บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากการสังเคราะห์เพปไทด์ YANAVQV-NH_2 (T-) และ YANAVQTV-NH_2 (T+) ซึ่งสอดคล้องกับลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนของฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจากก้านตากุ้งก้ามกราม โดยวิธี Solid Phase Peptide Synthesis พบว่าสามารถสังเคราะห์เพปไทด์ T- และ เพปไทด์ T+ ได้เพียง 1.82 มิลลิกรัม (23.9 %) และ 1.68 มิลลิกรัม (19.4 %) ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องจากประสิทธิภาพการ coupling ของกรดอะมิโนขั้นตอนแรกที่ได้จากการทดลองประมาณ 70 % ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นน้อยลงตามลำดับ หรือสภาวะที่ใช้ในการ cleavage ไม่เหมาะสม นอกจากนี้ยังอาจเกิดการสูญเสียในระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์

จากการกระตุ้นให้หนูขาวสร้างแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- และ T+ โดยใช้เพปไทด์ T- และ T+ เชื่อมกับโปรตีน BSA ฉีดเข้าไปในหนูขาวตัวอย่างละ 4 ตัว นำซีรัมที่ได้จากหนูแต่ละตัวมาตรวจหาไตเตอร์ของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเพปไทด์ T- และ T+ โดยวิธี indirect ELISA เนื่องจากในซีรัมมีแอนติบอดีต่อ BSA ปะปนมาด้วย ดังนั้นก่อนที่จะนำซีรัมไปตรวจหาไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเพปไทด์จะต้องกำจัดแอนติบอดีต่อ BSA ออกไป โดยการดูดซับด้วย BSA จากการทดลองพบว่าไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- มีค่าสูงกว่าไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ คือไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- ของหนูตัวที่ตอบสนองดีที่สุดเท่ากับ 1:128,000 ในขณะที่ไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ ของหนูตัวที่ตอบสนองดีที่สุดเท่ากับ 1:64,000 (ตารางที่ 3.2-3.3)

จากการนำแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- และ T+ มาทดสอบความสามารถในการจับกับเพปไทด์ T- และ T+ ที่สังเคราะห์ โดยวิธี dot-ELISA ซึ่งวิธีนี้มีความไวในการตรวจหาเพปไทด์สูงมากในระดับเฟมโตโมล อยู่ในระดับใกล้เคียงกับวิธี RIA (Sithigorngul, Stretton and Cowden, 1991) พบว่าแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- สามารถใช้จับกับเพปไทด์ T- ได้น้อยกว่า 15 พิโคกรัมต่อจุด ในขณะที่ไม่สามารถจับกับเพปไทด์ T+ ในปริมาณ 4 นาโนกรัมต่อจุด ในทำนองเดียวกันแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ สามารถใช้จับเพปไทด์ T+ ได้ปริมาณน้อยที่สุด 125 พิโคกรัมต่อจุด และที่ไม่พบปฏิกิริยากับเพปไทด์ T- ในปริมาณ 4 นาโนกรัมต่อจุด (รูปที่ 3.5) นั่นแสดงว่าแอนติบอดีต่อเพปไทด์ทั้งสองมี

ความจำเพาะสูงและมีปฏิกิริยาข้ามน้อยมากแม้ว่าเพปไทด์ทั้งสองจะมีกรดอะมิโนต่างกันตัวเดียวคือ ทรีโอนีน

จากการใช้แอนติบอดีต่อเพปไทด์ทั้งสองตรวจหาสารคล้ายเพปไทด์ T- และ T+ จากสารสกัดจากก้านตากุ้งก้ามกราม หลังผ่านกระบวนการ RP-HPLC โดยวิธี dot-ELISA พบสารคล้ายเพปไทด์ T- ในแฟรคชันที่ 30 และ สารคล้ายเพปไทด์ T+ในแฟรคชันที่ 38 ในขณะที่เมื่อนำแต่ละแฟรคชันที่แยกได้ตรวจหาฮอร์โมน CHH โดยดูจากการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนในการที่ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดกุ้งเพิ่มขึ้น พบว่าฮอร์โมน CHH กระจายอยู่ในแฟรคชันที่ 37-39 โดยมีมีปริมาณฮอร์โมนมากที่สุดในแฟรคชันที่ 38 (รูปที่ 3.6) ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการตรวจหาสารคล้ายเพปไทด์ T+ ในสารสกัดจากก้านตาโดยวิธี dot-ELISA สอดคล้องกับการตรวจหาฮอร์โมน CHH โดยวิธี biological activity test ซึ่งพบสารคล้ายเพปไทด์หรือฮอร์โมน CHH ในแฟรคชันที่ 38 ในขณะที่สารสกัดจากแฟรคชันที่ 30 ให้ผลไม่สอดคล้องกัน นั่นอาจแสดงว่าสารสกัดในแฟรคชันที่ 30 เป็นสารคล้ายเพปไทด์ T- แต่ไม่มีคุณสมบัติของ CHH

จากการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเพปไทด์ T- และ T+ ทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อก้านตากุ้งก้ามกราม พบว่า เมื่อใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเพปไทด์ T+ พบการติดสีน้ำตาลที่เซลล์ประสาทในบริเวณ Medulla Terminalis Ganglionic X-organ (MTGXO) จำนวน 24 $\pm$ 5 เซลล์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18$\pm$3 ไมโครเมตร และเส้นใยประสาทที่ส่งไปยังต่อมไซนัส (รูปที่ 3.8) แต่เมื่อใช้แอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- กับเนื้อเยื่อก้านตาของกุ้งก้ามกรามเช่นกัน พบว่า ไม่แสดงการติดสีน้ำตาลในบริเวณใดๆ ภายในเนื้อเยื่อก้านตา ดังนั้นคาดว่าปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- ในแฟรคชันที่ 30 ของการทดลอง dot-ELISA อาจเกิดจากปฏิกิริยาข้ามอ่อนๆต่อแอนติเจนบางชนิดที่กระจายอยู่ทั่วไปในก้านตา ดังนั้นจึงไม่สามารถสังเกตเห็นการจับของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- ได้ชัดเจน และจากการดูดซับแอนติบอดีด้วย BSA-T+ เพื่อยืนยันความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ ว่าไม่ได้เกิดจากการจับกันของแอนติบอดีกับองค์ประกอบในก้านตา พบว่าการติดสีที่เซลล์ประสาทและต่อมไซนัสหายไปหมด นั่นแสดงว่า การติดสีดังกล่าวเกิดจากแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ นั่นเอง

จากการที่แอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ ทำปฏิกิริยาบนเนื้อเยื่อก้านตากุ้งกุลาดำ พบว่ามีการติดสีของเซลล์ประสาทในบริเวณ MTGXO จำนวน 34$\pm$4 เซลล์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35$\pm$4 ไมโครเมตร เส้นใยประสาท และต่อมไซนัสเช่นกัน (รูปที่ 3.11) ดังนั้นจึงคาดว่า CHH ของกุ้งกุลาดำน่าจะมีลำดับกรดอะมิโนทางปลาย C คล้ายกับ CHH ของกุ้งก้ามกราม จากการที่พบเซลล์ประสาทที่สร้าง CHH เฉพาะในบริเวณ MTGXO และส่ง CHH ไปเก็บไว้ในต่อมไซนัสตามเส้นใยประสาท

ทั้งในกุ้งก้ามกรามและกุ้งกุลาดำดังกล่าวนั้น มีลักษณะเช่นเดียวกับที่พบในก้านตาของปูและกุ้ง crayfish ชนิดต่างๆ (Jaros and Keller *et al.*, 1979 ; Van Herp and Buggenum, 1979 ; Dircksen *et al.*, 1988 ; Rotllant et al., 1993) เซลล์ประสาทที่สร้าง CHH ในกุ้งก้ามกรามมีจำนวนใกล้เคียงแต่มีขนาดใหญ่กว่าที่พบในกุ้งลอบเตอร์ *Homorus gammarus* ซึ่งมีจำนวน 19±4 เซลล์ เส้นผ่านศูนย์กลาง 7±1 ไมโครเมตร (Rotllant *et al.*, 1993) ในขณะที่โดยทั่วไปปูชนิดต่างๆ เช่น *Cacimus maenas Liocarcinus puber Cancer pagurus Uca pugilator* และ *Maja squinado* มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 35-40 ไมโครเมตร (Dircksen *et al.*, 1988) นอกจากนี้ตำแหน่งที่พบเซลล์ประสาทที่สร้าง CHH จะพบเซลล์ประสาทที่สร้าง MIH และ GIH ด้วย โดยเซลล์ประสาทที่สร้าง MIH มีน้อยกว่าเซลล์ประสาทที่สร้าง CHH ประมาณสองเท่า และไม่พบเซลล์ประสาทที่สร้างทั้ง CHH และ MIH (Dircksen et al., 1988) ส่วนเซลล์ประสาทที่สร้าง GIH พบในบริเวณเดียวกับเซลล์ประสาทที่สร้าง CHH ซึ่งมีจำนวนและขนาดใกล้เคียงกันในกุ้งลอบเตอร์ *H. gammarus* และใน *Homarus americanus* และมีเซลล์ประสาทบางเซลล์เท่านั้นที่สร้างทั้ง CHH และ GIH (Rotllant et al., 1993 ; Kellen and Meusy, 1989) ซึ่งชี้ให้เห็นว่า ฮอร์โมน CHH MIH และ GIH มีการแสดงออกในเซลล์ต่างกันจึงน่าจะมีกระบวนการสร้างแยกออกจากกัน (Kellen and Meusy, 1989)

ความเข้มของเซลล์ที่ติดสีโดยกระบวนการ immunocytochemistry เมื่อใช้แอนติบอดีต่อเพปไทด์ T+ นั้น ในบางตัวอย่างมีเซลล์ติดสีความเข้มแตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าความแตกต่างในการติดสีแตกต่างกันนั้น อาจเกิดจากเซลล์เหล่านั้นสร้าง CHH รูปแบบต่างกัน จึงมีความสามารถในการจับกับแอนติบอดีแตกต่างกันด้วยเพราะในครัสทาเชียนหลายชนิดมีรายงานว่าพบ CHH มากกว่า 1 รูปแบบ (Huberman *et al.*, 1988 ; Tensen *et al.*, 1991) และในกุ้งกรามกรามก็เช่นเดียวกัน (Sithigorngul *et al.*, 1999) แต่อย่างไรก็ตามความแตกต่างของ CHH ในแต่ละรูปแบบมีน้อยมากในสัตว์ชนิดเดียวกัน ในการศึกษาด้วย electron microscope พบว่าในตัวเซลล์ประสาทที่พบ CHH ในกุ้ง crayfish *Astacus leptodactylus* ที่ติดสีระดับต่างๆ กันนั้น มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความหนาแน่นของแกรนูลที่บรรจุ CHH และคาดว่าเซลล์ประสาทที่ติดสีต่างกันนี้สามารถเปลี่ยนกลับไปกลับมาเป็นวงจรขึ้นอยู่กับกระบวนการสังเคราะห์และลำเลียงฮอร์โมนสู่ต่อมไซนัส (Kellen and Voorter, 1984)

จากผลการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่าสามารถผลิตแอนติบอดีต่อเพปไทด์ T- และ T+ ที่สังเคราะห์ขึ้นจากลำดับกรดอะมิโนทางปลาย C ของฮอร์โมน CHH จากก้านตากุ้งก้ามกราม ซึ่งแอนติบอดีทั้งสองมีความจำเพาะสูงและมีปฏิกิริยาข้ามกันต่ำมาก และเมื่อนำแอนติบอดีทั้งสองตรวจหาสารคล้ายเพปไทด์หรือ CHH ในสภาพธรรมชาติ โดยวิธี dot-ELISA และ วิธี immunocytochemistry พบว่าตรวจพบ CHH ในสารสกัดจากแฟรคชันที่ 38 และเฉพาะแอนติบอดีต่อ

เปปไค์ T+ เท่านั้นที่สามารถตรวจหาแหล่งสร้างฮอร์โมน CHH ในก้านตาได้ดังนั้นจึงสรุปว่า CHH ของกุ้งก้ามกรามน่าจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 หน่วย และมีทรีโอนีนในตำแหน่งที่ 71 ซึ่งสอดคล้องกับกุ้ง crayfish (Huberman *et al.*, Yasuda *et al.*, 1994) และกุ้งทะเล *Penaeus japonicus* (Yang *et al.*, 1995) ซึ่งมีวิวัฒนาการใกล้กันกว่าสัตว์ครัสทาเซียนในกลุ่มถอบเดอร์และปู ซึ่งมีกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 71 ของ CHH เป็นเมไทโอนีน (Weideman *et al.*, 1989, Tensen *et al*, 1991)

การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นแนวทางในการศึกษาเบื้องต้นในการสังเคราะห์เพปไทด์หรือลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของฮอร์โมนที่พบในก้านตาของสัตว์ครัสทาเซียน เพื่อใช้ในการสร้างแอนติบอดี ซึ่งแอนติบอดีที่ได้นี้อาจมีปฏิกิริยาข้ามกับฮอร์โมนอื่นๆที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกัน โดยเฉพาะฮอร์โมนในกลุ่ม CHH MIH และ GIH ซึ่งจะช่วยให้การทำให้บริสุทธิ์ฮอร์โมนเหล่านี้ทำได้สะดวกและง่ายขึ้น โดยอาศัยปฏิกิริยากระบวนการทางแอนติบอดีและแอนติเจนได้ต่อไป

	10		20		30
AILDQ	SCKGI	FDREL	FKKLD	RVCDD	CYNLY
	40		50		60
RKPYV	AIDCR	RGCYQ	NLVFR	QCIQD	LQLMD
	70				
DLDEY	ANAVQ	TV-NH_2			

รูปที่ 4.1 ลำดับกรดอะมิโนของ CHH ของกุ้งก้ามกรามที่คาดว่ามีทรีโอนีนอยู่ที่ตำแหน่งที่ 71

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย