



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

ปริญญา

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การเปรียบเทียบค่าบ่งชี้ความเครียดในปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.)

Comparison of Stress Indicators in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.)

นามผู้วิจัย นายภัทรารุช คำณูวัฒน์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รongศาสตราจารย์นันทวิทย์ อารีรักษ์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิริระงูมิ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พงศ์เชษฐ พิษิตกุล, Ph.D. Candidate)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รongศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การเปรียบเทียบค่าปัจจัยความเครียดในปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.)

Comparison of Stress Indicators in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.)

โดย

นายภัทรารุช คำณูณวัฒน์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภัทรารุช คำณวัฒน์ 2556: การเปรียบเทียบค่าบ่งชี้ความเครียดในปลานิล

(*Oreochromis niloticus* Linn.) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์นันทวิทย์ อารีรักษ์, Ph.D. 96 หน้า

การศึกษาเปรียบเทียบค่าบ่งชี้ความเครียดในปลานิล โดยการกระตุ้นให้เกิดความเครียด 2 ลักษณะ คือการเลียนแบบการขนส่งและการได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในการทดลองนี้ใช้ค่าบ่งชี้ความเครียด 3 ค่าคือ ปริมาณกลูโคสและ cortisol ในซีรัมและระดับการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) จากเหงือก การทดลองแรกจำลองการขนส่งโดยบรรจุปลานิลขนาดประมาณ 100 กรัมในถุงพลาสติกบรรจุน้ำ 5 ลิตร จำนวน 5, 10 และ 20 ตัวต่อถุง (คิดเป็นน้ำหนัก 100, 200 และ 400 กรัม/น้ำ 1 ลิตร) เป็นเวลา 6 ชั่วโมงแล้วนำไปเลี้ยงต่อบนบ่อซีเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ค่าบ่งชี้ความเครียดทั้ง 3 ที่ 0 (เมื่อขนส่งครบ 6 ชั่วโมง), 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมงหลังการขนส่ง พบว่าปริมาณกลูโคสในซีรัมของปลาทั้ง 3 ชุดการทดลองมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันคือ เพิ่มขึ้นเมื่อสิ้นสุดการขนส่ง 6 ชั่วโมง จากนั้นจะค่อย ๆ ลดลงจนมีค่าใกล้เคียงกับค่าก่อนทดลองเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง โดยปริมาณกลูโคสในซีรัมมีความสัมพันธ์กับระดับความเครียดระหว่างการทดลอง (จำนวนปลาที่บรรจุถุง) ระดับ cortisol ในซีรัมในทุกชุดการทดลองจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตั้งแต่สิ้นสุดการขนส่ง และยังคงสูงกว่าก่อนเริ่มการทดลองเมื่อครบ 24 ชั่วโมง ส่วนระดับการแสดงออกของยีน HSP70 พบว่าการแสดงออกสูงที่สุดเมื่อผ่านไป 6 ชั่วโมงหลังปล่อยลงเลี้ยง จากนั้นจะลดลงจนมีค่าใกล้เคียงกันทุกชุดการทดลองเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง การทดลองที่สองใช้การฉีดเชื้อ *S. agalactiae* เพื่อกระตุ้นให้ปลาเกิดความเครียด ที่ความเข้มข้น 10^6 และ 10^8 CFU/ml ส่วนชุดควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% แล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 7 วัน และวิเคราะห์ค่าบ่งชี้ความเครียดทั้ง 3 ที่ 12, 24, 48, 72 และ 168 ชั่วโมง พบว่าปริมาณกลูโคสในซีรัมมีการเปลี่ยนแปลงคล้ายกับการทดลองแรกซึ่งมีความสัมพันธ์กับระดับของความเครียด (ปริมาณเชื้อที่ฉีด) โดยปริมาณกลูโคสของปลาที่ฉีดด้วยแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 และ 12 ตามลำดับ จากนั้นจะค่อย ๆ ลดลง ส่วนปลาชุดควบคุมมีปริมาณกลูโคสในซีรัมค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง ปริมาณ cortisol ในซีรัมของปลาชุดการทดลองที่ได้รับเชื้อเพิ่มขึ้นสูงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 หลังจากนั้นจะลดลงและเพิ่มขึ้นแตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลอง ส่วนระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ในปลาที่ฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรียจะมีการแสดงออกต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมเมื่อเวลาผ่านไป 24, 48 และ 72 ชั่วโมงหลังการฉีดเชื้อ และแสดงออกสูงกว่าเมื่อเวลาผ่านไป 168 ชั่วโมง จากผลการทดลองดังกล่าวผู้วิจัยเสนอให้ใช้ปริมาณกลูโคสในซีรัมเป็นค่าบ่งชี้ความเครียดในปลานิลที่มีสาเหตุจากการขนส่งและการได้รับเชื้อแบคทีเรียชนิด *Streptococcus agalactiae* เนื่องจากปริมาณกลูโคสในซีรัมมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนและสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวข้องกับความเครียด รวมทั้งมีความสอดคล้องกับระดับของความเครียดมากกว่าระดับ cortisol ในซีรัมและการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70

Pattrawut Kumnoonwat 2013: Comparison of Stress Indicators in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.). Master of Science (Aquaculture), Major Field: Aquaculture, Department of Aquaculture. Thesis Advisor: Associate Professor Nontawith Areechon, Ph.D. 96 pages.

This study was conducted to compare 3 stress indicators including serum glucose, serum cortisol and heat shock protein 70 (HSP70) gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.). Tilapia, average weight of 100 g, were stress-induced by 6 hr transport simulation and experimentally infected with pathogenic bacteria, *Streptococcus agalactiae*. For the first experiment, fish were stress-induced by placing in polystyrene bag containing 5 L water holding 5, 10 and 20 fish per bag (equivalent to 100, 200 and 400 g/L) for 6 hr and released in the tank for 24 hr. Then, they were sampled at 0 (6 hr after transportation), 1, 6, 12 and 24 hr after stress induction. Serum glucose of all treatments showed similar pattern of change and appeared to be related with the degree of stress caused by different stocking densities. At 0 hr of sampling, serum glucose of all stocking densities reached peak level and then decreased to the initial level at 24 hr. Similar trend was found in cortisol level even though more fluctuations were observed. Cortisol of all groups increased right after transportation and stayed higher than initial level after 24 hr. Expression of HSP70 were highest at 6 hr in all densities and decreased to similar initial level at 24 hr. In the second experiment, tilapia were intraperitoneally injected with *S. agalactiae* at 10^6 and 10^8 CFU/ml and 0.85% NaCl injection was used for the control. Fish were sampled at 12, 24, 48, 72 and 168 hr. Similar finding was observed in which serum glucose of infected fish appeared to be related with the degree of stress caused by different bacterial concentration. At 24 and 12 hr of sampling, serum glucose of infected fish reached a peak level, respectively and decreased to the initial level at 168 hr. Serum cortisol of infected groups increased at 12 hr post-infection and fluctuated till the end of sampling period at 24 hr. Expression of HSP70 gene in infected groups were lower than control at 24, 48 and 72 hr but higher at 168 hr. The results of this study indicated that serum glucose was a reliable indicator of stress in Nile tilapia caused by transportation and bacterial infection due to the uniform change pattern of glucose in relationship with physiological condition after stress. Additionally, the serum glucose clearly showed a more positive correlation with the degree of stress when compared with the serum cortisol and HSP70 expression.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นนทวิทย์ อารีชัยน อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก อาจารย์ ดร. ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้
คำปรึกษาที่ดีเสมอมา ทั้งในด้านการเรียน การค้นคว้าวิจัยตลอดจนการแก้ไขตรวจทานวิทยานิพนธ์
ฉบับนี้จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เรืองวิชัย ยืนพันธ์ ที่ได้กรุณาเป็นประธานการสอบ
และ ดร. จิราพร เกษรจันทร์ ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคสัตว์น้ำ กรมประมง ที่ได้เป็นผู้ทรงคุณวุฒิในการ
สอบปากเปล่าขั้นสุดท้ายของข้าพเจ้า

ขอขอบคุณอาจารย์ผู้ควบคุมห้องปฏิบัติการสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัย รวมถึงเพื่อน พี่ น้องสมาชิกห้องปฏิบัติการจัดการ
สุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และเป็นกำลังใจใน
การทำวิทยานิพนธ์ให้แก่ข้าพเจ้าเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ทุกคนในครอบครัวที่ให้ความรัก ให้กำลังใจ
และให้การสนับสนุนในการศึกษาแก่ข้าพเจ้าจนสำเร็จลุล่วงด้วยดีตลอดมา

ภัทรารุช คำณูณวัฒน์

พฤษภาคม 2556

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	33
อุปกรณ์	33
วิธีการ	36
ผลและวิจารณ์	46
ผล	46
วิจารณ์	61
สรุป	76
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	78
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	96

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 Gene specific primers ของยีน Heat Shock Protein 70 สำหรับทำ Real - time PCR	40
2 ปริมาณกลูโคสในซีรัมของปลานิลหลังจากถูกกระตุ้นโดยการจำลองการขนส่งที่ความหนาแน่นต่าง ๆ กันเป็นเวลา 6 ชั่วโมง	47
3 ปริมาณ cortisol ในซีรัมของปลานิลหลังจากถูกกระตุ้นโดยการจำลองการขนส่งที่ความหนาแน่นต่าง ๆ กันเป็นเวลา 6 ชั่วโมง	49
4 ระดับการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ในปลานิลหลังจากถูกกระตุ้นโดยการจำลองการขนส่งด้วยความหนาแน่นต่าง ๆ กันเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และเลี้ยงต่อในสภาวะปกติเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	52
5 ปริมาณกลูโคสในซีรัมของปลานิลหลังจากถูกกระตุ้นด้วยการฉีดเชื้อ <i>Streptococcus agalactiae</i>	55
6 ปริมาณ cortisol ในซีรัมของปลานิลหลังจากถูกฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ <i>Streptococcus agalactiae</i>	57
7 ระดับการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ในปลานิลหลังจากฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรีย <i>Streptococcus agalactiae</i>	59

สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	หน้าที่ของ HSP70 ที่เป็น molecular chaperone โดยจะช่วยให้สายโปรตีนที่เพิ่งสร้างคงสภาพเพื่อให้โปรตีนขดตัวได้อย่างถูกต้อง	15
2	กลไกในการเพิ่มระดับของ Heat Shock Protein ในเซลล์ของคนและแมลงหวี่	16
3	สูตรโครงสร้างของฮอร์โมน cortisol	23
4	กลไกการควบคุมการหลั่งฮอร์โมน cortisol	24
5	ปริมาณกลูโคสในซีรัมของปลานิลที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียด โดยการจำลองการขนส่งด้วยความหนาแน่นต่าง ๆ กัน	48
6	ปริมาณ cortisol ในซีรัมของปลานิลที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียด โดยการจำลองการขนส่งด้วยความหนาแน่นต่าง ๆ กัน	50
7	ระดับการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ในปลานิลที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดโดยการจำลองการขนส่งด้วยความหนาแน่นต่าง ๆ กัน	53
8	ปริมาณกลูโคสในซีรัมของปลานิลที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียด โดยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย <i>Streptococcus agalactiae</i>	56
9	ปริมาณ cortisol ในซีรัมของปลานิลที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียด โดยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย <i>Streptococcus agalactiae</i>	58
10	ระดับการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ในปลานิลที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดโดยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย <i>Streptococcus agalactiae</i>	60

การเปรียบเทียบค่าบ่งชี้ความเครียดในปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.)

Comparison of Stress Indicators in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.)

คำนำ

ปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่มีการเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย ด้วยเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว ดำรงชีวิตอยู่ได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำกร่อย อีกทั้งยังเป็นปลาที่มีรสชาติดีสามารถนำมาประกอบอาหารได้หลากหลาย ธุรกิจการเลี้ยงปลานิลนั้น ใช้ระยะเวลาไม่นานก็สามารถมีผลผลิตออกสู่ตลาดได้ ตลอดจนปัจจุบันได้มีการพัฒนาระบบการเลี้ยงให้เลี้ยงได้หนาแน่นเพื่อเพิ่มผลผลิต อีกทั้งปลานิลยังเป็นที่นิยมของผู้บริโภค ทำให้เกษตรกรหันมาเลี้ยงปลานิลอย่างกว้างขวาง ปัจจุบันปริมาณผลผลิตปลานิลมีอยู่ประมาณ 200,000 ตัน มูลค่าประมาณ 7,900 ล้านบาท ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 40 ของปริมาณการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดทั้งหมดของประเทศไทย

ปัจจุบันมีการขยายตัวของ การเลี้ยงปลานิลเพิ่มมากขึ้น ทำให้ในบางครั้งการจัดการในเรื่องต่าง ๆ ของผู้เลี้ยงยังไม่ดีพอ ทำให้เกิดปัญหาต่าง ๆ ตามมาซึ่งสร้างความเสียหายต่อธุรกิจการเพาะเลี้ยงปลานิลเป็นอย่างมาก ซึ่งปัญหาที่มีความสำคัญในปัจจุบันก็คือการเกิดโรคระบาด โดยมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย ความเครียดที่เกิดขึ้นกับปลา ก็จัดเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญปัจจัยหนึ่ง ที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคระบาดขึ้นกับปลาได้ การขนส่งปลาและการเลี้ยงปลาด้วยความหนาแน่นสูง ล้วนแล้วแต่ส่งผลให้เกิดความเครียดขึ้นกับปลาได้ทั้งสิ้น โดยที่เมื่อปลาเกิดความเครียดก็จะมี การแสดงออกในหลายรูปแบบ ซึ่งค่าบ่งชี้ความเครียดในปลา ก็จะมีหลายลักษณะเช่นเดียวกัน

ปริมาณกลูโคส คอร์ติซอล cortisol และระดับการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein จัดเป็นค่าบ่งชี้ความเครียดของปลาที่มีความสำคัญ โดยมีรายงานการศึกษาจำนวนมากที่มีการใช้ กลูโคส และคอร์ติซอล cortisol เป็นดัชนีชี้วัดความเครียด อย่างไรก็ตามควรคำนึงด้วยว่ามีปัจจัยมากมายที่ส่งผลกระทบต่อการตอบสนองต่อความเครียด เมื่อพิจารณาว่าการตอบสนองในระดับ เซลล์ต่อสาเหตุที่ทำให้เกิดความเครียด การตอบสนองในระดับเซลล์ประกอบด้วย การเปลี่ยนแปลง โปรตีนบางชนิด เช่น การสังเคราะห์ Heat Shock Protein ซึ่งในสิ่งมีชีวิตที่ได้รับ ความเครียดพบว่ามี การผลิต Heat Shock Protein เพิ่มมากขึ้น

ด้วยมีสาเหตุของความเครียดหลายลักษณะที่เกิดขึ้นได้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น การขนส่ง การสัมผัสกับปลาเพื่อกิจกรรมบางอย่าง เช่น การฉีดฮอร์โมน หรือการให้วัคซีน และการเกิดโรค เป็นต้น ซึ่งสัตว์น้ำอาจมีการตอบสนองแตกต่างกันไป ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับการตอบสนองต่อความเครียดของสัตว์น้ำในประเทศไทยน้อยมาก ดังนั้นข้อมูลพื้นฐานเหล่านี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งเพื่อให้เกิดความเข้าใจถึงการปรับตัวทางสรีรของปลานิลต่อความเครียดลักษณะต่าง ๆ ซึ่งสามารถนำไปศึกษาต่อยอดในการจัดการสุขภาพของสัตว์น้ำต่อไป การวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นการเปรียบเทียบค่าบ่งชี้สภาพความเครียดของปลานิลจากการกระตุ้นให้เกิดความเครียดลักษณะต่าง ๆ เพื่อกำหนดค่าบ่งชี้ความเครียดที่น่าเชื่อถือ และนำไปใช้ในการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการสุขภาพปลานิลในการเพาะเลี้ยงต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบค่าบ่งชี้ความเครียด (stress indicators) ในปลานิลที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดโดยการจำลองการขนส่งที่ความหนาแน่นต่าง ๆ กัน
2. เพื่อเปรียบเทียบค่าบ่งชี้ความเครียด (stress indicators) ในปลานิลที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดโดยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae*
3. กำหนดค่าบ่งชี้ความเครียดในปลานิลที่มีความน่าเชื่อถือ และเหมาะสมกับสาเหตุของความเครียดลักษณะต่าง ๆ

การตรวจเอกสาร

ปลานิล

อนุกรมวิธานของปลานิล

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*, Linn.) เป็นปลาชนิดหนึ่งใน 16 ชนิดของครอบครัว Cichlidae มีรูปร่างและพฤติกรรมคล้ายคลึงกับปลาหมอเทศ (*Tilapia mossambica* Peters) หรือ Java tilapia โดยถิ่นฐานดั้งเดิมของปลาในครอบครัวนี้อยู่ในทวีปแอฟริกา พบทั่วไปตามหนอง บึง และทะเลสาบ ในประเทศซูดาน อุแกนดา แทนแกนยิกา เป็นต้น (ชาลยชัย, 2522) สำหรับประเทศไทย เจ้าฟ้าชายอาคิฮิโตะได้จัดส่งปลานิลจำนวน 50 ตัว มาทูลเกล้าฯ ถวายพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เมื่อปี พ.ศ. 2508 (สุปราณี, 2550) เนื่องจากปลานิลเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย ทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวจึงมอบหมายให้กรมประมงทำการเผยแพร่ และส่งเสริมให้มีการเลี้ยงปลานิลจนมีการเลี้ยงอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน

อนุกรมวิธานของปลานิล

Kingdom	Animalia
Phylum	Chordata
Class	Actinopterygii
Order	Perciformes
Family	Cichilidae
Genus	<i>Oreochromis</i>
Species	<i>niloticus</i>

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Oreochromis niloticus*

ลักษณะทั่วไปของปลานิล

ปลานิลมีลำตัวสั้น แบนข้าง ลักษณะพิเศษของปลานิลคือ ริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน ซึ่งปลานิลชนิดอื่น ๆ มักจะมีริมฝีปากบนสั้นกว่าริมฝีปากล่าง บริเวณแก้มมีเกล็ด 4 แถว สีของลำตัวเปลี่ยนไปตามสภาพแวดล้อมของแหล่งที่อยู่อาศัยคือตั้งแต่สีดำอ่อนจนถึงสีเขียวดำ ท้องสีขาว ที่ลำตัวมีลายพาดขวางประมาณ 9-10 แถบตั้งแต่หัวจรดโคนหาง แม้แต่ลูกปลาก็มีลายพาดขวางนี้เห็นชัดเจนไม่น้อยกว่า 7 แถบทั้งเพศผู้และเพศเมีย แต่เพศเมียสีจะจางกว่าเพศผู้มาก ครีบหลัง ครีบกันและครีบหางมีจุดสีขาวและเส้นสีดำตัดขวาง มีเกล็ด 3 แถวที่บริเวณแก้ม และอีก 1 แถวที่บริเวณเหนือเส้นข้างลำตัวเล็กน้อย ครีบหลังมีอันเดียวยาวจรดถึงคอดหาง ครีบหลังประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 15-18 อัน และก้านครีบอ่อน 12-14 อัน ครีบกันประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 3 อัน และก้านครีบอ่อน 9-10 อัน ครีบหางตัดตรง บนแถบเส้นข้างลำตัวมีเกล็ด 33 เกล็ด ทางด้านข้างมีเกล็ดตามแนวเฉียงจากตอนต้นของครีบหลังลงมาถึงเส้นข้างลำตัว 5 เกล็ด และจากเส้นข้างลำตัวลงมาถึงส่วนหน้าของครีบกัน 13 เกล็ด ตรงกลางเกล็ดมีสีเข้ม บริเวณปลายอ่อนของครีบหลัง ครีบกัน และครีบหางมีจุดสีขาวและเส้นสีดำตัดขวางคู่คล้ายลายข้าวตอกอยู่โดยทั่วไป ที่กระดูกแก้มมีจุดสีเข้มอยู่ 1 จุด ลักษณะพื้นบริเวณขากรรไกรและคอหอยจะมีหลายขนาด ตั้งแต่ค่อนข้างหยาบจนถึงละเอียด เหยือกมีซี่กรองประมาณ 15-17 อัน ปลานิลเมื่อมีอายุได้ประมาณ 3 เดือนเศษจะเริ่มมีลักษณะแตกต่างทางเพศ ปลานิลที่พบมีขนาดใหญ่ที่สุดมีน้ำหนักประมาณ 2.5 กิโลกรัม (อุดม, 2549)

ปลานิลมีนิสัยชอบอยู่รวมกันเป็นฝูง มีความอดทนและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ตามปกติรูปร่างภายนอกของปลานิลเพศผู้และเพศเมียจะมีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก แต่จะสังเกตเห็นลักษณะเพศได้โดยการดูอวัยวะเพศที่บริเวณใกล้กับช่องทวาร โดยเพศผู้จะมีอวัยวะเพศลักษณะเรียวยาวยื่นออกมา สำหรับเพศเมียมีลักษณะของอวัยวะเพศเป็นรูค่อนข้างใหญ่และกลม ขนาดปลาที่จะแยกเพศได้ชัดเจนต้องเป็นปลาที่มีขนาดยาวตั้งแต่ 10 เซนติเมตรขึ้นไป สำหรับปลาที่มีขนาดโตเต็มที่สามารถสังเกตเพศได้ด้วยการดูสีที่ลำตัว โดยสีบริเวณใต้หางและลำตัวของปลาเพศผู้จะมีสีเข้มกว่าปลาเพศเมีย เมื่อถึงฤดูผสมพันธุ์สีจะยิ่งเข้มขึ้น (สุปราณี, 2550)

ตามธรรมชาติแล้วปลานิลชอบอาศัยอยู่รวมกันเป็นฝูง (ยกเว้นเวลาสืบพันธุ์) ตามแม่น้ำ บึง ลำคลอง ทะเลสาบ ที่เป็นแหล่งน้ำจืด แต่สามารถนำไปเลี้ยงในบริเวณที่เป็นน้ำกร่อยได้ เนื่องจากมีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ดี สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในช่วงการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่กว้างมากคือตั้งแต่ 11-42 องศาเซลเซียส แต่ในอุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศา-

เซลเซียส พบว่าปลานิลปรับตัวและเจริญเติบโตได้ไม่คืนก ทั้งนี้เป็นเพราะถิ่นกำเนิดเดิมของปลาชนิดนี้อยู่ในเขตร้อน ส่วนความทนทานของปลานิลต่อความเป็นกรด - ด่างของน้ำ โดยเจริญเติบโตได้ดีในช่วง pH 6.5-8.5 ปลานิลจะเริ่มตายในน้ำที่มี pH 6.5-5.5 เฉลี่ย 10% และที่ pH 5.5-4.5 เฉลี่ย 70% และตายหมดที่ pH 4.5-3.5 นอกจากนี้ปลานิลยังมีความทนทานต่อความเค็มของน้ำ โดยอยู่ได้ปกติในน้ำที่มีความเค็มสูงสุด 20 ส่วนในพันส่วน ซึ่งนับว่าเป็นปลาที่เหมาะสมจะนำไปเลี้ยงในบ่อดินได้เป็นอย่างดี (อุดม, 2549)

การแพร่ขยายพันธุ์

ปลานิลสามารถแพร่พันธุ์ได้ตลอดปี โดยปกติวงจรการสืบพันธุ์วางไข่ของปลานิลจะใช้เวลาประมาณ 1 เดือน แต่อาจจะไม่เกิดขึ้นทุกเดือน ขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของแม่ปลาและสภาพแวดล้อม (ศิริ, 2542) เนื่องจากขนาด อายุและช่วงการสืบพันธุ์ของปลาแต่ละตัวจะแตกต่างกันไปตามสภาพแวดล้อม และสภาพทางสรีรวิทยาของปลาเอง โดยพบว่าปลานิลจะเริ่มมีพัฒนาการของไข่และน้ำเชื้อเมื่อมีความยาวประมาณ 6.5 เซนติเมตร

ในช่วงผสมพันธุ์วางไข่ ปลานิลเพศผู้จะแยกออกจากฝูงแล้วเริ่มสร้างรัง โดยเลือกบริเวณเชิงลาดหรือก้นบ่อที่มีระดับน้ำลึกระหว่าง 0.5-1 เมตร วิธีการสร้างรังก้นปลานิลจะปักหัวลงโดยตัวของมันจะอยู่ในระดับตั้งฉากกับพื้นดิน แล้วใช้ปากพร้อมกับการเคลื่อนไหวของลำตัวเขี่ยดินตะกอนออก จากนั้นจะอมดินตะกอนและจับเศษสิ่งของต่าง ๆ ออกไปที่ก้นบ่อ ทำเช่นนี้จนกว่าจะได้รังที่มีลักษณะค่อนข้างกลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20-25 เซนติเมตร ลึกประมาณ 3-6 เซนติเมตร ความกว้างและความลึกของรังที่ใช้วางไข่ขึ้นอยู่กับขนาดของพ่อปลา หลังจากสร้างรังเสร็จเรียบร้อยแล้ว มันจะไล่ปลาตัวอื่น ๆ ให้ออกไปนอกรัศมีของรังประมาณ 2-3 เมตร ขณะเดียวกันพ่อปลาที่สร้างรังจะแผ่ครีบทหลัง และอ้าปากกว้างในขณะที่มีปลาเพศเมียว่ายน้ำเข้ามาใกล้ ๆ รัง และเมื่อเลือกปลาเพศเมียได้ถูกใจแล้วจะแสดงอาการจับคู่กัน โดยใช้หางตีและกัดกันเบา ๆ การเคล้าเคลียดังกล่าวใช้เวลาไม่นานนัก ปลาเพศผู้จะใช้บริเวณหน้าผากคุดที่ได้ท้องของปลาเพศเมียเพื่อเป็นการกระตุ้นเร่งเร้าปลาเพศเมียให้วางไข่ ซึ่งปลาเพศเมียจะวางไข่ครั้งละ 10-15 ฟอง ปริมาณไข่ที่วางรวมกันแต่ละครั้งมีประมาณ 50-600 ฟอง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของแม่ปลา เมื่อปลาเพศเมียวางไข่แต่ละครั้ง ปลาเพศผู้จะว่ายน้ำไปเหนือไข่พร้อมกับปล่อยน้ำเชื้อลงไป จากนั้นปลาเพศเมียจะเก็บไข่ที่ได้รับการผสมแล้วไว้ในปาก ทำเช่นนี้จนกว่าการผสมพันธุ์แล้วเสร็จ โดยใช้เวลา 1-2

ชั่วโมง ปลาเพศเมียจะว่ายออกจากรังส่วนปลาเพศผู้จะคอยหาโอกาสเคล้าเคลียกับปลาเพศเมียตัวอื่นต่อไป

ไข่ที่ปลาเพศเมียอมไว้ในปากจะมีพัฒนาการขึ้นเป็นลำดับ ไข่ปลานิลเป็นประเภทไข่จม ไม่มีสารเหนียว มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.8-2.0 มิลลิเมตร ไข่แดงมีขนาดใหญ่ ไข่จะฟักเป็นตัวภายในเวลา 4 วัน ในน้ำที่อุณหภูมิ 27-28 องศาเซลเซียส ไข่ปลานิลจะพัฒนาเป็นปลานิลตัวอ่อน 5 ระยะ คือ

ระยะที่ 1 ไม่มีตา (Uneyed) ระยะนี้ไข่ยังคงเป็นสีเหลืองอ่อนตลอดทั้งฟอง ยังไม่มีพัฒนาการใด ๆ ให้เห็น

ระยะที่ 2 มีตา (Eyed) ไข่ยังคงมีสีเหลือง และมีจุดตาสีดำ

ระยะที่ 3 ก่อนฟักเป็นตัว (Pre-hatch) เป็นระยะที่ไข่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล มีการพัฒนาจนสังเกตเห็นส่วนตาและหางชัดเจน

ระยะที่ 4 ฟักเป็นตัวอ่อน (Hatch fry หรือ Yolk sac fry) เป็นระยะที่ลูกปลาฟักออกเป็นตัว และยังมี ไข่แดงติดอยู่

ระยะที่ 5 ตัวอ่อนที่ว่ายน้ำ (Swim-up fry) เป็นระยะที่ไข่แดงยุบและลูกปลาสามารถว่ายน้ำได้

แม่ปลาฟักไข่ในปากโดยการขยับปากให้น้ำไหลเข้าออกในช่องปากอยู่เสมอ เพื่อช่วยให้ไข่ที่อมไว้ได้รับน้ำที่สะอาดทั้งยังเป็นการป้องกันศัตรูที่จะมากินไข่ด้วย

ไข่จะพัฒนาเป็นลูกปลาที่ถึงอาหารยังไม่ยุบภายใน 8 วัน ลูกปลานิลจะเกาะรวมกันเป็นกลุ่มโดยว่ายวนเวียนอยู่บริเวณหัวของแม่ปลาและเข้าไปหลบซ่อนอยู่ในช่องปากเมื่อมีภัย เมื่อมีอายุครบ 13-14 วัน นับจากวันที่แม่ปลาวางไข่ ลูกปลานิลจะเริ่มกินอาหารจำพวกพืช และไรน้ำขนาดเล็ก หลังจากมีอายุ 3 สัปดาห์ขึ้นไป ลูกปลาจะกระจ่ายแตกฝูงไปหากินเลี้ยงตัวเองได้โดยลำพัง (สุปราณี, 2550)

อาหารและการกินอาหาร

นิสัยการกินอาหารของปลานิลสามารถกินได้ทั้งสัตว์และพืช รวมทั้งซากที่เน่าเปื่อย ปลา นิลกินซากพืช สาหร่าย โรติเฟออร์ สัตว์หน้าดิน และแพลงก์ตอนสัตว์ เช่น ตัวอ่อนของแมลงน้ำและ ไรน้ำ กินอาหารตั้งแต่ระดับผิวน้ำไปถึงพื้นท้องน้ำ นอกจากนี้ยังสามารถฝึกให้ปลานิลกิน อาหารเม็ด หรืออาหารผสมและเศษอาหารได้ง่าย (อุคม, 2549) การเลี้ยงปลานิลในบ่อนั้นนิยมให้ อาหารจำพวก รำ เศษอาหาร พืชจำพวกแห่น รวมทั้งมูลสัตว์และปุ๋ยวิทยาศาสตร์ เป็นต้น ต่อมาได้มี การปรับปรุงคุณภาพของอาหารปลานิลโดยเน้นรายละเอียดเกี่ยวกับปริมาณโปรตีนในอาหารผสม ให้ได้ระดับที่ต้องการเพื่อช่วยให้ปลาโตเร็วขึ้นและใช้ส่วนผสมของรำ ปลายข้าว กากถั่วเหลือง ใบ กระถินแห้ง ปลาป่น เกลือแร่และวิตามิน เป็นต้น (ชาญชัย, 2522)

ความเครียด

ความเครียด (stress) คือ สภาวะที่ร่างกายถูกกดดันหรือถูกคุกคามโดยปัจจัยหรือสิ่งกระตุ้น ทั้งทางด้านกายภาพ ทางด้านจิตใจ หรือการรบกวนสภาวะปกติของร่างกาย (Von Borell, 2001) ทำให้ร่างกายจำเป็นต้องมีการปรับตัวเพื่อรักษาการทรงสภาพปกติในร่างกาย (Squires, 2003) เมื่อเกิด ความเครียดร่างกายจะตอบสนองโดยการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยาและการเปลี่ยนแปลง ทางด้านพฤติกรรม (Von Borell, 2001) สภาวะที่สัตว์มีความเครียดจะส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Bilandžić *et al.*, 2005) การเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ (Squires, 2003) ซึ่งมักจะ เชื่อมโยงกับสวัสดิภาพสัตว์ (Abeni *et al.*, 2005) โดยสถานการณ์และสภาพแวดล้อมที่ก่อให้เกิด ความเครียดน้อยทำให้สัตว์มีความเป็นอยู่ดี (well-being) เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การเลี้ยงสัตว์มี ผลผลิตที่ดี (Stull, 1993)

การทรงสภาพปกติในร่างกาย หมายถึง กระบวนการร่วมต่าง ๆ ที่ทำให้ร่างกายรักษา องค์กรประกอบภายในไว้ในระดับค่อนข้างคงที่ได้ (นทีทิพย์, 2538) ซึ่งความต้องการภายในร่างกาย เพื่อรักษาสภาพปกตินี้บ่งบอกถึงการตอบสนองของร่างกาย Cannon (1914) และ Selye (1946) เป็น ผู้ให้คำอธิบายเกี่ยวกับความเครียด โดย Cannon (1914) อธิบายแนวความคิดในการตอบสนองต่อ ความเครียดแบบถอยหนีหรือต่อสู้ (flight or fight) เป็นการตอบสนองของระบบประสาทอัตโนมัติ sympathetic และต่อมหมวกไต (sympatho - adrenal) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของการตอบสนองต่อ ความเครียดที่เกิดขึ้นในทันทีทันใด โดยการทำงานของประสาทใน hypothalamus ทำให้หลัง

ฮอร์โมน epinephrine จากต่อมหมวกไตส่วนใน (adrenal medulla) เข้าสู่ระบบไหลเวียนมากขึ้น อัตราการเต้นของหัวใจ ระดับกลูโคส และความดันเพิ่มขึ้น การไหลเวียนของเลือดจากอวัยวะที่ไม่จำเป็นต้องใช้พลังงานในเวลานั้น เช่น การสืบพันธุ์และการย่อยอาหาร ไปสู่หัวใจและกล้ามเนื้อ เพื่อให้สัตว์สามารถตอบสนองโดยการถอยหนีหรือต่อสู้ Cannon (1932) กล่าวว่าอาการทรึงสภาพปกติของร่างกายนั้นมีขึ้นตอนที่ซับซ้อนเพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้

Selye (1946) อธิบายการตอบสนองต่อความเครียดโดยการทำงานของแกน hypothalamus ต่อมใต้สมอง และต่อมหมวกไต (hypothalamic-pituitary-adrenal axis; HPA) โดยจำแนกการตอบสนองต่อความเครียดเป็น 3 ระยะ คือ

1. The alarm reaction เป็นระยะที่ปลารับรู้ถึงความผิดปกติ หรือการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น เช่น การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ การได้รับบาดเจ็บและการติดเชื้อ เป็นต้น
2. The stage of resistance เป็นระยะที่ปลาตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม หรือการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น โดยการพยายามปรับร่างกายให้เข้าสู่ภาวะปกติหรือภาวะสมดุล
3. The stage of exhaustion เป็นระยะที่ปลาไม่สามารถปรับร่างกายให้เข้าสู่ภาวะปกติได้ มีผลทำให้ปลาอ่อนแอ เนื่องจากการสูญเสียพลังงานอย่างมาก รวมทั้งการสูญเสียสมดุลของอวัยวะในร่างกายอีกด้วย

การตอบสนองของร่างกายต่อความเครียด

ในการตอบสนองต่อความเครียดนั้น ระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian) มีการตอบสนองทางสรีรวิทยาและพฤติกรรม ในการตอบสนองทางด้านสรีรวิทยาเป็นการทำงานของแกน hypothalamus ต่อมใต้สมอง ต่อมหมวกไต และแกน sympathetic adrenal medullar (Squires, 2003) เพื่อการปรับตัวและการทรึงสภาพปกติในร่างกาย

สาเหตุและประเภทของความเครียด

สาเหตุที่ก่อความเครียด (stressor หรือ stress factor) ได้แก่ สิ่งกระตุ้นที่รบกวนต่อการทรงสภาพปกติของร่างกาย (Squires, 2003) ซึ่งสามารถแบ่งเป็น

1. สาเหตุที่ก่อความเครียดจากภายนอกในร่างกาย (external stressor) ได้แก่ ปัจจัยกีดกันทางสังคม (social stressor) เช่น ปฏิกริยาระหว่างสัตว์ต่อสัตว์ในกลุ่มเดียวกันหรือต่างฝูง (González *et al.*, 2003) หรือสภาพความเป็นอยู่อย่างโดดเดี่ยวของสัตว์ (Raussi, 2005) ปัจจัยกีดกันทางสภาพแวดล้อม (environmental stressor) เช่น อุณหภูมิอากาศ ความชื้น (Abilay *et al.*, 1975) และสภาพที่อยู่อาศัย (Tripaldi *et al.*, 2004) เป็นต้น และปัจจัยกีดกันจากคน (human stressor) เช่น การกระทำของคนต่อสัตว์อย่างไม่เหมาะสม (Munksgaard and Simonsen, 1996) การจัดการระบบการเลี้ยงที่ไม่สอดคล้องกับความต้องการตามธรรมชาติของสัตว์ (Maillard *et al.*, 2003) และการเคลื่อนย้ายสัตว์ (Lay *et al.*, 1996) เป็นต้น

2. สาเหตุที่ก่อความเครียดจากภายในร่างกาย (internal stressor) ได้แก่ ปัจจัยกีดกันทางด้านชีวภาพ (biological stressor) เช่น การบาดเจ็บ (Molony and Kent, 1996) การเป็นโรค (Walker *et al.*, 2008) หรือการติดเชื้อ (Nakao and Grunert, 1990) และปัจจัยทางโภชนาการ (nutritional stressor) เช่น การขาดอาหาร หรือน้ำ และการขาดสมดุลอาหาร (Mills and Jenny, 1979)

ความเครียดในปลา

ความเครียดที่เกิดขึ้นในปลากระดูกแข็งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน cortisol โดยตรง ภาวะความเครียดมีผลโดยตรงต่อการรอดตาย ระบบภูมิคุ้มกัน การเจริญเติบโต การรักษาสสมดุลเกลือแร่ในปลา ตลอดจนการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ โดย cortisol จะมีผลต่อการเพิ่มระดับกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือด เพื่อสลายเป็นพลังงานในการลดภาวะเครียด และมีผลต่อเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต และจะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ Gluconeogenesis ที่จะเปลี่ยนโปรตีนให้เป็นกลูโคสที่ตับ และยังมีผลต่อการลดการสังเคราะห์โปรตีนในเนื้อเยื่อต่าง ๆ รวมทั้งยังเพิ่มการสลายโปรตีน เพื่อนำไปเป็นพลังงาน นอกจากนี้ cortisol ยังมีผลต่อเมตาบอลิซึมของไขมัน โดยไปลดการสังเคราะห์ไขมันจากคาร์โบไฮเดรต และทำให้มีการสลายเอกรดไขมันอิสระออกจากกล้ามเนื้อ ทำให้มีกรดไขมันอิสระในเลือดเพิ่มสูงขึ้นและถูกนำไปใช้เป็นพลังงานแทนกลูโคส ซึ่งจะช่วยในการ

สลายกรดไขมันมาใช้เป็นพลังงานฉุกเฉิน การหลั่งของ cortisol อาศัยการควบคุมจากระบบประสาท โดยที่ภาวะเครียดต่าง ๆ มีผลต่อศูนย์ประสาทในสมอง กระตุ้นให้หลั่งฮอร์โมน cortisol และจะส่งผลให้เกิดเมตาบอลิซึมภายในร่างกายเพื่อลดความเครียด

Mazeaud *et al.* (1977) แบ่งขั้นตอนการตอบสนองต่อความเครียดของสัตว์น้ำได้ 3 ขั้นตอน ได้แก่

1. Primary effect เป็นการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนในร่างกาย เมื่อร่างกายได้รับสิ่งกระตุ้นที่ก่อให้เกิดความเครียด ร่างกายจะมีการตอบสนองโดยการหลั่งสาร catecholamine และ corticosteroid ใน พลาสมา รวมถึงปริมาณของ adrenaline และ noradrenaline หลังจากนั้น 2-3 นาที จะเกิดอาการขาดออกซิเจนในเลือด มีอาการกระวนกระวาย ซึ่งพบได้ในปลาปากกลม ปลากระดุกอ่อนและปลากระดุกแข็ง

ระดับของ adrenaline หรือ noradrenaline จะขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์น้ำ เช่น ในปลาคาร์พ (*Cyprinus carpio*) จะพบ noradrenaline สูงสุดเมื่อร่างกายมีบาดแผล และเมื่อปลาถูกย้ายจากน้ำเย็นไปอยู่ในน้ำอุ่น เช่นเดียวกัน หากปลาคาร์พเกิดอาการเครียดจะพบการไหลเวียนของ corticosteroid ในเลือดสูงขึ้น รวมถึงในปลากลุ่ม salmonid และปลาทอง (*Carassius auratus*) ส่วนในปลากลุ่ม Pacific salmon จะพบ catecholamine ในเลือด

2. Secondary effect เป็นการเปลี่ยนแปลงของสรีระ เพื่อตอบสนองกับปริมาณของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้นในร่างกาย โดยจะมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น มีการสลายไกลโคเจน (glycogen) ที่ตับ ทำให้มีระดับกลูโคสในเลือดสูง มีการสลายไขมันในร่างกาย และมีผลต่อระบบสมดุล เกลือแร่ในร่างกาย นอกจากนี้ corticosteroid ยังมีผลต่อการกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (immunosuppression) ทำให้ปลาอ่อนแอ เกิดการติดเชื้อได้ง่าย

3. Tertiary effect เป็นการเปลี่ยนแปลงของร่างกายที่เป็นผลจาก Secondary effect เช่น เกิดการตายของเนื้อเยื่อ หรือร่างกายอ่อนแอจนเกิดการติดเชื้อ

Tertiary effect ที่มีความสัมพันธ์กับการเลี้ยงสัตว์น้ำ คือ ทำให้ความต้านทานโรคของสัตว์น้ำลดลง และมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน เมื่อระดับของ cortisol ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่พบเป็นส่วนใหญ่

ของ corticosteroid เพิ่มขึ้น (Pickering, 1989) โดยมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลากระดูกแข็ง ทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาวลดลง (Pickering and Pottinger, 1987) มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non - specific immune responses) คือ ยับยั้งกิจกรรม respiratory burst (Stave and Robertson, 1985) ยับยั้งกระบวนการ phagocytosis (Ainsworth *et al.*, 1991) ทำให้การเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวช้าลง เมื่อมีการฉีด cortisol เข้าสู่ร่างกาย (MacArthur and Fletcher, 1985) นอกจากนี้ cortisol ยังมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง (specific immune responses) โดยการสร้างแอนติบอดีของร่างกายจะลดลงเมื่อปลาอยู่ในภาวะเกิดความเครียด (Ellsaesser and Clem, 1986) ผลกระทบจากการยับยั้งการทำงานของเม็ดเลือดขาว จะมีผลต่อการให้วัคซีนแก่ปลา (Houghton and Matthews, 1986)

โดยปกติแล้วการเกิดความเครียดกับสัตว์น้ำในกระบวนการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้นสามารถเกิดขึ้นได้ตลอดเวลา เช่น การจับปลา การคัดแยกปลา การชั่งวัดปลา การเคลื่อนย้ายปลา การรักษาโรค รวมทั้งการขนส่งปลา กิจกรรมเหล่านี้ล้วนแต่สามารถกระตุ้นให้ปลานั้นเกิดความเครียดได้ทั้งสิ้น นอกจากนี้ความเครียดยังสามารถเกิดขึ้นได้เมื่อปลาอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น การเสื่อมของคุณภาพน้ำ และความหนาแน่นที่มากจนเกินไปของปลาในพื้นที่เลี้ยง รวมทั้งการที่ปลาได้รับเชื้อโรค เช่น ปรสิตร แบคทีเรีย และไวรัส ก็เป็นที่มาของการเกิดความเครียดได้เช่นกัน แต่ทั้งนี้การติดเชื้อโรสดังกล่าวมักเกิดขึ้นหลังจากที่ปลาได้รับความเครียดจากการกระทำต่าง ๆ รวมไปถึงสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ส่งผลให้ร่างกายของปลาอ่อนแอ เชื้อโรคต่าง ๆ จึงสามารถเข้าสู่ร่างกายของปลาได้ง่ายขึ้น (Harmon, 2009; Wedemeyer, 1996)

ในระบบการเลี้ยงแบบหนาแน่นนั้นจะมีผลทำให้ปลาเกิดความเครียดเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากการเลี้ยงในลักษณะนี้จะทำให้คุณภาพของน้ำเสื่อมลงอย่างรวดเร็ว ประกอบกับสภาพที่มีความหนาแน่นสูงในระบบการเลี้ยงจึงทำให้ปลาเกิดความเครียดเกิดขึ้นได้มากกว่าการเลี้ยงในแบบอื่น ซึ่งความเครียดที่เกิดขึ้นนั้นสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งแบบเรื้อรังและแบบเฉียบพลัน (Wedemeyer, 1997)

สำหรับความเครียดที่เกิดขึ้นจากการขนส่งนั้นมักจะเกิดจากการกระตุ้นโดยขั้นตอนของการจับและบรรจุปลาลงในภาชนะที่ใช้ในการขนส่ง ทั้งนี้ในระหว่างการขนส่งความเครียดที่เกิดขึ้นจะมาจาก การเสื่อมลงของคุณภาพน้ำเนื่องจากปลามีการหายใจและปล่อยของเสียออกมาทำให้

ปริมาณก๊าซออกซิเจนในน้ำลดลง และจะมีปริมาณแอมโมเนียซึ่งมีความเป็นพิษต่อปลาเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลทำให้ปลาเกิดความเครียดได้ในระหว่างการขนส่ง (Harmon, 2009)

การวัดการตอบสนองต่อความเครียด

การวัดการตอบสนองต่อความเครียดนั้นเป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของสัตว์น้ำ (Mason, 1975) โดยการเปรียบเทียบการตอบสนองในสภาวะปกติต่อสิ่งกระตุ้นหลาย ๆ แบบ ซึ่งสามารถวัดได้จาก

1. การเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนที่ก่อให้เกิดความเครียด ได้แก่ ฮอร์โมน catecholamine และ corticosteroid ซึ่งสามารถวัดในรูปของฮอร์โมน cortisol และ cortisone (Donalson, 1981) adrenalin และ noradrenalin (Mazeaud and Mazeaud, 1981) นอกจากนี้ยังสามารถวัดปริมาณฮอร์โมน adenocorticotropic (ACTH) ที่หลั่งมาจาก adenohipophysis ซึ่งเป็นตัวกระตุ้น hypothalamus ให้หลั่งฮอร์โมนที่ก่อให้เกิดความเครียดออกมา (Mason, 1975)

2. การเปลี่ยนแปลงในทางสรีรวิทยาของสัตว์น้ำ ได้แก่

- การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของเลือด เช่น ภาวะการเกิด hyperglycemia, hyperlacticemia, hypochloremia, leucopenia และการแข็งตัวของเลือดซ้ำ (Mason, 1975)

- การเปลี่ยนแปลงในระดับของเนื้อเยื่อ เช่น ปริมาณไกลโคเจนในตับลดลงและปริมาณวิตามินซีในไตลดลง (Mason, 1975)

- การเปลี่ยนแปลงของ metabolic ต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น สมดุลของไนโตรเจน และความต้องการออกซิเจนเพิ่มขึ้น รวมถึงการเปลี่ยนแปลงระดับฮีโมโกลบินในเลือด (Mason, 1975)

3. การเปลี่ยนแปลงที่เกิดกับพฤติกรรมของสัตว์น้ำ เช่น การเจริญเติบโต การพัฒนารูปร่าง ความสามารถในการสืบพันธุ์ลดลง และความต้านทานโรคลดลง ตลอดจนอัตราการรอดตาย (Mason, 1975)

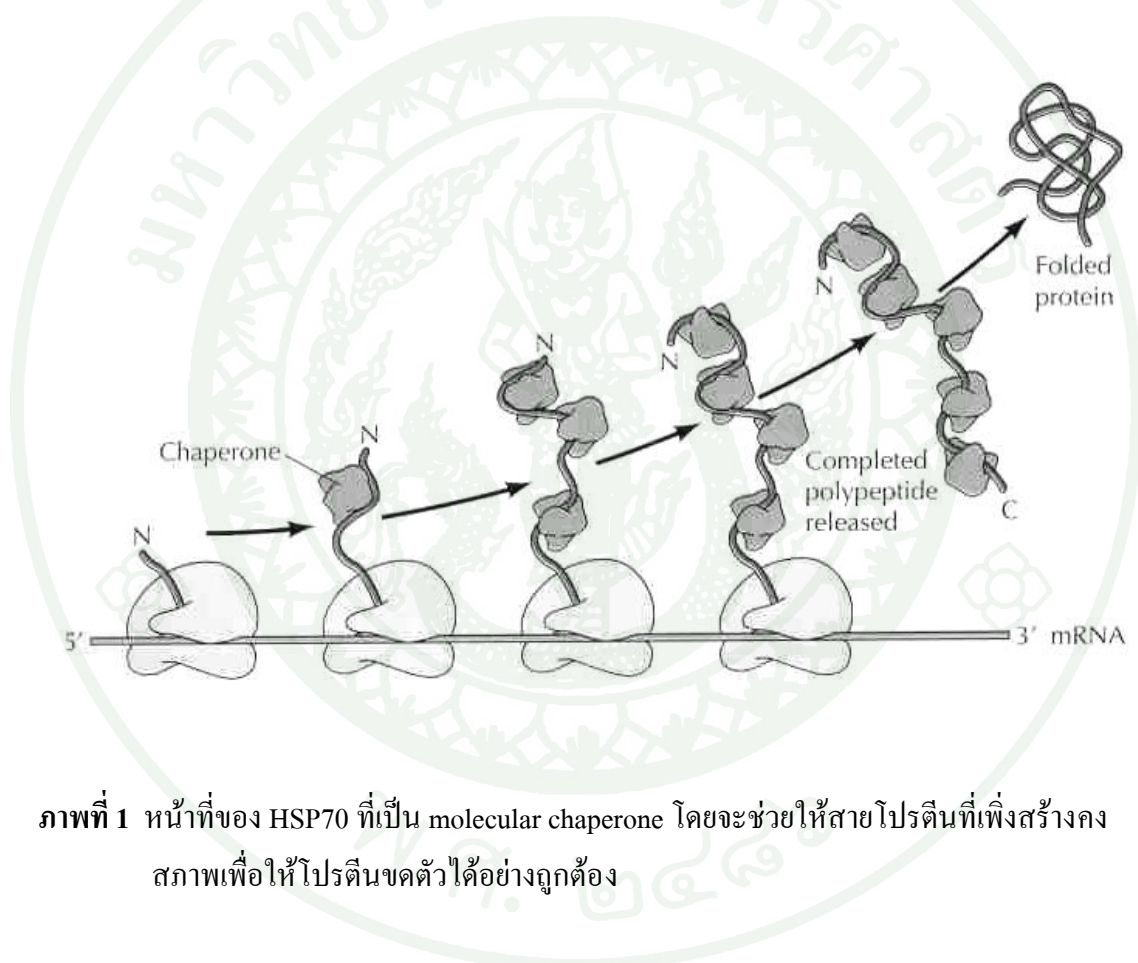
Heat Shock Protein

Heat Shock Protein (HSP) เป็นโปรตีนกลุ่มหนึ่งที่ถูกระตุ้นให้มีการสร้างเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อน รายงานฉบับแรกของการค้นพบ Heat Shock Protein โดย Ritossa (1962) พบว่า เซลล์ต่อมน้ำลายของแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) เมื่อได้รับอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และนำกลับมาอุณหภูมิปกติที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 70 และ 26 กิโลดาลตันเพิ่มมากขึ้นและต่อมาพบในสิ่งมีชีวิตทั้ง จุลินทรีย์ พืชและสัตว์ (Taiz and Zeiger, 1998) ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ต่อมาได้ถูกเรียกว่า Heat Shock Protein

Heat Shock Protein จะช่วยให้สิ่งมีชีวิตสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในอุณหภูมิแวดล้อมที่สูงขึ้นจากปกติ (Lindquist and Craig, 1988) สามารถพบได้ทั้งใน prokaryotes และ eukaryotes ซึ่งจะมีโครงสร้างที่อนุรักษ์มาก และจะถูกกระตุ้นให้แสดงออกมากในเซลล์ที่ได้รับความเครียดเนื่องจากความร้อน ซึ่งนอกจากความร้อนแล้ว โลหะหนัก การติดเชื้อเนื่องจากจุลินทรีย์ สารปฏิชีวนะ และฮอร์โมนต่าง ๆ ยังสามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของ Heat Shock Protein ได้อีกด้วย (Kiang and Tsokos, 1998)

ปัจจุบันพบว่ามี Heat Shock Protein หลายกลุ่มย่อย โดยใช้น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเป็นเกณฑ์ในการแบ่ง คือ HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40, HSP10 และ small HSP families (Vierling, 1991) ในเซลล์ที่ไม่ได้รับความเครียด โปรตีนเหล่านี้จะมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่าง ๆ ในเซลล์ตลอดเวลา โดย HSP90 จะถูกระตุ้นโดยส่วนประกอบต่าง ๆ ของ cytoskeleton และพวก steroid hormone receptor (Young *et al.*, 2001) HSP70 จะเป็นตัวช่วยให้สายโพลีเปปไทด์ขดตัว (folding) และเป็นตัวกลางในการซ่อมแซมและการย่อยสลายโปรตีนที่เสียสภาพไปของเซลล์ (Kiang and Tsokos, 1998) ส่วน HSP พวกที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ๆ จะมีหน้าที่แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ ซึ่งจะไม่เหมือนกับ Heat Shock Protein ชนิดอื่น ๆ เพราะโปรตีนเหล่านี้ยังไม่ทราบหน้าที่ปกติในเซลล์ที่ไม่ได้รับความเครียด และจะถูกกระตุ้นให้แสดงออกในเฉพาะกรณีเกิดความเครียดขึ้นเท่านั้น (Ciocca *et al.*, 1993) Heat Shock Protein ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับกระบวนการช่วยม้วนพับสายโพลีเปปไทด์ให้กลายเป็นโมเลกุลโปรตีนที่ถูกต้องและสมบูรณ์ เรียกโปรตีนที่มีหน้าที่นี้ว่า molecular chaperone การทำงานของ molecular chaperone ในการช่วยม้วนพับสายโพลีเปปไทด์ในเซลล์ในสภาวะปกติเกิดขึ้นได้ทั้งกระบวนการ translation

(ภาพที่ 1) และกระบวนการเคลื่อนย้ายโมเลกุลโปรตีนผ่าน membrane เข้าสู่ organelle ต่าง ๆ ของเซลล์ นอกจากนี้ molecular chaperone ยังเกี่ยวข้องกับการช่วยม้วนพับโมเลกุลโปรตีนที่เสียสภาพ และคลายตัวเมื่อเซลล์ได้รับภาวะร้อน ซึ่งคาดว่าโปรตีนที่มีการสร้างเพิ่มขึ้นนี้ถูกกระตุ้นด้วยความร้อนมีการตอบสนองแบบชั่วคราว (transient expression) และถึงแม้ว่า Heat Shock Protein ถูกพบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนแต่ก็มีรายงานว่า Heat Shock Protein แต่ละชนิดมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยปัจจัยทางกายภาพอื่น ๆ หรือสารเคมีบางชนิด (Morimoto *et al.*, 1994)

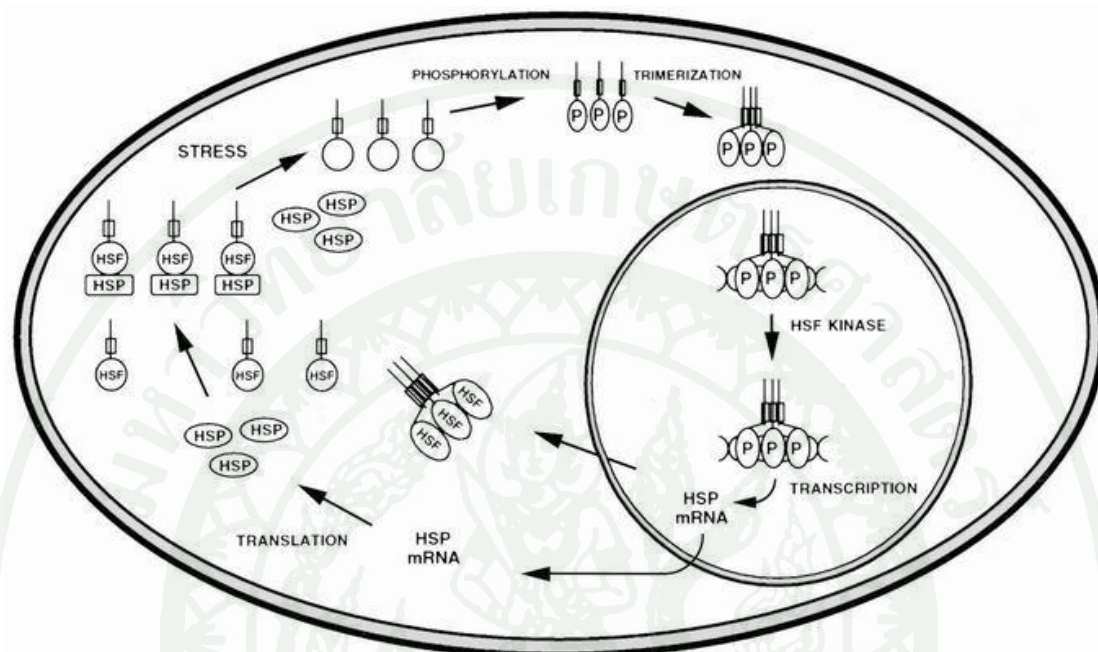


ภาพที่ 1 หน้าที่ของ HSP70 ที่เป็น molecular chaperone โดยจะช่วยให้สายโปรตีนที่เพิ่งสร้างลงสภาพเพื่อให้โปรตีนขดตัวได้อย่างถูกต้อง

ที่มา: Cooper (2000)

ในสภาวะปกติ Heat Shock Protein จะรวมตัวอยู่กับ Heat Shock Factor (HSF) แต่เมื่อเซลล์เกิดสภาวะเครียด หรือเกิด heat shock ขึ้น HSF จะแยกตัวออกจาก Heat Shock Protein แล้ว HSF จะถูกเติมด้วยหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) และรวมตัวกันเป็นไตรเมอร์ (trimer) จากนั้นจะเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียส และจับกับ heat shock element (HSE) ซึ่งเป็นส่วน promotor ของยีน Heat

Shock Protein ทำให้เกิดกระบวนการ transcription และ translation เป็น Heat Shock Protein ออกมาทำหน้าที่ต่าง ๆ ภายในเซลล์ตามลำดับ (Kiang and Tsokos, 1998) ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 กลไกในการเพิ่มระดับของ Heat Shock Protein ในเซลล์ของคนและแมลงหวี่

ที่มา: Kiang and Tsokos (1998)

กลไกในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของ Heat Shock Protein ยังไม่ชัดเจนนัก ซึ่งการควบคุมการแสดงออกของ Heat Shock Protein ส่วนใหญ่จะศึกษาในระดับของกระบวนการ transcription (Nover, 1991) การ characterize ยีน Heat Shock Protein และการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน promoter ของยีนจากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ทำให้สามารถจำแนก HSE ได้ ซึ่งโดยทั่วไปจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ คือ CNGGAANNTTCNNG (Bienz and Pelham, 1987) รวมถึงการชักนำให้สร้าง Heat Shock Protein เกิดจากการรวมตัวกันของ HSF กับ HSE ในส่วน upstream ของยีน Heat Shock Protein (Morimoto *et al.*, 1992) ซึ่งโดยปกติทั่วไปยีน Heat Shock Protein จะไม่มี intron อยู่เลย มีผลทำให้ mRNA ถูก translate ไปเป็น โปรตีนได้อย่างรวดเร็วภายในเวลาไม่กี่นาทีหลังจากเซลล์ได้รับความเครียด (Basu *et al.*, 2002)

Heat Shock Protein70 (HSP70)

เมื่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้รับอุณหภูมิที่สูงขึ้นเซลล์จะมีการแสดงออกของ HSP70 ซัดเจนมากซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีโครงสร้างของลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์มาก (Highly conserve) ทำหน้าที่สำคัญในการปกป้องเซลล์โดยจะรวมตัวกับโปรตีนที่สูญเสียสภาพ และจะทำให้โปรตีนเหล่านั้นขดตัวใหม่ (refolding) ให้สามารถกลับไปทำหน้าที่ดังเดิมได้ (Morimoto *et al.*, 1994) ปกติในเซลล์ที่ไม่ได้รับความเครียด HSP70 จะทำหน้าที่เป็น molecular chaperone หรือโปรตีนที่ช่วยโปรตีนอื่น ๆ ในการขดตัว โดยจะเข้าไปจับและช่วยให้โปรตีนนั้นคงสภาพ จนทำให้โปรตีนต่าง ๆ มีการขดตัวได้อย่างถูกต้อง (Cooper, 2000) HSP70 เป็น Heat Shock Protein กลุ่มหลักที่จะถูกสร้างเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนและทำหน้าที่ช่วยในการม้วนพับของสายโพลีเปปไทด์ให้กลายเป็นโมเลกุลโปรตีนที่สมบูรณ์ โดยทำงานร่วมกับ Heat Shock Protein ชนิดอื่น ๆ และโมเลกุลบางชนิดโดยหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการม้วนพับของสายโพลีเปปไทด์ให้กลายเป็นโมเลกุลโปรตีนที่สมบูรณ์นั้นเกิดขึ้นทั้งในสภาพปกติและสภาพที่เซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อน Heat Shock Protein ชนิดนี้มีขนาดประมาณ 70 กิโลดาลตัน (kDa) พบได้ทั่วไปทั้งใน cytoplasm matrix ของ mitochondria และ stroma ของ chloroplast โครงสร้างของโมเลกุลแบ่งออกเป็น 2 ส่วนหลักคือ

1. ATPase domain เป็นบริเวณที่อยู่ทางด้าน N-terminal ของโปรตีน มีขนาดประมาณ 40 kDa
2. Peptide binding domain เป็นบริเวณที่อยู่ทางด้าน C-terminal ของโปรตีน มีขนาดประมาณ 25 kDa

ทั้งสองส่วนถูกแบ่งด้วย hinge region ที่เกี่ยวข้องกับ protease cleavage และบริเวณปลายของด้าน C-terminal ที่มีขนาดประมาณ 5 kDa ของ HSP70 หลายชนิดจะทำหน้าที่ร่วมกับ co-chaperone

หน้าที่ของ ATPase domain จะเกี่ยวข้องกับ ATP hydrolysis และ Peptide binding domain ทำหน้าที่ในการจับกับ hydrophobic region ของสายโพลีเปปไทด์ซึ่งยังไม่ได้เกิดการม้วนพับที่สมบูรณ์ โดยการจับกับโมเลกุล ATP จะทำให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ ATPase

domain และส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ Peptide binding domain และทำให้สามารถจับกับ hydrophobic region ของสาย โพลีเปปไทด์ได้ (Miernyk and Hayman, 1996)

การศึกษากลไกการควบคุมการทำงานของ HSP70 นั้นได้มาจากการศึกษาการทำงานของ HSP40 ของ *E. coli* ซึ่งทำหน้าที่คล้ายคลึงกับ HSP70 ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง โดยพบว่าการทำงานของ HSP70 จะทำงานเป็นวัฏจักรร่วมกับ HSP40 เรียกว่า “HSP70 cycle” โดยมีกลไกการทำงานดังนี้

1. ATP จับกับ ATPase domain และทำให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ ATPase domain และส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ Peptide binding domain ทำให้สามารถจับกับ hydrophobic region ของสายโพลีเปปไทด์ได้แต่ความสามารถในการจับยังไม่ดี (low binding affinity)
2. HSP40 จะทำหน้าที่ในการนำสายโพลีเปปไทด์มายัง โมเลกุล HSP70
3. HSP40 จับกับบริเวณ ATPase domain ของ HSP70 และส่งต่อสายโพลีเปปไทด์ไปยัง Peptide binding domain
4. HSP40 ทำหน้าที่กระตุ้นให้บริเวณที่จับกับสายโพลีเปปไทด์ของ Peptide binding domain ทำงานได้ดีขึ้น ซึ่งขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนควบคุม (rate-limiting reaction) ในการจับกับสายโพลีเปปไทด์
5. GrpE ซึ่งเป็น โปรตีนที่ทำหน้าที่จับกับ HSP40 และ ADP จะทำหน้าที่ดึงเอา HSP40 และ ADP ออกจาก HSP70 และเริ่มต้นวัฏจักรใหม่

HSP70 นั้นเสมือนเป็นศูนย์กลางโครงข่ายของ molecular chaperones ชนิดอื่น ๆ ที่อยู่ในเซลล์ อีกทั้งยังเป็นตัวเร่งให้เกิดการม้วนพับของสายโปรตีนหลายชนิด โดยอาศัยการจับกันของ substrate binding domain และ short hydrophobic peptide segments ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่ในสารตั้งต้นของการสร้างโปรตีน และการจับกันของสองส่วนนี้จะเกิดขึ้นเป็นวัฏจักร คือจะมีการจับและแยกตัวออกจากกันต่อเนื่องไป ซึ่ง HSP70 จะเป็นเหมือนสวิตช์ปิดเปิดให้มีการจับและแยกตัวออกจากกัน โดยอาศัยการทำงานของ low-affinity ATP bound state และ high-affinity ADP bound state

ซึ่งเราเรียก cycle นี้ว่า ATPase cycle โดย ATPase cycle นี้จะถูกควบคุมโดย co-chaperones ในตระกูลของ J-domain proteins หรือที่เรียกว่า HSP40 นั่นเอง (Miernyk and Hayman, 1996)

การทำงานของ HSP70 ยังเกี่ยวข้องกับโปรตีน Hip ที่มีลักษณะเป็น tetratricopeptide repeat protein ซึ่งค้นพบครั้งแรกในพืชตระกูล Arabidopsis (Hohfeld *et al.*, 1995) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการจับกับ ATPase domain ของ HSP70 และทำให้สภาวะที่มีการจับของ ADP บน ATPase domain มีเสถียรภาพ รักษาความสามารถในการจับกับสายโพลีเปปไทด์ของ Peptide binding domain และความสามารถในการม้วนพับสายโพลีเปปไทด์ของ HSP70 นอกจากนี้ยังมีการค้นพบโปรตีน Hop ที่มีลักษณะเป็น tetratricopeptide repeat protein ทำหน้าที่ในการจับ HSP70 และ HSP90 รวมกันเป็นกลุ่มเพื่อทำหน้าที่ในการม้วนพับสายโพลีเปปไทด์ (multi-chaperone complex) และโปรตีน Bag-1 มีหน้าที่เป็น negative regulator โดยจะจับกับบริเวณ ATPase domain เพื่อกระตุ้นการเกิด ATP hydrolysis และเกิดการหลุดออกของ ADP ซึ่งหน้าที่นี้คล้ายคลึงกับการทำงานของ GrpE

ในสภาพปกติ HSP70 มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่มซึ่งอาจจับเป็น dimer, trimer หรือ oligomer ซึ่งการอยู่รวมกลุ่มกันนี้จะเป็นลักษณะของ inactive form และเมื่อเข้าสู่ภาวะเครียดก็จะมีการแยกตัวกลับมาเป็น โมเลกุลเดี่ยว เพื่อทำงานอีกครั้ง ซึ่งปัจจัยที่กำหนดการรวมกลุ่มกันของ โมเลกุล HSP70 นี้มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับปริมาณของสายโพลีเปปไทด์ในเซลล์ (Benaroudj *et al.*, 1997)

ยีน HSP70 ของสิ่งมีชีวิตโดยทั่ว ๆ ไปจะไม่มี intron และจะประกอบด้วย HSE 3 copies อยู่ในส่วนของ promoter ซึ่ง HSE จะเป็นที่ยึดของ HSF ในการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ HSP70 มากขึ้นเมื่อเกิดสภาวะเครียดต่าง ๆ (Halloran *et al.*, 2000) ในคนจะมียีน HSP70 ที่เหมือนกันอยู่ 2 ตำแหน่ง (duplicated locus) ในตำแหน่งใกล้เคียงกับยีน major histocompatibility complex (MHC) ซึ่งจะห่างกัน 12 กิโลเบส (Sugimoto *et al.*, 2003)

การควบคุมการแสดงออกของยีน HSP70 นั้นเกี่ยวข้องกับการได้รับภาวะร้อน โดยพบว่า HSP70 ส่วนใหญ่จะถูกกระตุ้นให้มีการสร้างเพิ่มขึ้นภายใน 30 นาที ถึง 4 ชั่วโมง หลังจากเซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วยอุณหภูมิ 37 ถึง 45 องศาเซลเซียส (Li *et al.*, 1999) โดยในพืชตระกูล Arabidopsis พบว่า HSP70 อย่างน้อยหนึ่งยีนได้รับการกระตุ้นให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นถึง 20 เท่า เมื่อได้รับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามมีรายงานว่ายีน HSP70 บางชนิดถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกได้ด้วยที่อุณหภูมิต่ำ (Guy and Li, 1998)

การควบคุมการแสดงออกของยีน HSP70 นั้นเกี่ยวข้องกับการทำงานของ heat shock transcription factors (HSFs) และ heat shock elements (HSEs) ที่มีตำแหน่งอยู่บน promoter โดย HSF จะทำหน้าที่ในการจับกับ HSE ที่อยู่บน promoter ของยีน HSP หลายชนิดรวมทั้ง HSP70 เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีน HSP70 (Schoffl *et al.*, 1998) ในสภาพปกติ HSF ที่อยู่ในสภาพ inactive ร่วมกับ HSP70 หรืออาจอยู่เป็นอิสระก็ได้ แต่เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยภาวะร้อนปริมาณ HSP70 (HSP70 pool) จะลดลงเนื่องจากไปทำหน้าที่ในการจับกับโมเลกุลโปรตีนที่คลายตัว เนื่องจากความร้อน HSF ที่อยู่ร่วมกับ HSP70 และแยกตัวออกเป็นอิสระจะไปทำหน้าที่จับกับ HSE และกระตุ้นการแสดงออกของยีน HSP70 และมีการเพิ่มปริมาณ HSP70 ในเซลล์ หากมีปริมาณ HSP70 มากเกินไปในเซลล์ HSP70 ก็จะจับกับ HSF อิสระเพื่อยับยั้งไม่ให้ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีน HSP70

การควบคุมการแสดงออกของยีน HSP70 อาจเกี่ยวข้องกับอีกกระบวนการหนึ่งที่เรียกว่า Unfolding protein pathway (UPR) ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการคลายตัวของ โมเลกุลโปรตีนกลายเป็นสายโพลีเปปไทด์เพื่อการเคลื่อนย้ายผ่านเมมเบรนเข้าสู่ organelle ต่าง ๆ pathway นี้จะกระตุ้นการแสดงออกของยีนกลุ่ม HSP70 เพื่อทำหน้าที่ในการช่วยการคลายตัวและม้วนพับตัวของสายโพลีเปปไทด์ (Sung *et al.*, 2001)

นอกจากนี้ HSP70 ยังทำงานร่วมกับ HSP90 เพื่อช่วยในการตอบสนองของเซลล์ โดยช่วยให้ Glucocorticoid Receptor (GR) สามารถจับกับฮอร์โมน cortisol โดย cortisol จะจับกับ GR ในไซโตพลาสซึม ซึ่งการเข้ามาจับของฮอร์โมนจะทำให้เกิดการแยกตัวของ HSP70 และ HSP90 ออกจาก GR ซึ่งในภาวะปกติ GR จะรวมตัวกับ HSP70 1 โมเลกุล และ HSP90 2 โมเลกุลเพื่อช่วยคงสภาพโครงสร้างของ GR และทำให้สามารถจับกับฮอร์โมนได้ จากนั้น hormone-receptor complex จะรวมตัวกันเป็น dimer การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ GR ดังกล่าวจะทำให้เกิดการส่งสัญญาณการเคลื่อนย้าย GR-dimer ไปยังนิวเคลียส จากนั้น GR-dimer จะเข้าไปจับกับ promoter sequence ที่จำเพาะของยีนต่าง ๆ หรือ glucocorticoid response element (GRE) มีผลทำให้เกิดการกระตุ้นหรือยับยั้งการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองของเซลล์ (Kino *et al.*, 2003) นอกจากนี้ HSP70 ยังช่วยให้ GR ที่ถูกกระตุ้นสามารถเคลื่อนที่จากไซโตพลาสซึมไปยังนิวเคลียส ทำให้เกิดกระบวนการ transcription และ translation เกิดการสร้างโปรตีนที่ใช้ในการตอบสนองต่อความเครียดต่าง ๆ ของเซลล์หรือร่างกาย (Bruner, 1997)

ภาวะร้อนซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ในหลายลักษณะ สิ่งหนึ่งที่เกิดขึ้นคือการชะลอกระบวนการสร้างโปรตีนทั่วไป และโปรตีนที่มีอยู่ในเซลล์ตลอดจนสายโพลีเปปไทด์ที่อยู่ในระหว่างการพับตัวเกิดความผิดปกติซึ่งนำไปสู่การม้วนพับกลายเป็นโมเลกุลที่ผิดปกติหรือเกิดการเกาะกลุ่มกันเป็นก้อน ในสภาวะเครียดเช่นนี้มีรายงานว่า Heat Shock Protein โดยเฉพาะ HSP70 จะถูกกระตุ้นให้มีการสร้างเพิ่มมากขึ้นเพื่อช่วยในกระบวนการรักษาโมเลกุลโปรตีนให้เกิดการม้วนพับตัวที่ถูกต้องและป้องกันการเกาะกลุ่มกันของโปรตีน

องค์ประกอบของสายโพลีเปปไทด์ในเซลล์ของพืชตระกูล Arabidopsis ที่ได้รับภาวะร้อนพบว่า มีสายโพลีเปปไทด์อย่างน้อย 12 ชนิดที่อยู่ในกลุ่ม HSP70 เพิ่มขึ้น (Wu *et al.*, 1988) สอดคล้องกับการศึกษาการแสดงออกของยีนที่พบว่ามีปริมาณ mRNA ที่เกี่ยวข้องกับ Heat Shock Protein กลุ่ม HSP70 เพิ่มขึ้น มีการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน HSP70 ในพืชตระกูล Arabidopsis โดยวิธี reverse transcription พบว่ายีน HSP70 อย่างน้อย 11 ยีน ถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 2 ถึง 20 เท่าเมื่อได้รับภาวะร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งยีนกลุ่มนี้เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ HSP70 ที่ทำงานทั้งใน cytosol, endoplasmic reticulum, mitochondrial matrix และ plastid stroma (Sung *et al.*, 2001)

ฮอร์โมน cortisol

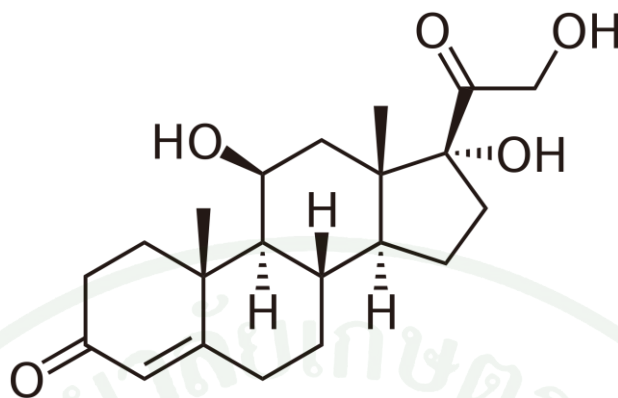
cortisol เป็น steroid hormone ที่สังเคราะห์มาจาก cholesterol โดยที่ steroid hormone จะไม่มีการเก็บสะสมแต่จะหลั่งลงเมื่อมีการสังเคราะห์ (Cunningham, 2002) พบว่า 75 - 80 เปอร์เซ็นต์จะไหลเวียนในกระแสเลือดโดยจับกับโปรตีนจำเพาะประเภทโกลบูลิน (specific glucocorticoid binding α 2-globulin, transcortin) 15 - 20 เปอร์เซ็นต์จะจับกับอัลบูมิน (albumin) และประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์เป็นฮอร์โมนอิสระ (free hormone) (Kaplan, 1992) cortisol ในพลาสมา มีระยะครึ่งชีวิต 70 - 90 นาที (Kacsoh, 2000) เนื่องจาก cortisol ในเลือดส่วนใหญ่อยู่ในรูปฮอร์โมนที่จับกับโปรตีนขนส่ง ดังนั้นระดับ cortisol ที่จับกับโปรตีนขนส่งจึงมีค่าสูงกว่า free hormone โดยที่ free hormone เท่านั้นที่ออกฤทธิ์ได้ ส่วนฮอร์โมนที่จับกับโปรตีนขนส่งทำหน้าที่เป็นฮอร์โมนสำรองสำหรับปลดปล่อย free hormone เพื่อการออกฤทธิ์ในเวลาต่อมา (นทีทิพย์, 2538) metabolism ของ cortisol เกิดขึ้นที่ตับและขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะ (Kacsoh, 2000)

cortisol เป็น corticosteroid hormone สร้างจากต่อม adrenal gland (ใน Zona fasciculata ของ adrenal cortex) เป็น stress hormone ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียด ทำให้ความดันเลือดและปริมาณน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นและกดภูมิคุ้มกัน ในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมี cortisol ที่เป็นฮอร์โมนชนิดหลักของ glucocorticoid hormone ซึ่งจะมีปริมาณและบทบาทสำคัญมาก โดยฮอร์โมนนี้มีหน้าที่หลักเกี่ยวข้องกับการ metabolism ของน้ำตาลกลูโคส โดยจะช่วยให้ระดับน้ำตาลในเลือดคงอยู่ในระดับปกติและป้องกันไม่ให้ความดันเลือดต่ำ (Wallberg *et al.*, 2001)

เมื่อเกิดความเครียดขึ้นไม่ว่าจะทางกายภาพหรือสภาวะอารมณ์ มีผลทำให้ระดับของ glucocorticoid hormone เพิ่มมากขึ้นในพลาสมา ทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลในเลือดสูงขึ้นและความดันเลือดสูงขึ้น โดย glucocorticoid hormone จะไปกระตุ้นกระบวนการต่าง ๆ มากมายเพื่อเพิ่มและคงระดับของกลูโคสในเลือด โดยกระตุ้นกระบวนการ gluconeogenesis ในตับ มีผลทำให้เกิดการสังเคราะห์กลูโคสจากกรดอะมิโนและไขมัน ซึ่งจะทำให้การกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการ gluconeogenesis รวมทั้งยังทำให้เกิดการนำกรดอะมิโนจากเนื้อเยื่อของตับมาใช้ในกระบวนการดังกล่าว นอกจากนี้ยังมีหน้าที่ยับยั้งการใช้กลูโคสในกล้ามเนื้อและในชั้นไขมัน (adipose tissue) เพื่อที่จะรักษาปริมาณกลูโคส และยังกระตุ้นให้มีการย่อยไขมันในชั้นไขมันทำให้กรดไขมันถูกปลดปล่อยออกมา สามารถนำมาใช้ผลิตพลังงานในกล้ามเนื้อและปลดปล่อย glycerol ออกมาเพื่อใช้ในกระบวนการ gluconeogenesis นอกจากนี้ในการเพิ่มระดับของ glucocorticoid hormone ยังลดการอักเสบของร่างกายและเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้นจึงช่วยลดการถูกทำลายของเนื้อเยื่อได้ (Wallberg *et al.*, 2001)

โครงสร้างของ cortisol

cortisol มีชื่อทางเคมีว่า $11\beta, 17, 21$ - trihydroxy - 4 - pregnene - 3, 20 - dione เนื่องจากมีคาร์บอนทั้งหมด 21 ตัว จัดเป็น pregnane แต่มีพันธะคู่ 1 พันธะ อยู่ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 และ 5 จึงเปลี่ยนค่าลงท้ายสารตั้งต้นจาก pregnane เป็น pregnene พร้อมทั้งระบุตำแหน่งของพันธะคู่เป็น 4 - pregnene - ถ้าเติมหน้าเขียนเป็น $11\beta, 17, 21$ - trihydroxy - เนื่องจากมีกลุ่มไครอกซิล 3 กลุ่มเข้ามาเกาะที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 11, 17 และ 21 โดยที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 11 เป็นเส้นทึบจึงเขียนเป็น 11β ค่าลงท้ายเขียนเป็น 3, 20 - dione เนื่องจากมีคีโตน 2 กลุ่มเข้ามาเกาะที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 20 (วีรพงษ์, 2546) มีสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 3

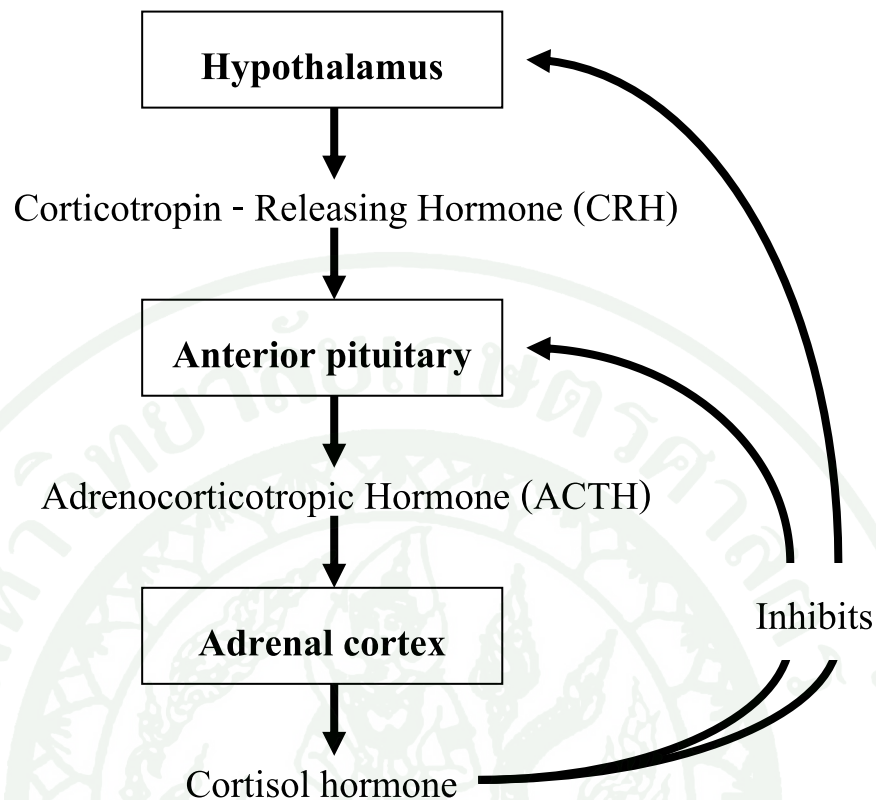


ภาพที่ 3 สูตรโครงสร้างของฮอร์โมน cortisol

ที่มา: Kaplan (1992)

กลไกการควบคุมการหลั่งฮอร์โมน cortisol

กลไกการควบคุมการหลั่ง cortisol (ภาพที่ 4) โดย Corticotropin - Releasing Hormone (CRH) จาก hypothalamus จะกระตุ้นต่อมใต้สมองส่วนหน้าให้หลั่ง Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH) ซึ่งมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการสังเคราะห์และการหลั่ง cortisol จากต่อมหมวกไตส่วนนอก (Squires, 2003) นอกจากนี้ความเครียดและสิ่งเร้าอื่น ๆ ยังมีผลต่อระบบประสาทส่วนกลางในการกระตุ้น hypothalamus ให้หลั่ง CRH ทำให้ระดับ cortisol ในระบบไหลเวียนสูงขึ้นกว่าระดับพื้นฐาน (basal level) ระดับ cortisol ที่สูงนี้จะไปยับยั้งย้อนกลับที่ระบบประสาทส่วนกลาง, hypothalamus และต่อมใต้สมองส่วนหน้า (Kaplan, 1992)



ภาพที่ 4 กลไกการควบคุมการหลั่งฮอร์โมน cortisol

ที่มา: ดัดแปลงจาก Kaplan (1992)

Cortisol จะทำงานได้โดยการไปจับอย่างจำเพาะกับ cortisol receptors ซึ่งอยู่ที่อวัยวะต่าง ๆ โดย receptors นี้สามารถพบได้ 2 ตำแหน่ง โดยตำแหน่งแรกจะเกาะอยู่บริเวณผิวเซลล์ซึ่งสามารถทำงานได้โดยตรงและรวดเร็ว (non-genomic pathway) ส่วนอีกตำแหน่งอยู่ภายในเซลล์ โดยที่เมื่อ receptors ซึ่งอยู่ภายในเซลล์รวมตัวกับ cortisol จะเกิดเป็น complex จากนั้นจะเคลื่อนที่เข้าสู่ nucleus ของเซลล์เป้าหมาย และทำหน้าที่เป็น transcription factor ไปช่วยในการกระตุ้นหรือควบคุมยีนหลาย ๆ ยีนภายในเซลล์ (a slower genomic pathway) (Sandi, 1996) ซึ่ง receptors ของ cortisol แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ mineralocorticoid receptors (MR) และ glucocorticoid receptors (GR) MR มีหน้าที่หลักเกี่ยวกับการไหลเวียนของฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ ส่วน GR มีหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับการตอบสนองต่อความเครียด โดยทั่วไปแล้วปลาจะมี MR 1 isoforms และ GR 2 isoforms คือ GR1 และ GR2 ซึ่งพบว่า GR2 จะมีการตอบสนองได้ดีเมื่อมีปริมาณ cortisol เพียงเล็กน้อย ส่วน GR1 จะมีการตอบสนองได้ดีเมื่อมีปริมาณ cortisol สูงเท่านั้น (Stolte *et al.*, 2008)

วิจัยและคณะ (2539) ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ cortisol และองค์ประกอบบิโอินในพลาสมา ระหว่างการลำเลียงปลาพ่อแม่พันธุ์ ซึ่งการลำเลียงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดความเครียด พบว่าการเปลี่ยนแปลงของ cortisol และกลูโคสในพลาสมา มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ภายในเวลา 15 - 90 นาที การขนส่งทำให้เกิดภาวะเครียดและเกิดขบวนการ glycogenolysis โดยไปสลาย glycogen ในตับมาเป็นกลูโคสเพื่อสลายมาเป็นพลังงานในการลดความเครียดที่เกิดขึ้นและพบว่าการลดลงของ cortisol และกลูโคสสู่ภาวะปกติในเวลา 1 - 2 วัน

เมื่อสัตว์ได้รับการกระตุ้นจากความเครียดสมองส่วน hypothalamus จะหลั่ง Corticotropin - Releasing Hormone (CRH) ไปในระบบไหลเวียนภายในเวลาไม่ถึงวินาที หลังจากนั้นประมาณ 10 วินาที ต่อมาได้สมองส่วนหน้าจะเพิ่มการหลั่ง Adrenocorticotropin Hormone (ACTH) และ glucocorticoid hormone จะถูกกระตุ้นให้หลั่งเพิ่มขึ้นในเวลา 5 นาที โดยใช้เวลาในการออกฤทธิ์ที่เนื้อเยื่อเป้าหมายประมาณ 30 นาที เนื่องจาก glucocorticoid hormone เป็น steroid hormone ซึ่งออกฤทธิ์ในระดับยีนจึงมีระยะเวลาในการออกฤทธิ์นานประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากเริ่มได้รับความเครียด (Sapolsky *et al.*, 2000)

cortisol มีรูปแบบการหลั่งที่เปลี่ยนแปลงตามเวลาในแต่ละวัน (circadian rhythm) (Hays *et al.*, 1975; Van Cauter, 2005) การศึกษาในคนและหนูทดลองพบว่า ระดับ cortisol สูงสุดในเวลาตื่นนอนตอนเช้า ต่ำสุดในช่วงแรกของการนอนและตอนดึก ดังนั้นการนอนหลับที่ปกติจะเกิดขึ้นเมื่อการทำงานของ cortisol ลดน้อยลง (Van Cauter, 2005) นอกจากนี้ในสัตว์อื่น ๆ พบว่า cortisol มีรูปแบบการหลั่งที่เปลี่ยนแปลงตามเวลาในแต่ละวันเช่นกัน

ผลของฮอร์โมน cortisol ต่อ metabolism ของสารอาหารในร่างกาย

Glucocorticoid hormone เป็น steroid hormone ที่มีผลต่อ metabolism ของกลูโคส (นทีทิพย์, 2538) เพื่อเป็นแหล่งพลังงานเมื่อร่างกายเกิดความเครียด (Kacsogh, 2000) โดยกระตุ้นการผลิตกลูโคสจากกรดไขมันและกรดอะมิโนในตับ (gluconeogenesis) และลดการใช้กลูโคสในเซลล์ต่าง ๆ โดยยับยั้งการขนส่งกลูโคสเข้าเซลล์ (Kaplan, 1992)

การออกฤทธิ์ของ glucocorticoid hormone มีผลทั้งในการสร้าง (anabolism) และการสลาย (catabolism) สารอาหาร glucocorticoid hormone นั้นมีผลทางการสลายสูงกว่าการสร้าง (Kaplan,

1992) โดยมีผลกระตุ้นการสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อโครงร่าง (skeletal muscle) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ได้กรดอะมิโน (amino acid) และกลีเซอรอล (glycerol) เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการเปลี่ยนไปเป็นกลูโคสในตับ โดยใช้พลังงานที่ได้จากกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) เอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการนี้ถูกกระตุ้นให้สังเคราะห์โดยการออกฤทธิ์ของ glucocorticoid hormone (Kacsoh, 2000) การใช้กรดอะมิโนไปในการสร้างกลูโคสจึงมีผลทางอ้อมในการลดการสังเคราะห์โปรตีนและไขมัน (นทีทิพย์, 2538) ดังนั้นการมี glucocorticoid hormone ในระดับสูงเป็นเวลานานจึงมีผลต่อการเกิดการเจริญเติบโต (Squires, 2003)

ระดับกลูโคสกับความเครียด

Vijayan *et al.* (1994) ชี้ให้เห็นว่าสภาวะทางโภชนาการมีผลต่อการตอบสนองต่อความเครียดและอัตราการกำจัดกลูโคส ซึ่งสิ่งเหล่านี้ได้รับการสนับสนุนจากนักวิทยาศาสตร์ท่านอื่น ๆ ซึ่งสรุปว่าการแปรผลระดับกลูโคสในกระแสเลือดต้องกระทำอย่างละเอียดรอบคอบ เพราะมีปัจจัยจากภายนอกเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย อาทิเช่น อาหาร ช่วงอายุของสัตว์ ระยะเวลาครั้งสุดท้ายของการให้อาหาร และช่วงฤดูกาลต่าง ๆ ในรอบปี เป็นต้น เนื่องจากสิ่งเหล่านี้ส่งผลต่อการกักเก็บ glycogen ในตับ (Wedemeyer *et al.*, 1990) สภาวะทางโภชนาการเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองของกลูโคส การกินอาหารด้วยส่วนประกอบของโปรตีนและไขมันในสัดส่วนที่แตกต่างกันเป็นผลให้เกิดการตอบสนองต่อระดับกลูโคสในเลือดที่แตกต่างกันด้วย นอกจากนั้นกลูโคสยังมีความแตกต่างในสัตว์แต่ละชนิดและช่วงอายุของสัตว์ (Iwama *et al.*, 2004) ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงผลการทดลองที่ผิดพลาดจึงควรปรับให้สิ่งมีชีวิตอยู่ในระดับมาตรฐานเดียวกันก่อนการทดลอง

ระดับกลูโคสในกระแสเลือดจะเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตสูง ปริมาณกลูโคสในเลือดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ หลังกินอาหาร 4 - 12 ชั่วโมง (Mills and Jenny, 1979) นอกจากนี้ความเครียดอย่างเฉียบพลันหรือรุนแรงซึ่งทำให้ cortisol ในกระแสเลือดสูงมีผลให้ระดับกลูโคสในกระแสเลือดสูงด้วย (Apple *et al.*, 1993)

สัตว์ที่อยู่ในสภาวะเครียดจะอยู่ในสภาพขาดสมดุลพลังงาน (negative energy balance) ซึ่งเป็นสภาวะที่มีระดับกลูโคสในกระแสเลือดต่ำ (Mudron *et al.*, 2005) cortisol จะกระตุ้นการหลั่งสารเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการ gluconeogenesis ในเนื้อเยื่อตับและยับยั้งการขนส่งกลูโคสเข้าเซลล์ ดังนั้นจึงทำให้ความเข้มข้นของกลูโคสในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น (Mayes and Bender, 2003) โดย

กลูโคสจะเป็นแหล่งพลังงานหลักสำหรับเซลล์เม็ดเลือดแดงและส่วนของระบบประสาทส่วนกลาง ระหว่างอยู่ในช่วงของความเครียด (Nockels, 1990) แต่การมีระดับกลูโคสในกระแสเลือดสูง (hyperglycemia) อาจเกิดจากสาเหตุอื่นที่ไม่ใช่ความเครียด (Moberg, 1985) ดังนั้นระดับกลูโคสในกระแสเลือดเพียงอย่างเดียวอาจจะไม่ใช่เป็นค่าชี้วัดระดับของความเครียดในสัตว์เนื่องจากระดับกลูโคสสามารถมีผลจากหลายปัจจัย (Schultz *et al.*, 1988)

มีการใช้กลูโคสเป็นค่าชี้วัดความเครียดอย่างกว้างขวาง แต่มีรายงานว่ากลูโคสเป็นดัชนีชี้วัดความเครียดที่มีความถูกต้องแม่นยำน้อยกว่า cortisol (Pottinger, 1998) ดังนั้นในการใช้กลูโคสเป็นค่าชี้วัดจึงต้องเพิ่มความระมัดระวัง โดย Simontacchi *et al.* (2008) กล่าวว่ากลูโคส และ cortisol ไม่สามารถใช้เป็นค่าชี้วัดความเครียดที่น่าเชื่อถือ

การใช้ Heat Shock Protein, cortisol และกลูโคสเป็นดัชนีชี้วัดความเครียดในปลา

Campbell *et al.* (1994) ทำการศึกษาพบว่า การขังปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) และปลา brown trout (*Salmo trutta*) ที่อยู่ในช่วงการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ระยะสุดท้ายเป็นเวลานาน ไม่มีผลต่อการสืบพันธุ์ของปลา rainbow trout แต่ทำให้ขนาดของไข่ปลา rainbow trout ลดลง และทำให้ลูกปลา brown trout และ rainbow trout ที่ได้จากปลาในกลุ่มทดลองความเครียดมีอัตราการรอดต่ำกว่าลูกปลาที่ได้จากกลุ่มควบคุม หลังการขังปลา trout นาน 2 สัปดาห์ พบว่าระดับ cortisol เพิ่มขึ้นในทุกกลุ่มทดลอง ขณะที่ระดับ testosterone ลดลง ความเครียดจากการกักขังไม่มีผลต่อระดับ 17α -estradiol ขณะที่ระดับ vitellogenin ในปลา rainbow trout เพศเมียในกลุ่มทดลองลดลง ปลา rainbow trout เพศเมียที่เลี้ยงในที่กักขังเป็นเวลา 1 และ 3 เดือน ให้ไข่ที่เล็กกว่าไข่ปลา กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และอัตราการรอดของลูกปลา brown trout และ rainbow trout กลุ่มทดลองต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าความเครียดมีผลต่อคุณภาพเซลล์สืบพันธุ์ของปลา

Cuesta *et al.* (2006) รายงานว่าปลา seabream (*Sparus aurata* L.) ที่ทำให้เครียดอย่างฉับพลัน มีระดับ cortisol และกลูโคสในพลาสมาเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของ cortisol ในกลุ่มทดลองเพิ่มขึ้น โดยอยู่ในช่วง 70 - 140 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดลองฉีด cortisol 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม พบว่าหลังจากฉีดเป็นเวลา 5 วัน ระดับ cortisol เพิ่มขึ้น 10 เท่า การย้ายปลาไปไว้ในน้ำความเค็มสูง (55 ppt) ทำให้ cortisol เพิ่มขึ้น การเพิ่มขึ้นของ cortisol ในพลาสมาหลังจากเกิดความเครียดมีผลต่อการปรับตัวและระบบภูมิคุ้มกัน

Fast *et al.* (2008) ทำการศึกษาผลของความเครียดในช่วงสั้นและยาวต่อระดับ cortisol และระบบภูมิคุ้มกันในปลา Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) พบว่าในการศึกษาความเครียดระยะสั้น โดยนำปลาขึ้นจากน้ำ 15 วินาที ระดับ cortisol ในพลาสมาเพิ่มขึ้นหลังจากผ่านไปแล้ว 1 และ 3 ชั่วโมง ระดับของกลูโคสในพลาสมาในชั่วโมงที่ 1, 3 และ 6 สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ interleukin - 1β (IL- 1β) ในชั่วโมงที่ 1 และ 3 ของกลุ่มทดลองสูงกว่ากลุ่มควบคุม ในการศึกษาความเครียดระยะยาวโดยการนำปลาขึ้นจากน้ำวันละ 15 วินาทีเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าระดับกลูโคสในพลาสมาของกลุ่มทดลองเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 1 ส่วน IL- 1β ในสัปดาห์ที่ 1, 2 และ 3 ในกลุ่มทดลองลดลง และ macrophages ของปลาในกลุ่มทดลองลดลงซึ่งสอดคล้องกับการลดลงของอัตราการรอด

Iwama *et al.* (1997) รายงานผลการทดลองฉีด cortisol เข้าไปในปลานิลเทศเมีย พบว่าทำให้เกิดภาวะเครียดขึ้นอย่างรุนแรงส่งผลให้ระดับ testosterone และ estradiol ในพลาสมาลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุมและยังมีผลทำให้ขนาดของไข่และรังไข่ลดลง ผลจากการศึกษาเบื้องต้นในปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) แสดงให้เห็นว่าการตอบสนองของ cortisol ต่อความเครียดอยู่ในระดับที่คงที่ตลอดเวลา (Pottinger *et al.*, 1992) โดยที่ลักษณะการตอบสนองต่อ cortisol นั้นสามารถส่งผลไปยังลูกได้ (Fevolden *et al.*, 1991; Pottinger and Carrick, 1999)

Strange *et al.* (1977) รายงานว่าปลา chinook salmon ที่ถูกกักขังในกระชังขนาดเล็กเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มี cortisol เพิ่มขึ้น และในปลา cutthroat trout ที่ถูกย้ายจากอุณหภูมิจาก 13 องศาเซลเซียส ไปอยู่ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส อย่างเฉียบพลันทำให้ระดับ cortisol เพิ่มขึ้นเช่นกัน

Iguchi *et al.* (2003) ศึกษาผลของความหนาแน่นต่อความเครียดและการเกิดโรคในปลา ayu (*Plecoglossus altivelis*) โดยเลี้ยงปลาที่ความหนาแน่น 1,250 ตัว หรือ 8.0 กิโลกรัม, 400 ตัว หรือ 2.6 กิโลกรัม และ 100 ตัว หรือ 0.6 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร พบว่าที่ความหนาแน่นสูง ความเข้มข้นของ cortisol ในพลาสมาสูงขึ้น และความเข้มข้นของ immunoglobulin M (IgM) ในพลาสมาลดลง ทำให้อัตราการตายสูงกว่าที่ความหนาแน่นปานกลางและต่ำ

Ercüment *et al.* (2011) ทำการศึกษาผลของระดับความหนาแน่นต่อการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein70 (HSP70) ในตับ กล้ามเนื้อ เหงือกและไตของปลา rainbow trout โดยเลี้ยงปลาที่ความหนาแน่นต่างกัน 4 ระดับ คือ 15, 20, 25 และ 30 กิโลกรัม/ตารางเมตร โดยก่อนการ

ทดลองจะเลี้ยงปลาที่ความหนาแน่นเท่ากันให้อาหารและอากาศอย่างเพียงพอเพื่อให้ปลาได้ปรับตัวเป็นเวลา 30 วัน ทำการทดลองเป็นเวลา 2 เดือน ใช้ปลาที่ความหนาแน่น 15 กิโลกรัม/ตารางเมตร เป็นชุดควบคุม ใช้ Real-Time PCR ในการวิเคราะห์การแสดงออกเชิงปริมาณของยีน HSP70 ผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของยีน HSP70 ในระดับสูงที่ความหนาแน่น 25 และ 30 กิโลกรัม/ตารางเมตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความหนาแน่น 15 และ 20 กิโลกรัม/ตารางเมตร

Kaur *et al.* (2011) ได้ศึกษาถึงผลกระทบของอุณหภูมิที่สูงขึ้นและการปนเปื้อนของสารกำจัดศัตรูพืชในน้ำต่อระดับการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein70 (HSP70) โดยทำการทดลองในปลาน้ำจืดชนิด *Channa punctata* กระตุ้นให้ปลาเกิดความเครียดโดยการนำไปแช่ในน้ำที่มีอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิน้ำปกติอยู่ 12 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นกระตุ้นต่อด้วยการนำไปแช่ในน้ำที่มีการปนเปื้อนของสารกำจัดศัตรูพืช โดยเติม deltamethrin (สารกำจัดศัตรูพืช) ลงไปในน้ำให้มีความเข้มข้น 0.75 ส่วนในพันล้าน แช่ปลาไว้ 48 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของยีน HSP70 ในระดับสูงขึ้นที่ตับ ไต และเหงือก

Kumar *et al.* (2011) ศึกษาผลของอาหารที่มีระดับโปรตีนแตกต่างกันที่ 20, 30, 40 และ 45% ต่อการตอบสนองต่อความเครียดในลูกปลา *Labeo rohita* น้ำหนักเฉลี่ย 6.57 กรัม โดยกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยวิธี Heat shock โดยเริ่มเลี้ยงปลาด้วยอาหารทดลองเป็นเวลา 30 วัน ในช่วงอุณหภูมิ 25.5 - 26.5 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปกระตุ้นให้เกิดความเครียด โดยการแช่น้ำอุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง พบว่าชุดการทดลองที่ระดับโปรตีน 20 และ 30% มีปริมาณไกลโคเจนในตับลดลงและแตกต่างทางสถิติจากค่าเริ่มต้น ในขณะที่ชุดการทดลองที่มีระดับโปรตีน 40 และ 45% มีปริมาณไกลโคเจนในตับค่อนข้างคงที่ ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับค่าเริ่มต้น เนื่องจากระดับโปรตีนที่สูงสามารถช่วยรักษาระดับไกลโคเจนในตับให้คงที่ได้โดยการใช้โปรตีนในการเป็นแหล่งพลังงานทดแทนไกลโคเจนที่ร่างกายปลามีความต้องการพลังงานมากขึ้นในช่วงที่เกิดความเครียด ในส่วนของปริมาณกลูโคสและ cortisol ในเลือดเพิ่มสูงขึ้นทุกชุดการทดลองและมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น แต่ชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารโปรตีนสูงมีแนวโน้มของการเพิ่มขึ้นดังกล่าวน้อยกว่า นอกจากนี้ปลากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีน 40 และ 45% มีอัตราการรอดตายสูงกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับโปรตีน 20 และ 30% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผู้วิจัยเสนอว่าอาจเกิดจากระดับโปรตีนสูงช่วยให้มีการปรับตัวกับความเครียด

ได้ดีกว่าชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหาร โปรตีนต่ำ ซึ่งแสดงจากค่าต่าง ๆ ที่ระบุถึงสภาวะเครียดของปลาทดลอง

Seyyed (2011) ศึกษาผลของกานพลูผงในการลดความเครียดของปลาการ์ฟ *Cyprinus carpio* (น้ำหนักประมาณ 10 กรัม) ทำการทดลองโดยเลี้ยงปลาในน้ำที่มีความเค็ม 3 ส่วนในพัน ก่อนการทดลองจะเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อใช้เป็นค่าเริ่มต้น จากนั้นกระตุ้นให้ปลาเครียดโดยการเพิ่มระดับความหนาแน่นให้สูงขึ้น (ใส่ปลาลงไปให้ได้ความหนาแน่น 25 กรัม/น้ำ 1 ลิตร เป็นเวลา 45 นาที) โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองที่ไม่ได้เติมกานพลูผงลงไป ในน้ำระหว่างที่กระตุ้นให้ปลาเกิดความเครียด (C0) และชุดการทดลองที่เติมกานพลูผงลงไป ในน้ำระหว่างที่กระตุ้นให้ปลาเกิดความเครียด โดยจะเติมลงไปในระดับต่าง ๆ กันคือ 50 (C50), 200 (C200) และ 300 (C300) มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อครบ 45 นาทีแล้วเก็บตัวอย่างเลือดของปลาทุกชุดการทดลองเพื่อนำมาตรวจหาปริมาณกลูโคส, cortisol, Na^+ และ Cl^- ซึ่งพบว่า ชุดการทดลองที่มีการเติมกานพลูผงลงไปทั้ง 3 ชุดการทดลอง จะช่วยให้ระดับของ cortisol ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น แต่ในส่วนของระดับกลูโคสมีค่าเพิ่มสูงขึ้นในทุกชุดการทดลองและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น ส่วนระดับของ Na^+ และ Cl^- ไม่มีการเปลี่ยนแปลงและไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในทุกชุดการทดลอง จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ากานพลูผงมีผลทำให้ปลาการ์ฟลด metabolism ลงและสามารถปรับตัวกับความเครียดที่เกิดจากความหนาแน่นสูงได้ดี ส่งผลต่อเนื่องให้ปริมาณ cortisol ลดลงด้วย

Oyoo - Okoth *et al.* (2011) ศึกษาผลของความเค็มระดับต่าง ๆ ในระหว่างการขนส่งต่ออัตราการรอดและการตอบสนองทางสรีรวิทยาของปลาน้ำจืดชนิด *Labeo victoriamus* โดยขนส่งเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ใช้ระดับความเค็มต่าง ๆ กันคือ 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 และ 10 psu โดยการขนส่งจะใส่ปลาลงไปในถุง ๆ ละ 100 ตัว (น้ำหนักเฉลี่ย 8 - 11 กรัม ความหนาแน่น 16 กิโลกรัม/ลูกบาศก์เมตร) และทำการวัดอุณหภูมิของน้ำ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) pH แอมโมเนียไนโตรเจนรวม (TAN) และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ทั้งก่อนและหลังการขนส่ง รวมทั้งวัดปริมาณ cortisol ในพลาสมา ปริมาณกลูโคสในเลือด ปริมาณโซเดียมในพลาสมา ปริมาณคลอไรด์ในพลาสมา และปริมาณแอมโมเนียในเลือด ภายหลังการขนส่งพบว่าอัตราการรอดและค่าบ่งชี้ต่าง ๆ ของปลามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในชุดควบคุม (0 psu) และชุดการทดลองที่มีระดับความเค็ม 0.25, 0.5 และ 10 psu มีอัตราการรอดตายที่ต่ำกว่า 70% การเพิ่มระดับของความเค็มขึ้นจะมีผลผกผันกับปริมาณของ TAN และ CO_2 ในน้ำ อีกทั้งยังพบว่าระดับของ cortisol ใน

ปลาสมากของปลาที่ขนส่งด้วยความเค็ม 0.5 - 8 psu ระดับของกลูโคสและแอมโมเนียในเลือดของปลาที่ขนส่งด้วยความเค็ม 1 - 4 psu และระดับของโซเดียมและคลอไรด์ในปลาสมากของปลาที่ขนส่งด้วยความเค็ม 1 - 8 psu ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างช่วงก่อนและหลังการขนส่ง จากผลการทดลองนี้มีข้อเสนอแนะให้ใช้ความเค็มระหว่าง 1 - 4 psu ในการขนส่งปลา *L. victoriana* ซึ่งจะช่วยลดผลกระทบของความเครียดให้เกิดขึ้นน้อยที่สุดกับสรีรวิทยาของปลา

การศึกษาผลของความเครียดต่ออัตราการรอดตาย อัตราการใช้ออกซิเจน ระดับของ plasma cortisol และ plasma glucose ในเลือด รวมทั้งการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ที่เหงือกของปลา Atlantic cod (*Gadus morhua*) ขนาด 10 และ 50 กรัม โดยการกระตุ้นให้ปลาเกิดความเครียดจากการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น 2 องศาเซลเซียส ในทุก ๆ ชั่วโมง จนถึงอุณหภูมิสูงสุดที่ 22 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่า การกระตุ้นให้ปลาเกิดความเครียดด้วยการเพิ่มอุณหภูมิอย่างเฉียบพลันนั้นมีค่าบ่งชี้ที่ใช้ในการวัดการตอบสนองต่อความเครียดที่เกิดขึ้นกับปลาได้ดีที่สุดคือ อัตราการใช้ออกซิเจนและระดับของ plasma cortisol ในเลือด ส่วนระดับของ plasma glucose และการแสดงออกของยีน HSP70 นั้นยังเป็นค่าบ่งชี้ที่มีความไวในการตอบสนองที่ต่ำกว่า (Perez-Casanova *et al.*, 2008)

การตอบสนองต่อความเครียดของปลาต่างชนิดกันแม้ว่าจะอยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกันก็จะมี ความแตกต่างกันในการตอบสนองต่อความเครียด เช่น ในการทดลองผลของการตอบสนองต่อ ความเครียดในปลา coral trout 2 ชนิดคือ *Plectropomus leopardus* และ *Plectropomus maculatus* พบว่าเมื่อนำปลาทั้ง 2 ชนิดมาทำการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยการจับ และการลดความเค็ม จากนั้นนำมาตรวจวัดค่าบ่งชี้ต่าง ๆ ที่เป็นผลมาจากการเกิดความเครียด เช่น ฮอร์โมน cortisol, glucose, lactate, hemoglobin และ hematocrit พบว่าข้อมูลที่ได้จากปลาทั้ง 2 ชนิดมีความแตกต่างกัน โดยสิ้นเชิง (Frisch and Anderson, 2005) ทั้งนี้การได้รับความเครียดซ้ำ ๆ กันอาจทำให้เกิด ความเครียดสะสม (Carmichael *et al.*, 1983; Flos *et al.*, 1988; Maule *et al.*, 1988) โดยที่การศึกษา ของ Barton *et al.* (1986) พบว่าเมื่อปลา chinook salmon ได้รับความเครียดจากการจับหลาย ๆ ครั้ง ระดับของฮอร์โมน cortisol จะมีการสะสมเพิ่มขึ้นในขั้นตอนสุดท้ายของการกระตุ้นให้เกิด ความเครียด และนอกจากการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมน cortisol แล้วระดับของกลูโคสในซีรัมยังเพิ่มขึ้น ด้วย ซึ่งช่วงเวลาที่ปลาได้รับการรบกวนจากปัจจัยที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดความเครียด และความ รุนแรงของการกระตุ้นให้เกิดความเครียดนั้นจะมีผลต่อลักษณะในการตอบสนองต่อความเครียด ของปลา ถ้าการกระตุ้นให้เกิดความเครียดนั้นไม่รุนแรงมาก ปลาก็สามารถที่จะปรับเปลี่ยนกลไก

ทางสรีรวิทยาให้เกิดการทดแทนสิ่งที่เสียไปเพื่อให้ร่างกายกลับสู่สภาพสมดุล แต่ถ้าหากปลาได้รับความเครียดอย่างรุนแรงจนร่างกายไม่สามารถปรับตัวให้เป็นปกติได้ทำให้ร่างกายได้รับผลกระทบด้านลบต่าง ๆ จนอาจถึงขั้นทำให้ปลาตายได้ (Schreck, 2000)

จากการทดลองของ Ortuno *et al.* (2001) ที่ได้ทำการทดลองในปลา gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) โดยให้ปลาอยู่ในสภาพที่มีความหนาแน่นสูงเป็นระยะเวลาสั้น ๆ เพื่อศึกษาผลของความเครียดที่เกิดขึ้นต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน พบว่าผลของความเครียดจะไปลดการทำงานของ complement activity และ phagocytic activity แต่การทำงานของระบบดังกล่าวจะกลับเป็นปกติภายหลังจากการทดลองเป็นเวลาประมาณ 3 วัน และจากผลของความเครียดที่ทำให้การทำงานของ phagocytic activity ลดลงนั้นอาจจะเกิดจากการที่ active cell ที่อยู่ในเนื้อเยื่อย้ายไปอยู่ในส่วนของกระแสเลือดแทน ส่งผลทำให้ค่าของ phagocytic activity ของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ไตส่วนหน้ามีค่าน้อยลง

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

สัตว์ทดลอง

ปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.) น้ำหนักประมาณ 100 กรัม จากสถานีวิจัยประมง กำแพงแสน คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน หรือจากฟาร์มเอกชน

อุปกรณ์ทดลอง

1. บ่อซีเมนต์ขนาด 1.5 ลูกบาศก์เมตร
2. เครื่องให้อากาศ
3. หัวทราย
4. สายออกซิเจน
5. ถังพลาสติกชนิดขุ่นขนาด 18 x 28 นิ้ว
6. สวิงตักปลา
7. เครื่องแก้ว เช่น Beaker, Flask และ Pasteur pipette
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ยี่ห้อ Thermo รุ่น Biomate 3
9. ถังกรองโฟม
10. กระบอกฉีดขนาด 3 มิลลิลิตร และ หัวเข็ม 24 G x 1
11. หลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
12. อุปกรณ์ในการเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย (ตะเกียงแอลกอฮอล์, Loop, Needle, Triangle)
13. อุปกรณ์ผ่าตัด
14. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave), Hirayama
15. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator), Memmert
16. ตู้อบไอร้อน (Hot air oven), Memmert
17. เครื่องเขย่า (Shaker machine), GFL 3016
18. สไลด์แก้ว และ cover slip
19. จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish)

20. Microcentrifuge ควาคุมอุณหภูมิจึง, Mikro 200R Hettich
21. Microcentrifuge ควาคุมอุณหภูมิจึง, Universal 320R Hettich
22. ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส, Whirlpool
23. ชุด Gel Electrophoresis, Bio-Rad
24. หลอด Centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร
25. ELISA reader, 1575 Bio-Rad
26. Touch mixer Model # 232 (Fisher Scientific, USA)
27. Power supply: Power PAC 3000 (Bio-Rad Laboratories, USA)
28. White/UV trasilluminator, UVP ImageStore 7500 (Mitsubishi Electric Corporation, Japan)
29. Thermal cycle (Polymerase chain reation; PCR) machine model TP600 (Takara Bio Inc.)
30. Real time PCR machine (Stratagene Mx3005p)
31. Homogenizer, FastPrep-24
32. Vortex Mixer, 2 Genic, Scientific Industries, USA
33. ถุงมือปลอดเชื้อ
34. PCR tube
35. ปิเปตอัตโนมัติ (Automatic pipette/Tip: 10 μ l, 200 μ l, 1000 μ l) Model COSTAR
36. เครื่องซังทศนิยม 2 ตำแหน่ง
37. เครื่องซังทศนิยม 3 ตำแหน่ง

สารเคมี

1. สารเคมีสำหรับงานทางด้านชีวโมเลกุล
 - 1.1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (Fermentas)
 - 1.2 Absolute ethanol (Merck)
 - 1.3 Ammonium persulfate (Bio basic Inc.)
 - 1.4 Chloroform (Fisher Scientific)
 - 1.5 Phenol (Merck)
 - 1.6 Tris (Tris-Borate EDTA) (Fisher Scientific)
 - 1.7 Ethidium bromide (Sigma)
 - 1.8 Ethylene diamine tetraacetic acid, disodium salt dehydrate; EDTA (Fluka)

- 1.9 Diethyl pyrocarbonate; DEPC (Sigma)
- 1.10 N, N-Dimethylformamide (Ajax Finechem)
- 1.11 β -mercaptoethanol (Sigma)
- 1.12 Formamide (BDH)
- 1.13 Formaldehyde (BDH)
- 1.14 3-[N-morpholino] propane-sulfonic acid; MOPS (BIO BASIC INC.)
- 1.15 Isopropyl- β -D-thiogalactoside; IPTG (Sigma)
- 1.16 5-bromo-4-cholo-3-indoyl- β -D-galactopyranoside; X-gal (Sigma)
- 1.17 Trizol reagent (Molecular Research Center) Isopropanol (Merck)
- 1.18 RNase A
- 1.19 iScriptTM Select cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad)
- 1.20 RevertAidTM Firststrand cDNA synthesis kit (Fermentas)
- 1.21 Loading dye (Fermentas)
- 1.22 Gel star (Lonza)
- 1.23 Agarose gel (Conda)
- 1.24 Brilliant[®] II SYBR[®] Green QPCR (stratagene)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
 - 2.1 Trypticase Soy Broth (Merck)
 - 2.2 Trypticase Soy Agar (Merck)
3. สายพันธุ์แบคทีเรีย
 - 3.1 *Streptococcus agalactiae* สายพันธุ์ AQA 08

วิธีการ

การทดลองที่ 1 การเปรียบเทียบดัชนีบ่งชี้ความเครียดในปลานิลที่ถูกกระตุ้นด้วยการจำลองการขนส่งที่ความหนาแน่นต่าง ๆ กัน

1. การวางแผนการทดลอง

ทำการกระตุ้นให้ปลานิลเกิดความเครียดโดยจำลองการขนส่งในถุงพลาสติกบรรจุน้ำ 5 ลิตร ที่ระดับความหนาแน่น (จำนวนปลา/ถุง) ต่าง ๆ กัน

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยมี 3 ชุดการทดลอง (Treatment) ในแต่ละชุดการทดลองมี 6 ซ้ำ (Replication) คือ

ชุดการทดลองที่ 1 บรรจупลานิลจำนวน 5 ตัว/ถุง (ความหนาแน่น 100 กรัม/น้ำ 1 ลิตร)

ชุดการทดลองที่ 2 บรรจупลานิลจำนวน 10 ตัว/ถุง (ความหนาแน่น 200 กรัม/น้ำ 1 ลิตร)

ชุดการทดลองที่ 3 บรรจупลานิลจำนวน 20 ตัว/ถุง (ความหนาแน่น 400 กรัม/น้ำ 1 ลิตร)

การทดลองนี้จำลองการขนส่งปลาเป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยมีการตรวจวัดระดับของกลูโคส cortisol และ Heat shock protein70 ในสภาพปกติก่อนการขนส่ง และที่เวลา 0, 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง หลังจากจำลองการขนส่งครบ 6 ชั่วโมง

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้ปลานิลที่มีน้ำหนักประมาณ 100 กรัม นำมาพักไว้ในบ่อซีเมนต์ขนาด 1.5 ลูกบาศก์เมตร ให้อากาศอย่างเพียงพอและมีการหมุนเวียนของน้ำอยู่ตลอดเวลา โดยจะพักไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง ให้อาหารปลากินพืชชนิดเม็ดสำเร็จรูปทุกวัน วันละ 2 ครั้ง โดยจะงดให้อาหาร 1 วัน ก่อนทดลอง

3. ขั้นตอนการทดลอง

3.1 ปรับสภาพปลาโดยนำมาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ขนาด 1.5 ลูกบาศก์เมตร ในระดับความหนาแน่นที่เหมาะสม ให้อากาศอย่างเพียงพอและมีการหมุนเวียนของน้ำอยู่ตลอดเวลา ก่อนนำมาใช้ทดลอง โดยใช้เวลาในการปรับสภาพปลาเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ให้อาหารปลาชนิดเม็ดสำเร็จรูปวันละ 2 ครั้ง โดยจะงดให้อาหาร 1 วันก่อนทำการทดลอง

3.2 หลังจากปรับสภาพปลาครบ 1 สัปดาห์แล้ว เริ่มการทดลองโดยการสุ่มตัวอย่างปลา 6 ตัว จาก บ่อซีเมนต์ เพื่อเก็บเลือดและเหงือก โดยจะเก็บเลือดจาก caudal vein ด้วยเข็มขนาด 24 Gx1 ให้ได้เลือดอย่างน้อย 2 ซีซี แยกเอาเฉพาะส่วนซีรัมนำไปใช้ในการตรวจวัดระดับของ cortisol และ กลูโคสส่วนเหงือกจะนำไปใช้ศึกษาการแสดงออกของ Heat shock protein70 (HSP70) เพื่อใช้เป็นค่าเริ่มต้นก่อนการขนส่ง

3.3 เตรียมถุงพลาสติกขนาด 18 x 28 นิ้ว จากนั้นใส่น้ำสะอาดลงไป ในถุงพลาสติกที่เตรียมไว้ให้ได้ปริมาตร 5 ลิตร

3.4 ใส่วัตถุที่ผ่านการปรับสภาพแล้วลงไป ในถุงพลาสติกจำนวน 5, 10 และ 20 ตัว/ถุง ซึ่งมีความหนาแน่นประมาณ 100, 200 และ 400 กรัม/น้ำ 1 ลิตร ตามลำดับ โดยจะใช้ชุดการทดลองละ 6 ถุง

3.5 อัดอากาศลงไป ในถุงบรรจุปลาจนเต็มถุง จากนั้นรัดปากถุงด้วยยางวงให้แน่น

3.6 นำถุงพลาสติกที่บรรจุปลาเรียบร้อยแล้วมาวางไว้เพื่อเป็นการจำลองการขนส่ง โดยใช้เวลาในการจำลองการขนส่งตลอดการทดลอง 6 ชั่วโมง เพื่อเป็นการกระตุ้นให้ปลาเกิดความเครียด

3.7 เมื่อครบระยะเวลาในการจำลองการขนส่ง เปิดถุงบรรจุปลาแล้วสุ่มเก็บตัวอย่างเลือด (วิธีเก็บตามข้อ 3.2) และเหงือกของปลา 6 ตัวต่อชุดการทดลอง (1 ตัว/ซ้ำ) ซึ่งการเก็บตัวอย่างจะเก็บเลือดของปลาก่อน จากนั้นจึงนำปลาตัวที่เก็บเลือดแล้ว ไปเก็บตัวอย่างเหงือกต่อไป โดยจะนับเวลาเป็น 0 ชั่วโมงหลังจากการจำลองการขนส่งครบ 6 ชั่วโมง ส่วนปลาที่เหลือของแต่ละชุดการทดลอง จะนำไปปล่อยลงเลี้ยงต่อในบ่อซีเมนต์ขนาด 1.5 ลูกบาศก์เมตร ซึ่งมีน้ำอยู่ 800 ลิตร แบ่งเป็น 3 ชุด

การทดลอง ชุดการทดลองละ 4 บ่อ (1 บ่อ/1 ช่วงเวลาของการเก็บตัวอย่าง ซึ่งจะมี 4 ช่วงเวลาคือ 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมงหลังจำลองการขนส่ง) ซึ่งการปล่อยปลาจะนำปลาที่เหลืออยู่ในแต่ละถุของ แต่ละชุดการทดลอง ไปปล่อยลงบ่อให้ครบบ่อละ 6 ตัว ตามบ่อที่กำหนดชุดการทดลองและ ช่วงเวลาของการเก็บตัวอย่างเอาไว้แล้ว โดยเมื่อเลี้ยงต่อไปจนครบช่วงเวลาต่าง ๆ ตามที่กำหนด เอาไว้ก็จะเก็บตัวอย่างเลือดและเหงือกของปลา คือเก็บตัวอย่างชุดการทดลองละ 6 ตัว เป็นการเก็บ หมดทั้งบ่อ (เก็บตัวอย่างช่วงเวลาละ 3 บ่อ คือ 3 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 1 บ่อ/ช่วงเวลา) รวมแล้วจะเก็บตัวอย่างปลาทั้งหมด 18 ตัว/ช่วงเวลา

3.8 การเก็บเหงือกจากตัวอย่างปลาที่สุ่มมาทำได้โดยการใช้ปากคีบเปิดแผ่นปิดเหงือกของ ปลาออก จากนั้นใช้กรรไกรตัดที่บริเวณเหงือกของปลา แล้วนำเหงือกที่ตัดได้ไปเก็บไว้ใน TRIzol reagent (Molecular Research Center) จากนั้นจึงนำไปสกัด Total RNA และสังเคราะห์ First Strand cDNA ต่อไป

3.9 เลือดที่ได้จากปลาในแต่ละช่วงเวลา จะนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 3,000 rpm อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาแต่ส่วนของซีรัมไปใช้ในการ ตรวจวัดระดับ cortisol และกลูโคส

4. วิธีการวิเคราะห์ระดับ cortisol และกลูโคส

ส่งตัวอย่างไปที่ BRIA group of companies เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ cortisol ด้วยเครื่อง ADVIA Centaur CP โดยอาศัยหลักการ CMIA (Chemiluminescent microparticle immunoassay)

การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสจะดำเนินการโดยใช้ชุดทดสอบ Liquid – Glucose (BIOTECH REAGENT) โดยอาศัยวิธี GOD - PAP Method และวัด end point โดยอาศัย Enzymatic Colorimetric Test

5. การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน HSP70

5.1 การสกัด Total RNA

นำตัวอย่างเหงือกที่เก็บไว้มาเติม TRIzol reagent (Molecular Research Center) ให้ได้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นบดให้ละเอียดและบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วเติม Chloroform ลง ไป 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องอีก 2 - 3 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแยกเอาแต่ส่วนใสที่อยู่ด้านบนซึ่งประกอบด้วย RNA ไป ไว้ในหลอด centrifuge หลอดใหม่ แล้วเติม Isopropyl alcohol ลงไปอีก 500 ไมโครลิตร และเขย่า ให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จะได้ตะกอนสีขาวของ RNA อยู่บริเวณก้นหลอด ล้างตะกอน RNA ด้วย 75% Ethanol 1 มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำออกมาใช้ สังเคราะห์ First Strand cDNA ต่อไป

5.2 การสังเคราะห์ First strand cDNA

นำ Total RNA ที่เก็บไว้ใน 75% Ethanol มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ตัวอย่างละลาย จากนั้นนำไปเขย่าด้วย Vortex mixture แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นดูด 75% Ethanol ออก แล้วตากตะกอนไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อตะกอนแห้ง หมด ๆ แล้วจึงเติม DEPC treated water ลงไปประมาณ 10 ไมโครลิตร ค่อย ๆ เติมทีละน้อยเพื่อให้ ตะกอนละลายจนหมด จากนั้นนำ Total RNA ที่ละลายแล้วออกมา 2 ไมโครลิตร นำไปผสมกับ DEPC treated water อีก 68 ไมโครลิตรแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 – 280 นาโนเมตร โดยใช้ DEPC treated water เป็น Blank จะได้ค่าความเข้มข้นของ Total RNA ในหน่วย ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นใช้ Total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อเหงือกที่มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม มาสังเคราะห์ First strand cDNA ต่อไปโดยใช้ iScript™ select cDNA synthesis kit (BIO - RAD) เพื่อนำมาใช้เป็น Template ซึ่งปฏิกริยามีปริมาตรรวมเท่ากับ 7.5 ไมโครลิตร ซึ่ง ประกอบด้วย Nuclease - free water, Oligo(dT)₂₀ primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาบ่มที่ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวางไว้บนน้ำแข็ง เตรียม Master mix ซึ่งมี ปริมาตรรวมเท่ากับ 10 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 5X iScript select reaction mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ iScript reverse transcriptase ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำไป

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที บ่มต่อที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส อีก 10 นาที แล้วจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real - time PCR

5.3 การวิเคราะห์ Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Real - time PCR)

การทดลองนี้จะใช้ชุด Brilliant[®] II SYBR[®] Green QPCR (Stratagene) ซึ่งปฏิกิริยามีปริมาตรรวมเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย First strand cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, SYBR Green Master mix 12.5 ไมโครลิตร, น้ำกลั่น 9.5 ไมโครลิตร และใช้ Specific primers ต่อยีน HSP70 ของปลานิล ได้แก่ HSP70f: 5'-CCACTTTGTGGAGGAGTTCAAGAG-3' และ HSP70r: 5'-AGCACAGCTCCTCAAAGCGAGCCC-3' ตามลำดับ และระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ของตัวอย่างจะถูก Normalize กับ Housekeeping gene คือ β -actin ซึ่ง Forward และ Reverse Primer มีลำดับเบสดังนี้ actinf: 5'-AACAGCGCAATCCTCTTCCAGAGT-3' และ actinr: 5'-ATGGTGCAGCCGCTATTAAGGGTT-3' (ตารางที่ 1) โดยสภาวะของปฏิกิริยา PCR มีดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นจะเป็นอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวนทั้งหมด 40 รอบ หลังจากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ Melting curve โดยที่จะดำเนินต่อเนื่องไป โดยมีสภาวะของปฏิกิริยา PCR ดังนี้คือ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที

ตารางที่ 1 Gene specific primers ของยีน Heat Shock Protein70 สำหรับทำ Real - time PCR

Gene Names	Primer names	Sequences from 5' to 3'	size (bp)
Heat shock protein70	HSP70f	5'-CCACTTTGTGGAGGAGTTCAAGAG-3'	156
	HSP70r	5'-AGCACAGCTCCTCAAAGCGAGCCC-3'	
β -actin	Actinf	5'-AACAGCGCAATCCTCTTCCAGAGT-3'	97
	Actinr	5'-ATGGTGCAGCCGCTATTAAGGGTT-3'	

5.4 การวิเคราะห์ Relative quantification ของ mRNA

การวิเคราะห์ข้อมูลจากการทำ Real - time PCR นั้นมี 2 วิธี คือ Absolute quantification และ Relative quantification (Livak and Schmittgen, 2001) สำหรับวิธี Absolute quantification จะทำการวิเคราะห์ Transcript copy number โดยการสร้างเส้น Standard curve ซึ่งเป็นการ Plot ค่า log แบบเส้นตรงของ Initial copy number สำหรับชุดของ Standard เทียบกับค่า Threshold cycle (C_t value) โดยจะมีการวัดค่า C_t ของ Unknown gene และ Standard curve เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ Copy number เบื้องต้น ส่วนวิธี Relative quantification จะใช้อธิบายถึงการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับ Reference group บางกลุ่ม เช่น Internal หรือ Untreated control เพื่อ Normalize จำนวนของ Target transcript ซึ่งวิธีนี้อยู่บนพื้นฐานของ Equal PCR efficiencies สำหรับ Target และ Internal control mRNAs

Relative copy number ของ mRNA จะคำนวณตามวิธี $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001) ค่าความแตกต่างของ Threshold cycle (ΔCT) ระหว่าง mRNA ของ HSP70 ซึ่งเป็น Target gene กับ β -actin ซึ่งเป็น Internal control ของแต่ละปฏิกิริยาจะใช้เพื่อ Normalize ระดับการแสดงออกของ mRNA ได้ดังสมการ

$$\Delta CT = CT(\text{HSP70}) - CT(\beta\text{-actin})$$

ค่านี้จะคำนวณในแต่ละ Unknown sample โดย mRNA ของ HSP70 จะถือว่ามีความสัมพันธ์คงที่กับ Total RNA ค่า ΔCT ในแต่ละตัวอย่างจะตรงกันกับ Relative quantification ของ mRNA ของ Heat Shock Protein70 และ Relative copy number จะถูกนำมาคำนวณโดยใช้สมการนี้

$$\text{Copy number} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

$$\text{โดย } \Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{Unknown sample}) - \Delta CT(\text{Reference sample})$$

ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ Primer การวิเคราะห์ Melt curve สามารถใช้ยืนยันว่าเป็น Product ที่เราต้องการเท่านั้น ที่ถูก Amplify ไม่ใช่มาจาก PCR product ที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจงหรือจาก Primer - dimer จับกันเอง อุณหภูมิสำหรับ Melting ที่แตกต่างกันจะสามารถสังเกต

ได้ระหว่าง Product ที่มีความจำเพาะหรือไม่มีความจำเพาะ โดย Melt curve จะได้จากการเปลี่ยน อุณหภูมิอย่างช้า ๆ ของปฏิกิริยา PCR จนกระทั่งอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นขณะที่มีการเก็บ ข้อมูล

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ระดับของกลูโคส, cortisol และระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ซึ่งจะแสดงไว้ในรูปของ Means \pm standard deviation วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ One - way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองโดยวิธี Duncan's new multiple range tests ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Steel and Torrie, 1986)

การทดลองที่ 2 การเปรียบเทียบดัชนีบ่งชี้ความเครียดในปลานิลที่ถูกกระตุ้นด้วยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae*

1. การวางแผนการทดลอง

ทำการกระตุ้นให้ปลานิลเกิดความเครียดจากการติดเชื้อโรค โดยการทดลองฉีดเชื้อแบคทีเรียชนิด *Streptococcus agalactiae* ที่จำนวนเซลล์ต่าง ๆ กัน

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยมี 3 ชุดการทดลอง (Treatment) ในแต่ละชุดการทดลองมี 6 ซ้ำ (Replication) คือ

ชุดการทดลองที่ 1 ชุดควบคุม ฉีดปลาด้วยน้ำเกลือที่ความเข้มข้น 0.85% ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร/ตัว

ชุดการทดลองที่ 2 ฉีดปลาด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ที่ความเข้มข้น 10^6 CFU/ml ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร/ตัว

ชุดการทดลองที่ 3 ฉีดปลาด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ที่ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร/ตัว

การทดลองนี้เป็นการกระตุ้นให้ปลาเกิดความเครียดโดยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหลักที่สร้างความเสียหายในปลานิลอย่างรุนแรง โดยจะมีการตรวจวัดระดับของกลูโคส, cortisol และ HSP70 ในสภาพปกติก่อนการฉีดเชื้อกระตุ้น และที่เวลา 12 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง 2 วัน 3 วัน และ 7 วันหลังจากฉีดเชื้อแบคทีเรียกระตุ้น

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้ปลานิลที่มีน้ำหนักประมาณ 100 กรัม นำมาพักไว้ในบ่อซีเมนต์ขนาด 1.5 ลูกบาศก์เมตร ให้อากาศอย่างเพียงพอและมีการหมุนเวียนของน้ำอยู่ตลอดเวลา โดยจะพักไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง ให้อาหารปลากินพืชชนิดเม็ดสำเร็จรูปทุกวัน วันละ 2 ครั้ง

3. ขั้นตอนการทดลอง

3.1 เลี้ยงปลานิลในบ่อซีเมนต์ขนาด 1.5 ลูกบาศก์เมตร ซึ่งมีน้ำอยู่ 800 ลิตร ใส่ปลานิลลงไป บ่อละ 6 ตัว มี 3 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 5 บ่อ (1 บ่อ/1 ช่วงเวลาของการเก็บตัวอย่าง) รวมทั้งหมด 15 บ่อ ให้อากาศอย่างเพียงพอและมีการหมุนเวียนของน้ำอยู่ตลอดเวลา โดยจะใช้เวลา 1 สัปดาห์เพื่อให้ปลาได้ปรับสภาพก่อนที่จะเริ่มการทดลอง ให้อาหารปลากินพืชชนิดเม็ดสำเร็จรูปวันละ 2 ครั้ง เช้า - เย็น

3.2 หลังจากปรับสภาพปลาครบ 1 สัปดาห์แล้ว เริ่มการทดลองโดยการสุ่มตัวอย่างปลา 6 ตัว จากบ่อซีเมนต์ (บ่อ stock) เพื่อเก็บเลือดและเหงือก โดยเลือดจะนำไปใช้ในการตรวจวัดระดับของ กลูโคสและ cortisol ส่วนเหงือกจะนำไปใช้ศึกษาการแสดงออกของยีน HSP70 เพื่อใช้เป็นค่าเริ่มต้นก่อนการฉีดกระตุ้น

3.3 เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในสารละลายน้ำเกลือ 0.85% ที่ระดับความเข้มข้น 10^6 และ 10^8 CFU/ml เพื่อใช้ในการฉีดกระตุ้นให้ปลาเกิดความเครียด

3.4 นำเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3 ไปฉีดเข้าทางช่องท้อง (Intraperitoneal injection) ของปลานิลที่เลี้ยงไว้ในบ่อซีเมนต์ (บ่อละ 6 ตัว) โดยฉีดปลานิลทุกตัว ตัวละ 0.2 มิลลิลิตร ส่วนในชุดควบคุมจะฉีดด้วยสารละลายน้ำเกลือที่ระดับความเข้มข้น 0.85%

3.5 เมื่อฉีดกระตุ้นแล้วปล่อยปลาลงเลี้ยงต่อในบ่อซีเมนต์ตามเดิม

3.6 หลังจากปล่อยปลาลงเลี้ยงต่อในบ่อซีเมนต์ครบ 12 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง 2 วัน 3 วัน และ 7 วัน จะเก็บตัวอย่างเลือดและเหงือกของปลาตามช่วงเวลาต่าง ๆ ดังกล่าว โดยเก็บตามบ่อที่ได้กำหนด ชุดการทดลองและช่วงเวลาไว้แล้ว คือ เก็บช่วงเวลาละ 3 บ่อ (3 ชุดการทดลอง) มีปลาอยู่บ่อละ 6 ตัว เก็บปลาหมดทั้งบ่อ รวมแล้วเก็บช่วงเวลาละ 18 ตัว ซึ่งการเก็บตัวอย่างจะเก็บเลือดของปลา ก่อน จากนั้นจึงนำปลาตัวที่เก็บเลือดแล้วไปเก็บตัวอย่างเหงือกต่อไป

3.7 การเก็บตัวอย่างเหงือกจากปลาทำโดยการใส่ปากคิบบเปิดแผ่นปิดเหงือกของปลาออก จากนั้นใช้กรรไกรตัดที่บริเวณเหงือกของปลาแล้วนำเหงือกที่ตัดได้ไปเก็บไว้ใน TRIzol reagent (Molecular Research Center) จากนั้นจึงนำไปสกัด Total RNA และสังเคราะห์ First Strand cDNA ต่อไป

3.8 เลือดที่ได้จากปลาในแต่ละช่วงเวลา จะนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 3,000 rpm อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาแต่ส่วนของซีรัมไปใช้ในการตรวจวัดระดับกลูโคสและ cortisol

4. วิธีการวิเคราะห์ระดับกลูโคสและ cortisol

ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

5. การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน HSP70

ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ระดับของกลูโคส, cortisol และระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ซึ่งจะแสดงไว้ในรูปของ Means \pm standard deviation วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ One - way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองโดยวิธี Duncan's new multiple range tests ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Steel and Torrie, 1986)

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการ การจัดการสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยทำวิจัยในระหว่างเดือนมิถุนายน 2554 – พฤษภาคม 2555

ผลและวิจารณ์

ผล

1. การเปรียบเทียบค่าบ่งชี้ความเครียดในปลานิลที่ถูกกระตุ้นด้วยการจำลองการขนส่งที่ความหนาแน่นต่าง ๆ กัน

1.1 ปริมาณกลูโคสในซีรัมของปลานิลที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดโดยการจำลองการขนส่งด้วยความหนาแน่นต่าง ๆ กัน

ในปลานิลก่อนเริ่มการทดลองมีปริมาณกลูโคสในซีรัมเท่ากับ 66.02 mg/dl และหลังจากปลานิลได้รับการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยการจำลองการขนส่งที่ความหนาแน่นต่าง ๆ กันเป็นเวลา 6 ชั่วโมงแล้ว พบว่า ชั่วโมงที่ 0 หลังการขนส่ง ปลาที่บรรจุด้วยความหนาแน่น 5 และ 10 ตัว/ถุง มีปริมาณกลูโคสในซีรัมอยู่ที่ 223.29 ± 23.36 และ 326.70 ± 58.28 mg/dl ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ส่วนปลาที่บรรจุด้วยความหนาแน่น 20 ตัว/ถุง มีปริมาณกลูโคสในซีรัมสูงกว่าปลาที่บรรจุด้วยความหนาแน่น 5 และ 10 ตัว/ถุง และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) คืออยู่ที่ 686.94 ± 96.30 mg/dl จากนั้นเมื่อปล่อยปลาลงเลี้ยงต่อในสภาวะปกติเป็นเวลา 1 ชั่วโมงหลังการขนส่งพบว่า ปลาที่บรรจุด้วยความหนาแน่น 5 ตัว/ถุง มีปริมาณกลูโคสในซีรัมต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับปลาที่บรรจุด้วยความหนาแน่น 10 และ 20 ตัว/ถุง คืออยู่ที่ 238.55 ± 19.77 mg/dl ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับปลาที่บรรจุ 20 ตัว/ถุง แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับปลาที่บรรจุ 10 ตัว/ถุง โดยปลาที่บรรจุ 10 และ 20 ตัว/ถุง จะมีค่าอยู่ที่ 270.68 ± 34.96 และ 478.31 ± 115.29 mg/dl ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 6 หลังการขนส่ง ปลาทุกชุดการทดลองมีปริมาณกลูโคสในซีรัมไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 174.29 ± 22.33 , 178.51 ± 19.52 และ 210.04 ± 26.02 mg/dl ตามลำดับ ($P > 0.05$) จากนั้นเมื่อผ่านไป 12 ชั่วโมงหลังขนส่ง ปลาที่บรรจุด้วยความหนาแน่น 5 ตัว/ถุง มีปริมาณกลูโคสในซีรัมสูงกว่าปลาอีก 2 ชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) คือมีค่าอยู่ที่ 351.60 ± 71.93 mg/dl ส่วนชุดการทดลองที่บรรจุปลา 10 และ 20 ตัว/ถุง มีปริมาณกลูโคสในซีรัมไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือมีค่าเท่ากับ 133.73 ± 10.34 และ 137.55 ± 23.25 mg/dl ตามลำดับ ($P > 0.05$) ส่วนชั่วโมงที่ 24 หลังขนส่ง ปริมาณกลูโคสในซีรัมของ

ปลาทั้ง 3 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 99.39 ± 25.74 , 101.00 ± 10.40 และ 82.53 ± 10.81 mg/dl ตามลำดับ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 2 และภาพที่ 5)

ตารางที่ 2 ปริมาณกลูโคสในซีรัมของปลานิลหลังจากถูกกระตุ้นโดยการจำลองการขนส่งที่ความหนาแน่นต่าง ๆ กันเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ชุดการทดลอง	ปริมาณกลูโคสในซีรัม (mg/dl) ในช่วงเวลาต่าง ๆ หลังจากกระตุ้นให้เกิดความเครียด				
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 6	ชั่วโมงที่ 12	ชั่วโมงที่ 24
5 ตัว/ถุง	223.29 ± 23.36^a	238.55 ± 19.77^a	174.29 ± 22.33^a	351.60 ± 71.93^b	99.39 ± 25.74^a
10 ตัว/ถุง	326.70 ± 58.28^a	270.68 ± 34.96^{ab}	178.51 ± 19.52^a	133.73 ± 10.34^a	101.00 ± 10.40^a
20 ตัว/ถุง	686.94 ± 96.30^b	478.31 ± 115.29^b	210.04 ± 26.02^a	137.55 ± 23.25^a	82.53 ± 10.81^a

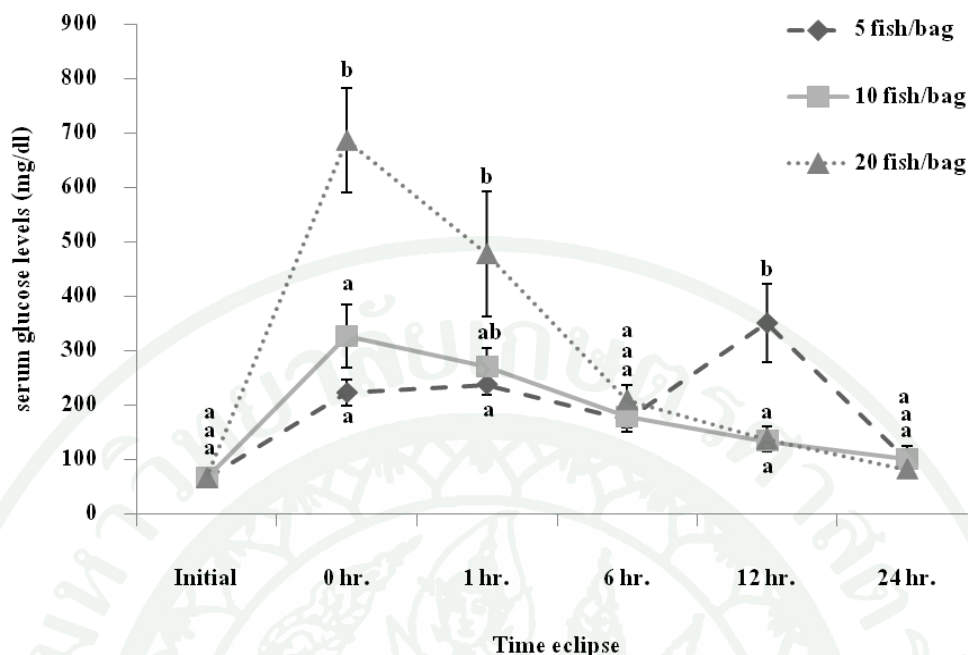
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับที่ต่างกันในแนวตั้ง

แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$)

5 ตัว/ถุง คือ บรรจุปลานิลด้วยความหนาแน่น 5 ตัว/ถุง
(น้ำหนักปลา 100 กรัม/น้ำ 1 ลิตร)

10 ตัว/ถุง คือ บรรจุปลานิลด้วยความหนาแน่น 10 ตัว/ถุง
(น้ำหนักปลา 200 กรัม/น้ำ 1 ลิตร)

20 ตัว/ถุง คือ บรรจุปลานิลด้วยความหนาแน่น 20 ตัว/ถุง
(น้ำหนักปลา 400 กรัม/น้ำ 1 ลิตร)



ภาพที่ 5 ปริมาณกลูโคสในซีรัมของปลานิลที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดโดยการจำลองการขนส่งด้วยความหนาแน่นต่าง ๆ กัน

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับที่ต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$)

1.2 ปริมาณ cortisol ในซีรัมของปลานิลที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดโดยการจำลองการขนส่งด้วยความหนาแน่นต่าง ๆ กัน

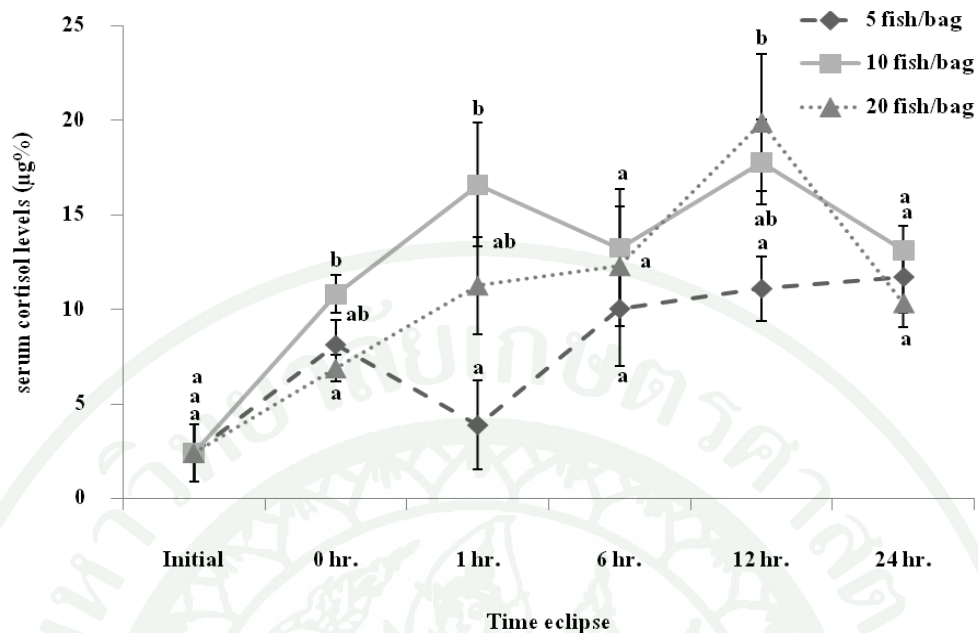
ปลานิลก่อนเริ่มการทดลองมีปริมาณ cortisol ในซีรัมเท่ากับ $2.42 \mu\text{g}\%$ จากนั้นเมื่อปลานิลได้รับการกระตุ้นให้เกิดความเครียดโดยการจำลองการขนส่งที่ความหนาแน่นต่าง ๆ กันเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าในชั่วโมงที่ 0 หลังการขนส่ง ปลาที่บรรจุด้วยความหนาแน่น 10 ตัว/ถุง มีปริมาณ cortisol ในซีรัมสูงที่สุดคือ $10.83 \pm 1.01 \mu\text{g}\%$ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับปลาที่บรรจุด้วยความหนาแน่น 20 ตัว/ถุง ซึ่งมีค่าเท่ากับ $6.91 \pm 0.68 \mu\text{g}\%$ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับปลาที่บรรจุด้วยความหนาแน่น 5 ตัว/ถุง ที่มีค่าอยู่ที่ $8.15 \pm 1.29 \mu\text{g}\%$ จากนั้นเมื่อปล่อยปลาลงเลี้ยงต่อในสภาวะปกติเป็นเวลา 1 ชั่วโมงหลังการขนส่งพบว่า ปลาที่บรรจุด้วยความหนาแน่น 10 ตัว/ถุง ยังคงมีปริมาณ cortisol ในซีรัมสูงที่สุดคือ

16.63±3.28 µg% รองลงมาคือปลาที่บรรจุด้วยความหนาแน่น 20 ตัว/ถุง ซึ่งมีค่า 11.28±2.56 µg% แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ส่วนปลาที่บรรจุด้วยความหนาแน่น 5 ตัว/ถุง มีปริมาณ cortisol ในซีรัมเท่ากับ 3.90±2.34 µg% ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับปลาที่บรรจุด้วยความหนาแน่น 10 ตัว/ถุง ส่วนชั่วโมงที่ 6 หลังการขนส่ง ปลาที่บรรจุด้วยความหนาแน่นแตกต่างกันทั้ง 3 ชุดการทดลองมีปริมาณ cortisol ในซีรัมไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเป็น 10.05±3.02, 13.28±3.09 และ 12.31±3.17 µg% ตามลำดับ ($P > 0.05$) เมื่อผ่านไป 12 ชั่วโมงหลังการขนส่ง ปลาที่บรรจุด้วยความหนาแน่น 20 ตัว/ถุง มีปริมาณ cortisol ในซีรัมเท่ากับ 19.91±3.64 µg% ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับปริมาณ cortisol ในซีรัมของปลาที่บรรจุด้วยความหนาแน่น 5 ตัว/ถุง ที่มีค่า 11.11±1.71 µg% แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับปลาที่บรรจุด้วยความหนาแน่น 10 ตัว/ถุง ที่มีค่าเท่ากับ 17.81±2.23 µg% จากนั้นเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงหลังการขนส่งปริมาณ cortisol ในซีรัมของปลาทั้ง 3 ชุดการทดลองมีค่าเท่ากับ 11.73±1.88, 13.13±1.29 และ 10.35±1.26 µg% ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 3 และภาพที่ 6)

ตารางที่ 3 ปริมาณ cortisol ในซีรัมของปลานิลหลังจากถูกกระตุ้นโดยการจำลองการขนส่งที่ความหนาแน่นต่าง ๆ กันเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ชุดการทดลอง	ปริมาณ cortisol ในซีรัม (µg%) ในช่วงเวลาต่าง ๆ หลังจากกระตุ้นให้เกิดความเครียด				
	ความเครียด				
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 6	ชั่วโมงที่ 12	ชั่วโมงที่ 24
5 ตัว/ถุง	8.15±1.29 ^{ab}	3.90±2.34 ^a	10.05±3.02 ^a	11.11±1.71 ^a	11.73±1.88 ^a
10 ตัว/ถุง	10.83±1.01 ^b	16.63±3.28 ^b	13.28±3.09 ^a	17.81±2.23 ^{ab}	13.13±1.29 ^a
20 ตัว/ถุง	6.91±0.68 ^a	11.28±2.56 ^{ab}	12.31±3.17 ^a	19.91±3.64 ^b	10.35±1.26 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับที่ต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 6 ปริมาณ cortisol ในซีรัมของปลานิลที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดโดยการจำลองการขนส่งด้วยความหนาแน่นต่าง ๆ กัน

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับที่ต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$)

1.3 ระดับการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ในปลานิลที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดโดยการจำลองการขนส่งด้วยความหนาแน่นต่าง ๆ กัน

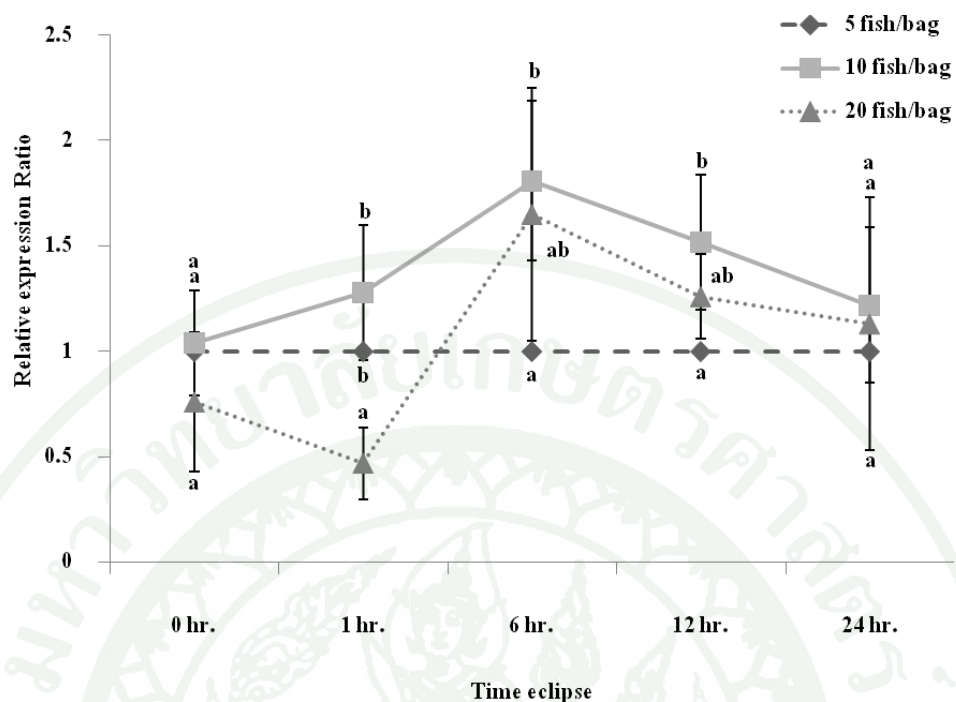
ตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ในปลานิลที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียด โดยใช้เทคนิค Real – time PCR และวิเคราะห์ข้อมูลจากการทำ Real – time PCR ด้วยวิธี Relative quantification โดยใช้ยีน β – actin ที่เป็น internal control มาใช้เพื่อ Normalize และใช้ระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ในปลาชุดที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยการบรรจุในถุงพลาสติกที่มีความหนาแน่น 5 ตัว/ถุง (ชุดควบคุม) มาเป็น Calibrator พบว่า ในชั่วโมงที่ 0 หลังการขนส่ง ปลาชุดที่ถูกบรรจุด้วยความหนาแน่น 10 ตัว/ถุง มีระดับการแสดงออกของยีน HSP70 สูงขึ้นอยู่ที่ 1.04 ± 0.25 ส่วนปลาชุดที่ถูกบรรจุด้วยความหนาแน่น 20 ตัว/ถุง มีระดับการแสดงออกลดลงที่ 0.76 ± 0.33 เมื่อเปรียบเทียบกับปลาชุดควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($P > 0.05$) จากนั้นเมื่อปล่อยปลาลงเลี้ยงต่อในสภาวะปกติเป็นเวลา 1 ชั่วโมงหลังการขนส่งพบว่า ระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ยังคงมีแนวโน้มเช่นเดิม คือ ปลาชุดที่ถูกบรรจุด้วยความหนาแน่น 10 ตัว/ถุง ยังคงมีการแสดงออกสูงขึ้นไปเท่ากับ 1.28 ± 0.32 และปลาชุดที่ถูกบรรจุด้วยความหนาแน่น 20 ตัว/ถุง มีการแสดงออกลดลงเท่ากับ 0.47 ± 0.17 เมื่อเปรียบเทียบกับปลาชุดควบคุมและเทียบกับช่วงเวลา 0 ชั่วโมงภายหลังการขนส่ง โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในชั่วโมงที่ 6 หลังจากปล่อยปลาเลี้ยงต่อในสภาวะปกติ ปลาทั้ง 2 ชุดการทดลองคือ ชุดที่บรรจุด้วยความหนาแน่น 10 และ 20 ตัว/ถุง มีระดับการแสดงออกของยีน HSP70 เพิ่มขึ้น คือ 1.81 ± 0.38 และ 1.65 ± 0.60 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับปลาชุดที่บรรจุด้วยความหนาแน่น 5 ตัว/ถุง ซึ่งใช้เป็น Calibrator พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับปลาที่บรรจุด้วยความหนาแน่น 10 ตัว/ถุง แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับปลาที่บรรจุด้วยความหนาแน่น 20 ตัว/ถุง ส่วนชั่วโมงที่ 12 หลังปล่อยลงเลี้ยงต่อพบว่า ปลาทั้ง 2 ชุดการทดลองมีระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชั่วโมงที่ 6 หลังการขนส่ง โดยมีค่าอยู่ที่ 1.52 ± 0.32 และ 1.26 ± 0.20 ตามลำดับ และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับปลาในชุดการทดลองที่ใช้เป็น Calibrator พบว่าปลาที่ใช้เป็นชุดทดลองทั้ง 2 ชุด ยังคงมีระดับของการแสดงออกที่สูงกว่า โดยปลาชุดที่บรรจุด้วยความหนาแน่น 10 ตัว/ถุง มีระดับของการแสดงออกสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปลาชุดที่บรรจุด้วยความหนาแน่น 20 ตัว/ถุง และเมื่อปล่อยปลาเลี้ยงต่อในสภาวะปกติเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปลาทั้ง 2 ชุดการทดลองมีการแสดงออกของยีน HSP70 ลดต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับระดับของการแสดงออกในชั่วโมงที่ 12 ภายหลังการขนส่ง โดยมีค่าเท่ากับ 1.22 ± 0.37 และ 1.13 ± 0.60 ตามลำดับ ซึ่งยังคงมีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับปลาชุดควบคุมแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกชุดทดลอง ($P > 0.05$) (ตารางที่ 4 และภาพที่ 7)

ตารางที่ 4 ระดับการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ในปลานิลหลังจากถูกกระตุ้นโดยการจำลองการขนส่งด้วยความหนาแน่นต่าง ๆ กันเป็นเวลา 6 ชั่วโมงและเลี้ยงต่อในสภาวะปกติเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชุดการทดลอง	ระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ในช่วงเวลาต่าง ๆ หลังจากกระตุ้นให้ปลานิลเกิดความเครียด				
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 6	ชั่วโมงที่ 12	ชั่วโมงที่ 24
	5 ตัว/ถุง*	1.00±0.00 ^a	1.00±0.00 ^b	1.00±0.00 ^a	1.00±0.00 ^a
10 ตัว/ถุง	1.04±0.25 ^a	1.28±0.32 ^b	1.81±0.38 ^b	1.52±0.32 ^b	1.22±0.37 ^a
20 ตัว/ถุง	0.76±0.33 ^a	0.47±0.17 ^a	1.65±0.60 ^{ab}	1.26±0.20 ^{ab}	1.13±0.60 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับที่ต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$)
*ใช้ปลานิลชุดที่บรรจุด้วยความหนาแน่น 5 ตัว/ถุง เป็น Calibrator



ภาพที่ 7 ระดับการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ในปลานิลที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดโดยการจำลองการขนส่งด้วยความหนาแน่นต่าง ๆ กัน

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับที่ต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$)

*ใช้ปลานิลชุดที่บรรจุด้วยความหนาแน่น 5 ตัว/ถุง เป็น Calibrator

2. การเปรียบเทียบค่าบ่งชี้ความเครียดในปลานิลที่ถูกกระตุ้นด้วยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย

Streptococcus agalactiae

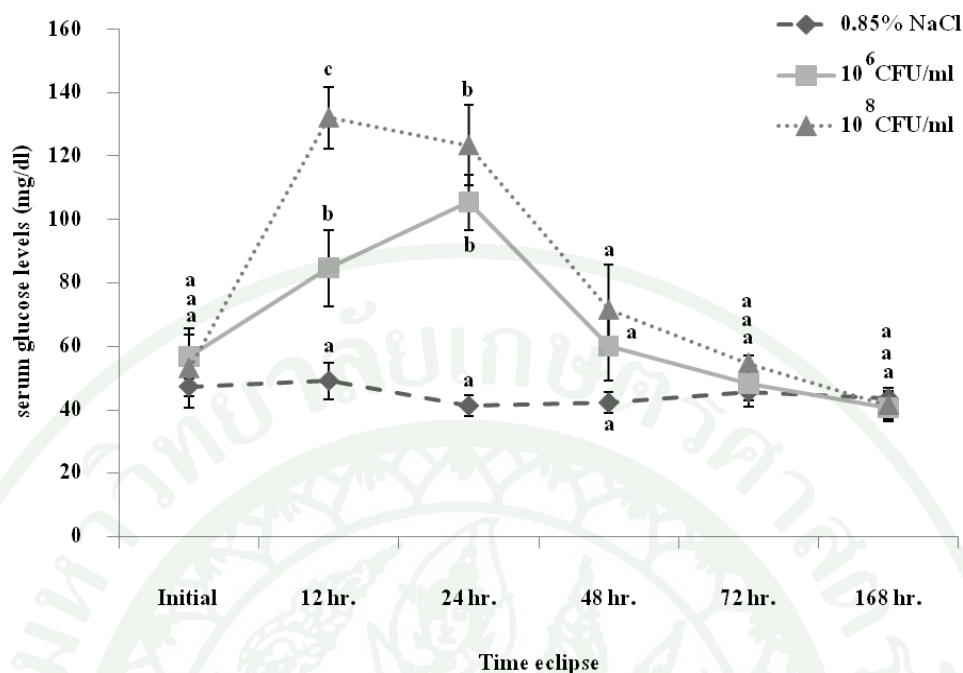
2.1 ปริมาณกลูโคสในซีรัมของปลานิลที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae*

ปริมาณกลูโคสในซีรัมของปลานิลก่อนเริ่มการทดลองมีค่าใกล้เคียงกันทุกชุดการทดลองคือ 47.32, 56.82 และ 53.10 mg/dl และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ซึ่งประกอบด้วย ชุดการทดลองที่ 1 ฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% (ชุดควบคุม) ชุดการทดลองที่ 2 และ 3 ฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 10^6 และ 10^8 CFU/ml ตามลำดับ หลังจากทำการฉีดกระตุ้นแล้วนำปลาไปปล่อยลงเลี้ยงต่อในสภาวะปกติเป็นเวลา 12 ชั่วโมงพบว่า ปลาชุดที่ฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 CFU/ml มีปริมาณกลูโคสในซีรัมสูงที่สุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับอีก 2 ชุดการทดลองคือมีค่า 132.21 ± 9.66 mg/dl รองลงมาคือชุดการทดลองที่ฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 10^6 CFU/ml มีค่าเท่ากับ 84.71 ± 11.94 mg/dl และปลาชุดที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% มีปริมาณกลูโคสในซีรัมต่ำที่สุดคือ 49.13 ± 5.70 mg/dl และเมื่อเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปลาชุดที่ฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น 10^6 และ 10^8 CFU/ml มีปริมาณกลูโคสในซีรัมใกล้เคียงกันและไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือมีค่าอยู่ที่ 105.52 ± 8.81 และ 123.48 ± 12.65 mg/dl ตามลำดับ ($P > 0.05$) ส่วนชุดการทดลองที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% มีปริมาณกลูโคสในซีรัมเท่ากับ 41.36 ± 3.25 mg/dl ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอีก 2 ชุดการทดลอง ($P < 0.05$) หลังจากนั้นเมื่อผ่านไป 48 ชั่วโมงปริมาณกลูโคสในซีรัมของปลาในทุกชุดการทดลองเริ่มมีค่าลดลงและใกล้เคียงกัน โดยที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่าอยู่ที่ 42.31 ± 3.25 , 60.10 ± 10.76 และ 71.58 ± 14.27 mg/dl ตามลำดับ ($P > 0.05$) ส่วนในชั่วโมงที่ 72 และ 168 ปริมาณกลูโคสในซีรัมของปลาในชุดที่ฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชุดการทดลอง มีปริมาณลดลงจนมีค่าใกล้เคียงกับปลาชุดที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% และใกล้เคียงกับปริมาณกลูโคสของปลา ก่อนเริ่มการทดลอง โดยชั่วโมงที่ 72 มีค่าเท่ากับ 45.59 ± 4.71 , 48.27 ± 5.16 และ 54.74 ± 2.41 mg/dl ตามลำดับ ส่วนในชั่วโมงที่ 168 มีค่าเท่ากับ 43.69 ± 3.36 , 40.75 ± 4.37 และ 41.45 ± 4.46 mg/dl ตามลำดับ (ตารางที่ 5 และภาพที่ 8)

ตารางที่ 5 ปริมาณกลูโคสในซีรัมของปลานิลหลังจากถูกกระตุ้นด้วยการฉีดเชื้อ *Streptococcus agalactiae*

ชุดการทดลอง	ปริมาณกลูโคสในซีรัม (mg/dl) ในช่วงเวลาต่าง ๆ หลังจากฉีดด้วยเชื้อ <i>S. agalactiae</i>				
	ชั่วโมงที่ 12	ชั่วโมงที่ 24	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72	ชั่วโมงที่ 168
ชุดควบคุม	49.13±5.70 ^a	41.36±3.25 ^a	42.31±3.25 ^a	45.59±4.71 ^a	43.69±3.36 ^a
10 ⁶ CFU/ml	84.71±11.94 ^b	105.52±8.81 ^b	60.10±10.76 ^a	48.27±5.16 ^a	40.75±4.37 ^a
10 ⁸ CFU/ml	132.21±9.66 ^c	123.48±12.65 ^b	71.58±14.27 ^a	54.74±2.41 ^a	41.45±4.46 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$)
 ชุดควบคุม คือ ปลานิลที่ถูกฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85%
 10⁶ CFU/ml คือ ปลานิลที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 10⁶ CFU/ml
 10⁸ CFU/ml คือ ปลานิลที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 10⁸ CFU/ml



ภาพที่ 8 ปริมาณกลูโคสในซีรัมของปลานิลที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดโดยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae*

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$)

2.2 ปริมาณ cortisol ในซีรัมของปลานิลที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae*

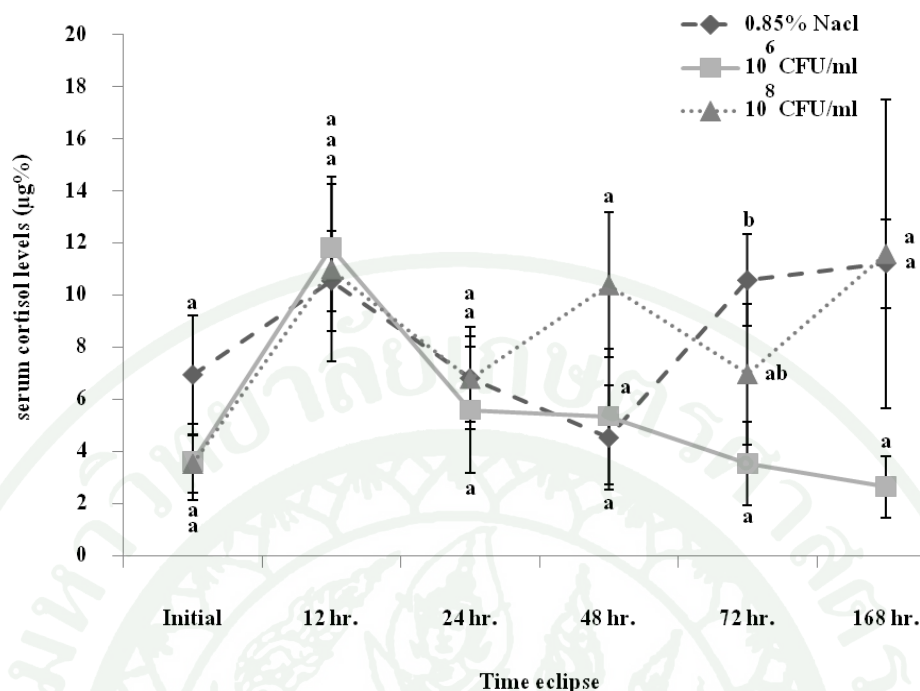
ปริมาณ cortisol ในซีรัมของปลานิลก่อนเริ่มการทดลองพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ทั้ง 3 ชุดการทดลองโดยมีค่าอยู่ที่ 6.96, 3.61 และ 3.53 $\mu\text{g}\%$ ซึ่งประกอบด้วยชุดการทดลองที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% และชุดการทดลองที่ฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 10⁶ และ 10⁸ CFU/ml ตามลำดับ เมื่อทำการฉีดน้ำเกลือและฉีดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* แล้วเลี้ยงต่อ พบว่าที่ 12 ชั่วโมง ปริมาณ cortisol ในซีรัมของปลานิลทั้ง 3 ชุดการทดลองมีค่าเพิ่มสูงขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 10.56±1.92, 11.85±2.44 และ 11.01±3.55 $\mu\text{g}\%$ ตามลำดับ ($P > 0.05$) เมื่อเลี้ยงต่อไปจนถึงชั่วโมงที่ 24 และ 48 พบว่าปริมาณ cortisol ในซีรัมของปลานิลทั้ง 3 ชุดการทดลองยังคงมีค่า

ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือมีค่า 6.83 ± 1.95 , 5.60 ± 2.43 และ 6.80 ± 1.65 $\mu\text{g}\%$ ในชั่วโมงที่ 24 และมีค่า 4.55 ± 2.00 , 5.36 ± 2.61 และ 10.40 ± 2.78 $\mu\text{g}\%$ ในชั่วโมงที่ 48 ตามลำดับ ($P > 0.05$) ปริมาณ cortisol ในซีรัมของปลานิลหลังจากเลี้ยงต่อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ปลาชุดที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% มีปริมาณ cortisol ในซีรัมสูงที่สุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 10.58 ± 1.76 $\mu\text{g}\%$ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับปลาชุดที่ฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 10^6 CFU/ml ที่มีค่าเท่ากับ 3.55 ± 1.59 $\mu\text{g}\%$ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับปลาชุดที่ฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น 10^8 CFU/ml ที่มีค่าเท่ากับ 6.98 ± 2.71 $\mu\text{g}\%$ และเมื่อเวลาผ่านไป 168 ชั่วโมงหลังการฉีดกระตุ้น ปลานิลทั้ง 3 ชุดการทดลองมีปริมาณ cortisol ในซีรัมไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีค่าอยู่ที่ 11.23 ± 1.70 , 2.65 ± 1.18 และ 11.60 ± 5.91 $\mu\text{g}\%$ ตามลำดับ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 6 และภาพที่ 9)

ตารางที่ 6 ปริมาณ cortisol ในซีรัมของปลานิลหลังจากถูกฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ *Streptococcus agalactiae*

ชุดการทดลอง	ปริมาณ cortisol ในซีรัม ($\mu\text{g}\%$) ในช่วงเวลาต่าง ๆ หลังจากฉีดด้วยเชื้อ <i>S. agalactiae</i>				
	ชั่วโมงที่ 12	ชั่วโมงที่ 24	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72	ชั่วโมงที่ 168
	ชุดควบคุม	10.56 ± 1.92^a	6.83 ± 1.95^a	4.55 ± 2.00^a	10.58 ± 1.76^b
10^6 CFU/ml	11.85 ± 2.44^a	5.60 ± 2.43^a	5.36 ± 2.61^a	3.55 ± 1.59^a	2.65 ± 1.18^a
10^8 CFU/ml	11.01 ± 3.55^a	6.80 ± 1.65^a	10.40 ± 2.78^a	6.98 ± 2.71^{ab}	11.60 ± 5.91^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 9 ปริมาณ cortisol ในซีรัมของปลานิลที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดโดยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae*

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$)

2.3 ระดับการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ในปลานิลที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae*

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ในปลานิลที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยการฉีดเชื้อแบคทีเรียพบว่า ภายหลังจากการฉีดกระตุ้นเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปลาชุดที่ฉีดด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 10^6 CFU/ml มีการแสดงออกของยีน HSP70 เท่ากับ 0.95 ± 0.17 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปลาชุดควบคุม ส่วนปลาชุดที่ถูกฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น 10^8 CFU/ml มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.19 ± 0.30 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) จากนั้นเมื่อเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงพบว่า ปลาชุดการทดลองที่ฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ระดับความเข้มข้น มีการแสดงออกสัมพัทธ์ของยีน HSP70 ลดลงทั้ง 2 ชุดการ

ทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับการแสดงออกในชั่วโมงที่ 12 หลังการฉีดกระตุ้น โดยในชั่วโมงที่ 24 มีค่าเท่ากับ 0.57 ± 0.21 และ 0.56 ± 0.08 ชั่วโมงที่ 48 มีค่าเท่ากับ 0.61 ± 0.27 และ 0.48 ± 0.15 ชั่วโมงที่ 72 มีค่าเท่ากับ 0.56 ± 0.19 และ 0.71 ± 0.10 ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 ช่วงเวลาดังกล่าวระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ในปลาที่ฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับชุดควบคุมภายในช่วงเวลาเดียวกันทั้ง 3 ช่วงเวลาพบว่า ปลาทั้ง 2 ชุดที่ฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรียมีระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ต่ำกว่าและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากนั้นเมื่อเลี้ยงปลาต่อเป็นเวลา 168 ชั่วโมงพบว่า ปลาชุดที่ฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรียในระดับความเข้มข้น 10^8 CFU/ml มีการแสดงออกของยีน HSP70 สูงที่สุดคือ 1.24 ± 0.25 แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับปลาชุดที่ฉีดด้วยระดับความเข้มข้น 10^6 CFU/ml ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.21 ± 0.04 แต่มีการแสดงออกของยีน HSP70 สูงกว่าชุดควบคุมและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 7 และภาพที่ 10)

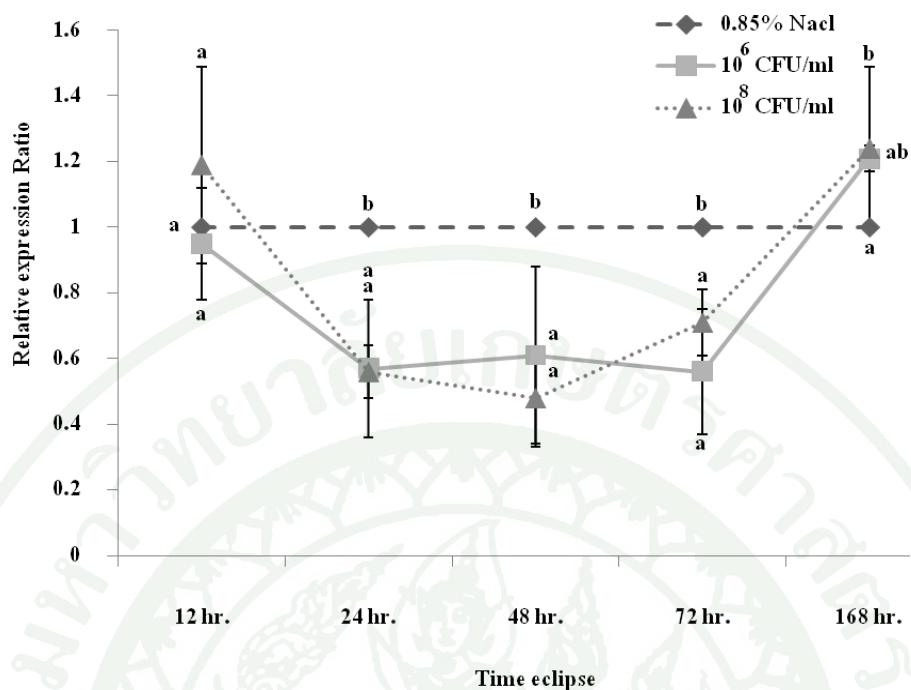
ตารางที่ 7 ระดับการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ในปลานิลหลังจากฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae*

ชุดการทดลอง	ระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ในช่วงเวลาต่าง ๆ หลังการฉีดด้วยเชื้อ <i>S. agalactiae</i>				
	ชั่วโมงที่ 12	ชั่วโมงที่ 24	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72	ชั่วโมงที่ 168
	ชุดควบคุม*	1.00 ± 0.00^a	1.00 ± 0.00^b	1.00 ± 0.00^b	1.00 ± 0.00^b
10^6 CFU/ml	0.95 ± 0.17^a	0.57 ± 0.21^a	0.61 ± 0.27^a	0.56 ± 0.19^a	1.21 ± 0.04^{ab}
10^8 CFU/ml	1.19 ± 0.30^a	0.56 ± 0.08^a	0.48 ± 0.15^a	0.71 ± 0.10^a	1.24 ± 0.25^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง

แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$)

*ใช้ปลานิลชุดควบคุมซึ่งฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% เป็น Calibrator



ภาพที่ 10 ระดับการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ในปลานิลที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดโดยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae*

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$)

*ใช้ปลานิลชุดควบคุมซึ่งฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% เป็น Calibrator

วิจารณ์

1. การเปรียบเทียบค่าป้องกันความเครียดในปลาชนิดที่ถูกกระตุ้นโดยการจำลองการขนส่งที่มีความหนาแน่นต่าง ๆ กัน

ความเครียดในปลามักถูกเหนี่ยวนำโดยการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมและร่างกายมีการปรับเพื่อให้เกิดความสมดุล ซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของพฤติกรรมและการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยาของสัตว์น้ำ (Akbari and Shariff, 2003; Li and Brouwer, 2007) สาเหตุของความเครียดที่เกิดขึ้นในสัตว์น้ำนั้นล้วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั้งสิ้น อาทิเช่น การทำงานวิจัย งานทดสอบเกี่ยวกับยาและสารเคมี รวมทั้งการเคลื่อนย้ายสัตว์น้ำ ส่วนความหนาแน่นของสัตว์น้ำและคุณภาพน้ำที่สัตว์น้ำอยู่ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถทำให้สัตว์น้ำเกิดความเครียดได้ เช่น การเลี้ยงสัตว์น้ำแบบพัฒนาที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่นสูง ซึ่งสภาพเช่นนี้ล้วนนำมาสู่การเสื่อมของคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยง และอาจส่งผลต่อการเกิดความเครียด ทำให้สัตว์น้ำเกิดการติดเชื้อได้ง่ายเนื่องจากร่างกายมีความต้านทานโรคต่ำ (Pickering, 1998)

การตอบสนองต่อความเครียดในปลา โดยทั่วไปแล้วสามารถประเมินได้จากระดับของ cortisol และ กลูโคสในเลือดที่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งค่าทั้งสองนี้สามารถนำมาใช้เป็นดัชนีชี้วัดเกี่ยวกับระดับความเครียดของปลาได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Schreck, 1982; Barton, 2002)

ในการทดลองครั้งนี้พบว่า การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกลูโคสในซีรัมของปลาชนิดที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาเนื่องจากได้รับความเครียดจากการขนส่งด้วยความหนาแน่นต่าง ๆ กันมีลักษณะคือ ระดับของกลูโคสในซีรัมจะเพิ่มขึ้นสูงที่สุดทันทีเมื่อขนส่งครบ 6 ชั่วโมง และปริมาณกลูโคสในซีรัมแสดงความสัมพันธ์กับระดับของความเครียดที่เกิดขึ้น (ระดับความหนาแน่นของปลาในการขนส่ง) ยิ่งมีความหนาแน่นมาก ปริมาณกลูโคสในซีรัมก็จะมีค่ามากตามไปด้วย หลังจากนั้นเมื่อปล่อยลงเลี้ยงต่อในสภาวะปกติพบว่าปริมาณกลูโคสในซีรัมจะค่อย ๆ ลดลงจนมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณกลูโคสในซีรัมของปลาชนิดก่อนเริ่มทำการทดลอง

การศึกษาเปรียบเทียบค่าป้องกันความเครียดในปลาชนิดที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดโดยการบรรจุในถุงพลาสติกด้วยความหนาแน่นต่างกัน 3 ระดับเป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยใช้ค่าป้องกัน 3 ค่าคือ ปริมาณกลูโคสในซีรัม ปริมาณ cortisol ในซีรัมและระดับการแสดงออกของยีน Heat Shock

Protein 70 (HSP70) พบว่าหลังการขนส่ง ปริมาณกลูโคสในซีรัมของปลานิลมีค่าเพิ่มขึ้นสูงที่สุดเมื่อขนส่งครบ 6 ชั่วโมง โดยปริมาณกลูโคสในซีรัมจะสูงที่สุดในชุดการทดลองที่มีความหนาแน่นของปลามากที่สุด ส่วนในชุดการทดลองที่มีความหนาแน่นน้อยกว่าจะมีปริมาณกลูโคสในซีรัมลดหลั่นกันลงมา ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างระดับของความเครียดและปริมาณกลูโคสในซีรัมในทิศทางที่สอดคล้องกัน หลังจากนั้นปริมาณกลูโคสของทุกชุดการทดลองก็จะค่อย ๆ ลดลงในชั่วโมงต่อ ๆ มาจนมีค่าใกล้เคียงกับปลา ก่อนเริ่มทำการทดลองเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงหลังการขนส่ง ซึ่งให้เห็นว่าระดับของความเครียดในปลาลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงซึ่งสอดคล้องกับ วิชัยและคณะ (2539) ที่ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกลูโคสในซีรัมในระหว่างการขนส่งพ่อแม่พันธุ์ปลาทะเล 4 ชนิดคือ ปลากะรัง (*Epinephelus coioides*) ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ปลากะพงทอง (*Lutjanus johnii*) และปลากะพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*) โดยพบว่าปริมาณกลูโคสในซีรัมจะมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายในเวลา 15-90 นาทีและลดลงสู่ภาวะปกติภายใน 1-2 วัน อีกทั้งยังมีความคล้ายคลึงกับการทดลองของ Gomes *et al.* (2006) ที่ได้ทำการทดลองขนส่งปลา *Arapaima gigas* เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างเลือดของปลาทันที แล้วจึงปล่อยปลาลงเลี้ยงต่อไปในบ่อดินจนครบ 96 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างเลือดเมื่อเวลาผ่านไปครบ 24, 48 และ 96 ชั่วโมง หลังจากปล่อยปลาลงเลี้ยง พบว่าระดับกลูโคสในซีรัมของปลา มีปริมาณสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 0 หลังการขนส่ง และมีปริมาณลดลงจนมีค่าใกล้เคียงกับปลา ก่อนการขนส่งเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงภายหลังจากปล่อยปลาลงเลี้ยงต่อไปในบ่อดิน และผลการทดลองในครั้งนี้ยังเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการทดลองของ Deriggi *et al.* (2006) ที่ได้ทำการศึกษาในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โดยทำการกระตุ้นให้ปลาเกิดความเครียดด้วยการจับและขังไว้ในพื้นที่แคบ ๆ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงปล่อยลงเลี้ยงต่อไปในสภาวะปกติจนครบ 6 ชั่วโมง พบว่าหลังจากที่ปลาได้รับการกระตุ้นให้เกิดความเครียด ปริมาณของกลูโคสในซีรัมจะเพิ่มขึ้นสูงที่สุดทันที จากนั้นเมื่อปล่อยปลาลงเลี้ยงต่อไปในสภาวะปกติจนครบ 6 ชั่วโมง ปริมาณของกลูโคสในซีรัมก็จะลดลงจนมีค่าใกล้เคียงกับปลา ก่อนเริ่มการทดลอง แต่ก็ยังคงมีปริมาณสูงกว่าเล็กน้อยและไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อีกทั้งยังมีผลการทดลองใกล้เคียงกับ Ortuno *et al.* (2001) ที่ศึกษาในปลา gilthead seabream (*Sparus aurata*) ซึ่งเลี้ยงด้วยความหนาแน่นสูงที่ 100 กิโลกรัม/ลูกบาศก์เมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และชุดควบคุมเลี้ยงด้วยความหนาแน่น 9 กิโลกรัม/ลูกบาศก์เมตร เมื่อครบ 2 ชั่วโมงจึงปล่อยเลี้ยงต่อที่ความหนาแน่นเท่ากับชุดควบคุม และเก็บตัวอย่างทันทีหลังจากครบ 2 ชั่วโมงและที่ 1, 2, 3 และ 4 วัน หลังจากเลี้ยงด้วยความหนาแน่นสูง พบว่า ระดับกลูโคสในซีรัมของปลาชุดทดลองมีค่าเพิ่มขึ้นสูงที่สุดทันทีหลังจากครบ 2 ชั่วโมง และมีค่าลดลงใกล้เคียงกับปลาชุดควบคุมเมื่อผ่านไป 1 วัน และมีค่าคงที่ในวันที่ 2, 3 และ 4 การขนส่งเป็นปัจจัยหนึ่ง

ส่งผลให้เกิดภาวะเครียดและเกิดขบวนการ glycogenolysis (Mayes and Bender, 2003) โดยเมื่อน้ำตาลในเลือดลดต่ำลง glycogen ในตับและกล้ามเนื้อจะถูกสลายและปล่อยออกมาในรูปของ glucose เพื่อรักษาระดับของน้ำตาลในเลือดไว้แต่จะใช้หมดภายในเวลา 12 - 18 ชั่วโมง โดยกลูโคสที่ได้จะถูกนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานในระหว่างที่เกิดความเครียดซึ่งร่างกายจะมีอัตรา metabolism สูงขึ้น ทำให้จำเป็นต้องใช้พลังงานมากขึ้นเช่นเดียวกัน (Nockels, 1990)

สำหรับความเครียดในปลาที่เกิดขึ้นจากการขนส่งนั้นถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของการเกิดความเครียดแบบเฉียบพลัน และเป็นสาเหตุให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับ cortisol ในกระแสเลือดของสัตว์น้ำได้ (Barton and Iwama, 1991) การหลั่งของ cortisol จะเกิดขึ้นทันทีที่ปลามีการเปลี่ยนแปลงจากสภาวะสมดุล และจากรายงานต่าง ๆ พบว่าการเพิ่มขึ้นของระดับ cortisol มีผลดีในการช่วยลดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากสภาพความเครียดที่ปลาได้รับ (Webster *et al.*, 2002; Bilodeau *et al.*, 2003) แต่ถ้าวระดับ cortisol ที่เกิดขึ้นมีปริมาณสูงเกินไปก็จะมีผลทำให้การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเสื่อมลง ทำให้ปลาอ่อนแอและเกิดโรคได้ง่าย (Ainsworth *et al.*, 1991) ส่วนกรณีของ cortisol ในซีรัมนั้น Barton (2002) รายงานว่า ระดับของ cortisol จะเพิ่มขึ้นสูงสุดภายหลังจากได้รับการกระตุ้นให้เกิดความเครียดเป็นเวลา 30 นาที และจะมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นเป็น 5 เท่าเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น แต่สำหรับการทดลองในครั้งนี้พบว่าระดับของ cortisol ในซีรัมมีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมงภายหลังจากปลานิลได้รับการกระตุ้นให้เกิดความเครียด และมีปริมาณ cortisol ในซีรัมเพิ่มสูงขึ้นประมาณ 8 เท่าเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับปลา ก่อนเริ่มต้นทำการทดลอง ซึ่งปลาในชุดการทดลองที่มีปริมาณ cortisol ในซีรัมสูงที่สุดก็คือปลาที่ถูกบรรจุลงในถุงพลาสติกด้วยความหนาแน่นสูงที่สุดนั่นเอง

โดยปกติแล้วระดับ cortisol ในซีรัมของปลาจะเพิ่มขึ้นเป็นครั้งแรกหลังจากที่ปลาได้รับความเครียด จากนั้นระดับกลูโคสในซีรัมจึงเพิ่มขึ้นตามมา จะเห็นว่าการเปลี่ยนแปลงขั้นแรกอันเนื่องมาจากผลของความเครียดคือการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียด คือ corticosteroids ซึ่งมีผลทำให้ glycogen ในตับเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกลูโคสที่เพิ่มสูงขึ้นในกระแสเลือด (Barton and Iwama, 1991)

ในการทดลองครั้งนี้พบว่าปริมาณ cortisol ในซีรัมของปลานิลหลังจากการขนส่งด้วยความหนาแน่นต่าง ๆ กันจะค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้น ไม่เพิ่มขึ้นสูงที่สุดทันทีหลังจากการขนส่งและไม่เพิ่มขึ้นรวดเร็วเหมือนกับปริมาณกลูโคส อีกทั้งปริมาณ cortisol ในซีรัมยังมีความสอดคล้องกับระดับของ

ความเครียดที่เกิดขึ้นน้อยกว่าปริมาณกลูโคส และเมื่อเวลาผ่านไปจนถึงสิ้นสุดการทดลองปริมาณ cortisol ในซีรัมยังมีค่าสูง ไม่ลดลงมาใกล้เคียงกับปลาก่อนเริ่มการทดลอง ซึ่งน่าจะต้องใช้เวลานานกว่านี้ที่ระดับของ cortisol ในซีรัมจะลดลงสู่ระดับปกติ

ปริมาณ cortisol ในซีรัมภายหลังการขนส่งมีแนวโน้มค่อย ๆ เพิ่มขึ้น โดยในชุดการทดลองที่บรรจุปลาด้วยความหนาแน่น 10 และ 20 ตัว/ถัง มีค่าสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 12 ภายหลังการขนส่ง เมื่อเปรียบเทียบในระหว่างชุดการทดลองพบว่าปริมาณ cortisol ในซีรัมจะสูงที่สุดในชุดการทดลองที่มีความหนาแน่นมากที่สุด ส่วนในชุดการทดลองที่มีความหนาแน่นน้อยกว่าก็จะมีปริมาณ cortisol ในซีรัมน้อยกว่าลงมาตามลำดับ หลังจากนั้นในชั่วโมงที่ 24 ภายหลังการขนส่ง ปริมาณ cortisol ในซีรัมมีค่าลดลงเล็กน้อย แต่ยังคงมีค่าสูงอยู่และยังไม่ใกล้เคียงกับค่าของปลาก่อนเริ่มการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับ Strange *et al.* (1977) ที่ทำการทดลองกับปลา chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) และ Iguchi *et al.* (2003) ที่ทดลองในปลา ayu (*Plecoglossus altivelis*) พบว่าการเลี้ยงปลาด้วยความหนาแน่นสูง จะทำให้ปริมาณ cortisol ในซีรัมสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่นต่ำ และผลการทดลองในครั้งนี้ยังเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับ Park *et al.* (2008) ซึ่งทำการศึกษาระดับของ cortisol ในซีรัมของปลา kelp grouper (*Epinephelus bruneus*) ที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดความเครียดโดยการขนส่ง พบว่า ระดับของ cortisol ในซีรัมของปลาจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงที่สุดเมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมงภายหลังการขนส่ง แต่ก็ยังมีความแตกต่างจากการทดลองของนักวิจัยท่านอื่น ๆ เช่น การทดลองของ Barcellos *et al.* (2001) ที่รายงานว่าระดับของ cortisol ในซีรัมของปลา *Rhamdia quelen* จะมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมงภายหลังจากการขนย้ายปลา และ Robertson *et al.* (1988) ที่ได้ทำการวิเคราะห์ความผันแปรของระดับ cortisol ในซีรัมของปลา *Sciaenops ocellatus* ในระหว่างการขนส่ง โดยพบว่าระดับของ cortisol ในซีรัมจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นมากที่สุดเมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง 30 นาทีภายหลังการขนส่ง จากนั้นเมื่อนำปลาไปพักไว้ในถังพักเป็นเวลา 2 วัน ระดับความเข้มข้นของ cortisol ในซีรัมของปลาจะมีค่าลดลงกลับสู่ค่าเริ่มต้นอีกครั้ง นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกว่าระดับ cortisol ในซีรัมของปลา Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) (Sandodden *et al.*, 2001) และในปลา Eurasian Perch (*Perca fluviatilis*) (Acerete *et al.*, 2004) จะมีค่าสูงที่สุดเมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมงหลังการขนส่ง ซึ่งความแตกต่างของผลการทดลองในการศึกษาต่าง ๆ นี้ น่าจะเกิดจากความแตกต่างของชนิดปลาและลักษณะของความเครียดที่ใช้ในการกระตุ้น

Cortisol จัดเป็น hormone ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียดหรือเรียกได้ว่าเป็น stress hormone เมื่อเกิดความเครียดขึ้นไม่ว่าจะด้วยสาเหตุใดก็ตามจะส่งผลทำให้ระดับของ cortisol ในเลือดเพิ่มมากขึ้นซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลในเลือดและความดันเลือดสูงขึ้นตามไปด้วย โดย cortisol ซึ่งเป็น glucocorticoid hormone จะไปกระตุ้นกระบวนการต่าง ๆ มากมายเพื่อเพิ่มและคงระดับของกลูโคสในเลือด โดยกระตุ้นกระบวนการ gluconeogenesis ในตับ ซึ่งกระบวนการนี้เป็นกระบวนการสร้างกลูโคสขึ้นมาใหม่จากสารประกอบที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต เช่น ไพรูเวท แลคเตท และกลีเซอรอล เป็นต้น กระบวนการนี้เกิดขึ้นในสภาวะที่ร่างกายต้องการกลูโคส เนื่องจากเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น สมอง ระบบประสาท ไตและเซลล์เม็ดเลือดแดง ต้องการกลูโคสซึ่งจัดเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญ ดังนั้น gluconeogenesis จึงเป็นกระบวนการที่สำคัญในการผลิตกลูโคสให้กับเนื้อเยื่อต่าง ๆ ดังกล่าว โดยมีผลทำให้เกิดการสังเคราะห์กลูโคสจากกรดอะมิโนและไขมัน รวมทั้งยังทำให้เกิดการนำกรดอะมิโนจากเนื้อเยื่อของตับมาใช้ในกระบวนการดังกล่าว นอกจากนี้ยังมีหน้าที่ยับยั้งการใช้กลูโคสในกล้ามเนื้อและในชั้นไขมันเพื่อที่จะรักษาปริมาณกลูโคสในเลือด และยังกระตุ้นให้มีการย่อยไขมันทำให้สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานในกล้ามเนื้อ (Wallberg *et al.*, 2001)

ในการทดลองนี้พบว่าระดับการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ในเหงือกของปลาไนที่ผ่านการขนส่งด้วยความหนาแน่นต่าง ๆ กันจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนถึงระดับสูงสุดหลังปล่อยลงเลี้ยงต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นจะค่อย ๆ ลดลงจนมีค่าใกล้เคียงกับปลาชุดควบคุมเมื่อสิ้นสุดการทดลอง แต่ระดับของการแสดงออกจะไม่สอดคล้องกับระดับของความเครียดที่เกิดขึ้นกับตัวปลา

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน HSP70 โดยในการทดลองนี้ใช้ยีน β -actin ที่ เป็น internal control มาใช้เพื่อ Normalize และใช้ระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ในปลาที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยการบรรจุในถุงพลาสติกที่ความหนาแน่น 5 ตัว/ถุง มาเป็น Calibrator พบว่าระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ในชุดการทดลองที่ระดับความหนาแน่น 10 และ 20 ตัว/ถุง จะค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้นและสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 6 หลังการขนส่ง โดยปลาชุดที่มีความหนาแน่น 10 ตัว/ถุง จะมีระดับการแสดงออกของยีน HSP70 สูงที่สุด รองลงมาคือปลาชุดที่มีความหนาแน่น 20 ตัว/ถุง ซึ่งทั้งสองชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่จะมีระดับการแสดงออกของยีน HSP70 สูงกว่าและมีความแตกต่างทางสถิติกับปลาชุดที่ใช้เป็น Calibrator จากนั้นระดับการแสดงออกของยีน HSP70 จะค่อย ๆ ลดลงจนมีค่าใกล้เคียงกับปลาชุดที่ใช้เป็น Calibrator เมื่อเวลา

ผ่านไป 24 ชั่วโมงหลังการขนส่ง โดยผลการทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Ercüment *et al.* (2011) ซึ่งทำการศึกษาในปลา rainbow trout โดยเลี้ยงปลาที่ความหนาแน่นแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 15, 20, 25 และ 30 กิโลกรัม/ตารางเมตร เป็นเวลา 2 เดือน และใช้ชุดการทดลองที่เลี้ยงปลาด้วยความหนาแน่น 15 กิโลกรัม/ตารางเมตร เป็นชุดควบคุม ใช้เทคนิค Real-time PCR ในการวิเคราะห์การแสดงออกเชิงปริมาณของยีน HSP70 พบว่าปลาที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น 25 และ 30 กิโลกรัม/ตารางเมตร มีการแสดงออกของยีน HSP70 ในระดับสูง ส่วนปลาที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น 15 และ 20 กิโลกรัม/ตารางเมตร จะมีการแสดงออกของยีน HSP70 ในระดับต่ำกว่า และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่ง HSP ส่วนใหญ่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการช่วยม้วนพับสายโพลีเปปไทด์ให้ได้เป็น โมเลกุล โปรตีนที่ถูกดัดและสมบูรณ์ซึ่งเรียกโปรตีนที่มีหน้าที่นี้ว่า molecular chaperone โดยสามารถพบโปรตีนชนิดนี้ได้ในทุกเซลล์ แม้ว่า HSP จะถูกพบว่ามีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนแต่ก็มีรายงานว่า HSP มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยปัจจัยอื่น ๆ (Morimoto *et al.*, 1994)

จากผลการทดลองที่ 1 นี้แสดงให้เห็นว่า ปริมาณกลูโคสในซีรัมมีความน่าเชื่อถือและมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นค่าบ่งชี้ความเครียดของปลานิลที่เกิดจากการขนส่งด้วยความหนาแน่นต่าง ๆ กัน เพราะปริมาณกลูโคสในซีรัมมีแนวโน้มของการเพิ่มขึ้นและลดลงที่ชัดเจน อีกทั้งยังมีความสอดคล้องกับระดับของความเครียดที่เกิดขึ้น ส่วนปริมาณ cortisol ในซีรัมและระดับการแสดงออกของยีน HSP70 นั้นมีแนวโน้มของการเพิ่มขึ้นและลดลงที่ค่อนข้างชัดเจนในระดับหนึ่ง แต่ยังไม่ชัดเจนและน่าเชื่อถือเท่ากับปริมาณกลูโคสในซีรัม รวมทั้งยังไม่มีความสอดคล้องกับระดับของความเครียดที่เกิดขึ้นอีกด้วย

2. การเปรียบเทียบค่าบ่งชี้ความเครียดในปลานิลที่ถูกกระตุ้นด้วยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย

Streptococcus agalactiae

การกระตุ้นให้ปลานิลเกิดความเครียดด้วยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* นั้นพบว่า ปริมาณกลูโคสในซีรัมเพิ่มขึ้นสูงที่สุดในช่วงแรกคือในชั่วโมงที่ 12 หลังจากปลาได้รับเชื้อแบคทีเรียเข้าไป จากนั้นเมื่อเวลาผ่านไปปริมาณกลูโคสในซีรัมจะค่อย ๆ ลดลงจนมีปริมาณใกล้เคียงกับปลา ก่อนเริ่มทำการทดลองและปลาที่ไม่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย และปริมาณของกลูโคสในซีรัมยังมีความสอดคล้องกับระดับของความเครียด (ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย) ที่ปลาได้รับอีกด้วย

การศึกษาเปรียบเทียบค่าบ่งชี้ความเครียดในปลาชนิดที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* โดยใช้ค่าบ่งชี้ความเครียด 3 ค่าคือ ปริมาณกลูโคสในซีรัม ปริมาณ cortisol ในซีรัมและระดับการแสดงออกของยีน HSP70 พบว่าหลังการฉีดกระตุ้น ปริมาณกลูโคสในซีรัมของปลาชนิดที่ฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรียมีค่าเพิ่มสูงขึ้นและสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 12 และ 24 ภายหลังจากฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น 10^8 และ 10^6 CFU/ml ตามลำดับ จากนั้น ปริมาณกลูโคสในซีรัมของปลาทั้งสองชุดจะค่อย ๆ ลดลงจนมีค่าใกล้เคียงกับปลาก่อนเริ่มการทดลองและปลาชุดที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% หลังการฉีดกระตุ้นและปล่อยลงเลี้ยงต่อเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ซึ่งให้เห็นว่าปลาที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้นสูงจะเกิดความเครียดมากและจะมีปริมาณกลูโคสในซีรัมสูงที่สุด และปลาที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่ำจะเกิดความเครียดน้อยกว่าและมีปริมาณของกลูโคสในซีรัมต่ำกว่า ส่วนปลาชุดที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% (ชุดควบคุม) พบว่าปริมาณของกลูโคสในซีรัมมีค่าค่อนข้างคงที่ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่านอกจากเชื้อแบคทีเรียจะก่อให้เกิดโรคร่วมกับปลาได้แล้วยังสามารถก่อให้เกิดความเครียดขึ้นได้ด้วย โดยที่เมื่อปลาได้รับเชื้อก่อโรคเข้าสู่ร่างกายแล้วปลาจะรับรู้ได้ถึงความผิดปกติที่เกิดขึ้นและจะพยายามปรับร่างกายให้กลับสู่สภาวะปกติ และการที่ปลาจะปรับตัวให้เข้าสู่สภาวะปกติได้นั้น จะต้องทำลายเชื้อก่อโรคที่เข้าไปในร่างกายโดยอาศัยการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เมื่อมีเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมเข้ามา ระบบภูมิคุ้มกันก็จะมีการทำงานมากขึ้น ส่งผลให้ร่างกายมีความจำเป็นต้องใช้พลังงานมากขึ้น ทำให้ปริมาณกลูโคสในซีรัมมีค่าเพิ่มสูงขึ้นนั่นเอง เช่นเดียวกับ Ackerman and Iwama (2001) ที่ได้ทำทดลองฉีดเชื้อ *Vibrio anguillarum* เข้าไปในปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) พบว่าปลาชุดที่ฉีดด้วยเชื้อดังกล่าวจะมีปริมาณกลูโคสในซีรัมเพิ่มสูงขึ้นและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปลากลุ่มควบคุมหลังจากฉีดเชื้อเป็นเวลา 6 วัน

ปริมาณ cortisol ในซีรัมของปลาชนิดที่เกิดความเครียดจากการได้รับเชื้อแบคทีเรียจะเพิ่มสูงขึ้นในช่วงแรก จากนั้นจะค่อย ๆ ลดปริมาณลง และในช่วงสุดท้ายจะเพิ่มขึ้นอีกครั้ง แต่จะมีบางชุดการทดลองที่ระดับของ cortisol เพิ่มขึ้นสูงสุดในช่วงแรก จากนั้นจะค่อย ๆ ลดลงจนมีค่าใกล้เคียงกับปลาก่อนเริ่มทำการทดลอง อย่างไรก็ตามปริมาณของ cortisol ในซีรัมนั้นไม่แสดงความสัมพันธ์กับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย รวมทั้งเมื่อเวลาผ่านไปจนถึงสิ้นสุดการทดลองแล้วระดับของ cortisol ในซีรัมยังคงมีค่าสูงซึ่งน่าจะต้องใช้เวลามากกว่านี้ระดับของ cortisol จึงจะลดลงจนมีค่าใกล้เคียงกับปลาก่อนเริ่มการทดลอง

ปริมาณ cortisol ในซีรัมของปลานิลหลังจากฉีดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 และ 10^6 CFU/ml และชุดควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% พบว่าปลาทั้ง 3 ชุดการทดลองมีปริมาณ cortisol เพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 12 หลังจากฉีดกระตุ้น โดยชุดที่ฉีดด้วยแบคทีเรียความเข้มข้น 10^6 CFU/ml จะเพิ่มขึ้นสูงที่สุด จากนั้นจะมีค่าลดลง ส่วนอีกสองชุดการทดลองนั้นปริมาณ cortisol จะมีค่าลดลงและเพิ่มขึ้นสูงที่สุดเมื่อเวลาผ่านไป 168 ชั่วโมงหลังการฉีดเชื้อ จากผลการทดลองจะเห็นว่า การเปลี่ยนแปลงของระดับ cortisol ในซีรัมนั้นมีรูปแบบที่ไม่แน่นอนและไม่สอดคล้องกับระดับของความเครียดที่เกิดขึ้น ซึ่งคล้ายคลึงกับ Ackerman and Iwama (2001) ที่ได้ทดลองกับปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) โดยฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio anguillarum* เพื่อให้ปลาเกิดความเครียด และวัดปริมาณ cortisol ในซีรัม พบว่าทั้งปลาชุดควบคุมและปลาชุดที่ถูกฉีดกระตุ้นมีปริมาณ cortisol ในซีรัมเพิ่มสูงขึ้นในช่วงแรกหลังการฉีดกระตุ้น จากนั้นปริมาณ cortisol ในซีรัมของปลาทั้งสองชุดการทดลองมีค่าลดลง และเมื่อผ่านไป 5 วัน พบว่าปริมาณ cortisol ในซีรัมของปลาชุดที่ได้รับการฉีดกระตุ้นกลับเพิ่มขึ้นอีกครั้ง ระดับของ cortisol มีการเปลี่ยนแปลงตอบสนองที่รวดเร็วต่อความเครียดจึงมีความเป็นไปได้ว่า ขั้นตอนการจับปลาเพื่อเก็บตัวอย่างอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ cortisol ในซีรัมของปลาได้ (Cleary *et al.*, 2002; Tsunoda *et al.*, 1999)

จากผลการทดลองปลานิลที่เกิดความเครียดจากการได้รับเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* จะมีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน HSP70 คือ ในช่วงแรกระดับของการแสดงออกจะค่อนข้างคงที่ จากนั้นจะลดลงและทรงตัว จนกระทั่งช่วงสุดท้ายของการทดลอง จะมีการแสดงออกสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ไม่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งระดับการแสดงออกของยีน HSP70 นั้นไม่แสดงความสัมพันธ์กับปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ปลาได้รับ

ระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ในชุดการทดลองที่ฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ความเข้มข้น 10^8 และ 10^6 CFU/ml มีแนวโน้มของการแสดงออกลดลงในชั่วโมงที่ 24, 48 และ 72 หลังการฉีดเชื้อเมื่อเปรียบเทียบกับปลานิลชุดที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% จากนั้นเมื่อเวลาผ่านไป 168 ชั่วโมง พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ในปลานิลทั้งสองชุดทดลองมีค่าสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% ผลการทดลองที่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับ Ackerman and Iwama (2001) ที่ทดลองกับปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) โดยฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio anguillarum* เข้าไปแล้วเลี้ยงต่อนาน 8 วัน และเก็บตัวอย่างตับและไตส่วนหน้าเป็นประจำทุกวันเพื่อนำมาตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน HSP70 โดยพบว่าในวันที่ 1 และ 2

หลังการกระตุ้นมีระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับปลาชุดควบคุมซึ่งไม่ได้ฉีดเชื้อ จากนั้นในวันที่ 3, 4 และ 5 พบว่าระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามลำดับโดยมีการแสดงออกสูงสุดในวันที่ 5 หลังการฉีดกระตุ้น ต่อจากนั้นในวันที่ 6, 7 และ 8 ระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ค่อย ๆ ลดลงจนใกล้เคียงกับปลาชุดควบคุมในวันที่ 8 หลังการฉีดกระตุ้น แต่ยังคงมีระดับการแสดงออกของยีน HSP70 สูงกว่าปลาชุดควบคุม ต่างกับ Cha *et al.* (2013) ที่ทดลองในปลา olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) โดยฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus parauberis* ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 CFU/ml เข้าทางช่องท้อง และเก็บตัวอย่างไตเพื่อนำไปตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน HSP70 โดยเก็บเมื่อเวลาผ่านไป 6, 24, 72 และ 120 ชั่วโมงหลังการฉีดเชื้อ ใช้ปลาที่ไม่ได้ฉีดเชื้อเป็นชุดควบคุม โดยเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน HSP70 กับชุดควบคุม พบว่า เมื่อครบ 6 ชั่วโมงระดับการแสดงออกของยีน HSP70 มีค่าลดลง แต่เมื่อผ่านไป 24 และ 72 ชั่วโมงกลับมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้น จากนั้นเมื่อครบ 120 ชั่วโมงระดับการแสดงออกมีค่าลดลงเล็กน้อย ซึ่งระดับของการแสดงออกที่ลดลงในชั่วโมงที่ 6 นั้น Cha *et al.* (2013) ให้เหตุผลว่าน่าจะเกิดจากการตายเป็นจำนวนมากของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะ monocytes หรือ macrophages ซึ่งถูกทำลายโดยเชื้อแบคทีเรียที่เข้าไปในร่างกายของปลา ทั้งนี้ macrophages เป็นเซลล์ที่มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันและมีระดับของโปรตีน HSP70 สูงกว่าเซลล์ชนิดอื่น ๆ (Bachelet *et al.*, 1998) ดังนั้นเมื่อเกิดการตายของเซลล์ macrophages เป็นจำนวนมากจึงส่งผลให้ระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ลดต่ำลง ส่วน Forsyth *et al.* (1997) ทำการทดลองในปลา coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) โดยการฉีดเชื้อ *Renibacterium salmoninarum* เข้าทางช่องท้องที่ระดับความเข้มข้น 10^4 CFU/ml จากนั้นเก็บตัวอย่างตับและไตส่วนหน้าเพื่อวัดระดับการแสดงออกของยีน HSP70 เมื่อเวลาผ่านไป 1, 4 และ 9 สัปดาห์หลังฉีดเชื้อ และใช้ปลาที่ไม่ได้ฉีดเชื้อเป็นชุดควบคุม พบว่า หลังจากฉีดเชื้อ ปลาในชุดทดลองจะมีทั้งปลาที่มีและไม่มีอาการของโรค โดยปลาชุดที่มีอาการของโรคจะมีการแสดงออกของยีน HSP70 สูงขึ้นทั้ง 2 อวัยวะและมีความแตกต่างทางสถิติกับปลาที่ไม่มีอาการของโรคและปลาชุดควบคุม ส่วนปลาชุดทดลองที่ไม่มีอาการของโรคนั้นจะมีการแสดงออกใกล้เคียงกับปลาชุดควบคุมและไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ซึ่ง Forsyth *et al.* (1997) กล่าวว่า การแสดงออกที่สูงขึ้นของยีน HSP70 ในปลาที่ติดเชื้อนั้นอาจมีผลมาจากการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพหรืออาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงอื่น ๆ ภายในร่างกายปลา เช่น ความผิดปกติของปริมาณไอออนในร่างกาย การเกิดสภาวะ hypoxia เนื่องจากมีระดับของ hemoglobin ในเลือดต่ำ หรือการที่เซลล์ถูกเชื้อโรคทำลาย นอกจากนี้เชื้อก่อโรคชนิดอื่น ๆ ในปลา ยังสามารถกระตุ้นให้ยีน HSP70 มีการแสดงออกสูงขึ้น การทดลองของ Deane *et al.* (2004) ที่ศึกษาในปลา sea bream (*Sparus sarba*) โดยฉีดด้วยเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ที่ความเข้มข้น 10^4

CFU/ml แล้วเก็บตัวอย่างดပ်เพื่อวัดระดับการแสดงออกของยีน HSP70 เมื่อเวลาผ่านไป 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมงหลังจากฉีดเชื้อ ใช้ปลาที่ไม่ได้ฉีดเชื้อเป็นชุดควบคุม พบว่า ในทุกช่วงเวลาหลังการฉีดเชื้อ ปลาชุดการทดลองที่ได้รับเชื้อมีการแสดงออกของยีน HSP70 สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยระดับของการแสดงออกในชั่วโมงที่ 12 มีค่าค่อนข้างสูง จากนั้นในชั่วโมงที่ 24 มีการแสดงออกลดลงเล็กน้อย และค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งในชั่วโมงถัดไปจนสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ส่วนชุดควบคุมมีระดับของการแสดงออกค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง

จากผลการทดลองที่ 2 นี้แสดงให้เห็นว่า ปริมาณของกลูโคสในซีรัมมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นค่าบ่งชี้ความเครียดในปลานิลที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* เพราะปริมาณกลูโคสในซีรัมมีแนวโน้มและความสัมพันธ์สอดคล้องกับระดับของความเครียดที่เกิดขึ้นจากปริมาณเชื้อที่แตกต่างกันค่อนข้างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ cortisol ในซีรัมและระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ซึ่งค่าบ่งชี้ทั้ง 2 นั้นมีแนวโน้มของการเพิ่มขึ้นและลดลงที่ไม่ชัดเจน อีกทั้งยังไม่มีความสัมพันธ์สอดคล้องกันกับระดับของความเครียดที่เกิดขึ้นอีกด้วย

การเปลี่ยนแปลงที่ตอบสนองต่อความเครียดในปลานั้นสามารถแบ่งได้เป็น 3 ระยะคือ ระยะแรกจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งระดับการไหลเวียนของ cortisol และ catecholamines จากนั้นจะเกิดการตอบสนองในระยะที่สองซึ่งเกิดจากการตอบสนองของต่อมไร้ท่อ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับกลูโคสในเลือด แลคเตต กรดแลคติก และไอออนชนิดต่าง ๆ เช่น คลอไรด์ ไอออน โซเดียม ไอออน และโปแตสเซียม ไอออน เป็นต้น รวมไปถึงเกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับไกลโคเจนในเนื้อเยื่อ และการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของ HSP และในระยะที่สามจะมีผลต่อการเจริญเติบโต ความต้านทานโรค รวมไปถึงพฤติกรรมต่าง ๆ ของปลา ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระยะที่สามนี้ส่งผลมาจากการตอบสนองในระยะแรกและระยะที่สองนั่นเอง (Barton, 2002)

การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่เกิดขึ้นอาจจะมีสาเหตุมาจากเหตุผลอื่น ๆ อีก 2 ประการ ประการแรกคือ ความแตกต่างทางด้านพันธุกรรม การพัฒนาการ และปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม ซึ่งปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ล้วนมีผลต่อการตอบสนองต่อความเครียดทั้งสิ้น ประการที่สองคือ การวิเคราะห์ข้อมูลที่มีความผันแปรสูงในกลุ่มการทดลองเดียวกันซึ่งเห็นได้ชัดเจนจากการตอบสนองของลักษณะทางเคมีในเลือดของปลาที่มีความแตกต่างกัน (Barton, 2002)

เมื่อปลาได้สัมผัสกับปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเครียด กลไกทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียดได้ถูกกระตุ้นโดยการส่งสัญญาณไปยังระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system: CNS) ซึ่งเส้นใยประสาทของระบบประสาทแบบ sympathetic ที่ปกคลุมในส่วน ของ Chromaffin cells ได้กระตุ้นให้เกิดการหลั่ง catecholamine ผ่าน cholinergic receptors ทั้งนี้จะ พบ Chromaffin tissues (adrenal medulla homologue) ได้ทั่วไปในไตส่วนหน้าของปลากระดูกแข็ง (Reid *et al.*, 1998) สำหรับ catecholamine และ epinephrine ในปลากระดูกแข็งนั้นถูกเก็บไว้ใน Chromaffin cells และจะหลั่งออกมาอย่างรวดเร็วเมื่อเกิดความเครียด (Mazeaud *et al.*, 1977; Randall and Perry, 1992; Reid *et al.*, 1998)

การหลั่งฮอร์โมน cortisol ของปลากระดูกแข็งจะสัมพันธ์กับการหลั่งของ catecholamine โดยเส้นทางของการหลั่ง cortisol เริ่มที่ hypothalamic pituitary interrenal axis (HPIaxis) ด้วยการ หลั่ง corticotropin - releasing hormone (CRH) จากสมองส่วน hypothalamus เพื่อกระตุ้น corticotropic cells ของ anterior pituitary ให้หลั่ง adrenocorticotropic hormone (ACTH) ออกมา ซึ่งสารนี้จะไหลเวียนไปกระตุ้น interrenal cells (adrenal cortex homologue) ที่อยู่ในไตเพื่อให้มีการ สังเคราะห์และหลั่ง corticosteroids สู่อวัยวะเป้าหมายต่าง ๆ สำหรับ interrenal tissue นี้จะอยู่ที่ไตส่วนหน้าของปลากระดูกแข็ง และจะมีลักษณะที่แตกต่างกันตาม วิวัฒนาการของสัตว์ (Nandi, 1962)

กระบวนการในการสังเคราะห์ฮอร์โมน cortisol นั้น เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ 17- α -hydroxylase ที่ไปเปลี่ยน progesterone และ pregnenolone ซึ่งมี cholesterol เป็นสารตั้งต้น ให้ ไปอยู่ในรูปของ 17- α -hydroprogesterone จากนั้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นรูปของ deoxycortisol โดย อาศัยเอนไซม์ C-21 hydroxylase จากนั้น deoxycortisol จะถูกเปลี่ยนไปเป็น cortisol โดย การทำงานของเอนไซม์ 11- β -hydroxylase (Lindzey and Korach, 1997)

เมื่อปลาเกิดความเครียดจากการกระตุ้นด้วยปัจจัยต่าง ๆ ปลาจะมีการเปลี่ยนแปลงทาง สรีรวิทยาโดยการสร้างและหลั่งฮอร์โมน cortisol สู่อวัยวะเลือด ซึ่งระดับของฮอร์โมน cortisol ใน กระแสเลือดที่สูงขึ้นนี้จะมีผลกระทบต่อการทำงานของทางภูมิคุ้มกัน เนื่องจาก ฮอร์โมน cortisol มีผลทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte ลดลง ลดกิจกรรมของ NK cell และ Neutrophil (Fast *et al.*, 2008) อีกทั้งยังไปขัดขวางการเพิ่มจำนวนของ T cell โดยไปขัดขวาง การหลั่ง Interleukin I และ Interleukin II ซึ่งเป็น T cell growth factor ทำให้ T cell ไม่สามารถเพิ่ม

จำนวนและคงอยู่ได้ ซึ่งการเกิดภาวะต่าง ๆ เหล่านี้ส่งผลให้การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในปลา มีประสิทธิภาพลดลง ปลาจึงมีสุขภาพอ่อนแอและรับเชื้อโรคชนิดต่าง ๆ เข้าสู่ร่างกายได้ง่ายขึ้น (Barton, 2002)

ความเครียดที่เกิดขึ้นในปลานั้นนอกจากจะมีผลต่อระบบต่อมไร้ท่อและระบบภูมิคุ้มกันแล้วยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาอื่น ๆ เช่น การสูญเสียพลังงานซึ่งเก็บไว้ที่กล้ามเนื้อและตับ (phosphocreatine, ATP และ glycogen) ทำให้มีการสูญเสียไอออนที่อยู่ในเลือด และทำให้น้ำตาลในเลือดสูงขึ้น เนื่องจากฮอร์โมน cortisol ที่เพิ่มขึ้นจากการเกิดความเครียดจะขัดขวางการทำงานของ Insulin ส่งผลให้เกิดภาวะ hyperglycemia โดย cortisol จะไปกระตุ้นให้เกิดการสลายตัวของ glycogen ที่ตับและยังไปช่วยในการยับยั้งการใช้กลูโคสที่มีอยู่ในกระแสเลือดได้อีกด้วย ทั้งนี้ cortisol ยังสามารถทำให้เกิดการสังเคราะห์ glycogen ที่ตับได้ในกรณีของปฏิกิริยาผันกลับ (King, 2005)

เมื่อมีความเครียดเกิดขึ้นจะส่งผลให้เกิดการลดการสร้างและการหลั่งของฮอร์โมนชนิดอื่น ๆ ในกระแสเลือด เช่น reproductive hormones (Pickering *et al.*, 1987; Pankhurst and Dedual, 1994; Haddy and Pankhurst, 1999) สำหรับการศึกษาก็เกี่ยวกับการตอบสนองต่อความเครียดนั้น ฮอร์โมน cortisol ถือว่าเป็นค่าบ่งชี้ที่วัดการตอบสนองต่อความเครียดได้ดีในระดับหนึ่ง นอกจากนี้ยังมีการใช้ catecholamine และ indoleamines เป็นค่าบ่งชี้ที่บอกลถึงการตอบสนองของ central brain monoamines เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยความเครียด (Winberg and Nilsson, 1993) และสามารถวัด serotonin เป็นดัชนีบ่งบอกลถึงการควบคุมการทำงานของ epinephrine และ cortisol ในระหว่างที่เกิดความเครียดได้ (Fritsche *et al.*, 1993; Winberg and Nilsson, 1993; Winberg *et al.*, 1997)

ปริมาณของ cortisol ยังมีผลต่อการเพิ่มขึ้นและลดลงของระดับการแสดงออกของยีน HSP70 (Pottinger, 1990; Maule and Schreck, 1991) โดยการเพิ่มขึ้นของระดับ cortisol จะทำให้เกิดการแยกตัวของ HSP70 และ HSP90 ออกจาก Glucocorticoid Receptor (GR) ซึ่งในสภาวะปกติ GR จะรวมตัวอยู่กับ HSP70 1 โมเลกุล และ HSP90 2 โมเลกุลเพื่อช่วยคงสภาพโครงสร้างของ GR และทำให้สามารถจับกับ cortisol ได้ (Pratt, 1993) ส่วนกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีน HSP70 นั้นเกี่ยวข้องกับการทำงานของ Heat Shock Factor (HSF) และ Heat Shock Element (HSE) (Schoffl *et al.*, 1998) โดย HSF จะอยู่ในสภาวะ inactive ซึ่งอาจอยู่ร่วมกับ HSP70 หรืออาจอยู่เป็นอิสระก็ได้ แต่เมื่อปริมาณ HSP70 ลดลง HSF ที่เป็นอิสระจะถูกเติมด้วยหมู่ฟอสเฟต

(phosphorylation) และเคลื่อนตัวเข้าสู่นิวเคลียสไปจับกับ HSE ซึ่งเป็นส่วน promotor ของยีน HSP ทำให้เกิดกระบวนการ transcription และ translation เป็น HSP ออกมาทำหน้าที่ต่าง ๆ ภายในเซลล์ แต่เมื่อมีปริมาณ HSP70 มากเกินไป HSP70 ก็จะจับกับ HSF อิสระเพื่อยับยั้งการกระตุ้นการ แสดงออกของยีน HSP70 (Morimoto *et al.*, 1992) นั่นคือ HSP70 อิสระที่แยกตัวออกมาจาก GR ใน ขั้นตอนของการจับกันระหว่าง GR และ cortisol นั้นจะไปยับยั้งย้อนกลับทำให้การแสดงออกของ ยีน HSP70 ลดลงเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ cortisol

Heat Shock Protein (HSP) ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับกระบวนการช่วยม้วนพับสายโพลีเปป-ไทด์ให้ได้เป็น โมเลกุล โปรตีนที่ถูกต้องและสมบูรณ์ โดยมีลักษณะของการทำงานคือ การช่วยม้วน พับสายโพลีเปปไทด์ในเซลล์และกระบวนการเคลื่อนย้ายโมเลกุลโปรตีนผ่าน membrane เข้าสู่ organelle ต่าง ๆ ของเซลล์ นอกจากนี้ยังมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการช่วยม้วนพับ โมเลกุลโปรตีนที่เสีย สภาพและคลายตัวเมื่อเซลล์ได้รับภาวะร้อน ถึงแม้ HSP จะถูกพบว่ามีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับ ความร้อนแต่ก็มีรายงานว่า HSP มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยปัจจัยทางกายภาพหรือ สารเคมีบางชนิด (Morimoto *et al.*, 1994)

HSP70 ยังมีหน้าที่ในการช่วยม้วนพับสาย โปรตีนที่เพิ่งสังเคราะห์ใหม่ให้มีการม้วนพับที่ ถูกต้องสมบูรณ์ และช่วยสายโปรตีนที่ม้วนพับผิดปกติและไม่สามารถทำงานได้ ให้กลับมาม้วนพับ ได้ถูกต้องและทำงานได้อีกครั้ง รวมถึงช่วยในการเคลื่อนย้ายโปรตีนและสารชนิดต่าง ๆ เข้าไปใน เซลล์ด้วย HSP70 จะทำหน้าที่คล้ายกับ housekeeping gene โดยเมื่ออยู่ภายในเซลล์จะช่วยในการ ม้วนพับสายโปรตีนและทำหน้าที่เป็นเหมือนตัวส่งสัญญาณเมื่อเซลล์มีความต้องการพลังงานมาก ขึ้นและช่วยควบคุมคุณภาพในการสังเคราะห์โปรตีนสายใหม่ให้มีโครงสร้างของโปรตีนถูกต้อง และใช้งานได้ (Cooper, 2000)

บทบาทของ HSP70 ในการช่วยม้วนพับสายโปรตีนที่เพิ่งสังเคราะห์ใหม่และยังไม่สามารถ ทำงานได้นั้นสามารถแบ่งได้เป็น 3 หน้าที่คือ ป้องกันการรวมตัวหรือพับตัวของสายโปรตีนที่เพิ่ง สังเคราะห์เสร็จ ช่วยให้สายโปรตีนม้วนพับ ได้ถูกต้องและสามารถทำงานได้ตามปกติ และทำหน้าที่ คล้ายสารละลายในการช่วยให้สายโปรตีนที่เกิดการรวมตัวกันอยู่นั้นแยกออกจากกัน จากนั้นจึงช่วย ม้วนพับสายโปรตีนให้ถูกต้องและทำงานได้ HSP70 ที่อยู่ภายในเซลล์นั้นจะทำหน้าที่ควบคุมไม่ให้ เกิดการม้วนพับของสายโปรตีนที่ไม่ถูกต้องและช่วยควบคุมคุณภาพของโปรตีนสายใหม่ที่ สังเคราะห์ขึ้นมาให้เป็นโปรตีนที่สามารถทำงานได้ (Bachelet *et al.*, 1998)

HSP70 มีหน้าที่สำคัญในการปกป้องเซลล์โดยจะรวมตัวกับโปรตีนที่เสียสภาพ และทำให้โปรตีนเหล่านั้นขดตัวใหม่ (refolding) ให้สามารถกลับไปทำหน้าที่ได้ (Morimoto *et al.*, 1994) เซลล์ที่ไม่ได้รับความเครียด HSP70 จะทำหน้าที่เป็น molecular chaperone หรือโปรตีนที่ช่วยโปรตีนอื่น ๆ ในการขดตัว โดยจะเข้าไปจับและช่วยให้โปรตีนนั้นคงสภาพ จนทำให้โปรตีนต่าง ๆ มีการขดตัวได้อย่างถูกต้อง (Cooper, 2000) ในสภาพปกติ HSP70 มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่มในรูป dimer, trimer หรือ oligomer ซึ่งการอยู่รวมกลุ่มกันนี้จะเป็นลักษณะของ inactive form และเมื่อเข้าสู่ภาวะเครียดก็จะมีการแยกตัวกลับมาเป็นโมเลกุลเดี่ยว เพื่อทำงานอีกครั้ง (Benaroudj *et al.*, 1997)

บทบาทการทำงานของ HSP70 ในการเป็น chaperone จะมีลักษณะของการทำงานในทางอ้อมซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะโดย แบบแรก HSP70 ซึ่งจับอยู่กับสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนนั้นจะมีการปล่อยสารตั้งต้นดังกล่าวออกมาให้อยู่ในรูปสารตั้งต้นอิสระในปริมาณเพียงเล็กน้อยเพื่อช่วยในการป้องกันการจับตัวหรือรวมตัวกันเองของสายโปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ซึ่งเป็นสายโปรตีนที่ยังไม่สามารถทำงานได้ ส่วนแบบที่สอง HSP70 จะช่วยให้สารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนกระตุ้นให้สายโปรตีนที่ยังม้วนพับตัวได้ไม่สมบูรณ์และสายโปรตีนที่มีการม้วนพับผิดปกติไปสามารถม้วนพับตัวได้อย่างถูกต้องและสมบูรณ์เพื่อให้สายโปรตีนเหล่านั้นทำงานได้ตามปกติ (Iwama *et al.*, 2003)

อย่างไรก็ตามการตอบสนองต่อความเครียดของ HSP นั้นมักจะมี ความแปรปรวน โดยเกิดจากปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้ศึกษา (Rabergh *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 1999) ชนิดของ HSP เช่น HSP90, HSP70 และ HSP60 เป็นต้น (Smith *et al.*, 1999) รวมไปถึงสาเหตุที่ก่อให้เกิดความเครียด (Airaksinen *et al.*, 2003) อีกทั้งระดับการแสดงออกของยีน HSP ยังมีความแตกต่างกัน โดยขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ทดลอง (Basu *et al.*, 2001; Nakano and Iwama, 2002) อายุของสัตว์ทดลอง (Santacruz *et al.*, 1997; Lele *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 2001) และฤดูกาลต่าง ๆ (Fader *et al.*, 1994) จากความแปรปรวนของการตอบสนองต่อความเครียดและการแสดงออกของยีน HSP ซึ่งเห็นได้จากข้อมูลเบื้องต้นเหล่านี้ทำให้ไม่สามารถสรุปได้ว่า HSP มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นค่าบ่งชี้ของการตอบสนองต่อความเครียดในปลา (Iwama *et al.*, 2003)

จากผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าค่าบ่งชี้ความเครียดในปลานิลที่มีความเหมาะสมและควรนำไปใช้เมื่อปลานิลเกิดความเครียดจากการขนส่งด้วยความหนาแน่นต่าง ๆ กันและจากการติดเชื้อแบคทีเรียก็คือ ปริมาณกลูโคสในซีรัม เนื่องจากมีแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน อีกทั้ง

ยังมีความสอดคล้องกับระดับของความเครียดที่เกิดขึ้น ซึ่งแตกต่างจากค่าบ่งชี้อื่นอีก 2 ค่าที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ ปริมาณ cortisol ในซีรัมและระดับการแสดงออกของยีน HSP70 จากเหงือกของปลานิลที่มีแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงไม่ชัดเจนนัก และยังไม่มีความสอดคล้องกับระดับของความเครียดที่เกิดขึ้นอีกด้วย ส่วนการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ในทั้ง 2 การทดลองนั้น ผู้วิจัยได้เลือกใช้เนื้อเยื่อเหงือกของปลานิลเพื่อนำมาวัดระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ซึ่งเนื้อเยื่อเหงือกอาจจะไม่ใช่อวัยวะเป้าหมายที่เหมาะสมในการนำมาใช้ตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดความเครียดจากการขนส่งและฉีดเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นจึงควรเลือกใช้เนื้อเยื่อที่จะนำมาวัดระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ให้มีความเหมาะสมกับลักษณะของความเครียดที่เกิดขึ้นกับตัวปลา อีกทั้งเทคนิคที่ใช้ในการวัดระดับการแสดงออกของยีน HSP70 นั้นเป็นเพียงการวัดปริมาณ mRNA เท่านั้น ทั้งนี้ผู้วิจัยจึงมีข้อเสนอแนะให้มีการตรวจวัดระดับของโปรตีนโดยตรงซึ่งผลการทดลองที่ได้อาจจะมีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามการนำปริมาณกลูโคสในซีรัมของปลาไปใช้เป็นค่าบ่งชี้ความเครียดควรมีข้อพึงระวังอยู่หลายประการ เช่น อายุของสัตว์ ชนิดของอาหารที่ได้รับ ระยะเวลาครั้งสุดท้ายของการให้อาหาร และช่วงฤดูกาลต่าง ๆ ในรอบปี เป็นต้น ดังนั้นเพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นจึงควรปรับให้สัตว์ทดลองอยู่ในระดับมาตรฐานเดียวกันก่อนทำการทดลอง และเนื่องจากการทดลองในครั้งนี้ใช้ค่าบ่งชี้ความเครียดเพียง 3 ค่า ดังนั้นในการต่อยอดจากการทดลองนี้อาจเพิ่มชนิดของค่าบ่งชี้ให้หลากหลายขึ้น เช่น แลคเตต กรดแลคติก คลอไรด์ไอออน โซเดียมไอออน และโปแตสเซียมไอออน เป็นต้น เพื่อจะได้ค่าบ่งชี้ที่มีความเหมาะสมต่อไป

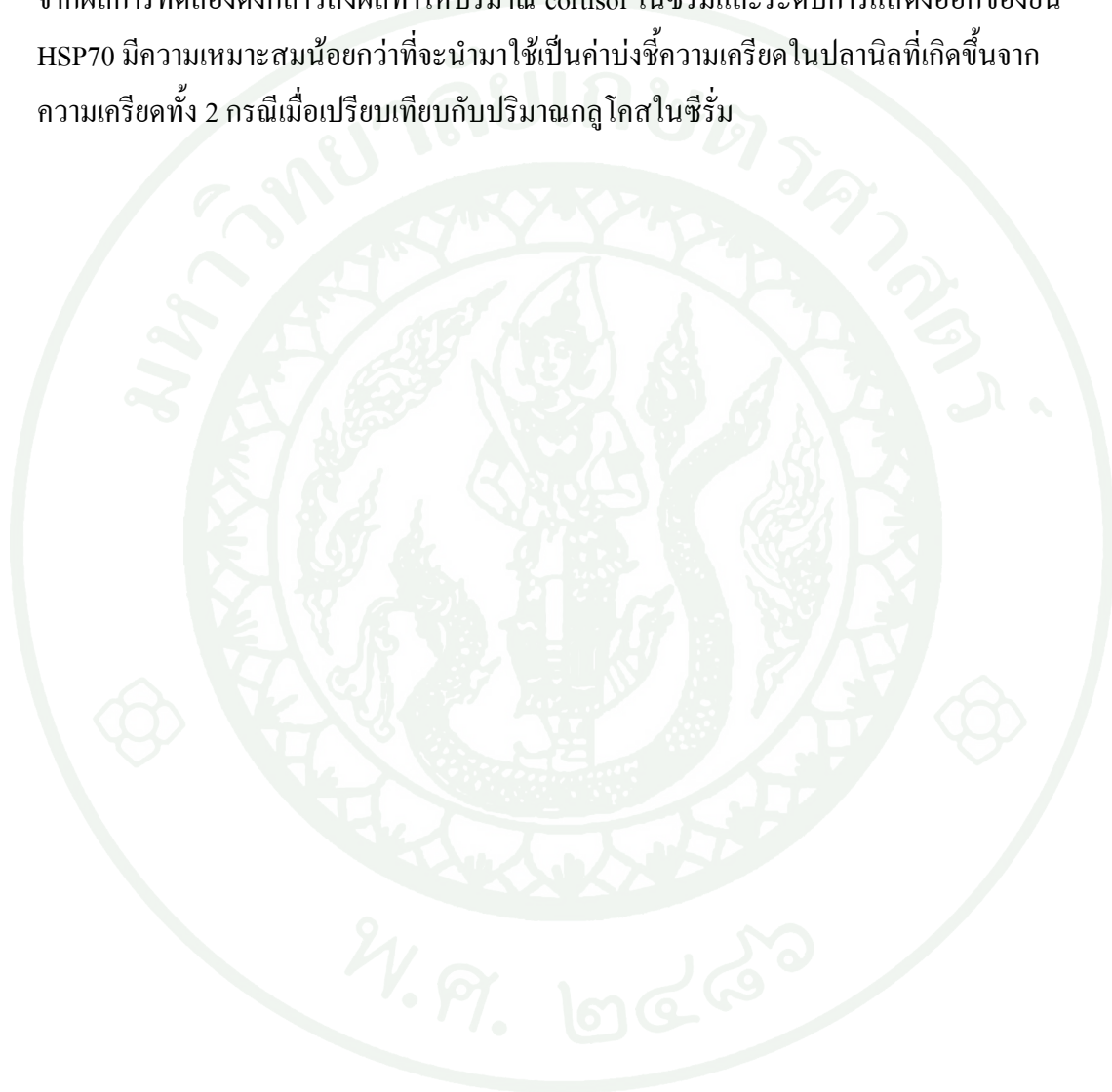
สรุป

1. การกระตุ้นให้ปลานิลเกิดความเครียดโดยการจำลองการขนส่งในสภาพที่มีความหนาแน่นต่างกันและทำการตรวจวัดค่าบ่งชี้ความเครียด 3 ค่า คือ ปริมาณกลูโคสในซีรัม ปริมาณ cortisol ในซีรัม และระดับการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 พบว่าค่าบ่งชี้ความเครียดที่มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้กับปลานิลที่เกิดความเครียดในลักษณะนี้คือ ปริมาณกลูโคสในซีรัม เนื่องจากมีแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงที่สอดคล้องกับระดับของความเครียดที่เกิดขึ้นค่อนข้างชัดเจน คือเมื่อขนส่งด้วยความหนาแน่นสูงจะพบว่ามีปริมาณกลูโคสในซีรัมสูง แต่เมื่อขนส่งด้วยความหนาแน่นต่ำก็จะพบว่ามีปริมาณกลูโคสในซีรัมลดลงมา ส่วนแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนก็คือ หลังการขนส่งจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงสุด จากนั้นจะค่อย ๆ ลดลงจนมีค่ากลับสู่สภาวะปกติ

2. การกระตุ้นให้ปลานิลเกิดความเครียดโดยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่มีความสำคัญในปลานิลโดยมีปริมาณเชื้อแตกต่างกันสองระดับ และทำการตรวจวัดค่าบ่งชี้ความเครียด 3 ค่า คือ ปริมาณกลูโคสในซีรัม ปริมาณ cortisol ในซีรัม และระดับการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 พบว่าค่าบ่งชี้ความเครียดในปลานิลที่มีความเหมาะสมกับความเครียดในลักษณะนี้คือ ปริมาณกลูโคสในซีรัม เพราะมีระดับของการเพิ่มขึ้นและลดลงเป็นแนวโน้มที่ชัดเจน คือปลานิลชุดที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นสูงจะมีระดับของกลูโคสในซีรัมสูง ส่วนปลานิลชุดที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่ำก็จะจะมีระดับของกลูโคสน้อยกว่าและพบว่าเมื่อเวลาผ่านไปจนถึงสิ้นสุดการทดลองจะมีปริมาณลดลงจนใกล้เคียงกับปลาปกติ ส่วนปลาชุดควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย ระดับของกลูโคสในซีรัมก็จะคงที่ตลอดการทดลอง

3. ค่าบ่งชี้อีก 2 ค่าซึ่งนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย ปริมาณ cortisol ในซีรัมและระดับการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 ในการทดลองที่ 1 พบว่า ปริมาณ cortisol ในซีรัมนั้น มีระดับการเปลี่ยนแปลงที่สอดคล้องกับระดับของความเครียดที่เกิดขึ้นเป็นบางช่วงเวลาเท่านั้น การเปลี่ยนแปลงส่วนใหญ่โดยภาพรวมแล้วยังไม่สอดคล้องกับระดับของความเครียด แต่แนวโน้มของการเพิ่มขึ้นและลดลงค่อนข้างชัดเจน ส่วนระดับการแสดงออกของยีน HSP70 นั้น มีการเปลี่ยนแปลงที่ไม่สอดคล้องกับระดับของความเครียดที่เกิดขึ้น แต่ยังคงมีแนวโน้มของการเพิ่มขึ้นและลดลงของระดับการแสดงออกที่ค่อนข้างชัดเจน และในการทดลองที่ 2 พบว่า ปริมาณ

cortisol ในซีรัม มีระดับการเปลี่ยนแปลงที่ไม่สอดคล้องกับระดับของความเครียดที่เกิดจากการกระตุ้นอีกทั้งยังมีแนวโน้มของการเพิ่มขึ้นและลดลงที่ไม่ชัดเจน ส่วนระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ก็จะคล้ายคลึงกับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ cortisol ในซีรัมคือ มีการเปลี่ยนแปลงที่ไม่สอดคล้องกับระดับของความเครียดที่เกิดขึ้น อีกทั้งแนวโน้มของการแสดงออกก็ไม่มี ความชัดเจน จากผลการทดลองดังกล่าวส่งผลทำให้ปริมาณ cortisol ในซีรัมและระดับการแสดงออกของยีน HSP70 มีความเหมาะสมน้อยกว่าที่จะนำมาใช้เป็นค่าบ่งชี้ความเครียดในปลานิลที่เกิดขึ้นจากความเครียดทั้ง 2 กรณีเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณกลูโคสในซีรัม



เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- คีรี ก่ออนันตกุล. 2542. การเพาะเลี้ยงปลานิลแปลงเพศ. กองประมงน้ำจืด, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.
- ชาญชัย แสนศรีมหาชัย. 2522. การเพาะพันธุ์ปลานิล. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืดแห่งชาติ, กองประมงน้ำจืด, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.
- นทีทิพย์ กฤษณามระ. 2538. ฮอร์โมนกลไกและการออกฤทธิ์ร่วม. ภาควิชาสัตววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.
- วิชัย วัฒนกุล, เรณู ยาชิโร และ พิษณุ นานันต์. 2539. การเปลี่ยนแปลงคอร์ติซอลและองค์ประกอบไอออนในพลาสมาระหว่างการลำเลียงพ่อแม่พันธุ์ปลาทะเล 4 ชนิด, น. 153-156. ใน รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2539. กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.
- วิรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2546. เอกสารประกอบการสอนวิชาวิทยาต่อมไร้ท่อของปลาและครึ่งเตีี๊ย. ภาควิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.
- สุปราณี ชินบุตร. 2550. ปลานิลจิตรลดา--สายสัมพันธ์พระราชวงศ์ไทย-ญี่ปุ่น. กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.
- อุดม เรืองนพคุณ. 2549. การเพาะพันธุ์และการเลี้ยงปลานิล. ครั้งที่ 1. อักษรสยามการพิมพ์. กรุงเทพฯ.
- Abeni, F., L. Calamari, F. Calza, M. Speroni, G. Bertoni and G. Pirlo. 2005. Welfare assessment based on metabolic and endocrine aspects in primiparous cow milked in a parlor or with an automatic milking system. **J. Dairy Sci.** 88: 3542-3552.

- Abilay, T.A., R. Mitra and H.D. Johnson. 1975. Plasma cortisol and total progestin levels in holstein steers during acute exposure to high environmental temperature (42°C) conditions. **J. Anim. Sci.** 41(1): 113-117.
- Acerete, L., J.C. Balasch and E. Espinosa. 2004. Physiological responses in Eurasian Perch (*Perca fluviatilis*) subjected to stress to transport and handling. **Aquaculture** 237: 167-178.
- Ackerman, P.A. and G.K. Iwama. 2001. Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to vibriosis. **J. Aquat. Anim. Health.** 13(2): 173-180.
- Ainsworth, J.A., C. Dexiang and P.R. Waterstrat. 1991. High physiological concentrations of cortisol in vivo can initiate phagocyte suppression. **J. Aquat. Anim. Health** 3: 41-47.
- Airaksinen, S., C.M.I. Rabergh, A. Lahti, A. Kaatrasalo, L. Sistonen and M. Nikinmaa. 2003. Stressor-dependent regulation of the heat shock response in zebrafish, *Danio rerio*. **Comp. Biochem. Physiol.** 134: 839-846.
- Akbari, S. and M. Shariff. 2003. Stress response of red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* exposed to sublethal concentrations of crude oil. **Arch. Razi Inst.** 54: 49-64.
- Apple, J.K., J.E. Minton, K.M. Parsons and J.A. Unruh. 1993. Influence of repeated restraint and isolation stress and electrolyte administration on pituitary-adrenal secretions, electrolytes, and other blood constituents of sheep. **J. Anim. Sci.** 71: 71-77.
- Bachelet, M., C. Adrie and B.S. Polla. 1998. Macrophages and heat shock proteins. **Research in Immunology** 149: 727-732.

- Barcellos, L.G., V.M. Woehl and G.F. Wassermann. 2001. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. **Aquacult. Res.** 32: 121-123.
- Barton, B.A. 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integ. Comp. Biol.** 42: 517-525.
- _____ and G.K. Iwama. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Ann. Rev. Fish Dis.** 1: 3-26.
- _____, C.B. Schreck and L.A. Sigismondi. 1986. Multiple acute disturbances evoke cumulative physiological stress responses in juvenile chinook salmon. **Trans. Am. Fish. Soc.** 115: 245-251.
- Basu, N., A.E. Todgham, P.A. Ackerman, M.R. Bibeau and K. Nakano. 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. **Gene** 295: 173-183.
- _____, T. Nakano, E.G. Grau and G.K. Iwama. 2001. The effects of cortisol on heat shock protein 70 levels in two fish species. **Gen. Comp. Endocrinol.** 124: 97-105.
- Benaroudj, N., B. Fouchaq and M.M. Ladjimi. 1997. COOH- terminal peptide binding domain is essential for self association of the molecular chaperone HSC70. **J. Biol. Chem.** 272: 8744-8751.
- Bienz, M. and H.R. Pelham. 1987. Mechanisms of heat shock gene activation in higher eukaryotes. **Adv. Genet.** 24: 31-72.
- Bilandžić, N., B. Šimić, M. Žurić and M. Lojkić. 2005. Effect of ACTH administration on biochemical and immunes in boars. **J. Vet. Med.** 52: 440-446.

- Bilodeau, A.L., B.C. Small and W.R. Walters. 2003. Pathogen loads, clearance and plasma cortisol response in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), following challenge with *Edwardsiella ictaluri*. **J. Fish Dis.** 26: 433-437.
- Bruner, K.L. 1997. The unliganded mineralocorticoid receptor is associated with heat shock proteins 70 and 90 and the immunophilin FKBP-52. **Recept. Signal Transduct.** 7: 85-98.
- Campbell, P.M., T.G. Pottinger and J.P. Sumpter. 1994. Preliminary evidence that chronic confinement stress reduced the quality of gametes produced by brown and rainbow trout. **Aquaculture** 120: 151-169.
- Cannon, W.B. 1914. The emergency function of the adrenal medulla in pain and the major emotions. **Am. J. Physiol.** 33: 356-372.
- _____. 1932. **The Wisdom of the Body.** W.W. Norton Company Inc., New York.
- Carmichael, G.J., G.A. Wedemeyer, J.P. McCraren and J.L. Millard. 1983. Physiological effects of handling and hauling stress on small mouth bass. **Prog. Fish-Cult.** 45: 110-113.
- Cha, I.S., J. Kwon, S.B. Park, H.B. Jang, S.W. Nho, Y.K. Kim, J. Hikima, T. Aoki and T.S. Jung. 2013. Heat shock protein profiles on the protein and gene expression levels in olive flounder kidney infected with *Streptococcus parauberis*. **Fish Shellfish Immun.** 24: 1-8.
- Ciocca, D.R., S. Oesterreich, G.C. Chamness, W.L. McGuire and S.A. Fuqua. 1993. Biological and clinical implications of Heat Shock Protein 27,000 (HSP27). **J. Natl. Cancer Inst.** 85: 1558-1570.

- Cleary, J.J., S.C. Battaglione and N.W. Pankhurst. 2002. Capture and handling stress affects the endocrine and ovulatory response to exogenous hormone treatment in snapper, *Pagrus auratus* (Bloch & Schneider). **Aquacult. Res.** 33: 829-838.
- Cooper, G.M. 2000. **The Cell: A Molecular Approach.** 2nd ed. Sinauer Associates Inc., Washington, D.C.
- Cuesta, A., R.L. Carrio, F. Arjona, M.P. Rio, J. Meseguer, J.M. Mancera and M.A. Esteban. 2006. Effect of PRL, GH and cortisol on the serum complement and IgM levels in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish Shellfish Immunol.** 20: 427-432.
- Cunningham, J.G. 2002. **Textbook of Veterinary Physiology.** 3rd ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Deane, E.E., J. Li and N.Y.S. Woo. 2004. Modulated heat shock protein expression during pathogenic *Vibrio alginolyticus* stress of sea bream. **Dis. Aquat. Org.** 62: 205-215.
- Deriggi, G.F., L.A.K.A. Inoue and G. Moraes. 2006. Stress responses to handling in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus): assessment of eugenol as an alternative anesthetic. **Acta Sci. Biol. Sci.** 28(3): 269-274.
- Donalson, E.M. 1981. The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish, pp. 11-48. *In* A.D. Pickering (ed.). **Stress and Fish.** Academic Press Inc., London.
- Ellsaesser, C.E. and L.W. Clem. 1986. Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. **J. Fish Biol.** 288: 511-521.
- Ercüment, A., D. Ekinçi, O. Erdoğlan, S. Beydemir, Z. Alım and S.B. Ceyhun. 2011. Increasing stocking density causes inhibition of metabolic-antioxidant enzymes and elevates mRNA levels of heat shock protein 70 in rainbow trout. **Livest. Sci.** 141(1): 69-75.

- Fader, S.C., Z. Yu and J.R. Spotila. 1994. Seasonal variation in heat shock proteins (hsp70) in stream fish under natural conditions. **J. Therm. Biol.** 19: 335-341.
- Fast, M.D., S. Hosoya, S.C. Johnson and L.O.B. Afonso. 2008. Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short and long-term stress. **Fish Shellfish Immunol.** 24: 194-204.
- Fevolden, S.E., T. Refstie and K.H. Roed. 1991. Selection for high and low cortisol stress response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture** 95: 53-65.
- Flos, R., L. Reig, P. Torres and L. Tort. 1988. Primary and secondary stress responses to grading and hauling in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Aquaculture** 71: 99-106.
- Forsyth, R.B., E.P.M. Candido, S.L. Babich and G.K. Iwama. 1997. Stress protein expression in coho salmon with bacterial kidney disease. **J. Aquat. Anim. Health** 9: 18-25.
- Frisch, A. and T. Anderson. 2005. Physiological stress responses of two species of coral trout (*Plectropomus leopardus* and *Plectropomus maculatus*). **Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.** 140: 317-327.
- Fritsche, R., S.G. Reid, S. Thomas and S.F. Perry. 1993. Serotonin mediated release of catecholamines in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **J. Exp. Biol.** 178: 191-204.
- Gomes, L.C., E.C. Chagas, R.P. Brinn, R. Roubach, C.E. Coppati and B. Baldisserotto. 2006. Use of salt during transportation of air breathing pirarucu juveniles (*Arapaima gigas*) in plastic bags. **Aquaculture** 256: 521-528.

- González, M., A.K. Yabuta and F. Galindo. 2003. Behaviour and adrenal activity of first parturition and multiparous cows under a competitive situation. **Appl. Anim. Behav. Sci.** 83: 259-266.
- Guy, C.L. and Q.B. Li. 1998. The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family. **Plant Cell** 10: 539-556.
- Haddy, J.A. and N.W. Pankhurst. 1999. Stress-induced changes in concentrations of plasma sex steroids in black bream. **J. Fish Biol.** 55: 1304-1316.
- Halloran, M.C., M. Sato-Maeda, J.T. Warren, F. Su, Z. Lele, P.H. Krone, J.Y. Kuwada and W. Shoji. 2000. Laser-induced gene expression in specific cells of transgenic zebrafish. **Development** 127: 1953-1960.
- Harmon, T.S. 2009. Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. **Rev. Aquaculture** 1: 58-66
- Hays, F.L., H. Armbruster, W. Vetter and W. Bianca. 1975. Plasma cortisol in cattle: circadian rhythm and exposure to a simulated high altitude of 5,000 m. **Int. J. Biometeor.** 19(2): 127-135.
- Hohfeld, J., Y. Minami and F.U. Hartl. 1995. Hip, a novel cochaperone involved in the eucaryotic HSC70/HSP40 reaction cycle. **Cell** 83: 589-598.
- Houghton, G. and R.A. Matthews. 1986. Immunosuppression of carp (*Cyprinus carpio* L.) to ichthyophthiriasis using the corticosteroid triamcinolone acetonide. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 12: 413-419.

- Iguchi, K., K. Ogawa, M. Nagae and F. Ito. 2003. The influence of rearing density on stress response and disease susceptibility of ayu (*Plecoglossus altivelis*). **Aquaculture** 220: 515-523.
- Iwama, G.K., A.D. Pickering, J.P. Sumpter and C.B. Schreck. 1997. Fish stress and health in aquaculture. **Soc. Exp. Biol. Semin. S.** 62: 73-80.
- _____, L.O.B. Afonso, A. Todgham, P. Ackerman and K. Nakano. 2004. Are HSPs suitable for indicating stressed states in fish?. **J. Exp. Biol.** 207: 15-19.
- Kacsoh, B. 2000. **Endocrine Physiology**. The McGraw-Hill Companies Inc., U.S.A..
- Kaplan, N.M. 1992. The adrenal gland, pp. 247-274. *In* J.E. Griffin and S.R. Ojeda (eds.). **Textbook of Endocrine Physiology**. 2nd ed. Oxford University Press Inc., New York.
- Kaur, M., F. Atif, R.A. Ansari, F. Ahman and S. Raisuddin. 2011. The interactive effect of elevated temperature on deltamethrin-induced biochemical stress responses in *Channa punctata* Bloch. **Chem. Biol. Interact.** 193(3): 216-224.
- Kiang, J.G. and G.C. Tsokos. 1998. Heat Shock Proteins 70kDa: Molecular biology, biochemistry and physiology. **Pharmacol. Ther.** 80: 183-201.
- King, M.W. 2005. **Lange Q&A USMLE Step 1**. 6th ed. Medical Pub. Division, McGraw-Hill, New York.
- Kino, T., E. Charmandari and G.P. Chrousos. 2003. **Glucocorticoid receptor**. Available Source: <http://www.endotext.org/adrenal/adrenal6/adrenalframe6.html>, September 9, 2009.

- Kumar, S., N.P. Sahu, A.K. Pal, S. Subramanian, H. Priyadarshi and V. Kumar. 2011. High dietary protein combats the stress of *Labeo rohita* fingerlings exposed to heat shock. **Fish. Physiol. Biochem.** 24: 78-87.
- Lay, D.C., J.R. Friend, T.H. Randel, R.D. Jenkins, O.C. Neuendorff, D.A. Kapp and D.M. Bushong. 1996. Adrenocorticotrophic hormone dose response and some physiological effects of transportation on pregnant Brahman cattle. **J. Anim. Sci.** 74: 1806-1811.
- Lele, Z., S. Engel and P.H. Krone. 1997. Hsp47 and hsp70 gene expression is differentially regulated in a stress- and tissue-specific manner in zebrafish embryos. **Dev. Genet.** 21: 123-133.
- Li, Q.B., D.W. Haskell and C.L. Guy. 1999. Coordinate and non-coordinate expression of the stress 70 family and other molecular chaperones at high and low temperature in spinach and tomato. **Plant. Mol. Biol.** 39: 21-34.
- Li, T. and M. Brouwer. 2007. Hypoxia-inducible factor, gsHIF, of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*: Molecular characterization and response to hypoxia. **Comp. Biochem. Physiol.** 147(B): 11-19.
- Lindquist, S. and E.A. Craig. 1988. The heat-shock proteins. **Annu. Rev. Genet.** 22: 631-677.
- Lindzey, J. and K. Korach. 1997. Steroid hormones, pp 49-60. In P. Com, (ed.). **Endocrinology: Basic and Clinical Principles**. NY Human Press, Totowa.
- Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta Ct) method. **Methods** 25: 402-408.
- MacArthur, J.I. and T.C. Fletcher. 1985. Phagocytosis in fish, pp. 29-46. In M.J. Manning and M.F. Tatner (eds.). **Fish Immunology**. Academic Press Inc., London.

- Maillard, S.C., H. Quinton, J. Lauffenburger, N.C. Lefort, C. Richard, J. Marchal, P. Mormede and J.P. Renard. 2003. Consequences of transvaginal follicular puncture on well-being in cows. **Reproduction** 125: 555-563.
- Martin, C.C., P. Tang, G. Barnardo and P.H. Krone. 2001. Expression of the chaperonin 10 gene during zebrafish development. **Cell Stress Chaperones** 6: 38-43.
- Mason, J.W. 1975. A historical view of the stress field. **J. Hum. Stress** 1: 6-12.
- Maule, A.G. and C.B. Schreck. 1991. Stress and cortisol treatment changed affinity and number of glucocorticoid receptors in leukocytes and gill of coho salmon. **Gen. Comp. Endocrinol.** 84: 83-93.
- _____, _____, C.S. Bradford and B.A. Barton. 1988. Physiological effects of collecting and transporting emigrating juvenile chinook salmon past dams on the Columbia River. **Trans. Am. Fish. Soc.** 117: 245-261.
- Mayes, P.A. and D.A. Bender. 2003. Gluconeogenesis and control of blood glucose, pp. 153-162. *In* R.K. Murray, D.K. Granner, P.A. Mayes and V.W. Rodwell (eds.). **Harper's Illustrated Biochemistry**. New Delhi, India.
- Mazeaud, M.M. and F. Mazeaud. 1981. Adrenergic response to stress in fish, pp. 49-75. *In* A.D. Pickering (ed.). **Stress and Fish**. Academic Press Inc., London.
- _____, _____ and E.M. Donaldson. 1977. Primary and secondary effect of stress in fish: some new data with a general review. **Trans. Am. Fish. Soc.** 160: 201-202.
- Miernyk, J.A. and G.T. Hayman. 1996. ATPase activity and molecular chaperone function of the stress 70 proteins. **Plant. Physiol.** 110: 419-424.

- Mills, S.E. and B.F. Jenny. 1979. Effect of high concentrate feeding and fasting on plasma glucocorticoids in dairy heifers. **J. Anim. Sci.** 48: 961-965.
- Moberg, G.P. 1985. **Animal Stress**. American Physiological Society, Bethesda.
- Molony, V. and J.E. Kent. 1996. Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. **J. Anim. Sci.** 75: 266-272.
- Morimoto, R.I., K.D. Sarge and K. Abravaya. 1992. Transcriptional regulation of heat shock genes. **J. Biol. Chem.** 267: 21987-21990.
- _____, A. Tissisere and C. Georgopoulos. 1994. **Stress Proteins in Biology and Medicine**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Mudron, P., J. Rehage, H.P. Sallmann, M. Höltershinken and H. Scholz. 2005. Stress response in dairy cows related to blood glucose. **Acta. Vet. Brno.** 74: 37-42.
- Munksgaard, L. and H. Simonsen. 1996. Behavioral and pituitary adrenal-axis response of dairy cows to social isolation and deprivation of lying down. **J. Anim. Sci.** 74: 769-778.
- Nakano, K. and G.K. Iwama. 2002. The 70-kDa heat shock protein response in two intertidal sculpins, *Oligocottus maculosus* and *O. snyderi*: relationship of hsp70 and thermal tolerance. **Comp. Biochem. Physiol.** 133: 79-94.
- Nakao, T. and E. Grunert. 1990. Effect of dystocia on postpartum adrenocortical function in dairy cows. **J. Dairy. Sci.** 73: 2801-2806.
- Nandi, J. 1962. The structure of the interrenal gland in teleost fishes. **Univ. Calif. Publ. Zool.** 65: 129-212.

- Nockels, C.F. 1990. Mineral alterations associated with stress, trauma and infection and the effect on immunity. **Cont. Educ. Pract. Vet.** 12: 1133-1139.
- Nover, L. 1991. **Heat Shock Response**. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Ortuno, J., M.A. Esteban and J. Meseguer. 2001. Effects of short-term crowding stress on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. **Fish Shellfish Immunol.** 11: 187-197.
- Oyoo - Okoth, E., L. Cherop, C.C. Ngugi, V.C. Boit, D.M. Lusega, J.A. Sabwa and H.C. Karisa. 2011. Survival and physiological response of *Labeo victorianus* (Pisces: Cyprinidae, Boulenger 1901) juveniles to transport stress under a salinity gradient. **Aquaculture** 319 (1-2): 226-231.
- Pankhurst, N.W. and M. Dedual. 1994. Effects of capture and recovery on plasma levels of cortisol, lactate and gonadal steroids in a natural population of rainbow trout. **J. Fish Biol.** 45: 1013-1025.
- Park, M.O., W.J. Hur, S.Y. Im, D.W. Seoll, J. Lee and I.S. Park. 2008. Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil-anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. **Aquacult. Res.** 39: 877-884.
- Perez-Casanova, J.C., L.O.B. Afonso, S.C. Johnson, S. Curroe and A.K. Gamperl. 2008. The stress and metabolic responses of juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* L. to an acute thermal challenge. **J. Fish Biol.** 72: 899-916.
- Pickering, A.D., T.G. Pottinger, J. Carragher and J.P. Sumpter. 1987. The effects of acute and chronic stress on the levels of reproductive hormones in the plasma of mature male brown trout, *Salmo trutta* L. **Gen. Comp. Endocrinol.** 68: 249-259.

- _____ and T.G. Pottinger. 1987. Crowding produces prolonged leucopennia in salmonid fish, despite interregnal acclimation. **J. Fish Biol.** 30: 701-712.
- _____. 1989. Stress responses and disease resistance in farmed fish, pp. 35-49. *In Aqua Nor 87*, Trondheim, Norway.
- _____. 1998. Stress responses of farmed fish, pp. 222-243. *In*, K.D. Black and A.D. Pickering, (eds.). **Biology of Farmed Fish**. Sheffield Academic Press, Sheffield.
- Pottinger, T.G. 1990. The effect of stress and exogenous cortisol on receptor-like binding of cortisol in the liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 78: 194-203.
- _____. 1998. Changes in blood cortisol, glucose and lactate in carp retained in angler's keepnets. **J. Fish Biol.** 53: 728-742.
- _____, A.D. Pickering and M.A. Hurley. 1992. Consistency in the stress response of individuals of two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture** 103: 275-289.
- _____ and T.R. Carrick. 1999. Modification of the plasma cortisol response to stress in rainbow trout by selective breeding. **Gen. Comp. Endocrinol.** 116: 122-132.
- Pratt, W.B. 1993. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. **J. Biol. Chem.** 268: 21455-21458.
- Rabergh, C.M.I., S. Airaksinen, A. Soitamo, H.V. Bjorklund, T. Johansson, M. Nikinmaa and J. Sistonen. 2000. Tissue-specific expression of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor 1 mRNAs in response to heat stress. **J. Exp. Biol.** 203: 1817-1824.

Randall, D.J. and S.F. Perry. 1992. Catecholamines, pp. 255-300. *In* W.S. Hoar and D.J. Randall, (eds.). **Fish Physiology**; Vol. 12B. Academic Press, New York.

Raussi, S. 2005. **Group Management of Young Dairy Cattle in Relation to Animal Behaviour and Welfare**. Doctoral Dissertation, University of Helsinki, Finland.

Reid, S.G., N.J. Bernier and S.F. Perry. 1998. The adrenergic stress response in fish: Control of catecholamine storage and release. **Comp. Biochem. Physiol.** 120C: 1-27.

Ritossa, F. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia** 18: 517-573.

Robertson, L., P. Thomus and R. Arnoldc. 1988. Plasma cortisol and secondary stress responses of cultured red drum (*Sciaenops ocellatus*) to several transportation procedures. **Aquaculture** 68: 115-130.

Sandi, C. 1996. Novelty-related rapid locomotor effects of corticosterone in rats. **Eur. J. Neurosci.** 8: 794-800.

Sandodden, R., B. Finstad and M. Iversen. 2001. Transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): anaesthesia and recovery. **Aquacult. Res.** 32: 87-90.

Santacruz, H., S. Vríz and N. Angelier. 1997. Molecular characterization of a heat shock cognate cDNA of zebrafish, hsc70, and developmental expression of the corresponding transcripts. **Dev. Genet.** 21: 223-233.

Sapolsky, R.M., M.L. Romero and A.U. Munck. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. **Endocrinol. Rev.** 21: 55-89.

- Schoffl, F., R. Prandl and A. Reindl. 1998. Regulation of heat shock response. **Plant. Physiol.** 117: 1135-1141.
- Schreck, C.B. 1982. Stress and rearing of salmonids. **Aquaculture** 28: 241-249.
- _____. 2000. Accumulation and long-term effects of stress in fish, pp. 147-158. *In* G.P. Moberg and J.A. Mench, (eds.). **The Biology of Animal Stress**. CABI Publishing, Wallingford, U.K.
- Schultz, L.H., H.F. Mayland and R.J. Emerick. 1988. Metabolic problems related to nutrition, pp. 493-531. *In* D.C. Church (ed.). **The ruminant animal: Digestive physiology and nutrition**. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Selye, H. 1946. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. **J. Clin. Endocrinol.** 6: 117-230.
- Seyyed, M.H. 2011. Efficacy of clove powder solution on stress mitigation in juvenile common carps, *Cyprinus carpio* (Linnaeus). **Comp. Clin. Pathol.** 20(4): 359-362.
- Simontacchi, C., C. Poltronieri, C. Carraro, D. Bertotto, G. Xiccato, A. Trocino and G. Radaelli. 2008. Alternative stress indicators in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **J. Fish Biol.** 72: 747-752.
- Smith, T.R., G.C. Tremblay and T.M. Bradley. 1999. Characterization of the heat shock protein response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Fish Physiol. Biochem.** 20: 279-292.
- Squires, E.J. 2003. **Applied Animal Endocrinology**. Department of Animal and Poultry Science, University of Guelph, Guelph, Canada. CABI Publishing, UK.

Stave, J.W. and B.S. Robertson. 1985. Hydrocortisone suppresses the chemiluminescent response of stripped bass phagocytes. **Dev. Comp. Immunol.** 9: 77-84.

Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1986. **Principles and Procedures in Statistics.** McGraw-Hill, New York.

Stolte, E.H., A.F. Mazon, K.M. Leon, M. Jesiak, N.R. Bury, A. Sturm, F.J. Huub, H.F.J. Savelkoul, B.M.L. Verburg and G. Flik. 2008. Corticosteroid receptors involved in stress regulation in common carp, *Cyprinus carpio*. **J. Endocrinol.** 198: 403-417.

Strange, R.J., C.B. Schreck and J.T. Golden. 1977. Corticoid stress responses to handling and temperature in salmonids. **Trans. Am. Fish. Soc.** 106: 213-218.

Stull, C.L. 1993. Minimizing stressors in the calf's physical environment, pp. 93-97. In P.K. Robert (ed.). **Western large herd management conference**, University of California, CA.

Sugimoto, M., H. Furuoka and Y. Sugimoto. 2003. Deletion of one of the duplicated HSP70 genes causes hereditary myopathy of diaphragmatic muscles in Holstein-Friesian cattle. **Anim. Genet.** 34: 191-197.

Sung, D.L., F. Kaplan and C.L. Guy. 2001. Plant HSP70 molecular chaperones: Protein structure, gene family expression and function. **Physiol. Plantarum.** 113: 443-451.

Taiz, L. and E. Zeiger. 1998. **Plant Physiology.** 2nd ed. Sinauer Associates, Massachusetts.

Tripaldi, C., G.De. Rosa, F. Grasso, G.M. Tezano and F. Napolitano. 2004. Housing system and welfare of buffalo (*Bubalus bubalis*) cows. **Anim. Sci.** 78: 477-483.

- Tsunoda, A., A. Purbayanto, S. Akiyama and T. Arimoto. 1999. Plasma cortisol level for stress management of Japanese whiting *Sillago japonica* captured by sweeping trammel net. **Nippon Suisan Gakkaishi** 65: 457-463.
- Van Cauter, E. 2005. **Endocrine Physiology**. Elsevier Saunders, Philadelphia.
- Vierling, E. 1991. The roles of heat shock proteins in plants. **Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.** 42: 579-620.
- Vijayan, M.M., C. Pereira and T.W. Moon. 1994. Hormonal-stimulation of hepatocyte metabolism in rainbow-trout following an acute handling stress. **Comp. Biochem. Phys. C.** 108: 321-329.
- Von Borell, E.H. 2001. The Biology of stress and its application to livestock housing and transportation assessment. **J. Anim. Sci.** 79: 260-267.
- Walker, S.L., R.F. Smith, D.N. Jones, J.E. Routly and H. Dobson. 2008. Chronic stress, hormone profiles and estrus intensity in dairy cattle. **Horm. Behav.** 53: 493-501.
- Wallberg, A.E., A. Wright and J. Gustafsson. 2001. Chromatin-remodeling complexes involved in gene activation by the glucocorticoid receptor, pp. 75-122. *In* G. Litwack (ed.). **Vitamins and Hormones**. Academic press, UK.
- Webster, J.I., L. Tonelli and E.M. Stemberg. 2002. Neuroendocrine regulation of immunity. **Annu. Rev. Immunol.** 20: 125-163.
- Wedemeyer, G.A. 1996. **Physiology of Fish in Intensive Culture Systems**. Chapman and Hall, New York.

- _____. 1997. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture, pp. 35-71. In G.K. Iwama, A.D. Pickering, J.P. Sumpter and C.B. Schreck, (eds.). **Fish Stress and Health in Aquaculture**. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- _____, B.A. Barton and D.J. McLeay. 1990. Stress and acclimation, pp. 491-527. In C.B. Schreck and P.B. Moyle (eds.). **Methods for Fish Biology**. MD: American Fisheries Society, Bethesda.
- Winberg, S. and G.E. Nilsson. 1993. Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonistic behavior and stress reactions, with particular reference to fish. **Comp. Biochem. Physiol.** 106C: 597-614.
- _____, A. Nilsson, P. Hylland, V. Soderstrom and G.E. Nilsson. 1997. Serotonin as a regulator of hypothalamic-pituitary-interrenal activity in teleost fish. **Neurosci. Lett.** 230: 113-116.
- Wu, C.W., T. Casper, J. Browse, S. Lindquist and C. Somerville. 1988. Characterization of an HSP70 gene family in Arabidopsis. **Plant. Physiol.** 88: 731-740.
- Young, J.C., I. Moarefi and F.U. Hartl. 2001. HSP90: A specialized but essential protein folding tool. **J. Cell. Biol.** 154: 267-273.

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล นายภัทรารุช คำณูณวัฒน์

วัน เดือน ปี ที่เกิด 24 กรกฎาคม 2527

สถานที่เกิด กรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษา วท.บ. (วิทยาศาสตร์การประมง) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร

ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน -

สถานที่ทำงานปัจจุบัน -

ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ -

ทุนการศึกษาที่ได้รับ -