

ผลของการใช้โพรสตาแกลนดินต่อระดับของฮอร์โมนเพศและวงรอบการสืบพันธุ์ในปลากระเบนน้ำจืด  
สายพันธุ์โมโตรัว (Potamotrygon motoro) ในบ่อเลี้ยง



นางสาวชญาณีศ ดาวฉาย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตว์แพทย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF PROSTAGLANDIN ON SEX HORMONE PROFILES AND REPRODUCTIVE  
CYCLE IN CAPTIVE OCELLATE RIVER STINGRAY (POTAMOTRYGON MOTORO)

Miss Chayanis Daochai



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Medicine

Department of Veterinary Medicine

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของการใช้โพรสตาแกลนดินต่อระดับของฮอร์โมนเพศ และวงรอบการสืบพันธุ์ในปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร (Potamotrygon motoro) ในบ่อเลี้ยง
โดย	นางสาวชญาณิศ ดาวฉาย
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์สัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.นันทริกา ชันช่อ

---

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.สมศักดิ์ ภัคภิคุณ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.นันทริกา ชันช่อ)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิณา เคยพุดซา)

.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจนจิต คุณดำรงสวัสดิ์)

ชฎานิศ ดาวฉาย : ผลของการใช้โพรสตาแกลนดินต่อระดับของฮอร์โมนเพศและวงรอบการสืบพันธุ์ในปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร (Potamotrygon motoro) ในปอเลี้ยง (EFFECTS OF PROSTAGLANDIN ON SEX HORMONE PROFILES AND REPRODUCTIVE CYCLE IN CAPTIVE OCELLATE RIVER STINGRAY (POTAMOTRYGON MOTORO)) อ.ที่ปริกษาวิทยาพนธ์หลัก: รศ. สพ.ญ. ดร.นันทริกา ชันชื้อ, หน้า.

การศึกษาคั้งนี้มีจุดประสงค์ในการประเมินวงรอบการสืบพันธุ์และศึกษาผลของการใช้ฮอร์โมนโพรสตาแกลนดินเอพทูแอลฟาสังเคราะห์ต่อระดับฮอร์โมนเพศและลักษณะทางกายภาพของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ โดยการเจาะเลือดเพื่อวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนเพศร่วมกับการศึกษาลักษณะทางกายภาพของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์จากการสังเกต วัด และการอัลตราซาวด์ในปลากระเบนเพศผู้และเพศเมียเป็นเวลา 17 สัปดาห์ และเก็บข้อมูลดังกล่าวหลังจากการฉีดโพรสตาแกลนดินสังเคราะห์เป็นเวลา 26 วัน พบว่าปลากระเบนโมโตโรในปอเลี้ยงมีการปรับตัวให้มีรูปแบบของวงรอบการสืบพันธุ์แบบไม่พร้อมกันทั้งฝูงและสามารถสืบพันธุ์ได้ตลอดปีแตกต่างจากในประชากรในธรรมชาติ โดยระดับฮอร์โมนเพศไม่สามารถนำมาประเมินวงรอบการสืบพันธุ์โดยตรงได้ ในขณะที่ลักษณะทางกายภาพของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์นั้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการประเมินวงรอบการสืบพันธุ์ ได้แก่ การเจริญของฟอลลิเคิล การตกไข่ การเปลี่ยนแปลงของมดลูก และความพร้อมในการผสมพันธุ์ของปลากระเบนเพศเมีย และการประเมินความเจริญพันธุ์และความพร้อมในการผสมพันธุ์ในปลากระเบนเพศผู้ได้ ซึ่งสามารถนำวิธีนี้มาใช้ในการประเมินรูปแบบและวงรอบการสืบพันธุ์ในปลากระเบนน้ำจืดที่หายากและใกล้สูญพันธุ์ได้ การใช้โพรสตาแกลนดินเอพทูแอลฟาแสดงผลชัดเจนต่อมดลูก ทำให้มดลูกลดขนาดลงรวมทั้งลดความยาวของเนื้อเยื่อผนังมดลูกภายใน 1 วัน จึงเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของมดลูกนี้จะเหนี่ยวนำให้เกิดการเตรียมพร้อมสำหรับวงรอบการสืบพันธุ์ครั้งใหม่ได้ ในขณะที่ฮอร์โมนดังกล่าวไม่แสดงผลชัดเจนต่อขนาดฟอลลิเคิลและระดับฮอร์โมนเพศ อย่างไรก็ตามการศึกษาคั้งนี้เป็นครั้งแรกที่มีรายงานการใช้โพรสตาแกลนดินเอพทูแอลฟาสังเคราะห์ในปลากระเบน

ภาควิชา อายุรศาสตร์ .....ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา อายุรศาสตร์สัตวแพทย์ .....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2557

# # 5475306231 : MAJOR VETERINARY MEDICINE

KEYWORDS: EXOGENOUS PROSTAGLANDIN, FRESHWATER STINGRAY, REPRODUCTIVE CYCLE, SEX HORMONE

CHAYANIS DAOCHAI: EFFECTS OF PROSTAGLANDIN ON SEX HORMONE PROFILES AND REPRODUCTIVE CYCLE IN CAPTIVE OCELLATE RIVER STINGRAY (POTAMOTRYGON MOTORO). ADVISOR: ASSOC. PROF. DR.NANTARIKA CHANSUE, pp.

The objective of this study was to study reproductive cycle and affects of exogenous prostaglandin on sex hormone profiles and reproductive anatomy in Ocellate river stingray. Reproductive cycle was estimated using serum hormone level and anatomy of external reproductive organ and ultrasonography of internal reproductive organ for 17 weeks. Then, the data were collected continuously for 26 days after injection of exogenous prostaglandin. The results indicated that reproductive cycle pattern of captive *P. motoro* has been adapted to asynchronous pattern and can reproduce throughout the year. Sex hormone profile could not be used to estimate reproductive cycle while reproductive anatomy can be used to estimate follicle development, ovulation, change of endometrium and courtship receptivity. Moreover, it can also be used to estimate sex maturity and breeding readiness in male stingray. Exogenous prostaglandin clearly showed effects on uterus and trophonemata. Vertical diameter of uterus and trophonemata length were definitely declined within a day after injection. The change of endometrium possibly induces resumption of postpartum reproductive cyclicity. In addition, the injection showed the effects on serum estradiol and progesterone with no significant impact on ovary volume and dominant follicle diameter. However, this is the first report on the application of exogenous prostaglandin in Elasmobranch.

Department: Veterinary Medicine

Student's Signature .....

Field of Study: Veterinary Medicine

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2014

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยคามอนุเคราะห์และความช่วยเหลือของ รศ.สพ.ญ.ดร. นันทริกา ชันช้อย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษาในการทำวิจัยพร้อม ทั้งคำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งตลอดมา

ขอขอบพระคุณ สพ.ญ.ดร.อัมพิกา ทองภักดี หัวหน้าฝ่ายวิจัยสำนักอนุรักษ์วิจัยและ การศึกษา องค์การสวนสัตว์ และนายชัยณรงค์ ปั่นคง เจ้าหน้าที่งานวิจัยฝ่ายอนุรักษ์ วิจัยสุขภาพ สัตว์ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว รวมทั้งบุคลากรของงานวิจัยฝ่ายอนุรักษ์ วิจัยสุขภาพสัตว์ สวนสัตว์เปิด เขาเขียวที่ให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือในเรื่องการตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมน

ขอขอบพระคุณบริษัท วิมาร์ค ฟาร์ม จำกัดที่ให้ปลากระเบนโมโตโร่สำหรับงานวิจัย และอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ สพ.ญ.ชวีัญญา เจียกวัธัญญ์ สพ.ญ.นิธิวดี เกษจำรัส และนางสาวกนกวรรณ ลีอวราพงษ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บข้อมูลของงานวิจัย ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่และสัตว แพทย์ทุกท่านของศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ ความช่วยเหลือระหว่างการวิจัย

ขอขอบพระคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยสำหรับ “ทุน 90 ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช (The 90th Anniversary of Chulalongkorn University Scholarship)” ที่ช่วยสนับสนุนในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบิดา (นายประดิษฐ์ ดาวฉาย) และมารดา (ผศ.สมศรี ดาวฉาย) ที่คอย เป็นแรงผลักดันช่วยเหลือให้การสนับสนุนและกำลังใจในการทำการศึกษารวมทั้งเพื่อนฝูงที่คอย เป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัย ซึ่งทุกท่านมีส่วนสำคัญอย่างยิ่งในการผลักดัน ให้ข้าพเจ้าทำการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูป.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
1.3 สมมติฐานการวิจัย.....	4
1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดของงานวิจัย.....	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 ปลากะเบนน้ำจืด.....	6
2.1.1 ข้อมูลทั่วไปของปลากะเบนน้ำจืด.....	6
2.1.2 ชีวิตวิทยาพื้นฐานของปลากะเบนน้ำจืด.....	6
2.1.3 การเพาะเลี้ยงปลากะเบนน้ำจืดในปัจจุบัน.....	8
2.2 ระบบสืบพันธุ์ของปลากะตุกอ่อน.....	9
2.2.1 ลักษณะทางกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์ของปลากะตุกอ่อนเพศเมีย.....	9
2.2.2 ลักษณะทางกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์ของปลากะตุกอ่อนเพศผู้.....	10
2.2.3 ชีวิตวิทยาและรูปแบบของระบบสืบพันธุ์ของปลากะตุกอ่อน.....	12
2.2.4 การอัลตราซาวด์เพื่อดูลักษณะทางกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์ของปลากะตุกอ่อน.....	13

2.2.5	วงรอบการสืบพันธุ์ (reproductive cycle).....	14
2.2.6	ฮอร์โมนเพศในปลากระดูกอ่อน .....	16
2.2.7	การตรวจฮอร์โมนเพศ.....	19
2.3	การใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ในสัตว์ โดยการใช้ โพรสตา แกลนดินเอฟทูแอลฟา (prostaglandin F2alpha).....	19
2.3.1	การใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ในสัตว์ .....	19
2.3.2	โพรสตาแกลนดินเอฟทูแอลฟา (prostaglandin F2alpha).....	21
2.3.3	ผลของโพรสตาแกลนดินเอฟทูแอลฟา (prostaglandin F2alpha) ต่อระดับฮอร์โมน เพศและลักษณะทางกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ .....	24
บทที่ 3	วิธีดำเนินงานวิจัย.....	26
3.1	สัตว์ทดลอง .....	26
3.2	การเตรียมสัตว์ทดลอง.....	26
3.2.1	การปรับสภาพสัตว์ก่อนทำการทดลอง.....	26
3.2.2	การป้องกันอันตรายจากสัตว์ .....	27
3.2.3	การเก็บบันทึกข้อมูลเบื้องต้น .....	27
3.3	การทดลองที่ 1 .....	31
3.3.1	สัตว์ทดลอง .....	31
3.3.2	การเก็บบันทึกข้อมูล.....	31
3.3.3	การเก็บตัวอย่างเลือด .....	33
3.3.4	การตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนด้วยวิธี ELISA .....	33
3.3.5	การอัลตราซาวด์อวัยวะสืบพันธุ์.....	38
3.4	การทดลองที่ 2 .....	40
3.4.1	สัตว์ทดลอง .....	40
3.4.2	การเก็บบันทึกข้อมูลทั่วไป.....	40



3.4.3 การใช้โพรสตาแกลนดิน .....	40
3.4.4 การตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนด้วยวิธี ELISA.....	41
3.4.5 การอัลตราซาวด์อวัยวะสืบพันธุ์.....	41
3.5 การตรวจคุณภาพน้ำ.....	42
3.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	43
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	44
4.1 ผลการทดลองที่ 1.....	44
4.1.1 ขนาด น้ำหนัก ลักษณะของฟันและขนาดของอวัยวะนำน้ำเชื้อของปลากะเบนน้ำ เจริญพันธุ์.....	44
4.1.2 ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลากะเบนโดยการอัลตราซาวด์ .....	48
4.1.3 ระดับฮอร์โมนเพศในเลือดในปลากะเบน .....	65
4.1.4 ความสัมพันธ์ของฮอร์โมนเพศในเลือดและลักษณะทางกายภาพโดยการ อัลตรา ซาวด์.....	70
4.2 ผลการทดลองที่ 2.....	77
4.2.1 พฤติกรรมการกินอาหาร น้ำหนักและขนาด.....	77
4.2.2 การเปลี่ยนแปลงของอวัยวะสืบพันธุ์โดยการอัลตราซาวด์ .....	77
4.2.3 ระดับฮอร์โมนเพศในเลือด .....	84
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย บทสรุป และข้อเสนอแนะ .....	88
อภิปรายผลการวิจัย.....	88
5.1 การทดลองที่ 1 .....	88
5.1.1 ขนาด น้ำหนัก ขนาดของท่อนำน้ำเชื้อ และฟันของปลากะเบนเพศเมียและปลา กระเบนเพศผู้เจริญพันธุ์.....	88
5.1.2 ลักษณะของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ของปลากะเบนเพศเมียโดยการ อัลตราซาวด์ ...	90
5.1.3 ลักษณะของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ของปลากะเบนเพศผู้โดยการ อัลตราซาวด์ .....	92

5.1.4 ระดับฮอร์โมนเพศในเลือดในปลากระเบนเพศเมีย .....	94
5.1.5 ระดับฮอร์โมนเพศในเลือดในปลากระเบนเพศผู้ .....	96
5.1.6 ความสัมพันธ์ของระดับฮอร์โมนเพศในเลือดและลักษณะของอวัยวะในระบบ สืบพันธุ์ของปลากระเบนเพศเมียและเพศผู้โดยการอัลตราซาวด์ .....	97
5.2 การทดลองที่ 2 .....	101
5.2.1 การเปลี่ยนแปลงของลักษณะของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ของปลากระเบนเพศเมีย โดยการอัลตราซาวด์ .....	101
5.2.2 ระดับฮอร์โมนในเลือดของปลากระเบนเพศเมีย .....	102
บทสรุป และข้อเสนอแนะ .....	106
.....	109
รายการอ้างอิง .....	109
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	123

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ค่าโลหิตวิทยา และชีวเคมีของเลือดของปลากระเบน ..... 31

ตารางที่ 2 คุณภาพน้ำในการทดลองที่ 1 และ 2..... 42

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของน้ำหนัก ความกว้างลำตัว ความยาวลำตัว และความยาวลำตัวรวมของปลากระเบนเทศเมียและเทศผู้ ..... 44

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดของอวัยวะนำน้ำเชื้อของปลากระเบนเทศผู้ (n=9)..... 45

ตารางที่ 5 ค่าร้อยละต่ำสุด ค่าร้อยละสูงสุด และค่าเฉลี่ยรวมของร้อยละของขนาดของอวัยวะนำน้ำเชื้อต่อความกว้างลำตัวของปลากระเบนเทศผู้ ..... 46

ตารางที่ 6 ปริมาตรรังไข่และเส้นผ่าศูนย์กลางของโอดิแนนท์ฟอลลิเคิลของปลากระเบนเทศเมีย (n=18)..... 51

ตารางที่ 7 การแบ่งระดับของลักษณะของมดลูกส่วนปลายที่พบโดยการอัลตราซาวด์..... 56

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเส้นผ่าศูนย์กลางแนวตั้งของมดลูก และความยาวของเนื้อเยื่อผนังมดลูกของปลากระเบนเทศเมีย (n=18)..... 58

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานปริมาตรอณฑะ เส้นผ่าศูนย์กลางของกليبของท่อเซมินิเฟอรัส และเส้นผ่าศูนย์กลางของท่อเซมินิออลเวสสิเคิล..... 63

ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับฮอร์โมนเอสทราไดออลและโปรเจสเทอโรนในเลือดในปลากระเบนเทศเมีย (n=18)..... 66

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับฮอร์โมนเทสโทสเทอโรนและฮอร์โมนเอสทราไดออลในเลือดในปลากระเบนเทศผู้ (n=9)..... 69

ตารางที่ 12 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาตรรังไข่ และเส้นผ่าศูนย์กลางของโอดิแนนท์ฟอลลิเคิลของปลากระเบนเทศเมียในกลุ่มควบคุม (n=8) และกลุ่มทดลอง (n=8) ในการทำการทดลองวันที่ 1, 2, 5, 12, 19 และ 26 ..... 78

ตารางที่ 13 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับของมดลูก เส้นผ่าศูนย์กลางตามแนวตั้งของมดลูก และความยาวของเนื้อเยื่อมดลูกของปลากระเบนเทศเมียในกลุ่มควบคุม (n=8) และกลุ่มทดลอง (n=8) ในการทำการทดลองวันที่ 1, 5, 8, 15, 22 และ 29 ..... 82

ตารางที่ 14 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับฮอร์โมนเพศในเลือดของปลากระเบน เพศเมียในกลุ่มควบคุม (n=8) และกลุ่มทดลอง (n=8) ในการทำการทดลองวันที่ 1, 2, 5, 12, 19 และ 26 .....	86
---	----



## สารบัญรูป

รูปที่ 1	ปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ .....	8
รูปที่ 2	การวัดขนาดตัว.....	28
รูปที่ 3	A) การเก็บตัวอย่างเลือดโดยการจับบังคับปลาโดยปราศจากการวางยาสลบ B) ตำแหน่งการเก็บตัวอย่างเลือด .....	28
รูปที่ 4	เครื่องตรวจและชุดตรวจสอบสำเร็จรูป Reflotron® test .....	29
รูปที่ 5	การวัดขนาดและความยาวของอวัยวะนำน้ำเชื้อ .....	32
รูปที่ 6	A) วิธีการวางอ่างทดลองเพื่อสังเกตรูปร่างฟันของปลากระเบนเพศผู้; B) ลักษณะฟันของปลากระเบนเพศผู้.....	33
รูปที่ 7	เครื่องอ่านผล spectrophotometer (TECAN® sunrise).....	38
รูปที่ 8	A) เครื่องอัลตราซาวด์เคลื่อนที่ Digital ultrasonic diagnostic imaging system และหัวตรวจชนิด Electronic micro-convex array transducer B) การอัลตราซาวด์อวัยวะในระบบสืบพันธุ์จากด้านบนของตัวสัตว์ด้วยวิธีปราศจากการวางยาสลบ.....	40
รูปที่ 9	แสดงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากปลากระเบนกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง.....	41
รูปที่ 10	ฮอโมนโพรสตาแกลนดินเอพทูแอลฟาสังเคราะห์.....	41
รูปที่ 11	ชุดตรวจคุณภาพน้ำสำเร็จรูป (AQUA VBN®).....	42
รูปที่ 12	ความยาวเส้นรอบวงของอวัยวะนำน้ำเชื้อของปลากระเบนเพศผู้.....	46
รูปที่ 13	ความยาวของอวัยวะนำน้ำเชื้อถึงปลายขอบที่ติดกับลำตัวของปลากระเบนเพศผู้ .....	47
รูปที่ 14	ความยาวของอวัยวะนำน้ำเชื้อถึงปลายขอบของท่อน้ำน้ำเชื้อของปลากระเบนเพศผู้.....	47
รูปที่ 15	รูปแบบของฟันที่มีลักษณะเป็นติ่งแหลม (cuspidate form) ของปลากระเบนเพศผู้.....	48
รูปที่ 16	ภาพอัลตราซาวด์รังไข่ด้านซ้ายของปลากระเบนเพศเมียซึ่งประกอบด้วยฟอลลิเคิล .....	49
รูปที่ 17	ภาพอัลตราซาวด์ฟอลลิเคิล (ลูกศรสีเหลือง) ในรังไข่ด้านซ้ายของปลากระเบนเพศเมีย .....	50
รูปที่ 18	ปริมาตรรังไข่ของปลากระเบนเพศเมีย .....	51
รูปที่ 19	เส้นผ่าศูนย์กลางของโคมิแนนท์ฟอลลิเคิล .....	52

รูปที่ 20 ภาพอัลตราซาวด์แสดงไข่ที่มีลักษณะฝ่อ (atresia follicle).....	53
รูปที่ 21 ภาพอัลตราซาวด์แสดงโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายคอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum-like structure).....	53
รูปที่ 22 ภาพอัลตราซาวด์เปรียบเทียบโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายคอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum-like structure) (ซ้าย) และไข่ที่มีลักษณะฝ่อ (atresia follicle) (ขวา).....	54
รูปที่ 23 สัดส่วนจำนวนปลากะเบนเพศเมียที่พบโครงสร้างคล้ายคอร์ปัสลูเทียมและฟอลลิเคิลในแต่ละสัปดาห์.....	54
รูปที่ 24 ภาพอัลตราซาวด์แสดงมดลูกส่วนปลายและเนื้อเยื่อผนังมดลูกของปลากะเบนเพศเมียเมื่อวางหัวตรวจตัดขวาง.....	56
รูปที่ 25 รูปวาดแสดงลักษณะของมดลูกส่วนปลายที่พบโดยการอัลตราซาวด์ในระดับต่างๆ.....	57
รูปที่ 26 สัดส่วนจำนวนปลากะเบนเพศเมียที่มีระดับของรูปร่างตัดตามแนวยาวของมดลูกในแต่ละสัปดาห์.....	58
รูปที่ 27 เส้นผ่าศูนย์กลางแนวตั้งของมดลูกของปลากะเบนเพศเมีย.....	59
รูปที่ 28 ความยาวของเนื้อเยื่อผนังมดลูกของปลากะเบนเพศเมีย.....	60
รูปที่ 29 ภาพอัลตราซาวด์อวัยวะของปลากะเบนเพศผู้.....	62
รูปที่ 30 ภาพอัลตราซาวด์ท่อเซมินอลเวสิเคิลของปลากะเบนเพศผู้ และแสดงการวัดความกว้าง (ลูกศรสีเหลือง) ของกลีบของท่อเซมินิเฟอร์ส.....	63
รูปที่ 31 ปริมาตรอวัยวะของปลากะเบนเพศผู้.....	64
รูปที่ 32 เส้นผ่าศูนย์กลางของกลีบของท่อเซมินิเฟอร์สของปลากะเบนเพศผู้.....	64
รูปที่ 33 เส้นผ่าศูนย์กลางของท่อเซมินอลเวสิเคิลของปลากะเบนเพศผู้.....	65
รูปที่ 34 ระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดในปลากะเบนเพศเมีย.....	67
รูปที่ 35 ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดในปลากะเบนเพศเมีย.....	67
รูปที่ 36 ระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในเลือดในปลากะเบนเพศผู้.....	69
รูปที่ 37 ระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดในปลากะเบนเพศผู้.....	70
รูปที่ 38 ความสัมพันธ์ของฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดและฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดของปลากะเบนเพศเมีย.....	71

รูปที่ 39 ความสัมพันธ์ของระดับฮอร์โมนกับรังไข่ของปลากระเบนเทศเมีย .....	72
รูปที่ 40 ความสัมพันธ์ของระดับฮอร์โมนกับมดลูกของปลากระเบนเทศเมีย.....	73
รูปที่ 41 ความสัมพันธ์ของระดับฮอร์โมนกับขนาดท่อนำน้ำเชื้อของปลากระเบนเทศผู้.....	74
รูปที่ 42 ความสัมพันธ์ของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในเลือดและเอสตราไดออลในเลือดในปลา กระเบนเทศผู้.....	75
รูปที่ 43 ความสัมพันธ์ของระดับฮอร์โมนกับอัตราและเซมินอลเวซิคูลของปลากระเบนเทศผู้.....	76
รูปที่ 44 ค่าเฉลี่ยของปริมาตรรังไข่ของปลากระเบนเทศเมียเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุม (n=8) และกลุ่มทดลอง (n=8) ในวันทดลองที่ 1, 2, 5, 12, 19 และ 26 .....	79
รูปที่ 45 ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโอดิแนนท์ฟอลลิเคิล ของปลากระเบนเทศเมีย เปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุม (n=8) และกลุ่มทดลอง (n=8) ในวันทดลองที่ 1, 2, 5, 12, 19 และ 26 .....	79
รูปที่ 46 ค่าเฉลี่ยของระดับของมดลูกของปลากระเบนเทศเมียเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุม (n=8) และกลุ่มทดลอง (n=8) ในวันทดลองที่ 1, 2, 5, 12, 19 และ 26.....	83
รูปที่ 47 ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางแนวตั้งของมดลูกส่วนปลายของปลากระเบนเทศเมีย เปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุม (n=8) และกลุ่มทดลอง (n=8) ในวันทดลองที่ 1, 2, 5, 12, 19 และ 26 .....	83
รูปที่ 48 ค่าเฉลี่ยของความยาวของเนื้อเยื่อผนังมดลูกของปลากระเบนเทศเมียเปรียบเทียบกับใน กลุ่มควบคุม (n=8) และกลุ่มทดลอง (n=8) ในวันทดลองที่ 1, 2, 5, 12, 19 และ 26 .....	84
รูปที่ 49 ระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดของปลากระเบนเทศเมียเปรียบเทียบกับในกลุ่ม ควบคุม (n=8) และกลุ่มทดลอง (n=8) ในวันทดลองที่ 1, 2, 5, 12, 19 และ 26 .....	87
รูปที่ 50 ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดของปลากระเบนเทศเมียเปรียบเทียบกับในกลุ่ม ควบคุม (n=8) และกลุ่มทดลอง (n=8) ในวันทดลองที่ 1, 2, 5, 12, 19 และ 26 .....	87

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลากระเบนโมโตโร่ (ocellate river stingray) เป็นปลากระเบนที่อาศัยอยู่ในน้ำจืดชนิดหนึ่ง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Potamotrygon motoro* จัดเป็นปลาจำพวกปลากระดูกอ่อน (elasmobranch) ในวงศ์ปลากระเบนหางสั้น (Potamotrygonidae) ซึ่งมีลักษณะตัวกลมแบนคล้ายจานข้าว โดยทั่วไปอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติของทวีปอเมริกาใต้ เช่น เปรู อุรุกวัย โคลัมเบีย โบลิเวีย อาร์เจนตินา และบราซิล ซึ่งคนในท้องถิ่นมักนิยมจับปลาชนิดนี้เพื่อมาเลี้ยงเป็นสัตว์น้ำสวยงามหรือกินเป็นอาหาร (Araújo et al., 2004)

ปลากระเบนเกือบทุกชนิดอาศัยอยู่ในทะเล มีเพียงปลากระเบนในวงศ์ Dasyatidae และ Potamotrygonidae เท่านั้นที่สามารถอาศัยอยู่ในน้ำจืดหรือน้ำกร่อยได้ (Oldfield, 2007) อย่างไรก็ตามปลากระเบนในวงศ์ Potamotrygonidae นั้นได้รับความนิยมในการนำมาเลี้ยงเป็นปลาน้ำจืดสวยงามมากกว่า เนื่องจากมีลวดลายสวยงามเฉพาะตัวและมีความหลากหลาย ปลากระเบนในวงศ์ Potamotrygonidae นั้นมีทั้งหมดประมาณ 40 ชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีลวดลายแตกต่างกัน สำหรับปลากระเบนโมโตโร่ (*Potamotrygon motoro*) นั้นเป็นปลากระเบนสายพันธุ์ที่ได้รับความนิยมอย่างมาก เนื่องจากพบได้ง่ายและมีการกระจายตัวอย่างกว้างขวางในหลายประเทศ สามารถเลี้ยงได้ง่าย แข็งแรง ทนทานต่อโรค และเพาะขยายพันธุ์ได้ไม่ยาก อีกทั้งกำลังเป็นที่ต้องการของตลาดสูง จึงทำให้มีคนไทยนำปลากระเบนสายพันธุ์โมโตโร่ มาเลี้ยงเป็นปลาสวยงามอย่างแพร่หลายและยังประสบความสำเร็จในการเพาะขยายพันธุ์อีกด้วย นอกจากผลิตขายภายในประเทศแล้ว ยังมีการเพาะพันธุ์ปลากระเบนชนิดนี้เพื่อส่งออกไปขายในตลาดต่างประเทศ โดยเฉพาะประเทศจีน ซึ่งเป็นตลาดรายใหญ่ อีกทั้ง ญี่ปุ่น มาเลเซีย ไต้หวัน รัสเซีย บรูไน อิหร่าน และคูเวต ดังนั้น ตลาดทั้งในและต่างประเทศจึงมีความต้องการปลากระเบนสวยงามชนิดนี้มากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ปัจจุบันจำนวนปลากระเบนไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด เนื่องมาจากการลดลงของปลากระเบนในธรรมชาติ แหล่งน้ำในธรรมชาติเสื่อมโทรม ข้อจำกัดในการซื้อขายและขนส่ง การขาดความรู้อย่างแท้จริงในเรื่องการจัดการดูแลทั้งทางด้านเลี้ยง อาหาร การดูแลสุขภาพ การสืบพันธุ์ และการเกิดโรค (อรุณี, 2556) การศึกษาข้อมูลพื้นฐานและการศึกษาวิจัยเพิ่มเติม จึงจำเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาความรู้ในการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ปลากระเบนน้ำจืดชนิดนี้ต่อไปในอนาคต



ปัจจุบันมีการเพาะพันธุ์ปลากระเบนโมโตโร้กันอย่างแพร่หลาย โดยทั่วไปปลากระเบนพ่อแม่พันธุ์จะเริ่มเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์เมื่ออายุประมาณ 1 ปีครึ่ง และมีขนาดประมาณ 30 เซนติเมตร ซึ่งในการเลี้ยงเพื่อการขยายพันธุ์นั้นตัวผู้จะสามารถผสมพันธุ์กับตัวเมียได้หลายตัว รูปแบบการสืบพันธุ์ของปลากระเบนเทศเมียนั้นเป็นแบบออกลูกเป็นตัวชนิดไม่มีรก (aplacental viviparous) ชนิดอาศัยไข่แดงและสารอาหารจากมดลูกในการเจริญเติบโต (placental analogue: histotrophe and trophonemata) ซึ่งจะมีระยะการตั้งท้องประมาณ 3-4 เดือน การศึกษาเกี่ยวกับวงจรการสืบพันธุ์ของปลากระดุกอ่อนโดยทั่วไปนั้น ปัจจุบันยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อย และจำกัดอยู่เพียงในปลากระดุกอ่อนบางชนิดเท่านั้น การศึกษาวงจรการสืบพันธุ์ของปลากระดุกอ่อนโดยทั่วไปจะมีการศึกษาจากประวัติการผสมพันธุ์ พฤติกรรมการสืบพันธุ์ และลักษณะทางกายภาคและจุลภาคของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ ประกอบกับการศึกษาระดับของฮอร์โมนเพศ สำหรับปลากระเบนน้ำจืดนั้นส่วนมากจะมีการศึกษาค่อนข้างมากในปลากระเบนวงศ์ *Dasyatidae* (Tricas et al., 2000) ซึ่งมีการกระจายอยู่ในธรรมชาติเป็นจำนวนมาก แต่ในปลากระเบนวงศ์ *Potamotrygonidae* มีการศึกษาวงจรการสืบพันธุ์จากเพียงลักษณะทางกายภาคและจุลภาคของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์เท่านั้น ซึ่งการศึกษาด้วยวิธีดังกล่าวนี้จำเป็นจะต้องการุณยฆาตสัตว์ทดลองในการเก็บตัวอย่าง และยังเป็นการศึกษาในแหล่งน้ำธรรมชาติในถิ่นที่อยู่อาศัยของปลาดังกล่าวเท่านั้นอีกด้วย

ความรู้เรื่องการเพาะพันธุ์ปลากระเบนน้ำจืดในบ่อเลี้ยงในปัจจุบันนั้นมักเป็นการศึกษาด้วยการสังเกตพฤติกรรมทางการสืบพันธุ์ โดยไม่มีแหล่งข้อมูลอ้างอิง หรือมีการศึกษาวิจัยที่เพียงพอ จึงทำให้การจัดการทางการสืบพันธุ์ค่อนข้างยาก ซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพในการผลิตลดลง ผู้เลี้ยงปลากระเบนยังไม่สามารถเพาะพันธุ์ปลากระเบนได้มากเพียงพอต่อความต้องการของตลาด ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เป็นสัตว์เศรษฐกิจ เช่น โคนม โคนเนื้อ และสุกร มีการมุ่งเน้นในการเพิ่มประสิทธิภาพการจัดการระบบสืบพันธุ์ค่อนข้างมาก จึงมีการกำหนดโปรแกรมการสืบพันธุ์ และโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดเพื่อให้เกิดผลผลิตทางการสืบพันธุ์สูงสุด การใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์นั้นได้รับความนิยมในการนำมาใช้เพื่อเพิ่มผลผลิตในฟาร์ม โดยมีการศึกษาวิจัยค่อนข้างมาก ฮอร์โมนสังเคราะห์ที่ได้รับความนิยม ได้แก่ โพรสเตาแกลนดินสังเคราะห์ (exogenous prostaglandin) โกนาโดโทรปิน-รีลีสซิงฮอร์โมนสังเคราะห์ (gonadotropins-releasing hormone; GnRH) เอสโตรเจนสังเคราะห์ (estrogen) และโปรเจสเตอโรนสังเคราะห์ (progesterone) (วิษณุ, 2547) สำหรับการกำหนดโปรแกรมการสืบพันธุ์ และโปรแกรมการเหนี่ยวนำให้เกิดการตกไข่ในปลานั้น มีการศึกษามากในปลากระดุกแข็ง (teleost) โดยมีการพัฒนาวิธีการใช้ฮอร์โมนต่างๆ เช่น สารสกัดจากต่อมใต้สมอง (pituitary extract) สารสกัดโกนาโดโทรปิน (purified gonadotropins) LHRH รีลีสซิงฮอร์โมน (LHRH releasing hormone) หรือ GnRH รีลีสซิงฮอร์โมน (GnRH

releasing hormone) ฮอโมนเพศสังเคราะห์ (sex steroid) โดปามีนแอนตาโกนิส (dopamine antagonists) และโพรสตาแกลนดินสังเคราะห์ (exogenous prostaglandin) (ภาณุและคณะ, 2545; โชคชัย, 2548) เพื่อใช้ในการกระตุ้นการตกไข่ การเพิ่มประสิทธิภาพการวางไข่ และอัตราการฟักไข่ อย่างไรก็ตามการกำหนดโปรแกรมการสืบพันธุ์โดยใช้ฮอโมนสังเคราะห์ดังกล่าวนี้ยังไม่มีการศึกษาวิจัยในปลากระดุกอ่อน ซึ่งมีลักษณะทางชีววิทยาการสืบพันธุ์แตกต่างจากปลากระดุกแข็ง (Hamlett and Koob, 1999a; Hamlett and Koob, 1999b)

การใช้โพรสตาแกลนดินเอพทูแอลฟาสังเคราะห์ (prostaglandin F<sub>2</sub>α; PGF<sub>2</sub>α) นั้นเป็นโปรแกรมรูปแบบแรกที่ได้รับการพัฒนาเพื่อใช้ควบคุมวงจรการสืบพันธุ์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เป็นสัตว์เศรษฐกิจทั้งโคและสุกรนั้น นิยมนำมาใช้ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดเพื่อกำหนดโปรแกรมการสืบพันธุ์ ฮอโมนดังกล่าวนี้มีผลในการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอโมนเพศที่มีผลในการควบคุมวงจรการสืบพันธุ์ ลักษณะทางกายภาพและการทำงานของอวัยวะสืบพันธุ์ของสัตว์อย่างมาก อย่างไรก็ตามการนำโพรสตาแกลนดินมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสัตว์น้ำนั้นมีการศึกษาน้อยมาก มีการศึกษาผลของฮอโมนดังกล่าวในการกระตุ้นพฤติกรรมผสมพันธุ์ กระตุ้นการตกไข่ และการวางไข่ในปลาเทราท์ ปลาทอง และปลาพาราไคซ์ (Jalabert and Szollosi, 1975; Stacey, 1976; Goetz and Smith, 1980; Villars et al., 1985) ทั้งนี้การศึกษากการใช้โพรสตาแกลนดินสังเคราะห์ในปลากระดุกอ่อนนั้นยังไม่พบว่ามีการศึกษามาก่อน

การศึกษาคั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาวงจรการสืบพันธุ์จากระดับฮอโมนเพศในเลือด ร่วมกับการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ และผลของโพรสตาแกลนดินสังเคราะห์ต่อระดับฮอโมนดังกล่าวรวมทั้งวงจรการสืบพันธุ์ของปลากระเบนสายพันธุ์โมโตโร้ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานของปลากระเบนน้ำจืดในวงศ์ Potamotrygonidae ที่มีการเลี้ยงในบ่อ และเพื่อพัฒนาองค์ความรู้ที่มีประโยชน์ต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการจัดการการเพาะพันธุ์ปลากระเบนชนิดต่างๆ ต่อไปในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาวงรอบการสืบพันธุ์ (reproductive cycle) โดยประเมินจากระดับฮอร์โมนเพศในเลือดและการตรวจโดยอัลตราซาวด์เพื่อคุณลักษณะทางกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลากะเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของการใช้โพรสตาแกลนดินสังเคราะห์ (exogenous prostaglandin) ต่อระดับฮอร์โมนเพศในเลือดและกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลากะเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโรเพศเมีย

## 1.3 สมมติฐานการวิจัย

1.3.1 ระดับฮอร์โมนเพศในเลือดและลักษณะของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์จากการทำอัลตราซาวด์สามารถนำมาใช้ในการประเมินวงรอบการสืบพันธุ์ของปลากะเบนน้ำจืดในวงศ์ Potamotrygonidae ในบ่อเลี้ยงได้

1.3.2 การใช้โพรสตาแกลนดินสังเคราะห์ (exogenous prostaglandin) มีผลกระทบต่อระดับฮอร์โมนเพศในเลือดและกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลากะเบนน้ำจืดในวงศ์ Potamotrygonidae เพศเมีย

## 1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดของงานวิจัย

ทำการศึกษาระดับฮอร์โมนเพศในเลือด โดยวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนเอสทราไดออลและโปรเจสเตอโรนในปลากะเบนเพศเมีย และวัดระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนและเอสทราไดออลในปลากะเบนเพศผู้ ร่วมกับการศึกษาลักษณะของมดลูก รังไข่ ฟอลลิเคิล อัมตะ และต่อมสร้างน้ำเลี้ยงอสุจิจากการทำอัลตราซาวด์ในปลากะเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโรเป็นระยะเวลา 17 สัปดาห์เพื่อนำมาวิเคราะห์วงรอบการสืบพันธุ์

ทำการศึกษาการเปลี่ยนระดับฮอร์โมนเพศในเลือดโดยวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนเอสทราไดออลและโปรเจสเตอโรนร่วมกับการศึกษาลักษณะของมดลูก รังไข่ และฟอลลิเคิลจากการทำอัลตราซาวด์หลังการฉีดโพรสตาแกลนดินสังเคราะห์เข้าทางกล้ามเนื้อในปลากะเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโรเพศเมีย เป็นเวลา 26 วัน

## 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 สามารถใช้ระดับฮอร์โมนเพศในเลือดและการอัลตราซาวด์ลักษณะทางกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ เพื่อประเมินวงจรการสืบพันธุ์ (reproductive cycle) ของปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร และเพื่อนำไปใช้อ้างอิงสำหรับปลากระเบนน้ำจืดชนิดอื่นๆ ในวงศ์ Potamotrygonidae ได้

1.5.2 ทราบผลของการใช้โพรสตาแกลนดินสังเคราะห์ (exogenous prostaglandin) ต่อระดับฮอร์โมนเพศในเลือดและกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโรเพศเมีย เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานต่อการนำไปใช้เพื่อพัฒนาการจัดการเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการสืบพันธุ์ในอนาคต



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ปลากระเบนน้ำจืด

##### 2.1.1 ข้อมูลทั่วไปของปลากระเบนน้ำจืด

ปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ (ocellate river stingray) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Potamotrygon motoro* จัดเป็นปลาประเภทปลากระดูกอ่อน (elasmobranch) ในชั้นย่อย (subclass) เดียวกับปลาฉลาม มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติของประเทศในทวีปอเมริกาใต้ เช่น เปรู อุรุกวัย โคลัมเบีย โบลิเวีย อาร์เจนตินา บราซิล เอกวาดอร์ ปารากวัย เป็นต้น ซึ่งคนท้องถิ่นนิยมจับมาเลี้ยงเป็นปลาสวยงามและยังนิยมนำมาใช้เป็นอาหารอีกด้วย (Araújo et al., 2004)

ปัจจุบันปลากระเบนน้ำจืดนั้นได้รับความนิยมอย่างมากในการเลี้ยงเป็นปลาสวยงาม เนื่องจากเป็นปลาที่มีลวดลายสวยงามแปลกตา อีกทั้งสามารถเลี้ยงและเพาะขยายพันธุ์ได้ไม่ยาก ชนิดของปลากระเบนน้ำจืดในครอบครัว Potamotrygonidae ที่มีการนิยมเลี้ยงในประเทศไทย ได้แก่ กระเบนโมโตโร่ (*P. motoro*) กระเบนโพลคาโดท (*P. leopoldi*) กระเบนจากัวร์ (*P. castexi*) กระเบนไทเกอร์ (*P. menchacai*) กระเบนดอกไม้ (*P. schroederi*) กระเบนโพลคาโดทจุดเล็ก (*P. itaituba*) และกระเบนเฟิลเรย์ (*Potamotrygon* sp.) ปลากระเบนแต่ละชนิดนั้นมีลวดลายและลักษณะเฉพาะแตกต่างกัน ปลากระเบนทุกชนิดมีราคาค่อนข้างสูงตามความสวยงาม ขนาด อายุ และความสามารถในการสืบพันธุ์ อย่างไรก็ตามปลากระเบนสายพันธุ์โมโตโร่เป็นปลากระเบนที่ตลาดมีความต้องการสูง เนื่องจากมีการซื้อขายในตลาดง่าย ราคาไม่สูง เลี้ยงง่าย และเพาะขยายพันธุ์ได้รวดเร็ว นอกจากตลาดสัตว์น้ำภายในประเทศแล้ว ตลาดต่างประเทศโดยเฉพาะประเทศจีน อีกทั้งญี่ปุ่น มาเลเซีย ไต้หวัน รัสเซีย บรูไน อิหร่าน และคูเวต ยังมีความต้องการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (อรุณี, 2556)

##### 2.1.2 ชีวิตวิทยาพื้นฐานของปลากระเบนน้ำจืด

ปลากระเบนน้ำจืดนั้นจัดเป็นปลาประเภทปลากระดูกอ่อน (elasmobranch) โดยทั่วไปแล้ว ปลากระดูกอ่อนส่วนใหญ่ (95%) อาศัยอยู่ในน้ำทะเล มีเพียงบางชนิด (5%) ที่มีการปรับตัวให้อาศัยอยู่ในน้ำจืดและน้ำกร่อยได้ สำหรับปลากระเบน มีเพียง 2 วงศ์ที่พบว่าอาศัยอยู่ในน้ำจืดได้ คือ ปลากระเบนในสกุล *Dasyatis* และ *Himantura* ในวงศ์ Dasyatidae และปลากระเบนทุกชนิดใน

วงศ์ Potamotrygonidae (Oldfield, 2005) ปลากระเบนในวงศ์ Potamotrygonidae มีจำนวนทั้งหมดประมาณ 40 ชนิด ซึ่งแบ่งแยกกันตามลักษณะของขนาด รูปร่าง ทาง เจริญ และตำแหน่งของตา (Ross, 2004) โดยมีเพียงประมาณ 20 สายพันธุ์ที่เป็นที่รู้จักและนิยมนำมาเลี้ยงเป็นสัตว์น้ำสวยงาม

สำหรับปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร (South American freshwater stingray, Ocellate river stingray) นั้นจัดอยู่ในวงศ์ Potamotrygonidae โดยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *P. motoro* และมีการจัดอนุกรมวิธานของปลากระเบนโมโตโรเป็นดังนี้

Domain: Eukaryota

Kingdom: Animalia

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Class: Chondrichthyes

Subclass: Elasmobranchii

Order: Myliobatiformes

Family: Potamotrygonidae

Genus: *Potamotrygon*

Species: *motoro*

ปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโรมีลักษณะตัวกลมแบนคล้ายจานข้าว ผิวลำตัวด้านบนเป็นสีน้ำตาลอ่อนหรือเข้มจนถึงสีเทา มีจุดกลมสีส้มอมเหลืองวงรอบด้วยสีน้ำตาลเข้มกระจายทั่วตัวไปจนถึงโคนหาง ซึ่งมีลักษณะ ขนาด และจำนวนแตกต่างกันในแต่ละตัว หางมีขนาดใหญ่และสั้นกว่าลำตัว (รูปที่ 1) มีเงี่ยงที่มีลักษณะแหลมคม 1-2 ชิ้นที่โคนหาง ซึ่งเป็นส่วนที่พัฒนามาจากส่วน denticles และมีต่อมพิษเคลือบอยู่ เมื่อปลากระเบนแทงเงี่ยงไปที่เหยื่อ เนื้อเยื่อที่เงี่ยง (integumentary sheat) จะฉีกขาดออกแล้วปล่อยพิษออกมาทำให้เกิดอันตรายต่อเหยื่อได้ (Pedroso et al., 2007) ตามีขนาดเล็ก และมีช่องหายใจ (spiracle) ขนาดใหญ่อยู่ด้านบนลำตัวทางด้านท้ายของตา ช่องเหงือก (gill slits) และปากซึ่งมีขนาดเล็กอยู่ด้านล่างของลำตัว ฟันมีลักษณะเป็นแผ่นบด (grinding teeth) ที่มีความคมและแข็งแรง ปลากระเบนชนิดนี้ไม่มีกระเพาะลม (swim bladder) เพื่อช่วยในการลอยตัว จึงอาศัยอยู่บริเวณหน้าดินเป็นส่วนใหญ่ เมื่อโตเต็มที่ในธรรมชาติ ตัวเมียจะมีเส้นผ่าศูนย์กลาง

ลำตัว (disc width) ประมาณ 35 เซนติเมตร ส่วนตัวผู้จะมีขนาดประมาณ 30 เซนติเมตร และมีน้ำหนักประมาณ 3-7 กิโลกรัม (Oldfield, 2007)



รูปที่ 1 ปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่

### 2.1.3 การเพาะเลี้ยงปลากระเบนน้ำจืดในบ่อเลี้ยงในปัจจุบัน

ปลากระเบนน้ำจืดจะนิยมเลี้ยงในตู้ปลาที่มีขนาดมากกว่า 36 นิ้วหรือบ่อเลี้ยงที่มีขนาดใหญ่เพียงพอสำหรับปลากระเบนตัวเต็มวัยซึ่งอาจมีขนาดใหญ่ได้ถึง 50 เซนติเมตร บ่อเลี้ยงมีความจำเป็นต้องใช้ระบบกรอง เนื่องจากปลาชนิดนี้เป็นปลาประเภทกินเนื้อ จึงมีการปล่อยของเสียออกมา มาก ซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำค่อนข้างมาก น้ำที่ใช้เลี้ยงปลากระเบนนั้นควรมีความเป็นกรดเล็กน้อย (pH 6.25-6.75) มีการควบคุมปริมาณแอมโมเนีย และไนโตรทอย่างสม่ำเสมอ และควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 24-30 องศาเซลเซียส อาหารที่ให้มักเป็นกุ้ง เนื้อหมู เนื้อปลาสด เนื้อปลาหมัก หรือหอย (Ross, 2004)

ปลากระเบนโมโตโร่เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ตั้งแต่อายุประมาณ 1 ปีครึ่ง และตัวเมียมีขนาด 24-32 เซนติเมตร ในขณะที่ตัวผู้จะมีขนาด 20-25 เซนติเมตร ปลากระเบนโมโตโร่ในธรรมชาตินั้นจะมีระยะการตั้งท้องประมาณ 6 เดือนและมีจำนวนลูกต่อครอกเฉลี่ย 6.3 ตัว ในขณะที่ปลากระเบนโมโตโร่เพาะเลี้ยงในบ่อเลี้ยงจะมีระยะการตั้งท้องประมาณ 3 เดือน และมีจำนวนลูกต่อครอกเฉลี่ย 3.3 ตัว โดยความแตกต่างนี้น่าจะเกิดจากความสมบูรณ์ของอาหารที่มีจำกัดในแหล่งธรรมชาติ (Ross, 2004; Charvet-Almeida et al., 2005; Oldfield, 2007) การเลี้ยงปลากระเบนน้ำจืดเพื่อเพาะพันธุ์ในประเทศไทย มักเลี้ยงในที่ที่มีอุณหภูมิน้ำ 24-30 องศาเซลเซียส และมีการเลี้ยงตัวผู้ 1 ตัว

ร่วมกับตัวเมีย 2-6 ตัว ระยะการตั้งท้องของปลากระเบนเพศเมียในบ่อเลี้ยงนั้นจะใช้เวลาประมาณ 3 เดือน และมีจำนวนลูกต่อครอก 3-15 ตัว เมื่อลูกกระเบนคลอดออกมาแล้วจะทำการแยกลูกออกมาจากบ่อเลี้ยงทันที เพื่อป้องกันพฤติกรรมการไล่กัดลูกปลาของปลากระเบนตัวผู้ หลังจากการคลอดแล้ว ส่วนใหญ่ปลากระเบนตัวผู้สามารถเข้าผสมพันธุ์ตัวเมียได้ทันที (กันยารัตน์, 2548)

## 2.2 ระบบสืบพันธุ์ของปลากระดูกอ่อน

การแยกเพศของปลากระดูกอ่อนโดยทั่วไปทำได้โดยสังเกตอวัยวะเพศของเพศผู้ (claspers) ซึ่งมีลักษณะเป็นท่อน้ำน้ำเชื้อ 2 อันบริเวณโคนหาง โดยเป็นอวัยวะที่ใช้ในการผสมพันธุ์และหลังน้ำเชื้อไปสู่ปลากระดูกอ่อนเพศเมีย (Rainboth, 1996)

### 2.2.1 ลักษณะทางกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์ของปลากระดูกอ่อนเพศเมีย

ลักษณะทางกายวิภาคของอวัยวะเพศเมียของปลากระดูกอ่อนประกอบด้วย รังไข่ (ovary) และท่อนำไข่ (reproductive tract) ซึ่งจะแบ่งเป็นส่วนต่างๆ คือ 1) รูเปิดท่อนำไข่ (ostium) 2) ท่อนำไข่ส่วนต้น (upper oviduct) 3) ต่อมสร้างเปลือกหุ้มไข่ (oviducal gland) 4) คอคอดท่อนำไข่ (isthmus) 5) ส่วนท้ายของท่อนำไข่ หรือ มดลูก (uterine portion of posterior oviduct or uterus) และ 6) ช่องเปิดร่วม (urogenital sinus) (Hamlett and Koob, 1999a)

จากการศึกษาของ Wourms (1977) พบว่ารังไข่และท่อนำไข่ของปลากระดูกอ่อนบางชนิดนั้นมีการเจริญที่ไม่สมมาตรกัน ในปลาฉลามชนิดที่ออกลูกเป็นตัวส่วนใหญ่ รังไข่และท่อนำไข่จะมีการพัฒนาและเจริญสมบูรณ์เฉพาะข้างขวา ขณะที่ในปลากระเบนมักพบว่าการพัฒนาและเจริญสมบูรณ์นั้นพบได้เฉพาะด้านซ้ายเท่านั้น อย่างไรก็ตามในปลากระดูกอ่อนประเภทสเกทซ์ (skates) นั้นพบว่าอวัยวะดังกล่าวมีการเจริญสมบูรณ์ทั้งสองข้าง

รังไข่ของปลากระดูกอ่อนแบ่งเป็น 2 ประเภท ประเภทแรก รังไข่จะอยู่ภายในเยื่อหุ้ม (epigonal organ) มีการสร้างไข่ขนาดเล็กจำนวนมาก ซึ่งพบได้ในปลาฉลามชนิด laminiiform ส่วนประเภทที่สองซึ่งพบในปลากระดูกอ่อนอื่นๆรวมทั้งปลากระเบนนั้น มีการเจริญของรังไข่ภายนอกเยื่อหุ้มหรือติดอยู่กับเยื่อช่องท้องที่ยึดรังไข่ (mesovarium) โดยตรง (Pratt, 1988) รังไข่ของปลากระดูกอ่อนแต่ละชนิดประกอบด้วยเซลล์ไข่ซึ่งเจริญเติบโตอยู่ภายใต้ฟอลลิเคิล มีหน้าที่ในการสร้างเซลล์ไข่ สะสมไข่แดง (yolk) รวมถึงการสร้างและการหลั่งฮอร์โมน (Hamlett and Koob, 1999a)

จากการศึกษาเปรียบเทียบระบบสืบพันธุ์และการเจริญของปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์ *P. motoro* และ *P. circularis* พบว่ารังไข่ของปลากระเบนในวัยเจริญพันธุ์ทั้ง 2 ชนิดนี้ มีการทำงาน



เฉพาะด้านซ้ายเท่านั้น ซึ่งอวัยวะดังกล่าวมีรูปร่างคล้ายไต (kidney-shaped) ยึดติดอยู่กับเยื่อช่องท้องและเยื่อมีโซวาเรียม (Mesovarium) บริเวณกลางลำตัวก่อนไปทางด้านบนของช่องท้อง และมีไข่ (ova) ซึ่งมีลักษณะเป็นก้อนกลมมนเจริญออกมาภายนอกเยื่อหุ้มทางด้านใต้ของรังไข่ ส่วนรังไข่ด้านขวาจะมีลักษณะแบน เรียว มีพื้นผิวเรียบและมีขนาดเล็กคล้ายกับรังไข่ที่ยังเจริญไม่เต็มที่ โดยไม่พบว่ามีการสร้างไข่ ขนาดของรังไข่ของปลากระเบนโมโตโรที่พบว่ามีการเจริญมากที่สุดอาจมีความยาวได้ถึง 130 มิลลิเมตร และมีความกว้างได้ถึง 45 มิลลิเมตร ในขณะที่ขนาดของไข่ที่อยู่ในรังไข่มีขนาด 10-35 มิลลิเมตร ขนาดของปลากระเบน *P. circularis* ที่เริ่มพบว่ามีไข่ของไข่นั้นพบได้ตั้งแต่ปลาที่มีความกว้างลำตัว (disc width) ตั้งแต่ 37 เซนติเมตรขึ้นไป โดยภายในไข่จะมีการสะสมของไข่แดง (yolk) มากขึ้นตามขนาดของไข่ การตกไข่จะเกิดขึ้นเมื่อไข่มีขนาดประมาณ 30 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตามการเจริญของท่อของระบบสืบพันธุ์อื่นๆ ทั้งรูเปิดท่อนำไข่ ท่อนำไข่ส่วนต้น ต่อมสร้างเปลือกหุ้มไข่ คอคอดท่อนำไข่ และมดลูกนั้น พบว่ามีเจริญใกล้เคียงกันทั้งสองข้าง โดยท่อนำไข่ส่วนต้นนั้นมีขนาดประมาณ 2.0-2.5 มิลลิเมตร และสามารถขยายใหญ่ขึ้นได้จนถึง 35 มิลลิเมตร หากมีการเคลื่อนตัวของไข่ผ่านทางท่อนำไข่นี้ ส่วนต่อมสร้างเปลือกหุ้มไข่นั้นมีขนาดประมาณ 5-11 มิลลิเมตร และมีขนาดใหญ่ขึ้นตามขนาดของท่อนำไข่ส่วนต้น สำหรับมดลูกซึ่งเป็นบริเวณที่ไข่ฝังตัวและมีการเจริญเติบโตของตัวอ่อนนั้นมีการเจริญทั้งสองข้าง ขนาดของมดลูกที่มีการศึกษานั้นมีความยาว 25-70 มิลลิเมตร ความกว้าง 6-35 มิลลิเมตร และมีส่วนของผนังมดลูกที่ยื่นยาวออกมาลักษณะคล้ายขนขนาดเล็ก (villi) โดยมีความยาวตั้งแต่ไม่น้อยกว่า 10 มิลลิเมตร ไปจนถึง 20 มิลลิเมตร เมื่อมีตัวอ่อนฝังตัวอยู่ในมดลูก (Thorson et al., 1983)

## 2.2.2 ลักษณะทางกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์ของปลากระดุกอ่อนเพศผู้

ระบบสืบพันธุ์ของปลากระดุกอ่อนเพศผู้ทั่วไปประกอบด้วย 1) อัณฑะ (testis) 2) ต่อมสร้างสารเลี้ยงอสุจิ (accessory gland) และอวัยวะสืบพันธุ์ทุติยภูมิ (secondary sex organ) ได้แก่ ต่อมเลย์ดิก (leydig gland) ต่อมอัลคาไลน์ (alkaline gland) และต่อมเซมินอลเวสิเคิล (seminal vesicle) 3) ท่อทางระบบสืบพันธุ์ (genital duct) ซึ่งประกอบด้วย ท่อนำอสุจิ (ductus efferent) ท่อเก็บอสุจิ (epididymis) และท่อนำอสุจิ (ductus deferens) 4) อวัยวะนำน้ำเชื้อ (claspers) (Hamlett and Koob, 1999b; Conrath, 2005)

อัณฑะของปลากระดุกอ่อนเพศผู้เป็นอวัยวะที่สร้างอสุจิและมีบทบาทในการสังเคราะห์และหลั่งฮอร์โมนเพศอีกด้วย โดย Pratt (1988) ได้แบ่งอัณฑะของปลากระดุกอ่อนเพศผู้ออกเป็น 3 ประเภท ตามลักษณะของท่อเซมินิเฟอร์รัส (semiferous tubule) คือ

1) diametric ท่อเซมินิเฟอร์สจะยื่นออกมาจากผนังของเยื่อหุ้มด้านหนึ่ง พบในปลากระดูกอ่อนในวงศ์ Carcharhinidae และ Sphyrnidae

2) radial ท่อเซมินิเฟอร์สจัดเรียงเป็นวงกลมอยู่ในเยื่อหุ้ม พบในปลากระดูกอ่อนจำพวก lamniform

3) compound ท่อเซมินิเฟอร์สไม่มีการแบ่งกลีบย่อย (lobule) อย่างชัดเจน ซึ่งเป็นลักษณะที่พบได้ทั่วไปในปลากระดูกอ่อนจำพวกปลากระเบน (Batoids)

อย่างไรก็ตามในปลากระเบนแต่ละประเภทนั้นมีลักษณะของอวัยวะที่ค่อนข้างแตกต่างกัน โดยปลากระเบนจำพวก Rajiform นั้น มีลักษณะเป็นแบบ compound โดยไม่มีการแบ่งกลีบย่อย (lobule) ภายในเยื่อหุ้ม ส่วนปลากระเบนจำพวก *Potamotrygon* sp. นั้นท่อเซมินิเฟอร์สมีการจัดเรียงตัวเป็นวงกลมและมีกลีบย่อยใกล้เคียงกับชนิด radial (Pratt, 1988)

การศึกษากายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ในปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์ *P. magdalenae* ระบุว่าอวัยวะมีการเจริญทั้งสองข้าง มีรูปร่างเป็นกลีบติดรวมอยู่กับเยื่อหุ้มบริเวณช่องท้องด้านหน้าค่อนข้างแบนในปลากระเบนที่ยังไม่เจริญเต็มที่อวัยวะจะมีลักษณะค่อนข้างกลม ประกอบด้วยกลีบขนาดเล็ก ซึ่งมีลักษณะโปร่งแสงเรียงเป็นแนวอยู่ด้านบนของเยื่อหุ้ม ส่วนอวัยวะในปลากระเบนที่โตเต็มที่จะมีกลีบขนาดใหญ่และเรียงตัวกันแน่นชัดเจน (Pedreros-Sierra and Ramirez-Pinilla, 2015) นอกจากนี้การศึกษาลักษณะทางกายภาพของอวัยวะในปลากระเบนสายพันธุ์ *P. circularis* นั้นพบว่าขนาดของอวัยวะในปลากระเบนที่เจริญพันธุ์เต็มที่มีความยาวประมาณ 75-133 มิลลิเมตร มีความกว้างประมาณ 20-44 มิลลิเมตร และมีขนาดใกล้เคียงกันทั้งสองข้าง (Thorson et al., 1983)

ส่วนถัดจากอวัยวะประกอบด้วยท่อเก็บอสุจิทั้งส่วนหัว (head of epididymis) ส่วนกลาง (body of epididymis) และส่วนหาง (tail of epididymis) ซึ่งเชื่อมต่อกับท่อนำอสุจิและต่อมสร้างน้ำเลี้ยงอสุจิต่อมสร้างน้ำเลี้ยงอสุจิประกอบด้วย 1) ต่อมเลย์ติก ซึ่งมีรูปทรงกระบอก และมีลักษณะเป็นกลีบย่อยอยู่ถัดจากท่อเก็บอสุจิ 2) ต่อมเซมินอลเวสิเคิล อยู่ถัดจากต่อมเลย์ติก มีลักษณะเป็นท่อยาวขดไปมาเมื่อปลากระเบนอยู่ในช่วงเจริญพันธุ์เต็มที่ หากปลาไม่ได้อยู่ในช่วงเจริญพันธุ์ต่อมนี้จะมีลักษณะเป็นท่อตรง และ 3) ต่อมอัลคาไลน์ มีลักษณะคล้ายถุง (bag-like) อยู่บริเวณด้านท้ายของต่อมเซมินอลเวสิเคิล (Pedreros-Sierra and Ramirez-Pinilla, 2015) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในกลุ่มปลากระเบนจะมีต่อมของท่อนำน้ำเชื้อ (clasper gland) ซึ่งอยู่ติดกับท่อนำน้ำเชื้อและทำหน้าที่ขับส่งน้ำเชื้อเข้าสู่เพศเมียอีกด้วย (Thorson et al., 1983)

อวัยวะนำน้ำเชื้อ (claspers) เป็นส่วนหนึ่งของครีบหลังของปลากระดูกอ่อนที่เปลี่ยนแปลงมาเป็นอวัยวะที่ใช้ในการสืบพันธุ์และนำน้ำเชื้อเข้าสู่ระบบสืบพันธุ์เพศเมีย โดยอวัยวะนำน้ำเชื้อในปลากระดูกอ่อนทุกชนิดนั้นจะมีร่องยาวอยู่ด้านบนซึ่งเป็นทางเปิดของท่อนำน้ำเชื้อ อย่างไรก็ตามอวัยวะนำน้ำเชื้อในปลากระดูกอ่อนแต่ละชนิดนั้นมีโครงสร้างแตกต่างกันค่อนข้างหลากหลายในปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์ *P. circularis* ตัวเต็มวัยมีความยาวของอวัยวะนำน้ำเชื้อประมาณ 48-115 มิลลิเมตรเมื่อวัดความยาวจากปลายถึงขอบที่ติดกับลำตัว (body axil) หรือประมาณ 30-67 มิลลิเมตรเมื่อวัดความยาวจากปลายถึงขอบของท่อนำน้ำเชื้อ และในปลากระเบนวัยเจริญพันธุ์พบว่าอวัยวะนำน้ำเชื้อมีขนาดเท่ากับร้อยละ 13 และร้อยละ 9 เมื่อเทียบกับความกว้างลำตัว (disc width) เมื่อวัดความยาวจากปลายถึงขอบที่ติดกับลำตัวและจากปลายถึงขอบของท่อนำน้ำเชื้อ ตามลำดับ (Thorson et al., 1983)

### 2.2.3 ชีวิตวิทยาและรูปแบบของระบบสืบพันธุ์ของปลากระดูกอ่อน

ปลากระดูกอ่อนทุกชนิดมีการผสมพันธุ์ภายในร่างกาย (internal fertilization) มีลักษณะทางชีวิตวิทยาของระบบสืบพันธุ์หลากหลาย วงรอบการสืบพันธุ์ซับซ้อน ระยะเวลาเจริญพันธุ์ยาวนาน และมีจำนวนลูกต่อครอกต่ำ (Henningsen et al., 2013)

รูปแบบของการสืบพันธุ์ในปลากระดูกอ่อนมีทั้งหมด 3 ชนิด (Conrath, 2005) คือ

1) ออกลูกเป็นไข่ (oviparity) - รูปแบบนี้พบในปลากระดูกอ่อนในครอบครัว Rajidae และในปลาฉลามบางชนิดที่อยู่ในอันดับ (order) Heterodontiformes, Orectolobiformes และ Carcharhiniformes ไข่ของปลากระดูกอ่อนที่มีรูปแบบการสืบพันธุ์แบบนี้จะอยู่ในเปลือกไข่ การเจริญเติบโตของตัวอ่อนจะเกิดภายในเปลือก ซึ่งอยู่นอกร่างกายของแม่

2) ออกลูกเป็นตัวชนิดมีรก (placental viviparous) - รูปแบบการสืบพันธุ์แบบนี้พบในปลาฉลามในอันดับ Carcharhiniformes โดยถุงหุ้มไข่แดง (yolk sac) จะเชื่อมต่อกับผนังมดลูกของแม่แล้วสร้างรกขึ้นภายในมดลูก

3) ออกลูกเป็นตัวชนิดไม่มีรก (aplacental viviparous) แบ่งออกเป็น 3 ประเภท

a) ชนิดอาศัยไข่แดงในการเจริญเติบโต (aplacental yolk sac) ตัวอ่อนจะดูดซึมไข่แดงที่ถูกสะสมไว้ตลอดระยะเวลาที่เจริญเติบโตจนสมบูรณ์ ซึ่งพบได้ในปลากระดูกอ่อนทุกชนิดที่อยู่ในอันดับ Hexanchiformes, Squaliformes, Pristiophoriformes, Squatiniformes,

Rhinobatiformes, Pristiformes, Torpediniformes และบางชนิดในอันดับ Orectolobiformes และ Carcharhiniformes

b) ชนิดกินไข่อื่นๆในการเจริญเติบโต (oophagy) ตัวอ่อนที่ฟักออกมาจะกินไข่อื่นๆที่กำลังจะตกไข่ตลอดการเจริญเติบโตจนสมบูรณ์ ซึ่งพบได้ในฉลามในอันดับ Lamniformes

c) ชนิดอาศัยไข่แดงและสารจากมดลูกในการเจริญเติบโต (placental analogue: histotrophe and trophonemata) รูปแบบนี้จะพบในปลากระเบนทุกชนิดที่อยู่ในอันดับ Myliobatiform ตัวอ่อนจะดูดซึมไข่แดงที่ถูกสะสมไว้ในช่วงแรกของการตั้งท้องจนหมด จากนั้นช่วงท้ายของการตั้งท้อง เยื่อของผนังมดลูกของแม่ที่เรียกว่า โทรโฟนีมาตา (trophonemata) จะหลั่งสารคล้ายน้ำนมที่เรียกว่า ฮิสโตโทรป (histotrophe) ซึ่งเป็นสารอาหารที่ตัวอ่อนจะดูดซึมเพื่อการเจริญเติบโตจนสมบูรณ์

จากการศึกษาทางกายวิภาคของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ของปลากระเบนน้ำจืดในวงศ์ Potamotrygonidae นี้ พบว่ามีรูปแบบการสืบพันธุ์แบบออกลูกเป็นตัวชนิดไม่มีรก ชนิดอาศัยไข่แดงและสารจากมดลูกในการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตาม สำหรับระยะการเจริญของตัวอ่อน ระยะที่มีการดูดซึมไข่แดง และระยะเริ่มดูดซึมสารอาหารจากมดลูกนั้นยังไม่มีการศึกษาแน่ชัด (Charvet-Almeida et al., 2005)

#### 2.2.4 การอัลตราซาวด์เพื่อดูลักษณะทางกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์ของปลากระดุกอ่อน

โดยทั่วไปการอัลตราซาวด์ในปลากระดุกอ่อนสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลายทั้งการตรวจสุขภาพทั่วไป การวินิจฉัยโรค การประเมินระบบสืบพันธุ์และใช้ในงานวิจัยต่างๆ อัลตราซาวด์ชนิดที่นิยมใช้ที่สุดในปลากระดุกอ่อน ได้แก่ ชนิดการแสดงผลภาพอัลตราซาวด์แบบ 2 มิติ (Real time B-mode ultrasound) สำหรับปลากระดุกอ่อนขนาดใหญ่ เช่น ปลาฉลามพันธุ์ใหญ่ควรใช้ความถี่ของหัวตรวจที่ 3.5 หรือ 5.0 เมกะเฮิรตซ์ ส่วนปลากระดุกอ่อนขนาดเล็กถึงขนาดกลาง เช่น ฉลามพันธุ์เล็ก หรือปลากระเบนควรใช้ความถี่ของหัวตรวจที่ประมาณ 6.5-7.5 เมกะเฮิรตซ์ (Stetter, 2013) การอัลตราซาวด์เพื่อประเมินระบบสืบพันธุ์ของปลากระดุกอ่อนนั้นมีประโยชน์ในการดูลักษณะทางกายภาพของอวัยวะสืบพันธุ์ ยืนยันภาวะตั้งท้อง ดูการมีชีวิตและการเจริญเติบโตของตัวอ่อนได้ และยังสามารถนับจำนวนไข่หรือตัวอ่อน รวมถึงอัตราการเต้นของหัวใจของตัวอ่อนได้อีกด้วย

การอัลตราซาวด์สามารถทำได้โดยตรงขณะที่สัตว์อยู่ในน้ำ โดยอาจไม่จำเป็นต้องใช้เจลหล่อลื่น (acoustic gel) การอัลตราซาวด์ควรเริ่มจากการวางหัวตรวจที่บริเวณด้านท้อง โดยใช้หัวใจซึ่งอยู่ระหว่างช่องหายใจทั้งสองข้าง (operculum) เป็นจุดหลัก จากนั้นเลื่อนหัวตรวจลงมาทางด้านท้าย จะพบตับ ถุงน้ำดี กระเพาะ ม้าม ลำไส้ และอวัยวะของระบบสืบพันธุ์ ตามลำดับ (Stetter, 2013) อย่างไรก็ตามการอัลตราซาวด์ด้านบนลำตัวเพื่อดูอวัยวะระบบสืบพันธุ์ ไต และระบบทางเดินอาหารก็สามารถทำได้

### 2.2.5 วงรอบการสืบพันธุ์ (reproductive cycle)

จากการศึกษาของ Wourms (1977) ได้แบ่งวงรอบการสืบพันธุ์ของปลากระดูกอ่อนออกเป็น 3 ประเภท คือ

- 1) สามารถสืบพันธุ์ได้ตลอดปี
- 2) วงรอบการสืบพันธุ์ยาวนาน
- 3) วงรอบการสืบพันธุ์ 1-2 ครั้งต่อปี

ในปลากระดูกอ่อนประเภทออกลูกเป็นตัว (viviparous) นั้น ส่วนใหญ่มักมีวงรอบการสืบพันธุ์ที่ชัดเจนในรอบปี และประชากรทั้งหมดในปลากระดูกอ่อนชนิดนั้นจะมีพฤติกรรมของการจับคู่ ผสมพันธุ์ ตั้งท้อง และออกลูกในช่วงเวลาเดียวกันทั้งหมด ปลาฉลามส่วนใหญ่มีช่วงการตั้งท้องค่อนข้างนานเกิน 1 ปี ในขณะที่ปลากระเบนจะมีระยะการตั้งท้องนานเพียงไม่กี่เดือน โดยมักพบว่าปลากระเบนจะตั้งท้องเป็นฤดูกาลในช่วงฤดูใบไม้ร่วง ฤดูร้อน และฤดูใบไม้ผลิ อย่างไรก็ตามวงรอบการสืบพันธุ์นั้นมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายอย่างจากสิ่งแวดล้อมที่ยังไม่ได้มีการศึกษาแน่ชัด เช่น แสงสว่าง อุณหภูมิ จำนวนเหยื่อ (Hamlett and Koob, 1999a)

ระยะเวลาของวงรอบการสืบพันธุ์สามารถระบุได้โดยการสังเกตคุณลักษณะทางกายวิภาคของอวัยวะระบบสืบพันธุ์เพศเมียโดยตรง วงรอบการตกไข่ (ovulation cycle) สามารถบอกได้จากการวัดขนาดของไข่เปรียบเทียบกับกันตลอดปี วงรอบการตั้งท้อง (gestation cycle) สามารถบอกได้จากการวัดขนาดของตัวอ่อนเปรียบเทียบกับกันตลอดปีเช่นกัน (Conrath, 2005)

วงรอบการสืบพันธุ์ของปลากระดูกอ่อนเพศผู้นั้นประมาณได้จากการดูขนาดของอวัยวะเพศ โดยสามารถประเมินได้จากค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศในปลา (gonadosomatic index, GSI) ซึ่งเป็นค่าความสัมพันธ์ของขนาดของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์และขนาดตัว ช่วงฤดูผสมพันธุ์นั้นค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศในปลานั้นมักมีค่าสูงสุด ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับช่วงที่มีการผลิตอสุจิสูงสุดของปีนั้นๆ แต่อย่างไรก็ตามควรใช้พารามิเตอร์อื่นๆ ร่วมด้วย เช่น ลักษณะทางจุลกายวิภาคของอวัยวะ จำนวนและ

สัดส่วนของปริมาณอสุจิหรือจำนวนเซลล์สร้างอสุจิ ลักษณะทางกายวิภาคของฟัน และรอยแผลที่เกิดจากการผสมพันธุ์ในปลากระดูกอ่อนเพศเมีย เป็นต้น (Conrath, 2005)

นอกจากนี้ยังมีการจัดวงจรการเจริญของอัณฑะ (testicular cycle) เป็น 3 ประเภท คือ

- 1) เจริญแบบไม่มีฤดูกาล สามารถสร้างอสุจิได้ตลอดปี โดยไม่มีความสัมพันธ์กับน้ำหนักของอัณฑะ (Kneebone et al., 2007; Awruch et al., 2009)
- 2) มีระยะพัก โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักของอัณฑะอย่างชัดเจน (Sulikowski et al., 2004)
- 3) ระยะที่ไม่เจริญพันธุ์สัมพันธ์กับน้ำหนักของอัณฑะที่ลดลง (Parsons and Grier, 1992; Hoffmayer et al., 2010)

การศึกษาปลาฉลามชนิด Blacktip sawtail catsharks (*Galeus sauteri*) พบว่ามีไข่ที่ถูกผสมและห่อหุ้มแล้ว (encapsulated fertilized eggs) ภายในอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียได้ตลอดปี ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าปลาฉลามชนิดนี้มีฤดูกาลสืบพันธุ์ประเภทสืบพันธุ์ได้ตลอดปี (Chen et al., 1996) การศึกษาปลาฉลามชนิด Dusky smooth-hounds (*Mustelus canis*) พบว่ามีวงจรการสืบพันธุ์ยาวนานชัดเจน โดยมีระยะการตั้งท้องประมาณ 11-12 เดือน (Conrath and Musick, 2002) สำหรับปลากระเบนชนิด Atlantic stingray (*Dasyatis sabina*) นั้นพบว่ามีวงจรการสืบพันธุ์ปีละครั้ง โดยมีการผสมพันธุ์สูงสุดและตั้งท้องในช่วงฤดูใบไม้ผลิ (เดือนพฤษภาคมถึงสิงหาคม) ส่วนในปลากระเบนเพศผู้พบว่ามีมีการขยายขนาดของอัณฑะ ในเดือนกันยายนและมีค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศในปลา (GSI) สูงสุดในเดือนพฤศจิกายน หลังจากนั้นเป็นช่วงฤดูผสมพันธุ์ของเพศผู้ไปจนถึงเดือนเมษายนซึ่งเป็นช่วงที่ปลากระเบนเพศเมียนั้นมีขนาดรังไข่ (ovarian egg size) ขยายใหญ่และช่วงตกไข่พอดี (Tricas et al., 2000)

สำหรับปลากระเบนน้ำจืดในวงศ์ Potamotrygonidae นั้นมีการศึกษาวงจรการสืบพันธุ์ในแหล่งน้ำธรรมชาติ พบว่าวงจรการสืบพันธุ์เกี่ยวข้องกับโดยตรงกับการเปลี่ยนแปลงของแหล่งน้ำ (hydrologic cycle) โดยประกอบด้วยระยะพัก ระยะที่มีการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์ซึ่งต้องใช้เวลาประมาณ 4 เดือนในช่วงฤดูแล้ง ระยะเวลากการตั้งท้องประมาณ 4-6 เดือน และระยะคลอดในช่วงฤดูฝน (Thorson et al., 1983; Charvet-Almeida et al., 2005) สำหรับการศึกษาวงจรการสืบพันธุ์ในปลากระเบนที่เลี้ยงในบ่อเลี้ยงนั้นยังไม่มีการศึกษาที่ชัดเจน แต่มีการบันทึกประวัติของวงจรการสืบพันธุ์ในสถานแสดงสัตว์น้ำบางแห่ง พบว่าปลากระเบนในวงศ์ Potamotrygonidae นั้นจะจับคู่ผสมพันธุ์ในช่วงเดือนกันยายนถึงเดือนธันวาคม และคลอดในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนมกราคม

อย่างไรก็ตามการศึกษาดังกล่าวนั้นเกิดขึ้นในประเทศทางตอนเหนือซึ่งมีภูมิอากาศหนาว (Ross, 2004)

## 2.2.6 ฮอริโมนเพศในปลากระดูกอ่อน

ระบบสืบพันธุ์ในปลานั้นถูกควบคุมด้วยฮอริโมนหลายชนิดที่มีการทำงานร่วมกับระบบประสาทและระบบต่อมไร้ท่อ ความหลากหลายของรูปแบบของระบบสืบพันธุ์ของปลากระดูกอ่อนนั้นทำให้การควบคุมฮอริโมนที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์นั้นมีความซับซ้อน อย่างไรก็ตามสรุปได้ว่า brain-pituitary -gonadal (BPG) axis คือ ระบบต่อมไร้ท่อแรกเริ่มที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมฮอริโมนทั้งหมดนี้ การกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น อุณหภูมิ น้ำ ปริมาณน้ำฝน คุณภาพน้ำ และความยาวช่วงแสง ที่เปลี่ยนแปลงไปจากปกติเป็นจุดเริ่มให้เกิดกระบวนการควบคุมฮอริโมนเป็นลำดับ (cascade) ซึ่งเริ่มต้นด้วย สิ่งเร้าจากสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลกระทบต่อประสาทสัมผัสของปลา ให้ส่งข้อมูลเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางให้กระตุ้นไปที่สมองส่วนหลัง คือ ไฮโปทาลามัส (hypothalamus) ทำให้มีการหลั่งฮอริโมน โกนาโดโทรปินรีลีสซิง (gonadotropin releasing hormone: GnRH) ไปกระตุ้นให้ต่อมใต้สมอง (pituitary gland) หลั่ง โกนาโดโทรปิน (gonadotropin : GtHs) ที่มีผลต่ออวัยวะเพศให้สร้างฮอริโมนเพศ (sex steroid) เช่น แอนโดรเจน (androgens) เอสโตรเจน (estrogens) โพรเจสเตอโรน (progesterone) และไดไฮโดรเทสโทสเตอโรน (dihydrotestosterone) ส่งผลต่อพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ในอวัยวะเพศเมียและเพศผู้ ฮอริโมนเพศดังกล่าวยังเกี่ยวข้องกับพฤติกรรมทางเพศ การพัฒนาและการทำหน้าที่ของอวัยวะสืบพันธุ์อีกด้วย (Gelslechter and Evans, 2012)

### 2.2.6.1 ฮอริโมนเพศของปลากระดูกอ่อนเพศเมีย

รังไข่ของปลากระดูกอ่อนเพศเมียนั้นจะสร้างฮอริโมนเพศหลัก คือ เอสตราไดออล (estradiol: E<sub>2</sub>) โพรเจสเตอโรน (progesterone: P<sub>4</sub>) และเทสโทสเตอโรน (testosterone: T) ซึ่งถูกสร้างมาจากเซลล์แกรนูโลซา (granulosa cell) และเซลล์ธีกา (theca cell) (Gelslechter, 2004) ในภาวะปกติเซลล์แกรนูโลซาจากฟอลลิเคิลจะสร้างเทสโทสเตอโรน และเอสตราไดออล ในปริมาณต่ำๆ และสามารถเพิ่มการสร้างเอสตราไดออล และโพรเจสเตอโรน ในภาวะที่ได้รับการกระตุ้นจากกลีบล่างของต่อมใต้สมอง ในทางตรงกันข้ามนั้นเซลล์ธีกาสร้างเทสโทสเตอโรน และเอสตราไดออล แต่ไม่มีการสร้างโพรเจสเตอโรน หรือเพิ่มการสร้างฮอริโมนสเตียรอยด์เมื่อมีการกระตุ้นเซลล์สืบพันธุ์ (Gelslechter et al., 2002)

จากการศึกษาในทั้งปลากระดูกอ่อนที่ออกลูกเป็นตัวและออกลูกเป็นไข่ นั้น ฮอริโมน เอสตราไดออลมีบทบาทต่อการสร้างไวเทลโลเจนิน (vitellogenin: Vg) ซึ่งเป็นต้นกำเนิดของโปรตีน

ของไข่แดง (egg yolk proteins) การสร้างไวเทโลเจนินนั้นเกิดในตับ และกระตุ้นโดย เอสทราไดออลผ่านทางตัวรับเอสโตรเจนในตับ (hepatic estrogen receptors : ER) (Koob and Callard, 1999) เอสทราไดออลในเลือดนั้นมีความเกี่ยวข้องกับการเจริญของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ของปลากระดูกอ่อนที่ออกลูกเป็นตัวอย่างมาก ปริมาณเอสทราไดออลในเลือดที่สูงขึ้นนั้นมักเกิดในช่วงเวลาที่มีการสร้างและพัฒนาฟอลลิเคิล ช่วงที่เกิดการตกไข่ ช่วงเวลาที่มีการปฏิสนธิและยังมีความสัมพันธ์กับการเจริญของต่อมสร้างเปลือกหุ้มและคอคอดน้ำไข่อีกด้วย (Maruska and Gelsleichter, 2010) จากการศึกษาในปลาฉลามหัวค้อน (bonnethead shark; *Sphyrna tiburo*) และปลากระเบนชนิด Atlantic stingray (*Dasyatis sabina*) พบว่ามีระดับของเอสทราไดออลในเลือดที่สูงขึ้นระหว่างการตั้งท้อง โดยปริมาณฮอร์โมนที่สูงขึ้นเกิดขึ้นในช่วงระยะเวลาเดียวกันกับการเปลี่ยนแปลงทั้งทางกายวิภาคและหน้าที่ของมดลูก ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงการดูดซึมสารอาหารของตัวอ่อน ในปลาฉลามหัวค้อน ฮอร์โมนเอสทราไดออลในเลือดที่สูงขึ้นเมื่อมีการสร้างปุ่มกระดูกของแม่และตัวอ่อน ในขณะที่ฮอร์โมนเอสทราไดออลในเลือดของปลากระเบนชนิด Atlantic stingray นั้นพบว่าสูงขึ้นในช่วงที่มดลูกเริ่มมีการสร้างฮิสโตรโทรฟ (histotroph) เพื่อการพัฒนาของตัวอ่อนแทนที่ไข่แดงทั้งหมดไปในช่วงท้ายของการตั้งท้อง (Manire et al., 1995; Snelson et al., 1997)

ระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดของปลากระดูกอ่อนเพศเมียนั้นมักสูงขึ้นในช่วงก่อนหรือหลังการตกไข่ และคงระดับไปจนถึงระยะที่มีการตั้งท้อง นอกจากนี้ฮอร์โมนชนิดนี้ยังมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการสร้างไวเทโลเจนินในตับซึ่งถูกกระตุ้นโดยฮอร์โมนเอสทราไดออลและยังการเจริญของฟอลลิเคิลอีกด้วย (Prisco et al., 2008; Maruska and Gelsleichter, 2010) จากการศึกษาในปลาชนิด spiny dogfish (*Squalus acinthias*) พบว่าไม่สามารถทำการกระตุ้นให้เกิดการสร้างไวเทโลเจนินในระหว่างช่วงแรกของการตั้งท้อง ซึ่งมีปริมาณโปรเจสเตอโรนในเลือดสูงได้แต่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างในช่วงท้ายของการตั้งท้อง ซึ่งปริมาณของโปรเจสเตอโรนในเลือดลดต่ำลงแล้วได้ (Ho et al., 1980; Tsang and Callard, 1987) ในปลาฉลามสายพันธุ์ *Rhizoprionodon taylori* ยังพบว่าฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดมีระดับสูงขึ้นในช่วงที่มีการตกไข่และคงระดับอยู่ตลอดช่วงระยะพักของวงรอบการสืบพันธุ์อีกด้วย (Waltrick et al., 2014)

สำหรับบทบาทของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (testosterone) และฮอร์โมนไดไฮโดรเทสโทสเตอโรน (dihydrotestosterone: DHT) ในปลากระดูกอ่อนเพศเมียนั้นยังไม่มีการศึกษาแน่ชัด อย่างไรก็ตามพบว่าฮอร์โมนทั้งสองชนิดในเลือดมีปริมาณสูงขึ้นในช่วงเดียวกับปริมาณของฮอร์โมนเอสทราไดออล ในการศึกษาความสัมพันธ์ของฮอร์โมนเพศกับวงรอบการสืบพันธุ์



ของปลากระเบน (Snelson et al., 1997) จึงมีข้อเสนอว่าฮอร์โมนดังกล่าวอาจเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์เอสตราไดออล (Rasmussen and Murru, 1992; Tricas et al., 2000) นอกจากนี้ฮอร์โมนทั้งสองชนิดนี้อาจมีบทบาทต่อพฤติกรรมการผสมพันธุ์และการกักเก็บอสุจิของต่อมสร้างเปลือกไข่อีกด้วย (Rasmussen and Gruber, 1993; Mull et al., 2010)

#### 2.2.6.2 ฮอร์โมนเพศของปลากระดูกอ่อนเพศผู้

อวัยวะของปลากระดูกอ่อนเพศผู้ประกอบด้วยเซลล์หลักๆ 2 ชนิด คือ เซลล์ตั้งต้น (germ cell) และเซลล์เนื้อเยื่อร่างกาย (somatic cell) ซึ่งมีทั้งเซลล์เลย์ดิก (leydig cell) และเซลล์อินเตอร์สติเชียลเซลล์ (interstitial cell) การสร้างฮอร์โมนเพศผู้ (androgens) ที่มีผลต่อกระบวนการสร้างอสุจิในสัตว์มีกระดูกสันหลังเพศผู้ทั่วไป พบว่ามีการสร้างจากทั้งเซลล์เลย์ดิก (Leydig cell) และเซลล์เซอร์ทอลิ (sertoli cell) ซึ่งเป็นเซลล์เนื้อเยื่อร่างกาย (somatic cell) ภายในอวัยวะ แต่สำหรับในปลากระดูกอ่อนเพศผู้มีรายงานว่าไม่มีเพียงเซลล์เซอร์ทอลิเท่านั้นที่มีบทบาทเป็นหลักในการสร้างและหลั่งฮอร์โมนเพศผู้ ในขณะที่ในปลากระดูกอ่อนบางชนิด เช่น *Scyliorhinus canicula*, *S. stellaris* และ *S. acanthia* ไม่พบเซลล์เลย์ดิก (leydig cell) ปลากระดูกอ่อนชนิด เช่น spiny dogfish ปรากฏเซลล์คล้ายเซลล์เลย์ดิก (leydig-like cell) แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสัมพันธ์กับกระบวนการสร้างอสุจิ (spermatogenesis) ดังเช่นกับในเซลล์เซอร์ทอลิ (sertoli cell) (Hamlett and Koob, 1999b; Maruska and Gelslechter, 2010; Gelslechter and Evans, 2012) ฮอร์โมนเพศผู้ที่มีความสำคัญในการควบคุมการเจริญของอวัยวะ และการสร้างอสุจิ ระดับของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในเลือดมักพบว่ามีค่าสูงขึ้นระหว่างช่วงระยะกลางและท้ายของกระบวนการสร้างอสุจิรวมถึงช่วงฤดูสืบพันธุ์ของปลากระดูกอ่อนชนิดนั้นๆ (Tricas et al., 2000; Gelslechter and Evans, 2012) นอกจากนี้ยังมีค่าสูงสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตและความยาวของอวัยวะสืบพันธุ์และช่วงการลำเลียงน้ำเชื้อภายในท่อทางระบบสืบพันธุ์อีกด้วย (Manire and Rasmussen, 1997; Hamlett and Koob, 1999b; Heupel et al., 1999; Gelslechter et al., 2002; Gelslechter and Evans, 2012) อย่างไรก็ตามปริมาณของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในเลือดนั้นอาจมีค่าค่อนข้างคงที่ หรือมีความสัมพันธ์ต่ำมากกับกระบวนการสร้างอสุจิในปลากระดูกอ่อนชนิดที่มีการสืบพันธุ์ตลอดทั้งปี (Kneebone et al., 2007)

บทบาทของฮอร์โมนเอสตราไดออลในปลากระดูกอ่อนเพศผู้ยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อย แต่อย่างไรก็ตามในปลากระดูกอ่อนเพศผู้บางชนิดพบที่มีความสัมพันธ์อย่างเป็นฤดูกาลกับระยะต้นและระยะกลางของกระบวนการสร้างอสุจิ ในปลากระเบนชนิด Atlantic stingray เพศผู้

พบว่าระดับของฮอร์โมนเอสทราไดออลในเลือดมีระดับใกล้เคียงกับฮอร์โมนเพศผู้ ซึ่งมีค่าขึ้นสูงตามการเจริญของอวัยวะและการทำงานของอสุจิ (Maruska and Gelsleichter, 2010)

ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone; P4) นั้นเชื่อว่าเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสร้างฮอร์โมนเพศผู้ (androgens) ในระยะท้ายของกระบวนการสร้างอสุจิ (Gelsleichter and Evans, 2012) และมีบทบาทในการเจริญของอวัยวะ (Rasmussen and Gruber, 1993; Manire and Rasmussen, 1997) กระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของอสุจิ (spermiogenesis) และกระบวนการปล่อยอสุจิออกสู่ท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์อีกด้วย (spermiation) (Cuevas and Callard, 1992; Gelsleichter and Evans, 2012)

### 2.2.7 การตรวจฮอร์โมนเพศ

วิธีการตรวจฮอร์โมนที่นิยมในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้นมี 2 วิธี คือ เรดิโออิมมิวโนเอสเส (radioimmunoassay; RIA) และเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนทแอสเส (Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA) ในอดีตการตรวจวัดระดับฮอร์โมนในสัตว์รวมทั้งปลากระดูกอ่อนนั้นนิยมใช้วิธีเรดิโออิมมิวโนเอสเส เนื่องจากให้ผลการวัดที่น่าเชื่อถือ แต่ต้องใช้เครื่องมือ สารเคมี และกัมมันตรังสีที่อันตราย ปัจจุบันวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนทแอสเสจึงได้รับการพัฒนาเพื่อใช้ในการศึกษาระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน ซึ่งไม่ต้องใช้สารกัมมันตรังสี และเตรียมสารเคมีได้ง่ายกว่า อุปกรณ์ราคาไม่แพง และมีอายุในการเก็บรักษานาน โดยมีหลักการ คือ การแข่งขันกันของแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (labeled antigen) และแอนติเจนที่ไม่ได้ติดฉลาก (unlabeled antigen) ซึ่งคือฮอร์โมนในตัวอย่างที่ต้องการตรวจวัด โดยแอนติเจนสองชนิดนี้จะแย่งกันเข้าจับกับแอนติบอดีที่มีจำนวนจำกัด ทำให้ความสามารถในการเข้าแย่งจับกับแอนติบอดีของแอนติเจนที่ไม่ได้ติดฉลากจึงแปรผันตามจำนวนของแอนติเจนดังกล่าวที่มีอยู่ในตัวอย่าง จากนั้นจึงเติมสารตั้งต้น (substrate) เพื่อเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์บนแอนติเจนที่ติดฉลาก เกิดเป็นสารมีสีขึ้น จึงแปลผลได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Brown et al., 2004; เพ็ญพรรณ, 2553)

## 2.3 การใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ในสัตว์ โดยการให้โพรสตาแกลนดินเอฟทูแอลฟา (prostaglandin F<sub>2</sub>alpha)

### 2.3.1 การใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ในสัตว์

ฮอร์โมนเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ที่สำคัญมาก ปัจจุบันจึงมีการนำฮอร์โมนสังเคราะห์มาประยุกต์ใช้ในสัตว์กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เป็นสัตว์เศรษฐกิจ เช่น โคเนื้อ โคนม โคเนื้อ และสุกร โดยมุ่งเน้นการเพิ่มประสิทธิภาพการจัดการระบบสืบพันธุ์เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุด จึงมีการนำฮอร์โมนสังเคราะห์มาใช้ในการกำหนดโปรแกรมการสืบพันธุ์

การเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ กำหนดระยะผสมเทียม รวมถึงการแก้ไขความผิดปกติบางอย่างของระบบสืบพันธุ์ เพื่อประโยชน์ในการวางแผนการผสมพันธุ์ให้ง่ายต่อการจัดการฟาร์มมากขึ้น ฮอร์โมนสังเคราะห์ที่ได้รับความนิยมและมีการศึกษาวิจัยค่อนข้างมาก ได้แก่ โพรสเตาแกลนดินสังเคราะห์ โภนาโดโทรปินรีลีสซิ่ง เอสโตรเจนสังเคราะห์ และโปรเจสเตอโรนสังเคราะห์ ซึ่งแต่ละฮอร์โมนมีกลไกในการออกฤทธิ์ วัตถุประสงค์ในการใช้และลักษณะการใช้ที่แตกต่างกันไปในตัวแต่ละชนิด (วิษณุ, 2547)

ปัจจุบันการเพาะพันธุ์ปลาเชิงการค้าได้นำความรู้พื้นฐานของฮอร์โมนในระบบสืบพันธุ์มาประยุกต์กันอย่างแพร่หลายและประสบความสำเร็จในปลาหลายชนิด สำหรับการกำหนดโปรแกรมการสืบพันธุ์ กระตุ้นการตกไข่ การเพิ่มประสิทธิภาพการวางไข่ และอัตราการฟักไข่ ในปลากระดูกแข็ง (teleost) นั้น มีการพัฒนาโดยวิธีการใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ต่างๆ (Rottmann et al., 1991; ภาณุและคณะ, 2545; โชคชัย, 2548) ได้แก่

- 1) สารสกัดจากต่อมใต้สมอง (pituitary extracts) ได้จากการนำต่อมใต้สมองของปลา (hypophysation) แล้วนำไปฉีดปลาเพื่อกระตุ้นการตกไข่และการวางไข่
- 2) สารสกัดโภนาโดโทรปิน (purified gonadotropins) ปัจจุบันมีการนำสารสกัดโภนาโดโทรปิน จากปลามาใช้ในการกระตุ้นการตกไข่ในปลาหลายชนิด นอกจากนี้ยังมีการใช้โภนาโดโทรปินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในรูป เอชซีจี (HCG) ซึ่งมีความสามารถในการกระตุ้น การตกไข่ และการวางไข่ได้ในปลาบางชนิด แต่ส่วนใหญ่ไม่ได้ผล เนื่องจากเอชซีจี (HCG) ไม่สามารถจับตัวรับจำเพาะเจาะจงของโภนาโดโทรปิน (gonadotropin receptor) บริเวณไข่ได้
- 3) LHRH รีลีสซิ่งฮอร์โมน (LHRH releasing hormone) หรือ GnRH รีลีสซิ่งฮอร์โมน (GnRH releasing hormone) เริ่มได้รับความนิยมในการเพาะพันธุ์ปลาอย่างมาก เพราะไปกระตุ้นให้ต่อมใต้สมองหลั่งโภนาโดโทรปินออกมาโดยตรง โดยทั่วไปนิยมใช้ในรูปอนุาลอกซ์
- 4) ฮอร์โมนเพศสังเคราะห์ (sex steroid) ปัจจุบันเริ่มมีการประยุกต์ใช้ฮอร์โมนเพศเพื่อฉีดเร่งความสมบูรณ์โดยตรงอย่างแพร่หลาย แต่พบว่าประสบความสำเร็จในปลาบางชนิดเท่านั้น เนื่องจากการฉีดฮอร์โมนเพศจะทำให้ระดับฮอร์โมนเพศในเลือดสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะเวลาสั้นๆ ไข่ในบางระยะจึงไม่ตอบสนองต่อระดับฮอร์โมนนั้นๆ
- 5) โดปามีนแอนตาโกนิส (dopamine antagonists) สารนี้มีฤทธิ์ยับยั้งฤทธิ์ของโดปามีนซึ่งยับยั้งการสร้างโภนาโดโทรปินของต่อมใต้สมอง ปัจจุบันนิยมฉีดร่วมกับ LHRH

รีลีสซิงฮอร์โมน (LHRH releasing hormone) หรือ GnRH รีลีสซิงฮอร์โมน (GnRH releasing hormone)

6) แนวทางอื่นๆ เช่นการใช้แอนตี้เอสโตรเจน โพรสตาแกลนดินสังเคราะห์ (prostaglandin) และการฝังฮอร์โมน (hormone implantation)

### 2.3.2 โพรสตาแกลนดินเอพทูแอลฟา (prostaglandin F2 $\alpha$ )

โพรสตาแกลนดิน (prostaglandin; PGs) เป็นกลุ่มของสารประกอบจำพวกไขมันซึ่งสร้างมาจากกรดไขมัน ออกฤทธิ์ต่อกล้ามเนื้อเรียบและหลอดเลือดแตกต่างกันตามโครงสร้างของโพรสตาแกลนดิน โพรสตาแกลนดินชนิดที่สำคัญในขบวนการสืบพันธุ์ ได้แก่ โพรสตาแกลนดินเอพทูแอลฟา และโพรสตาแกลนดินเอพทูอีทู (prostaglandin E<sub>2</sub>: PGE<sub>2</sub>) ซึ่งสร้างมาจากกรดอะราชีดอิก (arachidonic acid) โครงสร้างประกอบด้วยคาร์บอน 20 อะตอมที่เป็น unsaturated hydroxyl fatty acid จับกับ cyclopentane ring (Weems et al., 2006) สำหรับโพรสตาแกลนดินเอพทูแอลฟานั้น เป็นที่รู้จักว่ามีบทบาทมากในระบบสืบพันธุ์ของมนุษย์และสัตว์ (Inskeep, 1973) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโพรสตาแกลนดินเอพทูแอลฟาพบในผนังมดลูก (uterine endometrium) และปุ่มรก (maternal cotyledon) โดยระดับโพรสตาแกลนดินเอพทูแอลฟาจะมีระดับสูงขึ้นในระยะท้ายของวงรอบการเป็นสัด (Inskeep, 1973)

โพรสตาแกลนดินเอพทูแอลฟามีบทบาทหลักต่อระบบสืบพันธุ์ในร่างกายสัตว์เพศเมียหลายด้าน (Craig, 1975; Weems et al., 2006) ได้แก่

- 1) การหลั่งของฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ซึ่งควบคุมการทำงานของฮอร์โมนในระบบสืบพันธุ์
- 2) ระดับของฮอร์โมนในระบบสืบพันธุ์ เช่น โพรเจสเตอโรน และเอสโตรเจน
- 3) การเจริญของฟอลลิเคิล (follicular growth)
- 4) การตกไข่ (ovulation)
- 5) การเคลื่อนไหวกและการหดตัวของมดลูก
- 6) การเคลื่อนไหวกของท่อทางอวัยวะสืบพันธุ์ในการลำเลียงไข่และอสุจิ
- 7) การสลายของคอร์ปัสลูเทียม (luteolysis)
- 8) กระบวนการฝังตัวของตัวอ่อนในผนังมดลูก (implantation)

- 9) การตั้งท้อง (pregnancy)
- 10) การคลอด (parturition)
- 11) การเปลี่ยนแปลงของมดลูกหลังคลอด (postpartum period)

นอกจากนี้ โพรสตาแกลนดินเอฟทูแอลฟายังมีบทบาทหลักต่อระบบสืบพันธุ์ในร่างกายสัตว์เพศผู้ (Craig, 1975) ได้แก่

- 1) การหลั่งของฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน
- 2) การเคลื่อนที่ของอสุจิผ่านทางอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้
- 3) การเคลื่อนที่ของอสุจิผ่านไปยังช่องทางอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย

ปัจจุบันมีการพัฒนาโปรแกรมการใช้โพรสตาแกลนดินเอฟทูแอลฟาในโคและสุกร เพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัด การตกไข่ และการคลอด โดยมีวัตถุประสงค์หลักในการสลายคอร์ปัสลูเทียมที่สมบูรณ์บนรังไข่ (mature corpus luteum) ให้สลายตัว เป็นผลทำให้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนลดลง การหลั่งของลูทีไนซิงฮอร์โมน (Lutienizing Hormone; LH) มีความถี่เพิ่มสูงขึ้นกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาฟอลลิเคิลบนรังไข่และทำให้สัตว์แสดงอาการเป็นสัดและตกไข่ในที่สุด (บรรลือ และสุดสายใจ, 2549) ปัจจุบันมีการพัฒนาโปรแกรมการใช้โพรสตาแกลนดินทูแอลฟาในโคเพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ โดยการฉีดฮอร์โมนดังกล่าวในช่วงวันที่ 7-16 ของวงรอบการเป็นสัด และฉีดซ้ำอีกครั้งห่างจากครั้งแรก 11-14 วัน นอกจากนี้อาจใช้ร่วมกับฮอร์โมนโปรเจนเตอโรน และฮอร์โมนโกนาโดโทรปินรีลีสซิ่ง (gonadotropins-releasing hormone; GnRH) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำดังกล่าว สำหรับในสุกรพบว่านิยมใช้โพรสตาแกลนดินทูแอลฟาในการเหนี่ยวนำการคลอด โดยจะฉีด 1-2 วัน ก่อนกำหนดคลอด (วิชณู, 2547; บรรลือ และสุดสายใจ, 2549) นอกจากนี้ยังมีการนำโพรสตาแกลนดินมาใช้เพื่อการสิ้นสุดการท้องเทียม (terminate pseudopregnancy) ในม้า เหนี่ยวนำการคลอด (induced parturition) รักษาภาวะรกค้าง (treat retained placenta) รักษาถุงน้ำในรังไข่ (lutenized cyst) รักษาหมดลูกอักเสบ และรักษาเยื่อบุมดลูกอักเสบเรื้อรัง (chronic endometritis) (Weems et al., 2006)

โพรสตาแกลนดินสังเคราะห์ที่วางจำหน่ายนั้นมีหลายชนิด (วิชณู, 2547) ได้แก่

- 1) ลูตาไลท์ (Lutalyse<sup>®</sup>) เป็นฮอร์โมนโพรสตาแกลนดินเอฟทูแอลฟาสังเคราะห์ที่ใช้กันมากในการเหนี่ยวนำการเป็นสัด หรือช่วยเพิ่มอัตราการผลิต ลูตาไลท์ที่วาง

จำหน่าย จะบรรจุขวดละ 30 ซีซี เป็นสารละลายใสไม่มีสี ใน 1 ซีซี ประกอบด้วยไดโนโพรสโทรมิทามีน (dinoprost tromethamine) 5 มิลลิกรัม

2) เอสทรูเมท (Estrumate<sup>®</sup>) เป็นฮอร์โมนโพรสตาแกลนดินเอฟทูแอลฟาสังเคราะห์ที่ใช้กันมากอีกตัวหนึ่งในการเหนี่ยวนำการเป็นสัด หรือช่วยเพิ่มอัตราการผสมติด เอสทรูเมท เป็นสารละลายใสไม่มีสี ใน 1 ซีซี จะประกอบด้วยคลอโพรสทีนอล โซเดียม (cloprostenol sodium) 263 ไมโครกรัม ซึ่งเทียบเท่ากับ คลอโพรสทีนอล 250 ไมโครกรัม

นอกจากนี้ยังมีโพรสตาแกลนดินสังเคราะห์อื่นๆ เช่น เอสโตรแฟน (Estrophan<sup>®</sup>) ประกอบด้วย cloprostenol sodium และไดโนไลติก (Dinolytic<sup>®</sup>) ประกอบด้วย dinoprost tromethamine

ในปลาโพรสตาแกลนดินเป็นสารประกอบที่พบอยู่ในอวัยวะ รังไข่ เม็ดเลือด และพบว่ามีการหลั่งออกมาโดยเนื้อเยื่อรังไข่ (ovarian tissue) ในการทดลองในห้องปฏิบัติการ โพรสตาแกลนดินมีบทบาทในการทำงานต่างๆของร่างกายโดยเฉพาะระบบสืบพันธุ์ โดยมีผลต่อการหลั่งฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (gonadotropins hormone; GtH) ในปลา (Stacey and Goetz, 1982) จากการทดลองตัดต่อมใต้สมอง (hypophysectomy) ในปลาตุ๊ก (*Heteropneuster fossilis*) ออก พบว่าการฉีดโพรสตาแกลนดินเอฟทูแอลฟา (PGF<sub>2α</sub>) เข้าช่องท้องนั้นจะไปกระตุ้นการทำงานของฮอร์โมนโกนาโดโทรปินได้ และมีผลในการเหนี่ยวนำการตกไข่ภายใน 2-6 วัน (Singh and Singh, 1976) โดยทั่วไปการตกไข่ (ovulation) จะถูกหยุดหากมีการยับยั้งการสังเคราะห์โพรสตาแกลนดินในช่วงที่มีการเจริญของฟอลลิเคิลจากระดับการตกไข่ของฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน การใช้โพรสตาแกลนดินเอฟทูแอลฟาสังเคราะห์นั้นจะสามารถทำให้การตกไข่ที่เกิดจากฟอลลิเคิลที่ถูกเหนี่ยวนำจากระดับของฮอร์โมนโกนาโดโทรปินนั้นกลับไปได้ (Stacey and Goetz, 1982)

การศึกษาผลของการใช้โพรสตาแกลนดินเอฟทูแอลฟาสังเคราะห์ในปลาเรนโบว์เทราท์ (rainbow trout; *Salmo gairdneri*) และบรู๊คเทราท์ (brook rainbow trout; *Salvelinus fontinalis*) พบว่ามีผลในการกระตุ้นการตกไข่อย่างชัดเจน (Jalabert and Szollosi, 1975; Goetz and Smith, 1980)

นอกจากนี้โพรสตาแกลนดินยังมีส่วนในพฤติกรรมทางเพศของสัตว์เพศเมียทั้งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์เลี้ยงคลาน และปลา การศึกษาของ Stacey (1976) ในปลาทอง (gold fish; *Carassius auratus*) แสดงว่าเมื่อมีการฉีดอินโดเมทาซิน (indomethacin) ซึ่งเป็นสารยับยั้งการผลิตของโพรสตาแกลนดินแล้วพฤติกรรมในการวางไข่ (spawning) ของปลาจะถูกยับยั้งอย่างสิ้นเชิง จากนั้นหากมีการฉีดโพรสตาแกลนดินเอฟทูแอลฟาเข้าไป ทำให้ปลาสามารถวางไข่ต่อไปได้ นอกจากนี้ยังมี

การศึกษาพฤติกรรมการผสมพันธุ์ (reproductive behavior) ในปลาพาราไดซ์ (paradise fish; *Macropodus opercularis*) พบว่ากลุ่มปลาทดลองที่มีการฉีดโพรสตาแกลนดินเอพทูแอลฟา หลังจากวางไข่ (spawn) นั้นมีพฤติกรรมการผสมพันธุ์ในช่วงเวลา 15-75 นาทีหลังจากฉีด ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มีพฤติกรรมดังกล่าวเกิดขึ้น อย่างไรก็ตามพบว่าผลในการกระตุ้นพฤติกรรมการผสมพันธุ์ในปลาพาราไดซ์นี้ไม่เกิดขึ้นในปลาที่ยังไม่มีการวางไข่ (unspawn) (Villars et al., 1985)

การศึกษาผลของโพรสตาแกลนดินทูแอลฟาสังเคราะห์ของ Dongre (2013) ในปลาไน (*Cyprinus carpio*) และในปลาหมอสีแอฟริกัน (African cichlid fish; *Astatotilapia burtoni*) (Kidd et al., 2013) พบว่าฮอร์โมนดังกล่าวมีผลในการกระตุ้นฟีโรโมน (sex pheromone) พฤติกรรมการจับคู่ (courtship) การยอมรับคู่ผสม (sexual receptivity) และการวางไข่ของปลาชนิดดังกล่าวอย่างชัดเจน

อย่างไรก็ตามการใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ดังกล่าวนี้ยังไม่มีการศึกษาวิจัยในปลากระดุกอ่อน ซึ่งมีลักษณะทางชีววิทยาการสืบพันธุ์แตกต่างจากปลากระดุกแข็งค่อนข้างมาก

### 2.3.3 ผลของโพรสตาแกลนดินทูแอลฟา (prostaglandin F<sub>2</sub>α) ต่อระดับฮอร์โมนเพศและลักษณะทางกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์

ในมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไปโพรสตาแกลนดินทูแอลฟามีผลต่อระดับฮอร์โมนโกนาโดโทรปินลูทีไนซิงฮอร์โมน (Luteinizing Hormone; LH) โพรเจสเตอโรน และเอสตราไดออล และมีผลต่อลักษณะทางกายภาพของระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ การหดตัวของมดลูกและท่อทางระบบสืบพันธุ์ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการคลอดและการเคลื่อนตัวของไข่ผ่านท่อทางอวัยวะสืบพันธุ์ ขนาดและการเจริญของฟอลลิเคิลซึ่งนำไปสู่การตกไข่ และการเปลี่ยนแปลงสภาพของก้อนเนื้อเหลืองบนรังไข่ (corpus luteum) (Pharriss and Shaw, 1974; Craig, 1975; Goldberg and Ramwell, 1975; Kastelic et al., 1990; Weems et al., 2006)

การศึกษาของการใช้โพรสตาแกลนดินทูแอลฟาสังเคราะห์ในแม่สุกรสาวที่มีการให้ฮอร์โมนโพรเจสเตอโรนในช่วงท้ายของการตั้งท้องของ ปรากฏว่าระดับของฮอร์โมนโพรเจสเตอโรนลดลงใน 12 ชั่วโมงของการฉีดโพรสตาแกลนดินทูแอลฟาเข้าใต้ผิวหนังเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในขณะที่ความยาวของระยะตั้งท้องนั้นไม่แตกต่างกัน (Wilson et al., 1989) ในทำนองเดียวกัน การทดลองใช้โพรสตาแกลนดินทูแอลฟาในแม่โค พบว่าระดับของฮอร์โมนโพรเจสเตอโรนมีปริมาณลดลงในการศึกษาที่มีการใช้โพรสตาแกลนดินทูแอลฟาเพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแม่โคเทียบกับแม่โคที่เป็นสัดตามปกติ (พรรณพิไล และไกรวรรณ, 2548) และการใช้ฮอร์โมนดังกล่าวต่อระดับโพรเจสเตอโรนในแม่โคที่ถูกตัดมดลูกออกเหลือแต่รังไข่ (total hysterectomy) แล้ว (La Voie et al., 1975)

นอกจากนี้ยังพบว่า การฉีดโปรสตาแกลนดินทูแอลฟาเข้าภายในมดลูกของแม่โคยังส่งผลให้ระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดเพิ่มขึ้นภายใน 48 ชั่วโมงอีกด้วย (Louis et al., 1974)

การใช้โปรสตาแกลนดินทูแอลฟาสังเคราะห์ในวัวสาว (heifer) มีผลทำให้ขนาดของฟอลลิเคิลใหญ่ขึ้นและเหนียวนำไปเกิดการตกไข่ (Kastelic et al., 1990) นอกจากนี้ผลของการศึกษาของการใช้โปรสตาแกลนดินเอพทูแอลฟาในแม่โคพบว่า มีผลทำให้ขนาดรวมถึงน้ำหนักของก้อนเนื้อเหลืองบนรังไข่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Louis et al., 1974; La Voie et al., 1975) อย่างไรก็ตาม การศึกษาผลของการใช้โปรสตาแกลนดินทูแอลฟาต่อระดับฮอร์โมนเพศหรือลักษณะทางกายวิภาคของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ในปลานั้นยังไม่พบว่ามีกรรายงานอย่างชัดเจน





## บทที่ 3

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 สัตว์ทดลอง

ปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโรเพคเมีย น้ำหนัก 2.5-5.8 กิโลกรัม ความกว้างของลำตัว (disc width; DW) 35-50 เซนติเมตร ความยาวตั้งแต่ปลายจมูกถึงปลายกระดูกสะโพก (girdle length; GL) 35-50 เซนติเมตร และความยาวทั้งตัวตั้งแต่ปลายจมูกถึงปลายหาง (total length; TL) 60-80 เซนติเมตร จำนวน 18 ตัว ปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโรเพคผู้ น้ำหนัก 4-6 กิโลกรัม ความกว้างของลำตัว (disc width; DW) 30-40 เซนติเมตร ความยาวตั้งแต่ปลายจมูกถึงปลายกระดูกสะโพก (girdle length; GL) 35-45 เซนติเมตร และความยาวทั้งตัวตั้งแต่ปลายจมูกถึงปลายหาง (total length; TL) 45-80 เซนติเมตร จำนวน 9 ตัว จากบริษัท วิมาร์ค ฟาร์ม จำกัด อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี เลี้ยงในบ่อปูนระบบกึ่งปิด ขนาดกว้าง 2 เมตร ยาว 3 เมตร ปริมาตรความจุน้ำ 5 ตัน จำนวน 3 บ่อ และบ่อขนาดกว้าง 3 เมตร ยาว 4 เมตร ปริมาตรความจุน้ำ 10 ตัน จำนวน 2 บ่อ ซึ่งมีระบบกรองในบ่อคิดเป็นร้อยละ 30 ของพื้นที่บ่อทั้งหมด โดยเลี้ยงแยกเพศ

ทำการเปลี่ยนน้ำร้อยละ 30 ทุกสัปดาห์ ให้อากาศตลอดเวลา ให้กินเนื้อปลาแช่แข็งเป็นอาหารวันละ 1 ครั้ง เวลา 15.00 น. ปริมาณร้อยละ 3-5 ของน้ำหนักตัว

#### 3.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

##### 3.2.1 การปรับสภาพสัตว์ก่อนทำการทดลอง

ปรับสภาพสัตว์ก่อนทำการทดลองประมาณ 30 วัน หลังจากนั้นเริ่มทำการทดลอง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ช่วงการทดลอง (phase) โดยช่วงการทดลองที่ 1 (phase 1) แบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเพศเมีย จำนวน 18 ตัว และกลุ่มเพศผู้จำนวน 9 ตัว เลี้ยงแยกในบ่อปูนระบบกึ่งปิด ขนาดกว้าง 2 เมตร ยาว 3 เมตร ปริมาตรความจุน้ำ 5 ตัน จำนวน 3 บ่อ และบ่อขนาดกว้าง 3 เมตร ยาว 4 เมตร ปริมาตรความจุน้ำ 10 ตัน จำนวน 2 บ่อ ทำการเก็บตัวอย่างโดยการวัดขนาด ซึ่งน้ำหนัก เก็บตัวอย่างเลือด และอัลตราซาวด์ระบบสืบพันธุ์ทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 17 สัปดาห์

หลังจากจบการทดลองช่วงที่ 1 ทำการพักปลากระเบนดังกล่าวเป็นเวลาประมาณ 45 วัน เริ่มการทดลองช่วงที่ 2 (phase 2) โดยแบ่งปลากระเบนเพศเมียออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 8 ตัว

ทำการเก็บตัวอย่างโดยการวัดขนาด ชั่งน้ำหนัก เก็บตัวอย่างเลือด และอัลตราซาวด์ระบบสืบพันธุ์ ตามลำดับ ทั้งหมด 6 ครั้ง ในการทดลองที่ 2 (หัวข้อที่ 3.4)

### 3.2.2 การป้องกันอันตรายจากสัตว์

มีการสวมปลอกเงี่ยงที่เงี่ยงกระเบนก่อนทุกครั้ง และสวมถุงมือหนัง เพื่อความปลอดภัยของผู้ทดลอง

### 3.2.3 การเก็บบันทึกข้อมูลเบื้องต้น

#### 3.2.3.1 ถ่ายรูปและระบุตัวสัตว์

ถ่ายรูปปลากระเบนที่ใช้ในการทดลองทุกตัวเพื่อเป็นการระบุตัวสัตว์ โดยนำปลาลงอ่างไฟเบอร์ทรงเหลี่ยมที่มีขนาดความกว้าง 100 เซนติเมตร ความยาว 150 เซนติเมตร ปริมาตรความจุน้ำขนาดประมาณ 60 ลิตร

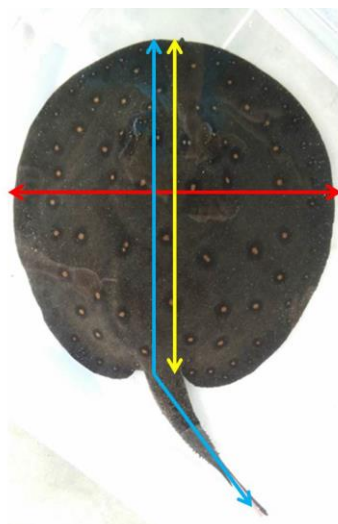
#### 3.2.3.2 ชั่งน้ำหนัก

ทำการชั่งน้ำหนัก (หน่วยเป็นกิโลกรัม) โดยนำปลากระเบนลงถังไฟเบอร์ทรงกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 70 เซนติเมตร ซึ่งตั้งอยู่บนตาชั่งสปริง (ชนิดที่รับน้ำหนักได้ 60 กิโลกรัม)

#### 3.2.3.3 วัดขนาด

ทำการวัดขนาด (หน่วยเป็นเซนติเมตร) ดังนี้ (รูปที่ 2)

- 1) ความกว้างของลำตัว (disc width; DW)
- 2) ความยาวลำตัว โดยวัดตั้งแต่ปลายจมูกถึงปลายกระดูกสะโพก (girdle length; GL)
- 3) ความยาวลำตัวรวม โดยวัดตั้งแต่ปลายจมูกถึงปลายหาง (total length; TL)

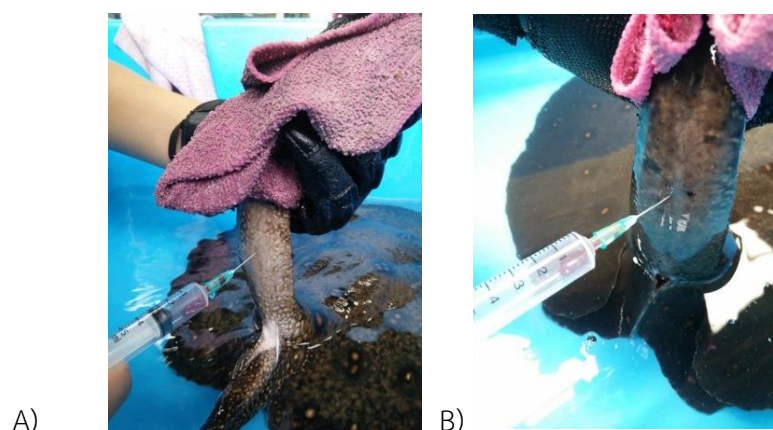


## รูปที่ 2 การวัดขนาดตัว

ลูกครีสีแดง; ความกว้างของลำตัว (disc width; DW) ลูกครีเหลือง; ความยาวตั้งแต่ปลายจมูกถึงปลายกระดูกสะโพก (girdle length; GL) ลูกครีฟ้า; ความยาวทั้งตัวตั้งแต่ปลายจมูกถึงปลายหาง (total length; TL)

### 3.2.3.4 การเก็บตัวอย่างเลือด

ทำการจับบังคับปลาโดยปราศจากการวางยาสลบ เจาะเลือดด้วยเข็มเบอร์ 21 G จากตำแหน่งเส้นเลือดดำใหญ่บริเวณโคนหาง (caudal tail vein) (Walsh and Luer, 2013) เก็บตัวอย่างเลือดปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่เคลือบด้วยสารกันเลือดแข็งตัว (heparin) หลังจากเจาะเลือดทำการปล่อยกระเบนลงบ่อแล้วสังเกตอาการ (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 A) การเก็บตัวอย่างเลือดโดยการจับบังคับปลาโดยปราศจากการวางยาสลบ B) ตำแหน่งการเก็บตัวอย่างเลือด

### 3.2.3.5 ตรวจวัดค่าทางชีวเคมีในเลือด

นำเลือดมาตรวจวิเคราะห์ค่าทางชีวเคมีของเลือดเพื่อตรวจสอบสุขภาพทั่วไป โดยวิเคราะห์ปริมาณ Calcium ion (mmol/L), sodium ion (mmol/L), potassium ion (mmol/L) และ blood gas (PCO<sub>2</sub> (mmHg), PO<sub>2</sub> (mmHg), pH, bicarbonate ion (mmol/L)) ตรวจโดยการดูดเลือดจากหลอดเลือดเก็บเลือดปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในชุดตรวจสอบสำเร็จรูป OPTI CCA<sup>®</sup> cassettes (Osmetech Inc., USA) แล้วนำมาอ่านผลด้วยเครื่อง blood gas analyzer (OPTI CCA<sup>®</sup>, Osmetech Inc., USA)

วิเคราะห์ปริมาณ Creatinine (mg/dl), cholesterol (mg/dl), triglycerides (mg/dl), alkaline phosphatase (ALP) (U/L), aspartate aminotransferase (AST) (mg/dl), alanine aminotransferase (ALT) (mg/dl) และ Glucose (mg/dl) โดยการหยดพลาสมา 30 ไมโครลิตร หยดลงบนเครื่องตรวจและชุดตรวจสอบสำเร็จรูป Reflotron<sup>®</sup> test (Roche, Germany) (รูปที่ 4) แล้วนำมาอ่านผลด้วยเครื่อง spectrophotometer (Reflonet<sup>®</sup> Plus, Roche Diagnostics, Germany)



รูปที่ 4 เครื่องตรวจและชุดตรวจสอบสำเร็จรูป Reflotron<sup>®</sup> test

### 3.2.3.5 การตรวจวัดค่าทางโลหิตวิทยา

นำเลือดมาตรวจวิเคราะห์ค่าทางชีวเคมีเพื่อตรวจสอบสุขภาพทั่วไป วิเคราะห์ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Packed cell volume; PCV หรือ Hematocrit; Hct) ด้วยวิธี Microhematocrit method โดยการนำเลือดมาใส่ใน microcapillary tube ประมาณ ¾ ของหลอด แล้วกดปลายหลอดด้านที่มีเลือดลงไปบนดินน้ำมัน นำไปปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นนำมาวัดอ่านค่า PCV ด้วย microhematocrit reader อ่านค่าออกมาเป็น % (อัจริยาและคณะ, 2549) การนับจำนวนเม็ดเลือดแดงโดยรวม (TRBC count) ดูตัวอย่างเลือด 40

ไมโครลิตร ผสมกับน้ำยา Natt and Herrick's solution 8000 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ นาน 1 นาที จะได้ สารละลายเม็ดเลือด 1:200 จากนั้นนำไปหยดใน hemocytometer หรือ Neubauer counting chamber โดยทิ้งไว้สักครู่ก่อน เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดอยู่นิ่ง การนับจำนวนเม็ดเลือดแดง ให้นำที่หัวกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างที่กำลังขยาย 40x โดยนับจากสี่เหลี่ยมจัตุรัส 5 ช่อง (medium-sized square) แล้วคำนวณจำนวนเม็ดเลือดแดงจากสูตร  $RBC/\mu l = \text{จำนวนของ RBCs ทั้งหมดที่นับได้} \times 10,000$  (Thrall et al., 2004)

การนับจำนวนเม็ดเลือดขาวโดยรวม (TWBC count) ดูตัวอย่างเลือด 40 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำยา Natt and Herrick's solution 8000 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ นาน 1 นาที จะได้ สารละลายเม็ดเลือด 1:200 จากนั้นนำไปหยดใน hemocytometer หรือ Neubauer counting 40 chamber โดยทิ้งไว้สักครู่ก่อน เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดอยู่นิ่ง โดยเม็ดเลือดขาวจะติดสีน้ำเงินเข้ม หรือเห็นเป็นแกรนูลอัดแน่นอยู่ในไซโตพลาสซึม ทำการนับจำนวนใน counting chamber ในช่อง สี่เหลี่ยมจัตุรัส 9 ช่อง แล้วนำมาคำนวณจำนวนเม็ดเลือดขาวจากสูตร  $TWBC/\mu l = (\text{จำนวน WBCs ที่นับได้ทั้งหมด} \times 9 \text{ ช่อง} + 10\% \text{ ของจำนวนทั้งหมดที่นับได้}) \times 200$  (Thrall et al., 2004)

ปลากระเบนทุกตัวที่นำมาในการทดลองเป็นปลากระเบนที่มีสุขภาพดี โดยมีค่าโลหิตวิทยา และชีวเคมีของเลือดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าโลหิตวิทยา และชีวเคมีของเลือดของปลากระเบน

พารามิเตอร์	ค่าเฉลี่ย	อ้างอิง
เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (PCV; %)	26.89±2.93	21±6.32
เม็ดเลือดแดง (RBC)	34.50±6.68	30±1
เม็ดเลือดขาว (WBC)	13.40±4.24	9.26±6.22
แคลเซียม (calcium; mmol/L)	0.58±0.20	0.65±0.25
โพแทสเซียม (potassium; mmol/L)	4.94±0.71	5±0.9
โซเดียม (sodium; mmol/L)	138.06±9.61	140±9.9
คาร์บอนไดออกไซด์ในเลือด (PCO <sub>2</sub> ; mmHg)	12.3±2.28	13±1.1
ออกซิเจนในเลือด (PO <sub>2</sub> ; mmHg)	56.06±12.02	56.4±18.9
ความเป็นกรดต่าง (pH)	7.40±0.08	7.41±0.10
ไบคาร์บอเนตไอออน (HCO <sub>3</sub> ; mmol/L)	8.06±1.77	8.3±2.4
ครีเอตินีน (creatinine (mg/dl)	0.76±0.15	0.795±0.22
ไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides; mg/dl)	<70	<70
คอเลสเตอรอล (cholesterol; mg/dl)	<100	<100
Alkaline phosphatase (ALP; U/I)	178.89±15.29	183±16.5
Aspartate aminotransferase (AST; U/I)	198.67±12.93	200±10.6
Alanine aminotransferase (ALT; U/I)	5.22±0.15	5.34±0.16
กลูโคส (Glucose; mg/dl)	32.22±1.71	32.3±1.6

### 3.3 การทดลองที่ 1

#### 3.3.1 สัตว์ทดลอง

แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ได้แก่ ปลากระเบนเพศผู้ 9 ตัว และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ปลากระเบนเพศเมีย 18 ตัว

#### 3.3.2 การเก็บบันทึกข้อมูล

##### 3.3.2.1 ชั่งน้ำหนักสัตว์ เช่นเดียวกับหัวข้อ 3.2.3.2

3.3.2.2 วัดขนาดตัว (ความกว้างลำตัว; disc width ความยาวลำตัว; girdle length และความยาวลำตัวรวม; total length) เช่นเดียวกับหัวข้อ 3.2.3.3

**3.3.2.3 วัดขนาดของท่อน้ำน้ำเชื้อ** โดยการวัดทั้งหมด 3 ตำแหน่ง (Thorson et al., 1983) (รูปที่ 5)

- 1) ความยาวเส้นรอบวงของท่อน้ำน้ำเชื้อ (clasper circumference) โดยวัดตรงจุดที่มีความกว้างมากที่สุด
- 2) ความยาวของท่อน้ำน้ำเชื้อจากปลายถึงขอบที่ติดกับลำตัว (body axil)
- 3) ความยาวของท่อน้ำน้ำเชื้อจากปลายถึงขอบของท่อน้ำน้ำเชื้อ (clasper axil)

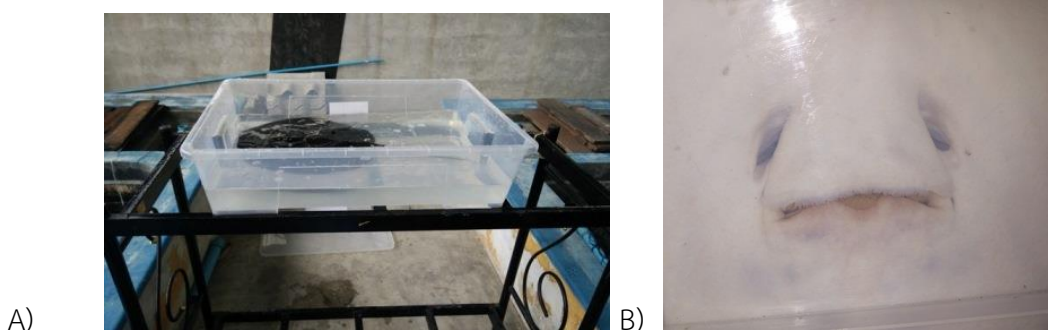


**รูปที่ 5** การวัดขนาดและความยาวของอวัยวะน้ำเชื้อ

ลูกครีสีฟ้า; ความยาวเส้นรอบวงของ ท่อน้ำน้ำเชื้อ (clasper circumference), ลูกครีสีแดง; ความยาวเส้นรอบวงของท่อน้ำน้ำเชื้อจากปลายถึงขอบที่ติดกับลำตัว (body axil), ลูกครีสีเหลือง; ความยาวเส้นรอบวงของท่อน้ำน้ำเชื้อจากปลายถึงขอบของท่อน้ำน้ำเชื้อ (clasper axil)

#### **3.3.2.4 บันทึกลักษณะทางกายวิภาคของฟันของปลากระเบนเพศผู้**

โดยการสังเกตรูปร่างของฟันเมื่อปลากระเบนเปิดปาก (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 A) วิธีการวางอ่างทดลองเพื่อสังเกตรูปร่างฟันของปลากระเบนเพศผู้; B) ลักษณะฟันของปลากระเบนเพศผู้

### 3.3.3 การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดปริมาตร 1.5 - 2 มิลลิลิตรของปลากระเบนโมโตโร่ทั้ง 2 กลุ่ม จำนวนทั้งหมด 25 ตัว ทุก 2 สัปดาห์ ติดต่อกันเป็นเวลาทั้งหมด 17 อาทิตย์ โดยเจาะจากตำแหน่งเส้นเลือดดำใหญ่บริเวณโคนหาง (caudal tail vein) โดยใช้เข็มเบอร์ 21 G นำเลือดเก็บในหลอดเก็บเลือดชนิดไม่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (plain tube) แล้วแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปปั่นแยกซีรัม (serum) ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดเก็บเฉพาะซีรัม ใส่หลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำหลอดเลือดไปปั่นแยกซีรัมอีกครั้งด้วย ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดเก็บเฉพาะซีรัมใส่หลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเก็บรักษาตัวอย่างในตู้แช่แข็งที่มีอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนเพศด้วยวิธีเอนไซม์ลิงคิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสส (Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA) โดยวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (testosterone; pg/ml) และเอสตราไดออล (estradiol; ng/ml) ในปลากระเบนเพศผู้ และวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนเอสตราไดออล (estradiol; ng/ml) และโปรเจสเตอโรน (progesterone; ng/ml) ในปลากระเบนเพศเมีย

### 3.3.4 การตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนด้วยวิธี ELISA

#### 3.3.4.1 เตรียมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อฮอร์โมน

1) นำแอนติบอดีของเอสตราไดออล (polyclonal anti-estradiol R0008; Clinical Endocrinology Lab, University of California, Davis, CA, USA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เจือจางกับ coating buffer ปริมาตร 4.95 มิลลิลิตร (1:100)



2) นำแอนติบอดีของโปรเจสเตอโรน (monoclonal anti-progesterone CL 425; Clinical Endocrinology Lab, University of California, Davis, CA, USA) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เจือจางกับ coating buffer 4.9 มิลลิลิตร (1:50)

3) นำแอนติบอดีของเทสโทสเตอโรน (polyclonal anti-testosterone R156/7; Clinical Endocrinology Lab, University of California, Davis, CA, USA) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เจือจางกับ coating buffer 2 มิลลิลิตร (1:100)

จากนั้นเก็บแอนติบอดีของฮอร์โมนที่เจือจางแล้วทั้งหมดไว้ในตู้แช่แข็งที่มีอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เมื่อต้องการนำแอนติบอดีของฮอร์โมนแต่ละชนิดที่เจือจางไว้แล้วนำมาใช้ให้นำมาเตรียมดังนี้

1) นำแอนติบอดีของเอสตราไดโอรอลที่ได้เจือจางไว้แล้ว (1:100) ปริมาตร 36 ไมโครลิตร เจือจางด้วย coating buffer 5 มิลลิลิตร ได้เป็นแอนติบอดีของ เอสตราไดโอรอลที่พร้อมใช้ (antibody-estradiol working stock) และมีอัตราส่วนเจือจาง 1:13,889

2) นำแอนติบอดีของโปรเจสเตอโรนที่ได้เจือจางไว้แล้ว (1:50) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เจือจางด้วย coating buffer 5 มิลลิลิตร ได้เป็นแอนติบอดีของ โปรเจสเตอโรนที่พร้อมใช้ (antibody- progesterone working stock) และมีอัตราส่วนเจือจาง 1:10,000

3) นำแอนติบอดีของเทสโทสเตอโรนที่ได้เจือจางไว้แล้ว (1:100) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เจือจางด้วย coating buffer 5 มิลลิลิตร ได้เป็นแอนติบอดีของเทสโทสเตอโรนที่พร้อมใช้ (antibody- testosterone working stock) และมีอัตราส่วนเจือจาง 1:16,666

#### 3.3.4.2 เตรียมสาร horseradish peroxidase-conjugated antibodies (HRP) ของแต่ละฮอร์โมน

1) นำ estradiol 17 $\beta$  horseradish peroxidase (estradiol-3-HemiS 250  $\mu$ l; Clinical Endocrinology Lab, University of California, Davis, CA, USA) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เจือจางกับ assay buffer 4.98 มิลลิลิตร (1:250)

2) นำ progesterone horseradish peroxidase (progesterone-3-CMO 250  $\mu$ l; Clinical Endocrinology Lab, University of California, Davis, CA, USA) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เจือจางกับ assay buffer 4.975 มิลลิลิตร (1:200)

3) นำ testosterone horseradish peroxidase (Clinical Endocrinology Lab, University of California, Davis, CA, USA) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เจือจางกับ assay buffer 2.475 มิลลิตร (1:100)

จากนั้นเก็บ horseradish peroxidase ของฮอร์โมนที่เจือจางแล้วทั้งหมดไว้ในตู้แช่เย็นที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เมื่อต้องการนำ horseradish peroxidase ของฮอร์โมนที่เจือจางแล้วทั้งหมดมาใช้ให้นำมาเจือจางด้วย assay buffer อีกครั้ง ตามขั้นตอน ดังนี้

1) นำ estradiol  $17\beta$  horseradish peroxidase ที่เจือจางไว้แล้ว (1:250) ปริมาตร 36.5 ไมโครลิตร มาเจือจางด้วย assay buffer 6 มิลลิตร ได้เป็น estradiol  $17\beta$  HRP ที่พร้อมใช้งาน (estradiol  $17\beta$  HRP working stock) ที่มีอัตราส่วนเจือจาง 1:41,096

2) นำ progesterone horseradish peroxidase ที่เจือจางไว้แล้ว (1:200) ปริมาตร 33.5 ไมโครลิตร มาเจือจางด้วย assay buffer 6 มิลลิตร ได้เป็น progesterone HRP ที่พร้อมใช้งาน (progesterone HRP working stock) ที่มีอัตราส่วนเจือจาง 1:35,821

3) นำ testosterone horseradish peroxidase ที่เจือจางไว้แล้ว (1:100) ปริมาตร 28.0 ไมโครลิตร มาเจือจางด้วย assay buffer 6 มิลลิตร ได้เป็น progesterone HRP ที่พร้อมใช้งาน (testosterone HRP working stock) ที่มีอัตราส่วนเจือจาง 1:21,429

### 3.3.4.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานของแต่ละฮอร์โมน

1) นำเอสตราไดออล ( $17\beta$  estradiol; catalog no. E8875; Sigma) ปริมาณ 1 กรัม เจือจางกับเอทานอล (EtOH) 100 มิลลิตร ได้เป็นสาร primary stock ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร จากนั้นนำ สาร primary stock ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เจือจางกับเอทานอล 10 มิลลิตร ได้เป็นสาร secondary stock ที่มีความเข้มข้น 10,000 นาโนกรัมต่อมิลลิตร จากนั้นนำสาร secondary stock ปริมาตร 125 ไมโครลิตร มาเจือจางกับ assay buffer 49.9 มิลลิตร ได้เป็นสารละลายมาตรฐานของเอสตราไดออลที่พร้อมใช้ (estradiol standard solution working stock) ที่มีความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อมิลลิตร

2) นำโปรเจสเตอโรน (progesterone; catalog no. P0130; Sigma) ปริมาตร 0.5 กรัม เจือจางกับเอทานอล 5 มิลลิตร ได้เป็นสาร ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร จากนั้นนำ สาร primary stock ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เจือจางกับเอทานอล 4 มิลลิตร ได้เป็นสาร secondary stock ที่มีความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิตร จากนั้นนำ

สาร secondary stock ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาเจือจางกับ assay buffer 49.8 มิลลิตร ได้เป็นสารละลายมาตรฐานของโปรเจสเตอโรนที่พร้อมใช้ (progesterone standard solution working stock) ที่มีความเข้มข้น 4 นาโนกรัมต่อมิลลิตร

3) นำเทสทอสเทอโรน (17 hydroxy-4-androsten 3 one; catalog no. A6950; Steraloids) ปริมาณ 1 กรัม เจือจางกับเอทานอล 1 มิลลิตร ได้เป็นสาร primary stock ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร จากนั้นนำ สาร primary stock ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เจือจางกับเอทานอล 10 มิลลิตร ได้เป็นสาร secondary stock ที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร จากนั้นนำสาร Stock B ปริมาตร 250 ไมโครลิตร มาเจือจางกับ assay buffer 24.75 มิลลิตร ได้เป็น tertiary stock ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิตร นำสาร Tertiary stock ปริมาตร 12 ไมโครลิตร มาเจือจางอีกครั้งด้วย assay buffer 88 มิลลิตร ได้เป็นสารละลายมาตรฐานของเทสทอสเทอโรนที่พร้อมใช้ (testosterone standard solution working stock) ที่มีความเข้มข้น 12,000 พิโคกรัมต่อมิลลิตร

จากนั้นเก็บสารละลายมาตรฐานของแต่ละฮอร์โมนที่เจือจางแล้วทั้งหมดไว้ในตู้แช่แข็งที่มีอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ก่อนเริ่มการวิเคราะห์ฮอร์โมนตามขั้นตอน 3.4.4 ให้นำสารละลายมาตรฐานพร้อมใช้ที่ทราบระดับความเข้มข้น working stock ดังกล่าว ปริมาตร 200 ไมโครลิตรมาละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วทำการเจือจางแบบสองเท่า (two-fold dilution) ด้วย assay buffer ในความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

- 1) เจือจางเอสตราไดโอดให้มีความเข้มข้น 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.12, 7.8, 3.9 และ 1.95 นาโนกรัมต่อหลอดตามลำดับ
- 2) เจือจางโปรเจสเตอโรนให้มีความเข้มข้น 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 และ 0.78 นาโนกรัมต่อหลอดตามลำดับ
- 3) เจือจางเทสทอสเทอโรนให้มีความเข้มข้น 600, 300, 150, 75, 37.5, 18.8, 9.4, 4.7 และ 2.3 พิโคกรัมต่อหลอดตามลำดับ

### 3.3.4.4 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ (assay protocol)

#### 1) การตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนเอสตราไดออล

การตรวจวิเคราะห์ทำในเพลท 96 หลุม ของ NuncMaxiSorp™ plate นำแอนติบอดีของเอสตราไดออลที่ได้เจือจางด้วย coating buffer ไว้แล้ว (1:13,889) เคลือบเพลทในแต่ละหลุมๆละ 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดีส่วนเกินที่เคลือบเพลทออกทั้งหมด 3 ครั้งหยุด assay buffer หลุมละ 50 ไมโครลิตร ปิดด้วยแผ่นอะซีเตต (acetate plate sealer) แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานเอสตราไดออลที่ทำการเจือจางไว้แล้ว ตามหัวข้อ 3.3.4.3 หลุมละ 20 ไมโครลิตร เติมสารละลายตัวอย่าง ลงในเพลทหลุมละ 20 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติม horseradish peroxidase ที่จำเพาะต่อเอสตราไดออลที่ได้เจือจางไว้แล้ว (1:41,096) หลุมละ 50 ไมโครลิตร ปิดเพลทด้วยแผ่นอะซีเตตแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างเพลททั้งหมด 3 ครั้ง เติม substrate (ประกอบด้วยส่วนผสมของ ATBS 125 ไมโครลิตร และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 40 ไมโครลิตรในสารละลายซบสเตรทบัฟเฟอร์ 12.5 มิลลิลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ปิดเพลทด้วยแผ่นอะซีเตต แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45-60 นาที แล้วจึงนำมาอ่านผลด้วยเครื่อง spectrophotometer (TECAN® sunrise) ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยใช้ค่าจากหลุมสารมาตรฐาน และคำนวณค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนในตัวอย่างต่อมิลลิลิตร (ng/ml) (Brown et al., 2004)

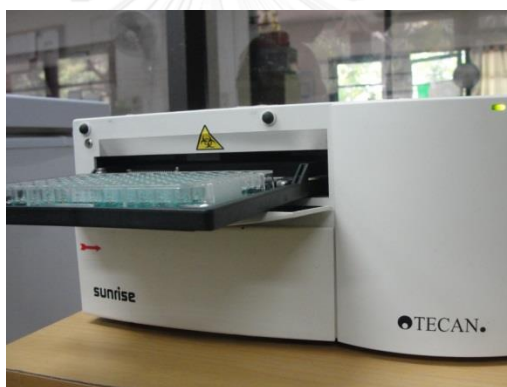
#### 2) การตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน

การตรวจวิเคราะห์ทำในเพลท 96 หลุม ของ NuncMaxiSorp™ plate นำแอนติบอดีของโปรเจสเตอโรน ที่ได้เจือจางด้วย coating buffer ไว้แล้ว (1:10,000) เคลือบเพลทในแต่ละหลุมๆละ 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดีส่วนเกินที่เคลือบเพลทออกทั้งหมด 3 ครั้งจากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานโปรเจสเตอโรนที่ทำการเจือจางไว้แล้ว ตามหัวข้อ 3.3.4.3 หลุมละ 50 ไมโครลิตร เติมสารละลายตัวอย่างลงในเพลทหลุมละ 50 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติม horseradish peroxidase ที่จำเพาะต่อโปรเจสเตอโรนที่ได้เจือจางไว้แล้ว (1:35,821) หลุมละ 50 ไมโครลิตร ปิดเพลทด้วยแผ่นอะซีเตตแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างเพลททั้งหมด 3 ครั้งเติม substrate (ประกอบด้วยส่วนผสมของ ATBS 125 ไมโครลิตร และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 40 ไมโครลิตรในสารละลายซบสเตรทบัฟเฟอร์ 12.5 มิลลิลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ปิดเพลทด้วยแผ่นอะซีเตตแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 50-60 นาที แล้วจึงนำมาอ่านผลด้วยเครื่อง

spectrophotometer (TECAN® sunrise) ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้ค่าจากหลุมสารมาตรฐาน และคำนวณค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนในตัวอย่างต่อมิลลิกรัม (ng/ml) (Brown et al., 2004)

### 3) การตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน

ขั้นตอนในการตรวจวิเคราะห์ทำเช่นเดียวกันกับวิธีของการตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนโดยใช้แอนติบอดีของเทสโทสเตอโรนที่ได้เจือจางด้วย coating buffer ไว้แล้ว (1:16,667) สารละลายมาตรฐานเทสโทสเตอโรนที่ทำการเจือจางไว้แล้ว ตามหัวข้อ 3.3.4.3 และสาร horseradish peroxidase ที่จำเพาะต่อเทสโทสเตอโรนที่ได้เจือจางไว้แล้ว (1:21,249) จากนั้นนำมาอ่านผลด้วยเครื่อง spectrophotometer (TECAN® sunrise) (รูปที่ 7) ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ค่าจากหลุมสารมาตรฐาน และคำนวณค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนในตัวอย่างต่อมิลลิกรัม (pg/ml) (Brown et al., 2004)



รูปที่ 7 เครื่องอ่านผล spectrophotometer (TECAN® sunrise)

### 3.3.5 การอัลตราซาวด์อวัยวะสืบพันธุ์

ทำการอัลตราซาวด์ปลากระเบนโมโตโร้ทุกตัว โดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์เคลื่อนที่ Digital ultrasonic diagnostic imaging system (รุ่น DP6600 vet) และหัวตรวจชนิด Electronic micro-convex array transducer: 65C15EA (Shenzhen Mindray Bio-medical Electronics Co.,Ltd.; USA) (รูปที่ 8) ชนิดของการแสดงภาพของเครื่องอัลตราซาวด์เป็นแบบ 2 มิติ (Real time B-mode ultrasound) โดยปรับความถี่ที่ 5, 6.5 และ 8 เมกะเฮิรตซ์ ตามขนาดของปลากระเบนแต่ละตัว ในการทำการอัลตราซาวด์แต่ละครั้งใช้เวลาประมาณ 15-25 นาทีในปลากระเบนเพศเมีย และ 20-30 นาทีในปลากระเบนเพศผู้

การอัลตราซาวด์ทำทางด้านบนของตัวสัตว์บริเวณช่องท้องวัดขนาดของอวัยวะสืบพันธุ์ ได้แก่

1) อัลตราซาวด์รังไข่ โดยการวางหัวตรวจด้านบนของปลากะเบนบริเวณด้านซ้ายตั้งฉากกับกระดูกสันหลังส่วนอกที่ 2 (2<sup>nd</sup> thoracolumbar) ถึงกระดูกสันหลังส่วนท้ายที่ 8 (8<sup>th</sup> precaudal vertebrae) จะพบรังไข่วางตัวแนวขนานห่างจากแนวกระดูกสันหลังประมาณ 2-4 เซนติเมตร วางตำแหน่งห่างจากกระดูกเชิงกราน (pelvic girdle) ตั้งแต่ 1-6 เซนติเมตร และทอดยาวไปจนถึงสุดปลายกระดูกอก (pectoral girdle) บันทึกขนาดรังไข่ทั้งสองข้าง โดยวัดความยาว (longitudinal of ovary) ความกว้าง (transverse diameter of ovary) และความลึก (height of ovary) จากนั้นนำมาคิดปริมาตรรังไข่ (ovarian volume) บันทึกขนาดของโดมิแนนท์ฟอลลิเคิล โดยการวัดความกว้างของโดมิแนนท์ฟอลลิเคิล (transverse diameter of follicle) ที่ใหญ่ที่สุด

2) อัลตราซาวด์มดลูก โดยการวางหัวตรวจด้านบนของปลากะเบนบริเวณด้านข้างตั้งฉากกับกระดูกสันหลังส่วนท้ายที่ 2-10 จะพบมดลูกที่วางตัวแนวขนานห่างจากแนวกระดูกสันหลังประมาณ 1-2 เซนติเมตร ตรงจุดที่ทำการอัลตราซาวด์เป็นมดลูกส่วนปลาย (caudal portion of uterus) ที่เบนตัวเป็นแนวขวางทำมุมประมาณ 80 องศาจากแนวกระดูกสันหลังเพื่อเปิดเข้าสู่ช่องทวารร่วมตรงตำแหน่งที่ตั้งฉากกับกระดูกสันหลังส่วนท้ายที่ 10 บันทึกรูปร่างตัดตามแนวยาว (appearance of uterus) เส้นผ่าศูนย์กลางแนวตั้งของมดลูก (vertical diameter of uterus) และความยาวของเนื้อเยื่อผนังมดลูก (trophonemata) ของมดลูก

3) อัลตราซาวด์อัณฑะของปลากะเบนเพศผู้ โดยการวางหัวตรวจด้านบนของปลากะเบนบริเวณทั้งด้านซ้ายและขวาตั้งฉากกับกระดูกสันหลังส่วนอกที่ 2 ถึงกระดูกสันหลังส่วนท้ายที่ 8 จะพบอัณฑะวางตัวแนวขนานห่างจากแนวกระดูกสันหลังประมาณ 2-4 เซนติเมตร บันทึกขนาดอัณฑะทั้งสองข้าง โดยวัดความยาว (longitudinal of testis) ความกว้าง (transverse diameter of testis) และความลึก (height of testis) จากนั้นนำมาคิดปริมาตรอัณฑะ (testicular volume) บันทึกขนาดของกลีบของท่อเซมินิเฟอรัส โดยวัดความกว้าง (transverse diameter of seminiferous lobe)

4) อัลตราซาวด์ท่อเซมินอลเวสิเคิลของปลากะเบนเพศผู้ โดยการวางหัวตรวจด้านบนของปลากะเบนบริเวณทั้งด้านซ้ายและขวาตั้งฉากกับกระดูกสันหลังส่วนท้ายที่ 6-10 บันทึกความกว้าง (transverse diameter of seminal vesicle) ของท่อเซมินอลเวสิเคิลที่ใหญ่ที่สุด



**รูปที่ 8** A) เครื่องอัลตราซาวด์เคลื่อนที่ Digital ultrasonic diagnostic imaging system และหัวตรวจชนิด Electronic micro-convex array transducer B) การอัลตราซาวด์อวัยวะในระบบสืบพันธุ์จากด้านบนของตัวสัตว์ด้วยวิธีปราศจากการวางยาสลบ

### 3.4 การทดลองที่ 2

#### 3.4.1 สัตว์ทดลอง

แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม โดยแบ่งเป็นกลุ่มควบคุม ได้แก่ปลากระเบนเพศเมีย 8 ตัว เลี้ยงในบ่อปูนขนาดความกว้าง 2 เมตร ยาว 3 เมตร ปริมาตรความจุน้ำ 5 ตัน จำนวน 2 บ่อ และกลุ่มทดลองได้แก่ปลากระเบนเพศเมียอีก 8 ตัว เลี้ยงในบ่อปูนขนาดความกว้าง 3 เมตร ยาว 4 เมตร ปริมาตรความจุน้ำ 10 ตัน จำนวน 1 บ่อ

#### 3.4.2 การเก็บบันทึกข้อมูลทั่วไป

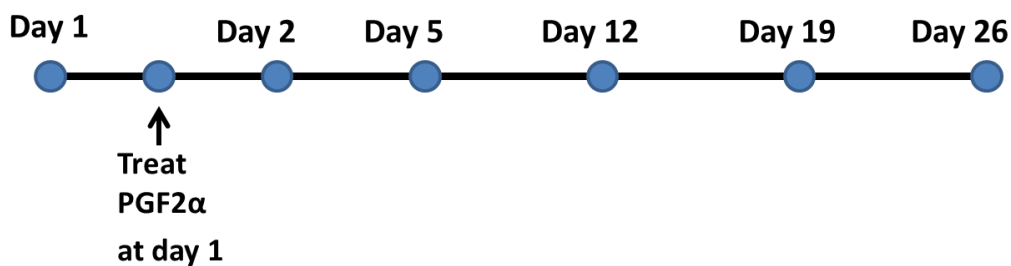
##### 3.4.2.1 ชั่งน้ำหนักสัตว์ เช่นเดียวกับหัวข้อ 3.2.3.2

3.4.2.2 วัดขนาดตัว (ความกว้างลำตัว; disc width ความยาวลำตัว; girdle length และความยาวลำตัวรวม; total length) เช่นเดียวกับหัวข้อ 3.2.3.3

#### 3.4.3 การใช้โพรสตาแกลนดิน

เก็บบันทึกข้อมูลทั่วไป เก็บตัวอย่างเลือด และอัลตราซาวด์ระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ รังไข่ ฟอลลิเคิล และมดลูก ก่อนเริ่มการทดลอง 3 วัน จากนั้นปลากระเบนกลุ่มควบคุมจะได้รับการฉีด normal saline 0.1 มิลลิลิตร เข้ากล้ามเนื้อบริเวณโคนหาง ในขณะที่กลุ่มทดลองจะได้รับการฉีด ฮอร์โมนโพรสตาแกลนดินเอพทุแอลฟาสังเคราะห์ (dinoprost tromethamine sterile solution; Pfizer Inc., New York) (รูปที่ 10) ขนาด 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว (Kobayashi and Stacey, 1993) เข้ากล้ามเนื้อบริเวณโคนหาง ทำการเจาะเลือดหลังจากการฉีดฮอร์โมน

โพรสตาแกลนดินเอฟทูแอลฟา 1 วัน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเลือดอีก 4 ครั้ง ทั้งจากปลากะเบนกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 แสดงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากปลากะเบนกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง



รูปที่ 10 ฮอร์โมนโพรสตาแกลนดินเอฟทูแอลฟาสังเคราะห์

นำเลือดเก็บในหลอดเก็บเลือดชนิดไม่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (plain tube) แล้วแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปั่นแยกซีรัม และวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน ตามขั้นตอนในหัวข้อ 3.3.3 เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

#### 3.4.4 การตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนด้วยวิธี ELISA

ทำเช่นเดียวกับวิธีการในหัว 3.3.4

#### 3.4.5 การอัลตราซาวด์อวัยวะสืบพันธุ์

ทำการอัลตราซาวด์รังไข่ โดมินันท์ฟอลลิเคิล และมดลูก ของปลากะเบนโมโตโร่เพศเมียทุกตัว เช่นเดียวกับในหัวข้อ 3.3.5



### 3.5 การตรวจคุณภาพน้ำ

ทำการตรวจคุณภาพน้ำทุกสัปดาห์เพื่อเป็นการควบคุมสภาพการเลี้ยงตลอดการทดลอง โดยการเก็บตัวอย่างน้ำในบ่อ แล้วนำมาวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้ ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ความเป็นด่าง (alkalinity; mg/l) ปริมาณแอมโมเนียรวม (total ammonia; mg/l) ปริมาณไนไตรท์ (nitrite; mg/l) โดยชุดตรวจคุณภาพน้ำสำเร็จรูป (AQUA VBN®) (รูปที่ 11) วัดค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ (dissolved oxygen; mg/l) และอุณหภูมิ (temperature; °C) โดยอุปกรณ์ตรวจปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (dissolved oxygen meter; YSI 550A, YSI incorporated, USA) และวัดความเค็ม (salinity; ppt) โดยอุปกรณ์ตรวจวัดความเค็ม (salinity refractometer)

คุณภาพน้ำตลอดการทดลองนั้นถูกควบคุมให้มีค่าค่อนข้างคงที่ โดยมีค่าดังตารางที่ 3.2 และช่วงที่ทำการทดลองคือเดือนมิถุนายนถึงธันวาคม ซึ่งมีความยาวนานของแสงแดดตั้งแต่ 11 ชั่วโมง 50 นาที ถึง 12 ชั่วโมง 54 นาที



รูปที่ 11 ชุดตรวจคุณภาพน้ำสำเร็จรูป (AQUA VBN®)

ตารางที่ 2 คุณภาพน้ำในการทดลองที่ 1 และ 2

พารามิเตอร์	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2
ความเป็นกรดต่าง (pH)	7.35±0.16	7.35±0.11
ความเป็นด่าง (Alkalinity)	72.94±4.7	65±5
ไนไตรท์ (Nitrite)	0.01±0.02	0±0
ออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolve oxygen)	90.71±0.47	90.67±0.47
อุณหภูมิ (Temperature)	28.71±0.47	27.67±0.47
ความเค็ม (Salinity)	0±0	0±0
คลอรีน (Chlorine)	0±0	0±0

### 3.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำขนาดตัวของสัตว์ทดลอง ระดับฮอร์โมนเพศ และลักษณะทางกายภาพของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์มาวิเคราะห์สถิติเชิงพรรณนา (descriptive analysis) เพื่อคำนวณค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสัปดาห์โดยใช้สถิติเพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วม (One way ANOVA) หรือ สถิติฟรیدแมน (Freidman test) และการทดสอบของวิลคอกสัน (Wilcoxon test)

ใช้การวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (pearson correlation) หรือ แบบสเปียร์แมน (spearman correlation) ในการวิเคราะห์ข้อมูลระหว่างปริมาณฮอร์โมนเพศกับลักษณะทางกายภาพของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์

แสดงผลของการใช้ฮอร์โมนโปรสเตอโรนแอสตาเกลนดินเอพูแอลฟาด้วยการวิเคราะห์ความแตกต่างภายในกลุ่มด้วย สถิติเพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วมแบบซ้ำ (Repeated measure ANOVA) หรือ สถิติฟรیدแมน (Freidman test) และการทดสอบของวิลคอกสัน (Wilcoxon test) และความแตกต่างระหว่างกลุ่มในแต่ละวันทดลองแบบ independent t-test หรือ สถิติ Mann-Whitney U

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 4.1 ผลการทดลองที่ 1

#### 4.1.1 ขนาด น้ำหนัก ลักษณะของพินและขนาดของอวัยวะนำน้ำเชื้อของปลากะเบนวัย เจริญพันธุ์

##### 4.1.1.1 ขนาดและน้ำหนักของปลากะเบนเพศเมียและปลากะเบนเพศผู้วัย เจริญพันธุ์

น้ำหนักเฉลี่ยรวมของปลากะเบนเพศเมียเท่ากับ  $5.43 \pm 0.99$  กิโลกรัม ความกว้างลำตัวเฉลี่ยรวมเท่ากับ  $445 \pm 29.4$  มิลลิเมตร มีความยาวลำตัวและความยาวลำตัวรวมเฉลี่ยรวมเท่ากับ  $435 \pm 23.1$  และ  $742.8 \pm 51.3$  มิลลิเมตร (ตารางที่ 3)

น้ำหนักเฉลี่ยรวมของปลากะเบนเพศผู้เท่ากับ  $4.06 \pm 1.04$  กิโลกรัม ความกว้างลำตัวเฉลี่ยรวมเท่ากับ  $383.9 \pm 31.8$  มิลลิเมตร มีความยาวลำตัวและความยาวลำตัวรวมเฉลี่ยรวมเท่ากับ  $372.2 \pm 28.2$  และ  $682.2 \pm 61$  มิลลิเมตร (ตารางที่ 3)

**ตารางที่ 3** ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของน้ำหนัก ความกว้างลำตัว ความยาวลำตัว และ ความยาวลำตัวรวมของปลากะเบนเพศเมียและเพศผู้

เพศ	น้ำหนัก (กก.)	ความกว้างลำตัว (มม.)	ความยาวลำตัว (มม.)	ความยาวลำตัวรวม (มม.)
เพศเมีย	$5.43 \pm 0.99$	$445 \pm 29.4$	$435 \pm 23.1$	$742.8 \pm 51.3$
เพศผู้	$4.06 \pm 1.04$	$383.9 \pm 31.8$	$372.2 \pm 28.2$	$682.2 \pm 61$

##### 4.1.1.2 ขนาดของอวัยวะนำน้ำเชื้อ และลักษณะของพินของปลากะเบนเพศผู้

ความยาวเส้นรอบวงของท่อนำน้ำเชื้อของปลากะเบนเพศผู้พบว่ามี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ในแต่ละสัปดาห์ ในขณะที่ความยาวของท่อนำน้ำเชื้อจากปลายถึง ขอบที่ติดกับลำตัวและความยาวลำตัวของท่อนำน้ำเชื้อจากปลายถึงขอบของท่อนำน้ำเชื้อนั้นไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4; รูปที่ 12, 13 และ 14)

ค่าร้อยละต่ำสุด ค่าร้อยละสูงสุด และค่าเฉลี่ยรวมของร้อยละความยาวเส้นรอบวงของท่อน้ำน้ำเชื้อต่อความกว้างลำตัว มีค่า 13.82, 17.46 และ  $21.71 \pm 1.82$  เซนติเมตร ตามลำดับ ค่าร้อยละต่ำสุด ค่าร้อยละสูงสุด และค่าเฉลี่ยรวมของร้อยละความยาวของท่อน้ำน้ำเชื้อจากปลายถึงขอบที่ติดกับลำตัวต่อความกว้างลำตัว มีค่า 20.00, 30.56 และ  $24.34 \pm 2.25$  เซนติเมตร ตามลำดับ ค่าร้อยละต่ำสุด ค่าร้อยละสูงสุด และค่าเฉลี่ยรวมของร้อยละความยาวลำตัวของท่อน้ำน้ำเชื้อจากปลายถึงขอบของท่อน้ำน้ำเชื้อ มีค่า 11.63, 21.43 และ  $15.67 \pm 1.99$  เซนติเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 5)

รูปแบบพื้นของปลากะเบนเพศผู้ทุกตัว (9/9) ตลอดช่วงการทดลองมีรูปร่างแหลม (cuspidate form) ชัดเจน (รูปที่ 15)

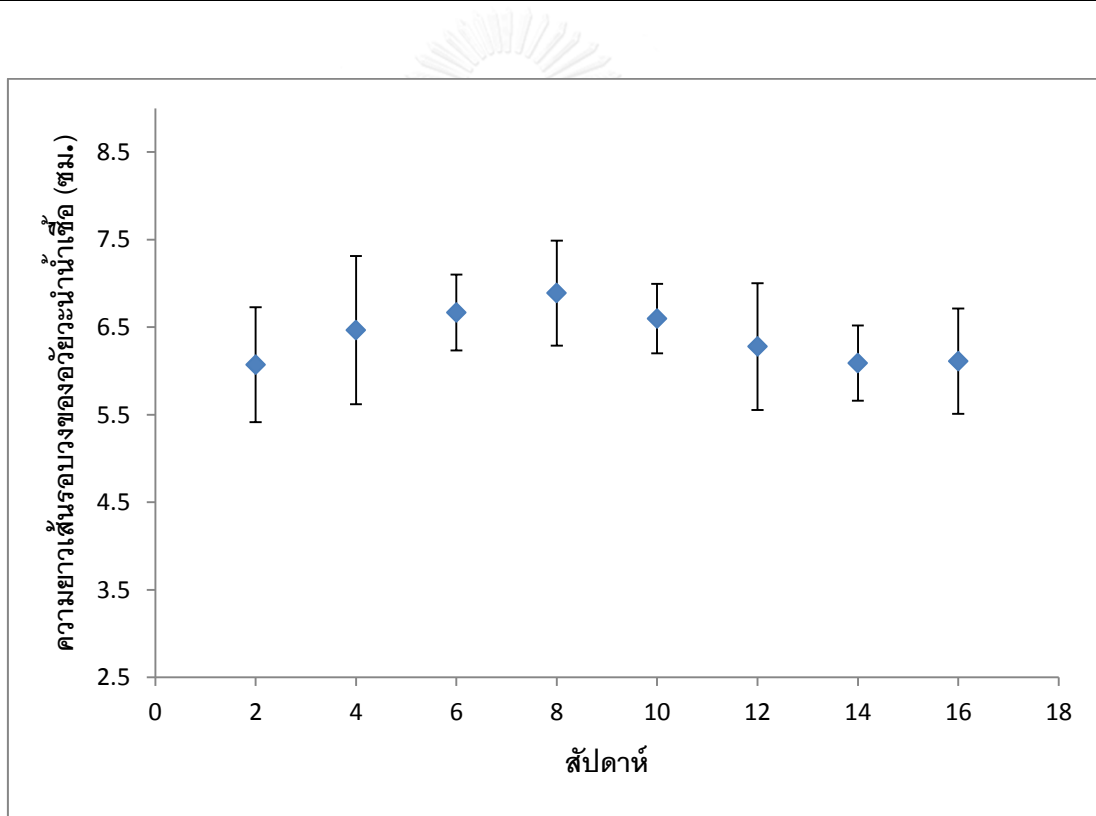
ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดของอวัยวะน้ำเชื้อของปลากะเบนเพศผู้ (n=9)

สัปดาห์	ความยาวเส้นรอบวง (ซม.)	ความยาวจากปลายถึงขอบที่ติดกับลำตัว (ซม.)	ความยาวลำตัวจากปลายถึงขอบของท่อน้ำเชื้อ (ซม.)
สัปดาห์ที่ 2	$6.07 \pm 0.66^a$	$9.06 \pm 0.73$	$5.61 \pm 0.45$
สัปดาห์ที่ 4	$6.47 \pm 0.85^{b,c,d}$	$8.91 \pm 0.67$	$5.79 \pm 0.65$
สัปดาห์ที่ 6	$6.67 \pm 0.43^{c,d}$	$8.94 \pm 0.79$	$5.58 \pm 0.80$
สัปดาห์ที่ 8	$6.89 \pm 0.60^d$	$8.78 \pm 0.80$	$5.56 \pm 0.75$
สัปดาห์ที่ 10	$6.60 \pm 0.40^{b,c}$	$9.12 \pm 1.35$	$5.78 \pm 0.41$
สัปดาห์ที่ 12	$6.28 \pm 0.72^{b,c}$	$9.06 \pm 0.60$	$6.33 \pm 0.85$
สัปดาห์ที่ 14	$6.09 \pm 0.43^{a,b}$	$8.58 \pm 0.70$	$5.87 \pm 0.58$
สัปดาห์ที่ 16	$6.11 \pm 0.60^b$	$8.89 \pm 0.64$	$5.36 \pm 0.28$

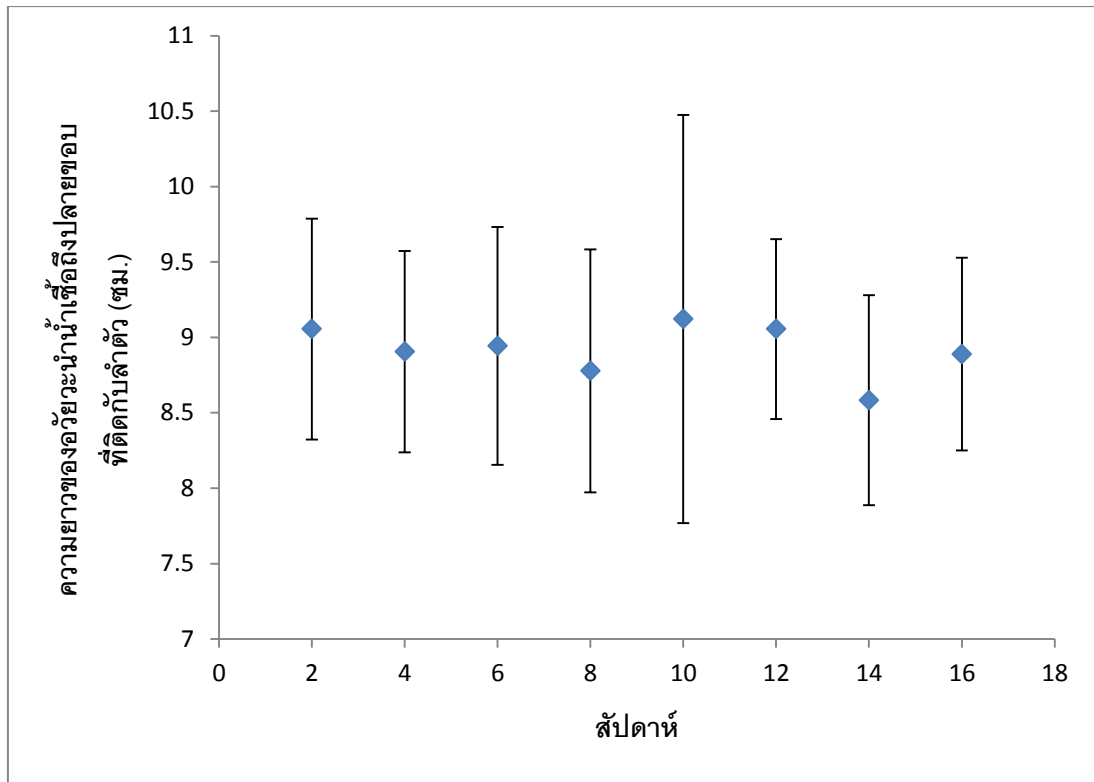
หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

ตารางที่ 5 ค่าร้อยละต่ำสุด ค่าร้อยละสูงสุด และค่าเฉลี่ยรวมของร้อยละของขนาดของอวัยวะนำน้ำเชื้อต่อความกว้างลำตัวของปลากระเบนเพศผู้

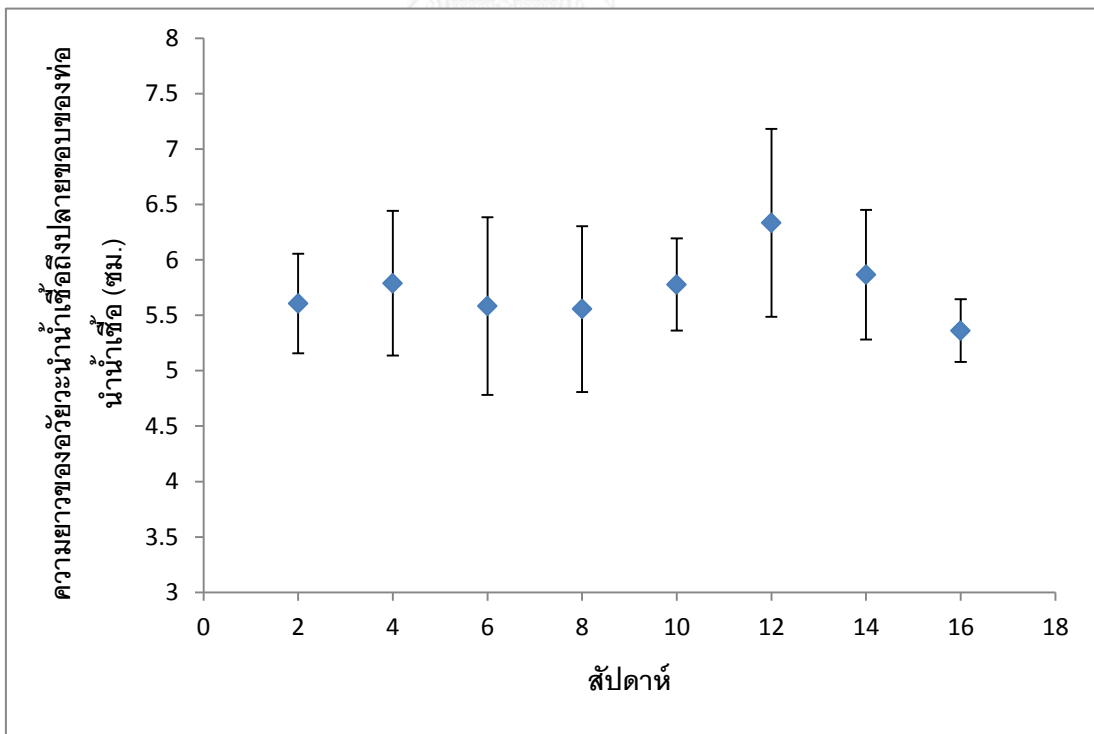
พารามิเตอร์	ร้อยละความยาวเส้นรอบวงต่อความกว้างลำตัว	ร้อยละความยาวจากปลายถึงขอบที่ติดกับลำตัวต่อความกว้างลำตัว	ร้อยละความยาวลำตัวจากปลายถึงขอบของท่อนำน้ำเชื้อ
ร้อยละต่ำสุด	13.82	20.00	11.63
ร้อยละสูงสุด	17.46	30.56	21.43
ค่าเฉลี่ยรวม	21.71±1.82	24.34±2.25	15.67±1.99



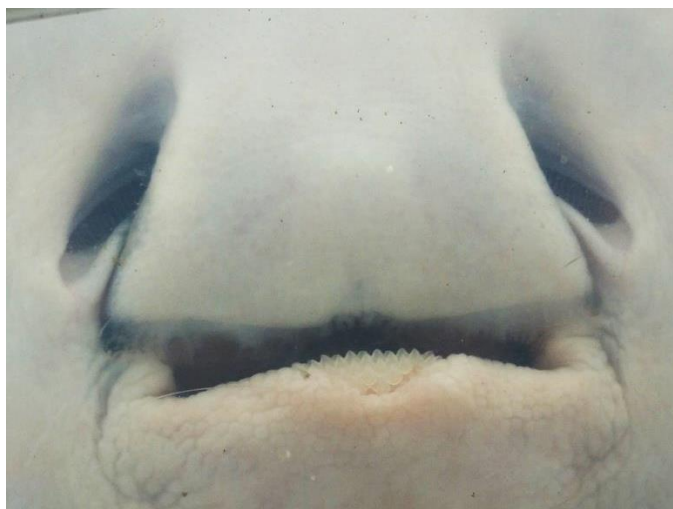
รูปที่ 12 ความยาวเส้นรอบวงของอวัยวะนำน้ำเชื้อของปลากระเบนเพศผู้



รูปที่ 13 ความยาวของอวัยวะนำน้ำเชื้อถึงปลายขอบที่ติดกับลำตัวของปลากระเบนเพศผู้



รูปที่ 14 ความยาวของอวัยวะนำน้ำเชื้อถึงปลายขอบของท่อนำน้ำเชื้อของปลากระเบนเพศผู้



รูปที่ 15 รูปแบบของฟันที่มีลักษณะเป็นติ่งแหลม (cuspidate form) ของปลากะเบนเพศผู้

#### 4.1.2 ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลากะเบนโดยการอัลตราซาวด์

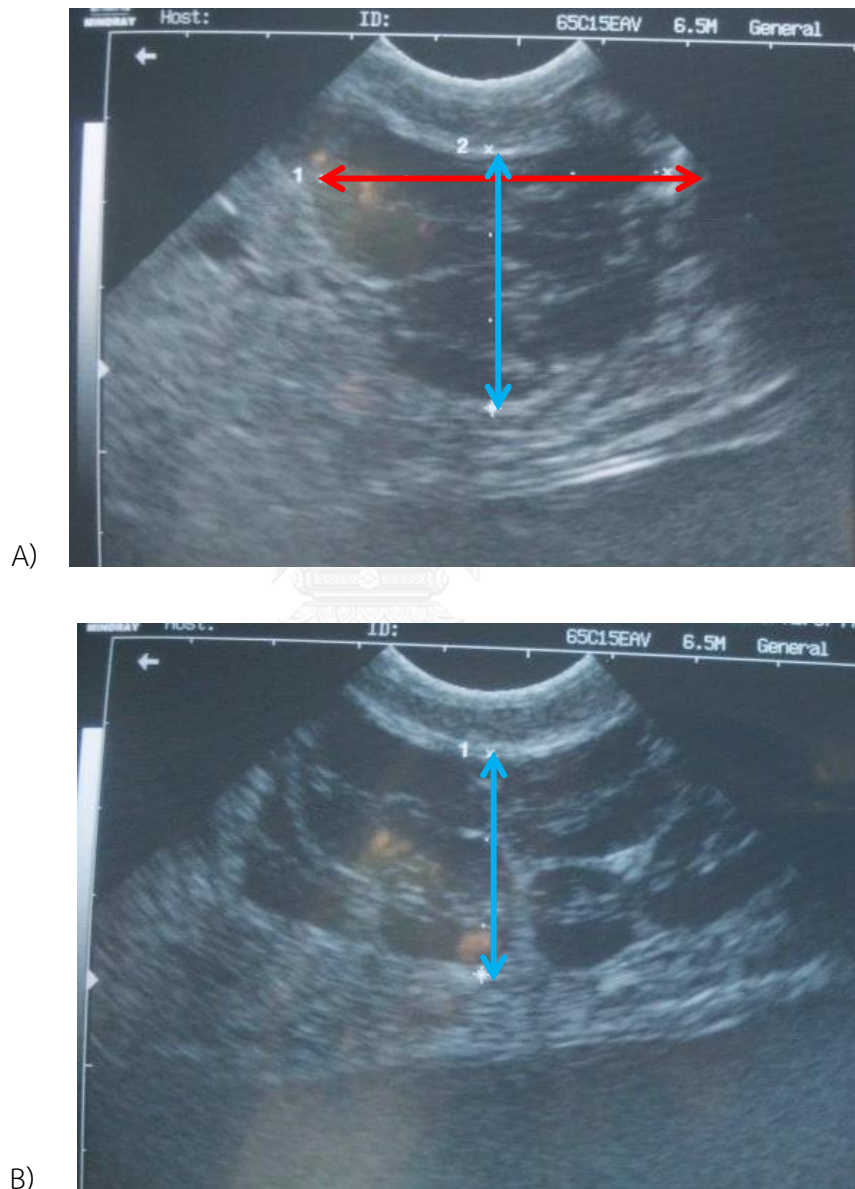
##### 4.1.2.1 ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลากะเบนเพศเมียโดยการอัลตราซาวด์

จากการอัลตราซาวด์รังไข่ พบว่าไม่ปรากฏเยื่อหุ้มรังไข่ชัดเจน บริเวณรังไข่มีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อที่สะท้อนคลื่นเสียงน้อย (hypoechoic) ส่วนที่ไม่มีไข่จะมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (homogenous texture) เมื่อเทียบกับบริเวณโดยรอบ (รูปที่ 16)

รูปร่างของรังไข่ในปลากะเบนที่พบโดยการอัลตราซาวด์ พบว่ามีรูปร่างยาว และเป็นทรงรี ช่วงที่ทำการทดลองมีความกว้างเฉลี่ยรวม ความยาวเฉลี่ยรวม และความลึกเฉลี่ยรวม เท่ากับ  $33.49 \pm 8.82$  มิลลิเมตร  $8.11 \pm 1.99$  เซนติเมตร และ  $23.74 \pm 8.61$  มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยมีพิสัยความกว้าง 14.77-56.70 มิลลิเมตร พิสัยความยาว 3.5-13.5 เซนติเมตร และมีพิสัยความลึก 6.39-39.50 มิลลิเมตร มีปริมาตรรังไข่ที่ประเมินโดยการอัลตราซาวด์เฉลี่ยรวม  $74.84 \pm 59.83$  ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยมีพิสัยของปริมาตร 6.50-318.32 ลูกบาศก์เซนติเมตร

ในรังไข่มีการเจริญของฟอลลิเคิลที่มีขนาดแตกต่างกัน แสดงโครงสร้างคล้ายถุงน้ำ (cystic structure) ทรงกลม ภายในมีการสะท้อนคลื่นเสียงต่ำ (anechoic) และมีขอบที่แสดงการสะท้อนคลื่นเสียงได้เล็กน้อย (hypoechoic rim) ชัดเจน (รูปที่ 17) อย่างไรก็ตามพบการเจริญของรังไข่ และพบฟอลลิเคิลเฉพาะในรังไข่ด้านซ้ายเท่านั้น ส่วนรังไข่ด้านขวาไม่สามารถแยกได้ชัดเจน จากการอัลตราซาวด์ เส้นผ่าศูนย์กลางของโดมิแนนท์ฟอลลิเคิลมีค่าเฉลี่ยรวม  $19.63 \pm 7.14$  มิลลิเมตร มีพิสัย 5 - 35.9 มิลลิเมตร (ตารางที่ 6)

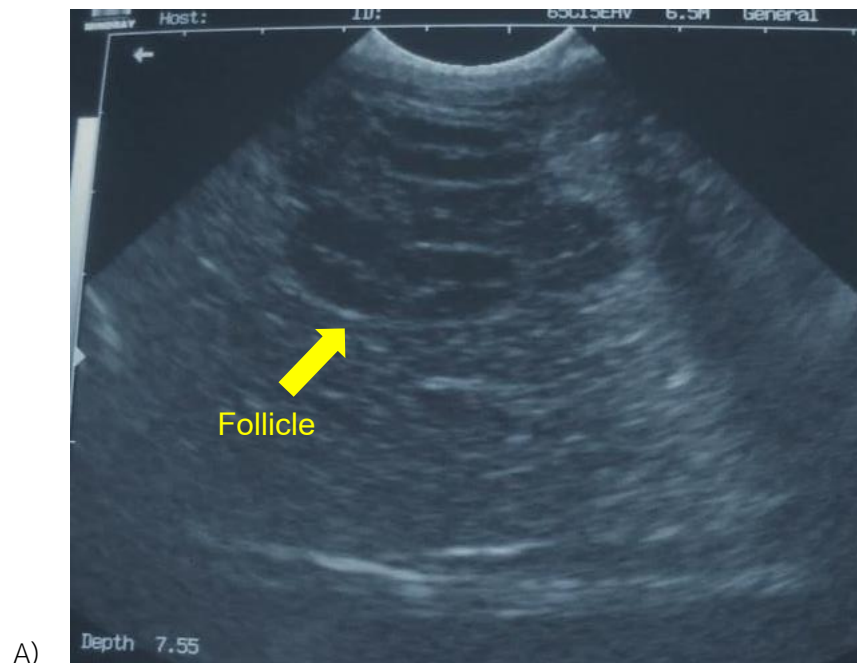
ปริมาตรรังไข่ (ovary volume) ที่ประเมินโดยการอัลตราซาวด์ของปลากระเบนเพศเมียนั้นมีความแปรปรวนสูง และไม่พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p>0.05$ ) เช่นเดียวกับเส้นผ่าศูนย์กลางของโดมิแนนท์ฟอลลิเคิล (diameter of dominant follicle) (ตารางที่ 6; รูปที่ 18 และ 19)



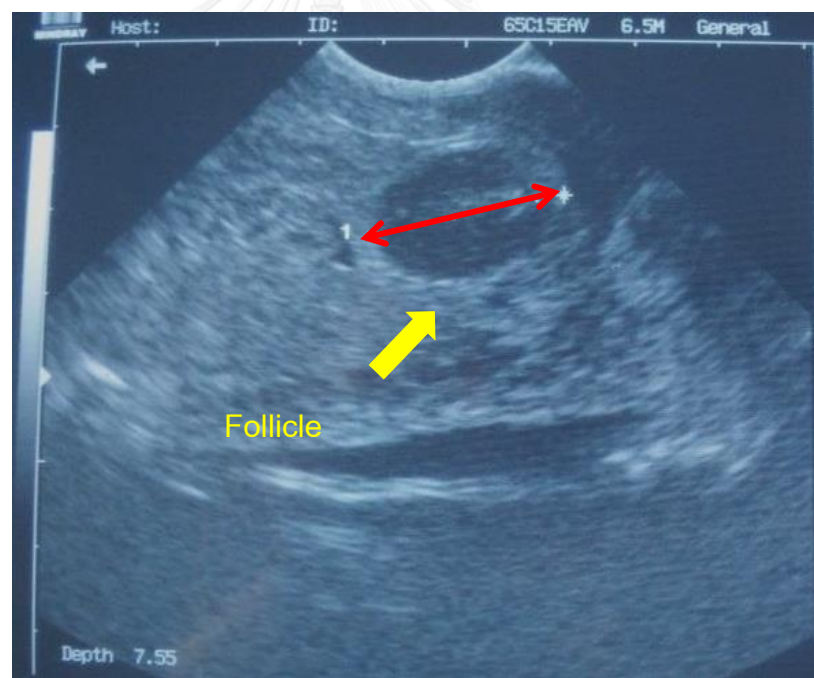
**รูปที่ 16** ภาพอัลตราซาวด์รังไข่ด้านซ้ายของปลากระเบนเพศเมียซึ่งประกอบด้วยฟอลลิเคิล

- A) การวัดความกว้าง (ลูกศรสีแดง) และความลึก (ลูกศรสีฟ้า) ของรังไข่ด้วยการวางหัวตรวจตัดขวาง  
 B) การวัดความลึก (ลูกศรสีฟ้า) ด้วยการวางหัวตรวจตามแนวยาว





A)



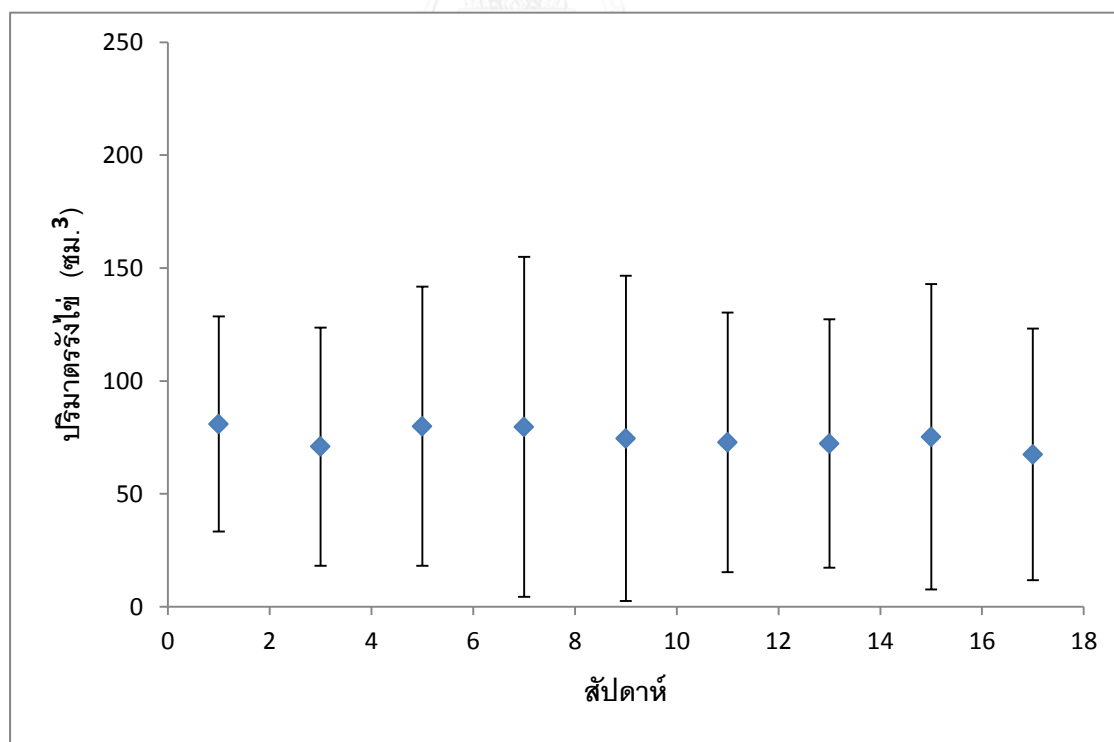
B)

รูปที่ 17 ภาพอัลตราซาวด์ฟอลลิเคิล (ลูกศรสีเหลือง) ในรังไข่ด้านซ้ายของปลากระเบนเพศเมีย

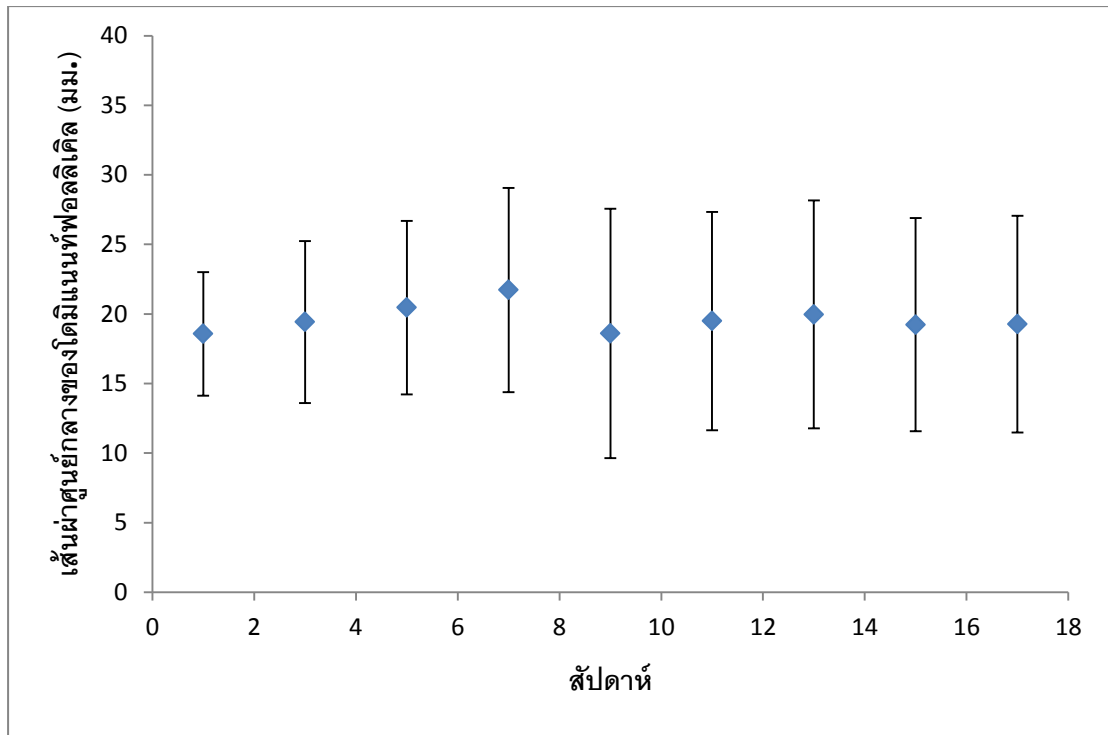
A) ฟอลลิเคิลขนาดแตกต่างกันเมื่อวางหัวตรวจตัดขวาง B) การวัดความกว้างฟอลลิเคิล (ลูกศรสีแดง)

ตารางที่ 6 ปริมาตรรังไข่และเส้นผ่าศูนย์กลางของโคมิแนนท์ฟอลลิเคิลของปลากระเบนเพศเมีย (n=18)

สัปดาห์	ปริมาตรรังไข่ (ซม. <sup>3</sup> )	เส้นผ่าศูนย์กลางของ โคมิแนนท์ฟอลลิเคิล (มม.)
สัปดาห์ที่ 1	80.92±47.63	18.57±4.44
สัปดาห์ที่ 3	70.88±52.80	19.43±5.82
สัปดาห์ที่ 5	79.89±61.81	20.46±6.24
สัปดาห์ที่ 7	79.62±75.26	21.64±7.54
สัปดาห์ที่ 9	74.53±72.04	18.60±8.96
สัปดาห์ที่ 11	72.74±57.48	19.49±7.85
สัปดาห์ที่ 13	72.26±55.01	19.97±8.19
สัปดาห์ที่ 15	75.22±67.61	19.23±7.66
สัปดาห์ที่ 17	67.46±55.66	19.27±7.80



รูปที่ 18 ปริมาตรรังไข่ของปลากระเบนเพศเมีย

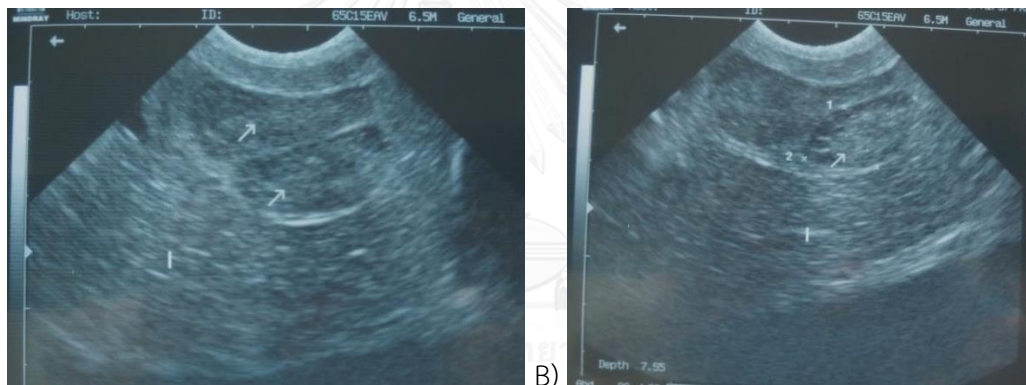


รูปที่ 19 เส้นผ่าศูนย์กลางของโดมิแนนท์ฟอลลิเคิล

ภายในรังไข่ยังปรากฏไข่ที่มีลักษณะฝ่อ (atresia follicle) รูปร่างไม่ชัดเจนมีขอบหนาตัว (thickening rim) และขรุขระ (irregular rim) (รูปที่ 20 และ รูปที่ 22) นอกจากนี้ยังพบโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายคอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum-like structure) มีการสะท้อนคลื่นเสียงน้อยบริเวณตรงกลาง (hypoechoic center) และมีการสะท้อนคลื่นเสียงต่ำบริเวณโดยรอบ (anechoic surrounding) (รูปที่ 21 และ 22) อย่างไรก็ตามโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายคอร์ปัสลูเทียมที่พบโดยการอัลตราซาวด์นั้นมีความแตกต่างกันในแต่ละสัปดาห์ โดยสัปดาห์ที่ 1 ของการทดลองไม่พบโครงสร้างนี้ในปลากระเบนเพศเมียที่ทำการทดลอง หลังจากนั้นเริ่มพบโครงสร้างดังกล่าวในสัปดาห์ที่ 3 โดยพบว่ามีส่วนความถี่สูงสุดในสัปดาห์ที่ 9 และมีสัดส่วนที่แปรปรวนจนสิ้นสุดการทดลองตามสัดส่วนที่แสดงในรูปที่ 23

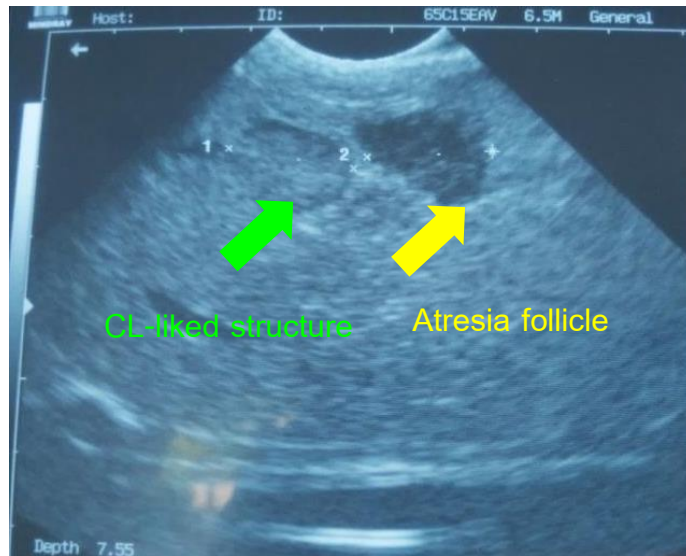


รูปที่ 20 ภาพอัลตราซาวด์แสดงไข่ที่มีลักษณะฝ่อ (atresia follicle)

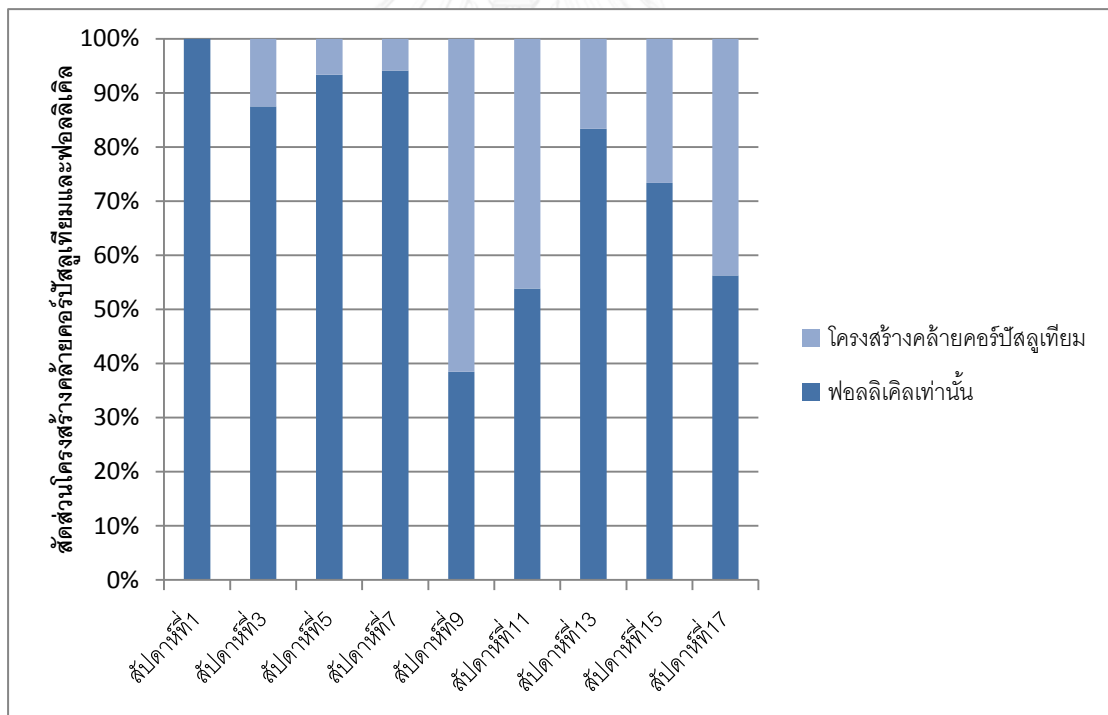


รูปที่ 21 ภาพอัลตราซาวด์แสดงโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายคอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum-like structure)

A) และ B) ไข่ที่มีลักษณะขาวขุ่นขนาดใหญ่ มีการสะท้อนคลื่นเสียงต่ำโดยรอบ (anechoic surrounding) ลูกศร; มีการสะท้อนคลื่นเสียงน้อยบริเวณตรงกลาง (hypoechoic center)



รูปที่ 22 ภาพอัลตราซาวด์เปรียบเทียบโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายคอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum-like structure) (ซ้าย) และไข่ที่มีลักษณะฝ่อ (atresia follicle) (ขวา)



รูปที่ 23 สัดส่วนจำนวนปลากระเบนเพศเมียที่พบโครงสร้างคล้ายคอร์ปัสลูเทียมและฟอลลิเคิลในแต่ละสัปดาห์

มดลูกของปลากระเบนเพศเมียที่พบจากการอัลตราซาวด์มีลักษณะเป็นท่อ มีผนังหนาเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous) แต่ไม่ปรากฏขอบเขตที่ชัดเจนมากนัก (รูปที่ 24) ช่วงที่ทำการทดลองมีเส้นผ่าศูนย์กลางตามแนวตั้งเฉลี่ยรวม  $5.81 \pm 1.79$  มิลลิเมตร โดยมีพิสัย 2.3-14 มิลลิเมตร

ด้านในของผนังมดลูกปรากฏเนื้อเยื่อผนังมดลูกซึ่งมีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อที่ยื่นออกมาคล้ายวิลโล (villi) เรียกว่า โทรโฟนีมาตา (trophonemata) (รูปที่ 24) ซึ่งในช่วงที่ทำการทดลองมีความยาวเฉลี่ยรวม  $2.49 \pm 0.84$  มิลลิเมตร โดยมีพิสัย 1-5.5 มิลลิเมตร

รูปร่างของมดลูกส่วนปลายโดยการอัลตราซาวด์นั้นมีความหลากหลาย โดยผู้ทำการทดลองได้แบ่งลักษณะของมดลูกส่วนปลายที่พบ ออกเป็น 4 ระดับตามขนาดและรูปร่างของมดลูก และความยาวและการเคลื่อนไหวของเนื้อเยื่อผนังมดลูก ดังตารางที่ 7 และ รูปที่ 25 อย่างไรก็ตาม ปลากระเบนเพศเมียมีระดับของมดลูกส่วนปลายที่พบโดยการอัลตราซาวด์ค่อนข้างหลากหลาย โดยสัปดาห์ที่ 1 ของการทดลองพบว่า จำนวนกระเบนที่มีระดับของมดลูกส่วนปลายที่ระดับ 1 มีความถี่ในสัดส่วนสูงสุดในสัปดาห์ที่ 1 และ 5 ในสัปดาห์ที่ 3 พบว่าจำนวนกระเบนที่มีระดับ 0 มีสัดส่วนความถี่สูงสุด และในสัปดาห์ที่ 5-17 นั้นพบว่าระดับของมดลูกส่วนปลายนั้นมีความแปรปรวนสูงตามสัดส่วนที่แสดงในรูปที่ 26

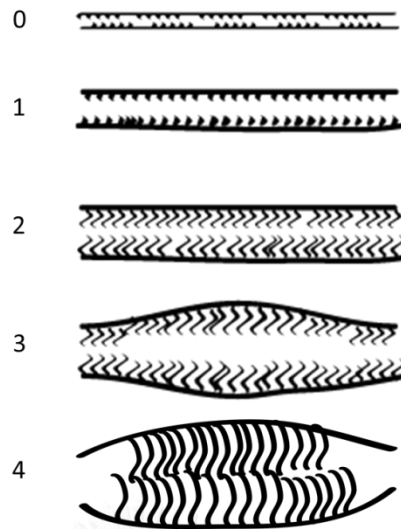
เส้นผ่าศูนย์กลางตามแนวตั้งของมดลูก (vertical diameter of uterus) ของปลากระเบนเพศเมียในช่วงที่ทำการทดลอง พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยพบว่ามีเส้นผ่าศูนย์กลางตามแนวตั้งของมดลูกนั้นมีความกว้างสูงสุดในช่วงสัปดาห์ที่ 9 (ตารางที่ 8; รูปที่ 27) ในขณะที่ความยาวของเนื้อเยื่อผนังมดลูก (length of trophonemata) นั้นไม่พบว่ามี ความแตกต่างกันระหว่างสัปดาห์ตลอดช่วงการทดลอง (ตารางที่ 8; รูปที่ 28)



**รูปที่ 24** ภาพอัลตราซาวด์แสดงมดลูกส่วนปลายและเนื้อเยื่อผนังมดลูกของปลากระเบนเพศเมียเมื่อวางหัวตรวจตัดขวาง

**ตารางที่ 7** การแบ่งระดับของลักษณะของมดลูกส่วนปลายที่พบโดยการอัลตราซาวด์

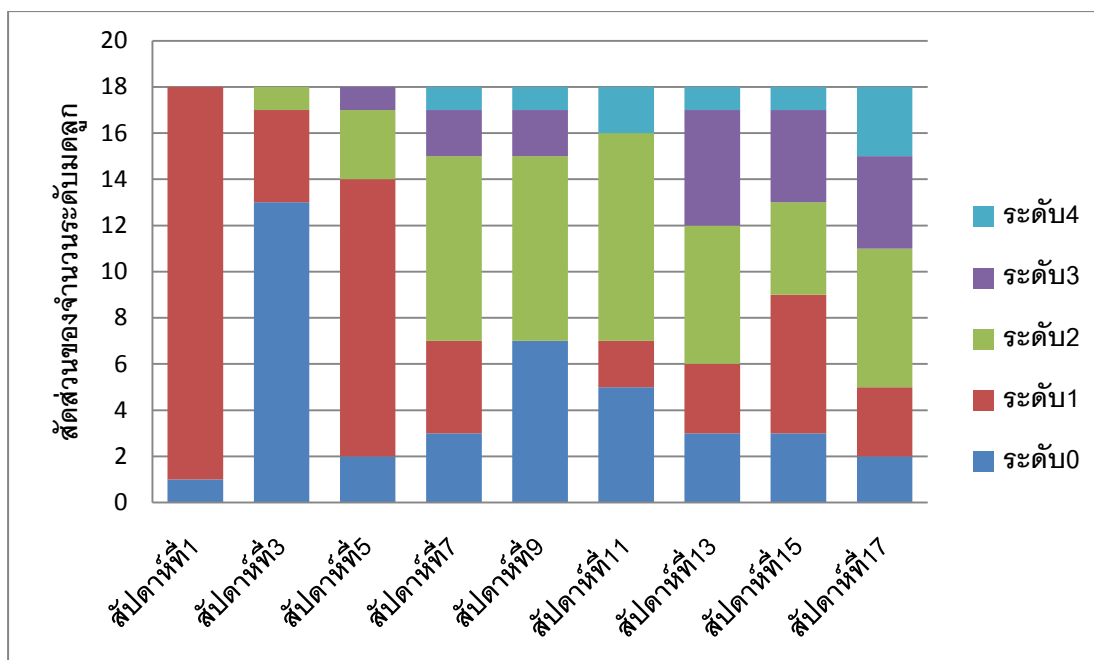
ระดับ	ลักษณะของมดลูกส่วนปลายที่พบโดยการอัลตราซาวด์
<b>ระดับ 0</b>	มดลูกมีขนาดเล็ก รูปร่างเป็นท่อแคบ ผนังมดลูกทั้งสองด้านขนานกัน เนื้อเยื่อผนังมดลูกสั้น และไม่มีการเคลื่อนไหวของเนื้อเยื่อผนังมดลูก
<b>ระดับ 1</b>	มดลูกมีขนาดค่อนข้างเล็ก ผนังมดลูกทั้งสองด้านขนานกัน เนื้อเยื่อผนังมดลูกสั้น และมีการเคลื่อนไหวของเนื้อเยื่อผนังมดลูก
<b>ระดับ 2</b>	มดลูกมีขนาดค่อนข้างใหญ่เห็นได้ชัดเจน ผนังมดลูกทั้งสองด้านขนานกัน สังเกตเห็นเนื้อเยื่อผนังมดลูกได้ชัดเจน และมีการเคลื่อนไหวของเนื้อเยื่อผนังมดลูก
<b>ระดับ 3</b>	มดลูกมีขนาดใหญ่ ผนังมดลูกทั้งสองข้างไม่ขนานกัน เนื้อเยื่อผนังมดลูกค่อนข้างยาว และมีการเคลื่อนไหวของเนื้อเยื่อผนังมดลูก
<b>ระดับ 4</b>	มดลูกมีขนาดใหญ่ ผนังมดลูกทั้งสองข้างไม่ขนานกัน เนื้อเยื่อผนังมดลูกข้างยาวเป็น $\frac{1}{2}$ ของความกว้างของมดลูก และมีการเคลื่อนไหวของเนื้อเยื่อผนังมดลูก



**รูปที่ 25** รูปวาดแสดงลักษณะของมดลูกส่วนปลายที่พบโดยการอัลตราซาวด์ในระดับต่างๆ

0 = มดลูกมีขนาดเล็ก รูปร่างเป็นท่อแคบ ผนังมดลูกทั้งสองด้านขนานกัน เนื้อเยื่อผนังมดลูกสั้น และไม่มีการเคลื่อนไหวของเนื้อเยื่อผนังมดลูก; 1 = มดลูกมีขนาดค่อนข้างเล็ก ผนังมดลูกทั้งสองด้านขนานกัน เนื้อเยื่อผนังมดลูกสั้น และมีการเคลื่อนไหวของเนื้อเยื่อผนังมดลูก; 2 = มดลูกมีขนาดค่อนข้างใหญ่เห็นได้ชัดเจน ผนังมดลูกทั้งสองด้านขนานกัน สังเกตเห็นเนื้อเยื่อผนังมดลูกได้ชัดเจน และมีการเคลื่อนไหวของเนื้อเยื่อผนังมดลูก; 3 = มดลูกมีขนาดใหญ่ ผนังมดลูกทั้งสองข้างไม่ขนานกัน เนื้อเยื่อผนังมดลูกค่อนข้างยาว และมีการเคลื่อนไหวของเนื้อเยื่อผนังมดลูก; 4 = มดลูกมีขนาดใหญ่ ผนังมดลูกทั้งสองข้างไม่ขนานกัน เนื้อเยื่อผนังมดลูกยาวเป็น  $\frac{1}{2}$  ของความกว้างมดลูก และมีการเคลื่อนไหวของเนื้อเยื่อผนังมดลูก



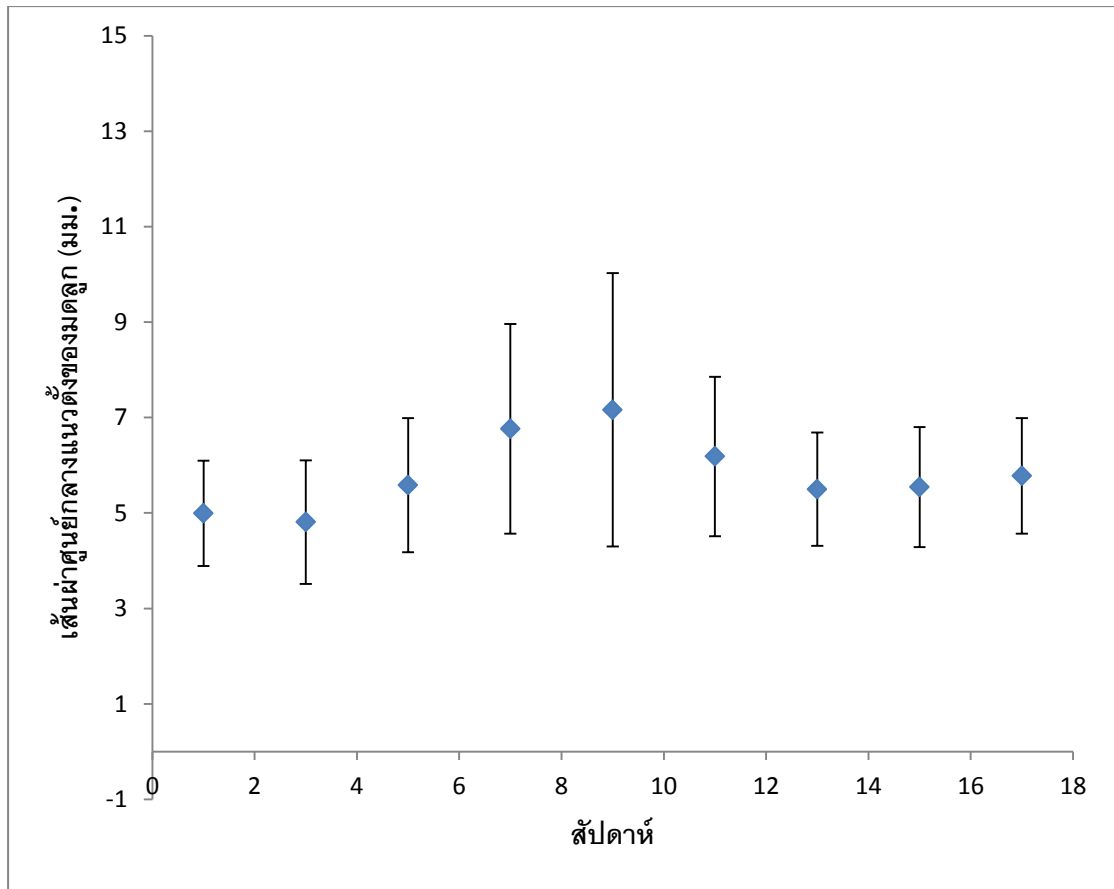


รูปที่ 26 ส่วนจำนวนปลากะเบนเทศเมียที่มีระดับของรูปร่างตัดตามแนวยาวของมดลูกในแต่ละสัปดาห์

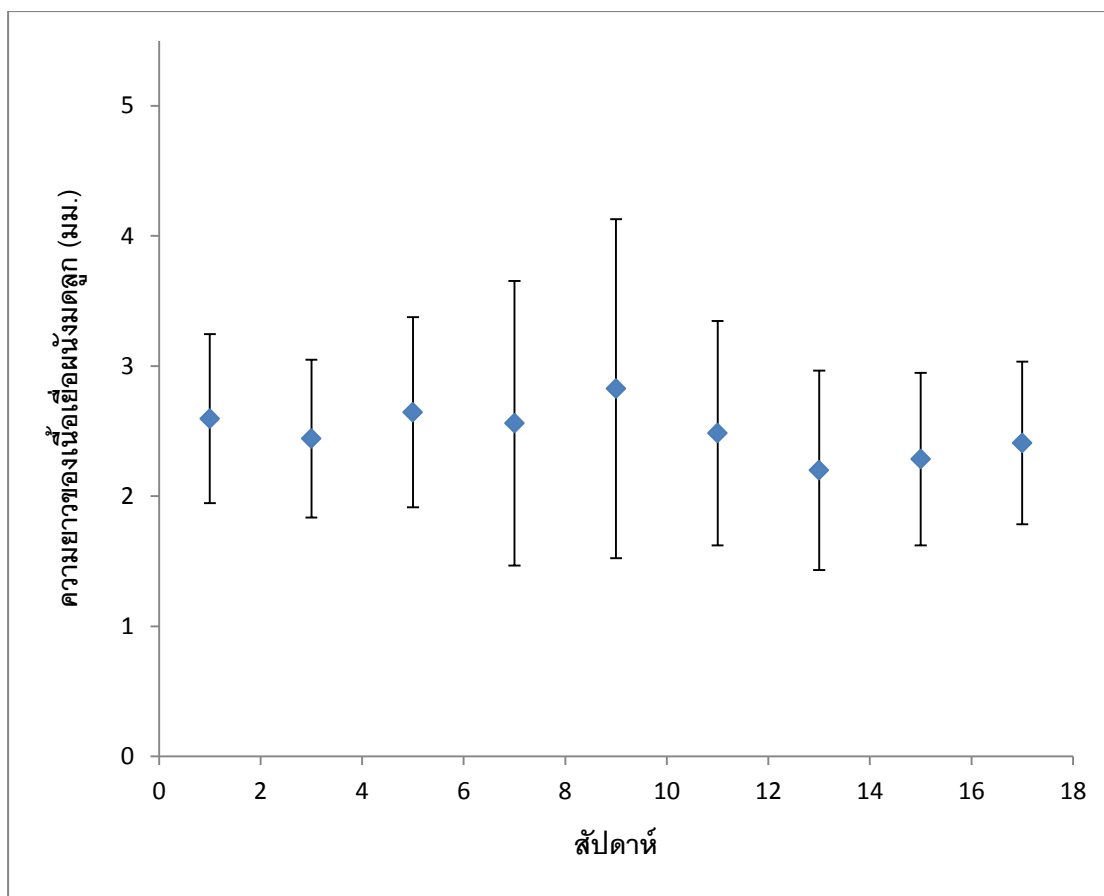
ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเส้นผ่าศูนย์กลางแนวตั้งของมดลูก และความยาวของเนื้อเยื่อผนังมดลูกของปลากะเบนเทศเมีย (n=18)

สัปดาห์	เส้นผ่าศูนย์กลางแนวตั้งของมดลูก (มม.)	ความยาวของเนื้อเยื่อผนังมดลูก (มม.)
สัปดาห์ที่ 1	4.99±1.10 <sup>a,b</sup>	2.60±0.65
สัปดาห์ที่ 3	4.81±1.29 <sup>a</sup>	2.44±0.61
สัปดาห์ที่ 5	5.58±1.40 <sup>a,b,c</sup>	2.64±0.73
สัปดาห์ที่ 7	6.76±2.20 <sup>c,d</sup>	2.56±1.09
สัปดาห์ที่ 9	7.16±2.86 <sup>d</sup>	2.83±1.30
สัปดาห์ที่ 11	6.18±1.67 <sup>b,c,d</sup>	2.48±0.86
สัปดาห์ที่ 13	5.50±1.19 <sup>a,b</sup>	2.20±0.77
สัปดาห์ที่ 15	5.54±1.26 <sup>a,b,c</sup>	2.28±0.66
สัปดาห์ที่ 17	5.78±1.21 <sup>a,b,c</sup>	2.41±0.63

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)



รูปที่ 27 เส้นผ่าศูนย์กลางกึ่งกลางแนวตั้งของมดลูกของปลากระเบนเพศเมีย



รูปที่ 28 ความยาวของเนื้อเยื่อผนังมดลูกของปลากระเบนเพศเมีย

#### 4.1.2.2 ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลากระเบนเพศผู้โดยการอัลตราซาวด์

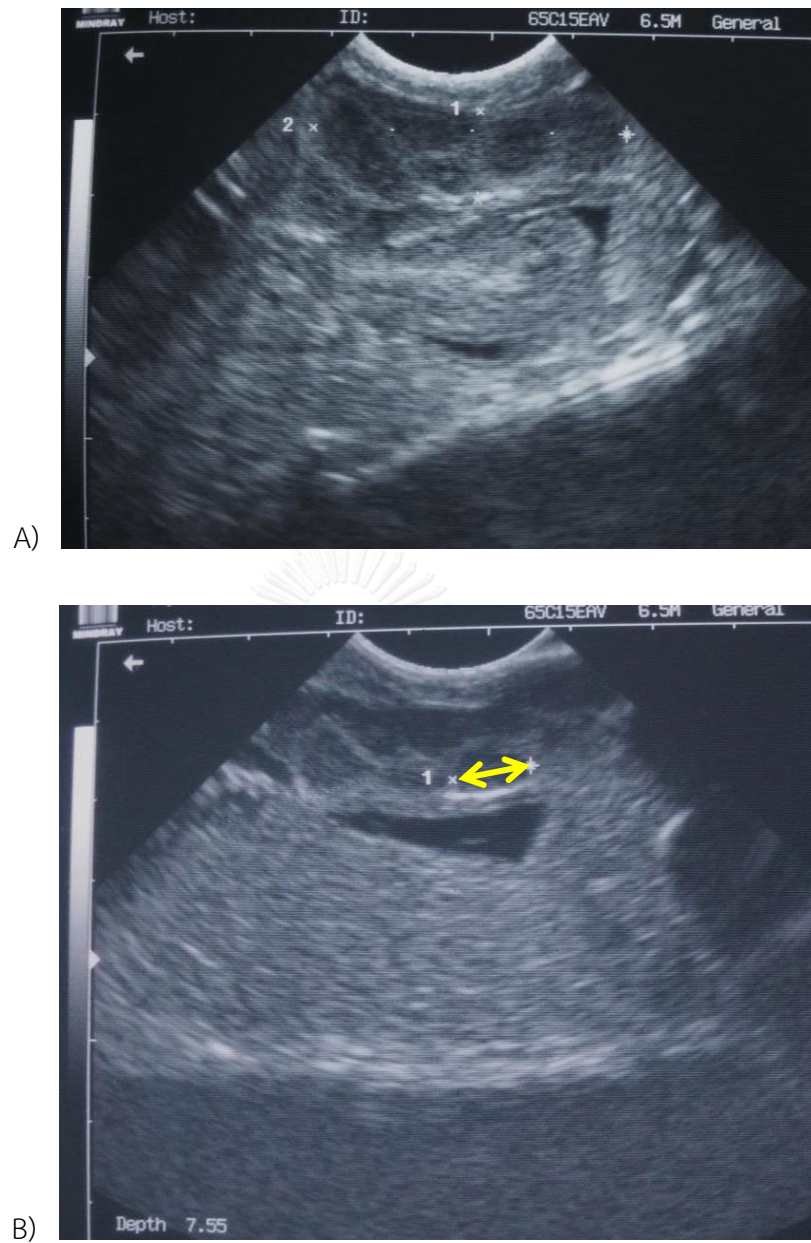
รูปร่างของอวัยวะในปลากระเบนเพศผู้ที่พบโดยการอัลตราซาวด์ พบว่ามีขอบเขตของเยื่อหุ้มค่อนข้างชัดเจน มีรูปร่างยาว และเป็นทรงแท่ง ช่วงที่ทำการทดลองมีความกว้างเฉลี่ยรวม ความยาวเฉลี่ยรวม และความลึกเฉลี่ยรวมเท่ากับ  $27.84 \pm 5.5$  มิลลิเมตร  $8.26 \pm 1.29$  เซนติเมตร และ  $19.12 \pm 4.13$  มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยมีพิสัยความกว้าง 13.90-37.83 มิลลิเมตร พิสัยความยาว 5-11 เซนติเมตร และมีพิสัยความลึก 11.9-28.37 มิลลิเมตร มีปริมาตรอวัยวะที่ประเมินอย่างหยาบโดยการอัลตราซาวด์เท่ากับ  $48.78 \pm 20.48$  ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยมีพิสัยของปริมาตร 12.19-103.64 ลูกบาศก์เซนติเมตร

อวัยวะทั้งสองด้านของปลากระเบนเพศผู้วางตำแหน่งห่างจากกระดูกเชิงกราน (pelvic girdle) ตั้งแต่ 0-5.5 เซนติเมตร และทอดยาวไปจนถึงสุดปลายกระดูกอก (pectoral girdle) ปรากฏเยื่อหุ้มอวัยวะ (epigonial organ) มีลักษณะการสะท้อนคลื่นเสียงปานกลาง (dense

echoic) ภายในอณฑะพบว่าการจัดเรียงตัวของท่อมินิเฟอร์สเป็นวงกลมที่มีขนาดใกล้เคียงกันอยู่ภายในเยื่อหุ้มชัดเจน กลีบย่อยนี้มีการสะท้อนคลื่นเสียงต่ำ (anechoic) โดยมีเนื้ออณฑะที่มีการสะท้อนคลื่นเสียงน้อยและมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (homogenous hypoechoic) ล้อมรอบ (รูปที่ 29)

การอัลตราซาวด์ท่อเซมินอลเวซิเคิลของปลากระเบนเพศผู้ทำได้โดยการวางหัวตรวจด้านบนของปลากระเบนบริเวณทั้งด้านซ้ายและขวาตั้งฉากกับกระดูกสันหลังส่วนท้ายที่ 6-10 (6<sup>th</sup>-10<sup>th</sup> precaudal vertebrae) จะพบท่อเซมินอลเวซิเคิลวางตัวชิดกับแนวกระดูกสันหลัง โดยท่อเซมินอลเวซิเคิลนี้เป็นท่อทรงกลมที่มีขอบเขตชัดเจน มีผนังบางที่สะท้อนคลื่นเสียงปานกลาง (dense echoic) และพับเรียงตัวซ้อนกัน 2-4 ชั้น โดยภายในมีการสะท้อนคลื่นเสียงต่ำ (anechoic) (รูปที่ 30)

ปริมาตรอณฑะ (testis volume) ที่ประเมินโดยการอัลตราซาวด์เส้นผ่าศูนย์กลางของกลีบของท่อเซมินิเฟอร์ส (transverse diameter of seminiferous lobe) และเส้นผ่าศูนย์กลางของท่อเซมินอลเวซิเคิล (transverse diameter of seminal vesicle) ของปลากระเบนเพศผู้ที่มีความแปรปรวน และไม่พบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) (ตารางที่ 9; รูปที่ 31, รูปที่ 32 และ รูปที่ 33)



รูปที่ 29 ภาพอัลตราซาวด์อันทะของปลากระเบนเพศผู้

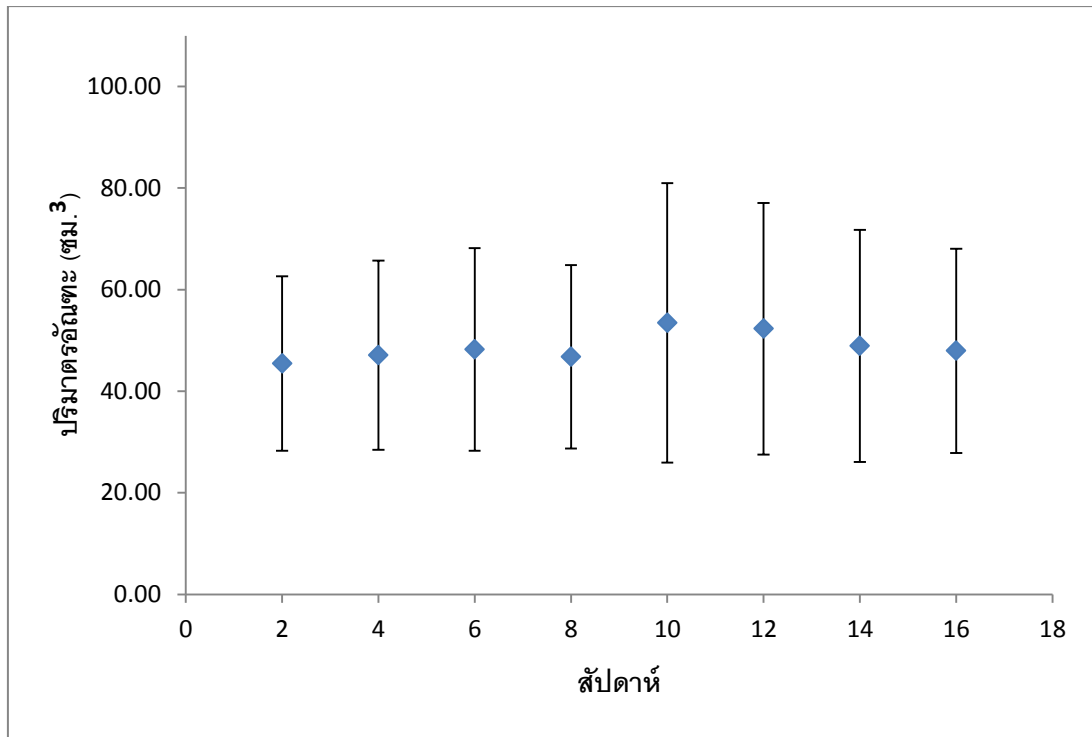
A) อันทะของปลากระเบนเพศผู้ตัดตามขวาง และ 1,2 แสดงการวัดความลึกและความกว้างตามลำดับ; B) อันทะของปลากระเบนเพศผู้ตัดตามขวาง และ แสดงการวัดความกว้าง (ลูกศรสีเหลือง) ของกลีบของท่อเซมินิเฟอรัส



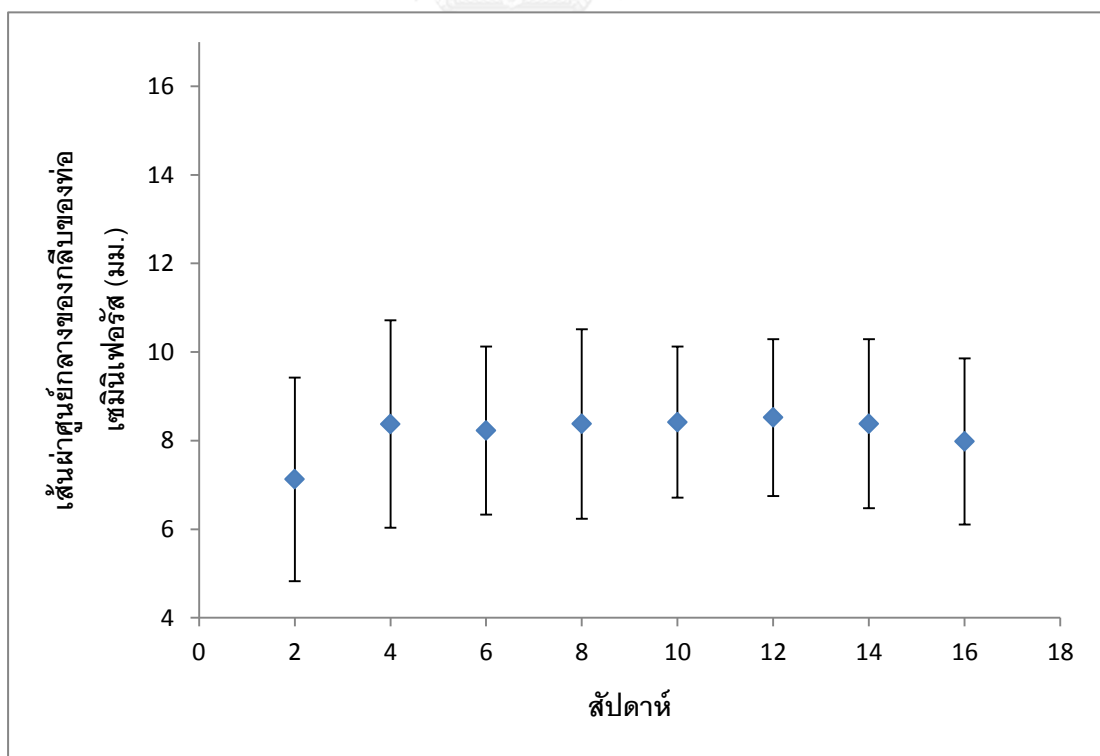
รูปที่ 30 ภาพอัลตราซาวด์ท่อนอิมินอลเวสเซลของปลากระเบนเพศผู้ และแสดงการวัดความกว้าง (ลูกศรสีเหลือง) ของกลีบของท่อนอิมินิเฟอร์ส

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานปริมาตรอันทะ เส้นผ่าศูนย์กลางของกลีบของท่อนอิมินิเฟอร์ส และเส้นผ่าศูนย์กลางของท่อนอิมินอลเวสเซล

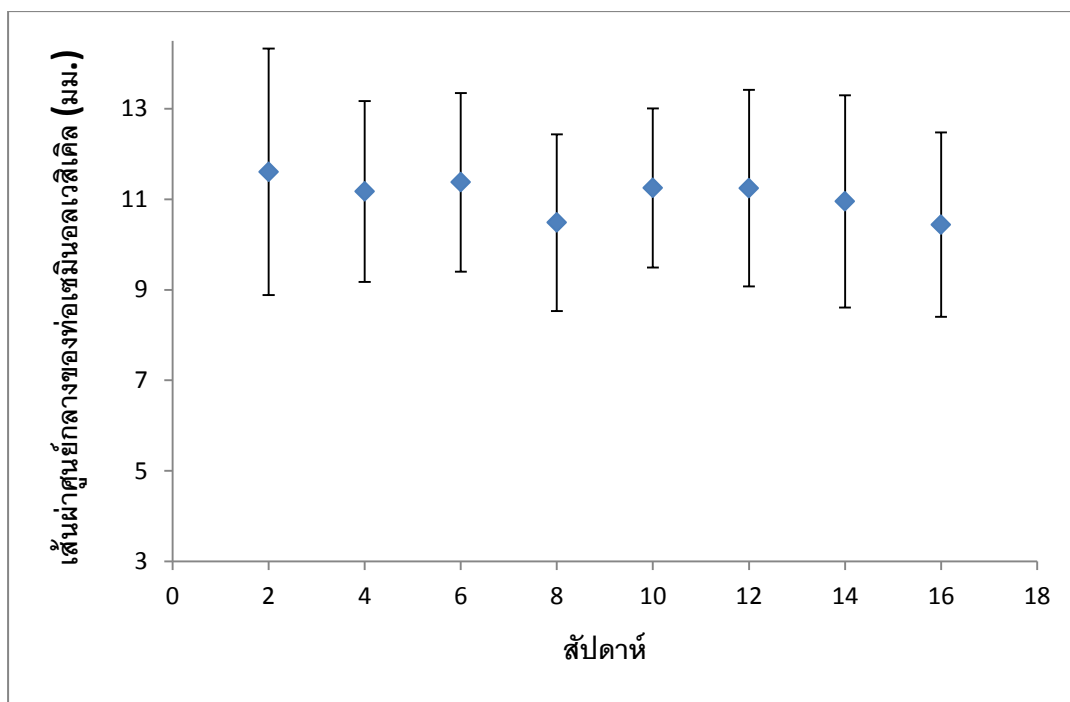
สัปดาห์	ปริมาตรอันทะ ( $\text{cm}^3$ )	เส้นผ่าศูนย์กลางของกลีบ ของท่อนอิมินิเฟอร์ส (มม.)	เส้นผ่าศูนย์กลางของท่อนอิมินอลเวสเซล (มม.)
สัปดาห์ที่ 2	45.45±17.15	7.13±2.30	11.60±2.72
สัปดาห์ที่ 4	47.11±18.62	8.37±2.34	11.17±1.99
สัปดาห์ที่ 6	48.25±19.96	8.22±1.90	11.37±1.97
สัปดาห์ที่ 8	46.76±18.07	8.38±2.14	10.48±1.95
สัปดาห์ที่ 10	53.48±27.52	8.42±1.71	11.25±1.76
สัปดาห์ที่ 12	52.30±24.78	8.52±1.77	11.24±2.17
สัปดาห์ที่ 14	48.93±22.83	8.38±1.91	10.95±2.34
สัปดาห์ที่ 16	47.96±20.12	7.98±1.88	10.44±2.04



รูปที่ 31 ปริมาตรน้ำของปลากระเบนเพศผู้



รูปที่ 32 เส้นผ่าศูนย์กลางของก้านของท่อเซมินิเฟอร์รัสของปลากระเบนเพศผู้



รูปที่ 33 เส้นผ่าศูนย์กลางกลางของท่อเซมินอลเวสิเคิลของปลากระเบนเพศผู้

#### 4.1.3 ระดับฮอร์โมนเพศในเลือดในปลากระเบน

##### 4.1.3.1 ระดับฮอร์โมนเพศในเลือดในปลากระเบนเพศเมีย

ค่าปริมาณความเข้มข้นพื้นฐาน (baseline concentration) ของระดับของฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดของปลากระเบนเพศเมีย มีค่าเฉลี่ยรวมตลอดการทดลอง  $0.73 \pm 0.51$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.03 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จนถึง 2.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาพบว่าแบบแผนของฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดของปลากระเบนเพศเมียในช่วงที่ทำการทดลองนั้นค่อนข้างแปรปรวนสูง มีการขึ้นลงสลับกัน โดยมีแนวโน้มที่แสดงถึงความแตกต่างของปริมาณฮอร์โมนในช่วงสัปดาห์ที่ 11 ที่สูงกว่าช่วงอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และมีแนวโน้มต่ำสุดในช่วงสัปดาห์ที่ 7 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (ตารางที่ 10; รูปที่ 34)

ค่าปริมาณความเข้มข้นพื้นฐาน (baseline concentration) ของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดของปลากระเบนเพศเมีย มีค่าเฉลี่ยรวมตลอดการทดลอง  $0.70 \pm 0.50$



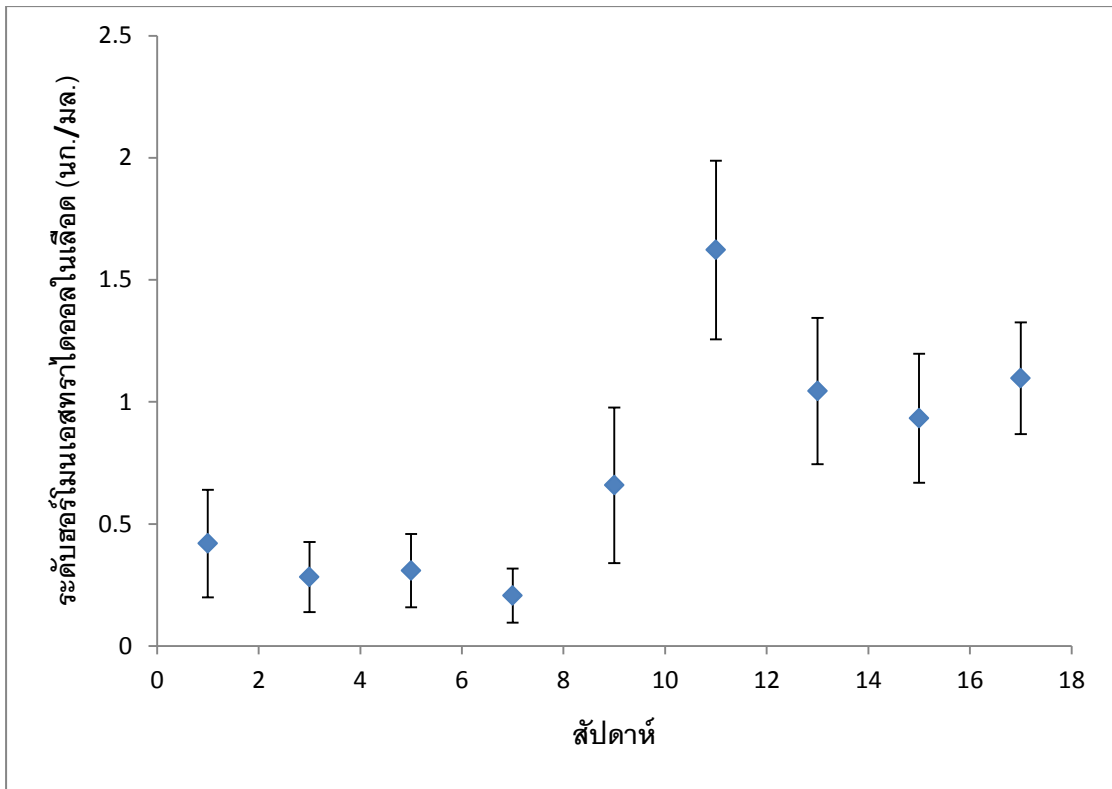
นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.04 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จนถึง 2.40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

แบบแผนของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดของปลากระเบนเพศเมียในช่วงที่ทำการทดลองนั้นค่อนข้างแปรปรวนเช่นเดียวกับฮอร์โมนเอสทราไดออล โดยมีแนวโน้มสูงสุดในช่วงต้นของการทดลอง (สัปดาห์ที่ 1, 3, 5 และ 7) และลดลงต่ำสุดในช่วงสัปดาห์ที่ 11 และ 15 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (ตารางที่ 10; รูปที่ 35)

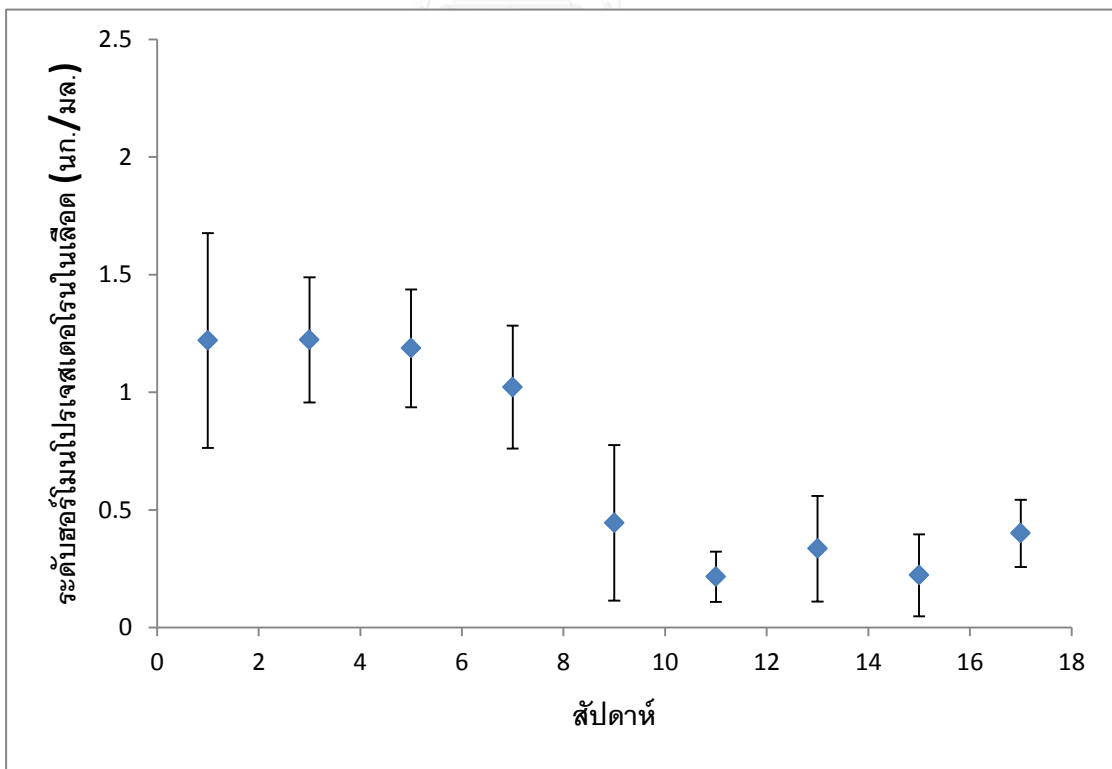
**ตารางที่ 10** ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับฮอร์โมนเอสทราไดออลและโปรเจสเตอโรนในเลือดในปลากระเบนเพศเมีย (n=18)

สัปดาห์	ระดับฮอร์โมน	
	เอสทราไดออล (นก./มล.)	โปรเจสเตอโรน (นก./มล.)
สัปดาห์ที่ 1	0.42±0.22 <sup>c</sup>	1.22±0.46 <sup>d</sup>
สัปดาห์ที่ 3	0.28±0.14 <sup>b</sup>	1.22±0.27 <sup>d</sup>
สัปดาห์ที่ 5	0.31±0.15 <sup>b</sup>	1.19±0.25 <sup>d</sup>
สัปดาห์ที่ 7	0.21±0.11 <sup>a</sup>	1.02±0.26 <sup>c</sup>
สัปดาห์ที่ 9	0.66±0.32 <sup>d</sup>	0.44±0.33 <sup>b</sup>
สัปดาห์ที่ 11	1.62±0.37 <sup>g</sup>	0.22±0.11 <sup>a</sup>
สัปดาห์ที่ 13	1.04±0.30 <sup>f</sup>	0.34±0.22 <sup>b</sup>
สัปดาห์ที่ 15	0.99±0.42 <sup>e</sup>	0.22±0.17 <sup>a</sup>
สัปดาห์ที่ 17	1.10±0.23 <sup>f</sup>	0.40±0.14 <sup>b</sup>

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



รูปที่ 34 ระดับฮอร์โมนเอสทราไดอลในเลือดในปลากระเบนเทศเมีย



รูปที่ 35 ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดในปลากระเบนเทศเมีย

#### 4.1.3.2 ระดับฮอร์โมนเพศในเลือดในปลากระเบนเพศผู้

ค่าปริมาณความเข้มข้นพื้นฐาน (baseline concentration) ของระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในเลือดของปลากระเบนเพศผู้ มีค่าเฉลี่ยรวมตลอดการทดลอง  $513.62 \pm 395.05$  พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีความเข้มข้นตั้งแต่ 74.821 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร จนถึง 1588.4 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาพบว่าแบบแผนของของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในเลือดของปลากระเบนเพศผู้ในช่วงที่ทำการทดลองนั้น ปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนมีแนวโน้มต่ำในช่วงต้นของการทดลอง (สัปดาห์ที่ 2, 4 และ 6) ก่อนเพิ่มขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 10 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (ตารางที่ 11; รูปที่ 36)

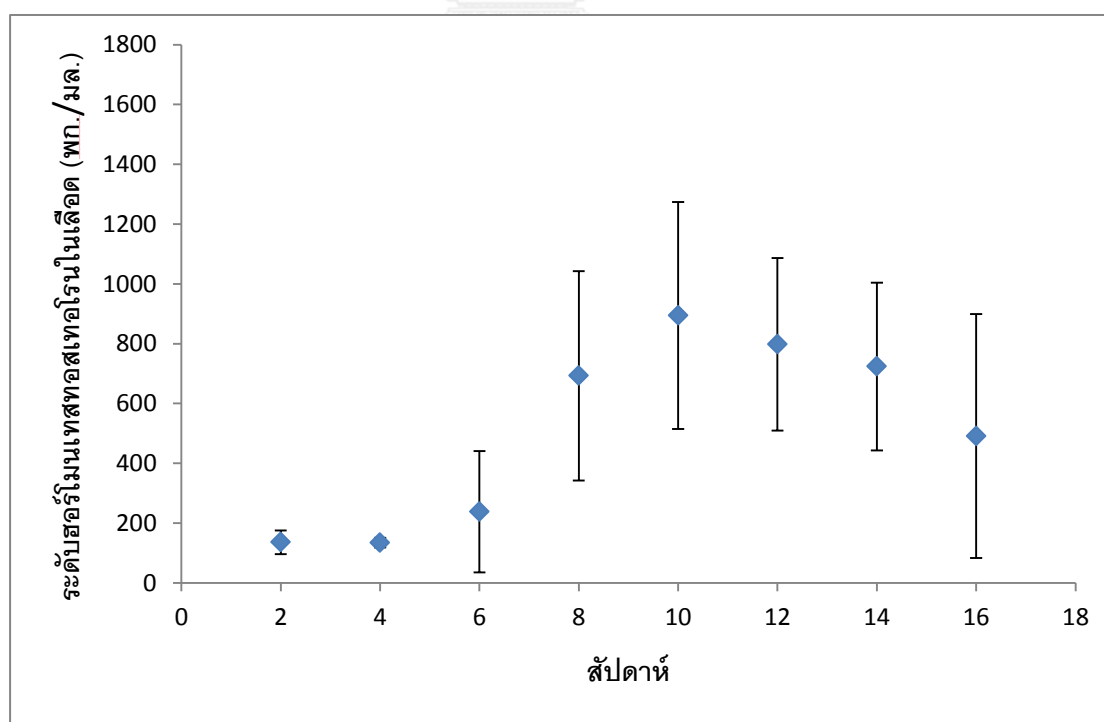
ค่าปริมาณความเข้มข้นพื้นฐาน (baseline concentration) ของระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดของปลากระเบนเพศผู้ มีค่าเฉลี่ยรวมตลอดการทดลอง  $0.94 \pm 0.30$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.38 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จนถึง 1.6384 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

แบบแผนของของฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดของปลากระเบนเพศผู้ในช่วงที่ทำการทดลองนั้นค่อนข้างแปรปรวน มีการขึ้นลงสลับกัน โดยมีแนวโน้มที่แสดงถึงความแตกต่างของปริมาณฮอร์โมนในช่วงสัปดาห์ที่ 10 และ 12 ที่สูงกว่าช่วงอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (ตารางที่ 11; รูปที่ 37)

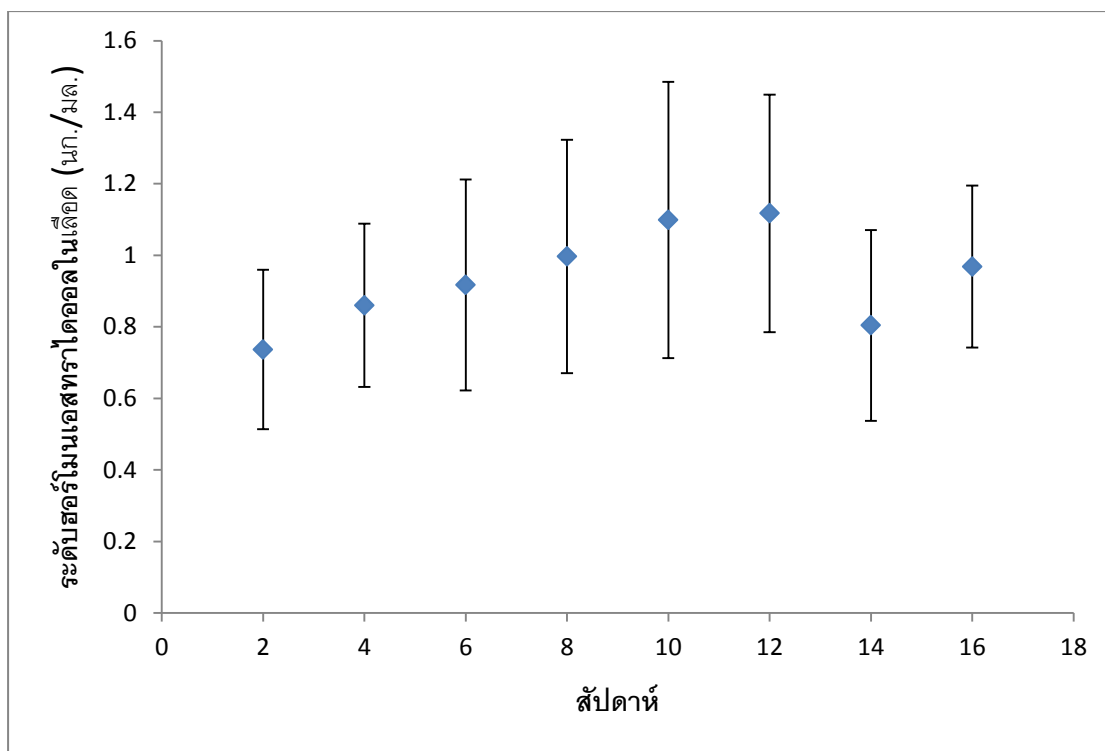
ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนและฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดในปลากระเบนเพศผู้ (n=9)

สัปดาห์	ระดับฮอร์โมน เทสโทสเตอโรน (พก./มล.)	ระดับฮอร์โมน เอสตราไดออล (นก./มล.)
สัปดาห์ที่ 2	136.11±39.85 <sup>a</sup>	0.74±0.22 <sup>a</sup>
สัปดาห์ที่ 4	134.56±15.81 <sup>a</sup>	0.86±0.23 <sup>a,b</sup>
สัปดาห์ที่ 6	238.46±203.04 <sup>a,b</sup>	0.92±0.30 <sup>a,b</sup>
สัปดาห์ที่ 8	692.72±350.36 <sup>c,d</sup>	1.00±0.33 <sup>a,b</sup>
สัปดาห์ที่ 10	894.28±379.54 <sup>d</sup>	1.10±0.39 <sup>b</sup>
สัปดาห์ที่ 12	798.01±288.26 <sup>d</sup>	1.12±0.33 <sup>b</sup>
สัปดาห์ที่ 14	723.71±280.19 <sup>d</sup>	0.80±0.27 <sup>a</sup>
สัปดาห์ที่ 16	491.13±407.60 <sup>b,c</sup>	0.97±0.23 <sup>a,b</sup>

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)



รูปที่ 36 ระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในเลือดในปลากระเบนเพศผู้

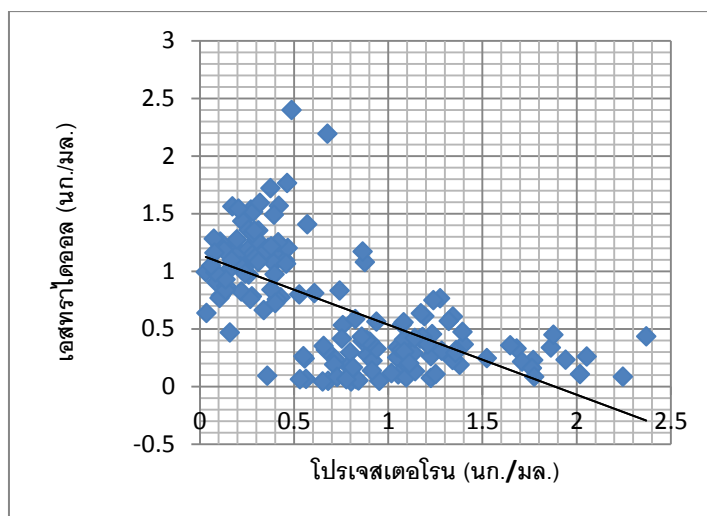


รูปที่ 37 ระดับฮอร์โมนเอสตราไดโอลในเลือดในปลากระเบนเพศผู้

#### 4.1.4 ความสัมพันธ์ของฮอร์โมนเพศในเลือดและลักษณะทางกายภาพโดยการอัลตราซาวด์

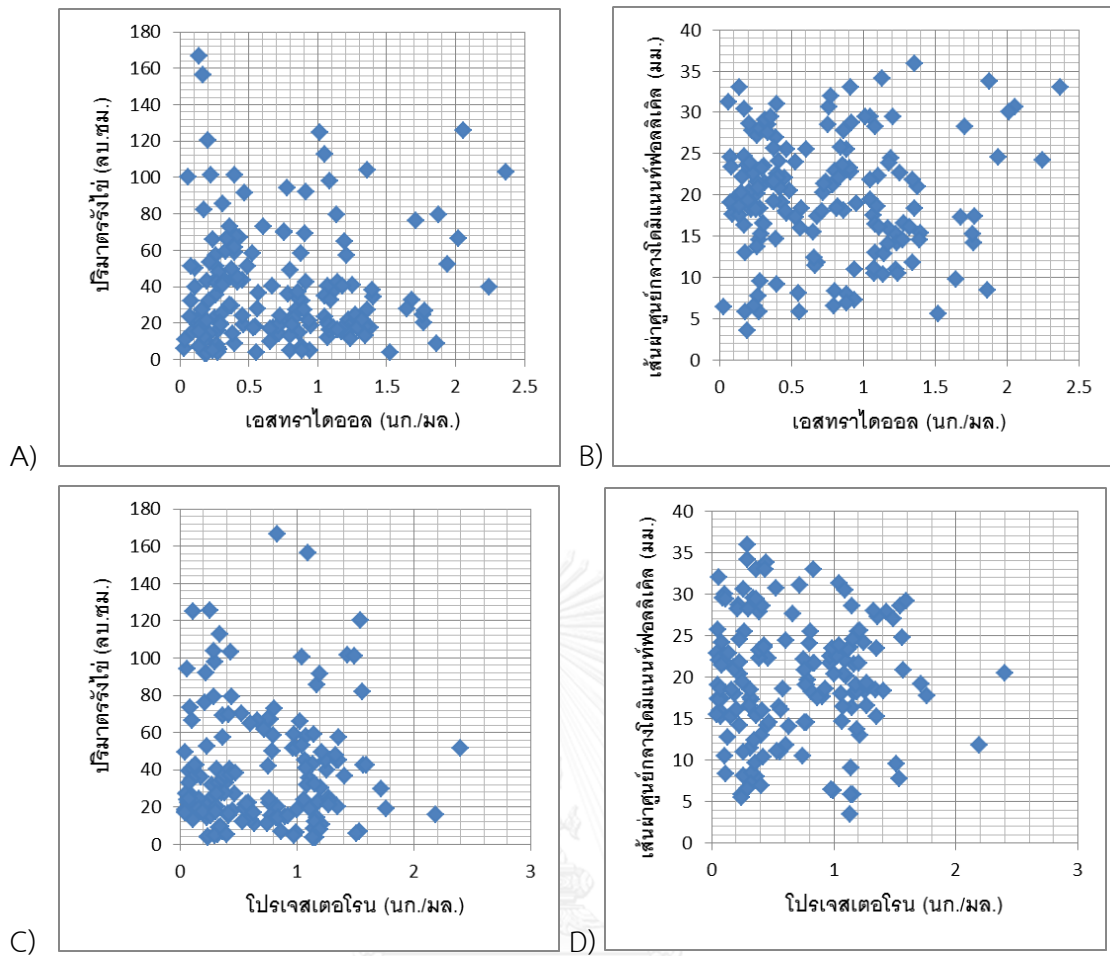
##### 4.1.4.1 ความสัมพันธ์ของฮอร์โมนเพศในเลือดและลักษณะทางกายภาพในปลากระเบนเพศเมีย

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของฮอร์โมนเอสตราไดโอลในเลือดและฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดของปลากระเบนเพศเมียในช่วงที่ทำการทดลองนั้น พบว่าฮอร์โมนดังกล่าวมีความสัมพันธ์กันในเชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ( $r = -0.661$  ;  $p = 0.000$ ) (รูปที่ 38)



รูปที่ 38 ความสัมพันธ์ของฮอร์โมนเอสตราไดโอดอลในเลือดและฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดของปลากระเบนเพศเมีย

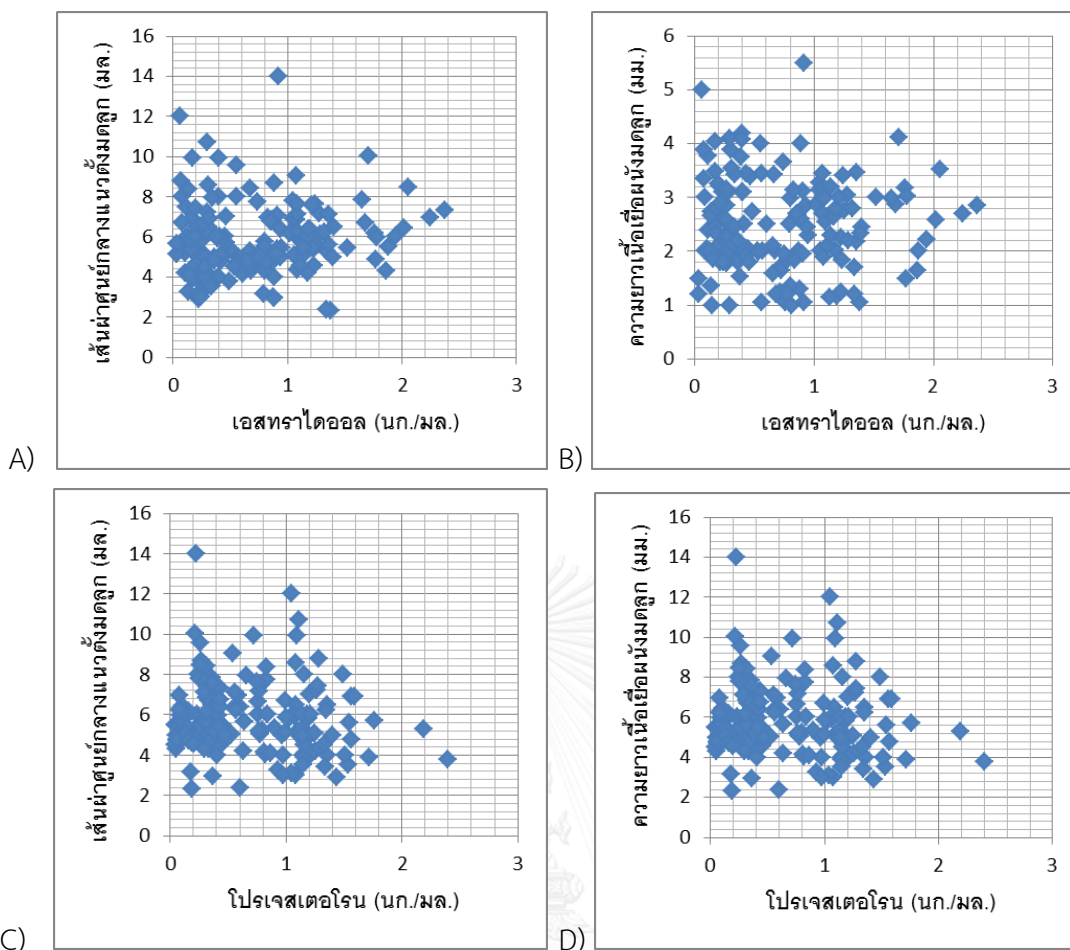
จากการศึกษาความสัมพันธ์ของฮอร์โมนเพศเมียและลักษณะทางกายภาพของรังไข่พบว่า ทั้งฮอร์โมนเอสตราไดโอดอลและโปรเจสเตอโรนนั้นไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณรังไข่ และความกว้างของโดมินันท์ฟอลลิเคิล (รูปที่ 39)



รูปที่ 39 ความสัมพันธ์ของระดับฮอร์โมนกับรังไข่ของปลากะเบนเพศเมีย

A) ความสัมพันธ์ของระดับเอสตราไดออลในเลือดกับปริมาตรรังไข่; B) ความสัมพันธ์ของระดับเอสตราไดออลในเลือดกับขนาดของโคมิแนนท์ฟอลลิเคิล; C) ความสัมพันธ์ของระดับโปรเจสเตอโรนในเลือดกับปริมาตรรังไข่; D) ความสัมพันธ์ของระดับโปรเจสเตอโรนในเลือดกับขนาดของโคมิแนนท์ฟอลลิเคิล

ความสัมพันธ์ของระดับฮอร์โมนเพศพบว่า ระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือด และฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดนั้นไม่มีความสัมพันธ์ทางสถิติกับเส้นผ่าศูนย์กลางแนวตั้งของมดลูก (vertical diameter of uterus) และความยาวของเนื้อเยื่อผนังมดลูก (trophonemata) ของปลากะเบนเพศเมียในช่วงที่ทำการทดลอง (รูปที่ 40)



รูปที่ 40 ความสัมพันธ์ของระดับฮอร์โมนกับมดลูกของปลากะเบนเพศเมีย

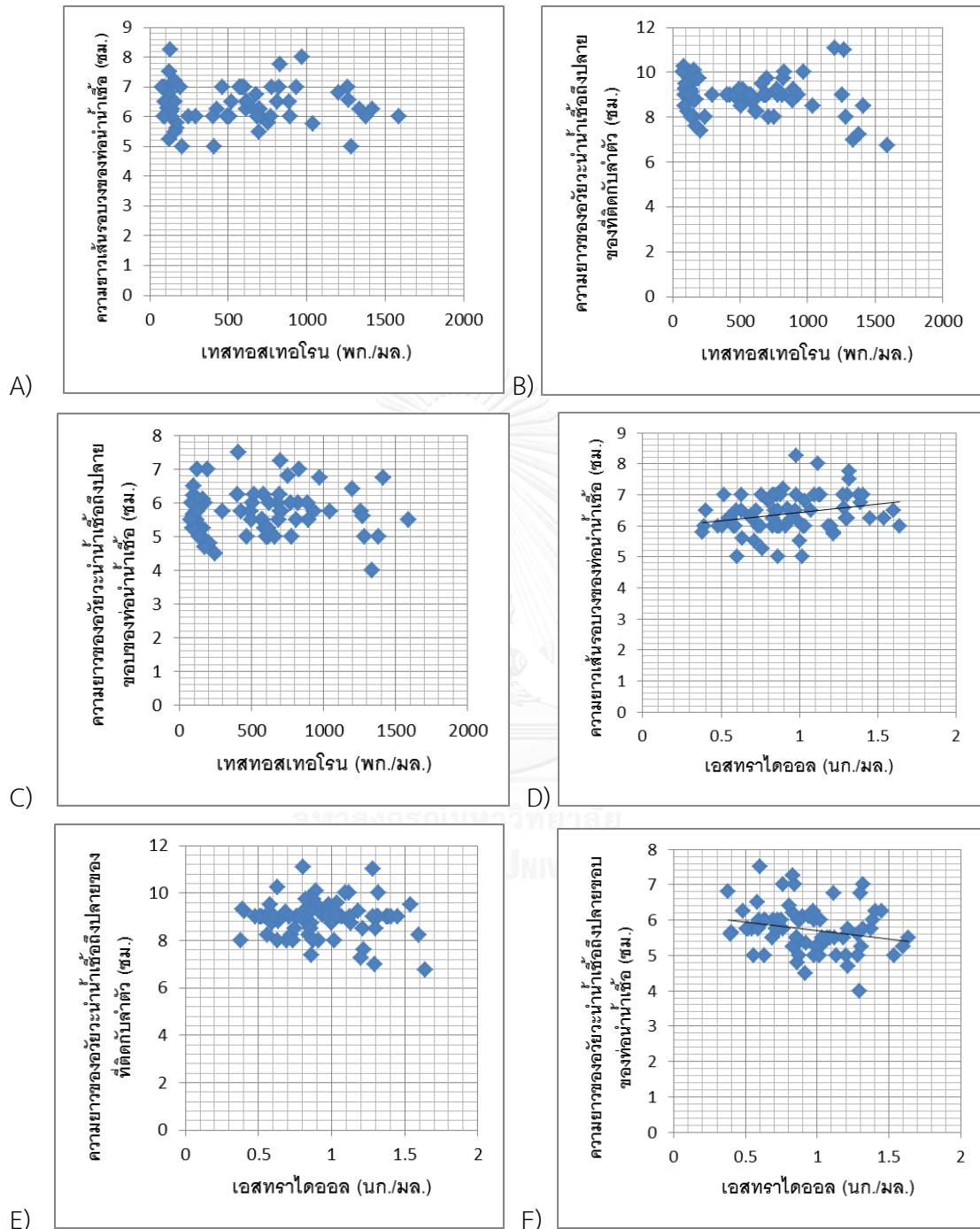
- A) ความสัมพันธ์ของระดับเอสตราไดออลในเลือดกับเส้นผ่าศูนย์กลางแนวตั้งของมดลูก ;  
 B) ความสัมพันธ์ของระดับเอสตราไดออลในเลือดกับความยาวของเนื้อเยื่อผนังมดลูก ;  
 C) ความสัมพันธ์ของระดับ โปรเจสเตอโรนในเลือดกับเส้นผ่าศูนย์กลางแนวตั้งของมดลูก ;  
 D) ความสัมพันธ์ของระดับโปรเจสเตอโรนในเลือดกับความยาวของเนื้อเยื่อผนังมดลูก

#### 4.1.4.2 ความสัมพันธ์ของฮอร์โมนเพศในเลือดและลักษณะทางกายภาพในปลากะเบนเพศผู้

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับฮอร์โมนกับขนาดของท่อนำน้ำเชื้อของปลากะเบนเพศผู้ พบว่าระดับฮอร์โมนเทสโทสเทอโรนในเลือดไม่มีความสัมพันธ์ทางสถิติกับทั้งความยาวเส้นรอบวงของท่อนำน้ำเชื้อ ความยาวของอวัยวะนำน้ำเชื้อถึงปลายของที่ติดกับลำตัว และความยาวของอวัยวะนำน้ำเชื้อถึงปลายขอบของท่อนำน้ำเชื้อ ในขณะที่ระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดนั้นมีความสัมพันธ์ทางสถิติกับความยาวเส้นรอบวงของท่อนำน้ำเชื้อ และความยาวของอวัยวะ



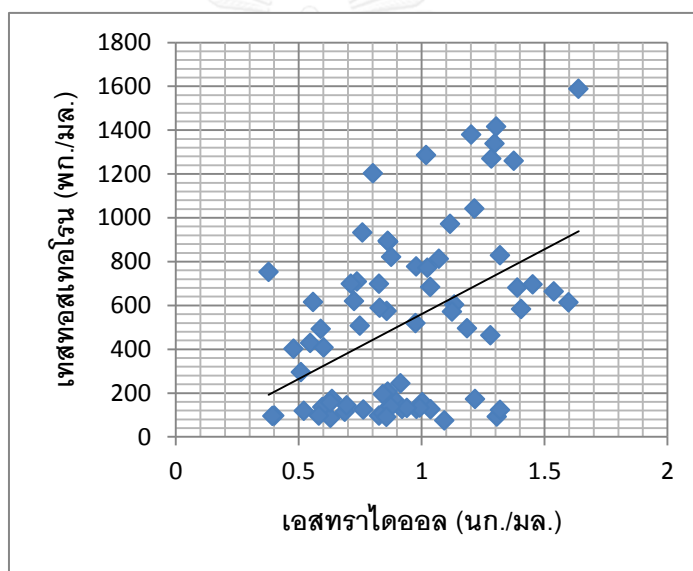
นำน้ำเชื้อถึงปลายของที่ติดกับครีบล้าง และไม่มีความสัมพันธ์กับความยาวของอวัยวะนำน้ำเชื้อถึงปลายของที่ติดกับลำตัว (รูปที่ 41)



รูปที่ 41 ความสัมพันธ์ของระดับฮอร์โมนกับขนาดท่อนำน้ำเชื้อของปลากระเบนเพศผู้

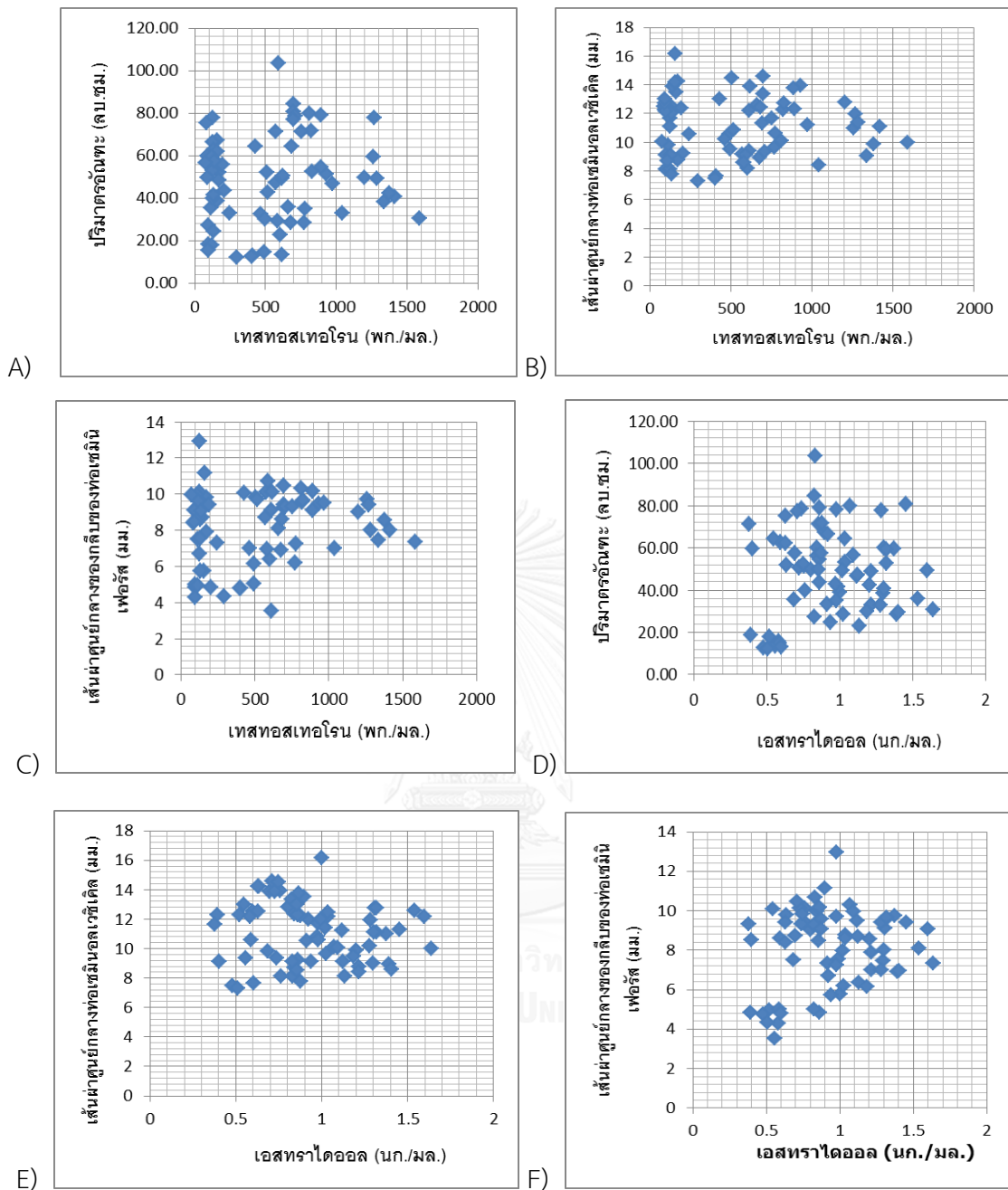
A) ความสัมพันธ์ของระดับเทสโทสเทอโรนในเลือดกับความยาวเส้นรอบวงของท่อน้ำเชื้อ; B) ความสัมพันธ์ของระดับเทสโทสเทอโรนในเลือดกับความยาวของอวัยวะนำน้ำเชื้อถึงปลายขอบที่ติดกับลำตัว; C) ความสัมพันธ์ของระดับเทสโทสเทอโรนในเลือดกับความยาวของอวัยวะนำน้ำเชื้อถึงปลายขอบของท่อน้ำเชื้อ; D) ความสัมพันธ์ของระดับเอสทราไดออลในเลือดกับความยาวเส้นรอบวงของท่อน้ำเชื้อ ( $r = 268$ ,  $p = 0.023$ ); E) ความสัมพันธ์ของระดับเอสทราไดออลในเลือดกับความยาวของอวัยวะนำน้ำเชื้อถึงปลายขอบที่ติดกับลำตัว; F) ความสัมพันธ์ของระดับเอสทราไดออลในเลือดกับความยาวของอวัยวะนำน้ำเชื้อถึงปลายขอบของท่อน้ำเชื้อ ( $r = -250$ ,  $p = 0.034$ )

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของฮอร์โมนเทสโทสเทอโรนและฮอร์โมนเอสทราไดออลในเลือดของปลากระเบนเพศผู้ในช่วงที่ทำการทดลองนั้น พบว่าฮอร์โมนดังกล่าวมีความสัมพันธ์กันในเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ( $r = 0.356$ ;  $p = 0.002$ ) (รูปที่ 42)



**รูปที่ 42** ความสัมพันธ์ของฮอร์โมนเทสโทสเทอโรนในเลือดและเอสทราไดออลในเลือดในปลากระเบนเพศผู้

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับฮอร์โมนเพศผู้กับลักษณะทางกายภาพของอวัยวะทางระบบสืบพันธุ์เพศผู้พบว่ทั้งฮอร์โมนเทสโทสเทอโรนในเลือดและเอสทราไดออลในเลือดของปลากระเบนเพศผู้ไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับทั้งปริมาตรอัมทะเส้นผ่าศูนย์กลางของก๊ีบของท่อเซมินิเฟอรัส และเส้นผ่าศูนย์กลางของท่อเซมินอลเวสิเคิล (รูปที่ 43)



**รูปที่ 43** ความสัมพันธ์ของระดับฮอร์โมนกับอัตราและเซมินอลเวซิเคิลของปลากระเบนเพศผู้

A) ความสัมพันธ์ของระดับเทสโทสเตอโรนในเลือดกับปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน; B) ความสัมพันธ์ของระดับเทสโทสเตอโรนในเลือดกับเส้นผ่านศูนย์กลางของกอลิบของท่อเซมินิเฟอร์รัส; C) ความสัมพันธ์ของระดับเทสโทสเตอโรนในเลือดกับเส้นผ่านศูนย์กลางของเซมินอลเวซิเคิล; D) ความสัมพันธ์ของระดับเอสตราไดออลในเลือดกับปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน; E) ความสัมพันธ์ของระดับเอสตราไดออลในเลือดกับเส้นผ่านศูนย์กลางของกอลิบของท่อเซมินิเฟอร์รัส; F) ความสัมพันธ์ของระดับเอสตราไดออลในเลือดกับเส้นผ่านศูนย์กลางของเซมินอลเวซิเคิล

## 4.2 ผลการทดลองที่ 2

ทำการเก็บตัวอย่างจากปลากระเบนทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองในวันทดลองที่ 1 จากนั้นทำการฉีดโพรสตาแกลนดินสังเคราะห์เข้ากล้ามเนื้อให้กับกลุ่มทดลองและฉีด normal saline เข้ากล้ามเนื้อให้กับกลุ่มควบคุม หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างต่อเนื่องในวันทดลองที่ 2, 5, 12, 19 และ 26

### 4.2.1 พฤติกรรมการกินอาหาร น้ำหนักและขนาด

ผลการสังเกตพฤติกรรมการกินอาหารพบว่าปลากระเบนในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมีพฤติกรรมการกินอาหารปกติ โดยกินอาหารร้อยละ 1-2 ของน้ำหนักตัวต่อวัน

มีค่าเฉลี่ยรวมน้ำหนักในกลุ่มควบคุม คือ  $6.91 \pm 1.28$  และกลุ่มทดลอง คือ  $6.58 \pm 1.04$  กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยรวมขนาดความกว้างลำตัวในกลุ่มควบคุม คือ  $454.2 \pm 31.3$  และกลุ่มทดลอง คือ  $446.9 \pm 33.3$  มิลลิเมตร

### 4.2.2 การเปลี่ยนแปลงของอวัยวะสืบพันธุ์โดยการอัลตราซาวด์

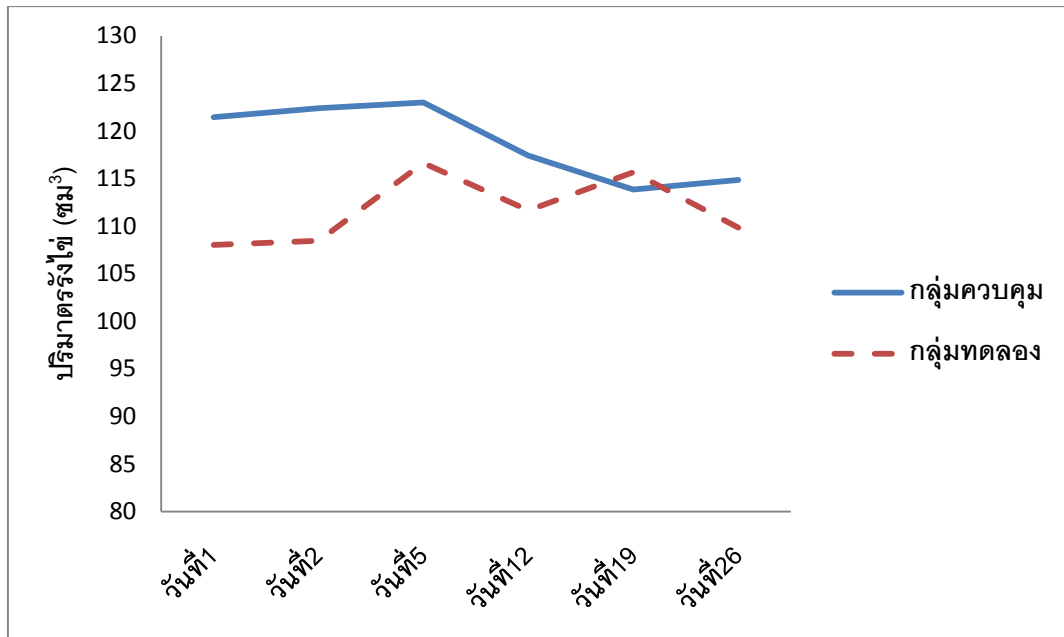
จากการอัลตราซาวด์เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของรังไข่ พบว่าปริมาตรรังไข่โดยการอัลตราซาวด์ในกลุ่มควบคุมนั้นมีค่าเฉลี่ยเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (วันที่ 1) คือ  $121.44 \pm 66.03$  ลูกบาศก์เซนติเมตร และมีค่าเฉลี่ยในวันทดลองที่ 2, 5, 12, 19 และ 26 คือ  $122.37 \pm 65.54$ ,  $122.99 \pm 68.34$ ,  $117.41 \pm 62.24$ ,  $113.83 \pm 60.85$  และ  $114.84 \pm 59.28$  ลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ โดยไม่พบว่ามี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญตลอดการทดลอง ปริมาตรรังไข่โดยการอัลตราซาวด์ในกลุ่มทดลองนั้นมีค่าเฉลี่ยเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (วันที่ 1) คือ  $108.01 \pm 65.49$  ลูกบาศก์เซนติเมตร และมีค่าเฉลี่ยในวันทดลองที่ 2, 5, 12, 19 และ 26 คือ  $108.46 \pm 63.94$ ,  $116.64 \pm 66.53$ ,  $111.64 \pm 65.32$ ,  $115.65 \pm 72.83$  และ  $109.85 \pm 77.41$  ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยไม่พบว่ามี ความแตกต่างทางนัยสำคัญตลอดการทดลองเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม ( $p > 0.05$ ) (ตารางที่ 12; รูปที่ 44)

จากการอัลตราซาวด์เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของเส้นผ่าศูนย์กลางของโดมิแนนท์ฟอลลิเคิล พบว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของโดมิแนนท์ฟอลลิเคิลในกลุ่มควบคุมนั้นมีค่าเฉลี่ยเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (วันที่ 1) คือ  $29.41 \pm 3.29$  มิลลิเมตร และมีค่าเฉลี่ยในวันทดลองที่ 2, 5, 12, 19 และ 26 คือ  $29.89 \pm 3.44$ ,  $29.09 \pm 3.56$ ,  $27.98 \pm 4.55$ ,  $27.21 \pm 5.06$  และ  $27.78 \pm 5.12$  มิลลิเมตรตามลำดับ โดยไม่พบว่ามี ความแตกต่างทางนัยสำคัญตลอดการทดลอง เส้นผ่าศูนย์กลางของโดมิแนนท์ฟอลลิเคิลในกลุ่มทดลองนั้นมีแนวโน้มไปในทางเดียวกันกับกลุ่มควบคุม โดยมีค่าเฉลี่ยเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (วันที่ 1) คือ  $26.74 \pm 3.31$  มิลลิเมตร และมีค่าเฉลี่ยในวันทดลองที่ 2, 5, 12, 19 และ 26 คือ

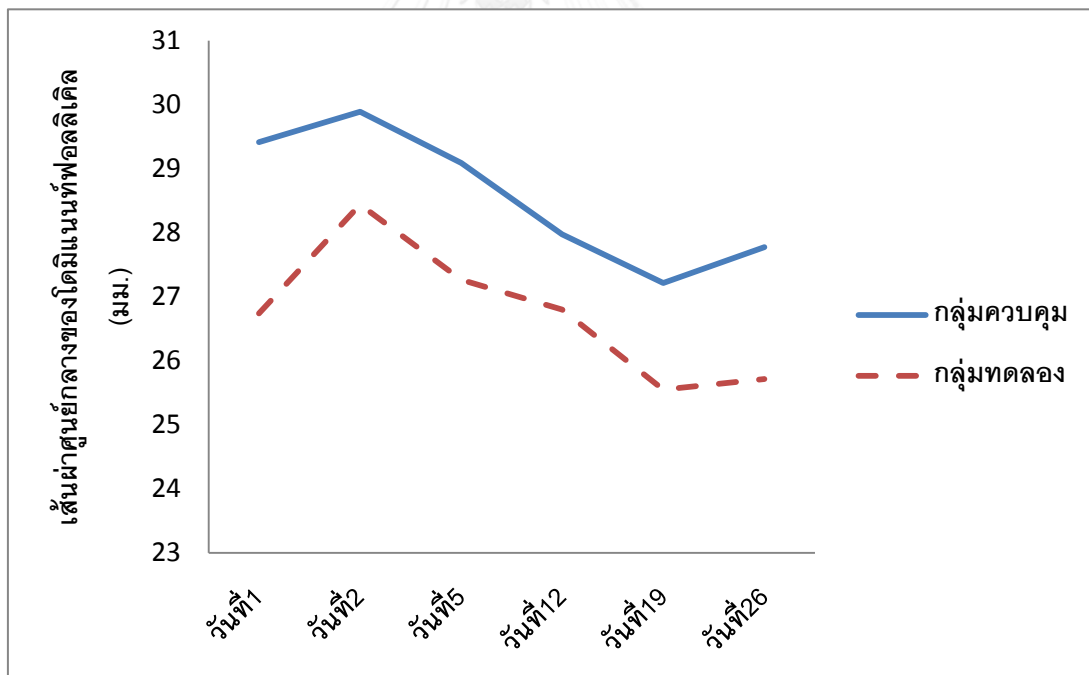
28.44±4.22, 27.26±4.15, 26.80±4.37, 25.55±2.57 และ 25.71±2.95 มิลลิเมตร โดยไม่พบว่ามี ความแตกต่างทางนัยสำคัญตลอดการทดลองเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม ( $p>0.05$ ) (ตารางที่ 12; รูปที่ 45)

**ตารางที่ 12** ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาตรรังไข่ และเส้นผ่าศูนย์กลางของ โดมิแนนท์ฟอลลิเคิลของปลากระเบนเพศเมียในกลุ่มควบคุม (n=8) และกลุ่มทดลอง (n=8) ในการทำ การทดลองวันที่ 1, 2, 5, 12, 19 และ 26

พารามิเตอร์	วัน	กลุ่มควบคุม (n=8)	กลุ่มทดลอง (n=8)
ปริมาตรรังไข่ (ซม <sup>3</sup> )	1	121.44±66.03	108.01±65.49
	2	122.37±65.54	108.46±63.94
	5	122.99±68.34	116.64±66.53
	12	117.41±62.24	111.64±65.32
	19	113.83±60.85	115.65±72.83
	26	114.84±59.28	109.85±77.41
เส้นผ่าศูนย์กลางของโดมิแนนท์ฟอลลิเคิล(มม.)	1	29.41±3.29	26.74±3.31
	2	29.89±3.44	28.44±4.22
	5	29.09±3.56	27.26±4.15
	12	27.98±4.55	26.80±4.37
	19	27.21±5.06	25.55±2.57
	26	27.78±5.12	25.71±2.95



รูปที่ 44 ค่าเฉลี่ยของปริมาณรังไข่ของปลากะเบนเทศเมียเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุม (n=8) และกลุ่มทดลอง (n=8) ในวันทดลองที่ 1, 2, 5, 12, 19 และ 26



รูปที่ 45 ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโดมิแนนท์ฟอลลิเคิล ของปลากะเบนเทศเมียเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุม (n=8) และกลุ่มทดลอง (n=8) ในวันทดลองที่ 1, 2, 5, 12, 19 และ 26

การอัลตราซาวด์เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของระดับมดลูก ในกลุ่มควบคุมระดับมดลูกนั้นมีค่าเฉลี่ยเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (วันที่ 1) คือ  $1.69 \pm 0.37$  และมีค่าเฉลี่ยในวันทดลองที่ 2, 5, 12, 19 และ 26 คือ  $2.00 \pm 0.27$ ,  $2.06 \pm 0.62$ ,  $2.00 \pm 0.85$ ,  $1.75 \pm 0.89$  และ  $2.00 \pm 0.46$  ตามลำดับ โดยไม่พบว่ามี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญตลอดการทดลอง ในขณะที่ระดับมดลูกในกลุ่มทดลองนี้มีค่าเฉลี่ยเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (วันที่ 1) คือ  $1.50 \pm 0.60$  หลังจากฉีดโพรสตาแกลนดินสังเคราะห์แล้วระดับมดลูกลดลงในวันที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญ คือ  $0.38 \pm 0.58$  หลังจากนั้นระดับของมดลูกได้เพิ่มระดับขึ้นเล็กน้อยเป็น  $0.50 \pm 0.71$  ในวันทดลองที่ 5 และมีระดับใกล้เคียงกันจนสิ้นสุดการทดลอง คือ  $0.81 \pm 0.65$ ,  $0.44 \pm 0.73$  และ  $0.44 \pm 0.50$  โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ตั้งแต่วันที่ 2 จนสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 26 นั้น พบว่าระดับมดลูกมีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองในแต่ละวันทดลองนั้นๆ อีกด้วย (ตารางที่ 13; รูปที่ 46)

การอัลตราซาวด์เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของเส้นผ่าศูนย์กลางตามแนวตั้งของมดลูก พบว่า ในกลุ่มควบคุมเส้นผ่าศูนย์กลางตามแนวตั้งของมดลูกมีค่าเฉลี่ยเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (วันที่ 1) คือ  $5.73 \pm 0.78$  มิลลิเมตร และมีค่าเฉลี่ยในวันทดลองที่ 2, 5, 12, 19 และ 26 คือ  $5.82 \pm 0.37$ ,  $5.84 \pm 0.69$ ,  $5.83 \pm 0.84$ ,  $5.82 \pm 0.89$  และ  $5.87 \pm 0.52$  มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยไม่พบว่ามี ความแตกต่างกันทางสถิติตลอดการทดลอง ในขณะที่เส้นผ่าศูนย์กลางตามแนวตั้งของมดลูกในกลุ่มทดลองมีค่าเฉลี่ยเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (วันที่ 1) คือ  $5.45 \pm 0.26$  มิลลิเมตร หลังจากฉีดโพรสตาแกลนดินสังเคราะห์แล้วเส้นผ่าศูนย์กลางตามแนวตั้งของมดลูกลดลงเป็น  $4.23 \pm 0.12$  มิลลิเมตร ในวันที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญ หลังจากนั้นเส้นผ่าศูนย์กลางตามแนวตั้งของมดลูกมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น  $5.03 \pm 0.19$  มิลลิเมตรในวันทดลองที่ 5 และคงระดับใกล้เคียงกันในวันทดลองที่ 12, 19 และ 26 ( $4.94 \pm 0.16$ ,  $4.91 \pm 0.16$  และ  $4.94 \pm 0.13$ ) โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติจนสิ้นสุดการทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่าในวันทดลองที่ 2 นั้น เส้นผ่าศูนย์กลางตามแนวตั้งของมดลูกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างของทั้ง 2 กลุ่มในวันทดลองอื่นๆ (ตารางที่ 13; รูปที่ 47)

การอัลตราซาวด์เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของความยาวของเนื้อเยื่อมดลูก พบว่า ในกลุ่มควบคุมความยาวของเนื้อเยื่อมดลูกมีค่าเฉลี่ยเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (วันที่ 1) คือ  $2.32 \pm 0.0$  มิลลิเมตร และมีค่าเฉลี่ยในวันทดลองที่ 2, 5, 12, 19 และ 26 คือ  $2.20 \pm 0.09$ ,  $2.6 \pm 0.10$ ,  $2.17 \pm 0.08$ ,  $2.24 \pm 0.14$  และ  $2.15 \pm 0.12$  มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยไม่พบว่ามี ความแตกต่างกันทางสถิติตลอดการทดลอง ในกลุ่มทดลองความยาวของเนื้อเยื่อมดลูกมีค่าเฉลี่ยเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (วันที่ 1) คือ  $2.17 \pm 0.10$  มิลลิเมตร หลังจากฉีดโพรสตาแกลนดินสังเคราะห์แล้วความยาวของเนื้อเยื่อมดลูกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เป็น  $1.67 \pm 0.06$  มิลลิเมตร และคงระดับต่ำในวันทดลองที่ 5, 12, 19

และ 26 คือ  $1.83 \pm 0.10$ ,  $1.87 \pm 0.10$ ,  $1.86 \pm 0.1$  และ  $1.76 \pm 0.12$  มิลลิเมตรตามลำดับ นอกจากนี้ตั้งแต่วันที่ทดลองที่ 2 จนถึงสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 26 นั้น พบว่าความยาวของเนื้อเยื่อมดลูกมีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในแต่ละวันทดลองนั้นๆอีกด้วย (ตารางที่ 13; รูปที่ 48)

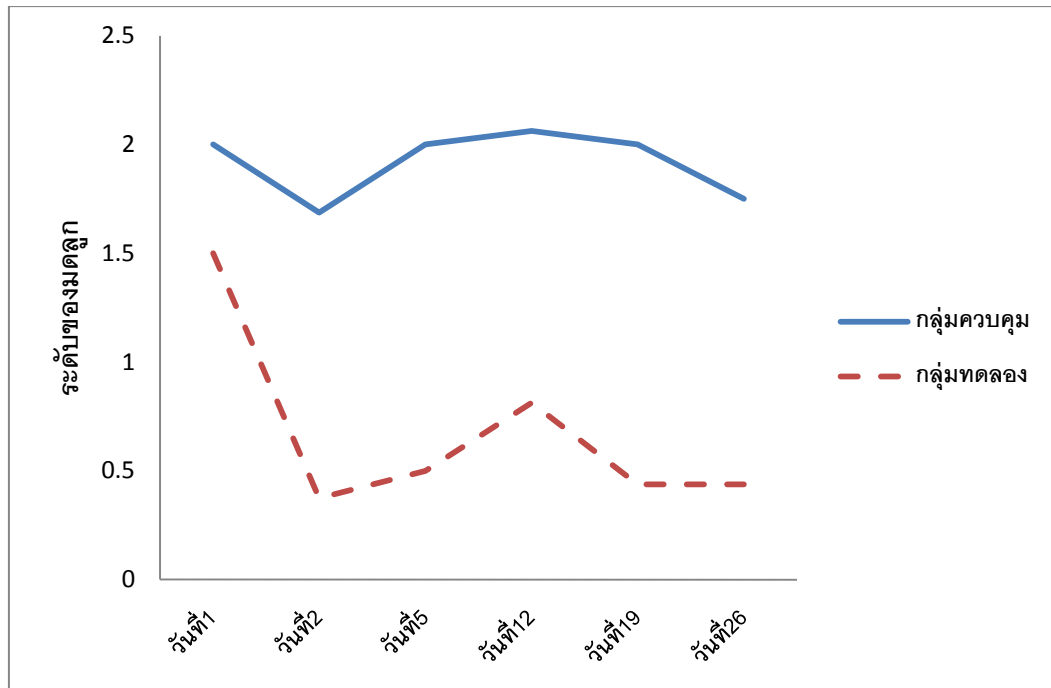




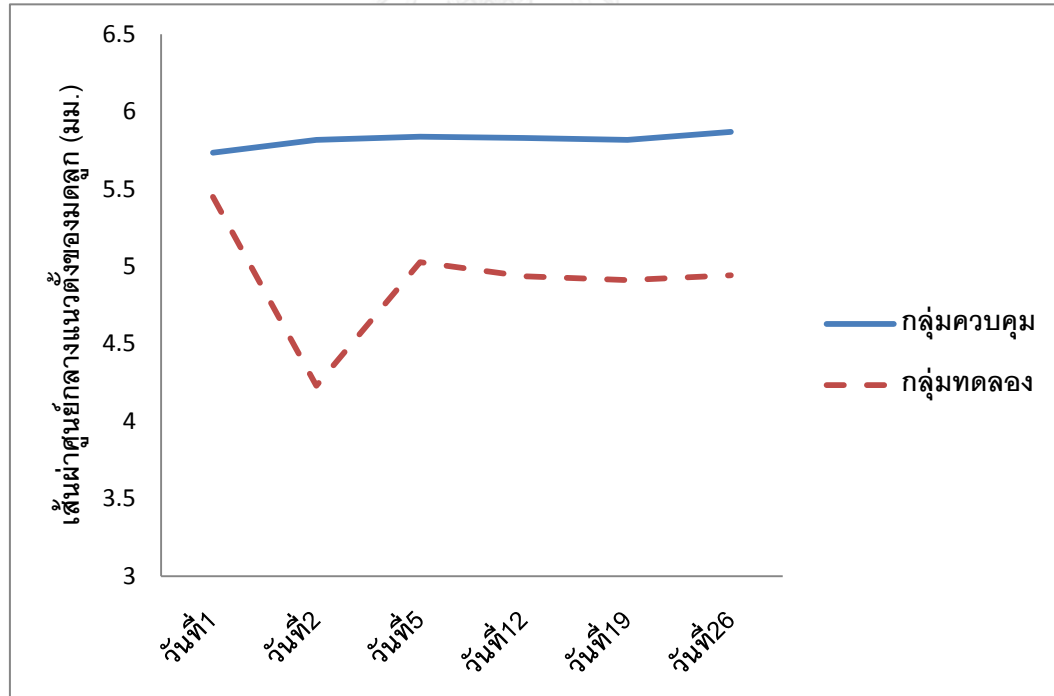
**ตารางที่ 13** ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับของมดลูก เส้นผ่าศูนย์กลางตามแนวตั้งของมดลูก และความยาวของเนื้อเยื่อมดลูกของปลากระเบนเพศเมียในกลุ่มควบคุม (n=8) และกลุ่มทดลอง (n=8) ในการทำการทดลองวันที่ 1, 5, 8, 15, 22 และ 29

พารามิเตอร์	วัน	กลุ่มควบคุม (n=8)	กลุ่มทดลอง (n=8)
ระดับของมดลูก	1	1.69±0.37	1.50±0.60 <sup>b</sup>
	2	*2.00±0.27	*0.38±0.58 <sup>a</sup>
	5	*2.06±0.62	*0.50±0.71 <sup>b</sup>
	12	*2.00±0.85	*0.81±0.65 <sup>b</sup>
	19	*1.75±0.89	*0.44±0.73 <sup>a,b</sup>
	26	*2.00±0.46	*0.44±0.50 <sup>b</sup>
เส้นผ่าศูนย์กลางตามแนวตั้งของมดลูก (มม.)	1	5.73±0.78	5.45±0.26 <sup>b</sup>
	2	*5.82±0.37	4.23±0.12 <sup>a</sup>
	5	5.84±0.69	5.03±0.19 <sup>b</sup>
	12	5.83±0.84	4.94±0.16 <sup>b</sup>
	19	5.82±0.89	4.91±0.16 <sup>b</sup>
	26	5.87±0.52	4.94±0.13 <sup>b</sup>
ความยาวของเนื้อเยื่อมดลูก (มม.)	1	2.32±0.09	2.17±0.10 <sup>b</sup>
	2	*2.20±0.09	*1.67±0.06 <sup>a</sup>
	5	*2.26±0.10	*1.83±0.10 <sup>a,b</sup>
	12	*2.17±0.08	*1.87±0.10 <sup>a,b</sup>
	19	*2.24±0.14	*1.86±0.11 <sup>a,b</sup>
	26	*2.15±0.12	*1.76±0.12 <sup>a</sup>

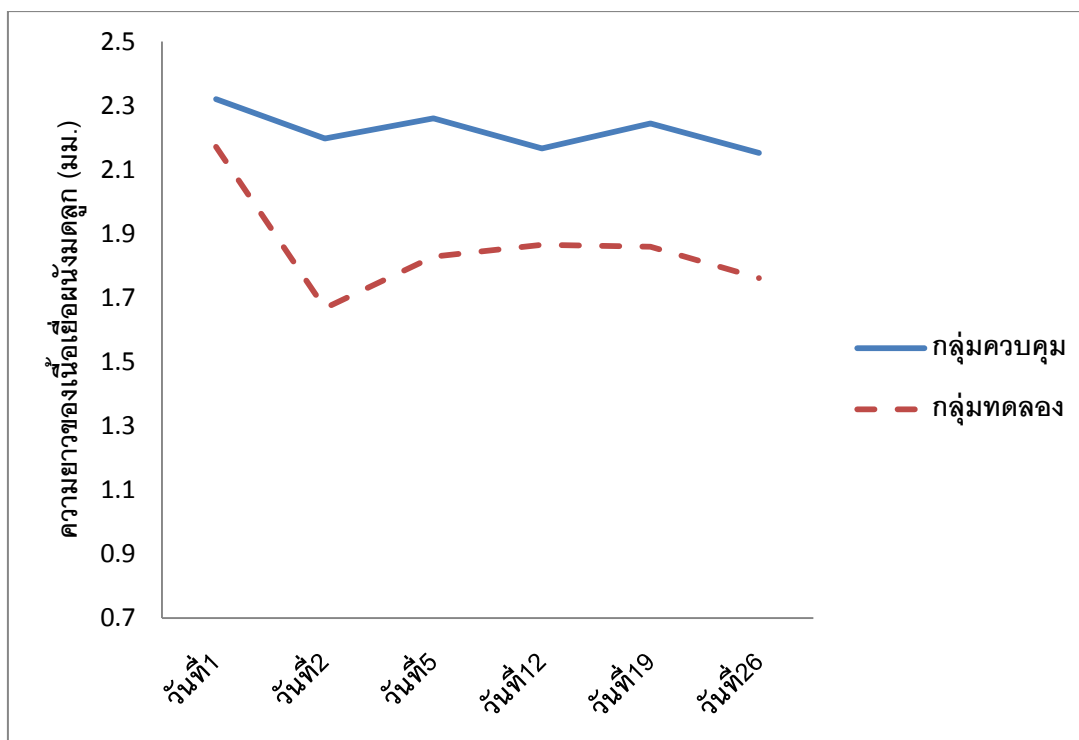
หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในกลุ่มเดียวกันที่วันทดลองต่างๆ; \* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองในวันทดลองเดียวกัน



รูปที่ 46 ค่าเฉลี่ยของระดับของมดลูกของปลากระเบนเพศเมียเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุม (n=8) และกลุ่มทดลอง (n=8) ในวันทดลองที่ 1, 2, 5, 12, 19 และ 26



รูปที่ 47 ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางแนวตั้งของมดลูกส่วนปลายของปลากระเบนเพศเมียเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุม (n=8) และกลุ่มทดลอง (n=8) ในวันทดลองที่ 1, 2, 5, 12, 19 และ 26



รูปที่ 48 ค่าเฉลี่ยของความยาวของเนื้อเยื่อผนังมดลูกของปลากระเบนเพศเมียเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุม (n=8) และกลุ่มทดลอง (n=8) ในวันทดลองที่ 1, 2, 5, 12, 19 และ 26

#### 4.2.3 ระดับฮอร์โมนเพศในเลือด

ระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดของปลากระเบนเพศเมียทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองค่อนข้างมีความแปรปรวน ในกลุ่มควบคุมระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดก่อนทำการทดลอง (วันที่ 1) มีความเข้มข้นเฉลี่ย  $1.15 \pm 0.17$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับฮอร์โมนลดลงเหลือ  $1.05 \pm 0.19$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ  $1.05 \pm 0.25$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ในวันทดลองที่ 2 และ 5 จากนั้นมีระดับฮอร์โมนสูงขึ้นและลดลงสลับกัน คือ  $1.28 \pm 0.29$ ,  $0.84 \pm 0.28$  และ  $1.16 \pm 0.41$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจนถึงสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่กลุ่มทดลองระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดก่อนทำการทดลอง (วันที่ 1) มีความเข้มข้นเฉลี่ย  $1.12 \pm 0.16$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากฉีดโปรสตาแกลนดินสังเคราะห์แล้ว ระดับฮอร์โมนค่อนข้างคงที่ (วันที่ 2) คือ  $1.13 \pm 0.17$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อวันทดลองที่ 5 คือ  $0.89 \pm 0.09$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นมีระดับสูงขึ้นเป็น  $1.06 \pm 0.13$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในวันทดลอง 12 และค่อยๆลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เป็น  $0.91 \pm 0.08$  และ  $0.73 \pm 0.14$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันทดลองที่ 19 และ 26 ตามลำดับ นอกจากนี้ระดับ

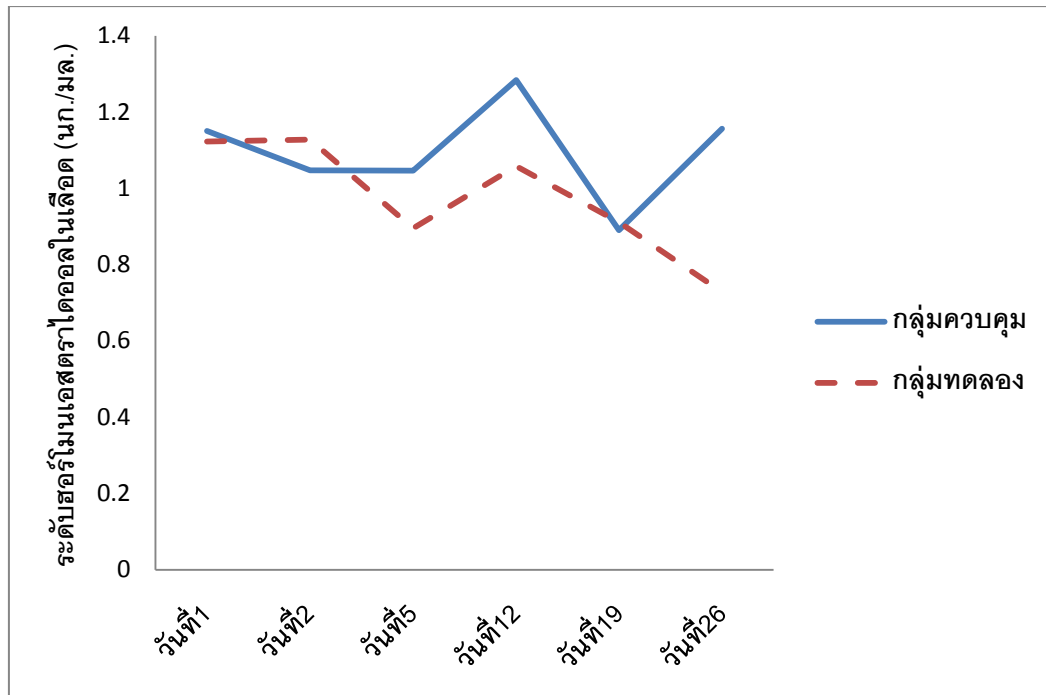
ฮอร์โมนเอสตราไดโอลยังมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ในระหว่างกลุ่มควบคุมและทดลองในวันทดลองที่ 5 อีกด้วย (ตารางที่ 14; รูปที่ 49)

ในกลุ่มควบคุมระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดก่อนทำการทดลอง (วันที่ 1) มีความเข้มข้นเฉลี่ย  $0.17 \pm 0.01$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และมีระดับความเข้มข้นมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เป็น  $0.28 \pm 0.12$  และ  $0.34 \pm 0.14$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันทดลองที่ 2 และ 5 จากนั้นระดับฮอร์โมนลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ในวันทดลองที่ 19 คือ  $0.17 \pm 0.07$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนจะเพิ่มสูงขึ้นเป็น  $0.34 \pm 0.20$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดก่อนทำการทดลอง (วันที่ 1) มีความเข้มข้นเฉลี่ย  $0.19 \pm 0.03$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากฉีดโปรสตาแกลนดินสังเคราะห์แล้วระดับฮอร์โมนค่อนข้างคงที่โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในวันทดลองที่ 2, 5 และ 12 คือ  $0.19 \pm 0.03$ ,  $0.22 \pm 0.04$  และ  $0.26 \pm 0.04$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนจะมีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ในวันทดลองที่ 19 คือ  $0.11 \pm 0.01$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) อีกครั้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 26) นอกจากนี้ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนยังมีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในระหว่างกลุ่มควบคุมและทดลองในวันทดลองที่ 26 อีกด้วย (ตารางที่ 14; รูปที่ 50)

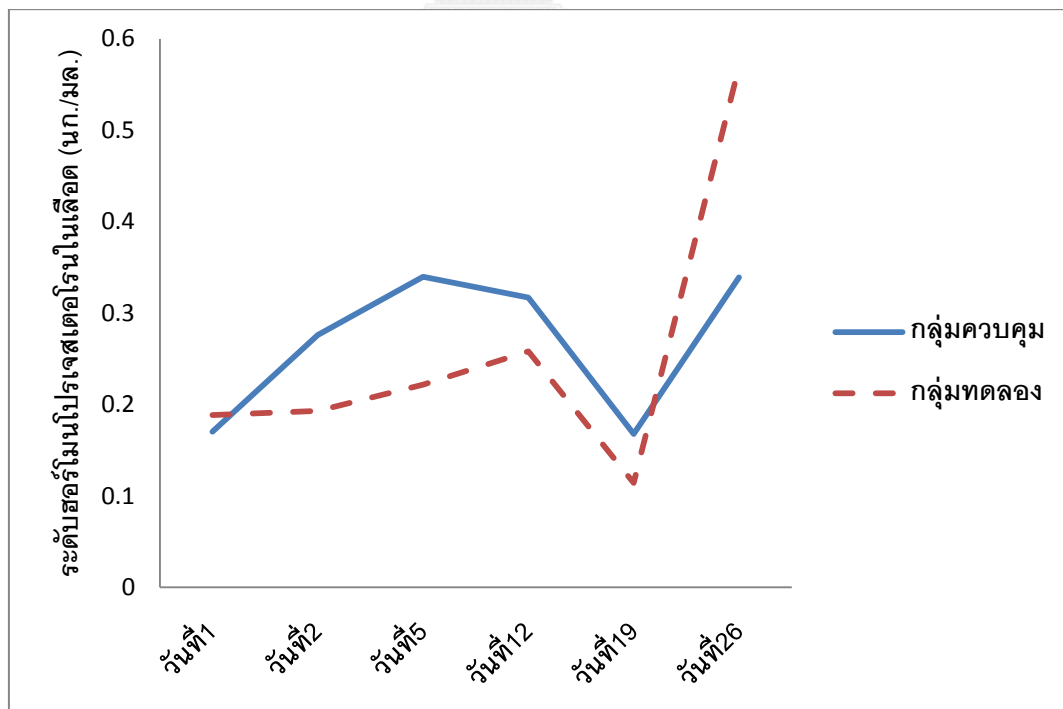
ตารางที่ 14 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับฮอร์โมนเพศในเลือดของปลากระเบนเพศเมียในกลุ่มควบคุม (n=8) และกลุ่มทดลอง (n=8) ในการทำการทดลองวันที่ 1, 2, 5, 12, 19 และ 26

พารามิเตอร์	วัน	กลุ่มควบคุม (n=8)	กลุ่มทดลอง (n=8)
ระดับฮอร์โมนเอสตราไดออล (ng/ml)	1	1.15±0.17 <sup>a</sup>	1.12±0.16 <sup>a</sup>
	2	1.05±0.19 <sup>b</sup>	1.13±0.17 <sup>a,b</sup>
	5	*1.05±0.25 <sup>b,c</sup>	*0.89±0.09 <sup>b</sup>
	12	1.28±0.29 <sup>a</sup>	1.06±0.13 <sup>a,b</sup>
	19	0.84±0.28 <sup>c</sup>	0.91±0.8 <sup>b</sup>
	26	1.16±0.41 <sup>a,b</sup>	0.73±0.14 <sup>c</sup>
ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (ng/ml)	1	0.17±0.01 <sup>a</sup>	0.19±0.03 <sup>a,b</sup>
	2	0.28±0.12 <sup>b,c</sup>	0.19±0.03 <sup>a,b</sup>
	5	0.34±0.14 <sup>c</sup>	0.22±0.04 <sup>a,b</sup>
	12	0.32±0.24 <sup>c</sup>	0.26±0.04 <sup>b</sup>
	19	0.17±0.07 <sup>a,b</sup>	0.11±0.01 <sup>a</sup>
	26	*0.34±0.20 <sup>c</sup>	*0.61±0.12 <sup>b</sup>

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในกลุ่มเดียวกันที่วันทดลองต่างๆ; \* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองในวันทดลองเดียวกัน



รูปที่ 49 ระดับฮอร์โมนเอสตราไดโอดในเลือดของปลากระเบนเพศเมียเปรียบเทียบกับกันในกลุ่มควบคุม (n=8) และกลุ่มทดลอง (n=8) ในวันทดลองที่ 1, 2, 5, 12, 19 และ 26



รูปที่ 50 ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดของปลากระเบนเพศเมียเปรียบเทียบกับกันในกลุ่มควบคุม (n=8) และกลุ่มทดลอง (n=8) ในวันทดลองที่ 1, 2, 5, 12, 19 และ 26

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการวิจัย บทสรุป และข้อเสนอแนะ

#### อภิปรายผลการวิจัย

##### 5.1 การทดลองที่ 1

##### 5.1.1 ขนาด น้ำหนัก ขนาดของท่อน้ำน้ำเชื้อ และฟันของปลากระเบนเพศเมียและปลากระเบนเพศผู้วัยเจริญพันธุ์

ปลากระเบนที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นปลากระเบนวัยเจริญพันธุ์ โดยตัวเมียมีขนาดใหญ่กว่าตัวผู้เล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่ได้ศึกษาเปรียบเทียบขนาดของปลากระเบนสายพันธุ์ *Potamotrygon* sp. วัยเจริญพันธุ์ในธรรมชาติกล่าวว่าในปลากระเบนสายพันธุ์ *P. motoro* นั้น ตัวเมียที่เจริญสมบูรณ์จะมีความกว้างลำตัวประมาณ 440 มิลลิเมตร และตัวผู้จะมีความกว้างลำตัวเล็กกว่าเพศเมียเล็กน้อยคือประมาณ 390 มิลลิเมตร (Charvet-Almeida et al., 2005) จึงเป็นไปได้ว่าปลากระเบนสายพันธุ์ในบ่อเลี้ยงในมีขนาดในวัยเจริญพันธุ์ใกล้เคียงกับปลากระเบนที่อาศัยอยู่ในธรรมชาติ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าปลากระเบนสายพันธุ์ *P. motoro* เพศเมียจะเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ได้ตั้งแต่มีความกว้างลำตัว 240-320 มิลลิเมตร ในขณะที่ปลากระเบนสายพันธุ์ *P. motoro* เพศผู้นั้นจะเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ได้ตั้งแต่มีความกว้างลำตัว 330 มิลลิเมตร (Thorson et al., 1983)

ความยาวเส้นรอบวงของท่อน้ำน้ำเชื้อในการทดลองนั้นพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ในแต่ละสัปดาห์ ซึ่งเป็นไปได้ว่าเกิดจากการเปลี่ยนแปลงขนาดของต่อมของท่อน้ำน้ำเชื้อ (clasper gland) ที่วางตำแหน่งอยู่ภายในอวัยวะน้ำน้ำเชื้อทางด้านล่าง (ventral) บริเวณด้านท้ายของครีบท้อง และอยู่ถัดจากช่องทวารร่วม (cloaca) (Thorson et al., 1983; Taniuchi and Ishihara, 1990) ต่อมของท่อน้ำน้ำเชื้อนี้ประกอบไปด้วยชั้นกล้ามเนื้อและท่อที่ทำหน้าที่บรรจุน้ำเชื้อเพื่อลำเลียงไปยังท่อทางระบบสืบพันธุ์ของปลากระเบนเพศเมียเมื่อมีการผสมพันธุ์ (copulation) ต่อมของท่อน้ำน้ำเชื้อของปลากระเบนสายพันธุ์ *Dasyatis sabina* มีการเปลี่ยนแปลงสัมพันธ์กับฤดูกาลสืบพันธุ์ โดยพบว่าเมื่อเข้าสู่ช่วงฤดูกาลผสมพันธุ์นั้น ท่อภายในของต่อมของท่อน้ำน้ำเชื้อนั้นมีการขยายขนาดขึ้น ในขณะที่เมื่อหมดฤดูกาลสืบพันธุ์ท่อภายในดังกล่าวนั้นก็จะมีขนาดเล็กลง (Piercy et al., 2003) นอกจากนี้ยังพบว่าการสร้างของเหลวภายในท่อยังมีปริมาณมากกว่าอย่างชัดเจนเมื่ออยู่ในฤดูกาลสืบพันธุ์ ในขณะที่ช่วงที่ไม่ใช่ฤดูกาลสืบพันธุ์ของเหลวภายในท่อจะลดน้อยลง อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าการทำงานของต่อมของท่อน้ำน้ำเชื้อนี้อาจจะมี

ความสัมพันธ์กับการทำงานและขนาดของอัณฑะ (testicular activity) ซึ่งมักจะทำงานสูงขึ้นเมื่ออยู่ในฤดูกาลสืบพันธุ์ (Johnson and Snelson, 1996; Snelson et al., 1997; Piercy et al., 2003)

ความยาวของอวัยวะนำน้ำเชื้อในการทดลองนี้พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทั้งความยาวจากปลายขอบถึงขอบที่ติดกับลำตัวและความยาวถึงขอบของท่อ นำน้ำเชื้อ โดยภายในของอวัยวะนำน้ำเชื้อนั้นประกอบด้วยกระดูกอ่อนแกนกลาง (axial cartilages) ขึ้นกระดูกอ่อนส่วนบนและล่าง (dorsal and ventral marginal) และขึ้นกระดูกอ่อนส่วนปลายด้านบนและล่าง (dorsal and ventral terminal) (Taniuchi and Ishihara, 1990; Delpiani et al., 2012) ซึ่งทำให้ไม่มีการเปลี่ยนความยาวของอวัยวะนำน้ำเชื้อที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญในแต่ละสัปดาห์ อย่างไรก็ตามกระดูกอ่อนของอวัยวะนำน้ำเชื้อนี้มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นตามวัย ในการทดลองครั้งนี้มีช่วงระยะเวลาที่สั้นเกินกว่าที่จะเห็นการเปลี่ยนแปลงของความยาวจากการเจริญของกระดูกอ่อนดังกล่าวได้ นอกจากนี้ความยาวของอวัยวะนำน้ำเชื้อของปลากระเบนเพศผู้สายพันธุ์ *P. circularis* ในวัยเจริญพันธุ์นั้น พบว่ามีความยาวเป็นร้อยละ 13-22.9 และ 9-12.6 เมื่อวัดจากปลายถึงขอบที่ติดกับลำตัว และวัดจากปลายถึงขอบของท่อ นำน้ำเชื้อตามลำดับ (Thorson et al., 1983) ซึ่งสอดคล้องกับความยาวของปลากระเบนเพศผู้ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ร้อยละของความยาวของท่อ นำน้ำเชื้อต่อความกว้างลำตัวจึงอาจนำมาใช้ในการประเมินการเจริญพันธุ์ปลากระเบนเพศผู้ได้

ปลากระดุกอ่อนจำพวกปลากระเบนส่วนใหญ่มีการเปลี่ยนชุดฟันอย่างต่อเนื่องตลอดชีวิต (Moss, 1972) ซึ่งรูปแบบของฟันของปลากระเบนสายพันธุ์ *D. sabina* เพศผู้มีการเปลี่ยนแปลงให้มีรูปแบบแหลมคมสัมพันธ์กับช่วงเดือนที่เป็นฤดูกาลผสมพันธุ์ และหากเมื่อหมดฤดูกาลผสมพันธุ์รูปแบบของฟันนั้นจะเปลี่ยนเป็นแบบฟันบด (molariform) ซึ่งคล้ายกับรูปแบบของฟันของปลากระเบนเพศเมียที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบเลยตลอดทั้งปี (Kajiura and Tricas, 1996) การเปลี่ยนแปลงรูปแบบของฟันนี้มีความสำคัญกับพฤติกรรมการจับคู่และพฤติกรรมการผสมพันธุ์ของปลากระเบน เนื่องจากตัวผู้จะมีพฤติกรรมกัดที่ครีบของปลากระเบนเพศเมียเพื่อเป็นการจับคู่ก่อนการเข้าผสมพันธุ์ และเป็นการจับยึดในระหว่างการผสมพันธุ์อีกด้วย (Springer, 1960; Nordell, 1994; Kajiura et al., 2000) ลักษณะของฟันของปลากระเบนเพศผู้ที่ใช้ในการทดลองนี้พบว่า มีรูปร่างแหลม (cuspidate form) ทุกตัวตลอดช่วงระยะเวลาทดลอง ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าปลากระเบนสายพันธุ์ *P. motoro* ที่เลี้ยงในบ่อเลี้ยงนี้มีความสามารถในการผสมพันธุ์ได้ตลอดช่วงที่ทำการทดลอง อย่างไรก็ตามยังมีการระบุถึงรัศมีความแหลมคม ซึ่งมีความแตกต่างกันเล็กน้อยระหว่างช่วงที่เป็นฤดูกาลผสมพันธุ์ (Kajiura and Tricas, 1996) ซึ่งไม่สามารถทำการศึกษาได้ในการทดลองครั้งนี้



### 5.1.2 ลักษณะของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ของปลากระเบนเพศเมียโดยการอัลตราซาวด์

รังไข่ของปลากระเบนเพศเมียของปลากระเบนโมโตโรนั้นสามารถประเมินได้โดยการอัลตราซาวด์ โดยพบว่ามียรูปร่างยาวเป็นทรงรี ไม่ปรากฏเยื่อหุ้มรังไข่ชัดเจน ฟอลลิเคิลเจริญออกมาภายนอกเยื่อหุ้ม และพบการเจริญและฟอลลิเคิลได้เฉพาะรังไข่ด้านซ้ายเท่านั้น ส่วนรังไข่ด้านขวานั้นไม่สามารถแยกได้ชัดเจนจากการอัลตราซาวด์ ซึ่งมีลักษณะและขนาดสอดคล้องกับลักษณะทางกายภาพ ในปลากระเบนสายพันธุ์ *P. motoro* และ *P. circularis* (Thorson et al., 1983; Pratt, 1988) นอกจากนี้ยังพบลักษณะเช่นเดียวกันนี้ในปลากระเบนสายพันธุ์อื่น ได้แก่ *Myliobatis californica*, *Dasyatis* sp. (Pratt, 1988) *Dasyatis bleeketi* (Chatchavalvanich and Visutthipat, 1997) และ yellow stingray (*Urobatis jamaicensis*) (Fahy et al., 2007) อย่างไรก็ตามปลากระเบนชนิดอื่นๆ เช่น *Raja erinacea* และ *Leucoraja ocellata* นั้นพบว่ามีรังไข่เจริญทั้งสองข้างและมีรังไข่ชนิดที่ฟอลลิเคิลเจริญอยู่ภายในเยื่อหุ้ม (Sulikowski et al., 2004; Serra-Pereira et al., 2011)

ปริมาตรของรังไข่ที่ประเมินโดยการอัลตราซาวด์นั้นพบว่ามีค่าแปรปรวนมาก และไม่พบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละสัปดาห์ โดยพบว่าปลากระเบนเพศเมียแต่ละตัวซึ่งมีขนาดความกว้างลำตัวใกล้เคียงกันนั้น มีปริมาตรรังไข่แตกต่างกันค่อนข้างมาก ซึ่งอาจจะเกิดจากข้อจำกัดคือ การที่รังไข่นั้นไม่มีเยื่อหุ้มล้อมรอบชัดเจน จุดที่ทำการวัดได้นั้นจึงเป็นบริเวณที่มีการเจริญของฟอลลิเคิลเท่านั้นหากเป็นเนื้อเยื่อรังไข่ที่ไม่มีฟอลลิเคิลนั้นภาพอัลตราซาวด์จะเห็นเป็นเนื้อเดียวกันซึ่งแยกได้ยากจากเนื้อเยื่อโดยรอบจึงทำให้การประเมินขนาดที่แท้จริงนั้นอาจมีความคลาดเคลื่อนได้ นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากความแตกต่างเฉพาะตัวอีกด้วย อย่างไรก็ตามขนาดของรังไข่นั้นจะมีขนาดขึ้นอยู่การปรากฏของฟอลลิเคิลบนรังไข่ (Pratt, 1988) ขนาดของฟอลลิเคิลที่พบในการทดลองมีความหลากหลายมาก โดยพบว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของ โดมิแนนท์ฟอลลิเคิลมีความแปรปรวนและไม่พบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละสัปดาห์เช่นเดียวกับรังไข่ ปลากระเบนสายพันธุ์ *P. circularis* ในธรรมชาตินั้นมีฟอลลิเคิลหลายขนาดอยู่ในรังไข่ในช่วงเวลาเดียวกัน ได้แก่ ฟอลลิเคิลที่คาดว่าจะตกไข่ ซึ่งมีขนาด 20-25 มิลลิเมตร ฟอลลิเคิลขนาดกลาง ซึ่งมีขนาด 10-20 มิลลิเมตร และฟอลลิเคิลขนาดเล็ก ซึ่งมีขนาด 1-10 มิลลิเมตร (Thorson et al., 1983) จึงเป็นไปได้ว่าฟอลลิเคิลนั้นสามารถเจริญได้อย่างต่อเนื่องไม่พร้อมกันและตกไข่ได้หลายครั้งในฤดูกาลสืบพันธุ์ เช่นเดียวกับที่พบในปลากระเบนสายพันธุ์ *Dasyatis americana* (Ramírez-Mosqueda et al., 2012) และ *Malacoraja senta* และ *Amblyraja radiata* (Kneebone et al., 2007) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการผสมพันธุ์แบบไม่พร้อมกัน (asynchronous) หรือผสมพันธุ์ได้ตลอดทั้งปี โดยมี

แนวโน้มที่ขนาดของโดมิแนนท์ฟอลลิเคิลมีขนาดใกล้เคียงกันตลอดปี โดยไม่แสดงช่วงที่หยุดการพัฒนาด้านขนาดของฟอลลิเคิล อย่างไรก็ตามในสายพันธุ์ที่พบว่ามีการผสมพันธุ์พร้อมกันทั้งฝูง (synchronous) และผสมพร้อมกันเป็นฤดูกาลนั้นจะพบว่าการเจริญของฟอลลิเคิลจะมีขนาดใหญ่ขึ้นหรือเล็กลงตามฤดูกาลผสมพันธุ์ (Maruska et al., 1996; Tricas et al., 2000; Gelsleichter et al., 2002; Sulikowski et al., 2004; Mull et al., 2010)

นอกจากนี้การอัลตราซาวด์รังไข่ยังพบโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายคอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum-like structure) มีการสะท้อนคลื่นเสียงน้อยบริเวณตรงกลาง และมีการสะท้อนคลื่นเสียงต่ำบริเวณโดยรอบ โดยมีลักษณะทางภาพอัลตราซาวด์สอดคล้องกับคอร์ปัสลูเทียมในรังไข่ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไป (Nautrup and Tobias, 2000) จึงคาดว่าเป็นคอร์ปัสลูเทียมที่เกิดขึ้นหลังจากเกิดการตกไข่ โดยมีรายงานลักษณะทางจุลกายวิภาคในปลากระเบนชนิด Smallnose fanskate และ *D. bleekeri* ว่าการสลายตัวของเนื้อเยื่อและลดขนาดฟอลลิเคิลร่วมกับมีการแทรกตัวของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Chatchavalvanich and Visutthipat, 1997; Diaz-Andrade et al., 2011) คอร์ปัสลูเทียมที่พบในการทดลองครั้งนี้พบได้ในปลากระเบนเพศเมียบางตัวและจำนวนปลาที่พบโครงสร้างนี้ นั้นมีจำนวนไม่เท่ากันในแต่ละสัปดาห์ โดยเมื่อเทียบกับปลากระเบนที่ไม่พบคอร์ปัสลูเทียมนั้น พบว่ามีสัดส่วนความถี่สูงสุดในสัปดาห์ที่ 9 อย่างไรก็ตามเนื่องจากการเก็บตัวอย่างทำได้เพียง 1 ครั้งต่อ 2 สัปดาห์ ดังนั้นอาจจะมีจำนวนคอร์ปัสลูเทียมที่เกิดขึ้นระหว่างสัปดาห์ที่ไม่ได้เก็บตัวอย่างได้ สำหรับไข่ที่มีลักษณะฝ่อ รูปร่างไม่ชัดเจน มีขอบหนาตัว และขรุขระนั้นคาดว่าเป็นฟอลลิเคิลฝ่อ (atresia follicle) ซึ่งเป็นฟอลลิเคิลที่ไม่สามารถเจริญไปเป็นฟอลลิเคิลที่ตกไข่ได้ โดยสามารถเกิดขึ้นได้ทุกช่วงของการเจริญของฟอลลิเคิล (Chatchavalvanich and Visutthipat, 1997; Díaz-Andrade et al., 2011)

มดลูกและเนื้อเยื่อมดลูกของปลากระเบนเพศเมียสามารถประเมินได้โดยการอัลตราซาวด์ โดยมดลูกของปลากระเบนวางตัวยาวขนานกันทั้งสองข้างของกระดูกแกนกลางลำตัว อยู่ถัดจากต่อมสร้างเปลือกหุ้มไข่ หลังจากนั้นจึงเปิดเข้าช่องทวารร่วม (Wenbin Zheng and Shuyuan Qiu, 1993; Hamlett and Koob, 1999a; Elías, 2015) แต่มีข้อจำกัดเล็กน้อยเนื่องจากจุดที่มดลูกวางตัวนั้นติดกับแกนกลางกระดูกสันหลังซึ่งทำให้อัลตราซาวด์ได้ยาก อีกทั้งตำแหน่งและเส้นผ่าศูนย์กลางของมดลูกนั้นมีความไม่แน่นอนเนื่องจากอาจมีการเบียดของลำไส้ ดังนั้นจุดที่ทำการอัลตราซาวด์จึงเป็นมดลูกส่วนปลายที่เบนตัวเป็นแนวขวางทำมุมประมาณ 80 องศาจากแนวกระดูกสันหลังเพื่อเปิดเข้าสู่ช่องทวารร่วมตรงตำแหน่งที่ตั้งฉากกับกระดูกสันหลังส่วนท้ายที่ 10 ซึ่งเป็นส่วนที่เห็นมดลูกได้ชัดเจนที่สุด ในปลากระเบนสายพันธุ์ *P. circularis* นั้น มดลูกมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 6-35 มิลลิเมตร มีความยาว 25-70 มิลลิเมตร และมีความยาวของเนื้อเยื่อมดลูกประมาณ 10-20 มิลลิเมตร

ในกระเบนที่มีความกว้างลำตัว 370-540 มิลลิเมตร (Thorson et al., 1983) อย่างไรก็ตามขนาดดังกล่าวเป็นเส้นผ่าศูนย์กลางที่วัดมดลูกที่ถูกผ่าออกมาแล้วและเป็นมดลูกส่วนกลางที่มีการขยายตัวเป็นบางส่วน ซึ่งในการอัลตราซาวด์จะไม่สามารถมองเห็นมดลูกส่วนนี้ได้ชัดเจน

รูปร่างของมดลูกส่วนปลายโดยการอัลตราซาวด์นั้นมีความหลากหลาย โดยผู้ทำการทดลองได้แบ่งลักษณะของมดลูกส่วนปลายที่พบ ออกเป็น 4 ระดับ ตามรูปร่างและขนาดของมดลูกส่วนปลาย การเคลื่อนไหวและความยาวของเนื้อเยื่อผนังมดลูก ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบต่างๆอาจมีสาเหตุเนื่องจากปลากระดูกอ่อนที่ออกลูกเป็นตัวนั้น มดลูกจะถูกพัฒนามาเพื่อการหลังสารถัดหลังการฝังตัว และรองรับการเคลื่อนไหวของตัวอ่อน โดยจะประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อผนังมดลูก เส้นเลือด และชั้นกล้ามเนื้อเรียบ ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาลผสมพันธุ์ ในช่วงฤดูกาลผสมพันธุ์นั้นจะมีเลือดมาเลี้ยงที่บริเวณชั้นเยื่อเมือก (mucosa) มากขึ้น มีการหลังสารถัดหลังเพิ่มขึ้น และมีการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์ให้เหมาะสมกับการแลกเปลี่ยนสาร (Hamlett et al., 1996; Hamlett and Hysell, 1998; Hamlett et al., 1998; Elías, 2015) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของขนาดมดลูกนั้นมีความสัมพันธ์กับฤดูกาลผสมพันธุ์ของปลากระดูกอ่อนประเภทนี้

เป็นที่น่าสังเกตว่าค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโดมิแนนท์ฟอลลิเคิลมีแนวโน้มสูงสุดในช่วงสัปดาห์ที่ 7 แม้จะไม่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากนั้นพบว่าค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางตามแนวตั้งของมดลูกมีค่าสูงสุดในช่วงสัปดาห์ 9 เช่นเดียวกับค่าเฉลี่ยของความยาวของเนื้อเยื่อผนังมดลูกนั้นมีค่าสูงสุดในช่วงสัปดาห์เดียวกันแม้จะไม่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ( $p=0.060$ ) ประกอบกับการปรากฏของคอร์ปัสลูเทียมที่มีสัดส่วนสูงสุดในสัปดาห์ที่ 9 จึงเป็นไปได้ว่าการเจริญของฟอลลิเคิลที่นำไปสู่การตกไข่จนเกิดคอร์ปัสลูเทียมนั้นมีความสัมพันธ์กับการเจริญของมดลูกและความยาวของเนื้อเยื่อผนังมดลูกในการทดลองครั้งนี้ โดยมีช่วงเวลาระหว่างการตกไข่จนสังเกตเห็นคอร์ปัสลูเทียมร่วมกับการเจริญของผนังมดลูกประมาณ 2 สัปดาห์ นอกจากนี้สัดส่วนของระดับมดลูกในระดับที่ 2-4 นั้นเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 7-17 สอดคล้องกับการพบคอร์ปัสลูเทียมอีกด้วย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของระดับของมดลูกนี้น่าจะเป็นการเตรียมเนื้อเยื่อผนังมดลูกเพื่อการฝังตัวอ่อนหลังจากการตกไข่ (Hamlett et al., 1996)

### 5.1.3 ลักษณะของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ของปลากระเบนเพศผู้โดยการอัลตราซาวด์

อวัยวะของปลากระเบนเพศผู้สามารถประเมินได้โดยการอัลตราซาวด์ โดยอวัยวะของปลากระเบนเพศผู้นี้มี 2 ข้าง วางตำแหน่งอยู่ช่องท้อง แขนงตัวอยู่กับเยื่อช่องท้องด้านบน (mesorchai) (Chatchavalvanich et al., 2005; Zaiden et al., 2011) รูปร่างของอวัยวะที่พบโดย

การอัลตราซาวด์ มีลักษณะสอดคล้องกับลักษณะทางกายภาพอัมตะของปลากระเบนสายพันธุ์ *P. magdalenae* (Pedreros-Sierra and Ramirez-Pinilla, 2015), *P. cf. hystrix* (Zaiden et al., 2011) และ *Dasyatidae* sp. (Chatchavalvanich et al., 2005) และมีขนาดใกล้เคียงกับในปลากระเบนสายพันธุ์ *P. circularis* ที่มีความกว้างลำตัว 338 มิลลิเมตร โดยมีอัมตะยาว 75 มิลลิเมตร กว้าง 20 มิลลิเมตร (Thorson et al., 1983)

จากการอัลตราซาวด์ภายในอัมตะพบว่ามีการจัดเรียงตัวของท่อมินิเฟอร์สเป็นวงกลมที่มีขนาดใกล้เคียงกันอยู่ภายในเยื่อหุ้มชัดเจนซึ่งสอดคล้องกับรายงานในปลากระเบนสายพันธุ์ *Himantura signifier*, *D. sabina* และ *P. motoro* ในธรรมชาติ ซึ่งมีอัมตะประเภท radial คือมีการจัดเรียงของท่อเซมินิเฟอร์สเป็นวงกลมอยู่ในเยื่อหุ้ม โดยแต่ละกลีบย่อยจะมีจุดต้นกำเนิดในการสร้างเซลล์อสุจิ อยู่ตรงกลางของกลีบย่อย และมีการเจริญออกไปทางด้านนอกของกลีบย่อย (Pratt, 1988; Chatchavalvanich et al., 2005; Zaiden et al., 2011; Pedreros-Sierra and Ramirez-Pinilla, 2015) ในขณะที่ปลากระเบนสายพันธุ์ *Raja erinacae* นั้นมีอัมตะประเภท compound ซึ่งมีการจัดเรียงของท่อเซมินิเฟอร์สไม่มีการแบ่งกลีบย่อยชัดเจน (Pratt, 1988)

ภายในอัมตะจะประกอบด้วยกลีบย่อยของการเรียงตัวของท่อเซมินิเฟอร์ส (seminiferous lobe or seminiferous follicle) ซึ่งแสดงขอบเขตแบ่งแยกชัดเจนโดยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และมีจำนวนหลากหลายตั้งแต่ 20-30 กลีบย่อย โดยมีเซลล์อสุจิที่เจริญจากกึ่งกลางของกลีบออกไปทางขอบนอกของกลีบย่อยตามกระบวนการสร้างอสุจิ (Pratt, 1988; Wenbin Zheng and Shuyuan Qiu, 1993; Chatchavalvanich et al., 2005) จากการทดลองครั้งนี้พบว่าขนาดของอัมตะและเส้นผ่าศูนย์กลางของกลีบของท่อเซมินิเฟอร์สของปลากระเบนเพศผู้ที่มีความแปรปรวน และไม่พบว่ามีขนาดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นไปได้ว่าปลากระเบนเพศผู้ดังกล่าวมีกระบวนการสร้างอสุจิในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน และมีความสามารถในการสร้างอสุจิได้ตลอดช่วงที่ทำการทดลอง

ท่อเซมินิโอลเวซิเคิลของปลากระเบนเพศผู้สามารถประเมินได้ด้วยการอัลตราซาวด์ โดยมีลักษณะสอดคล้องกับในปลากระเบนสายพันธุ์ *P. magdalenae* ที่พบว่าท่อเซมินิโอลเวซิเคิลมีลักษณะเป็นท่อที่มีผนังบาง ภายในเป็นท่อกลวงยาว และหดไปมาเมื่อปลากระเบนอยู่ในช่วงเจริญพันธุ์เต็มที่ วางตำแหน่งอยู่ถัดจากต่อมเลย์ดิกก่อนเข้าสู่ต่อมอัลคาไลนด้านท้ายของไตทั้งสองข้าง รายงานของ โดยตำแหน่งของท่อเซมินิโอลเวซิเคิลนี้มีความใกล้เคียงกันในปลากระเบนชนิดอื่นๆ (Hamlett et al., 2002; Pedreros-Sierra and Ramirez-Pinilla, 2015)

เส้นผ่าศูนย์กลางของท่อเซมินิโอลเวซิเคิลที่พบในการทดลองนี้มีความแปรปรวนสูงและไม่แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละสัปดาห์ อย่างไรก็ตามการศึกษาของ การเปลี่ยนแปลง

ของท่อเซมินอลเวซิเคลกับฤดูกาลผสมพันธุ์ในปลากระเบนสายพันธุ์ *D. sabina* โดยการดูลักษณะทางจุลกายวิภาคและการย้อมสี proliferating cell nuclear antigen (PCNA) นั้นพบว่าในช่วงต้นของการสร้างอสุจิจะยังไม่มีอาการเจริญหรือเปลี่ยนแปลงของท่อดังกล่าว แต่จะพบว่า PCNA แสดงจำนวนมากขึ้น และเมื่อเข้าสู่ระยะท้ายของการสร้างอสุจิจะพบว่าลักษณะทางจุลกายวิภาคของท่อเซมินอลเวซิเคลมีการเปลี่ยนแปลง ท่อมีขนาดใหญ่ขึ้น และมีน้ำเชื้อบรรจุอยู่เต็มภายในท่อ ร่วมกับปริมาณของ PCNA ที่เพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจน (Piercy et al., 2003) อย่างไรก็ตามหลังจากที่กระบวนการสร้างอสุจิเสร็จสิ้นแล้วท่อเซมินอลเวซิเคลนี้ยังคงการทำงานเช่นเดิมไปหลายเดือนตลอดฤดูกาลสืบพันธุ์ ในขณะที่ท่อเก็บอสุจิ (epididymis) นั้นจะมีขนาดและการทำงานลดลงทันทีเมื่อมีกระบวนการดังกล่าวเสร็จสิ้น นอกจากนี้ในปลากระเบนแล้วยังพบการเปลี่ยนแปลงที่ใกล้เคียงกันในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังเพศผู้ชนิดอื่นๆอีกด้วย (Todhunter and Gemmell, 1987; Stefanini et al., 1999) จึงเป็นไปได้ว่าขนาดของท่อเซมินอลเวซิเคลนี้มีความแปรปรวนเนื่องจากหน้าที่ในการบรรจุน้ำเชื้อรวมถึงการแลกเปลี่ยนสารอาหารของน้ำเชื้อ และการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคต่างที่มีผลต่อการขนาดของพื้นที่ผิวของท่อในแต่ละช่วงของกระบวนการสร้างอสุจิ และไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนเนื่องมาจากการทำงานที่สม่ำเสมอของการบรรจุน้ำเชื้อตลอดช่วงเวลาที่อยู่ในช่วงการผสมพันธุ์ (Hamlett et al., 2002; Henderson et al., 2014; Pedreros-Sierra and Ramirez-Pinilla, 2015) อย่างไรก็ตามท่อทางระบบสืบพันธุ์อื่นๆ เช่น ท่อเก็บอสุจิ ต่อมเลย์ติค ต่อมอัลคาไลน์ ท่อนำอสุจินั้นไม่สามารถแยกได้ชัดเจนจากการอัลตราซาวด์ เนื่องจากมีขนาดเล็กและเนื้อเยื่อของต่อมนั้นๆไม่มีความแตกต่างกับเนื้อเยื่อโดยรอบ

#### 5.1.4 ระดับฮอร์โมนเพศในเลือดในปลากระเบนเพศเมีย

ค่าปริมาณความเข้มข้นพื้นฐานของระดับของฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดของปลากระเบนเพศเมีย มีค่าเฉลี่ยรวมตลอดการทดลอง  $0.73 \pm 0.51$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีระดับใกล้เคียงกับปลากระเบนสายพันธุ์ *Leucoraja ocellata* เพศเมียที่มีระดับเอสตราไดออลในเลือด 704-5,143 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (Sulikowski et al., 2004) และในปลากระเบนสายพันธุ์ *D. sabina* เพศเมียมีระดับเอสตราไดออลในเลือด 44-3,427 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (Snelson et al., 1997; Tricas et al., 2000)

ค่าปริมาณความเข้มข้นพื้นฐานของระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดของปลากระเบนเพศเมีย มีค่าเฉลี่ยรวมตลอดการทดลอง  $0.70 \pm 0.50$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ปลากระเบนสายพันธุ์ *Leucoraja ocellata* เพศเมียมีระดับโปรเจสเตอโรนในเลือด 72-1,114 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (Sulikowski et al., 2004) ในปลากระเบนสายพันธุ์ *D. sabina* เพศเมียมีระดับโปรเจสเตอโรน 6-358 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (Snelson et al., 1997; Tricas et al., 2000)

จากการศึกษาพบว่าแบบแผนของแต่ละฮอร์โมนของปลากระเบนเพศเมียในช่วงที่ทำการทดลองนั้นมีแบบแผนที่เป็นไปในทางเดียวกันทั้งกลุ่มการทดลอง โดยระดับฮอร์โมนเอสทราไดโอดลมีแนวโน้มที่แสดงถึงความแตกต่างของปริมาณฮอร์โมนในช่วงสัปดาห์ที่ 11 ที่สูงกว่าช่วงอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และมีแนวโน้มต่ำสุดในช่วงสัปดาห์ที่ 7 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในขณะที่ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีแนวโน้มสูงสุดในช่วงต้นของการทดลอง (สัปดาห์ที่ 1, 3, 5 และ 7) และลดลงต่ำสุดในช่วงสัปดาห์ที่ 11 และ 15 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) อย่างไรก็ตามการศึกษาในทั้งปลากระดุกอ่อนที่ออกลูกเป็นตัวและออกลูกเป็นไข่ นั้น เอสทราไดโอดในเลือดนั้นมีความเกี่ยวข้องกับการเจริญของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ของปลากระดุกอ่อนที่ออกลูกเป็นตัวอย่างมาก ปริมาณเอสทราไดโอดในเลือดที่สูงขึ้นนั้นมักเกิดในช่วงเวลาที่มีการสร้างและพัฒนา فولลิเคิล (Maruska and Gelsleichter, 2010) เนื่องจากเซลล์แกรนูโลซาและเซลล์ทีกาที่อยู่ภายใน فولลิเคิลจะสร้างฮอร์โมนเอสทราไดโอด ดังนั้นช่วงที่มีการเจริญของ فولลิเคิลระดับของฮอร์โมนเอสทราไดโอดจึงมักเพิ่มขึ้นด้วย (Tsang and Callard, 1992) นอกจากนี้ยังมีรายงานในปลากระเบนสายพันธุ์ *D. sabina* ว่าระดับของฮอร์โมนเอสทราไดโอดจะสูงขึ้นสูงสุด 2 ช่วงคือ ช่วงที่เกิดการตกไข่ซึ่งเป็นช่วงสุดท้ายของการเจริญของ فولลิเคิล ตามด้วยการปฏิสนธิ และช่วงที่มีการเจริญของตัวอ่อนช่วงท้ายก่อนคลอด (Tricas et al., 2000) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ว่าระดับของเอสทราไดโอดในเลือดจะสูงขึ้นเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงการดูดซึมสารอาหารของตัวอ่อนระหว่างการสร้างปมรกและการสร้างฮิสโตทรอป (histotroph) อีกด้วย (Manire et al., 1995; Snelson et al., 1997) ในปลากระเบนเพศเมียที่ออกลูกเป็นตัวนั้นมียางานว่าความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนนั้นจะมีระดับสูงขึ้นช่วงก่อนการตกไข่ และหากมีการตั้งท้องฮอร์โมนชนิดนี้ก็จะยังคงระดับสูงไปจนถึงช่วงต้นของการตั้งท้อง (Manire et al., 1995; Snelson et al., 1997; Tricas et al., 2000; Prisco et al., 2008) สอดคล้องกับรายงานที่กล่าวว่าโปรเจสเตอโรนนั้นถูกสร้างจากเซลล์แกรนูโลซาใน فولลิเคิลซึ่งถูกกระตุ้นจากการทำงานของต่อมใต้สมอง (Mull et al., 2010)

นอกจากนี้ยังพบว่าฮอร์โมนเอสทราไดโอดในเลือดและฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดของปลากระเบนเพศเมียในช่วงที่ทำการทดลองนั้นมีความสัมพันธ์กันในเชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ว่าโปรเจสเตอโรนนั้นออกฤทธิ์ตรงกันข้าม (antagonist effect) กับฮอร์โมนเอสทราไดโอด เนื่องจากโปรเจสเตอโรนมีบทบาทในการยับยั้งการสร้างไวโทโลเจนิคในตัวยังถูกกระตุ้นโดยเอสทราไดโอด สอดคล้องกับรายงานในปลากระดุกอ่อนชนิด spiny dogfish (*Squalus acinthias*) และ *Triplophysa marmorata* ที่กล่าวว่าเมื่อระดับของโปรเจสเตอโรนสูงจะไม่พบไวโทโลเจนิคในตัวยังพบว่าการระดับของเอสทราไดโอดมีความเข้มข้นต่ำ (Ho et al., 1980;

Tsang and Callard, 1987; Prisco et al., 2008) อย่างไรก็ตามกลไกการยับยั้งการสร้างไวเทโลเจนนี้นี้ยังไม่มีข้อมูลชัดเจน (Koob and Callard, 1999; Gelslechter and Evans, 2012)

### 5.1.5 ระดับฮอร์โมนเพศในเลือดในปลากระเบนเพศผู้

ค่าปริมาณความเข้มข้นพื้นฐานของระดับของฮอร์โมนเพศโทสเทอโรนในเลือดของปลากระเบนเพศผู้ มีค่าเฉลี่ยรวม  $513.62 \pm 395.05$  พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ปลากระเบนสายพันธุ์ *D. sabina* เพศผู้มีระดับฮอร์โมนเพศโทสเทอโรน 233.1- 8,177 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (Snelson et al., 1997; Tricas et al., 2000) ปลากระเบนสายพันธุ์ *Leucoraja ocellata* เพศผู้มีระดับฮอร์โมนเพศโทสเทอโรนในเลือด 31,658-60,670 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (Sulikowski et al., 2004) ค่าปริมาณความเข้มข้นพื้นฐานของระดับของฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดของปลากระเบนเพศผู้มีค่าเฉลี่ยรวม  $0.94 \pm 0.30$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ปลากระเบนสายพันธุ์ *D. sabina* เพศผู้มีระดับเอสตราไดออลในเลือด 25-158 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (Snelson et al., 1997; Tricas et al., 2000) และปลากระเบนสายพันธุ์ *Leucoraja ocellata* เพศผู้มีระดับเอสตราไดออลในเลือด 41-106 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (Sulikowski et al., 2004)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าแบบแผนของของฮอร์โมนเพศโทสเทอโรนในเลือดของปลากระเบนเพศผู้นั้น ปริมาณฮอร์โมนเพศโทสเทอโรนมีแนวโน้มต่ำในช่วงต้นของการทดลอง (สัปดาห์ที่ 2, 4 และ 6) ก่อนเพิ่มขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 10 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในขณะที่แบบแผนของระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดของปลากระเบนเพศผู้นั้นค่อนข้างแปรปรวน โดยมีแนวโน้มที่แสดงถึงความแตกต่างของปริมาณฮอร์โมนในช่วงสัปดาห์ที่ 10 และ 12 ที่สูงกว่าช่วงอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เช่นกัน อย่างไรก็ตามฮอร์โมนเพศโทสเทอโรนในเลือดของปลากระเบนเพศผู้นั้นมีบทบาทสำคัญการพัฒนาและการเจริญของเซลล์อสุจิ ระดับของฮอร์โมนมักเพิ่มขึ้นในช่วงกลางและช่วงท้ายของการบวกรสร้างอสุจิ (mid and late stage of spermatogenesis) (Cuevas and Callard, 1992; Garnier et al., 1999; Awruch et al., 2008; Gelslechter and Evans, 2012) ซึ่งสอดคล้องกับในปลากระเบนเพศผู้สายพันธุ์ *D. sabina* ที่พบว่าระดับของฮอร์โมนเพศโทสเทอโรนนั้นเพิ่มสูงขึ้นสัมพันธ์กับความหนาแน่นของอสุจิ การเพิ่มจำนวนของเซลล์เซอโทไล และขนาดของอันทะที่เพิ่มขึ้นในการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาค (Tricas et al., 2000) นอกจากนี้ยังพบว่าระดับฮอร์โมนเพศโทสเทอโรนที่สูงขึ้นยังสัมพันธ์กับพฤติกรรมผสมพันธุ์ภายในช่วงฤดูการสืบพันธุ์อีกด้วย (Hoisington and Lowe, 2005; Vaudo and Lowe, 2006) ในทางตรงกันข้ามระดับของฮอร์โมนเพศโทสเทอโรนในปลากระเบนออ่อนบางชนิด เช่น *Malacoraja senta* และ *Amblyraja radiata* ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละเดือนของระดับของฮอร์โมนเพศโทสเทอโรนเนื่องมาจากความสามารถในการสืบพันธุ์ตลอดทั้งปี (Kneebone et al., 2007)

ฮอร์โมนเอสทราไดออลนั้นมีบทบาทที่ไม่แน่ชัดนักในปลากระเบนเพศผู้ อย่างไรก็ตามมีการพบตัวรับของเอสทราไดออลในอวัยวะของปลากระเบนเพศผู้ (Callard et al., 1985; Cuevas and Callard, 1992) และยังพบว่าเอสทราไดออลจะมีระดับสูงขึ้นในช่วงกลางของกระบวนการสร้างอสุจิอีกด้วย (Callard et al., 1991; Tricas et al., 2000; Sulikowski et al., 2004)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนและฮอร์โมนเอสทราไดออลในเลือดของปลากระเบนเพศผู้ในช่วงที่ทำการทดลองนั้น พบว่าฮอร์โมนดังกล่าวมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ว่าระดับเอสทราไดออลนั้นจะมีระดับสูงขึ้นในช่วงที่มีการทำงานของของกระบวนการสร้างอสุจิสูงสุดเช่นเดียวกับเทสโทสเตอโรน (Tricas et al., 2000) อีกทั้งการที่มีตัวรับเอสทราไดออลในอวัยวะ และการพบการทำงานของเอนไซม์อโรมาเตส (aromatase enzyme activity) ในช่วงที่มีการสร้างอสุจิสูงสุด จึงมีแนวโน้มว่าระดับของฮอร์โมนเอสทราไดออลในเลือดของปลากระเบนเพศผู้ นั้นจะสูงขึ้นพร้อมกับระดับของเทสโทสเตอโรน (Callard et al., 1985; Callard et al., 1991) นอกจากนี้ในปลากระดูกแข็ง (teleost) ยังพบว่าฮอร์โมนเพศผู้ (androgen) นั้นเป็นสารตั้งต้นในการสร้างเอสทราไดออลอีกด้วย (Barannikova et al., 2000)

#### 5.1.6 ความสัมพันธ์ของระดับฮอร์โมนเพศในเลือดและลักษณะของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ของปลากระเบนเพศเมียและเพศผู้โดยการอัลตราซาวด์

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของฮอร์โมนเพศเมียและลักษณะทางกายภาพของรังไข่พบว่า ทั้งฮอร์โมนเอสทราไดออลและโปรเจสเตอโรนนั้นไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างปริมาณรังไข่ ความกว้างของโดมิแนนท์ฟอลลิเคิล เส้นผ่าศูนย์กลางแนวตั้งของมดลูก และความยาวของเนื้อเยื่อผนังมดลูก ซึ่งสอดคล้องกับในปลากระเบนสายพันธุ์ *Malacoraja senta* และ *Amblyraja radiata* ที่พบว่าระดับของฮอร์โมนทั้งสองไม่มีความสัมพันธ์ต่อน้ำหนักของรังไข่ ต่อมสร้างเยื่อหุ้มเปลือกไข่ และขนาดของโดมิแนนท์ฟอลลิเคิล อย่างไรก็ตามในปลากระเบนสายพันธุ์ *D. sabina* ระดับของเอสทราไดออลและโปรเจสเตอโรนนั้นมีความสัมพันธ์กับการตกไข่ และขนาดของโดมิแนนท์ฟอลลิเคิล แม้ว่าจะมีรายงานยืนยันว่าระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนนั้นมีระดับสูงขึ้นก่อนการตกไข่และคงระดับสูงไปถึงที่มีการฝังตัวและตั้งท้อง แต่ยังไม่มียางานชัดเจนในเรื่องความสัมพันธ์ของระดับโปรเจสเตอโรนกับมดลูกหรือความยาวของเนื้อเยื่อผนังมดลูกของปลากระดูกอ่อน มีเพียงข้อมูลที่แสดงว่าโปรเจสเตอโรนในเลือดนั้นไม่มีความสัมพันธ์ต่อการวางไข่หรือไม่ในปลากระเบนสายพันธุ์ *A. radiata* (Maruska and Gelsleichter, 2010) และมีความสัมพันธ์กับการฝังตัวของไข่ในปลากระเบนสายพันธุ์ *L. erinacea* และ *L. ocellata* (Koob et al., 1986; Sulikowski et al., 2004) นอกจากนี้เอสทราไดออลในเลือดนั้นมีส่วนในบทบาทในการหดตัวของมดลูกและการปรับตัวของปากมดลูกอีกด้วย (Maruska



and Gelslechter, 2010) อย่างไรก็ตามในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไป พบว่าเอสตราไดออลและโปรเจสเตอโรนนั้นมีการกระตุ้นการเจริญของมดลูกทั้งทั้งการเพิ่มขนาด (hypertrophy) และเพิ่มจำนวน (hyperplasia) ของเซลล์ผนังมดลูก (Sam and Nils, 1961) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าฮอร์โมนเพศที่ทำการศึกษานี้ไม่ได้มีผลโดยตรงกับการเจริญของรังไข่และการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อมดลูกของปลากระเบนโมโตโรเพคเมีย

สำหรับในปลากระเบนเพศผู้นั้นไม่พบว่าระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในเลือดนั้นมีความสัมพันธ์ทางสถิติกับทั้งปริมาณอณูหะ ความกว้างของกลีบย่อยของท่อเซมินิเฟอร์ส ความกว้างของท่อเซมินอลเวสิเคิล ความยาวเส้นรอบวงของท่อน้ำน้ำเชื้อ ความยาวของอวัยวะนำน้ำเชื้อถึงปลายของที่ติดกับลำตัว และความยาวของอวัยวะนำน้ำเชื้อถึงปลายขอบของท่อน้ำน้ำเชื้อ และระดับของเอสตราไดออลในเลือดของปลากระเบนเพศผู้ไม่พบว่าความสัมพันธ์กับทั้งปริมาณอณูหะ ความกว้างของกลีบย่อยของท่อเซมินิเฟอร์ส ความกว้างของท่อเซมินอลเวสิเคิล และความยาวของอวัยวะนำน้ำเชื้อถึงปลายของที่ติดกับลำตัว ซึ่งสอดคล้องรายงานที่พบว่าระดับเทสโทสเตอโรนของปลากระเบนสายพันธุ์ *M. senta* และ *A. radiata* นั้นไม่มีความสัมพันธ์ต่อลักษณะทางกายภาพของอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งน้ำหนักของอณูหะและการเจริญของกระบวนการสร้างอสุจิ (Kneebone et al., 2007) ในขณะที่ความสัมพันธ์ในเชิงบวกของเทสโทสเตอโรนกับการเจริญของเซลล์อสุจิในระยะต่างๆ นั้นมีรายงานในฉลามสายพันธุ์ *Hemiscyllium ocellatum* (Heupel et al., 1999) และปลากระเบนสายพันธุ์ *D. sabina* (Tricas et al., 2000) นอกจากนี้ยังพบว่าระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลของปลากระเบนเพศผู้มีความสัมพันธ์กับการเจริญของอณูหะอีกด้วย (Snelson et al., 1997)

ไม่พบว่ามีการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับฮอร์โมนเพศกับขนาดของต่อมเซมินอลของปลากระเบนเพศผู้โดยตรงอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามพบว่าระดับของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนที่สูงขึ้นนั้นไม่มีความสัมพันธ์กับการเจริญหรือการเปลี่ยนแปลงของท่อเก็บอสุจิ (epididymis) ในกระเบนสายพันธุ์ *D. sabina* (Snelson et al., 1997) ในขณะที่มีรายงานว่าระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลของปลากระเบนดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการเจริญและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ของท่อเก็บอสุจิและต่อมเซมินอลเวสิเคิล (Gelslechter and Evans, 2012) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าฮอร์โมนเพศที่ทำการศึกษานี้ไม่ได้มีผลโดยตรงต่อกระบวนการสร้างอสุจิและการสร้างน้ำเลี้ยงเชื้อของปลากระเบนโมโตโรเพคผู้

อย่างไรก็ตามพบว่าระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดนั้นมีความสัมพันธ์ทางสถิติกับความยาวเส้นรอบวงของท่อน้ำน้ำเชื้อ และความยาวของอวัยวะนำน้ำเชื้อถึงปลายขอบของท่อน้ำน้ำเชื้อ ซึ่ง

เป็นได้ว่าเอสตราไดออลนั้นมีผลในการเพิ่มการสร้างน้ำเลี้ยงเชื้อภายในต่อมของท่อนำน้ำเชื้อ ฮอร์โมน เอสตราไดออลใน *D. sabina* นั้นมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับการสร้างน้ำเลี้ยงเชื้อและขนาดของ อัณฑะในช่วงฤดูกาลผสมพันธุ์ (Snelson et al., 1997) ในทางตรงกันข้ามไม่มีรายงานของ ความสัมพันธ์ของเอสตราไดออลกับความยาวของอวัยวะนำน้ำเชื้อ แต่มีรายงานว่าฮอร์โมนเพศผู้ที่มีความสัมพันธ์เชิงบวกต่อความยาวของอวัยวะนำน้ำเชื้อ (Callard et al., 1991; Rasmussen and Murru, 1992; Sulikowski et al., 2005)

การที่เอสตราไดออลในเลือดนั้นไม่แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะทางกายภาพของอวัยวะ สืบพันธุ์ในปลากระเบนเพศเมียทั้งปริมาตรรังไข่ ขนาดของโตมิแนนท์พอลลิเคิล และมดลูก และ เทสโทสเทอโรนไม่แสดงความสัมพันธ์ต่อลักษณะทางกายภาพของอวัยวะสืบพันธุ์ในปลากระเบนเพศ ผู้ทั้งปริมาตรอัณฑะ ขนาดของกลีบย่อยของท่อเซมินิเฟอร์ขนาดท่อเซมินอลเวซิเคิลและขนาดของ อวัยวะนำน้ำเชื้อนั้น มีแนวโน้มที่จะสรุปได้ว่าปลากระเบนชนิดนี้มีความสามารถในการสืบพันธุ์ได้ ตลอดทั้งปี เช่นเดียวกับที่พบในปลากระเบนสายพันธุ์ *M. senta* และ *A. radiata* (Sulikowski et al., 2005; Kneebone et al., 2007) อย่างไรก็ตามปลากระเบนอีกหลายสายพันธุ์ที่มีวงรอบการ สืบพันธุ์ชัดเจน เช่น *L. erinacea*, *L. ocellata* และ *D. sabina* นั้นแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ฮอร์โมนเพศกับน้ำหนักรังไข่ น้ำหนักอัณฑะ ขนาดของโตมิแนนท์พอลลิเคิล และอวัยวะนำน้ำเชื้อ อย่างชัดเจน (Koob et al., 1986; Tsang and Callard, 1987; Sulikowski et al., 2004) อย่างไรก็ตาม การไม่สัมพันธ์กันทางสถิติดังกล่าวนี้แสดงถึงรูปแบบการสืบพันธุ์แบบไม่พร้อมกันในฝูง (asynchronous) มากกว่าจะแสดงว่าระดับฮอร์โมนนั้นไม่มีความสำคัญต่อวงรอบการสืบพันธุ์เลย (Kneebone et al., 2007)

อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานถึงรูปแบบและช่วงเวลาของวงรอบการสืบพันธุ์ที่ชัดเจน สำหรับปลากระเบนสายพันธุ์ *P. motoro* แต่มีรายงานว่า *P. motoro* นั้นมีวงรอบการสืบพันธุ์ขึ้นอยู่ กับวัฏจักรของน้ำ (hydrological cycle) (Charvet-Almeida et al., 2005) ซึ่ง *P. motoro* ที่อาศัย อยู่ในลุ่มแม่น้ำอเมซอนนั้นจะมีฤดูผสมพันธุ์ในช่วงฤดูฝนหรือฤดูแล้ง โดยมีระยะเวลาในการพัฒนาของ ไข่ประมาณ 3 เดือน และตั้งท้อง 3-9 เดือน จากการทดลองครั้งนี้พบว่าฮอร์โมนเพศนั้นมีแนวโน้มที่ แสดงถึงการมีวงรอบการสืบพันธุ์เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงระดับขึ้นลงพร้อมกันทั้งฝูง แต่เนื่องจาก ลักษณะทางกายภาพของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์นั้นไม่มีความสัมพันธ์กับฮอร์โมนดังที่กล่าวมาแล้ว จึง เป็นไปได้ว่าปลากระเบนสายพันธุ์นี้สามารถปรับตัวให้อยู่ในสิ่งแวดล้อมเช่นในบ่อเลี้ยงได้และมีความสามารถในการผสมพันธุ์แบบไม่พร้อมกันได้ตลอดปี ความแตกต่างเช่นเดียวกันนี้พบได้ในปลา กระเบนสายพันธุ์ *D. americana* (Grubbs et al., 2009) โดยปลากระเบนสายพันธุ์นี้ที่อาศัยอยู่ใน แหล่งธรรมชาติที่ชายฝั่งตะวันออกเฉียงใต้ของสหรัฐอเมริกา นั้นมีวงรอบการสืบพันธุ์พร้อมกันชัดเจนคือ

1 รอบต่อปี ในขณะที่ปลากะเบนสายพันธุ์นี้ที่อาศัยอยู่ในธรรมชาติที่อ่าวเม็กซิโก (Ramírez-Mosqueda et al., 2012) นั้นมีรูปแบบการสืบพันธุ์แบบไม่พร้อมกันในฝูง ทั้งๆที่สายพันธุ์ *Dasyatis* sp. ส่วนใหญ่ (*D. sayi*, *D. sabina*, *D. marianae*, *D. guttata* และ *D. chrysonota*) นั้นมีรูปแบบการสืบพันธุ์แบบพร้อมกันทั้งฝูงชัดเจน (Snelson et al., 1989; Johnson and Snelson, 1996; Yokota and Lessa, 2007; Ebert and Cowley, 2009) และเป็นที่น่าสนใจว่าฉลามบางชนิดที่อาศัยอยู่บริเวณเขตร้อน (tropical) นั้นมีรูปแบบการสืบพันธุ์แบบไม่พร้อมกันทั้งฝูงเนื่องจากมีสิ่งแวดล้อมที่ค่อนข้างคงที่และมีอาหารที่สมบูรณ์ตลอดปี (Castro, 2009) นอกจากนี้ยังพบว่าปลากะเบนสายพันธุ์ *D. Americana* ในบ่อเลี้ยงนั้นมีการสืบพันธุ์เป็น 2 รอบต่อปี ปลาในบ่อเลี้ยงนั้นสามารถผสมพันธุ์และตั้งท้องได้ทันที ในขณะที่ปลาในธรรมชาตินั้นมีช่วงเว้นว่างเนื่องจากสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย เช่นอุณหภูมิ ในทำนองเดียวกันฉลามสายพันธุ์ *Hemiscyllium ocellatum* ในธรรมชาตินั้นมีการสืบพันธุ์ 1 ครั้งต่อปีชัดเจน เมื่อถูกนำมาเลี้ยงในบ่อเลี้ยง ฉลามสายพันธุ์นี้สามารถเปลี่ยนวงจรการสืบพันธุ์ให้สามารถผสมพันธุ์ได้ตลอดปี จึงเป็นไปได้ว่าการที่อุณหภูมิค่อนข้างคงที่และเหมาะสมทำให้ปลากะเบนชนิดต่างๆ ดังกล่าวปรับตัวได้ (Henningsen et al., 2013)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนเพศและลักษณะทางกายภาพต่างๆ พบว่าระดับฮอร์โมนเพศในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถนำมาประเมินวงจรการสืบพันธุ์โดยตรงของปลากะเบนโมโตโรในบ่อเลี้ยงได้ เนื่องจากมีระดับที่ไม่สัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางกายภาพทั้งภายนอกและลักษณะทางกายภาพของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์โดยการอัลตราซาวด์ ซึ่งสอดคล้องกับที่พบปลากะเบนสายพันธุ์ *M. senta* และ *A. radiata* (Sulikowski et al., 2005; Kneebone et al., 2007) ที่พบว่าระดับฮอร์โมนเพศนั้นไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงชัดเจน และไม่มีความสัมพันธ์ต่อลักษณะทางกายภาพของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์เนื่องจากเป็นปลากะเบนที่มีความสามารถในการผสมพันธุ์ได้ตลอดปี ในขณะที่ลักษณะทางกายภาพของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ที่ประเมินโดยการอัลตราซาวด์นั้นสามารถนำมาประยุกต์ในการประเมินวงจรการสืบพันธุ์ในปลากะเบนเพศเมีย ได้แก่ การเจริญของฟอลลิเคิล การตกไข่ การเปลี่ยนแปลงของมดลูกเพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการฝังตัวของตัวอ่อน ความพร้อมในการผสมพันธุ์และความสมบูรณ์พันธุ์ของปลากะเบนเพศเมียได้ โดยการประเมินจากขนาดของโดมิแนนท์ฟอลลิเคิล การปรากฏของคอร์ปัสลูเทียม และระดับและขนาดของมดลูก สำหรับปลากะเบนเพศผู้ยังสามารถนำมาประยุกต์ในการประเมินช่วงอายุการเจริญพันธุ์ และความพร้อมในการผสมพันธุ์ จากการประเมินขนาดของอวัยวะนำน้ำเชื้อและการเจริญของอัณฑะและท่อเซมินอลเวซิเคิล อย่างไรก็ตามวงจรการเจริญของฟอลลิเคิลและการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อมดลูกนั้นยังเห็นไม่ชัดเจนในระยะการศึกษานี้ จึงเป็นไปได้ว่า

วงรอบการสืบพันธุ์ของปลากระเบนสายพันธุ์นี้ในบ่อเลี้ยงมีระยะเวลานานกว่า 17 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ไม่เพียงพอต่อการประเมินวงรอบดังกล่าวเนื่องจากข้อจำกัดระยะเวลาในการศึกษาและความคลาดเคลื่อนของการประเมินวงรอบการตั้งท้องในปลากระเบนสายพันธุ์นี้ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษายืนยันเกี่ยวกับวงรอบการสืบพันธุ์ในปลากระเบนสายพันธุ์นี้ในระยะยาวต่อไป

## 5.2 การทดลองที่ 2

### 5.2.1 การเปลี่ยนแปลงของลักษณะของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ของปลากระเบนเทศเมีย โดยการอัลตราซาวด์

จากการอัลตราซาวด์เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของปริมาตรรังไข่ และเส้นผ่าศูนย์กลางของโดมิแนนท์ฟอลลิเคิลนั้น พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญตลอดการทดลอง แม้ว่าจะมีรายงานยืนยันมากมาย เกี่ยวกับบทบาทของโพรสตาแกลนดินเอพูแอลฟาในการทำให้เกิดการตกไข่ และเกิดการเปลี่ยนแปลงกับฟอลลิเคิลโดยเฉพาะในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเศรษฐกิจ (Pharriss and Shaw, 1974; Armstrong, 1981) สำหรับในสัตว์น้ำโพรสตาแกลนดินเอพูแอลฟานั้นสามารถกระตุ้นการตกไข่ของโดมิแนนท์ฟอลลิเคิลได้จากการกระตุ้นให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของกับเซลล์ที่กาในปลาชนิด rainbow trout (Jalabert and Szollosi, 1975) และยังมีบทบาทในการฉีกขาดของผนังฟอลลิเคิลเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการตกไข่ในปลาทองอีกด้วย (Stacey and Goetz, 1982) ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มอัตราการตกไข่ใน Japanese eel (Kagawa et al., 2003) และการส่งผลต่อการหดตัวของผนังของโดมิแนนท์ฟอลลิเคิลในปลา brook trout (Hsu and Goetz, 1991) นอกเหนือจากบทบาทของโพรสตาแกลนดินเอพูแอลฟาในระดับการออกฤทธิ์ต่อรังไข่แล้วนั้น ฮอโมนชนิดนี้ยังอาจเป็นสื่อกลางในการกระตุ้นกระบวนการตกไข่ผ่านทางต่อไฮโปธาลามัสและต่อมใต้สมองอีกด้วย (Singh and Singh, 1976) อย่างไรก็ตาม ยังกล่าวถึงอีกปัจจัยที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อรังไข่ ฟอลลิเคิล และคอร์ปัสลูเทียม คือฤทธิ์ในการทำให้เส้นเลือดหดตัวของโพรสตาแกลนดินเอพูแอลฟาซึ่งส่งผลให้เลือดไปเลี้ยงรังไข่น้อยลงส่งผลให้เกิดการสลายของคอร์ปัสลูเทียม (Pharriss and Shaw, 1974)

การอัลตราซาวด์เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของระดับมดลูก พบว่าหลังจากฉีดโพรสตาแกลนดินสังเคราะห์แล้ว ระดับมดลูกลดลงในวันที่ 2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) หลังจากนั้นระดับของมดลูกได้เพิ่มระดับขึ้นเล็กน้อยและมีระดับใกล้เคียงกันจนสิ้นสุดการทดลองโดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ตั้งแต่วันที่ทดลองที่ 2 จนสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 26 นั้น พบว่าระดับมดลูกมีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองในแต่ละวันทดลอง

นั้นๆอีกด้วย และเมื่ออัลตราซาวด์เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของเส้นผ่าศูนย์กลางตามแนวตั้งของมดลูก พบว่า ในกลุ่มควบคุมเส้นผ่าศูนย์กลางตามแนวตั้งของมดลูก หลังจากฉีดโพรสตาแกลนดินสังเคราะห์ แล้วเส้นผ่าศูนย์กลางตามแนวตั้งของมดลูกลดลงในวันที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) หลังจากนั้น เส้นผ่าศูนย์กลางตามแนวตั้งของมดลูกมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และคงระดับใกล้เคียงกันโดยไม่มี ความแตกต่างทางสถิติจนสิ้นสุดการทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่าในวันทดลองที่ 2 นั้น เส้นผ่าศูนย์กลางตามแนวตั้งของมดลูกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างของทั้ง 2 กลุ่มในวันทดลองอื่นๆ การอัลตราซาวด์เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของความยาวของเนื้อเยื่อมดลูก พบว่า หลังจากฉีดโพรสตาแกลนดินสังเคราะห์แล้วความยาวของเนื้อเยื่อมดลูกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ในวันทดลองที่ 2 เช่นเดียวกับระดับมดลูกและเส้นผ่าศูนย์กลางตามแนวตั้งของมดลูก และคงระดับต่ำในวันทดลองที่ 5, 12, 19 และ 26 นอกจากนี้ตั้งแต่วันทดลองที่ 2 จนสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 26 นั้น พบว่าความยาวของเนื้อเยื่อมดลูกมีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในแต่ละวันทดลองนั้นๆอีกด้วย

เป็นที่น่าสังเกตว่ากลุ่มที่ทำการฉีดโพรสตาแกลนดินสังเคราะห์นั้นมีการเปลี่ยนแปลงของมดลูกทันทีอย่างชัดเจนในวันถัดไป อย่างไรก็ตามเส้นผ่าศูนย์กลางตามแนวตั้งของมดลูกนั้นกลับมามีความกว้างที่ไม่แตกต่างจากเดิมในวันทดลองที่ 5 จนจบการทดลอง และยังไม่มีความแตกต่างกลับกลุ่มควบคุมอีกด้วย ในขณะที่ระดับของมดลูกนั้นมีระดับลดลงอย่างทันทีเช่นเดียวกัน แต่ยังคงแสดง ความแตกต่างในแต่ละวันทดลองกับกลุ่มควบคุมจนจบการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับการที่ความยาวของเนื้อเยื่อมดลูกลดลงในวันทดลองที่ 2 และยังคงน้อยไปจนจบการทดลอง อย่างไรก็ตามผลของโพรสตาแกลนดินสังเคราะห์ในกลุ่มควบคุมนั้นสอดคล้องกับผลการใช้ฮอร์โมนดังกล่าวในคนและสัตว์ชนิดอื่นๆ ซึ่งแสดงผลในการหดตัวของมดลูกทั้งช่วงปกติและช่วงการคลอด (Craig, 1975; Rexroad and Barb, 1975; Bygdeman et al., 1979) โดยโพรสตาแกลนดินแอฟทูแอลฟ้านั้นมีผลในการยับยั้งการจับกันของแคลเซียมของผนังมดลูก (Carsten, 1974) นอกจากนี้โพรสตาแกลนดินแอฟทูแอลฟายังมีผลในการลดปริมาณการไหลของเลือดมายังมดลูกด้วยกลไกการออกฤทธิ์ต่อการหดตัวของเส้นเลือด และผลโดยตรงต่อเส้นเลือดของกล้ามเนื้อเรียบของมดลูก (Clark and Myatt, 2008)

### 5.2.2 ระดับฮอร์โมนในเลือดของปลากระเบนเพศเมีย

ระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดของปลากระเบนเพศเมียทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองค่อนข้างมีความแปรปรวน ระดับฮอร์โมนสูงขึ้นและลดลงสลับกันอย่างแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่กลุ่มทดลองหลังจากฉีดโพรสตาแกลนดินสังเคราะห์แล้ว ระดับฮอร์โมนค่อนข้างคงที่ (วันที่ 2) เริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อวันทดลองที่ 5 จากนั้นมีระดับสูงขึ้นเล็กน้อย

ในวันทดลอง 12 และค่อยๆลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) จนจบการทดลอง นอกจากนี้ระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลในกลุ่มทดลองยังน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ในวันทดลองที่ 5 อีกด้วย สำหรับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดนั้นพบว่าในกลุ่มทดลองฮอร์โมนมีระดับค่อนข้างคงที่ อย่างไรก็ตามระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมีแนวโน้มไปในทางเดียวกันโดยไม่มีความแตกต่างกันของทั้งสองกลุ่มในแต่ละวันทดลองจนกระทั่งวันทดลองที่ 26 ที่กลุ่มทดลองนั้นมีระดับฮอร์โมนเพิ่มขึ้นสูงกว่า ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่าผลการทดลองดังกล่าวนี้แตกต่างจากในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไปที่พบว่าทำให้โพรสตาแกลนดินแอฟทูแอลฟ่านั้นมีผลทำให้ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดลดลง (Goldberg and Ramwell, 1975; Weems et al., 2006) ในการทดลองใช้โพรสตาแกลนดินแอฟทูแอลฟาในแม่โค พบว่าระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีปริมาณลดลงเมื่อมีการใช้โพรสตาแกลนดินแอฟทูแอลฟาเพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแม่โคเทียบกับแม่โคที่เป็นสัดตามปกติ (พรณพพิไล และไกรวรรณ, 2548) และการใช้ฮอร์โมนดังกล่าวต่อระดับโปรเจสเตอโรนในแม่โคที่ถูกตัดมดลูกออกเหลือแต่รังไข่ (total hysterectomy) แล้ว (La Voie et al., 1975) และแม่โคให้นม (Baishya et al., 1994) ในทำนองเดียวกันการศึกษาในม้าพบว่าหลังจากให้โพรสตาแกลนดินแอฟทูแอลฟาสังเคราะห์แล้วฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดลดลงอย่างต่อเนื่อง (Ginther et al., 2009) อย่างไรก็ตามการศึกษาในงูสายพันธุ์ *Thamnophis sirtalis* (Whittier and Crews, 1986) พบว่าการฉีดโพรสตาแกลนดินแอฟทูแอลฟาสังเคราะห์นั้น ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนทั้งโปรเจสเตอโรนและเอสตราไดออล ในทำนองเดียวกันการให้ฮอร์โมนนี้ในสุนัขเพศเมียที่ไม่ได้อยู่ในระยะเวลาตั้งท้องพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ให้ (Paradis et al., 1983) นอกจากนี้ยังพบว่าการศึกษาโพรสตาแกลนดินแอฟทูแอลฟาสังเคราะห์ในหนูนั้นมีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดลดลง แต่มี 20 แอลฟาไดไฮโดรโปรเจสเตอโรน (20 $\alpha$ -dihydroprogesterone) ซึ่งเป็นสารเมแทบอลิทในการสร้างโปรเจสเตอโรนเพิ่มมากขึ้น (Pharriss and Wyngarden, 1969) ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าอาจจะป็นสาเหตุที่ทำให้ระดับโปรเจสเตอโรนเพิ่มมากขึ้นกว่าปกติในภายหลัง

ข้อมูลที่แสดงผลของโพรสตาแกลนดินแอฟทูแอลฟาสังเคราะห์ต่อเอสตราไดออลนั้นมีไม่มาก อย่างไรก็ตาม การศึกษาระดับของระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลในแม่แกะตั้งท้องที่ถูกตัดมดลูก หรือรังไข่ที่ได้รับการฉีดโพรสตาแกลนดินแอฟทูแอลฟาสังเคราะห์พบว่าระดับเอสตราไดออลในเลือดลดลงอย่างชัดเจน (Weems et al., 1994) ในขณะที่แม่โคที่ได้รับการฉีดโพรสตาแกลนดินแอฟทูแอลฟาสังเคราะห์เข้าภายในมดลูก พบว่าส่งผลให้ระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดเพิ่มขึ้นภายใน 48 ชั่วโมง (Louis et al., 1974) อย่างไรก็ตามในบางรายงานกลับแสดงให้เห็นว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดในแม่วัวหลังคลอด (Peters, 1989) สำหรับในสัตว์น้ำนั้นไม่

มีรายงานใดๆที่แสดงผลของโพรสตาแกลนดินฟูแอลฟาสังเคราะห์ต่อฮอร์โมนโพสโดยตรง แต่ฮอร์โมนดังกล่าวนี้มีผลต่อฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (GtH) ซึ่งเป็นฮอร์โมนสำคัญในการควบคุมฮอร์โมนเพศในปลากระดูกอ่อนอย่างเอสทราไดออลและโปรเจสเตอโรน โดยโพรสตาแกลนดินฟูแอลฟาสังเคราะห์นั้น มีผลในการกระตุ้นฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ส่งผลให้เกิดการตกไข่ (Singh and Singh, 1976) แต่ในทางตรงกันข้ามบางรายงานแสดงให้เห็นว่าการฉีดโพรสตาแกลนดินฟูแอลฟาสังเคราะห์เข้าสมองของปลาทองนั้นส่งผลให้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินจะลดลง (Peter and Billard, 1976)

การใช้โพรสตาแกลนดินในการทดลองในครั้งนี้มีผลชัดเจนต่อการเคลื่อนไหว การหดตัวของมดลูก และการหดสั้นของเนื้อเยื่อผนังมดลูก ซึ่งเป็นกระบวนการที่จำเป็นในการขับเอาสารคัดหลั่งและสิ่งเจือปนในมดลูกออกไปหลังจากการคลอด และการซ่อมแซมเนื้อเยื่อผนังมดลูกเพื่อเริ่มต้นวงจรการสืบพันธุ์ใหม่ (Weems et al., 2006) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าผลต่อมดลูกของโพรสตาแกลนดินเอพฟูแอลฟาในการศึกษาครั้งนี้จะเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการดังกล่าวเพื่อเตรียมพร้อมสำหรับวงจรการสืบพันธุ์ครั้งใหม่ได้ นอกจากนี้ผลของฮอร์โมนชนิดนี้ต่อมดลูกอาจนำมาประยุกต์ใช้ในการเหนี่ยวนำการคลอดในปลากระเบนแม่พันธุ์ที่ใช้เวลาในการคลอดยาวนานและมีจำนวนลูกเยอะ เพื่อป้องกันภาวะอ่อนแรงหรือช็อกเนื่องจากสูญเสียพลังงานในการคลอดมาก อีกทั้งยังอาจนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาภาวะตัวอ่อนที่ตายก่อนคลอดค้างในมดลูกและภาวะมดลูกอักเสบได้เนื่องจากความสามารถในการขับเอาสารคัดหลั่ง สิ่งเจือปน และหนองในมดลูกออกมาได้ เช่นเดียวกับที่มีการนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาภาวะรกค้างและมดลูกอักเสบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ เช่น โค สุกร และม้า (Weems et al., 2006) มดลูกของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทางเศรษฐกิจนั้นมีระยะเวลาในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อผนังก่อนการเตรียมการฝังตัวอ่อนครั้งต่อไป โดยในโคเนื้อ โคนม แกะ และสุกรมีระยะเวลาดังกล่าวคือ 30-35 วัน 45-50 วัน 28-30 วัน และ 28-30 วัน ตามลำดับ (Senger, 1997) เมื่อมีการใช้โพรสตาแกลนดินสังเคราะห์แล้วระยะเวลาเหล่านี้จะสั้นลงอย่างเห็นได้ชัด (Tolleson and Randel, 1988; Randel et al., 1996) จึงมีประโยชน์ในการเร่งเวลาของวงจรการสืบพันธุ์ลง ในการศึกษานี้พบว่าความยาวของเนื้อเยื่อมดลูกนั้นหดสั้นลงไปอย่างน้อย 26 วัน จึงเป็นที่น่าสนใจว่าฮอร์โมนดังกล่าวส่งผลกับเนื้อเยื่อมดลูกซึ่งมีความสำคัญต่อการฝังตัวของตัวอ่อนนั้นเป็นระยะเวลาที่ค่อนข้างนาน และเป็นไปได้ว่าระยะเวลาปกติที่ใช้ในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อผนังก่อนการเตรียมการฝังตัวอ่อนครั้งต่อไปนั้นมีระยะเวลานานมากกว่า 1 เดือน อย่างไรก็ตาม เนื่องจากยังไม่เคยมีรายงานการใช้โพรสตาแกลนดินเอพฟูแอลฟาในสัตว์น้ำประเภทปลากระดูกอ่อนที่มีมดลูกมาก่อน ผลของการทำให้ความยาวของเนื้อเยื่อมดลูกนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจและเป็นข้อเสนอแนะที่ควรศึกษาเพิ่มเติม

ผลของโพस्ताกลนดินเอฟฟุแอลฟาในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ส่งผลให้เห็นชัดเจนต่อขนาดของโดมิแนนท์พอลลิเคิล จึงเป็นไปได้ว่าการฉีดโพस्ताกลนดินเอฟฟุแอลฟาสังเคราะห์เข้าทางกล้ำมเนื้อในปลากระเบนเพศเมียในขนาด 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวนั้นไม่เพียงพอที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนของพอลลิเคิลหรือการตกไข่ได้ อย่างไรก็ตามการนำโพस्ताกลนดินสังเคราะห์มาเพื่อใช้เหนี่ยวนำการเปิดสัดในโค นิยมฉีดโพस्ताกลนดินเป็นโปรแกรมโดยฉีดทั้งหมดสองครั้ง ห่างกันประมาณ 11-14 วัน โดยการฉีดครั้งแรกนั้นจะมุ่งเน้นผลในการสลายคอร์ปัสลูเทียมที่มีอยู่เดิมตามธรรมชาติ และการเหนี่ยวนำการเจริญและพัฒนาของพอลลิเคิล จากนั้นการฉีดโพस्ताกลนดินสังเคราะห์ครั้งที่สองจะมุ่งเน้นผลในการเหนี่ยวนำการเจริญของโดมิแนนท์พอลลิเคิลและการตกไข่ ซึ่งโปรแกรมรูปแบบนี้จะทำให้แม่โคแสดงการเป็นสัด มีการตกไข่ และพร้อมสำหรับการผสมใน 2-5 วัน อย่างไรก็ตามโปรแกรมการฉีดโพस्ताกลนดินสังเคราะห์มีหลากหลายรูปแบบ โดยอาจจะมีการเว้นระยะห่างระหว่างการฉีดทั้งสองครั้ง 2-14 วัน ตามแต่ละรายงาน (บันลือและสุดสายใจ, 2549) นอกจากนี้ปัจจุบันยังนิยมใช้โพस्ताกลนดินสังเคราะห์ร่วมกับฮอร์โมนสังเคราะห์อื่นๆ ได้แก่ โปรเจสเตอโรนสังเคราะห์ เอสทราไดออลเบนโซเอท และโกนาโดโทรปินรีลีสซิงฮอร์โมน เพื่อช่วยในการเหนี่ยวนำการเจริญและพัฒนาของพอลลิเคิลอีกด้วย ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าการใช้โพस्ताกลนดินเอฟฟุแอลฟาสังเคราะห์เพื่อการเหนี่ยวนำการเป็นสัดหรือเหนี่ยวนำการตกไข่นั้นจำเป็นต้องเพิ่มขนาดในการฉีด หรือทำการฉีดกระตุ้นซ้ำ จากการสังเกตของผู้ทำการวิจัยพบว่าพอลลิเคิลที่พบในรังไข่นั้นจะมีขนาดหลากหลาย โดยพบตั้งแต่ขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร ไปจนถึง 30 มิลลิเมตร โดยโดมิแนนท์พอลลิเคิลนั้นจะเกิดการตกไข่และมีการเจริญของพอลลิเคิลขนาดเล็กกว่าขึ้นมาทดแทนกันซึ่งใช้เวลาประมาณ 2-6 สัปดาห์ ดังนั้นการฉีดกระตุ้นซ้ำควรภายในทำในช่วงเวลาดังกล่าว

ระดับฮอร์โมนเพศของปลากระเบนที่ได้รับการฉีดโพस्ताกลนดินเอฟฟุแอลฟานั้นไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัดเจนและไม่ได้แสดงระดับที่มีผลโดยตรงต่อวงจรการสืบพันธุ์ อย่างไรก็ตามเนื่องจากปลากระเบนโมโตโร้ที่ทำการทดลองในครั้งนี้พบว่ามีรูปแบบของวงจรการสืบพันธุ์แบบสืบพันธุ์ได้ตลอดทั้งปี และระดับของฮอร์โมนไม่มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของทั้งรังไข่และมดลูก ดังนั้นจึงไม่สามารถประเมินผลของการใช้โพस्ताกลนดินเอฟฟุแอลฟาสังเคราะห์ต่อวงจรการสืบพันธุ์โดยการดูจากระดับฮอร์โมนเพศได้

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าโพस्ताกลนดินเอฟฟุแอลฟาสังเคราะห์นั้นมีผลต่อการหลั่งฮอร์โมนโกนาโดโทรปินในปลา (Stacey and Goetz, 1982) พฤติกรรมการวางไข่ (Stacey, 1976) การกระตุ้นพฤติกรรมผสมพันธุ์ (Villars et al., 1985) และการกระตุ้นฟีโรโมนในปลากระดุกแข็งอีกด้วย (Kidd et al., 2013) ดังนั้นการศึกษากการหลังฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน พฤติกรรมในการวางไข่



และการผสมพันธุ์ในปลากระเบนเพศเมียจึงเป็นที่น่าสนใจและเสนอแนะให้มีการศึกษาต่อไปในอนาคต

### บทสรุป และข้อเสนอแนะ

การเจาะเลือดเพื่อระดับฮอร์โมนในเลือดร่วมกับการอัลตราซาวด์เพื่อดูลักษณะทางกายภาพทางระบบสืบพันธุ์ของปลากระเบนสายพันธุ์ *P. motoro* นั้นสามารถนำมาประเมินรูปแบบของวงรอบการสืบพันธุ์ของปลากระเบนสายพันธุ์นี้ในบ่อเลี้ยงได้ โดยพบว่าระดับฮอร์โมนเพศนั้นมีแนวโน้มที่เป็นวงรอบ ในขณะที่ลักษณะทางกายภาพนั้นไม่มีวงรอบชัดเจนและไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามไม่พบว่าระดับฮอร์โมนเพศและลักษณะทางกายภาพทางระบบสืบพันธุ์นั้นมีความสัมพันธ์กันนอกจากระดับฮอร์โมนเอสตราไดโอดอกกัน ความยาวเส้นรอบวงและความยาวที่วัดจากขอบของท่อำน้ำเชื้อของอวัยวะนำน้ำเชื้อ จึงสรุปได้ว่าปลากระเบนสายพันธุ์ *P. motoro* ที่เลี้ยงในบ่อเลี้ยงในประเทศไทยนั้นมีวงรอบการสืบพันธุ์ในรูปแบบไม่พร้อมกันทั้งฝูงและมีความสามารถในการผสมพันธุ์ได้ตลอดทั้งปี ทั้งๆที่ปลากระเบนสายพันธุ์นี้มีแนวโน้มที่แสดงถึงการมีวงรอบการสืบพันธุ์ชัดเจนแบบพร้อมกันทั้งฝูงในธรรมชาติ แต่เนื่องจากการอยู่ในบ่อเลี้ยงนั้นไม่มีข้อจำกัดในเรื่องอุณหภูมิ กระแสน้ำ และอาหาร ปลาจึงสามารถปรับตัวให้มีการสืบพันธุ์แบบดังกล่าวได้

อย่างไรก็ตามระดับฮอร์โมนเพศในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถนำมาประเมินวงรอบการสืบพันธุ์โดยตรงของปลากระเบนโมโตโรในบ่อเลี้ยงได้เนื่องจากมีระดับไม่สัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางกายภาพทั้งภายนอกและลักษณะทางกายภาพของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์โดยการอัลตราซาวด์ ในขณะที่ลักษณะทางกายภาพของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ที่ประเมินโดยการอัลตราซาวด์นั้นสามารถนำมาประยุกต์ในการประเมินวงรอบการสืบพันธุ์ ได้แก่ การเจริญของฟอลลิเคิล ช่วงเวลาการตกไข่ การเปลี่ยนแปลงของมดลูกเพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการฝังตัวของตัวอ่อน ความพร้อมในการผสมพันธุ์และความสมบูรณ์พันธุ์ของปลากระเบนเพศเมีย และประเมินการเจริญพันธุ์ และความพร้อมในการผสมพันธุ์ของปลากระเบนเพศผู้ได้

นอกจากนี้วิธีการประเมินวงรอบการสืบพันธุ์ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในปลากระเบนน้ำจืดในวงศ์ *Potamotrygon* สายพันธุ์อื่นๆได้ โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่หายากหรือใกล้สูญพันธุ์เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่จำเป็นต้องทำการการุณยฆาตสัตว์ทดลอง

การทดลองครั้งนี้ยังมีข้อจำกัดหลายอย่าง ได้แก่ ความถี่ที่จำกัดในการเก็บตัวอย่างเนื่องจากการจับปลากระเบนขึ้นมาเก็บตัวอย่างนั้นจะทำให้ปลาเครียดเป็นอย่างมาก การเก็บตัวอย่างถี่มากกว่า 2 สัปดาห์ต่อครั้งจึงเป็นไปได้ยากหากเป็นการเก็บตัวอย่างระยะยาว ซึ่งอาจจะมีผลต่อการกินอาหารหรือสุขภาพปลาโดยรวมได้ และการอัลตราซาวด์อวัยวะในระบบสืบพันธุ์นั้นยังทำได้ค่อนข้างยาก

เนื่องจากไม่มีข้อมูลอ้างอิงชัดเจน และทำโดยปราศจากการวางยาสลบ ดังนั้นการอัลตราซาวด์อาจมีความคลาดเคลื่อนได้เล็กน้อยเนื่องจากปลาขยับตัวอยู่ตลอดเวลา อย่างไรก็ตามควรมีการป้องกันอันตรายจากเงี่ยงกระเบนโดยการใส่ปลอกแขนด้วย

ผลของการใช้โพรสตาแกลนดินูแอลฟาสังเคราะห์ ต่อวงรอบการสืบพันธุ์ในปลากระเบนสายพันธุ์ *P. motoro* นั้นแสดงผลต่อระดับของมดลูก เส้นผ่าศูนย์กลางตามแนวตั้งของมดลูก และความยาวของเนื้อเยื่อผนังมดลูก โดยฮอร์โมนดังกล่าวส่งผลชัดเจนในการทำให้มดลูกลดขนาดลงรวมทั้งลดความยาวของเนื้อเยื่อผนังมดลูกอย่างชัดเจนทันทีหลังจากที่ฉีดฮอร์โมนชนิดนี้ไปเพียง 1 วัน โดยทำให้เนื้อเยื่อผนังมดลูกนั้นหดสั้นไปอย่างน้อย 26 วันหลังจากฉีดโพรสตาแกลนดินูแอลฟาสังเคราะห์ ดังนั้นจึงเป็นไปได้กระบวนการเคลื่อนไหว การหดตัวของมดลูก และการหดสั้นของเนื้อเยื่อผนังมดลูกในการศึกษาครั้งนี้จะเหนี่ยวนำให้เกิดการเตรียมพร้อมสำหรับวงรอบการสืบพันธุ์ครั้งใหม่ได้ นอกจากนี้ผลของฮอร์โมนชนิดนี้ต่อมดลูกอาจนำมาประยุกต์ใช้ในการเหนี่ยวนำการคลอดในปลาแม่พันธุ์กระเบนที่ใช้เวลาในการคลอดยาวนานและมีจำนวนลูกเยอะ การรักษาภาวะตัวอ่อนที่ตายก่อนคลอดค้างในมดลูกและภาวะมดลูกอักเสบได้

อย่างไรก็ตามปลากระเบนเพศเมียที่ได้รับโพรสตาแกลนดินูแอลฟาสังเคราะห์นั้นไม่ได้แสดงให้เห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของปริมาตรของรังไข่ และเส้นผ่าศูนย์กลางของโดมิแนนท์ฟอลลิเคิล จึงเป็นไปได้ว่าการใช้โพรสตาแกลนดินูแอลฟาสังเคราะห์เพื่อการเหนี่ยวนำการเป็นสัดหรือเหนี่ยวนำการตกไข่นั้นจำเป็นต้องเพิ่มขนาดในการฉีด หรือทำการฉีดกระตุ้นซ้ำในระยะเวลาประมาณ 2-6 สัปดาห์ หรือมีการเหนี่ยวนำร่วมกับการใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ชนิดอื่น เช่น โพรเจสเตอโรนสังเคราะห์ เอสตราไดโอดเบนโซเอท และโกนาโดโทรปินรีลีสซิงฮอร์โมน

ผลของโพรสตาแกลนดินูแอลฟาสังเคราะห์ที่มีต่อระดับฮอร์โมนเพศทั้งเอสตราไดโอดและโพรเจสเตอโรนนั้นยังไม่ชัดเจน โดยกลุ่มทดลองนั้นมีแนวโน้มว่าระดับฮอร์โมนเอสตราไดโอดลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุม โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในวันทดลองที่ 5 และไม่เห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนของระดับโพรเจสเตอโรนระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองนอกจากระดับฮอร์โมนที่มากขึ้นในช่วงวันทดลองที่ 26 ดังนั้นระดับฮอร์โมนเพศของปลากระเบนที่ได้รับการฉีดโพรสตาแกลนดินูแอลฟานั้นไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัดเจนและไม่ได้แสดงระดับที่มีผลโดยตรงต่อวงรอบการสืบพันธุ์ อย่างไรก็ตามเนื่องจากปลากระเบนโมโตโรที่ทำการทดลองในครั้งนี้นั้นพบว่ามีรูปแบบของวงรอบการสืบพันธุ์แบบสืบพันธุ์ได้ตลอดทั้งปี และระดับของฮอร์โมนไม่มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของทั้งรังไข่และมดลูก ดังนั้นจึงไม่สามารถประเมินผลของ

การใช้โพรสตาแกลนดินเอฟฟูแอลฟาสังเคราะห์ต่อวงจรการสืบพันธุ์โดยการดูจากระดับฮอร์โมนเพศได้ชัดเจน

แม้ว่าการใช้ฮอร์โมนโพรสตาแกลนดินฟูแอลฟาสังเคราะห์นั้นได้รับการศึกษา พัฒนา และประยุกต์ใช้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั้งสัตว์เลี้ยงและสัตว์เศรษฐกิจมาเป็นเวลายาวนาน แต่การใช้ฮอร์โมนชนิดนี้ยังไม่เคยมีรายงานในปลากระดูกอ่อนมาก่อน มีเพียงรายการในสัตว์น้ำจำพวกปลากระดูกแข็งเท่านั้น ซึ่งมีสรีรวิทยาของระบบสืบพันธุ์แตกต่างกับปลากระดูกอ่อนค่อนข้างมาก การทดลองครั้งนี้จึงเป็นครั้งแรกที่มีการศึกษาผลของฮอร์โมนโพรสตาแกลนดินฟูแอลฟาสังเคราะห์ในปลากระดูกอ่อนเพื่อศึกษาข้อมูลพื้นฐานต่อระดับฮอร์โมนเพศ และอวัยวะในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย ดังนั้นผู้วิจัยจึงเสนอแนะให้มีการศึกษาการใช้ฮอร์โมนนี้เพิ่มเติมเกี่ยวกับขนาดที่ใช้ จำนวนครั้ง หรือการประยุกต์ใช้ฮอร์โมนเหนี่ยวนำตัวอื่นๆ



## รายการอ้างอิง

- Araújo M, Charvet-Almeida P, Almeida MP and Pereira H. 2004. Freshwater stingrays (Potamotrygonidae): status, conservation and management challenges. Information document AC. 20: 1-6.
- Armstrong DT. 1981. Prostaglandins and follicular functions. J Reprod Fertil. 62(1): 283-291.
- Awruch CA, Pankhurst NW, Frusher SD and Stevens JD. 2008. Endocrine and morphological correlates of reproduction in the draughtboard shark *Cephaloscyllium laticeps* (Elasmobranchii: Scyliorhinidae). J Exp Zoo. 309A(4): 184-197.
- Awruch CA, Pankhurst NW, Frusher SD and Stevens JD. 2009. Reproductive seasonality and embryo development in the draughtboard shark *Cephaloscyllium laticeps*. Mar Freshwater Res. 60(12): 1265-1272.
- Baishya N, Cooper MJ, Hart IC, Jackson PS, Furr BJ, Jenkin G and Pope GS. 1994. Effects of luteolytic doses of prostaglandin F2 alpha and cloprostenol on concentrations of progesterone, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, glucose, insulin, growth hormone, thyroxine, prolactin and cortisol in jugular plasma of lactating dairy cows. Br Vet J. 150(6): 569-583.
- Barannikova IA, Diubin VP, Baiunova LV and Semenkova TB. 2000. [Steroids in the reproductive function regulation in fish]. Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova. 86(8): 968-978.
- Brown J, Walker S and Steinman K. 2004. Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species. In: Endocrine Research Laboratory, Department of Reproductive Sciences, Conservation and Research Center, National Zoological Park, Smithsonian Institution. 102.
- Bygdeman M, Bremme K, Gillespie A and Lundström V. 1979. Effects of the prostaglandins on the uterus. Acta Obstet Gynecol Scand Suppl. 58(87): 33-38.

- Callard GV, Pudney JA, Mak P and Canick JA. 1985. Stage-dependent changes in steroidogenic enzymes and estrogen receptors during spermatogenesis in the testis of the dogfish, *Squalus acanthias*. *Endocrinology*. 117(4): 1328-1335.
- Callard IP, Etheridge K, Giannoukos G, Lamb T and Perez L. 1991. The role of steroids in reproduction in female elasmobranchs and reptiles. *J Steroid Biochem*. 40(4-6): 571-575.
- Carsten ME. 1974. Prostaglandins and oxytocin: Their effects on uterine smooth muscle. *Prostaglandins*. 5(1): 33-40.
- Charvet-Almeida P, Araújo M and Almeida M. 2005. Reproductive aspects of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon Basin. *J Northw Atl Fish Sci*. 35: 165-171.
- Chatchavalvanich K, Thongpan A and Nakai M. 2005. Structure of the testis and genital duct of freshwater stingray, *Himantura signifer* (Elasmobranchii: Myliobatiformes: Dasyatidae). *Ichthyological Research*. 52(2): 123-131.
- Chatchavalvanich K and Visutthipat R. 1997. Gross and microscopic structures of the female reproductive system in the whip-tail stingray (*Dasyatis bleekeri*). *J Sci Tech*. 2(1): 47-55.
- Clark K and Myatt L. 2008. Prostaglandins and the reproductive cycle. *Glob Libr.Womens Med*. 17566-17512.
- Conrath CL. 2005. Reproductive Biology. In: Management techniques for elasmobranch fisheries ed. Musick John A and Bonfil Ramón (ed.). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 103-126.
- Conrath CL and Musick JA. 2002. Reproductive biology of the dusky smooth-hound, *Mustelus canis*, in the northwest Atlantic Ocean. *Environmental Biology of Fishes*. 64: 367-377.
- Craig GM. 1975. Prostaglandins in reproductive physiology. *Postgrad Med J*. 51(592): 74-84.
- Cuevas ME and Callard G. 1992. Androgen and progesterone receptors in shark (*Squalus* sp.) testis: characteristics and stage-related distribution. *Endocrinology*. 130(4): 2173-2182.

- Delpiani G, Figueroa DE and Mabragana E. 2012. Description of the clasper of the Southern Thorny Skate *Amblyraja doellojuradoi* (Pozzi, 1935)(Chondrichthyes: Rajidae). *Zootaxa*. 3182: 57-64.
- Díaz-Andrade MC, Galíndez EJ, López-Cazorla A and Estecondo S. 2011. Ovarian Folliculogenesis in the Smallnose Fanskate *Sympterygia bonapartii* (Müller & Henle, 1841) (Chondrichthyes, Rajidae). *Int J Morphol*. 29(1): 174-181.
- Dongre V. 2013. Effect of prostaglandin with sex pheromone on reproduction through neuroetho-hypophysio-gonadal pathway in the fish, *Cyprinus carpio*. *Int J Innov Biosciences*. 3(2): 33-39.
- Ebert DA and Cowley PD. 2009. Reproduction and embryonic development of the blue stingray, *Dasyatis chrysonota*, in southern African waters. *J Mar Biol Assoc UK*. 89(4): 809-815.
- Elias FG. 2015. Microscopic analysis of *Mustelus schmitti*' s uteri during reproductive cycle. *Annu Res Rev Biol*. 6(1): 20-32.
- Fahy DP, Spieler RE and Hamlett WC. 2007. Preliminary observations on the reproductive cycle and uterine fecundity of the yellow stingray, *Urobatis jamaicensis* (Elasmobranchii: Myliobatiformes: Urolophidae) in Southeast Florida, USA. *Raffles B Zoo*. 14: 131-139.
- Garnier DH, Sourdain P and Jegou B. 1999. Seasonal variations in sex steroids and male sexual characteristics in *Scyliorhinus canicula*. *Gen Comp Endocrinol*. 116(2): 281-290.
- Gelsleichter J and Evans AN. 2012. Hormonal regulation of elasmobranch physiology. In: *Biology of Sharks and their Relatives*. ed. JC Carrier, JA Musick, and MR Heithaus (ed.). Florida: CRC press. 313-348.
- Gelsleichter J, Rasmussen L, Manire C, Tyminski J, Chang B and Lombardi-Carlson L. 2002. Serum steroid concentrations and development of reproductive organs during puberty in male bonnethead sharks, *Sphyrna tiburo*. *Fish Physiol Biochem*. 26(4): 389-401.
- Ginther OJ, Siddiqui MA and Beg MA. 2009. Physiologic and nonphysiologic effects of exogenous prostaglandin F2alpha on reproductive hormones in mares. *Theriogenology*. 72(3): 417-424.

- Goetz F and Smith D. 1980. In vitro effects of theophylline and dibutyryl adenosine 3' 5'-cyclic monophosphoric acid on spontaneous and prostaglandin PGF 2 $\alpha$ -induced ovulation of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) oocytes. *Biol Reprod Suppl.* 22(1): 114A.
- Goldberg VJ and Ramwell PW. 1975. Role of prostaglandins in reproduction. *Physiol Rev.* 55(3): 325-351.
- Grubbs D, Snelson F, Piercy A, Rosa R and Furtado M. 2009. *Dasyatis americana*. IUCN.
- Hamlett WC and Hysell MK. 1998. Uterine specializations in elasmobranchs. *J Exp Zool.* 282(4-5): 438-459.
- Hamlett WC, Hysell MK, Galvin J and Spieler RE. 1998. Reproductive accommodations for gestation in the Atlantic guitarfish, *Rhinobatos lentiginosus*, Rhinobatidae. *J Elisha Mitchell Sci Soc.* 114(4): 199.
- Hamlett WC and Koob TJ. 1999a. Female reproductive system. In: *Sharks, skates, and rays: the biology of elasmobranch fishes.* ed. WC Hamlett (ed.). Baltimore: The John Hopkins University Press. 398-443.
- Hamlett WC and Koob TJ. 1999b. Male reproductive system. In: *Sharks, skates, and rays: the biology of elasmobranch fishes.* ed. WC Hamlett (ed.). Baltimore: The John Hopkins University Press. 444-470.
- Hamlett WC, Musick JA, Eulitt AM, Jarrell RL and Kelly MA. 1996. Ultrastructure of uterine trophonemata, accommodation for uterolactation, and gas exchange in the southern stingray, *Dasyatis americana*. *Can J Zool.* 74(8): 1417-1430.
- Hamlett WC, Reardon M, Clark J and Walker TI. 2002. Ultrastructure of sperm storage and male genital ducts in a male holocephalan, the elephant fish, *Callorhynchus milii*. *J Exp Zool.* 292(2): 111-128.
- Henderson A, Reeve A and Ambu-Ali A. 2014. Microanatomy of the male and female reproductive tracts in the long-tailed butterfly ray *Gymnura poecilura*, an elasmobranch with unusual characteristics. *J Fish Biol.* 84(2): 297-313.
- Henningsen AD, Smale M, Garner R and Kinnunen N. 2013. Reproduction, embryonic development, and reproductive physiology of elasmobranchs. In: *The*

- elasmobranch husbandry manual: captive care of sharks, rays and their relatives. ed. M Smith, D Warmolts, D Thoney, and R Hueter (ed.). Ohio Biological Survey. 227-236.
- Heupel MR, Whittier JM and Bennett MB. 1999. Plasma steroid hormone profiles and reproductive biology of the epaulette shark, *Hemiscyllium ocellatum*. J Exp Zool. 284(5): 586-594.
- Ho S, Wulczyn G and Callard I. 1980. Induction of vitellogenin synthesis in the spiny dogfish, *Squalus acanthias*. Bull Mt Desert Isl Biol Lab. 19: 37-38.
- Hoffmayer E, Sulikowski JA, Hendon JM and Parsons GR. 2010. Plasma steroid concentrations of adult male Atlantic sharpnose sharks, in the northern Gulf of Mexico, with notes on potential long term shifts in reproductive timing. Environ BiolFishe. 1(88): 1-7.
- Hoisington G and Lowe CG. 2005. Abundance and distribution of the round stingray, *Urobatis halleri*, near a heated effluent outfall. Mar Environ Res. 60(4): 437-453.
- Hsu SY and Goetz FW. 1991. Sodium orthovanadate induces in vitro ovulation and ovarian prostaglandin synthesis in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). J Exp Zool. 260(1): 43-49.
- Inskeep EK. 1973. Potential uses of prostaglandins in control of reproductive cycles of domestic animals. J Anim Sci. 36(6): 1149-1157.
- Jalabert B and Szollosi D. 1975. In vitro ovulation of trout oocytes: effect of prostaglandins on smooth muscle-like cells of the theca. Prostaglandins. 9(5): 765-778.
- Johnson MR and Snelson FF. 1996. Reproductive life history of the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina* (Pisces, Dasyatidae), in the freshwater St. Johns River, Florida. Bull Mar Sci. 59(1): 74-88.
- Kagawa H, Tanaka H, Unuma T, Ohta H, Gen K and Okuzawa K. 2003. Role of prostaglandin in the control of ovulation in the Japaneseeel *Anguilla japonica*. Fisheries Sci. 69(2): 234-241.
- Kajiura S and Tricas T. 1996. Seasonal dynamics of dental sexual dimorphism in the Atlantic stingray *Dasyatis sabina*. J Exp Zool. 199(10): 2297-2306.



- Kajiura SM, Sebastian AP and Tricas TC. 2000. Dermal bite wounds as indicators of reproductive seasonality and behaviour in the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*. *Environmental Biology of Fishes*. 58(1): 23-31.
- Kastelic J, Knopf L and Ginther O. 1990. Effect of day of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. *Anim Reprod Sci*. 23(3): 169-180.
- Kidd MR, Dijkstra PD, Alcott C, Lavee D, Ma J, O'Connell LA and Hofmann HA. 2013. Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  facilitates female mating behavior based on male performance. *Behav Ecol Sociobiol*. 67(8): 1307-1315.
- Kneebone J, Ferguson DE, Sulikowski JA and Tsang PC. 2007. Endocrinological investigation into the reproductive cycles of two sympatric skate species, *Malacoraja senta* and *Amblyraja radiata*, in the western Gulf of Maine. *Environmental Biology of Fishes*. 80(2-3): 257-265.
- Kobayashi M and Stacey N. 1993. Prostaglandin-induced female spawning behavior in goldfish (*Carassius auratus*) appears independent of ovarian influence. *Horm Behav*. 27(1): 38-55.
- Koob T, Tsang P and Callard I. 1986. Plasma estradiol, testosterone, and progesterone levels during the ovulatory cycle of the skate (*Raja erinacea*). *Biol Reprod*. 35(2): 267-275.
- Koob TJ and Callard IP. 1999. Reproductive endocrinology of female elasmobranchs: lessons from the little skate (*Raja erinacea*) and spiny dogfish (*Squalus acanthias*). *J Exp Zool*. 284(5): 557-574.
- La Voie V, Poncelet G, Han D, Soliday C, Lambert P and Moody E. 1975. Effect of prostaglandin f<sub>2</sub> $\alpha$  on the estrous cycle, corpora lutea and progesterone levels of hysterectomized cows. *J Anim Sci*. 41(1): 166-171.
- Louis TM, Hafs HD and Morrow DA. 1974. Intrauterine administration of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha in cows: progesterone, estrogen, LH, estrus and ovulation. *J Anim Sci*. 38(2): 347-353.
- Manire CA and Rasmussen LE. 1997. Serum concentrations of steroid hormones in the mature male bonnethead shark, *Sphyrna tiburo*. *Gen Comp Endocrinol*. 107(3): 414-420.

- Manire CA, Rasmussen LE, Hess DL and Hueter RE. 1995. Serum steroid hormones and the reproductive cycle of the female bonnethead shark, *Sphyrna tiburo*. Gen Comp Endocrinol. 97(3): 366-376.
- Maruska KP, Cowie EG and Tricas TC. 1996. Periodic gonadal activity and protracted mating in elasmobranch fishes. Journal of Experimental Zoology. 276(3): 219-232.
- Maruska KP and Gelsleichter J. 2010. Hormones and reproduction in chondrichthyan fishes. In: Hormones and Reproduction in Vertebrates. ed. DO Norris and KH Lopez (ed.). Elsevier. 209-237.
- Moss SA. 1972. Tooth Replacement and Body Growth Rates in the Smooth Dogfish, *Mustelus canis* (Mitchill). Copeia. 1972(4): 808-811.
- Mull CG, Lowe CG and Young KA. 2010. Seasonal reproduction of female round stingrays (*Urobatis halleri*): steroid hormone profiles and assessing reproductive state. Gen Comp Endocrinol. 166(2): 379-387.
- Nautrup CP and Tobias R. 2000. Atlas and textbook of diagnostic ultrasonography of the dog and cat. In: Manson Publishing Ltd. 400
- Nordell S. 1994. Observations of the mating behavior and dentition of the round stingray, *Urolophus halleri*. Environmental Biology of Fishes. 39(3): 219-229.
- Oldfield RG. 2007. Biology, husbandry, and reproduction of freshwater stingrays. TFH magazine. 53(12): 114-116.
- Paradis M, Post K and Mapletoft R. 1983. Effects of prostaglandin F<sub>2α</sub> on corpora lutea formation and function in mated bitches. Can Vet J. 24(8): 239.
- Parsons GR and Grier HJ. 1992. Seasonal changes in shark testicular structure and spermatogenesis. J Exp Zool. 261(2): 173-184.
- Pedreras-Sierra TM and Ramirez-Pinilla MP. 2015. Morphology of the reproductive tract and acquisition of sexual maturity in males of *Potamotrygon magdalenae* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae). J Morphol. 276(3): 273-289.
- Pedroso CM, Jared C, Charvet-Almeida P, Almeida MP, Neto DG, Lira MS, Haddad Jr V, Barbaro KC and Antoniazzi MM. 2007. Morphological characterization of the venom secretory epidermal cells in the stinger of marine and freshwater stingrays. Toxicon. 50(5): 688-697.

- Peter RE and Billard R. 1976. Effects of third ventricle injection of prostaglandins on gonadotropin secretion in goldfish, *Carassius auratus*. Gen Comp Endocrinol. 30(4): 451-456.
- Peters AR. 1989. Effect of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha on hormone concentrations in dairy cows after parturition. Vet Rec. 124(14): 371-373.
- Pharriss B and Shaw JE. 1974. Prostaglandins in reproduction. Annu Rev Physiol. 36(1): 391-412.
- Pharriss B and Wyngarden L. 1969. The effect of prostaglandin F<sub>2</sub>α on the progesterone content of ovaries from pseudopregnant rats. Exp Biol Med. 130(1): 92-94.
- Piercy A, Gelsleichter J and Snelson FF, Jr. 2003. Morphological and histological changes in the genital ducts of the male Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*, during the seasonal reproductive cycle. Fish Physiol Biochem. 29(1): 23-35.
- Pratt HL. 1988. Elasmobranch gonad structure: a description and survey. Copeia. 719-729.
- Prisco M, Valiante S, Maddalena Di Fiore M, Raucci F, Del Giudice G, Romano M, Laforgia V, Limatola E and Andreuccetti P. 2008. Effect of 17β-estradiol and progesterone on vitellogenesis in the spotted ray *Torpedo marmorata* Risso 1810 (Elasmobranchii: Torpediniformes): studies on females and on estrogen-treated males. Gen Comp Endocrinol. 157(2): 125-132.
- Rainboth WJ. 1996. Fishes of the cambodian mekong. In: FAO Species identification field guide for fishery purposes, Rome.
- Ramírez-Mosqueda E, Pérez-Jiménez JC and Mendoza-Carranza M. 2012. Reproductive parameters of the southern stingray *Dasyatis americana* in southern gulf of Mexico. Lat Am J Aquat Res. 40(2): 335-344.
- Randel RD, Lammoglia MA, Lewis AW, Neuendorff DA and Guthrie MJ. 1996. Exogenous PGF<sub>2</sub>α enhanced GnRH-induced LH release in postpartum cows. Theriogenology. 45(3): 643-654.
- Rasmussen L and Murru F. 1992. Long-term studies of serum concentrations of reproductively related steroid hormones in individual captive carcharhinids. Mar Freshwater Res. 43(1): 273-281.

- Rasmussen LE and Gruber SH. 1993. Serum concentrations of reproductively-related circulating steroid hormones in the free-ranging lemon shark, *Negaprion brevirostris*. *Environmental Biology of Fishes*. 167-174.
- Rexroad CE and Barb CR. 1975. Effect of prostaglandins on uterine contractions in the estrous ewe. *Theriogenology*. 4(4): 111-124.
- Ross R. 2004. Husbandry of Freshwater Stingrays of the Family Potamotrygonidae. In: The elasmobranch husbandry manual: captive care of sharks, rays, and their relatives. ed. M Smith, D Warmolts, D Thoney, and R Hueter (ed.). Ohio Biological Survey. 473-482.
- Rottmann R, Shireman J and Chapman F. 1991. Hormonal control of reproduction in fish for induced spawning. SRAC publication. 424: 1-4.
- Sam B and Nils W. 1961. Ovarian hormones and uterine growth: Effects of estradiol, progesterone and relaxin on cell growth and cell division in the rat uterus. *Endocrinology*. 68(6): 971-977.
- Senger PL. 1997. Pathways to pregnancy and parturition. In: Current Conceptions, Inc.
- Serra-Pereira B, Figueiredo I and Gordo LS. 2011. Maturation of the gonads and reproductive tracts of the thornback ray *Raja clavata*, with comments on the development of a standardized reproductive terminology for oviparous elasmobranchs. *Mar Coast Fish*. 3(1): 160-175.
- Singh AK and Singh TP. 1976. Effect of clomid, sexovid and prostaglandins on induction of ovulation and gonadotropin secretion in a freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Endokrinologie*. 68(2): 129-136.
- Snelson FF, Jr., Rasmussen LE, Johnson MR and Hess DL. 1997. Serum concentrations of steroid hormones during reproduction in the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*. *Gen Comp Endocrinol*. 108(1): 67-79.
- Snelson FF, Williams-Hooper SE and Schmid TH. 1989. Biology of the bluntnose stingray, *Dasyatis sayi*, in Florida coastal lagoons. *Bull Mar Sci*. 45(1): 15-25.
- Springer S. 1960. Natural history of the sandbar shark *Eulamia milberti*. *Bull Fish Wildl Serv US*. 61: 1-38.
- Stacey NE. 1976. Effects of indomethacin and prostaglandins on the spawning behaviour of female goldfish. *Prostaglandins*. 12(1): 113-126.

- Stacey NE and Goetz FW. 1982. Role of Prostaglandins in Fish Reproduction. *Can J Fish Aquat Sci.* 39(1): 92-98.
- Stefanini MA, Orsi AM, Gregorio EA, Viotto MJ and Baraldi-Artoni SM. 1999. Morphologic study of the efferent ductules of the pigeon (*Columba livia*). *J Morphol.* 242(3): 247-255.
- Stetter MD. 2013. Diagnostic imaging of Elasmobranchs. In: The elasmobranch husbandry manual: captive care of sharks, rays and their relatives ed. Smith Mark FL, Warmolts Doug, Thoney Dennis, and Hueter Robert (ed.). Ohio Biological Survey. 297-306.
- Sulikowski JA, Kneebone J, Elzey S, Jurek J, Danley PD, Howell WH and Tsang PC. 2005. The reproductive cycle of the thorny skate (*Amblyraja radiata*) in the western Gulf of Maine. *Fish Bull.* 103: 536-543.
- Sulikowski JA, Tsang PCW and Huntting Howell W. 2004. An annual cycle of steroid hormone concentrations and gonad development in the winter skate, *Leucoraja ocellata*, from the western Gulf of Maine. *Mar Biol.* 144(5): 845-853.
- Taniuchi T and Ishihara H. 1990. Anatomical Comparison of Claspers of Freshwater Stingrays (Dasyatidae and Potamotrygonidae). *Jpn J Ichthyol.* 37(1): 10-16.
- Thorson T, Langhammer J and Oetinger M. 1983. Reproduction and development of the South American freshwater stingrays, *Potamotrygon circularis* and *P. motoro*. *Environmental Biology of Fishes.* 9(1): 3-24.
- Thrall M, Baker D and Campbell T. 2004. Veterinary hematology and clinical chemistry. In: ALP pincott William and Willkins Philadelphai. 498.
- Todhunter R and Gemmell RT. 1987. Seasonal changes in the reproductive tract of the male marsupial bandicoot, *Isodon macrourus*. *J Anat.* 154: 173-186.
- Tolleson DR and Randel RD. 1988. Effects of Alfaprostol and uterine palpation on postpartum interval and pregnancy rate to embryo transfer in Brahman influenced beef cows. *Theriogenology.* 29(3): 555-564.
- Tricas TC, Maruska KP and Rasmussen LE. 2000. Annual cycles of steroid hormone production, gonad development, and reproductive behavior in the Atlantic stingray. *Gen Comp Endocrinol.* 118(2): 209-225.

- Tsang PC and Callard IP. 1992. Regulation of ovarian steroidogenesis in vitro in the viviparous shark, *Squalus acanthias*. J Exp Zool. 261(1): 97-104.
- Tsang PCW and Callard IP. 1987. Morphological and endocrine correlates of the reproductive cycle of the aplacental viviparous dogfish, *Squalus acanthias*. Gen Comp Endocrinol. 66(2): 182-189.
- Vaudo JJ and Lowe CG. 2006. Movement patterns of the round stingray *Urobatis halleri*(Cooper) near a thermal outfall. J Fish Biol. 68(6): 1756-1766.
- Villars TA, Hale N and Chapnick D. 1985. Prostaglandin-F2 alpha stimulates reproductive behavior of female paradise fish (*Macropodus opercularis*). Horm Behav. 19(1): 21-35.
- Walsh CJ and Luer CA. 2013. Elasmobranch hematology: identification of cell types and practical applications. In: The elasmobranch husbandry manual: captive care of sharks, rays and their relatives ed. Smith Mark FL, Warmolts Doug, Thoney Dennis, and Hueter Robert (ed.). Ohio Biological Survey.
- Waltrick D, Jones SM, Simpfendorfer CA and Awruch CA. 2014. Endocrine control of embryonic diapause in the australian sharpnose shark *Rhizoprionodon taylori*. 1932-6203. Public Library of Science, San Francisco, USA.
- Weems CW, Weems YS and Randel RD. 2006. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. Vet J. 171(2): 206-228.
- Weems YS, Vincent DL, Nusser KD, Tanaka Y, Miller-Patrick K, Ledgerwood KS and Weems CW. 1994. Effects of prostaglandin F2 alpha (PGF2 alpha) on secretion of estradiol-17 beta and cortisol in 90 to 100 day hysterectomized, intact and ovariectomized pregnant ewes. Prostaglandins. 48(3): 139-156.
- Wenbin Zheng and Shuyuan Qiu. 1993. Reproductive biology of the guitarfish, *Rhinobatos hynnicephalus*. Environmental Biology of Fishes. 38: 81-93.
- Whittier JM and Crews D. 1986. Effects of prostaglandin F2 alpha on sexual behavior and ovarian function in female garter snakes (*Thamnophis sirtalis parietalis*). Endocrinology. 119(2): 787-792.

- Wilson ME, Edgerton LA, Stahly TS and Cromwell GL. 1989. Effects of estrogen and prostaglandin on progesterone-delayed farrowing. *Theriogenology*. 32(4): 577-583.
- Wourms JP. 1977. Reproduction and development in chondrichthyan fishes. *Am Zool*. 17(2): 379-410.
- Yokota L and Lessa RP. 2007. Reproductive biology of three ray species: *Gymnura micrura* (Bloch & Schneider, 1801), *Dasyatis guttata* (Bloch & Schneider, 1801) and *Dasyatis marianae* Gomes, Rosa & Gadig, 2000, caught by artisanal fisheries in northeastern Brazil. *Cah Biol Mar*. 48(3): 249-257.
- Zaiden SF, Brinn RP, Marcon JL and Urbinati EC. 2011. Testicular structure and spermatogenesis of Amazonian freshwater cururu stingray *Potamotrygon cf. hystrix*. *Zygote*. 19(3): 245-253.
- กันยารัตน์ สุวรรณประทีป. 2548. รวมสุดยอดกระเบนน้ำจืดยอดฮิต. พิมพ์ครั้งที่ 1. เค แอนด์ เค บุ๊คพับลิชชิง หจก. 98 หน้า.
- โชคชัย เหลืองธูปราณีต 2548. หลักการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์ โพรเพช. 498 หน้า.
- บรรลือ กรมาทิตย์สุข และสุดสายใจ กรมาทิตย์สุข 2549. การกำหนดโปรแกรมการสืบพันธุ์ในแมคโคนมหลังคลอด. *สัตวแพทยสาร*. ปีที่ 57 (1): 56-72.
- พรรณพิไล เสกสิทธิ์ และไกรวรรณ หงษ์ยันตรชัย. 2548. การผสมไม่ติดในโคนมที่เหนียวนำการเป็นสัตว์ด้วยโปรสตาแกลนดินและโคนมที่เป็นสัตว์ตามปกติ. *สัตวแพทยสาร*. ปีที่ 56 (1): 16-24.
- เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเดี่ยว 2553. ฮอร์โมนในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ = HORMONES IN AQUACULTURE. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 272 หน้า.
- ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล สุจินต์ หนูขวัญ และวีระ วัชรกรโยธิน. 2545. การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด. สำนักงานฝ่ายฝึกอบรม ศูนย์พัฒนาการประมงแห่งเอเชียตะวันออกเฉียงใต้. 48-62.
- วิษณุ ไพศาลรุ่งพนา. 2547. การใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์เกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์. ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพนครราชสีมา. 987-1001.
- อรุณี รอดลอย. 2556. “ปลากระเบนน้ำจืดสวยงาม เลี้ยงง่าย ขายคล่อง ตลาดส่งออกไม่อื่น” [On line]. Available:<http://www.fisheries.go.th/aquaorna/web2/images/download/string%20ray.pdf>.

อัจฉริยา ไสละสูต วิจิตร บรรณนารา และสมพร เตชะงามสุวรรณ 2549. ภาคปฏิบัติการเซลล์ วิทยา  
วินิจฉัยในพยาธิวิทยาคลินิกทางสัตวแพทย์. ใน: พยาธิวิทยาคลินิกทางสัตวแพทย์. อัจฉริยา  
ไสละสูต นพดล พิฬารัตน์ และสุประดิษฐ์ หวังในธรรม (บรรณาธิการ) กรุงเทพฯ: ปอยท์  
กราฟิก. 78-80.







ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวชฎานิศ ดาวฉาย เกิดวันที่ 12 ธันวาคม พ.ศ. 2529 จังหวัดเชียงใหม่ จบการศึกษาระดับมัธยมจากโรงเรียนราชินี จังหวัดกรุงเทพมหานคร เมื่อปี พ.ศ. 2547 จบการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขา

สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดกรุงเทพมหานคร เมื่อปี พ.ศ. 2553 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2554

มีผลงานทางวิชาการที่ตีพิมพ์เผยแพร่ ได้แก่

ชฎานิศ ดาวฉาย และวีณา เคยพุดชา. 2556. การลดปริมาณทองแดงในน้ำทะเล โดยใช้ถ่านกัมมันต์ชนิดที่ทำจากกะลามะพร้าว = Removal of Copper from Natural Sea Water Using Coconut Shell Activated Carbon. วารสารการประมง 66(2): 124-133.

ชฎานิศ ดาวฉาย อธิษฐาน วานากิตติเสถียร เมธิรา เลิศหิรัญวงศ์ ศรัณย์สิริ นวลมณี ฐนิตา เหวตระกุล นันทริการ ชันชื้อ. 2556. รายงานสัตว์ป่วย: การใช้ Baytril® เพื่อควบคุมการติดเชื้อหลังการตัดหาง (tail amputation) ในปลากระเบนโมโตโร (Potamotrygon motoro). VPAT Regional Veterinary Congress 2014. 18-21 พฤษภาคม 2556. กรุงเทพฯ: 179-180.

Daochai C, Keschumrus N and Chansue N 2015. Effect of exogenous prostaglandin on reproductive organs in captive female Ocellate river stingray (Potamotrygon motoro) by ultrasonography. Proceedings of the 14th Chulalongkorn University Veterinary Conference CUVC 2015: Responsible for Live. April 20-22, 2015, Bangkok: 179-180.

Keschumrus N, Daochai C and Chansue N 2015. Evaluation of fresh and chilled semen from Ocellate river stingray (Potamotrygon motoro). Proceedings of the 14th Chulalongkorn University Veterinary Conference CUVC 2015: Responsible for Live. April 20-22, 2015, Bangkok: 255-256.