เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 182

Technical Paper No. 182

การทดสอบประสิทธิภาพของฮอร์โมนสังเคราะห์ชนิดต่าง ๆ ในการเพาะขยายพันธุ์ปลาน้ำจืด

Efficiency Testing of Synthesized Hormone Analogues in Freshwater Fish Propagation

สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด
กรมประมง
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
National Inland Fisheries Institute
Department of Fisheries
Ministry of Agriculture and Cooperatives

เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 182 Technical Paper No. 182

การทดสอบประสิทธิภาพของฮอร์โมนสังเคราะห์ชนิดต่างๆ ในการเพาะขยายพันธุ์ปลาน้ำจืด

Efficiency Testing of Synthesized Hormone Analogues in Freshwater Fish Propagation

ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล Panu Tavarutmaneegul
กำชัย ลาวัณยวุฒิ Khamchai Lawonyawut
สุจินต์ หนูขวัญ Sujin Nukwan

สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด
กรมประมง
2539

National Inland Fisheries Institute
Department of Fisheries
1996

รหัสทะเบียนวิจัยเลขที่ 35-18108-2105-187

การทดสอบประสิทธิภาพของฮอร์โมนสังเคราะห์ชนิดต่างๆ ในการเพาะขยายพันธุ์ปลาน้ำจืด

Efficiency Testing of Synthesized Hormone Analogues in Freshwater Fish Propagation

โดย

ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล

กำชัย ลาวัณยวุฒิ

สุจินต์ หนูขวัญ

กลุ่มชีววิทยาการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำจืด

สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด

กรมประมง

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของ

โครงการผลิตและทดสอบฮอร์โมนสังเคราะห์เพื่อใช้ในการเพาะขยายพันธุ์ปลา

The Production and Testing of

Luteinizing Hormone Releasing Hormone Analogues

for Fish Propagation

ระหัสทะเบียนวิจัยเลขที่ 35-13108-2105-187

การทดสอบประสิทธิภาพของฮอร์โมนสังเคราะห์ชนิดต่างๆ ในการเพาะขยายพันธุ์ปลาน้ำจืด

ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล, กำชัย ลาวัณยวุฒิ และสุจินต์ หนูขวัญ

เรื่องย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพของฮอร์โมนสังเคราะห์ชนิดต่างๆ ในการเพาะพันธุ์ปลาน้ำจืด ได้ทำโดยใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ที่นิยมใช้กันทั่วๆไป 3 ชนิด คือ D-Ala^{6}-LHRHa, D-Arg^{6}-Pro^{9}-LHRHa (sGnRHa) และ Buserelin และฮอร์โมนที่ผลิตขึ้นได้จากโครงการผลิตและทดสอบฮอร์โมนสังเคราะห์เพื่อใช้ในการผสมเทียมพันธุ์ปลาของกรมประมง จำนวน 4 ชนิด คือ D-Trp^{6}-LHRHa, D-Ala^{6}-LHRHa, Trp^{7}-Tyr^{8}-Pro^{9}-Gly^{10} diethylamide GnRHa และ D-His^{5}-Pro^{9}-Gly^{10} diethylamide GnRHa และ D-His^{5}-Pro^{9} ในอัตรา 30 ไมโครกรัม/น้ำหนักแม่ปลา 1 กก ร่วมกับ Domperidone ในอัตรา 5 มก/น้ำหนักปลา 1 กก ฉีดในแม่ปลาตะเพียนขาวและแม่ปลาดุกอุยเพื่อกระตุ้นให้วางไข่ โดยมีชุดควบคุม (control) คือแม่ปลาทั้งสองชนิดที่ฉีดด้วย น้ำกลั่น เป็นชุดควบคุมลบ และฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองปลา เป็นชุดควบคุมบวก ผลการทดลองใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ที่นิยมใช้กันทั่วๆไป พบว่าในปลาตะเพียนขาวฮอร์โมน D-Ala^{6}-LHRHa, D-Arg^{6}-Pro^{9}-LHRHa และ Buserelin มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้แม่ปลาวางไข่ได้ 100 % สูงเท่ากัน ส่วนในปลาดุกอุย ฮอร์โมน D-Arg^{6}-Pro^{9}-LHRHa และ Buserelin มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้แม่ปลาวางไข่เท่ากับ 82.22 และ 95.00 % ตามลำดับ ฮอร์โมน D-Trp^{6}-LHRHa มีประสิทธิภาพต่ำสุดเท่ากับ 12.78 % ผลการทดลองใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ที่ผลิตโดยโครงการฯ ทั้ง 4 ชนิด พบว่าในปลาตะเพียนขาว ฮอร์โมน D-Trp^{6}-LHRHa มีประสิทธิภาพสูงสุดเท่ากับ 70.00 % ในขณะที่ฮอร์โมน D-Ala^{6}-LHRHa มีประสิทธิภาพเท่ากับ 30.00 % ส่วนฮอร์โมน Trp^{7}-Tyr^{8}-Pro^{9}-Gly^{10} diethylamide GnRHa และ D-His^{5}-Pro^{9}Dly^{10} diethylamide GnRHa ไม่สามารถกระตุ้นให้แม่ปลาว่างไข่ได้ ส่วนในปลาดุกอุย พบว่า ฮอร์โมน D-Ala^{6}-LHRHa ไม่สามารถกระตุ้นให้แม่ปลาวางไข่ได้ ฮอร์โมน D-Trp^{6}-LHRHa มีผลกระตุ้นให้แม่ปลาวางไข่ได้ผลดีพอสมควร จากผลการทดลองสรุปได้ว่า ฮอร์โมนสังเคราะห์ที่นิยมใช้กันทั่วๆไปมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกัน มีเฉพาะฮอร์โมน D-Trp^{6}-LHRHa ชนิดเดียวเท่านั้นที่มีประสิทธิภาพต่ำในปลาดุกอุย ฮอร์โมนสังเคราะห์ที่ผลิตโดยโครงการฯ ยังมีประสิทธิภาพต่ำ การเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมน 17 β-Estradiol (E_2) และ 17 α, 20 β dihydroxy-4-pregnen-3-one (17 α, 20 β, P_4) ในเลือดปลาภายหลังการฉีดด้วยฮอร์โมน Buserelin ทั้งในฤดูและนอกฤดูได้รายงานและวิจารณ์ผลไว้ในตอนท้าย

Efficiency Testing of Synthesized Hormone Analogues in Freshwater Fish Propagation

Panu Tavarutmaneegul, Khamchai Lawonyawut and Sujin Nukwan

Abstract

The study on efficiency testing of synthesized hormone analogues in freshwater fish propagation was conducted by using 3 commercial analogues [D-Ala^{6}-LHRHa, D-Arg^{6}-Pro^{9}-LHRHa (SGnRHa) and Buserelin]; and 4 analogues prepared by the Production and Testing of Luteinizing Hormone Releasing Hormone Analogues for Fish Propagation project namely D-Trp^{6}-LHRHa, D-Ala^{6}-LHRHa, Trp^{7}-Tyr^{8}-Pro^{9}-Gly^{10} diethylamide GnRHa and D-His^{5}-Pro^{8}-Dro^{9}-Gly^{10} diethylamide GnRHa. All of the hormones were used to induce spawning in Thai barb *(Puntius gonionotus)* and walking catfish (*Clarias macrocephalus*). A standard dosage was used for the injection at 30 μg/ 1 kg of brood fish plus 5 mg of Domperidone/ 1 kg of brood fish. The results were compared with the control brood fish injected with distilled water as negative control and the solution of pituitary gland extract as positive control. In the Thai barb, the results of using all the 3 commercial analogues were 100 % success in induced spawning. However, in the walking catfish, the efficiency in induced spawning of D-Arg^{6}-Pro^{9}-LHRHa and Buserelin were 82.22 % and 95.00 % respectively while D-Ala^{6}-LHRHa was 12.78 %. The results of testing 4 analogues produced by the project in Thai barb showed that hormone D-Trp^{6}-LHRHa has the highest efficiency to induce spawning (70 %) while D-Ala^{6}-LHRHa gave a moderate efficiency (30%). The other two analogues (Trp^{7}-Tyr^{8}-Pro^{9}-Gly^{10} diethylamide GnRHa and D-His^{5}-Pro^{8}-Dro^{9}-Gly^{10} diethylamide GnRHa) were not success in both species. In walking catfish, D-Trp^{6}-LHRHa showed a satisfactory result while D-Ala^{6}-LHRHa has no response. The study was demonstrated all of commercial analogues consistenly gave high efficiency for induced spawning in both species, except only result of D-Ala^{6}-LHRHa in walking catfish. The efficiency of analogues produced by the project were low. The fuctuation of the level of 17 β-Estradiol (E_2) and 17 α, 20 β dihydroxy-4-pregnen-3-one (17 α, 20 β, P_4) in fish blood after injected with Burserelin (in and out of breeding season) have been reported and discussed in this paper.

คำนิยม

ผลงานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของกิจกรรมในโครงการผลิตและการทดสอบฮอร์โมนสังเคราะห์LHRH เพื่อใช้ในการเพาะพันธุ์ปลา (The Production and Testing of Luteinizing Hormone Releasing Hormone Analogues for Fish Propagation) ซึ่งได้รับเงินทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี่ (Science and Technology Development Board) คณะผู้ทำการวิจัยใคร่ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่ได้ให้ความสนับสนุนจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีไว้ ณ โอกาสนี้

ผลงานวิจัยนี้ได้รับผลสำเร็จเป็นอย่างดีเพราะได้รับความร่วมมือในการสังเคราะห์ฮอร์โมนและตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนในเลือดปลา จากทางฝ่ายผู้ร่วมทำการวิจัยที่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อันประกอบด้วย รศ. แพทย์หญิง ขนิษฐา บูรณะศิริ, ผศ. แพทย์หญิง ธาดา สืบหลินวงศ์ และ อาจารย์ ดร. สุกัญญา วีระวัฒนะกุมภะ คณะผู้ทำการวิจัยขอขอบคุณในความร่วมมืออย่างดีของทุกท่านไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ii
สารบัญภาพ	iii
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การศึกษาจากเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ	6
ผลการศึกษา	10
1. ประสิทธิภาพของฮอร์โมนสังเคราะห์ชนิดต่าง ๆ ที่นิยมกันทั่วๆไป	10
2. ประสิทธิภาพของฮอร์โมนที่โครงการฯ สังเคราะห์ขึ้น	10
3. การเปลี่ยนแปลงฮอร์โมน 17β-estradiol และ 17α, 20β-dihydroxy -4-pregnen-3-one ในเลือดปลา	11
สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา	18
เอกสารอ้างอิง	21

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

1. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของฮอร์โมนสังเคราะห์ที่นิยมใช้กันทั่วๆไป โดยสรุป 12
2. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของฮอร์โมนสังเคราะห์ที่ทางโครงการฯ สังเคราะห์ขึ้นโดยสรุป 13
3. ระดับฮอร์โมนเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานของ 17β-estradiol ใน ปลาตะเพียน จำนวน 6 ตัว ที่เวลาต่างๆ ภายหลังการฉีดฮอร์โมน Buserelin 14
4. ระดับฮอร์โมนเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานของ 17α, 20β-dihydroxy -4-pregnen-3-one ในปลาปลาตะเพียน จำนวน 6 ตัว ที่เวลาต่างๆ ภายหลัง การฉีดฮอร์โมน Buserelin 14
5. ระดับฮอร์โมนเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาของ 17β-estradiol ใน ปลาดุกอุย จำนวน 6 ตัว ที่เวลาต่างๆ ภายหลังการฉีดฮอร์โมน Buserelin 15
6. ระดับฮอร์โมนเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานของ 17α, 20β-dihydroxy -4-pregnen-3-one ในปลาดุกอุย จำนวน 6 ตัว ที่เวลาต่างๆ ภายหลังการฉีด ฮอร์โมน Buserelin 15

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ระดับฮอร์โมนเฉลี่ยของ 17β-Estradial (E_2) ในปลาตะเพียน ภายหลังการฉีดฮอร์โมน Buserelin 16

ภาพที่ 2 ระดับฮอร์โมนเฉลี่ยของ 17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one ในปลาตะเพียน ภายหลังการฉีดฮอร์โมน Buserelin 16

ภาพที่ 3 ระดับฮอร์โมนเฉลี่ย 17β-Estradial (E_2) ในปลาดุกอุยภายหลังการฉีดฮอร์โมน Buserelin 17

ภาพที่ 4 ระดับฮอร์โมนเฉลี่ยของ 17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one ในปลาดุกอุยภายหลังการฉีดฮอร์โมน Buserelin 17

การทดสอบประสิทธิภาพของฮอร์โมนสังเคราะห์ชนิดต่าง ๆ ในการเพาะขยายพันธุ์ปลาน้ำจืด

Efficiency Testing of Synthesized Hormone Analogues in Freshwater Fish Propagation

คำนำ

ฮอร์โมนในระบบสืบพันธุ์ของปลาสร้างมาจาก ต่อมใต้สมอง ไฮโปทาลามัส (hypothalamus) และต่อมเพศ ฮอร์โมนเหล่านี้ทำหน้าที่ควบคุมระบบสืบพันธุ์ให้เป็นปกติเพื่อความอยู่รอดของเผ่าพันธุ์ เช่น การพัฒนาการสร้างไข่ การพัฒนาการสร้างสเปิร์ม การควบคุมการตกไข่และการวางไข่ ฮอร์โมนเหล่านี้จะทำงานได้เป็นปกติเมื่อสภาพแวดล้อมต่างๆ มีความเหมาะสมต่อการผสมพันธุ์วางไข่ของปลา กล่าวคือสภาพแวดล้อมจะกระตุ้นอวัยวะรับความรู้สึกและเส้นข้างลำตัว ให้ส่งกระแสความรู้สึกไปยังสมองบริเวณไฮโปทาลามัสส่วนกลาง ซึ่งจะทำการหลั่งรีลีสซิ่ง ฮอร์โมน (releasing hormone) ออกมากระตุ้นการทำงานของต่อมใต้สมอง (pituitary gland) ให้หลั่งฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (gonadotropin hormone) ไปกระตุ้นรังไข่ หรืออัณฑะให้หลั่งฮอร์โมนเพศออกมาก็จะทำให้ไข่และสเปิร์มสมบูรณ์เต็มที่และถูกปล่อยออกมา การตกไข่จะเกิดขึ้นได้ต่อเมื่อไข่อยู่ในระยะ germinal vessicle เคลื่อนที่ไปยังขอบของเซลแล้ว และจะต้องมีปริมาณ gonadotropin ในเลือดสูง ดังนั้นการฉีด gonadotropin จากภายนอกเพิ่มให้กับแม่ปลา ในระยะที่ไข่มีการเจริญพันธุ์เต็มที่ก็จะช่วยให้เกิดการตกไข่ได้เร็วขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการหลั่งโกนาโดโทรปินก็ยังถูกควบคุมโดยฮอร์โมน GnRH และ dopamin ในสภาวะปกติทั่วไป พบว่าเมื่อต่อมใต้สมองหลั่งโกนาโดโทรปินออกมากระตุ้นรังไข่หรืออัณฑะ ก็จะมีผลทำให้รังไข่หรืออัณฑะหลั่งฮอร์โมนเพศออกมา ถ้าฮอร์โมนเพศมีระดับต่ำก็จะกระตุ้นให้ มีการหลั่งโกนาโดโทรปินมากขึ้นจนทำให้ฮอร์โมนเพศมีระดับสูงขึ้น แต่เมื่อฮอร์โมนเพศมีระดับสูงขึ้นถึงระดับหนึ่งก็จะกลับไปยับยั้งการทำงานของไฮโปทาลามัสและต่อมใต้สมองให้หลั่งโกนาโดโทรปินลดลง และมีผลทำให้ฮอร์โมนเพศมีระดับลดลง สาเหตุที่กลไกควบคุมดังกล่าวเกิดได้ เนื่องจากมีตัวรับสัญญาณที่บริเวณไฮโปทาลามัส หรือต่อมใต้สมองที่เรียกว่า สเตอรอยด์ ไบดิ้งไซต์ (steroid binding site) ทำหน้าที่จับกับฮอร์โมนเพศที่มาตามกระแสเลือด แล้วแปลสัญญาณ ทำการกระตุ้นหรือยับยั้งการหลั่งโกนาโดโทรปิน (Peter *et al.* 1987a) การที่ GnRH หรือ LHRH มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย จึงได้มีการพยายามสังเคราะห์ฮอร์โมนดังกล่าวออกมาในรูปของ อนาลอกซ์ (analogue) เพื่อใช้กระตุ้นการตกไข่ และการวางไข่ของปลา ฮอร์โมนสังเคราะห์ GnRHa และ LHRHa จะมีความคงตัวและค่าครึ่งชีวิต (half life) นานกว่า GnRH และ LHRH เนื่องจากอนาลอกซ์ดังกล่าวจะถูกสังเคราะห์ให้มีกรดอะมิโน 9 ตัว (nanopeptide) อยู่ในรูปของ D-amino acid ซึ่งจะคงตัวดีกว่า L-amino acid ในธรรมชาติ อีกทั้ง

ยังสามารถจับกับตัวรับจำเพาะ (receptor) ที่บริเวณต่อมใต้สมองได้ดีกว่า (binding affinity) จึงมีผลทำให้การฉีด GnRHa และ LHRHa มีแนวโน้มกระตุ้นต่อมใต้สมองให้หลั่งโกนาโดโทรปินไปยังรังไข่หรืออัณฑะมากขึ้น และประสบผลสำเร็จในการเพาะพันธุ์ปลาดีกว่า (Peter *et al.* 1987b)

ปัจจุบันมีการสังเคราะห์ analogue ขึ้นมาหลายชนิด แต่โดยทั่วไปแล้วที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะพันธุ์ปลามีหลายชนิด ได้แก่ LHRHa, sGnRHa และ Buserelin ฯลฯ สำหรับในประเทศไทยนั้น ยังมิได้มีการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ analogue แต่ละชนิด ในการเพาะขยายพันธุ์ปลาน้ำจืด เพื่อนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด โครงการวิจัยหนึ่งของสถาบันวิจัยประมงน้ำจืดได้รับเงินทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีคือ โครงการผลิตและการทดสอบฮอร์โมนสังเคราะห์เพื่อใช้ในการเพาะพันธุ์ปลา ได้ทำการผลิตฮอร์โมน analogue ขึ้นมา 4 ชนิด เพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพเปรียบเทียบกับฮอร์โมน analogues ที่นิยมใช้กันทั่วๆไปในปัจจุบัน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของฮอร์โมนสังเคราะห์ที่นิยมใช้กันทั่วๆ ไป 3 ชนิด คือ LHRHa, sGnRHa และ Buserelin ในการเพาะพันธุ์ปลาน้ำจืด

2. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของฮอร์โมน GnRHa ที่ทางโครงการฯ ผลิตขึ้นมา 4 ชนิด เปรียบเทียบกับฮอร์โมน analogues ที่ใช้ได้ผลดีในปัจจุบัน

3. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน 17β-Etradiol (E_2) และฮอร์โมน 17 α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (17α-20β-P_4) ในเลือดปลาตะเพียนขาว และปลาดุกอุยกับระยะการวางไข่ ภายหลังฉีดด้วยฮอร์โมน Buserelin ทั้งในและนอกฤดูผสมพันธุ์

การศึกษาจากเอกสาร

การเพาะพันธุ์ปลาด้วยวิธีการฉีดฮอร์โมนผสมเทียมในประเทศไทยเริ่มเมื่อ ปี พ.ศ. 2509 โดย อารีย์และคณะ สามารถเพาะพันธุ์ปลาสวายโดยการใช้ต่อมใต้สมอง จากความสำเร็จนี้ได้ขยายผลไปยังปลาน้ำจืดชนิดอื่นๆ จำนวนมากมาย (วีรพงศ์, 2536) ต่อมาได้มีการสกัดโกนาโดโทรปินจากสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น ปลา และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ฯลฯ ในรูปโกนาโดโทรปินบริสุทธิ์ และ HCG ที่ได้ จากปัสสาวะของหญิงมีครรภ์ แต่กระนั้นโกนาโดโทรปินเหล่านี้มีราคาแพงและใช้ไม่ได้ผลในปลาบางชนิด (อุทัยรัตน์, 2531) ต่อมาเมื่อมีการแยก LHRH จากไฮโปธาลามัสของหมูและแกะได้สำเร็จในปี ค.ศ. 1971 (Donaldson and Hunter, 1983) ทำให้ทราบว่าฮอร์โมนชนิดนี้

เป็นตัวควบคุมการผลิตและการหลั่งโกนาโดโทรปิน (gonadotropin, GtH) จากต่อมใต้สมอง (pituitary gland) เมื่อนำฮอร์โมน LHRH ไปฉีดให้กับปลาจะทำให้ปลาสามารถวางไข่ได้ (นฤพล และวัฒนะ, 2531) ต่อจากนั้นได้มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่าน ศึกษาและแยกทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น จนพบว่า LHRH มีโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยกรดอะมิโน 10 โมเลกุล (decapeptide) ต่อเรียงกัน และได้พบว่าอนาล็อคของ LHRH ซึ่งมีโครงสร้างต่างกัน โดยประกอบด้วยกรดอะมิโนเพียง 9 โมเลกุล (nanopeptide) มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการตกไข่ของปลาได้ดีกว่า เรียกชื่อย่อว่า LRHa หรือ LHRHa (Luteinising Hormone Releasing Hormone analogue) ได้แก่ D-Ala^{6}-des Gly^{10}-LHRH (1-9) ethylamide, D-Ser-(t-Bu)^{6} -des Gly^{10}-LHRH (1-9) ethylamide (อุทัยรัตน์, 2531)

การประยุกต์ใช้ฮอร์โมนในการเพาะพันธุ์ปลา

การเพาะพันธุ์ปลา ต้องการพ่อแม่พันธุ์ที่สมบูรณ์เพศ ซึ่งโดยทั่วไปพ่อพันธุ์จะมีการสร้างสเปิร์มที่เร็ว แต่สำหรับแม่พันธุ์แล้ว มักจะมีการสร้างไข่ที่ช้ากว่า การเร่งการพัฒนาการของสเปิร์มและไข่สามารถเร่งได้ โดยการใช้ฮอร์โมนชนิดต่างๆฉีดกระตุ้น ซึ่งในปัจจุบันการเพาะพันธุ์ปลาในเชิงการค้า ได้นำความรู้พื้นฐานของฮอร์โมนในระบบสืบพันธุ์มาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลาย และประสบความสำเร็จในปลาหลายชนิด ฮอร์โมนเหล่านั้นได้ถูกนำมาใช้ในลักษณะแตกต่างกันดังนี้

1. ต่อมใต้สมอง (pituitary gland) ได้จากการนำต่อมใต้สมองของปลามาบดให้ละเอียด แล้วผสมตัวทำละลายจึงนำไปฉีดปลา (Hypophysation) เพื่อกระตุ้นการตกไข่และการวางไข่ ต่อมใต้สมองอาจถูกนำมาใช้ในรูปของต่อมสด หรือต่อมแช่อซิโตน หรือ แอลกอฮอล์ก็ได้ ต่อมใต้สมองเมื่อถูกบดละเอียดก็อาจมีฮอร์โมนหลายชนิดที่สะสมอยู่ในต่อมใต้สมอง ซึ่งก็รวมทั้งโกนาโดโทรปินละลายออกมาด้วย

2. ฮอร์โมนสกัด (extract hormone) ซึ่งหมายถึง โกนาโดโทรปินสกัดจากปลา โกนาโดโทรปินสกัดจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และต่อมใต้สมองบดโดยพบว่า โกนาโดโทรปินสกัดจากปลาเช่น SG-G100 ได้ถูกนำมาใช้กระตุ้นการตกไข่ของปลาหลายชนิด เช่น ปลากระบอก, ปลาช่ง และปลาดุก เป็นต้น สำหรับโกนาโดโทรปินสกัดจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะนิยมใช้ เอชซีจี (HCG) มากที่สุด การใช้เอชซีจีอย่างเดียว ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่ไม่สามารถกระตุ้นการตกไข่ และการวางไข่ในปลาหลายชนิด เนื่องจากเอชซีจีไม่สามารถจับตัวกับ ตัวรับจำเพาะเจาะจงของโกนาโดโทรปิน (gonadotropin receptor) บริเวณไข่ เช่น ใน ปลาไน, ปลาเฉา, ปลาช่ง, ปลาเล่ง, ปลายี่สก และปลาตะเพียนขาว เป็นต้น ปลาบางชนิดเท่านั้นที่จะตกไข่และวางไข่เมื่อฉีดเอชซีจีกระตุ้นอย่างเดียว เช่น แม่ปลาดุกอุย เมื่อฉีดเอชซีจี 2 ครั้ง โดยครั้งแรกฉีด 1,000 ไอยู/กิโลกรัม แล้วปล่อยไว้ 6 ชั่ว

โมงจึงฉีดครั้งที่สอง 2,000 ไอยู/กิโลกรัม ก็จะตกไข่ได้ในเวลา 9-12 ชั่วโมงต่อมา แม่ปลากระบอกที่ได้รับการฉีดเอชซีจีครั้งแรก 20 ไอยู/กิโลกรัม แล้วปล่อยไว้ 24 ชั่วโมงจึงฉีดครั้งที่สอง 40 ไอยู/กิโลกรัม ปล่อยให้รัดกันเองก็สามารถวางไข่ได้โดยธรรมชาติ (natural spawning) (Kuo *et al.* 1973 cited by Sherwood, 1984) เอชซีจี มีชื่อทางการค้าหลายชนิด เช่น CG-5, CG-10, pregnyl, puberogen และ synahorin เป็นต้น การสกัดเอชซีจีอย่างง่ายๆ ทำโดยการนำปัสสาวะหญิงมีครรภ์ในระยะ 3 เดือนแรก มาผสมอะซีโตนในอัตรา 1:2 แล้วปล่อยให้ตกตะกอนออกมาแช่แข็งและไล่ความชื้น (freeze drying) ก็สามารถนำผลึกหรือผงฮอร์โมนไปทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธี RIA (radioimmunoassay) เพื่อนำฮอร์โมนไปใช้เพาะพันธุ์ปลาต่อไป

3. รีลีสซิ่งฮอร์โมน ซึ่งได้แก่ LHRH, GnRH, LHRHa และ GnRHa เริ่มได้รับความนิยมในการเพาะพันธุ์ปลาอย่างมาก เพราะจะไปกระตุ้นต่อมใต้สมองให้หลั่งโกนาโดโทรปินออกมาโดยตรง โดยทั่วไปนิยมใช้ในรูปของอนาลอกซ์ จากการศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมระบบการสืบพันธุ์วางไข่ภายในต่อมใต้สมองของปลานั้น พบว่า เมื่อฉีดกระตุ้นด้วย LHRH นั้น จะมีสารบางอย่างที่สมองสร้างขึ้นมาและมีผลต่อการออกฤทธิ์ของ LHRH โดยไปยับยั้งการทำงานของต่อมใต้สมองที่ผลิตและหลั่งโกนาโดโทรปินออกมาทำให้ปลาไม่สามารถวางไข่ได้แม้ว่าจะฉีดกระตุ้นด้วย LHRH ในปริมาณสูงแล้วก็ตาม จากการศึกษาพบว่าสารตัวนี้คือ Dopamin ซึ่งอยู่ในกลไกการควบคุมย้อนกลับ (negative feedback pathway) ซึ่งสารนี้มีอยู่สูงมากในปลาบางชนิดจนสามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของ LHRH ต่อต่อมใต้สมองได้โดยสมบูรณ์ แต่ในปลาบางชนิดก็มีปริมาณไม่มากพอที่จะไปขัดขวางการออกฤทธิ์ของ LHRH ต่อต่อมใต้สมองได้ นักวิทยาศาสตร์ได้ทดลองฉีด Domperidone ซึ่งเป็น Dopamin Antagonist ควบคู่กับ LHRH เพื่อแก้ไขหยุดยั้งขบวนการผลิต และหลั่ง gonadotropin เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LHRH ทำให้ปลาสามารถวางไข่ได้ (Peter *et al.* 1986) การฉีดกระตุ้นด้วย LHRHa หรือ GnRHa ร่วมกับ Domperidone เรียกว่า Linpe method จากวิธีการดังกล่าว ทำให้สามารถเพาะพันธุ์ปลาในประเทศจีนได้หลายชนิด เช่น ปลาไน, ปลาเฉา, ปลาซ่ง, ปลาเล่ง, ปลา mud carp, ปลา black carp และปลา oream ฯลฯ (Peter *et al.* 1988) ส่วนในปลาต่างประเทศชนิดอื่น ๆ ได้แก่ ปลาดุกแอฟริกัน (Leeuw *et al.* 1985) สำหรับในเมืองไทยมีการใช้ฉีดกับปลาหลายชนิดได้แก่ ปลาเฉา, ปลาซ่ง, ปลาลิ่น, ปลายี่สกเทศ, ปลาตะเพียนขาว, ปลาสวาย และปลาดุกอุย ฯลฯ (นฤพล และวัฒนะ, 2531) โดยพบว่าปลาบางชนิดตกไข่ได้เมื่อฉีดกระตุ้นด้วย LHRHa หรือ GnRHa ร่วมกับโดปามินแอนตาโกนิส ซึ่งเรียกวิธีนี้ว่า ลินพี เมทธอด (Linpe method) เพื่อเป็นเกียรติแก่ Dr. R. E. Peter และ Dr. Hao Ren Lin ซึ่งเป็นบุคคลแรกที่ค้นพบเทคนิคดังกล่าว เทคนิคดังกล่าวสามารถเพาะปลาได้หลายชนิดโดยเฉพาะตระกูลปลาจีน เช่น ปลาไน, ปลาทอง, ปลาเฉา, ปลาซ่ง, ปลาเล่ง, ปลายี่สก รวมทั้งปลาดุกและปลาสวาย เป็นต้น และส่วนใหญ่สามารถเพาะพันธุ์ได้โดยการฉีดฮอร์โมนเพียงครั้งเดียวเท่านั้น ซึ่งถ้าฉีดฮอร์โมนกระตุ้น โดยการใช้ต่อมใต้สมองบดหรือต่อมใต้สมองบดผสมเอชซีจี อาจต้องฉีดฮอร์โมนกระตุ้นถึง 2 ครั้ง

4. ฮอร์โมนเพศ จากความรู้ที่ว่า โกนาโดโทรปินที่ปลาผลิตขึ้นเอง (endogenous gonadotropin) หรือโกนาโดโทรปินที่ฉีดเข้าไป (exogenous gonadotropin) จะไปมีผลทำให้รังไข่หรืออัณฑะ สร้างฮอร์โมนเพศออกมาและทำให้ไข่และสเปิร์มมีความพร้อมในการปฏิสนธินั้น ทำให้มีการฉีดฮอร์โมนเพศเข้าไปในพ่อแม่พันธุ์ปลาโดยตรง เพื่อเร่งความสมบูรณ์เพศ (Huat, 1980) แนวทางดังกล่าวได้เริ่มมีการประยุกต์อย่างแพร่หลายในแม่ปลาแต่ก็พบว่าประสบความสำเร็จในปลาบางชนิดเท่านั้น เช่นการฉีดฮอร์โมน 17α, 20 β, 21-trihydroxy-4-pregnen-3-One แก่แม่ปลาก็สามารถที่จะเร่งให้มีไข่แก่ระยะสุดท้ายและตกไข่ได้โดยไม่ใช้โกนาโดโทรปินช่วยเลย (Trant *et al.* 1986) ส่วนใหญ่แล้วแม่ปลาที่ได้รับการฉีดฮอร์โมนเพศจะตกไข่ได้จะต้องมีไข่แก่จัดเท่านั้น เนื่องจากการฉีดฮอร์โมนเพศจะทำให้ระดับฮอร์โมนเพศในพลาสมาสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ในระยะเวลาสั้นๆ ฉะนั้นไข่ที่ตอบสนองได้ดีต้องเป็นไข่แก่จัดเท่านั้น แม่ปลาที่ไข่แก่ไม่เพียงพอถ้าได้รับการฉีดฮอร์โมนเพศจะตอบสนองไม่ดี เพราะต้องใช้ระยะเวลาในการพัฒนาให้ไข่แก่ในขณะที่ฮอร์โมนเพศมีฤทธิ์ในระยะเวลาสั้นๆ จึงไม่ทำให้ตกไข่

5. แนวทางใหม่ๆ (new avenues) ได้มีการนำเทคนิคใหม่ๆ มาพัฒนากระตุ้นการตกไข่และการวางไข่ปลา เช่น ได้มีการนำแอนตี้เอสโตรเจน (antiestrogen) ซึ่งจะจับกับ สเตอรอยด์ไบดิงไซต์ ทำให้เกิดพาธเวย์ อินเอฟเฟกทิฟ (pathway ineffective) สารดังกล่าวเช่น โครมิเฟนซิเตรท (clomiphene citrate) และทาโมซิเฟน (tamoxiphen) นอกจากนี้พรอสตาแกลนดินก็ได้เริ่มมีบทบาทในการฉีดกระตุ้นการเพาะพันธุ์ปลา รวมทั้งการฝังฮอร์โมน (hormone implantation) เข้าไปในตัวปลา การฝังฮอร์โมนมีข้อดีที่เป็นการนำฮอร์โมนที่อัดเม็ดซึ่งสามารถออกฤทธิ์ได้ช้าๆ นานกว่าการฉีดฮอร์โมนกระตุ้น ซึ่งจะออกฤทธิ์อย่างรวดเร็ว ฉะนั้นจึงมีประโยชน์ที่สามารถกระตุ้นความสมบูรณ์เพศปลาอย่างช้าๆ ได้นานหลายสัปดาห์ เทคนิคดังกล่าวเป็นการนำฮอร์โมนที่ต้องการ ผสมกับสารเหนียวและอัดเป็นเม็ด Sherwood *et al.* (1989) นำ GnRHa มาอัดเป็นเม็ดโดยใช้คอเลสเทอรอล (cholesterol) และเซลลูโลส (cellulose) ผสมในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน แล้วอัดเป็นเม็ด เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ยาว 3 มิลลิเมตร ซึ่งพบว่าการใช้ 5 % เซลลูโลส ร่วมกับ 95% คอเลสเทอรอล หรือ 100% คอเลสเทอรอลอย่างเดียวจะมีประสิทธิภาพทำให้ฮอร์โมนหลั่งออกมาช้า ๆ โดยสลายไปแค่ 36-38% ในเวลา 28 วัน เทคนิคนี้ประสบผลสำเร็จในการกระตุ้นการตกไข่และการวางไข่ปลาบางชนิด เช่น ปลานวลจันทร์ (Lee *et al.* 1986) และปลากะพงขาว (Almendras *et al.* 1988) เป็นต้น

ชนิดของฮอร์โมนสังเคราะห์ที่นิยมใช้กันทั่วไป

1. LHRHa จัดเป็น analogue ของ LHRH โดย LHRHa มีชื่อทางการค้าว่า Agerst 25201 และมีสูตรย่อว่า D-Ala^{6}-Pro^{9}-LHRH-NEt ซึ่งมีกรดอะมิโน 9 ตัว โดยกรดอะมิโนลำดับที่ 6 เป็น alanine และจะไม่มีกรดอะมิโนลำดับที่ 10 (glycine) แต่จะเหลือกรดอะมิโน ลำดับที่ 9

ซึ่งเป็น proline เกาะติดกับ ethylamide

2. GnRHa จัดเป็น analogue ของ GnRH โดยในปัจจุบัน GnRHa ได้ถูกสังเคราะห์และนำมาใช้ในการเพาะพันธุ์ปลามี 2 รูปแบบ คือ D-Arg^{6}-Pro^{9}-GnRH-NEt และ D-Ala^{6} -Pro^{9}-GnRH-NEt โดยกรดอะมิโนในลำดับที่ 6 เป็น arginine หรือ alanine ตามลำดับ และจะไม่มีกรดอะมิโนในลำดับที่ 10 (glycine) เช่นเดียวกัน แต่จะเหลือกรดอะมิโนในลำดับที่ 9 (proline) เกาะติดกับ ethylamide

3. Buserelin จัดเป็น analogue ของ LHRH และมีชื่อทางการค้าว่า Hoechst 766 และมีสูตรย่อเป็น D-Ser (t-Bu)^{6}-Pro^{9}-LHRH-NEt โดยกรดอะมิโนในลำดับที่ 6 เป็น serine และจะไม่มีกรดอะมิโนในลำดับที่ 10 (glycine) แต่จะเหลือกรดอะมิโนลำดับที่ 9 เกาะติดกับ ethylamide

สูตรโครงสร้างดังกล่าวมีดังต่อไปนี้ คือ

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
LHRH	: **Pyro**	**Glu-**	**His-**	**Trp-**	**Ser-**	**Tyr-**	**Ala-**	**Leu-**	**Arg-**	**Pro-NEt**
GnRHa I	: **Pyro**	**Glu-**	**His-**	**Trp-**	**Ser-**	**Tyr-**	**Arg-**	**Trp-**	**Leu-**	**Pro-NEt**
GnRHa II	: **Pyro**	**Glu-**	**His-**	**Trp-**	**Ser-**	**Tyr-**	**Ala-**	**Trp-**	**Leu-**	**Pro-NEt**
Buserelin	: **Pyro**	**Glu-**	**His-**	**Trp-**	**Ser-**	**Tyr-**	**Ser(t-Bu)-**	**Leu-**	**Arg-**	**Pro-NEt**

(วีระพงศ์, 2536)

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการ

อุปกรณ์

ก. **ครุภัณฑ์**

1. บ่อดินขนาด 400 ตารางเมตร 1 บ่อ
2. บ่อซีเมนต์ขนาด 50 ตารางเมตร จำนวน 4 บ่อ บ่อซีเมนต์ขนาด 15 ตารางเมตร จำนวน 6 บ่อ และบ่อซีเมนต์ขนาด 5 ตารางเมตร จำนวน 12 บ่อ
3. ถังไฟเบอร์ ขนาด 5,000 ลิตร จำนวน 2 ใบ
4. เครื่องเป่าอากาศ
5. อุปกรณ์ชั่งวัดพ่อแม่ปลา 1 ชุด
6. อุปกรณ์และสารเคมีในการทำ Radioimmunoassay

ข. วัสดุ

1. แม่พันธุ์ปลาดุกอุย 500 ตัว
2. พ่อพันธุ์ปลาดุกอุย 150 ตัว
3. พ่อแม่ปลาตะเพียน จำนวน 200 ตัว
4. อุปกรณ์เพาะผสมเทียม 1 ชุด
5. ฮอร์โมนที่ใช้ในการทดสอบ 1 ชุด
6. อุปกรณ์การเปลี่ยนถ่ายน้ำ 1 ชุด

วิธีการดำเนินการ

1. การเตรียมปลาทดลอง

ปลาน้ำจืดที่นำมาใช้เป็นตัวอย่างในการทดสอบประสิทธิภาพของฮอร์โมนมี 2 ชนิด คือ ปลาตะเพียนขาวและปลาดุกอุย โดยปลาตะเพียนขาวเป็นตัวแทนของปลาที่มีเกล็ด และปลาดุกอุยเป็นตัวแทนของปลาไม่มีเกล็ด สำหรับปลาตะเพียนขาวเป็นปลาที่มีอายุประมาณ 1-2 ปี เลี้ยงในบ่อดินขนาด 400 ตารางเมตรให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับปลากินพืช โปรตีน 17.5% เป็นอาหารในอัตรา 5%/น้ำหนักตัว/วัน เมื่อต้องการจะทดสอบก็เลือกตัวที่มีไข่แก่โดยดูจากลักษณะภายนอก ส่วนปลาดุกอุยที่ใช้ในการทดลองเพาะพันธุ์เป็นปลาที่มีอายุ 1 ปีขึ้นไป เลี้ยงในบ่อคอนกรีตขนาด 50 ตารางเมตร ระดับน้ำลึก 70 เซนติเมตร ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับปลาดุกใหญ่ โปรตีน 25% เป็นอาหารในอัตรา 5% น้ำหนักตัว/วัน เมื่อต้องการจะทดสอบก็เลือกดูจากลักษณะภายนอก

2. ฮอร์โมนที่ใช้ทดสอบ

ฮอร์โมนที่นิยมใช้ทั่วไปเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพ ได้แก่

(1) D-Ala^{6}-LHRHa

(2) D-Arg^{6}-Pro^{9}-LHRHa ของบริษัท Bachem Inc. มีชื่อเรียกว่า sGnRHa

(3) Buserelin ในรูปของ Buserelin acetate ของบริษัท Hoechst มีชื่อทางการค้าว่า Suprefact

ส่วนฮอร์โมนที่ทางโครงการสังเคราะห์ขึ้นเองเพื่อใช้ในการทดสอบ ได้แก่

(1) D-Trp^{6}-LHRH

(2) D-Ala^{6}-LHRH

(3) Trp^{7}-Tyr^{8}-Pro^{9}-Gly^{10} diethylamide GnRH

(4) D-His^{5}-Pro^{9} diethylamide GnRH

3. การทดสอบฮอร์โมน

การทดสอบประสิทธิภาพของฮอร์โมนที่นิยมใช้อยู่ทั่วๆไป จะทำการเปรียบเทียบทั้งในปลาตะเพียนขาว และปลาดุกอุย ชนิดละ 3 ครั้ง ในช่วงระยะเวลาแตกต่างกัน โดยใช้อัตราความเข้มข้นที่ทดสอบเดียวกัน คือ 30 μg/kg น้ำหนักแม่ปลา ร่วมกับ Domperidone 5 mg/kg น้ำหนักแม่ปลา โดยมีชุดควบคุมคือแม่ปลาทั้งสองชนิดฉีดด้วย น้ำกลั่น เป็นชุดควบคุมลบ และฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองปลา เป็นชุดควบคุมบวก หลังจากนั้นตรวจสอบจำนวนแม่ปลาที่วางไข่แล้วตรวจสอบอัตราการผสมติดและอัตราฟัก

การทดสอบประสิทธิภาพของฮอร์โมนที่ทางโครงการสังเคราะห์ขึ้นเอง การทดสอบจะขึ้นอยู่กับ ฮอร์โมนสังเคราะห์จากห้องปฏิบัติการภาควิชาชีวเคมี คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จะเป็นผู้ส่งฮอร์โมนมาให้ทดสอบ โดยตอนแรกได้สังเคราะห์ ฮอร์โมน D-Trp^6-LHRHa มาให้ทดสอบในปลาตะเพียนขาวและ D-Ala^6-LHRHa ทดสอบในปลาดุกอุย โดยเปรียบเทียบกับฮอร์โมนที่มีใช้ในท้องตลาดคือ Buserelin ต่อมาได้สังเคราะห์ฮอร์โมนเพิ่มขึ้นมาอีก 2 ชนิด คือ Try^7-Typ^8 -Pro^9 -Gly^{10}-diethylamide GnRHa และ D-His^5-pro^9-diethylamide GnRHa โดยทดสอบในปลาตะเพียนขาวร่วมกับฮอร์โมนสังเคราะห์ชุดเดิมคือ D-Trp^6-LHRHa และ D-Ala^6-LHRHa เปรียบเทียบกับ ฮอร์โมนที่นิยมใช้กันทั่วๆไปคือ Buserelin โดยการทดสอบแต่ละครั้งจะทำ 2 ซ้ำ โดยจะเน้นทดสอบในปลาตะเพียนขาว อัตราของฮอร์โมนที่ใช้ทดสอบเป็นอัตราเดียว คือ 30 μg/kg น้ำหนักแม่ปลา ร่วมกับ Domperidone 5 mg/kg น้ำหนักแม่ปลา หลังจากฉีดฮอร์โมน ตรวจสอบจำนวนแม่ปลาที่วางไข่ อัตราผสมติดและอัตราฟักไข่

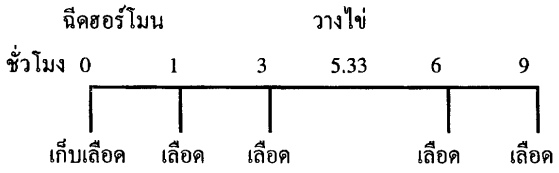
4. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมน 17β Estradiol (E_2) และ 17 α, 20 β-dihydroxy- 4-pregnen-3-one ในเลือดปลา

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับของฮอร์โมนในเลือดปลาตะเพียนขาว ดำเนินการสุ่มแม่ปลาตะเพียนขาวและปลาดุกอุย จำนวนอย่างละ 6 ตัว ชั่งวัดน้ำหนักและความยาว แล้วฉีดด้วยฮอร์โมน Buserelin ในปริมาณความเข้มข้นของฮอร์โมน 30 μg/kg น้ำหนักแม่ปลา และ Domperidone 5 mg/kg น้ำหนักแม่ปลา แต่ละกลุ่มการทดลองจะดำเนินการ 2 ซ้ำ ทั้งในฤดูการผสมพันธุ์วางไข่ (มิย.-สค.) และนอกฤดูการผสมพันธุ์วางไข่ (ธค.-มค.) ภายหลังการฉีดฮอร์โมน Buserelin ปลาตะเพียนจะวางไข่ภายในระยะเวลา 4-6 ชั่วโมง และปลาดุกอุยจะวางไข่ในระยะเวลา 14-16 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างแม่ปลาตะเพียนขาวและปลาดุกอุย จำนวน 6 ตัว แล้วนำมาชั่งน้ำหนักและวัดความยาวของแต่ละตัวอีกครั้ง พร้อมเก็บเลือดที่โคนหาง ตัวละประมาณ 1.5 มิลลิลิตร โดยใช้หลอดดูดเลือดสูญญากาศ (heparinized vacuum blood collecting tubes) ตัวอย่างเลือดปลาถูกนำไปแยกเอาพลาสมา โดยการปั่น (centrifuge) เป็นเวลา 10 นาทีที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที แล้ว

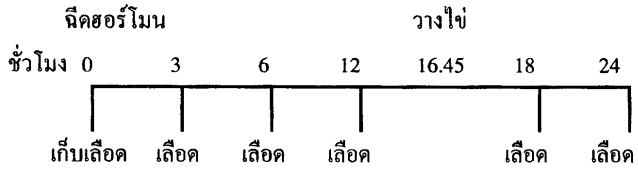
แยกเอาพลาสมาไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -68°C เพื่อนำไปวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน โดยวิธี Radioimmunoassay

ข้อมูลระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน ได้ถูกนำมาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานแล้ว จึงนำมาสร้างเป็นกราฟ เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนทั้งสองชนิด ข้อมูลได้ถูกแปลงด้วย log 10 ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์หาความแตกต่างโดยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างคู่โดย Turky test โดยสรุปการดูดเลือดจะดำเนินการดังนี้ คือเก็บเลือดจากปลาตัวอย่าง จำนวน 1 ซีซี. ก่อนการฉีดฮอร์โมน และหลังฉีดฮอร์โมน หลังจากนั้นจึงเก็บเลือดอีกจำนวน 4 ครั้ง ในปลาตะเพียนขาวที่ 1, 3, 6 และ 9 ชั่วโมงตามลำดับ ส่วนในปลาดุกอุยจะเก็บเลือดอีกจำนวน 5 ครั้ง ที่เวลา 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ ดังแสดงในแผนผังต่อไปนี้

ปลาตะเพียน



ปลาดุกอุย



สถานที่ดำเนินการ

ดำเนินการทดลองที่สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด กรมประมง และที่ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระยะเวลาดำเนินการ

การศึกษาได้เริ่มดำเนินการ ระหว่างเดือนมิถุนายน 2535 - ธันวาคม 2537

ผลการทดลอง

1. ประสิทธิภาพของฮอร์โมนสังเคราะห์ที่นิยมใช้กันทั่วๆไป

จากการทดสอบประสิทธิภาพของ ฮอร์โมนสังเคราะห์ 3 ชนิด คือ D-Ala^6-LHRHa, D-Arg^6-Pro^9-LHRHa และ Buserelin ในการฉีดกระตุ้นให้แม่ปลาดุกอุยและปลาตะเพียนขาววางไข่ ชนิดละ 3 ครั้ง การทดสอบพบว่าในปลาตะเพียนขาวที่ทดสอบจำนวน 22 ตัว ฮอร์โมนสังเคราะห์ทั้ง 3 ชนิดให้ประสิทธิภาพ ในอัตราการวางไข่ของแม่ปลาไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.01$) และไม่แตกต่างจากต่อมใต้สมองรวมทั้งอัตราการผสมติดและอัตราการฟักก็ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1) ส่วนการทดสอบในปลาดุกอุยจากจำนวนปลาที่ทดสอบรวม 37 ตัว ฮอร์โมนสังเคราะห์ D-Ala^6 -LHRHa (12.78%) มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการวางไข่ของปลาดุกอุยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับฮอร์โมน D-Arg^6-Pro^9 -LHRHa (95%) และ Buserelin (82.22%) ซึ่งทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกัน การเปรียบเทียบทางสถิติของอัตราการผสมติดและอัตราการฟักของไข่ ก็ได้ผลเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 1)

2. ประสิทธิภาพของฮอร์โมนสังเคราะห์ที่ทางโครงการฯ สังเคราะห์ขึ้น

ตอนแรกทางโครงการฯ ได้สังเคราะห์ ฮอร์โมน D-Trp^6-LHRHa มาให้ทำการทดสอบในปลาตะเพียนขาว และ D-Ala^6-LHRHa มาให้ทดสอบในปลาดุกอุย โดยเปรียบเทียบกับฮอร์โมนที่นิยมใช้กันทั่วๆไปคือ Buserelin พบว่าฮอร์โมน D-Trp^6-LHRHa (28.58%) ให้ประสิทธิภาพในการกระตุ้นการวางไข่ต่ำกว่า Buserelin (100.00%) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$) อัตราการผสมติดและอัตราฟักของไข่ไม่มีความแตกต่างกัน ($P \leq 0.01$) ส่วนการทดสอบฮอร์โมนสังเคราะห์ D-Ala^6-LHRHa ในปลาดุกอุย พบว่าไม่สามารถกระตุ้นการวางไข่ในปลาดุกอุยได้ ในขณะที่ปลาที่ฉีดด้วย Buserelin ให้ผลดี (ตารางที่ 2)

ต่อมาทางโครงการได้ทดลองสังเคราะห์ฮอร์โมนเพิ่มขึ้นมาอีก 2 ชนิด คือ Try^7-Typ^8 -Pro^9 -Gly^{10}-diethylamide GnRHa และ D-His^5-pro^9-diethylamide GnRHa โดยทดสอบในปลาตะเพียนขาวร่วมกับฮอร์โมนสังเคราะห์ชุดเดิมคือ D-Trp^6-LHRHa และ D-Ala^6-LHRHa เปรียบเทียบกับ ฮอร์โมนที่นิยมใช้กันทั่วๆไปคือ Buserelin ปรากฏว่าฮอร์โมนสังเคราะห์ 2 ชนิด ที่ดำเนินการสังเคราะห์ใหม่ ไม่สามารถกระตุ้นให้ปลาตะเพียนขาววางไข่ได้ ในขณะที่ D-Trp^6 -LHRHa และ D-Ala^6-LHRHa สามารถกระตุ้นปลาตะเพียนขาวให้วางไข่ได้ในอัตรา 70.00% และ 30% ในขณะที่ Buserelin ให้ผลดี 100% โดยอัตราผสมและอัตราฟักเฉลี่ยของลูกปลาที่ได้จากการฉีดฮอร์โมนแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันด้วย ($P \leq 0.01$) (ตารางที่ 2)

3. การเปลี่ยนแปลงฮอร์โมน 17 β-Estradiol (E_2) และ 17α, 20 β dihydroxy-4-pregnen-3-one ในเลือดปลา

3.1 ปลาตะเพียนขาวในฤดูผสมพันธุ์ วางไข่ จะมีระดับฮอร์โมน 17 β-Estradiol (E_2) ในพลาสมาของเลือดปลาที่ระยะเวลาต่างๆ ภายหลังการฉีดด้วย Buserelin แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$) โดยระดับฮอร์โมนจะมีค่าเพิ่มสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 3 และลดลงหลังการวางไข่ ในขณะที่นอกฤดูการผสมพันธุ์จะไม่มีความแตกต่างกันก่อนและหลังการฉีด ($P \leq 0.01$) (ภาพที่ 1 และตารางที่ 3) ส่วนฮอร์โมน 17 α, 20 β-dihydroxy-4-pregnene-3-one ในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ระดับฮอร์โมนในพลาสมาของเลือดปลา จะมีค่าเพิ่มสูงขึ้นหลังการฉีดด้วย ฮอร์โมน Buserelin ในระยะเวลา 3-6 ชั่วโมง หลังจากนั้นฮอร์โมนดังกล่าวจะลดลง ส่วนนอกฤดูการผสมพันธุ์ระดับฮอร์โมน 17 α, 20 β-P_4 จะเพิ่มขึ้นหลังการฉีดฮอร์โมน 3 ชั่วโมง โดยรักษาระดับฮอร์โมนคงที่และลดลงภายหลังการฉีดฮอร์โมนในชั่วโมงที่ 9 ปริมาณฮอร์โมนดังกล่าวในเลือดปลาไม่มีความแตกต่างกัน ($P \leq 0.01$) (ภาพที่ 2 และตารางที่4)

3.2 ปลาดุกอุย ในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ระดับฮอร์โมน 17 β-Estradiol (E_2) ในพลาสมาของเลือดปลาที่ระยะเวลาต่างๆ ภายหลังการฉีดด้วย Buserelin จะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$) โดยจะเพิ่มขึ้นในระยะเวลา 12-18 ชั่วโมงหลังจากฉีดฮอร์โมน หลังจากนั้นจะลดลงในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนนอกฤดูผสมพันธุ์วางไข่ในปลาดุกอุย ฮอร์โมนในพลาสมาของเลือดปลาจะรักษาระดับคงที่ในระยะเวลา 6-12 ชั่วโมง และจะลดลงในระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง ปริมาณฮอร์โมนดังกล่าวในเลือดปลาไม่มีความแตกต่างกัน ($P \leq 0.01$) (ภาพที่ 3 และตารางที่ 5)

ฮอร์โมน 17 α, 20 β-dihydroxy-4-pregnene-3-one ในพลาสมาของเลือดปลาดุกอุยที่ระยะเวลาต่างๆ ภายหลังการฉีดด้วย Buserelin จะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$) โดยจะเพิ่มสูงภายหลังการฉีด 6 ชั่วโมง และจะลดลงต่ำในระยะเวลา 18-24 ชั่วโมงหลังจากฉีด ในปลานอกฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ปริมาณฮอร์โมนดังกล่าวในเลือดปลาไม่มีความแตกต่างกัน ($P \leq 0.01$) ในระยะเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากฉีดด้วย Buserelin (ภาพที่ 4 และตารางที่ 6)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของฮอร์โมนสังเคราะห์ที่มนิยมใช้กันทั่วๆไปโดยสรุป

ชนิดปลา	ชนิดฮอร์โมน	จำนวนปลาที่ฉีดทดสอบ(ตัว)	ร้อยละเฉลี่ยของแม่ปลาที่วางไข่ (%)	อัตราการผสมติดเฉลี่ย (%)	อัตราฟักเฉลี่ย (%)
ตะเพียนขาว	D-ALa^{6}-LHRH	22	100.00^{ก}	79.67^{ก}	90.33^{ก}
	D-Arg^{6}Pro^{9}-LHRH	22	100.00^{ก}	78.33^{ก}	89.00^{ก}
	Buserelin	22	100.00^{ก}	81.00^{ก}	90.00^{ก}
	ต่อมใต้สมอง	22	95.83^{ก}	61.00^{ก}	84.67^{ก}
	น้ำกลั่น	22	15.00^{ข}	41.67^{ก}	52.33^{ก}
คุกอุย	D-Ala^{6}-LHRH	37	12.78^{ข}	33.33^{ข}	43.33$^{ก ข}$
	D-Arg^{6}Pro^{9}-LHRH	37	95.00^{ก}	78.67^{ก}	77.67^{ก}
	Buserelin	37	82.22^{ก}	76.00^{ก}	72.33^{ก}
	ต่อมใต้สมอง	37	73.89^{ก}	74.33^{ก}	72.33^{ก}
	น้ำกลั่น	37	0.00^{ข}	0.00^{ก}	0.00^{ข}

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกันในแถวเดียวกันในแนวตั้งของปลาแต่ละชนิด ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.01$)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของฮอร์โมนสังเคราะห์ที่ทางโครงการฯ สังเคราะห์โดย สรุป

ชนิดปลา	ชนิดฮอร์โมน	จำนวนปลาที่ฉีดทดสอบ (ตัว)	ร้อยละเฉลี่ยของแม่ปลาที่วางไข่ (%)	อัตราการผสมติดเฉลี่ย (%)	อัตราฟักเฉลี่ย (%)
ตะเพียนขาว	D-Trp^6 LHRH	14	28.58^{ข}	75.00^{ก}	86.67^{ก}
	Buserelin	14	100.00^{ก}	73.75^{ก}	91.25^{ก}
ดุกอุย	D-Ala^6 LHRH	10	0.00^{ข}	0.00^{ข}	0.00^{ข}
	Buserelin	10	100.00^{ก}	72.00^{ก}	83.00^{ก}
ตะเพียนขาว	D Trp^{6}LHRH	10	70.00^{ข}	77.50^{กข}	72.20^{ก}
	D-Ala^6 LHRH	10	30.00^{ค}	75.00^{ข}	71.00^{ก}
	Trp^7 Tyr^8 Pro^9 Gly^{10} diethylamide GnRH	10	0.00^{ง}	0.00^{ค}	0.00^{ข}
	D-His^5 Pro^9 diethylamide GnRH	10	0.00^{ง}	0.00^{ค}	0.00^{ข}
	Buserelin	10	100.00^{ก}	84.00^{ก}	80.50^{ก}

หมายเหตุ อักษรพยัญชนะที่เหมือนกันในแถวเดียวกัน ในแนวตั้งของปลาแต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % ($P \leq 0.01$)

ตารางที่ 3 ระดับฮอร์โมนเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ng/ml) ของ 17 β-estradiol ในปลาตะเพียนขาว จำนวน 6 ตัว ที่เวลาต่างๆ ภายหลังการฉีดด้วยฮอร์โมน Buserelin

เดือน/ปี	จำนวนชั่วโมงภายหลังการฉีดฮอร์โมน				
	0	1	3	6	9
มิย. 35	1.99 ± 0.53	0.95 ± 0.20	4.49 ± 3.20	1.69 ± 0.90	0.69 ± 0.20
สค. 35	1.42 ± 0.29	1.02 ± 0.62	4.86 ± 1.69	1.95 ± 0.53	0.96 ± 0.29
ธค. 35	1.74 ± 0.78	1.22 ± 0.55	1.00 ± 0.65	1.64 ± 1.46	0.98 ± 0.76
มค. 36	2.63 ± 1.94	1.68 ± 0.80	1.26 ± 0.51	1.09 ± 0.47	0.66 ± 0.16

ตารางที่ 4 ระดับฮอร์โมนเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (pg/ml) ของ 17 α,20 β-dihydroxy-4-pregnen-3-one ในปลาตะเพียนขาว จำนวน 6 ตัว ที่เวลาต่างๆ ภายหลังการฉีดฮอร์โมน Buserelin

เดือน ปี	จำนวนชั่วโมงภายหลังการฉีดฮอร์โมน				
	0	1	3	6	9
มิย.35	60.77±20.24	69.42±11.60	78.22±13.93	80.12±15.33	33.68±8.94
สค.35	98.18±22.78	84.18±15.79	95.73±19.18	105.42±22.39	85.27±22.33
ธค.35	63.62±25.84	63.34±16.54	83.62±25.39	78.02±22.14	78.23±18.49
มค.36	*	*	*	*	*

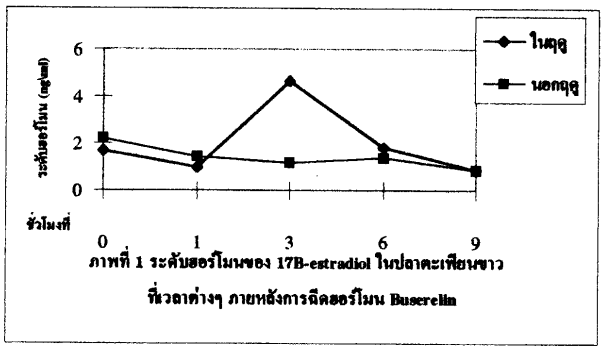
* ตัวอย่างไม่ได้วิเคราะห์ เนื่องจากฮอร์โมน Steroid บางตัวขาดตลาด

ตารางที่ 5 ระดับฮอร์โมนเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ng/ml) ของ 17 β-estradiol ในปลาดุกอุย จำนวน 6 ตัว ที่เวลาต่างๆ ภายหลังการฉีดฮอร์โมน Buserelin

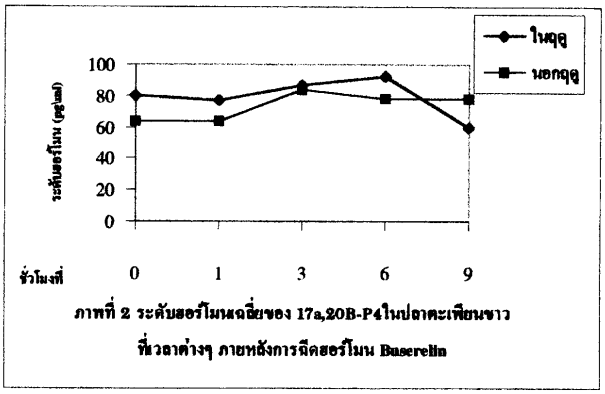
เดือน/ปี	จำนวนชั่วโมงภายหลังการฉีดฮอร์โมน					
	0	3	6	12	18	24
มิย. 35	14.13 ± 3.15	8.99 ± 3.95	10.14 ± 2.65	25.98 ± 6.16	19.65 ± 10.29	12.05 ± 3.56
สค. 35	12.21 ± 5.67	15.81 ± 4.12	18.78 ± 10.44	32.61 ± 9.42	30.03 ± 13.94	21.58 ± 8.39
ธค. 35	5.51 ± 3.95	6.39 ± 5.95	6.92 ± 4.34	10.31 ± 7.15	5.39 ± 3.45	3.82 ± 2.29
มค. 36	8.28 ± 4.63	11.14 ± 9.99	16.76 ± 10.62	15.42 ± 16.86	7.44 ± 5.90	5.00 ± 3.16

ตารางที่ 6 ระดับฮอร์โมนเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (pg/ml) ของ 17 α, 20 β-dihydroxy-4-pregnen3-one ในปลาดุกอุยจำนวน 6 ตัว ที่เวลาต่างๆ ภายหลังการฉีดฮอร์โมน Buserelin

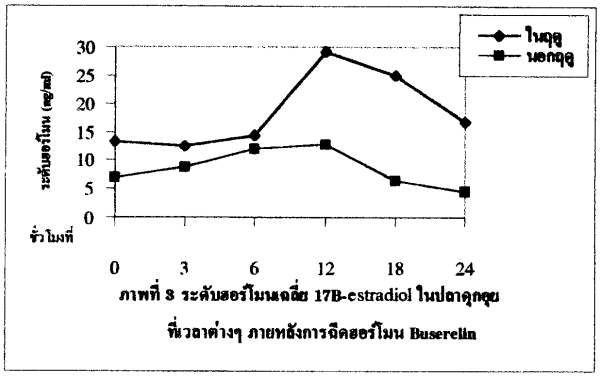
เดือน ปี	จำนวนชั่วโมงภายหลังการฉีดฮอร์โมน					
	0	3	6	12	18	24
มิย.35	117.16±31.82	122.00±28.92	357.30±237.65	224.00±56.32	112.20±26.37	116.04±26.79
สค.35	145.70±20.16	174.93±59.90	*	313.37±95.50	189.93±42.64	174.27±19.30
ธค.35	114.43±39.76	159.30±40.34	116.17±47.09	133.30±25.20	121.17±27.13	132.52±43.05
มค.36	116.80±23.49	129.07±30.52	146.43±30.17	82.20±20.54	93.80±27.05	100.50±14.52



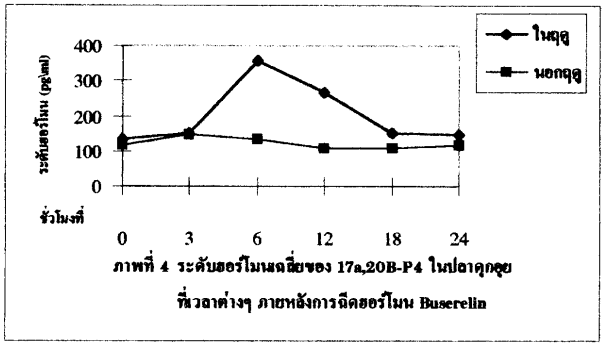
ภาพที่ 1 ระดับฮอร์โมนของ 17B-estradiol ในปลาตะเพียนขาว
ที่เวลาต่างๆ ภายหลังการฉีดฮอร์โมน Buserelin



ภาพที่ 2 ระดับฮอร์โมนเฉลี่ยของ 17a,20B-P4ในปลาตะเพียนขาว
ที่เวลาต่างๆ ภายหลังการฉีดฮอร์โมน Buserelin



ภาพที่ 3 ระดับฮอร์โมนเฉลี่ย 17B-estradiol ในปลาคุกอุย ที่เวลาต่างๆ ภายหลังการฉีดฮอร์โมน Buserelin



ภาพที่ 4 ระดับฮอร์โมนเฉลี่ยของ 17a,20B-P4 ในปลาคุกอุย ที่เวลาต่างๆ ภายหลังการฉีดฮอร์โมน Buserelin

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ประสิทธิภาพของฮอร์โมนสังเคราะห์ที่นิยมใช้กันทั่วๆไป

ผลการทดลองฮอร์โมนสังเคราะห์ D-Ala^{6}-LHRHa, D-Arg^{6}-Pro^{9}-LHRHa และ Buserelin ให้ประสิทธิภาพสูง ในการกระตุ้นการวางไข่ในปลาตะเพียนขาว คิดเป็น 100 % ส่วนในปลาดุกอุยฮอร์โมนสังเคราะห์ D-Arg^{6}-Pro^{9}-LHRHa และ Buserelin ให้ประสิทธิภาพในการกระตุ้นการวางไข่สูงระหว่าง 82.22%และ95.00% แต่ D-Ala^{6}-LHRHa ให้ประสิทธิภาพในการกระตุ้นการวางไข่ต่ำ (12.78 %) เมื่อดูที่สูตรโครงสร้างแล้วจะเห็นว่าฮอร์โมนทั้ง 3 ชนิดมีความแตกต่างกันที่กรดอมิโน ตำแหน่งที่ 6, 7 และ 8 สาเหตุที่ D-Ala^{6}-LHRHa มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการวางไข่ต่ำในปลาดุกอุยอาจเนื่องจากมี กรดอมิโน ตำแหน่งที่ 8 เป็น arginine ซึ่งแตกต่างไปจากฮอร์โมนอีก 2 ชนิดที่เป็น leucine

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ฮอร์โมน sGnRHa และ LHRHa จากการสังเคราะห์ และฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกันในการกระตุ้นให้แม่ปลาตะเพียนขาวและปลาดุกอุยวางไข่ เมื่อใช้ควบคู่กับยาเสริมฤทธิ์ (Domperidone) อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาผลกระทบจากยาเสริมฤทธิ์ เนื่องจากมีรายงานว่า บางครั้งยาเสริมฤทธิ์เพียงอย่างเดียวก็สามารถกระตุ้นให้ปลาตะเพียนขาววางไข่ได้ (นฤพล และคณะ, 2537)

สูตรโครงสร้างของฮอร์โมน LHRHa และ GnRHa มีลักษณะใกล้เคียงกัน จัดเป็นเปปไทด์ฮอร์โมนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 10 ตัว (decapeptide) ต่อกันและเรียงตัวเป็นเส้นตรง แต่ทั้งสองตัวมีความแตกต่างกันที่ LHRHa มีกรดอะมิโนลำดับที่ 7 และ 8 เป็นลูซีน (leucine) และอาร์จินีน (arginine) ในขณะที่ GnRHa จะเป็นทริบโทเฟน (tryptophan) และลูซีน (leucine) ตามลำดับ โดยกรดอะมิโนในลำดับที่ 10 เป็นไกลซีน (glycine) เช่นเดียวกัน ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าฮอร์โมนที่กระตุ้นให้ปลามีเกล็ดวางไข่ได้ผล แต่ในปลาไม่มีเกล็ดอาจไม่ได้ผลก็ได้ ซึ่งฮอร์โมนสังเคราะห์ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพ การวางไข่ที่ได้ผลดี คือ D-Arg^{6}-Pro^{9}-LHRHa ซึ่งมีผลดีกว่าการใช้ Buserelin ฉีดกระตุ้นให้แม่ปลาน้ำจืดทั้งชนิดมีเกล็ด และไม่มีเกล็ดวางไข่ได้ดี

2. ประสิทธิภาพของฮอร์โมนสังเคราะห์ที่ทางโครงการฯ สังเคราะห์ขึ้น

โครงการฯสามารถสังเคราะห์ฮอร์โมนขึ้นมาได้ 4 ชนิดคือ D-Trp^{6}-LHRHa, D-Ala^{6}-LHRHa, Trp^{7}-Tyr^{8}-Pro^{9}-Gly^{10}-diethylamide GnRHa และ D-His^{5}-Pro^{9}-diethylamide GnRHa จากการนำฮอร์โมนดังกล่าวมาทดสอบในปลาตะเพียนขาวพบว่า D-Trp^{6}-LHRHa ให้ประสิทธิภาพในการกระตุ้นการวางไข่สูงพอควร (28.58-70.00%) ส่วนฮอร์โมน D-Ala^{6}-LHRHa ให้ประสิทธิ

ภาพในการกระตุ้นการวางไข่ค่อนข้างต่ำ (30.00%) ฮอร์โมน Trp^7-Tyr^8-Pro^9-Gly^{10}diethylamide-GnRHa และ D-His^5-Pro^9-diethylamide-GnRHa ไม่สามารถกระตุ้นการวางไข่ในปลาตะเพียนขาว ส่วนในปลาดุกอุยฮอร์โมน D-Ala^6-LHRHa ไม่มีผลในการกระตุ้นการวางไข่ ซึ่งให้ผลการทดลองเหมือนกับผลของฮอร์โมน D-Ala^6-LHRHa ที่จัดซื้อมาทำการทดสอบประสิทธิภาพ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของ GnRH ที่สกัดมาจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mGnRH) พบว่า ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน glycine ที่ตำแหน่งที่ 10 ของ GnRH จาก glycinamide (Pro^9, Gly^{10}-NH_2) มาเป็น ethylalmide (Pro^9, NHEt; mGnRHa) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของ mGnRH ได้ถึง 6 เท่า (Fujino *et al.* 1972) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงนี้จะเพิ่มประสิทธิภาพการจับบนตัวรับ (receptor) ของ GnRH บนต่อมใต้สมอง (Conn *et al.* 1984)

ใน sGnRH ซึ่งพบว่ามีสภาพความเป็น hydrophobic สูงกว่า mGnRH เพราะว่ามีกรดอะมิโน tryptophan อยู่ในตำแหน่งที่ 7 (Sherwood *et al.* 1983) ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงใน ตำแหน่งที่ 6 โดย D-Argenine (D-Arg) และตำแหน่งที่ 10 โดยการเปลี่ยน glycinamide เป็น ethylamide จะทำให้เกิด sGnRHa [(D-Arg^6-Pro^9-NET)-LHRHa] ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง GtH ในปลาทอง ปลาไนและปลา Chinese loach (Crim *et al.* 1988) ในปลา striped mullet ปลา milkfish และ ปลา rainbow trout (Sherwood et al. 1984) และปลา African catfish (De Leeuw *et al.* 1988) ความพยายามที่จะสังเคราะห์ GnRH ที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับ GnRH ธรรมชาติ (native form) ที่สร้างมาจากต่อมใต้สมองของปลาชนิดนั้นๆ เพื่อนำมาใช้ฉีดกระตุ้นให้แม่ปลาวางไข่ได้แม่นยำขึ้นได้รับความสนใจศึกษากันอย่างแพร่หลาย จนต่อมาได้มีการสังเคราะห์ Catfish gonadotropin-releasing hormone เพื่อจะนำมาใช้กับปลาจำพวก catfish ด้วยกัน (Sherwood *et al.* 1989)

ประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้ปลาวางไข่ของฮอร์โมนแต่ละชนิด มีผลแตกต่างกัน เนื่องจากฮอร์โมนสังเคราะห์ (analogue) แต่ละชนิด มีกรดอมิโนที่มาประกอบในโครงสร้างแตกต่างกันไป เป็นผลให้มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันไป อีกทั้งประสิทธิภาพในการจับกับตัวรับ (receptor) บนต่อมใต้สมองของฮอร์โมนสังเคราะห์แต่ละชนิดได้ดีแตกต่างกัน สาเหตุสำคัญอีกประการที่สัมพันธ์กับประสิทธิภาพของฮอร์โมนสังเคราะห์คือ ความบริสุทธิ์ (purity) ฮอร์โมนสังเคราะห์ที่ทางโครงการฯ สังเคราะห์ขึ้นอาจมีความบริสุทธิ์ไม่เพียงพอ ซึ่งอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้ผลการทดสอบประสิทธิภาพไม่ดีเท่าที่คาดหวังเอาไว้ ในเรื่องนี้ทางโครงการฯ โดยเฉพาะทางฝ่ายที่รับหน้าที่ในการผลิตฮอร์โมนจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องนำผลการทดสอบในครั้งนี้ ไปศึกษาเพื่อหาทางปรับปรุงขั้นตอนการสังเคราะห์ฮอร์โมนเหล่านี้ในโอกาสต่อไป

3. การเปลี่ยนแปลงฮอร์โมน 17β-Estradiol (E_2) และ 17 α, 20 β dihydroxy-4-pregnen-3-one (17 α, 20 β, P_4) ในเลือดปลาภายหลังการฉีด Buserelin

โกนาโดโทรปิน (gonadotropin, GtH) เป็นกลไกที่สำคัญในการกระตุ้นให้รังไข่สร้างฮอร์โมนเพศ (sex steroid) ชนิดต่างๆที่มีผลต่อการสุกของไข่ (final maturation) และ การตกไข่ (ovulation) ตามลำดับ (Nagahama, 1987) จากการศึกษาในปลาเขตหนาวตระกูลปลาแซลมอน พบว่าการลดระดับอย่างรวดเร็วของ 17 β-estradiol (E_2) ในพลาสมาเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มระดับของ GtH และ GtH ที่เพิ่มขึ้นนี้จะเป็นตัวกระตุ้นให้เนื้อเยื่อชั้น granulosa ของไข่ (oocyte) เปลี่ยน testosterone (T) ที่สร้างมาจากเนื้อเยื่อชั้น theca ของไข่ เป็น 17 α, 20 β dihydroxy-4-pregnene-3-one (17 α, 20 β-P_4) ซึ่งเป็นสเตรอยด์ที่ทำให้ไข่สุกและตกไข่ในที่สุด (Fostier *et al.* 1983 ; Scott *et al.* 1983) ในช่วงเวลาก่อนการตกไข่กลับมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเพิ่มระดับของ GtH ในพลาสมา Kime and Biniarz (1987) พบว่าระดับของ 17 α, 20 β-P_4 จะเพิ่มขึ้นสูงเฉพาะในแม่ปลาที่ผ่านการฉีดกระตุ้น (priming dose) ด้วยต่อมใต้สมอง ก่อนที่จะมีการฉีดเร่งให้แม่ปลาวางไข่ การฉีดกระตุ้นนั้นมีผลทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของนิวเคลียสจากจุดศูนย์กลางของไข่ไปยังที่ผนังของไข่ (germinal vessicle migration, GVM) และสลายตัว (Germinal vessicle breakdown, GVBD) ในที่สุด ซึ่งทั้ง GVM และ GVBD นั้นเป็นขั้นตอนที่สำคัญสำหรับการสร้าง 17 α, 20 β-P_4

จากผลการทดลองในครั้งนี้จะเห็นว่าในช่วงฤดูการผสมพันธุ์วางไข่ การเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมน 17 β-estradiol (E_2)และ 17 α, 20 β dihydroxy-4-pregnene-3-one (17 α, 20 β-P_4) ในเลือดปลาที่เวลาต่างๆ ภายหลังการฉีดด้วยฮอร์โมน Buserelin ทั้งในปลาตะเพียนขาวและปลาดุกอุย จะมีผลในทางบวก กล่าวคือ เมื่อฉีดฮอร์โมน Buserelin กระตุ้นให้แก่แม่ปลาจะมีผลให้ระดับฮฮร์โมน E_2 และ 17 α, 20 β-P_4 มีการเปลี่ยนแปลงไปด้วย ตามระยะเวลาภายหลังที่ฉีดฮอร์โมน ซึ่งสอดคล้องกับช่วงระยะวางไข่ทั้งในปลาตะเพียนขาว (5.33 ชั่วโมง) และปลาดุกอุย (16.45 ชั่วโมง) ส่วนในช่วงนอกฤดูการผสมพันธุ์ว่างไข่จะเห็นว่าระดับฮอร์โมน E_2 และ 17 α, 20 β-P_4 ไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาหลังจากที่ฉีดฮอร์โมน โดยสรุปอาจกล่าวได้ว่าการฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์ให้แก่แม่ปลาในฤดูผสมพันธุ์วางไข่เพื่อกระตุ้นให้มีการวางไข่ ภายหลังการฉีดจะทำให้ระดับฮอร์โมน E_2 และ 17 α, 20 β-P_4 ในเลือดปลาเปลี่ยนแปลงสูงขึ้น ซึ่งจะมีผลในขบวนการพัฒนาของไข่และรังไข่ต่อไป การฉีดฮอร์โมน Buserelin ในช่วงนอกฤดูการผสมพันธุ์วางไข่ไม่ค่อยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมน E_2 และ 17 α, 20 β-P_4 และไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการวางไข่ ผลการศึกษานี้มีประโยชน์อย่างมาก สำหรับนักเพาะพันธุ์ปลาที่จะนำไปประยุกต์ในการวางแผนการเพาะพันธุ์ปลาชนิดต่างๆต่อไป

เอกสารอ้างอิง

นฤพล สุขุมาสวิน และ วัฒนะ ลีลาภัทร. 2531. การใช้ Gonadotropin Releasing Hormone Analogue ร่วมกับ Domperidone สำหรับเพาะพันธุ์ปลาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. โครงการพัฒนาประมงภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (NFP/FECH. Report 15). กรมประมง. 31 หน้า.

นฤพล สุขุมาสวิน, ณรงค์ศักดิ์ ศิริชัยพันธุ์, โชคชัย ศุภศันสนีย์ และ สุดชาดา อักขราสา. 2537. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของฮอร์โมน salmon gonadotropin releasing hormone analog และ domperidone ที่สามารถกระตุ้นให้ปลาสร้อยขาว (*Cirrhinus jullieni* Sauvage) วางไข่โดยการให้ฮอร์โมนทางปาก. วารสารการประมง 47 (1) : 63-67.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2536. การเพาะพันธุ์ปลา. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพมหานคร. 194 หน้า

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2531. การเพาะขยายพันธุ์ปลา. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 148 หน้า.

Almendras, J. M., Duenas, C., Nacario, J., Scherwood, N. M. and Crim, L. W. 1988. Sustained hormone release. III. Use of gonadotropin releasing hormone analogues to induce multiple spawnings in sea bass, *Lates calcarifer*. Aquaculture, 74 : 97-111.

Conn, P.M., Huseh, A. J. W. and Crowley, F. Jr. 1984. Gonadotropin-releasing hormone: Molecular and cell biology, physiology, and clinical application. Federation Proceedings. 43:2351-2361.

Crim, L. W., Nestor, J. J. Jr. and Wilson, C. E. 1988. Studies of the biology activity of LHRH analogs in the rainbow trout, landlocked salmon, and winter flounder. Gen. Comp. Endocrinol. 71:372-382.

De Leeuw, R., Van't Veer, C., Smit-Van Dijik, W. and Goos, H.J.T. 1988. Binding affinity and biological activity of gonadotropin-releasing hormone in the African catfish, *Clarias gariepinus*. Aquaculture. 71:119-131.

Donaldson, E.M. and G.A. Hunter. 1983. Induced final maturation, Ovulation and spermiation. pp. 351-403, In Hoar, W.S., D.J. Randall and E.M. Donaldson. Fish Physiology Vol. IX B. Academic Press, Inc., New York.

Fujino, J., Kobayashi, S., Obayashi, M., Yamazaki, S., Sakahama, R., White, W.F. and Rippel, R.H. 1972. Structure-activity relationships in the C-terminal part of luteinizing hormone reloasing hormone (LH-RH).Biochem.Biophys.Res.Commun. 49:863-869.

Fostier, A., Billard, R., Breton, B. and Zohar, Y. 1983. The gonadal steroids. *In.* W.S. Hoar, D.J. Randall and E.M. Donaldson (eds.), Fish physiology vol. 9A. Academic Pres, New York. pp. 279-372.

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

Kime, D. and Binairz, K. 1987. Gonadotropin-induced changes in steroid production by ovaries of the common carp,*Cyprinus carpio* L. around the time of ovulation. Fish Physiol. Biochem. 3:49-52.

Lee, C. S., Tamara, C. S., Banno, J. E. and Kelley, C. D. 1986. Enfluence of chronic administration of LHRH analogues and/ or 17 α methyltestosterone on maturation in milk fish, *Chanos chanos*. Aquaculture, 59 : 147-159.

Leeuw, S.D. Goos, H.J., Richter, C.J.J., and Eding, E.H. 1985. Pimozide-LHRHa-induced breeding of the african catfish *Clarias gariepinus* (Burchell).Aquaculture 44:295-302.

Nagahama, Y. 1987. Review: Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogensis in teleost gonads. Zool Sci. 4:209-227.

Peter, R.E., Chang, J.P., Narhorniak, C.S., Omelianiuk, R.J. Sokolowska, M., shin, S.H. and Billard, R. 1986. Interactions of catecholamines and GnRH in vegulation of gonadotropin secretion in teleost fish Recent Prog. Horm. Res. 42 : 513-548.

Peter, R. E., Habibi, H. R., Marchant, T. A. and Nahorniak, C. S. 1987a. Vertebrate gonadotropin-releasing hormones: Phylogyny and structure-funtion relationships. Annals N. Y. Acad. Sci., 519 : 299-309.

Peter, R.E., Lin, H.R. and Kraak, G.V.D. 1988. Induced Ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China : Advances in application of GnRHa and dopamin antagonists. Aquaculture 74 : 1-10.

Peter, R.E., Narhorniak, C.S., Shih, S., King, J.A. and Millar, R.P. 1987b. Activity of position-8-substituted analogs of mammalian gonadotropin-releasing hormones in goldfish. Gen. Comp. Endocrinol. 65:385-393.

Scott. A.P., Sumpter, J.P. and Hardiman, P.A. 1983. Hormonal changes during ovulation in the rainbow trout *(Salmo gairdneri)*. Gen. Comp. Endocrinol. 49:128-134.

Sherwood, N. M., Crim, L. W., Carolsfeld, J. and Walters, S. M. 1988. Sustained hormone release. I. Characteristics of in vitro release of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRH-A) from pellets. Aquaculture, 74 : 75-86.

Sherwood, N.M., De Leeuw, R. and Goos, H. 1989. A new member of the gonadotropin-releasing hormone family in teleosts: Catfish gonadotropin-releasing hormone. Gen. Comp. Endocrinol. 75:427-436.

Sherwood, N.M., Eiden, L., Brownstein, M., Spicess, J., Rivier, J. and Vale, W. 1983. Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:2794-2798.

Sherwood, N.M., Harrey, B., Brownstein, M.J. and Eiden, L.E. 1984. Gonodotropin releasing hormone (GnRH) in striped mullet, milkfish, rainbow trout : comparison with salmon GnRH. Gen. Comp. Endocrinol. 55 : 174-181.

Trant, J. M., Thomas, P. and Shackleton, C. H. L. 1986. Identification of 17 α, 20 β, 21-trihydroxy-4- pregnen-3-One as the major ovarian steriod produced by the teleost *Microponias undulatus* during final oocyte maturation. Steroids, 47 : 89-99.