



รายงานการวิจัย

การศึกษาการปรากฏและการกระจายตัวของเลปตินในทางเดินอาหาร
และบทบาทของเลปตินต่อการกินอาหารของหอยเชอร์รี่
(Study of existence and distribution of leptin in gastrointestinal tract
and the effect of leptin on food intake of *Pomacea canaliculata*)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
กองทุนสนับสนุนการวิจัยและพัฒนา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รายงานการวิจัย

การศึกษาการปรากฏและการกระจายตัวของเลปตินในทางเดินอาหาร
และบทบาทของเลปตินต่อการกินอาหารของหอยเชอรี
(Study of existence and distribution of leptin in gastrointestinal
tract and the effect of leptin on food intake of *Pomacea canaliculata*)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยดา เงินสูงเนิน

สาขาวิชาปรีคลินิก

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ เงินสูงเนิน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นภวรรณ เสาวคนธ์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนสนับสนุนการวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2561

กิติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณกองทุนสนับสนุนการวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำงานวิจัย เรื่องการศึกษาการปรากฏและการกระจายตัวของเลปตินในทางเดินอาหาร และบทบาทของเลปตินต่อการกินอาหารของหอยเชอรี่ (รหัสโครงการ SUT1-104-58-24-17) ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิและคณะกรรมการทุกท่านที่ให้ข้อเสนอแนะ ที่มีประโยชน์เป็นอย่างยิ่งต่อการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณบุคลากรของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำงานวิจัยนี้ได้แก่ คณะผู้บริหาร คณาจารย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งคณาจารย์สาขาวิชาปรีคลินิก สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ และบุคลากรสายปฏิบัติการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งบุคลากรศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ให้การสนับสนุนในการทำวิจัยในครั้งนี้จนประสบความสำเร็จ

สุดท้ายขอขอบคุณญาติสนิท และมิตรสหายของคณะผู้วิจัย สำหรับกำลังใจที่ให้แก่คณะผู้วิจัย จนกระทั่งสามารถทำงานนี้ได้อย่างสำเร็จลุล่วง

คณะผู้วิจัย

สิงหาคม 2561



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

ในปัจจุบัน หอยเชอร์รี่เป็นศัตรูพืชชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิดปัญหาสำคัญต่อการทำเกษตรกรรมในประเทศไทย สาเหตุหนึ่งเพราะหอยเชอร์รี่สามารถกินอาหารได้ปริมาณมากในหนึ่งวัน งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์หลักในการศึกษาการควบคุมการกินอาหารของสัตว์ชนิดนี้ โดยมุ่งศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของทางเดินอาหารของหอย การปรากฏของเซลล์หลังเลปตินเพปไทด์ในทางเดินอาหารของหอย การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของเลปตินเพปไทด์ เปรียบเทียบระหว่างหอยที่ได้รับอาหารปกติและหอยที่อดอาหาร ศึกษาน้ำหนักตัว และปริมาณอาหารที่หอยกิน เปรียบเทียบระหว่างหอยกลุ่มที่ได้รับการฉีดและไม่ได้รับการฉีดเลปตินเพปไทด์ การศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์ในส่วนต่างๆของระบบทางเดินอาหารของหอย ได้แก่ หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ พบว่าหลอดอาหาร กระเพาะอาหาร และลำไส้ใหญ่ ถูกบุด้วยเซลล์บุผิวชนิดซิมเพลคอล์มনার และพบไมโครวิลไลที่บริเวณด้านบนของเซลล์บุผิว อย่างไรก็ตาม ลำไส้เล็ก ถูกบุด้วยเซลล์บุผิวชนิดซิวโคสตราติไฟด์คอล์มনার และพบซิเลียที่บริเวณด้านบนของเซลล์บุผิว เซลล์บุผิวมีความสูงมากที่สุดที่บริเวณลำไส้เล็ก รองลงมาคือที่บริเวณกระเพาะอาหาร ส่วนหลอดอาหารมีความสูงของเยื่อผิวน้อยที่สุด นอกจากนี้ยังพบเซลล์หลังมิวซิน ทั้งชนิดนิวทรัลมิวซิน เซียโลมิวซิน และซัลโฟมิวซิน ซึ่งเซลล์หลังมิวซินนี้พบแทรกอยู่ระหว่างเซลล์บุผิวเกือบตลอดทั้งทางเดินอาหาร ยกเว้นที่กระเพาะอาหาร การศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้โดยใช้แอนติบอดีต่อต้านต่อเลปตินของมนุษย์ พบการปรากฏของเซลล์หลังเลปตินเพปไทด์ ในทุกส่วนของทางเดินอาหาร ซึ่งบริเวณที่พบความหนาแน่นของเซลล์หลังเลปตินเพปไทด์ มากที่สุดคือที่ลำไส้เล็ก โดยเลปตินเพปไทด์ที่พบมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 16 กิโลดัลตัน ซึ่งเท่ากับมวลโมเลกุลของเลปตินของมนุษย์ที่ใช้เป็นเพปไทด์ควบคุม การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของเลปตินเพปไทด์ในเลือด เปรียบเทียบระหว่างหอยที่ได้รับอาหารปกติและหอยที่อดอาหาร พบว่าความเข้มข้นของเลปตินเพปไทด์ในกลุ่มที่อดอาหารมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กินอาหารปกติ และพบว่าความเข้มข้นของเลปตินเพปไทด์กลับมามีค่าใกล้เคียงกัน เปรียบเทียบระหว่างหอยกลุ่มที่กินอาหารปกติ และหอยกลุ่มอดอาหารที่กลับมาได้รับอาหารอีกครั้ง นอกจากนี้ยังพบว่า หอยที่ได้รับการฉีดเลปตินเพปไทด์กินอาหารน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบกับหอยกลุ่มที่ไม่ได้รับการฉีดเลปตินเพปไทด์ อย่างไรก็ตามน้ำหนักตัวของหอยทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน ผลจากการศึกษานี้จึงอาจสามารถนำไปใช้เป็นความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับระบบต่อมไร้ท่อของหอย ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมการกินอาหารของสัตว์ชนิดนี้

Abstract

At present, the golden apple snail is one of the pests causing major problems in agriculture in Thailand. One reason is that a snail consumes a lot of food in a day. The main objective of the present study was to investigate the controlling the snail eating, including the study of the gastrointestinal (GI) tract anatomy, the presence of leptin peptide-secreting cells in the GI tract, changing of the leptin peptide concentrations compared between fed and fasted snails, and comparison between body weights and food consumptions of leptin-treated and non-treated snails. Microanatomy study revealed that parts of the GI tract including the esophagus, stomach, and large intestine were covered with simple columnar epithelium with microvilli presented at the apical surface of the epithelial cells. However, the small intestine was covered with pseudostratified columnar epithelium with cilia presented at the apical surface of the epithelial cells. Height of the epithelial cells was greatest at the small intestine, followed by the stomach. The esophagus had the least epithelial cell height. Moreover, mucin-secreting cells including neutral mucin-, sialomucin-, and sulfomucin-secreting cells were scattered among the epithelial cells. The mucin-secreting cells were found in most parts of the GI tract, except the stomach. Immunohistochemistry study using antibody that raised against human leptin showed the presence of leptin peptide-secreting cells in all parts of the GI tract. The highest density of the leptin peptide secreting cells was observed in the small intestine. The leptin peptide had the molecular weight of 16 kDa which was the same as that of human leptin (positive control). Study of changing of leptin peptide concentrations in the hemolymph compared between fed and fasted snails revealed that the concentration of the leptin peptide significantly decreased in the fasted snail. The concentrations were similar in fed and re-fed snails. In addition, the leptin-treated snails consumed significantly less food compared to the non-treated snails. However, body weights of the leptin-treated and non-treated groups were similar. Results of the present study could provide basic knowledge on the endocrinology of the snail which related to its feeding control.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
- หอยเชอรี่	6
- ทางเดินอาหารของหอย	7
- Leptin peptide	9
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
- การเตรียมสัตว์ทดลอง	11
- การศึกษาลักษณะ โครงสร้างของทางเดินอาหาร	12
- การศึกษาการปรากฏของ leptin peptide ในส่วนต่างๆ	14
ของทางเดินอาหารของหอยเชอรี่	
- การศึกษาการแสดงออกของ leptin peptide ในส่วนต่างๆ	15
ของทางเดินอาหารของหอยเชอรี่	
- การเปรียบเทียบปริมาณของ leptin peptide ใน hemolymph	17
ของหอยเชอรี่ที่กินอาหารปกติและหอยที่อดอาหาร	
- การเปรียบเทียบน้ำหนักตัวและปริมาณอาหารที่กิน	18
ระหว่างหอยที่ได้รับและไม่ได้รับการฉีด leptin peptide	

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
- ลักษณะโครงสร้างของทางเดินอาหารของหอยเชอรี่.....	20
- การปรากฏของ leptin peptide ในส่วนต่างๆ ของทางเดินอาหาร.....	36
- การแสดงออกของ leptin peptide ในส่วนต่างๆ ของทางเดินอาหาร....	38
- ความแตกต่างของความเข้มข้นของ leptin peptide.....	40
เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มของหอยกินอาหารปกติและกลุ่มหอยอดอาหาร	
- ความแตกต่างของน้ำหนักตัว เปรียบเทียบระหว่าง.....	41
หอยกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการฉีด leptin peptide	
- ความแตกต่างของปริมาณอาหารที่กิน เปรียบเทียบระหว่าง.....	42
หอยกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการฉีด leptin peptide	
บทที่ 5 อภิปรายผล	43
บทที่ 6 บทสรุป	47
บรรณานุกรม	48
ภาคผนวก ก.....	54
ภาคผนวก ข.....	59
ประวัติผู้วิจัย	62

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ขอบเขตของการวิจัย	4
ตารางที่ 2	การปรากฏของ secretory cell ในเยื่อผิวของทางเดินอาหาร.....	32



สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	การผสมพันธุ์ของหอยเชอร์รี่และไข่ของหอยเชอร์รี่.....	6
ภาพที่ 2	ส่วนประกอบของระบบทางเดินอาหารของ giant land snail.....	8
ภาพที่ 3	ส่วนประกอบของระบบทางเดินอาหารของ <i>Pomacea canaliculata</i>	8
ภาพที่ 4	ตำแหน่งของอำเภอโนนไทย จังหวัดนครราชสีมา.....	11
ภาพที่ 5	โครงสร้างของทางเดินอาหารของหอยเชอร์รี่ที่ใช้ในการทดลอง.....	12
ภาพที่ 6	ลักษณะเยื่อบุผิวของทางเดินอาหารส่วนต่างๆ.....	22
ภาพที่ 7	ความสูงของเยื่อบุผิวของทางเดินอาหารส่วนต่างๆ.....	23
ภาพที่ 8	การปรากฏของ neutral mucin-secreting cell ในทางเดินอาหารส่วนต่างๆ...	24
ภาพที่ 9	การปรากฏของ sialomucin-secreting cell ในทางเดินอาหารส่วนต่างๆ.....	25
ภาพที่ 10	การปรากฏของ sulfomucin-secreting cells ในทางเดินอาหารส่วนต่างๆ.....	26
ภาพที่ 11	การเปรียบเทียบจำนวนของ mucin-secreting cells ในเยื่อบุผิวของ..... ทางเดินอาหารส่วนต่างๆ	27
ภาพที่ 12	Ultrastructure ของ esophagus.....	28
ภาพที่ 13	Ultrastructure ของ stomach.....	29
ภาพที่ 14	Ultrastructure ของ small intestine	30
ภาพที่ 15	Ultrastructure ของ large intestine	31
ภาพที่ 16	ลักษณะโครงสร้างของ secretory cell ที่พบใน esophagus.....	33
ภาพที่ 17	ลักษณะโครงสร้างของ secretory cell ที่พบใน small intestine	34
ภาพที่ 18	ลักษณะโครงสร้างของ secretory cell ที่พบใน large intestine	35
ภาพที่ 19	ผลการย้อมด้วยวิธี immunoperoxidase แสดงการปรากฏและ..... การกระจายตัวของ leptin peptide ในส่วนต่างๆของทางเดินอาหาร	37
ภาพที่ 20	ความหนาแน่นของเซลล์ที่มีการปรากฏของ leptin peptide..... ในส่วนต่างๆของทางเดินอาหาร	38
ภาพที่ 21	Western immunoblotting ของ leptin peptide.....	39
ภาพที่ 22	ความเข้มข้นของ leptin peptide เปรียบเทียบระหว่าง..... หอยกลุ่มกินอาหารปกติ และหอยกลุ่มอดอาหาร	40
ภาพที่ 23	น้ำหนักตัวของหอยในวันต่างๆ เปรียบเทียบระหว่าง..... หอยกลุ่มควบคุมและหอยกลุ่มที่ได้รับการฉีด leptin peptide	41

ภาพที่ 24	ปริมาณอาหารที่หอยกินในวันต่างๆ เปรียบเทียบระหว่าง.....	42
	หอยกลุ่มควบคุม และหอยกลุ่มที่ได้รับการฉีด leptin peptide	



บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

หอยเชอร์รี่ (*Pomacea canaliculata*) หรือ หอยโข่งอเมริกาใต้ มีถิ่นกำเนิดและเป็นสัตว์ท้องถิ่นของทวีปอเมริกาใต้ เช่น อาเจนตินา บราซิล เป็นต้น เนื่องจากมูลค่าของหอยเป่าสูบน้ำเค็มมีราคาแพง ดังนั้นช่วงปี 1980 หอยเชอร์รี่จึงถูกนำเข้าจากประเทศอาเจนตินามาสู่ทวีปเอเชีย คือ ประเทศจีน (ไต้หวัน) เพื่อการบริโภคทดแทนหอยเป่าสูบน้ำ นอกจากนี้หอยเชอร์รี่ยังมีประโยชน์ทางด้านอื่นๆ ได้แก่ การนำมาทำความสะอาดเพิ่มสวยงามของตู้ปลา เพราะหอยเชอร์รี่สามารถกำจัดสาหร่ายหรือตะไคร่น้ำในตู้ปลาได้ดี (Halwart 1994, Tanaka *et al.*, 1999; Naylor, 1996; Mochida, 1991) นอกจากนี้ เกษตรกรยังมีการเพาะเลี้ยงหอยเชอร์รี่ในฟาร์มเพื่อการค้าเชิงพาณิชย์เพราะหอยเชอร์รี่ถูกเพาะเลี้ยงได้ง่าย มีการสืบพันธุ์ได้รวดเร็ว และมีระยะเวลาวางไข่สั้น หอยเชอร์รี่อายุประมาณ 3 เดือน สามารถวางไข่ได้แล้ว และออกไข่ได้ประมาณ 11,000 ฟอง/ครั้ง นอกจากนี้หอยเชอร์รี่สามารถวางไข่ได้สูงสุด 14 ครั้ง/เดือน ดังนั้นประชากรของหอยเชอร์รี่จึงสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว (Estebenet and Martin, 2002) การวางไข่ของหอยเชอร์รี่จะวางไข่เป็นแผงหรือกลุ่มๆ ยึดติดกับต้นพืชอยู่เหนือน้ำ และแผงไข่สามารถสังเกตได้ง่าย เพราะไข่มีสีชมพูเข้มสวยงาม แต่ไข่หอยเชอร์รี่มีพิษต่อระบบย่อยอาหาร ดังนั้นศัตรูตามธรรมชาติของหอยเชอร์รี่จึงมีค่อนข้างน้อยมาก ซึ่งการที่ศัตรูตามธรรมชาติของหอยเชอร์รี่มีค่อนข้างน้อยจึงเป็นอีกหนึ่งสาเหตุที่ทำให้จำนวนประชากรของหอยเชอร์รี่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (Dreon *et al.*, 2010; Carlsson *et al.*, 2004) การเพาะเลี้ยงหอยเชอร์รี่ในฟาร์มไม่ประสบความสำเร็จด้านการตลาด เพราะผู้บริโภคไม่นิยมบริโภคหอยเชอร์รี่เหมือนหอยเป่าสูบน้ำ ดังนั้นหอยเชอร์รี่จึงถูกลักลอบปล่อยลงสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติ และแพร่กระจายอย่างรวดเร็วในแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วทวีปเอเชีย เช่น ไทย ไต้หวัน ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย เป็นต้น (Naylor, 1996) การเพิ่มจำนวนประชากรของหอยเชอร์รี่ในแหล่งน้ำธรรมชาติ และพื้นที่ทางการเกษตร (นาข้าว) เป็นสาเหตุสำคัญทำให้เกิดการสูญเสียความสมดุลของระบบนิเวศ เพราะหอยเชอร์รี่มีความสามารถในการแย่งชิงอาหารและบริโภคอาหารปริมาณมาก ดังนั้นหอยเชอร์รี่จึงกลายเป็นศัตรูที่สำคัญของพืช ปัจจุบันหอยเชอร์รี่สร้างความเสียหายต่อต้นข้าวของเกษตรกรมาก เพราะหอยเชอร์รี่หนึ่งตัวสามารถกินต้นข้าวได้เป็นจำนวนมาก ดังนั้นเกษตรกรจึงจำเป็นต้องพ่นสารเคมีหรือยาฆ่าแมลงเพื่อกำจัดหอยเชอร์รี่ในแปลงข้าว การกำจัดหอยเชอร์รี่ด้วยวิธีนี้ เป็นอีกหนึ่งสาเหตุของการทำลายสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในระบบนิเวศด้วยเช่นกัน (Calumpang *et al.*, 1995) นอกจากนี้การกำจัดหอยเชอร์รี่ในแปลงข้าวยังเป็นการเพิ่มต้นทุนของการผลิตข้าวของเกษตรกร ซึ่งส่งผลกระทบต่อรายได้ของเกษตรกรลดลงได้ด้วยเช่นกัน ข้อมูลจากประเทศไต้หวันพบว่า เกษตรกรสูญเสียผลผลิตทางการเกษตรจากการทำลายของหอยเชอร์รี่ประมาณ 3 ล้านดอลลาร์ต่อปี (Mochida, 1996) พื้นที่ปลูกข้าวนาปีของประเทศไทยในปี 2561 มีประมาณ 58 ล้านไร่ แต่อย่างไรก็ตามผลผลิตข้าวสามารถเก็บเกี่ยวได้เพียงประมาณ 440 กิโลกรัมต่อไร่เท่านั้น ซึ่งต่ำกว่าผลผลิตจากประเทศเพื่อนบ้าน เช่น ประเทศเวียดนามมีผลผลิตข้าวมากกว่าประเทศไทย 2 เท่า โดยอยู่ที่ประมาณ 900 กิโลกรัมต่อไร่ เป็นต้น (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, กรกฎาคม 2561) ปัจจัย

ส่วนหนึ่งของการเก็บเกี่ยวผลผลิตได้น้อยมีสาเหตุจากความเสียหายจากการกัดกินต้นข้าวของหอยเชอริ โดยหอยเชอริสามารถสร้างความเสียหายแก่เกษตรกรได้ตลอดช่วงของการเพาะปลูก เพราะหอยเชอริสามารถกัดกินต้นข้าวตั้งแต่ระยะต้นกล้าถึงระยะข้าวแตกกอ นอกจากนี้หอยเชอริสามารถกัดกินต้นข้าวได้ตั้งแต่พักออกจากไขจนเติบโตเต็มวัย ซึ่งหากประชากรของหอยเชอริมีปริมาณมากจะสามารถกัดกินข้าวเสียหายเป็นปริมาณมากจนเป็นสาเหตุให้ปริมาณผลผลิตที่เก็บเกี่ยวลดลงได้ การทำงานของระบบทางเดินอาหารของสัตว์ถูกควบคุมในลักษณะทั้งกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานจาก peptide หลากหลายชนิด เช่น การกระตุ้นการกินอาหารถูกควบคุมด้วยฮอร์โมน ghrelin peptide ซึ่งฮอร์โมนนี้ถูกสร้างมาจากเซลล์ในกระเพาะอาหาร (Kojima *et al.*, 1999; Ngernsoungnern *et al.*, 2016) หรือ leptin peptide ซึ่งสามารถยับยั้งการกินอาหารได้ (Campfield *et al.*, 1995; Montague *et al.*, 1997) เป็นต้น

ดังนั้น การทราบถึงข้อมูลพื้นฐานของฮอร์โมนที่มีความสามารถในการควบคุมหรือยับยั้งการกินอาหารของหอยเชอริ จะเป็นอีกหนึ่งช่องทางที่สามารถนำไปวิจัยต่อยอดเพื่อประยุกต์ใช้ในการลดการกินอาหารของหอยเชอริเพื่อหยุดการทำลายต้นข้าว และนำไปสู่การเพิ่มผลผลิตการเก็บเกี่ยว ลดต้นทุนการผลิต และเพิ่มกำไรแก่เกษตรกรผู้ปลูกข้าวในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของทางเดินอาหารของหอยเชอริ รวมถึงเซลล์บุผนังของทางเดินอาหารภายใต้การศึกษาค้นคว้ากล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
2. เพื่อศึกษาการกระจายตัวของ leptin peptide ในส่วนต่างๆ ของทางเดินอาหารของหอยเชอริ โดยวิธี immunohistochemistry
3. เพื่อศึกษาการแสดงออกของ leptin peptide ในส่วนต่างๆ ของทางเดินอาหารของหอยเชอริ และยืนยันความจำเพาะเจาะจงของ primary antibody จากการทดลองตามวัตถุประสงค์ข้อ 2 โดยวิธี Western immunoblotting
4. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบระดับของ leptin peptide ในหอยที่กินอาหารปกติและหอยที่อดอาหาร โดยวิธี ELISA technique
5. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบปริมาณการกินอาหารของหอยเชอริภายหลังการฉีดกระตุ้นด้วย leptin peptide โดยวิธี In vivo bioassay
6. เพื่อเป็นองค์ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับการควบคุมหรือการยับยั้งการกินอาหารของหอยเชอริเพื่อพัฒนาต่อยอดในเชิงพาณิชย์เพื่อควบคุมการทำลายข้าวของหอยเชอริ ซึ่งส่งผลต่อการเพิ่มผลผลิตข้าวต่อไร่ ลดต้นทุนและความเสี่ยงต่อการเพาะปลูกข้าว

ขอบเขตของการวิจัย

ขอบเขตของการวิจัยได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. การทดลองวิจัยระยะที่ 1 เป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของส่วนต่างๆ ของทางเดินอาหาร ได้แก่ esophagus, stomach, small intestine และ large intestine โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

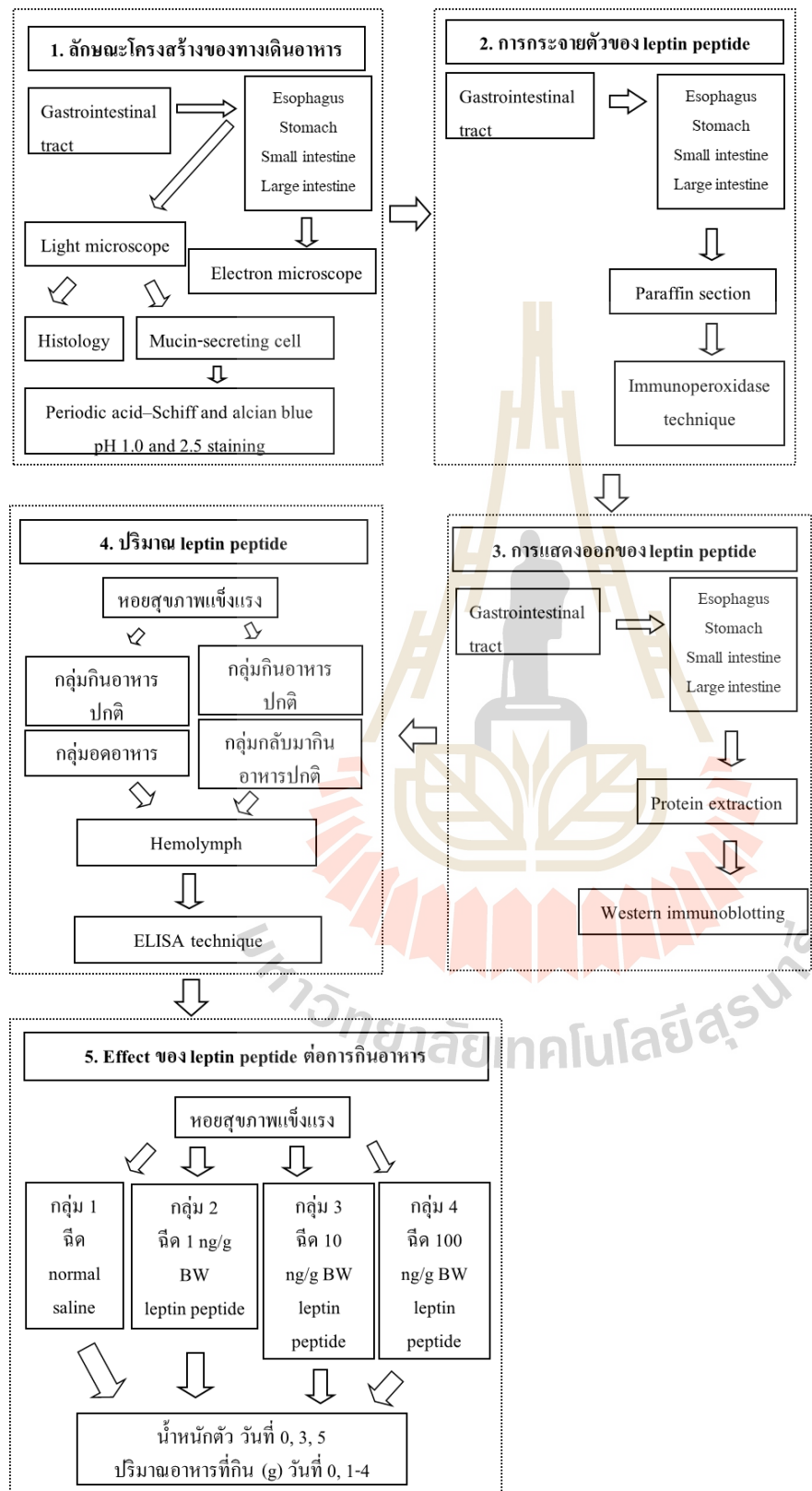
2. การทดลองวิจัยระยะที่ 2 เป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจสอบว่า leptin peptide กระจายตัวอยู่ที่เซลล์ชนิดใดบ้าง ในส่วนต่างๆ ของทางเดินอาหาร ซึ่งการทดลองจะอาศัยวิธี immunohistochemistry ได้แก่ immunoperoxidase

3. เมื่อทราบการปรากฏและการกระจายตัวของ leptin peptide จากวิธี immunohistochemistry แล้ว การทดลองระยะที่ 3 เป็นการทดลองวิจัยในห้องปฏิบัติการ เพื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ leptin peptide ในส่วนต่างๆ ของทางเดินอาหาร โดยวิธี Western immunoblotting ซึ่งวิธีนี้นอกจากจะบอกถึงการปรากฏของ leptin peptide แล้ว ยังสามารถใช้วัดระดับการแสดงออกของ leptin peptide จากแต่ละส่วนของทางเดินอาหาร ในลักษณะของ semi-quantitative และยังใช้ยืนยันความจำเพาะเจาะจงของ primary antibody ที่ใช้ในการทดลองวิจัยระยะที่ 2 ได้อีกด้วย

4. การทดลองระยะที่ 4 เป็นการทดลองวิจัยในห้องปฏิบัติการ ซึ่งเป็นการทดลองที่จะใช้เปรียบเทียบระดับของ leptin peptide จาก hemolymph โดยเปรียบเทียบในหอยเชอร์รี่ที่กินอาหารปกติและหอยเชอร์รี่ที่อดอาหาร การทดลองอาศัย ELISA technique ซึ่งวิธีนี้สามารถบ่งบอกระดับของ leptin peptide ได้เป็นค่าตัวเลขที่แน่นอน (quantitative)

5. การทดลองวิจัยระยะที่ 5 เป็นการทดลองวิจัยในห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบบทบาทของ leptin peptide ต่อปริมาณการกินอาหารของหอยเชอร์รี่ ซึ่งการทดลองอาศัย *In vivo* bioassay จากการเปรียบเทียบการกินอาหารจากหอยกลุ่มควบคุม และหอยที่ได้รับการฉีด leptin peptide การตรวจสอบจะบันทึกจากปริมาณของอาหารที่กิน รวมถึงน้ำหนักของหอย

ตารางที่ 1 ขอบเขตของการวิจัยการศึกษาการปรากฏและการกระจายตัวของ leptin peptide ในทางเดินอาหาร และบทบาทของ leptin peptide ต่อการกินอาหารของหอยเชอรี่



ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาองค์ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับลักษณะ โครงสร้างของทางเดินอาหารของหอยเชอรี่ ซึ่งเป็นหอยน้ำจืด ว่ามีความเหมือนหรือแตกต่างจากทางเดินอาหารของสัตว์ใน species ใกล้เคียงกัน
2. เพื่อพัฒนาองค์ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับการปรากฏของ leptin peptide ว่าสามารถพบได้ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังได้เช่นเดียวกัน ซึ่งจากรายงานการวิจัยพบว่า leptin peptide สามารถพบได้ในสัตว์มีกระดูกสันหลังหลายชนิด
3. เพื่อพัฒนาองค์ความรู้พื้นฐานว่า leptin peptide มีความเกี่ยวข้องกับการกินอาหารของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังเช่นเดียวกัน เพราะรายงานการวิจัยพบว่า leptin peptide ทำหน้าที่ควบคุมการกินอาหารของสัตว์มีกระดูกสันหลังหลายชนิด
4. ผลการวิจัยครั้งนี้สามารถเผยแพร่ผลงานในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ หรือ เผยแพร่ผลงานในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ
5. ทุนสำหรับงานวิจัยครั้งนี้สามารถใช้เป็นแหล่งทุนและแหล่งความรู้ในการผลิตนักศึกษาาระดับบัณฑิตศึกษา
6. ความรู้พื้นฐานจากงานวิจัยครั้งนี้สามารถถูกใช้เป็นฐานข้อมูลเพื่ออ้างอิง ซึ่งหน่วยงานของภาครัฐและภาคเอกชนสามารถนำไปศึกษาวิจัยต่อยอด เพื่อนำไปสู่การควบคุมการกินอาหารของหอยเชอรี่ในภาคเกษตรกรรมได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แหล่งที่มาของข้อมูล

1. หอยเชอรี

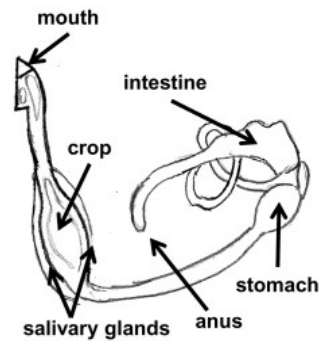
หอยเชอรี (*Pomacea canaliculata*) มีถิ่นกำเนิดแถบประเทศเส้นศูนย์สูตรของทวีปอเมริกาใต้ เนื่องจากหอยเป่าฮือ (abalome) มีความนิยมถูกนำมาบริโภคเป็นอาหาร แต่ราคาของหอยเป่าฮือค่อนข้างสูง ดังนั้นเกษตรกรจากประเทศแถบทวีปเอเชียจึงตั้งฟาร์มเพาะเลี้ยงหอยเชอรีเพื่อการพาณิชย์ เพื่อนำมาป้อนอาหารทดแทนหอยเป่าฮือ เช่น ไต้หวัน ฟิลิปปินส์ และญี่ปุ่น เป็นต้น แต่เนื่องจากหอยเชอรีไม่ได้รับความนิยมในการบริโภคเป็นอาหาร การเพาะเลี้ยงในฟาร์มจึงต้องยุติลง ดังนั้นเกษตรกรจึงนำหอยเชอรีปล่อยลงสู่แหล่งน้ำจืดตามธรรมชาติ (Halwart 1994, Tanaka *et al.*, 1999; Naylor, 1996) หอยเชอรีมีความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดี และมีความอยู่รอดค่อนข้างสูง นอกจากนี้หอยเชอรีมีความสามารถแพร่พันธุ์อย่างรวดเร็ว (เริ่มต้นเมื่อหอยมีอายุประมาณ 3 เดือน) หอยเชอรีสามารถวางไข่ได้ตลอดช่วงชีวิต และสามารถวางไข่ได้สูงถึง 11,000 ฟองต่อครั้ง ดังนั้นจำนวนประชากรหอยเชอรีจึงเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว (Albrecht *et al.*, 2005; Estebenet and Martin, 2002) (ภาพที่ 1) หอยเชอรีมีแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติคือจะอาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำจืด และอาหารหลักของหอยเชอรีคือพืชน้ำทุกชนิด นอกจากนี้ หอยเชอรีที่อาศัยในนาข้าวก็เป็นศัตรูที่สำคัญของข้าวอย่างมาก การระบาดของหอยเชอรีสามารถสร้างความเสียหายจากการกัดกินต้นข้าวเป็นบริเวณกว้างขวาง ซึ่งนำไปสู่สาเหตุหนึ่งของการประสบปัญหาการขาดทุนอย่างต่อเนื่องทุกปีของเกษตรกรจากความเสียหายของต้นข้าวและการลดลงของผลผลิต นอกจากนี้หอยเชอรียังเป็นพาหะของหนอนพยาธิชนิด *Angiostrongylus cantonensis* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningoencephalitis) ของมนุษย์ด้วย ดังนั้นเกษตรกรจึงไม่นิยมบริโภคหอยเชอรีเป็นอาหารเหมือนหอยชนิดอื่นๆ (Mochida, 1991)



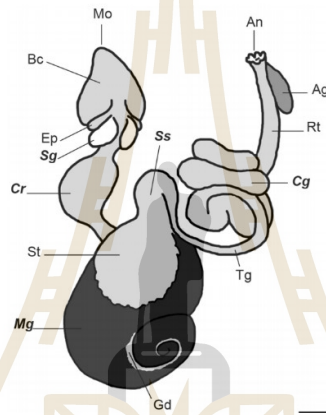
ภาพที่ 1 การผสมพันธุ์ของหอยเชอรีเพศผู้และเพศเมีย (ซ้าย) และไข่ของหอยเชอรีที่เกิดจากการปฏิสนธิเกาะติดกับลำต้นผักบุ้ง (ขวา)

2. ทางเดินอาหารของหอย

ทางเดินอาหาร (gastrointestinal tract) ของสัตว์ประเภทหอยสามารถแบ่งออกเป็นส่วนต่างๆ ได้แก่ หลอดอาหาร (esophagus) ทำหน้าที่เชื่อมต่อระหว่างช่องปาก (mouth) และกระเพาะอาหาร (stomach) อวัยวะส่วนยาวที่สุดของทางเดินอาหาร คือ ลำไส้ (intestine) ซึ่งสามารถแยกย่อยออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ลำไส้เล็ก (small intestine) และลำไส้ใหญ่ (large intestine) และอวัยวะส่วนสุดท้ายของทางเดินอาหาร คือ ไส้ตรงและทวารหนัก (rectum and anus) (Voltzow, 1994; Martin *et al.*, 2011) การศึกษาทางเดินอาหารของ giant land snail (*Achatina fulica*) และ giant keyhole limpet (*Megathura crenulata*) พบว่า อวัยวะของทางเดินอาหารสามารถแบ่งออกเป็นช่องปาก (mouth) ท่อบดอาหาร (crop) ต่อมน้ำลาย (salivary gland) หลอดอาหาร (esophagus) กระเพาะอาหาร (stomach) ลำไส้ (intestine) และทวารหนัก (anus) (Cardoso *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2011) (ภาพที่ 2) ทางเดินอาหารของหอยเชอรี่สามารถแบ่งได้ดังนี้ mouth, buccal cavity, esophageic pouch, crop, stomach, style sac, midgut gland (digestive gland), thin gut, coiled gut, rectum และ anus (Godoy *et al.*, 2013) (ภาพที่ 3) การศึกษาโครงสร้างของเซลล์ในระดับ ultrastructure พบว่า ปริมาณเซลล์จำนวน 85% ของทางเดินอาหาร (esophagus, style sac และ intestine) ของ giant keyhole limpet ประกอบด้วย เซลล์ 2 ชนิด คือ mucus secreting cell และ apocrine cell (Martin *et al.*, 2010) การวิจัยเซลล์ของทางเดินอาหารของ *Megathura crenulata* พบว่า เซลล์ของทางเดินอาหารสร้างน้ำย่อยหลายชนิด ได้แก่ protease, amylase, lipase, cellulase, และ lysozyme ซึ่งน้ำย่อยเหล่านี้ถูกสร้างมาจาก apocrine cell ของ esophagus และ intestine (Martin *et al.*, 2011) อวัยวะในระบบทางเดินอาหารของหอยเชอรี่ประกอบด้วย ต่อมสร้างน้ำย่อย ได้แก่ digestive gland ซึ่งต่อมนี้มีเยื่อหุ้มประกอบด้วย เซลล์ 2 ชนิด ได้แก่ 1) columnar cell ที่ภายใน cytoplasm พบ vacuole จำนวนมาก เรียกว่า digestive cell และ 2) basophil cell ที่อาจมีการจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นกลุ่ม (cluster) หรือ เซลล์เดี่ยว และภายใน cytoplasm พบ basophilic granule จำนวนมาก (Kruatrachue *et al.*, 2011) การศึกษาโครงสร้างเซลล์ของต่อมน้ำลายของหอย *Philinopsis depicta* สามารถแยกเซลล์ออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ ciliated cell, granular cell และ cell with apical vacuole (Lobo-da-Cunha *et al.*, 2009) การจัดจำแนกเซลล์ตามลักษณะของ rER และ secretory vesicle ของต่อมน้ำลายจาก gastropods จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Elona quimperiana*, *Trissexodon constrictus*, *Hygromia limbata*, *Cerneuella aginnica*, *Cepaea nemoralis* และ *Helix aspersa* สามารถจำแนกเซลล์ออกเป็น 5 ชนิด ได้แก่ type A, B, C, D และ E (Serrano *et al.*, 1996)



ภาพที่ 2 ส่วนประกอบของทางเดินอาหารของ giant land snail ประกอบด้วย mouth, crop, salivary gland, stomach, intestine และ anus (Cardoso *et. al.*, 2012)



ภาพที่ 3 ส่วนประกอบของทางเดินอาหารของ *Pomacea canaliculata* ประกอบด้วย mouth (Mo), buccal cavity (Bc), esophageic pouches (Ep), crop (Cr), salivary gland (Sg), stomach (St), style sac (Ss), thin gut (Tg), coiled gut (Cg), rectum (Rt) และ anus (An) (Godoy *et. al.*, 2013)

การทำงานของระบบทางเดินอาหารของสัตว์ประเภทหอยถูกควบคุมจาก peptide หลากหลายชนิด เพื่อการกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของเซลล์ของระบบทางเดินอาหาร การกินอาหารของ *Lymnaea stagnalis* ถูกควบคุมด้วย octopamine peptide ที่ถูกสร้างและหลั่งมาจากเซลล์ของระบบประสาท ได้แก่ เซลล์ประสาทที่พบใน buccal ganglion (Vehovszky and Elliott, 2000) การควบคุมกระบวนการ metabolism และกระบวนการ glycogenolysis ของ *Helix pomatia* เกิดจากการควบคุมของ vasoactive intestinal peptide (VIP) ซึ่งถูกสร้างและหลั่งมาจากเซลล์ของระบบประสาทของหอย (Kaufmann *et. al.*, 1995) สำหรับพฤติกรรมการกินอาหารของ *H. aspersa* พบว่าถูกควบคุมจากการทำงานของ bioactive peptide เช่น cholecystinin 8 (CCK8) ซึ่ง peptide นี้ถูกสร้างและหลั่งมาจากเซลล์ของระบบประสาท 2 ตำแหน่ง คือ cerebrum และ buccal ganglia ซึ่งการปรากฏของ peptide จะพบในระยะเวลาที่มีการกินอาหารของหอย (Pisu *et. al.*, 2000) มีการวิจัยพบว่า การกินอาหารถูกกระตุ้นด้วย ghrelin peptide ด้วยเช่นกัน ซึ่งใน

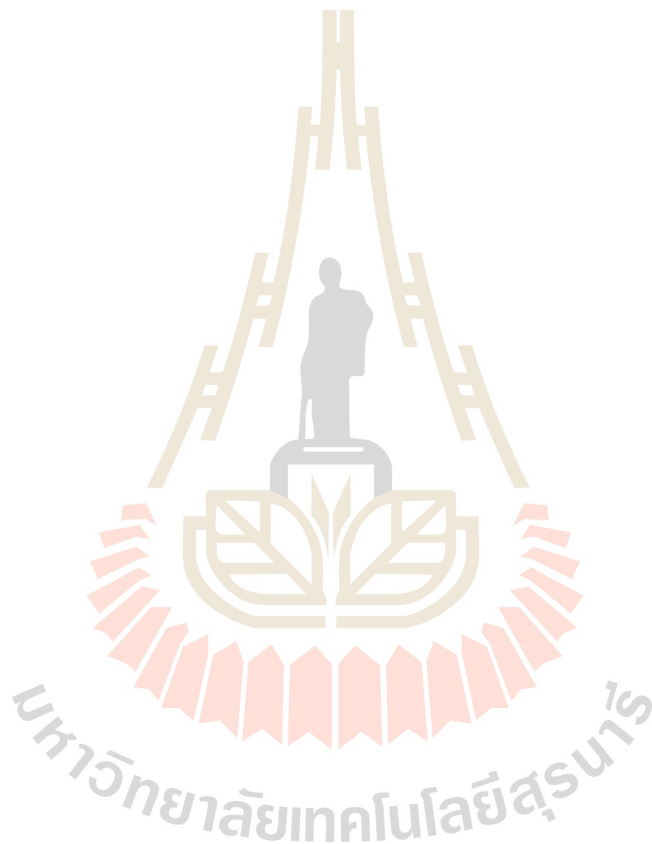
สัตว์มีกระดูกสันหลัง peptide นี้ ถูกสร้างมาจากเซลล์ของกระเพาะอาหาร (Kojima *et. al.*, 1999) นอกจากนี้ มีการวิจัยพบว่า ghrelin peptide สามารถสร้างมาจากเซลล์ในส่วนต่างๆ ของระบบทางเดินอาหารได้ด้วย เช่นเดียวกัน (Kaiya *et. al.*, 2011; Wang *et. al.*, 2008; Wang *et. al.*, 2009; Kaiya *et. al.*, 2011) โดยเฉพาะ grelin-like peptide ถูกพบอยู่ส่วนต่างๆ ของทางเดินอาหารของหอยเชอรี่ (Ngersoungnern *et al.*, 2016) สภาวะการอดอาหารสามารถกระตุ้นการสร้างและหลั่งของ ghrelin peptide ซึ่งส่งผลต่อการเพิ่มการหดตัวหรือการทำงานของระบบทางเดินอาหาร และสามารถเพิ่มการสร้างและการหลั่ง growth hormone ได้ด้วย (Kojima *et. al.*, 2001; Kaiya *et.al.*, 2005; Kitazawa *et. al.*, 2009)

3. Leptin peptide

Leptin peptide หรือ obese (ob) protein ถูกควบคุมการสร้างและการหลั่งจาก *ob* gene โดยเซลล์ที่สร้างและหลั่ง leptin peptide ผ่านเข้าสู่กระแสเลือด คือ เซลล์ไขมัน (adipocyte) (Zhang *et. al.*, 1994; Borstein *et. al.*, 2000) การศึกษาวิจัยบทบาทและหน้าที่ของ leptin peptide ของสัตว์มีกระดูกสันหลังพบว่า leptin peptide ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของระบบต่างๆ ภายในร่างกาย ได้แก่ การกินอาหาร ความสมดุลของพลังงาน และการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อ (Ahima *et. al.*, 2000) นอกจากนี้ leptin peptide ยังทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของระบบสืบพันธุ์เช่นเดียวกัน (Paczoska-Eliasiewicz *et. al.*, 2003) โครงสร้างของ leptin peptide ประกอบด้วย 167 amino acid และมีน้ำหนักประมาณ 16 kDa เมื่อ leptin peptide ถูกสร้างจากเซลล์ จะถูกนำเข้าสู่กระแสเลือดเพื่อลำเลียงไปยังอวัยวะเป้าหมาย และจับกับตัวรับ (receptor) ในบริเวณ hypothalamus ส่วนควบคุมความอยากอาหาร (appetite center) ดังนั้นสัตว์จึงถูกยับยั้งการกินอาหาร รายงานการวิจัยพบว่า สาเหตุของโรคอ้วนอย่างรุนแรงสามารถเกิดจากความผิดปกติหรือความบกพร่องของ leptin gene หรือ leptin receptor หรือ leptin peptide (Campfield *et. al.*, 1995; Montague *et. al.*, 1997) การทดลองเพื่อลดน้ำหนักของร่างกายสามารถกระตุ้นการทำงานของ leptin gene เพื่อเพิ่มการสร้างและการหลั่ง leptin peptide เข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งหลักการนี้จะส่งผลต่อการลดการกินอาหาร และนำไปสู่การลดน้ำหนักในที่สุด (Halaas *et. al.*, 1995; Chen, 1996; Denbow *et. al.*, 2000) การทำงานของ leptin peptide พบว่า leptin peptide สามารถทำงานร่วมกับ CCK เพื่อการกระตุ้นการทำงานของ hypothalamus เพื่อการลดการกินอาหาร แต่ไม่มีผลต่อการหลั่งน้ำย่อยจากกระเพาะอาหารและตับอ่อน (Konturek *et. al.*, 2001) การศึกษาระดับของ leptin peptide ในเลือดของไก่ที่มีการสะสมของไขมันร่างกายในปริมาณที่สูง พบว่ามีระดับของ leptin peptide สูงกว่าไก่ที่มีการสะสมของไขมันปริมาณในปริมาณที่น้อย ทฤษฎีสนับสนุนรายงานการวิจัยนี้ คือ ไก่ที่มีการสะสมไขมันมากมีพลังงานเพียงพอต่อการใช้งานของร่างกาย ดังนั้น การกินอาหารจึงลดลง แต่ไก่ที่มีปริมาณของไขมันน้อยจึงต้องมีการกินอาหารในปริมาณที่สูง เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการพลังงานของร่างกาย นอกจากนี้ มีรายงานการวิจัยพบว่าการฉีด leptin peptide ในไก่นั้น สามารถลดการกินอาหารของไก่ เพราะการกระตุ้นผ่าน satiety center ของ hypothalamus (Dridi *et. al.*, 2005; Kuo *et. al.*, 2005) นอกจาก leptin peptide จะถูกสร้างมาจากเซลล์ไขมันแล้ว ยังมีรายงานการวิจัยพบว่า leptin peptide ยังถูกสร้างจากเซลล์จากอวัยวะของระบบทางเดินอาหารส่วนต่างๆ เช่น chief cell, gastric fundic mucosa ของ

กระเพาะอาหาร และเซลล์ของลำไส้ เป็นต้น (Widjaja *et. al.*, 2000; Nishi *et. al.*, 2005; Bodo *et. al.*, 1998; Cinti *et. al.*, 2000; Sobhani *et. al.*, 2000; Neglia *et. al.*, 2007)

ปัจจุบันพบว่า ยังไม่มีการวิจัยเพื่อศึกษาว่า leptin peptide เกี่ยวข้องกับการกินอาหารในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังการ ดังนั้น รายงานการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นรายงานการวิจัยครั้งแรกที่แสดงถึงการปรากฏของ leptin peptide ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง นอกจากนี้การศึกษาวิจัยทางด้านความรู้พื้นฐานเพื่อทราบถึงฮอร์โมนที่ควบคุมการกินอาหารของหอยเชอรี่ มีความสำคัญยิ่งเพื่อนำไปสู่งานวิจัยประยุกต์เพื่อต่อยอดองค์ความรู้ในการควบคุมการกินอาหารหรือกินข้าวของหอยเชอรี่ในเชิงพาณิชย์ต่อไป



บทที่ 3

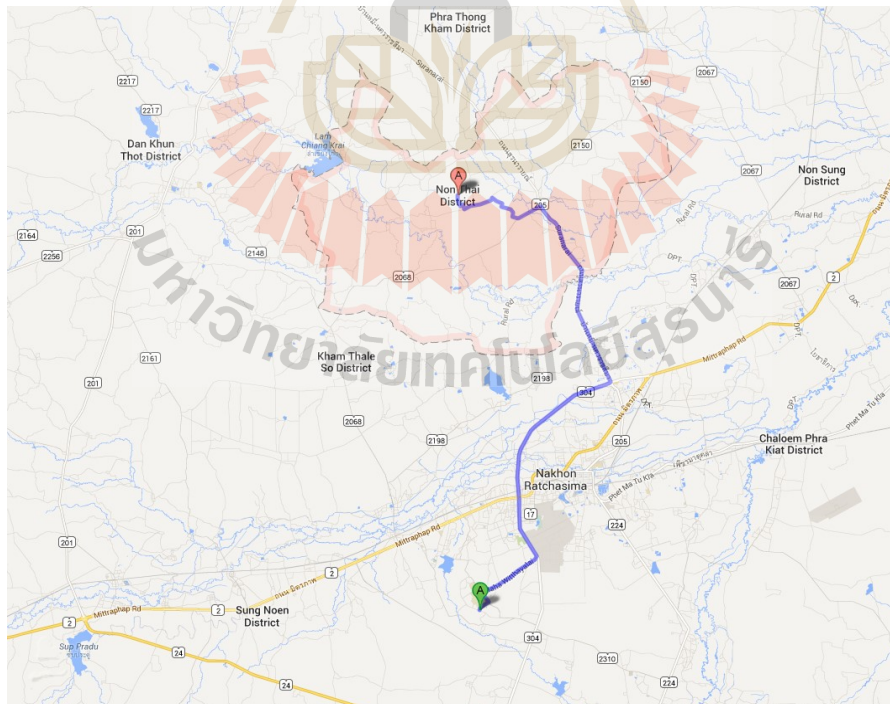
วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

1. การเตรียมสัตว์ทดลอง (Animal preparation)

สัตว์ทดลองเป็นหอยเชอรี่เพศเมียเพราะมีอัตราการกินอาหารสูงมากกว่าหอยเชอรี่เพศผู้ เนื่องจากหอยเชอรี่เพศเมียต้องการพลังงานสูงเพื่อการเจริญพันธุ์ การทดลองครั้งนี้คัดเลือกหอยที่มีการเจริญเติบโตสมบูรณ์เต็มที่ ซึ่งการคัดเลือกจะพิจารณาจากความกว้างของ operculum width ให้มีค่าเท่ากับ 4.5-5.6 เซนติเมตร และน้ำหนักตัวอยู่ระหว่าง 40-45 กรัม (Youens and Burks, 2008)

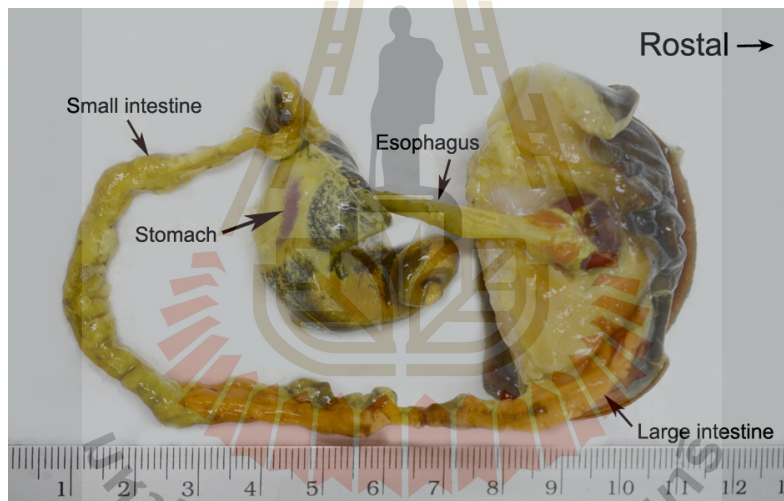
หอยเชอรี่ที่ใช้การทดลองในครั้งนี้มีแหล่งที่มาจากแปลงนาจากอำเภอโนนไทย จังหวัดนครราชสีมา (ภาพที่ 4) แปลงนาที่ถูกคัดเลือกเพื่อจับหอยเชอรี่จะพิจารณาการปราศจากการฉีดพ่นสารเคมีเพื่อกำจัดหอยเชอรี่ และแมลงศัตรูพืชเพื่อลดปัจจัยที่มีผลต่อความสมบูรณ์ของสัตว์ทดลอง โดยหอยเชอรี่ถูกนำมาพักที่ห้องปฏิบัติการนาน 2 สัปดาห์เพื่อปรับสภาพร่างกาย หอยถูกนำไปไว้ในอ่างน้ำพลาสติกขนาด 20 ลิตร ปริมาณของหอยเชอรี่ 20 ตัว/อ่างน้ำ (ตัวผู้ 5 ตัว และตัวเมีย 15 ตัว) และหอยได้รับผักบุงเป็นอาหารวันละ 1 ครั้ง การควบคุมอุณหภูมิภายในห้องถูกควบคุมที่ประมาณ 27-28 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการรับแสงสว่าง 12 ชั่วโมง และไม่ได้รับแสงสว่าง 12 ชั่วโมง



ภาพที่ 4 ตำแหน่งของอำเภอ โนนไทย จังหวัดนครราชสีมา และเส้นทางจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อไปเก็บตัวอย่าง (<https://maps.google.co.th/maps>)

2. การศึกษาลักษณะโครงสร้างของทางเดินอาหารของหอยเชอรี่

หอยเชอรี่ถูกทำให้สลบด้วยน้ำแข็งเพื่อลดความเจ็บปวดจากการผ่าตัด เปลือกหอยถูกทุบให้แตกด้วยค้อน อวัยวะในระบบทางเดินอาหารถูกนำออกมาและตัดแยกออกเป็นส่วนๆ ได้แก่ 1) esophagus, 2) stomach, 3) small intestine และ 4) large intestine (ภาพที่ 5) อวัยวะส่วนต่างๆ ของทางเดินอาหารถูกตัดเลือกเฉพาะบริเวณกลางของแต่ละส่วนเท่านั้นเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากส่วนที่อยู่ใกล้เคียง เนื้อเยื่อที่แยกออกมาถูกรักษาสภาพด้วย Bouin's fixative (Bio-optica, Milano, Italy) นาน 24 ชั่วโมง เมื่อเนื้อเยื่อผ่านกระบวนการรักษาสภาพด้วย Bouin's fixative เรียบร้อยแล้ว เนื้อเยื่อถูกล้างด้วย 70% Alcohol จำนวน 5 ครั้งๆ ละ 10 นาที เพื่อชะล้าง fixative ส่วนเกินออกจากเนื้อเยื่อ ชิ้นเนื้อตัวอย่างถูกนำเข้าสู่กระบวนการดิ่งน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วย 70%, 80%, 90%, 95%, 100% Alcohol ด้วยเครื่อง Tissue processor (ATP 700, Australia) ตามด้วยการนำชิ้นเนื้อตัวอย่างฝังใน paraffin wax ด้วยเครื่องมือ Embedding station (Bio-optica รุ่น CD 1000, Italy) แล้วนำ paraffin block ไปตัดด้วยเครื่องตัด Rotary microtome (Hestion รุ่น EMR 4000, Australia) ที่ความหนา 5 μm ตามด้วยการวาง paraffin sections บน slide



ภาพที่ 5 โครงสร้างของทางเดินอาหารของหอยเชอรี่ที่ใช้ในการทดลอง ประกอบด้วย หลอดอาหาร (esophagus) กระเพาะอาหาร (stomach) ลำไส้เล็ก (small intestine) และลำไส้ใหญ่ (large intestine)

2.1 การเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาด้วย light microscope

Paraffin section จากเนื้อเยื่อแต่ละส่วนของทางเดินอาหาร ถูกนำไปย้อมด้วยสี hematoxylin and eosin (Bio-Optica) โดย section ถูกจุ่มใน xylene (Fisher Chemical, New Jersey, NY) เพื่อกำจัด paraffin ออกจากเนื้อเยื่อ การย้อมสีจำเป็นต้องให้มัน้ำในเนื้อเยื่อ ดังนั้น section ถูกนำไปผ่านกระบวนการ rehydrate ด้วยการจุ่มเนื้อเยื่อใน graded series of ethanol (100-70%) ตามลำดับ และตามด้วยการจุ่มใน distilled water เพื่อนำน้ำเข้าไปในเนื้อเยื่อ ขั้นตอนภายหลังการย้อมด้วยสี hematoxylin and eosin นั้น เนื้อเยื่อถูก dehydrate

ด้วยการจุ่มใน graded series of ethanol (70-100%) ตามลำดับ ตามด้วยกระบวนการ clearing ด้วย xylene และขั้นตอนสุดท้าย คือ การปิด section ด้วย cover slip ตั้งเกดลักษณะของเนื้อเยื่อภายใต้ light microscope (Nikon Eclipse 80i) และถ่ายรูปด้วย Olympus DP72 Camera

2.2 การวัดความสูงของ epithelial cell

ความสูงของ epithelial cell ที่บุผนังของส่วนต่างๆของทางเดินอาหารถูกวัด โดยเลือกถ่ายรูปจาก section ของแต่ละส่วนของทางเดินอาหาร (n = 5, each) แต่ละ section ถูกถ่ายภาพทั้งหมด 10 ภาพ (1 microscopic field area เท่ากับ 0.75 ตารางมิลลิเมตร ที่กำลังขยายเท่ากับ 40×) การวัดความสูงของ epithelial cell จะวัดจาก basement membrane ขึ้นไปยัง apical surface ของ epithelial cell โดยใช้ Cell[^]D software

2.3 การศึกษาการปรากฏของ mucin-secreting cell ในส่วนต่างๆของทางเดินอาหารของหอยเชอรี่

Paraffin section จากส่วนต่างๆ ของทางเดินอาหาร ถูกนำมาศึกษาการปรากฏของ neutral mucin- และ acidic mucin-secreting cell โดยการย้อมด้วย Periodic acid-Schiff (PAS) และ alcian blue, pH 1.0 และ 2.5 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) การย้อมสีต้องมีการนำ paraffin ออกจากเนื้อเยื่อด้วย xylene ตามด้วยการดึงน้ำเข้าสู่เนื้อเยื่อด้วยกระบวนการ rehydrate ด้วยการจุ่มใน graded series of ethanol (100-70%) ตามลำดับ แล้วนำเนื้อเยื่อไปย้อมด้วย PAS หรือ alcian blue, pH 1.0 หรือ pH 2.5 จากนั้น section ถูก dehydrate ด้วย graded series of ethanol (70-100%) ตามลำดับ ผ่านกระบวนการ clearing ด้วย xylene และขั้นตอนสุดท้าย คือ mount เนื้อเยื่อด้วย Permount (Fisher Chemical) ก่อนที่จะนำไปศึกษาด้วย light microscope

จำนวนของ mucin-secreting cell จากแต่ละส่วนของทางเดินอาหารถูกนับภายใต้ light microscope และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของจำนวนของ mucin-secreting cell จากแต่ละส่วนของทางเดินอาหารดังสมการ

$$\text{Percentage of mucin-secreting cells} = \frac{\text{Number of mucin-secreting cells}}{\text{Total number of epithelial cells}} \times 100$$

2.4 การเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาด้วย transmission electron microscope

หอยเชอรี่ถูกทำให้สลบด้วยน้ำแข็งเพื่อลดความเจ็บปวดจากการผ่าตัด เปลือกหอยถูกทุบให้แตกด้วยก้อน ส่วนต่างๆของทางเดินอาหารถูกนำออกมาและตัดแยกออกเป็นส่วนๆ ได้แก่ 1) esophagus, 2) stomach, 3) small intestine และ 4) large intestine (ภาพที่ 5) ส่วนต่างๆของทางเดินอาหารถูกตัดเลือกเฉพาะบริเวณกลางของแต่ละส่วนเท่านั้น เนื้อเยื่อที่แยกออกมาถูกรักษาสภาพด้วย 2.5% glutaraldehyde และ 2% paraformaldehyde (Aros Organics) ใน phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4 และแช่เนื้อเยื่อ นาน 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับสาร glutaraldehyde และ paraformaldehyde ส่วนเกินที่เกาะที่อยู่ ในเนื้อเยื่อถูกล้างออกด้วย phosphate buffer saline และนำเนื้อเยื่อเข้าสู่กระบวนการ post-fix ด้วย 1% osmiumtetroxide (Electron Microscopy Sciences) ใน PBS จากนั้น เนื้อเยื่อถูก dehydrate เพื่อดึงน้ำออก

จากเนื้อเยื่อด้วย graded series of ethanol (50-100%) ตามลำดับ ตามด้วยการนำเนื้อเยื่อเข้าสู่กระบวนการ clearing ด้วย propylene oxide และผ่านกระบวนการ infiltration ด้วยพลาสติกจากอัตราส่วนผสมของ propylene oxide : araldite 502 resin (2:1, 1:1 และ 1:2 v/v ตามลำดับ) และขั้นตอนสุดท้าย เนื้อเยื่อถูกฝังลงในพลาสติก araldite 502 resin (Electron Microscopy Sciences) ภายหลังจากที่ araldite แข็งตัวสมบูรณ์เรียบร้อยแล้ว tissue block ถูกนำมาตัดเป็น semi-thin section และถูกนำไปย้อมด้วยสี methylene blue เพื่อกำหนดบริเวณที่ต้องการจะตัดเนื้อเยื่อให้เป็น thin section เมื่อได้ thin section เป็นที่เรียบร้อยแล้ว thin section ถูกนำไป coat ด้วย lead citrate และ uranyl acetate ก่อนที่จะนำไปศึกษาด้วย JEOL-JEM-2010 transmission electron microscope

3. การศึกษาการปรากฏของ leptin peptide ในส่วนต่างๆ ของทางเดินอาหารของหอยเชอรี่

3.1 วิธี immunoperoxidase

Paraffin section ของเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆของทางเดินอาหาร จากการเตรียมตามกระบวนการที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น ถูกนำเข้าสู่กระบวนการกำจัด paraffin wax ออกจากเนื้อเยื่อด้วย xylene 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นนำเนื้อเยื่อเข้าสู่กระบวนการดึงน้ำเข้าสู่เนื้อเยื่ออีกครั้ง ด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ประกอบด้วย 100%, 95%, 90% และ 70% แอลกอฮอล์ ตามลำดับ ซึ่งแต่ละความเข้มข้นต้องทำซ้ำจำนวน 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที เนื้อเยื่อจะถูกแช่ใน 70% แอลกอฮอล์ที่ผสมด้วย 1% LiCO₃ เป็นเวลา 30 นาที (อุณหภูมิห้อง) เพื่อกำจัด picric acid ที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อจากการรักษาภาพด้วย Bouin's fixative เนื่องจากทดลองเป็นการย้อม immunoperoxidase technique ดังนั้น endogenous peroxidase ภายในเนื้อเยื่อ จึงต้องถูกกำจัดด้วยการแช่เนื้อเยื่อใน 1% hydrogen peroxide ใน PBS, pH 7.4 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที สำหรับการกำจัด free aldehyde group ที่อยู่ในเนื้อเยื่อ กระทำด้วยการแช่เนื้อเยื่อใน 0.1 M glycine ใน PBS ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และการเพิ่ม permeability ของเนื้อเยื่อทำโดยใช้กระบวนการแช่เนื้อเยื่อใน 0.1% Triton X-100 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที สำหรับการป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific binding) ของ primary antibody ทำด้วยการแช่เนื้อเยื่อใน 4% bovine serum albumin (BSA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที ในกล่องเก็บความชื้น (moist chamber) ตามด้วยการแช่เนื้อเยื่อกับ primary antibody คือ rabbit anti-human (dilution 1:500) (Abcam, UK) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในกล่องเก็บความชื้น (moist chamber) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สำหรับ primary antibody ส่วนเกินหรือส่วนที่จับแบบไม่จำเพาะเจาะจงจะถูกกำจัดจากการล้างด้วย PBS ที่ผสมด้วย 0.1% Tween 20 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที การตรวจหา primary antibody ในเนื้อเยื่อจะถูกตรวจด้วยการนำเนื้อเยื่อไปแช่กับ secondary antibody คือ goat anti rabbit-HRP (dilution 1:1,000) (Abcam, UK) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในกล่องเก็บความชื้น (moist chamber) เป็นเวลา 60 นาที สำหรับ secondary antibody ส่วนเกินหรือส่วนที่จับแบบไม่จำเพาะเจาะจงกับ primary antibody จะถูกกำจัดจากการล้างด้วย PBS ที่ผสมด้วย 0.1% Tween 20 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที ตามด้วยการใส่ substrate เพื่อให้ทำปฏิกิริยากับ peroxidase คือ การแช่เนื้อเยื่อกับ 0.05% diaminobenzidine (DAB) และ 0.03% hydrogen peroxide ซึ่งผลิตภัณฑ์หรือผลการทดลองที่ได้เห็นเป็นสี

น้ำตาลเข้ม สำหรับ negative control แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ 1) กลุ่มที่เนื้อเยื่อไม่ได้แช่กับ primary antibody แต่แช่กับ PBS แทน เพื่อตรวจสอบการจับที่จำเพาะเจาะจงของ secondary antibody และ 2) กลุ่มที่ primary antibody ถูก pre-absorbed ด้วย leptin peptide (Abcam, UK) โดยการ incubate primary antibody ที่ working dilution กับ 100 μg leptin peptide ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบการจับที่จำเพาะเจาะจงของ primary antibody ผลการทดลองที่ได้ถูกถ่ายภาพด้วยกล้องรุ่น Nikon ECLIPSE E600 light microscope และ Nikon ECLIPSE 2000 CCD camera

3.2 การนับความหนาแน่นของเซลล์ที่มีการปรากฏของ leptin peptide

การนับความหนาแน่นของเซลล์ที่มีการปรากฏของ leptin peptide (จำนวนเซลล์ที่มีการปรากฏของ leptin peptide/พื้นที่ (ตารางมิลลิเมตร)) การทดลองทำด้วยการถ่ายภาพจาก section ที่ผ่านกระบวนการย้อม immunoperoxidase เรียบร้อยแล้ว ภาพถ่ายที่เลือกมานับจำนวนเซลล์จะถูกถ่ายจาก section ของแต่ละส่วนของทางเดินอาหาร ($n = 5$, each) แต่ละ section ถูกถ่ายภาพทั้งหมด 10 ภาพ (1 microscopic field area เท่ากับ 0.75 ตารางมิลลิเมตร ที่กำลังขยายเท่ากับ $40\times$ และในแต่ละภาพ เซลล์ที่มีการปรากฏของ leptin peptide ได้ถูกนับจำนวนโดยใช้ Cell \hat{D} software เมื่อได้ค่าเฉลี่ยของความหนาแน่นของเซลล์ที่มีการปรากฏของ leptin peptide จากแต่ละส่วนของทางเดินอาหารแล้ว ค่าเฉลี่ยนี้ได้ถูกนำมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยใช้ analysis of variance (ANOVA) ตามด้วย Tukey post hoc multiple comparison โดยค่า probability value ที่น้อยกว่า 0.05 ($p < 0.05$) ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4. การศึกษาการแสดงออกของ leptin peptide ในส่วนต่างๆ ของทางเดินอาหารของหอยเชอรี่ ด้วยวิธี Western immunoblotting

หอยเชอรี่ถูกทำให้สลบด้วยน้ำแข็ง เปลือกหอยถูกทุบให้แตกด้วยค้อนเพื่อตัดแยกระบบทางเดินอาหารออกเป็นส่วนๆ ได้แก่ 1) esophagus, 2) stomach, 3) small intestine และ 4) large intestine ส่วนต่างๆ ของทางเดินอาหารถูกตัดเลือกเฉพาะบริเวณกลางของแต่ละส่วนเท่านั้น เนื้อเยื่อที่ถูกตัดออกมาถูกรักษาสภาพของโปรตีนในเนื้อเยื่อด้วยการแช่แข็งเนื้อเยื่อใน liquid nitrogen และจัดเก็บในตู้แช่แข็งที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดลองขั้นตอนต่อไป

4.1 การสกัดโปรตีนจากส่วนต่างๆ ของระบบทางเดินอาหาร

ส่วนต่างๆ ของทางเดินอาหารที่ผ่านการแช่แข็งแล้วถูกนำมาชั่งน้ำหนัก แล้วนำไปใส่ในหลอดแก้วบดเนื้อเยื่อด้วยมือ (hand homogenizer) ที่ถูกแช่ในน้ำแข็งเพื่อควบคุมให้มีอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส แล้วจึงใส่ lysis buffer (10mM Tris-HCl, 150 mM NaCl และ 1mM EDTA) ที่ผสมด้วย 0.5% Triton X-100 และ 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) ลงไปในหลอดแก้วบดเนื้อเยื่อที่ปริมาตร 5 เท่าของเนื้อเยื่อ (น้ำหนักเนื้อเยื่อ/ปริมาตร buffer) และบดเนื้อเยื่อจนละเอียด ซึ่งกระบวนการบดทำในน้ำแข็งตลอดเวลาเพื่อป้องกันการสลายของโปรตีน (protein degradation) จากนั้น นำของเหลวจากการบดเนื้อเยื่อที่ได้ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 ml เพื่อนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 20,000g ที่ความเย็น 4 องศาเซลเซียส นาน 20 แล้วจึงดูด

เก็บเฉพาะสารละลายที่อยู่ด้านบน (supernatant) เท่านั้น ปริมาณของโปรตีนที่สกัดแยกออกมาได้จะถูกวัดด้วย Bradford's assay

4.2 วิธีการทำ Western immunoblotting

โปรตีนสกัด (crude protein) จากส่วนต่างๆของทางเดินอาหารถูกปรับปริมาณให้เท่ากันด้วย phosphate buffer saline (PBS) การทดลองครั้งนี้ใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 40 μ g จากนั้นใส่ loading dye เพื่อให้โปรตีนมีความเป็นประจุลบ (negative charge) การส่งโปรตีนให้ลอดผ่านช่องตะแกรงของ sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) จะต้องทำให้โครงสร้างของโปรตีนยืดออกเป็นสายยาว (linear protein) ดังนั้นโปรตีนสกัดจึงถูกนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที และถูกนำไปแยกขนาดด้วย 12.5% SDS-PAGE จากนั้นโปรตีนสกัดถูกส่งถ่ายด้วยกระแสไฟฟ้าเพื่อไปยัง nitrocellulose membrane (Amersham Bioscience, UK) นาน 60 นาที เพื่อป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific binding) ของ primary antibody แผ่น membrane จึงถูกนำไปแช่ใน 5% skimmed milk (ละลายใน PBS) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 60 นาที และการตรวจหา leptin peptide ในเนื้อเยื่อนั้น ทำได้โดยการนำแผ่น membrane ไปแช่กับ primary antibody คือ rabbit anti-human leptin (dilution 1:500) (Abcam, UK) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สำหรับ primary antibody ส่วนเกินหรือส่วนที่จับแบบไม่จำเพาะเจาะจงถูกกำจัดด้วยการล้างด้วย PBS ที่ผสมด้วย 0.1% Tween 20 ที่อุณหภูมิห้อง จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที จากนั้นแผ่น membrane ถูกนำไปแช่กับ secondary antibody คือ goat anti-rabbit-HRP (dilution 1:5,000) (Abcam, UK) และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที สำหรับ secondary antibody ส่วนเกินหรือส่วนที่จับแบบไม่จำเพาะเจาะจงจะถูกกำจัดด้วยการล้างด้วย PBS ที่ผสมด้วย 0.1% Tween 20 ที่อุณหภูมิห้อง จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที ตามด้วยการใส่ substrate เพื่อให้ทำปฏิกิริยากับ peroxidase ทำโดยการแช่แผ่น membrane กับ 0.05% diaminobenzidine (DAB) และ 0.03% hydrogen peroxide เพื่อสังเกตแถบ band ของ leptin peptide ซึ่งผลิตภัณฑ์หรือผลการทดลองจะที่ได้จะเห็นเป็นสีน้ำตาลเข้ม สำหรับ positive control ของการทดลองใช้ human leptin peptide (Abcam, UK) ส่วน negative control แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ 1) membrane ที่ไม่ได้แช่กับ primary antibody แต่แช่กับ PBS แทน เพื่อตรวจสอบการจับที่จำเพาะเจาะจงของ secondary antibody และ 2) กลุ่มที่ primary antibody ถูก pre-absorbed ด้วย leptin peptide (Abcam, UK) โดยการ incubate primary antibody ที่ working dilution กับ 100 μ g leptin peptide ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบการจับที่จำเพาะเจาะจงของ primary antibody

4.3 การเปรียบเทียบปริมาณแบบ semi-quantitative ของ leptin peptide ที่ปรากฏในส่วนต่างๆของทางเดินอาหาร

การเปรียบเทียบปริมาณของ immunoreactive band จากส่วนต่างๆของทางเดินอาหารด้วยการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Image J software) สามารถทำได้ด้วยการวาง box (50 \times 50 pixels) ลงบน immunoreactive band แต่ละ band เพื่อให้ software ทำการวัดค่า intensity จาก immunoreactive band ของแต่ละ band เหล่านั้น ค่าตัวเลขที่ได้ออกมาจะมีหน่วยเป็น arbitrary unit (AU) การทดลองได้ถูกทำซ้ำทั้งหมด

5 ครั้ง โดยใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อจากหอย 5 ชุด ไม่ซ้ำกัน เมื่อได้ค่าเฉลี่ยของ intensity ของ immunoreactive band จากส่วนต่างๆของทางเดินอาหารแล้ว ค่าเฉลี่ยเหล่านี้ได้ถูกนำมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยใช้ analysis of variance (ANOVA) ตามด้วย Tukey post hoc multiple comparison โดยค่า probability value ที่น้อยกว่า 0.05 ($p < 0.05$) ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

5. การเปรียบเทียบปริมาณของ leptin peptide ใน hemolymph ของหอยเชอรี่ที่กินอาหารปกติและหอยที่อดอาหาร โดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

5.1 การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง

หอยเชอรี่ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (กลุ่มละ 10 ตัว) ได้แก่ 1) กลุ่มกินอาหารปกติ และ 2) กลุ่มอดอาหาร 24 ชั่วโมง

5.2 การเก็บ hemolymph

เมื่อหอยกลุ่มอดอาหารได้รับการอดอาหารครบ 24 ชั่วโมงแล้ว hemolymph จะถูกเก็บจากทั้งหอยกลุ่มกินอาหารปกติและกลุ่มอดอาหาร โดยการใช้ tip สะกิดที่บริเวณ foot muscle ของหอย และรอให้ hemolymph หยดลงมา หลังจากนั้นหอยกลุ่มอดอาหารจะได้กินอาหารปกติเป็นเวลา 5 ชั่วโมง และ hemolymph จะถูกเก็บจากทั้งหอยกลุ่มกินอาหารปกติและกลุ่มอดอาหารอีกครั้ง

5.3 การทำ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Hemolymph ถูกนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตกตะกอน ที่ความเร็ว 10,000g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และดูดเก็บเฉพาะสารละลายที่อยู่ด้านบน (supernatant) เท่านั้น ปริมาณของ protein ที่อยู่ใน hemolymph ถูกวัดด้วยเทคนิค Bradford's assay จากนั้นปริมาณของ leptin peptide ใน hemolymph ถูกนำไปวัดด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay การทดลองนี้ใช้ human leptin peptide (Abcam, UK) เป็นค่ามาตรฐาน (standard) ของการทดลอง ปริมาณ protein ที่อยู่ใน hemolymph จากหอยแต่ละกลุ่มทดลองถูก diluted ด้วย coating buffer (15 mM Na_2CO_3 , 35 mM NaHCO_3 , pH 9.6) ให้ได้ปริมาณที่เท่าๆ กัน คือเท่ากับ 40 μg จากนั้นถูก coat ลงบน ELISA plate ที่ปริมาตร 100 μl และนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นโปรตีนส่วนเกินจะถูกล้างออกด้วย 0.01 M PBS (pH 7.4) ที่มีส่วนผสมของ 0.05% Tween-20 จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที การป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific binding) ของ primary antibody ทำโดยการใส่ 100 μl blocking solution (0.25% BSA, 0.05% Tween 20 ใน 0.01M PBS, pH 7.4) เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายหลังจากการล้าง blocking solution ส่วนเกินออกไปด้วย PBS เรียบร้อยแล้ว primary antibody (rabbit anti-human leptin (dilution 1:500)) (Abcam, UK) ถูกใส่ลงไปบน plate ที่ปริมาตร 100 μl และปล่อยให้ใช้เวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นล้าง primary antibody ส่วนเกินหรือส่วนที่จับแบบไม่จำเพาะเจาะจงด้วย 0.05% Tween 20 ใน 0.01 M PBS จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที สำหรับ secondary antibody ของการทดลอง คือ goat anti rabbit-HRP (dilution 1:5000) (Abcam, UK) ปริมาตร 100 μl โดย incubate กับ secondary antibody เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วจึงล้าง secondary antibody

ส่วนเกินหรือส่วนที่จับแบบไม่จำเพาะเจาะจงด้วย 0.05% Tween 20 ใน 0.01 M PBS จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วจึงตรวจสอบ primary-secondary complex ด้วยการใส่ substrate คือ TMB solution ที่ปริมาตร 100 μ l เพื่อสังเกตปริมาณการเกิดสีของผลิตภัณฑ์ ปฏิกิริยาถูกหยุดด้วยการใส่ 100 μ l ของ stopping solution (2 M H₂SO₄) และนำผลการทดลองที่ได้ไปอ่านค่าความเข้มของแสงที่ 450 nm โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ความถูกต้องของผลการทดลองสามารถตรวจสอบด้วย 1) การใส่ PBS แทน primary antibody และ 2) การใช้ pre-absorbed primary antibody (รายละเอียดตามที่กล่าวไว้แล้วในวิธี immunoperoxidase)

5.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้ถูกนำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเชิงปริมาณ โดยการใช้ one-way Analysis of Variance (ANOVA) และตามด้วย Tukey post hoc multiple comparison โดยค่า p-value น้อยกว่า 0.05 ($p < 0.05$) ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

6. การเปรียบเทียบน้ำหนักตัวและปริมาณอาหารที่กิน ระหว่างหอยที่ได้รับและไม่ได้รับการฉีด leptin peptide

6.1 การฉีด leptin peptide

หอยถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ได้แก่ 1) หอยกลุ่มที่ 1 ได้รับการฉีดด้วย 0.9% normal saline เพื่อเป็นกลุ่มควบคุม 2) หอยกลุ่มที่ 2-4 ได้รับการฉีด leptin peptide ที่ปริมาณต่างๆ กัน (1, 10 และ 100 ng/g body weight ตามลำดับ) การฉีดกระทำในวันที่ 1 และวันที่ 3 เวลาประมาณ 08.00 น. โดย leptin peptide ถูก dilute ใน 0.9% normal saline เป็น 3 ความเข้มข้นตามที่กล่าว

6.2 การชั่งน้ำหนักหอย

หอยทุกตัวในแต่ละกลุ่มจะถูกนำไปชั่งน้ำหนักในวันที่ 0 (วันก่อนเริ่มการทดลอง ก่อนการฉีด leptin peptide), วันที่ 3 และวันที่ 5 ของการทดลอง วิธีการชั่งน้ำหนักของหอยทำด้วยการนำหอยมาวางบนฝ้านาน 1 ชั่วโมง เพื่อกำจัดน้ำอยู่ในเปลือกหอยให้ไหลออกมาเพื่อป้องกันการคาดเคลื่อนของน้ำหนักตัวหอยจากน้ำที่สะสมในตัวหอย

6.3 การให้อาหารและการบันทึกปริมาณอาหารที่กิน

หอยได้รับอาหารเป็น ใบผักบุ้งที่อบใน oven ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง โดยได้รับวันละ 1 ครั้ง หลังจากได้รับการฉีด leptin peptide หรือ normal saline นาน 2 ชั่วโมง ใบผักบุ้งที่เหลือจากการกินถูกเก็บในตอนเช้าของวันถัดไป และถูกนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง แล้วจึงถูกบันทึกน้ำหนัก โดยบันทึกในวันที่ 0 (วันก่อนเริ่มการทดลอง ก่อนการฉีด leptin peptide) และวันที่ 1-4 ในแต่ละวันหอยแต่ละกลุ่มได้รับปริมาณอาหารที่เท่าๆ กัน กำหนดจากการชั่งน้ำหนักของอาหารที่ให้ จากนั้นอาหารหลังกินถูกชั่งน้ำหนักเช่นเดียวกัน และคำนวณหาปริมาณอาหารที่ถูกกิน

6.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้ถูกนำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเชิงปริมาณ โดยการใช้ one-way Analysis of Variance (ANOVA) และตามด้วย Tukey post hoc multiple comparison โดยค่า p-value น้อยกว่า 0.05 ($p < 0.05$) ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. ลักษณะโครงสร้างของทางเดินอาหารของหอยเชอรี่

1.1 ผลของการศึกษาด้วย light microscope

การศึกษาเยื่อเมือกของทางเดินอาหารของหอยเชอรี่พบว่า ทางเดินอาหารส่วน esophagus, stomach และ large intestine ถูกบุด้วยเยื่อเมือกชนิด simple columnar epithelium with microvilli (ภาพที่ 6) โดยเซลล์วางอยู่บน basement membrane และตำแหน่งของ nucleus อยู่บริเวณฐานของเซลล์ ส่วนทางเดินอาหารส่วน small intestine ถูกบุด้วยเยื่อเมือกชนิด pseudostratified columnar epithelium with cilia โดยเซลล์มีลักษณะเป็นเซลล์ทรงสูง วางอยู่บน basement membrane และตำแหน่งของ nucleus ของแต่ละเซลล์อยู่ต่างระดับกัน แต่อยู่ก่อนมาทาง basement membrane มากกว่า

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ ได้ทำการวัดความสูงของเยื่อเมือกของทางเดินอาหารส่วนต่างๆ ด้วยโปรแกรม Cell[^]D software เพื่อทำการเปรียบเทียบความสูงของส่วนต่างๆ ของทางเดินอาหาร ซึ่งผลการศึกษาพบว่า small intestine มีความสูงของเยื่อเมือกมากที่สุด ($2.00 \pm 0.19 \mu\text{m}$) (ภาพที่ 7) โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับความสูงของเยื่อเมือกของ esophagus ($0.8 \pm 0.05 \mu\text{m}$) stomach ($1.10 \pm 0.06 \mu\text{m}$) และ large intestine ($1.00 \pm 0.07 \mu\text{m}$)

การศึกษากการปรากฏของ mucin-secreting cell ในเยื่อเมือกของส่วนต่างๆของทางเดินอาหาร ใช้การย้อมด้วยสี 2 ชนิด ได้แก่ 1) การย้อมด้วย Periodic acid-Schiff (PAS) เพื่อศึกษากการปรากฏของ neutral mucin-secreting cell และ 2) การย้อมด้วย alcian blue เพื่อศึกษากการปรากฏของ acid mucin-secreting cell นอกจากนี้ การย้อมด้วยสี alcian blue แบ่งออกย่อยออกเป็น 2 แบบ คือ alcian blue pH 1.0 ซึ่งมีความจำเพาะต่อ sulfomucin-secreting cell และ alcian blue pH 2.5 ซึ่งจำเพาะต่อ sialomucin-secreting cell ผลการศึกษากการปรากฏของ mucin-secreting cell ในทางเดินอาหารส่วนต่างๆของหอยเชอรี่มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1) การปรากฏของ neutral mucin-secreting cell สามารถแบ่งลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่สร้าง mucin ชนิดนี้ ออกเป็นเซลล์ 2 ชนิด ได้แก่ pear-shaped cell และ columnar-shaped cell (ภาพที่ 8) ซึ่งบริเวณ apical surface ของเซลล์ทั้งสองชนิดติดกับ lumen ของทางเดินอาหาร สามารถพบ neutral mucin-secreting cells กระจายทั่วไปในเยื่อเมือกของ esophagus, small intestine และ large intestine ซึ่งลักษณะรูปร่างของเซลล์ในแต่ละส่วนมีความแตกต่างกัน คือ neutral mucin-secreting cell ของ esophagus และ small intestine มีลักษณะเป็น pear-shaped cell และ columnar-shaped cell แต่ neutral mucin-secreting cell ที่พบใน large intestine มีลักษณะเป็น pear-shaped cell เพียงอย่างเดียว ไม่ปรากฏ neutral mucin-secreting cell ในเซลล์เยื่อเมือกของ stomach อย่างไรก็ตาม พบ neutral mucin ที่บริเวณ microvilli ของเซลล์เยื่อเมือกของ stomach

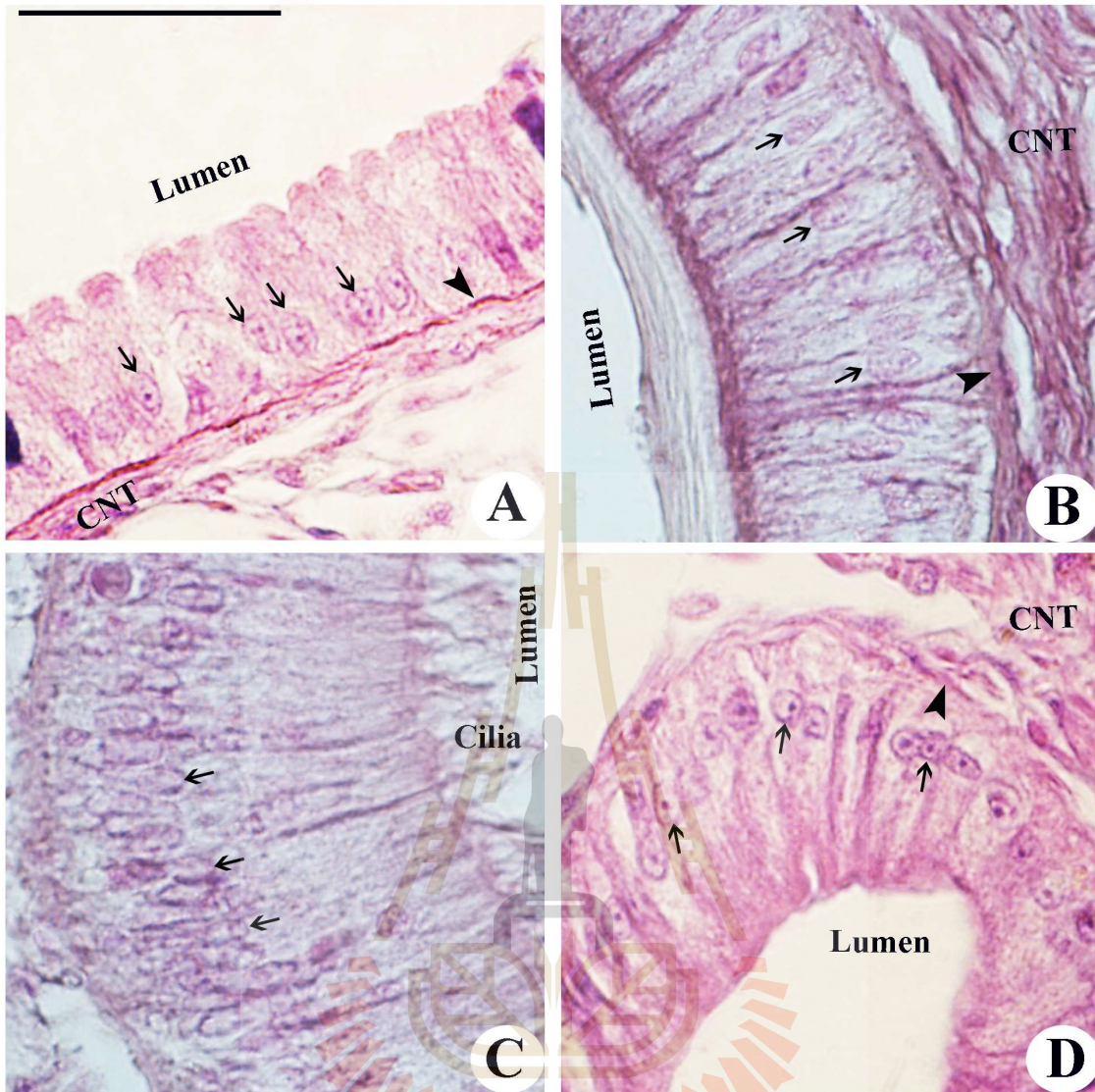
2) การปรากฏของ sialomucin-secreting cell สามารถแบ่งลักษณะรูปร่างของเซลล์ออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ pear-shaped cell และ columnar-shaped cell เช่นเดียวกับ neutral mucin-secreting cell (ภาพที่ 9) ไม่ปรากฏ sialomucin-secreting cell ในเยื่อเมือกของ stomach แต่ใน esophagus, small intestine และ large intestine สามารถพบ sialomucin-secreting cell กระจายทั่วไปในเยื่อเมือก ซึ่งลักษณะรูปร่างของเซลล์ในแต่ละส่วนมีความแตกต่างกัน คือ sialomucin-secreting cell ของ esophagus มีลักษณะ pear-shaped cell เพียงอย่างเดียว และ large intestine มี sialomucin-secreting cell ที่มีลักษณะ columnar-shaped cell เพียงอย่างเดียว แต่ใน small intestine พบ sialomucin-secreting cell ที่มีลักษณะทั้ง pear-shaped cell และ columnar-shaped cell

3) การปรากฏของ sulfomucin-secreting cell ก็สามารถแบ่งลักษณะรูปร่างของเซลล์ออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ pear-shaped cell และ columnar-shaped cell ได้เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 10) ซึ่งผลการศึกษพบว่า ไม่ปรากฏ sulfomucin-secreting cell ในเยื่อเมือกของ stomach แต่พบ sulfomucin-secreting cell กระจายทั่วไปในเยื่อเมือกของ esophagus, small intestine และ large intestine ซึ่งลักษณะรูปร่างของเซลล์ในแต่ละส่วนมีความแตกต่างกัน คือ sulfomucin-secreting cell ที่พบใน esophagus มีลักษณะ pear-shaped cell เพียงอย่างเดียว ส่วนใน large intestine พบ sulfomucin-secreting cell ที่มีลักษณะ columnar-shaped cell เพียงอย่างเดียว แต่ใน small intestine พบ sulfomucin-secreting cell ที่มีลักษณะเป็นทั้ง pear-shaped cell และ columnar-shaped cell

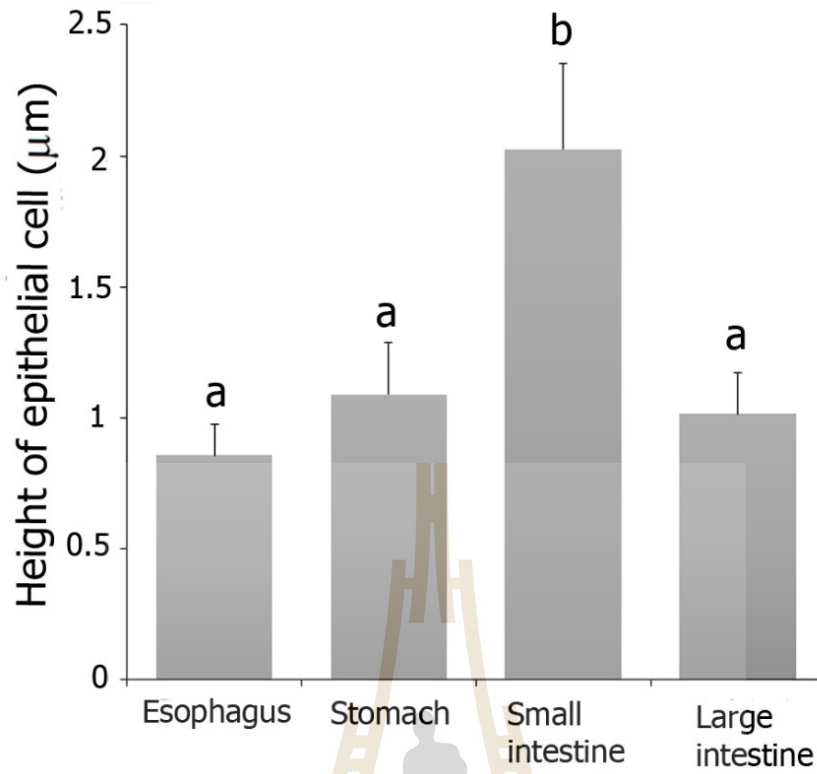
การศึกษาเปอร์เซ็นต์ของ mucin-secreting cell ในเยื่อเมือกของทางเดินอาหาร พบว่า large intestine มีเปอร์เซ็นต์ของ neutral mucin-secreting cell มากที่สุด ($42.33 \pm 0.08\%$) (ภาพที่ 11) และเปอร์เซ็นต์ของ neutral mucin-secreting cell ลดลงใน small intestine ($37.00 \pm 0.04\%$) และ esophagus ($26.89 \pm 0.02\%$) ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์ของ neutral mucin-secreting cell ของ small intestine และ large intestine มีมากกว่าเปอร์เซ็นต์ที่พบใน esophagus อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ส่วน sulfomucin-secreting cell นั้น พบว่ามีเปอร์เซ็นต์มากที่สุดใน small intestine ($33.18 \pm 4.28\%$) (ภาพที่ 11) และมีเปอร์เซ็นต์น้อยกว่าใน esophagus ($27.53 \pm 4.80\%$) ส่วน large intestine มีเปอร์เซ็นต์ของ sulfomucin-secreting cell น้อยที่สุด ($16.47 \pm 2.63\%$) ซึ่ง sulfomucin-secreting cell ใน esophagus และ small intestine มีเปอร์เซ็นต์มากกว่าใน large intestine อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

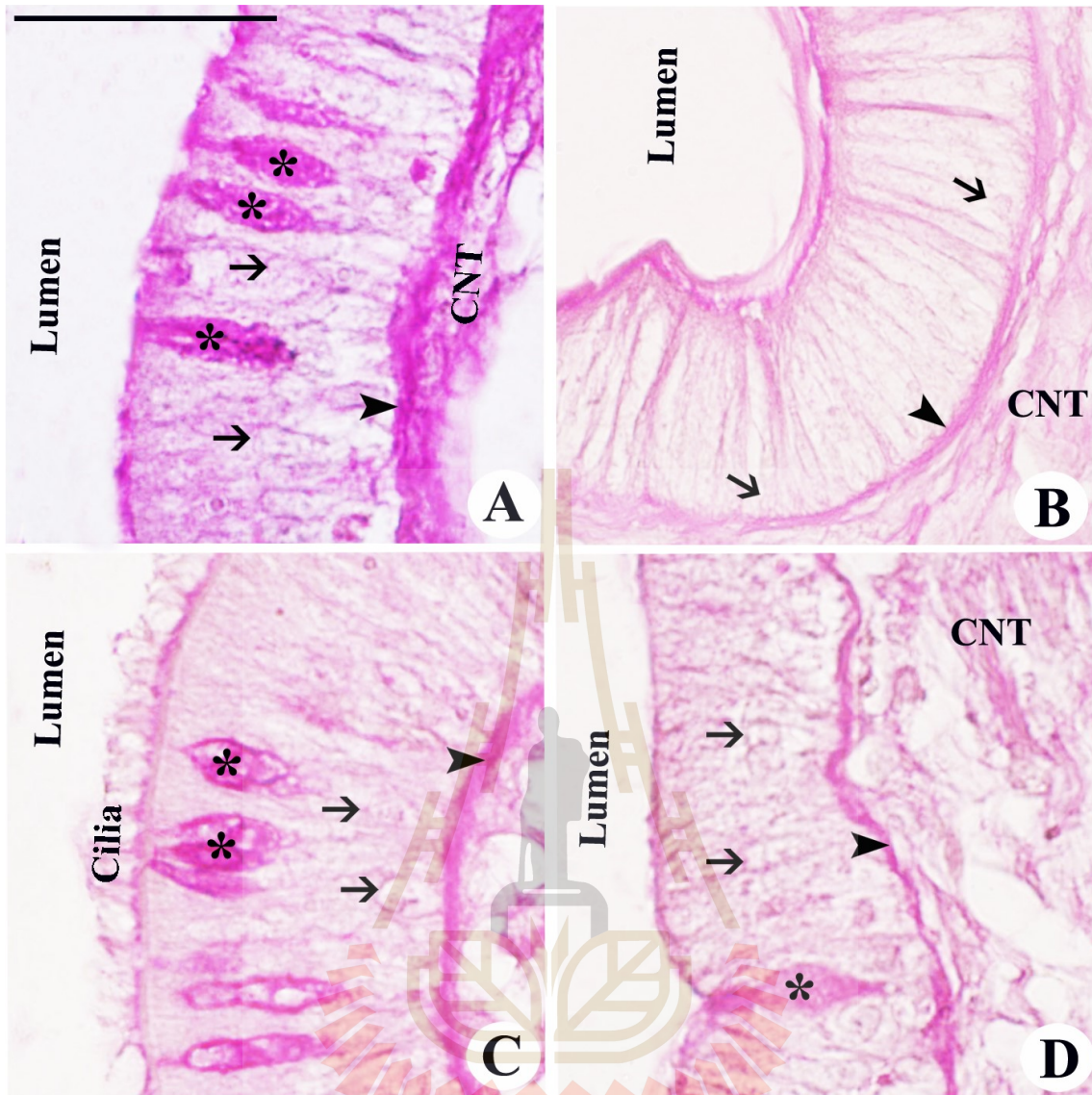
สำหรับ sialomucin-secreting cell พบว่ามีเปอร์เซ็นต์มากที่สุดใน esophagus ($28.18 \pm 4.78\%$) (ภาพที่ 11) และมีเปอร์เซ็นต์ลดลงใน small intestine ($27.02 \pm 4.13\%$) และ large intestine ($12.68 \pm 1.97\%$) ตามลำดับ ซึ่งเปอร์เซ็นต์ของ sialomucin-secreting cell ใน esophagus และ small intestine มีมากกว่าที่พบใน large intestine อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



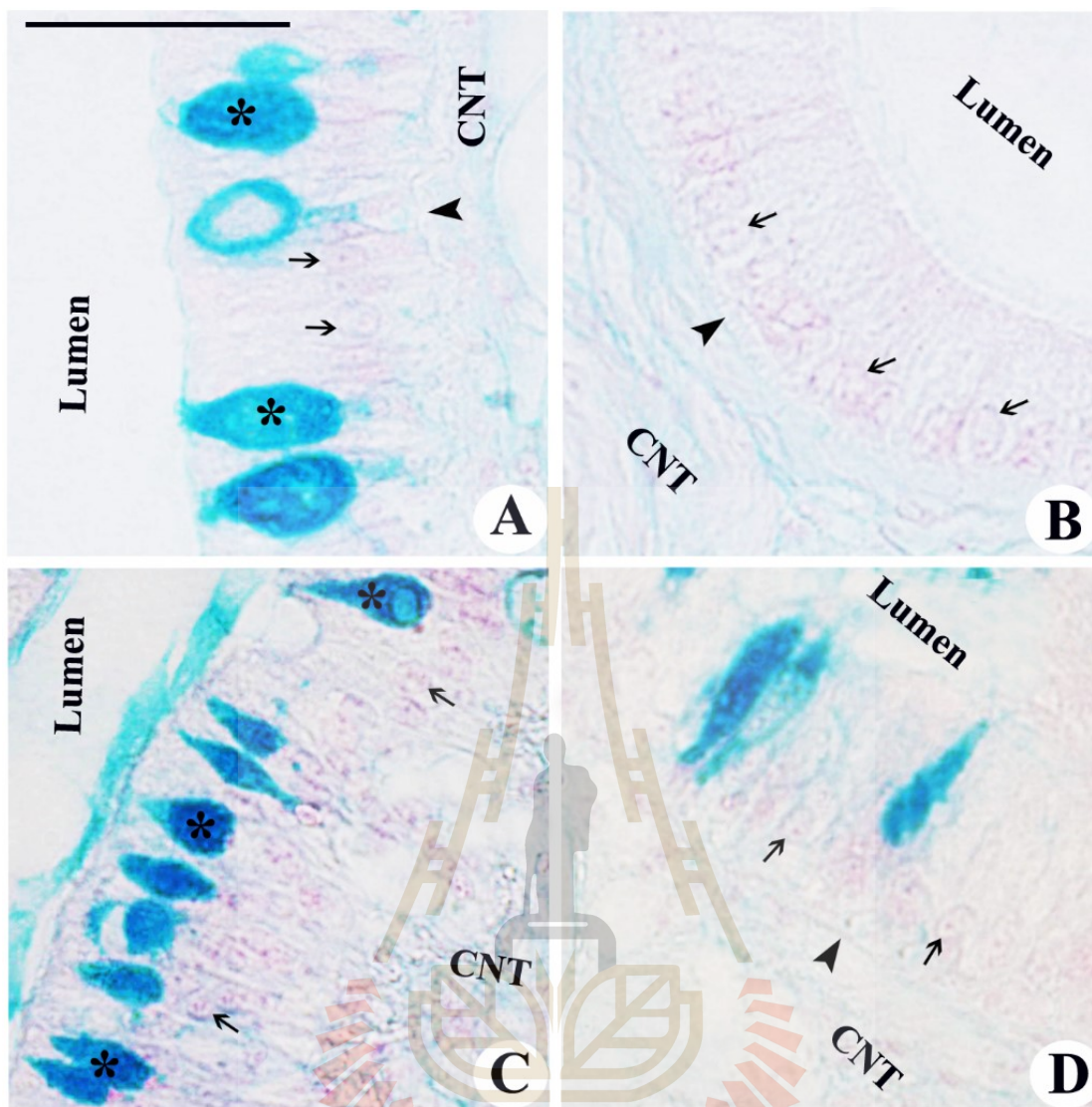
ภาพที่ 6 ลักษณะเยื่อบุผิวของทางเดินอาหารส่วน esophagus (A) stomach (B) และ large intestine (D) เป็นชนิด simple columnar epithelium with microvilli ส่วน small intestine (C) ถูกบุด้วยเยื่อบุผิวชนิด pseudostratified columnar epithelium with cilia เซลล์เยื่อบุผิวมี nucleus อยู่ที่ฐานของเซลล์ (ลูกศร) และเซลล์วางอยู่บน basement membrane (หัวลูกศร) บริเวณด้านล่างของเยื่อบุผิวเป็นโครงสร้างของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue; CNT) Scale bar = 200 μ m



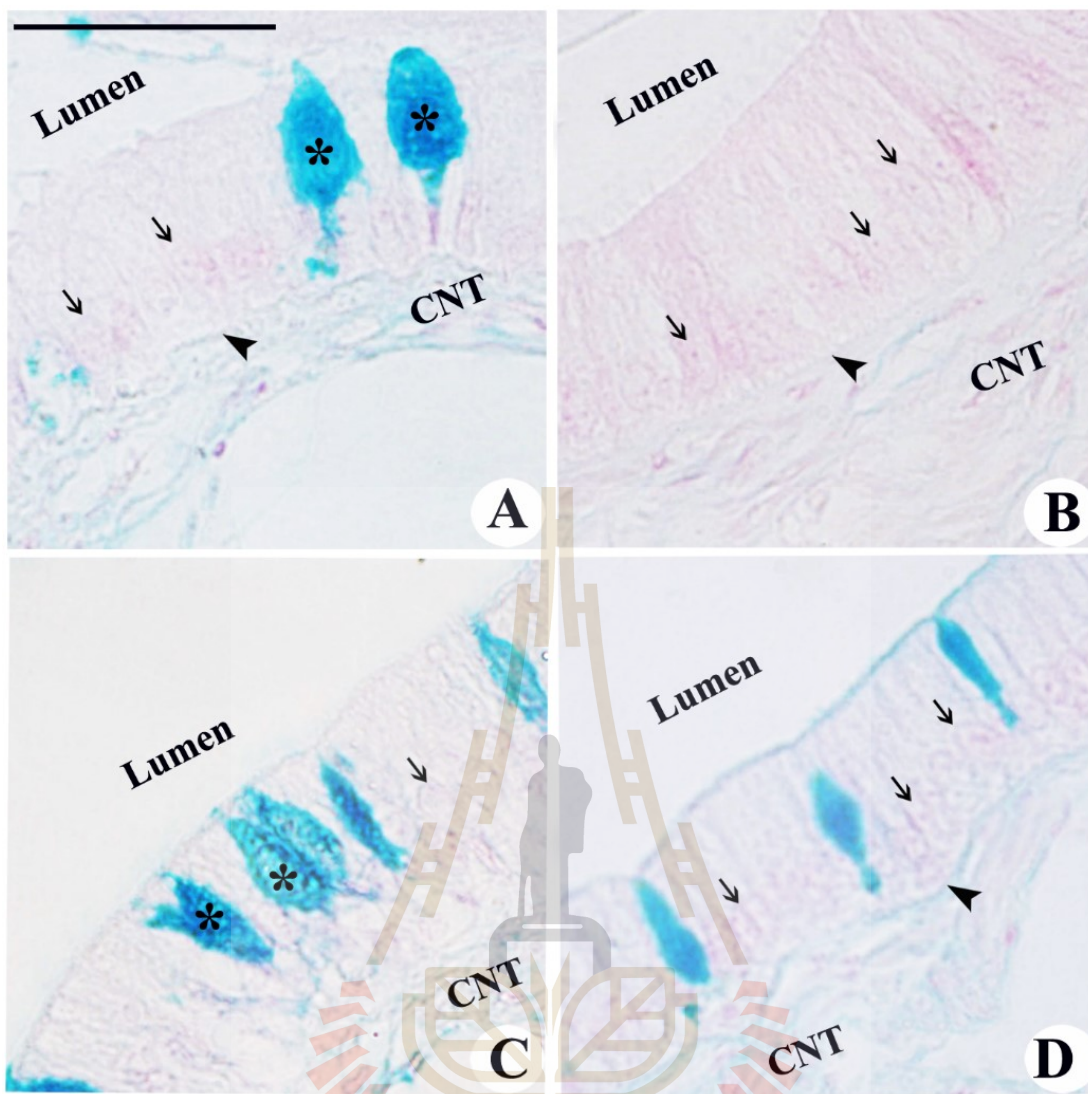
ภาพที่ 7 ความสูงของเยื่อบุผิวของทางเดินอาหารส่วนต่างๆ ตัวอักษรบนแท่งกราฟที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความสูงของเยื่อบุผิว



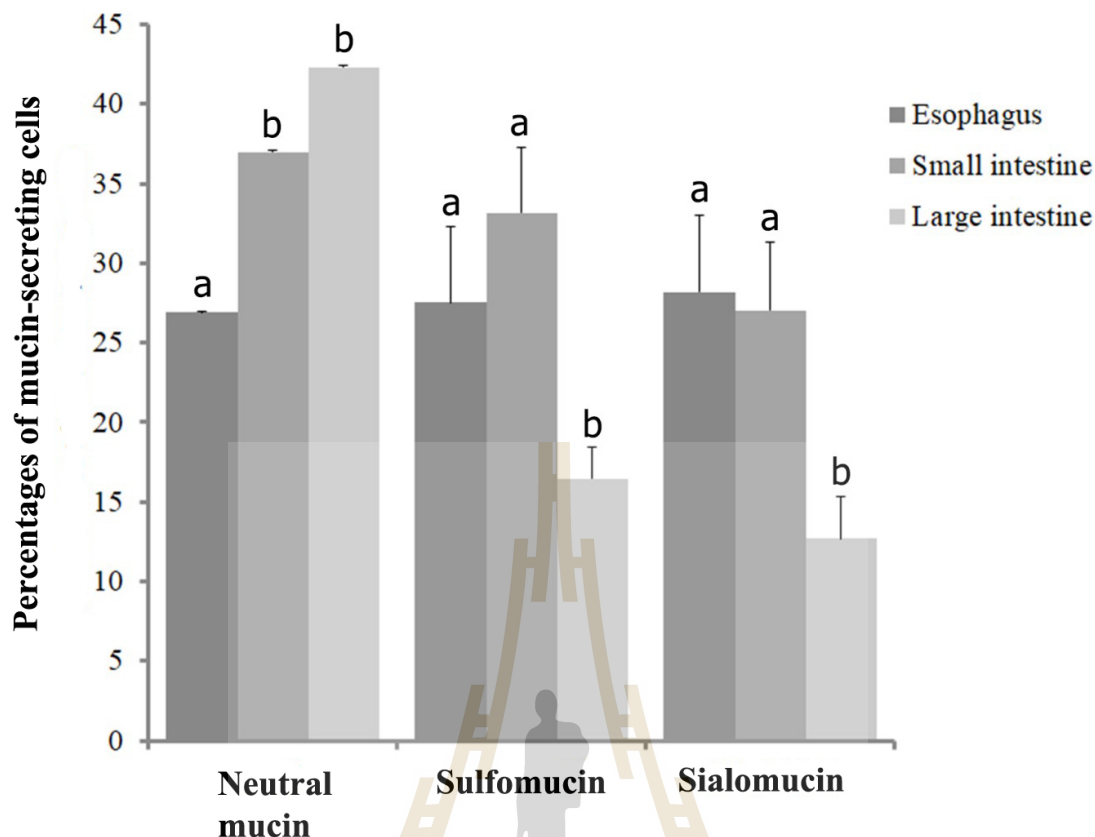
ภาพที่ 8 การปรากฏของ neutral mucin-secreting cell ในทางเดินอาหารส่วนต่างๆ ได้แก่ esophagus (A) stomach (B) small intestine (C) และ large intestine (D) ซึ่ง neutral mucin-secreting cell ของ esophagus และ small intestine มีลักษณะเป็น pear-shaped cell (ดอกจัน) และ columnar-shaped cell แต่ neutral mucin-secreting cell ของ large intestine มีลักษณะเป็น pear-shaped cell เพียงอย่างเดียว เชื้อบิวคิวงของ stomach ไม่ปรากฏ neutral mucin-secreting cell ลูกศรแสดงตำแหน่ง nucleus และหัวลูกศรแสดง basement membrane CNT = connective tissue; Scale bar = 200 μ m



ภาพที่ 9 การปรากฏของ sialomucin-secreting cell ในทางเดินอาหารส่วนต่างๆ ได้แก่ esophagus (A) stomach (B) small intestine (C) และ large intestine (D) ซึ่ง sialomucin-secreting cell ของ esophagus มีลักษณะเป็น pear-shaped cell (ดอกจัน) ส่วน sialomucin-secreting cell ของ small intestine มีลักษณะเป็น pear-shaped cell (ดอกจัน) และ columnar-shaped cell แต่ sialomucin-secreting cells ของ large intestine มีลักษณะเป็น pear-shaped cell เพียงอย่างเดียว เชื้อราของ stomach ไม่ปรากฏ sialomucin-secreting cell ลูกศรแสดงตำแหน่ง nucleus และหัวลูกศรแสดง basement membrane CNT = connective tissue; Scale bar = 200 μ m



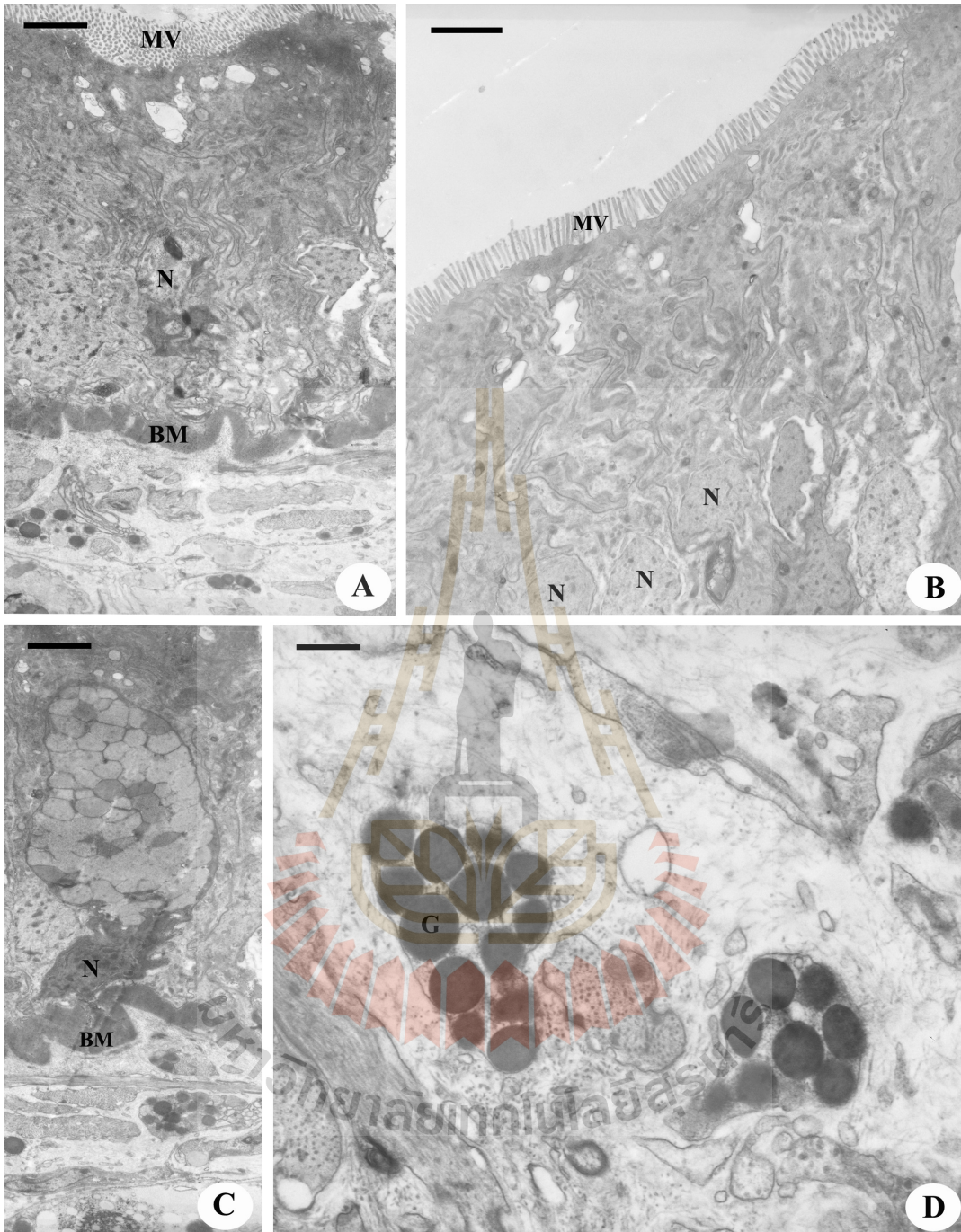
ภาพที่ 10 การปรากฏของ sulfomucin-secreting cells ในทางเดินอาหารส่วนต่างๆ ได้แก่ esophagus (A) stomach (B) small intestine (C) และ large intestine (D) ซึ่ง sulfomucin-secreting cell ของ esophagus มีลักษณะเป็น pear-shaped cell (ดอกจัน) และ sulfomucin-secreting cell ของ large intestine มีลักษณะเป็น columnar-shaped cell เพียงอย่างเดียว แต่ใน small intestine เซลล์มีลักษณะเป็น pear-shaped cell (ดอกจัน) และ columnar-shaped cell เชื้อบูฟิวของ stomach ไม่ปรากฏ sulfomucin-secreting cells ถูกครีแสดงตำแหน่ง nucleus และหัวลูกครีแสดง basement membrane CNT = connective tissue; Scale bar = 200 μ m



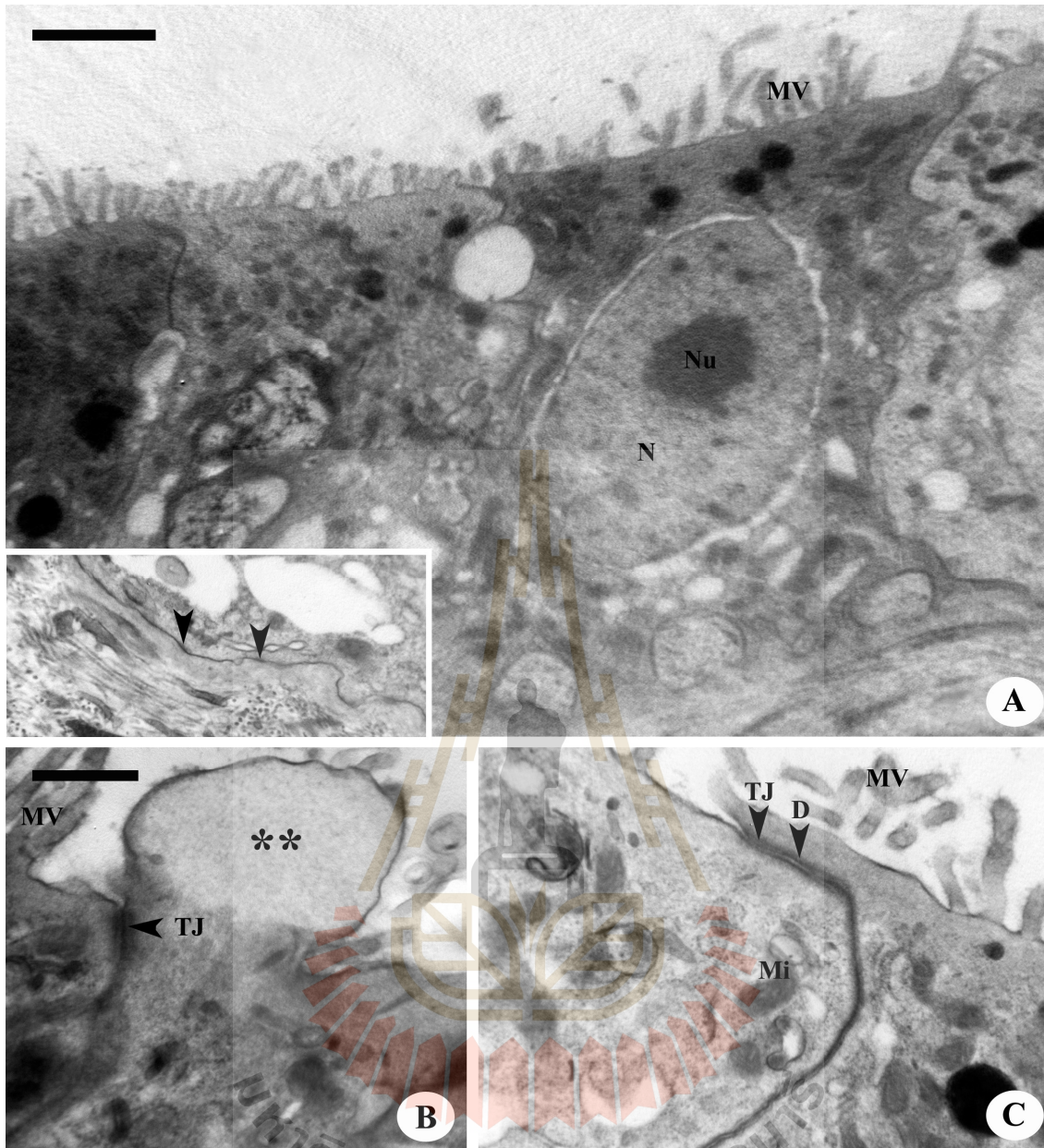
ภาพที่ 11 การเปรียบเทียบจำนวนของ mucin-secreting cells ในเยื่อเมือกของทางเดินอาหารส่วนต่างๆ ตัวอักษรบนแท่งกราฟที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

1.2 ผลของการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope)

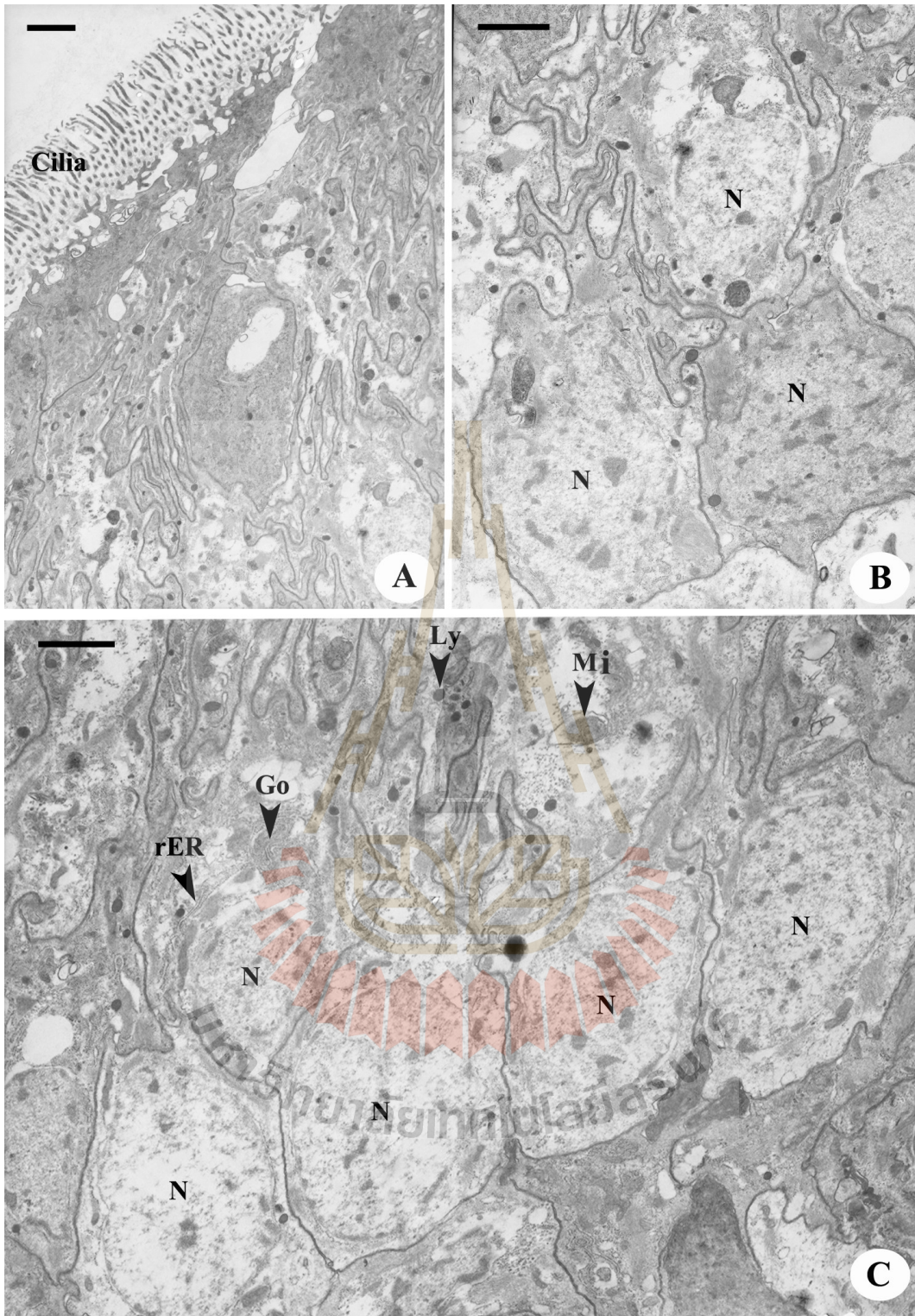
การศึกษาโครงสร้างของเยื่อเมือกของทางเดินอาหารของหอยเชอรี่ พบว่าเยื่อเมือกของทางเดินอาหารส่วน esophagus (ภาพที่ 12) stomach (ภาพที่ 13) และ large intestine (ภาพที่ 15) มีลักษณะเป็น simple columnar epithelium ซึ่งมีลักษณะเป็นเซลล์ทรงสูง วางตัวอยู่บน basement membrane และบริเวณด้านบนของเซลล์ถูกปกคลุมด้วย microvilli จำนวนมาก สามารถพบ nucleus ของเซลล์ที่บริเวณด้านล่างของเซลล์ ส่วนใน small intestine (ภาพที่ 14) เยื่อเมือกมีลักษณะเป็น pseudostratified columnar epithelium โดย nucleus ของเซลล์พบอยู่ต่างระดับกัน และพบว่าบริเวณด้านบนของเซลล์ถูกปกคลุมด้วย cilia จำนวนมาก ในเซลล์เยื่อเมือกของทางเดินอาหารทุกส่วน พบว่า chromatin ภายใน nucleus มีลักษณะเป็น euchromatin สำหรับ organelle ของเซลล์ ได้แก่ mitochondria, Golgi apparatus, lysosome และ rough endoplasmic reticulum พบได้ภายในเซลล์ นอกจากนี้พบว่าเซลล์เยื่อเมือกยึดติดกับเซลล์ข้างเคียงด้วย tight junction, desmosome และ adherents junction (ภาพที่ 13 และ 15)



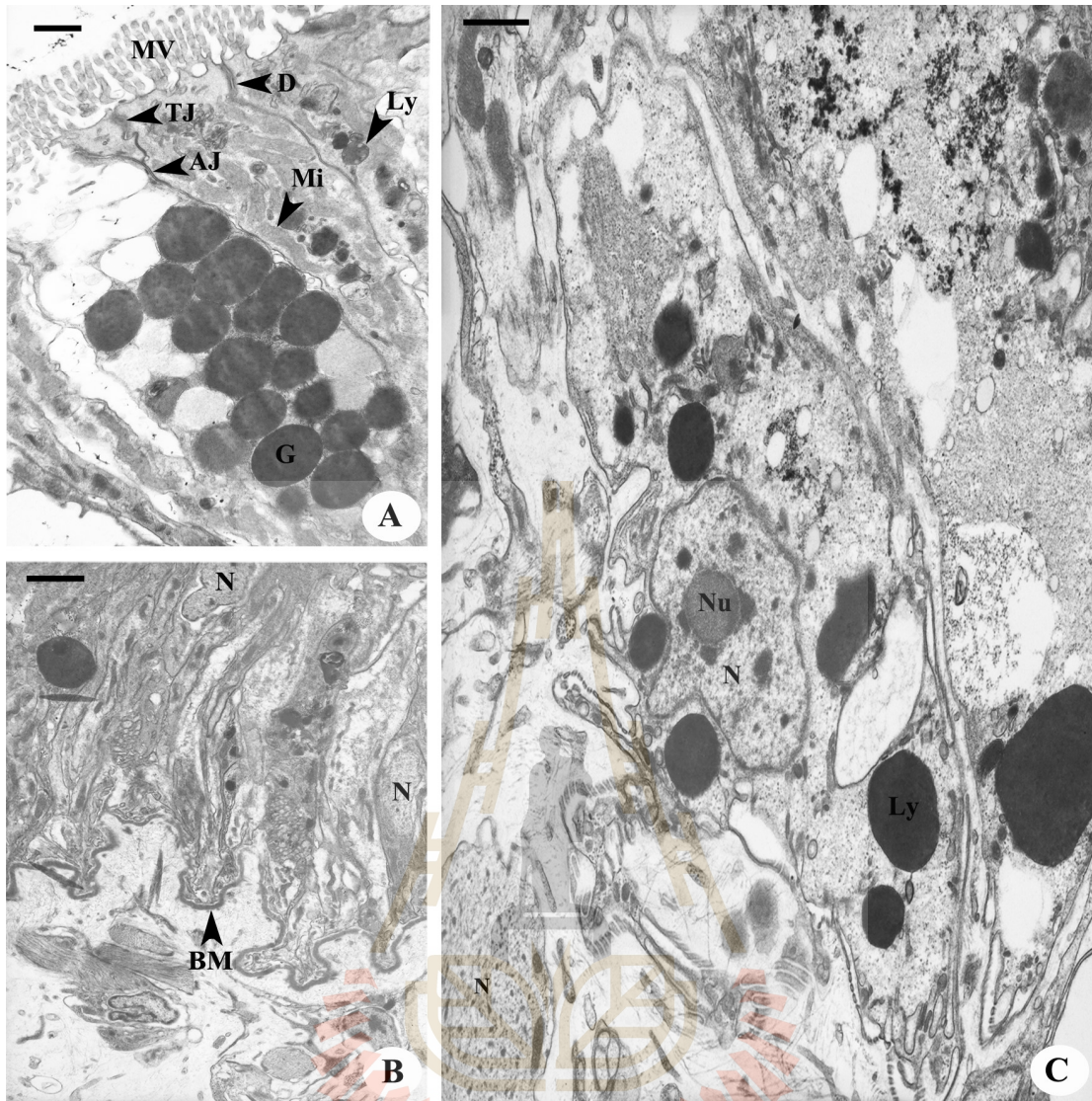
ภาพที่ 12 Ultrastructure ของ esophagus (A และ B) แสดงเยื่อผิวชนิด simple columnar epithelium with microvilli (MV) เซลล์วางตัวอยู่บน basement membrane (BM) ตำแหน่ง nucleus (N) อยู่บริเวณฐานของเซลล์ (C) แสดง secretory cell ที่แทรกอยู่ในเซลล์เยื่อผิว (D) แสดงเซลล์ที่บรรจุ secretory granule (G) ซึ่งพบบริเวณเนื้อเยื่อด้านล่างต่อเยื่อผิว Scale bar A-C= 2 μ m และ D = 500 nm



ภาพที่ 13 Ultrastructure ของ stomach (A) แสดงเยื่อผิวชนิด simple columnar epithelium with microvilli (MV) เซลล์ถูกรองรับด้วย basement membrane (inset; หัวลูกศร) (B และ C) แสดงการหลั่งสารออกจาก secretory cell (ดอกจัน) และการยึดติดกับเซลล์ข้างเคียงด้วย tight junction (TJ) และ desmosome (D) N = nucleus; Nu = nucleolus; Mi = mitochondria; Scale bar A-C = 2 μ m และ D = 500 nm



ภาพที่ 14 Ultrastructure ของ small intestine (A) แสดงเยื่อบุผิวชนิด pseudostratified columnar epithelium with cilia (B และ C) แสดงตำแหน่ง nucleus (N) ของเซลล์ของเยื่อบุผิว ภายในเซลล์สามารถพบ rough endoplasmic reticulum (rER), Golgi apparatus (Go), mitochondria (Mi) และ lysosome (Ly) Scale bar = 1 μm



ภาพที่ 15 Ultrastructure ของ large intestine (A) แสดงเยื่อเมือกชนิด simple columnar epithelium with microvilli (MV) ซึ่งเยื่อเมือกแทรกด้วย secretory cell type ซึ่งบรรจุ granule (G) และเซลล์ข้างเคียงถูกยึดด้วย tight junction (TJ) adherent junction (AJ) และ desmosome (D) (B) แสดงเซลล์ของเยื่อเมือกอยู่บน basement membrane (BM) (C) แสดงโครงสร้างของเซลล์ซึ่งประกอบด้วย lysosome (Ly) BM = basement membrane; N = nucleus; Nu = nucleolus; Scale bar A = 500 nm, B = 2 μ m และ C = 1 μ m

เซลล์เยื่อผิวของทางเดินอาหารถูกแทรกด้วย secretory cell ซึ่งบริเวณด้านบนของ secretory cell ไม่พบ microvilli หรือ cilia และพบว่าด้านบนของ secretory cell บางเซลล์เปิดออกสู่ lumen ของทางเดินอาหารเพื่อปล่อยสารคัดหลั่ง สามารถแบ่ง secretory cell ตามลักษณะรูปร่างออกได้เป็น 4 ชนิด ตามลักษณะโครงสร้างของ granule ที่พบภายในเซลล์ ดังนี้

- 1) Secretory cell type a (SCa) มีรูปร่าง pear-shaped ภายใน cytoplasm บรรจุ granule เป็น electron lucent granule เพียงชนิดเดียวเท่านั้น (ภาพที่ 16, 17 และ 18)
- 2) Secretory cell type b (SCb) มีรูปร่าง pear-shaped ภายใน cytoplasm บรรจุ granule 2 ชนิด คือ electron lucent granule และ moderate electron-dense granule โดย electron lucent granule จะมีปริมาณมากกว่า (ภาพที่ 16)
- 3) Secretory cell type c (SCc) มีรูปร่าง columnar-shaped และมี granule 2 ชนิด คือ moderate electron-dense granule และ high electron-dense granule ซึ่ง granule ทั้งสองชนิดมีปริมาณพอๆกัน (ภาพที่ 17 และ 18)
- 4) Secretory cell type d (SCd) มีรูปร่าง columnar-shaped และเซลล์มี granule เพียง 1 ชนิด คือ high electron-dense granule และ แต่ละเซลล์มีเพียง 1 granule เท่านั้น (ภาพที่ 18)

การปรากฏของ secretory cell ในแต่ละส่วนของระบบทางเดินอาหารของหอยเชอรี่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 2) โดยพบ secretory cell 2 ชนิด คือ SCa และ SCb ที่ esophagus ส่วนที่ small intestine พบ secretory cell 2 ชนิด คือ SCa และ SCc และที่ large intestine พบ secretory cell 3 ชนิด คือ SCa, SCc และ SCd

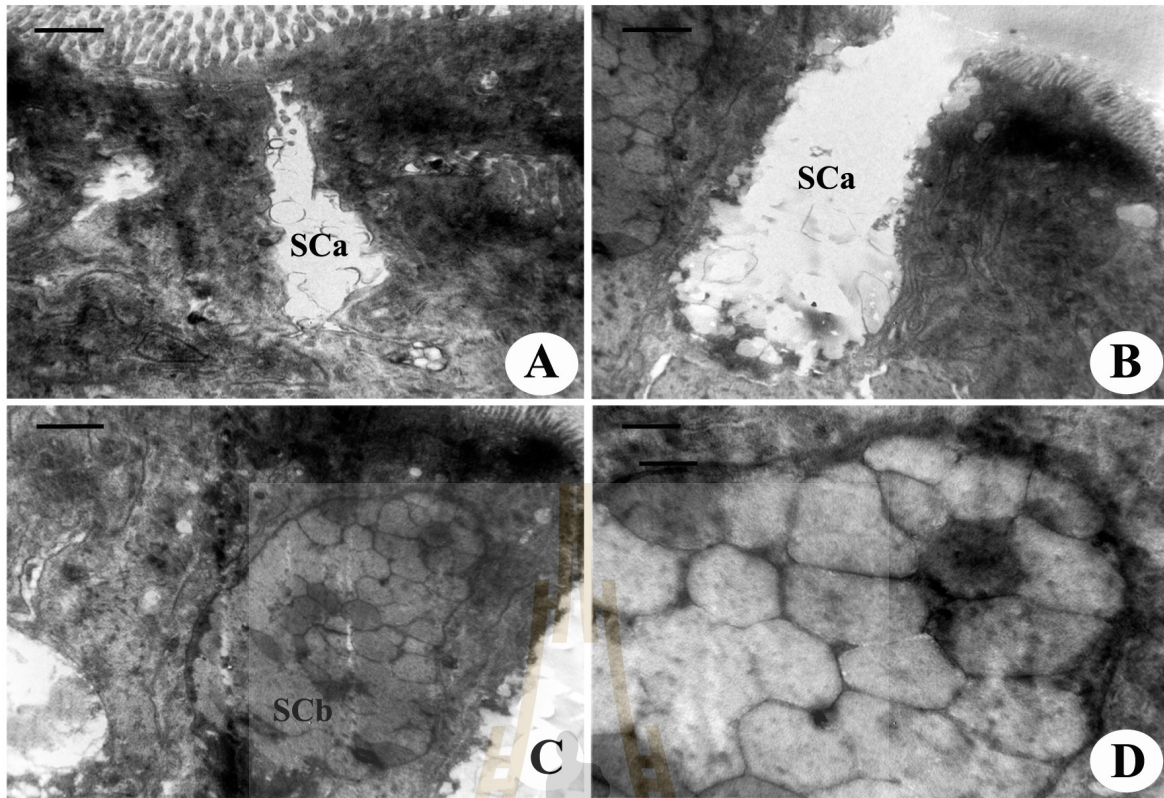
ตารางที่ 2 การปรากฏของ secretory cell ในเยื่อผิวของทางเดินอาหาร

Types of secretory cell

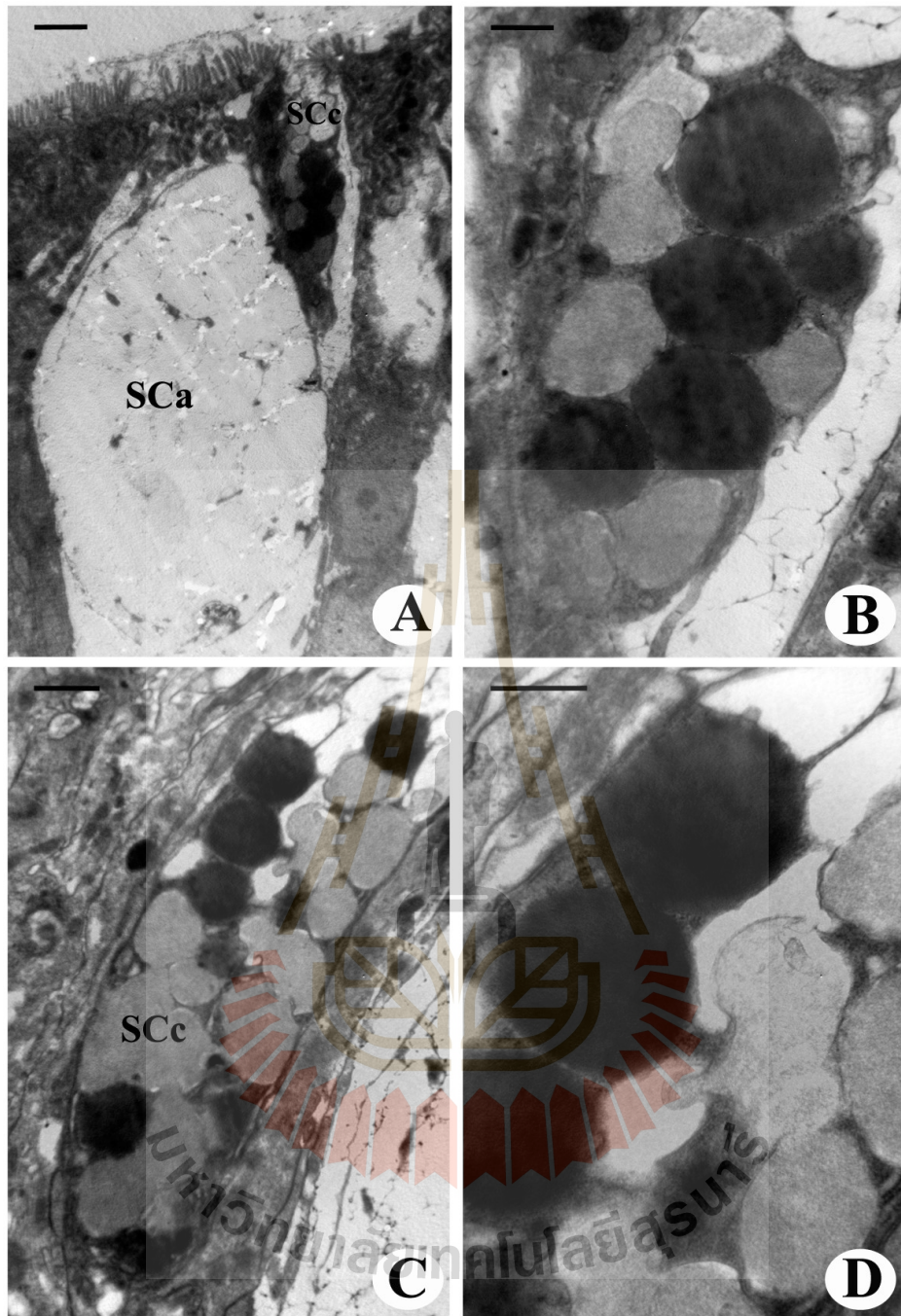
Parts of the gastrointestinal tract

	Esophagus	Stomach	Small intestine	Large intestine
Secretory cell type a	+	-	+	+
Secretory cell type b	+	-	-	-
Secretory cell type c	-	-	+	+
Secretory cell type d	-	-	-	+

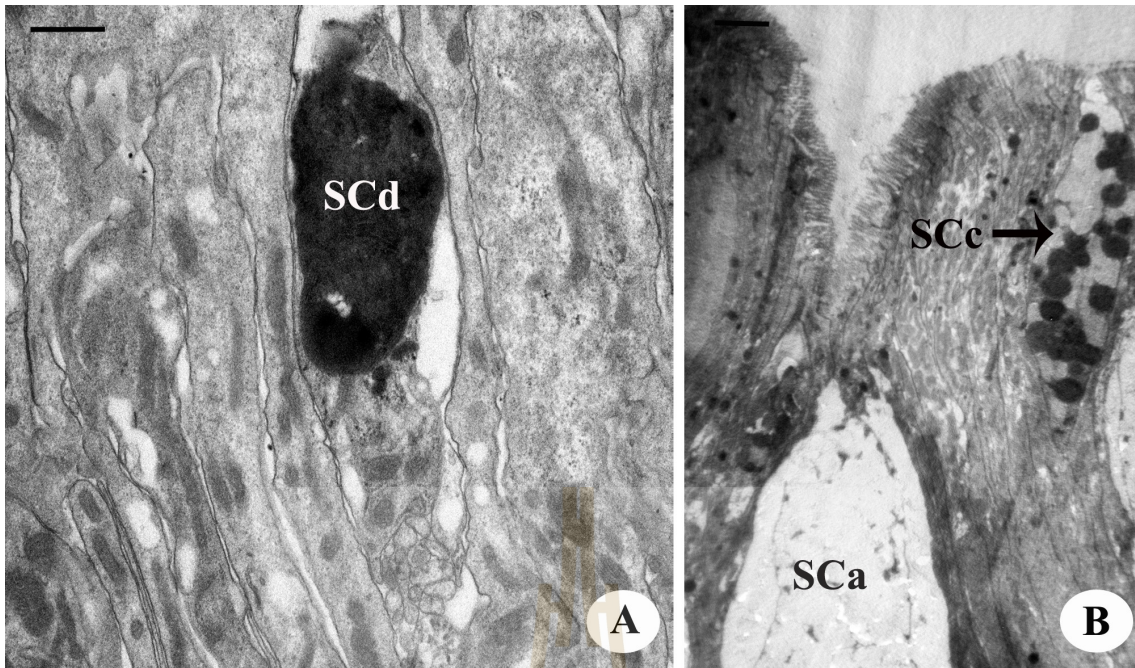
Note: + = present; - = absent



ภาพที่ 16 ลักษณะ โครงสร้างของ secretory cell ที่พบใน esophagus (A และ B) แสดง secretory cell type a (SCa) ซึ่งบรรจุ granule ชนิด electron lucent granule (C) แสดง secretory cell type b (SCb) ซึ่งบรรจุ granule 2 ชนิด คือ moderate electron-dense granule และ high electron-dense granule (D) ภาพขยาย granule ของ SCb; Scale bar = 200 μ m



ภาพที่ 17 ลักษณะโครงสร้างของ secretory cell ที่พบใน small intestine (A) แสดง secretory cell type a (SCa) ซึ่งบรรจุ granule ชนิด electron lucent granule และ secretory cell type c (SCc) ซึ่งบรรจุ granule ชนิด moderate electron-dense granule และ high electron-dense granule (B-D) ภาพขยาย granule ของ SCc Scale bar = 200 μ m



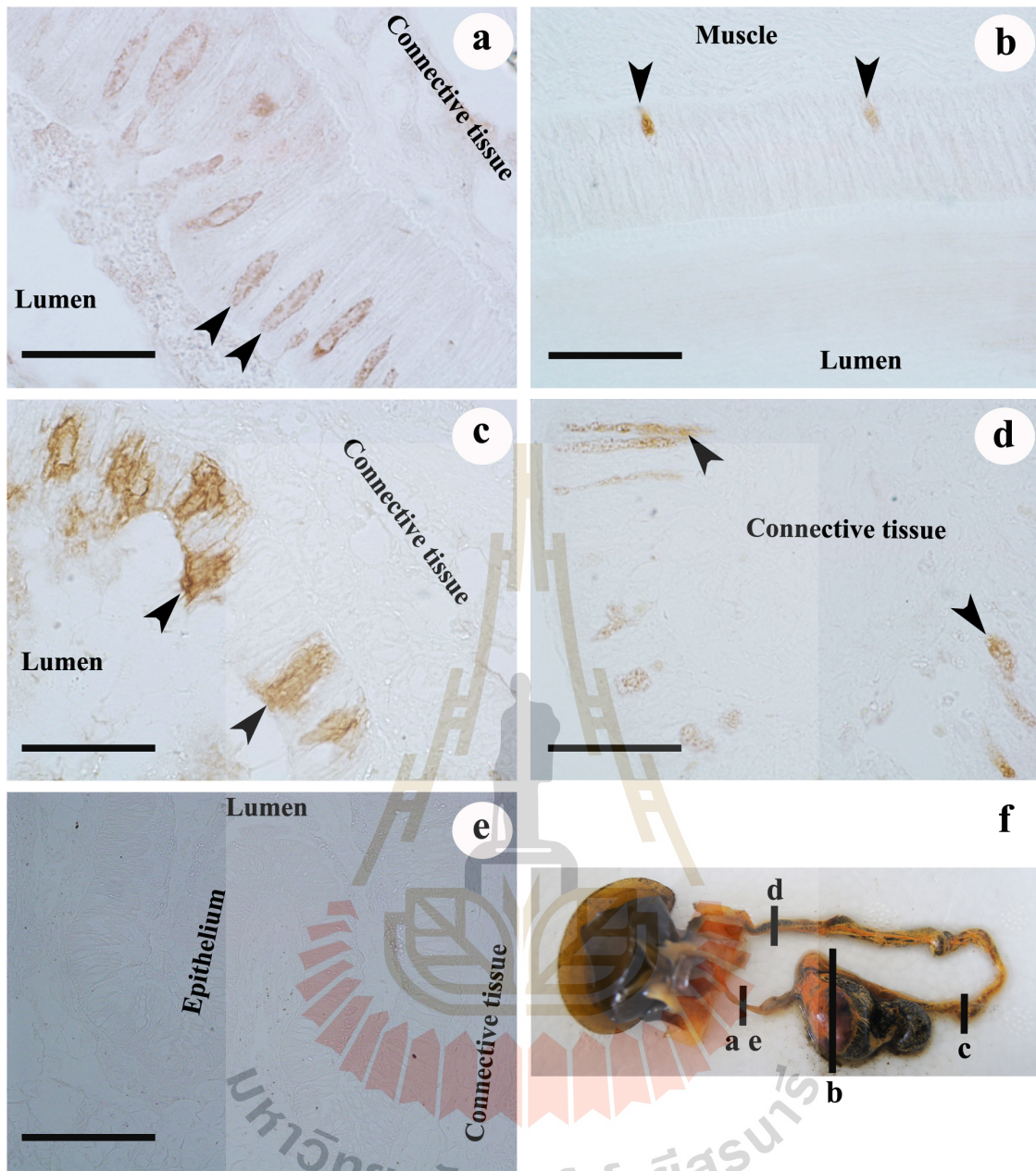
ภาพที่ 18 ลักษณะโครงสร้างของ secretory cell ที่พบ large intestine (A) แสดง secretory cell type d (SCd) ที่มี granule เป็นแบบ high electron-dense granule เพียงก้อนเดียว (B) แสดง secretory cell type a (SCa) ที่มี granule เป็นแบบ electron lucent granule และ secretory cell type c (SCc) ที่มี granule เป็นแบบ moderate electron-dense granule และ high electron-dense granule Scale bar = 200 μm



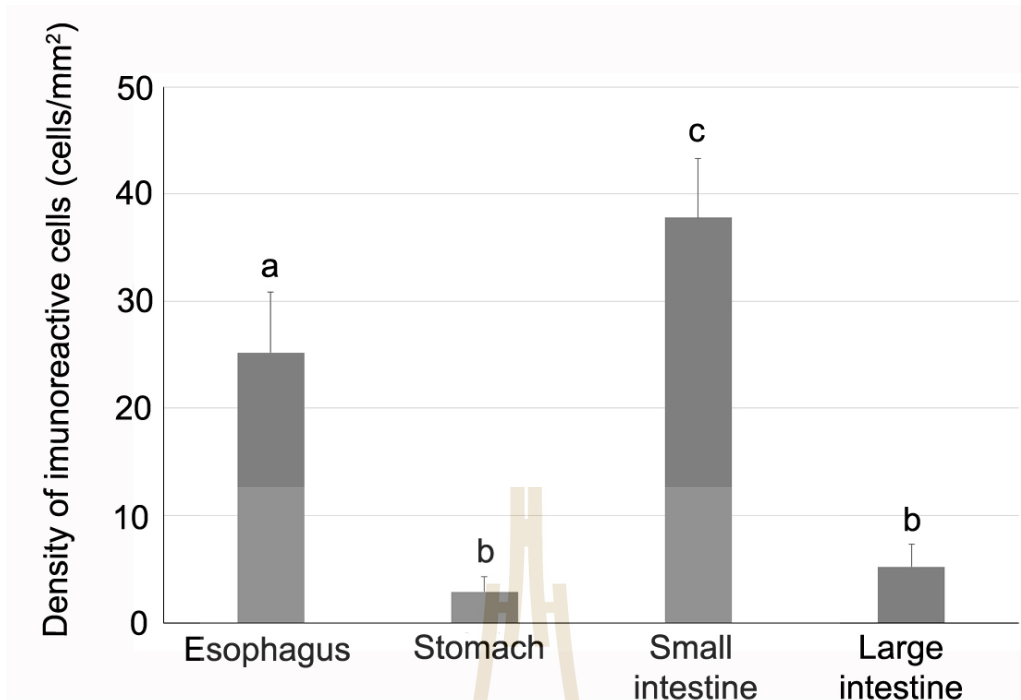
2. การปรากฏของ leptin peptide ในส่วนต่างๆ ของทางเดินอาหารของหอยเชอร์รี่

การใช้ immunoperoxidase technique เพื่อดูการปรากฏของ leptin peptide ในทางเดินอาหารส่วนต่างๆ พบการปรากฏของ leptin peptide ในทางเดินอาหารของหอยเชอร์รี่ทุกส่วน ได้แก่ esophagus, stomach, small intestine และ large intestine (ภาพที่ 19) บริเวณที่พบ leptin peptide คือบริเวณเยื่อบุผิวของทางเดินอาหาร โดยพบ immunoreactivity ตามความยาวของ epithelial cell ในทางเดินอาหารส่วน esophagus, small intestine และ large intestine ส่วนใน stomach พบ immunoreactivity ใน epithelial cell บริเวณใกล้กับ basement membrane ในกลุ่ม negative control ไม่ปรากฏว่าพบ leptin peptide ซึ่งยืนยันถึง specificity ของทั้ง primary antibody และ secondary antibody

การนับความหนาแน่นของเซลล์ที่มีการปรากฏของ leptin peptide พบความหนาแน่นมากที่สุดบริเวณทางเดินอาหารส่วน small intestine (37.80 ± 5.47 cell/mm²; ภาพที่ 20) โดยเซลล์ที่มีการปรากฏของ leptin peptide ในบริเวณ small intestine นี้ มีความหนาแน่นมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับความหนาแน่นของเซลล์ที่บริเวณ esophagus (25.20 ± 5.69 cell/mm²), stomach (2.90 ± 1.37 cell/mm²) และ large intestine (5.20 ± 2.15 cell/mm²) บริเวณที่ความหนาแน่นของเซลล์ที่มีการปรากฏของ leptin peptide พบเป็นลำดับที่สองคือบริเวณ esophagus ซึ่งพบว่ามีความหนาแน่นมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับความหนาแน่นที่บริเวณ stomach และ large intestine เช่นเดียวกัน ส่วนของทางเดินอาหารที่พบว่ามีความหนาแน่นของเซลล์ที่มีการปรากฏของ leptin peptide น้อยที่สุดคือ stomach



ภาพที่ 19 ผลการย้อมด้วยวิธี immunoperoxidase แสดงการปรากฏและการกระจายตัวของ leptin peptide ในส่วนต่างๆของทางเดินอาหาร ได้แก่ esophagus (a) stomach (b) small intestine (c) และ large intestine (d) (หัวลูกศรแสดงเซลล์ที่ปรากฏ leptin peptide) (e) ไม่พบ immunoreactivity ใน negative control ที่ทำใน esophagus และ (f) แสดงบริเวณของระบบทางเดินอาหารที่น่าเชื่อมาคึกษาในภาพ a-e



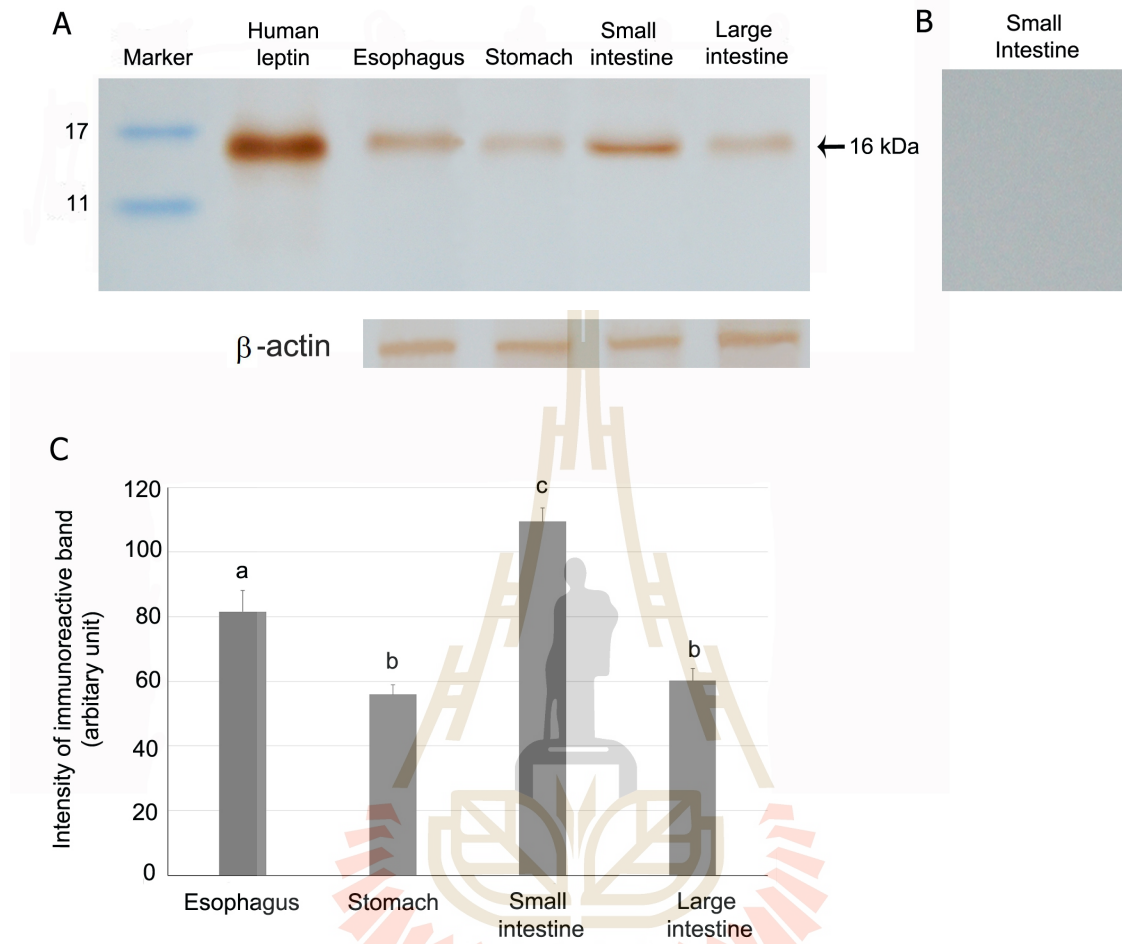
ภาพที่ 20 ความหนาแน่นของเซลล์ที่มีการปรากฏของ leptin peptide ในส่วนต่างๆของทางเดินอาหาร ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3. การแสดงออกของ leptin peptide ในส่วนต่างๆของทางเดินอาหารของหอยเชอรี่

จากการศึกษาการแสดงออกของ leptin peptide ในส่วนต่างๆของทางเดินอาหารโดยใช้วิธี Western immunoblotting พบว่ามีการแสดงออกของ leptin peptide ในทุกส่วนของทางเดินอาหารของหอยเชอรี่ที่ได้นำมาศึกษา ผลการทดลองปรากฏ immunoreactive band ของ leptin peptide เพียง band เดียวที่ molecular weight เท่ากับ 16 kDa (ภาพที่ 21 A) ในทุกส่วนของทางเดินอาหาร ซึ่ง molecular weight ของ leptin peptide ที่ได้นี้เท่ากับ molecular weight ของ human leptin ที่ใช้เป็น positive control นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มของ immunoreactive band มากที่สุดที่บริเวณ small intestine เมื่อเทียบกับทางเดินอาหารส่วนอื่นๆ ความเข้มของ immunoreactive band พบรองลงมาที่ esophagus ส่วนที่ stomach และ large intestine นั้น พบว่าความเข้มของ immunoreactive band น้อยกว่า เมื่อเทียบกับที่ esophagus และ small intestine ในส่วนของ negative control ปรากฏว่า การ preadsorb primary antibody ด้วย human leptin ทำให้เกิดการหยุดยั้งการเกิด immunoreactivity (ภาพที่ 21 B)

การเปรียบเทียบ intensity ของ immunoreactive band โดยการใช้โปรแกรม image J พบว่า intensity ของ immunoreactive band มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ small intestine (109.46 ± 6.45 AU; ภาพที่ 21 C) เมื่อเปรียบเทียบกับ intensity ของ immunoreactive band จาก esophagus, stomach และ large intestine บริเวณที่มี intensity ของ immunoreactive band มากรองลงมาเป็นลำดับที่สอง คือบริเวณ esophagus (81.58 ± 4.23 AU) ซึ่งพบว่า intensity นี้มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบกับ

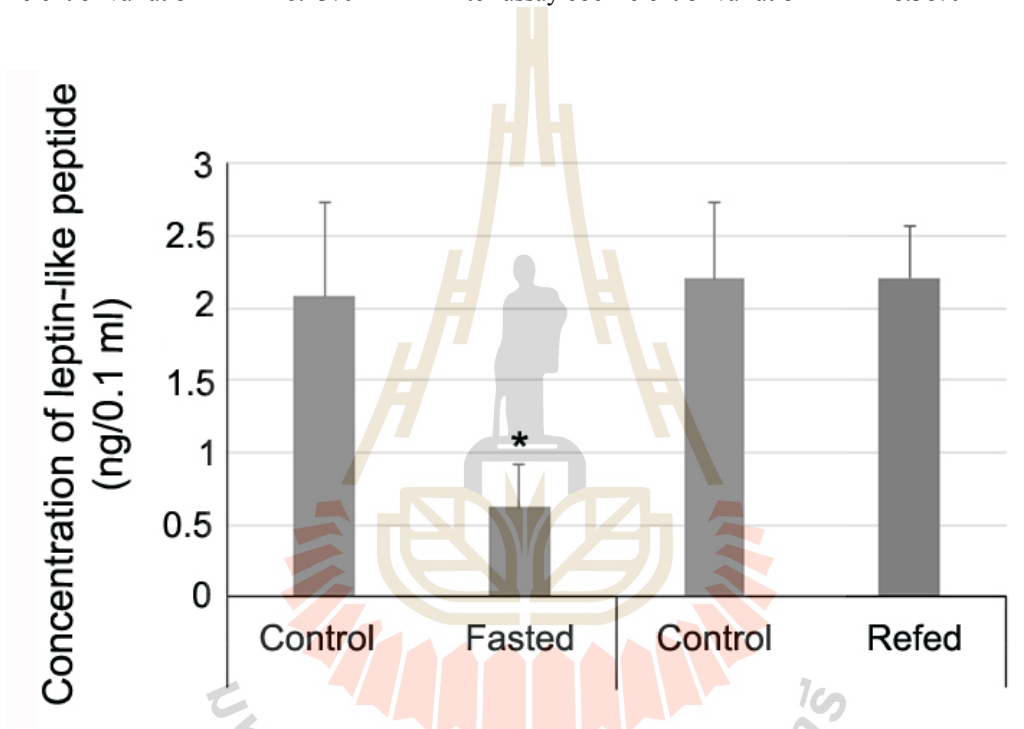
intensity ของ immunoreactive band จาก stomach (55.94 ± 3.79 AU) และ large intestine (60.19 ± 2.90 AU) ส่วนของทางเดินอาหารที่พบว่ามี intensity ของ immunoreactive band น้อยที่สุดคือ stomach



ภาพที่ 21 (A) Western immunoblotting ของ leptin peptide จาก crude protein ที่สกัดจากส่วนต่างๆของทางเดินอาหาร ได้แก่ esophagus (lane 3), stomach (lane 4), small intestine (lane 5) และ large intestine (lane 6) โดย molecular weight ของ leptin peptide ที่แสดงออกในส่วนต่างๆของทางเดินอาหารของหอยสอดคล้องกับ molecular weight ของ human leptin (lane 2) ที่มีค่าเท่ากับ 16 kDa การทดลองนี้ใช้ β -actin เป็น internal control (B) Negative control ที่ได้จากการ preadsorb primary antibody ด้วย human leptin ไม่ปรากฏ immunoreactivity (C) Intensity ของ immunoreactive band ที่วัดได้จากส่วนต่างๆของทางเดินอาหารตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4. ความแตกต่างของความเข้มข้น (concentration) ของ leptin peptide เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มของหอยกินอาหารปกติและกลุ่มหอยอดอาหาร

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของ leptin peptide ในหอยกลุ่มกินอาหารปกติและกลุ่มอดอาหาร พบว่าความเข้มข้นของ leptin peptide ในหอยกลุ่มกินอาหารปกติมีค่าเท่ากับ 2.08 ± 0.65 ng/0.1 ml ซึ่งมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหอยกลุ่มอดอาหาร (0.62 ± 0.30 ng/0.1 ml) (ภาพที่ 22) แต่เมื่อหอยกลุ่มอดอาหารกลับมาได้กินอาหารอีกครั้ง ความเข้มข้นของ leptin peptide ในหอยกลุ่มนี้ก็กลับมามีค่าใกล้เคียงกับความเข้มข้นของ leptin peptide ในหอยกลุ่มกินอาหารปกติ (2.20 ± 0.53 และ 2.21 ± 0.35 ng/0.1 ml ตามลำดับ) การทดลองนี้มีค่า sensitivity ของ ELISA assay เท่ากับ 0.125 ng/0.1 ml ค่า intra-assay coefficient of variation เท่ากับ 6.23% และค่า inter-assay coefficient of variation เท่ากับ 8.38%



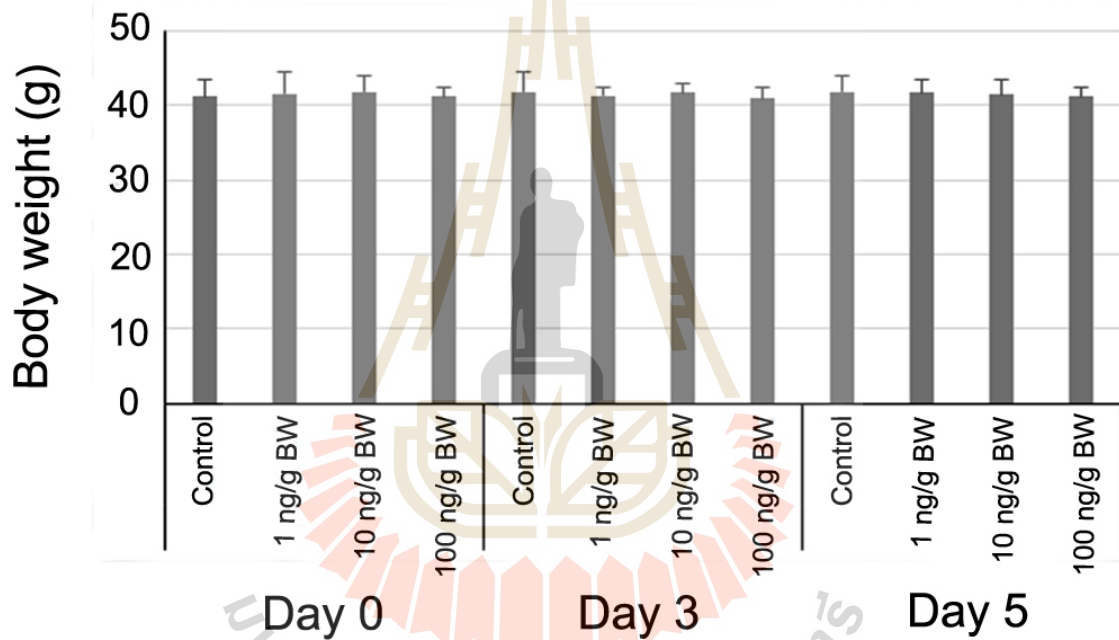
ภาพที่ 22 ความเข้มข้นของ leptin peptide เปรียบเทียบระหว่างหอยกลุ่มกินอาหารปกติ (Control) และหอยกลุ่มอดอาหาร (Fasted) และเปรียบเทียบระหว่างหอยกลุ่มกินอาหารปกติ (control) และหอยกลุ่มอดอาหารที่ได้กลับมากินอาหารอีกครั้ง (Refed)

* แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่กินอาหารปกติที่สภาวะเดียวกัน

5. ความแตกต่างของน้ำหนักตัว เปรียบเทียบระหว่างหอยกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการฉีด

leptin peptide

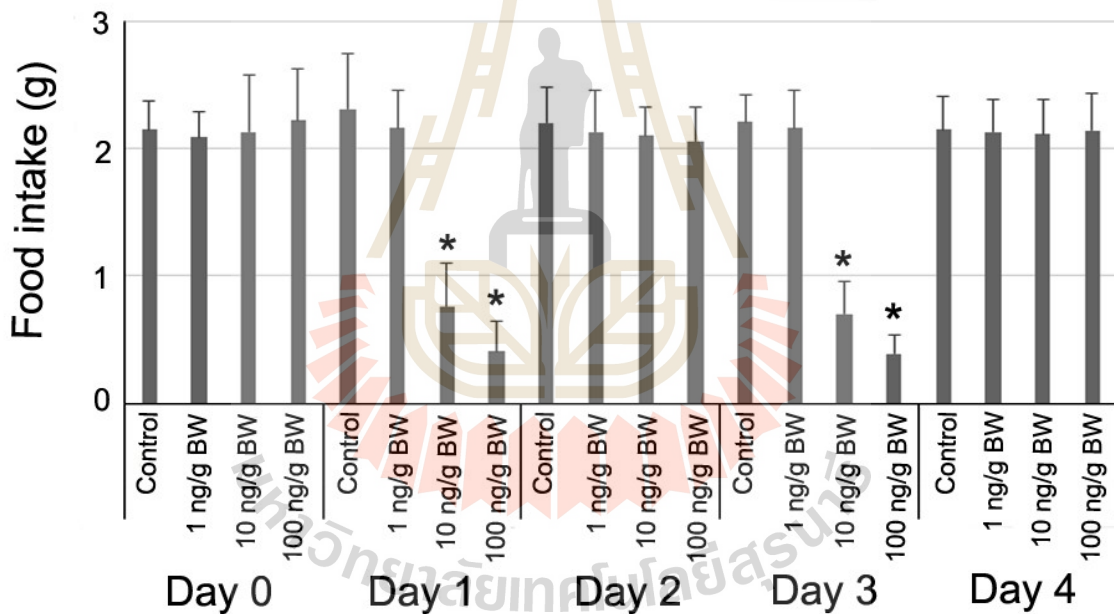
เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักตัวระหว่างหอยกลุ่มควบคุมและหอยที่ได้รับการฉีด leptin peptide ทั้ง 1, 10 และ 100 ng/g BW พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของน้ำหนักตัวของหอยทุกกลุ่มทดลอง ทั้งในวันที่ 0, 3 และ 5 (ภาพที่ 23) โดยหอยกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักตัวเท่ากับ 41.29 ± 2.11 g ในวันก่อนเริ่มการทดลอง (วันที่ 0) และมีน้ำหนักตัวเท่ากับ 41.85 ± 2.31 g ในวันสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 5) ส่วนหอยกลุ่มที่ได้รับการฉีด leptin peptide (1, 10 และ 100 ng/g BW) มีน้ำหนักตัวเท่ากับ 41.67 ± 2.82 , 41.89 ± 2.08 และ 41.28 ± 1.29 g ตามลำดับ ในวันก่อนเริ่มการทดลอง และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง หอยที่ได้รับการฉีด leptin peptide ทั้งสาม dose ดังกล่าว มีน้ำหนักตัวเท่ากับ 41.78 ± 1.65 , 41.56 ± 2.05 และ 41.21 ± 1.37 g ตามลำดับ



ภาพที่ 23 น้ำหนักตัวของหอยในวันต่างๆ เปรียบเทียบระหว่างหอยกลุ่มควบคุม และหอยกลุ่มที่ได้รับการฉีด leptin peptide ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ng/g BW

6. ความแตกต่างของปริมาณอาหารที่กิน เปรียบเทียบระหว่างหอยกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการฉีด leptin peptide

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณอาหารที่กินระหว่างหอยกลุ่มควบคุมและหอยที่ได้รับการฉีด leptin peptide พบว่าอาหารที่หอยกินมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มหอยที่ได้รับการฉีด leptin peptide เฉพาะที่ 10 และ 100 ng/g BW ในวันที่ 1 และ 3 การทดลอง ซึ่งเป็นวันที่หอยได้รับการฉีด leptin peptide (ภาพที่ 24) โดยในวันที่ 1 หอยกลุ่มควบคุมกินอาหาร 2.31 ± 0.44 g และหอยกลุ่มที่ได้รับการฉีด leptin peptide ที่ 10 และ 100 ng/g BW กินอาหาร 0.75 ± 0.34 และ 0.41 ± 0.23 g ตามลำดับ และในวันที่ 3 ปริมาณอาหารที่หอยกลุ่มควบคุมกินเท่ากับ 2.21 ± 0.21 g และปริมาณอาหารที่หอยกลุ่มที่ได้รับการฉีด leptin peptide ที่ 10 และ 100 ng/g BW เท่ากับ 0.70 ± 0.26 และ 0.39 ± 0.15 g ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ในวันที่ 2 และ 4 ซึ่งเป็นวันหลังจากการฉีด leptin peptide พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณอาหารที่กินระหว่างหอยกลุ่มควบคุมและหอยที่ได้รับการฉีด leptin peptide ทั้ง 3 dose



ภาพที่ 24 ปริมาณอาหารที่หอยกินในวันต่างๆ เปรียบเทียบระหว่างหอยกลุ่มควบคุม และหอยกลุ่มที่ได้รับการฉีด leptin peptide ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ng/g BW

บทที่ 5

อภิปรัชญา

ลักษณะโครงสร้างของเยื่อเมือกในทางเดินอาหาร

การศึกษาลักษณะเยื่อเมือกของทางเดินอาหารของหอยเชอรี่ในครั้งนี้ พบว่าเยื่อเมือกที่บริเวณ esophagus, stomach และ large intestine เป็นชนิด simple columnar epithelium with microvilli ส่วนเยื่อเมือกที่บริเวณ small intestine เป็นชนิด pseudostratified columnar epithelium with cilia ข้อมูลจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้มีความใกล้เคียงกับการศึกษาเยื่อเมือกในทางเดินอาหารของหอยทะเล *Mitra crenata* และ *Aplysia depilans* ที่ศึกษาพบว่าเยื่อเมือกในส่วน of stomach และ large intestine เป็นชนิด simple columnar epithelium with microvilli เช่นเดียวกับเยื่อเมือกของหอยเชอรี่ (Lobo-da-Cunha and Batista-Pinto, 2005; Martin *et al.*, 2010) มีความแตกต่างกันก็คือเยื่อเมือกบริเวณ small intestine ของ *M. crenata* และ *A. depilans* ก็เป็นชนิด simple columnar epithelium with microvilli เช่นเดียวกัน แต่ small intestine ของหอยเชอรี่ถูกบุด้วยเยื่อเมือกชนิด pseudostratified columnar epithelium with cilia นอกจากนี้การศึกษาวิจัยเยื่อเมือกของ esophagus, stomach และ small intestine ของหอย *Bulla striata* ก็พบว่าเยื่อเมือกเป็น ciliated columnar และบริเวณด้านบนของเยื่อเมือกของ stomach ยังถูกปกคลุมด้วย cuticle หนา (Lobo-da-Cunha and Batista-Pinto, 2010; Lobo-da-Cunha *et al.*, 2011) ความแตกต่างของเยื่อเมือกบริเวณ small intestine ระหว่างหอยเชอรี่และหอยชนิดอื่นๆ อาจบ่งบอกถึงบทบาทการทำหน้าที่ของ small intestine ที่แตกต่างกันไม่มากนักน้อยในหอยแต่ละชนิด

Mucin-secreting cell ในทางเดินอาหาร

การจัดจำแนกสารคัดหลั่ง mucin จะพิจารณาจากคุณสมบัติการก่อตัวเป็น gel ซึ่งสามารถจัดจำแนก mucin ออกเป็น 2 ชนิด คือ gel-forming mucin (secreted) และ non-gel-forming mucin (membrane-bound) (Devine and McKenzie, 1992) นอกจากนี้สารคัดหลั่ง mucin สามารถจัดแบ่งตามคุณสมบัติประจุของโมเลกุล (net charge of molecule) ซึ่งสามารถจัดจำแนกเป็น 2 ชนิด คือ neutral mucin และ acid mucin สำหรับ acid mucin สามารถจัดจำแนกย่อยตามคุณสมบัติอีก 2 ชนิดย่อย คือ sulfomucins (sulfate-containing mucin) และ sialomucin (sialic acid containing mucin) (Filipe, 1979) การศึกษาวิจัยในหอยเชอรี่ครั้งนี้พบว่า mucin-secreting cell กระจายทั่วไปในเยื่อเมือกของระบบทางเดินอาหาร ยกเว้น stomach ที่ไม่ปรากฏว่ามี mucin-secreting cell โดยผลการทดลองมีความสอดคล้องกับการศึกษาการปรากฏของ mucin ที่ปรากฏในระบบทางเดินอาหารของ gastropod หลายชนิด ได้แก่ *Marisa cornuarietis* (Demian and Michelson, 1971), *Bulinus africanus* (Brackenbury, 1999), *A. depilans* (Lobo-da-Cunha and Batista-Pinto, 2005) และ *M. crenulata* (Martin *et al.*, 2010)

การศึกษาการปรากฏของ neutral mucin และ acid mucin ในทางเดินอาหารของหอยเชอรี่พบว่า neutral mucin พบจำนวนมากที่สุดในบริเวณ large intestine ซึ่งจำนวนลดลงใน small intestine และพบน้อยที่สุดใน esophagus ตามลำดับ แต่ผลการวิจัยนี้จะให้ผลที่ตรงข้ามกับการปรากฏของ acid mucin ที่พบจำนวนมากที่สุดใน esophagus และลดจำนวนลงใน small intestine และ large intestine ตามลำดับ การทำหน้าที่ของ neutral mucin ในระบบทางเดินอาหารพบว่า neutral mucin สามารถลด pH และลดความเป็นพิษของสารที่เคลื่อนที่ผ่านระบบทางเดินอาหาร และพบว่า acid mucin สามารถทำหน้าที่เป็น antibacterial และ antiviral ของระบบทางเดินอาหาร (Nikumbh *et al.*, 2012) นอกจากนี้ mucin-secreting cell ยังมีบทบาทในการป้องกันอันตรายต่อเยื่อผิวของระบบทางเดินอาหารทางด้านกายภาพ จากการขีดข่วนและปกป้องทางเดินอาหารจากสิ่งที่เป็นอันตรายกับอาหาร การป้องกันอันตรายนี้เกิดจากการหลั่งสารที่ทำหน้าที่เป็นสารหล่อลื่น (lubricant) หรือ การทำให้เกิดการจับตัวกันเป็นก้อนของ microorganism ที่กำลังเคลื่อนผ่านเยื่อผิว (Leknes, 2011) โครงสร้างของ mucin oligosaccharide ที่มีลักษณะเป็น gel ประกอบด้วย peptide, carbohydrate และ nutrient ที่ทำให้เกิดการจับตัวเป็นก้อน ในการดักจับ microorganism ที่ผ่านเข้ามาในระบบทางเดินอาหาร (Deplancke and Gaskins, 2001) การปรากฏและการกระจายตัวของเซลล์ที่สามารถสร้าง mucin ในระบบทางเดินอาหารขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ลักษณะทางกายวิภาคของแต่ละส่วนของระบบทางเดินอาหาร และ/หรือพยาธิสภาพที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียต่อระบบทางเดินอาหาร (Scillitani *et al.*, 2007) ซึ่งการศึกษา mucin ในระบบทางเดินอาหารมีความสำคัญ เพราะทำให้เกิดความเข้าใจในลักษณะการทำงาน (physiology) ของทางเดินอาหาร พยาธิสภาพ (pathology) และอนุกรมวิธานของสิ่งมีชีวิตนั้น (taxonomy) (Cao and Wang, 2009) ได้ ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าไม่ปรากฏ mucin-secreting cell ใน stomach แต่อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองพบ neutral mucin ที่บริเวณ microvilli ของ stomach เล็กน้อย ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการที่ neutral mucin ถูกหลั่งออกมาจากเซลล์ของ esophagus และถูกส่งต่อไปยัง stomach ในระหว่างการเคลื่อนที่ของอาหาร

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ สามารถแบ่งชนิดของ mucin-secreting cell ออกได้เป็น 4 ชนิด ตามลักษณะของ granule ที่ปรากฏในเซลล์ อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาด้วยการย้อมเซลล์ด้วย PAS, alcian blue pH 2.5 และ 1.0 ในหอย *Patella vulgata* พบว่า mucin-secreting cell ถูกแบ่งออกเป็น 9 ชนิด และพบว่า mucin-secreting cell 4 ชนิด สร้าง neutral mucin และ acidic sulfated mucin (Grenon and Walker, 1978)

การปรากฏของ leptin- peptide ในเซลล์เยื่อผิวทางเดินอาหาร

ผลการศึกษาครั้งนี้พบการปรากฏของ leptin peptide ในเซลล์เยื่อผิวของทางเดินอาหารของหอยเชอรี่ มีการศึกษาในสัตว์มีกระดูกสันหลังจำพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian) พบว่า เซลล์ที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งสร้าง leptin peptide คือ เซลล์ไขมัน (adipocyte) ของเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) แต่อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยหลากหลายซึ่งรายงานไว้ว่า leptin peptide สามารถพบที่เซลล์ประสาทของสมอง (brain) และ

เซลล์ของรก (placenta) ด้วยเช่นกัน ผลการวิจัยครั้งนี้พบการปรากฏของ leptin peptide ภายในเซลล์จากระบบทางเดินอาหารส่วนต่างๆ ได้แก่ esophagus, stomach, small intestine และ large intestine ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาด้วย immunohistochemistry technique เพื่อดูการปรากฏของ leptin peptide ในสัตว์มีกระดูกสันหลังที่ไม่ใช่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (non-mammalian) หลายชนิด ได้แก่ คางคก กบ กิ้งก่า และงู ซึ่งในสัตว์เหล่านี้สามารถพบการปรากฏของ leptin peptide ภายในเซลล์ของ oxyntic gland ของกบ และพบกระจายทั่วไปใน endocrine cell ของกิ้งก่า นอกจากนี้ leptin peptide ยังถูกพบใน myenteric plexus ของคางคก กบ และงู ด้วยเช่นกัน (Muruzabal *et al.*, 2002) มีรายงานการศึกษาวิจัยเรื่องการปรากฏของ leptin peptide ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมว่า พบการปรากฏของ leptin peptide ใน pepsinogen-secreting chief cell ของ stomach ของมนุษย์ (Bado *et al.*, 1998) นอกจากนี้ในสัตว์ฟันแทะ (rodent) สามารถพบการปรากฏของ leptin peptide ในเยื่อผิวนิวส่วน fundus ของ stomach ของหนู (Buyse *et al.*, 2004; Cammisotto *et al.*, 2005) จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การปรากฏของ leptin peptide ใน stomach อาจจะมีข้องเกี่ยวกับการทำงานของ chief cell เพื่อตอบสนองต่อการควบคุมการกินอาหาร (Cammisotto *et al.*, 2005) มีรายงานว่า การปรากฏของ leptin peptide อาจจะมีสัมพันธ์กับการปรากฏของ mucin-secreting cell ซึ่งการสร้างและการหลั่งของ mucin อาจจะได้รับกระตุ้นจาก leptin peptide เพื่อทำหน้าที่ปกป้องเยื่อผิวจากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย (Plaisancie *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังมีการรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการศึกษา leptin receptor ใน Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) ซึ่งพบ leptin receptor ในเยื่อผิวของระบบทางเดินอาหาร ซึ่งรายงานการวิจัยนี้เป็นข้อบ่งชี้ว่า leptin peptide สามารถทำหน้าที่แบบ paracrine control เพื่อกระตุ้นการทำงานของลำไส้ (Jiang *et al.*, 2010) จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่า leptin peptide สามารถแสดงบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่ของลำไส้ ได้แก่ การป้องกันความเสียหายต่อเยื่อผิวของลำไส้ ซึ่งอาจจะสัมพันธ์กับการสร้าง mucin และการดูดซึมสารอาหารผ่านเยื่อผิวของลำไส้ (Buyse *et al.*, 2001)

การแสดงออกของ leptin peptide ในทางเดินอาหาร

ผลการวิจัยครั้งนี้พบว่า molecular weight ของ leptin peptide ที่พบในทางเดินอาหารของหอยเชอร์รี่ มีขนาดเท่ากับ 16 kDa ซึ่งเป็นขนาดเดียวกับขนาดของ human leptin peptide ดังนั้นข้อมูลนี้จึงเป็นข้อบ่งชี้ว่า leptin peptide ในทางเดินอาหารของหอยเชอร์รี่ น่าจะมีโครงสร้างที่คล้ายกับโครงสร้างของ leptin peptide ของมนุษย์ นอกจากนี้ molecular weight ของ leptin peptide ของหอยเชอร์รี่มีความสอดคล้องกับการศึกษาในปลากระดูกอ่อน (*Scyliorhinus canacula*) ซึ่ง leptin peptide ที่พบบริเวณ gastric pit ของกระเพาะอาหาร มี molecular weight เท่ากับ 16 kDa เช่นเดียวกัน (Gambardella *et al.*, 2010) ยังมีรายงานการวิจัยจากการศึกษาในปลากระดูกแข็ง ได้แก่ sea bass (*Dicentrarchus labrax*) และ rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ที่ศึกษาการแสดงออกของ leptin peptide ด้วยวิธี immunoblotting ซึ่งรายงานการวิจัยให้ผลการทดลองที่

เหมือนกัน คือ molecular weight ของ leptin peptide เท่ากับ 16 kDa (Gambardella *et al.*, 2010; Kling *et al.*, 2009 and 2010)

Leptin peptide กับการกินอาหาร

การวัดปริมาณของ leptin peptide เปรียบเทียบระหว่างหอยกลุ่มอดอาหารและหอยที่กินอาหารปกติ พบว่า หอยกลุ่มอดอาหารมีปริมาณของ leptin peptide ต่ำกว่าหอยที่กินอาหารปกติ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าว มีความสอดคล้องกับการศึกษาปริมาณของ leptin peptide ในปลา green sunfish ซึ่งพบว่าปริมาณของ leptin peptide ลดลงภายหลังจากการให้ปลาอดอาหาร (Johnson *et al.*, 2000) การทดลองในหอยเชอรี่ในครั้งนี้ยัง พบว่าการฉีด leptin peptide ให้กับหอย ทำให้หอยมีการกินอาหารลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยที่ทำใน กุ้งก้ามกราม โดยการฉีด leptin peptide เข้าสู่กุ้งก้ามกราม พบว่าสามารถลดการกินอาหาร และเพิ่มอัตราการเผาผลาญของ กุ้งก้ามกรามได้ (Niewarowski *et al.*, 2000) การศึกษาในไก่พบว่า leptin peptide ลดการกินอาหารของไก่ในลักษณะ dose-dependent (Denbow *et al.*, 2000) ส่วนการศึกษาในไก่ไทย (*Gallus domesticus*) พบว่า leptin peptide มี ปริมาณสูงที่สุดขณะที่ไก่กำลังฟักไข่ ซึ่งส่งผลให้ไก่กินอาหารลดลงในขณะที่ฟักไข่ (Ngernsoungnern *et al.*, 2012) การศึกษาในปลา ray-finned fish พบว่า การแสดงออกของ leptin gene ลดลงหลังจากที่ปลาอดอาหาร และเพิ่มขึ้นหลังจากที่ปลาได้กลับมากินอาหารอีกครั้ง (Yuan *et al.*, 2014) นอกจากนี้ การแสดงออกของ leptin cDNA ในตับของไก่ถูกควบคุมโดยปริมาณของ insulin จึงสันนิษฐานว่าการหลั่งของ leptin ถูก ควบคุมโดยสภาวะทางโภชนาการของสัตว์ (Taouis *et al.*, 2001) การเพิ่มปริมาณของ leptin peptide จากการ สร้างจาก adipocyte ในเนื้อเยื่อไขมัน อาจจะมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของ ghrelin peptide ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการกินอาหาร (Gil-Campos *et al.*, 2010) เมื่อมีการสร้างของ leptin peptide และมีการจับกันระหว่าง leptin peptide และ receptor ของมัน จะนำไปสู่การยับยั้งการทำงานของ neuropeptide Y และ agouti-related protein ใน hypothalamus ซึ่งทำให้เกิดความไม่อยากอาหาร เนื่องจาก neuropeptide Y และ agouti-related protein ทำหน้าที่กระตุ้นความอยากอาหาร (Linjawi and Hussain, 2012) นอกจากนี้มีรายงานการวิจัยพบว่า การฉีด leptin peptide สามารถยับยั้งการทำงานของ melanocyte-stimulating hormone ซึ่งส่งผลต่อการหลั่งของ agouti-related protein ที่กระตุ้นความอยากอาหาร (Breen *et al.*, 2005) นอกจากนี้ข้อมูลที่บ่งบอกหน้าที่ของ leptin peptide ที่เกี่ยวข้องกับความอยากอาหารและการกิน อาหารแล้ว ยังมีข้อมูลการวิจัยที่แสดงว่า leptin peptide ทำหน้าที่เกี่ยวข้องการทำงานของลำไส้ ได้แก่ การหดตัวของลำไส้ และการดูดซึมสารอาหารของลำไส้อีกด้วย (Buyse *et al.*, 2001)

บทที่ 6

บทสรุป

ผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ สามารถสรุปได้ดังนี้

1) เยื่อบุผิวของทางเดินอาหารของหอยเชอรี่ส่วนหลอดอาหาร กระเพาะอาหาร และลำไส้ใหญ่ เป็นชนิด simple columnar epithelium ประกอบด้วยเซลล์ 2 ชนิด คือ columnar cell with microvilli และ mucin-secreting cell ส่วนเยื่อบุผิวของลำไส้เล็ก เป็นชนิด pseudostratified columnar epithelium with cilia ประกอบด้วยเซลล์ 2 ชนิด คือ columnar cell with cilia และ mucin-secreting cell เช่นเดียวกัน

2) Mucin-secreting cell สร้างสารคัดหลั่ง 2 รูปแบบ ได้แก่ neutral mucin และ acid mucin นอกจากนี้การศึกษาในระดับ ultra-structure ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนยังพบว่า mucin-secreting cell สามารถจัดจำแนกออกเป็น 4 ชนิดย่อย ได้แก่ secretory type a, b, c และ d จากการสังเกตลักษณะของ secretory granule ที่พบใน cytoplasm ของเซลล์

3) การวิจัยเพื่อศึกษาการปรากฏของ leptin peptide ในเยื่อบุผิวของทางเดินอาหารของหอยเชอรี่โดยวิธี immunohistochemistry พบว่า leptin peptide ปรากฏมากที่สุดที่ลำไส้เล็ก รองลงมาคือหลอดอาหาร ลำไส้ใหญ่ และกระเพาะอาหาร ตามลำดับ

4) การศึกษาการแสดงออกของ leptin peptide ในเยื่อบุผิวจากส่วนต่างๆ ของทางเดินอาหารของหอยเชอรี่โดยวิธี Western immunoblotting พบว่า ลำไส้เล็กมีการแสดงออกของ leptin peptide มากที่สุด และกระเพาะอาหารมีการแสดงออกของ leptin peptide น้อยที่สุด ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองจากการศึกษาโดยวิธี immunohistochemistry นอกจากนี้ น้ำหนักโมเลกุลของ leptin peptide ที่แสดงออกในทางเดินอาหารส่วนต่างๆของหอย มีขนาดเท่ากับ leptin peptide ของมนุษย์ ดังนั้นผลการศึกษาในครั้งนี้จึงอาจจะเป็นอีกหนึ่งข้อมูลที่ยืนยันว่า leptin peptide เป็น peptide ที่ค่อนข้างจะ conserve ในวิวัฒนาการของสัตว์

5) การศึกษาความเข้มข้นของ leptin peptide ใน hemolymph เปรียบระหว่างหอยอดอาหารและหอยกินอาหารปกติ พบว่า leptin peptide มีความเข้มข้นน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหอยที่อดอาหาร นอกจากนี้ปริมาณของ leptin peptide กลับเข้าสู่ระดับปกติหลังจากหอยอดอาหารกลับมาได้กินอาหารอีกครั้ง

6) การศึกษาหน้าที่ของ leptin peptide เกี่ยวกับการควบคุมการกินอาหารของหอยเชอรี่พบว่า leptin peptide มีผลยับยั้งการกินอาหาร ซึ่งการทดลองแสดงให้เห็นว่า การฉีด leptin peptide จะส่งผลให้หอยกินอาหารลดน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ข้อมูลที่ได้นี้ แสดงให้เห็นว่า การกินอาหารของหอยอยู่ภายใต้อิทธิพลของการควบคุมของ leptin peptide

บรรณานุกรม

- Ahima R.S., Saper C.B., Flier J.S., Elmquist J.K. (2000). Leptin regulation of neuroendocrine system. Front. Neuroendocrinol. 21. 263-267.
- Bado A., Lévassieur S., Attoub S., Kermorgant S., Laianeau L. P., Bortoluzzi M. N., Moizo L., Lwhey T., Guerre-millo M., Le Marchand-Brustel Y., and Lewin M. J. (1998). The stomach is a source of leptin. Nature. 394. 790-793.
- Bornstein S.R., Abu-Asab M., Glasow A., Path G., Hauner H., Tsokos M., Chrousos G.P., Scherbaum W.A. (2000). Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. Diabetes. 49. 532-538.
- Brackenbury T. D. (1999). Gross histopathological effects of an extract of *Agave attenuata* on the epithelium of the digestive tract of *Bulinus africanus*. Annals of Tropical and Parasitology. 93. 516-26.
- Breen T. L., Conwell I. M., Wardlaw S. L. (2005). Effects of fasting, leptin, and insulin on AGRP and POMC peptide release in the hypothalamus. Brain Research. 1032. 141-148.
- Buyse M., Aparicio T., Guilmeau S., Goyot H., Sobhani, I. Bado A. (2004). Paracrine actions of the stomach-derived leptin. Medecine Sciences. 20. 183-188.
- Buyse M., Mado A., Dauge V. (2001). Leptin decrease feeding and exploratory behavior via interactions with CCK1 receptor in the rat. Neuropharmacology. 40. 25-818.
- Calumpang S.M.S, Medina M.J.B., Tejada A.W., Medina J.R. (1995). Environmental impact of two molluscicidal: niclosamide and metaldehyde in a rice paddy ecosystem. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 55. 494-501.
- Cammisotto P. G., Renaud C., Gingras D., Delvin E., Levy E., Bendayan M. (2005). Endocrine and exocrine secretion of leptin by the gastric mucosa. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 53. 851-860.
- Campfield L.A., Smith F.J., Guisez Y., Devos R., Bum P. (1995). Recombinant mouse ob protein: evidence for peripheral signal linking adiposity and central networks. Science 269: 546-549.
- Cao X. J., Wang W. M. (2009). Histology and mucin histochemistry of the digestive tract of yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*. Anatomia, Histologia, Embryologia. 38. 61-254.
- Carlsson N.O.L. Bronmark C., Hansson L.A. (2004). Invading herbivory: the golden apple snail alter ecosystem functioning in Asian wetlands. Ecology 85. 1575-1580.

- Chen H. (1996). Disappearance of body fat in normal rats induced by adenovirus-mediated leptin gene therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93. 14795-14799.
- Cinti S., De Matteis R.D., Pico C., Ceresi E., Obrador A., Maffei C., Oliver J., Palou A., (2000). Secretory granules of endocrine and chief cells of human stomach mucosa contain leptin. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 24: 789-793.
- Demian E. S., Michelson E. H. (1971). Histochemistry of the epithelial mucins in the alimentary tract of the snail *Marisa cornuarietis*. Journal of Morphology. 135. 213-46.
- Denbow M.D. Meade S., Robertson A., McMurtry J.P., Richards M., Ashwell C. (2000). Leptin-induced decrease in food intake in chickens. Physiol. Behav. 69. 359-362.
- Deplancke B., Gaskins H. R. (2001). Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. The American Journal of Clinical Nutrition. 73. 41-1131.
- Devine P. L., McKenzie I. F. (1992). Mucins: structure, function, and associations with malignancy. Bio Essays Journal. 14. 25-619.
- Dreon M.S., Ituarte S, Heras H. (2011). The role of the protease inhibitor in apple snail eggs resemble plant embryo defense against predation. PLOS ONE. 5. 12. 1-12.
- Dridi S., Buyse J., Decuypere E., Taoius M. (2005). Potential role of leptin in increase of fatty acid synthase gene expression in chicken liver. Domest. Anim. Endocrinol. 29. 646-660.
- Filipe M. I. (1979). Mucins in the human gastrointestinal epithelium: a review. Investigative Cell Pathology. 2. 3. 195-216.
- Gambardella C., Gallus L., Ravera S., Fasulo S., Vacchi M., Ferrando S. (2010). First evidence of a Leptin-Like peptide in a cartilaginous fish. The Anatomical Record. 93.1692-1697.
- Gil-Campos M., Aguiler C. M., Ramirez-Tortosa M. C., Canete R., Gil A. (2010). Fasting and postprandial relationships among plasma leptin, ghrelin, and insulin in prepubertal obese children. Clinical Nutrition. 29. 54-59.
- Godoy M.S., Castro-Vasquez A., Vega I.A. (2013). Endosymbiotic and Host Proteases in the Digestive Tract of the Invasive Snail *Pomacea canaliculata*: Diversity, Origin and Characterization. PLOS ONE 8. 6. 1-10.
- Halaas J.L., Gajiwala K.S., Maffei M., Cohen S.L., Chait B.T., Rabinowitz D., Lallone R.L., Burley S.K., Friedman J.M. (1995). Weight reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. Science 269. 543-546.
- Jiang H., Yin Y., Zhang X., Hu S., Wang Q. (2010). Chasing relationships between nutrition and reproduction: A comparative transcriptome analysis of hepatopancreas and testis from *Eriocheir sinensis*. Comparative Biochemistry and Physiology Part D. 4. 227-234.

- Johnson R. M., Johnson T. M., Londraville R. L. (2000). Evidence for leptin expression in fishes. Journal of Experimental Zoology. 286. 718-724.
- Kaiya H., Small B.C., Bilodeau A.L., Shepherd B.S., Kojima M., Hosoda H., Kangawa K. (2005). Purification, cDNA cloning, and characterization of ghrelin in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. General and Comparative Endocrinology. 143. 201-210.
- Kaiya H., Miyazato F., Miyazato M., Kangawa K. (2009). Current knowledge of the roles of ghrelin in regulating food intake and energy balance in birds. General and Comparative Endocrinology. 163. 33-38.
- Kaiya H., Miyazato M., kangawa K. (2011). Recent advances in the phylogenetic study of ghrelin. Peptides. 32. 2155-2174.
- Kaufmann W., Kerschbaum H.H., Hauser-Kronberg C., Hacker G.W., Hermann A. (1995). Distribution and seasonal variation of vasoactive intestina (VIP)-like peptides in the nervous system of *Helix pomatia*. Brain Res. 695.125–136.
- Kitazawa T., Maeda Y., Kaiya H. (2009). Molecular cloning of growth hormone secretagogue-receptor and effect of quail ghrelin on gastrointestinal motility in Japanese quail. Regulatory Peptides. 158. 132-142.
- Kling P., Bjornsson B. T., Kurokawa T. (2010). Leptin and leptin receptor genes in Atlantic salmon: cloning, phylogeny, tissue distribution and expression correlated to long-term feeding status. General and Comparative Endocrinology. 168. 55-70.
- Kling P., Ronnestad I., Stefansson S. O., Murashita K., Kurokawa T., Bjornsson B. T. (2009). A homologous salmonid leptin radioimmunoassay indicates elevated plasma leptin levels during fasting of rainbow trout. General and Comparative Endocrinology. 162. 307-312.
- Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H., Kangawa K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature. 402. 656-660.
- Kojima M., Hosoda H., Matsuo H., Kangawa, K. (2001). Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. TRENDS in Endocrinology & Metabolism. 12. 3. 118-126.
- Kruatrachue M., Sumridee C., Pokethitiyook P, Singhakaew S. (2011). Histopathological effects of contaminated sediments on golden apple snail (*Pomacea canaliculata*, Lamarck 1822). Bull Environ. Contam. Toxicol. 86. 610-614.
- Leknes I. V. (2011). Histochemical studies on mucin-rich cells in the digestive tract of a teleost, the Buenos Aires tetra (*Hyphessobrycon anisitsi*). Acta Histochemica. 113. 353-357.

- Linjawi S. A., Hussain N. A. (2012). Impact of Leptin Receptor Gene GLN223ARG Polymorphism on Obesity in Jeddah City. Life Science Journal. 9. 818-828.
- Lobo-da-Cunha A., Batista-Pinto C. (2005). Light and electron microscopy studies of the oesophagus and crop epithelium in *Aplysia depilans* (Mollusca, Opisthobranchia). Tissue and Cell. 37. 447-56.
- Lobo-da-Cunha A., Oliveira V., Alves A., Coelho R., Calado G. (2010). Light and electron microscopic study of the anterior oesophagus of *Bulla striata* (Mollusca, Opisthobranchia). Acta Zoologica (Stockholm). 91. 125-138.
- Lobo-da-Cunha A., Malheiro A. R., Alves A., Oliveira E., Coelho R., Calado G. (2011). Histological and ultrastructural characterisation of the stomach and intestine of the opisthobranch *Bulla striata* (heterobranchia: Cephalaspidea). An International Journal of Marine Sciences. 27. 61-75.
- Martin, G. G., Bessette, T., Martin, A., and Oakes, C. (2010). Morphology of epithelial cells lining the digestive tract of the giant keyhole limpet, *Megathura crenulata* (Mollusca; Vetigastropoda). Journal of Morphology. 271. 1134-51.
- Mochida O. (1991). Spread of freshwater *Pomacea canaliculata* (Pilidae, Mollusca) from Argentina to Asia. Micronesica. 3. 51-62.
- Montague C.T., Farooqi I.S., Whitehead J.P., Soos M.A., Rau H., Wareham N.J., Sewter C.P., Digby J.E., Mohammed S.N., Hurst J.A., Cheetham C.H., Earley A.R., Barnett A.H., Prins J.B., O'Rahilly S. (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. Nature. 387. 903-908.
- Muruzabal F. J., Frühbeck G., Gomez A J., Archanco M., Burrell M. A. (2002). Immunocytochemical detection of leptin in non-mammalian vertebrate stomach. General and Comparative Endocrinology. 128. 149-152.
- Naylor R. (1996). Invasions in agriculture: Assessing the coat of the golden apple snail in Asia. Ambio. 25. 443-448.
- Neglia S., Arcamone N., Garguilo G., de Girolamo P. (2007). Immunocytochemical detection of leptin-like peptide immunoreactivity in the chicken gastroenteric tract. General and Comparative Endocrinology. 155. 432-437.
- Ngernsoungnern A., Ngernsoungnern P. Localization of ghrelin-like peptide in the gastrointestinal tract of the golden apple snail (*Pomacea canaliculata*) and changing of its concentration during fasting. (2016). Acta Histochemica. 118. 244-251.
- Ngernsoungnern P., Sartsoongnoen N., Prakobsaeng N., Chaiyachet O., Chokchaloemwong D., Suksaweang S., Ngernsoungnern A., Chaiseha Y. Plasma leptin concentrations during the

- reproductive cycle in the native Thai chicken (*Gallus domesticus*). (2012). Animal Reproduction Science 136. 115-120.
- Niewiarowski P. H., Balk M. L., Londraville R. L. (2000). Phenotypic effects of leptin in an ectotherm: a new tool to study the evolution of life histories and endothermy. The Journal of Experimental Biology. 203. 295-300.
- Nikumbh R. D., Nikumbh D. B., Umarji B. N. (2012). Mucin histochemical study of the colon in normal and malignant lesions. International Journal of Health Science & Research. 2. 20-32.
- Paczoska-Eliasiewicz H.E., Proszkiewicz-Weglarz M., Proudman J., Hrabia A., Sechman A., Mika M., Jacek T., Cassy S., Raver N., Rzasza J. (2003). Attenuate by leptin of the effects of fasting on ovarian function in hens (*Gallus domesticus*). Reproduction. 126. 739-751.
- Plaisancie P., Ducroc R., El Homsy M., Tsocas A., Guilmeau S., Zoghbi S., Thibaudeau O., Bado A. (2006). Luminal leptin activates mucin-secreting goblet cells in the large bowel. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology. 290. 805-812.
- Pisu M.B., Conforti E., Scherini E., Bernocchi G. (2000). Gastrin-Cholecystokinin Immunoreactivity in the Central Nervous System of *Helix aspersa* during Rest and Activity. Journal of Experimental Zoology. 287. 29-37.
- Scillitani G, Zizza S., Liquori G. E., Ferri D. (2007). Lectin histochemistry of gastrointestinal glycoconjugates in the greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum* (Schreber, 1774). Acta Histochemica. 109. 5. 57-347.
- Serrano T., Gomez B.G., E. Angulo E. (1996). Light and electron microscopy study of the salivary gland secretory cells of Helicoidea (Gastropoda, Stylommatophora). Tissue & Cell. 28. 2. 237-251.
- Sobhani I., Bado A., Vissuzaine C., Buyse M., Kermorgant S., Laigneau J.P., Attoub S., Lehy T., Henin D., Migon M., Lewin M.J.M. (2000). Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. Gut. 47. 178-183.
- Taouis M., Chen J.W., Daviaud C., Dupont J., Derouet M., Simon J. (1998). Cloning the chicken leptin gene. Gene. 208. 239-242.
- Vehovszky A., Elliott C.J. (2000). The octopamine-containing buccal neurons are a new group of feeding interneurons in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. Acta Biol Hung. 51. 2-4. 165-76.
- Wang Y.Z. Peng K.M. Liu H.Z., Song H., Chen X., Liu M. (2009). Distribution and developmental changes in ghrelin-immunoreactive cells in the gastrointestinal track of African ostrich chicks. Regul. Pept. 154. 97-101.
- Wang Y.Z., Song H.X. Fang Y.Q. (2008). Distribution of ghrelin-immunoreactive cells in amphioxus, *Branchiostoma belcheri*-A study of immunohistochemistry. Prog. Natl. Sci. 18. 245-249.

- Youens A.K., Burks R.L., (2008). Comparing applesnails with oranges: the need to standard size measuring techniques when studying *Pomacea*. Aquat. Ecol. 42. 679–684.
- Yuan D., Wang T., Zhou C., Lin F., Chen H., Wu H., Wei R., Xin Z., Li Z. (2014). Leptin and cholecystokinin in *Schizothorax prenanti*: molecular cloning, tissue expression, and mRNA expression responses to periprandial changes and fasting. Gen. Comp. Endocrinol. 204. 13-24.
- Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature. 372. 425-432.



ภาคผนวก ก

การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

“The 11th Asia Pacific Microscopy Conference”

“The 33rd International Conference of the Microscopy Society of Thailand”

and

“The 39th Annual Conference of the Anatomy Association of Thailand”

วันที่ 23-27 พฤษภาคม 2559

ณ โรงแรมภูเก็ต เกรซแลนด์ รีสอร์ท และสปา จังหวัดภูเก็ต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Histological Study of the Gastrointestinal Tract of *Pomacea Canaliculata*

Piyachat Songvijit¹, Apichart Ngernsounnern², Piyada Ngernsounnern^{2*}

¹ School of Pharmacology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand

² School of Anatomy, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand

*Corresponding author, e-mail: npiyada@sut.ac.th

Abstract

In the present study, histology of epithelial cells lining the gastrointestinal tract of the *Pomacea canaliculata* was studied. It was observed that the snail's gastrointestinal tract consisted of the esophagus, stomach, intestine, and rectum. The esophageal crop was not apparently seen. Using conventional hematoxylin and eosin staining, the result showed that morphology of the epithelial cells was similar in all parts of the gastrointestinal tract. Each part of the gastrointestinal tract was covered by simple columnar epithelium with microvilli presented at the apical region of the cells. Moreover, both neutral and acidic mucin-secreting cells were observed in parts of the snail's gastrointestinal tract.

Keywords Gastrointestinal tract, golden apple snail, *Pomacea canaliculata*

Background

The golden apple snail, *Pomacea canaliculata*, is a freshwater snail that is commonly found in South America. Since 1980, the snail has been brought to many countries in Asia for human food consumption instead of abalone which is more costly. However, this species escaped or was released into natural environment. The snail has then become a cause of major problems in agriculture as a wetland pest (Hayes et al., 2008).

Morphology of the gastrointestinal (GI) tract compared between gastropods was similar. The GI tract consists of the esophagus leading from the mouth to the stomach followed by the long intestine. The stomach is embedded within the digestive gland. The caudal part of the GI tract is the rectum which ended at the anus. However, some gastropods have the crop located between the esophagus and stomach (Voltzow, 1994).

P. canaliculata has been brought to Thailand for over many decades. The snail can propagate and grow quickly because its diets are all types of plants. Moreover, the snail consumes more food than other snail species. The reason why the snail is a good survivor is still undefined. Moreover, knowledge on the snail's biology is still limited. The main objective of the present study was thus to investigate the snail's biology emphasizing on the histology of its GI tract.

Materials and Methods

After euthanization of the snails, the GI tracts were removed and parts of the GI tract were classified. Each part of the GI tract was then processed conventionally for embedding in paraffin wax. Subsequently, the tissue blocks were cut and the sections were stained with hematoxylin and eosin. The sections were then dehydrated, cleared, mounted, and finally observed under a light microscope.

Mucus-secreting cells in parts of the GI tract were also identified. According to the methods suggested by the manufacturer, the paraffin sections of the GI tract were counterstained with Periodic acid-Schiff (PAS) and alcian blue, pH 2.5 for neutral and acidic mucins, respectively. The sections were then dehydrated, cleared, mounted, and finally visualized under a light microscope.

Results, Discussion and Conclusion

The GI tract of *P. canaliculata* composed of the esophagus which connected the mouth to the stomach (Fig.1). The esophagus situated ventrally to the buccal mass and entered the rostral part of the stomach. Follow the length of the esophagus was the intestine. The distal part of the intestine connected to the rectum, and the ended part of the GI tract was the anus. The stomach is embedded within a digestive gland. This is similar to the structure of the GI tract of other gastropods. A study in *Megathura crenulata* indicated that its GI tract was divided into the esophagus, stomach and intestinal loop which terminated at the anus (Martin et al., 2010). In *P. canaliculata*, no apparent crop was seen. However, the crop was found in some gastropods, such as, *Helix aspersa* (Charrier and Rouland, 2001), *Aplysia depilans* (Lobo-da-Cunha and Batista-Pinto, 2005), and *Achatina fulica* (Cardoso et al., 2012). This indicates some differences among the structure of the GI tract of gastropods.

In *P. canaliculata*, all parts of the GI tract were lined with simple columnar epithelium with microvilli presents on the apical region of the cells (Fig.2). All cells were rested on the same basement membrane and their nuclei were located at the basal region. Similarly, the stomach, intestine, and rectum of *M. crenulata* were also lined with simple columnar epithelium with microvilli (Martin et al., 2010). Moreover, the epithelium of the esophagus and crop of *A. depilans* consisted of a single layer of columnar cells with apical microvilli, and some of them also possessed cilia (Lobo-da-Cunha and Batista-Pinto, 2005).

Mucus-secreting cells were observed in parts of the GI tract of *P. canaliculata*, but not in the stomach (Fig.3). Cells that secrete mucins were found in the GI tract of various gastropods, for example, *Marisa cornuarietis* (Demian and Michelson, 1971), *Bulinus africanus* (Brackenbury, 1999), *A. depilans* (Lobo-da-Cunha and Batista-Pinto, 2005), and *M. crenulata* (Martin et al., 2010). This suggests that the secretory processes concerning with digestion occurs in most regions of the GI tract of gastropods.

Both neutral and acidic mucins were observed in parts of the GI tract of *P. canaliculata*. It was reported that neutral mucins were found in the stomach and duodenum, whereas acid mucins were distributed throughout the GI tract (Awad and Abdul Raheem, 2014). Neutral mucins are known to help for reducing the pH and toxicity of substances that pass through the GI tract, whereas acidic mucins contain chelating agents and have antibacterial and antiviral properties (Nikumbh et al., 2012).

In summary, the structure of the GI tract of *P. canaliculata* is similar to those of the other gastropods with some minor differences. The mucosa of the GI tract was lined by simple columnar epithelium with apical microvilli. In addition, mucus-secreting cells were scattered within the epithelial cells. Results of the present study could be useful for further studies conducting to understand how this snail species is a good survivor.

Acknowledgement

This work was supported by Suranaree University of Technology (Grant number 45/2558 (SUT1-104-58-24-17) to P. Ngernsoungrern).

References

1. Awad E, Abdul Raheem EM. Demonstration of Mucins in gastrointestinal tract carcinoma lesions in Sudanese patients. International Journal of Pure and

- Applied Sciences and Technology 2014; 21: 28-31.
2. Brackenbury TD. Gross histopathological effects of an extract of *Agave attenuata* on the epithelium of the digestive tract of *Bulinus africanus*. *Annals of Tropical and Parasitology* 1999; 93: 516-26.
 3. Cardoso AM, Cavalcante JJ, Cantão ME, Thompson CE, Flatschart RB, Glogauer A, Scapin SM, Sade YB, Beltrão PJ, Gerber AL, Martins OB, Garcia ES, de Souza W, Vasconcelos AT. Metagenomic analysis of the microbiota from the crop of an invasive snail reveals a rich reservoir of novel genes. *PLoS One* 2012; 7: e48505.
 4. Charrier M, Rouland C. Mannan-degrading enzymes purified from the crop of the brown garden snail *Helix aspersa* Müller (Gastropoda Pulmonata). *Journal of Experimental Zoology* 2001; 290: 125-35.
 5. Demian ES, Michelson EH. Histochemistry of the epithelial mucins in the alimentary tract of the snail *Marisa cornuarietis*. *Journal of Morphology* 1971; 135: 213-46.
 6. Hayes KA, Joshi RC, Thiengo SC, Cowie RH. Out of South America: multiple origins of non-native apple snails in Asia. *Diversity and Distributions* 2008; 14: 701-12.
 7. Lobo-da-Cunha A, Batista-Pinto C. Light and electron microscopy studies of the oesophagus and crop epithelium in *Aplysia depilans* (Mollusca, Opisthobranchia). *Tissue and Cell* 2005; 37: 447-56.
 8. Martin GG, Bessette T, Martin A, Oakes C. Morphology of epithelial cells lining the digestive tract of the giant keyhole limpet, *Megathura crenulata* (Mollusca; Vetigastropoda). *Journal of Morphology* 2010; 271: 1134-51.
 9. Nikumbh RD, Nikumbh DB, Umarji BN. Mucin histochemical study of the colon in normal and malignant lesions. *International Journal of Health Science & Research* 2012; 2: 20-32.
 10. Voltzow J. Gastropoda: Prosobranchia. In: Harrison FW, Kohn AJ, editors. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. New York: Wiley-Liss, 1994: 111-252.



Fig.1 Gross structure of the GI tract of *P. conaliculata*. The GI tract composed of the esophagus, stomach, intestine, and rectum.

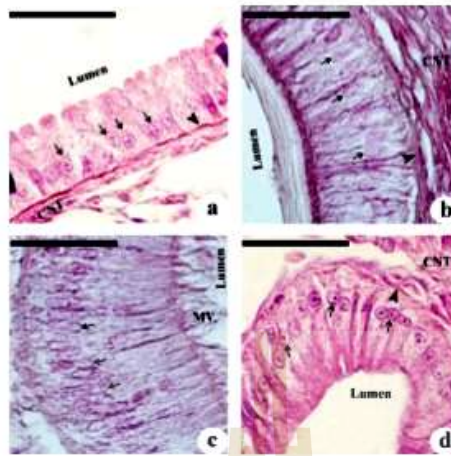


Fig.2 Histology of parts the GI tract of *P. canaliculata*: a, esophagus; b, stomach; c, intestine; d, rectum. Arrows, cell nuclei; arrow heads, basement membranes; CNT, connective tissue; MV, microvilli. Scale bars = 100 μ m.

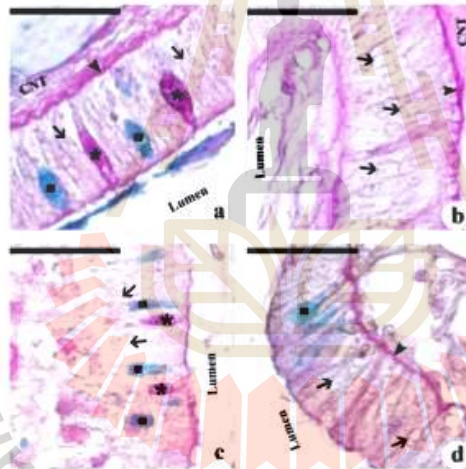


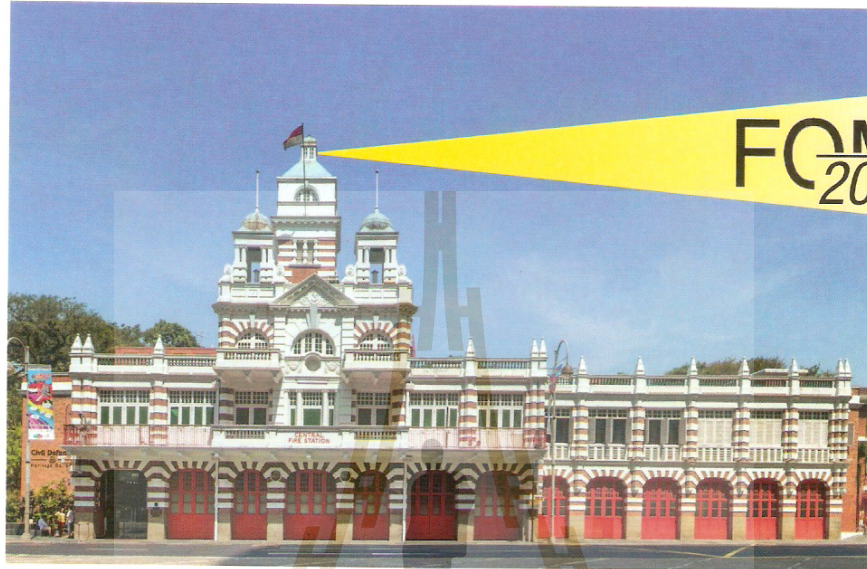
Fig.3 Mucus-secreting cells in the GI tract of *P. canaliculata*: a, esophagus; b, stomach; c, intestine; d, rectum. Asterisks indicate cells stained with PAS and rectangles indicate cells stained with alcian blue, pH 2.5. Arrows, cell nuclei; arrow heads, basement membrane; CNT, connective tissue; MV, microvilli. Scale bars = 100 μ m.



ภาคผนวก ข
การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ
“Focus on Microscopy 2018”
วันที่ 25-28 มีนาคม 2561
ณ Singapore EXPO ประเทศสิงคโปร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

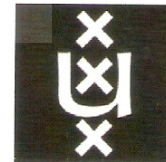
Program and Abstract Book Focus on Microscopy FOM 2018



Focus on Microscopy 2018

MAX Atria - Singapore EXPO

25-28 March
Singapore



GLYCOCONJUGATE-SECRETING CELLS IN THE GASTROINTESTINAL TRACT OF THE GOLDEN APPLE SNAIL

Apichart Ngermsounguern, Piyada Ngermsounguern

School of Preclinic, Institute of Science, Suranaree University of Technology

111, Muang District, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand

E-mail : apichart@sut.ac.th

KEY WORDS: glycoconjugate, secretory cell, gastrointestinal tract, golden apple snail

The functional morphology and anatomy of the golden apple snail gastrointestinal (GI) system was under studied. We identified glycoconjugate (Gly)-secreting cells with light microscopy and transmission electron microscopy (TEM). Staining of alcian blue pH 2.5 in combination with periodic acid Schiff revealed in the esophagus, intestine and rectum but not the stomach. The Gly-secreting cells were primarily pear shaped with some elongated cells. The apical regions of the cells were in contact with the GI tract lumen. Four different types of Gly-secreting cells (types A, B, C, and D) were identified using the TEM [1]. The Gly-secreting cells were scattered among epithelial cells. Type A cells were similar in shape and appearance to goblet cells. They contained completely electron lucent granules occupying the entire cytoplasm. Type B cells contained mostly moderate electron-dense granules. Type C cells consisted of granules with an unequal distribution of both moderate electron dense materials and high electron-dense materials, whereas type D cells contained only high electron-dense granules. Extrusion of the secretory materials from all cell types was often observed.

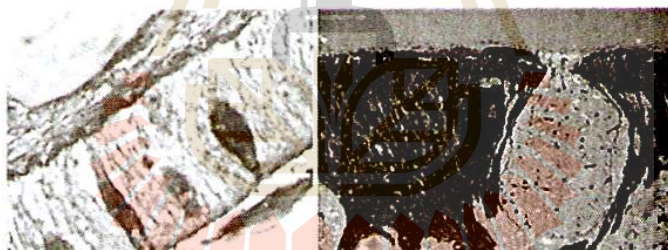


Figure 1 : Glycoconjugate-secreting cells in the gastrointestinal tract of the golden apple snail

Reference:

- [1] I. Bravo Portela; V.S. Martinez-Zorzano; I. Molist- Perez; and P. Molist Garcia, "Ultrastructure and glycoconjugate pattern of the foot epithelium of the abalone *Haliotis tuberculata* (Linnaeus, 1758) (Gastropoda, Haliotidae)," *The Scientific World Journal*, 2012, 1-12 (2012).

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. หัวหน้าโครงการวิจัย

- 1) ชื่อ นางปิยดา เงินสูงเนิน/Mrs. Piyada Ngernsoungnem
- 2) ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์
- 3) สถานที่ทำงาน สาขาวิชาปริคลินิก สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี/
School of Preclinic, Institute of Science, Suranaree University of
Technology

โทรศัพท์ 0-4422-4317

โทรสาร 0-4422-4185

ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (E-mail) npiyada@sut.ac.th

4) ประวัติการศึกษา

- 2002-2007 **Doctor of Philosophy (Anatomy)**
Mahidol University, Thailand
- 1996-1999 **Master of Science (Anatomy)**
Mahidol University, Thailand
- 1990-1994 **Bachelor of Nursing Science (The Second Class Honors)**
Mahidol University, Thailand

5) สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

- 1) Endocrinology
- 2) Human Anatomy
- 3) Structural biology

6) งานวิจัยที่ได้รับการเผยแพร่

Thumanu K., Srisamut D., Ngernsoungnem A., **Ngernsoungnern P.**, Siriwong S., Chomnonloa A., Songvijit P., Poompramun C., Sindhupakorn B. Infrared microspectroscopy to investigate structural changes of subchondral bone and articular cartilage in osteoarthritic knee. Suranaree Journal of Science and Technology 2018; 25(1): 101-114

Tanthaisong P., Imsoonthornruksa S., Ngernsoungnem A., **Ngernsoungnern P.**, Ketudat-Cairns M., Parnpai R. Enhanced chondrogenic differentiation of human umbilical cord Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells by GSK-3 inhibitors. PLoS One 2017; 12(1): e0168059.

Ngernsoungnern A., **Ngernsoungnern P.** Localization of ghrelin-like peptide in the gastrointestinal tract of the golden apple snail (*Pomacea canaliculata*) and changing of its concentration during fasting. *Acta Histochemica* 2016; 118: 244-251.

Ngernsoungnern P., Sretarugsa P., Ngernsoungnern A. Alteration of egg activation by protease inhibitors in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Invertebrate Reproduction and Development* 2015; 59: 206-211.

Saowakon N., **Ngernsoungnern P.**, Watcharaviton P., Ngernsoungnern A., Kosanlavit R. Formaldehyde exposure in gross anatomy laboratory of Suranaree University of Technology: a comparison of area and personal sampling. *Environmental Science and Pollution Research* 2015; 22: 19002-19012.

Panpai R., Liang Y., Paul A.K., Ngernsoungnern A., **Ngernsoungnern P.**, Ketudat-Cairns M. Cryopreservation of buffalo oocytes. *The Thai Journal of Veterinary Medicine Supplement 1* 2014; 44: 119-123.

Ngernsoungnern P., Sartsoongnoen N., Prakobsaeng N., Chaiyachet O., Chokchaloemwong D., Suksaweang S., Ngernsoungnern A., Chaiseha Y. Plasma leptin concentrations during the reproductive cycle in the native Thai chicken (*Gallus domesticus*). *Animal Reproduction Science* 2012; 136: 115-120.

Ngernsoungnern P., Ngernsoungnern A., Chaiseha Y., Sretarugsa P. Role of vitelline envelope during fertilization in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Acta Histochemica* 2012; 114: 659-664.

Chaiseha Y., **Ngernsoungnern P.**, Sartsoongnoen N., Prakobsaeng N., El Halawani M. Presence of prolactin mRNA in extra-pituitary brain areas in the domestic turkey. *Acta Histochemica* 2012; 114: 116-121.

Ngernsoungnern P., Ngernsoungnern A., Weerachatanukul W., Meeratana P., Hanna P.J., Sobhon P., Sretarugsa P. Abalone egg-laying hormone induces rapid ovarian maturation and early spawning of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 2009; 296: 143-149.

Ngernsoungnern P., Ngernsoungnern A., Sobhon P., Sretarugsa P. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and a GnRH analog induce ovarian maturation in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Invertebrate Reproduction and Development* 2009; 53: 125-135.

Ngernsoungnern P., Ngernsoungnern A., Kavanaugh S., Sower S. A., Sobhon P., Sretarugsa P. The presence and distribution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-liked factor in the nervous and gonadal tissues of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *General and Comparative Endocrinology* 2008; 155: 613-622.

Ngernsoungnern A., **Ngernsoungnern P.**, Weerachayanukul W., Chavadej J., Sobhon P., Sretarugsa P. The existence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) immunoreactivity in the ovary and the effects of GnRHs on the ovarian maturation in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 2008; 279: 197-203.

Ngernsoungnern A., **Ngernsoungnern P.**, Kavanaugh S., Sower S.A., Weerachayanukul W., Sobhon P., Sretarugsa P. The identification and distribution of gonadotropin-releasing hormone-like peptides in the central nervous system and ovary of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Invertebrate Neuroscience* 2008; 8: 49-57.

2. ผู้ร่วมโครงการวิจัย

- 1) ชื่อ นายอภิชาติ เงินสูงเนิน/Mr. Apichart Ngernsoungnern
- 2) ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์/Assistant Professor
- 3) สถานที่ทำงาน สาขาวิชาปริคตินิก สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี/
School of Anatomy, Institute of Science, Suranaree University of
Technology

โทรศัพท์ 0-4422-4632

โทรสาร 0-4422-4185

ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (E-mail) apichart@sut.ac.th

4) ประวัติการศึกษา

- | | |
|-----------|---|
| 2004-2008 | Doctor of Philosophy (Anatomy)
Mahidol University, Thailand |
| 2001-2003 | Master of Science (Anatomy)
Mahidol University, Thailand |
| 1997-2001 | Bachelor of Science (Physical Therapy)
Khon Kaen University, Thailand |

5) สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

- 1) Endocrinology
- 2) Structural biology
- 3) Reproductive biology

6) งานวิจัยที่ได้รับการเผยแพร่

Thumanu K., Srisamut D., **Ngernsoungnern A.**, Ngernsoungnern P., Siriwong S., Chomnonloa A., Songvijit P., Poompramun C., Sindhupakorn B. Infrared microspectroscopy to investigate structural changes of subchondral bone and articular cartilage in osteoarthritic knee. *Suranaree Journal of Science and Technology* 2018; 25(1): 101-114.

Tanthaisong P., Imsoonthornruksa S., **Ngernsoungnern A.**, Ngernsoungnern P., Ketudat-Cairns M., Parnpai R. Enhanced chondrogenic differentiation of human umbilical cord Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells by GSK-3 inhibitors. *PLoS One* 2017; 12(1): e0168059.

Ngernsoungnern A., Ngernsoungnern P. Localization of ghrelin-like peptide in the gastrointestinal tract of the golden apple snail (*Pomacea canaliculata*) and changing of its concentration during fasting. *Acta Histochemica* 2016; 118: 244-251.

Ngernsoungnern P., Sretarugsa P., **Ngernsoungnern A.** Alteration of egg activation by protease inhibitors in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Invertebrate Reproduction and Development* 2015; 59(4): 206-211.

Saowakon N., Ngernsoungnern P., Watcharavitoon P., **Ngernsoungnern A.**, Kosanlavit R. Formaldehyde exposure in gross anatomy laboratory of Suranaree University of Technology: a comparison of area and personal sampling. *Environmental Science and Pollution Research* 2015; 22: 19002-19012.

Panpai R., Liang Y., Paul A.K., **Ngernsoungnern A.**, Ngernsoungnern P., Ketudat-Cairns M. Cryopreservation of buffalo oocytes. *The Thai Journal of Veterinary Medicine Supplement 1* 2014; 44: 119-123.

Ngernsoungnern P., Sartsoongnoen N., Prakobsaeng N., Chaiyachet O., Chokchaloemwong D., Suksaweang S., **Ngernsoungnern A.**, Chaiseha Y. Plasma leptin concentrations during the reproductive cycle in the native Thai chicken (*Gallus domesticus*). *Animal Reproduction Science* 2012; 136: 115-120.

Ngernsoungnern P., **Ngernsoungnern A.**, Chaiseha Y., Sretarugsa P. 2012. Role of vitelline envelope during fertilization in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Acta Histochemica* 2012; 114: 659-664.

Ngernsoungnern P., **Ngernsoungnern A.**, Sobhon P., Sretarugsa P. 2009. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and a GnRH analog induce ovarian maturation in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Invertebrate Reproduction and Development* 2009; 53(3): 125-135.

Ngernsoungnern P., **Ngernsoungnern A.**, Weerachayanukul W., Meeratana P., Hanna P.J., Sobhon P., Sretarugsa P. Abalone egg-laying hormone induces rapid ovarian maturation and early spawning of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 2009; 296: 143-149.

Ngernsoungnern A., Ngernsoungnern P., Weerachayanuku W., Chavadej J., Sobhon P., Sretarugsa P. The existence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) immunoreactivity in the ovary and the effects of GnRHs on the ovarian maturation in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 2008; 279: 197-203.

Ngernsoungnern A., Ngernsoungnern P., Kavanaugh S., Sower S.A., Weerachayanukul W., Sobhon P., Sretarugsa P. The identification and distribution of gonadotropin-releasing hormone-like peptides in the central nervous system and ovary of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Invertebrate Neuroscience* 2008; 8: 39-57.

Ngernsoungnern P., **Ngernsoungnern A.**, Kavanaugh S., Sower S.A., Sobhon P., Sretarugsa P. The presence and distribution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-liked factor in the nervous and gonadal tissues of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *General and Comparative Endocrinology* 2008; 155: 613-622.

Ngernsoungnern A., Weerachayanukul W., Saewu A., Thitilerdecha S., Sobhon P., Sretarugsa P. Rat sperm AS-A: subcellular localization in testis and epididymis and surface distribution in epididymal sperm. *Cell and Tissue Research* 2004; 318: 353-363.

3. ผู้ร่วมโครงการวิจัย

- 1) ชื่อ นางนภวรรณ เสาวคนธ์/ Mrs. Naruwan Saowakon
- 2) ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์/Assistant Professor
- 3) สถานที่ทำงาน สาขาวิชาปรีคลินิก สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี/

School of Anatomy, Institute of Science, Suranaree University of
Technology

โทรศัพท์ 0-4422-4623

โทรสาร 0-4422-4185

ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (E-mail) naruwan@sut.ac.th

4) ประวัติการศึกษา

- 2002-2009 **Doctor of Philosophy (Anatomy)**
Mahidol University, Thailand
- 1999-2002 **Master of Science (Anatomy)**
Khon Kaen University, Thailand
- 1993-1997 **Bachelor of Science (Physical Therapy)**
Khon Kaen University, Thailand

5) สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

- 1) กายภาพบำบัด
- 2) ประสาทวิทยาการคิดเชื่อและการรักษา
- 3) พืชวิทยา

6) งานวิจัยที่ได้รับการเผยแพร่

Saowakon N., Ngermsoungnern P., Watcharavitoon P., Ngermsoungnern A., Kosanlavit R. Formaldehyde exposure in gross anatomy laboratory of Suranaree University of Technology: a comparison of area and personal sampling. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2015; 22(23); 19002-12.

Srimaroeng C., Ontawong A., **Saowakon N.**, Vivithanaporn P., Pongchaidecha A., Amornlerdpison D., Soodvilai S., Chatsudthipong V. Antidiabetic and renoprotective effects of *Cladophora glomerata* Kützing extract in experimental type 2 diabetic rats: a potential nutraceutical product for diabetic nephropathy. *J Diabetes Res.* 2015(4); 320167.

Ontawong A., **Saowakon N.**, Vivithanaporn P., Pongchaidecha A., Lailerd N., Amornlerdpison D., Lungkaphin A., Srimaroeng C. Antioxidant and Renoprotective Effects of *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing Extract in Experimental Type 2 Diabetic Rats. *Biomed Res Int.* 2013; 1-15.

Saowakon N., Lorsuwannarat N., Changklungmoa N., Wanichanon C., Sobhon P. *Paramphistomum cervi*: the in vitro effect of plumbagin on motility, survival and tegument structure. *Exp Parasitol.* 2013; 133(2); 179-86.

Lorsuwannarat N., **Saowakon N.**, Ramasoota P., Wanichanon C., Sobhon P. The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.* 2013; 133(1); 18-27.

Saowakon N., Tansatit T., Wanichanon C., Chanakul W., Reutrakul V., Sobhon P. *Fasciola gigantica*: anthelmintic effect of the aqueous extract of *Artocarpus lakoocha*. *Exp Parasitol.* 2009; 122(4); 289-98.