บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการวิเคราะห์โปรตีนในต่อมน้ำลายยุงลายบ้าน, ยุงลายสวน และยุงแม่ไก่โดยวิธีอิเลคโตรโฟริซิสแบบเอสดีเอสเพจ สามารถสรุปได้ดังนี้

1. ต่อมน้ำลายยุงเพศผู้และเพศเมียในยุงลายบ้าน, ยุงลายสวน และยุงแม่ไก่ จะสังเคราะห์โปรตีนแตกต่างกันโดยต่อมน้ำลายยุงเพศเมียจะสังเคราะห์โปรตีนได้มากกว่าต่อมน้ำลายยุงเพศผู้ และมีโปรตีนที่จำเพาะซึ่งอาจมีบทบาทเกี่ยวข้องในการดูดกินเลือดของยุง

2. ต่อมน้ำลายยุงเพศผู้และเพศเมียในยุงลายบ้าน, ยุงลายสวน และยุงแม่ไก่ ที่มีอายุแตกต่างกัน ทั้งที่กินน้ำตาลและกินเลือดเป็นอาหารจะสังเคราะห์โปรตีนได้ไม่แตกต่างกัน แสดงว่า โปรตีนในต่อมน้ำลายยุงอายุ 1 วัน 3 วัน และ 5 วัน ของยุงทั้ง 2 เพศที่กินน้ำตาลเป็นอาหารจะเริ่มสะสมตั้งแต่วันแรกที่เป็นตัวเต็มวัย และสามารถตรวจพบได้ตลอดระยะเวลา 5 วันที่ยุงเป็นตัวเต็มวัย และเป็นไปได้ที่ไม่มีโปรตีนจำเพาะที่สังเคราะห์ขึ้นจากการชักนำโดยเลือด แต่โปรตีนในต่อมน้ำลายยุงเพศเมียที่กินเลือดเป็นอาหารจะถูกใช้ไปในระหว่างที่ยุงกินเลือดและจะถูกสังเคราะห์ขึ้นทดแทนโปรตีนที่สูญเสียไป

3. ต่อมน้ำลายยุงลายบ้านและยุงลายสวนจะสังเคราะห์โปรตีนที่มีรูปแบบคล้ายกันซึ่งจะแตกต่างจากต่อมน้ำลายยุงแม่ไก่ กล่าวคือรูปแบบโปรตีนในต่อมน้ำลายของยุงลายบ้านและยุงลายสวนนั้นเหมือนกันที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 97, 89, 55, 37, 30, 24 และ 18 kDa และรูปแบบโปรตีนของต่อมน้ำลายยุงแม่ไก่ พบว่า มีประมาณ 9 แถบโปรตีนหลักซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 68, 65, 60, 55, 40, 30, 28, 21 และ 15 kDa โดยแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 21 kDa จะพบที่บริเวณส่วนปลายของกลีบด้านข้างของต่อมน้ำลายยุงเพศเมียเท่านั้น ซึ่งแสดงว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 21 kDa นี้มีบทบาทสำคัญในการดูดกินเลือดของยุง จากความแตกต่างนี้อาจแสดงถึงความเป็นพาหะที่ต่างกันในการถ่ายทอดโรค

อภิปรายผลการวิจัย

มีการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะโครงสร้างและองค์ประกอบของต่อมน้ำลายยุงหลายชนิด[8] ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งมีความแตกต่างกันของรูปร่างและขนาดต่อมน้ำลาย คือ ต่อมน้ำลายยุงเพศผู้จะมีขนาดเล็กกว่าต่อมน้ำลายยุงเพศเมียและประกอบด้วย 3 กลีบที่เหมือนกัน ในขณะที่ต่อมน้ำลายยุงเพศเมียประกอบด้วย 2 กลีบด้านข้างที่เหมือนกัน และ 1 กลีบกลางที่สั้นและกว้างกว่า[51,52] แต่อย่างไรก็ตามยังมีการพิจารณาถึงความหลากหลายของรูปร่างต่อมน้ำลายในยุงชนิดเดียวกัน โดยศึกษาในยุงกลุ่ม Culicines พบว่าต่อมน้ำลายมี 1 ถึง 6 กลีบ และในยุง *Anopheles quadrimaculatus* จากการสังเกตลักษณะและขนาดของต่อมน้ำลายยุงทั้ง 3 ชนิดในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าต่อมน้ำลายมีรูปแบบเหมือนกับที่มีการศึกษาในยุงชนิดอื่นๆ สำหรับยุงแม่ไก่ต่อมน้ำลายจะมีขนาดใหญ่กว่ายุงลายบ้านและยุงลายสวนประมาณ 2 เท่า ซึ่งอาจเป็นไปตามขนาดของตัวยุงแม่ไก่ที่มีขนาดใหญ่กว่ายุงลายบ้านและยุงลายสวน

รูปแบบโปรตีนของต่อมน้ำลายยุงลายบ้านเพศผู้และเพศเมียที่ปรากฏ จากการวิเคราะห์โปรตีนในต่อมน้ำลายยุงโดยวิธี SDS-PAGE นั้นมีความแตกต่างกันซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา[23,24] ที่ว่าต่อมน้ำลายยุงเพศผู้จะผลิตโปรตีนเป็นจำนวนประมาณ 10 % ของที่พบในต่อมของยุงเพศเมีย สำหรับแถบโปรตีนหลักที่พบในต่อมน้ำลายยุงเพศผู้และเพศเมียที่กินน้ำตาลเป็นอาหารซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 97 และ 68 kDa น่าจะเป็น α-amylase และ α-glucosidase ตามลำดับ[29,30] ส่วนแถบโปรตีนในต่อมน้ำลายยุงเพศเมียที่กินเลือด ที่พบมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 68 kDa ซึ่งอาจจะเป็นโปรตีน Apyrase[34] และโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 37 kDa น่าจะเป็นโปรตีนที่เป็นผลิตภัณฑ์จากยีน D7[21] ซึ่งจะถูกสังเคราะห์ขึ้นในยุงตัวเต็มวัยเพศเมียในกลีบกลางและส่วนปลายของกลีบด้านข้าง ซึ่งจะพบเฉพาะในต่อมน้ำลายยุงเพศเมียเท่านั้นและยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการกินเลือดของยุง

สำหรับยุงลายสวน แถบโปรตีนหลักที่พบในต่อมน้ำลายยุงเพศผู้และเพศเมียซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 67 kDa อาจจะเป็นโปรตีน α-glucosidase ซึ่งจะถูกสังเคราะห์ขึ้นในยุงตัวเต็มวัยและสะสมในบริเวณส่วนต้นของกลีบด้านข้างของยุงเพศเมียและในต่อมน้ำลายยุงเพศผู้[37] ดังที่มีรายงาน ส่วนโปรตีนที่พบในต่อมน้ำลายยุงเพศเมียที่กินเลือด ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 61 kDa นั้นน่าจะเป็น apyrase โดยจะถูกสังเคราะห์ในยุงตัวเต็มวัยและสะสมในบริเวณส่วนปลายของกลีบด้านข้างของต่อมน้ำลายยุงเพศเมีย[37] Marinotti *et al.* (1996)[37] ได้ศึกษาโปรตีนที่สำคัญ 2 ชนิดในต่อมน้ำลายยุงลายสวน *Ae. albopictus* คือ apyrase และ α-glucosidase พบว่า กิจกรรมของ apyrase และ α-glucosidase จะพบในระดับต่ำเมื่อยุงออกเป็นตัวเต็มวัยใหม่ๆ

และจะค่อยๆเพิ่มขึ้นตามอายุของยุงตัวเต็มวัย ซึ่งกิจกรรมของ apyrase นั้นไม่สามารถตรวจพบได้ทันทีที่ยุงกลายเป็นตัวเต็มวัย ในขณะที่ α-glucosidase จะพบประมาณ 10% ของกิจกรรมสูงสุดที่จะได้รับในวันที่ 3 หลังจากยุงออกมาเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้มีการสังเคราะห์ในเวลาที่แตกต่างกัน

ปริมาณโปรตีนในต่อมน้ำลายยุงแม่ไก่ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียที่มีอายุต่างๆ กัน แสดงให้เห็นว่าปริมาณโปรตีนในต่อมน้ำลายยุงเพศเมียยังคงมีมากกว่าในต่อมน้ำลายยุงเพศผู้ และในยุงตัวเต็มวัยเพศผู้ระดับของปริมาณโปรตีนจะค่อนข้างคงที่ใน 3 วันแรกที่เป็นตัวเต็มวัยและจะเพิ่มขึ้นถึง 3 เท่า ในวันที่ 5 ที่เป็นตัวเต็มวัย ส่วนในยุงตัวเต็มวัยเพศเมีย ปริมาณโปรตีนจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันแรกจนถึงวันที่ 5 ที่เป็นตัวเต็มวัย ซึ่งแสดงว่าโปรตีนจะถูกสังเคราะห์ขึ้นในระดับต่ำจากวันแรกที่ออกมาเป็นตัวเต็มวัยและเก็บสะสมอย่างต่อเนื่องในต่อมน้ำลาย จากงานวิจัยของ Poehling. (1979)[23] ยังแสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่สกัดจากต่อมน้ำลายยุง *Culex pipiens* เพศเมียจะมีระดับต่ำในตอนที่ออกเป็นตัวเต็มวัยใหม่ๆ และยุง *An. stephensi* ปริมาณโปรตีนจะเพิ่มขึ้นและถูกเก็บอยู่ในต่อมน้ำลายจนถึงวันที่ 7 ที่เป็นตัวเต็มวัย นอกจากนี้ยังมีการวัดปริมาณโปรตีนในยุง *Ae. capius* [53] ซึ่งพบว่าระดับของโปรตีนจะคงที่ตลอด 4 วันที่เป็นตัวเต็มวัยแต่จะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าในวันที่ 5 ที่เป็นตัวเต็มวัย

รูปแบบโปรตีนของต่อมน้ำลายยุงแม่ไก่เพศผู้และเพศเมียที่ปรากฏนั้นแตกต่างกัน จากผลการศึกษาพบแถบโปรตีนอย่างน้อย 1 แถบที่เห็นเด่นชัดซึ่งจำเพาะกับยุงเพศเมียเท่านั้น คือแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 21 kDa โดยจะพบที่บริเวณส่วนปลายของกลีบด้านข้างของต่อมน้ำลายยุงเพศเมีย แต่ไม่พบในต่อมน้ำลายยุงเพศผู้ อาจเป็นไปได้ว่าโปรตีนนี้ถูกสังเคราะห์จากเซลล์ที่จำเพาะกับต่อมน้ำลายยุงเพศเมียและน่าจะเป็นไปได้ว่าเกี่ยวข้องกับการดูดกินเลือดของยุง มีการศึกษาโปรตีนที่จำเพาะกับยุงเพศเมียในยุง *Culex quinquefasciatus* พบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 35.7 และ 28.3 kDa ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการกินเลือดของยุง[54] ในการวิเคราะห์โปรตีนจากต่อมน้ำลายยุงที่บริเวณแตกต่างกัน โดยวิธี SDS-PAGE นั้นมีการศึกษาในยุง *An. stephensi* และ *Cx. pipiens* [23] แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่จำเพาะจะถูกผลิตในส่วนที่แตกต่างกันของต่อมน้ำลายยุงเพศเมีย ซึ่งเป็นสิ่งที่บอกได้ว่าเนื้อเยื่อที่บริเวณต่างๆ จะผลิตสารที่ขับออกมาต่างกันหรือมีองค์ประกอบแตกต่างกัน[14,15]

เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของยุงกับโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากต่อมน้ำลายยุงทั้ง 3 ชนิด ซึ่งไม่พบความแตกต่างของรูปแบบโปรตีนในต่อมน้ำลายยุงอายุ 1 วัน 3 วัน และ

5 วัน ของยุงทั้ง 2 เพศ อาจเป็นไปได้ว่าโปรตีนในต่อมน้ำลายยุงเพศผู้และเพศเมียที่กินน้ำตาลเป็นอาหารจะเริ่มสะสมตั้งแต่วันแรกที่เป็นตัวเต็มวัย และสามารถตรวจพบได้ตลอดระยะเวลา 5 วันที่ยุงเป็นตัวเต็มวัย ดังที่มีการศึกษาในยุง *An. stephensi*, *Cx. quinquefasciatus* และ *Cx. pipiens* ซึ่งพบว่าโปรตีนหลักจะปรากฏในต่อมน้ำลายยุงตั้งแต่วันแรกที่ยุงเป็นตัวเต็มวัย[54]

จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของต่อมน้ำลายยุงเพศเมียที่กินเลือดในยุงทั้ง 3 ชนิด พบว่าแถบโปรตีนที่ปรากฏในช่วงเวลาต่างๆ หลังจากที่ยุงกินเลือดนั้นไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลา มีการศึกษาวิเคราะห์โปรตีนในต่อมน้ำลายยุง *Anopheles darlingi*[55] พบว่ารูปแบบโปรตีนที่เวลาต่างๆ กันหลังจากที่ยุงกินเลือดแสดงความไม่แตกต่าง ซึ่งชี้ให้เห็นว่า เป็นไปได้ที่ไม่มีโปรตีนจำเพาะที่สังเคราะห์ขึ้นจากการชักนำโดยเลือด สิ่งที่สังเกตเห็นได้ชัดอย่างหนึ่งคือ จะมีความเข้มชัดขึ้นของแถบโปรตีนเมื่อเวลาผ่านไป แสดงว่าโปรตีนอาจถูกใช้ไปในช่วงเวลาที่ยุงดูดกินเลือดซึ่งยุงจะขับโปรตีนที่อยู่ในน้ำลายเข้าไปใน โฮสต์ มีรายงายว่าหลังจากยุง *Cx. pipiens* ได้รับเลือดเป็นอาหารแล้วโปรตีนจะถูกปล่อยออกจากกลีบกลางและส่วนต้นของกลีบด้านข้างของต่อมน้ำลาย[14,23] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในยุง *An. stephensi* และ *Cx. pipiens*[23] ยุง Anopheline[56] และยุง *Ae. aegypti*[39] Orr *et al.* (1961)[16] ได้สังเกตเซลล์ของต่อมน้ำลายยุง *Ae. aegypti* หลังจากได้รับเลือดเป็นอาหารทันที พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต่อมน้ำลาย แต่หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง nucleoli เซลล์ของกลีบกลางและกลีบด้านข้างขยายใหญ่ขึ้น และมีการเพิ่มขึ้นของ RNA บริเวณรอบๆ nuclei สรุปได้ว่า การกินเลือดของยุงทำให้เกิดการใช้โปรตีนที่ผลิตจากเซลล์ในต่อมน้ำลายและการสูญเสียโปรตีนจากการดูดกินเลือดของยุงจะนำมาซึ่งการสังเคราะห์โปรตีนออกมาใหม่ จากการศึกษานี้สามารถคาดเดาผลจากรูปแบบโปรตีนที่ปรากฏว่า ช่วงเวลาหลังจากยุงได้รับเลือดใหม่ๆ จะไม่มีโปรตีนมากเท่ากับเมื่อเวลาผ่านไปถึง 48 ชั่วโมง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์ในต่อมน้ำลายยุงทั้ง 3 ชนิด สามารถสังเคราะห์โปรตีนขึ้นมาทดแทนโปรตีนที่ถูกปล่อยออกไปในโฮสต์ที่ยุงดูดกินเลือด ดังจะเห็นได้ชัดเจนจากรูปแบบโปรตีนของยุงแม่ไก่ ในชั่วโมงที่ 48 หลังจากยุงได้รับเลือดเป็นอาหารจะปรากฏแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 21 kDa ชัดเจนมากกว่าเวลาหลังจากยุงได้รับเลือดทันที 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่งโมงตามลำดับ

จากผลการเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนในต่อมน้ำลายยุงตัวเต็มวัยเพศเมียที่กินน้ำตาลกับที่กินเลือดเป็นอาหารในยุงทั้ง 3 ชนิดนั้น ไม่พบความแตกต่าง ซึ่งมีการศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนในต่อมน้ำลายยุง *An. darlingi*[55] พบว่าแถบโปรตีนหลักๆ ของต่อมน้ำลายยุงตัวเต็มวัย

เพศเมียที่กินน้ำตาลเป็นอาหารก็ปรากฏในรูปแบบโปรตีนของต่อมน้ำลายยุงตัวเต็มวัยเพศเมียที่กินเลือดด้วยเช่นเดียวกัน

ในการดูดกินเลือดของยุงนั้น นอกจากยุงจะได้รับเลือดที่เป็นอาหารแล้ว เชื้อโรคยังถูกถ่ายทอดจากยุงไปสู่โฮสต์ผ่านทางน้ำลายซึ่งมีโปรตีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องในการดูดกินเลือดของยุงโดยโปรตีนอาจจะมีโอกาสสัมผัสติดต่อกับเชื้อโรคที่ถูกถ่ายทอด ในยุง *An. gambiae*[42] มีการศึกษาโปรตีนในต่อมน้ำลายพบว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 100 kDa ซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเพาะกับต่อมน้ำลายยุงเพศเมียและเกี่ยวข้องกับกระบวนการดูดกินเลือดของยุงจะต่อต้านกับ monoclonol antibody ซึ่งจะไปยับยั้งการบุกรุกต่อมน้ำลายของ *Plasmodium yoelii* sporozoite ของมาลาเรียพาราไซต์ได้มากกว่า 75 % ซึ่งเป็นทางเลือกทางหนึ่งในการขัดขวางการถ่ายทอดของเชื้อมาลาเรียโดยยุงพาหะ

ในการวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายยุงแต่ละชนิด การพิจารณาเปรียบเทียบถึงความเข้มชัดของแถบโปรตีนที่ปรากฏ ดังเช่น รูปแบบโปรตีนจากต่อมน้ำลายยุงที่ dissect ในเวลาต่างๆ กันหลังจากยุงกินเลือดเป็นอาหารจะสังเกตเห็นได้ชัดว่าแถบโปรตีนบางแถบจะค่อยๆ เข้มชัดขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปถึง 48 ชั่วโมง ซึ่งบอกได้ว่ามีโปรตีนบางชนิดถูกใช้ไปในช่วงเวลาหลังจากที่ยุงกินเลือดใหม่ๆ และจะมีปริมาณโปรตีนสะสมเพิ่มมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป ปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญและมีผลต่อการพิจารณาก็คือ จำนวนของต่อมน้ำลายในแต่ละ lane ของรูปแบบโปรตีน ถ้าหากบาง lane มีจำนวนต่อมน้ำลายมากหรือน้อยกว่ากันนั่นก็จะมีผลให้การพิจารณาเปรียบเทียบผิดพลาดได้ ฉะนั้นจึงควรระมัดระวังและควบคุมตั้งแต่ขั้นตอนการ dissect ให้มีจำนวนต่อมน้ำลายเท่ากัน และขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนที่จะทำ SDS-PAGE ในขณะที่ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้งหลังจากทำการปั่นต่อมน้ำลายในสารละลาย *Aedes* Saline ใน tube ต้องระมัดระวังมิให้ต่อมน้ำลายติดออกไปกับสารละลายซึ่งจะทำให้มีจำนวนต่อมน้ำลายไม่เท่ากันในแต่ละ tube และมีผลต่อการพิจารณาเปรียบเทียบ ทางหนึ่งที่อาจช่วยในการพิจารณาคือ ควรมีการวัดปริมาณโปรตีนในแต่ละตัวอย่างก่อนที่จะนำมาทำ SDS-PAGE ซึ่งจะช่วยในการพิจารณาเปรียบเทียบได้

ข้อเสนอแนะ

ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษามากมายเกี่ยวกับโปรตีนในต่อมน้ำลายยุงหลายชนิดที่เกี่ยวข้องในการดูดกินเลือด[22,36,38,41] แต่สำหรับยุงแม่ไก่ยังไม่มีข้อมูลในเรื่องนี้ ดังนั้นการศึกษาวิเคราะห์โปรตีนในต่อมน้ำลายยุงชนิดนี้จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนในต่อมน้ำลายยุงเพศเมียต่อเนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ คือ ควรจะมีการสกัดโปรตีนที่จำเพาะและเด่นชัดในต่อมน้ำลายยุงเพศเมียนี้มาวิเคราะห์ในรายละเอียดระดับโมเลกุล เพื่อศึกษาถึงชนิดของโปรตีนและยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนดังกล่าว ซึ่งจะสามารถแสดงให้เห็นถึงกลไกในการป้องกันการแข็งตัวของเลือดในยุงแม่ไก่ขณะดูดกินเลือดและอาจนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยที่มีอาการแพ้ที่เกิดจากยุงกัดหรือนำไปใช้อธิบายกลไกที่เกี่ยวข้องในการบุกรุกของพาราไซต์ ตลอดจนอาจเป็นแนวทางในการศึกษาป้องกันการถ่ายทอดเชื้อพาราไซต์ผ่านทางยุงพาหะได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย