



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์)

ปริญญา

กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์

กายวิภาคศาสตร์

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาจุลกายวิภาคศาสตร์และเนื้อเยื่อเคมีพวกไกลโคคอนจูเกตในต่อมน้ำลายของ  
ลิ่นชวา (*Manis javanica*)

Studies on Histology and Glycoconjugates Histochemistry in Salivary Gland of the  
Malayan Pangolin (*Manis javanica*)

นามผู้วิจัย นางสาวรุธานี หมีนยะลา

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์อภิรักษ์ สุประเสริฐ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์พันเอกหญิงมาลีวรรณ เหลี่ยมศิริเจริญ, วท.ม.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ศุภลักษณ์ โรมนันท์, วท.ม.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธีระศักดิ์ พรพวงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

สืบศิริ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาจุลกายวิภาคศาสตร์และเนื้อเยื่อเคมีพวกไกลโคคอนจูเกต  
ในต่อมน้ำลายของลิ่นชวา (*Manis javanica*)

Studies on Histology and Glycoconjugates Histochemistry in Salivary Gland  
of the Malayan Pangolin (*Manis javanica*)

โดย

นางสาวรุธานี หมื่นยะลา

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์)

พ.ศ. 2553

รุษานี หมื่นยะลา 2553: การศึกษาจุลกายวิภาคศาสตร์และเนื้อเยื่อเคมีพวกไกลโคคอนจูเกตในต่อมน้ำลายของลิงขาว (*Manis javanica*) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์) สาขากายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศาสตราจารย์อภิรักษ์ สุประเสริฐ, Ph.D. 124 หน้า

การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์และเนื้อเยื่อเคมีพวกไกลโคคอนจูเกตในต่อมน้ำลาย ของ ลิ่นสายพันธุ์ขาว (*Manis javanica*) โดยทำการศึกษา 3 ต่อมหลัก คือ ต่อมน้ำลายใต้ลิ้น ต่อมน้ำลายขากรรไกรและ ต่อมน้ำลายกกหู ด้วยเทคนิคเนื้อเยื่อวิทยาและเทคนิคเนื้อเยื่อเคมีโดยใช้สีย้อม Hematoxylin และ Eosin (H&E), Alcian Blue (AB pH 2.5), Periodic acid - Schiff (PAS) และ AB pH 2.5 - PAS และ lectins ที่ใช้ย้อม ได้แก่ Concanavalin A (Con A), *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA), *Ricinus communis* agglutinin - I (RCA - I), Soybean agglutinin (SBA), *Ulex europaeus* agglutinin - I (UEA - I), Wheat germ agglutinin (WGA) และ Peanut agglutinin (PNA) ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase

ผลการทดลองพบว่าโครงสร้างของต่อมน้ำลายของลิงขาว (*Manis javanica*) ทางจุลกายวิภาคศาสตร์ ทั้ง 3 ต่อมเป็นชนิด tubuloacinar gland โดยเซลล์คัดหลั่งของต่อมน้ำลายใต้ลิ้นและต่อมน้ำลาย กกหู ประกอบด้วย mucous cells และ serous cells เหมือนกัน และพบ granular convoluted tubule (GCT) ในต่อมน้ำลายกกหู ขณะที่ต่อมน้ำลายใต้ขากรรไกร พบเซลล์คัดหลั่ง mucous cells มากมาย จากการย้อมด้วยเทคนิคเนื้อเยื่อเคมีพบว่าเซลล์คัดหลั่ง mucous cells และ serous cells ของต่อมน้ำลายทั้ง 3 ต่อมบรรจุด้วย vicinal diol groups ร่วมกับ acid และ neutral glycoconjugates จากการย้อมด้วยสาร lectins พบว่าเซลล์คัดหลั่ง serous cells และ serous demilunes ในต่อมน้ำลายใต้ลิ้นและต่อมน้ำลายกกหูประกอบด้วยอนุพันธุ์น้ำตาล mannose, N - acetylgalactosamine, Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) N - acetylglucosamine, fucose, N - acetylglucosamine และ Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) N - acetylgalactosamine ขณะที่เซลล์คัดหลั่ง mucous cells ในต่อมน้ำลายทั้ง 3 ต่อมหลัก พบอนุพันธุ์น้ำตาล mannose, N - acetylgalactosamine, Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) N - acetylglucosamine, fucose และ N - acetylglucosamine ผลการย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมต่อด้วย AB pH 2.5 พบปริมาณ sialic acid จำนวนมาก และผลการย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมต่อด้วยสาร lectins PNA พบ sialic acid จับกับอนุพันธุ์น้ำตาล Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) N - acetylgalactosamine ในเซลล์คัดหลั่งของต่อมน้ำลายทั้ง 3 ต่อมหลัก

Ruhanee Munyala 2010: Studies on Histology and Glycoconjugates Histochemistry in Salivary Gland of the Malayan Pangolin (*Manis javanica*). Master of Science (Veterinary Anatomy), Major Field: Veterinary Anatomy, Department of Anatomy. Thesis Advisor: Professor Apinun Suprasert, Ph.D. 124 pages.

The histology and glycoconjugates histochemistry in salivary glands of the Malayan pangolin (*Manis javanica*) were investigated by means of histological and histochemical techniques. The staining procedures were performed by using Hematoxylin and Eosin (H&E), Alcian Blue (AB pH 2.5), Periodic acid - Schiff (PAS) and AB pH 2.5 - PAS. The lectins used were Concanavalin A (Con A), *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA), *Ricinus communis* agglutinin - I (RCA - I), Soybean agglutinin (SBA), *Ulex europaeus* agglutinin - I (UEA - I), Wheat germ agglutinin (WGA) and Peanut agglutinin (PNA) in combination with enzyme neuraminidase digestion method.

In this study, salivary glands of Malayan pangolin (*Manis javanica*) showed tubuloacinar type. The secretory endpieces of sublingual salivary gland and parotid salivary gland were composed of mucous cells and serous cells, and parotid salivary gland found granular convoluted tubule (GCT), whereas mandibular salivary gland contained exclusively mucous cells. The analysis of the histochemical methods, most of secretory endpieces all three major salivary glands showed vicinal diol groups with acid and neutral glycoconjugates in mucous cells and serous cells. Lectin histochemistry revealed the presence of glycoconjugates containing mannose, N - acetylgalactosamine, Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) N - acetylglucosamine, fucose, N - acetylglucosamine and Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) N - acetylgalactosamine in serous cells and serous demilunes, while the mucous cells of all major salivary glands demonstrate the presence of mannose, N - acetylgalactosamine, Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) N - acetylglucosamine, fucose and N - acetylglucosamine residues. Following digestion with neuraminidase and staining with AB pH2.5, disclosed the presence of sialic acid residues and neuraminidase digestion with lectins PNA staining, revealed the presence of terminal sialic acid linked to Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) N - acetylgalactosamine in the secretory endpieces in all major salivary glands.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์อภินันท์ สุประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่ได้ให้ความกรุณาช่วยเหลือและให้คำแนะนำทั้งเรื่องการเรียนรู้และการทำวิจัย วิทยานิพนธ์รวมถึงช่วยตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ของวิทยานิพนธ์ให้มีความสำเร็จลุล่วงจนเสร็จสมบูรณ์ อีกทั้งอาจารย์ยังสนับสนุนให้ข้าพเจ้าได้มีโอกาสเสนอผลงานทางวิชาการในรูปแบบโปสเตอร์ อาทิเช่น งานประชุมวิชาการ Japanese Association of Veterinary Anatomists (JAVA 2006), งานประชุมวิชาการ The Second Congress of the Asian Association of Veterinary Anatomists (AAVA 2007) และงานประชุมวิชาการ Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2009) และกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ พันเอกหญิง มาลีวรรณ เหลี่ยมศิริเจริญ และรองศาสตราจารย์ศุภลักษณ์ โรมนันท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมตลอดจนผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนินทร์ ติรวัฒนวานิช อาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยและผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุไร พงศ์ชัยฤกษ์ ที่ให้ความกรุณาให้คำปรึกษาในการจัดทำวิทยานิพนธ์ให้มีความสำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณคณาจารย์จากภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ที่ให้ความเมตตากรุณา ชี้นำและให้ความรู้ในเรื่องการศึกษาต่าง ๆ เป็นอย่างดี รวมทั้งขอขอบพระคุณท่านอาจารย์รองลภ สุขมาสรวง ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษา ประสานงานการเก็บตัวอย่าง ขอขอบพระคุณ คุณผกาดี พงษ์เกษ ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างตลอดจนให้คำปรึกษาระหว่างที่ข้าพเจ้าใช้ห้องเตรียมปฏิบัติการจุลกายวิภาคศาสตร์ ขอขอบพระคุณ คุณณฐนันท์ พรหมพา ที่ให้ความช่วยเหลือในการจัดทำโปสเตอร์ประชุมวิชาการต่าง ๆ เป็นอย่างดี ขอขอบพระคุณ คุณกฤษณา แสงประไพทิพย์ คุณอภินันท์ ค้างเงิน คุณพิบูลย์ เรืองสุภาภิชาติ รวมทั้งพี่ๆ เพื่อนๆ ปริญญาโท และท้ายสุดขอกราบขอบพระคุณครอบครัวหมื่นยะลา และครอบครัวหลี่หิม ทุกคนที่เป็นกำลังใจและสนับสนุนการศึกษาข้าพเจ้าเสมอมา ส่งผลให้การศึกษาและวิจัยวิทยานิพนธ์มีความสำเร็จสมบูรณ์

ผลงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2550 จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

รุธานี หมื่นยะลา

เมษายน 2553

## สารบัญ

### หน้า

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| สารบัญ                     | (1) |
| สารบัญตาราง                | (2) |
| สารบัญภาพ                  | (3) |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ  | (6) |
| คำนำ                       | 1   |
| วัตถุประสงค์               | 2   |
| การตรวจเอกสาร              | 3   |
| อุปกรณ์และวิธีการ          | 26  |
| อุปกรณ์                    | 26  |
| วิธีการ                    | 28  |
| ผลการทดลอง                 | 34  |
| สรุปผลการทดลอง             | 72  |
| เอกสารและสิ่งอ้างอิง       | 81  |
| ภาคผนวก                    | 89  |
| ประวัติการศึกษาและการทำงาน | 124 |

## สารบัญตาราง

## ตารางที่

## หน้า

|   |                                                                                                                                                                                 |    |
|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | ชนิดพันธุ์และการแพร่กระจายของลิ้นในประเทศต่าง ๆ                                                                                                                                 | 3  |
| 2 | การเชื่อมต่อของคาร์โบไฮเดรตกับโปรตีนในไกลโคโปรตีนชนิดต่าง ๆ                                                                                                                     | 20 |
| 3 | lectins ชนิดต่าง ๆ ที่จับกับน้ำตาลที่จำเพาะเจาะจง                                                                                                                               | 22 |
| 4 | ผลการทดลองการติดสีย้อมในเนื้อเยื่อน้ำลายใต้ลิ้น<br>ของลิ้นขวา ( <i>Manis javanica</i> )                                                                                         | 38 |
| 5 | ผลการย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมต่อด้วย Alcian Blue<br>pH 2.5 และ lectins PNA ในต่อมน้ำลายใต้ลิ้นของลิ้นขวา ( <i>Manis javanica</i> )                                 | 45 |
| 6 | ผลการทดลองการติดสีย้อมในเนื้อเยื่อน้ำลายจากกรรไกร<br>(mandibular salivary gland) ของลิ้นขวา ( <i>Manis javanica</i> )                                                           | 51 |
| 7 | ผลการย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมต่อด้วย Alcian Blue pH 2.5<br>และ lectins PNA ในต่อมน้ำลายจากกรรไกรของลิ้นขวา ( <i>Manis javanica</i> )                               | 57 |
| 8 | ผลการทดลองการติดสีย้อมในเนื้อเยื่อน้ำลายกกหู (parotid salivary gland)<br>ของลิ้นขวา ( <i>Manis javanica</i> )                                                                   | 63 |
| 9 | ผลการทดลองการย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมต่อด้วย<br>Alcian Blue pH 2.5 และเลกติน PNA ในต่อมน้ำลายกกหู<br>(parotid salivary gland) ของลิ้นขวา ( <i>Manis javanica</i> ) | 69 |

## สารบัญภาพ

### ภาพที่ หน้า

|    |                                                                                         |    |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1  | ลักษณะต่อมน้ำลายกลุ่ม major salivary gland                                              | 7  |
| 2  | ลักษณะการปล่อยสารคัดหลั่งของต่อมน้ำลาย                                                  | 7  |
| 3  | ลักษณะของเซลล์คัดหลั่ง                                                                  | 9  |
| 4  | การเชื่อม oligosaccharide ในไกลโคโปรตีน                                                 | 19 |
| 5  | ตำแหน่งต่าง ๆ ของเซลล์ที่ lectins สามารถจำเพาะกับน้ำตาล                                 | 23 |
| 6  | ตำแหน่งของ sialic acid ที่พบอยู่ปลายสุดท้ายของสาย glycoprotein                          | 24 |
| 7  | ตำแหน่งการวางตัวของต่อมน้ำลายในสายพันธุ์ชะวา ( <i>Manis javanica</i> )                  | 34 |
| 8  | ลักษณะการวางตัวของต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual salivary gland)                         | 35 |
| 9  | โครงสร้างทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลายใต้ลิ้น<br>โดยย้อมด้วย H&E                    | 36 |
| 10 | โครงสร้างทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลายใต้ลิ้น<br>โดยย้อมด้วย H&E ในบริเวณ anterior  | 37 |
| 11 | โครงสร้างทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลายใต้ลิ้น<br>โดยย้อมด้วย H&E ในบริเวณ posterior | 37 |

|    |                                                                              |    |
|----|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 12 | ผลการติดสี AB pH 2.5 ของต่อมน้ำลายใต้ลิ้น                                    | 39 |
| 13 | ผลการติดสี PAS ของต่อมน้ำลายใต้ลิ้น                                          | 40 |
| 14 | ผลการติดสี AB pH 2.5 - PAS ของต่อมน้ำลายใต้ลิ้น                              | 40 |
| 15 | ผลการติดสี Lectins Con A ในต่อมน้ำลายใต้ลิ้น                                 | 42 |
| 16 | ผลการติดสี Lectins DBA ในต่อมน้ำลายใต้ลิ้น                                   | 42 |
| 17 | ผลการติดสี Lectins PNA ในต่อมน้ำลายใต้ลิ้น                                   | 43 |
| 18 | ผลการติดสี Lectins RCA - I ในต่อมน้ำลายใต้ลิ้น                               | 43 |
| 19 | ผลการติดสี Lectins SBA ในต่อมน้ำลายใต้ลิ้น                                   | 44 |
| 20 | ผลการติดสี Lectins UEA - I ในต่อมน้ำลายใต้ลิ้น                               | 44 |
| 21 | ผลการติดสี Lectins WGA ในต่อมน้ำลายใต้ลิ้น                                   | 45 |
| 22 | ผลการติดสี AB pH 2.5 โดยไม่ย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase ในต่อมน้ำลายใต้ลิ้น | 47 |

(4)

### สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ | หน้า                                                                                         |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 23     | ผลการติดสีของต่อมน้ำลายใต้ลิ้นโดยทำการย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมต่อด้วย AB pH 2.5 |
| 47     |                                                                                              |

|    |                                                                                                     |    |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 24 | ผลการติดสี Lectins PNA ของต่อมน้ำลายใต้ลิ้นโดยไม่ย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase                      |    |
| 48 |                                                                                                     |    |
| 25 | ผลการติดสีของต่อมน้ำลายใต้ลิ้นภายหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมต่อด้วยสาร Lectins PNA |    |
| 48 |                                                                                                     |    |
| 26 | ภาพการเปิดผิวหนังเพื่อแสดงตำแหน่งการวางตัวของต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland)         |    |
| 49 |                                                                                                     |    |
| 27 | ลักษณะของเนื้อต่อมน้ำลายขากรรไกรในลิงชวา ( <i>Manis javanica</i> )                                  |    |
| 50 |                                                                                                     |    |
| 28 | โครงสร้างทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลายขากรรไกรโดยย้อมด้วย H&E                                   | 50 |
| 29 | ผลการติดสี AB pH 2.5 ในต่อมน้ำลายขากรรไกร                                                           | 52 |
| 30 | ผลการติดสี PAS ในต่อมน้ำลายขากรรไกร                                                                 | 52 |
| 31 | ผลการติดสี AB pH 2.5-PAS ในต่อมน้ำลายขากรรไกร                                                       | 53 |
| 32 | ผลการติดสี Lectins Con A ในต่อมน้ำลายขากรรไกร                                                       | 54 |
| 33 | ผลการติดสี Lectins DBA ในต่อมน้ำลายขากรรไกร                                                         | 54 |
| 34 | ผลการติดสี Lectins PNA ในต่อมน้ำลายขากรรไกร                                                         |    |
| 55 |                                                                                                     |    |
| 35 | ผลการติดสี Lectins RCA - I ในต่อมน้ำลายขากรรไกร                                                     | 55 |
| 36 | ผลการติดสี Lectins SBA ในต่อมน้ำลายขากรรไกร                                                         | 56 |
| 37 | ผลการติดสี Lectins UEA - I ในต่อมน้ำลายขากรรไกร                                                     | 56 |

|    |                                                   |    |
|----|---------------------------------------------------|----|
| 38 | ผลการติดสี Lectins WGA ในต่อมน้ำลายขากรรไกร       |    |
|    | 57                                                |    |
| 39 | ผลการติดสี AB pH 2.5 ในต่อมน้ำลายขากรรไกร         |    |
|    | โดยไม่ย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase               | 58 |
| 40 | ผลการย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมติดด้วย |    |
|    | AB pH 2.5 ในต่อมน้ำลายขากรรไกร                    | 59 |

(5)

### สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ |                                                       | หน้า |
|--------|-------------------------------------------------------|------|
| 41     | ผลการติดสี Lectins PNA ในต่อมน้ำลายขากรรไกรโดยไม่ย่อย |      |
|        | ด้วยเอนไซม์ neuraminidase                             |      |
| 59     |                                                       |      |
| 42     | ผลการย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมติดด้วย     |      |
|        | สาร Lectins PNA ในต่อมน้ำลายขากรรไกร                  |      |
| 60     |                                                       |      |
| 43     | ลักษณะของต่อมน้ำลายกหนู (parotid salivary gland)      |      |
|        | ของลิงชวา ( <i>Manis javanica</i> )                   |      |
| 61     |                                                       |      |
| 44     | ผลการติดสี H&E ในต่อมน้ำลายกหนูในบริเวณ posterior     |      |
| 62     |                                                       |      |
| 45     | ผลการติดสี AB pH 2.5 ในต่อมน้ำลายกหนู                 |      |
| 64     |                                                       |      |
| 46     | ผลการติดสี PAS ในต่อมน้ำลายกหนู                       |      |
| 64     |                                                       |      |
| 47     | ผลการติดสี AB pH 2.5 - PAS ในต่อมน้ำลายกหนู           |      |
| 65     |                                                       |      |
| 48     | ผลการติดสี Lectins Con A ในต่อมน้ำลายกหนู             |      |
| 66     |                                                       |      |

|    |                                                                                       |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 49 | ผลการติดสี Lectins UEA - I ในต่อมน้ำลายกหนู                                           |
| 66 |                                                                                       |
| 50 | ผลการติดสี Lectins SBA ในต่อมน้ำลายกหนู                                               |
| 67 |                                                                                       |
| 51 | ผลการติดสี Lectins DBA ในต่อมน้ำลายกหนู                                               |
| 67 |                                                                                       |
| 52 | ผลการติดสี Lectins PNA ในต่อมน้ำลายกหนู                                               |
| 69 |                                                                                       |
| 53 | ผลการติดสี Lectins WGA ในต่อมน้ำลายกหนู                                               |
| 69 |                                                                                       |
| 54 | ผลการติดสี AB pH 2.5 ในต่อมน้ำลายกหนู<br>โดยไม่ย่อยด้วย เอนไซม์ neuraminidase         |
| 70 |                                                                                       |
| 55 | ผลการย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมติดด้วย<br>AB pH 2.5 ในต่อมน้ำลายกหนู       |
| 70 |                                                                                       |
| 56 | ผลการติดสี Lectins PNA ของต่อมน้ำลายกหนู<br>โดยไม่ย่อยด้วย เอนไซม์ neuraminidase      |
| 71 |                                                                                       |
| 57 | ผลการย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมติดด้วย<br>สาร Lectins PNA ในต่อมน้ำลายกหนู |
| 71 |                                                                                       |

(6)

### คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

|                 |                                                                  |
|-----------------|------------------------------------------------------------------|
| H&E             | สีย้อม Hematoxylin ย้อมติดด้วย Eosin                             |
| AB pH 2.5       | สีย้อม Alcian Blue ที่ระดับ pH 2.5                               |
| PAS             | สีย้อม Periodic acid - Schiff                                    |
| AB pH 2.5 - PAS | สีย้อม Alcian Blue pH 2.5 แล้วย้อมติดด้วย Periodic acid - Schiff |

|                 |                                                                  |
|-----------------|------------------------------------------------------------------|
| Con A           | เลกติน Concanavalin A                                            |
| DBA             | เลกติน <i>Dolichos biflorus</i> agglutinin                       |
| PNA             | เลกติน Peanut agglutinin                                         |
| RCA - I         | เลกติน <i>Ricinus communis</i> agglutinin- I                     |
| SBA             | เลกติน Soybean agglutinin                                        |
| UEA - I         | เลกติน <i>Ulex europaeus</i> agglutinin - I                      |
| WGA             | เลกติน Wheat germ agglutinin                                     |
| Neu - AB pH 2.5 | ย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase แล้วย้อมติดด้วย Alcian Blue pH 2.5 |
| Neu - PNA       | ย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase แล้วย้อมติดด้วย เลกติน PNA         |
| M               | Mucous cells                                                     |
| S               | Serous cells                                                     |
| D               | Striated ducts                                                   |
| SD              | Serous demilunes                                                 |
| MC              | Myoepithelial cells                                              |
| CM              | Cell membrane                                                    |
| GCT             | Granular convoluted tubule                                       |
| SSG             | Sublingual salivary gland                                        |
| MSG             | Mandibular salivary gland                                        |
| PSG             | Parotid salivary gland                                           |
| 4               | ติดสีเข้มมาก                                                     |
| 3               | ติดสีเข้ม                                                        |
| 2               | ติดสีปานกลาง                                                     |
| 1               | ติดสีเล็กน้อย                                                    |
| 0               | ไม่ติดสีเลย                                                      |

**การศึกษาจุลกายวิภาคศาสตร์และเนื้อเยื่อเคมีพวกไกลโคคอนจูเกต  
ในต่อมน้ำลายของลิ่นชวา (*Manis javanica*)**

**Studies on Histology and Glycoconjugates Histochemistry in Salivary  
Gland of the Malayan Pangolin (*Manis javanica*)**

## คำนำ

ลิ่น (Pangolin) เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีลักษณะคล้ายสัตว์เลื้อยคลานซึ่งจัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่าพ.ศ. 2535 ปัจจุบันลิ่นได้ลดจำนวนลงอย่างต่อเนื่องเพราะถูกจับเป็นอาหารและความเชื่อในการนำเกล็ดไปปรุงเป็นยาในหมู่ชาวจีน ทำให้มีการลักลอบขนย้ายลิ่นจากประเทศพม่า มาเลเซีย อินโดนีเซียและประเทศไทย เพื่อนำไปขายในประเทศจีน

ลิ่นเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศเนื่องจากสามารถควบคุมประชากรมด ปลวก และแมลงต่าง ๆ ไม่ให้มีมากเกินไป อาหารจำพวกมด แมลงต่าง ๆ ที่เข้าสู่ช่องปากจะถูกเคล้ากับน้ำลายซึ่งสกัดมาจากต่อมน้ำลายต่าง ๆ ที่วางตัวอยู่รอบ ๆ ช่องปาก น้ำลายเป็นสารพวก glycoprotein ซึ่งคัดหลั่งมาจากต่อมน้ำลายนั้น มีรายงานถึงประโยชน์มากมาย เช่น เป็นสารพวกหล่อลื่นทางเดินอาหาร ช่วยปกป้องเนื้อเยื่อบริเวณช่องปากตลอดจนช่วยดักจับทำลายเชื้อโรคที่เข้าสู่ช่องปาก

ต่อมน้ำลายในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีหลายต่อมตั้งอยู่บริเวณรอบช่องปาก ขากรรไกร และกกหู เรียกชื่อแตกต่างกันออกไปตามบริเวณที่พบ เช่น sublingual salivary gland, mandibular salivary gland, parotid salivary gland, submandibular salivary gland และ maxillary salivary gland เป็นต้น ต่อมน้ำลายในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมดังกล่าว ได้มีการศึกษาลักษณะโครงสร้างเนื้อเยื่อและเคมีในเนื้อเยื่ออย่างกว้างขวางพบลักษณะแตกต่างมากมายทั้งในต่อมต่าง ๆ ของสัตว์ชนิดเดียวกัน และในต่อมเดียวกันของสัตว์แต่ละชนิด แต่ยังไม่มียารายงานทางกายวิภาคศาสตร์ จุลกายวิภาคศาสตร์และ เนื้อเยื่อเคมีในต่อมน้ำลายของลิ่นชวา (*Manis javanica*) แต่อย่างใด

2

## วัตถุประสงค์

1. ศึกษาลักษณะกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลายของลิ่นชวา (*Manis javanica*) เพื่อคุณลักษณะการวางตัวของต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual salivary gland) ต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) และต่อมน้ำลายกกหู (parotid salivary gland) โดยการเปิดชำแหละและบันทึกภาพ

2. ศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลายของลิ่นชวา (*Manis javanica*) อย่างละเอียดโดยใช้เทคนิคการย้อมทางเนื้อเยื่อเคมี ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase เพื่อต้องการหาอนุพันธ์ของน้ำตาลและทราบถึงบทบาทหน้าที่ของอนุพันธ์น้ำตาลที่บรรจุอยู่ในต่อมน้ำลายทั้ง 3 ต่อมหลักและอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light Microscope)

3. เพื่อรวบรวมข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาลักษณะกายวิภาคศาสตร์และจุลกายวิภาคศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับต่อมน้ำลายของลิ่นชวา (*Manis Javanica*) สำหรับใช้เปรียบเทียบกับต่อมน้ำลายของสัตว์ชนิดอื่น ๆ

#### ขอบเขตการวิจัย

1. ศึกษาลักษณะโครงสร้างทางกายวิภาคศาสตร์และจุลกายวิภาคศาสตร์ในต่อมน้ำลายของลิ่นชวา (*Manis javanica*) ทั้ง 3 ต่อมหลักคือ ต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual salivary gland) ต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) และต่อมน้ำลายกกหู (parotid salivary gland) อย่างละเอียด

2. ศึกษาชนิดของน้ำตาลที่พบในต่อมน้ำลายทั้ง 3 ต่อมหลัก ด้วยเทคนิคเนื้อเยื่อเคมี เทคนิคเลกตินและหาโครงสร้างสุดท้ายของอนุพันธ์น้ำตาลโดยเทคนิคการย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase

## การตรวจเอกสาร

### ชีววิทยาของลัน

ลัน (Pangolin) เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีลักษณะคล้ายสัตว์เลื้อยคลาน จัดอยู่ใน Phylum Chordata, Class Mammalia, Order Pholidota, Family Manidae และ Genus *Manis* ลันเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองจำพวกสัตว์เลื้อยลูกด้วยนม ตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 และตามอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์หรือ CITES (The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) ลันจัดอยู่ในชนิดพันธุ์แบบท้ายบัญชีหมายเลข 2 เป็นชนิดที่ยังไม่ถึงกับใกล้จะสูญพันธุ์อนุญาตให้ทำการค้าขายได้ แต่ต้องมีการควบคุมไม่ให้เกิดความเสียหายหรือลดจำนวนของชนิดพันธุ์นั้นอย่างรวดเร็วและ IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources) ซึ่งเป็นองค์กรเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติและทรัพยากรธรรมชาติ เล็งเห็นถึงความสำคัญของการลดจำนวนลงของประชากรลันจึงจัดให้ลันอยู่ใน Red List ประเภทใกล้ถูกคุกคาม การแบ่งชนิดพันธุ์ของลัน (Pangolin) แบ่งออกเป็น 2 ประเภท ดังนี้

ตารางที่ 1 ชนิดพันธุ์และการแพร่กระจายของลันในประเทศต่าง ๆ

| ชนิดพันธุ์                                       | ประเทศที่พบ                                       |
|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| ลันแอฟริกัน (African pangolin)                   |                                                   |
| - Common pangolin ( <i>Manis temminckii</i> )    | Zimbabwe, Botswana, Namibia                       |
| - Giant pangolin ( <i>Manis gigantea</i> )       | Uganda, Tanzania, ตะวันตกของ Kenya                |
| - Tree pangolin ( <i>Manis tricuspis</i> )       | East และ South Africa                             |
| ลันเอเชีย (Asian pangolin)                       |                                                   |
| - Chinese pangolin ( <i>Manis pentadactyla</i> ) | Thailand, Nepal, Bangladesh, China, Myanmar       |
| - Indian pangolin ( <i>Manis crassicaudata</i> ) | Pakistan, Sri Lanka, Bangladesh, China,           |
| - Malayan pangolin ( <i>Manis javanica</i> )     | Myanmar Thailand, Lao, China, Malaysia, Indonesia |

ที่มา: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources [IUCN] (1996)

ประเทศไทยสามารถพบลิ้นอยู่ 2 ชนิด ได้แก่

1. ลิ้นพันธุ์ชาว (Manis javanica)
2. ลิ้นพันธุ์จีน (Manis pentadactyla)

### ลักษณะลิ้นพันธุ์ชาว (Manis javanica)

ลิ้นพันธุ์ชาว (Manis javanica) มีชื่อสามัญว่า Malayan pangolin, Pangolin javanaise, Pangolin malais และ Pangolin malayo (Desmarest, 1822) ลิ้นพันธุ์ชาวพบได้ในป่าทุกประเภท เช่น ป่าโปร่ง หรือ ป่าดิบชื้น สามารถพบได้ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศ อินโดนีเซีย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ ไทย ลาว และ จีน (ดังตารางที่ 1)

ลักษณะเด่นของลิ้นพันธุ์ชาว (Manis javanica) มีลำตัวแบนยาว หัวเรียวเล็กปากแหลม ปกคลุมด้วยเกล็ดที่มีลักษณะแข็ง ตั้งแต่จมูกถึงปลายหาง บริเวณหน้า ท้อง และฝ่าเท้า ไม่มีเกล็ดปกคลุม ขนาดลำตัวยาวตั้งแต่ปากถึงหางประมาณ 79 - 88 เซนติเมตร และเพศผู้จะมีขนาดใหญ่กว่าเพศเมีย ใบหูมีขนาดเล็ก หางตามีความหนา ช่องจมูกและช่องหูสามารถปิดได้เพื่อป้องกันมดและแมลงต่าง ๆ ภายในปากไม่มีฟัน ลิ้นมีลักษณะหนาและสามารถยืดได้ถึง 25 เซนติเมตร ลิ้นถูกปกคลุมด้วยน้ำลายที่มีลักษณะเหนียวเพื่อสามารถที่จะเก็บกิน มด ปลวก และแมลงต่าง ๆ ได้สะดวก (Nowak, 1999) เมื่อเปรียบเทียบกับลิ้นพันธุ์จีน (Manis pentadactyla) พบว่ามีขนาดเล็กกว่าลิ้นพันธุ์ชาว (Manis javanica) และสีเกล็ดจะมีสีดำนขณะที่ลิ้นพันธุ์ชาวสีเกล็ดจะมีสีน้ำตาล

### พฤติกรรมและอาหาร

ลิ้นเป็นสัตว์ที่หากินในเวลากลางคืนและช่วงเวลากลางวันจะอาศัยอยู่ตามโพรงต้นไม้หรือโพรงดิน มันสามารถปีนต้นไม้ได้โดยใช้เล็บและหางช่วยในการปีนป่ายต้นไม้ ลิ้นกินมด ปลวก และแมลงต่าง ๆ เป็นอาหาร ลิ้นจะทำการดมบริเวณที่มีแหล่งอาหาร จากนั้นใช้เล็บเท้าหน้าตะกุดดินในบริเวณที่มีรังมด หรือรังปลวก เมื่อพบอาหารจึงแลบลิ้นซึ่งปกคลุมด้วยน้ำลายที่เหนียวออกมาเพื่อกินอาหาร (Griffiths et al., 1990) ลิ้นเป็นสัตว์ที่ตกใจง่าย เชื่องช้าเมื่อพบศัตรูก็จะม้วนตัวกลมโดยปลายหางจะยึดกับเกล็ดที่แข็งแรงทำให้แเกะตัวลิ้นออกยาก ถ้าศัตรูพยายามคุกคามโดยแเกะตัวลิ้นกิน ลิ้นจะใช้ปากคุดสารที่ก้นซึ่งมีกลิ่นแรงมากทำให้ศัตรูพากันถอยหนีไป (Nowak, 1999)

## การแพร่พันธุ์

ยังไม่มีข้อมูลที่แน่ชัด คาดว่าอายุที่สามารถสืบพันธุ์ได้ตั้งแต่ 2 ปีขึ้นไป ระยะเวลาตั้งท้องสั้นเฉลี่ยประมาณ 120 - 150 วัน โดยทั่วไปออกลูกครั้งละ 1 ตัว หรือบางครั้งอาจจะ 2 ตัว ลูกกลืนหย่านมที่อายุ 3 เดือน และฤดูผสมพันธุ์ในช่วงฤดูใบไม้ร่วง

## ความสำคัญต่อระบบนิเวศน์

ลิ่นมีความสามารถในการควบคุมประชากรมด ปลวก และแมลงต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี มีการรายงานว่า ลิ่นที่โตเต็มที่สามารถที่จะกินมด หรือปลวก ประมาณ 70 ล้านตัว/ปี จากพฤติกรรมของลิ่นในการหาอาหารและสร้างโพรงโดยการขุดดิน พบว่าลิ่นเป็นตัวช่วยในการเพิ่มอากาศให้กับดิน

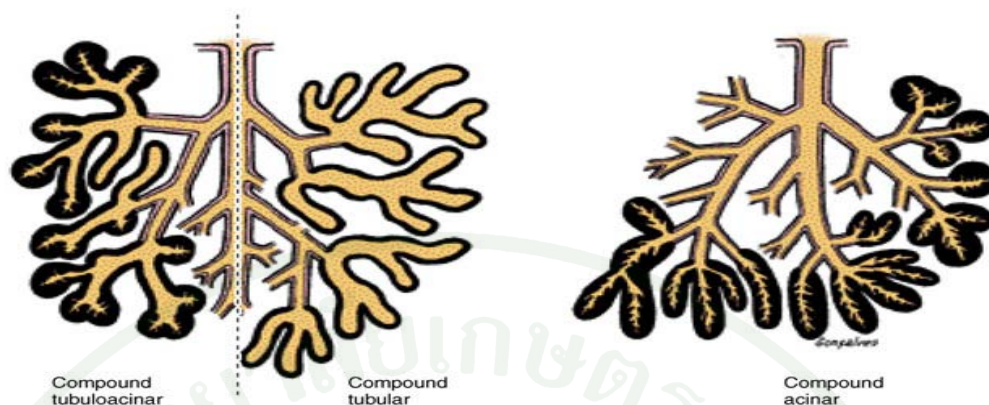
## ต่อมน้ำลาย

ต่อมน้ำลาย (Salivary gland) เจริญมาจากเนื้อเยื่อผิวหนังที่อยู่ในชั้นของ ectoderm มีการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนมากมายโดยแทรกตัวเข้าไปในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและเจริญเป็นกลุ่ม gland ที่มีขนาดใหญ่เรียกว่า compound tubuloacinar gland (Eroschenko, 2005) ต่อมน้ำลายแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ Major salivary gland เป็นต่อมน้ำลายที่มีขนาดใหญ่มีกวางตัวอยู่ด้านนอกของ oral cavity เช่น sublingual salivary gland, mandibular salivary gland และ parotid salivary gland เป็นต้น และ Minor salivary gland เป็นต่อมน้ำลายที่พบภายใน oral cavity การเรียกชื่อของต่อมน้ำลายเรียกตามตำแหน่งที่พบ เช่น lingual gland (พบที่ลิ้น) buccal gland (พบที่แก้ม) หรือ labial gland (พบที่ริมฝีปาก) เป็นต้น

ต่อมน้ำลายเป็นต่อมที่ทำหน้าที่ในการสร้างน้ำลายโดยหน่วยย่อยที่ทำหน้าที่ในการสร้างคือ กลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า acini กลุ่มเซลล์จะหลั่งสารซึ่งประกอบด้วย น้ำ อิเล็กโทรไลต์ สารเมือก และน้ำย่อย enzyme ทั้งหมดนี้จะหลั่งออกจาก acini เข้าสู่ collecting ducts ขณะอยู่ภายใน ducts จะมีการดูดสารโซเดียม หลัง โปแตสเซียม และไบคาร์บอเนต ออกมา ทำให้น้ำลายมีคุณสมบัติเป็นด่าง น้ำลายมีหน้าที่มากมายเช่น ช่วยทำให้ oral mucosa ชุ่มชื้น ช่วยหล่อลื่นทางเดินอาหาร และช่วยละลายอาหารทำให้อาหารจับตัวเป็นกลุ่มก้อน เป็นต้น

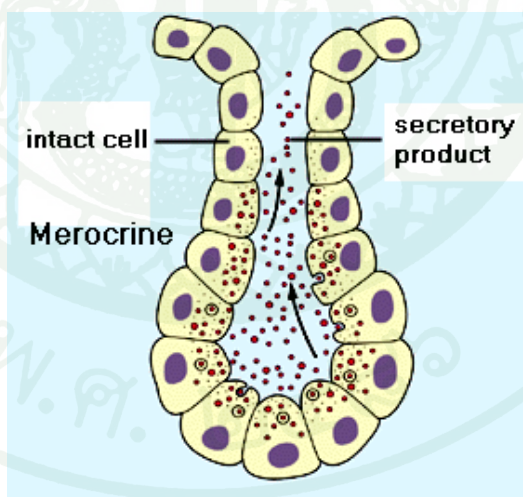
ต่อมน้ำลายเป็นต่อมที่มีระบบท่อ (exocrine gland) สำหรับส่งสารคัดหลั่งไปตามท่อนั้น ๆ ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่สร้างและขับสาร (secretory portion) และส่วนที่เป็นท่อ (duct) ต่อมน้ำลายกลุ่ม major salivary gland เกิดจากการรวมกันของต่อมที่มีลักษณะคล้าย simple gland หลาย ๆ ต่อมรวมกันกันกลายเป็นต่อมที่มีขนาดใหญ่ขึ้น มีการแตกแขนงมากมาย และส่งสารคัดหลั่งออกมาตามท่อ และหลาย ๆ ท่อมาเปิดรวมเป็นท่อใหญ่ ออกสู่ภายนอกเพียงท่อเดียว ต่อมน้ำลาย major salivary gland ประกอบด้วย sublingual salivary gland, mandibular salivary gland และ parotid salivary gland เป็นต้น โดยทั้ง 3 ต่อมจัดว่าเป็น compound branched tubuloacinar gland ซึ่งมี secretory portion ที่มีทั้งแบบเป็นท่อตรง (tubular) และกระเปาะ (acinar) และรวมกลุ่มกันแตกแขนงมากมาย (ดังภาพที่ 1) และต่อมน้ำลายเหล่านี้จะปล่อยสารคัดหลั่งออกจากเซลล์โดยวิธี merocrine gland ซึ่งวิธีการหลั่งสารคัดหลั่งจะไม่มีการสูญเสียในส่วนของเซลล์และ cytoplasm เลย (ดังภาพที่ 2)

สารคัดหลั่งที่ถูกผลิตออกมาจาก acinus จะออกสู่ภายนอกโดยมี myoepithelial cells ทำหน้าที่ในการช่วยบีบตัวให้หลังสารคัดหลั่งออกมาตามท่อ โดยเริ่มจาก intercalated ducts เป็นท่อที่มีขนาดเล็กที่สุด รับสารคัดหลั่งมาจาก lumen ของ acinus ลักษณะเซลล์เป็น low simple cuboidal epithelium เส้นผ่าศูนย์กลางของท่อมีขนาดเท่ากับ lumen ของเซลล์คัดหลั่ง ท่อที่ต่อมาจาก intercalated duct คือ intralobular ducts (หรือ striated ducts) ลักษณะเซลล์เป็น simple cuboidal epithelium หรือ low columnar epithelium (Eroschenko, 2005) ลักษณะของท่อชนิดนี้จะเห็นเป็นลาย (striation) ที่ basal portion ของเซลล์ซึ่งเกิดจากการเรียงตัวของไมโทคอนเดรียจำนวนมาก (ศึกษาทาง EM) การเรียงตัวของไมโทคอนเดรียเกี่ยวข้องกับการขนส่งของน้ำและไอออนต่าง ๆ เพื่อปรับองค์ประกอบที่เป็นอิเล็กโทรไลต์ของน้ำลาย ต่อมา intralobular duct จะมาเปิดร่วมกันเข้าสู่ interlobular ducts โดยท่อชนิดนี้อยู่ใน connective tissue septa ลักษณะเซลล์เป็น stratified columnar epithelium หรือ pseudostratified columnar epithelium จากนั้นจะมารวมกันกลายเป็นท่อที่มีขนาดใหญ่เปิดร่วมกันเข้าสู่ excretory ducts ลักษณะเซลล์เป็น stratified squamous epithelium ท่อชนิดนี้จะเปิดเข้าสู่ช่องปากต่อไป



ภาพที่ 1 ลักษณะต่อมน้ำลายกลุ่ม major salivary gland มีลักษณะแบบ compound branched tubuloacinar gland ซึ่งมี secretory portion ที่มีทั้งแบบเป็นท่อ (tubular) และกระเปาะ (acinar) และรวมกลุ่มกันแตกแขนงออกมาหลาย

ที่มา: Junqueira *et al.* (1998)



ภาพที่ 2 ลักษณะการปล่อยสารคัดหลั่งของต่อมน้ำลายออกจากเซลล์โดยวิธี merocrine gland ซึ่งวิธีการหลั่งสารคัดหลั่งจะไม่มีการสูญเสียในส่วนของเซลล์และ cytoplasm เลย

ที่มา: Donald and Rubbelke (1999)

## ลักษณะของเซลล์คัดหลั่งในต่อมน้ำลาย

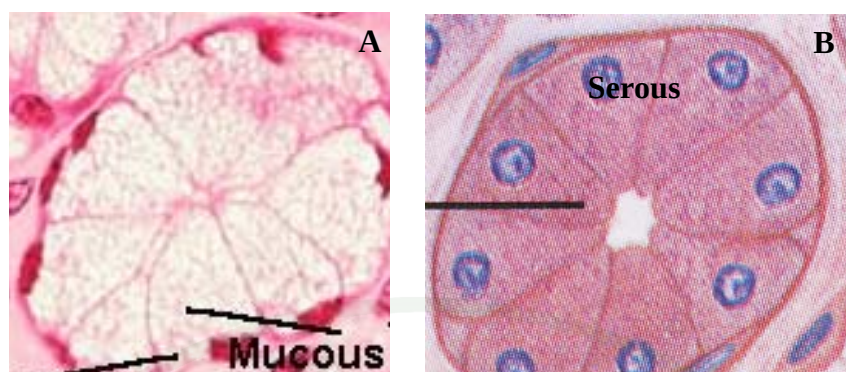
ต่อมน้ำลายจะมีเซลล์คัดหลั่งที่ทำหน้าที่ในการหลั่งสารออกมา โดยลักษณะของสารที่หลั่งก็จะแตกต่างกัน เช่น สารคัดหลั่งลักษณะใส สารคัดหลั่งลักษณะเมือกข้น หรือสารคัดหลั่งที่มีทั้งลักษณะเมือกข้นและใส เป็นต้น

### 1. Mucous cells

หลังสารคัดหลั่งที่มีลักษณะเป็นเมือกข้น ลักษณะเซลล์แบบ pear shape และ mucous cells มักเรียงตัวเป็นกระเปาะยาว (tubule) วางอยู่บน basal lamina และมี lumen ตรงกลางกว้างกว่า serous acinus นิวเคลียสค่อนข้างแบนอยู่ที่ฐานของเซลล์ ไซโตพลาสซึมมีลักษณะใสเพราะบรรจุ mucinogen granules โดยภายในไซโตพลาสซึมมี rough endoplasmic reticulum (RER) และ mucinogen granules ซึ่งประกอบด้วย glycoprotein และ mucin (ดังภาพที่ 3, A)

### 2. Serous cells

หลังสารคัดหลั่งที่มีลักษณะเหลว ลักษณะเซลล์แบบ pyramid ด้านบนของเซลล์แคบและด้านล่างเซลล์กว้างวางอยู่บน basal lamina นิวเคลียสค่อนข้างกลมอยู่ตรงกลางเซลล์ ภายในไซโตพลาสซึมมีลักษณะเข้มเพราะบรรจุ zymogen granules โดยภายในไซโตพลาสซึมด้านบนมี secretory granules ด้านฐานมี rough endoplasmic reticulum (RER) เป็นแหล่งสำหรับผลิตโปรตีนและเอนไซม์ (Young and Van Lennep, 1978) (ดังภาพที่ 3, B)



ภาพที่ 3 ลักษณะของเซลล์คัดหลั่ง (A) Mucous cells (B) Serous cells

ที่มา: Eroschenko (2005)

### ลักษณะเฉพาะของต่อมน้ำลาย Major salivary gland ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

#### ต่อมน้ำลาย Sublingual salivary gland

##### ลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์

ต่อมน้ำลาย sublingual salivary gland มีขนาดเล็ก วางตัวอยู่ใต้ mucous membrane ที่พื้นของปาก ด้านข้างของ frenulum ของลิ้น อยู่ติด sublingual depression บน inner surface ของกระดูกขากรรไกรล่าง (mandible) ด้านบนสัมผัสกับ sublingual fold ด้านล่างกับ mylohyoid muscle ด้านหลังกับ deep process ของ submandibular gland ด้านข้างกับ sublingual fovea (fossa) บน medial surface ของ mandible และ ด้าน medial กับกล้ามเนื้อ genioglossus โดยแยกจากกล้ามเนื้อด้วย lingual nerve และ submandibular duct มีท่อหลายอันลักษณะสั้นเปิดเข้าสู่ช่องปากทาง sublingual fold (plica sublingualis) (Evans and Delahunta, 2000)

##### ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์

เซลล์คัดหลั่งของต่อมน้ำลาย sublingual salivary gland ลักษณะเป็น mixed gland ประกอบด้วย mucous cells, serous cells หรือ serous demilunes เป็นจำนวนมากขึ้นกับ species

ของสัตว์แต่ละชนิด เช่น sublingual salivary gland ของวัว แกะ และสุกร ส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม mucous cells เกือบทั้งหมด ขณะที่ serous demilunes พบเพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์กินเนื้อ (carnivora) เช่น สุนัขและแมว จะเป็นกลุ่ม serous cells เป็นส่วนใหญ่ และ mucous cells เรียงตัวเป็นท่อ (tubular) อย่างชัดเจนและติดต่อกับ serous cells ด้วย intercalated ducts โดยตรง ขณะที่ท่อของ sublingual salivary gland ก็มีความแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด เช่น แมว สุนัข และอูฐ จะมี intercalated ducts และ striated ducts สั้นและเจริญไม่ค่อยดี (Martin and Young, 1971a) ขณะที่ใน แกะ วัว สัตว์ฟันแทะ และสุกร พบว่า intercalated ducts และ striated ducts เจริญดีมาก ถึงแม้ว่าท่อจะมีลักษณะสั้นกว่าก็ตาม ดังนั้นสารคัดหลั่งจึงถูกปล่อยเข้าสู่ striated ducts โดยตรง เนื่องจาก intercalated ducts มีขนาดสั้นหรือในอูฐมี striated ducts เจริญน้อยมากจึงเปิดเข้าสู่ excretory ducts โดยตรง (Young and Van Lennep, 1978)

### ต่อมน้ำลาย Mandibular salivary gland

#### ลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์

ต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland วางตัวอยู่ตรงมุมกระดูกขากรรไกรล่าง (mandible) ด้าน inferior surface ปกคลุมด้วย skin และ fascia และสัมพันธ์กับ facial vein และ submandibular lymph nodes ด้าน lateral surface สัมพันธ์กับ submandibular fossa บน inner surface ของ body กระดูกขากรรไกรล่าง ด้าน medial surface สัมพันธ์กับ mylohyoid, hyoglossus และ digastrics ทั้งด้าน inferior และ medial surface ปกคลุมด้วย cervical fascia มีท่อขนาดเล็กแตกแขนงมาจาก deep surface ของตัวต่อมและเปิดเข้าสู่ช่องปากทางรูเปิด sublingual papilla ซึ่งอยู่ที่ด้านข้างของ frenulum ของลิ้น

#### ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์

เซลล์คัดหลั่งของต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland ลักษณะเป็น mixed gland ประกอบด้วย serous cells และ mucous cells หรือเรียกว่า seromucous cells ซึ่งเซลล์คัดหลั่งจะมีลักษณะเป็นท่อ (tubular) ส่วนปลายขยายใหญ่เป็นกระเปาะ (acinar) หรือเรียกว่า serous demilunes ล้อมรอบ mucous cells ไว้ และมี myoepithelial cells โอบล้อมเซลล์คัดหลั่งเพื่อช่วยให้มีการบีบตัวหลังสารคัดหลั่งออกมา เช่น แมว สุนัข แพะ และ วัว ส่วน mucous cells พบมากขณะที่

serous cells และ serous demilunes พบน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับคน ลิง หนู (guinea pig) และ สุนัข พบ serous cells และ seromucous cells มากกว่า ขณะที่ mucous cells พบเพียงเล็กน้อย (Young and Van Lennep, 1978) ท่อของต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland จะมีความแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิดโดยทั่วไปในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม intercalated ducts จะมีลักษณะสั้นส่วน striated ducts ส่วนใหญ่จะมีการเจริญดีมาก นอกจากนี้ striated ducts ยังมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง กลายเป็นท่อที่มีขนาดใหญ่ขึ้นพบได้ในสัตว์บางชนิด ท่อชนิดนี้เรียกว่า granular ducts หรือ granular convoluted tubules ลักษณะเป็น modified striated ducts (Srinivasan and Chang, 1975) โดยท่อจะมีขนาดใหญ่ลักษณะขดม้วน (convoluted tubules) และ lumen กว้าง เซลล์แบบ stratified columnar epithelium หรือ pseudostratified columnar epithelium ที่ฐานของเซลล์จะเห็นเป็น striation ซึ่งเกิดจากการเรียงตัวของไมโทคอนเดรีย (Dorey and Bhoola, 1972b) บริเวณ apical ของ cytoplasm มี secretory granules บรรจุหนาแน่น ท่อชนิดนี้สามารถพบได้ในต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland ของสัตว์ฟันแทะ (Gresik *et al.*, 1996; Odajima, 1996)

### ต่อมน้ำลาย Parotid salivary gland

#### ลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์

ต่อมน้ำลาย parotid salivary gland ในสัตว์เลี้ยงด้วยนมทั่วไปจะมีขนาดใหญ่ อยู่ต่ำกว่า zygomatic arch และอยู่หน้าต่อ external acoustic meatus วางอยู่บน masseter muscle และอยู่หลัง ramus ของกระดูกขากรรไกรล่าง ต่อมน้ำเหลืองอยู่ระหว่าง rostral border ของ gland (Evans and Delahunta, 2000) ด้าน inferior end ของต่อมจะอยู่ข้างหลังของมุม mandible ส่วนที่คลุม superficial surface ของต่อมจะยึดติดแน่นกับต่อมและยึดติดกับ zygomatic arch และส่วน deep part ของ capsule ยึดติดกับ styloid process, mandible, tympanic plate และกลืนไปกับ fibrous sheath ของ masseter muscle ส่วน fascia ที่อยู่ระหว่าง styloid process และ mandible จะหนา ตรง รูเปิดของท่อน้ำลายยื่นออกมาเรียก parotid papilla และเปิดเข้าสู่ช่องปากทาง vestibule ของปาก ตรงข้ามกับ second upper molar tooth

#### ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์

เซลล์คัดหลั่งของต่อมน้ำลาย parotid salivary gland ประกอบด้วย lobule จำนวน มากมายแต่ละ lobule ประกอบด้วยเซลล์คัดหลั่งมากมายโดยทั่วไปเซลล์คัดหลั่งมีลักษณะเป็น

serous acinus มีนิวเคลียสอยู่ที่ฐานของเซลล์ และที่ส่วนยอดของเซลล์มี secretory granule ซึ่งมีเอนไซม์ zymogen granule บรรจุอยู่ เอนไซม์นี้ทำหน้าที่ย่อยคาร์โบไฮเดรต ส่วน myoepithelial cells อยู่ระหว่าง basal membrane ของ secretory cells และ basal laminal ขณะที่ lumen ของเซลล์คัดหลั่ง เปิดเข้าสู่ intercalated ducts ที่บุด้วย cuboidal epithelium ท่อนี้จะต่อกับ striated ducts ที่บุด้วย cuboidal หรือ columnar cells ลักษณะของท่อชนิดนี้จะเห็น striation ที่ basal portion ของเซลล์ ซึ่งเกิดจากการเรียงตัวของ mitochondria (ศึกษาทาง EM) โดยทั่วไปต่อมน้ำลาย parotid salivary gland ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เซลล์คัดหลั่งจะเป็นแบบ serous cells เป็นส่วนใหญ่ เช่น ในหนู mouse สุกร หนู และ กระต่าย (Young and Van Lennep, 1978) ขณะที่ในสัตว์บาง species จะมีการหลั่งทั้ง serous cells และ mucous cells หรือเรียกว่า seromucous cells เช่น แมว และสุนัข ขณะที่ท่อของต่อมน้ำลาย parotid salivary gland จะมีความแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิดเช่นกัน แต่ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไป intercalated ducts มีลักษณะค่อนข้างยาวขณะที่ striated ducts จะมีลักษณะที่หลากหลาย โดยพบท่อชนิดนี้เจริญดีและเด่นชัดมากใน สุนัข (Cowley and Shackleford, 1970b) ขณะที่ในแมว พบ striated ducts เจริญไม่ดีพบเพียงเล็กน้อย (Shackleford and Klapper, 1962) แต่ในสัตว์บางชนิด striated ducts อาจจะเปลี่ยนแปลงรูปร่างกลายเป็นท่อที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเรียกว่า granular ducts หรือ granular convoluted tubules (GCT) ซึ่งพบในค้างคาว (*Desmodus rotundus*) (Junqueira and Fava - De Moraes, 1965), เม่น (*Erinaceus europaeus*) (Henriksen, 1972; Tandler and Mac Callum, 1974) และ ลิง (*Ateles paniscus*) (Young and Van Lennep, 1978)

### การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์และเนื้อเยื่อเคมีของต่อมน้ำลายในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

การศึกษาด้านจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลายในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่ามีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย จากการศึกษาลักษณะของต่อมน้ำลาย submandibular salivary gland ในโค พบว่าเซลล์คัดหลั่งเป็นชนิด mucous cells และพบ serous demilunes ที่ปลายของบริเวณเซลล์คัดหลั่งโดยเฉพาะ mucous cells บรรจุ sialomucin เป็นส่วนใหญ่ ส่วน serous demilunes บรรจุ neutral glycoconjugates และพบ sialomucin เพียงเล็กน้อย (Quintarelli *et al.*, 1960; Shackleford and Klapper, 1962)

จากการศึกษาลักษณะของต่อมน้ำลาย submandibular salivary gland ของหนู mouse พบว่าเซลล์คัดหลั่งประกอบด้วย mucous cells (Spicer and Duvenci, 1964) ขณะที่ Caramia (1966) รายงานว่า เซลล์คัดหลั่งเป็นแบบ seromucous cells และมี serous demilunes โดยที่เซลล์คัด

หลังประกอบด้วย neutral glycoprotein และ sialomucin จากการรายงานใน sublingual salivary gland ของหนู mouse พบว่าเซลล์คัดหลั่ง mucous cells บรรจุด้วย neutral และ sialic acid (Spicer and Duvenci, 1964) ขณะที่ serous demilunes บรรจุด้วย sulphate mucopolysaccharide และจากการศึกษาในหนู rat พบว่าเซลล์คัดหลั่งของหนู rat มีลักษณะคล้ายกับเซลล์คัดหลั่งของหนู mouse จากการย้อมด้วยเทคนิค lectins พบว่าส่วน acinar cells ของต่อมน้ำลาย submandibular salivary gland ไม่พบ fucose แต่จะพบ galactosamine, N - acetylneuraminic acid และ galactose ขณะที่ granular tube พบน้ำตาล fucose, N - acetylneuraminic acid, galactose และ N - acetylgalactosamine (Zhang *et al.*, 1994)

การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ในต่อมน้ำลาย submandibular salivary gland ของ Syrian hamster พบว่ามี acidic sulphomucin และ sialo mucopolysaccharide แต่จะพบว่ามี ความแตกต่างกันโดยเพศเมียพบ sialomucin เด่นชัดกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเพศผู้ และในต่อมน้ำลาย sublingual salivary gland พบ acidic mucopolysaccharide แพร่กระจายมากมาย (Spicer and Duvenci, 1964)

การศึกษาในกระต่ายรายงานว่าเซลล์คัดหลั่งของต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland ประกอบด้วย serous cells และ seromucous cells โดย serous cells บรรจุด้วย neutral glycoconjugates ขณะที่ seromucous cells บรรจุทั้ง neutral glycoconjugates และ sialomucin จากการศึกษโดยใช้เทคนิค lectins ร่วมกับการย่อยด้วย enzyme ในกระต่ายพบ sialic acid ต่อกับ galactose และ sialic acid ต่อกับ N - acetyl - D - galactose ขณะที่การรายงานในต่อมน้ำลาย sublingual salivary gland พบลำดับของ sialic acid ต่อกับ galactose เป็น terminal dimer ขณะที่ fucose พบที่ N - acetylglucosamine ซึ่งเป็น subterminal dimer ของทั้งสองต่อม (Menghi *et al.*, 1988)

จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลาย submandibular salivary gland ในแมว พบว่าเซลล์คัดหลั่งประกอบด้วย mucous cells และ serous demilunes (Shackleford and Wilborn, 1970b) ขณะที่ Reifel and Travill (1972) ได้ทำการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์และเทคนิคเนื้อเยื่อเคมี ในลูกแมวระยะต่าง ๆ โดยพบว่า submandibular salivary gland ของลูกแมวทุกระยะประกอบด้วย mucous cells ที่บรรจุด้วย sulphomucin และ serous demilunes บรรจุด้วย sialomucin ขณะที่ mucous cells ของต่อมน้ำลาย sublingual salivary gland ครั้งหนึ่ง

ประกอบด้วย sulphomucin ส่วนอีกครั้งหนึ่งประกอบด้วย sialomucin จนกระทั่งอายุประมาณ 6 เดือนจะประกอบด้วย sialomucin เป็นส่วนใหญ่ และจากการใช้เทคนิค lectins เพื่อหาลำดับน้ำตาลของ glycoconjugates ในต่อมน้ำลาย submandibular salivary gland พบว่าเซลล์คัดหลั่งทั้ง mucous cells และ serous demilunes ประกอบด้วย fucose และ galactose ขณะที่ fucose - N - acetyl - D - glucosamine พบที่บริเวณ striated ducts และ sialic acid - galactose กับ sialic acid - N - acetyl - D - glucosamine พบทั้งใน acinus และ ductal cells (Menghi *et al.*, 1989)

การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland ในแกะ พบว่าเซลล์คัดหลั่งเป็นชนิด mucous cells ซึ่งบรรจุด้วย sialomucin และ serous demilunes บรรจุด้วย neutral glycoconjugates เป็นหลัก จากการศึกษาด้วยวิธี lectins histochemistry พบว่าบริเวณ mucous cells ส่วนใหญ่ประกอบด้วย N - acetylneuraminic acid ต่อกับ N - acetylglucosamine และพบ N - acetylneuraminic acid ต่อกับน้ำตาล galactose ประมาณ 20 - 30 % (Schulte *et al.*, 1985)

การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland ในสุนัขตัวเต็มวัย พบว่าเซลล์คัดหลั่งเป็นชนิด mixed glands ประกอบด้วย mucous cells และ serous demilunes จากการศึกษาด้วยเทคนิค lectins พบว่าเซลล์คัดหลั่ง mucous cells บรรจุด้วยอนุพันธ์น้ำตาล N - acetylglucosamine, N - acetylglucosamine และ fucose ขณะที่ serous demilunes ซึ่งถูกย่อยด้วยเอนไซม์พบ sialic acid จับกับ Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) N - acetylglucosamine (Pedini *et al.*, 1994)

การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland ในกวาง (fallow - deer) พบว่าเซลล์คัดหลั่งประกอบด้วย mucous cells และ serous demilunes จากการใช้เทคนิค lectins ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase พบว่าเซลล์คัดหลั่ง mucous cells บรรจุด้วยอนุพันธ์น้ำตาล N - acetylglucosamine และ sialic acid จับกับ Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) N - acetylglucosamine ขณะที่ serous demilunes บรรจุด้วยอนุพันธ์น้ำตาล fucose และ mannose จากการศึกษาในต่อมน้ำลาย parotid salivary gland พบว่าเซลล์คัดหลั่ง serous cells บรรจุด้วยอนุพันธ์น้ำตาล N - acetylglucosamine, N - acetylglucosamine และ mannose (Pedini *et al.*, 1997)

การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland ในหนู Hoary bamboo (*Rhizomys purinosus*) พบว่าเซลล์คัดหลั่งเป็น mixed glands ประกอบด้วย serous cells และ mucous cells โดยเซลล์คัดหลั่งทั้ง 2 ชนิดบรรจุด้วย vicinal diol groups glycoconjugates และ acid glycoconjugates จากการศึกษาในต่อมน้ำลาย sublingual salivary gland พบเป็น mixed glands เหมือนกัน ประกอบด้วย mucous cells ซึ่งบรรจุด้วย vicinal diol groups glycoconjugates และ acid glycoconjugates ขณะที่ serous cells ไม่พบสารไกลโคคอนจูเกต และศึกษาในต่อมน้ำลาย parotid salivary gland พบเซลล์คัดหลั่งประกอบด้วย serous cells เป็นจำนวนมาก จากการใช้เทคนิค lectins พบว่าต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland ส่วน mucous cells บรรจุด้วย fucose, galactose และ N - acetylgalactosamine ขณะที่ serous cells ไม่พบอนุพันธ์น้ำตาล จากการศึกษาต่อมน้ำลาย sublingual salivary gland พบเซลล์คัดหลั่ง mucous cells บรรจุด้วย galactose และ N - acetylgalactosamine เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์คัดหลั่ง serous cells พบอนุพันธ์น้ำตาล fucose, galactose, N - acetylgalactosamine และ N - acetylglucosamine จากการศึกษาในต่อมน้ำลาย parotid salivary gland พบว่าเซลล์คัดหลั่ง serous cells บรรจุด้วย galactose, N - acetylgalactosamine และ N - acetylglucosamine (Kimura *et al.*, 1998)

จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland ของกระซัง (*Tragulus javanicus*) พบว่าเซลล์คัดหลั่งเป็น mixed glands ประกอบด้วยเซลล์คัดหลั่ง mucous cells และ serous cells จากการศึกษาโดยใช้เทคนิค lectins พบว่าเซลล์คัดหลั่ง mucous cells บรรจุด้วยอนุพันธ์น้ำตาล N - acetylgalactosamine และเซลล์คัดหลั่ง serous cells บรรจุด้วยอนุพันธ์น้ำตาล mannose และ fucose จากการศึกษาในต่อมน้ำลาย parotid salivary gland พบเซลล์คัดหลั่ง serous cells เพียงชนิดเดียว บรรจุด้วยอนุพันธ์น้ำตาล mannose, Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) N - acetylglucosamine และ N - acetylglucosamine (Adnyane *et al.*, 2006)

### การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับต่อมน้ำลายในสัตว์ประเภทกินแมลง

การศึกษาด้านจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลายในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประเภทกินแมลง (insectivorous) พบว่ามีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย เช่น เม่น คูน Giant ant - eater และ Armadillo เป็นต้นโดยสัตว์ประเภทนี้ มีความใกล้เคียงกับลิงสายพันธุ์ชาว (*Manis javanica*) ที่พบว่าเป็นสัตว์ประเภทกินมดและแมลงเหมือนกัน และจากพฤติกรรมการกินอาหารทำให้ทราบได้ว่ามีต่อมน้ำลายที่เจริญดีมากโดยเฉพาะต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) (Shackelford and Wilborn, 1969)

จากการรายงานในต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland ของเม่น (*Erinaceus europaeus*) พบว่าเซลล์คัดหลั่งเป็นชนิด serous cells และมี serous demilunes กระจายอย่างแพร่หลายโดยภายใน serous cells บรรจุด้วย neutral glycoconjugates และภายใน serous demilunes บรรจุด้วย sialomucin และมี neutral glycoconjugates ปะปนเพียงเล็กน้อย (Tandler and Mac Callum, 1974) จากการศึกษาในต่อมน้ำลาย parotid salivary gland พบว่าเซลล์คัดหลั่งเป็นชนิด serous cells ภายในบรรจุด้วย neutral glycoconjugates (Henriksen, 1972)

จากการศึกษาในต่อมน้ำลาย sublingual salivary gland ของตุ่น (*Tachyglossus aculeatus*) พบว่าลักษณะของเซลล์คัดหลั่งเป็นชนิด mucous cells ซึ่งภายในบรรจุด้วย sialomucin กับ neutral glycoconjugates มากมายมี sulphomucins ปะปนเพียงเล็กน้อย ขณะที่ intercalated ducts และ striated ducts เจริญเพียงเล็กน้อย จากการศึกษาในต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland พบว่าเซลล์คัดหลั่งเป็นชนิด mucous cells (ศึกษาด้วยกล้อง LM) และศึกษาด้วยกล้อง EM จะเห็นเซลล์คัดหลั่งเป็นแบบ seromucous cells ขณะที่ intercalated ducts มีลักษณะสั้น และ striated ducts พบเพียงเล็กน้อย และจากการศึกษาในต่อมน้ำลาย parotid salivary gland เซลล์คัดหลั่งประกอบด้วย serous cells และ striated ducts เจริญดีมาก (Young and Van Lennep, 1978)

การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลาย sublingual salivary gland ใน armadillo (*Cabassous loricatus*) พบว่าเซลล์คัดหลั่งเป็นแบบ mucous cells กับ serous demilunes และพบ serous cells ด้วย ซึ่งเซลล์คัดหลั่งทั้งชนิด serous cells และ mucous cells บรรจุด้วย neutral glycoconjugates กับ sialomucin และจากการศึกษาของต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland เซลล์คัดหลั่งเป็นชนิด mucous cells และพบ seromucous cells เล็กน้อยโดยเซลล์คัดหลั่งทั้งสองชนิดบรรจุด้วย neutral glycoconjugates กับ sialomucin จากการศึกษาในต่อมน้ำลาย parotid salivary gland เซลล์คัดหลั่งเป็นชนิด seromucous cells ภายในบรรจุด้วย neutral glycoconjugates กับ sialomucin (Young and Van Lennep, 1978)

การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลาย submandibular salivary gland ใน giant ant - eater (*Myrmecophaga tridactyla*) พบว่าเซลล์คัดหลั่งเป็นแบบ seromucous cells และจากการใช้เทคนิค lectins พบว่าภายในเซลล์คัดหลั่งบรรจุด้วย galactose และ N - acetylgalactosamine หลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase พบว่า sialic acid ต่อกับ galactose และ sialic ต่อกับ N - acetylgalactosamine (Meyer *et al.*, 1993)

### การศึกษาไกลโคคอนจูเกต (Glycoconjugates)

glycoconjugates คือ สารจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วย oligosaccharides หรือ polysaccharides เป็นโมเลกุลคาร์โบไฮเดรตขนาดใหญ่ ที่มักจะไม่วางอย่างอิสระแต่จะยึดจับกับโมเลกุลอื่นเช่น คาร์โบไฮเดรตจับกับไขมัน เกิดเป็นโครงสร้างผสม เรียกชื่อใหม่ว่า glycolipid คาร์โบไฮเดรตจับกับกรดนิวคลีอิก เรียกชื่อใหม่ว่า nucleoprotein คาร์โบไฮเดรตจับกับ หมู่ฟอสเฟต เรียกชื่อใหม่ว่า phosphoprotein หรือ คาร์โบไฮเดรตจับกับโปรตีน เรียกชื่อใหม่ว่า glycoprotein เป็นต้น โดยการรวมกันระหว่างคาร์โบไฮเดรตกับโมเลกุลอื่น ๆ ทำให้กลายเป็น macromolecules ที่มีขนาดใหญ่หรือเรียกว่า glycoconjugates ซึ่งสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป โดยมีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่ในกระบวนการทางชีวภาพมากมาย เช่น

1. สารไกลโคคอนจูเกตที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ ที่มีทั้ง ไขมัน โปรตีน และ คาร์โบไฮเดรตในสัดส่วนและปริมาณที่แตกต่างกันตามชนิดหรือตำแหน่งของเยื่อหุ้มเซลล์
2. สารไกลโคคอนจูเกตที่พบในออร์แกเนลล์ชนิดต่าง ๆ เช่น golgi complex เป็นบริเวณที่มีการเสริมเติมคาร์โบไฮเดรตให้กับโมเลกุลโปรตีนให้มีความเข้มข้นก่อนถูกส่งออกนอกเซลล์ เป็นต้น โดยสารไกลโคคอนจูเกตที่อยู่ในรูปของ secretory จะมีหน้าที่ในระบบทางเดินอาหารมากมาย เช่น เคลือบผิวทางเดินอาหารหรือช่วยคลุกเคล้าอาหารภายในช่องปาก เป็นต้น
3. สารไกลโคคอนจูเกตที่เป็น membrane receptor โดยจับกับโมเลกุลอื่นที่อยู่นอกเซลล์ ซึ่ง membrane receptor มี 3 ส่วน คือ ส่วนที่อยู่นอกเซลล์ทำหน้าที่จับกับตัวรับ (ligand binding domain) ส่วนที่แทรกในผนังเซลล์ และส่วนที่อยู่ในไซโตพลาสซึม ทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (signal transducing domain)
4. สารไกลโคคอนจูเกตที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น การแบ่งตัวของเซลล์ (division) การเปลี่ยนแปลงรูปร่างหรือหน้าที่ของเซลล์ (differentiation) หรือการเคลื่อนตัวของเซลล์ (migration) เป็นต้น (Spicer and Schulte, 1992)
5. สารไกลโคคอนจูเกตที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดหรือการเชื่อมกันของเซลล์ (Cell adhesion) เช่น การเกาะติดกันของเซลล์เม็ดเลือดขาว และการเคลื่อนที่ไปยังตำแหน่งที่มีการอักเสบ เป็นต้น (Lasky, 1992)

## ไกลโคโปรตีน (Glycoprotein)

เกิดจากพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ระหว่างโปรตีนกับคาร์โบไฮเดรตชนิด oligosaccharide โดย oligosaccharide ของไกลโคโปรตีนเป็นสายสั้น ๆ ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวไม่เกิน 15 หน่วย ซึ่งอาจอยู่ในรูปที่มีการแตกแขนงได้แก่ น้ำตาลพวก mannose, galactose, glucose, galactosamine, glucosamine, sialic acid และ fucose (สุนันทา, 2539) เซลล์อาจจะใช้ oligosaccharide ของไกลโคโปรตีนที่อยู่บนผิวเซลล์เป็นเครื่องหมายหรือรหัสเพื่อให้เซลล์แต่ละชนิดจดจำกันได้หรือเป็น (binding site) ให้โมเลกุลมาเกาะเพื่อที่จะเข้าไปในเซลล์และส่งสัญญาณให้เซลล์รับทราบ

โดยมากจะพบไกลโคโปรตีนที่บริเวณด้านนอกของ plasma membrane หรือ extracellular matrix ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด และไกลโคโปรตีนยังเป็นส่วนประกอบของพวก hormone, serum, collagen และ mucin เป็นต้น ไกลโคโปรตีนมักพบในระบบทางเดินอาหาร และระบบทางเดินหายใจ ซึ่งระบบพวกนี้มักจะมีสารเมือกต่าง ๆ ที่มีไกลโคโปรตีนเป็นองค์ประกอบจำนวนมาก เช่น สารเมือก (mucus) จากลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ หรือ หลอดลม โดยสารไกลโคโปรตีนเหล่านี้จะเคลือบอยู่ที่ผิวของเซลล์ มีความหนืดสูงทำหน้าที่เป็นสารหล่อลื่น เนื่องจากคาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบของไกลโคโปรตีนสามารถจับกับน้ำได้ทำให้น้ำเชื่อมมีความยืดหยุ่นและทนต่อแรงกดดันสูงได้ดี (สุนันทา, 2539) หรือหลอดอาหาร มีสารเมือกที่ช่วยเคลือบและป้องกันไม่ให้เกิดอันตรายกับเยื่อผิว เป็นต้น

นอกจากนี้ยังพบไกลโคโปรตีนที่เกิดจากพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ระหว่างโปรตีนกับคาร์โบไฮเดรตชนิด polysaccharide สายยาวมาก ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเกิน 10 หน่วยขึ้นไป อยู่ในรูปที่เป็นสายตรงไม่มีการแตกแขนง เรียกว่า glycosaminoglycan มักพบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยจะให้ความหนืดและสารหล่อลื่นในข้อต่อของสัตว์มีกระดูกสันหลังซึ่ง glycosaminoglycan มี 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มี sulfate group โดยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะมีลักษณะเหนียวและช่วยเสริมสร้างความแข็งแรงให้กับอวัยวะ กับกลุ่มที่ไม่มี sulfate group เนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะมีลักษณะอ่อน

## ลักษณะโครงสร้างของไกลโคโปรตีน

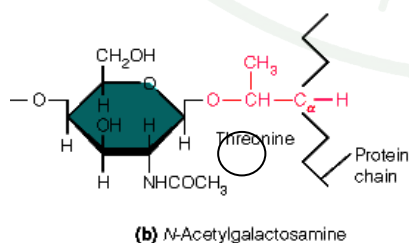
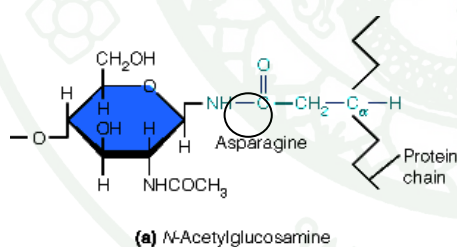
โครงสร้างของไกลโคโปรตีนเกิดจากส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตจะเชื่อมต่อกับ amino acid ของโปรตีนด้วยพันธะ glycosidic bond ซึ่งการเชื่อมต่อนี้จะเป็นการเติมโมเลกุลน้ำตาลเข้าไปที่สายของ polypeptide ที่ตำแหน่ง amino acid ต่าง ๆ เพื่อช่วยให้โปรตีนละลายน้ำได้ดีขึ้น ลักษณะการเชื่อมของไกลโคโปรตีนแบ่งออกเป็นดังนี้ (ตารางที่ 2)

### การเชื่อมต่อแบบ N - glycosidic links

เป็นการเชื่อมต่อระหว่างน้ำตาล N - acetylglucosamine กับ asparagine (amino acid) โดยจับที่ตำแหน่ง nitrogen อะตอมของ asparagine บนสาย polypeptide (Allen, 1981) ตัวอย่างเช่น ovalbumin ของไก่ (ดังภาพที่ 4, a)

### การเชื่อมต่อแบบ O - glycosidic links

เป็นการเชื่อมต่อระหว่างน้ำตาล N - acetylgalactosamine โดยจับที่ตำแหน่ง oxygen อะตอมของ serine หรือ threonine ตัวอย่างเช่น mucin, fetuin และ Ig A เป็นต้น (ดังภาพที่ 4, b)



ภาพที่ 4 การเชื่อม oligosaccharide ในไกลโคโปรตีน เกิดขึ้น 2 แบบ ได้แก่

- (a) พันธะ N - linked ระหว่าง N - acetylglucosamine จับกับตำแหน่ง nitrogen อะตอมของ asparagine
- (b) พันธะ O - linked ระหว่าง N - acetylgalactosamine จับกับตำแหน่ง oxygen อะตอมของ serine หรือ threonine

ที่มา: Mathews *et al.* (2000)

**ตารางที่ 2** การเชื่อมต่อของคาร์โบไฮเดรตกับโปรตีนในไกลโคโปรตีนชนิดต่าง ๆ

| ลักษณะการเชื่อม | น้ำตาล | amino acid | ชนิดของ glycoprotein                   |
|-----------------|--------|------------|----------------------------------------|
| O - glycosidic  | GalNAc | Ser,Thr    | mucin, fetuin<br>membrane glycoprotein |
| N - glycosidic  | GlcNAc | Asp        | zona pellucida                         |

**ที่มา:** Schachter and Brockhausen (1992)

### เทคนิคทางเนื้อเยื่อเคมีที่จำเพาะเจาะจงกับ Glycoconjugates

เทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบคุณสมบัติหรือโครงสร้างของไกลโคโปรตีนในเนื้อเยื่อนั้นมีหลากหลาย เช่น การใช้เทคนิคเนื้อเยื่อทางเคมี ได้แก่ สีย้อมพวก AB pH 2.5, PAS, HID, LID หรือการย้อมต่อเนื่องกันระหว่าง สีย้อม AB pH 2.5 กับสีย้อม PAS เทคนิคการใช้สาร lectins เช่น lectins Con A, DBA, PNA หรือ WGA เป็นต้น และเทคนิคการย่อยด้วยเอนไซม์ ได้แก่ เอนไซม์ trypsin หรือ เอนไซม์ neuraminidase เป็นต้น

Spicer and Schulte (1992) กล่าวว่าเทคนิคเนื้อเยื่อทางเคมีสามารถแสดงตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจงของไกลโคคอนจูเกตได้อย่างแม่นยำรวมทั้งแยกความแตกต่างของไกลโคคอนจูเกตได้จาก protein, nucleic acid และ lipid โดยอาศัยปริมาณของคาร์โบไฮเดรตกับ vicinal hydroxyls และ acid glycoconjugates ซึ่งเทคนิคดังกล่าวเป็นที่นิยมและมีความเหมาะสมในการศึกษาทางเนื้อเยื่อเคมีโดยสีย้อมแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะเจาะจงกับไกลโคคอนจูเกตบนผิวเซลล์ที่แตกต่างกัน

## การศึกษาทาง Histochemistry เพื่อศึกษา Glycoconjugates โดยการย้อมสีชนิดต่าง ๆ

### Alcian Blue pH 2.5 (AB pH 2.5)

ผลการย้อมสีจะให้สีฟ้าถึงสีน้ำเงินเข้ม ที่ระดับ pH 2.5 โดยมากจะติด acid glycoconjugates ขณะที่ระดับ pH 1.0 ผลการย้อมสีจะติด sulphated glycoconjugates และ mucopolysaccharide ค่อนข้างหนาแน่นมาก (Scott and Dorling, 1965)

### Periodic acid - Schiff's reagent (PAS)

ผลการย้อมสีจะให้สีชมพูเข้มถึงแดง การเกิดสีขึ้นอยู่กับปฏิกิริยา oxidation ของ periodic acid บนตำแหน่ง vicinal diol groups ซึ่งพบในน้ำตาลพวก galactose, mannose, glucose, fucose และ sialic acid ของสารพวก glycoconjugates ทำให้เกิดเป็น aldehyde groups เมื่อทำปฏิกิริยากับ schiff's reagent ทำให้เกิดสีแดงหรือสีชมพูเข้ม

### AB pH 2.5 - PAS

เป็นการย้อมที่ต่อเนื่องกัน โดยลำดับแรกย้อม AB pH 2.5 ก่อนจากนั้นย้อมต่อด้วย PAS ผลการย้อมสีจะให้สีผสมกันระหว่างสีฟ้าจะย้อมติด acid glycoconjugates และสีแดงย้อมติด neutral glycoconjugates เมื่อผสมกันสีจะออกมาเป็นสีชมพูเข้มอมม่วง

### High Iron Diamine (HID)

เป็นการย้อมเพื่อจับ sulphated glycoconjugates ในเนื้อเยื่อ ผลการย้อมสีพบติดสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง sulphated ester และ cationic dye (Hirabayashi, 1992)

### Low Iron Diamine (LID)

เป็นการย้อมเพื่อจับกับ sulphated glycoconjugates ผลการย้อมจะติดดำ (Spicer, 1965)

HID - AB pH 2.5

เป็นการเชื่อมต่อเนื่องโดยเชื่อม HID ก่อนและเชื่อมต่อด้วย AB pH 2.5 ผลการเชื่อมติดสีน้ำตาลเข้ม หรือสีดำซึ่งเชื่อมติด sulphated glycoconjugates และสีฟ้าเชื่อมติด carboxylated glycoconjugates เมื่อผสมสีกันจะเป็นสีดำปนฟ้าเข้ม (Spicer, 1965)

### การศึกษาทาง Histochemistry เพื่อศึกษา Glycoconjugates โดยเทคนิคการย้อมด้วย Lectins

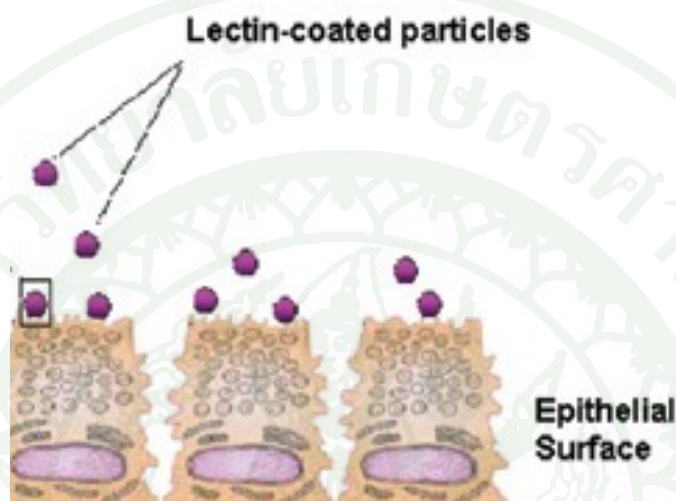
เลกติน (lectins) เป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่สกัดมาจากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ต่าง ๆ ซึ่ง lectins ที่นำมาใช้ในการศึกษาทาง Histochemistry ต้องผ่านกรรมวิธีการดกตะกอนหรือการทำให้ lectins บริสุทธิ์โดยอาศัยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดต่าง ๆ (Sternbach, 1991) lectins เมื่อผ่านกรรมวิธีการทำให้บริสุทธิ์แล้ว สามารถนำไปใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาหน้าที่และโครงสร้างของไกลโคโปรตีนซึ่ง lectins ที่ใช้ในการศึกษานั้นมีมากมายหลายชนิดแต่ละชนิดมีคุณสมบัติในการจับจำเพาะกับน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์ที่แตกต่างกัน (ดังตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 lectins ชนิดต่าง ๆ ที่จับกับน้ำตาลที่จำเพาะเจาะจง

| แหล่งที่มาของ lectins               | ตัวย่อ  | คาร์โบไฮเดรตที่จำเพาะเจาะจง                                    |
|-------------------------------------|---------|----------------------------------------------------------------|
| Concanavalin A                      | Con - A | mannose                                                        |
| <i>Dolichos biflorus</i> agglutinin | DBA     | N - acetylgalactosamine                                        |
| Peanut agglutinin                   | PNA     | Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) N - acetylgalactosamine |
| <i>Ricinus communis</i> agglutinin  | RCA- I  | Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) N - acetylglucosamine   |
| Soybean agglutinin                  | SBA     | N - acetylgalactosamine                                        |
| <i>Ulex europaeus</i> agglutinin    | UEA - I | fucose                                                         |
| Wheat germ agglutinin               | WGA     | N - acetylglucosamine                                          |

ที่มา: Gabius and Gabius (1993)

ดังนั้น lectins สามารถแยกชนิดของเซลล์ได้โดยมันจะจับจำเพาะกับน้ำตาลบนผิวเซลล์ และตำแหน่งต่าง ๆ ของเซลล์ที่ lectins สามารถจำเพาะกับน้ำตาล เห็นได้จากกล้องใช้แสง Light Microscope (LM) ได้แก่บริเวณ plasmalemma, secretory granules, lysosomes, และ golgi cisternae (ดังภาพที่ 5) (Spicer and Schulte, 1992)



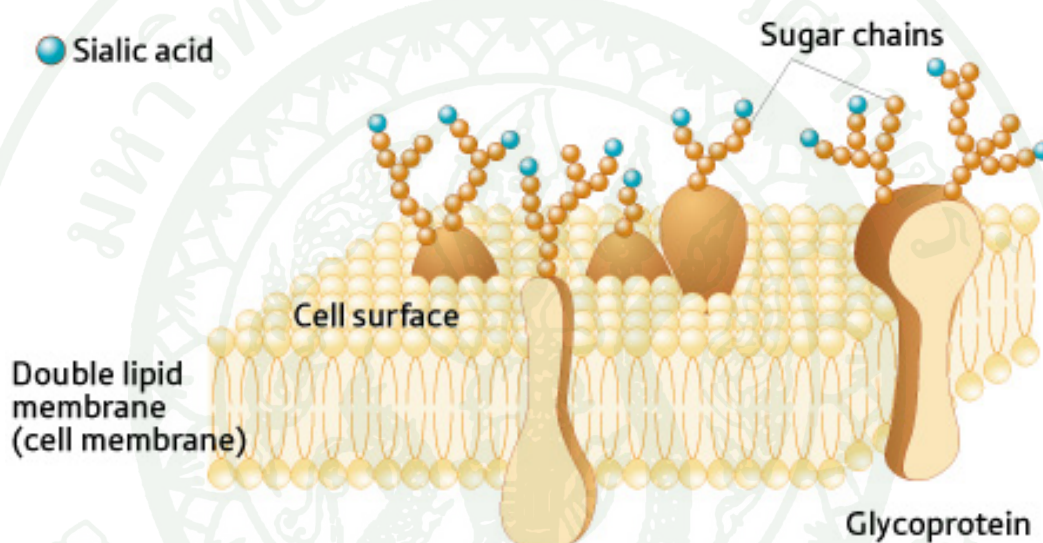
ภาพที่ 5 ตำแหน่งต่าง ๆ ของเซลล์ที่ lectins สามารถจำเพาะกับน้ำตาล

ที่มา: Rocca and Shah (2004)

จากคุณสมบัติดังกล่าว lectins จึงเป็นประโยชน์อย่างมากมาใช้ในการนำไปศึกษาวิจัยในหลายด้านเช่น ด้านชีวเคมี ด้านเซลล์วิทยา หรือด้านระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น ปัจจุบันมีการใช้ lectins เป็นเครื่องมือในการนำไปศึกษาวิจัยมากมายและกว้างขวาง อาทิ การนำ lectins ไปใช้ในการแยกชนิดของเซลล์ตามความแตกต่างของน้ำตาลบนผิวเซลล์ (Sharon, 1977; Oda *et al.*, 1999) การใช้ lectins ในการแยกหมู่เลือดในธนาคารเลือด (Sharon, 2007) หรือการใช้ lectins เป็นตัวยาหรือสารเคมีโดย lectins บางชนิดสามารถจับกับเซลล์ที่เจริญผิดปกติได้ดี จึงมีการใช้ lectins เป็นตัวเข้าไปช่วยในการทำลายเซลล์ที่ผิดปกติ เป็นต้น

**การศึกษาทาง Histochemistry เพื่อศึกษา Glycoconjugates โดยเทคนิค  
การย่อยด้วย Enzyme neuraminidase**

Enzyme neuraminidase หรือ N - acetylneuraminic glycohydrolase จากเชื้อ *Vibrio cholerae* สามารถย่อย N - acetylneuraminic acid หรือ sialic acid จากสายของ glycoprotein ซึ่งเป็น receptor site บนผิวเซลล์ได้โดย sialic acid มักพบอยู่ที่ตำแหน่งสุดท้ายของสาย glycoprotein (ดังภาพที่ 6)



**ภาพที่ 6** ตำแหน่งของ sialic acid ที่พบอยู่ปลายสุดท้ายของสาย glycoprotein

**ที่มา:** Yukishige (2008)

จุดประสงค์ในการนำเอนไซม์ neuraminidase เข้ามาย่อย sialic acid เพื่อแสดงโมเลกุลน้ำตาลลำดับถัดไป เนื่องจากสีย้อมบางตัวหรือ lectins บางชนิดไม่สามารถย้อมติดสีภายในเซลล์ผิวเซลล์ หรือเนื้อเยื่อได้ ทำให้เข้าใจได้ว่าอาจมีสารจำพวกไกลโคโปรตีนได้ทำการบดบังน้ำตาลที่อยู่บนผิวเซลล์ทำให้ย้อมไม่ติดสี นั่นหมายความว่าไม่สามารถแสดงโมเลกุลน้ำตาลตัวถัดไปได้ ดังนั้นเอนไซม์ neuraminidase มีบทบาทสำคัญในการช่วยย่อยสารดังกล่าวที่บดบังน้ำตาลบนผิวเซลล์ออก ซึ่งผลของการย่อยจะทำให้เซลล์มีการติดสี แสดงให้เห็นถึงโมเลกุลน้ำตาลลำดับถัดไปนั่นเอง

วิธีการทำงานของเอนไซม์ neuraminidase เริ่มจากการย่อยด้วยเอนไซม์ก่อน ต่อมา sialic acid ที่บริเวณปลายของสายโกลโคโปรตีนจะถูกย่อยออกไป จากนั้นทำการเชื่อมต่อดัวยสาร lectins PNA หรือเชื่อมด้วยสี AB pH 2.5 เพื่อแสดงลำดับโมเลกุลน้ำตาลตัวถัดไป ผลที่เกิดขึ้นคือถ้าเนื้อเยื่อที่เชื่อมด้วย AB pH 2.5 จะไม่สามารถเชื่อมติดกับหมู่ carboxyl ในโมเลกุลของ sialic acid ได้ ขณะที่เนื้อเยื่อที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase ผลคือจะติดสีฟ้าเข้มมาก (Drury and Wallington, 1967) และถ้าเชื่อมด้วยสาร lectins PNA ผลจะทำให้เนื้อเยื่อติดสีน้ำตาลเข้ม แสดงว่าเชื่อมติดอนุพันธ์น้ำตาลในโมเลกุล ขณะที่เนื้อเยื่อที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase จะเชื่อมไม่ติดสีก็ไม่สามารถแสดงโมเลกุลน้ำตาลตัวถัดไปได้

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

1. ตัวอย่างต่อมน้ำลายของลิ้นขวา (sublingual salivary gland, mandibular salivary gland และ parotid salivary gland)
2. ยาสลบ Nembutal<sup>®</sup> (Sodium pentobarbitone) เข็มฉีดยา และชุดเครื่องมือผ่าตัด
3. สารเคมีที่ใช้ในการคงสภาพตัวอย่างคือ 10 % neutral buffer formalin solution
4. อุปกรณ์ในการทำ paraffin section technique
  - 4.1 เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor)
  - 4.2 เครื่องหยอดพาราฟิน (embedder)
  - 4.3 กระถางโลหะ (mold)
  - 4.4 กรอบพลาสติก (embedding ring)
5. สารเคมีใช้ในการจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อทำให้เนื้อเยื่อใส และการฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน
  - 5.1 Ethyl alcohol ระดับความเข้มข้น 70 %, 80%, 95% และ 100%
  - 5.2 Xylene
  - 5.3 Paraplast plus
6. อุปกรณ์ในการตัดเนื้อเยื่อและติดเนื้อเยื่อบนสไลด์
  - 6.1 เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบหมุนด้วยมือ (rotary microtome)
  - 6.2 อ่างลอยเนื้อเยื่อ (water bath)
  - 6.3 ใบมีดชนิดใช้แล้วทิ้ง (disposable blade)
  - 6.4 พู่กัน
  - 6.5 แผ่นกระจกสไลด์ และกระจกปิดสไลด์
  - 6.6 เครื่องอุ่นสไลด์และตู้อบ (slide warmer and oven)

## 7. สารเคมีที่ใช้ในการติดเนื้อเยื่อบนสไลด์

7.1 Ethyl alcohol ระดับความเข้มข้น 50%

7.2 Egg albumin (ใช้ทาบนแผ่นสไลด์)

## 8. สารสีย้อมและเอนไซม์

8.1 Hematoxylin

8.2 Eosin

8.3 Alcian blue

8.4 Schiff's reagent

8.5 Periodic acid

8.6 Enzyme neuraminidase

## 9. สาร lectins

9.1 Concanavalin A (Con - A)

9.2 *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA)

9.3 Peanut agglutinin (PNA)

9.4 *Ricinus communis* agglutinin (RCA - I)

9.5 Soybean agglutinin (SBA)

9.6 *Ulex europaeus* agglutinin (UEA - I)

9.7 Wheat germ agglutinin (WGA)

## 10. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง Light Microscope (LM) สำหรับดูผลการติดสีในเนื้อเยื่อ

## 11. กล้องถ่ายภาพเพื่อบันทึกข้อมูลและแผ่นบันทึกข้อมูล

## วิธีการ

1. ทำการชั่งน้ำหนักลิ่นชา (*Manis javanica*) เพศเมีย (ซึ่งอยู่ในสภาพที่ใกล้ตาย) น้ำหนักตัวประมาณ 3 กิโลกรัม และวางยาสลบโดยฉีด pentobarbitone (Nembutal®) ปริมาณ 2 ซีซี ต่อ น้ำหนัก 3 กิโลกรัม เข้าบริเวณช่องท้อง เมื่อสัตว์อาการสงบลงทำการเปิดชำแหละโดยเริ่มกรีดตั้งแต่บริเวณใต้ปากจนถึงช่วงอกและทำการเปิดผิวหนังออก

2. ศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์โดยบันทึกภาพตำแหน่งการวางตัวของต่อมน้ำลาย ทั้ง 3 ต่อมหลักได้แก่ต่อมน้ำลาย sublingual salivary gland ต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland และ ต่อมน้ำลาย parotid salivary gland

3. เก็บตัวอย่างต่อมน้ำลายของลิ่นชาทั้ง 3 ต่อมหลัก นำมาคงสภาพใน 10 % neutral buffer formalin โดยนำชิ้นเนื้อจุ่มในน้ำยาคงสภาพ (immersion) ประมาณ 24 ชั่วโมง หรือคงสภาพใน carnoy's fluid ประมาณ 6 - 8 ชั่วโมง

4. ตัวอย่างที่คงสภาพด้วย 10 % neutral buffer formalin ล้างด้วยน้ำประปาประมาณ 1 ชั่วโมง หรือตัวอย่างที่คงสภาพด้วย carnoy's fluid ล้างด้วย 100 % Ethyl alcohol ได้ทันที

5. ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อและทำให้เนื้อเยื่อใสโดยผ่านกระบวนการ tissue processing ดังนี้

|                                   |       |         |
|-----------------------------------|-------|---------|
| 5.1 70% alcohol ครั้งที่ 1        | 5     | ชั่วโมง |
| 5.2 70% alcohol ครั้งที่ 2        | 2     | ชั่วโมง |
| 5.3 80% alcohol ครั้งที่ 1        | 1     | ชั่วโมง |
| 5.4 80% alcohol ครั้งที่ 2        | 1     | ชั่วโมง |
| 5.9 95% alcohol ครั้งที่ 1        | 1     | ชั่วโมง |
| 5.6 95% alcohol ครั้งที่ 2        | 1     | ชั่วโมง |
| 5.7 100% alcohol ครั้งที่ 1       | 1     | ชั่วโมง |
| 5.8 100% alcohol ครั้งที่ 2       | 1     | ชั่วโมง |
| 5.9 xylene ครั้งที่ 1             | 1     | ชั่วโมง |
| 5.10 xylene ครั้งที่ 2            | 1     | ชั่วโมง |
| 5.11 paraffin หลอมเหลว ครั้งที่ 1 | 1 1/2 | ชั่วโมง |

## 5.12 paraffin หลอมเหลว ครั้งที่ 2

1 1/2

ชั่วโมง

6. เมื่อครบกำหนด 18 ชั่วโมง นำเนื้อเยื่อขึ้นจากเครื่อง automatic tissue processor แล้วเข้าเครื่องปรับความดันสุญญากาศ (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว) ประมาณ 10 นาที เพื่อช่วยให้ขั้นตอนการแทรกซึมของพาราฟินเข้าสู่เนื้อเยื่อดียิ่งขึ้น

7. นำกระจกโลหะเพื่อที่จะฝังเนื้อเยื่อในพาราฟินโดยใช้เครื่อง embedder รอให้พาราฟินแข็งตัว แล้วแกะออกจากบล็อก ตกแต่งหน้าบล็อกโดยตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมู และนำบล็อกไปตัดให้เป็นแผ่นบางด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบหมุนด้วยมือ (rotary microtome) โดยตัดเนื้อเยื่อหนาประมาณ 3 - 4  $\mu\text{m}$ .

8. ใช้กระจกสไลด์สะอาดที่ยังไม่ทำ egg albumin และหยด Ethanol alcohol ความเข้มข้น 50% บนสไลด์ให้ทั่วทั้งแผ่นใช้ฟูกันตะเนื้อเยื่อเบา ๆ นำมาวางบนสไลด์ที่มี 50% alcohol จากนั้นเนื้อเยื่อจะยึดตัวออกและนำไปลอยในอ่างลอยเนื้อเยื่อ (water bath) (ตั้งอุณหภูมิที่ 40 - 45 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิที่เหมาะสมจะช่วยให้เนื้อเยื่อแผ่เรียบขึ้น ต่อมาใช้แผ่นสไลด์ที่ทำ egg albumin ช้อนตักเนื้อเยื่อที่ลอยในอ่างลอยเนื้อเยื่อ จัดวางตำแหน่งให้เหมาะสมและนำเข้าตู้อบ (ตั้งอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส) เพื่อให้เนื้อเยื่อติดสไลด์ดียิ่งขึ้น

9. นำแผ่นสไลด์ที่ติดเนื้อเยื่อเสร็จสมบูรณ์แบ่งสไลด์ที่เก็บ section ต่อมน้ำลายแต่ละชนิดเป็น 4 กลุ่ม คือ

9.1 สีย้อม Hematoxylin และ Eosin (H&E) เพื่อดูโครงสร้างทั่วไป

9.2 เทคนิคเนื้อเยื่อทางเคมี

9.3 เทคนิคการใช้สาร lectins

9.4 ย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมต่อด้วยสีหรือสาร lectins

9.1 สีย้อม Hematoxylin และ Eosin (H&E) เพื่อดูโครงสร้างทั่วไป

ขจัดพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อโดย xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เอนำเข้าเนื้อเยื่อโดยแอลกอฮอล์เริ่มจาก 100% alcohol, 95% alcohol และ 70% alcohol อย่างละ 2 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น และย้อมด้วย hematoxylin ประมาณ 7 นาที ล้างสีส่วนเกินออกโดยจุ่มใน 1 % acid alcohol ประมาณ 2 - 3 ครั้งและล้างออกด้วยน้ำกลั่น 1 - 2 นาที ปรับเนื้อเยื่อให้มีสภาพเป็นกลางโดยจุ่มใน

ammonia water ประมาณ 3 - 4 ครั้งและล้างออกด้วยน้ำกลั่น 1 - 2 นาที ต่อมา conterstain ด้วย eosin 2 นาที และขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อเริ่มจาก 70% alcohol จุ่ม 1 ครั้ง 95% alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที 100% alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที ต่อมาขจัดแอลกอฮอล์และทำให้เนื้อเยื่อใสโดย xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นหยด permount ปิดด้วย cover glass นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์

## 9.2 เทคนิคเนื้อเยื่อทางเคมี

### 9.2.1 สีย้อม Alcian Blue (AB pH 2.5)

ขจัดพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อโดย xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เอน้ำเข้าเนื้อเยื่อโดย แอลกอฮอล์เริ่มจาก 100% alcohol, 95% alcohol และ 70% alcohol อย่างละ 2 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น 2 - 3 นาทีต่อมาย้อมด้วย Alcian Blue (pH 2.5) ประมาณ 30 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น 3 นาที และ conterstain ด้วย hematoxylin 1 ครั้ง ล้างออกด้วยน้ำกลั่น 2 - 3 นาที จากนั้นขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อเริ่มจาก 95% alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที 100% alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที ต่อมาขจัดแอลกอฮอล์และทำให้เนื้อเยื่อใสโดย xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ต่อมาหยด permount และ ปิดด้วย cover glass นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์

### 9.2.2 สีย้อม Periodic acid - Schiff (PAS)

ขจัดพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อโดย xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เอน้ำเข้าเนื้อเยื่อโดย แอลกอฮอล์เริ่มจาก 100% alcohol, 95% alcohol และ 70% alcohol อย่างละ 2 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น จุ่มใน periodic acid 5 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น 5 นาทีและจุ่มใน schiff reagent 10 นาที จากนั้นจุ่มในสารละลาย sodium metabisulfite 3 ครั้ง ๆ ละ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น 5 นาทีและ conterstain ด้วย hematoxylin 1 ครั้ง ล้างออกด้วยน้ำกลั่น 3 นาที จากนั้นขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อโดยเริ่มที่ 70% alcohol จุ่ม 1 ครั้ง 95% alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที 100% alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที ต่อมาขจัดแอลกอฮอล์และทำให้เนื้อเยื่อใสโดย xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นหยด permount ปิดด้วย cover glass นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์

### 9.2.3 สีย้อม AB pH 2.5 - PAS

เป็นการย้อมต่อเนื่องของสีย้อม 2 ชนิดโดยย้อม Alcian Blue 30 นาที ต่อมาล้างด้วยน้ำกลั่น 3 นาที และย้อมต่อเนื่องด้วย PAS และล้างออกด้วยน้ำกลั่น 3 นาที counterstain ด้วย hematoxylin 1 ครั้ง ล้างออกด้วยน้ำกลั่น 2 - 3 นาที และขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อเริ่มที่ 70% alcohol จุ่ม 1 ครั้ง 95% alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที 100% alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที ขจัดแอลกอฮอล์และทำให้เนื้อเยื่อใสโดย xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นหยด permount และ ปิดด้วย cover glass นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์

### 9.3 เทคนิคการใช้สาร lectins

ขจัดพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อโดย xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที นำน้ำเข้าเนื้อเยื่อโดยผ่านแอลกอฮอล์เริ่มจาก 100% alcohol, 95% alcohol และ 70% alcohol อย่างละ 2 นาที จุ่มใน PBS (Phosphate Buffered Saline) 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เช็ดรอบเนื้อเยื่อให้แห้งต่อมาหยดด้วย lectins โดย lectins สามารถสกัดได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืช โดยวิธีการตกตะกอนหรือการทำบริสุทธิ์อาศัยเทคนิคโครมาโทกราฟี ชนิดต่าง ๆ ตามความเหมาะสม (Sternbach, 1991) ทำการย้อมเนื้อเยื่อโดยชุด lectins สำเร็จรูปจาก Vector Laboratories, Inc (Burlingame, CA, USA) โดยนำ lectins แต่ละชนิด (น้ำหนักสาร 1 มิลลิกรัม) เจือจางใน PBS (Phosphate Buffered Saline) ที่ pH 7.4 เจือจางจนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 40 µg/ml จากนั้นหยด lectins ที่เจือจางแล้วให้ท่วมเนื้อเยื่อทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำไปจุ่ม PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เช็ดรอบเนื้อเยื่อให้แห้ง ซึ่งการทดลองใช้ lectins 7 ชนิด ได้แก่ Con A, DBA, PNA, RCA - I, SBA, UEA - I และ WGA ต่อมาหยด ABC kit (Avidin Biotinylated Complex) เตรียมโดยนำสารละลาย Reagent A (Avidin) และ Reagent B (Biotin) อย่างละ 0.2 มิลลิลิตร ผสมรวมกับ PBS 10 มิลลิลิตร โดยเตรียมก่อนใช้งานประมาณ 30 นาที จากนั้นนำมาหยดให้ท่วมเนื้อเยื่อทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เมื่อครบกำหนดนำสไลด์จุ่มใน PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

ต่อมาหยด DAB Substrate Kit (3,3' - diaminobenzidine) เตรียมโดยหยด DAB 0.2 มิลลิลิตร ลงใน PBS 5 มิลลิลิตร เมื่อเตรียมเสร็จก่อนใช้งานให้เติม Hydrogen peroxide 0.1 มิลลิลิตร ลงใน DAB ที่ได้เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปหยดให้ท่วมเนื้อเยื่อทิ้งไว้ประมาณ 3 - 5 นาที นำไปล้างด้วยน้ำกลั่นและ counterstain โดยจุ่มใน hematoxylin 1 ครั้ง เพื่อให้นิวเคลียส

ชัดเจนยิ่งขึ้น จากนั้นล้างออกด้วยน้ำกลั่น 2 - 3 นาทีและขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อเริ่มจาก 95% alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที 100% alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที ต่อมาขจัดแอลกอฮอล์และทำให้เนื้อเยื่อใสโดย xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที หยด permount และปิดด้วย cover glass นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์เพื่อดูโครงสร้างต่าง ๆ ต่อไป

#### 9.4 ย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมติดด้วยสีหรือสาร lectins

ขจัดพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อโดย xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาทีเอาน้ำเข้าเนื้อเยื่อโดยแอลกอฮอล์เริ่มจาก 100% alcohol, 95% alcohol และ 70% alcohol อย่างละ 2 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น 3 - 5 นาที ต่อมาแบ่งสไลด์ (ที่ติดเนื้อเยื่อสมบูรณ์แล้ว) ออกเป็น 2 แผ่นคือ สไลด์แผ่นที่ 1 เป็นเนื้อเยื่อที่ไม่หยด เอนไซม์ neuraminidase สไลด์แผ่นที่ 2 เป็นเนื้อเยื่อที่หยดด้วยเอนไซม์ neuraminidase (ปริมาตรทั้งหมด 0.11 มิลลิลิตร) โดยเจือจางเอนไซม์ใน buffer solution A ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ไมโครลิตร ต่อมาทำการย่อยด้วยเอนไซม์เริ่มจาก สไลด์แผ่นที่ 1 หยดด้วย buffer solution B (ปราศจากเอนไซม์) ให้ท่วมเนื้อเยื่อ และสไลด์แผ่นที่ 2 หยดเอนไซม์ neuraminidase ให้ท่วมเนื้อเยื่อ จากนั้นนำแผ่นสไลด์ทั้ง 2 แผ่น อบในอุณหภูมิที่ 37 ° C ประมาณ 3 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้ล้างออกด้วยน้ำกลั่น 3 - 5 นาที จากนั้นนำสไลด์ทั้ง 2 แผ่น ย้อมติดด้วยวิธีการย้อมด้วยสี AB pH 2.5 หรือวิธีการใช้สาร lectins PNA ต่อไป

10. การประเมินผลของสารสีย้อม โดยกำหนดตัวเลขเพื่อจัดระดับความเข้มของสีย้อม กำหนดให้ 0 = ไม่ติดสีเลย, 1 ติดสีเล็กน้อย, 2 = ติดสีปานกลาง, 3 = ติดสีเข้ม และ 4 = ติดสีเข้มมาก จากนั้นทำแบบสอบถามการประเมินผลของสารสีย้อม พร้อมรูปภาพสีของต้อมน้ำลายหลักทั้ง 3 ต้อมที่บันทึกจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (LM) ให้ผู้ที่ไม่ได้มีความเชี่ยวชาญด้านกายวิภาคศาสตร์และจุลกายวิภาคศาสตร์ ทำการประเมินผลโดยการสังเกตและวัดระดับสีย้อมด้วยสายตา และบันทึกผลลงในแบบสอบถามที่กำหนดให้ โดยใช้กลุ่มผู้ประเมินผล 10 คน จากนั้นนำผลการประเมินทั้งหมดมาหาค่าเฉลี่ยและสรุปผลลงในตารางผลการทดลองต่อไป

## สถานที่และระยะเวลาการทดลอง

### สถานที่ทำการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างต่อมน้ำลายของลิงชวา (*Manis javanica*) 3 ต่อมหลัก ได้แก่ ต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual salivary gland) ต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) และต่อมน้ำลายกกหู (parotid salivary gland) โดยเก็บตัวอย่างในสภาพที่สัตว์ใกล้ตายและอัตราการรอดชีวิตต่ำ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก สถานีวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาประทับช้าง จังหวัดราชบุรี

2. ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อทางเคมี การทำสไลด์ การย้อมสีด้วยเทคนิคต่าง ๆ รวมถึงการบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง Light Microscope (LM) ดำเนินการ ณ ห้องเตรียมปฏิบัติการจุลกายวิภาคศาสตร์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน แขวงลาดยาว จตุจักร กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10900

### ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มทำการทดลอง เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2550 - เดือนเมษายน พ.ศ. 2552

### ผลการทดลอง

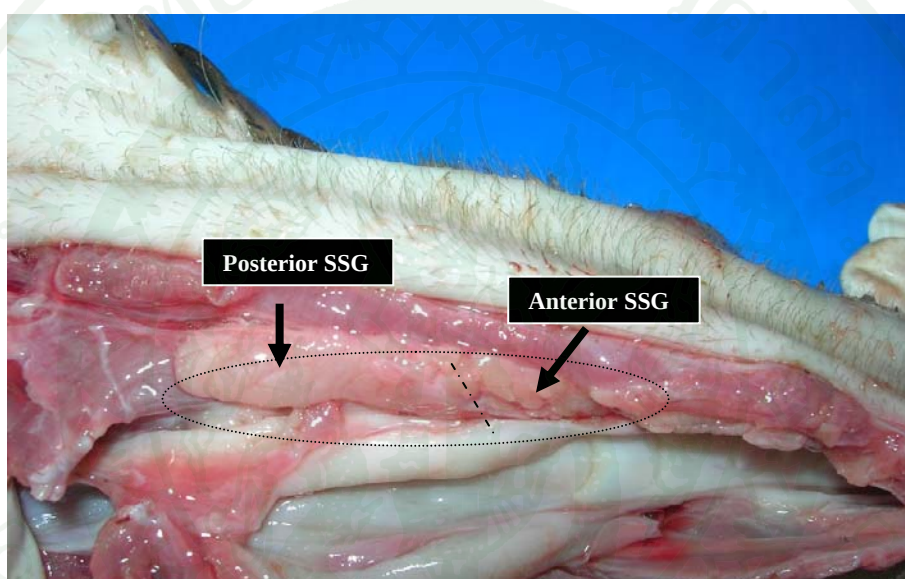
ผลการเปิดชำแหละลิ้นขวา (*Manis javanica*) เพศเมียโดยใช้มีดกรีดเป็นแนวยาวตั้งแต่บริเวณใต้ปากจนมาถึงบริเวณช่วงอกและเปิดผิวหนังออก ทำให้มองเห็นการวางตัวของต่อมน้ำลายทั้ง 3 ต่อมหลัก ผลการศึกษาลักษณะการวางตัวของต่อมน้ำลายพบว่า ต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual salivary gland) วางตัวอยู่ใต้ลิ้นโดยขนานไปกับลิ้น ขณะที่ต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) มีขนาดใหญ่ที่สุด วางตัวตั้งแต่ใต้ขากรรไกรทอดยาวมาถึงตอนต้นของกระดูกอก (sternum) และต่อมน้ำลายกกหู (parotid salivary gland) มีขนาดเล็กที่สุดวางตัวอยู่ด้านหลังของกกหูเล็กน้อย (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ภาพตำแหน่งการวางตัวของต่อมน้ำลายของลิ้นขวา (*Manis javanica*) SSG = Sublingual Salivary Gland, MSG = Mandibular Salivary Gland และ PSG = Parotid Salivary Gland

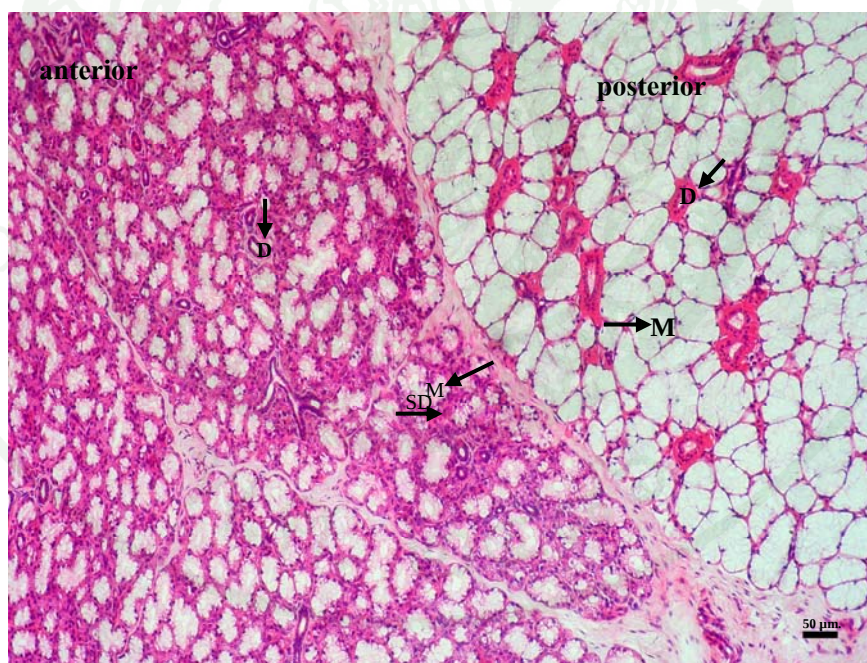
### ผลการทดลองในต่อมน้ำลายใต้ลิ้น

จากการเก็บตัวอย่างต่อมน้ำลายใต้ลิ้น(sublingual salivary gland) ของลิ่นชวา (*Manis javanica*) พบว่าลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ ตัวต่อมวางตัวอยู่ใต้ลิ้นโดยขนานไปกับลิ้น ประกอบด้วย 2 lobe และตัวต่อมมีความยาวประมาณ 2 - 3 เซนติเมตร มองด้วยตาเปล่าสามารถแบ่งออกเป็น 2 บริเวณคือบริเวณ anterior เนื้อต่อมมีสีเข้มและบริเวณ posterior เนื้อต่อมมีสีขาวขุ่น (ภาพที่ 8)

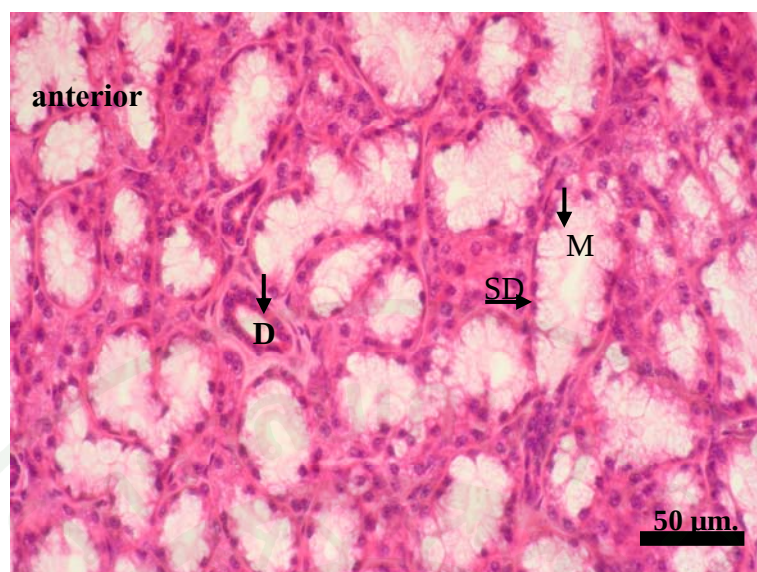


ภาพที่ 8 ลักษณะการวางตัวของต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual salivary gland) โดยตัวต่อมวางตัวขนานไปกับลิ้นประกอบด้วย 2 lobe มีลักษณะยาวประมาณ 2 - 3 เซนติเมตรมองด้วยตาเปล่าสามารถแบ่งออกเป็น 2 บริเวณคือ บริเวณ anterior เนื้อต่อมมีสีเข้มและบริเวณ posterior เนื้อต่อมมีสีขาวขุ่น

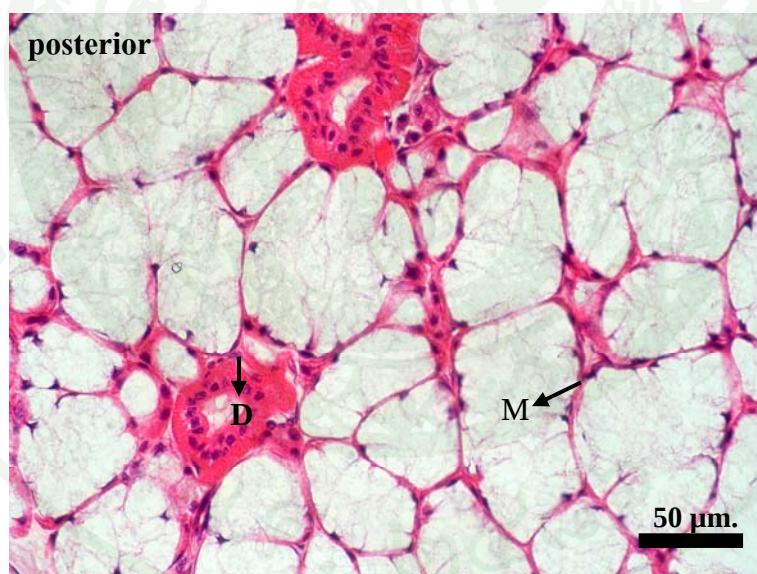
จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลายใต้ลิ้นของลิงชวา (*Manis javanica*) เพื่อดูโครงสร้างทั่วไปโดยการย้อมด้วย Hematoxylin และ Eosin (H&E) ผลการศึกษาพบว่า เซลล์คัดหลั่งมีลักษณะแบบ tubuloacinar gland เซลล์คัดหลั่งแยกออกจากกันอย่างเห็นได้ชัดโดยมี connective tissue บาง ๆ กั้นแยก lobule ไว้ ทำให้แบ่งออกเป็น 2 บริเวณคือบริเวณ anterior ประกอบด้วย mucous cells และ serous demilunes ขณะที่บริเวณ posterior ประกอบด้วย mucous cells (ภาพที่ 9) โดยบริเวณ anterior เซลล์คัดหลั่ง mucous cells ลักษณะเป็นเซลล์ทรงสูง นิวเคลียสมีลักษณะแบนเรียงตัวที่ฐานของเซลล์และมองเห็น lumen ได้ชัด ขณะที่ serous ที่โอบล้อมแนบชิดกับ mucous หรือเรียกว่า serous demilunes ลักษณะเซลล์เป็นเซลล์ทรงกลม นิวเคลียสกลมอยู่ตรงกลางเซลล์และมองเห็น lumen ไม่ชัดเจน (ภาพที่ 10) เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ posterior ประกอบด้วยเซลล์คัดหลั่งชนิด mucous cells เป็นจำนวนมาก ลักษณะเซลล์เป็นเซลล์ทรงสูง นิวเคลียสมีลักษณะแบนเรียงตัวที่ฐานของเซลล์ และมองไม่เห็น lumen ของ acinus ลักษณะของ striated ducts เป็นเซลล์แบบ simple cuboidal epithelium หรือ simple columnar epithelium (ภาพที่ 11)



**ภาพที่ 9** โครงสร้างทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual salivary gland) โดยย้อมด้วย Hematoxylin และ Eosin (H&E) พบว่าเซลล์คัดหลั่งแบ่งออกเป็น 2 บริเวณคือ บริเวณ anterior ประกอบด้วย mucous cells (M) และ serous demilunes (SD) ขณะที่บริเวณ posterior ประกอบด้วย mucous cells (M)



ภาพที่ 10 โครงสร้างทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual salivary gland) โดยย้อมด้วย Hematoxylin และ Eosin (H&E) ในบริเวณ anterior



ภาพที่ 11 โครงสร้างทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual salivary gland) โดยย้อมด้วย Hematoxylin และ Eosin (H&E) ในบริเวณ posterior

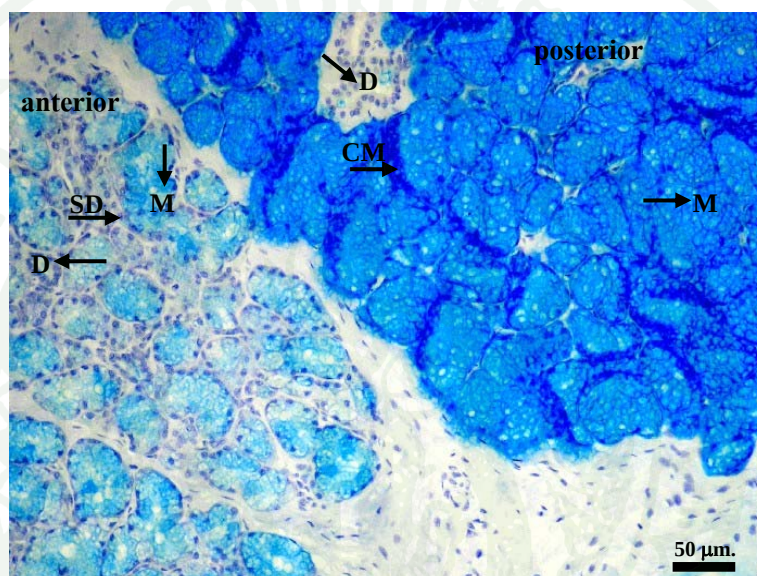
จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลาย sublingual salivary gland ของลิ้นสายพันธุ์ชวา (*Manis javanica*) โดยการย้อมด้วยเทคนิคเนื้อเยื่อทางเคมีด้วย AB pH 2.5, PAS, AB pH 2.5 - PAS และสาร lectins 7 ชนิด ได้แก่ Con A, DBA, PNA, RCA - I, SBA, UEA - I และ WGA ผลการทดลองระบุในตารางที่ 4

**ตารางที่ 4** ผลการทดลองการติดสีย้อมในเนื้อเยื่อต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual salivary gland) ของลิ้นชวา (*Manis javanica*)

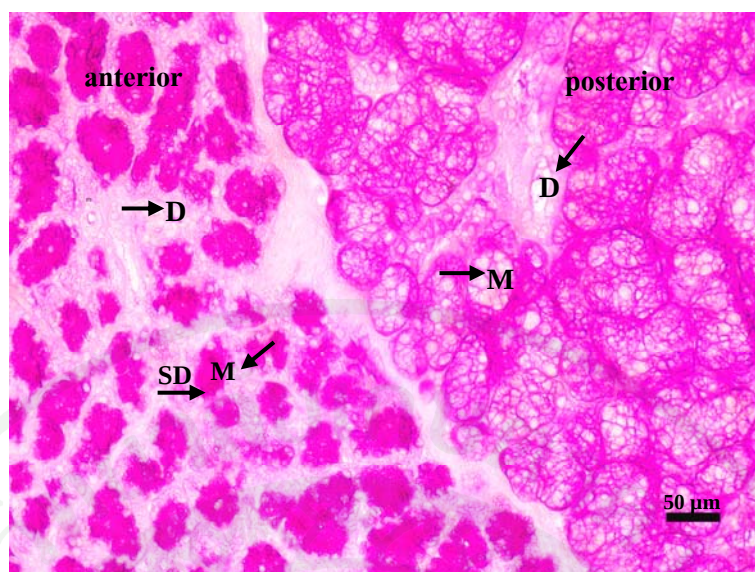
| ชนิดสีย้อม      | Anterior     |                  | Posterior    |
|-----------------|--------------|------------------|--------------|
|                 | Mucous cells | Serous demilunes | Mucous cells |
| AB pH 2.5       | 2            | 0                | 3            |
| PAS             | 4            | 1                | 2            |
| AB pH 2.5 - PAS | 4            | 1                | 4            |
| Con A           | 2            | 3                | 2            |
| DBA             | 1            | 3                | 1            |
| PNA             | 3            | 4                | 1            |
| RCA - I         | 4            | 3                | 1            |
| SBA             | 0            | 3                | 0            |
| UEA - I         | 4            | 2                | 1            |
| WGA             | 3            | 3                | 1            |

ผลการย้อมด้วยเทคนิคเนื้อเยื่อทางเคมีด้วย AB pH 2.5 พบว่าบริเวณ anterior ส่วน mucous cells ติดสีฟ้าปานกลาง ขณะที่ serous demilunes และ striated ducts ย้อมไม่ติดสี เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ posterior ส่วน mucous cells ติดสีฟ้าเข้มและ striated ducts ย้อมไม่ติดสี ขณะที่บริเวณ cell membrane ติดสีฟ้าเข้มมาก แสดงว่า mucous cells ทั้ง 2 บริเวณ บรรจุด้วย acid glycoconjugates เหมือนกันแต่มีปริมาณ acid glycoconjugates ที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 12) ผลการย้อมสี PAS พบว่าบริเวณ anterior ส่วน mucous cells ติดสีชมพูอมแดงเข้มมาก ขณะที่ serous demilunes และ striated ducts มีการติดสีเพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ posterior ส่วน mucous cells มีการติดสีชมพูอมแดงปานกลาง striated ducts มีการติดสีเพียงเล็กน้อย และบริเวณ cell membrane มีการติดสีชมพูเข้ม แสดงว่าทุกบริเวณมี vicinal diol groups glycoconjugates บรรจุอยู่แต่มีปริมาณที่ต่างกัน (ภาพที่ 13) ผลการย้อมด้วย AB pH 2.5 และ

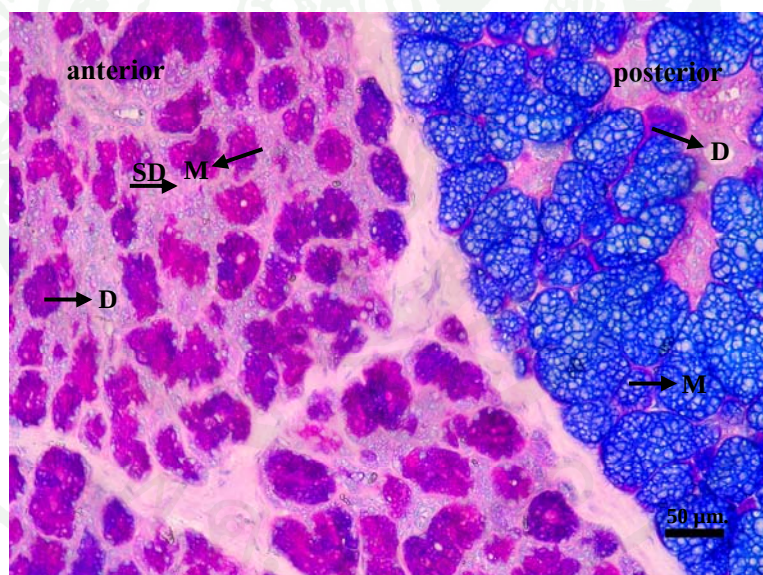
ย้อมด้วย PAS พบว่าบริเวณ anterior ส่วน mucous cells ติดสีแดงอมม่วงเข้มมาก แสดงว่ามี neutral glycoconjugates บรรจุปริมาณมาก และลักษณะการติดสีฟ้าไม่เด่นนักเข้าใจว่ามี acid glycoconjugates เพียงเล็กน้อย ขณะที่บริเวณ serous demilunes ติดสีเล็กน้อย และ striated ducts ไม่ติดสี เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ posterior ส่วน mucous cells ติดสีน้ำเงินอมม่วงเข้มมาก แสดงว่ามี acid glycoconjugates ปริมาณมากกว่า neutral glycoconjugates ขณะที่บริเวณ striated ducts ติดสีเล็กน้อย (ภาพที่ 14)



**ภาพที่ 12** ผลการติดสี AB pH 2.5 ของต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual salivary gland) พบว่าบริเวณ anterior ส่วน mucous cells (M) ติดสีฟ้าปานกลาง ขณะที่ serous demilunes (SD) และ striated ducts (D) ย้อมไม่ติดสี เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ posterior ส่วน mucous cells (M) ติดสีฟ้าน้ำเงินเข้ม และ striated ducts (D) ย้อมไม่ติดสี ขณะที่บริเวณ cell membrane (CM) ติดสีฟ้าน้ำเงินเข้มมาก

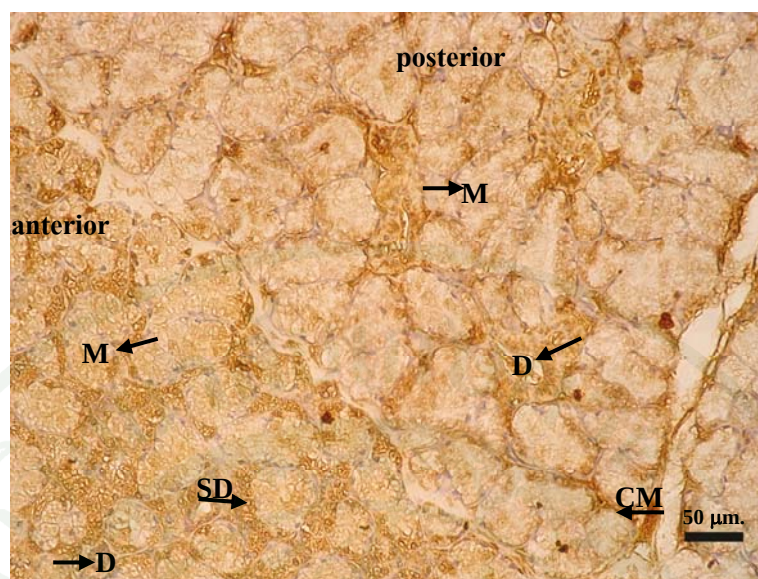


ภาพที่ 13 ผลการติดสี PAS ในต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual salivary gland) บริเวณ anterior และ บริเวณ posterior

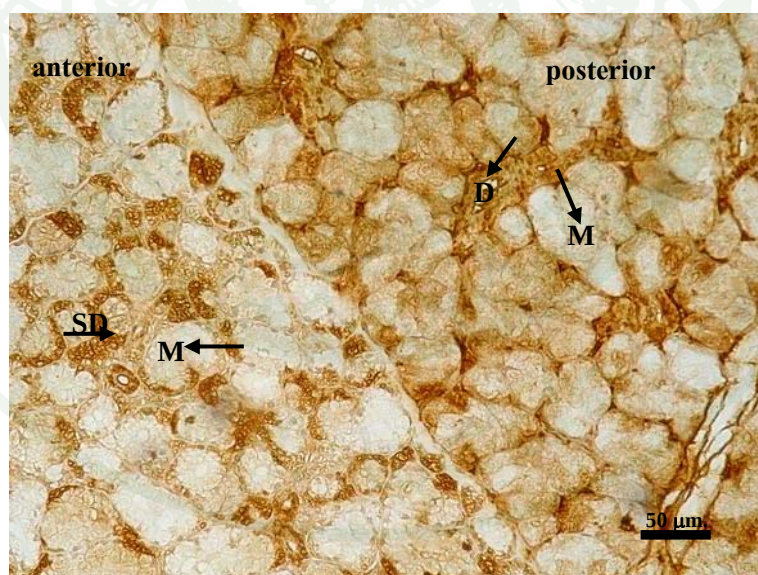


ภาพที่ 14 ผลการติดสี AB pH 2.5 - PAS ในต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual salivary gland) บริเวณ anterior และบริเวณ posterior

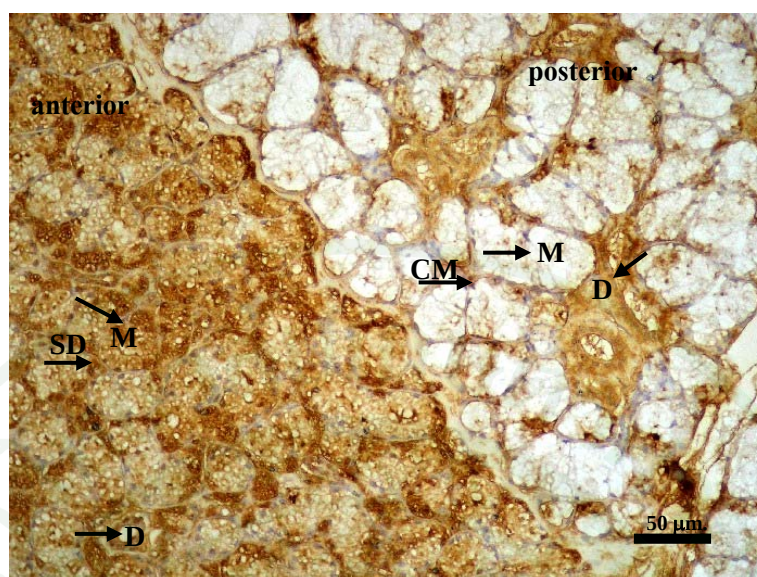
จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual salivary gland) ของลิ้นสายพันธุ์ชวา (*Manis javanica*) ด้วยเทคนิคเนื้อเยื่อทางเคมีโดยใช้สาร lectins เพื่อต้องการหาอนุพันธ์ของน้ำตาลบางชนิดที่อยู่ในสายของ oligosaccharide จากการทดลองมีการใช้สาร lectins 7 ชนิดได้แก่ lectins Con A, DBA, PNA, RCA - I, SBA, UEA - I และ WGA ผลการทดลองด้วยสาร lectins Con A พบว่าบริเวณ anterior ส่วน mucous cells ติดสีน้ำตาลปานกลาง ขณะที่ serous demilunes ติดสีน้ำตาลเข้มและ striated ducts ติดสีน้ำตาลอ่อนเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ posterior ส่วน mucous cells ติดสีน้ำตาลปานกลางเช่นกัน ขณะที่บริเวณ cell membrane และ striated ducts ติดสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 15) ผลการทดลองด้วยสาร lectins DBA บริเวณ anterior ส่วน mucous cells ติดสีน้ำตาลเล็กน้อย ขณะที่ serous demilunes และ striated ducts ติดสีน้ำตาลเข้ม บริเวณ posterior ส่วน mucous cells ติดสีน้ำตาลเล็กน้อยและ striated ducts มีการติดสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 16) ผลการทดลองด้วยสาร lectins PNA พบว่าบริเวณ anterior ส่วน mucous cells และ striated ducts ติดสีน้ำตาลเข้ม ขณะที่บริเวณ serous demilunes ติดสีน้ำตาลเข้มมาก และบริเวณ posterior ส่วน mucous cells ติดสีน้ำตาลเพียงเล็กน้อย striated ducts ติดสีน้ำตาลเข้ม สังเกตได้ว่าบริเวณ cell membrane มีการติดสีน้ำตาลด้วย (ภาพที่ 17) ผลการทดลองด้วยสาร lectins RCA - I พบว่าบริเวณ anterior ส่วน mucous cells, serous demilunes และ intercalated ducts ติดสีน้ำตาลเข้มมาก ขณะที่บริเวณ posterior ส่วน mucous cells ติดสีน้ำตาลเพียงเล็กน้อย striated ducts และ cell membrane ติดสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 18) ผลการทดลองด้วยสาร lectins SBA พบว่าบริเวณ anterior ส่วน mucous cells และ striated ducts ไม่มีการติดสี ขณะที่บริเวณ serous demilunes มีการติดสีน้ำตาลเข้ม และบริเวณ posterior ทั้ง mucous cells และ striated ducts ไม่มีการติดสีเลย (ภาพที่ 19) ผลการทดลองด้วยสาร lectins UEA - I พบว่าบริเวณ anterior ส่วน mucous cells ติดสีน้ำตาลเข้มมาก และ serous demilunes ติดสีน้ำตาลปานกลาง ขณะที่บริเวณ striated ducts ติดสีน้ำตาลเข้ม เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ posterior ส่วน mucous cells ติดสีน้ำตาลเล็กน้อย ขณะที่บริเวณ striated ducts ติดสีน้ำตาลเข้มมาก (ภาพที่ 20) ผลการทดลองด้วยสาร lectins WGA พบว่าบริเวณ anterior ส่วน mucous cells และ serous demilunes ติดสีน้ำตาลเข้ม ขณะที่ striated ducts ติดสีน้ำตาลปานกลาง เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ posterior ส่วน mucous cells ติดสีน้ำตาลเพียงเล็กน้อย ขณะที่ cell membrane ติดสีน้ำตาลเข้มและ striated ducts ติดสีน้ำตาลปานกลาง (ภาพที่ 21)



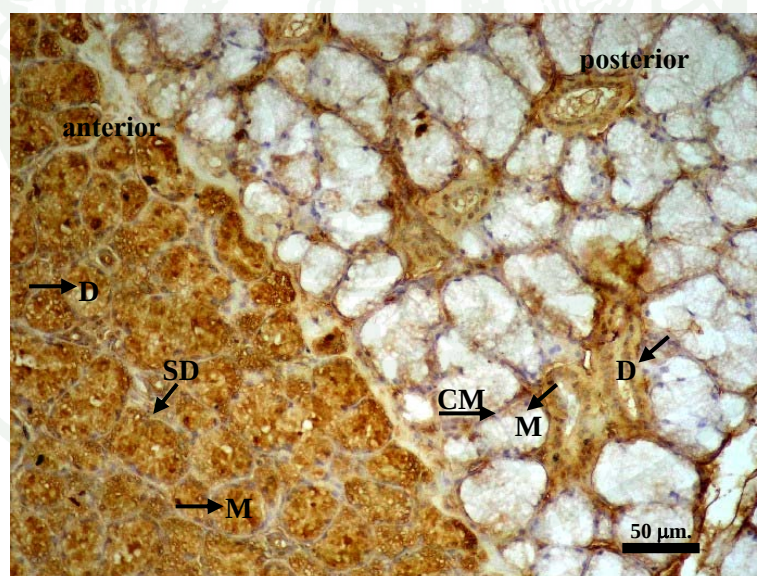
ภาพที่ 15 ผลการติดสี Lectins Con A ในต่อมน้ำลายใต้ลิ้น(sublingual salivary gland) ในบริเวณ anterior และบริเวณ posterior



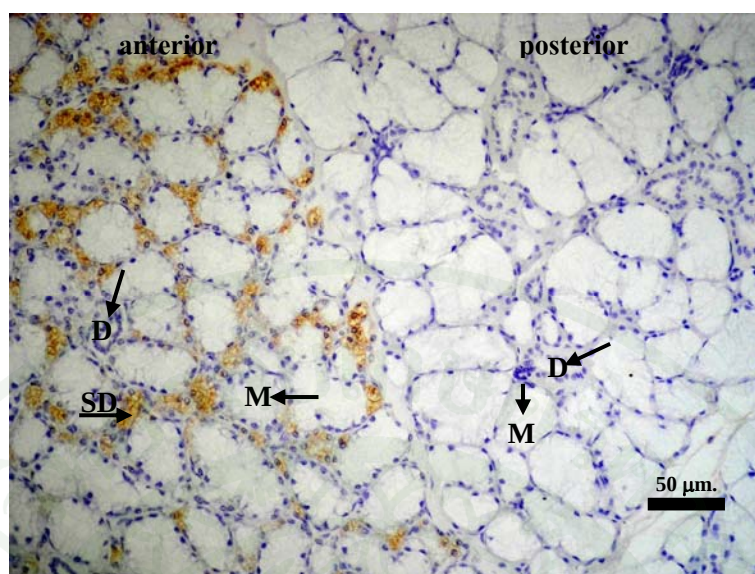
ภาพที่ 16 ผลการติดสี Lectins DBA ในต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual salivary gland) ในบริเวณ anterior และบริเวณ posterior



ภาพที่ 17 ผลการติดสี Lectins PNA ในต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual salivary gland) ในบริเวณ anterior และบริเวณ posterior



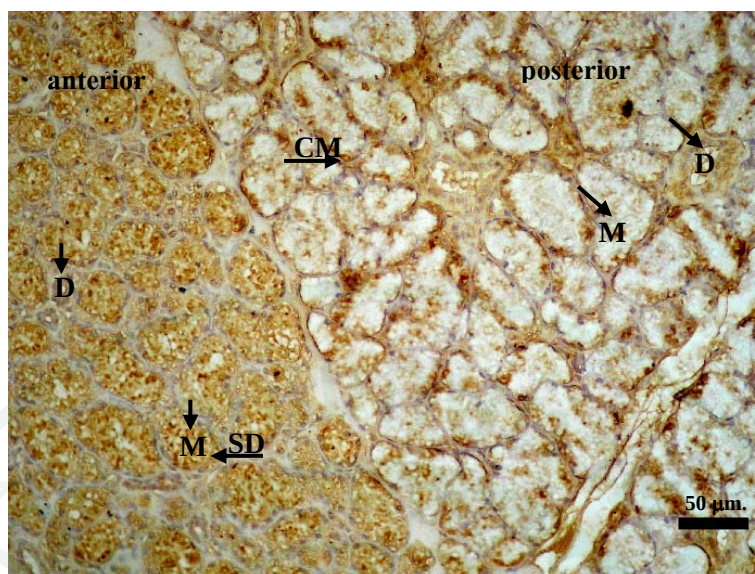
ภาพที่ 18 ผลการติดสี Lectins RCA - I ในต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual salivary gland) ในบริเวณ anterior และบริเวณ posterior



ภาพที่ 19 ผลการติดสี Lectins SBA ในต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual salivary gland) ในบริเวณ anterior และบริเวณ posterior



ภาพที่ 20 ผลการติดสี Lectins UEA - I ในต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual salivary gland) ในบริเวณ anterior และบริเวณ posterior



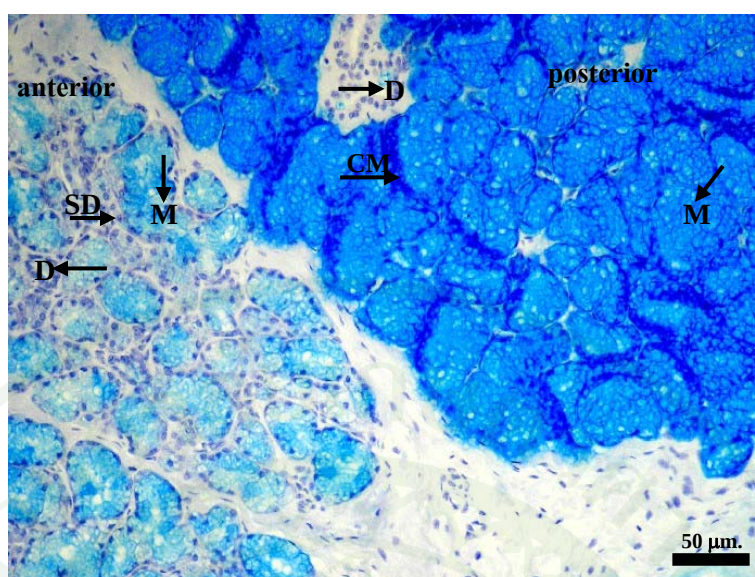
**ภาพที่ 21** ผลการติดสี Lectins WGA ในต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual salivary gland) ในบริเวณ anterior และบริเวณ posterior

จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลายใต้ลิ้นของลิ้นสายพันธุ์ชวา (*Manis javanica*) คือ (1) การใช้เอนไซม์ neuraminidase เข้ามาย่อยและนำตัวอย่างย้อมติดด้วย AB pH 2.5 (2) การใช้เอนไซม์ neuraminidase ย่อยและนำตัวอย่างย้อมติดด้วยสาร lectins PNA (ตารางที่ 5)

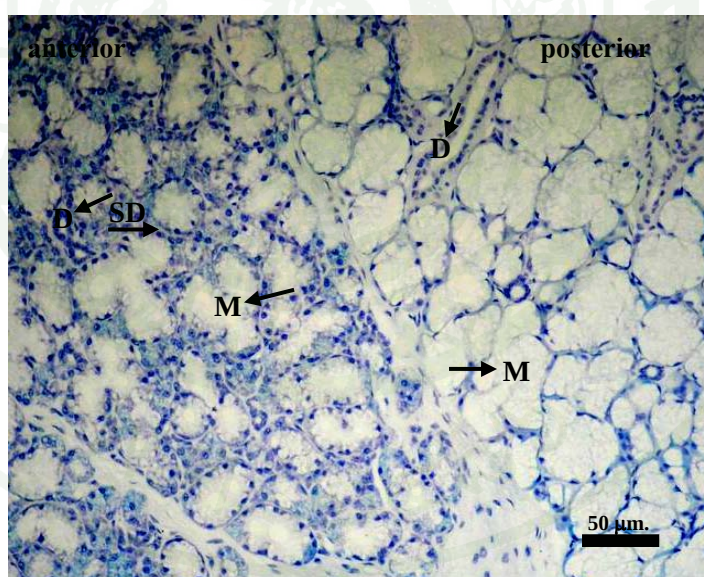
**ตารางที่ 5** ผลการย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมติดด้วย Alcian Blue pH 2.5 และ lectins PNA ในต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual salivary gland) ของลิ้นชวา (*Manis javanica*)

| เอนไซม์และสีย้อม | Anterior     |                  | Posterior    |
|------------------|--------------|------------------|--------------|
|                  | Mucous cells | Serous demilunes | Mucous cells |
| AB pH 2.5        | 2            | 0                | 3            |
| Neu - AB pH 2.5  | 0            | 0                | 0            |
| PNA              | 3            | 4                | 1            |
| Neu - PNA        | 3            | 4                | 2            |

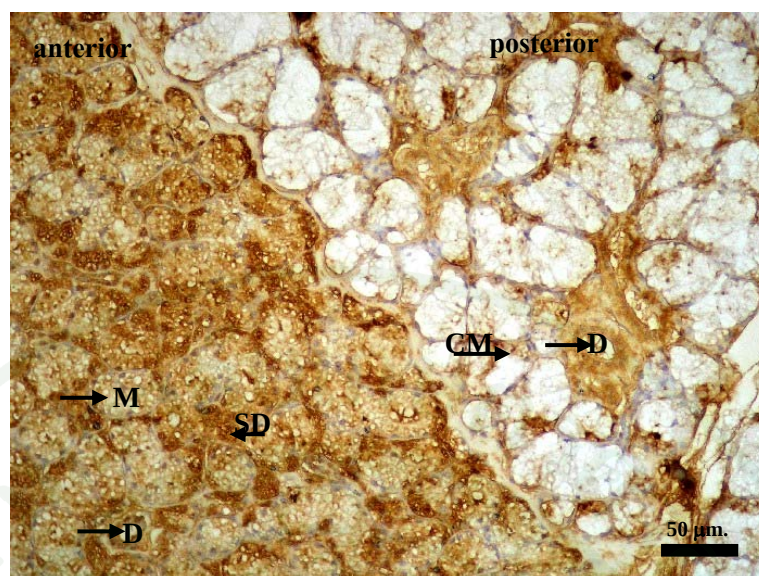
ผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างที่ไม่ใช่เอนไซม์ neuraminidase และเชื่อมต่อด้วย AB pH 2.5 พบว่าบริเวณ anterior ส่วน mucous cells ติดสีฟ้าปานกลาง แสดงว่ามีปริมาณ acid glycoconjugates ปานกลางขณะที่ serous demilunes และ striated ducts ไม่ติดสี เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ posterior ส่วน mucous cells ติดสีฟ้าเข้ม แสดงว่ามีปริมาณ acid glycoconjugates เป็นจำนวนมาก ขณะที่บริเวณ striated ducts ไม่ติดสีและเป็นที่น่าสังเกตว่าบริเวณ cell membrane มีการติดสีฟ้าเข้มมาก (ภาพที่ 22) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และเชื่อมต่อด้วย AB pH 2.5 ผลการทดลองพบว่า เซลล์คัดหลัง และ striated ducts ทั้งบริเวณ anterior และ posterior มีการติดสีฟ้าจางลงคือสีเชื่อม AB pH 2.5 ไม่สามารถเชื่อมติดกับหมู่คาร์บอกซิลในโมเลกุลของ sialic acid ได้ (ภาพที่ 23) ผลการทดลองตัวอย่างที่ไม่ย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และเชื่อมต่อด้วยสาร lectins PNA พบว่าบริเวณ anterior ส่วน mucous cells และ striated ducts ติดสีน้ำตาลปานกลาง ขณะที่บริเวณ serous demilunes ติดสีน้ำตาลเข้ม เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ posterior ส่วน mucous cells ติดสีน้ำตาลเพียงเล็กน้อย striated ducts ติดสีน้ำตาลเข้ม และบริเวณ cell membrane มีการติดสีน้ำตาลเล็กน้อย (ภาพที่ 24) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และเชื่อมต่อด้วยสาร lectins PNA พบว่าบริเวณ anterior ส่วน mucous cells และ striated ducts ติดสีน้ำตาลปานกลางและ serous demilunes ติดสีน้ำตาลเข้ม ภายหลังการย่อยพบว่าบริเวณ posterior ส่วน mucous cells มีการติดสีน้ำตาลปานกลางถึงเข้ม striated ducts ติดสีน้ำตาลเล็กน้อย และ cell membrane ติดสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 25)



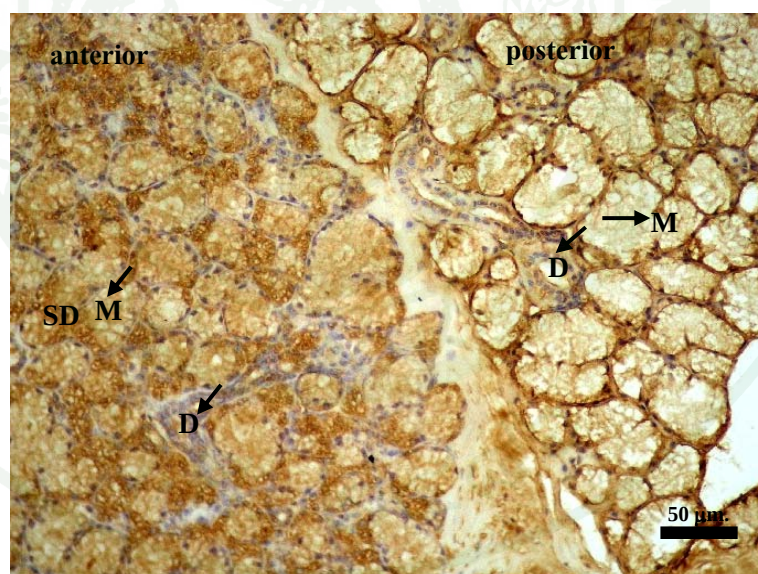
ภาพที่ 22 ผลการติดสี AB pH 2.5 โดยไม่ย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase ในต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual salivary gland) ในบริเวณ anterior และบริเวณ posterior



ภาพที่ 23 ผลการติดสีของต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual salivary gland) โดยทำการย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมต่อด้วย AB pH 2.5 ในบริเวณ anterior และ posterior



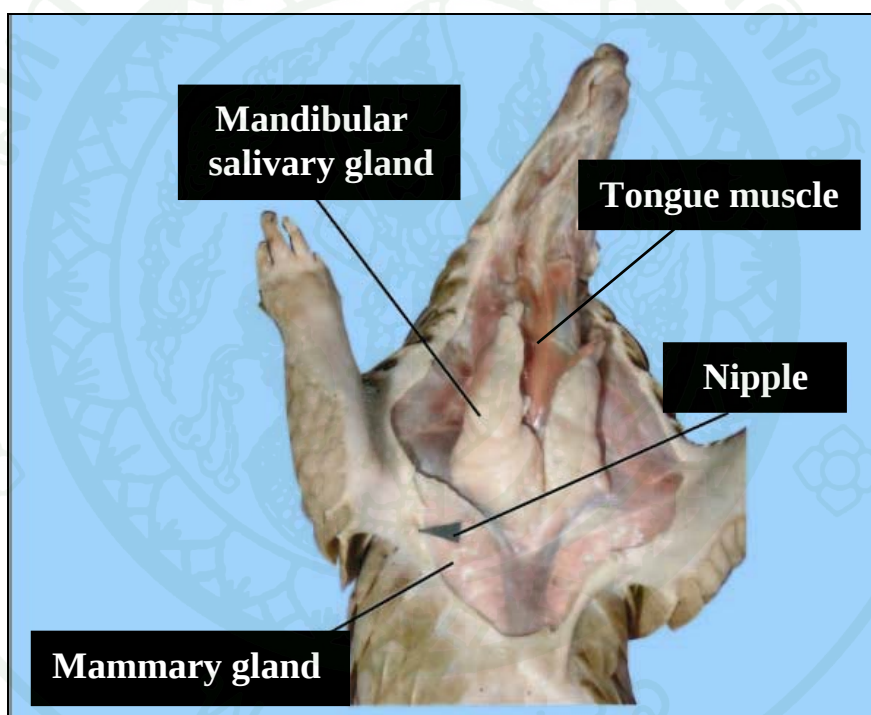
ภาพที่ 24 ผลการติดสี Lectins PNA ของต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual salivary gland) โดยไม่ย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase ในบริเวณ anterior และบริเวณ posterior



ภาพที่ 25 ผลการติดสีของต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual salivary gland) ภายหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase ย้อมต่อด้วยสาร Lectins PNA ในบริเวณ anterior และบริเวณ posterior

### ผลการทดลองในต่อมน้ำลายขากรรไกร

จากการเก็บตัวอย่างของต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) ของลิงสายพันธุ์ชวา (*Manis javanica*) ในเพศเมียพบว่าลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ ตัวต่อมมีขนาดใหญ่ ประกอบด้วย 2 lobe วางตัวอยู่ด้านล่างของกระดูกขากรรไกร (mandible) ทอดยาวจนถึงตอนต้นของกระดูกอก (sternum) เหนือเต้านม (nipple) และมีกล้ามเนื้อลิ้น (tongue muscle) กั้นกลางระหว่างต่อมทั้ง 2 lobe (ภาพที่ 26) เมื่อชำแหละและนำตัวต่อมออกจากลำตัว พบลักษณะของเนื้อต่อมมีสีขาวขุ่นทั่วทั้งต่อมสามารถมองเห็นเป็น lobe ช่อแยกกัน และรูปร่างต่อมเป็นรูปวงรี ยาวประมาณ 4 - 6 เซนติเมตร (ภาพที่ 27)

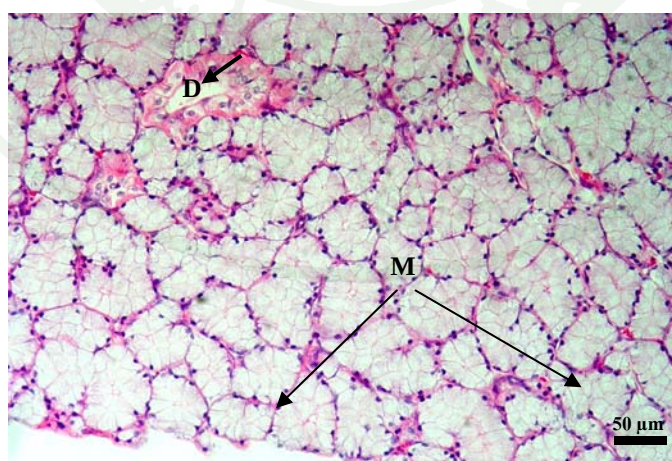


**ภาพที่ 26** ภาพการเปิดผิวหนังบริเวณช่วงอก เพื่อแสดงตำแหน่งการวางตัวของต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) ประกอบด้วย 2 lobe ขนาดใหญ่ วางตัวอยู่ด้านล่างของกระดูกขากรรไกร (mandible) ทอดยาวจนถึงตอนต้นของกระดูกอก (sternum) เหนือเต้านม (nipple) และมีกล้ามเนื้อลิ้น (tongue muscle) กั้นกลางระหว่างต่อมทั้ง 2 lobe



ภาพที่ 27 ลักษณะของเนื้อต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) ในลิ่นชวา (*Manis javanica*) เนื้อต่อมจะมีสีขาวขุ่นทั่วทั้งต่อม รูปทรงต่อมเป็นรูปวงรีและยาวประมาณ 4 - 6 เซนติเมตร

จากการศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์เพื่อดูโครงสร้างทั่วไปโดยการย้อมด้วย Hematoxylin และ Eosin (H&E) ผลการศึกษาพบว่าเซลล์คัดหลั่งมีลักษณะเป็น tubuloacinar gland ประกอบด้วย mucous cells เป็นจำนวนมาก ลักษณะเซลล์เป็นเซลล์ทรงสูง นิวเคลียสมีลักษณะแบนพบที่ฐานของเซลล์ มองไม่เห็น lumen ของ acinus และพบ striated ducts ปริมาณน้อยและลักษณะของ striated ducts เป็นเซลล์แบบ simple cuboidal epithelium (ภาพที่ 28)



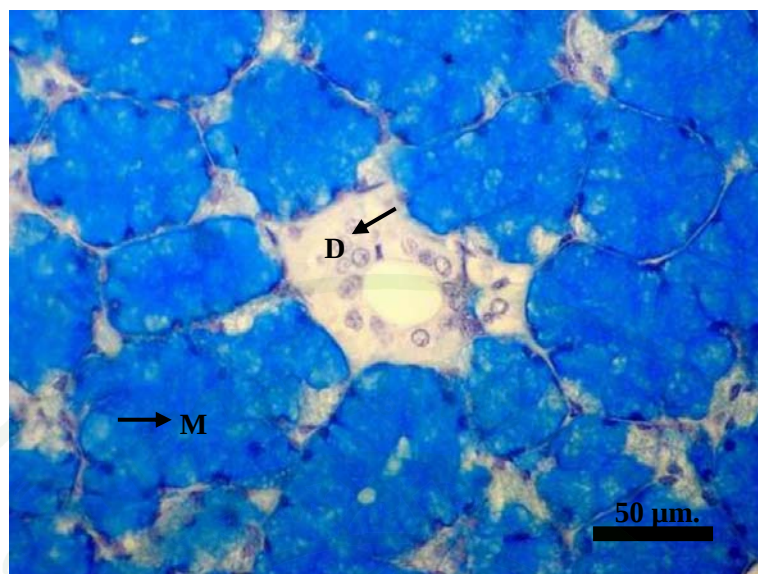
ภาพที่ 28 โครงสร้างทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) โดยย้อมด้วย H&E

จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) ของลิ้นสาหร่าย (Manis javanica) โดยการย้อมด้วยเทคนิคเนื้อเยื่อทางเคมีด้วย AB pH 2.5, PAS, AB pH 2.5 - PAS และสาร lectins 7 ชนิด ได้แก่ Con A, DBA, PNA, RCA - I, SBA, UEA - I และ WGA ผลการทดลองระบุในตารางที่ 6

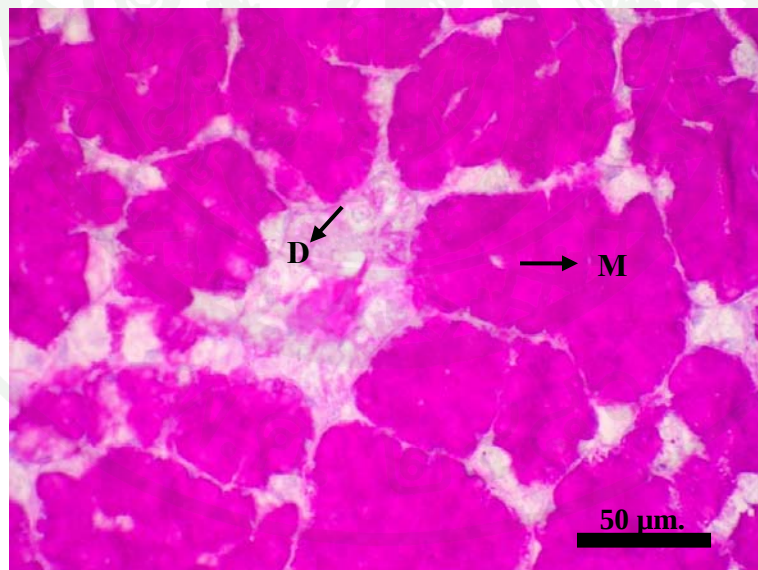
ตารางที่ 6 ผลการทดลองการติดสีย้อมในเนื้อเยื่อต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) ของลิ้นสาหร่าย (Manis javanica)

| ชนิดสีย้อม      | ชนิดเซลล์คัดหลั่ง |
|-----------------|-------------------|
|                 | Mucous cells      |
| AB pH 2.5       | 4                 |
| PAS             | 4                 |
| AB pH 2.5 - PAS | 4                 |
| Con A           | 0                 |
| DBA             | 3                 |
| PNA             | 0                 |
| RCA - I         | 1                 |
| SBA             | 3                 |
| UEA - I         | 0                 |
| WGA             | 2                 |

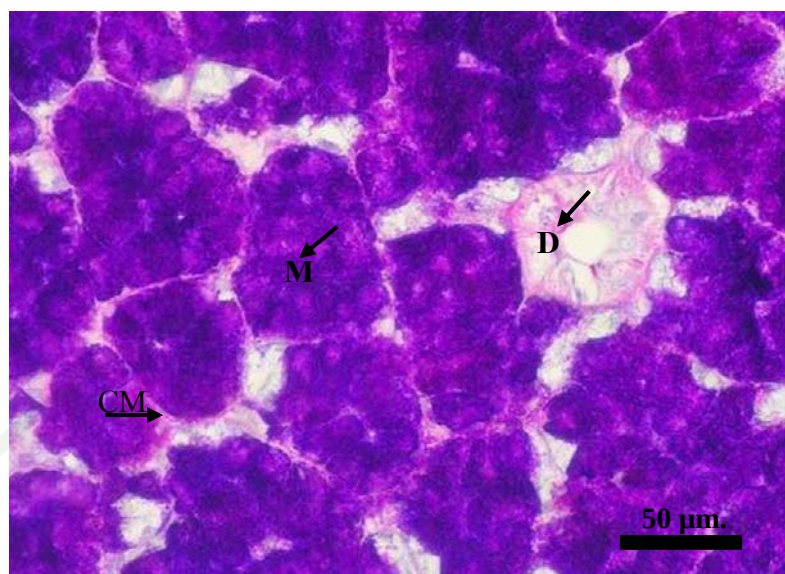
ผลการย้อมด้วยเทคนิคเนื้อเยื่อทางเคมีโดยใช้ AB pH 2.5 พบว่ามีการติดสีฟ้าน้ำเงินเข้มมากทั่วทั้งต่อมแสดงว่ามี acid glycoconjugates ปริมาณมากบรรจุภายในเซลล์คัดหลั่งขณะที่ striated ducts ย้อมไม่ติดสี (ภาพที่ 29) ผลการย้อมด้วยสี PAS พบว่ามีการติดสีชมพูแดงเข้มมากในทุกบริเวณของ mucous cells แสดงว่ามี vicinal diol groups glycoconjugates บรรจุอยู่ในปริมาณมาก ขณะที่ striated ducts ติดสีเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 30) ผลการย้อมด้วย AB pH 2.5 และย้อมต่อด้วย PAS พบว่ามีการติดสีม่วงอมน้ำเงินเข้มทั่วทุกบริเวณของ mucous cells บ่งบอกว่ามีทั้ง acid และ neutral glycoconjugates บรรจุอยู่ภายในเซลล์คัดหลั่ง ลักษณะการติดของสีจะต่างกันโดยสีม่วงอมน้ำเงินจะเด่นกว่าทำให้ทราบว่าปริมาณของ acid glycoconjugates มากกว่า neutral glycoconjugates ขณะที่ cell membrane มีการติดสีชมพูเด่นกว่า ทำให้ทราบว่าปริมาณของ neutral glycoconjugates มากกว่า และ striated ducts ติดสีเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 31)



ภาพที่ 29 ผลการติดสี AB pH 2.5 ในต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) พบว่าการติดสีฟ้าเข้มมากในทุกตำแหน่งของ mucous cells (M) ขณะที่บริเวณ striated ducts (D) ไม่มีการติดสี

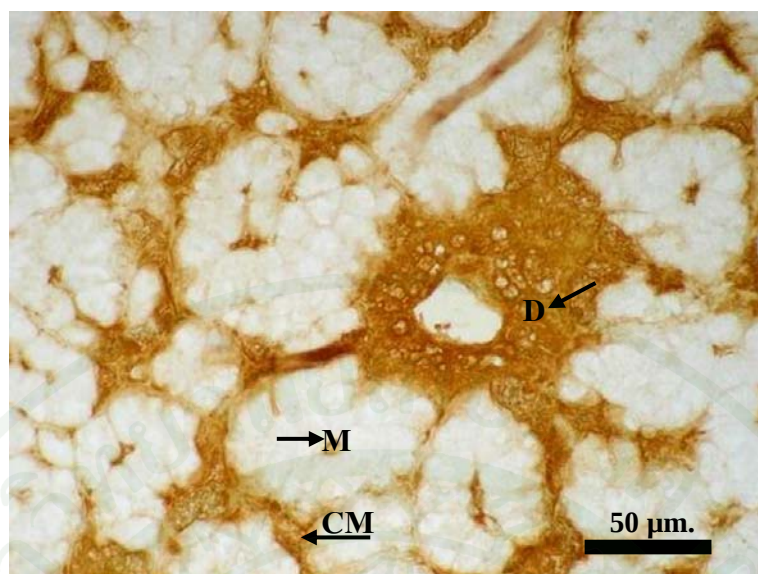


ภาพที่ 30 ผลการติดสี PAS ในต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) พบว่าการติดสีชมพูแดงเข้มมากทั่วทั้งบริเวณ mucous cells (M) ขณะที่ striated ducts (D) ติดสีเพียงเล็กน้อย

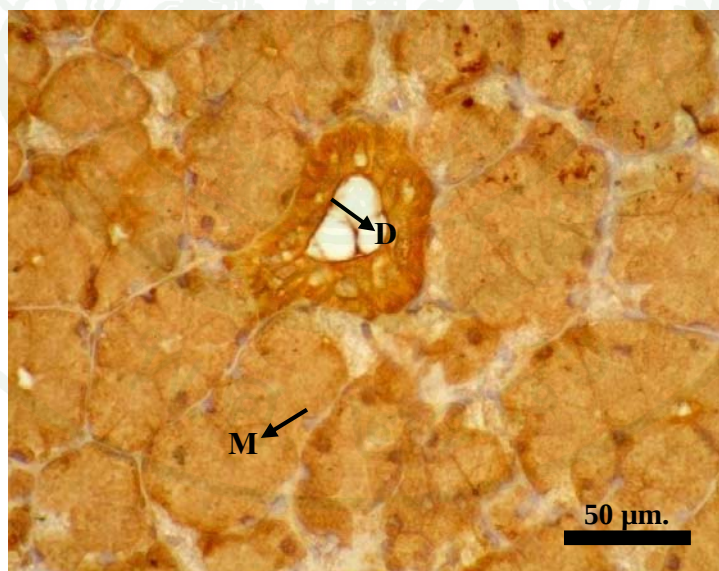


ภาพที่ 31 ผลติดสี AB pH 2.5 - PAS ของต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) พบว่า การติดสีม่วงอมน้ำเงินเข้มทั่วทุกบริเวณของ mucous cells (M) และ cell membrane (CM) มีการติดสีชมพูเด่น ขณะที่ striated ducts (D) ติดสีเพียงเล็กน้อย

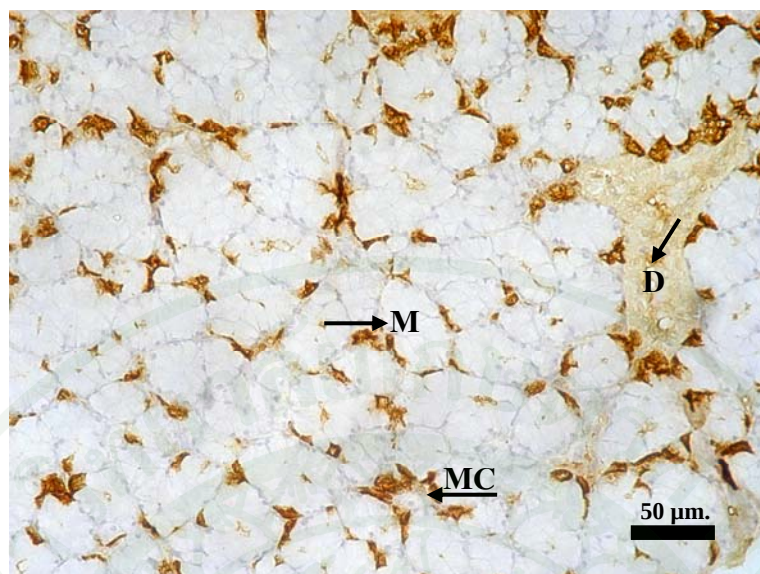
จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) ลิ่นสายพันธุ์ชวา (*Manis javanica*) ด้วยเทคนิคเนื้อเยื่อทางเคมีโดยใช้สาร lectins 7 ชนิด ได้แก่ lectins Con A, DBA, PNA, RCA - I, SBA, UEA - I และ WGA ผลการทดลองด้วยสาร lectins Con A พบว่าบริเวณ mucous cells ไม่มีการติดสี ขณะที่บริเวณ cells membrane มีการติดสีน้ำตาลเข้มและ striated ducts ติดสีน้ำตาลเข้มมาก (ภาพที่ 32) ผลการย้อมด้วยสาร lectins DBA พบว่าบริเวณ mucous cells ติดสีน้ำตาลเข้ม ขณะที่ striated ducts ติดสีน้ำตาลเข้มมาก (ภาพที่ 33) ผลการย้อมด้วยสาร lectins PNA พบว่าบริเวณ mucous cells ไม่มีการติดสีแต่ myoepithelial cells ติดสีน้ำตาลเข้มมากและ striated ducts ติดสีน้ำตาลเล็กน้อย (ภาพที่ 34) ผลการย้อมด้วยสาร lectins RCA - I พบบริเวณ mucous cells ติดสีน้ำตาลเล็กน้อย และ striated ducts ติดสีน้ำตาลปานกลาง (ภาพที่ 35) ผลการย้อมด้วยสาร lectins SBA พบว่าบริเวณ mucous cells ติดสีน้ำตาลเข้ม ขณะที่ striated ducts และ myoepithelial cells ติดสีน้ำตาลเข้มมาก (ภาพที่ 36) ผลการย้อมด้วยสาร lectins UEA - I พบว่าบริเวณ mucous cells ไม่มีการติดสี ขณะที่ myoepithelial cells ติดสีน้ำตาลปานกลาง และ striated ducts ติดสีน้ำตาลเข้มมาก (ภาพที่ 37) ผลการย้อมด้วยสาร lectins WGA พบว่าบริเวณ mucous cells ติดสีน้ำตาลปานกลาง ขณะที่ myoepithelial cells และ striated ducts ติดสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 38)



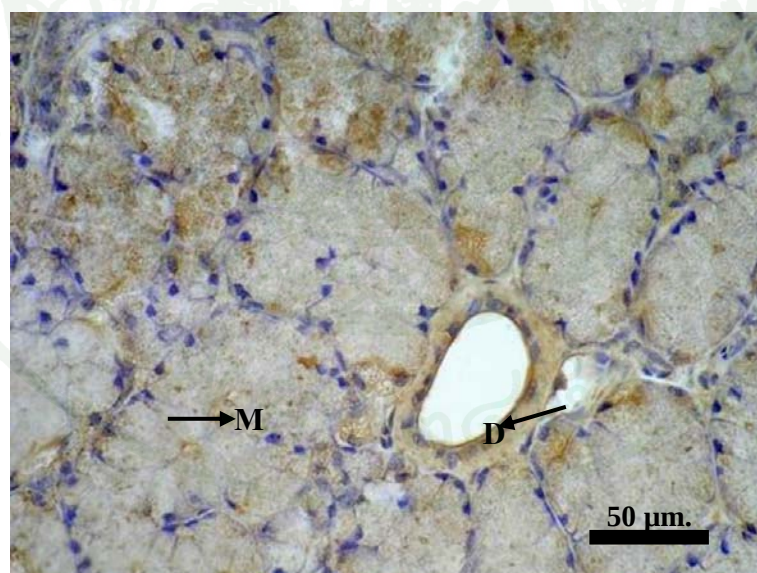
ภาพที่ 32 ผลการติดสี Lectins Con A ในต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) พบว่าไม่มีการติดสีใน mucous cells (M) ขณะที่บริเวณ cells membrane (CM) มีการติดสี น้ำตาลเข้ม และ striated ducts (D) ติดสีน้ำตาลเข้มมาก



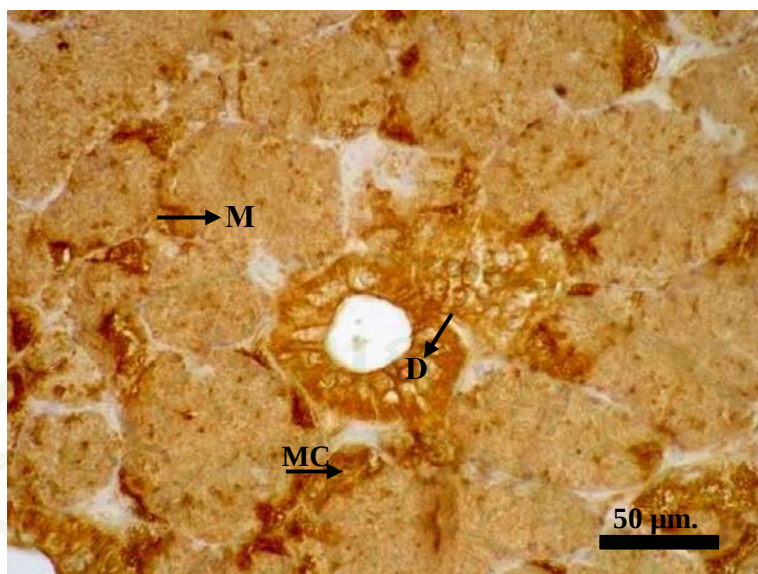
ภาพที่ 33 ผลการติดสี Lectins DBA ในต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) พบว่ามีการติดสีน้ำตาลเข้มทั่วทั้งบริเวณ mucous cells (M) และบริเวณ striated ducts (D) ติดสีน้ำตาลเข้มมาก



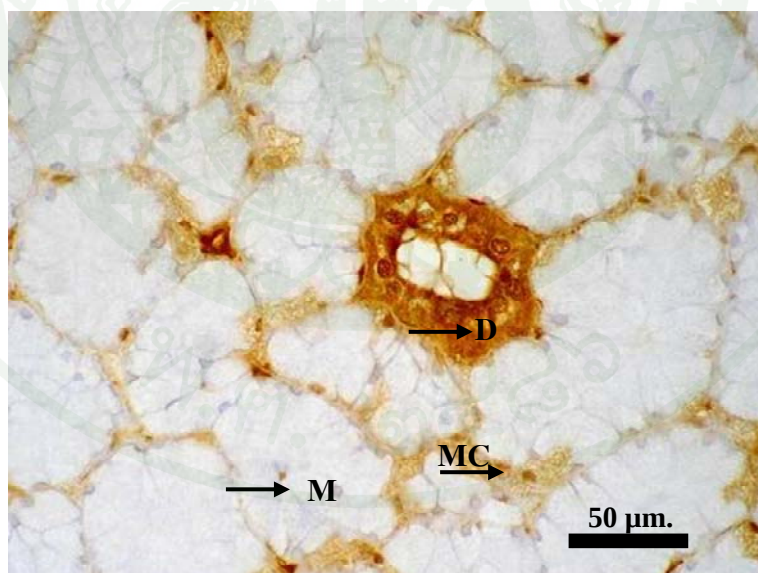
ภาพที่ 34 ผลการติดสี Lectins PNA ในต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) พบว่า ไม่มีการติดสีน้ำตาลในบริเวณ mucous cells (M) ขณะที่ myoepithelial cells (MC) ติดสีน้ำตาลเข้มมากและ striated ducts (D) ติดสีน้ำตาลเล็กน้อย



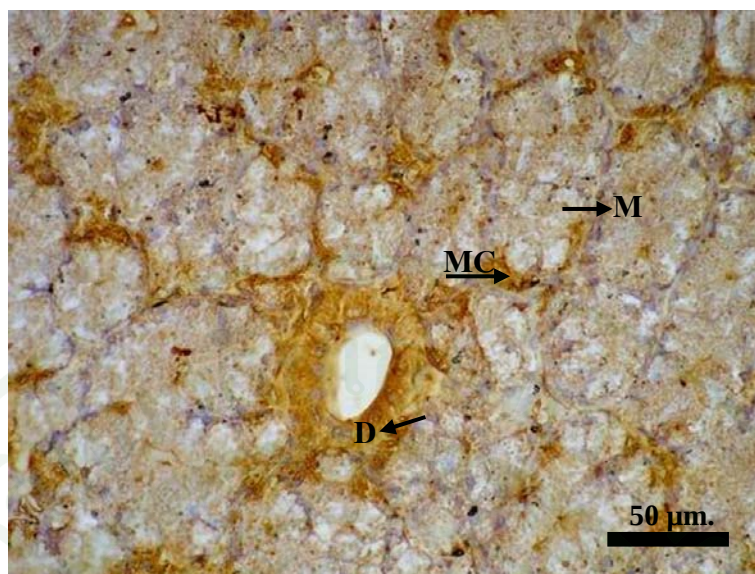
ภาพที่ 35 ผลการติดสี Lectins RCA - I ของต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) พบ มีการติดสีน้ำตาลเล็กน้อยทุกบริเวณของ mucous cells (M) ขณะที่ striated ducts (D) ติดสีน้ำตาลปานกลาง



ภาพที่ 36 ผลการติดสี Lectins SBA ในต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) พบว่า มีการติดสีน้ำตาลเข้มทุกบริเวณของ mucous cells (M) ขณะที่ striated ducts (D) และ myoepithelial cells (MC) ติดสีน้ำตาลเข้มมาก



ภาพที่ 37 ผลการติดสี Lectins UEA - I ในต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) พบว่าไม่มีการติดสีน้ำตาลในทุกตำแหน่งของ mucous cells (M) ขณะที่ myoepithelial cells (MC) ติดสีน้ำตาลปานกลางและ striated ducts (D) ติดสีน้ำตาลเข้มมาก



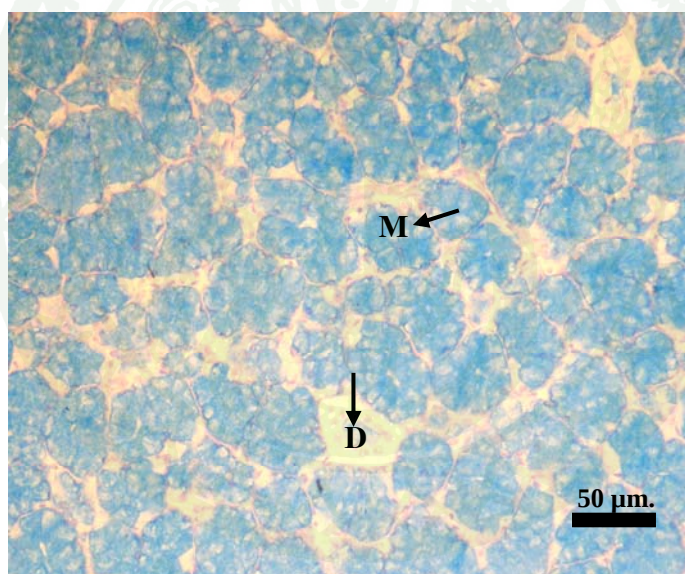
**ภาพที่ 38** ผลการติดสี Lectins WGA ในต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) พบว่ามีการติดสีน้ำตาลปานกลางทุกตำแหน่งของ mucous cells (M) ขณะที่ myoepithelial cells (MC) และ striated ducts (D) ติดสีน้ำตาลเข้ม

จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) ลิ่นสายพันธุ์ชวา (*Manis javanica*) โดย (1) ใช้เอนไซม์ neuraminidase เข้ามาย่อยและนำตัวอย่างย้อมติดด้วย AB pH 2.5 (2) ใช้เอนไซม์ neuraminidase ย่อยและย้อมติดด้วยสาร lectins PNA (ตารางที่ 7)

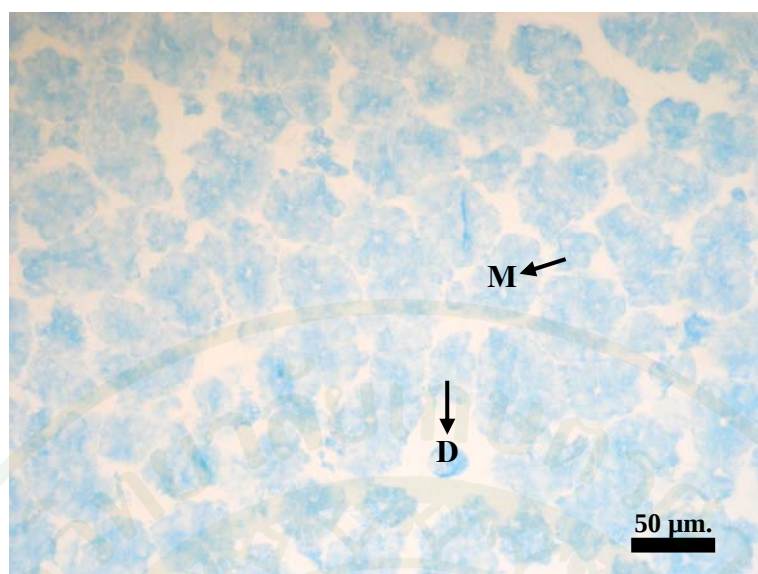
**ตารางที่ 7** ผลการย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมติดด้วย AB pH 2.5 และ lectins PNA ในต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) ของลิ่นชวา (*Manis javanica*)

| เอนไซม์และสีย้อม | ชนิดเซลล์คัดหลัง |
|------------------|------------------|
|                  | Mucous cells     |
| AB pH 2.5        | 4                |
| Neu - AB pH 2.5  | 1                |
| PNA              | 0                |
| Neu - PNA        | 1                |

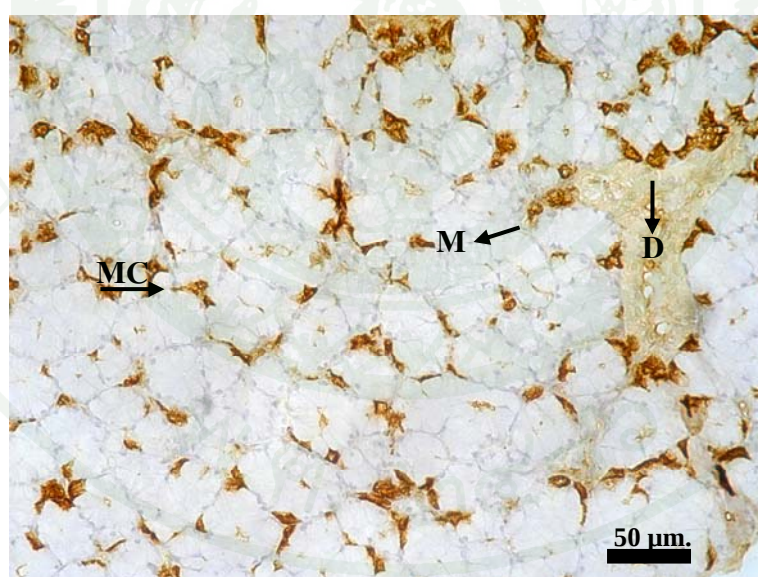
ผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างที่ไม่ย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase แล้วย้อมด้วย AB pH 2.5 พบว่าบริเวณ mucous cells ติดสีฟ้าเข้มแสดงให้เห็นถึงการมีปริมาณของ acid glycoconjugates แพร่กระจายเป็นจำนวนมาก ขณะที่บริเวณ striated ducts ไม่มีการติดสี (ภาพที่ 39) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมด้วย AB pH 2.5 ผลการทดลองพบว่าบริเวณ mucous cells ติดสีฟ้าจาง เนื่องจากว่าสีย้อม AB pH 2.5 ไม่สามารถย้อมติดกับหมู่คาร์บอกซิลในโมเลกุลของ sialic acid ได้ และ striated ducts ไม่มีการติดสี (ภาพที่ 40) ผลการทดลองตัวอย่างที่ไม่ใช่เอนไซม์ neuraminidase และย้อมด้วยสาร lectins PNA พบว่าบริเวณ mucous cells ไม่มีการติดสี ขณะที่ myoepithelial cells ติดสีน้ำตาลเข้มมากและ striated ducts ติดสีน้ำตาลเล็กน้อย (ภาพที่ 41) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมด้วย สาร lectins PNA พบว่าบริเวณ mucous cells และ striated ducts ติดสีน้ำตาลเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ขณะที่บริเวณ myoepithelial cells ติดสีน้ำตาลเข้มมาก (ภาพที่ 42)



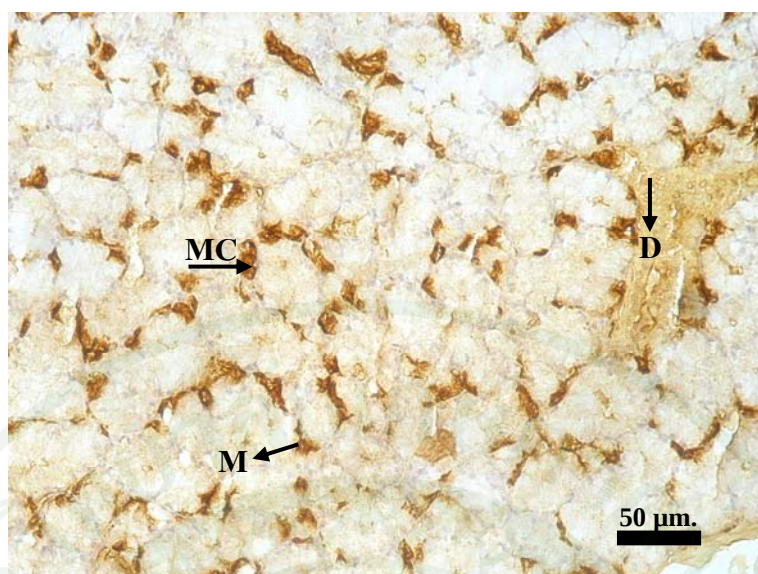
ภาพที่ 39 ผลการติดสีของ AB pH 2.5 ในต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) โดยไม่ย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase พบว่าบริเวณ mucous cells (M) มีการติดสีฟ้าเข้มขณะที่บริเวณ striated ducts (D) ไม่มีการติดสี



ภาพที่ 40 ผลการย้อมด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมต่อด้วย AB pH 2.5 ในต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) พบว่าบริเวณ mucous cells (M) มีการติดสีฟ้าเพียงเล็กน้อยและบริเวณ striated ducts (D) ไม่มีการติดสี



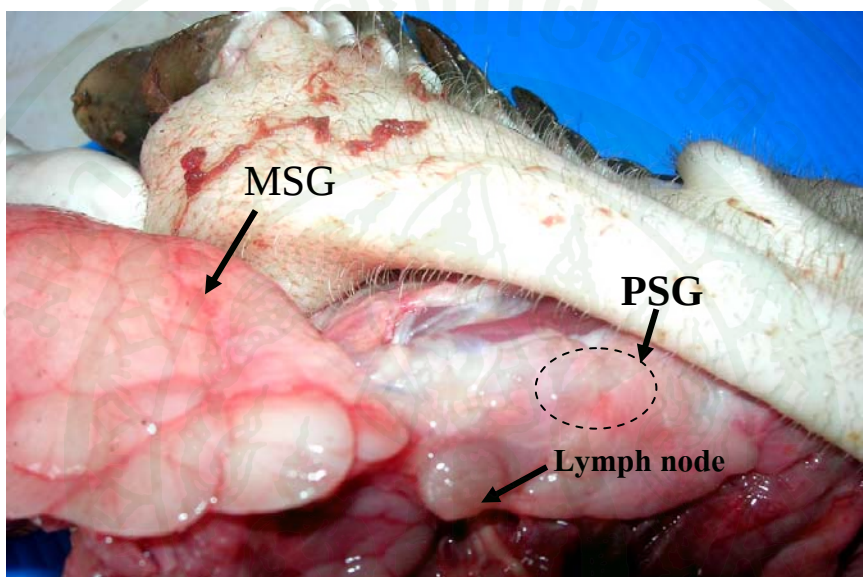
ภาพที่ 41 ผลการติดสี Lectins PNA ในต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) โดยไม่ย้อมด้วยเอนไซม์ neuraminidase พบว่าไม่มีการติดสีน้ำตาลในบริเวณ mucous cells (M) ขณะที่ myoepithelial cells (MC) ติดสีน้ำตาลเข้มมากและ striated ducts (D) ติดสีน้ำตาลเล็กน้อย



ภาพที่ 42 ผลการย้อมด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมต่อด้วยสาร Lectins PNA ในต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) พบว่าการติดสีน้ำตาลเข้มขึ้นจากเดิมเล็กน้อยในบริเวณ mucous cells (M) และ striated ducts (D) ขณะที่บริเวณ myoepithelial cells (MC) ติดสีน้ำตาลเข้มมาก

### ผลการทดลองในต่อมน้ำลายกหนู

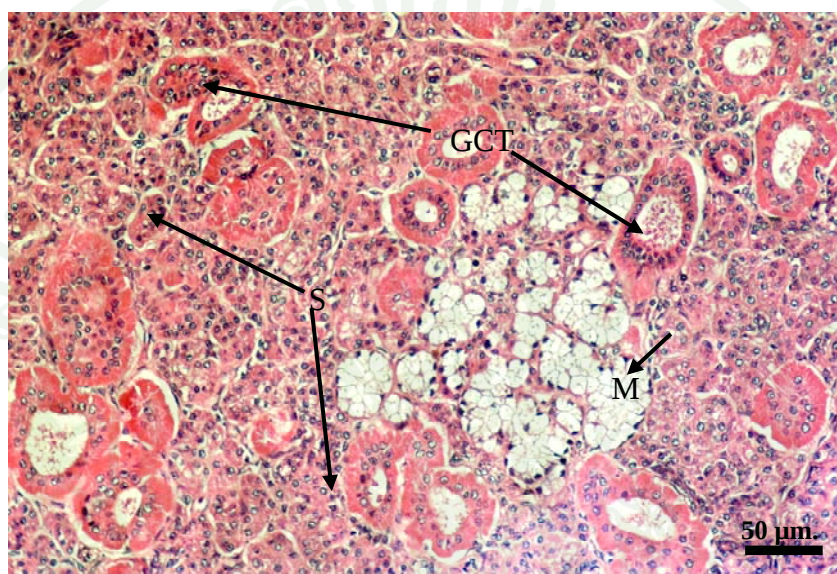
จากการเก็บตัวอย่างของต่อมน้ำลายกหนู (parotid salivary gland) ของลิงสายพันธุ์ชวา (*Manis javanica*) ในเพศเมียพบว่าต่อมน้ำลายกหนูมีขนาดเล็ก ตัวต่อมยาวประมาณ 1 - 2 เซนติเมตรวางตัวอยู่บริเวณด้านหลังของกหนูทั้ง 2 ข้าง โดยมีต่อมน้ำเหลืองกั้นระหว่างต่อมน้ำลายกหนู (parotid salivary gland) กับต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) (ภาพที่ 43)



ภาพที่ 43 ลักษณะของต่อมน้ำลายกหนู (parotid salivary gland) ของลิงชวา (*Manis javanica*) มีขนาดเล็ก ตัวต่อมยาวประมาณ 1 - 2 เซนติเมตร พบมีต่อมน้ำเหลืองกั้นระหว่าง parotid salivary gland (PSG) และ mandibular salivary gland (MSG)

ผลการศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์เพื่อดูโครงสร้างทั่วไปของต่อมน้ำลายกหนู (parotid salivary gland) โดยการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) พบว่าเซลล์คัดหลั่งมีลักษณะแบบ tubuloacinar gland ประกอบด้วย mucous cells และ serous cells โดยเซลล์คัดหลั่งแบ่งออกเป็น 2 บริเวณคือบริเวณ anterior ประกอบด้วยเซลล์คัดหลั่งชนิด serous cells เป็นจำนวนมาก ลักษณะเซลล์เป็นเซลล์ทรงกลม นิวเคลียสกลมอยู่กลางเซลล์ และบริเวณ posterior ประกอบด้วยเซลล์คัดหลั่งชนิด serous cells และมีกลุ่มของ mucous cells จำนวนเล็กน้อยแทรกปนกับ serous cells ที่มีจำนวนมาก ลักษณะของ mucous cells เป็นเซลล์ทรงสูง นิวเคลียสเรียงตัวที่ฐานของเซลล์ lumen ของ acinus แคบ และลักษณะของ serous cells เป็นเซลล์ทรงกลมนิวเคลียสกลมเรียงตัวอยู่กลางเซลล์ lumen ของ acinus แคบมองเห็นไม่ชัดเจน (ภาพที่ 44)

เป็นที่น่าสังเกตว่าต่อมน้ำลายกกหู (parotid salivary gland) ของลิ้นจาว (*Manis javanica*) ทั้งบริเวณ anterior และ posterior พบ granular convoluted tubule (GCT ducts) เป็นจำนวนมากซึ่งท่อชนิดนี้มีการเปลี่ยนแปลงมาจาก striated ducts กลายเป็นท่อที่มีขนาดใหญ่ลักษณะท่อเป็น convoluted tubule เซลล์เป็นแบบ stratified columnar epithelium หรือ pseudostratified columnar epithelium ส่วนของ lumen กว้างและที่ basal portion มองเห็นเป็นลายซึ่งเกิดจากการเรียงตัวของไมโทคอนเดรีย



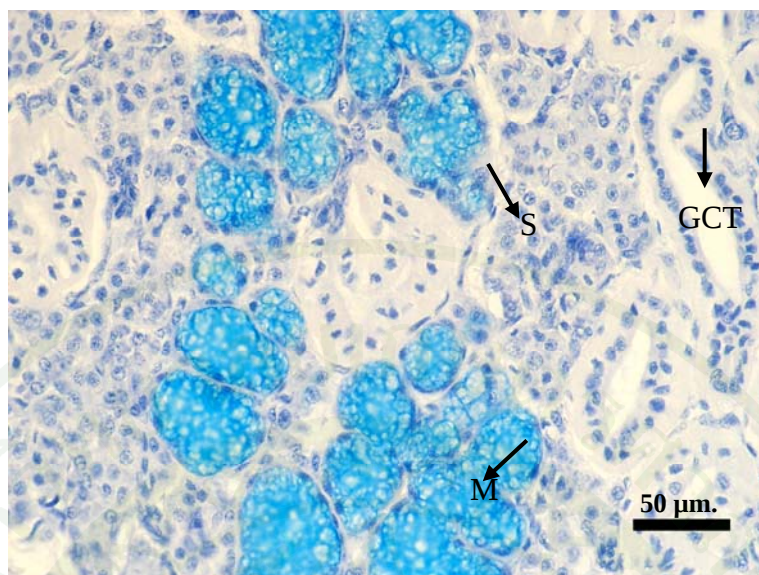
ภาพที่ 44 การติดสี H&E ในต่อมน้ำลายกกหู (parotid salivary gland) ในบริเวณ posterior ประกอบด้วยเซลล์กีดหลังชนิด serous cells และ mucous cells โดยมีกลุ่มของ mucous cells (M) จำนวนน้อยแทรกปนกับกลุ่ม serous cells (S) ที่มีจำนวนมาก

จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลายต่อมน้ำลายกกหู (parotid salivary gland) ของลิ้นจาว (*Manis javanica*) โดยการย้อมด้วยเทคนิคเนื้อเยื่อทางเคมีด้วย AB pH 2.5, PAS, AB pH 2.5 - PAS และสาร lectins 6 ชนิด ได้แก่ Con A, DBA, PNA, SBA, UEA - I และ WGA ผลการทดลองระบุในตารางที่ 8

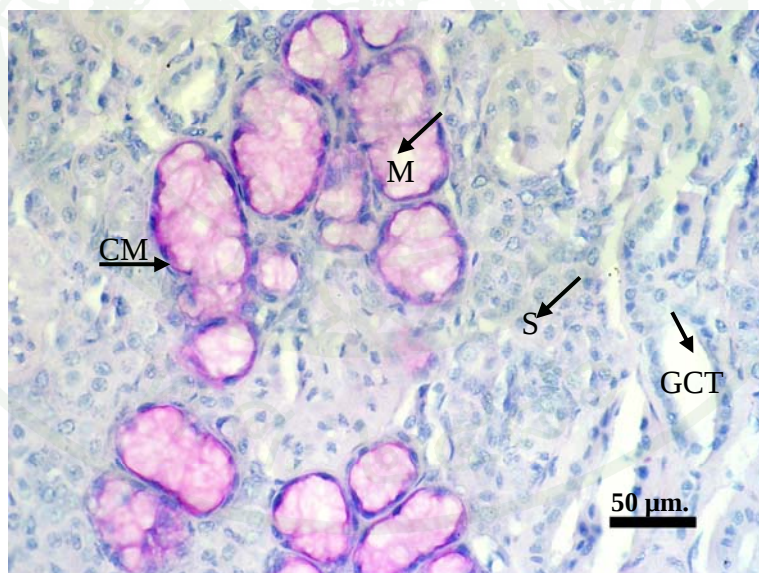
ตารางที่ 8 ผลการทดลองการติดสีข้อมในเนื้อเยื่อต่อมน้ำลายกหนู (parotid salivary gland) ของลิง  
ชวา (*Manis javanica*)

| ชนิดสีข้อม      | ชนิดเซลล์คัดหลั่ง |              |           |
|-----------------|-------------------|--------------|-----------|
|                 | Mucous cells      | Serous cells | GCT ducts |
| AB pH 2.5       | 2                 | 0            | 0         |
| PAS             | 2                 | 1            | 1         |
| AB pH 2.5 - PAS | 3                 | 1            | 1         |
| Con A           | 1                 | 4            | 3         |
| UEA - I         | 0                 | 1            | 4         |
| SBA             | 0                 | 2            | 2         |
| DBA             | 1                 | 4            | 4         |
| PNA             | 0                 | 3            | 1         |
| WGA             | 3                 | 2            | 1         |

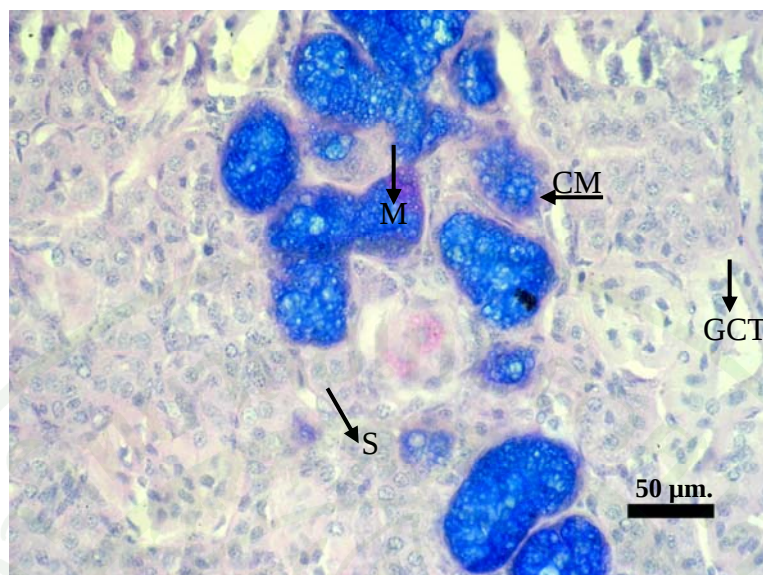
ผลการข้อมด้วยเทคนิคเนื้อเยื่อทางเคมีโดยใช้ AB pH 2.5 พบว่าบริเวณ mucous cells ติดสีฟ้าน้ำเงินปานกลาง แสดงให้เห็นถึงการมี acid glycoconjugates บรรจุปานกลาง ขณะที่บริเวณ serous cells และ granular convoluted tubule (GCT ducts) ข้อมไม่ติดสี (ภาพที่ 45) ผลการข้อมด้วย PAS พบว่าบริเวณ mucous cells มีการติดสีชมพูอมแดงปานกลาง cell membrane ติดสีชมพูอมแดงเข้ม และบริเวณ serous cells กับ granular convoluted tubule (GCT ducts) มีการติดสีเพียงเล็กน้อย ทุกบริเวณติดสีมากน้อยต่างกัน ดังนั้นปริมาณของ vicinal diol groups glycoconjugates ก็ต่างกันตามตำแหน่งที่พบ (ภาพที่ 46) ผลการข้อมด้วย AB pH 2.5 และข้อมต่อด้วย PAS พบว่าบริเวณ mucous cells ติดสีน้ำเงินอมม่วงเข้ม ซึ่งความโดดเด่นของสีทำให้ทราบว่าปริมาณของ acid glycoconjugates เป็นจำนวนมาก และบริเวณของ cell membrane ติดสีชมพูเพียงเล็กน้อย แสดงให้เห็นถึงการมี neutral glycoconjugates เพียงเล็กน้อย ขณะที่บริเวณ serous cells และ granular convoluted tubule (GCT ducts) ข้อมติดสีเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 47)



ภาพที่ 45 ผลการติดสี AB pH 2.5 ในต่อมน้ำลายกหนู (parotid salivary gland) โดย mucous cells (M) มีการติดสีฟ้าน้ำเงินปานกลาง เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ serous cells (S) และ granular convoluted tubule (GCT ducts) พบว่าไม่มีการติดสีเลย

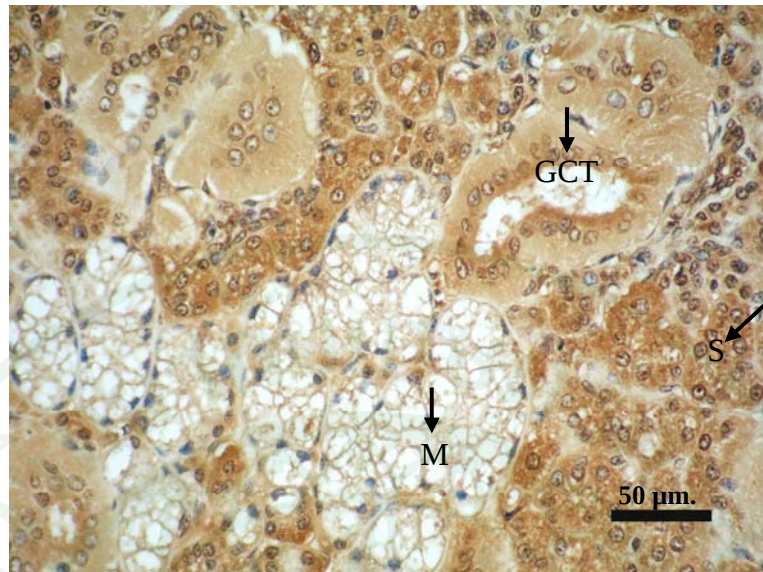


ภาพที่ 46 ผลการติดสี PAS ในต่อมน้ำลายกหนู (parotid salivary gland) พบว่าบริเวณ mucous cells (M) ติดสีชมพูอมแดงปานกลางขณะที่ cell membrane (CM) ติดสีชมพูอมแดงเข้มและบริเวณ serous cells (S) กับ granular convoluted tubule (GCT ducts) มีการติดสีเพียงเล็กน้อย

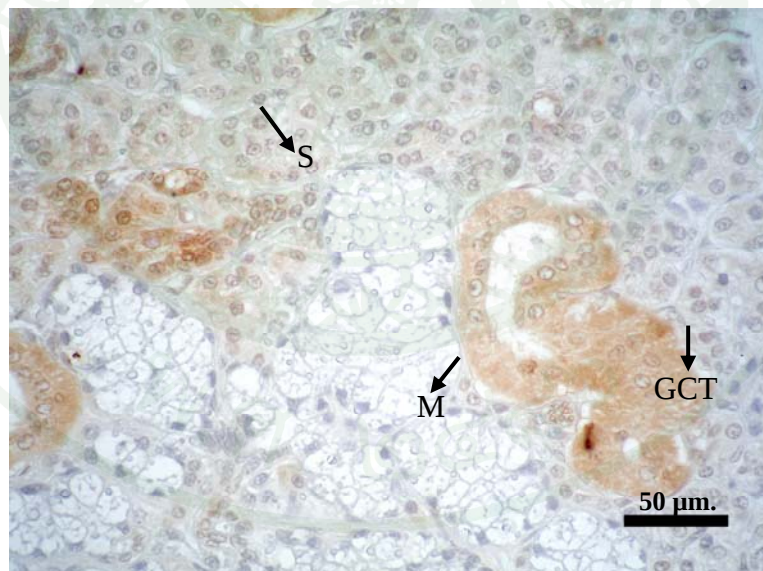


ภาพที่ 47 ผลการติดสี AB pH 2.5 - PAS ในต่อมน้ำลายกหนู (parotid salivary gland) พบบริเวณ mucous cells (M) ติดสีน้ำตาลอมม่วงเข้ม และบริเวณของ cell membrane (CM) ติดสีชมพูเพียงเล็กน้อยขณะที่บริเวณ serous cells (S) และ granular convoluted tubule (GCT ducts) ข้อมติดสีเพียงเล็กน้อย

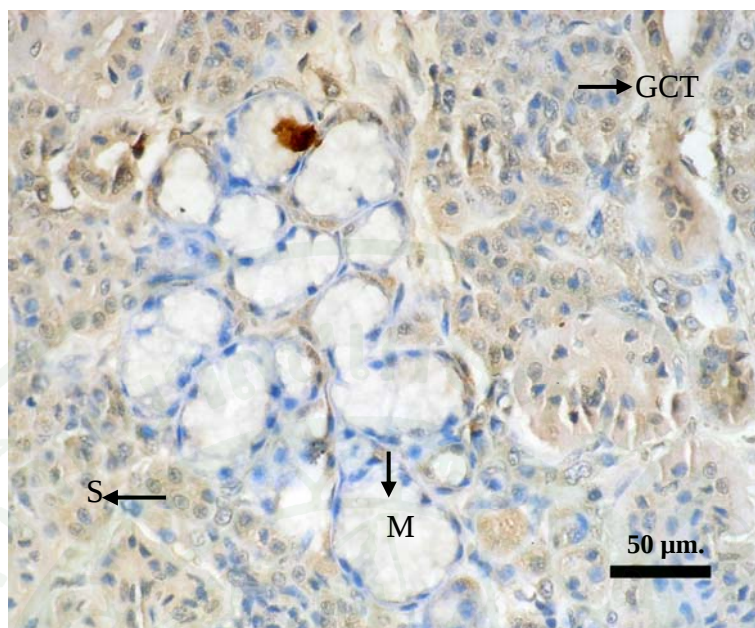
จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลายน้ำลายกหนู (parotid salivary gland) ลิ่นขาว (*Manis javanica*) ด้วยเทคนิคเนื้อเยื่อทางเคมีโดยใช้สาร lectins 6 ชนิดผลการทดลองด้วยสาร lectins Con A พบว่าบริเวณ mucous cells ติดสีน้ำตาลเพียงเล็กน้อย ขณะที่บริเวณ serous cells ติดสีน้ำตาลเข้มมาก และบริเวณ granular convoluted ducts (GCT ducts) ติดสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 48) ผลการทดลองด้วยสาร lectins UEA - I พบว่าบริเวณ mucous cells ข้อมไม่ติดสีเมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ serous cells มีการติดสีน้ำตาลเล็กน้อย ขณะที่บริเวณ GCT ducts ติดสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 49) ผลการทดลองด้วยสาร lectins SBA พบว่าบริเวณ mucous cells ไม่มีการติดสีขณะที่บริเวณ serous cells และ GCT ducts มีการติดสีน้ำตาลปานกลาง (ภาพที่ 50) ผลการทดลองด้วยสาร lectins DBA พบว่าบริเวณ mucous cells ติดสีน้ำตาลเพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ serous cells และ GCT ducts มีการติดสีน้ำตาลเข้มมาก (ภาพที่ 51) ผลการทดลองด้วยสาร lectins PNA พบว่าบริเวณ mucous cells ไม่มีการติดสีเลย เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ serous cells ติดสีน้ำตาลเข้ม และ GCT ducts มีการติดสีน้ำตาลเล็กน้อย (ภาพที่ 52) ผลการทดลองด้วยสาร lectins WGA พบว่าบริเวณ mucous cells มีการติดสีน้ำตาลเข้ม ขณะที่บริเวณ serous cells ติดสีน้ำตาลปานกลางและบริเวณ GCT ducts ติดสีน้ำตาลเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 53)



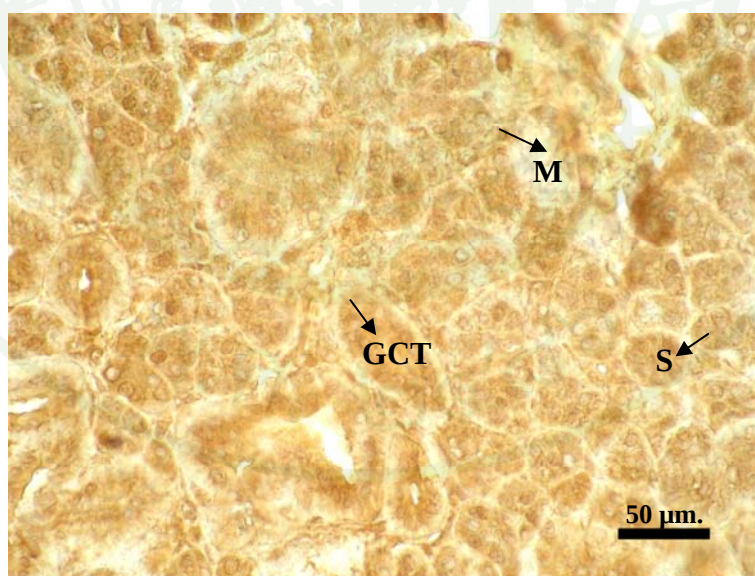
ภาพที่ 48 ผลการติดสี Lectins Con A ในต่อมน้ำลายกกหู (parotid salivary gland) พบว่าบริเวณ mucous cells (M) มีการติดสีเพียงเล็กน้อยขณะที่บริเวณ serous cells (S) ติดสีน้ำตาลเข้ม มาก และ granular convoluted tubule (GCT ducts) ติดสีน้ำตาลเข้ม



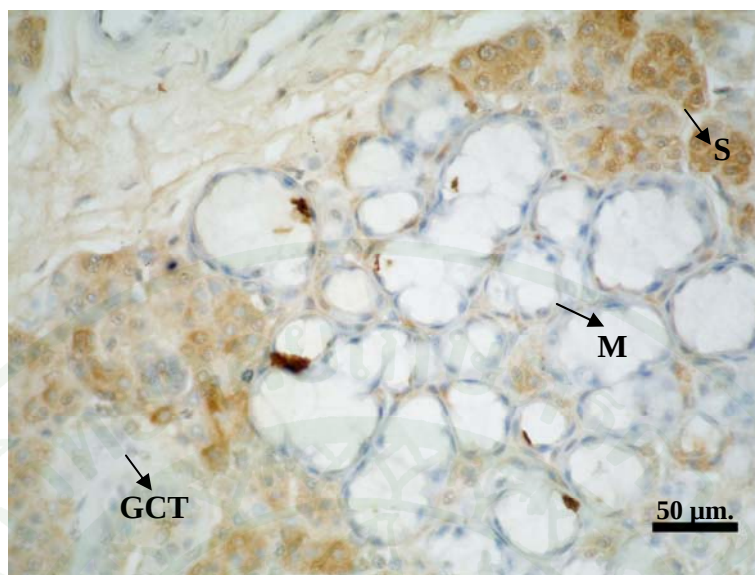
ภาพที่ 49 ผลการติดสี Lectins UEA - I ในต่อมน้ำลายกกหู (parotid salivary gland) พบบริเวณ mucous cells (M) ไม่มีการติดสีของ lectins เมื่อเทียบกับบริเวณ serous cells (S) พบมีการติดสีน้ำตาลปานกลางขณะที่ granular convoluted tubule (GCT ducts) ติดสีน้ำตาลเข้ม



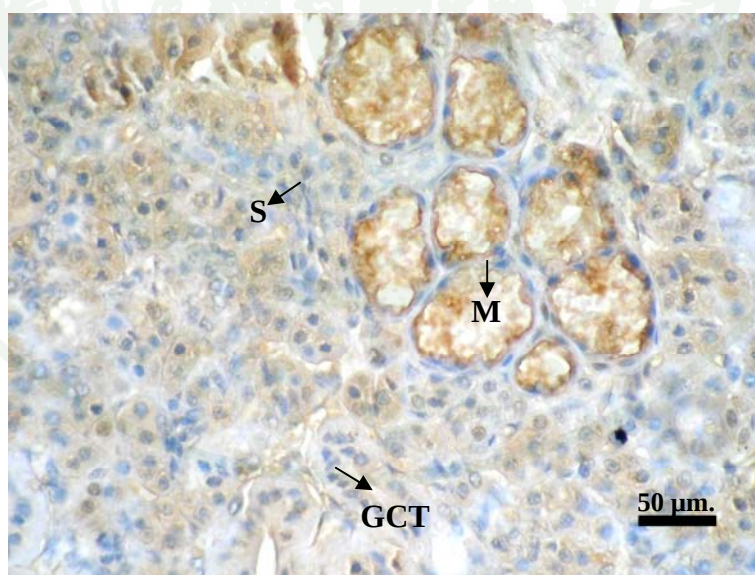
ภาพที่ 50 ผลการติดสี Lectins SBA ในต่อมน้ำลายกหนู (parotid salivary gland) พบว่าบริเวณ mucous cells (M) ไม่มีการติดสีเมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ serous cells (S) และ granular convoluted tubule (GCT ducts) มีการติดสีน้ำตาลปานกลาง



ภาพที่ 51 ผลการติดสี Lectins DBA ของต่อมน้ำลายกหนู (parotid salivary gland) พบบริเวณ mucous cells (M) มีการติดสีน้ำตาลเพียงเล็กน้อยขณะที่บริเวณ serous cells (S) และ granular convoluted tubule (GCT ducts) มีการติดสีน้ำตาลเข้มมาก



ภาพที่ 52 ผลการติดสี Lectins PNA ของต่อมน้ำลายกหนู (parotid salivary gland) พบว่าบริเวณ mucous cells (M) ไม่มีการติดสีเลย เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ serous cells (S) ติดสีน้ำตาลเข้มและ granular convoluted tubule (GCT ducts) มีการติดสีน้ำตาลเล็กน้อย



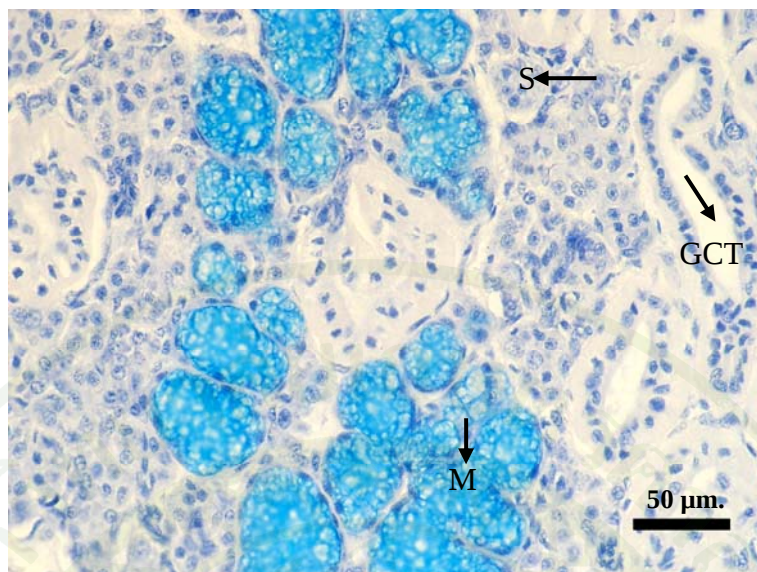
ภาพที่ 53 ผลการติดสี Lectins WGA ในต่อมน้ำลายกหนู (parotid salivary gland) พบว่าส่วน mucous cells (M) ติดสีน้ำตาลเข้ม ขณะที่ serous cells (S) ติดสีน้ำตาลปานกลางและ granular convoluted tubule (GCT ducts) ติดสีน้ำตาลเล็กน้อย

จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลายขากรรไกร (mandibular salivary gland) ถิ่นสายพันธุ์ชวา (*Manis javanica*) โดย (1) ใช้เอนไซม์ neuraminidase เข้ามาย่อย และนำตัวอย่างย้อมต่อด้วย AB pH 2.5 (2) ใช้เอนไซม์ neuraminidase เข้ามาย่อยและย้อมต่อด้วย สาร lectins PNA (ตารางที่ 9)

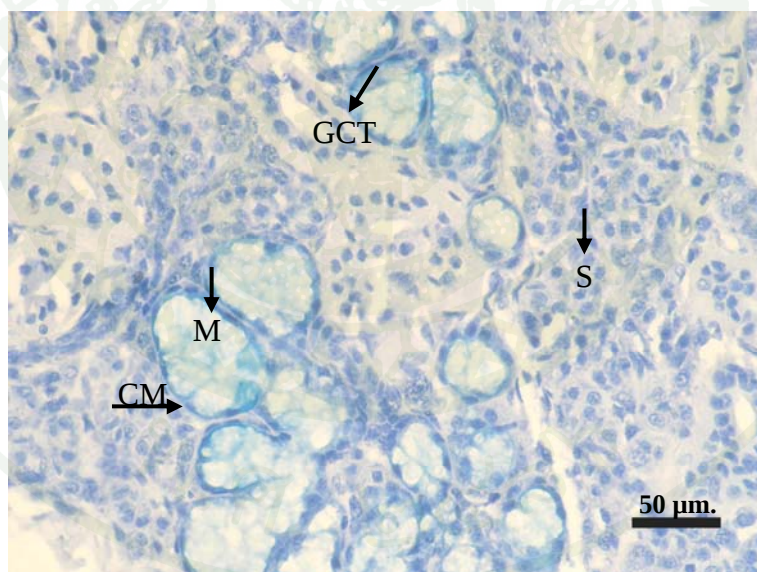
**ตารางที่ 9** ผลการย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมต่อด้วย Alcian Blue pH 2.5 และ lectins PNA ในต่อมน้ำลายกกหู (parotid salivary gland) ของถิ่นชวา (*Manis javanica*)

| เอนไซม์และย้อม  | ชนิดเซลล์คัดหลั่ง |              |             |
|-----------------|-------------------|--------------|-------------|
|                 | Mucous cell       | Serous cells | GCT (Ducts) |
| AB pH 2.5       | 3                 | 0            | 0           |
| Neu - AB pH 2.5 | 1                 | 0            | 0           |
| PNA             | 0                 | 3            | 1           |
| Neu - PNA       | 3                 | 2            | 1           |

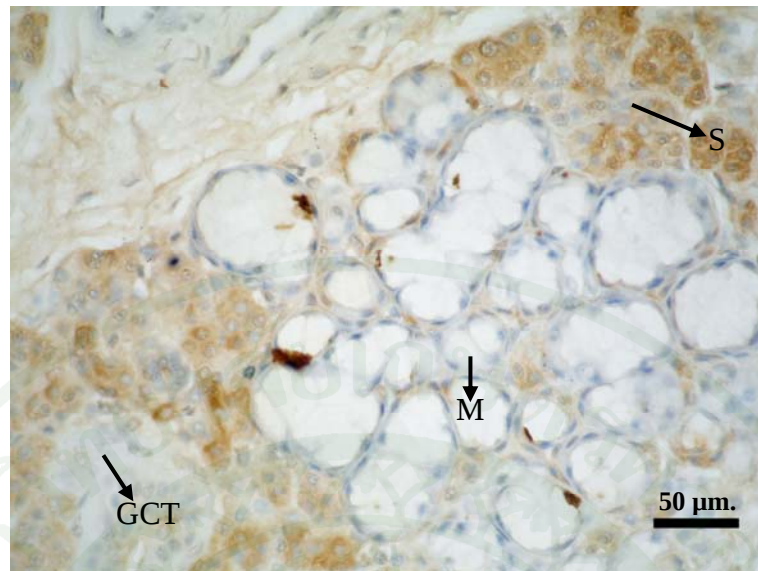
ผลการทดลองพบว่าตัวอย่างที่ไม่ย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมต่อด้วย AB pH 2.5 พบว่าบริเวณ mucous cells ติดสีฟ้าน้ำเงินเข้มแสดงว่ามีปริมาณ acid glycoconjugates เป็นจำนวนมากขณะที่บริเวณ serous cells และ granular convoluted tubule (GCT ducts) ไม่ติดสี (ภาพที่ 54) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมต่อด้วย AB pH 2.5 ผลการทดลองพบว่าบริเวณ mucous cells ติดสีฟ้าจางขณะที่ cell membrane ยังคงติดสีฟ้าเข้ม ส่วนบริเวณ serous cells และ granular convoluted tubule (GCT ducts) ย้อมไม่ติดสี AB pH 2.5 เนื่องจากไม่สามารถย้อมติดกับหมู่คาร์บอกซิลในโมเลกุลของ sialic acid (ภาพที่ 55) ผลการทดลองตัวอย่างที่ไม่ใช้เอนไซม์ neuraminidase และย้อมต่อด้วยสาร lectins PNA พบว่าบริเวณ mucous cells ไม่ติดสีแต่บริเวณ serous cells ติดสีน้ำตาลเข้มและบริเวณ granular convoluted tubule (GCT ducts) ติดสีน้ำตาลเล็กน้อย (ภาพที่ 56) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมต่อด้วย lectins PNA พบว่า บริเวณ mucous cells มีการติดสีน้ำตาลเข้มขึ้น บริเวณ serous cells ติดสีน้ำตาลปานกลาง และ granular convoluted tubule (GCT ducts) ไม่ติดสี (ภาพที่ 57)



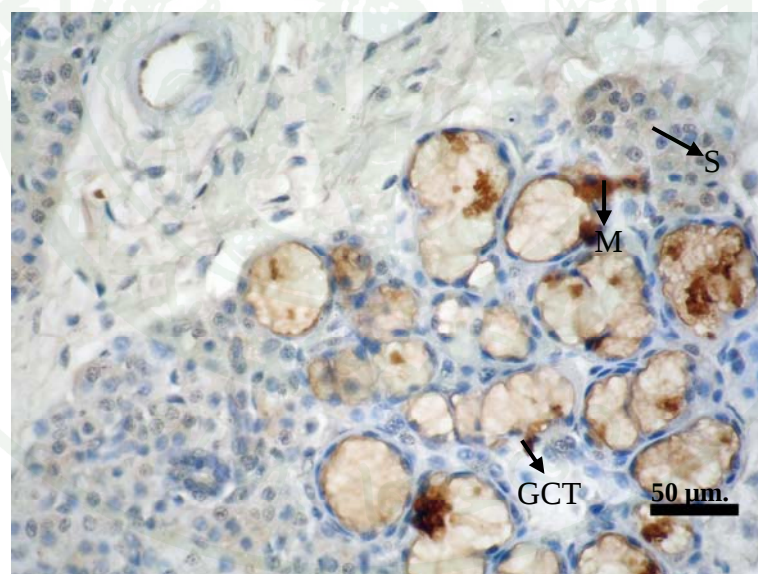
ภาพที่ 54 ผลการติดสี AB pH 2.5 ในต่อมน้ำลายกหนู (parotid salivary gland) โดยไม่ย้อมด้วยเอนไซม์ neuraminidase บริเวณ mucous cells (M) ติดสีฟ้าน้ำเงินเข้ม



ภาพที่ 55 ผลการย้อมด้วยเอนไซม์ neuraminidase และเชื่อมต่อด้วย AB pH 2.5 ในต่อมน้ำลายกหนู (parotid salivary gland) พบว่าบริเวณ mucous cells (M) มีการติดสีฟ้าจางลง



ภาพที่ 56 ผลการติดสี Lectins PNA ของต่อมน้ำลายกกหู (parotid salivary gland) โดยไม่ย่อยด้วย เอนไซม์ neuraminidase พบว่าบริเวณ mucous cells (M) ไม่มีการติดสีเลย



ภาพที่ 57 ผลการย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมติดด้วย Lectins PNA ในต่อมน้ำลายกกหู (parotid salivary gland) พบว่าภายหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase บริเวณ mucous cells (M) มีการติดน้ำตาลเข้มขึ้นชัดเจน

## สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลายลิ้นขวา (*Manis javanica*) ทั้ง 3 ต่อมหลัก พบว่าต่อมน้ำลาย sublingual salivary gland ประกอบด้วย 2 lobe ตัวต่อมวางตัวได้ลิ้นและขนานไปกับลิ้น มองด้วยตาเปล่าเนื้อต่อมสามารถแบ่งออกเป็น 2 บริเวณ คือบริเวณ anterior เนื้อต่อมมีสีเข้ม ขณะที่บริเวณ posterior เนื้อต่อมมีสีขาวขุ่น เมื่อเปรียบเทียบกับต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland พบมีขนาดใหญ่สุดประกอบด้วย 2 lobe ตัวต่อมวางตัวอยู่ด้านล่างของกระดูกขากรรไกร (mandible) ทอดยาวจนถึงตอนต้นของกระดูกซี่โครง (rib) และมีกล้ามเนื้อ (tongue muscle) กั้นกลางระหว่างต่อมทั้ง 2 lobe ลักษณะเนื้อต่อมมีสีขาวขุ่นทั่วทั้งต่อม และจากพฤติกรรมในการกินอาหารทำให้พบว่าต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland มีการเจริญดีมาก โดยต่อมมีขนาดที่ใหญ่กว่าต่อมน้ำลายชนิดอื่น สอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ใน เม่น คูน และ Armadillo ที่พบว่าต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland มีขนาดใหญ่และเจริญดีมากเช่นกัน (Shackleford and Wilborn, 1969) ขณะที่ต่อมน้ำลาย parotid salivary gland ของลิ้นขวา (*Manis javanica*) พบมีขนาดเล็กสุดประกอบด้วย 2 lobe ตัวต่อมวางตัวอยู่บริเวณด้านหลังของกกหูเพียงเล็กน้อย โดยมีต่อมน้ำเหลืองกั้นระหว่างต่อมน้ำลาย parotid salivary gland และต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไปพบว่าต่อมน้ำลาย parotid salivary gland มีขนาดใหญ่โดยเฉพาะในสัตว์ที่กินพืช (herbivores) เช่น สัตว์ฟันแทะ หรือ สัตว์เคี้ยวเอื้อง (Stevens and Hume, 1995) ขณะที่ในลิ้นขวา (*Manis javanica*) ต่อมน้ำลาย parotid salivary gland มีขนาดเล็ก เนื่องจากเป็นสัตว์กินมดและแมลง (insectivores) ทำให้ต่อมน้ำลายชนิดนี้ไม่ได้ขยายตัวใหญ่เหมือนสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไป

จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลายลิ้นซ้ายพันธุ์ขวา (*Manis javanica*) เพื่อดูโครงสร้างของเซลล์ทั่วไปโดยการย้อมด้วย Hematoxylin และ Eosin (H&E) ผลการศึกษาพบว่าลักษณะต่อมน้ำลาย ทั้ง 3 ต่อมหลัก เป็นแบบ tubuloacinar gland เป็นต่อมน้ำลายขนาดใหญ่ที่มีเซลล์คัดหลั่งทั้งแบบเป็นท่อ (tubular) และกระเปาะ (acinar) ผลการทดลองพบเซลล์คัดหลั่งของต่อมน้ำลาย sublingual salivary gland ของลิ้นขวา (*Manis javanica*) แบ่งออกเป็น 2 บริเวณ โดยมี connective tissues บาง ๆ กั้นแยกไว้คือ บริเวณ anterior เซลล์คัดหลั่งประกอบด้วย mucous cells และ serous demilunes โดย serous demilunes ลักษณะเซลล์เป็นเซลล์

ทรงกลม นิวเคลียสกลมอยู่ตรงกลางเซลล์และมองเห็น lumen ไม่ชัดเจน ขณะที่ mucous cells จะมี lumen ที่เห็นได้ชัดเจนกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ posterior เซลล์คัดหลั่งประกอบด้วย mucous cells เป็นจำนวนมาก มองไม่เห็น lumen ความแตกต่างของ mucous cells ทั้ง 2 บริเวณ อยู่จากการติดสี Eosin ในไซโตพลาสซึมที่ต่างกันโดยที่บริเวณ anterior ส่วน mucous cells ติดสี Eosin เข้มกว่าขณะที่ mucous cells ในบริเวณ posterior ย้อมไม่ติดสี Eosin เนื่องจากว่า mucin ได้ละลายออกไปในขบวนการทำ preparation เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไป เช่น ในคน ลิง วัว แกะ สุกร และ หนู Hoary bamboo (Kimura *et al.*, 1998) พบว่าเซลล์คัดหลั่งของต่อมน้ำลาย sublingual salivary gland ทั้งต่อมประกอบด้วย mucous cells และ serous demilunes ในปริมาณที่แตกต่างกัน และไม่มีการแบ่งแยกออกเป็นบริเวณ anterior หรือ posterior แต่อย่างใด ดังนั้นการพบ mucous cells เป็นจำนวนมากในต่อมน้ำลาย sublingual salivary gland ของลิงชะวา (*Manis javanica*) จะสัมพันธ์กับการที่มันไม่มีฟัน ดังนั้นจำเป็นต้องใช้ลิ้นช่วยในการกินอาหาร ทำให้ต่อมน้ำลายชนิดนี้หลั่งสารเมือกข้นออกมามากมายเพื่อช่วยให้กินอาหารได้สะดวกรวดเร็ว และง่ายขึ้นขณะที่ serous demilunes จะหลั่งสารลักษณะใสออกมาเพื่อช่วยในขบวนการกินอาหารด้วย และ striated ducts มีการเจริญเหมือนสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไปลักษณะเซลล์เป็นแบบ simple cuboidal epithelium หรือ simple columnar epithelium

จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland ของลิงสายพันธุ์ชะวา (*Manis javanica*) โดยการย้อมด้วย Hematoxylin และ Eosin (H&E) เพื่อดูโครงสร้างทั่วไป ผลการศึกษาพบว่าเซลล์คัดหลั่งประกอบด้วย mucous cells เป็นจำนวนมาก ซึ่งสัมพันธ์กับพฤติกรรมการกินอาหารของลิงชะวา (*Manis javanica*) โดยสารคัดหลั่งจะมีลักษณะเหนียวข้นทำให้จับกินอาหารได้ง่าย สอดคล้องกับการรายงานในตุ่น (*Tachyglossus aculeatus*) (Young and Van Lennep, 1978) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์คัดหลั่งของต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไป พบว่าประกอบด้วย mucous cells, serous cells หรือ seromucous cells หลั่งสารทั้งลักษณะใสและลักษณะข้นปนกัน ซึ่งพบใน แมว (Leppi *et al.*, 1967), สุนัข (Leppi *et al.*, 1967; Miyazaki, 1972; Reifel and Travill, 1972), คน (Harrison *et al.*, 1987), ม้า (Gargiulo *et al.*, 1993), หนู Hoary bamboo (Kimura *et al.*, 1998) และกระเจง (Adnyane *et al.*, 2006)

จากการศึกษา striated ducts ของต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland ของลิงสายพันธุ์ชะวา (*Manis javanica*) พบเจริญเพียงเล็กน้อยโดยโครงสร้างของ ducts มีลักษณะเหมือนกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไปลักษณะเซลล์เป็นแบบ simple cuboidal epithelium หรือ low columnar

epithelium (สมชัย, 2524) สอดคล้องกับการพบในคูน (*Tachyglossus aculeatus*) (Young and Van Lennep, 1978) เมื่อเปรียบเทียบกับกรายงานในสัตว์ฟันแทะ (Flon *et al.*, 1970 ; Gresik *et al.*, 1996), เม่น (*Erinaceus europaeus*) (Tandler and Mac Callum, 1974) และใน House musk shrew (*Suncus murinus*) (Suprasert *et al.*, 2001) พบว่า striated ducts จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็น ducts ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นลักษณะท่อขดม้วนเรียกว่า granular ducts หรือ granular convoluted tubule (GCT ducts) จากการรายงานในต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland ของหนู mouse พบว่าบริเวณ GCT ducts มีความเกี่ยวข้องในการผลิตสารฮอร์โมนบางชนิดที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการโต้ตอบทางพฤติกรรม (pheromone) เพื่อสื่อความหมายบางประการต่อสัตว์ชนิดเดียวกัน (Materazzi, 1967) และจากการรายงานของ Mori *et al.* (1992) พบว่า GCT ducts ในต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland ของหนู mouse มีการผลิต Epidermal growth factor (EGF) โดยพบว่าสารชนิดนี้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนเซลล์ epidermal และ epithelial tissue ซึ่งเชื่อว่าจะช่วยในกระบวนการหายของแผลทำให้แผลหายเร็วขึ้น

จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมน้ำลาย parotid salivary gland ของลิงชวา (*Manis javanica*) โดยการย้อมด้วย Hematoxylin และ Eosin (H&E) เพื่อดูโครงสร้างทั่วไป ผลการศึกษาพบว่าเซลล์คัดหลั่งแบ่งออกเป็น 2 บริเวณ คือ บริเวณ anterior ประกอบด้วย serous cells เป็นจำนวนมาก ขณะที่บริเวณ posterior ประกอบด้วย serous cells และ mucous cells (seromucous cells) โดยพบกลุ่ม mucous cells เล็กน้อยแทรกปนกับ serous cells ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานในแมว (Young and van Lennep, 1978) และในค่างขาว (Tandler *et al.*, 1997) ที่พบว่าเซลล์คัดหลั่งประกอบด้วย seromucous cells การพบ serous cells ในต่อมน้ำลาย parotid salivary gland ของลิงชวา (*Manis javanica*) เป็นจำนวนมากทำให้ทราบได้ว่าการผลิตสารคัดหลั่งที่มีลักษณะเหลวใสมากมาย ซึ่งจะช่วยในการย่อยและทำให้อาหารนั้นอ่อนตัวลง ขณะเดียวกันยังพบ mucous cells เป็นกลุ่มเล็ก ๆ จำนวนน้อยที่หลังสารลักษณะเหนียวขึ้นออกมาด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์คัดหลั่งของต่อมน้ำลาย parotid salivary gland ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไป พบว่าเซลล์คัดหลั่งประกอบด้วย serous cells เพียงชนิดเดียว ดังนั้นจึงมีการหลั่งเฉพาะสารลักษณะใสที่ช่วยในการย่อยอาหารเท่านั้น พบใน สุกร (Jerry and Wilborn, 1977), ม้า (Gargiulo *et al.*, 1993), หนู Hoary bamboo (Kimura *et al.*, 1998), หนู mice (Young *et al.*, 2004) และ กระเจิง (Adnyane *et al.*, 2006)

จากการศึกษาของ granular convoluted tubule (GCT ducts) ในต่อมน้ำลาย parotid salivary gland ของลิ้นจาว (*Manis javanica*) พบว่าทั้งบริเวณ anterior และบริเวณ posterior พบ GCT ducts เป็นจำนวนมาก ลักษณะท่อขดม้วน (convoluted tubule) โดยท่อมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างมาจาก striated ducts กลายเป็น ducts ที่มีขนาดใหญ่เรียกว่า modified striated ducts หรือ granular convoluted tubule (GCT ducts) ซึ่งสอดคล้องกับการพบในต่อมน้ำลาย parotid salivary gland ของค่างคาว (*Desmodus rotundus*) (Junqueira and Fava - De Moraes, 1965), เม่น (*Erinaceus europaeus*) (Henriksen, 1972 ; Tandler and Mac Callum, 1974) และ ลิง (*Ateles paniscus*) (Young and Van Lennep, 1978) บทบาทของ granular ducts หรือ granular convoluted tubule (GCT) ในต่อมน้ำลาย parotid salivary gland เกี่ยวข้องกับการขนส่งของน้ำและไอออนต่างๆ เพื่อปรับองค์ประกอบที่เป็นอิเล็กโทรไลต์ของน้ำลาย ซึ่งมีหน้าที่สอดคล้องกับ striated ducts (Young and Van Lennep, 1978)

จากการศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์โดยการใช้เทคนิคเนื้อเยื่อเคมีเพื่อศึกษาไกลโคคอนจูเกตในต่อมน้ำลาย sublingual salivary gland ของลิ้นจาว (*Manis javanica*) โดยการย้อมด้วย Alcian Blue (AB pH 2.5) ผลการศึกษาพบว่าบริเวณ anterior ที่ประกอบด้วย mucous cells และ serous demilunes พบว่าส่วน mucous cells พบปริมาณ acid glycoconjugates เพียงเล็กน้อย ขณะที่ serous demilunes และ striated ducts ไม่มี acid glycoconjugates เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ posterior ส่วน mucous cells พบว่ามีปริมาณของ acid glycoconjugates เป็นจำนวนมาก ดังนั้นความแตกต่างของปริมาณ acid glycoconjugates น่าจะเกิดจากการความกว้างของ lumen สังเกตจากการที่บริเวณที่มีปริมาณ acid glycoconjugates น้อย lumen จะกว้าง ขณะที่บริเวณที่มี acid glycoconjugates ปริมาณมาก lumen จะแคบ และสังเกตได้ว่าบริเวณ cell membrane ของเซลล์คัดหลั่งพบปริมาณ acid glycoconjugates ที่มากกว่าตำแหน่งอื่น ๆ ซึ่งเชื่อว่าน่าจะบทบาทเกี่ยวข้องกับการยึดติดกับเซลล์ข้างเคียง (Spicer and Schulte, 1992) ขณะที่ striated ducts ไม่มี acid glycoconjugates บรรจุนอยู่

ผลการย้อมด้วย Periodic acid - Schiff (PAS) ในต่อมน้ำลาย sublingual salivary gland ของลิ้นจาว (*Manis javanica*) พบว่าบริเวณ anterior ส่วน mucous cells บรรจุนด้วย vicinal diol groups glycoconjugates จำนวนมาก สอดคล้องกับการรายงานในหนู Hoary bamboo (Kimura *et al.*, 1998) และ Armadillo (*Zaedyus pichiy*) (Estecondo *et al.*, 2005) ขณะที่บริเวณ serous demilunes และ striated ducts พบ vicinal diol groups glycoconjugates เพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ posterior ส่วน mucous cells ของลิ้นจาว (*Manis javanica*) พบ vicinal

diol groups glycoconjugates ปานกลาง ขณะที่บริเวณ cell membrane ของ mucous cells พบปริมาณมาก และ striated ducts มีการแพร่กระจายเพียงเล็กน้อย และผลการย้อมด้วย AB pH 2.5 - PAS ในต่อมน้ำลาย sublingual salivary gland ของลิ้นชวา (*Manis javanica*) พบมีการติดของสีย้อมทั้งสองชนิดโดยพบว่าบริเวณ anterior ส่วน mucous cells มี neutral glycoconjugates เพิ่มขึ้นขณะที่ acid glycoconjugates ลดลง และ serous demilunes พบเพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ posterior ส่วน mucous cells พบปริมาณของ neutral glycoconjugates ลดลง ขณะเดียวกัน acid glycoconjugates มีแนวโน้มเพิ่มปริมาณมากขึ้น

จากการศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์โดยการใช้เทคนิคเนื้อเยื่อเคมีเพื่อศึกษาไกลโคคอนจูเกตในต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland ของลิ้นชวา (*Manis javanica*) โดยการย้อมด้วย Alcian Blue (AB pH 2.5) ผลการศึกษาพบว่าบริเวณ mucous cells บรรจุด้วย acid glycoconjugates จำนวนมาก สอดคล้องกับการรายงานใน ลิง (*Cercopithecus aethiops*) (Jacobsen, 1973), House musk shrew (*Suncus murinus*) (Suprasert *et al.*, 2001), วัว และ แพะ (สหเทพ และ อภินันท์, 2547) และ Armadillo (*Zaedyus pichiy*) (Estecondo *et al.*, 2005) ซึ่งพบว่าบริเวณ mucous cells มี acid glycoconjugates แพร่กระจายเป็นจำนวนมาก และเมื่อเปรียบเทียบกับย้อมด้วย Periodic acid - Schiff (PAS) ในต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland ของลิ้นชวา (*Manis javanica*) พบว่าบริเวณ mucous cells มี vicinal diol groups glycoconjugates บรรจุปริมาณมาก โดยการพบทั้ง acid และ vicinal diol groups glycoconjugates จะสัมพันธ์กับพฤติกรรมในการกินอาหาร ที่จำเป็นต้องมีสารไกลโคคอนจูเกตช่วยในการกวาดกินอาหารได้คราวละมากขึ้น สอดคล้องกับการรายงานในหนู Hoary bamboo (Kimura *et al.*, 1998), House Musk Shrew (*Suncus murinus*) (Suprasert *et al.*, 2001) วัว และ แพะ (สหเทพ และ อภินันท์, 2547) และผลการย้อมด้วย AB pH 2.5 - PAS พบว่าบริเวณ mucous cells พบปริมาณของ acid glycoconjugates เพิ่มขึ้นขณะที่ neutral glycoconjugates น่าจะมีแนวโน้มลดปริมาณลง แต่จะพบปริมาณ acid และ neutral glycoconjugates เค้นซัดที่ cell membrane ซึ่งเชื่อว่าเกี่ยวข้องกับการ differentiation ของเซลล์ (Spicer and Schulte, 1992)

จากการศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์โดยการใช้เทคนิคเนื้อเยื่อเคมีเพื่อศึกษาไกลโคคอนจูเกตในต่อมน้ำลาย parotid salivary gland ของลิ้นชวา (*Manis javanica*) โดยรายงานเฉพาะบริเวณ posterior ที่ประกอบด้วยเซลล์ค้ำหลังทั้ง serous cells และ mucous cells (seromucous cells) ซึ่งจากการย้อมด้วย Alcian Blue (AB pH 2.5) พบว่าบริเวณ mucous cells มีปริมาณ acid glycoconjugates จำนวนมาก ขณะที่บริเวณ serous cells และ granular convoluted tubule (GCT

ducts) ไม่พบ การที่ไม่พบปริมาณ acid glycoconjugates ในบริเวณ serous cells สอดคล้องกับการรายงาน Armadillo (*Zaedyus pichiy*) (Estecondo *et al.*, 2005) เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาด้วย Periodic acid - Schiff (PAS) ในต่อมน้ำลาย parotid salivary gland ของลิงพันธุ์ชวา (*Manis javanica*) พบว่าบริเวณ mucous cells มี vicinal diol groups glycoconjugates ปานกลาง และมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นในบริเวณ cell membrane ขณะที่บริเวณ serous cells และ granular convoluted tubule (GCT ducts) พบเพียงเล็กน้อย และผลการย้อมด้วย AB pH 2.5 - PAS ในต่อมน้ำลาย parotid salivary gland ของลิงชวา (*Manis javanica*) พบว่าบริเวณ mucous cells มีปริมาณ acid glycoconjugates จำนวนมาก ขณะที่ neutral glycoconjugates พบเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ serous cells และ striated ducts พบ acid กับ neutral glycoconjugates เล็กน้อย

ผลการศึกษาด้วยเทคนิคเนื้อเยื่อเคมีในต่อมน้ำลายทั้ง 3 ต่อมหลักของลิงชวา (*Manis javanica*) พบสารไกลโคคอนจูเกตพวก vicinal diol groups, acid glycoconjugates และ neutral glycoconjugates แพร่กระจายในบริเวณเซลล์คัดหลั่ง mucous cells โดยสารไกลโคคอนจูเกตที่ถูกผลิตออกมามากมาย จะสัมพันธ์กับพฤติกรรมในการกินอาหาร โดยลิงชวาจะใช้ลิ้นกวาดกินอาหารได้จำนวนมากขึ้น และสารไกลโคคอนจูเกตยังมีบทบาทช่วยให้อาหารเกาะตัวเป็นกลุ่ม ก้อนง่ายในการกลืนไม่ทำให้เสียพลังงานเกิดอันตรายต่อเซลล์เยื่อบุผิวของระบบทางเดินอาหาร ในขณะที่ลูกเคี้ยวและเมื่ออาหารเคลื่อนที่ (Nieuw Amerongen *et al.*, 1995) ขณะที่บริเวณ cell membrane ของเซลล์คัดหลั่ง mucous cells พบสารไกลโคคอนจูเกตมากมาย ซึ่งเชื่อว่ามีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเชื่อมติดกันระหว่างเซลล์ หรือยึดติดกับเซลล์ข้างเคียง และเกี่ยวข้องกับการ differentiation ของเซลล์ (Spicer and Schulte, 1992)

จากการศึกษาด้วยเทคนิคเนื้อเยื่อทางเคมีโดยใช้สาร lectins เพื่อต้องการหาอนุพันธุ์ของน้ำตาล โดยใช้สาร lectins 7 ชนิดได้แก่ Concanavalin A (Con A), *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA), Peanut agglutinin (PNA), *Ricinus communis* agglutinin - I (RCA - I), Soy bean agglutinin (SBA), *Ulex europaeus* agglutinin - I (UEA - I) และ Wheat germ agglutinin (WGA) ผลการศึกษาด้วยสาร lectins ในต่อมน้ำลาย sublingual salivary gland ของลิงชวา (*Manis javanica*) พบว่า mucous cells ทั้ง 2 บริเวณ บรรจุน้ำตาล mannose, Galactosyl ( $\beta \rightarrow 4$ ) N - acetylglucosamine ขณะที่การพบอนุพันธุ์น้ำตาล N - acetylglucosamine, fucose และ N - acetylgalactosamine สอดคล้องกับการรายงานในม้า (Gargiulo *et al.*, 1993) และในหนู Hoary

Bamboo (Kimura *et al.*, 1998) เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ serous demilunes ของลิ้นชาว (*Manis javanica*) พบอนุพันธู์น้ำตาล mannose, N - acetylgalactosamine, Galactosyl ( $\beta \rightarrow 4$ ) N - acetylglucosamine, fucose และ N - acetylglucosamine ขณะที่การรายงานในม้ของ Gargiulo *et al.* (1993) พบอนุพันธู์น้ำตาล N - acetylgalactosamine บรรจุใน serous cells และการรายงานในหนุ Hoary bamboo ของ Kimura *et al.* (1998) พบอนุพันธู์น้ำตาล fucose และ N - acetylglucosamine บรรจุใน serous cells

จากการศึกษาด้วยเทคนิคเนื้อเยื่อเคมีด้วยสาร lectins ในต่อมน้ลาย mandibular salivary gland ของลิ้นชาว (*Manis javanica*) พบว่ามีการติดสีน้ำตาลในบริเวณ mucous cells ประกอบด้วยอนุพันธู์น้ำตาล mannose และ Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) N - acetylglucosamine ขณะที่การพบอนุพันธู์น้ำตาล N - acetylgalactosamine ตรงกับการรายงานในแกะ (Schulte *et al.*, 1985), ม้ (Gargiulo *et al.*, 1993), สุนัข (Pedini *et al.*, 1994), หนุ Hoary bamboo (Kimura *et al.*, 1998), House Musk Shrew (*Suncus murinus*) (Suprasert *et al.*, 2001) และกระเจง (Adnyane *et al.*, 2006) และการพบอนุพันธู์น้ำตาล N - acetylglucosamine ตรงกับการรายงานในม้ (Gargiulo *et al.*, 1993), สุนัข (Pedini *et al.*, 1994), กวาง (fallow - deer) (Pedini *et al.*, 1997) และใน House musk shrew (*Suncus murinus*) (Suprasert *et al.*, 2001)

จากการศึกษาด้วยเทคนิคเนื้อเยื่อเคมีด้วยสาร lectins ในต่อมน้ลาย parotid salivary gland ของลิ้นชาว (*Manis javanica*) พบว่าบริเวณ posterior ส่วน mucous cells ประกอบด้วยอนุพันธู์น้ำตาล mannose, N - acetylgalactosamine, และ N - acetylglucosamine เมื่อเปรียบเทียบกับส่วน serous cells พบว่าประกอบด้วยอนุพันธู์น้ำตาล fucose ขณะที่การพบอนุพันธู์น้ำตาล N - acetylgalactosamine สอดคล้องกับการพบในม้ (Gargiulo *et al.*, 1993), กวาง (fallow - deer) (Pedini *et al.*, 1997) และในหนุ Hoary bamboo (Kimura *et al.*, 1998) ขณะที่การพบอนุพันธู์น้ำตาล N - acetylglucosamine สอดคล้องกับการพบในกวาง (fallow - deer) (Pedini *et al.*, 1997), หนุ Hoary Bamboo (Kimura *et al.*, 1998) และ กระเจง (Adnyane *et al.*, 2006) การพบอนุพันธู์น้ำตาล mannose สอดคล้องกับการรายงานในกวาง (fallow - deer) (Pedini *et al.*, 1997) และกระเจง (Adnyane *et al.*, 2006)

จากการศึกษาด้วยสาร lectins ในต่อมน้ลายทั้ง 3 ต่อมหลัก พบว่าทั้งต่อมน้ลาย sublingual salivary gland และต่อมน้ลาย parotid salivary gland ในบริเวณ serous cells และ serous demilunes ประกอบด้วยอนุพันธู์น้ำตาล mannose, N - acetylgalactosamine, Galactosyl

( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) N - acetylglucosamine, fucose, N - acetylglucosamine และ Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) N - acetylgalactosamine ขณะที่เซลล์คัดหลั่ง mucous cells ในต่อมน้ำลายหลักทั้ง 3 ต่อมน้ำลายพบอนุพันธุ์น้ำตาล mannose, N - acetylgalactosamine, Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) N - acetylglucosamine และ N - acetylglucosamine ซึ่งเชื่อว่าอนุพันธุ์น้ำตาลเหล่านี้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อไวรัส แบคทีเรีย หรือเชื้อรา ต่าง ๆ ภายในช่องปาก (Sharon, 2007) ขณะที่บริเวณ striated ducts ของต่อมน้ำลาย sublingual salivary gland และต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland และบริเวณ granular convoluted tubule (GCT ducts) ของต่อมน้ำลาย parotid salivary gland ในลิงชวา (*Manis javanica*) พบว่าคิดสีน้ำตาลที่ตำแหน่ง supranuclear และ cytoplasm ระหว่าง fold ซึ่งคาดว่ามี RER, Golgi complex และ Mitochondria บรรจุปริมาณมาก โดยจะสัมพันธ์กับการ reabsorption ของน้ำและ electrolyte (Young and Van Lennep, 1978) ขณะที่บริเวณ cell membrane ของเซลล์คัดหลั่ง mucous cells ในต่อมน้ำลาย sublingual salivary gland และต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland พบอนุพันธุ์น้ำตาลเป็นจำนวนมาก ทำให้ทราบถึงบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการเชื่อมต่อของเซลล์ (cells connection) และการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ (cells communication) (Spicer and Schulte, 1992) และบริเวณ myoepithelial cells ของต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland พบมีการแพร่กระจายของอนุพันธุ์น้ำตาลจำนวนมาก โดยปกติ myoepithelial cells ทำหน้าที่ในการบีบรัดสารคัดหลั่งให้หลั่งออกมาตามท่อ แต่การพบอนุพันธุ์น้ำตาลในบริเวณดังกล่าว เข้าใจว่าน่าจะมีการกระตุ้นให้หลั่งสารออกมามากกว่าปกติ เนื่องจากว่าต่อมน้ำลาย mandibular salivary gland มีขนาดใหญ่กว่าต่อมน้ำลายต่อมอื่น ๆ ทำให้เซลล์คัดหลั่งหลั่งสารมากขึ้น

ผลการย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase เพื่อต้องการหาลำดับโมเลกุลของน้ำตาลตัวถัดไปโดยทำการย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase ในต่อมน้ำลายทั้ง 3 ต่อมน้ำลาย พบว่าภายหลังจากการย่อยด้วยเอนไซม์และย้อมต่อด้วย AB pH 2.5 ผลคือทุกบริเวณของต่อมน้ำลายทั้ง 3 ต่อมน้ำลายมีการติดสีฟ้าจางลง แสดงว่าเอนไซม์ neuraminidase ได้ทำการย่อย sialic acid ในบริเวณ mucous cells และ serous cells ออกไป ผลทำให้พบ sialic acid จำนวนมาก เมื่อเปรียบเทียบกับที่ย้อมด้วย AB pH 2.5 เพียงอย่างเดียวพบว่าบริเวณ mucous cells ของต่อมน้ำลายทั้ง 3 ต่อมน้ำลายพบ acid glycoconjugates บรรจุอยู่ภายในเซลล์คัดหลั่ง และผลการย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase และย้อมต่อด้วยสาร lectins PNA พบว่าต่อมน้ำลายทั้ง 3 ต่อมน้ำลาย มีการติดสีน้ำตาลเพิ่มขึ้นในบริเวณ mucous cells แสดงว่าเอนไซม์ neuraminidase ได้ทำการย่อย sialic acid ออกไปทำให้พบ sialic acid เพิ่มขึ้น โดยจะจับกับอนุพันธุ์น้ำตาล Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) N - acetylgalactosamine เมื่อเปรียบเทียบกับที่ย้อมด้วยสาร lectins PNA เพียงอย่างเดียว โดยไม่ได้

ย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase พบว่ามีการติดสีเพียงเล็กน้อยหรือไม่มีการติดสีเลยแสดงว่า sialic acid ได้มีการบดบังหรือปกคลุมน้ำตาล Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) N - acetylgalactosamine ทำให้ย้อมไม่ติดคอนพุน้ำตาลดังกล่าว โดยปกติผิวเซลล์เป็นบริเวณแรกที่เกิดการติดเชื้อ การพบ sialic acid เคลือบที่ผิวเซลล์ทำให้ทราบถึงบทบาทการยับยั้งการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร และป้องกันการรุกรานของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อจุลินทรีย์ และเชื้อไวรัส ต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิดโรคภายในช่องปากได้ (Wang and Miller, 2003; Yasui *et al.*, 2005)

การศึกษาเนื้อเยื่อเคมีเพื่อที่จะแสดงความหลากหลายของไกลโคคอนจูเกตในต่อมน้ำลายของลิงชวา (*Manis javanica*) ทำให้ทราบว่าต่อมน้ำลายทั้ง 3 ต่อมหลัก มีการผลิตสารไกลโคคอนจูเกตออกมามากมาย เพื่อช่วยทำให้อาหารจับตัวเป็นกลุ่มก้อนง่ายในการกลืน กวาดกินเหยื่อหรืออาหารได้คราวละมาก ๆ ช่วยเคลือบเนื้อเยื่อผิวภายในช่องปาก รวมทั้งช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตและป้องกันการรุกรานของเชื้อโรคและเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ภายในช่องปาก ทั้งนี้ลิงชวา (*Manis javanica*) เป็นสัตว์ที่ไม่มีฟัน ไม่สามารถที่จะกัดแทะหรือเคี้ยวอาหารโดยใช้ฟันได้ ดังนั้นสันชาตญาณการอยู่รอดของตัวสัตว์เอง จำเป็นต้องปรับพฤติกรรมการกินอาหารโดยใช้ลิ้นที่มีความแข็งแรงในการกวาดเก็บกินอาหารจำพวกมดและแมลงที่มีขนาดเล็กเข้าสู่ช่องปาก ซึ่งสัมพันธ์กับการที่มีต่อมน้ำลายเจริญดีมาก อีกทั้งพฤติกรรมในการกินอาหารของลิงชวา (*Manis javanica*) ยังช่วยให้เกิดประโยชน์ต่อระบบนิเวศน์ในแง่ของการควบคุมจำนวนประชากรมด ปลวก หรือ แมลงต่าง ๆ ไม่ให้มีมากเกินไป ซึ่งแมลงหรือมดบางชนิดสร้างปัญหาและก่อให้เกิดความเสียหายต่อพืชผลทางการเกษตรและทำให้ระบบนิเวศน์ทางธรรมชาติเสียหายได้

การศึกษานี้เพื่อรายงานลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์และลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ในต่อมน้ำลายของลิงชวา (*Manis javanica*) ทั้ง 3 ต่อมหลัก โดยการใช้เทคนิคเนื้อเยื่อเคมีรวมทั้งการใช้เอนไซม์ neuraminidase ช่วยในการย่อน้ำตาลเพื่อแสดงลำดับโมเลกุลของน้ำตาลตัวถัดไป โดยการศึกษาครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการศึกษาทางด้านการเปรียบเทียบทาง Histology, Histopathology และ Immunology ต่อไปในอนาคต

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

สุนันทา รัตนาโก. 2539. ไกลโคโปรตีน, น. 46 - 54. **ชีวโมเลกุลที่ไม่ควรมองข้าม**. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สหเทพ จันทรวิมล และ อภินันท์ สุประเสริฐ. 2547. การศึกษาเนื้อเยื่อของเคมีไกลโคคอนจูเกตใน ต่อมน้ำลายจากกรรไกรของกระบือและสัตว์เลี้ยงอื่นชนิดอื่น. **วารสารสัตวแพทย์** 14 (2): 110 -115.

Adnyane, I. K. M., T. Wresdiyati, I. W .T. Wibawan, A. Winarto and S. Agungpriyono. 2006. The morphological study of salivary glands [parotid and mandibular glands] of the lesser mouse deer (*Tragulus javanicus*) with special reference to the distribution of glycoconjugates and lysozyme, pp. 26 - 29. In **Proceedings of AZWMP**. 26 -29 October 2006. Faculty of Veterinary. Chulalongkorn University. Bangkok, Thailand.

Allen, A. 1981. Structure and function of gastrointestinal mucous, pp. 617 - 638. In R.J. Leonard., eds. **Physiology of the gastrointestinal tract**. Raven Press, New York.

Caramia, F.1966. Ultrastructure of mouse submaxillary gland. I. Sexual differences. **J. Ultrastr Res.** 16 : 505 - 523.

Cowley, L.H and J.M. Shackelford. 1970b. Electron microscopy of squirrel monkey parotid glands. **Ala. J. med Sci.** 7 : 273 - 282.

Donald, L and D.A. Rubbelke. 1999. **Tissues of the human body**. Available Source : [http://www.mhhe.com/biosci/ap/histology\\_mh/glands.html](http://www.mhhe.com/biosci/ap/histology_mh/glands.html),1999.

Dorey, G and K.D. Bhoola.1972b. Ultrastructure of duct cell granules in mammalian submaxillary glands. **Z. Zellforsch.** 126 : 335 - 347.

- Drury, R.A.B and E.A. Wallington. 1967. **Carleton's histological technique**, p. 218. 4<sup>th</sup> ed. Oxford University press, New York, Toronto.
- Eroschenko, P. 2005. **Atlas of histology with Functional correlations**, pp. 223 - 227. 10<sup>th</sup> ed. Anatomy Medical Program, Idaho University, Moscow, Idaho.
- Estecondo, S., S.M. Codon and E.B. Casanave. 2005. Histological study of the salivary glands in *Zaedyus pichiy* (Mammalia, Xenarthra, Dasypodidae). **Int. J Morphol.** 23 (1) : 19 - 24.
- Evans, H.E and A. Delahunta. 2000. **Guide to the dissection of the dog**, pp. 282 - 283. 5<sup>th</sup> ed. Cornell University, Ithaca, New York.
- Flon, H., R. Gerstner, O.G. Mitchell and A. Feldman. 1970. Salivary glands of heteromyid rodents, with a summary of the literature on rodent submandibular gland morphology. **J Morphol.** 131 : 179 - 194.
- Gabius, H.J and S. Gabius. 1993. Lectins and glycobiology, pp. 158 - 159. In I.J. Goldstein and R.D. Poretz., eds. **Lectins as indicators of disease associated glycoforms**. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Gargiulo, A.M., V. Pedini and P. Ceccarelli. 1993. Lectin histochemistry of glycoconjugates in horse salivary glands. **Anat Histol Embryol.** 22 (1) : 83 - 90.
- Gresik, E.W., K. Hosoi, K. Kurihana, S. Maruyama and T. Ueha. 1996. The rodent granular convoluted tubule cell. **Eur. J Morphol.** 34 (3) : 221 - 224.
- Griffiths, M., P.J.M. Greenslade, L. Miller and J.A. Kerle. 1990. The diet of the spring - ant eater *Tachyglossus Aculeatus Acanthion* in tropical habitats in the northern territory. **The Beagle.** 7 : 79 - 80.

- Harrison, J.D., D. W. Auger, K.L. Paterson and P. S. A. Rowley.1987. Mucin histochemistry of Submandibular and parotid salivary glands of man : Light and electron microscopy. **J Histochem.** 19 (10 - 11) : 555 - 564.
- Henriksen, A. 1972. Light and electronmicroscope shown enzyme histochemistry *Erinaceus europaeus*. **Z Saugetierk.** 37 : 185 - 203.
- Hirabayashi,Y.1992. Light - microscopic detection of acidic **glycoconjugates** with sensitized diamine procedures. **J Histochem.** 24 : 409 - 418.
- International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. 1996. **IUCN Red List of Threatened Animals**, p.368. IUCN, Switzerland.
- Jacobsen, N and S.H. From. 1973. Mucous and serous components of the submandibular and sublingual glands of *Macaca irus* and *Cercopithecus aethiops*. **Acta histochem.** (Jena). 46 : 281 - 287.
- Jerry, L.B and W. H. Wilborn . 1977. Histology and ultrastructure of the pig parotid gland. **Am. J Anat.** (152) 4 : 447 - 465.
- Junqueira, L.C.U and F. Fava - De Moraes. 1965. **Compararative aspects of the vertebrate major salivary glands biology**, pp. 36 - 48. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Junqueira, L.C., J.Carneiro and R.O. Kelley. 1998. **Basic Histology**, p. 79. 9<sup>th</sup> ed. A lange medical book, Appleton & Lange, Prentice - Hall International, Inc, USA.
- Kimura,J., I.Habata, H. Endo, W. Rerkamnuaychoke, M. Kurohmaru, J.Yamada, T.Nishida and A.Tsukise.1998. Histochemistry of complex carbohydrate in the major salivary glands of Hoary Bamboo Rats (*Rhizomys puvinosus*). **Anat Histol Embryol.** 27 : 147 - 153.

- Lasky, L. 1992. Selectins : interpreters of cell - specific carbohydrate information during inflammation. **Sci.** 258 (5084) : 964 - 969.
- Leppi, T.J., S.S. Spicer, J.G. Henson and J.Fioravanti. 1967. Correlated histochemical staining and  $S^{35}O_4$  labeling (sic) of salivary gland mucosubstances. **J Histochem Cytochem.** 15 : 745 - 751.
- Luna,L.G.1968. **Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology**, p. 200. 3<sup>rd</sup> ed. McGraw - Hill, Inc, America.
- Materazzi, G. 1967. Some observations on the function of the “ convoluted granular tubules ” in the submaxillary gland of the rat. **Riv Biol.** 60 : 85 - 90.
- Mathews, C.K., K.E. van Holde and K.G. Ahern. 2000. **Biochemistry**. 3<sup>rd</sup> ed. Addison Wesley Longman, Inc.
- Martin, C.J and J.A. Young. 1971a. Electolyte concentrations in primary and final saliva of the rat sublingual gland studied by micropuncture and characterization techniques. **Pflugers Arch.** 324 : 344 - 360.
- Menghi,G., A.M. Bondi, D.Accili and G. Materazzi. 1988. Visualization of carbohydrate chains in rabbit salivary glands by means of enzymatic degradation and plant lectin. **Acta Histochem.** 84 (2) : 163 -177.
- Menghi,G., D.Accili, A.M. Bondi and M.G. Gabrielli.1989. Enzymatic degradation and quantitative lectin labeling for characterizing glycoconjugates which as lectin acceptors in cat submandibular gland. **J Histochem.** 90 (5) : 331 - 338.
- Meyer,W., C. Beyer and H. Wissdorf. 1993. Lectin histochemistry of salivary glands in the giant ant - eater (*Myrmecophaga tridactyla*). **Histol Histopathol.** 8 (2) : 305 - 316.

- Mori, M., Y. Takai and M. Kunikata.1992. Biologically active peptides in the submandibular gland role of the granular convoluted tubule. **Acta Histochem Cytochem.** 25 : 325 - 341.
- Miyazaki, K.1972. Histological and histochemical investigations on the major salivary glands of the dog. **Aichi Gakuin. J Dent Sci** (Nagoya). 10 : 125 - 147.
- Nieuw Amerongen, A.V., J.G.M.Bolscher and E.C.I.Veerman.1995. Salivary mucins: protective functions in relation to their diversity. **Glycol.** 5 (8) : 733 - 740.
- Nowak, R. 1999. **Walker's mammals of the world**, pp. 286 - 287. 6<sup>th</sup> ed. Baltimore : The Johns Hopkins, University Press, London.
- Oda,Y., J. Sanders, S. Roberts, M. Maruyama, A.Kiddie, J. Furmaniak and B.R.Smitha.1999. Analysis of carbohydrate residues on recombinant human thyrotropin receptor. **J Clinical Endocri Metabolism.** 84 : 6.
- Odajima, M. 1996. Zipper - like filamentous structures in convoluted granular tube cells of rat submandibular gland. **J. Electron Microsc.** 45 : 498 - 500.
- Pedini,V., P.Ceccarelli and A.M.Gargiulo. 1994. Glycoconjugates in the mandibular salivary gland of adult dogs revealed by lectin histochemistry. **J Vet Sci.** 57 (3) : 353 - 357.
- Pedini,V., P.Ceccarelli, A.M.Gargiulo and C. Dall Aglio. 1997. Histochemical study of lectin binding in the major salivary glands of adult fallow - deer (*Dama dama*). **Acta Histochem.** 99 (1) : 81 - 89.
- Pedini,V., C. Dall ' Aglio, F. Parillo and P. Scocco. 2004. A lectin histochemical study of the oesophagus of shi drum. **J Fish Biol.** 64 : 625 - 631.

- Prophet, E.B., B. Mills., J.B. Arrington and L.H. Sobin. 1994. Laboratory methods in histotechnology, p.161. *In* E. Gaffney., eds. **Armed forces Institute of Pathology**. Washington, D.C.
- Quintarelli,G., S. Tsuiki, Y. Hashimoto and W. Pigman. 1960. Histochemical studies of bovine salivary gland mucins. **Biochem Biophys Res Commun.** 2 : 423 - 426.
- Reifel, C.W and A.A.Travill. 1972. Structure and carbohydrate histochemistry of postnatal canine salivary glands. **Amer J Anat.** 134 : 377 - 393.
- Rocca.J.G and K. Shah.2004. **Lectins as next - generation mucoadhesives for specific targeting of** the gastrointestinal tract. Drug delivery technology. Available Source : <http://www.drugdeliverytech.com>. June, 2004.
- Schachter, H and I.Brockhausen.1992. The biosynthesis of serine (threonine) - N - Acetylgalactosamine linked carbohydrate moieties, p.263. **Glycoconjugates**. Dekker.
- Shackleford, J.M and C.E. Klapper.1962. Structure and carbohydrate histochemistry of mammalian of salivary gland. **Amer. J Anat.** 111 : 25 - 47.
- Shackleford, J.M and W.H. Wilborn.1969. Ultrastructure of bovine parotid glands. **J Morph.** 127 : 453 - 473.
- Shackleford, J.M and W.H. Wilborn. 1970b. Ultrastructural aspects of calf submandibular glands. **Amer. J Anat.** 127 : 259 - 279.
- Scott, J.E and J. Dorling. 1965. Differential staining of acid glycosaminoglycans by alcian blue in salt solution. **J Histochem.** 5 : 221 - 233.
- Schulte, B.A., S.S. Spicer and R.L. Miller. 1985. Lectin histochemistry of secretory and surface glycoconjugates in the ovine submandibular gland. **Cell tissue Res.** 240 (1) : 57 - 66.

Sharon, N.1977. Lectin. **Sci Am.** 236 : 108 -119.

Sharon, N. 2007. Lectins : Carbohydrate specific reagents and biological recognition molecules.  
**J Biol Chem.** 282 (5) : 2753 - 2764.

Srinivasan, R and W.W.L.Chang. 1975. The development of the granular convoluted duct in the rat submandibular gland. **Anat Rec.** 182 : 29 - 40.

Spicer, S.S and J. Duvenci. 1964. Histochemical characteristics of mucopolysaccharides in salivary and exobital lacrimal glands. **Anat Rec.** 149 : 333 - 358.

Spicer, S.S. 1965. Diamine methods for differentiating mucosubstances histochemically. **J Histochem Cytochem.** 13 : 211 - 234.

Spicer, S.S and B.A. Schulte.1992. Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically : A prespective. **J Histochem Cytochem.** 40 : 1 - 38.

Sternbach, H. 1991. **Chromatographische methoden in der biochemie**, p. 139. In G. Thieme Verlag, eds. Stuttgart, New York.

Stevens, C.E and I.D.Hume. 1995. **Comparative physiology of the vertebrate digestive system**, pp. 243 - 244. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge University press, United States of America.

Suprasert, A., J. Sahathep and R. Pibul. 2001. Lectins histochemical studies in sublingual salivary gland of the House musk shrew (*Suncus murinus*). **Kasetsart J (Nat.Sci.)**. 35 : 304 - 310.

Tandler,B and D.K. Mac Callum. 1974. Ultrastructure and histochemistry of the submandibular gland of the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). L.II. Intercalated ducts and granular striated ducts. **J Anat (Lond)**. 117 : 117 - 131.

- Tandler B., T.Nagato, K.Toyoshima and C.J. Phillips .1997. Ultrastructure of the parotid gland in the common vampire bat (*Desmodus rotundus*) with special emphasis on oncocytes. **J Submicrosc Cytol Pathol.** 29 (1) : 37 - 49.
- Wang, B and J.B. Miller. 2003. The role and potential of sialic acid in human nutrition. **Eur. J Clinical Nutrition.** 57 : 1351 - 1369.
- Yasui,T., A. Tsukise and W. Meyer.2005. Morphology and glycoconjugate histochemistry of the eccrine glands in the snout skin of the North American raccoon (*Procyon lotor*). **Arch Dermatol Res.** 296 : 482 - 488.
- Yong, J.A and E.W.Van Lennep. 1978. **The Morphology of salivary glands**, pp. 158 - 176. Departments of Physiology and of Histology and Embryology, University of Sydney, Academic Press, London.
- Young ,W.G., G.O.R. Yanez, T.J. Daley and J.R. Smid. 2004. Growth hormone and epidermal growth factor in salivary glands of giant and dwarf transgenic mice. **J Histochem Cytochem.** 52 (9) : 1191 -1197.
- Yukishige, I. 2008. **Chemical synthesis of sugar chains to unravel the mysteries of their roles in biological phenomena.** Frontlines. Available Source : [http : //www.rikenresearch.riken.jp/frontline/549/](http://www.rikenresearch.riken.jp/frontline/549/), August 15, 2008.
- Zhang, X.S., G.B.Proctor, J.R.Garrett, B.A. Schulte and D.K. Shori.1994.Use of lectin probes on tissue and sympathetic saliva to study the glycoproteins secreted by rat submandibular glands. **J Histochem Cytochem.** 42 : 1261 - 1269.



## การเตรียมสารเคมีต่าง ๆ

### 1. การเตรียมน้ำยาคงสภาพ

#### 1.1 10 % formalin (neutral buffer formalin solution)

##### ประกอบด้วย

|                                   |     |           |
|-----------------------------------|-----|-----------|
| formalin (37 - 40 % formaldehyde) | 100 | มิลลิลิตร |
| distilled water                   | 900 | มิลลิลิตร |
| sodium phosphate dibasic          | 6.5 | กรัม      |
| sodium phosphate monobasic        | 4.0 | กรัม      |

#### 1.2 Carnoy's fluid solution

##### ประกอบด้วย

|                       |    |           |
|-----------------------|----|-----------|
| 100 % ethanol alcohol | 60 | มิลลิลิตร |
| chloroform            | 30 | มิลลิลิตร |
| glacial acetic acid   | 10 | มิลลิลิตร |

### 2. การเตรียมสีย้อมเนื้อเยื่อ

#### 2.1 สีย้อม Harris' hematoxylin

##### ประกอบด้วย

|                        |      |           |
|------------------------|------|-----------|
| hematoxylin crystals   | 5.0  | กรัม      |
| potassium alum         | 100  | กรัม      |
| absolute ethyl alcohol | 50   | มิลลิลิตร |
| mercuric oxide (red)   | 2.5  | กรัม      |
| distilled water        | 1000 | มิลลิลิตร |

### ขั้นตอนการเตรียม Harris' hematoxylin

นำ hematoxylin ละลายใน absolute ethyl alcohol และนำ potassium alum ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นนำสารละลายทั้ง 2 อย่างมาผสมเข้าด้วยกันและนำไปต้มโดยใช้เวลาประมาณ 1 นาที ต่อมายกออกจากความร้อนและเติม mercuric oxide (red) ลงไปและนำไปเคี่ยวด้วยความร้อนอีกครั้ง เคี่ยวจนกว่าสีจะกลายเป็นสีม่วงเข้มและยกออกจากความร้อนรอให้สีเย็นลง จากนั้นจึงเติม glacial acetic acid 2 - 4 มิลลิลิตร ต่อ 100 มิลลิลิตรของสารละลาย ซึ่งทำให้นิวเคลียสติดสียิ่งขึ้น

**หมายเหตุ:** ก่อนใช้ต้องกรองสีก่อนและควรเก็บไว้ในขวดสีชา เพื่อป้องกันแสงเนื่องจากแสงจะผลทำให้สีเกิดการเสื่อมคุณภาพซึ่งจะมีผลในการย้อมสีต่อไป

### 2.2 สีย้อม Eosin

#### ประกอบด้วย

#### 1 % stock alcoholic eosin (Luna, 1968)

|                         |     |           |
|-------------------------|-----|-----------|
| eosin Y ( ละลายน้ำได้ ) | 1.0 | กรัม      |
| ethyl alcohol 95 %      | 80  | มิลลิลิตร |
| distilled water         | 20  | มิลลิลิตร |

นำ eosin Y ละลายรวมกับน้ำกลั่นจากนั้นเติม ethyl alcohol 95 %

#### Working solution

|                      |   |      |
|----------------------|---|------|
| eosin stock solution | 1 | ส่วน |
| ethyl alcohol 80 %   | 3 | ส่วน |

**หมายเหตุ:** ก่อนใช้ให้เติม glacial acetic acid 0.5 มิลลิลิตรต่อ 100 มิลลิลิตรของสีและคนให้เข้ากัน

## 2.3 สีย้อม Periodic acid - Schiff (PAS)

### ประกอบด้วย

#### Periodic acid

|                           |     |           |
|---------------------------|-----|-----------|
| periodic acid             | 0.6 | กรัม      |
| nitric acid concentration | 0.3 | มิลลิลิตร |
| distilled water           | 100 | มิลลิลิตร |

#### Sodium bisulfite

|                      |     |           |
|----------------------|-----|-----------|
| sodium metabisulfite | 0.5 | กรัม      |
| distilled water      | 100 | มิลลิลิตร |

#### Schiff reagent

|                      |         |           |
|----------------------|---------|-----------|
| basic fuchsin        | 0.5 - 1 | กรัม      |
| sodium metabisulfite | 1.9     | กรัม      |
| 1 normal HCL         | 15      | มิลลิลิตร |
| distilled water      | 85      | มิลลิลิตร |

### ขั้นตอนการเตรียม Schiff reagent

นำสารละลายทั้งหมดมาผสมรวมกันในขวดที่มีที่ว่างเหนือสารละลายประมาณ 50 - 60 มิลลิลิตร เขย่าเป็นระยะหรือทิ้งไว้ข้ามคืนจากนั้นเติมผงถ่าน 200 มิลลิกรัม และเขย่าขวดทิ้งไว้ 1 นาที และนำไปกรองทำซ้ำจนกว่าสารละลายจะใส จากนั้นเก็บ schiff reagent ในขวดที่มีเนื้อที่อากาศเหนือสารละลายน้อยที่สุดเก็บไว้ในตู้เย็นห้ามเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง

หมายเหตุ: ก่อนนำไปใช้ควรทดสอบคุณภาพของ schiff reagent โดยการหยดใน formaldehyde 2 - 3 หยด ถ้าเกิดสีชมพูเข้มแสดงว่า schiff reagent ใช้ได้

## 2.4 สีย้อม Alcian Blue (AB pH 2.5)

### ประกอบด้วย

|                     |     |           |
|---------------------|-----|-----------|
| alcian blue         | 1.0 | กรัม      |
| glacial acetic acid | 100 | มิลลิลิตร |
| distilled water     | 97  | มิลลิลิตร |

### ขั้นตอนการเตรียม Alcian Blue (AB pH 2.5)

นำสารทั้งหมดผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer) กวนประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายไปกรองและนำไปใช้ได้ สามารถเก็บสารละลายไว้ใช้ได้นานหลายปี

หมายเหตุ: เพื่อให้การย้อมสีมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นควรกรองสีทุกครั้งที่ใช้งาน

## 2.4 ชุดอุปกรณ์สีย้อม Lectin

### ประกอบด้วย

ชุด lectins สำเร็จรูป จาก Vector Laboratories, Inc ( Burlingame, CA, USA)

lectin kit I (cat. no. BK - 1000) ได้แก่

Concanavalin A (Con - A)

*Dolichos biflorus* agglutinin (DBA)

Peanut agglutinin (PNA)

*Ricinus communis* agglutinin (RCA - I)

Soybean agglutinin (SBA)

*Ulex europaeus* agglutinin (UEA - I)

Wheat germ agglutinin (WGA)

น้ำหนักสารชนิดละ 1 มิลลิกรัม

### ขั้นตอนการเตรียม lectins

นำ lectins แต่ละชนิด (น้ำหนักสาร 1 มิลลิกรัม) เจือจางด้วย PBS (Phosphate Buffered Saline) ที่ pH 7.4 เจือจางจนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 40 µg/ml จากนั้นจัดเก็บ lectins ที่เจือจางแล้วในตู้เย็น (ที่อุณหภูมิ 5 - 8 องศาเซลเซียส)

### ชุด DAB Substrate Kit (3,3' - diaminobenzidine) ประกอบด้วย

|                   |     |                           |             |
|-------------------|-----|---------------------------|-------------|
| DAB               | 0.5 | ไมโครกรัม ละลายในน้ำกลั่น | 1 มิลลิลิตร |
| Hydrogen peroxide | 0.3 | ไมโครกรัม ละลายในน้ำกลั่น | 1 มิลลิลิตร |

เมื่อละลาย DAB และ Hydrogen peroxide ในน้ำกลั่นเสร็จสิ้นแล้ว นำ DAB ผสมให้เข้ากับสารละลายดังต่อไปนี้

|                   |      |                        |
|-------------------|------|------------------------|
| DAB Substrate     | 0.20 | มิลลิลิตร (หรือ 4 หยด) |
| Buffer pH 7.5     | 0.10 | มิลลิลิตร (หรือ 2 หยด) |
| Hydrogen peroxide | 0.10 | มิลลิลิตร (หรือ 2 หยด) |
| Distilled water   | 5.0  | มิลลิลิตร              |

### ขั้นตอนการเตรียม DAB Substrate Kit (3,3' - diaminobenzidine)

นำสารละลายทั้งหมดผสมรวมกันในขวดที่ปิดฟอยด์มิดชิดเพื่อป้องกันไม่ให้สารนั้นเกิดปฏิกิริยา จากนั้นเมื่อถึงเวลาจะใช้ DAB Substrate Kit ให้เติม hydrogen peroxide 0.12 มิลลิลิตร (หรือ 2 หยด) และนำไปใช้งานได้ทันที

**หมายเหตุ:** DAB (3,3' - diaminobenzidine) มีคุณสมบัติทำให้ติดสีน้ำตาลเข้มยิ่งขึ้นการติดสีมีความคงทนและถาวร ควรระมัดระวังในการใช้ DAB ควรใช้ในที่ปลอดแสงเพื่อป้องกันสารทำปฏิกิริยากับแสงซึ่งจะมีผลกับเนื้อเยื่อได้ และคุณสมบัติที่ดีของ DAB ไม่ละลายในน้ำ, alcohol และ xylene

### ชุด ABC Kit (Avidin Biotinylated Complex) ประกอบด้วย

|                    |      |                        |
|--------------------|------|------------------------|
| reagent A (Avidin) | 0.12 | มิลลิลิตร (หรือ 2 หยด) |
| reagent B (Biotin) | 0.12 | มิลลิลิตร (หรือ 2 หยด) |
| PBS                | 10.0 | มิลลิลิตร              |

### ขั้นตอนการเตรียม ABC Kit (Avidin Biotinylated Complex)

นำสารละลายทั้งหมดผสมรวมกัน และควรเตรียมสารก่อนใช้งาน 30 นาที สารละลายควรเก็บในตู้เย็นตลอด (ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)

### PBS (Phosphate Buffer Saline)

#### ประกอบด้วย

|                                  |      |           |
|----------------------------------|------|-----------|
| NaCl                             | 8.0  | กรัม      |
| KCl                              | 0.2  | กรัม      |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>  | 0.2  | กรัม      |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1.15 | กรัม      |
| distilled water                  | 1000 | มิลลิลิตร |

### ขั้นตอนการเตรียม PBS (Phosphate Buffer Saline)

นำสารละลายทั้งหมดผสมรวมกันในบีกเกอร์ที่เตรียมไว้ และเติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร คนให้สารละลายเข้าด้วยกัน จากนั้นปรับสมดุล (pH) โดยใช้ pH meter ปรับค่าที่ 7.4 เพื่อให้สารละลายมีความเป็นกลาง ถ้าปรับ pH ให้มีค่าสูงใช้สารละลาย NaOH และถ้าปรับ pH ให้ค่าลดลงใช้สารละลาย HCl เมื่อปรับได้ค่า pH ที่ต้องการแล้ว ค่อย ๆ เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

## เอนไซม์ neuraminidase (Prophet *et al.*, 1994)

### ประกอบด้วย

#### Solutions

##### Buffer solution A

|                  |      |           |
|------------------|------|-----------|
| sodium acetate   | 26.2 | กรัม      |
| calcium chloride | 8.9  | กรัม      |
| distilled water  | 200  | มิลลิลิตร |

##### Buffer solution B

|                  |      |           |
|------------------|------|-----------|
| sodium acetate   | 26.0 | กรัม      |
| calcium chloride | 0.8  | กรัม      |
| distilled water  | 200  | มิลลิลิตร |

#### Enzyme

Neuraminidase (จากเชื้อ *Vibrio cholerae*) ปริมาตรรวมทั้งหมด 0.11 มิลลิลิตร

### ขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์ neuraminidase

นำเอนไซม์ neuraminidase (*Vibrio cholerae*) (ปริมาตร 0.11 มิลลิลิตร) เจือจางด้วย Buffer solution A ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ไมโครลิตร และจัดเก็บเอนไซม์ที่เจือจางแล้วในตู้เย็น (ที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส) สามารถเก็บเอนไซม์ได้นานถึง 2 ปี

ผลงานวิจัยทางวิชาการเผยแพร่ในวารสารทางวิชาการ  
ที่เกี่ยวข้องกับวิทยานิพนธ์

1. Characterization of Glycoconjugates in the Sublingual Salivary Gland of Malayan Pangolin (*Manis javanica*) ตีพิมพ์ในวารสาร Kasetsart J. (Nat.Sci.) 42 : 88 - 94 (2008).

2. Glycoconjugates in the Secretary Epithelium of the Mandibular Salivary Gland of Malayan Pangolin (*Manis javanica*) ตีพิมพ์ในวารสาร KKU Veterinary Journal. 19 (2) : 162 - 170. July - December (2009).

3. Histochemical detection of glycoconjugates in the parotid salivary gland of Malayan pangolin (*Manis Javanica*) ตีพิมพ์ในวารสารเชียงใหม่สัตวแพทยสาร ฉบับปีที่ 8 เล่ม 1 ปี 2553 (ขณะนี้อยู่ระหว่างการจัดพิมพ์)

## Characterization of Glycoconjugates in the Sublingual Salivary Gland of Malayan Pangolin (*Manis javanica*)

Ruhanee Munyala, Maleewan Liumsiricharoen\*,  
Pakawadee Pongket, Teerasak Prapong and Apinun suprasert

### ABSTRACT

The sublingual salivary gland of Malayan pangolin (*Manis javanica*) was investigated by using conventional and lectin histochemical methods in combination with enzyme digestion procedures. The results showed both mucous and serous cells in secretory endpieces of sublingual salivary gland. Mucous cells showed a large number of vicinal diol groups with acid and neutral glycoconjugates. Lectin histochemistry gave evidence of the presence of mannose,  $\alpha$  N - acetylgalactosamine, N- acetylglucosamine and sialic acid linked to Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) N - acetylglucosamine residues.

Serous cells had positive reaction with almost all the conventional employed, with the exception of acid glycoconjugates which were less diffused. Serous cells secreted predominantly neutral glycoconjugates with mannose, Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) N- acetylglucosamine, N- acetylglucosamine and fucose residues.

**Key words:** sublingual salivary gland, glycoconjugates, histochemistry, Malayan pangolin, lectin

### INTRODUCTION

The Malayan pangolin (*Manis javanica*) or scaly anteater is a unique and interesting mammal found in Thailand and other countries in Southeast Asia. Populations of most pangolin species are somehow threatened. *Manis javanica* is listed by IUCN as Red list or Lower risk, meaning that it is nearly threatened (Nowak, 1999). Pangolin has an enormous salivary gland in its chest to lubricate the tongue with sticky, ant catching saliva. Therefore, they are important to the environment because they can control insect and termite populations. By constructing burrows and digging a bit to get at ants and termites, these animals also aid in soil aeration.

Glycoconjugates in salivary glands of mammalian species have been studied previously (Shackelford and Klapper, 1962; Spicer and Duvenci, 1964; Harrison, 1974). From these studies, the cyto - architecture and histochemical reactivities of the salivary gland are known to vary widely, between glands for a single species and between species for a given gland. Lectins are currently valuable histochemical probes for detecting specific carbohydrate residues due to their high affinity and specificity. (Pedini *et al.*, 2002). Nevertheless, glycoconjugates histochemical data on the sublingual salivary gland of Malayan pangolin (*Manis javanica*) is not available. Therefore, this study was performed to detect glycoconjugates in sublingual salivary gland by using conventional

Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok 10900 Thailand.

\* Corresponding author, e-mail: fvetais@ku.ac.th

and lectin staining procedures.

## MATERIALS AND METHODS

### Tissue preparation

The Malayan pangolin (*Manis javanica*) carcasses were obtained from Khao Prathup Chang Wildlife Breeding Center in Ratchaburi Province Thailand. Ratchaburi province, Thailand. Samples of the sublingual salivary gland were fixed in buffered formalin. Tissues were dehydrated through a series of graded ethanols, clearing in xylene and embedded in paraffin wax. Sections were cut at thickness of 3-4  $\mu$ m, deparaffinized in xylene, hydrated in graded ethanols. They were then subjected to staining with conventional and lectin staining procedures.

#### Conventional staining procedures

1. Hematoxylin and Eosin (H&E) for the general observation of histological structures.
2. Acian Blue pH 2.5 (AB pH 2.5) for detection of acidic glycoconjugates (Spicer *et al.*, 1967).
3. Periodic acid - Schiff (PAS) for detection of vicinal - diol groups of glycoconjugates (Pearse, 1968).
4. AB pH 2.5 - PAS for demonstrating acidic and neutral glycoconjugates (Mowry, 1963).

### Lectin staining procedures

1. *Glycine max* (SBA) for  $\beta$  N - acetylglucosamine residues.
2. *Ulex europaeus agglutinin -I* (UEA-I) for fucose residues (Goldstein and Hayes, 1978).
3. Concanavalin A (Con A) for mannose residues of glycoconjugates (Yamada and Shimizu, 1976).
4. *Dolichos biflorus agglutinin* (DBA) for a N - acetylglucosamine residues.
5. Wheat germ agglutinin (WGA) for N-acetylglucosamine residues (Goldstein and Hayes, 1978).
6. *Ricinus communis agglutinin -I*

(RCA-I) for Galactosyl ( $\beta$ 1  $\rightarrow$ 4 ) N-acetylglucosamine (Yamada and Shimizu, 1977).

7. Peanut agglutinin (PNA) for Galactosyl ( $\beta$ 1  $\rightarrow$ 3) N - acetylglucosamine residues (Stoward, 1980).

### Enzyme digestion

Enzymatic digestion with neuraminidase (from *Vibrio cholerae*) was performed. Prior to staining with AB pH 2.5 and lectin PNA, sections were incubated in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.3) containing 1 unit / ml of the enzyme and 0.04 M  $\text{CaCl}_2$  at 39 - 41  $^{\circ}\text{C}$  for 12 - 16 h (Spicer *et al.*, 1967). Enzyme digestion was controlled by being exposed to neuraminidase free buffer under the same experimental conditions. (Pedini *et al.*, 2004).

## RESULTS

The sublingual salivary gland of Malayan pangolin (*Manis javanica*) showed tubuloacinar gland. It was characterized by the presence of mucous cells and serous cells in secretory endpieces. The staining results in the mucous cells and serous cells are listed in the Table 1.

The mucous cells stained strongly positive with AB pH 2.5 (Figure 9) and PAS (Figure 1). In combined staining, the mucous cells were colored deep blue and some other were bluish - purple with AB pH 2.5 - PAS (Figure 2). The AB pH 2.5 (Figure 10) reaction decreased in intensity after digested with neuraminidase. Mucous cells presented positive staining with all lectins, except SBA (Figure 3) and UEA - I (Figure 4). Labeling was strong with Con A (Figure 5). DBA (Figure 6) weakly to moderately stained mucous cells. Mucous cells were stained by WGA (Figure 7), RCA - I (Figure 8) and PNA (Figure 11). After neuraminidase digestion, the mucous cells stained moderately to strongly with PNA (Figure 12).

In the striated duct cells, the supranuclear region of mucous cells localized at

the apex of the folds showed moderate to strong reactivity with UEA - I, Con A, DBA, WGA, RCA - I and PNA and were weakly stained with AB pH 2.5 - PAS. In contrast, they did not stain with AB pH 2.5, PAS and SBA.

The serous cells exhibited very strong magenta staining with PAS (Figure 1). In contrast, they stained weakly with AB pH 2.5 (Figure 9) and negative stain or weakly stain after treated with neuraminidase (Figure 10). The serous cells were

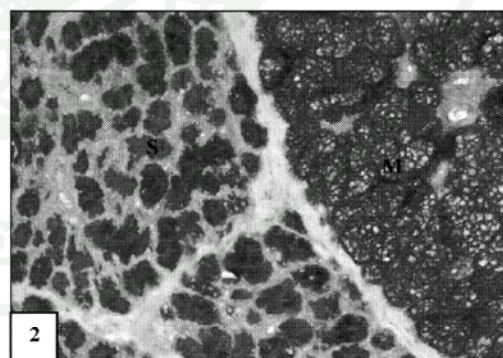
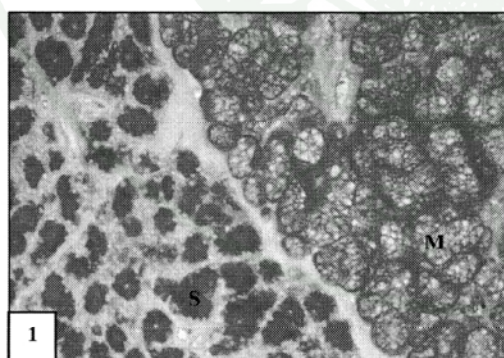
stained moderately to strongly with UEA - I (Figure 4) and RCA - I (Figure 8) respectively. The labeling was also moderate to strong with Con A (Figure 5) and WGA (Figure 7). The serous cells showed weak staining with DBA (Figure 6), whereas negative stain was evidenced by SBA (Figure 3). Labeling was strong to very strong with PNA (Figure 11). However, digestion with neuraminidase did not cause an increment in PNA (Figure 12) staining.

**Table 1** Histochemical reaction of glycoconjugates in sublingual salivary gland of the Malayan pangolin (*Manis javanica*).

| Staining methods | Mucous cells | Serous cells |
|------------------|--------------|--------------|
| AB pH 2.5        | 3            | 1            |
| Neu - AB pH 2.5  | 0 - 1        | 0 - 1        |
| PAS              | 2 - 3        | 4            |
| AB pH 2.5 - PAS  | 2 - 3        | 3 - 4        |
| SBA              | 0            | 0            |
| UEA-I            | 0            | 3 - 4        |
| Con A            | 3            | 2 - 3        |
| DBA              | 1 - 2        | 1            |
| WGA              | 1            | 2            |
| RCA-I            | 1            | 4            |
| PNA              | 1            | 3 - 4        |
| Neu - PNA        | 2 - 3        | 3 - 4        |

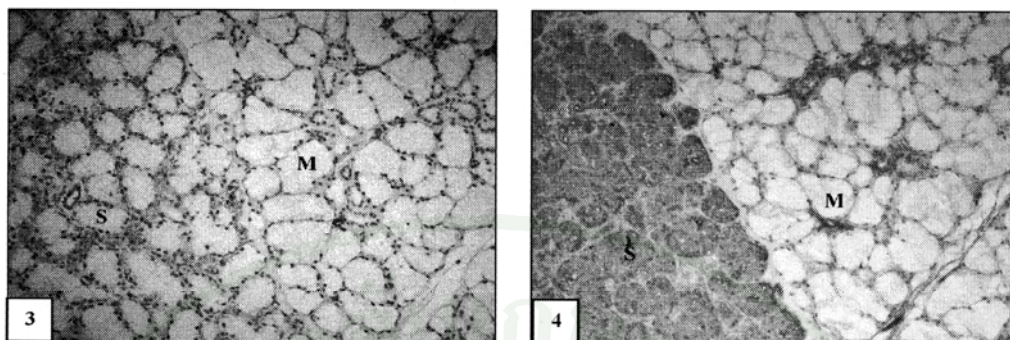
Numbers indicate staining intensity on a subjective scale :

0 = unstained, 1= weak, 2= moderate, 3= strong , 4 = very strong , Neu = Neuraminidase



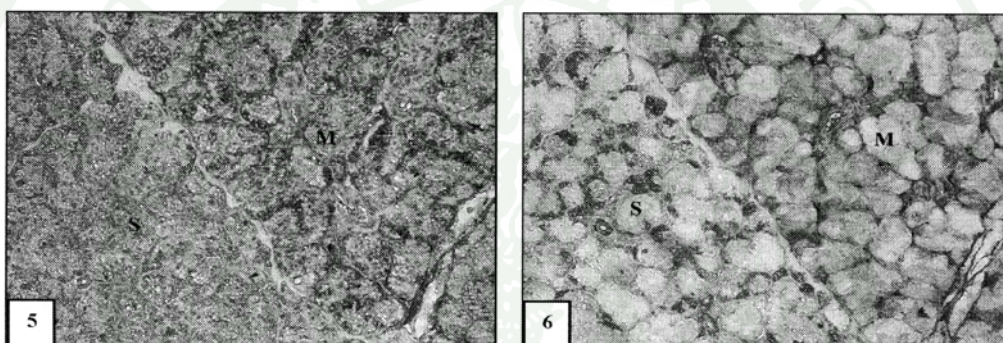
**Figure 1** The mucous cells (M) stained strongly positive with PAS. The serous cells (S) exhibit very strong magenta staining with PAS (200X).

**Figure 2** The dual staining with AB pH 2.5 - PAS resulted in deep blue with mucous cells (M) and strong red with serous cells (S) (200X).



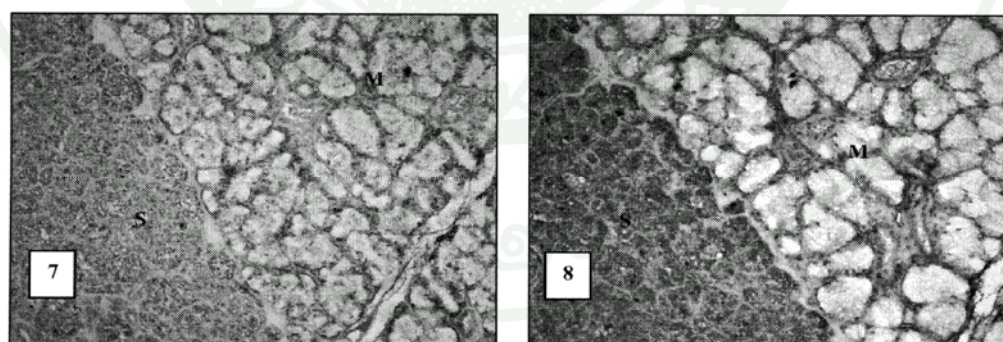
**Figure 3** The lectins SBA did not label mucous cells (M) and serous cells (S) (200X).

**Figure 4** The mucous cells (M) were unreactive toward UEA-I. In contrast, the serous cells (S) stained positively after UEA-I (200X).



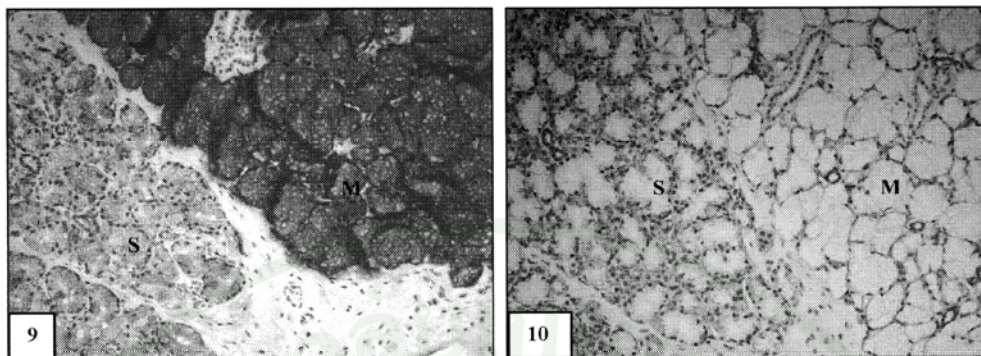
**Figure 5** The lectins Con A strongly stained the mucous cells (M) and a moderate to strong reaction in serous cells (S) (200X).

**Figure 6** The lectins DBA weakly to moderately marked mucous cells (M), while it only weakly stained serous cells (S) (200X).



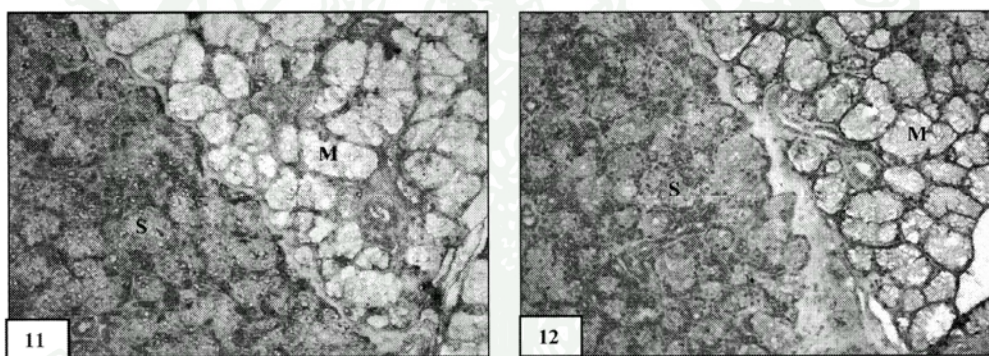
**Figure 7** The lectins WGA caused weak staining in mucous cells (M) and the labeling was moderate with serous cells (S) (200X).

**Figure 8** The mucous cells (M) show a weak reaction with RCA - I. In contrast, the serous cells (S) stained very strongly with RCA - I (200X).



**Figure 9** The mucous cells (M) stain intensely with AB pH 2.5 but the labeling was weak in serous cells (S) (200X).

**Figure 10** Digestion with neuraminidase greatly diminished the intensity of AB pH 2.5 reaction of mucous cells (M) and serous cells (S) (200X).



**Figure 11** The reaction with the lectins PNA was weak in serous cells (S) but an intense staining was evident after lectins PNA in mucous cells (M) (200X).

**Figure 12** After neuraminidase treatment caused an enhancement of lectins PNA reactivity in mucous cells (M) but did not modify serous cells (S) after treatment (200X).

In the striated duct cells, the supranuclear region of serous cells were stained positively with UEA-I, Con A, DBA, WGA, RCA-I and PNA but the supranuclear region of serous cells were unreactive with AB pH 2.5, PAS, AB pH 2.5 - PAS and SBA.

### DISCUSSION

Histochemical methods indicate a precise localization of individual glycoconjugates to specific intra and extracellular sites. More recently,

lectin histochemistry demonstrated a remarkable variety saccharides residues of glycoconjugates in the tissue. It is well known that lectin histochemistry represents a more sensitive method than conventional histochemistry for detecting glycoconjugates (Spicer and Schulte, 1992; Danguy *et al.*, 1998).

In this study, glycoconjugates were formed in both mucous cells and serous cells in secretory endpieces of sublingual salivary gland of Malayan Pangolin (*Manis javanica*).

The mucous cells reacted strongly with AB pH 2.5 (Spicer *et al.*, 1967), PAS (Pearse, 1968) and AB pH 2.5 – PAS (Mowry, 1963), revealing the presence of vicinal diol groups with acid and neutral glycoconjugates. Sialic acid residues were furthermore confirmed by AB pH 2.5 staining procedure after enzyme digestion with neuraminidase. Lectin histochemistry revealed the presence of glycoconjugates containing mannose (Con A labeling),  $\alpha$  N - acetylgalactosamine (DBA labeling), N - acetylglucosamine (WGA labeling) and Galactosyl ( $\beta$ 1  $\rightarrow$ 4) N - acetylglucosamine (RCA - I labeling) residues in mucous cells. Conversely, the negative results obtained in mucous cells after lectins SBA and UEA - I incubation indicated the absence of  $\beta$  N - acetylgalactosamine and fucose residues. In addition, the intensification of PNA staining after neuraminidase digestion confirmed highly presence of sialic acid residues linked to Galactosyl ( $\beta$ 1  $\rightarrow$ 3) N - acetylgalactosamine in the terminal position.

The serous cells presented uniform and intense staining with PAS and AB pH 2.5 – PAS demonstrating the presence of primarily neutral glycoconjugates and some acid glycoconjugates. Furthermore, the presence effects of digestion of this enzyme neuraminidase upon the AB pH 2.5 reaction of the serous cells are taken to indicate the existence of the sialic acid residues. In the present study, the lectins Con A, WGA, RCA - I and UEA - I were also positive in the serous cells, indicated the presence of glycoconjugates with mannose, N - acetylglucosamine, Galactosyl ( $\beta$ 1  $\rightarrow$ 4) N - acetylglucosamine and fucose residues.

In this study, it could be demonstrated the variety of glycoconjugates in secretory mucins in the sublingual salivary gland of Malayan Pangolin (*Manis javanica*). This general data of glycoconjugates was intended to illustrate the importance of glycoconjugates and to explain the necessity of localizing carbohydrate moieties at

cellular levels. Predominant glycoconjugates with terminal sialic acid in mucous cells were believed to coat the mucosal surface so as to provide an environment designed to preserve hydration and to protect the cell from pathogenic organisms (Schulte *et al.*, 1984). In addition, predominant neutral glycoconjugates with fucose residues in serous cells were also thought to guard against digestive tract infections (Mondoa *et al.*, 2001; Elkins, 2003). Fucose and another sugar residue, mannose, have the ability to kill bacteria and to fortify resistance to infections. Moreover, both neutral and acid glycoconjugates were important components of saliva. These glycoconjugates were extremely effective in binding masticated food into a slippery bolus and slides easily through digestive tract without inflicting damage to the mucosa.

In conclusion, these data define the normal picture of conventional and lectin labeling in sublingual salivary gland of Malayan pangolin (*Manis javanica*) for the first time. More data is needed in order to better define the significance of these findings.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded by the the graduate School Kasetsart University. We would like to thank the Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, for providing some of experimental facilities.

## LITERATURE CITED

- Danguy, A., C. Decaestecker, F. Genten, I. Salmon and R. Kiss. 1998. Applications of lectins and neoglycoconjugates in histology and pathology. **Acta Anatomica**. 161: 206 - 218.
- Elkins, R. M.H. 2003. Miracle Sugars. Woodland Publishing. Online : <http://www.glyconutrients-center.org/fucose.php>.
- Goldstein, I.J and C.E. Hayes. 1978. The lectins : Carbohydrate binding proteins of plant and

- animal. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.** New York. 35: 127 - 340.
- Harrison, J.D. 1974. Salivary glands of the cat: a histochemical study. **Histochem. J.** 6: 649 - 664.
- Mondoa, E.I.M.D and K. Mindy. 2001. Sugars that Heal. Ballantine Publishing. Online : [http://www.randomhouse.com/catalog/display.pperl?isbn=9780345441072 & view=excerpt](http://www.randomhouse.com/catalog/display.pperl?isbn=9780345441072&view=excerpt).
- Mowry, R.W. 1963. The special value of methods that color both acidic and vicinal hydroxyl groups in the histochemical study of mucin with revised directions for the colloidal iron stain, the use of alcian blue 8 GX, and their combination with the Periodic acid - Schiff reaction. Ann. NY **Aca.Sci** : 106 - 402.
- Nowak, R. 1999. **Walker 's Mammals of the World**, 6<sup>th</sup> ed. Baltimore : The Johns Hopkins University Press.
- Pearse, A.G.E. 1968. The Periodic acid – Schiff technique, pp. 659 – 660. In J. & A. Churchill (ed.). **Histochemistry, Theoretical and Applied, Vol. 1, 3rd ed.** Edinburgh, London, New York
- Pedini, V., P. Scocco, A. M. Gargiulo, P. Ceccarelli and S. Lorvik. 2002. Glycoconjugate characterization in the intestine of *Umbrina cirrosa* by means of lectin histochemistry. **J. Fish Biology** 61: 1363 – 1372.
- Pedini, V., C. Dall'Aglio, F. Parillo and P. Scocco. 2004. A lectin histochemical study of the oesophagus of shi drum. **J. Fish Biology**. 64: 625 - 631.
- Schulte, B.A., S.S. Spicer and R.L. Miller. 1984. Histochemical localization of sialoglycoconjugates with a sialic acid – specific lectin from the slug *Limax flavus*. **Histochem. J.** 16: 1125 – 32.
- Shackleford, J.M and C.E. Klapper. 1962. Structure and carbohydrate histochemistry of mammalian of salivary gland. Amer. **J. Anat.** 111: 25 - 47.
- Spicer, S.S and J. Duvenci. 1964. Histochemical characteristics of mucopolysaccharides in salivary and exobital lacrimal gland. **Anat. Rec.** 149: 333.
- Spicer, S.S., R.G. Horn and T.J. Leppi. 1967. Histochemistry of connective tissue mucopolysaccharides, pp. 251-203. In B.M. Wagner and D.E. Smith (eds.). **Connective Tissue**. Baltimor: William & Wilkins.
- Spicer, S.S and B.A. Schulte. 1992. Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: A prespective. **J. Histochem. Cytochem.** 40: 1 - 38.
- Stoward, P.J., S.S Spicer and R. Miller. 1980. Histochemical reactivity penut lectin – horseradish peroxidase conjugate. **J. Histochem. Cytochem.** 28: 979 –990.
- Yamada, K and S. Shimizu. 1976. Concanavalin A - peroxidase – diaminobenzidine ( Con A – PO – DAB ) – alcian blue (AB) : Areliable method for dual staining of complex carbohydrates. **J. Histochem.** 47: 159 - 69.
- Yamada, K. and S. Shimizu. 1977. The histochemistry of galactose residues of complex carbohydrates as studied by peroxidase - labelled *Ricinus communis* agglutinin. **J. Histochem.** 53: 143 - 56.

## RESEARCH ARTICLE

## Glycoconjugates in the Secretory Epithelium of the Mandibular Salivary Gland of Malayan Pangolin (*Manis javanica*)

Ruhanee Munyala<sup>1</sup>, Maleewan Liumsiricharoen<sup>1</sup>, Pakawadee Pongket<sup>1</sup>,  
Teerasak Prapong<sup>1</sup>, Apinun Suprasert<sup>1\*</sup>

### Abstract

**Objective** — To reveal the distribution of glycoconjugates in the mandibular salivary gland of the Malayan pangolin (*Manis javanica*).

**Materials and Methods** — The histology and glycoconjugates histochemistry of the mandibular salivary gland in Malayan pangolin (*Manis javanica*) were examined by conventional histology and lectin histochemistry in combination with enzymatic (neuraminidase) digestion. Staining for conventional histology included hematoxylin and eosin (H&E), alcian blue (AB), and periodic acid Schiff (PAS). For lectin histochemistry, we used 7 lectins including *Glycine max* (SBA), Wheat germ agglutinin (WGA), *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA), Concanavalin A (Con A), *Ulex europaeus* agglutinin-I (UEA-I), *Ricinus communis* agglutinin-I (RCA-I) and Peanut agglutinin (PNA). Intensities of staining were evaluated.

**Results** — Morphology of the mandibular salivary gland appears as a tubuloacinar gland with its secretory endpieces contained exclusively mucous acinar cells. A large number of acidic and neutral glycoconjugates were observed in the sections stained with AB and PAS. In the sections stained with lectins, glycoconjugates with N-acetylgalactosamine, N-acetylglucosamine, Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) N-acetylglucosamine and mannose were present; conversely, fucose residues were not found in mucous cells of the gland. Neuraminidase digestion revealed the presence of sialic acid residues linked to Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) N-acetylgalactosamine (PNA staining). In intercalated duct of the gland, the apical surface bordering the lumen was heavily to moderately stained with lectin SBA, WGA, DBA, UEA-I and Con A and weakly to negatively stained with AB pH 2.5, PAS, AB pH 2.5 - PAS and RCA - I.

**Conclusion** — This study demonstrated a remarkable variety of glycoconjugates in the mandibular salivary gland of Malayan pangolin. The variety may reflect different functions.

KKU Vet J. 2009;19(2):162-170

<http://vet.kku.ac.th/journal/>

**Keywords:** Mandibular salivary gland; Malayan pangolin; Glycoconjugates; Lectin histochemistry

<sup>1</sup>Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, 10900, Thailand

\*Corresponding Author E-mail: fvetais@ku.ac.th

## Introduction

The Malayan pangolin (*Manis javanica*) or a scaly anteater, found in Thailand and other countries in Southeast Asia, is a unique and interesting mammal because of at least 2 reasons. First, Chinese people believe that scales of pangolins can reduce swelling, promote blood circulation, and help breastfeeding women to produce milk. For this belief, Thailand has become a major transit hub for pangolins smuggled from Malaysia and Indonesia to China. Second, the pangolin eats insects and ants; therefore, around the forest area where it lives, it may play an important role for controlling the population of those animals. The pangolin also has a distinct gastrointestinal tract. It has no teeth but uses a sticky tongue to eat its prey. In addition, its stomach shows peculiar structures, a thick wall with a lumen often containing stones. This may indicate adapting for its toothlessness, eating habit [1] and triturating function [2].

Histochemistry can be defined as the chemistry of tissue components and its relation to tissue morphology. In histochemical study, lectins have extensively been used as probes in studying the cell surface interaction and carbohydrate composition in many tissues because lectins, naturally polypeptides, can bind specifically to carbohydrate residues in term of glycoconjugates [5]. Lectin histochemistry can be used in combination with enzyme neuraminidase digestion procedure because neuraminidase cleaves terminal sialic acid residues from carbohydrate moieties on the surface cell. Many authors have focused on the importance of glycoconjugates in salivary glands of mammalian species and correlated them with body functions such as, transporting of macromolecules for digestive efficiency, preventing proteolytic damage on epithelium, and defending against bacteria [3,4].

Glycoconjugates histochemical data on mandibular salivary gland of the Malayan pangolin, however, are not available. Therefore, in this study we conducted conventional staining for histological analysis and lectin histochemical methods for detecting sugar residues in the glycoconjugates.

## Material and Methods

### Tissue Collection

The Malayan pangolins (*Manis javanica*) were collected from Khao Prathup Chang Wildlife Breeding Research Station, Ratchaburi province in Thailand. One male Malayan pangolin was deeply anesthetized with sodium pentobarbital by abdomen injection. The mandibular salivary gland was dissected; then, tissue samples of the gland were quickly removed. These tissues were

fixed in 10 % neutral buffered formalin, dehydrated in ethanol, and embedded in paraffin wax. Serial sections (3–4  $\mu\text{m}$ ) of the tissue samples were mounted on albumin coated slides. After that, the sections were stained with either conventional or lectin histochemical methods in combination with enzyme neuraminidase digestion.

#### Tissue Staining

As a detail in **Table 1**, we used both conventional staining (H&E, AB, and PAS) and lectin (7 types of lectins) histochemical staining methods.

**Table 1.** Summary of Staining for Conventional Histology and Lectin Histochemistry

| Conventional Staining Procedures                                                             | Lectin Histochemical Staining Procedures                                                                                         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Hematoxylin and Eosin (H&E)<br>for the general observation of<br>histological structures. | 1. <i>Glycine max</i> (SBA) for<br>N - acetylgalactosamine residues.                                                             |
| 2. Alcian Blue pH 2.5 (AB pH 2.5)<br>for detection acidic glycoconjugates [6].               | 2. Wheat germ agglutinin (WGA) for<br>N - acetylglucosamine residues [9].                                                        |
| 3. Periodic acid - Schiff (PAS) for<br>vicinal - diol containing glycoconjugates [7].        | 3. <i>Dolichos biflorus</i> agglutinin (DBA) for<br>N - acetylgalactosamine residues.                                            |
| 4. AB pH 2.5 - PAS for demonstrating<br>acidic and neutral glycoconjugates [8].              | 4. Concanavalin A (Con A) for mannose<br>residues of glycoconjugates [10].                                                       |
|                                                                                              | 5. <i>Ulex europaeus</i> agglutinin -I (UEA-I) for fu<br>cose residues [9].                                                      |
|                                                                                              | 6. <i>Ricinus communis</i> agglutinin -I (RCA-I) for<br>Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) N- acetylglucosamine<br>residues. |
|                                                                                              | 7. Peanut agglutinin (PNA) for Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 3$ )<br>N - acetylgalactosamine residues.                       |

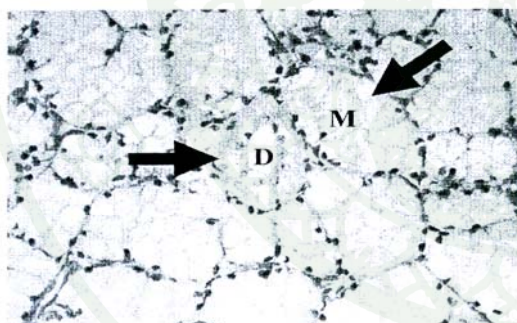
#### Enzyme Digestion

We used neuraminidase (from *Vibrio cholerae*) for enzymatic digestion procedures. Before stained with AB pH 2.5, AB pH 2.5 - PAS and lectin PNA, the sections were incubated in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.5) containing 1 unit/ml of the enzyme and 0.04 M  $\text{CaCl}_2$  at 39–41 °C for 12–16 h [6]. The controls for enzyme digestion were exposed to neuraminidase-free buffer under the same experimental conditions. The section were observed and photographed under light microscope (LM). To determine intensities of each staining, each stained slide was evaluated subjectively under 4 categories (0=unstained, 1=weak stained, 2=moderate stained, 3=strong stained, and 4=very strong stained).

## Results

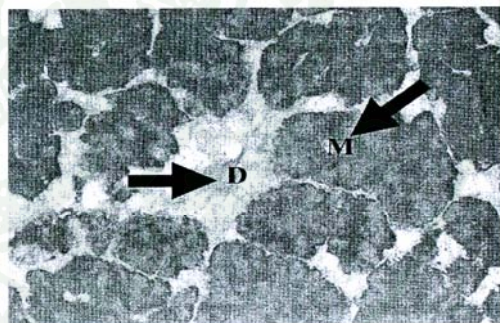
The mandibular salivary gland of Malayan pangolin (*Manis javanica*) showed tubuloacinar gland with its secretory endpieces containing exclusively mucous cells (**Figure 1**). The intensities of staining of mucous cells of the gland were listed in **Table 2**. The secretory granules of the mucous cells were stained strongly with AB pH 2.5 and PAS (**Figure 2**). In combined staining, the mucous cells were in deep blue with AB pH 2.5-PAS (**Figure 3**). With lectin staining procedure, the mucous cells showed strong to very strong staining with SBA, WGA and DBA (**Figure 5**), moderate staining with lectin RCA- I, and weak to negative staining with Con A and UEA-I (**Figure 6**). Under AB pH 2.5-PAS staining, color of numerous mucous cells changed from deep blue to light blue after neuraminidase digestion (**Figure 4**). The mucous cells were reacted very strongly with AB pH 2.5 staining but reacted weakly after treatment with neuraminidase. The mucous cells were unstained with lectin PNA; however, they were stained weakly with this lectin after neuraminidase digestion. In an intercalated duct of the gland, the apical surface bordering the lumen was positively stained with SBA, WGA, DBA, UEA - I and Con A , with the exception of AB pH 2.5, PAS, AB pH 2.5-PAS and lectin RCA - I.

**Figure 1.** The Mandibular Salivary Gland of Malayan pangolin (*Manis javanica*) with H&E Staining



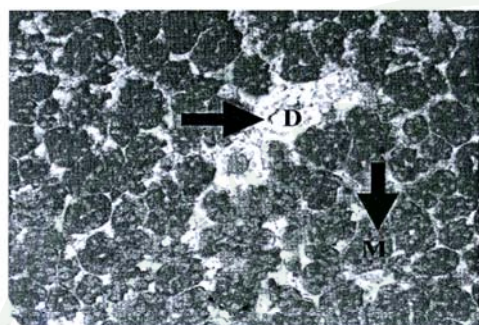
A tubuloacinar gland was observed with its secretory endpieces containing exclusively mucous cells [M]. The intercalated duct [D] was stained moderately with H&E. Image magnification=400X

**Figure 2.** The Mandibular Salivary Gland of Malayan pangolin (*Manis javanica*) with PAS Staining



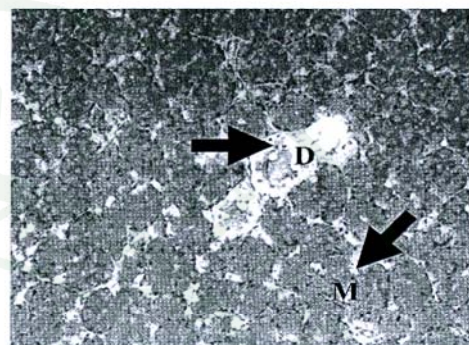
With PAS staining, mucous cells [M] of the gland were strongly positive, but the intercalated duct [D] was weak to negative. Image magnification=400X

**Figure 3.** The Mandibular Salivary Gland of Malayan pangolin (*Manis javanica*) with AB pH 2.5-PAS Dual Staining



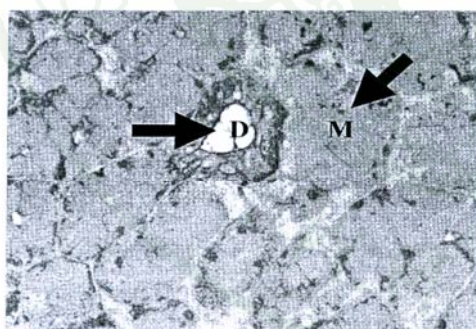
A large number of mucous cells [M] were in deep blue, but the intercalated duct [D] was not stained. Image magnification=200X

**Figure 4.** The Mandibular Salivary Gland of Malayan pangolin (*Manis javanica*) with AB pH 2.5-PAS Dual Staining Plus Neuraminidase Digestion



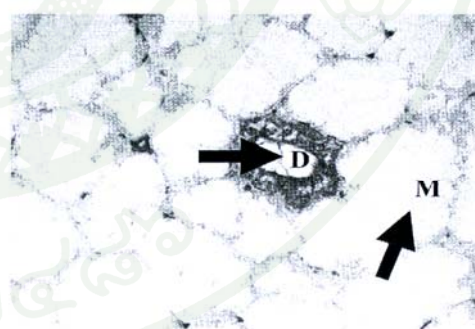
The staining of the mucous cells [M] changed from deep blue to light blue. The intercalated duct [D] remained unreactive. Image magnification=200X

**Figure 5.** The Mandibular Salivary Gland of Malayan pangolin (*Manis javanica*) with lectin DBA Staining



The mucous cells [M] and the intercalated duct [D] were strongly to very strongly positive. Image magnification=400X

**Figure 6.** The Mandibular Salivary Gland of Malayan pangolin (*Manis javanica*) with lectin UEA - I Staining



The mucous cells [M] were unstained; conversely, the intercalated duct [D] exhibited strongly reaction. Image magnification=400X

**Table 2.** Intensities of Conventional and Lectin Histochemical Staining in the Mandibular Salivary Gland of Malayan Pangolin (*Manis javanica*)

| Staining Methods    | Intensities in Mucous Cells |
|---------------------|-----------------------------|
| AB pH 2.5           | 4                           |
| Neu - AB pH 2.5     | 1 - 2                       |
| PAS                 | 4                           |
| AB pH 2.5 - PAS     | 3 - 4                       |
| Neu AB pH 2.5 - PAS | 1 - 2                       |
| SBA                 | 3 - 4                       |
| WGA                 | 3 - 4                       |
| DBA                 | 3 - 4                       |
| Con A               | 1                           |
| UEA - I             | 0                           |
| RCA - I             | 2                           |
| PNA                 | 0                           |
| NEU - PNA           | 1                           |

Abbreviations: AB, Alcian blue; Neu, Neuraminidase; PAS, Periodic acid Schiff; SBA, *Glycine max*; WGA, Wheat germ agglutinin; DBA, *Dolichos biflorus* agglutinin; Con A, Concanavalin A; *Ulex europaeus* agglutinin-I, UEA-I; RCA-I, *Ricinus communis* agglutinin -I; PNA, Peanut agglutinin.

Staining interpretations: 0 = Unstained, 1 = Weak, 2 = Moderate, 3 = Strong, 4 = Very strong

## Discussion

As a major salivary gland of the body, a mandibular salivary gland of different mammals shows a great variety in the form of its secretory endpieces. In cats [11,12] and dogs [11,13,14], the secretory endpieces showed mucous cells with seromucous cells. However, in goats, the secretory endpieces are mainly composed of mucous cells with serous demilunes, but some serous cells were also found. In contrast, the mandibular salivary gland of mice revealed the presence of seromucous cells. [15,16]. In the present study, the mandibular salivary gland of Malayan pangolin showed tubuloacinar gland with its secretory endpieces containing exclusively mucous cells. Similar results were found in the chicken [17]. Histochemical methods have been developed for qualitative and quantitative analysis of virtually all cellular components including proteins, carbohydrates, and lipids [18,19]. The histochemical results in a mandibular salivary gland of the mouse demonstrate the presence of neutral glycoconjugates [15,16].

In this study, vicinal diol group and acidic glycoconjugates were observed in a numerous mucous cells of the mandibular salivary gland of Malayan pangolin. Lectin histochemistry demonstrated a remarkable variety of glycoconjugates in the tissue. Lectin staining showed the presence of N-acetylgalactosamine (SBA and DBA labeling), N-acetylglucosamine (WGA labeling) and Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) N-acetylglucosamine (RCA-I labeling) in a large number of the mucous cells. Conversely, the failure of mucous cells to staining with lectin UEA-I and Con A indicated the absence or the presence at only low levels of fucose and mannose residues. This basic study shows that the mucous cells of Malayan pangolin is characterized by a rich supply of glycoconjugates. Acid glycoconjugates prevent damage to the gut epithelium [20] and the presence of neutral glycoconjugates could be evidence of absorption [21]. The mucus secreted by mucous cells aids lubrication of the food during passage and may provide cofactors required for enzymatic degradation of the food [22]. It is well known that salivary mucins serve as a masticatory lubricant, contributing to the formation of a thin film, which maintains the mucosa integrity of the first tract of the digestive system.

In addition, the acidic glycoconjugates are thought to contain terminal sialic acid residues since AB pH 2.5 reaction decreased in intensity after digestion with neuraminidase [23]. Furthermore, the present effects of digestion of this enzyme upon the AB pH 2.5-PAS reaction of the mucous cells indicate the presence of the sialic acid residues. Intensity of the lectin PNA staining in the mucous cells was increased after neuraminidase digestion, this indicated the presence of sialic acid residues linked to Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) N - acetylgalactosamine in the terminal position. Predominant glycoconjugates with terminal sialic acid in mucous cells may coat the mucosal surface so as to provide an environment designed to preserve hydration [24,25] and to protect the cell from pathogenic organisms [26].

### Acknowledgement

This research was supported by the Graduate School, Kasetsart University. We thanked the Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, for Kasetsart University for providing some of experimental facilities.

## References

1. Nisa C, Kitamura N, Sasaki M, Agungpriyono S, Choliq C, Budipitojo T, et al. Immunohistochemical study on the distribution and relative frequency of endocrine cells in the stomach of the Malayan pangolin, *Manis javanica*. *Anat Histol Embryol*. 2005;34:373-378.
2. Stevens CE, Hume ID. *Comparative physiology of the vertebrate digestive system*. 2nd ed. New York: Cambridge University Press. 1995.
3. Nakhoul SA, Nakhoul NL, Wheeler SA, Haque S, Wang P, Brown K, et al. Characterization of esophageal submucosal glands in pig tissue and cultures. *Dig Dis Sci*. 2007;52:3054-3065.
4. Arellano J, Dinis MT, Sarasquete C. Histomorphological characteristics of the intestine of the Senegal Sole, *Solea senegalensis*. *Eur J Histochem*. 1999;43:121-133.
5. Scocco P, Accili D, Menghi G, Ceccarelli P. Unusual glycoconjugates in the oesophagus of a tilapine polyhybrid. *J Fish Biology*. 1998;53:39-48.
6. Spicer SS, Horn RG, Leppi TJ. Histochemistry of connective tissue mucopolysaccharides. In: Wagner BM, Smith DE, editors. *The connective tissue*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1967. p.251-303.
7. Pearse AGE. *Histochemistry, theoretical and applied*. New York: Churchill; 1968.
8. Mowry RW. The special value of methods that color both acidic and vicinal hydroxyl groups in the histochemical study of mucin with revised directions for the colloidal iron stain, the use of alcian blue 8 GX, and their combination with the Periodic acid - Schiff reaction. *Ann NY Aca Sci*. 1963;106-402.
9. Goldstein IJ, Hayes CE. The lectins: carbohydrate binding proteins of plant and animal. *Adv Carbohydr Chem Biochem*. 1978;35:127-340.
10. Yamada K, Shimizu S. Concanavalin A-peroxidase-diaminobenzidine (Con A -PO-DAB) - alcian blue (AB): a reliable method for dual staining of complex carbohydrates. *Histochem*. 1976;47: 159-169.
11. Leppi TJ, Spicer SS, Henson JG, Fioravanti J. Correlated histochemical staining and  $S^{35}O_4^{+}$  labeling (sic) of salivary gland mucosubstances. *J Histochem Cytochem*. 1967;15:745-751.
12. Shackelford JM, Wilborn WH. Ultrastructural aspects of calf submandibular glands. *Am J Anat*. 1970b;127:259-279.
13. Miyazaki K. Histological and histochemical investigations on the major salivary glands of the dog. *Aichi Gakuin J Dent Sci (Nagoya)*. 1972;10:125-147.
14. Reifel CW, Travill AA. Structure and carbohydrate histochemistry of postnatal canine salivary glands. *Am J Anat*. 1972;134:377-393.
15. Caramia F. Ultrastructure of mouse submaxillary gland.I. Sexual differences. *J Ultrastruct Res*. 1966;16:505-523.
16. Martinez - Hernandez A, Nakane PK, Pierce GB. The secretory granules of the acinar cells of the mouse submaxillary gland. *Am J Anat*. 1972;133:259-267.
17. Suprasert A, Fujioka T, Yamada K. Glycoconjugates in the secretory epithelium of the chicken mandibular gland. *J Histochem*. 1986;18:115-121.

18. Conn HJ. *Biological stains: a handbook on the nature and uses of the dyes employed in the biological laboratory*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1989.
19. Kiernan JA. *Histological and histochemical methods : theory and practice*. 2nd ed. Oxford: Pergamon Press; 1990.
20. Ferraris RP, Tan JD, De La Cruz MC. Development of the digestive tract of milkfish, *channos chanos*: Histology and Histochemistry. *Aquaculture*.1987;61:241-257.
21. Sarasquete C, Gisbert E, Ribeiro L, Vieira L, Dinis MT. Glycoconjugates in epidermal, branchial and digestive mucous cells and gastric glands of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, Senegal sole, *Solea senegalensis* and Siberian sturgeon, *Acipenser baeri* development. *European J histochem*. 2001;45:267-278.
22. Anderson TR. Histological and cytological structure of the gastrointestinal tract of the luderick, *Girella tricuspidata* (Pisces, Kyphosidae) in relation to diet. *J Morphol*. 1986;190:109-119.
23. Suprasert A, Fujioka T. Lectin histochemistry of glycoconjugates in esophageal mucous gland of the chicken. *Jpn J Vet Sci*. 1987;49:555-557.
24. Jeanloz RW, Codington JF. The biological role of sialic acid at the surface of the cell. In: Rosenberg A, Schengrund CL, editors. *Biological roles of sialic acid*. New York: Plenum Press; 1976. p. 201-238.
25. Montreuil J. Primary structure of glycoprotein - glycans: basis for the molecular biology of glycoproteins. *Adv Carbohydr Chem Biochem*. 1980;37:157-213.
26. Schulte BA, Spicer SS, Miller RL. Histochemical localization of sialoglycoconjugates with a sialic acid specific lectin from the slug *Limax flavus*. *J Histochem*. 1984;16:1125-1132.



## การตรวจหาเนื้อเยื่อเคมีไกลโคคอนจูเกตในต่อมน้ำลายกหนูของลิงชวา

รุธานี หมิ่นยะลา<sup>1</sup>, มาลีวรรณ เหลี่ยมศิริเจริญ<sup>1</sup>, ผกาดี พงษ์เกษ<sup>1</sup>,

ธีระศักดิ์ พรพวงษ์<sup>1</sup>, อภินันท์ สุประเสริฐ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

**บทคัดย่อ** ศึกษาการแพร่กระจายของสารไกลโคคอนจูเกตในต่อมน้ำลายกหนูของลิงสายพันธุ์ชวาโดยวิธีการย้อมด้วยเทคนิคเนื้อเยื่อทางเคมีและใช้สารเลกตินร่วมกับย้อมด้วยแอนไชม์นิวรามิเนส ผลการศึกษาพบว่าต่อมน้ำลายกหนูมีลักษณะเป็น tubuloacinar gland เซลล์คัดหลั่งแบบ seromucous cells ผลการย้อมพบ acid and vicinal - diol groups และ acid กับ neutral GCs แพร่กระจายใน mucous cells จำนวนมาก ขณะที่ serous cells พบเล็กน้อย หลังย้อมด้วยแอนไชม์นิวรามิเนสย้อมต่อด้วย AB pH 2.5 พบ sialic acid จำนวนมาก ผลการย้อมด้วยสารเลกตินพบอนุพันธ์น้ำตาล mannose, N - acetylgalactosamine, Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) N - acetylglucosamine, fucose and N - acetylglucosamine ใน serous cells ขณะที่ mucous cells พบเพียง N - acetylgalactosamine และ N - acetylglucosamine ผลการย้อมด้วยแอนไชม์นิวรามิเนสย้อมต่อด้วยเลกติน PNA บริเวณ mucous cells พบ sialic acid จับกับ Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) N - acetylgalactosamine สารไกลโคคอนจูเกตที่พบมากมายในต่อมน้ำลายกหนูจะช่วยป้องกันเซลล์จากการถูกรุกรานจากเชื้อโรคในช่องปาก

**คำสำคัญ :** ต่อมน้ำลายกหนู, ไกลโคคอนจูเกต, เนื้อเยื่อเคมี, ลิงพันธุ์ชวา

### Introduction

The malayan pangolin (*Manis javanica*) or scaly anteaters are strikingly unique creatures. The digestive system of *Manis javanica* shows peculiar structure because of the insect eating adaption habit. They have extremely long tongues, which covered with a sticky saliva secreted from the large salivary glands<sup>(1)</sup>. The sense of smell of *Manis javanica* is good at the location of termite and ant nests<sup>(2)</sup>. The parotid salivary glands of other mammals is mainly serous cells, secrete a number of proteins, fluid and electrolytes important in glandular secretion, digestion proteins and hydration of mucins. Generally,

Address request for reprints : Apinun suprasert, Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand ; E – mail : fvetais@ku.ac.th

glycoconjugates appear to play important roles in many functions of salivary glands, including the defense against chemical and mechanical damages, as well as microbial invasion in the oral cavity<sup>(3,4)</sup>. The morphology and histochemistry of parotid salivary glands in mammals has been the object of numerous reports<sup>(5,6,7)</sup>. However, there has been no report available on the lectin histochemistry of the glycoconjugates in the parotid salivary gland of *Manis javanica*. The present study aims to reveal the distribution of complex carbohydrates in the parotid salivary glands of *Manis javanica* by using conventional, lectins histochemical staining and enzyme neuraminidase digestion methods.

### Materials and Methods

Two adult female *Manis javanica*, weighing between 2500 - 3000 g, were obtained from Khao Prathup Chang Wildlife Breeding Research Station, Ratchaburi Province, Thailand. The animals were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (20 mg/kg) to overdose by abdomen injection and

under' gone operation for collecting tissue of parotid salivary gland as quickly as possible. After sample collection, the specimens was fixed for gross anatomical study.

The parotid salivary gland were fixed in buffered formalin, dehydrated, cleared and embedded. Blocks were cut at 3 - 4  $\mu$ m, mounted on albumin coated slides and stained with AB pH 2.5, PAS, AB pH 2.5 - PAS. Lectins applied were Con A, DBA, PNA, RCA - I, SBA, UEA - I and WGA staining, sometimes in combination with neuraminidase enzyme treatment.

### Enzyme digestion

Enzymatic digestion with neuraminidase (from *Vibrio cholerae*) was performed prior to stain with AB pH 2.5 and lectin PNA. Sections were incubated in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.5) containing 1 unit/ml of the enzyme and 0.04 M  $\text{CaCl}_2$  at 39 - 41 C° for 12 - 16 h<sup>(8)</sup>. The control specimens for enzyme digestion were also done by exposing to neuraminidase free buffer under the same experimental conditions.

The sections were observed and photographed under light microscope (LM). This is study a test of eyesight observation and staining of positive sites was assessed

subjectively by numbers indicate staining from 0, unstained to 4, very strong.

## Results

The conventional and lectins histochemical staining methods demonstrated positive reactions of various intensities for different glycoconjugates in the secretory endpieces of the parotid salivary gland of malayan pangolins (*Manis javanica*). The main findings of this work were summarized in Table 1. Our study through light microscopy (LM), the stain with H&E showed tubuloacinar gland and secretory endpieces was characterized by the presence of a large number of serous cells and a few mucous cells (seromucous cells). The histochemical results (Figure 1), the serous cells showed a weak positive stain to PAS, while mucous cells showed strong stain (A). The majority of serous cells showed pale positive stain to AB pH 2.5 - PAS, while mucous cells showed intensive stain (B). The mucous cells showed strong staining with the AB pH 2.5 but serous cells did not stain (C). After treatment with neuraminidase and

staining by AB pH 2.5, both mucous cells and serous cells exhibited weak positive reaction (D). The serous cells disclosed very strong reaction with lectins Con A, whereas mucous cells showed pale staining (E). The serous cells showed weak to moderate staining with lectins RCA - I, SBA and UEA - I (F). In contrast, the mucous cells were unreactive. The lectins DBA strongly marked the serous cells, whereas the mucous cells were moderately stained (G). The lectins WGA moderately stained the serous cells and strongly stained the mucous cells (H). The lectins PNA strongly marked the serous cells, whereas the mucous cells showed negative staining (I). After treatment with neuraminidase and staining by lectins PNA, mucous cells showed strong stain and serous cells showed moderate reaction (J).

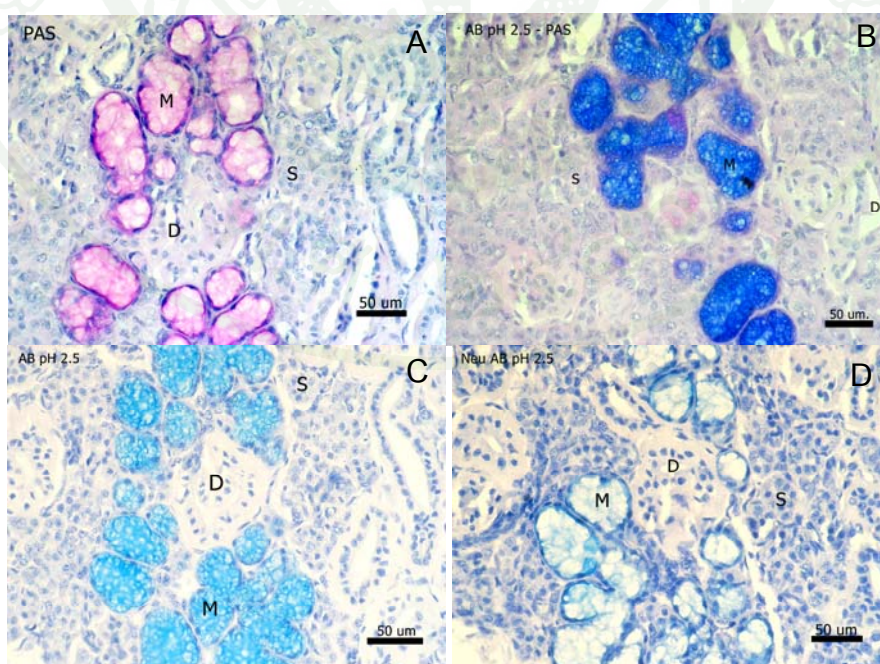
## Discussion

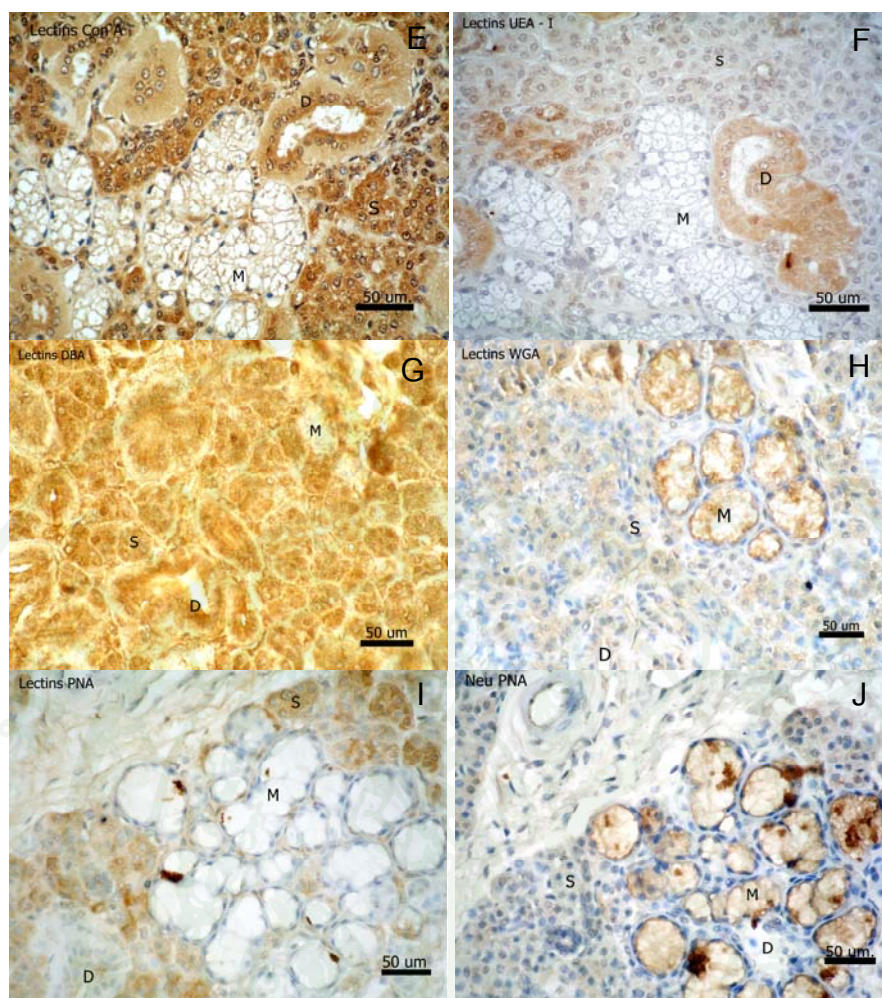
The malayan pangolins (*Manis javanica*) is an insectivorous mammals with peculiar structures of digestive system. Since there is no teeth in oral cavity of *Manis javanica*, there are a lot of salivary

**Table 1.** A Summary of the results from the conventional and lectin histochemical tests to demonstrate the parotid salivary gland of Malayan pangolin (*Manis javanica*)

| Staining procedures                  | Acronym         | Specificity                                                    | Color of positive reaction |                  |
|--------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------|------------------|
|                                      |                 |                                                                | Serous cells (S)           | Mucous cells (M) |
| Alcian Blue pH 2.5                   | AB pH 2.5       | acidic GCs                                                     | 0                          | 4                |
| Neuraminidase AB pH 2.5              | Neu AB pH2.5    | sialic acid                                                    | 0                          | 1                |
| Periodic acid - Schiff               | PAS             | vicinal - diol group GCs                                       | 1                          | 2                |
| AB pH 2.5 - PAS                      | AB pH 2.5 - PAS | acidic and neutral GCs                                         | 1                          | 4                |
| Concanavalin A                       | Con A           | mannose                                                        | 4                          | 1                |
| <i>Dolichos biflorus</i> agglutinin  | DBA             | N - acetylgalactosamine                                        | 4                          | 2                |
| <i>Ricinus communis</i> agglutinin-I | RCA - I         | Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) N-acetylglucosamine     | 1 - 2                      | 0                |
| Soy bean agglutinin                  | SBA             | N - acetylgalactosamine                                        | 2                          | 0                |
| <i>Ulex europaeus</i> agglutinin-I   | UEA - I         | fucose                                                         | 2                          | 0                |
| Wheat germ agglutinin                | WGA             | N - acetylglucosamine                                          | 2                          | 3                |
| Peanut agglutinin                    | PNA             | Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) N - acetylgalactosamine | 3                          | 0                |
| Neuraminidase PNA                    | Neu PNA         | sialic acid                                                    | 2                          | 3                |

**Note :** 0 = unstained, 1 = weak, 2 = moderate, 3 = strong, 4 = very strong, Neu = Neuraminidase, GCs = Glycoconjugates, S = Serous cells, M = Mucous cells, D = Striated ducts





**Figure 1.** Photomicrographs of the parotid salivary gland of malayan pangolin (*Manis javanica*). PAS staining (A), AB pH 2.5 - PAS staining (B), AB pH 2.5 staining (C), Neu AB pH 2.5 staining (D), Lectins Con A (E), Lectins UEA - I (F), Lectins DBA (G), Lectins WGA (H), Lectins PNA (I), Neu PNA (J).

glands and sticky saliva in a rod - shaped tongue. The parotid salivary gland of *Manis javanica*, is located at the backside of the ear, while other mammals it is in front of the ear. The

lymph node is located between parotid salivary gland and mandibular salivary gland. The parotid salivary gland of *Manis javanica* consists of mainly serous cells and a few of mucous cells

<sup>(9)</sup>, similar to these of goat, cat <sup>(5)</sup> and vampire bat <sup>(10)</sup>. The analysis of the histochemical results in *Manis javanica* obtained with AB pH 2.5, PAS, AB pH 2.5 - PAS staining in the present work, the mucous cells indicate a rich supply of acid and vicinal diol groups with acid and neutral glycoconjugates, respectively. In contrast, the serous cells a lesser or absence acid and vicinal diol groups, similar to those of Hoary bamboo rat <sup>(7)</sup> with acid and neutral glycoconjugates. The significance of acid glycoconjugates in secretory endpieces, prevent damage to the gut epithelium <sup>(11)</sup> and neutral glycoconjugates could be transport of macromolecules through the membranes <sup>(12)</sup>. In addition, the acid glycoconjugates are thought to contain terminal sialic acid residues since AB pH 2.5 reaction decreased in intensity after treatment with neuraminidase <sup>(13)</sup>.

The glycoconjugates distribution in secretory endpieces of parotid salivary gland (*Manis javanica*) has been studied using different labeled lectins. Because lectins can recognize specific carbohydrate residues in the cells <sup>(14)</sup>. In this study, lectins Con A, DBA, RCA - I,

SBA, UEA - I and WGA staining is positive in serous cells, showed a large number of mannose, similar results were found in fallow - deer <sup>(6)</sup> and lesser mouse deer <sup>(15)</sup> N - acetylgalactosamine, similar to those of fallow - deer <sup>(6)</sup> and Hoary Bamboo Rats <sup>(7)</sup>, Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) N - acetylglucosamine, fucose and N - acetylglucosamine residues, respectively. On the contrary, the negative results in mucous cells after lectins Con A, RCA - I and UEA - I staining, whereas positive result in mucous cells staining with lectins Con A, DBA and WGA, indicating the presence of mannose, N - acetylgalactosamine and N - acetylglucosamine residues. Lectin histochemistry revealed differences in production of glycoconjugates in secretory endpieces. The abundance of serous cells secretes mainly of glycoconjugates. In addition to their role in initiation of infection, such as the function in protection against infectious agents in the oral cavity <sup>(16)</sup>. In the present digestion with neuraminidase study, the mucous cells showed increase staining with lectins PNA demonstrating the presence of terminal

sialic acid linked to Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) N - acetylgalactosamine in mucous cells, while the serous cells (both controls and digestion neuraminidase) showed the presence of Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) N - acetylgalactosamine residues. In our study, the parotid salivary gland has shown the different of glycoconjugates in secretory endpieces of malayan pangolins (*Manis javanica*). Interestingly, the mucous cells of parotid salivary gland involved a large amount of sialic acid residues. Such residues are believed to coat the mucosal surface so as to provide and environment designed to preserve hydration<sup>(17)</sup>. Thus, the salivary mucins may be of primary importance in defense against chemical and mechanical damage and microbial invasion in the oral cavity<sup>(3,4)</sup>. In addition, they may be involved in the processes specific for the oral cavity such as mastication and food bolus formation.

#### Acknowledgments

This research was supported by the Graduate School, Kasetsart University (Bangkan). We thanked the Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University for providing some of experimental facilities.

#### References

1. Nowak R. Walker's mammals of the world. 6<sup>th</sup> ed. Baltimore : The Johns Hopkins, University Press, 1999.
2. Ofusori DA, Enaibe BU, Falana BA, Adeeyo OA, Yusuf UA, Ajayi SA. A comparative morphometric analysis of the stomach in rat *Rattus norvegicus*, Bat *Eidolon helvum* and pangolin *Manis tricuspis*. J Cell Ani Biol 2008 ; 2 (3) : 079 - 083.
3. Amerongen AV, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary mucins diversity. J Glycobiol 1995; 5 : 733 - 740.
4. Tabak LA. In defense of the oral cavity structure, biosynthesis and function of salivary mucins. Annu Rev Physiol 1995 ; 57 : 547 - 564.
5. Yong JA, Van Lennep EW. The Morphology of salivary glands, London : Academic Press, 1978 ; 158 - 176.

6. Pedini V, Ceccarelli P, Gargiulo AM, Dall Aglio C. Histochemical study of lectin binding in the major salivary glands of adult fallow - deer (*Dama dama*). *Acta Histochem* 1977 ; 99 (1) : 81 - 89.
7. Kimura J, Habata I, Endo H, Rerkamnuaychoke W, Kurohmaru M, Yamada J, Nishida T, Tsukise A. Histochemistry of complex carbohydrate in the major salivary glands of Hoary Bamboo Rats (*Rhizomys puvinosus*). *Anat Histol Embryol* 1998 ; 27 : 147 - 153.
8. Spicer SS, Horn RG, Leppi TJ. Histochemistry of connective tissue mucopolysaccharides. D.E. William & Wilkins. Baltimore 1967 : 251 - 303.
9. Prapong T, Liumsiricharoen M, Chantakru S, Chongmeepornsirisopa P, Pongket P, Suprasert A. Histology and Histochemistry of the Salivary Glands in Malayan Pangolin (*Manis javanica*). The First Conference of The Asian Association of Veterinary Anatomists, Japan 2006 : 76.
10. Tandler B, Nagato T, Toyoshima K, Phillips CJ. Ultrastructure of the parotid gland in the common vampire bat (*Desmodus rotundus*) with special emphasis on oncocytes. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1997; 29 (1) : 37 - 49.
11. Ferraris RP, Tan JD, De La Cruz MC. Development of the digestive tract of milkfish, *channos chanos*. *J Histol Histochem* 1987 ; 61 : 241 - 257.
12. Sarasquete C, Gisbert E, Ribeiro L, Vieira L, Dinis MT. Glycoconjugates in epidermal, branchial and digestive mucous cells and gastric glands of gilthead sea bream, *Sparus anurata*, Senegal sole, *Solea senegalensis* and Siberian sturgeon, *Acipenser baeri* development. *Eur J Histochem* 2001; 45 : 267 - 278.
13. Suprasert A, Fujioka T. Lectin histochemistry of glycoconjugates in esophageal mucous gland of the chicken. *Jpn J Vet Sci* 1987 ; 49 (3) : 555 - 557.
14. Sharon N, Halina L. Lectins. Kluwer Academic Publisher Dordrecht 2003.
15. Adnyane IKM, Wresdiyati T, Wibawan IWT, Winarto A, Agungpriyono S. The morphological study of salivary glands [parotid and mandibular glands] of the lesser mouse deer (*Tragulus javanicus*) with special reference to the distribution of glycoconjugates and lysozyme. In Proceedings of AZWMP. Faculty of

- Veterinary, Chulalongkorn University, 2007 ; 282 (5) : 2753 - 2764. 122  
Bongkok, Thailand 2006 ; 26 – 29.
16. Sharon N. Lectins : Carbohydrate specific reagents and biological recognition molecules. J Biol Chem 1973 ; 248 (1) : 1-6.
17. Montreuil J. Primary structure of glycoprotein - glycans : basis for the molecular biology of glycoproteins. Adv Carbohydr Chem Biochem 1980 ; 37 : 157 - 213.



## Histochemical detection of glycoconjugates in the parotid salivary gland of Malayan pangolin (*Manis Javanica*)

Ruhanee Munyala<sup>1</sup>, Maleewan Liumsiricharoen<sup>1</sup>, Pakawadee Pongket<sup>1</sup>,

Teerasak Prapong<sup>1</sup> and Apinuni suprasert<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

**Abstract** Study revealed the distribution of glycoconjugates in parotid salivary gland of malayan pangolin (*Manis javanica*) was detected by means of lectins histochemical and enzyme neuraminidase digestion staining methods. The results indicated that tubuloacinar gland and secretory endpieces were characterized by the presence of seromucous cells. Mucous cells showed the great number of acid and vicinal - diol groups and acid with neutral GCs, whereas indicated a few or even absence in serous cells. After digestion with neuraminidase and staining with AB pH2.5, the presence of sialic acid residues. The results of lectins staining, the presence of mannose, N - acetylgalactosamine, Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) N - acetylglucosamine, fucose and N - acetylglucosamine residues in serous cells, whereas mucous cells showed the presence of N - acetylgalactosamine and N - acetylglucosamine residues. After neuraminidase digestion revealed the presence of terminal sialic acid linked to Galactosyl ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) N - acetylgalactosamine in mucous cells. Many GCs found in parotid salivary gland function for protection cells from invasion of pathogenic organisms in oral cavity.

**Keyword** : parotid salivary gland, glycoconjugates, histochemical, Malayan pangolin

## ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ นางสาวรุธานี หมื่นยะลา

เกิดวันที่ 21 ธันวาคม 2526

สถานที่เกิด ชูแอบอาลี เมืองมังกะฮ์ ประเทศซาอุดีอาระเบีย

ประวัติการศึกษา วท.บ. (วิทยาศาสตร์สุขภาพสัตว์) คณะเกษตรศาสตร์บางพระ  
สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล จังหวัดชลบุรี

ตำแหน่งปัจจุบัน -

สถานที่ทำงานปัจจุบัน -

ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ ร่วมเสนอผลงานทางวิชาการระดับนานาชาติและตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติ เช่น

- เสนอผลงานวิจัยภาคโปสเตอร์หัวข้อเรื่อง Application of lectins for detection of glycoconjugates in sublingual gland of the Malayan Pangolin, *Manis javanica* ในงานประชุมวิชาการ Japanese Association of Veterinary Anatomists (JAVA 2007) ระหว่างวันที่ 3 - 5 เมษายน 2550 ณ ประเทศญี่ปุ่น
- เสนอผลงานวิจัยภาคโปสเตอร์หัวข้อเรื่อง Glycoconjugates in the Secretory Epithelium of the Mandibular Salivary Gland of Malayan Pangolin (*Manis javanica*) ในงานประชุมวิชาการ The Second Congress of the Asian Association of Veterinary Anatomists (AAVA 2007) ระหว่างวันที่ 12 - 14 กันยายน 2550 ณ ประเทศไทย และได้ตีพิมพ์ในวารสาร KKU Veterinary Journal. 19 (2): 162 - 170. July - December (2009)
- เสนอผลงานวิจัยภาคโปสเตอร์หัวข้อเรื่อง Histochemical detection of glycoconjugates in the parotid salivary gland of Malayan pangolin (*Manis Javanica*) ในงานประชุมวิชาการวิชาการ Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2009) ระหว่างวันที่ 14 - 16 กุมภาพันธ์ 2552 ณ ประเทศไทย และได้ตีพิมพ์ในวารสารเชียงใหม่สัตวแพทยสาร ฉบับปีที่ 8 เล่ม 1 ปี 2553 (ขณะนี้อยู่ระหว่างการจัดพิมพ์)

ทุนการศึกษาที่ได้รับ ทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2550 จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน