

K 45301204 : สาขาวิชาเคมีศึกษา

คำสำคัญ : GnRH / Immunocytochemistry/ *Macrobrachium rosenbergii*/ Testicular Index

ศุภาวดี ศรีทาหาญ : การตรวจหา GnRH-LIKE NEUROPEPTIDE ในกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*)

โดยวิธี IMMUNOCYTOCHEMISTRY (IMMUNOCYTOCHEMICAL DETECTION OF GnRH-LIKE NEUROPEPTIDE IN RIVER PRAWN (*Macrobrachium rosenbergii*)) อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ : รศ. ดร. ธนิต ผิวมัน, 101 หน้า.

ISBN 974-11-6232-4

สามารถตรวจพบเพปไทด์คล้าย GnRH ได้ที่ระบบประสาทส่วนกลางของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ด้วยเทคนิค Immunocytochemistry โดยใช้ rabbit anti-mGnRH เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ ตามด้วย goat anti-rabbit IgG ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง Cyanine (Cy-3) เป็นแอนติบอดีทุติยภูมิ การศึกษาโดย Laser Confocal Microscope พบเซลล์ประสาทที่ผลิตเพปไทด์คล้าย GnRH อยู่กันเป็นกลุ่มบริเวณด้านบนของก้านคา การย้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วย DAPI ทำให้เห็นนิวเคลียสในเซลล์บดชัดเจนว่าล้อมรอบด้วยเพปไทด์คล้าย GnRH ซึ่งปรากฏมีอยู่ทั่วเซลล์ต่อเนื่องถึงโปรเซสของเซลล์ ประชากรของเซลล์ประสาทที่ผลิตเพปไทด์คล้าย GnRH มีอยู่น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับประชากรเซลล์โดยรวมที่ปรากฏให้เห็นจากการย้อมด้วย DAPI การฉีดกุ้งก้ามกรามด้วยบูเซอร์เรวินซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ GnRH ให้กับกุ้งก้ามกรามเพศผู้เป็นเวลา 3, 5, 7, 9, 11 และ 13 วัน เพื่อดูผลที่มีต่อ Testicular Index และจำนวนสเปิร์ม แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วย paired samples T-Test ที่ $p < 0.05$ พบว่ากุ้งกลุ่มที่ฉีดอนุพันธ์ของ GnRH ทุกกลุ่มมีค่า Testicular Index มากกว่ากลุ่มควบคุม แต่ความแตกต่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ค่า Testicular Index ของกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ฉีดอนุพันธ์ของ GnRH ซึ่งทำการเลี้ยงไว้เป็นระยะเวลา 3, 5, 7, 9, 11 และ 13 วัน เป็นดังนี้ 0.0974 ± 0.0412 , 0.0963 ± 0.0219 , 0.1713 ± 0.1287 , 0.1523 ± 0.0772 , 0.1651 ± 0.0415 , 0.0675 ± 0.0483 และ 0.1458 ± 0.1274 , 0.1631 ± 0.0720 , 0.1727 ± 0.0987 , 0.1857 ± 0.0371 , 0.2103 ± 0.0707 , 0.0837 ± 0.0785 ตามลำดับ กุ้งก้ามกรามกลุ่มที่ฉีดอนุพันธ์ของ GnRH ทุกกลุ่มมีจำนวนสเปิร์มมากกว่ากลุ่มควบคุม โดยเฉพาะวันที่ 13 ของการฉีดอนุพันธ์ของ GnRH กุ้งก้ามกรามกลุ่มที่ฉีดอนุพันธ์ของ GnRH มีจำนวนสเปิร์มมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ค่าจำนวนสเปิร์มของกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ฉีดอนุพันธ์ของ GnRH ซึ่งทำการเลี้ยงไว้เป็นระยะเวลา 3, 5, 7, 9, 11 และ 13 วัน เป็นดังนี้ $9.5 \times 10^4 \pm 8.9 \times 10^4$, $4 \times 10^5 \pm 2.5 \times 10^5$, $8.3 \times 10^5 \pm 1.8 \times 10^5$, $5.4 \times 10^5 \pm 2.8 \times 10^5$, $5.4 \times 10^5 \pm 3.2 \times 10^5$, $4.4 \times 10^5 \pm 9.2 \times 10^4$ และ $3.6 \times 10^5 \pm 1.5 \times 10^5$, $6.7 \times 10^5 \pm 4.7 \times 10^5$, $1.2 \times 10^6 \pm 8.7 \times 10^5$, $7.7 \times 10^5 \pm 6.3 \times 10^5$, $1.1 \times 10^6 \pm 5.3 \times 10^5$, $7.7 \times 10^5 \pm 8.9 \times 10^4$ cells/mL/g ตามลำดับ จากการศึกษาผลของ GnRH ต่อการสร้างคาร์โบทีนออกไซด์ในเปลือกกุ้งก้ามกรามพบว่า ปริมาณคาร์โบทีนออกไซด์ที่พบในเปลือกกุ้งก้ามกรามกลุ่มควบคุมมีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มที่ฉีดอนุพันธ์ของ GnRH โดยมีค่าเป็น 0.1700 ± 0.0293 และ 0.1610 ± 0.0756 $\mu\text{mol/gram of shell weight}$ ตามลำดับ นอกจากนี้ได้ตรวจพบเพปไทด์คล้าย GnRH บริเวณหนวด (antennae) ของไรแดง โดยพบเซลล์สร้างเพปไทด์คล้าย GnRH นี้รวมกันอยู่เป็นกลุ่ม และสร้างเพปไทด์คล้าย GnRH นี้มากที่ cell body จึงทำการศึกษาผลของ GnRH และ Testosterone ต่อการสังเคราะห์ Glycosaminoglycans ในไรแดงโดยใช้ $[S^{35}]\text{SO}_4^{2-}$ เป็น Tracer แล้วตรวจวัดปริมาณรังสีของเซลล์ในหน่วย count per minute (cpm) ด้วยเครื่อง Liquid Scintillation Counter พบว่าไรแดงที่ได้รับฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิดมีการสังเคราะห์ Glycosaminoglycans มากกว่ากลุ่มควบคุม

K 45301204 : MAJOR : CHEMICAL STUDIES

KEY WORD : GnRH / Immunocytochemistry/ *Macrobrachium rosenbergii*/ Testicular Index

SUPAWADEE SRITHAHAN : IMMUNOCYTOCHEMICAL DETECTION OF GnRH-LIKE NEUROPEPTIDE IN RIVER PRAWN (*Macrobrachium rosenbergii*). THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. THANIT PEWNIM, Ph.D. 101 pp.
ISBN 974-11-6232-4

Immunocytochemical technique was used to detect GnRH-like peptide in river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). GnRH-like peptide was shown to be present in the central nervous system (CNS) of the prawn. The method used rabbit anti-mGnRH as the primary antibody then followed with goat anti-rabbit IgG labeled with cyanine (Cy-3) as the secondary antibody. Neurosecretory cells producing GnRH-like peptide were observed under laser confocal microscope and found clustered in a small group above each eyestalk of the prawn. DAPI staining of cell nuclei revealed that GnRH-like peptide producing cells had prominent nuclei in the cell bodies. GnRH-like peptides were present throughout cell bodies including cell processes. As revealed by DAPI staining, population of GnRH-like peptide producing cells was extremely low compared to population of other cell types present in the eyes. Injections of a GnRH analogue, buserelin, to male river prawns were carried out for 3, 5, 7, 9, 11 and 13 days to assess the effect of GnRH on testicular index and sperm counts. Results were analyzed statistically using paired samples T-Test at $p < 0.05$. It was found that all group of prawns receiving GnRH analogue had higher testicular index than the control groups. However, the differences were not statistically significant ($p > 0.05$). The values of testicular index of the control prawns and the GnRH analogue-treated prawns from the 3, 5, 7, 9, 11 and 13 day groups were 0.0974 ± 0.0412 , 0.0963 ± 0.0219 , 0.1713 ± 0.1287 , 0.1523 ± 0.0772 , 0.1651 ± 0.0415 , 0.0675 ± 0.0483 and 0.1458 ± 0.1274 , 0.1631 ± 0.0720 , 0.1727 ± 0.0987 , 0.1857 ± 0.0371 , 0.2103 ± 0.0707 , 0.0837 ± 0.0785 , respectively. All group of prawns receiving GnRH analogue also showed higher sperm counts than the control groups. However, only the sperm counts of the 13 day group were statistically sig. ($p < 0.05$). The values of sperm counts of the control prawns and the GnRH analogue-treated prawns from the 3, 5, 7, 9, 11 and 13 day groups were $9.5 \times 10^4 \pm 8.9 \times 10^4$, $4 \times 10^5 \pm 2.5 \times 10^5$, $8.3 \times 10^5 \pm 1.8 \times 10^5$, $5.4 \times 10^5 \pm 2.8 \times 10^5$, $5.4 \times 10^5 \pm 3.2 \times 10^5$, $4.4 \times 10^5 \pm 9.2 \times 10^4$ and $3.6 \times 10^5 \pm 1.5 \times 10^5$, $6.7 \times 10^5 \pm 4.7 \times 10^5$, $1.2 \times 10^6 \pm 8.7 \times 10^5$, $7.7 \times 10^5 \pm 6.3 \times 10^5$, $1.1 \times 10^6 \pm 5.3 \times 10^5$, $7.7 \times 10^5 \pm 8.9 \times 10^4$ cells/mL/g, respectively. Effect of the GnRH analogue on carotenoid levels was assessed. It was found that the level of carotenoid in shell of prawns from the control group was similar to the level of carotenoid from the GnRH analogue-treated group. The carotenoid levels being 0.1700 ± 0.0293 and 0.1610 ± 0.0756 $\mu\text{mol/g}$ shell weight, respectively. GnRH-like peptide was also detected in water fleas (*Moina sp.*). GnRH-like peptide producing cells were found clustered as a group in each antenna. GnRH-like peptide was found filling up most of the cell bodies. Effect of GnRH analogue and testosterone on the synthesis of glycosaminoglycans in water fleas was carried out using $[S^{35}] \text{SO}_4^{2-}$ as a tracer. Radioactivity of $[S^{35}] \text{SO}_4^{2-}$ in cpm was measured by liquid scintillation counter. It was found that both GnRH analogue and testosterone increased the incorporation of $[S^{35}] \text{SO}_4^{2-}$ into glycosaminoglycans in *Moina sp.*.