

บทที่ 2

บทบทวนเอกสาร

2.1 สัณฐานวิทยาของหนอนเยื่อไผ่

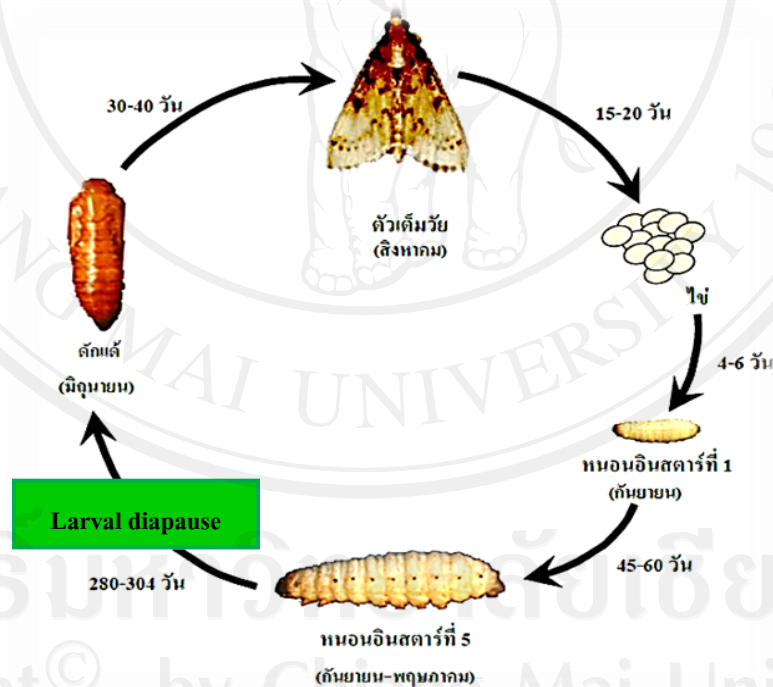
หนอนเยื่อไผ่เป็นระยะตัวหนอนของผีเสื้อกลางคืน (ภาพที่ 2.1) มีชื่อเรียกทางวิทยาศาสตร์คือ *Omphisa fuscidentalis* Hampson จัดอยู่ในวงศ์ Pyralidae อันดับ Lepidoptera จากการศึกษาลักษณะโดยทั่วไปของหนอนเยื่อไผ่พบว่า ลักษณะตัวหนอนเป็นแบบ eruciform โดยมีส่วนหัวเจริญดี มีปากแบบกัดกิน (chewing type) มีหนวด (antennae) สั้นมาก 1 คู่ ลำตัวแบ่งออกเป็นทั้งหมด 13 ปล้อง ส่วนอกมี 3 ปล้อง ส่วนท้องมี 10 ปล้อง ปล้องอกแต่ละปล้องมีขาจริง (true leg) ปล้องละ 1 คู่ ส่วนขาเทียม (proleg) จะพบที่ส่วนท้องปล้องที่ 6 7 8 9 และ 10 ปล้องละ 1 คู่ โดยขาเทียมต่างจากขาจริงคือ มีกล้ามเนื้อมากกว่าและตรงปลายขามีตะขอเล็กๆ เรียงเป็นวง เรียก crochets ทางเดินอาหารมีลักษณะเป็นท่อตรงยาวตลอดตัว แบ่งเป็นทางเดินอาหารส่วนต้น (foregut) ส่วนกลาง (midgut) และส่วนท้าย (hindgut) เปิดออกสู่ภายนอกที่ปล้องท้ายสุดของลำตัว ระบบหายใจประกอบด้วยท่ออากาศ (trachea) และรูหายใจ (spiracle) ระบบหมุนเวียนโลหิตพบว่ามี dorsal blood vessel อยู่ทางกึ่งกลางด้านบนของลำตัว ส่วนระบบประสาทมีสมอง 1 คู่ อยู่บริเวณส่วนหัว และมีเส้นประสาทอยู่ทางกึ่งกลางด้านล่างตลอดความยาวลำตัว (วนิดา, 2539)



ภาพที่ 2.1 แสดงหนอนเยื่อไผ่ระยะไคอะพอส (—เท่ากับ 25 มิลลิเมตร)

2.2 วงชีวิตและการดำรงชีวิตของหนอนเยื่อไผ่

หนอนเยื่อไผ่อาศัยอยู่ภายในต้นไผ่ เช่น ไผ่บง ไผ่ซาง ไผ่หูก พบว่าการแพร่กระจายมากที่สุดบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทยได้แก่ จังหวัดน่าน ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน และเชียงราย นอกจากนี้ยังพบได้ในประเทศใกล้เคียง เช่น ประเทศพม่า ประเทศลาว ประเทศจีน และประเทศมาเลเซีย เนื่องจากบริเวณดังกล่าวมีสภาพพื้นที่และลักษณะภูมิอากาศที่คล้ายคลึงกัน โดยปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการกำหนดถิ่นอาศัยของหนอนเยื่อไผ่คือ ต้องเป็นบริเวณที่มีความชื้นและมีปริมาณน้ำฝนในแต่ละปีสูง อากาศค่อนข้างเย็น ฟ้าไผ่ต้องมีความหนาแน่นพอสมควรและมีร่มเงามากเพราะหนอนเยื่อไผ่เป็นแมลงที่ไม่ชอบแสง ดังนั้นลักษณะของไผ่จะต้องเป็นไผ่ที่มีเนื้อหนาและมีช่องว่างภายในใหญ่พอสมควรเพราะหนอนอาศัยกินเยื่อไผ่เป็นอาหาร (เดชา, 2535) จากการที่พบหนอนเยื่อไผ่ได้ในหลายพื้นที่ จึงทำให้มีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไป เช่น คนพื้นเมืองในภาคเหนือส่วนใหญ่เรียก แ่นหรือแมะ บางกลุ่มเรียก แด้หรือด้วงไม้ไผ่ อีกชื่อเรียก ฮาโบลั่ว กะเหรี่ยงเรียก คลีแคล๊ะ พม่าเรียก วาโป้ว ส่วนจีนฮ่อเรียก จูซุง (ไพฑูรย์, 2538)



ภาพที่ 2.2 แสดงวงจรชีวิตของหนอนเยื่อไผ่
(ที่มา : ทิพวรรณ, 2549)

จากการศึกษาวงจรชีวิตของหนอนเชื้อไฟ (ภาพที่ 2.2) พบว่าผีเสื้อตัวเมียจะวางไข่สีขาวขุ่นที่บริเวณโคนหน่อไฟที่โผล่พ้นดินแล้วประมาณ 10-15 วัน ซึ่งสามารถพบได้ในช่วงต้นเดือนสิงหาคม ระยะไข่ใช้เวลาประมาณ 4-6 วัน จึงฟักเป็นตัวหนอนแล้วจะพากันเจาะทะลุหน่อไฟให้เป็นรูเพื่อเข้าไปอาศัยอยู่ภายในปล้องไม้ไผ่ ลักษณะไม้ไผ่ที่ถูกหนอนกัดกินเมื่อสังเกตจากภายนอกจะพบว่าปลายยอดจะหักและเห็นได้อย่างชัดเจน ด้านข้างปล้องมีรูเล็ก ๆ รูปร่างรีเพื่อให้อากาศถ่ายเทและเป็นทางออกของตัวเต็มวัย ตัวหนอนจะมีการเจริญเติบโตภายในกระบอกลูกไม้ไผ่และอยู่กันเป็นกลุ่ม โดยจะกัดกินเยื่อของไม้ไผ่ที่อยู๋ภายในเป็นอาหาร ระหว่างที่หนอนเจริญเติบโตและพร้อมกันนั้นต้นไผ่ก็สูงขึ้นเรื่อย ๆ หนอนจะพากันเจาะทะลุระหว่างปล้องแล้วเคลื่อนย้ายกัดกินเชื้อไฟขึ้นไปเรื่อยๆ เพราะหนอนจะกินเฉพาะเชื้อไฟที่ยังอ่อนเท่านั้น ส่วนใหญ่หนอนจะกินบริเวณ โคนปล้องก่อนเรื่อยไปจนถึงกลางปล้อง หลังจากที่ตัวหนอนย้ายขึ้นไปอยู่ปล้องอื่นแล้วจะพบว่าไม้ซึ่งขั้วปลายลักษณะเหมือนฟองน้ำ สีน้ำตาลติดอยู่ตามผนังของปล้อง นอกจากนั้นสีผิวของไม้ไผ่ภายในปล้องจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มออกดำแดง แตกต่างไปจากลักษณะภายในของปล้องที่ไม่มีหนอนอาศัยอยู่อย่างชัดเจน ในไผ่ลำหนึ่งจะพบหนอนอาศัยอยู่ประมาณ 100-250 ตัว โดยระยะตัวหนอนนี้ใช้เวลานานประมาณ 280-304 วัน หรือประมาณ 9 เดือน จากนั้นจึงจะเข้าสู่ระยะดักแด้ (ภาพที่ 2.3) โดยจะพบได้ตั้งแต่ช่วงเดือนกันยายนไปจนถึงปลายเดือนพฤษภาคมของปีถัดไป



ภาพที่ 2.3 แสดงลักษณะดักแด้ของหนอนเชื้อไฟ

(ที่มา : <http://www.tunu.ac.th/elearning/mediawinht/science>)

เมื่อตัวหนอนเจริญเติบโตเต็มที่แล้วจะเคลื่อนย้ายผ่านรูระหว่างปล้องที่เคยเจาะไว้ในตอนแรกลงมาอยู่รวมกันใกล้ปล้องด้านล่างที่เจาะรูเข้ามาในตอนแรกเพื่อรอเข้าดักแด้ในปล้องนั้น ซึ่งในระหว่างที่รอเข้าดักแด้ตัวหนอนจะพากันสร้างเยื่อหนาสีน้ำตาลล้อมรอบบริเวณที่รวมกลุ่มกันอยู่เพื่อป้องกันการรบกวนจากศัตรูธรรมชาติ เช่น มด ส่วนรูที่ทะลุระหว่างปล้องก็จะถูกปิดไว้เพื่อป้องกันศัตรูเช่นกัน ในช่วงปลายเดือนพฤษภาคมหนอนจะสร้างใยสีขาวขนาดเล็กจำนวนมากพาดตามแนวขวางของปล้องจากนั้นตัวหนอนจะเริ่มห้อยหัวลงโดยมีส่วนท้ายของลำตัวยึดติดกับผนังของปล้องไม่ไผ่ด้วยเส้นใยดังกล่าวแล้วทยอยลอกคราบกลายเป็นดักแด้ โดยดักแด้จะมีสีน้ำตาลอ่อนในระยะแรกและค่อยๆ เข้มขึ้นในเวลาต่อมา ระยะดักแด้ใช้เวลาประมาณ 30-40 วัน ซึ่งจะพบในช่วงเดือนมิถุนายนถึงกรกฎาคม การแขวนตัวของดักแด้มีประโยชน์ในการออกเป็นตัวเต็มวัย โดยอาศัยแรงดึงดูดของโลกช่วยในการลอกคราบและกางปีกแล้วคลานออกจากรูที่เตรียมไว้ สำหรับตัวเต็มวัยสามารถพบได้ในช่วงต้นเดือนสิงหาคม ซึ่งเป็นช่วงที่หน่อไผ่อ่อนกำลังแทงยอดขึ้น แม้ผีเสื้อจึงทยอยวางไข่ได้ต่อไป ตัวเต็มวัยของหนอนเชื้อไผ่เป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก มีสีน้ำตาลเข้มทั้งตัว ลักษณะเด่นคือปลายปีกคู่หน้ามีรอยหยักเป็นเส้นโค้งสีดำสามารถเห็นได้อย่างชัดเจน ขนาดกว้างเมื่อกางปีกแล้วจะวัดได้ 30-60 มิลลิเมตร ขึ้นอยู่กับเพศ โดยตัวเมียมีขนาดใหญ่กว่าตัวผู้ ระยะตัวเต็มวัยใช้เวลาเพียง 15-20 วันเท่านั้น (ภาพที่ 2.4)



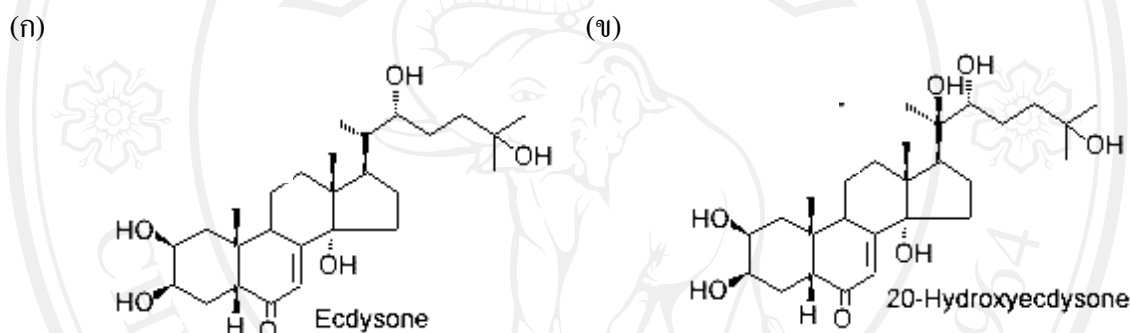
ภาพที่ 2.4 แสดงลักษณะตัวเต็มวัยของหนอนเชื้อไผ่

(ที่มา : http://www.aksorn.com/lib/detail_print.php?topicid=491)

2.3 ฮอร์โมนและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลง

2.3.1 ฮอร์โมนเอกไดโซน (ecdysone, Ec)

ฮอร์โมนเอกไดโซนถูกค้นพบเป็นครั้งแรกจากคักแด้ของ *B. mori* โดยพบว่ามีสเตอรอยด์ 2 โมเลกุลที่มีความแตกต่างกันและมีบทบาทในการชักนำให้เกิดการลอกคราบได้และให้ชื่อว่า “ α -ecdysone” (ภาพที่ 2.5 ก) และ “ β -ecdysone” (ภาพที่ 2.5 ข) (Butenand and Karlson, 1954) ต่อมาได้สกัดแยกฮอร์โมนออกจากแมลงได้คือ α -ecdysone ซึ่งในปัจจุบันเรียกว่า “เอกไดโซน” ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่หลั่งมาจากต่อมไพรโทแรกซิก โดยปกติแล้วเอกไดโซนจะอยู่ในสภาพเฉื่อย (inactive) หรือเรียกว่า “prohormone” ซึ่งสามารถเปลี่ยนไปอยู่ในสภาพที่พร้อมจะทำงาน (active form) คือ 20-ไฮดรอกซีเอกไดโซนซึ่งถือว่าเป็นฮอร์โมนลอกคราบตัวแรกที่พบในแมลงเป็นส่วนมาก (Gilbert, 1989)



ภาพที่ 2.5 แสดงสูตรโครงสร้างของฮอร์โมนเอกไดโซน

(ก) สูตรโครงสร้างของ α -ecdysone (ecdysone)

(ข) สูตรโครงสร้างของ β -ecdysone (20E)

(ที่มา : <http://fr.wikipedia.org/wiki/Ecdysone>)

ฮอร์โมนเอกไดโซนเป็นฮอร์โมนที่จำเป็นต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลง โดยมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นเซลล์อีพิเดอร์มิส (epidermis) ให้หลั่งสารที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบของแมลงและสารไคติน (chitin) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของคิวติเคิลทำให้เซลล์อีพิเดอร์มิสมีการเจริญและแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ นอกจากนี้ฮอร์โมนเอกไดโซนยังส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตของแมลงและมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม การซ่อมแซมอวัยวะส่วนที่ชำรุดเสียหาย (regeneration) และการเปลี่ยนแปลงสีลำตัวของแมลงอีกด้วย แต่บทบาทที่สำคัญที่สุดก็คือ การกระตุ้นให้แมลงเกิดการลอกคราบ (สมร, 2535) จากการศึกษาพบว่าฮอร์โมน 20E

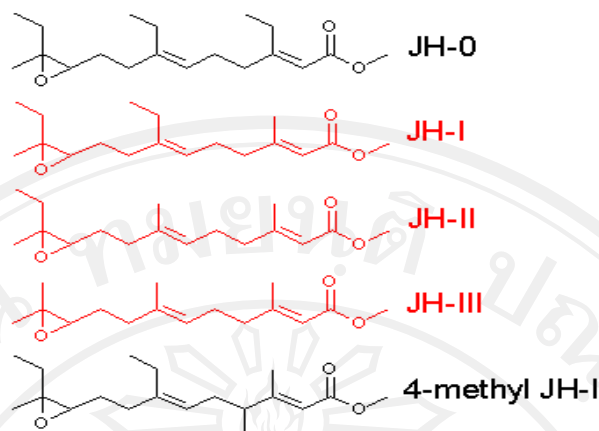
สามารถชักนำให้หนอนเชื้อไฟเกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ก่อนเวลาตามธรรมชาติได้ การเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้จะเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของฮอร์โมน 20E ที่ให้แก่ตัวหนอน ซึ่งฮอร์โมนความเข้มข้นสูงจะทำให้หนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ได้เร็วกว่ากลุ่มที่ให้ฮอร์โมนความเข้มข้นต่ำ ซึ่งลักษณะของดักแด้ที่ได้สามารถแบ่งตามการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาได้ดังนี้ ในระยะ G0 ดักแด้จะมีสีขาวปกติและตัวหนอนจะหยุดการเคลื่อนไหว ระยะ G1 จะเริ่มเห็นจุดสีส้มกระจายตามลำตัว ระยะ G2 สีลำตัวจะเปลี่ยนเป็นสีส้มทั่วลำตัว และระยะ G3 สีลำตัวจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลตามลำตัว (Singtripop *et al.*, 2002)

2.3.2 ฮอร์โมนจูวีไนล์ (juvenile hormone, JH)

ฮอร์โมนจูวีไนล์เป็นฮอร์โมนที่พบมากในอาณาจักรสัตว์ทั้งหมด มีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและการเจริญพัฒนาของแมลง การสืบพันธุ์ การแยกวรรณะในแมลงสังคม การควบคุมพฤติกรรม การอยู่เป็นโคลอนีของผึ้ง ความหลากหลายในพวกเพลี้ยอ่อนและด้วง การควบคุมการเกิด larval diapause และ adult diapause การสังเคราะห์ vitellogenin การเจริญพัฒนาของไข่ และการควบคุมเมแทบอลิซึมหลายๆ อย่าง ฮอร์โมนจูวีไนล์จะหลั่งมาจากต่อมคอร์ปอรา อัลลาตา ในปี 1956 Williams เป็นคนแรกที่สามารถสกัดฮอร์โมนจูวีไนล์จากส่วนท้องในระยะตัวเต็มวัยของผีเสื้อยักษ์เพศผู้ (*Hyalophora cecropia*) และเมื่อนำสารสกัดที่ได้มาฉีดเข้าไปในระยะดักแด้ ทำให้ดักแด้เกิดการลอกคราบไปเป็นดักแด้ระยะที่สอง (second pupae) แทนที่จะกลายเป็นตัวเต็มวัย โครงสร้างทางเคมีของฮอร์โมนจูวีไนล์ได้มีการค้นพบโดย Roller *et al.* (1967) ซึ่งจัดเป็นสารประกอบประเภท sesquiterpene ที่มี epoxide group ที่ส่วนปลาย และมี methyl ester อยู่อีกด้านหนึ่ง และในภายหลังได้มีการค้นพบว่าฮอร์โมนจูวีไนล์ในธรรมชาติมีหลายฟอร์ม ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีเหมือนกันเกือบทั้งหมด แต่แตกต่างกันเฉพาะ ethyl side chain ฮอร์โมนจูวีไนล์ที่ Roller ค้นพบนั้นปัจจุบันนี้คือ JH-I (C18-JH) และภายหลังพบอีก 4 ไอโซฟอร์ม รวมเป็น 5 ไอโซฟอร์ม ดังนี้

1. JH-I (C-18 JH) มีคาร์บอน 18 อะตอม
2. JH-II (C-17 JH) มีคาร์บอน 17 อะตอม
3. JH-III (C-16 JH) มีคาร์บอน 16 อะตอม
4. JH-O (C-19 JH) มีคาร์บอน 19 อะตอม พบในไข่ของหนอนใยผ้า
5. 4-Methyl JH-I

JH-I & II พบเฉพาะในแมลงอันดับ Lepidoptera JH-III พบในเกือบทุกอันดับของแมลง JH-O และ 4-Methyl JH-I พบในไข่ของแมลงอันดับ Lepidoptera เท่านั้น (ภาพที่ 2.6)



ภาพที่ 2.6 แสดงโครงสร้างของฮอร์โมนจูวีไนล์ : JH-0, JH-I, JH-II, JH-III และ 4-Methyl JH-I

(ที่มา : <http://www.scitech.cz/VZORCE.HTM>)

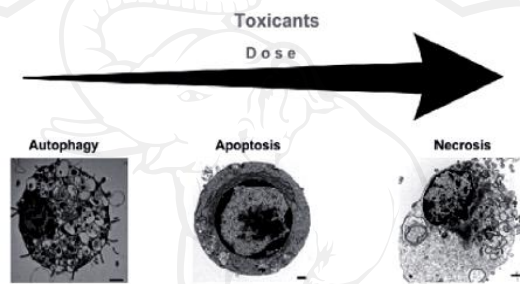
ฮอร์โมนจูวีไนล์เป็น โมเลกุลของไขมันแบบไม่มีขั้ว (non-polar) มีการทำงานในระดับเซลล์ 2 กลไกดังนี้คือ

1. กลไกแบบสเตอรอยด์ฮอร์โมน โดยสามารถจับจำเพาะกับรีเซพเตอร์ในนิวเคลียส
2. กลไกแบบเปปไทด์ฮอร์โมน โดยจับกับรีเซพเตอร์ที่ผิวเซลล์ กระตุ้น phosphatidyl inositol mediated second messenger system

จากการศึกษาผลของฮอร์โมนจูวีไนล์ในหนอนเยื่อไผ่พบว่า การให้ฮอร์โมนจูวีไนล์สังเคราะห์แก่หนอนเยื่อไผ่ระยะ ไดอะพอสในปริมาณที่เหมาะสมสามารถชักนำให้หนอนเยื่อไผ่เกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ โดยความสามารถในการชักนำนี้จะขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของฮอร์โมนที่ให้ โดยกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนปริมาณสูงจะใช้เวลาในการเข้าสู่ระยะดักแด้เร็วกว่ากลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนในปริมาณต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่าฮอร์โมนจูวีไนล์สามารถกระตุ้นให้ปริมาณฮอร์โมนเอกไดโซนในสีโมลิฟเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งส่งผลให้หนอนเยื่อไผ่เข้าสู่ระยะดักแด้ได้โดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงของสีผิวเป็นสีน้ำตาลเนื่องจากการสร้างคิวติเคิลของดักแด้ (pupal cuticle) หรือการเข้าดักแด้อย่างสมบูรณ์ (complete pupa) เมื่อให้ฮอร์โมนในปริมาณที่เหมาะสม (Singtripop *et al.*, 2002)

2.4 โปรแกรมการตายของเซลล์ในแมลง (programmed cell death, PCD)

โปรแกรมการตายของเซลล์เป็นกระบวนการสำคัญในขั้นตอนสุดท้ายของการมีชีวิตอยู่ของเซลล์หรือสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ สามารถเกิดขึ้นได้เสมอในระหว่างการเจริญเติบโตของสัตว์เกือบทุกชนิด เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมกลไกทางชีววิทยาหลายอย่าง เช่น การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ การรักษาสภาพของเซลล์ และการกำจัดเซลล์ที่เป็นพิษหรือเซลล์ที่ไม่มีความจำเป็นแล้วออกจากร่างกายของสิ่งมีชีวิต หากกระบวนการตายของเซลล์ถูกยับยั้งจะทำให้เกิดการเป็นพิษต่อเซลล์หรือสิ่งมีชีวิตเองหรืออาจทำให้เกิดความผิดปกติขึ้นได้ในขั้นตอนต่อมาของการเจริญของเซลล์เช่นเดียวกับการนำไปสู่การเกิดมะเร็งในคน (ทิพวรรณ, 2549) รูปแบบการตายของเซลล์สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภทขึ้นอยู่กับการทำงานของเซลล์ ได้แก่ apoptosis necrosis และ autophagy (ภาพที่ 2.7)



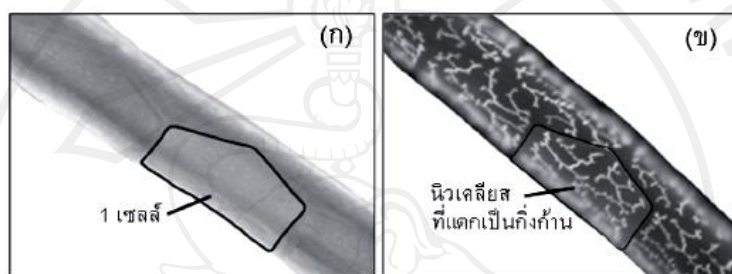
ภาพที่ 2.7 แสดงรูปแบบการตายของเซลล์เมื่อได้รับความเข้มข้นของสารพิษระดับต่างๆ โดยหากเซลล์ได้รับสารพิษหรือสิ่งแปลกปลอมน้อยเซลล์จะตอบสนองโดยการเกิด autophagy หากเซลล์ได้รับสารพิษมากไป เซลล์จะตอบสนองโดยการเกิด necrosis (ที่มา : มนพร, 2554)

ความแตกต่างของรูปแบบการตายของเซลล์ทั้ง 3 แบบ สืบเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาภายนอกและภายในเซลล์ เซลล์ที่เกิด apoptosis นั้นมักจะถูกควบคุมด้วยเอนไซม์แคสเปส (caspase) เชื้อหุ้มเซลล์เกิด blebbing ทำให้เซลล์มีรูปร่างกลมมากขึ้น เกิดการอัดแน่นของเส้นใยโครมาติน (chromatin) ในนิวเคลียส เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอและเกิดสีดำขนาดเล็กภายในเซลล์เรียกว่า “apoptotic body” ซึ่งจะพบเฉพาะในเซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis เท่านั้น การตายของเซลล์แบบ autophagy เกิดโดยเชื้อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไปมี 2 ชั้นหรือมากกว่า เรียกว่า autophagosome จากนั้นเชื้อหุ้มเซลล์นี้จะไปรวมตัวกับออร์แกเนลล์ภายในเซลล์คือ ไลโซโซมเกิดเป็นถุงจำนวนมากเรียกแต่ละถุงว่า autophagic vesicle ในถุงนี้มีสารโมเลกุลขนาดใหญ่ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ซึ่งจะถูกย่อยโดยเอนไซม์จากไลโซโซมแล้วปล่อยเข้าสู่ไซโทพลาสซึมของเซลล์ การมี autophagosome มากเกินไปอาจทำให้เซลล์

ตายได้ จึงรวมเอา autophagy เป็นรูปแบบหนึ่งของการตายของเซลล์ด้วย สำหรับการตายของเซลล์แบบ necrosis ไม่ได้เป็นผลเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์แคสเปสหรือไลโซโซม ลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเซลล์จึงแตกต่างจากที่พบในการตายของเซลล์แบบ apoptosis และ autophagy การเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัดคือ เซลล์ฉีกขาด (cell rupture) เซลล์และออร์แกเนลล์ต่างๆ ภายในเซลล์บวม (swelling) การเกิด necrosis จึงเป็นการตอบสนองของเซลล์ต่อความเป็นพิษระดับเฉียบพลัน (acute) หรือเซลล์ที่อักเสบ (inflammation) ในแมลงการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัดเจนเมื่อเซลล์เกิดการตายคือ เกิดการสลายตัวของเนื้อเยื่อบางส่วนที่พบเฉพาะในระยะตัวหนอน (larval specific tissues) ในขั้นสุดท้ายก่อนเข้าสู่ระยะดักแด้ ถ้ากระบวนการตายของเซลล์ถูกยับยั้งจะทำให้ดักแด้เกิดความผิดปกติและทำให้ดักแด้ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์ได้ จะเห็นได้ว่าการตายของเซลล์ในแมลงมีความสำคัญเช่นเดียวกับการตายของเซลล์ในสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆ เพราะเป็นกระบวนการที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการย่อยสลายของเนื้อเยื่อในระหว่างการเจริญเติบโตของตัวหนอนและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นดักแด้และตัวเต็มวัย ดังนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่าการควบคุมการตายของเซลล์ในเนื้อเยื่อตัวหนอนของแมลงมีความสำคัญต่อกระบวนการถอดรูปของแมลง

รูปแบบการตายของเซลล์ที่พบในแมลงที่มีการสมบูรณ์เป็นแบบ apoptosis สำหรับการตายของเซลล์แบบ autophagy และ necrosis นั้นก็มีการศึกษามายาวนานเช่นกัน แต่ข้อมูลที่ได้ศึกษาการตายของเซลล์แบบ autophagy มีมากกว่า necrosis พบว่าการตายของเซลล์แบบ autophagy และ necrosis ความสัมพันธ์กันและมีบทบาทต่อการถอดรูปของแมลงเช่น ในแมลงหวี่ (*D. melanogaster*) หนอนไหม (*B. mori*) และผึ้ง (*A. mellifera*) โดยจะพบการตายของเซลล์แบบ apoptosis ก่อนแล้วตามด้วยการเกิด autophagy ในภายหลัง ตัวอย่างเนื้อเยื่อของระยะตัวหนอนที่พบว่าเกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis และ autophagy ได้แก่ ต่อมน้ำลาย รั้งไข่ และทางเดินอาหารส่วนกลาง (มนพร, 2554) มีการศึกษาเกี่ยวกับการตายของเซลล์ในแมลงอย่างแพร่หลายในแมลงหลายชนิด แต่ที่นิยมศึกษากันมากเป็นการศึกษาการตายโดยอาศัยต่อมน้ำลายของแมลงหวี่เป็นต้นแบบ แต่เนื่องจากเซลล์ต่อมน้ำลายของแมลงหวี่มีขนาดเล็กทำให้ไม่สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในเซลล์ได้ชัดเจน การตรวจวัดการแตกหักของดีเอ็นเอ โดยการทำให้เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ทำได้ยากเนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอในต่อมน้ำลายมีน้อย (Martin and Baehrecke, 2004) การศึกษาเรื่องการตายของเซลล์ในแมลงหวี่จึงทำได้เพียงการตรวจวัดการแตกหักของดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediate deoxyuridine triphosphate biotin nick end labeling) (Daish *et al.*, 2004) และเนื่องจากการศึกษาเรื่องการตายในแมลงหวี่ได้ทำอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานข้อมูลในระดับโมเลกุลจึงมีค่อนข้างมาก

อย่างไรก็ตามหากต้องการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์และนิวเคลียส จำเป็นต้องเลือกเนื้อเยื่อแมลงที่มีขนาดใหญ่ ต่อมสร้างใหม่ของหนอนไหมเป็นเนื้อเยื่อที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในตัวหนอนระยะสุดท้ายของหนอนไหม (*B. mori*) จึงถูกเลือกมาเพื่อเป็นต้นแบบในการศึกษาการตายในแมลงนอกเหนือจากต่อมน้ำลายที่ทำการศึกษาในแมลงหิว นอกจากต่อมสร้างใหม่จะมีข้อได้เปรียบในเรื่องขนาดของเซลล์แล้วยังพบว่าเซลล์ที่ถูกรอบบ่อต่อมสร้างใหม่มีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ เซลล์แต่ละเซลล์มีรูปร่างเป็นแผ่นหกเหลี่ยมและมีนิวเคลียสแตกกิ่งก้านเห็นได้ชัดเจนเมื่อย้อมด้วยสี DAPI (4',6-diamidono-2-phenylindole) (Daish *et al.*, 2004; Iga *et al.*, 2007) (ภาพที่ 2.8)

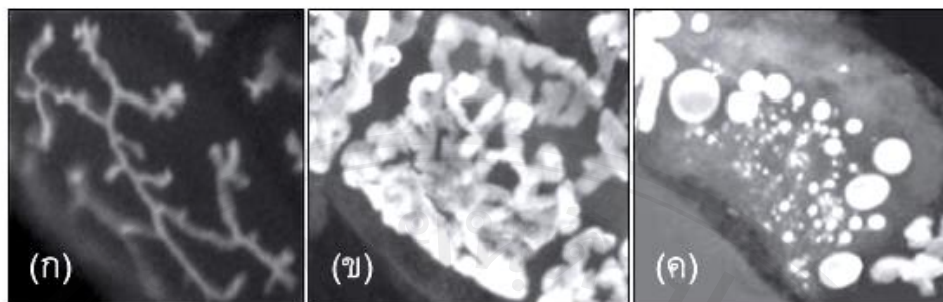


ภาพที่ 2.8 แสดงลักษณะของต่อมสร้างใหม่ส่วนต้นของหนอนไหม (ที่มา : มนพร, 2554)

(ก) ต่อมสร้างใหม่ส่วนต้นของหนอนไหม

(ข) นิวเคลียสเมื่อย้อมด้วยสี DAPI

เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของต่อมสร้างใหม่ส่วนต้นของตัวหนอนในระยะก่อนเปลี่ยนเป็นดักแด้ จนกระทั่งเป็นดักแด้ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์และนิวเคลียสที่เห็นได้ชัดเจน และผลการศึกษาที่ได้จากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงนี้คล้ายคลึงกับผลการศึกษาที่ได้จากการนำต่อมสร้างใหม่ส่วนต้นมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแมลงที่เติมฮอร์โมน 20E ลงไปด้วย โดยพบว่าเซลล์ของต่อมมีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาทำให้สามารถมองเห็นการเปลี่ยนแปลงได้เป็นระดับขั้น เรียกคะแนนการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวว่า PCD score มีทั้งหมด 6 ระดับคะแนนการตาย (Terashima *et al.*, 2000; Kakei *et al.*, 2005) นอกจากนี้แล้วยังพบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับนิวเคลียสด้วยเช่นกัน โดยพบว่า 20E ทำให้เกิดการตายชนิด apoptosis โดยส่งผลใน 2 ขั้นตอน คือ ส่งผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์และส่งผลในระดับโมเลกุล สำหรับการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาที่เกิดขึ้นสามารถสังเกตได้จากลักษณะของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นลำดับ โดยเริ่มจากการหดตัวของเซลล์ (cell shrinkage) การเกิดการอัดแน่นของนิวเคลียส การเกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ การเกิดการแตกหักของนิวเคลียส (ภาพที่ 2.9) และการเกิด apoptotic body (Iga *et al.*, 2007; Manaboon *et al.*, 2009)



ภาพที่ 2.9 แสดงลักษณะนิวเคลียสของต่อมสร้างไทม์ส่วนต้นที่เกิด PCD (ที่มา : มนพร, 2554)

(ก) นิวเคลียสที่ไม่เกิด PCD

(ข) นิวเคลียสที่เกิดการอัดแน่น

(ค) นิวเคลียสที่เกิดการแตกหัก

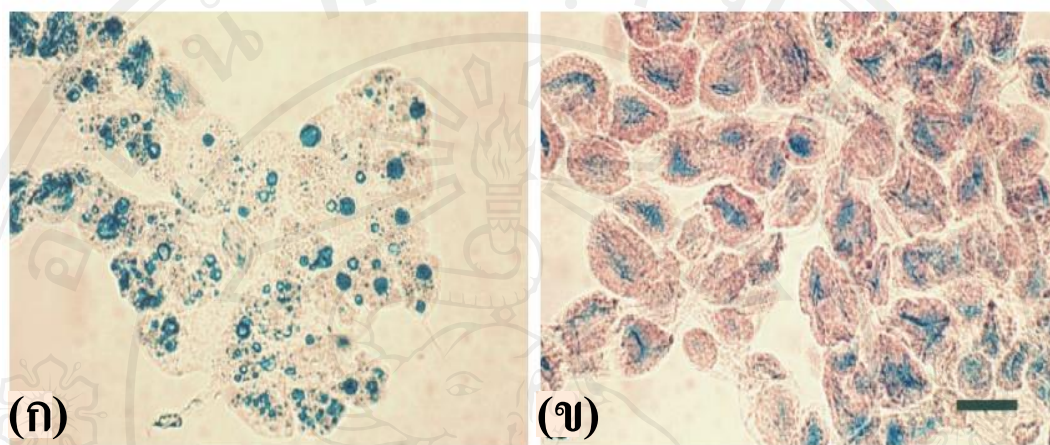
2.4.1 การศึกษาการเกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ในต่อมโปรทอแรกซิก

ต่อมโปรทอแรกซิกเป็นต่อมไร้ท่อที่สำคัญของแมลง เนื่องจากเป็นแหล่งสังเคราะห์ฮอร์โมนเอคไดโซนซึ่งเป็นฮอร์โมนที่สำคัญต่อกระบวนการลอกคราบ (molting) ต่อมาชนิดนี้เป็นต่อมที่อยู่บริเวณส่วนอกปล้องแรกทาบบนท่อลม (trachea) มีขนาดใหญ่ ลักษณะของเนื้อต่อมประกอบไปด้วย polypoid nuclei มีท่อลมและเส้นประสาทแทรกอยู่เป็นจำนวนมาก เมื่อศึกษาถึงระดับเซลล์พบว่าลักษณะเซลล์เป็นเหมือนเซลล์ที่ผลิตสเตอรอยด์ของสัตว์มีกระดูกสันหลังเป็นอย่างมาก ในไซโทพลาสซึมจะมีสารต่างๆ กัน มีเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (agranular endoplasmic reticulum) บางๆ ที่บริเวณกอลจิ (golgi) ชัดมาก มีไรโบโซม (ribosome) อิสระ มีไมโครทิวบูลล์ (microtubule) มากมาย มีไมโทคอนเดรีย (mitochondria) และอินคลูชัน (inclusion) เหมือนไลโซโซม (lysosome) ไหลเวียนชัดเจน โดยที่นิวเคลียส ไมโทคอนเดรีย และไลโซโซม จะมีการเปลี่ยนแปลงสัมพันธ์กับระยะที่มีการลอกคราบ และจะหายไปเมื่อเป็นตัวเต็มวัย กล่าวคือ ต่อมโปรทอแรกซิกจะแสดงวงจรการเจริญที่สัมพันธ์กับการหลั่งสาร ซึ่งถ้าในขณะที่ไม่มีการหลั่งสารนิวเคลียสจะมีขนาดเล็ก รูปไข่ แต่เมื่อมีการสังเคราะห์ฮอร์โมนนิวเคลียสจะขยายใหญ่ มีรูปร่างเป็นพู และเซลล์ยืดยาวออก ไซโทพลาสซึมจะติดสีได้ชัดเจน จำนวนไมโทคอนเดรียที่ล้อมรอบนิวเคลียสจะเพิ่มขึ้น และเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมจะยืดขยายออกมาเพื่อสร้างโปรตีน เมื่อสิ้นสุดวงจรการหลั่งสารนิวเคลียสจะมีขนาดลดลงเหมือนเดิมและจะเกิดการสลายไปหลังจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและกลายเป็นตัวเต็มวัย (เสาวภา, 2536) Dai and Gilbert (1997) ได้ศึกษาการสลายตัวไปของต่อมโปรทอแรกซิกใน *M. sexta* พบว่าจะเกิดขึ้นในระหว่างการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากดักแด้ไปเป็นตัวเต็มวัย ความสามารถในการผลิตฮอร์โมนเอคไดโซนสามารถตรวจสอบได้โดย

radioimmunoassay (RIA) พบว่าปริมาณฮอร์โมนเอกไดโซนจะเพิ่มสูงสุด ในวันที่ 4 และจะลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 6 จนกระทั่งลดต่ำลงในวันที่ 8 ของระยะดักแด้ ต่อมาโปรทอแรกซิกจะเริ่มสลายตัวในวันที่ 6 ซึ่งเป็นช่วงที่ปริมาณฮอร์โมนเอกไดโซนลดลง เมื่อดูจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าลักษณะการเปลี่ยนแปลงของต่อมที่เกิดขึ้นมีดังนี้คือ ในวันที่ 0 ของระยะดักแด้ เซลล์จะมีขนาดเล็ก รูปร่างยาวเรียวตัวไม่เป็นระเบียบ ในวันที่ 2 เมื่อปริมาณฮอร์โมนเอกไดโซนเริ่มเพิ่มขึ้น เซลล์จะเป็นทรงกลม นิวเคลียสจะยื่นออกมาและมีขนาดใหญ่ ในวันที่ 4 ซึ่งมีปริมาณฮอร์โมนเอกไดโซนสูงที่สุด ลักษณะของเซลล์จะเหมือนกับวันที่ 2 แต่จะมี fat body และ hemocyte มาอยู่ใกล้กับตัวต่อมโปรทอแรกซิกในวันที่ 6 fat body และ hemocyte จะเริ่มกินเซลล์ของต่อมโปรทอแรกซิกและในบางเซลล์จะเกิดการอัดแน่นของนิวเคลียสขึ้นและจะเริ่มอัดแน่นกันมากขึ้นในวันที่ 8 จะมีการเกิด vacuole ขึ้นในไซโทพลาสซึม ในวันที่ 10 จะเกิดการแตกหักของนิวเคลียส ส่วนของเซลล์ที่ตายจะถูกปกคลุมด้วย hemocyte ขนาดเล็กเป็นจำนวนมาก ในวันที่ 12 นิวเคลียสและไซโทพลาสซึมที่เหลือจะถูกคลุมด้วย hemocyte จะไม่ค่อยเหลือส่วนของไซโทพลาสซึมที่เป็นปกติ และในวันที่ 14 ของระยะดักแด้จะเหลือแต่ซากของเซลล์ที่ตายแล้ว และ hemocyte ขนาดเล็กๆ ซึ่งลักษณะเซลล์ของต่อมโปรทอแรกซิกดังที่ได้กล่าวมานี้ได้แสดงให้เห็นถึงการสลายตัวของต่อมอย่างสมบูรณ์โดยโปรแกรมการตายของเซลล์นั่นเอง

ต่อมาในปี Dai and Gilbert (1998) ได้ทำการศึกษาต่อโดยศึกษาผลของฮอร์โมนจูวีไนล์ต่อการป้องกันการเกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ในต่อมโปรทอแรกซิกพบว่า ถ้าให้ฮอร์โมนจูวีไนล์ในช่วง 16-18 ชั่วโมงหลังจากที่หนอนเข้าสู่ระยะดักแด้จะทำให้ต่อมโปรทอแรกซิกสร้างฮอร์โมนเอกไดโซนได้จนถึงวันที่ 11 หลังจากที่ได้รับฮอร์โมนจูวีไนล์ แต่ในกลุ่มที่ไม่ได้รับฮอร์โมนจูวีไนล์ปริมาณเอกไดโซนจะลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 6 ของระยะดักแด้ และเมื่อทำการตรวจสอบคุณลักษณะของต่อมในวันที่ 9 พบว่าต่อมเกิดการแตกหักขึ้นแสดงให้เห็นว่าฮอร์โมนจูวีไนล์สามารถรักษาค่อมโปรทอแรกซิกไว้ได้ และ Dai and Gilbert (1999) พบว่าเมื่อปริมาณของฮอร์โมนเอกไดโซนลดลงต่อมโปรทอแรกซิกของหนอนไวยาสูบจะสลายไป ซึ่งฮอร์โมนเอกไดโซนอาจมีผลชักนำให้เซลล์เกิดการตายได้ Dai and Gilbert (1999) ได้ทำการศึกษาต่อพบว่าการสลายตัวของต่อมโปรทอแรกซิกในหนอนไวยาสูบจะเกิดขึ้นหลังจากที่ปริมาณฮอร์โมนเอกไดโซนลดลงในระหว่างการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยทำการเลี้ยงต่อมโปรทอแรกซิกใน Grace' insect medium ที่ไม่มีฮอร์โมน 20E และมีฮอร์โมน 20E ที่ความเข้มข้น 0.07 0.7 และ 7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีเซลล์มีการหดตัวและเกิดการอัดแน่นของนิวเคลียสขึ้นในชั่วโมงที่ 48 และเพิ่มมากขึ้นในชั่วโมงที่ 96 ในกลุ่มที่ให้ฮอร์โมน 20E ที่ความเข้มข้น 7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าการอัดแน่นของนิวเคลียส 100% ในกลุ่มที่ให้ฮอร์โมน 20E ที่ความเข้มข้น 0.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จะเกิดมากกว่า 50% และในกลุ่มที่ให้ฮอร์โมน 20E ที่ความเข้มข้น 0.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร จะไม่มีการเกิดการอัดแน่นของนิวเคลียสขึ้นเลย และพบว่าในกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนความเข้มข้น 0.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ช่วงเวลาน้อยที่สุดของฮอร์โมน 20E ที่สามารถชักนำให้เกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ในต่อมโปรทอแรกซิกคือ 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 2.10)



ภาพที่ 2.10 แสดงการเกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ในต่อมโปรทอแรกซิก (ที่มา : Dai and Gilbert, 1999)

(ก) ไม่มีฮอร์โมน 20E

(ข) มีฮอร์โมน 20E

2.4.2 การศึกษาการเกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ในต่อมน้ำลาย

ต่อมน้ำลายจัดเป็นต่อมที่เจริญมากที่สุดในส่วนหัว สามารถพบในแมลงเกือบทุกชนิด ลักษณะเป็นท่อยาวธรรมดา แตกแขนงเป็นท่อเล็กๆ รวมเป็นจุด บางที่ขยายใหญ่ขึ้น มีหน้าที่หลั่งน้ำย่อยออกมาเพื่อช่วยย่อยอาหาร หลั่งสารพวก anticoagulin เพื่อไม่ให้เลือดแข็งตัวในพวกแมลงกินเลือดและทำหน้าที่ในการสร้างเส้นใยในพวกตัวอ่อนของแมลงอันดับ Lepidoptera และ Hymenoptera บางชนิดในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลงแต่ละครั้งจะมีการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์เกิดขึ้น การเปลี่ยนแปลงอย่างหนึ่งที่ได้ชัดเจนคือ เมื่อตัวอ่อนเจริญถึงขั้นสุดท้ายแล้วเนื้อเยื่อของตัวอ่อนจะสลายไปและมีการสร้างโครงสร้างใหม่ที่สำคัญสำหรับตัวเต็มวัยแทน ซึ่งต่อมน้ำลายเป็นโครงสร้างหนึ่งที่จะมีการสลายไประหว่างการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลง เช่น ในแมลงหัวต่อมน้ำลายเป็นเนื้อเยื่อที่มีความเหมาะสมสำหรับการศึกษาโปรแกรมการตายของเซลล์และการวิเคราะห์ลำดับของยีนที่ถูกชักนำโดยฮอร์โมนเอกไดโซนในกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลง (Farkas and Mechler, 2000) ซึ่งรูปแบบการตาย

ของต่อมน้ำลายจะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างเป็นลำดับขั้นตอนอย่างเห็นได้ชัด โดยจะมีการพองตัวของโครโมโซมเกิดขึ้นในช่วงท้ายของระยะตัวหนอนไปจนถึงช่วงก่อนการเข้าสู่ระยะดักแด้ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้จะถูกควบคุมโดย early และ late gene (Ashburner, 1974; Russell and Ashburner, 1996) การแสดงออกของ early gene จะถูกชักนำโดยเอกไดโซนรีเซพเตอร์โดยตรงให้มีการสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายขึ้นมาส่งผลให้ยีนที่เกี่ยวข้องทั้งหมดเกิดการแสดงออกแล้วชักนำให้เซลล์ตายได้และได้ศึกษาการตายของเซลล์ในต่อมน้ำลายของผึ้ง (*A. mellifera*) พบว่าในช่วงระยะอินสตาร์สุดท้ายของตัวหนอน นิวเคลียสของต่อมน้ำลายส่วนใหญ่จะเริ่มรวมตัวกันและมีการอัดแน่นของเส้นใยโครมาตินภายในนิวเคลียส นิวเคลียสของเซลล์จะเกิดการตายแบบ apoptosis และ autophagic ส่วนในช่วงก่อนการเข้าดักแด้ เส้นใยโครมาตินในนิวเคลียสจะมีการหดตัวเกิดมากขึ้นตามลำดับ และจะมอดแน่นกันอยู่ข้างเยื่อหุ้มของต่อมน้ำลายจนเกิดการสลายตัวและตายไปในที่สุด (Silva *et al.*, 2002)

2.4.3 การศึกษาการเกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ในต่อมสร้างไหม

ต่อมสร้างไหมเป็นเนื้อเยื่อที่จำเพาะของตัวหนอนในแมลงอันดับ Lepidoptera โดยต่อมนี้นประกอบไปด้วยสามส่วนด้วยกันคือ ส่วนต้น (anterior) ส่วนกลาง (middle) และส่วนท้าย (posterior) มีการศึกษาการเกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ในต่อมสร้างไหมส่วนต้นในหนอนไหม (*B. mori*) โดยดูจากการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของการเกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ในสภาวะ *in vivo* พบว่าจะเริ่มเกิดขึ้นในวันที่ 2 หลังจากการตรวจพบ gut purge ส่วนในวันที่ 0 และ 1 ของการเกิด gut purge ลักษณะเซลล์ของต่อมสร้างไหมส่วนต้นจะเหมือนในหนอนที่ยังไม่มี gut purge คือ เซลล์จะเรียงตัวเป็นระเบียบ อาจเห็นขอบเขตของเซลล์บ้างแต่จะไม่มีช่องว่างระหว่างเซลล์เกิดขึ้น ต่อมาในวันที่ 2 เซลล์จะมีลักษณะทึบแสงและสามารถสังเกตเห็นขอบเขตของเซลล์ได้ชัดเจน วันที่ 3 เซลล์จะเริ่มมีรูปร่างทรงกลม จะเกิดการอัดแน่นของเซลล์และนิวเคลียสขึ้น จากนั้นเมื่อหนอนเข้าสู่ระยะดักแด้ในช่วง 1 ชั่วโมงแรกพบว่า นิวเคลียสจะมีการอัดแน่น ผนังด้านนอกของต่อมจะมีการหดตัว และ 12 ชั่วโมงต่อมาเซลล์จะเริ่มแยกออกจากกัน ผิวภายนอกของต่อมจะถูกล้อมรอบด้วย basement membrane ในชั่วโมงที่ 24 เซลล์จะแยกจากกันอย่างสมบูรณ์เห็นส่วนที่เป็นสีกด้า ที่ 36 ชั่วโมง ส่วนที่มีสีกด้าจะมาเกาะกลุ่มและรวมกันในช่วง 42 ชั่วโมง และจะหายไปในช่วง 48 ชั่วโมง การศึกษาผลของฮอร์โมน 20E ต่อการเกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ของต่อมสร้างไหมส่วนต้นในสภาวะ *in vivo* โดยนำต่อมสร้างไหมส่วนต้นมาเลี้ยงใน Grace's insect medium ที่มีฮอร์โมน 20E ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าลักษณะการตายสามารถแบ่งระดับการเปลี่ยนแปลงออกได้เป็น 6 ระดับคะแนนการตาย ดังนี้คือ

- score 0 ลักษณะของเซลล์ยังเป็นปกติ
- score 1 เริ่มสังเกตเห็นช่องว่างระหว่างเซลล์
- score 2 เซลล์ทั้งหมดเปลี่ยนเป็นสีทึบแสง
- score 3 เซลล์จะมีการอัดตัวแน่นเป็นรูปทรงกลม
- score 4 เซลล์มีการหดตัวและเป็นสีคล้ำ
- score 5 ลักษณะของเซลล์ภายนอกผิดปกติ มีการอัดแน่นของส่วนที่เป็นสีคล้ำแตกออกเป็นเม็ดเล็กๆ หลายขนาด
- score 6 เกิดการแตกหักของต่อมเป็น granule เล็กๆ หลายขนาด

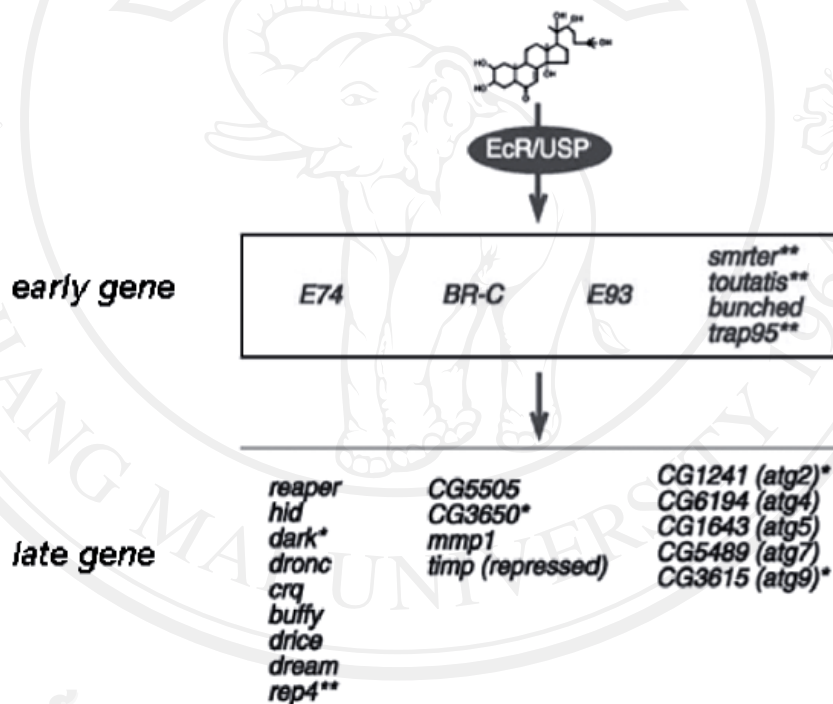
การเกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ในต่อมสร้างใหม่ส่วนต้นขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของฮอร์โมน 20E ที่ได้รับ โดยฮอร์โมนที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร จะเกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ได้อย่างสมบูรณ์เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 144 ชั่วโมง และนอกจากนี้ยังได้ทำการตรวจหาการเกิด nucleosomal ladder จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต่อมสร้างใหม่ส่วนต้นที่เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับ 2 4 และ 6 โดยใช้วิธีเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสพบว่า nucleosomal ladder จะเริ่มเกิดขึ้นในการเปลี่ยนแปลงระดับที่ 4 หรือในระดับที่มากกว่า การเกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ของต่อมสร้างใหม่ส่วนต้นนี้สามารถถูกยับยั้งได้โดย caspase 3 inhibitor เมื่อเติมสารเข้าไปในช่วง 8 ชั่วโมงแรกที่ทำให้การเพาะเลี้ยงใน medium ที่มีฮอร์โมน 20E แต่จะไม่สามารถยับยั้งการเกิดการอัดแน่นของโครมาตินได้เมื่อตรวจสอบโดยการย้อมด้วย acridine orange ในทำนองเดียวกันกับ cyclohexamide และ emetine ที่ให้ไปใน 18 ชั่วโมงแรก จะสามารถยับยั้งการเกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 8 และ 18 ชั่วโมง ตามลำดับ (Terashima *et al.*, 2000) มีการศึกษาช่วงเวลา que ต่อมสร้างใหม่ส่วนต้นถูกกำหนดให้ตาย (death commitment) โดยทำการตรวจสอบการตอบสนองต่อฮอร์โมน 20E และฮอร์โมน JHA ของต่อมสร้างใหม่ส่วนต้นในสภาวะ *in vivo* และ *in vitro* พบว่าต่อมสร้างใหม่ส่วนต้นของหนอนไหมอินสตาร์สุดท้ายวันที่ 6 จะเกิดโปรแกรมการตายของเซลล์อย่างสมบูรณ์เมื่อเลี้ยงใน medium ที่มีฮอร์โมน 20E ในขณะที่ต่อมสร้างใหม่ส่วนต้นของหนอนไหมในวันที่ 4 และช่วง 15 ชั่วโมงแรกของวันที่ 5 จะไม่เกิดโปรแกรมการตายของเซลล์แต่จะเริ่มเกิดขึ้นหลังจากชั่วโมงที่ 18 ของวันที่ 5 ซึ่งฮอร์โมน JHA จะไม่สามารถยับยั้งการเกิดการตายของต่อมสร้างใหม่ส่วนต้นได้เมื่อมีการเริ่มตอบสนองต่อฮอร์โมน 20E แสดงให้เห็นว่า death commitment อาจะเกิดในระหว่างวันที่ 4 และวันที่ 5 นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษา death commitment ของต่อมสร้างใหม่ส่วนต้นในหนอนไหมอินสตาร์ที่ 4 โดยทำการผ่าตัดเอาต่อมคอร์ปอรา อัลลาตา ออก (allatectomy) โดยนำต่อมสร้างใหม่ส่วนต้นของชั่วโมงที่ 72 และ 96 ซึ่งเป็นช่วง 24-48 ชั่วโมงก่อนที่จะเกิด gut purge

ขึ้นในหนอนที่ทำการผ่าตัดเอาต่อมคอร์ปอรา อัลลาตา ออก ผลที่ได้พบว่าจะคล้ายคลึงกับผลของหนอนอินสตาร์สุดท้าย แสดงว่าเซลล์อาจจะถูกกำหนดให้ตาย 1 วันก่อนที่จะสามารถตอบสนองต่อฮอร์โมน 20E นั้นเอง (Kakei *et al.*, 2005) และยังได้มีศึกษาการตายของเซลล์ในต่อมสร้างไหมของ *A. mellifera* พบว่านิวเคลียสของเซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis และ autophagy ลักษณะการตายของเซลล์ที่เกิดขึ้นก็มีการหดตัวและการแตกหักของนิวเคลียสและพบการอัดแน่นของโครมาตินในหลายนิวเคลียสอีกด้วย (Silva *et al.*, 2006) ต่อมาในปีเดียวกันนี้เอง Sekimoto *et al.* พบว่าการเกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ในต่อมสร้างไหมส่วนต้นของหนอนไหม (*B. mori*) ระยะอินสตาร์ที่ 5 ถูกกระตุ้นโดยฮอร์โมน 20E และพบการแสดงออกของ transcription factor gene ทั้ง 11 ชนิดที่สามารถชักนำให้เซลล์เกิดการตายขึ้น ได้แก่ *EcR-A*, *EcR-B1*, *usp-1*, *usp-2*, *E75A*, *E75B*, *BHR3*, *BR-C Z1*, *BR-C Z2*, *BR-C Z4* และ β *FTZ-F1* เป็นต้น Manaboon *et al.* (2012) ได้พบว่าฮอร์โมน JHA สามารถทำให้ระยะไคอะพอสของหนอนเยื่อไผ่สิ้นสุดลง โดยจะมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณเอกโคไซโนในฮีโมลิฟท์ที่จะไปกระตุ้นให้เกิดโปรแกรมการตายของเซลล์เนื่องจากผลในทางอ้อมของฮอร์โมน JHA ที่ชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ในเนื้อเยื่อต่อมสร้างไหมส่วนต้นของหนอนเยื่อไผ่ระยะไคอะพอสได้ โดยสามารถแบ่งระดับการเปลี่ยนแปลงของต่อมสร้างไหมส่วนต้นออกได้เป็น 6 ระดับคะแนนการตาย (ตั้งแต่ระดับ score 0-5) ดังนี้คือ

- score 0 ลักษณะของท่อไหมส่วนต้นจะเป็นท่อตรง ไม่สามารถสังเกตเห็นขอบเขตของเซลล์ได้ เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงธรรมดา ลักษณะนิวเคลียสจะมีรูปทรงยาว ลักษณะของท่อจะโปร่งแสง
- score 1 เซลล์เริ่มมีการหดตัวทำให้สามารถสังเกตเห็นขอบเขตของเซลล์ได้ นิวเคลียสมียาวแต่จะเริ่มเกิดการอัดแน่นขึ้น ลักษณะของท่อจะโปร่งแสง
- score 2 เซลล์จะมีการหดตัวและนิวเคลียสจะมีการอัดแน่นเข้าหากันมากขึ้น ทำให้มีลักษณะเซลล์และนิวเคลียสเป็นทรงกลม
- score 3 ลักษณะภายนอกของท่อไหมส่วนต้นในบางบริเวณจะทึบแสง นิวเคลียสมีการอัดแน่น เซลล์แยกห่างจากกันมากขึ้น
- score 4 นิวเคลียสของแต่ละเซลล์จะหดเข้ามาอยู่ใกล้กันทำให้เกิดช่องว่างระหว่างเซลล์ชัดเจน
- score 5 ต่อมสร้างไหมส่วนต้นจะเสถียรภาพ มี apoptotic bodies ขนาดเล็กๆ กระจายทั่วไปและจะไม่พบเซลล์และนิวเคลียสที่สมบูรณ์

2.5 การควบคุมโปรแกรมการตายของเซลล์โดยฮอร์โมนแมลงในระดับโมเลกุล

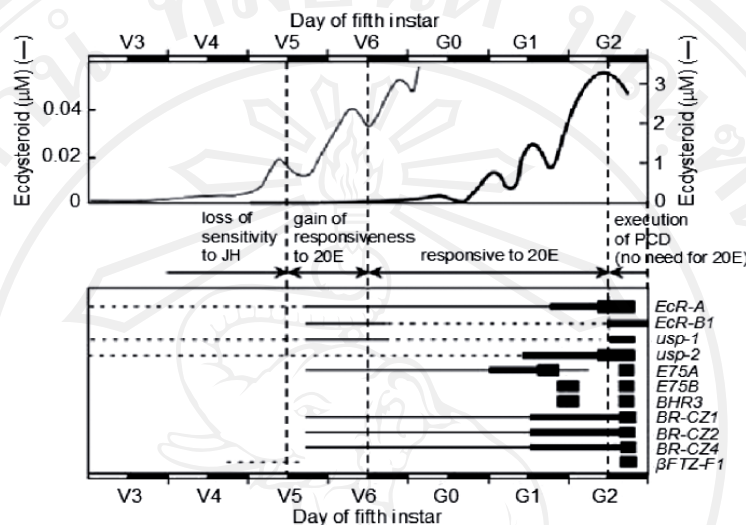
ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าฮอร์โมน 20E มีผลไปกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา การศึกษาเรื่องการตายของเซลล์โดยอาศัยการทดลองในทางเดินอาหารส่วนกลางและต่อมน้ำลายแสดงให้เห็นว่าฮอร์โมนเอกไดโซนมีผลต่อการควบคุมการตายของเซลล์ในระดับโมเลกุลของยีนผ่าน 2 กลไก กลไกแรกจะไปกระตุ้นการทำงานของ early gene กลไกที่สองเป็นผลเนื่องมาจากการกระตุ้นของ early gene ต่อยีนที่ควบคุมการตาย กลไกแรกเริ่มจากการจับกันระหว่างฮอร์โมนเอกไดโซนกับรีเซพเตอร์ของฮอร์โมน ชื่อ เอกไดโซนรีเซพเตอร์กับ partner protein ชื่อ อัลตราสไปราเกิดการจับกันของฮอร์โมนกับรีเซพเตอร์นี้จะไปมีผลกระตุ้นให้เกิดการทำงานของ early gene ได้แก่ *BR-C*, *E74* และ *E93* (Yin and Thummel, 2005; Sekimoto *et al.*, 2006) (ภาพที่ 2.11)



ภาพที่ 2.11 แสดงการกระตุ้นการทำงานของเอกไดโซนรีเซพเตอร์ โปรตีนอัลตราสไปราเคิล และยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ในต่อมน้ำลายของหนอนไหมระยะตัวหนอน

(ที่มา : Yin and Thummel, 2005)

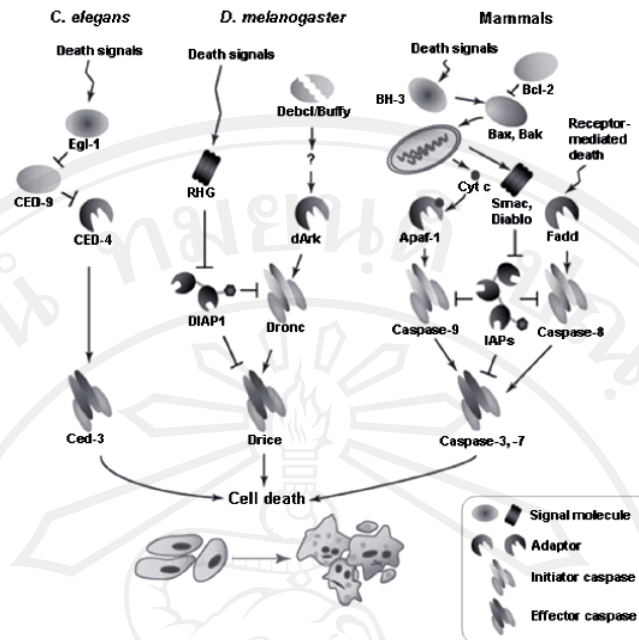
การควบคุมโดยยีนที่กล่าวมามีความคล้ายคลึงกับการควบคุมโดยยีนที่พบในแมลงอันดับ Lepidoptera ชนิดอื่นเช่น หนอนไหม (*B. mori*) และหนอนใบยาสูบ (*M. sexta*) ในหนอนไหมพบว่าฮอร์โมน 20E มีผลไปกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อ 20E (20E responsive genes) คือ early gene ได้แก่ *EcR*, *USP*, *BR-C*, *E74*, *E75* และ *E93* (Sekimoto *et al.*, 2006; Myer *et al.*, 2009) (ภาพที่ 2.12)



ภาพที่ 2.12 แสดงการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่สัมพันธ์กับระดับฮอร์โมนเอกโดโซนในฮีโมลิฟท์ ในระยะการเจริญขึ้นต่างๆ V = ตัวหนอนระยะที่ 5 เลขที่ระบุด้านหลังตัวอักษร V หมายถึงอายุของตัวหนอนในระยะที่ 5 (วัน) G = ตัวหนอนระยะก่อนเข้าดักแด้ เลขที่ระบุด้านหลังตัวอักษร G หมายถึงอายุของตัวหนอนระยะก่อนเข้าดักแด้

(ที่มา : Sekimoto *et al.*, 2006)

การทำงานของ *BR-C* และ *E74* จะขึ้นกับระดับของเอกโดโซนในฮีโมลิฟท์ที่สูงขึ้น แต่ยีน *E79* เป็นยีนที่แสดงออกอย่างจำเพาะเจาะจงในแต่ละระยะการเจริญ การควบคุมของยีนทั้งสามตัวมีผลกระตุ้นการทำงานของยีนที่ควบคุมการตายหลายตัวเช่น *rpr* (*reaper*), *hid* (*head involution defective*) และ *dronc* (ภาพที่ 2.13) การศึกษาทางพันธุศาสตร์โดยเทคนิค RNA interference (RNAi) ให้ผลยืนยันว่ายีน *rpr* และ *hid* เป็นยีนที่จำเป็นต่อการส่งสัญญาณให้เซลล์ตาย และพบว่า *BR-C* มีผลโดยตรงต่อการแสดงออกของ *dronc* (Cakouros *et al.*, 2002) ความผิดปกติของยีน *E93* ไปมีผลทำให้การแสดงออกของ death gene เช่น *rpr*, *hid*, *dronc* และ *crq* ลดลง (Lee *et al.*, 2002)



ภาพที่ 2.13 แสดงการส่งสัญญาณระดับเซลล์เพื่อควบคุมการตายของเซลล์ในหนอนตัวกลม แมลงหวี่ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยมีเอนไซม์แคสเปสเป็นตัวกลาง

(ที่มา : Hay and Guo, 2006)

2.6 Broad-Complex gene (BR-C)

ยีน *Broad-Complex* เป็นยีนแรกที่มีการตอบสนองต่อ ecdysteroid signaling pathway ยีนนี้จัดอยู่ในกลุ่มของ C_2H_2 zinc finger transcription factors ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการต่างๆ ของแมลง ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย การสร้างไข่แดง เป็นต้น (Deng and Bownes, 1997; Chen *et al.*, 2004; Reza *et al.*, 2004; Dubrovsky, 2005; Spokony and Restifo, 2007) มีการศึกษาทางระดับโมเลกุลดังนี้คือ ในแมลงหวี่ (*D. melanogaster*) พบว่ายีน *BR-C* มีบริเวณที่แตกต่างกันจึงทำให้สามารถแยกยีนชนิดนี้ออกได้เป็น 4 ไอโซฟอร์มคือ Z1 Z2 Z3 และ Z4 ซึ่งส่วนที่มีความเหมือนกันมากที่สุดของยีน *BR-C* จะเรียกว่า BRcore และในบริเวณ BRcore ยังมีส่วนของ *BR-C* Tramtrack-Bric-a-Brac (BTB) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการติดต่อสื่อสารระหว่างโปรตีนอีกด้วย (Dibello *et al.*, 1991) มีการศึกษาการแสดงออกของยีนชนิดนี้ในแมลงต่างๆ เช่น ใน *A. gambiae* (Chen *et al.*, 2004) *M. sexta* (Zhou *et al.*, 1998) และ *B. mori* (Ijiro *et al.*, 2004; Nishita and Takiya, 2004; Reza *et al.*, 2004) ซึ่งแสดงออกของยีนจะขึ้นอยู่กับปริมาณฮอร์โมนเอกไดโซนงานวิจัยที่ได้ศึกษาความสำคัญของยีน *BR-C* ต่อการควบคุม

การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลงคั้งนี้คือ ในปี 1998 Zhou *et al.* พบว่า ยีน *BR-C* จะช่วยให้การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลงเป็นไปอย่างค่อยเป็นค่อยไปจนกระทั่งเข้าสู่กระบวนการลอกคราบ จากนั้น ยีนจะมีการแสดงออกลดลงในช่วงการเป็นดักแด้ (pupation) ต่อมาในปีเดียวกันนี้เอง Kiss *et al.* ได้ทำการศึกษาใน *D. melanogaster* พบว่าหากมีการแสดงออกของยีน *BR-C* ในแต่ละไอโซฟอร์มใน ระยะการเป็นตัวหนอนแล้วหนอนไม่สามารถลอกคราบเป็นดักแด้ได้ Reza *et al.* (2004) ได้สกัดตัวอย่าง cDNA ที่มียีน *BR-C* ออกมาจากต่อมสร้างไหมส่วนต้นของหนอนไหม (*B. mori*) และตรวจสอบการแสดงออกของยีน พบว่ามีการแสดงออกของยีน *BR-C* ทั้ง 4 ไอโซฟอร์มในหลายเนื้อเยื่อ ได้แก่ เนื้อเยื่อ ต่อมสร้างไหมส่วนต้น ระบบประสาทส่วนกลาง เนื้อเยื่อไขมัน ทางเดินอาหารส่วนกลาง รังไข่ และ ปุ่มปีก การแสดงออกของ *BR-C* mRNA จะพบในช่วงของตัวหนอนระยะอินสตาร์สุดท้ายจนกลายไปเป็น ดักแด้ แต่จะไม่พบการแสดงออกในตัวหนอนระยะอินสตาร์ต้นๆ โดยที่ฮอร์โมน 20E สามารถชักนำให้มีการแสดงออกของยีน *BR-C* ได้ Piulachs *et al.* (2010) ได้ศึกษาหน้าที่ของยีน *BR-C* ในกระบวนการ embryogenesis โดยได้โคลนยีน *BR-C* ในแมลงสาบ (*Blattella germanica*) โดยพบว่ายีน *BR-C* ในแมลงสาบมีอยู่ด้วยกัน 6 ไอโซฟอร์มคือ Z1-Z6 ซึ่ง Z1-Z5 ในแมลงทั่วไปจะมีลำดับของกรดอะมิโน ที่คล้ายคลึงกัน ส่วนไอโซฟอร์ม Z6 ถูกค้นพบใหม่ ได้ทำการทดลองโดยวิธี RNAi โดยฉีด dsBg*BR-C* ปริมาณ 1 ไมโครกรัม เข้าที่ช่องท้องของแมลงสาบเพศเมียที่กำลังท้องอยู่แล้วตรวจดูการเจริญของตัวอ่อน ภายในท้องพบว่าตัวอ่อนที่ได้มีหลากหลายฟีโนไทป์ (phenotype) ซึ่งชี้ให้เห็นถึงบทบาทของ Bg*BR-C* ต่อการเจริญของตัวอ่อน เช่น มีการสะสมของ germ band เพิ่มขึ้นจาก 30% เป็น 35% ของการเจริญ ทั้งหมด มีการเจริญของเยื่อหุ้มตัวอ่อนและการพัฒนาของอวัยวะขั้นที่ 2 เกิดขึ้นทางด้านบนของลำตัว และในขั้นตอนของกระบวนการฟักตัวจะมีการประสานงานกันระหว่างระบบประสาท ระบบต่อมไร้ท่อ และระบบกล้ามเนื้อเกิดขึ้นอีกด้วย

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับหนอนเยื่อไผ่ทางด้านฮอร์โมน

ผู้ริเริ่มศึกษางานวิจัยเกี่ยวกับฮอร์โมนในหนอนเยื่อไผ่เป็นคนแรกคือ ศาสตราจารย์ ดร. ทิพวรรณ สิงห์ไตรภพ โดยมีลำดับการค้นพบงานวิจัยต่างๆ ดังนี้ ในช่วงระยะไคอะพอสของหนอนเยื่อไผ่พบว่ามีปริมาณของ ฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมฟ์น้อยมาก แสดงว่าต่อมโปรทอแรกซิกมีกิจกรรมการหลั่งฮอร์โมนต่ำ งานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่า การให้ฮอร์โมน JHA แก่หนอนเยื่อไผ่ระยะไคอะพอสสามารถชักนำให้เกิด การเข้าดักแด้ได้โดยเกิดการกระตุ้นต่อมโปรทอแรกซิกและไม่เกี่ยวข้องกับสมอง โดยหลังจากการให้ฮอร์โมน JHA พบว่ากิจกรรมการหลั่งฮอร์โมนของต่อมเพิ่มขึ้น จนเป็นผลให้ปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนเพิ่มขึ้น

ภายใน 2 สัปดาห์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าฮอร์โมน JHA อาจไม่ได้กระตุ้นต่อมไทรอยด์ให้สังเคราะห์ฮอร์โมนเอคไดโซนได้โดยตรง ดังนั้นใน จึงได้ทำการศึกษาดังปริมาณฮอร์โมน JHA ที่น้อยที่สุด ที่สามารถกระตุ้นต่อมไทรอยด์ได้ โดยการให้ฮอร์โมน JHA ที่ความเข้มข้น 0.1 0.25 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรของอะซิโตน แล้วทำการปลูกถ่ายต่อมไทรอยด์ (transplantation) ของ donor larvae ให้กับหนอนที่ไม่ได้รับฮอร์โมน (recipient larvae) ในวันที่ 1 2 และ 3 หลังจากการให้ฮอร์โมนแล้วสังเกตผลการเปลี่ยนแปลงของ recipient larvae ผลการทดลองพบว่า ระยะเวลาการกระตุ้นของ JHA สำหรับการชักนำการเข้าดักแด้ใช้เวลาอย่างน้อย 1 วัน และปริมาณฮอร์โมน JHA ที่ให้ผลดีที่สุดคือ 1 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรของอะซิโตน นอกจากนี้ยังพบว่าการทำงานของต่อมไทรอยด์จะเพิ่มขึ้นในวันที่ 16 หลังจากปลูกถ่ายต่อมไทรอยด์ เป็นผลให้ปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมฟ์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าฮอร์โมน JHA กระตุ้นต่อมไทรอยด์ของ donor larvae และปริมาณฮอร์โมนจากต่อมของ donor larvae มีผลไปกระตุ้นต่อมไทรอยด์ของ recipient larvae (recipient PG) ทำให้การเพิ่มขึ้นของปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมฟ์ ดังนั้น recipient PG ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอคไดโซนที่หลั่งออกมา โดยผ่านกลไก positive feedback activation เมื่อปริมาณฮอร์โมนเอคไดโซนเหนือระดับ threshold หรือถึงระดับ suprathreshold ในการศึกษาการแสดงออกของ *EcR* mRNA ของหนอนเชื้อไฟ และการทำ cloning *EcR* พบว่า *Omphisa EcR* มีขนาด 973 คู่เบส จากการเปรียบเทียบการแสดงออกของ *EcR* mRNA ของต่อมไทรอยด์ของหนอนที่ได้รับและไม่ได้รับฮอร์โมน JHA พบว่ามีการเพิ่มการแสดงออกของ *Omphisa EcR* mRNA ในต่อมไทรอยด์ของหนอนที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน JHA สูงกว่าในหนอนกลุ่มที่ไม่ได้รับฮอร์โมน แสดงให้เห็นว่าฮอร์โมน JHA เกี่ยวข้องกับการสิ้นสุดของระยะลาวัลโคอะพอสในหนอนเชื้อไฟ โดยมีการเพิ่มขึ้นของระดับฮอร์โมนเอคไดโซนในฮีโมลิมฟ์และเพิ่มการแสดงออกของ *EcR* mRNA ในต่อมไทรอยด์ (มนพร, 2546)

ปี 2549 ทิพวรรณ ชะสง่า ได้ศึกษาผลของฮอร์โมน JHA และฮอร์โมน 20E ต่อการเกิดโปรแกรมการตายของต่อมไทรอยด์ ต่อสร้างใหม่ส่วนต้น และต่อมน้ำลายของหนอนเชื้อไฟทั้งในสภาวะ *in vivo* และ *in vitro* ผลการศึกษาพบว่า การให้ฮอร์โมน JHA 1 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรของอะซิโตน จะกระตุ้นการเกิดโปรแกรมการตายของต่อมไทรอยด์ ต่อสร้างใหม่ส่วนต้น และต่อมน้ำลายเมื่อหนอนเข้าสู่ระยะ G0 ส่วนกลุ่มที่ฉีดฮอร์โมน 20E 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าจะกระตุ้นการเกิดโปรแกรมการตายของต่อมสร้างใหม่ส่วนต้นและต่อมน้ำลายเมื่อหนอนเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะ G0-G1 ยกเว้นในต่อมไทรอยด์ที่จะเกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ขึ้นในวันที่ 1 การที่ฮอร์โมน JHA

สามารถชักนำให้เกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ในต่อมทั้ง 3 เป็นผลมาจากฮอร์โมน JHA ไปกระตุ้นต่อมโปรทอแรกซิกทำให้ปริมาณฮอร์โมนเอกไดโซนในฮีโมลิมฟ์เพิ่มขึ้น และระดับฮอร์โมนเอกไดโซนที่เพิ่มขึ้นนี้จะไปกระตุ้นการเกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ นอกจากนี้การศึกษาทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเนื้อเยื่อวิทยาของการเกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ แสดงถึงการหดตัวของเซลล์ การอัดแน่นของนิวเคลียส และการแตกหักของ DNA ซึ่งเป็นลักษณะการตายแบบ apoptosis การเพาะเลี้ยงต่อมโปรทอแรกซิก ต่อมสร้างไหมส่วนต้น และต่อมน้ำลายใน Grace's insect medium ที่มีฮอร์โมน 20E ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าฮอร์โมน 20E จะกระตุ้นการเกิดโปรแกรมการตายของต่อมโปรทอแรกซิก ต่อมสร้างไหมส่วนต้น และต่อมน้ำลายหลังจาก 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง แสดงให้เห็นว่าต่อมโปรทอแรกซิก ต่อมสร้างไหมส่วนต้น และต่อมน้ำลายเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายของฮอร์โมน 20E นอกจากนี้พบว่าการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนเอกไดโซนในฮีโมลิมฟ์หลังจากได้รับฮอร์โมน JHA 1 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรของอะซิโตน จะชักนำให้มีการแสดงออกของ *EcR-A* และ *EcR-B1* mRNA ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับ การเกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ทั้ง 3 ชนิด ผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าฮอร์โมน JHA และฮอร์โมน 20E มีผลชักนำให้เกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ของต่อมโปรทอแรกซิก ต่อมสร้างไหมส่วนต้น และต่อมน้ำลายทั้งในสภาวะ *in vivo* และ *in vitro* (ทิพวรรณ, 2549)

ในปี 2551 อรทัย คำสร้อย ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของฮอร์โมนจูวีไนล์เอสเทอร์และการแสดงออกของยีน *OfJhe* ในระหว่างการเจริญของหนอนเชื้อไผ่ พบว่าการทำงานของเอนไซม์ JHE จะเพิ่มขึ้นเมื่อตัวหนอนมีการลอกคราบเข้าสู่ระยะอินสตาร์ที่ 5 ส่วนในระยะไคอะพอส การทำงานของเอนไซม์ JHE จะลดลงมาอยู่ในระดับใกล้เคียงกันกับระยะอินสตาร์ที่ 3 และ 4 หลังจากนั้นการทำงานของเอนไซม์ JHE จะเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งเมื่อตัวหนอนเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ในเดือนพฤษภาคม ในการให้ฮอร์โมน JHA และฮอร์โมน 20E แก่หนอนเชื้อไผ่ระยะไคอะพอส มีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์ JHE ในฮีโมลิมฟ์และเนื้อเยื่อไขมันเพิ่มสูงขึ้น โดยหลังจากการให้ฮอร์โมนการทำงานของเอนไซม์ JHE ในฮีโมลิมฟ์จะมีระดับสูงสุดในช่วงก่อนเข้าดักแด้ แต่ในเนื้อเยื่อไขมันกลับพบว่า ระดับการทำงานของเอนไซม์ JHE จะต่ำ และไม่พบ peak ของการทำงานของเอนไซม์ และยังพบว่าระดับการแสดงออกของ *OfJhe* mRNA ในเนื้อเยื่อไขมันมีความสัมพันธ์กับการทำงานของเอนไซม์ JHE ในฮีโมลิมฟ์ โดยการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อไขมันจะเพิ่มสูงขึ้นในระยะอินสตาร์ที่ 5 ก่อนเข้าสู่ระยะไคอะพอส และลดต่ำลงเมื่อเข้าสู่ระยะไคอะพอส และการแสดงออกของ *OfJhe* จะเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งในช่วงก่อนการลอกคราบเข้าสู่ระยะดักแด้ ในการให้ฮอร์โมน JHA แก่หนอนเชื้อไผ่ระยะไคอะพอส สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ *OfJhe* ในเนื้อเยื่อไขมันให้เพิ่มสูงขึ้น ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 18 หลังจากได้รับฮอร์โมนและ

มีระดับการแสดงออกสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 โดยความเข้มข้นของฮอร์โมน JHA ที่เหมาะสมต่อการชักนำการแสดงออกของ *OfJhe* คือ 0.1 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรของอะซิโตน และหลังจาก 48 ชั่วโมง จะพบการแสดงออกของยีนสูงสุดในวันที่ 10 และระยะ G0 โดยความเข้มข้นของฮอร์โมน 20E ที่เหมาะสมในการกระตุ้นการแสดงออกของ *OfJhe* คือ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ *OfJhe* ในเนื้อเยื่อไขมันหลังจากได้รับฮอร์โมน 20E จะสัมพันธ์กับการทำงานของเอนไซม์ JHE ในฮีโมลิมฟ์ (อรทัย, 2551)

การศึกษาในขั้นต่อมาจึงได้ตรวจสอบการมีส่วนร่วมของยีนเคไคโซนรีเซพเตอร์ (*EcR*) 2 ไอโซฟอร์มคือ ยีน *EcR-A* และ *EcR-B* ในต่อมโปรทอแรกซิกที่ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมน JHA ผลจากการวิจัยพบว่าถึงแม้เคไคโซนรีเซพเตอร์ทั้ง 2 ไอโซฟอร์มมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นพร้อมกับการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนเคไคโซนในฮีโมลิมฟ์ แต่ระดับการแสดงออกของ mRNA ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเลยก่อนการเพิ่มกิจกรรมการหลั่งฮอร์โมนของต่อมโปรทอแรกซิก ดังนั้นการแสดงออกของ *EcR* mRNA อาจไม่ได้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นย้อนกลับ (feedback activation) ของต่อมโปรทอแรกซิก (Singtripop *et al*, 2008)

มีการศึกษาพบว่า การให้ฮอร์โมน JHA แก่หนอนเยื่อไผ่ระยะ 4 จะสามารถชักนำให้เกิดการเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ โดยการเพิ่มปริมาณฮอร์โมนเคไคโซนในฮีโมลิมฟ์สูงขึ้น ฮอร์โมน 20E จะจับกับเคไคโซนรีเซพเตอร์และอัลตราสไปราเคิล ซึ่งเป็น heterodimers และควบคุมกระบวนการถอดรหัสของยีนเป้าหมาย ดังนั้นจึงได้ทำการโคลนยีน *OfUSP-1* และ *OfUSP-2* พบว่า partial sequence ของ *OfUSP-1* มีขนาด 410 คู่เบส และลำดับเบสของ *OfUSP-2* มีขนาด 2005 คู่เบส จากนั้นจึงทำการแสดงออกของ *OfEcR-A*, *OfEcR-B1*, *OfUSP-1* และ *OfUSP-2* mRNA ในสภาวะ *in vivo* และ *in vitro* โดยใช้เทคนิค RT-PCR พบว่าการแสดงออกของ *OfEcR-A* และ *OfEcR-B1* mRNA ลดลงหลังจากได้รับฮอร์โมน JHA ก่อนเข้าสู่ระยะดักแด้ อย่างไรก็ตามการแสดงออกของ *OfEcR-A* และ *OfEcR-B1* mRNA จะเพิ่มขึ้นในช่วงระยะ G1 และ G2 ของการเข้าระยะดักแด้ แล้วลดลงอีกครั้งในระยะ G3 การฉีดฮอร์โมน 20E ทำให้การแสดงออกของ *OfEcR-A* และ *OfEcR-B1* mRNA ลดลงในวันที่ 2 และระยะ G0 แล้วเพิ่มขึ้นอีกครั้งในระยะ G1 และ G2 สำหรับการแสดงออกของ *OfUSP-1* และ *OfUSP-2* mRNA ทั้งในกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมน JHA หรือ 20E จะเพิ่มขึ้นในระยะ G1 จนถึงระยะ G2 แล้วลดลงในระยะ G3 เช่นกัน สำหรับการศึกษาในสภาวะ *in vitro* ทำการเพาะเลี้ยงต่อมโปรทอแรกซิกใน Grace's insect medium ที่เติมฮอร์โมน JHA หรือ 20E ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ผลการทดลองพบว่าฮอร์โมน JHA และ 20E ที่ความเข้มข้นสูงสามารถเพิ่มการแสดงออกของ *OfEcR-A*, *OfEcR-B1*, *OfUSP-1* และ *OfUSP-2* เมื่อเพาะเลี้ยงต่อมใน Grace's insect

medium ที่เดิม JHA 1 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรของอะซิโตน ที่เวลาต่างๆ กัน พบว่าการแสดงออกของ *OfEcR-A* และ *OfEcR-B1* มีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง ในทางตรงกันข้ามการแสดงออกของ *USP-2* มีค่าสูงในชั่วโมงที่ 4 แต่การแสดงออกของ *USP-1* มีค่าสูงในชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง ผลการทดลองที่ได้คล้ายกับผลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต่อมใน Grace's insect medium ที่เดิม 20E 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพบว่าการแสดงออกของ *OfEcR-A* และ *OfEcR-B1* เพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 4 อย่างไรก็ตามพบว่าการแสดงออกของ *OfUSP-1* มีค่าลดลงในขณะที่การแสดงออกของ *OfUSP-2* มีค่าสูงที่ชั่วโมงที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง สรุปได้ว่าฮอร์โมน JHA และ 20E ทำให้สิ้นสุดระยะไคอะพอสของหนอนเยื่อไผ่ โดยมีผลต่อการเพิ่มระดับเอนไซม์แคสเทรอลอยด์ในฮีโมลิมฟ์และเพิ่มการแสดงออกของ *EcR* และ *USP* ในต่อมโปรทอแรกซิก (บุญณวัช, 2553)

การหยดฮอร์โมน JHA สามารถชักนำให้เกิดดักแด้ในหนอนเยื่อไผ่ได้ โดยการกระตุ้นต่อมโปรทอแรกซิกในระยะไคอะพอสของหนอนเยื่อไผ่ เพื่อตรวจสอบหาช่วงเวลาที่มีน้อยที่สุดในการกระตุ้นต่อมโปรทอแรกซิกโดยฮอร์โมน JHA จึงได้ทำการปลูกถ่ายต่อมโปรทอแรกซิกของหนอนเยื่อไผ่ที่ได้รับฮอร์โมน JHA (donors) ไปยังหนอนที่ไม่ได้รับฮอร์โมน JHA ระยะเวลาต่างๆ กัน เมื่อได้รับฮอร์โมนแล้วจึงสังเกตการเปลี่ยนเป็นดักแด้ของหนอนเยื่อไผ่ที่เป็นตัวรับ ผลการศึกษาพบว่า การกระตุ้นต่อมโปรทอแรกซิกโดยฮอร์โมน JHA เป็นระยะเวลา 1 วัน ก็เพียงพอสำหรับการชักนำให้หนอนที่เป็นตัวรับเปลี่ยนเป็นดักแด้ได้ เมื่อตรวจวัดระดับฮอร์โมนเอนโดไคโซนในหนอนตัวรับพบว่าระดับฮอร์โมนเอนโดไคโซนในฮีโมลิมฟ์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 18 ภายหลังการปลูกถ่าย แต่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในระหว่างวันที่ 24-28 ก่อนการเปลี่ยนเป็นดักแด้ เนื่องจากกิจกรรมการทำงานของต่อมโปรทอแรกซิกของหนอนตัวรับมีค่าต่ำกว่าที่จะทำให้เกิดการกระตุ้นและทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนเอนโดไคโซนในฮีโมลิมฟ์ ดังนั้นต่อมโปรทอแรกซิกที่ได้จากหนอนตัวให้ต้องทำหน้าที่ในการสร้างฮอร์โมนเอนโดไคโซนในฮีโมลิมฟ์ของหนอนตัวรับ นอกจากนี้ฮอร์โมนเอนโดไคโซนที่ผลิตมาจากต่อมโปรทอแรกซิกของหนอนตัวให้อาจมีการกระตุ้นไปยังต่อมโปรทอแรกซิกของหนอนตัวรับ (ทิพวรรณ, 2555)