บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

(Discussion)

จากการศึกษาพบว่า specific activity ของเอ็นไซม์ ornithine transcarbamylase และ arginase ในตับของ Bufo melanostictus เพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ระยะตุ่มขาหลังจนถึงระยะตัวสำเร็จและระยะตัวเต็มวัย ผลของการเพิ่มระดับ activity ของเอ็นไซม์ทั้งสองนี้เหมือนกับผลของ Brown, Brown and Cohen (1959) ที่ศึกษา urea cyle enzymes ของ Rana catesbeiana ในขณะที่มี metamorphosis แต่ใน Rana catesbeiana, specific activity ของ ornithine transcarbamylase และ arginase จะเริ่มเพิ่มสูงมากในระยะ metamorphosis แทนที่จะเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ระยะ premetamophosis Dolphin and Frieden (1955) ศึกษาเอ็นไซม์ arginase ใน Bufo terrestris และ Rana hecksheri พบว่า specific activity ของ arginase ของ Rana hecksheri ในระยะ premetamorphosis ไม่เพิ่มสูงขึ้นมากเหมือนของ Bufo terrestris อาจเนื่องจาก Rana hecksheri มีระยะ premetamorphosis และ metamorphosis นานกว่าใน Bufo terrestris ในทำนองเดียวกันการที่ specific activity ของ ornithine transcarbamylase และ arginase ของ Bufo melanostictus เพิ่มสูงขึ้นเร็วกว่าของ Rana catesbeiana ก็อาจมีเหตุผลเช่นเดียวกัน การที่specific activity ของเอ็นไซม์ทั้งสองของ Bufo melanostictus เพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ระยะ premetamorphosis อาจเป็นการเตรียมตัวก่อนที่จะมีการขับถ่าย urea เพิ่มมากขึ้นในขณะที่มี metamorphosis

total activity และ total activity/gm. body wt. ของเอ็นไซม์ ornithine transcarbamylase และ arginase ของ Bufo melanostictus เพิ่มสูงขึ้นในระยะ premetamorphosis เช่นเดียวกับน้ำหนักตัวและน้ำหนักตับ ในระยะขาหน้า total activity และ total activity/gm. body wt. ยังคงเพิ่มสูงขึ้นแม้ว่าน้ำหนักตัวและน้ำหนักตับลดลง total activity และ total activity/gm. body wt. ลดลงในระยะหางหดสั้นและระยะตัวสำเร็จ ศิริวรรณ โกมารทัต (2514) อธิบายถึงการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของ Bufo melanostictus ในขณะที่มี metamorphosis ว่าการที่น้ำหนักตัวในระยะ premetamorphosis เพิ่มขึ้นจนสูงมากที่สุดในระยะที่มีขาหลังเจริญเติบโตเต็มที่ เนื่องจาก hyaluronic acid ในเนื้อเยื่อของตัวอ่อนช่วยทำให้มีการดูดน้ำเข้าตัวมาก ในระยะ metamorphosis ฮอร์โมนจากต่อมไทรอยด์ทำงานได้ดีขึ้นและ steroid hormones ในตัวอ่อนจะช่วยกระตุ้นเอ็นไซม์ hyaluronidase เป็นอิสระและสลาย hyaluronic acid ในเนื้อเยื่อทำให้ดูดน้ำเข้าตัวได้น้อยลงและน้ำหนักตัวจะค่อย ๆ ลดลง แต่การทดลองหาน้ำหนักแห้งทั้งตัว (dry weight) ของ Bufo melanostictus ในขณะที่มี metamorphosis พบว่าน้ำหนักแห้งทั้งตัวเพิ่มขึ้นสูงมากที่สุดในระยะขาหน้าแล้วค่อย ๆ ลดลงในระยะหางหดสั้นและระยะตัวสำเร็จ การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งทั้งตัวมีลักษณะใกล้เคียงกับการเปลี่ยนแปลง total activity และ total activity/gm. body wt. ของเอ็นไซม์ ornithine transcarbamylase และ arginase นอกจากนี้ Balinsky (1970) กล่าวว่าในขณะที่มี metamorphosis ของ amphibian นั้น นอกจากจะมีการสูญเสียเนื้อเยื่อบางอย่างเช่นเหงือกและหางแล้วเนื้อเยื่ออื่น ๆ ที่ไม่ได้เป็นพวกที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจะมีการหดตัวด้วย และ amphibian ในระยะ post metamorphosis มีส่วนหัวและลำตัวเล็กกว่าระยะก่อนที่จะมี metamorphosis ดังนั้นการเปลี่ยนแปลง total activity และ total activity/gm. body wt. ของ

ornithine transcarbamylase และ arginase ของ Bufo melanostictus เกิดเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตับนั่นเอง

การที่ specific activity ของเอ็นไซม์ทั้งสองยังคงเพิ่มสูงขึ้นในขณะที่มี metamorphosis แม้ว่าน้ำหนักตับลดลง ทำให้เชื่อว่ามีการสังเคราะห์เอ็นไซม์เพิ่มมากขึ้น สาเหตุที่มีการสังเคราะห์เอ็นไซม์เพิ่มมากขึ้นนี้อาจเนื่องมาจากในขณะที่มี metamorphosis ฮอร์โมนจากต่อมไทรอยด์ทำให้ปริมาณน้ำในตัวของ amphibian ลดน้อยลง ทำให้มี ammonia สะสมอยู่ในร่างกายเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะเป็นการกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์เอ็นไซม์ที่จะเปลี่ยน ammonia ให้เป็น urea เพิ่มมากขึ้นด้วย (Weber, 1967) นอกจากนี้ยังมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของปากและสูญเสีย horny teeth ทำให้กินอาหารพวกพืชได้น้อยลง (Balinsky, 1970) และจากศึกษาการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบทางเคมีในเนื้อเยื่อของ Bufo vulgaris (Urbani, 1957) พบว่า total nitrogen, total lipids และ total carbohydrates ในระยะที่มี metamorphosis นั้นมีระดับต่ำกว่าในระยะที่มีขาหลังเจริญเติบโตเต็มที่ถึง 60% เพราะเหตุที่อาหารที่สะสมในร่างกายลดน้อยลงในขณะที่มี metamorphosis จะทำให้มีการสลายโปรตีนที่สะสมอยู่เพื่อให้ได้พลังงานสำหรับการดำรงชีวิตหลังจาก carbohydrate ที่มีอยู่ถูกใช้หมดไปแล้ว การสลายโปรตีนทำให้มี ammonia ในร่างกายเพิ่มมากขึ้น แต่เหงือกซึ่งเคยใช้เป็นทางขับถ่าย ammonia ได้สลายไปในขณะ metamorphosis จึงต้องหาทางกำจัด ammonia ออกจากร่างกายโดยการสังเคราะห์เอ็นไซม์ที่จะเปลี่ยน ammonia ให้เป็น urea เพิ่มมากขึ้น

Schimke (1963) และ Freeland and Sodikoff (1962) รายงานว่าสภาวะต่าง ๆ ที่ทำให้มีการสลายโปรตีนในร่างกายเพิ่มมากขึ้น เช่นการให้อาหารที่มีโปรตีนสูงแก่หนู (Mandelstam and Yudkin, 1952;

Ashida and Harper, 1961; Schimke, 1962) และแกะ (Payne and Morris, 1969) การให้หนูอดอาหาร (Schimke, 1962a) และการให้ corticosteroid แก่หนู (Bach, Carter and Killip, 1958) จะทำให้ระดับ activity ของ urea cycle enzymes เพิ่มสูงขึ้น ในทางตรงกันข้ามสภาวะต่าง ๆ ที่ทำให้ protein catabolism ลดลงเช่นการให้อาหารที่ไม่มีโปรตีนหรือมีโปรตีนต่ำแก่หนู, การตัดต่อมหมวกไตออกจะทำให้ระดับ activity ของ urea cycle enzymesลดลง (Mc.Lean and Gurney, 1963; Bach, Carter and Killip, 1958)

จากการศึกษา Histologyของต่อมไทรอยด์ของ Bufo melanostictus พบว่า activity เพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจน ในระยะขาหน้า (ศิริวรรณ โกมารทัต, 2514) ซึ่งเป็นระยะเดียวกับที่การขับถ่าย urea เริ่มเพิ่มสูงขึ้น การทดลองให้ thyroxine และ tri-iodothyronine แก่ Bufo terrestris และ Rana hecksheri ในขณะที่มี metamorphosis ทำให้ระดับ activity ของเอ็นไซม์ arginase เพิ่มสูงขึ้นเร็วกว่าปกติ และเอ็นไซม์ arginase ตอบสนองต่อฮอร์โมนของต่อมไทรอยด์ได้เร็วกว่าการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างภายนอก (Dolphin and Frieden, 1955) Munro (1953) ทำการทดลองโดยใช้ Rana temporaria ในระยะที่มี metamorphosis แช่ใน thyroid extract พบว่าจะทำให้เกิด precocious metamorphosis และมีการขับถ่าย urea เพิ่มมากขึ้น จากผลการทดลองเหล่านี้แสดงว่าฮอร์โมนจากต่อมไทรอยด์ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มีความสำคัญต่อการ metamorphosis ของ amphibian นั้น นอกจากจะมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างแล้ว ยังมีผลทางอ้อมต่อการสังเคราะห์ urea อีกด้วย

Bufo melanostictus ในระยะตัวเต็มวัยมีระดับ activity ของเอ็นไซม์ ornithine transcarbamylase ในตับใกล้เคียงกับผลการ

ศึกษาใน adult Anuran ชนิดอื่น ๆ เช่น Bufo floweri, Bufo marinus (Brown and Cohen, 1960) Rana catesbeiana (Brown, Brown and Cohen, 1959) Rana montezumae (Mora et al.,1965) สำหรับ activity ของเอ็นไซม์ arginase ของ Bufo melanostictus เมื่อเปรียบเทียบกับ adult Anurarn ชนิดอื่นพบว่ามีระดับใกล้เคียงกับของ Bufo marinus (Brown and Cohen, 1960) และ Rana catesbeiana (Brown, Brown and Cohen, 1959)

จากการทดลองพบว่าอัตราการขับถ่าย urea ของ Bufo melanostictus เพิ่มสูงขึ้นในขณะที่มี metamorphosis เช่นเดียวกับ Rana catesbeiana อัตราการขับถ่าย urea ในระยะตัวเต็มวัยสูงกว่าระยะตัวสำเร็จเล็กน้อย (ประมาณ 20%) เช่นเดียวกับผลการทดลองใน Bufo bufo bufo (Munro, 1953) อัตราการขับถ่าย urea ในขณะที่มี metamorphosis มีความสัมพันธ์กับ specific activity ของเอ็นไซม์ ornithine transcarbamylase และ arginase แต่ในระยะ premetamorphosis อัตราการขับถ่าย urea มีระดับต่ำมากแม้ว่า specific activityของเอ็นไซม์ทั้งสองจะเพิ่มสูงขึ้น อาจมี factor อื่นที่ทำให้การขับถ่าย urea ในระยะ premetamorphosisมีระดับต่ำ Brown, Brown and Cohen (1959) ทำการศึกษาใน Rana catesbeiana กล่าวว่าอัตราการขับถ่าย urea มีความสัมพันธ์กับระดับ activity ของเอ็นไซม์ arginine synthetase system ซึ่งเป็น rate limiting enzyme ของ urea cycle และเป็นเอ็นไซม์ที่มี activity ต่ำที่สุดใน urea cycle ในระยะ premetamophosis เอ็นไซม์ arginine synthetase มีระดับ activity ต่ำมาก ในขณะที่มี metamorphosis เอ็นไซม์นี้จะมี activity เพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นการศึกษาเอ็นไซม์ arginine synthetase ใน Bufo melanostictus อาจช่วยทำให้เข้าใจการเปลี่ยนแปลงอัตราการขับถ่าย urea ได้ดีขึ้น

จากการทดลองครั้งนี้และจากรายงานการศึกษาของผู้อื่น อาจจะสรุปได้ว่าการสังเคราะห์ urea นั้นเกี่ยวข้องกับ factor ต่าง ๆ หลายอย่างเช่น genetics, enviroment และ hormone

genetics จัดเป็น factor ที่สำคัญที่สุดเพราะใน biosynthesis ใด ๆ ก็ตามจะต้องมีเอ็นไซม์เป็นตัว catalyst การสังเคราะห์ urea จาก ammonia ก็เช่นกันต้องใช้เอ็นไซม์ใน urea cycle เป็นตัว catalyst และการสังเคราะห์เอ็นไซม์เหล่านี้ถูกควบคุมโดย genes ที่ตำแหน่งต่าง ๆ บน chromosomes

รายงานการทดลองส่วนใหญ่ได้เน้นถึงความสำคัญของสภาพแวดล้อมที่สัตว์อาศัยอยู่ซึ่งได้แก่ การอยู่ในน้ำหรืออยู่บนบกว่าเป็นสิ่งตัดสินว่าสัตว์จะขับถ่าย ammonia, urea หรือ uric acid เป็น nitrogenous waste product (Munro, 1953; Balinsky, 1962) แต่มีรายงานว่าสัตว์ที่อาศัยอยู่ในน้ำบางชนิดเช่นปลากระดูกอ่อน, chelonian reptile (เต่า) สามารถสังเคราะห์ urea ได้ และผลการทดลองครั้งนี้ใน Bufo melanostictus รวมทั้งรายงานใน amphibian ชนิดอื่น (Munro, 1953; Dolphin and Frieden, 1955; Brown, Brown and Cohen, 1959 และ Balinsky and Baldwin, 1963) พบว่าการสังเคราะห์เอ็นไซม์ใน urea cycle และการขับถ่าย urea เพิ่มมากขึ้น ในขณะที่มี metamorphosis ซึ่งเป็นระยะที่สัตว์ยังอาศัยอยู่ในน้ำ ผลการทดลองเหล่านี้จะทำให้เห็นว่าในการที่จะเปลี่ยน enviroment นั้นสัตว์จะต้องมีการปรับตัวเองก่อน เช่นการที่พวก amphibian สามารถสังเคราะห์ urea จาก ammonia ได้นั้น อาจเป็นสาเหตุทำให้สัตว์เหล่านี้ขึ้นมาอาศัยอยู่บนบกได้ แม้การสังเคราะห์ urea จะทำให้สูญเสียพลังงาน แต่เป็นขบวนการที่เกิดขึ้นเพื่อป้องกันการสะสมของ ammoria ซึ่งเป็นพิษต่อร่างกาย (Cragg, Balinsky and Baldwin, 1963)

การตรวจพบเอ็นไซม์บางตัวใน urea cycle ก่อนที่จะมีวิวัฒนาการของ cycle นี้เพื่อใช้เป็นกลไกในการกำจัด nitrogenous waste โดยที่พบเอ็นไซม์เหล่านี้ในสัตว์และพืชต่าง ๆ รวมทั้งในแบคทีเรีย เช่น พบเอ็นไซม์ ornithine transcarbamylase ใน Streptococcus faecalis (Burnett and Cohen, 1957) และพบเอ็นไซม์ arginase ใน Neurospora crasa (Ratner, 1954) ทำให้เข้าใจว่า urea cycle ที่สมบูรณ์นั้นอาจเกิดจากการมี mutation มาเป็นลำดับของ genes ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์เอ็นไซม์เหล่านี้ Brown and Cohen (1960) กล่าวว่าการตรวจพบ urea cycle ในพวกปลากระดูกอ่อน ทำให้สันนิษฐานได้ว่า urea cycle ที่สมบูรณ์อาจจะมีอยู่ตั้งแต่ในต้นตระกูลของพวกปลา พวกปลากระดูกแข็ง Actinopterigii อาจเกิด mutation มี deletion ของเอ็นไซม์ใน urea cycle ซึ่งหมายถึงการที่ activity ของเอ็นไซม์เหล่านี้ลดต่ำลงจนถึงระดับที่ไม่สามารถทำหน้าที่เปลี่ยน ammonia ให้เป็น urea ได้ และการที่ activity ของเอ็นไซม์เหล่านี้ลดต่ำลงอาจเกิดจากการสูญเสีย genetic information ที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์เอ็นไซม์ ส่วนพวกปลากระดูกอ่อนและปลากระดูกแข็ง Choanichthyes ยังคงมี urea cycle ที่สมบูรณ์ พวก amphibian ยังคงรักษา urea cycle ไว้ได้ และเมื่อมีวิวัฒนาการมาถึงพวก Cytolosauria (stem reptile) ซึ่งเป็นต้นตระกูลของสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมนั้น พวก chelonian reptile และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมมีวิวัฒนาการต่อไปโดยยังคงมี urea cycle อยู่ ส่วนพวกนกและสัตว์เลื้อยคลานอื่น ๆ จะมี deletion ของ activity ของเอ็นไซม์ใน urea cycle

นอกจากนั้นการตรวจพบ urea cycle enzymes ในพยาธิตัวตืด, ไส้เดือนดินและหอยนั้นเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาต่อไปว่า การกำจัด nitrogenous waste ออกจากขับถ่ายโดยอาศัย urea cycle นั้นจะเกิดตั้งแต่ในขณะที่มีวิวัฒนาการของสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังได้หรือไม่

Brown, Brown and Cohen (1959) กล่าวว่าการเปลี่ยนแปลง activity ของ urea cycle enzymes ของพวก amphibian ซึ่งทำให้มีการขับถ่าย urea เพิ่มมากขึ้นในขณะที่มี metamorphosis นั้น อาจเป็นการเลียนแบบวิวัฒนาการของการขับถ่าย nitrogenous waste ซึ่งอาจเกิดขึ้นพร้อมกับการเริ่มมีกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่บนบกในยุค Devonian ก็เป็นได้ สำหรับใน Bufo melanostictus ซึ่งพบว่า specific activity ของ ornithine transcarbamylase และ arginase เพิ่มสูงขึ้นในขณะ metamorphosis รวมทั้งมีการขับถ่าย urea เพิ่มมากขึ้นด้วยนั้น แสดงให้เห็นถึงการปรับตัวเองเพื่อให้สามารถอาศัยอยู่บนบกได้ภายหลัง metamorphosis เช่นเดียวกับ amphibian ชนิดอื่น ๆ