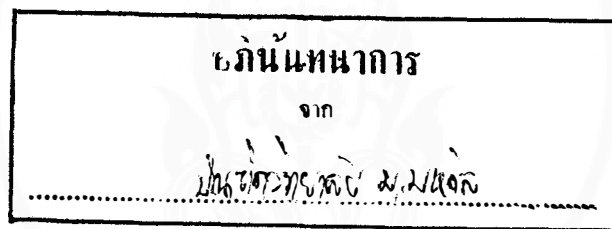




11 DEC 1991

CHARACTERISTICS AND BIORHYTHM OF L-[³H] GLUTAMATE BINDING
SITES IN THE OPTIC LOBE OF THE GIANT FRESHWATER PRAWN,
Macrobrachium rosenbergii de Man

PISAMAI PRATUMTAN



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
(ANATOMY)

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1991

Copyright by Mahidol University

17649

ชื่อวิทยานิพนธ์

คุณสมบัติและการเปลี่ยนแปลงปริมาณการจับของ L-[³H]
glutamate ต่อสมองส่วนก้านตากลุ่มของกิ้งก่ามกราม
Macrobrachium rosenbergii de Man

ผู้วิจัย

พิศมัย ประทุมทาน

ปริญญา

ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

บุญเสริม วิทยชานาญกุล, M.D, Ph. D

ปิยะรัตน์ กลางกัลยา, Ph. D

เรื่อน สมณะ, M.D., Ph. D

วันที่สำเร็จการศึกษา

12 มีนาคม พ.ศ. 2534

บทคัดย่อ

ปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับสารสื่อประสาท ที่ควบคุมการทำงานของเซลล์ประสาทที่ทำหน้าที่หลั่งฮอร์โมน ในก้านตากลุ่มอย่างกว้างขวาง อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดถึงการควบคุมการทำงานดังกล่าว รายงานที่ได้นำเสนอนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกเกี่ยวกับการจับของ L-[³H] glutamate ต่อ crude membrane ที่เตรียมจากก้านตากลุ่มซึ่งประกอบด้วย lamina ganglionaris, medulla externa, medulla interna และ medulla terminalis โดยตัดก้านตากลุ่มจากกิ้งก่าเป็นๆ ที่ถูกทำให้สลบด้วยการแช่น้ำแข็ง นาน 20-30 นาที และทำการแยกโดยการบด และปั่นเป็นชั้นตอนจนกระทั่งได้ crude membrane นำมาผสมกับ L-[³H] glutamate ที่ความเข้มข้น 100 nM ที่ 37°C เป็นเวลา 60 นาที ได้แยกการจับที่ไม่เฉพาะเจาะจงออกโดยวิธีใส่ L-glutamate ที่ไม่เป็นกัมมันตรังสีจำนวนมากเกินพอ ผลการทดลองพบว่า มีการจับของ L-[³H] glutamate ที่เฉพาะเจาะจง โดยมีค่าคงที่ในการแยกตัว (K_d) 205 nM และปริมาณการจับสูงสุด (B_{max}) 2.04 nmol /mg protein จากลักษณะแบบแผนของการจับแสดงว่ามีการจับของกลูตาเมตแบบชนิดเดียว การศึกษาโดยใช้สารต่อต้านการจับชนิดต่างๆ พร้อมทั้งคำนวณค่า IC_{50} ของสารแต่ละตัวทำให้ทราบชนิดของการจับว่าเป็นแบบ metabotropic subtype

ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของไอออนชนิดต่างๆ อาทิ Na^+ , K^+ , Ca^{++} , NH_4^+ , Cl^- , NO_3^- และ CH_3COO^- ต่อการจับของกลูตาเมต โดยการเพิ่มความเข้มข้นของไอออน 5 ถึง 80 mM พบว่า Cl^- ที่ความเข้มข้น 5-40 mM สามารถเพิ่มการจับได้ 1.5 เท่าของการจับปกติ ที่ไม่เติม Cl^- และการจับที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากการเติม Cl^-

นี้ถูกทำให้ลดลงได้โดยการเติม Na^+ และ K^+ นอกจากนี้การจับของกลูตาเมตที่มี Cl^- หรือไม่มี Cl^- สามารถทำให้ลดลงได้โดยการเติม Ca^{++} การศึกษาอิทธิพลของอออนชนิดต่างๆทำให้เชื่อได้ว่าการจับของกลูตาเมตที่ก้านตาเป็นชนิด metabotropic subtype

การศึกษาค่า B_{max} และ K_d ตลอดระยะต่างๆของการลอกคราบทำให้ทราบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของ B_{max} ในระยะต่างๆของการลอกคราบ โดยค่า B_{max} ในระยะก่อนการลอกคราบ (premolt) มีค่าสูงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับระยะหลังลอกคราบ (postmolt) ในขณะที่ค่า K_d ไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะของการลอกคราบ

การศึกษาค่า B_{max} และ K_d ในกิ้งที่ตัดตาและไม่ตัดตา พบว่าในช่วงเวลา 12.00 น. และ 24.00 น. ค่า K_d และ B_{max} ไม่แตกต่างกันทั้งในกิ้งที่ตัดตาและไม่ตัดตา แต่ในช่วงเวลา 24.00 น. B_{max} ของกิ้งที่ตัดตาต่ำกว่ากิ้งที่ไม่ตัดตาอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจสรุปได้ว่า การเปลี่ยนแปลงปริมาณการจับของกลูตาเมตในช่วงเวลา 24.00 น. มีแนวโน้มว่าจะเกิดขึ้นได้ชัดเจนกว่าในช่วงเวลา 12.00 น.

การศึกษาการจับของกลูตาเมตที่ก้านตาก็ และการเปลี่ยนแปลงปริมาณการจับในระยะต่างๆของการลอกคราบ รวมทั้งการลดลงของการจับในกิ้งตัดตานับเป็นข้อมูลเบื้องต้น ที่สรุปได้ว่ากลูตาเมต อาจมีบทบาทเป็นสารสื่อประสาท ที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและ metabolism ต่างๆ ในระหว่างการลอกคราบ

fugation. The membrane suspension was incubated with 10-1,000 nM of L-[³H] glutamate at 37°C for 60 minutes. Tissue-dependent and time-course studies were determined. The binding saturation curve revealed a single binding site with a dissociation equilibrium constant (K_d) of 205 +/- 49 (SEM) nM and maximum number of binding sites (B_{max}) of 2.04 +/- 0.71 (SEM) nmol/mg protein. To determine the subtype of glutamate receptors, competitive study was carried out and IC_{50} of several glutamate agonists and antagonists were determined. The results suggested a metabotropic subtype of glutamate binding .

Ion dependency study was performed by determining the effects of various ions Na^+ , K^+ , Ca^{++} , NH_4^+ , Cl^- , NO_3^- and CH_3COO^- on the binding. Increasing concentrations of Cl^- from 0 to 40 mM in the reaction mixture enhanced the binding to 1.5 fold of the basal level. The enhancement was abolished by adding Na^+ and K^+ in the reaction mixture. Sodium ions, at 80 mM, inhibited the basal binding. Calcium also eliminated the Cl^- -stimulated binding and suppressed the basal binding. The ion dependency study also support that the glutamate binding was the metabotropic subtype. The B_{max} and K_d were determined during molting cycle. The B_{max} was increased gradually from postmolt to intermolt and to premolt stages. The premolt B_{max} was significantly higher than that of the postmolt stages. The K_d in the three stages did not differ. The result reveals an existence of the rhythm of specific L-[³H]

glutamate binding in the optic lobe during molting cycle.

The B_{\max} and K_d of specific L-[^3H] glutamate binding were determined during daytime and nighttime in intact and unilateral eyestalk-ablated prawns. In the intact prawns, the B_{\max} and K_d determined at 12:00 hr did not differ from those determined at 24:00 hr. Similar results were found in the unilateral eyestalk-ablated prawns. When the 24:00 hr-level of B_{\max} between the intact and eyestalk-ablated prawns were compared, that of the latter was significantly lower than the former. The suppression of nighttime B_{\max} in unilateral eyestalk-ablated prawns was thus demonstrated.

Pharmacological evidence presented in the present study suggests that the glutamate in the optic lobe of M. rosenbergii that may act as the neurotransmitter and, probably, concern physiological changes occurring during molting cycle.