ผลของฮอร์โมนและสารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตริน ต่อพัฒนาการของรังไข่ปลากดแก้ว

Effectiveness of Hormone and Cyclodextrin Complex on Gonadal Development of Red-tail Catfish, *Hemibagrus wyckioides* (Fang and Chaux, 1949)

วิศณุพร รัตนตรัยวงศ์

Wisanuporn Ratanatrivong

ผู้รับผิดชอบ: ศูนย์วิจัยและทดสอบพันธุ์สัตว์น้ำอุตรดิตถ์ 34 หมู่ 10 ตำบลวังแดง อำเภอตรอน จังหวัดอุตรดิตถ์ 53140

โทรศัพท์ 055-491002

Corresponding author: Uttaradit Fisheries Test and Research Center, 34 Moo 10 tumbon Wangdaeng

บทคัดย่อ

การทดลองฉีดสารไซโคลเด็กซ์ตริน (Heptakis–(2,6–di–O–ethyl)–β–cyclodextrin) และฮอร์โมน LHRH (des–Gly^{10}–,[D–Ala^{6}]–LH–RH) ในรูประบบนำส่ง (LHRH-CDs) และฉีดฮอร์โมน LHRH ในอัตรา 30 ไมโครกรัม/กิโลกรัม และน้ำมัน arachis ในปลากลุ่มควบคุม เพื่อเปรียบเทียบผลระหว่างฮอร์โมน LHRH กับฮอร์โมน LHRH-CDs แบ่งออกเป็น 3 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองมี 5 ซ้ำ ฉีดฮอร์โมนให้กับปลากดแก้วเพศเมียที่มีความสมบูรณ์เพศใน 3 ช่วง คือ ช่วงมีความสมบูรณ์เพศต่ำ ปานกลาง และความสมบูรณ์เพศสูง แล้วนำ plasma ที่เก็บจากเลือดปลาที่ระยะเวลาหลังฉีดฮอร์โมน 30 วันไปวัดระดับฮอร์โมน estradiol ค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์ (GSI) และระยะพัฒนาการของไข่ในรังไข่ ดำเนินการศึกษาในเดือนเมษายน - กรกฎาคม 2550 ที่ศูนย์วิจัยและทดสอบพันธุ์สัตว์น้ำอุตรดิตถ์ จังหวัดอุตรดิตถ์ ผลการทดลองพบว่า ค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์และปริมาณฮอร์โมน Estradiol ของแม่ปลากดแก้วที่ได้รับฮอร์โมนในแต่ละชุดการทดลองไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) ในแต่ละช่วงเวลาของการทดลอง และไม่มีผลร่วมระหว่างการใช้ฮอร์โมนและช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ($p>0.05$) โดยอิทธิพลร่วมของฮอร์โมนและช่วงฤดูผสมพันธุ์มีผลให้แม่ปลากดแก้วมีพัฒนาของไข่ในระยะ mature ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่การพัฒนาของไข่ในระยะ immature และ atretic แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และการพัฒนาของไข่ในระยะ maturing แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) โดยพบไข่ในระยะนี้มากที่สุดในชุดที่ได้รับฮอร์โมน LHRH ซึ่งไม่แตกต่างจากชุดที่ได้รับฮอร์โมน LHRH-CDs แต่แตกต่างจากชุดควบคุม โดยชุดควบคุมกับชุดที่ได้รับฮอร์โมน LHRH-CDs ไม่แตกต่างกัน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารไซโคลเด็กซ์ตรินและฮอร์โมน LHRH ในระบบนำส่งของการทดลองนี้มีประสิทธิภาพออกฤทธิ์แบบเนิ่นนานในระดับต่ำเนื่องมาจากการประยุกต์ใช้กับปลายังไม่เหมาะสม และ/หรือใช้ฮอร์โมน LHRH ในปริมาณน้อยเกินไป และเกิดจากการยับยั้งฮอร์โมน $LHRH_a$ จากกลไก

dopaminergic inhibition ในตัวปลา แต่ผลของสารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กตรินอาจส่งผลให้มีการพัฒนาของไข่ในปลาชุดที่ฉีดฮอร์โมนจนทำให้มีไข่ระยะ maturing และ atretic มากกว่าปลาชุดควบคุม

คำสำคัญ ปลากดแก้ว, สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตริน, ฮอร์โมน Estradiol, ค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์ (GSI), พัฒนาการของรังไข่

ABSTRACT

This study aimed to investigate the effectiveness of LHRH (des–Gly^{10}–,[D–Ala^{6}]–LH–RH) and LHRH-CDs (Heptakis–(2,6–di–O–ethyl)–β–cyclodextrin complex) on gonado somatic index (GSI), ovarian developmental stage via histological slide and Estradiol concentration in plasma samples of the female Bagrid Catfish (*Hemibagrus wyckioides*). Three times (block) of hormonal treatment with 5 replications, LHRH-CDs in arachis oil 30 μg/kg, 30 μg/kg LHRH in arachis oils and arachis oil for control was intramuscular injected to female catfish and measurement were taken at 30 days post injection. The experiment was took place on April - July 2007 at Uttaradit Fisheries Test and Research Center, Uttaradit province.Result found estradiol concentration and GSI were no significantly difference between hormones ($p>0.05$) but highly significantly difference ($p<0.01$) between times and no interaction between hormone and times ($p>0.05$) The interaction between hormone and times causes no significantly differences in mature stage in ovarian ($p>0.05$) but significant in immature and atretic stages ($p<0.05$) and highly significant in maturing stage ($p<0.01$) The maturing stage eggs found in LHRH treatment were higher than control ($p<0.05$) but no significantly differences with LHRH-CDs and control were no significantly differences with LHRH-CDs treatments. Results from this study indicates Cyclodextrin complex with LHRH in the vehicle system has low sustainable releasing property causes by improper modification from original protocol and/or less $LHRH_a$ in vehicle system, dopaminergic inhibition activity by dopamine are finally causes estradiol level between experimental groups undifference. However, result from egg stages may indicates the effluence from cyclodextrin complex to gonadal development in Bagrid catfish.

Key words: Red-tail catfish, *Hemibagrus wyckioides* , Cyclodextrins, Ovarian development, GSI, Estradiol

คำนำ

ปลากดแก้ว หรือปลากดคัง *Hemibagrus wyckioides* (Fang and Chaux, 1949) เป็นปลาน้ำจืดชนิดไม่มีเกล็ดขนาดใหญ่ที่สุดในสกุลปลากดที่มีอยู่ พบแพร่กระจายอยู่ในทวีปเอเชียบริเวณตอนกลางของคาบสมุทรอินโดจีน ได้แก่ กัมพูชา ลาว และไทย (Ng and Rainboth, 1999) สำหรับในประเทศไทย พบว่าปลากดแก้วมีถิ่นอาศัยแพร่กระจายอยู่ตามแหล่งน้ำธรรมชาติ บริเวณแม่น้ำสายหลัก ลำคลอง และอ่างเก็บน้ำต่าง ๆ ทั่วทุกภาค เช่น แม่น้ำโขง แม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำน่าน แม่น้ำตาปี แม่น้ำแม่กลอง บึงบอระเพ็ด อ่างเก็บน้ำเขื่อนสิริกิติ์ จังหวัดอุตรดิตถ์ อ่างเก็บน้ำเขื่อนรัชชประภา จังหวัดสุราษฎร์ธานี และอ่างเก็บน้ำเขื่อนศรีนครินทร์ จังหวัดกาญจนบุรี (คีรี และคณะ, 2546 ; วิศณุพร และคณะ, 2537 ; ทัศพล, 2537 ; ชวลิต และคณะ, 2543) ปลากดแก้วเป็นปลาน้ำจืดพันธุ์พื้นเมืองที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่กรมประมงเล็งเห็นความสำคัญของการเพาะเลี้ยง และส่งเสริมให้มีการวิจัยอย่างต่อเนื่องในรูปแบบต่าง ๆ ทุกด้าน ตลอดจนการศึกษาทางด้านพันธุกรรมสัตว์น้ำ เพื่อวางแผนการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ปลากดแก้วเพื่อการเพาะเลี้ยงอย่างยั่งยืน (สุภัทรา และคณะ, 2544) แนวทางที่สำคัญในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่เพาะพันธุ์ได้ยาก คือการจัดการให้พ่อแม่พันธุ์ปลาที่เลี้ยงในบ่อดินให้มีความสมบูรณ์เพศในช่วงฤดูวางไข่และมีช่วงระยะเวลาในการวางไข่ยาวนานขึ้น โดยวิธีการจัดการสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมหรือการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นเป็นระยะ ๆ ต่อเนื่องกันไปหลาย ๆ วัน เพื่อให้ฮอร์โมนกระตุ้นพัฒนาการของรังไข่จนถึงระยะสุดท้ายที่แม่ปลาวางไข่ออกมา (Mylonas *et al*., 2003) ซึ่งไม่เหมาะสมกับการปฏิบัติเนื่องจากต้องสิ้นเปลืองแรงงานและเวลาอย่างมาก และในแต่ละครั้งที่นำปลาขึ้นมาฉีดฮอร์โมน จะทำให้มีความเครียดสูง ส่งผลต่อพัฒนาการของรังไข่จนบางครั้งไม่สามารถวางไข่ได้ (Contrearas-Sanchez *et al.,*1998; Barton, 2002; Wagner *et al*., 2002)

ปลากดแก้วสามารถเพาะพันธุ์ได้โดยวิธีการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นให้แม่ปลาวางไข่แต่มีข้อจำกัดคือการฉีดฮอร์โมนเพาะพันธุ์สัตว์น้ำนั้นมีผลให้ระดับฮอร์โมนคงอยู่ในกระแสเลือดในระดับสูงเพียงช่วงระยะเวลาสั้น ๆ เท่านั้น เนื่องจากฮอร์โมนที่ใช้ในการเพาะพันธุ์ปลาทั่วไปออกฤทธิ์กระตุ้นให้ปลาวางไข่ได้ในระยะเวลาสั้นๆไม่กี่ชั่วโมงเท่านั้น ตามรายงานของ Gothilf and Zohar (1991) อ้างตาม Mylonas and Zohar (2001) ที่พบว่า GnRHa ที่ฉีดเพื่อกระตุ้นให้ปลาวางไข่ จะออกฤทธิ์ลดลงครึ่งหนึ่ง (half life) ทุกๆ 23 นาที ดังนั้นการทำให้ฮอร์โมนที่กระตุ้นการผสมพันธุ์วางไข่คงระดับอยู่ในกระแสเลือดทีละน้อยๆ เป็นระยะเวลายาวนานนอกจากจะลดผลกระทบซึ่งเกิดจากการฉีดฮอร์โมนปริมาณมากเข้าสู่ตัวปลาจากการผสมเทียมโดยวิธีปกติ ยังอาจเป็นการสร้างความสมบูรณ์เพศของแม่พันธุ์และยืดระยะเวลาการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำให้ยาวนานขึ้นได้ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการพัฒนาระบบนำส่งยาที่เป็นสารโพลีเมอร์บางชนิด (Benita *et al*., 1984) ให้มีคุณสมบัติในการหุ้มห่อฮอร์โมนเอาไว้เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วสลายตัวช้าๆ พร้อมกับปลดปล่อยฮอร์โมนออกมาทีละน้อยติดต่อกันยาวนาน (Sustained release) ทำให้ฮอร์โมนชนิดนี้เมื่อฉีดเข้าร่างกายแล้วสามารถออกฤทธิ์อยู่ได้นานจึงเรียกว่า ฮอร์โมนชนิดออกฤทธิ์เนิ่นนาน (Sustained release hormone) และได้มีการนำไปใช้ในวงการแพทย์เพื่อรักษาโรคที่ต้องบำบัดด้วยการให้ฮอร์โมนติดต่อกันเป็นเวลานาน โดยฉีดฮอร์โมนชนิดนี้ครั้งเดียวแล้วสามารถออกฤทธิ์อยู่ในร่างกายได้นาน 1 - 3 เดือน (Okada *et al* ., 1988; Okada *et al* .,1994a ; Okada *et*

al ., 1994b; Okada *et al* ., 1994c; Okada, 1997) ทำให้ผู้ป่วยไม่ต้องมาพบแพทย์เพื่อฉีดยาบ่อย ๆ เหมือนก่อน ในหลักการเดียวกัน เทคโนโลยีนี้ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้กับสัตว์หลายชนิด รวมทั้งปลา (Zohar and Mylonas, 2001) เพื่อให้ฮอร์โมนชนิดออกฤทธิ์เนิ่นนานเข้าไปควบคุมพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ถึงขั้นวางไข่ได้

การศึกษาวิธีการให้ฮอร์โมนหรือยาถูกปลดปล่อยออกมาทีละน้อยโดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตริน (Cyclodextrins, CDs) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีน้ำตาล D–glucopyranose หลายโมเลกุลต่อกันเป็นวงแหวน ผลจากการจัดเรียงโมเลกุลเหล่านี้ทำให้โครงสร้างด้านในละลายน้ำได้น้อยแต่โครงสร้างด้านนอกจะละลายน้ำได้ดี Cyclodextrins ที่พบโดยทั่วไปมี 3 แบบ คือ α –CDs, β–CDs และ γ–CDs ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาล D–glucopyranose 6, 7 และ 8 โมเลกุล ตามลำดับ ต่อกันเป็นอนุมูล โดยแต่ละอนุมูลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α–1,4 glycosidic เป็นโครงสร้างโมเลกุลวงแหวนขนาดใหญ่ Cyclodextrins ที่หมู่ไฮดรอกซิลถูกแทนที่ด้วยหมู่เอธิล (ethylation) จะทำให้ความสามารถในการละลายน้ำลดลงแต่ทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า sustainable release หากมีโมเลกุลอื่นแทรกอยู่ในภายในโมเลกุล Cyclodextrins จากปรากฏการณ์นี้เอง จึงได้มีการประยุกต์ใช้สาร CDs ในทางเภสัชกรรมและอุตสาหกรรมอื่นๆ เป็นต้นมา ที่นิยมใช้ในทางเภสัชกรรมชนิดหนึ่งคือ เฮปตาคิส (Heptakis– (2,6–di–O–ethyl)–β–cyclodextrins) ซึ่งมีคุณสมบัติ sustained–release เมื่อนำไปใช้ร่วมกับยาหลายชนิด (Sinha *et al*., 2002) และจากการทดลองใช้เฮปตาคิสเป็นโมเลกุลพาหะให้กับฮอร์โมนสังเคราะห์ LHRH (des-Gly10, [D-Ala6] Luteinizing Hormone Releasing hormone Ethylamide) (Sigma) และยาเสริมฤทธิ์ domperidone (Motilium®) สามารถกระตุ้นการตกไข่ของแม่ปลากดแก้วและผลิตลูกปลาวัยอ่อนได้ (วิศณุพร, 2550) การศึกษาการใช้สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตรินมาเป็นพาหะให้กับฮอร์โมนสังเคราะห์ LHRH ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของสัตว์น้ำ ทำให้แม่พันธุ์ที่เลี้ยงในบ่อดินมีความสมบูรณ์เพศและยืดระยะช่วงฤดูวางไข่ให้ยาวนานออกไป จะเป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ปลากดแก้ว หากประสบผลสำเร็จจะเป็นนวัตกรรมในการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำ และเป็นองค์ความรู้ที่สำคัญยิ่งในการประยุกต์ใช้ในสัตว์น้ำต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของการใช้สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตรินร่วมกับฮอร์โมนสังเคราะห์ต่อระดับฮอร์โมน Estradiol ค่า GSI และพัฒนาการของรังไข่ปลากดแก้วในช่วงเวลาต่าง ๆ

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

1. <u>การเตรียมการทดลอง</u>

1.1 การเตรียมบ่อดิน ใช้บ่อดินขนาด 600 ตารางเมตร จำนวน 3 บ่อ ตากให้แห้งเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โรยปูนขาวในอัตรา 25 กิโลกรัม/บ่อ เติมน้ำให้มีระดับน้ำเฉลี่ย 1.0 เมตร

1.2 การเตรียมปลากดแก้วเพศเมีย เลี้ยงแม่พันธุ์ปลากดแก้วอายุ 2-3 ปี ขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 2-3 กิโลกรัม จำนวน 45 ตัว ในบ่อดินขนาด 600 ตารางเมตร ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง โดยตอนเช้าให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปโปรตีน 30% และตอนเย็นให้อาหารผสม (ประกอบด้วยปลาทะเลสด ปลาป่น กากถั่วเหลือง รำละเอียด) โปรตีนไม่ต่ำกว่า 40% ในอัตรา 3% ของน้ำหนักตัวปลา/วัน

1.3 การเตรียมสารประกอบเชิงซ้อน ใช้ฮอร์โมน LHRH คือ des–Gly^{10}–,[D–Ala^{6}]–LH–RH (SIGMA®, U.S.A.) และสารไซโคลเด็กซ์ตริน (Cyclodextrins, CDs) คือ เฮปตาคิส (Heptakis–(2,6–di–*O*–ethyl)–β–cyclodextrins) (Fluka®, U.S.A.) ในอัตราส่วนฮอร์โมนฯ : เฮปตาคิส เป็น 1 : 100 (w/w) ด้วยวิธี kneading ตามวิธีการของ Tsuruoka *et al.* (1989) โดยผสม LHRH$_a$ 1 มิลลิกรัม ในเอธานอลเข้มข้น 50 % (v/v) ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร และ เฮปตาคิส 100 มิลลิกรัม ใช้แท่งแก้วนวดเคล้าส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิห้องนาน 90 นาที ปล่อยให้ส่วนผสมแห้งในสภาพมีความดันอากาศที่อุณหภูมิห้องนาน 1 วัน ป่นส่วนผสมให้เป็นผงและกรองผ่านตะแกรงขนาด 100 mesh แล้วนำไปผสมกับน้ำมัน arachis ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ความเข้มข้นฮอร์โมนฯ เป็น 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร μg/ml นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –30 °C

2. <u>วิธีการทดลอง</u>

วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomized complete block design, RCBD) ที่มี 3 ชุดการทดลอง (treatment) คือ ชุดการทดลองที่ 1 ฉีดฮอร์โมน-CDs ผสมน้ำมัน arachis, ชุดการทดลองที่ 2 ฉีดฮอร์โมน ผสมน้ำมัน arachis, ชุดการทดลองที่ 3 ชุดควบคุม (ฉีดน้ำมัน arachis) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (replication) โดยใช้ระยะเวลาในการทดลองที่แตกต่างกัน (block) ในช่วงเวลาที่ต่างกัน 3 ช่วง คือ ครั้งที่ 1 ช่วงก่อนฤดูพันธุ์ (เดือนเมษายน), ครั้งที่ 2 ช่วงกลางฤดูผสมพันธุ์ (เดือนมิถุนายน) และครั้งที่ 3 ปลายฤดูผสมพันธุ์ (เดือนกันยายน) แต่ละชุดการทดลองใช้แม่พันธุ์จำนวน 5 ตัว ฉีดน้ำมัน arachis ที่ผสมฮอร์โมนและสารประกอบเชิงซ้อนตามวิธีการเตรียมใน 1.3 ให้กับแม่พันธุ์ปลาที่เตรียมใน 1.2 ในแต่ละชุดการทดลองแต่ละช่วงระยะเวลา ๆ ละจำนวน 15 ตัว โดยใช้เข็มฉีดขนาด 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าบริเวณกล้ามเนื้อที่ตำแหน่งโคนครีบหลังในอัตรา 30 ไมโครกรัม/ปลา 1 กิโลกรัม ทำเครื่องหมายที่ตัวปลาโดยการฝังไมโครชิพ แล้วปล่อยลงเลี้ยงร่วมกันในบ่อดินขนาด 600 ตารางเมตร เป็นระยะเวลา 30 วัน จึงเก็บรวบรวมข้อมูล

3. <u>การเก็บรวบรวมข้อมูล</u>

3.1 ศึกษาค่าสัมประสิทธิ์ความสมบูรณ์ของรังไข่ (Gonosomatic index, GSI) นำปลาเพศเมียมาผ่าเก็บรังไข่มาชั่งน้ำหนักนำไปคำนวณค่า GSI ตามวิธีของ Benfey and Sutterlin (1984) จากสูตร

ดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์ = น้ำหนักรังไข่หรืออัณฑะ/น้ำหนักตัว x 100

3.2 ศึกษาการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ทางเนื้อเยื่อวิทยา นำเนื้อเยื่อรังไข่ไปตรวจสอบโดยวิธีย้อมสีเซลล์ด้วยวิธีมิญชยวิทยา (Histology) เพื่อเปรียบเทียบระยะการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ โดยผ่าตัดปลาบริเวณท้องเพื่อเก็บตัวอย่างรังไข่ แล้วนำไปตัดแบ่งเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 1-2 เซนติเมตร แช่ลงไปในน้ำยาคง

สภาพ Bouin's solution ที่มีส่วนผสมของ Picric acid 750 ml., Formalin 40% 250 ml., และ Acetic acid นาน 24 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยสารละลายเอธิลแอลกอฮอร์ 70% จากนั้นนำไปศึกษาพัฒนาการของรังไข่ด้วยวิธีทำสไลด์เนื้อเยื่อ(Histology) ของรังไข่ ตาม Humason, (1972) โดยนำไปเข้าเครื่อง tissue processor แล้วทำ paraffin embeded และตัดรังไข่ตามขวาง ความหนา 5 ไมครอนที่ส่วนต้น กลาง และส่วนปลายรังไข่ด้วยเครื่องไมโครโทม (microtome) นำชิ้นเนื้อเยื่อวางบนสไลด์และย้อมเนื้อเยื่อด้วยสี Eosin-Haematoxilin แล้วจึงนำไปนับจำนวนเซลล์ไข่ระยะต่างๆ จำนวนไข่ที่พบในแต่ละระยะจะคำนวณกลับเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ เพื่อหาค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์เซลล์ไข่ระยะต่าง ๆ ที่พบ โดย ดัดแปลงวิธีการของ Groman (1982) ที่แบ่งระยะการพัฒนาของไข่ปลาออกเป็น 6 ระยะ Al-Daham and Bhatti (1979) ที่ศึกษาในปลา *Barbus luteus* Chinabut *et al* (1991) ศึกษาในปลาดุกด้าน *(Clarias batrachus*) ภาณุ และคณะ (2539) ศึกษาในปลาดุกอุย และปลาตะเพียนขาว และปลานิลโดย Babiker and Ibrahim (1979); Coward and Bromage (1998); Tacon *et al.* (2000) และ Msiska, (2002) ให้เหมาะสมกับการทดลองครั้งนี้ด้วยการแบ่งระยะพัฒนาการของไข่ปลากดแก้วโดยใช้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไข่เป็นหลักให้เหลือเพียง 4 ระยะ คือระยะเริ่มต้นพัฒนา (immature oocytes) ระยะกำลังพัฒนา (maturing oocytes) ระยะปลายของการพัฒนา (mature oocytes) และระยะไข่ฝ่อ (atretic oocytes) ตามลำดับ

3.3 ศึกษาปริมาณฮอร์โมนในซีรัม เก็บตัวอย่างเลือดปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยใช้เข็มฉีดยาที่เคลือบ (rinse) ด้วยสารละลาย Heparin เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดูดเลือดจากเส้นเลือดใหญ่ใต้กระดูกสันหลังที่บริเวณกึ่งกลางด้านข้างคอดหางใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่เติมสารยับยั้งการย่อยโปรตีน (Aprotenin) เข้มข้น 1 ยูนิต/มิลลิลิตร นำตัวอย่างเลือดที่ได้ในหลอดเก็บเลือดแช่ในถาดซึ่งมีน้ำผสมกับน้ำแข็งควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ประมาณ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง นำเลือดไปแยกเก็บเฉพาะน้ำเลือด (plasma) โดยนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงในอัตรา 5,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ดูดเฉพาะสารละลายใส่หลอดแช่แข็ง (cryotube) ขนาด 1 มิลลิลิตร นำไปเก็บในไนโตรเจนเหลวแล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ระดับฮอร์โมน Estradiol ด้วยวิธี Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA) โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Architect® Estradiol (Abbott Laboratories, USA)

4. **<u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u>**

ทดสอบความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลค่า GSI, ปริมาณฮอร์โมน Estradiol, เปอร์เซ็นต์ไข่ที่พบในระยะ immature, maturing, mature และ atretic โดยวิธี Analysis of variance ทำการแปลงข้อมูลที่มีค่าสังเกตเป็นทศนิยมและเปอร์เซ็นต์ก่อนวิเคราะห์เพื่อให้ข้อมูลมีการกระจายเป็นแบบปกติ (normal distribution) ด้วยวิธี angular transformation (จรัญ, 2534) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองในแต่ละชุดข้อมูลที่นำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SAS

ผลการทดลอง

ผลการทดลองฉีดฮอร์โมนให้กับแม่ปลากดแก้วในช่วงเวลาที่มีความสมบูรณ์เพศแตกต่างกัน หลังจากฉีดฮอร์โมนเป็นระยะเวลา 30 วัน จึงนำมาศึกษาสัมประสิทธิ์ความสมบูรณ์ของรังไข่ ปริมาณฮอร์โมน Estradiol และพัฒนาการของไข่ปลากดแก้วในระยะต่าง ๆ ดำเนินการ 3 ช่วงเวลา ดังนี้

ครั้งที่ 1 (วันที่ 23 เมษายน 2550) เป็นช่วงเริ่มต้นฤดูผสมพันธุ์ แม่ปลามีความสมบูรณ์เพศน้อย ความยาวและน้ำหนักเฉลี่ยของแม่ปลากดแก้วที่เริ่มทดลองแสดงในตารางที่ 1 แม่ปลาชุดควบคุมจำนวน 5 ตัว มีน้ำหนักเฉลี่ย 1.7 $\pm$ 0.05 กิโลกรัม ความยาวเฉลี่ย 58.8 $\pm$ 0.45 เซนติเมตร ค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์ (GSI) เฉลี่ย 7.6$\pm$0.62 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณฮอร์โมน Estradiol เฉลี่ย 142.6$\pm$179.82 pg/ml

ครั้งที่ 2 (วันที่ 16 พฤษภาคม 2550) เป็นช่วงกลางฤดูผสมพันธุ์ แม่ปลามีความสมบูรณ์เพศปานกลาง ความยาวและน้ำหนักเฉลี่ยของแม่ปลากดแก้วที่เริ่มทดลองแสดงในตารางที่ 1 แม่ปลาชุดควบคุมจำนวน 5 ตัว มีน้ำหนักเฉลี่ย 1.8 $\pm$ 0.16 กิโลกรัม ความยาวเฉลี่ย 59.8 $\pm$ 3.90 เซนติเมตร ค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์ (GSI) เฉลี่ย 8.5$\pm$1.93 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณฮอร์โมน Estradiol เฉลี่ย 495.4$\pm$164.63 pg/ml

ครั้งที่ 3 (วันที่ 20 มิถุนายน 2550) เป็นช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์ เป็นช่วงที่ปลากดแก้วมีความสมบูรณ์เพศสูง ความยาวและน้ำหนักเฉลี่ยของแม่ปลากดแก้วที่เริ่มทดลองแสดงในตารางที่ 1 แม่ปลาชุดควบคุมจำนวน 5 ตัว มีน้ำหนักเฉลี่ย 1.6 $\pm$ 0.12 กิโลกรัม ความยาวเฉลี่ย 56.1 $\pm$ 0.89 เซนติเมตร ค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์ (GSI) เฉลี่ย 9.1$\pm$0.73 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณฮอร์โมน Estradiol เฉลี่ย 2,486.4$\pm$1,410.33 pg/ml

1. <u>ผลของฮอร์โมนต่อค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์ (GSI) และปริมาณฮอร์โมน Estradiol</u>

เมื่อตรวจสอบค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์ (GSI) และผลการวัดระดับฮอร์โมน Estradiol ใน plasma แสดงในตารางที่ 1 แล้วพบว่า ค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์และปริมาณฮอร์โมน Estradiol ของแม่ปลากดแก้วที่ได้รับฮอร์โมนในแต่ละชุดการทดลองไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) ในแต่ละช่วงเวลาของการทดลอง และไม่มีผลร่วมระหว่างการใช้ฮอร์โมนและช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ($p>0.05$) โดยค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์ของแม่ปลากดแก้วในช่วงปลายของฤดูผสมพันธุ์มีค่าเฉลี่ยสูงกว่า ช่วงกลางฤดูผสมพันธุ์ แต่ไม่แตกต่างจากช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์ และช่วงกลางฤดูผสมพันธุ์ไม่แตกต่างจากช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์

2. <u>ผลของฮอร์โมนต่อพัฒนาการของรังไข่แม่ปลากดแก้ว</u>

ฮอร์โมน LHRH ที่ฉีดให้แม่ปลากดแก้ว จะไปกระตุ้นให้ต่อมใต้สมองสร้าง Gonadotropin ซึ่งมีผลในกระบวนการสร้างไข่และสะสมโยล์ค (Vitellogenesis) ของแม่ปลาโดยจะไปกระตุ้นให้รังไข่สร้างฮอร์โมน Estradiol ที่จะไปกระตุ้นให้ตับสร้าง Vitellogenin ส่งไปสะสมไว้ที่ไข่ทำให้ไข่พัฒนาเพิ่มขนาดขึ้นอย่างรวดเร็ว ดังนั้นระดับ Estradiol จึงมีความสัมพันธ์กับระยะการพัฒนาของไข่ปลากดแก้ว โดยเฉพาะไข่ในระยะกำลังพัฒนา (maturing) ซึ่งจำแนกออกเป็น ระยะต่าง ๆ ได้ 5 ระยะ คือ

1. ระยะ Oogonia ไข่ระยะนี้มีขนาดเล็กมีรูปร่างกลมรี มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 12-13 ไมครอน ไซโตพลาสมย้อมติดสีชมพูอ่อนเมื่อย้อมด้วย H&E นิวเคลียสมีขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 7-8 ไมครอน ย้อมติดสีเช่นเดียวกับไซโตพลาสม Oogonia มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่มเซลล์ที่บริเวณขอบของ lamellae ของรังไข่ (ภาพที่ 1)

2. ระยะ Immature oocyte ไข่ระยะนี้มีขนาดใหญ่ขึ้นมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 35-90 ไมครอน เซลล์ไข่มีรูปร่างไม่แน่นอนอาจมีรูปร่างกลม หรือเป็นรูปเหลี่ยมก็ได้ ไซโตพลาสมติดสีน้ำเงินเข้มเมื่อย้อมด้วย H&E นิวเคลียสมีลักษณะกลมย้อมติดสีชมพูอ่อน มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 13-35 ไมครอน ภายในนิวเคลียสมีนิวคลีโอลัสกระจายอยู่ โดยรอบเซลล์ไข่พบว่ามี follicle cells หุ้มอยู่ (ภาพที่ 2)

3. ระยะ Maturing oocyte ไข่ระยะนี้มีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าไข่ระยะ immature oocyte โดยไข่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 120-470 ไมครอน (ภาพที่ 3) ไซโตพลาสมติดสีน้ำเงินจางกว่าไข่ระยะ immature เมื่อย้อมด้วย H&E ภายในจะพบว่าเริ่มมีการสะสม fat vacuoles และ yolk granules ขนาดเล็กจำนวนมาก นิวเคลียสเป็นรูปกรมรี ย้อมติดสีชมพูอ่อน มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 48-130 ไมครอน มีนิวคลีโอลัสอยู่ที่ผนังของนิวเคลียส เริ่มพบว่ามีชั้น zona radiata อยู่ใต้ follicle cells ที่มีรูปร่างเป็นรูปกระสวยจนถึงเป็นรูปสี่เหลี่ยมทรงเตี้ยโดยมีนิวเคลียสรูปร่างกลมเห็นชัดเจน (ภาพที่ 4)

4. ระยะ Mature oocyte ไข่ระยะนี้จะมีขนาดใหญ่ที่สุดโดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.9-2.2 มิลลิเมตร ภายในไซโตพลาสมจะเต็มไปด้วย fat vacuoles และ yolk granules ขนาดใหญ่จำนวนมาก ติดสีชมพูเข้มเมื่อย้อมด้วย H&E นิวเคลียสรูปร่างไม่แน่นอนเนื่องจากผนังนิวเคลียสถูกเบียดโดย fat vacuoles และ yolk granules โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 100-110 ไมครอน และพบนิวคลีโอลัสอยู่ที่ผนังนิวเคลียส เห็นชั้น zona radiata ชัดเจน follicle cells มีรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมทรงสูงมองเห็นขอบเขตของนิวเคลียสไม่ชัดเจน (ภาพที่ 5)

5. ระยะ Atretic oocyte ไข่ระยะนี้เป็นระยะที่ต่อจาก mature oocyte ซึ่งเป็นระยะที่ไข่สลายตัวเองหลังจากมีการพัฒนาเต็มที่แล้วยังไม่ถูกปล่อยออกมานอกรังไข่เพื่อทำการผสม ไข่จะมีรูปร่างไม่แน่นอน ภายในไซโตพลาสมพบว่า yolk granules จะสลายตัวรวมกันเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่พบนิวเคลียส ชั้น zona radiate ส่วน follicle cells มีการเปลี่ยนรูปร่างโดยเซลล์ขยายตัวใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 6)

เมื่อตรวจดูค่าระยะการพัฒนาของไข่ที่พบในระยะ immature, maturing, mature และ atretic แสดงในตารางที่ 2 เปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลองและระหว่างช่วงการทดลองแล้ว พบว่า อิทธิพลร่วมของฮอร์โมนและช่วงฤดูผสมพันธุ์มีผลให้แม่ปลากดแก้วมีพัฒนาของไข่ในระยะ immature แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยฮอร์โมนมีผลให้พัฒนาของไข่ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่ฤดูผสมพันธุ์มีผลพัฒนาของไข่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยพบไข่ในระยะนี้มากที่สุดในช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์ และช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์ซึ่งมากกว่าช่วงกลางฤดูผสมพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

การพัฒนาของไข่ในระยะ maturing ของแม่ปลากดแก้วที่ได้รับอิทธิพลร่วมของทั้งฮอร์โมนและช่วงฤดูผสมพันธุ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) โดยฮอร์โมนมีผลให้พัฒนาของไข่ไม่แตกต่างกัน

($p>0.05$) และฤดูผสมพันธุ์มีผลพัฒนาของไข่ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) โดยพบไข่ในระยะนี้มากที่สุดในชุดที่ได้รับฮอร์โมน LHRH ซึ่งไม่แตกต่างจากชุดที่ได้รับฮอร์โมน LHRH-CDs แต่แตกต่างจากชุดควบคุม โดยชุดควบคุมกับชุดที่ได้รับฮอร์โมน LHRH-CDs ไม่แตกต่างกัน

การพัฒนาของไข่ในระยะ mature ของแม่ปลากดแก้วที่ได้รับอิทธิพลร่วมของทั้งฮอร์โมนและช่วงฤดูผสมพันธุ์ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) โดยฮอร์โมนมีผลให้พัฒนาของไข่ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่ฤดูผสมพันธุ์มีผลพัฒนาของไข่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) โดยพบไข่ในระยะนี้มากที่สุดในช่วงฤดูวางไข่ มากกว่าช่วงต้นฤดูวางไข่และช่วงปลายฤดูวางไข่ซึ่งไม่แตกต่างกัน

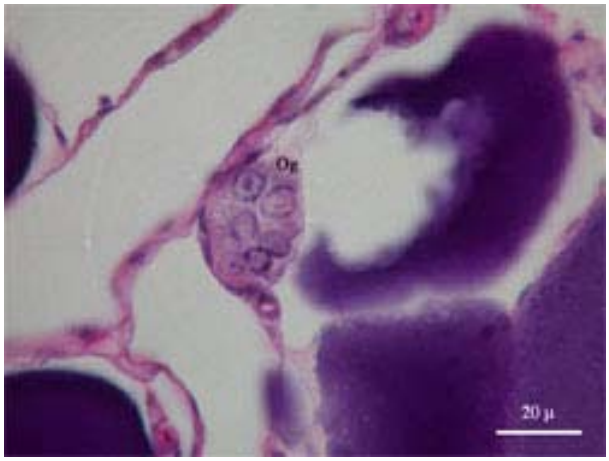
การพัฒนาของไข่ในระยะ atretic ของแม่ปลากดแก้วที่ได้รับอิทธิพลร่วมของฮอร์โมนและช่วงฤดูผสมพันธุ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยฮอร์โมนมีผลให้พัฒนาของไข่ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) และฤดูผสมพันธุ์มีผลพัฒนาของไข่ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) โดยพบไข่ในระยะนี้มากที่สุดในชุดที่ได้รับฮอร์โมน LHRH-CDs ซึ่งไม่แตกต่างจากชุดที่ได้รับฮอร์โมน LHRH แต่แตกต่างจากชุดควบคุม โดยชุดควบคุมกับ ชุดที่ได้รับฮอร์โมน LHRH ไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 1 ค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์และปริมาณฮอร์โมน Estradiol ของแม่ปลากดแก้วที่ได้รับฮอร์โมนในแต่ละชุดการทดลอง

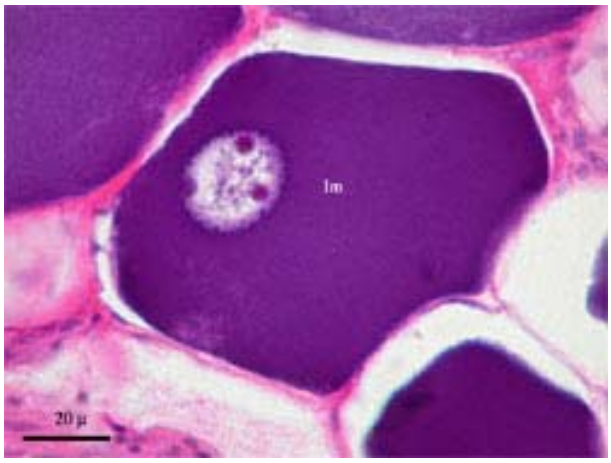
ช่วงการทดลอง	ชุดการทดลอง	ความยาวเฉลี่ย (เซนติเมตร)	น้ำหนักเฉลี่ย (กิโลกรัม)	GSI (%)	Estradiol (pg/ml)
1	LHRH-CDs	64.4 ± 1.52	2.2 ± 0.17	8.9 ± 1.92	1,301.6 ± 447.41
	LHRH	63.2 ± 3.89	2.1 ± 0.32	6.7 ± 2.14	850.6 ± 369.65
	Control	61.0 ± 2.00	2.0 ± 0.13	7.3 ± 1.85	821.2 ± 650.23
2	LHRH-CDs	64.6 ± 1.56	2.3 ± 0.17	6.6 ± 1.41	1,156.0 ± 604.98
	LHRH	63.0 ± 2.67	2.3 ± 0.13	8.0 ± 1.69	1,198.4 ± 476.23
	Control	64.7 ± 1.47	2.3 ± 0.17	6.9 ± 1.43	1,253.2 ± 259.89
3	LHRH-CDs	58.6 ± 4.28	1.8 ± 0.20	9.8 ± 0.70	1,690.0 ± 572.29
	LHRH	58.8 ± 1.96	1.8 ± 0.17	8.8 ± 2.25	1,426.4 ± 697.82
	Control	56.1 ± 3.36	1.6 ± 0.15	7.9 ± 1.25	1,659.2 ± 272.78

ตารางที่ 2 ระยะการพัฒนาของไข่ปลากดแก้วและปริมาณฮอร์โมน Estradiol ของแม่ปลากดแก้วที่ได้รับฮอร์โมนในแต่ละชุดการทดลอง

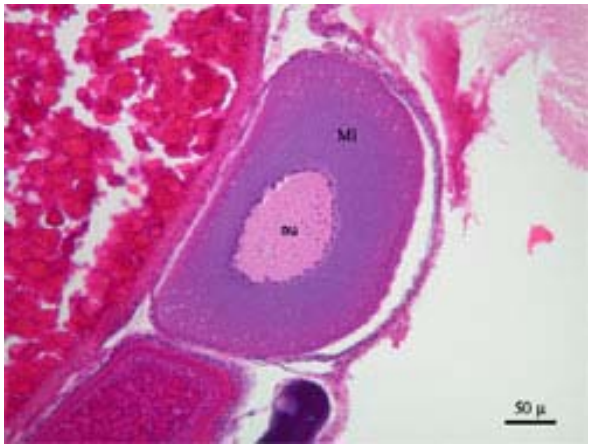
ช่วงการทดลอง	ชุดการทดลอง	ระยะพัฒนาการของไข่ (%)			
		Immature	Maturing	Mature	Atretic
1	LHRH-CDs	56.9 ± 8.08	18.8 ± 5.53	22.3 ± 8.35	2.0 ± 1.52
	LHRH	72.6 ± 8.18	9.8 ± 6.14	10.4 ± 3.88	7.2 ± 4.05
	Control	67.7 ± 8.13	14.1 ± 8.35	16.6 ± 1.43	2.4 ± 1.28
2	LHRH-CDs	55.6 ± 15.04	14.6 ± 6.44	25.7 ± 9.99	4.13 ± 1.44
	LHRH	55.7 ± 7.97	17.8 ± 3.12	23.8 ± 8.41	2.68 ± 2.46
	Control	57.9 ± 8.98	13.8 ± 6.29	26.9 ± 7.05	1.39 ± 1.02
3	LHRH-CDs	68.8 ± 7.68	10.6 ± 3.51	16.1 ± 4.41	4.6 ± 3.04
	LHRH	54.1 ± 10.60	25.7 ± 7.04	18.8 ± 5.36	1.6 ± 1.18
	Control	73.4 ± 10.59	10.3 ± 6.45	14.1 ± 3.25	3.3 ± 3.41



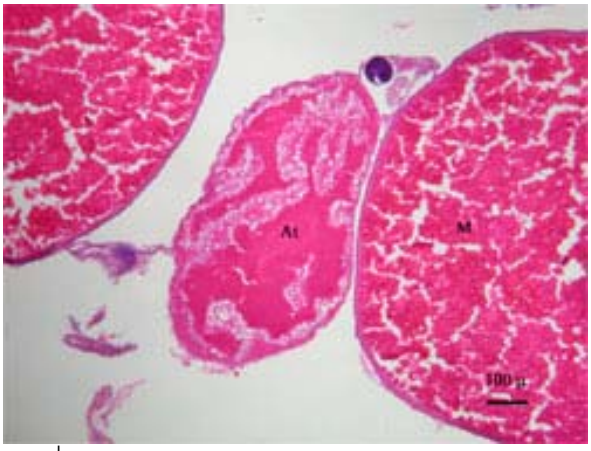
ภาพที่ 1 เซลล์ไข่ระยะ Oogonia (Og)



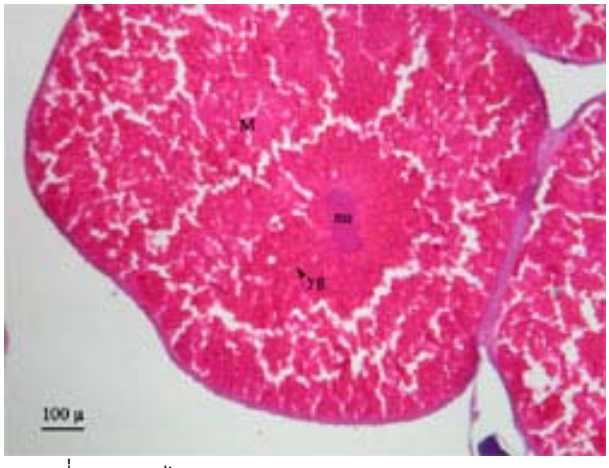
ภาพที่ 2 เซลล์ไข่ระยะ Immature oocyte (Im)



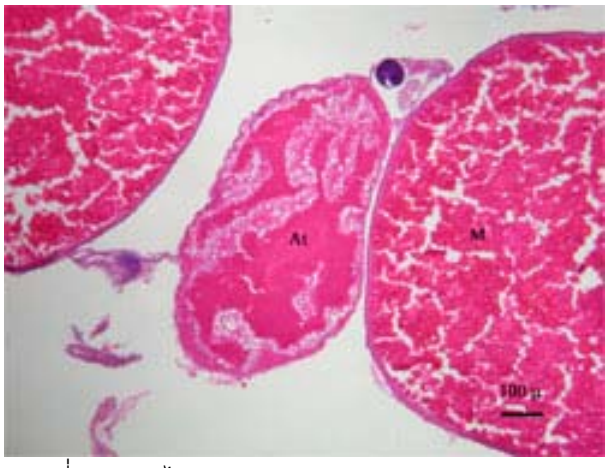
ภาพที่ 3 เซลล์ไข่ระยะ Maturing oocyte (Mi)



ภาพที่ 4 fat vacuoles (fv), yolk granules (yg) และ zona radiata (zr) รอบเซลล์ไข่



ภาพที่ 5 เซลล์ไข่ระยะ Mature oocyte (M)



ภาพที่ 6 เซลล์ไข่ระยะ Atretic oocyte (At)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองฉีดฮอร์โมน LHRH และฮอร์โมน LHRH-CDs ให้กับแม่ปลากดแก้ว ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของฮอร์โมน LHRH และฮอร์โมน LHRH-CDs ซึ่งใช้สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตริน (heptakis) เพื่อให้เป็นระบบนำส่ง (vehicle) ฮอร์โมน LHRH ให้ออกฤทธิ์แบบเนิ่นนาน ซึ่งทำหน้าที่เสมือนฮอร์โมน Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) โดยจะไปกระตุ้นให้ต่อมใต้สมองหลั่งฮอร์โมน gonadotropins (GtHs) ไปทำให้เซลล์สืบพันธุ์สร้างฮอร์โมน estradiol ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ไปทำให้รังไข่มีการพัฒนาเซลล์ไข่ และฮอร์โมนสังเคราะห์ยังมีผลให้ปลากดแก้วพัฒนาไข่จนถึงระยะสุดท้ายจนสามารถรีดไข่ไปผสมเทียมได้ (วิศณุพร และคณะ, 2537) และ LHRH-CDs ในอัตรา 30 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์ domperidone (Motilium®) 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สามารถกระตุ้นการตกไข่ของแม่ปลากดแก้วและผลิตลูกปลาวัยอ่อนได้ (วิศณุพร, 2550) นอกจากนี้ การวางแผนการทดลองครั้งนี้ใช้ปลาชุดที่ฉีดฮอร์โมนและชุดควบคุมเป็นปลารุ่นเดียวกัน มีความยาวและน้ำหนักไม่แตกต่างกัน ปลากดแก้วที่ทดลองจึงมีความสมบูรณ์เพศอยู่ในระดับเดียวกัน และมีระดับ estradiol และค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์ก่อนฉีดกระตุ้นไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ช่วงเวลา ซึ่งเป็นช่วงที่แม่ปลากดแก้วมีระดับความสมบูรณ์เพศต่างกัน คือ ช่วงมีความสมบูรณ์เพศต่ำ ปานกลาง และความสมบูรณ์เพศสูง ฉีดฮอร์โมนในอัตรา 30 ไมโครกรัม/กิโลกรัม หลังจากฉีดฮอร์โมนเป็นระยะเวลา 30 วัน จึงนำมาศึกษาสัมประสิทธิ์ความสมบูรณ์ของรังไข่ ปริมาณฮอร์โมน estradiol และพัฒนาการของไข่ปลากดแก้วในระยะต่าง ๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังนั้นความแตกต่างของระดับฮอร์โมน ค่า GSI และระยะพัฒนาการของไข่ ในปลาชุดการทดลองจะเป็นผลมาจากฮอร์โมนในรูปแบบที่แตกต่างกันเป็นหลัก ฮอร์โมน estradiol นั้นมีรายงานว่ามีผลไปกระตุ้นให้ตับสร้างไข่แดงและไปสะสมในไข่ (hepatic vitellogenesis) ในปลานิล (Coward and Bromage, 2000) และระดับ estradiol มีความผันแปรโดยตรงต่อระดับ LHRH โดยมีรายงานว่าระดับ estradiol ในปลา Gilthead seabream (*Sparus aurata*) และปลา silver perch (*Bidyanus bidyanus*) จะเพิ่มขึ้นหลังจากฉีดฮอร์โมน LHRH (Zohar *et al*., 1988; Levavi–Sivan *et. al*., 2004) ดังนั้นหากมีการวัดระดับฮอร์โมน LHRH ใน plasma ปลากดแก้วจะสามารถทราบถึงประสิทธิภาพของสารไซโคลเด็กซ์ตรินได้โดยตรง แต่ในการศึกษาครั้งนี้ได้วัดระดับฮอร์โมน estradiol ซึ่งเป็นผลทางอ้อมของฮอร์โมน LHRH ที่ฉีดกระตุ้นจึงอาจมีข้อผิดพลาดเนื่องจาก estradiol ที่วัดได้นอกจากเป็นผลจาก LHRH แล้วยังมีผลมาจาก GnRH ที่มีอยู่ในตัวปลาด้วยอีกส่วนหนึ่ง อย่างไรก็ตามผลการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของปริมาณฮอร์โมน estradiol และค่า GSI ที่เป็นผลมาจาก LHRH และ LHRH-CDs แต่พบความแตกต่างที่เป็นผลมาจากช่วงความสมบูรณ์เพศของแม่ปลากดแก้ว และไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่างฮอร์โมนและช่วงความสมบูรณ์เพศของแม่ปลา แสดงให้เห็นว่าผลของฮอร์โมนในรูปสารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตรินส่งผลในระดับต่ำต่อปลากดแก้วทำให้ระดับ estradiol ใน plasma ของปลาชุดที่ฉีดฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้นไม่แตกต่างจากปลาชุดควบคุม อาจเกิดจากปริมาณฮอร์โมน LHRH ที่ใช้ในอัตรา 30 ไมโครกรัม/กิโลกรัม นั้นต่ำเกินไป เมื่อเทียบกับการทดลองในปลากะพงขาว (Almendras *et al*., 1988), ปลา Herring (*Clupea*

harengus) (Carolsfeld *et al*., 1988) และปลา Greenback flounder (*Rhombosolea tapirina*) (Lim *et al*., 2004) ที่ทดลองใช้ระบบนำส่งฮอร์โมน $LHRH_a$ แบบฮอร์โมนเม็ด (hormone pellet) โดยมีความเข้มข้นฮอร์โมนอยู่ในช่วง 100–1,006 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ในขณะที่การทดลองนี้ที่ใช้ความเข้มข้นฮอร์โมนเพียง 30 ไมโครกรัม/กิโลกรัม จึงทำให้ฮอร์โมนถูกปล่อยออกจากระบบในช่วงเวลาแรกจนเกือบหมด ส่งผลให้ฮอร์โมนช่วงระยะหลังๆ ถูกปลดปล่อยออกมาน้อยมาก จนทำให้ระดับฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้นในปลาชุดการทดลองไม่แตกต่างกัน และเกิดจากกลไก dopaminergic inhibition ซึ่งพบในปลาหลายชนิด โดยกลไกนี้เกิดขึ้นเมื่อมีระดับฮอร์โมน $LHRH_a$ สูงในกระแสโลหิต ทำให้สมองสร้างสาร dopamine ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน $LHRH_a$ (Levavi–Sivan *et al*., 2003)

อย่างไรก็ตาม ผลของฮอร์โมนในรูปสารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตรินมีผลต่อการพัฒนาของไข่ปลากดแก้วเมื่อเปรียบเทียบระยะพัฒนาการของไข่ในระยะต่าง ๆ พบว่า อิทธิพลร่วมของฮอร์โมนและช่วงความสมบูรณ์เพศไม่มีผลต่อไข่ในระยะ mature แต่มีผลต่อการพัฒนาของไข่ในระยะ immature maturing และ atretic โดยพบไข่ในระยะ maturing และ atretic มากที่สุดในชุดที่ได้รับฮอร์โมน LHRH และ LHRH-CDs แสดงให้เห็นผลของการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน LHRH และการออกฤทธิ์แบบเนิ่นนานของฮอร์โมน LHRH-CDs โดยทำให้ไข่ในระยะ maturing มีเปอร์เซ็นต์เพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ฮอร์โมนไม่มีผลต่อพัฒนาของไข่ในระยะ mature และทำให้ไข่ในระยะ mature เปลี่ยนสภาพเป็นไข่ฝ่อ (Atresia couste) เมื่อแม่พันธุ์ไม่มีการผสมพันธุ์วางไข่แต่ก็พบในเปอร์เซ็นต์ที่น้อยมากสอดคล้องกับ Lam (1982) อ้างตาม อุทัยรัตน์ (2538) ได้สรุปว่า การตอบสนองต่อฮอร์โมน LHRH และ LHRHa เปลี่ยนแปลงไปตามระยะการเจริญของรังไข่และอัณฑะโดยปลาที่มีไข่และน้ำเชื้อเจริญเต็มที่ตอบสนองต่อฮอร์โมนนี้ได้ดีกว่าและการฉีดฮอร์โมน LHRHa ในระดับฮอร์โมนที่สูงเกินไปจะมีผลในทางยับยั้งการตกไข่ อย่างไรก็ตามปริมาณฮอร์โมนที่ฉีดให้แม่ปลาในครั้งนี้ไม่สามารถกระตุ้นให้แม่ปลาตกไข่ เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะพันธุ์ปลากดแก้วโดยใช้ฮอร์โมนชนิดเดียวกันในอัตราเดียวกันที่รายงานในวิศณุพร (2550) ที่ระดับฮอร์โมนเดียวกันสามารถกระตุ้นให้แม่ปลากดแก้วที่มีความสมบูรณ์เพศตกไข่ได้ แต่แตกต่างกันตรงไม่ได้ใช้ร่วมกับ domperidone และไม่ได้นำแม่ปลามาตรวจสอบการตกไข่และรีดไข่ผสมเทียม อาจจะมีสาเหตุจากสาร Dopamine(DA) ที่สมองสร้างขึ้นมาต่อต้านการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน LHRH ต่อต่อมใต้สมอง ทำให้ต่อมใต้สมองไม่สามารถสร้าง Gonadotropin ที่จะไปกระตุ้นพัฒนาการของรังไข่ให้พัฒนาก้าวหน้าต่อไปจนถึงขั้นสุดท้ายที่เรียกว่า Dopaminergic inhibition ซึ่งพบในกลุ่มปลา Tilapia ปรากฏการณ์นี้มีเกิดขึ้นให้เห็นชัดเจนเป็นปกติ (Levavi-Sivan *et al*., 2003; Levavi-Sivan *et al*.,2004; Levavi-Sivan *et al*.,2006) และในปลา rainbow trout(Vacher *et al*., 2000; Vacher *et al*.,2002) ปลาดุกอาฟริกา *Clarias gariepinus*(Van Assselt *et al*.,1990) และปลาไหลทะเล *Anguilla anguilla* (Vidal *et al.,* 2004) เป็นต้น ดังนั้นในการเพาะพันธุ์ปลาในกลุ่มที่มีปรากฏการณ์เช่นนี้จะต้องใช้สารยับยั้ง DA ที่เรียกว่า Dopomine Antagonist เช่น pimozide, domperidone, metoclopramide เป็นต้น ฉีดเข้าตัวปลาพร้อมกับฮอร์โมน GnRHa เพื่อไปยับยั้งการออกฤทธิ์ของ DA ทำให้ GnRHa ที่ฉีดสามารถกระตุ้นต่อมใต้สมองให้สร้าง

gonadotropin ขึ้นไปกระตุ้นรังไข่ให้พัฒนาก้าวหน้าต่อไปจนถึงขั้นสุดท้าย (Aizen *et al*.,2005; Yaron *et al*., 2003; Mylonas and Zohar, 2001; Peter and Yu, 1997; Ando *et al*.,2003)

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองใช้สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตรินเป็นระบบนำส่งฮอร์โมน $LHRH_a$ เพื่อให้เกิดการออกฤทธิ์แบบเนิ่นนานในปลากดแก้วพบว่าระดับฮอร์โมน estradiol ซึ่งเป็นผลทางอ้อมจากฮอร์โมน $LHRH_a$ ให้ผลไม่ชัดเจน โดยระดับฮอร์โมนเพิ่มสูงขึ้นในระยะที่แม่ปลามีความสมบูรณ์เพศมากขึ้น แต่ฮอร์โมนในรูปแบบนี้มีผลให้ไข่ปลากดแก้วมีพัฒนาการมากกว่าปลาในชุดควบคุม ดังนั้นจึงควรมีการดำเนินการศึกษาเพิ่มเติมในประเด็นต่างๆ เช่นการค้นคว้าและพัฒนาวิธีการวัดระดับฮอร์โมน $LHRH_a$ ใน plasma ปลาเพื่อนำไปใช้วัดระดับฮอร์โมนโดยตรง การปรับปรุงการทำสารประกอบเชิงซ้อนฯ และระบบนำส่งฮอร์โมนฯ เช่น การใช้สารประกอบชนิดอื่นที่ทำให้ฮอร์โมนออกฤทธิ์เนิ่นนานมากขึ้น การเพิ่มปริมาณฮอร์โมน $LHRH_a$ และทำระบบนำส่งสาร dopamine antagonist ควบคู่ไปกับระบบนำส่งฮอร์โมน $LHRH_a$ เพื่อลดผลกระทบจาก dopaminergic inhibition

เอกสารอ้างอิง

คีรี กออนันตกุล, ชวลิต วิทยานนท์, อภิชาต เติมวิชชากร, ชัยศิริ ศิริกุล และ นิพนธ์ จันทร์ประทัด. 2546. พรรณปลาในบึงบอระเพ็ด (ลุ่มน้ำเจ้าพระยา). เอกสารเผยแพร่. สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรประมงน้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ.

จรัญ จันทลักขณา. 2534. สถิติวิธีวิเคราะห์และวางแผนงานวิจัย. โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช. กรุงเทพฯ.

ชวลิต วิทยานนท์, อภิชาต เติมวิชชากร และ ชัยศิริ ศิริกุล. 2543. ความหลากชนิดของปลาในบึงบอระเพ็ด(ลุ่มน้ำเจ้าพระยา), น. 6-66. *ใน* คีรี กออนันตกุล, ชวลิต วิทยานนท์, อภิชาต เติมวิชชากร และ ชัยศิริ ศิริกุล (คณะผู้จัดทำ) พรรณปลาในบึงบอระเพ็ด (ลุ่มน้ำเจ้าพระยา). กองประมงน้ำจืด และ สถาบันพิพิธภัณฑ์สัตว์น้ำ กรมประมง, กรุงเทพฯ.

ทัศพล กระจ่างดารา. 2537. อนุกรมวิธานและชีวประวัติบางประการของปลาอ่างเก็บน้ำเขื่อนรัชชประภา จังหวัดสุราษฎร์ธานี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล, สุจินต์ หนูขวัญ และ กำชัย ลาวัณยวุฒิ. 2539. การพัฒนาระบบสืบพันธุ์ในช่วงรอบปีของปลาดุกอุยและปลาตะเพียนขาวเพศเมีย. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ.

วิศณุพร รัตนตรัยวงศ์, ยงยุทธ ทักษิญ และ สุภาพ แก้วละเอียด. 2537. การเพาะพันธุ์ปลากดแก้ว. เอกสารวิชาการฉบับที่ 27/2537. กองประมงน้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ.

วิศณุพร รัตนตรัยวงศ์. 2550. การเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ปลากดแก้วโดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตริน. *ใน* บทคัดย่อรายงานการประชุมวิชาการประมง ครั้งที่ 2 เพื่อความมั่นคงด้านการประมงและทรัพยากรน้ำ. คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.

สุภัทรา อุไรวรรณ์, วิศณุพร รัตนตรัยวงศ์ และ สุรางค์ สุมโนจิตราภรณ์. 2544. การถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจของปลากดแก้ว. เอกสารวิชาการฉบับที่ 3/2544. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง, กรุงเทพฯ.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2538. การเพาะขยายพันธุ์ปลา. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Aizen, Joseph., I. Meiri, I. Tzchori, B. Levavi-Sivan and H. Rosenfeld. 2005. Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. General and Comparative Endocrinology 142: 212-221.

Ando, H., P. Swanson and A. Urano. 2003. Regulation of LH synthesis and release by GnRH and gonadal steroids in masu salmon. Fish physiology and Biochemistry 28: 61-63.

Al-Daham, N. K. and M. N. Bhatti. 1979. Annual changes in the ovarian activity of the freshwatwer teleost, *Barbus luteus* (Heckel) from Southern Iraq. J. Fish Biol. 14:381-387.

Barton, Bruce A., 2002. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. Integrative and Comparative Biology. 42: 517-525.

Babiker, M. M., and H. Ibrahim, 1979. Studies on the biology of reproduction in the cichlid *Tilapia nilotica* (L.): gonadal maturation and fecundity. J. Fish Biol. 14: 437-448.

Benfey, T.J. and A.M. Sutterlin. 1984. Growth and gonad development in triploid landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*). Can.J.Fish. Aquat. Sci. 41: 1387-1392.

Benita, S., J. P. Benoit, F. Puisieux and C. Thies. 1984. Characterization of Drug-Loaded Poly (*d*,*l*-lactide) Microspheres. Journal of Pharmaceutical Sciences. 73: 1721-1724.

Carolsfeld, J., N. M. Sherwood, H. Kreiberg and S. A. Sower. 1988. Induded sexual maturation of Herring using GnRH 'Quick–Release' Cholesterol Pellets. Aquaculture 70: 169–181.

Coward, K. and N.R. Bromage. 1998. Histological classification of oocyte growth and the dynamics of ovarian recrudescence in *Tilapia zillii*. Journal of Fish Biology 53: 285-302.

Coward, K. and N.R. Bromage. 2000. Reproductive physiology of female tilapia broodstock. Fish Biology and Fisheries 10: 1-25.

Chaux, J. and P.-W. Fang. 1949. Catalogue des Siluroidei d' Indochine de la collection du Laboratoire des Peches Coloniales au Museum, avec la description de six especes nouvelles (suite et fin). Bull. Mus. Natn. Hist. Natl. (Ser 2) 194-201.

Chinabut, S., C. Limsuwan and P. Kitsawat. 1991. Histology of the Walking Catfish, *Clarias batrachus*. Department of Fisheries, Bangkok. 96 pp.

Contrearas-Sanchez, W.M., C.B. Schreck, M.S. Fitzpatrick and C.B. Pereira. 1998. Effects of stress on the reproductive performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biology of Reproduction 58: 439-447.

Groman, DB. 1982. Histology of the stripes bass. American Fisheries Society. Bethesda, Maryland. 116 p.

Gothilf, Y. and Y. Zohar. 1991. Clearance of different forms of GnRH from the circulation of the gilthead seabream, *Sparus auratus* in relation to their degradation and bioactivities. *In*: Scot, A.P., J.P. Sumpter , D.E. Kime, and M.S. Rolfe (eds.). Reproductive Physiology of Fish. Fish Symposium 91. Sheffield. pp.35-37.

Humason G. 1972 . Animal Tissue Techniques. W.H.Freeman, New York USA.

Levavi–Sivan, B., A. Ayelet and K. Tamir. 2003. Characterization of the inhibitory dopamine receptor from the pituitary of tilapia. Fish Physiology and Biochemistry 28 : 73–75.

Levavi–Sivan, B., R. Vaiman, O. Sachs and I. Tzchori. 2004. Spawning induction and hormonal levels during final oocyte maturation in the silver perch (*Bidyanus bidyanu*). Aquaculture 229 : 419–431.

Levavi-Sivan, Berta., Jakob Biran and Einat Fireman. 2006. Sex Steroids Are Involved in the Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone and Dopamine D2 Receptors in Female Tilapia Pituitary. Biology of Reproduction 75: 642-650.

Lim, H. K., N. W. Pankhurst and Q. P. Fitzgibbon. 2004. Effects of slow release gonadotropin releasing hormone analog on milt characteristics and plasma levels of gonadal steroids in greenback flounder, *Rhombosolea tapirina*. Aquaculture 240 : 505–516.

Msiska, O.V. 2002. The histology of mature gonads of *Oreochromis* (Nyasalapia) *karongae* (Trewavas). Afr. J. Ecol. 40: 164-171.

Mylonas, Constantinos C .and Yonathan Zohar . 2001. Endocrine regulation and artificial induction of oocyte maturation and spermiation in basses of the genus *Morone*. Aquaculture 202: 205-220.

Mylonas, Constantinos C .and Yonathan Zohar . 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. Fish Biology and Fisheries 10: 463-491.

Ng, H. H. and W. J. Rainboth. 1999. The bagrid catfish genus Hemibagrus (Teleostei : Siluriformes) in central Indochina with a new species from the Mekong River. Raffles Bull. Zod 47(2): 555-576.

Okada, Hiroaki., T. Heya, Y. Ogawa, and T. Shimamoto. 1988. One-Month Release Injectable Mi Microcapsules of a Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Agonist (Leuprolide Acetate) for Treating Experimental Endometriosis in Rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 244: 711-749.

Okada, Hiroaki, Y. Doken, Y. Ogawa, and H. Toguchi. 1994a. Sustained Suppression of the Pituitary- Gonadal Axis by Leuprorelin Three-Month Depot Microspheres in Rats and Dogs. Pharm. Res. 11: 1199-1206.

Okada, Hiroaki, M. Yamamoto, T. Heya, Y. Inouue, S Kamei, Y. Ogawa and H. Toguchi. 1994b. Drug delivery using biodegradable microspheres. J. Contr. Rel. 28: 121-129.

Okada, Hiroaki. Y. Doken, Y. Ogawa, and Hajime Toguchi. 1994c. Preparation of Three-Month Depot Injectable Microsphers of Leuprorelin Acetate Using Biodegradable Polymers. Pharm. Res. 11: 1143-1151.

Okada, Hiroaki. 1997. One- and three-month release injectable microspheres of the LH-RH superagonist leuprorelin acetate. Advanced Drug Delivery Reviews 28: 43-70.

Peter, R.E. and K.L. Yu. 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fish basic and applied apects. Fish biology and Fisheries 7: 173-197.

Sinha, V.R., A. Nanda and R. Kumria. 2002. Cyclodextrins as sustained–release carriers. Available Source:http://www.pharmtech.com/pharmtech/data/articlestandard/pharmtech/432002/36186/article.pdf., November 21, 2006.

Tacon, P., J.F. Baroiller, P.Y. Le Bail, P.Prunet and B. Jalabert. 2000. Effect of Egg Deprivation on Sex Steroids, Gonadotropin, Prolactin, and Growth Hormone Profiles during the Reproductive Cycle of the Mouthbrooding Cichild Fish *Oreochromis niloticus*. General and Comparative Endocrinology 117: 54-65.

Tsuruoka, M., T. Hashimoto, H. Seo, S. Ichimasa, O. Fujinaga, Uekama, K., H. Arima, T. Irie, K. Matsubara and T. Kuriki. 1989. Sustained release of buserelin acetate, a luteinizing hormone-releasing hormone agonist, from an injectable oily preparation utilizing ethylated β-cyclodextrin. J. Pharm. Pharmacol. 41: 874-87.

Wagner, Eric, Ronney Arndt and Blaine Hilton. 2002. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. Aquaculture 211: 323-366.

Uekama, K., Y Tahara, T. Ijitsu and T. Yamada. 1989. Sustained Release Drug Preparation. Nisshin Flour Miling Co.,Ltd., Tokyo, Japan.

Vacher, C., E.L. Mananos, B. Breton, M.H. Marmignon and C. Saligaut. 2000. Modulation of Pituitary Dopamine D_1 or D_2 Receptors and Secretion of Follicle Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone During the Annual Reproductive Cycle of Female Rainbow Trout. Journal of Neuroendocrinology 12: 1219-1226.

Vacher, Coralie., Francios Ferriere, Marie-Helene Marmignon, Elisabeth Pekkegrini and Christian Saligaut. 2002. Dopamine D2 receptors and secretion of FSH and LH: role of sexual Steroids on the pituitary of the female rainbow trout. General and Comparative Endocrinology 127: 198-206.

Van Asselt, L.A.C., H.J.Th. Goos, R. De Leeuw, R.E. Peter, E.M. Hol, F.P. Wassenberh and P.G.W.J. Van Oordt. 1990. Characterization of dopamine D_2 receptors in the pituitary of the African catfish, *Clarias gariepinus*. General and Comparative Endocrinology 80: 107-115.

Vidal, Bernadette, Catherine Pasqualini, Nadine Le Belle, M. Claire H. Holland, Miskal Sbaihi, Philippe Verier, Yonathan Zohar and Sylvie Dufour. 2004. Dopanime Inhibits Luteinizing Hornone Synthesis and Release in the Juvenile European Eel: A Neruoendocrine Lock for the Onset of Puberty. Biology of Reproduction 40: 1491-1500.

Yaron, Zvi, Gal Gur, Philippa Melamed, Hanna Rosenfeld, Abigail Elizur and Berta Levavi-Sivan. 2003. Regulation of Fish Gonadotropins. Int. Rev of Cytology 225(1): 131-185.

Zohar, Y., G. Pagelson and M. Tosky. 1988. Daily changes in reproductive hormone levels in the female gilthead seabream *Sparus aurata* at the spawning period. In: INRA, Paris (Editor), Reproduction in Fish – Basic and Applied Aspects in Endocrinology and Genetics. Les Colloques de l'INRA, 44 : 119-125.

Zohar, Yonathan and Constantinos C. Mylonas. 2001. Endocrine manipulations of spawning in fish cultured: from hormones to genes. Aquaculture 197: 99-136.