะพรุนชนิด *Blackforida virginica* ในแถบประเทศบราซิลและอาร์เจนตินา (Genzano et al., 2006) อินเดีย โปรตุเกส (Re, 1996; Marques et al., 2015) โรมาเนีย (Mills and Sommer, 1995; Chícharo et al., 2009) เป็นต้น ซึ่งเหตุการณ์เหล่านี้สะท้อนให้เห็นว่าสภาพแวดล้อมทางทะเลมีความเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องจนทำให้เกิดการรุกรานของสัตว์ต่างถิ่นได้ และในอนาคตอาจพบการแพร่กระจายของแมงกะพรุนต่างถิ่น แมงกะพรุนที่มีพิษรุนแรงก็อาจมีจำนวนเพิ่มขึ้นได้ในทุกภูมิภาคของโลกรวมถึงประเทศไทยด้วยเช่นกัน ดังนั้นการเตรียมการรับมือโดยการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารพิษในแมงกะพรุนเพื่อพัฒนาแนวปฏิบัติที่ถูกต้อง และการพัฒนาเภสัชภัณฑ์สำหรับการรักษาพิษจากแมงกะพรุนจึงเป็นเรื่องจำเป็นและสำคัญ

สถาณภาพการแพร่กระจายของแมงกะพรุนในประเทศไทยและจังหวัดชลบุรี

สำหรับประเทศไทยผลจากการสำรวจและรวบรวมตัวอย่างแมงกะพรุนพิษ โดยกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งระหว่างปี 2553–2560 ครอบคลุมพื้นที่ชายฝั่งทะเล เบื้องต้นพบว่าแมงกะพรุนพิษกลุ่มแมงกะพรุนกล่องมีการแพร่กระจายในพื้นที่ชายฝั่ง โดยพบแมงกะพรุนกล่อง (Cubozoa) จำนวน 11 ชนิด (เป็นแมงกะพรุนพิษหรือสงสัยว่ามีพิษ 7 ชนิด) แมงกะพรุนกลุ่มไซโฟซัว (Scyphozoa) ประมาณ 15 ชนิด (เป็นแมงกะพรุนไฟ 2 ชนิด) และแมงกะพรุนกลุ่มไฮโดรซัว (Hydrozoa) 3 ชนิด (เป็นแมงกะพรุนพิษ 1 ชนิด) แมงกะพรุนกล่อง เป็นแมงกะพรุนพิษที่มีรายงานว่าทำให้เสียชีวิตได้ โดยมีพิษต่อระบบต่าง ๆ คือ ระบบหัวใจ สามารถทำให้หัวใจหยุดเต้นและเสียชีวิตได้ภายใน 2-3 นาที พิษต่อระบบประสาท มีผลทำให้กล้ามเนื้อเกี่ยวกับการหายใจเป็นอัมพาตและหยุดหายใจ รวมทั้งทำให้กล้ามเนื้อแขนขาเป็นอัมพาต และเสียชีวิตจากการจมน้ำได้ พิษต่อระบบเลือด ทำให้เกิดการทำลายเม็ดเลือดแดง และเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันตามมาได้ สำหรับจังหวัดชลบุรีพบ**ความหลากหลายชนิดและการแพร่กระจายของแมงกะพรุน**ในช่วงปี 2553–2559 สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเล และป่าชายเลน ได้สำรวจและรวบรวมตัวอย่าง บริเวณชายหาดพัทยา (2553) ชายหาดพัทยาใต้บริเวณแหลมบาหลีฮาย (2557–2558) ชายหาดจอมเทียน (2558–2559) และบริเวณชายหาดบางแสน (2559) พบแมงกะพรุนจำนวน 7 ชนิด เป็นแมงกะพรุนในกลุ่ม Cubozoa หรือแมงกะพรุนกล่อง 1 ชนิด และแมงกะพรุนกลุ่ม Scyphozoa 6 ชนิด (สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเลและป่าชายเลน, 2560)

ข้อจำกัดและแนวทางการศึกษา

จากสถาณภาพการแพร่กระจายของแมงกะพรุนจะเห็นได้ว่าชายฝั่งจังหวัดชลบุรีมีโอกาสพบแมงกะพรุน รวมถึงแมงกะพรุนพิษได้มากโดยเฉพาะในฤดูมรสุม แต่ประชาชนยังขาดความรู้ความเข้าใจเรื่องการเกิดพิษและแนวทางการปฐมพยาบาลเบื้องต้น จึงควรมีการให้ความรู้เกี่ยวกับแมงกะพรุนพิษแก่หน่วยงานที่เกี่ยวข้องทั้งภาครัฐ ประชาชนและผู้ประกอบการธุรกิจในพื้นที่เสี่ยง และปัจจุบันมีการประชาสัมพันธ์การพยาบาลเบื้องต้นโดยใช้น้ำส้มสายชู แต่รายงานวิจัยพบว่าน้ำส้มสายชูไม่ได้ช่วยรักษาพิษแมงกะพรุนได้ทุกชนิด ตรงกันข้ามน้ำส้มสายชูอาจกระตุ้นให้อาการเกิดพิษเพิ่มมากขึ้นสำหรับแมงกะพรุนบางชนิด เช่น แมงกะพรุนโนะมุระ (*Nemopilema nomurai*) ที่

พบว่าน้ำส้มสายชูกระตุ้นให้เกิดการปล่อยของเข็มพิษจากเซลล์เข็มพิษทำให้การเกิดพิษรุนแรงมากขึ้น (Pyo et al., 2016)

ดังนั้นจึงควรทำการสำรวจเพิ่มเติมเนื่องจากองค์ความรู้เกี่ยวกับพิษและกลไกการเกิดพิษของแมงกะพรุนพิษในประเทศไทยยังมีน้อย นอกจากนี้ในปัจจุบันยังขาดข้อมูลที่สำคัญอีกหลายด้าน อาทิ ความชุกชุม และชีววิทยาของแมงกะพรุนพิษ จึงจำเป็นต้องเร่งทำการศึกษาในรายละเอียด หากปราศจากการจัดการที่เหมาะสมและทันเวลา อาจทำให้เกิดผลกระทบต่อการท่องเที่ยวเป็นอย่างมากได้

งานวิจัยครั้งนี้มุ่งศึกษาในตัวอย่างแมงกะพรุน 2 ชนิด ได้แก่ แมงกะพรุนหนัง *Rhopilema hispidum* ซึ่งเป็นชนิดที่พบมากในเขาชายฝั่งประเทศไทยรวมถึงจังหวัดชลบุรี และ แมงกะพรุนไฟ *Sanderia Malayensis* ซึ่งเป็นชนิดมีพิษที่มีการเพาะเลี้ยงในระบบปิดที่มีการควบคุม ในสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

แมงกะพรุนหนัง *Rhopilema hispidum* จัดอยู่ในคลาสไซโฟซัว Scyphozoa หรือกลุ่มแมงกะพรุนแท้ มีร่างกายเป็นก้อนคล้ายวุ้นโปร่งใส มีรูปร่างคล้ายร่ม เมื่อโตเต็มที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางร่มได้ถึง 70 เซนติเมตร และมีน้ำหนักได้ถึง 30 กิโลกรัม บริเวณขอบร่มเป็นริ้วตรงกลางด้านเว้ามีส่วนยื่นออกไปเป็นช่อคล้ายดอกกะหล่ำที่มีปากอยู่ตรงกลาง แมงกะพรุนหนังจัดเป็นแมงกะพรุนที่สามารถรับประทานได้ (Edible jellyfish) (Omori and Kitamura, 2004) ชาวประมงจะจับมาแล้วนำไปล้างด้วยโซเดียมไบคาร์บอเนตและสารส้ม เพื่อให้เมือกหลุดจากตัวแมงกะพรุนและทำให้มีเนื้อที่แข็งขึ้น ก่อนจะนำไปปรุงอาหาร พิษของแมงกะพรุนหนัง พบรายงานว่าทำให้เกิดการระคายเคืองปานกลางผิวหนังบริเวณสัมผัสและในรายที่ได้รับพิษมากพบว่าทำให้เกิดอาการบวมแดงและเจ็บปวดบริเวณผิวหนังที่สัมผัสกับแมงกะพรุน และอาจรุนแรงถึงกับเกิดแผลไหม้ร่วมกับอาการปวดแสบปวดร้อนบริเวณผิวหนังได้ (Kawahara et al., 2006; Othman et al., 1996) โดยอาการเกิดพิษจะเพิ่มขึ้นหลังได้รับพิษเป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง โดยมีอาการบวมเพิ่มขึ้น อาการบวมจะลดลงในวันต่อมา แต่จะพบจุดบวมแดงคงอยู่นานกว่า 30 วัน (Kawahara et al., 2006) อย่างไรก็ตามข้อมูลผลกระทบที่เกิดจากพิษแมงกะพรุนในกลุ่มที่ใช้บริโภคมีน้อยมาก โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อศึกษาโครงสร้างของเข็มพิษ การแพร่กระจายของเข็มพิษในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของร่างกาย และกลไกการกระตุ้นการปล่อยเข็มพิษ องค์ความรู้ที่ได้จะนำไปสู่การพัฒนาแนวปฏิบัติที่ถูกต้องสำหรับการแก้พิษแมงกระพรุน และการผลิตเภสัชภัณฑ์สำหรับชุมชนต่อไป

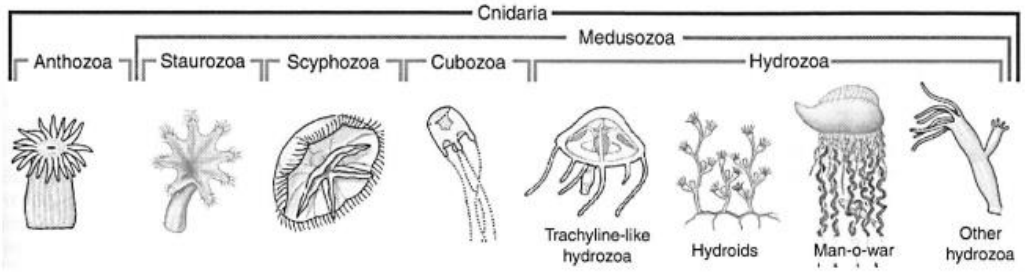
นอกจากการศึกษากลไกการเกิดพิษแล้วอาจทำการระบุตำแหน่งของคอลลาเจนในเนื้อเยื่อของแมงกระพรุน เพื่อให้เป็นวัตถุดิบสำหรับการสกัดคอลลาเจนให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด เนื่องจาก *การศึกษาในแมงกะพรุนหนัง Rhopilema hispidum* พบว่ามีน้ำเป็นองค์ประกอบมากถึงร้อยละ 97.80 ± 0.36 มีปริมาณเถ้าร้อยละ 1.56 ± 0.56 และมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 0.50 ± 0.23 ของน้ำหนักสด และโปรตีนที่พบมากที่สุดคือคอลลาเจน (Khong et al., 2016) ดังนั้นแมงกะพรุนจึงเป็นแหล่งที่น่าสนใจสำหรับการสกัดคอลลาเจน การศึกษาเนื้อเยื่อโดยการย้อมสีชนิดพิเศษในโครงการวิจัยนี้จะช่วยระบุตำแหน่งของคอลลาเจนในเนื้อเยื่อแมงกะพรุนได้เป็นอย่างดีและเป็นประโยชน์อย่างมากในการนำไปต่อยอดการสกัดคอลลาเจนต่อไป

แมงกะพรุนไฟ *Sanderia Malayensis* เป็นแมงกระพรุนแท้เช่นกับแมงกะพรุนหนัง แต่มีพิษรุนแรงกว่า พบได้ในเขตชายฝั่งตะวันออกของประเทศจีน และทางตอนใต้ของประเทศญี่ปุ่น เมื่อโตเต็มที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางร่มประมาณ 20 เซนติเมตร ในโครงการวิจัยนี้ จะใช้แมงกะพรุนไฟ *Sanderia Malayensis* เป็นตัวเปรียบเทียบโครงสร้าง ปริมาณ การแพร่กระจายของเข็มพิษในเนื้อเยื่อบริเวณต่างๆ รวมถึงกลไกการกระตุ้นการปล่อยเข็มพิษ ซึ่งคาดว่าจะช่วยให้เข้าใจกลไกการกระตุ้นของเซลล์เข็มพิษในแมงกะพรุนหนังได้ดีขึ้น

2.1 ชีววิทยาของแมงกะพรุน

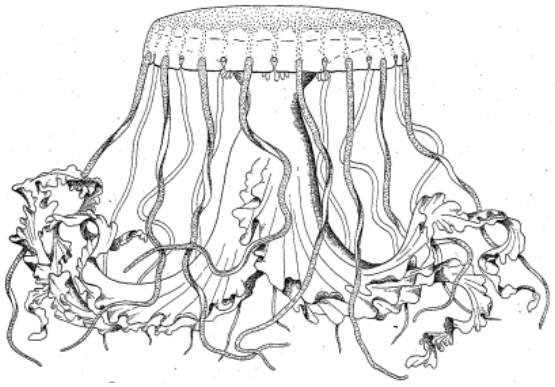
2.1.1 การจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน

แมงกะพรุนไฟมาเลเซียเป็นแมงกะพรุนแท้ (True jellyfish) ซึ่งเป็นสัตว์ในไฟลัมไนดาเรีย (Cnidaria) ที่ถูกจัดอยู่ในคลาสไซโฟซัว (Scyphozoa) สัตว์ในไฟลัมนี้มีความซับซ้อนน้อย แต่เซลล์ร่างกายมีการทำงานร่วมกันเกิดเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆ ซึ่งมีเนื้อเยื่อสองชั้น (diplobastic animal) เรียกสัตว์ที่อยู่ในกลุ่มนี้ว่า (Cnidarians) และมีสัตว์ชนิดอื่นๆที่อยู่ในไฟลัมนี้ นอกจากแมงกะพรุนเช่น ไฮดรา ดอกไม้ทะเล กัลปังหา และปะการัง เป็นต้น แมงกะพรุนแท้มีชั้นมีโซเกลียที่หนาและภายในมีสารจำพวกเจลาติน (gelatin) ลักษณะคล้ายวุ้น ซึ่งมีมากกว่า 200 ชนิด Parracho & Morais (2015)



ภาพที่ 2-1 ลักษณะทั่วไปและการจำแนกกลุ่มสัตว์ในไฟลัมไนดาเดีย (Cnidaria)
ที่มา: (Hickman et al, 2014)

Phylum Cnidaria
Class Scyphozoa
Subclass Discomedusae
Order Semaeostomeae
Family Pelagiidae
Genus Sanderia

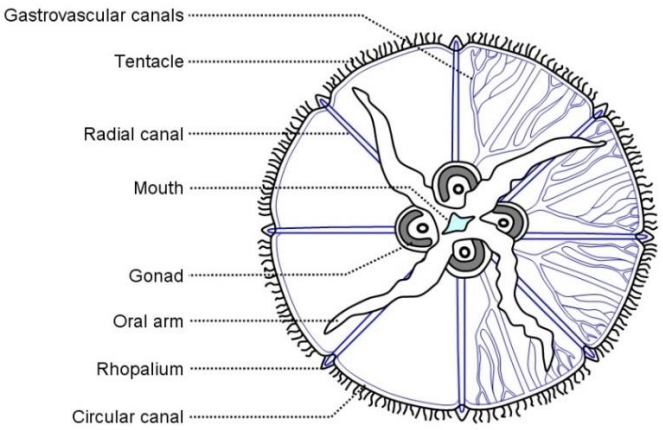


ภาพที่ 2-2 ลักษณะสัณฐานภายนอกของแมงกะพรุนไฟมาเลเซีย *Sanderia malayensis*
ที่มา: (Mater, 1902)

แมงกะพรุนไฟมาเลเซีย ชื่อสามัญ Malaysian sea nette ชื่อวิทยาศาสตร์ *Sanderia malayensis* บรรยายลักษณะทางอนุกรมวิธานของแมงกะพรุนดังนี้ แมงกะพรุนไฟมาเลเซียจัดอยู่ในจีนัส Sanderla พบกระจายอยู่ในบริเวณเขตร้อน ในมหาสมุทรอินเดียและหมู่เกาะมาเลเซีย ประกอบด้วยส่วนของแขนรอบปาก (oral arm) ที่ทำหน้าที่ในการว่ายน้ำ ซึ่งเป็นอวัยวะที่สามารถรับสัมผัสได้ มีหนวด (tentacle) ลักษณะคล้ายริบบิ้นจำนวน 16 เส้นหลักและแต่ละเส้นแตกอออกเป็น 2 แฉก รวมทั้งหมดเป็น 32 แฉก ร่ม (umbrella) มีลักษณะแบนและมีแผ่นกั้นคลุมมาถึงขอบร่ม ร่มมีความกว้างประมาณ 90 มิลลิเมตร ซึ่งมีเข็มพิษอยู่โดยรอบ ซึ่งบริเวณศูนย์กลางของร่มจะมีเข็มพิษกระจายเป็นแนวยาวอยู่หนาแน่นและจำนวนค่อยๆลดน้อยลงบริเวณรอบนอกของร่ม จนไม่พบเข็มพิษในบริเวณขอบร่ม คอหอย (Esophagus) มีลักษณะเป็นท่อยาวเกิดจากเพอเรเดียล คอนเนอร์ (Perradial coners) 4 อัน โดยภายในมีลักษณะเป็นรูปหัวใจ มีอวัยวะสืบพันธุ์ภายนอกอยู่รอบนอก ลักษณะคล้ายรูปนิ้วมือ มีจำนวนประมาณ 25-30 อัน และอวัยวะสืบพันธุ์ภายใน (gonads) จำนวน 4 อัน กระเพาะอาหาร (stomach) มีลักษณะเป็นกระเปาะ แตกออกเป็น 32 แฉกในแนวรัศมีของหนวดที่สามารถรับสัมผัสได้ Mater (1902) ซึ่งมีการจัดจำแนกให้อยู่ในลำดับต่างๆทางอนุรมวิธาน

2.1.2 สัณฐานภายนอกของแมงกะพรุน

แมงกะพรุนมีสมมาตรร่างกายแบบรัศมี รูปร่างแบบ (medusa) ซึ่งเป็นลักษณะร่างกายที่คล้ายตัวร่มหรือระฆังคว่ำ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-40 เซนติเมตรหรือบางชนิดอาจถึง 2 เมตร ขอบร่มจะมีหนวดห้อยลงมาด้านล่าง มีจำนวน 4 เส้นหรือทวีคูณของ 4 และตรงกลางใต้ร่มจะมีท่อลักษณะคล้ายทรงกระบอก เรียกว่า มานูเบรียม (manubrium) ซึ่งความยาวขึ้นอยู่กับชนิดของแมงกะพรุน ตรงปลายเป็นช่องเปิดที่ถือว่าเป็นปาก บริเวณขอบปากจะมีส่วนที่ยื่นลงมาขนาดใหญ่ลักษณะคล้ายหนวดหรือแขน เรียกว่า แขนรอบปาก (oral arm) แสดงดังภาพที่ 2-3



ภาพที่ 2-3 ลักษณะสัณฐานภายนอกของแมงกะพรุนแท้
(ที่มา: http://mesosyn.com)

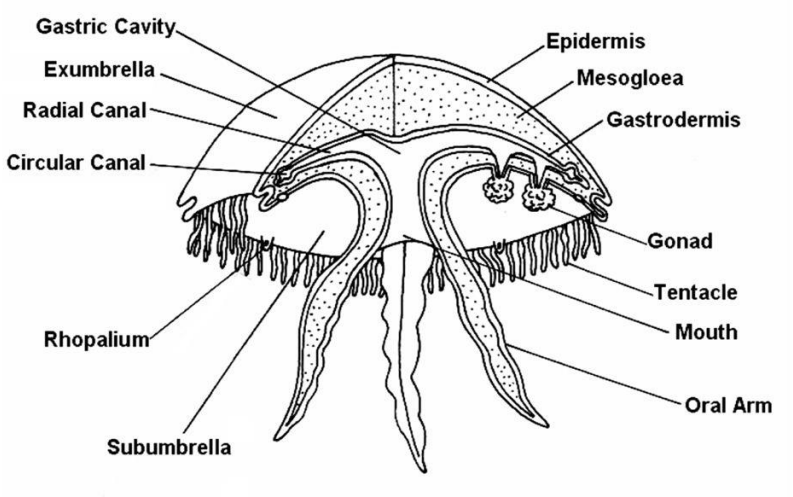
2.1.3 กายวิภาคและสรีรวิทยาของแมงกะพรุน

ระบบเนื้อเยื่อ ร่างกายของแมงกะพรุนประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 2 ชั้น ได้แก่ชั้นนอกเป็นเนื้อเยื่อบุผิว (epidermis) และชั้นในเป็นชั้นที่บุอยู่บริเวณทางเดินอาหาร (gastrodermis) ระหว่างทั้งสองชั้นนี้จะมีชั้นที่มีลักษณะคล้ายวุ้น เรียกว่า มีโซเกลีย (mesoglea) ซึ่งจะมีเซลล์อะมีโบไซต์ (amoebocyte) เป็นเซลล์ที่สามารถเคลื่อนที่ได้โดยจะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหาร การขนส่งสารอาหาร การซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่เสียหาย และการจับกินเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

ระบบประสาท ระบบประสาทของแมงกะพรุนเป็นระบบประสาทแบบร่างแห (nerve nets) โดยจะมีเซลล์ประสาทเชื่อมต่อกันเป็นคู่ๆ เรียงตัวกันชั้นเดียวหรือ 2 มิติทั่วร่างกาย ซึ่งในการรับความรู้สึกจากจุดใดจุดหนึ่งของร่างกายจะส่งกระแสประสาทต่อไปเป็นทอดๆทั่วทั้งระบบร่างกาย เรียกว่า ดิฟฟิวคอนดักชั่น (diffuse conduction) ยังมีปมประสาท (ganglia) และมัดประสาทวงแหวน (nerve ring) ถือว่าเป็นการรวมตัวและทำงานร่วมกันของเซลล์ประสาทจำนวนมาก ซึ่งจะอยู่บริเวณขอบร่ม

ระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินอาหารของแมงกะพรุนเป็นแบบไม่สมบูรณ์ (incomplete digestive tract) คือมีปากแต่ไม่มีทวารหนัก อาหารจะถูกจับด้วยหนวดและเข็มพิษ จากนั้นจะถูกส่งเข้าปากและเข้าไปที่ช่องขนาดใหญ่กลางลำตัวเรียกว่า ซีเลนเทอรอน (coelenteron) หรือแกสโทรวาสคูลาคาวิตี (gastrovascular cavity) อาหารจะถูกย่อยโดยน้ำย่อยทำให้ได้สารอาหารที่จะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย ส่วนสารอาหารที่มีขนาดใหญ่จะถูกย่อยต่อในเซลล์เยื่อบุซีเลนเทอรอนด้วยกระบวนการกินของเซลล์ (phagocytosis) ซึ่งแมงกะพรุนมีโครงสร้างในการย่อยอาหารที่เจริญดี ถัดจากปากเข้าไปทางท่อมานูเบรียมจะพบกระเพาะอาหาร (stomach) ที่เป็นโพรงค่อนข้างใหญ่อยู่กลางลำตัวสามารถยืดขยายเพิ่มพื้นที่สำหรับการย่อยอาหารออกไปด้านข้างเป็น 4 ถุงย่อยเรียกแต่ละถุงว่า แกสตริก เพาช์ (gastric pouch) โดยภายในจะมีกลุ่มของเส้นใยที่เรียกว่า แกสตริก ฟิลาเมนท์ (gastric filament) ในการหาอาหารจะใช้หนวดในการจับเหยื่อ โดยมีการหดตัวของกล้ามเนื้อและส่งต่อไปยังแขนรอบปาก Mori et al. (2017)

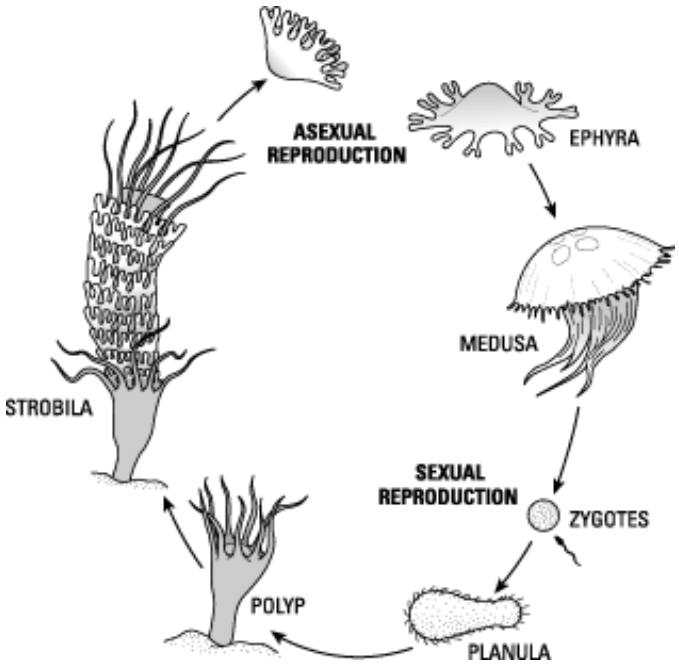
การแลกเปลี่ยนแก๊สและระบบขับถ่าย : มีการแลกเปลี่ยนแก๊สและขับถ่ายของเสีย คือ แอมโมเนียด้วยการแพร่ผ่านทางผิวร่างกายที่สัมผัสกับน้ำโดยตรง ซึ่งที่เซลล์ผิวหนังจะมีซีเลียที่ช่วยโบกพัดทำให้เกิดการหมุนเวียนบนผิวของร่างกาย Rupper et al. (2004)



ภาพที่ 2-4 สัณฐานภายในของแมงกะพรุนแท้ ที่มา: (https://slideplayer.com)

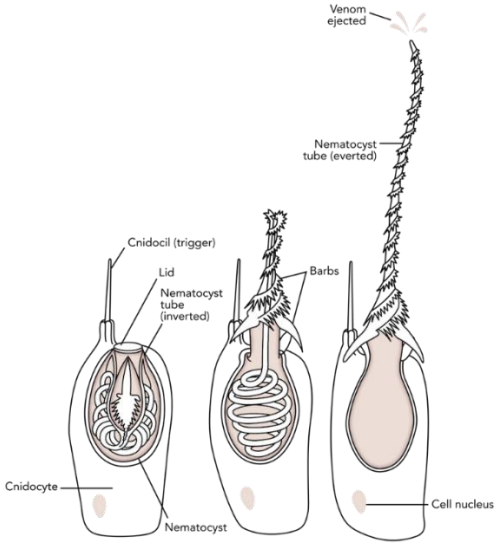
2.1.4 การสืบพันธุ์และการเจริญเติบโต

วงชีวิตของแมงกะพรุนแท้ในคลาสไซโฟซัว มีรูปแบบของลำตัวเป็นแบบโพลิปและเมดูซ่า การสืบพันธุ์ของแมงกะพรุนแท้เป็นแบบอาศัยเพศโดยมีเพศแยก เซลล์สืบพันธุ์จะถูกสร้างจากเนื้อเยื่อชั้นในและเจริญพัฒนาอยู่ในชั้นบุทางเดินอาหาร เซลล์สืบพันธุ์ทั้งไข่และสเปิร์มจะถูกปล่อยออกมาปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (external fertilization) หลังจากปฏิสนธิจะได้ไซโกต (zygote) จากนั้นจะเจริญต่อไปเป็นตัวอ่อนที่เรียกว่า พลานูลา (planula) ซึ่งตัวอ่อนพานูลาจะมีเนื้อเยื่อชั้นนอกที่มีซิเลียทำหน้าที่ช่วยในการว่ายน้ำ โดยตัวอ่อนจะว่ายน้ำโดยหันด้านตรงข้ามปาก (aboral) ไปด้านหน้าและหาพื้นที่ในการลงเกาะเพื่อเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัย แสดงดังภาพที่ 2-5 Pechenik (2015)



ภาพที่ 2-5 วงชีวิตของแมงกะพรุนแท้ ที่มา: (http://www.thaigoodview.com)

2.1.5 ข้อมูลเกี่ยวกับเข็มพิษ (nematocyst)

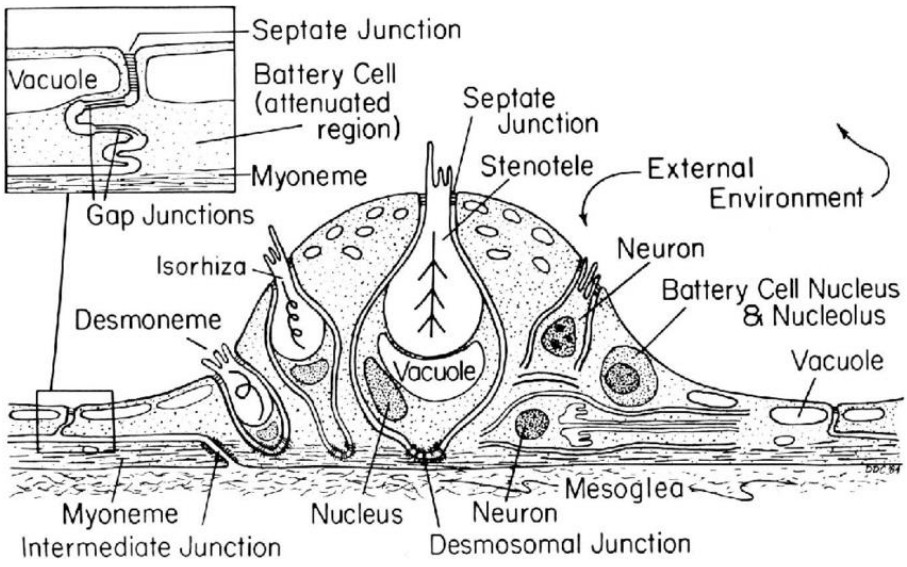


ภาพที่ 2-6 องค์ประกอบต่างๆของเซลล์สร้างเข็มพิษ และการปล่อยออกมาของเข็มพิษ
ที่มา: (Pechenik, 2015)

เซลล์เข็มพิษหรือนีมาโตซิส (nematocyst) เกิดจากการหลั่งของเซลล์พิเศษที่ไม่มีชีวิต ที่เรียกว่านีมาโตไซต์ (nematocyte) หรือไนโดไซต์ (cnidocyte) ซึ่งถูกพัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิด (multipotent stem cells) ในพวก Coelenterates พบเข็มพิษซึ่งเปรียบเสมือนอาวุธที่ทำหน้าที่ใน

การจับเหยื่อและป้องกันตัวจากผู้ล่า ในระยะการพัฒนาจะมีลักษณะเป็นถุงคอลลาเจนที่บรรจุน้ำพิษ Kass-Simon & Scappaticci (2002) เป็นสารจำพวกโปรตีนที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ cytotoxic, hemolytic, hepatotoxic, cardiotoxic และneurotoxic ส่วนประกอบของน้ำพิษในแมงกะพรุนต่างชนิดจะมีความแตกต่างกัน และอาจจะขึ้นอยู่กับบริเวณถิ่นที่อยู่อาศัยทางภูมิศาสตร์ตลอดจนความแตกต่างของฤดูกาล Pyo et al. (2016) เซลล์เข็มพิษประกอบด้วยแคปซูล (capsule) ฝาปิด (operculum) ท่อกลวงหรือหลอดเข็ม (nematocyst tube) ซึ่งท่อกลวงที่มีสารอยู่ในสถานะเป็นของเหลวซึ่งมีความเป็นพิษ โดยท่อกลวงจะม้วนขดอยู่ภายในแคปซูล เมื่อเซลล์เข็มพิษถูกกระตุ้นฝาจะเปิดออกจากแคปซูล ท่อกลวงและสารพิษภายในจะถูกฉีดออกมาเพื่อป้องกันตัวเองและทำร้ายเหยื่อ Parracho & Morais (2015) สารเคมีบางชนิดมีการกระตุ้นให้มีการปล่อยของเข็มพิษ โดยเข็มพิษจะถูกปล่อยออกมาภายในเวลา 3 มิลลิวินาที Ryuju Kitatani et al. (2015) ซึ่งเซลล์เข็มพิษ (nematocysts) จะมีขนาดและรูปร่างต่างๆกัน โดยสารจำแนกเข็มพิษได้มากกว่า 25 ชนิด แสดงดังภาพที่ 2-8 ซึ่งสามารถแบ่งตามหน้าที่ ได้แก่ การจับเหยื่อและการเกาะติดกับพื้นผิว Pyo et al. (2016) เมื่อเข็มพิษมีการพัฒนาเต็มที่จะเคลื่อนไปในบริเวณที่พร้อมจะปล่อยหรือพุ่งออกทางด้านนอก ถ้าได้รับการกระตุ้นที่เหมาะสมจะทำให้เข็มพิษตอบสนองโดยการปล่อยหรือฉีดท่อกลวงออกมาที่เป้าหมาย ซึ่งยังไม่ทราบชัดเจนถึงรูปแบบเชิงเสรีรวิทยาของกระบวนการรับความรู้สึกและกลไกการตอบสนองแต่สันนิษฐานว่าอาจจะเกี่ยวข้องกับแรงดันออสโมซิสภายในแคปซูล ลักษณะการทำงานขึ้นอยู่กับชนิดของเข็มพิษ โดยจะล้อมรอบหรือแท่งเป้าหมาย ซึ่งเข็มพิษเป็นองค์ประกอบในเซลล์ (organelles) ที่ถูกหลั่งออกมาเรียกว่า Cnidae Kass-Simon & Scappaticci (2002)

2.1.5.1 การพัฒนาของเข็มพิษ



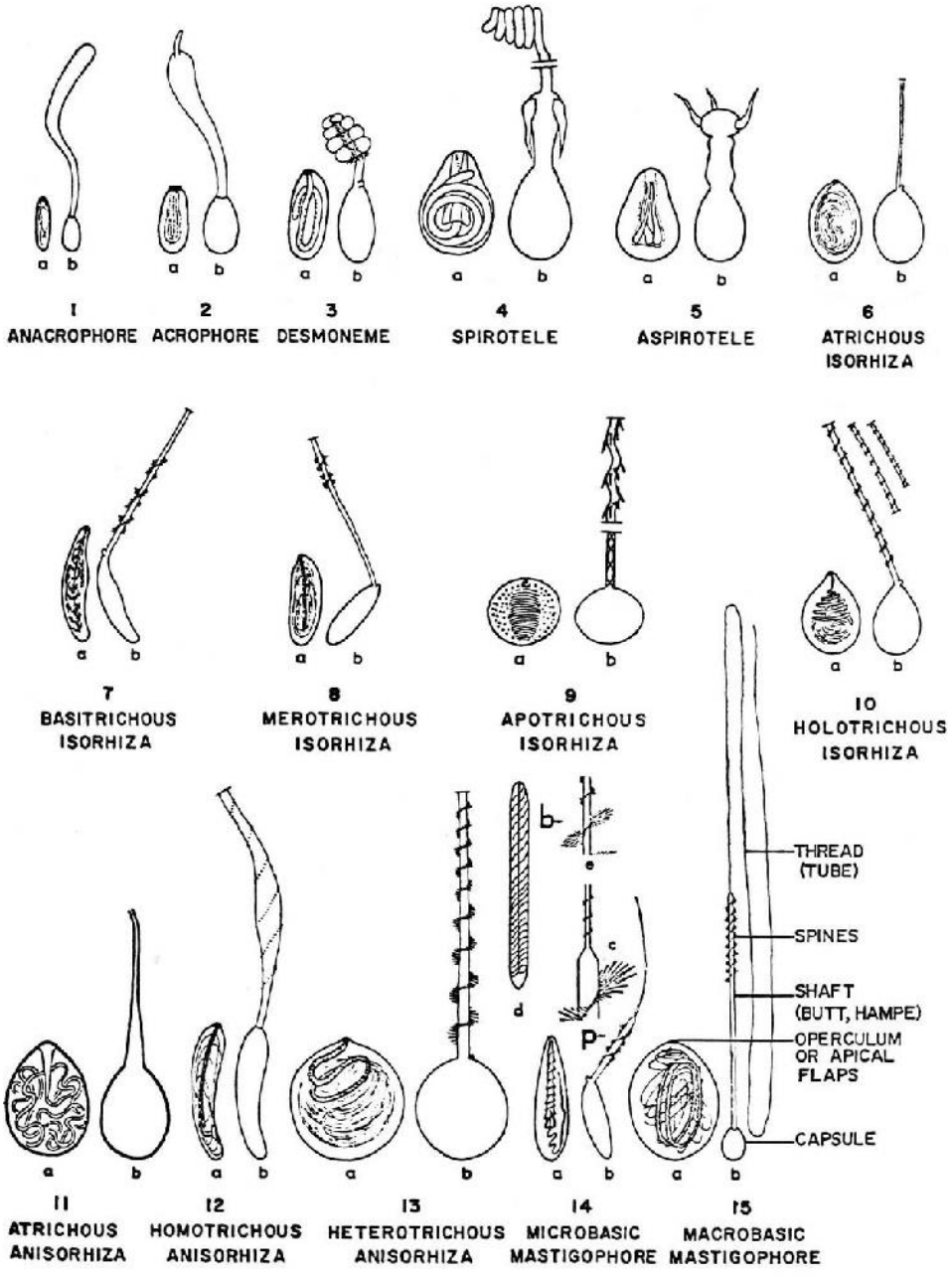
ภาพที่ 2-7 การพัฒนาของเข็มพิษชนิดต่างๆในบริเวณ Battery Cell
ที่มา: (Kass-Simon & Scappaticci, 2002)

เข็มพิษพัฒนามาจากเซลล์ร้างเข็มพิษ (nematocytes) ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์มีพิษของ Interstitial cells หรือ i-cells ที่อยู่ตลอดในเนื้อเยื่อชั้นนอก (ectodrem) และเนื้อเยื่อชั้นใน (endodrem) เมื่อ Interstitial cells มีการเปลี่ยนแปลง (differentiate) ส่วนใหญ่จะเรียงตัวในบริเวณเยื่อบุผิวชั้นนอก (ectodermal epithelial cells) ที่เรียกว่า battery cell ซึ่ง i-cells จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเข็มพิษที่อยู่บนเซลล์สร้างเข็มพิษ โดย i-cells จะเกิดเป็นกลุ่มของ 2n cells เกิดจากกลุ่มเล็กๆ 2 กลุ่มหรือกลุ่มขนาดใหญ่ถึง 4 กลุ่ม ซึ่งแต่ละกลุ่มของ i-cells มีเข็มพิษอยู่จำนวน 4 8 และ 16 เซลล์ เซลล์ทั้งหมดในกลุ่มเดียวกันจะสร้างแคปซูลชนิดเดียวกัน เข็มพิษที่ล้อมรอบด้วยเซลล์สร้างเข็มพิษที่พัฒนาแล้วจะอยู่บนยอดสุดของเซลล์ โดยเข็มพิษจะถูกห่อหุ้มด้วยแคปซูลที่สร้างขึ้นจากเซลล์สร้างเข็มพิษ เริ่มจาก precursor cell และเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เข็มพิษ จากนั้นจะเคลื่อนไปบริเวณที่พร้อมจะปล่อยออกด้านนอก ในพวกแมงกะพรุนจะพบเข็มพิษที่เจริญเต็มที่และอัดกันหนาแน่น ทำให้มีลักษณะเป็นปุ่มยื่นออกมาอย่างชัดเจนกระจายอยู่รอบนอก โดยเฉพาะในหนวดจึงเรียกว่า cnidosacs เข็มพิษเป็นส่วนที่ไม่มีชีวิตโดยถูกหลั่งออกมาจากส่วนที่มีชีวิต และถูกออกแบบให้มีความซับซ้อนและรวดเร็วในการทำงาน ซึ่งองค์ประกอบของเข็มพิษจะถูกสร้างจากเอนโดพาสมิสเรติคูลัมชนิดขุรขระ (rough endoplasmic reticulum) และ Golgi complexes ซึ่งเข็มพิษจะหลั่งองค์ประกอบของสารโมเลกุลขนาดใหญ่ออกมาเป็นถุง (vesicle) และส่งผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ออกไป โดยบรรจุด้วยกรดอะมิโนพวก glutamic และ aspartic ที่ต่อด้วยพันธะเปปไทด์จำนวนมาก สารพิษที่เป็นของเหลวในแคปซูลที่มี collagenous เป็นองค์ประกอบ และสายท่อกลวงบรรจุพวก sulfur metalloproteins แคปซูลประกอบด้วยชั้นบางๆ 2 ชั้น มีองค์ประกอบของสารจำพวกโปรตีนคล้ายคอลลาเจน ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดต่างๆได้แก่ proline, hydroxyproline, glycine และ cysteine ที่เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bonds) จะขยายขนาดและล้อมรอบท่อกลวงที่ค้ำจุลโดย microtubules และปลายท่อที่อยู่ภายนอกจะกลับเข้าไปอยู่ภายแคปซูล ท่อกลวงที่กลับเข้าไปภายในจะมีคุณสมบัติและโครงสร้างแตกต่างไปจากเดิม Kass-Simon & Scappaticci (2002)

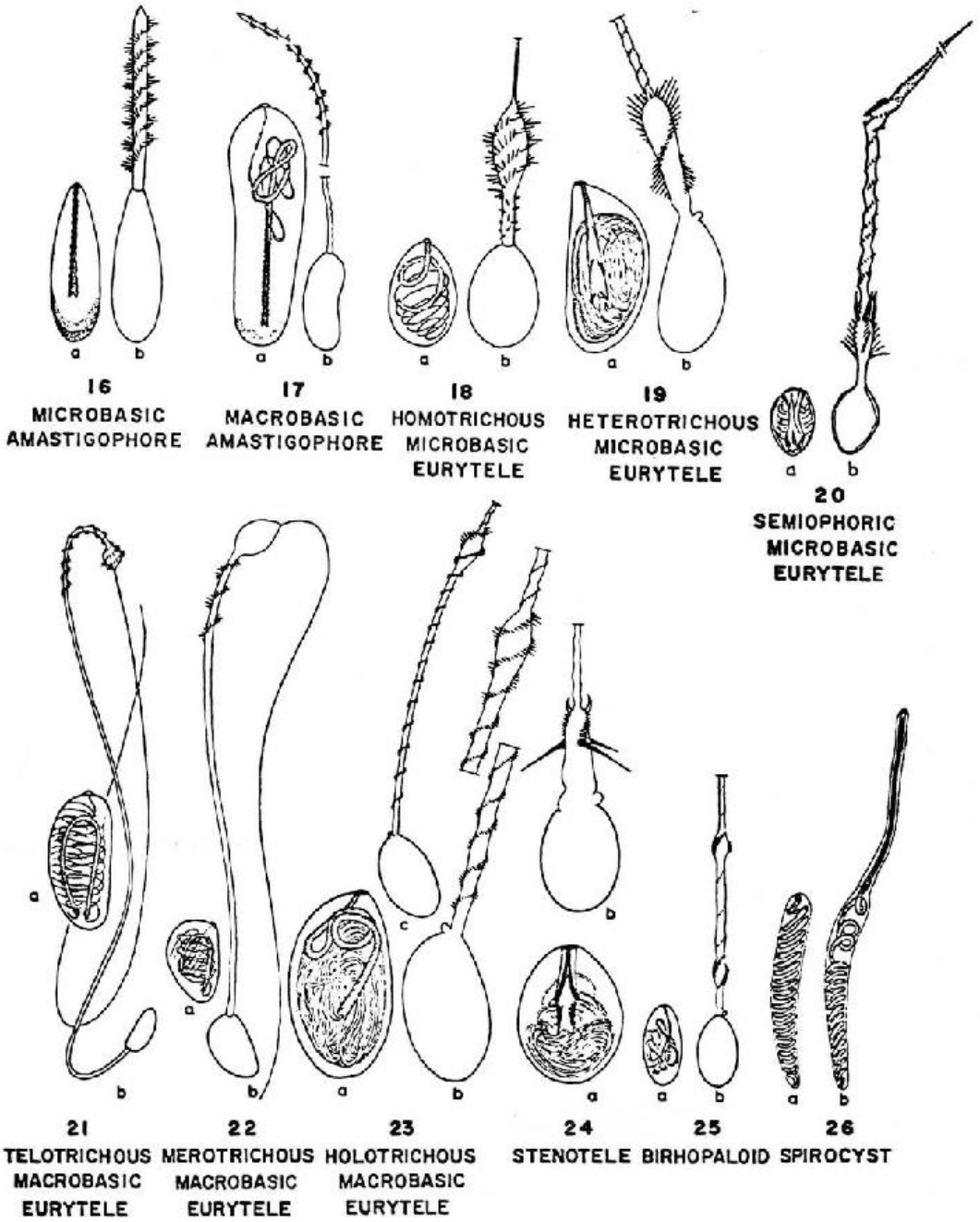
2.1.5.2 การจำแนกเข็มพิษจากสัณฐานวิทยา

เข็มพิษจำแนกได้เป็น 25 ชนิด พบใน class Hydrozoa 22 ชนิด โดยมี 17 ชนิดที่พบในคลาสนี้ class Scyphozoa 4 ชนิด และ class Anthozoa 6 ชนิด ซึ่งการจัดจำแนกไม่เกี่ยวข้องกับสายวิวัฒนาการ แต่เกี่ยวกับโครงสร้างและลักษณะของท่อกลวง แสดงดังภาพที่ 2-8 กลุ่มแรกแบ่งตามท่อกลวงที่มีปลายเปิดหรือปิด ท่อกลวงปลายเปิดเรียกว่า stomocnidae และท่อกลวงปลายปิดเรียกว่า astomocnidae ซึ่งกลุ่ม stomocnidae เช่น stenotele จะปล่อยสารพิษเข้าไปที่เหยื่อ astomocnidae เช่น desmoneme ซึ่งจะทำหน้าที่ยึดเกาะพื้นผิว ประเภทย่อยของเข็มพิษจะสอดคล้องกันในด้านที่เกี่ยวกับลักษณะของลูกดอกและท่อกลวง โดยขึ้นอยู่กับการมีหนามและไม่มีหนาม สอดคล้องกับสัณฐานวิทยาที่จำเพาะต่อหน้าที่ ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3-4 หน้าที่ 2 กลุ่มแรกเกี่ยวข้องกับการหาอาหาร เมื่อเหยื่อหรือผู้ล่ามาสัมผัสเข็มพิษจะปล่อยออกมาและฉีดสารพิษเข้าสู่ร่างกาย กลุ่มที่ 3 เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะกับพื้นผิวโดยเฉพาะขณะที่มีการเคลื่อนที่ และกลุ่ม 4 เกี่ยวข้องกับการป้องกันตัว กลุ่มแรกจะแบ่งจากการที่ท่อกลวงมีและไม่มีถุงปิดที่ปลาย โดยท่อกลวงปลายเปิดจะเรียกว่า stomochidae เช่น stenotele โดยสามารถปล่อยน้ำพิษเข้าสู่ตัวเหยื่อ และท่อ

กลวงปลายปิดเรียกว่า astomocnidae เช่น desmoneme จะทำหน้าที่ยึดเกาะกับพื้นผิวและพันตัวเหยื่อ ส่วนประเภทย่อยๆของเข็มพิษจะสอดคล้องกับลักษณะของลูกดอก (shaft) และท่อกลวง (thread) โดยขึ้นอยู่กับการมีและไม่มีหนามในแต่ละชนิด Kass-Simon & Scappaticci (2002)



ภาพที่ 2-8 ชนิดของเข็มพิษในโดยจัดจำแนกตามสัณฐานวิทยา
ที่มา: (Kass-Simon & Scappaticci, 2002)



ภาพที่ 2-8 ชนิดของเข็มพิษในโดยจัดจำแนกตามสัณฐานวิทยา (ต่อ)
ที่มา: (Kass-Simon & Scappaticci, 2002)

2.2 คุณสมบัติของสารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง

2.2.1 น้ำกลั่น (Distilled water)

น้ำกลั่นมีค่าเป็นกลาง คือน้ำที่ปราศจากคุณสมบัติทางด้านเคมี และแบคทีเรีย เนื่องจากน้ำกลั่นมีความบริสุทธิ์สูงมาก ไม่มีแร่ธาตุ ในทางการแพทย์จึงนำไปใช้ในการเตรียมสารละลายต่างๆ โดยผ่านการต้มให้เดือด ตัวกำหนดคุณภาพน้ำที่นิยมใช้วัดความบริสุทธิ์ของน้ำกลั่น คือ ค่าสารละลาย (Total dissolved solids) มักจะมีค่าประมาณ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร Pomfret (1996)

2.2.2 กรดอะซิติก (Acetic acid)

กรดอะซิติกหรือกรดน้ำส้ม คือ กรดอินทรีย์หรือสารประกอบเคมีอินทรีย์ที่พบได้ในธรรมชาติมีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน มีลักษณะใส ไม่มีสี มีกลิ่นฉุนที่เป็นเอกลักษณ์ มีรสเปรี้ยว ระเหยง่าย ละลายได้ในน้ำ แอลกอฮอล์ กลีเซอรีน มีความเสถียร มีสูตรทางเคมี CH_3COOH เมื่อแข็งตัวมีลักษณะเป็นผลึกใส ผลึกของกรดอะซิติกนั้นจะมีความบริสุทธิ์สูงมากเรียกว่า หัวน้ำส้มหรือกรดกลาเซียอะซิติก (Glacial acid) ที่ได้จากการสะกัดทางเคมี หัวกรดน้ำส้มนั้นสามารถนำไปเจือจางเพื่อทำน้ำส้มสายชูเทียม ซึ่งจะทำให้โปรตีนเกิดการแปลงสภาพ โดยโมเลกุลของโปรตีนเกิดการคลายเกลียวของโครงสร้าง 3 มิติ ทำให้มีโครงสร้างที่ไม่เหมาะสมกับการทำหน้าที่ทางชีวภาพ เป็นผลให้โปรตีนแข็งตัวและไม่ละลายน้ำจึงเกิดการตกตะกอน Liao et al. (2010)

2.2.3 แอลกอฮอล์ (Alcohol)

แอลกอฮอล์เป็นสารที่ท้าให้เกิดการคายน้ำ (strong dehydrating agent) ออกจากเซลล์ แล้วดูดซึมแอลกอฮอล์เข้าไปทำให้เซลล์เมมเบรนถูกทำลายและโปรตีนเปลี่ยนสภาพอย่างรวดเร็ว ทำให้ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ ซึ่งเป็นผลต่อเนื่องไปรบกวนเมตาบอลิซึม Donnell and Russell (1999)

2.2.4 ชา (Tea)

ชาประกอบด้วยสารโพลีฟีนอล (polyphenols) ส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีคุณสมบัติเป็นสารต้าน อนุมูลอิสระและสารต้านการกลายพันธุ์ สารประกอบโพลีฟีนอลที่พบมากในชาได้แก่ แทนนิน พบในใบชาประมาณร้อยละ 20-30โดยน้ำหนัก เป็นสารที่ทำให้เกิดรสฝาดและรสขม พนิดา อากาศวิภาต และคณะ (2015)

2.2.5 ผักบุ้งทะเล

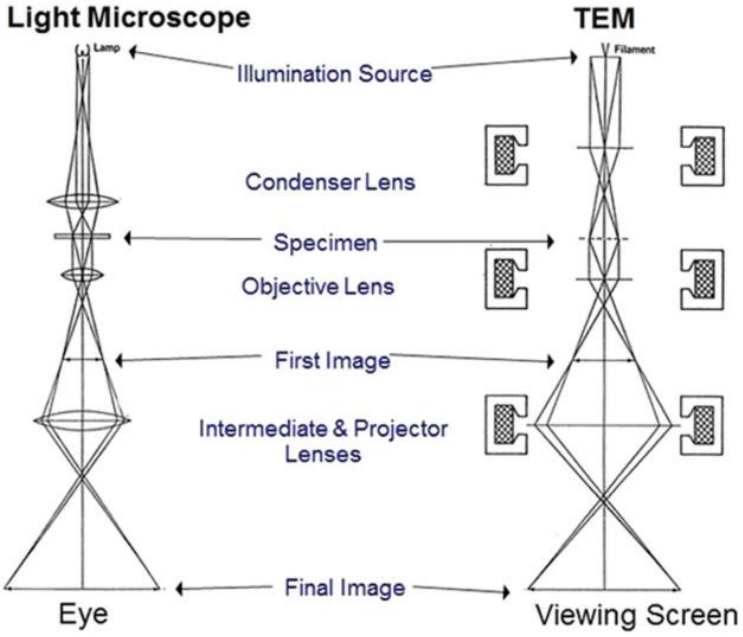
ผักบุ้งทะเลคือไม้ล้มลุก เลื้อยตามผิวดิน มักพบในพื้นที่ชายฝั่งทะเล ทั้งต้นมียางขาว ใบเดี่ยวออกเรียงสลับกัน แผ่นใบค่อนข้างหนา โคนใบรูปหัวใจ ปลายเว้าลึก ดอกออกเป็นช่อ กลีบดอกสีม่วงชมพู โคนเชื่อมติดกันเป็นถ้วย ปลายบานออกคล้ายปากแตร ผลเป็นผลแห้ง แตกได้ รูปกลมหรือรูปไข่ ประกอบด้วยสารต่างๆได้แก่ Beta-damascenone และ E-ehytol มีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดคลายตัวเป็นผลให้การอักเสบลดลง สารออกฤทธิ์ลดการอักเสบอื่น ได้แก่ 2-hydroxy-4, 4, 7-trimethyl-1-(4H)-naphthalenone, (-)-mellein, eugenol (2, 3), 4-vinyl guaiacol, actinidols

Ia และ Ib ซึ่งออกฤทธิ์ต้านพรอสตาแกลนดิน นำมาใช้ในการรักษาโรคไขข้อ โรคกระเพาะอาหาร ยับยั้งพิษแมงกะพรุน นำมาใช้ในการปฐมพยาบาลจากการถูกแมงกะพรุนต่อย Manigaunha et al. (2015)

2.3 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านหรือ transmission electron microscope เรียกย่อๆว่า TEM ที่ใช้ลำอเล็กตรอนพลังงานสูงที่มีความยาวคลื่นสั้นกว่าความยาวคลื่นแสงถึง 100,000 เท่า ทำมีกำลังขยายสูงกว่าและการแจกแจงรายละเอียดต่างๆได้มากกว่ากล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านมีกำลังขยายสูงถึง 0.1 นาโนเมตร และมีประสิทธิภาพในการแจกแจงรายละเอียดสูงมากต้องเตรียมตัวอย่างให้บางเพื่อให้ลำอิเล็กตรอนทะลุผ่านไปได้ จะทำได้ภาพจากการตรวจวัดอิเล็กตรอนที่ทะลุผ่านตัวอย่าง ซึ่งภาพที่ได้จะเป็นภาพ 2 มิติ สำหรับนำมาใช้ในการศึกษารายละเอียดขององค์ประกอบและสัณฐานภายในของตัวอย่าง เช่นลัษณะของเยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์ เป็นต้น

ภาพที่ 2-9 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ที่มา: (http://www.nano.pitt.edu)



ภาพที่ 2-10 เปรียบเทียบส่วนประกอบต่าง ๆ ของกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบประกอบและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่งผ่าน
ที่มา: (https://www2.mtec.or.th)

หลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ประกอบด้วยแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอนโดยจะทำหน้าที่ผลิตอิเล็กตรอนเพื่อป้อนให้กับระบบ ซึ่งกลุ่มอิเล็กตรอนที่ได้จะถูกเร่งด้วยสนามไฟฟ้า จากนั้นกลุ่มอิเล็กตรอนจะผ่านเลนส์รวมรังสี (condenser lens) เพื่อทำให้กลุ่มอิเล็กตรอนกลายเป็นลำอิเล็กตรอน ซึ่งสามารถปรับขนาดของลำอิเล็กตรอนได้ตามต้องการ จากนั้นลำอิเล็กตรอนจะเคลื่อนผ่านตัวอย่างที่มีลักษณะแบนและบางมาก และจะเกิดการกระเจิงของอนุภาค โดยลำอิเล็กตรอนที่ทะลุผ่านตัวอย่างจะถูกปรับโฟกัสของภาพด้วยเลนส์ใกล้วัตถุ (objective lens) ซึ่งเป็นเลนส์ที่ทำหน้าที่ขยายภาพให้ได้รายละเอียดมากที่สุด จากนั้นจะถูกขยายด้วยเลนส์ทอดภาพไปสู่จอรับ (projector lens) และปรับโฟกัสของลำอนุภาคอิเล็กตรอนให้มีความยาวพอดีที่จะแสดงบนฉากเรืองแสงและสร้างเป็นภาพขึ้นมา นายนิวัฒน์ ศรีสวัสดิ์ (2561)

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างแมงกะพรุน

งานวิจัยครั้งนี้จะทำการศึกษาในแมงกะพรุนทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ แมงกะพรุนหนัง *Rhopilema hispidum* ซึ่งเป็นแมงกะพรุนหนังชนิดที่ใช้ทำเป็นอาหารและมีรายงานความเป็นพิษด้วยเช่นกัน และแมงกะพรุนไฟ *Sanderia malayensis* ซึ่งเป็นแมงกะพรุนที่มีพิษรุนแรง

แมงกะพรุนหนัง *Rhopilema hispidum* เก็บตัวอย่างในระยะเมดูซาจากแหล่งธรรมชาติ โดยทำการเก็บตัวอย่าง บริเวณชายฝั่ง จังหวัดชลบุรี แล้วนำตัวอย่างมีชีวิตกลับมาวิคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการ

แมงกะพรุนไฟ *Sanderia malayensis* จะเก็บตัวอย่างในระยะเมดูซาจากโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพาเท่านั้นเนื่องจากเป็นแมงกะพรุนที่มีพิษรุนแรงและไม่พบการแพร่กระจายบ่อย ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงแมงกะพรุนไฟนั้น ได้รับความอนุเคราะห์จากนางสาววิไลวรรณ พวงสันเทียะ และนางสาวศิริวรรณ ชูศรี ทำหน้าที่เพาะเลี้ยง โดยมีวิธีการโดยสรุปดังนี้

ทำการเก็บตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์แมงกะพรุน ใส่ถังที่มีน้ำความเค็ม นำมาบรรจุในถุงพลาสติกใสก้นกลมมัดถุงให้แน่นไม่ให้มีฟองอากาศเหลืออยู่ภายในถุง บรรจุลังโฟม ปิดฝาให้สนิท และนำตัวอย่างมาที่สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยง สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล นำถุงที่บรรจุแมงกะพรุนลอยในถังน้ำเค็มที่มีการเตรียมไว้ล่วงหน้าที่ปริมาตร 1,000 ลิตรต่อจำนวนความหนาแน่นแมงกะพรุน 4 ตัว โดยมีการปรับความเค็มและอุณหภูมิให้ใกล้เคียงกับค่าคุณภาพน้ำที่เก็บตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์แมงกะพรุนหนังจากธรรมชาติ ให้อากาศเบา ๆ และก่อนปล่อยแมงกะพรุนลงในถังเลี้ยง จะทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางร่ม และตรวจสอบความสมบูรณ์เพศแมงกะพรุนและแยกเพศ โดยการใช้หลอดหยดดูดอวัยวะสืบพันธุ์มาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereo microscope) เพื่อตรวจสอบความสมบูรณ์ของเซลล์สืบพันธุ์ นำพ่อแม่พันธุ์แมงกะพรุนที่มีความสมบูรณ์เพศปล่อยในถังเลี้ยงเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จึงนำน้ำมาตรวจสอบหาตัวอ่อนพลานูล่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การเตรียมตัวอย่างแมงกะพรุนวัยอ่อน สุ่มตักน้ำในถังเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ มาตรวจหาตัวอ่อนพลานูล่า ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อนำน้ำมาตรวจพบตัวอ่อนระยะพลานูล่ามีลักษณะรูปร่างทรงรี มีซิเลียรอบตัว ล่องลอยอยู่ในน้ำ ทำการกรองด้วยสวิงขนาดตาข่าย 45 ไมโครเมตร จากนั้นใช้หลอดหยดพลาสติกดูดแยกตัวอ่อนพลานูล่าออกมาใส่ในภาชนะพลาสติกใส ที่ปริมาตรความจุน้ำ 150 มิลลิลิตร ที่ความหนาแน่นของพลานูล่า 10 ตัวต่อมิลลิลิตร และใส่วัสดุเพื่อล่อการลงเกาะ ได้แก่ เปลือกหอยนางรม แผ่นกระจกอะคริลิค และแผ่นโพลีโพรพีลีน เป็นต้น จึงเริ่มดำเนินการศึกษาวิจัยโดยการวัดขนาดและบันทึกภาพของพลานูล่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การเลี้ยงและการจัดการระหว่างการศึกษา จะเริ่มให้อาหารเมื่อแมงกะพรุนวัยอ่อนเข้าสู่ระยะโพลิป โดยจะให้อาหารเป็นโรติเฟอร์ผสมอาร์ทีเมียแรกฟัก ที่ความหนาแน่น 5 ตัวต่อมิลลิลิตร เท่ากันทุกการทดลอง ความถี่ในการให้อาหารจะให้ทุกเช้าเวลา 09.00 น. ทุก 2 วัน และจะทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำในตอนบ่ายในอัตรา 20 เปอร์เซ็นต์ และเติมน้ำเค็มใหม่ให้ได้ระดับเดิม น้ำเค็มที่ใช้ในการเปลี่ยนถ่ายน้ำจะกรองผ่านไส้กรองขนาด 5 ไมโครเมตร ทำการเลี้ยงจนได้ระยะเมดูซา เพื่อใช้สำหรับการศึกษาเนื้อเยื่อและเซลล์สร้างเข็มพิษต่อไป

2. ศึกษาสัณฐานและกระจายตัวของเข็มพิษ (nematocyst)

การศึกษาสัณฐานและกระจายตัวของเข็มพิษ (nematocyst) ทำโดยนำแมงกระพรุนแต่ละส่วนมาตัด ได้แก่ การหนวดมาตัดโดยมีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ตัดร่มให้มีลักษณะสามเหลี่ยมและแขนรอบปาก จำนวนอวัยวะละ 1 ชิ้น ทั้งหมด 6 ตัว วางบนสไลด์ จากนั้นนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบประกอบและถ่ายภาพด้วยกล้อง Omax A3550U จึงนำภาพที่ได้มาวัดด้วยโปรแกรม Image J และสังเกตลักษณะการกระจายตัวของเข็มพิษ โดยนำภาพหนวดมาวัดเส้นผ่านศูนย์กลางและความยาวเพื่อหาพื้นที่ของหนวด นำภาพแขนรอบปากมากำหนดพื้นที่เท่ากับ 0.36 ตารางมิลลิเมตร และภาพร่มโดยกำหนดจากพื้นที่ของภาพทั้งหมด เท่ากับ 1.28 ตารางมิลลิเมตร โดยนับจำนวนกลุ่มเข็มพิษและจำนวนเข็มพิษในกลุ่ม วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของกลุ่มเข็มพิษและจดบันทึก จากนั้นนำข้อมูลไปคำนวนหาจำนวนกลุ่มเข็มพิษต่อพื้นที่เฉลี่ยหรือค่าความหนาแน่นของกลุ่มเข็มพิษเฉลี่ย จำนวนเข็มพิษต่อพื้นที่เฉลี่ยหรือค่าความหนาแน่นของเข็มพิษเฉลี่ยในพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร คำนวนหาส่วนเบี่ยงเบนมาตฐานและวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยทดสอบความแปรปวนของความหนาแน่นของเข็มพิษเฉลี่ยของทั้งสามอวัยวะ จึงทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธีเชิงสถิติประเภทการวิเคราะห์ความแปรปวนสำหรับแผนแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ หรือสถิติทดสอบ F-test เพื่อตรวจสอบสมมติฐานที่ว่าความหนาแน่นของเข็มพิษทั้งสามอวัยวะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

3. การศึกษาเนื้อเยื่อแมงกะพรุนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ LM SEM และ TEM

หลังจากเก็บตัวอย่างแมงกะพรุนไฟ *Sanderia malayensis* และ แมงกะพรุนหนัง *Rhopilema hispidum* ทำการตัดแยกชิ้นส่วนอวัยวะของแมงกระพรุน ได้แก่ บริเวณหนวด (tentacle) บริเวณผิวของส่วนหัวหรือหมวก (umbrella) และ เนื้อเยื่อรอบปาก (oral arm) โดยตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อให้ได้ขนาดพอเหมาะสำหรับการศึกษา ดังต่อไปนี้

3.1 การศึกษาเนื้อเยื่อแมงกะพรุนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ LM

ใช้สำหรับศึกษาเนื้อเยื่อแมงกะพรุนไฟ *Sanderia malayensis* และ แมงกะพรุนหนัง *Rhopilema hispidum* นำชิ้นเนื้อเยื่อแช่ในสารละลายบูแองส์หรือสารละลายเดวิสันอย่างใดอย่างหนึ่งเพื่อคงสภาพเนื้อเยื่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือข้ามคืน จากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อที่ผ่านวิธีคงสภาพแล้วมาล้างด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70% หลายครั้ง ครั้งละประมาณ 30 นาที ล้างจนกระทั่งเนื้อเยื่อไม่

มีสีเหลือง แล้วจึงนำเนื้อเยื่อไปผ่านกระบวนการดึงน้ำออกในเอทานอลที่มีความเข้มข้น 80% 90% และ 95% ขั้นตอนละ 1 ชั่วโมง แล้วแช่ใน Absolute ethanol 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปแช่ในไดออกเซน 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง แล้วจึงแช่เนื้อเยื่อในพาราพลาสต์เหลวอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 3 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง แล้วฝังเนื้อเยื่อลงในพาราพลาสต์ เมื่อพาราพลาสต์แข็งตัวแล้วจึงตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (Microtome) ให้มีความหนา 6 ไมโครเมตร นำเนื้อเยื่อที่ตัดแล้วติดลงบนแผ่นสไลด์โดยใช้เจลาตินเป็นตัวช่วยให้เนื้อเยื่อติดลงบนแผ่นสไลด์ นำสไลด์ที่ติดชิ้นเนื้อเยื่อแล้วมาวางให้แห้งบนเครื่องอุ่นแผ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือข้ามคืนเพื่อให้เนื้อเยื่อแห้งสนิท หลังจากนั้นนำมาย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลีนและสีอีโอซิน (Haematoxylin and Eosin) และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เพื่อบันทึกภาพและวิเคราะห์ภาพถ่าย

การย้อมสีฮีมาทอกไซลีนและสีอีโอซิน เริ่มจากนำสไลด์ที่มีแผ่นเนื้อเยื่อติดอยู่แช่ในไซลีน 2 ครั้งๆ ละ 5 นาทีเพื่อกำจัดแวกพาราฟินจากเนื้อเยื่อ จากนั้นแช่ใน Absolute ethanol เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการลดความเข้มข้นเอทานอลลงเป็น 95% 80% และ 70% ตามลำดับ ขั้นละ 5 นาที แล้วย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลีน เป็นเวลา 2 นาที นำไปล้างในน้ำประปาที่ไหลผ่านตลอด แล้วจึงนำไปแช่ในเอทานอลความเข้มข้น 70% เป็นเวลา 5 นาที และย้อมด้วยสีอิโอซิน เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นจุ่มเนื้อเยื่อในเอทานอลความเข้มข้น 95% อย่างรวดเร็วแล้วจึงนำไปแช่ใน Absolute ethanol เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยแช่ในบิวทานอลอีก 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที และ Mounting ด้วย Permount ทิ้งให้แห้ง และนำสไลด์ไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง การย้อมสีฮีมาทอกไซลีนและสีอีโอซินจะทำให้เห็นโครงสร้างทั่วไปของเนื้อเยื่อโดยสีฮีมาทอกไซลีนเป็นสีที่มีคุณสมบัติเป็นเบสซึ่งจะย้อมติดโครงสร้างที่เป็นกรด เช่น นิวเคลียส ส่วนสีอีโอซินเป็นสีที่มีคุณสมบัติเป็นกรดซึ่งจะย้อมติดโครงสร้างที่เป็นเบส การย้อมสีฮีมาทอกไซลีนและสีอีโอซินจึงเป็นที่นิยมสำหรับการศึกษาโครงสร้างพื้นฐานของเนื้อเยื่อทั่วไป หลังจากทราบองค์ประกอบของเนื้อเยื่อพื้นฐานของแมงกะพรุนแล้ว ในขั้นต่อไปผู้วิจัยจะศึกษาคุณสมบัติเชิงเคมีของเนื้อเยื่อและเซลล์เข็มพิษโดยใช้วิธีย้อมสีที่มีคุณสมบัติเฉพาะต่อไป

3.2 การศึกษาเนื้อเยื่อแมงกะพรุนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ SEM

ใช้สำหรับศึกษาแมงกะพรุนไฟ *Sanderia malayensis* แช่เนื้อเนื่อเพื่อคงสภาพใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffered saline ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 0.1 M phosphate buffered saline ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ใน 0.1 M phosphate buffered saline ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำไปผ่านกระบวนการ coating เพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เพื่อถ่ายภาพ และวิเคราะห์ผลการศึกษาต่อไป

3.3 การศึกษาเนื้อเยื่อแมงกะพรุนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ TEM

ใช้สำหรับศึกษาแมงกะพรุนไฟ *Sanderia malayensis* แช่เนื้อเนื่อเพื่อคงสภาพใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffered saline ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 0.1 M phosphate buffered saline ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ใน 0.1 M phosphate buffered saline ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำเนื้อเยื่อที่เก็บไว้มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 1x1 มิลลิเมตร แช่ใน 1% osmium tetroxideใน 0.1 M phosphate buffered saline ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 0.1 M phosphate buffered saline ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นแช่ในเอทานอล 70%, 80%, 90% และ 95% ความเข้มข้นละ 2 ครั้ง ๆ ละ 30 นาทีตามลำดับ แล้วแช่ในเอทานอล 100% 3 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที จากนั้นแช่ใน propylene oxide 2 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที แช่ใน propylene oxide : araldite 502 resin (2:1) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และแช่ใน propylene oxide : araldite 502 resin (1:2) เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง จากนั้นฝังเนื้อเยื่อใน pure araldite 502 resin พอลิเมอไรซ์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 45 และ 60 องศาเซลเซียส อุณหภูมิละ 1 ครั้ง ๆ ละ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ตัดเนื้อเยื่อแบบ semi-thin section ให้มีความหนา 500-700 นาโนเมตร ย้อมด้วยสีเมทิลีนบลูในน้ำ แล้วศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เมื่อได้ตำแหน่งเนื้อเยื่อที่ต้องการแล้ว จึงตัดเนื้อเยื่อที่ต้องการแบบ ultra-thin section ให้มีความหนาประมาณ 60-90 นาโนเมตร วางเนื้อเยื่อลงบน copper grid ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วย้อมด้วย saturated uranyl acetate ในเมทานอล 70% เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วย 0.1% lead citrate ในน้ำ เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) โดยจะทำการษึกษาที่ศูนย์กล้องจุลทรรศน์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สรุปการศึกษาจุลกายวิภาคของเข็มพิษภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

นำตัวอย่างหนวดแมงกะพรุน แช่ในกลูตารอลดีไฮด์เพื่อรักษาสภาพ แสดงดังภาพที่ 3-1 จากนั้นส่งตัวอย่างไปที่ศูนย์ปฏิบัติการกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตอน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยนำมาผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง แสดงดังภาพที่ 3-2

แช่ใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M Phosphate buffer saline (PBS)
ที่ 4ºC นาน 4 hrs.

ล้างใน 0.1 M PBS ที่ 4ºC 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

เก็บรักษาพยาธิไว้ใน 0.1 M PBS ที่ 4ºC

ภาพที่ 3-1 แผนผังขั้นตอนการรักษาสภาพตัวอย่างหนวดของแมงกะพรุนไฟมาเลเซีย

นำตัวอย่างที่เก็บไว้มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ~ 1 x1

↓

Fixed ด้วย 1% osmium tetroxide ใน 0.1M PBS ที่ 4°C นาน 2 hrs.

↓

ล้างด้วย 0.1M PBS ที่ 4°C 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

↓

Dehydrated ด้วย ethyl alcohol (70%, 80%, 90%, 95% 2 ครั้ง และ100% 3 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที ตามลำดับ)

↓

Infiltrated ด้วย propylene oxide (PO) 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที, PO : Araldite 502 resin (2:1) นาน 1 hr. และ (1:2) นาน 12–14 hrs.

↓

embedded ใน pure Araldite 502 resin

↓

polymerize ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 hrs., 45°C และ60°C เป็นเวลาอย่างละ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

↓

นำไปตัดด้วยเครื่อง ultramicrotome (หนา ~ 60-90nm)

↓

นำ section วางลงบน Copper grid

↓ ทิ้งไว้จนแห้ง

ย้อมด้วย saturated uranyl acetate ใน 70% methanol และ 0.1% lead citrate ในน้ำ (อย่างละ 15 นาที)

↓ ทิ้งไว้จนแห้ง

นำไปศึกษาด้วยกล้อง TEM (TECHNI 20, Philips) ที่ 75kV

ภาพที่ 3-2 แผนผังการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

4. การศึกษากลไกการปล่อยเข็มพิษของแมงกระพรุน

ใช้สำหรับศึกษาแมงกะพรุนไฟ *Sanderia malayensis* เนื่องจาก nematocyst ที่พบในใน แมงกะพรุนต่างชนิดกันมีความแตกต่างกันทั้งในแง่ของโครงสร้าง จำนวน ความเป็นพิษ กลไกการ กระตุ้น ดังนั้นหลังจากการศึกษารายละเอียดของเนื้อเยื่อแมงกะพรุนและเซลล์สร้างเข็มพิษแล้ว ลำดับต่อไปผู้วิจัยต้องการทราบถึงกลไกและลักษณะการปล่อยเข็มพิษจากเนื้อเยื่อบริเวณหนวดของ แมงกะพรุนไฟ *Sanderia malayensis* ซึ่งเป็นชนิดมีพิษวิธีการศึกษาจะทำการตัดเนื้อเยื่อบริเวณ หนวดของแมงกะพรุนขณะยังมีชีวิตให้ได้ความยาวประมาณ 0.5 เซ็นติเมตร จากนั้นทำการกระตุ้น ด้วยวิธีต่างๆ เพื่อให้เข็มพิษปล่อยออกมาจากโครงสร้างแคปซูล nematocyst ทำการศึกษาภายใต้ กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง บันทึกภาพและภาพเคลื่อนไหวของเนื้อเยื่อบริเวณแคปซูล nematocyst การกระตุ้นจะใช้วิธีการกระตุ้นด้วยสารละลายชนิดต่าง ๆ และศึกษาการเปลี่ยนแปลงภายใต้กล้อง จุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า

จากตัวอย่างแมงกะพรุน 3 ตัว ทำการทดสอบและสังเกต ซึ่งแบ่งเป็นแมงกะพรุนหมายเลข 1 2 และ 3 โดยแต่ละคนตัดส่วนหนวดแต่ละหมายเลขอย่างสุ่ม วางบนสไลด์ จากนั้นนำสไลด์ไปส่อง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบประกอบ หยดสารเคมีชนิดต่างๆได้แก่ น้ำกลั่น (disteller water) น้ำทะเลเทียม (artifical sea water) ความเข้มข้น 10 ppt 20 ppt และ 30 ppt เอทานอล (ethanol) ความเข้มข้น 40% และ 70% น้ำส้มสายชู (acetic acid) ความเข้มข้น 4% และ 5% โซดา น้ำชา ผักบุ้งทะเลในน้ำกลั่น และผักบุ้งทะเลในน้ำทะเลเทียม หยดลงบนหยดลงบนหนวด ประมาณ 2-3 หยด ทิ้งไว้ 3 นาที โดยทำพร้อมกันทั้ง 3 หมายเลข และสังเกตการเปลี่ยนแปลงของ การปล่อยเข็มพิษ และบันทึกผลจากการสังเกต โดยกำหนดปริมาณเข็มพิษที่ปล่อยออกมาเป็น

0 หมายถึง ไม่มีการปล่อยเข็มพิษ

+ หมายถึง มีการปล่อยเข็มพิษเล็กน้อย

++ หมายถึง มีการปล่อยเข็มพิษมาก และ

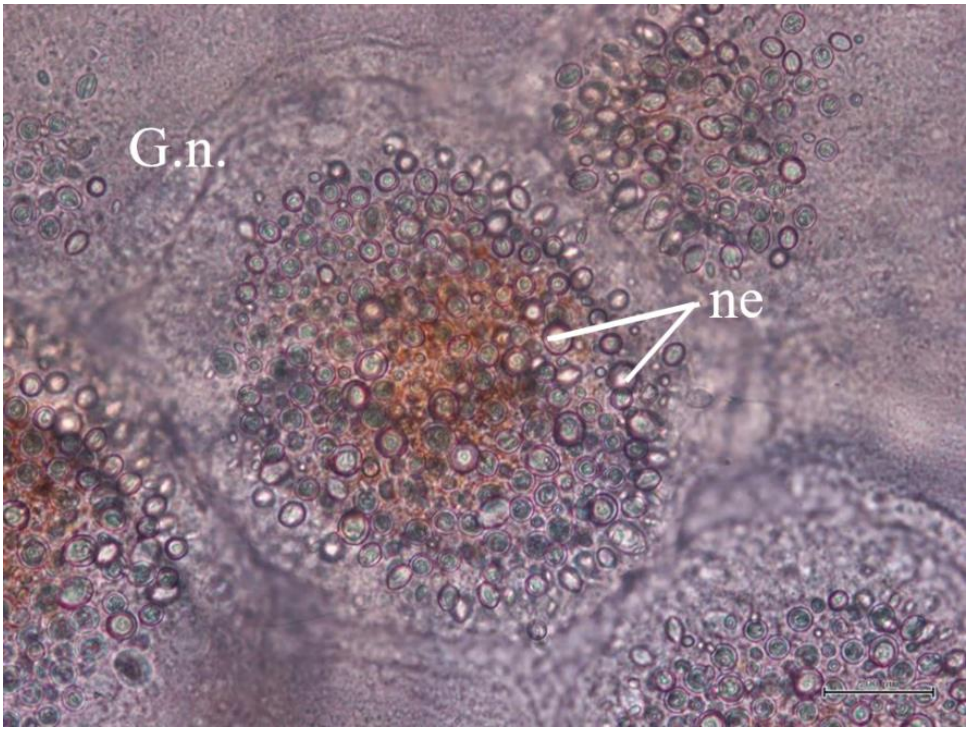
+++ หมายถึง มีการปล่อยเข็มพิษมากที่สุด

บทที่ 4
ผลการวิจัย

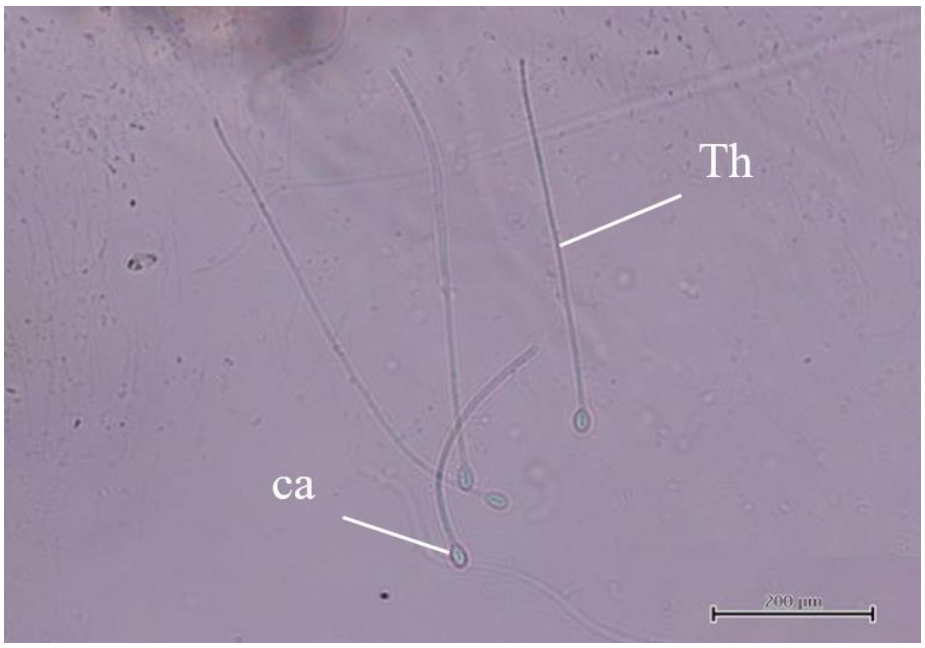
4.1 สัณฐานและการกระจายตัวของเข็มพิษในแมงกะพรุน *Sanderia malayensis*

4.1.1 สัณฐานของเข็มพิษ (nematocysts)

จากศึกษาลักษณะสัณฐานของเข็มพิษพบว่า เข็มพิษมีลักษณะค่อนข้างกลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ขนาดของเข็มพิษและขนาดของกลุ่มมีความแตกต่างกัน แสดงดังภาพที่ 4-1 เข็มพิษมีลักษณะเป็นกระเปาะหรือแคปซูล (capsule) ที่มีท่อกลวงขดอยู่ภายใน และถูกปล่อยออกมาเมื่อได้รับการกระตุ้น ซึ่งส่วนที่ถูกปล่อยออกมาจะมีลักษณะคล้ายเส้นด้ายเรียกว่า ท่อกลวงหรือ Thread แสดงดังภาพที่ 4-2



ภาพที่ 4-1 สัณฐานของเข็มพิษที่เรียงตัวเป็นกลุ่มภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 1000 เท่า (ne = nematocysts; G.n. Group of nematocysts)



ภาพที่ 4-2 สัณฐานของเข็มพิษซึ่งถูกปล่อยออกมา ที่ประกอบด้วยแคปซูลและท่อกลวง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 1,000 เท่า
(ca = capsule, Th = thread)

ภาพที่ 4-3 สัณฐานของกลุ่มเข็มพิษภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 400 เท่า
(G.n. = Group of nematocysts)

4.1.2 การกระจายตัวของเข็มพิษ

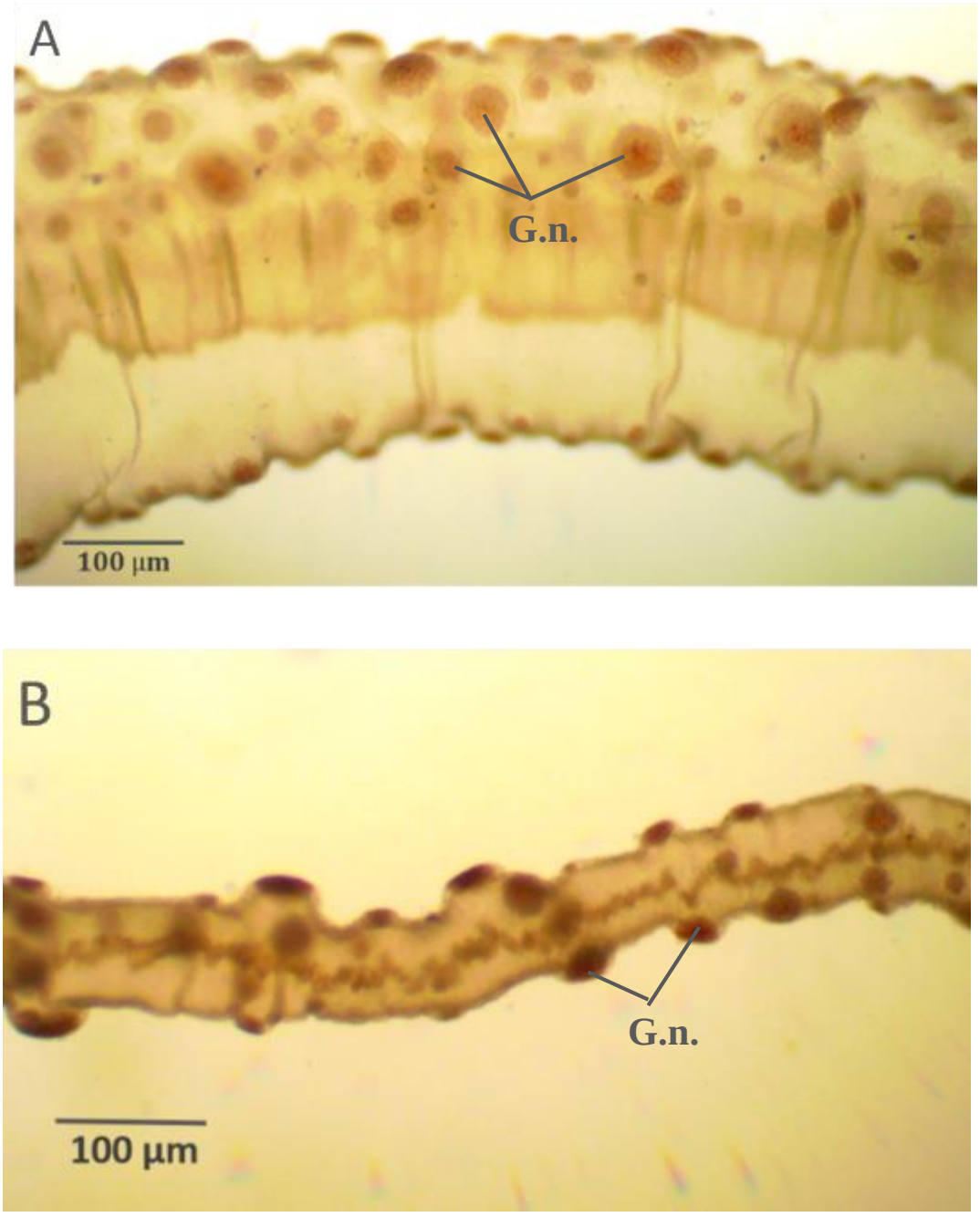
จากการศึกษาการกระจายตัวของเข็มพิษพบว่า การกระจายตัวของเข็มพิษในแมงกะพรุนไฟมาเลเซีย อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ตามอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ หนวด แขนรอบปาก และร่ม โดยแต่ละอวัยวะมีลักษณะการกระจายตัวของกลุ่มเข็มพิษ และมีความหนาแน่นของเข็มพิษแตกต่างกัน แสดงดังตารางที่ 4-1 ซึ่งความสัมพันธ์ของจำนวนเข็มพิษและพื้นที่ของกลุ่มเข็มพิษบริเวณอวัยวะต่างๆ โดยจะเห็นว่าถ้าพื้นที่กลุ่มมีขนาดใหญ่ขึ้นจะมีจำนวนของเข็มพิษมากขึ้นด้วย แสดงว่าพื้นที่กลุ่มของเข็มพิษแปรผันตรงกับจำนวนของเข็มพิษ

4.1.2.1 หนวด (tentacle)

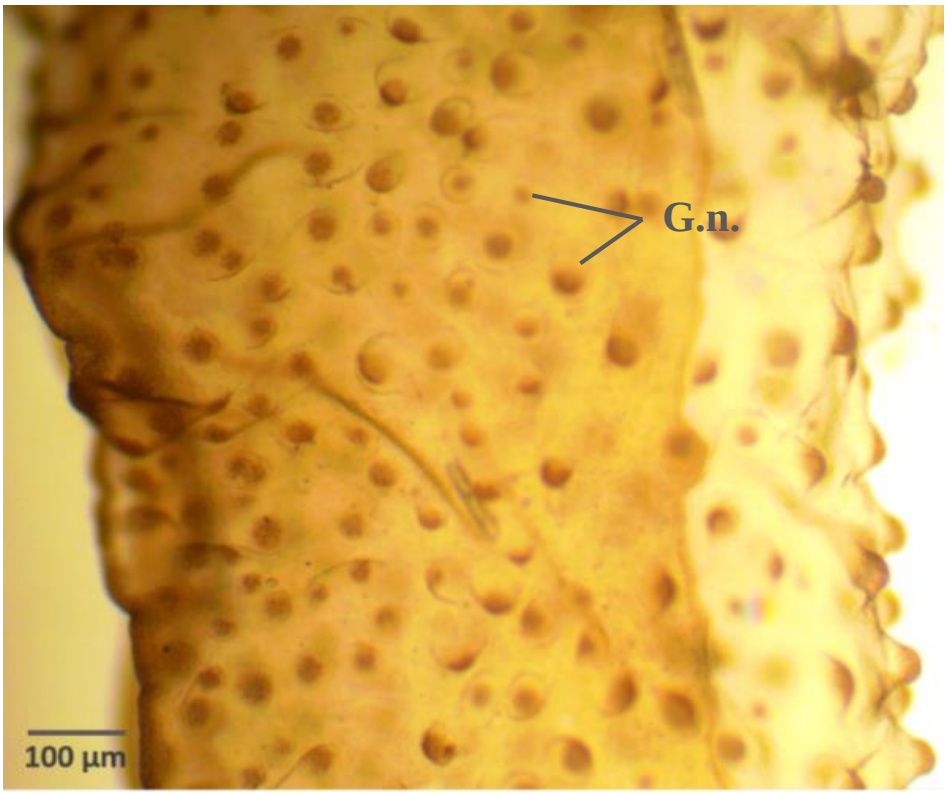
กลุ่มของเข็มพิษเรียงตัวกันอย่างหนาแน่นมากที่สุดและจำนวนเข็มพิษภายในกลุ่มเรียงตัวเป็นลักษณะวงกลม เมื่อมองด้วยตาเปล่าจึงเห็นเป็นปุ่มนูนขึ้นมา โดยหนวดมีขนาดกลุ่มของเข็มพิษไม่เท่ากัน ซึ่งกลุ่มขนาดใหญ่และกลุ่มขนาดเล็กจะกระจายตัวสลับกันและกระจายตัวไม่เท่ากันตลอดความยาวของหนวด บริเวณโคนหนวดมีกลุ่มของเข็มพิษกระจายอยู่จำนวนมากที่สุด โดยจำนวนจะลดลงจากโคนถึงปลายหนวด แสดงดังภาพที่ 4-4 โดยกลุ่มเข็มพิษบริเวณหนวดจะมีขนาดที่แตกต่างกันมากตั้งแต่กลุ่มขนาดเล็กที่สุด มีจำนวนเข็มพิษเท่ากับ 6 อันต่อกลุ่ม ถึงกลุ่มขนาดใหญ่ที่สุดมีจำนวนเข็มพิษเท่ากับ 225 อันต่อกลุ่ม ซึ่งมีจำนวนเข็มพิษต่อกลุ่มเฉลี่ยเท่ากับ 79.25 อันต่อกลุ่ม

4.1.2.2 แขนรอบปาก (oral arm)

เข็มพิษเรียงตัวเป็นกลุ่มโดยมีลักษณะเป็นวงกลม ซึ่งกลุ่มของเข็มพิษกระจายค่อนข้างหนาแน่น ทำให้เมื่อมองด้วยตาเปล่าจะเห็นเป็นปุ่มนูน ขนาดกลุ่มของเข็มพิษบริเวณแขนรอบปากจะมีขนาดไม่เท่ากัน ซึ่งกลุ่มขนาดใหญ่และกลุ่มขนาดเล็กจะกระจายตัวสลับกันและค่อนข้างสม่ำเสมอ แสดงดังภาพที่ 4-5 กลุ่มเข็มพิษบริเวณแขนรอบปากจะมีขนาดที่แตกต่างกันปานกลาง พบจำนวนเข็มพิษตั้งแต่กลุ่มเล็กที่สุดเท่ากับ 28 อันต่อกลุ่ม และมากที่สุดเท่ากับ 115 อันต่อกลุ่ม ซึ่งจำนวนเข็มพิษเฉลี่ยต่อกลุ่มเท่ากับ 63.7 อันต่อกลุ่ม



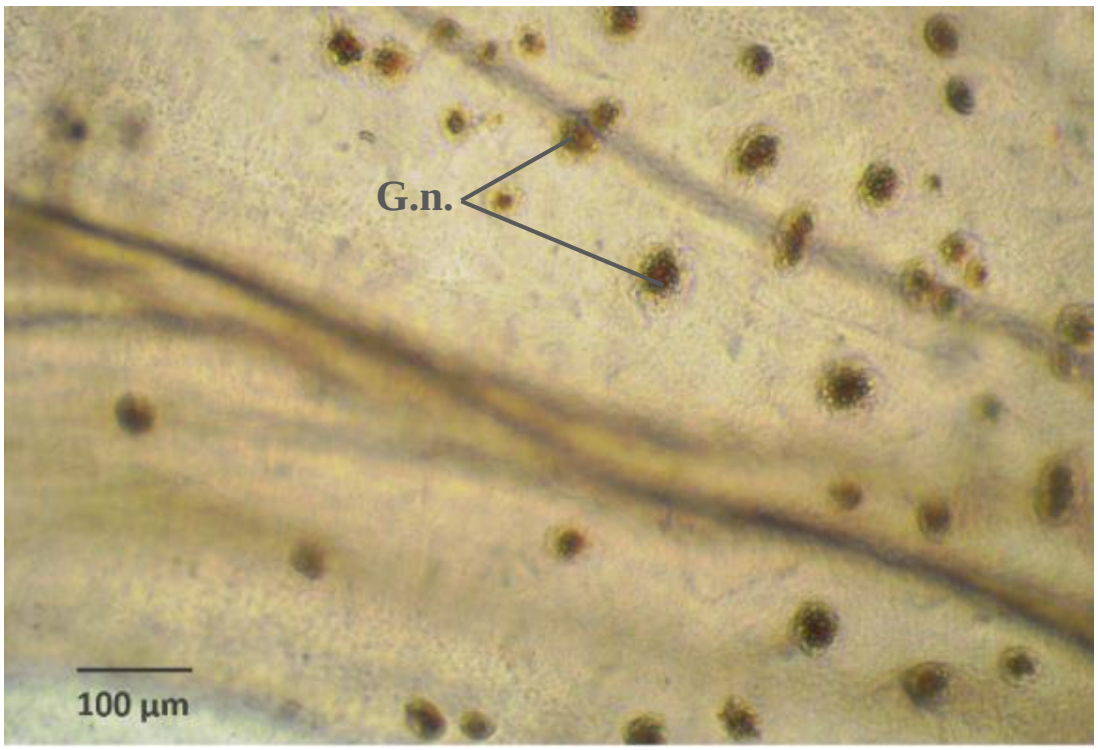
ภาพที่ 4-4 ลักษณะการกระจายตัวของกลุ่มเข็มพิษบริเวณหนวด
(A) ลักษณะการกระจายตัวของกลุ่มเข็มพิษบริเวณโคนหนวด (B) ลักษณะการกระจายตัวของกลุ่มเข็มพิษบริเวณปลายหนวด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 40 เท่า (G.n. = Group of nematocysts)



ภาพที่ 4-5 ลักษณะการกระจายตัวของกลุ่มเข็มพิษบริเวณแขนรอบปาก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 40 เท่า (G.n. = Group of nematocysts)

4.1.2.3 ร่ม (umbella)

เข็มพิษเรียงตัวเป็นกลุ่มที่มีลักษณะเป็นวงกลม โดยกลุ่มของของเข็มพิษกระจายอยู่อย่างไม่หนาแน่นเมื่อเทียบกับบริเวณหนวดและแขนรอบปาก โดยขนาดกลุ่มของเข็มพิษบริเวณร่มจะมีขนาดไม่เท่ากันแต่ส่วนใหญ่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน ซึ่งกลุ่มของเข็มพิษจะกระจายตัวสลับกันและเป็นการกระจายตัวแบบสุ่ม โดยจะมีความหนาแน่นของเข็มพิษในแต่ละบริเวณของร่มไม่สม่ำเสมอ แสดงดังภาพที่ 4-6 กลุ่มเข็มพิษบริเวณร่มจะมีขนาดที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งจำนวนเข็มพิษในกลุ่มมีจำนวนน้อยมาก กลุ่มเข็มพิษที่มีจำนวนน้อยที่สุดเท่ากับ 17 อันต่อกลุ่ม และมากที่สุดเท่ากับ 25 อันต่อกลุ่ม โดยมีจำนวนเข็มพิษเฉลี่ยต่อกลุ่มเท่ากับ 17.25 อันต่อกลุ่ม



ภาพที่ 4-6 ลักษณะการกระจายของกลุ่มเข็มพิษแบบสุ่มบริเวณร่ม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้กำลังขยาย 40 เท่า (G.n. = Group of nematocysts)

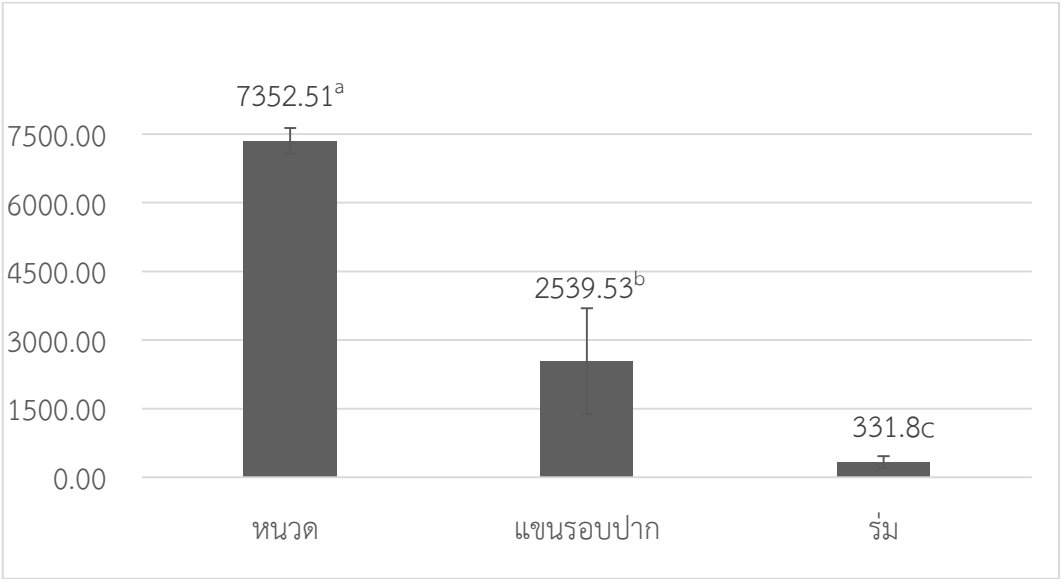
4.1.2.4 การเปรียบเทียบผลการกระจายตัวของเข็มพิษบริเวณอวัยวะต่างๆ

จากการเปรียบเทียบการกระจายของเข็มพิษทั้งสามอวัยวะ ได้แก่ หนวด แขนรอบปาก และร่มพบว่า บริเวณหนาดมีจำนวนเข็มพิษต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร หรือมีความหนาแน่นของเข็มพิษมากที่สุดและบริเวณร่มมีความหนาแน่นของเข็มพิษน้อยที่สุด ซึ่งจำนวนกลุ่มเข็มพิษต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร จำนวนกลุ่มเข็มพิษบริเวณหนวดมีค่ามากที่สุดประมาณ 93 กลุ่มต่อตารางมิลลิเมตร แขนรอบปากมีประมาณ 40 กลุ่มต่อตารางมิลลิเมตร และบริเวณร่ม 1 ตารางมิลลิเมตรพบกลุ่มของเข็มพิษประมาณ 19 กลุ่มต่อตารางมิลลิเมตร เมื่อนับจำนวนของเข็มพิษภายในกลุ่มได้ค่าเฉลี่ยของจำนวนเข็มพิษต่อกลุ่มบริเวณหนวด แขนรอบปาก และร่มประมาณ 80 64และ 19 อันตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำผลที่ได้มาคำนวนหาปริมาณเข็มพิษต่อพื้นที่หรือค่าความหนาน่นของเข็มพิษเฉลี่ยพบว่าในบริเวณของของอวัยวะที่แตกต่างกันจะมีความหนาแน่นที่แตกต่างกัน ซึ่งบริเวณหนวดมีเข็มพิษหนาแน่นมากที่สุดประมาณ 7,353 อันต่อตารางมิลลิเมตร แขนรอบปากมีเข็มพิษหนาแน่นปานกลางประมาณ 2,540 อันต่อตารางมิลลิเมตร และร่มจะมีความหนาแน่นน้อยที่สุด ประมาณ 332 อันต่อตารางมิลลิเมตร โดยเปรียบเทียบในรูปแบบของกราฟ แสดงดังตารางที่ 4-1 และภาพที่ 4-7

ตารางที่ 4-1 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเข็มพิษและจำนวนกลุ่มเข็มพิษต่อกลุ่มและพื้นที่ หน่วยตารางมิลลิเมตร

อวัยวะ	ค่าเฉลี่ย		
	จำนวนกลุ่มเข็มพิษต่อพื้นที่ (mm^2)	จำนวนเข็มพิษต่อกลุ่ม	จำนวนเข็มพิษต่อพื้นที่ (mm^2)
Tentacle	92.78 ± 22.07	79.25	7,352.51 ± 1748.76[a]
Oral arm	39.87 ± 39.87	63.70	2,539.53 ± 1155.96[b]
Umbrella	19.23 ± 24.54	19.00	331.80 ± 131.06[c]

[a, b, c,] หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (*P*-value < 0.05) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม Minitab โดยวิธีเชิงสถิติประเภทการวิเคราะห์ความแปรปวนสำหรับแผนแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ หรือสถิติทดสอบ F-test พบว่า ความหนาแน่นของเข็มพิษจากทั้งสามอวัยวะมีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P*-value < 0.05)



ภาพที่ 4-7 กราฟการเปรียบเทียบค่าความหนาแน่นเฉลี่ยหรือจำนวนเข็มพิษต่อพื้นที่เฉลี่ย (หน่วยตารางมิลลิเมตร) ในบริเวณอวัยวะต่าง ๆ โดย a, b, c, หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P*-value < 0.05)

4.3 จุลกายวิภาคของเซลล์เข็มพิษและเข็มพิษ

จากการศึกษาจุลกายวิภาคพบว่า เข็มพิษ (nematocyst) จะถูกสร้างอยู่ภายในเซลล์สร้างเข็มพิษ (nematocyte) คล้ายออแกเนลล์ของเซลล์ ซึ่งมีขนาดใหญ่ที่สุดประมาณ 10 ไมโครเมตร ซึ่งเข็มพิษมีลักษณะเป็นกระเปาะ ที่เรียกว่าแคปซูล มีผนัง (capsule wall) ที่ค่อนข้างหนาล้อมรอบภายในแคปซูลติดสีเข้มที่บรรจุท่อกลวง แต่การศึกษาครั้งนี้สังเกตเห็นได้ไม่ชัดเจน โดยท่อกลวงที่ขดอยู่ภายในจะสร้างภายนอกแคปซูลก่อนแล้วจึงม้วนเข้าไปภายใน พบเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมแบบขรุขระ (rough endoplasmic reticulum, RER) จำนวนมากภายในไซโทพลาสซึม บริเวณรอบ ๆ นิวเคลียส ระหว่างเซลล์พบการเชื่อมต่อกันระหว่างเซลล์สร้างเข็มพิษแบบ Septate Junction

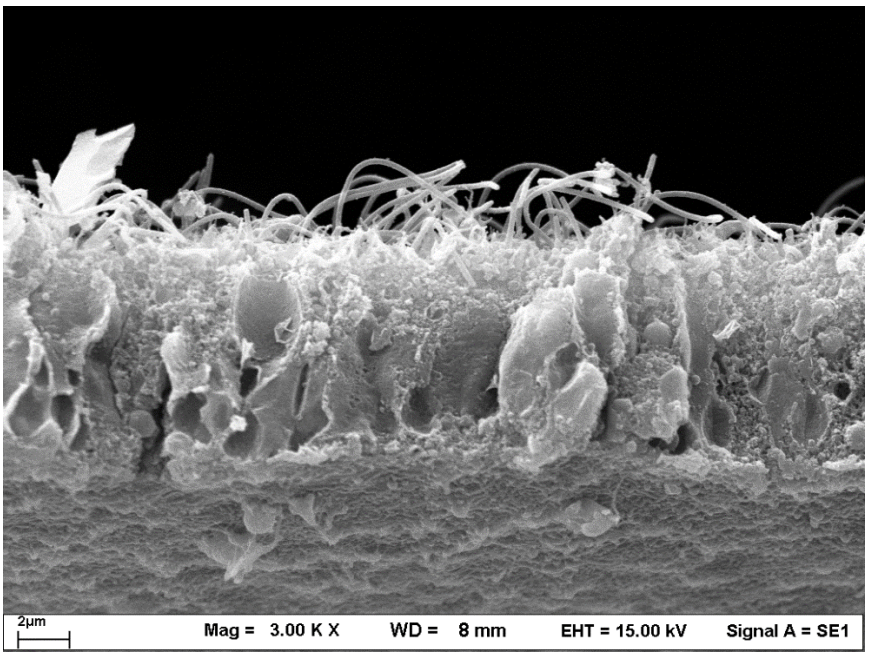
การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด SEM (Scanning electron microscope) และรายละเอียดของเซลล์สร้างเข็มพิษ (nematocyte) และ เข็มพิษ (nematocyst) ดังแสดงในภาพที่ 4-8 ถึง ภาพที่ 4-11

การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ TEM (Transmission electron microscope) และรายละเอียดของเซลล์สร้างเข็มพิษ (nematocyte) และ เข็มพิษ (nematocyst) พร้อมรายละเอียด organale ที่พบในเซลล์ ดังแสดงในภาพที่ 4-12 ถึง ภาพที่ 4-16

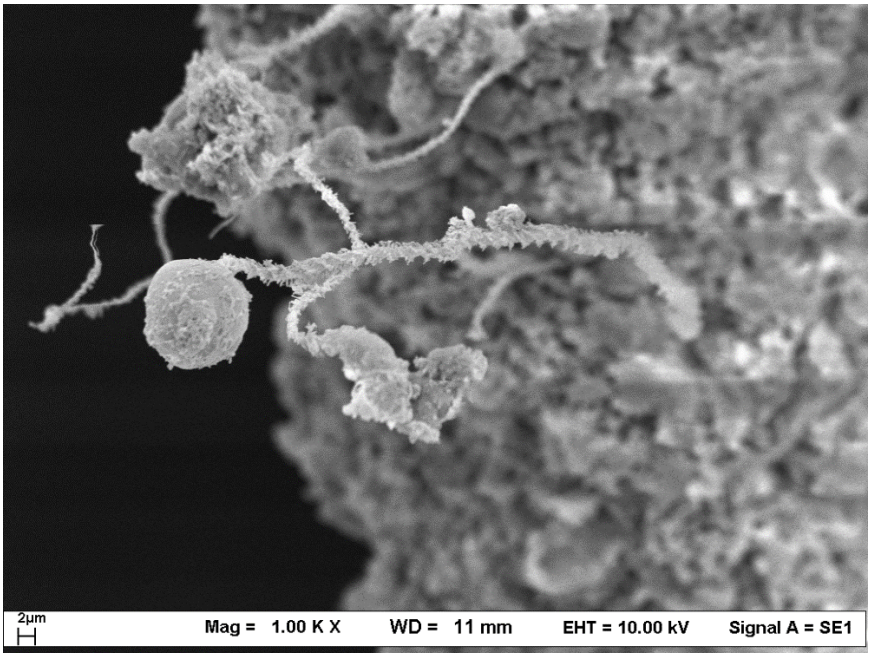
การศึกษาจุลกายวิภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนทั้งแบบ TEM และ SEM พบว่าเนื้อเยื่อแมงกะพรุน *Sanderia malayensis* ประกอบด้วยเยื่อบุผิวชนิด pseudostratified ciliated columnar epithelium ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อชั้นเดียวที่ประกอบด้วยเซลล์ 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์พื้นฐาน เซลล์สร้างเมือก และเซลล์สร้างเข็มพิษ

ลักษณะของเซลล์สร้างเข็มพิษ (nematocyte) จะพบนิวเคลียสขนาดใหญ่มีนิวคลีโอลัสชัดเจน พบ euchromatin ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์มีกิจกกรรมมาก นอกจากนี้ยังพบออร์แกเนลล์อื่น ๆ ได้แก่ พบ RER หรือ rough endoplasmic reticulum และ Golgi compex จำนวนมาก อีกทั้งยังพบ vesicle ที่มีลักษณะ electon-dense granule ขนาดใหญ่จำนวนมาก ลักษณะดังกล่าวเป็นการแสดงกิจกรรมของเซลล์ในการสร้างโปรตีนเพื่อส่งออกไปยังตำแหน่งเป้าหมาย ซึ่งคาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการสร้างพิษชนิดโปรตีนเพื่อเก็บสะสมในแคปซูลของเข็มพิษ เพื่อทำหน้าที่ attact เหยื่อสำหรับแมงกะพรุน

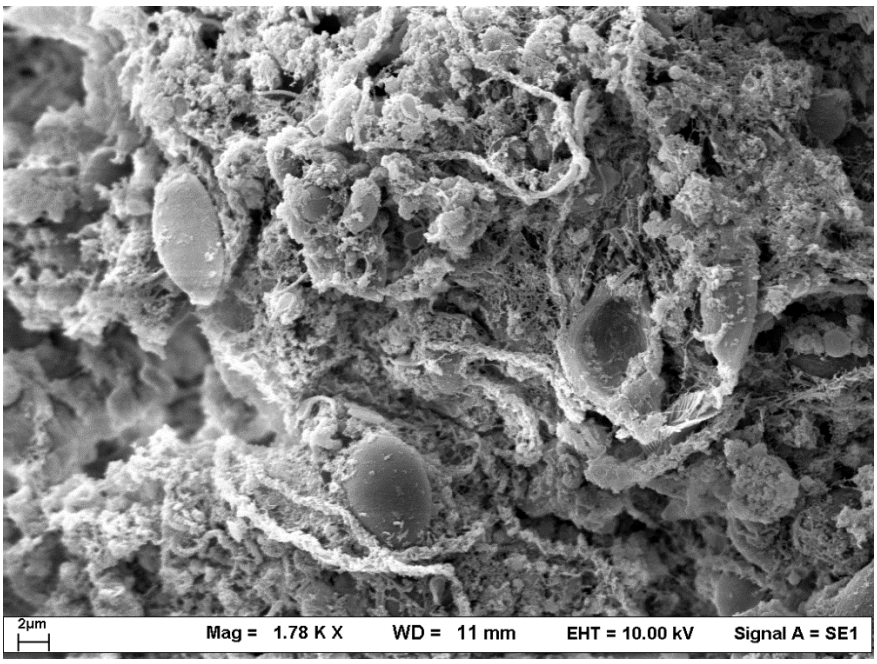
เข็มพิษ (nematocyst) มีลักษณะเป็นกระเปาะเรียกว่า แคปซูล และมีท่อกลวงที่ขดอยู่ภายในบริเวณที่ติดสีเข้ม โดยถูกล้อมรอบด้วยผนังแคปซูลที่ค่อนข้างหนา ซึ่งเข็มพิษจะถูกสร้างขึ้นจากเซลล์สร้างเข็มพิษ โดยจะสร้างแคปซูลและองค์ประกอบภายในของเข็มพิษ ในไซโทรพลาสซึม ซึ่งสร้างท่อกลวงภายนอกแคปซูลก่อน จากนั้นจะม้วนเข้าไปอยู่ภายในแคปซูล ซึ่งสังเกตพบว่าเข็มพิษมีรูปร่างและขนาดแตกต่างกัน และพบเข็มพิษที่มีขนาดใหญ่ที่สุดมีความยาวประมาณ 10 ไมโครเมตร ซึ่งจะถูกสร้างขึ้นจากเซลล์สร้างเข็มพิษ โดยจะสร้างองค์ประกอบภายในของเข็มพิษขึ้นก่อน จากนั้นจะมีการสร้างแคปซูลที่มีผนังค่อนข้างหนาล้อมลอบ ภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์สร้างเข็มพิษพบ เอนโดพลาสมิดเรติคูลัมแบบขรุขระจำนวนมากบริเวณที่มีการพัฒนาของเข็มพิษ เนื่องจากองค์ประกอบต่างๆของเข็มพิษเป็นสารจำพวกโปรตีน พบ Septate junction เพื่อช่วยยึดเซลล์ทั้งสองเซลล์ให้ติดกัน



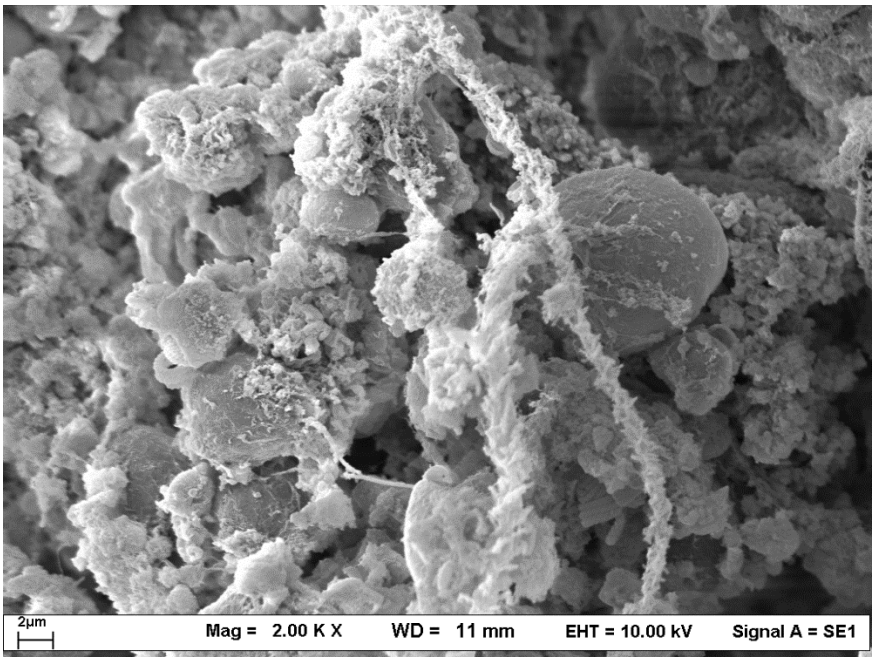
ภาพที่ 4-8 โครงสร้างจุลกายภาพ (SEM) ของเนื้อเยื่อในแมงกะพรุนไฟ *Sanderia malayensis* เนื้อเยื่อประกอบด้วย Psudostratified columnar epithelium ด้านนอกพบ cilia



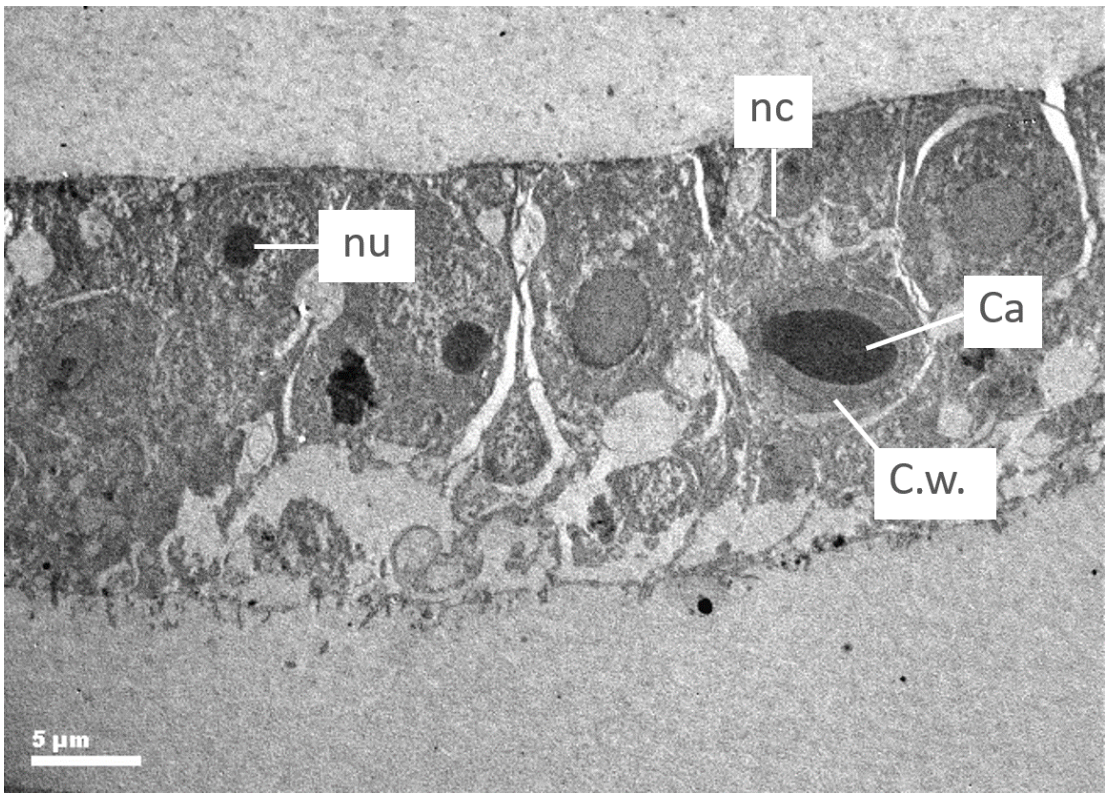
ภาพที่ 4-9 โครงสร้างจุลกายภาพ (SEM) ของ nematocyst ในแมงกะพรุนไฟ *Sanderia malayensis* พบส่วนของ thread ที่ปล่อยออกมาจาก nematocyst



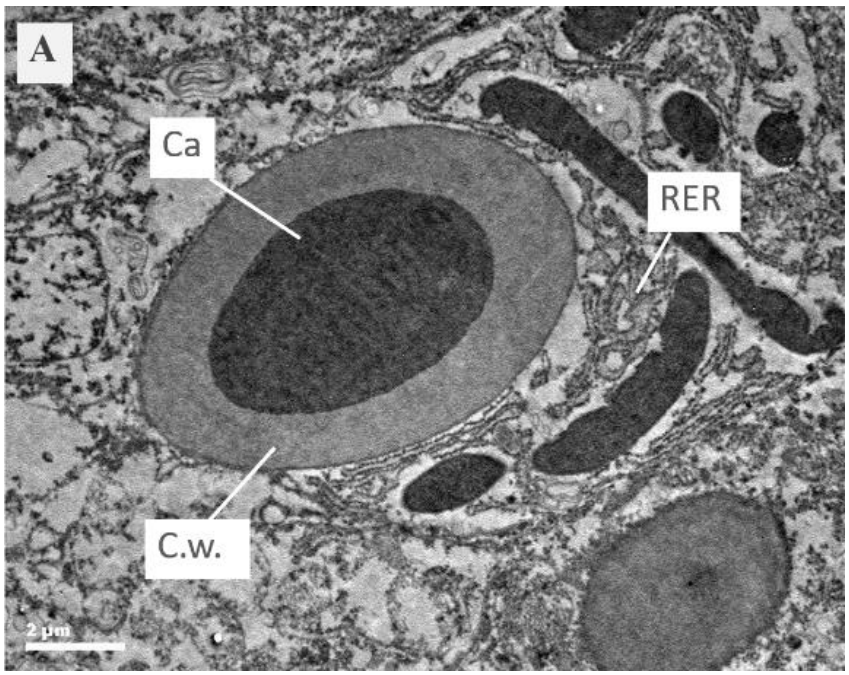
ภาพที่ 4-10 โครงสร้างจุลกายภาพ (SEM) ของเนื้อเยื่อแมงกะพรุนไฟ *Sanderia malayensis* ที่กระตุ้นการปล่อย nematocyst ด้วยน้ำกลั่นพบส่วนของ nematocyst กระจายทั่วไป



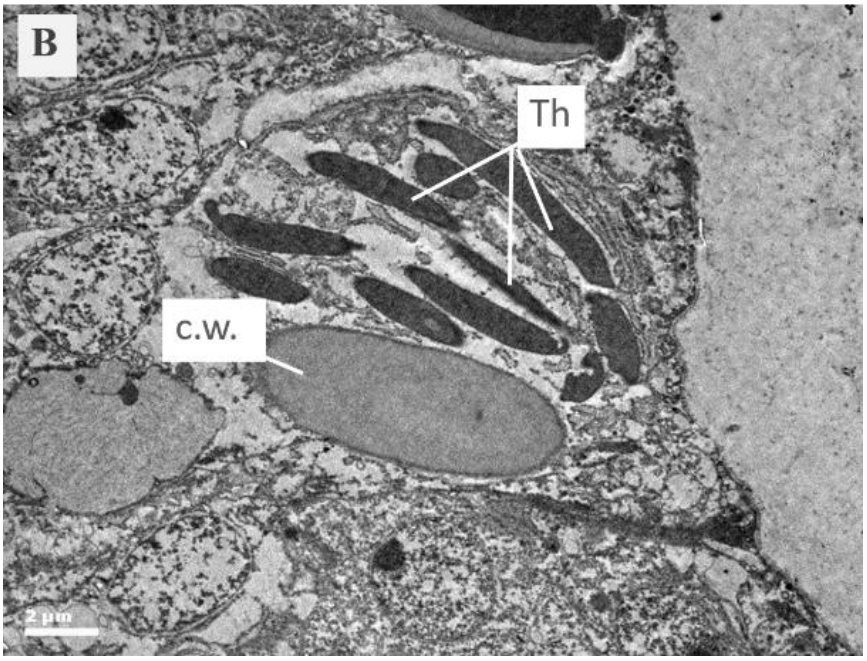
ภาพที่ 4-11 โครงสร้างจุลกายภาพ (SEM) ของ nematocyst แมงกะพรุนไฟ *Sanderia malayensis* ที่ปล่อย thread ออกมา พบโครงสร้างของ thread แบบเกรียว



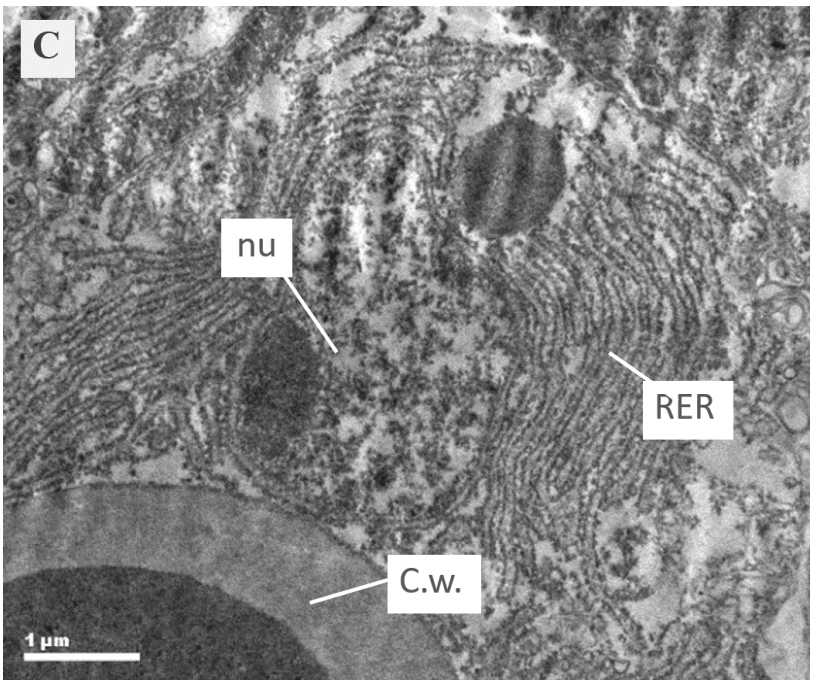
ภาพที่ 4-12 การวางตัวของเซลล์สร้างเข็มพิษและเข็มพิษ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)
(nu = nucleus; nc = nematocyst; Ca = capsule; C.w. = capsule wall)



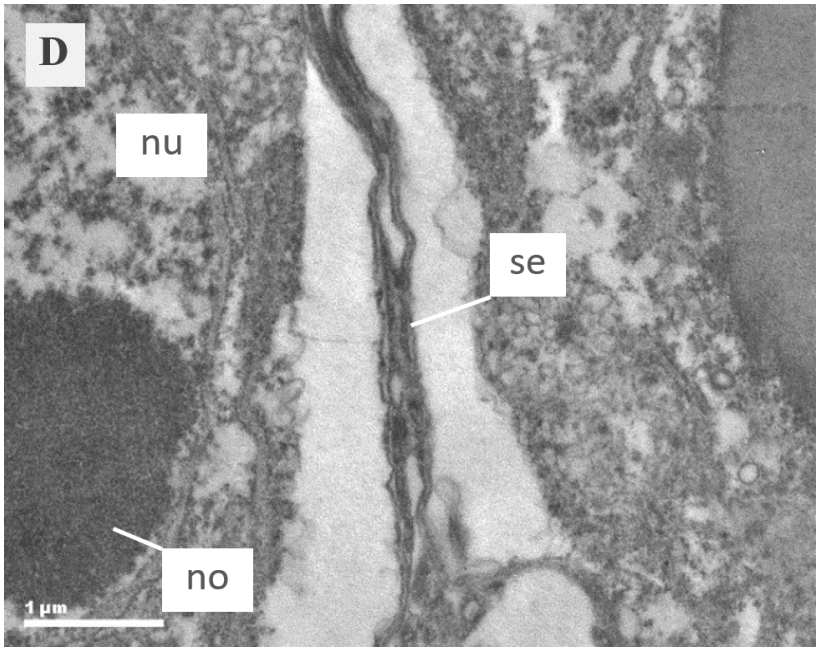
ภาพที่ 4-13 โครงสร้างจุลกายภาพของเข็มพิษในแมงกะพรุนไฟ *Sanderia malayensis* (TEM)
(Ca = capsule; Cw = capsule wall; RER = rough endoplasmic reticulum)



ภาพที่ 4-14 โครงสร้างจุลกายภาพของเซลล์สร้างเข็มพิษ (nematocyte) ในแมงกะพรุนไฟ
Sanderia malayensis ซึ่งพบการสร้างเข็มพิษ (nematocyst) อยู่ภายในเซลล์ (TEM)
(Cw = capsule wall; Th = Thread)



ภาพที่ 4-15 โครงสร้างจุลกายภาพของเซลล์สร้างเข็มพิษในแมงกะพรุนไฟ *Sanderia malayensis* พบ RER มาก นิวเคลียสแบบ euchromatin (TEM)
(nu = nucleus; Cw = capsule wall; RER = rough endoplasmic reticulum)



ภาพที่ 4-16 โครงสร้างจุลกายภาพบริเวณ cell junction ของเซลล์สร้างเข็มพิษ (nematocyte) ในแมงกะพรุนไฟ *Sanderia malayensis* (TEM)
(nu = nucleus; no = nucleolous; se = septatate junction)

4.2 ผลของการกระตุ้นการปล่อยเข็มพิษด้วยสารเคมีชนิดต่างๆ

จากการทดสอบพบว่า เมื่อหยดสารเคมีชนิดต่าง ๆ และทิ้งไว้ 3 นาที จะมีผลกระตุ้นการปล่อยเข็มพิษดังนี้ น้ำกลั่น (disteller water) กระตุ้นให้เข็มพิษปล่อยออกมามากประมาณ 20-30 อันต่อกลุ่ม ซึ่งจัดอยู่ในระดับ ++ น้ำทะเลเทียม (artifical sea water) ความเข้มข้น 30 ppt ไม่กระตุ้นให้เข็มพิษปล่อยออกมา อยู่ในระดับ 0 น้ำทะเลเทียม ความเข้มข้น 20 ppt จะกระตุ้นให้เข็มพิษปล่อยออกมาเล็กน้อย ประมาณ 1-10 อันต่อกลุ่ม อยู่ในระดับ + ส่วนน้ำทะเลเทียม ความเข้มข้น 10 ppt จะกระตุ้นให้เข็มพิษปล่อยออกมามากกว่า ความเข้มข้น 20 ppt โดยจะถูกปล่อยออกมาประมาณ 5-10 อันต่อกลุ่ม แต่อยู่ในระดับ + เช่นเดียวกัน เอทานอล (ethanol) ความเข้มข้น 40% กระตุ้นให้เข็มพิษปล่อยออกมามาก ประมาณ 10 อันต่อกลุ่ม จัดอยู่ในระดับ ++ ส่วนแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70% กระตุ้นให้เข็มพิษปล่อยออกมากแต่มากกว่าแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70% ซึ่งถูกปล่อยออกมาประมาณ 10-30 อันต่อกลุ่ม และจัดอยู่ในระดับ ++ น้ำส้มสายชู (Acetic acid) ความเข้มข้น 4% และ 5% กระตุ้นให้เข็มพิษถูกปล่อยออกมาไม่แตกต่างกัน โดยเข็มพิษถูกกระตุ้นให้ปล่อยออกมาเกือบทุกอันและปล่อยออกมาทันทีเมื่อสัมผัสกับน้ำส้มสายชู ซึ่งถือว่าได้รับการกระตุ้นให้ปล่อยออกมามากที่สุด อยู่ในระดับ +++ โซดา (Soda) กระตุ้นให้เข็มพิษปล่อยออกมาเล็กน้อยประมาณ 10 อันต่อกลุ่ม น้ำชา (Tea) กระตุ้นให้เข็มพิษปล่อยออกมาเล็กน้อยเช่นเดียวกับโซดา ซึ่งจัดอยู่ในระดับ + ผักบุ้งทะเลในน้ำกลั่น จะกระตุ้นให้เข็มพิษแตกออกมาเล็กน้อยในระดับ + และผักบุ้งทะเลในน้ำทะเลเทียม ไม่มีการกระตุ้นให้เข็มพิษแตกออกมา

ตารางที่ 4-2 ผลการกระตุ้นการปล่อยเข็มพิษด้วยสารเคมีชนิดต่าง ๆ

สารเคมี (Chemical)	**การสังเกตการปล่อยเข็มพิษ (Nematocyst discharge)**		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
น้ำกลั่น (Disteller water)	++	++	++
น้ำทะเลเทียม (Artifical sea water) 30 ppt	0	0	0
น้ำทะเลเทียม (Artifical sea water) 20 ppt	+	+	0
น้ำทะเลเทียม (Artifical sea water) 10 ppt	+	+	+
แอลกอฮอล์ (Alcohol) 40%	++	++	++
แอลกอฮอล์ (Alcohol) 70%	++	++	+
น้ำส้มสายชู (Acetic acid) 4%	+++	+++	+++
น้ำส้มสายชู (Acetic acid) 5%	+++	+++	+++
โซดา (Soda)	+	+	+
น้ำชา (Tea)	+	+	+
ผักบุ้งทะเลในน้ำกลั่น	+	+	++
ผักบุ้งทะเลในน้ำทะเลเทียม	0	0	0

หมายเหตุ

0 หมายถึง ไม่มีการปล่อยเข็มพิษ

+ หมายถึง มีการปล่อยเข็มพิษเล็กน้อย

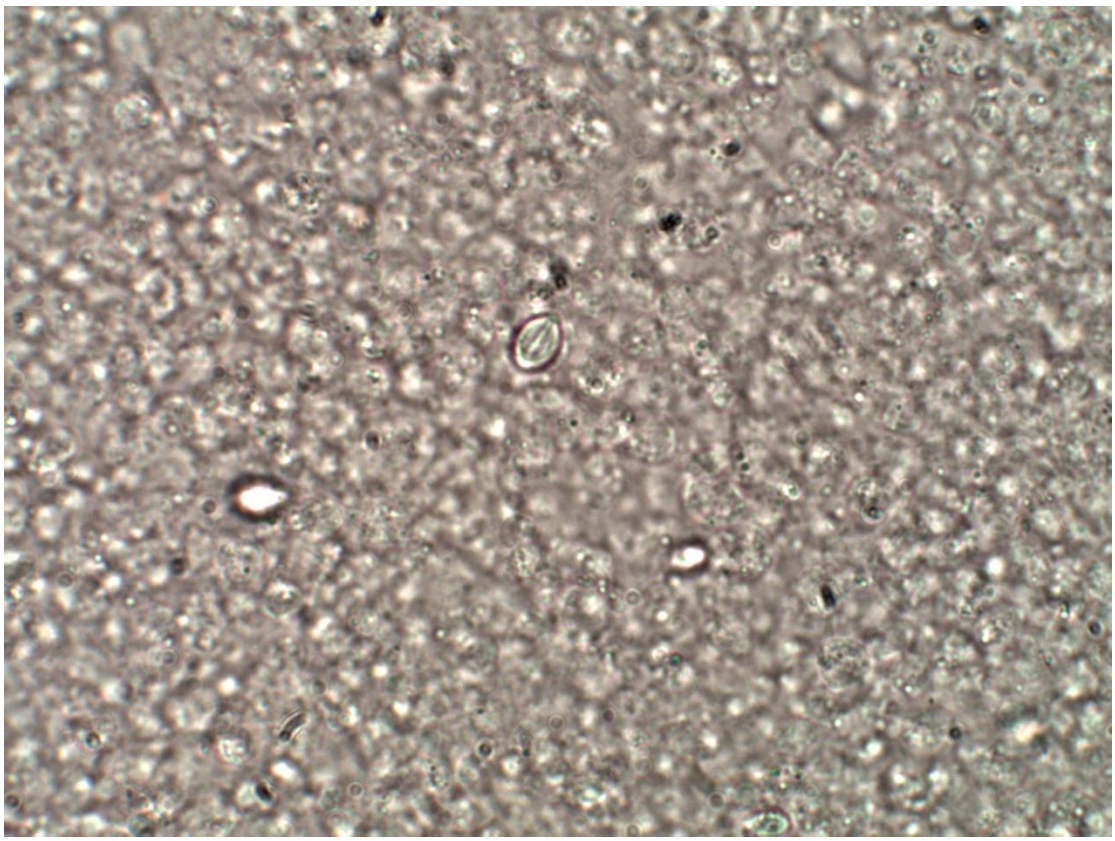
++ หมายถึง มีการปล่อยเข็มพิษมาก และ

+++ หมายถึง มีการปล่อยเข็มพิษมากที่สุด

4.4 แมงกะพรุน *Rhopilema hispidum*

จากศึกษาลักษณะสัณฐานของแมงกะพรุนและเข็มพิษในครั้งนี้พบว่า ลักษณะพื้นผิวภายนอกของแมงกะพรุนหนัง แสดงดังภาพที่ 4-17 เข็มพิษมีลักษณะค่อนข้างกลม อยู่กระจัดกระจายและพบจำนวนเข็มพิษน้อย เมื่อเทียบกับแมงกะพรุนไฟมาเลเซีย *Sandaria malayensis* พบเข็มพิษที่มีลักษณะเป็นกระเปาะหรือแคปซูล (capsule) ที่มีท่อกลวงขดอยู่ภายใน แสดงดังภาพที่ 4-18

ภาพที่ 4-17 พื้นผิวภายนอกของแมงกะพรุนหนัง *Rhopilema hispidum*



ภาพที่ 4-18 เข็มพิษที่พบในแมงกะพรุนหนัง *Rhopilema hispidum*

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

5.1.1 สัณฐานและการกระจายตัวของเข็มพิษในแมงกะพรุน *Sanderia malayensis*

จากการศึกษาพบว่า เข็มพิษมีลักษณะเป็นกระเปาะที่มีท่อกลวงขดอยู่ภายใน ผู้วิจัย ซึ่งสามารถถูกกระตุ้นให้ปล่อยออกมาได้ โดยจะเรียงตัวเป็นกลุ่มอย่างหนาแน่น ทำให้เมื่อมองด้วยตาเปล่าจะเห็นเป็นปุ่มนูนขึ้นมา การกระจายตัวของเข็มพิษในบริเวณต่าง ๆ แตกต่างกัน โดยพบว่าบริเวณหนวดมีเข็มพิษหนาแน่นมากที่สุดประมาณ 7,353 อันต่อตารางมิลลิเมตร แขนรอบปากมีเข็มพิษหนาแน่นปานกลางประมาณ 2,540 อันต่อตารางมิลลิเมตร และร่มจะมีความหนาแน่นน้อยที่สุดประมาณ 332 อันต่อตารางมิลลิเมตร เนื่องจากเข็มพิษมีหน้าที่ในการการจับเหยื่อหรือป้องกันตัวจากผู้ล่า ซึ่งเข็มพิษเป็นออแกเนลล์หนึ่งของเซลล์สร้างเข็มพิษ โดยหน้าที่ของเข็มพิษสัมพันธ์กับอวัยวะ ซึ่งหนวดเป็นอวัยวะที่ใช้ในการจับเหยื่อเช่นกัน ดังนั้นหนวดจึงเป็นอวัยวะที่เหมาะสำหรับการมีปริมาณเข็มพิษมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับสมมุติฐาน และรายงานของ (Colin & Costello, 2007) และคาดว่าเข็มพิษที่พบในแมงกะพรุนไฟมาเลเซียเป็นเข็มพิษชนิด Holotrichous Isorhiza เนื่องจากเข็มพิษที่พบของกระเปาะและท่อกลวงมีลักษณะคล้ายคลึงกับรายงานของ (Kass-Simon & Scappaticci, 2002)

5.1.2 โครงสร้างจุลกายวิภาคของเข็มพิษในแมงกะพรุน *Sanderia malayensis*

จากการศึกษาจุลกายวิภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนทั้งแบบ TEM และ SEM พบว่า เนื้อเยื่อแมงกะพรุน *Sanderia malayensis* ประกอบด้วยเยื่อบุผิวชนิด pseudostratified ciliated columnar epithelium ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อชั้นเดียวที่ประกอบด้วยเซลล์ 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์พื้นฐาน เซลล์สร้างเมือก และเซลล์สร้างเข็มพิษ

ลักษณะของเซลล์สร้างเข็มพิษ (nematocyte) จะพบนิวเคลียสขนาดใหญ่มีนิวคลีโอลัสชัดเจน พบ euchromatin ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์มีกิจกกรรมมาก นอกจากนี้ยังพบออร์แกเนลล์อื่น ๆ ได้แก่ พบ RER หรือ rough endoplasmic reticulum และ Golgi compex จำนวนมาก อีกทั้งยังพบ vesicle ที่มีลักษณะ electon-dense granule ขนาดใหญ่จำนวนมาก ลักษณะดังกล่าวเป็นการแสดงกิจกรรมของเซลล์ในการสร้างโปรตีนเพื่อส่งออกไปยังตำแหน่งเป้าหมาย ซึ่งคาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการสร้างพิษชนิดโปรตีนเพื่อเก็บสะสมในแคปซูลของเข็มพิษ เพื่อทำหน้าที่ attact เหยื่อสำหรับแมงกะพรุน

เข็มพิษ (nematocyst) มีลักษณะเป็นกระเปาะเรียกว่า แคปซูล และมีท่อกลวงที่ขดอยู่ภายในบริเวณที่ติดสีเข้ม โดยถูกล้อมรอบด้วยผนังแคปซูลที่ค่อนข้างหนา ซึ่งเข็มพิษจะถูกสร้างขึ้นจากเซลล์สร้างเข็มพิษ โดยจะสร้างแคปซูลและองค์ประกอบภายในของเข็มพิษ ในไซโทรพลาสซึม ซึ่งสร้างท่อกลวงภายนอกแคปซูลก่อน จากนั้นจะม้วนเข้าไปอยู่ภายในแคปซูล ซึ่งสังเกตพบว่าเข็มพิษมีรูปร่าง

และขนาดแตกต่างกัน และพบเข็มพิษที่มีขนาดใหญ่ที่สุดมีความยาวประมาณ 10 ไมโครเมตร ซึ่งจะถูกสร้างขึ้นจากเซลล์สร้างเข็มพิษ โดยจะสร้างองค์ประกอบภายในของเข็มพิษขึ้นก่อน จากนั้นจะมีการสร้างแคปซูลที่มีผนังค่อนข้างหนาล้อมลอบ ภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์สร้างเข็มพิษพบ เอนโดพลาสมิดเรติคูลัมแบบขรุขระจำนวนมากบริเวณที่มีการพัฒนาของเข็มพิษ เนื่องจากองค์ประกอบต่างๆของเข็มพิษเป็นสารจำพวกโปรตีน จากการรายงานของ (Kass-Simon & Scappaticci, 2002) พบการเชื่อมต่อระหว่างเซลล์เป็นการเชื่อมกันแบบ Septate junction เพื่อช่วยยึดเซลล์ทั้งสองเซลล์ให้ติดกัน และนอกจากนี้ยังพบการเชื่อมกันของเซลล์แบบอื่น ๆ อีก โดยสังเกตพบการขดม้วนของบริเวณที่เชื่อมกันของเซลล์โดยผู้วิจัยไม่สามารถระบุถึงชนิดของการเชื่อมต่อของลักษณะนี้ได้ และไม่พบว่ามีรายงานที่กล่าวถึงการเชื่อมต่อชนิดนี้

5.1.3 การทดสอบการกระตุ้นการปล่อยเข็มพิษด้วยสารเคมีชนิดต่าง ๆ

เมื่อทดสอบการกระตุ้นการปล่อยเข็มพิษบริเวณหนวดพบว่า น้ำกลั่นกระตุ้นเข็มพิษให้ปล่อยออกมามาก ส่วนน้ำทะเลเทียม 30 ppt จะไม่มีการกระตุ้นให้เข็มพิษปล่อยออกมา สัณนิฐานว่าเกี่ยวข้องกับแรงดันออสโมซิส สเนื่องจากความเข้มข้นของน้ำทะเลเท่ากับความเข้มข้นภายในแคปซูลของเข็มพิษ เมื่อความเข้มข้นของสารภายในและภายนอกเข็มพิษอยู่ในจุดสมดุลจะไม่เกิดการปล่อยของเข็มพิษ แต่น้ำทะเลเทียมความเข้มข้น 20 ppt ความเข้มข้น 10 ppt และน้ำกลั่นทำให้เกิดการปล่อยของเข็มพิษเนื่องจากความเข้มข้นของสารภายในเข็มพิษมากกว่าภายนอก น้ำจึงเกิดการแพร่เข้าสู่ภายในเข็มพิษและทำให้เข็มพิษเกิดการแตกและปล่อยออกมา เอทานอลกระตุ้นให้เข็มพิษปล่อยออกมามาก ถ้าเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้นจะทำให้มีการปล่อยเข็มพิษเพิ่มขึ้นด้วย คาดว่าเอทานอลทำให้โปรตีนเสียสภาพอย่างรวดเร็ว เกิดการคลายเกลียวของโครงสร้าง 3 มิติ ทำให้โปรตีนในเข็มพิษไม่สามารถทำหน้าที่ได้ น้ำส้มสายชูหรือกรดแอซิติก 4% และ 5% กระตุ้นให้เข็มพิษถูกปล่อยออกมาไม่แตกต่างกัน โดยเข็มพิษถูกกระตุ้นให้ปล่อยออกมาทันทีและปล่อยออกมามากที่สุด ยังไม่ทราบสาเหตุที่น้ำส้มสายชูทำให้เข็มพิษของแมงกะพรุนไฟมาเลเซีย เกิดการปล่อยออกมา คาดว่าน้ำส้มสายชูไปมีผลทำให้โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเข็มพิษเสียสภาพ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Pyo et al. (2016) รายงานว่า น้ำส้มสายชูมีผลกระตุ้นการปล่อยเข็มพิษในแมงกะพรุนแท้ แต่ไม่กระตุ้นการปล่อยเข็มพิษในแมงกะพรุนกล่อง ซึ่งไม่พบว่ามีการอธิบายถึงสาเหตุของความแตกต่างในแมงกะพรุนทั้งสองชนิด จึงสัณนิฐานว่ากลไกการปล่อยเข็มพิษในแมงกะพรุนทั้งสองกลุ่มนี้มีความแตกต่างกัน โซดาจะกระตุ้นให้เข็มพิษปล่อยออกมาเล็กน้อย เนื่องจากโซดาเป็นสารผสมระหว่างโซเดียมไฮโดเจนคาร์บอเนตกับน้ำ จึงคาดว่าทำให้เกิดการแพร่ของน้ำเข้าสู่ภายในเข็มพิษ น้ำชากระตุ้นให้เข็มพิษปล่อยออกมาเล็กน้อยเช่นเดียวกับโซดา ผักบุ้งทะเลในน้ำกลั่นจะกระตุ้นให้เข็มพิษแตกออกมาแต่ผักบุ้งทะเลในน้ำทะเลเทียม จะไม่มีการกระตุ้นให้เข็มพิษแตกออกมา ดังนั้น ผักบุ้งทะเลสามารถยับยั้งการปล่อยเข็มพิษในแมงกะพรุนชนิด *Sanderia malayensis* จึงเหมาะสำหรับนำมาใช้ในการปฐมพยาบาลเบื้องต้นสำหรับการถูกแมงกะพรุนชนิดนี้ต่อยได้ สอดคล้องกับรายงานของ (คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล, 2554).

5.2 สรุปผลการวิจัย

บริเวณหนวดมีเข็มพิษกระจายอยู่หนาแน่นมากที่สุด น้ำส้มสายชูเป็นสารที่ไม่ควรนำมาใช้ปฐมพยาบาลเบื้องต้นสำหรับการถูกแมงกะพรุนแท้ชนิด *Sanderia malayensis* เนื่องจากกระตุ้นการปล่อยเข็มพิษเพิ่มมากขึ้น ส่วนสารเคมีที่ยับยั้งการปล่อยเข็มพิษถูกออกมา ได้แก่ น้ำทะเลความเข็มพิษ 30 ppt และผักบุ้งทะเล ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการปฐมพยาบาลเบื้องต้นจากการถูกแมงกะพรุนแท้ต่อย และการศึกษาลักษณะสัณฐานพบว่า เข็สร้างขึ้นจากมพิษที่เซลล์สร้างเข็มพิษสร้างเข็มพิษได้มากกว่าหนึ่งอัน โดยภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์สร้างเข็มพิษจะพบ นิวเคลียสเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมจำนวนมากอยู่บริเวณที่มีการพัฒนาของเข็มพิษ คาดว่าเกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษที่มีองค์ประกอบของสารประเภทโปรตีน

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ควรเพิ่มเติมชนิดของสารทดสอบให้มีความหลากหลายมากขึ้น และเพิ่มชนิดของสารในกลุ่มเดียวกันเพื่อเปรียบเทียบถึงคุณสมบัติอื่นๆ

2. ศึกษาการกระจายตัวของของเข็มพิษในแมงกะพรุนกลุ่มอื่น ๆ เพิ่มเติมเพื่อเปรียบเทียบความรุนแรงของพิษหรือเก็บเป็นข้อมูลเชิงสถิติ

บรรณานุกรม

คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล. (2554). การรักษาพิษแมงกะพรุนด้วยผักบุ้งทะเลค้นข้อมูล วันที่ 5 พฤษภาคม 2562, เข้าถึงได้จาก http://www.thaitravelclinic.com/blog/other-travel-tips/thai-pakbung-tale.html

นิวัฒน์ ศรีสวัสดิ์ สถาบันนวัตกรรมและพัฒนากระบวนการเรียน มหาวิทยาลัยมหิดล. (2561). กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน. วันที่ค้นข้อมูล 6 มิถุนายน 2561, เข้าถึงได้จาก http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/nano/Page/Unit4-5.html

พนิดา อากาศวิภาต, ทิพรัตน์ฟู, ณัฐปภัสร์ศิริสุขชัยถาวร, ณัฐพรอาวะกลุ พาณิชย์, รสมันต์ จงเจริญ และเบญจวรรณ ธรรมธนารักษ์.(2015). การนำกากใบชามาใช้เพื่อผลิตเครื่องดื่มชา. วารสารวิทยาศาสตร์ประยุกต์ 14(1), 45–57

วิศิษฏพงศ์ ยอดศรี หน่วยวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของวัสดุ ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (2557). การทำางานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบทรานสมิสชัน. วันที่ค้นข้อมูล 3 พฤษภาคม 2562, เข้าถึงได้จาก https://www2.mtec.or.th

สุชัย สุเทพารักษ์ ภาควิชาอายุรศาสตร์คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สถานเสาวภา สภากาชาดไทย. (2562). คลินิกพิษจากแมงกะพรุน. วันที่ค้นข้อมูล 7 มรกราคม 2562, เข้าถึงได้จาก httpwww.errama.comsystemspaw2uploadsfilesjellyfish.

Boero, F. (2013). General Fisheries Commission for the Mediterranean. FAO 92, 1–63

Kass-Simon, G. and Scappaticci, A.A. (2002). The behavioral and developmental physiology of nematocysts. The National Register of Citizene 80, 1172–1794

Kitatani, R., Yamada, M., Kamio M. and Nagai, N. (2015). Is associated with pain: Jellyfish with painful Sting Have Longer Nematocyst Tubules than Harmless Jellyfish Creative. PLoS ONE. 10(8), 1–13

Mater, A.G. (1902) Medusae of the world-the scyphomedusae. Carnegie Institution of Washington 109(3), 504–728

Manigaunha, A., Ganesh, N. and Kharya, M.D. (2010). Morning glory: A new thirst in-search of de-novo therapeutic approach. International Journal of Phytomedicine 2, 18–21.

Mori, K., Sullivan, M. and Ayers, J. (2017). Sensory discrimination by isolated feeding tentacles in *Sanderia malayensis*. BioRxiv 12, 1–17

Parracho, T. and Morais, Z. (2015). Catostylus tagi: partial rDNA sequencing and characterization of nematocyte structures using two improvements in jellyfish sample preparation. Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases 21(40), 1–10

Pechenik, J.A. (2015). Biology of the invertebrates (seventh edition). McGraw-Hill, New York.

Pongprayoon, U., Wasuwat, S., Sunthornpalin, P. and Bohlin, L. (1987). Chemical and pharmacological studies of the Thai medicinal plant Ipomoea pes-caprae (Phakbungthale). The First Princess Chulabhorn Science Congress 10–13

Pyo, M., Lee, H., Bae, S.K., Heo, Y., Choudhary, I., Yoon, D.W., Kang, C. and Kim, E. (2016). Modulation of jellyfish nematocyst discharges and management of human skin stings in *Nemopilema nomurai* and *Carybdea mora*. Taxicon 109, 26–32

Liao, L., Zhao, M., Ren, J., Zhao, H., Cui, C. and Hu, X. (2010). Effect of acetic acid deamidation-induced modification on functional and nutritional properties and conformation of wheat gluten. J Sci Food Agric 90(3). 409–417

Pechenik, J.A. (2015). Biology of the invertebrates (seventh edition). McGraw-Hill, New York.

Ruppert, E.E., Fox, R.S., and Barnes, R.D. (2004). Invertebrate zoology: a functional evolutionary approach (seventh edition). Brooks Cole, USA.

Cegolon, L., Heymann W. C., Lange H.J., and Mastrangelo G. 2013. Jellyfish stings and their management: A review. 11(2), 523–550.

Donnell, G. and Russell, A.D. (1999). Antiseptic and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance 1(12), 147-179.

Colin S. P. & Costello J. H (2007) Functional characteristics of nematocysts found on the scyphomedusa *Cyanea capillata*. Experimental Marine Biology and Ecology 3(51) 114–120