วิจารณ์ผลการทดลอง

วิตามินซีเป็นวิตามินที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายให้การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ รวมทั้งนำมาผสมในอาหารในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเพื่อวัตถุประสงค์ต่าง ๆ มากมาย แต่การศึกษาบทบาทของวิตามินซีที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง โดยเฉพาะในกลุ่ม crustacean ยังมีข้อมูลน้อยอยู่ รวมทั้งบทบาทของวิตามินซีที่เข้าไปมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ในกลุ่มนี้ยังไม่แน่ชัด เนื่องจากกุ้งมีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง ทำให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแตกต่างจากสัตว์ในกลุ่มที่มีกระดูกสันหลัง จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าวิตามินซีมีผลทำให้ปริมาณเม็ดเลือดสูงขึ้นสัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น โดยกุ้งกุลาดำที่กินอาหารผสมวิตามินซีจะมีปริมาณเม็ดเลือดอยู่ในช่วง 3.15×10^7 - 6.60×10^7 เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณเม็ดเลือดมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งกุลาดำในกลุ่มที่ไม่มีการผสมวิตามินซีในอาหาร ซึ่งพบว่ามีปริมาณเม็ดเลือดเท่ากับ 2.65×10^7 เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งผลที่ได้คล้ายกับผลงานวิจัยของ Lee and Shiau (2002) พบว่าปริมาณเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่กินอาหารเสริมวิตามินซีในรูปอนุพันธ์ที่แตกต่างกันจะส่งผลให้มีปริมาณเม็ดเลือดต่างกันด้วย โดยปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดจะอยู่ในช่วง 20×10^6 - 35×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร เช่นเดียวกับรายงานของ Le *et al.* (1997) ซึ่งพบว่าในกุ้งกุลาดำกลุ่มที่ได้รับวิตามินซีจะมีค่า Total Haemocytes Count อยู่ในช่วง $20 - 40 \times 10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร เช่นเดียวกัน และเมื่อประเมินค่าองค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันทั้งหมดจากการทดลองที่ 1 พบว่าควรใช้วิตามินซีปริมาณ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ในการทดลองที่ 2 ต่อไป จากการทดลองพบว่ากุ้งที่กินอาหารผสมวิตามินซีเป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน/เดือน เป็นเวลา 1 เดือน มีปริมาณ เม็ดเลือดจะอยู่ในช่วง $4.031 - 4.471 \times 10^7$ เซลล์/มิลลิลิตร โดยมีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกุ้งในกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) ซึ่งใกล้เคียงกับกุ้งที่ได้รับวิตามินซี 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ในการทดลองที่ 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.38×10^7 เซลล์/มิลลิลิตร ภายหลังจากหยุดให้วิตามินซีเพียง 10 วัน ปริมาณเม็ดเลือดจะลดลงอย่างรวดเร็วใกล้เคียงกันทุกทรีทเมนต์แสดงให้เห็นว่าวิตามินซีสามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดได้ระยะเวลาอันสั้นเท่านั้นและยังพบว่าการให้วิตามินซีแก่กุ้งกุลาดำเป็นประจำทุกวันจะมีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงกว่ากุ้งกุลาดำกลุ่มที่ได้รับวิตามินซีเพียง 10 และ 20 วัน/เดือน ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Lopez *et al.* (2003) ซึ่งทำการศึกษาในกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* โดยให้อาหารผสมวิตามินซีปริมาณ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม พบว่ากุ้งขาวกลุ่มที่ได้รับวิตามินซีเป็นประจำทุกวันจะมีค่า Total Haemocytes Count (THC), ปริมาณเม็ดเลือดชนิด granular cells และปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase สูงกว่ากลุ่มที่ให้วิตามินซี 7 วัน สลับกับอาหารไม่ผสมวิตามินซี 7 วันตลอดระยะ

เวลา 40 วัน ซึ่งเมื่อหยุดให้วิตามินซีเพียง 10 วันผลปรากฏว่าปริมาณเม็ดเลือดลดลงค่อนข้างมาก อาจจะเนื่องมาจากคุณสมบัติทางเคมีบางประการของวิตามินซีที่ง่ายต่อการเปลี่ยนแปลงและไม่คงทนเมื่ออยู่ในน้ำ รวมทั้งลักษณะทางสรีรวิทยาของกุ้งกุลาดำเองที่มีลำไส้ที่ตรง จึงทำให้การสะสมวิตามินซีเป็นไปได้น้อยหรือไม่ได้เลย หรือมีปริมาณไม่เพียงพอที่จะนำไปใช้ในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ค่าองค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันมีค่าลดลงเมื่อหยุดให้วิตามินซี ณ เวลาต่าง ๆ

เนื่องจาก haemocytes เป็นศูนย์กลางในการตอบสนองแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้ง โดยอาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดและสารน้ำในน้ำเลือดในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายด้วยกระบวนการต่าง ๆ เช่น Phenoloxidase Activity System, Bactericidal Activity, Phagocytic Activity, Nodule formation and Encapsulation และ Clotting Reaction เป็นต้น ดังนั้นหากปริมาณเม็ดเลือดยิ่งมากนั่นหมายถึงประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันก็จะสูงขึ้น ร่างกายของสัตว์น้ำก็จะสามารถต่อต้านสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคที่จะเข้าสู่ร่างกายได้ดีด้วย เช่นเดียวกับที่มีการศึกษาในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ เกี่ยวกับบทบาทของวิตามินซีที่มีต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ทำหน้าที่ในการกำจัดและทำลายสิ่งแปลกปลอม โดย Thomas and Holt (1978) พบว่าวิตามินซีมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophils และมีส่วนช่วยทำให้เกิดการเคลื่อนที่และการทำงานของเซลล์พวก neutrophils, lymphocytes และ macrophage ดีขึ้น Goodman (2002) รายงานว่าวิตามินซีมีส่วนช่วยให้ประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ lymphocytes และ leucocyte ในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันดีขึ้น เนื่องจากเซลล์ lymphocytes เกิดการ budding หรือเกิดปฏิกิริยา blastogenesis ได้เซลล์ใหม่เพิ่มขึ้น และ John (1999) ยังพบว่าปริมาณวิตามินซีที่เพิ่มขึ้นจะกระตุ้นการทำงานของ cell mediated immunity ในน้ำเลือดและเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวต้องการวิตามินซีในปริมาณสูง เนื่องจากวิตามินซีจะช่วยให้กระบวนการ metabolic ที่เรียกว่า hexose monophosphate หรือ pentose pathway ให้ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดย hexose monophosphate เมื่อเกิดปฏิกิริยาจะให้น้ำตาล ribose ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์ DNA หรือเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวให้มากขึ้น อย่างเช่นเมื่อร่างกายได้รับเชื้อโรคจะส่งผลให้ cytotoxic T-cell เพิ่มจำนวนมากขึ้น นอกจากนี้ hexose monophosphate ยังช่วยให้ phagocytic cell สร้างสารเคมีที่มีความเป็นพิษออกมาจำนวนมากในการย่อยสลายเชื้อโรคด้วยกระบวนการ phagocytosis จึงส่งผลให้กระบวนการย่อยสลายมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น ซึ่งอัตราการการเกิด pentose pathway ดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับปริมาณวิตามินซีที่สิ่งมีชีวิตได้รับ

นอกจากนี้การศึกษาของ Lee and Shiau (2002) ยังพบว่ากุ้งกุลาดำที่กินอาหารเสริมวิตามินซีจะมีผลทำให้เซลล์เม็ดเลือดสามารถผลิต intracellular superoxide anion (O_2^-) ได้ประมาณ 1.27 - 2.24 เท่า ซึ่งมีค่าสูงกว่าเม็ดเลือดที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ซึ่งผลที่ได้คล้ายกับที่มีการศึกษาโดย Song and Hsieh (1994) ซึ่งพบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เม็ดเลือดจะสามารถผลิต intracellular superoxide anion (O_2^-) ได้เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า โดยสารที่ใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่น heat killed *Vibrio vulnificus*, β-1,3-1,6-glucan และ zymosan เป็นต้น

ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งเมื่อได้รับการกระตุ้นพบว่าเอนไซม์หลักที่จะถูกผลิตขึ้นมาคือเอนไซม์ phenoloxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดกระบวนการ melanization ที่เกิดขึ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้ามาใน haemocoel และระหว่างการสมานแผลจะเกิดเป็น melanin ที่ใช้ในการห้อมล้อมสิ่งแปลกปลอมไม่ให้กระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย (Vargas and Albores, 1995) ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่เกิดขึ้นในตัวกุ้ง 90% จะพบในเม็ดเลือดและปริมาณ 10% ในซีรั่ม (กิจการและคณะ, 2543ค; Parrazzolo and Barracco, 1997) ซึ่งจะถูกปลดปล่อยออกมาจากเม็ดเลือดชนิดที่มี granular ถึง 90% ของปริมาณเม็ดเลือดรวมภายในตัวกุ้ง (กิจการและคณะ, 2543ค; Martin and Graves, 1985) จึงเป็นเหตุผลให้ปริมาณเม็ดเลือดมีความสัมพันธ์กับปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase จากการทดลองที่ 1 พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ที่วิเคราะห์ได้จากเม็ดเลือดพบว่ามีค่าแตกต่างกัน โดยเอนไซม์ phenoloxidase จะเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของวิตามินซี แต่เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่าวิตามินซีที่ระดับความเข้มข้น 3 และ 5 กรัม ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิตามินซีในระดับ 1 กรัมและกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) นอกจากนี้เอนไซม์ phenoloxidase ที่สูงขึ้นยังสัมพันธ์กับปริมาณเม็ดเลือดรวมที่เพิ่ม เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 ซึ่งปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งกลุ่มที่ให้วิตามินซีทุกวันพบว่ามีค่าสูงสุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ให้วิตามินซีเพียง 10 วันและกลุ่มควบคุม และเมื่อหยุดให้วิตามินซีพบว่าปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase มีค่าลดลงตามระยะเวลาการให้มีแนวโน้มลดลงตามปริมาณเม็ดเลือด แต่จะพบว่าในบางช่วงของการทดลองปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase มีค่าไม่สัมพันธ์กับปริมาณเม็ดเลือดรวม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณเม็ดเลือดรวมที่นับได้ส่วนใหญ่เป็นชนิดที่ไม่มี granular (hyaline cell) จึงทำให้มีการปลดปล่อยเอนไซม์ดังกล่าวออกมาน้อย ซึ่งตามรายงานของ Soderhall and Smith (1983) พบว่าเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำชนิด hyaline cell จะตรวจไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเลย ในขณะที่เม็ดเลือดชนิดที่มี granule จะพบกิจกรรมของเอนไซม์ที่มีค่าสูงถึง 8,300 unit/min/mg protein

Bactericidal Activity เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของ haemolymph ในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย โดยวิเคราะห์จากความสามารถของน้ำเลือดและสารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำเลือด โดยสารประกอบมีทั้งที่เป็นโปรตีนและเอนไซม์ที่หลั่งออกมาจาก granule ภายในเซลล์เม็ดเลือด ซึ่งมีความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรียและทำให้เกิดการ lysis ของเซลล์ จากการศึกษาของกิจการและคณะ (2543ก) พบว่ากุ้งกุลาดำโดยปกติจะมีความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียอยู่ในช่วง 1:2-1:4 ซึ่งจากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำที่กินอาหารผสมวิตามินซีที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ได้ไม่มากนักซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 1:4 - 1:16 ซึ่งความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียจะดีที่สุดเมื่อกุ้งกินอาหารผสมวิตามินซีในระดับความเข้มข้นที่สูง (3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Zhou *et al.* (2002) พบว่า *Trionyx sinensis* (solf-shelled turtle) ที่กินอาหารเสริมวิตามินซีปริมาณ 2,500 และ 5,000 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเลือดในการทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ ในขณะที่วิตามินซีในระดับที่ต่ำหรือสูงกว่านี้ไม่สามารถเพิ่มค่า Bactericidal Activity ได้ ซึ่งผลได้ที่ได้คล้ายกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ทำการศึกษาในกุ้ง *Penaeus chinensis* ที่กินอาหารผสมวิตามินซีที่ระดับความเข้มข้น 1,000-4,000 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จะส่งผลให้ค่า Bactericidal Activity เพิ่มขึ้น ในขณะที่วิตามินซีปริมาณ 8,000 และ 12,000 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ไม่มีผลต่อค่า Bactericidal Activity (Wang and Li, 1996) ส่วนการทดลองที่ 2 เมื่อให้วิตามินซีครบ 1 เดือน กุ้งที่ให้วิตามินซี ณ เวลาต่าง ๆ จะมีค่า Bactericidal Activity อยู่ในช่วง 1:4 - 1:8 และเมื่อหยุดให้วิตามินซีเป็นระยะเวลา 10 วัน ค่า Bactericidal Activity เริ่มลดลงในบางชุดการทดลอง และค่าที่ได้จะลดลงเท่ากับกลุ่มควบคุมเมื่อหยุดให้วิตามินซีครบ 1 เดือน จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าวิตามินซีสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของซีรั่มในกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้ในระดับหนึ่งเท่านั้น โดยการให้วิตามินซีทุกวันจะทำให้ กิจกรรมดังกล่าวดำเนินไปได้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งบทบาทของวิตามินซีต่อกิจกรรม Bactericidal Activity ยังไม่เป็นที่แน่ชัดเหมือนกับการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดอื่น

จากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารผสมวิตามินซีที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการทดลองนี้พบว่าเซลล์เม็ดเลือดมีความสามารถในการจับกินเซลล์ยีสต์ด้วยกระบวนการ phagocytosis เพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณวิตามินซีที่เสริมลงในอาหารเช่นเดียวกับค่า phagocytic index โดยกุ้งกลุ่มที่กินอาหารผสมวิตามินซี 5 กรัม สามารถจับกินเซลล์ยีสต์ได้ถึง 47.16% และค่า phagocytic index ที่ 29.43 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกุ้งกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) ที่จับกินสิ่งแปลกปลอมได้เพียง 28% และค่า phagocytic index เท่ากับ 11.85 คล้ายกับการทดลองที่ 2 ที่ percent phagocytosis

และ phagocytic index มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและลดลงตามปริมาณเม็ดเลือดรวม ส่วนกุ้งในกลุ่มที่ไม่ได้รับวิตามินซีจากทั้ง 2 การทดลองจะมี percent phagocytosis อยู่ในช่วง 21.453 - 28.48% ซึ่งค่าที่ได้ใกล้เคียงกับการทดลองของกิจการและคณะ (2543 ค) ที่พบว่ากุ้งปกติจะมี percent phagocytosis เท่ากับ 22.87% โดยกระบวนการกลืนทำลายเกิดขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ เช่น สัตว์ในกลุ่ม crustacean นั้น hyaline cell และ semigranular cell จะทำหน้าที่กลืนทำลาย (Soderhall, 1992) และจากการทดลองพบว่าเซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในการจับกินเซลล์ยีสต์นั้นมีทั้งชนิด hyaline cell และ semigranular cell โดยประสิทธิภาพในการจับกินนั้นพบว่าเซลล์เม็ดเลือด 1 เซลล์ สามารถจับกินเซลล์ยีสต์ได้มากกว่า 1 เซลล์ โดยสามารถประเมินค่าได้จาก phagocytic index ทั้งนี้เปอร์เซ็นต์ของการเกิด phagocytosis เป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือด ยิ่งมีเปอร์เซ็นต์ของการเกิด phagocytosis มากนั่นก็หมายถึงการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันยิ่งดีเช่นเดียวกับค่า phagocytic index กระบวนการ phagocytosis เป็นหนึ่งในกลไกการป้องกันตัวแรก ๆ ของระบบภูมิคุ้มกันในการต่อต้านเชื้อโรคที่จะเข้ามาในร่างกาย ตามที่มีรายงานว่ากุ้ง *Penaeus chinensis* และปลาเรนโบร์เทร้าท์ (*Oncorhynchus mykiss*) (Verlhac *et al*., 1996) เลี้ยงด้วยอาหารที่มีการเสริมวิตามินซีสามารถทำให้กระบวนการ phagocytosis เพิ่มสูงขึ้น ผลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าอาหารที่มีการเสริมวิตามินซีปริมาณ 2,500 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์เม็ดเลือดในการเกิดกระบวนการ phagocytosis โดยบทบาทของวิตามินซีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดังกล่าวนั้นยังไม่แน่ชัด ซึ่งวิตามินซีอาจจะมีผลต่อกระบวนการ phagocytosis ของเซลล์ phagocyte ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์ phagocyte ดีขึ้น (Li and Lovell, 1985) โดยการได้รับวิตามินซีในปริมาณที่ไม่เพียงพอจะทำให้การ migration และการตอบสนองของ macrophages ในการเกิด chemotactic ลดลงใน guinea pig (Ganguly *et al*., 1976) นอกจากวิตามินซีจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของ macrophages ในการเกิดกระบวนการ phagocytosis ในปลา rainbow trout แล้ววิตามินซียังเกี่ยวข้องกับการเพิ่มการผลิต superoxide anion (O^-_2) (Verlhac *et al*., 1996) ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวอาจจะระบุได้ว่าวิตามินซีมีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์เม็ดเลือดในการเกิดกระบวนการ phagocytosis รวมทั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดให้ดีขึ้น ซึ่งยังต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

นอกจากนี้ชนิดและอนุพันธ์ของวิตามินซีก็ถือว่ามีความสำคัญต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเช่นกัน จากการศึกษาของ Lee and Shiau (2002) พบว่ากุ้งกุลาดำที่กินอาหารเสริมวิตามินซี L-ascorbic acid (AA) และอนุพันธ์ทั้ง 4 ชนิด จะมีผลทำให้ค่า Total haemocytes

count, การผลิต superoxide anion (O_2^-) และกิจกรรม phenoloxidase activity สูงกว่ากลุ่มควบคุม รวมทั้งเมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดของอนุพันธ์พบว่า L-ascorbyl-2- monophosphate-Na มีประสิทธิภาพดีกว่าหรือเท่ากับ L-ascorbic acid ในบาง parameter เนื่องจาก L-ascorbic acid อยู่ในรูปที่ไม่เสถียร ทำให้อนุพันธ์ของวิตามินซีที่มีการนำสาร sulphate และ phosphate เข้าทำปฏิกิริยากับคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 (C-2) ของ lactone ring ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ไม่เสถียร มีความเสถียรและคงตัวเพิ่มขึ้น ส่งผลให้กุ้งได้รับสารอาหารตามต้องการ ดังนั้นจึงส่งผลให้ประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันดีกว่าวิตามินซีธรรมดา Shiau and Hsu (1994) รายงานว่ากุ้งกุลาดำสามารถดูดซึมวิตามินซีในรูปอนุพันธ์ที่มีสารประกอบต่างชนิดไปใช้ประโยชน์ได้แตกต่างกันโดยเรียงลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้ L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg, L-ascorbyl-2-monophosphate-Na, L-ascorbyl-2-polyphosphate และ L-ascorbyl-2-sulphate ตามลำดับ ดังนั้นการเลือกชนิดของอนุพันธ์ให้เหมาะสมกับการนำไปใช้ประโยชน์และความต้องการของสัตว์น้ำจึงถือว่าเป็นสิ่งที่สำคัญเพราะสัตว์น้ำจะได้รับวิตามินซีในอัตราที่เพียงพอที่จะใช้ในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพและเคมีของคุณภาพน้ำ ซึ่งจะส่งผลต่อ metabolism, การเจริญเติบโต, การลอกคราบ, อัตรารอด และระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย จากการศึกษาของ กิจการและคณะ (2543ค) พบว่าปริมาณเม็ดเลือดและปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase จะถูกผลิตเพิ่มขึ้นในช่วงอุณหภูมิสูง (30 องศาเซลเซียส) ส่วนปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำน้อยเกินไปคือ 0.9-1.2 มก./ลิตร จะส่งผลให้ปริมาณเม็ดเลือด, เอนไซม์ phenoloxidase และ percent phagocytosis ลดลง และพบว่าการเปลี่ยนแปลง pH จะไม่ทำให้มีปริมาณเม็ดเลือดรวมแตกต่าง จึงไม่มีผลต่อปริมาณ phenoloxidase และจากการศึกษาของ Le and Haffner (2000) พบว่า ปริมาณ phenoloxidase จะลดลงที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ในขณะที่ plasma protein จะเพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิ 28 และ 32 องศาเซลเซียส และค่า Total Haemocytes Count จะลดลงประมาณ 40% เมื่ออุณหภูมิต่ำ และนอกจากนี้ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่ำจะทำให้ลดอัตรา metabolic และเกิดการเปลี่ยนแปลงแรงดัน osmotic ของ haemolymph โดยกุ้ง *Penaeus stylirostris* จะเกิดสภาวะ hypoxia จะชักนำให้ปริมาณ Total Haemocytes Count ลดลง โดยเฉพาะเม็ดเลือดชนิด semigranular cell และ hyaline cell ขณะที่ Phenoloxidase Activity มีค่าเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับ plasma protein ที่เพิ่มขึ้น ในกุ้งกุลาดำพบว่า Phagocytic Activity ของเซลล์เม็ดเลือดจะมีประสิทธิภาพลดลงในขณะที่ปริมาณออกซิเจนลดลง (Direkbusarakom and Danayadol, 1998) นอกจากนี้สภาพแวดล้อมที่เกิดการเปลี่ยนแปลงอยู่ใน

สภาวะที่ไม่เหมาะสมจะทำให้การแบ่งเซลล์ของ haematopoietic tissues ลดลง ซึ่งส่งผลให้การสร้างเม็ดเลือดลดลงด้วย (Le and Haffner, 2000)

จากผลการทดลองทั้งหมดโดยพิจารณาจากค่าองค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันต่าง ๆ พบว่าวิตามินซีที่ระดับความเข้มข้น 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีที่สุด แต่สาเหตุที่เลือกวิตามินซีที่ระดับความเข้มข้น 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มาใช้ทดลองต่อในการทดลองที่ 2 เนื่องจากเป็นระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถกระตุ้นภุมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกัน ซึ่งมีค่าแตกต่างทางสถิติกับกุ้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับวิตามินซีเพียง 1 กรัม และการศึกษาระยะเวลาการใช้วิตามินซีที่เหมาะสมในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันนั้นพบว่าเมื่อให้วิตามินซีที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน คือ 10, 20 และ 30 วัน เป็นเวลา 1 เดือน ค่าองค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันต่าง ๆ มีค่าแตกต่างต่างกัน โดยกลุ่มที่มีได้รับวิตามินซีเป็นประจำทุกวันจะมีค่าสูงสุด และเมื่อหยุดให้วิตามินซี ณ เวลาต่าง ๆ พบว่าค่าองค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันต่าง ๆ มีค่าลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งอัตราการลดลงจะสัมพันธ์กับระยะเวลาการให้วิตามินซี ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติทางเคมีของวิตามินซีทำให้ไม่มีการสะสมวิตามินซีภายในร่างกายหรือเหลือเพียงพอที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดยกลุ่มที่ให้วิตามินซีทุกวันจะมีอัตราการลดลงช้ากว่าชุดการทดลองอื่น ๆ แสดงให้เห็นว่าการให้วิตามินซีอย่างต่อเนื่องจะส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันมีการทำงานได้อย่างประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นและทำให้ค่าองค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ลดลงช้ากว่าเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่น ดังนั้นควรให้อาหารผสมวิตามินซี 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมให้กินเป็นประจำทุกวันจึงจะมีประสิทธิภาพดีที่สุด

สรุปผลการทดลอง

1. อาหารที่มีการเสริมวิตามินซีที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน จะส่งผลให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแตกต่างกัน โดยพิจารณาจากค่าองค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันต่าง ๆ พบว่าระดับความเข้มข้นของวิตามินซีในรูป Na,Ca-ascorbyl-2-monophosphate ที่น้อยที่สุดที่ส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น คือ วิตามินซี 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมและวิตามินซี 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ทั้งนี้ระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำที่สูงขึ้นสัมพันธ์กับปริมาณวิตามินซีที่เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งการใช้วิตามินซีในระดับที่เพียงพอและเหมาะสม นอกจากจะส่งผลดีต่อตัวสัตว์น้ำแล้ว ยังนำไปสู่การลดปริมาณการใช้วิตามินซี ซึ่งเป็นแนวทางในการลดต้นทุนการผลิตให้แก่เกษตรกร โดยไม่จำเป็นต้องให้วิตามินซีในปริมาณสูงก็สามารถทำให้กุ้งกุลาดำมีความต้านทานต่อเชื้อโรคเพิ่มขึ้นและการติดเชื้อโรคก็จะลดลง

2. จากการทดลองพบว่าควรให้วิตามินซีในระดับความเข้มข้น 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ให้กุ้งกุลาดำกินเป็นประจำทุกวันตลอดระยะเวลาการเลี้ยงหรือในช่วงที่คาดว่าจะเกิดปัญหาโรคระบาดจะทำให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันดีขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติทางเคมีบางประการของวิตามินซี รวมทั้งลักษณะทางสรีรวิทยาของกุ้งกุลาดำเองจึงทำให้เมื่อหยุดให้วิตามินซี ระบบภูมิคุ้มกันจึงลดลงใกล้เคียงกับกุ้งในกลุ่มควบคุม ดังนั้นการให้วิตามินซีเป็นประจำทุกวันจะช่วยให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำเป็นไปได้อย่างต่อเนื่อง แต่หากต้องการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในช่วงระยะเวลาอันสั้นการให้วิตามินซีเพียง 10 หรือ 20 วัน/เดือน ก็สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกัน

3. การศึกษาองค์ประกอบบางประการของระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำขนาดประมาณ 10 กรัม พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวม, กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส, กิจกรรมของเซลล์เม็ดเลือดในการจับกินสิ่งแปลกปลอมด้วยกระบวนการ phagocytosis และกิจกรรมในการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้งจะสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นของวิตามินซีที่เพิ่มขึ้น

4. ในการคิดต้นทุนของการใช้วิตามินซีที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาดังกล่าวเพื่อผลิตกุ้งกุลาดำ 1 ตัน ในระยะเวลา 4 เดือน คำนวณจากอัตราแลกเนื้อ (Feed Conversion Rate) ที่ 1.5 จะต้องใช้วิตามินซี 4.5 กิโลกรัม คิดเป็นค่าใช้จ่ายเป็นเงินทั้งสิ้น 3,600 บาท (ราคาวิตามินซีประมาณ 800 บาท/กิโลกรัม) หรือคิดเป็น 3.60 บาทต่อการผลิตกุ้ง 1 กิโลกรัม

ข้อเสนอแนะ

1. ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในข้างต้น จัดเป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับบทบาทของวิตามินซีต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ โดยสามารถนำข้อมูลดังกล่าวไปใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

2. การศึกษากลไกของวิตามินซีว่าเข้าไปมีบทบาทในกระตุ้นภูมิคุ้มกันหรือเสริมภูมิคุ้มกันให้ดีขึ้นได้อย่างไรนั้น ยังมีการศึกษาน้อยอยู่ ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบเพียงคร่าว ๆ โดยพิจารณาจากองค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันที่เพิ่มขึ้นเท่านั้น ดังนั้นการศึกษาถึงที่มาและปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็นประโยชน์ต่อไปในอนาคต

3. กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์เลือดเย็น ซึ่งมีระบบกลไกทางชีวเคมีภายในร่างกายแปรเปลี่ยนไปตามสภาพแวดล้อมภายนอก ถึงแม้ว่าสามารถทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้ในช่วงกว้างแต่กุ้งจะสามารถเจริญเติบโตและดำรงชีวิตได้ดีที่สุดในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในช่วงแคบ ๆ เท่านั้น ทั้งยังส่งผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้วย ดังนั้นควรมีการศึกษาว่าปัจจัยสิ่งแวดล้อมใดบ้างที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันพื้นฐานของกุ้งกุลาดำในระหว่างที่ให้วิตามินซี เพื่อเป็นแนวทางในการจัดการระบบการเลี้ยงให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น