โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ความแตกต่างในรอบวันของค่าโลหิตวิทยาของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

Diurnal variation of hematological parameters in the Hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata* in captivity at Talu Island, Prachuap Khirikhan Province

ชื่อนิสิต นางสาวกัลยกร นามจันทรา **เลขประจำตัว** 5832008523

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the senior project authors' files submitted through the faculty.

โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ความแตกต่างในรอบวันของค่าโลหิตวิทยาของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

Diurnal variation of hematological parameters in the Hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata* in captivity at Talu Island, Prachuap Khirikhan Province

ชื่อนิสิต นางสาวกัลยกร นามจันทรา **เลขประจำตัว** 5832008523

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความแตกต่างในรอบวันของค่าโลหิตวิทยาของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

Diurnal variation of hematological parameters in the Hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata* in captivity at Talu Island, Prachuap Khirikhan Province

นางสาวกัลยกร นามจันทรา

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

อาจารย์ ดร.จิรารัช กิตนะ

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพดล กิตนะ

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต

สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2561

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงงานวิจัย	: ความแตกต่างในรอบวันของค่าโลหิตวิทยาของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	: นางสาวกัลยกร นามจันทรา
อาจารย์ที่ปรึกษา	: อาจารย์ ดร.จิรารัช กิตนะ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพดล กิตนะ
ภาควิชา	: ชีววิทยา

บทคัดย่อ

เต่ากระเป็นเต่าทะเลที่จัดอยู่ในสถานภาพเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ขั้นวิกฤติ ในประเทศไทยพบเต่ากระขึ้นวางไข่บริเวณชายฝั่งอ่าวไทยจำเพาะบางบริเวณเท่านั้น ได้แก่ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ มูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยามได้ทำการนำไข่เต่ามาเพาะฟักและอนุบาลลูกเต่าในบ่อเลี้ยงจนแข็งแรงแล้วจึงปล่อยสู่ธรรมชาติ การอนุบาลเต่ากระในบ่อเลี้ยงต้องมีการตรวจสุขภาวะเต่าโดยการประเมินจากสภาพภายนอก และการประเมินทางโลหิตวิทยา ซึ่งเป็นพารามิเตอร์ที่อาจมีความแตกต่างในรอบวัน และอาจมีผลต่อการวินิจฉัยเมื่อเก็บตัวอย่างเลือดเต่าในช่วงเวลาต่าง ๆ ได้ โครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความแตกต่างในรอบวันของค่าทางโลหิตวิทยาของเต่ากระในบ่อเลี้ยง โดยเก็บตัวอย่างเลือดเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ ในช่วงเวลากลางวันและกลางคืนในฤดูก่อนมรสุม และฤดูมรสุม นำมาตรวจสอบค่าทางโลหิตวิทยา ได้แก่ การนับแยกชนิดเซลล์เม็ดเลือดขาว และการหาค่าเซลล์เม็ดเลือดขาวอัดแน่น รวมถึงวิเคราะห์ปริมาณสารชีวโมเลกุลในพลาสม่า ได้แก่ โปรตีน ยูเรียไนโตรเจน และครีเอทินิน พร้อมทั้งเก็บข้อมูลสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิน้ำ อุณหภูมิอากาศ ค่า pH ค่าความเข้มแสง และค่าความเค็มของน้ำทะเลภายในบ่อเลี้ยง ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างที่เด่นชัดในรอบวันของค่าทางโลหิตวิทยา พบค่าทางโลหิตวิทยาที่มีความแตกต่างระหว่างช่วงกลางวันและกลางคืนอย่างมีนัยสำคัญทั้ง 2 ฤดู ได้แก่ ร้อยละของเฮเทอโรฟิล ร้อยละของลิมโฟไซต์ และอัตราส่วนเฮเทอโรฟิลต่อลิมโฟไซต์ ส่วนค่าทางโลหิตวิทยาที่พบว่ามีความแตกต่างระหว่างช่วงกลางวันและกลางคืนอย่างมีนัยสำคัญเพียงฤดูก่อนมรสุมฤดูเดียว ได้แก่ ร้อยละของโมโนไซต์ ซึ่งการศึกษาความแตกต่างในรอบวันของค่าทางโลหิตวิทยาในเต่ากระมีความสำคัญและจำเป็นมากเนื่องจากเป็นข้อมูลที่มีผลต่อการแปรผลทางโลหิตวิทยาเพื่อประเมินสุขภาวะ และสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลเพื่อต่อยอดการศึกษาทางด้านสรีรวิทยาของเต่ากระในอนาคตได้

คำสำคัญ: การนับแยกชนิดเซลล์เม็ดเลือดขาว, เต่าทะเล, อัตราส่วนเฮเทอโรฟิลต่อลิมโฟไซต์, *Eretmochelys imbricata*

Research title : Diurnal variation of hematological parameters in the Hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata* in captivity at Talu Island, Prachuap Khirikhan Province
Student name : Miss Kanyakorn Namchantra
Advisor : Jirarach Kitana, Ph.D.
Co-advisor : Assistant Professor Noppadon Kitana, Ph.D.
Department : Biology

Abstract

The hawksbill turtle has been listed as critically endangered species. In Thailand, nesting of hawksbill turtle can be found in confined shoreline of the Gulf of Thailand, specifically at Talu Island, Prachuap Khirikan Province where the Siam Marine Rehabilitation Foundation has collected the eggs and nursed the turtles in captivity before releasing them into nature. In the nursery, health assessment is needed and it has been carried out by external examination and hematological assessment. The latter is the parameter known to have diurnal variation which may affect the health interpretation. So, in this study, we aim to observe diurnal variation of hematological parameters in captive *E. imbricata*. Blood samples were collected from the juvenile hawksbill turtles reared at the Talu Island before and during monsoon season of 2018. Blood samplings were carried out at both daytime and nighttime. All samples were subjected to hematological evaluation for differential leukocyte count, packed cell volume and the levels of biomolecules in plasma including total protein, blood urea nitrogen and creatinine. Environmental factors such as water temperature, water salinity, water pH, air temperature and light intensity were measured. The results indicate that in both seasons remarkable diurnal variation of hematological parameters was presented including percentage of heterophil, percentage of lymphocyte and heterophil lymphocyte ratio**.** The results from this study is crucial for hematological interpretation and useful for the health assessment of hawksbill turtles reared in captivity in the future.

Keywords: differential leukocyte count, *Eretmochelys imbricata*, heterophil lymphocyte ratio, marine turtle

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากความช่วยเหลือของผู้เกี่ยวข้องทุกฝ่าย โดยเฉพาะ อาจารย์ ดร.จิรารัช กิตนะ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์นพดล กิตนะ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน ให้ความรู้ คำแนะนำ ในเรื่องการทำงานวิจัย รวมถึงช่วยตรวจแก้ไข และแก้ปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการดำเนินงานจนกระทั่งโครงการนี้สำเร็จด้วยดี และให้ข้อคิดการใช้ชีวิตเป็นนิสิตในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยอย่างมีความสุข จึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) สนองพระราชดำริโดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนโครงการวิจัย เรื่อง “ความแตกต่างในรอบวันของค่าทางโลหิตวิทยาของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์” ทั้งด้านงบประมาณ รวมถึงการดำเนินงานต่าง ๆ ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณมูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม และเกาะทะลุไอร์แลนด์รีสอร์ทที่ช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในการออกภาคสนามเพื่อเก็บตัวอย่าง รวมถึงอาหารและที่พักระหว่างการดำเนินงาน

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ช่วยอบรมสั่งสอน รวมถึงให้ความรู้อันเป็นประโยชน์แก่การทำวิจัยในครั้งนี้ และการดำรงชีวิตในอนาคต

ขอขอบคุณสมาชิกใน BioSentinel Lab ทุกท่านตั้งแต่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเลือด การให้คำแนะนำ รวมถึงการดูแลอย่างอบอุ่นจนกระทั่งงานนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา เพื่อน รุ่นพี่ รุ่นน้อง และทุก ๆ คนที่คอยให้คำปรึกษา และให้กำลังใจตลอดการดำเนินงาน

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุน และให้โอกาสในการปฏิบัติการจริงในโครงการวิจัยชิ้นนี้

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย ..... **ก**

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... **ข**

กิตติกรรมประกาศ ..... **ค**

สารบัญ ..... **ง**

สารบัญตาราง ..... **ฉ**

สารบัญภาพ ..... **ช**

บทที่ 1 บทนำ **1**

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม **3**

บทที่ 3 ขั้นตอนการดำเนินงาน **7**

สัตว์ทดลอง 7

การบันทึกข้อมูลทางกายภาพของบ่อเลี้ยง 7

การวัดขนาดสัณฐานและประเมินสภาพภายนอกของเต่ากระ 7

การศึกษาค่าโลหิตวิทยา 8

ก. การศึกษาสัณฐานวิทยาเซลล์เม็ดเลือด 8

ข. การหาค่าเซลล์เม็ดเลือดอัดแน่น (packed cell volume; PCV) 9

ค. การนับแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว 9

ง. การตรวจสอบระดับสารชีวโมเลกุลในเลือด 9

การตรวจสอบปริมาณโปรตีน 9

การตรวจสอบปริมาณ Blood Urea Nitrogen 9

การตรวจสอบปริมาณครีเอทินิน 10

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 10

บทที่ 4 ผลการศึกษา **11**

1. ปัจจัยทางกายภาพของบ่อเลี้ยง 11

2. สัณฐานวิทยาของเต่ากระ 11
3. โลหิตวิทยาของเต่ากระ 12
3.1 สัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือด 12
3.2 ค่าทางโลหิตวิทยาของเต่ากระ 12
ค่าเซลล์เม็ดเลือดอัดแน่น (PCV) 13
ปริมาณทรอมโบไซต์ 13
การนับแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว 13
ปริมาณสารชีวโมเลกุลในเลือด 14
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา **31**
เอกสารอ้างอิง **33**
ภาคผนวก **35**
การเตรียมสารเคมี 35
Phosphate buffer pH 7.0 35
การเตรียมสีย้อม Giemsa stain 35

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ค่าปัจจัยทางกายภาพบริเวณบ่อเลี้ยงเต่ากระ ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ก่อนฤดูมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561 11
ตารางที่ 2 ขนาดสัณฐานของเต่ากระอายุ 8-10 เดือนในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ก่อนฤดูมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561 11
ตารางที่ 3 ค่าเซลล์เม็ดเลือดอัดแน่นของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561 16
ตารางที่ 4 สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวอิโอสิโนฟิลของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561 17
ตารางที่ 5 สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561 18
ตารางที่ 6 สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561 19
ตารางที่ 7 สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวเฮเทอโรฟิลของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561 20
ตารางที่ 8 อัตราส่วนเฮเทอโรฟิลต่อลิมโฟไซต์ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561 21
ตารางที่ 9 ปริมาณโปรตีนในพลาสมาของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561 22
ตารางที่ 10 Blood Urea Nitrogen ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561 23
ตารางที่ 11 ครีเอทินินในพลาสมาของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561 24

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 บ่ออนุบาลเต่ากระ ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 4
ภาพที่ 2 เต่ากระ *Eretmochelys imbricata* อายุ 8-10 เดือนจากบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 7
ภาพที่ 3 การวัดขนาดสัณฐานกระดองหลังของเต่ากระ *E. imbricata* โดยใช้สายวัด 8
ภาพที่ 4 การย้อมสีสไลด์เลือดด้วยสี Giemsa's stain 9
ภาพที่ 5 สัญลักษณ์สีสำหรับแสดงผลแบบแยกฤดูและรวม 2 ฤดู 13
ภาพที่ 6 A. สัณฐานของเซลล์เม็ดเลือดของเต่ากระ *E. imbricata* อายุ 8-10 เดือนในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ประกอบด้วย B. เซลล์เม็ดเลือดแดง C. ลิมโฟไซต์ D. โมโนไซต์ E. เกล็ดเลือด F. อิโอสิโนฟิล G. เฮเทอโรฟิล, Giemsa stain 15
ภาพที่ 7 ค่าเซลล์เม็ดเลือดอัดแน่นของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์..... 25
ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561 25
ภาพที่ 8 สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง 4 ชนิดของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในช่วงก่อนฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561 25
ภาพที่ 9 สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง 4 ชนิดของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในช่วงฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561 26
ภาพที่ 10 สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวอิโอสิโนฟิลของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561 26
ภาพที่ 11 สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561 27
ภาพที่ 12 สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561 27
ภาพที่ 13 สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวเฮเทอโรฟิลของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561 28
ภาพที่ 14 อัตราส่วนเฮเทอโรฟิลต่อลิมโฟไซต์ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561 28
ภาพที่ 15 ปริมาณโปรตีนในพลาสมาของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561 29

ภาพที่ 16 Blood Urea Nitrogen ในพลาสมาของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม 29
ภาพที่ 17 ระดับคริเอทินินในพลาสมาของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561..... 30

บทที่ 1

บทนำ

สิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ล้วนตอบสนองต่อปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ค่า pH ปริมาณแสง ซึ่งเปลี่ยนแปลงตามเวลาในรอบวัน และฤดูกาล ทำให้สิ่งมีชีวิตจำเป็นต้องมีการปรับพฤติกรรม รวมถึงกลไกในร่างกายเพื่อที่จะดำรงชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงนี้ได้ โดยกลไกหนึ่งที่เกี่ยวข้องในเรื่องนี้ คือ biological clock ในร่างกาย ซึ่งเป็นกลไกที่ควบคุมกระบวนการทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงปัจจัยสิ่งแวดล้อมในรอบวัน ทำให้เกิดความแตกต่างที่สามารถวัดได้ของพารามิเตอร์บางค่าในร่างกายสัตว์ เช่น ฮอร์โมน melatonin และ growth hormone ที่จะมีการหลั่งในปริมาณที่มากในช่วงเวลากลางคืน (Wyse et al., 2018; Brandenberger and Weibel, 2004) โดยอีกหนึ่งพารามิเตอร์ในร่างกายสัตว์ที่อาจมีการเปลี่ยนแปลงคือค่าทางโลหิตวิทยา ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม มีรายงานในวัว พบว่ามีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดง ค่าฮีโมโกลบิน และค่าเซลล์เม็ดเลือดอัดแน่น แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในรอบวัน และยังแตกต่างกันในแต่ละฤดูกาลด้วย (Scaglione et al., 2018) ในสัตว์เลื้อยคลานมีรายงานในงู พบว่าค่านับแยกชนิดเซลล์เม็ดเลือดขาว (different leukocyte count) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในรอบวัน (Singh et al., 2015) เช่นเดียวกันกับวัว ซึ่งเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม จึงเป็นที่น่าสนใจว่าสัตว์ชนิดอื่นจะมีการเปลี่ยนแปลงของค่าทางโลหิตวิทยาไปตามช่วงเวลาในรอบวันเช่นเดียวกันกับสัตว์ทั้งสองชนิดนี้หรือไม่

เต่ากระ *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766) เป็นเต่าทะเล 1 ใน 4 ชนิดที่พบว่ามีการขึ้นมาวางไข่บนชายฝั่งของประเทศไทย (กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง, 2556) ปัจจุบันเต่ากระถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มสัตว์ที่มีความเสี่ยงขั้นวิกฤติต่อการสูญพันธุ์ (critically endangered; Mortimer and Donnelly, 2008) เนื่องจากการลดจำนวนของประชากรเต่ากระอย่างต่อเนื่อง จึงมีการประกาศให้แหล่งวางไข่เต่าทะเลหลายแห่งเป็นเขตอุทยานแห่งชาติ โดยมีการเพาะเลี้ยง จัดตั้งศูนย์อนุบาลเต่า รวมถึงศูนย์วิจัยเพื่อดูแลลูกเต่าให้แข็งแรงพอที่จะปล่อยสู่ธรรมชาติ ซึ่ง ณ บริเวณเกาะทะลุ อำเภอบางสะพานน้อย จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เป็นหนึ่งในพื้นที่ที่พบการวางไข่ของเต่ากระ มูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยามจึงมีการสร้างบ่ออนุบาลลูกเต่าและปล่อยคืนสู่ธรรมชาติเพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิต

การอนุบาลเต่ากระจำเป็นจะต้องควบคุมบ่อเลี้ยงให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสม เช่น ปริมาณเต่าในบ่อเลี้ยง สภาพน้ำ อุณหภูมิ และอาหาร มิเช่นนั้นเต่ากระอาจเกิดสภาวะเครียดและมีอาการป่วยได้

โดยในขั้นตอนการอนุบาล จำเป็นต้องมีการประเมินสุขภาวะของเต่าเป็นระยะ ซึ่งจะสามารถประเมินได้จากลักษณะภายนอก และการเจาะเลือดเพื่อนำมาตรวจค่าทางโลหิตวิทยา วิธีการดังกล่าวเป็นวิธีที่ง่าย และสามารถนำมาเป็นข้อมูลประกอบการวินิจฉัยโรค รวมถึงป้องกันโรคที่อาจจะเกิดขึ้น (เฉลียว ศาลากิจ, 2548) โดยอาจนำมาพัฒนาการอนุบาลให้เต่ากระแข็งแรงพอที่จะปล่อยสู่ธรรมชาติเพื่อที่จะเพิ่มอัตราการอยู่รอด

จากงานวิจัยก่อนหน้าที่ได้ทำการศึกษาสหสัมพันธ์ระหว่างความเครียดและสุขภาวะของเต่ากระที่เลี้ยงไว้ในบ่ออนุบาล ณ เกาะทะลุ ก่อนฤดูมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2559 พบว่าค่านับแยกเม็ดเลือดขาวของกลุ่มเต่ากระปกติ และกลุ่มเต่ากระที่มีอาการป่วย มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (วรภัทร สวัสดิ์วงษ์, 2559) การเก็บตัวอย่างเลือดเต่าในงานวิจัยนี้ เป็นการเก็บตัวอย่างเพียงเวลาใดเวลาหนึ่ง ถ้าหากค่าทางโลหิตวิทยามีความแตกต่างในรอบวัน จะทำให้เกิดผลที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเปลี่ยนแปลงเวลาการเก็บตัวอย่าง ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อความแม่นยำในการประเมินสุขภาพเต่ากระได้ การศึกษาความแตกต่างในรอบวันของค่าทางโลหิตวิทยาในเต่ากระจึงมีความสำคัญและจำเป็น เนื่องจากเป็นข้อมูลที่มีผลต่อการแปรผลทางโลหิตวิทยา และสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลเพื่อต่อยอดการศึกษาทางด้านสรีรวิทยาของเต่ากระในอนาคตได้

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความแตกต่างในรอบวันของค่าทางโลหิตวิทยาของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

เต่ากระเป็น 1 ใน 4 เต่าทะเลที่พบการวางไข่ในประเทศไทย โดยในปัจจุบันเต่ากระมีการกระจายตัวของประชากรอยู่แถบน่านน้ำเขตอบอุ่นทั่วโลก ได้แก่ มหาสมุทรแปซิฟิก มหาสมุทรแอตแลนติก และมหาสมุทรอินเดีย แต่อย่างไรก็ตามจากการรายงานของ National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA), กระทรวงพาณิชย์สหรัฐอเมริกา (U.S. Department of Commerce) พบพื้นที่การวางไข่ของเต่ากระเป็นปริมาณน้อย และมีจำนวนประชากรลดลงอย่างต่อเนื่องในทุก ๆ ปี เนื่องจากภัยคุกคาม อาทิเช่น การทำลายแหล่งที่อยู่ การจับเพื่อไปทำสินค้าเนื่องจากกระดองที่มีลายสวยงาม สหภาพระหว่างประเทศเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติ (International Union for Conservation of Nature: IUCN) จึงจัดเต่ากระเข้าไว้ใน IUCN Red List โดยอยู่ในสัตว์กลุ่มที่ใกล้สูญพันธุ์ขั้นวิกฤต (Critically endangered; Mortimer and Donnelly, 2008)

จากการลดจำนวนของประชากรเต่ากระในแต่ละปีนั้น จึงมีการจัดตั้งโครงการอนุบาลเต่ากระตามแนวชายฝั่งที่พบการวางไข่ของเต่ากระ การนำเต่าทะเลมาอนุบาลในบ่อเลี้ยง เพื่อที่จะเพิ่มอัตราการรอดชีวิตเมื่อปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ (Head-starting Program) มีการดำเนินการอยู่หลายโครงการทั่วโลก และประสบผลสำเร็จในการอนุรักษ์ประชากรเต่าทะเล ยกตัวอย่างเช่น การนำไข่เต่าหญ้าแอตแลนติก *Lepidochelys kempii* มาเพาะฟักและอนุบาลในบ่อเลี้ยง ณ เกาะ Padre ประเทศสหรัฐอเมริกา (Bowen et al., 1994) นอกจากโครงการในต่างประเทศ ในประเทศไทยก็มีโครงการ Head-stating Program เพื่ออนุรักษ์เต่าทะเลตามแนวชายฝั่งที่พบการวางไข่เช่นเดียวกัน ยกตัวอย่างเช่น ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล กองทัพเรือ ซึ่งอยู่ในความดูแลของหน่วยบัญชาการต่อสู้อากาศยานและรักษาฝั่ง (สอ.รฝ.) อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี โดยดำเนินการอนุรักษ์เต่าทะเลมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2493 และโครงการอนุรักษ์เต่ากระ ณ เกาะทะลุ อำเภอบางสะพานน้อย จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งอยู่ในความดูแลของมูลนิธิฟื้นฟูทรัพยากรทะเลสยาม หน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการกองทัพเรือ และเกาะทะลุ ไอซ์แลนด์ รีสอร์ท โดยดำเนินการโครงการตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553 ซึ่งมีการนำไข่เต่ากระมาเพาะฟักและนำมาอนุบาลในบ่อเลี้ยงให้แข็งแรงก่อนปล่อยคืนสู่ธรรมชาติต่อไป

ภาพที่ 1 บ่ออนุบาลเต่ากระ ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเต่าในการอนุบาลในบ่อเลี้ยงนั้น จำเป็นจะต้องมีการประเมินสุขภาวะเบื้องต้น จากลักษณะภายนอก และการเจาะเลือดเพื่อนำมาประเมินค่าทางโลหิตวิทยา โดยค่าทางโลหิตวิทยา (hematological parameters) เป็นอีกหนึ่งพารามิเตอร์ที่สามารถตรวจสอบได้เมื่อเกิดความเปลี่ยนแปลงภายในร่างกายของสัตว์ ยกตัวอย่างเช่น สัณฐานของเซลล์เม็ดเลือด สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาว ความอัดแน่นเซลล์เม็ดเลือด (PCV) รวมถึงระดับสารชีวโมเลกุลชนิดต่าง ๆ ในเลือด

เซลล์เม็ดเลือดที่สามารถพบได้ในสัตว์เลื้อยคลาน ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เม็ดเลือดขาวอิโอสิโนฟิล เซลล์เม็ดเลือดขาวเฮเทอโรฟิล เซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ เซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ เซลล์เม็ดเลือดขาวเบโซฟิล และเซลล์เม็ดเลือดชนิดทรอมโบไซต์ (เฉลียว ศาลากิจ, 2548) โดยมีรายงานเกี่ยวกับการนับแยกชนิดเซลล์เม็ดเลือดขาวว่าสามารถนำมาประเมินสุขภาวะเบื้องต้นได้ ปริมาณสัดส่วนของแต่ละชนิดเซลล์เม็ดเลือดขาวจะแสดงถึงความผิดปกติที่เกิดในตัวสิ่งมีชีวิต ดังนี้

เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอิโอสิโนฟิลเป็นเม็ดเลือดขาวขนาดใหญ่ เมื่อพบว่ามีปริมาณมากอาจแสดงได้ถึงการติดเชื้อปรสิต หรือระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายถูกกระตุ้น (Mead and Borysenko, 1984)

เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเฮเทอโรฟิลเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวขนาดใหญ่ที่มีสัดส่วนมากเป็นลำดับที่ 2 รองจากลิมโฟไซต์ โดยทำหน้าที่ phagocytosis เชื้อแบคทีเรีย (Campbell, 2015) แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มลดของปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนี้นอกจากเกิดจากการติดเชื้อจากแบคทีเรียหรือปรสิต อาจเกิดจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม โดยในบางสปีชีส์มีการตอบสนองต่ออุณหภูมิและกิจกรรมที่ทำ (Campbell, 2015) รวมถึงอาจเกิดจากความเครียด โดยจะมีการนำเซลล์เม็ดเลือดจากไขกระดูกปล่อยลงมายังกระแสเลือดมากขึ้น และลดการนำเซลล์เม็ดเลือดไปทำลาย หรือนำเข้าสู่

เนื้อเยื่อ จึงทำให้สัดส่วนเม็ดเลือดขาวชนิดเฮเทอโรฟิลมีปริมาณที่มากขึ้นในกระแสเลือดของสัตว์ปีกและสัตว์เลื้อยคลาน (Davis et al., 2008)

เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีขนาดใกล้เคียงกันกับเม็ดเลือดแดง เมื่อพบว่ามีปริมาณมากอาจแสดงได้ถึงการอักเสบและการติดเชื้อ ยกตัวอย่างเช่น เต่าตนุ *Chelonia mydas* ที่มีภาวะ fibropapilomatosis จะมีปริมาณสัดส่วนของเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์สูงกว่าเต่าตนุในสภาวะปกติ (Campbell, 2015)

เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีสัดส่วนมากที่สุด โดยหน้าที่ของเซลล์ชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน แต่อย่างไรก็ตามปริมาณสัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดชนิดนี้สามารถเปลี่ยนแปลงไปด้วยความเครียดของสัตว์เช่นเดียวกันกับเฮเทอโรฟิล โดยพบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนี้ออกจากกระแสเลือดไปยังเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในร่างกาย ทำให้สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์มีปริมาณที่น้อยลงในกระแสเลือดของสัตว์ปีกและสัตว์เลื้อยคลาน (Davis et al., 2008)

ในส่วนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเบโซฟิล โดยมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการสร้างพื้นผิวอิมมูโนโกลบูลินในสัตว์เลื้อนคลานทั่วไป (Campbell, 2015) แต่ไม่มีรายงานการพบเซลล์เม็ดเลือดชนิดนี้ในเต่ากระ (Zhang et al.,2009)

อัตราส่วนระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวเฮเทอโรฟิลต่อลิมโฟไซต์ เป็นค่าทางโลหิตวิทยาที่แสดงถึงความเครียดของสัตว์ได้ ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น เมื่อสัตว์มีความเครียดจะทำให้สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเฮเทอโรฟิลมีปริมาณมากขึ้นในกระแสเลือด และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์มีการออกจากกระแสเลือด จึงทำให้อัตราส่วนระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวเฮเทอโรฟิลต่อลิมโฟไซต์มีค่าเปลี่ยนแปลงไป

ค่าเซลล์เม็ดเลือดอัดแน่น (Packed cell volume) เป็นค่าทางโลหิตวิทยาที่สามารถแสดงถึงสุขภาวะของเต่าได้ จากงานวิจัยของ Hunt และคณะในปี 2016 มีการนำค่าทางโลหิตวิทยานี้มาประเมินสุขภาวะและความเครียดของเต่า *Lepidochelys kempii*

นอกจากค่าทางโลหิตวิทยาที่ได้กล่าวมานั้น ยังมีค่าทางโลหิตวิทยาอื่น ๆ เช่น ระดับของสารชีวโมเลกุลในเลือด โดยจากงานวิจัยของ Flint และคณะในปี 2010 มีการศึกษาค่าทางโลหิตวิทยารวมถึงระดับของสารชีวโมเลกุลในเลือดว่าสามารถนำมาประเมินสุขภาวะเบื้องต้นของเต่าตนุ *Chelonia mydas* ได้

ความแตกต่างในรอบวันของค่าทางโลหิตวิทยาเป็นปรากฏการณ์ที่ค่าทางโลหิตวิทยามีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มลดในรอบวัน โดยพบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม รวมถึงสัตว์เลื้อยคลาน ซึ่งการเปลี่ยนระดับหรือสัดส่วนของค่าทางโลหิตวิทยาอาจเกิดได้จากปัจจัยภายนอก เช่น ฤดูกาล อุณหภูมิ ความเครียดเนื่องจากสภาพถิ่นที่อยู่อาศัย และปัจจัยภายใน เช่น ฮอร์โมนภายในร่างกาย (Campbell,

2015) ความแตกต่างในรอบวันของค่าทางโลหิตวิทยาพบได้ในสัตว์เลี้อยคลาน โดยจากงานวิจัยของ Singh และคณะในปี 2015 พบว่าค่าทางโลหิตวิทยาของงูน้ำ มีความแตกต่างในรอบวันในบางพารามิเตอร์ ได้แก่ ค่านับแยกเม็ดเลือดขาว นั่นคือ สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอิโอสิโนฟิล และสัดส่วนเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์

บทที่ 3

ขั้นตอนการดำเนินงาน

สัตว์ทดลอง

โครงการนี้ใช้เต่ากระ *Eretmochelys imbricata* อายุ 8-10 เดือน จากบ่ออนุบาลเต่ากระ เกาะทะลุ อำเภอบางสะพานน้อย จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ โดยทำการศึกษา 2 ครั้ง ได้แก่ ฤดูก่อนมรสุมในวันที่ 13-14 ตุลาคม 2561 ใช้เต่าจำนวน 70 ตัว และฤดูมรสุมในวันที่ 24-25 พฤศจิกายน 2561 ใช้เต่าจำนวน 32 ตัว

โครงการวิจัยนี้ได้รับอนุญาตจากกรมประมง ตามหนังสืออนุญาตเลขที่ 11/2559 และได้ผ่านการพิจารณาและอนุมัติการใช้สัตว์ทดลองจากคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยง และการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Protocol Review No. 1623013)

ภาพที่ 2 เต่ากระ *Eretmochelys imbricata* อายุ 8-10 เดือนจากบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

การบันทึกข้อมูลทางกายภาพของบ่อเลี้ยง

บันทึกข้อมูล pH ด้วย pH paper (MERCK), บันทึกอุณหภูมิน้ำและอากาศด้วย data logger (LogTag Recorder Ltd.) และบันทึกความเค็มของน้ำในบ่อเลี้ยงด้วย salinometer และความเข้มแสงบริเวณบ่อเลี้ยงด้วย luxmeter (Lutron Electronic Enterprise Co., Ltd.)

การวัดขนาดสัณฐานและประเมินสภาพภายนอกของเต่ากระ

วัดความกว้าง และความยาวกระดองหลังตามแนวตรง (straight carapace length) และความกว้าง และความยาวของกระดองหลังตามแนวโค้ง (curved carapace length) ด้วยสายวัดและไม้บรรทัดดังภาพที่ 3 รวมถึงถ่ายรูปด้วยกล้องดิจิตอล และประเมินลักษณะภายนอกของเต่ากระ

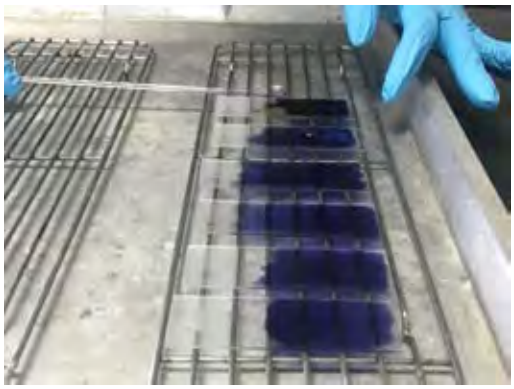
ภาพที่ 3 การวัดขนาดสัณฐานกระดองหลังของเต่ากระ *E. imbricata* โดยใช้สายวัด

การศึกษาค่าโลหิตวิทยา

เจาะเก็บตัวอย่างเลือดเต่ากระ โดยใช้เข็มขนาด 25 Ga ยาว 1 นิ้ว และกระบอกฉีดยาที่กลั้วด้วย heparin (LEO) ไว้ เจาะเลือดบริเวณ cervical dorsal sinus ปริมาณไม่เกิน 0.5 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม (Heatley and Johnson, 2009) โดยมีการเก็บตัวอย่างเลือดทั้งหมด 2 ฤดูกาล ได้แก่ วันที่ 13-14 ตุลาคม พ.ศ. 2561 ซึ่งเป็นตัวแทนของฤดูก่อนมรสุม เจาะเก็บตัวอย่างทั้งหมด 14 ครั้ง แต่ละครั้งใช้ตัวอย่างเต่าจำนวน 5 ตัว และแต่ละครั้งห่างกัน 2 ชั่วโมง และวันที่ 24-25 พฤศจิกายน พ.ศ. 2561 ซึ่งเป็นตัวแทนของฤดูมรสุม เจาะเก็บตัวอย่างทั้งหมด 6 ครั้ง แต่ละครั้งใช้ตัวอย่างเต่าจำนวน 5-6 ตัว และแต่ละครั้งห่างกัน 4 ชั่วโมง แต่ละครั้งที่เก็บตัวอย่างเลือดจะทำการแบ่งตัวอย่างเลือดออกเป็น 3 ส่วน คือ 1) เก็บใน microcentrifuge tube ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง microcentrifuge ด้วยความเร็ว 15,100 xg เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดแยกส่วนพลาสมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนทำการศึกษาขั้นต่อไป 2) นำมาเกลี่ย (smear) ลงบนสไลด์ และ 3) นำใส่ capillary hematocrit tube เพื่อนำไปศึกษาค่าทางโลหิตวิทยาดังนี้

ก. การศึกษาสัณฐานวิทยาเซลล์เม็ดเลือด

นำสไลด์ที่ผ่านการเกลี่ย (smear) ผ่านการรักษาสภาพ และย้อมสีด้วย Giemsa’s stain มาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า และบันทึกลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดเพื่อใช้ในการจัดจำแนกในการนับแยกเซลล์ต่อไป นำเลือดปริมาณ 4 ไมโครลิตร มาเกลี่ยให้บาง (smear) ลงบนสไลด์ทิ้งให้แห้งในอากาศ และนำมารักษาสภาพด้วย absolute methanol นาน 1 นาที จากนั้นนำไปย้อมสีด้วย Giemsa’s stain นาน 15 นาที ชะล้างด้วย phosphate buffer pH 7.0 และนำไปสะบัดในน้ำเพื่อล้างตะกอนสี ทิ้งให้แห้ง หลังจากนั้นนำไปส่องด้วยกล่องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า



ภาพที่ 4 การย้อมสีสไลด์เลือดด้วยสี Giemsa's stain

ข. การหาค่าเซลล์เม็ดเลือดอัดแน่น (packed cell volume; PCV)

นำเลือดใส่ใน capillary hematocrit tube ปริมาณ 3 ใน 4 ของหลอด แล้วอุดปลายหลอดด้วย critoseal นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่อัตราเร็ว 88,400 xg เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปอ่านค่าร้อยละเซลล์เม็ดเลือดอัดแน่นด้วย PCV reading chart (Heatley and Johnson, 2009)

ค. การนับแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว

นำสไลด์เลือดที่ผ่านกระบวนการในข้อ ก. มาศึกษาปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิด โดยศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า เช่นเดียวกัน นับแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ อิโอสิโนฟิล โมโนไซต์ เฮเทอโรฟิล และลิมโฟไซต์ โดยเทียบสัดส่วนจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด 300 เซลล์ (Bain et al., 2012)

ง. การตรวจสอบระดับสารชีวโมเลกุลในเลือด

การตรวจสอบปริมาณโปรตีน

นำพลาสมาไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1 ต่อ 1000 และนำไปผ่านขั้นตอนการตรวจวัดโปรตีนด้วย Bradford's protein assay (Bain et al., 2012) ซึ่งในสารละลาย Bradford ประกอบไปด้วยสาร Coomassie blue ซึ่งจะจับกับโปรตีนทำให้เกิดสีน้ำเงิน และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (ThermoLabsystem Ltd.) แล้วคำนวณปริมาณโปรตีนของพลาสมาจากกราฟมาตรฐาน

การตรวจสอบปริมาณ Blood Urea Nitrogen (BUN)

นำพลาสมามาผ่านปฏิกิริยากับ urease และ glutamate dehydrogenase ตามลำดับ และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงของ NADH ที่ 340 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง iLAB 650 (Diamond Ltd.) การ

วิเคราะห์ดังกล่าวทำโดยห้องปฏิบัติการทางโลหิตวิทยาและชีวเคมี โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจสอบปริมาณคริเอทินิน

นำพลาสมามาทำปฏิกิริยากับ picrate ได้สารสีแดง และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตรด้วยเครื่อง iLAB 650 (Diamond Ltd.) การวิเคราะห์ดังกล่าวทำโดยห้องปฏิบัติการทางโลหิตวิทยาและชีวเคมี โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างในรอบวันของค่าทางโลหิตวิทยาว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ โดยใช้ One-way ANOVA เมื่อข้อมูลมีการกระจายแบบปกติ และใช้ Kruskal-Wallis analysis เมื่อข้อมูลมีการกระจายแบบไม่ปกติ และวิเคราะห์ความแตกต่างในรอบวันของค่าทางโลหิตวิทยาของฤดูก่อนมรสุม และในมรสุม โดยใช้ Student’s t test เมื่อข้อมูลมีการกระจายแบบปกติ และใช้ Mann-Whitney U test เมื่อข้อมูลมีการกระจายแบบไม่ปกติ และทำการรวมข้อมูลเมื่อพบว่าข้อมูลทั้ง 2 ฤดูกาลไม่มีความแตกต่างกัน

บทที่ 4

ผลการศึกษา

1. ปัจจัยทางกายภาพของบ่อเลี้ยง

การศึกษาปัจจัยทางกายภาพทั้ง 5 ปัจจัย ได้แก่ pH, อุณหภูมิ และความเค็มของน้ำในบ่อ รวมถึงอุณหภูมิอากาศและความเข้มของแสงบริเวณบ่อเลี้ยง พบว่าก่อนฤดูมรสุมและฤดูมรสุม มีปัจจัยทางกายภาพต่างกันเพียงเล็กน้อยดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าปัจจัยทางกายภาพบริเวณบ่อเลี้ยงเต่ากระ ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ก่อนฤดูมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561

ฤดูกาล	pH น้ำ	อุณหภูมิน้ำ	ความเค็มของน้ำ	อุณหภูมิอากาศ	ความเข้มของแสง
ก่อนฤดูมรสุม	6.0	27.7±0.02˚C	28-30 ppt	28.4±0.14˚C	0-5170 Lux
ฤดูมรสุม	6.0-6.5	27.2±0.04˚C	30-32 ppt	28.7±0.12˚C	0-3180 Lux

2. สัณฐานวิทยาของเต่ากระ

การวัดขนาดสัณฐานและประเมินสภาพภายนอกของเต่ากระอายุ 8-9 เดือนในบ่อเลี้ยงนั้น พบว่ามีน้ำหนัก ความกว้าง และความยาวกระดองหลังตามแนวตรง (straight carapace length) และความกว้าง และความยาวของกระดองหลังตามแนวโค้ง (curved carapace length) มีความใกล้เคียงกันดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ขนาดสัณฐานของเต่ากระอายุ 8-10 เดือนในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ก่อนฤดูมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561

ฤดูกาล	น้ำหนัก (kg)	Carapace width (cm)		Carapace length (cm)	
		curve	straight	curve	straight
ก่อนฤดูมรสุม	0.55±0.002	15.05±0.0156	13.64±0.016	17.07±0.018	17.13±0.172
ฤดูมรสุม	0.73±0.004	16.62±0.031	13.62±0.033	18.96±0.042	17.89±0.042

3. โลหิตวิทยาของเต่ากระ

3.1 สัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือด

จากการศึกษาสัณฐานวิทยาเซลล์เม็ดเลือดของเต่ากระ *E. imbricata* พบเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เม็ดเลือดขาว 4 ชนิด และทรอมโบไซต์ โดยมีลักษณะดังนี้

เซลล์เม็ดเลือดแดงของเต่ากระเป็นเซลล์รูปร่างรี มีขนาดใหญ่ มีนิวเคลียสกลมรีติดสีม่วงน้ำเงินอยู่กลางเซลล์ ไซโทพลาสซึมใส ไม่ติดสี (ภาพที่ 6B)

ทรอมโบไซต์ เป็นเซลล์รูปร่างคล้ายกระสวย มีขนาดเล็กกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดง นิวเคลียสรูปร่างรีติดสีม่วงอยู่กลางเซลล์ ไซโทพลาสซึมมีปริมาณน้อย ลักษณะใสไม่ติดสี (ภาพที่ 6E)

เซลล์เม็ดเลือดขาว จากการศึกษานี้พบทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่

เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอิโอสิโนฟิล เป็นเซลล์รูปร่างกลม มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์เม็ดเลือดแดง นิวเคลียสรูปร่างกลมรีอยู่ชิดขอบเซลล์ ไซโทพลาสซึมใส ไม่ติดสี และมี granule รูปร่างกลม ติดสีกรด คือ สีแดงอมส้ม (ภาพที่ 6F)

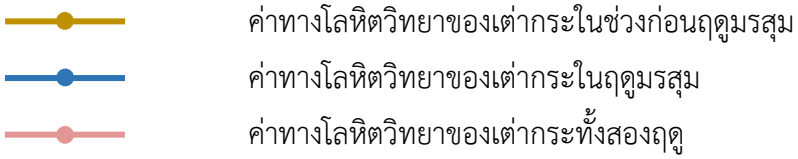
เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเฮเทอโรฟิล เป็นเซลล์รูปร่างกลม มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์เม็ดเลือดแดง นิวเคลียสรูปร่างกลมรีอยู่ชิดขอบเซลล์ ไซโทพลาสซึมติดสีกรด และมี granule รูปร่างรี ติดสีกรด คือ สีแดงอมส้ม (ภาพที่ 6G)

เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ เป็นเซลล์รูปร่างกลม มีความแปรผันของขนาดของเซลล์. รูปร่างกลม ไม่มี granule นิวเคลียสรูปร่างกลมมีโครมาตินที่ขดแน่น จึงติดสีม่วงเข้มเมื่อย้อมด้วยสี Giemsa นิวเคลียสมีขนาดใหญ่เต็มเซลล์ ทำให้มีปริมาณของไซโทพลาสซึมน้อย ติดสีม่วงอ่อน (ภาพที่ 6C)

เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ เป็นเซลล์รูปร่างกลม มีขนาดใกล้เคียงกับเซลล์เม็ดเลือดแดง นิวเคลียสรูปร่างกลม รี ไปจนถึงมีรอยเว้าคล้ายเม็ดถั่ว ชิดทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ไม่มี granule นิวเคลียสมีโครมาตินที่ขดแน่นน้อยกว่าลิมโฟไซต์ จึงติดสีม่วงจางกว่าลิมโฟไซต์เมื่อย้อมด้วยสี Giemsa ไซโทพลาสซึมติดสีม่วงอ่อน และมีปริมาณมากกว่าลิมโฟไซต์ (ภาพที่ 6D)

3.2 ค่าทางโลหิตวิทยาของเต่ากระ

การศึกษาในเบื้องต้นจะแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม อ้างอิงตามช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง ได้แก่ เต่ากระที่เก็บตัวอย่างในช่วงก่อนฤดูมรสุม และเต่ากระที่เก็บตัวอย่างในช่วงฤดูมรสุม หลังจากนั้นข้อมูลที่ได้จะนำมาการวิเคราะห์ความแตกต่างในรอบวันของค่าทางโลหิตวิทยาทั้ง 3 ค่า ได้แก่ ค่าเซลล์เม็ดเลือดอัดแน่น ค่านับแยกเม็ดเลือดขาว และระดับสารชีวโมเลกุลในพลาสมา หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่าง 2 ฤดู ถ้ามีความแตกต่างระหว่างฤดู จะแสดงผลเป็นกราฟเส้น 2 เส้น แต่ถ้าไม่มีความแตกต่างระหว่างฤดู จะแสดงผลเป็นกราฟเส้น 1 เส้น โดยใช้สีแสดงดังในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 สัญลักษณ์สีสำหรับแสดงผลแบบแยกฤดูและรวม 2 ฤดู

จากการศึกษาความแตกต่างในรอบวันของค่าทางโลหิตวิทยาต่าง ๆ ผลการศึกษาดังนี้

ค่าเซลล์เม็ดเลือดอัดแน่น (PCV)

จากการวิเคราะห์ผลการศึกษาค่าเซลล์เม็ดเลือดอัดแน่นโดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละช่วงเวลา ไม่พบความแตกต่างในรอบวัน และโดยการนำค่าเฉลี่ยแต่ละช่วงเวลามาเปรียบเทียบระหว่างฤดูกาลไม่มีความแตกต่างกันระหว่างฤดู (ตารางที่ 3; ภาพที่ 7)

ปริมาณทรอมโบไซต์

จากการนับจำนวนทรอมโบไซต์ในเต่ากระ อ้างอิงหลักการนับจากงานวิจัยของ Dias และคณะในปี 2008 โดยใช้ตัวอย่างเลือดจากเต่าจำนวน 20 ตัว พบว่ามีค่าเฉลี่ยและความคาดเคลื่อนมาตรฐานของจำนวนทรอมโบไซต์เท่ากับ 64.8±2.56 เซลล์ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง 2000 เซลล์

การนับแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว

ผลการนับแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวพบว่าสัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีมากที่สุด คือ ลิมโฟไซต์ รองลงมาคือ เฮเทอโรฟิล โมโนไซต์ และอิโอสิโนฟิลตามลำดับ (ภาพที่ 8 และภาพที่ 9)

จากผลการวิเคราะห์ค่าสัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวอิโอสิโนฟิล (ตารางที่ 4; ภาพที่ 10) ไม่พบความแตกต่างในรอบวันระหว่างค่าเฉลี่ยสัดส่วนทั้งสองฤดู และไม่พบความแตกต่างระหว่างฤดูกาลของค่าเฉลี่ยสัดส่วนในช่วงเวลาเดียวกัน

จากผลการวิเคราะห์ค่าสัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ (ตารางที่ 5; ภาพที่ 11) พบความแตกต่างในรอบวันระหว่างค่าเฉลี่ยสัดส่วนเพียงช่วงก่อนฤดูมรสุมเท่านั้น และพบความแตกต่างระหว่างฤดูกาลของค่าเฉลี่ยสัดส่วนในช่วงเวลาเดียวกัน

จากผลการวิเคราะห์ค่าสัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ (ตารางที่ 6; ภาพที่ 12) พบความแตกต่างในรอบวันระหว่างค่าเฉลี่ยสัดส่วนทั้งสองฤดู และพบความแตกต่างระหว่างฤดูกาลของค่าเฉลี่ยสัดส่วนในช่วงเวลาเดียวกัน

จากผลการวิเคราะห์ค่าสัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวเฮเทอโรฟิล (ตารางที่ 7; ภาพที่ 13) พบความแตกต่างในรอบวันระหว่างค่าเฉลี่ยสัดส่วนทั้งสองฤดู และไม่พบความแตกต่างระหว่างฤดูกาลของค่าเฉลี่ยสัดส่วนในช่วงเวลาเดียวกัน

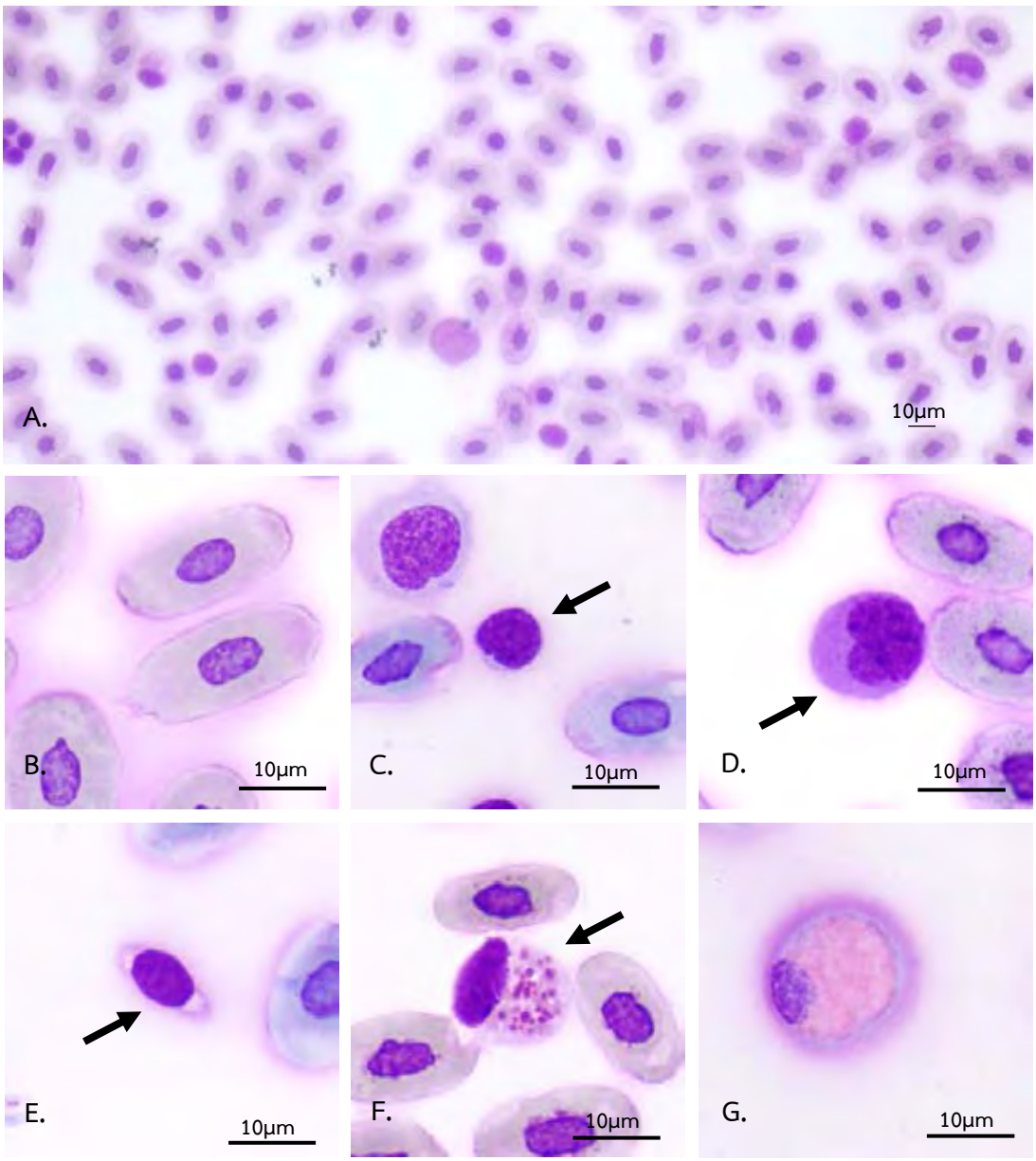
จากผลการวิเคราะห์ค่าอัตราส่วนเฮเทอโรฟิลต่อลิมโฟไซต์ (ตารางที่ 8; ภาพที่ 14) พบความแตกต่างในรอบวันระหว่างค่าเฉลี่ยสัดส่วนทั้งสองฤดู และพบความแตกต่างระหว่างฤดูกาลของค่าเฉลี่ยสัดส่วนในช่วงเวลาเดียวกัน

ปริมาณสารชีวโมเลกุลในเลือด

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในพลาสมา (ตารางที่ 9; ภาพที่ 15) พบความแตกต่างในรอบวันระหว่างค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนในเลือด และไม่พบความแตกต่างระหว่างฤดูกาลของค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนในเลือดในช่วงเวลาเดียวกัน

จากการวิเคราะห์ปริมาณ Blood Urea Nitrogen ในพลาสมา (ตารางที่ 10; ภาพที่ 16) พบความแตกต่างในรอบวันทั้งสองฤดูกาลระหว่างค่าเฉลี่ย Blood Urea Nitrogen และไม่พบความแตกต่างระหว่างฤดูกาลของค่าเฉลี่ย Blood Urea Nitrogen ในช่วงเวลาเดียวกัน

จากการวิเคราะห์ปริมาณคริเอทินินในพลาสมา (ตารางที่ 11; ภาพที่ 17) พบความแตกต่างในรอบวันทั้งสองฤดูกาลระหว่างค่าเฉลี่ยปริมาณคริเอทินิน และไม่พบความแตกต่างระหว่างฤดูกาลของค่าเฉลี่ยปริมาณคริเอทินินในช่วงเวลาเดียวกัน



ภาพที่ 6 A. ภาพถ่ายเลือดเกลี่ยบางแสดงสัณฐานของเซลล์เม็ดเลือดของเต่ากระ *E. imbricata* อายุ 8-10 เดือนในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ประกอบด้วย B. เซลล์เม็ดเลือดแดง C. ลิมโฟไซต์ (ลูกศรชี้) D. โมโนไซต์ (ลูกศรชี้) E. ทรอมโบไซต์ (ลูกศรชี้) F. อิโอสิโนฟิล (ลูกศรชี้) G. เฮเทอโรฟิล, Giemsa stain

ตารางที่ 3 ค่าเซลล์เม็ดเลือดอัดแน่นของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ใน ฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561

ฤดู	เวลา	N	Mean±S.E.
ก่อนฤดูมรสุม	13:30	5	13±0.25
	15:30	5	13.2±0.54
	17:30	5	11.7±0.75
	19:30	5	15±0.65
	21:30	5	11.6±0.76
	23:30	5	10.1±0.41
	1:30	5	14.4±0.98
	3:30	4	14.6±0.75
	5:30	5	17.3±0.56
	7:30	5	13±0.65
	9:30	5	16.5±0.62
	11:30	5	15.8±1.26
	13:30	5	17.4±0.64
	15:30	5	17.7±1.31
ฤดูมรสุม	19:30	6	11.3±0.3
	23:30	5	11.9±1.57
	3:30	5	12.5±1.03
	7:00	6	12.3±0.52
	11:30	5	11.7±0.71
	15:30	5	13.5±1.00

ตารางที่ 4 สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวอิโอสิโนฟิลของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561

ฤดู	เวลา (น.)	N	Mean±S.E.
ก่อนฤดูมรสุม	13:30	5	0.9±0.10
	15:30	5	1.0±0.10
	17:30	5	0.9±0.36
	19:30	5	0.4±0.19
	21:30	5	0.4±0.23
	23:30	5	0.6±0.27
	1:30	5	1.9±0.42
	3:30	4	1.3±0.37
	5:30	5	1.3±0.64
	7:30	5	0.4±0.16
	9:30	5	0.7±0.37
	11:30	5	0.9±0.37
	13:30	5	0.9±0.10
	15:30	5	1±0.10
ฤดูมรสุม	19:30	6	0.8±0.52
	23:30	5	0.7±0.28
	3:30	5	0.7±0.46
	7:00	6	1.7±0.48
	11:30	5	1.6±0.45
	15:30	5	1.5±0.17

ตารางที่ 5 สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561

ฤดู	เวลา (น.)	N	Mean±S.E.
ก่อนฤดูมรสุม	13:30	5	5.7±0.39
	15:30	5	4.1±0.30
	17:30	5	7.2±2.78
	19:30	5	19±2.61
	21:30	5	4.7±1.69
	23:30	5	2.2±0.72
	1:30	5	6.6±1.11
	3:30	4	7.4±2.35
	5:30	5	4.7±0.95
	7:30	5	6.4±1.45
	9:30	5	3.5±0.93
	11:30	5	6.3±1.55
	13:30	5	5.7±0.39
	15:30	5	4.1±0.30
ฤดูมรสุม	19:30	6	1.3±0.34
	23:30	5	3.5±1.14
	3:30	5	2.1±0.62
	7:00	6	4.2±0.91
	11:30	5	2.2±0.86
	15:30	5	3.4±0.71

ตารางที่ 6 สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561

ฤดู	เวลา (น.)	N	Mean±S.E.
ก่อนฤดูมรสุม	13:30	5	62.3±2.27
	15:30	5	56.0±1.48
	17:30	5	64.1±5.43
	19:30	5	51.3±5.24
	21:30	5	63.2±3.77
	23:30	5	66.4±1.38
	1:30	5	60.2±2.41
	3:30	4	54.3±6.52
	5:30	5	53.1±2.63
	7:30	5	61.7±4.09
	9:30	5	79.2±3.29
	11:30	5	65.7±3.25
	13:30	5	75.0±3.07
	15:30	5	64.8±1.63
ฤดูมรสุม	19:30	6	76.9±3.08
	23:30	5	77.5±4.97
	3:30	5	85.2±2.32
	7:00	6	60.1±4.24
	11:30	5	68.7±1.57
	15:30	5	68.5±3.47

ตารางที่ 7 สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวเฮเทอโรฟิลของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561

ฤดู	เวลา (น.)	N	Mean±S.E.
ก่อนฤดูมรสุม	13:30	5	24.7±0.91
	15:30	5	38.3±1.31
	17:30	5	27.7±4.07
	19:30	5	29.5±5.19
	21:30	5	31.7±2.87
	23:30	5	30.8±1.41
	1:30	5	30.7±2.10
	3:30	4	37.1±5.37
	5:30	5	40.8±2.91
	7:30	5	31.5±4.36
	9:30	5	16.6±2.90
	11:30	5	27.1±3.16
	13:30	5	24.7±0.91
	15:30	5	30.7±0.41
ฤดูมรสุม	19:30	6	18.3±2.76
	23:30	5	18.3±4.13
	3:30	5	12.1±1.95
	7:00	6	34.1±4.44
	11:30	5	27.5±1.51
	15:30	5	26.5±3.53

ตารางที่ 8 อัตราส่วนเฮเทอโรฟิลต่อลิมโฟไซต์ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561

ฤดู	เวลา (น.)	N	Mean±S.E.
ก่อนฤดูมรสุม	13:30	5	0.5±0.07
	15:30	5	0.7±0.04
	17:30	5	0.5±0.10
	19:30	5	0.6±0.16
	21:30	5	0.5±0.08
	23:30	5	0.5±0.03
	1:30	5	0.5±0.06
	3:30	4	0.7±0.18
	5:30	5	0.8±0.09
	7:30	5	0.5±0.11
	9:30	5	0.2±0.05
	11:30	5	0.4±0.06
	13:30	5	0.3±0.06
	15:30	5	0.5±0.01
ฤดูมรสุม	19:30	6	0.2±0.05
	23:30	5	0.3±0.06
	3:30	5	0.1±0.03
	7:00	6	0.6±0.11
	11:30	5	0.4±0.03
	15:30	5	0.4±0.07

ตารางที่ 9 ปริมาณโปรตีนในพลาสมาของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ใน ฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561

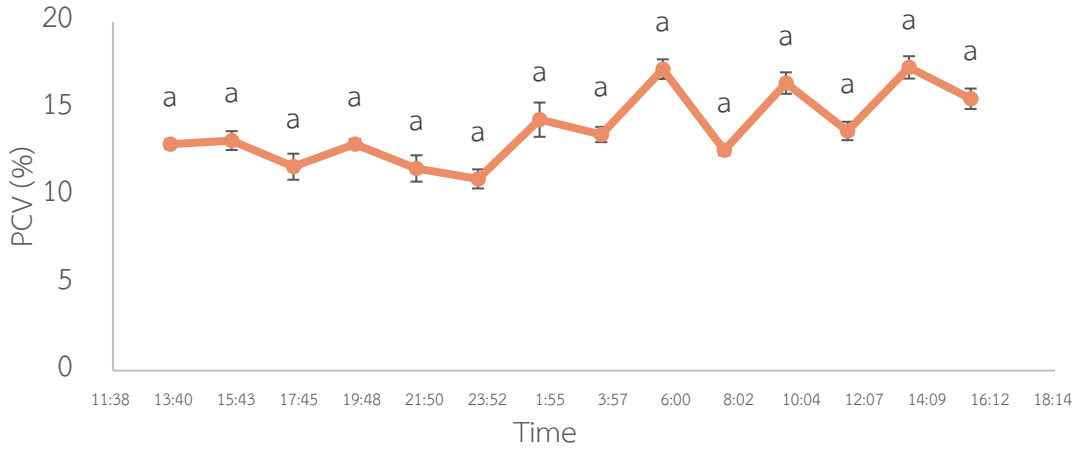
ฤดู	เวลา (น.)	N	Mean±S.E.
ก่อนฤดูมรสุม	13:30	5	25.2±1.90
	15:30	5	23.2±0.99
	17:30	5	27.0±0.92
	19:30	5	23.7±0.58
	21:30	5	22.4±1.25
	23:30	5	24.7±0.89
	1:30	5	25.4±0.48
	3:30	4	26.2±1.66
	5:30	5	25.1±1.47
	7:30	5	18.3±1.14
	9:30	5	34.7±1.55
	11:30	5	26.1±0.59
	13:30	5	28.7±1.38
	15:30	5	25.8±0.68
ฤดูมรสุม	19:30	6	15.5±1.33
	23:30	5	23.2±1.39
	3:30	5	25.6±2.01
	7:00	6	24.2±1.03
	11:30	5	15.6±1.28
	15:30	5	22.1±1.40

ตารางที่ 10 Blood Urea Nitrogen ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ใน ฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561

ฤดู	เวลา (น.)	N	Mean±S.E.
ก่อนฤดูมรสุม	13:30	5	53.6±3.46
	15:30	5	46.7±1.01
	17:30	5	64.8±6.60
	19:30	5	57.2±3.36
	21:30	5	54.3±5.35
	23:30	5	54.8±7.21
	1:30	5	55.9±4.46
	3:30	4	60.6±5.97
	5:30	5	46.2±4.58
	7:30	5	42.5±2.87
	9:30	5	54.9±7.02
	11:30	5	43.8±4.17
	13:30	5	39.7±3.16
	15:30	5	46.7±1.01
ฤดูมรสุม	19:30	6	70.2±2.69
	23:30	5	63.2±4.85
	3:30	5	68.9±3.92
	11:30	5	42.6±3.77
	15:30	5	58.7±4.81

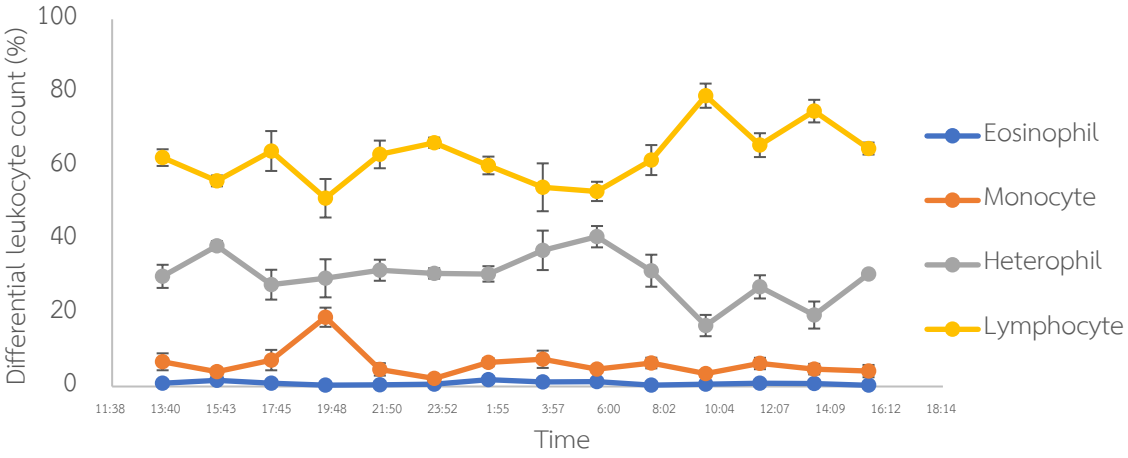
ตารางที่ 11 คริเอทินินในพลาสมาของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561

ฤดู	เวลา (น.)	N	Mean±S.E.
ก่อนฤดูมรสุม	13:30	5	0.06±0.005
	15:30	5	0
	17:30	5	0.08±0.020
	19:30	5	0.03±0.025
	21:30	5	0.08±0.025
	23:30	5	0.10±0.001
	1:30	5	0.03±0.025
	3:30	4	0.28±0.256
	5:30	5	0.46±0.306
	7:30	5	0.04±0.024
	9:30	5	0.12±0.020
	11:30	5	0.12±0.020
	13:30	5	0.06±0.005
	15:30	5	0.10±0.000
ฤดูมรสุม	19:30	6	0.07±0.033
	23:30	5	0.10±0.000
	3:30	5	0.14±0.024

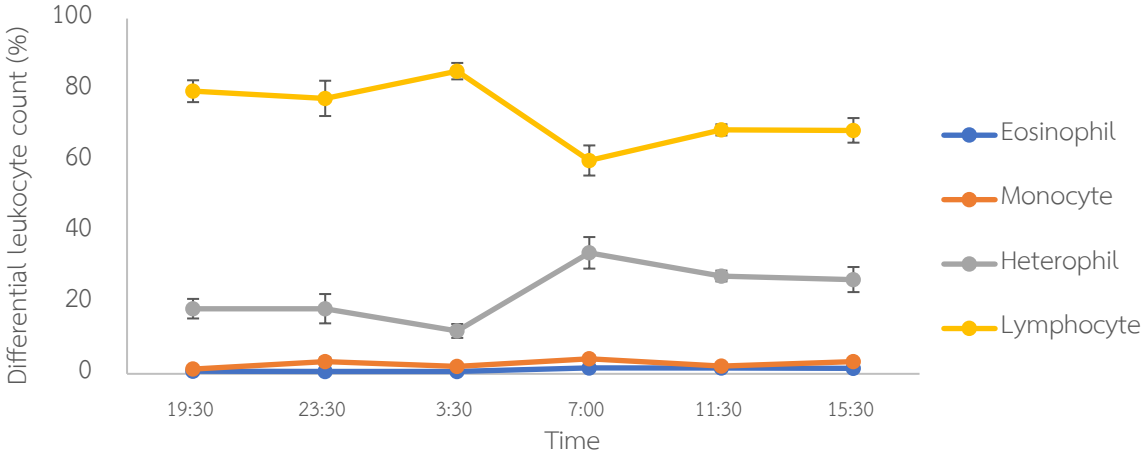


ภาพที่ 7 ค่าเซลล์เม็ดเลือดอัดแน่นของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561

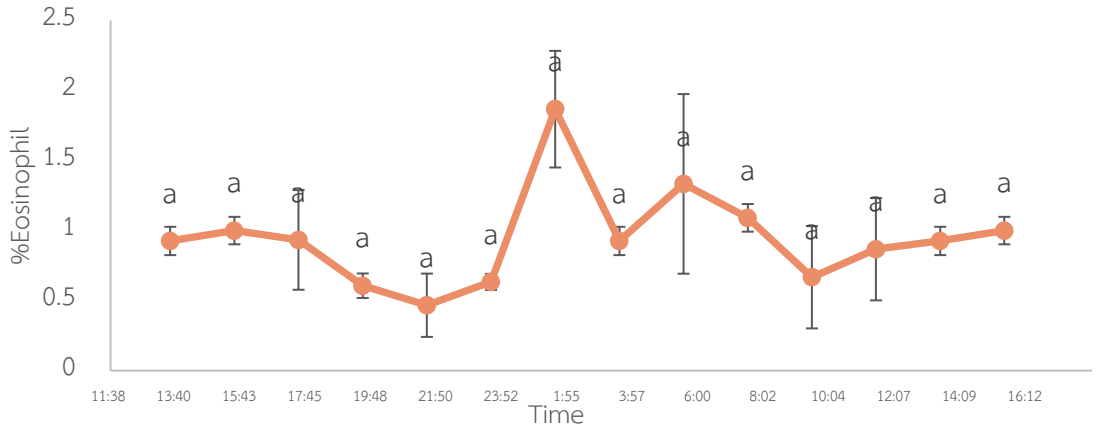
หมายเหตุ ทดสอบด้วย Independent sample t-test, One way ANOVA และ Tukey post-hoc test



ภาพที่ 8 สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง 4 ชนิดของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในช่วงก่อนฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561

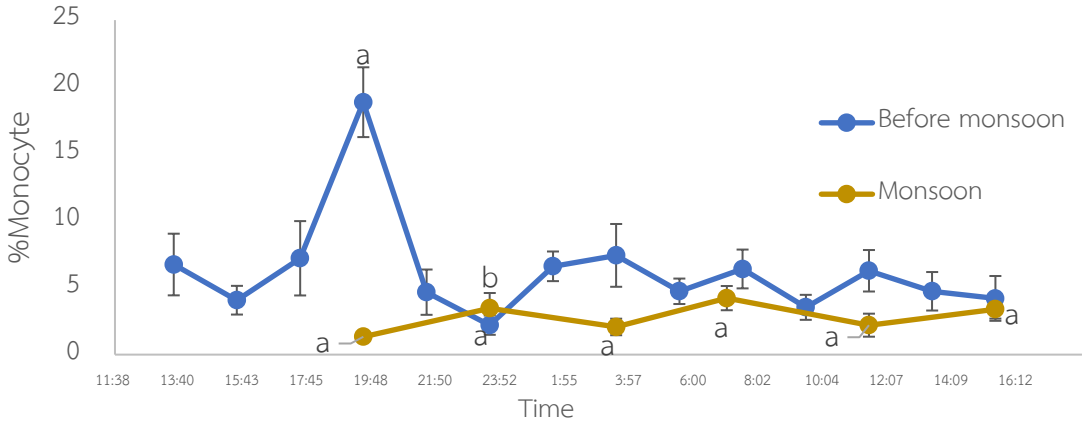


ภาพที่ 9 สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง 4 ชนิดของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในช่วงฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561



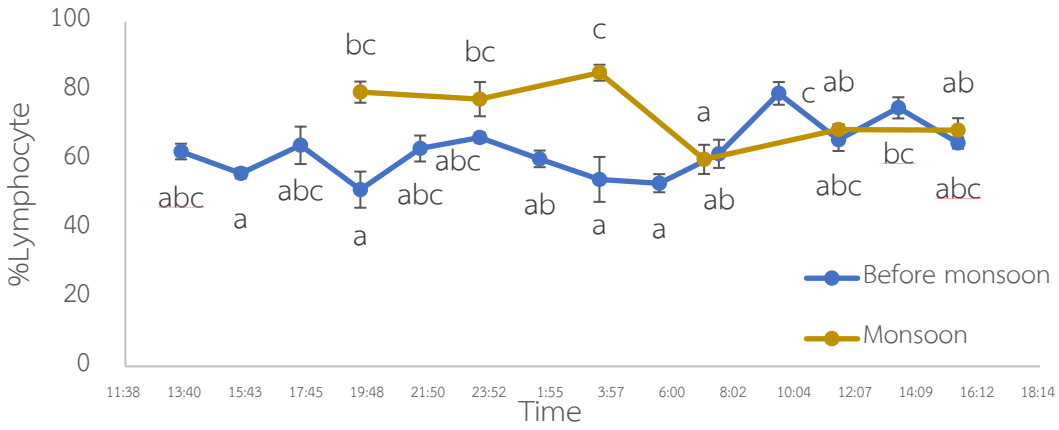
ภาพที่ 10 สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวอิโอสิโนฟิลของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561

หมายเหตุ ทดสอบด้วย Independent sample t-test, Kruskal Wallis analysis และ Tukey post-hoc test



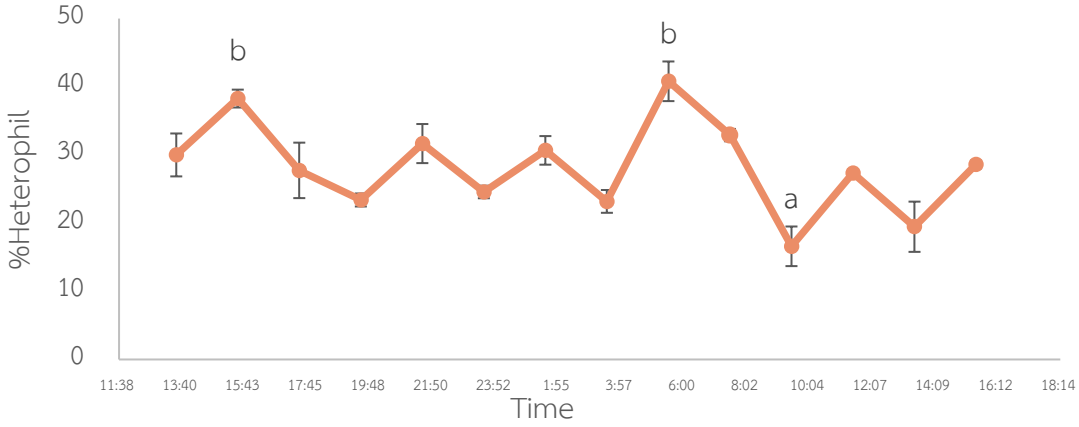
ภาพที่ 11 สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561

หมายเหตุ ทดสอบด้วย Kruskal Wallis analysis, Dunn's post-hoc test และ One way ANOVA



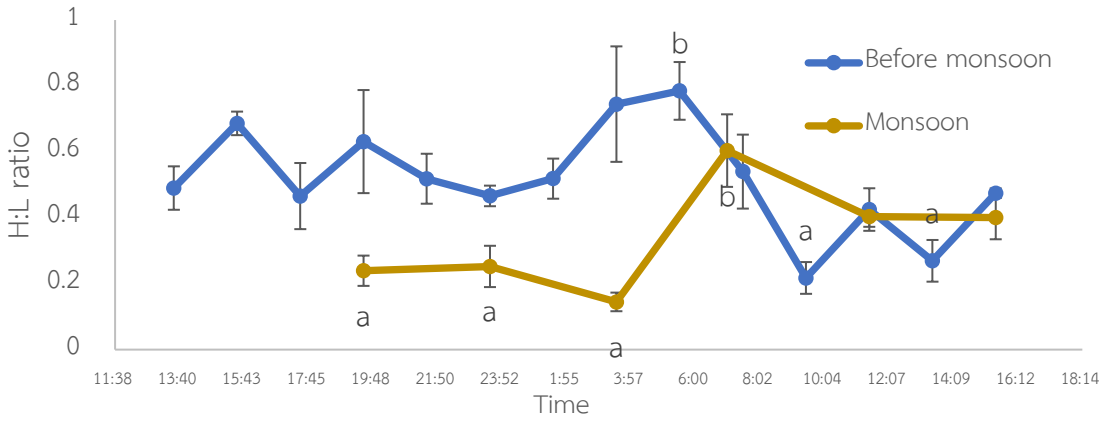
ภาพที่ 12 สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมไฟไซต์ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561

หมายเหตุ ทดสอบด้วย One way ANOVA, One way ANOVA และ Tukey post-hoc test



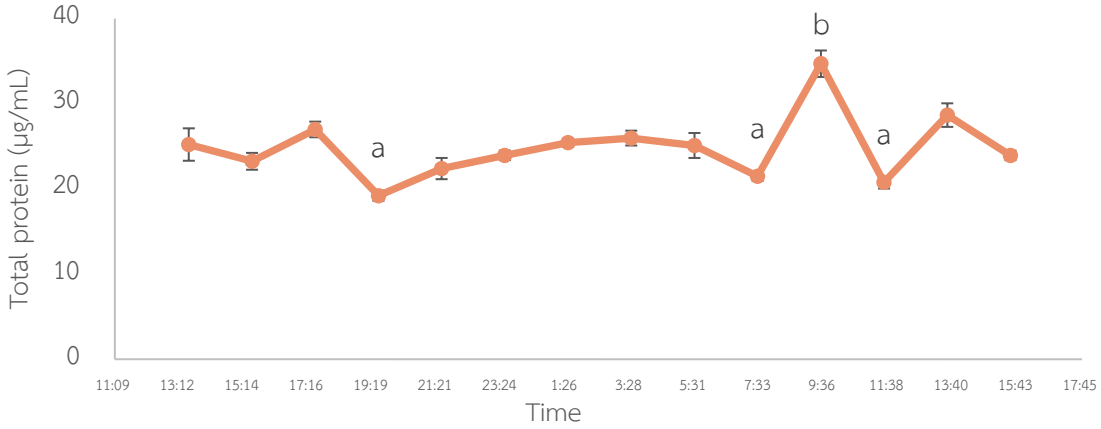
ภาพที่ 13 สัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวเฮเทอโรฟิลของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561

หมายเหตุ ทดสอบด้วย Independent sample t-test, Kruskal Wallis analysis และ Dunn's post-hoc test



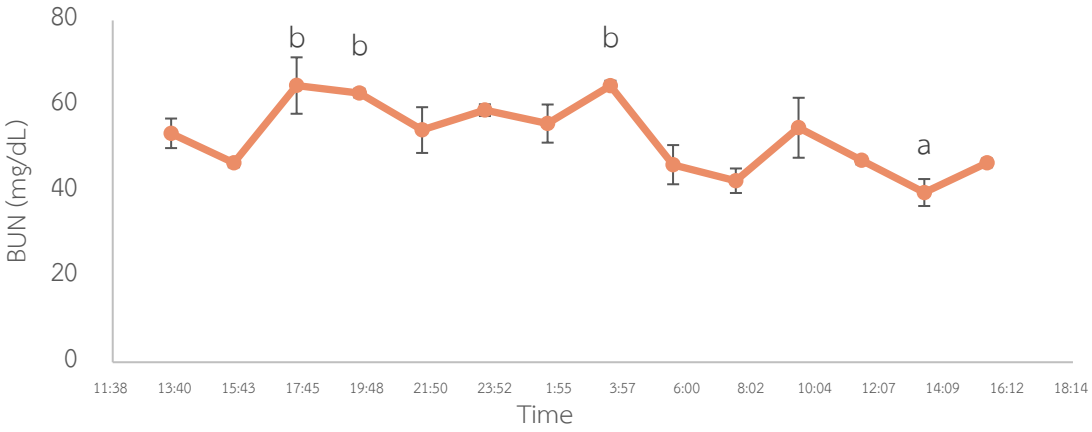
ภาพที่ 14 อัตราส่วนเฮเทอโรฟิลต่อลิมโฟไซต์ของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561

หมายเหตุ ทดสอบด้วย Kruskal Wallis analysis, Dunn's post-hoc test, One way ANOVA และ Tukey post-hoc test



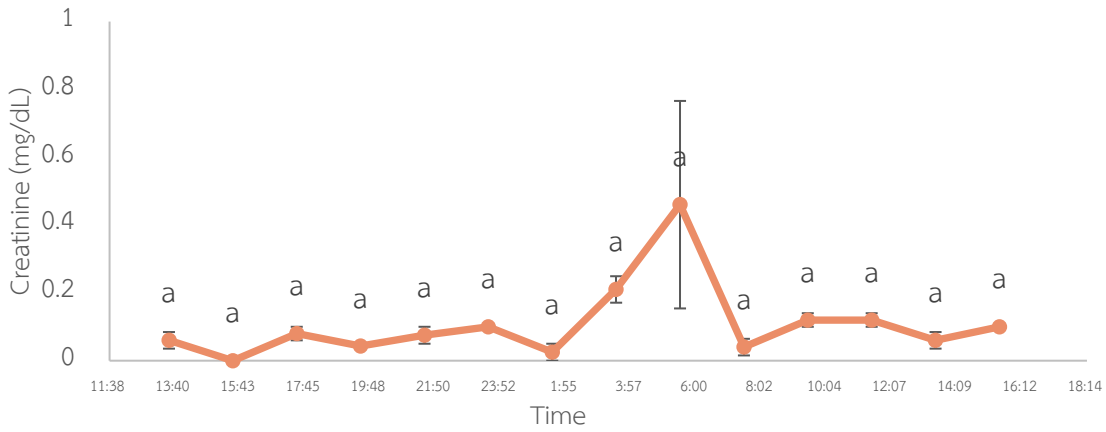
ภาพที่ 15 ปริมาณโปรตีนในพลาสมาของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561

หมายเหตุ ทดสอบด้วย Independent sample t-test, One way ANOVA, P<0.05 และ Tukey post-hoc test



ภาพที่ 16 Blood Urea Nitrogen ในพลาสมาของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม

หมายเหตุ ทดสอบด้วย Independent sample t-test, One way ANOVA และ Tukey post-hoc test



ภาพที่ 17 ระดับคริเอทินินในพลาสมาของเต่ากระในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ในฤดูก่อนมรสุมและฤดูมรสุม ปี พ.ศ. 2561

หมายเหตุ ทดสอบด้วย Independent sample t-test, One way ANOVA และ Tukey post-hoc test

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาในครั้งนี้ได้มีการบันทึกค่าทางโลหิตวิทยาของเต่ากระ ได้แก่ ค่านับแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว อัตราส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเฮเทอโรฟิลต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ ค่าเซลล์เม็ดเลือดอัดแน่น และระดับสารชีวโมเลกุลในเลือด รวมถึงเก็บข้อมูลปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิน้ำ อุณหภูมิอากาศ ค่าความเข้มแสง และค่า pH ของน้ำในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

จากผลการวิเคราะห์ค่านับแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวของเต่ากระ พบว่าสัดส่วนลิมโฟไซต์มีค่าที่สูงที่สุด รองลงมา คือ สัดส่วนเฮเทอโรฟิล สัดส่วนโมโนไซต์ และสัดส่วนอิโอสิโนฟิลตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาสัดส่วนของเซลล์เม็ดเลือดขาวในสัตว์เลื้อยคลานของ Campbell ในปี ค.ศ. 2015

ความแตกต่างในรอบวันของค่าทางโลหิตวิทยาของเต่ากระ สามารถพบได้ใน 6 พารามิเตอร์ ได้แก่ สัดส่วนโมโนไซต์ สัดส่วนลิมโฟไซต์ สัดส่วนเฮเทอโรฟิล อัตราส่วนของเฮเทอโรฟิลต่อลิมโฟไซต์ รวมถึงปริมาณของยูเรียไนโตรเจน และปริมาณของโปรตีนในพลาสม่า ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้าไม่มีรายงานการพบความแตกต่างในรอบวันของค่าโลหิตวิทยาในเต่าทะเล หรือเต่ากลุ่มอื่น ๆ เลย และจากผลการศึกษาในครั้งนี้พบความแตกต่างในรอบวันของค่าทางโลหิตวิทยาหลายค่าซึ่งมากกว่าผลที่เคยมีผู้ศึกษาไว้ในงูน้ำ *Natrix piscator* ซึ่งพบความแตกต่างในรอบวันของค่านับแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวเพียง 2 ค่า ได้แก่ สัดส่วนอิโอสิโนฟิล และสัดส่วนลิมโฟไซต์ (Singh et al., 2015)

การเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของเซลล์เม็ดเลือดขาว เกิดได้จากหลายปัจจัย ทั้งปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอก ปัจจัยภายในที่มีผล เช่น การเป็นโรคและการติดเชื้อ รวมถึงฮอร์โมนต่าง ๆ จากงานวิจัยของ Davis และคณะในปีค.ศ. 2008 พบว่าฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์ มีผลทำให้ลิมโฟไซต์ออกจากระบบไหลเวียนโลหิต และเข้าสู่เนื้อเยื่อต่าง ๆ ทำให้มีค่าสัดส่วนในกระแสเลือดลดลง รวมถึงเฮเทอโรฟิลเข้ามาในระบบไหลเวียนโลหิตจากไขกระดูกมากขึ้น ทำให้มีค่าสัดส่วนในกระแสเลือดมากขึ้นได้ ปัจจัยภายนอก เช่น อุณหภูมิ อาหาร ความเครียดเนื่องมาจากถิ่นที่อยู่อาศัยถูกรุกราน และการเปลี่ยนแปลงฤดูกาลก็สามารถมีผลต่อสัดส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวได้

จากการศึกษาก่อนหน้าในเรื่องความแตกต่างในรอบวันของค่าทางโลหิตวิทยาของนกแร้งและนกเค้าใหญ่ (Rodriguez et al., 1987) พบว่ามีความแตกต่างในรอบวันของปริมาณของยูเรียไนโตรเจน โดยพบว่าจะมีปริมาณที่สูงในช่วงเวลากลางคืนมากกว่าเวลากลางวัน ซึ่งอาจเกิดขึ้นจากการลดการทำงานของไตในเวลากลางคืน และการอัตราการเผาผลาญต่ำลง จึงทำให้เวลากลางคืนมีระดับของยูเรียไนโตรเจนที่สูงขึ้นช่วงเวลาสั้น ๆ รวมถึงระดับปริมาณโปรตีน และครีเอทินินใน

พลาสมามีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเกิดจากสารจำพวกโปรตีนมีส่วนสำคัญในการรักษาความดันออสโมติกคอลลอยด์ในเลือด รวมถึงรักษาระดับของปริมาณเลือด และ pH ในเลือดอีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้เช่นเดียวกัน

จากการวิเคราะห์ข้อมูลปัจจัยทางกายภายของทั้งสองฤดูกาล พบว่ามีความแตกต่างระหว่างฤดูกาลเพียงเล็กน้อยทั้ง 4 ปัจจัย แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Singh และคณะในปี ค.ศ. 2015 ที่ศึกษาความแตกต่างในรอบวันของค่าทางโลหิตวิทยาของงูน้ำ *Natrix piscator* ใน 3 ฤดูกาล พบว่าความแตกต่างในรอบวันของค่าทางโลหิตวิทยา ได้แก่ สัดส่วนอิโอสิโนฟิล มีความแตกต่างในรอบวันแค่เพียงในฤดูใบไม้ผลิ และสัดส่วนลิมโฟไซต์มีความแตกต่างในรอบวันแค่เพียงในฤดูร้อน อาจกล่าวได้ว่าทั้งสองค่านี้มีความแตกต่างระหว่างฤดูกาล ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีค่าทางโลหิตวิทยาบางส่วน ได้แก่ สัดส่วนโมโนไซต์ สัดส่วนลิมโฟไซต์ และอัตราส่วนของเฮเทอโรฟิลต่อลิมโฟไซต์ มีความแตกต่างระหว่างฤดูกาล ทั้งนี้ค่าทางโลหิตวิทยาอื่น ๆ ที่ไม่พบความแตกต่างในรอบวัน และไม่พบความแตกต่างระหว่างทั้ง 2 ฤดูกาล มีความเป็นไปได้ว่าอาจมีความแตกต่างของฤดูกาลอื่น ๆ ที่ไม่ได้ทำการเก็บข้อมูล ดังนั้นงานวิจัยเพิ่มเติมควรมีการเก็บข้อมูลให้ครบทุกฤดูเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครอบคลุมมากขึ้นในการประเมินความแตกต่างในรอบวันของค่าทางโลหิตวิทยาในเต่ากระ

ดังที่กล่าวมา ค่าทางโลหิตวิทยามีประโยชน์ในการใช้ประเมินสุขภาวะเบื้องต้นในเต่ากระ ดังนั้นในการเจาะเก็บตัวอย่างเลือด รวมถึงการนำมาวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยาจึงจำเป็นต้องตระหนักถึงความแตกต่างในรอบวัน โดยจากผลการศึกษา การตรวจสุขภาวะเต่ากระในบ่อเลี้ยงด้วยการประเมินค่าทางโลหิตวิทยาหากต้องมีการประเมินค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ควรต้องคำนึงถึงความแตกต่างของพารามิเตอร์นั้น ๆ ตามช่วงเวลาและฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างด้วย เพื่อลดความผิดพลาดในการตรวจสุขภาวะของเต่ากระในบ่อเลี้ยงในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

ระบบฐานข้อมูลกลางและมาตรฐานข้อมูลทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง. 2556. สถานภาพเต่าทะเลในน่านน้ำไทย. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://marinegiscenter.dmcr.go.th/km/seaturtle_doc02/#.WpBB_6jFJPY [20 กุมภาพันธ์ 2561]

วรภัทร สวัสดิ์วงษ์. 2559. สหสัมพันธ์ระหว่างความเครียดและสุขภาวะของเต่ากระ *Eretmochelys imbricata* ในบ่อเลี้ยง ณ เกาะทะลุ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์. โครงการเรียนการสอนเพิ่มเสริมประสบการณ์. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เฉลียว ศาลากิจ. 2548. โลหิตวิทยาทางสัตวแพทย์. นครปฐม: โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมละอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, หน้า 646-656

Bowen, B.W., Conant, T.A., and Hopkins-Murphy, S.R. 1994. Where are they now? The Kemp's ridley headstart project. Conservation Biology. 8: 853-856

Brandenberger, G. and Weibel, L. 2004. The 24-h growth rhythm in men: sleep and circadian influences questioned. Journal of sleep research. 13: 251-255.

Campbell, T.W. 2015. Exotic animal Hematology and Cytology.,4th ed. Ames, IA: John Wiley & Sons.

Davis, A.K., Maney, D.L., and Maerz, J.C. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: A review of ecologists. Functional Ecology. 22: 760-772

Flint, M. et al. 2010. Development and application of biochemical and haematological reference intervals to identify unhealthy green sea turtles (*Chelonia mydas*). The Veterinary Journal. 185: 299-304

Garcia-Rodriguez, T., Ferrer, M., Reciot, F., and Castroviejo, J. 1987. Circadian rhythms of determined blood chemistry values in buzzards and eagle owls. Comp. Biochem. Physiol. 88A (4): 663-669

Heatley, J.J., and Johnson, M. 2009. Clinical technique: Amphibian hematology: A practitioner's guide. Journal of Exotic Pet Medicine. 18: 14-19

Hunt, K.E. et al. 2016. Assessment of ground transportation stress in juvenile Kemp's ridley sea turtles (*Lepidochelys kempii*). Conservation Physiology. 4.

Mead, K.F. and Borysenko, M. 1984. Surface immunoglobulins on granular and agranular leukocytes in the thymus and spleen of the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. Dev Comp Immunol. 8: 109-120

Mortimer, J.A. and Donnelly, M. 2008. *Eretmochelys imbricata.* [Online]. Available from: http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T8005A12881238.en [20 กุมภาพันธ์ 2561]

Scaglione, M.C., Cerutti, R.D., Arfuso, F., Rizzo, M., Pugliese, M. and Piccione, G. 2018. Daily rhythm of some haematological parameters in Holstein bovine maintained under natural conditions in southern hemisfere. Biological rhythm research. DOI: 10.1080/09291016.2018.1440769

Singh, A., Tripathi, M.K., Singh, R. and Pati, A.K. 2014. Circadian rhythmicity in leukocytes immune responses in the freshwater snake, *Natrix piscator.* Biological rhythm Research. 46: 181-194

Wyse, C.A., Zhang, X., Mclaughlin, M., Biello, S.M., Hough, D., Bellingham, M., Curtis, A.M., Robinson, J.E. and Evans, N.P. 2018. Circadian rhythms of melatonin and behaviour in juvenile sheep in field condition: Effects of photoperiod, environment and weaning. Physiology and Behavior. 194: 362-370

Zhang, F.Y., Gu, H.X., Chen, H.L., Xia, Z.R., and Li, P.P. 2009. Blood cells morphology and hematology of *Eretmochelys imbricata* and *Chelonia mydas*. Chinese Journal of Zoology. 44: 113-121

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

Phosphate buffer pH 7.0

Solution A

Sodium phosphate dibasic, anhydrous (Na_2HPO_4)	9.5	g
Distilled water	1000.0	mL

Solution B

Potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4)	9.7	g
Distilled water	1000.0	mL

Working Solution

Solution A	61.1	mL
Solution B	38.9	mL
Distilled water	900	mL

ปรับ pH และเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมสีย้อม Giemsa stain

Giemsa stain	1	mL
Phosphate buffer pH 7.0	6	mL