

๒๒๗.๕๔๘

๙๒๒๒๐

๖.๖

การตรวจหาตำแหน่งของสารคล้ายแพนกรีเอทิกโพลีเปปไทด์และสารคล้าย FMRFamide ใน
ก้านตาทิ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*

ปริญญาโท

ของ

จันทร์ทิพย์ คงสินรัตน์ชัย

๒๕๓ พ.ศ. ๒๕๔๓

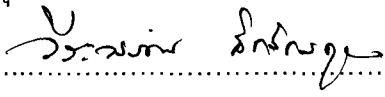
เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ

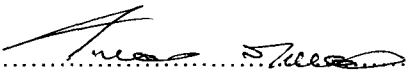
กุมภาพันธ์ ๒๕๔๓

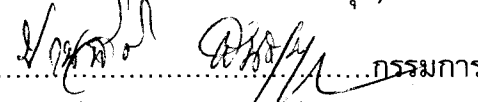
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณะกรรมการควบคุมและคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปริญญาโทฉบับนี้แล้ว
เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอก
เคมีชีวภาพของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

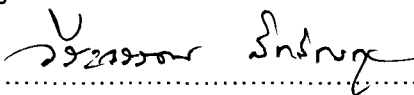
คณะกรรมการควบคุม

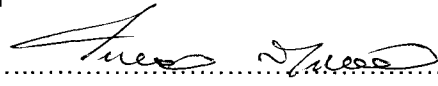
.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วีระวรรณ สิทธิกรกุล)

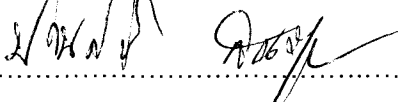
.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล)

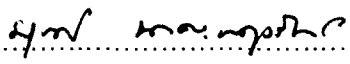
.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปานสิริ พันธุ์สุวรรณ)

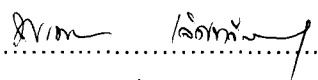
คณะกรรมการสอบ

.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วีระวรรณ สิทธิกรกุล)

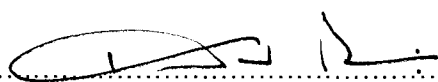
.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปานสิริ พันธุ์สุวรรณ)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ดร. ยุวดี นาคะผดุงรัตน์)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พรพรรณ เลิศทวีสินธุ์)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปริญญาโทฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.เสริมศักดิ์ วิศาลาภรณ์)

วันที่ 29 เดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2543

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือและแนะนำอย่างดีเยี่ยมจาก ผศ.ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล ที่กรุณาเป็นประธานควบคุมการทำปริญญาพนธ์และ รศ.ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล ที่กรุณาให้คำปรึกษาและให้ความดูแลอย่างใกล้ชิดมาตลอด และ รศ.ดร. ปานสิริ พันธุ์สุวรรณ ที่กรุณาให้คำแนะนำเป็นอย่างดี รวมทั้งดร.ยุวดี นาคะผดุงรัตน์ และ ผศ.พรพรรณ เลิศทวีสินธุ์ ที่กรุณาาร่วมเป็นกรรมการสอบ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ Prof. Dr. A.O.W. Stretton, University of Wisconsin-Madison ที่ กรุณาอนุเคราะห์ไฟล์โคลนอลแอนติบอดี PP6 รวมทั้งโมโนโคลนอลแอนติบอดี FM-23, AF1-62 และ AF2-32 สำหรับใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ในระหว่างการศึกษาได้รับทุนสนับสนุนการศึกษาคือ ทุนพัฒนามหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2538 ทุนราชกรีฑาสโมสร ประจำปีการศึกษา 2539 – 2540 ทุนศาสตราจารย์ ดร. ประยงค์ พงษ์ทองเจริญ ประจำปีการศึกษา 2541 และทุนอุดหนุน โครงการวิจัยผ่านคณะกรรมการควบคุมปริญญาพนธ์

ท้ายนี้ขออน้อมรำลึกถึงพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้อง เพื่อน ๆ และทุกท่าน ที่ได้ให้กำลังใจผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา ทั้งนี้ขอขอบคุณผู้ที่ช่วยเหลือทุกท่านที่มีได้กล่าวนาม ในที่นี้ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

จันทร์ทิพย์ คงสินรัตนชัย

สารบัญ

บทที่	หน้า
1. บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	2
ชีววิทยาของกิ้งกูดดำ.....	39
โครงสร้างภายในก้านตาของกิ้งกูดดำ.....	45
หลักการของวิธีอินไดเรคติมูโนเปอรอกซิเดส.....	47
จุดมุ่งหมายของการวิจัย.....	49
ความสำคัญของการวิจัย.....	49
ขอบเขตของการวิจัย.....	49
2. วิธีการวิจัย.....	50
แนวทางดำเนินงานวิจัย.....	50
สัตว์ทดลอง.....	50
อุปกรณ์และสารเคมี.....	50
วิธีดำเนินการทดลอง.....	52
การตรวจหาสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide	52
การเตรียมเนื้อเยื่อ.....	52
กระบวนการย้อมด้วยเทคนิคอินไดเรคติมูโนเปอรอกซิเดส.....	53
การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ PP และแอนติบอดีต่อ FMRFamide.....	55
การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ PP	56
การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ FMRFamide.....	56
การศึกษาการปรากฏร่วมและการปรากฏแยกแยะระหว่างสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide.....	56
การเก็บรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล.....	58
3. ผลการวิจัย.....	62
4. สรุปและอภิปรายผล.....	88

บทที่	หน้า
บรรณานุกรม.....	90
ภาคผนวก.....	101
ภาคผนวก ก.....	102
ภาคผนวก ข.....	105
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	107

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 โครงสร้างของ PP ในตับอ่อนของสัตว์ต่าง ๆ	30
2 หน้าที่ของ PP ในหนูและสุนัข.....	31
3 ตำแหน่งที่พบ PP ในคนและสัตว์ต่าง ๆ.....	32
4 โครงสร้างของสารคล้าย FMRFamide ในสัตว์ต่าง ๆ.....	34
5 ตำแหน่งที่พบสารคล้าย FMRFamide ในสัตว์ต่าง ๆ.....	37
6 ตำแหน่ง จำนวนเซลล์ประสาท และเส้นใยประสาทที่พบสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในบริเวณต่าง ๆ ของก้านตาของกิ้งกูด้า.....	74
7 ขนาดของเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในบริเวณต่าง ๆ ของก้านตาของกิ้งกูด้า.....	75
8 ตำแหน่งและจำนวนเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PP ในบริเวณต่าง ๆ ในก้านตาของกิ้งกูด้าในแต่ละก้านตา.....	103
9 ตำแหน่งและจำนวนเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย FMRFamide ในบริเวณต่าง ๆ ในก้านตาของกิ้งกูด้าในแต่ละก้านตา.....	104

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 โครงสร้างภายนอกโดยทั่วๆ ไปของกิ้งกูดดำ <i>Penaeus monodon</i>	42
2 ลักษณะของกิ้งกูดดำเพศเมีย (บน) และเพศผู้ (ล่าง)	43
3 ภาพจากด้านท้องของกิ้งกูดดำแสดงขาว่ายน้ำ พิเทสมา และทีไลคัม.....	44
4 ภาพวาดแสดงพิเทสมา (ซ้าย) และทีไลคัม (ขวา)	44
5 โครงสร้างภายในก้านตาของกิ้งกูดดำ	46
6 แสดงปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีโดยวิธีอินไตเรคติมมูโนเปอร์รอกซิเดส	48
7 ไตอะแกรมการหยดแอนติบอดีในการทดสอบความจำเพาะของ rabbit anti-PP6 antiserum.....	56
8 ไตอะแกรมการหยดแอนติบอดีในการทดสอบความจำเพาะของ mouse anti- FMRFamide monoclonal antibodies.....	57
9 ไตอะแกรมการหยดแอนติบอดีในการศึกษาการปรากฏร่วมและการปรากฏแยก ระหว่างสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide	58
10 ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อทางมิถุนวิทยา.....	59
11 ขั้นตอนการตรวจหาตำแหน่งของสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ด้วยวิธี อินไตเรคติมมูโนเปอร์รอกซิเดส.....	60
12 ขั้นตอนการตรวจหาการปรากฏร่วมและการปรากฏแยกของสารคล้าย PP และสาร คล้าย FMRFamide โดยวิธีอินไตเรคติมมูโนเปอร์รอกซิเดส.....	61
13 ภาพก้านตาข้างซ้ายของกิ้งกูดดำ บริเวณที่ติดสีน้ำตาลแสดงตำแหน่งเซลล์ประสาท และเส้นใยประสาทที่พบสารคล้าย PP เมื่อใช้ rabbit anti-human PP6 anti-serum อัตราส่วน 1:10,000	67
14 ภาพก้านตาของกิ้งกูดดำ บริเวณที่ติดสีน้ำตาลแสดงตำแหน่งเซลล์ประสาทและเส้น ใยประสาทที่พบสารคล้าย PP เมื่อใช้ rabbit anti-human PP6 antiserum อัตรา ส่วน 1:10,000	69
15 ภาพก้านตาข้างขวาของกิ้งกูดดำ บริเวณที่ติดสีน้ำตาลแสดงตำแหน่งเซลล์ประสาท และเส้นใยประสาทที่พบสารคล้าย FMRFamide เมื่อใช้ mouse anti-FMRFamide monoclonal antibodies อัตราส่วน 1:100	71
16 ภาพก้านตาข้างขวาของกิ้งกูดดำ บริเวณที่ติดสีน้ำตาลแสดงตำแหน่งเซลล์และเส้น ใยประสาทที่พบสารคล้าย FMRFamide เมื่อใช้ mouse anti-FMRFamide antiserum อัตราส่วน 1:100	73

17	ภาพวาดของเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบสารคล้าย PP ในบริเวณต่าง ๆ ของก้านตาข้างซ้ายของกิ้งกูดำ.....	77
18	ภาพวาดของเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบสารคล้าย FMRFamide ในบริเวณต่าง ๆ ของก้านตาข้างซ้ายของกิ้งกูดำ.....	79
19	ภาพการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ PP และแอนติบอดีต่อ FMRFamide ในก้านตาข้างซ้ายของกิ้งกูดำ	81
20	ภาพการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ FMRFamide และแอนติบอดีต่อ PP ในก้านตาข้างซ้ายของกิ้งกูดำ	83
21	ภาพการปรากฏร่วมในก้านตาข้างขวาของกิ้งกูดำ บริเวณที่ติดสีน้ำตาลแสดงตำแหน่งเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide	85
22	ภาพการปรากฏร่วมและการปรากฏแยกของเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาข้างขวาของกิ้งกูดำ	87

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

แพนกรีเอทิกโพลีเปปไทด์ (pancreatic polypeptide, PP) เปปไทด์ไทโรซีน-ไทโรซีน (peptide YY, PYY) และ neuropeptide Y (NPY) เป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มที่เรียกว่า pancreatic polypeptide (PP) family หรือ neuropeptide Y (NPY) superfamily เนื่องจากเปปไทด์ทั้งสามมีโครงสร้างคล้ายคลึงกันคือประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย ที่ปลายคาร์บอกซีหรือปลายซี (C-terminus) มีไทโรซีนเอไมด์ (tyrosine amide) และมีโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) คล้ายกัน (Maule and others. 1995)

จากการศึกษาเกี่ยวกับสายวิวัฒนาการของบรรพบุรุษพบว่าทั้ง PYY และ NPY พบในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำ เป็นไปได้ว่ายีน (gene) ที่ควบคุมการสร้างเปปไทด์ทั้งสองอาจจะเกิดจากการจำลอง (duplication) มาจากยีนของบรรพบุรุษเดียวกันในช่วงต้นของสัตว์มีกระดูกสันหลัง มีข้อเสนอแนะว่ายีนของ PP อาจจำลองมาจากยีนของ PYY ตอนที่จะมีการเกิดสัตว์กลุ่มครึ่งบกครึ่งน้ำ (Larhammar, Blomquist and Soderberg. 1993)

แพนกรีเอทิกโพลีเปปไทด์ หรือ PP สร้างจากเซลล์ที่เรียกว่าเซลล์ที่มี PP (PP cell) หรือเซลล์เอฟ (F cell) ในไอส์เลตส์ออฟแลงเกอฮานส์ (islets of Langerhans) ที่ตับอ่อน พบเซลล์ที่มี PP อยู่ที่บริเวณขอบ ๆ ของไอส์เลตส์ (Norris. 1997) PP พบครั้งแรกในตับอ่อนของไก่ (Kimmel and others. 1968) หลังจากนั้นได้มีการทำให้บริสุทธิ์จากตับอ่อนของสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ เช่น ไก่ (Kimmel, Hayden and Pollock. 1975) กระต่าย (Marks and others. 1993) หนู (Kimmel and others. 1984) PP มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 4,200 ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย ฤทธิ์ทางชีวภาพของ PP ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ในคนพบว่าถ้าได้รับอาหารที่มีโปรตีนสูงจะตรวจพบ PP ในเลือดเพิ่มสูงขึ้น การคัดหลั่งของ PP จะถูกยับยั้งได้โดยโซมาโตสแตติน (somatostatin) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่สร้างจากไอส์เลตส์เช่นกัน ส่วนฤทธิ์ของ PP ในสัตว์พวกอื่นมีแนวโน้มว่าจะไปยับยั้งการคัดหลั่งของอินซูลิน (insulin) ส่วนในนก PP อาจมีฤทธิ์เป็นตัวกระตุ้นการคัดหลั่งของกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) และเปปซิน (pepsin) จากกระเพาะ แต่ไม่ได้รายงานฤทธิ์ของ PP นี้ในคน ความเข้มข้นของ PP ในคนจะสูงขึ้นตามกับอายุ (Bolander. 1994; Norris. 1997)

FMRFamide พบครั้งแรกจากปมประสาทของหอยสองฝา เมื่อทำให้บริสุทธิ์พบว่ามีโครงสร้างเป็น tetrapeptide ประกอบด้วยกรดอะมิโนคือ Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ หน้าที่ที่เด่นชัดคือกระตุ้นการทำงานของหัวใจ กระตุ้นการหดตัวและคลายตัวของกล้ามเนื้อลาย และมีผลต่อ

การทำงานของระบบหมุนเวียนโลหิตและระบบประสาท (Price and Greenberg. 1977) หลังจากนั้นมีการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide ในสมองของสัตว์มีกระดูกสันหลังจนถึงสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิดเช่น วัว (Yang and others. 1985) หนู (Majane and others. 1989) ไก่ (Dockray and others. 1983) แมลงสาบ (Veenstra and Lambrou. 1995) กุ้งก้ามกราม (วีระวรรณและคณะ. 2538; Sithigorngul and others. 1998) และไฮดรา (Grimmelli-khuijzen and others. 1982)

สารคล้าย FMRFamide มีโครงสร้างหลายรูปแบบ และแต่ละรูปแบบมีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกัน ส่วนใหญ่พบสารคล้าย FMRFamide มีการเรียงลำดับกรดอะมิโน 4 หน่วยทางด้านปลายคาร์บอกซีดังนี้ Phe-X-Arg-Phe-NH₂ โดยที่ X อาจเป็น Met, Leu หรือ Ile ก็ได้ (Krajniak and Price. 1990) น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 596 - 2,175 ดาลตัน (Johnston and others. 1996; Sithigorngul and Stretton. 1995)

จะเห็นว่าสารคล้าย PP โดยมากพบในสัตว์มีกระดูกสันหลังและสารคล้าย FMRFamide พบในสัตว์มีกระดูกสันหลังจนถึงสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จึงเป็นจุดสนใจที่จะศึกษาสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังควบคู่ไปเนื่องจากการพบและการปรากฏร่วมของสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในปมประสาทส่วนอกและส่วนท้องของตั๊กแตน *Schistocerca gregaria* (Swales and Evans. 1995) กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย สามารถส่งออกและทำรายได้ให้แก่ประเทศเป็นจำนวนมาก ในปี 2538 ได้มีรายงานว่าประเทศไทยส่งออกกุ้งกุลาดำมากเป็นอันดับหนึ่งของโลกมีปริมาณถึง 168,946 เมตริกตัน มูลค่าประมาณ 49,827.52 ล้านบาท (คมสัน ลีลาคหกิจ. 2539) จึงเป็นมูลเหตุที่น่าสนใจที่จะศึกษาดำเนินงานที่พบสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในกุ้งกุลาดำ เนื่องจากเปปไทด์ทั้งสองมีลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลายคาร์บอกซีคล้ายกันคือ -RYamide และ -RFamide ซึ่งอาจมีปฏิกิริยาข้ามกัน (cross reactivity) ระหว่างแอนติบอดีทั้งสองชนิดได้ ดังนั้นเมื่อทราบถึงตำแหน่งที่พบ แหล่งที่ผลิต แหล่งเก็บสะสมแล้ว จะทำให้สามารถศึกษาถึงการทำให้บริสุทธิ์ การหามวลโมเลกุล การหาลำดับกรดอะมิโนและศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในกุ้งกุลาดำและครัสตาเซียนอื่นๆ ต่อไป

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แพนกรีเอทิกโพลีเปปไทด์ (Pancreatic Polypeptide, PP)

โครงสร้างและหน้าที่ของ PP และสารคล้าย PP

ได้มีรายงานการศึกษา PP และสารคล้าย PP ที่เกี่ยวกับการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ การหาน้ำหนักโมเลกุล การตรวจหาลำดับกรดอะมิโน และหน้าที่ในสิ่งมีชีวิตต่างๆ หลายชนิด ตั้งแต่สัตว์มีกระดูกสันหลังจนถึงสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังดังนี้ (ตาราง 1 และ 2)

PP พบครั้งแรกโดยคิมเมลและคณะ (Kimmel, Pollock and Hazelwood. 1968) ในตับอ่อนของไก่ *Gullus domesticus* โดยพบ PP ระหว่างการแยกสกัดอินซูลิน และพบว่าตับอ่อนของไก่มี aPP (avian pancreatic polypeptide) ปริมาณ 4 มิลลิกรัม/100 กรัม น้ำหนักโมเลกุล 4,240 ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย และมีลำดับกรดอะมิโนคือ GPSQPTYPGDDAPVEDLIRFYDNLQQYLNVVTRHRY-NH₂ (Kimmel, Hayden and Pollock. 1975)

ในไฟลัมคอร์ดาคา (Phylum Chordata) ได้มีรายงานการศึกษาสารคล้าย PP ในสิ่งมีชีวิตจำพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Class Mammalia) ดังนี้ ในคน ในปี 1979 พบว่าปริมาณของ PP ในตับอ่อนส่วนหน้ามีค่าเฉลี่ย 119.9 ไมโครกรัม/กรัม ส่วนกลางมีค่าเฉลี่ย 6.5 ไมโครกรัม/กรัม และส่วนหลังมีค่าเฉลี่ย 9.7 ไมโครกรัม/กรัม โดยพบมากที่สุดที่ตับอ่อนส่วนหน้า (Gersell, Gingerich and Greider. 1979) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย และมีลำดับกรดอะมิโนคือ APLEPVYPGDNATPEQWAQYAADLRRYINMLTRPRY-NH₂ มีหน้าที่เร่งการคัดหลั่งเปปซินและกรดไฮโดรคลอริก (Norris. 1997)

ส่วนในหมู ในปี 1994 เซนและคณะ (Chen and others. 1994) พบว่า PP ที่แยกได้จากลำไส้ของหมูมีปริมาณ 3 ไมโครกรัม/กิโลกรัม มีโครงสร้างปฐมภูมิประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุล 4,194 ดาลตัน และมีผลลดการหลั่งอินซูลินในหลอดทดลอง

ในสุนัข ในปี 1979 พบว่าปริมาณของ PP ในตับอ่อนส่วนหน้ามีค่าเฉลี่ย 118.48 ไมโครกรัม/กรัม ส่วนกลางมีค่าเฉลี่ย 18.02 ไมโครกรัม/กรัม และส่วนหลังมีค่าเฉลี่ย 14.02 ไมโครกรัม/กรัม โดยพบมากที่สุดที่ตับอ่อนส่วนหน้า (Gersell, Gingerich and Greider. 1979) และในปี 1997 โอคิตะและคณะ (Okita and others. 1997) พบว่าการหลั่งของ PP ในสุนัขถูกควบคุมโดยระดับน้ำตาลในเลือดและอาหารที่รับประทานเข้าไปโดยมีเส้นประสาททวารกัส-โคลิเนอร์จิก (vagus-cholinergic nerve) เป็นกลไกควบคุมที่สำคัญโดยเฉพาะช่วงการหลั่ง PP ในระยะเซฟาไลคเฟส (cephalic phase)

ในกระต่าย ปี 1993 มาร์คและคณะ (Marks and others. 1993) ได้มีรายงานว่า PP ที่แยกจากตับอ่อนมีลำดับกรดอะมิโนคือ APPEPVYPGDDATPEQMAEYVADLRRYINMLTRPRY-NH₂ และมีน้ำหนักโมเลกุล 4,196 ดาลตัน

ในหนูแรท (rat) ปี 1981 เมอร์ฟีและคณะ (Murphy and others. 1981) พบว่า hPP₁₋₃₆ มีผลลดระดับของอินซูลิน ในปี 1984 คิมเมลและคณะ (Kimmel and others. 1984) พบว่าตับอ่อนหนูแรทมีปริมาณ PP 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และมีลำดับกรดอะมิโนคือ APLEPMYPGDYATHEQRAQYETQLRRYINTLTRPRY-NH₂ ในปี 1993 แมคทิวและคณะ (McTigue, Edward and Rogers. 1993) พบว่า PP มีผลต่อการเพิ่มการหลั่งกรดไฮโดรคลอริกและการเคลื่อนไหวของกระเพาะส่วน แอนทรัม (antrum) ในปี 1993 วาเกอร์-เพจและคณะ (Wager-Page and others. 1993) พบว่า PP เพิ่มความดันภายในลูเมน (lumen) ของลำไส้

เล็กและลำไส้ใหญ่ในหนูแรท ในปี 1995 แมคทิวและคณะ (McTigue and Rogers. 1995) พบว่า PP เพิ่มการหลังกรดไฮโดรคลอริกและเปปซินจากกระเพาะหนูแรท

ในสิ่งมีชีวิตจำพวกสัตว์ปีก (Class Aves) ในปี 1973 แลงสโลว์และคณะ (Langslow and others. 1973) พบว่าตับอ่อนของสัตว์ปีก 7 สปีชีส์มีปริมาณ aPP (avian PP) ดังนี้ ในแม่ไก่มี aPP ปริมาณ 4.60 มิลลิกรัม/100 กรัมของตับอ่อน นกฟิราบบีมี aPP ปริมาณ 0.54 มิลลิกรัม/100 กรัม ห่านมี aPP ปริมาณ 4.23 มิลลิกรัม/100 กรัม เป็ดมี aPP ปริมาณ 5.78 มิลลิกรัม/100 กรัม นกปากเป็ด *Ajoia ajajia* มี aPP ปริมาณ 5.05 มิลลิกรัม/100 กรัม นกเค้าแมว *Bufo virginianus* มี aPP ปริมาณ 2.23 มิลลิกรัม/100 กรัม และนกเหยี่ยวหางแดง *Buteo jamaicensis* มี aPP ปริมาณ 6.28 มิลลิกรัม/100 กรัม ในปี 1974 ลาร์สสันด์และคณะ (Larssons and others. 1974) ได้มีรายงานพบว่าบทบาทของ aPP ในไก่และจัดเป็นฮอร์โมนจากตับอ่อนคือ 1) ไหลเวียนในกระแสโลหิตที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายหลังการทานอาหาร 2) มีอิทธิพลกับกิจกรรมทางด้านชีวภาพ 3) หลังจากเซลล์ต่อมไร้ท่อ 4) เก็บสะสมที่แกรนูลในไซโตพลาสซึม ในปี 1993 มาร์คส์และคณะ (Marks and others. 1993) ได้มีรายงานการทำให้บริสุทธิ์และศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิของ PP ในนกอีกา (Eurasian crows) 5 สปีชีส์คือ *Pica pica Garrulus glandarius Corvus corone Corvus frugilegus Corvus monedula* พบว่าสามารถแยก PP จากตับอ่อนได้ปริมาณต่าง ๆ ดังนี้ ใน *Pica pica* มีปริมาณ 5.6 นาโนโมล/กรัม ใน *Garrulus glandarius* มีปริมาณ 4.1 นาโนโมล/กรัม ใน *Corvus corone* มีปริมาณ 5.8 นาโนโมล/กรัม ใน *Corvus frugilegus* มีปริมาณ 10.9 นาโนโมล/กรัม และใน *Corvus monedula* มีปริมาณ 14.7 นาโนโมล/กรัม เมื่อนำไปหามวลโมเลกุลพบว่า PP จากตับอ่อนของนกทั้ง 5 ชนิดมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย $4,166 \pm 2$ ดาลตัน และประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย มีลำดับกรดอะมิโนคือ APAQPAYPGDDAPVEDLLRFYNDLQQYLVNVTTRPRY-NH₂ เหมือนกัน ในปี 1994 บาร์ตันและคณะ (Barton and others. 1994) พบว่า PP จากตับอ่อนนกนางนวล *Larus argentatus* มีปริมาณ PP ที่แยกสกัดได้ 5 นาโนโมล/กรัม มีน้ำหนักโมเลกุล 4,237 ดาลตัน และประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วยซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนคือ GPVQPTYPGDDAPVEDLVRFYNDLQQYLVNVTTRHRY-NH₂

ในสิ่งมีชีวิตจำพวกสัตว์เลื้อยคลาน (Class Reptilia) ได้มีรายงานการศึกษาในตับอ่อนของสัตว์เลื้อยคลาน 2 สปีชีส์ได้แก่ เต่า *Pseudemys scripta elegans* และจระเข้ *Caiman sclerops* พบว่าตับอ่อนของเต่า *P. elegans* มี aPP ปริมาณ 1.30 มิลลิกรัม/100 กรัม และตับอ่อนของจระเข้ *C. sclerops* มี aPP ปริมาณ 11.40 มิลลิกรัม/100 กรัม (Langslow and others. 1973) ต่อมาปี 1984 ลานซ์และคณะ (Lance and others. 1984) ได้รายงานการศึกษาในตับอ่อนของจระเข้ *Alligator mississippiensis* พบว่ามีปริมาณ PP ที่แยกสกัดได้ 17.2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วยคือ PLQPKYPGDGAPVEDLIQFYNDLQQYLVNVTTRPRF-NH₂

ในสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (Class Amphibia) ปี 1988 พอลลอกและคณะ (Pollock and others. 1988) ได้ศึกษาในตับอ่อนของกบ *Rana catesbeiana* พบว่ามีปริมาณ PP ที่แยกสกัดได้ 21 ไมโครกรัม/กรัม ประกอบด้วยการเรียงตัวของกรดอะมิโน 36 หน่วยคือ APSEPHHPGD QATPDQLAQYYS DLYQYITFITRPRF-NH₂

ในปลากระดูกอ่อน (Class Chondrichthyes) ในปี 1991 คอนลอน บาลาซุบรามานาเนียมและฮาซัน (Conlon, Balasubramaniam and Hazon. 1991) ได้ศึกษาในปลา small-spotted dogfish *Scyliorhinus canicula* พบว่ามีปริมาณ PP ที่แยกสกัดได้ 16 นาโนโมล/กรัม ประกอบด้วยการเรียงตัวของกรดอะมิโน 36 หน่วยคือ TPPKPEDPGEDAPPEELAKYYS AV RHYINLITRQRY-NH₂

การตรวจหาตำแหน่งที่พบสารคล้าย PP

ในการศึกษาสารคล้าย PP ที่เกี่ยวกับการตรวจหาตำแหน่ง (localization) การปรากฏร่วม (co-localization) และการปรากฏแยก (differential localization) ด้วยกระบวนการทางอิมมูโนไซโตเคมีสทรี (immunocytochemistry) หรืออิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี (immunohistochemistry) โดยใช้เทคนิคการย้อมแบบอิมมูโนเพอรอกซิเดส (indirect immunoperoxidase method) วิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (indirect immunofluorescence method) วิธีเพอรอกซิเดสแอนติเพอรอกซิเดส (peroxidase antiperoxidase method, PAP method) เทคนิคอิมมูโนโกลเดเบลลิ่ง (indirect immunogold labelling technique) และเทคนิคอะวิดินไบโอตินคอมเพล็กซ์ (avidin biotin complex, ABC technique) ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ตั้งแต่สัตว์มีกระดูกสันหลังจนถึงสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังดังนี้ (ตาราง 3)

ในสัตว์มีกระดูกสันหลังจำพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้มีการศึกษาตำแหน่งที่พบ PP ในคน ในปี 1979 โดยเกอร์เซลล์ จิงเกอร์ริชและไกรเดอร์ (Gersell, Gingerich and Greider. 1979) ได้นำเอาเนื้อเยื่อตับอ่อนซึ่งแบ่งออกเป็น 4 บริเวณคือ 1) บริเวณปลายสุดของส่วนหัวของตับอ่อนถึงด้านหลังซ้ายของหลอดเลือดแดงเลี้ยงลำไส้ (superior mesenteric artery) 2) บริเวณส่วนหน้าของตับอ่อนและบริเวณรอบท่อน้ำดี 3) บริเวณส่วนกลางของตับอ่อน และ 4) บริเวณส่วนปลายของตับอ่อน มาทำให้คงสภาพด้วย Bouin's fluid เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำพาราฟินเซกชัน ย้อมโดยใช้วิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ ด้วยวิธี unlabeled antibody-enzyme method แอนติบอดีตัวแรกคือ rabbit anti-bPP antiserum ทำ serial dilution ช่วงความเข้มข้นระหว่าง 1:5,000 - 1:500 ช่วงความเข้มข้นที่ใช้คือ 1:500 ทดสอบความจำเพาะ (control) ทำโดยแทนที่แอนติบอดีตัวแรกด้วยซีรัมปกติ หรือบ่มแอนติบอดีตัวแรกด้วย bPP ในปริมาณที่มากเกินไป พบ PP ที่ตับอ่อนคนบริเวณเซลล์เอฟ (F-cell) บางครั้งพบเซลล์เอฟใน ส่วนที่เป็นต่อมมีท่อ (acini) และปรากฏเด่นชัดในต่อมไร้ท่อบริเวณขอบๆ ไอส์เลตส์ออฟแลงเกอฮานส์ พบเซลล์ที่มี PP ในตับอ่อนส่วนหน้า ส่วนกลางและส่วนหลัง โดยพบเซลล์มากที่สุด บริเวณตับอ่อนส่วนหน้า

ในคน ในปี 1983 ทาเทโมโตและคณะ (Tatemoto and others. 1983) ได้ศึกษาถึง ตำแหน่งที่พบเซลล์ที่มี PP ในทางเดินอาหารของคน การทดลองนำเอากระเพาะส่วนต่าง ๆ คือ บริเวณคาร์เดีย (cardia) ฟันดัส (fundus) คอร์ปัส (corpus) ไพลอร์ส (pylorus) ลำไส้เล็กส่วน ดูโอดีนัม (duodenum) เจจูนัม (jejunum) อิลีียม (ileum) ลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอน (colon) ไส้ติ่ง และเรคตัม (rectum) มาทำให้คงสภาพด้วย Bouin's fluid หรือ 4% ฟอรั่มัลดีไฮด์ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำพาราฟินเซกชัน ตัดเซกชันที่ความหนา 5 ไมครอน ย้อมโดยใช้วิธี PAP แอนติบอดีตัวแรกคือ rabbit anti-PP antiserum ทำ serial dilution ช่วงความเข้มข้นระหว่าง 1:6,000 - 1:50 ความเข้มข้นที่ใช้คือ 1:2,000 ทดสอบความ จำเพาะทำโดยแทนที่แอนติบอดีตัวแรกด้วยซีรัมปกติ หรือบ่มแอนติบอดีตัวแรกด้วยเปปไทด์ ชนิดนั้น หรือด้วยโพลีเปปไทด์ (polypeptide) อื่น ๆ จากตับอ่อนหรือทางเดินอาหาร เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ 4 องศาเซลเซียส พบเซลล์ที่มี PP จำนวนน้อยบริเวณโคลอนซึ่งมีลักษณะคล้าย ทรงกระบอกบาง พบมากบริเวณเรคตัมซึ่งเซลล์มีลักษณะคล้ายรูปพลาสติก และไม่พบเซลล์ที่มี PP ที่กระเพาะและลำไส้เล็กบริเวณดูโอดีนัม เจจูนัม อิลีียม และไส้ติ่ง

ในปี 1992 ลูคิเนียสและคณะ (Lukinius and others. 1992) ได้ศึกษา PP ในตับอ่อน คนที่กำลังพัฒนาขณะตั้งครรภ์ที่ได้ทำให้แห้งอย่างถูกต้องตามกฎหมายโดยใช้สารพรอสตา- แกลนดิน (prostaglandin) แล้วนำเนื้อเยื่อตับอ่อนขนาด 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มาทำให้คงสภาพ ใน 4% พาราฟอรั่มัลดีไฮด์/ 0.5% กลูตารัลดีไฮด์ ใน 0.1 โมลาร์ คาโคไคเลทบัฟเฟอร์ (cacodylate buffer) พีเอช 7.2 กับ 0.1 โมลาร์ ซูโครส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศา-เซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างมาตึงน้ำออกด้วยเอทานอล 50% - 90% ที่อุณหภูมิต่ำกว่า -20 องศาเซลเซียส และฝังลงใน Lowicryl K4M ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างมาติด ฉลากด้วยเทคนิคอิมมูโนโกลด์เลเบลลิงแบบการติดฉลากซ้อน (double labelling) โดยใช้ แอนติบอดีตัวแรกคือ rabbit anti-PP antiserum (polyclonal) อัตราส่วน 1:1,000 และ แอนติบอดีตัวที่สองคือ goat anti-rabbit IgG antiserum/G5 หรือ G15 (GAR-G5, GAR-G15) antiserum อัตราส่วน 1:20 สร้างจากสัตว์ต่างชนิดกัน การติดฉลากซ้อนตามกระบวนการทำ 2 ครั้ง การทดลองครั้งที่หนึ่งใช้อนุภาคทองขนาด 5 นาโนเมตร และการทดลองครั้งที่สองใช้ อนุภาคทองขนาด 15 นาโนเมตร นำเซกชันมาบล็อค (block) ด้วยซีรัมปกติ แล้วบ่มด้วย แอนติบอดีตัวแรกตลอดคืน จากนั้นบ่มด้วยแอนติบอดีตัวที่สอง 2 ชั่วโมง เคา์เตอร์สเทน (counterstain) ด้วยยูรานิลอะซิเตท (uranyl acetate) และเลดซิเตรท (lead citrate) ตรวจสอบด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope, EM) ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี โดยบ่มแอนติเจนที่ปริมาณมากเกินไป (10 - 100 ไมโครกรัมของฮอร์โมนที่สังเคราะห์/ มิลลิลิตร) กับแอนติบอดีตัวแรกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าตับอ่อน ของตัวอ่อนคนอายุ 14 สัปดาห์ สามารถสร้างฮอร์โมนได้ทั้งอินซูลิน กลูคากอน โซมาโตสแตติน และ PP โดยเก็บสะสมภายในเซลล์เดียวกันและภายในแกรนูลเดียวกันของเซลล์ต่อมไร้ท่อใน ตับอ่อน แกรนูลจะเป็น polyhormonal granule เมื่ออายุของทารกเพิ่มขึ้น เซลล์ของต่อมไร้ท่อ

เติบโตขึ้น พบเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนชนิดเดียวคือเซลล์ที่มี PP ต่อมาพบเซลล์ที่มีโซมาโตสแตติน ส่วนเซลล์ที่มีอินซูลินและกลูคากอนจะพบตอนหลังจากเกิดแล้ว ดังนั้นจึงเชื่อว่าเซลล์ของต่อมไร้ท่อในตับอ่อนทารกสามารถสังเคราะห์ฮอร์โมนหลักในไอส์เลตส์ออฟแลงเกอฮานส์และเปปไทด์หลายชนิดเก็บสะสมไว้ในแกรนูลเดียวกัน สำหรับทารกอายุ 14 สัปดาห์พบเซลล์ที่มี PP ซึ่งบรรจุด้วยแกรนูลที่มี PP เป็น mature granule กระจายอยู่รอบๆ ไอส์เลตส์ของตับอ่อน แกรนูลมีลักษณะทรงกลมใสและขนาดเท่า ๆ กัน แกรนูลมีขนาดเฉลี่ย 140 ± 60 นาโนเมตร

ในหนู ได้มีรายงานการศึกษา PP ในตัวอ่อนหมูที่กำลังพัฒนาในตั้งครรภ์ วิธีการทดลองทำเช่นเดียวกับในคน พบฮอร์โมนอินซูลิน กลูคากอน โซมาโตสแตติน และ PP ภายในแกรนูลเดียวกันของเซลล์ของต่อมไร้ท่อในตับอ่อนของตัวอ่อนของหมูอายุ 50 - 90 วัน จัดเป็น polyhormonal granule เมื่ออายุของตัวอ่อนเพิ่มขึ้นและเซลล์ของต่อมไร้ท่อเติบโตขึ้นพบว่า polyhormonal granule จะค่อย ๆ หายไปในตัวอ่อนของหมูอายุ 70 วัน (Lukinius and others. 1992) ต่อมาในปี 1994 เซนและคณะ (Chen and others. 1994) ได้ศึกษา PP จากทางเดินอาหารของหมูอายุ 3 เดือน โดยนำบริเวณกระเพาะอาหารส่วนแอนโทรไพโรลิก (antropyloric stomach) ลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม เจจูนัม อีเลียม ลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอน และตับอ่อน มาทำหัตถสภาพใน 10% ฟอร์มาลินบัฟเฟอร์ ทิ้งข้ามคืน ทำพาราฟินเซกชัน แอนติบอดีตัวแรกที่ใช้คือ rabbit anti-synthetic human PP antiserum ที่สังเคราะห์ขึ้น ความเข้มข้นที่เหมาะสม 1:1,800 ทดสอบความจำเพาะโดยวิธีดูดซับโดยบ่มแอนติบอดีตัวแรกด้วย synthetic hPP ที่ปริมาณมากเกินพอ (0.5, 2 และ 10 นาโนโมล hPP/ มิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 - 8 องศาเซลเซียส พบเซลล์ที่มี PP ที่เยื่อบุผิวชั้นมิวโคซา (mucosa) ของกระเพาะอาหารส่วนแอนโทรไพโรลิส เยื่อบุผิวชั้นมิวโคซาของลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอน ลำไส้ส่วนดูโอดีนัม ต่อมบรูเนอร์ (Brunner's gland) ที่ลำไส้เล็ก และตับอ่อนพบ PP มากที่สุด แต่ไม่พบเซลล์ที่มี PP ที่ลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมและอีเลียม

ในสุนัข ในปี 1979 เกอร์เชลล์ จิงเกอร์ริชและไกรเดอร์ (Gersell, Gingerich and Greider. 1979) พบเซลล์ที่มี PP ในตับอ่อนของสุนัข โดยนำเนื้อเยื่อตับอ่อนของสุนัขแบ่งออกเป็น 3 บริเวณคือ 1) บริเวณปลายสุดด้านขวาของพู 2) บริเวณส่วนกลางและ 3) บริเวณส่วนหลังทางด้านซ้ายของพู วิธีการทดลองเช่นเดียวกับในคนในปีเดียวกัน พบเซลล์เอฟที่มี PP อยู่รอบๆ ไอส์เลตส์ในตับอ่อนของสุนัขซึ่งมีมากที่สุดที่บริเวณพูขวาของตับอ่อน

ในกระเจง ปี 1994 เอกังปรีโยโนและคณะ (Agungpriyono and others. 1994) ได้มีรายงานการศึกษาตำแหน่งที่พบ bPP (bovine PP) ในกระเจง Lesser mouse deer *Tragulus javanicus* โดยนำทางเดินอาหารมาทำหัตถสภาพใน Bouin's solution ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์และไซลีน ทำพาราฟินเซกชัน ที่ความหนา 5 ไมครอน ย้อมโดยใช้เทคนิคอะวิตินไบโอตินเปอร์ออกซิเดส โดยนำเซกชันมาบไลอค endogenous peroxidase activity โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 0.3% ในเมทานอล (methanol) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาบไลอคต่อด้วยซีรัมปกติ เป็นเวลา 30 นาที แอนติบอดีตัวแรกคือ rabbit anti-bPP antiserum

อัตราส่วน 1:10,000 บ่มข้ามคืน แอนติบอดีตัวที่สองใช้ biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulin antiserum อัตราส่วน 1:200 เป็นเวลา 30 นาที สารละลายสับสเตรทที่ใช้ประกอบด้วย DAB 0.03% ในทริส-ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer) (W/V) ผสมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทดสอบความจำเพาะโดย 1) แทนที่แอนติบอดีตัวแรกด้วยซีรัมปกติ 2) แทนที่แอนติบอดีตัวแรกด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3) ดูดซับแอนติบอดีด้วยแอนติเจน (< 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในอัตราส่วนของแอนติบอดีที่ใช้) ที่ทางเดินอาหารบริเวณกระเพาะส่วนแอบโอม่าซั่ม (abomasum) พบเซลล์ของ bPP จำนวนมากที่ต่อมในกระเพาะ (gastric gland) ส่วนไพลอร์ส ส่วนลำไส้เล็กพบเซลล์ที่มี PP ที่วิลไล (villi) และที่ร่อง (crypts) ที่บริเวณอิลีเยียมส่วนปลาย ส่วนที่ลำไส้ใหญ่พบที่ซีคั่ม โคลอน และเรคตัม โดยพบมากที่สุดที่โคลอนส่วนขวาง

ในแกะ ปี 1984 คาลิงกาสันและคณะ (Calingasan and others. 1984) ได้รายงานการศึกษาตำแหน่งที่พบ PP ที่เซลล์ของต่อมไร้ท่อในทางเดินอาหาร โดยนำทางเดินอาหารและตับอ่อนของแกะ มาทำให้คงสภาพโดยใช้ Bouin's solution จากนั้นดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์และไซลีน ทำพาราฟินเซกชันที่ความหนา 2 - 4 ไมครอน ย้อมโดยใช้เทคนิค PAP แอนติบอดีตัวแรกที่ใช้คือ rabbit anti-bovine PP antiserum ทดลองความเข้มข้นที่เหมาะสม จาก 1:18,000 - 1:9,000 พบว่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมคือ 1:5,000 แอนติบอดีตัวที่สองใช้คือ unlabeled swine anti-rabbit IgG antiserum อัตราส่วน 1:20 สารที่ใช้คือ DAB จากนั้น เคน์เตอร์สแตนด้วยสี Mayer's hematoxylin พบเซลล์ที่มี PP ที่บริเวณดูโอดินัม เจจุนัม อิลีเยียม ซีคั่ม โคลอน เรคตัม โดยบริเวณลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่จะมีเซลล์ PP ที่มีลักษณะเป็นรูปไข่หรือปิรามิด ส่วนในตับอ่อนเด่นชัดและเป็นจำนวนมากในต่อมไร้ท่อ แต่ในต่อมมีท่อ พบค่อนข้างน้อยและเซลล์อยู่อย่างกระจัดกระจายอยู่ด้านในของท่อในตับอ่อนโดยเซลล์ที่อยู่นอกไอส์เลตส์อาจอยู่เดี่ยวหรืออยู่เป็นกลุ่ม

ในหนูเมาส์ (mouse) ปี 1986 รอมบอทและคณะ (Rombout and others. 1986) ได้ศึกษาตำแหน่งที่พบและการปรากฏร่วมของ PP และ FMRFamide ในตับอ่อนและทางเดินอาหารของหนู โดยนำทางเดินอาหารและตับอ่อนมาทำให้คงสภาพใน Bouin's solution หรือ GPA (กลูตารัลดีไฮด์ 25% กับกรดพิคริกที่อิ่มตัว 75% ผสมด้วยกรดอะซิติก 1%) ทำพาราฟินเซกชันที่ความหนา 2 - 5 ไมครอน ย้อมโดยใช้เทคนิค PAP แอนติบอดีตัวแรกที่ใช้คือ guinea-pig anti-bovine PP antiserum อัตราส่วน 1:2,000 guinea pig anti-porcine PP antiserum อัตราส่วน 1:800 และ guinea pig anti-FMRFamide antiserum อัตราส่วน 1:2,000 แอนติบอดีตัวที่สองที่ใช้คือ peroxidase-labeled goat anti-guinea pig antiserum ทดสอบความจำเพาะโดย 1) แทนที่แอนติบอดีตัวแรกด้วยซีรัมปกติ 2) เว้นขั้นตอนของ PAP-reaction 1 ขั้นตอน 3) ดูดซับแอนติบอดีด้วยแอนติเจน (10 - 20 นาโนโมลในอัตราส่วนของแอนติบอดีที่ใช้) 4) เซกชันที่ทราบว่ามีเปปไทด์ฮอร์โมนอยู่ทดสอบเป็น positive control พบการปรากฏร่วมของ PP และ FMRFamide ในตับอ่อน

ในหนูแรทในปี 1995 ลายาทและคณะ (Elayat and others. 1995) ได้ศึกษาตำแหน่งที่พบ PP ในตับอ่อน โดยนำตับอ่อนมาทำให้คงสภาพใน Bouin's solution ทำพาราฟินเซกชันที่ความหนา 4 ไมครอน ย้อมโดยใช้เทคนิค ABC (avidin-biotin complex technique) แอนติบอดีตัวแรกที่ใช้คือ rabbit anti-human PP antiserum ทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่าง 1:10,000 - 1:100 ซึ่งความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมคือ 1:5,000 แอนติบอดีตัวที่สองใช้คือ biotinylated swine anti-rabbit IgG antiserum อัตราส่วน 1:200 สารที่ให้สีใช้ DAB จากนั้นเคาน์เตอร์สแตนท์ด้วยสี Harris's hematoxylin พบเซลล์ที่มี PP อยู่อย่างกระจุกกระจายในต่อมไทรอยด์ของตับอ่อนซึ่งแบ่งเป็น 4 บริเวณคือตับอ่อนส่วนที่ดูโอดีนัมส่วนล่าง ส่วนที่ดูโอดีนัมส่วนบน ส่วนที่กระเพาะ และส่วนที่ม้าม โดยในตับอ่อนบริเวณดูโอดีนัมส่วนล่าง พบเซลล์ที่มี PP มีเส้นผ่านศูนย์กลางของนิวเคลียสขนาด 6.297 ± 0.14 ไมโครเมตร จำนวน $1,679 \pm 168$ เซลล์ต่อไอส์เลตส์ ส่วนที่บริเวณดูโอดีนัมส่วนบนพบเซลล์ที่มี PP มีเส้นผ่านศูนย์กลางของนิวเคลียสขนาด 6.182 ± 0.10 ไมโครเมตร จำนวน 143 ± 20 เซลล์ต่อไอส์เลตส์ ส่วนที่บริเวณกระเพาะพบเซลล์ที่มี PP มีเส้นผ่านศูนย์กลางของนิวเคลียสขนาด 6.341 ± 0.15 ไมโครเมตร จำนวน 435 ± 32 เซลล์ต่อไอส์เลตส์ และส่วนที่บริเวณม้ามพบเซลล์ที่มี PP มีเส้นผ่านศูนย์กลางของนิวเคลียสขนาด 6.389 ± 0.12 ไมโครเมตร จำนวน 405 ± 30 เซลล์ต่อไอส์เลตส์

ในสัตว์ปีก ในปี 1974 ลาสสันและคณะ (Larsson and others. 1974) ได้รายงานการศึกษาถึงตำแหน่งและลักษณะเซลล์ที่มี PP ในไก่ ในการทดลองได้นำไก่อายุ 6 - 9 สัปดาห์ ฉีดด้วย L-dopa 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จากนั้น 3 ชั่วโมงต่อมาให้นำตับอ่อนมาทำให้คงสภาพด้วย Bouin's solution ทำพาราฟินเซกชัน แอนติบอดีตัวแรกใช้ rabbit anti-aPP antiserum อัตราส่วน 1:20 หรือ 1:5 แอนติบอดีตัวที่สองใช้ FITC-labeled anti-rabbit IgG antiserum ทำ negative control โดยดูดซับแอนติบอดีด้วย 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบเซลล์ที่มี PP จำนวนมากกระจายอยู่ในเยื่อพาราเรโนโคมาของต่อมมีท่อในตับอ่อนไก่ ไม่พบสารฟลูออเรสเซนต์ในตัวอย่างไก่ที่ไม่ให้ L-dopa ในการศึกษาทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ ทำโดยนำตับอ่อนไก่ทำให้คงสภาพด้วยน้ำยา Stefanini's fluid และฝังลงในพลาสติก ตัดเซกชันให้มีขนาดบาง 1 - 2 ไมครอน ดูผลด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบแกรนูลที่มี PP อยู่จำนวนมากในไซโตพลาสซึมของเยื่อพาราเรโนโคมาของต่อมมีท่อในตับอ่อน เซลล์ที่มี PP มีลักษณะหลายเหลี่ยม หรือแหลมหัวแหลมท้าย พบเซลล์ที่มี aPP มากสุดในตับอ่อนไก่หลังจากฟักออกจากไข่ 1 วัน ต่อมาในสัตว์ปีกที่เป็นสัตว์เลี้ยง ในปี 1982 อัลซาลฮีและคณะ (El-Salhy and others. 1982) ได้รายงานการศึกษาถึงตำแหน่งและลักษณะเซลล์ที่มี PP ในสัตว์ปีกที่เป็นสัตว์เลี้ยงอายุ 2 ปี โดยนำเนื้อเยื่อหลอดอาหาร crop proventriculus gizzard ดูโอดีนัม เจจุนัม อิลีเยม โคลอน เรคตัม และซีคัม มาทำให้คงสภาพด้วยสารคงสภาพคือ Bouin's solution หรือฟอร์มาลิน (neutral) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำพาราฟินเซกชันที่ความหนา 5 ไมครอน ย้อมโดยใช้เทคนิค PAP แอนติบอดีตัวแรกที่ใช้คือ rabbit anti-aPP antiserum อัตราส่วน 1:8,000 - 1:2,500 ทดสอบความจำเพาะโดย 1) แทนที่แอนติบอดีตัวแรกด้วยซีรัมปกติ 2) ดูดซับแอนติบอดีด้วยแอนติเจน

(80 - 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในอัตราส่วนของแอนติบอดีที่ใช้) พบเซลล์ที่มี PP มากที่สุดที่บริเวณลำไส้ส่วนเจริญม ร่องลงมาคือที่บริเวณดูโอเดนิม อีเลียม และโคลอน ไม่พบเซลล์ที่มี PP บริเวณหลอดอาหาร crop proventriculus gizzard เรคตัม ซีกัม

ในพวกปลากระดูกแข็ง (Class Osteichthyes) ปี 1986 คาร์ริลโลและคณะ (Carillo and others. 1986) ศึกษาตำแหน่งที่พบ PP ในตับอ่อนของปลากะพงทะเล (sea bass) *Dicentrarchus labrax* โดยนำตับอ่อนมาทำให้คงสภาพใน 2.5% กลูตารัลดีไฮด์ใน 0.2 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 ชั่วโมง เปลี่ยนเนื้อเยื่อไว้ใน 1% ออสเมียมเตตรอกไซด์ (osmium tetroxide) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำพาราฟินเซกชันที่ความหนา 6 ไมครอน ย้อมโดยใช้เทคนิค PAP แอนติบอดีตัวแรกที่ใช้คือ rabbit anti-bovine PP antiserum อัตราส่วน 1:2,000 แอนติบอดีตัวที่สองใช้คือ peroxidase-labeled sheep anti-rabbit Immunoglobulin antiserum อัตราส่วน 1:20 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และสุดท้ายแอนติบอดีตัวที่สามใช้ rabbit peroxidase-anti-peroxidase antiserum อัตราส่วน 1:50 เป็นเวลา 30 นาที ปฏิกริยาเปอร์ออกซิเดสใช้ DAB และ H₂O₂ ทดสอบความจำเพาะทำโดยดูดซับแอนติบอดีด้วยแอนติเจน และใช้เนื้อเยื่อตับอ่อนของหนูทำควบคุมไปด้วย พบเซลล์ที่มี bPP บรรจุด้วยแกรนูลที่มี PP ที่มีความทึบของแสงอิเล็กตรอนต่าง ๆ กันเป็นจำนวนมากกระจายทั่วไปในไซโตพลาสซึมของเซลล์ในต่อมไร้ท่อของตับอ่อน

ส่วนในปี 1986 รอมบอทและคณะ (Rombout and others. 1986) ได้มีการศึกษาดำเนินการที่พบและการปรากฏร่วมของ PP และ FMRamide ในตับอ่อนและทางเดินอาหารของพวกปลากระดูกแข็ง *Barbus conchoniis* โดยนำทางเดินอาหารและตับอ่อนมาทำการทดลองวิธีเดียวกันกับการทดลองในหนูในปีเดียวกัน พบเซลล์ที่มี PP และ FMRamide ปรากฏร่วมกันในเซลล์ของต่อมไร้ท่อในไอส์เลตส์ออฟแลงเกอฮานส์ของตับอ่อน และต่อมาในปีเดียวกัน รอมบอท, โบเอล และทาเวร์น (Rombout, Boel and Taverne. 1986) ได้ศึกษาเพิ่มเติมในปลาชนิดเดียวกัน การทดลองเหมือนเดิม ยกเว้นทำ ultrathin section ย้อมโดยใช้เทคนิค protein A-gold technique ใช้อนุภาคทองขนาด 7 นาโนเมตร (white phosphorus) และอนุภาคทองขนาด 12 นาโนเมตร (sodium ascorbate) ตรวจดูผลด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบแกรนูลที่มี PP ขนาด 174 นาโนเมตร และยังคงศึกษาการใช้สารคงสภาพหลายชนิดเพื่อศึกษาเซลล์ที่มี PP บริเวณลำไส้ ผลการทดลองแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม 1) เห็นโครงสร้างภายในดีมากได้แก่ 0.25% และ 0.5% กลูตารัลดีไฮด์ 0.25% และ 0.5%, อะโครลิน (acrolin) 2% / ฟอรั่มลดีไฮด์ 2% 2) เห็นโครงสร้างภายในดีปานกลางได้แก่ Bouin's solution (modified) และ 3) เห็นโครงสร้างภายในไม่ค่อยดีได้แก่ กลูตารัลดีไฮด์ 0.75% และ 2%, กลูตารัลดีไฮด์ 2%/ ออสเมียมเตตรอกไซด์ 1%/ ฟอรั่มลดีไฮด์ 3%, Karnovsky (กลูตารัลดีไฮด์ 5%)

ในปลากลุ่มเดียวกันนี้ ในปี 1997 ได้มีรายงานการศึกษาถึงตำแหน่งที่พบ PP ในปลากะดุกแข็งพวกปลาตัวแบน turbot *Scophthalmus maximus* โดยนำทางเดินอาหารและทั้งตัว

ของตัวอ่อน (larvae) ช่วงต้นพัฒนาการในระยะต่างๆ มาทำให้คงสภาพใน Zamboni (Bouin's solution ที่ไม่มีกรดอะซิติก) เป็นเวลา 3 - 5 ชั่วโมง ผ่าตัดเอาทางเดินอาหาร ทำพาราฟินเซกชันที่ความหนา 4 ไมครอน ย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสซิน แอนติบอดีตัวแรกใช้ rabbit anti-salmon PP antiserum อัตราส่วน 1:700 และ rabbit anti-bPP antiserum อัตราส่วน 1:500 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส แอนติบอดีตัวที่สองใช้ biotinylated goat-anti rabbit IgG antiserum อัตราส่วน 1:100 เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ต่อจากนั้นบ่มต่อด้วย streptavidin-FITC อัตราส่วน 1:50 เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด ทดสอบความจำเพาะ 1) แทนที่แอนติบอดีตัวแรกด้วยซีรัมปกติ 2) ดูดซับแอนติบอดีด้วยแอนติเจนที่ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัม - 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผลการทดลองพบเซลล์ที่มี bPP (bovine PP) และ sPP (salmon PP) ในตัวอ่อนปลาระยะที่ 3 อายุ 8 - 10 วัน ระยะที่ 4 อายุ 11 -15 วัน และระยะที่ 5 อายุ 17 -20 วัน นอกจากนี้ยังพบเซลล์และเส้นใยประสาทที่มี sPP บริเวณต่อมไร้ท่อในลำไส้เล็กระยะที่ 5 อายุ 24 วัน และระยะที่ 6 อายุ 41 วัน โดยตรวจไม่พบเซลล์ bPP และ sPP ในระยะที่ 1 อายุ 1 - 4 วัน และระยะที่ 2 อายุ 5 - 7 วัน โดยเฉพาะบริเวณกระเพาะของตัวอ่อนปลา *S. maximus* ตรวจไม่พบปฏิกิริยาทางอิมมูโนต่อ bPP และ sPP ในทุกช่วงระยะเวลาของพัฒนาการ (Reinecke and others. 1997)

ในไฟลัมมอลลัสคา (Phylum Mollusca) ปี 1994 เลียงและคณะ (Leung and others. 1994) ได้ศึกษาในสัตว์จำพวกเซฟาโลพอด (Class Cephalopoda) คือปลาหมึกกล้วย (*squid*) *Loligo vulgaris* โดยนำสมอง ปมประสาทรอบๆ หลอดอาหารและปลาหมึกทั้งตัว สำหรับการทำให้ cryostat section นำเนื้อเยื่อมาทำให้คงสภาพใน 4% พาราฟอร์มัลดีไฮด์ (paraformaldehyde (PFA) ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างน้ำยาคงสภาพออกด้วย 5% ซูโครสในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 24 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส ทำ cryostat protection ด้วย 30% ซูโครส (W/V) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แช่แข็งใน Cryo-m-bed ที่ -20 องศาเซลเซียส ตัดเซกชันที่ความหนา 12 ไมครอน นำเซกชันที่ได้ติดบน coverslip ที่เคลือบด้วยเจลาติน จากนั้นนำไปแช่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง บ่มด้วยแอนติบอดีตัวแรกคือ rabbit anti-PP antiserum อัตราส่วนที่ใช้ 1:200 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง จากนั้นนำมาบ่มด้วยแอนติบอดีตัวที่สองคือ FITC-swine anti-rabbit antiserum เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นฉีกหรือเมาส์ (mount) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์/กลีเซอรอล (1:9, V/V) ทดสอบความจำเพาะโดย 1) ไม่ใช้แอนติบอดีตัวแรก 2) แทนที่แอนติบอดีตัวแรกด้วยซีรัมปกติ 3) ดูดซับแอนติบอดีตัวแรกด้วย synthetic bPP, synthetic FMRFamide และ nature helix NPF ความเข้มข้นช่วงระหว่าง 50 - 1,000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร พบเซลล์ที่มี PP ที่สมอง

ในพวกแกสโตรพอด (Class Gastropoda) ปี 1994 เลียงและคณะ (Leung and others. 1994) ศึกษาในหอย garden snail *Helix pomatia*, whelk *Buccinum undatum*,

periwinkle *Littorina littorea* และหอย *Helix aspersa* โดยศึกษาจากสมอง ปมประสาทรอบ ๆ หลอดอาหารและทั้งตัว วิธีการทดลองเช่นเดียวกับในพวกเซฟาโลพอดในปีเดียวกัน ผลการทดลองในหอย *H. pomatia* พบเซลล์ที่มี PP ที่สมอง เท้าและก้านตา ในหอย *whelk B. undatum* และในหอย periwinkle *L. littorea* พบเซลล์ที่มี PP ที่สมองและเท้า ในหอย *H. aspersa* พบเซลล์ที่มี PP ที่สมอง เท้า ก้านตา หลอดอาหาร ลำไส้เล็ก ต่อมน้ำย่อย หัวใจ หลอดเลือด และไต นอกจากนี้ในหอย *H. aspersa* พบเส้นใยประสาททั่วไปตลอดปมประสาทสมอง เส้นประสาทตา บริเวณไขว้ของเส้นประสาทตา ปมประสาทบริเวณรอบ ๆ หลอดอาหาร โดยพบหนาแน่นภายในปมประสาทตามร่างกายและเส้นใยประสาทรอบ ๆ ปมประสาท และตลอดระบบประสาทส่วนปลาย เส้นใยประสาทเล็กๆ ที่ผ่านเข้าไปในกล้ามเนื้อเท้า และพบหนาแน่นบริเวณประสาทลำตัว (nerve trunk)

ในไฟลัมแพลทีเฮลมินธิส (Phylum Platyhelminthes) ในคลาสเซสโทดา (Class Cestoda) ปี 1994 เลียงและคณะ (Leung and others. 1994) ได้ศึกษาในพยาธิตัวตืด *Moniezia expansa* โดยศึกษาจากปมประสาทรอบ ๆ หลอดอาหารและทั้งตัว วิธีการทดลองเช่นเดียวกับในพวกแกสโตรพอดในปีเดียวกัน พบเซลล์ที่มี PP ตลอดบริเวณเนื้อเยื่อประสาท

เปปไทด์ไทโรซีน - ไทโรซีน (Peptide YY, PYY)

โครงสร้างและหน้าที่ของ PYY

PYY พบครั้งแรกในลำไส้หมูโดยทาเทโมโตและคณะในปี 1978 (Tatemoto and Mutt. 1978) ระหว่างการแยกและทำให้บริสุทธิ์ฮอร์โมนซีครีติน (secretin) ต่อมาศึกษาและทำให้บริสุทธิ์ (Tatemoto and Mutt. 1980) พบเป็นเปปไทด์ชนิดใหม่โดยใช้ระบบตัวอักษรเดี่ยวตั้งชื่อเป็นเปปไทด์เท่ากับพี (Peptide, P) มีปลายเอ็นเป็นไทโรซีน (Tyrosine, Y) และปลายซีเป็นไทโรซีนเอไมด์ (Tyrosine, -Y-NH₂) จึงเรียก PYY ซึ่งจากการวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนพบว่า PYY ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย มีปลายเอ็นเป็น -YPAKPEAPG และปลายซีเป็น -RY-NH₂ มีโครงสร้างปฐมภูมิคล้าย PP (Tatemoto. 1982a) และ NPY (neuropeptide Y) (Tatemoto. 1982b) PYY มีฤทธิ์ยับยั้งการคัดหลั่งสารต่างๆ จากตับอ่อน (Tatemoto. 1982a) ยับยั้งการเคลื่อนไหวของลำไส้บริเวณเจจุนัมและโคลอน แต่กระตุ้นการบีบตัวของหลอดเลือด (vasoconstriction) โดยพบเซลล์ที่มี PYY ปรากฏที่ทางเดินอาหารในเซลล์ของต่อมไร้ท่อในเยื่อบุชั้นมิวโคซาของลำไส้ (Lundberg and others. 1982a) จึงจัด PYY เป็นฮอร์โมนในระบบทางเดินอาหาร (Larhammar and others. 1993) การหลั่ง PYY ถูกกระตุ้นโดยสารอาหารจำพวกไขมันในอิลีียมและโคลอน (Adrian and others. 1985) PYY ยังพบเป็นจำนวนมากในต่อมมีท่อของตับอ่อน โดย PYY มีกลไกการหลั่งแบบพาราครายน์ (paracrine mechanism) (Leiter and others. 1987)

ในคน ได้รายงานที่ human PYY จากลำไส้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนคือ YPIKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂

ซึ่ง PYY ในคนแตกต่างจากในหมู 2 ตำแหน่งด้วยกันคือตำแหน่งที่ 3 (อะลานีนแทนที่ไอโซลิวซีน) และตำแหน่งที่ 18 (ซีรีนแทนที่แอสปาราจีน) (Tatemoto and others. 1988)

ในหมู ในปี 1982 ทาเทโมโต (Tatemoto. 1982a) พบว่าโครงสร้างของ PYY จากลำไส้ส่วนบนประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนคือ YPAKPEA PGEDASPEELSRYYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂

ส่วนการศึกษา PYY ในสุนัข ในปี 1986 แพพพิส ดีบัส และเทลเลอร์ (Pappas, Debas and Talor. 1986) พบว่า PYY มีผลยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะ

ในแมว ในปี 1980 ทาเทโมโตและคณะ (Tatemoto and Mutt. 1980) พบว่า PYY ยับยั้งฤทธิ์ของซีรีดินในตับอ่อนของแมว การฉีด porcine PYY 5 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ลดการหลั่งของไบคาร์บอเนตลงประมาณ 30% จากการถูกเหนี่ยวนำโดยซีรีดินที่ให้ในปริมาณ 0.2 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ต่อมาในปี 1982 ลันเบอร์กและคณะ (Lundberg and others. 1982a) พบว่าจากการฉีด porcine PYY เข้าไปในหลอดเลือดแดง (superior mesentery) ปริมาณ 150 พิโคโมล/กิโลกรัม/นาท พบว่ามีผลเพิ่มการบีบตัวของหลอดเลือดแดง ทำให้ความดันหลอดเลือดแดงเพิ่มขึ้น แต่อัตราการเต้นหัวใจลดลง และมีผลยับยั้งการเคลื่อนไหวของลำไส้ส่วนเจจุนัมและโคลอน

ในหนูตะเภา ปี 1980 ทาเทโมโตและคณะ (Tatemoto and Mutt. 1980) พบว่าการฉีด PYY 0.5 - 5 ไมโครกรัม/กิโลกรัม พบว่ามีผลต่อการหดตัวของถุงน้ำดี ในหนูแรท ในปี 1982 ลันเบอร์กและคณะ (Lundberg and others. 1982) พบว่าบริเวณดูโอดีนัมมี PYY ปริมาณน้อยกว่า 12 พิโคโมล/กรัม เจจุนัมมี PYY ปริมาณน้อยกว่า 30 พิโคโมล/กรัม อีเลียมมี PYY ปริมาณ 68 - 378 พิโคโมล/กรัม โคลอนมี PYY ปริมาณ 710 - 1,312 พิโคโมล/กรัม ตับอ่อนมี PYY ปริมาณ 68 - 270 พิโคโมล/กรัม สมอง (whole) มี PYY ปริมาณ 20 พิโคโมล/กรัม และพลาสมามี PYY ปริมาณ < 5 พิโคโมล/กรัม ในปี 1986 มียาชิและคณะ (Miyachi and others. 1986) พบว่าจากบริเวณทางเดินอาหารส่วนดูโอดีนัมไปยังปลายของโคลอนของหนูแรทมีความเข้มข้นของ PYY เพิ่มขึ้น และที่บริเวณโคลอนมีความเข้มข้นของ PYY 298.7 - 449.5 พิโคโมล/กรัม มากกว่าบริเวณดูโอดีนัมถึง 100 - 200 เท่า บริเวณต่อมใต้สมองและตับอ่อนมีความเข้มข้นของ PYY 6.8 - 6.3 พิโคโมล/กรัม ความเข้มข้นของ PYY ที่เยื่อผิวกระเพาะชั้นมิวโคซา มากกว่าเยื่อผิวชั้นกล้ามเนื้อในลำไส้เล็ก โคลอน ซีคัมและเรคตัม ต่อมาปี 1993 วาเกอร์เพจและคณะ (Wager-Page and others. 1993) พบว่า PYY เพิ่มความดันเลือดเฉลี่ย (mean arterial pressure, MAP) และในขณะที่เดียวกันมีผลเพิ่มการเคลื่อนไหวของกระเพาะและลำไส้หนูแรท

การศึกษา PYY ในปลากระดูกแข็ง ปี 1987 คัทฟีลด์ คาร์น และคัทฟีลด์ (Cutfield, Carne and Cutfield. 1987) ได้ศึกษา PYY จากบริเวณ Brockmann bodies ของปลา daddy sculpin *Cottus scorpius* พบว่า PYY ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนคือ YPPQPESPGGNASPEDWAKYHAAVRHYVNLITRQRY-NH₂ ต่อมาในปี 1994

เจนเซนต์และคอนลอน (Jensen and Conlon. 1992) ในปลากลุ่มเดียวกันยังมีการศึกษา PYY จากสมองและกระเพาะของปลา Atlantic cod *Gadus morhua* และปลาเทราท์ *Oncorhynchus mykiss* พบว่า PYY ที่แยกได้จากกระเพาะปลาเทราท์ มีปริมาณ 73 นาโนโมล/กรัม และสมองปลาเทราท์ 100 พิโคโมล/กรัม โครงสร้างปฐมภูมิของ PYY ที่แยกได้จากอวัยวะทั้งสองประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันคือ YPPKPENPGEDAPPEELAKY YTALRHYINLITRQRY-NH₂

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาตำแหน่งที่พบสารคล้าย PYY

ในการศึกษาสารคล้าย PYY ที่เกี่ยวข้องกับการตรวจหาตำแหน่งในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ตั้งแต่สัตว์มีกระดูกสันหลังจนถึงสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังมีดังนี้

ในคน ปี 1982 ลันเบอร์กและคณะ (Lundberg and others. 1982a) ได้ศึกษาดำแหน่งที่พบ PYY ด้วยเทคนิคอินไดเรคติมูโนฟลูออเรสซิน โดยนำตับอ่อนและโคลอนมาล้างด้วย saline ที่เย็นจัดเป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้คงสภาพด้วยสารละลายผสมของ 0.25% พาราเบนโซควิ-โนนและ 5% ฟอรัมาลินในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ 4 องศาเซลเซียส ทำ cryostat section แอนติบอดีตัวแรกใช้ rabbit anti-PYY antiserum อัตราส่วน 1:100 เป็นเวลา 14 - 20 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส แอนติบอดีตัวที่สองใช้ FITC conjugated sheep anti-rabbit IgG antiserum เป็นเวลา 30 นาทีที่ 37 องศาเซลเซียส ทดสอบความจำเพาะทำด้วยวิธีดูดซับโดยนำ PYY antiserum อัตราส่วน 1:100 ดูดซับด้วย PYY, aPP, bPP, neurotensin, gastric inhibitory peptide (GIP) กลูคาγον ที่ 0.25 หรือ 25 นาโนโมลต่อ 200 ไมโครลิตร ของ PYY antiserum อัตราส่วน 1:100 พบเซลล์ที่มี PYY ในตับอ่อนและลำไส้ส่วนโคลอน

ในคน ในปี 1983 ทาเทโมโตและคณะ (Tatemoto and others. 1983) นำเอาเนื้อเยื่อกระเพาะบริเวณคาร์เดีย ฟันดัส และไพลอร์ส และเนื้อเยื่อของลำไส้บริเวณดูโอดีนัม เจจูนัม อิลีเยม โคลอน ไส้ติ่ง และเรคตัม มาทำให้คงสภาพด้วย Bouin's fluid หรือ 4% ฟอรัมัลดีไฮด์ ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำพาราฟินเซกชัน ตัดเซกชันที่ความหนา 5 ไมครอน ย้อมโดยใช้ PAP แอนติบอดีตัวแรก rabbit anti-PYY antiserum พบว่าช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมคือที่ระดับความเข้มข้น 1:2,000 ทดสอบความจำเพาะทำโดยแทนที่แอนติบอดีตัวแรกด้วยซีรัมปกติ หรือบ่มแอนติบอดีตัวแรกด้วยเปปไทด์ชนิดนั้นหรือด้วย gastroentero-pancreatic polypeptide อื่น ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ 4 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบเซลล์ที่มี PYY มีขนาด 150 นาโนเมตร (ช่วงระหว่าง 100 - 300 นาโนเมตร) พบกระจายบริเวณโคลอน อิลีเยม พบมากที่สุดบริเวณ เรคตัม ที่ส่วนลึกของ crypt of Lieberkuhn ซึ่งเป็นส่วนเปิดไปยังลูเมน (lumen) มีลักษณะสูงในอิลีเยม และมีลักษณะฐานเซลล์กว้างที่โคลอน ในเรคตัมมีลักษณะเป็นรูปพลาสติก หรือปิรามิด และไม่พบเซลล์ที่มี PYY ที่กระเพาะและลำไส้เล็กบริเวณดูโอดีนัม เจจูนัม และไส้ติ่ง

ในแมว ปี 1982 ลันเบอร์ก (Lundberg and others. 1982) ใช้เทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสซิน โดยศึกษาบริเวณลำไส้เล็ก ตับอ่อน สมอง ปมประสาทซิมพาเทติก ต่อมไทรอยด์ ต่อมหมวกไต ท่อน้ำสเปิร์มของแมวและหนู วิธีการทดลองเช่นเดียวกับทำการทดลองในปีเดียวกันในคน พบเซลล์ที่มี PYY บริเวณอวัยวะและโคลอน

ส่วนในหนูแรทและหนูตะเภา ในปี 1982 ลันเบอร์ก (Lundberg and others. 1982) พบเซลล์ที่มี PYY จำนวนมากบริเวณลำไส้เล็ก โคลอนและเรคตัม พบมากที่สุดบริเวณไอส์เลตส์ออฟแลงเกอฮานส์ในตับอ่อน ไม่พบปฏิกิริยาทางอิมมูโนบริเวณสมอง ปมประสาทซิมพาเทติก ต่อมไทรอยด์ ต่อมหมวกไต ท่อน้ำสเปิร์ม กระเพาะและดูอดินัม ต่อมาในหนูแรทพบว่า PYY กระจายทั่วไปในต่อมมีท่อของตับอ่อนคล้ายกับ PP (Leiter and others. 1987)

ในพวกสัตว์มีปีกที่เป็นสัตว์เลี้ยง ในปี 1982 อัลแซลฮีและคณะ (El-Salhy and others. 1982) ในสัตว์ปีกที่เป็นสัตว์เลี้ยงอายุ 2 ปี พบเซลล์ที่มี PYY บริเวณลำไส้ส่วนดูอดินัม เจอรัม ไม่พบบริเวณเนื้อเยื่อหลอดอาหาร crop proventriculus gizzard ลำไส้ส่วนอวัยวะ โคลอน เรคตัมและซีคัม

นิวโรเปปไทด์ Y (Neuropeptide Y, NPY)

โครงสร้าง หน้าที่ และตำแหน่งที่พบ NPY

NPY พบครั้งแรกในสมองหมู ในปี 1982 โครงสร้างปฐมภูมิของ NPY ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย และพบอีกว่าปลายเอ็นเป็นไทโรซีนและปลายซีเป็นไทโรซีนเอไมด์คล้ายกับ PYY ลำดับกรดอะมิโนคล้าย PYY และ PP และหน้าที่ทางชีววิทยาคือคล้าย PYY ซึ่ง NPY อาจเป็นนิวโรทรานสมิตเตอร์หรือนิวโรฮอโมนที่มีบทบาททางสรีรวิทยาในระบบประสาทส่วนกลาง (Tatemoto, Carlquist and Mutt. 1982b) และพบว่า NPY มีการเรียงลำดับของกรดอะมิโนคือ YPSKPDNPGEDAPAEDLARYSA LRHYINLITRQRY-NH₂ ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนคล้าย porcine PYY 70 % และมีลำดับกรดอะมิโนคล้าย PP 50 % ดังนั้นจึงสรุปว่า NPY PYY และ PP จัดเป็น peptide family กลุ่มใหม่ในกลุ่มเดียวกัน (Tatemoto. 1982c)

ในคนเมื่อปี 1983 จูและคณะ (Gu and others. 1983) พบว่าบริเวณรอบ ๆ หลอดเลือดโคโรนารี (coronary vessel) มี NPY ปริมาณ 19.6 ± 6.2 พิโคโมล/กรัม บริเวณ atrio-ventricular node มี NPY ปริมาณ 22.1 ± 3.7 พิโคโมล/กรัม ส่วนบริเวณอื่น ๆ ของหัวใจมี NPY อยู่ในช่วง 10 - 14 พิโคโมล/กรัม และในปีเดียวกัน ลันเบอร์กและคณะ (Lundberg and others. 1983) พบว่าเนื้อเยื่อบริเวณปมประสาทซิมพาเทติก (S1 sympathetic ganglion) ปมประสาทสตีลเลท (stellate ganglia) หลอดเลือดแดงเลี้ยงสมองส่วนหน้า (anterior cerebral artery) โคโรนารีอาร์เทอร์ หัวใจห้องบนขวา ขั้วปอดมี NPY ปริมาณระหว่าง 24 - 395 พิโคโมล/กรัม ส่วนที่สมองบริเวณต่าง ๆ ของคน มี NPY ปริมาณ 1.4 - 38.1 พิโคโมล/กรัม (Dawbarn, Hunt and Emson. 1984) ต่อมาในปี 1993 ชอว์ และคณะ (Shaw and others.

1993) พบว่าที่ตับอ่อนมีปริมาณ NPY 3.4 นาโนโมล/กรัม น้ำหนักโมเลกุล 4,270 ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย และมีการเรียงลำดับของกรดอะมิโนคือ YPSKPDNPGEDA PAEDMARYYSALRHYNLITRQRY-NH₂

ในปี 1983 ลันเบอร์กและคณะ (Lundberg and others. 1983) พบ NPY จากเนื้อเยื่อบริเวณสมอง coeliac ganglion ปมประสาทสตีลเลท ต่อมหมวกไต หัวใจห้องบนขวา หลอดเลือดแดงเลี้ยงสมองส่วนหน้า ม้าม ดูโอดีนัมของหมู มีปริมาณ NPY ระหว่าง 13 - 922 พิโคโมล/กรัม ส่วนในแมวพบ NPY จากเนื้อเยื่อปมประสาท ต่อมหมวกไต หัวใจ หลอดเลือดแดงเลี้ยงสมองส่วนหน้า ม้าม หลอดเลือดแดงเลี้ยงต่อมน้ำลาย หลอดเลือดแดงเลี้ยงปอด ต่อมน้ำลายใต้ขากรรไกร ขั้วปอด หลอดลม มี NPY ปริมาณระหว่าง 5 - 2,914 พิโคโมล/กรัม ส่วนในหนูตะเภาพบว่าเนื้อเยื่อบริเวณปมประสาทสตีลเลท หัวใจห้องบนขวา ม้าม ท่อนาสเปิร์มมี NPY ปริมาณระหว่าง 126 - 792 พิโคโมล/กรัม ส่วนในหนูแรทได้รายงานว่าสมองหนูมี NPY ปริมาณระหว่าง 27 - 980 พิโคโมล/กรัม (Allen and others. 1983) ในปีเดียวกัน เจิร์นควิสท์และคณะ (Stjernquist and others. 1983) พบว่า NPY มีผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบปากมดลูกของหนูแรทในหลอดทดลอง ต่อมาในปี 1993 วาเกอร์เพจและคณะ (Wager-Page and others. 1993) พบว่า NPY เพิ่มการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัมและลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอนในหนู

ได้มีรายงานการศึกษา NPY ในปลากระดูกอ่อน (Class Chondrichthyes) ในปลา small-spotted dogfish *Scyliorhinus canicula* ในปี 1991 คอนลอน บาลาซุบรามานีเยียมและฮาซัน พบว่าเมื่อฉีด NPY ที่ปริมาณ 0.5 - 4 นาโนโมล เข้าที่ celiac artery พบว่ามีผลเพิ่มความดันหลอดเลือดแดง (Conlon, Balasubramaniam and Hazon. 1991)

ในคลาสไซโคลสโตมาตา (Class Cyclostomata) ในปี 1991 คอนลอนและคณะ (Conlon and others. 1991) ศึกษาเปปไทด์ใน PP family จากลำไส้เล็กของปลาแลมเพรย์ทะเล *Petromyzon marinus* พบว่าเปปไทด์ที่แยกได้มีปริมาณ 26 นาโนโมล/164 กรัม โครงสร้างปฐมภูมิมีปลายซีเป็นไทโรซีนเอไมด์ (-YCO-NH₂) ปลายเอ็นเป็นเมไทโอนีน (M) จึงเรียกชื่อ เปปไทด์นี้ว่า PMY ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย มีลำดับกรดอะมิโนคือ MPPKPDAP SPDASPEELSKYMLAVRQYINLITRQRY-NH₂ น้ำหนักโมเลกุล 4201.4 ดาลตัน

ต่อมาในปลากระดูกแข็ง ปี 1992 เจนเซนและคอนลอน (Jensen and Conlon. 1992) ได้รายงานการศึกษา NPY จากสมองและกระเพาะของปลาแอตแลนติกคอด (Atlantic cod) *Gadus morhua* และปลาเทราท์ (trout) *Oncorhynchus mykiss* พบว่า NPY ที่แยกได้จากสมองปลาแอตแลนติกคอด *G. morhua* มีปริมาณ 4 นาโนโมล/ 250 กรัม โครงสร้างปฐมภูมิประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 หน่วย ลำดับกรดอะมิโนที่แยกได้จากสมองปลา *G. morhua* คือ YPIKPNPGEDAPADE LAKYYSALRHYNLITRQRY-NH₂ สำหรับ NPY ที่แยกได้จากกระเพาะปลา *G. morhua* และสมองปลาเทราท์ *O. mykiss* มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันคือ

YPVKPENPGEDAPTEELAKYYTALRHYINLITRQRY-NH₂ และ NPY ในสมองปลาเทราท์
O. mykiss มีปริมาณ 250 พิโคโมล/77 กรัม

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาตำแหน่งที่พบสารคล้าย NPY

ในการศึกษาสารคล้าย NPY ที่เกี่ยวข้องกับการตรวจหาตำแหน่งในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ตั้งแต่สัตว์มีกระดูกสันหลังจนถึงสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังมีดังนี้

ในคนปี 1983 จูและคณะ (Gu and others. 1983) ได้นำหัวใจส่วนเอเตรียม (atrium) ซ้ายและขวา เวนทริเคิล (ventricle) ซ้ายและขวา sinuatrial (S-A) node, atrioventricular (A-V) nodes, atrial septum และ ventricular septum เนื้อเยื่อรอบ ๆ หลอดเลือดโคโรนารี ทำให้คงสภาพโดยใช้ 0.4% พาราเบนโซควิโนน ทำ cryostat section ตัดเซกชันที่ความหนา 5 ไมครอน ย้อมโดยใช้เทคนิคอินไดเรคติมูโนฟลูออเรสซินและวิธี PAP แอนติบอดีตัวแรกใช้ rabbit anti- porcine NPY antiserum อัตราส่วน 1:600 และ 1:4,000 ทดสอบความจำเพาะโดยบ่มแอนติบอดีตัวแรกบ่มด้วย NPY 1.0 นาโนโมล/มิลลิลิตร พบเซลล์ที่มี NPY ทั่วไปในหัวใจซึ่งหนาแน่นมากที่สุดที่ S-A node และ A-V node ในปีเดียวกัน ฮอร์กเฟลท์และคณะ (Hokfelt and others. 1983) ได้ศึกษา NPY ในเด็กทารก โดยนำเมดัลลาออบลองกาตา (medulla oblongata) ทำให้คงสภาพด้วยสารละลายผสมของ 10% ฟอรัมาลิน หรือ 0.25% พาราเบนโซควิโนนใน 2% ฟอรัมาลินที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นเวลา 4 - 8 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วยสารละลาย 5% ซูโครส ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำ cryostat section ย้อมโดยใช้เทคนิคอินไดเรคติมูโนฟลูออเรสซิน แอนติบอดีตัวแรกใช้ rabbit anti-NPY antiserum อัตราส่วน 1:100 เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แอนติบอดีตัวที่สองใช้ FITC- conjugated sheep-anti-rabbit antiserum การทดสอบความจำเพาะทำโดยแทนที่แอนติบอดีตัวแรกด้วยซีรัมปกติหรือบ่มด้วย NPY 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบเซลล์และเส้นใยประสาทของ NPY ที่ย้อมติดฟลูออเรสซินมากมายในเมดัลลาออบลองกาตาส่งล่าง เซลล์มีขนาด 50 ไมครอน

ในปีเดียวกันลันเบิร์กและคณะ (Lundberg and others. 1983) ได้นำเนื้อเยื่อระบบประสาทและระบบอื่นๆ ของคนที่เสียชีวิตภายใน 36 ชั่วโมง มาทำให้คงสภาพด้วยสารละลายผสมของฟอรัมาลินและพาราเบนโซควิโนน ทำ cryostat section พบเซลล์ที่มี NPY หนาแน่นในระบบประสาทซิมพาเทติก pelvic plexus และมีใยประสาทมากมายบริเวณ traversing sensory neuron และ พบที่หัวใจห้องบนขวาและล่างซ้าย โคโรนารีอาร์เทอร์รี่ และ bronchial ganglia หลอดเลือดแดงเลี้ยงสมองส่วนหน้า หลอดเลือดแดงเลี้ยงต่อมหน้าลาย หลอดเลือดฝอยในท่อไต (ureter) ยูรีทรา (urethra) กระเพาะปัสสาวะ ช่องคลอด (vagina) มดลูก (uterus) รั้งไข่ ต่อมโพรสแตต (prostate gland) และท่อนำสเปิร์ม ยังพบเซลล์ที่มี NPY ในทางเดินอาหารที่กล้ามเนื้อเรียบของหลอดอาหาร กระเพาะ ลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม โคลอนและบริเวณ intestinal ganglionic plexus กระจายรอบ ๆ หลอดเลือด ภายใน lamina propria ของกระเพาะชั้นมิวโคซา และยังพบที่ต่อมไร้ท่อในไฮโปทาลามัสของสัตว์อื่น

ต่อมาในปี 1984 ดอร์บาร์น ฮันท์ และเอ็มสัน (Dawbarn, Hunt and Emson. 1984) นำเนื้อเยื่อสมองของคนที่เสียชีวิตภายใน 36 ชั่วโมง มาทำให้คงสภาพด้วยสารละลาย 4% พอร์มาลินใน 100 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ที่มี 0.34% ไลซีน (w/v) และ 0.055% โซเดียมเพอริออกเตท (sodium periodate, w/v) จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อใส่ใน 30% ซูโครส ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์อย่างน้อยเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำ cryostat section ตัดเซกชันที่ความหนา 20 ไมครอน ย้อมโดยใช้เทคนิค PAP แอนติบอดีตัวแรกใช้ rabbit anti-NPY antiserum อัตราส่วน 1:1,000 ทดสอบความจำเพาะโดยแอนติบอดีตัวแรกบ่มด้วย NPY 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 60 นาทีก่อนใช้ พบเซลล์ที่มีสารคล้าย NPY บริเวณ cortex และสเตรตัม ตัวเซลล์มีขนาด 20 ไมครอน

ในหนู ทำการทดลองเช่นเดียวกับในคน พบเซลล์ที่มีสารคล้าย NPY ที่ต่อมอะดรีนัล ในทางเดินอาหารพบเซลล์ที่มี NPY ในชั้นกล้ามเนื้อของหลอดอาหาร (oesophagus) กระเพาะ และคูโอดีนิม โคลอน พบเซลล์จำนวนมากในปมประสาทและยังพบที่ต่อมไร้ท่อในไฮโปทาลามัส แล่งเกอฮานส์ของตับ ส่วนในแมวและหนูตะเภา ทำการทดลองเช่นเดียวกับในคน พบเซลล์ที่มีสารคล้าย NPY ที่หัวใจห้องบนขวาและห้องล่างซ้าย (Lundberg and others. 1983)

ในปี 1983 อัลเลน และคณะ (Allen and others. 1983) ได้ศึกษาดำแหน่งที่พบ aPP, bPP และ NPY ในสมองหนูแรท พบตัวเซลล์และเส้นใยประสาทมากที่สุดและอยู่ทั่วไปในบริเวณ cortex, limbic และไฮโปทาลามัส และในปีเดียวกัน เจิร์นควิสท์และคณะ (Stjernquist and others. 1983) ได้ศึกษาดำแหน่งของ NPY ในหนูแรท โดยนำเอาท่ออวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมียบริเวณ uterine horn, cervix, fallopian tube และรังไข่แช่ในน้ำยาคงสภาพที่ใช้คือ 4% พอร์มัลดีไฮด์ใน 0.1 โมลาร์ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ทำ cryostat section ที่ความหนา 10 - 20 ไมครอนโดยตัดตามแนวนอน ย้อมโดยใช้เทคนิคอินไดเรคติมูโนฟลูออเรสซิน ทดสอบความจำเพาะด้วยการดูดซับแอนติบอดีด้วย porcine NPY 10 - 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบกลุ่มเส้นใยประสาทที่มีสารคล้าย NPY ทั่วไปใน uterine horn และ cervix, fallopian tube และรังไข่ โดยพบเส้นใยประสาทมากที่สุดบริเวณ cervix

ในพวกปลากระดูกอ่อน ในปี 1988 เจนมิงและฮอล์มเกรน (Bjenming and Holmgren. 1988) ได้รายงานถึงตำแหน่งที่พบสารคล้ายเปปไทด์ NPY ในปลากระเบน 4 สปีชีส์ด้วยกัน ได้แก่ thornback ray *Raja clavata*, painted ray *Raja microcellata*, spotted ray *Raja montagui* และ cockoo ray *Raja naevus* และยังได้ศึกษาในปลากระดูกแข็งคือปลาคาร์พ (carp) *Cyprinus carpio* และปลาแอตแลนติกคอด (Atlantic cod) *Gadus morhua* โดยนำกระเพาะ ลำไส้ เรคตัม มาทำให้คงสภาพโดยแช่ในพาราเบนโซควิโนน ย้อมโดยใช้เทคนิคอินไดเรคติมูโนเปอร์ออกซิเดส แอนติบอดีตัวแรกใช้ rabbit anti-porcine NPY antiserum อัตราส่วน 1:200 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แอนติบอดีตัวที่สองใช้ swine-anti-rabbit IgG antiserum antiserum-FITC อัตราส่วน 1:10 ทดสอบความจำเพาะโดยแอนติบอดีตัวแรกบ่ม

ด้วย synthetic NPY 10 นาโนโมล/มิลลิลิตร พบเซลล์ประสาทของ NPY บริเวณกระเพาะ ลำไส้ และเรคตัม

นอกจากนี้ในปลากระดูกแข็งชนิดอื่นยังได้มีรายงานการศึกษาในสมองปลา Masu salmon *Oncorhynchus masou* ใช้เทคนิคกระบวนการย้อมแบบสเตรปตาวิดินไบโอตินเปอรอกซิเดส แอนติบอดีตัวแรกใช้ rabbit anti-NPY antiserum อัตราส่วนที่ใช้ 1:3,000 และ rabbit anti-FMRFamide antiserum อัตราส่วนที่ใช้ 1:5,000 ทดสอบความจำเพาะด้วยการดูดซับ แอนติบอดีด้วย NPY และ PYY ส่วน anti-FMRFamide antiserum ดูดซับด้วย FMRFamide พบการปรากฏร่วมของสารคล้าย NPY และ FMRFamide ที่เซลล์เดียวกันบริเวณ terminal nerve ganglion (Chiba. 1997a) และมีการศึกษาในสมองปลา Bichir *Polypterus senegalus* ย้อมด้วยเทคนิคสเตรปตาวิดินไบโอตินเปอรอกซิเดสคอมเพล็กซ์ น้ำยาคงสภาพที่ใช้คือ Bouin's solution ที่ไม่มีกรด หรือ 4% พาราฟอร์มัลดีไฮด์ และ 0.5% กลูตารัลดีไฮด์ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เตรียมด้วยน้ำทะเล ทำพาราฟินเซกชัน ตัดเซกชันที่ความหนา 8 หรือ 15 ไมครอน แอนติบอดีตัวแรกใช้ rabbit anti-porcine NPY antiserum อัตราส่วน 1:3,000 และ rabbit anti-FMRFamide antiserum อัตราส่วน 1:3,000 ทดสอบความจำเพาะโดยแอนติบอดีตัวแรกบ่มด้วย synthetic NPY 1.0 นาโนโมล/มิลลิลิตร พบเซลล์ประสาทที่มี NPY หนาแน่นมากที่สุดที่ diencephalon บริเวณ ventral hypothalamus, thalamic nucleus, periventricular preoptic nucleus นอกจากนี้ยังพบบริเวณ pallial zone ของ telencephalon บริเวณ tegmentum ของ mesencephalon และบริเวณ intermedioventralis ของ rhombencephalon พบเส้นใยประสาทที่มี NPY อย่างหนาแน่นใน ventral telencephalon ไฮโปทาลามัส และ ventrolateral area ของ rhombencephalon พบเส้นใยประสาทปริมาณน้อยที่ neural lobe ใน hypophysis (Chiba. 1997b)

ในสัตว์จำพวกครัสเตเชีย (Class Crustacea) ในปี 1996 ฮอนมา ทาคาโน และชิบา (Honma, Takano and Chiba. 1996) พบสารคล้ายเปปไทด์ NPY ในสมองปู *Chiromantes haematocheir* การทดลองนำเอาส่วนหัว-ส่วนอก (cephalo-thorax) และส่วนท้อง (abdomen) แช่ในน้ำยาคงสภาพ Bouin's solution ซึ่งไม่มีกรดอะซิติกและเตรียมด้วยน้ำทะเล ทำพาราฟินเซกชันตัดเซกชันที่ความหนา 10 ไมครอนโดยตัดตามแนวนอน กระบวนการย้อมแบบสเตรปตาวิดินไบโอตินเปอรอกซิเดส นำเซกชันมาบล็อคด้วย 0.5% ไฮโดรเจนเปอรอกไซด์ เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นบล็อคด้วยซีรัมปกติเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แอนติบอดีตัวแรกที่ใช้คือ rabbit anti-synthetic porcine NPY antiserum อัตราส่วนที่ใช้ 1:3,000 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และ anti-FMRFamide antiserum อัตราส่วนที่ใช้ 1:3,000 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แอนติบอดีตัวที่สองใช้ biotinylate goat anti-rabbit IgG antiserum อัตราส่วน 1:50 เป็นเวลา 15 นาที และบ่มต่อด้วย streptavidin-biotin peroxidase complex อัตราส่วน 1:100 เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง สารละลายสับสเตรทที่ใช้ประกอบด้วย DAB (20 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) และ 0.01% ไฮโดรเจนเปอรอก-

ไซต์ในทริสบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทดสอบความจำเพาะโดยการดูดซับ แอนติบอดีด้วยแอนติเจน (1 ไมโครโมล, 10 ไมโครโมล) พบกลุ่มเซลล์ที่มีสารคล้าย NPY ทั่วไปในสมองปู บริเวณ cephalic ganglion และ neuropile และพบเส้นใยประสาทบริเวณ proto-cerebrum, deutocerebrum และ tritocerebrum นอกจากนี้ยังพบ FMRFamide ที่เซลล์เดียวกันกับ NPY เป็นส่วนใหญ่

สารคล้าย FMRFamide

โครงสร้างและหน้าที่ของ FMRFamide และสารคล้าย FMRFamide

ได้มีรายงานการศึกษาสารคล้าย FMRFamide มากมายเกี่ยวกับการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ วิธีการติดตามตรวจสอบ เพื่อศึกษามวลโมเลกุล หรือลำดับกรดอะมิโน และนำสารที่บริสุทธิ์ไปทดสอบทางชีวภาพเพื่อศึกษาถึงหน้าที่ของสารนี้ในสิ่งมีชีวิตทั้งหลายตั้งแต่สัตว์มีกระดูกสันหลังจนถึงสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังดังนี้ (ดังตาราง 4)

ได้มีรายงานการพบ FMRFamide ครั้งแรกในปี 1977 โดยไพร์ชและกรีนเบิร์ก (Price and Greenberg, 1977) จากการแยกสกัดสารนี้จากปมประสาทของหอยสองฝา *Macrocallista nimbosa* พบว่าสารที่แยกได้จัดเป็นนิวโรเปปไทด์ที่มีโครงสร้างเป็น tetrapeptide amide มีลำดับกรดอะมิโนดังนี้ FMRF-NH₂ (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂) และพบว่า FMRFamide ที่ความเข้มข้น 10⁻⁸ โมลาร์ต่อลิตร มีผลกระตุ้นอัตราการเต้นของหัวใจในหอยสองฝาชนิดนี้

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในปี 1985 หยางและคณะ (Yang and others, 1985) ได้ศึกษาสารคล้าย FMRFamide จากสมองของวัวส่วนเมดัลลาออบลองกาตา (medulla oblongata) และสมองส่วนกลาง หลังจากทำให้บริสุทธิ์ นำไปหาลำดับกรดอะมิโนได้ 2 รูปแบบ มีลำดับกรดอะมิโนดังนี้ AGEGLSSPFWSLAAPQRF-NH₂ และ FLFQPQR-NH₂ ส่วนปี 1983 ดอคเคย์และวิลเลียมส์ (Dockray and Williams, 1983) ได้ศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในระบบประสาทของหนู พบว่าในไขสันหลังและไฮโปธาลามัสมีสารคล้าย FMRFamide ในปริมาณสูง ส่วนในซีรีเบลลัมและสเตรตัม (striatum) มีสารคล้าย FMRFamide ในปริมาณที่ต่ำ และในปี 1989 มาเจเน พานูลา และหยาง (Majane, Panula and Yang, 1989) ได้ศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในสมองหนู พบว่าสารคล้าย FMRFamide ที่แยกได้มีโครงสร้างเป็น F-8-F-NH₂ โดยที่บริเวณไขสันหลังแยกได้ 368 เฟมโตโมล/มิลลิกรัม ที่บริเวณไฮโปธาลามัสแยกได้ 202 เฟมโตโมล/มิลลิกรัม และที่บริเวณพอนส์-เมดัลลาแยกได้ 136 เฟมโตโมล/มิลลิกรัม และมีลำดับกรดอะมิโนคือ FLFQPQRF-NH₂

สำหรับสัตว์ในคลาสเอวีส ในปี 1983 ดอคเคย์และคณะ (Dockray and others, 1983) ได้ศึกษาสารคล้าย FMRFamide จากสมองไก่ พบว่าสารที่แยกได้มีลำดับกรดอะมิโนคือ LPLRF-NH₂

ส่วนสัตว์ในไฟลัมอาร์โทรโปดา (Phylum Arthropoda) ได้มีการศึกษาในพวกแมลง (Class Insecta) ในปี 1989 โรบบ์ แพคแมน และอีแวนส์ (Robb, Packman and Evans. 1989) ได้ศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในตั๊กแตน *Schistocerca gregaria* พบว่าสารที่แยกได้มีลำดับกรดอะมิโนคือ PDVDHVFLRF-NH₂ ต่อมาปี 1995 วีนสตราและแลมบริว (Veenstra and Lanbrou. 1995) ได้ศึกษาสารคล้าย FMRFamide จากระบบประสาทบริเวณทางเดินอาหาร ส่วนกลางของแมลงสาบอเมริกัน *Periplaneta americana* พบสารคล้าย FMRFamide มีน้ำหนักโมเลกุลที่ 1,316.03 ดาลตัน และลำดับกรดอะมิโนคือ ANRSPSLRLRF-NH₂

ในสัตว์พวกครัสเตเชีย ในปี 1991 คราจเนียค (Krajniak. 1991) ได้ศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในปูม้า (blue crab) *Callinectes sapidus* ที่บริเวณเยื่อหุ้มหัวใจ พบสารคล้าย FMRFamide ที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุล 1,159 ดาลตัน และมีการเรียงลำดับกรดอะมิโนคือ GYNRSFLRF-NH₂ และเมื่อศึกษาบทบาททางสรีรวิทยา พบว่ามีผลเพิ่มอัตราการเต้นหัวใจ ในปี 1993 ยาสุตะ นายา และนากานิชิ (Yasuda, Naya and Nakanishi. 1993) สามารถแยกสารคล้าย FMRFamide จากก้านตาของปูม้า *Callinectes sapidus* ได้เช่นกัน ซึ่งมีโครงสร้างปฐมภูมิ 2 รูปแบบคือ CP1 มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนคือ pEGRF-NH₂ และ CP2 มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนคือ pELGRF-NH₂

ในกุ้ง ในปี 1987 ทริมเมอร์ โคเบียร์สกีและเครวิทซ์ (Trimmer, Kobierski and Kravitz. 1987) ได้ศึกษาในกุ้งล็อบสเตอร์ *Homarus americanus* ที่บริเวณเยื่อหุ้มหัวใจ พบสารคล้าย FMRFamide มีโครงสร้างเป็น octapeptide amide มีโครงสร้างปฐมภูมิ 2 รูปแบบ ชื่อ FLI3 และมีการเรียงลำดับกรดอะมิโนคือ SDRNFLRF-NH₂ และ FLI4 ซึ่งมีการเรียงลำดับกรดอะมิโนคือ TNRNFLRF-NH₂ ในปี 1991 เมอร์เซียร์ (Mercier. 1991) ได้ศึกษาในกุ้งแคร์ยฟิช *Procamburus crakii* พบสารคล้าย FMRFamide ที่แยกได้จากบริเวณเยื่อหุ้มหัวใจและมีผลเพิ่มความแรงและอัตราการเต้นของหัวใจ ต่อมาในปี 1993 เมอร์เซียร์และคณะ (Mercier and others. 1993) ได้ศึกษาสารคล้าย FMRFamide เพิ่มเติมในกุ้งชนิดเดียวกันและจากอวัยวะบริเวณเดียวกัน พบว่าสารคล้าย FMRFamide ที่แยกได้มีปริมาณ 7-13 พิโคโมล มีโครงสร้างปฐมภูมิ 2 รูปแบบ NF1 มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนคือ NRNFLRF-NH₂ และ NF2 มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนคือ DRNFLRF-NH₂ ส่วนในกุ้งก้ามกราม fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii* ได้มีรายงานการพบสารคล้าย FMRFamide ในก้านตากุ้งกระจายอยู่ในแฟรคชันต่าง ๆ ตั้งแต่แฟรคชันที่ 24 - 41 (จำนวน 13 แฟรคชัน) แฟรคชันที่มีสีเข้มมากที่สุด ได้แก่แฟรคชันที่ 38 คาดว่าสารคล้าย FMRFamide อาจมีหลายรูปแบบในปริมาณต่าง ๆ กัน และแยกอยู่ในแฟรคชันต่าง ๆ กัน (วีระวรรณ สิทธิกรกุลและคณะ) ต่อมาในปี 1998 สิทธิกรกุลและคณะ (Sithigorngul and others. 1998) ได้ศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในก้านตากุ้งก้ามกรามจำนวน 5,000 ก้านตา พบสารคล้าย FMRFamide มีโครงสร้างปฐมภูมิ 5 รูปแบบดังนี้ 1) Mar-FLP มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนคือ DRNFLRF-NH₂ มีน้ำหนักโมเลกุล 965.7 ดาลตัน ปริมาณที่แยกได้ 120 พิโคโมล/ 5,000 ก้านตา 2) Mar-FLP2 มีการเรียงลำดับกรดอะมิโน

คือ ADKNFLRF-NH₂ มีน้ำหนักโมเลกุล 1,009.4 ดาลตัน ปริมาณที่แยกได้ 100 พิโคโมล 3) Mar-FLP3 มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนคือ NYDKNFLRF-NH₂ มีน้ำหนักโมเลกุล 1,215.4 ดาลตัน ปริมาณที่แยกได้ 130 พิโคโมล 4) Mar-FLP4 มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนคือ APALRLRF-NH₂ มีน้ำหนักโมเลกุล 943.00 ดาลตัน ปริมาณที่แยกได้ 180 พิโคโมล 5) Mar-FLP5 มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนคือ DRTPALRLRF-NH₂ มีน้ำหนักโมเลกุล 1,243.00 ดาลตัน ปริมาณที่แยกได้ 280 พิโคโมล

ในสิ่งมีชีวิตในไฟลัมมอลลัสคา สัตว์จำพวกแกสโตรโพดา ปี 1982 ไพรซ์ (Price, 1982) ศึกษาจากปมประสาทของหอยทาก *Helix aspersa* พบว่าสารคล้าย FMRFamide ที่แยกได้มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนคือ ENFIRF-NH₂

ส่วนสัตว์ไฟลัมแอนเนลิดา (Phylum Annelida) พวกโพลีชีตา (Class Polychaeta) ได้มีรายงานในแม่เพรียง *Nereis virens* ในปี 1990 โดยคราเจเนียค และไพรซ์ (Krajniak and Price, 1990) พบสารคล้าย FMRFamide ที่แยกได้มีปริมาณ 100 - 600 เฟมโตโมล/ตัว น้ำหนักโมเลกุล 615.32 ดาลตัน มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนคือ FMRF-NH₂

ในไฟลัมนีมาโทดา (Phylum Nematoda) ในปี 1989 คาวเดน สเตรตตันและเดวิส (Cowden, Stretton and Davis, 1989) ได้ศึกษาสารคล้าย FMRFamide จากระบบประสาทส่วนหัวของหนอนตัวกลม *Ascaris suum* พบสารคล้าย FMRFamide เป็น heptapeptide ชื่อ AF1 มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนคือ KNEFIRF-NH₂ เมื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่ามียับยั้งการเคลื่อนที่ของนีมาโทด นอกจากนี้ในปี 1995 สิทธิกรกุล และสเตรตตัน (Sithigorngul and Stretton, 1995) ได้รายงานการศึกษาเกี่ยวกับการทำให้บริสุทธิ์ ศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิและหาน้ำหนักโมเลกุลของสารคล้าย FMRFamide จากระบบประสาทหนอนตัวกลม *Caenorhabditis elegans* พบสารคล้าย FMRFamide มีโครงสร้างปฐมภูมิ 9 รูปแบบดังนี้ 1) KHEYLRF-NH₂ น้ำหนักโมเลกุล 991.9 ดาลตัน 2) KHEYLRF-NH₂ น้ำหนักโมเลกุล 879.9 ดาลตัน 3) KPSFVRF-NH₂ น้ำหนักโมเลกุล 952.6 ดาลตัน 4) KNEFIRF-NH₂ น้ำหนักโมเลกุล 1,256.2 ดาลตัน 5) RNKFEFIRF-NH₂ น้ำหนักโมเลกุล 1,134.1 ดาลตัน 6) APEASPFIRF-NH₂ น้ำหนักโมเลกุล 2,175.6 ดาลตัน 7) HFYNFSSSRKPNFLRF-NH₂ น้ำหนักโมเลกุล 994.8 ดาลตัน 8) SDNPFLRF-NH₂ น้ำหนักโมเลกุล 1,065.5 ดาลตัน และ 9) AAADPNFLRF-NH₂ น้ำหนักโมเลกุล 1,120.5 ดาลตัน

ส่วนสัตว์ในไฟลัมแพลทีเฮลมินธิส คลาสเซสโทดา ในปี 1993 มอลล์ และคณะ (Maule and others, 1993) ได้ศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในพวกตัวดีด (tapeworm) *Moniezia expansa* ซึ่งเป็นพยาธิตัวดีดจากลำไส้แกะ พบสารคล้าย FMRFamide มีน้ำหนักโมเลกุล 785 ดาลตัน มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนคือ GNFFRF-NH₂

ในคลาสเทอบูลลาเรีย (Class Turbellaria) ได้มีรายงานการศึกษาในพลานาเรีย *Dugesia tigrina* พบสารคล้าย FMRFamide ที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุล 658.7 ดาลตัน มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนคือ GTIRF-NH₂ ในปี 1996 จอห์นสตันและคณะ (Johnston and others,

1996) พบสารคล้าย FMRFamide ในหนอนตัวแบน *Bdelloura candida* ที่แยกได้มีโครงสร้างปฐมภูมิ 2 รูปแบบคือ FaRP1 มีน้ำหนักโมเลกุล 653.8 ดาลตัน มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนคือ GYIRF-NH₂ และ FaRP2 มีน้ำหนักโมเลกุล 596.1 ดาลตัน มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนคือ YIRF-NH₂

ส่วนสัตว์ไฟลัมซีเลนเทอรตา (Phylum Coelenterata) คลาสไฮโดรซัว (Class Hydrozoa) ในปี 1982 กริมเมลิกูจเซน ดอคครีย์และชอทท์ (Grimmelikhuijzen, Dockray and Schot. 1982) ได้ศึกษาจากไฮดรา *Hydra attenuata* ทั้งตัว พบว่าสามารถแยกสารคล้าย FMRFamide ได้ 8 ± 5 พิโคโมล/กรัม ต่อมาปี 1986 กลุ่มผู้ทดลองเดียวกัน (Grimmelikhuijzen, Dockray and Schot. 1986) ได้รายงานการศึกษาสารคล้าย FMRF-amide ในคลาสแอนโทซัว (Class Anthozoa) จากระบบประสาทที่หนวดของดอกไม้ทะเล *Anthopleura elegantissima* พบสารคล้ายที่แยกได้มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนคือ pEGRF-NH₂ และในปี 1993 เวสท์ฟอลล์ และกริมเมลิกูจเซน (Westfall and Grimmelikhuijzen. 1993) พบว่าสารคล้าย FMRFamide จาก *Anthopleura elegantissima* ซึ่งเรียกว่า antho-RFamide มีบทบาทเป็นสารสื่อประสาทในดอกไม้ทะเล

ส่วนในคลาสไซโฟซัว (Class Scyphozoa) ในปี 1992 แอนเดอร์สัน มูสเลอร์และกริมเมลิกูจเซน (Anderson, Moosler and Grimmelikhuijzen. 1992) ได้ศึกษาสารคล้าย FMRFamide ในแมงกะพรุน *Chrysaora hysocella*, *Cyanea capillata* และ *Cyanea lanarckii* พบสารคล้าย FMRFamide ที่แยกได้ปริมาณ 55 นาโนโมล/น้ำหนักตัว

การตรวจหาตำแหน่งที่พบสารคล้าย FMRFamide

ได้มีรายงานการศึกษามากมายเกี่ยวกับการหาตำแหน่งที่พบตัวเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่มีสารคล้าย FMRFamide ในสิ่งมีชีวิตทั้งหลายตั้งแต่สัตว์มีกระดูกสันหลังจนถึงสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังโดยใช้วิธีอิมมูโนฟลูออเรสซิน วิธีอิมมูโนโกลด์เลเบลลิง และวิธี PAP ดังตาราง 5

ในปี 1989 เชน ไช และเชน (Chen, Tsai and Shen. 1989) พบเซลล์ของสารคล้าย FMRFamide ในระบบประสาทส่วนกลาง โดยเฉพาะสมองส่วนหน้าของลิง formosan *Macaca cyclopsis* ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นการหมุนเวียนโลหิต

ในปลากระดูกอ่อนมีการศึกษาคำแหน่งที่พบสารคล้าย FMRFamide ในสมองปลา small-spotted dogfish *Scyliorhinus canicula* การทดลองนำต่อมใต้สมองไปทำให้คงสภาพด้วย Bouin's solution หรือ 4% พาราฟอร์มัลดีไฮด์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ทำพาราฟินเซกชัน ที่ความหนา 5 ไมครอน หรือ cryostat section ที่ความหนา 20 ไมครอน ย้อมโดยใช้เทคนิค อินไดเร็กอิมมูโนฟลูออเรสซิน แอนติบอดีตัวแรกใช้ rabbit anti-FMRFamide antiserum อัตราส่วน 1:400 หรือ 1:800 แอนติบอดีตัวที่สองใช้ FITC- swine anti-rabbit IgG antiserum อัตราส่วน 1:100 ทดสอบความจำเพาะโดยผ่านเลขชั้นตอนของแอนติบอดีไป 1 ชั้นตอน หรือแทนที่

แอนติบอดีตัวแรกด้วยซีรัมปกติ หรือบ่มแอนติบอดีตัวแรกด้วย 10 ไมโครโมล synthetic FMRFamide พบเซลล์และเส้นใยประสาทที่มีของสารคล้าย FMRFamide อยู่อย่างหนาแน่น บริเวณ telencephalon และ diencephalon ส่วน mesencephalon และ caudal brainstem พบเฉพาะเส้นใยประสาท (Vallarino and others. 1991)

สัตว์ในไฟลัมอาร์โทรโปดา คลาสอินเซ็คตา ในปี 1985 เวอร์ฮาร์ทและคณะ (Verheart and others. 1985) พบสารคล้าย FMRFamide และ bPP ในแมลงสาบ *Periplaneta americana* การทดลองนำสมองบริเวณ corpora cardiaca (CC) corpora allata (CA และ suboesophageal ganglia (SOG) ไปทำให้คงสภาพด้วย 10% Bouin's fixative และทำพาราฟินเซกชัน ย้อมโดยใช้วิธี PAP แอนติบอดีตัวแรกใช้ anti-FMRFamide antiserum และ anti-bPP antiserum (bPP₃₁₋₃₆ hexapeptide) แอนติบอดีตัวที่สามใช้ peroxidase-anti-peroxidase complex อัตราส่วน 1:1,000 - 1:2,000 สารละลายสับสเตรทที่ใช้ประกอบด้วย DAB หรือ chloronaphthol และ H₂O₂ ทดสอบความจำเพาะโดยบ่มแอนติบอดีตัวแรกบ่มด้วย ซีรัมปกติ พบเซลล์และเส้นใยประสาทของสารคล้าย bPP และ สารคล้าย FMRFamide ที่บริเวณเดียวกันในสมองบริเวณ CC CA และ SOG กล่าวได้ว่าสารคล้าย bPP และ สารคล้าย FMRFamide อาจมีบทบาทเป็นสารสื่อประสาทหรือนิวโรโมดูเลเตอร์หรือนิวโรฮอร์โมน

ต่อมาในปี 1995 สวาลส์และอีแวนส์ (Swales and Evans. 1995) ได้ศึกษาตำแหน่งที่พบสารคล้าย FMRFamide ในตั๊กแตน *Schistocerca gregaria* การทดลองนำปมประสาทของ ventral nerve cord ไปทำให้คงสภาพด้วย Bouin's solution เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำพาราฟินเซกชัน ที่ความหนา 10 ไมครอน ย้อมโดยใช้ avidin/biotin horseradish peroxidase method และศึกษาการปรากฏร่วมระหว่าง Schisto FLRLamide และ bPP-like immunoreactivity แอนติบอดีตัวแรกใช้ goat anti-Schisto FLRFamide antiserum (PDVDHV antiserum) อัตราส่วน 1:1,000 (ก่อนใช้ดูดซับด้วย 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร BSA 1:100) และ rabbit anti-bPP antiserum อัตราส่วน 1:500 บ่มข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส สารให้สีใช้ DAB ทดสอบความจำเพาะโดยบ่มแอนติบอดีตัวแรก 1 มิลลิลิตรด้วย 10 ไมโครโมล bPP พบเซลล์ที่มี Schisto-FLRLamide ทั่วไปที่ปมประสาทของ ventral nerve cord และบริเวณ suboesophageal ganglia ซึ่งแบ่งเป็น 3 fused neuromere คือ บริเวณที่ 1 เริ่มจาก anterior ไป posterior บริเวณที่ 2 คือ mandibular และบริเวณที่ 3 คือ maxillary neuromere และ labial neuromere เซลล์ที่พบมีขนาด 15 - 35 ไมครอนจากการย้อมด้วยแอนติบอดีของ bPP และพบการปรากฏร่วมระหว่าง Schisto FLRLamide และ bPP-like immunoreactivity ในเซลล์เดียวกันที่ปมประสาทอกและท้อง

ส่วนสัตว์ในคลาสครัสเตเชีย ในปี 1987 แมนเกอร์ริชและคณะ (Mangerich and others. 1987) พบสารคล้าย FMRFamide และสารคล้าย PDH ในก้ามตาของปู shore crab *Carcinus maenas* และกุ้งเครย์ฟิช (cray fish) *Orconectes limosus* การทดลองนำก้ามตามาลอกเปลือกแข็งออก แล้วนำก้ามตาไปทำให้คงสภาพด้วย Bouin's solution ซึ่งไม่มีกรดอะซิติก

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำพาราฟินเซกชัน ที่ความหนา 5 ไมครอน ย้อมโดยใช้วิธี PAP แอนติบอดีตัวแรกใช้ rabbit anti-PDH antiserum อัตราส่วน 1:4,000-1:6,000 หรือ rabbit anti-FMRFamide antiserum อัตราส่วน 1:750 บ่มข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส หรือที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สารให้สีที่ใช้ประกอบด้วย 0.05% DAB เป็นเวลา 3 - 5 นาที ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีโดยบ่ม 1 ไมโครโมล anti-PDH antiserum กับ 10 นาโนโมล PDH ที่สังเคราะห์ หรือ 1 ไมโครโมล anti-FMRFamide antiserum กับ 1.7 นาโนโมล FMRFamide ที่สังเคราะห์ ตลอดคืนที่ 4 องศาเซลเซียสก่อนใช้ พบการปรากฏร่วมของ PDH และ FMRFamide ในก้านตาของ *C. maenas* และ *O. limosus* ผลการทดลองทั่วไปติดคล้ายกันมากแต่ไม่ทั้งหมด บริเวณที่มีปฏิกิริยาทางอิมมูโนต่อ PDH ภายในจะพบว่ามีปฏิกิริยาต่อ FMRFamide ด้วย พบมากที่ระหว่าง medulla interna (MI) และ medulla terminalis (MT) โดยมากเป็นเซลล์เล็ก ๆ และบางเซลล์ที่ใหญ่กว่าพบว่าจะมีปฏิกิริยาต่อทั้ง PDH และ FMRFamide แต่ก็มีบางเซลล์ที่เฉพาะเจาะจงกับ PDH และมีบางเซลล์ที่เฉพาะเจาะจงกับ FMRFamide โดยเฉพาะเซลล์ที่ย้อมติดปฏิกิริยาทางอิมมูโนของ PDH บริเวณ X-organ ของ *C. maenas* ภายในจะพบว่าย้อมติดปฏิกิริยาทางอิมมูโนของ FMRFamide ยังพบปลายแอกซอนที่มี PDH ยื่นเข้าไปใน MT ส่วน FMRFamide ก็ติดเช่นเดียวกันแต่มีจำนวนเส้นใยประสาทน้อยกว่า

ในปี 2537 วีระวรรณ สิทธิกรกุลและคณะ ได้รายงานการศึกษาตำแหน่งที่พบสารคล้าย FMRFamide จากก้านตากุ้งกุลาดำ tiger prawn *Penaeus monodon* โดยตัดก้านตากุ้งที่มีชีวิต ลอกเปลือกแข็งออกและทำให้คงรูปด้วย Bouin's fixative ล้างน้ำและดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อก้านตาด้วยแอลกอฮอล์ จากนั้นฝังก้านตาในพาราพลาสติก ตัดเซกชันที่ความหนา 40 ไมครอน ย้อมโดยใช้เทคนิคอินไดเรคอิมมูโนเปอร์ออกซิเดส การทดลองนำเซกชันที่ได้มาละลายพาราพลาสติกออกด้วยไซลีน ผ่านแอลกอฮอล์และน้ำ จากนั้นล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะด้วย P_1^+ (10% fetal calf serum in PBS) เป็นเวลา 30 นาที นำไปบ่มด้วยแอนติบอดีตัวแรกคือ rabbit anti-FMRFamide antiserum อัตราส่วน 1:3,000 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำมาล้างด้วย P_1^+ 4 ครั้ง จากนั้นบ่มด้วยแอนติบอดีตัวที่สองใช้ GAR-HRP (peroxidase conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin anti-serum, heavy and light chain) อัตราส่วน 1:1,000 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซกชันมาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ก่อนแช่ในสารละลายสับสเตรทที่ประกอบด้วย 0.03 DAB % และ 0.006% H_2O_2 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ขั้นตอนสุดท้ายเคาน์เตอร์สแตนด์ด้วย 0.05% อีโอซิน ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีโดยการดูดซับแอนติบอดีตัวแรกด้วยแอนติเจน โดยนำแอนติบอดี anti-FMRFamide antiserum อัตราส่วน 1:5,000 ผสมกับ FMRFamide-BSA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร พบเซลล์ที่มีสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาบริเวณ lamina ganglionaris (LG) รอบ medulla externa (ME) ระหว่าง MI และ MT ตัวเซลล์กระจายอยู่เป็นกลุ่ม ๆ และมีปลายแอกซอนส่งไปยังบริเวณต่าง ๆ คือ ME MI MT และ sinus gland (SG) และเส้นประสาทตา ต่อมาในปี 2538 วีระวรรณ สิทธิกรกุลและคณะ ได้รายงานการศึกษาตำแหน่งที่

พบสารคล้าย FMRFamide ในกึ่งก้ามกราม fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii* ย้อมโดยใช้วิธีอินไดเรคติมมูโนเปอรอกซิเดส และทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัม การทดลองทำวิธีเดียวกันคือแอนติบอดีตัวแรกใช้ anti-FMRFamide antiserum อัตราส่วน 1:3,000 แอนติบอดีตัวที่สองใช้ GAR-HRP อัตราส่วน 1:1,000 พบเซลล์และเส้นใยประสาทของสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาบริเวณต่าง ๆ ของกึ่งก้ามกราม *M. rosenbergii* คือที่ LG รอบ ME ระหว่าง MI และ MT และ MT และยังพบที่เส้นใยประสาทบริเวณ ME MI MT ต่อมไชนัส และเส้นประสาทตา

ในปี 1996 ฮาร์ซชและดาวีร์ส (Harzsch and Dawirs. 1996) ได้ศึกษาตำแหน่งที่พบสารคล้าย FMRFamide ในสมองและ ventral nerve cord ของปู spider crab *Hyas araneus* ในระยะตัวอ่อน (larva) (อายุ 11 - 29 วัน) นำตัวอ่อนทั้งตัวทำให้คงสภาพด้วย 4% พาราฟอร์มัลดีไฮด์ ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส (บริเวณ optic lobe และ abdominal ganglia เล็กจนไม่สามารถตัดมาศึกษาได้) ย้อมโดยใช้วิธี PAP แอนติบอดีตัวแรกใช้ rabbit anti-FMRFamide antiserum อัตราส่วน 1:1,000 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส แอนติบอดีตัวที่สองใช้ goat anti-rabbit antiserum อัตราส่วน 1:50 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่ 21 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาบ่มต่อด้วย PAP antibody complex อัตราส่วน 1:500 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่ 21 องศาเซลเซียส สารละลายสับสเตรทที่ใช้ประกอบด้วย 0.013% DAB ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โคบอลท์คลอไรด์ (cobalt chloride) และนิคเกิลคลอไรด์ (nickel chloride) เป็นเวลา 7 - 9 นาที ทดสอบความจำเพาะโดยบ่มแอนติบอดีตัวแรก ที่ความเข้มข้น 1:1,000 ด้วย 100 มิลลิโมล FMRFamide ที่สังเคราะห์ พบเซลล์ที่มีสารคล้าย FMRFamide กระจายมากอยู่ในระบบประสาท primary neurite และ neuropil ตลอดจนการเจริญในช่วง ระยะ zoea 1 และระยะ zoea 2 คือระยะ zoea 1 พบเซลล์ของสารคล้าย FMRFamide ประมาณ 30 เซลล์ ระยะ zoea 2 ก่อนเมตามอร์โฟซิส (metamorphosis) พบเซลล์ของสารคล้าย FMRFamide จำนวน 60 เซลล์ ส่วนที่ ventral nerve cord (VNC) ซึ่งได้แก่บริเวณ commissural ganglia (CG) esophageal connective (OC) suboesophageal ganglia (SOG) และ thoracic ganglia (TG) พบเส้นใยประสาทมีลักษณะยาวขยายขึ้นในระยะ zoea 2

ในปี 1996 ฮอนมา ทาคาโน และชิบา (Honma, Takano and Chiba. 1996) พบปฏิกิริยาทางอิมมูโนของ FMRFamide ที่สมองปู *Chiromantes haematocheir* บริเวณ protocerebrum และ deutocerebrum ในปี 1992 ลอฟส์สัน (Elofsson. 1992) ได้รายงานการศึกษาตำแหน่งที่พบสารคล้าย FMRFamide ในสมองของ *Hutchinsoniella macracantha* (Cephalocarida) สารคงสภาพใช้ 4% พาราฟอร์มัลดีไฮด์ ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ย้อมโดยใช้วิธี PAP แอนติบอดีตัวแรกใช้ anti-FMRFamide antiserum อัตราส่วน 1:1,000 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส ส่วน peroxidase-anti-peroxidase complex ใช้อัตราส่วน 1:50 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารละลายสับสเตรทที่ใช้ประกอบด้วย DAB 0.03% และ 0.015%

H₂O₂ เป็นเวลา 30 นาที พบเซลล์ของสารคล้าย FMRFamide ประมาณ 160 เซลล์ กระจายอยู่ทั่วไปใน CNS

ส่วนสัตว์ในไฟลัมแอนเนลิดา ในปี 1991 มิรานดา และคณะ (Miranda and others. 1991) พบสารคล้าย FMRFamide และ สารคล้าย NPY จากระบบประสาทของหนอนทะเล *Sabellatarte magnifica* โดยนำเอากล้ามเนื้อส่วนท้อง และบริเวณ ventral nerve cords (VNC) มาทำให้คงสภาพในสารละลายกรดพิริค-พาราฟอร์มัลดีไฮด์ (Zamboni) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส ย้อมโดยใช้เทคนิคอินไดเร็กต์อิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ แอนติบอดีตัวแรกใช้ rabbit anti-FMRFamide antiserum อัตราส่วน 1:250, 1:500 และ 1:1,000 และ porcine anti-NPY antiserum อัตราส่วน 1:1,500 และ 1:1,000 ข้ามคืน จากนั้นบ่มด้วยแอนติบอดีตัวที่สองคือ FITC-goat anti-rabbit IgG antiserum อัตราส่วน 1:50 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทดสอบความจำเพาะโดยใช้แอนติบอดีติดขัดด้วยแอนติเจนคือ anti-FMRFamide antiserum อัตราส่วน 1:250 ติดขัดด้วย 100 ไมโครโมล FMRFamide และ anti-NPY antiserum ติดขัดด้วย 2 ไมโครโมล NPY ที่สังเคราะห์ พบเซลล์ที่มีสารคล้าย FMRFamide และสารคล้าย NPY มีลักษณะยาวในบริเวณระบบประสาทนอกส่วนกลาง โดยทั้งสารคล้าย FMRFamide และสารคล้าย NPY พบเซลล์มีลักษณะยาวปริมาณ 44% และรูปปริมิต 56% ส่วนบริเวณที่พบเส้นใยประสาทของสารคล้าย FMRFamide และสารคล้าย NPY พบที่ระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทนอกส่วนกลาง นอกจากนี้ยังพบที่กล้ามเนื้อตามยาว

ส่วนในคลาสฮิรูดีน (Class Hirudinae) ปี 1989 อีแวนส์และคาราบรีส์ (Evans and Cala-brese. 1989) พบสารคล้าย FMRFamide ในเซลล์ประสาทบริเวณ segmental ganglion และสมองของปลิง *Hirudo medicinalis*

ในคลาสโพลีชีทาคือแม่เพรียง *Nereis virens* ในปี 1990 คราซเนียค และไพรัช (Krajniak and Price. 1990) พบว่าสารคล้าย FMRFamide กระจายอยู่ในปมประสาทส่วน supraesophageal ganglia, subesophageal ganglia และ intersegmental ganglia ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท

ส่วนในไฟลัมนีมาโทดา ในปี 1990 สิทธิกรกุลและคณะ (Sithigorngul and others. 1990) ได้รายงานการศึกษาตำแหน่งที่พบสารคล้าย FMRFamide จากระบบประสาทส่วนหัวของหนอนตัวกลม *Ascaris suum* ที่ได้จากลำไส้เล็กของหมู สารคงสภาพที่ใช้คือ 1% พาราฟอร์มัลดีไฮด์ ทำให้คงสภาพข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส ย้อมโดยใช้วิธีอินไดเร็กต์อิมมูโนเปอรอกซิเดส ป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะด้วย P₁⁺ (10% fetal calf serum และ 1% Triton-X100 ใน P₁; P₁ = 0.05% NP-40 และ 0.1% BSA ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์) นำไปบ่มด้วยแอนติบอดีตัวแรกคือ rabbit anti-FMRFamide antiserum อัตราส่วน 1:5,000 และ anti-NPY antiserum อัตราส่วน 1:2,500 ปริมาณ 50 - 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำมาล้างด้วย P₁⁺ 4 ครั้ง ๆ ละ 20 นาที จากนั้นบ่มด้วยแอนติบอดีตัวที่สองใช้ GAR-HRP อัตราส่วน 1:1,000 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารละลายสับสเตรทที่ใช้ประกอบด้วย 0.03% DAB

และ 0.006% H_2O_2 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เคนันเตอร์สเตนด้วย 0.05% 4-chloronaphthol, 20% methanol และ 0.006% H_2O_2 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซึ่งจะให้สีม่วง-เทา ซึ่งแตกต่างจากสีน้ำตาลแดงของ DAB ทดสอบความจำเพาะโดยใช้แอนติบอดีตัวแรกบ่มด้วย FMRFamide-BSA ปริมาณ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และได้ศึกษาบริเวณฟาริงซ์ (pharynx) และทาง ใช้วิธีการเดียวกันพบเซลล์ที่มี FMRFamide ที่เซลล์ประสาทบริเวณ ventral ganglion และบริเวณฟาริงซ์

ในปี 1993 คาวเดน และคณะ (Cowden and others. 1993) ได้รายงานการศึกษาว่าพบเซลล์และแขนงเส้นใยประสาทที่มีสารคล้าย FMRFamide ที่ระบบประสาทส่วนหัว ทางและระบบประสาทด้านข้างลำตัวของหนอนตัวกลม *Ascaris suum* โดยเซลล์ประสาทเหล่านี้เป็นทั้งเซลล์ประสาทนำเข้า (sensory neuron) เซลล์ประสาทเชื่อมต่อ (interneuron) และเซลล์ประสาทส่งออก (motor neuron) อาจมีบทบาททำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท

ในไฟลัมมอลลัสคา คลาสแกสโตรโพดา ในปี 1995 ทูและครอลล์ (Too and Croll. 1995) ได้ศึกษาตำแหน่งที่มีสารคล้าย FMRFamide ในหอยแครง sea scallop *Placopecten magellanicus* พบสารคล้าย FMRFamide เซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่ปมประสาทซีรีบริม ปมประสาทพีดัล (pedal ganglia) ปมประสาทพาไรโทวิสเซอร์ล (parietovisceral ganglia) และยังพบสารนี้ในเซลล์ที่กระจายทั่วไปในทางเดินอาหารและเหงือก ส่วนที่กล้ามเนื้อยึดกาบ (adductor muscle) หัวใจและอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) พบติดสีจาง

ในสัตว์ไฟลัมแพลทีเฮลมินทิส คลาสเทอบีเลลาเรีย ในปี 1996 จอห์นสตัน และคณะ (Johnston and others. 1996) ได้ศึกษาตำแหน่งที่พบสารคล้าย FMRFamide ในพยาธิตัวแบน *Bdelloura candida* พบสารคล้าย FMRFamide กระจายอยู่ทั่วลำตัวทั้งในระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทนอกส่วนกลาง ได้แก่ สมอ เส้นประสาทตามแนวยาวของสัตว์ (longitudinal nerve cord) เส้นประสาทตามแนวขวางและเส้นประสาทที่เชื่อมตัวด้านข้าง (transverse and lateral commissures) และพบกลุ่มเส้นใยประสาทบริเวณคอหอย (pharyngeal plexus) กลุ่มเส้นใยประสาทใต้กล้ามเนื้อและผิวหนัง (subepidermal and submuscular plexuses) และส่วนต่าง ๆ ของอวัยวะสืบพันธุ์ ซึ่งสารคล้าย FMRFamide อาจทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทหรือนิวโรโมดูเลเตอร์

ในไฟลัมและคลาสเดียวกันนี้ ในปี 1997 อาร์มสตรองและคณะ (Armstrong and others. 1997) ได้รายงานการศึกษาตำแหน่งที่พบสารคล้าย FMRFamide ในพยาธิตัวแบน *Polystoma nearcticum* ย้อมด้วยเทคนิคอินไดเรคติมูโนฟลูออเรสซิน แอนติบอดีตัวแรกคือ guinea pig anti-GYIRFamide antiserum อัตราส่วน 1:400 บ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บ่มด้วยแอนติบอดีตัวที่สองคือ FITC-labeled rabbit anti-guinea pig IgG antiserum แล้วล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ข้ามคืน ทดสอบความจำเพาะทำโดยแทนที่แอนติบอดีด้วยซีรัมปกติ หรือใช้แอนติบอดีตัวแรกบ่มด้วย GYIRFamide ปริมาณ 10 – 1,000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร พบสารคล้าย FMRFamide ในระบบประสาทส่วนกลางบริเวณ cerebral ganglion ที่เส้นใยประสาทที่เชื่อมระหว่าง ganglionic region และเส้น

ประสาทตามยาว ส่วนในระบบประสาทส่วนปลายพบเส้นใยประสาทกระจายทั่วไปตลอดร่างกาย พบร่างแหเส้นใยประสาทมากที่บริเวณปากดูด (oral sucker) และฟาริงซ์

ในฟิล์มซีเลนเทอราดา คลาสไฮโดรซัว ในปี 1982 กริมเมริกูจเซน ดอคเครย์และชอทท์ (Grimmelikhuijzen, Dockray and Schot. 1982) ได้รายงานการศึกษาตำแหน่งที่พบสารคล้าย FMRFamide ในสมองไฮดรา *Hydra attenuata* สารคงสภาพใช้คือ 4% พาราฟอร์มัลดีไฮด์ใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำ cryostat section ที่ความหนา 12 ไมครอน ย้อมโดยใช้เทคนิคอินไดเรคติมูโนฟลูออเรสเซน แอนติบอดีตัวแรกใช้ rabbit anti-FMRFamide antiserum อัตราส่วน 1:250 แอนติบอดีตัวที่สองใช้ FITC-anti-rabbit IgG antiserum หรือ rhodamine-labeled goat anti-rabbit IgG antiserum อัตราส่วน 1:20 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทดสอบความจำเพาะ 1) แทนที่แอนติบอดีตัวแรกด้วยซีรัมปกติ 2) บ่มแอนติบอดีตัวแรกที่มีความเข้มข้น 1:250 ด้วย FMRFamide สังเคราะห์ความเข้มข้น 1, 10 หรือ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบตัวเซลล์และเส้นใยประสาทที่มีสารคล้าย FMRFamide โดยกระจายมากอยู่ที่ชั้นเอกโตเดอรัม (ectoderm) บริเวณ lower peduncle region ใกล้กับบริเวณ basal disk เมื่อตัดผ่านบริเวณ lower peduncle region พบตัวเซลล์ประสาทมีลักษณะคล้ายวงแหวน (ring) ที่ชั้นเอกโตเดอรัมที่หนวด (tentacle) และชั้นเอกโตเดอรัมที่ไฮโปสโตม (hypostome)

ในคลาสไซโฟซัว ในปี 1992 แอนเดอร์สัน, มูสเลอร์และกริมเมริกูจเซน (Anderson, Moosler and Grimmelikhuijzen. 1992) ได้รายงานว่าพบร่างแหประสาท (nerve net) ที่มีสารคล้าย FMRFamide ที่หนวดบริเวณเนื้อเยื่อในชั้น subumbrella ectoderm และ exumbrella ectoderm ของแมงกะพรุน *Chrysaora hysocella*, *Cyanea capillata* และ *Cyanea lanarckii* และพบเซลล์ประสาทจำนวนมากที่ฐานของหนวด ซึ่งสารนี้อาจทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทในแมงกะพรุน

ส่วนคลาสแอนโทซัว ในปี 1993 เวสต์ฟอลล์และกริมเมริกูจเซน (Westfall and Grimmelikhuijzen. 1993) ได้รายงานการศึกษาตำแหน่งที่พบสารคล้าย FMRFamide จากระบบประสาทที่หนวดของดอกไม้ทะเล *Anthopleura elegantissima* เรียก antho-RFamide สารคงสภาพใช้คือ 4% พาราฟอร์มัลดีไฮด์ และ 0.1% กลูตารัลดีไฮด์ ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 1 หรือ 2 ชั่วโมง กระบวนการย้อมใช้ immunogold labelling method แอนติบอดีตัวแรกใช้ rabbit anti-Antho-RFamide antiserum อัตราส่วน 1:500 แอนติบอดีตัวที่สองใช้ GAR-IgG antiserum conjugated 5-, 10-, 15-nm gold particle อัตราส่วน 1:40 ทดสอบความจำเพาะใช้แอนติบอดีตัวแรกด้วยการบ่มด้วยแอนติเจนคือ Antho-RFamide antiserum อัตราส่วน 1:500 บ่มด้วย Antho-RFamide ปริมาณ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ข้ามคืนก่อนใช้ พบเซลล์ที่มี Antho-RFamide ที่ nerve plexus ที่หนวดของดอกไม้ทะเล

ตาราง 1 โครงสร้างของ PP ที่ตับอ่อนของสัตว์ต่าง ๆ

PHYLUM	Amino acid sequence				References	
Class						
Common name						
Scientific name						
CHORDATA						
Mammalia	1	11	21	31		
Rabbit	APPEP	VYPGD	DATPE QMAEY	VADLR RYINM	LTRPRY -NH ₂	Marks and others. 1993
Rat	APLEP	MYPGD	YATHE QRAQY	ETQLR RYINT	LTRPRY -NH ₂	Kimmel and others. 1984
Aves						
Chicken	GPSQP	TYPGD	DAPVE DLIRF	YNDLQ QYLVN	VTRHRY -NH ₂	Kimmel, Hayden and Pollock. 1975
<i>Gullus domesticus</i>						
<i>Eurasian crow</i>						
<i>Pica pica</i>	APAQP	AYPGD	DAPVE DLLRF	YNDLQ QYLVN	VTRPRY -NH ₂	Marks and others. 1993
<i>Garrulus glandarius</i>	APAQP	AYPGD	DAPVE DLLRF	YNDLQ QYLVN	VTRPRY -NH ₂	Marks and others. 1993
<i>Corvus corone</i>	APAQP	AYPGD	DAPVE DLLRF	YNDLQ QYLVN	VTRPRY -NH ₂	Marks and others. 1993
<i>Corvus frugilegus</i>	APAQP	AYPGD	DAPVE DLLRF	YNDLQ QYLVN	VTRPRY -NH ₂	Marks and others. 1993
<i>Corvus monedula</i>	APAQP	AYPGD	DAPVE DLLRF	YNDLQ QYLVN	VTRPRY -NH ₂	Marks and others. 1993
Herring gull	GPVQP	TYPGD	DAPVE DLVRF	YNDLQ QYLVN	VTRHRY NH ₂	Barton and others. 1994
<i>Larus argentatus</i>						
Reptilia						
Alligator	TPLQP	KYPGD	GAPVE DLIQF	YNDLQ QYLVN	VTRPRF -NH ₂	Lance and others. 1984
<i>Alligator mississippiensis</i>						
Amphibia						
Bullfrog	APSEP	HHPGD	QATPD QLAQY	YSDLY QYITF	ITRPRF -NH ₂	Pollock and others. 1988
<i>Rana catesbeiana</i>						
Chondrichthyes						
Small-spotted dogfish	MPPKP	DNPSP	DASPE ELSKY	MLAVR NYINL	ITRQRY -NH ₂	Conlon, Balasubramaniam and Hazon. 1991
<i>Scyliorhinus canicula</i>						

ตาราง 2 หน้าที่ของ PP ในหนูและสุนัข

Animals	Function	References
Dog	- Increase glucose concentration	Okita and others. 1997
Rat	- Inhibit insulin secretion	Murphy and others. 1981
	- Increase hydrochloric acid and pepsin secretion	McTigue and Rogers. 1995
	- Stimulate gastric acid secretion and motility	McTigue, Edwards and Rogers. 1993
	- Increase gastric emptying	Wager-Page and others. 1993a
	- Increase duodenal and colonic intraluminal pressure	and Wager-Page and others. 1993b
	- Decrease mean arterial pressure	McTigue and Rogers. 1995
	- Increase gastric emptying	

ตาราง 3 ตำแหน่งที่พบ PP ในคนและสัตว์ต่าง ๆ

PHYLUM	Localization	References
Class		
Common name		
Scientific name		
CHORDATA		
Mammalia		
Human	- F-cell and periphery of islets of endocrine pancreas - Scatter throughout the ducts and acini	Gersell, Gingerich and Greider. 1979
	- Conlon and rectum	Tatemoto and others. 1983
	- Cell type : flask or cylinder	
	- Colocalization of insulin, glucagon, somatostatin and pancreatic polypeptide in islet of fetal human (polyhormonal granule)	Lukinius and others. 1992
Lesser mouse deer <i>Tragulus javanicus</i>	- Gastrointestinal tract, gastric gland or pyloric gland in the abomasum	Agungpriyono and others. 1994
Sheep	- Endocrine and exocrine of pancreas - Stomach : cardia fundus pylorus - Small intestine : duodenum jejunum - Cell type : pyramid or oval	Calingason and others. 1984
Porcine	- Colocalization of insulin, glucagon, somatostatin and pancreatic polypeptide in islet of fetal porcine (polyhormonal granule) - Antropylic region, Brunner gland of duodenum and pancreas	Lukinius and others. 1992 Chen and others. 1994
Canine	- Right lobe, body and tail of pancreas	Gersell, Gingerich and Greider. 1979
Rat	- Colocalization of PP and glucagon in stomach and endocrine pancreas - Pancreas	Rombout and others. 1986 Elayat and others. 1995
Aves		
Chicken	- Exocrine parenchyma of pancreas - Polygonal or spindle-shaped APP cell - APP cells numerous at hatching	Larsson and others. 1974
Chicken	- PPIR cells in duodenum, jejunum, ileum and Conlon - Basal lamina of gut lumen - Mostly in crepts	EI-Salhy and others. 1982
Osteichthyes		
Sea Bass <i>Dicentrarchus labrax</i>	- Endocrine and exocrine of pancreas	Carrillo and others. 1986
<i>Barbus conchoniuis</i>	- Colocalization of PP-like peptide and glucagon in gut	Rombout and others. 1986
Turbot <i>Scophthalmus maximus</i>	- Small intestine	Reinecke and others. 1997

ตาราง 3 (ต่อ)

PHYLUM	Localization	References
Class		
Common name		
Scientific name		
MOLLUSCA		
Gastropoda		
Garden snail	- Brain, eyestalk and foot	Leung and others. 1994
<i>Helix pomatia</i>		
Garden snail	- Brain, eyestalk, foot, oesophagus, intestine, digestive gland, heart, blood vessel, kidney, common duct, dart sac and albumin gland	Leung and others. 1994
<i>Helix aspersa</i>		
Whelk	- Brain and foot	Leung and others. 1994
<i>Buccinum undatum</i>		
Periwinkle	- Brain and foot	Leung and others. 1994
<i>Littorina littorea</i>		
Cephalopoda		
Squid	- Brain	Leung and others. 1994
<i>Loligo vulgaris</i>		
PLATYHELMINTHES		
Cestoda		
Flatworm	- Neural tissue	Leung and others. 1994
<i>Moniezia expansa</i>		

ตาราง 4 โครงสร้างของสารคล้าย FMRFamide ในสัตว์ต่าง ๆ

PHYLUM	Organ	Amino acid sequence	References
Class			
Common name			
Scientific name			
CHORDATA			
Mammalia			
Cow	Brain	AGEGLSSPFWSLAAPQRF -NH ₂ FLFQPQRF -NH ₂	Yang and others. 1985
Rat	Brain	FLFQPQRF -NH ₂	Majane and others. 1989
Aves			
Chicken	Brain	LPLRF -NH ₂	Dockray and others. 1983
ARTHROPODA			
Insecta			
American cockroach <i>Periplaneta americana</i>	Midgut	ANRSPSLRLRF -NH ₂	Veenstra and Lambrou. 1995
Blowfly <i>Calliphora vomitoria</i>	Thoracic ganglia	TPQQDFMRF -NH ₂ TPSQDFMRF -NH ₂ PSPQDFMRF -NH ₂ KPNQDFMRF -NH ₂ APGQDFMRF -NH ₂ ASGQDFMRF -NH ₂ ASGQDFMRF -NH ₂ AXGQDFMRF -NH ₂ GANDFMRF NH ₂ SVNTKNDFMRF -NH ₂ STPNRDFMRF -NH ₂ APDNFMRF -NH ₂ AAGQDNFMRF -NH ₂ AGQDGMRF -NH ₂	Duve and others. 1992
Locust <i>Schitocerca gregaria</i>	Thoracic nerve cord	PDVDHVFLRF -NH ₂	Robb, Packman and Evans. 1989
Crustacea			
American lobster <i>Homerus americanus</i>	Pericardial organ	SDRNFLRF -NH ₂ TNRNFLRF -NH ₂	Trimmer and others. 1987
Blue crab <i>Callinectes sapidus</i>	Pericardial organ and thoracic ganglia	GYNRSFLRF -NH ₂	Krajniak . 1991
<i>Callinectes sapidus</i>	Eyestalk	PEGRG NH ₂ PELGRF NH ₂	Yasuda and others. 1993

ตาราง 4 (ต่อ)

PHYLUM	Organ	Amino acid sequence	References
Class			
Common name			
Scientific name			
Crustacea			
Giant fresh water prawn <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Eyestalk	DRNFLRF -NH ₂ ADKNFLRF -NH ₂ NYDKNFLRF -NH ₂ APARLRF -NH ₂ DRTPALRLRF -NH ₂	Sithigomgul and others. 1998
Crayfish <i>Procambarus clarkii</i>	Pericardial organ	NRNFLRF -NH ₂ DRNFLRF -NH ₂	Mercier and others. 1993
MOLLUSCA			
Clam <i>Macrocallista nimbosa</i>	Ganglia	FMRF -NH ₂	Price and Greenberg. 1977
Garden snail <i>Helix aspersa</i>	Ganglia	ENFIRF -NH ₂	Price . 1982
ANNELIDA			
Hirudinea			
Leech <i>Hirudo medicinalis</i>	CNS	YMRF -NH ₂ FMRF -NH ₂ YLRF -NH ₂ FLRF -NH ₂ GGKYMRF -NH ₂	Evans and others. 1991
Polychaeta			
<i>Nereis virens</i>	Ganglia	FMRF -NH ₂	Krajniak and others. 1990
NEMATODA			
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Whole	KHEYLRF -NH ₂ KPSFVRF -NH ₂ KNEFIRF -NH ₂ RNKFEFIRF -NH ₂ APEASPFIRF -NH ₂ HFYNFSESERKNPFLRF -NH ₂ SDNPFLRF -NH ₂ SADPNFLRF -NH ₂ AAADPNFLRF -NH ₂	Sithigomgul and others. 1995
<i>Ascaris suum</i>	Head and tail	AVPGVLRF -NH ₂ GDVPGVLRF -NH ₂ SGKPTFIRF -NH ₂ AGPRGIRF -NH ₂ GLGPRPLRF -NH ₂ GFGDEMSMPGVLRF -NH ₂ SDIGISEDNFLRF -NH ₂ GFDEMSMPGVLRF -NH ₂	Cowden and stretton. 1995
<i>Ascaris suum</i>	Head	KNEFIRF -NH ₂	Cowden and others. 1989

ตาราง 4 (ต่อ)

PHYLUM	Organ	Amino acid sequence	References
Class			
Common name			
Scientific name			
PLATYHELMINTHES			
Cestoda			
Flatworm	Whole	GNFFRF -NH ₂	Maule and others. 1993
<i>Moniezia expansa</i>			
Turbellaria			
Marine turbellaria			
<i>Bdelloura candida</i>	Whole	GYIRF -NH ₂ YIRF -NH ₂	Johnston and others. 1996
Planaria	Whole	GTIRF -NH ₂	Johnston and others. 1995
<i>Dugasia tigrina</i>			
COELENTERATA			
Anthozoa			
Sea anemone	Whole	pEGRF -NH ₂	Grimmelikhuijzen and Graft. 1986
<i>Anthopleura elegantissima</i>			

ตาราง 5 ตำแหน่งที่พบสารคล้าย FMRFamide ในสัตว์ต่าง ๆ

PHYLUM	Localization	References
Class		
Common name		
Scientific name		
CHORDATA		
Mammalian		
Formosan monkey <i>Macaca cyclopsis</i>	- Forebrain, CNS	Chen, Tsai and Shen. 1989
Chondrichthyes		
Small-spotted dogfish <i>Scyliorhinus canicula</i>	- Brain	Vallarino and others. 1991
ARTHROPODA		
Insecta		
Locust <i>Schistocerca gregaria</i>	- Colocalization of bPP and Schisto FLRFamide in ventral nerve cord and suboesophageal ganglia	Robb, Packman and Evans. 1989
<i>Schistocerca gregaria</i>	- Ventral nerve cord	Swales and Evans. 1995
American cockroach <i>Periplaneta americana</i>	- Colocalization of bPP and FMRFamide in brain , corpora cardiaca, corpora allata and suboesophageal ganglia	Verheart and others. 1985
<i>Periplaneta americana</i>	- Brain	Veenstra and Lambrou. 1995
Crustacea		
<i>Hutchinsoniella macracantha</i>	- CNS	Elofsson. 1990
Shore crab <i>Carcinus maenas</i>	- Eyestalk : between MI and MT and MT	Mangerich and others. 1987
Spider crab <i>Hyas areneus</i>	- Brain	Harzsch and Dawirs. 1996
Land crab <i>Chiromantes haematocheir</i>	- Protocerebrum and deutocerebrum	Honma, Takano and Chiba. 1996
Crayfish <i>Orconectes limosus</i>	- Eyestalk : between MI and MT and MT	Mangerich and others. 1987
Tiger prawn <i>Penaeus monodon</i>	- Eyestalk: LG, around ME, between MI and MT and MT	Sithigomgul and others. 1994
Giant fresh water prawn <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	- Eyestalk: LG, around ME, between MI and MT and MT	Sithigomgul and others. 1995
ANNELIDA		
<i>Subellatarte magnifica</i>	- Ganglia and longitudinal muscle - Cell type - pyramid 56% - long 44%	Miranda and others. 1991
Hirudinae		
<i>Hirudo medicinalis</i>	- Brain and segmental ganglia	Evans and Calabrese. 1989
Polychaeta		
<i>Nereis virens</i>	- Supraesophageal ganglia, subesophageal ganglia, intersegmental ganglia	Krajniak and Price. 1990

ตาราง 5 (ต่อ)

PHYLUM	Localization	References
Class		
Common name		
Scientific name		
NEMATODA		
<i>Ascaris suum</i>	- Ventral ganglia and pharynx - Pharyngeal ganglia	Sithigorngul and others. 1990 Cowden and others. 1993
Gastropoda		
Sea scallop <i>Placopecten magellanicus</i>	- Cerebral ganglia, pedal ganglia, parietovisceral ganglia, adductor muscle, heart and gonad	Too and Croll. 1995
PLATYHELMINTHES		
Turbellaria		
<i>Bdelloura candida</i> <i>Polystom nearcticum</i>	- CNS, PNS, gonad - CNS	Johnston and others. 1996 Armstrong and others. 1997
COELENTERATA		
Anthozoa		
<i>Anthopleura elegantissima</i>	- Neuronal vesicles in tentacle nerve	Westfall and Grimmelikhuijzen. 1993
Hydrozoa		
<i>Hydra attenuata</i>	- Brain	Grimmelikhuijzen, Dockray and Schot. 1982
Scyphozoa		
<i>Chrysaora hysocella</i> , <i>Cyanea capillata</i> and <i>Cyanea lanarckii</i>	- Subumbrella ectoderm and exumbrella ectoderm	Anderson, Moosler and Grimmelikhuijzen. 1992

ชีววิทยาของกุ้งกุลาดำ

ลักษณะทั่วไป

กุ้งกุลาดำ หรือกุ้งทะเล หรือกุ้งม้าลาย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus monodon* Fabricius และมีชื่อเป็นภาษาอังกฤษว่า tiger prawn หรือ jumbo tiger prawn กุ้งชนิดนี้อยู่ในวงศ์ Penaeidae ในขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ลำตัวจะเป็นสีม่วงแดง นอกจากนี้มีลักษณะอื่น ๆ ที่เด่นชัดคือ มีแถบสีน้ำตาลหรือน้ำตาลเข้มพาดขวางด้านหลังประมาณ 9 แถบ และสีออกน้ำตาลเข้มข้างแถบสีขาว ลำตัวเป็นปล้อง ๆ โคนขาว่ายน้ำมีแถบสีเหลืองเป็นปล้อง ๆ เปลือกหัวเกลี้ยงไม่มีขน หนวดมีสีดำ ไม่มีลายหรือลายจางมากไม่เด่นชัด ด้านบนของกรีมีฟัน 6 – 8 ซี่ ด้านล่างมี 2 – 4 ซี่ แก้มอยู่ในแนวระนาบ และสันที่อยู่สองข้างโคนกรี ยาวเกือบถึงฟันกร้ออันหลังสุด ซึ่งมีแนวข้างเฉียงขึ้นไปทางนัยน์ตา ร่องข้างกรีทั้งสองด้านมีลักษณะแคบและยาวไม่ถึงฟันกร้ออันสุดท้าย ที่ขาเดินคู่ที่ 5 ไม่มีระยางค์อันนอก ขอบปลายหางและขาว่ายน้ำมีขนสีแดง ขนาดความยาวประมาณ 18 – 25 เซนติเมตร (กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2530; วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2531; ปัญญา สุวรรณสมุทร. 2534) (ภาพประกอบ 1 และ 2)

การจัดลำดับหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานของกุ้งกุลาดำ มีการจัดลำดับดังนี้ (Holthuis. 1980)

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacean
Subclass	Malacostraca
Order	Decapoda
Suborder	Natantia
Infraorder	Penaeidae
Family	Penaeidae
Genus	Penaeus
Species	monodon

ถิ่นอาศัย

มีอยู่ทั่วไปในทวีปเอเชีย ในประเทศไทยพบแพร่กระจายทั่วไปในอ่าวไทย แต่จะพบมากบริเวณเกาะช้าง บริเวณนอกฝั่งจังหวัดชุมพรถึงนครศรีธรรมราชและทางฝั่งมหาสมุทรอินเดีย (ทะเลอันดามัน) บริเวณนอกฝั่งของจังหวัดภูเก็ต และระนอง ซอบอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีพื้นดินเป็นทรายปนโคลนหรือทรายปนเปลือกหอยและหินปะการัง กุ้งชนิดนี้สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี สามารถปรับตัวอยู่อาศัยในแหล่งน้ำกร่อยได้ (ปัญญา สุวรรณสมุทร. 2534)

การผสมพันธุ์

กึ่งกุลาดำจะผสมพันธุ์ได้ก็ต่อเมื่อตัวเมียได้ลอกคราบแล้วและอยู่ในระยะที่เปลือกยังไม่อยู่เท่านั้น ส่วนมากจะผสมพันธุ์กันในเวลากลางคืน ตัวผู้เมื่อเห็นตัวเมียลอกคราบใหม่ จะพยายามว่ายน้ำไปประกบ กึ่งตัวผู้จะพยายามเคล้าเคลียเร่งเร้าให้ตัวเมียว่ายน้ำไปด้วยกัน ถ้าสำเร็จกึ่งทั้งคู่จะว่ายน้ำขนานกันไป โดยกึ่งตัวผู้จะอยู่ข้างล่างและตัวเมียจะอยู่ข้างบน เมื่อได้จังหวะตัวผู้จะหงายท้องรัดตัวเมียโดยตัวผู้จะสอดอวัยวะเพศที่เรียกว่า พีเทสมา (petesma) เข้าไปในอวัยวะเพศเมียที่เรียกว่า ทีไรคัม (thelycum) กึ่งเพศผู้จะมีท่อส่งน้ำเชื้อไปเปิดออกบริเวณขาเดินคู่ที่ 5 และปล่อยน้ำเชื้อออกทางช่องเปิดไปที่บริเวณด้านท้องหรือด้านหลังของทีไรคัมของกึ่งเพศเมีย น้ำเชื้อจะถูกเก็บไว้ในถุงเก็บน้ำเชื้อเพื่อรอโอกาสที่จะผสมกับไข่ในระยะหลังเมื่อไข่แก่และสุกเต็มที่ก็จะถูกขับออกมาทางช่องเพศไข่ตรงโคนขาเดินคู่ที่สาม และจะได้รับการผสมกับน้ำเชื้อตัวผู้ซึ่งจะไหลออกจากถุงเก็บน้ำเชื้อทางรูเปิดเล็ก ๆ ที่บริเวณโคนขาเดินคู่ที่สี่ของตัวเมีย (ปัญญา สุวรรณสมุท. 2534)

การวางไข่

กึ่งกุลาดำวางไข่ในทะเล กึ่งที่มีอายุประมาณ 12 – 18 เดือน จะวางไข่ในทะเลลึกที่ระดับน้ำประมาณ 15 – 30 เมตร ใกล้กับพื้นท้องทะเล กึ่งขนาด 70 – 150 กรัม จะวางไข่ครั้งละประมาณ 1,000,000 - 1,200,000 ฟอง การวางไข่จะเริ่มตั้งแต่เวลา 10.00 น ถึง 2.00 น ของวันใหม่ ขณะที่กึ่งวางไข่มักจะว่ายน้ำวนไปรอบ ๆ ถังวางไข่ ไข่จะถูกขับออกมาทางเปิดตรงโคนขาเดินคู่ที่สาม และผสมกับน้ำเชื้อตัวผู้ ซึ่งจะไหลออกจากถุงเก็บน้ำเชื้อตัวผู้ที่ตัวเมียได้รับนั้นจะมีปริมาณมากและเพียงพอกับไข่ที่แม่กึ่งจะปล่อยในระยะต่าง ๆ แต่ไข่จะมีโอกาสผสมกับน้ำเชื้ออย่างน้อยแค่ไหนนั้นขึ้นอยู่กับความพอดีของไข่และน้ำเชื้อที่แม่กึ่งปล่อยออกมาแต่ละครั้ง แม่กึ่งจะใช้เวลาในการไข่ครั้งหนึ่งประมาณ 3 – 5 นาที ไข่ที่ผสมแล้วขณะที่ถูกขับออกมาใหม่ ๆ จะมีลักษณะกลมมีเมือกห่อหุ้ม ไข่จะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นรูปผลึกในระยะหลัง ต่อไปไข่จะค่อย ๆ พัฒนาจนฟักเป็นตัว ภายในเวลาประมาณ 15 ชั่วโมง โดยทั่วไปไข่จะหนักกว่าน้ำทะเลเล็กน้อย จึงมักจม เมื่อกึ่งวางไข่หมดแล้วถุงน้ำเชื้อจะหลุดไปพร้อมกับคราบ การตรวจดูว่าแม่กึ่งวางไข่หรือยัง โดยดูจากคราบไขมันเกาะขอบบ่อ ถ้ามีเมือกสีน้ำตาลหรือสีส้มติดตามขอบบ่อในตอนเช้าแสดงว่าแม่กึ่งวางไข่แล้ว (วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2531; ปัญญา สุวรรณสมุท. 2534)

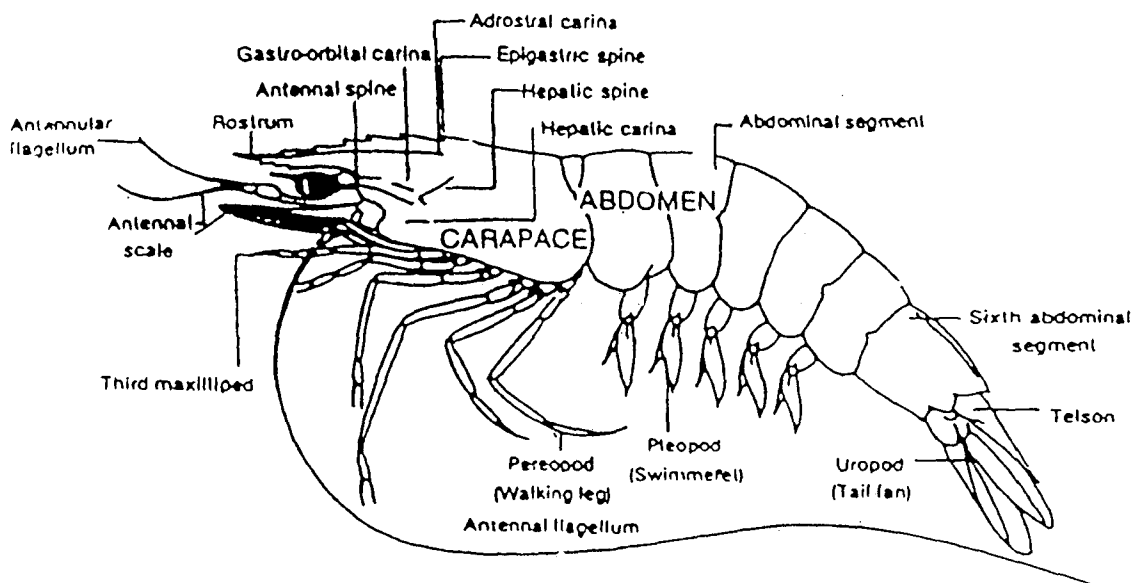
การลอกคราบ

กึ่งจำเป็นต้องลอกคราบเพื่อการเจริญเติบโต ทั้งนี้เพราะเปลือกกึ่งเป็นอวัยวะที่ไม่สามารถเพิ่มขนาดได้เหมือนกับเปลือกหอยหรือกระดองเต่าได้ ดังนั้นในการเพิ่มขนาดตัวของกึ่งแต่ละครั้งจึงจำเป็นต้องสลัดเอาเปลือกเก่าทิ้งไปแล้วสร้างเปลือกใหม่ที่มีขนาดใหญ่กว่าขึ้นมาแทน กึ่งจะเริ่มลอกคราบจะมีการสะสมอาหารในร่างกายมากกว่าปกติโดยเฉพาะสารที่สร้างเปลือก เพราะเปลือกจะต้องแข็งตัวโดยเร็ว หลังจากลอกคราบแล้ว เมื่อกึ่งสลัดเปลือกออกหมด

ลำตัวจะขยายใหญ่ขึ้น และเปลือกจะแข็งตัวภายใน 3 – 8 ชั่วโมง การลอกคราบของกุ้งแต่ละครั้งอยู่ภายใต้ทดสอบความจำเป็นของระบบประสาทส่วนกลางและฮอร์โมนสองชนิดที่อยู่ในก้านตา แต่ก็ขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ หลายอย่างด้วย เช่น วัยของกุ้ง อาหาร แสง และอุณหภูมิ ถ้าสภาพแวดล้อมเหมาะสมกับกุ้งจะลอกคราบห่างกันครั้งละประมาณ 20 – 30 วัน (ปัญญาสุวรรณสมุท. 2534)

ความแตกต่างระหว่างกุ้งกุลาดำเพศผู้และเพศเมีย

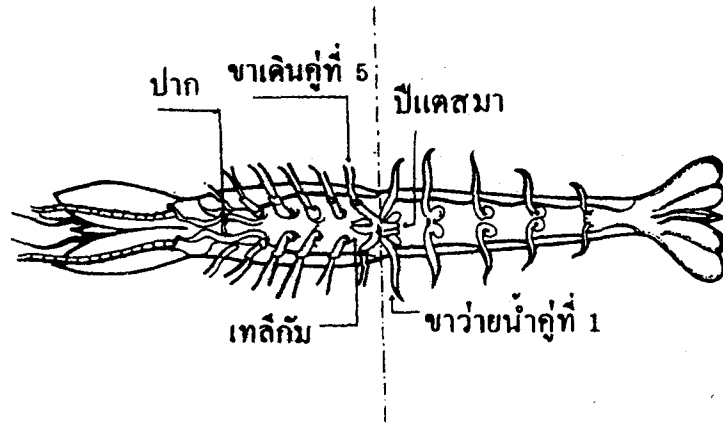
กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์ที่มีเพศแยกกัน โดยปกติกุ้งเพศเมียมักจะมีขนาดใหญ่กว่ากุ้งเพศผู้ที่อายุเท่ากัน การที่จะแยกได้ว่าเป็นกุ้งเพศเมียหรือกุ้งเพศผู้ได้นั้น สังเกตได้จากกุ้งเพศผู้จะมีพีเทสมาซึ่งพัฒนามาจากส่วนของแขนงอันใน (endopod) ของระยางค์ว่ายน้ำคู่ที่หนึ่ง พีเทสมา มีลักษณะคล้ายเตี้ยอย่างแข็ง 2 อันซ้ายขวาติดกันด้วยคิวติเคิล (cuticle) บาง ๆ ทับซ้อนกันที่บริเวณโคนขา และสามารถถลึงออกเป็นแผ่นกว้างได้ กุ้งวัยรุ่นเพศผู้ที่พีเทสมาจะยึดติดกับส่วนโคนขาว่ายน้ำ เมื่อการลอกคราบครั้งสุดท้ายเพื่อเป็นกุ้งโตเต็มวัย ขอบของพีเทสมาประมาณครึ่งหนึ่งจะแผ่ออกติดกันตลอดอัน และมีปุ่มคล้ายตั้งทำหน้าที่ช่วยในการยึดติดในเวลาผสมพันธุ์ ส่วนในกุ้งเพศเมียนั้นสังเกตได้จากบริเวณส่วนท้องของตัวเมียจะมีติ่งแบน ๆ เรียกว่าทีไลคัม มีลักษณะคล้ายลอนหรือพูเล็ก ๆ หลายอันเรียงกันอยู่ตรงบริเวณโคนขาเดินคู่ที่สี่และห้า ซึ่งด้านในมีถุงสำหรับเก็บน้ำเชื้อตัวผู้ไว้ในเวลาที่มีการผสมพันธุ์และมีท่อน้ำไขเปิดออกโคนขาเดินคู่ที่สาม (ปิยะพงษ์ โชติพันธ์. 2529; 2534; บังอร ศรีมุกดา. 2530) (ภาพประกอบ 3 และ 4)



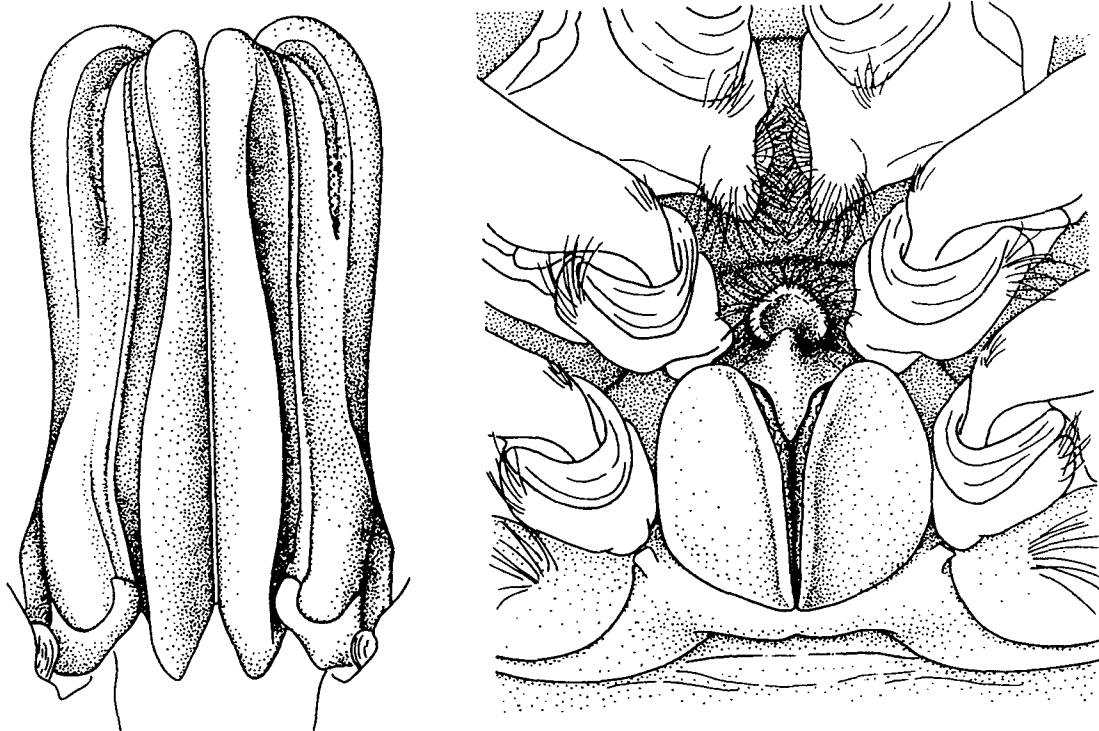
ภาพประกอบ 1 โครงสร้างภายนอกโดยทั่ว ๆ ไปของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* (Solis, 1988)



ภาพประกอบ 2 ลักษณะของกุ้งกุลาดำเพศเมีย (บน) และเพศผู้ (ล่าง)



ภาพประกอบ 3 ภาพจากด้านท้องของกิ้งกูดดำแสดงขาว่ายน้ำ พีเทสมา และทีไลคัม (บรรจง เทียนสังข์รมี. 2529)

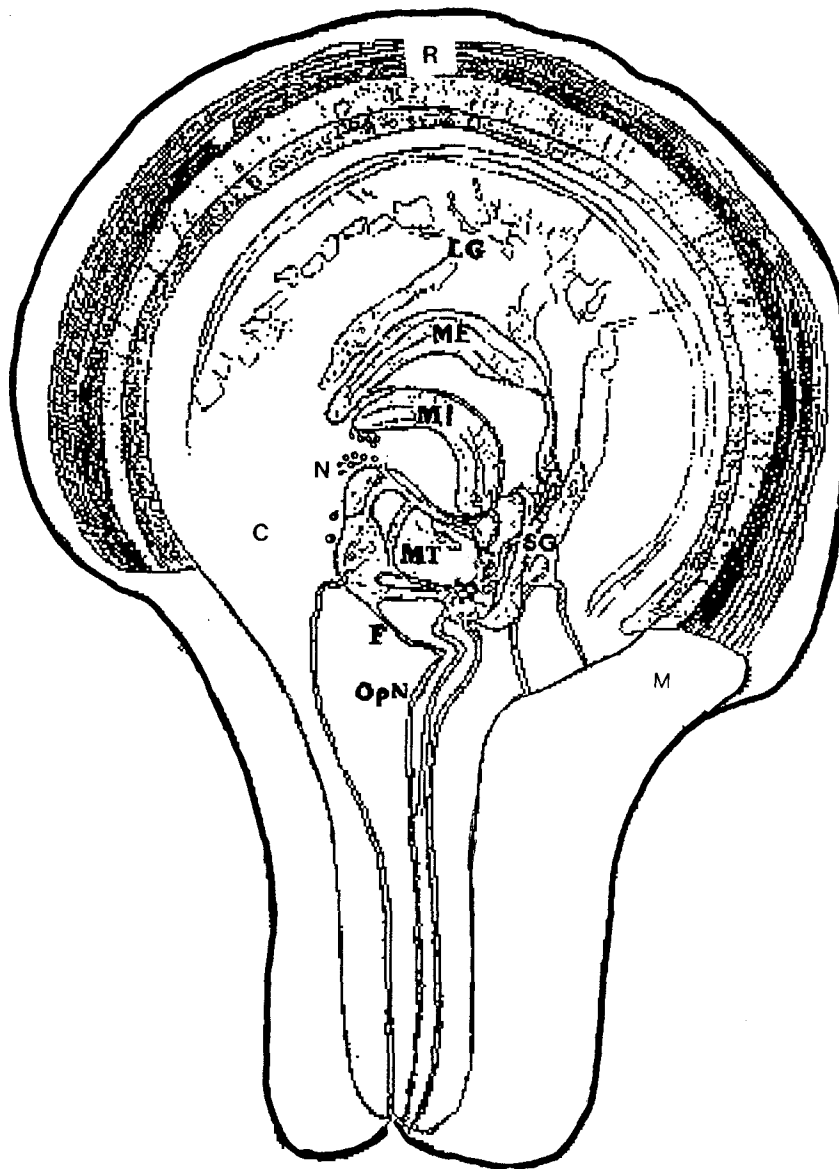


ภาพประกอบ 4 ภาพวาดแสดงพีเทสมา (ซ้าย) และทีไลคัม (ขวา) (Farfante and Kensley, 1997)

โครงสร้างภายในก้านตากุ้งกุลาดำ

กุ้งมีตาประกอบเป็นอวัยวะรับสัมผัสซึ่งประกอบด้วยห้องเล็ก ๆ ที่เรียกว่าออมมาทีเดีย (ommatidia) เป็นรูปกรวยประมาณ 2,500 หน่วย แต่ละหน่วยมีม่านตา เซลล์ม่านตา 2 เซลล์ และเซลล์เม็ดสี บริเวณฐานเป็นเซลล์ที่ไวต่อแสงเรียกเรตินา ติดต่อไปยังสมองทางเซลล์ประสาท การมองเห็นของกุ้งจึงมีเขตจำกัดในแต่ละออมมาทีเดีย และภาพซึ่งปรากฏแก่ตากุ้งทั้งหมดนั้นจะประกอบด้วยภาพเล็ก ๆ หลายภาพรวมกัน มองเห็นเป็นภาพเดียว (สุรินทร์ มัจฉาชีพ.)

ตากุ้งเมื่อลอกเปลือกแข็ง (exoskeleton) ภายนอกก้านตาออก โครงสร้างจากภายนอกเข้าไปจะเป็นเรตินา (retina, R) lamina ganglionaris (LG) ถัดเข้าไปมีปมประสาทตา (optic ganglia) ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 บริเวณได้แก่ medulla externa (ME) medulla interna (MI) และ medulla terminalis (MT) ปมประสาทแต่ละบริเวณมีเซลล์ประสาท (neuronal cell body, N) ในบริเวณต่าง ๆ ของตากุ้ง จะทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนส่งไปตามเส้นใยประสาท (nerve fiber, F) ซึ่งปล่อยออกและสะสมที่ต่อมไซนัส (sinus gland, SG) และหลังเข้าสู่กระแสเลือดหรือฮีโมลิมพ์ (haemolymph) ของกุ้ง เนื้อเยื่อรอบ ๆ ปมประสาทเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue, C) บูอยู่ภายใน ส่วนภายนอกมีกล้ามเนื้อ (muscle, M) ห่อหุ้ม นอกจากนี้มีเส้นใยประสาทเชื่อมต่อไปยังเส้นประสาทตา (optic nerve, OpN) และส่งเข้าสู่สมอง (brain) ดังภาพประกอบ 5



ภาพประกอบ 5 โครงสร้างภายในก้านตาของกิ้งกือดำ

R = Retina	LG = Lamina ganglionaris
ME = Medulla externa	MI = Medulla interna
MT = Medulla terminalis	N = Neuronal cell body
F = Nerve fiber	SG = Sinus gland
C = Connective tissue	M = Muscle
OpN = Optic nerve	

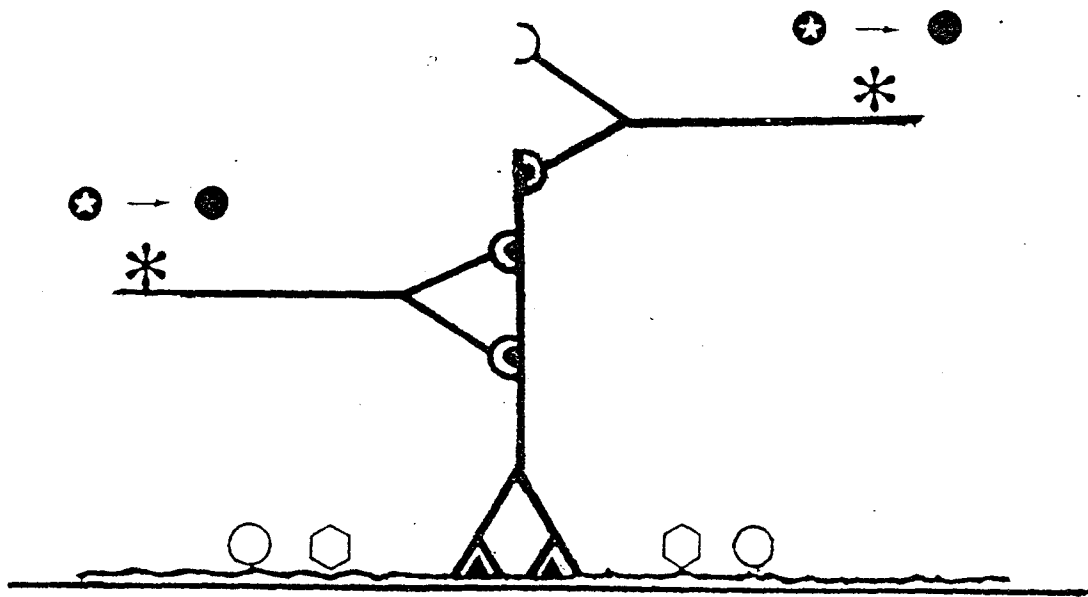
หลักการของวิธีอินไดเรคติมมูโนเปอรอกซิเดส

การตรวจหาคำแหน่งที่พบฮอร์โมนในครีσταเขียนชนิดต่าง ๆ ส่วนมากใช้วิธีอิมมูโนไซโตเคมีสทรี ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจหาแอนติเจน (antigen) ในเนื้อเยื่อโดยอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี (antibody) ที่มีความจำเพาะต่อกัน เทคนิคนี้จะใช้แอนติบอดีติดฉลากด้วยสารบางชนิด เช่น เอนไซม์ (enzyme) สารเรืองแสง (fluorescence substrate) อนุภาคทอง (colloidal gold) สารกัมมันตภาพรังสี (radioactive substance) เป็นต้น ซึ่งสารที่นำมาติดฉลากจะใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ (marker) ถึงตำแหน่งที่แอนติเจนชนิดนั้น ๆ ปรากฏอยู่ สำหรับกระบวนการทางอิมมูโนออสติชันขั้นตอนการทำปฏิกิริยาของแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งแบ่งวิธีทดสอบออกเป็น 2 วิธีคือ

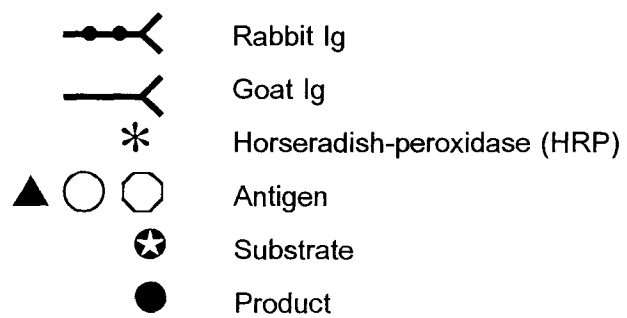
1. วิธีตรง (direct method) วิธีนี้จะใช้สารที่นำมาติดฉลากติดเข้าโดยตรงกับแอนติบอดีตัวแรก (primary antibody) และให้ทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่ต้องการตรวจหาแอนติเจน ข้อดีของวิธีนี้คือมีเพียงขั้นตอนเดียว ถ้าแอนติเจนที่ต้องการตรวจสอบมีเพียงไม่กี่ชนิด วิธีนี้จะให้ผลรวดเร็ว แต่ถ้ามีแอนติเจนที่ต้องการตรวจสอบหลายชนิด วิธีนี้จะใช้เวลานาน ยุ่งยากและสิ้นเปลืองสารเคมีในการเตรียมแอนติบอดีให้ติดกับสารที่นำมาติดฉลาก ปกติแล้ววิธีนี้ไม่ค่อยเป็นที่นิยม เพราะว่ามีประสิทธิภาพ (efficiency) และความไว (sensitivity) ต่ำกว่าวิธีอื่น

2. วิธีอ้อม (indirect method) วิธีนี้จะใช้สารที่นำมาติดฉลากติดเข้าโดยตรงกับแอนติบอดีตัวที่สอง (secondary antibody) หรือแอนติบอดีตัวที่สาม (tertiary antibody) โดยให้แอนติเจนที่ต้องการตรวจสอบทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะหรือแอนติบอดีตัวแรก จากนั้นจะใช้แอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) ที่ติดฉลากไว้ด้วยสารชนิดต่าง ๆ เป็นตัวทำปฏิกิริยาอีกตัวหนึ่ง วิธีนี้เป็นที่นิยมแพร่หลาย เพราะว่ามีประสิทธิภาพและความไวดีกว่าวิธีแรก ประหยัดค่าใช้จ่ายและสะดวกเพราะแอนติบอดีที่ติดฉลากสามารถหาซื้อหาได้

ในการศึกษาเพื่อตรวจหาคำแหน่งที่พบสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกุ้งกุลาดำด้วยวิธีอินไดเรคติมมูโนเปอรอกซิเดส ได้ใช้เอนไซม์ horseradish peroxidase มาติดกับแอนติบอดีตัวที่สอง จากนั้นตรวจสอบการมีปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี โดยตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของซับสเตรตคือไฮโดรเจนเปอรอกไซด์ และสารที่ทำให้เกิดสี (chromogen) คือ 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ปฏิกิริยาเกิดขึ้นโดยไฮโดรเจนเปอรอกไซด์ถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase กลายเป็นผลิตภัณฑ์ (product) คือออกซิเจนและน้ำ ออกซิเจนที่เกิดขึ้นในสารละลายจะไปทำปฏิกิริยากับ DAB ทำให้เกิดตะกอน สีน้ำตาลในตำแหน่งที่มีเอนไซม์อยู่ ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกับตำแหน่งที่มีแอนติเจนที่ต้องการตรวจหาคือ PP และ FMRFamide ปฏิกิริยาเกิดขึ้นดังแสดงในภาพประกอบ 6



ภาพประกอบ 6 แสดงปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีโดยวิธีอิมมูโนเปอร์ออกซิเดส



จุดมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อตรวจหาสารคล้าย PP ในก้านตากุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*
2. เพื่อตรวจสอบว่าสารคล้าย PP ในก้านตากุ้งกุลาดำเป็นสารชนิดเดียวกับสารคล้าย FMRFamide หรือไม่

ความสำคัญของการวิจัย

1. เพื่อใช้เป็นแนวทางในการหาตำแหน่งที่มีฮอร์โมนชนิดอื่นๆ ในก้านตากุ้งกุลาดำต่อไป
2. เพื่อเป็นข้อมูลในการแยก (isolation) และการทำให้บริสุทธิ์ (purification) การหาลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequencing) การหามวลโมเลกุล และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) ของฮอร์โมน ซึ่งนำไปสู่การใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำต่อไป

ขอบเขตการวิจัย

1. ศึกษาเฉพาะตำแหน่งที่พบสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในก้านตากุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*
2. ศึกษาเฉพาะจำนวนและขนาดของเซลล์ที่พบสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในก้านตากุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*
3. ศึกษาเฉพาะการปรากฏร่วมและการปรากฏแยกแยะระหว่างสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในก้านตากุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

แนวทางดำเนินงานวิจัย

การตรวจหาตำแหน่งที่พบสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของ กุ้งกุลาดำด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมีสทรี แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

- ก. การตรวจหาตำแหน่ง (localization) เซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PP และ สารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกุ้งกุลาดำ
- ข. การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของแอนติบอดีต่อ PP และแอนติบอดีต่อ FMRFamide ด้วยเทคนิคการดูดซับ (adsorption test) ในก้านตาของกุ้งกุลาดำ
- ค. การปรากฏร่วม (co-localization) และการปรากฏแยก (differential localization) ของสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกุ้งกุลาดำ

สัตว์ทดลอง

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) อายุ 12 เดือน น้ำหนักประมาณ 80 - 150 กรัม ชื้อจาก อำเภอพระประแดง จังหวัดสมุทรปราการ

อุปกรณ์และสารเคมี

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องมือผ่าตัด
2. จานแก้ว (petridish)
3. ขวดรูปกรวยมีแขน (suction flask)
4. เครื่องปั๊มดูดอากาศ (suction pump)
5. สไลด์พร้อมกระจกปิดสไลด์
6. โถแก้วสำหรับย้อมสไลด์ (couplin jar)
7. ตะกร้าสำหรับย้อมสไลด์ (slide basket)
8. ไมโครปิเปตต์ (micropipette)
9. ขวดแก้วปากตรง (vial)
10. เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน (rotary microtome)
11. ตะเกียงแอลกอฮอล์
12. ตู้อบ (hot air oven)
13. ตู้ดูดควัน (chemical fume hood)
14. แท่นอุ่นสไลด์ (slide warmer)
15. กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง (light microscope)

16. อุปกรณ์วาดภาพจากกล้องจุลทรรศน์ (camera lucida)
17. กล้องและอุปกรณ์ในการถ่ายภาพ

สารเคมี

1. เอธิลแอลกอฮอล์ 70%, 90%, 95%
2. นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ (N-butyl alcohol)
3. ไซลีน (xylene)
4. พาราพลาสต์ (paraplast)
5. Bouin's fixative
6. สารละลาย P₁⁺ (calf bovine serum : PBS (1:1) dilution 1:10)
7. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffered saline, PBS) 0.15 โมลาร์ พีเอช 7.2
8. ไดอะมิโนเบนซีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ (diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB)
9. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30%
10. สี่ไอซอิน 0.1% ในเอธิลแอลกอฮอล์ 95%
11. แอนติเจนและแอนติบอดีสำหรับตรวจสารคล้าย PP6
 - human PP6-BSA
 - Rabbit anti-human PP6 antiserum (LTRPRYamide)
 - Goat anti-rabbit IgG H and L chain horseradish peroxidase conjugate (GAR-HRP) (Biorad)
12. แอนติเจนและแอนติบอดีสำหรับตรวจสารคล้าย FMRFamide
 - FM-23 (FMRFamide)
 - AF1-62 (KNEFFIRFamide)
 - AF2-32 (KHEYLRFamide)
 - FM-23 (mouse anti-FMRFamide monoclonal antibody)
 - AF1-62 (mouse anti-KNEFFIRFamide monoclonal antibody)
 - AF2-32 (mouse anti-KHEYLRFamide monoclonal antibody)
 - Goat anti mouse IgG H and L chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) (Biorad)

แอนติเจนและแอนติบอดีต่อสารคล้าย PP6 และสารคล้าย FMRFamide ทั้ง 3 ชนิดนี้ได้รับอนุเคราะห์จาก Dr. Anthony O. W. Stretton, Department of Zoology, University of Wisconsin-Madison ประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีดำเนินการทดลอง

ก. การตรวจหาตำแหน่งเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกิ้งกูดดำ

1. การเตรียมเนื้อเยื่อทางมิถุนวิทยา (ภาพประกอบ 9)

1.1 นำกิ้งกูดดำเพศเมียที่โตเต็มวัย น้ำหนักประมาณ 80-150 กรัม ประมาณ 30 ตัว มาตัดก้านตา การตัดตาจะทำภายหลังกึ่งลอกคราบและมีเปลือกแข็งแล้ว โดยจับกึ่งทางด้านหลังและใช้กรรไกรขนาดเล็กที่คม ตัดที่ประมาณกึ่งกลางของก้านตา การตัดตากิ่งจะต้องทำด้วยความรวดเร็ว จากนั้นผ่าตัดก้านตากิ่งบนน้ำแข็งโดยลอกเปลือกแข็งภายนอก (exoskeleton) ของก้านตาออก

1.2 นำก้านตาที่ได้ไปทำให้คงรูป (fix) ใน Bouin's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยแยกตาข้างซ้ายและข้างขวา

1.3 นำก้านตามาล้างด้วยน้ำประปาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อล้างน้ำยาทำให้คงรูปออก

1.4 ดึงน้ำออก (dehydrate) จากก้านตาด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ และนอร์มัล-บิวทิลแอลกอฮอล์ตามลำดับ จากนั้นอินฟิลเตรท (infiltrate) ด้วยพาราพลาสต์ ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1.4.1 นำก้านตามาแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

1.4.2 เปลี่ยนสารละลายเป็นเอทิลแอลกอฮอล์ 90% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

1.4.3 เปลี่ยนสารละลายเป็นเอทิลแอลกอฮอล์ 95% จำนวน 2 ครั้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.4.4 เปลี่ยนสารละลายเป็นนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.4.5 เปลี่ยนสารละลายเป็นสารละลายผสมระหว่างนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์กับไซลีน ในอัตราส่วน 1 : 1 แช่ก้านตาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.4.6 เปลี่ยนสารละลายเป็นไซลีน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.4.7 เปลี่ยนสารละลายเป็นไซลีนผสมกับพาราพลาสต์ที่หลอมเหลว ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วน 1 : 1 เป็นเวลา 30 นาที

1.4.8 เปลี่ยนสารละลายเป็นพาราพลาสต์ที่หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จำนวน 3 ครั้ง เป็นเวลาครั้งละ 30 นาที

1.5 นำก้านตาที่อินฟิลเตรทด้วยพาราพลาสต์แล้วไปฝัง (embed) ในพาราพลาสต์ โดยเทพาราพลาสต์ขณะที่หลอมเหลวลงไปในบล็อก (block) สีเหลือง จากนั้นใช้ปากคีบลงไฟจับก้านตาของกึ่งแต่ละก้านตาฝังในพาราพลาสต์ โดยให้ด้านหลัง (dorsal) ของก้านตาอยู่ทางด้านบนของบล็อก

1.6 ตัดก้านตาที่ฝังอยู่ในบล็อกด้วยเครื่องไมโครทอมแบบโรตารี (rotary microtome) โดยให้แต่ละชั้นมีความหนาขนาด 8 หรือ 40 ไมครอนเรียงต่อกัน (serial section) เป็นริบบอน (ribbon) โดยตัดทางด้านล่างของบล็อกคือตัดตามยาวทางด้านท้อง (ventral) ของ ก้านตา

1.7 นำเซกชัน (section) ของก้านตามาติดบนสไลด์แก้ว เรียงตามลำดับ เซกชันแรกและ

เซกชันสุดท้ายเป็นเซกชันที่เห็นเนื้อเยื่อภายในตัดผ่านเรตินาเข้าไป โดยหยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ แก้วที่เคลือบด้วยเจลาติน (gelatin) ให้เป็นแถว 3 แถวตามแนวนอนของสไลด์ จากนั้นนำแถวของ เซกชันไปวางบนหยดน้ำ 1 แถวมี 8 เซกชัน และ 3 แถวต่อ 1 สไลด์ (โดยประมาณ) นำสไลด์วาง บนแท่นอุ่นสไลด์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ไม่ควรเกิน 50 องศาเซลเซียส เพราะจุดหลอม เหลวของพาราฟินอยู่ที่ 58 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงจะทำให้เนื้อเยื่อกรอบ เมื่อเนื้อเยื่อแผ่ ยึดดีไม่มีการซ้อนทับกันของเนื้อเยื่อแล้ว นำลงมาซับน้ำออกให้แห้งจนหมด เพื่อให้เนื้อเยื่อติดตรึง บนสไลด์ นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซ้ำมคินก่อนนำมาใช้ หากซับน้ำออกไม่ แห้งให้อบในตู้อบจนน้ำออกหมดและแน่ใจว่าเนื้อเยื่อติดตรึงบนสไลด์ดีแล้วจึงค่อยนำมาใช้

จำนวนเซกชันในแต่ละก้านตาของกึ่งกุลาตาเฉลี่ยต่อ 1 ก้านตา เมื่อตัดด้วยความหนา 8 ไมครอน เฉลี่ยประมาณ 300 เซกชันต่อ 1 ก้านตา เมื่อตัดด้วยความหนา 40 ไมครอน เฉลี่ย ประมาณ 100 เซกชันต่อ 1 ก้านตา

2. กระบวนการย้อมโดยวิธีอินไดเรกติมูโนเปอร์ออกซิเดส (indirect immunoperoxidase method) ด้วย rabbit anti-PP6 antiserum และ mouse anti-FMRFamide monoclonal antibodies โดยมีขั้นตอนดังนี้ (ดัดแปลงจากวิธีการของ Sithigorngul, Stretton and Cowden. 1990) (ภาพประกอบ 10)

2.1 นำสไลด์ที่มีเซกชันมาละลายเอาพาราฟลาสต์ออกจากเนื้อเยื่อ (deparaffination) โดย วางสไลด์ลงในตะกร้า (slide basket) แล้วจุ่มลงในโทแก้วย้อมสไลด์ โดยแช่ก้านตาใน

2.1.1 โซลีนที่ 1 เป็นเวลา 15 นาที

2.1.2 โซลีนที่ 2 เป็นเวลา 10 นาที

2.1.3 โซลีนที่ 3 เป็นเวลา 10 นาที

2.2 เติมน้ำ (hydration) เข้าสู่เนื้อเยื่อก้านตาด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ โดยแช่ก้าน ตาใน

2.2.1 นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 5 นาที

2.2.2 เอธิลแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 5 นาที

2.2.3 เอธิลแอลกอฮอล์ 90% เป็นเวลา 5 นาที

2.2.4 เอธิลแอลกอฮอล์ 80% เป็นเวลา 5 นาที

2.2.5 เอธิลแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 5 นาที

2.3 ล้างเนื้อเยื่อก้านตาด้วย phosphate buffered saline (PBS) เพื่อล้างเอาแอลกอฮอล์ ออกให้หมดโดย

2.3.1 จุ่มล้างเนื้อเยื่อก้านตาด้วย PBS อย่างรวดเร็ว

2.3.2 ล้างด้วย PBS อีก 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

2.4 ดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกก้านตาออกโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump)

2.5 ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารละลาย P_1^+ หยดให้กลุ่มแต่ละเชกชั้น (เพื่อป้องกันการจับของโปรตีนแบบไม่จำเพาะ) บ่ม (incubate) เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เพื่อป้องกันไม่ให้เชกชั้นแห้ง นำไปเก็บไว้ในที่ชื้นโดยอาจเก็บในกล่องหรือจานเลี้ยงเชื้อ ปิดฝาภายในตู้ด้วยกระดาษทิชชูที่เปียกชื้น

2.6 ใส่ first antibody

2.6.1 ดูดสารละลาย P_1^+ ในแต่ละเชกชั้นออก

2.6.2 หยด first antibody ให้กลุ่มแต่ละเชกชั้น First antibody ที่ใช้คือ

2.6.2.1 Rabbit anti-PP6 antiserum ที่เจือจางด้วยสารละลาย P_1^+ ที่มีความเข้มข้น 1 : 10,000 หรือ

2.6.2.2 Mouse anti-FMRamide monoclonal antibodies (FM-23 : AF1-62 : AF2-23 (1: 1: 1)) ที่เจือจางด้วยสารละลาย P_1^+ ที่มีความเข้มข้น 1 : 100

2.6.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.7 ล้างเนื้อเยื่อล้างตาด้วย PBS

2.7.1 ล้างเนื้อเยื่อล้างตาด้วย PBS อย่างรวดเร็วเพื่อล้างเอาแอนติบอดีออก

2.7.2 ล้างด้วย PBS อีก 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที

2.8 ใส่ secondary antibody

2.8.1 ดูดสารละลาย PBS ในแต่ละเชกชั้นออก

2.8.2 หยด second antibody ให้กลุ่มแต่ละเชกชั้น Second antibody ที่ใช้คือ

2.8.2.1 Goat anti-rabbit horseradish peroxidase (GAR-HRP) สำหรับ rabbit anti-PP6 antiserum ที่เจือจางด้วยสารละลาย P_1^+ โดยมีความเข้มข้น 1 : 1000 ลงกลุ่มแต่ละเชกชั้น หรือ

2.8.2.2 Goat anti-mouse horseradish peroxidase (GAM-HRP) สำหรับ mouse anti-FMRamide monoclonal antibodies ที่เจือจางด้วยสารละลาย P_1^+ โดยมีความเข้มข้น 1 : 1000

2.8.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.9 ล้างเนื้อเยื่อล้างตาด้วย PBS

2.9.1 ล้างเนื้อเยื่อล้างตาด้วย PBS เพื่อล้างเอาแอนติบอดีออก

2.9.1 ล้างด้วย PBS อีก 3 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที

2.10 นำเนื้อเยื่อล้างตามาทำปฏิกิริยากับ 3,3'-ไดอะมิโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ 0.03% และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.006% ที่ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที (เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ บริเวณที่ติด (positive) สามารถเห็นเป็นสีน้ำตาล)

2.11 ล้างเนื้อเยื่อล้างตาด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

2.12 ตึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อล้างตา โดยใส่ในแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ คือ

2.12.1 เอธิลแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 5 นาที

2.12.2 เอธิลแอลกอฮอล์ 80% เป็นเวลา 5 นาที

2.12.3 เอธิลแอลกอฮอล์ 90% เป็นเวลา 5 นาที

2.12.4 เอธิลแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 5 นาที

2.13 ย้อม (counterstain) เนื้อเยื่อที่กั้นตาด้วยสีอีโอซิน 0.1% ในเอธิลแอลกอฮอล์ 95% แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 95%

2.14 นำเนื้อเยื่อที่กั้นตามาตั้งน้ำออกจากเนื้อเยื่อที่กั้นตาโดยผ่านสารละลายต่าง ๆ ดังนี้

2.14.1 นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 5 นาที

2.14.2 สารละลายผสมระหว่างนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์กับไซลีน (1 : 1) เป็นเวลา 5 นาที

2.14.3 ไซลีน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

2.15 ทำเป็นสไลด์ถาวรโดยเม้าท์ (mount) ด้วยเปอร์เม้าท์ (permount) ทำโดยหยดเปอร์เม้าท์ประมาณ 3 หยด บนสไลด์ และขอบด้านหนึ่งของกระจกปิดสไลด์บนเปอร์เม้าท์โดยเอียงประมาณ 45 องศาแล้วค่อย ๆ วางลง ควรระวังมิให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น หากมีฟองอากาศเกิดขึ้นให้นำสไลด์มาล้างเปอร์เม้าท์ออกด้วยไซลีนแล้วค่อยทำการเม้าท์สไลด์ใหม่อีกครั้ง

2.16 นำสไลด์ที่ได้มาตรวจหาตำแหน่งและเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในทุกเขตกั้นด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยสังเกตจากการติดสีน้ำตาลเนื่องจากปฏิกิริยาของแอนไซม์เปอร์ออกซิเดส นับจำนวนและวัดขนาดของเซลล์ที่พบสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในบริเวณต่าง ๆ ของกั้นตา

2.17 วาดรูปประกอบโดยใช้ camera lucida เพื่อบอกถึงตำแหน่งที่มีสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide

ข. การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของแอนติบอดีต่อ PP และแอนติบอดีต่อ FMRFamide ด้วยเทคนิคการดูดซับ (adsorption test) ในกั้นตาของกึ่งกุลาตา

นำตากึ่งกุลาตาที่ตัดเขตกั้นความหนา 8 ไมครอนและติดบนสไลด์เรียบร้อยแล้ว มาทดลองตามวิธีในข้อ ก ทุกอย่างยกเว้นการหยด first antibody และ second antibody จำนวนสไลด์ต่อ 1 ตา ประมาณ 15 สไลด์ และนำสไลด์ทั้งหมดแบ่งเป็น 3 ชุด

ชุดที่ 1 สไลด์ที่ 1, 6, 11

นำไปทำการทดลองในข้อ 1

ชุดที่ 2 สไลด์ที่ 2, 7, 12

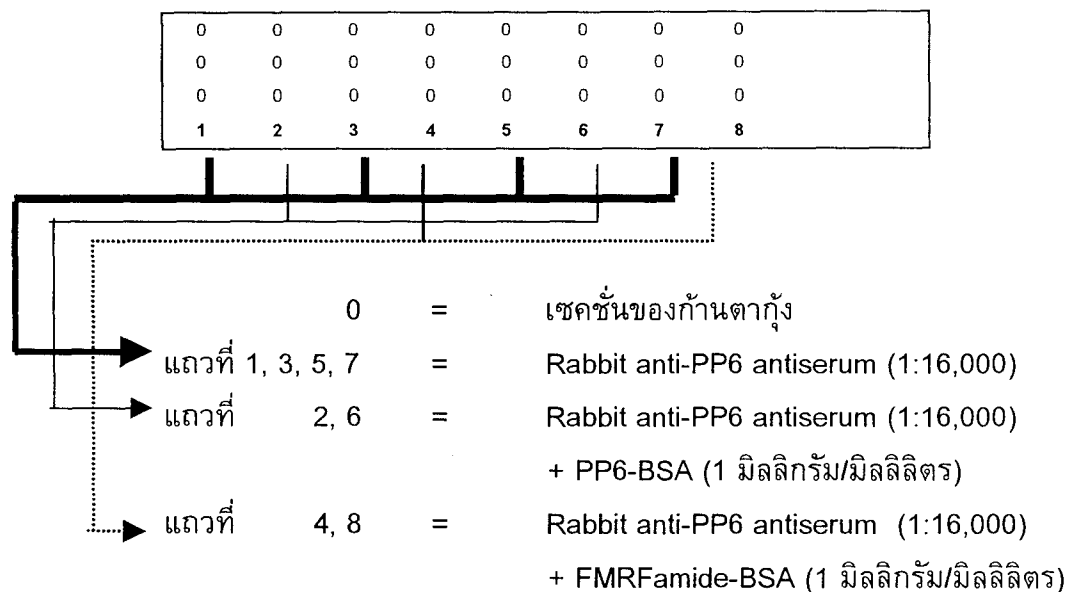
นำไปทำการทดลองในข้อ 2

ชุดที่ 3 สไลด์ที่ 3 - 5, 8 - 10, 13 - 15

นำไปทำการทดลองในข้อ 3

1. การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ PP

การหยด rabbit anti-PP6 antiserum สลับกับ rabbit anti-PP6 antiserum ที่ดูดซับด้วย PP6-BSA หรือที่ดูดซับด้วย FMRFamide-BSA ทำดังนี้คือ ในแถวที่ 1, 3, 5, 7 หยดด้วย first antibody คือ rabbit anti-PP6 antiserum (1:16,000) Second antibody ที่ใช้คือ GAR-HRP (1:1,000) ในแถวที่ 2, 6 หยดด้วย rabbit anti-PP6 antiserum (1:16,000) ที่ผสมกับ PP6-BSA (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) Second antibody ที่ใช้คือ GAR-HRP (1:1,000) ในแถวที่ 4, 8 หยดด้วย rabbit anti-PP6 antiserum (1:16,000) ที่ผสมกับ FMRFamide-BSA (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) Second antibody ที่ใช้คือ GAR-HRP (1:1,000) สลับกันเพื่อเปรียบเทียบกัน ดังภาพประกอบ 6

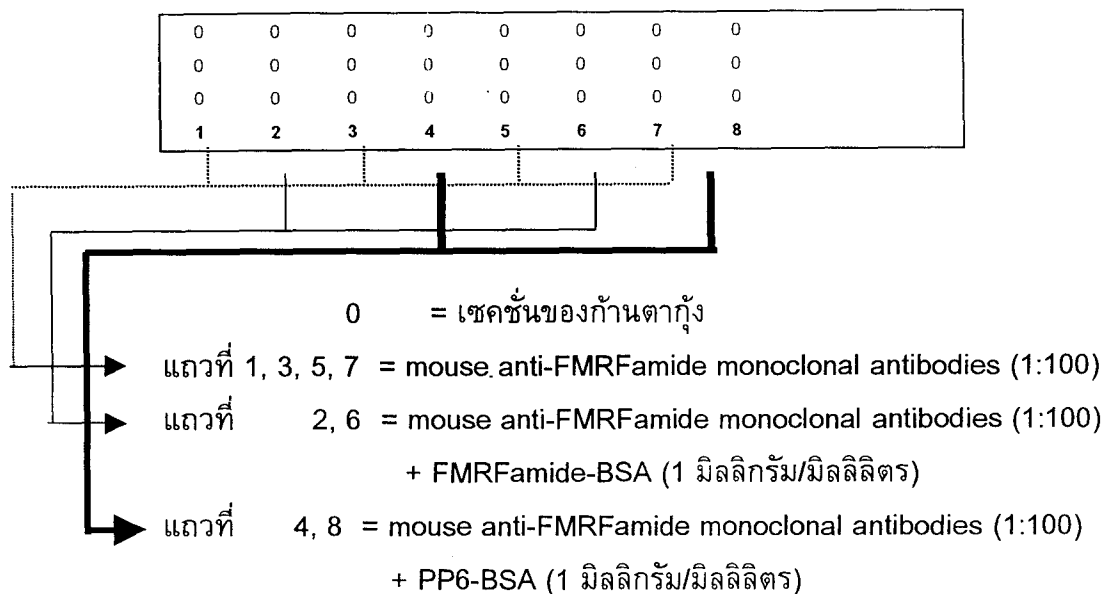


ภาพประกอบ 7 ไดอะแกรมการหยดแอนติบอดีในการทดสอบความจำเพาะของ rabbit anti-PP6 antiserum

Mouse anti-FMRFamide monoclonal antibodies ที่ใช้คือ FM-23 + AF1-62 + AF-32 รวมกันในอัตราส่วน 1: 1: 1 แล้วเจือจางด้วย P_1^+ ในอัตราส่วน 1:100 ก่อนใช้

2. ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ FMRFamide

หยด mouse anti-FMRFamide monoclonal antibodies สลับกับ mouse anti-FMRFamide monoclonal antibodies ที่ดูดซับด้วย FMRFamide-BSA หรือที่ดูดซับด้วย PP6-BSA โดยในแถวที่ 1, 3, 5, 7 หยดด้วย first antibody คือ mouse anti-FMRFamide monoclonal antibodies (1:100) Second antibody ที่ใช้คือ GAM-HRP (1:1,000) ในแถวที่ 2, 6 หยดด้วย mouse anti-FMRFamide monoclonal antibodies (1:100) ที่ดูดซับด้วย FMRFamide-BSA (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) Second antibody ที่ใช้คือ GAM-HRP (1:1,000) ในแถวที่ 4, 8 หยดด้วย mouse anti-FMRFamide monoclonal antibodies (1:100) ที่ดูดซับด้วย PP6-BSA (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) Second antibody ที่ใช้คือ GAM-HRP (1:1,000) สลับกันเพื่อเปรียบเทียบกัน ดังภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 8 ไดอะแกรมการหยดแอนติบอดีในการทดสอบความจำเพาะของ mouse anti-FMRFamide monoclonal antibodies

Mouse anti-FMRFamide monoclonal antibodies ที่ใช้คือ FM-23 + AF1-62 + AF-32 รวมกันในอัตราส่วน 1: 1: 1 แล้วทำการเจือจางด้วย P_1^+ ในอัตราส่วน 1:100 ก่อนใช้

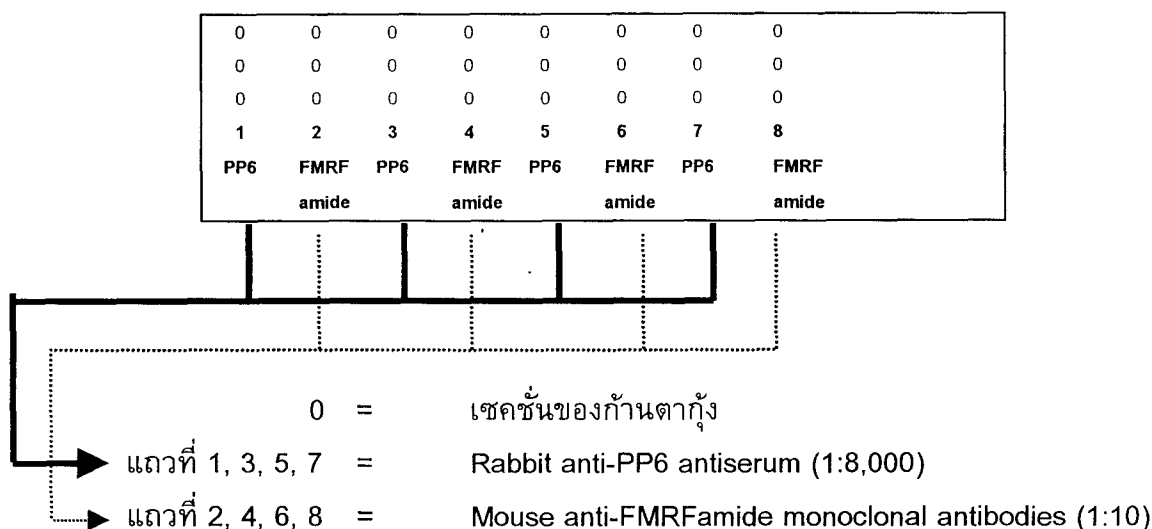
3. การทดสอบการปรากฏร่วมและการปรากฏแยกของสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide

ทำการทดลองเหมือนในข้อ ข. ทุกอย่าง Mouse anti-FMRFamide monoclonal antibodies ที่ใช้คือ FM-23 + AF1-62 + AF-32 รวมกันในอัตราส่วน 1: 1: 1 แล้วทำการเจือจางด้วย P_1^+ ในอัตราส่วน 1:100 ก่อนใช้

ค. การปรากฏร่วมและการปรากฏแยกของสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกุ้งกุลาดำ (ภาพประกอบ 11)

นำตากุ้งกุลาดำที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อตามการทดลองในข้อ 1 ก. และฝังอยู่ในพาราพลาสติกมาตัดเซลล์ที่ความหนา 8 ไมครอนให้เป็นสายริบบอนติดต่อกัน นำเซลล์ไปเรียงติดบนสไลด์ 8 เซลล์ต่อแถว และ 3 แถวต่อ 1 สไลด์ พบว่า 1 ตาที่ตัดความหนา 8 ไมครอนจะได้ประมาณ 12 - 15 สไลด์

นำสไลด์ที่มีตากุ้ง มาทดลองตามวิธีในข้อ ก ทุกอย่างยกเว้นการหยด first antibody ซึ่งสลับกันและใช้ second antibody ต่างกัน โดยในแถวที่ 1, 3, 5, 7 หยดด้วย first antibody คือ rabbit anti-PP6 antiserum อัตราส่วน 1:8,000 และ second antibody ที่ใช้คือ GAR-HRP อัตราส่วน 1:1,000 ส่วนในแถวที่ 2, 4, 6, 8 หยดด้วย mouse anti-FMRFamide monoclonal antibodies อัตราส่วน 1 : 1 หรือ 1 : 10 และ second antibody ที่ใช้คือ GAM-HRP อัตราส่วน 1:1,000 สลับกันเพื่อเปรียบเทียบกัน ดังภาพประกอบ 8

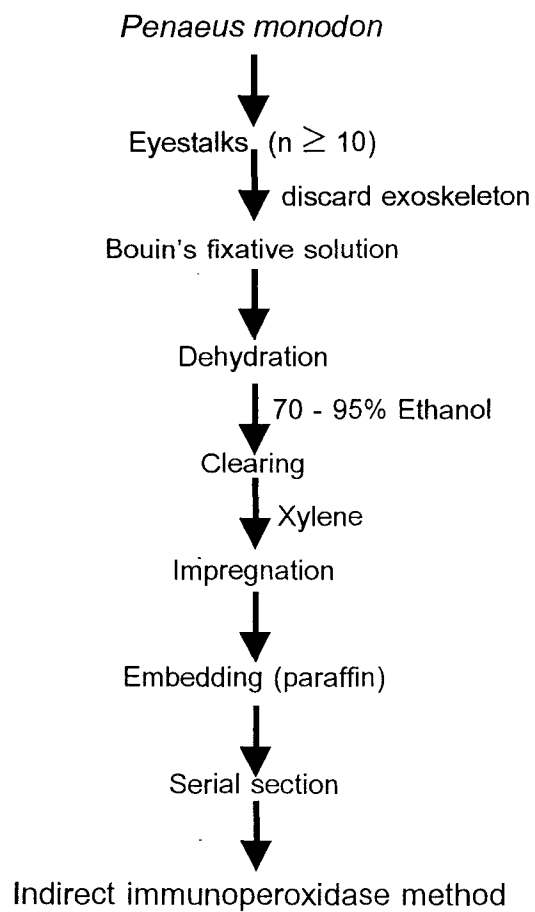


ภาพประกอบ 9 ไตอะแกรมการหยดแอนติบอดีในการศึกษาการปรากฏร่วมและการปรากฏแยก
ระหว่างสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide

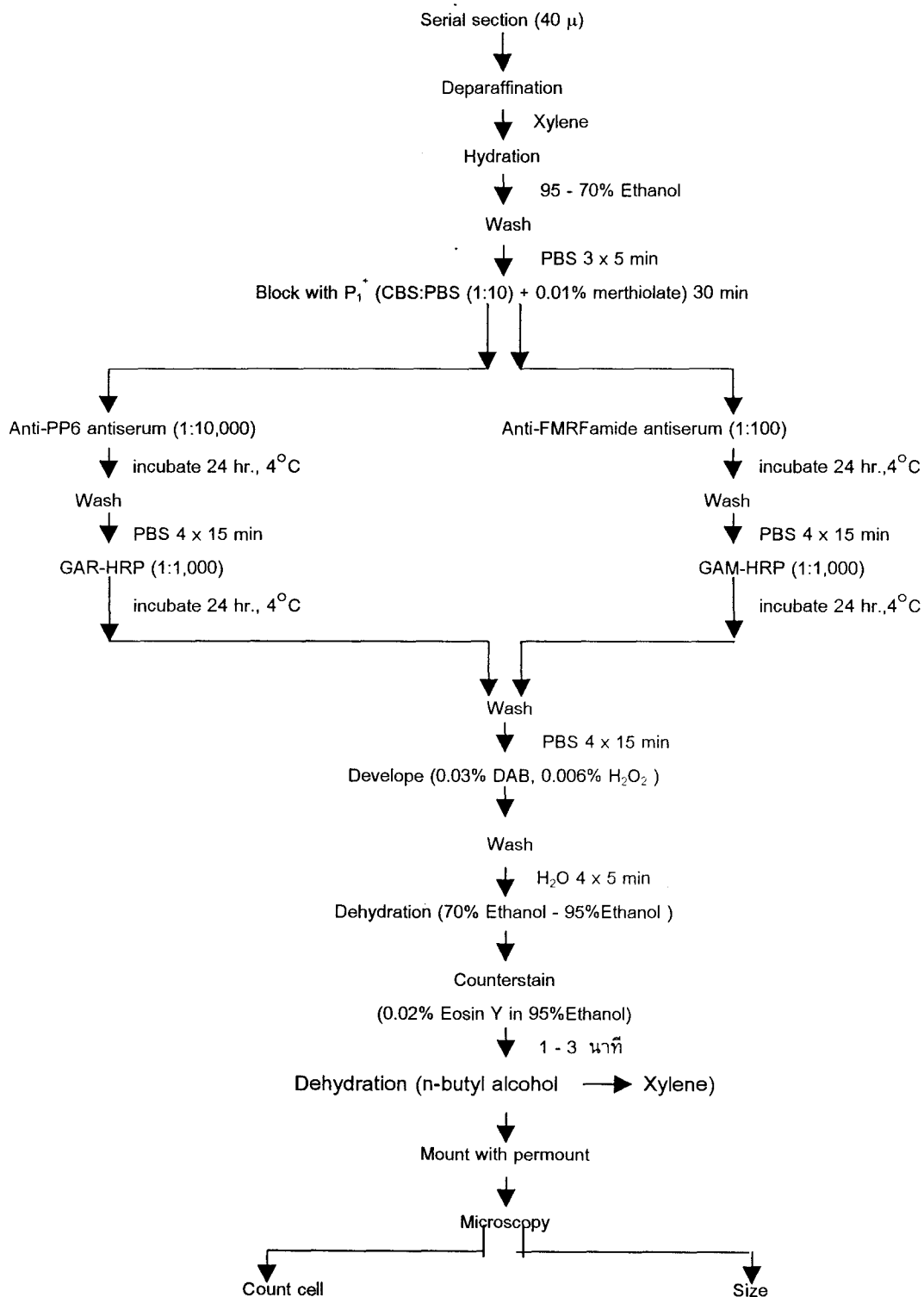
Mouse anti-FMRFamide monoclonal antibodies ที่ใช้คือ FM-23 + AF1-62 + AF-32 รวมกันในอัตราส่วน 1: 1: 1 แล้วทำการเจือจางด้วย P_1^+ ในอัตราส่วน 1:10 ก่อนใช้ ในการใช้แอนติบอดีต่างชนิดกันบนสไลด์เดียวกันต้องหยดไม่ให้อาหารละลายมารวมกัน

การเก็บรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

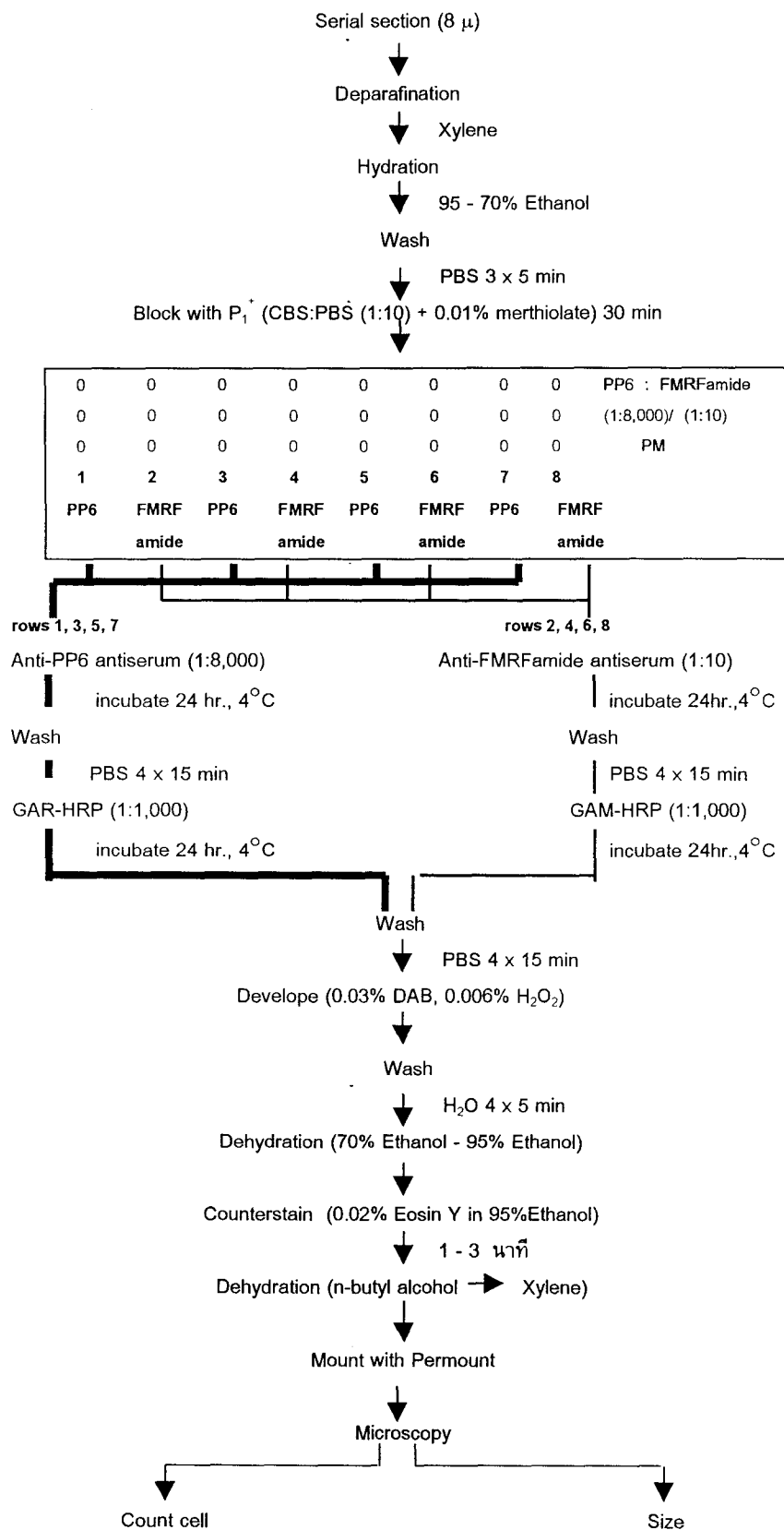
1. นำสไลด์ที่ได้มาตรวจนับจำนวนและวัดขนาดของเซลล์ประสาทและตรวจหาเส้นใยประสาทที่พบสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ทุกเซกชั่นในบริเวณต่าง ๆ ของก้านตา ดังนี้คือ lamina ganglionaris (LG) medulla externa (ME) medulla interna (MI) medulla terminalis (MT) สังเกตจากการติดสีน้ำตาลเนื่องจากปฏิกิริยาของแอนิไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วย กล้องจุลทรรศน์และบันทึกลงในตารางเพื่อเปรียบเทียบ โดยรวบรวมข้อมูลจากก้านตาจำนวนอย่างน้อย 10 ก้านตาในแต่ละสารคล้าย คำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
2. ตรวจดูว่าเซลล์ประสาทบริเวณใดพบเฉพาะสารคล้าย PP หรือ สารคล้าย FMRFamide หรือเซลล์ใดพบทั้งสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide โดยรวบรวมข้อมูลจากก้านตาจำนวนอย่างน้อย 3 ก้านตา
3. ถ่ายภาพแสดงตำแหน่งที่พบเซลล์และเส้นใยประสาทที่มีสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide
4. วาดภาพแสดงตำแหน่งที่พบเซลล์และเส้นใยประสาทที่มีสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide โดยใช้ camera lucida ติดกับตัวกล้องจุลทรรศน์



ภาพประกอบ 10 ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อทางมิถุนวิทยา



ภาพประกอบ 11 ขั้นตอนการตรวจหาตำแหน่งสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ด้วยวิธีอินไดเรคติมูโนเปอร์ออกซิเดส



ภาพประกอบ 12 ขั้นตอนการตรวจหาการปรากฏร่วมและการปรากฏแยกของสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ด้วยวิธีอินไดเร็กติฟอโรกราฟี

บทที่ 3 ผลการวิจัย

จากการตรวจหาตำแหน่งที่พบสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกิ้งกูดำด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมีสทรี ได้ผลการทดลองซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

ก. การตรวจหาตำแหน่ง (localization) เซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกิ้งกูดำ

จากการใช้เซกชันของก้านตากิ้งกูดำจำนวน 22 ก้านตา ตัดเซกชันที่ความหนา 40 ไมครอน ซึ่งตัดเป็น serial section ประมาณ 100 เซกชันต่อก้านตา และใช้แอนติบอดีคือ rabbit anti-human PP antiserum อัตราส่วน 1 : 10,000 จำนวน 10 ก้านตา และ mouse anti-FMRFamide monoclonal antibodies (แอนติบอดีผสมระหว่าง FM-23, AF1-62 และ AF2-32 อัตราส่วน 1 : 1:1) อัตราส่วน 1 : 100 จำนวน 12 ก้านตา เพื่อตรวจหาเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทและจำนวนของเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในบริเวณต่าง ๆ ของก้านตาได้ผลการทดลองดังนี้

1. การตรวจหาตำแหน่งที่พบเซลล์และเส้นใยประสาทที่มีสารคล้าย PP (ภาพประกอบ 17)

พบเซลล์ที่มีสารคล้าย PP ในก้านตากิ้งกูดำอยู่ในบริเวณรอบ ๆ medulla externa (ME) บริเวณระหว่าง medulla interna (MI) กับ medulla terminalis (MT) และบริเวณ MT (ภาพประกอบ 13 และ 14 และตาราง 6 และ 7)

ในบริเวณรอบ ๆ ME พบเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลเนื่องมาจากปฏิกิริยาของสารคล้าย PP กับแอนติบอดีต่อ PP จำนวน 42 ± 30 เซลล์ พิสัย 2 - 91 เซลล์ และเซลล์มีขนาดเล็กมีเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ 4.9 - 9.8 ไมครอน เซลล์ประสาทเหล่านี้ส่งเส้นใยประสาทเข้าไปในบริเวณ ME

ในบริเวณระหว่าง MI กับ MT พบเซลล์ประสาทที่มีสารคล้าย PP จำนวน 148 ± 18 เซลล์ พิสัย 127 - 183 เซลล์ และเซลล์มีขนาดกลางมีเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ 14.7 - 17.5 ไมครอน เซลล์ประสาทเหล่านี้ส่งเส้นใยประสาทเข้าไปในบริเวณ MI

ในบริเวณ MT พบเซลล์ประสาทที่มีสารคล้าย PP จำนวน 44 ± 31 เซลล์ พิสัย 6 - 106 เซลล์ และเซลล์มีขนาดกลางถึงขนาดใหญ่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ 17.7 - 53.9 ไมครอน ส่วนมากเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ ซึ่งจะส่งเส้นใยประสาทที่มีสารคล้าย PP เข้าไปในบริเวณ MT

ไม่พบเซลล์ประสาทที่มีสารคล้าย PP บริเวณ lamina ganglionaris (LG) (ภาพประกอบ 13.1)

โดยทั่วไปเซลล์ประสาทที่มีสารคล้าย PP ติดสีน้ำตาลอ่อนถึงเข้ม (ภาพประกอบ 13.2, 13.3 และ 13.4) เซลล์มีลักษณะเป็นทรงกลม รูปไข่ หรือทรงรี ในบริเวณระหว่าง MI กับ MT และบริเวณ MT (ภาพประกอบ 13.2, 13.3 และ 13.3) พบเซลล์มีลักษณะทรงกลมขนาด

เล็กและขนาดกลางซึ่งมีขนาดเท่ากันมากและเซลล์จะเรียงชิดติดกันมากจนบางครั้งเรียงต่อกันเป็นแนวยาวในบริเวณระหว่าง MI กับ MT (ภาพประกอบ 13.2 และ 14.3) ในบริเวณ MT มีเซลล์ขนาดกลางและขนาดใหญ่ ส่วนมากเป็นเซลล์ขนาดใหญ่มีทั้งทรงกลมและทรงรี

เซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาของสารคล้าย PP ในบริเวณระหว่าง MI กับ MT จะยื่นเส้นใยประสาทเข้าไปในบริเวณ MI (ภาพประกอบ 14.3) นอกจากนี้กลุ่มเซลล์ประสาทบริเวณระหว่าง MI กับ MT ส่งแขนงเส้นใยประสาทไปยังบริเวณด้านข้าง MI โอบล้อม MI ทางด้านบนไปยังอีกปลายด้านหนึ่งของ ME (ภาพประกอบ 14.1, 14.2 และ 14.3)

ในบริเวณรอบ ๆ ME เซลล์ประสาทที่มีสารคล้าย PP6 จะส่งเส้นใยประสาทเข้าไปในบริเวณ ME

พบเส้นใยประสาทขนาดเล็กจำนวนมากซึ่งติดสีน้ำตาลอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาของสารคล้าย PP ในบริเวณ ME MI และ MT และต่อมไชนัส บริเวณด้านข้างและด้านบนของ MI และจะมีเส้นใยประสาทและรวมเป็นเส้นขนาดใหญ่ที่บริเวณปลายสุด MI ผ่านบริเวณระหว่าง MI กับ MT ตรงไปยัง MT ปลายสุดของเส้นใยประสาทขนาดใหญ่นี้จะอ้อมกลุ่มก้อนเส้นใยประสาทขนาดเล็กจำนวนมาก ซึ่งกลุ่มก้อนเส้นใยประสาทมีลักษณะทรงกลมในบริเวณที่ติดกับต่อมไชนัส (ภาพประกอบ 14.2) ส่งเส้นใยประสาทไปรวมกับเส้นใยประสาทขนาดเล็กจากกลุ่มก้อนเส้นใยประสาทขนาดเล็กไปยังต่อมไชนัส (ภาพประกอบ 14.2) และบางเซลล์ส่งเส้นใยประสาทขนาดเล็กเข้าไปใน MT ไปรวมกับเส้นใยประสาทขนาดเล็กบริเวณด้านล่าง MT รวมเป็นเส้นใยประสาทขนาดใหญ่ขึ้นที่เส้นประสาทตา (ภาพประกอบ 14.4) ส่วนที่ต่อมไชนัสซึ่งเต็มไปด้วยเส้นใยประสาทขนาดเล็กที่มีสารคล้าย PP จะแผ่ขยายเข้าไปยังบริเวณด้านข้าง ME MI และ MT โดยต่อมไชนัสจะอยู่ชิดติดกับ MT (ภาพประกอบ 14.4)

2. การตรวจหาตำแหน่งที่พบเซลล์และเส้นใยประสาทที่มีสารคล้าย FMRFamide (ภาพประกอบ 18)

จำนวนและขนาดเซลล์ประสาทที่มีสารคล้าย FMRFamide ในบริเวณต่าง ๆ ในก้านตาของกิ้งกูด้าแสดงดังนี้ (ภาพประกอบ 15 และ 16 และตาราง 6 และ 7)

ในบริเวณ LG พบเซลล์ประสาทที่มีสารคล้าย FMRFamide จำนวน $3,118 \pm 459$ เซลล์ พิสัย 2,389 – 3,765 เซลล์ และเซลล์มีขนาดเล็กมากมีเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์น้อยกว่า 4 ไมครอน ซึ่งจะส่งเส้นใยประสาทที่มีสารคล้าย FMRFamide เข้าไปในบริเวณ ME

ในบริเวณรอบ ๆ ME พบเซลล์ประสาทที่มีสารคล้าย FMRFamide จำนวน $1,651 \pm 303$ เซลล์ พิสัย 1,111 – 2,213 เซลล์ และเซลล์มีขนาดเล็กมีเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ 4.1 – 11.00 ไมครอน ซึ่งจะส่งเส้นใยประสาทเข้าไปในบริเวณ ME

ในบริเวณระหว่าง MI กับ MT พบเซลล์ประสาทที่มีสารคล้าย FMRFamide จำนวน 116 ± 41 เซลล์ พิสัย 54 - 183 เซลล์ และเซลล์มีขนาดกลางมีเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ 14.7 ไมครอน เซลล์มีขนาดใกล้เคียงกันมาก ซึ่งจะส่งเส้นใยประสาทเข้าไปในบริเวณ MI และ MT

ในบริเวณ MT พบเซลล์ประสาทที่มีสารคล้าย FMRFamide จำนวน 303 ± 91 เซลล์ พิสัย 153 - 492 เซลล์ เซลล์มีขนาดกลางถึงขนาดใหญ่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ $19.6 - 36.5$ ไมครอน ส่วนมากเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ ซึ่งจะส่งเส้นใยประสาทเข้าไปในบริเวณ MT

ในบริเวณ ME, MI, MT และต่อมไฮโปฟิซีสพบเส้นใยประสาทขนาดเล็กที่มีสารคล้าย FMRFamide เส้นใยประสาทในต่อมไฮโปฟิซีสเป็นเส้นใยประสาทที่มาจากเซลล์ประสาทที่อยู่ในบริเวณระหว่าง MI กับ MT

บริเวณเส้นประสาทตาพบเส้นใยประสาทขนาดใหญ่ที่ติดสีน้ำตาลอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาของสารคล้าย FMRFamide ซึ่งมาจากบริเวณ MT

โดยทั่วไปเซลล์ที่ติดสีน้ำตาลเข้ม เซลล์มีลักษณะเป็นทรงกลม รูปไข่ หรือทรงรีในบริเวณรอบ ๆ ME ระหว่าง MI กับ MT และบริเวณ MT (ภาพประกอบ 15.2, 15.4 และ 16.4) บางครั้งพบเซลล์มีลักษณะขนาดกลางซึ่งมีขนาดเท่ากันมากและเซลล์จะเรียงชิดติดกันในบริเวณระหว่าง MI กับ MT (ภาพประกอบ 15.4) เซลล์ในบริเวณ MT มีหลายขนาดส่วนมากเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ (ภาพประกอบ 15.2)

นอกจากนี้ยังพบว่าต่อมไฮโปฟิซีสแผ่ขยายบริเวณด้านข้าง ME MI และ MT (ภาพประกอบ 15.1, 15.3, 16.1, 16.3) โดยต่อมไฮโปฟิซีสจะอยู่ชิดติดกับ MI และ MT (ภาพประกอบ 16.1 และ 16.3)

พบกลุ่มเซลล์ขนาดกลางจำนวนมากบริเวณระหว่าง MI กับ MT ส่งเส้นใยประสาทเข้าไปใน MI พบปลายเส้นใยประสาทอยู่ชิดต่อมไฮโปฟิซีส และนอกจากนี้ยังมีแขนงเส้นใยประสาทขนาดใหญ่บริเวณด้านข้าง MI โอบล้อม MI ทางด้านบนไปยัง ME (ภาพประกอบ 16.1 และ 16.3) และนอกจากนี้พบเส้นใยประสาทขนาดใหญ่จาก MT มายังเส้นประสาทตา (ภาพประกอบ 16.2)

ข. การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ PP6 และแอนติบอดีต่อ FMRFamide ด้วยเทคนิคการดูดซับในก้านตาของกิ้งกูดดำ (ภาพประกอบ 19 และ 20)

จากการใช้เซกชันของก้านตากิ้งกูดดำตัดเซกชันที่ความหนา 8 ไมครอน ซึ่งตัดเป็น serial section ประมาณ 300 เซกชันต่อก้านตา เพื่อการทดสอบความจำเพาะแอนติบอดีต่อ PP6 และแอนติบอดีต่อ FMRFamide ด้วยเทคนิคการดูดซับในก้านตาของกิ้งกูดดำ แบ่งผลการทดลองเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

1. การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ PP6 และแอนติบอดีต่อ FMRFamide ในบริเวณที่พบเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อ PP6 (อัตราส่วน 1:16,000) (ภาพประกอบ 19) เมื่อดูดซับแอนติบอดีต่อ PP6 ด้วย PP6-BSA ผลก็จะไม่พบเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PP6 หรือติดติดสีน้ำตาลจางมากและบางเซลล์ไม่ติดสี (ภาพประกอบ 19.2) แต่เมื่อดูดซับแอนติบอดี PP6 ด้วย FMRFamide-BSA (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในอัตราส่วนของแอนติบอดีที่ใช้) ได้ผลคล้ายกับการดูดซับด้วย

PP6-BSA โดยเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PP การติดสีจะจางลงและบางเซลล์ไม่ติดสี (ภาพประกอบ 19.4)

2. การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ FMRFamide และแอนติบอดีต่อ PP6 ในบริเวณที่พบเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำตาลอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อ FMRFamide (อัตราส่วน 1 : 100) (ภาพประกอบ 20) เมื่อดูดซับแอนติบอดีต่อ FMRFamide ด้วย FMRFamide-BSA (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในอัตราส่วนของแอนติบอดีที่ใช้) การติดสีของเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย FMRFamide จะหายไป (ภาพประกอบ 20.2) แต่เมื่อดูดซับแอนติบอดีต่อ FMRFamide ด้วยแอนติเจน PP6-BSA (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในอัตราส่วนของแอนติบอดีที่ใช้) การติดสีของเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย FMRFamide บางส่วนจะหายไป ในขณะที่เซลล์ประสาทบางส่วนยังคงติดสีอยู่ (ภาพประกอบ 20.4)

ค. การปรากฏร่วม (co-localization) และการปรากฏแยก (differential localization) ของสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกิ้งกูดดำ (ภาพประกอบ 21 และ 22)

จากการใช้เซกชันของก้านตากิ้งกูดดำ ตัดเซกชันที่ความหนา 8 ไมครอน เพื่อศึกษาการปรากฏร่วมและการปรากฏแยกของสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกิ้งกูดดำ จำนวน 2 ก้านตา ได้ผลการทดลองดังนี้

ส่วนใหญ่พบการปรากฏร่วมในบริเวณรอบ ๆ ME ระหว่าง MI กับ MT และบริเวณ MT จำนวนที่แตกต่างกันมากมักจะเป็นบริเวณรอบ ๆ ME

การปรากฏร่วมของสารคล้าย PP (ภาพประกอบ 21.1 และ 21.3) และสารคล้าย FMRFamide (ภาพประกอบ 21.2 และ 21.4) ในบริเวณระหว่าง MI และ MT ในก้านตาข้างขวาของกิ้งกูดดำ พบว่า 46.38 % และ 49.35 % ของเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PP จะพบสารคล้าย FMRFamide ด้วย ดังนั้น ประมาณครึ่งหนึ่งของเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PP ไม่พบสารคล้าย anti-FMRFamide

ภาพประกอบ 13 ภาพก้านตาข้างซ้ายของกิ้งกูดดำ บริเวณที่ติดสีน้ำตาลแสดงตำแหน่งเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบสารคล้าย PP เมื่อใช้ rabbit anti-human PP6 antiserum อัตราส่วน 1:10,000 บาร์ = 200 ไมโครเมตร

1. ภาพกำลังขยายต่ำ แสดงเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทในบริเวณต่าง ๆ ของก้านตา
2. ภาพกำลังขยายสูง แสดงกลุ่มเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทบริเวณระหว่าง MI กับ MT ในก้านตา
3. ภาพกำลังขยายสูงแสดงเซลล์ประสาทบริเวณระหว่าง MI กับ MT ซึ่งส่งเส้นใยประสาทไปยัง MT ในก้านตา
4. ภาพกำลังขยายสูง แสดงเซลล์ประสาทขนาดกลางและเซลล์ประสาทขนาดใหญ่ในบริเวณ MT ของก้านตา

LG	= Lamina ganglionaris
ME	= Medulla externa
MI	= Medulla interna
MT	= Medulla terminalis
F	= Nerve fiber
N	= Neuronal cell body



ภาพประกอบ 13 ภาพก้านตาข้างซ้ายของกิ้งกูดดำ บริเวณที่ติดสีน้ำตาลแสดงตำแหน่งเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบสารคล้าย PP เมื่อใช้ rabbit anti-human PP6 antiserum อัตราส่วน 1:10,000

ภาพประกอบ 14 ภาพก้านตาของกิ้งกูดำ บริเวณที่ติดสีน้ำตาลแสดงตำแหน่งเซลล์ประสาท และเส้นใยประสาทที่พบสารคล้าย PP เมื่อใช้ rabbit anti-human PP6 antiserum อัตราส่วน 1:10,000 บาร์ = 200 ไมโครเมตร

1. ภาพกำลังขยายต่ำ แสดงเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทในบริเวณต่าง ๆ ของก้านตาข้างซ้าย
2. ภาพกำลังขยายสูง แสดงเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทขนาดใหญ่บริเวณ MT ซึ่งอยู่ชิดกับต่อมไชนัส ส่งเส้นใยประสาทผ่านบริเวณระหว่าง MI กับ MT อ้อมส่วนโค้งด้านบนของบริเวณ MI ไปยังบริเวณ ME ของก้านตาข้างซ้าย
3. ภาพกำลังขยายสูง แสดงกลุ่มเซลล์ประสาทบริเวณระหว่าง MI กับ MT ซึ่งส่งเส้นใยประสาทเข้าไปในบริเวณ MI ของก้านตาข้างขวา
4. ภาพกำลังขยายต่ำ แสดงเซลล์ประสาทบริเวณ MT ส่งเส้นใยประสาทไปยังบริเวณ MT เส้นใยประสาทจาก MT ไปยังเส้นประสาทตา และต่อมไชนัสซึ่งแผ่ขยายเข้าไปชิดกับบริเวณ ME บริเวณระหว่าง MI กับ MT และบริเวณ MT ของก้านตาข้างซ้าย

LG	= Lamina ganglionaris
ME	= Medulla externa
MI	= Medulla interna
MT	= Medulla terminalis
SG	= Sinus gland
ON	= Optic nerve
F	= Nerve fiber
N	= Neuronal cell body



ภาพประกอบ 14 ภาพก้านตาของกึ่งกุลาดำ บริเวณที่ติดสีน้ำตาลแสดงตำแหน่งเซลล์ประสาท และเส้นใยประสาทที่พบสารคล้าย PP เมื่อใช้ rabbit anti-human PP6 antiserum อัตราส่วน 1:10,000

ภาพประกอบ 15 ภาพก้านตาข้างขวาของกิ้งกูดดำ บริเวณที่ติดสีน้ำตาลแสดงตำแหน่งเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบสารคล้าย FMRamide เมื่อใช้ mouse anti-FMRamide monoclonal antibodies อัตราส่วน 1:100 บาร์ = 200 ไมโครเมตร

1. ภาพกำลังขยายต่ำ แสดงเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทในบริเวณต่าง ๆ ของก้านตา
2. ภาพกำลังขยายสูง แสดงเซลล์ประสาทขนาดกลางและขนาดใหญ่ที่ติดสีน้ำตาลในบริเวณระหว่าง MI กับ MT และเส้นใยประสาทในบริเวณ MI และ MT
3. ภาพกำลังขยายต่ำ และ 4. ภาพกำลังขยายสูง แสดงกลุ่มเซลล์ประสาทที่บริเวณระหว่าง MI กับ MT ซึ่งส่งเส้นใยประสาทเข้าไปใน MI และต่อกันเป็นแขนงเส้นใยประสาทบริเวณด้านข้างของ MI โดยมีแขนงปลายเปิดขนาดใหญ่อยู่ชิดกับต่อมไชนัส

LG	=	Lamina ganglionaris
ME	=	Medulla externa
MI	=	Medulla interna
MT	=	Medulla terminalis
F	=	Nerve fiber
N	=	Neuronal cell body



ภาพประกอบ 15 ภาพก้านตาข้างขวาของกึ่งกุลาดำ บริเวณที่ติดสีน้ำตาลแสดงตำแหน่งเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบสารคล้าย FMRamide เมื่อใช้ mouse anti-FMRamide monoclonal antibodies อัตราส่วน 1:100

ภาพประกอบ 16 ภาพก้านตาข้างขวาของกิ้งกูด้า บริเวณที่ติดสีน้ำตาลแสดงตำแหน่งเซลล์ และเส้นใยประสาทที่พบสารคล้าย FMRFamide เมื่อใช้ mouse anti-FMRFamide monoclonal antibodies อัตราส่วน 1:100 บาร์ = 200 ไมโครเมตร

1. ภาพกำลังขยายต่ำ แสดงเซลล์ประสาท เส้นใยประสาทและต่อมไซเนสในบริเวณต่าง ๆ ของก้านตา
2. ภาพกำลังขยายสูง แสดงเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทบริเวณด้านข้างของ MI เส้นใยประสาทที่ MI กับ MT เส้นใยประสาทตามขวางในบริเวณ MT และเส้นใยประสาทจาก MT ไปยังเส้นประสาทตา
3. ภาพกำลังขยายสูง แสดงต่อมไซเนสซึ่งอยู่ชิดกับเส้นใยประสาทขนาดใหญ่ด้านข้างของ MI
4. ภาพกำลังขยายสูง แสดงเซลล์ประสาทขนาดเล็กบริเวณรอบ ๆ ME ติดกับ LG ซึ่งส่งเส้นใยประสาทไปยังบริเวณ ME

LG	= Lamina ganglionaris
ME	= Medulla externa
MI	= Medulla interna
MT	= Medulla terminalis
SG	= Sinus gland
F	= Nerve fiber
N	= Neuronal cell body



ภาพประกอบ 16 ภาพก้านตาข้างขวาของกึ่งกุลาดำ บริเวณที่ติดสีน้ำตาลแสดงตำแหน่งเซลล์ และเส้นใยประสาทที่พบสารคล้าย FMR1famide เมื่อใช้ mouse anti-FMR1famide monoclonal antibodies อัตราส่วน 1:100

ตาราง 6 ตำแหน่ง จำนวนเซลล์ประสาท และเส้นใยประสาทที่พบสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในบริเวณต่าง ๆ ของก้านตาของกิ้งกูดดำ

บริเวณต่าง ๆ ของก้านตา	ก้านตากิ้งกูดดำ	
	PP ($\bar{X} \pm SD$) n = 10	FMRFamide ($\bar{X} \pm SD$) n = 12
LG	-	3,118 \pm 459 (2,389 – 3,765)
รอบ ๆ ME	42 \pm 30 (2 - 91)	1,651 \pm 303 (1,111 – 2,213)
ระหว่าง MI กับ MT	148 \pm 18 (127 – 183)	116 \pm 41 (54 - 183)
MT	44 \pm 31 (6 - 106)	303 \pm 91 (153 - 492)
LG	-	+
ME	+	+
MI	+	+
MT	+	+
SG	+	+
OpN	+	+

LG = Lamina ganglionaris + = พบเส้นใยประสาทที่ติดสีน้ำตาล
 ME = Medulla externa - = ไม่พบเส้นใยประสาทที่ติดสีน้ำตาล
 MI = Medulla interna X = ค่าเฉลี่ย
 MT = Medulla terminalis SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
 SG = Sinus gland () = พิสัย
 OpN = Optic nerve n = จำนวนกึ่งตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม

ตาราง 7 ขนาดของเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในบริเวณต่าง ๆ ของก้านตาของกิ้งกูดดำ

บริเวณต่าง ๆ ของก้านตา	ก้านตากิ้งกูดดำ	
	PP6 (μm) n = 10	FMRFamide (μm) n = 12
LG	-	< 4.0
รอบ ๆ ME	4.9 – 9.8	4.1 – 11.00
ระหว่าง MI กับ MT	14.7 – 17.5	11.0 - 14.7
MT	21.5 – 53.9	19.6 – 36.5

ME = Medulla externa

MI = Medulla interna

MT = Medulla terminalis

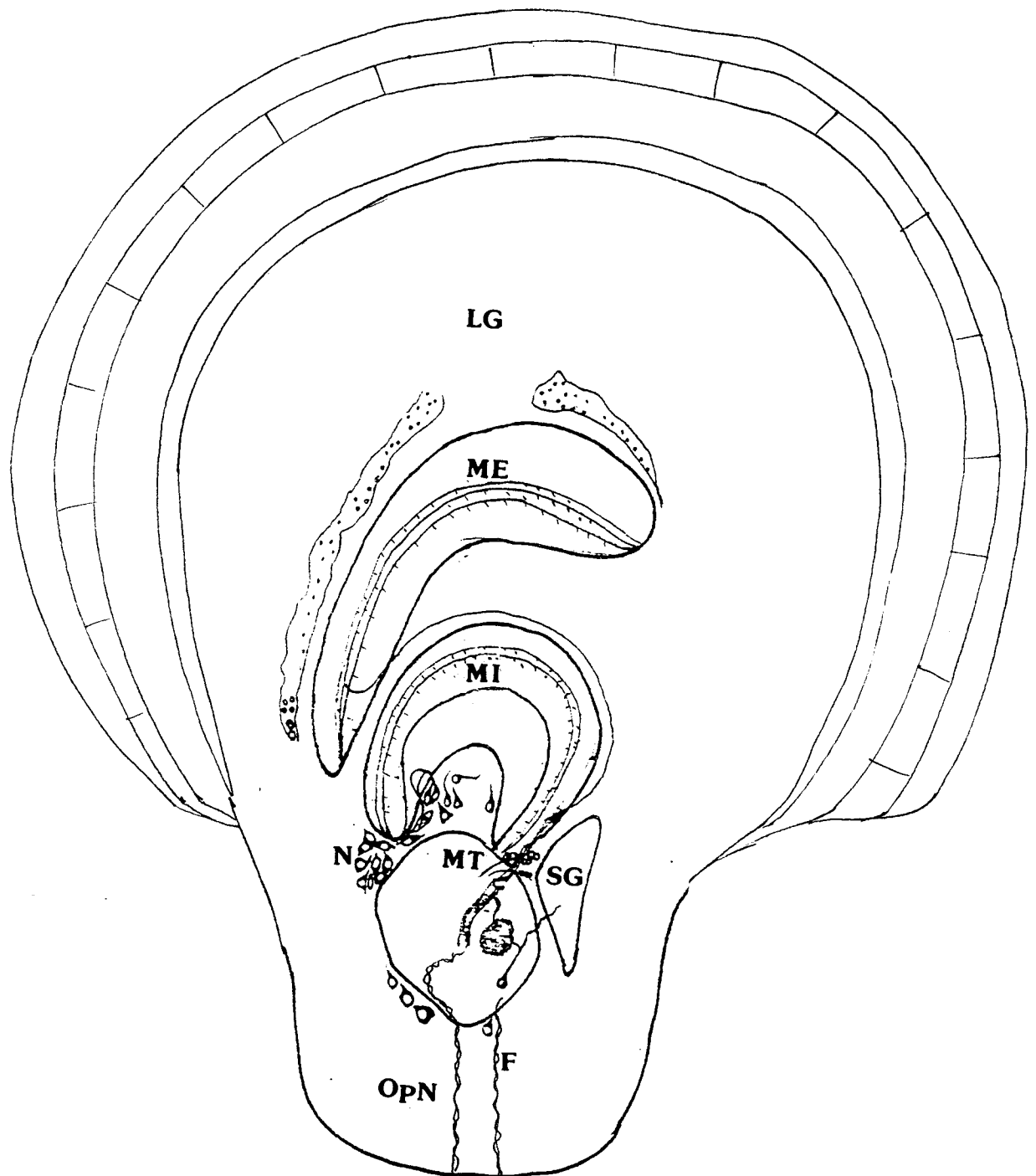
LG = Lamina ganglionaris

- = ไม่พบเส้นใยประสาทที่ติดสีน้ำตาล

n = จำนวนกึ่งตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม

ภาพประกอบ 17 ภาพวาดแสดงเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบสารคล้าย PP ในบริเวณต่าง ๆ ของก้านตาข้างซ้ายของกิ้งกูดดำ

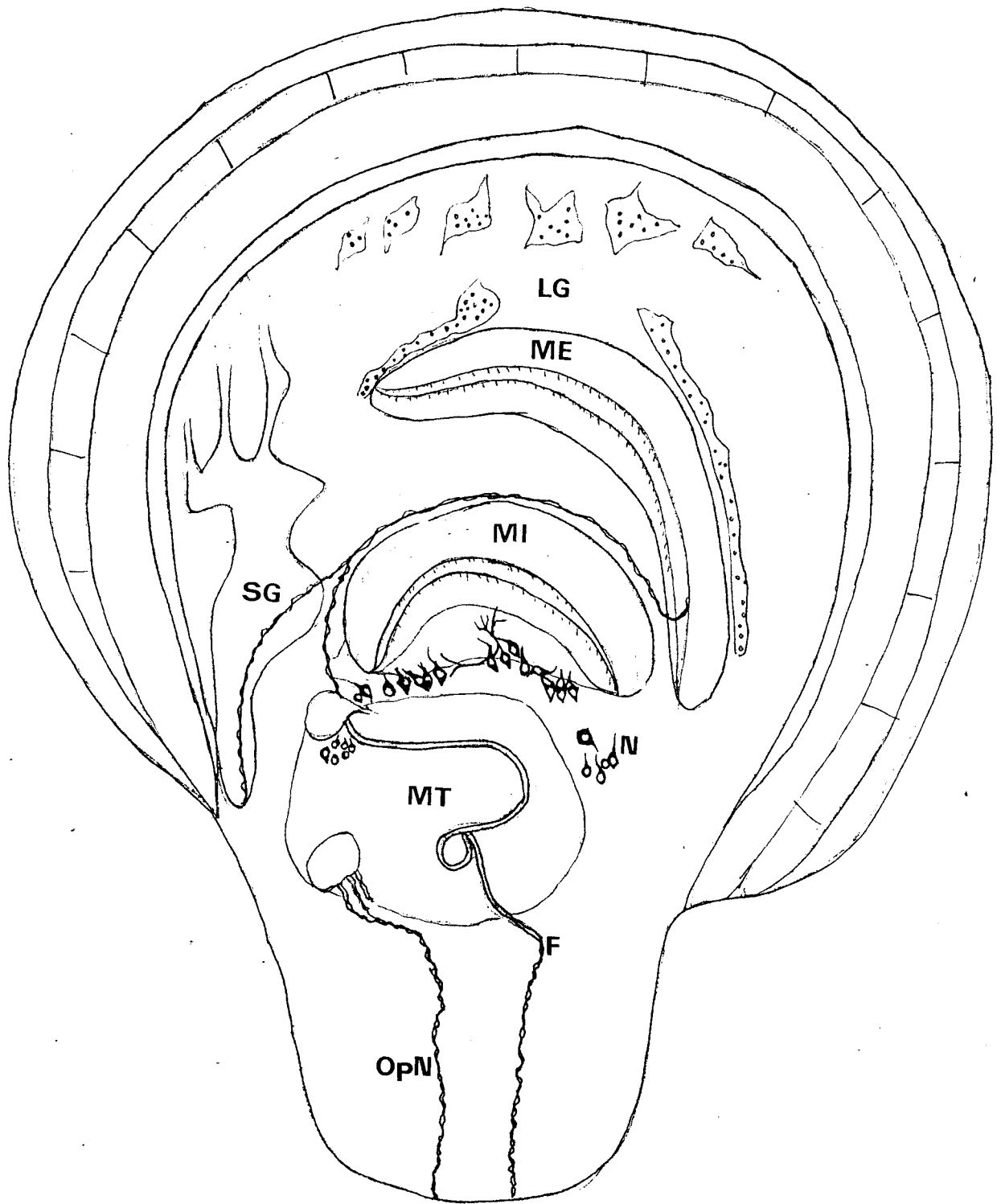
- LG = Lamina ganglionaris
- ME = Medulla externa
- MI = Medulla interna
- MT = Medulla terminalis
- SG = Sinus gland
- OpN = Optic nerve
- F = Nerve fiber
- N = Neuronal cell body



ภาพประกอบ 17 ภาพวาดแสดงเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบสารคล้าย PP ใน บริเวณต่าง ๆ ของก้านตาข้างซ้ายของกิ้งกูด้า

ภาพประกอบ 18 ภาพวาดแสดงเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบสารคล้าย FMRamide ในบริเวณต่าง ๆ ของก้านตาข้างซ้ายของกิ้งกูดำ

LG	=	Lamina ganglionaris
ME	=	Medulla externa
MI	=	Medulla interna
MT	=	Medulla terminalis
SG	=	Sinus gland
OpN	=	Optic nerve
F	=	Nerve fiber
N	=	Neuronal cell body

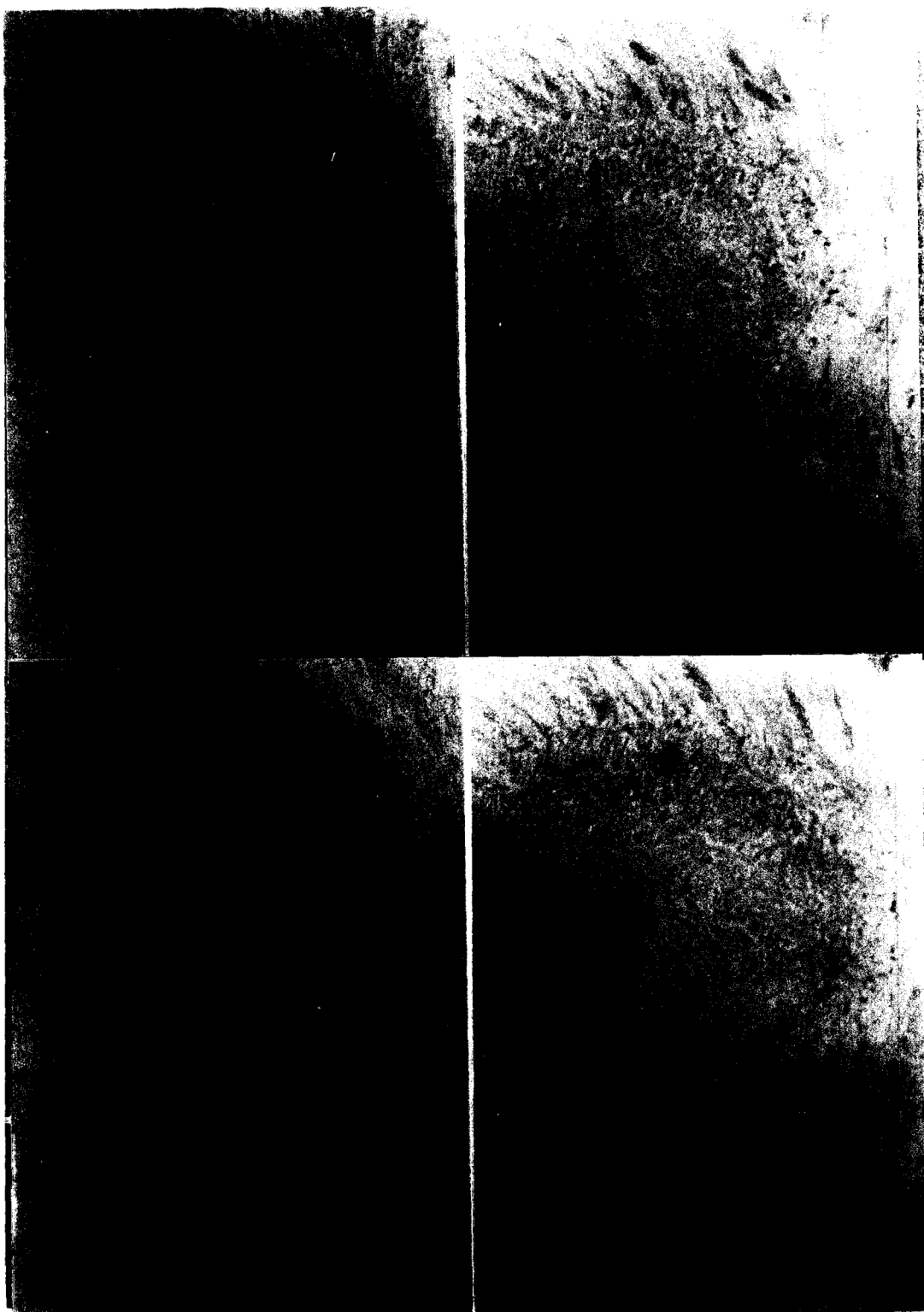


ภาพประกอบ 18 ภาพวาดแสดงเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบสารคล้าย FMRFamide ในบริเวณต่าง ๆ ของก้านตาข้างซ้ายของกิ้งกูดดำ

ภาพประกอบ 19 ภาพการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ PP และแอนติบอดีต่อ FMRFamide ในก้านตาข้างซ้ายของกึ่งกุลาดำ บาร์ = 200 ไมโครเมตร

MI = Medulla interna, MT= Medulla terminalis

1. และ 3. หยดด้วย rabbit anti-PP6 antiserum (1:16,000)
2. หยดด้วย rabbit anti-PP6 antiserum (1:16,000)
+ PP6-BSA (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) แสดงเซลล์ที่ไม่ติดสีน้ำตาล (หัวลูกศร)
4. หยดด้วย rabbit anti-PP6 antiserum (1:16,000)
+ FMRFamide-BSA (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) แสดงเซลล์ที่ไม่ติดสีน้ำตาล (หัวลูกศร)

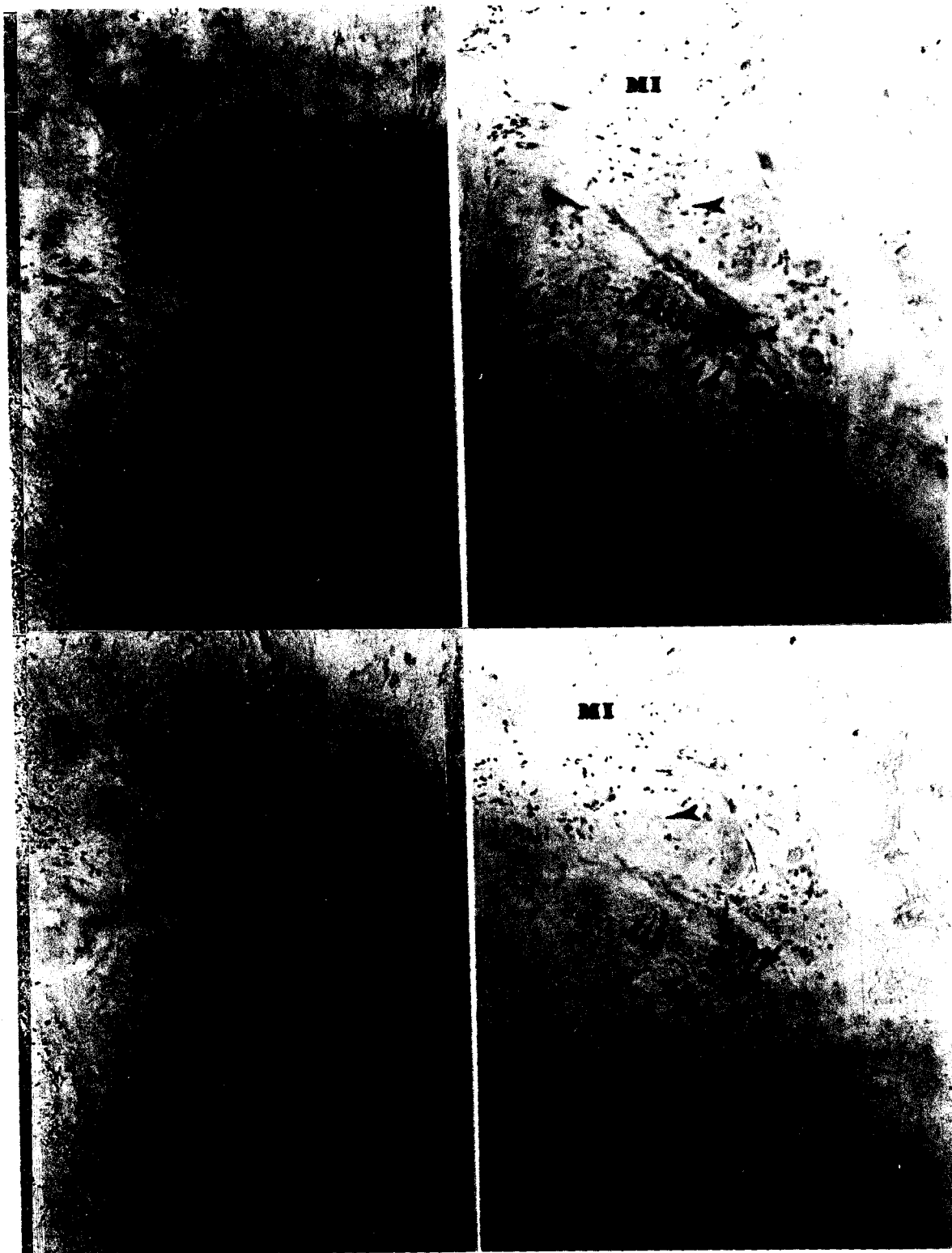


ภาพประกอบ 19 ภาพการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ PP และแอนติบอดีต่อ FMRamide ในก้านตาข้างซ้ายของกิ้งกูดดำ

ภาพประกอบ 20 ภาพการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ FMRFamide และ
แอนติบอดีต่อ PP ในก้านตาข้างซ้ายของกึ่งกูด้า บาร์ = 200 ไมโครเมตร

MI = Medulla interna, MT = Medulla terminalis

1. และ 3. หยดด้วย mouse anti-FMRFamide monoclonal antibodies (1:100)
2. หยดด้วย mouse anti-FMRFamide monoclonal antibodies
(1:100) + FMRFamide-BSA (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) แสดงเซลล์ที่ไม่ติดสีน้ำตาล
(หัวลูกศร)
4. หยดด้วย mouse anti-FMRFamide monoclonal antibodies (1:100) + PP6-BSA
(1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) แสดงเซลล์ที่ไม่ติดสีน้ำตาล (หัวลูกศร) บางเซลล์ยังติดสีน้ำตาล
(ลูกศร)

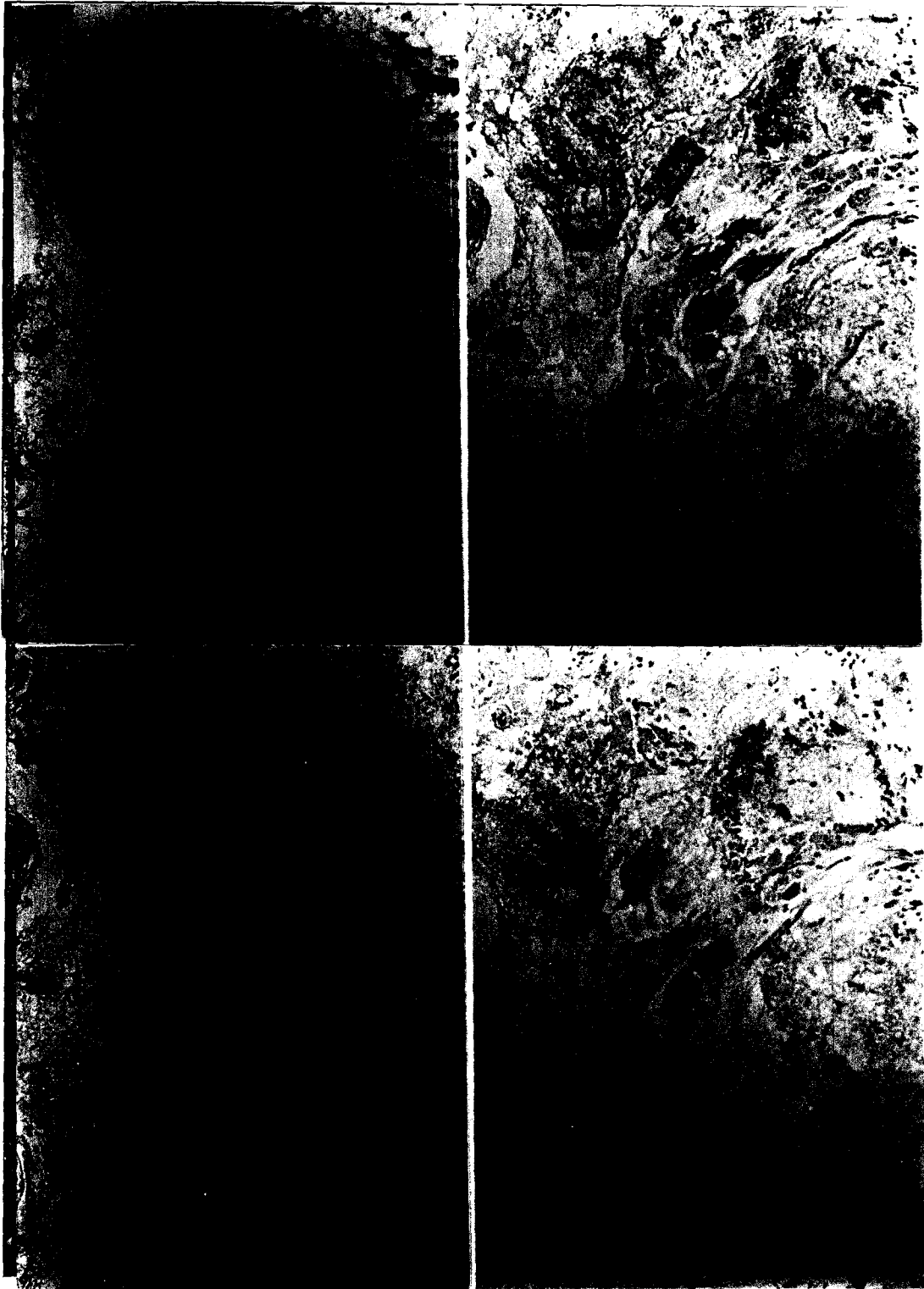


ภาพประกอบ 20 ภาพการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ FMRamide และ
แอนติบอดีต่อ PP ในก้านตาข้างซ้ายของกิ้งกูดดำ

ภาพประกอบ 21 ภาพการปรากฏร่วมในก้านตาข้างขวาของกึ่งกลาดำ บริเวณที่ติดสีน้ำตาล แสดงตำแหน่งเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบสารคล้าย PP และสารคล้าย

FMRFamide บาร์ = 200 ไมโครเมตร MT = Medulla terminalis

1. และ 3. หยดด้วย rabbit anti-PP6 antiserum (1:8,000)
2. และ 4. หยดด้วย mouse anti-FMRFamide monoclonal antibodies (1:10)



ภาพประกอบ 21 ภาพการปรากฏร่วมในก้านตาข้างขวาของกิ้งกูดำ บริเวณที่ติดสีน้ำตาล แสดงตำแหน่งเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRamide

ภาพประกอบ 22 ภาพการปรากฏร่วมและการปรากฏแยกของเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาข้างขวาของกิ้งก่าดำ บาร์ = 50 ไมโครเมตร MT = Medulla terminalis

1. และ 3. หยดด้วย rabbit anti-PP6 antiserum (1:8,000)

2. และ 4. หยดด้วย mouse anti-FMRFamide monoclonal antibodies (1:10)

ลูกศรสีดำ → แสดงเซลล์ประสาทที่พบทั้งสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide

หัวลูกศรสีดำ ➤ แสดงเซลล์ประสาทที่พบเฉพาะสารคล้าย PP



ภาพประกอบ 22 ภาพการปรากฏรวมและการปรากฏแยกของเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทที่พบสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาข้างขวาของกิ้งกูดดำ

บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผล

จากการตรวจหาเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ใน ก้านตาของกิ้งกูดดำด้วยวิธีอินไดเรคติมูโนเปอรอกซิเดส พบว่าเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย FMRFamide (เฉลี่ยประมาณ 5,000 เซลล์/ก้านตา) มีจำนวนมากกว่าเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PP มาก (เฉลี่ยประมาณ 200 เซลล์/ก้านตา) แสดงว่าถึงแม้ anti-FMRFamide antibodies จะประกอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพียง 3 ชนิด แต่ความจำเพาะของ แอนติบอดีค่อนข้างกว้าง (broad specificity) สามารถจับกับสารคล้าย FMRFamide ได้หลาย รูปแบบ ซึ่งคาดว่าจะมีมากกว่า 5 รูปแบบ ดังเช่นพบในก้านตาของกิ้งกูดดำ (Sithigorngul and others. 1998) ในขณะที่ anti-PP antiserum ซึ่งเป็น polyclonal antibodies อาจมีความจำเพาะ จับกับเปปไทด์ได้น้อยรูปแบบกว่า ซึ่งจะเห็นได้ว่าเมื่อใช้ PP6-BSA ดูดซับ anti-FMRFamide antibodies ทำให้ปฏิกิริยาทางอิมมูโน (immunoreactivity) ของเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย FMRFamide บางเซลล์เท่านั้นหายไป การติดสีของเซลล์ประสาทบางเซลล์ยังคงแสดงอยู่ ซึ่ง คล้ายกับรายงานการใช้ anti-FMRFamide antiserum ที่ดูดซับด้วย bovine PP ในตั๊กแตนซึ่ง พบว่า 30% บางเซลล์ประสาทจะยังคงต้องติดสีอยู่ (Swales and Evan. 1995) และในทางกลับ กันเมื่อใช้ FMRFamide-BSA ดูดซับ anti-PP6 antiserum ทำให้ปฏิกิริยาทางอิมมูโนของเซลล์ ประสาทที่พบสารคล้าย PP หายไป แสดงว่าแอนติบอดีทั้งสองมีปฏิกิริยาข้ามกันเนื่องจากปลาย ซีของเปปไทด์ทั้งสองมีลักษณะคล้ายกันมาก (-RFamide และ -RYamide) และแอนติบอดีต่อ เปปไทด์ทั้งสองส่วนใหญ่จะจำเพาะทางปลายซีของเปปไทด์ จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาข้ามของ แอนติบอดีต่อเปปไทด์ชนิดเดียวกันในก้านตาของกิ้งกูดดำ ซึ่งจากการใช้ rabbit anti-bovine PP₃₁₋₃₆ antiserum และ rabbit anti-FMRFamide antiserum ย่อมตบอ่อนของหนูและไก่ แอนติ- ซีรัมทั้งสองแสดงปฏิกิริยาทางอิมมูโนในเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนโซมาโตสแตตินหรือเซลล์ D เหมือนกัน (Verhaert and others. 1985) และจากการใช้ anti-PP6 antiserum เทียบกับ anti-NPF antiserum ในการตรวจหาเปปไทด์ PP6 และ NPF (Neuropeptide F) ในหอยน้ำจืด *Helix aspersa* พบว่าแอนติซีรัมทั้งสองมีปฏิกิริยาข้ามกันอย่างสมบูรณ์ (Leung and others. 1994)

แต่อย่างไรก็ตามจากการใช้ anti-FMRFamide antibodies และ anti-PP6 antiserum ตรวจหาเปปไทด์ในก้านตาบนเซกชั่นสลับกัน พบว่าเซลล์ที่พบสารคล้าย PP6 เกือบ 50% ที่ แสดงปฏิกิริยาทางอิมมูโนเหมือนกับ anti-FMRFamide antibodies (co-localization) ซึ่ง แอนติเจนที่จับโดยแอนติบอดีทั้งสองอาจเป็นชนิดเดียวกัน แอนติบอดีทั้งสองนี้อาจจับกับเปป- ไทด์ตัวเดียวกันก็ได้เพราะส่วนใหญ่แอนติบอดีทั้งสองมีปฏิกิริยาข้ามกันได้ (Myers and Evan. 1985) แต่อย่างไรก็ดีพบว่าเซลล์ที่พบสารคล้าย FMRFamide จำนวนมากมักพบสารคล้ายเปป-

ไทด์อื่นรวมอยู่ด้วยเสมอ เช่น PDH (pigment-dispersing hormone) ในปู *Carcinus maenas* และกุ้ง crayfish *Orconectes limosus* (Mangerich and others. 1987) ดังนั้นเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PP มากกว่าครึ่งหนึ่งนั้นมีสารคล้าย PP รูปแบบที่แตกต่างออกไปและไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ anti-FMRFamide antibodies ซึ่งคล้ายกับการศึกษาเปรียบเทียบโดยการใช้ anti-NPY antiserum และ anti-FMRFamide antiserum ในเซลล์ประสาทของ olfactory system ของปลาซัลมอน *Oncorhynchus masou* พบว่า anti-NPY antiserum น่าจะจับกับแอนติเจนต่างจาก anti-FMRFamide antiserum (Chiba. 1997)

ถึงแม้ว่าเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PP จะพบจำนวนน้อยกว่าเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย FMRFamide มากก็ตาม แต่สารคล้าย PP พบกระจายทั่วไปในเส้นใยประสาทที่แผ่ในบริเวณ ME, MI, MT ซึ่งเป็น neuropile แหล่งใหญ่ จึงคาดว่าสารคล้าย FMRFamide และสารคล้าย PP อาจมีบทบาทสำคัญ โดยทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter) หรือนิวโรโมดูเลเตอร์ (neuromodulator) ที่สำคัญเช่นเดียวกับที่พบในแมลงคือตั๊กแตน (Myers and Evan. 1985) ซึ่ง neuropile เหล่านี้น่าจะเกี่ยวข้องโดยตรงกับการมองเห็นของแมลง เพราะลักษณะการจัดเรียงตัวของ neuropile มีลักษณะเป็นระเบียบเช่นเดียวกับใน visual cortex ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากนี้เส้นประสาทที่พบสารคล้าย PP บางส่วนเดินทางและสิ้นสุดที่ต่อมไซเนสซึ่งเป็นแหล่งหลั่งฮอร์โมนออกสู่อิมโบลิมป์ (haemolymph) จึงไม่เป็นที่น่าสงสัยเลยว่าสารคล้าย PP บางรูปแบบทำหน้าที่เป็นนิวโรฮอโมน (neurohormone) ด้วยเช่นเดียวกับที่พบในตั๊กแตน (Myers and Evan. 1985; Swales and Evan. 1995) และแมลงสาบ (Verhearts and others. 1985) และเช่นเดียวกับสารคล้าย FMRFamide และ NPY (Lance and others. 1984; Pollock and others. 1988; Barton and others. 1994) แต่จนถึงปัจจุบันฮอร์โมนกลุ่มนี้ในสัตว์มีกระดูกสันหลังเท่านั้นที่มีการศึกษาทราบโครงสร้างลำดับกรดอะมิโน ในสัตว์พวกไม่มีกระดูกสันหลังยังไม่มียางานการศึกษาลำดับกรดอะมิโนในสัตว์ชนิดใดเลย นอกจากการศึกษาด้านอิมมูโนไซโตเคมีสทรีเท่านั้น (Leung and others. 1994; Verhaert and others. 1995; Sithigorngul and others. 1996) ดังนั้นการทำให้บริสุทธิ์และศึกษาลำดับกรดอะมิโนของสารคล้าย PP จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาบทบาทหน้าที่ PP ในการดำรงชีวิตของกุ้งและครัสตาเซียนอื่น ๆ ต่อไป

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- คมสัน ลีลาคหกิจ. "ความเคลื่อนไหวในแวดวงวิชาการ เขาซื้อขายกึ่งกันอย่างไร," วารสารการ
ประมง. 49(5): 465 – 468; 2539. ✓
- บรรจง เทียนสงฆ์ศรี. การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล. กรุงเทพฯ: อักษรเจริญทัศน์, หน้า 1 – 35; 2529. ✓
- บังอร ศรีมุกดา. การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. เอกสารวิชาการ. สถานีประมงน้ำจืดร้อย จ.ระยอง, ฉบับที่
55; 2 – 12; 2530.
- ปัญญา สุวรรณสมุทร. กุ้งแชบ๊วยและกุ้งกุลาดำ. กรุงเทพฯ: โครงการหนังสือเกษตรชุมชน. หน้า
7 – 8; 2534. ✓
- ปิยะพงษ์ โชติพันธ์. การเลี้ยงกุ้ง. โครงการคู่มือการประกอบอาชีพสำหรับประชาชน. ศูนย์ส่งเสริม
และฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, หน้า 27 – 30; 2529. ✓
- วันเพ็ญ สหายทองคำ. การแยกและการทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกุ้ง
ก้ามกรามโดยวิธี RP-HPLC. วิทยานิพนธ์. วท.ม. (เคมีชีวภาพ) กรุงเทพฯ;
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร; 2539. อัดสำเนา
- วัลลภ คงเพิ่มพูน. "กุ้งกุลาดำ," โครงการหนังสือเกษตรชุมชน. กรุงเทพฯ: หน้า 5 – 37; 2534.
- วีระวรรณ สิทธิกรกุล, ไพศาล สิทธิกรกุล, สันติ เรืองมณีไพฑูรย์, สุนิสา แสงมงคลพิพัฒน์ และเปี่ยม
ศักดิ์ เมนะเศวต. "การตรวจหานิวโรเปปไทด์ในก้านตาของกุ้งกุลาดำโดยปฏิกิริยาทาง
ภูมิคุ้มกัน," วารสารวาริชศาสตร์. 1(1): 1-19; 2537. ✓
- วีระวรรณ สิทธิกรกุล, ไพศาล สิทธิกรกุล, นรินทร์ บุญอิงเฟิศพงษ์ และ ศิวาพร ลงยันต์. "สารคล้าย
FMRFamide ในก้านตาของกุ้งก้ามกราม," วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 11(1): 15-28; 2538.
- สุนิสา แสงมงคลพิพัฒน์. การตรวจหาพิกเมนต์ดีสเพอร์ซิงฮอร์โมนในก้านตาของกุ้งก้ามกราม กุ้ง
กุลาดำ และกุ้งตะกาดด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมีสทรี. วิทยานิพนธ์. วท.ม. กรุงเทพฯ;
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร; 2536. อัดสำเนา
- Adrian, T.E. and others. *Gastroenterology*. 89: 1070-1077; 1985. in Leiter, B.A. and others.
"Peptide YY structure of the precursor and expression in exocrine pancreas," J.
Biol. Chem. 262(27): 12984-12988; 1987. ✓
- Allen, Y.S. and others. "Neuropeptide Y distribution in the rat brain," 877-879 ; 1983. ✓
- Anderson, P.A.V., A. Moosler and C.J.P. Grimmerlikhuijzen. "The presence and distribution
of Antho-RFamide-like material in scyphomedusae," Cell Tissue Res. 267: 67-74;
1992. ✓

- Agungpriyono, S. and others. "Immunohistochemical study of the distribution of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the lesser mouse deer (*Tragulus javanicus*)," Acta. Anat. 151: 232-238; 1994.
- Armstrong, E.P. and others. "Immunocytochemical evidence for the involvement of an FMRFamide-related peptides in egg production in the flatworm parasite *Polystoma nearcticum*," J. Comp. Neurol. 377: 41-48; 1997.
- Barton, C.L. and others "Isolation and structural characterisation of herring gull (*Larus argentatus*) pancreatic polypeptide," Gen. Com. Endocrinol. 93: 255-259; 1994.
- Björning, C. and S. Holmgren. "Neuropeptides in the fish gut," Neurochem. 88: 155 - 163; 1988.
- Blundell, T.L. and others. "X-ray analysis (1.4-Å resolution) of avian pancreatic polypeptide: small globular protein hormone," Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78(7): 4175-4179; 1981.
- Calingasan, M. Y. and others. "Immunocytochemical study of the gastroenteropancreatic endocrine cells of the sheep," Acta. Anat. 118: 171-180; 1984.
- Carrillo, M. and others. "Identification of hormone-producing cells of the endocrine pancreas of the sea bass, *Dicentrarchus labrax*, by ultrastructural immunocytochemistry," Gen. Comp. Endocrinol. 61: 287-301; 1986.
- Chen, S.-T., M.S. Tsai and C.L. Shen. "Distribution of FMRFamide-like immunoreactivity in the central nervous system of the formosan monkey (*Macaca cyclopsis*)," Peptides. 10: 825-834; 1989.
- Chen, Z.-W. and others. "A porcine gut polypeptide identical to the pancreatic hormone PP (pancreatic polypeptide)," FEBS Letters 341: 239-243; 1994.
- Chiba, A. "Colocalization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-neuropeptide Y (NPY)-, and molluscan cardioexcitatory tetrapeptide (FMRFamide)-like immunoreactivities in the ganglion cells of the terminal nerve of the Masu salmon," Fisheries Science. 63(1): 153-154; 1997a.
- Chiba, A. "Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the brain of the bichir, *Polypterus senegalus*, with special regard to the terminal nerve," Cell. Tissue Res.: 289: 275 - 284; 1997b.
- Conlon, J.M., A. Balasubramaniam, and N. Hazon. "Structural characterization and biological activity of a neuropeptide Y-related peptide from the dogfish, *Scyliorhinus canicula*," Endocrinology 128(5): 2273-2279; 1991.

- Conlon, J.M. and others. "Primary structure and conformational analysis of peptide methionine-tyrosine, a peptide related to neuropeptide Y and peptide YY isolated from lamprey intestine," Eur. J. Biochem. 199: 293-298; 1991.
- Cowden, C., A.O.W. Stretton and R.E. Davis. "AF1, a sequenced bioactive neuropeptide isolated from the nematode *Ascaris suum*," Neuron. 2: 1415-1473; 1989.
- Cowden, C. and others. "Localization and differential expression of FMRFamide-like immunoreactivity in the nematode *Ascaris suum*," J. Comp. Neurol. 333: 455-468; 1993.
- Cowden, C. and A.O.W. Stretton. "Eight novel FMRFamide-like neuropeptides isolated from the nematode *Ascaris suum*," Peptides. 16(3): 491-500; 1995.
- Cutfield, S.M., A. Carne and J.F. Cutfield. "The amino-acid sequences of sculpin islet somatostatin-28 and peptide YY," FEBS. 214(1): 57-61; 1987.
- Dawbarn, D., S.P. Hunt and P.C. Emson. "Neuropeptide Y: regional distribution chromatographic characterization and immunohistochemical demonstration in post-mortem human brain," Brain Research. 296: 168-173; 1984.
- Dockray, G.J. and others. "A novel active pentapeptide from chicken brain identified by antibodies to FMRFamide," Nature. 305: 328-330; 1983.
- Dockray, G.J. and R.G. Williams. "FMRFamide-like immunoreactivity in rat brain: development of radioimmunoassays and its application in studies of distribution and chromatography properties," Brain Research. 226: 295-303; 1983.
- Duve, H. and others. "Isolation, structure, and activity of -Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ neuropeptides (designated calliFMRFamides) from the blowfly *Calliphora vomitoria*," Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 2326-2330; 1992.
- Edwards, A.V., S.R. Bloom and M.A. Ghatei. "Pancreatic endocrine responses to the peptides VIP and PACAP in the conscious calf," Experimental Physiology. 82: 717-727; 1997.
- Elayat, A.A., M.M. El-Naggar and M. Tahir. "An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets," J. Anat. 186: 629-637; 1995.
- Elofsson, R. "Monoaminergic and peptidergic neurons in the nervous system of *Hutchinsoniella macracantha* (Cephalocarida)," J. Crustacean biol. 12(4): 531-536; 1992.
- El-Salhy, M. and others. "The distribution of polypeptide YY (PYY) and pancreatic polypeptide (PP) immunoreactive cells in the domestic fowl," Histochem. 75: 25-30; 1982

- El-Salhy, M. and others. "Immunocytochemical identification of polypeptide YY (PYY) cells in the human gastrointestinal tract," Histochem. 77: 15-23; 1983.
- Evans, B.D. and R.L. Calabrese. "Small cardioactive peptide-like immunoreactivity and its colocalization with FMRFamide-like immunoreactivity in the central nervous system of the leech *Hirudo medicinalis*," Cell Tissue Res. 257: 187-199; 1989.
- Evans, B.D. and others "Identification of RFamide neuropeptides in the medicinal leech," Peptides. 12: 879-908; 1991.
- Farfante, P.I. and B. Kensley. "Genus *penaeus* Fabricius," Pemaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world : keys and diagnosis for the families and genera. Memories du museum national d'Histoire naturelle, Paris, 132; 1997.
- Gersell, D.J., R.L. Gingerich and M.H. Greider. "Regional distribution and concentration of pancreatic polypeptide in the human and canine pancreas," Diabetes. 28: 11-15; 1979.
- Glover, D. and others. "Conformational studies on the pancreatic polypeptide hormone family," J. Biochem. 142: 379-385; 1985.
- Grimmelikhuijzen, C.J.P., G.J. Dockray and L.P.C. Schot. "FMRFamide-like immunoreactivity in the nervous system of Hydra," Histochem. 73 : 499-508; 1982.
- Grimmelikhuijzen, C.J.P., and D. Graff. "Isolation of <Glu-Gly-Arg-Phe-NH₂ (Antho-RFamide), a neuropeptide from sea anemones," Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 9817-9821; 1986.
- Gu, J. and others. "Neuropeptide tyrosine (NPY) - a major cardiac neuropeptide," Lancet. 1008 - 1010 ; 1983.
- Harzsch, S. and R.R. Dawirs. "Development of neurons exhibiting FMRFamide-related immunoreactivity in the central nervous system of larvae of the spider crab *Hyas araneus* (Decapoda;Majidae)," J. Crustacean biol. 16(1): 10-19; 1996.
- Hokfelt, T. and others. "Occurrence of neuropeptide Y (NPY)- like immunoreactivity in catecholamine neurons in the human medulla oblongata," Neuroscience Letters. 36: 217-222 ; 1983.
- Honma, Y. and others. "Immunohistochemical localization of neuropeptides in the cephalic ganglion of the land crab *Chiromantes haematocheir*," Fisheries Science 62(6): 909-913; 1996.
- Jenkin, P.M. "Source of kinetic and metabolic hormones," Animal hormones a comparative survey part I – kinetic and metabolic hormones. Pergamon press, London, 18-55.

- Jensen, N. and J.M. Conlon. "Characterization of peptides related to neuropeptide tyrosine and peptide tyrosine-tyrosine from the brain and gastrointestinal tract of teleost fish," J. Biochem. 210 : 405-410 ; 1992.
- Johnston, R.N. and others. "GYIRFamide: A novel FMRFamide-related peptide (FaRP) from the triclad turbellarian, *Dugesia trigrina*," Biochem. Biophys. Res. Com. 209(2): 689-697; 1995.
- Johnston, R.N. and others. "Isolation, localization and bioactivity of the FMRFamide-related neuropeptides GYIRFamide and YIRFamide from the marine turbellarian, *Bdelloura candida*," J. Neurochem. 67: 814-821; 1996.
- Kimmel, J.R., H.G. Pollock and R.L. Hazelwood. "Isolation and characterization of chicken insulin," Endocrinol. 83: 1323-1330; 1968.
- Kimmel, J.R., L.J. Hayden, and H.G. Pollock. "Isolation and characterization of a new pancreatic polypeptide hormone," J. Bio. Chem. 250(24) : 9369-9376; 1975.
- Kimmel, R.J. and others. "Pancreatic polypeptide from rat pancreas," Endocrinol. 114(5): 1725-1731; 1984.
- Krajniak, K.C. and D.A. Price. "Authentic FMRFamide is present in the polychaete *Nereis virens*," Peptides. 11: 75-77; 1990
- Krajniak, K.C. "The Identification and structure-activity relations of a cardioactive FMRFamide-related peptide from the blue crab *Callinectes sapidus*," Peptides. 12: 1295-1302; 1991.
- Krause, W.J. and others. "Immunohistochemical study of the developing endocrine pancreas of the opossum (*Didelphis virginiana*)," Acta Anat. 135: 84-96; 1989.
- Lance, V. and other. "Isolation and characterization of reptilian insulin, glucagon, and pancreatic polypeptide: complete amino acid sequence of alligator (*Alligator mississippiensis*) insulin and pancreatic polypeptide," Gen. Comp. Endocrinol. 55: 112-124; 1984.
- Langslow, D.R., J.R. Kimmel and H.G. Pollock. "Studies of the distribution of a new avian pancreatic polypeptide and insulin among birds, reptiles, amphibians and mammals," Endocrinol. 93: 558-565; 1973.
- Larhammar, D. and others. "Evolution of neuropeptide Y and its related peptides," Comp. Biochem. Physiol. 106C: 743-752; 1993.
- Larsson, L.-I. and others. "Localization of APP, a postulated new hormone, to a pancreatic endocrine cell type," Histochem. 42: 377-382; 1974.

- Leiter, A.B., H.T. Keutmann, and R.H. Goodman. "Structure of a precursor to human pancreatic polypeptide," J. Biol. Chem. 259(23): 14702-14705; 1984.
- Leiter, A.B. and others. "Peptide YY structure of the precursor and expression in exocrine pancreas," J. Biol. Chem. 262(27): 12984-12988; 1987.
- Leung, S.P. and others. "Immunohistochemical distribution of neuropeptides F (NPF) in the gastropod mollusc, *Helix aspersa*, and in several other invertebrates," Cell tissue Res. 275: 383-393; 1994.
- Lin, T.-M. and others. "Bovine pancreatic polypeptide : action on gastric and pancreatic secretion in dogs," Am. J. Physiol. 232(3): E311-E315; 1977.
- Lukinius, A. and others. "Ultrastructural studies of the ontogeny of fetal human and porcine endocrine pancreas, with special reference to colocalization of the four major islet hormones," Develop. Bio. 153: 376-385; 1992.
- Lundberg, J.M. and K. Tatemoto. "Pancreatic polypeptide family (APP, BPP, NPY and PYY) in relation to sympathetic vasoconstriction resistant to α -adrenoceptor blockade," Acta Physiol Scand. 116: 393-402; 1982.
- Lundberg, J.M. and others. "Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function," Acta Physiol. Scand. 116: 477-480; 1982.
- Lundberg, J.M. and others. "Localization of peptide YY (PYY) in gastrointestinal endocrine cells and effects on intestinal blood flow and motility," Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 4471-4475; 1982.
- Lundberg, J.M. and others. "High levels of neuropeptide Y in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man," Neuroscience Letters. 42: 167-172; 1983.
- Lundberg, J.M. and L. Stjarne. "Neuropeptide Y (NPY) depresses the secretion of -like adrenalin and the contractile response evoked? stimulation, in rat vas deferens," Acta Physiol. Scand. 120: 477-479 ; 1984.
- Mangerich, S. and others. "Immunocytochemical localization of pigment dispersing hormone (PDH) and its coexistence with FMRFamide immunoreactivity material in the eyestalk of the decapod crustaceans *Carcinus maenas* and *Orconectes limosus*," Cell tissue Res. 260: 365-375; 1987.
- Majane, E.A., P. Panula and H.-Y.T. Yang. "Rat brain regional distribution and spinal cord neuronal pathway of FLFQPQRF-NH₂ a mammalian FMRF-NH₂-like peptide," Brain Res. 494: 1-12; 1989.

- Majane, E.A. and H.-Y.T. Yang. "Mammalian FMRF-NH₂-like peptide in rat pituitary: decrease by osmotic stimulus," Peptides. 12: 1303-1308; 1991.
- Marks N.J. and others. "Isolation and primary structure of a novel avian pancreatic polypeptide from five species of Eurasian crow," Regulatory Peptides. 47: 187-194 ; 1993.
- Marks, J.N. and others. "Rabbit pancreatic polypeptide," Comp. Biochem. Physiol. 106B(4): 883-887; 1993.
- Maule, A.G. and others. "GNFFRFamide: a novel FMRFamide immunoreactivity peptide isolate from the sheep tapeworm *Moniezia expansa*," Biochem Biophys. Res. Com. 193(3): 1054-1060; 1993.
- Maule, A.G., D.W. Halton and C. Shaw. "Neuropeptide F : a ubiquitous invertebrate neuromediator?," Hydrobiologia. 305: 297-303; 1995.
- McGaw, I.J. and B.R. McMahon. "The FMRFamide-related peptides F1 and F2 alter hemolymph distribution and cardiac output in the crab *Cancer magister*," Biol. Bull. 188: 186-196; 1995.
- McTigue, D.M., N.K. Edwards and R.C. Rogers. "Pancreatic polypeptide in dorsal vagal complex stimulates gastric acid secretion and motility in the rats," Am. J. Physiol. 265: G1169-G1176; 1993.
- McTigue, D.M. and C.-H. Chen. "Intracisternal rat pancreatic polypeptide stimulates gastric emptying in the rat," Am. J. Physiol. 269: R167-R172; 1995.
- McTigue, D.M. and R.C. Rogers. "Pancreatic polypeptide stimulates gastric acid secretion through a vagal mechanism in rats," Am. J. Physiol. 269: R983-R987; 1995.
- Mercier, A.J. "FMRFamide-like immunoreactivity in the crayfish nervous system," J. Exp. Biol. 156: 519-538; 1991.
- Mercier, A.J. and others. "Isolation of two FMRFamide-related peptides from crayfish pericardial organs," Peptides. 14: 137-143; 1993.
- Miranda, L.D. and others. "Localization of neuropeptides in the nervous system of the marine annelid *Sabellastarte manifera*," Cell tissue. Res. 210-214; 1991.
- Miyachi, S. and others "The distribution of polypeptide YY-like immunoreactivity in rat tissues," Endocrinol. 118: 2163-2167; 1986.
- Murphy, W.A. and others. "Human pancreatic polypeptide inhibits insulin release in the rat," Biochem Biophys. Res. Com. 101: 189-193; 1981.
- Norris O.D. and others. "Chemical regulators of metabolism," Vertebrate Endocrinology. 3th: Academic press, USA, 519-520; 1997.

- Okita, M. and others. "Central cholinergic regulation of pancreatic polypeptide secretion in conscious dogs," J. Endocrinol. 154: 311-317 ; 1997.
- Pappas, T.N., H.T. Debas and I.L. Taylor. "Enterogastrone-like effect of peptide YY is vagally mediated in the dogs," J. Clinical. Inves. 77: 49-53; 1986.
- Pollock, H.G. and others. "Isolation of peptide hormones from the pancreas of the bullfrog (*Rana catesbeiana*)," J. Biol. Chem. 263(20): 9746-9751; 1988.
- Price, D.A. and M.J. Greenberg. "Structure of molluscan cardioexcitatory neuropeptide," Science. 197: 670-671; 1977
- Price, D.A. "The FMRFamide-like peptide of *Helix aspersa*," Com. Biochem Physiol. 72C: 325-328; 1982.
- Price, D.A. "The FMRFamide-like peptide of *Helix aspersa*," Com. Biochem Physiol. 193(3): 1054-1060; 1993.
- Reinecke, M., C. Muller and H. Segner. "An immunohistochemical analysis of the ontogeny, distribution and coexistence of 12 regulatory peptides and serotonin in endocrine cells and nerve fibers of the digestive tract of the turbot, *Scophthalmus maximus* Teleostei," Anat. Embryol. 195: 87 - 102; 1997.
- Robb, S., L.C. Packman and P.D. Evans. "Isolation, primary structure and activity of SchistoFIRFamide, a FMRFamide-like neuropeptide from the locust, *Schistocera gregaria*," Biochem Biophys Res Com. 160: 850-856; 1989.
- Rombout, J.H.W.M. and others. "Immunocytochemical identification and localization of peptide hormones the gastro-entero-pancreatic (GEP) endocrine system the mouse and a stomachless fish, *Barbus conchoniuis*," Biochem. 84: 471-483; 1986.
- Shaw, C. and others. "Neuropeptide Y and neuropeptide Y 3-36: isolation from human pancreatic endocrine tumours," Regulatory Peptides. 45: 387-394; 1993.
- Shaw C., A.G. Maule and D.W. Halton. "Platyhelminth FMRFamide-related peptides ," Inter. J. Parasitol. 26(4): 335-345; 1996.
- Sithigorngul, P., A.O.W. Stretton and C. Cowden. "Neuropeptide diversity in *Ascaris*: an Immunocytochemical study," J. Comp. Neurol. 294: 362-376; 1990.
- Sithigorngul, P., A.O.W. Stretton and C. Cowden. "A versatile dot-ELISA method with femtomole sensitivity for detecting small peptides," J. Immunol. Methods. 141: 23-32; 1991.
- Sithigorngul, P. and A.O.W. Stretton "Sixmore FMRFamide-like peptide from the nematode *Caenorhabditis elegans*: Four new and two old," Third progress report for biotechnology career fellowship the Rockefeller foundation. 1-18; 1995.

- Sithigorngul, P., C. Cowden. and A.O.W. Stretton. "Heterogeneity of cholecystokinin/ gastrin-like immunoreactivity in the nervous system of the nematode *Aacaris suum*," J. Comp. Neurol. 370: 427-442; 1996.
- Sithigorngul, P. and others. "Novel FMRFamide-like neuropeptides from the eyestalk of the giant freshwater prawn *Macrobrachium resenbergtii*," Com. Biochem Physiol. 120B: 587-595; 1998.
- Solis, N.B. Biology and Culture of *Penaeus monodon*. Asian Fisheries Development Center, Philippins, 6-10; 1988
- Stjernquist, M. and others. "Neuropeptide Y in the female reproductive tract of the rat. Distribution of nerve fibres and motor effects," Neuroscience Letters. 39: 279-284; 1983.
- Swales, L. and P.D. Evans. "Distribution of schistoFLRFamide-like immunoreactivity in the adult ventral nervous system of the locust, *Schistocerca gregaria*," Cell tissue. Res. 281: 339-348; 1995.
- Tatemoto, K. and V. Mutt. "Chemical determination of polypeptide hormones," Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75: 4115-4119; 1978.
- Tatemoto, K. and V. Mutt. "Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides," Nature. 285: 417-418; 1980.
- Tatemoto, K. and V. Mutt. "Chemical determination of polypeptide hormones," Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75(9): 4115-4119; 1978.
- Tatemoto, K., M. Carlquist and V. Mutt. "Neuropeptide Y - a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide," Nature. 296: 659-660; 1982.
- Tatemoto, K. "Isolation and characterization of peptide YY (PYY), a candidate gut hormone that inhibits pancreatic exocrine secretion," Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 2514-2518; 1982a.
- Tatemoto, K. "Neuropeptide Y: Complete amino acid sequence of the brain peptide," Biochem. 79: 5485-5489; 1982b.
- Tatemoto, K. and others. "Isolation and characterization of neuropeptide Y from porcine intestine," FEBS. 179: 181-184; 1985.
- Tatemoto, K. "Isolation and primary structure of human peptide YY," Biochem Biophys. Res. Com. 157(2): 713-717; 1988.

- Too, C.K.L. and R.P. Croll. "Detection of FMRFamide-like immunoreactivities in the sea scallop *Placopecten magellanicus* by immunohistochemistry and Western blot analysis," Cell tissue. Res. 281: 295-304; 1995.
- Trimmer B.A., L.A. Kobierski and E.A. Kravitz. "Purification and characterization of FMRFamidelike immunoreactive substances from the lobster nervous system: Isolation and sequence analysis of two closely related peptides," J. Comp. Neurol. 266: 16-26; 1987.
- Vallarino, M. and others. "Distribution of FMRFamide-like immunoreactivity in the brain of the Elasmobranch fish *Scyliorhinus canicula*," Peptides. 12: 1321-1328; 1991.
- Veenstra, J.A. and G. Lambrou. "Isolation of a novel RFamide peptide from midgut of the american cockroach, *Periplaneta americana* ," Biochem. Biophys. Res. Commun. 213(2): 519-524 ; 1995.
- Verheart, P., C.J.P. Grimmelikhuijzen and A.D. Loof. "Distinct localization of FMRFamide- and bovine Pancreatic Polypeptide-like material in the brain, retrocerebral complex and suboesophageal ganglion of the cockroach *Periplaneta americana*," Brain Res. 348: 331-338; 1985.
- Wager-Page, S.A. and others. "Spinal modulation of duodenal and Conlonic motility and arterial pressure by neuropeptide Y, neuropeptide Y fragment 13-36, peptide YY, and pancreatic polypeptide in rats: involvement of the cholinergic nervous system," Can J. Physiol. Pharma-col. 71: 112-119; 1993.
- Wager-Page, A.S. and others. "Peripheral modulation of duodenal and Conlonic motility and arterial pressure by neuropeptide Y, neuropeptide Y fragment 13-36, peptide YY, and pancreatic polypeptide in rats: Cholinergic mechanisms," Can. J. Physiol. Pharma-col. 71: 768-775; 1993.
- Westfall, J.A. and C.J.P. Grimmelikhuijzen. "Antho-RFamide immunoreactivity in neuronal synaptic and nonsynaptic vesicles of sea anemones," Biol. Bull. 185: 109-114; 1993.
- Yang, and others. "Isolation, sequencing, synthesis, and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine," Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 7757-7761; 1985.
- Yasuda, A., Y. Naya and K. Nakanishi. "Isolation of Antho -RFamide related peptides from the eyestalks of the blue crab," Comp. Biochem. Physiol. 104B: 235-240; 1993.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ข้อมูลดิบ : ตำแหน่งและจำนวนของเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PP และ
สารคล้าย FMRFamide ในบริเวณต่าง ๆ ในก้านตาของกิ้งกูดดำ

ตาราง 8 ตำแหน่งและจำนวนของเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PP ในบริเวณต่าง ๆ ในก้าน
ตาของกิ้งกูดำในแต่ละก้านตา

บริเวณ ก้านตาที่/ ตา/เพศ	LG (เซลล์)	รอบ ๆ ME (เซลล์)	ระหว่าง MI กับ MT (เซลล์)	MT (เซลล์)	Total (เซลล์)	SG	OpN
1/ ตาซ้าย/เพศเมีย	-	71	128	106	305	+	+
2/ ตาซ้าย/เพศเมีย	-	91	163	6	260	+	+
3/ ตาซ้าย/เพศเมีย	-	50	137	34	221	+	+
4/ ตาซ้าย/เพศเมีย	-	48	131	23	202	+	+
5/ ตาซ้าย/เพศเมีย	-	67	127	58	252	+	+
6/ ตาขวา/เพศเมีย	-	46	157	16	219	+	+
7/ ตาขวา/เพศเมีย	-	26	183	24	233	+	+
8/ ตาขวา/เพศเมีย	-	6	160	31	197	+	+
9/ ตาขวา/เพศเมีย	-	2	152	69	223	+	+
10/ตาขวา/เพศเมีย	-	11	147	74	232	+	+

หมายเหตุ : เซลล์ประสาทในบริเวณรอบ ๆ ME ติดสีน้ำตาลจางกว่าในเซลล์ประสาทใน
บริเวณอื่น

LG = Lamina ganglionalis

ME = Medulla externa

MI = Medulla interna

MT = Medulla terminaris

SG = Sinus gland

OpN = Optic nerve

+ = พบเส้นใยประสาทที่ติดสีน้ำตาล

ตาราง 9 ตำแหน่งและจำนวนของเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย FMRamide ในบริเวณต่าง ๆ
 ในก้านตาของกิ้งก่าดำในแต่ละก้านตา

บริเวณ ก้านตาที่/ ตา/เพศ	LG (เซลล์)	รอบ ๆ ME (เซลล์)	ระหว่าง MI กับ MT (เซลล์)	MT (เซลล์)	TOTAL (เซลล์)	SG	OpN
1/ ตาซ้าย/เพศเมีย	3,192	1,697	88	263	5,561	+	+
2/ ตาซ้าย/เพศเมีย	3,234	1,768	81	380	5,584	+	+
3/ ตาซ้าย/เพศเมีย	3,548	1,558	147	193	3,918	+	+
4/ ตาขวา/เพศเมีย	3,412	1,862	54	233	5,650	+	+
5/ ตาขวา/เพศเมีย	2,875	2,213	149	347	5,753	+	+
6/ ตาขวา/เพศเมีย	2,489	1,111	100	218	5,240	+	+
7/ ตาขวา/เพศเมีย	3,402	1,844	136	268	5,463	+	+
8/ ตาขวา/เพศเมีย	3,492	1,764	65	432	4,287	+	+
9/ ตาขวา/เพศเมีย	2,487	1,439	105	256	5,446	+	+
10/ตาขวา/เพศเมีย	3,132	1,565	183	153	5,033	+	+
11/ตาขวา/เพศเมีย	2,389	1,190	123	400	4,102	+	+
12/ตาขวา/เพศเมีย	3,765	1,798	168	492	6,223	+	+

หมายเหตุ : เซลล์ประสาทในบริเวณ LG และรอบ ๆ ME ติดสีน้ำตาลจางกว่าในเซลล์ประสาท
 ในบริเวณอื่น

LG = Lamina ganglionalis

SG = Sinus gland

ME = Medulla externa

OpN = Optic nerve

MI = Medulla interna

+ = พบเส้นใยประสาทที่ติดสีน้ำตาล

MT = Medulla terminaris

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

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 ₂ PO ₄	0.20	กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.15	กรัม
หรือ Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	2.15	กรัม
H ₂ O (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 P₁⁺

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

5. สีอีโอซิน 0.1% ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95%

สีอีโอซิน	0.1	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์ 95%	100	มิลลิลิตร

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ นางสาวจันทร์ทิพย์ ชื่อสกุล คงสินรัตน์ชัย
 เกิดวันที่ 14 เดือนมีนาคม พุทธศักราช 2515
 สถานที่เกิด อำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี
 สถานที่อยู่ปัจจุบัน เลขที่ 1027/4 แพลตสตรีกัญ
 ถ.สุขุมวิท วัฒนา พระโขนง
 กรุงเทพฯ 10110

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2532 มัธยมศึกษาปีที่ 6 (แผนกวิทย์-คณิต) จากโรงเรียนบางลี่วิทยา
 พ.ศ. 2536 กศ.บ. (วิชาเอกวิทยาศาสตร์-เคมี) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
 วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ
 พ.ศ. 2542 วท.ม. (เคมีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
 วิทยาเขตประสานมิตร กรุงเทพฯ

การตรวจหาตำแหน่งของสารคล้ายแพนกรีเอติกโพลีเปปไทด์และสารคล้าย FMRFamide
ในก้านตากุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*

บทคัดย่อ
ของ
จันทร์ทิพย์ คงสินรัตน์ชัย

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ
กุมภาพันธ์ 2543

การตรวจหาแหล่งที่พบสารคล้ายแพนครีเอทิกโพลีเปปไทด์ (PP) และสารคล้าย FMRFamide ในก้านตาทิ้งๆ โดยวิธีอินไดเร็กต์อิมมูโนเปอร์ออกซิเดสโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ PP (anti-human LTRPRYamide antiserum) และแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ FMRFamide (anti-FMRFamide, anti-KNEFIRFamide, anti-KHEYLRFamide monoclonal antibodies) สามารถตรวจพบสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide ในเซลล์ประสาทที่บริเวณรอบ ๆ medulla externa (ME) บริเวณระหว่าง medulla interna (MI) กับ medulla terminalis (MT) และบริเวณรอบๆ MT ส่วนสารคล้าย FMRFamide ยังพบในเซลล์ประสาทขนาดเล็กที่ lamina ganglionaris เซลล์ประสาทที่มีสารคล้าย FMRFamide (เฉลี่ยประมาณ 5,000 เซลล์/ก้านตา) มีจำนวนมากกว่าเซลล์ประสาทที่มีสารคล้าย PP (เฉลี่ยประมาณ 200 เซลล์/ก้านตา) โดยพบมากที่บริเวณรอบๆ ME เซลล์ประสาทที่พบทั้งสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide จะพบประมาณ 47% จากจำนวนเซลล์ประสาทที่พบสารคล้าย PP ยังตรวจพบสารคล้ายทั้งสองในเส้นใยประสาทที่ ME, MI, MT ต่อมน้ำไขสันหลังและเส้นประสาทตา ดังนั้นสารคล้าย PP และสารคล้าย FMRFamide อาจทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทหรือนิวโรโมดูเลเตอร์และนิวโรฮอร์โมน

IMMUNOCYTOCHEMICAL LOCALIZATION OF PANCREATIC POLYPEPTIDE- AND
FMRFamide-LIKE SUBSTANCES FROM THE EYESTALKS OF
THE GIANT TIGER PRAWN, *Penaeus monodon*

AN ABSTRACT

BY

JANTHIP KONGSINRATTANACHAI

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

February 2000

Localization of pancreatic polypeptide and FMRFamide like substances in the eyestalk of *Panaeus monodon* by indirect immunoperoxidase technique using anti-PP6 antiserum (LTRPRYamide) and a combination of anti-FMRFamide like peptide (FLP) monoclonal antibodies (FMRFamide, KNEFIRFamide, KHEYLRFamide) revealed about 200 neurons for pancreatic polypeptide like immunoreactivity (PPLI) and 5,000 neurons for FMRFamide like immunoreactivity (FLI) around medulla externa (ME) between medulla interna (MI) and medulla terminalis (MT) and in MT. Only FLI was found in numerous neurons in lamina ganglionaris. About 47% of PPLI neurons were also contained FLI. The functional roles of PPLI and FLI may act as neurotransmitter or neuromodulator since the immunoreactivities were found in the neuropils of ME, MI and MT and some forms may act as neurohormone due to the sinus gland was also recognized by both antibodies