ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 23 : 45 - 65 (2532)

การศึกษาผิวหนังของปลาที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของน้ำด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

An Electron Microscope Study of Fish Skin Affected by Changes of pH Values

ประมาณ พรหมสุทธิรักษ์[1] และ รุจิพร สินเจริญกุล[2]

Pramarn Phromsuthirak and Rujiporn Sincharoenkul

ABSTRACT

The epidermis of *Clarias macrocephalus* (Günther), *Pangasius pangasius* (Buchanun) and *Ophicephalus striatus* Bloch unexposed and exposed to the acidity or alkalinity of the water, with the temperature range of 24-29°C, for 96 hours was ultrastructurally studied. At low and high pH, both filament-containing cells in the uppermost surface layer and goblet mucous cells were involved in releasing more mucus. The former produced numerous vesicles passing through terminal web, while the latter increased in number closed to the surface layer. At pH 3.46-3.38 chloride cells which have osmoreguratory function became active in secretory activities, showing distended tubules in their cytoplasms. An unidentified matrix was found in a club cell at high pH. When the experimental time was prolonged to 11 days of low pH exposure (4-6.8), a symptom of necrotic cells at the basal layer occurred, showing abnormalities in their cytoplasms.

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาผิวหนังชั้นนอกของปลาดุกอุย ปลาสวาย และปลาช่อน ที่อยู่ในน้ำมี pH ปกติ และมี pH ต่ำและสูง นาน 96 ชั่วโมง ด้วยกล้องจุลทรรศน์-อิเล็กตรอน พบว่า เซลล์ที่ผลิตเมือกจะปล่อยเมือกออกมากขึ้นทั้งที่ pH ต่ำ และที่ pH สูง filament-containing cells ที่อยู่ชั้นบนสุด จะมี vesicles เป็นจำนวนมาก ผ่านออกไปทาง terminal web goblet mucous cells มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นในบริเวณที่อยู่ติดกับเซลล์ชั้นบนสุด ที่ pH 3.46–3.38 chloride cells ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับ osmoregulation ทำการขับสารเพิ่มขึ้น สังเกตจากการบวมของ tubules พบสารที่ยังไม่ได้จำแนกอยู่ภายใน club cell ที่ pH สูงด้วย เมื่อยืดเวลาการทดลองให้นานถึง 11 วัน ที่ pH ต่ำ (4–6.8) กระบวนการ การตายของเซลล์เริ่มเกิดขึ้นในเซลล์ชั้นล่างสุด โดยมีความผิดปกติปรากฏในไซโทพลาซึม

[1] ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dept. of Fishery Biology, Faculty of Fisheries, Kasetsart Univ., Bangkok, Thailand.

[2] ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และห้องปฏิบัติการกลาง บางเขน

Research Facilities Service Division, KURDI.

คำนำ

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่สำคัญ ทำหน้าที่ห่อหุ้มร่างกายของสัตว์ทุกชนิด เป็นด่านแรกในการป้องกันตัวเอง ป้องกันความร้อนความเย็น ป้องกันมิให้เชื้อโรค สารพิษแทรกซึมเข้าสู่อวัยวะที่สำคัญอื่นได้เร็วเกินไป นอกจากนี้ยังทำหน้าที่รับความรู้สึกด้วย ดังนั้นสัตว์มีกระดูกสันหลังจึงมีชีวิตอยู่รอดและเจริญเติบโต ทั้งในน้ำ บนแผ่นดิน และในอากาศ ได้โดยการปรับตัวของผิวหนังนี้เอง (Parakkal and Alexander, 1972)

ดังนั้น ถ้าผิวหนังมีสุขภาพไม่สมบูรณ์ ด้วยสาเหตุใดก็ตามย่อมเป็นช่องทางหนึ่งที่เชื้อโรคจะเข้าสู่ร่างกายของสัตว์ และเกิดโรค หรือเจ็บป่วยได้ ดังจะเห็นได้ว่า ตั้งแต่ปลายปี พ.ศ. 2525 เป็นต้นมา ได้เกิดโรคระบาดกับปลาน้ำจืดในประเทศไทยทั้งในแหล่งน้ำธรรมชาติและในบ่อเลี้ยงปลาที่ใช้น้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ (ประมาณ, 2529) การศึกษาวิจัยสาเหตุการเกิดโรคระบาดในปลาได้กระทำต่อเนื่องเรื่อยมาจนกระทั่งได้มุ่งความสนใจมาที่คุณภาพน้ำ ที่อาจทำให้ปลาอ่อนแอเป็นผลให้เชื้อโรคเข้าสู่ตัวปลาได้ง่ายขึ้น

เนื่องจากค่า pH ของน้ำเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของคุณภาพน้ำอย่างหนึ่ง ในการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ นักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ศึกษาถึงผลกระทบของน้ำที่มี pH ต่ำต่อปลา (Ellgaard and Gilmore, 1984; Hilden and Hirvi, 1987; และ Leuven and Oyen, 1987) อาทิ Leuven and Oyen (1987) ได้พบว่าน้ำที่มีระดับ pH 4–6 จำนวนชนิดของปลาที่อาศัยจะลดลง สุธรรม และคณะ (2529) ได้ทดสอบความเป็นด่างของน้ำที่มีผลกระทบต่อปลาตะเพียนขาว ปลาช่อน และปลาดุกด้าน เป็นต้น การสอบสวนดังกล่าวนี้ส่วนใหญ่จะตรวจสอบผลกระทบว่าปลามีชีวิตอยู่รอดหรือไม่ การเจริญเติบโตเป็นอย่างไร ฯลฯ การศึกษาครั้งนี้ได้เน้นทางด้าน ultrastructure เพื่อตรวจสอบว่า ค่า pH ของน้ำระดับต่าง ๆ ที่ปลาอาศัยอยู่ จะมีผลกระทบอย่างไรต่อเซลล์ของผิวหนังชั้นนอก (epidermis) โดยเฉพาะว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงมากน้อยเพียงใด

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมปลาทดลอง ปลาดุกอุย, *Clarias macrocephalus* (Günther), ปลาสวาย, *Pangasius pangasius* (Buchanun) ได้รับจากบ่อเลี้ยงปลาส่วนปลาช่อน, *Ophicephalus striatus* Bloch จับจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ปลาทั้ง 3 ชนิดมีความยาวและน้ำหนัก 11–16 ซม., 10–30 กรัม ; 12–20 ซม., 10–49 กรัม; และ 12 ซม., 20 กรัม ตามลำดับ นำมาเลี้ยงไว้ในตู้เลี้ยงปลา ขนาด 42 × 77 × 42 ซม. ในน้ำที่มี pH 8.54 และให้ออกซิเจนอย่างพอเพียง โดยมีช่วงอุณหภูมิ 24–29 องศาเซลเซียส ในห้องทดลอง เป็นเวลาอย่างน้อย 15 วัน เพื่อให้ปลาคุ้นกับห้องก่อนจะดำเนินการทดลอง

2. การเตรียมน้ำและการทดลอง ใช้กรด (hydrochloric acid) และด่าง (sodium hydroxide) เป็นตัวปรับค่า pH ของน้ำประปาที่ได้วางทิ้งไว้ 3 วันล่วงหน้า (การปรับค่า pH ของน้ำที่มีผลกระทบต่อปลามิได้ขึ้นกับชนิด แต่ขึ้นกับปริมาณของสารที่ใช้ Ellgaard and Gilmore, 1984) นำน้ำใส่ตู้ปลาขนาด 26 × 42 × 26 ซม. ปรับค่า pH ของน้ำ ระดับละ 3 ซ้ำ ให้มีค่าเป็นกลาง, ต่ำ และสูง โดยวัดค่า pH ที่แน่นอนทั้งก่อนและหลังการทดลอง แล้วจึงใส่ปลาลงตู้ละ 1 ตัว ให้อยู่นาน 96 ชั่วโมง (ในการทดลองกับปลาสวายที่ pH 4 ได้ขยายเวลานานถึง 11 วัน) โดยไม่ให้อาหารและไม่ให้ออกซิเจนเพิ่ม จากนั้นจึงเก็บตัวอย่าง โดยทำให้ปลาสลบก่อน ใน MS-222 (tricaine methanesulfonate) ที่มีความเข้มข้น 1 : 4,000 แล้วจึงฆ่าปลาและเก็บผิวหนังบริเวณด้านท้อง

3. การเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

3.1 ดองตัวอย่างใน glutaraldehyde 5% ซึ่งมีฟอสเฟต 0.1 M เป็นบัฟเฟอร์ และมี pH 7.2 เป็นเวลานาน 2 $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.2 ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M pH 7.2 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.3 ดองตัวอย่างอีกครั้ง (post fix) ในกรดออสมิค (OsO_4) 2% มีน้ำกลั่นต้มเป็นบัฟเฟอร์ เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.4 ล้างด้วยน้ำกลั่นต้ม 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.5 ย้อมตัวอย่างด้วย uranyl acetate 3% ในน้ำกลั่น ในที่มืดนาน 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จนน้ำล้างใส (ไม่มีสีเหลือง)

3.6 นำตัวอย่างมาผ่านใน acetone 30%, 50%, 70% และ 90% ระดับละ 15 นาที (หรืออาจจะทิ้งค้างคืนที่ระดับ 70% ได้) และใน acetone 100% 3 ครั้ง ๆ ละ 15 นาทีเพื่อเอาน้ำออก

3.7 ฝังตัวอย่างใน Spurr epoxy resin โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.7.1 ในส่วนผสมของ acetone : Spurr เท่ากับ 2 : 1 เป็นเวลานาน 1 $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง

3.7.2 ในส่วนผสมของ acetone : Spurr เท่ากับ 1 : 2 เป็นเวลานาน 1 $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า

3.7.3 ใน pure Spurr เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า

3.7.4 ใน pure Spurr อีกครั้งหนึ่ง ทิ้งค้างคืนบนเครื่องเขย่า

3.7.5 ใน pure Spurr ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 8 ชั่วโมง

3.8 ใช้ ultramicrotome LKB ตัด sections จนได้สีทองหรือสีเทา ยืดขยาย sections ด้วยไอของ xylol และช้อน sections ด้วย 200-/300-mesh copper grids

3.9 ย้อม sections ด้วย uranyl acetate อิ่มตัวในน้ำกลั่น 20 นาที แล้วย้อมด้วย lead citrate (Reynolds, 1963) นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นต้มสุก 30 หยด

3.10 ตรวจดู sections ด้วยกล้องจุลทรรศน์-อิเล็กตรอน Hitachi Hu-12A ของศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และห้องปฏิบัติการกลาง บางเขน

ผล

ผิวหนังประกอบด้วย 2 ส่วน ส่วนแรกคือ ผิวหนังชั้นนอก (epidermis หรือ surface epithelium) ซึ่งพัฒนามาจาก embryonic ectoderm ส่วนที่สองคือ ผิวหนังชั้นใน (dermis หรือ connective tissue) ซึ่งพัฒนามาจาก mesoderm

ผิวหนังชั้นนอก เป็นชั้นที่มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา โดยที่เซลล์จะมีการแบ่งตัว, การเคลื่อนที่, การเปลี่ยนแปลงไปเป็นส่วนอื่น และการหลุดลอกไป (exfoliation) สำหรับในสัตว์น้ำโดยเฉพาะในปลานั้น ระยะ "การหลุดลอกไป" ยังไม่มีการบันทึกไว้ หรืออาจไม่เกิดขึ้นก็ได้ เนื่องจากเซลล์ชั้นนอกสุดยังคงทำหน้าที่ได้ตามปกติตลอดอายุของปลา รวมทั้งผลิตเมือกปกคลุมตัวด้วย (Whitear, 1970)

ปลาดุกอุยและปลาสวายเป็นปลาที่ไม่มีเกล็ด ปลาช่อนมีเกล็ด เพื่อความสะดวกในการเก็บและเตรียมตัวอย่าง จึงเลือกเก็บผิวหนังในบริเวณที่มีเกล็ดน้อยที่สุดหรือไม่มีเลย และการศึกษาครั้งนี้ได้กระทำจำกัดเฉพาะผิวหนังชั้นนอกเท่านั้น โดยมีผลการศึกษาดังนี้

ก. ลักษณะผิวหนังชั้นนอกของปลาในน้ำที่ไม่มีการปรับค่า pH

ผิวหนังชั้นนอกของปลาดุกอุยและปลาสวายมีความหนาของชั้นเซลล์มากกว่าของปลาช่อน ทั้งนี้จำนวนของชั้นเซลล์จะมีมากหรือน้อยขึ้นกับขนาดของปลา และบริเวณส่วนไหนของตัวปลาด้วย (Henrikson and Matoltsy, 1968a) ผิวหนังชั้นนอกอาจจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ชั้นล่างประกอบด้วยเซลล์มีลักษณะรูปร่างค่อนข้างเป็นเหลี่ยม ชั้นกลางมีเซลล์ค่อนข้างกลม และชั้นบนสุดมีเซลล์รูปร่างค่อนข้างแบนที่ปกคลุมด้วยเมือก (Figure 2 and 3) ทุก ๆ เซลล์จะเชื่อมกันด้วย desmosomes นอกจากนี้มีเซลล์อีกพวกหนึ่ง (mucous cell, club cell และ chloride cell) ซึ่งมีลักษณะรูปร่างและขนาดแตกต่างจากเซลล์อื่น แต่มี desmosomes ยึดกับเซลล์ข้างเคียงอยู่ เซลล์เหล่านี้ยังนับว่าเป็นเซลล์แท้ ๆ ของผิวหนังชั้นนอก และมีเซลล์อีกประเภทหนึ่งซึ่งไม่มี desmosome ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดขาว รายละเอียดของเซลล์แบบต่าง ๆ มีดังนี้

(1) Filament-containing cell เซลล์ชนิดนี้ (Figure 2) โดยจำนวนแล้ว เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของผิวหนังชั้นนอก มีลักษณะสังเกตได้อย่างชัดเจน คือ มีเส้นสาย (filament) มากมายในไซโทพลาซึม (Figure 2 d) มี mitochondria, Golgi complex, smooth endoplasmic reticulum, free ribosomes และ vesicles รวมทั้งมี desmosomes มาก (Figure 2 b and d) ซึ่งมี tonofilaments ยื่นเข้าไปในส่วนของไซโทพลาซึม นิวเคลียสมีรูปร่างไม่แน่นอน และมี nucleolus บรรจุอยู่ภายใน เซลล์ที่อยู่ชั้นล่างจะมีผนังเซลล์ด้านที่ติดกับ basement membrane ค่อนข้างหนา (Figure 2 e) กว่าผนังเซลล์ส่วนอื่น แต่ไม่มี hemidesmosome เซลล์ที่ชั้นกลางมักจะพบซ้อนกันคล้ายนิ้วมือที่ประสานกัน (interdigitations) (Figure 2 c) ตามปกติเซลล์ชั้นบนสุด (Figure 2 a) มักจะมีสีเข้ม (electron-dense) กว่าเซลล์ที่อยู่ชั้นล่าง

(2) Goblet mucous cell ในปลากระดูกแข็ง mucous cell จะมีรูปร่างหลายแบบ (Henrikson and Matoltsy, 1968b) แต่แบบที่เรียกว่า goblet mucous cell นั้น จะพบในปลาทุกชนิด (Whitear, 1970) และมักจะพบอยู่ในชั้นบน ๆ ของผิวหนังชั้นนอก (Figure 1, 4 and 5) เซลล์ชนิดนี้ตามปกติมีรูปร่างเป็นรูปไข่ (Figure 4 b) บางครั้งพบค่อนข้างกลม (Figure 4 c) ภายในไซโทพลาซึมจะเต็มไปด้วย mucous droplets ที่ห่อหุ้มด้วย membrane ชั้นเดียว ดังนั้นจึงทำให้ cytoplasmic organelles รวมกันอยู่บริเวณตอนล่างของเซลล์ พร้อมด้วยนิวเคลียสที่มีรูปร่าง eccentric บางครั้งพบ rough endoplasmic reticulum เป็นจำนวนมาก (Figure 4 d) ถัดจากนิวเคลียสขึ้นมา และพบระหว่าง mucous droplets ด้วย นอกจากนี้มี Golgi complex, มี vescicles บ้าง, มี mitochondria จำนวนไม่มาก มีเส้นสายในไซโทพลาซึม รวมทั้งมี desmosomes เชื่อมต่อกับ filament-containing cell (Figure 4 d) และจะพบเซลล์ที่กำลังปล่อย mucous droplets ออกสู่ภายนอกได้เสมอ ดัง Figure 4 a

(3) Chloride cell เซลล์ชนิดนี้ตามปกติจะพบมากที่เหงือกปลา ในผิวหนังชั้นนอกจะพบแถบชั้นกลางจนถึงชั้นนอกสุด (Figure 6 a) มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือยาวรี ไซโทพลาซึมทึบแสงน้อยกว่าของ filament-containing cell ลักษณะเด่นคือ มี mitochondria และ branching tubules จำนวนมาก Golgi complex อาจพบได้บริเวณเหนือนิวเคลียสซึ่งมีรูปร่างไม่แน่นอน บางครั้งพบเป็นรูปไข่มี nucleolus เห็นชัด มี desmosomes เชื่อมกับ filament-containing cell แต่จำนวนจะน้อยกว่า desmosomes ที่เชื่อมระหว่าง filament-containing cell ด้วยกัน

(4) Club cell เซลล์ชนิดนี้มีขนาดใหญ่มากในปลาดุกอุย วัดขนาดความสูงได้ถึง 75 μm ในปลาสวาย

94–113 μm (Figure 1) และในFigure 6 b มีขนาด 42.5 μm จะพบเซลล์นี้ได้มากในปลาไม่มีเกล็ด ปลาดุกอุยและปลาสวายพบบริเวณชั้นกลางของผิวหนังชั้นนอกมี desmosomes เชื่อมต่อกับ filament-containing cell ภายในเซลล์มีสารที่เป็น electron-lucent บรรจุเกือบเต็มเซลล์ ส่วนที่เหลือของไซโทพลาซึมรอบ ๆ มี endoplasmic reticulum อยู่บ้าง นิวเคลียสซึ่งมีขนาดเล็กตามปกติจะพบบริเวณด้านล่างของเซลล์ (Figure 6 c) เซลล์ชนิดนี้จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (Figure 1 and 6 d)

(5) **เซลล์เม็ดเลือดขาว** ตามปกติเม็ดเลือดขาวซึ่งควรจะนับว่าเป็นกองกำลังเคลื่อนที่อยู่ภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิตนั้น จะพบได้เสมอในผิวหนังชั้นนอกของปลาดุกอุย ปลาสวาย และปลาช่อน (Figure 7) แท้จริงแล้วเซลล์เม็ดเลือดขาวเหล่านี้จะเคลื่อนตัวมาจากผิวหนังชั้นใน และสามารถตรวจพบความแตกต่างจากเซลล์ของผิวหนังชั้นนอกนี้ได้ โดยไม่มี desmosome เชื่อมต่อระหว่างเซลล์ไม่มีเส้นสายภายในเซลล์ ไซโทพลาซึมมีลักษณะจางกว่าของ filament-containing cells นอกจากนี้จะสังเกตได้จากขนาดและรูปร่าง รวมทั้งลักษณะของ lysosomal granules ที่แตกต่างกันระหว่างชนิดของเม็ดเลือดขาว รายละเอียดลักษณะของเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ ขอให้ดูจาก "การศึกษาลักษณะชนิดของเม็ดเลือดขาวในปลาช่อนและปลาดุกด้าน" ของประมาณ (2529) สำหรับรายละเอียดโดยย่อมีดังนี้

Lymphocytes มีนิวเคลียสค่อนข้างกลม หรือเป็นรูปไข่ขนาดใหญ่บรรจุอยู่เกือบเต็มไซโทพลาซึม เซลล์มีขนาดเล็กกว่าเม็ดเลือดขาวชนิดอื่น (Figure 7 a and b)

Neutrophils มีขนาดและรูปร่างไม่แน่นอน มีเนื้อที่ของไซโทพลาซึมมาก ภายในมีกรานูลทึบแสงมาก (Figure 7 c and d)

Eosinophils มีขนาดและรูปร่างไม่แน่นอน นิวเคลียสจะอยู่ค่อนไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์เสมอ มีเนื้อที่ของไซโทพลาซึมมาก ภายในมีกรานูลทึบแสงมาก กรานูลมีขนาดใหญ่กว่ากรานูลของ neutrophils (Figure 7 e)

Macrophages มีขนาดและรูปร่างไม่แน่นอน มักจะพบ phagosomes บรรจุอยู่ภายในไซโทพลาซึมที่มีสีค่อนข้างจางกว่าเม็ดเลือดขาวชนิดอื่น มีกรานูลทึบแสงบ้างเล็กน้อย (Figure 7 f)

ข. ลักษณะผิวหนังชั้นนอกของปลาในน้ำที่มีการปรับค่า pH

เซลล์ชนิดต่าง ๆ ที่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลง คือ filament-containing cell, mucous cell มีจำนวนเพิ่มขึ้น, การเปลี่ยนแปลงใน chloride cell และ club cell ส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวไม่พบความแตกต่างแต่อย่างใด

1. **ในน้ำที่มี pH ต่ำ** ที่ pH 3.46–3.38 ผิวหนังชั้นนอกของปลาดุกอุยมีจำนวน mucous cell เพิ่มขึ้นและเคลื่อนขึ้นมาอยู่ใกล้เซลล์ชั้นบนสุดมากกว่าปกติ โดยมี filament-containing cell คลุมอยู่เพียงชั้นเดียวเท่านั้น (Figure 1 b and 8 a) นอกจากนี้ organelle ใน chloride cell มีลักษณะผิดปกติ กล่าวคือ มีการบวมของ branching tubules (Figure 9 a and b)

ในปลาสวายที่ pH 3.42–5.7 พบว่า filament-containing cell ในชั้นบนสุดของผิวหนังชั้นนอก มี vesicles มาก (Figure 8 c) และในชั้นล่างมีเส้นสายมาก (Figure 8 e) นอกจากนี้ในการขยายเวลาให้ปลาสวายอยู่ในน้ำค่อนข้างเป็นกรด (pH 4–6.8) นานถึง 11 วัน โดยไม่ได้รับอาหารนั้น ปรากฏว่ามี lipid droplets (Figure 8 f) และลักษณะผิดปกติ (Figure 8 g and h) ใน filament-containing cell ชั้นล่างที่อยู่ติดกับ basement membrane อีกด้วย ทั้งนี้เมื่อตรวจสอบกับผิวหนังชั้นนอกของปลาสวายที่อยู่ในน้ำไม่มีการปรับค่า pH ไม่ให้อาหารในระยะเวลาที่เท่ากัน ไม่มีลักษณะภาพ

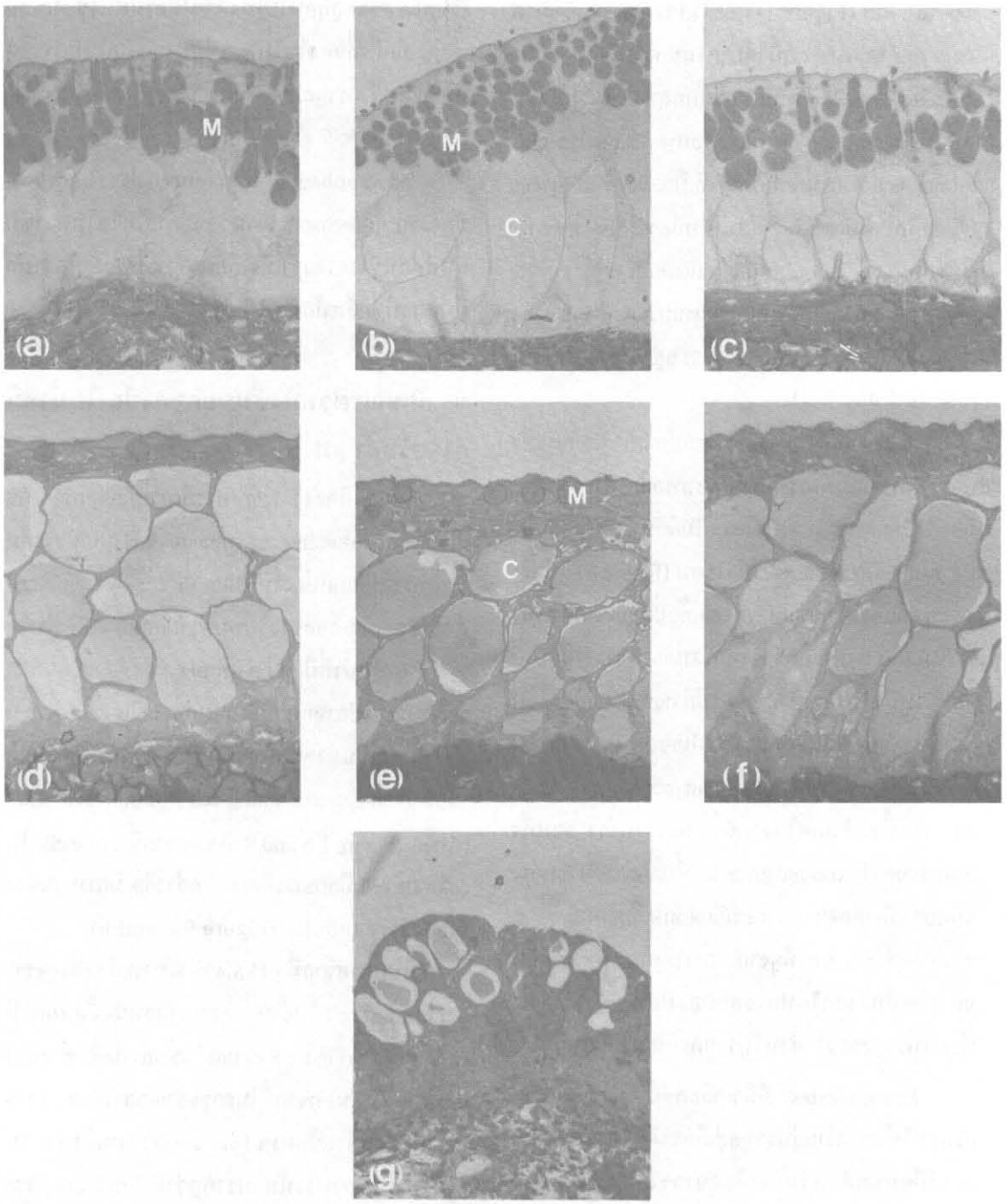

Figure 1 Epidermis of *Clarias macrocephalus* (Günther), *Pangasius pangasius* (Buchanun) and *Ophicephalus striatus* Bloch exposed to different pH values for 96 hours (a) *Clarias* at pH 7.5-8.2 (b) *Clarias* at pH 3.46-3.38 (c) *Clarias* at pH 10.75-7.95 (d) *Pangasius* at pH 8.54-7.1 (e) *Pangasius* at pH 3.7-4.8 (f) *Pangasius* at pH 9.8-7.45 (g) *Ophicephalus* at pH 3.88-4.5; C, club cell; M, mucous cell × 264

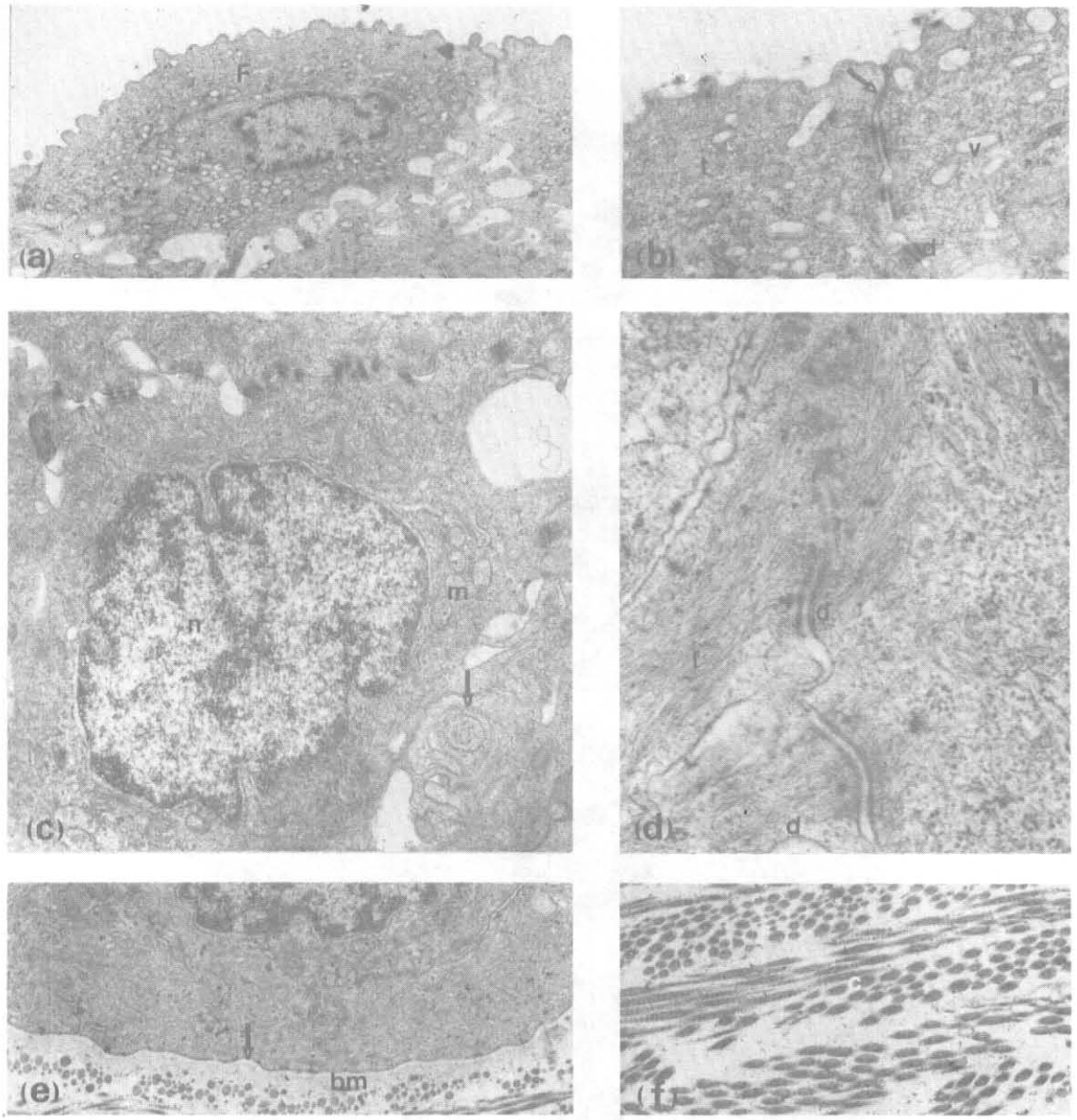

Figure 2 Filament-containing cells, F, in the epidermis of *Clarias macrocephalus* (Günther) exposed to pH 7.5-8.2 for 96 hours (a) a rather flat cell in the outermost layer × 8,273 (b) tight junction (arrowed), terminal web, t; vesicle, v; and desmosome, d × 20,682 (c) a nearly round cell in the middle layer; the arrow indicates cell interdigitation × 12,410 (d) desmosome and filament, f, in the cytoplasm × 33,782 (e) thick cell membrane of the innermost layer cell facing basement membrane × 12,410 (f) collagen, c, of the dermis × 12,410; m, mitochondria; n, nucleus

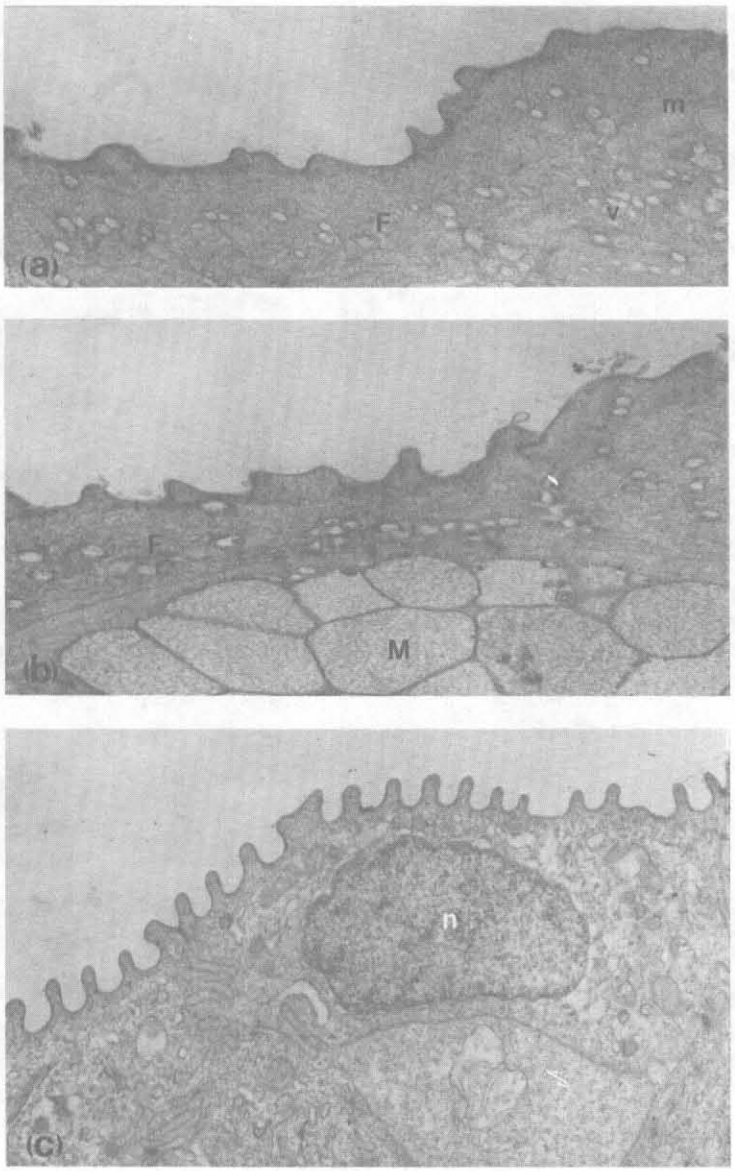

Figure 3 Filament-containing cells, F, in the outermost layer of epidermis of *Pangasius pangasius* (Buchanun) and *Ophicephalus striatus* Bloch exposed to pH 8.54-7.1 and 3.88-4.5 respectively for 96 hours (a) & (b) *Pangasius* × 12,410 (c) *Ophicephalus* × 12,410; m, mitochondria; M, mucous cell; n, nucleus; v, vesicle

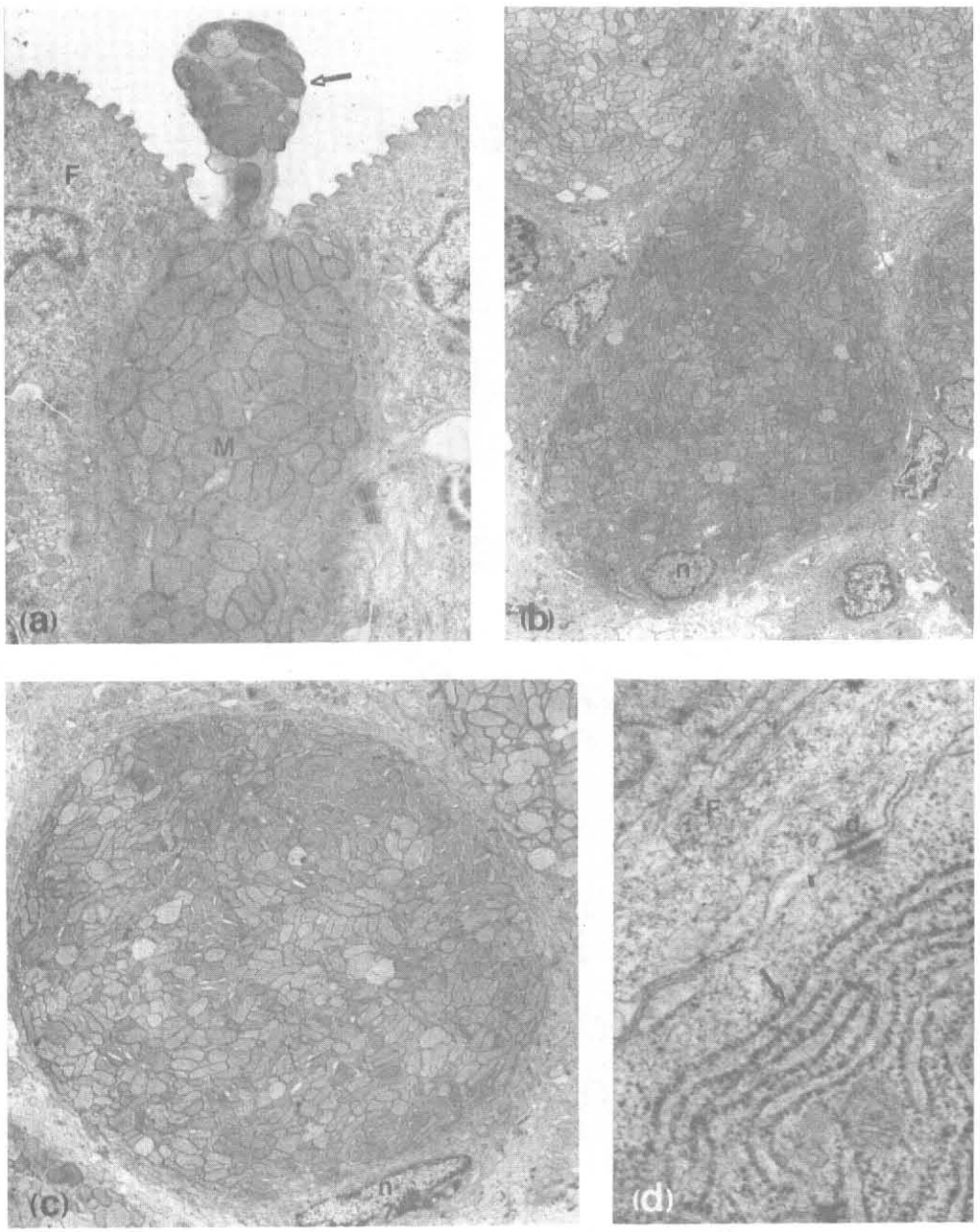

Figure 4 Mucous cells, M, in the epidermis of *Clarias macrocephalus* (Günther) exposed to pH 7.5-8.2 for 96 hours (a) reaching the outermost layer and releasing mucous droplet (arrowed) × 8,273 (b) a goblet-like mucous cell in the middle layer × 2,760 (c) a nearly round cell × 4,114 (d) rough endoplasmic reticulum (arrowed) and desmosome, d, joining to other cells × 33,782; F, filament-containing cell; n, nucleus

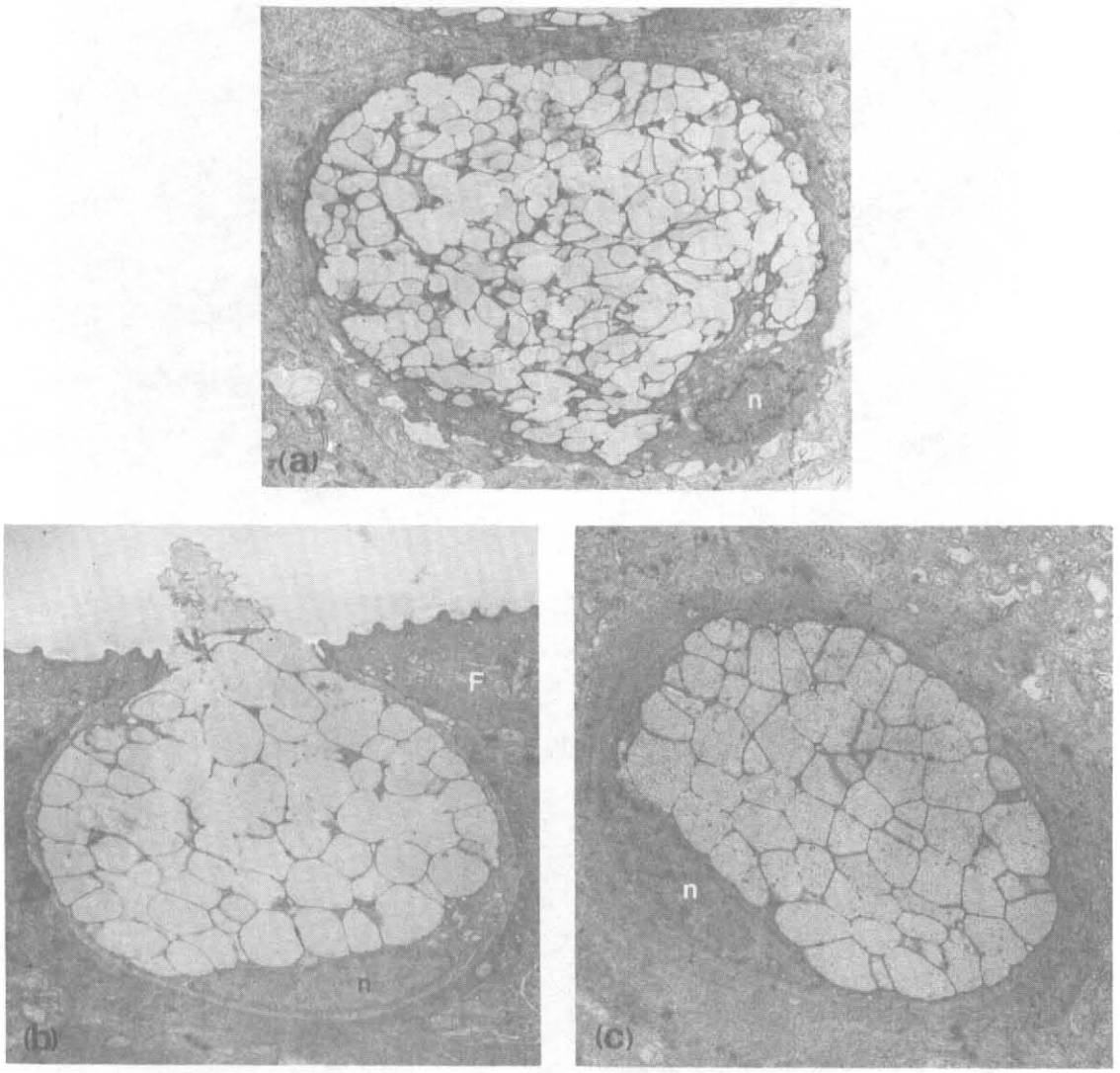

Figure 5 Mucous cells in the epidermis of (a) *Clarias macrocephalus* (Günther) exposed to pH 7.5-8.2 for 96 hours × 4,114 (b) × 5,515 and (c) × 6,480 *Pangasius pangasius* (Buchanun), pH 8.54-7.1 for 96 hours; F, Filament-containing cell; n, nucleus

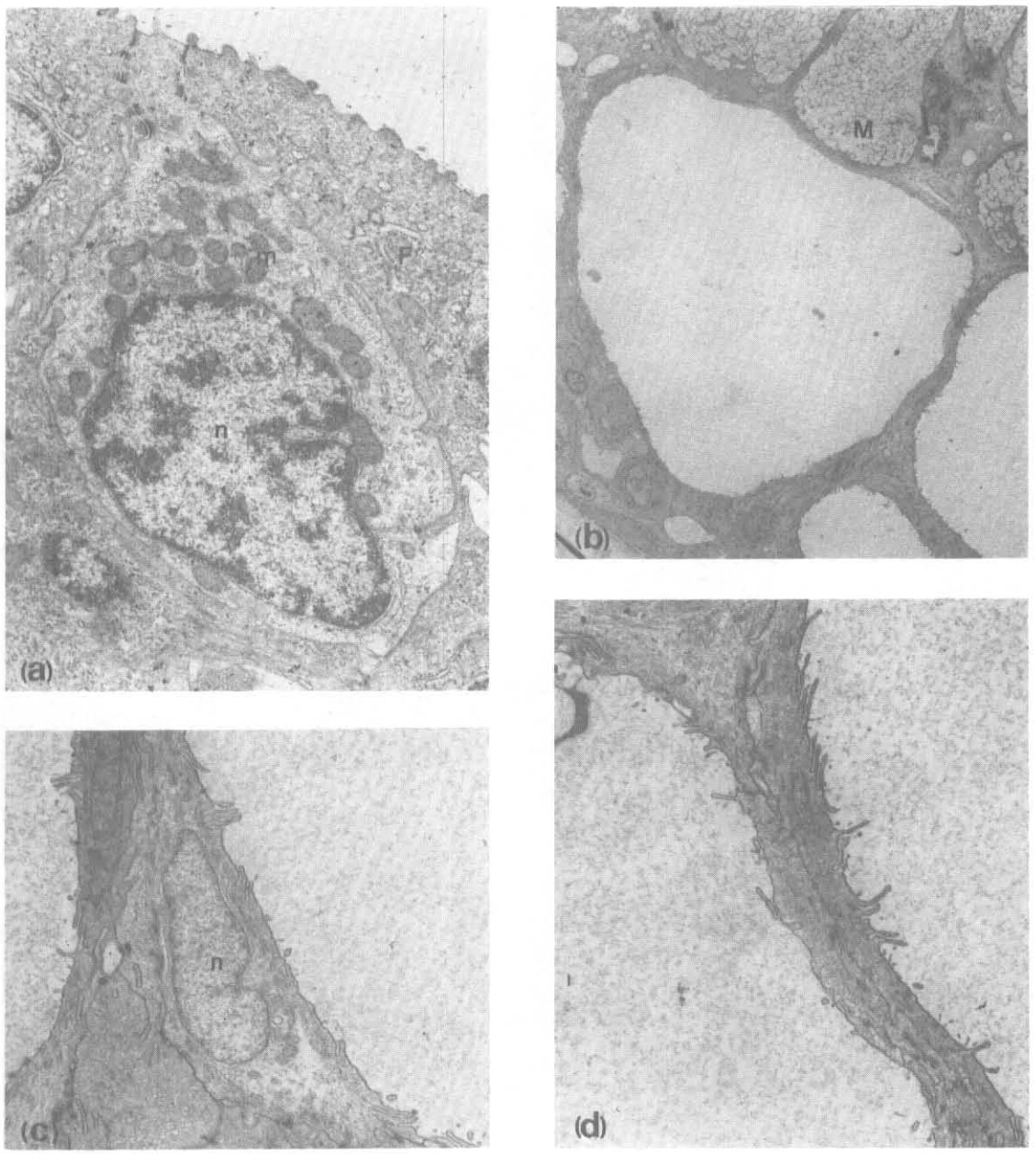

Figure 6 Other epithelial cells in the epidermis of *Clarias macrocephalus* (Günther) exposed to pH 7.5-8.2 for 96 hours (a) a chloride cell × 11,031 (b) club cells × 1,380 (c) club cell nucleus found in the periphery of cytoplasm × 6,480 (d) the adjoining club cells × 6,480; F, filament-containing cell; M, mucous cell; m, mitochondria; n, nucleus

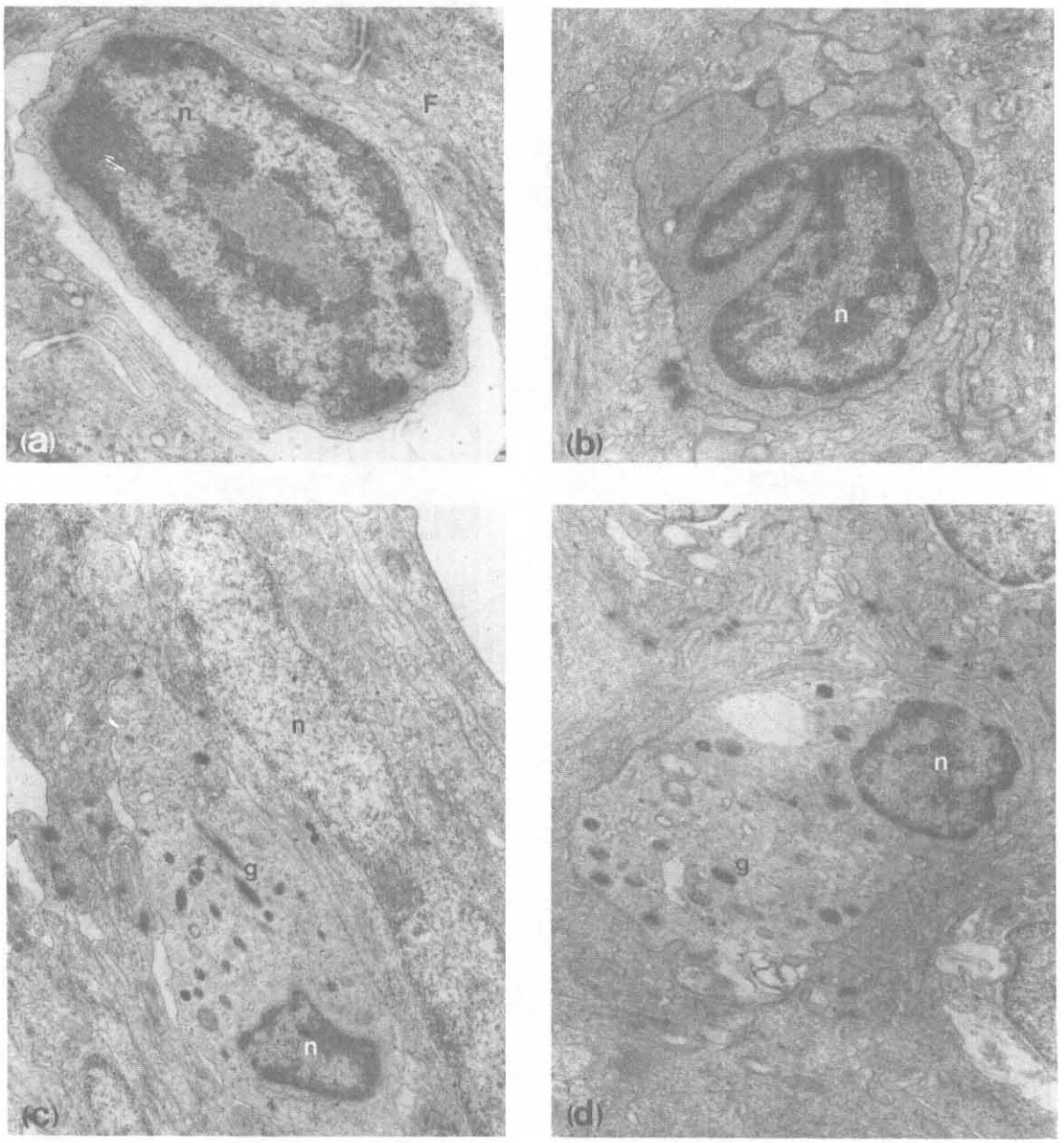

Figure 7 Leucocytes in the epidermis (a) *Clarias* lymphocyte × 20,682 (b) *Pangasius* lymphocyte × 13,788 (c) *Clarias* neutrophil × 12,410 (d) *Ophicephalus* neutrophil × 11,031; F, filament-containing cell; g, granule; n, nucleus

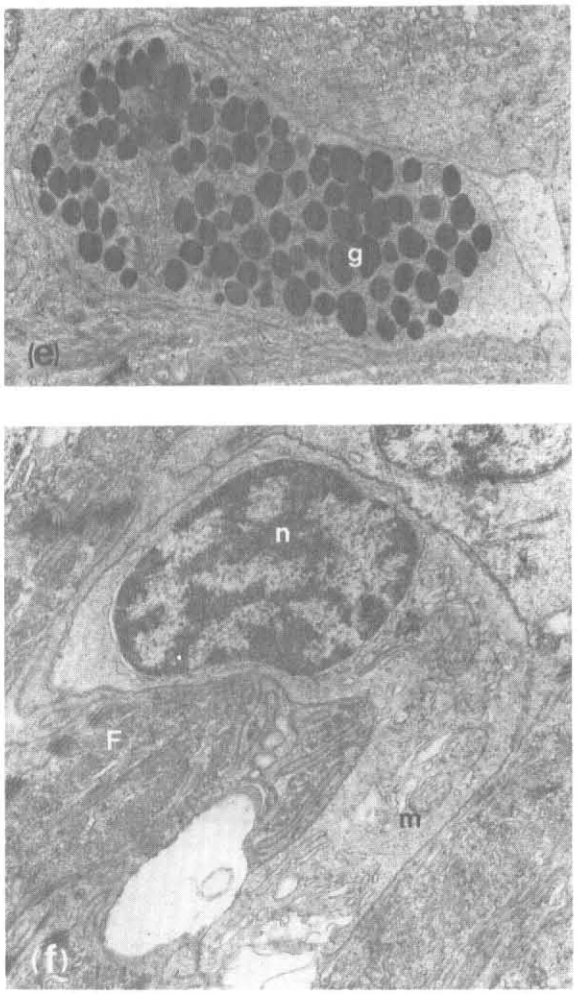

Figure 7 **(continued) Leucocytes in the epidermis (e) *Clarias* eosinophil × 8,273 (f) *Pangasius* macrophage × 12,410; F, filament-containing cell; g, granule; m, mitochondria; n, nucleus**

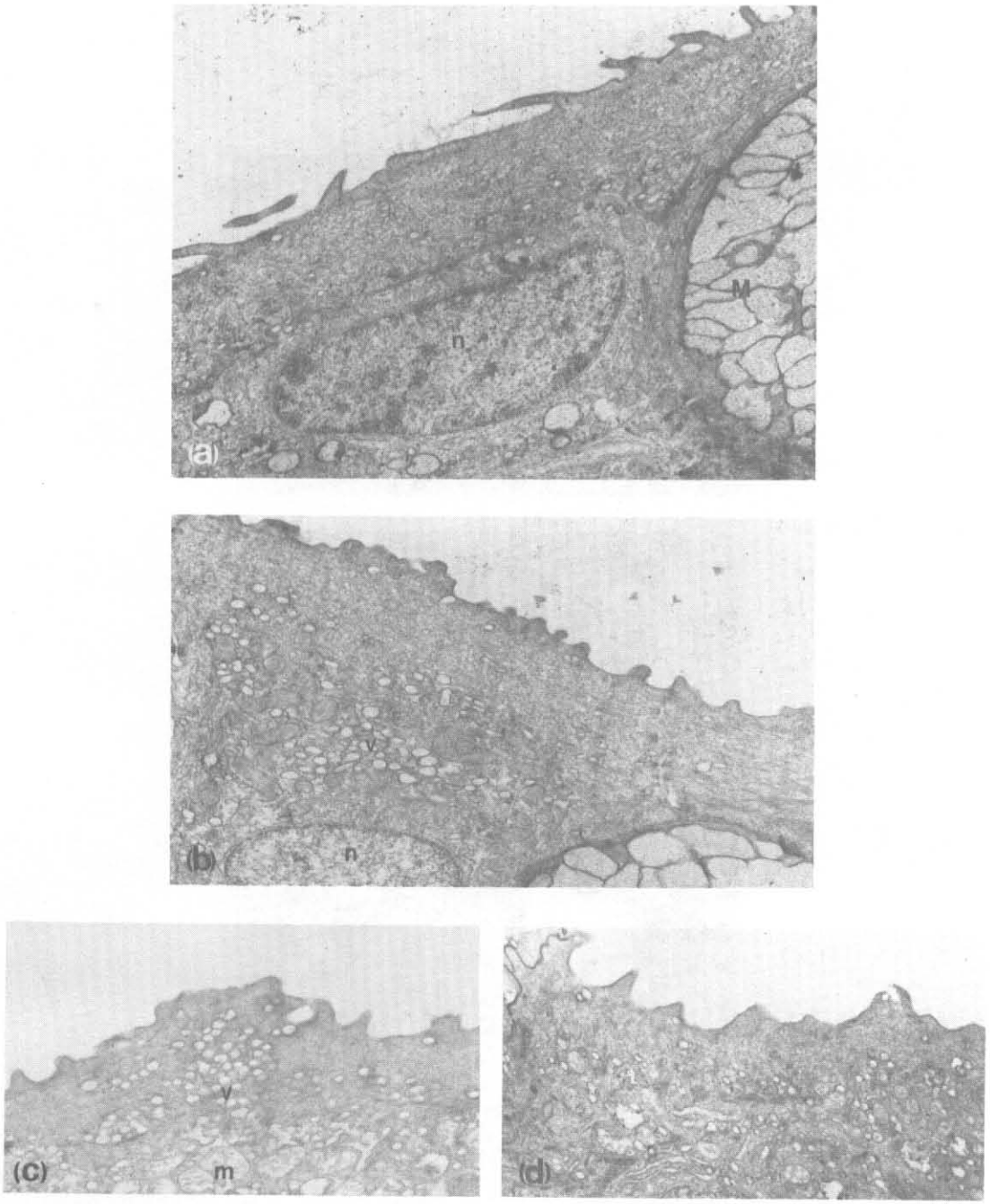

Figure 8 Filament-containing cells in the outermost layer of the epidermis exposed to low and high pH for 96 hours (a) *Clarias* at pH 3.46-3.38 × 11,031 (b) Clarias at pH 10.75-7.95 × 11,031 (c) *Pangasius* at pH 3.42-5.7 × 9,592 (d) *Pangasius* at pH 10.72-7.92 × 8,273; M, mucous cell; m, mitochondria; n, nucleus; v, visicle

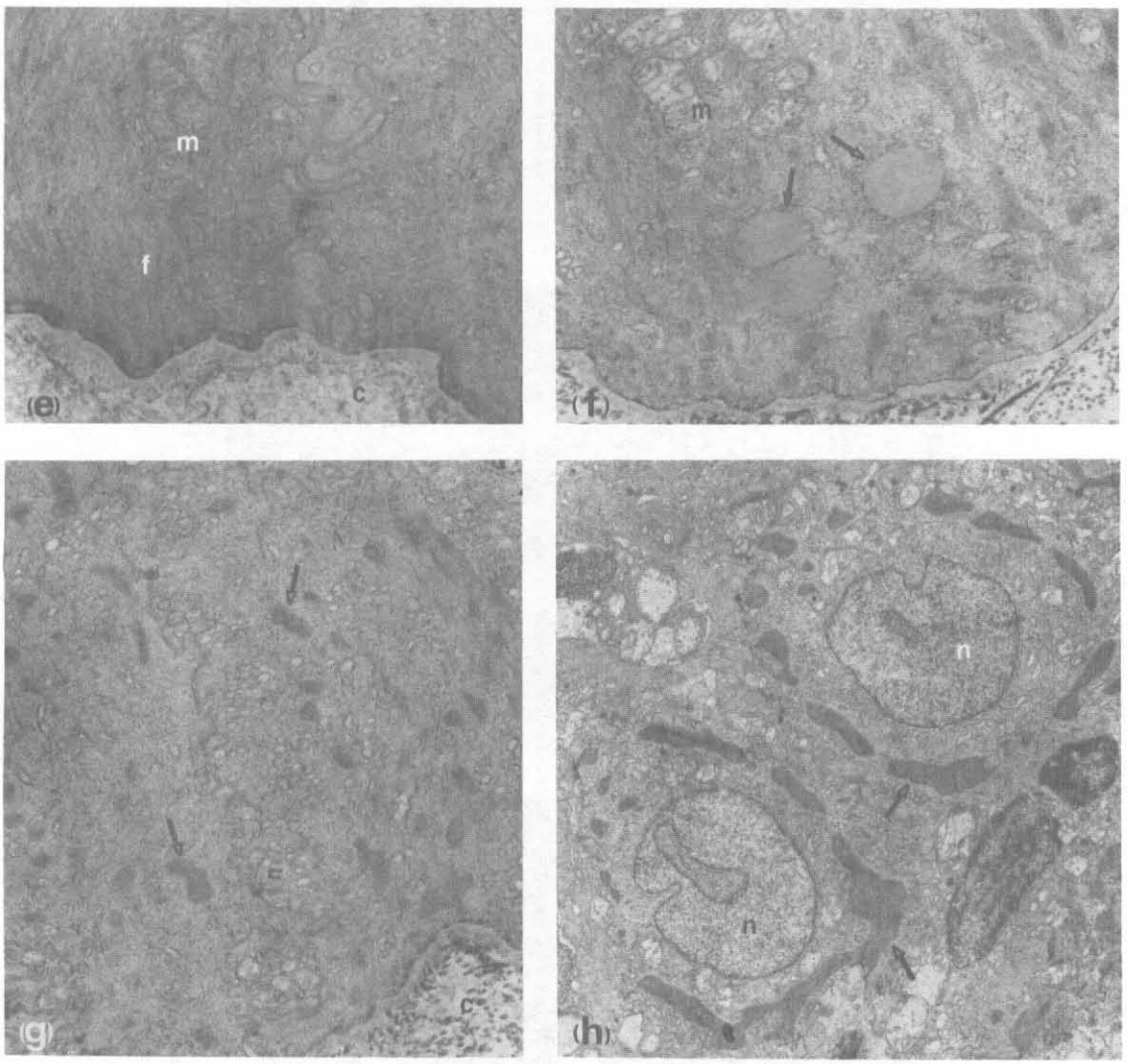

Figure 8 (continued) Filament-containing cells in the innermost layer of epidermis of *Pangasius pangasius* (Buchanun) exposed to low and high pH (e) at pH 3.42-5.7 for 96 hours-note the numerous filaments × 12,410 (f), (g) & (h) at pH 4-6.8 for 11 days (f) lipid droplet (arrowed) × 12,410 (g) abnormality in the cytoplasm (arrowed) × 12,410 (h) more abnormality × 5,515; c, collagen; m, mitochondria; n, nucleus

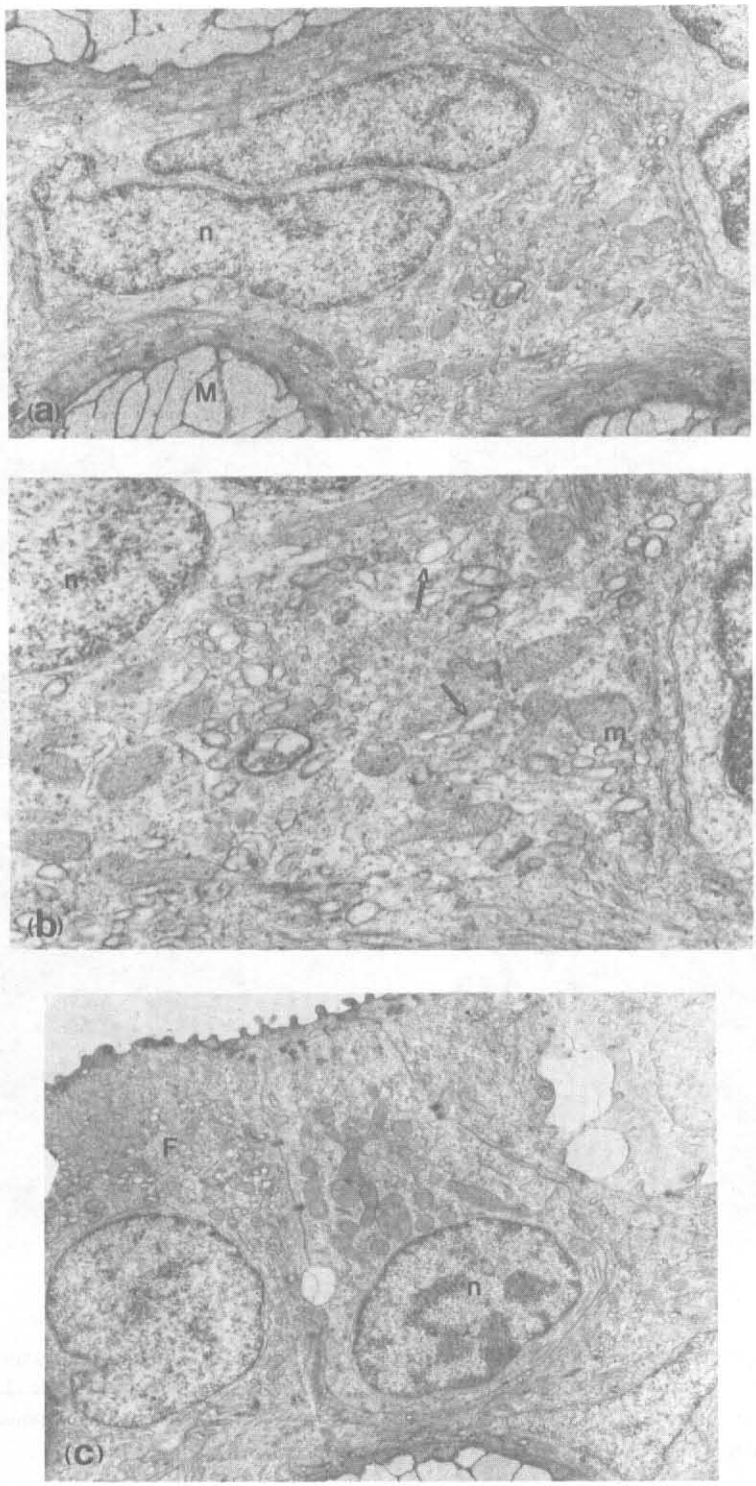

Figure 9 Chloride cells in the epidermis of *Clarias macrocephalus* (Günther) exposed to low and high pH for 96 hours (a) at pH 3.46-3.38 × 11,031 (b) part of (a) showing distended tubules (arrowed) × 20,682 (c) at pH 10.75-7.95 appearing normal × 6,480; F, filament-containing cell; M, mucous cell; m, mitochondria; n, nucleus

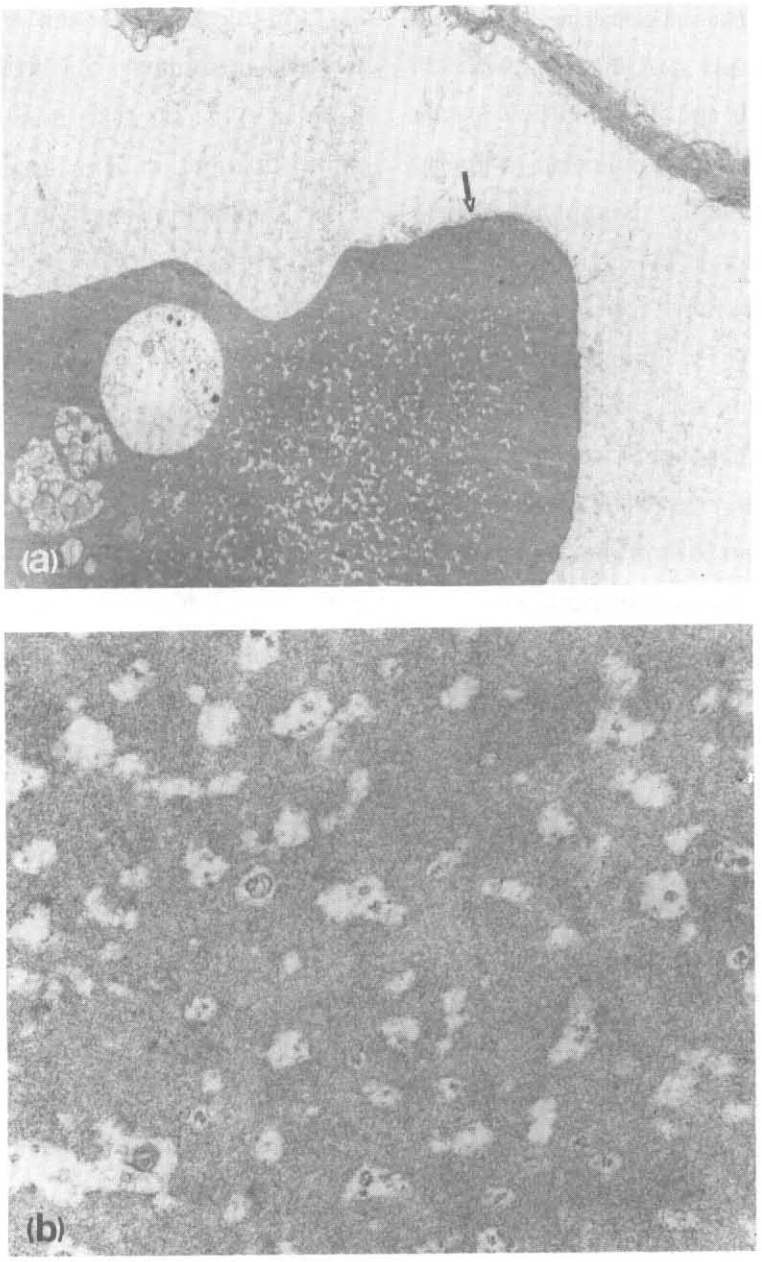

Figure 10 A club cell in the epidermis of *Pangasius pangasius* (Buchanun) exposed to pH 10.75-7.8 for 96 hours (a) matrix (arrowed) found in the cytoplasm × 3,450 (b) matrix seen at higher magnification × 24,130

ดังกล่าวเกิดขึ้น จึงเป็นข้อสันนิษฐานว่า การที่ปลาสวายอยู่ในน้ำที่มีสภาพค่อนข้างเป็นกรดเป็นเวลานาน ทำให้เกิดความผิดปกติใน filament-containing cell ชั้นล่างได้

2. **ในน้ำที่มี pH สูง** ทั้งปลาดุกอุยและปลาสวาย (Figure 8 b and d) เมื่ออยู่ในน้ำ pH สูง (10.75) จะทำให้น้ำขุ่น เนื่องจากปลาจะขับของเสียออกจากร่างกายรวมทั้งขับเมือก ปรากฏการณ์นี้จะเห็นได้ชัดเจนในเวลาเพียง 1 ชั่วโมง โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับปลาสวาย ขณะเดียวกันการรักษาให้น้ำคงสภาพเป็นด่างในระดับนั้น กระทำได้ไม่ดีพอ เมื่อครบ 96 ชั่วโมง pH ของน้ำจะลดลงเหลือเพียง 7.8–7.9 เป็นผลให้การสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต่าง ๆ (ที่อาจเกิดขึ้น) กระทำได้ไม่ดีเท่าที่ควร เช่น chloride cell มีลักษณะปกติ (Figure 9 c) อย่างไรก็ตามได้พบว่า club cell ในผิวหนังชั้นนอกของปลาสวาย มีสารอื่นเกิดขึ้นภายใน (Figure 10 a and b) และมี vesicles เป็นจำนวนมากใน filament-containing cell ชั้นบนสุด (Figure 8 d)

วิจารณ์

ผิวหนังชั้นนอกของปลาไม่เหมือนกับของสัตว์ครึ่งน้ำครึ่งบก นก และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ตรงที่ไม่มีการกลายเป็นแผ่นแข็ง – keratinization (Henrikson and Matoltsy, 1968a) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า filament-containing cell ที่อยู่ชั้นบนสุด จะมีรูปร่างแบน และมีสีคล้ำกว่าเซลล์ชั้นถัดไป ทั้งนี้อาจเนื่องจากการที่เซลล์มีรูปร่างแบน organelles จึงอยู่ใกล้ชิดกันมากกว่าปกติทำให้ดูทึบขึ้น อย่างไรก็ตามเซลล์ชั้นบนสุดนี้ยังทำหน้าที่ผลิตเมือก ซึ่งเป็นสาร mucopolysaccharide (Whitear, 1970) ออกคลุมตัวปลา การผลิตเมือกนี้จะเกิด vesicles ผ่านทางบริเวณ terminal web (Whitear, 1970; Mittal *et al.*, 1980) ด้วยเหตุนี้เองเมื่อปลาได้รับผลกระทบจากน้ำที่มีระดับ pH ต่ำ/สูง จึงทำให้ปรากฏมี vesicles มากกว่าปกติ ใน filament-containing cell ชั้นบนสุด (Figure 8 c and d)

เมือกปลานอกจากจะผลิตโดย filament-containing cell ชั้นบนสุดแล้ว ยังได้จาก goblet mucous cell ด้วย (Whitear, 1981) เซลล์ชนิดนี้จะมีจำนวนแตกต่างกันในปลาแต่ละชนิด และในแต่ละส่วนของตัวปลา โดยที่เซลล์ที่พร้อมจะปล่อย mucous droplets ออกไป จะเคลื่อนขึ้นไปอยู่ชั้นบน ๆ ของผิวหนังชั้นนอก (Henrikson and Matoltsy, 1968b) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่า mucous cell ในปลาดุกอุยที่อยู่ในน้ำที่มี pH 3.46–3.38 เคลื่อนขึ้นมาอยู่ใกล้เซลล์ชั้นบนสุดมากกว่าปกติ (Figure 1 b and 8 a) และปล่อย mucous droplets ออกไปเหมือนที่เกิดขึ้นใน Figure 4 a ทั้งนี้เมือกที่ได้จาก filament-containing cell จะช่วยในการป้องกันเชื้อโรคและพยาธิที่จะเจาะไชเข้าทำอันตรายต่อผิวหนัง เมือกที่ได้จาก mucous cell จะช่วยเสริมการหล่อลื่นเพิ่มขึ้น รวมทั้งช่วยในการป้องกันตัวทำให้โคลนในน้ำรอบ ๆ ตัวตกตะกอน (Whitear, 1970) นอกจากนี้ Fletcher and Grant (1969) ได้พบ antibodies ในเมือกของปลา plaice ด้วย

สำหรับการเปลี่ยนแปลงของ chloride cell ที่เกิดขึ้นจากการศึกษาครั้งนี้นั้นอธิบายว่า เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปแล้วและจากผลการศึกษาของ Bierther (1970) ที่ว่า เซลล์ชนิดนี้ทำหน้าที่เกี่ยวกับ osmoregulation ฉะนั้นการที่ branching tubules บวม หรือพองออก (Figure 9 a and b) แสดงถึงปฏิกิริยาของเซลล์ชนิดนี้ต่อคุณสมบัติของน้ำในขณะนั้น ทั้งนี้ Matthiessen and Brafield (1973) และ Shirai and Utida (1970) ได้เห็นพ้องกันว่าลักษณะภาพของ chloride cell ดังกล่าวนี้ คือ การมี secretory activities เพิ่มขึ้น

เมื่อขยายเวลาการทดลองให้ปลาอยู่ในน้ำที่ปรับค่า pH ยาวนานออกไปถึง 11 วัน พบ lipid droplet (Figure 8 f) และลักษณะผิดปกติ (Figure 8 g and h) ใน

filament-containing cell ที่อยู่ชั้นล่างของผิวหนังชั้นนอกนั้น อธิบายได้ว่า การที่ปลาอยู่ในระหว่างการทดลองเป็นเวลานานและไม่ได้รับอาหาร อาจจะปลดปล่อยอาหารที่เก็บไว้ออกมา ซึ่งได้แก่ lipid ทั้งนี้เมื่อมีการทดลองทำบาดแผลให้เกิดขึ้นใน cornea ของตากระต่าย (Blümcke, *et al.*, 1969) ในผิวหนังของปลา *Gasterosteus* (Phromsuthirak, 1977) ได้พบ lipid droplets ด้วยเช่นกัน ส่วนลักษณะที่ผิดปกตินั้นอาจจะเป็นการเริ่มกระบวนการตายของเซลล์เกิดขึ้น อย่างไรก็ตามทั้ง 2 กรณีนี้ กลับไม่พบในปลาที่อยู่ในน้ำระดับ pH ปกติ และไม่ได้รับอาหารในเวลานานเท่ากัน แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้ เป็นผลมาจากการที่ปลาต้องอยู่ในน้ำที่มี pH ต่ำ เป็นเวลานาน

Figure 10 a and b ตรวจพบ matrix ภายในไซโทพลาซึมของ club cell เมื่อปลาอยู่ในน้ำที่ pH สูง ความจริงเซลล์ชนิดนี้ไม่พบในปลาทุกชนิด เช่น Henrikson and Matoltsy (1968c) พบในผิวหนังชั้นนอกของปลา *Carassius auratus* (goldfish), *Corydoras aeneus* (catfish) และปลา *Anguilla* sp. (eel) แต่ไม่พบในปลา *Lebistes reticulatus* (guppy) Mittal and Munshi (1969) พบในผิวหนังชั้นนอกของ *Rita rita* (Bagridae) Whitear (1971) พบที่ผิวหนังชั้นนอกของกระพุ้งแก้มของ *Phoxinus* และ Carmignani and Zaccone (1974) พบในปลา *Malopterurus electricus* Lacép. (electric fish) ฉะนั้นเซลล์ชนิดนี้จึงมักจะพบในปลาที่ไม่มีเกล็ดหรือมีเกล็ดน้อย ดังที่พบอย่างเด่นชัดในปลาดุกอุย และปลาสวาย (Figure 1) และโดยทั่วไปเซลล์ชนิดนี้ถ้าพบจะมีเป็นจำนวนมาก อยู่บริเวณชั้นกลางของผิวหนังชั้นนอก มีขนาดใหญ่มาก มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 105 μm บางเซลล์มีขนาดถึง 210 μm (Mittal and Munshi, 1970) หรือมีความสูง 100 μm และกว้าง 35 μm (Whitear, 1981) มีนิวเคลียสอยู่ตรงกลางเซลล์ แต่การศึกษาครั้งนี้พบนิวเคลียส (Figure 6 c) บริเวณด้านล่างของเซลล์ ซึ่ง Phromsuthirak (1977) พบเช่นเดียวกันในปลา *Gasterosteus* (แต่ให้ชื่อว่า "clear cell") สำหรับหน้าที่ของ club cell ยังไม่แน่ชัด ถึงแม้ว่า Henrikson and Matoltsy (1968c) จะรายงานว่า ถ้าผิวหนังของปลาที่มี club cell เกิดแผลขึ้น club cell จะแตกออกสารที่บรรจุอยู่ภายในซึ่งเป็นสารกระตุ้นประสาท ทำให้ปลาอื่นตกใจหนีไป อย่างไรก็ดีในผิวหนังปกติของปลา Whitear (1981) ได้ชี้ว่า ยังไม่มีหลักฐานบ่งชี้ว่า มีสารอะไรที่ถูกขับออกจากไซโทพลาซึมของ club cell ได้ ในกรณีการศึกษาครั้งนี้เช่นเดียวกัน การพบสารอื่นในไซโทพลาซึมของ club cell จึงหาคำอธิบายไม่ได้ชัดเจน นอกจากสันนิษฐานว่า เซลล์ชนิดนี้สามารถที่จะ "engulf" เซลล์ตายแล้ว หรือสารแปลกปลอมอื่นได้ ส่วนหน้าที่ของ club cell นั้น น่าจะทำหน้าที่ยืดหยุ่นเพื่อป้องกันแรงกระแทกที่ผิวหนังได้เป็นอย่างดี

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ น้ำที่มี pH ต่ำหรือสูงกว่าปกติ ย่อมมีผลกระทบต่อผิวหนังชั้นนอกของปลาในกระบวนการพื้นฐานต่าง ๆ เช่น การเคลื่อนไหว, osmoregulation, กลไกการป้องกันตัวเอง และความต้านทานต่อเชื้อโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าปลาต้องอยู่ในน้ำที่มีคุณสมบัติไม่เหมาะสมดังกล่าวเป็นเวลานาน ทั้งนี้ความทนทานของปลาต่อ pH ขึ้นกับชนิด ขนาด อายุ และความแข็งแรงของปลาด้วย ผลกระทบดังกล่าวนี้มีต่อเนื่องไปถึง การสืบพันธุ์, การผิดปกติของกระดูก, การเจริญเติบโต รวมทั้งการเคลื่อนไหว (Ellgaard and Gilmore, 1984) ทำให้จำนวนชนิดของปลาลดลงในน้ำที่มี pH ค่อนข้างต่ำ และอาจจะพบปลาเพียงชนิดเดียวในน้ำ pH ต่ำกว่า 3.5 (Leuven and Oyen, 1987) สิ่งเหล่านี้จึงมีผลกระทบต่อองค์ประกอบของชนิดและปริมาณของประชากรปลาในแหล่งน้ำได้

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสภาวิจัยแห่งชาติ ที่ให้ทุนสนับสนุน

เอกสารอ้างอิง

ประมาณ พรหมสุทธิรักษ์. 2529. การศึกษาลักษณะชนิดของเม็ดเลือดขาวในปลาช่อน และปลาดุกด้าน. ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 20 : 318–332.

สุธรรม สิทธิชัยเกษม, ธีระ เล็กชลยุทธ และ จารุวรรณ สมศิริ. 2529. ผลกระทบของค่า pH ที่เป็นด่างต่อปลาน้ำจืด. รายงานการประชุมทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 24 สาขาประมง. น. 53–60.

Bierther, M. 1970. Die chloridzellen des stichlings. Z. Zellforsch. 107 : 421-446.

Blümcke, S., J. Rode and H.R. Niedorf. 1969. Formation of the basement membrane during regeneration of the corneal epithelium. Z. Zellforsch. 93 : 84-92.

Carmignani, M.P.A. and G. Zaccone. 1974. Histochemical investigations on the epidermis of the electric fish *Malopterurus electricus* Lacep. (Teleostei : Malopteruridae). Acta histochem. Bd. 48. S : 51-61.

Ellgaard, E.G. and J.Y. Gilmore. 1984. Effects of different acids on the blue gill sunfish, *Lepomis macrochirus* Rafinesque. J. Fish Biol. 25 : 133-137.

Fletcher, T.G. and P.T. Grant. 1969. Immunoglobulins in the serum and mucus of plaice *(Pleuronectes platessa)*. Biochem. J. 115 : 1-65.

Henrikson, R.C. and A.G. Matoltsy. 1968a. The fine structure of teleost epidermis. I Introduction and filament-containing cells. J. Ultrastruct. Res. 21 : 194-212.

Henrikson, R.C. and A.G. Matoltsy. 1968b. The fine structure of teleost epidermis. II. Mucous cells. J. Ultrastruct. Res. 21 : 213-221.

Henrikson, R.C. and A.G. Matoltsy. 1968c. The fine structure of teteost epidermis. III. Club cells and other cell types. J. Ultrastruct. Res. 21 : 222-232.

Hilden, M. and J.P. Hirvi. 1987. The survival of larval perch, *Perca fluviatilis* L., under different combinations of acidity and duration of acid conditions, analysed with a generalized linear model. J. Fish Biol. 30 : 667-677.

Leuven, R.S. E.W. and F.G.F. Oyen. 1987. Impact of acidification and eutrophication on the distribution of fish species in shallow and lentic soft waters of The Netherlands : An historical perspective. J. Fish Biol. 31 : 753-774.

Matthiessen P. and A.E. Brafield. 1973. The effects of dissolved zinc on the gills of the stickleback, *Gasterosteus aculeatus* (L.). J. Fish Biol. 5 : 607-613.

Mittal, A.K. and J.S.D. Munshi. 1969. Histochemical and autoradiographic studies of skin glands of *Rita rita* (Ham.) (Bagridae, Pisces). Microskopie. 24 : 193-205.

Mittal, A.K. and J.S.D. Munshi. 1970. On the origin and cytomorphosis of "Club Cells" in the skin of *Rita rita* (Ham.) (Bagridae, Pisces). Zeitschr. f. mikro.-anat. Forschung. 82 : 229-235.

Mittal, A.K., M. Whitear and S.K. Agarwal. 1980. The fine structure and histochemistry of the epidermis of the fish *Monopterus cuchia*. J. Zool., Lond. 191 : 107-125.

Parakkal, P.F. and N.J. Alexander. 1972. Keratinization : A survey of vertebrate epithelia. Academic Press. New York and London.

Phromsuthirak, P. 1977. Electron microscopy of wound healing in the skin of *Gasterosteus aculeatus*. J. Fish Biol. 11 : 193-206.

Reynolds, E. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17 : 208-212.

Shirai, N. and S. Utida. 1970. Development and degeneration of the chloride cell during sea-water and freshwater adaptation of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Z. Zellforsch. 103 : 247-264.

Whitear, M. 1970. The skin surface of bony fishes. J. Zool., Lond. 160 : 437-454.

Whitear, M. 1971. Cell specialization and sensory function in fish epidermis. J. Zool., Lond. 163 : 237-264.

Whitear, M. 1981. Secretion in the epidermis of polypteriform fish. Z. mikrosk.-anat. Forsch., Leipzig. 95s : 531-543.