

# จุลกายวิภาคและเคมีจุลกายวิภาคโดยการใช้ lectin ในการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ เพศเมียในม้าน้ำดำ (*Hippocampus kuda*)

## Histology and Lectin Histochemistry in the Development of Female Germ Cells in Seahorse (*Hippocampus kuda*)

ธนภรณ์ เลิศสุรัตน์<sup>1</sup> วรณภา บุญวานิช<sup>2</sup> และ อัมพร ทองกู่เกียรติกุล<sup>1\*</sup>

Thanaporn Lersurat<sup>1</sup> Wannapa Boonwanich<sup>2</sup> and Amporn Thongkukiatkul<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

<sup>2</sup>ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

<sup>1</sup>Biology Department, Faculty of Science, Burapha University

<sup>2</sup>Chemistry Department, Faculty of Science, Burapha University

Received : 6 January 2016

Accepted : 22 March 2016

Published online : 7 April 2016

### บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาจุลกายวิภาคและเคมีของการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียของม้าน้ำดำ (*Hippocampus kuda*) โดยกรรมวิธีพาราฟิน เก็บตัวอย่างรังไข่จากตัวสัตว์ และรักษาสภาพด้วยสารละลายบูแอง นำตัวอย่างที่ฝังในพาราฟินไปตัดที่มีความหนา 7 ไมครอน และทำการย้อมด้วยสีฮีมาทอกซาลีนและอีโอซิน (H-E) สีเพอร์ไอดิช ซิฟ และฮีมาทอกซาลีน (PAS/H) สีอัลเซียน บลู pH2.5 (AB pH2.5) เซลล์ภายในรังไข่ม้าน้ำดำแยกเป็นระยะต่างๆ ดังนี้ ระยะ oogonia ระยะ primary growth ระยะ oil droplet ระยะ cortical alveolus ระยะ vitellogenic และระยะ maturation โอโอไซต์มีขนาดประมาณ 10 ไมครอนถึง 675 ไมครอน ในการศึกษาการกระจายของไกลโคคอนจูเกตด้วยเลคติน (lectin) ระหว่างการพัฒนาของโอโอไซต์ เมื่อเริ่มต้นระยะ cortical alveolus พบว่า cortical alveoli กระจายใกล้บริเวณด้านนอกของไซโทพลาสซึม และ cortical alveoli บรรจุสารพวกไกลโคคอนจูเกตที่เป็นกลางและเป็นกรด โดยเฉพาะน้ำตาล  $\alpha\beta$ -acetyl-D-galactosamine,  $\alpha$ -acetyl-D glucosamine,  $\alpha$ -mannose และ sialic acid ชั้น zona radiata ย้อมติดเลคตินทุกชนิด แสดงว่าผิวของโอโอไซต์มีองค์ประกอบของโพลีแซคคาไรด์ที่ซับซ้อน

คำสำคัญ : *Hippocampus kuda* การเจริญของโอโอไซต์ เลคติน

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

### Abstract

The present research aimed to study on feature histological and histochemical of the female germ cells In the seahorse (*Hippocampus kuda*) during development stages by using paraffin methods. The ovarian samples were taken from animal bodies and fixed in Bouin's solution. The paraffin embed samples were sectioned at 7  $\mu\text{m}$ -thickness which were stained with Hematoxylin and Eosin (H-E), Periodic-acid Schiff and hematoxylin (PAS/H), alcian blue pH2.5 (AB pH2.5) and lectin. The ovarian cells in seahorse ovary were characterized into various stages (including oogonia, primary growth, oil droplet, cortical alveolus, vitellogenic and maturation). Those of the observed oocytes showed a wide range of diameters 10  $\mu\text{m}$  to 675  $\mu\text{m}$ . Lectin histochemistry was also applied to distribution of glycoconjugates during the initiation of cortical alveolus stage, an appearance of cortical alveoli containing neutral and carboxylated glycoconjugates was obviously seen around the peripheral area of cytoplasm. Both of glycoconjugates within cortical alveoli were specially composed of  $\alpha/\beta$ -acetyl-D-galactosamine,  $\alpha$ -acetyl-D glucosamine,  $\alpha$ -mannose and sialic acid. The zona radiata positively reacted to all lectins, which indicated the complex polysaccharides in the surface of oocytes.

**Keywords :** *Hippocampus kuda*, oocyte growth, lectins

### บทนำ

*Hippocampus kuda* หรือ ม้าน้ำดำ เป็นม้าน้ำชนิดหนึ่งที่จัดในวงศ์ Syngnathidae ม้าน้ำดำเป็นม้าน้ำที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในน่านน้ำไทย (<http://www.aquatoyou.com/index.php/2013-02-20-13-43-43/719-seahorse>) ม้าน้ำเป็นปลากระดูกแข็งมีเพศแยก เพศเมียมีรังไข่ 1 คู่ ลักษณะคล้ายท่อ พบบริเวณด้านหลังของช่องท้อง แต่จะรังไข่ทำหน้าที่สร้างไข่แล้วปล่อยไปเก็บไว้ที่ถุงหน้าท้องตัวผู้เพื่อรอการปฏิสนธิ (Stöiting & Wilson, 2007) เมื่อไข่มีการปฏิสนธิแล้ว จะฟักตัวเป็นตัวอ่อนอยู่ในถุงหน้าท้อง และถูกปล่อยออกสู่ทะเลต่อไป การเจริญตัวอ่อนของม้าน้ำจึงเป็นแบบ ovoviparus (Silveira & Fontoura, 2010)

งานวิจัยที่ศึกษาการพัฒนาและการเจริญของโอโอไซต์ในปลาที่มีจำนวนมากมาย การเจริญของโอโอไซต์ในปลาแบ่งเป็นระยะต่างๆโดยดูจากลักษณะของนิวเคลียส การเปลี่ยนแปลงโอโอพลาสซึมและการเปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มเซลล์ (Selman & Wallace, 1986; Begovac & Wallace, 1989; Wallace & Selman, 1990; Casadevall *et al.*, 1993; Tyler & Sumpter, 1996) ซึ่งสามารถสรุปและแบ่งเป็นระยะต่างๆได้ดังนี้ 1) ระยะ primary growth หรือระยะ previtellogenesis เซลล์ในระยะนี้มีการเปลี่ยนแปลงความหนาของโครโมโซม และการจำลองตัวเองของ DNA (Selman *et al.* 1993) 2) ระยะ cortical alveolus เซลล์ระยะนี้มี cortical alveoli กระจายทั่วไปในไซโทพลาสซึม cortical alveoli มีลักษณะเป็นถุงใส เมื่อย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีย้อมทอกโซลินและสีย้อมไอซอิน ภายในถุงมี polysialoglycoprotein มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200 kDa (Inoue & Inoue, 1987; Selman *et al.*, 1993; Ramezani-Fard *et al.*, 2013) 3) ระยะ lipid vesicle lipid droplets เริ่มปรากฏในไซโทพลาสซึมของเซลล์ตั้งแต่ระยะ cortical alveolus หลังจากนั้นมีการรวมตัวและมีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น (Grier, 2012) 4) ระยะ vitellogenic เซลล์เพิ่มขนาดและมีขนาดใหญ่กว่าระยะก่อนหน้าประมาณ 50-100 เท่า (Tyler & Sumpter, 1996) เซลล์เริ่มสะสม yolk granules

ในไซโทพลาสซึม (Babin *et al.*, 2007) 5) ระยะ maturation เซลล์ระยะนี้มีการเปลี่ยนแปลงหลายอย่างเช่น การแตกสลายของ germinal vesicle และ yolk granules รวมตัวมีขนาดใหญ่ขึ้นเช่นเดียวกับ lipid droplets ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น (Mayer *et al.*, 1988)

เลคตินเป็นโปรตีนที่พบได้ทั้งในพืช สัตว์และจุลินทรีย์ มีหน้าที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน การเจริญเติบโตของเซลล์ การตายของเซลล์ และการควบคุมไขมันในร่างกาย เลคตินสามารถจับจำเพาะกับน้ำตาลชนิดต่างๆดังตารางที่ 1 ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการวิเคราะห์โครงสร้างของ glycoconjugate ในเนื้อเยื่อและเซลล์ (Lis & Sharon, 1986; Spicer & Schulte, 1992) การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียของปลาม่าน้ำดำและการกระจายของ glycoconjugates ในเซลล์ระยะต่างๆในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งจะทำให้เกิดความรู้พื้นฐานทางด้านชีววิทยาของการสืบพันธุ์เพื่อนำไปใช้จัดการเกี่ยวกับวงสืบพันธุ์ของปลาในการเพาะเลี้ยงและสำหรับใช้ในงานวิจัยทางด้านฮอริโมนที่ควบคุมการทำงานของระบบสืบพันธุ์ นอกจากนี้ยังสามารถนำความรู้ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกระบวนการสร้างเซลล์ไข่ในปลาชนิดอื่น

### วิธีดำเนินการวิจัย

นำปลาม่าน้ำดำเพศเมียจำนวน 10 ตัว ที่มีความยาวประมาณ 14-16 เซนติเมตร จากบริเวณอ่าวไทย และนำมาเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการนาน 24 ชั่วโมง ทำการสลบปลาด้วย Tricaine methane-sulfonate (MS-222) ปริมาณ 70 มิลลิกรัม/ลิตร นานประมาณ 20-30 นาที เมื่อปลาสลบทำการผ่าท้องปลาเอารังไข่ทั้ง 2 ข้าง ตัดรังไข่เป็นชิ้นขนาดประมาณ 3-5 มิลลิเมตร และแบ่งเนื้อเยื่อเป็น 2 ส่วน เนื้อเยื่อส่วนที่ 1 ใช้ในการศึกษา lipid inclusion ในโอโอไซต์ ตัดแปลงจากวิธีทำของ Ortiz-Delgado *et al.* (2008) โดยนำชิ้นเนื้อเยื่อแช่ในสารละลาย 1% osmium นาน 24 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.1M PBS แล้วสังเกต lipid inclusion ในโอโอไซต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Olympus BX50 เนื้อเยื่อส่วนที่ 2 นำไปแช่ในสารละลายบูแอง (Bouin) นาน 24 ชั่วโมง แล้วล้างชิ้นเนื้อเยื่อด้วย 70% เอทานอล จนกระทั่งไม่มีสีเหลืองของสารละลายบูแอง จากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อไปศึกษาต่อด้วยวิธี histological techniques และ histochemistry technique

#### 2.1 Histological techniques

นำเนื้อเยื่อที่แช่ใน 70% เอทานอล ผ่านกระบวนการดึ่งน้ำออกโดยเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอล นำชิ้นเนื้อเยื่อฝังในพาราฟิน ตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 7 ไมครอน ย้อมสีด้วยสีย้อมมาทอกไฮลีนและสีย้อมไอซัน ตัดแปลงจากวิธีของ Humason (1962) สังเกตโครงสร้างของโอโอไซต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Olympus BX50

#### 2.2 Histochemistry techniques

ตัดชิ้นเนื้อเยื่อที่ฝังในพาราฟินจากข้อ 2.1 หนา 7 ไมครอน แล้วย้อมด้วยสีย้อม periodic acid-Schiff / H (PAS/H) เพื่อศึกษา neutral glycoconjugate และย้อมด้วยสีย้อม alcian blue (AB) pH2.5 / PAS เพื่อศึกษา carboxylated glycoconjugate ซึ่งขั้นตอนการย้อมสีทั้ง 2 ชนิดตัดแปลงจากวิธีของ Pearse, 1985

#### 2.3 Lectin Histochemistry

ขั้นตอนนี้ใช้วิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาล (ตารางที่ 1) ในสายที่เป็นองค์ประกอบของ glycoconjugate โดยนำชิ้นเนื้อเยื่อที่ฝังในพาราฟินจากข้อ 2.1 ตัดหนา 7 ไมครอน มาแช่ในสารละลาย 0.3% hydrogen peroxide ใน Tris buffer saline (TBS) pH 7.2 เป็นเวลา 10 นาที เพื่อยับยั้งการเกิด endogenous peroxidase จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปมใน horseradish peroxidase-conjugated lectins (HRP-lectin conjugated) ชนิดต่างๆดังนี้ WGA, HRP, Con A และ SBA ที่ละลายใน TBS นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย TBS 3 ครั้ง ศึกษาปฏิกิริยาเอนไซม์ peroxidase ด้วย 0.05% 3,3'-diaminobenzidine

tetrahydrochloride (DAB) ที่ละลายใน TBS ล้าง sections ด้วยน้ำประปาไหลผ่านนาน 10 นาที จากนั้นผ่านขั้นตอนล้างน้ำ ออกและ clearing ใน xylene แล้วปิดสไลด์ด้วย permount สำหรับสไลด์ควบคุม ใช้ TBS แทนเลคติน ดัดแปลงวิธีทำจากวิธี ของ Ortiz-Delgado *et al.* (2008) โดยใช้เลคตินและแอนไทม์ จากบริษัท Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA. .

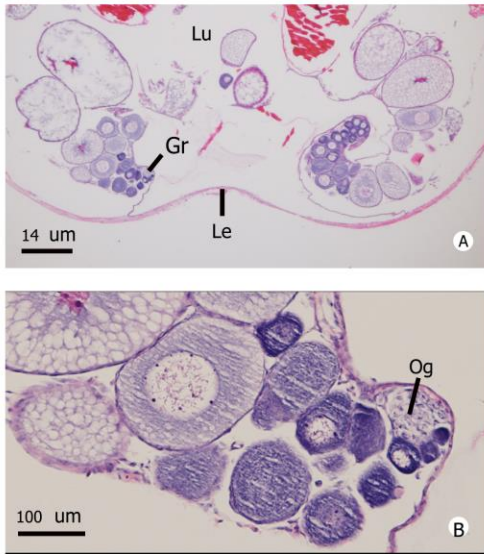
**ตารางที่ 1** แสดงชนิดของเลคติน ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ และการจับจำเพาะกับน้ำตาลดัดแปลงจาก Spicer & Schulte, (1992) และ Skutelsky *et al.* (1994)

| ชื่อเต็มและชื่อย่อเลคติน                      | ความเข้มข้น | การจับจำเพาะ          |
|---|-------------|-----------------------|
| <i>Triticum vulgare</i> (wheat germ) WGA      | 50 µg/ml    | α-GlcNAc, sialic acid |
| <i>Helix pomatia</i> (HPA)                    | 50 µg/ml    | α-GalNAc              |
| <i>Canavalia ensiformis</i> (jack bean) Con-A | 50 µg/ml    | α-Man, α-GlcNAc       |
| <i>Glycine max</i> (soybean) SBA              | 50 µg/ml    | α/β GalNAc            |

α-Man, α-mannose; GlcNAc, α/β-acetyl-glucosamine; α-acetyl-galactosamine

### ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

จากการศึกษาเนื้อเยื่อรังไข่ของปลาแม่น้ำดำ โดยตัดตามขวางรังไข่แม่น้ำดำพบว่าภายในรังไข่มี 2 germinal ridges ซึ่งมีลักษณะแผ่นม้วน และพบกลุ่ม stem cells ทางด้านหลัง และมีโอโอไซต์ระยะต่างๆแทรกระหว่างผนังรังไข่และเยื่อบุผิวที่ล้อมรอบท่อ (luminal epithelium) (ภาพที่ 1A) รังไข่ของแม่น้ำดำเหมือนรังไข่ปลา *Corythoichthys haematopterus* ที่มี 2 germinal ridges แต่ต่างจากปลา *Syngnathus* ที่มี 1 germinal ridge (Sogabe *et al.*, 2008) ระยะการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของแม่น้ำดำเพศเมีย แบ่งตามขนาดของเซลล์ ลักษณะของนิวเคลียส และลักษณะของ ooplasm แบ่งเป็น 5 ระยะดังนี้ **ระยะโอโอโกเนีย (oogonia, Og)** เซลล์มีรูปร่างกลม ขนาดประมาณ  $15 \pm 5$  ไมครอน นิวเคลียสมีรูปร่างกลม และมีนิวคลีโอลัสตรงกลาง เซลล์ระยะนี้พบบริเวณ germinal ridge (ภาพที่ 1B) เซลล์โอโอเนียจะแบ่งนิวเคลียสแบบไมโทซิสเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่เซลล์บางเซลล์เจริญเข้าสู่ระยะ primary growth ต่อไป (Abou-seedo *et al.*, 2003)



ภาพที่ 1 เนื้อเยื่อรังไข่ของม้าน้ำ *H.kuda*

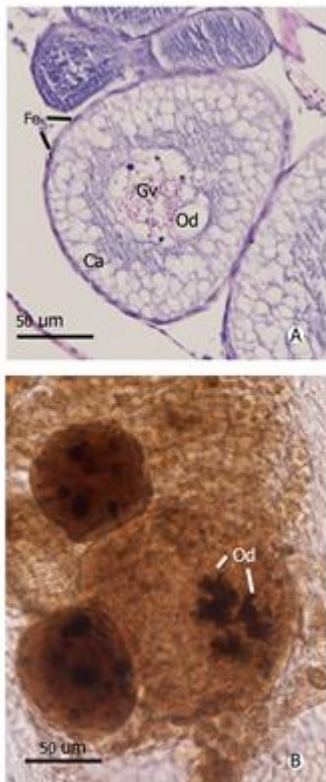
- (A) Germinal ridges 2 ข้าง, Luminal epithelium (Le); Lumen (Lu); Germinal ridge (Gr)
- (B) Oogonia (Og) บริเวณ germinal ridge

**ไพรมารี โกรท ( primary growth phase)** แบ่งเป็น 2 ระยะย่อยคือระยะ chromatin nucleolus และระยะ perinucleolus เซลล์ระยะ chromatin nucleolus (OC1 ) มีขนาด  $22 \pm 6$  ไมครอน และมีลักษณะดังนี้ นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ โครโมโซมสั้น และหนา (ภาพที่ 2) เซลล์เริ่มมีการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิส มีโครโมโซมแบบ haploid (Lee *et.al.* 2008) หลังจากระยะนี้ เซลล์จะเข้าสู่ระยะ perinucleolus ต่อไป เซลล์ระยะ perinucleolus (OC2) มีขนาด  $60 \pm 5$  ไมครอน มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ และพบนิวคลีโอลัสหลายนิวคลีโอลัสอยู่ใกล้กับเยื่อหุ้มนิวเคลียส ไฮโทพลาสซึมติดสีน้ำเงินเมื่อย้อมด้วยสี H-E (ภาพที่ 2) นิวคลีโอลัสทำหน้าที่สังเคราะห์ RNA และไรโบโซม ส่งไปยังไฮโทพลาสซึมเพื่อสังเคราะห์โปรตีนสำหรับการพัฒนาของโอโอไซต์ และการพัฒนาของตัวอ่อน (Wallace & Selman, 1990) นอกจากนี้ภายในไฮโทพลาสซึมยังพบ Balbiani vitelline body หรือเรียกว่า yolk body มีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยวอยู่ข้างนิวเคลียสหรือเป็นวงแหวนล้อมรอบนิวเคลียส บริเวณ Balbiani vitelline body พบออร์แกเนลชนิดต่างๆเช่นไมโทคอนเดรีย กอลจี้ คอมเพลกซ์ เอนโดพลาสมิก เรติคูลัม แบบละเอียด และ multivesicular body รวมกลุ่มกัน ชนิดของออร์แกเนลที่พบบริเวณ Balbiani vitelline body จะแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิด (Guraya, 1979; Guraya, 1986) Balbiani vitelline body นอกจากพบในโอโอไซต์ของปลา ยังพบในโอโอไซต์ของสัตว์สะเทินบกสะเทินน้ำและคน (Zelazowska *et al.*, 2007; Kress, 1996) )



ภาพที่ 2 โอโอไซต์ระยะ chromatin nucleolus (OC1) และระยะ perinucleolus (OC2) ย้อมด้วยสี H-E นิวเคลียส (N); ★ Balbiani vitelline body; นิวคลีโอลัส (no)

**ระยะ oil droplets** โอโอไซต์ระยะนี้ (OC3) มีขนาด  $130 \pm 14$  ไมครอน เริ่มต้นระยะนี้ oil droplets พบใกล้เยื่อหุ้มนิวเคลียส แล้วกระจายทั่วไปในไซโทพลาสซึม (ภาพที่ 3A) oil droplets มี triacylglycerol องค์ประกอบ (Mourente *et al.* 2002) oil droplets มีลักษณะคล้าย cortical alveoli เนื่องจากสารใน oil droplets สูญหาย ระหว่างขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ ซึ่งเกิดจากสารละลายบุแ่งที่ใช้ในการรักษาภาพเนื้อเยื่อไม่สามารถรักษาภาพ triacylglycerol ใน oil droplets ได้ (Selman & Wallace, 1986) แต่เมื่อโอโอไซต์ที่ผ่าจากรังไข่มีน้ำดำแล้วย้อมด้วยสารละลาย 1% osmium จะพบ oil droplets ติดสีน้ำตาลเข้มกระจายในไซโทพลาสซึม (ภาพที่ 3B) เมื่อไข่เข้าสู่ระยะ vitellogenesis oil droplets จะรวมตัวมีขนาดใหญ่ขึ้นเรียก oil globules ซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานของตัวอ่อน และการलयของไข่ (Wiegand, 1996; Grier, 2012; Mommsen & Walsh, 1988) โอโอไซต์ระยะนี้ถูกหุ้มด้วย follicle epithelium ซึ่ง follicular cells ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีน และไขมันที่ใช้ระหว่างโอโอไซต์เจริญเติบโต และโปรตีนยังใช้สำหรับสร้าง zona radiata (Hamlet *et al.*, 1999)



**ภาพที่ 3** (A) โอโอไซต์ระยะ oil droplet (OC3)

ย้อมด้วย H-E

พบ Oil droplet (Od) ใกล้เยื่อหุ้มนิวเคลียส

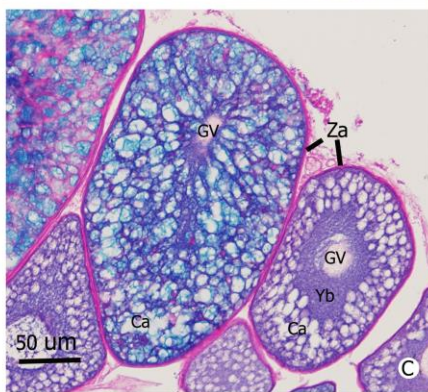
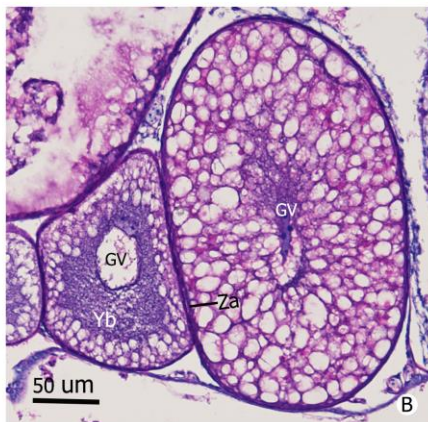
Germinal vesicle (Gv); Cortical alveoli (Ca); Follicle epithelium (Fe)

(B) โอโอไซต์ระยะ oil droplet ย้อมด้วย

1% osmium

Oil droplet (Od) ติดสีน้ำตาลเข้ม

ระยะ cortical alveolus โอโอไซต์ (OC4) มีรูปร่างคล้ายหยดน้ำ ยาว  $260 \pm 13$  ไมครอน เมื่อเริ่มต้นระยะนี้ โอโอไซต์มี cortical alveoli ใกล้กับเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อโอโอไซต์พัฒนาและมีขนาดใหญ่ขึ้น germinal vesicle สลาย cortical alveoli จะกระจายทั่วเซลล์ (ภาพที่ 4A, 4B และ 4C) ภายในถุง cortical alveoli มีสาร neutral glycoconjugate เพราะย้อมติดสี PAS (ภาพที่ 4B) และมีสาร carboxylated glycoconjugate เพราะย้อมติดสี AB pH2.5 (ภาพที่ 4C) เมื่อไข่เกิดการปฏิสนธิ cortical alveoli จะถูกปล่อยออกไปที่ perivitelline space เพื่อป้องกันการเกิด polyspermy (Ohta *et al.*, 1990) ระยะนี้ โอโอไซต์ถูกหุ้มด้วย zona radiata และ ย้อมติดสี PAS แสดงว่ามีสาร neutral glycoconjugate เป็นองค์ประกอบ (Kunz, 2004)



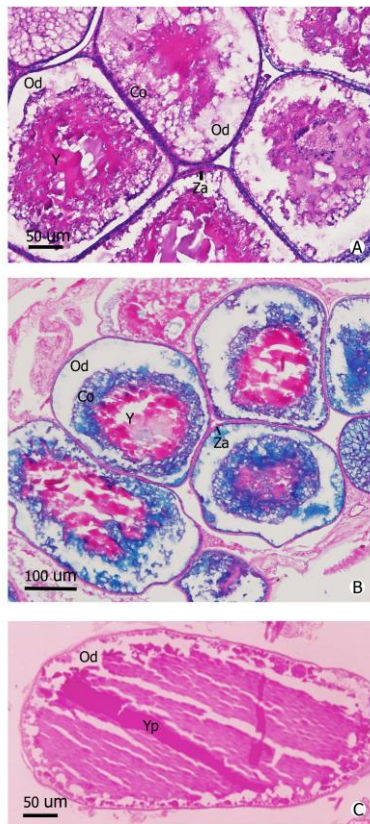
ภาพที่ 4 โอโอไซต์ระยะ cortical alveoli (OC4)

- (A) ย้อมด้วยสี H-E
- (B) ย้อมด้วยสี PAS/H
- (C) ย้อมด้วยสี AB pH2.5/PAS

Germinal vesicle (GV); Cortical alveoli (Ca);  
Yolk body (Yb); Zona radiata (Za)

### ระยะ vitellogenic

โอโอไซต์ระยะนี้มีขนาด  $422 \pm 18$  ไมครอน เมื่อเริ่มต้นระยะนี้ โอโอไซต์ (OC5) มี yolk granules ติดสีไอซอิน สีชมพูเข้มกระจายทั่วไซโทพลาสซึม (ภาพที่ 5A) yolk ใช้เป็นอาหารระหว่างตัวอ่อนที่กำลังพัฒนา (Uribe *et al.*, 2012) เมื่อย้อม yolk granules ด้วย PAS ติดสีชมพู แสดงว่า yolk มีสาร neutral glycoconjugate เป็นองค์ประกอบ เหมือนองค์ประกอบของ yolk ในโอโอไซต์ของปลา *Xiphias gladius* (Ortiz-Delgado *et al.*, 2008) และปลา *Thunnus thynnus* (Sarasquete *et al.*, 2002) แต่ต่างจาก yolk ของปลาทองและปลากะพง (Khoo, 1979; Mayer *et al.*, 1998) ซึ่งย้อมไม่ติดสี PAS แต่เมื่อย้อมด้วยสี AB pH2.5 ติดสีฟ้า (ภาพที่ 5B) แสดงว่า yolk เป็นสาร carboxylated glycoconjugate เหมือนองค์ประกอบของ yolk ของปลา *Solea senegalensis* (Gutiérrez *et al.*, 1985) แต่ต่างจาก yolk ในโอโอไซต์ของปลา *X. gladius* (Ortiz-Delgado *et al.*, 2008) และปลา *Thunnus thynnus* (Sarasquete *et al.*, 2002) ที่ย้อมไม่ติดสี AB pH2.5 องค์ประกอบของ yolk แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของปลา แต่ yolk ของปลาทุกชนิดมีโปรตีนที่เป็นอนุพันธ์ของ vitellogenin เป็นส่วนประกอบรวม โปรตีนชนิดนี้สร้างที่ตับแล้วจึงถูกนำเข้าไปโอโอไซต์ (LaFleur *et al.*, 2005) โอโอไซต์ระยะนี้ถูกหุ้มด้วยชั้น zona radiata หนามากขึ้น



**ภาพที่ 5** (A) โอโอไซต์ระยะ vitellogenic (OC5) ย้อมด้วยสี H-E, Oil droplet (Od); Cortical alveoli (Ca); Zona radiata (Za)  
 (B) โอโอไซต์ระยะ vitellogenic ย้อมด้วยสี alcian blue pH2.5/PAS, Oil droplet (Od); Zona radiata (Za); Y (Yolk)  
 (C) โอโอไซต์ระยะ maturation (OC6) ย้อมด้วยสี PAS, Oil droplet (Od); Yolk plate (Yp)



**ระยะ maturation**

โอโอไซต์ (OC6) ระยะนี้มีขนาดใหญ่ที่สุด  $650 \pm 25$  ไมครอน yolk granules รวมเป็น yolk plates กระจายเต็มเซลล์ zona radiata หนามากที่สุด zona radiata ย้อมติดสี PAS (ภาพที่ 5C) ซึ่งเหมือนกับ zona radiata ที่หุ้มโอโอไซต์ปลา *Brycon nattereri* (Maria *et al.*, 2014) และปลา *T. thynnus* (Sarasquete *et al.*, 2002) zona radiata หุ้มไข่ปลาแต่ละชนิดหนาไม่เท่ากัน ซึ่งแสดงถึงความสามารถของปลาแต่ละชนิดในการปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อม เช่นไข่ปลาที่จมจะมี zona radiata หนาเพื่อป้องกันแรงที่เกิดจากการกระแทกของน้ำ แต่ไข่ปลาลอยจะมี zona radiata บาง (Stehr & Hawkes, 1979)

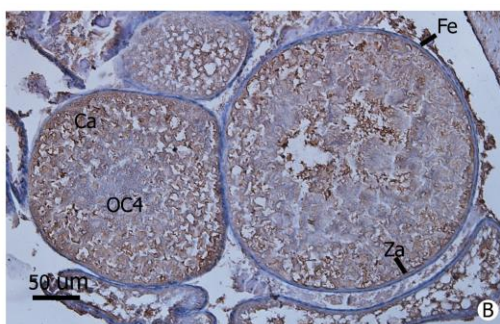
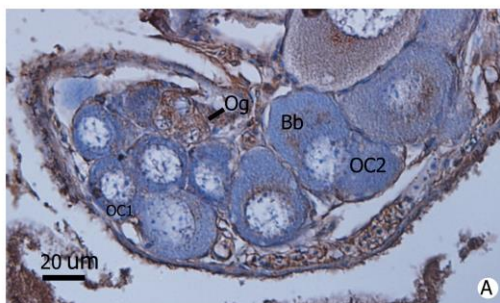
เมื่อศึกษาเนื้อเยื่อเคมีโดยการใช้เทคนิค พบว่าเฉพาะ ConA ย้อมติดนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมของโอโอไซต์ระยะ chromatin nucleolus (OC1) และ โอโอไซต์ระยะ perinucleolus (OC2) แต่เทคนิคทุกชนิดย้อมติด cortical alveoli, yolk granules, zona radiata และ follicular envelope ความไวการติดเทคนิคแต่ละชนิดไม่เท่ากัน ดังตารางที่ 2

**ตารางที่ 2** ผลของการศึกษาเนื้อเยื่อเคมีในโอโอไซต์ระยะต่างๆของ *H.kuda* ด้วยเทคนิค lectin histochemistry

|       | Chromatin nucleous (OC1) | Perinucleolus (OC2) | Oil droplet (OC3) | Cortical alveoli (OC4) | Vitellogenesis (OC5) |
|-------|--------------------------|---------------------|-------------------|------------------------|----------------------|
| WGA   | +                        | +                   | +                 | +++                    | +++                  |
| HPA   | -                        | -                   | -                 | ++                     | ++                   |
| Con A | ++++                     | ++++                | ++++              | ++++                   | ++++                 |
| SBA   | -                        | -                   | -                 | ++                     | ++                   |

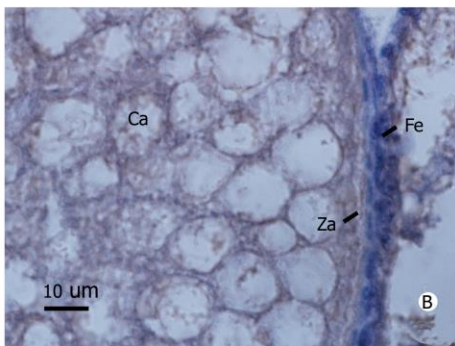
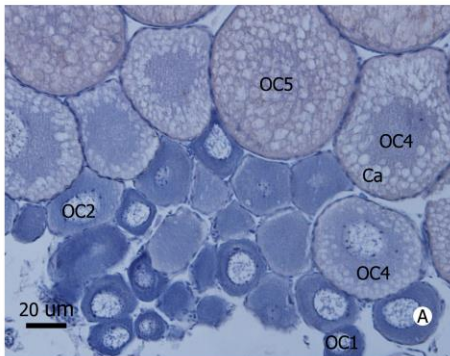
ความไวการติดเทคนิค: +ติดอ่อนมาก; ++ ติดอ่อน, +++ ติดปานกลาง, ++++ ติดเข้ม

ผลการศึกษาเนื้อเยื่อเคมีโดยการใช้เทคนิค สามารถบอกถึงชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของ glycoconjugate ที่พบในโอโอไซต์ระยะต่างๆ ดังตารางที่ 2 แต่ในตารางที่ 2 ไม่มีรายงานผลระยะ oogonia เพราะ oogonia ย้อมติด WGA ชนิดเดียว และWGA ย้อมติด Balbiani vitelline body ในไซโทพลาสซึมของโอโอไซต์ระยะ perinucleolus (OC2) (ภาพที่ 6A) และย้อมติด cortical alveoli และ zona radiata ของโอโอไซต์ระยะ cortical alveolus (OC4) (ภาพที่ 6B) แต่ไม่ติด follicular epithelium



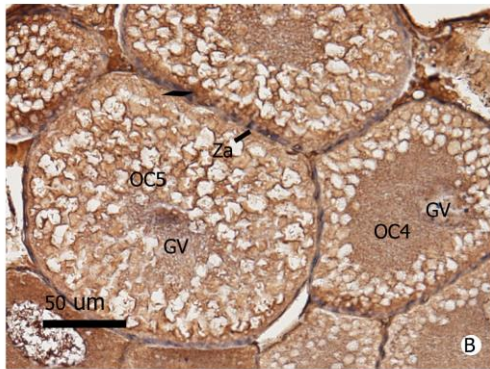
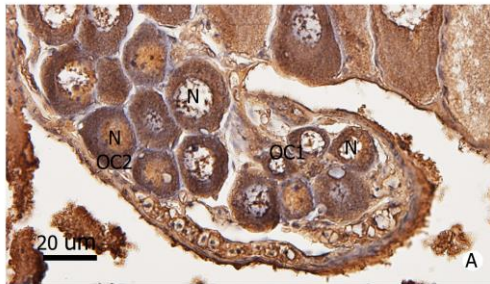
**ภาพที่ 6** (A) โอโอไซต์ระยะต่างๆภายในรังไข่ ม้วนน้ำย้อมด้วย WGA พบว่า WGA ย้อมติดไซโทพลาสซึมของโอโอโกเนีย (Og) โอโอไซต์ระยะ chromatin nucleolus (OC1) และย้อมติด Balbiani vitelline body (Bb) ในโอโอไซต์ระยะ perinucleolus (OC2)  
 (B) WGA ย้อมติดโอโอไซต์ระยะ cortical alveolus (OC4) โดยย้อมติด cortical alveoli (Ca) และ Zona radiata (Za) แต่ย้อมไม่ติด Follicular epithelium (Fe)

สำหรับ HPA ย้อมติด cortical alveoli ในโอโอไซ์ระยะ cortical alveolus (OC4) และโอโอไซ์ระยะ vitellogenic (OC5) และย้อมติด zona radiata ที่หุ้มโอโอไซ์ทั้ง 2 ระยะ (ภาพที่ 7A และ 7B)

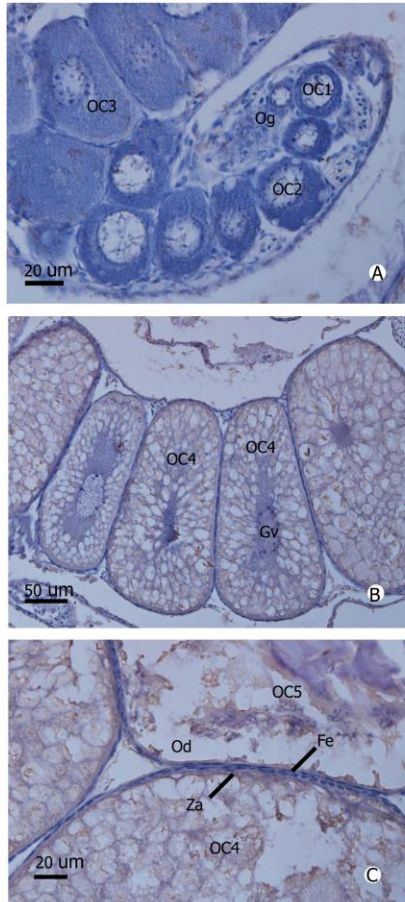


**ภาพที่ 7** (A) โอโอไซ์ระยะต่างๆในรังไข่ม้าน้ำย้อมด้วย HPA โอโอไซ์ระยะ chromatin nucleolus (OC1) และ โอโอไซ์ระยะ perinucleolus (OC2) ย้อมไม่ติด HPA แต่ cortical alveoli (Ca) ในโอโอไซ์ระยะ cortical alveolus (OC4) และโอโอไซ์ระยะ vitellogenic (OC5) ย้อมติด HPA  
(B) ภาพขยายโอโอไซ์ระยะ vitellogenic (OC5) HPA ย้อมติด cortical alveoli (Ca) และ Zona radiata (Za) แต่ย้อมไม่ติด Follicular epithelium (Fe)

เมื่อย้อมด้วย Con A พบว่า Con A ย้อมติดนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมของโอโอไซ์ระยะ chromatin nucleolus (OC1) จนถึงในโอโอไซ์ระยะ cortical alveolus (OC4) และย้อมติด cortical alveoli และ zona radiata ของโอโอไซ์ระยะ cortical alveolus (OC4) และโอโอไซ์ระยะ vitellogenic (OC5) (ภาพที่ 8A และ 8B) ส่วน SBA ย้อมติด cortical alveoli ในโอโอไซ์ตั้งแต่ระยะ cortical alveolus (OC4) จนถึงโอโอไซ์ระยะ vitellogenic (OC5) และย้อมติด zona radiata ที่หุ้มโอโอไซ์ทั้ง 2 ระยะแต่ย้อมไม่ติด follicle epithelium (ภาพที่ 9A และ 9B)



**ภาพที่ 8** (A) โอลิโอไซต์ระยะต่างๆในรังไข่ม้าน้ำย้อมด้วย Con A  
Con A ย้อมติดนิวเคลียส (N) และไซโทพลาสซึม  
ของโอลิโอไซต์ระยะ chromatin nucleolus (OC1)  
และระยะ perinucleolus (OC2)  
(B) Con A ย้อมติด Cortical alveoli (Ca) และ  
Zona radiata (Za) ของโอลิโอไซต์ระยะ cortical  
alveolus (OC4) และโอลิโอไซต์ระยะ vitellogenic  
(OC5), Germinal vesicle (Gv)



**ภาพที่ 9** (A) โอลิโกเนีย (Og) และโอลิโอไซต์ระยะต่างๆภายในรังไข่มีน้ำย้อมด้วย SBA พบว่า โอลิโกเนีย (Og) โอลิโอไซต์ระยะ chromatin nucleolus (OC1) โอลิโอไซต์ระยะ perinucleolus (OC2) และโอลิโอไซต์ระยะ oil droplets (OC3) ย้อมไม่ติด SBA (B) Cortical alveoli (Ca) ในโอลิโอไซต์ระยะ cortical alveolus (OC4) ย้อมติด SBA, Germinal vesicle (Gv) (C) โอลิโอไซต์ระยะ cortical alveolus (OC4) และ โอลิโอไซต์ระยะ vitellogenic (OC5) ย้อมด้วย SBA พบว่า ย้อมติด Zona radiata (Za) แต่ย้อมไม่ติด Oil droplet (Od) และ Follicle epithelium (Fe)

จากการวิจัยครั้งนี้พบว่า cortical alveoli ย้อมติด lectins ทั้ง 4 ชนิดแสดงว่า มีสาร glycoconjugate ที่มีน้ำตาลชนิด mannose,  $\alpha$ -acetyl-D-glucosamine,  $\alpha/\beta$ -acetyl-D-galactosamine และ sialic acid เป็นส่วนประกอบ น้ำตาล sialic acid เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของสารภายใน cortical alveoli เพื่อป้องกันการเกิด polyspermy และป้องกันตัวอ่อนไม่ให้ติดเชื้อแบคทีเรีย (Tiralongo & Duncker, 2015) ชั้น zona radiata ย้อมติด lectin ทุกชนิด แสดงว่า zona radiata ของ *H.kuda* ประกอบด้วยสารพวก glycoconjugate ที่มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับที่พบใน cortical alveoli สาร glycoconjugate ยังพบได้ที่ชั้น zona pellucida ของโอลิโอไซต์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิดต่างๆ (Parillo *et al.*, 2000) และพบได้ที่ชั้น zona radiata ของโอลิโอไซต์สัตว์สะเทินบกสะเทินน้ำ (Dell *et al.*, 1999) สาร glycoconjugate ที่เป็นองค์ประกอบของ zona radiata ทำให้เกิดการจับอย่างจำเพาะระหว่างไข่และสเปิร์ม (Skutelsky *et al.*, 1994) และ zona radiata สามารถจับกับสาร เช่น ฮอริโมน เมตะบอลไลท์ชนิดต่างๆ รวมทั้งอ็อน เพื่อขนส่งผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Miller & Ax, 1990)

### สรุปผลการวิจัย

องค์ประกอบน้ำตาลใน cortical alveoli, yolk และ zona radiata ของโอโอไซต์ของม้าน้ำ *H. kuda* สามารถบ่งบอกสรีรวิทยาการทำงานของระบบสืบพันธุ์ของปลา *H. kuda* ได้ เช่นน้ำตาล mannose,  $\alpha$ -acetyl-D-glucosamine,  $\alpha/\beta$ -acetyl-D-galactosamine และ sialic acid ที่เป็นส่วนประกอบของสาร glycoconjugate ที่อยู่ใน cortical alveoli จะถูกหุ้มไปยังบริเวณ perivitelline space เมื่อไข่เกิดการปฏิสนธิ เพื่อป้องกันการเกิด polyspermy ส่วน yolk มี neutral และ carboxylated glycoconjugate เป็นองค์ประกอบ yolk เป็นแหล่งพลังงานและอาหารที่สำคัญของตัวอ่อน

### เอกสารอ้างอิง

- Abou-seedo, F., Dadzie S. & Kanaan A. (2003). Histology of ovarian development and maturity stages in the yellowfin seabream, *Acanthopagrus ltu* (Teleostei: Sparidae) (Hottuyn, 1782) reared in cages. *Kuwait Journal of Science*, 30, 121-135.
- Babin, P.J., Cerdà, J. & Lubzens, E. (2007). *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological applications*. Dordrecht. Springer.
- Begovac, P.C. & Wallace, R. (1989). Major vitelline envelope proteins in pipefish oocytes originate within the follicle and are associated with Z3 layer. *Journal of experimental Zoology*, 251, 56-73.
- Casadevall, M., Bonet, S. & Matallanas, J. (1993). Description of different stages in *Ophiodon barbatum* (Pisces, Ophiidae). *Environmental Biology of Fish*. 36, 127-133.
- Dell, A., Morris, H. R., Easton, R. L., Patankar, M. & Clark, G. F. (1999). The glycobiology of gametes and fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1473, 196–205.
- Grier, H.J. (2012). Development of the follicle complex and oocyte staging in red drum, *Sciaenops ocellatus* Linnaeus, 1776 (Perciformes, Sciaenidae). *Journal of Morphology*, 273, 801–829.
- Guraya, S. S. (1979). Recent advances in the morphology, cytochemistry and function of Balbiani's vitelline body in animal oocytes. *International Review of Cytology*, 59, 249-321
- Guraya, S.S. (1986). *The Cell and Molecular Biology of Fish Oogenesis*. In: Sauer HW (ed). Karger, New York.
- Gutiérrez, M., Sarasquete C. & Rodríguez R.B. (1985). Caracteres citohistoquímicos de carbohidratos proteínas durante la ovogénesis del lenguado, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). *Investigacion pesquera*, 49, 353-363.
- Hamlet, W.C., Jezior, M. & Spieler, R. (1999). Ultrastructural analysis folliculogenesis in the ovary of yellow spotted stingray *Urolophus jamaicensis*. *Annals of anatomy*, 181, 159-172.
- Humason, G.L. (1962). *Animal tissue technique*. San Francisco, W.H. Freeman.
- Aquatoyou.com (2015). Retrieved January 2, 2016, from <http://www.aquatoyou.com/index.php/2013-02-20-13-43-43/719-seahorse>
- Inoue, S. & Inoue, Y. (1986). Fertilization (activation)-induced 200 to 9-kDa depolymerization of

- polysialoglycoprotein, a distinct component of cortical alveoli of rainbow trout eggs. *Journal of Biological Chemistry*, 261,5256-5261.
- Khoo K.H. (1979). The histochemistry and endocrine control of vitellogenesis in goldfish ovaries. *Canadian Journal of Zoology*, 57,617-626.
- Kunz, Y.W. (2004). Developmental biology of teleost fishes. Netherlands: Springer, 636 p.
- Kress, A. (1996). A comparison of oocyte organelles in *Monodelphis domestica* with those of other Marsupials and Eutherians. *Reproduction Fertility and Development*, 8, 521-533.
- LaFleur, G.J. Jr., Raldúa, D., Fabra, M., Carnevali, O., Denslow, N., Wallace, R.A. & Cerdá, J. (2005). Derivation of major yolk proteins from parental vitellogenins and alternative processing during oocyte maturation in *Fundulus heteroclitus*. *Biological Reproduction*, 73, 815-824.
- Lee M.F., Huang J.D. & Chang C.F. (2008). Development of ovarian tissue and female germ cells in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii* (Perciformes, Sparidae). *Zoological Studies*, 47, 302-316.
- Lis H. & Sharon N. (1986). Lectins as molecules and as tools. *Annual Review Biochemistry*, 55, 35-67,
- Maria A.N., Laura H. Orfão, L.H., Rizzo E. & Ninhaus-Silveira, A. (2014). Histochemical and morphological features of biopsied and stripped oocytes from the Brazilian endangered teleost pirapitinga, *Brycon nattereri* (Characiformes). *Zygote*, 23, 1-7.
- Mayer, I., Schackley, S.E. & Ryland, J.S. (1988). Aspects of reproductive biology of the bass, *Dicentrarchus labrax* L. I. A histological and histochemical study of oocyte development. *Journal of Fish Biology*, 33, 609-622.
- Miller, D. J. & AX R.L. (1990). Carbohydrate and fertilization in animals. *Molecular Reproduction Development*, 26,184-192.
- Mommsen, T.P. & Walsh, P.J. (1988). Vitellogenesis and oocyte assembly. In: Fish physiology. Vol.1A. Hoar W.S. and Randall D.J. (eds). Academic Press. New York. pp 347-406.
- Mourente G., Megina, G. & Diaz-Salvago, E. (2002). Lipids in female northern Bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.) during sexual maturation. *Fish Physiology Biochemistry*, 24,351-363.
- Ortiz-Delgado, J.B., Porcelloni S., Fossi C. & Sarasquete, C. (2008). Histochemical characterisation of oocytes of the swordfish *Xiphias gladius*. *Scientia Marina*, 72, 549-564.
- Ohta T., Iwamatsu T., Tanaka M., & Yoshimoto, Y. (1990). Cortical alveolus breakdown in the eggs of the freshwater teleost *Rhodeus oceltatus*, *Anatomy Record*, 227,486-496.
- Parillo, F., Fagioli O., Dall'Aglio C. & Verini-Supplizi, A. (2000). Lectin histochemical detection of sulfoglycans in the zona pellucida of mammalian antral oocytes. *Acta Histochemistry*, 10,193-202.
- Pearse, A.G.E. (1985). Histochemistry. Theoretical and applied. Vol. 2. Analytic technology. 4th ed. Churchill Livingstone. New York, NY, 1055 pp.
- Ramezani-Fard E., Kamarudin, M.S. & Harmin, S.A. (2013). Endocrine control of oogenesis in teleosts. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8, 205-215.

- Sarasquete, C., Cárdenas S., González de Canales, M.L., & Pascua E. (2002). Oogenesis in the bluefin tuna, *Thunnus thynnus* L., A histological and histochemical study. *Histology Histopathology*, 17, 775-788
- Selman, K. & Wallace, R.A. (1986). Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. *American Zoologist*, 26, 173-192.
- Selman, K., Wallace, R.A., Sarka, A. & Xiaoping, Q. (1993). Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Journal of Morphology*, 218, 203-24.
- Silveira, R.B. & Fontoura, N.F. (2010). Fecundity and fertility of the longsnout seahorse, *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae), in tropical Brazil. *Revista Brasileira de Biociências. Brazilian Journal of Biosciences*, 8,362-367.
- Skutelsky, E., Ranen, E. & Shalgi, R. (1994). Variations in the distribution of sugar in the zona pellucida as possible species specific determinants of mammalian oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 100, 35-41.
- Sogabe, A., Matsumoto, K., Ohashi M., Watanabe A., Takata H., Murakami Y., Omor, I K. & Yanagisawa, Y. (2008). A monogamous pipefish has the same type of ovary as observed in monogamous seahorses. *Biology Letter*, 4, 362-365.
- Spicer, S.S. & Schulte, B. A. (1992). Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: a perspective. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 40, 1-38.
- Stehr, C.M. & Hawkes J.W. (1979). The comparative ultrastructure of the egg membrane and associated pore structures in the starry flounder, *Platichthys stellatus* (Pallas), and pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum). *Cell Tissue Research*, 200, 347-356.
- Stölting, K.N. & Wilson, A.B. (2007). Male pregnancy in seahorses and pipefish: beyond the mammalian model. *Bioassays*, 29, 884-96.
- Tiralongo, J. & Duncker, I.M. (2015). Sialobiology: structure, biosynthesis and function. Sialic acid glycoconjugates in health and disease. *Glycoconjugate Journal*, 77-78.
- Tyler, C.R. & Sumpter J.P. (1996). Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 6,287-318.
- Uribe M.C., Grier, H.J. & Parenti L.R. (2012). Ovarian structure and oogenesis of the oviparous goodeids *Crenichthys baileyi* (Gilbert, 1893) and *Empetrichthys latos* Miller, 1948 (Teleostei, Cyprinodontiformes). *Journal of Morphology*, 273,371–387.
- Wallace,R.A. & Selman K. (1990). Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *Journal of Electron Microscopy Technique*, 16,175–201.
- Wiegand, M.D. (1996). Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. *Review in Fish Biology and Fisheries*, 6,259–286.

Zelazowska, M., Kilarski, W., Bilinski, S. M., Podder, D. D. & Kloc, M. (2007). Balbiani cytoplasm in oocytes of a primitive fish, the sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii*, and its potential homology to the Balbiani's body (mitochondrial cloud) of *Xenopus laevis* oocytes. *Cell Tissue Research*, 329, 137-145.