



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การเตรียมไข่ปลาสุกในห้องทดลองเพื่อประสิทธิภาพ
การผสมเทียมปลาบึก (*Pangasianodon gigas*)

โดย

ดร. จิราพร โรจน์ทินกร

ปี 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การเตรียมไข่ปลาสุกในห้องทดลองเพื่อประสิทธิภาพ
การผสมเทียมปลาน้ำจืด (*Pangasianodon gigas*)

ผู้วิจัย

ดร. จิราพร รัตนทินกร

สนับสนุนโดย

ทบวงมหาวิทยาลัย และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ทบวงฯ และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเป็นข้อด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

ปลาบึก (*Pangasianodon gigas* Chevey, 1931) เป็นปลาหนังน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในโลก เป็นปลาพบเฉพาะถิ่นในแม่น้ำโขงเท่านั้น เป็นที่นิยมบริโภค จึงมีการจับปลาบึกกันมาก ทำให้ปลาบึกซึ่งมีอายุชั้ยาว วางไข่ปีละ 4-6 สัปดาห์ และมีแหล่งเพาะขยายพันธุ์และวางไข่จำเพาะ มีจำนวนลดลงอย่างมาก ในปี พ.ศ. 2533 ปลาบึกถูกจัดเป็นสัตว์น้ำใกล้สูญพันธุ์ (CITES Appendices I) ทั้งนี้ได้มีการเพาะขยายพันธุ์ปลาบึกในฟาร์มเลี้ยง โดยการฉีดฮอร์โมนในพ่อแม่พันธุ์ ไรต์ไซ (โอโอไซท์) นำมาผสมกับน้ำเชื้อ แล้วทำการฟักและอนุบาล แต่ปัญหาสำคัญ คือ ปริมาณและคุณภาพของลูกปลาที่ได้ไม่แน่นอน และในบางกรณีอาจประสบปัญหาสูญเสียปลา เนื่องจากพ่อแม่ปลาบึกมีความผันแปรสูงทำให้การฉีดฮอร์โมนไม่แน่นอน ทั้งในเรื่องปริมาณฮอร์โมน ระยะเวลาที่รอ รวมถึงความไม่แน่นอนของคุณภาพโอโอไซท์ที่ฉีดได้

ได้ศึกษาสารดองสีที่เหมาะสมสำหรับโอโอไซท์ปลาดุกกระสับ โดยใช้สารดองสี 5 สูตร ได้แก่ Clearing 1 : 50 ml formaldehyde, 40 ml acetic acid, 60 ml glycerol and 9 g NaCl, Clearing 2 : 4% formaldehyde และ 1% glutaraldehyde, Clearing 3 : ethanol : formalin : glacial acetic acid = 6 : 3 : 1, Clearing 4 : 5% formalin and 4% acetic acid in Ringer's solution (6.5g NaCl, 0.42 g KCl and 0.25 CaCl₂) และ Clearing 5 : Clearing 2 in Ringer's solution พบว่า สารดองสี Clearing 3 มีประสิทธิภาพในการคงสภาพ และสะดวกในการสังเกตระยะของโอโอไซท์ปลาจากการเคลื่อนที่ของนิวเคลียสได้ดีที่สุด และเมื่อทดสอบกับโอโอไซท์ปลาบึกและปลาสวายก็ให้ผลดีเช่นเดียวกัน

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการเลี้ยงโอโอไซท์ของปลาสวายในห้องทดลอง ซึ่งปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus* Sauvage, 1878) เป็นปลาชนิดพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับปลาบึกมากที่สุด จึงใช้เป็นปลาทดลองนำร่อง โดยต้องการเลี้ยงโอโอไซท์ให้ถึงระยะ metaphase II ในห้องทดลอง เพื่อนำมาผสมเทียมได้ ทำการเลี้ยงโอโอไซท์ด้วยอาหารเลี้ยง 3 ชนิด ได้แก่ Leibovitz L-15 medium, Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium (Advanced DMEM/F-12) และ M-199 medium เสริมด้วยกลุ่มฮอร์โมน 4 ชนิด ได้แก่ human chorionic gonadotropins (HCG), luteinizing hormone (LH), 17 β -estradiol (E2) และ 17 α -20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) และเสริมด้วย growth factors 3 ชนิด ได้แก่ insulin (from bovine pancreas) insulin-like growth factor-I (IGF-I) และ fetal bovine serum (FBS) โดยแปรผันอุณหภูมิบ่มที่ 23, 25 และ 28 °C

พบว่า ที่ 25 °C เป็นอุณหภูมิบ่มที่เหมาะสมสำหรับโอโอไซท์ปลาสวาย โดยให้อัตรารอดสูงในการใช้อาหารเลี้ยงทั้ง 3 ชนิด และ L-15 medium เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ให้อัตรา

รอดของโอโอไซท์ปลาสรวยสูงสุด (81 ± 2 %) ในการเสริมฮอร์โมน LH ให้อัตรารอดของโอโอไซท์โดยรวมสูง และสามารถกระตุ้นโอโอไซท์ปลาสรวยให้มีการพัฒนาจากระยะที่ 4 ไปสู่ระยะที่ 5 โดยความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 11 ng/ml ให้อัตรารอด 89 ± 2 % และมีการพัฒนา 10 ± 2 % ส่วนการเสริม growth factor insulin ช่วยให้มีการพัฒนาของโอโอไซท์ปลาสรวยได้ โดยเข้มข้นที่เหมาะสม คือ $6 \text{ }\mu\text{M}$ ให้อัตรารอด 57 ± 9 % และมีการพัฒนา 18 ± 2 %

การเสริมฮอร์โมน HCG และ IGF-I ในอาหาร L-15 medium บ่มที่ 25°C ช่วยกระตุ้นให้มีการพัฒนาของโอโอไซท์ปลาสรวยได้เล็กน้อย โดยมีค่าสูงที่ HCG 10 IU/ml ให้อัตรารอด 42 ± 10 % และมีการพัฒนา 7 ± 1 % และ IGF-I 100 ng ให้อัตรารอด 44 ± 10 % และมีการพัฒนา 6 ± 1 % ส่วน estradiol DHP และ FBS ไม่มีผลต่อการพัฒนาของโอโอไซท์ปลาสรวยระยะที่ 4

ได้นำผลการเลี้ยงโอโอไซท์ปลาสรวยมาทดลองปรับใช้กับโอโอไซท์ปลาบึก แต่ไม่พบการพัฒนาใดๆ ในทุกชุดทดลอง และโอโอไซท์ปลาบึกเสียหายหมดภายใน 12 ชั่วโมง ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่า โอโอไซท์ของปลาบึกมีความไวอย่างมากต่อสภาพที่ไม่เหมาะสม อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ทั้ง 3 ชนิด อาจจะไม่เหมาะสมสำหรับโอโอไซท์ปลาบึก หรือโอโอไซท์ปลาบึกที่เก็บตัวอย่างได้มีคุณภาพต่ำ อีกทั้งแม่ปลาบึกอาจมีความเครียดสูงจากการจับและขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง เป็นผลกระทบต่อโอโอไซท์ได้

ผลจากงานวิจัยนี้ ได้ข้อมูลสูตรอาหารเลี้ยงโอโอไซท์ปลาสรวยให้เกิดการพัฒนาได้ในเบื้องต้น และพบว่าโอโอไซท์ของปลาบึกมีความไวสูงกว่าโอโอไซท์ปลาสรวย ซึ่งควรจะมีการวิจัยเพิ่มเติม เช่น การใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความจำเพาะสำหรับโอโอไซท์ ช่วงเวลาและลำดับการใส่ฮอร์โมนและสารเสริมต่างๆ เป็นต้น เพื่อให้เข้าใจถึงความต้องการฮอร์โมนและสารต่างๆของโอโอไซท์ปลาบึก ให้สามารถนำไปพัฒนาวิธีการผสมเทียมให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์ปลาบึกต่อไป

คำสำคัญ : ปลาบึก, *Pangasianodon gigas*, ปลาสรวย, *Pangasianodon hypophthalmus*,
โอโอไซท์

IVM

ABSTRACT

Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas* Chevey, 1931) is the biggest freshwater catfish of the world. It is endemic species only in Mekong River. Because of popular consumption and high capture, this catfish, with long lifespan, short spawning period (4-6 week a year) and specific spawning habitat, has been significantly decreased. Since 1990, Mekong giant catfish was classified as endangered species (CITES Appendices I). In farming, this catfish has been cultured and breed by hormone injection in broodstock, oocyte rolling, mixing with milt, then hatching and nursery. However the key issue is uncertain quantity and quality of offsprings, and some cases is totally lost. The broodstocks are highly variable and unpredictable effect of hormone injections from volume, interval period of injection, and uncertain quality of collected oocytes.

Suitable clearing solution for fish oocyte, using African catfish oocytes, was followed with 5 formulas; i.e. Clearing 1 : 50 ml formaldehyde, 40 ml acetic acid, 60 ml glycerol and 9 g NaCl, Clearing 2 : 4% formaldehyde and 1% glutaraldehyde, Clearing 3 : ethanol : formalin : glacial acetic acid = 6 : 3 : 1, Clearing 4 : 5% formalin and 4% acetic acid in Ringer's solution (6.5g NaCl, 0.42 g KCl and 0.25 CaCl₂) and Clearing 5 : Clearing 2 in Ringer's solution. It was resulted that Clearing 3 showed the effective fixing agent and clearly to observe nucleus movement. The same result was observed in oocytes of Mekong giant catfish and striped catfish.

Oocytes of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus* Sauvage, 1878), the most closed species to Mekong giant catfish, were performed as pilot experiments. In vitro oocyte culture was aimed to metaphase II for artificial fertilization. Variation of media, hormones and growth factors was applied at temperature of 23, 25 and 28 °C. Three media were Leibovitz L-15 medium, M-199 medium and Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium (Advanced DMEM/F-12). Four hormones were human chorionic gonadotropins (HCG), 17β-estradiol (E2), luteinizing hormone (LH), and 17α-20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP). Three growth factors were insulin (from bovine pancreas), insulin-like growth factor-I (IGF-I) and fetal bovine serum (FBS).

It is resulted that at 25 °C was optimal incubating temperature with high survival rate in all three media. Oocyte cultured with L-15 medium showed highest survival rate of 81±2 %. For hormone supplement, LH showed overall high survival rate and stimulating to oocyte development from stage 4 to stage 5 with the appropriate concentration of 11 ng/ml giving 89±2 % survival rate and 10±2 % development rate. For supplement of growth factors, insulin showed stimulating to oocyte development, with the optimal concentration of 6 µM giving 57±9 % survival rate and 18±2 % development rate.

Supplementing the hormone HCG and IGF-I in the L-15 medium and incubated at 25 °C showed a few developments of striped catfish oocytes. Their high values were HCG of 10 IU/ml with 42±10 % survival rate and 7±1 % development rate, and IGF-I of 100 ng with 44±10 % survival rate and 6±1 % development rate. For supplements of estradiol, DHP and FBS showed no effect on the development of stage 4 oocytes.

The result of striped catfish oocyte culture was tried to apply to Mekong giant catfish oocyte culture. In all experiment, however, Mekong giant catfish oocytes died within 12 hours and there was no any development. It may be possible that Mekong giant catfish oocytes is highly sensitive to inappropriate culture conditions. The three types of media may be unsuitable or the oocytes may be low quality. In additionally, the female Mekong giant catfish may be stressed from capture and sampling procedures that effecting to oocytes.

From the results of this research, the data of medium and formula to stimulating primary development in striped catfish oocytes was achieved, and it understood that Mekong giant catfish oocyte is more sensitive than striped catfish oocyte. In order to understanding of the needs of various hormones and chemicals in Mekong giant catfish oocytes, this should be more researches for Mekong giant catfish oocyte culture such as special medium, time and sequence to additive of hormones and other supplements, etc. It will be benefited for the efficient artificial fertilization for farming and conservation of Mekong giant catfish.

keyword : Mekong giant catfish, *Pangasianodon gigas*, striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*, oocyte, IVM

1. บทนำ

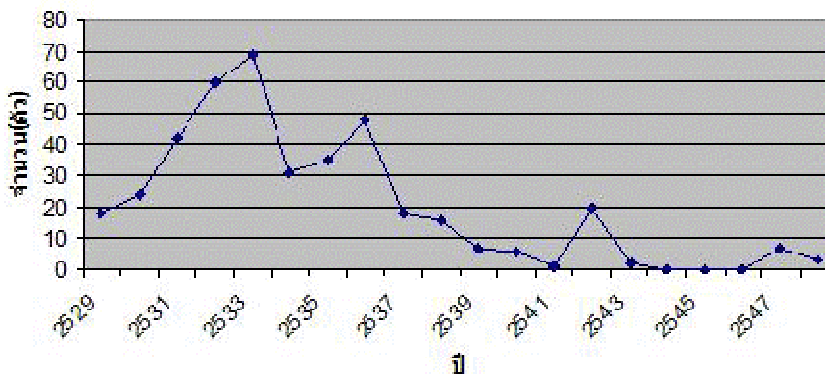
ปลาบึก *Pangasianodon gigas* (Chevey, 1931) เป็นปลาไม่มีเกล็ด และเป็นปลาน้ำจืดขนาดใหญ่ที่สุดในโลก อาศัยอยู่ และอพยพย้ายถิ่นเฉพาะในลำน้ำโขงเท่านั้น แต่เดิมคาดกันว่าแหล่งผสมพันธุ์และวางไข่ของปลาบึกอยู่ทางตอนบนของแม่น้ำโขงที่ทะเลสาบต้าลี มณฑลยูนนาน ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ลูกปลาบึกวัยอ่อนลอยตัวตามน้ำ เข้าไปอาศัยอยู่ตามเกาะแก่งของทะเลสาบต่างๆ ที่ติดต่อกับลำน้ำโขงในเขตสาธารณรัฐประชาชนกัมพูชา เมื่อเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัย จะอพยพเข้าสู่แม่น้ำโขง แล้วว่ายทวนน้ำขึ้นสู่ตอนบนของแม่น้ำโขง เมื่อเดินทางมาถึงทางตอนเหนือของประเทศไทย จะเข้าสู่ช่วงที่เริ่มพัฒนาการสุกของไข่ในแม่ปลา และเดินทางกลับสู่ทะเลสาบต้าลี ในมณฑลยูนนาน (โสม, 2510; เสน่ห์, 2526; เสน่ห์ และภาณุ, 2541; เกรียงศักดิ์, 2543) อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันได้มีการตั้งข้อสังเกตว่า ปลาบึกที่ชาวบ้านจับได้ที่บ้านหาดไคร้ อ.เชียงของ จ.เชียงราย เป็นปลาที่มีไข่แก่และมีน้ำเชื้อสมบูรณ์ จึงคาดว่าแหล่งผสมพันธุ์และวางไข่อาจจะอยู่ไม่ไกลจากเมืองไทยมากนัก ซึ่งอาจเป็นบริเวณทางเหนือของบ้านเมืองกาญจน์ทางฝั่งไทยขึ้นไปจนถึงบ้านปากยอนของสาธารณรัฐประชาชนลาว เมื่อประมาณปี 2470 ชาวประมงลาวบ้านปากน้ำยอนอ้างว่าเคยเห็นพฤติกรรมการผสมพันธุ์ของปลาบึก (ธีรพันธ์, 2526)

เนื่องจากประชาชนในแถบแม่น้ำโขงมีความเชื่อมาแต่โบราณว่า การกินเนื้อปลาบึกจะทำให้ฉลาดและอายุยืน โดยจะต้องมีพิธีกรรมบวงสรวงก่อนจับ เป็นเหตุให้เนื้อปลาบึกมีราคาสูง ทำให้มีการจับปลาบึกกันมาก โดยจะมีการจับมากในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนมิถุนายน ซึ่งเป็นฤดูผสมพันธุ์และวางไข่ของปลาบึก เป็นผลให้ปลาบึกลดจำนวนลงอย่างมาก จนใกล้จะสูญพันธุ์

ปลาบึกได้ถูกจัดเป็นปลาใกล้สูญพันธุ์ตามอนุสัญญาว่าด้วยการอนุรักษ์พันธุ์พืชและสัตว์ป่า Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES) ตาม IUCN 3.1 ได้กำหนดให้ปลาบึกเป็นสัตว์น้ำใกล้สูญพันธุ์ (endangered species) CITES appendices I และตามประกาศของ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ลงวันที่ 2 กรกฎาคม พ.ศ.2533 ประกาศให้ปลาบึกเป็นสัตว์น้ำสงวน ห้ามจับก่อนได้รับอนุญาต จากสถิติการจับปลาบึกที่จับได้ในแม่น้ำโขง ในปี 2524 ถึง 2549 (บัณฑิต, มปป.) พบว่าปลาบึกลดจำนวนลงอย่างมาก จากปี 2528 เป็นต้นมา กรมประมงได้ทำการเพาะปลาบึกโดยใช้พ่อแม่ปลาจากที่ชาวบ้านจับได้ และปล่อยลงสู่เขื่อนและอ่างเก็บน้ำขนาดใหญ่ (โสม, 2510; ประดิษฐ์, 2539; เกรียงศักดิ์, 2543) แต่ยังไม่มียางานแน่ชัดเกี่ยวกับการเจริญพันธุ์จนถึงสามารถแพร่ลูกแพร่หลานได้ของปลาบึกในแหล่งน้ำที่ปล่อยเหล่านี้

จากการสังเกตความสมบูรณ์ของไข่ปลาบึกเพศเมียที่จับได้ และจากความสำเร็จในการผสมเทียมของ เสน่ห์ ผลประสิทธิ์และคณะ บ่งชี้ว่า ปลาบึกมีฤดูผสมพันธุ์อยู่ในช่วงต้นฤดูฝน ประมาณเดือนพฤษภาคมถึงเดือนมิถุนายน (เกรียงศักดิ์, 2543; Baird, 1996) ความตกไข่ของ

สถิติจำนวนปลาบึกที่จับได้ที่ตำบลเวียง อำเภอเชียงของ จังหวัดเชียงราย



แม่ปลาบึกสมบูรณ์เพศตามธรรมชาติคาดประเมินว่า 800,000 ฟองต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัม (เสน่ห์ และภาณุ, 2540)

สำหรับงานวิจัยที่มีเป้าหมายเพื่อเพาะขยายพันธุ์ปลาบึก ได้มีการทดลองผสมเทียม ปลาบึกในหลายวิธี ได้แก่ การใช้ไข่และน้ำเชื้อสด ภายใต้การกระตุ้นการตกไข่ของแม่ปลาด้วย ฮอร์โมน (เสน่ห์, 2526; เสน่ห์และคณะ, 2536) การผสมเทียมโดยใช้ไข่สดและน้ำเชื้อปลาบึก แช่แข็ง (กฤษณ์, 2536; Mongkonpanya et al., 1995) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องอื่นๆ ได้แก่ การอนุบาลและเลี้ยงลูกปลาบึกเพื่อให้อัตราการรอดดี การเจริญเติบโต (วิจัย และคณะ, 2527; เข็มชาติ และคณะ, 2530; เสน่ห์ และคณะ, 2535) แต่งานวิจัยที่มีมานี้ยังจำกัดด้วยการใช้ไข่สดจาก แม่ปลาบึก ปัญหาที่ประสบ คือ ความไม่สมบูรณ์ของไข่ จำนวนแม่ปลาที่จำกัดในการทดลอง การกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเพื่อให้ได้ปริมาณ (dose) และช่วงเวลา (interval time and boosters) ที่เหมาะสม และฤดูกาลผสมพันธุ์ตามธรรมชาติที่ค่อนข้างสั้นเพียง 2 เดือนต่อปีเท่านั้น

งานวิจัยมีเป้าหมายจะศึกษาการเตรียมโอโอไซต์ปลาบึกให้สุก (metaphase II) ใน ห้องทดลอง (in vitro maturation, IVM) ด้วยเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพการเลี้ยงโอโอไซต์ใน ห้องทดลอง โดยทำการทดลองนําร่องในไข่ปลาสาวย *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878) ซึ่งเป็นปลาสายพันธุ์ใกล้เคียงกับปลาบึกมากที่สุดเป็นการทดลองนําร่อง แล้ว นำผลที่ได้ทดลองปรับใช้กับไข่ปลาบึก โดยผู้วิจัยได้รับคำแนะนำการวิจัยจาก ศ.ดร. กนก ภาวสุทธิพิศิฐ และ รศ.ดร. ยินดี กิตยานันท์ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งมีประสบการณ์สูงเกี่ยวกับเทคนิคทาง IVM และ AI (Artificial Insemination) ในสัตว์หลายชนิด

ผลจากงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการพัฒนาของโอโอไฮท์ปลาบึก ซึ่งจะมีประโยชน์ในการพัฒนาการเพาะพันธุ์ปลาบึกด้วยวิธีการผสมเทียมให้ประสิทธิภาพสูงได้

เป้าหมายโครงการวิจัย

1. พัฒนารูปแบบการเลี้ยงไขปลาสวยและปลาบึกให้สุกในห้องทดลอง เป็นการเตรียมไขปลาเพื่อการผสมเทียมปลาโดยเฉพาะปลาบึกให้มีประสิทธิภาพ
2. เพื่อพัฒนาการผสมเทียมให้มีประสิทธิภาพสูงและสามารถกำหนดได้ด้วยใช้เทคนิคขั้นสูง โดยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพ

วัตถุประสงค์เชิงกิจกรรม

1. เพื่อเลี้ยงไขปลาสวยและปลาบึกให้สุกในห้องทดลองได้
2. เพื่อพัฒนาการผสมเทียมปลาน้ำจืดที่มีประสิทธิภาพโดยใช้เทคโนโลยีขั้นสูง โดยเฉพาะในปลาใกล้สูญพันธุ์ ได้แก่ ปลาบึก
3. เพื่อศึกษาการเจริญของลูกปลาที่ผสมเทียมจากไขสุกในห้องทดลอง

การจับแม่ปลาบึกตัวอย่าง ที่ จรัลฟาร์ม ตำบลดอยงาม อำเภอพาน จังหวัดเชียงราย



2. การตรวจเอกสาร

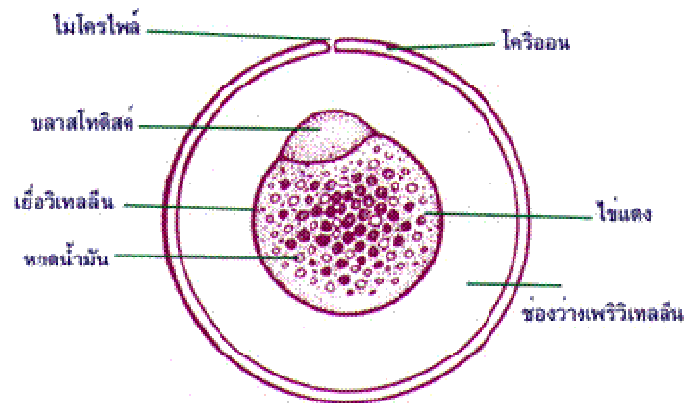
2.1 โอโอไซท์ในปลาและการพัฒนา

ขบวนการสร้างไข่ (oogenesis) เริ่มต้นที่ฟอลลิเคิลเซลล์ในรังไข่ ภายในฟอลลิเคิลจำนวนมากมีเซลล์สืบพันธุ์เบื้องต้น ซึ่งเมื่อปลาสมบูรณ์เพศเซลล์เหล่านี้จะแบ่งตัวแบบไมโทซิส เพื่อเพิ่มจำนวนและขนาดโตขึ้น เรียกแต่ละเซลล์ว่า โอโอโกเนีย (oogonia) หลังจากนั้นโอโอโกเนียจะแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส เมื่อสิ้นสุดการแบ่งไมโอซิสขั้นแรกได้โอโอไซด์ปฐมภูมิ (primary oocyte) กับเซลล์ขั้ว (polar body) จากนั้นโอโอไซด์ปฐมภูมิจะผ่านขบวนการสร้างไข่แดง (vitellogenesis) โดยเซลล์บุผิวที่อยู่รอบๆ สร้างอาหารสะสมในรูปของโปรตีนและไขมัน (granular yolk) การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสขั้นที่สองจะเกิดต่อไป แต่ปลาส่วนใหญ่จะค้างอยู่ที่ระยะเมทาเฟส (metaphase II) จะมีการตกไข่ ซึ่งการแบ่งไมโอซิสขั้นที่สองจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์เมื่ออสุจิเข้าปฏิสนธิกับโอโอไซท์ ก่อนการปฏิสนธิจะได้นิวเคลียสของไข่ (female pronucleus) ซึ่งมีโครโมโซมชุดเดียว ขบวนการแบ่งเซลล์หลังปฏิสนธิจะได้ไซโกต (zygote) ซึ่งมีโครโมโซมเป็นดิพลอยด์เหมือนพ่อแม่

โอโอไซท์ที่สุกแล้ว (mature oocyte) จะถูกปล่อยออกมาทางช่องเพศ ยกเว้นในปลากระดูกอ่อนจะปล่อยออกมาทางทวารร่วมซึ่งเป็นทางออกร่วมกับอุจจาระ โอโอไซท์ของปลาจัดเป็นไข่แบบเทโลลิซิธแรล (telolecithal egg) คือ มีไข่แดงจำนวนมากอยู่ขั้วหนึ่งซึ่งสะสมอาหารสำหรับตัวอ่อน เรียก ขั้วพืช (vegetal pole) อีกขั้วหนึ่งเป็นบริเวณที่มีนิวเคลียส เรียก ขั้วสัตว์ (animal pole) ซึ่งเป็นบริเวณที่จะเป็นตัวปลา ไข่มีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น คือ

1. ชั้นนอก เรียกโคริออน (chorion) เป็นชั้นที่หุ้มไข่เอาไว้ ทางขั้วสัตว์มีรูเล็กๆ เรียกไมโครไพล์ (micropyle) ซึ่งเป็นทางเข้าของอสุจิเพื่อเข้าไปปฏิสนธิกับไข่
 2. ชั้นใน เรียกเยื่อไวเทลลีน (vitelline membrane) หุ้มไข่แดงและนิวเคลียสของไข่
- ระหว่าง 2 ชั้นนี้มีช่องว่างเรียกว่าเพริวิทเทลลีน (perivitelline space)

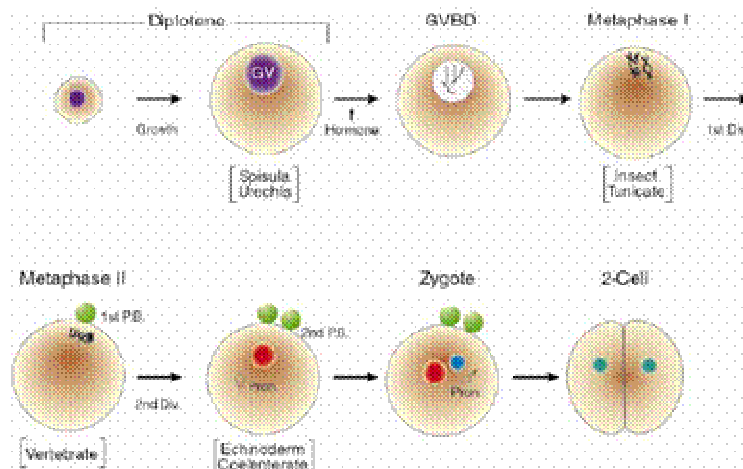
ภายในโอโอไซท์ประกอบด้วยไข่แดง ซึ่งรวมกันเป็นก้อน มีไซโทพลาสซึมหุ้มล้อมรอบเป็นชั้นบางๆ ทางด้านขั้วสัตว์มีลักษณะหนารูปร่างเหมือนหมวก มีนิวเคลียสอยู่ เรียกบริเวณนี้ว่า เจมิเนล ดิสก์ (germinal disc) หรือ บลาสโตดิสก์ (blastodisc) ซึ่งเป็นบริเวณที่จะมีการแบ่งตัวเจริญเป็นตัวอ่อนเมื่อได้รับการปฏิสนธิกับอสุจิ ภายในไข่แดงมีหยดน้ำมัน (oil globule หรือ oil droplet) หยดน้ำมันจะมีขนาดเล็กหรือใหญ่ จำนวนมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของปลา (อุทัยรัตน์, 2531)



ภาพที่ 1 ลักษณะของโอโอไซต์ปลา

วีระชัย (2535) พบว่าระบบสืบพันธุ์ของปลาบึกเพศเมียวัยเจริญพันธุ์มีรังไข่มีขนาดใหญ่พบไข่ระยะต่างๆ บรรจุอยู่ โดยการเจริญของไข่แบ่งได้เป็น 5 ระยะ คือ

1. oogonia
2. primary growth phase
3. early-vitellogenesis ขนาดของไข่และนิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้นไซโทพลาสซึมเริ่มใส และมีการเพิ่มจำนวน นิวคลีโอลัส
4. mid-vitellogenesis ไข่ระยะนี้มีโครงสร้างห่อหุ้มหลายชั้น จากชั้นนอกเข้าไปข้างในตามลำดับ คือ theca externa, theca interna, follicular layer granulosa และ zona radiata ไซโทพลาสซึมมี yolk granules จำนวนมากอยู่ใกล้นิวเคลียส เริ่มมีการเคลื่อนตัวของนิวเคลียสไปอยู่ขอบเซลล์ด้าน animal pole ซึ่ง yolk granules จะเริ่มเชื่อมติดกันเกิดช่องว่างทำให้ไข่เริ่มใสขึ้น
5. maturation egg stage เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5 มิลลิเมตร yolk granules เชื่อมติดกันไข่มีลักษณะใสและนิวเคลียสมีตำแหน่งชิดขอบเซลล์ ความตลกของไข่มีค่าประมาณ 600-700 ฟอง/กรัม

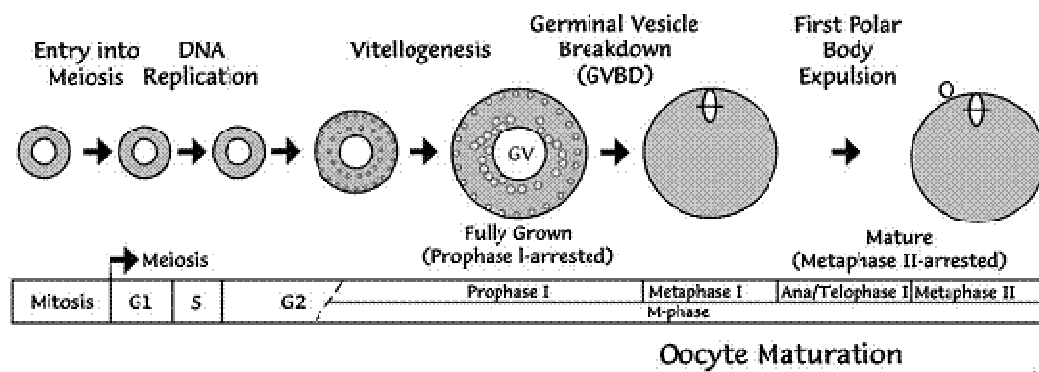


ภาพ 2 การพัฒนาของโอโอไซต์ในกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง
ที่มา : Masui (2001)

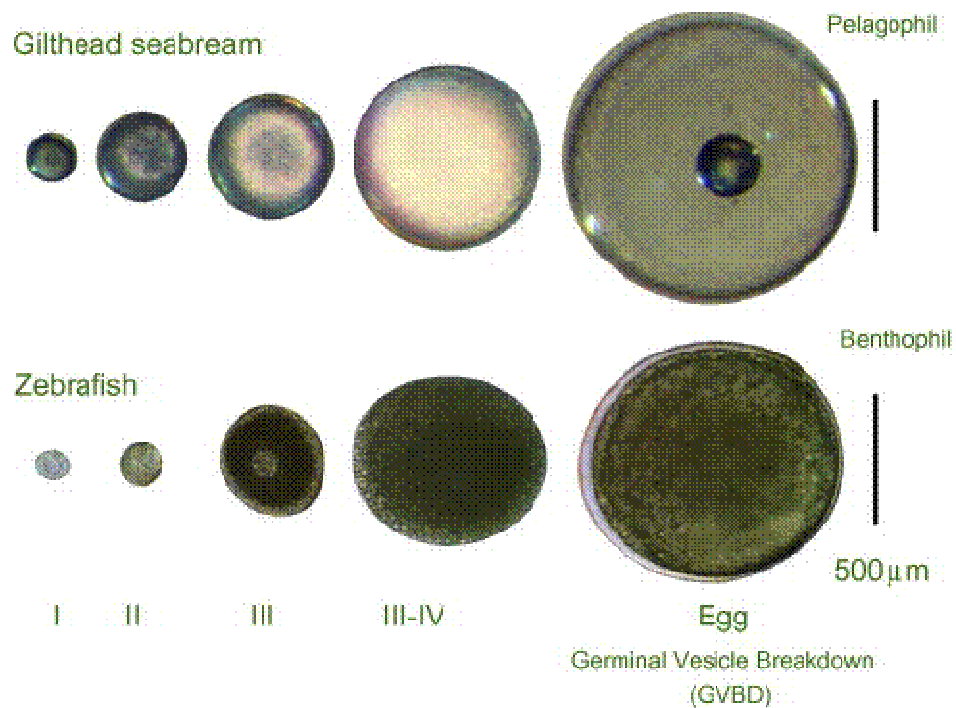
การพัฒนาของโอโอไซต์ในปลา จากการเจริญเติบโตของโอโอไซต์จนถึงการพัฒนาของโอโอไซต์ โดยเริ่มจากการสังเคราะห์ไข่แดง จากช่วงที่ก่อนการสังเคราะห์ไข่แดง ไปสู่ระยะที่มีการสังเคราะห์ไข่แดงในโอโอไซต์เกิดขึ้น จนถึงระยะที่ไข่แดงมีลักษณะเป็นก้อนกลมในเซลล์ และเกิดการเคลื่อนย้ายของ germinal vesicle (GV) จนเกิด germinal vesicle breakdown (GVBD) ซึ่งจะมีการรวมตัวกันของหยดไขมัน และเกิดโพลาร์บอดีอันแรกซึ่งเป็นลักษณะของโอโอไซต์ที่มีการพัฒนา (Nagahama et al., 1983)

Suwa and Yamashita (2007) ได้แบ่งระยะการพัฒนาโอโอไซต์ปลาไว้ ระหว่างที่โอโอไซต์มีการพัฒนา โอโอไซต์จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะทางภายนอกอย่างมาก ซึ่งจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการพัฒนาในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส โดยจะมีการหยุดพักช่วงเกิดขึ้นในระยะระหว่างโปรเฟสกับเมตาเฟสในไมโอซิสระยะที่สอง และมีการพัฒนาต่อเมื่อมีการกระตุ้นจากฮอร์โมน เมื่อโอโอไซต์มีการพัฒนาเต็มที่แล้วในระยะที่เรียกว่า germinal vesicle breakdown (GVBD) ซึ่งปรากฏการณ์นี้แสดงให้เห็นว่าโอโอไซต์มีการพัฒนาที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 3)

ส่วน Lubzens et al. (2010) ได้แสดงให้เห็นว่า โอโอไซต์มีกลไกการปล่อยน้ำเข้าและออก เพื่อการลอยตัวในน้ำ โดยดูได้จากลักษณะที่แตกต่างกันในแต่ละระยะของไข่ลอย (Pelagophil oocyte) จากปลา gilthead seabream (*Sparus aurata*) และ ไข่จม benthophil oocytes จากปลาม้าลาย (*Danio rerio*) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 ไมโอซิสและการพัฒนาของโอโอไซต์ปลากระดุกแข็ง
ที่มา : Suwa and Yamashita (2007)



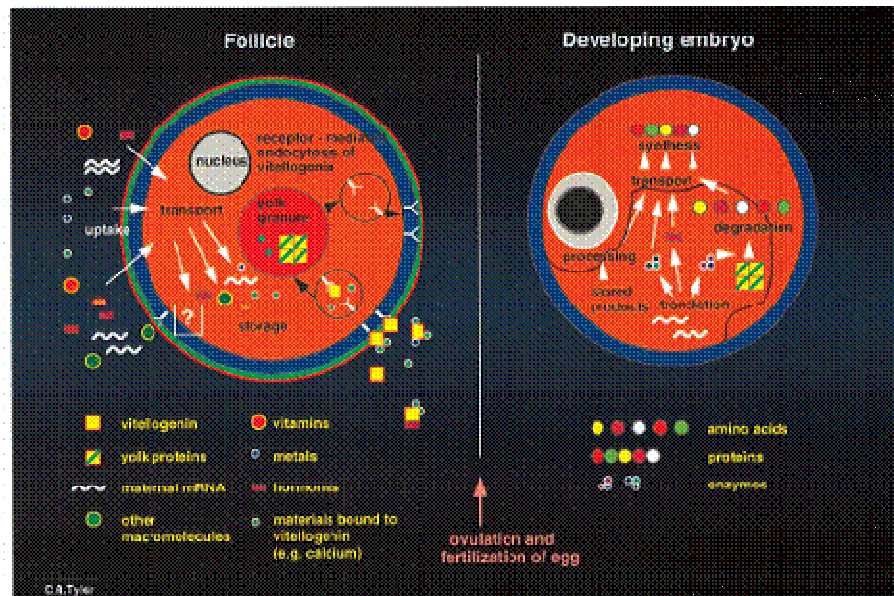
ภาพที่ 4 ความแตกต่างของโอโอไซต์ปลาชนิดไข่จมและไข่ลอย
ที่มา : Lubzens et al. (2010)

ระดับโกนาโดโทรปิน จะมีการเพิ่มขึ้นในพลาสมา ในช่วงที่มีการพัฒนาระยะโอโอ-ไซท์ต่างๆ ในปลา และเป็นสารที่กระตุ้นให้เกิดการพัฒนาของโอโอไซท์ โดยการทำปฏิกิริยากับสารพวกสเตอรอยด์ในการกระตุ้นให้เกิดการพัฒนา (Goetz, 1983; Patino and Thomas, 1990; Kagawa et al., 1994) ดังการเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคของโอโอไซท์ปลาที่กล่าวไว้ว่า ระหว่างที่มีการเจริญของโอโอไซท์มีส่วนคล้ายๆกันในกลุ่มปลากระดูกแข็ง และการสังเคราะห์ไขแดงของโอโอไซท์จะอยู่ในช่วงท้ายของการพัฒนา โดยการรวมตัวกันของหยดน้ำมันของไข่แดง โดยเส้นผ่านศูนย์กลางของขนาดโอโอไซท์ก็จะมีขนาดเพิ่มขึ้น จนถึงมีขนาดใหญ่ที่สุดเมื่อสังเกตเห็นมีหยดน้ำมันแบบเดี่ยวๆอยู่ใกล้บริเวณตรงกลาง และชั้นของฟอลลิเคิลจะแตกออก โดยการรวมตัวกันของสารประกอบพวกน้ำมีรายงานไว้ว่าเป็นสาเหตุให้มีการเพิ่มขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางโอโอไซท์ขึ้นในปลากระดูกแข็ง (Wallace and Selman, 1981)

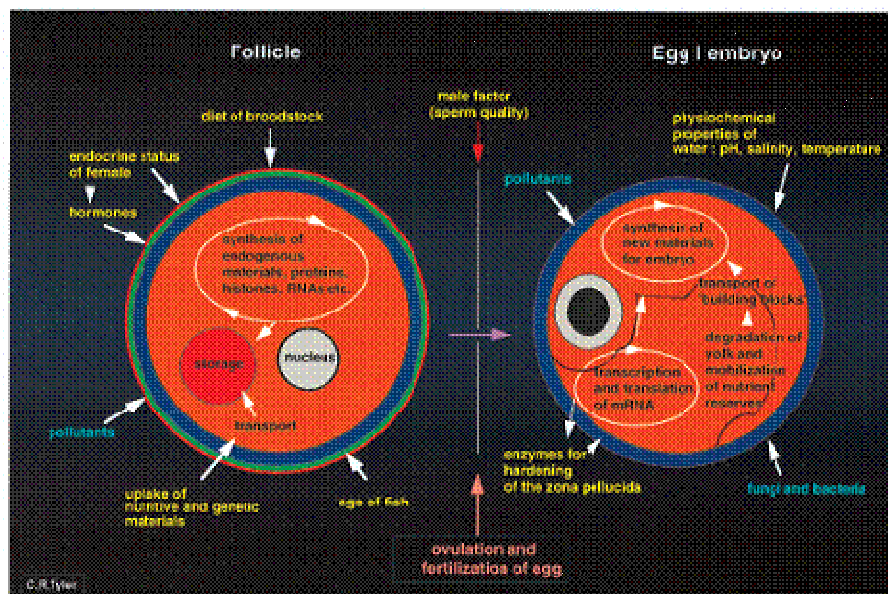
มีกรณีอีกหลายอย่างที่เป็นสาเหตุให้มีการพัฒนาระยะของโอโอไซท์ เช่น การเพิ่มแรงออสโมซิสจากแรงดันต่างๆทำให้เกิดการรวมตัวของน้ำ และเกิดการพัฒนาของรังไข่ตามมา $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ เป็นสาเหตุให้ระดับของโซเดียมมีเพิ่มขึ้นในเซลล์ (Greeley et al., 1987) และการเกิดระดับของกรดอะมิโนอิสระเพิ่มสูงขึ้นจากขบวนการ proteolysis (การแตกตัวของโปรตีน และเป็นชนิดจากการกระทำของสารเอนไซม์โดยเฉพาะในขบวนการย่อยอาหาร) โดยเกิดขึ้นในช่วงที่มีการพัฒนาของโอโอไซท์ในระยะสุดท้าย และเกิดการเพิ่มแรงดันออสโมซิสขึ้นตามมา (Wallace and Selman, 1981; Greeley et al., 1987)

การพัฒนาของโอโอไซท์ในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังมักจะมีพัฒนาที่ต่ำเนื่องจากต้องมีการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนต่างๆ หรือเรียกว่า maturation-inducing hormone (MIH) ซึ่งจะแสดงปฏิกิริยาโดยจับที่เยื่อหุ้มเซลล์ของโอโอไซท์ และเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาของฮอร์โมน ที่มีผลต่อการพัฒนาภายในไซโตพลาสซึม (Ishikawa et al., 1977; Yoshikuni and Nagahama, 1993; Masui and Clarke, 1979)

สารสเตอรอยด์ (Maturation inducing hormone; MIH) ซึ่งพบว่าที่มีส่วนในการพัฒนาโอโอไซท์ ได้แก่ $17\alpha\text{-}20\beta\text{-dihydroxy-4 pregnen-3-one}$ (DHP) และ $17\alpha\text{-}20\beta\text{-tri-hydroxy-4 pregnen-3-one}$ ($20\beta\text{-s}$) โดยได้มีรายงานไว้ในปลาหลายชนิด เช่น ในปลาทอง $17\alpha\text{-}20\beta\text{-dihydroxy-4 pregnen-3-one}$ (DHP) ได้มีการศึกษาพบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาของโอโอไซท์ได้ โดยการกระตุ้นทำให้เกิดการสังเคราะห์สารพวก cyclin B ซึ่งถือได้ว่าเป็นปัจจัยจำเป็นที่สองรองจากการใช้ปัจจัยต่างๆ เช่น ฮอร์โมนในการพัฒนาโอโอไซท์ (maturation-promoting factor; MPF) โดยเป็นสารที่ทำหน้าที่คล้ายกับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone) เช่น $17\alpha\text{-}20\beta\text{-tri-hydroxy-4 pregnen-3-one}$ ($20\beta\text{-s}$)



ภาพที่ 6 การรับสารและแร่ธาตุเข้าสู่ฟอลลิเคิล เพื่อใช้ในการพัฒนาของโอโอไซต์
ที่มา : Brooks และคณะ (1997)



ภาพที่ 7 ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมและพันธุกรรมที่มีผลต่อการพัฒนาของโอโอไซต์ปลา
ที่มา : Brooks และคณะ (1997)

2.2 การวางไข่และสืบพันธุ์ของปลาบึก

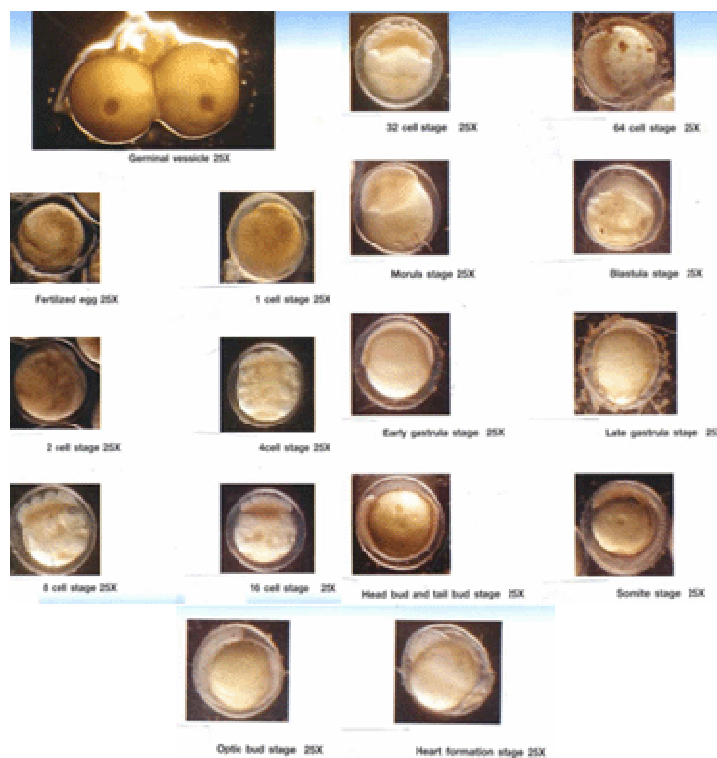
เสนห์ (2526) ได้ทดลองผสมเทียมปลาบึกด้วยการฉีดฮอร์โมนสำเร็จเป็นคนแรก โดยใช้ฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองปลาเกล็ดเงินฉีดให้พ่อแม่ปลาบึก ทำการฉีดเข็มแรก 0.5 โดส ในเพศเมีย หลังจากนั้น 8 ชั่วโมง เข็มที่สอง 1.4 โดสสำหรับแม่ปลา และฉีดพ่อปลาพร้อมกัน 0.5 โดส ผ่านไป 12 ชั่วโมง ฉีดเข็มที่สามทั้งสองตัว 0.5 โดสผสม domperidone จากนั้นรอเวลา 4-6 ชั่วโมง ตรวจสอบความพร้อมของแม่ปลา ถ้าไข่แก่ดี ริดไข่และริดน้ำเชื้อผสม นำไปพัก ที่ 25°C นาน 45-54 ชั่วโมง นำลูกปลาที่ฟักออกเป็นตัวไปอนุบาล

เสนห์ และคณะ (2536) ศึกษาเปรียบเทียบผลการใช้ salmon gonadotrophin releasing hormone analogue (sGnRHa) 1 ชนิด คือ suprefact ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์ dopamine antagonist 2 ชนิด คือ domperidone และ sulpiride ในสูตรต่างๆ 7 สูตร พบว่า ที่ได้ผลดีที่สุด และต้นทุนถูกที่สุด คือ การใช้ suprefact ร่วมกับ domperidone

จากการสังเกตความสมบูรณ์ของไข่ปลาบึกเพศเมียที่จับได้ และจากความสำเร็จ ในการผสมเทียมของเสนห์ ผลประสิทธิ์และคณะ บ่งชี้ว่า ปลาบึกมีฤดูผสมพันธุ์อยู่ในช่วงต้นฤดู ฝน ประมาณเดือนพฤษภาคมถึงเดือนมิถุนายน (เกรียงศักดิ์, 2543; Baird, 1996) ความดกไข่ ของแม่ปลาบึกสมบูรณ์เพศตามธรรมชาติคาดประเมินว่า 800,000 ฟองต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัม (เสนห์และภาณุ, 2540)

นายยงยุทธ อุณากรสวัสดิ์ หัวหน้าสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดพะเยา และทีมงาน (2544) ได้ประสบความสำเร็จในการเพาะปลาบึก โดยริดไข่ได้น้ำหนักทั้งหมด 1,200 กรัม นำมาผสมกับน้ำเชื้อปลาบึก และได้ลูกปลา จำนวน 350,000 ตัว

เกรียงศักดิ์ และคณะ (2547) รายงานว่าระบบสืบพันธุ์ของปลาบึกเพศเมียอายุ 3 ปี ครึ่ง ภายในรังไข่มี ovigerous lamellae ยื่นออกมาจากผนังรังไข่เข้าสู่ส่วนกลางท่อ ภายใน lamellae พบไข่ 2 ระยะ คือ ระยะ oogonia อยู่เป็นกลุ่มหรืออยู่เดี่ยวฝังอยู่เป็นเซลล์เล็กๆ มี นิวเคลียสใหญ่อยู่กลางเซลล์ และ ไข่ระยะ primary growth phase มีขนาดใหญ่ขึ้น นิวเคลียสมี ขนาดใหญ่ และมีนิวคลีโอลัสมากกว่าหนึ่ง อวัยวะสืบพันธุ์ยังไม่เจริญเติบโตเต็มที่ เมื่อ เปรียบเทียบกับรังไข่ของปลาบึกจากแม่น้ำโขงวัยเจริญพันธุ์มีขนาดใหญ่มาก มีไข่ระยะต่างๆ บรรจบอยู่ การเจริญของไข่ แบ่งได้ 5 ระยะ สองระยะแรก คือ oogonia และ primary growth phase มีลักษณะเช่นเดียวกับที่พบในปลาบึกวัย 3 ปีครึ่ง แต่พบจำนวนน้อย ระยะที่ 3 ได้แก่ ระยะ early-vitellogenesis ขนาดของไข่และนิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้น ไซโตพลาสซึมเริ่มใส และ มีการเพิ่มจำนวนนิวคลีโอลัส ระยะที่ 4 ได้แก่ mid-vitellogenesis ไข่ระยะนี้ ไซโตพลาสซึมมี yolk granules จำนวนมากอยู่ใกล้นิวเคลียส เริ่มมีการเคลื่อนตัวของนิวเคลียสไปอยู่ขงเซลล์ ด้าน animal pole ซึ่ง yolk granules จะเริ่มเชื่อมติดกันเกิดช่องว่างทำให้ไข่เริ่มใสขึ้น แสดงให้



ภาพที่ 8 การพัฒนาของไข่ปลาบีก

ที่มา : ยงยุทธ (2544)

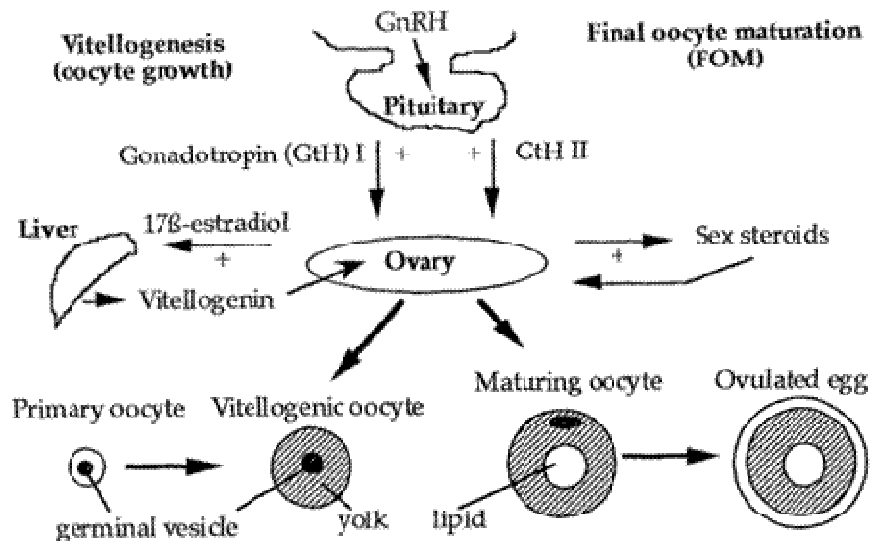
เห็นว่าปลาบีกเข้าสู่ฤดูผสมพันธุ์ ระยะที่ 5 ได้แก่ maturation egg stage ไข่ระยะนี้มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 mm Yolk granules เข้มมติดกัน ไข่มีลักษณะใส และนิวเคลียสมีตำแหน่งชิดขอบเซลล์

2.3 การพัฒนาโอโอไซท์สุกในห้องทดลอง (*in vitro* maturation, IVM) ในสัตว์น้ำ

มีรายงานยืนยันว่า กระบวนการ oocyte maturation ในสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิด ถูกควบคุมโดยสามปัจจัยหลักคือ โกลาโดโทรปิน (gonadotropin; GTH) maturation-inducing hormone (MIH) และ maturation-promoting factor (MPF) ซึ่งมีหน้าที่แตกต่างกันไปในแต่ละระดับ ได้แก่ เนื้อเยื่อฟอลลิเคิลในรังไข่ เยื่อหุ้มเซลล์ของโอโอไซท์

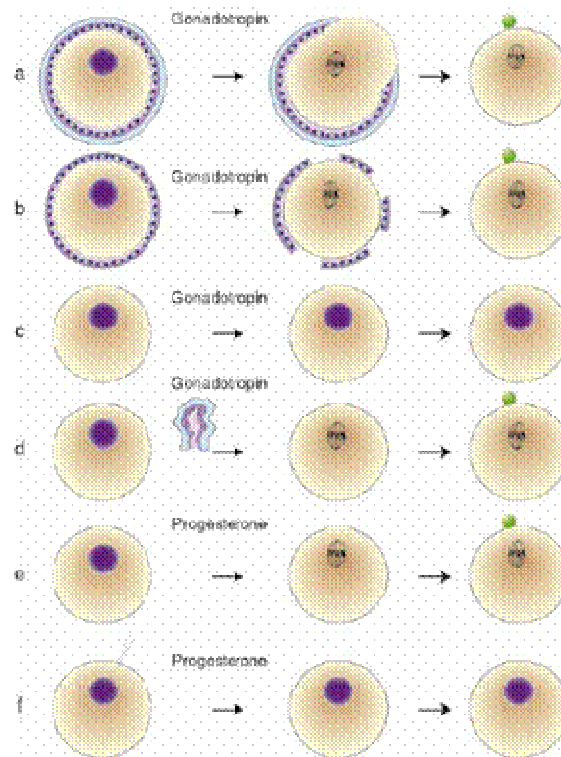
แลโซโตพลาสซึมของโอโอไซท์ (Wasserman and Smith, 1978; Masui and Clarke, 1979; Nagahama, 1987; Kishimoto, 1988) อย่างไรก็ตาม ในสัตว์ส่วนใหญ่กระบวนการ oocyte maturation จะมีการเริ่มต้นก่อนที่จะมีการตกไข่ เมื่อรังไข่ถูกกระตุ้นโดยโกนาโดโทรปิน ซึ่งเป็นการที่หลังจากต่อมใต้สมองซึ่งพบในพวกกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลัง หรือจากระบบประสาทในกลุ่มสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ในกระบวนการ oocyte maturation ของกบจะมีการถูกกระตุ้นโดยสารประเภทโกนาโดโทรปินจากต่อมใต้สมอง ระหว่างที่มีการ oocyte maturation สามารถสังเกตในเซลล์ของโอโอไซท์ได้ จุดที่สังเกตได้ของการเกิด oocyte maturation คือการเกิด germinal vesicle breakdown (GVBD) เมื่อนิวเคลียสขนาดใหญ่ของโอโอไซท์ซึ่งถูกเรียกว่า germinal vesicle (GV) มีการแตกและ nucleoplasm มีการหลั่งสู่ cytoplasm และจะเกิดการเข้าสู่ของโครโมโซม เพื่อเข้าสู่ระยะ metaphase ต่อไป (Nagahama et al., 1995)

มีการศึกษาโอโอไซท์ของกบ เริ่มตั้งแต่ปี 1937 โดยได้มีการสังเกตว่า oocyte maturation สามารถกระตุ้นได้โดยโกนาโดโทรปินจากต่อมใต้สมอง ต่อมาพบว่าผลการตกไข่ของโกนาโดโทรปินสามารถทำให้เพิ่มขึ้นได้โดย progesterone (Zwarenstein, 1937; Burgers and Li, 1960; Wright, 1961; Schuetz, 1967; Smith et al. (1968)



ภาพ 9 กลไกของฮอร์โมนต่อการควบคุมระยะโอโอไซท์ในปลาซัลมอน
ที่มา : Swanson (1991)

ต่อมา Masui และคณะ (Masui, 2001) ได้ทำการศึกษาการพัฒนาของโอโอไซต์ของกบ *Rana pipens* อย่างจริงจัง ดังนี้ Masui and Markert (1971) พบว่า ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนปริมาณต่ำกระตุ้นให้ไข่กบเกิดการสุกได้ดีกว่าปริมาณสูง และ Masui (1976) พบว่า โกลาโดโทรปินจากต่อมใต้สมองส่งผลกระตุ้นฟอลลิเคิลให้หลั่งฮอร์โมนที่มีคุณสมบัติคล้ายโปรเจสเตอโรน (progesterone-like) ออกมา และมีผลโดยตรงต่อกระบวนการ oocyte maturation Masui and Clarke (1979) ได้ฉีดโปรเจสเตอโรนเข้าไปในโอโอไซต์ ซึ่งคาดว่าภายในโอโอทีมีสารสเตอรอยด์ฮอร์โมนอื่น รวมทั้งสารที่ไม่ใช่สเตอรอยด์อีกหลายชนิด พบว่าผลต่อการพัฒนาของโอโอไซต์ได้ด้วยเช่นกันโดยที่ประสิทธิภาพจะแตกต่างกันไป ต่อมา Masui (2001) ได้มีการทดลองความเกี่ยวข้องของโอโอไซต์กับเซลล์ฟอลลิเคิล โดยใช้โอโอไซต์ที่ยังคงติดกับรังไข่และฟอลลิเคิล (ภาพ 10a) หรือมีเซลล์บางส่วนติดอยู่ (ภาพ 10b) นำมาเลี้ยงด้วยฮอร์โมนโกลาโดโทรปิน พบว่า โอโอไซต์มีการพัฒนาจนเกิด GVBD ได้ แต่เมื่อนำโอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์ฟอลลิเคิล (ภาพ 10c) มาเลี้ยงเช่นกัน จะไม่มีการตอบสนองต่อฮอร์โมน และเมื่อเติมสารสกัดจากต่อมใต้สมองเพิ่มลงไป (ภาพ 8d) หรือโปรเจสเตอโรน (ภาพ 10e) พบว่า โอโอไซต์เกิดการพัฒนาได้ แต่เมื่อฉีดโปรเจสเตอโรนเข้าในโอโอไซต์ (ภาพ 10f) พบว่า ไม่มีการพัฒนาดังนั้นสรุปได้ว่า โกลาโดโทรปินนั้นต้องใช้มีสื่อกลางในการแสดงปฏิกิริยาโดยใช้ฟอลลิเคิลเป็นสื่อในการกระตุ้นโอโอไซต์ของกบเมื่อเริ่มมีการ maturation



ภาพ 10 โอโอไซ์ระยะต่างเมื่อถูกทดสอบด้วยโกนาโดโทรปิน
ที่มา : Masui (2001)

- (a) โอโอไซ์ที่ยังคงติดกับฟอลลิเคิล
- (b) โอโอไซ์ที่มีเซลล์ฟอลลิเคิลติดอยู่บ้าง
- (c) โอโอไซ์ปราศจากเซลล์ฟอลลิเคิลโดยสมบูรณ์
- (d) โอโอไซ์ที่เลี้ยงด้วยสารสกัดต่อมใต้สมองสกัด
- (e) โอโอไซ์ที่เลี้ยงด้วยโปรเจสเตอโรน
- (f) โอโอไซ์ที่ฉีดโปรเจสเตอโรน

2.4 ฮอร์โมนกับการพัฒนาโอโอไซท์ปลาโดยเทคนิค IVM

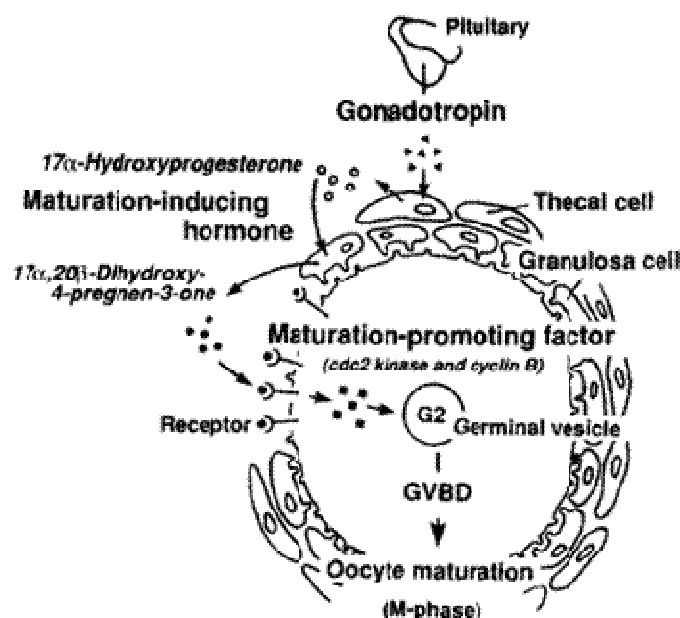
การศึกษาการเลี้ยงโอโอไซท์ (IVM) ในปลามีรายงานมากมาย ซึ่งจะได้กล่าวแยกตามฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องในหัวข้อต่อไป ส่วนในสัตว์น้ำไม่มีกระดูกสันหลัง มีรายงานในดาวทะเล ซึ่งมีระบบประสาทแบบรัศมี (radial nerve) พบว่ามีการผลิตสารขึ้นมาชนิดหนึ่งในรังไข่ของดาวทะเล เมื่อถูกกระตุ้นโดยโกนาโดโทรปินทางระบบประสาท ทำให้เกิดการตกไข่ และ oocyte maturation ได้ (Kanatani, 1964) ต่อมาสารดังกล่าวได้ถูกจำแนกไว้ว่าเป็นสาร 1-methyladenine (1-MA) Kanatani et al. (1969)

2.4.1 โกนาโดโทรปิน (gonadotropin, GTH)

มีการศึกษาพบว่าปลาแซลมอนนั้นการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ไม่เหมือนกับกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง โดยจะถูกควบคุมโดยโกนาโดโทรปินสองชนิด (Swanson, 1999; Kawachi et al., 1989) ได้แก่สารที่มีลักษณะคล้าย FSH จะเป็น GTH I ซึ่งจะมีการหลั่งในช่วงที่มีการเจริญของระบบสืบพันธุ์ (vitellogenesis และ spermatogenesis) และมีหน้าที่ในการหลั่งฮอร์โมนที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโตของระบบสืบพันธุ์ และการสังเคราะห์สารสเตอรอยด์ในระยะนี้ ส่วนฮอร์โมนที่เหมือน LH จะเป็น GTH II จะมีเพิ่มขึ้นในปลาในวัยที่มีการพัฒนาระยะท้ายของเซลล์สืบพันธุ์ (final maturation) และจะส่งผลถึงการสังเคราะห์สารสเตอรอยด์เพื่อที่จะมีผลต่อการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์และการหลั่งของสารสเตอรอยด์

จากการศึกษาของ Yueh และ Chang (2000) ในปลา White bass (*Moxone chrysops*) ซึ่งมีการทดลองแบบ *in vivo* และ *in vitro* ด้วยการใช้โกนาโดโทรปิน (GnRHa) เพื่อไปเหนี่ยวนำให้เกิดการพัฒนาของโอโอไซท์พบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับระดับ LH ในปลาอย่างมีนัยสำคัญ และมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์สารพวกสเตอรอยด์ของอวัยวะสืบพันธุ์ โดยโอโอไซท์สามารถทำปฏิกิริยากับ 17, 20 β -P, 20 β -S และ HCG ได้ในหลอดทดลองในช่วงชั่วโมงที่ 9 หลังจากฉีด LHRH จนเกิด GVBD การเหนี่ยวนำที่ระดับของ MIS receptor โดยการใช้โกนาโดโทรปินเป็นตัวกระตุ้น พบว่ามีความสำคัญในการที่จะทำให้โอโอไซท์สามารถที่จะพัฒนาได้

Tapiador (1976) ได้รายงานผลการใช้ HCG ฉีดให้แก่ปลาการ์ฟในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน พบว่าสามารถเร่งให้ปลาดังกล่าววางไข่ได้เมื่อฉีดด้วยโดส 800-1100 IU ต่อน้ำหนักปลา 1 กก. โดยการฉีด 2 เข็ม ระยะเวลาห่าง 8 ชม. โดยฉีดเข็มแรกด้วยอัตราส่วนฮอร์โมน 10-15% ของปริมาณฮอร์โมนที่ต้องการ



ภาพ 11 การควบคุมการพัฒนาของโอโอไซต์ (oocyte maturation) จนเกิด GVBD (germinal vesicle breakdown) ในรังไข่ปลาแซลมอน

ที่มา : Nagahama (1997)

Chen et al. (1977) พบว่า การใช้ต่อมใต้สมองของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ร่วมกับ HCG สามารถนำมาเร่งฉีดเร่งให้ปลากะรัง (*Epinephelus tauvina*) วางไข่ได้จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่า ปลาต้องการฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองปลาในการฉีดเข็มแรกและฉีดตามด้วย HCG ด้วยโดส 500-1000 IU ต่อน้ำหนักปลา 1 กก. ในเข็มที่สอง ปริมาณฮอร์โมนและเวลาในการวางไข่ขึ้นอยู่กับสภาพแม่ปลาเป็นปัจจัยสำคัญ

Hiruyavasit (1979) ได้ศึกษาคุณสมบัติและกลไกการทำงานของ HCG พบว่าในปลัสวาทะหึงมีครีร์จะมีปริมาณ HCG ประมาณ 50 IU ต่อปลัสวาทะ 1 ซี.ซี. โดยที่ HCG นี้มีคุณสมบัติเป็น LH-like ซึ่งทำหน้าที่ในการตกไข่ (egg ovulation)

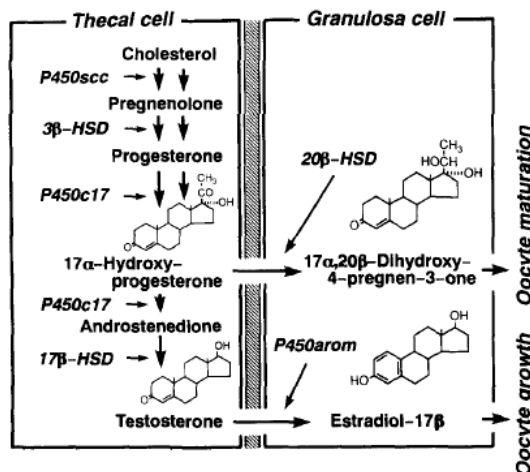
Pillay (1979) รายงานว่า ในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนได้ทดลองเพาะพันธุ์ปลาด้วย HCG เพียงอย่างเดียว ได้ผลกับปลาเกือบทุกชนิด ยกเว้น mud carp, grass carp และรายงานต่อว่า ในประเทศจีนนั้น ส่วนใหญ่จะใช้ฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองปลา common carp แต่ก็มีการใช้ต่อมใต้สมองปลา silver carp big head, grass carp เช่นเดียวกัน

Ngamvongchon (1981) ได้รายงานผลการทดลองใช้ HCG ในแม่ปลาตะเพียนขาว (*Puntius barbodes* Bleeker) และปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus* Gunther) พบว่า HCG เพียงอย่างเดียวไม่สามารถเร่งให้ปลาตะเพียนขาววางไข่ได้ แต่สามารถเร่งให้ปลาดุกอุยวางไข่ได้ ซึ่งผลการทดลองนี้เป็นการสนับสนุนผลการวิเคราะห์ของ Fontain (1976)

2.4.2 MIH (Maturation Inducing Hormone) ของปลา

GTH (gonadotropin) จากต่อมใต้สมองถูกกล่าวไว้ว่าเป็นฮอร์โมนชนิดแรกที่เป็นปัจจัยให้มีการพัฒนาของโอโอไซท์ในปลา แต่ก็ดูเหมือนว่า GTH นั้นมีการทำปฏิกิริยาต่อรังไข่ที่เนื้อเยื่อของฟอลลิเคิล ซึ่งเป็นสาเหตุให้มีการผลิต MIH (Maturation inducing hormone) ออกมา ซึ่งมีปฏิกิริยาโดยตรงต่อการเริ่มมีกระบวนการ oocyte maturation ขึ้น (Young et al., 1982) MIH (17α , 20β -DP) มีรายงานว่าพบในกลุ่มปลาแซลมอน เช่น ใน amargo salmon (*Oncorhynchus rhodorus*) ได้ถูกแยกไว้ได้ครั้งแรกในขณะที่ยังไม่เคยมีการแยกในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นมาก่อน จากโอโอไซท์ระยะที่ยังไม่พัฒนาแต่อยู่ในระยะที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่แล้วในขณะที่ยังอยู่ในฟอลลิเคิลซึ่งถูกเลี้ยงด้วย GTH (Nagahama and Adachi, 1985) พบว่า 17α , 20β -DP มีระดับต่ำในโอโอไซท์ระยะ vitellogenic ในปลาแซลมอล เพตเมีย และเพิ่มขึ้นสูงในปลาที่อยู่ในระยะเจริญพันธุ์และตกไข่ (Young et al., 1983) ในการทดลองเลี้ยงโอโอไซท์ระดับ *in vitro* เมื่อพิจารณาจากสารสเตอรอยด์หลายชนิดที่ทำการทดสอบแล้ว 17α , 20β -DP มีผลต่อการพัฒนาโอโอไซท์ในปลาหลายชนิดซึ่งรวมถึงใน amargo salmon ด้วย (Nagahama, 1983) และมีการค้นพบสารสเตอรอยด์ชนิดอื่นด้วย ได้แก่ 17α , 20β , 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (20β -dihydro-11-deoxycortisol, 20β -S) ซึ่งถูกจำแนกไว้ว่าเป็น MIH ของปลา Atlantic croaker (*Micropogonias undulates*) และ Spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*) (Trant and Thomas, 1989; Thomas, 1994)

ฟอลลิเคิลในรังไข่ของปลานั้นจะมีลักษณะคล้ายกับสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นๆ ซึ่งจะประกอบด้วยเนื้อเยื่อหลักสองชนิดในฟอลลิเคิลคือ ชั้นนอกจะเป็น thecal cell และชั้นในจะเป็น granulose cell (Nagahama, 1983) มีการศึกษารังไข่ของปลาแซลมอน ได้แก่ amargo salmon และ rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ซึ่งเป็นรังไข่จากระยะ postvitellogenic เพื่อดูกลไกในการสังเคราะห์ 17α , 20β -DP ในฟอลลิเคิล ระดับ *in vitro* พบว่ามีเซลล์สองชนิดของฟอลลิเคิลที่มีส่วนเกี่ยวข้องซึ่งได้แก่ thecal cell และ granulose cell โดยมีการผลิต 17α , 20β -DP ขึ้นในรังไข่ของปลาแซลมอน (Young et al., 1986) ซึ่งในรูปแบบนี้พบว่าที่เนื้อเยื่อชั้น thecal ของฟอลลิเคิลมีการผลิต 17α -hydroxy-progesterone ที่ basal lamina และสารนี้จะเปลี่ยนเป็น 17α , 20β -DP โดยเนื้อเยื่อ granulosa อีกทีหนึ่ง โดยเนื้อเยื่อชั้น



ภาพ 12 ชั้นเซลล์ของฟอลลิเคิล 2 ชนิดที่มีส่วนในการสังเคราะห์ Estradiol-17 β และ 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one โดยฟอลลิเคิลของปลาแซลมอน
ที่มา : Nagahama (1997)

นี้มีการทำปฏิกิริยาของ GTH I ซึ่งเป็นสารกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase (20 β -HSD) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญโดยเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนรูปแบบของ 17 α -hydroxy-progesterone มาเป็น 17 α , 20 β -DP

ขั้นตอนแรกที่มีการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาของ GTH ใน thecal cell ขึ้นก็คือ receptor-mediated มีการทำปฏิกิริยาของ adenylate cyclase และกลไกของ cAMP เกิดขึ้น โดย GTH จะเป็นสารกระตุ้นให้เกิดกิจกรรมของ cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 (P450scc) ขึ้น และ เนื้อเยื่อชั้น granulosa ในปลาจะขาดระบบของ P450scc การทำปฏิกิริยาของ GTH ต่อ 20 β -HSD จึงเพิ่มขึ้นอย่างมากในเนื้อเยื่อชั้น granulosa cell ซึ่งได้ถูกจำลองแบบการเกิดปฏิกิริยาตรงนี้ได้โดย forskolin ซึ่งเป็นกลไกของ dbcAMP แต่ในที่นี้ไม่ใช่ dbcAMP และ สาร phosphodiesterase 2 ชนิดที่เป็นสารยับยั้ง (Nagahama et al., 1985). นอกจากนี้ GTH และ forskolin ยังเป็นสาเหตุให้มีการสะสมของ cAMP อย่างรวดเร็วที่ระดับสูงสุดประมาณ 30-60 นาที ซึ่งการค้นพบตรงนี้เป็นความคงที่ของค่า cAMP ว่าเป็นตัวสื่อสารที่สอง (second messenger) ในปฏิกิริยาของ GTH

เมื่อทดลองฉีด 17 α , 20 β -DP เข้าไปในโอโอไซต์ระยะ full-grown immature ในปลาทองพบว่าโอโอไซต์ไม่มีกระบวนการ oocyte maturation เกิดขึ้น ในขณะที่เมื่อมีการ

กระตุ้นจากภายนอกพบว่ามีผลในการพัฒนา (Nagahama, 1987) แสดงให้เห็นได้ว่าปฏิกิริยาของ 17α , 20β -DP อาจจะมีตัวกลางเป็นสื่อโดยเป็นรีเซพเตอร์ประเภทโปรตีนชนิดหนึ่งอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของโอโอไซต์ (membrane-bound receptor protein) ในสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำพบว่ามีการมีฮอร์โมน progesterone ซึ่งถือว่าเป็น MIH ชนิดหนึ่งของสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำที่พบว่ามีปฏิกิริยาต่อรีเซพเตอร์ที่ผิวเซลล์ของโอโอไซต์ แต่ไม่มีผลต่อรีเซพเตอร์ที่อยู่ภายในเซลล์ (cytoplasmic receptor) หรือนิวเคลียส (nuclear receptor) (Maller, 1985) ซึ่งมีการค้นพบรีเซพเตอร์ของ 17α , 20β -DP และ 20β -S ที่เยื่อหุ้มเซลล์โอโอไซต์ในกลุ่มปลาแซลมอน (Maneckjee et al., 1989; Yoshikuni and Nagahama, 1993) และในรังไข่ของปลา spotted seatrout (Patino and Thomas, 1990) ตามลำดับ ความจำเพาะของรีเซพเตอร์ 17α , 20β -DP ที่ plasma membranes ของโอโอไซต์ปลาเรนโบว์เทราท์ (Yoshikuni and Nagahama, 1993) เมื่อมีการใช้วิธี scatchard analysis yielded พบว่ามีทั้งระดับสูงสุด ($K_d = 18\text{ nM}$; $B_{\max} = 0.2\text{ pmol/mg protein}$) และค่าต่ำสุด ($K_d = 0.3\text{ }\mu\text{M}$; $B_{\max} = 1\text{ pmol/mg protein}$)

มีรายงานการพบ 17α , 20β -DP-binding protein (DBP) โดยการแยกออกมาได้อย่างบริสุทธิ์จากปลาเรนโบว์เทราท์ในช่วงฤดูวางไข่ มีน้ำหนักโมเลกุล 110 kDa จากการทดสอบโดยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ประกอบด้วยโมเลกุล 2 ส่วนคือ 50 และ 55 kDa ใน SDS-PAGE (Yoshikuni et al., 1994) ซึ่งการวิเคราะห์ scatchard analysis นี้ได้มีการอธิบายไว้ถึงการจับคู่ของโมเลกุลว่าประกอบด้วย K_d 10 nM และ $B_{\max}$ 5 nmol/mg protein ดังนั้นคุณสมบัติทางโครงสร้างโมเลกุลเคมีของ DBP และ 17α , 20β -DP – receptor มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

พบมีความแตกต่างกันในการเพิ่มขึ้นเกี่ยวกับความเข้มข้นรีเซพเตอร์ของ 17α , 20β -DP และ 20β -S ในโอโอไซต์ปลา seatrout (Patino and Thomas, 1990) และปลา flounder (Yoshikuni, unpublished data Cited by Nagahama, 1997) เมื่อเข้าสู่ final maturation ซึ่งจากการศึกษาในระดับ *in vitro* โดยการทดสอบ GTH กับฟอลลิเคิลพบว่าเป็นสาเหตุให้มีการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นรีเซพเตอร์ด้วยเช่นกัน (Yoshikuni, unpublished data Cited by Nagahama, 1997; Thomas, 1994) นอกจากนี้ การกระตุ้นของ GTH ที่มีการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้น MIH-receptor แล้วยังพอดีกับการเพิ่มขึ้นของการพัฒนาของโอโอไซต์ แสดงให้เห็นได้ว่า GTH นั้นทำให้มีการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้น MIH-receptor ในโอโอไซต์ และทำให้มีการเพิ่มกระบวนการ oocyte maturation ตามไปด้วย (Patino and Thomas, 1990; Kobayashi et al., 1988)

17 , 20β -DHP สามารถกระตุ้นการพัฒนาของโอโอไซต์ได้ดีกว่า 20β -S แต่ยังไม่มีความชัดเจนว่าส่วนของ 17 , 20β -P หรือ 20β -S สารใดจะมีหน้าที่เป็น MIS ในปลา black porgy ซึ่งก็พบว่าฮอร์โมนทั้งคู่สามารถกระตุ้นการสร้างสเปิร์มในปลา black porgy เพศผู้ที่มี

อายุ 1 ปีได้ในช่วงที่มีการวางไข่ (Yueh and Chang, 2000) และยังพบว่า $17\alpha, 20\beta$ -P.กระตุ้นการสร้างสเปิร์มในปลาคาร์ฟเพคผู้ได้ด้วย (Yueh and Chang, 2000) อีกทั้งมีรายงานว่า $17\alpha, 20\beta$ -DHP มีผลในการทำปฏิกิริยาต่อ MIS ในปลาแซลมอนและกลุ่มปลา cyprinids (Nagahama, 1987) เป็นปัจจัยที่ทำให้มีการวางไข่ได้หลายครั้งในปลา *tbinumeri-dragonet* (*Repomucenus beniteguri*) (Asahina et al., 1991) และสามารถเหนี่ยวนำให้มีการพัฒนาของโอโอไซต์ไปจนถึงระยะสุดท้ายได้ใน red seabream (*Pagrus major*) (Kagawa et al., 1998)

ปลาในครอบครัว Perciform และ Sciaenidae พบว่า ทั้ง $17\alpha, 20\beta$ -P และ 20β -S มีผลในการกระตุ้นให้โอโอไซต์เกิดการพัฒนาดังระยะสุดท้ายในปลากลุ่ม Perciform (striped bass, *Moxone saxatilis*; white perch, *M. Americana*; white bass, *M. chrysops*; King et al., 1994, 1995)

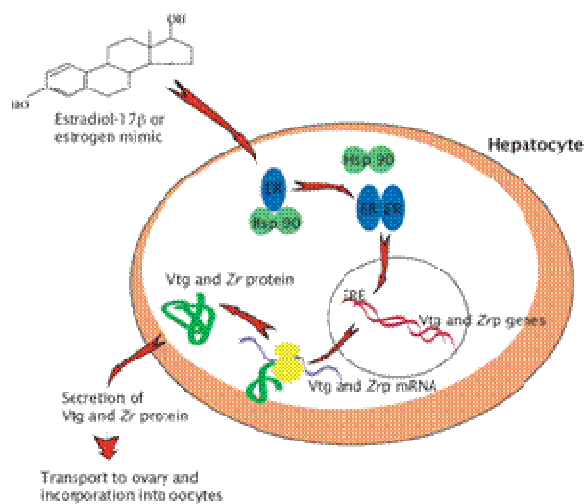
นอกจากนี้ยังพบว่าการกระตุ้นของ $17\alpha, 20\beta$ -DP ต่อกระบวนการ oocyte maturation พบว่ามีการลดลงของกระบวนการ cAMP ในโอโอไซต์ปลาเรนโบว์เทราท์แบบชั่วคราวเกิดขึ้น แม้ว่า โดยจะมีความแตกต่างของช่วงระยะเวลาที่เกิดในปลาแต่ละชนิด (Jalabert and Finet, 1986) แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการลดลงของกระบวนการ cAMP ในช่วงเวลานั้นมีส่วนเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการพัฒนาของโอโอไซต์โดยสารสเตอรอยด์ อีกทั้งมีหลักฐานของกระบวนการ cAMP พบในการทดลองครั้งนี้ว่า $17\alpha, 20\beta$ -DP ได้ยับยั้งกิจกรรมของ adenylate cyclase ที่เยื่อหุ้มเซลล์โอโอไซต์ของปลาเรนโบว์เทราท์ (Yoshikuni and Nagahama, 1994)

2.4.3 Estradiol- 17β

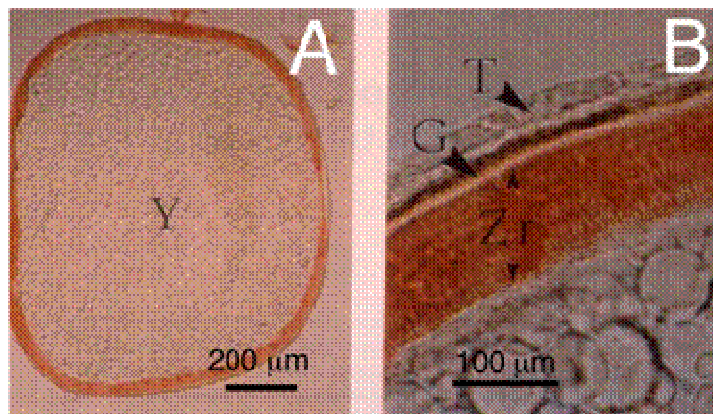
GtH ที่สกัดได้จากสมองของปลาหลายชนิด พบว่า GtH สามารถจำแนกออกได้เป็น 2 ชนิด (GtH I & II) ซึ่งโครงสร้างทางเคมีจะมีความคล้ายคลึงกับ human follicle-stimulating hormone (FSH) และ luteinising hormone (LH) ตามลำดับ โดยฮอร์โมนเหล่านี้จะหลั่งจากสมองในกลุ่มปลากระดูกแข็ง (Swanson, 1991) โดย GtH I (FSH) นั้นจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการบวนการสร้างไข่แดง (vitellogenesis) และ zonagenesis ในขณะที่ GtH II (LH) จะมีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมการพัฒนาของโอโอไซต์ช่วงระยะท้าย (final maturation) และการตกไข่ (ovulation) การหลั่งของ GtH นั้นจะถูกควบคุมผ่านปฏิกิริยาย้อนกลับ (feedback mechanism) โดย estradiol- 17β (E_2) และ testosterone ซึ่งกลไกของปฏิกิริยาย้อนกลับนี้พบว่า มีผลต่อการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์โดยผ่านตั้งแต่ hypothalamus-pituitary-gonadal-liver ตามลำดับ

เพราะว่าอวัยวะเหล่านี้จะมีการผลิตสารที่มีอิทธิพลต่อกันและกันออกมา ซึ่งเป็นการนำไปสู่การพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ และการวางไข่ตามมา และการหลั่งของ GnRH จะถูกยับยั้งโดยสารประเภท dopamine โดยจะทำให้มีผลต่อระดับของสเตอรอยด์ อีกทั้ง testosterone นอกจากจะเป็นสารตั้งต้นของ E_2 แล้วยังมีผลต่อปฏิกิริยาย้อนกลับ (feedback mechanism) ไปยังสมองแล้วยังพบว่ามีส่วนในการเพิ่มการกระตุ้นฮอร์โมนโกนาโดโทรปินในการทดลอง *in vitro* อีกด้วย (Young et al., 1982)

E_2 เป็นสารประเภทฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) ในกลุ่มปลาคะดุกแข็งเพศเมีย แต่ก็พบว่ามีการผลิตฮอร์โมน androgen และ testosterone ปริมาณมากด้วยเช่นกันโดยรังไข่ ซึ่งในรังไข่จะมีเซลล์อยู่ 2 ชนิดในการสังเคราะห์ E_2 และ testosterone ซึ่ง theca cell จะทำการผลิต testosterone โดย testosterone จะมีการเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีโดย cytochrome P450aromatase (CYP19) เป็น E_2 ที่เนื้อเยื่อชั้น granulosa cells และ E_2 จะกระตุ้นให้เกิดการผลิต vtg และ eggshell zr-protein โดยตับของปลาเพศเมีย (Augustine and Anders, 2003)



ภาพ 13 กลไกการทำงานของ E_2 ในการผลิต yolk protein ใน hepatocyte ในตัว
ที่มา : Augustine and Anders (2003)



ภาพ 14 ภาพแสดงให้เห็นลักษณะเซลล์ของโอโอไซต์ซึ่งจะพบ yolk protein ภายในเซลล์ (Y) และชั้นเนื้อเยื่อของฟอลลิเคิลซึ่งได้แก่ theca cell layers (T) และ granulosa cell layers (G) อีกทั้ง zr-protein (Z) ซึ่งอยู่ระหว่างโอโอไซต์และฟอลลิเคิล
ที่มา : Augustine and Anders (2003)

Upadhyaya และ Haider (2004) ได้มีการศึกษาประสิทธิภาพของ estradiol-17 β , androgen, corticosteroids, progesterone และสารอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของโอโอไซต์ในระดับ *in vitro* ต่อการเกิด germinal vesicle breakdown (GVBD) ซึ่งในการทดลองได้ใช้ฟอลลิเคิลของปลา Indian Catfish (*Mystus vittatus*) ในการทดลอง ซึ่งก็พบว่า 17 α , 20 β -dihydroxy-progesterone จะให้ผลการการ GVBD มากที่สุดโดยส่วนใหญ่ซึ่งเป็นสารประเภท maturation-inducing steroid (MIS) ส่วน estradiol-17 β และ testosterone พบว่าไม่มีผลต่อการเกิด GVBD แต่ androsterone พบว่าให้ผลในการพัฒนาโอโอไซต์ในระดับปานกลาง ในขณะที่ Deoxycorticosterone (DOC), hydrocortisone, progesterone และ 17 α -hydroxyprogesterone พบว่าจะให้ผลต่อการพัฒนาในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่า ส่วนสารประเภท 5 β พบว่าลดการพัฒนาของโอโอไซต์โดยส่วนใหญ่ แต่ 5 β -pregnene-3 α -ol-20-one สามารถกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาของโอโอไซต์ได้ ซึ่งพบว่ามีแตกต่างจากปลา Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*) ในผลของ MIS ต่อการพัฒนาโอโอไซต์

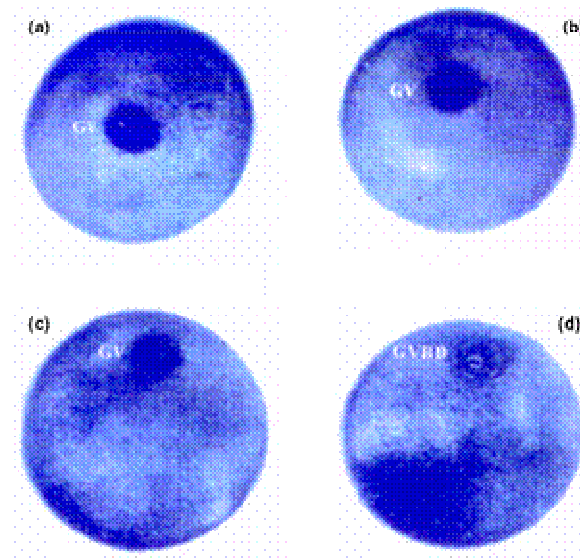
Sundararaj et al. (2002) ได้มีการศึกษาถึงระยะเวลาในการเพิ่มขึ้นของสาร cortisol, testosterone และ estradiol ในปลา gravid catfish และพบว่ามีระดับอยู่ที่ 15, 90 และ 120 นาที ตามลำดับ จากการใช้ร่วมกับ ovine luteinizing hormone (LH) หรือ salmon

gonadotropin (SG-100) จากสเตอรอยด์ทั้ง 3 ชนิดนี้ พบว่าสาร cortisol จะเกิดขึ้นที่ระหว่างไต (interregal) ในขณะที่ testosterone และ estradiol จะมีการผลิตที่รังไข่ นอกจากนี้เนื้อเยื่อของรังไข่ปลา gravid catfish เมื่อมีการกระตุ้นจากฮอร์โมนกลุ่มโกนาโดโทรปิน พบว่าสามารถทำให้เกิดการสังเคราะห์ pregnanolone (3 α -hydroxy-5 β -pregnan-20-one) ทำให้เห็นได้ว่าเมื่อมีการฉีดโกนาโดโทรปินเข้าไปกระตุ้นจะมีการผลิต cortisol ขึ้นก่อนที่ไต และทำให้เกิดการสังเคราะห์สเตอรอยด์ที่รังไข่ตามมาในจากรังไข่ของ gravid catfish ในการทดลองนี้ได้มีการสังเกตประสิทธิภาพของโกนาโดโทรปิน cortisol และสเตอรอยด์จากรังไข่ระหว่างที่มีการ oocyte maturation ในระดับ *in vitro* culture ของโอโอไซต์ใน catfish ด้วยการให้ cortisol หรือ LH เพียงอย่างเดียว และกับการใช้สารอื่นร่วมด้วยนั้นพบว่ามีแค่เพียง cortisol เท่านั้นที่ให้ผลในการพัฒนาของโอโอไซต์ได้มากกว่า LH แต่ฮอร์โมนทั้งสองชนิดนี้ก็ยังคงใช้ปริมาณความเข้มข้นที่ยังกว้างอยู่มาก ซึ่งก่อนหน้านี้จากการศึกษาก็พบว่า LH หรือ pregnanolone จะมีผลอยู่ในช่วงระยะเวลาสั้นๆคือประมาณ 90 นาทีหลังจากที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น ซึ่งต่อมาจะพบว่า cortisol จะมีปฏิกิริยาต่อการเกิด maturation มากกว่า อีกทางหนึ่งอาจจะจะเป็นเพราะมีการสังเคราะห์สารเกิดขึ้นของ LH โดยผ่านทางโอโอไซต์ อีกทั้งการใช้ testosterone และ estradiol ใน culture medium ที่มีการจำลองจากการใช้ cortisol พบว่า LH ให้ผลในการยับยั้งการพัฒนาของโอโอไซต์อย่างชัดเจน

2.4.4 Growth factor ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาโอโอไซต์ในการทดลอง IVM

1) Insulin

Dasgupta et al. (2001) กล่าวว่าอินซูลินเมื่อนำมาใช้เป็นสารร่วมพบว่าทำให้สารอื่นมีประสิทธิภาพมากขึ้นอย่างใน DHP, IGF-I และ GtH ในโอโอไซต์ปลา Indian carp (*Labeo rohita*) และพบว่าการใช้อินซูลินเพียงอย่างเดียวในการเลี้ยงโอโอไซต์ที่อยู่ในหลอดทดลองสามารถทำให้เกิด GVBD ซึ่งเป็นลักษณะระยะการพัฒนาขั้นสุดท้ายของโอโอไซต์ อิทธิพลของอินซูลินมีผลต่อ GV ของโอโอไซต์ โดยมีการเคลื่อนย้ายของโพลาร์บอดีไปสู่แอนิมอลโพล์ ซึ่งเป็นช่วงระยะทางที่ไปถึงช่องสืบพันธุ์ และหลังจากนั้นก็ถึงขั้น GVBD พบว่าความเข้มข้นที่ดีที่สุดคือ 6.3 μ M ในการเหนี่ยวนำให้เกิด GVBD และพบว่าเมื่อมีการทดลองใช้ร่วมกับสารยับยั้งเช่น cycloheximide (Chx) และ actinomycin (AcD) ซึ่งเป็นกลุ่มสารยับยั้งในการพัฒนาโอโอไซต์ พบว่า actinomycin (AcD) ไม่มีผลในการยับยั้งการพัฒนา



ภาพ 15 การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาคาร์พที่มีการใช้ insulin $6.3 \mu\text{M}$

- (a) โอโอไซต์ที่ปราศจากฮอร์โมนในการเลี้ยง GV จะยังคงอยู่ที่จุดกึ่งกลางเซลล์
- (b) โอโอไซต์ที่ทดสอบด้วย insulin เริ่มมีการเคลื่อนที่ของ GV เกิดขึ้นในชั่วโมงที่ 12,
- (c) โอโอไซต์เริ่มมีการเคลื่อนที่ของ GV ไปที่ขั้วเซลล์ในชั่วโมงที่ 15
- (d) โอโอไซต์ที่เกิด GVBD ในชั่วโมงที่ 18

ที่มา : Dasgupta et al. (2001)

2) Insulin-like growth factor-I (IGF-I)

Insulin-like growth factor-I (IGF-I) นั้นมีอิทธิพลต่อการพัฒนาของรังไข่และการเกิด FOM ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Grigorescu et al., 1994.; Duan, 1997; Poretsky et al., 1999) การแสดงออกของ IGF-I นั้นสามารถทำให้เกิด GVBD ได้ในสัตว์หลายชนิด รวมทั้งปลาหลายชนิดด้วยเช่นกัน

การสำรวจปฏิกิริยาของ IGF-I ก่อนหน้านี้ต่อการเกิด FOM ในปลาที่มีการทดลองไว้ในระดับ *in vitro* พบว่าในปลา red seabream (*Pagrus major*) IGF-I สามารถมีผลต่อการพัฒนาของ meiosis (germinal vesicle breakdown; GVBD) ซึ่งปราศจากการใช้สารสเตอรอยด์ (sex steroids) ที่ผลิตจากรังไข่ หรือทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของฟอลลิเคิลนั้นเป็นผลให้

โอโอไซท์ที่มีผลตอบสนองต่อ MIS (MIS competent) (Kagawa et al., 1994) ซึ่งปฏิกิริยาของ IGF-I ได้เคยมีอธิบายไว้แล้วในปลาชนิดอื่นๆ แม้ว่าจะไม่ได้มีปฏิกิริยากับทุกชนิด

ความสามารถของ MIS ที่สามารถถูกกระตุ้นได้โดย IGF-I พบในทั้งปลา spotted sea trout (*Cynoscion nebulosus*) และ ปลา White perch (*Morone Americana*) ซึ่งก็เป็นปลาประเภทเดียวกันกับ Striped bass (*M. saxatilis*) (Thomas and Ghosh, 1995; Weber et al., 1997)

ในปลา spotted sea trout พบว่าเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ MIS โดย IGF-I มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำให้ receptor สามารถจับกับ MIS ได้มากขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ของรังไข่ แต่ก็ไม่พบว่า IGF-I มีผลตรงนี้น้อยกว่า GtH (Thomas and Ghosh, 1995)

ส่วนข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับช่องว่างที่เชื่อมต่อระหว่าง granulose cells และโอโอไซท์ที่เจริญเต็มที่แล้วนั้น มีผลเช่นเดียวกับช่องว่างระหว่าง granulose cell ด้วยกัน ซึ่งตรงส่วนนี้จะเป็นส่วนที่จะถูกกระตุ้นได้โดย GtH และ IGF-I ในปลา red seabream (Patino and Kagawa, 1999)

การเพิ่มความสามารถของ MIS สอดคล้องกับข้อมูลที่รายงานใน red seabream และ Atlantic croaker (*Micropogonias undulates*) (Patino and Kagawa, 1999; York et al., 1993; Chang et al., 1999) ตรงกันข้ามกับข้อมูลที่พบว่าช่องว่างระหว่าง granulose และ โอโอไซท์นั้นปรากฏว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำให้มีการพักตัวของเซลล์ในระยะ meiosis ในโอโอไซท์ของ *Fundulus heteroclitus* (Greeley et al., 1987; Ceda et al., 1993)

IGF-I กระตุ้นให้เกิด GVBD ได้โดยตรงในโอโอไซท์ของ *Fundulus* โดยปราศจากผลของการสังเคราะห์สารสเตอรอยด์ของฟอลลิเคิล (Negatu et al., 1998) ระยะเวลาที่เกิด GVBD ซึ่งถูกกระตุ้นโดย IGF-I นั้นจะรวดเร็วกว่า MIS ซึ่ง Negatu และคณะ (1998) ได้กล่าวไว้ว่า กลไกของ IGF-I นั้นใกล้เคียงกับการควบคุมการเกิด FOM กับการควบคุมโดย MIS ซึ่งก็ได้มีรายงานไว้ด้วยว่ากลไกการทำงานของ IGF-I นั้นมีความสำคัญเหมือนกับ GtH ที่สามารถกระตุ้นให้มีการผลิต MIS ได้ ในฟอลลิเคิลปลา coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) (Maestro et al., 1995)

ถึงอย่างไรก็ตามได้มีการอธิบายถึงกลไกของ IGF-I ไว้มาก ต่อการเกิด FOM ซึ่งเป็นกลไกที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดย IGF-I จะไปกระตุ้นการเกิด GVBD และ ความสามารถของ MIS หรือสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการสังเคราะห์สารสเตอรอยด์ที่ฟอลลิเคิล จนถึง การกระตุ้นให้มีการผลิต MIS ซึ่งก็ไม่ได้แสดงลักษณะเช่นนี้ในปลาหลายชนิดนัก ในฟอลลิเคิลระยะ postvitellogenic จากปลา red seabream หรือ *Fundulus* เมื่อมีการ transcription พบว่ามีสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง ซึ่งก็ได้แก่ actinomycin D สามารถยับยั้งการทำงานของ GtH ในการ

กระตุ้นให้เกิดการพัฒนาของโอโอไซต์ได้ แต่พบว่าไม่สามารถยับยั้งใน IGF-I หรือ MIS แต่ฮอร์โมนทั้งสามชนิดนี้ก็สามารถถูกยับยั้งได้โดย สารยับยั้งที่มีการ translation ซึ่งได้แก่ cycloheximide (Kagawa et al., 1994; Kagawa and Moriyama, 1995; Negatu et al., 1998)

ดังนั้นน่าจะต้องมีความแตกต่างระหว่าง GtH และ IGF-I ในกลไกที่ทำปฏิกิริยาในการพัฒนาของโอโอไซต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง GtH เป็นฮอร์โมนที่มีความต้องการเพื่อสังเคราะห์ mRNA ในการพัฒนาของโอโอไซต์ระยะ postvitellogenic จนถึงระยะ GVBD ในขณะที่ IGF-I และ MIS ไม่ได้มีหน้าที่แบบนั้น อย่างไรก็ตาม ฮอร์โมนทั้งสามชนิดนี้ก็ยังคงมีความต้องการเพื่อการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะมีส่วนเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาของ MPF จนกระตุ้นให้เกิด GVBD ขึ้น (Kagawa et al., 1994; Kagawa and Moriyama, 1995; Negatu et al., 1998)

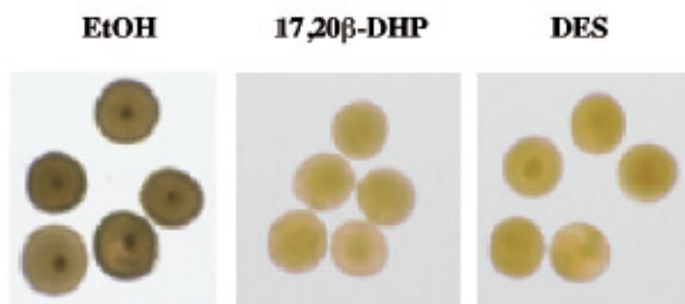
3) Diethylstilbestrol

Tokumoto et al. (2004) ได้มีการศึกษาถึงการใช้กลุ่มสารเคมีประเภทฮอร์โมนชนิดหนึ่งเรียกว่า Diethylstilbestrol (DES) ค้นพบในปี 1940 จนถึงต้นปี 1970 โดยค้นพบในการแท้งของผู้หญิงหรือการเกิด preeclampsia และปัญหาต่างๆในการตั้งครรภ์ เด็กไม่ว่าจะเป็นผู้หญิงหรือผู้ชายขณะที่อยู่ในครรภ์หรือในมดลูก พบว่า DES มีส่วนในการพัฒนาโรคประเภทเนื้องอกในช่องทางของระบบสืบพันธุ์ได้ ซึ่งอาจมีส่วนมาจากการเปลี่ยนแปลงระหว่างที่มีการพัฒนา และ DES ไม่ใช่สารสเตอรอยด์ประเภทเอสโตรเจน แต่ก็พบว่าเป็นสารกระตุ้นให้โอโอไซต์เกิดพัฒนาจนถึงระยะสุดท้ายคือ germinal vesicle breakdown (GVBD) และเกิดการสังเคราะห์ของ cyclin B

DES มีการจำแนกไว้เป็นสารที่มีส่วนทำให้มีการพัฒนาโอโอไซต์ดังสารกลุ่มสเตอรอยด์ เช่น 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17α , 20β -DHP) การทำงานของ DES จะทำงานเป็นแบบสารเสริมฤทธิ์ที่ทำงานร่วมกับสารอื่นแล้วไปเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของสารนั้นๆให้มีมากขึ้น เช่น เมื่อทดลองร่วมกับ 17α , 20β -DHP เพื่อเหนี่ยวนำให้โอโอไซต์มีการพัฒนา ทั้ง 17α , 20β -DHP และ DES การพัฒนาโอโอไซต์จะถูกยับยั้งได้โดยพวกยาปฏิชีวนะซึ่งจะเป็นตัวจับกับพวกสารพวกฮอร์โมนเพื่อยับยั้งฤทธิ์ อาจเกี่ยวข้องกับโครงสร้างตัวจับสาร (receptor) ของ 17α , 20β -DHP ในการตอบสนองของเซลล์เป้าหมายทางชีวภาพ

ในการศึกษาถึงโครงสร้างที่มีความต้องการทำปฏิกิริยาต่อ MIH ของ DES เมื่อมีการเปรียบเทียบกับสารสังเคราะห์ DES ในการเหนี่ยวนำให้เกิด GVBD จากสารประกอบทั้งหมดยกเว้น DM-DES พบว่ามีการกระตุ้นให้โอโอไซต์มีการพัฒนาเกิดระยะ GVBD ซึ่งกระตุ้นมีส่วนคล้ายกับการกระตุ้นของ 17α , 20β -DHP แม้ว่า ฤทธิ์ของสารจะมีความแตกต่าง

กันอย่างมีนัยสำคัญ (17α , 20β -DHP > DES, HEX > DIES, และ DP-DES > DMS) โครงสร้างนี้มีความสัมพันธ์มาจาก สารประกอบที่พบ คือกลุ่มของ ethyl และ hydroxyl ของ DES ที่แสดงให้เห็นถึงการทำปฏิกิริยาภายในระหว่าง DES และตัวจับสารของ MIH ส่วน สารประกอบอย่างอื่น อย่างเช่น 4-hydroxytamoxifen และ bisphenol ซึ่งมีโครงสร้างแบบผิว เฝินคล้ายกับ DES ก็พบว่ามีความจำเป็นต่อศักยภาพของการทำปฏิกิริยากับตัวจับสารของ MIH ซึ่งสารประกอบนี้มีความเป็นไปได้ที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการพัฒนาของโอเอสโตรเจนในปลา สารเคมีหลายชนิดที่มีส่วนในการทำลายสารประเภทฮอร์โมน อย่างเช่น Kepon และ dichlorodichloroethane



Treatment		GVBD, % at concentration, μ M of				
		0.001	0.01	0.1	1	2
EtOH		0				
17,20 β -DHP		28.1 $\pm$ 17.4	86.5 $\pm$ 11.9	92.6 $\pm$ 4.1	92.1 $\pm$ 6.9	–
DES		–	2.9 $\pm$ 2.6	72.5 $\pm$ 10.3	84.9 $\pm$ 9.3	91.2 $\pm$ 6.4
DMS		–	0 $\pm$ 0.0	1.8 $\pm$ 3.1**	7.9 $\pm$ 6.3**	11.5 $\pm$ 8.1**
HEX		–	0 $\pm$ 0.0	38.3 $\pm$ 21.2**	82.4 $\pm$ 5.8	86.3 $\pm$ 8.2
DIES		–	0 $\pm$ 0.0	4.5 $\pm$ 3.8**	49.2 $\pm$ 3.4**	73.2 $\pm$ 2.2**
DM-DES		–	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0**	0 $\pm$ 0.0**	–
DP-DES		–	5.0 $\pm$ 0.5	16.7 $\pm$ 7.1**	63.5 $\pm$ 4.5**	74.4 $\pm$ 2.8*

ภาพ 16 การเลี้ยงโอเอสโตรเจนโดยเสริมสารต่างๆ และ DES

ที่มา : Tokumoto et al. (2004)

4) Cyanoketone (CK) และ Forskolin (FK)

Chaube และ Haider (1997) ได้มีการศึกษาผลของ cyanoketone (CK) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งชนิดหนึ่งของ 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD) มีผลต่อผลของกระบวนการ cAMP และ forskolin (FK) สารพวกนี้มีผลต่อการพัฒนาของโอโอไซท์ในปลาตุ๊กตาด่าน (*Clarias batrachus*) ในการทดลองแบบ *in vitro* maturation เมื่อโอโอไซท์ถูกเลี้ยงในอาหารซึ่งประกอบด้วย $1\mu\text{g/ml}$ 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17α , 20β -DP) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าทำให้โอโอไซท์ในการเลี้ยงแบบ *in vitro* มีการพัฒนา $85.3 \pm 1.36\%$ ในการเกิด germinal vesicle breakdown (GVBD) โดยปกติจะใช้เวลาในการเลี้ยงประมาณ 20-30 ชั่วโมง เมื่อมีการใช้ cAMP ที่ความเข้มข้น 1.0 และ 8.0 mM หลังจากที่ใช้ 17α , 20β -DP เลี้ยงก่อน 6 ชั่วโมงก็พบว่าเป็นสาเหตุให้เกิดการยับยั้งการเกิด GVBD อย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อใช้ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า (0.1 และ 0.5 mM) ของ cAMP พบว่าไม่มีการยับยั้งการเกิด GVBD

อย่างไรก็ตามก่อนที่จะทำการเลี้ยงโอโอไซท์เมื่อใช้ $1\mu\text{g/ml}$ CK ก่อนเป็นเวลา 1 ชั่วโมงพบว่าทำให้เกิดการยับยั้งการเกิดขึ้นของ GVBD อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีรายงานรวมถึงการใช้ร่วมกับ cAMP ที่ความเข้มข้นต่ำด้วย FK เป็นสารกระตุ้นของ adenylate cyclase ซึ่งพบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิด GVBD ได้ทุกความเข้มข้น (0.1 , 0.5 , 1.0 และ $10.0\mu\text{l}$) ในการแปรผันความเข้มข้นและเวลา เมื่อโอโอไซท์ถูกเลี้ยงไว้ใน CK $1\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนที่จะกระตุ้นด้วย FK พบว่ามีการยับยั้งการเกิด GVBD ได้อย่างสมบูรณ์ แต่เมื่อมีการทดลองใช้ CK หลังจากการใช้ FK พบว่าเป็นบางส่วนเท่านั้นที่มีการยับยั้ง เมื่อนำสารเหล่านี้มาใช้ร่วมกัน ข้อมูลจากการทดลองไม่สามารถบอกได้โดยตรงกันว่า FK นั้นเป็นไปได้ที่จะมีส่วนในการเหนี่ยวนำให้โอโอไซท์ของ catfish มีการพัฒนา โดยการกระตุ้นให้ฟอลลิเคิลสร้างสารสเตอรอยด์ (17α , 20β -DP) โดยผ่านการเกิด adenylate cyclase-cAMP-mediated pathway ซึ่งเป็นกลไกที่เหมือนกับที่ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาของโอโอไซท์ได้

นอกจากนี้แล้วในปลา amago salmon Kanamori และ Nagahama (1988) ได้มีรายงานไว้ว่าการแสดงการผลิตสเตอรอยด์โดยโกนาโดโทรปิน นั้นขึ้นอยู่กับเพิ่มขึ้นของระดับ cAMP ในชั้นเซลล์ของฟอลลิเคิลของโอโอไซท์ แสดงให้เห็นได้ว่าโกนาโดโทรปินได้กระตุ้นการสร้าง cAMP ในฟอลลิเคิลเซลล์ มีเป้าหมายเพื่อให้กระตุ้นการมีการสังเคราะห์ MIS

อย่างไรก็ตาม เมื่อ CK หรือ trilostane (สารที่มีความจำเพาะในการยับยั้ง 3β -HSD) ได้มีการใช้ร่วมกับโกนาโดโทรปินเพื่อให้มีการผลิต MIS ในฟอลลิเคิล มีส่วนเกี่ยวข้องกับที่ยับยั้งไม่ให้เกิดการพัฒนาเกิดขึ้นด้วย (Young et al., 1982; Petrino et al., 1989; Patino and Thomas, 1990; King et al., 1994) แสดงให้เห็นว่าผลจากการพัฒนาของโกนาโดโทรปิน

จะมีการยับยั้งได้โดยสมบูรณ์ได้โดย 3β -HSD ซึ่งเป็นสารที่พบว่าจะไปยับยั้งการเปลี่ยนสารสเตอรอยด์ $\Delta 3$ ไปเป็น สเตอรอยด์ $\Delta 5$

เห็นได้ว่าเป็นไปได้ในกฎของ cAMP ต่อการสังเคราะห์สารสเตอรอยด์ของฟอลลิเคิล และมีส่วนเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของโอโอไซต์ จากที่มีรายงานไว้ โอโอไซต์ของ Catfish ที่มีการเลี้ยงใน FK พบว่าสารนี้เป็นสารที่มีส่วนในการกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ cAMP ในเซลล์ โดยการกระตุ้นจากขบวนการ adenylate cyclase ซึ่งได้เคยมีรายงานไว้ว่ามีส่วนในการกระตุ้นให้มีการผลิตของ cAMP และ MIS ในปลากระดูกแข็งหลายชนิด (Iwamatsu et al., 1987; Kanamori and Nagahama, 1988; King et al., 1994)

ในปลา *Oryzias latipes* (Iwamatsu et al., 1987) และ ปลา *M. saxatilis* (King et al., 1994) ค้นพบว่า FK มีการกระตุ้นให้ฟอลลิเคิลมีการผลิต MIS และเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิด GVBD ไปพร้อมๆกันด้วย แสดงให้เห็นได้ว่าการใช้ FK นั้นมีส่วนในการกระตุ้นให้เกิด GVBD ได้หลายความเข้มข้นด้วยเช่นกันซึ่งใช้เวลาประมาณ 10 ชั่วโมง จากข้อสังเกตตรงนี้ FK นั้นทำหน้าที่คล้ายกับโกนาโดโทรปิน ซึ่งมีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารสเตอรอยด์ใช้ชั้นเนื้อเยื่อของฟอลลิเคิล

3. วิธีวิจัย

3.1 ตัวอย่างปลา

ปลาน้ำจืด (*Pangasianodon gigas*) เพศเมีย อายุ 6-12 ปี (น้ำหนัก 35-65 กิโลกรัม)
และ ปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) เพศเมีย อายุ 3 ปี (น้ำหนัก 1.5-2 กิโลกรัม)

3.2 การศึกษาเนื้อเยื่อโอโอไซต์

3.2.1 การดองใสโอโอไซต์

โดยใช้ clearing solution 5 สูตร ได้แก่

Clearing 1 50 ml formalin, 40 ml acetic acid, ml ethanol 60 and 9 g NaCl

(Galbreath and Thorgaard, 1995)

Clearing 2 4 % formaldehyde and 1 % glutaraldehyde

(Asturiano et al., 2002)

Clearing 3 ethanol : formalin : acetic acid = 6 : 3 : 1

(Gregory and Craig, 2000; Yaron, 1995; Yueh and Chang, 2000)

Clearing 4 5 % formalin, 4 % acetic acid in Ringer's solution (6.5g NaCl, 0.42 g

KCl และ 0.25 CaCl₂ (Kondo et al., 1997)

Clearing 5 Clearing 2 in Ringer's solution

(Asturiano et al., 2002)

3.2.2 การเตรียมและย้อมสีเนื้อเยื่อ

ศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาตามวิธีของ Humason (1979) โดยนำตัวอย่างรังไข่ดองไว้ในฟอร์มาลิน 10% เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ต่อจากนั้นตัวอย่างเนื้อเยื่อจะถูกนำมาทำการขจัดน้ำ (dehydration) นำไปตรึงในพาราฟิน (paraffin wax) แล้วทำการตัดเนื้อเยื่อที่ความบาง 5 m แล้วทำการย้อมสีด้วย Haematoxylin & Eosin (H&E) สังเกตโครงสร้างของโอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3 อาหารเลี้ยงเซลล์และสารที่เกี่ยวข้อง

ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ 3 ชนิด ได้แก่ (1) Leibovitz's L-15 medium [Sigma] (2) Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium (advanced D-MEM/F-12) [Gibco] และ (3) M-199 medium [Gibco]

ฮอร์โมน ที่ใช้ ได้แก่ human chorionic gonadotropins (hCG) [Sigma] Luteinizing hormone (LH) [Sigma] 17β -Estradiol (E_2) [Sigma] 17α -20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) [Sigma] และ growth factors ที่ใช้ ได้แก่ insulin (from bovine pancreas) [Sigma] insulin-like growth factor-I (IGF-I) [Sigma] และ fetal bovine serum (FBS) [Gibco] โดยใช้ absolute ethanol เป็นตัวทำละลายสำหรับฮอร์โมน และ acetic acid (10 mM) (Webber et al., 2000) เป็นตัวทำละลายสำหรับ insulin และ IGF-I

สารเสริม (supplements) ที่ใส่ในทุกตัวอย่าง ได้แก่ Penicillin-Streptomycin (10,000 units/ml) [Gibco] HEPES buffer Solution (1M) [Gibco] formaldehyde [Gibco] acetic acid [Gibco] glycerol [Gibco] glutaraldehyde [Gibco]

เตรียม Ringer's solution โดยมีส่วนประกอบ ดังนี้ 0.346 g $CaCl_2$, 0.597 g KCl, 0.017 g $MgCl_2$, 13.5 g NaCl, 0.025 g $NaHCO_3$, และ 1000 ml distilled water

3.4 การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาบึกและปลาสวาย

- เก็บตัวอย่างโอโอไซต์จากแม่ปลาบึกและปลาสวายสมบูรณ์เพศ โดยใช้ catheter เก็บในช่วงเดือนพฤษภาคม- ตุลาคม
- ตรวจสอบระยะการพัฒนาของโอโอไซต์
- เลี้ยงโอโอไซต์ปลา ที่ระยะ immature (ระยะที่ 4 ; post-vitellogenesis) เพื่อให้พัฒนาเป็น mature egg (germinal vesicle breakdown; GVBD) ด้วยอาหารเลี้ยงโอโอไซต์ต่างๆ แปรผันสารชนิดต่างๆ ที่ใช้ได้แก่ medium , hormones/growth factors และ อุณหภูมิ โดยแต่ละชุดการทดลองจะใส่โอโอไซต์จำนวน 30 เซลล์/cell culture dish และทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยมีชุดทดลอง ดังนี้

1) การแปรชนิดของ medium

เพื่อศึกษาชุดอาหารที่เหมาะสม โดยใช้ข้อมูลที่ได้รายงานไว้ใน การทดลองกับปลาชนิดต่างๆ ได้แก่ ปลา red seabream (*Pagrus major*) (Kagawa et al., 1994) และ ปลา striped bass (*Morone saxatilis*) (King et al., 1994; Webber et al., 2000) ได้อาหารเลี้ยง 3 ชุด ดังนี้

- L-15 medium ที่ประกอบด้วย 25 nM HEPES และ 1% penicillin-streptomycin
- Advanced DMEM/F-12 ที่ประกอบด้วย 25 nM HEPES, 1% penicillin-streptomycin, NEAA, sodium pyruvate 110 mg/l ปราศจาก L-glutamine
- M-199 medium ที่ประกอบด้วย 25 mM HEPES, 1% penicillin-streptomycin, Hank's Salts และ L-Glutamine

2) การแปรผันอุณหภูมิในการบ่ม

เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสม ในการเตรียมไข่สุกในห้องทดลอง โดยเลี้ยงโอโอไซต์ ในอาหารเลี้ยง 3 สูตร บ่มที่อุณหภูมิ 23, 25 และ 28 °C

3) การแปรชนิดของ hormones

ชนิดฮอร์โมนที่มีความเกี่ยวข้องกับขบวนการ final oocyte maturation (FOM) ในปลา ได้แก่ กลุ่มฮอร์โมน Gonadotropins (GtH) เช่น FSH, LH และ HCG และ กลุ่ม MIS เช่น 17 α -20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) และ 17 β -Estradiol ดังรายงานของ Toshinobu et al. (2004) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทดลองแปรชนิด และปริมาณฮอร์โมนเหล่านี้ในการเลี้ยงโอโอไซต์

- human chorionic gonadotropins (HCG) โดยแปรความเข้มข้นที่ 0, 20, 30, 50, 100, 200 U/ml
- Luteinizing hormone (LH) โดยแปรความเข้มข้น ที่ 0, 11, 33, 100 และ 300 ng/ml
- 17 β -Estradiol โดยแปรความเข้มข้น ที่ 0, 20, 50, 100 และ 200 nM
- 17 α -20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) โดยแปรความเข้มข้นที่ 0, 200, 300, 500, 1000 และ 1500 nM

4) การแปรชนิดของ growth factors

Kagawa et al. (1994) และ Webber et al. (2000) ได้รายงานว่า IGF-I มีผลชัดเจนต่อขบวนการ FOM ในปลา อีกทั้ง S Dasgupta et al. (2001) ได้รายงานว่า Insulin เพียงตัวแปรเดียวก็มีผลทำให้โอโอไซต์ปลาพัฒนาได้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงทดลองแปรผัน ปริมาณของ insulin-like growth factor-I (IGF-I) insulin (bovine pancrease) และ FBS

- IGF-I โดยแปรความเข้มข้นที่ 0, 10, 30, 50 และ 100 ng
- insulin โดยแปรความเข้มข้นที่ 0, 6, 8, 10 และ 12 μ M
- fetal bovine serum (FBS) โดยแปรความเข้มข้น ที่ 1, 2, 3, 5 และ 10 %

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

ตรวจระยะโอโอไซต์ในการเลี้ยงระหว่างการทดลอง ทุก 6 ชั่วโมง จนครบ 36 ชั่วโมง โดยสารถองใสในการสังเกตการเคลื่อนที่ของนิวเคลียส ถ่ายรูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกจำนวนโอโอไซต์ที่มีการพัฒนา ไม่พัฒนา และเซลล์ที่เสีย โดยคัดออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความแตกต่างค่าทางสถิติ ด้วยโปรแกรม SPSS โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบแบบแฟกทอเรียล (ชนิดฮอร์โมน X ความเข้มข้นของฮอร์โมน X อุณหภูมิ)

4. ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 การศึกษาสภาพทางเนื้อเยื่อวิทยาของโอโอไซต์ (Histopathology of Oocyte)

ศึกษาลักษณะสภาพทางเนื้อเยื่อของโอโอไซต์ภายในรังไข่ปลาสาวย โดยแบ่งรังไข่ออกเป็น 3 ส่วนคือ ส่วนต้น ส่วนกลาง และส่วนปลาย เพื่อดูความแตกต่างของระยะโอโอไซต์ในแต่ละส่วนของรังไข่ ในเดือนสิงหาคม พบว่าสังเกตลักษณะของระยะโอโอไซต์ในฤดูวางไข่ 4 ระยะ จากทั้งหมด 6 ระยะ ตามที่เกรียงศักดิ์ และคณะ (2547) ดังนี้

Stage 1 central germinal vesicle (CGV) ขนาดของโอโอไซต์ และ นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้นอยู่ตำแหน่งกลางเซลล์ ไซโตพลาสซึมเริ่มใส และมีการเพิ่มจำนวนของนิวคลีโอลัส (ภาพที่ 17 รังไข่ส่วนปลาย)

Stage 2 migrating germinal vesicle (MGV) โอโอไซต์ระยะนี้ ไซโตพลาสซึมมี yolk granules จำนวนมากอยู่ใกล้นิวเคลียส เริ่มมีการเคลื่อนตัวของนิวเคลียสไปอยู่ขอบเซลล์ด้าน animal pole (ภาพที่ 17 รังไข่ส่วนต้น ส่วนกลาง และ ส่วนปลาย)

Stage 3 peripheral germinal vesicle (PGV) โดยโอโอไซต์ระยะนี้ พบว่านิวเคลียสได้เคลื่อนตัวไปที่ขอบเซลล์ด้าน animal pole (ภาพที่ 17 รังไข่ส่วนต้น)

Stage 4 maturation (germinal vesicle breakdown, GVBD) นิวเคลียสขีดยอบเซลล์ และ yolk granule เต็มเซลล์ (ภาพที่ 17 รังไข่ส่วนต้น)



ภาพที่ 17 รังไข่ปลาสาวย ส่วนต้น ส่วนกลาง และส่วนปลาย

เนื้อเยื่อหนา 5 μ m ย้อมสีด้วย haematoxylin & eosin (H&E)

PG : primary growth phase

GV : germinal vesicle(nucleus)

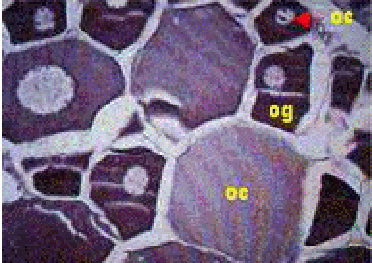
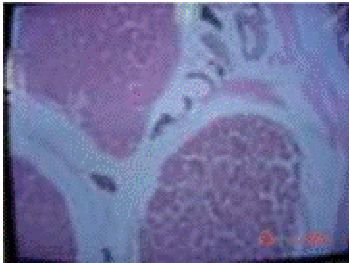
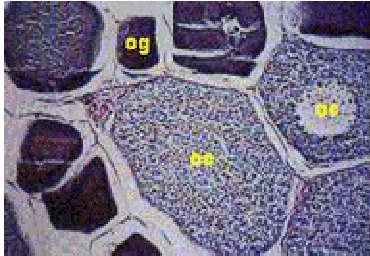
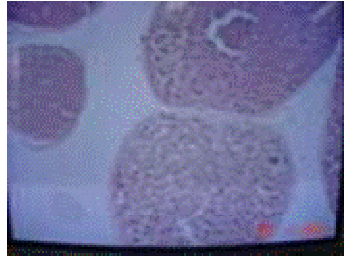
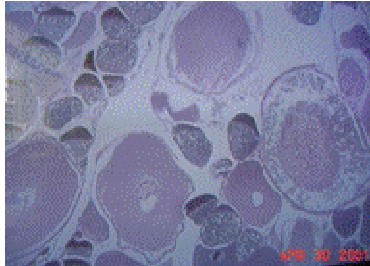
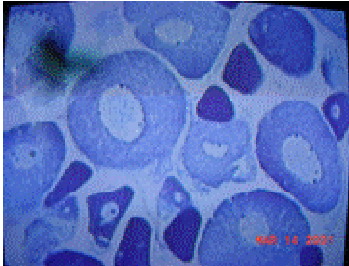
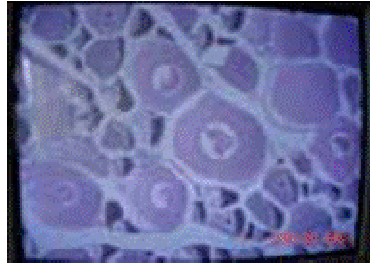
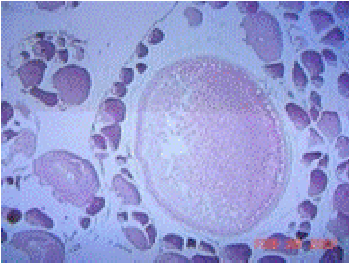
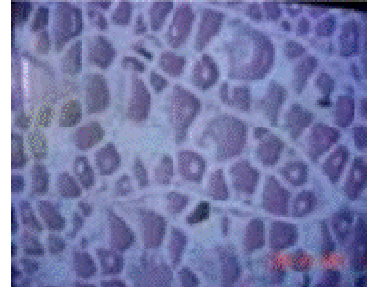
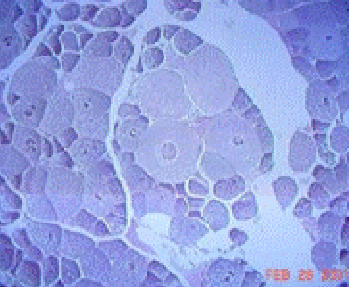
CGV : central germinal vesicle

MGV : migrating germinal vesicle

PGV : peripheral germinal vesicle

GVBD : germinal vesicle breakdown

เมื่อเปรียบเทียบโอโอไซต์แต่ละระยะระหว่างปลาทรายและปลาน้ำจืด พบว่า มีความคล้ายคลึงกันมาก

ระยะ	ปลาน้ำจืด	ปลาทราย
OG		
CGV		
MGV		
PGV		
GVM		

ภาพที่ 18 โอโอไซต์ปลาน้ำจืดและปลาทรายที่ระยะต่าง

การที่พบโอโอไซต์เพียง 4 ระยะ อาจเนื่องจากอยู่ในช่วงฤดูกาลวางไข่ ซึ่งคล้ายคลึงกับผลของเกรียงศักดิ์ และคณะ (2547) ที่พบระยะของโอโอไซต์ปลาทราย ในช่วงเดือนมิถุนายน – กันยายน เมื่อเปรียบเทียบกับสภาพทางเนื้อเยื่อของโอโอไซต์ปลาทรายจากการศึกษานี้กับการ ศึกษาเนื้อเยื่อโอโอไซต์ของปลานิล จากผลการศึกษาของ เกรียงศักดิ์และคณะ (2544) พบว่าสามารถแบ่งระยะโอโอไซต์ออกได้เป็น 5 ระยะ ซึ่งสองระยะแรก คือ oogonia และ primary growth phase จะพบได้น้อย ส่วนระยะที่ 3 ได้แก่ ระยะ early-vitellogenesis ขนาดของโอโอไซต์และนิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้นไซโทพลาสซึมเริ่มใส และมีการเพิ่มจำนวนของนิวคลีโอลัส ระยะที่ 4 ได้แก่ mid-vitellogenesis โอโอไซต์ระยะนี้ ไซโทพลาสซึมมี yolk granules จำนวนมากอยู่ใกล้นิวเคลียส เริ่มมีการเคลื่อนตัวของนิวเคลียสไปอยู่ขอบเซลล์ด้าน animal pole ซึ่ง yolk granules จะเริ่มเชื่อมติดกันเกิดช่องว่างทำให้โอโอไซต์เริ่มใสขึ้น แสดงให้เห็นว่าปลากำลังเข้าสู่ฤดูผสมพันธุ์ ระยะที่ 5 ได้แก่ maturation egg stage โอโอไซต์ระยะนี้มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 มิลลิเมตร yolk granule เชื่อมติดกัน โอโอไซต์มีลักษณะใส และนิวเคลียสมีตำแหน่งชิดขอบเซลล์

4.2 การทดสอบสารดองใส (Clearing solution) ในโอโอไซต์ปลา

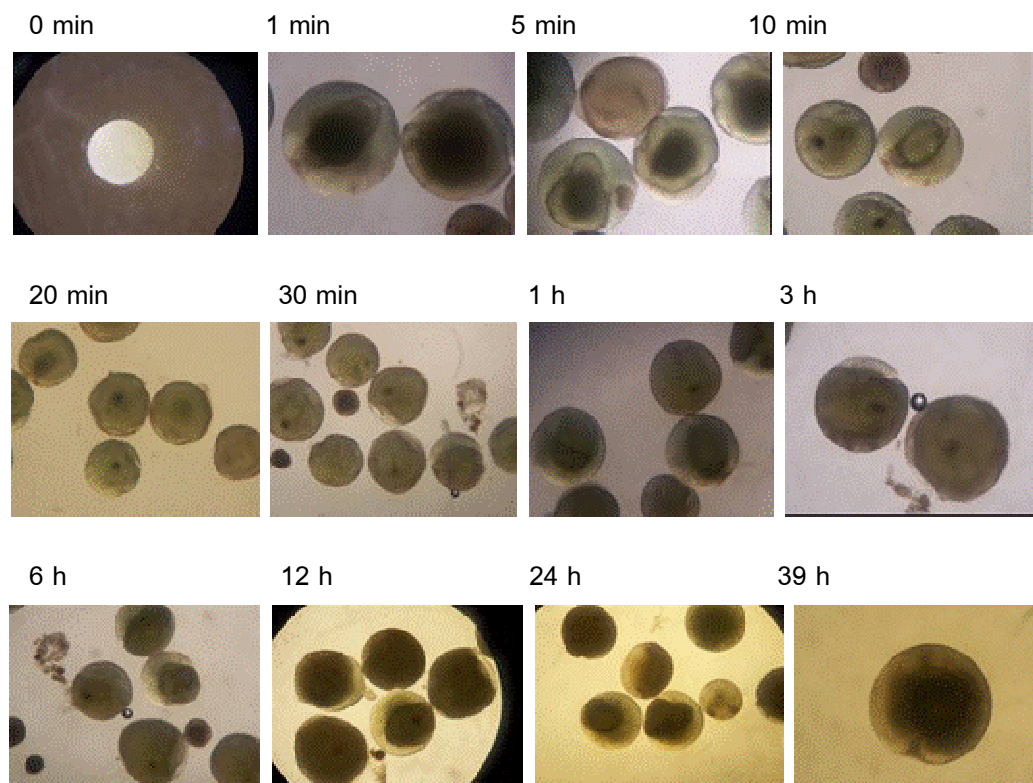
เนื่องจากในช่วงการดำเนินการเก็บตัวอย่าง โอโอไซต์ปลาดุกรัสเซีย (*Clarias gariepinus*) ทำได้สะดวกกว่า และปลาดุกรัสเซียเป็นปลาหนึ่งในกลุ่มใกล้เคียงกัน จึงได้ทำการทดสอบสารดองใสในโอโอไซต์ปลาดุกรัสเซีย และนำผลที่ได้ไปใช้กับโอโอไซต์ปลาทราย

จากการทดสอบการใช้ Clearing solution 5 สูตร (ตามรายละเอียดใน 3.2.1) พบว่า Clearing 1, 3, และ 4 มีประสิทธิภาพทำให้โอโอไซต์ปลาใส สังเกตเห็นตำแหน่งของนิวเคลียสภายในได้ชัดเจน ส่วน Clearing 2 และ 5 ไม่สามารถทำให้โอโอไซต์ใส (ภาพที่ 19-23)

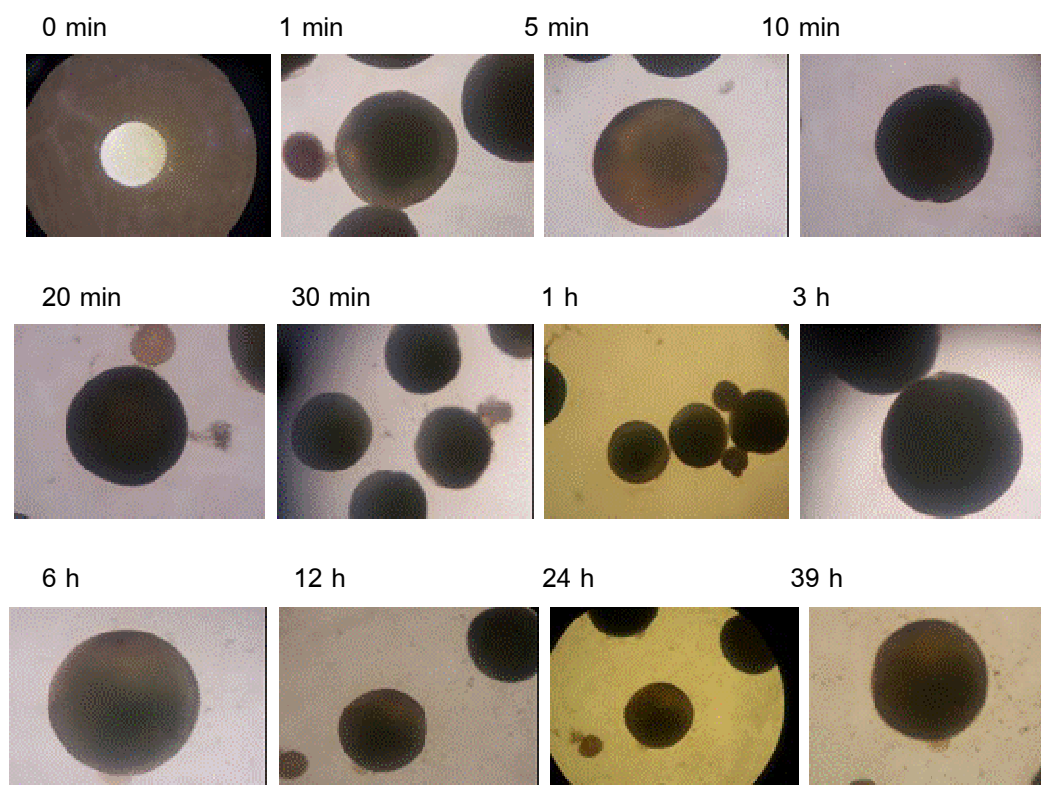
Clearing 1 ที่เวลาหลังแช่ 5 นาที พบว่า โอโอไซต์มีการเหี่ยวภายในเซลล์เหมือนเกิดการสูญเสียน้ำในเซลล์ และเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที พบว่า โอโอไซต์มีสภาพทึบแสงมากขึ้น ไม่สามารถมองเห็นตำแหน่งของนิวเคลียสได้

พบว่า Clearing 3 มีประสิทธิภาพทำให้โอโอไซต์ใสได้นานกว่า Clearing 4 เนื่องจาก Clearing 3 สามารถมองเห็นนิวเคลียสได้ชัดเจนจนถึงชั่วโมงที่ 3 ในขณะที่ Clearing 4 โอโอไซต์เริ่มทึบแสงเมื่อแช่นาน 20 นาที

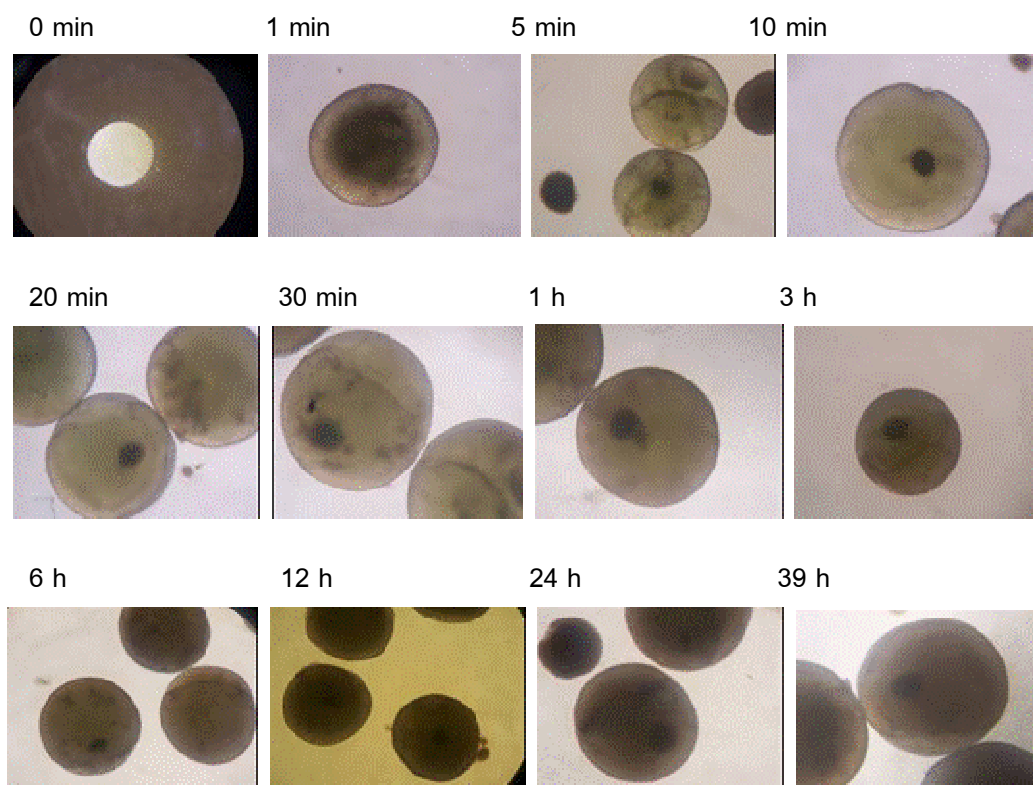
ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า Clearing 3 มีประสิทธิภาพในการคงสภาพ และสะดวกในการสังเกตระยะของโอโอไซต์ปลาจากการเคลื่อนที่ของนิวเคลียสได้ดีที่สุด



ภาพที่ 19 ลักษณะของโอโอไซท์พลาตุรัสเซีย ด้วยสารดองใส Clearing 1 ที่เวลาต่างๆ
 Clearing 1 : 50 ml formaldehyde, 40 ml acetic acid, 60 ml glycerol and 9 g NaCl

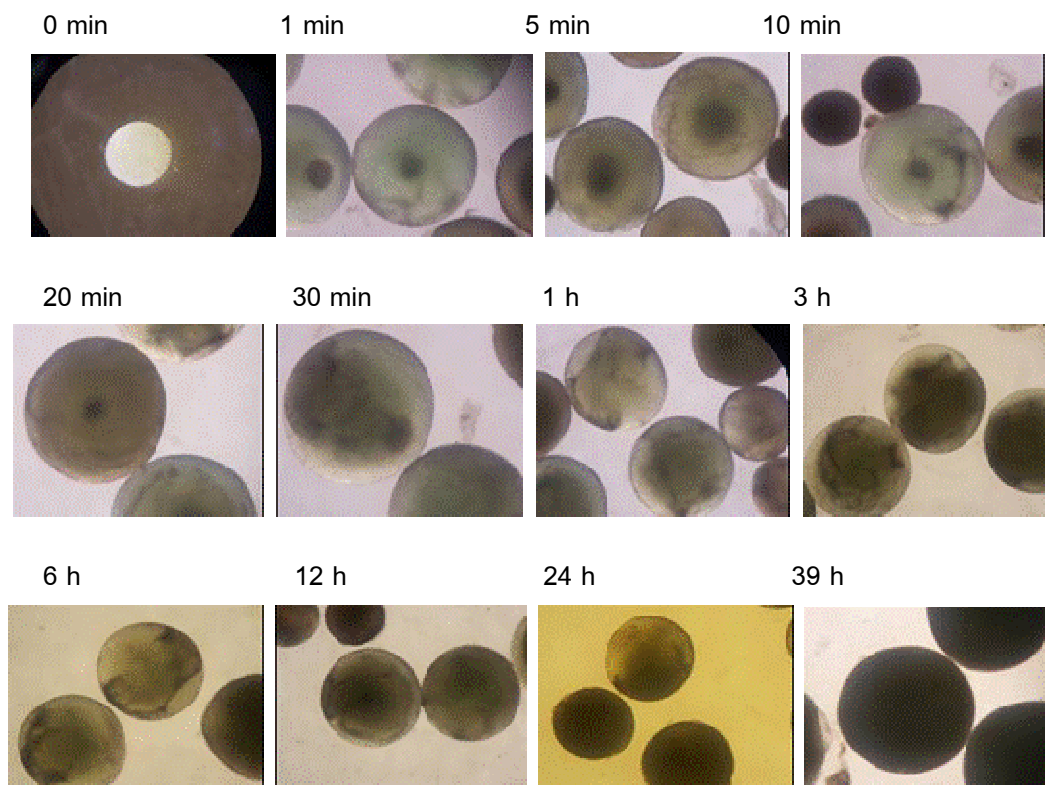


ภาพที่ 20 ลักษณะของโอโอไซท์ปลาตุกรัสเซีย ด้วยสารดองใส Clearing 2 ที่เวลาต่างๆ
Clearing 2 : 4% formaldehyde และ 1% glutaraldehyde

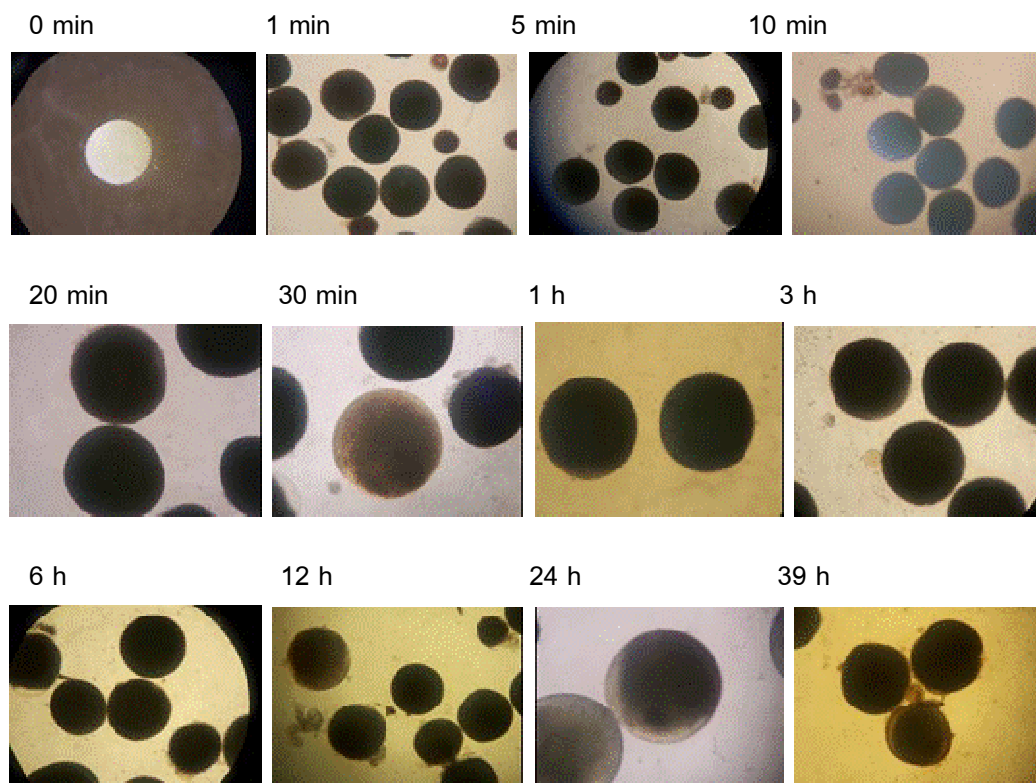


ภาพที่ 21 ลักษณะของโอโอไซต์ปลาตุกรัสเซีย ด้วยสารดองใส Clearing 3 ที่เวลาต่างๆ

Clearing 3 : ethanol : formalin : glacial acetic acid = 6 : 3 : 1



ภาพที่ 22 ลักษณะของโอโอไซต์ปลาตุกรัสเซีย ด้วยสารดองใส Clearing 4 ที่เวลาต่างๆ
 Clearing 4 : 5% formalin and 4% acetic acid in Ringer's solution (6.5g NaCl, 0.42 g KCl and 0.25 CaCl₂)



ภาพที่ 23 ลักษณะของโอโอไซต์ปลาตุกรัสเซีย ด้วยสารดองใส Clearing 5 ที่เวลาต่างๆ

Clearing 5 : Clearing 2 in Ringer's solution

อย่างไรก็ตามพบว่า ช่วงเวลาที่ 5 นาทีจนถึง 1 ชั่วโมง เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมในการสังเกต และถ่ายรูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทั้งนี้ยังสังเกตได้อีกว่าโอโอไฮท์ที่เสียสภาพแล้วมองด้วยตาเปล่ามีลักษณะขาวขุ่น เมื่อนำมาตองจะมีลักษณะทึบแสง และไม่สามารถสังเกตตำแหน่งของนิวเคลียสได้ ส่วนโอโอไฮท์ที่ดี ยังมีชีวิตอยู่ เมื่อนำมาตองจะมีลักษณะใสในเวลาทดสอบเท่ากัน แสดงให้เห็นด้วยว่า เราน่าจะสามารถใช้สารประเภท Clearing ในการทดสอบการมีชีวิตโอโอไฮท์ได้อีกทางหนึ่งด้วย

เนื่องจาก Clearing แต่ละสูตรนั้นได้มีการถูกใช้กับโอโอไฮท์ปลาชนิดที่ต่างกัน ไป จึงเป็นไปได้ว่าประสิทธิภาพของ Clearing อาจขึ้นอยู่กับชนิดของโอโอไฮท์ปลาด้วย และพบว่า Clearing 3 เป็นสูตรที่นิยมใช้ในโอโอไฮท์ปลา ส่วนกลไกการทำงานของสาร Clearing ยังไม่มีการอธิบายไว้อย่างแน่ชัด แต่สารที่คล้ายกับสารประเภท fixation ซึ่งใช้ในการเก็บรักษาดตัวอย่างของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ ฟอร์มาดีไฮด์ (formaldehyde) และ กลูตาโรลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ซึ่งมีผลต่อการทำให้ส่วนโปรตีนแข็งตัว เอทิลแอลกอฮอล์ (ethylalcohol) มีผลในการดึงน้ำออกจากเซลล์ และ กรดอะซิติก (acetic acid) เป็นสารทำให้เนื้อเยื่อบวม (swelling) (Humason, 1979) ซึ่งส่วนใหญ่พบว่าจะมีการใช้ควบคู่ไปกับแอลกอฮอล์ และยังไม่มีการอธิบายกลไกการทำงานไว้อย่างแน่ชัดนัก ซึ่งแอลกอฮอล์น่าจะมีประสิทธิภาพในการช่วยให้เซลล์ใส อัตราส่วนผสมของสารแต่ละชนิดในแต่ละสูตรของ Clearing ก็มีการใช้แตกต่างกัน แสดงให้เห็นด้วยว่าอัตราส่วนที่ใช้มีผลต่อกลไกการทำงานเช่นกัน อีกทั้ง clearing solution ส่วนใหญ่เป็นสารเคมีประเภทระเหยง่าย การเก็บรักษาสารก็อาจจะมีผลต่อประสิทธิภาพด้วยเช่นกัน

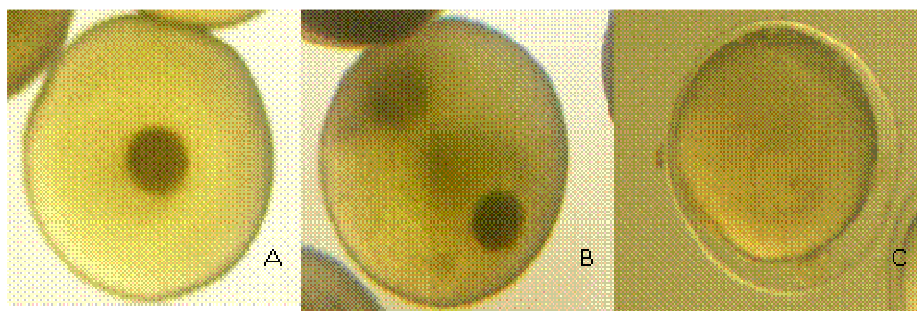
ได้ทดลองนำ Clearing 3 ไปทดสอบกับโอโอไฮท์ปลาสวยและปลาบึก ก็ให้ผลเช่นเดียวกับโอโอไฮท์ของปลาดุกรัสเซีย ดังนั้นสารดองใส Clearing 3 จึงเป็นสูตรที่เหมาะสมในการศึกษาปลาหนังทั้งสองกลุ่มนี้

4.3 การทดลองเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวาย

ได้ทดลองเลี้ยงโอโอไซต์ของปลาสวาย โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ 3 ชนิด ได้แก่ (1) Leibovitz L-15 medium (2) M-199 medium และ (3) Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium (Advanced DMEM/F-12) ซึ่งแปรผันความเข้มข้นของฮอร์โมน ได้แก่ human chorionic gonadotropins (HCG), luteinizing hormone (LH), 17β -estradiol (E2) และ 17α -20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) และความเข้มข้นของ growth factors ได้แก่ insulin (from bovine pancreas) insulin-like growth factor-I (IGF-I) และ fetal bovine serum (FBS) โดยแปรผันอุณหภูมิที่ 23, 25 และ 28 °C

โดยเริ่มต้นที่การใช้โอโอไซต์ปลาสวาย ในระยะที่ 4 (central germinal vesicle; CGV) ขนาดประมาณ 500 μ m สังเกตการเปลี่ยนแปลงของโอโอไซต์ไปสู่ระยะที่ 5 และ 6 จากการเคลื่อนที่ของ GV (germinal vesicle) จนเกิด GVBD (germinal vesicle breakdown) (ภาพที่ 24) โดยจะใช้ภาพนี้เป็นลักษณะอ้างอิงเปรียบเทียบกับตัวอย่างทดลองต่อไป

ในการทดลองเบื้องต้นทำการเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวาย พบว่า สามารถเลี้ยงโอโอไซต์ได้ 36 ชั่วโมงเท่านั้น ซึ่งหลังจากเวลาที่ 36 ชั่วโมง พบว่าโอโอไซต์ส่วนใหญ่จะตาย โดยการสังเกตจากการใช้สารดองใส Clearing 3 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงติดตามสังเกตและบันทึกผลของลักษณะของโอโอไซต์เป็นเวลา 36 ชั่วโมง



ภาพที่ 24 การพัฒนาโอโอไซต์ปลาสวายที่เลี้ยงในห้องทดลอง
(A) : ระยะที่ 4 (B) : ระยะที่ 5 และ (C) : ระยะที่ 6

4.3.1 L-15 medium, Hormone, Growth factor และอุณหภูมิ

ได้ทำการเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายด้วยอาหาร L-15 medium โดยแปรผันความเข้มข้นฮอร์โมนและ growth factor ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 23, 25 และ 28 °C ซึ่งสามารถนำมาเปรียบเทียบหาประสิทธิภาพของความเข้มข้นของฮอร์โมนต่ออัตราการรอดของโอโอไซต์ (survival) และการพัฒนา (mature) ที่อุณหภูมิต่างกัน (ตารางที่ 1 และ 2)

พบว่า โอโอไซต์ปลาสวายชุดควบคุม มีอัตราการรอดสูงสุดที่อุณหภูมิ 23 °C (81±2 %) ส่วนที่อุณหภูมิ 28 °C มีอัตราการรอดต่ำที่สุด (31±7 %) โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ส่วนโอโอไซต์ปลาสวายที่เลี้ยงด้วย L-15 medium เสริมฮอร์โมนและ growth factor ต่างๆ พบว่า ในบางชุดทดลองมีการพัฒนาของโอโอไซต์ ดังนี้

การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายอาหารที่เสริมด้วยฮอร์โมน HCG พบว่า ที่ 25 °C โอโอไซต์โดยรวมมีอัตราการรอดสูงสุด ($P<0.05$) และมีการพัฒนาเกิดขึ้นจากการเคลื่อนที่ของ GV (ระยะที่ 5) ในความเข้มข้น HCG ที่ 10 IU/ml 25 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 7±1 % (ตารางที่ 1 และภาพที่ 25)

การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายอาหารที่เสริมด้วยฮอร์โมน estradiol (E_2) พบว่า โดยรวมการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 23 °C โอโอไซต์มีอัตราการรอดสูงสุด ($P<0.05$) แต่ไม่พบว่าการพัฒนาของโอโอไซต์เกิดขึ้นในชุดการทดลองนี้ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 26)

การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายอาหารที่เสริมด้วยฮอร์โมน LH พบว่า โดยรวมการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °C โอโอไซต์มีอัตราการรอดของมากที่สุด รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 28 °C ส่วนในอุณหภูมิที่ 23 °C มีอัตราการรอดค่อนข้างต่ำกว่า โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ผลที่สำคัญ พบว่ามีการพัฒนาของโอโอไซต์เกิดขึ้นมีการเคลื่อนที่ของ GV ดังนี้คือ ที่ความเข้มข้น 11 ng/ml 23 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 2±1 % และอุณหภูมิ 25 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 10±2 % ที่ความเข้มข้น 33 ng/ml 23 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 9±2 % และที่อุณหภูมิ 25 °C 24 ชั่วโมง มีการพัฒนา 3±1 % ที่ความเข้มข้น 100 ng/ml 23 °C 36 ชั่วโมง มีการพัฒนา 2±1 % และอุณหภูมิ 25 °C 24 ชั่วโมง มีการพัฒนา 4±1 % และอุณหภูมิ 28 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 2±1 % ที่ความเข้มข้น 300 ng/ml 23 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 3±1 % และ 25 °C 24 ชั่วโมง มีการพัฒนา 8±2 % (ตารางที่ 1 และภาพที่ 27)

การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายอาหารที่เสริมด้วย DHP พบว่า โอโอไซต์โดยรวมมีอัตราการรอดสูงสุด ที่การใช้ DHP 500 nM อุณหภูมิ 25 °C รองลงมาคือ อุณหภูมิ 23 °C และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนที่อุณหภูมิ 28 °C พบว่าอัตราการรอด

ค่อนข้างต่ำ แต่ก็ไม่พบการพัฒนาของโอโอไซต์เกิดขึ้นในชุดการทดลองนี้ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 28)

การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายอาหารที่เสริมด้วย insulin อุณหภูมิ 23, 25 และ 28 °C พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 °C โอโอไซต์โดยรวมมีอัตราการสูงสุด โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) พบว่า มีการพัฒนาของโอโอไซต์จากการสังเกตเห็นการเคลื่อนที่ของ GV ดังนี้ ที่ความเข้มข้น 6 μM 24 ชั่วโมง 23, 25 และ 28 °C มีการพัฒนา 6 ± 1 , 18 ± 2 และ 6 ± 1 % ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 8 μM ที่อุณหภูมิ 23 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 3 ± 1 % และที่อุณหภูมิ 25 °C 24 ชั่วโมง มีการพัฒนา 8 ± 2 % และ 28 °C 36 ชั่วโมง มีการพัฒนา 4 ± 1 % ที่ความเข้มข้น 10 μM 23 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 6 ± 1 % ที่อุณหภูมิ 25 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 7 ± 1 % และที่อุณหภูมิ 28 °C 36 ชั่วโมง มีการพัฒนา 3 ± 1 % ที่ความเข้มข้น 12 μM 25 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 6 ± 1 % และที่อุณหภูมิ 28 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 7 ± 1 % (ตารางที่ 2 และภาพที่ 29)

การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายอาหารที่เสริมด้วย IGF-I ที่อุณหภูมิ 23, 25 และ 28 °C พบว่า ที่อุณหภูมิ 23 °C โอโอไซต์โดยรวมมีอัตราการมากกว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 28 °C ($P < 0.05$) และพบว่าการพัฒนาของโอโอไซต์จากการเคลื่อนที่ของ GV ดังนี้ ที่ความเข้มข้น 10 ng 25 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 1 ± 0 % ที่ความเข้มข้น 30 ng 23 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 2 ± 1 % ที่ความเข้มข้น 50 ng 23 °C 18-30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 24 ± 2 % และที่อุณหภูมิ 25 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 2 ± 1 % และที่ความเข้มข้น 100 ng 23 °C 18 ชั่วโมง มีการพัฒนา 23 ± 2 % และที่อุณหภูมิ 25 °C 24 ชั่วโมง มีการพัฒนา 6 ± 1 % (ตารางที่ 2 และภาพที่ 30)

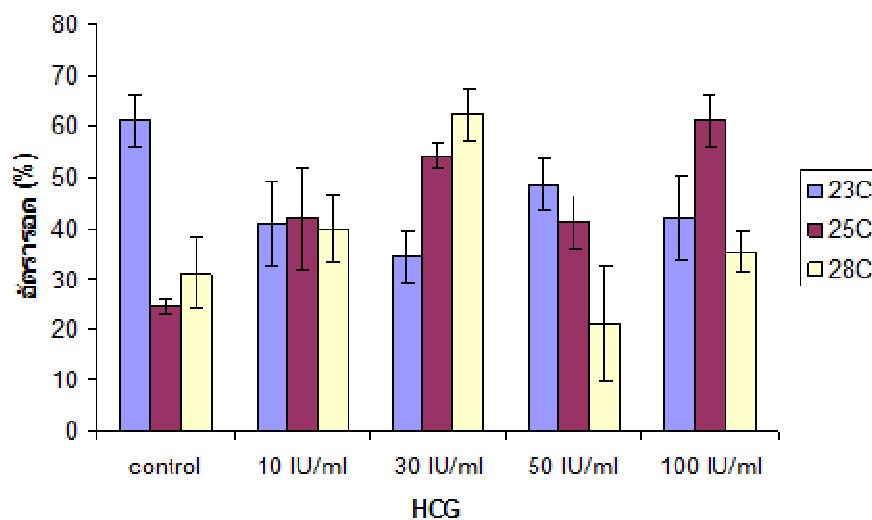
การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายอาหารที่เสริมด้วย FBS ที่อุณหภูมิ 23, 25 และ 28 °C พบว่า ที่อุณหภูมิ 23 °C โอโอไซต์โดยรวมมีอัตราการมากกว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 28 °C ($P < 0.05$) แต่ไม่พบการพัฒนาของโอโอไซต์ในการทดลองชุดนี้ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 31)

ตารางที่ 1 โอโอไซต์ปลาสวาย ที่เลี้ยงด้วย L-15 medium โดยเสริมด้วยฮอร์โมนและบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ

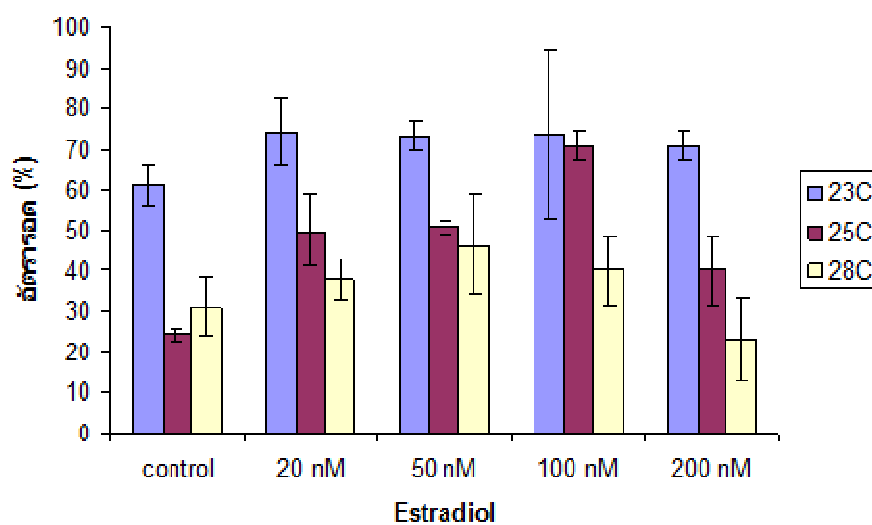
L-15 medium		23°C		25°C		28°C	
		Survival (%)	Mature (%)	Survival (%)	Mature (%)	Survival (%)	Mature (%)
HCG	Control	61 $\pm$ 5	0	81 $\pm$ 2	0	31 $\pm$ 7	0
	10 IU/ml	41 $\pm$ 9	0	42 $\pm$ 10	7 $\pm$ 1	40 $\pm$ 7	0
	30 IU/ml	34 $\pm$ 5	0	54 $\pm$ 2	1 $\pm$ 0	62 $\pm$ 5	0
	50 IU/ml	49 $\pm$ 5	0	41 $\pm$ 5	0	21 $\pm$ 12	0
	100 IU/ml	42 $\pm$ 9	0	61 $\pm$ 5	0	36 $\pm$ 4	0
Estradiol (E ₂)	20 nM	74 $\pm$ 8	0	50 $\pm$ 9	0	38 $\pm$ 5	0
	50 nM	73 $\pm$ 4	0	51 $\pm$ 2	0	47 $\pm$ 12	0
	100 nM	73 $\pm$ 21	0	59 $\pm$ 3	0	21 $\pm$ 9	0
	200 nM	71 $\pm$ 3	0	40 $\pm$ 9	0	23 $\pm$ 10	0
LH	11 ng/ml	23 $\pm$ 9	2 $\pm$ 1	89 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2	64 $\pm$ 4	0
	33 ng/ml	36 $\pm$ 4	9 $\pm$ 2	74 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1	52 $\pm$ 5	0
	100 ng/ml	33 $\pm$ 0	2 $\pm$ 1	92 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1	76 $\pm$ 8	2 $\pm$ 1
	300 ng/ml	40 $\pm$ 7	3 $\pm$ 1	66 $\pm$ 8	8 $\pm$ 2	69 $\pm$ 3	0
DHP	200 nM	57 $\pm$ 4	0	31 $\pm$ 5	0	42 $\pm$ 22	0
	300 nM	40 $\pm$ 3	0	39 $\pm$ 3	0	40 $\pm$ 11	0
	500 nM	53 $\pm$ 4	0	79 $\pm$ 16	0	21 $\pm$ 17	0
	1000 nM	30 $\pm$ 3	0	34 $\pm$ 5	0	26 $\pm$ 5	0
	1500 nM	32 $\pm$ 2	0	33 $\pm$ 4	0	11 $\pm$ 10	0

ตารางที่ 2 โอโอไซต์ปลาทรายที่เลี้ยงด้วย L-15 medium โดยเสริมด้วย growth factors และ บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ

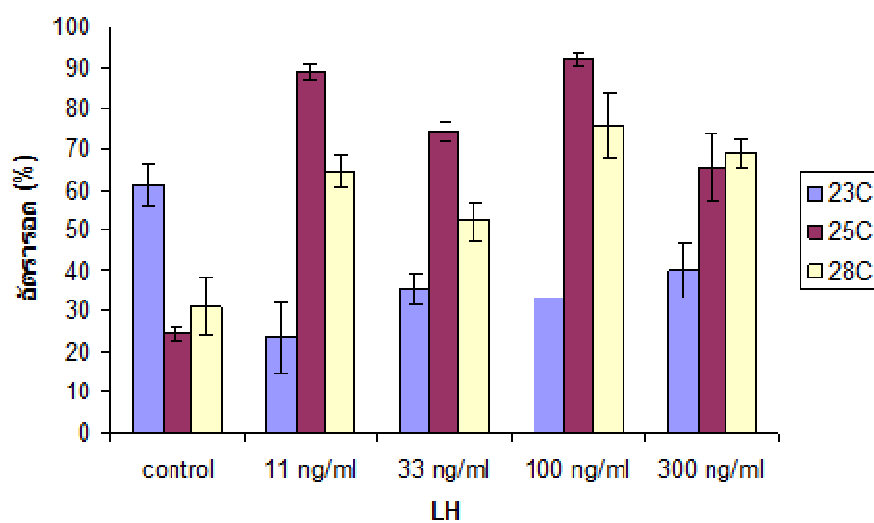
L-15 medium		23°C		25°C		28°C	
		Survival (%)	Mature (%)	Survival (%)	Mature (%)	Survival (%)	Mature (%)
Insulin	6 uM	57+9	6+1	57+9	18+2	46+11	6+1
	8 uM	49+9	3+1	68+2	8+2	50+3	4+1
	10 uM	53+12	6+1	69+2	7+1	58+12	3+1
	12 uM	51+2	0	71+3	6+1	48+3	7+1
IGF-I	10 ng	57 _± 9	0	29 _± 3	1 _± 0	51 _± 2	0
	30 ng	69 _± 2	2 _±	60 _± 9	0	41 _± 9	0
	50 ng	49 _± 17	24 _± 2	58 _± 16	2 _± 1	44 _± 2	0
	100 ng	67 _± 4	23 _± 2	44 _± 10	6 _± 1	51 _± 2	0
FBS	1%	46 _± 4	0	39 _± 10	0	44 _± 10	0
	2%	58 _± 9	0	39 _± 7	0	51 _± 20	0
	3%	69 _± 3	0	42 _± 9	0	58 _± 9	0
	5%	68 _± 2	0	28 _± 5	0	51 _± 17	0
	10%	69 _± 5	0	37 _± 6	0	57 _± 14	0



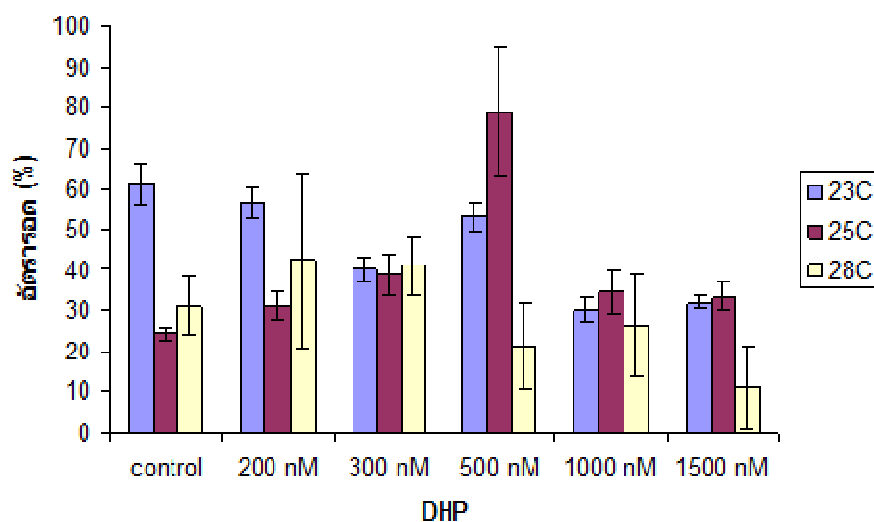
ภาพที่ 25 การเลี้ยงโอโอไซท์ปลาสวายด้วย L-15 medium เสริม HCG ที่อุณหภูมิต่างๆ



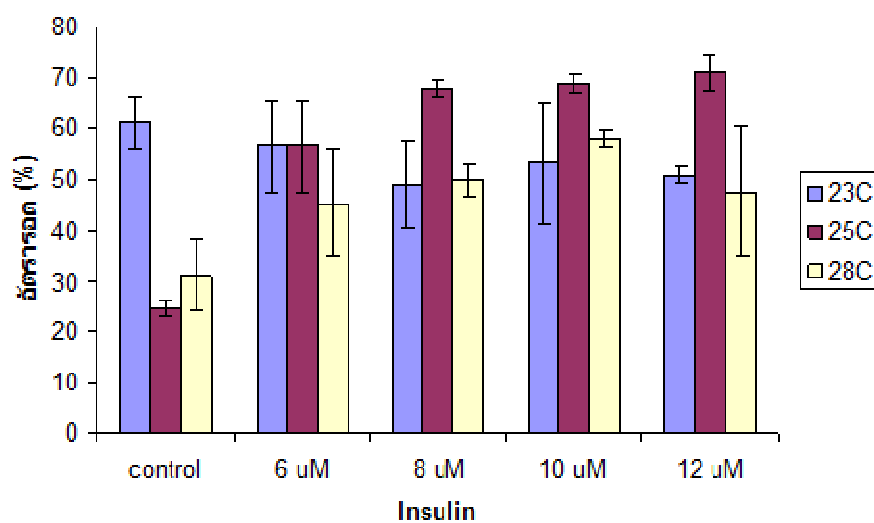
ภาพที่ 26 การเลี้ยงโอโอไซท์ปลาสวายด้วย estradiol (E_2) ที่อุณหภูมิต่างๆ



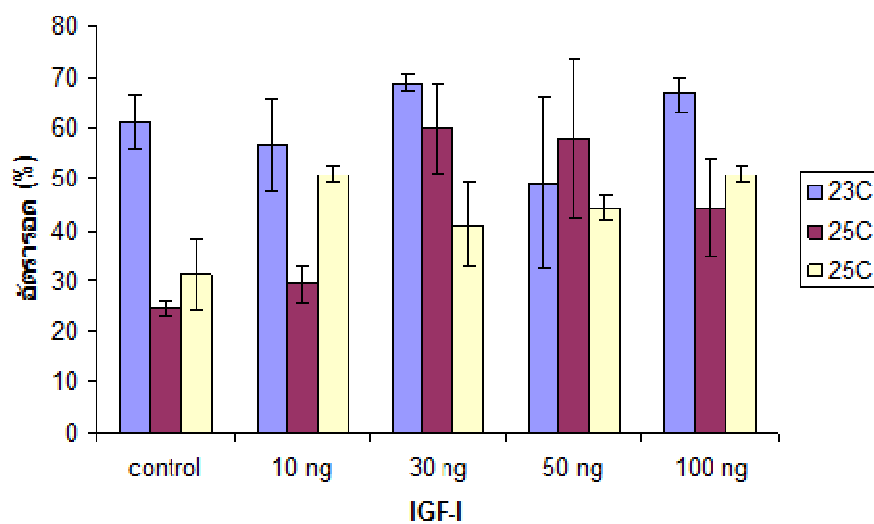
ภาพที่ 27 การเลี้ยงโอโอไซท์ปลาสวายด้วย L-15 medium เสริม LH ที่อุณหภูมิต่างๆ



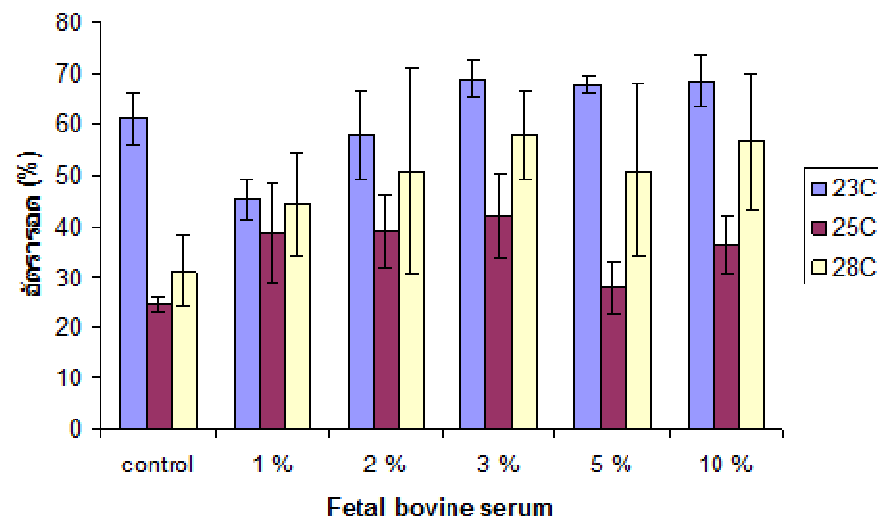
ภาพที่ 28 การเลี้ยงโอโอไซท์ปลาสวายด้วย L-15 medium เสริม DHP ที่อุณหภูมิต่างๆ



ภาพที่ 29 การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายด้วย L-15 medium เสริม insulin ที่อุณหภูมิต่างๆ



ภาพที่ 30 การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายด้วย L-15 medium เสริม IGF-I ที่อุณหภูมิต่างๆ



ภาพที่ 31 การเลี้ยงโอโอไซท์ปลาสาวยด้วย L-15 medium เสริม FBS ที่อุณหภูมิต่างๆ

4.3.2 M-199 medium, Hormone, Growth factor และอุณหภูมิ

ได้ทำการเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายด้วยอาหาร M-199 medium โดยแปรผันความเข้มข้นฮอร์โมนและ growth factor ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 23, 25 และ 28 °C ซึ่งสามารถนำมาเปรียบเทียบหาประสิทธิภาพของความเข้มข้นของฮอร์โมนต่ออัตราการรอดของโอโอไซต์ (survival) และการพัฒนา (mature) ที่อุณหภูมิต่างกัน (ตารางที่ 3 และ 4)

พบว่า โอโอไซต์ปลาสวายชุดควบคุม มีอัตราการรอดสูงสุดที่ 28 °C (69±2 %) ส่วนที่อุณหภูมิ 28 °C มีอัตราการรอดต่ำที่สุด (50±2 %) โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ส่วนโอโอไซต์ปลาสวายที่เลี้ยงด้วย M-199 medium เสริมฮอร์โมนและ growth factor ต่างๆ พบว่า ในบางชุดทดลองมีการพัฒนาของโอโอไซต์ ดังนี้

การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายอาหารที่เสริมด้วย HCG พบว่า ที่ 25 °C โอโอไซต์มีอัตราการรอดมากกว่าที่อุณหภูมิ 23 และ 28 °C ($P<0.05$) แต่ไม่พบว่ามีการพัฒนาของโอโอไซต์เกิดขึ้น (ตารางที่ 3 และภาพที่ 32)

การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายอาหารที่เสริมด้วย estradiol (E_2) พบว่า ที่อุณหภูมิ 23 °C โดยรวมโอโอไซต์จะมีอัตราการรอดมากกว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 28 °C ($P<0.05$) โดยจะสูงมากที่สุดที่ความเข้มข้น 20 nM ของอุณหภูมิ 23 °C (88±4 %) แต่ไม่พบการพัฒนาของโอโอไซต์เกิดขึ้นในการทดลองชุดนี้ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 33)

การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายอาหารที่เสริมด้วย LH พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 °C โดยรวมโอโอไซต์มีอัตราการรอดสูง เมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิ 23 และ 28 °C ($P<0.05$) และ พบว่ามีพัฒนาของโอโอไซต์เกิดขึ้น ดังนี้ ที่ความเข้มข้น 11 ng/ml 23 °C ที่ชั่วโมง 30 มีการพัฒนา 2±1 % ที่อุณหภูมิ 25 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 1±0% และที่อุณหภูมิ 28 °C ชั่วโมง 30 มีการพัฒนา 1±0 % ที่ความเข้มข้น 33 ng/ml 23 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 7±1 % และที่อุณหภูมิ 25 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 6±1 % ที่ความเข้มข้น 100 ng/ml อุณหภูมิ 23 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 3±1 % และที่อุณหภูมิ 25 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 3±1 % ที่ความเข้มข้น 300 ng/ml 23 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 3±1 % และที่อุณหภูมิ 25 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 6±1 % (ตารางที่ 3 และภาพที่ 34)

การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายด้วย M-199 medium ที่เสริม DHP พบว่า โอโอไซต์มีอัตราการรอดต่ำ 30-40 % โดยอัตราการรอดต่ำกว่าชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และไม่พบว่ามีพัฒนาของโอโอไซต์เกิดขึ้นในชุดการทดลองนี้ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 35)

การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายอาหารที่เสริมด้วย insulin พบว่า ที่อุณหภูมิ 28 °C โดยรวมโอโอไซต์มีอัตราการรอดสูง ($P<0.05$) และมีการพัฒนาของโอโอไซต์ ดังนี้ ที่ความเข้มข้น 6 μM 23 °C 24-30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 6 ± 1 % และที่อุณหภูมิ 28 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 6 ± 1 % ที่ความเข้มข้น 8 μM 23 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 3 ± 1 % และที่อุณหภูมิ 28 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 4 ± 1 % ที่ความเข้มข้น 10 μM 23 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 4 ± 1 % และที่อุณหภูมิ 25 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 4 ± 1 % ที่ความเข้มข้น 12 μM 23 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 8 ± 2 % และที่อุณหภูมิ 25 °C 24 ชั่วโมง มีการพัฒนา 8 ± 2 % และที่อุณหภูมิ 28 °C 36 ชั่วโมง มีการพัฒนา 2 ± 1 % (ตารางที่ 4 และภาพที่ 36)

การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายอาหารที่เสริมด้วย IGF-I พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 °C โดยรวมโอโอไซต์มีอัตราการรอดสูง ($P<0.05$) และพบว่ามีการพัฒนาของโอโอไซต์ ดังนี้ ที่ความเข้มข้น 10 ng 23 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 6 ± 1 % และที่อุณหภูมิ 25 °C 24-30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 6 ± 1 % ที่ความเข้มข้น 30 ng 23 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 9 ± 2 % และที่อุณหภูมิ 25 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 2 ± 1 % ที่ความเข้มข้นที่ 50 ng 30 ชั่วโมง 23, 25 และ 28 °C มีการพัฒนา 2 ± 1 , 3 ± 1 และ 3 ± 1 % ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 100 ng 23 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 6 ± 1 % และที่ 28 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 2 ± 1 % (ตารางที่ 4 และภาพที่ 37)

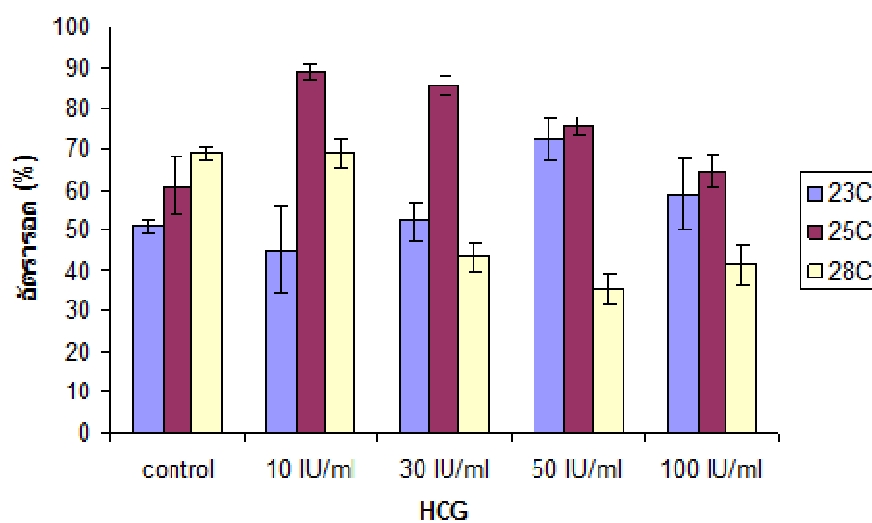
การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายอาหารที่เสริมด้วย FBS พบว่า ที่ 28 °C โอโอไซต์ โดยรวมมีอัตราการรอดสูง ($P<0.05$) แต่อย่างไรก็ตามไม่พบการพัฒนาของโอโอไซต์เกิดขึ้นในชุดการทดลองนี้ (ตารางที่ 4 และภาพที่ 38)

ตารางที่ 3 โอโอไซท์ปลาซวายที่เลี้ยงด้วย M-199 medium โดยเสริมด้วยฮอร์โมนและบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ

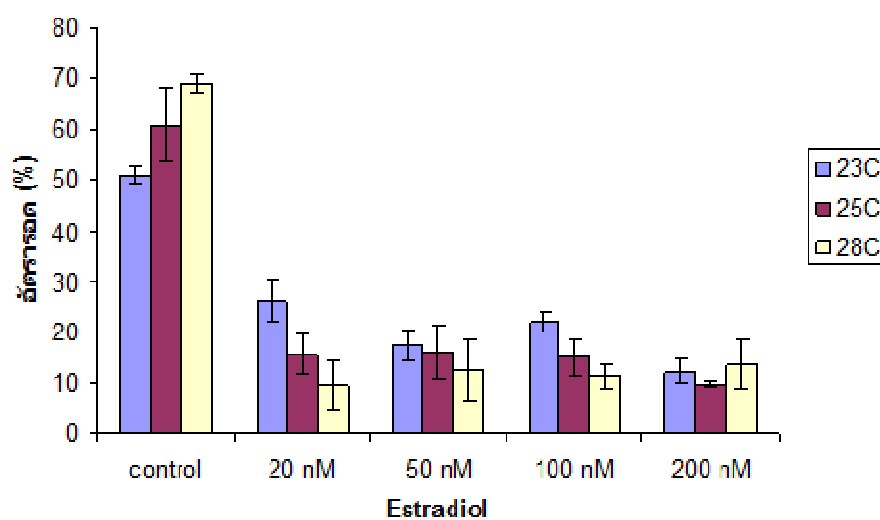
M-199 medium		23°C		25°C		28°C	
		Survival (%)	Mature (%)	Survival (%)	Mature (%)	Survival (%)	Mature (%)
HCG	Control	50 $\pm$ 2	0	61 $\pm$ 7	0	69 $\pm$ 2	0
	10 IU/ml	47 $\pm$ 11	0	89 $\pm$ 2	0	69 $\pm$ 3	0
	30 IU/ml	52 $\pm$ 5	0	86 $\pm$ 2	0	43 $\pm$ 4	0
	50 IU/ml	72 $\pm$ 5	0	76 $\pm$ 2	0	36 $\pm$ 4	0
	100 IU/ml	59 $\pm$ 9	0	64 $\pm$ 9	0	41 $\pm$ 5	0
Estradiol (E ₂)	20 nM	88 $\pm$ 4	0	52 $\pm$ 4	0	32 $\pm$ 5	0
	50 nM	58 $\pm$ 3	0	53 $\pm$ 5	0	42 $\pm$ 6	0
	100 nM	73 $\pm$ 2	0	50 $\pm$ 4	0	38 $\pm$ 4	0
	200 nM	41 $\pm$ 3	0	32 $\pm$ 1	0	46 $\pm$ 2	0
LH	11 ng/ml	31 $\pm$ 3	2 $\pm$ 1	76 $\pm$ 4	1 $\pm$ 0	41 $\pm$ 5	1 $\pm$ 0
	33 ng/ml	41 $\pm$ 9	7 $\pm$ 1	91 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1	78 $\pm$ 2	0
	100 ng/ml	36 $\pm$ 4	3 $\pm$ 1	79 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1	68 $\pm$ 2	0
	300 ng/ml	36 $\pm$ 4	3 $\pm$ 1	92 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1	67 $\pm$ 0	0
DHP	200 nM	38 $\pm$ 1	0	31 $\pm$ 3	0	33 $\pm$ 2	0
	300 nM	32 $\pm$ 1	0	31 $\pm$ 1	0	23 $\pm$ 2	0
	500 nM	38 $\pm$ 2	0	20 $\pm$ 4	0	31 $\pm$ 3	0
	1000 nM	41 $\pm$ 3	0	42 $\pm$ 3	0	37 $\pm$ 1	0
	1500 nM	37 $\pm$ 3	0	38 $\pm$ 2	0	8 $\pm$ 3	0

ตารางที่ 4 โอโอไซต์ปลาทรายที่เลี้ยงด้วย M-199 medium โดยเสริมด้วย growth factors และบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ

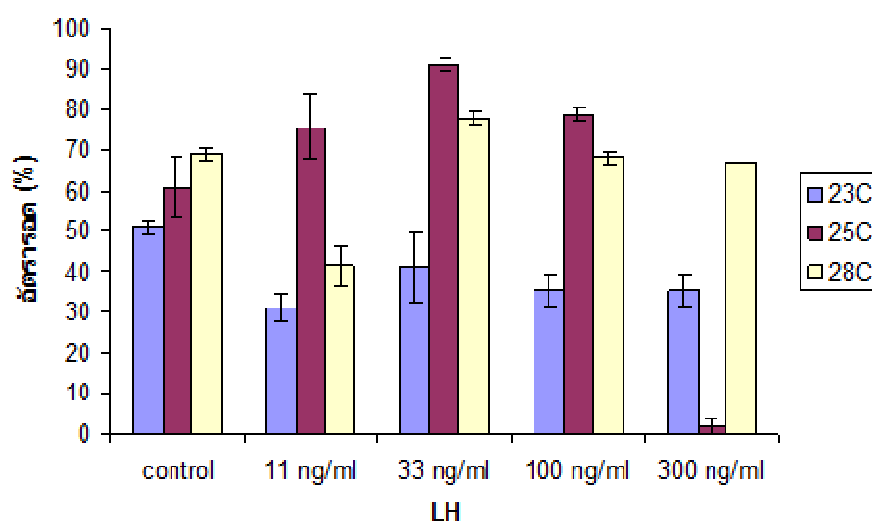
M-199 medium		23°C		25°C		28°C	
		Survival (%)	Mature (%)	Survival (%)	Mature (%)	Survival (%)	Mature (%)
Insulin	6 uM	57 $\pm$ 9	6 $\pm$ 1	63 $\pm$ 4	0	73 $\pm$ 5	6 $\pm$ 1
	8 uM	49 $\pm$ 11	3 $\pm$ 1	54 $\pm$ 2	0	86 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1
	10 uM	37 $\pm$ 4	4 $\pm$ 1	37 $\pm$ 4	4 $\pm$ 1	71 $\pm$ 2	0
	12 uM	69 $\pm$ 3	8 $\pm$ 2	69 $\pm$ 3	8 $\pm$ 2	84 $\pm$ 2	2 $\pm$ 1
IGF-I	10 ng	31 $\pm$ 3	6 $\pm$ 1	56 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1	49 $\pm$ 3	0
	30 ng	56 $\pm$ 14	9 $\pm$ 2	69 $\pm$ 2	2 $\pm$ 1	69 $\pm$ 3	0
	50 ng	52 $\pm$ 15	2 $\pm$ 1	76 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1	48 $\pm$ 4	3 $\pm$ 1
	100 ng	48 $\pm$ 3	6 $\pm$ 1	67 $\pm$ 0	0	61 $\pm$ 2	2 $\pm$ 1
FBS	1%	32 $\pm$ 2	0	50 $\pm$ 17	0	58 $\pm$ 9	0
	2%	27 $\pm$ 9	0	36 $\pm$ 4	0	60 $\pm$ 9	0
	3%	54 $\pm$ 11	0	32 $\pm$ 2	0	64 $\pm$ 4	0
	5%	29 $\pm$ 5	0	30 $\pm$ 3	0	68 $\pm$ 5	0
	10%	52 $\pm$ 7	0	58 $\pm$ 9	0	69 $\pm$ 3	0



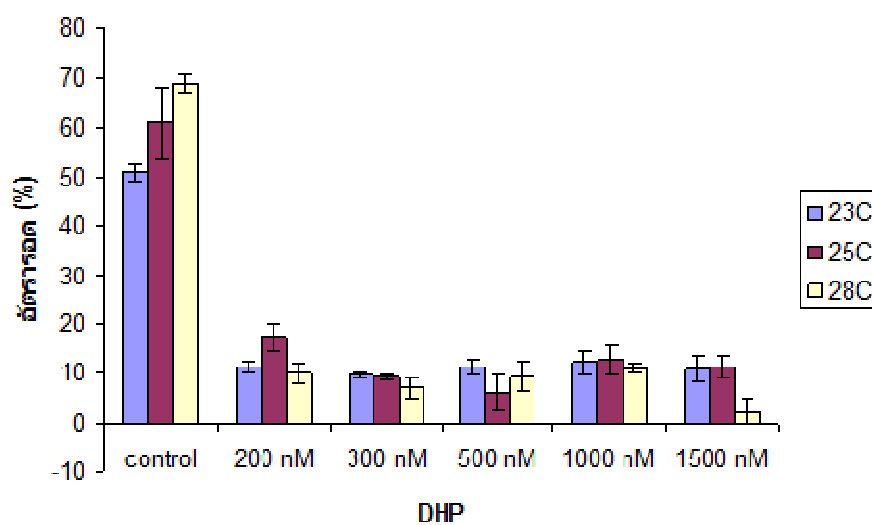
ภาพที่ 32 การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายด้วย M-199 medium เสริม HCG ที่อุณหภูมิต่างๆ



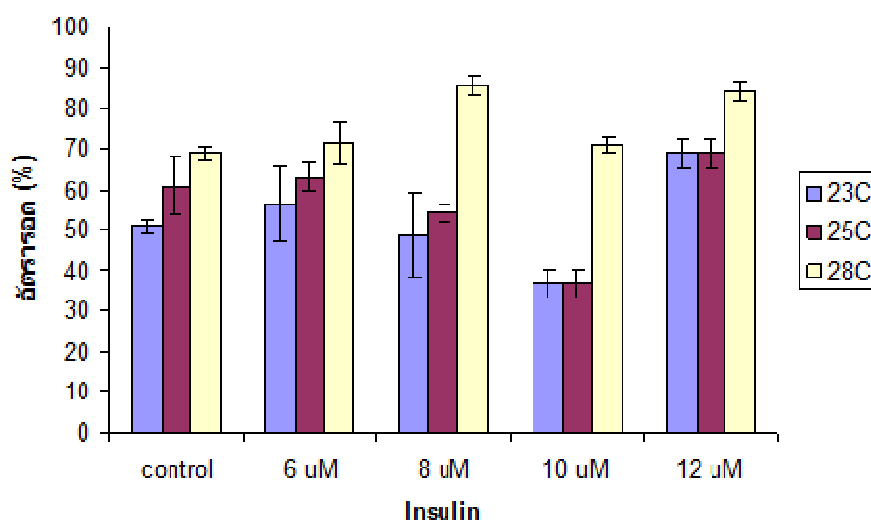
ภาพที่ 33 การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายด้วย M-199 medium เสริม estradiol (E₂) ที่อุณหภูมิต่างๆ



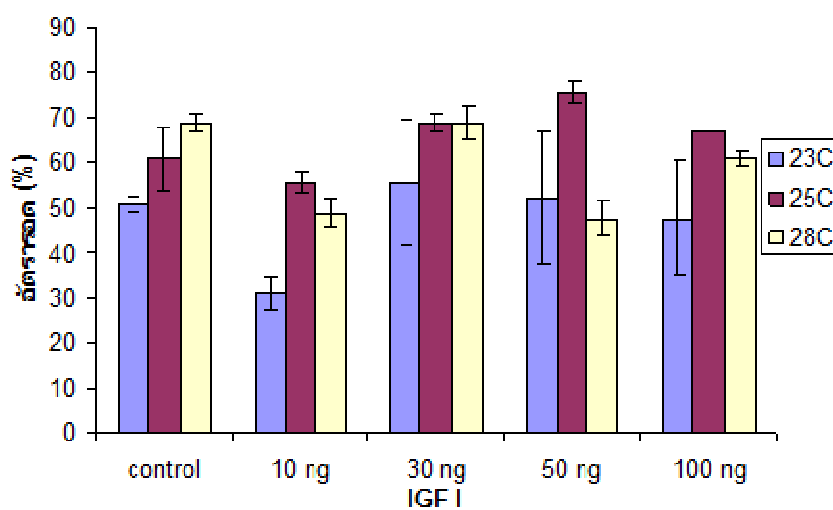
ภาพที่ 34 การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายด้วย M-199 medium เสริม LH ที่อุณหภูมิต่างๆ



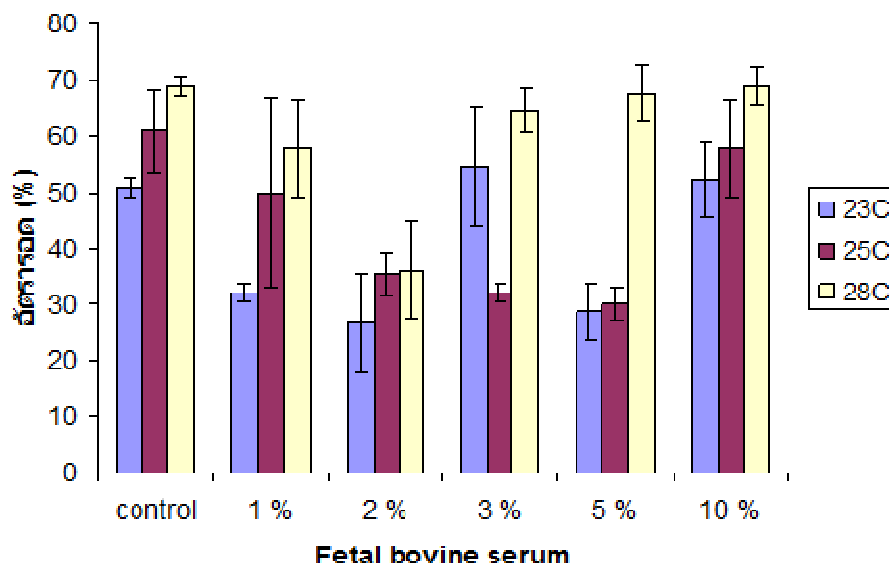
ภาพที่ 35 การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายด้วย M-199 medium เสริม DHP ที่อุณหภูมิต่างๆ



ภาพที่ 36 การเลี้ยงโอโอไซท์ปลาสายด้วย M-199 medium เสริม insulin ที่อุณหภูมิต่างๆ



ภาพที่ 37 การเลี้ยงโอโอไซท์ปลาสายด้วย M-199 medium เสริม IGF-I ที่อุณหภูมิต่างๆ



ภาพที่ 38 การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายด้วย M-199 medium เสริม FBS ที่อุณหภูมิต่างๆ

4.3.3 Advanced DMEM/F-12 medium, Hormone, Growth factor และอุณหภูมิ

ได้ทำการเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายด้วยอาหาร Advanced DMEM/F-12 โดยแปรผันความเข้มข้นฮอร์โมนและ growth factor ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 23, 25 และ 28 °C ซึ่งสามารถนำมาเปรียบเทียบหาประสิทธิภาพของความเข้มข้นของฮอร์โมนต่ออัตราการรอดของโอโอไซต์ (survival) และการพัฒนา (mature) ที่อุณหภูมิต่างกัน (ตารางที่ 5 และ 6)

พบว่า โอโอไซต์ปลาสวายชุดควบคุม มีอัตราการรอดสูงสุดที่อุณหภูมิ 25 °C (70±3 %) ส่วนที่อุณหภูมิ 28 °C มีอัตราการรอดต่ำที่สุด (20±12 %) โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ส่วนโอโอไซต์ปลาสวายที่เลี้ยงด้วย Advanced DMEM/F-12 เสริมฮอร์โมนและ growth factor ต่างๆ พบว่า ในบางชุดทดลองมีการพัฒนาของโอโอไซต์ ดังนี้

การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายอาหารที่เสริมด้วย HCG พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 °C โดยรวมโอโอไซต์ที่มีอัตราการรอดโอโอไซต์มากกว่าที่อุณหภูมิ 23 และ 28 °C ($P<0.05$) แต่ไม่พบว่ามีการพัฒนาของโอโอไซต์ (ตารางที่ 5 และภาพที่ 39)

การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายอาหารเสริมด้วย E₂ พบว่า ที่อุณหภูมิ 23 °C โดยรวมโอโอไซต์ที่มีอัตราการรอดสูง ($P<0.05$) แต่ก็ไม่พบการพัฒนาของโอโอไซต์เกิดขึ้นในชุดการทดลองนี้ (ตารางที่ 5 และภาพที่ 40)

การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายอาหารเสริมด้วย LH พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 °C โดยรวมโอโอไซต์ที่มีอัตราการรอดของได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 23 และ 28 °C ($P<0.05$) และพบว่ามีการพัฒนาของโอโอไซต์เกิดขึ้น ดังนี้ ที่ความเข้มข้น 11 ng/ml 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 1 % ที่ความเข้มข้น 33 ng/ml 36 ชั่วโมง มีการพัฒนา 1 % ที่ความเข้มข้น 100 ng/ml 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 3±1 % (ตารางที่ 5 และภาพที่ 41)

การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายอาหารเสริมด้วย DHP พบว่า ที่ 23 °C โดยรวมโอโอไซต์ที่มีอัตราการรอดดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 28 °C ($P<0.05$) แต่ก็ไม่พบการพัฒนาของโอโอไซต์เกิดขึ้นในชุดการทดลองนี้ (ตารางที่ 5 และภาพที่ 42)

การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายอาหารเสริมด้วย insulin พบว่า ที่อุณหภูมิ 28 °C โดยรวมโอโอไซต์ที่มีอัตราการรอดสูงกว่าที่อุณหภูมิ 23 และ 25 °C ($P<0.05$) และพบว่ามีพัฒนาโอโอไซต์ ดังนี้ ที่ความเข้มข้น 6 µM 23 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 2±1 % และที่อุณหภูมิ 28 °C 36 ชั่วโมง มีการพัฒนา 1±0 % ที่ความเข้มข้น 8 µM 25 °C 36 ชั่วโมง มีการพัฒนา 1±0 % และที่ความเข้มข้นที่ 12 µM 25 °C 36 ชั่วโมง มีการพัฒนา 1±0 % (ตารางที่ 6 และภาพที่ 43)

การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายอาหารที่เสริมด้วย IGF-I พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 °C โดยรวมโอโอไซต์ที่มีอัตราการรอดดีกว่าที่อุณหภูมิ 23 °C ($P<0.05$) และพบว่ามีพัฒนาของโอโอไซต์เกิดขึ้น ดังนี้ ที่ความเข้มข้นของ IGF-I 10 ng 23 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 2±1 % และที่อุณหภูมิ 28 °C 36 ชั่วโมง มีการพัฒนา 1±0 % ที่ความเข้มข้น 30 ng อุณหภูมิ 23 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 2±1 % ที่ความเข้มข้น 50 ng 23 °C 30 ชั่วโมงมีการพัฒนา 3±1 % และที่อุณหภูมิ 28 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 1±0 % ที่ความเข้มข้น 100 ng อุณหภูมิ 23 °C 30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 3±1 % และที่อุณหภูมิ 25 °C 24-30 ชั่วโมง มีการพัฒนา 6±1 % (ตารางที่ 6 และภาพที่ 44)

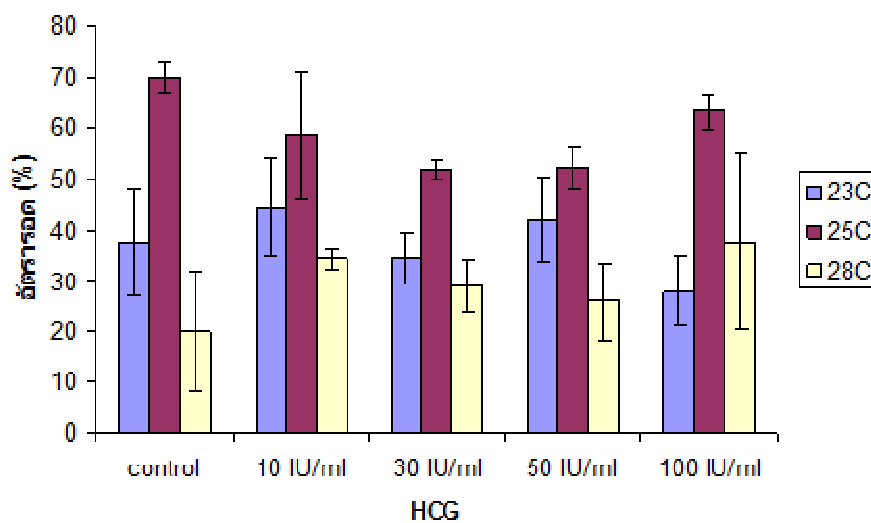
การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายอาหารที่เสริมด้วย FBS พบว่า ที่อุณหภูมิ 23 °C โดยรวมโอโอไซต์ที่มีอัตราการรอดดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 28 °C อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) อย่างไรก็ตามไม่พบการพัฒนาของโอโอไซต์ในการทดลองชุดนี้ (ตารางที่ 6 และภาพที่ 45)

ตารางที่ 5 โอโอไซท์ปลาสวายที่เลี้ยงด้วย Advanced DMEM/F-12 โดยเสริมด้วยฮอร์โมนและ
บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ

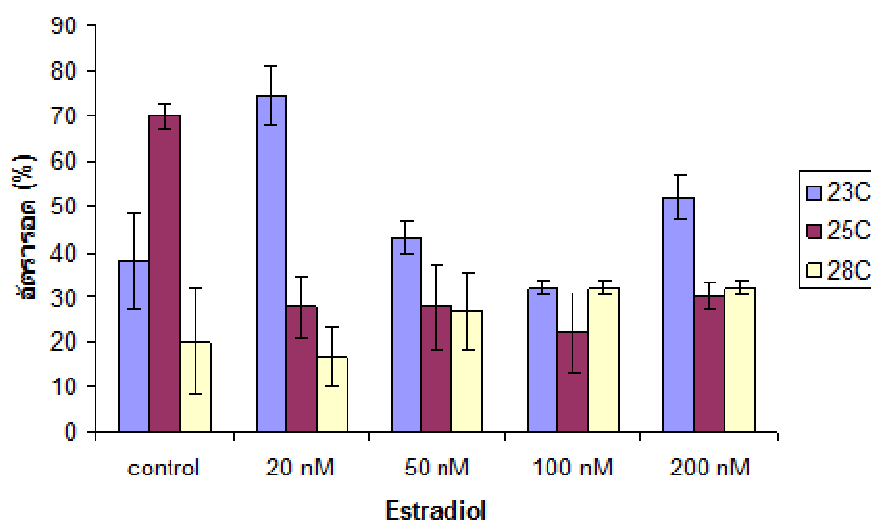
Advanced DMEM/F-12		23°C		25°C		28°C	
		Survival (%)	Mature (%)	Survival (%)	Mature (%)	Survival (%)	Mature (%)
HCG	control	38±11	0	70±3	0	20±12	0
	10 IU/ml	43±10	0	59±13	0	34±2	0
	30 IU/ml	33±5	0	54±2	0	29±5	0
	50 IU/ml	43±9	0	52±4	0	26±8	0
	100 IU/ml	27±7	0	63±4	0	38±17	0
Estradiol (E ₂)	20 nM	74±7	0	28±7	0	17±7	0
	50 nM	43±4	0	28±9	0	27±9	0
	100 nM	32±2	0	22±9	0	31±2	0
	200 nM	52±5	0	30±3	0	32±2	0
LH	11 ng/ml	24±8	0	31±2	1±0	34±2	0
	33 ng/ml	28±9	0	50±3	1±0	46±11	0
	100 ng/ml	26±7	0	37±4	3±1	37±4	0
	300 ng/ml	24±5	0	61±7	0	23±9	0
DHP	200 nM	89±5	0	33±0	0	17±7	0
	300 nM	56±5	0	30±3	0	38±5	0
	500 nM	43±9	0	23±9	0	38±11	0
	1000 nM	40±7	0	36±4	0	41±9	0
	1500 nM	34±2	0	38±4	0	10±7	0

ตารางที่ 6 โอโอไซต์ปลาสวายเป็นเลี้ยงด้วย Advanced DMEM/F-12 โดยเสริม growth factors และบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ

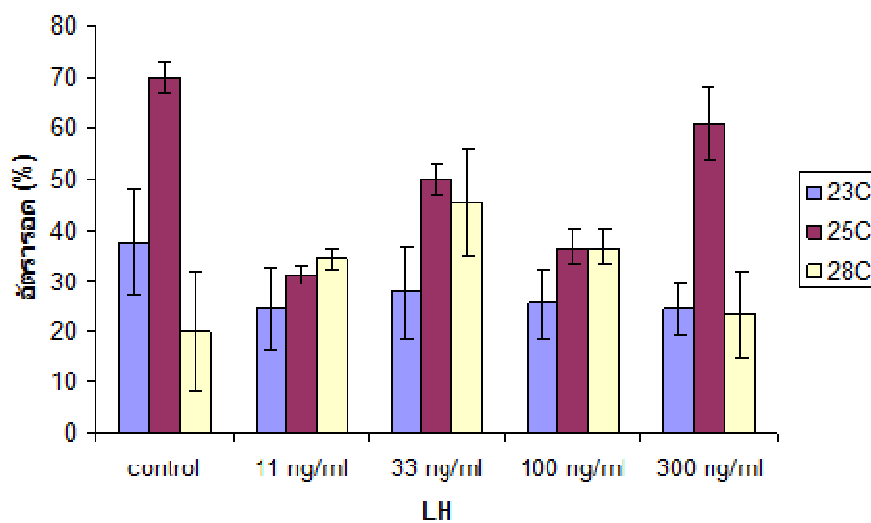
Advanced DMEM/F-12		23°C		25°C		28°C	
		Survival (%)	Mature (%)	Survival (%)	Mature (%)	Survival (%)	Mature (%)
Insulin	6 uM	27 $\pm$ 9	2 $\pm$ 1	36 $\pm$ 4	0	53 $\pm$ 4	1 $\pm$ 0
	8 uM	18 $\pm$ 9	0	33 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	68 $\pm$ 2	0
	10 uM	24 $\pm$ 10	0	53 $\pm$ 2	0	64 $\pm$ 2	0
	12 uM	34 $\pm$ 5	0	52 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1	48 $\pm$ 7	0
IGF-I	10 ng	29 $\pm$ 5	2 $\pm$ 1	27 $\pm$ 4	0	57 $\pm$ 4	1 $\pm$ 0
	30 ng	22 $\pm$ 12	2 $\pm$ 1	34 $\pm$ 2	0	39 $\pm$ 5	0
	50 ng	26 $\pm$ 12	3 $\pm$ 1	44 $\pm$ 8	0	72 $\pm$ 7	1 $\pm$ 0
	100 ng	24 $\pm$ 8	3 $\pm$ 1	54 $\pm$ 19	6 $\pm$ 1	36 $\pm$ 4	0
FBS	1%	44 $\pm$ 2	0	24 $\pm$ 8	0	24 $\pm$ 8	0
	2%	48 $\pm$ 2	0	41 $\pm$ 9	0	19 $\pm$ 7	0
	3%	42 $\pm$ 10	0	50 $\pm$ 7	0	31 $\pm$ 2	0
	5%	76 $\pm$ 10	0	28 $\pm$ 10	0	34 $\pm$ 2	0
	10%	52 $\pm$ 5	0	27 $\pm$ 12	0	24 $\pm$ 8	0



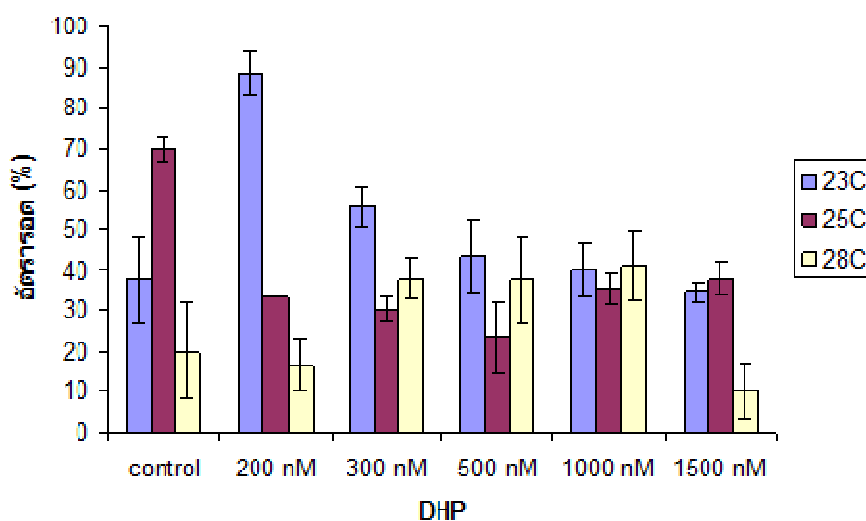
ภาพที่ 39 การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายด้วย Advanced DMEM/F-12 เสริม HCG ที่อุณหภูมิต่างๆ



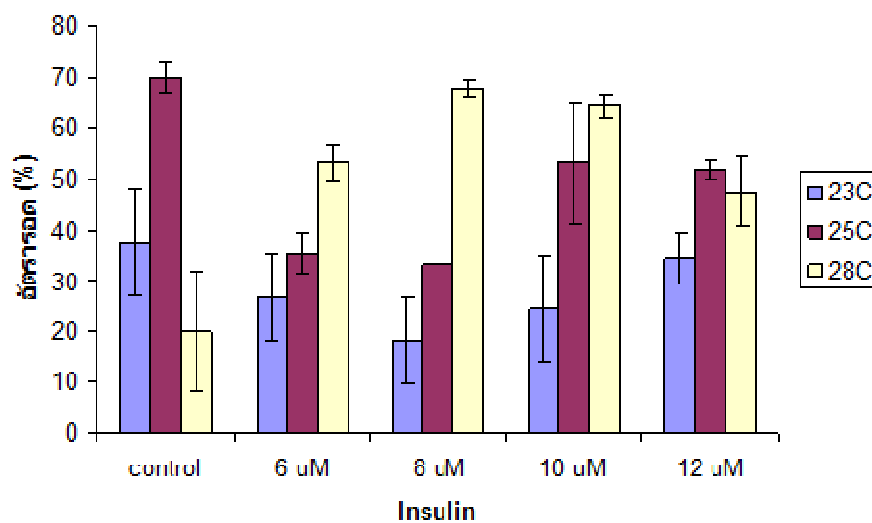
ภาพที่ 40 การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายด้วย Advanced DMEM/F-12 เสริม estradiol (E_2) ที่อุณหภูมิต่างๆ



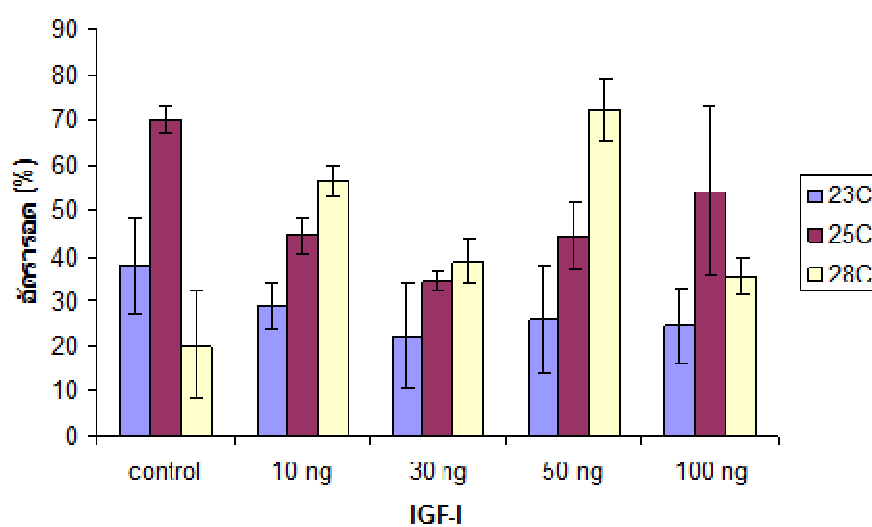
ภาพที่ 41 การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายด้วย Advanced DMEM/F-12 เสริม LH ที่อุณหภูมิต่างๆ



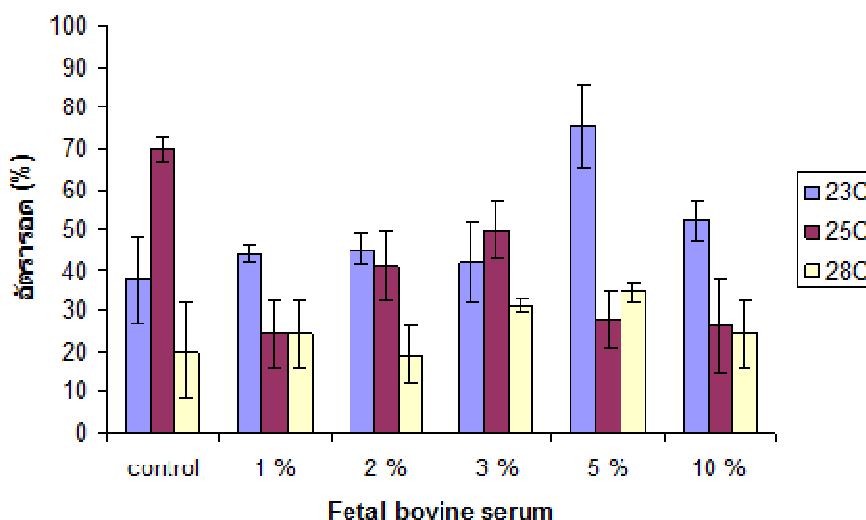
ภาพที่ 42 การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายด้วย Advanced DMEM/F-12 เสริม DHP ที่อุณหภูมิต่างๆ



ภาพที่ 43 การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายด้วย Advanced DMEM/F-12 เสริม insulin ที่อุณหภูมิต่างๆ



ภาพที่ 44 การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายด้วย Advanced DMEM/F-12 เสริม IGF-I ที่อุณหภูมิต่างๆ



ภาพที่ 45 การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายด้วย Advanced DMEM/F-12 เสริม FBS ที่อุณหภูมิต่างๆ

4.3.4 การเปรียบเทียบอัตราการรอดของการเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวาย

โดยนำความเข้มข้นของฮอร์โมน และ growth factor ในระดับอุณหภูมิ 23, 25 และ 28 °C พบว่า ตัวแปรทั้งหมดมีผลต่ออัตราการรอดโอโอไซต์ ดังนี้

1) การเปรียบเทียบในชุดควบคุม (ไม่ใส่สารเสริมใดๆ) พบว่า อาหารเลี้ยง L-15 medium ให้อัตราการรอดของโอโอไซต์ปลาสวายสูงที่สุด และการบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C ในอาหารเลี้ยงทั้ง 3 ชนิด ให้อัตราการรอดของโอโอไซต์ปลาสวายสูงที่สุด

2) การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวายในอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 medium ที่อุณหภูมิ 23 °C จะเห็นได้ว่าการเสริมด้วย E₂ 20 nM, IGF-I 30 ng และ FBS 3% โอโอไซต์มีอัตราการรอดสูงอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) โดยไม่มีการพัฒนาของโอโอไซต์ เมื่อเสริมด้วย E₂ 20 nM และ FBS 3% แต่พบการพัฒนาของโอโอไซต์สู่ระยะที่ 5 เมื่อเสริมด้วย IGF-I 30 ng (9±2 %), LH 33 ng/ml (7±1 %) และ insulin 6 μM (6±1 %)

3) การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวาย ใน L-15 medium เสริมด้วย LH 11 ng/ml, IGF-I 30 ng และ FBS 3 % ที่อุณหภูมิ 25 °C มีอัตราการรอดโอโอไซต์อยู่ในระดับที่ดี (70-90 %)

และมีการพัฒนาของโอโอไซต์สู่ระยะที่ 5 ใน HCG 30 IU/ml (1 %) ซึ่งมีอัตราการรอดของโอโอไซต์มากกว่าที่ความเข้มข้น 10 IU/ml แต่ที่ความเข้มข้น 10 IU/ml จะมีการพัฒนาของโอโอไซต์มากกว่า (7 ± 1 %), LH 11 ng/ml (10 ± 2 %), insulin 6 μ M (18 ± 2 %)

4) การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวยใน L-15 medium ที่อุณหภูมิ 28 °C พบว่าโดยส่วนใหญ่จะมีอัตราการรอดของโอโอไซต์ค่อนข้างน้อย โดยมีอัตราการรอดมากที่สุดที่ชุดควบคุม และการเสริม LH แต่ก็พบว่าการพัฒนาของโอโอไซต์ (ระยะที่ 5) LH 100 ng/ml (2 ± 1 %) และมีการพัฒนาในการใช้ Insulin ทุกความเข้มข้นในอุณหภูมินี้

5) การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวย ใน M-199 medium อุณหภูมิ 23 °C พบว่าการเสริม E₂ 20 nM มีอัตราการรอดสูงสุดแต่ไม่พบว่าการพัฒนาของโอโอไซต์เกิดขึ้น พบว่าการพัฒนาของโอโอไซต์ (ระยะที่ 5) ที่ทดสอบด้วย LH 11 ng/ml (2 ± 1 %), insulin 6 μ M (6 ± 1 %) และ IGF-I 30 ng (9 ± 2 %) แต่อย่างไรก็ตามในกลุ่มฮอร์โมนนี้ที่มีการพัฒนาของโอโอไซต์ที่มีอัตราการรอดของโอโอไซต์จากการเลี้ยงที่ค่อนข้างน้อย

6) การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวยใน M-199 medium ที่อุณหภูมิ 25 °C พบว่าที่ HCG 10 IU/ml และ LH 33 ng/ml มีอัตราการรอดโอโอไซต์สูงสุดซึ่งพบว่าการพัฒนาของโอโอไซต์เกิดขึ้น (ระยะที่ 5) ที่ LH 33 ng/ml (7 ± 1 %) และ IGF-I 30 ng (6 ± 1 %)

7) การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวยใน M-199 medium ที่อุณหภูมิ 28 °C ซึ่งพบว่าการเสริม LH 33 ng/ml และ insulin 8 μ M มีอัตราการรอดของโอโอไซต์สูงสุดในการทดลองที่อุณหภูมิและอาหารเลี้ยงเซลล์นี้ อีกทั้งพบว่าที่ความเข้มข้นของ insulin ดังกล่าวยังพบว่าการเกิดการพัฒนาของโอโอไซต์เกิดขึ้น (6 ± 1 %) (ระยะที่ 5)

8) การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวยใน DMEM medium ที่อุณหภูมิ 23 °C ซึ่งพบว่าการเสริม E₂ 20 nM, DHP 200 nM และ FBS 5 % ที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีอัตราการรอดโอโอไซต์ในระดับที่ดีกว่าสารอื่น (70-90 %) แต่ไม่พบว่าการพัฒนาของโอโอไซต์เกิดขึ้นในสารดังกล่าว แต่พบว่าการพัฒนาโอโอไซต์ (ระยะที่ 5) เกิดขึ้นใน insulin 8 μ M (2 ± 1 %) และ IGF-I 10 ng (2 ± 1 %) มีอัตราการรอดโอโอไซต์ที่ค่อนข้างต่ำ (ประมาณ 30 %)

9) การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาสวยใน DMEM medium ที่อุณหภูมิ 25 °C ซึ่งพบว่าการชุดควบคุมมีอัตราการรอดมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบการทดลองใช้ด้วยฮอร์โมนต่างๆ ที่มีอัตราการรอดค่อนข้างต่ำ และไม่พบว่าการพัฒนาของโอโอไซต์เกิดขึ้นในการใช้ฮอร์โมนที่ความเข้มข้นและอุณหภูมิดังกล่าว

10) การเลี้ยงโอโอไซต์ใน DMEM medium ที่อุณหภูมิ 28 °C พบว่าการเสริม insulin 8 μ M มีอัตราการรอดของโอโอไซต์มากที่สุดและมากกว่าชุดควบคุม แต่ในการเลี้ยงในอุณหภูมินี้โดยส่วนใหญ่อัตราการรอดโอโอไซต์จะค่อนข้างต่ำ และพบว่าการพัฒนาของโอโอไซต์ (ระยะที่ 5) ที่ IGF-I 10 ng (1 %)

สรุปได้ว่า คาดว่าการเลี้ยงโอโอไซต์ปลาซวายให้เกิดการพัฒนา อาหารเลี้ยงที่เหมาะสม คือ L-15 medium ที่อุณหภูมิ 25 °C เสริมด้วย HCG 10 IU/ml LH 11 ng/ml insulin 6 μ M และ IGF-I 100 ng โดยคำนึงถึงการใช้สารที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ส่งผลการพัฒนาสูงสุด

4.4 การทดลองเลี้ยงโอโอไซต์ปลาบึก

ได้มีความพยายามในการเลี้ยงโอโอไซต์ของปลาบึก เพื่อให้มีการพัฒนาจากระยะที่ 4 โดยใช้สูตรอาหาร ทั้ง L-15 medium, M-199 medium และ Advanced DMEM/F-12 เสริมด้วยฮอร์โมนและ growth factors ต่างๆ ที่ได้ผลจากโอโอไซต์ปลาซวาย แต่ไม่พบการพัฒนาใดๆ และไม่สามารถเลี้ยงโอโอไซต์ได้เกิน 12 ชั่วโมง ในทุกชุดทดลอง

อาจจะเป็นไปได้ว่า โอโอไซต์ของปลาบึกมีความไวอย่างมากต่อสภาพที่ไม่เหมาะสม เช่น อาหารเลี้ยงที่ใช้ทั้ง 3 ชนิด อาจจะไม่เหมาะสมสำหรับโอโอไซต์ปลาบึก หรือโอโอไซต์ปลาบึกที่เก็บตัวอย่างได้มีคุณภาพต่ำ อีกทั้งแม่ปลามีความเครียดสูงจากการจับและขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง

4.5 การวิจารณ์

จากการทดลองพบว่าการเสริม LH ในการเลี้ยงโอโอไซต์ปลาซวาย สามารถทำให้โอโอไซต์พัฒนาจากระยะที่ 4 ถึง ระยะที่ 5 ได้ ซึ่งมีการศึกษาผลการตอบสนองของเนื้อเยื่อฟอลลิเคิลในระดับ in vitro จากการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนกลุ่มโกนาโดโทรปิน (FSH และ LH) ต่อการผลิตสารสเตอรอยด์ที่มีผลต่อการพัฒนาของโอโอไซต์ใน coho salmon จากระยะ vitellogenesis จนกระทั่งถึงระยะ final oocyte maturation (FOM) พบว่า ฟอลลิเคิลที่ยังติดอยู่กับโอโอไซต์ (intact follicle) และฟอลลิเคิลที่แยกออกเป็นชั้น ในระดับ in vitro ของชุดการทดลองที่ทำการทดสอบด้วยฮอร์โมน T, 17OH-P และ DHP มีผลการพัฒนาเพิ่มขึ้น เมื่อใช้ร่วมกับฮอร์โมนกลุ่มโกนาโดโทรปินร่วมด้วย (Kagawa et al., 1998)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับสเตอรอยด์ของเนื้อเยื่อรังไข่ coho salmon ในระดับ in vitro มีความสัมพันธ์เกี่ยวกับการขึ้นลงของระดับ DHP และ E2 ในระบบเลือด ในช่วงฤดูผสมพันธุ์ และการพัฒนาของโอโอไซต์ในแต่ละระยะ ดังการศึกษาในปลาแซลมอน (Planas and Swanson, 1995) และ ผลการทดลองของ Van Der Kraak และ Donaldson (1986) ถึงการเพิ่มขึ้นของสารสเตอรอยด์ในรังไข่ coho salmon จากการผลิต E2 จนถึงการผลิต DHP ระหว่างที่มีการพัฒนาการของรังไข่นั้น แสดงให้เห็นว่า FSH ได้มีการกระตุ้นให้เกิดการผลิต E2 จากการสัณเฑาะใน intact follicle ที่ระยะ central GV โดยการกระตุ้นให้เกิดการผลิต T ที่ชั้น theca cell ก่อน

อย่างไรก็ตามเมื่อถึงระยะที่มีการพัฒนาอย่างสมบูรณ์ (peripheral GV stage) พบว่าทั้ง FSH และ LH ถูกยับยั้งไม่ให้เกิดการผลิต E2 ใน granulose layers ที่ถูกแยกออกจากปลานชนิดอื่น ซึ่งผลตรงนี้น่าจะเป็นไปได้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างแน่นอนโดยเข้ามาแทนที่กลไกการทำงานของ aromatase ระหว่างระยะที่ GV มีการเคลื่อนที่ (migrating) และระยะที่ GV อยู่ที่ขอบเซลล์(peripheral GV stage) การยับยั้งผลของ LH ในการสร้าง E2 โดยก่อนที่จะเกิด GVBD เนื้อเยื่อ granulose มีรายงานไว้ว่ามีผลต่อ GTH ในการยับยั้งการผลิต E2 และการทำงานของ aromatase ด้วย (Suzuki et al., 1988)

ในหนู LH จะมีความสำคัญที่จำเพาะต่อการยับยั้งเอนไซม์ aromatase ใน luteinizing granulose cells (Richard, 1994) ในเนื้อเยื่อชั้น granulose cells ที่ระยะ GVBD ไม่พบว่า FSH และ LH มีผลต่อการผลิต E2 และการทำงานของ aromatase ในระยะนี้มีระดับต่ำด้วยเช่นกัน แต่ถึงอย่างไรก็ตาม ผลของ intact follicle ที่ระยะ GVBD ยังคงพบว่าการผลิต E2 ที่ระดับต่ำเมื่อตอบสนองกับ FSH และ LH แสดงให้เห็นได้ว่าถึง FSH และ LH จะมีผลต่อการผลิต E2 ในเนื้อเยื่อ granulose layer อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าการผลิต E2 จะมีการลดลงในรังไข่ แต่ FSH และ LH ก็ยังสามารถกระตุ้นให้มีการผลิต E2 ใน intact follicle ซึ่งส่งผลให้โอโอไซต์เกิดการพัฒนาได้

ในฟอลลิเคิลที่ทำการแยกชั้น (เหมือนกับผลที่เกิดใน intact follicle เช่นกัน) ปราศจากการผลิตจาก T เป็น E2 ใน granulosa layers (ฟอลลิเคิลที่แยกชั้นออก) จากการแยกเนื้อเยื่อฟอลลิเคิลชั้น granulose ออกมา ตามผลงานวิจัยก่อนที่ว่าการลดลงหรือไม่กิจกรรมของ aromatase เกิดขึ้น ในฟอลลิเคิลปลาแซลมอน ซึ่งกิจกรรมนี้ก็ไม่ได้อยู่ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนกลุ่มโกนาโดโทรปินด้วยเช่นกัน (Young et al., 1983; Kanamori, 1988)

ระหว่างระยะที่มีการเคลื่อนที่นิวเคลียสของโอโอไซต์ และ โอโอไซต์ระยะที่มีการพัฒนา จากการกระตุ้นของ FSH และ LH พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการผลิต E2 ซึ่งจะมีการผลิตน้อยลงใน intact follicle ถึง 15 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับระดับที่ผลิต E2

ปกติ และ เมื่อมีการลดลงของกิจกรรม aromatase (Young et al., 1983; Kanamori et al., 1988) ดังที่รายงานไว้ในปลาแซลมอนอีกหลายชนิด (Young, 1983; Kanamori et al., 1988)

ในกระบวนการที่มีการผลิต E2 ลดลงนั้น ใน intact follicle ยังพบว่าการผลิต DHP มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสังเกตเห็นได้ชัดในระยะ FOM อีกทั้งการผลิต DHP ที่เพิ่มขึ้นมากนั้นเกิดจากการใช้ LH ในการกระตุ้นเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าการผลิตสารสเตอรอยด์ชนิดนี้เป็นผลมาจาก LH ไม่ใช่ FSH ในชั้น granulose cells แม้ว่า FSH จะมีผลต่อการกระตุ้นให้มีการผลิต 17OH-P โดยชั้น theca layer จากทุกระยะของโอโอไซต์ แต่ FSH ก็ไม่ได้มีผลต่อการผลิต DHP ใน granulose layers แต่อย่างใด ซึ่งผลตรงนี้ยืนยันจากข้อมูลที่รายงานไว้ว่า จะพบ receptor ของ GTH II ในชั้น granulosa cells (Yan and Swanson, 1992; Miwa et al., 1994)

ผลจากการกระตุ้นของ LH ต่อการผลิต DHP มีสื่อกลางโดยต้องผ่าน receptor ของ GTH II ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจเป็นการทำงานร่วมกับ 20 β -HSD และ ความสามารถของ LH ในการกระตุ้นให้มีการผลิต DHP โดย intact follicle และ granulose layer ที่ระยะ Central GV อาจจะบอกได้ว่า receptor ของ GTH II อาจจะมีอยู่แล้วก่อนที่จะตอบสนองต่อ LH ในระบบหมุนเวียนเลือด และ 20 β -HSD นั้นก็พบว่าถูกกระตุ้นให้ทำปฏิกิริยาได้อยู่แล้ว ในการศึกษาก่อนหน้านี้ได้มีรายงานไว้ด้วยว่า GTH ที่มีความบริสุทธิ์ไม่มากนักจากการเตรียมก็ทำให้ granulose cells มีการผลิต DHP ก่อนที่จะถึงระยะ FOM ด้วย (Yong et al., 1983; Kanamori et al., 1988)

การผลิต DHP ของ FSH และ LH พบว่า LH สามารถกระตุ้นให้เกิด GVBD ได้แต่ FSH ไม่สามารถ แสดงให้เห็นว่า LH สามารถกระตุ้นให้เกิด GVBD ได้ โดยเป็นผลมาจากการที่มีการผลิต DHP เกิดขึ้นใน granulose cells และมีรายงานว่า LH เป็นฮอร์โมนกลุ่ม GTH เพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่ทำให้เกิด GVBD ในปลากลุ่มที่ไม่ใช่แซลมอน ซึ่งได้แก่ seabream (Kagawa et al., 1998) ดังนั้นผลตรงนี้น่าจะชี้ให้เห็นได้ว่า LH น่าจะเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญในการเกิด FOM ในกลุ่มปลากระดูกแข็งทั่วไปด้วยเช่นกัน ซึ่งการตอบสนองของฟอลลิเคิลที่ทำการแยกเนื้อเยื่อต่อ FSH และ LH ในการผลิตสารสเตอรอยด์นั้นมีความแตกต่างจาก intact follicle

มีการยับยั้งการผลิต E2 เกิดขึ้น จากการใช้ FSH และ LH ใน granulose cells ที่ระยะ peripheral GV แต่ก็พบว่าผลของการผลิต E2 โดย intact follicle ให้ผลที่ระยะเดียวกันกับงานที่ศึกษาในปลาชนิดอื่น ซึ่งกฎของการผลิต E2 นั้นอาจจะไม่ได้ขึ้นอยู่กับระดับการทำงานของ aromatase เท่านั้น แต่อาจขึ้นอยู่กับระดับของ T ที่ผลิตขึ้นโดย theca layer ด้วยก็ได้ ส่วนปริมาณที่แตกต่างกันของสารสเตอรอยด์ที่ผลิตได้ระหว่างฟอลลิเคิลที่ทำการแยกชั้น

และ intact follicle นั้นพบว่ามีความที่แตกต่างกันด้วยเช่นกัน เช่น พบว่าระดับของสเตอรอยด์ที่ผลิตได้โดยฟอลลิเคิลที่ทำการแยกเนื้อเยื่อมีสูงกว่าถึง 10 เท่า ของ intact follicle ซึ่งความแตกต่างที่เกิดความคาดหมายตรงนี้อาจจะเป็นไปได้ว่า ฟอลลิเคิลที่ทำการแยกเนื้อเยื่อ กับ intact follicle มีความแตกต่างกันจากอะไรบางอย่างเข้ามาแทนที่ผลจากการติดต่อกันภายในระหว่าง granulose cell และ theca cell ใน intact follicle เมื่อพิจารณาตรงส่วนนี้ มีหลายปัจจัยที่ผลิตโดย theca cell ใน intact follicle ซึ่งน่าจะมีผลต่อการแสดงออกของ granulose cell ด้วย หรือไม่ก็เป็นสารธรรมชาติที่ไม่มีผลอะไร และ น่าจะมีสารชนิดหนึ่งที่เป็น insulin-like growth factor I (IGF-I) ในรังไข่ของปลากระดูกแข็งส่วนใหญ่จะมีการผลิตได้ทั้งใน granulose และ theca cells (Kagawa et al., 1995)

IGF-I เป็นสารที่สามารถเชื่อมตัวกับ receptor ในเนื้อเยื่อของฟอลลิเคิลได้ทั้งสองชั้น และ ยังเป็นสารที่ทำให้มีผลต่อการผลิตสเตอรอยด์ที่แตกต่างกันของเนื้อเยื่อฟอลลิเคิลแต่ละชั้นด้วย (Maestro et al., 1997)

นอกจากนี้แล้วปริมาณสเตอรอยด์ที่แตกต่างกันในฟอลลิเคิลที่แยกชั้นเนื้อเยื่อ กับฟอลลิเคิลปกติ น่าจะมีส่วนสัมพันธ์กับปริมาณสารตั้งต้นของสเตอรอยด์ที่มีอยู่มากในเนื้อเยื่อ granulose layer ที่ถูกแยกชั้น ซึ่งน่าจะบอกได้ว่าการเปลี่ยนแปลงในการสังเคราะห์สเตอรอยด์ระหว่างที่เกิด FOM นั้นน่าจะมีส่วนสัมพันธ์กัน ในส่วนของระดับกลไกการทำงานของ FSH และ LH ในพลาสมา และชนิดของ receptor กับตำแหน่งที่ตั้ง อย่างไรก็ตาม ปัจจัยอื่นๆอีกหลายตัว เช่น เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงกลไกการทำงานของ FSH และ LH ซึ่งน่าจะมีผลมาจากระดับของ growth factor ต่างๆ หรืออาจเป็นการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สเตอรอยด์ ซึ่งไม่สามารถพิสูจน์ได้ การเพิ่มขึ้นของระดับ LH ในระบบหมุนเวียนเลือดระหว่างที่มีการพัฒนาของโอโอไซต์ระยะท้ายๆ พบว่ามี receptor ของ GTH II ปรากฏอยู่ปริมาณมาก ทำให้เห็นว่าเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้มีการผลิต 17, 20 β -P ตามมา และเป็นผลให้เกิด FOM ความสำคัญในส่วนตรงนี้ และปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะของ LH ระหว่างที่เกิด FOM

มีการศึกษาระดับ in vitro และสังเกตถึงความเกี่ยวข้องที่ใกล้ชิดกันระหว่างการกระตุ้นให้เกิด upregulation receptor โดยโกนาโดโทรปิน และการพัฒนาของ OMC ซึ่งผลจากการทดลองนี้ได้อธิบายเพิ่มเติมข้อมูลที่มีมาก่อนเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของสองสารนี้ ในระหว่างที่มีการ oocyte maturation ของ spotted seatrout (Thomas and Patino, 1991) และมีผลการศึกษา ซึ่งได้วิจารณ์ไว้ของ Nagahama (1997) ได้กล่าวถึงผลที่ศึกษาในปลาลิ้นหมา ระหว่างที่เกิด oocyte maturation พบว่าสามารถทำการกระตุ้นได้ ส่วนใหญ่โอโอไซต์ที่กระตุ้นได้จะอยู่ในระยะที่โอโอไซต์เจริญเต็มที่แล้วเท่านั้น (fully grown) ในโอโอไซต์ของ seatrout ซึ่งพบว่ายาระยะนี้มีความเข้มข้นของ MIS-receptor เพิ่มขึ้นถึง 2 pmol/g ovary ซึ่งเป็นความเข้มข้น

สูงสุดที่พบเท่ากับไอโอไซท์ของ seatrout ในธรรมชาติเมื่อถึงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และยังพบว่าช่วงระยะเวลาในการกระตุ้น OMC นี้จะเป็นแต่ช่วงระยะเวลาสั้นๆ เท่านั้นหลังจากความเข้มข้นของ receptor ขึ้นสูงสุด อีกทั้งพบที่มีความสัมพันธ์ ($R = 0.88$) ที่ใกล้เคียง และสอดคล้องกันมาก ระหว่างเปอร์เซ็นต์ของไอโอไซท์ที่มีความสามารถในการพัฒนา และความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้น receptor หลังจากทดสอบด้วยความเข้มข้นของ โกลาโดโทรปินต่างๆ ซึ่งได้แก่ LH-like หรือสารเคมีที่มีส่วนในการเพิ่มระดับ cAMP

จากการทดลองพบว่าทั้ง insulin และ IGF-I ให้ผลการพัฒนาจากระยะที่ 4 เป็นระยะที่ 5 ได้ดี โดยเกิดได้เกือบทุกอุณหภูมิตามชนิดของอาหารที่เลี้ยง แต่อัตราการรอดของไอโอไซท์ยังคงต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับฮอร์โมนชนิดอื่นในการเลี้ยง ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดอาหาร และอุณหภูมิการเลี้ยงด้วยเช่นกัน

ตามที่ Dasgupta et al. (2001) ได้ทำการทดลองใช้ insulin ในการกระตุ้นการเลี้ยง ไอโอไซท์ปลาการ์ฟเพียงอย่างเดียว ด้วยการทดลองแบบ in vitro พบว่าสามารถทำให้ไอโอไซท์พัฒนาจนถึงระยะ GVBD ได้ แต่จากการทดลองสามารถทำให้ไอโอไซท์ปลาสวายพัฒนาจากระยะที่ 4 เป็นระยะที่ 5 ได้เท่านั้น อาจเนื่องมาจากความแตกต่างทางด้านสรีรวิทยาของปลาแต่ละชนิด และความต้องการการกระตุ้นในระดับของสารที่แตกต่างกัน จึงยังไม่สามารถพัฒนาจนถึงระยะ GVBD ได้ และมีการกล่าวว่าการไถ่การทำงานของ insulin และ IGF-I นั้นมีการทำงานที่คล้ายกัน โดย IGF-I นั้นได้ถูกดัดแปลงมาจาก insulin (Kagawa et al., 1994) จากการทดลองพบว่าสารทั้งสองชนิดนี้ให้ผลการทดลองที่เท่าๆกัน และมีผลในชนิดอาหารรวมทั้งอุณหภูมิในการเลี้ยงที่คล้ายกันทั้งในปลาสวาย

ในการทดลองพบว่าสารที่ทำให้เกิดการพัฒนายไอโอไซท์มากที่สุดได้แก่ IGF-I ซึ่งเกิดขึ้นในปลาสวายที่ความเข้มข้น 50 ng (24+2 %) และ 100 ng (23+2 %) ใน L-15 medium ที่อุณหภูมิ 23 °C จากการศึกษาเกี่ยวกับ insulin-like growth factor-I ที่มีการใช้เป็นสารเดี่ยวๆในการกระตุ้นให้เกิด oocyte maturation ก็พบว่าสามารถทำได้ ในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังหลายชนิด รวมทั้งสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม, สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และ ปลากระดูกแข็งต่างๆ (Kagawa et al., 1994; El-Etr et al., 1979; Maller and Koontz, 1981)

มีการค้นพบ IGF-I- receptor บนไอโอไซท์ของ *Xenopus* และ ก็ได้มีการโคลน (clone) จาก oocyte cDNA library ขึ้นแล้วจากสัตว์ชนิดนี้ (Taghon and Sadler, 1994; Zhu and Ohan, 1998)

นอกจากจะพบ post receptor-mediated ของ IGF-I ในไอโอไซท์ของ *Xenopus* แล้วยังมีการค้นพบ mitogen-activated kinase และ cyclin-dependent kinase อีกด้วย (Grigorescu et al., 1994) แต่ยังคงขาดข้อมูลเกี่ยวกับเรื่องนี้ในกลุ่มปลากระดูกแข็ง

อย่างไรก็ตาม IGF-I และ mRNA (IGF-I) ได้เคยถูกค้นพบบ้างแล้วในรังไข่กลุ่มปลากระดูกแข็ง และก็โอโอไซต์ด้วย (Kagawa et al., 1995; Duan, 1998) และจากรายงานเกี่ยวกับ IGF-I ก็ยังพบว่าการกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์สารสเตอรอยด์ในรังไข่ และเกิด oocyte maturation ได้ในกลุ่มปลากระดูกแข็ง (Kagawa et al., 1994; Srivastana and Van Der Kraak, 1994)

ปฏิกิริยาของ IGF-I นั้นได้มีการจำลองเลียนแบบมาจากการทำปฏิกิริยาของโกนาโดโทรปินในรังไข่ปลา red seabream พบว่าทำให้เกิดการพัฒนาของโอโอไซต์ที่ได้สมบูรณ์ (GVBD) ได้เหมือนกัน (Kagawa et al., 1994) และพบว่า IGF-I ก็สามารถกระตุ้น OMC ใน spotted seatrout กระบวนการนี้ก็มีความเกี่ยวข้องกับการ upregulation ของ MIS-receptor ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของโอโอไซต์ จากที่ได้มีการศึกษาพบว่า IGF-I นั้นได้มีการกระตุ้นอย่างอื่นเกิดขึ้นด้วยในช่วงที่มีการเกิด OMC ใน seabream พบว่ามีการเพิ่มขึ้นเกี่ยวกับความเข้มข้นของ homologous และ heterologous gap junctions (Patino and Kagawa, 1999) ดังนั้น IGF-I จึงน่าจะสามารถใช้เป็นสารที่สามารถเลียนแบบ หรือแทนปฏิกิริยาที่สำคัญได้สองอย่าง คือ ทั้งของโกนาโดโทรปินในช่วงที่มีการพัฒนาของ OMC และ การ upregulation MIS-receptor ที่เยื่อหุ้มเซลล์และเพิ่มความเข้มข้นของ gap junction ในฟอลลิเคิลของรังไข่

แม้ว่าจะยังไม่มีผลการพบว่ามี ความเข้มข้นของ IGF-I เพิ่มขึ้นสูงในขณะที่ oocyte maturation โดยตรงก็ตาม และข้อมูลเกี่ยวกับกลไกภายในเซลล์ของ IGF-I นั้นก็ยังคงขาดแคลนอยู่ การสังเคราะห์ IGF-I ในรังไข่ยังไม่มีปรากฏว่าควบคุมโดย growth hormone แต่อย่างใด (Duan, 1998) ซึ่งก็อาจเป็นไปได้ว่า IGF-I นั้นอาจจะรวมอยู่กับกระบวนการของโกนาโดโทรปิน ซึ่งก็ได้เคยมีอยู่ในส่วนของผลวิจารณ์ของ Kagawa et al. (1994)

ได้มีรายงานว่าในกระบวนการ oocyte maturation ของ striped bass สาร IGF-I ไม่ได้มีการแสดงออกที่เลียนแบบจากโกนาโดโทรปินในปลา spotted seatrout (Weber et al., 1997) ซึ่งพบที่มีความสัมพันธ์กันระหว่างการกระตุ้น MIS-receptor และการพัฒนาของ OMC และมีผลแตกต่างเกิดขึ้นหลังจากที่มีการทดสอบด้วย 100 μ M porcine insulin กับโกนาโดโทรปิน มีการแสดงให้เห็นว่าให้ผลการกระตุ้นการเกิด OMC ได้ดีขึ้น แม้ว่าจะให้ผลทางศักยภาพแตกต่างกัน ในการตอบสนองต่อ insulin (หรือ IGF-I) และโกนาโดโทรปิน ใน spotted seatrout แต่ก็ยังมีผลความแตกต่างที่ยังไม่มีความชัดเจนนัก

อย่างไรก็ตามกลไกที่ควบคุมความเข้มข้นของ receptor สารสเตอรอยด์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ยังคงได้รับความสนใจน้อย และยังคงมีความเข้าใจไม่มากนัก ได้มีการอธิบายไว้ว่าโกนาโดโทรปินสามารถ upregulate ความเข้มข้นของ MIS-receptor ในรังไข่ที่เจริญเต็มที่แล้ว (fully

grown ovaries) ในโอโอไซท์ของ *Xenopus* และ spotted seatrout (Liu and Patino, 1993; Thomas and Patino, 1991)

ในการทดลองกับอวัยวะและสเปิร์มของ spotted seatrout และ Atlantic croaker ซึ่งมีการศึกษาเกี่ยวกับ upregulation ของโกนาโดโทรปินต่อ MIS-receptor มีส่วนเกี่ยวข้องทั้งการสังเคราะห์ mRNA และโปรตีน แต่ก็ยังไม่พบว่า receptor นี้เป็นสื่อกลางที่มีผลต่อการสังเคราะห์สเตอรอยด์ให้เพิ่มขึ้นแต่อย่างใด นอกจากนี้ความแตกต่างในกลไกการทำงานของ การเพิ่มขึ้นของความเข้มข้น MIS-receptor ที่มีผลต่อการพัฒนาของ OMC ได้มีการอธิบายไว้อย่างชัดเจนแล้วในปลา seatrout แสดงให้เห็นได้ว่า รูปแบบของ FOM ทั้งในปลา และสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำสามารถเห็น และเข้าใจได้อย่างชัดเจนถึงการควบคุมฮอร์โมนของ receptor-steroid ที่เยื่อหุ้มเซลล์เป็นการทำงานแบบ non-genomic steroid (ไม่เกี่ยวกับการถ่ายทอดสารพันธุกรรมในนิวเคลียส) (Thomas, 1997; Thomas et al., 1997)

มีรายงานว่า DHP, estradiol (E2) และ human chorionic gonadotropin (HCG) ไม่สามารถกระตุ้นให้โอโอไซท์ของ striped bass (*Morone saxatilis*) พัฒนาจนถึงขั้นสมบูรณ์ได้ใน IVM และกล่าวว่า HCG ไม่มีผลต่อ MIS receptor และไม่สามารถพัฒนาโอโอไซท์ในช่วงการพัฒนาระยะสุดท้ายได้ (Webber and Sullivan, 2000) ส่วน 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) พบว่า ทำหน้าที่เป็น maturation-inducing hormone (MIH) ระหว่างที่มีการพัฒนาของโอโอไซท์ปลาทอง (*Carassius auratus*) (Katsu et al., 1999) และ มีการใช้ร่วมกับ cAMP forskolin และ cyanoketone ในการพัฒนาโอโอไซท์ปลาตุ๊กตาด่าน (*Clarias batrachus*) ในห้องทดลอง เพื่อให้โอโอไซท์พัฒนาจนถึงระยะสุดท้าย (Chaube and Haider, 1997) จากผลการทดลองนี้ พบว่า ไม่มีการพัฒนาเกิดขึ้นในปลาสวาย อาจแสดงให้เห็นว่าสารเหล่านี้สารใดสารหนึ่งเพียงชนิดเดียว ไม่สามารถทำให้โอโอไซท์ในกลุ่มปลา catfish ทุกชนิดพัฒนาได้เมื่อใช้ อาจจะต้องมีการใช้ควบคู่กับสารชนิดอื่นเพื่อเป็นการเสริมฤทธิ์ต่อไป

จากรายงานว่าโกนาโดโทรปินที่ปลาผลิตขึ้นเอง (endogenous gonadotropin) หรือ โกนาโดโทรปินที่ฉีดเข้าไป (exogenous gonadotropin) มีผลทำให้รังไข่หรืออวัยวะสร้างฮอร์โมนเพศ ส่งผลให้ไข่ และสเปิร์มมีความพร้อมในการปฏิสนธิ นั้น ทำให้มีการฉีดฮอร์โมนเพศเข้าไปในพ่อแม่พันธุ์โดยตรง เพื่อเร่งความสมบูรณ์เพศ (Huat, 1980) แนวทางดังกล่าวได้เริ่มมีการประยุกต์อย่างแพร่หลายในแม่ปลา แต่ก็พบว่าประสบความสำเร็จในปลาบางชนิดเท่านั้น เช่น การฉีดฮอร์โมน 17α , 20β , 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one ในแม่ปลาสามารถเร่งให้มีการพัฒนาของโอโอไซท์สู่ระยะสุดท้าย และตกไข่ได้ โดยไม่ต้องใช้โกนาโดโทรปินเลย (Trant et al., 1986)

แต่ส่วนใหญ่แม่ปลาที่ได้รับการฉีดฮอร์โมนเพศจะตกไข่ได้จะต้องมีโอโอไซต์ระยะท้ายๆเท่านั้น เนื่องจากการฉีดฮอร์โมนเพศจะทำให้ระดับฮอร์โมนเพศในพลาสมาสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ในระยะเวลานั้นๆ ฉะนั้นโอโอไซต์ที่ตอบสนองได้ดีต้องเป็นโอโอไซต์ระยะท้าย ในแม่ปลาที่มีโอโอไซต์ระยะต้น เมื่อได้รับการฉีดฮอร์โมนเพศจะตอบสนองไม่ดี เนื่องจากต้องใช้ระยะเวลาในการพัฒนาของโอโอไซต์ ในขณะที่ฮอร์โมนเพศมีฤทธิ์ในระยะเวลานั้น จึงไม่สามารถทำให้ตกไข่ได้ (ภานุ และคณะ, 2539)

การพัฒนาของโอโอไซต์จนถึงระยะสุดท้ายน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับฟอลลิเคิล เนื่องจากการทดลองก่อนหน้านี้ในการพัฒนาโอโอไซต์ปลาชนิดต่างๆ แบบ *in vitro* maturation จะเตรียมตัวอย่างโดยการผ่าตัดรังไข่แล้วนำมาเลี้ยง โดยจะมีฟอลลิเคิลติดมาด้วย (Suzuki et al., 1988; Sire and Depeche, 1981; Goetz and Thomas, 1995; Maestro et al., 1997)

ในการพัฒนาโอโอไซต์ของปลาโดยทั่วไป จะมีการดูดน้ำเข้าสู่เซลล์ (hydration) มีผลทำให้ขนาดของโอโอไซต์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย เช่น ในปลาดุกกรัสเซียในขั้นตอนการเจริญระยะสุดท้ายของโอโอไซต์ (ระยะที่ 6) นอกจากจะเกิดการเคลื่อนที่และการสลายของ GV แล้วยังตามด้วยการเคลื่อนที่ของไซโทพลาสซึมไปรวมกับสารประกอบนิวเคลียสทาง animal pole เกิดเป็นลักษณะหนูนูนชัดเจน และในที่สุดเกิด attachment disc ซึ่งสร้างโดยเนื้อเยื่อชั้น granulose cell ในฟอลลิเคิล และเกิดชั้นวันรอบๆ โอโอไซต์ (Berg, 2003) ดังนั้นน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการพัฒนาโอโอไซต์โดยสมบูรณ์ด้วยเช่นกัน อีกทั้งเมื่อโอโอไซต์ยังอยู่ในฟอลลิเคิล ช่องว่างระหว่างฟอลลิเคิลกับโอโอไซต์จะบรรจุไปด้วยของเหลว (germinal fluid) ซึ่งของเหลวนี้นี้ประกอบด้วยสารประเภทโปรตีนที่เรียกว่า connexin ซึ่งมีการศึกษาถึงการเพิ่มขึ้นของระดับ mRNA ของ connexin ใน gap junctions (ช่องว่างระหว่างโอโอไซต์ และฟอลลิเคิล พบว่าเกิดระหว่างที่เกิด FOM (final oocyte maturation) ในรังไข่ของ Atlantic croaker (Yoshizaki et al, 1994; Chang et al, 1999) อย่างไรก็ตามผลการทดลองตรงส่วนนี้ ถ้านำไปเทียบโดยส่วนรวมกับชนิดของปลากระดูกแข็งนั้นก็ยังไม่มีความชัดเจนนัก เพราะว่ามี การลดลงของ gap junction ระหว่างที่ oocyte maturation ในปลา fundulus (Cerde et al, 1993)

4.6 สรุปผลการวิจัย

การเลี้ยงโอโอไซต์ปลาบึกและปลาซวาย ด้วยอาหารเลี้ยง 3 ชนิด ได้แก่ Leibovitz L-15 medium, Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium (Advanced DMEM/F-12) และ M-199 medium เสริมด้วยกลุ่มฮอร์โมน 4 ชนิด ได้แก่ human chorionic gonadotropins (HCG), luteinizing hormone (LH), 17β -estradiol (E2) และ 17α -20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) และเสริมด้วย growth factors 3 ชนิด ได้แก่ insulin (from bovine pancrease) insulin-like growth factor-I (IGF-I) และ fetal bovine serum (FBS) โดยแปรผันอุณหภูมิบ่มที่ 23, 25 และ 28 °C ได้ประสบความสำเร็จสำหรับโอโอไซต์ปลาซวายในเบื้องต้นเท่านั้น โดยมีการพัฒนาจากระยะที่ 4 เข้าสู่ระยะที่ 5 โดยไม่มีการพัฒนาถึงระยะที่ 6 (ระยะไข่สุก) ทำให้ไม่สามารถนำไปทดสอบผสมกับน้ำเชื้อได้ อย่างไรก็ตามไม่สามารถเลี้ยงโอโอไซต์ปลาบึกด้วยสูตรอาหารที่เลี้ยงโอโอไซต์ปลาซวายได้

สามารถสรุปผลการเลี้ยงโอโอไซต์ปลาซวายได้ ดังนี้

- 1) L-15 medium เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ให้อัตราการรอดของโอโอไซต์ปลาซวายสูงสุด โดยค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 25 °C ให้อัตราการรอด 81±2 %
- 2) 25 °C เป็นอุณหภูมิบ่มที่เหมาะสมสำหรับโอโอไซต์ปลาซวาย โดยให้อัตราการรอดสูงสุดในการใช้อาหารเลี้ยงทั้ง 3 ชนิด
- 3) การเสริมฮอร์โมน LH ในอาหารเลี้ยง ให้อัตราการรอดของโอโอไซต์โดยรวมสูง และสามารถกระตุ้นโอโอไซต์ปลาซวายให้มีการพัฒนาจากระยะที่ 4 ไปสู่ระยะที่ 5 โดยความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 11 ng/ml ให้อัตราการรอด 89±2 % และมีการพัฒนา 10±2 %
- 4) การเสริม growth factor insulin ช่วยให้มีการพัฒนาของโอโอไซต์ปลาซวายได้ โดยเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 6 μ M ให้อัตราการรอด 57±9 % และมีการพัฒนา 18±2 %
- 5) การเสริม HCG และ IGF-I ในอาหาร L-15 medium บ่มที่ 25 °C ช่วยกระตุ้นให้มีการพัฒนาของโอโอไซต์ปลาซวายได้เล็กน้อย โดยมีค่าสูงที่ HCG 10 IU/ml ให้อัตราการรอด 42±10 % และมีการพัฒนา 7±1 % และ IGF-I 100 ng ให้อัตราการรอด 44±10 % และมีการพัฒนา 6±1 %
- 6) การเสริม estradiol, DHP และ FBS ในอาหาร L-15 medium ไม่มีผลต่อการพัฒนาของโอโอไซต์ปลาซวายระยะที่ 4

ในการวิจัยครั้งนี้ มีข้อจำกัดของตัวอย่างโอโอไซต์จากปลาซวายและปลาบึก ทำการเก็บได้เพียงปีละ 1 ครั้งเท่านั้น ปลาบึก 4-6 สัปดาห์ในช่วงเดือนพฤษภาคม-มิถุนายน และ

สำหรับปลาสวายในช่วงเดือนพฤษภาคม-ตุลาคม นอกจากนี้แม่ปลาบึกในฟาร์มเลี้ยงที่ให้โอโอไฮที่ระยะที่ 4 มีจำนวนน้อย ทำให้การทดลองเลี้ยงโอโอไฮที่ต้องดำเนินอย่างรีบเร่ง และต้องมีการรอดตัวอย่างโอโอไฮในรอบปีต่อไป แต่ได้แก้ไขปัญหาดังกล่าวโดยวางแผนการทดลองที่ไม่จำเพาะ เช่น การทดสอบสารดองไส้ การศึกษาลักษณะของโอโอไฮที่ระยะต่างๆ ให้ดำเนินการในช่วงนอกฤดูวางไข่ของปลาสวายและปลาบึก และใช้โอโอไฮของปลาดุกรัสเซียแทนในการทดลอง

บรรณานุกรม

- กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. การเก็บน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 128 หน้า.
- เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน. 2543. ปลาบึก. เอกสารเผยแพร่ ชุด โครงการ "อุตสาหกรรมสัตว์น้ำ" สกว. ชุดที่ 1. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.). 134 หน้า.
- เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, เทพรัตน์ อึ้งเศรษฐพันธ์, ทิพสุคนธ์ พิมพ์พิมล, อานุกาพ วรรณคณาพล และเขมชาติ จิวประเสริฐ. 2544. การศึกษาข้อมูลเบื้องต้นด้านการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ระดับฮอร์โมนเพศ และอายุของปลาบึกในแหล่งน้ำธรรมชาติ. วารสารการประมง 54 (3): 249-256.
- เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, จงกล พรหมยะ, อานุกาพ วรรณคณาพล, รัชต์ ชัดติยะ, จีระเดช มโนสร้อย และอรุณญา มโนสร้อย. 2547. ปริมาณฮอร์โมนเพศ การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในรอบปี และอายุของปลาบึกในบ่อดิน. วารสารการประมง 57(5): 447-452.
- เขมชาติ นิ่มสมบุญ, ยงยุทธ ทักษิณ และเกียรติคุณ เจริญสวรรค์. 2530. การเพาะพันธุ์ปลาบึกที่เลี้ยงในกระชัง. รายงานประจำปี สถานีประมงน้ำจืด นครสวรรค์. กองประมงน้ำจืด กรมประมง. หน้า 30-33.
- นฤพล สุขุมาสวิน และวัฒน์ สีสากิธร. 2537. วงจรการสืบพันธุ์ในรอบปีของแม่ปลาตะเพียนขาว. วารสารการประมง 47(1): หน้า 21-30. อ้างโดย เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, เทพรัตน์ อึ้งเศรษฐพันธ์, ทิพสุคนธ์ พิมพ์พิมล, อานุกาพ วรรณคณาพล และเขมชาติ จิวประเสริฐ. 2544. การศึกษาข้อมูลเบื้องต้นด้านการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ระดับฮอร์โมนเพศ และอายุของปลาบึกในแหล่งน้ำธรรมชาติ. วารสารการประมง 54(3): 249-256.
- ชะลอ ลิ้มสุวรรณ, ปวีณา กิจสวัสดิ์ และ สุปราณี ชินบุตร. 2530. เนื้อเยื่อของปลาดุกด้าน. กรุงเทพฯ: คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 138 หน้า.
- ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล, กำชัย ลาวัณยวุฒิ และสุจินต์ หนูขวัญ. 2539. การทดสอบประสิทธิภาพของฮอร์โมนสังเคราะห์ชนิดต่างๆในการเพาะขยายพันธุ์ปลาน้ำจืด. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 182 สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด. 23 หน้า.
- วิชัย ศรีสุวรรณทัช, มานพ ตั้งตรงไพโรจน์ และสมศักดิ์ ล้วนปรีดา. 2527. การอนุบาลปลาบึก. สถานีประมงน้ำจืดแห่งชาติ.
- วีระชัย โชติรัตนศักดิ์. 2535. การศึกษาลักษณะทางมิวติวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ในปลาบึก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาชีววิทยา, ภาควิชาสัตววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 75 หน้า.
- ธีรพันธ์ ภูคาสวรรค์. 2511. ปลาบึก. วารสารการประมง 21(3): 244-252.
- บัณฑิต ปิยะศิลป์. มปป. โครงการเชื่อมชนลุ่มน้ำโขง : ผลกระทบต่อวิถีชีวิตชาวประมงพื้นบ้านหลังจากการหายไปของน้ำท่าในแม่น้ำโขง. เข้าถึงได้จาก www.mekonglover.com/news_pop.asp?NewsId=126

- ยงยุทธ อุณากรสวัสดิ์. 2544. การเพาะพันธุ์ปลาบึกจากพ่อแม่พันธุ์ในบ่อเลี้ยงประสบ
ความสำเร็จครั้งแรกในโลก. ใน สมปอง วิชญวิเชียร. ปลาบึก : บันทึกเส้นทางอนุรักษ์
ปลาบึกสู่ทรัพยากรธรรมชาติที่ยั่งยืน. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า
13-25.
- เสนห์ ผลประสิทธิ์. 2526. การผสมเทียมปลาบึก. วารสารการประมง 36(4):347-360.
- เสนห์ ผลประสิทธิ์, มาโนช เบญจกาญจน์ และเรวัตร ฤทธาภรณ์. 2535. การพัฒนาระบบการ
เลี้ยงปลาบึกเชิงพาณิชย์. เอกสารวิชาการฉบับที่ 14. กองประมงน้ำจืด กรมประมง. 51
หน้า.
- เสนห์ ผลประสิทธิ์ และภาณุ เทวรัตน์มณีกุล. 2541. ชีวิตวิทยาและการเพาะเลี้ยงปลาบึก.
วารสารการประมง 51(2):107-115.
- เสนห์ ผลประสิทธิ์, ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล และกฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. การเพาะ
ขยายพันธุ์ปลาบึก. วารสารการประมง. 46(5) ก.ย.-ต.ค.: 339-415.
- โสม พัตรสันดร. 2510. การล่าปลาบึก. วารสารการประมง 20(1):225-231.
- อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2535. การเพาะขยายพันธุ์ปลา. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 239 หน้า.
- Ali, A., Coenen, K., Bousquet, D. and Sirard, M. 2004. Origin of bovine follicular fluid
and its effect during in vitro maturation on the developmental competence of
bovine oocytes. Therio. J. 62: 1596-1606.
- Augustine, A. and Anders, G. 2003. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic
proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary
implications of endocrine disruption. Comp. Hepa. 2: 4.
- Asturiano, J.F., Sorbera, L.A., Ramos, J., Kime, D.E., Carrillo, M. and Zanuy, S. 2002.
Group synchronous ovarian development, ovulation and spermiation in the
European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) could be regulated by shifts in
gonadal steroidogenesis. SCI. MAR., 66(3) : 273-282.
- Baird G. 1996. Khnoe Falls Fisheries. Mekong Fisheries Network Newsletter 2(2):1-5.
- Brooks, S., TYLER, C.R. and SUMPTER, J.P. 1997. Egg quality in fish: what makes a
good egg? Reviews in Fish Biology and Fisheries 7(4) : 387-416,
- Burgens, A.C.J. and Li, C.H. 1960. Amphibian ovulation in vitro induced by
mammalian pituitary hormones and progesterone. Endocrin. 66: 255-259.
- Ceda, J.L., Petrino, T.R., and Wallace, R.A. 1993. Functional heterologous gap junctions
in Fundulus ovarian follicles maintain meiotic arrest and permit hydration during

- oocyte follicles maintains meiotic arrest and permit hydration during oocyte maturation. *Dev. Biol.* 160: 228-235.
- Chang, X., Patino, R., Thomas, P., Yoshizaki, G. 1999. Developmental and protein kinase development regulation of ovarian connexin mRNA and oocyte maturational competence in Atlantic croaker. *Gen. Comp. Endocrinol.* 114: 330-339.
- Chaube, SK. and Haider, S. 1997. Effects of cAMP forskolin and cyanoketone on in vitro oocyte maturation in the catfish, *Clarias batrachus*. *J. Biol.* 22: 255-265.
- Chen, F.Y., M. Chow, T.M. Cho and R. Lim. 1977. Artificial Spawning and Larval Rearing of the Grouper, *Epinephelus tauvina* (Forsk.) in Singapore. Singapore. *J. Pri. Ind.* 5(1): 1-21.
- Dasgupta, S., Basu, D., Ravikumar, L. and Bhattacharya, S. 2001. Insulin alone can lead to a withdrawal of meiotic arrest in the carp oocyte. *J. Biosci.* 26: 341-347.
- Duan, C. 1997. The insulin-like growth factor system and its biological actions in fish. *Am. Zool.* 37: 491-503.
- Duan, C. 1998. Nutritional and development regulation of insulin-like growth factors in fish. *J. Nutr.* 128: 306-314.
- El-Etr, M., Schorderet-Slatkine, S., Baulieu, EE. 1979. Meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes initiated by insulin. *Sci.* 205: 1397-1399.
- Fontain, M. 1976. Hormones and the Control of Reproduction in Aquaculture. *J. Fish. Res. Can.* 33: 922-939.
- Fortune, J.E., Concannon, P.W. and Hansel, W. 1975. Ovarian progesterone levels in in vitro oocyte maturation and ovulation in *Xenopus laevis*. *Bio. Reprod.* 13: 561-567.
- Godeau, J.F., Schorderet-Slatkine, S., Hubert, P. and Baulieu, E-E. 1978. Induction of maturation in *Xenopus laevis* oocytes by a steroid linked to a polymer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 2353-2357.
- Goetz, F.W. 1983. Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes physiology. *J. Fish. Res. Can.* 117-170.
- Galbreath, P.F. and Thorgaard, G.H. 1995. Sexual maturation and fertility of diploid and triploid Atlantic salmon X brown trout hybrids. *Aquaculture* 137: 299-311.
- Goetz, F.W. and Thomas, P. 1995. Reproductive Physiology of Fish. Austin. TX: Fish Sym. 95: 293-295.

- Greeley, MS Jr., Begovac, PC., Wallace, RA. 1987. Removal of enveloping follicle cells can trigger resumption of meiotic maturation in *Fundulus heteroclitus* oocytes. J. Exp. Zool. 244: 177-180.
- Grigorescu, F., Baccara, M-T., Rouard, M., Renard, E. 1994. Insulin and IGF-I signaling in oocyte maturation. Horm. Res. 42: 55-61.
- Hirunyavasi, V. 1979. Biological and Immunological Studies on Urinary HCG from Patients with Gestational Trophoblastic Diseases 1979. Thesis submitted for Master Degree to Mahidol University. 127 p.
- Huat, K.K. 1980. Stimulation of ovarian maturation in fish by sustained hormone preparations. Horm. Res. 20: 275-280.
- Humason, G.L. 1979. Animal Tissue Techniques. W.H. Freeman and Company, San Francisco. 611 pp.
- Ishikawa, K., Hanaoka, Y., Kondo, Y. and Imai, K. 1977. Primary action of steroid hormone at the surface of amphibian oocyte in the induction of germinal vesicle breakdown. Mol. Cell. Endocrinol. 9: 91-100.
- Iwamatsu, T., Takahashi, SY., Sakai, N., Nagahama, Y. and Onitake, K. 1987. Induction and inhibition of in vitro oocyte maturation and production of steroids in fish follicles by forskolin. J. Exp. Zool. 241: 101-111.
- Jalabert, B. and Finet, B. 1986. Regulation of oocyte maturation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*: Role of cyclic AMP in the mechanism of action of the maturation inducing steroid (MIS), 17 α -hydroxy, 20 β -dihydro-progesterone. Fish. Physiol. Biochem. 2: 65-74.
- Juan, F.A., Lisa, A.S., Jesus, R., David, E. K., Manuel, C. and Silvia, Z. 2002. Group synchronous ovarian development, ovulation and spermiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) could be regulated by shifts in gonadal steroidogenesis. SCI. MAR. 66(3): 273-282.
- Kagawa, H., Kobayashi, M., Hasegawa, Y. and Aida, K. 1998. Insulin and insulin-like growth factor I and II induce final maturation of oocytes of red seabream, *Pagrus major*, in vitro. Gen. Comp. Endocrinol. 112: 80-88.
- Kagawa, H., Moriyama, S. and Kawauchi, H. 1995. Immunocytochemical localization of IGF-I in the ovary of red seabream, *Pagrus major*. Gen. Comp. Endocrinol. 99: 307-315.

- Kagawa, H. and Moriyama, S. 1995. Effects of insulin-like growth factor-I on final oocyte maturation of oocytes of red seabream, *Pagrus major*, *in vitro*. Gen. Comp. Endocrinol. 43: 345-347.
- Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K. and Hirose, K. 1994. Development of maturational competence of oocytes of red seabream, *Pagrus major*, after human chorionic gonadotropin treatment *in vitro* requires RNA and protein synthesis. Gen. Comp. Endocrinol. 94: 199-206.
- Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K. and Kobayashi, M. 1998. GTH II but not GTH I induces final maturation and the development of maturational competence of oocytes of red seabream *in vitro*. Gen. Comp. Endocrinol. 112: 80-88.
- Kanamori, A. and Nagahama, Y. 1988. Involvement of 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate in the control of follicular steroidogenesis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). Gen. Comp. Endocrinol. 72: 39-53.
- Kanamori, A., Adachi, S. and Nagahama, Y. 1988. Developmental changes in steroidogenic response of ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) to chum salmon gonadotropin during oogenesis. Gen. Comp. Endocrinol. 72: 13-24.
- Kanatani, H. 1964. Spawning of starfish : action of gamete-shedding substance obtained from radial nerves. Sci. 146: 1177-1179.
- Kanatani, H. and Hiramoto, Y. 1970. Site of action of 1-methyl-adenine in inducing oocyte maturation. Exp. Cell. Res. 61: 280-284.
- Kanatani, H. and Shirai, H. 1967. In vitro production of meiosis-inducing substance by nerve extract in ovary of starfish. Nat. L. 216: 284-286. Cited by Masui, Y. 2001. From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). Differ. 69: 1-17.
- Katsu, Y., Yamashita, M. and Nagahama, Y. 1999. Translational regulation of cyclin B mRNA by 17α , 20β - dihydroxy-4-pregnen-3-one (maturation-inducing hormone) during oocyte maturation in a teleost fish, the goldfish (*Carassius auratus*). Mol. & Cell. Endocrin. 158: 79-85.
- Kawauchi, H., Suzuki, K., Itoh, H., Swanson, P., Naito, N., Nagahama, Y., Nozaki, M., Nakai, Y. and Itoh, S. 1989. The duality of teleost gonadotropins. Fish. Physiol. Biochem. 7: 29-38.

- King, VW., Thomas, P., Harrell RM., Hodson, RG. and Sullivan, CV. 1994. Plasma levels of gonadal steroids during final oocyte maturation of striped bass, *Morone saxatilis* L. Gen. Comp. Endocrinol. 95: 178-191.
- King, VW., Thomas, P. and Sullivan, CV. 1995. Hormonal regulation of final maturation of striped bass oocytes *in vitro*. Gen. Comp. Endocrinol. 96: 223-233.
- Kishimoto, T. 1988. Regulation of metaphase by a maturation-promoting factor. Dev. Growth. Differ. 30: 105-115.
- Kobayashi, M., Aida, K., Furukawa, K., Law, YK., Moriwaki, T. and Hanyu, I. 1988. Development of sensitivity to maturation-inducing steroids in the oocytes of the daily spawning teleost, the kisu, *Sillago japonica*. Gen. Comp. Endocrinol. 72: 264-271.
- Kondo, T., Yanagawa, T., Yoshida, N. and Yamashita, M. 1997. Introduction of Cyclin B Induces Activation of the Maturation-Promoting Factor and Breakdown of Germinal Vesicle in Growing Zebrafish Oocytes Unresponsive to the Maturation-Inducing. Horm. Dev. Biol. 190: 142-152.
- Liu, Z. and Patino, R. 1993. High-affinity binding of progesterone to the plasma membrane of *Xenopus* oocytes: characteristics of binding and hormonal and developmental control. Biol. Reprod. 49: 980-988.
- Lubzens E., Young G., Bobe J. and Cerdà J. 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. General and Comparative Endocrinology 165 : 367–389.
- Maestro, MA., Planas, JV., Moriyama, S., Gutierrez, J., Planas, J. and Swanson, P. 1997. Ovarian receptors for Insulin and insulin-like growth factor I (IGF-I) and effects of IGF-I on steroid production by isolated follicular layers of the preovulatory coho salmon ovarian follicle. Gen. Comp. Endocrinol. 106: 189-201.
- Maestro, MA., Planas, JV., Swanson, P. and Gutierrez, J. 1995. Insulin-like growth factor I (IGF-I). Symp. Repro. Physio. Fish. 22: 279-283.
- Maller, JL. and Koontz, JW. 1981. A study of the induction of cell division in amphibian oocytes by insulin. Development Biological 85: 309-316.
- Maller, JL. 1985. Regulation of amphibian oocyte maturation. Cellular Differentiation 16: 211-221.

- Maneckjee, A., Weisbart, M. and Idler, DR. 1989. The presence of 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one receptor activity in the ovary of the brook trout, *Salvelinus fontinalis*, during terminal stage of oocyte maturation. *Fish. Physiol. Biochem.* 6: 19-38.
- Masui, Y. and Clarke, H.J. 1979. Oocyte maturation. *Intntl. Rev. Cytol.* 57: 185-282.
- Masui, Y. and Markert, C.L. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocyte. *Journal of Experimental Zoology* 117: 129-145.
- Masui, Y. 1976. Relative rates of the pituitary, follicle cells, and progesterone in the induction of oocyte maturation in *Rana pipiens*. *Journal of Experimental Zoology* 166: 365-376.
- Masui, Y. 2001. From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). *Differentiation* 69 (1): 1-17.
- Mishra, A., Joy, K.P. 2006. Effect of gonadotropin in vivo and 2-hydroxyoestradiol- 17β in vitro on follicular steroid hormone profile associated with oocyte maturation in the catfish *Heteropneustes fossilis*. *Society Endocrinology International* 33: 221-242.
- Miwa, S., Yan, L. and Swanson, P. 1994. Localization of two gonadotropin receptors in the salmon gonad by in vitro ligand autoradiography. *Biological Reproduction* 50: 629-642.
- Mongkonpanya K, Chairak N, Pupipat T and Tiersch TR. 1995. Cryopreservation of Mekong Giant Catfish sperm. *Asian Fisheries Science* 8(1995). Fisheries Society, Philipines:211-221.
- Nagahama, Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads. *Fish. Physiol.* 32: 223-275.
- Nagahama, Y. 1987. 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one: a teleost maturation-inducing hormone. *Dev. Growth. Differ.* 29: 1-12.
- Nagahama, Y. 1987. Endocrine control of oocyte maturation. *J. Exp. Zool.* 21: 171-202.
- Nagahama, Y. 1997. 17α , 20β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: Mechanisms of synthesis and action. *Steroids.* 62: 190-196.

- Nagahama, Y., Hirose, K., Young, G., Adachi, S., Suzuki, K. and Tamoki, B. 1983. Relative in vitro effectiveness of 17α , 20β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one and other pregnene derivatives on germinal vesicle breakdown in oocytes of ayu (*Plecoglossus altivelis*), amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*), rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and goldfish (*Carassius auratus*). Gen. Comp. Endocrinol. 51: 15-23.
- Nagahama, Y. and Adachi, S. 1985. Identification of a maturation-inducing steroid in a teleost, the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). Dev. Biol. 109: 428-435.
- Nagahama, Y., Kagawa, H. and Young, G. 1985. Stimulation of 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one production in the granulosa cells of amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*, by cyclic nucleotides. J. Exp. Zool. 236: 371-375.
- Nagahama, Y., Yamashita, M., Tokumoto, T. and Katsu, Y. 1995. Regulation of oocyte maturation in fish. Curr. Top. Dev. Biol. 30: 103-145.
- Negatu, Z., Hsiao, SM. and Wallace, RA. 1998. Effects of insulin-like growth factor-I on final oocyte maturation and steroid production in *Fundulus heteroclitus*. Fish. Physiol. Biochem. 18: 13-21.
- Ngamvongchon, S. 1981. A preliminary Study of Hormone from the Urine of Pregnant Woman to Induce Some Freshwater Fishes Spawning in Thailand. 1981. Thesis submitted for Master Degree to Mahidol University. 62 pp.
- Patino, R. and Kagawa, H. 1999. Regulation of gap junctions and oocyte maturational competence by gonadotropin and insulin-like growth factor-I in ovarian follicles of red seabream. Gen. Comp. Endocrinol. 115: 454-462.
- Patino, R. and Thomas, P. 1990. Characterization of membrane receptor activity for 17α , 20β , 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one in ovaries of spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*). Gen. Comp. Endocrinol. 78: 204-217.
- Patino, R. and Thomas, P. 1990. Induction of maturation of Atlantic croaker oocytes by 17α , 20β , 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one in vitro: consideration of some biological and experimental variables. J. Exp. Zool. 255: 97-109.
- Petrino, T R, Lin, Y-WP. and Wallace, RA.. 1989. Steroidogenesis in *Fundulus heteroclitus*. I. Production of 17α -hydroxy, 20β -dihydroprogesterone, testosterone, and 17β -estradiol by prematurational follicles *in vitro*. Gen. Comp. Endocrinol. 73: 147-156.
- Pillay, T.V.R. 1979. Aquaculture Development in China. ADCP. REP. 79: 10-20 p.

- Planas, J.V. and Swanson, P. 1995. Maturation associated changes in the response of the salmon testis to the steroidogenic actions of gonadotropins (GTH I and GTH II) *in vitro*. Biol. Reprod. 52: 697-704.
- Poretsky, L., Cataldo, N.A., Rosenwaks, Z., Guidice, L.C. 1999. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. Endocr. Rev. 20: 535-582.
- Schuetz, A.W. 1967. Action of hormones on germinal vesicle breakdown in frog oocytes *Rana pipiens in vitro*. J. Exp. Zool. 166: 347-354.
- Sire, O. and Depeche, J. 1981. In vitro effect of a fish gonadotropin on aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities in the ovary of rainbow trout. Reprod. Nutr. Dev. 21: 715-726.
- Smith, L.D. and Ecker, R.E. 1969. Role of oocyte nucleus in physiological maturation in *Rana pipiens*. Dev. Biol. 19: 281-309.
- Smith, L.D., Ecker, E.R. and Suthelney, S. 1968. In vitro induction of physiological maturation in *Rana pipiens* oocytes from ovarian follicles. Dev. Biol. 17: 627-643.
- Srivastava, R.K. and Van Der Kraak, G. 1994. Regulation of DNA synthesis in goldfish vitellogenic ovarian follicles by hormones and growth factors. J. Exp. Zool. 270: 263-272.
- Sundararaj, B.I., Goswami, V.S. and Lamba, V. 2002. Some aspects of oocyte maturation in catfish. Am. Zool. (abstract).
- Suwa K. and Yamashita M. 2007. Chapter 11: Regulation mechanisms of oocyte maturation and ovulation. In Babin P.J., Cerdà J. and Lubzens E. (editors). 2007. The Fish Oocyte. Springer, USA.
- Suzuki, K., Kawauchi, H., Nagahama, Y. 1988. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. Gen. Comp. Endocrinol. 71: 292-301.
- Swason, P. 1991. Salmon gonadotropins: Reconciling old and new ideas. Fish. Symp. 91:2-7.
- Taghon, M.S. and Sadler, S.E. 1994. Insulin-like growth factor I receptor-mediated endocytosis in *Xenopus laevis* oocytes. Dev. Biol. 163: 66-74.
- Tapiador, D.D. 1976. Freshwater Fisheries and Aquaculture in China. FAO. Fish. Tech. Pap. 168: 50-51.

- Thomas, P. and Patino, R. 1991. Changes in 17α , 20β , 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one membrane receptor concentrations in ovaries of spotted seatrout during final oocyte maturation. *East. An. Uni.* 11:122-124.
- Thomas, P., Breckenridge-Miller, D. and Detweiler, C. 1997. Binding characteristics and regulation of the 17α , 20β , 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (20β -S) receptor on testicular and sperm plasma membranes of spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*). *Fish. Physiol. Biochem.* 17: 109-116.
- Thomas, P. and Das, S. 1997. Correlation between binding affinities of C21 steroid for the maturation-inducing steroid membrane receptor in spotted seatrout ovaries and their agonist and antagonist activities in an oocyte maturation bioassay. *Biol. Reprod.* 57: 999-1007.
- Thomas, P. and Ghosh, S. 1995. Regulation of the maturation-inducing receptor in spotted seatrout ovaries. *Fish. Physiol. Biochem.* 22: 376-386.
- Thomas, P. 1994. Hormonal control of final oocyte maturation in sciaenid fishes. *Comp. Endocrin.* 45: 619-625.
- Tokumoto, T., Tokumoto, M., Horiguchi, R., Ishikawa, K. and Nakahama, Y. 2004. Diethylstilbestrol induces fish oocyte maturation. *PNAS.* 101(10): 3686-3690.
- Trant JM. and Thomas P. 1989. Isolation of a novel maturation-inducing steroid produced in vitro by ovaries of Atlantic croaker. *Gen. Comp. Endocrinol.* 75: 397-404.
- Trant, J. M., Thomas, P. and Shackleton, C. H. L. 1986. Identification of 17α , 20β , 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one as the major ovarian steroid produced by the teleost *Microponias undulates* during final oocyte maturation. *Steroids.* 47: 89-99.
- Upadhyaya, H. and Haider, S. 2004. Germinal vesicle breakdown in oocytes of catfish, *Mystus vittatus* (Bloch): Relative in vitro effectiveness of estradiol- 17β , androgens, corticosteroids, progesterone, and other pregnene derivatives. *Am. Zool.* 22: 456-467.
- Van Der Kraak, G. and Donaldson, EM. 1986. Steroidogenic capacity of coho salmon ovarian follicles throughout the periovulatory period. *Fish. Physiol. Biochem.* 1: 179-186.
- Wallace, R.A. and Selman, K. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Am. Zool.* 21: 325-343.

- Wani, NA. 2002. In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. *Small Rum.* 44: 89-95.
- Wasserman WJ. and Smith LD. 1978. Oocyte maturation in nonmammalian vertebrates. *Am. Zool.* 89: 443-468.
- Webber, GM. and Sullivan, CV. 2000. Effects of insulin-Like Growth Factor-I on In Vitro Final oocyte Maturation and ovarian Steroidogenesis in Striped Bass, *Morone saxatilis*. *Biol. Reprod.* 63: 1049-1057.
- Weber, GM., King, W., Hodson, RG. and Sullivan CV. 1997. Effects of insulin-like growth factor I on steroidogenesis and oocyte maturation in temperate basses (gene *Morone sp.*). *Am. Zool.* 37: 112 (abstract).
- Wright, P.A. 1961. Induction of ovulation in vitro in *Rana pipens* with steroids. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1: 20-23.
- Yan, L., Swanson, P. and Dickhoff, WW. 1992. A two-receptor model for salmon gonadotropins (GTH I and GTH II). *Biol. Reprod.* 47: 418-427.
- York, WS., Patino, R. and Thomas, P. 1993. Ultrastructural changes in follicle cell oocytes associations during development and maturation of the ovarian follicle in Atlantic croaker. *Gen. Comp. Endocrinol.* 92: 402-418.
- Yoshikuni, M., Matsushita H., Shibata N. and Nagahama, Y. 1994. Purification and characterization of 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one-binding protein from plasma of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 96: 189-196.
- Yoshikuni, M. and Nagahama, Y. 1993. Specific binding of [3 H] 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one to oocyte cortices of rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish. Physiol. Biochem.* 11: 15-24.
- Yoshikuni, M. and Nagahama, Y. 1994. Involvement of an inhibitory G-protein in the signal transduction pathway of maturation-inducing hormone (17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one) action in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) oocytes. *Dev. Biol.* 166: 615-622.
- Yoshizaki, G., Patino, R. and Thomas, P. 1994. Connexin messenger ribonucleic acids in the ovary of Atlantic croaker: molecular cloning and characterization, hormonal control, and correlation with appearance of oocyte maturational competence. *Biol. Reprod.* 51: 493-503.

- Young, G., Adachi, S. and Nagahama, Y. 1986. Role of ovarian thecal and granulosa layers in gonadotropin-induced synthesis of a salmonid maturation-inducing substance (17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one). *Dev. Biol.* 118: 1-8.
- Young, G., Crim, L.W., Kagawa, H., Kambegawa, A. and Nagahama, Y. 1983. Plasma 17α , 20β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one levels during sexual maturation of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*): correlation with plasma gonadotropin and in vitro production by ovarian follicles. *Gen. Comp. Endocrinol.* 51: 96-106.
- Young, G., Kagawa, H. and Nagahama, Y. 1982. Oocyte maturation in the amago salmon (*Oncorhynchus rhodorus*): in vitro effects of salmon gonadotropin, steroids and cyanoketone (an inhibitor of 3β -hydroxy-D5 –steroid dehydrogenase). *J. Exp. Zool.* 224: 265-275.
- Yueh, W.S. and Chang, C.F. 2000. Morphological Changes and Competence of Maturing oocytes in the Protandrous Black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. *Zoo. Stud.* 39(2): 114-122.
- Zhu, L., Olan, N., Agazie, Y., Cummings, C., Farah, S. and Liu, X.J. 1998. Molecular cloning and characterization of *Xenopus* insulin-like growth factor I receptor: its role in mediating insulin-induced *Xenopus* oocytes maturation and expression during embryogenesis. *Endocrinol.* 139: 949-954.
- Zwarenstein, H. 1937. Experimental induction of ovarian with progesterone. *Nature. L.* 139: 112-113.