

การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย และตำแหน่งของ Progesterone Receptors ในรังไข่ของกิ้งกักแตนเขี้ยว (*Oratosquilla nepa*)

Oogenesis and Localization of Progesterone Receptors in Ovary of *Oratosquilla nepa*

อัมพร ทองกู่เกียรติกุล^{1*} สัจจาพร ภูประดิษฐ์² สุกิจ มีสมบัติ¹ และ ดำรัสศิริ สัจจาธรรม³

Amporn Thongkukiatkul^{1*}, Satjaporn Bhupradid², Sukit Meesombat¹ and Damratsiri Sajjatam³

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

²โรงเรียนจอมสุรางค์อุปถัมภ์ อำเภอพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

³โรงเรียนคลองใหญ่วิทยาคม อำเภอคลองใหญ่ จังหวัดตราด

¹Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University

²Chomsurang Upatham School, Phra Nakhon Si Ayutthaya District, Phra Nakhon Si Ayutthaya Province

³Klongyaiwittayakom School, Khlong Yai District, Trat Province

Received : 13 December 2017

Accepted : 6 March 2018

Published online : 14 March 2018

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษามีถุขวิทยาของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียและการแสดงออกของโปรเจสเทอโรนรีเซปเตอร์ในรังไข่ของกิ้งกักแตนเขี้ยว (*Oratosquilla nepa*) จากการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาสามารถแสดงลำดับการพัฒนาของโอโอไซต์และแบ่งเซลล์เป็น 6 ชนิด คือเซลล์โอโอโกเนียม (Og) และโอโอไซต์ 5 ชนิดได้แก่ early chromatin nucleolus (Oc1), late chromatin nucleolus (Oc2), previtellogenic oocyte (Oc3), vitellogenic oocyte (Oc4) และ mature oocyte (Oc5) เซลล์โอโอโกเนียมมีเฮเทอโรโครมาตินติดสีน้ำเงินเข้มและเรียงใกล้เยื่อหุ้มนิวเคลียส Oc1 มีนิวเคลียสรูปร่างกลมและเฮเทอโรโครมาตินกระจายทั่วนิวเคลียส Oc2 มีนิวเคลียสกลมและภายในนิวเคลียสมี 1-2 นิวคลีโอล ไชโทพลาสซึมติดสีน้ำเงิน Oc3 เซลล์มีขนาดใหญ่และไซโทพลาสซึมมี vacuolated globules Oc4 มี yolk granules จำนวนมากในไซโทพลาสซึม Oc5 เป็นเซลล์มีขนาดใหญ่สุด ไซโทพลาสซึมมี yolk plates ติดสีส้มเมื่อย้อมด้วยสีย้อมมาทอกไซลีนและสีย้อมอิน การแสดงออกของ progesterone receptors พบ progesterone receptors ย้อมติดไซโทพลาสซึมของ Oc2 และเซลล์ฟอลลิเคิลที่ล้อมรอบ Oc3, Oc4 และ Oc5 แต่ย้อมไม่ติดโอโอโกเนียมและOc1

คำสำคัญ : กิ้งกักแตน การพัฒนาของโอโอไซต์ โปรเจสเทอโรนรีเซปเตอร์

*Corresponding author. E-mail : amporn@buu.ac.th

Abstract

The objective of this study was to describe histological characteristics of the female germ cells and to characterize progesterone receptors expression in the ovary of *Oratosquilla nepa*. The histology of the ovary demonstrated subsequent stages of development of the oocytes. According to their cellular characteristics, oogonia and 5 types of oocytes were classified : early chromatin nucleolus (Oc1), late chromatin nucleolus (Oc2), previtellogenic oocyte (Oc3), vitellogenic oocyte (Oc4) and mature oocyte (Oc5). Oogonium has condensed basophilic heterochromatin which is usually located near the nuclear membrane. Oc1 has a round nucleus containing dispersed heterochromatin. Oc2 has a round nucleus with 1-2 nucleoli, basophilic cytoplasm. Oc3 are larger, cytoplasm fill with vacuolated globules. Oc4 is characterized by the appearance of yolk granules in cytoplasm. Oc5 is the largest of the germ cells. The cytoplasm is filled with yolk plates stained orange color with hematoxylin-eosin. Progesterone receptor y immunoreactivity was detected in cytoplasm of Oc2 and follicular cells of Oc3, Oc4 and Oc5. In contrast, there was no progesterone receptor immunoreactivity was observed in oogonia and Oc1.

Keywords: *Oratosquilla nepa*, oocyte development, progesterone receptor

บทนำ

กั้งตั๊กแตนเขี้ยว (*Oratosquilla nepa*) เป็นกั้งตั๊กแตนชนิดหนึ่ง จัดอนุกรมวิธานใน Subphylum Crustacean Class Malacostraca มีชื่อสามัญคือ Mantis shrimp กั้งตั๊กแตนพบมากในเขตร้อนและมีมากกว่า 300 สปีชีส์ (Ahyong, 2004) กั้งตั๊กแตนมีประโยชน์มากมาย เช่น กั้งตั๊กแตนบางชนิดเป็นสัตว์สวยงามสามารถเลี้ยงไว้ในพิพิธภัณฑ์สัตว์น้ำใช้สำหรับบริโภค เป็นอาหาร กั้งตั๊กแตนเป็นสัตว์เศรษฐกิจเป็นที่ต้องการทั้งตลาดภายในประเทศและต่างประเทศเช่น สิงคโปร์ ฮองกง ญี่ปุ่น และไต้หวัน กั้งตั๊กแตนสำหรับบริโภคทั้งหมดได้จากการประมงที่จับจากธรรมชาติ จึงทำให้ประชากรกั้งตั๊กแตนในธรรมชาติ ลดน้อยลง สัตว์ในไฟลัมครัสตาเซียมีระบบสืบพันธุ์แบบแยกเพศคือเพศผู้และเพศเมีย ระบบสืบพันธุ์เพศเมียประกอบด้วย รังไข่ 1 คู่ ท่อนำไข่ และ gonophores (Nagaraju, 2011) การศึกษามิถุนวิทยาของรังไข่และการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียของสัตว์ในไฟลัมนี้มีจำนวนมากแต่นั้นสัตว์เศรษฐกิจพวกปูและกั้ง เช่นปู *Portunus pelagicus* (Ravi & Manisseri, 2012) ปู *Travancoriana schirnerae* (Smija & Devi, 2015) กุ้ง *Exhippolysmata oplophoroides* (Braga et al., 2016) และกั้งเคยไฟซ *Procambarus clarkii* (Kulkarni, Glade, & Fingerman, 1991) แต่การศึกษาในกั้งมีน้อยมาก การเจริญเติบโตของรังไข่และการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียของสัตว์ไฟลัมครัสตาเซียถูกควบคุมโดยฮอร์โมนหลายชนิด เช่น neurohormones , methyl farnesoate, ecdysteroid และสเตียรอยด์ ฮอร์โมนของสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ฮอร์โมนอีสโตรเจน และฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (Köhler et al., 2007; Laufer et al., 1998) ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนทำหน้าที่กระตุ้นรังไข่ให้เจริญเต็มที่และกระตุ้นกระบวนการ vitellogenesis (Kulkarni, Nagabhushanam, & Joshi, 1979; Yano, 1985; Subramoniam, 2016) ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสามารถตรวจพบได้ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิดเช่นปู *P. trituberculatus*

(Feng et al., 2009) กุ้งลอปสเตอร์ *Homarus americanus* (Couch, Hagino, & Lee, 1987) และปู *Eriocheir sinensis* (Wu et al., 2014)) ปู *Scylla paramamosain* (Ye et al., 2010) และกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* (Thongbuakaew et al., 2016) กุ้ง *P. dardwiakii* (Gunamalai, Kirubakaran, R. & Subramoniam, 2006) และเพรียงทะเล (Meunpol et al., 2007) แต่ยังไม่มีการศึกษาในกั้งตักแตน กลไกควบคุมการทำงานของระบบสืบพันธุ์และการเจริญเติบโตของรังไข่ในกั้งตักแตน โดยฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนยังไม่ทราบแน่ชัด ดังนั้นความรู้เกี่ยวกับชีววิทยาการสืบพันธุ์และกลไกการควบคุมการสร้างไข่ของกั้งตักแตนเขี้ยว *O. nepa* จะมีประโยชน์ต่อการจัดการการเพาะเลี้ยงกั้งโดยสามารถใช้ฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนการกระตุ้นการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย

วิธีดำเนินการวิจัย

ช็อกกั้งตักแตนเขี้ยวเพศเมียขนาด 11-13.5 เซนติเมตร จำนวน 30 ตัวจากสะพานปลาอ่างศิลา มาเลี้ยงไว้ในถังไฟเบอร์ โดยให้ออกซิเจนตลอดเวลา ที่อุณหภูมิ 28 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นสลบกั้งตักแตนเขี้ยวด้วยน้ำแข็งนานประมาณ 30 นาที ผ่าเอารังไข่แบ่งรังไข่เป็น 3 ส่วนคือ ด้านหน้าของรังไข่ ตอนกลางของรังไข่และส่วนท้ายของรังไข่ ขนาดชิ้นเนื้อเยื่อยาวประมาณ 5-7 มิลลิเมตร แช่เนื้อเยื่อในสารละลายบูแองค์เพื่อรักษาสภาพเนื้อเยื่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างสารละลายบูแองค์ออกจากเนื้อเยื่อด้วย 70% เอทานอลหลายๆครั้งจนกระทั่งเนื้อเยื่อไม่มีสีเหลือง จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปศึกษาต่อด้วยเทคนิค histological technique, histochemical technique และ immunocytochemical technique

Histological technique

นำชิ้นเนื้อเยื่อที่แช่ 70% เอทานอล ผ่านกระบวนการดึ่งน้ำออกโดยเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอล จากนั้นฝังชิ้นเนื้อเยื่อในพาราฟิน ตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 6 ไมโครเมตร ย้อมเชกซ์ด้วยสีมาทอกไซลีนละสีอีโอซิน (H & E) ตัดแปลงจากวิธีของ Humason (1962) สังเกตรูปร่างและโครงสร้างของโอโอโกเนีย โอโอไซตระยะต่างๆด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง Olympus BX50

Histochemical technique

ตัดชิ้นเนื้อเยื่อที่ฝังในพาราฟิน ที่ได้จากขั้นตอน histological technique หนา 6 ไมโครเมตร แล้วย้อมสี periodic acid-Schiff and hematoxylin (PAS/H) เพื่อศึกษา neutral glycoaminoglycan (GAGs) และ ย้อมด้วยสี bromophenol blue เพื่อศึกษาโปรตีน (Pearse, 1960)

Immunocytochemical technique

ตัดชิ้นเนื้อเยื่อที่ฝังในพาราฟิน ที่ได้จากขั้นตอน histological technique ให้มีความหนา 6 ไมโครเมตร แล้วทำขั้นตอนดังนี้ เอาพาราฟินออกจากเชกซ์ บ่มเนื้อเยื่อใน 3% ไฮโดรเจน เพอร์ออกไซด์ละลายในสารละลายเมทานอล ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อป้องกันการ ทำงานของ endogenous peroxidase ล้างเนื้อเยื่อด้วย 0.1M PBS ที่มี 0.5% Tween20 แล้วบ่มเนื้อเยื่อในสารละลาย blocking solution (สารละลาย PBS 4% มี bovine serum albumin (BSA), 5% normal goat serum, and 0.4% Triton X-100) เพื่อป้องกันการเกิดการจับอย่างไม่จำเพาะของแอนติเจน จากนั้นล้างเชกซ์ด้วยสารละลาย PBS บ่มเชกซ์ในสารละลาย polyclonal rabbit anti-human progesterone receptor (Santa Cruz Biotechnology, USA) ความเข้มข้น 1:500 ในสารละลาย PBS จากนั้นบ่มเชกซ์ในสารละลาย biotinylated secondary antibody (Thermo Fisher Scientific, USA) บ่มเชกซ์ในสารละลาย streptavidin-peroxidase conjugate ตรวจปฏิกิริยาด้วยการบ่มเชกซ์ใน

สารละลาย 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) ย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีฮีมาทอกไซลีน จากนั้นนำสไลด์ไป ศึกษาสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง Olympus BX50 ถ้าเกิดปฏิกิริยาจะพบตะกอนสีน้ำตาลบนเนื้อเยื่อ สไลด์เซกชั่นกลุ่มควบคุมให้เติมสารละลาย PBS แทน primary antibody

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

กิ้งกั๊กแตงเขียว มีรังไข่ 2 พู อยู่ด้านบนของ hepatopancreas ตามแนวยาวของลำตัว เริ่มตั้งแต่ปล้องอกจนถึงปล้องหาง (ภาพที่ 1) คล้ายกับรังไข่ของกิ้งกั๊กแตง *O. massavensis* (El-Sherifa , El-Khodary & Ghonimb, 2012) รังไข่กิ้งกั๊กมีการเปลี่ยนสีเช่น สีเหลือง สีส้มอ่อน และสีส้มแก่ ในระหว่างกระบวนการ vitellogenesis เช่นเดียวกับสัตว์ครึ่งปลาครึ่งกุ้งชนิดอื่นๆ เช่น *Callinectes danae* Smith, 1869 (Costa & Negreiros-Fransozo, 1998) *P. spinimanus* Latreille (Santos & Negreiros-Fransozo, 1999) และ *Cherax quadricarinatus* (Abdu., Yehezkel, & Saki, 2000) การเปลี่ยนสีของรังไข่ในสัตว์ครึ่งปลาครึ่งกุ้งมีความสัมพันธ์กับการสังเคราะห์รงควัตถุ carotenoid ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ vitellogenin (Fyhn & Costlow, 1977)

ภาพที่ 1 รังไข่กิ้งกั๊กแตงเขียว เพศเมียตัวเต็มวัย



การแบ่งระยะการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ในสัตว์ครึ่งตัวครึ่งปลาแต่ละชนิดไม่เหมือนกัน เช่นกึ่ง *M. rosenbergii* แบ่งเป็น 5 ระยะ โดยใช้ ขนาด การสะสม yolk และ รูปร่างเซลล์ฟอลลิเคิล (O'Donovan, Abraham, & Cohen, 1984) ปู *Sodhiiana iranica* แบ่งเป็น 7 ระยะ โดยใช้การเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม (Sharifian, et al., 2015) และ ปู *Cardisoma guanhumi* แบ่งเป็น 4 ระยะ ใช้ รูปร่าง สัดส่วนนิวเคลียสต่อไซโทพลาสซึม การทำปฏิกิริยากับสีต่างๆ (Souza et al, 2017) เซลล์สืบพันธุ์เพศเมียของกั้งตักแดนเขี้ยวแบ่งเป็น 6 ระยะได้แก่ระยะโอโอโกเนีย (Og) ระยะ early chromatin nucleolus (Oc1) ระยะ late chromatin nucleolus (Oc2) ระยะ previtellogenic oocyte (Oc3) ระยะ vitellogenic oocyte (Oc4) และระยะ mature oocyte (Oc5) โดยแบ่งตามขนาดของเซลล์ ลักษณะและขนาดของนิวเคลียส ลักษณะของไซโทพลาสซึมและการติดสี H & E สี PAS และสี bromophenol blue

ระยะ oogonia (Og)

เซลล์ โอโอโกเนียมีรูปร่างทรงไข่ ขนาด 11.33 ± 2.4 ไม่นิวเคลียสขนาดใหญ่ มีเส้นใยเฮเทอโรโครมาตินติดสีน้ำเงินเข้มกระจายทั่วนิวเคลียส ไม่พบนิวคลีโอลัส (ภาพที่ 2A) มีไซโทพลาสซึมจำนวนน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของนิวเคลียส เซลล์โอโอโกเนียมีการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโทซิส (Desouza & Silva, 2009; Stewart et al., 2007) เซลล์ โอโอโกเนียรวมกลุ่มบริเวณ germinal zone (germarium) มีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันล้อมรอบ (King, 1948; Krol et al., 1992) germinal zone ภายในรังไข่กั้งตักแดนเขี้ยวพบบริเวณตรงกลางของรังไข่ (ภาพที่ 2A) เหมือนกับ germinal zone ที่พบในรังไข่ของ *P. pelagicus* (Ravi, Manisseri, & Sanil, 2012) *Potamon dehaani* และ *P. clarkii* (Ando & Makioka, 1998; 1999)

ระยะ early chromatin nucleolus (Oc1)

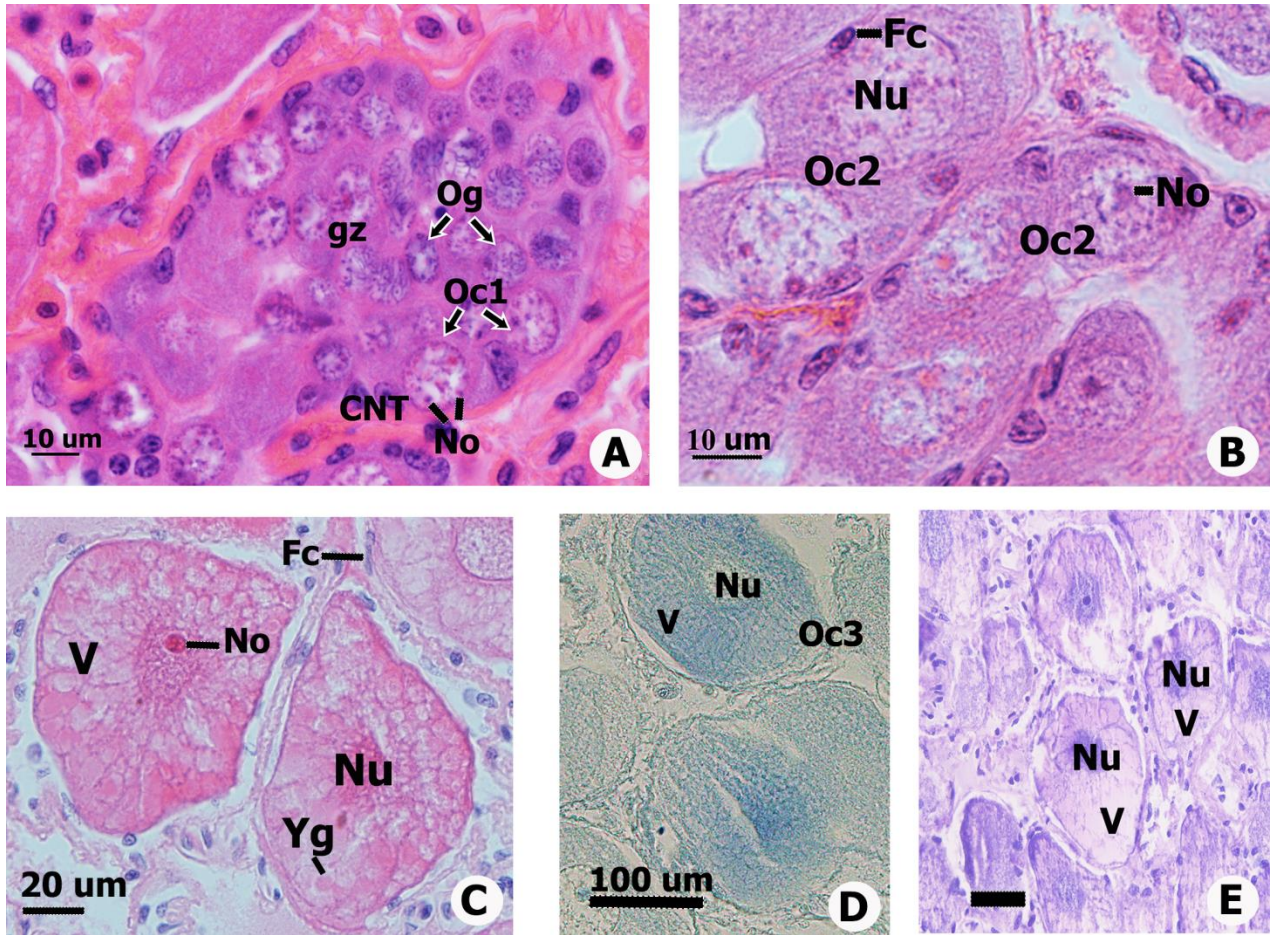
เซลล์มีรูปร่างกลม ขนาด 28.92 ± 3.32 ไมโครเมตร นิวเคลียสมีขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ พบเฮเทอโรโครมาตินมีลักษณะเป็นจุดกระจายทั่วนิวเคลียส ไซโทพลาสซึมติดสีชมพูน้ำเงิน เมื่อย้อมด้วยสี H & E โอโอไซต์ระยะนี้ไม่มีเซลล์ฟอลลิเคิลล้อมรอบ (ภาพที่ 2A)

ระยะ late chromatin nucleolus (Oc2)

เซลล์มีรูปร่างทรงไข่ขนาด 34.28 ± 3.36 ไมโครเมตร นิวเคลียสมีขนาดใหญ่มากขึ้น มี 1 หรือ 2 นิวคลีโอลัส ไซโทพลาสซึมติดสีชมพูน้ำเงิน (ภาพที่ 2B) แต่ติดสีน้ำเงินมากขึ้น เพราะภายในไซโทพลาสซึมมีไรโบโซมและเอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัมจำนวนมาก (Smija & Devi, 2015; Kessel, 1968.) เซลล์ฟอลลิเคิลมีรูปร่างเป็นรูปกระสวย (ภาพที่ 2B)

ระยะ previtellogenic (Oc3)

เซลล์มีรูปร่างทรงไข่ ขนาด 70.55 ± 5.38 ไมโครเมตร นิวเคลียสรูปร่างกลม พบเฮเทอโรโครมาติน เป็นเส้นหนา ย้อมติดสีชมพูกระจายทั่วนิวเคลียสเมื่อย้อมด้วยสี H & E พบนิวคลีโอลัสตรงกลางนิวเคลียส และระยะนี้พบ vacuolated globules กระจายทั่วไซโทพลาสซึม มีลักษณะกลมหรือรี ภายในติดสีชมพูต่างๆ เมื่อย้อมด้วยสี H & E (ภาพที่ 2C) แต่ย้อมไม่ติดสี PAS และสี bromphenol blue (ภาพที่ 2D; 2E) vacuolated globule ทำหน้าที่เป็นกรอบสำหรับการสะสม yolk (Smija & Davi, 2015) เมื่อเริ่มมี vacuolated globules ในไซโทพลาสซึมแสดงว่าโอโอไซต์กำลังจะเปลี่ยนเป็นระยะ vitellogenesis ต่อไป (Minagawa et al., 1993) โอโอไซต์ระยะนี้มี เซลล์ฟอลลิเคิล รูปทรงกระสวยล้อมรอบ (ภาพที่ 2C)



ภาพที่ 2 ภาพตัดขวางโอโอโกเนียม (Og) โอโอไซต์ระยะ late chromatin nucleolus (Oc2) และระยะ previtellogenic (Oc3) ภายในรังไข่กึ่งตีตกแดนเขียว

- (A) Og และ Oc1 พบบริเวณ germinal zone (gz) ล้อมรอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (CNT) นิวคลีโอลัส (No)
- (B) โอโอไซต์ระยะ late chromatin nucleolus (Oc2) มีนิวเคลียส (Nu) ขนาดใหญ่และพบ นิวคลีโอลัส (No) กลางนิวเคลียส โอโอไซต์ล้อมรอบด้วยเซลล์ฟอลลิเคิล (Fc)
- (C) โอโอไซต์ระยะ (Oc3) มีขนาดใหญ่ขึ้น แต่ขนาดนิวเคลียส (Nu) เล็กลง นิวคลีโอลัสเด่น (No) พบ vacuolated globule (V) ในไซโทพลาสซึม ติดสีชมพูจากเม็ดย้อมด้วยสี H & E เซลล์ฟอลลิเคิล (Fc); Yolk granule (Yg)
- (D) Oc3 มี vacuolated globule (V) ย้อมไม่ติดสี bromophenol blue นิวเคลียส (Nu)
- (E) Oc3 มี vacuolated globule (V) ย้อมไม่ติดสี PAS/H นิวเคลียส (Nu)

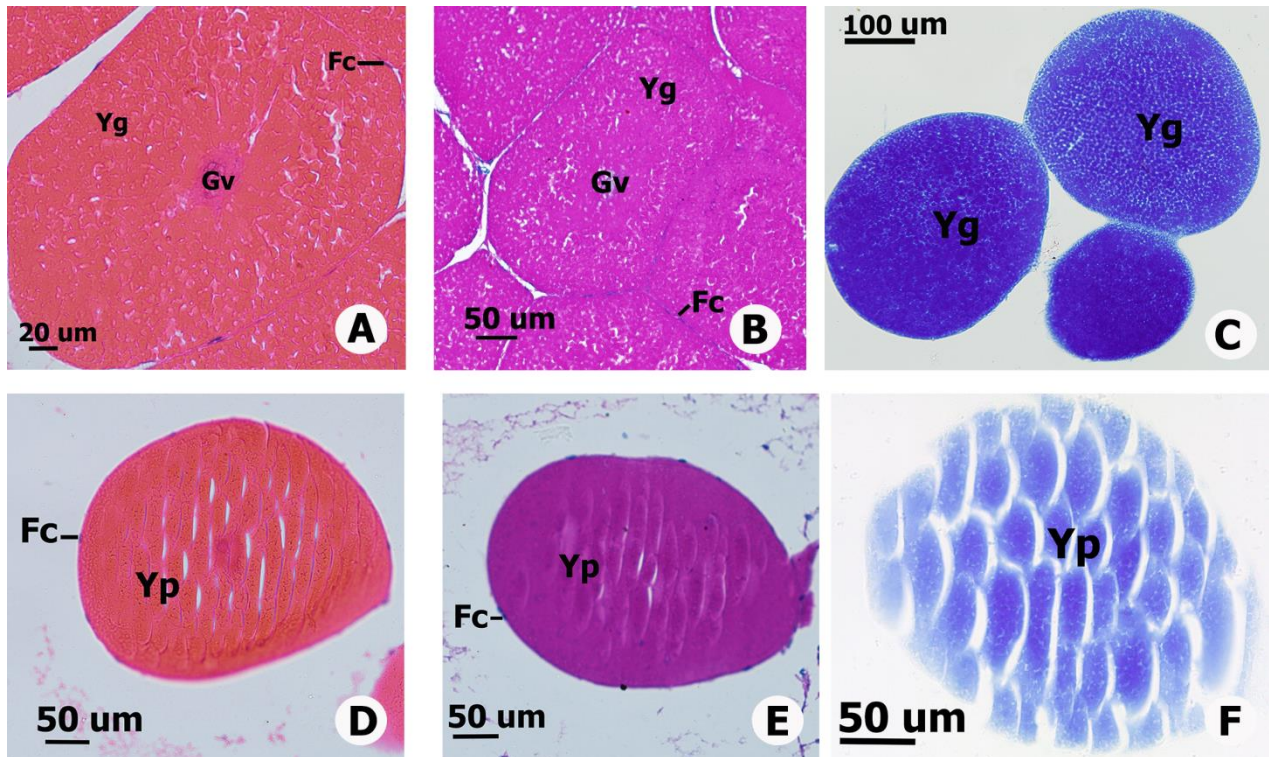
ระยะ vitellogenic (Oc4)

เซลล์มีรูปร่างทรงไข่ มีขนาดใหญ่กว่าระยะ previtellogenic (ขนาด 300.56 ± 10.56 ไมโครเมตร) พบ yolk granules ติดสีส้มจำนวนมากในไซโทพลาสซึมเมื่อย้อมด้วยสี H & E (ภาพที่ 3A) และย้อมติดสีชมพูเมื่อย้อมด้วยสี PAS/H (ภาพที่ 3B) แสดงว่ามี neutral GAGs โมเลกุลของ GAGs มีขั้ว จึงทำหน้าที่ควบคุมการเก็บน้ำในเซลล์ซึ่งจำเป็นสำหรับการสร้าง yolk (Nicolau *et al.*, 2012) yolk granules ย้อมติดสีน้ำเงินเข้มเมื่อย้อมด้วยสี bromphenol blue (ภาพที่ 3C) แสดงว่า yolk มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบ yolk ประกอบด้วยน้ำ โปรตีน ไขมัน น้ำตาล สเตียรอยด์ ฮอริโมนบางชนิด (Couch & Hagino, 1983; Adiyodi, 1985) และสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการพัฒนาของตัวอ่อน (Krol *et al.*, 1992) การสร้าง yolk ในสัตว์ crustacean มี 2 วิธี วิธีแรกสร้างจาก Rough endoplasmic reticulum และ Golgi complexes ในไซโทพลาสซึมของโอโอไซต์ และวิธีที่สอง สร้างจาก fat body หรือ hepatopancreas (Wolin *et al.*, 1973; Ferreira *et al.*, 2012; Soroka, Milner, & Sagi, 2000) จากนั้น yolk ถูกขนส่งด้วยฮีโมลิมพ์ (Yehezkel *et al.*, 2000) แล้วจึงนำเข้าสู่โอโอไซต์ ด้วยวิธี micropinocytosis (Papathanassiou & King, 1984) การสร้าง yolk ของกั้งจะเป็นแบบที่สองสร้างจากภายนอกโอโอไซต์ (Suzuki *et al.*, 1989) โอโอไซต์ระยะนี้มีเซลล์ฟอลลิเคิลรูปร่างแบนบางติดสีน้ำเงินเข้ม เมื่อย้อมด้วยสี H&E (ภาพที่ 3A)

ระยะ Maturation (Oc5)

เซลล์มีขนาดใหญ่สุด ขนาด 265 ± 3.5 ไมโครเมตร yolk granules รวมกันเป็นแผ่น yolk plates รูปร่างคล้ายเกล็ดปลา ซึ่งยังไม่มีรายงานพบในโอโอไซต์ของสัตว์ครึ่งตัวครึ่งปลาชนิดอื่น yolk plates ย้อมติดสีส้มเข้มเมื่อย้อมด้วยสี H & E (ภาพที่ 3D) ติดสีชมพูอมม่วงเมื่อย้อมด้วยสี PAS/H (ภาพที่ 3E) และติดสีน้ำเงินเมื่อย้อมด้วยสี bromophenol blue (ภาพที่ 3F) แสดงว่าปริมาณของ GAGs และโปรตีนเพิ่มมากขึ้นตามการพัฒนาของโอโอไซต์ เซลล์ฟอลลิเคิลที่พบในโอโอไซต์ระยะนี้มีรูปร่างแบน (ภาพที่ 3D) ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าเซลล์ฟอลลิเคิลที่ล้อมรอบโอโอไซต์ระยะ vitellogenic

เซลล์ฟอลลิเคิลมีหน้าที่ควบคุมให้โอโอไซต์เข้าสู่ระยะโตเต็มที่พร้อมๆกัน ซึ่งสำคัญต่อการปล่อยไข่ และเซลล์ฟอลลิเคิล มีรูปร่างที่แตกต่างกันในแต่ละระยะการพัฒนาของโอโอไซต์ โดยเปลี่ยนจากรูปทรงกระสวยเป็นรูปทรงแบนขึ้นกับกิจกรรมการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ (Chang & Shih, 1995)



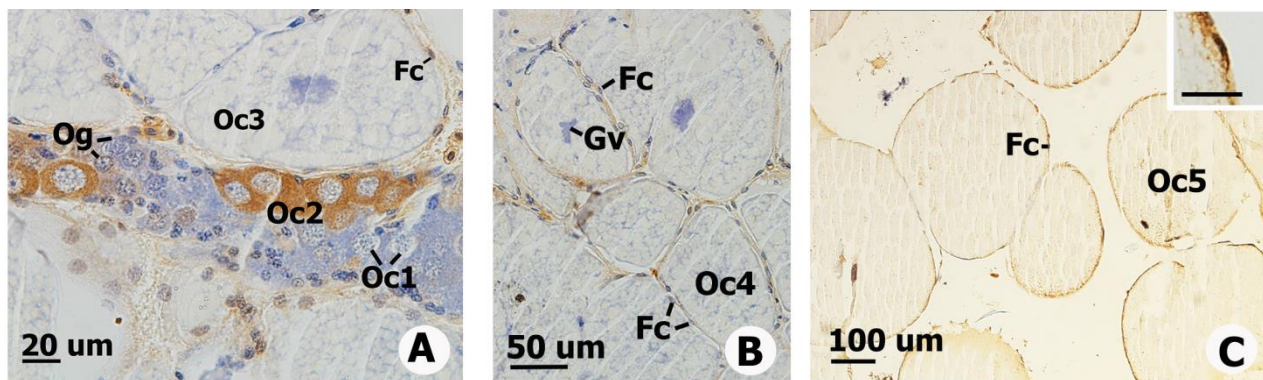
ภาพที่ 3 ภาพตัดขวางโอโอไซต์ระยะ vitellogenic (Oc4) และ โอโอไซต์ระยะ maturation (Oc5)

- (A) Oc4 มีขนาดใหญ่ มี germinal vesicle (Gv) กลางเซลล์ และ yolk granules (Yg) ติดสีส้มกระจายทั่วไซโทพลาสซึม เมื่อย้อมด้วยสี H & E เซลล์ฟอลลิเคิล (Fc); Germinal vesicle (Gv)
- (B) Oc4 มี germinal vesicle (Gv) กลางเซลล์ และ yolk granules (Yg) ติดสีชมพูเมื่อย้อมสี PAS/H เซลล์ฟอลลิเคิล (Fc)
- (C) Oc4 มี yolk granules (Yg) ติดน้ำเงินเข้ม เมื่อย้อมสี bromophenol blue
- (D) Oc5 มี yolk plates (Yp) ติดสีส้มกระจายทั่วไซโทพลาสซึม เมื่อย้อมด้วยสี H & E เซลล์ฟอลลิเคิล (Fc)
- (E) Oc5 มี yolk plates (Yp) ติดสีชมพูกระจายทั่วไซโทพลาสซึม เมื่อย้อมด้วยสี PAS/H เซลล์ฟอลลิเคิล (Fc)
- (F) Oc5 มี yolk plates (Yp) ติดสีน้ำเงินกระจายทั่วไซโทพลาสซึม เมื่อย้อมด้วยสี bromophenol blue

การตรวจหา progesterone receptors ในรังไข่กั้งตักแดนเขี้ยว (*O.nepa*)

ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ของสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Fingerman, Nagahshnam & Sarojini, 1993) ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในสัตว์มีกระดูกสันหลังทำหน้าที่ควบคุม sexual differentiation และการทำงานของระบบสืบพันธุ์ (Quadros *et al.*, 2002) แต่ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการ vitellogenesis และการเติบโตของไข่ (Lafont & Mathieu, 2007) การศึกษาฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในฮีโมลิมฟ์และเนื้อเยื่อชนิดต่างๆของสัตว์ครึ่งตัวเขี้ยวมีหลายวิธีดังนี้ ใช้ Gas chromatography/mass spectrometry (Fairs, Quinlan & Goad, 1990) วิธี Radioimmunoassay (RIA) (Warrier *et al.*, 2001) วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Ye *et al.*, 2010) และวิธี immunohistochemistry (Paolucci, Cristo, & Cosmo,

2002) งานวิจัยครั้งนี้จึงศึกษาตำแหน่งของ progesterone receptors ในรังไข่กั้งตั๊กแตนเขียวด้วยวิธี immunocytochemistry พบว่า progesterone receptors ย้อมติดไซโทพลาสซึมของโอโอไซต์ระยะ late chromatin nucleolus (Oc2) (ภาพที่ 4A) ฮอริโมน โปรเจสเตอโรนเป็น steroid hormone จึงสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าจับกับ progesterone receptors ในไซโทพลาสซึม (Robinson *et al.*, 2001) จากนั้น progesterone receptor-PR complex จะเคลื่อนเข้านิวเคลียสจับกับกับ gene และกระตุ้น กระบวนการ transcription (Thomas *et al.*, 2007) นอกจากนี้ผลงานวิจัยครั้งนี้ยังพบว่า progesterone receptors ย้อมติด เยื่อหุ้มเซลล์โอโอไซต์และเซลล์ฟอลลิเคิลล้อมรอบโอโอไซต์ระยะ previtellogenic (Oc3) ระยะ vitellogenic (Oc4) และระยะ maturation (Oc5) (ภาพที่ 4A; 4B; 4C) คล้ายกับปู *S. paramamosain* และหมีก *Octopus vulgaris* (Di Cosmo *et al.*, 1998) พบ progesterone receptors ย้อมติดเซลล์ฟอลลิเคิลที่หุ้มโอโอไซต์ระยะ vitellogenic stage I แสดงว่าฮอริโมน progesterone กระตุ้น เซลล์ฟอลลิเคิลให้ขนส่ง yolk เข้าสู่โอโอไซต์โดยผ่าน progesterone receptors (Ye *et al.*, 2010)



ภาพที่ 4 การกระจายของ progesterone receptors ในรังไข่ของกั้ง ตั๊กแตนเขียว

- (A) Polyclonal rabbit anti-human progesterone receptor ย้อมติดไซโทพลาสซึมของโอโอไซต์ระยะ late chromatin (Oc2) และย้อมติดติดเยื่อหุ้มเซลล์โอโอไซต์และเซลล์ฟอลลิเคิลล้อมรอบโอโอไซต์ระยะ Oc3 แต่ย้อมไม่ติดเซลล์โอโอโกเนีย (Og) และโอโอไซต์ระยะ early chromatin nucleolus (Oc1)
- (B) Polyclonal rabbit anti-human progesterone receptor ย้อมติดเซลล์ฟอลลิเคิล (Fc) ที่ล้อมรอบโอโอไซต์ระยะ vitellogenic (Oc4) Germinal vesicle (Gv)
- (C) Polyclonal rabbit anti-human progesterone receptor ย้อมติดเซลล์ฟอลลิเคิลโอโอไซต์ระยะ maturation (Oc5) ภาพแทรกขยายเซลล์ฟอลลิเคิล (scale bar = 20 ไมครอน)

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าโครงสร้างของโอโอไซต์ระยะต่างๆในกั้งตั๊กแตนเขียว ไม่ได้แตกต่างจากโครงสร้างของโอโอไซต์ของครัสตาเซียชนิดอื่นๆ แต่ระยะของการพัฒนาของโอโอไซต์แตกต่างกันเนื่องจากเกณฑ์ที่ใช้แตกต่างกัน และจากงานวิจัยครั้งนี้ตรวจพบ progesterone receptors ที่โอโอไซต์ระยะต่างๆของรังไข่ของกั้งตั๊กแตนเขียวสามารถสรุปได้ว่าฮอริโมน โปรเจสเตอโรนมีบทบาทต่อกระบวนการ vitellogenesis และการเจริญเติบโตของโอโอไซต์ของกั้งตั๊กแตนเขียว อย่างไรก็ตาม

ยังต้องมีการวิจัยเพิ่มเติมเกี่ยวกับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่เหมาะสมในการกระตุ้นการพัฒนาของโอโอไซต์ของกั้งตักแดนเขี้ยวก่อนนำไปใช้ในฟาร์ม

เอกสารอ้างอิง

- Abdu,U., Yehezkel, G., & Saki, A. (2000). Oocyte development and polypeptide dynamics during ovarian maturation in the red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Invertebrate Reproduction and Development*, 37, 75-83.
- Ando, H. & Makioka, T. (1998). Structure of the ovary and mode of oogenesis in a fresh water crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). *Zoological Science*, 15, 893-901.
- Ando, H. & Makioka, T. (1999). Structure of the ovary and Mode of oogenesis in a freshwater crab (*Potamon dehaani*). *Journal of morphology*, 239, 107-114.
- Braga, A.A. Nunes , E.T. López-Grecco, L.S. Camargo-Mathias, M.I., & Fransozo, V. (2016). Histological and histochemical features of the oogenesis in the simultaneous protandric hermaphrodite shrimp *Exhippolysmata oplophoroides* (Decapoda: Caridea). *Micron*, 88,60-67.
- Chang, C.F. & Shih, T.W. (1995). Reproductive cycle of ovarian development and vitellogenin profiles in the freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. *Invertebrate Reproduction and Development*, 27, 11-20.
- Costa, T.M.C. & Negreiros-Fransozo, M.L. (1998). The reproductive cycle of *Callinectes danae* Smith, 1869 (Decapoda, Portunidae) in the Ubatuba region, Brazil. *Crustaceana*, 71, 615-627.
- Couch, E.F., Hagino, N., & Lee, J.W. (1987). Changes in estradiol and progesterone immunoreactivity in tissues of the lobster, *Homarus americanus*, with developing and immature ovaries. *Comparative Biochemistry Physiology*, 85A, 765-770.
- Desouza, L.P., & Silva, J.R.F. (2009). Morphology of the female reproductive system of the red clawed mangrove tree crab (*Goniopsis cruentata* Latreille, 1803). *Scientia Marina*, 73, 527-539.
- Di Cosmo, A., Paolucci, M., Di Cristo, C., Botte V. & Ciarcia, G. 1998. Progesterone and 17 β -estradiol involment in the yolk protein synthesis in the ovary of *Octopus vulgaris*. *Molecular Reproduction and Development*, 50,451-460
- El-Sherifa ,S, S., El-Khodary, G.M., & Ghonimb A.M. (2012). Ovarian cycle and scanning electron micrographs of the spawned egg of female mantis shrimp *Oratosquilla massavensis* (Alexandria, Egypt). *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 65, 116-124.
- Fairs, N., Quinlan, P., & Goad, L. (1990) Changes in ovarian unconjugated and conjugated steroid titers during vitellogenesis in *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 89, 83-99.

- Feng, L., Wu, X.G., Lu, J.F., Liu Z.J., & Cheng, Y.X. (2009). Changes of progesterone and 17β -estradiol concentrations in ovary, hepatopancreas, and hemolymph of swimming crab *Portunus trituberculatus* during the reproductive cycle. *Journal of Fish China*, 33, 86.
- Ferreira, M.A.P., Resende, B.M., Lima, M.Y.S., Santos, S.S.D., & Rocha, R.M. (2012). The stages of ovarian development affects organ expression of vitellogenin as well as the morphometry and ultrastructure of germ cells in the freshwater prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862), *Theriogenology* 78, 981–990.
- Fingerman, M., Nagahshanam, R., & Sarojini R. (1993). Vertebrate-type hormones in crustaceans: localization, identification and functional significance. *Zoological Science*, 10,13–29.
- Fyhn, M.E.H. & Costlow, J.D. (1977). Histology and histochemistry of the ovary and oogenesis in *Balanus amphitrite* L and *Balanus eburneus* Gould (Cirripedia: Crustacea). *Biological Bulletin*, 152, 351-359.
- Gunamalai, V., Kirubakaran, R., & Subramoniam, T. (2006). Vertebrate steroids and the control of female reproduction in two decapod crustaceans, *Emerita asiatica* and *Macrobrachium rosenbergii*. *Current Science India*, 90,119–123.
- Humason, G.L. (1972) Animal tissue technique. W.H. Freeman, San Francisco.641pp.
- Kessel, R.G. (1968). Mechanisms of protein yolk synthesis and deposition in crustacean oocytes. *Zeitschrift für Zellforschung Mikroskopische Anatomie*, 89, 17-38.
- King, J.E.(1948). A study reproductive organs of the common marine shrimp, *Peneaus sertiferus* (Linnaeus). *Biological Bulletin*, 94, 224-262.
- Köhler, H. R., Kloas, W., Schirling, M., Lutz, L., Reye, A.L., Langen, J., Triebkorn, R., Nagel, R., & Schoñfelder, G. (2007). Sex steroid receptor evolution and signalling in aquatic invertebrates. *Ecotoxicology*, 16, 131–143.
- Kulkarni, G.K., Nagabhushanam, R., & Joshi, P.K. (1979). Effect of progesterone on ovarian maturation in a marine penaeid prawn, *Parapenaeopsis hardwickii*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 17, 986–987.
- Kulkarni, G.K., Glade, L., & Fingerman, M. (1991). Oogenesis and effects of neuroendocrine tissues on *in vitro* synthesis of protein by the ovary of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*, *Journal of Crustacean Biology*, 11, 513–522
- Krol, R.M., & Hawkins, W.E., Overstreet R.M. Reproductive components. F.W. Harrison, F.W., Humes A.G., (Eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates Vol 10: Decapod Crustacea*, Wiley-Liss, New York (1992), pp. 259-343.
- LaFont, R., & Mathieu, M. (2007). Steroids in aquatic invertebrate. *Ecotoxicology*, 16,109-130.
- Meunpol, O., lam-Pai, S., Suthikrai, W., & Piyatiratitivorakul, S. (2007). Identification of progesterone and 17β -hydroxyprogesterone in polychaetes (*Perinereis* sp.) and the effects of hormone extracts on penaeid oocyte development *in vitro*. *Aquaculture*, 270, 485–492.

- Minagawa, M., J.-R. Chiu, J.-R. Kudo, F. Ito, F. & Takashima, F. (1993). Female reproductive biology and oocyte development of the red frog crab, *Ranina ranina*, off Hachijojima, Izu Islands, Japan. *Marine Biology*, 115, 613–623.
- Nicolau, C.F., Nascimento, A.A., Machado-Santos, C., Sales, A. & Oshiro, L.M.Y. (2012). Gonads of males and females of the mangrove tree crab *Aratus pisonii* (Grapsidae: Brachyura: Decapoda): a histological and histochemical view. *Acta Zoology*, 93, 222–230.
- O'Donovan, P., Abraham, M., & Cohen D. (1984). The ovarian cycle during the intermoult in ovigerous *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 36, 347-358.
- Papathanassiou, E., & King, P.E. (1984). Ultrastructural Studies on Gametogenesis of the Prawn *Puemon serratus* (Pennant). I. Oogenesis. *Acta Zoologica* (Stockh.), 65, 17-31.
- Paolucci, M., Cristo, C, D., & Cosmo, A.D. (2002). Immunological evidence for progesterone and estradiol receptors in the freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes*. *Molecular reproduction and development*. 63, 55-62.
- Pearse, A.G, E. (1960). Histochemistry theoretical and applied. Vol. 2. London: Jet. Churchill Ltd. p. 965.
- Quadros, P.S., Lopez, V., De Vries, G.J., Chung, W.C., & Wagner, C.K. (2002). Progesterone receptors and the sexual differentiation of the medial preoptic nucleus. *Journal Neurobiology*, 51, 24-32.
- Ravi , R., Manisseri, M. K., & Sanil, N, K. (2012). Ovarian maturation and oogenesis in the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus* (Decapoda: Portunidae). *Acta Zoologica* (Stockholm), 94, 291–299.
- Robinson, R.S., Mann, G.E., Lamming, G.E., & Wathes, D.C. (2001). Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the estrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction*, 122, 965–979.
- Santos S. & Negreiros-Fransozo, M.L. (1999). Reproductive cycle of the swimming crab *Portunus spinimanus* Latreille (Crustacea, Decapoda, Brachyura) from the Ubatuba, São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 16, 1183-1193.
- Sharifian, S., Kamrani, E., Safaie, M., & Sharifian, S. (2015). Oogenesis and ovarian development in the freshwater Crab *Sodhiana iranica* (Decapoda: Gecarcinuidae) from the south of Iran. *Tissue and cell*, 47, 213-220.
- Soroka, Y., Milner, Y. & Sagi, A. (2000). The hepatopancreas as a site of yolk protein synthesis in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Invertebrate Reproductive Development*, 37, 61–68.
- Souza ,T.L., .Bragaa, A.A., López, L.S., & Nunesa, G,E. (2017). Dynamics of oogenesis in ghost shrimp *Callichirus major* (Crustacea: Axiidea): a morphofunctional and histochemical study. *Acta Histochemica*, 119,769-777.

- Stewart, M.J., Soonklang, N., Stewart, P., Hanna, P.J., Wanichanon, C., Parratt, A., Duan, W., & Sobhon, P., 2007. Histological studies of the ovaries of two tropical portunid crabs, *Portunus pelagicus* (L.) and *Scylla serrata* (F.). *Invertebrate Reproduction Development*, 50, 85–97.
- Suzuki, S., Yamasaki, K., & Katakura, Y., (1989) Vitellogenin synthesis by fat body and ovary in the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare*. *General Comparative Endocrinology*, 74, 120-126.
- Thongbuakaew, T., Siangcham, T., Suwansa-ard, S., Elizur, A., Cummins, S.F., Sobhon, P., & Sretarugsa, P. (2016). Steroids and genes related to steroid biosynthesis in the female giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Steroids*, 107, 149-160.
- Thomas, P., Tubbs Hakan C., Berg, H., & Dressing, G. (2007) Sex steroid hormone receptors in fish ovaries. Dordrecht, the Netherlands: Springer. p. 203–232.
- Warrier, S.R., Tirumalai, R., & Subramoniam, T. (2001) Occurrence of vertebrate steroids, estradiol 17β and progesterone in the reproducing females of the mud crab *Scylla serrata*. *Comparative Biochemistry Physiology A Molecular Integrate Physiology*, 130, 283-294.
- Wolin, E.M., Laufer, H., & Albertini, D.F. (1973) Uptake of yolk protein lipovitelline by developing crustacean oocytes. *Developmental Biology*, 35, 160-170.
- Wu, X., Chen, H., Liu, Z., Cheng, Y., (2014.) Immunorecognition and distribution of progesterone receptors in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* during ovarian development. *Journal of Shellfish Research*, 33, 35-43
- Yano, I. (1985). Induced ovarian maturation and spawning in greasyback shrimp, *Metapenaeus ensis*. By progesterone, *Aquaculture*, 47, 223-229,
- Ye, H., Songa, P., Mab, J., Huang, H., & Wang, G. (2010). Changes in progesterone levels and distribution of progesterone receptor during vitellogenesis in the female mud crab (*Scylla paramamosain*). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 43, 25-35.