

595.3

595.3

จ.3

การตรวจหาฟิสิกเมนต์ดีสเพอร์ซิงฮอว์โมนในก้านตาของกิ้งก่ามกราม
กึ่งกลางค่า และกึ่งตกาศด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมีสทรี

ปริชญานิพนธ์

ของ

สุนิสา แสงมงคลพิพัฒน์

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ

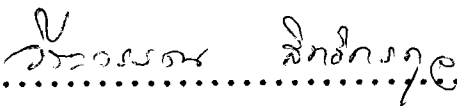
พฤษภาคม 2536

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

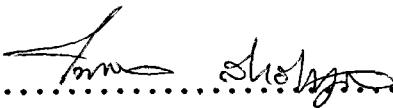
187619

คณะกรรมการควบคุมและคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปริญญาบัตรฉบับนี้แล้ว
เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอก
เคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการควบคุม

.....ประธาน

(ดร. วีระวรม สิกษิกรกุล)

.....กรรมการ

(ผศ.ดร. ไพศาล สิกษิกรกุล)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธาน

(ดร. วีระวรม สิกษิกรกุล)

.....กรรมการ

(ผศ.ดร. ไพศาล สิกษิกรกุล)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(ดร. สายสนม ธรรมนิกข์)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปริญญาบัตรฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศ.ดร. สมพร บัวทอง)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ประกาศขอบคุณ

ปัญญานิพนธ์นี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือและแนะนำอย่างดีจาก ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล และ ผศ.ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล รวมทั้ง ดร.สาธิต สมธรรมพิทักษ์ ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ Dr. R. Rao มหาวิทยาลัยเวสต์ฟลอริดา สหรัฐอเมริกา ที่ให้ความอนุเคราะห์แอนติซีรัมต่อ α -PDH และ β -PDH

ขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการให้ยืมใช้กล้องจุลทรรศน์สำหรับถ่ายภาพ เพื่อนำภาพมาประกอบในปัญญานิพนธ์

ขอขอบคุณ คุณศิวพร ลงยันต์ ที่ช่วยพิมพ์และแก้ไขปัญญานิพนธ์ฉบับนี้จนเรียบร้อยสมบูรณ์ ขอโน้มรำลึกถึงพระคุณบิดา มารดา ที่สนับสนุนทางการศึกษาและให้กำลังใจผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา และขอขอบคุณผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวนามในที่นี้ ที่ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ จนปัญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

สุนิสา แสงมงคลพิพัฒน์

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า.....	15
ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า.....	15
ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า.....	16
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	16
2 วิธีการวิจัย.....	17
สัตว์ทดลอง.....	17
วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี.....	17
วิธีดำเนินการทดลอง.....	19
3 ผลการวิจัย.....	25
4 สรุปผลและอภิปรายผล.....	63
ข้อเสนอแนะ.....	66
บรรณานุกรม.....	67
ภาคผนวก.....	72
ภาคผนวก ก.....	73
ภาคผนวก ข.....	80
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	82

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ RPCH, α -PDH และ β -PDH.....	31
2 แสดงตำแหน่งและจำนวนของเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในก้านตาของกิ้งก่ามกราม กิ้งกูดาค่าและกิ้งตะภาค.....	32
3 แสดงตำแหน่งและจำนวนของเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH ในบริเวณต่าง ๆ ในก้านตาของกิ้งก่ามกราม.....	74
4 แสดงตำแหน่งและจำนวนของเซลล์ประสาทที่พบ β -PDH ในบริเวณต่าง ๆ ในก้านตาของกิ้งก่ามกราม.....	75
5 แสดงตำแหน่งและจำนวนของเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH ในบริเวณต่าง ๆ ในก้านตาของกิ้งกูดาค่า.....	76
6 แสดงตำแหน่งและจำนวนของเซลล์ประสาทที่พบ β -PDH ในบริเวณต่าง ๆ ในก้านตาของกิ้งกูดาค่า.....	77
7 แสดงตำแหน่งและจำนวนของเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH ในบริเวณต่าง ๆ ในก้านตาของกิ้งตะภาค.....	78
8 แสดงตำแหน่งและจำนวนของเซลล์ประสาทที่พบ β -PDH ในบริเวณต่าง ๆ ในก้านตาของกิ้งตะภาค.....	79

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ		หน้า
1	แสดงรูปร่างของโครมาโทฟอร์ซึ่งมีเม็ดสีกระจายอยู่ ในระดับต่าง ๆ	2
2	แสดงภาพวาดของอัมมาติเดียมในตาประกอบของกิ้ง <i>Palaeon spp.</i>	4
3	แสดงปฏิกิริยาของแอนติเจนและแอนติบอดีโคฮิวอีอินโคเรค อิมมูโนเปอร์ออกซิเดส.....	14
4	แสดงเซคชั่นกันตาทิ้งความหนา 8 ไมครอน โดยหยดด้วย rabbit anti- α -PDH antiserum สลับกับ rabbit anti- β -PDH antiserum.....	23
5	แสดงภาพวาดของเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบ α -PDH ในบริเวณต่าง ๆ ในกันตาทิ้งขาวของกิ้งก่ามกราม.....	33
6	แสดงภาพวาดของเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบ β -PDH ในบริเวณต่าง ๆ ในกันตาทิ้งขาวของกิ้งก่ามกราม.....	35
7	แสดงภาพวาดของเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบ α -PDH ในบริเวณต่าง ๆ ในกันตาทิ้งขาวของกิ้งกูดาค่า.....	37
8	แสดงภาพวาดของเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบ β -PDH ในบริเวณต่าง ๆ ในกันตาทิ้งขาวของกิ้งกูดาค่า.....	39
9	แสดงภาพวาดของเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบ α -PDH ในบริเวณต่าง ๆ ในกันตาทิ้งขาวของกิ้งตะกาด.....	41
10	แสดงภาพวาดของเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบ β -PDH ในบริเวณต่าง ๆ ในกันตาทิ้งขาวของกิ้งตะกาด.....	43
11	แสดงภาพถ่ายกำลังขยายต่ำของกันตาทิ้งขาวของกิ้งก่ามกราม กิ้งกูดาค่า และกิ้งตะกาด.....	45

12	แสดงภาพกำลังขยายสูงของเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในก้านตาข้างซ้ายของกิ้งก่ามกราม ที่บริเวณ ME ระหว่าง MI กับ MT และ MT.....	47
13	แสดงภาพกำลังขยายสูงของเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในก้านตาข้างขวาของกิ้งกูดาค่า ที่บริเวณ ME ระหว่าง MI กับ MT และ MT.....	49
14	แสดงภาพกำลังขยายสูงของเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในก้านตาข้างขวาของกิ้งคะกาด ที่บริเวณ ME ระหว่าง MI กับ MT และ MT.....	51
15	แสดงภาพกำลังขยายสูงของเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในก้านตาข้างขวาของกิ้งก่ามกราม ที่บริเวณ LG, ME, ระหว่าง MI กับ MT, SG และ OpN.....	53
16	แสดงภาพกำลังขยายสูงของเส้นใยประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในก้านตาของกิ้งกูดาค่าและกิ้งคะกาด ที่บริเวณ SG และ OpN.....	55
17	แสดงตำแหน่งที่อยู่ร่วมกันและตำแหน่งที่ต่างกันของเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในบริเวณ ME ระหว่าง MI กับ MT และ MT ในก้านตาข้างซ้ายของกิ้งก่ามกราม.....	57
18	แสดงตำแหน่งที่อยู่ร่วมกันและตำแหน่งที่ต่างกันของเซลล์ประสาท ที่พบ α -PDH และ β -PDH ในบริเวณ ME ระหว่าง MI กับ MT และ MT ในก้านตาข้างขวาของกิ้งกูดาค่า.....	59
19	แสดงตำแหน่งที่อยู่ร่วมกันและตำแหน่งที่ต่างกันของเซลล์ประสาท ที่พบ α -PDH และ β -PDH ในบริเวณ ME ระหว่าง MI กับ MT และ MT ในก้านตาข้างขวาของกิ้งคะกาด.....	61

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

สัตว์พวกครัสตาเซีย (crustacean) เช่นพวกกุ้งและปูชนิดต่าง ๆ มีความสามารถในการเปลี่ยนสีตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมภายนอกได้อย่างรวดเร็ว และปรับการเคลื่อนที่ของเม็ดสี (pigment granule) ในโครมาโทฟอร์ (chromatophore) และเรตินัลพิกเมนต์เซลล์ (retinal pigment cell) ในตาประกอบ (compound eye) ต่อที่มีคและที่สว่างได้

โครมาโทฟอร์

โครมาโทฟอร์อยู่ตามผิวหนังและอวัยวะภายในบางอวัยวะ เช่น ต่อมเพศ (gonad) ทางเดินอาหารส่วนปลาย (hind gut) และเส้นประสาททางค้ำท้อง (ventral nerve cord) (Fingerman, 1988) เป็นต้น โครมาโทฟอร์ของสัตว์พวกครัสตาเซียเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ที่มีแขนงของไซโตพลาสซึมยื่นออกไป (branched cell) แบ่งออกเป็น 4 ชนิดดังนี้ (Rao, 1985)

- 1.1 เมลานินฟอร์ (melanophore) เป็นเซลล์เม็ดสีที่มีสีน้ำตาลหรือสีดำ
- 1.2 อีริโทรฟอร์ (erythrophore) เป็นเซลล์เม็ดสีที่มีสีแดง
- 1.3 แซนโทฟอร์ (xanthophore) เป็นเซลล์เม็ดสีที่มีสีเหลือง
- 1.4 ลิวโคฟอร์ (leucophore) เป็นเซลล์เม็ดสีที่มีสีขาว

การที่โครมาโทฟอร์มีสีต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับเม็ดสีที่เป็นองค์ประกอบอยู่ภายในโครมาโทฟอร์นั้น ๆ โครมาโทฟอร์อาจมีเม็ดสีเพียงชนิดเดียวหรือมากกว่า 1 ชนิดก็ได้ การที่โครมาโทฟอร์ดูเหมือนว่าแผ่ขยายหรือหดตัวเกิดจากการที่เม็ดสีเหล่านี้เคลื่อนที่ไปมาภายในเซลล์ (Rao, 1985) โดยปกติแล้วเม็ดสีที่พบในครัสตาเซียส่วนใหญ่จะมีสีดำ สีน้ำตาลเข้ม สีแดง สีขาว สีเหลืองและสีฟ้า (Lockwood, 1967) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่เป็นองค์ประกอบ เช่น เม็ดสีสีแดงและสีเหลืองเป็นสารพวกแคโรทีนอยด์ (carotinoid) เม็ดสีสีขาวเป็นสารพวกเทอริดีน (pteridines) และเพียวรีน (purines) เม็ดสีสีน้ำตาลและสีดำที่พบในปูกลุ่มบราโคซูแรน (brachyurans) เป็นสาร

พวกเมลานิน (melanin) (Fingerman. 1988) เม็ดสีสีฟ้าเป็นสารพวกแคโรทีนอยด์ที่รวมตัวกับโปรตีน (Cheesman and Prebble. 1966) รูปร่างของโครมาโทฟอร์ดังแสดงในภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 แสดงรูปร่างของโครมาโทฟอร์ซึ่งมีเม็ดสีกระจายอยู่ในระดับต่าง ๆ (Britto and others. 1990)

- ก = เม็ดสีกระจายตัวอยู่เต็มตัวเซลล์และแขนงเซลล์
- ข, ค และ ง = เม็ดสีกระจายตัวในระดับต่าง ๆ
- จ = เม็ดสีรวมตัวอยู่ตรงกลางเซลล์
- ลูกศร = แสดงแขนงเซลล์

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสีตัวของสัตว์ให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมภายนอกได้แก่

1. การเปลี่ยนแปลงลักษณะของสีตัว (morphological color change)
2. การเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีระของสีตัวภายในตัวกึ่ง (physiological color

change)

การเปลี่ยนแปลงลักษณะของสีตัว

การเปลี่ยนแปลงลักษณะของสีตัวนี้เป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอย่างช้า ๆ ซึ่งเกี่ยวข้องกับจำนวนเม็ดสีที่อยู่ภายในโครมาโทฟอร์และลักษณะของเซลล์เม็ดสี ตัวอย่างเช่น กุ้ง *Palaeomonetes*

vulgaris จำนวนเม็ดสีสีแดง สีฟ้า และสีเหลืองจะลดลงเมื่อกิ่งอาศัยอยู่ในบริเวณพื้นที่ที่มีสีอ่อนหรือสีขาว แต่ถ้าพื้นที่ที่อาศัยอยู่เป็นสีเข้มแล้วจำนวนเม็ดสีสีแดงและสีฟ้าจะเพิ่มขึ้น ส่วนในปู พบว่าการเปลี่ยนสีในกรณีนี้เป็นผลมาจากการเพิ่มจำนวนโครมาโทฟอร์ตต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ หรือโดยการเพิ่มจำนวนของเม็ดสีในโครมาโทฟอร์ต หรืออาจเป็นได้ในทั้งสองกรณีรวมกัน (Lockwood. 1967)

การเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีระของสัตว์ภายในตัวกึ่ง

การเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีระนี้เป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นได้เร็วมาก ภายในไม่กี่นาทีหรือชั่วโมง การเปลี่ยนแปลงแบบนี้จะไม่เกี่ยวข้องกับรูปร่างของโครมาโทฟอร์ตและจำนวนของเม็ดสี แต่ขึ้นอยู่กับการกระจายหรือรวมตัวของเม็ดสีในโครมาโทฟอร์ต ถ้าเม็ดสีไปรวมตัวกันที่จุดใดจุดหนึ่ง สัตว์จะมีสีเข้มหรือสีจาง แต่ถ้าเม็ดสีกระจายอยู่ทั่ว ๆ ไปสัตว์จะมีสีเข้มขึ้น (Lockwood. 1967)

เรตินัลพิกเมนต์เซลล์

เรตินัลพิกเมนต์เซลล์พบที่อัมมาติเดียม (ommatidium) ของตาประกอบของคริสตาเซียน มีหน้าที่ตอบสนองต่อแสงที่มาตกกระทบแรบโดม (rhabdom) ซึ่งเป็นส่วนที่ทำหน้าที่รับแสงของพวกคริสตาเซียน ในตาประกอบของกึ่งและปูจะมีเรตินัลพิกเมนต์เซลล์อยู่ 3 ชนิดคือ

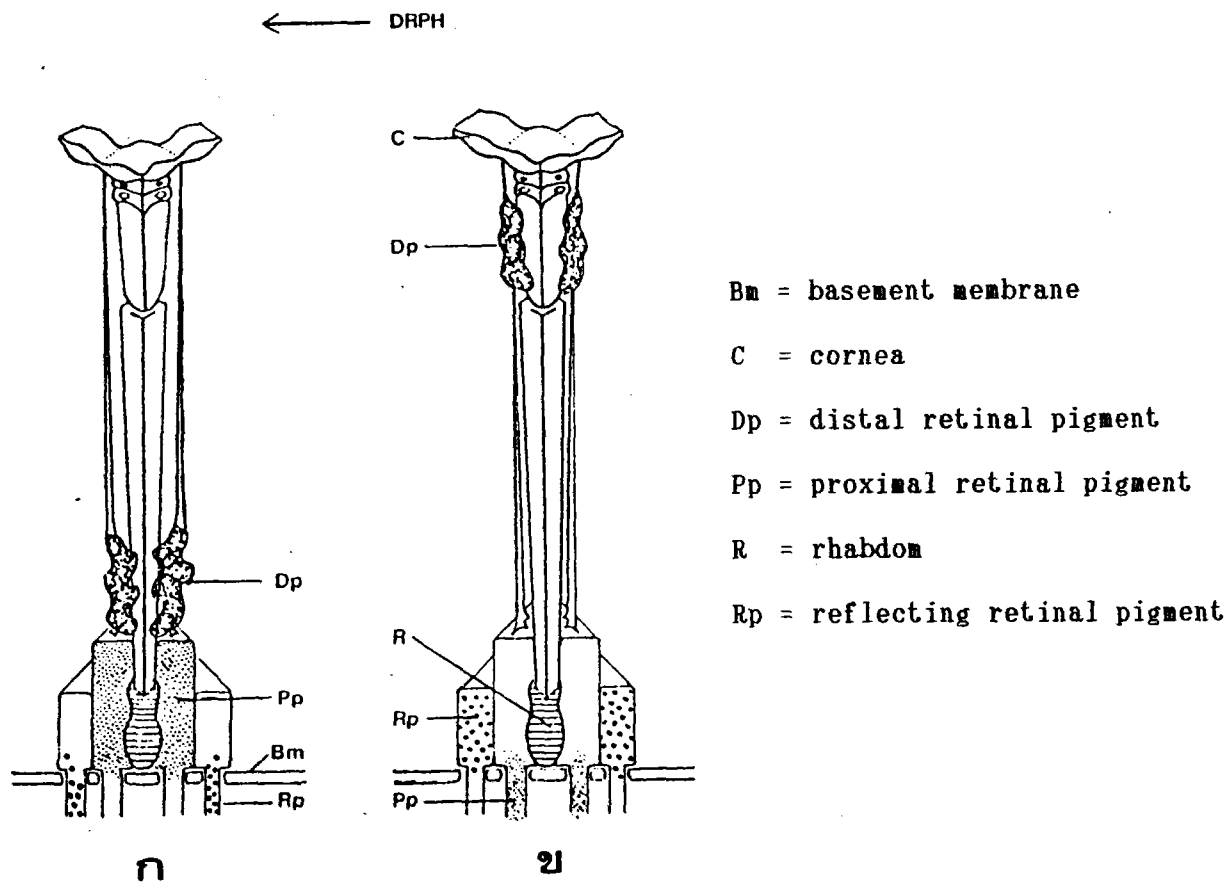
2.1 ดิสทัลเรตินัลพิกเมนต์เซลล์ (distal retinal pigment cell) พบอยู่ในเนื้อเยื่อรอบ ๆ คริสทัลไลน์โคน (crystalline cone)

2.2 พรอกซิมัลเรตินัลพิกเมนต์เซลล์ (proximal retinal pigment cell) พบอยู่ทั่ว ๆ ไปภายในเรตินูลาร์เซลล์ (retinular cell)

2.3 รีเฟลกติงเรตินัลพิกเมนต์เซลล์ (reflecting retinal pigment cell) พบอยู่บริเวณฐานของเรตินูลาร์เซลล์

ในที่สว่างพบว่าดิสทัลเรตินัลพิกเมนต์จะเคลื่อนที่มายู่ตรงกลางเซลล์และกระจายตัวออก พรอกซิมัลเรตินัลพิกเมนต์จะกระจายตัวอยู่เหนือเยื่อเซลล์ที่ฐานของเซลล์ (basement membrane) ส่วนรีเฟลกติงเรตินัลพิกเมนต์ยังคงอยู่ใต้เยื่อเซลล์ที่ฐานของเซลล์ ในทางกลับกันพบว่า ในที่มีมืด ดิสทัลเรตินัลพิกเมนต์จะเคลื่อนที่มารวมกันที่คอร์เนีย (cornea) ซึ่งอยู่ด้านบน พรอกซิมัลเรตินัลพิกเมนต์จะเคลื่อนที่ลงมายู่ใต้เยื่อเซลล์ที่ฐานของเซลล์ ส่วนรีเฟลกติงเรตินัลพิกเมนต์จะเคลื่อนที่มา

อยู่ในเนื้อเยื่อเซลล์ที่ฐานของเซลล์ซึ่งเป็นการช่วยในการสะท้อนของแสง ดังภาพประกอบ 2



ภาพประกอบ 2 แสดงภาพวาดของอวัยวะตาเดี่ยวในตาประกอบของกิ้ง *Palaemon spp.* (Josefsson. 1983)

ก. ในที่สว่าง ข. ในที่มืด

เม็ดสีจะอยู่ในโครมาโทฟอร์และเรตินัลพิกเมนต์เซลล์ การเคลื่อนที่ของเม็ดสีนี้ถูกควบคุมด้วยนิวโรฮอร์โมน (neurohormone) ที่สร้างจากก้านตา (eyestalk) หรือเนื้อเยื่อประสาทนอกก้านตา (Kleinholz and Kimball. 1965; Lockwood. 1967) นิวโรฮอร์โมนนี้มีหลายชนิด แต่เท่าที่ทราบในปัจจุบันมีอยู่ 2 กลุ่มซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ทำงานตรงกันข้ามกัน (antagonistic hormone) (Rao and Riehm. 1988) ดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1 ฮอร์โมนที่ช่วยในการรวมตัว (aggregation หรือ concentration) ของเม็ดสีในโครมาโทฟอร์และฮอร์โมนที่ช่วยในการปรับการเคลื่อนที่ของเม็ดสีภายในอัมมาติเดียมต่อที่มีค ฮอร์โมนในกลุ่มนี้ที่ทราบโครงสร้างแล้วคือ Red-Pigment-Concentrating Hormone (RPCH) (Fernelund and Josefsson, 1972) โดยมีลำดับของกรดอะมิโน (amino acid sequence) ดังแสดงในตาราง 1

กลุ่มที่ 2 ฮอร์โมนที่ช่วยในการกระจายตัว (dispersion) ของเม็ดสีในโครมาโทฟอร์ และฮอร์โมนที่ช่วยในการปรับการเคลื่อนที่ของเม็ดสีในอัมมาติเดียมต่อที่สว่าง ฮอร์โมนในกลุ่มนี้ที่ทราบโครงสร้างแล้วคือ Pigment-Dispersing Hormone (PDH) ซึ่งมีอยู่ 2 รูปแบบ (form) คือ α และ β (Fernelund, 1976; Rao and others, 1985; Kleinholz and others, 1986)

ก้านตาของสัตว์พวกครัสเตเชียประกอบด้วยนิวโรเลนโดครีนเซลล์ (neuroendocrine cell) และมีนิวโรฮีมาลอแกน (neurohemal organ) คือ ค่อมไซนัส (sinus gland) (Josefsson, 1983) ก้านตาของสัตว์กลุ่มนี้เป็นแหล่งสร้างและเก็บสะสมฮอร์โมนที่สำคัญหลายชนิด เช่น ฮอร์โมนที่ยับยั้งการลอกคราบ (Molting Inhibiting Hormone-MIH) (Webster and Keller, 1986; Chang, Bruce and Newcomb, 1987) ฮอร์โมนที่ยับยั้งการพัฒนาของรังไข่ (Vitellogenesis Inhibiting Hormone-VIH) (Soyez, Deijnen and Martin, 1987) ฮอร์โมนที่ควบคุมการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (Crustacean Hyperglycemic Hormone-CHH) (Huberman and Aquilar, 1988) รวมทั้งฮอร์โมนที่ช่วยในการกระจายตัวของเม็ดสีในโครมาโทฟอร์และฮอร์โมนที่ช่วยในการปรับการเคลื่อนที่ของเม็ดสีภายในอัมมาติเดียมของสัตว์ต่อที่สว่าง ซึ่ง ได้แก่ PDH (Rao and Riehm, 1988) การตรวจหาฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อก้านตาของสัตว์กลุ่มนี้ ส่วนใหญ่จะศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมีสทรี (immunocytochemistry) แต่การศึกษาทางด้านนี้ยังมีขอบเขตจำกัด เนื่องจากฮอร์โมนที่แยกได้จากเนื้อเยื่อก้านตาของสัตว์กลุ่มนี้และฮอร์โมนที่สังเคราะห์ขึ้น มีเพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถนำมาใช้เป็นแอนติเจนเพื่อผลิตแอนติซีรัม (antiserum) ปัจจุบันสามารถแยก RPCH α -PDH และ β -PDH ให้บริสุทธิ์ได้ พร้อมทั้งทราบลำดับของกรดอะมิโน และสามารถผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมนเหล่านั้น (Dircken and others, 1987)

จากรายงานการตรวจหาเซลล์ประสาทที่มีฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ ในก้านตาของครัสตาเซียสนั้นส่วนมากจะพบเซลล์ที่มีฮอร์โมนต่าง ๆ ในบริเวณปมประสาทตา (optic ganglia) ซึ่งมีอยู่ 4 บริเวณ ได้แก่ ลามินาแกนกลีโอนาวิส (lamina ganglionaris) เมดัลลาเอกเทอร์นา (medulla externa) เมดัลลาอินเทอร์นา (medulla interna) และเมดัลลาเทอร์มินาลิส (medulla terminalis) (Van Deijnen, Vek and Van Herp. 1985; Bellon-Humbert, Van Herp and Schooneveld. 1986; Mangerich and others. 1987)

การศึกษาและแยกสกัด PDH ในครัสตาเซียสน

การศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนสีตัวในครัสตาเซียสนได้ศึกษากันมานานแล้ว โดยในปี ค.ศ. 1842 โครเซอร์ (Kroyer) พบว่าการเปลี่ยนสีตัวในสัตว์เกิดขึ้นเนื่องจากการเคลื่อนที่ของเม็ดสีในโครมาโทฟอร์ (cited from Fingerman. 1985) ต่อมาในปี ค.ศ. 1928 เพอร์กินและโคลเลอร์ (Perkins and Koller) ได้ทดลองให้เห็นว่าการเปลี่ยนสีตัวในสัตว์เป็นอิทธิพลของฮอร์โมนที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อก้านตาของสัตว์ (cited from Bellon-Humbert, Van Herp and Schooneveld. 1986; Fingerman. 1987)

การแยก PDH โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) และเทคนิคทางโครมาโทกราฟี (chromatography) พบว่า PDH มีอยู่หลายรูปแบบ ซึ่งแตกต่างกันไปในครัสตาเซียสนแต่ละชนิด คาดว่า PDH อาจมีอยู่ถึง 7 รูปแบบด้วยกัน (Rao and Riehm. 1988) ปัจจุบันมี PDH เพียง 2 รูปแบบที่ทราบลำดับของกรดอะมิโนคือ α -PDH และ β -PDH (Fernlund. 1976; Rao and others. 1985; Kleinholz and others. 1986)

เฟิร์นลันด์ (Fernlund) ได้ทำการแยกและหาลำดับของกรดอะมิโนของ Distal-Retinal-Pigment Hormone (DRPH) จากเนื้อเยื่อก้านตาของกุ้ง *Pandalus borealis* ซึ่งฮอร์โมนนี้เป็นฮอร์โมนที่ช่วยในการปรับการเคลื่อนที่ของเม็ดสีภายในอัมมาติเดียมของตาประกอบในที่สว่าง (Fernlund. 1976) ต่อมาจากการศึกษาในครัสตาเซียสนหลายชนิดพบว่า DRPH และ α -PDH จากกุ้ง *Pandalus borealis* เป็นฮอร์โมนชนิดเดียวกัน (Josefsson. 1983) ฮอร์โมนนี้เป็นเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 18 ตัว มีลำดับของกรดอะมิโนดังแสดงในตาราง 1 (Fernlund. 1976)

ในการศึกษา β -PDH เราและคนอื่น ๆ (Rao and others. 1985) ได้ทำการแยกสกัด β -PDH จากปูก้ามดาบ *Uca pugilator* โดยใช้วิธีเจลฟิลเตรชัน (gel filtration) โอลอนแลกเปลี่ยนไอออนโครมาโทกราฟี (ion exchange chromatography) พาร์ทิชัน-โครมาโทกราฟี (partition chromatography) ตามด้วย reversed-phase HPLC (High Performance Liquid Chromatography) และในปีถัดมาไคลน์โฮลซ์และคนอื่น ๆ (Kleinholz and others. 1986) สามารถแยกสกัด β -PDH จากปู *Cancer magister* โดยใช้วิธีดังกล่าวได้เช่นเดียวกัน พบว่า β -PDH เป็นเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 18 ตัวเช่นเดียวกับ α -PDH แต่ PDH ทั้งสองรูปแบบมีกรดอะมิโนแตกต่างกัน 6 ตัวในตำแหน่งที่ 3, 4, 11, 13, 16 และ 17 ดังตาราง 1 ซึ่งจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าในครัสเตเชียชนิดกันอาจมีความคล้ายกันหรือแตกต่างกันในแง่โครงสร้างของ PDH นอกจากนี้ยังพบสารที่มีโครงสร้างคล้ายกับ PDH ในแมลงต่าง ๆ เช่นพบที่ส่วนหัวของตั๊กแตน *Romalea microptera* (Rao and others. 1987) จิ้งหรีด *Acheta domesticus* (Rao and others. 1986) เป็นต้น

การตรวจหาค่าแห่งที่พบ PDH ในครัสเตเชีย

การตรวจหาค่าแห่งที่พบ PDH ในครัสเตเชียชนิดต่าง ๆ จะตรวจหาด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมีสทรี ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจหาแอนติเจน (antigen) ในเนื้อเยื่อโดยอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี (antibody) ที่มีความจำเพาะต่อกัน เทคนิคนี้จะใช้แอนติบอดีติดฉลากด้วยสารบางชนิด เช่น เอนไซม์ (enzyme) สารเรืองแสง (fluorescent substance) เฟอร์ริติน (ferritin) สารกัมมันตภาพรังสี (radioactive substance) อนุภาคทอง (colloidal gold) เป็นต้น ซึ่งสารที่นำมาติดฉลากมีคุณสมบัติที่ใช้เป็นเครื่องหมาย (marker) ในตำแหน่งที่แอนติเจนชนิดนั้น ๆ ปรากฏอยู่ โดยหลักการสามารถแบ่งวิธีทดสอบออกได้เป็น 2 วิธีคือ

1. วิธีตรง (direct method) วิธีนี้จะใช้สารที่นำมาติดฉลากติดเข้าไปโดยตรงกับแอนติบอดีตัวแรก (primary antibody) และให้ทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่ต้องการตรวจหาแอนติเจน ข้อดีของวิธีนี้คือมีเพียงขั้นตอนเดียว ถ้าแอนติเจนที่ต้องการตรวจสอบมีเพียงไม่กี่ชนิด วิธีนี้จะให้ผลรวดเร็ว แต่ถ้ามีแอนติเจนที่ต้องการตรวจสอบหลายชนิด วิธีนี้จะใช้เวลานานยุ่งยาก

และสิ้นเปลืองสารเคมีในการเตรียมแอนติบอดีให้ติดกับสารที่นำมาติดฉลาก ปกติแล้ววิธีนี้ไม่ค่อยเป็นที่นิยมเพราะมีประสิทธิภาพ (efficiency) และความไว (sensitivity) ต่ำกว่าวิธีอื่น

2. วิธีอ้อม (indirect method) วิธีนี้จะใช้สารที่นำมาติดฉลากติดเข้ากับแอนติบอดีตัวที่สอง (secondary antibody) หรือแอนติบอดีตัวที่สาม (tertiary antibody) โดยให้แอนติเจนที่ต้องการทดสอบทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะ จากนั้นจะใช้แอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) ซึ่งติดฉลากไว้ด้วยสารชนิดต่าง ๆ เป็นตัวทำปฏิกิริยาอีกตัวหนึ่ง ซึ่งจะช่วยให้ทราบว่าปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบนั้นเกิดขึ้นหรือไม่ วิธีนี้เป็นที่นิยมแพร่หลาย เพราะมีประสิทธิภาพและความไวดีกว่าวิธีแรก อีกทั้งยังประหยัดค่าใช้จ่ายและสะดวกเพราะแอนติบอดีที่ติดฉลากสามารถหาซื้อได้

ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา การศึกษาเพื่อตรวจหาคำแหน่งที่พบ PDH ในครัสตาเซียชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธีอ้อมอิมมูโนไซโตเคมีสตรี้ มีดังนี้คือ

ชูเลอร์ (Schueler) และคนอื่น ๆ ได้ใช้วิธีอ้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (indirect immunofluorescence) ตรวจหาเซลล์ประสาทที่มี DRPH ในก้านตาและระบบประสาทส่วนกลางของกิ้ง *crayfish Orconectes immunis* พบว่าเซลล์ประสาทที่มี DRPH ในก้านตาของกิ้ง *crayfish* อยู่ในบริเวณปมประสาทที่ตาที่เรียกว่าเมดัลลาอินเทอร์นา เมดัลลาเอ็กเทอร์นา และลามินาแกนกลีโอนาวิส และพบ DRPH ที่เส้นใยประสาทซึ่งมีลักษณะเป็นปุ่ม ๆ (varicose fibers) ในนิวโรไฟล์ (neuropil) ของปมประสาทที่ตาทั้งสามบริเวณดังกล่าว ส่วนในสมองพบว่าเซลล์ประสาทที่มี DRPH ส่วนใหญ่จะอยู่เป็นกลุ่มในบริเวณนิวโรไฟล์ (neuropil area) หลายบริเวณ (Schuler and others. 1986)

ในปี 1987 มานเจอร์ริช (Mangerich) และคณะได้ใช้วิธี PAP (unlabelled antibody peroxidase-antiperoxidase) เพื่อศึกษาแหล่งของ β -PDH ในก้านตาปู *Carcinus maenas* และในกิ้ง *crayfish Orconectes limosus* พบว่าครัสตาเซียทั้งสองชนิดมีรูปแบบการกระจายของฮิสโทเคมีสตรี้คล้ายคลึงกัน กล่าวคือ เมื่อสังเกตการติดสี พบเซลล์ประสาทขนาดใหญ่อยู่บริเวณระหว่างปมประสาทที่ตาสองบริเวณคือ เมดัลลาอินเทอร์นา และเมดัลลาเทอร์มินาวิส และพบเซลล์ประสาทขนาดเล็กในลามินาแกนกลีโอนาวิส ส่วนใน *C. maenas* พบเซลล์ประสาทจำนวน 2-3 เซลล์ใน X-organ และใน *O. limosus* พบเซลล์ประสาทจำนวน 2-4 เซลล์

ในบริเวณเมดัลลาเทอร์มินาลิส นอกจากนี้เซลล์ประสาทที่อยู่ระหว่างเมดัลลาอินเทอร์นาและเมดัลลาเทอร์มินาลิส ยังส่งออร์โมนไปตามเส้นใยประสาท (nerve fiber) ไปยังบริเวณเมดัลลาเอ็กเทอร์นา เมดัลลาอินเทอร์นา เมดัลลาเทอร์มินาลิส และต่อมไชนัสซึ่งเป็นนิวโรฮีมาลอแกน (neurohemal organ) อีกด้วย (Mangerich and others. 1987) และจากการทดลองเดียวกันพบว่า มีเซลล์ประสาทบางเซลล์และเส้นใยประสาทบางบริเวณที่ทำปฏิกิริยาต่อแอนติบอดีสองชนิดคือแอนติบอดีของ β -PDH และ FMRamide (Phe-Met-Arg-Phe-amide) ซึ่งความสำคัญของการอยู่ในเซลล์บางเซลล์ร่วมกัน (co-localization) ระหว่าง β -PDH และสารคล้าย FMRamide (FMRamide analog) ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่สารคล้าย FMRamide นี้พบได้ในกิ้งกอลบสเตอร์ *Homarus americanus* (Trimmer, Kobierski and Kravitz. 1987) ในสารสกัดจากหัวของแมลงสาบ (Holman, Cook and Nachman. 1986) และสัตว์อื่น ๆ อีกมากมายหลายชนิด เช่น หอย นก และสัตว์เลื้อยคลาน (Melchiorri. 1985)

จากการใช้วิธี PAP ดังกล่าวเช่นเดียวกัน ดิคเซน (Dircksen) และคนอื่น ๆ ได้ศึกษารายละเอียดของโครงสร้างที่ปลายแอกซอน (axon) ภายในต่อมไชนัส ซึ่งเป็นบริเวณที่หลัง β -PDH ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยศึกษาในครัสเตเชีย 4 ชนิดคือ ปู *Carcinus maenas*, *Cancer pagurus*, *Uca pugilator* และกิ้ง crayfish *Orconectes limosus* พบว่าที่ปลายแอกซอนจะประกอบไปด้วยนิวโรซีรีทอรีแกรนูล (neurosecretory granule) ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 90-130 นาโนเมตร โดยที่แกรนูล (granule) เหล่านี้จะหลัง β -PDH ไปยังฮีโมลิฟลาคูเน (hemolymph lacunae) (Dircksen and others. 1987)

ส่วนการศึกษารูปแบบการกระจายของ β -PDH ในระบบประสาทของปู *Carcinus maenas* และกิ้ง crayfish *Orconectes limosus* ด้วยวิธี PAP นี้ แมนเกอร์ริชและเคลเลอร์ (Keller) พบว่าในสัตว์แต่ละชนิดมีเซลล์ประสาทที่พบ β -PDH จำนวนเท่ากันคือ ประมาณ 10-12 เซลล์ โดยพบในบริเวณแอนทีเรียร์มีเดียล (anterior medial) ดอร์ซอลเลทีรัล (dorsal lateral) และแอนกูลาร์โซมาตา (angular somata) ของปมประสาทที่สมอง (cerebral ganglion) ใน *C. maenas* จะพบเซลล์ประสาทที่พบ β -PDH 1 เซลล์ในแต่ละคอมมิสซูรัลแกนเกลียน (commissural ganglion) และพบเซลล์ประสาทที่พบ β -PDH จำนวนหลายเซลล์ในปมประสาทที่อก (thoracic ganglion) ส่วนใน *O. limosus* พบเซลล์ประสาทที่พบ β -PDH

จำนวน 4 เซลล์ในเส้นประสาททางด้านท้อง นอกจากนั้นยังพบ α -PDH ที่เส้นใยประสาทในบริเวณ
เซ็นทรัลแกนเกลีย (central ganglia) ของสัตว์ทั้งสองชนิด (Mangerich and Keller.
1988)

กิ้งก่ามกราม กุ้งกุลาดำและกุ้งตะกาด อยู่ในไฟลัมอาร์โทรโปดา (phylum Arthropoda)
และคลาสครัสเตเชีย (class Crustacea) การจัดหมวดหมู่ (classification) ของกิ้ง
กิ้งสามชนิดนี้ในระดับต่าง ๆ ดังแสดง (Holthuis. 1980)

	กิ้งก่ามกราม	กิ้งกุลาดำ	กิ้งตะกาด
Phylum	Arthropoda	Arthropoda	Arthropoda
Subphylum	Mandibulata	Mandibulata	Mandibulata
Class	Crustacea	Crustacea	Crustacea
Subclass	Malacostraca	Malacostraca	Malacostraca
Order	Decapoda	Decapoda	Decapoda
Suborder	Natantia	Natantia	Natantia
Infraorder	Caridea	Penaeidea	Penaeidea
Family	Palaemonidae	Penaeidae	Penaeidae
Genus	<i>Macrobrachium</i>	<i>Penaeus</i>	<i>Metapenaeus</i>
Species	<i>rosenbergii</i>	<i>monodon</i>	<i>affinis</i>

ชีววิทยาของกิ้งก่ามกราม กุ้งกุลาดำและกุ้งตะกาด

กิ้งก่ามกราม

กิ้งก่ามกราม เป็นกิ้งน้ำจืดขนาดใหญ่ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ กุ้งชนิดนี้บางครั้งอาจเรียกว่า
กิ้งนาง หรือกิ้งหลวง กิ้งก่ามกรามอาศัยตามแม่น้ำลำคลอง ลำธาร ทะเลสาบ รวมทั้งแหล่งน้ำจืด
ที่มีทางติดต่อกับทะเล และแหล่งน้ำกร่อยบริเวณปากแม่น้ำ ลำคลองและทะเลสาบ

กิ้งก่ามกรามมีลำตัวเป็นปล้อง เปลือกหุ้มลำตัวทั้งหมดแข็ง มีสีน้ำตาลปนดำโดยบริเวณส่วน

ท้องจะมีสี่แ่งกว่าส่วนหัว ปล้องท้อง 3 ปล้องสุดท้ายมีจุดสีเหลือง ส่วนของลำตัวเปลือก จะแยกเป็นปล้อง ๆ ส่วนหัวและอกจะคลุมด้วยเปลือกชั้นเดียวกัน กวีเรือยาวเลขแผ่นกำบังทวนาคู่ที่สอง ปลาขริงอนเข็ดขึ้นเหนือโคนกรี บริเวณโคนกรีกนูนโค้งขึ้น แ่งยื่นแบบฟันเลื่อยทั้งด้านบนและด้านล่างและมีจำนวนใกล้เคียงกันคือประมาณ 12-13 ซี่ เปลือกส่วนหัวเป็นมันเรียบ กุ้งก้ามกรามมีขนาด 2 คู่ ขาเดิน 5 คู่ และขาว่ายน้ำ 5 คู่ ปลาขหางจะมีลักษณะเป็นหนามแหลมและมีแขนหาง 2 ข้าง ขาเดินคู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 จะมีปลายเป็นก้ามซึ่งมีสีครามสดถึงสีครามแก่ ส่วนขาเดินคู่ที่ 3, 4 และ 5 มีลักษณะเป็นปลายแหลมธรรมดา สำหรับขาเดินคู่ที่ 2 ของกุ้งตัวผู้โตเต็มที่จะเป็นก้ามที่มีขนาดใหญ่และยาวกว่าของตัวเมียอย่างเห็นได้ชัดเจน ผิวด้านนอกของขาเดินคู่นี้มีหนามแหลมเรียงอยู่กระจัดกระจายและนิ้วของก้ามหนีบมีขนปกคลุมอย่างหนาแน่น ขนาดลำตัวยาวประมาณ 120-130 มิลลิเมตร

ลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันระหว่างกุ้งเพศผู้และเพศเมีย ก็คือ กุ้งที่โตเต็มวัยตัวผู้จะมีขนาดใหญ่กว่าตัวเมีย ก้ามของตัวผู้จะมีขนาดใหญ่ ก้ามของตัวเมียจะมีขนาดเล็ก เปลือกหุ้มตัวส่วนท้องของตัวผู้จะแคบแต่ของตัวเมียจะกว้าง สำหรับกุ้งที่ยังไม่โตเต็มที่อาจจะใช้ลักษณะอื่นเข้าช่วย ซึ่งจะต้องดูละเอียดขึ้น ลักษณะที่สามารถใช้แยกเพศกุ้งตั้งแต่ตัวเล็กถึงตัวโตคือ ลักษณะของขาว่ายน้ำคู่ที่ 2 ซึ่งจะมีลักษณะแตกต่างกันระหว่างเพศผู้และเพศเมีย กุ้งตัวเมียตรงปลายขาว่ายน้ำคู่ที่ 2 ตรงปล้องสุดท้ายจะแยกออกเป็นแขนง 3 อัน โดสอันเล็กสุดอยู่ด้านใน ส่วนกุ้งตัวผู้ปลายขาว่ายน้ำคู่ที่ 2 จะแยกเป็นแขนง 4 อัน โดสมีเพิ่มเข้ามาอีก 1 อัน ระหว่างอันที่ 2 และ 3 ส่วนที่เพิ่มขึ้นมานี้เรียกว่าแอฟเพนดิก มีสกุลลิน่า (appendix masculina) ซึ่งพบเฉพาะในกุ้งตัวผู้ซึ่งจะแทรกอยู่ระหว่างแขนงอันที่ 2 คือ เอ็นโดพอด (endopod) และแขนงอันที่ 3 คือ แอฟเพนดิก อินเทอร์นา (appendix interna) สำหรับแขนงอันที่ 1 มีชื่อเฉพาะว่าเอ็กโซพอด (exopod) การแยกเพศกุ้งโดยวิธีดูปลาขว่ายน้ำคู่ที่ 2 นี้ ถ้าเป็นกุ้งขนาดโตก็สามารถแยกได้ง่าย แต่ถ้าเป็นกุ้งขนาดเล็กต้องใช้แว่นขยายหรือกล้องจุลทรรศน์ช่วยจึงจะเห็นได้ชัด ลักษณะอื่น ๆ ที่สามารถจะใช้แยกเพศกุ้งขนาดปานกลางหรือขนาดใหญ่ได้ ได้แก่ ช่องเปิดสำหรับเชื้อตัวผู้และช่องเปิดสำหรับไข่ โดสในตัวผู้ช่องเปิดจะอยู่ที่บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 ส่วนตัวเมียช่องเปิดจะอยู่ที่โคนขาเดินคู่ที่ 3 ลักษณะอีกอย่างหนึ่งที่อาจช่วยในการแยกเพศกุ้งคือ ที่ปล้องที่ 1 ของส่วนท้องของกุ้งตัวผู้ตรงกลางด้านท้องจะเป็นปุ่มเล็ก ๆ สามารถรู้สึกได้โดยใช้นิ้วมือสัมผัส

(ชูศิลป์ อัดชู. 2526; ศุภผล เทพเฉลิม. 2527; ฮนค์ มุลิก. 2529)

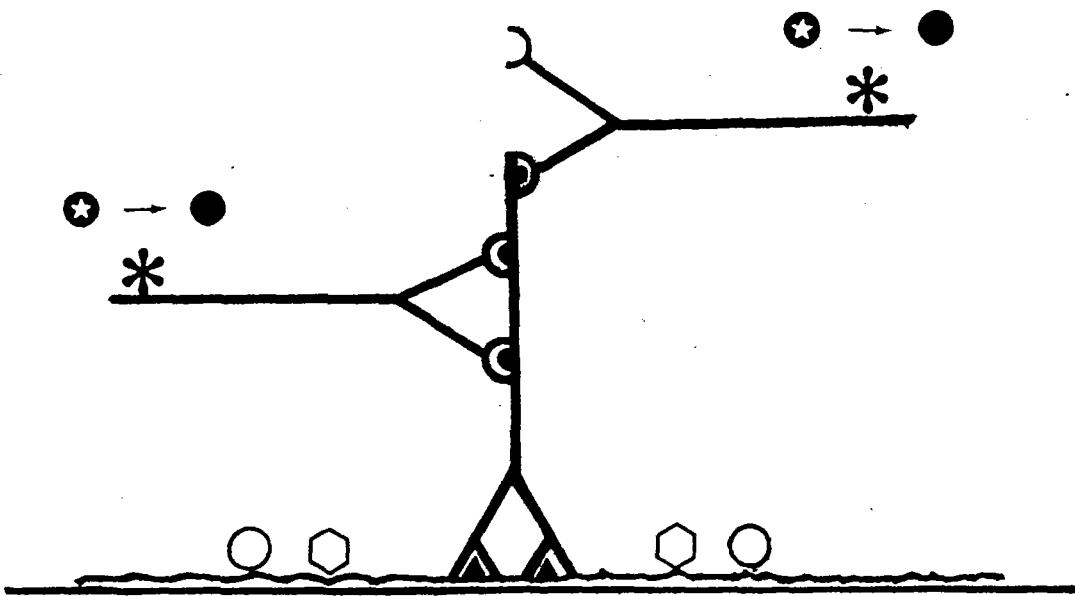
กึ่งกุลาดำ

กึ่งกุลาดำ เป็นกึ่งทะเลขนาดใหญ่ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและเป็นสินค้าที่ตลาดโลกมีความต้องการสูงเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ กึ่งชนิดนี้เรียกกันชื่อต่าง ๆ ว่า กึ่งกุลาดำ กึ่งกุลากุลาชและกึ่งประ กึ่งกุลาดำอาศัยอยู่ตามพื้นที่ของทะเลที่เป็นโคลน โคลนปนทราย บริเวณสถานที่ใกล้ปากแม่น้ำ

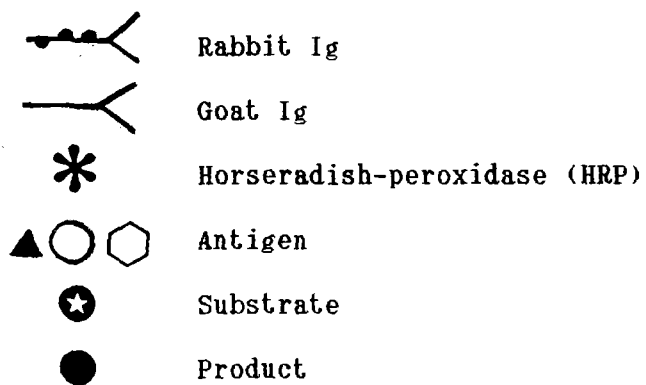
กึ่งกุลาดำมีลำตัวสีน้ำตาลหรือสีน้ำตาลและมีลักษณะเป็นข้อปล้อง ทั้งหมดมีประมาณ 19 ปล้อง แต่ละปล้องมีระยางค์ 1 คู่ ซึ่งทำหน้าที่แตกต่างกันไป บนปล้องท้องแต่ละปล้องมีแถบสีม่วงหรือสีดำ หาดขวาง 2 แถบ เปลือกส่วนหัว สันข้างแก้ม (hepatic carina) ทอดขนานไปตามยาว ร่างกายของกึ่งแบ่งออกเป็น 3 ส่วนใหญ่ ๆ คือ หัว อก และลำตัว ส่วนหัวและอกมี 5 ปล้อง แต่รวมเป็นปล้องเดียวมีเปลือกคลุม ส่วนหัวมีระยางค์ 5 คู่ ระยางค์คู่ที่ 1 และ 2 เป็นหนวดใช้ในการสัมผัส ระยางค์คู่ที่ 3 ได้แก่ขากรรไกรล่างมีหน้าที่ในการขบเคี้ยวอาหาร ส่วนคู่ที่ 4 และ 5 เป็นขากรรไกรบนมีหน้าที่เช่นเดียวกับขากรรไกรล่าง เปลือกหุ้มตัวตอนหน้าสุดของปล้องที่ 1 จะยื่นเป็นพื้นแหลมไปข้างหน้าเรียกว่า กรี โคนกรีโค้งและปลาอกรีเซดขึ้นเล็กน้อย ด้านบนของกรีมีฟัน 7-8 ซี่ ด้านล่าง 2-3 ซี่ หนวดสีดำไม่มีลาย สองข้างโคนกรี (adrostral sulcus) มีร่องยาวถึงพื้น สันที่ต่อจากโคนกรี (postrostral carina) ยาวจรดขอบ ส่วนอกมี 8 ปล้อง ได้แก่ ปล้องที่ 6-13 ระยางค์คู่ที่ 6, 7 และ 8 อยู่บนอกเรียกว่า แมกซิลลิเพด (maxillipeds) มีหน้าที่ช่วยในการกินอาหารหรือป้องกันภัย ส่วนระยางค์คู่ที่ 12 และ 13 เป็นขาใช้สำหรับเดินและเคลื่อนไหว ลำตัวมี 6 ปล้อง เปลือกปล้องท้องอันที่ 2 ไม่ทับปล้องแรก ระยางค์คู่ที่ 14, 15, 16, 17 และ 18 มีลักษณะคล้ายใบพาย ใช้สำหรับว่ายน้ำ ส่วนระยางค์คู่ที่ 19 หรือหางประกอบด้วยแพนหางและหางรูปพัดซึ่งขึ้นลงได้ตามต้องการ ขนาดลำตัวประมาณ 150-300 มิลลิเมตร

ลักษณะที่แตกต่างกันระหว่างกึ่งเพศผู้และกึ่งเพศเมียคือ กึ่งตัวเมียจะมีอวัยวะเพศเมียที่สามารถมองเห็นได้จากภายนอกซึ่งเรียกว่าซีลิคัม (thelycum) อยู่ที่โคนขาเดินคู่ที่ 5 ส่วนกึ่งตัวผู้จะมีอวัยวะเพศผู้ที่สามารถมองเห็นได้จากภายนอกเช่นเดียวกับอวัยวะเพศเมีย อวัยวะเพศผู้เรียกว่าปีทาสมา (petasma) อยู่ที่โคนขาว่ายน้ำคู่ที่ 1

(สมศักดิ์ ปัทมา. 2525; พิชัย สราญรมย์และอภิรักษ์ จันตะนี. 2534)



ภาพประกอบ 3 แสดงปฏิกิริยาของแอนติเจนและแอนติบอดีโดยวิธีอิมมูโน
เปอร์ออกซิเดส



เนื่องจากกิ่งก้ามกราม กิ่งกุลาดำและกิ่งตะกาดอยู่ต่างอินฟราออร์เดอร์ (infrarorder) กัน ดังนั้นจึงเป็นเรื่องที่ทำให้สนใจจะศึกษาและเปรียบเทียบรูปแบบการกระจายของ α -PDH และ β -PDH ในก้านตาของกิ่งทั้งสามชนิด เพื่อเป็นการตรวจสอบถึงความคล้ายคลึงหรือแตกต่างกันของ ฮีโมโกลบินในกลุ่มนีโอสตาเซียมและเพื่อที่จะได้ทราบความสัมพันธ์ในแง่วิวัฒนาการเกี่ยวกับการกระจายของฮีโมโกลบินในกิ่งทั้งสามชนิด และเนื่องจากกิ่งทั้งสามชนิดเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ การตรวจหา α -PDH และ β -PDH ด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมีสตรี้ จึงเป็นพื้นฐานในการตรวจหาฮีโมโกลบินชนิดอื่น ๆ ในก้านตา เพื่อที่จะได้ทราบตำแหน่งของเซลล์ประสาทที่มีฮีโมโกลบินเหล่านั้น เพื่อที่จะง่ายต่อการตรวจหาตำแหน่งของเซลล์ประสาทที่มี GIH และแอกสกีด GIH ในบริเวณนั้นออกมา และถ้าสามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ GIH ได้ จะเป็นการลดปริมาณของฮีโมโกลบินในตัวกิ่งและเร่งให้กิ่งสร้างไข่ได้เร็วขึ้น ซึ่งเป็นการลดต้นทุนในการผลิต

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อศึกษาคำแหน่งที่พบ α -PDH และ β -PDH ในก้านตาของกิ่งก้ามกราม กิ่งกุลาดำ และกิ่งตะกาด
2. เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบการกระจายของ α -PDH และ β -PDH ในก้านตาของกิ่งก้ามกราม กิ่งกุลาดำและกิ่งตะกาด
3. เพื่อเป็นแนวทางในการตรวจหารูปแบบการกระจายของฮีโมโกลบินอื่น ๆ ในก้านตาของกิ่งก้ามกราม กิ่งกุลาดำและกิ่งตะกาด

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. ทำให้ทราบรูปแบบการกระจายของ α -PDH และ β -PDH ในก้านตาของกิ่งก้ามกราม กิ่งกุลาดำและกิ่งตะกาด
2. ทำให้ทราบความสัมพันธ์ของฮีโมโกลบินในแง่ของวิวัฒนาการเกี่ยวกับรูปแบบการกระจายของ α -PDH และ β -PDH ในกิ่งก้ามกราม กิ่งกุลาดำและกิ่งตะกาด
3. เป็นพื้นฐานในการตรวจหาฮีโมโกลบินชนิดอื่น ๆ เพื่อการแยกสกัดฮีโมโกลบินเหล่านั้นในกิ่งทั้งสามชนิดต่อไป

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ใช้สัตว์ทดลองคือ กุ้งก้ามกรามตัวเต็มวัย จากจังหวัดพระนครศรีอยุธยา กุ้งกุลาดำและกุ้งตะกาดตัวเต็มวัย จากจังหวัดชลบุรี
2. ศึกษาโดยการตรวจนับเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในก้านตาของกุ้งก้ามกราม กุ้งกุลาดำและกุ้งตะกาด
3. ศึกษารูปแบบการกระจายของ α -PDH และ β -PDH ในบริเวณปมประสาทตาของ กุ้งก้ามกราม กุ้งกุลาดำและกุ้งตะกาด
4. ตรวจสอบว่าเซลล์ประสาทเซลล์ใดที่พบเฉพาะ α -PDH หรือ β -PDH หรือเซลล์ใดพบทั้ง α -PDH และ β -PDH ในก้านตาของกุ้งก้ามกราม กุ้งกุลาดำและกุ้งตะกาด
5. วาดรูปแสดงจำนวนและตำแหน่งของเซลล์ และเส้นใยประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในบริเวณต่าง ๆ ในก้านตาของกุ้งก้ามกราม กุ้งกุลาดำและกุ้งตะกาด

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. นิกเมนต์ดีสเพอร์ซิงฮอร์โมน หมายถึง ฮอร์โมนที่ช่วยในการกระจายตัวของเม็ดสีในโทรมาโทฟอร์และฮอร์โมนที่ช่วยในการปรับการเคลื่อนที่ของเม็ดสีในอัมมาติเดียมต่อที่สว่าง
2. อิมมูโนไซโตเคมีสทรี หมายถึง วิธีที่ใช้ตรวจหาแอนติเจนในเนื้อเยื่อโดยอาศัยหลักการทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

สัตว์ทดลอง

1. กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ตัวเต็มวัย น้ำหนักประมาณ 20-35 กรัม จากอำเภอเมือง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา
2. กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ตัวเต็มวัย น้ำหนักประมาณ 80-130 กรัม จากอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี
3. กุ้งตะกาด (*Metapenaeus affinis*) ตัวเต็มวัย น้ำหนักประมาณ 15-25 กรัม จากอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องมือผ่าตัด
2. จานแก้ว (petridish)
3. ขวดรูปกรวยมีแขน (suction flask)
4. เครื่องดูดอากาศ (suction pump)
5. สไลด์พร้อมกระจกปิดสไลด์
6. โถแก้วสำหรับย้อมสไลด์ (couplin jar)
7. ไมโครปิเปตต์ (micropipette)
8. ขวดแก้วปากตรง (vial)
9. เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน (rotary microtome)
10. ตะเกียงแอลกอฮอล์

11. ตู้อบ (hot air oven)
12. แท่นอุ่นสไลด์ (slide warming plate)
13. กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง (light microscope)
14. อุปกรณ์วาดภาพจากกล้องจุลทรรศน์ (camera lucida)
15. กล้องและอุปกรณ์ในการถ่ายภาพ

สารเคมี

1. เอธิลแอลกอฮอล์ 70%, 90%, 95%
2. นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ (N-butyl alcohol)
3. ไชลีน (xylene)
4. พาราพลาสต์ (paraplast) (Oxford Labware)
5. Bouin's fixative (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
6. สารละลาย P_1^+ (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
7. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ 0.15 โมลาร์ พีเอช 7.2
(Phosphate Buffered Saline-PBS) (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
8. 3,3' ไดอะมีโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ (3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride-DAB) (Sigma)
9. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30% (Sigma)
10. สีสียออสิน (Eosin) 0.1 % ในเอธิลแอลกอฮอล์ 95% (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
11. นมผงพราวน์เนซ (Carnation)
12. Calf serum (Sigma)
13. Rabbit anti- α -PDH antiserum
14. Rabbit anti- β -PDH antiserum

Rabbit antisera ทั้งสองชนิดนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก

Professor K.Ranga Rao มหาวิทยาลัยเวสต์ฟลอริดา สหรัฐอเมริกา

15. Goat anti rabbit IgG H and L chain-horseradish-peroxidase conjugate (GAR-HRP) (Biorad)

วิธีดำเนินการทดลอง

การตรวจหาฟิสิกเมนต์ดีสเพอร์ซิงฮอร์โมนในก้านตาของกึ่งก้ามกราม กึ่งกุลาค่า และ กึ่งตะกาดด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมีสทรี แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

ก. การตรวจหาเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในก้านตากึ่งก้ามกราม กึ่งกุลาค่าและกึ่งตะกาด

ข. การปรากฏร่วม (co-localization) และการแยกปรากฏ (differential localization) ของ α -PDH และ β -PDH ในเซลล์ประสาทของก้านตากึ่งก้ามกราม กึ่งกุลาค่า และกึ่งตะกาด

ก. การตรวจหาเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในก้านตาของกึ่งก้ามกราม กึ่งกุลาค่า และกึ่งตะกาด

1. การเตรียมเนื้อเยื่อทางมีดชีววิทยา

1.1 นำกึ่งแต่ละชนิดมาตัดตามและก้านตา (กึ่งแต่ละชนิดจำนวน 10 ก้านตา) จากนั้นลอกเปลือกแข็งภายนอก (exoskeleton) ของก้านตาออก แล้วนำก้านตาที่ได้ไปทำให้คงรูป (fix) ใน Bouin's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 นำก้านตามาล้างด้วยน้ำประปาเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อล้างน้ำยาทำให้คงรูปออก

1.3 ทำการดึงน้ำออก (dehydrate) จากก้านตาด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ และนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ ตามลำดับ จากนั้นอินฟิลเตรท (infiltrate) ด้วยพาราพลาสต์ ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1.3.1 นำก้านตามาแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

1.3.2 เปลี่ยนสารละลายที่แช่ก้านตาเป็นเอทิลแอลกอฮอล์ 90% แช่ก้านตาเป็น

เวลา 3 ชั่วโมง

1.3.3. เปลี่ยนสารละลายที่แช่ก้านตาเป็นเอทิลแอลกอฮอล์ 95% แช่ก้านตาทิ้งไว้ค้างคืน (24 ชั่วโมง)

1.3.4 เปลี่ยนสารละลายที่แช่ก้านตาเป็นนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ แช่ก้านตาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.3.5 เปลี่ยนสารละลายที่แช่ก้านตาเป็นสารละลายผสมระหว่างนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์กับไซลีน ในอัตราส่วน 1:1 แช่ก้านตาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.3.6 เปลี่ยนสารละลายที่แช่ก้านตาเป็นไซลีน แช่ก้านตาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.3.7 เปลี่ยนสารละลายที่แช่ก้านตาเป็นไซลีนอีกครั้งหนึ่ง แช่ก้านตาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.3.8 เปลี่ยนสารละลายที่แช่ก้านตาเป็นไซลีนผสมกับพาราฟลาสต์ที่หลอมเหลว (โดยนำพาราฟลาสต์ก้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส) ในอัตราส่วน 1:1 แช่ก้านตาในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

1.3.9 เปลี่ยนสารละลายที่แช่ก้านตาเป็นพาราฟลาสต์ที่หลอมเหลว 3 ครั้ง โดยแช่ก้านตาในตู้อบเป็นเวลาครั้งละ 30 นาที

1.4 นำก้านตาที่อินฟิลเตรตด้วยพาราฟลาสต์แล้วไปฝัง (embed) ในพาราฟลาสต์ โดยเทพาราฟลาสต์ที่อุ่นลงไปบล็อก (block) สีเหลือง จากนั้นใช้ปากคีบลงไฟจับก้านตาของกึ่งแต่ละชนิดไปฝังในพาราฟลาสต์ โดยให้ด้านหลัง (dorsal) ของก้านตาส่งตั้งด้านบนของบล็อก

1.5 ใช้เครื่องไมโครทอม (microtome) ตัดก้านตาที่ฝังอยู่ในบล็อก ตัดเนื้อเยื่อให้เป็นชิ้นบาง 40 ไมครอนเรียงกัน (serial section) โดยตัดทางด้านล่างของบล็อก (ตัดตามยาวทางด้านหน้า (ventral) ของก้านตา)

1.6 นำเซกชัน (section) ของก้านตามาติดบนสไลด์แก้วตามลำดับ

2. กระบวนการย้อมโดยวิธีอินโดเรคติมูโนเปอร์ออกซิเดสด้วย rabbit anti- α -PDH antiserum และ rabbit anti- β -PDH antiserum โดยมีขั้นตอนดังนี้ (ดัดแปลงจากวิธีการของ Sithigorngul, Stretton and Cowden.1990)

2.1 นำสไลด์ที่มีเซคชั่นมาละลายเอาพาราฟลาสต์ออกจากเนื้อเยื่อ (dewax) ด้วยไซลีน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

2.2 ทำการเติมน้ำ (rehydrate) เข้าสู่เนื้อเยื่อที่กั้นตาด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ คือ นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ เอทิลแอลกอฮอล์ 95%, 90%, 70% ตามลำดับ โดยจุ่มสไลด์ในแอลกอฮอล์แต่ละชนิดนานประมาณ 5 นาที

2.3 ล้างเนื้อเยื่อที่กั้นตาด้วย phosphate buffered saline (PBS) 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที โดยล้างเนื้อเยื่อบนสไลด์ในโถแก้วย้อมสไลด์ที่ใส่ PBS

2.4 ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารละลาย P_1^+ แล้วหยดให้คลุมแต่ละเซคชั่น บ่มไว้ (incubate) เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อป้องกันการจับของโปรตีนแบบไม่จำเพาะ

2.5 ดูดสารละลาย P_1^+ ส่วนเกินในแต่ละเซคชั่นออก จากนั้นหยด rabbit anti- α -PDH antiserum ที่เจือจางด้วยสารละลาย P_1^+ โดยมีความเข้มข้น 1:3000 หรือ rabbit anti- β -PDH antiserum ที่เจือจางด้วยสารละลาย P_1^+ โดยมีความเข้มข้น 1:5000 คลุมแต่ละเซคชั่น แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.6 ล้างเนื้อเยื่อที่กั้นตาด้วย PBS 5 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที จากนั้นใช้ไมโครปิเปตต์หยด goat anti-rabbit horseradish peroxidase (GAR-HRP) ที่เจือจางด้วยสารละลาย P_1^+ โดยมีความเข้มข้น 1:1000 ลงคลุมแต่ละเซคชั่น

2.7 ล้างเนื้อเยื่อที่กั้นตาด้วย 0.5% blotto (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข) 4 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที แล้วล้างต่อด้วย PBS 1 ครั้ง นาน 10 นาที

2.8 นำเนื้อเยื่อที่กั้นตามาทำปฏิกิริยากับ 3,3'-ไดอะมีโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ 0.03% และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.006% ที่ละลายใน PBS เป็นเวลา 3 นาที

2.9 ล้างเนื้อเยื่อที่กั้นตาด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

2.10 ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อที่กั้นตาด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ คือ เอทิลแอลกอฮอล์ 70%, 90%, และ 95% โดยจุ่มสไลด์ในโถแก้วย้อมสไลด์ที่ใส่แอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ

นานประมาณ 5 นาที

2.11 ย้อมเนื้อเยื่อที่ก้านตาด้วยสีโอโรซัน 0.1% ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95%

2.12 นำเนื้อเยื่อที่ก้านตามาทำการดึงน้ำ (dehydrate) ออกจากก้านตา โดยผ่านสารละลายต่าง ๆ ดังนี้คือ

2.12.1 นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 5 นาที

2.12.2 สารละลายผสมระหว่างนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์กับไซลีนเป็นเวลา

5 นาที

2.13.3 ไซลีน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

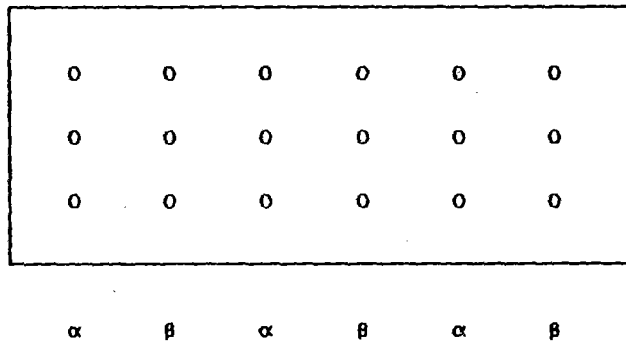
2.13 ทำเป็นสไลด์ถาวรโดยเม้าท์ (mount) ในเปอร์เม้าท์ (permount) และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

2.14 นำสไลด์ที่ได้มาตรวจหาตำแหน่งและเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในทุกเซลล์ชั้นด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยสังเกตจากการติดสีน้ำตาลเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

จำนวนเซลล์ชั้นในก้านตาของกึ่งก้ามกรามและกึ่งตะกาดมีประมาณ 40-50 เซลล์ชั้นต่อ 1 ก้านตา ส่วนในกึ่งกลาคามีประมาณ 70-90 เซลล์ชั้นต่อ 1 ก้านตา

ข. การปรากฏร่วม (co-localization) และการแยกปรากฏ (differential-localization) ของ α -PDH และ β -PDH ในเซลล์ประสาทของก้านตาของกึ่งก้ามกรามกึ่งกลาค่าและกึ่งตะกาด

ทำการทดลองตามวิธีการในข้อ ก ทุกอย่าง แต่ใช้เซลล์ชั้นความหนา 8 ไมครอน เรียงกันตามลำดับ และทดสอบด้วย rabbit anti- α -PDH antiserum และ rabbit anti- β -PDH antiserum สลับกันเพื่อเปรียบเทียบกัน ดังภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 4 แสดงเซตขึ้นก้านตักถึงความหนา 8 ไมครอน โดยทดสอบด้วย rabbit anti- α -PDH antiserum สลับกับ rabbit anti- β -PDH antiserum

- o = เซตขึ้นของก้านตัก
- แถวที่ 1,3,5 = Rabbit anti- α -PDH antiserum
- แถวที่ 2,4,6 = Rabbit anti- β -PDH antiserum

จำนวนเซตขึ้นในก้านตักกัมกรามและกึ่งตะกาดมีประมาณ 200-250 เซตขึ้นต่อ 1 ก้านตัก ส่วนในกึ่งกลาคามีประมาณ 400-450 เซตขึ้นต่อ 1 ก้านตัก

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. นำสไลด์ที่ได้มาตรวจนับจำนวนเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ทุกเซตขึ้นในบริเวณต่าง ๆ ของก้านตักดังนี้คือ ลามินาแอกนกลีโอนาริส เมดัลลาเอกเทอร์นา เมดัลลาเทอร์มินาลิส ต่อมไชนิส และเส้นประสาทตา บันทึกลงในตารางเพื่อเปรียบเทียบ โดยรวบรวมข้อมูลจากก้านตักจำนวน 10 ก้านตักของกึ่งแต่ละชนิดคือ กึ่งกัมกราม กึ่งกลาค่าและกึ่งตะกาด
2. วาดรูปแสดงจำนวนเซลล์ประสาทและตำแหน่งของเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในบริเวณดังกล่าว เปรียบเทียบรูปแบบการกระจายของ α -PDH และ β -PDH ในก้านตักของกึ่งทั้งสามชนิด
3. ตรวจสอบว่าเซลล์ประสาทเซลล์ใดพบเฉพาะ α -PDH หรือ β -PDH หรือเซลล์ใดพบทั้ง

α -PDH และ β -PDH โคสรบรวมข้อมูลจากก้านตาจำนวนสามก้านตาของกิ้งกัแต่ละชนิด

4. ถ่ายภาพแสดงเซลล์และเส้นใยประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในกิ้งกัทั้งสามชนิด

บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. การตรวจหาค่าแห่งและจำนวนของเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในก้านตาของกิ้งก่ามกราม กิ่งกุดาค่าและกิ่งตะกาด

จากการใช้เซคชั่นก้านตาของกิ้งก่าที่มีความหนา 40 ไมครอน เพื่อตรวจหาค่าแห่งและจำนวนของเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในบริเวณต่าง ๆ ของก้านตังกิ้งก่ามกราม กิ่งกุดาค่า และกิ่งตะกาด ได้ผลดังนี้คือ

1.1 กิ้งก่ามกราม

พบเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในก้านตาของกิ้งก่ามกราม อยู่ในบริเวณ lamina ganglionaris (LG) บริเวณรอบ ๆ medulla externa (ME) บริเวณระหว่าง medulla interna กับ medulla terminalis (MT) บริเวณ MT บริเวณ sinus gland (SG) และบริเวณเส้นประสาทตา (optic nerve) (ภาพประกอบ 5, 6, 11-1) ซึ่งมีรายละเอียดคือ

ในบริเวณ LG พบเซลล์ประสาทขนาดเล็กที่ติดสีน้ำตาลอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาของ α -PDH และ β -PDH (ภาพประกอบ 15-1.2, 15-2.1) เป็นจำนวนมากคือ α -PDH จำนวน 320.4 ± 96.5 เซลล์ β -PDH จำนวน 598.9 ± 73.2 เซลล์ (ตาราง 2) ซึ่งจำนวนเซลล์ประสาทที่พบ β -PDH จะมีจำนวนมากกว่าและติดสีเข้มกว่า α -PDH เซลล์ประสาทขนาดเล็กนี้จะกระจายอยู่ทั่วไปในบริเวณ LG และมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7.0-8.8 ไมโครเมตร เซลล์ประสาทเหล่านี้จะส่งเส้นใยประสาทไปในบริเวณ LG (ภาพประกอบ 5, 6)

ในบริเวณรอบ ๆ ME พบเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาของ α -PDH (ภาพประกอบ 12-1.1, 15-1.2) แต่ไม่พบเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาของ β -PDH เซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลของปฏิกิริยาของ α -PDH ที่บริเวณรอบ ๆ ME นี้มีรูปร่างค่อนข้างกลมและมีขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 17.5-28.0 ไมโครเมตรและมี

จำนวน 10.4 ± 2.5 เซลล์ (ตาราง 2) เซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลเหล่านี้จะส่งเส้นใยประสาทไปอยู่ในบริเวณ ME (ภาพประกอบ 5)

ในบริเวณระหว่าง MI กับ MT พบเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาทั้งของ α -PDH และ β -PDH และมีจำนวนใกล้เคียงกัน โดยที่ α -PDH มีจำนวนเซลล์ประมาณ 48.1 ± 4.9 เซลล์ ส่วน β -PDH มีจำนวน 49.0 ± 4.5 เซลล์ (ตาราง 2) เซลล์ประสาทในบริเวณนี้ส่วนใหญ่จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (ภาพประกอบ 12-1.1, 12-2.1, 15-1.2) และมีขนาดแตกต่างกัน คือมีเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 8.8-24.0 ไมโครเมตร เซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลเหล่านี้จะส่งเส้นใยประสาทไปยังบริเวณ ME MI และ MT (ภาพประกอบ 5, 6, 12-2.1)

ในบริเวณ MT พบเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาทั้งของ α -PDH และ β -PDH (ภาพประกอบ 12-1.2, 12-2.1, 12-2.2) โดยที่ α -PDH มีจำนวนเซลล์ 3.4 ± 1.3 เซลล์ ส่วน β -PDH มีจำนวนเซลล์ 4.5 ± 0.5 เซลล์ (ตาราง 2) เซลล์ประสาทเหล่านี้มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10.5-17.5 ไมโครเมตร เซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลในบริเวณ MT จะส่งเส้นใยประสาทไปยังบริเวณ MT (ภาพประกอบ 5, 6, 12-1.2, 12-2.1, 12-2.2)

ในบริเวณ SG พบเส้นใยประสาทที่ติดสีน้ำตาลอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาของทั้ง α -PDH (ภาพประกอบ 15-1.1) และ β -PDH ซึ่งเส้นใยประสาทเหล่านี้เป็นเส้นใยประสาทที่มาจากเซลล์ประสาทที่อยู่ในบริเวณระหว่าง MI กับ MT (ภาพประกอบ 5, 6)

ในบริเวณเส้นประสาทตา พบเส้นใยประสาทที่ติดสีน้ำตาลทั้งของปฏิกิริยา α -PDH และ β -PDH (ภาพประกอบ 15-2.2) โดยที่เส้นใยประสาทเหล่านี้เป็นเส้นใยประสาทที่มาถึงบริเวณ MT (ภาพประกอบ 5, 6)

1.2 กิ่งกุดาค่า

ในก้านตาของกิ่งกุดาค่า พบเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH อยู่ในบริเวณ ME บริเวณระหว่าง MI กับ MT บริเวณ MT บริเวณ SG และเส้นประสาทตา ส่วนในบริเวณ LG ไม่พบเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาของ α -PDH และ β -PDH (ภาพประกอบ 7, 8, 11-2)

ในบริเวณ ME พบเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลเนื่องจากปฏิกิริยาของ α -PDH เท่านั้น

(ภาพประกอบ 13-1.1) ไม่พบว่ามีเซลล์ประสาทเซลล์ใดที่ติดสีน้ำตาลเนื่องจากปฏิกิริยาของ β -PDH ในบริเวณนี้ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลเนื่องจากปฏิกิริยาของ α -PDH ในบริเวณนี้ติดสีน้ำตาลจางกว่าในบริเวณอื่น เซลล์ประสาทในบริเวณนี้มีลักษณะค่อนข้างกลมและมีขนาดแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน เซลล์ประสาทขนาดใหญ่ส่วนใหญ่จะอยู่บริเวณปลาย ME (ภาพประกอบ 7) มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 21.0-45.5 ไมโครเมตร ส่วนเซลล์ประสาทขนาดเล็กจะอยู่ส่วนบนของ ME ติดกับ LG (ภาพประกอบ 7) และมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10.5-14.0 ไมโครเมตร เซลล์ประสาทในบริเวณนี้ส่วนใหญ่จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มและมีจำนวนมากกว่าเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลในบริเวณอื่นคือมีจำนวนประมาณ 101.9 ± 17.3 เซลล์ (ตาราง 2) เซลล์ประสาทเหล่านี้จะส่งเส้นใยประสาทเข้าไปในบริเวณ ME (ภาพประกอบ 7)

ในบริเวณระหว่าง MI กับ MT พบเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลอื่นเนื่องมาจากปฏิกิริยาของ α -PDH และ β -PDH และมีจำนวนใกล้เคียงกัน โดยที่ α -PDH มีจำนวนเซลล์ประมาณ 81.9 ± 6.0 เซลล์ ส่วน β -PDH มีจำนวนเซลล์ประมาณ 78.6 ± 8.1 เซลล์ (ตาราง 2) เซลล์ประสาทในบริเวณนี้ส่วนใหญ่จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (ภาพประกอบ 13-1.1, 13-2.1) และมีขนาดแตกต่างกันคือ มีขนาดระหว่าง 10.5-42.0 ไมโครเมตร เซลล์ประสาทเหล่านี้จะส่งเส้นใยประสาทไปยังบริเวณ ME MI และ MT (ภาพประกอบ 7, 8, 13-1.1, 13-2.1)

ในบริเวณ MT พบเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลอื่นเนื่องมาจากปฏิกิริยาของทั้ง α -PDH และ β -PDH (ภาพประกอบ 13-1.2, 13-2.2) แต่เซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลเนื่องจากปฏิกิริยาของ α -PDH จะมีจำนวนมากกว่าของ β -PDH คือ α -PDH มีจำนวน 13.4 ± 2.7 เซลล์ ส่วน β -PDH มีจำนวน 5.1 ± 1.2 เซลล์ (ตาราง 2) และมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10.5-24.5 ไมโครเมตร และเซลล์ประสาทเหล่านี้จะส่งเส้นใยประสาทไปในบริเวณ MT (ภาพประกอบ 7, 8, 13-1.2, 13-2.2)

ในบริเวณ SG พบเส้นใยประสาทที่ติดสีน้ำตาลอื่นเนื่องมาจากปฏิกิริยาของทั้ง α -PDH และ β -PDH (ภาพประกอบ 16-1.1, 16-1.2) ซึ่งเส้นใยประสาทเหล่านี้เป็นเส้นใยประสาทที่มาจากเซลล์ประสาทที่อยู่ในบริเวณระหว่าง MI กับ MT (ภาพประกอบ 7, 8)

ในบริเวณเส้นประสาทตาพบเส้นใยประสาทที่ติดสีน้ำตาลของปฏิกิริยา α -PDH และ β -PDH (ภาพประกอบ 16-1.2) โดยที่เส้นใยประสาทเหล่านี้เป็นเส้นใยประสาทที่มายังบริเวณ MT

(ภาพประกอบ 7, 8)

1.3 กิ่งตะกาด

ในก้านตาของกิ่งตะกาด พบเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH อยู่ในบริเวณรอบ ๆ ME ระหว่าง MI กับ MT บริเวณ MT บริเวณ SG และบริเวณเส้นประสาทตา ส่วนในบริเวณ LG ไม่พบเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลเนื่องจากปฏิกิริยาของ α -PDH และ β -PDH (ภาพประกอบ 9, 10, 11-3)

ในบริเวณรอบ ๆ ME พบเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลเนื่องมาจากปฏิกิริยาของ α -PDH (ภาพประกอบ 14-1.1) แต่ไม่พบเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลอื่นเนื่องมาจากปฏิกิริยาของ β -PDH เซลล์ประสาทบริเวณนี้ติดสีน้ำตาลจางกว่าเซลล์ประสาทในบริเวณอื่น และมีจำนวนเซลล์ประมาณ 37.6 ± 10.1 เซลล์ (ตาราง 2) เซลล์ประสาทจะมีลักษณะค่อนข้างกลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่มและมีขนาดแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน เซลล์ประสาทขนาดใหญ่ส่วนใหญ่จะอยู่บริเวณปลาย ๆ ME (ภาพประกอบ 9) มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 24.5-35.0 ไมครอนเมตร ส่วนเซลล์ประสาทขนาดเล็กจะอยู่ส่วนบนของ ME ติดกับบริเวณ LG (ภาพประกอบ 9) มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10.5-14.0 ไมครอน เซลล์ประสาทเหล่านี้จะส่งเส้นใยประสาทเข้าไปในบริเวณ ME (ภาพประกอบ 9)

ในบริเวณระหว่าง MI กับ MT พบเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลอื่นเนื่องมาจากปฏิกิริยาของทั้ง α -PDH และ β -PDH (ภาพประกอบ 14-1.1, 14-2.1) เซลล์ประสาทในบริเวณนี้ส่วนใหญ่จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และมีจำนวนใกล้เคียงกัน โดยที่ α -PDH มีจำนวนเซลล์ประมาณ 50.5 ± 4.6 เซลล์ ส่วน β -PDH มีจำนวนเซลล์ประมาณ 55.9 ± 6.2 เซลล์ (ตาราง 2) เซลล์ประสาทเหล่านี้มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10.5-35.0 ไมครอนเมตร และจะส่งเส้นใยประสาทไปยังบริเวณ ME MI และ MT (ภาพประกอบ 9, 10)

ส่วนในบริเวณ MT พบเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลอื่นเนื่องมาจากปฏิกิริยาของทั้ง α -PDH และ β -PDH (ภาพประกอบ 14-1.2, 14-2.2) โดยที่ α -PDH มีจำนวนเซลล์ประมาณ 7.2 ± 1.8 เซลล์ ส่วน β -PDH มีจำนวนเซลล์ประมาณ 7.1 ± 1.9 เซลล์ (ตาราง 2) เซลล์ประสาทเหล่านี้มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10.5-24.5 ไมครอนเมตรและจะส่งเส้นใยประสาทไปในบริเวณ

MT (ภาพประกอบ 9, 10, 14-1.2, 14-2.2)

ในบริเวณ SG พบเส้นใยประสาทที่ติดสีน้ำตาลอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาของทั้ง α -PDH (ภาพประกอบ 16-2.1) และ β -PDH ซึ่งเส้นใยประสาทเหล่านี้เป็นเส้นใยประสาทที่มาจากเซลล์ประสาทที่อยู่บริเวณระหว่าง MI กับ MT (ภาพประกอบ 9, 10)

ส่วนบริเวณเส้นประสาทตา พบเส้นใยประสาทที่ติดสีน้ำตาลเนื่องจากปฏิกิริยาของ α -PDH และ β -PDH (ภาพประกอบ 16-2.2) โดยที่เส้นใยประสาทเหล่านี้เป็นเส้นใยประสาทที่ไปยังบริเวณ MT (ภาพประกอบ 9, 10)

2. การปรากฏร่วมและการแยกปรากฏของ α -PDH และ β -PDH ในเซลล์ประสาทของก้านตา

กึ่งกัมกราม กึ่งกูลาค่าและกึ่งตะภาค

จากการใช้เทคนิคความหนา 8 ไมครอนและทดสอบ rabbit anti- α -PDH antiserum และ rabbit anti- β -PDH antiserum บนต่างเทคนิคสลับกันเพื่อเปรียบเทียบกันได้ผลการทดลองดังนี้

2.1 กึ่งกัมกราม

จากการหาการปรากฏร่วมและการแยกปรากฏของ α -PDH และ β -PDH ในเซลล์ประสาทที่บริเวณต่าง ๆ ของก้านตากึ่งกัมกราม พบว่าเซลล์ประสาทเซลล์เดียวกันที่ติดสีน้ำตาลอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาของทั้ง α -PDH และ β -PDH ส่วนใหญ่จะเป็นเซลล์ประสาทในบริเวณ LG ระหว่าง MI กับ MT (ภาพประกอบ 17) และ MT ส่วนเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลเฉพาะปฏิกิริยาของ α -PDH แต่ไม่ติดสีน้ำตาลของปฏิกิริยา β -PDH คือเซลล์ประสาทที่อยู่รอบ ๆ ME (ภาพประกอบ 17) จากผลการทดลองนี้แสดงว่าการปรากฏร่วมของ α -PDH และ β -PDH ในเซลล์ประสาทคือ เซลล์ประสาทที่อยู่ในบริเวณ LG ระหว่าง MI กับ MT และ MT ส่วนการแยกปรากฏของ α -PDH หรือเซลล์ประสาทที่พบเฉพาะ α -PDH เท่านั้นได้แก่ เซลล์ประสาทที่อยู่ในบริเวณรอบ ๆ ME

2.2 กึ่งกูลาค่า

พบว่าจากการหาการปรากฏร่วมและการแยกปรากฏของ α -PDH และ β -PDH ในเซลล์

ประสาทบริเวณต่าง ๆ ของก้านตังกิ่งกลาดำ พบเซลล์ประสาทเซลล์เดียวกันที่ติดสีน้ำตาลอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาของ α -PDH และ β -PDH ส่วนใหญ่จะเป็นเซลล์ประสาทในบริเวณระหว่าง MI กับ MT (ภาพประกอบ 18-1) ส่วนเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลเฉพาะปฏิกิริยาของ α -PDH คือ เซลล์ประสาทที่อยู่รอบ ๆ ME ในบริเวณนี้จะไม่พบเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาของ β -PDH (ภาพประกอบ 18-2) ส่วนในบริเวณ MT พบว่าในบริเวณนี้มีเซลล์ประสาทบางเซลล์ที่ติดสีน้ำตาลของปฏิกิริยาทั้งของ α -PDH และ β -PDH และมีบางเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลเฉพาะปฏิกิริยาของ α -PDH เท่านั้นแต่ไม่ติดสีน้ำตาลของ β -PDH จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการปรากฏร่วมของ α -PDH และ β -PDH ในเซลล์ประสาทคือ เซลล์ประสาทในบริเวณระหว่าง MI กับ MT และเซลล์ประสาทบางเซลล์ในบริเวณ MT ส่วนการแยกปรากฏของ α -PDH ได้แก่ เซลล์ประสาทที่อยู่ในบริเวณรอบ ๆ ME และเซลล์ประสาทบางเซลล์ในบริเวณ MT

2.3 กิ่งตะกาด

ผลของการหาการปรากฏร่วมและการแยกปรากฏของ α -PDH และ β -PDH ในเซลล์ประสาทที่บริเวณต่าง ๆ ของก้านตังกิ่งตะกาด พบว่าเซลล์ประสาทเซลล์เดียวกันที่ติดสีน้ำตาลอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาของทั้ง α -PDH และ β -PDH ส่วนใหญ่จะเป็นเซลล์ประสาทในบริเวณระหว่าง MI กับ MT (ภาพประกอบ 19-1, 19-2) และบริเวณ MT ส่วนเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลเฉพาะปฏิกิริยาของ α -PDH คือ เซลล์ประสาทที่อยู่รอบ ๆ ME (ภาพประกอบ 19-1, 19-2) ในบริเวณนี้จะไม่พบเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลของ β -PDH จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การปรากฏร่วมของ α -PDH และ β -PDH คือ เซลล์ประสาทในบริเวณระหว่าง MI กับ MT และบริเวณ MT ส่วนการแยกปรากฏของ α -PDH ได้แก่ เซลล์ประสาทที่อยู่ในบริเวณรอบ ๆ ME

ตาราง 1 แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ RPCH (Fernlund and Josefsson. 1972), α -PDH (Fernlund.1976) และ β -PDH (Rao and others. 1985; Kleinholz and others. 1986)

กรดอะมิโนในตำแหน่งที่	RPCH (<i>Pandalus borealis</i>)	α -PDH (<i>Pandalus borealis</i>)	β -PDH (<i>Uca pugilator</i> และ Cancer magister)
1	Glu	Asn	Asn
2	Leu	Ser	Ser
3	Asn	Gly	Glu
4	Phe	Met	Leu
5	Ser	Ile	Ile
6	Pro	Asn	Asn
7	Gly	Ser	Ser
8	Trp-NH ₂	Ile	Ile
9		Leu	Leu
10		Gly	Gly
11		Ile	Leu
12		Pro	Pro
13		Arg	Lys
14		Val	Val
15		Met	Met
16		Thr	Asn
17		Glu	Asp
18		Ala-NH ₂	Ala-NH ₂

ตาราง 2 แสดงตำแหน่งและจำนวนของเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในบริเวณต่าง ๆ ในก้านตารังแกมแกรม กิ่งกุดาค่าและกิ่งตะกาด

ชนิดของกิ่ง	กิ่งแกมแกรม		กิ่งกุดาค่า		กิ่งตะกาด	
	α -PDH (\bar{X} +SD)	β -PDH (\bar{X} +SD)	α -PDH (\bar{X} +SD)	β -PDH (\bar{X} +SD)	α -PDH (\bar{X} +SD)	β -PDH (\bar{X} +SD)
LG	320.4+96.5 (199-509)	598.9+73.2 (454-725)	-	-	-	-
รอบ ๆ ME	10.4+2.5 (7-15)	-	101.9+17.3 (76-126)	-	37.6+10.1 (19-54)	-
ระหว่าง MI กับ MT	48.1+4.9 (42-58)	49.0+4.5 (43-57)	81.9+6.0 (71-90)	78.6+8.1 (71-91)	50.5+4.6 (44-60)	55.9+6.2 (46-63)
MT	3.4+1.3 (2-6)	4.5+0.5 (4-5)	13.4+2.7 (12-18)	5.1+1.2 (3-7)	7.2+1.8 (5-11)	7.1+1.9 (6-10)
SG	+	+	+	+	+	+
OpN	+	+	+	+	+	+

LG = lamina ganglionaris

ME = medulla externa

MI = medulla interna

MT = medulla terminalis

OpN = optic nerve

SG = sinus gland

+ = พบเส้นใยประสาทที่คิดสีน้ำตาล

- = ไม่พบเซลล์ประสาทที่คิดสีน้ำตาล

\bar{X} = ค่าเฉลี่ย

SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

() = พิสัย

จำนวนกิ่งตัวอย่างในแต่ละกลุ่มคือ 10 ตัว

ภาพประกอบ 5 แสดงภาพวาดของเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบ α -PDH ในบริเวณ
ต่าง ๆ ในก้านตาข้างขวาของกิ้งก่ามกราม

LG = lamina ganglionaris

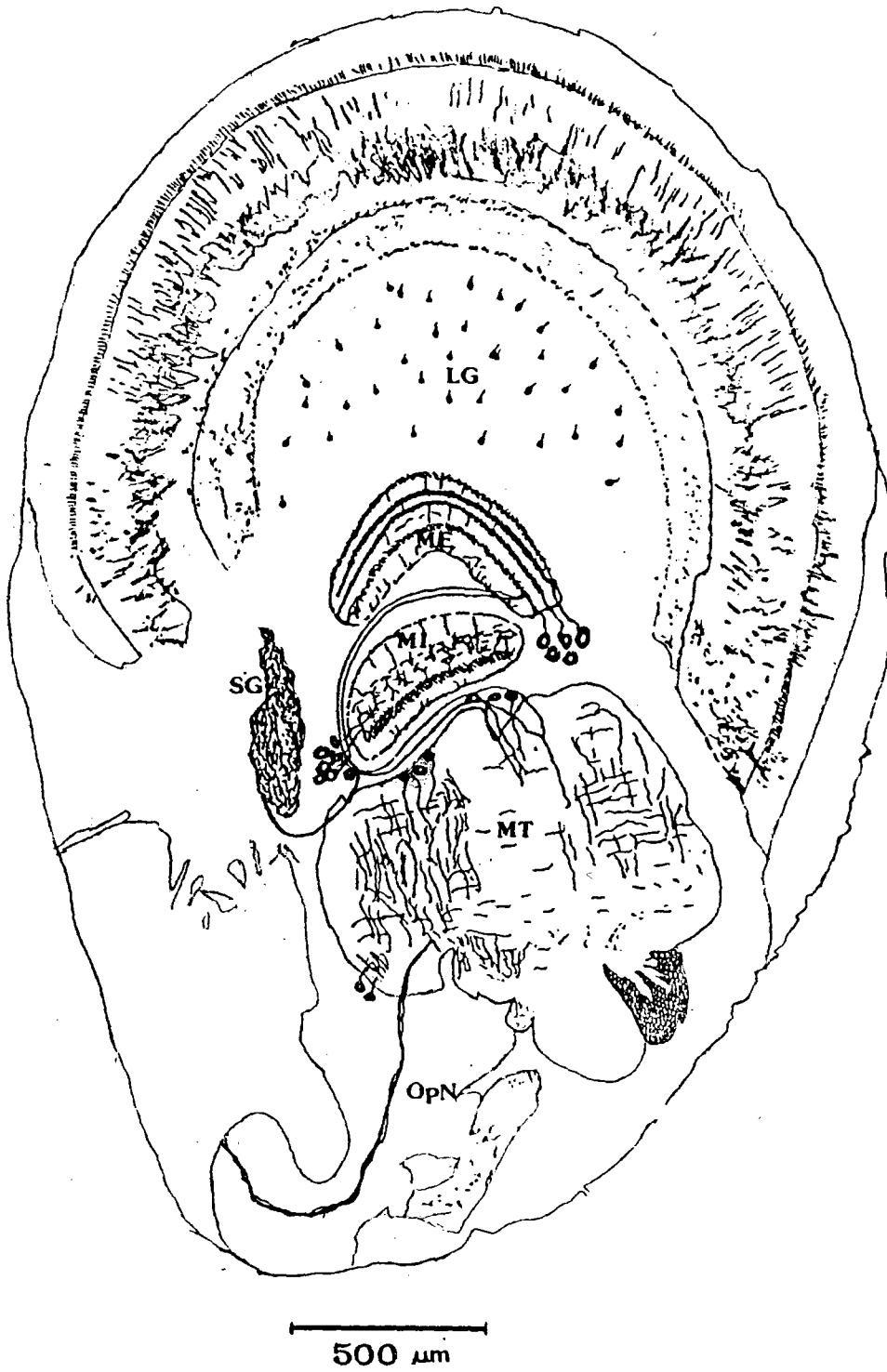
ME = medulla externa

MI = medulla interna

MT = medulla terminalis

SG = sinus gland

OpN = optic nerve



ภาพประกอบ 6 แสดงภาพวาดของเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบ β -PDH ในบริเวณ
ต่าง ๆ ในก้านตาข้างขวาของกิ้งก่ามกราม

LG = lamina ganglionaris

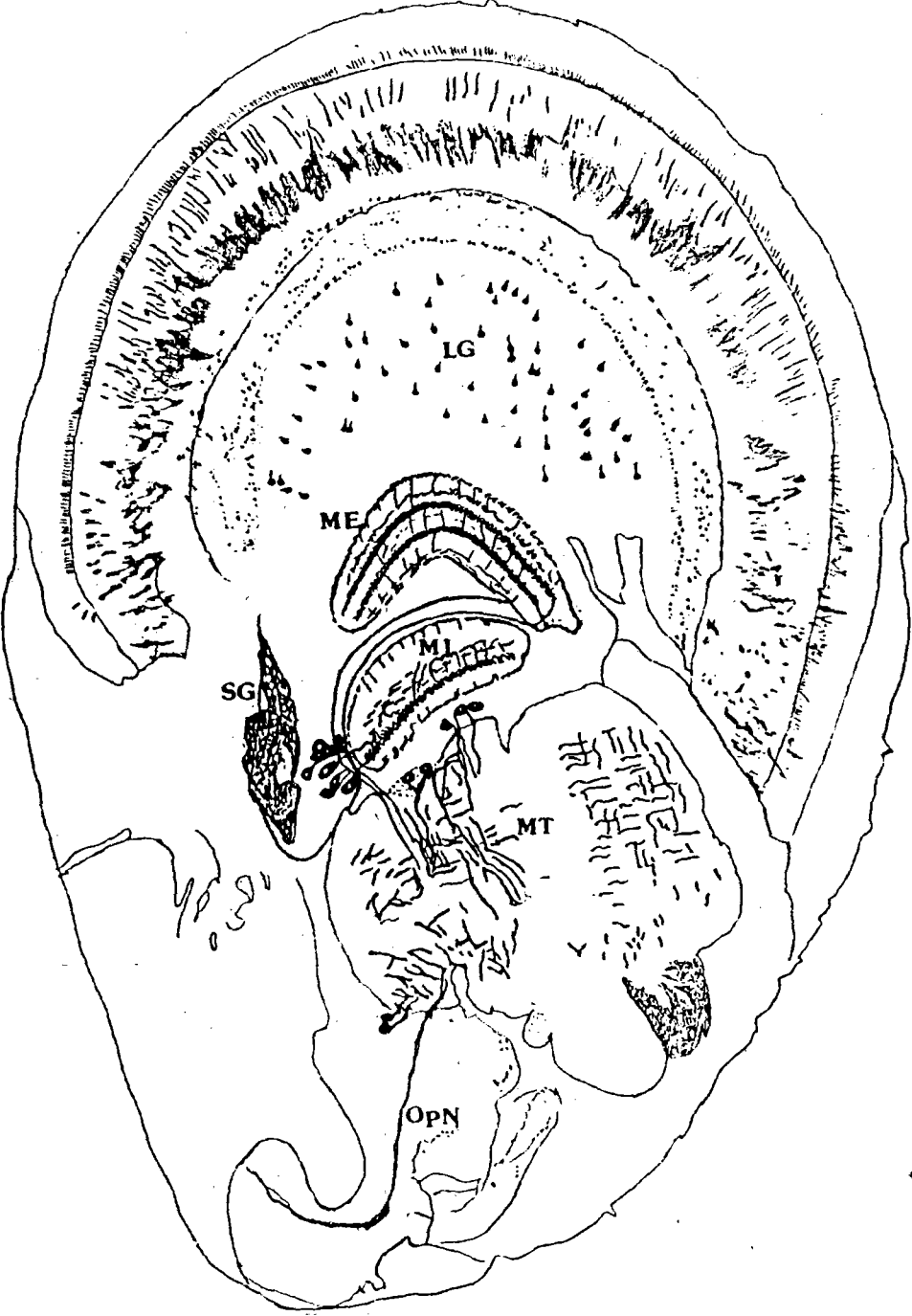
ME = medulla externa

MI = medulla interna

MT = medulla terminalis

SG = sinus gland

OpN = optic nerve



500 μ m

ภาพประกอบ 7 แสดงภาพวาดของเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบ α -PDH ในบริเวณ
ต่าง ๆ ในก้านตาข้างขวาของกิ้งกูดาค่า

LG = lamina ganglionaris

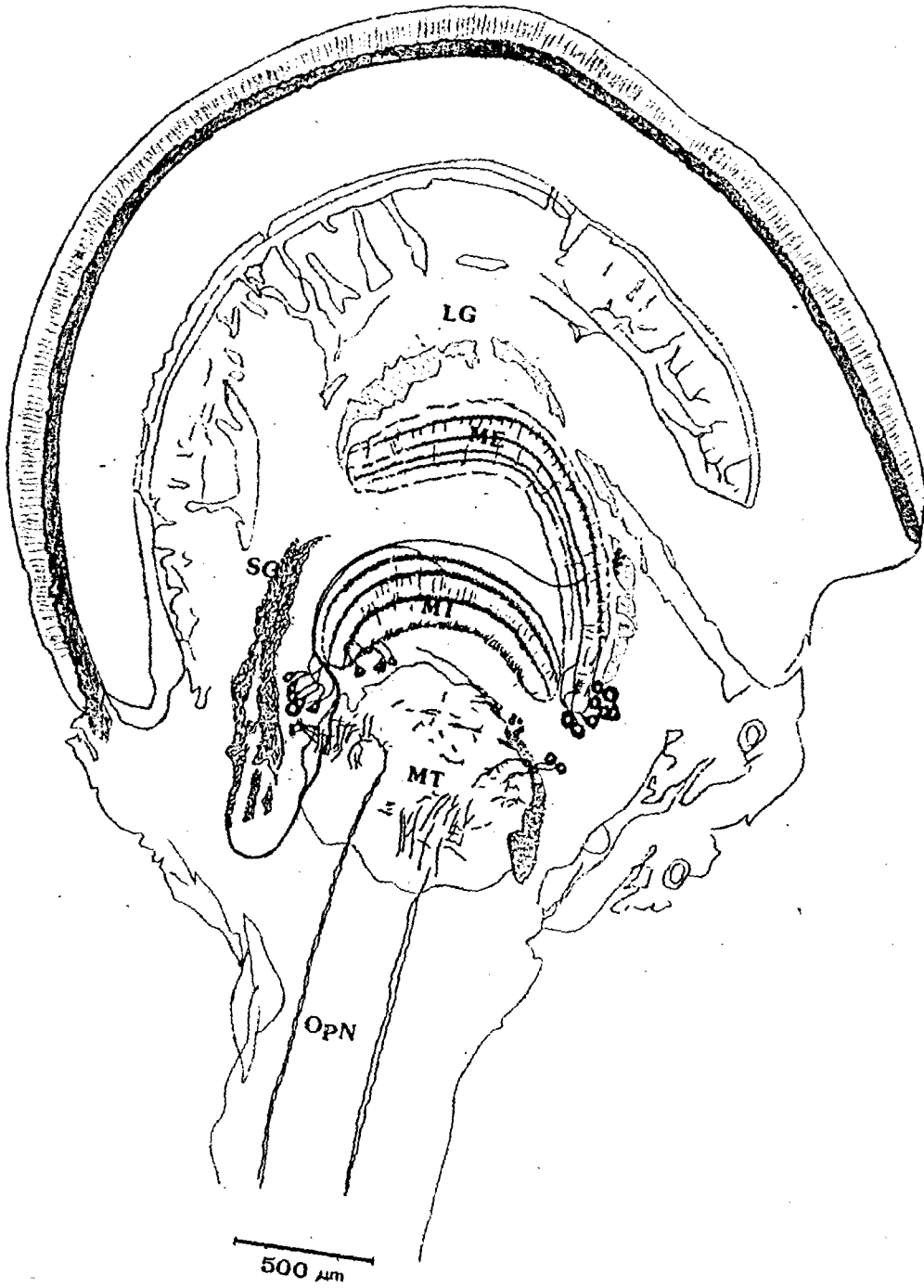
ME = medulla externa

MI = medulla interna

MT = medulla terminalis

SG = sinus gland

OpN = optic nerve



ภาพประกอบ 8 แสดงภาพวาดของเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบ β -PDH ในบริเวณ
ต่าง ๆ ในก้านตาข้างขวาของกิ้งกูดดำ

LG = lamina ganglionaris

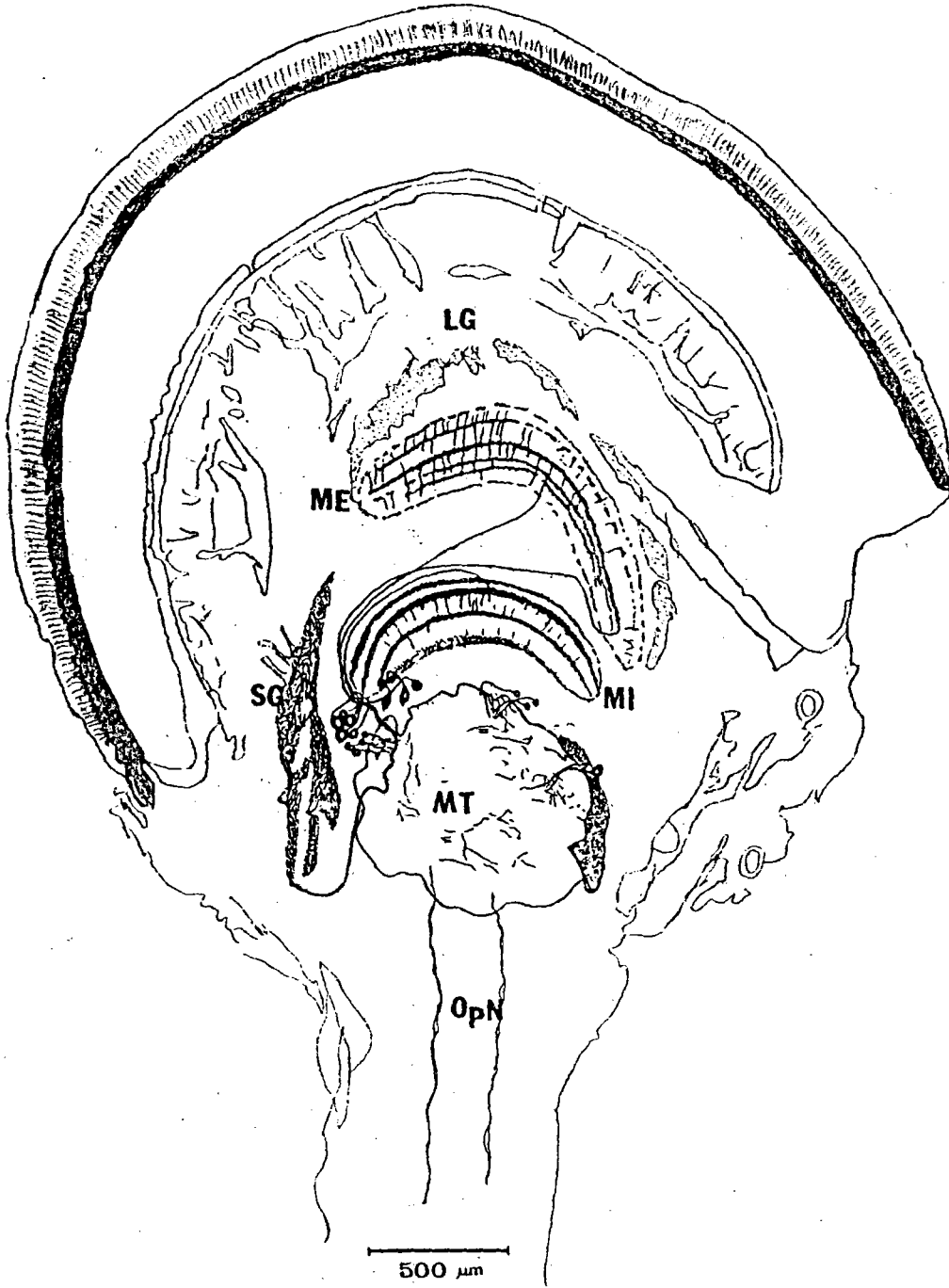
ME = medulla externa

MI = medulla interna

MT = medulla terminalis

SG = sinus gland

OpN = optic nerve



ภาพประกอบ 9 แสดงภาพวาดของเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบ α -PDH ในบริเวณ
ต่าง ๆ ในก้านตาข้างขวาของกิ้งก่า

LG = lamina ganglionaris

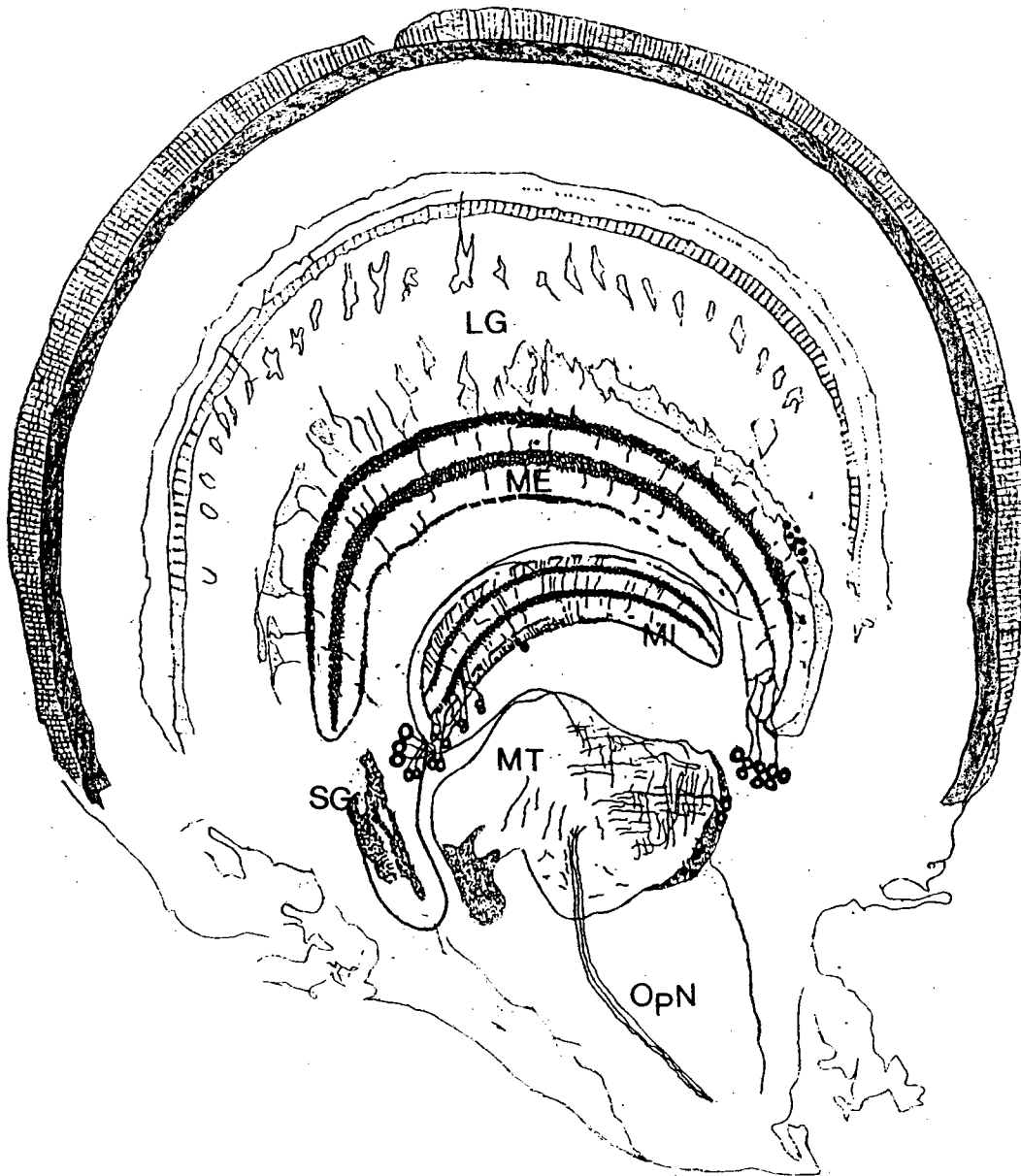
ME = medulla externa

MI = medulla interna

MT = medulla terminalis

SG = sinus gland

OpN = optic nerve



500 μ m

ภาพประกอบ 10 แสดงภาพวาดของเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบ α -PDH ในบริเวณ
ต่าง ๆ ในก้านตาข้างขวาของกิ้งก่า

LG = lamina ganglionaris

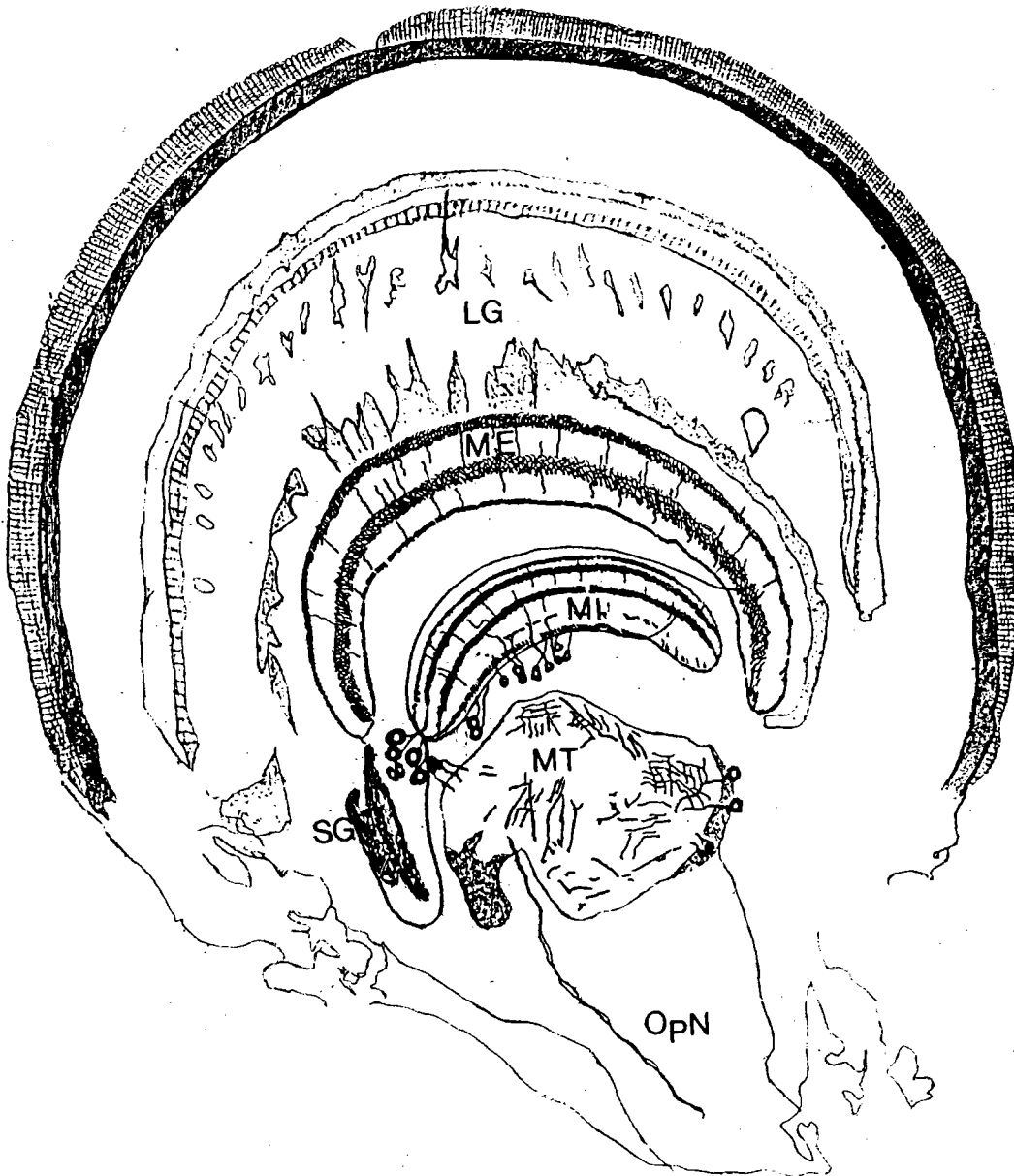
ME = medulla externa

MI = medulla interna

MT = medulla terminalis

SG = sinus gland

OpN = optic nerve



500 μ m

ภาพประกอบ 11 แสดงภาพถ่ายกำลังขยายต่ำของก้านตาข้างขวาของกิ้งก่ามกราม (1)

กิ้งก่าดำ (2) และกิ้งก่าตะกาด (3)

แถวที่ 1 ซ้อมด้วย rabbit anti- α -PDH antiserum (1.1, 2.1, 3.1)

แถวที่ 2 ซ้อมด้วย rabbit anti- β -PDH antiserum (1.2, 2.2, 3.2)

LG = lamina ganglionaris

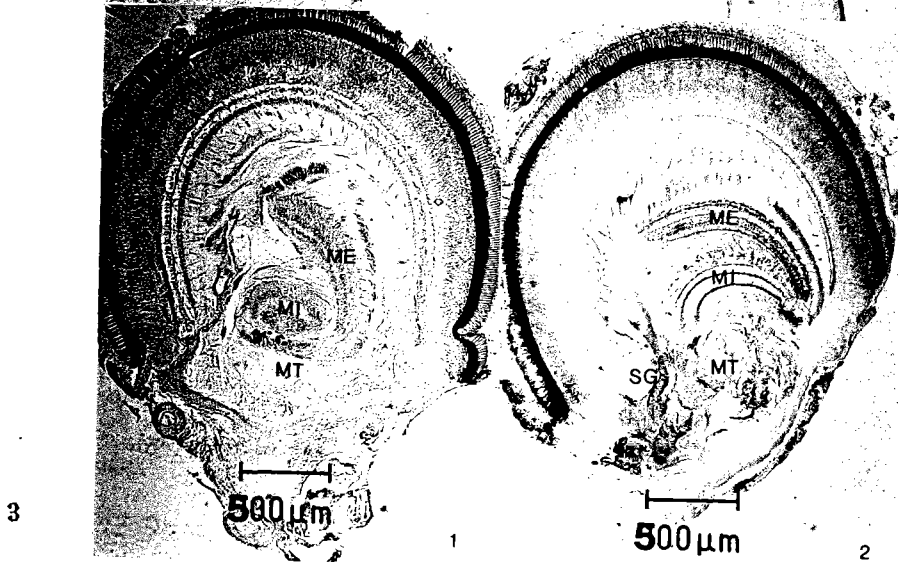
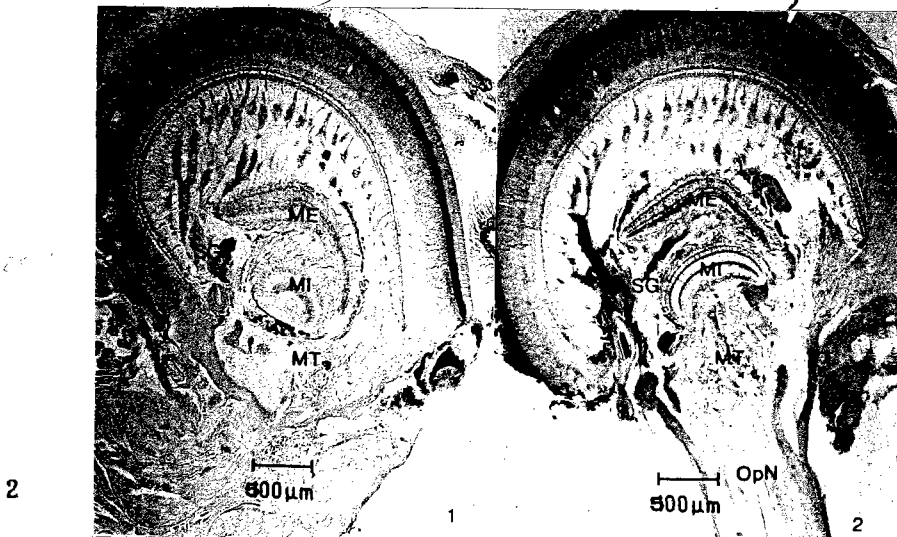
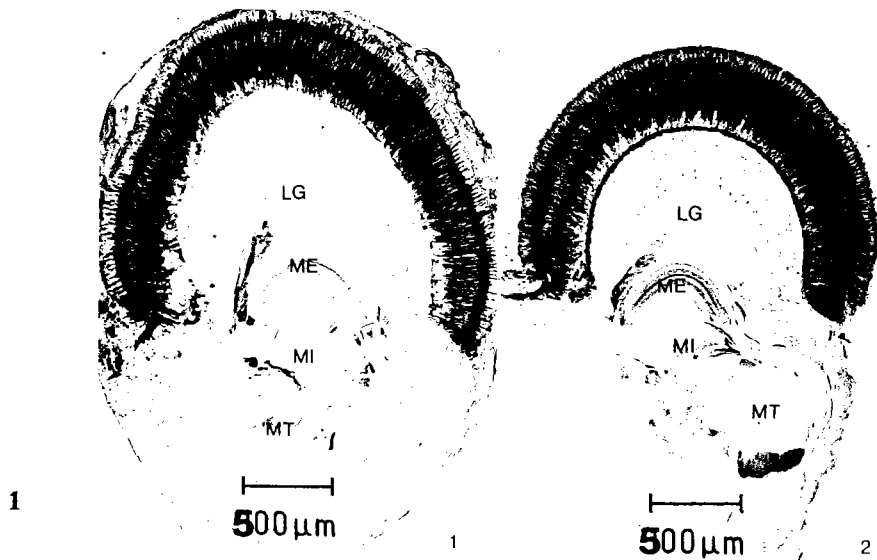
ME = medulla externa

MI = medulla interna

MT = medulla terminalis

SG = sinus gland

OpN = optic nerve



ภาพประกอบ 12 แสดงภาพกำลังขยายสูงของเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในก้านตา
ข้างซ้ายของกิ้งก่ามกราม ที่บริเวณ ME ระหว่าง MI กับ MT และ MT

แถบบน ย้อมด้วย rabbit anti- α -PDH antiserum (1.1, 1.2)

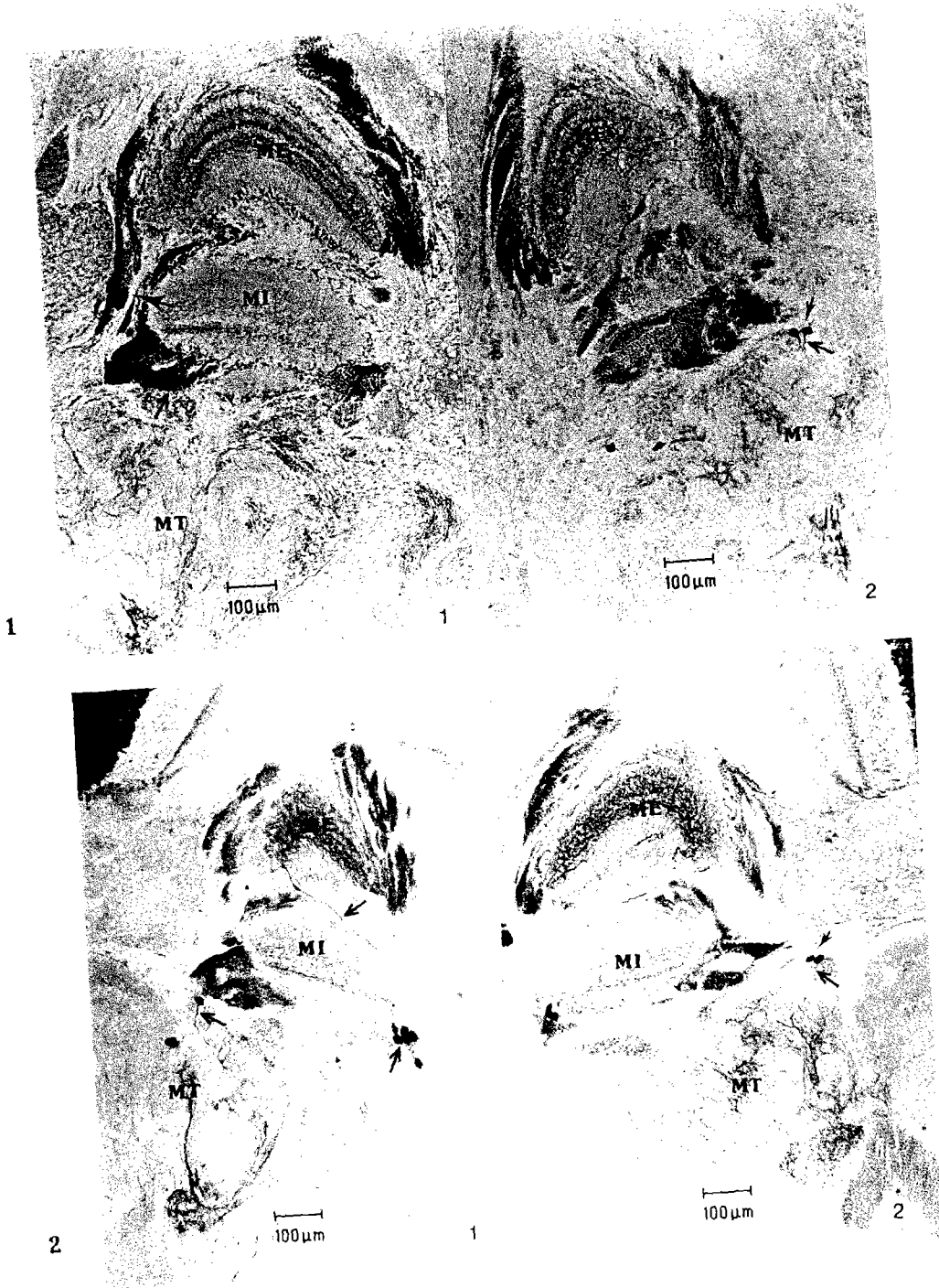
แถบล่าง ย้อมด้วย rabbit anti- β -PDH antiserum (2.1, 2.2)

ME = medulla externa

MI = medulla interna

MT = medulla terminalis

ลูกศร = เซลล์ประสาทและเส้นใยประสาท



ภาพประกอบ 13 แสดงภาพกำลังขยายสูงของเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในก้านตาข้างขวาของกิ้งก่าดำ ที่บริเวณ ME ระหว่าง MI กับ MT และ MT

แถบบน ส้อมด้วย rabbit anti- α -PDH antiserum (1.1, 1.2)

แถบล่าง ส้อมด้วย rabbit anti- β -PDH antiserum (2.1, 2.2)

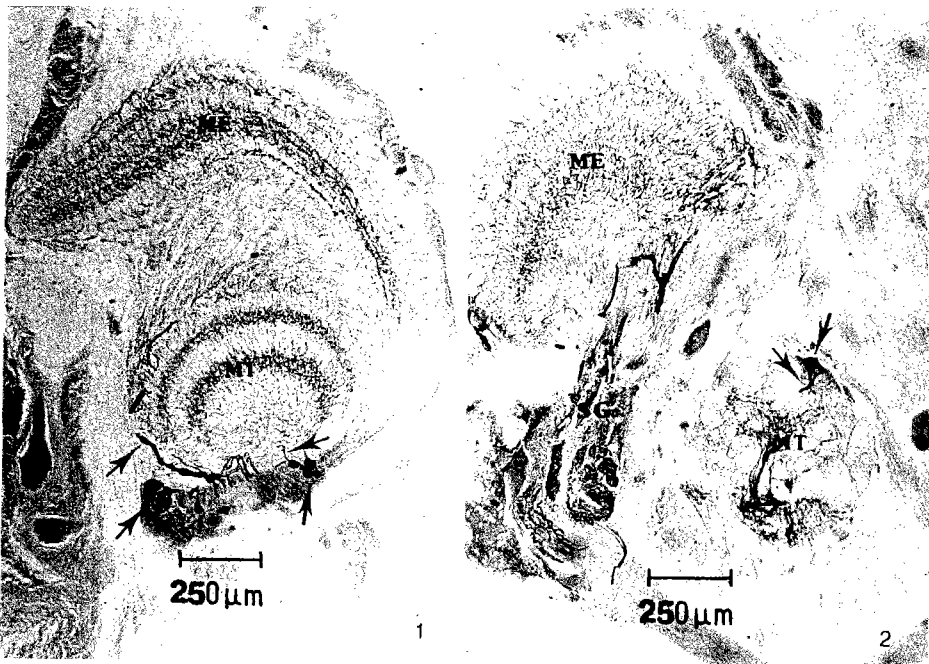
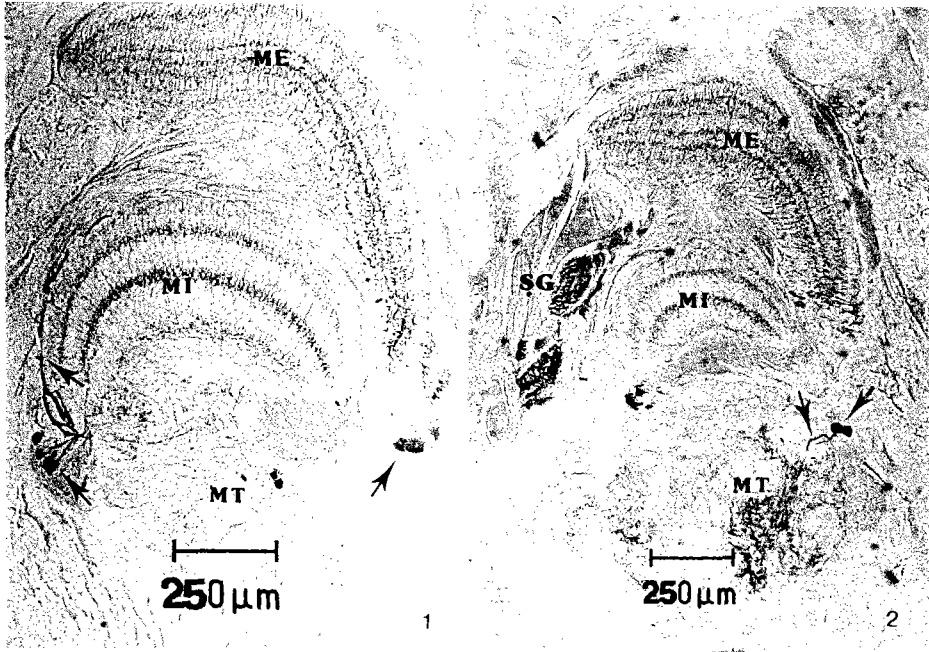
ME = medulla externa

MI = medulla interna

MT = medulla terminalis

SG = sinus gland

ลูกศร = เซลล์ประสาทและเส้นใยประสาท



ภาพประกอบ 14 แสดงภาพกำลังขยายสูงของเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในก้านตา
ข้างขวาของกิ้งก่าที่บริเวณ ME ระหว่าง MI กับ MT และ MT

แถบบน ส้อมค้ำย rabbit anti- α -PDH antiserum (1.1, 1.2)

แถบล่าง ส้อมค้ำย rabbit anti- β -PDH antiserum (2.1, 2.2)

ME = medulla externa

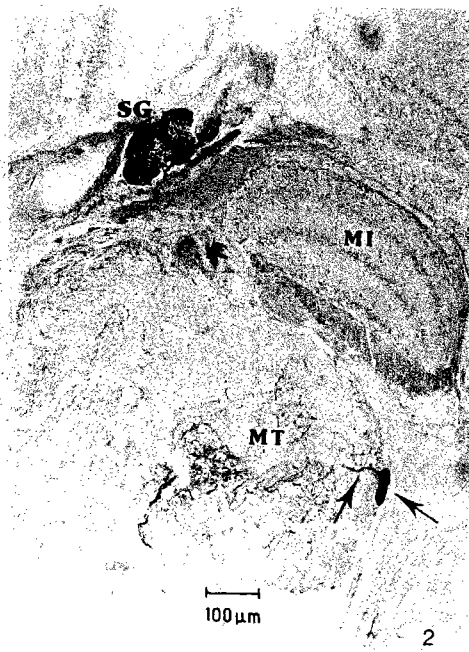
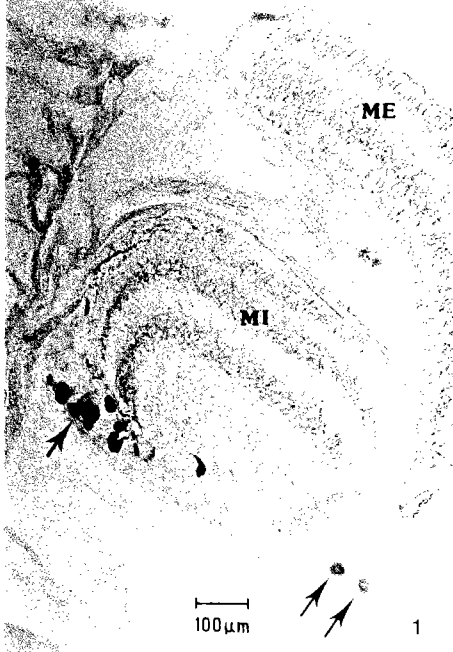
MI = medulla interna

MT = medulla terminalis

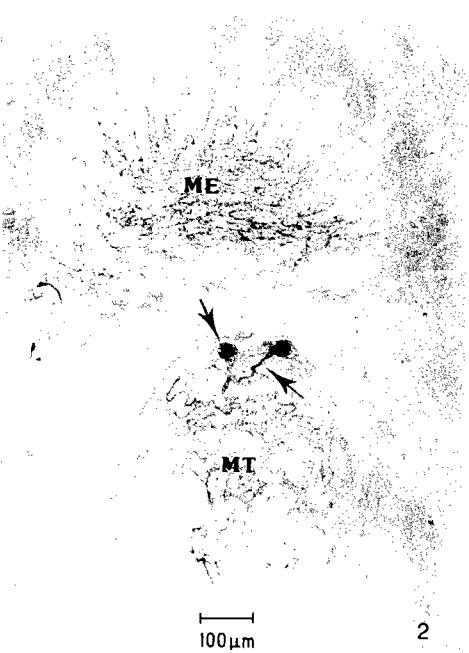
SG = sinus gland

ลูกศร = เซลล์ประสาทและเส้นใยประสาท

1



2



ภาพประกอบ 15 แสดงภาพกำลังขยายสูงของเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในก้านตาข้างขวาของกิ้งก่ามกราม ที่บริเวณ LG, ME, ระหว่าง MI กับ MT, SG และ OpN

แถบบน ย้อมด้วย rabbit anti- α -PDH antiserum (1.1, 1.2)

แถบล่าง ย้อมด้วย rabbit anti- β -PDH antiserum (2.1, 2.2)

LG = lamina ganglionaris

ME = medulla externa

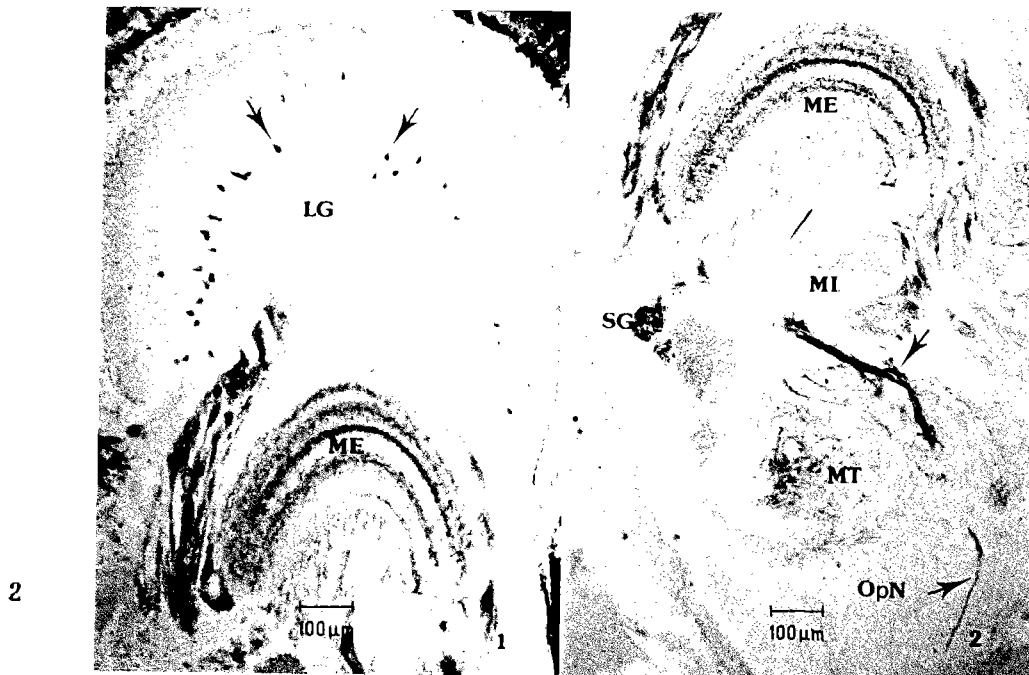
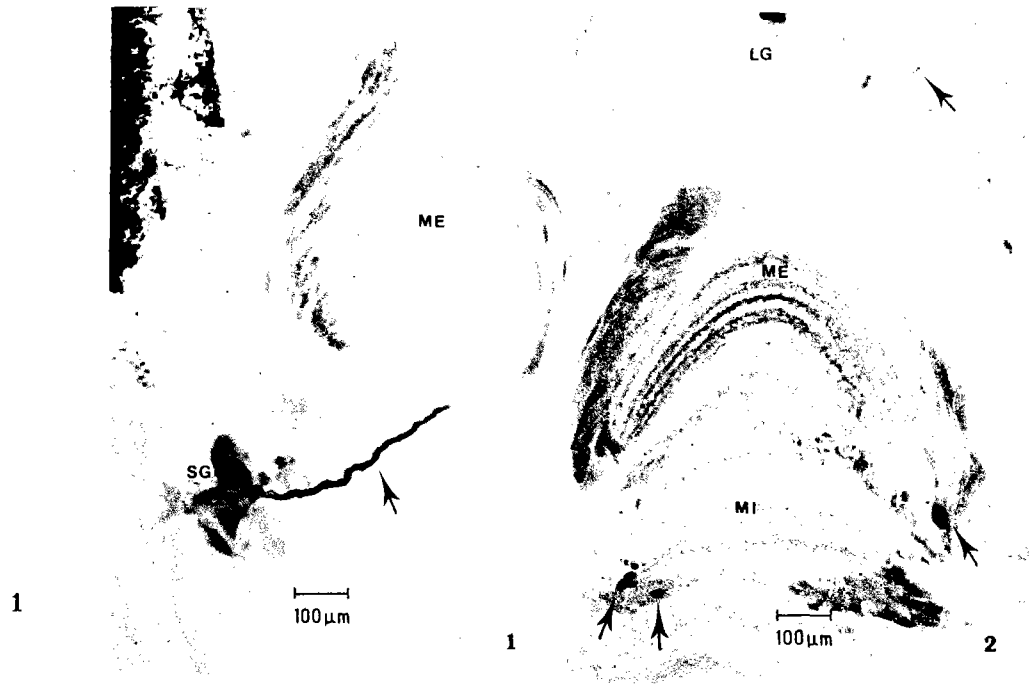
MI = medulla interna

MT = medulla terminalis

SG = sinus gland

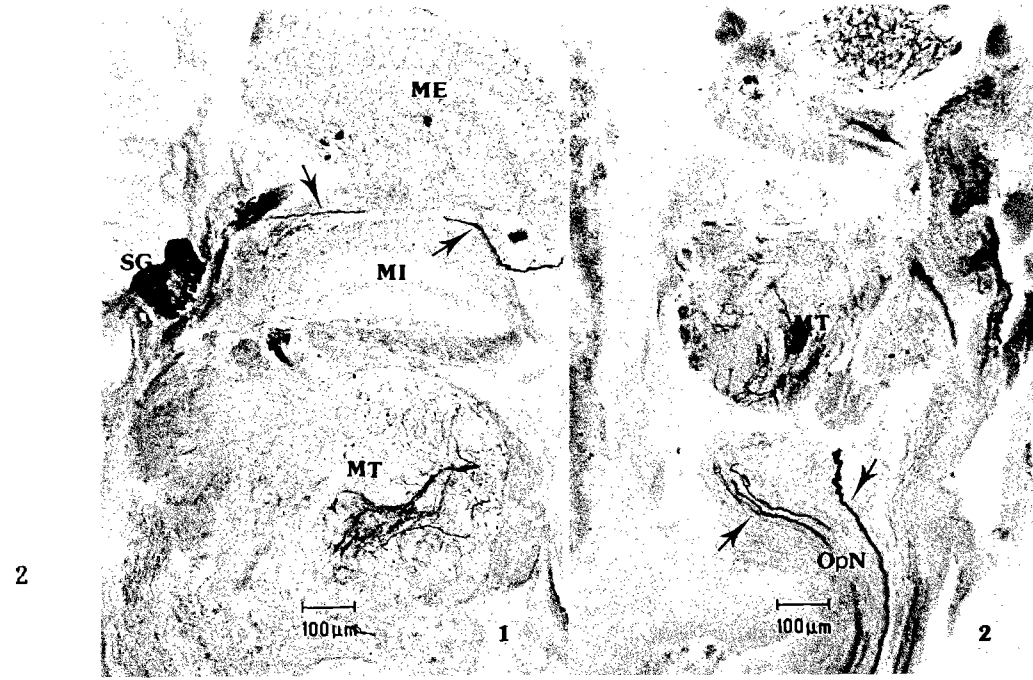
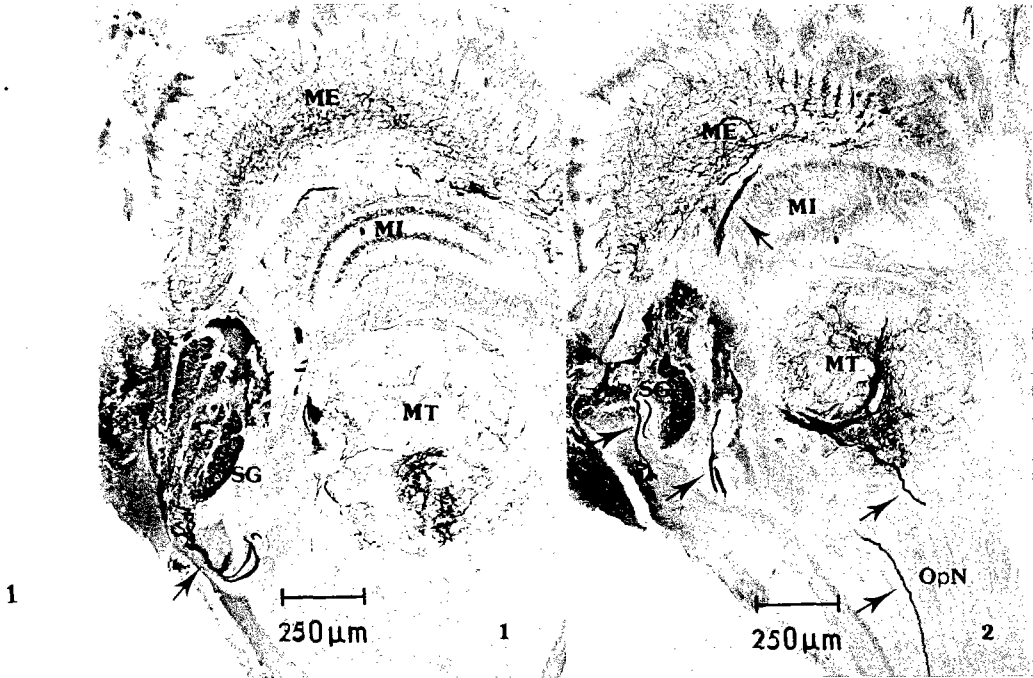
OpN = optic nerve

ลูกศร = เซลล์ประสาทและเส้นใยประสาท



ภาพประกอบ 16 แสดงภาพกำลังขยายสูงของเส้นใยประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในก้านตาข้างขวาของกิ้งกูดและก้านตาข้างขวา (2.1) ก้านตาข้างซ้าย (2.2) ของกิ้งกูด ที่บริเวณ SG และ OpN

- 1.1 และ 1.2 ซ้อมด้วย rabbit anti- β -PDH antiserum
 - 2.1 ซ้อมด้วย rabbit anti- α -PDH antiserum
 - 2.2 ซ้อมด้วย rabbit anti- β -PDH antiserum
- ME = medulla externa
- MI = medulla interna
- MT = medulla terminalis
- SG = sinus gland
- OpN = optic nerve
- ลูกศร = เส้นใยประสาท



ภาพประกอบ 17 แสดงการปรากฏร่วมและการแยกปรากฏของ α -PDH และ β -PDH ในเซลล์
 ประสาทที่บริเวณ ME ระหว่าง MI กับ MT และ MT ในก้านตาข้างซ้ายของกิ้งก่ามกรม

1.1 และ 1.3 ส้อมด้วย rabbit anti- β -PDH antiserum

1.2 ส้อมด้วย rabbit anti- α -PDH antiserum

2.1 และ 2.3 ส้อมด้วย rabbit anti- α -PDH antiserum

2.2 ส้อมด้วย rabbit anti- β -PDH antiserum

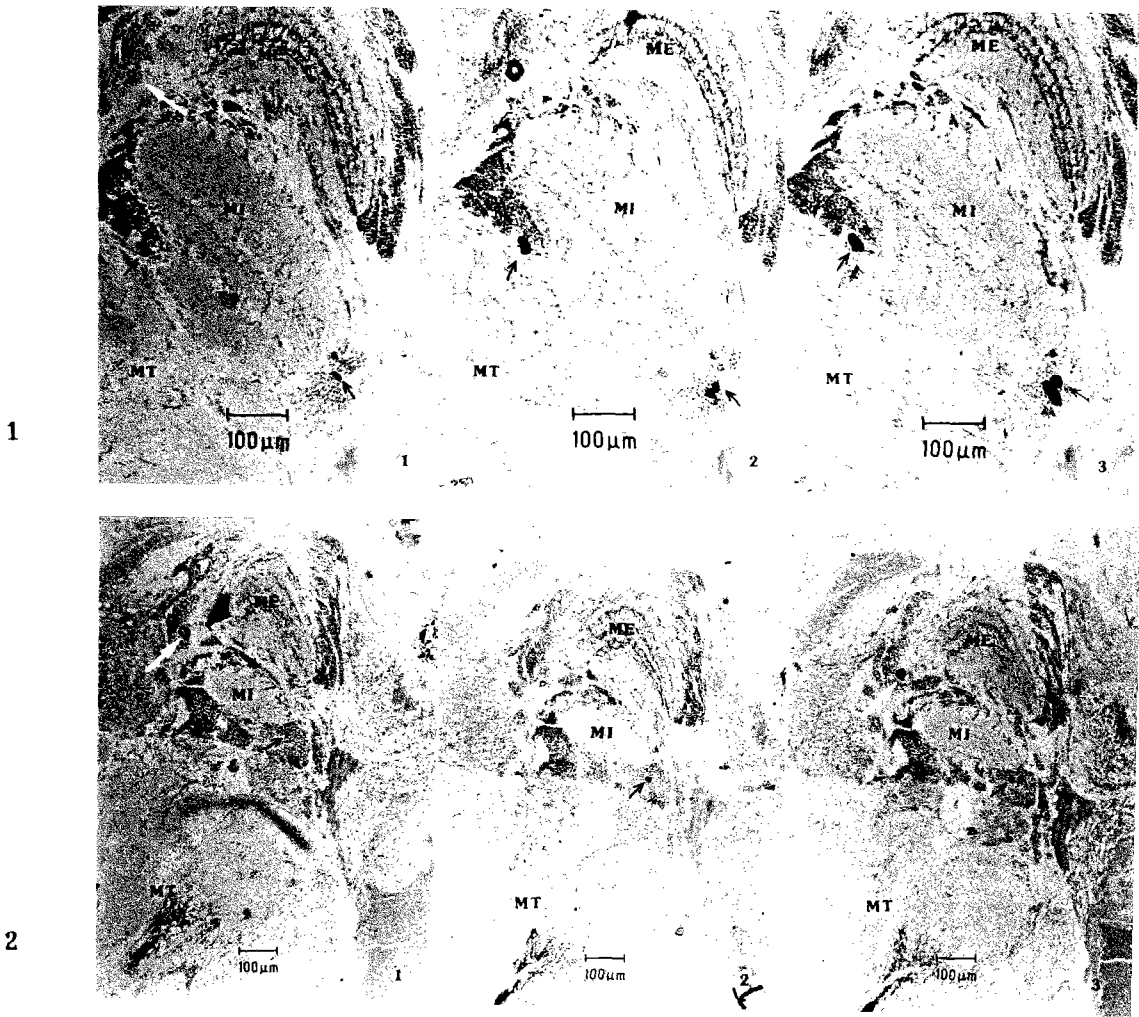
ลูกศรสีดำ แสดงเซลล์ประสาทที่พบทั้ง α -PDH และ β -PDH

ลูกศรสีขาว แสดงเซลล์ประสาทที่พบเฉพาะ α -PDH

ME = medulla externa

MI = medulla interna

MT = medulla terminalis



ภาพประกอบ 18 แสดงการปรากฏร่วมและการแยกปรากฏของ α -PDH และ β -PDH ในเซลล์ประสาทที่บริเวณ ME ระหว่าง MI กับ MT และ MT ในก้านตาข้างขวาของกิ้งกูดาค่า

แถวที่ 1 และ 3 ใช้มด้าส rabbit anti- α -PDH antiserum (1.1, 1.3, 2.1, 2.3)

แถวที่ 2 ใช้มด้าส rabbit anti- β -PDH antiserum (1.2, 2.2)

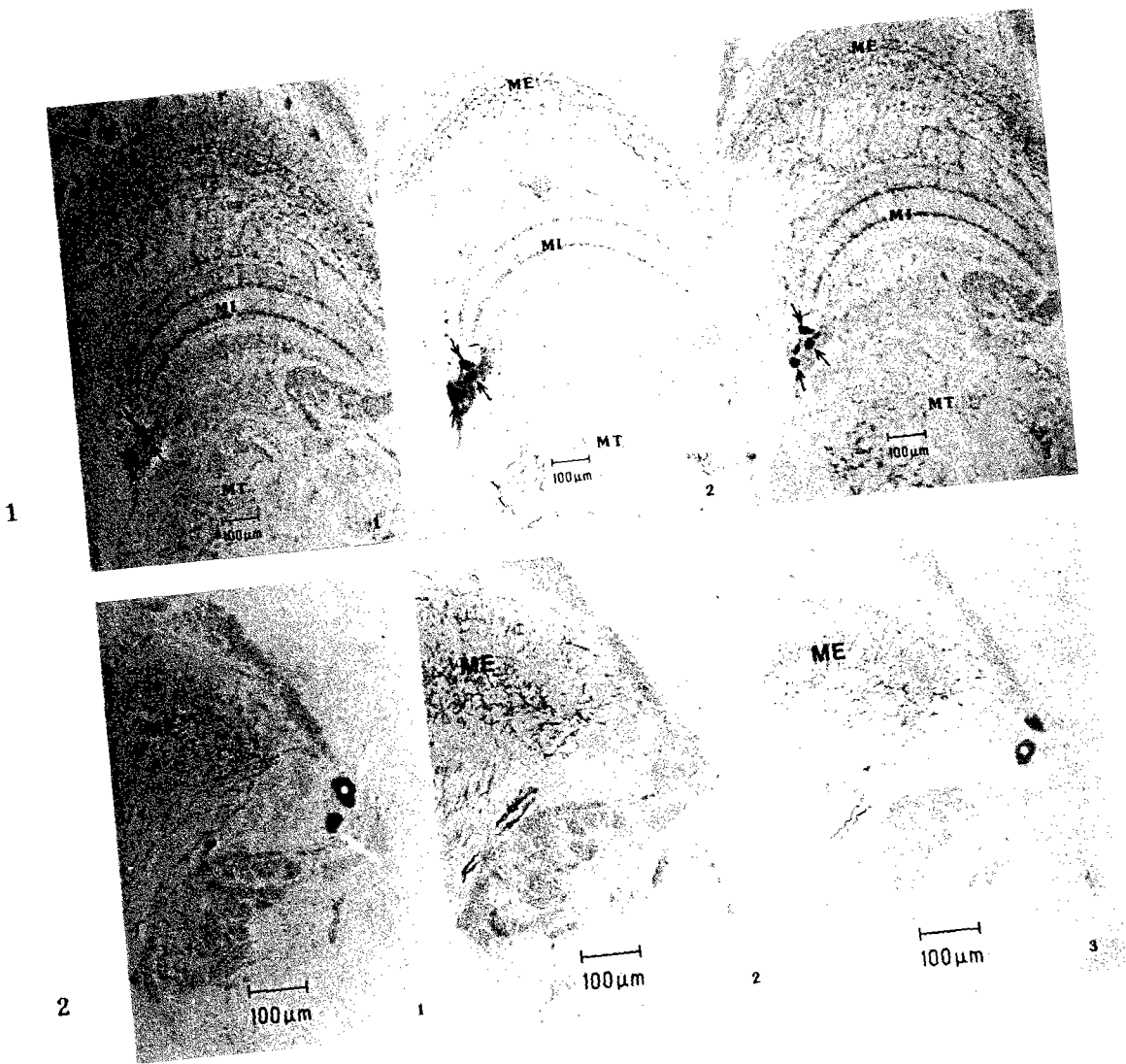
ลูกศรสีดำ แสดงเซลล์ประสาทที่พบทั้ง α -PDH และ β -PDH

ลูกศรสีขาว แสดงเซลล์ประสาทที่พบเฉพาะ α -PDH

ME = medulla externa

MI = medulla interna

MT = medulla terminalis



ภาพประกอบ 19 แสดงการปรากฏร่วมและการแยกปรากฏของ α -PDH และ β -PDH ในเซลล์
 ประสาทที่บริเวณ ME ระหว่าง MI กับ MT และ MT ในก้านตาข้างขวา
 ของกิ้งก่า

แถวที่ 1 และ 3 ย้อมด้วย rabbit anti- α -PDH antiserum (1.1,
 1.3, 2.1, 2.3)

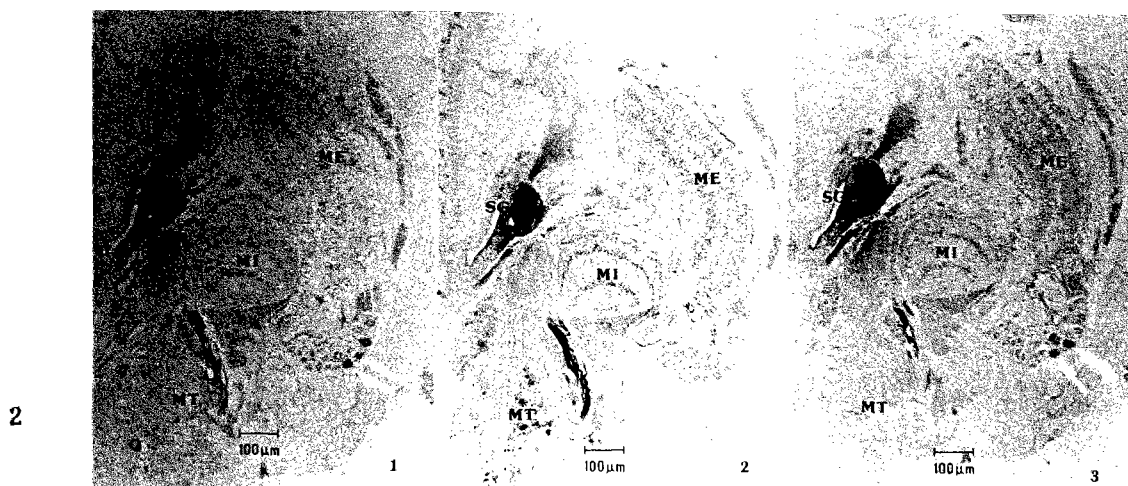
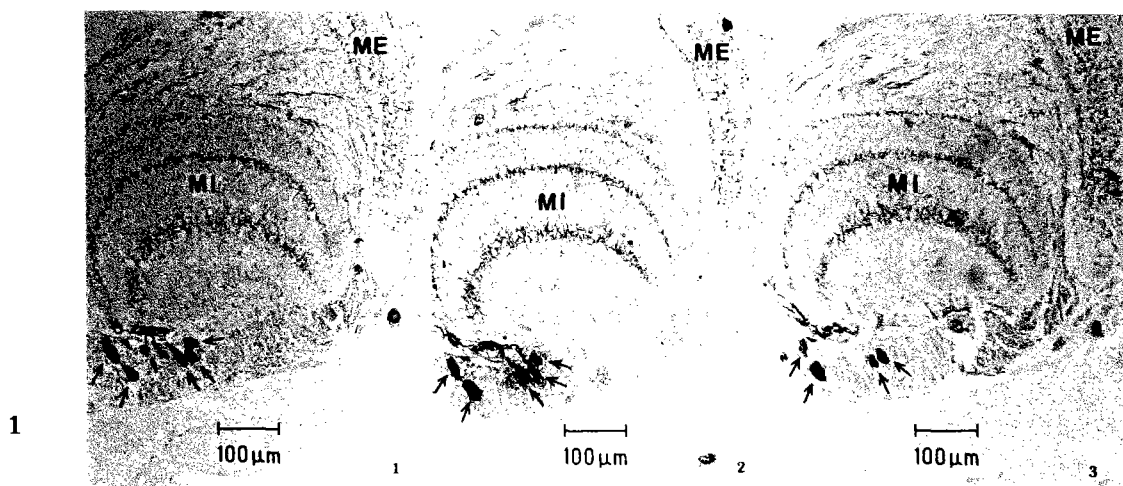
แถวที่ 2 ย้อมด้วย rabbit anti- β -PDH antiserum (1.2,
 2.2)

ลูกศรสีดำ แสดงเซลล์ประสาทที่พบทั้ง α -PDH และ β -PDH

ลูกศรสีขาว แสดงเซลล์ประสาทที่พบเฉพาะ α -PDH

ME = medulla externa

MI = medulla interna



บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผล

จากการศึกษาตำแหน่งและจำนวนที่พบเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลเนื่องจากปฏิกิริยาของ α -PDH และ β -PDH ในก้านตาของกิ้งก่ามกราม กิ้งกูดาค่าและกิ้งตะกาด จะอยู่ในบริเวณเดียวกันเป็นส่วนใหญ่ แต่มีบางตำแหน่งที่แตกต่างกัน ซึ่งสรุปผลได้ดังนี้

ในกิ้งก่ามกราม กิ้งกูดาค่าและกิ้งตะกาด พบเซลล์ประสาทที่พบ β -PDH อยู่ในบริเวณเดียวกันคือบริเวณระหว่าง MI กับ MT และบริเวณ MT เซลล์ประสาทที่พบ β -PDH ในบริเวณทั้งสองในกิ้งกิ้งสามชนิดจะส่งเส้นใยประสาทไปยังบริเวณที่เหมือนกันคือ เซลล์ประสาทที่พบ β -PDH ในบริเวณระหว่าง MI กับ MT จะส่งเส้นใยประสาทไปยังบริเวณ ME MI MT และ SG ส่วนเซลล์ประสาทในบริเวณ MT จะส่งเส้นใยประสาทไปในบริเวณ MT

ในกิ้งก่ามกรามยังพบเซลล์ประสาทขนาดเล็กจำนวนมาก กระจายอยู่ทั่วไปในบริเวณ LG ซึ่งจะส่งเส้นใยประสาทไปในบริเวณ LG จากการทดลองพบว่า ตำแหน่งที่พบเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลอันเนื่องมาจากปฏิกิริยา β -PDH ในกิ้งก่ามกรามจะอยู่ในบริเวณเดียวกับเซลล์ประสาทที่พบ β -PDH ในปู *Carcinus maenas* และในกิ้ง crayfish *Orconectes limosus* คือเซลล์ประสาทที่พบ β -PDH จะอยู่ในบริเวณ LG บริเวณระหว่าง MI กับ MT และในบริเวณ MT (Mangerich and others. 1987)

ในกิ้งก่ามกราม กิ้งกูดาค่าและกิ้งตะกาด พบว่าเซลล์ประสาทที่มี α -PDH จะอยู่ในบริเวณเดียวกันกับที่มี β -PDH นอกจากนี้ยังพบเซลล์ที่มี α -PDH ในบริเวณรอบ ๆ ME ของกิ้งกิ้งสามชนิด เฉพาะในกิ้งกูดาค่าพบเซลล์ที่มี α -PDH ในบริเวณ MT มากกว่าเซลล์ที่มี β -PDH ส่วนในกรณีของกิ้งก่ามกรามพบว่า เซลล์ที่มี β -PDH ในบริเวณ LG จะมีจำนวนมากและติดสีเข้มกว่าเซลล์ที่มี α -PDH

จำนวนของเซลล์ประสาทที่พบ β -PDH ในบริเวณระหว่าง MI กับ MT ในกิ้งก่ามกราม กิ้งกูดาค่าและกิ้งตะกาด จะมีจำนวนเซลล์ประสาทมากกว่าเซลล์ประสาทที่พบ β -PDH ในบริเวณระหว่าง MI กับ MT ในปู *Carcinus maenas* และกิ้ง crayfish *Orconectes limosus*

ส่วนในบริเวณ MT พบว่าเซลล์ประสาทที่พบ β -PDH ในกึ่งก้ามกรามจะมีจำนวนใกล้เคียงกันกับเซลล์ประสาทที่พบ β -PDH ในปูและกึ่ง crayfish ดังกล่าวข้างต้น ส่วนในกึ่งกุลาดำและกึ่งตะกาดพบว่าเซลล์ประสาทที่พบ β -PDH ในบริเวณ MT จะมีจำนวนมากกว่าเซลล์ประสาทที่พบ β -PDH ในปูและกึ่ง crayfish ดังกล่าวเช่นกัน (Mangerich and others. 1987)

จากการศึกษาการปรากฏร่วมและการแสดงปรากฏของ α -PDH และ β -PDH ในเซลล์ประสาทของก้ามกึ่งก้ามกราม กึ่งกุลาดำและกึ่งตะกาด เป็นการยืนยันว่า จำนวนของเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในบริเวณระหว่าง MI กับ MT และบริเวณ MT ในกึ่งแต่ละชนิดจะมีจำนวนใกล้เคียงกัน เนื่องจากเซลล์ประสาทเหล่านั้นมีทั้ง α -PDH และ β -PDH ในเซลล์เดียวกัน แต่ในบางบริเวณจะพบเซลล์ประสาทที่มีเฉพาะ α -PDH เท่านั้น ทำให้จำนวนเซลล์ของ α -PDH มากกว่าจำนวนเซลล์ของ β -PDH ในบริเวณส่วนใหญ่ ยกเว้นบริเวณ LG ของกึ่งก้ามกรามมีเซลล์ที่มี β -PDH มากกว่าเซลล์ที่มี α -PDH

นอกจากนี้จากข้อมูลดังกล่าวซึ่งทำให้ทราบอีกว่า anti- α -PDH antiserum ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกัน (cross reactivity) กับ β -PDH เนื่องจากไม่พบปฏิกิริยาของ β -PDH ในเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH ในบริเวณ ME แต่อาจเกิดปฏิกิริยาข้ามกันกับ PDH ในรูปแบบอื่น ๆ ซึ่งอาจมีอยู่ถึง 7 รูปแบบด้วยกัน (Rao and Riehm. 1988) ดังนั้นเหตุที่เซลล์ประสาทที่พบ α -PDH ติดสีจางในบริเวณ ME อาจเกิดเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาข้ามกันกับ PDH รูปแบบอื่น ๆ ซึ่งไม่ใช่ β -PDH แน่แน่นอน ส่วนในบริเวณ MT ของกึ่งกุลาดำก็เช่นเดียวกัน เซลล์ประสาทบางเซลล์ที่พบ α -PDH ก็จะไม่พบ β -PDH สำหรับในบริเวณ LG ของกึ่งก้ามกราม เซลล์ประสาทที่พบ α -PDH จะมีจำนวนน้อยกว่าของ β -PDH และเซลล์ประสาทที่นับได้ในแต่ละก้ามตามีจำนวนแตกต่างกันมาก ซึ่งเป็นเพราะว่าเซลล์ประสาทเหล่านี้ติดสีน้ำตาลค่อนข้างจางทำให้มีปัญหาในการนับ เหตุที่เซลล์ประสาทที่พบ α -PDH นี้ติดสีจางอาจเป็นเพราะ anti- α -PDH antiserum เกิดปฏิกิริยาข้ามกันกับ PDH รูปแบบอื่น ๆ ก็เป็นไปได้

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการกระจายของ α -PDH ของกึ่งก้ามกราม กับกึ่งกุลาดำและกึ่งตะกาด (ภาพประกอบ 5, 7, 9) หรือรูปแบบการกระจายของเซลล์ประสาทที่พบ β -PDH ของกึ่งก้ามกรามกับกึ่งกุลาดำและกึ่งตะกาด (ภาพประกอบ 6, 8, 10) จะเห็นได้ว่าในกึ่งก้ามกรามจะมีรูปแบบการกระจายของเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH แตกต่างไปจากกึ่งกุลาดำและกึ่งตะกาด โดยที่กึ่งกุลาดำและกึ่งตะกาด มีแบบแผนการกระจายของเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH และ

β -PDH คล้ายคลึงกัน สำหรับในกิ้งก่ามกรามจะมีเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH กระจายอยู่ทั่วไปในบริเวณ LG ซึ่งเซลล์ประสาทในบริเวณนี้จะไม่พบในกิ้งกูดาค่าและกิ้งตะกาด การที่รูปแบบการกระจายของเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในกิ้งก่ามกรามแตกต่างไปจากกิ้งกูดาค่าและกิ้งตะกาดอาจเป็นเพราะว่ากิ้งก่ามกรามอยู่ต่างอินฟราออร์เดอร์จากกิ้งกูดาค่าและกิ้งตะกาด โดยที่กิ้งก่ามกรามอยู่ในอินฟราออร์เดอร์ Caridea และวงศ์ (family) Palaemonidae ส่วนในกิ้งกูดาค่าและกิ้งตะกาดอยู่ในอินฟราออร์เดอร์และวงศ์เดียวกัน คือ Penaeidea และ Penaeidae ซึ่งรูปแบบการกระจายของฮอว์โมนในสัตว์ที่ใกล้ชิดกันอาจมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน (Mangerich and others. 1987) ส่วนในบริเวณเส้นประสาทตาจะเห็นเส้นใยประสาทที่ติดสีน้ำตาลอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาทั้งของ α -PDH และ β -PDH ในกิ้งกิ้งสามชนิด ซึ่งเป็นเส้นประสาทที่ไปยังบริเวณ MT (ภาพประกอบ 5-10) ซึ่งอาจสันนิษฐานได้ว่าทั้ง α -PDH และ β -PDH นอกจากจะพบในก้านตาของสัตว์แล้วยังอาจพบได้ในบริเวณอื่น ๆ ของร่างกายสัตว์ ซึ่งบริเวณเหล่านี้อาจเป็นแหล่งสร้างฮอว์โมนชนิดนี้แล้วส่งมาตามเส้นใยประสาทเข้าไปยังบริเวณ MT ซึ่งจากการศึกษาในปู *Carcinus maenas* และกิ้ง crayfish *Orconectes limosus* พบว่า นอกจากจะพบ β -PDH ในบริเวณก้านตาของปู และกิ้ง crayfish ทั้งสองชนิดนี้แล้ว (Dircksen and others. 1987; Mangerich and others. 1987) ยังพบตัวเซลล์ที่ติดสีน้ำตาลของ β -PDH ในบริเวณปมประสาทที่สมองของสัตว์ทั้งสองชนิดนี้ และในบริเวณอื่น ๆ อีก เช่น พบตัวเซลล์ในแต่ละคอมมิสซูร์ล-แกนเกลชัน และปมประสาทที่อกของปู *C. maenas* และพบตัวเซลล์ในเส้นประสาททางด้านท้องของกิ้ง crayfish *O. limosus* เป็นต้น (Mangerich and Keller. 1988)

เนื่องจาก Rabbit anti- α -PDH antiserum ที่นำมาใช้ทั้งสองชนิดเป็นแอนติซีรัมซึ่งสร้างจากการปลูกภูมิคุ้มกัน (immunized) กระจาดด้วย PDH ที่สังเคราะห์ขึ้น โดยที่ α -PDH นั้นสังเคราะห์ขึ้นจากลำดับกรดอะมิโนของ α -PDH ที่แยกได้จากกิ้ง *Pandalus borealis* (Fernelund. 1976) และ β -PDH นั้นสังเคราะห์ขึ้นจากลำดับของกรดอะมิโนของ β -PDH ที่แยกได้จากปูก้ามดาบ *Uca pugilator* (Rao. and others. 1985) และปู *Cancer magister* (Kleinholz and others. 1986) ซึ่งมีลำดับของกรดอะมิโนที่เหมือนกัน ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า α -PDH และ β -PDH ในกิ้งกิ้งสามชนิดคือกิ้งก่ามกราม กิ้งกูดาค่าและกิ้งตะกาด อาจมีโครงสร้างเหมือนหรือคล้ายกันมากกับกิ้ง *Pandalus spp.* ปูก้ามดาบ *Uca spp.* และปู *Cancer spp.*

อย่างไรก็ตาม antiserum ต่อ α -PDH และ β -PDH ที่ใช้อาจเกิดปฏิกิริยาข้ามกันกับ PDH รูปแบบอื่น ๆ ซึ่งอาจมีอยู่ถึง 7 รูปแบบด้วยกัน (Rao and Riehm, 1988) ซึ่งก็ยังไม่มียังข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างของ PDH ในรูปแบบอื่น ๆ นอกจาก α -PDH และ β -PDH ที่กล่าวมาข้างต้น

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษารูปแบบการกระจายของ α -PDH และ β -PDH ในก้านตาของครีเสตาเขื่อนชนิดอื่น ๆ อีกเช่น ในกึ่งน้ำจืดชนิดอื่น ๆ เป็นต้น เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบการกระจายของฮอร์โมนทั้งสองชนิดนี้กับในกึ่งน้ำกราม กึ่งน้ำจืดและกึ่งทะเล
2. ควรศึกษาค่าแห่งของ α -PDH และ β -PDH ในบริเวณอื่น ๆ นอกจากก้านตาของกึ่งน้ำจืด เช่น ศึกษาตำแหน่งของฮอร์โมนทั้งสองชนิดนี้ในระบบประสาทส่วนกลาง เป็นต้น

မဟာမိတ်

บรรณานุกรม

- ชูศิลป์ อัดชู. สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่เป็นอาหารในภาคกลางของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2526. อัดสำเนา.
- พิชัย สราธรรมย์และอภิรักษ์ จันตะนี. "กิ้งกูดาค่า," ครุปริทัศน์. 16 : 94-101; กรกฎาคม-กันยายน 2534.
- สนต์ มุสิก. การเพาะเลี้ยงกิ้งกูด้ากรม. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2529.
- ศุภผล เทพเฉลิม. สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่ใช้เป็นอาหารในภาคใต้ของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2527. อัดสำเนา.
- สมศักดิ์ ปัญหา. สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่เป็นอาหารในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคตะวันตกของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2525. อัดสำเนา.
- Barbara, S.B. and D.B. Gail. Immunocytochemical Techniques : Principle and Practice. Massachusetts : Blackwell Scientific Publications Inc, 1989.
- Bellon-Humbert, C., F. Van Herp and H. Schooneveld. "Immunocytochemical Study of the Red Pigment Concentrating Material in the Eyestalk of the Prawn Palaemon serratus Pennant using Rabbit Antisera against the Insect Adipokinetic Hormone," Biol. Bull. 171:647-659; 1986.
- Britto, A.C.M. and others. "Quantitative In Vitro Assay for Crustacean Chromatophorotropins and Other Pigment Cell Agonists," Pigment Cell Res. 3:28-32; 1990.
- Chang, E.S., M.J. Bruce and R.W. Newcomb. "Purification and Amino Acid Composition of a Peptide with Molt-Inhibiting Activity from the Lobster, Homarus americanus," Gen. Comp. Endocrinol. 65:56-6; 1987.
- Cheesman, D.F. and J. Prebble. "Astaxanthin Ester As a Prosthetic Group : A Carotenoprotein from the Hermit Crab," Comp. Biochem. Physiol. 17:929-935; 1966.
- Dircken, H. and others. "The Ultrastructure of Nerve Ending Containing Pigment-Dispersing Hormone (PDH) in Crustacean Sinus Gland: Identification by an Antiserum against a Synthetic PDH," Cell Tissue Res. 250:377-387; 1987.

- Fernlund, P. "Structure of a Light-Adapting Hormone from the Shrimp, Pandalus borealis," Biochim. Biophys. Acta. 439:17-25; 1976.
- Fernlund, P. and L. Josefsson. "Crustacean Color Change Hormone: Amino Acid Sequence and Chemical Synthesis," Science. 177:173-175; 1972.
- Fingerman, M. "The Physiology and Pharmacology of Crustacean Chromatophores," Amer.Zool. 25:233-252; 1985.
- _____. "The Endocrine Mechanisms of Crustaceans," J. Crust. Biol. 7(1): 1-24; 1987.
- _____. "Pigment Hormones in Crustacea," in Endocrinology of Selected Invertebrate Type. p.357-374. Louisiana : Alan R. Liss. Inc., 1988.
- Holman, G.M., B.J. Cook and R.J. Nachman. "Isolation Primary Structure and Synthesis of Leucomyosuppressin, an Insect Neuropeptide That Inhibits Contractions of the Cockroach Hindgut," Comp. Biochem. Physiol. 85C:329-335; 1986.
- Holthuis, L.B. FAO Species Catalogue Vol.1-Shrimps and Prawns of the World. FAO Fisheries Synopsis No.125 Volume 1, 1980.
- Huberman, A. and M.B. Aguilar. "A Neurosecretory Hyperglycemic Hormone From the Sinus Gland of the Mexican Crayfish (Procambarus bouvieri : Ortmann)-II. Structural Comparison of Two Isoforms of the Hormone," Comp. Biochem. Physiol. 91B:(2) 345-349; 1988.
- Hudson, L. and F.C. Hay. Practical Immunology. Oxford : Alden Press, 1976.
- Humason, G.L. Animal Tissue Techniques. 4th ed. San francisco : W.H. Freeman and Company, 1979.
- Josefsson, L. "Invertebrate Neuropeptide Hormones," Int. J. Pept. Protein Res. 21:459-470; 1983.
- Kleinholz, L.H. and F. Kimball. "Separation of Neurosecretory Pigmentary-Effector Hormones of the Crustacean Eyestalk," Gen. Comp. Endocrinol. 5:336-341; 1965.
- Kleinholz, L.H. and others. "Isolation and Sequence Analysis of a Pigment-Dispersing Hormone from Eyestalks of the Crab, Cancer magister," Biol. Bull. 170:135-143; 1986.
- Lockwood, A.P.M. "Hormone," in Aspect of the Physiology of Crustacea. p.76-98. Great Britain : Aberdeen University, 1967.

- Mangerich, S. and R. Keller. "Localization of Pigment-Dispersing Hormone (PDH) Immunoreactivity in the Central Nervous System of Carcinus maenas and Orconectes limosus (Crustacea), with Reference to FMRFamide Immunoreactivity in O. limosus," Cell Tissue Res. 253:199-208; 1988.
- Mangerich, S. and others. "Immunocytochemical Localization of Pigment-Dispersing Hormone (PDH) and Its Coexistence with FMRFamide-Immunoreactive Material in the Eyestalks of the Decapod Crustacean Carcinus maenas and Orconectes limosus," Cell Tissue Res. 250:365-375; 1987.
- Melchiorri, P. "The Discovery of Nonmammalian Peptide," Peptides. 6:3-5; 1985.
- Rao, K.R. "Pigmentary Effector," in : Bliss D.E., Mantel L.H.(eds) The Biology of Crustacea. V.9. p. 395-462. New York : Academic Press, 1985.
- Rao, K.R. and J.P. Riehm. "Pigment-Dispersing Hormone : An Novel Family of Neuropeptides from Arthropods," Peptides. 9:153-159; 1988.
- Rao, K.R. and others. "Characterization of a Pigment-Dispersing Hormone in Eyestalks of the Fiddler Crab Uca pugilator," Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:5319-5322; 1985.
- Rao, K.R. and others. "Isolation and Partial Sequence Analysis of Analog of Crustacean Pigment Dispersing Hormone from the Cricket Acheta domesticus," Soc. Neurosci. Abstr. 12 : 244; 1986.
- Rao, K.R. and others. "Primary Structure of and Analog of Crustacean Pigment-Dispersing Hormone from the Lubbe Grasshopper Romalea microptera," J. Biol. Chem. 262 : 2672-2675; 1987.
- Schueler, P.A. and others. "Immunohistochemical Mapping of Distal Retinal Pigment Hormone in the Crayfish Central Nervous System," Soc. Neurosci. Abstr. 12:242; 1986.
- Sithigorngul, P., A.O.W. Stretton and C. Cowden. "Neuropeptide Diversity in Ascaris : An Immunocytochemical Study," J. Comp. Neurol. 294: 362-376; 1990.
- Soyez, D., J.E. Van Deijnen and M. Martin. "Isolation and Characterization of a Vitellogenesis Inhibiting Factor from Sinus Gland of the Lobster, Homarus americanus," J. Exp. Zool. 244:479-484; 1987.
- Trimmer, B.A., L.A. Kobierski and E.A. Kravitz. "Purification and Characterization of FMRFamide Like Immunoreactive Substances from Lobster Nervous System : Isolation and Sequence Analysis of Two Closely Related Peptides," J. Comp. Neurol. 266:16-26; 1987.

- Van Deijnen, J.E., F. Vek and F. Van Herp. "An Immunocytochemical Study of the Optic Ganglia of the Crayfish Astacus leptodactylus with Antisera against Biologically Active Peptides of Vertebrates and Invertebrate," Cell Tissue Res. 240 : 175-183; 1985.
- Webster, G and R. Keller. "Purification, Characterization and Amino Acid Composition of the Putative Molt-Inhibiting Hormone (MIH) of Carcinus maenas (Crustacea, Decapoda)," J. Comp. Physiol. 156 B:617-624; 1986.

ภาคผนวก

תאריך: 10/10/2023

ตาราง 3 แสดงตำแหน่งและจำนวนของเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH ในบริเวณต่าง ๆ ในก้านตาของ
กิ้งก่ามกราม

บริเวณ ก้านตาที่ /ตา/เพศ	LG (เซลล์)	รอบ ๆ ME (เซลล์)	ระหว่าง MI กับ MT (เซลล์)	MT (เซลล์)	SG	OpN
1/ตาขวา/เพศเมีย	333	15	50	5	+	+
2/ตาขวา/เพศเมีย	291	9	44	4	+	+
3/ตาขวา/เพศเมีย	453	10	43	6	+	+
4/ตาขวา/เพศเมีย	228	8	44	3	+	+
5/ตาขวา/เพศเมีย	320	9	42	3	+	+
6/ตาขวา/เพศเมีย	509	9	51	4	+	+
7/ตาขวา/เพศเมีย	241	13	58	2	+	+
8/ตาซ้าย/เพศเมีย	321	11	49	3	+	+
9/ตาซ้าย/เพศเมีย	309	13	48	2	+	+
10/ตาซ้าย/เพศเมีย	199	7	52	2	+	+

หมายเหตุ เซลล์ประสาทในบริเวณ LG คิดสื่อน้ำตาลจางกว่าเซลล์ประสาทในบริเวณอื่น

LG = lamina ganglionaris

MT = medulla terminalis

ME = medulla externa

SG = sinus gland

MI = medulla interna

OpN = optic nerve

+ = พบเส้นใยประสาทที่คิดสื่อน้ำตาล

ตาราง 4 แสดงตำแหน่งและจำนวนของเซลล์ประสาทที่พบ β -PDH ในบริเวณต่าง ๆ ในก้านตาของ
กิ้งก่ามกราม

ก้านตาที่ /ตา/เพศ	บริเวณ	LG (เซลล์)	รวม ๆ ME (เซลล์)	ระหว่าง MI กับ MT (เซลล์)	MT (เซลล์)	SG	OpN
1/ตาขวา/เพศเมีย		610	-	49	4	+	+
2/ตาขวา/เพศเมีย		725	-	48	5	+	+
3/ตาขวา/เพศเมีย		685	-	44	4	+	+
4/ตาขวา/เพศเมีย		567	-	43	5	+	+
5/ตาขวา/เพศเมีย		613	-	46	4	+	+
6/ตาขวา/เพศเมีย		590	-	54	4	+	+
7/ตาซ้าย/เพศเมีย		598	-	46	5	+	+
8/ตาซ้าย/เพศเมีย		454	-	57	5	+	+
9/ตาซ้าย/เพศเมีย		549	-	52	4	+	+
10/ตาซ้าย/เพศเมีย		598	-	51	5	+	+

LG = lamina ganglionaris

ME = medulla externa

MI = medulla interna

MT = medulla terminalis

SG = sinus gland

OpN = optic nerve

+ = พบเส้นใยประสาทที่ติดสีน้ำตาล

ตาราง 5 แสดงตำแหน่งและจำนวนของเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH ในบริเวณต่าง ๆ ในก้านตาของ
กิ้งก่า

บริเวณ ก้านตาที่ /ตา/เพศ	LG (เซลล์)	รอบ ๆ ME (เซลล์)	ระหว่าง MI กับ MT (เซลล์)	MT (เซลล์)	SG	OpN
1/ตาขวา/เพศผู้	-	100	81	17	+	+
2/ตาขวา/เพศผู้	-	76	78	13	+	+
3/ตาขวา/เพศเมีย	-	78	87	12	+	+
4/ตาขวา/เพศเมีย	-	86	86	13	+	+
5/ตาขวา/เพศเมีย	-	99	76	10	+	+
6/ตาซ้าย/เพศผู้	-	116	71	12	+	+
7/ตาซ้าย/เพศเมีย	-	118	90	16	+	+
8/ตาซ้าย/เพศเมีย	-	113	88	12	+	+
9/ตาซ้าย/เพศเมีย	-	126	83	18	+	+
10/ตาซ้าย/เพศเมีย	-	107	79	11	+	+

หมายเหตุ เซลล์ประสาทบริเวณรอบ ๆ ME ติดสีน้ำตาลจางกว่าเซลล์ประสาทในบริเวณอื่น

LG = lamina ganglionaris

MT = medulla terminalis

ME = medulla externa

SG = sinus gland

MI = medulla interna

OpN = optic nerve

+ = พบเส้นใยประสาทที่ติดสีน้ำตาล

ตาราง 6 แสดงตำแหน่งและจำนวนของเซลล์ประสาทที่พบ β -PDH ในบริเวณต่าง ๆ ในก้านตาของ
กิ้งก่าดำ

บริเวณ ก้านตาที่ /ตา/เพศ	LG (เซลล์)	รอบ ๆ ME (เซลล์)	ระหว่าง MI กับ MT (เซลล์)	MT (เซลล์)	SG	OpN
1/ตาขวา/เพศผู้	-	-	77	6	+	+
2/ตาขวา/เพศผู้	-	-	71	3	+	+
3/ตาขวา/เพศเมีย	-	-	71	4	+	+
4/ตาขวา/เพศเมีย	-	-	85	6	+	+
5/ตาซ้าย/เพศผู้	-	-	71	7	+	+
6/ตาซ้าย/เพศผู้	-	-	84	5	+	+
7/ตาซ้าย/เพศผู้	-	-	72	5	+	+
8/ตาซ้าย/เพศเมีย	-	-	74	5	+	+
9/ตาซ้าย/เพศเมีย	-	-	90	6	+	+
10/ตาซ้าย/เพศเมีย	-	-	91	4	+	+

LG = lamina ganglionaris

ME = medulla externa

MI = medulla interna

MT = medulla terminalis

SG = sinus gland

OpN = optic nerve

+ = พบเส้นใยประสาทที่ติดสีน้ำตาล

ตาราง 7 แสดงตำแหน่งและจำนวนของเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH ในบริเวณต่าง ๆ ในก้านตาของ
กิ้งก่า

ก้านตาที่ /ตา/เพศ	บริเวณ	LG (เซลล์)	รอบ ๆ ME (เซลล์)	ระหว่าง MI กับ MT (เซลล์)	MT (เซลล์)	SG	OpN
1/ตาขวา/เพศเมีย	-	-	19	46	7	+	+
2/ตาขวา/เพศเมีย	-	-	49	52	6	+	+
3/ตาขวา/เพศเมีย	-	-	38	51	6	+	+
4/ตาขวา/เพศเมีย	-	-	54	46	6	+	+
5/ตาขวา/เพศเมีย	-	-	33	44	11	+	+
6/ตาขวา/เพศเมีย	-	-	45	53	9	+	+
7/ตาซ้าย/เพศเมีย	-	-	36	51	8	+	+
8/ตาซ้าย/เพศเมีย	-	-	35	49	6	+	+
9/ตาซ้าย/เพศเมีย	-	-	39	53	8	+	+
10/ตาซ้าย/เพศเมีย	-	-	28	60	5	+	+

หมายเหตุ เซลล์ประสาทบริเวณ ME ติดสีน้ำตาลจางกว่าเซลล์ประสาทในบริเวณอื่น

LG = lamina ganglionaris

MT = medulla terminalis

ME = medulla externa

SG = sinus gland

MI = medulla interna

OpN = optic nerve

+ = พบเส้นใยประสาทที่ติดสีน้ำตาล

ตาราง 8 แสดงตำแหน่งและจำนวนของเซลล์ประสาทที่พบ β -PDH ในบริเวณต่าง ๆ ในก้านตาของ
กิ้งก่า

บริเวณ ก้านตาที่ /ตา/เพศ	LG (เซลล์)	รวม ๆ ME (เซลล์)	ระหว่าง MI กับ MT (เซลล์)	MT (เซลล์)	SG	OpN
1/ตาขวา/เพศเมีย	-	-	47	9	+	+
2/ตาขวา/เพศเมีย	-	-	56	7	+	+
3/ตาซ้าย/เพศเมีย	-	-	61	5	+	+
4/ตาซ้าย/เพศเมีย	-	-	57	7	+	+
5/ตาซ้าย/เพศเมีย	-	-	63	5	+	+
6/ตาซ้าย/เพศเมีย	-	-	61	5	+	+
7/ตาซ้าย/เพศเมีย	-	-	55	9	+	+
8/ตาซ้าย/เพศเมีย	-	-	62	6	+	+
9/ตาซ้าย/เพศเมีย	-	-	51	8	+	+
10/ตาซ้าย/เพศเมีย	-	-	46	10	+	+

LG = lamina ganglionaris

MT = medulla terminalis

ME = medulla externa

SG = sinus gland

MI = medulla interna

OpN = optic nerve

+ = พบเส้นใยประสาทที่ติดสีน้ำตาล

๒๒๒๒๒๒

การเตรียมสารเคมี

1. Bouin's fixative (Humason. 1979)

Glacial acetic acid	5	มิลลิลิตร
40% Formaldehyde	25	มิลลิลิตร
Picric acid (saturated aqueous solution)	75	มิลลิลิตร

2. สารละลาย PBS (Phosphate Buffered Saline)

0.15 โมลาร์ พีเอช 7.2 (Hudson and Hay. 1976)

NaCl	8	กรัม
KCl	0.20	กรัม
KH_2PO_4	0.20	กรัม
Na_2HPO_4	1.15	กรัม
หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.15	กรัม
H_2O (distilled)	1,000	มิลลิลิตร

3. สารละลาย Blotto 0.5%

นมผงพร่องมันเนย	0.5	กรัม
สารละลาย PBS 0.15 โมลาร์ พีเอช 7.2	100	มิลลิลิตร

4. สารละลาย P_1^+

Calf serum	10	มิลลิลิตร
สารละลาย PBS 0.15 โมลาร์ พีเอช 7.2	100	มิลลิลิตร

5. สีนีโอทิน 0.1% ในเอซิดแอลกอฮอล์ 95%

ซีนีโอทิน	0.1	กรัม
เอซิดแอลกอฮอล์ 95%	100	มิลลิลิตร

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ นางสาวสุนิสา ชื่อสกุล แสงมงคลพิพัฒน์
 เกิดวันที่ 5 เดือนพฤศจิกายน พุทธศักราช 2509
 สถานที่เกิด อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา
 สถานที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 83 เจริญผลพาร์ทเมนต์
 ถนนบรรทัดทอง แขวงรองเมือง เขตปทุมวัน
 กรุงเทพฯ 10330

ประวัติการศึกษา

- พ.ศ. 2527 มัธยมศึกษาปีที่ 6 (แผนกวิทยาศาสตร์) จากโรงเรียนพนมสารคาม
 "พนมอศุฉวิทยา"
 พ.ศ. 2529 ปกศ.สูง (วิชาเอกวิทยาศาสตร์ทั่วไป) จากวิทยาลัยครูฉะเชิงเทรา
 พ.ศ. 2531 กศ.บ. (วิชาเอกวิทยาศาสตร์-ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
 บางเขน
 พ.ศ. 2536 วท.ม. (เคมีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

การตรวจหาฟิสิกเมนต์ดีส์เพอร์ซิงฮอร์โมนในก้านตาของกิ้งก่ามกราม
กึ่งกลางค่าและกึ่งตะกาดด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมีสทรี

บทคัดย่อ

ของ

สุนิสา แสงมงคลนิวัฒน์

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ

พฤษภาคม 2536

จากการใช้แอนติบอดีซึ่งสร้างต่อ pigment dispersing hormone (PDH) ที่สังเคราะห์ขึ้นทั้งสองชนิดคือ α -PDH และ β -PDH เพื่อศึกษาตำแหน่งของเซลล์ประสาทและรูปแบบการกระจายของฮอร์โมนทั้งสองด้วยวิธีอินไดเรกต์อิมมูโนเปอร์ออกซิเดส (indirect immunoperoxidase method) ในกิ้งก่ามกราม กิ้งก่าดำและกิ้งก่าตะกาด พบว่าตำแหน่งของเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ในกิ้งก่าทั้งสามชนิดจะอยู่ในบริเวณเดียวกันเป็นส่วนใหญ่ คือบริเวณระหว่าง medulla interna (MI) กับ medulla terminalis (MT) และบริเวณ MT ส่วนเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH ในบริเวณ medulla externa (ME) ในกิ้งก่าทั้งสามชนิดจะไม่พบ β -PDH ในบริเวณนี้ ในกิ้งก่ามกรามนอกจากจะพบเซลล์ประสาทในบริเวณดังกล่าวแล้ว ยังพบ α -PDH และ β -PDH ในบริเวณ lamina ganglionaris (LG) ด้วย

จำนวนของเซลล์ประสาทที่พบ α -PDH และ β -PDH ส่วนใหญ่จะมีจำนวนใกล้เคียงกันในกิ้งก่าแต่ละชนิดคือ ในบริเวณระหว่าง MI กับ MT และบริเวณ MT ของกิ้งก่ามกรามมีประมาณ 42-57 เซลล์และ 2-6 เซลล์ ของกิ้งก่าดำมีประมาณ 44-63 เซลล์และ 5-11 เซลล์ และของกิ้งก่าดำมีประมาณ 71-91 เซลล์ ยกเว้นในบริเวณ MT ของกิ้งก่าดำจะมีเซลล์ประสาทที่พบ β -PDH มากกว่า α -PDH คือมี α -PDH 12-18 เซลล์และมี β -PDH 3-7 เซลล์ ส่วนในบริเวณรอบ ๆ ME พบเฉพาะเซลล์ที่มี α -PDH เท่านั้น คือกิ้งก่ามกรามมี 7-15 เซลล์ กิ้งก่าดำมี 76-126 เซลล์และกิ้งก่าตะกาดมี 19-54 เซลล์ ส่วนในกิ้งก่ามกรามจะพบเซลล์ประสาทที่มี α -PDH และ β -PDH จำนวน 390 เซลล์และ 598 เซลล์

เซลล์ประสาทในบริเวณต่าง ๆ ของกิ้งก่าทั้งสามชนิดนี้จะส่งเส้นใยประสาทไปยังบริเวณต่าง ๆ ที่เหมือนกันคือ เซลล์ประสาทที่อยู่บริเวณ ME จะส่งเส้นใยประสาทไปยังบริเวณ ME เซลล์ประสาทที่อยู่บริเวณระหว่าง MI กับ MT จะส่งเส้นใยประสาทไปในบริเวณ ME MI MT และ sinus gland (SG) เซลล์ประสาทที่อยู่บริเวณ MT จะส่งเส้นใยประสาทไปยังบริเวณ MT เซลล์ประสาทที่อยู่บริเวณ LG ในกิ้งก่ามกรามจะส่งเส้นใยประสาทไปในบริเวณ LG ส่วนบริเวณเส้นประสาทตาพบเส้นใยประสาทซึ่งเป็นเส้นใยประสาทที่ไปยังบริเวณ MT

จากการย้อมเซกชันชนิดบางด้วย rabbit anti- α -PDH antiserum และ rabbit anti- β -PDH antiserum สลับเซกชันกัน เป็นการยืนยันว่าเซลล์ประสาทที่พบฮอร์โมนทั้งสองชนิด คือ α -PDH และ β -PDH ได้แก่เซลล์ประสาทบริเวณ LG บริเวณระหว่าง MI กับ MT และบริเวณ MT เป็นเซลล์เดียวกัน ส่วนเซลล์บริเวณรอบ ๆ ME ในกึ่งทั้งสามชนิดและบางส่วนของเซลล์ในบริเวณ MT ในกึ่งกลาดำพบเฉพาะ α -PDH เท่านั้น แต่เซลล์บางเซลล์ของ LG ในกึ่งก้ามกรามพบเฉพาะ β -PDH

IMMUNOCYTOCHEMICAL LOCALIZATION OF PIGMENT-DISPERSING
HORMONE LIKE-SUBSTANCES IN THE EYESTALKS OF
Macrobrachium rosenbergii, Penaeus monodon AND
Metapenaeus affinis

AN ABSTRACT

BY

SUNISA SAENGMONGKOLPIPAT

Presented in partial fulfillment of the requirements for the
Master of Science degree in Biological Chemistry
at Srinakharinwirot University

May 1993

By using antisera raised against synthetic pigment-dispersing hormone (PDH), α and β forms, the distribution of the two hormones in the eyestalks of Macrobrachium rosenbergii, Penaeus monodon and Metapenaeus affinis was studied by indirect immunoperoxidase method. Immunoreactive patterns obtained from both antisera, α -PDH and β -PDH, were similar among the three species. Strong α and β -PDH immunoreactivity was observed in neurons in the region between medulla interna (MI) and medulla terminalis (MT) and MT. But α -PDH reactivity was only found in the medulla externa (ME). In case of M. rosenbergii α and β -PDH immunoreactivity was also located in the lamina ganglionaris (LG).

The numbers of α and β -PDH positive neurons found in each region were similar among all species. In M. rosenbergii, M. affinis and P. monodon, the numbers of α and β -PDH positive neurons found in the region between MI and MT were in the similar range of 42-57, 44-63, 71-91 neurons consecutively as well as in the region of MT similar range of neurons were observed, 2-6 and 5-11 neurons. In case of P. monodon the number of α -PDH immunoreactive neurons in the MT was greater than β -PDH immunoreactive neurons; 12-18 and 3-7 neurons. In the region around the ME, only α -PDH immunoreactive neurons were found in all three species, 7-15 neurons in M. rosenbergii, 76-126 neurons in P. monodon and 19-54 neurons in M. affinis. In addition, 320 α -PDH positive neurons and 598 β -PDH positive neurons were observed in the LG of M. rosenbergii.

Similar patterns of PDH immunoreactive nerve tracts were presented in all three species. The neurons surrounded the ME send their processes into the ME; the neurons in the region between MI and MT send their processes to the ME, MI, MT and sinus gland (SG); the neurons around the MT have their processes go into the MT as well as the neurons in the LG send their process to the LG; the MT also recieves PDH fibers from optic nerves.

By application of rabbit anti- α and β -PDH antisera on alternated thin sections. It is confirmed that α and β -PDH immunoreactivity was presented in the same neurons in the region between MI and MT, LG, and MT. There is no β -PDH immunoreactivity in all α -PDH positive neurons in the region surrounded the ME among the three species and some α -PDH positive neurons in the MT of P. monodon. In contrast, there is no α -PDH immunoreactivity in some β -PDH positive neurons in the LG of M. rosenbergii.