การพัฒนาโอโอไซต์ปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) ในห้องทดลองโดยอาหารเลี้ยงเซลล์ อุณหภูมิ และฮอร์โมน

In vitro maturation of asian catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) oocyte by media, temperature and hormones

จริยา เทพณรงค์[1] และ จิราพร โรจน์ทินกร[1]

[1]คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

ศึกษาการพัฒนาโอโอไซท์ปลาสวายด้วยวิธีการ In vitro maturation (IVM) โดยการใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ 3 ชนิด ได้แก่ Leibovitz's L15, Dulbecco's Modified Eagle Medium และ M-199 medium ที่อุณหภูมิบ่ม 23, 25 และ 28°C และการใช้ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของโอโอไซท์ 4 ชนิด ได้แก่ human chorionic gonadotro-pin (hCG), Luteinizing hormone (LH), 17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) และ Estradiol -17β ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเลี้ยงโอโอไซท์ด้วย M-199 medium ที่อุณหภูมิ 25°C ทำให้สภาพเซลล์และอัตรารอดของโอโอไซท์ดีที่สุด จากการใช้ฮอร์โมน พบว่า Luteinizing hormone (LH) ที่ความเข้มข้น 11 และ 33 ng/ml มีการพัฒนาของโอโอไซท์จากระยะ germinal vesicle migration (GVM) ไปเป็น germinal vesicle beak down (GVBD)

Abstract

In vitro maturation of Asian Catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) oocyte was studied using in 3 culture media (Leibovitz's L15, Dulbecco's Modified Eagle Medium and M-199 medium), at 3 temperatures (23, 25 and 28 ^{O}C) and 4 oocyte maturation hormones (human chorionic gonadotropin (hCG), Luteinizing hormone (LH), 17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) and Estradiol -17β). The results showed that M-199 medium at 25 ^{O}C showed satisfied oocyte form and high survival rate. The culture oocytes with Luteinizing hormone (LH) at 11 and 33 ng/ml induced the oocyte development from the germinal vesicle migration (GVM) stage to germinal vesicle breakdown (GVBD).

คำนำ

การเลี้ยงโอโอไซท์ให้มีการพัฒนาในห้องทดลอง (*in vitro* maturation, IVM) เป็นการนำเอาโอโอไซท์มาเลี้ยงด้วยอาหารที่เหมาะสม โดยควบคุมสิ่งแวดล้อมและปัจจัยต่างๆ ให้ใกล้เคียงกับการพัฒนาของโอโอไซท์ตามธรรมชาติ เทคนิคนี้มีการใช้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด เช่น การใช้ bovine follicular fluid ในการพัฒนาโอโอไซท์ (*in vitro* maturation) และ การปฏิสนธิ (*in vitro* fertilization) ของวัวในห้องทดลอง (Ali *et al*, 2004), การพัฒนาโอโอไซท์และปฏิสนธิแกะในห้องทดลอง (Wani, 2002) เป็นต้น

ต่อมาได้มีการนำเทคนิค IVM มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาของโอโอไซท์ในสัตว์น้ำ เช่น การศึกษา Maturation-Promoting Factor (MPF) และ Cytostatic Factor (CSF) ที่มีผลต่อการพัฒนาโอโอไซท์และเอมบริโอของกบ (*Xenopus laevis*), การศึกษาผลของ Cyclin B ต่อการพัฒนาโอโอไซท์ในปลาม้าลาย (*Danio rerio*) (Kondo *et al*. 1997), การศึกษากายวิภาคการพัฒนาของโอโอไซท์โดยฮอร์โมนเพศต่างๆในปลา Protandrous Black Porgy (*Acanthopagrus schlegeli*) (Yueh and Chang, 2000) และการใช้อินซูลินเพียงอย่างเดียวในการพัฒนาโอโอไซท์ในปลา Indian carp (*Labeo rohita*) (Dasgupta *et al*, 2001) เป็นต้น

ในกลุ่มปลา catfish ได้มีการพัฒนาโอโอไซท์ของ ปลาจีด (*Heteropneustes fossilis*) ในแบบ in vivo โดย ฮอร์โมนประเภทโกนาโดโทรปิน (gonadotropin) และ แบบ in vitro โดย 2-hydroxyoestradiol-17β (Mishra and Joy, 2006) อีกทั้ง การศึกษา cyanoketone (CK) ซึ่งมีผลต่อ cAMP และ forskolin (FK) ต่อการพัฒนาโอโอไซท์ในปลาดุกด้าน (*Clarias batrachus*) โดยใช้เทคนิค in vitro maturation (Chaube and Haider, 1997)

ในงานวิจัยนี้ได้ทดสอบการพัฒนาของโอโอไซท์ปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) โดยการแปรผันชนิดอาหารเลี้ยงเซลล์ อุณหภูมิบ่ม และฮอร์โมน เพื่อศึกษาประสิทธิผลของสารเหล่านี้ และปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาโอโอโซท์ในห้องทดลอง คาดว่าผลของงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นประโยชน์ต่อการเลี้ยงโอโอไซท์ของปลากลุ่ม Pangasianodon ให้สุกในห้องทดลอง ซึ่งจะประยุกต์ใช้กับปลาชนิดที่ใกล้จะสูญพันธุ์ ได้แก่ ปลาบึก ได้

อุปกรณ์และวิธีการ

ปลาสวายตัวอย่าง และการเก็บตัวอย่างโอโอไซท์

ปลาสวายเพศเมีย อายุ 3 ปี (น้ำหนัก 1.5 - 2 กิโลกรัม) ทำการเก็บตัวอย่างโอโอไซท์ โดยวิธีการ Cathetor ตรวจสอบระยะของโอโอไซท์โดยใช้สารดองใส (Clearing solution) ethanol: formalin: glacial acetic acid (6:3:1) (จิราพร และจริยา, 2549) โดยโอโอไซท์ที่จะนำมาทดลองจะอยู่ในระยะที่ 4 (postvitellogenic oocyte) ซึ่งจะสังเกตเห็น GV (germinal vesicle) อยู่บริเวณตรงกลางเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

สารเคมี

อาหารเลี้ยงเซลล์ 3 ชนิด คือ 1) Leibovitz L-15 medium ที่ประกอบด้วย 25 mM HEPES, 0.2 mg/ml gentamycin sulphate และ streptomycin 1% 2) DMEM/F-12 ที่ประกอบด้วย 1% penicillin-streptomycin และ 25 mM HEPES 3) M-199 medium ที่ประกอบด้วย 1% penicillin-streptomycin ซึ่งสั่งซื้อจากบริษัท Gibthai company

ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของโอโอไซท์ 4 ชนิด คือ human Chorionic Gonadotropin (hCG), Luteinizing hormone (LH), 17α,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) และ Estradiol-17β (E_2) ซึ่งสั่งซื้อจากบริษัท Sigma Chemical company, USA

การเลี้ยงโอโอไซท์ (In vitro incubation)

นำโอโอไซท์ระยะที่ 4 ล้างในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่จะทำการทดลอง (L-15, DMEM/F-12 หรือ M-199) ซึ่งจะประกอบด้วย 1% penicillin-streptomycin) ต่อจากนั้น แบ่งโอโอไซท์ 30-35 โอโอไซท์ ใส่ในเพลทที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ 3 ml ซึ่งชุดการทดลองจะแบ่งตามการแปรผัน อุณหภูมิ 3 ระดับ (23, 25 และ 28°C) ซึ่งแต่ละอุณหภูมิจะมีการแปรผันอาหารเลี้ยงเซลล์ 3 ชนิด (L-15, DMEM/F-12 และ M-199) โดยอาหารเลี้ยงแต่ละชนิดมีการแปรผันความเข้มข้นของฮอร์โมน 4 ชนิด ตามลำดับ โดยชุดควบคุมจะเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากฮอร์โมน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การตรวจผล และ การวิเคราะห์ข้อมูล

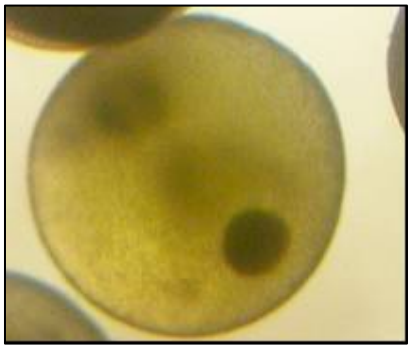
สังเกตการณ์พัฒนาของโอโอไซท์จากการเคลื่อนที่ของนิวเคลียส (Germinal vesicle, GV) โดยเก็บตัวอย่างหลังจากการเลี้ยงในชั่วโมงที่ 6, 12, 18, 24, 30 และ 36 ตามลำดับ ซึ่งโอโอไซท์ที่เก็บจากอาหารเลี้ยงเซลล์ จะทำการล้างด้วย Ringer's solution ก่อนใส่สารดองใส (clearing solution) ethanol: formalin :glacial acetic acid (6:3:1) เพื่อให้สังเกตเห็นตำแหน่งนิวเคลียสได้ง่ายขึ้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ่ายรูป และบันทึกผลการทดลองจำนวนโอโอไซท์ที่ยังคงอยู่ที่ระยะที่ 4, โอโอไซท์ที่มีการเคลื่อนที่ของนิวเคลียส (ระยะที่ 5-6) และอัตรารอดของโอโอไซท์

วิเคราะห์หาความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยทางสถิติ Analysis of Variance (ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ย Least Significant Different test (LSD) โดยใช้โปรแกรม Statistic Package for Social Science (SPSS)

ผลการศึกษา

โอโอไซท์ที่เก็บตัวอย่างได้ ส่วนใหญ่อยู่ในระยะ 4 สังเกตได้จากนิวเคลียสที่อยู่ตรงกลางเซลล์ดังรูปที่ 1 หลังจากการทดลองเลี้ยง 36 ชั่วโมง และมีบางส่วนของโอโอไซท์ที่มีการพัฒนา (ระยะ 5) ดังรูปที่ 2

ภาพที่ 1 ลักษณะของโอโอไซท์ระยะที่ 4 (จากระยะเริ่มต้นของการเลี้ยง) หลังจากเลี้ยงได้ 24 ชั่วโมงในอาหาร L-15 ที่ประกอบด้วย LH 11ng/ml ซึ่งมีขนาด ~500μm



ภาพที่ 2 โอโอไซท์ระยะที่ 5 ซึ่งมีการเคลื่อนที่ของนิวเคลียส (germinal vesicle migration, GVM) จากการเลี้ยงด้วยอาหาร L-15 ด้วยฮอร์โมน LH 11ng/mlในชั่วโมงที่ 30 ขนาด ~500μm

ผลการพัฒนาของโอโอไซท์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Leibovitz's L15 medium (L-15), M-199 medium (M-199) และ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) อุณหภูมิ 23, 25 และ 28°C โดยมีการแปรผันฮอร์โมนที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางที่1

ตารางที่ 1 ผลการทดลองเลี้ยงโอโอไซท์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ อุณหภูมิบ่ม และความเข้มข้นของฮอร์โมนต่าง ๆ

Hormones & Concentration		23°C						25°C						28°C					
		L-15		M-199		DMEM		L-15		M-199		DMEM		L-15		M-199		DMEM	
		%immature	%mature	%immature	%mature	%immature	%mature	%immature	%mature	%immature	%mature	%immature	%mature	%immature	%mature	%immature	%mature	%immature	%mature
HCG	control	61	0	50	0	38	0	81	0	61	0	70	0	31	0	69	0	20	0
	10 IU/ml	41	0	47	0	0	0	42	7	89	0	59	0	40	0	69	0	34	0
	30 IU/ml	34	0	52	0	0	0	54	1	86	0	54	0	62	0	43	0	29	0
	50 IU/ml	49	0	72	0	0	0	41	0	76	0	52	0	21	0	36	0	26	0
	100 IU/ml	42	0	59	0	0	0	61	0	64	0	63	0	36	0	41	0	38	0
Estradiol	20 nM	74	0	88	0	74	0	50	0	52	0	28	0	38	0	32	0	17	0
	50 nM	73	0	58	0	43	0	51	0	53	0	28	0	47	0	42	0	27	0
	100 nM	73	0	73	0	32	0	59	0	50	0	22	0	21	0	38	0	31	0
	200 nM	71	0	41	0	52	0	40	0	32	0	30	0	23	0	46	0	32	0
DHP	200 nM	57	0	38	0	89	0	31	0	31	0	33	0	42	0	33	0	17	0
	300 nM	40	0	32	0	56	0	39	0	31	0	30	0	40	0	23	0	38	0
	500 nM	53	0	38	0	43	0	79	0	20	0	23	0	21	0	31	0	38	0
	1000 nM	30	0	41	0	40	0	34	0	42	0	36	0	26	0	37	0	41	0
	1500 nM	32	0	37	0	34	0	33	0	38	0	38	0	11	0	8	0	10	0
LH	11 ng/ml	23	2	31	2	24	0	89	10	76	1	31	1	64	0	41	1	34	0
	33 ng/ml	36	9	41	7	28	0	74	3	91	6	50	1	52	0	78	0	46	0
	100 ng/ml	33	2	36	3	26	0	92	4	79	3	37	3	76	2	68	0	37	0
	300 ng/ml	40	3	36	3	24	0	66	8	92	6	61	0	69	0	67	0	23	0

วิจารณ์ผล

โอโอไซท์ที่มีการพัฒนาถึงระยะที่ 5 (mature) คือ โอโอไซท์ที่เลี้ยงด้วย Luteinizing hormone (LH) ที่ 23 และ 25 ^{O}C ในอาหาร M-199 และ L-15 นิวเคลียสยังคงอยู่ตรงกลางเซลล์ โดยสังเกตเห็นการเคลื่อนที่ของนิวเคลียสไปทางด้าน animal pole ของเซลล์โอโอไซท์ แต่โอโอไซท์ที่เลี้ยงในอาหาร M-199 ที่อุณหภูมิ 25 ^{O}C ให้เปอร์เซ็นต์มีชีวิต และ immature สูงกว่า

มีรายงานว่า Estradiol และ human chorionic gonadotropin (hCG) ไม่สามารถกระตุ้นให้โอโอไซท์ของ Striped Bass, *Morone saxatilis* พัฒนาจนถึงขั้นสมบูรณ์ได้ใน IVM (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) และมีการใช้ร่วมกับ cAMP forskolin และ cyanoketone ในการพัฒนาโอโอไซท์ปลาดุกด้าน (*Clarias batrachus*) ในห้องทดลอง เพื่อให้โอโอไซท์พัฒนาจนถึงระยะสุดท้าย (Chaube and Haider, 1997) แสดงให้เห็นว่าสารทั้งสามชนิดเพียงอย่างเดียวให้การพัฒนาโอโอไซท์นี้ไม่สามารถทำให้โอโอไซท์ในกลุ่มปลา Catfish พัฒนาจนถึงระยะสุดท้ายได้ อาจจะต้องมีใช้ควบคู่กับสารชนิดอื่นเพื่อเป็นการเสริมฤทธิ์ต่อไป

จากความรู้ที่ว่า โกนาโดโทรปินที่ปลาผลิตขึ้นเอง (endogernous gonadotropin) หรือ โกนาโดโทรปินที่ฉีดเข้าไป (exogernous gonadotropin) มีผลทำให้รังไข่หรืออัณฑะสร้างฮอร์โมนเพศ ส่งผลให้ไข่และสเปิร์มมีความพร้อมในการปฏิสนธินั้น ทำให้มีการฉีดฮอร์โมนเพศเข้าไปในพ่อแม่พันธุ์โดยตรง เพื่อเร่งความสมบูรณ์เพศ (Huat,1980) แนวทางดังกล่าวได้เริ่มมีการประยุกต์อย่างแพร่หลายในแม่ปลาแต่ก็พบว่าประสบความสำเร็จในปลาบางชนิดเท่านั้น เช่น การฉีดฮอร์โมน 17α, 20β, 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one ในแม่ปลาก็สามารถเร่งให้มีการพัฒนาของโอโอไซท์สู่ระยะสุดท้าย และตกไข่ได้ โดยไม่ต้องใช้โกนาโดโทรปินเลย (Trant *et al*, 1986) ส่วนใหญ่แม่ปลาที่ได้รับการฉีดฮอร์โมนเพศจะตกไข่ได้จะต้องมีโอโอไซท์ระยะท้ายๆ เท่านั้น เนื่องจากการฉีดฮอร์โมนเพศจะทำให้ระดับฮอร์โมนเพศในพลาสมาสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ในระยะเวลาสั้นๆ ฉะนั้นโอโอไซท์ที่ตอบสนองได้ดีต้องเป็นโอโอไซท์ระยะท้าย ในแม่ปลาที่มีโอโอไซท์ระยะต้น เมื่อได้รับการฉีดฮอร์โมนเพศจะตอบสนองไม่ดี เนื่องจากต้องใช้ระยะเวลาในการพัฒนาของโอโอไซท์ ในขณะที่ฮอร์โมนเพศมีฤทธิ์ในระยะเวลาสั้น จึงไม่สามารถทำให้ตกไข่ได้ (ภานุ และคณะ, 2539)

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า การใช้ฮอร์โมนเพียงชนิดเดียวในการเลี้ยงโอโอไซท์ปลาสวายในห้องทดลองไม่สามารถทำให้โอโอไซท์พัฒนาได้อย่างสมบูรณ์ ต้องมีการใช้ฮอร์โมนร่วม เช่น LH เป็นต้น นอกจากนี้

จะทำการวิจัยสร้างสูตรผสมอาหารเลี้ยงเซลล์ และการเสริมด้วยสารอื่น เช่น growth factor เป็นต้น เพื่อให้ได้โอโอไซท์ที่พัฒนาสมบูรณ์และใช้ในการปฏิสนธิต่อไปได้

คำขอบคุณ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ รหัสโครงการ MRG4680067

บรรณานุกรม

จิราพร โรจน์ทินกร และจริยา เทพณรงค์. 2549. เทคนิคการศึกษาเนื้อเยื่อและเซลล์ของโอโอไซท์ในกลุ่มปลา Catfish. การประชุมวิชาการประมง ประจำปี 2549 กรมประมง กรุงเทพฯ.

ภานุ เทวรัตน์มณีกุล, กำชัย ลาวัณยวุฒิ และสุจินต์ หนูขวัญ. 2539. การทดสอบประสิทธิภาพของฮอร์โมนสังเคราะห์ชนิดต่างๆในการเพาะขยายพันธุ์ปลาน้ำจืด. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 182 สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด. 23 หน้า.

Mishra, A., Joy, K.P. 2006. Effect of gonadotropin in vivo and 2-hydroxyoestradiol-17 β *in vitro* on follicular steroid hormone profile associated with oocyte maturation in the catfish *Heteropneustes fossilis*. Society for Endocrinology, India.33 pp.

Ali, A., Coenen, K., Bousquet, D., Sirard, M. 2004. Origin of bovine follicular fluid and its effect during in vitro maturation on the developmental competence of bovine oocytes. Theriogenology. 62: 1596-1606.

Webber, Gregory M. and Sullivan, Craig V. 2000. Effects of insulin-Like Growth Factor-I on In Vitro Final oocyte Maturation and ovarian Steroidogenesis in Striped Bass, *Morone saxatilis*. Biology of Reproduction. 63: 1049-1057.

Huat, K.K.. 1980. Stimulation of ovarian maturation in fish by sustained hormone preparations. Aquaculture. 20: 275-280.

Wani, N.A. 2002. In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. Small Ruminant Research. 44: 89-95.

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.

Chaube, Shail K. and Haider, S.1997. Effects of cAMP forskolin and cyanoketone on in vitro oocyte maturation in the catfish, *Clarias batrachus*. *J. Biosci*. 22: 255-265.

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 Hormone. Developmental Biology. 190: 142-152.

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.

Katsu,Y., Yamashita, M., 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*). Molecular and Cellular Endocrinology. 158: 79-85.