บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาผลของสารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunostimulants) ต่อการแสดงออกของยีน Ribosomal Protein L26 (RPL26)

จากการศึกษาของ Segade และคณะ (1996) พบยีน RPL26 มีการแสดงออกสูงขึ้น ในการตอบสนองต่อกระบวนการกระตุ้นแมคโครฟาจ (macrophage activation) ของ mouse macrophage cell line เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย silica, LPS และ IFNγ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Larade และคณะ (2001) พบว่ายีน RPL26 จาก hepatopancrease ของ marine snail (*L. littorea)* มีการแสดงออกสูงขึ้น เมื่อได้รับสภาวะที่ขาดออกซิเจน นอกจากนี้พบว่ายีน RPL26 ใน *P. japonicus* มีการแสดงออกอย่างต่อเนื่อง ระหว่างการลอกคราบ (Watanabe, 1998) ในสภาวะที่เกิดการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ก็พบการแสดงออกของยีน RPL26ในเลือดที่สูงขึ้น (เอื้อมนัส, 2545) เช่นเดียวกับที่พบในเลือดของกุ้งคุรุมา (*P. japonicus*) ที่ติดเชื้อ WSSV (Rojtinakorn, et. al., 2002) การศึกษาในครั้งนี้ พบว่าการแสดงออกของยีน RPL26 จากเลือด (hemolymph) ของกุ้งกุลาดำ สามารถชักนำได้จากการฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่อ่อนกำลัง (inactivated WSSV) เชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่อ่อนกำลัง (IVH) และสาร fucoidan เนื่องจากสารทั้ง 3 ชนิดนี้มีรายงานถึงความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อ WSSV (Namikoshi, *et. al .*, 2003; Takahashi, *et. al.*, 2000; Chotigeat, *et. al.*, 2003) โดยจากการศึกษาในครั้งนี้ไม่พบการแสดงออกของยีน RPL26 ใน hepatopancrease และ lymphoid organ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า RPL26 น่าจะหลั่งมาจากเซลล์เม็ดเลือด ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ non-specific immune response ซึ่งสามารถถูกกระตุ้นได้โดยสิ่งกระตุ้นต่างๆ ตัวอย่างเช่น inactivated WSSV, IVH และสาร fucoidan โดยการกระตุ้นการแสดงออกของ RPL26 โดย inactivated WSSV, IVH และสาร fucoidan สามารถพบได้ตั้งแต่ที่ 6 ชั่วโมง หลังได้รับการกระตุ้น และมีการแสดงออกที่สูงที่สุดที่ 72 ชั่วโมง เมื่อกระตุ้นด้วย IVH 1 สัปดาห์ เมื่อกระตุ้นด้วย inactivated WSSV และ 2 สัปดาห์ เมื่อกระตุ้นด้วยสาร fucoidan และไม่พบการแสดงออกของยีน RPL26 จากการกระตุ้นด้วยสารทั้ง 3 ชนิด หลังได้รับการกระตุ้นผ่านไป 5 สัปดาห์ ซึ่งเมื่อทดสอบได้สารที่มีคุณสมบัติในการชักนำการแสดงออกของยีน RPL26 จึงนำสารดังกล่าวไปทดสอบถึงความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อ WSSV ในลำดับต่อไป

4.2 การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสาร IVH โดยวิธีการฉีด

จากการศึกษาการกระตุ้นการแสดงออกของยีน RPL26 ในข้างต้นพบว่า IVH มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างของ RPL26 ได้อย่างรวดเร็วและปริมาณสูง ประกอบกับสาร IVH เตรียมได้ง่าย และมีต้นทุนต่ำในการเตรียมน้อยกว่าสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน inactivated WSSV และ fucoidan ดังนั้นจึงได้เลือกสาร IVH ในการเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันสำหรับป้องกันการติดเชื้อ WSSV โดยจะทำการทดสอบถึงความเป็นไปได้ในการเกิด cross immunitics ระหว่าง *V. harveyi* และ WSSV โดยในขั้นแรกได้ทำการทดลองให้สาร IVH โดยวิธีการฉีดเข้าสู่กล้ามเนื้อเพื่อให้กุ้งได้รับสาร IVH ต่อกุ้งแต่ละตัวในปริมาณที่แน่นอน (0.3 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) ซึ่งระหว่างการทดลองได้ทำการเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งที่ 72 ชั่วโมงหลังได้รับการฉีดด้วยสาร IVH โดยพบการแสดงออกของยีน RPL26 ที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม และเมื่อกุ้งกุลาดำได้รับเชื้อ WSSV พบว่าสาร IVH มีคุณสมบัติเพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดของกุ้งจากเชื้อ WSSV มากขึ้น โดยมีค่า RPS เป็น 50% เมื่อได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ความเข้มข้น $7x10^{-6}$ ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น และมีค่า RPS เป็น 46% เมื่อได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ความเข้มข้น $9x10^{-6}$ ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น ซึ่งเห็นได้ว่าอัตราการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำสอดคล้องกับปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ WSSV ที่ได้รับ

4.3 การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสาร IVH โดยวิธีการกิน

แม้ว่าการให้วัคซีนโดยวิธีการฉีดจะทำให้สามารถควบคุมปริมาณสารที่ตัวตัวกุ้งได้แน่นอน แต่ก่อให้เกิดความเครียดต่อตัวกุ้ง และนำไปปฏิบัติได้ยากในสภาวะการเลี้ยงในระบบฟาร์มจึงได้ทำการทดลองให้สาร IVH โดยการผสมกับอาหารกุ้ง ให้กุ้งได้รับสาร IVH โดยวิธีกิน ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระบบฟาร์มได้สะดวกขึ้น โดยมีการรายงานจากการทดลองของ Itami และคณะ (1991) พบว่าเมื่อนำเชื้อ *V. harveyi* ที่ฆ่าด้วยฟอร์มาลิน 0.5% มาผสมอาหารสำหรับลูกกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ปริมาณ 0.05, 0.5 และ 5% ของน้ำหนักอาหาร ทำให้อัตราการมีชีวิตรอดของลูกกุ้งกุลาดำระยะ zoea สูงกว่ากลุ่มควบคุม การทดลองในครั้งนี้จึงได้นำสาร IVH ผสมอาหารกุ้งในปริมาณ 0.375%, 0.5% และ 0.625 % ของน้ำหนักอาหาร หรือคิดเป็นปริมาณ 225 300 และ 375 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ตามลำดับ โดยให้อาหารดังกล่าวตลอดการทดลองและมีการให้เชื้อไวรัส WSSV ในวันที่ 3 (72 ชั่วโมง) หลังได้รับอาหารมื้อแรกและมีการสุ่มมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน RPL26 ในเลือดเช่นกัน พบว่ากลุ่มซึ่งได้รับสาร IVH ปริมาณ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน มีอัตราการมีชีวิตรอดสูงสุดโดยมีค่า RPS เป็น 75% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการได้รับสาร IVH ซึ่งมีคุณสมบัติกระตุ้นการแสดงออกของยีน RPL26 ในปริมาณที่เหมาะสมสามารถช่วยในการป้องกันการติดเชื้อ WSSV ได้

นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบการรับเชื้อซ้ำของกลุ่มซึ่งได้รับอาหารผสมสาร IVH ปริมาณ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ในกลุ่มซึ่งได้รับเชื้อ 1 ครั้ง และ 2 ครั้ง โดยมีค่า RPS เป็น 60% และ 20% ตามลำดับ หรือคิดเป็น 33% ของกุ้งที่รอดตายจากการติดเชื้อครั้งแรก ซึ่งระยะห่างจากการได้รับเชื้อในกลุ่มที่รับเชื้อ 2 ครั้งเป็น 12 วัน โดยจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ จรีพร (2546) พบว่ากุ้งกุลาดำซึ่งรอดตายจากการติดเชื้อ WSSV ในครั้งแรกสามารถต้านทานต่อการติดเชื้อ WSSV ซ้ำได้ดีที่สุดหลังได้รับเชื้อครั้งแรก 43 วัน ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถของสาร IVH ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเพื่อช่วยในการกำจัดเชื้อ WSSV ออกจากร่างกายในระยะเวลาอันรวดเร็วและสามารถต้านทานต่อการติดเชื้อซ้ำได้

4.4 ความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำเมื่อได้รับโปรตีนลูกผสม RPL 26

จากการศึกษาที่ผ่านมาชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน กับการแสดงออกของยีน RPL26 และความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อ WSSV ในการศึกษาขั้นต่อไปจึงมุ่งประเด็นไปที่คุณสมบัติของโปรตีน RPL26 ต่อความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันการติดเชื้อ WSSV โดยได้ทำการเตรียมโปรตีนลูกผสม RPL26 ในลักษณะที่เชื่อมกับส่วนปลายของโปรตีน GST (GST-RPL26) ซึ่งการศึกษาการใช้โปรตีนลูกผสมส่วนใหญ่จะใช้โปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบของไวรัส โดยใช้ปริมาณอยู่ที่ 4 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักตัวในกุ้งกุลาดำ (*P. monodon)* (Witteveldt, *et. al.*, 2004) และ 100 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักตัวในกุ้งคุรุมา (*P. japonicus*) (Namikoshi, et al., 2004) การทดลองในครั้งนี้จึงได้ใช้โปรตีนลูกผสม GST-RPL26 ในปริมาณ 4, 16 และ 32 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักตัว โดยมีโปรตีน GST ในปริมาณที่เท่ากันเป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งพบว่าเมื่อทำการฉีดโปรตีน GST-RPL26 ในปริมาณ 16 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักตัว ทำให้กุ้งกุลาดำมีอัตราการมีชีวิตรอดจากเชื้อ WSSV สูงสุดหลังได้รับโปรตีนดังกล่าวไป 3 ชั่วโมง โดยมีค่า RPS เป็น 64% เนื่องจากปริมาณโปรตีนที่ต่ำ (4 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักตัว) อาจไม่เพียงพอในการกระตุ้น และปริมาณโปรตีนที่สูงเกิน (32 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักตัว) อาจเป็นพิษต่อตัวกุ้งได้ แต่เนื่องด้วยโปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีนที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เนื่องจากหากใช้โปรตีนที่บริสุทธิ์ต้องใช้ในปริมาณที่สูงมาก ดังนั้นหากกุ้งได้รับโปรตีนที่บริสุทธิ์โดยตรงอาจใช้ปริมาณในการกระตุ้นให้เกิดผลที่ดีที่สุดแตกต่างไปจากการทดลองนี้

4.5 การศึกษาความว่องไวของฟาโกไซโตซิส (Phagocytosis activity) ของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำเมื่อได้รับโปรตีนลูกผสม RPL26 ที่ปริมาณต่าง ๆ

จากการศึกษาของ Segade และคณะ (1996) พบว่าเมื่อทำการทดลองเลี้ยงเซลล์ macrophage-like cell line RAW 264.7 โดยมี LPS, IFNγ และซิลิกาซึ่งเป็นสิ่งแปลกปลอม พบว่ามีการแสดงออกของยีน RPL26 มากกว่าสภาวะปกติ ซึ่งคาดว่าโปรตีนดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของ macrophage ในการเกิดกระบวนการ phagocytosis เพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอม การศึกษาในครั้งนี้จึงได้ทำการเตรียมโปรตีนลูกผสม RPL26 ในลักษณะที่เชื่อมกับส่วนปลายของโปรตีน GST (GST-RPL26) เพื่อความสะดวกในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ โดยได้นำโปรตีนลูกผสม GST-RPL26 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วมาทดสอบคุณสมบัติในการกระตุ้นการเกิดกระบวนการ phagocytosis ของเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ ด้วยการบ่มโปรตีนกับเซลล์เม็ดเลือดและเม็ดบีดเรืองแสง โดยใช้โปรตีน GST-RPL26 ปริมาณ 0.01 ไมโครกรัม 0.05 ไมโครกรัม และ 0.10 ไมโครกรัม และใช้โปรตีน GST ในปริมาณที่เท่ากันและเซลล์เม็ดเลือดปกติเป็นกลุ่มควบคุม เนื่องจากการทดลองก่อนหน้านี้ได้ทดลองใช้โปรตีนปริมาณ 0.30 ไมโครกรัม 0.50 ไมโครกรัม และ 1.0 ไมโครกรัม พบว่าทำให้เซลล์เม็ดเลือดของกุ้งแตกเป็นส่วนใหญ่ จึงลดปริมาณลงเป็นปริมาณดังกล่าว โดยพบว่าโปรตีน GST-RPL26 มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ phagocytosis ของเซลล์ที่สูงขึ้นโดยพบว่าโปรตีนปริมาณ 0.01 ไมโครกรัม มีความสามารถในการกระตุ้นได้สูงสุด โดยการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน RPL26 กับการกระตุ้นการเกิดกระบวนการ phagocytosis ของเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำในระดับหนึ่ง แต่สำหรับกลไกที่แท้จริงของการเกิดการกระตุ้นดังกล่าว รวมทั้งปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกลไกนี้จำเป็นที่จะต้องมีการศึกษากันต่อไป