รหัสโครงการ SUT1-104-39-12-05

รายงานการวิจัย

การตอบสนองของเมลาโนฟอร์ของปลาต่อยาบางชนิด

Response of Fish Melanophores to Some Drugs

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-104-39-12-0

รายงานการวิจัย

การตอบสนองของเมลาโนฟอร์ของปลาต่อยาบางชนิด

Response of Fish Melanophores to Some Drugs

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พาณี วรรณนิธิกุล

สาขาวิชาชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

นางสาววิมลพร โสภณ

ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ยุทธนา สมิตะสิริ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีปีงบประมาณ 2539

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2542

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความสะดวกด้านสถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆที่ใช้ในการวิจัย และขอขอบคุณ ฟาร์ม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างปลานิลจิตรลดา

ขอขอบคุณ อาจารย์สมร ขวัญทอง คุณสำรวย เจ็กเหล็ก คุณนพดล พริ้งเพราะ และคุณปลื้มจิตร กังตระกูล ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆจนงานวิจัยนี้สำเร็จเรียบร้อย

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อภาษาไทย

ศึกษาการตอบสนองของเมลาโนฟอร์ของปลาที่มีต่อ norepinephrine และ acetylcholine ในปลาสามชนิด คือ ปลานิล (*Tilapia nilotica*) ปลาหมอเทศ (*Tilapia mossambica*) และปลาช่อน (*Channa striatus* (Bloch)) โดยวิธี split-tail fin พบว่า maximal aggregation ของเมลาโนฟอร์เกิดเมื่อได้รับ norepinephrine 10^{-8} M ในปลานิล และ 10^{-7} M ในปลาหมอเทศและปลาช่อน ซึ่งจะถูกยับยั้งโดย phentolamine ที่เป็น alpha–adrenoceptor blocker ส่วน beta–adrenoceptor blocker คือ propranolol นั้น ไม่มีผลยับยั้งการ aggregation ของ melanosome ที่ถูกชักนำโดย norepinephrine สำหรับ acetylcholine ซึ่งเป็น muscarinic cholinergic agonist ไม่ทำให้เกิด melanosome aggregation ในปลาเหล่านี้ ผลการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่า receptor ซึ่งเป็นตัวกลางที่ก่อให้เกิด melanosome aggregation อันเป็นการตอบสนองของเมลาโนฟอร์ในปลากระดูกแข็งทั้งสามชนิดนี้ คือ alpha-adrenoceptor ไม่พบ muscarinic cholinoceptor บนเยื่อหุ้มเซลล์เมลาโนฟอร์ของปลาทั้งสามชนิด

Abstract

Responses of fish melanophores to norepinephrine and acetylcholine have been studied in split-tail fin melanophores of 3 teleost species: Nile tilapia (*Tilapia nilotica*), Java tilapia (*Tilapia mossambica)* and striped snake-head fish (*Channa striatus* (Bloch)). Maximal aggregation of melanophores induced by norepinephrine 10^{-8} M in *Tilapia nilotica* and 10^{-7} M in *Tilapia mossambica* and *Channa striatus* was completely blocked by phentolamine, alpha-adrenoceptor blocker. Propranolol, beta-adrenoceptor blocker, did not inhibit melanosome aggregation induced by norepinephrine. Acetylcholine, muscarinic cholinergic agonist, did not induce melanosome aggregation within melanophores of these fishes. These results indicated that receptors, which mediate melanosome-aggregation response of the melanophores in these 3 teleost species, are alpha-adrenoceptors. Muscarinic cholinoceptors were not found in melanophores of these fishes.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง..... จ
สารบัญภาพ..... ฉ
บทที่ 1 บทนำ
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย..... 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย
อุปกรณ์ 3
สารเคมี 3
ปลาที่ใช้ในการทดลอง..... 3
วิธีดำเนินการวิจัย..... 4
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..... 7
บทที่ 4 วิจารณ์และสรุปผล..... 16
บรรณนุกรม 18
ภาคผนวก..... 20
ประวัติผู้วิจัย..... 23

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 Melanophore index ของปลานิล ปลาหมอเทศ และปลาช่อน ภายหลังการได้รับสารละลาย Norepinephrine ความเข้มข้นต่างๆ นาน 10 นาที..... 14

ตารางที่ 2 Melanophore index ของปลานิล ปลาหมอเทศ และปลาช่อน ภายหลังการได้รับสารละลาย Acetylcholine ความเข้มข้นต่างๆ นาน 10 นาที..... 14

ตารางที่ 3 Melanophore index ของปลานิล ปลาหมอเทศ และปลาช่อน ภายหลังการได้รับสารละลาย Phentolamine hydrochloride ความเข้มข้นต่างๆ นาน 2 นาที..... 15

ตารางที่ 4 Melanophore index ของปลานิล ปลาหมอเทศ และปลาช่อน ภายหลังการได้รับสารละลาย Propranolol hydrochloride ความเข้มข้นต่างๆ นาน 2 นาที..... 15

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 Melanophore Index ของปลา..... 9
รูปที่ 2 เมลาโนฟอร์ของปลานิล..... 10
A. ภายหลังการได้รับสารละลาย Physiological saline นาน 5 นาที
B.-E. ภายหลังการได้รับสารละลาย Norepinephrine 10^{-8} M
นาน 2 นาที (MI 4-1 ตามลำดับ)
F. ภายหลังการล้าง Norepinephrine ด้วย Physiological saline นาน 15 นาที
รูปที่ 3 เมลาโนฟอร์ของปลาหมอเทศ..... 11
A. ภายหลังการได้รับสารละลาย Physiological saline นาน 5 นาที
B.-E. ภายหลังการได้รับสารละลาย Norepinephrine 10^{-7} M
นาน 2 นาที (MI 4-1 ตามลำดับ)
F. ภายหลังการล้าง Norepinephrine ด้วย Physiological saline นาน 15 นาที
รูปที่ 4 เมลาโนฟอร์ของปลาหมอช่อน..... 12
A. ภายหลังการได้รับสารละลาย Physiological saline นาน 5 นาที
B.-E. ภายหลังการได้รับสารละลาย Norepinephrine 10^{-7} M
นาน 2 นาที (MI 4-1ตามลำดับ)
F. ภายหลังการล้าง Norepinephrine ด้วย Physiological saline นาน 15 นาที
รูปที่ 5 เมลาโนฟอร์ของปลา 3 ชนิด ภายหลังการได้รับสารละลาย
Acetylcholine 10^{-5} M นาน 10 นาที 13
A. ปลาช่อน
B. ปลานิล
C. ปลาหมอเทศ
รูปที่ 6 เมลาโนฟอร์ของปลา 3 ชนิด ภายหลังการได้รับสารละลาย
Phentolamine hydrochloride 10^{-5} M นาน 10 นาที 13
A. ปลาช่อน
B. ปลานิล
C. ปลาหมอเทศ
รูปที่ 7 เมลาโนฟอร์ของปลาชนิดต่างๆ (ภาคผนวก)..... 21
รูปที่ 7 (ต่อ) เมลาโนฟอร์ของปลาชนิดต่างๆ (ภาคผนวก)..... 22

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

เมลาโนฟอร์ (melanophore) เป็นเซลล์สารสี (pigment cell) ชนิดหนึ่งที่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลังพวกสัตว์เลือดเย็น (poikilothermous) เช่น ปลา สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ภายในเซลล์มีเมลาโนโซม (melanosomes) ซึ่งเป็นออร์แกเนลล์ที่บรรจุเมลานิน (melanin) ที่เป็นสารสีน้ำตาลหรือดำ

เมลาโนฟอร์เป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสีตัวของสัตว์ ซึ่งจำเป็นต่อการป้องกันตัวและการอยู่รอดในธรรมชาติ รวมทั้งการติดต่อสื่อสารระหว่างกันด้วยโดยเฉพาะในปลา การเปลี่ยนแปลงสีผิวอย่างฉับพลันเกิดจากการเคลื่อนที่ของเมลาโนโซม ถ้าเมลาโนโซมเคลื่อนที่เข้าหาตัวเซลล์ไปรวมเป็นกลุ่ม เรียกว่า **Aggregation** (การรวมกลุ่ม) ถ้าเมลาโนโซมเคลื่อนที่ออกจากตัวเซลล์กระจายไปตามแขนงของเซลล์เรียกว่า **Dispersion** (การกระจาย)

การรวมกลุ่มของเมลาโนโซมในเมลาโนฟอร์ของปลากระดูกแข็งถูกควบคุมโดย sympathetic postganglionic innervation และ alpha-adrenoceptor และ neurotransmitters ที่เกี่ยวข้องคือ Norepinephrine (Anderson *et al.*, 1984; Fujii, 1993 และ Fujii และ Oshima, 1986, 1994) แต่ในปลาบางกลุ่ม เช่น Catfishes ใน Family Siluridae, Order Siluriformes และปลาบางชนิดใน Family Cyprinidae การรวมกลุ่มของเมลาโนโซมถูกควบคุมโดย muscarinic cholinoceptors และ neurotransmitters ที่เกี่ยวข้องคือ acetylcholine (Kasukawa *et al.*, 1986; Hayashi และ Fujii, 1993) ปัจจุบันยังไม่มีรายงานถึง muscarinic cholinoceptor ในปลากระดูกแข็งกลุ่มอื่นที่นอกเหนือไปจากที่กล่าวมาแล้ว

เนื่องจากเมลาโนฟอร์เป็นเซลล์แบนบาง มีการกระจายตัวในสองระนาบ และมีเส้นประสาทมากระจายติดอยู่รอบตัวเซลล์ในแนวระนาบเดียวกัน ดังนั้นจึงมักใช้เมลาโนฟอร์ในการศึกษาผลทางสรีรวิทยาหรือเภสัชวิทยาหรือเซลล์วิทยา ทั้งนี้เพราะสารเคมีหรือตัวยาที่นำมาศึกษาสามารถแพร่เข้าถึงเซลล์ได้ง่ายโดยไม่ถูกขัดขวาง และสามารถล้างสารเคมีและตัวยาเหล่านี้ออกได้ง่ายด้วย นอกจากนั้นการตอบสนองอย่างรวดเร็วของเมลาโนฟอร์ทำให้สามารถสังเกตผลของฮอร์โมนหรือ neuronal substances ได้ง่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์

จำนวนชนิดและลักษณะของ receptors ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์เมลาโนฟอร์ จะเป็นตัวส่งข้อมูลจากสิ่งแวดล้อมภายนอกไปยังสิ่งแวดล้อมภายใน ผลที่ได้จากการศึกษาจากปลาอาจจะเป็นประโยชน์ในการทำความเข้าใจในกลไกพื้นฐานการควบคุมการเคลื่อนที่ของออร์แกเนลล์ภายในเซลล์สัตว์มีกระดูกสันหลังทั้งหมดรวมทั้งคนด้วย นอกจากนั้นความรู้ที่ได้จากระบบการควบคุมใน

เมลาโนฟอร์อาจช่วยให้สามารถอธิบายกระบวนการทางสรีรวิทยาของเซลล์หลายๆอย่างได้ เช่น signal transducton, การทำงานของ microtubules เป็นต้น

วัตถุประสงค์ของโครงการ

การวิจัยนี้มุ่งที่จะศึกษาปฏิกิริยาของเมลาโนฟอร์ในปลากระดูกแข็งบางชนิดในประเทศไทยที่มีต่อ Norepinehrine และ Acetylcholine ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน เพื่อหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เมลาโนฟอร์เกิด maximal aggregation ในเวลาที่น้อยที่สุด โดยที่เซลล์เมลาโนฟอร์ไม่ตายและยังคงสามารถตอบสนองต่อสารเคมีที่นำมาทดสอบต่อไปได้ และศึกษาหาชนิดของ receptor ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเมลาโนฟอร์ว่าจะเป็นแบบ alpha-adrenoceptor, beta-adrenoceptor หรือ muscarinic cholinoceptor เพียงอย่างเดียว หรือทั้งสองแบบอยู่ด้วยกันในปลาชนิดเดียวกัน

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Stereo microscope)
2. กล้องจุลทรรศน์คอมพาวด์ (Compound microscope) Olympus CX 40 ติดกล้องถ่ายรูป
3. เครื่องมือผ่าตัด ถาดผ่าตัด เครื่องแก้ว
4. อ่างเลี้ยงปลาและเครื่องปั๊มอากาศ
5. ปั๊มควบคุมการไหล (peristaltic pumps) พร้อมท่อยาง

สารเคมี

1. Physiological saline solution ที่ประกอบด้วย: NaCl 125.3 mM, KCl 2.7 mM, $CaCl_2$ 1.8 mM, $MgCl_2$ 1.8 mM, R-(+)- glucose 5.6 mM, Tris-HCl buffer 5.0 (pH 7.2)
2. 50 mM K^+ - rich saline solution
3. Norepinephrine (Arterenol) barbiturate (Sigma)
4. Acetylcholine chloride (Sigma)
5. Phentolamine hydrochloride (Fluka) เป็น alpha- adrenoceptor blocker
6. Propranolol hydrochloride (Sigma) เป็น beta- adrenoceptor blocker
7. Scopolamine hydrochloride (Fluka) เป็น cholinergic receptor blocker

สารเคมีตั้งแต่หมายเลข 3 ถึง 7 เตรียมเป็น stock solution ความเข้มข้น 10^{-2} M เตรียมสารเคมีทั้งหมดโดยละลายในน้ำกลั่น เก็บ stock solution ทั้งหมดในที่มืดที่อุณหภูมิ –80° C stock solutions ทั้งหมดจะถูกเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการทันทีก่อนเริ่มการทดลองแต่ละครั้ง โดยใช้ stock solution ผสมกับสารละลาย physiological saline ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

ปลาที่ใช้ในการศึกษา

ปลาที่ใช้ในการศึกษาซื้อมาจากร้านขายปลาสวยงามในเขตอำเภอเมืองจังหวัดนครราชสีมา และจากแหล่งขายพันธุ์ปลาในที่ทำการประมงจังหวัดนครราชสีมา ปลาที่นำมาใช้ไม่ได้จำแนกเพศ มีความยาวประมาณ 7-12 เซนติเมตร ปลาทั้งหมดจะถูกนำมาเลี้ยงในอ่างเลี้ยงปลาในห้องปฏิบัติการชีววิทยาสัตว์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่อุณหภูมิประมาณ 25-28° C ประมาณ 5 วัน เพื่อให้คุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมใหม่ ปลาจะได้รับแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ขนาด 10 วัตต์ในเวลากลางวัน ส่วนกลางคืนจะปิดไฟ

การจำแนกชนิดและ Family ของปลาที่นำมาศึกษา จำแนกตามหนังสือสองเล่มคือ :

1. สมพร ภูริพงศ์และ สมโภชน์ อัคคะทวีวัฒน์ (บรรณาธิการ). 2535. **ภาพปลาและสัตว์น้ำของไทย**. พิมพ์ครั้งที่ 2 กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. องค์การค้าของคุรุสภา. 325 หน้า.
2. Suvatti, Chote. 1981. **Fishes of Thailand**. Royal Institute, Thailand. 379 p.

ปลาที่ใช้ในการศึกษาได้แก่

1. ปลาช่อน (*Channa striatus* (Bloch)) Family Chanidae
2. ปลานิล (*Tilapia nilotica*) Family Cichlidae
3. ปลาหมอเทศ (*Tilapia mossambica*) Family Cichlidae

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การทำ Split- tail fin

ตัดครีบหางของปลา นำมาทำ Split-fin ตามวิธีของ Fujii (1959, อ้างตาม Nagaishi และคณะ, 1992) ในสารละลาย physiological saline หางปลาที่ตัดมาประกอบด้วยผิวหนังที่อยู่ระหว่างกระดูกที่เป็นโครงของครีบ 1 คู่ ใช้ปากคีบปลายแหลมแยกส่วนครีบออกเป็น 2 ชิ้นที่สมมาตรกัน โดยมีผิวหนังอยู่ระหว่างกระดูก นำชิ้นผิวหนังที่แยกออกมาแล้ว 1 ชิ้นไปติดบน glass holder ที่ประกอบด้วย cover glass และ fine glass fibers โดยให้ส่วน epidermis ของผิวหนังอยู่ติดกับ cover glass นำ holder ไปวางบน perfusion chamber ที่มีช่องสำหรับใส่สารละลาย physiological saline แล้วนำไปวางบนแท่นวางสไลด์ของกล้องจุลทรรศน์ที่ติดกล้องถ่ายรูป ชิ้นผิวหนังจะได้รับสารละลาย physiological saline หรือสารที่ใช้ทดสอบไหลผ่านอย่างต่อเนื่องตลอดเวลาที่ทำการทดลอง

ทดสอบการตอบสนองของเซลล์เมลาโนฟอร์ว่าเป็นปกติหรือไม่ โดยให้สารละลาย K^+-rich saline แทน physiological saline ถ้าเซลล์เป็นปกติ เซลล์จะเกิด maximal aggregation อย่างรวดเร็ว (ระยะเวลาขึ้นกับเมลาโนฟอร์ของปลาแต่ละชนิด) หลังจากนั้นล้าง K^+-rich saline ออกด้วยสารละลาย physiological saline จนกระทั่งเซลล์เกิด maximal dispersion อีกครั้ง จึงทำการทดลองต่อไป

2. การทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของ Norepinephrine (NE) และ Acetylcholine (Ach) ที่ทำให้เมลาโนฟอร์เกิด maximal aggregation ในเวลาที่น้อยที่สุด

2.1 Norepinephrine ความเข้มข้น 10^{-10} M-10^{-5} M

เมลาโนฟอร์ในผิวหนังปลาเมื่อได้รับสารละลาย physiological saline จะเกิด maximal dispersion เปลี่ยนสารละลายจาก physiological saline เป็น Norepinephrine ความเข้มข้น 10^{-10}M-10^{-5} M โดยเริ่มจาก NE 10^{-10} M ผิวหนังจะได้รับสารละลาย NE แต่ละความเข้มข้นนาน 10 นาที

และเมื่อครบ 10 นาทีแล้ว จะต้องล้าง NE ออกด้วยสารละลาย physiological saline จนเซลล์เกิด maximal dispersion อีกครั้งจึงทำการทดลองต่อไป บันทึกปฏิกิริยาการตอบสนองของเมลาโนฟอร์ด้วยกล้องถ่ายรูปที่ติดกับกล้องจุลทรรศน์ การทดลองสารละลายแต่ละความเข้มข้นจะทำซ้ำ 10 ครั้งต่อปลาแต่ละชนิด

2.2 Acetylcholine ความเข้มข้น 10^{-10} M-10^{-5} M

ใช้วิธีเดียวกันกับข้อ 2.1 แต่เปลี่ยนสารละลายเป็น Acetylcholine

2.3 Melanophore Index (MI) อ่านค่าผลการตอบสนองของเมลาโนฟอร์ต่อ NE และ Ach แต่ละความเข้มข้นจากภาพถ่าย โดยให้ค่าในรูปของ melanophore index (Hogben และ Slome, 1931) ซึ่งให้ 1 เป็นค่าของเมลาโนฟอร์ที่มี maximal aggregation และ 5 เป็นค่าของเมลาโนฟอร์ที่มี maximal dispersion ส่วน 2, 3 และ 4 เป็นค่าของเมลาโนฟอร์ที่มีการกระจายของเมลาโนโซมอยู่ระหว่าง 1 และ 5 (รูปที่ 1) เลือกค่าความเข้มข้นของ NE และ Ach ที่ทำให้เมลาโนฟอร์ทุกเซลล์มีค่าเป็น 1 ในระยะเวลาที่น้อยที่สุด เป็นความเข้มข้นของ NE และ Ach ที่จะนำไปใช้ในการศึกษาชนิดของ receptor ในเมลาโนฟอร์

3. การทดสอบชนิดของ Receptor ของเมลาโนฟอร์

3.1 Alpha – adrenoceptor และ Beta - adrenoceptor

จากข้อ 2.1 ในกรณีที่เมลาโนฟอร์เกิด aggregation จนมีค่าเป็น 1 เมื่อได้รับ NE แสดงว่า receptor ของเมลาโนฟอร์เป็น adrenoceptor ในขั้นนี้จะทำการทดสอบหาชนิดย่อยของ adrenoceptor ว่าเป็นชนิด alpha-adrenoceptor หรือ beta-adrenoceptor โดยวิธีการดังนี้

ก. ให้สารละลาย physiological saline กับผิวหนัง

ข. ตามด้วยสารละลายที่เป็นปฏิปักษ์ (antagonist) ของ NE คือ Phentolamine hydrochloride **(PHT)** ในสารละลาย physiological saline นาน 5-7 นาที โดยเริ่มที่ความเข้มข้น 10^{-6} M (PHT เป็น alpha-adrenoceptor blocker ซึ่งสามารถขัดขวางการทำงานของ NE ได้ถ้า receptor ของเมลาโนฟอร์เป็น alpha–adrenoceptor)

ค. ให้ NE ที่มี PHT ผสมอยู่ด้วยในความเข้มข้นเท่ากับสารละลายในข้อ ข.ใช้ความเข้มข้นของ NE และระยะเวลานานเท่ากับค่าที่ได้จากข้อ 2.1 (คือ 10^{-8} M หรือ 10^{-7} M นาน 1-2 นาที ขึ้นกับเมลาโนฟอร์ของปลาแต่ละชนิด) ถ่ายภาพบันทึกผลด้วยกล้องถ่ายรูปที่ติดกับกล้องจุลทรรศน์

ง. ถ้าหากว่าใช้ PHT ความเข้มข้น 10^{-6} M และ 10^{-5} M แล้วเมลาโนฟอร์ยังคงเกิด aggregation ให้ใช้ PHT ความเข้มข้น 10^{-4} M เป็นความเข้มข้นสุดท้ายในการทดสอบ

จ. จากนั้นล้างด้วยสารละลาย physiological saline 15 นาที ตามด้วย NE 10^{-8} M สำหรับปลานิล และ 10^{-7} M สำหรับปลาหมอเทศและปลาช่อน เพื่อชักนำให้เมลาโนฟอร์เกิด maximal aggregation อีกครั้ง เป็นการทดสอบการมีชีวิตของเมลาโนฟอร์หลังการได้รับ PHT

ฉ. อ่านค่าผลการตอบสนองของเมลาโนฟอร์เช่นเดียวกับข้อ 2.3 หากค่าที่ได้เป็น 5 แสดงว่า receptor ของเมลาโนฟอร์เป็น alpha–adrenoceptor เพราะ PHT สามารถยับยั้งการทำงานของ NE ทำให้เมลาโนฟอร์เกิด aggregation ไม่ได้ แต่ถ้าค่าที่ได้เป็น 1 แสดงว่าไม่ใช่ alpha–adrenoceptor จึงต้องทดสอบด้วย Propranolol hydrochloride (**PP**) ซึ่งเป็น beta-adrenoceptor blocker เพื่อทดสอบว่าเป็น beta-adrenoceptor หรือไม่ โดยใช้วิธีการเดียวกับข้อ ก. ถึง จ. แต่เปลี่ยนสารละลายจาก PHT เป็น PP ถ้า PP สามารถยับยั้งการ agggregation ของเมลาโนฟอร์ได้ แสดงว่ามี beta-adrenceptor อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์

3.2 Muscarinic Cholinergic Receptor (Muscarinic cholinoceptor)

จากข้อ 2.2 ถ้าเมลาโนฟอร์ของปลาเกิด maximal aggregation เมื่อได้รับ Ach แสดงว่ามี receptor เป็น Cholinergic receptor ทำการทดสอบด้วยการใช้ Muscarinic cholinergic blocker คือ Scopolamine hydrochloride (**Sco**)โดยวิธีการเดียวกับข้อ 3.1 แต่เปลี่ยนจาก PHT เป็น Sco หากเมลาโนฟอร์ไม่เกิด aggregation แสดงว่ามี Muscarinic cholinergic receptor

การทดลองทั้งหมดทำในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20-22° C

บทที่ 3

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ลักษณะของเมลาโนฟอร์ *in vitro*

เมื่อเมลาโนฟอร์อยู่ในสารละลาย physiological saline เมลาโนฟอร์จะเกิด maximal dispersion (รูปที่ 2A, 3A, และ 4A) ดังนั้น ก่อนการทดลองหาผลของ NE และ Ach ทุกครั้ง ผิวหนังปลาจะได้รับสารละลาย K^+-rich saline ก่อน เพื่อทดสอบว่าเมลาโนฟอร์มีการตอบสนองเป็นปกติ

2. ผลของ Norepinephrine ที่ความเข้มข้นต่างๆต่อเมลาโนฟอร์

เมลาโนฟอร์ของปลานิลเกิด maximal aggregation ได้ภายในเวลา 1.50 นาที เมื่อได้รับ NE ที่ความเข้มข้น 10^{-8} M (รูปที่ 2) ส่วนของปลาหมอเทศและปลาช่อนเกิด maximal aggregation ได้ภายในเวลา 2 นาที เมื่อได้รับ NE ที่ความเข้มข้น 10^{-7} M (รูปที่ 3 และ 4) โดยที่ความเข้มข้นที่ 10^{-10} M, 10^{-9} M และ 10^{-8} M ไม่สามารถทำให้เมลาโนฟอร์ของปลาช่อนและปลาหมอเทศเกิด maximal aggregation ได้แม้จะได้รับนานถึง 10 นาที เช่นเดียวกับเมลาโนฟอร์ของปลานิลที่ไม่เกิด maximal aggregation เมื่อได้รับ NE ที่ความเข้มข้น 10^{-10} M และ 10^{-9} M นาน 10 นาที (ตารางที่ 1)

จากการที่เมลาโนฟอร์ของปลาทั้ง 3 ชนิดตอบสนองต่อ norepinephrine แสดงว่า receptor ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์เมลาโนฟอร์เป็น adrenoceptor

ดังนั้น จึงเลือกใช้ norepinephrine ความเข้มข้น 10^{-8} M สำหรับปลานิล และความเข้มข้น 10^{-7} M สำหรับปลาหมอเทศและปลาช่อน เพื่อใช้ในการทดสอบหาชนิดย่อยของ adrenoceptor ว่าเป็นชนิด alpha-adrenoceptor หรือ beta-adrenoceptor

3. ผลของ Acetylcholine ที่ความเข้มข้นต่างๆต่อเมลาโนฟอร์

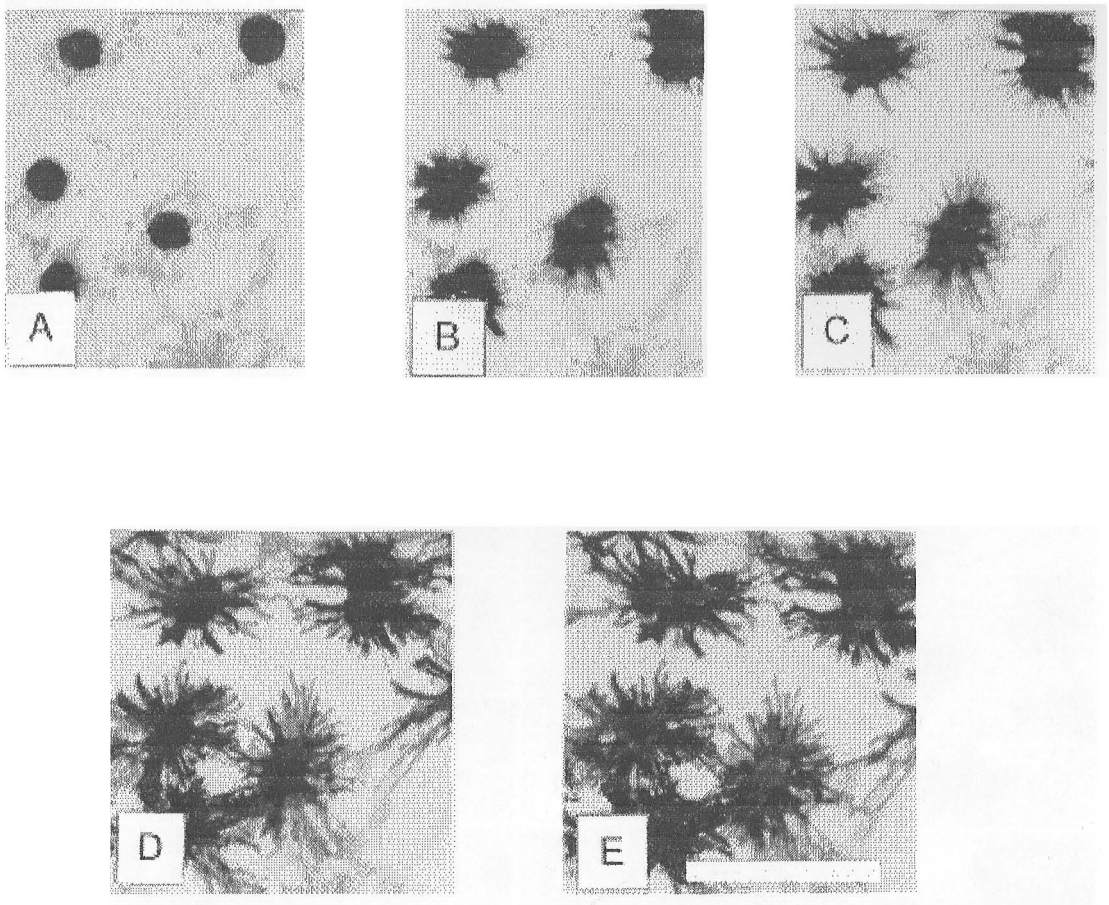
เมลาโนฟอร์ของปลาสามชนิดไม่ตอบสนองต่อ acetylcholine ความเข้มข้น 10^{-6} M - 10^{-4} M แสดงว่า receptor ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์เมลาโนฟอร์ไม่ใช่ muscarinic cholinoceptor จึงไม่ต้องทำการทดสอบในขั้นต่อไป (รูปที่ 5 และตารางที่ 2)

4. ผลของ Phentolamine hydrochloride

Phentolamine hydrochloride ที่ความเข้มข้น 10^{-6} M-10^{-4} M สามารถยับยั้งการทำงานของ NE ทำให้เมลาโนฟอร์ของปลานิล ปลาหมอเทศ และปลาช่อน ไม่สามารถเกิดการ aggregation ได้ (รูปที่ 6 และตารางที่ 3) แม้จะใช้ความเข้มข้นเพียง 10^{-6} M ก็เริ่มยับยั้งได้บางส่วนแล้ว

5. ผลของ Propranolol hydrochloride

Propranolol hydrochloride ที่ความเข้มข้น 10^{-6} M -10^{-2} M ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของ norepinephrine ได้ ทำให้เมลาโนฟอร์ของปลานิล ปลาหมอเทศ และปลาช่อนเกิด maximal aggregation ตามผลการชักนำของ norepinephrine (ตารางที่ 4)



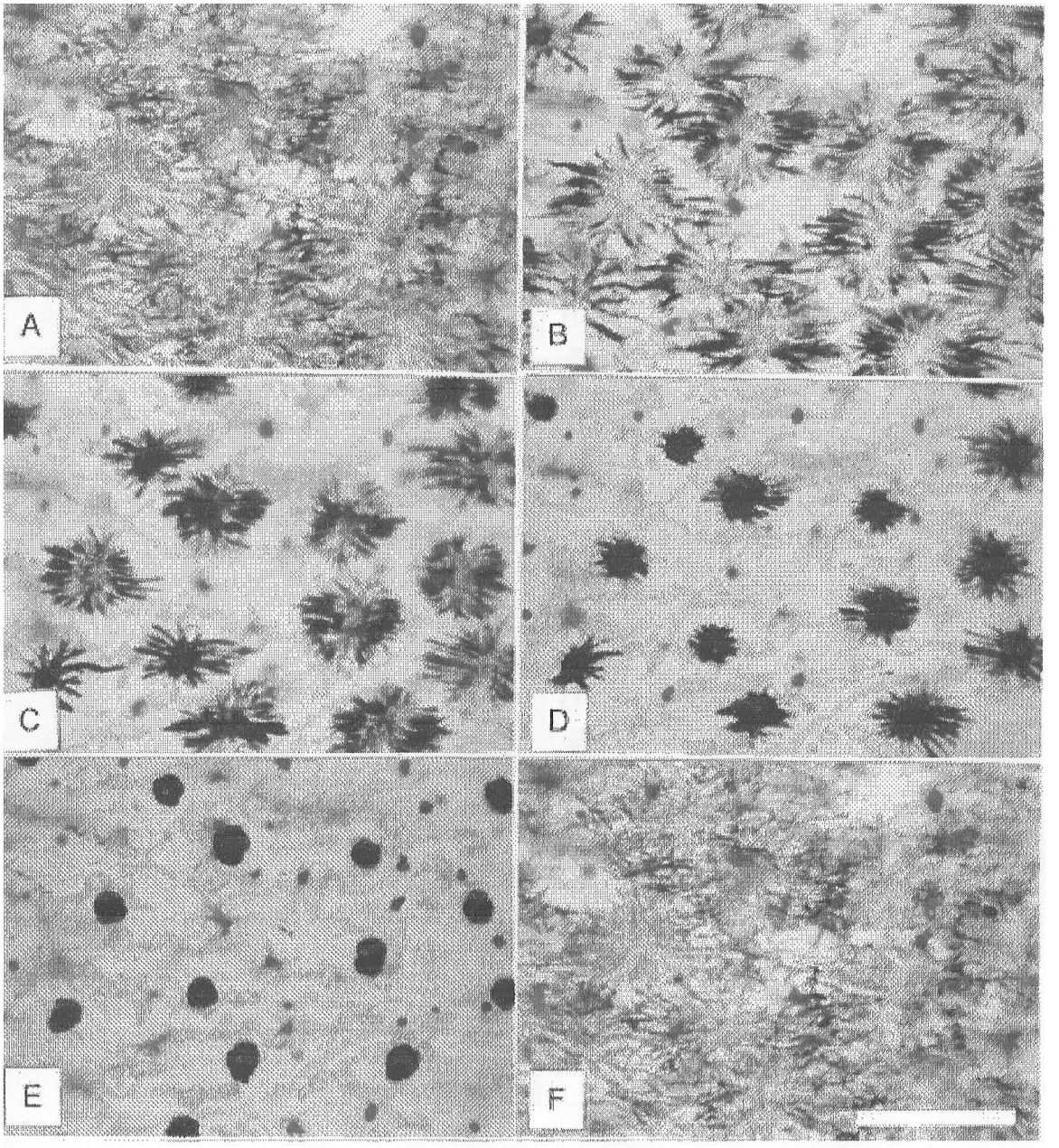
รูปที่ 1 Melanophore Index, MI 1 - MI 5 ตัวอย่างเซลล์เมลาโนฟอร์จากปลาช่อน

A. MI 1 = maximum aggregation

B.-D. MI 2, MI 3 และ MI 4 = Intermediate aggregation

E. MI 5 = maximum dispersion

Bar = 100 μm



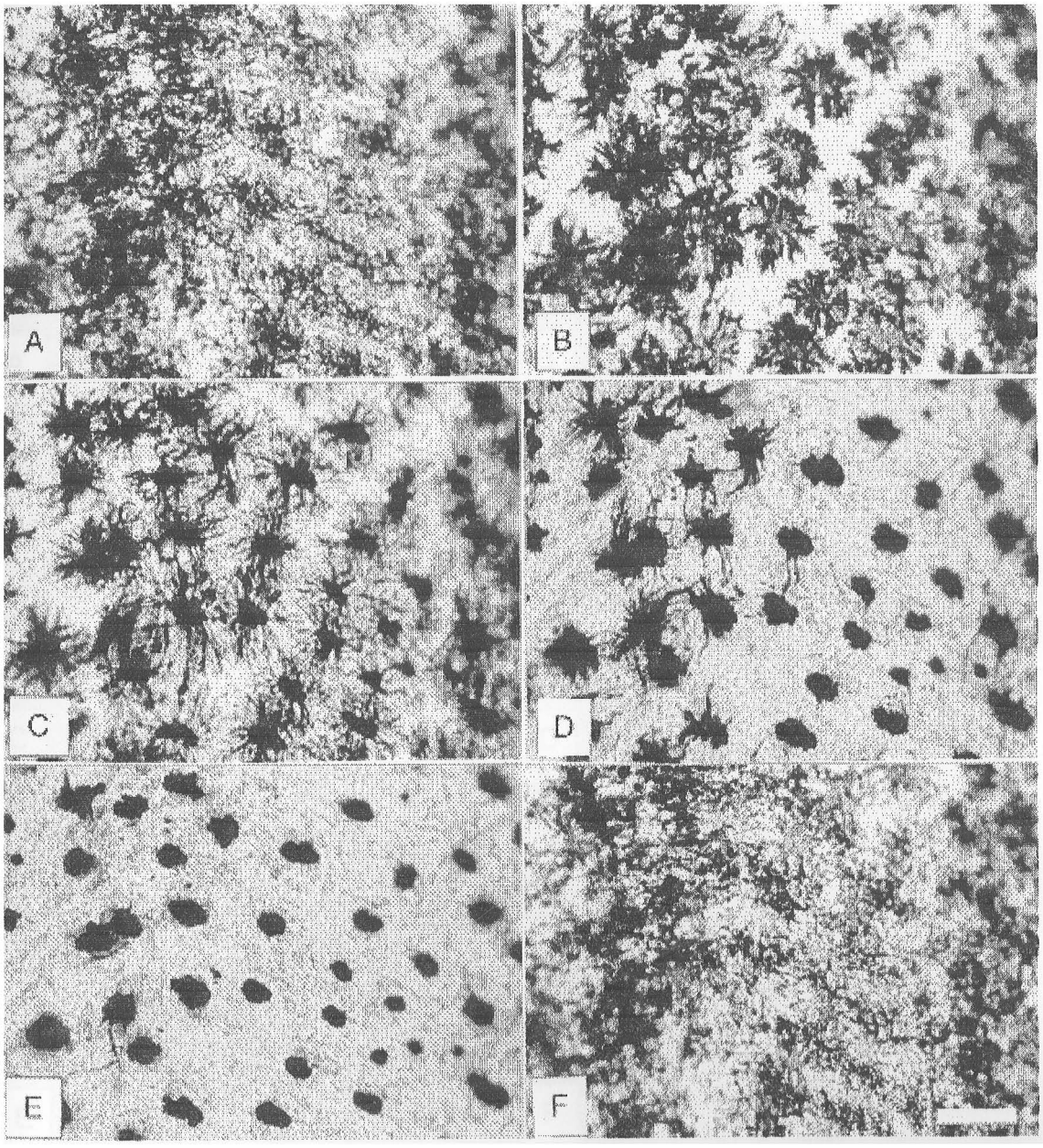
รูปที่ 2 เมลาโนฟอร์ของปลานิล

A. ภายหลังการได้รับสารละลาย Physiological saline นาน 5 นาที (MI 5)

B.-E. ภายหลังการได้รับสารละลาย Norepinephrine 10^{-8} M นาน 2 นาที (MI 4-1 ตามลำดับ)

F. ภายหลังการล้าง Norepinephrine ด้วยสารละลาย Physiological saline นาน 15 นาที

Bar = 100 μm



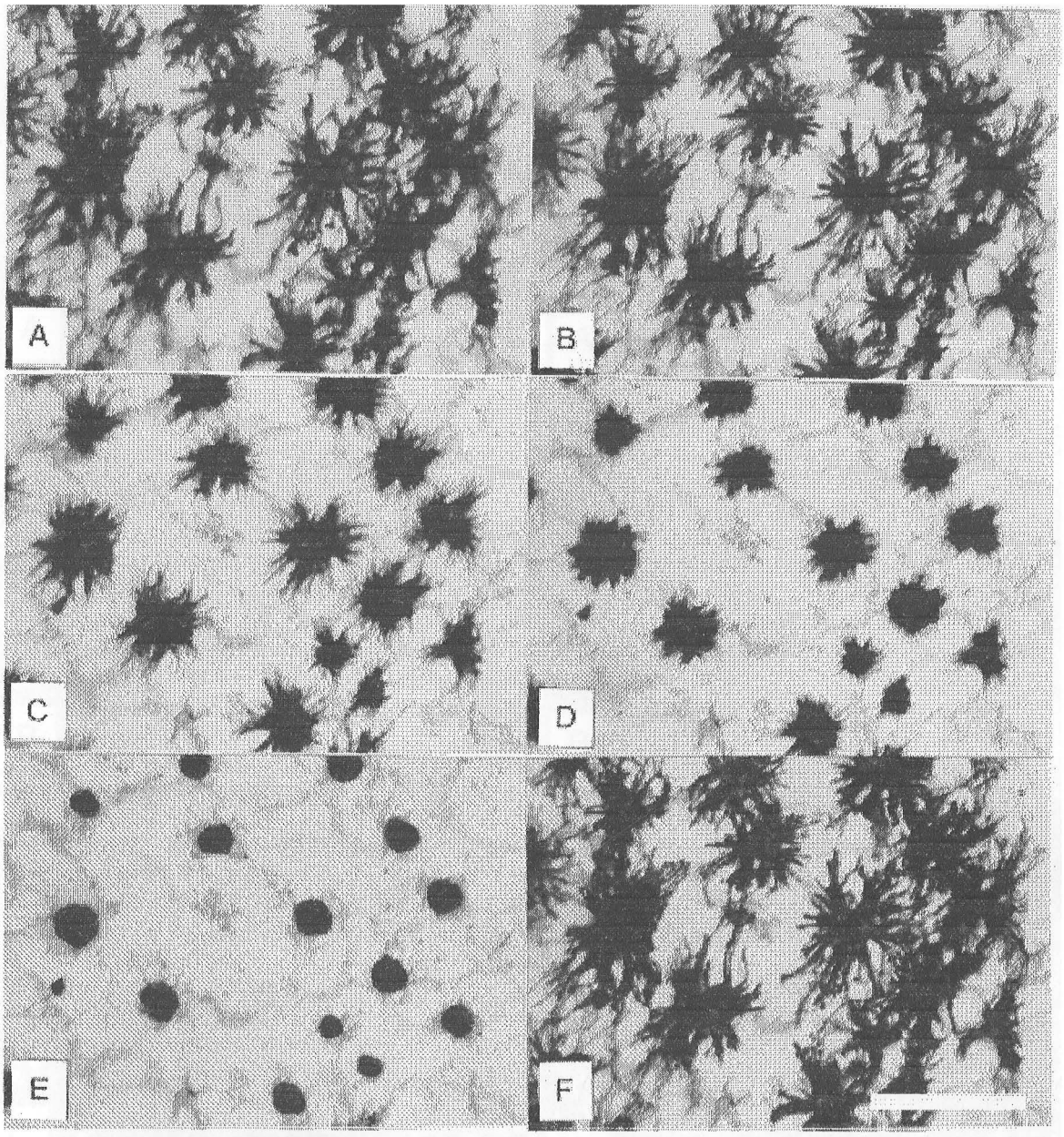
รูปที่ 3 เมลาโนฟอร์ของปลาหมอเทศ

A. ภายหลังการได้รับสารละลาย Physiological saline นาน 5 นาที (MI 5)

B.-E. ภายหลังการได้รับสารละลาย Norepinephrine 10^{-7} M นาน 2 นาที (MI 4 -1 ตามลำดับ)

F. ภายหลังการล้าง Norepinephrine ด้วยสารละลาย Physiological saline นาน 15 นาที

Bar= 100 μm



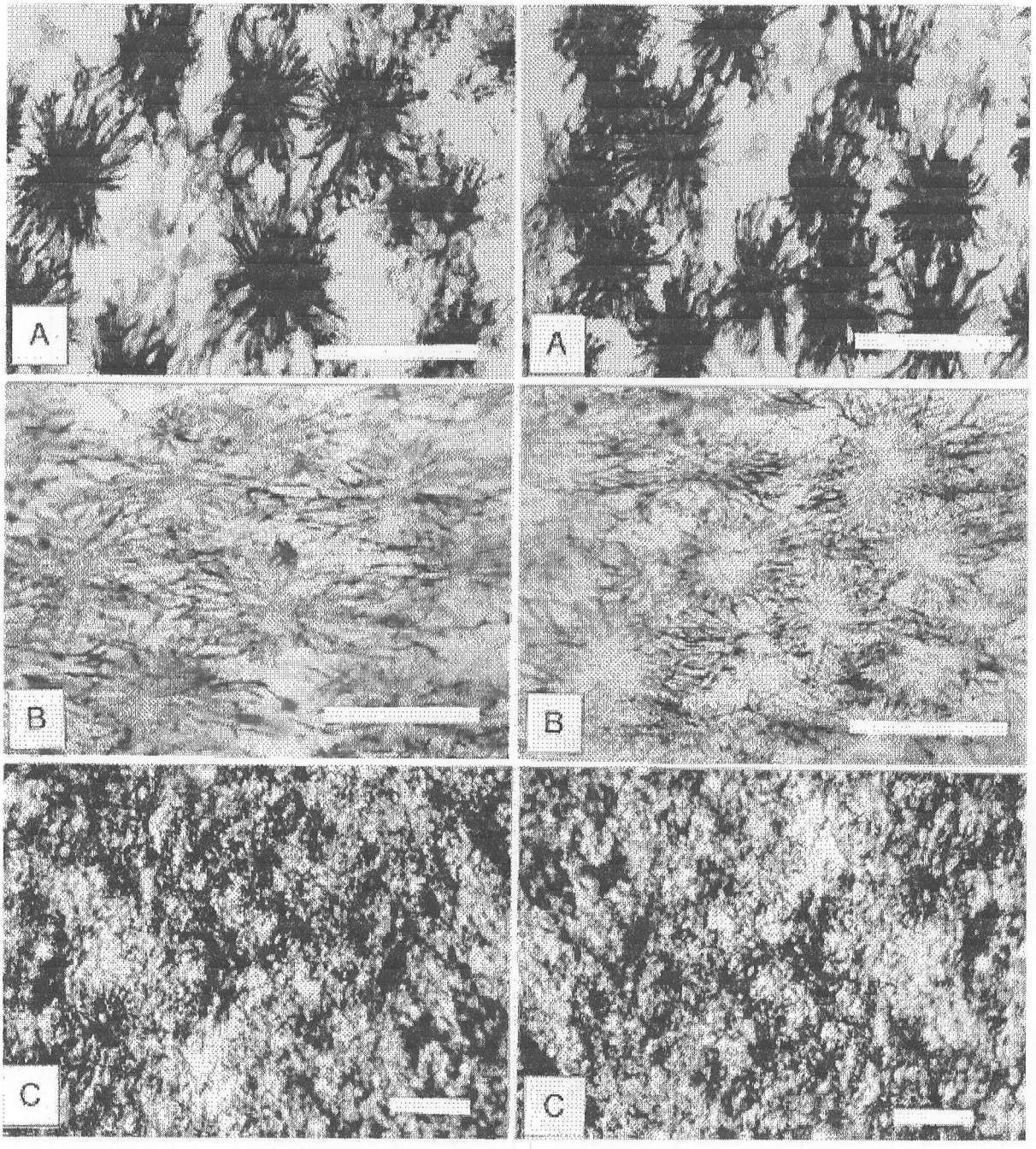
รูปที่ 4 เมลาโนฟอร์ของปลาช่อน

A. ภายหลังการได้รับสารละลาย Physiological saline นาน 5 นาที (MI 5)

B.- E. ภายหลังการได้รับสารละลาย Norepinephrine 10^{-7} M นาน 2 นาที (MI 4-1 ตามลำดับ)

F. ภายหลังการล้าง Norepinephrine ด้วยสารละลาย Physiological saline นาน 15 นาที

Bar = 100 μm



รูปที่ 5 เมลาโนฟอร์ของปลา 3 ชนิด ภายหลังการได้รับสารละลาย Acetylcholine 10^{-5} M นาน 10 นาที

A. ปลาช่อน B. ปลานิล

C. ปลาหมอเทศ. Bar = 100 μm

รูปที่ 6 เมลาโนฟอร์ของปลา 3 ชนิด ภายหลังการได้รับสารละลาย Phentolamine hydrochloride 10^{-5} M นาน 10 นาที

A. ปลาช่อน B. ปลานิล

C. ปลาหมอเทศ. Bar = 100 μm

ตารางที่ 1 Melanophore index ของปลานิล ปลาหมอเทศ และปลาช่อน ภายหลังการได้รับสารละลาย Norepinephrine ความเข้มข้นต่างๆ นาน 10 นาที

ความเข้มข้นของ Norepinephrine (M)	ปลานิล		ปลาหมอเทศ		ปลาช่อน	
	เวลา (นาที)	MI*	เวลา (นาที)	MI*	เวลา (นาที)	MI*
10^{-10}	10	5	10	5	10	5
10^{-9}	10	4	10	5	10	5
10^{-8}	1.50	1	10	4	10	4
10^{-7}	1	1	2	1	2	1
10^{-6}	0.45	1	1	1	1.20	1
10^{-5}	0.30	1	0.40	1	1	1

MI* = melanophore index เป็นค่าเฉลี่ยจากหางปลา 10 หาง

ตารางที่ 2 Melanophore index ของปลานิล ปลาหมอเทศ และปลาช่อน ภายหลังการได้รับสารละลาย Acetylcholine ความเข้มข้นต่างๆ นาน 10 นาที

ความเข้มข้นของ Acetylcholine (M)	MI*		
	ปลานิล	ปลาหมอเทศ	ปลาช่อน
10^{-10}	5	5	5
10^{-9}	5	5	5
10^{-8}	5	5	5
10^{-7}	5	5	5
10^{-6}	5	5	5
10^{-5}	5	5	5

MI* = melanophore index เป็นค่าเฉลี่ยจากหางปลา 10 หาง

ตารางที่ 3 **Melanophore index** ของปลานิล ปลาหมอเทศและปลาช่อน ภายหลังการได้รับสารละลาย **Phentolamine hydrochloride** ความเข้มข้นต่างๆ นาน 2 นาที

ความเข้มข้นของ Phentolamine hydrochloride (M)	MI*		
	ปลานิล	ปลาหมอเทศ	ปลาช่อน
10^{-6}	3	4	4
10^{-5}	5	5	5
10^{-4}	5	5	5

MI* = melanophore index เป็นค่าเฉลี่ยจากหางปลา 10 หาง

ตารางที่ 4 **Melanophore index** ของปลานิล ปลาหมอเทศ และปลาช่อน ภายหลังการได้รับสารละลาย **Propranolol hydrochloride** ความเข้มข้นต่างๆ นาน 2 นาที

ความเข้มข้นของ Phentolamine hydrochloride (M)	MI*		
	ปลานิล	ปลาหมอเทศ	ปลาช่อน
10^{-6}	1	1	1
10^{-5}	1	1	1
10^{-4}	1	1	1
10^{-3}	1	1	1
10^{-2}	1	1	1

MI* = melanophore index เป็นค่าเฉลี่ยจากหางปลา 10 หาง

บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผล

การเลือกใช้สารละลาย K^+-rich saline เป็นตัวทดสอบความปกติในการตอบสนองของเมลาโนฟอร์เป็นเพราะว่าเมลาโนฟอร์จะถูกชักนำให้เกิด aggregation อย่างรวดเร็วและสามารถกลับคืนสู่สภาพ dispersion อย่างรวดเร็วเมื่อได้รับสารละลาย physiological saline และผลที่เกิดตามมาหลังการกระตุ้นมีน้อยมาก นอกจากนั้นการตอบสนองต่อ K^+-rich saline นี้ยังเป็นหลักฐานที่ช่วยให้ทราบว่ามีเซลล์ประสาทมา innervated เป็นปกติ เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีว่า aggregation ของเมลาโนโซมในการตอบสนองต่อ K^+ ion นั้นถูกชักนำโดยการที่เซลล์ปล่อย neurotransmitters ออกมาจาก sympathetic fibers (Fujii, 1959, อ้างตาม Fujii และ Oshima, 1986)

จากตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่า norepinephrine ความเข้มข้น 10^{-7} M, 10^{-6} M และ 10^{-5} M สามารถทำให้เมลาโนฟอร์ของปลานิลเกิด maximal aggregation ได้ เช่นเดียวกันกับที่ norepinephrine ความเข้มข้น 10^{-6} M และ 10^{-5} M สามารถทำให้เมลาโนฟอร์ของปลาหมอเทศและปลาช่อนเกิด maximal aggregation ได้ในเวลาที่น้อยกว่า norepinephrine 10^{-8} M และ 10^{-7} M ที่เลือกมาใช้ในการทดลองต่อไป แต่เนื่องจากว่า norepinephrine ความเข้มข้น 10^{-7} M, 10^{-6} M และ 10^{-5} M ดังกล่าว เมื่อชักนำให้เกิด maximal aggregation อย่างรวดเร็วแล้ว มีผลทำให้เมลาโนฟอร์ไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพ maximal dispersion ได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้ norepinephrine ความเข้มข้น 10^{-8} M สำหรับปลานิลและ norepinephrine ความเข้มข้น 10^{-7} M สำหรับปลาหมอเทศและปลาช่อนซึ่งสามารถทำให้เมลาโนฟอร์เกิด maximal aggregation ได้ และเมลาโนฟอร์สามารถกลับคืนสู่สภาพ maximal dispersion ได้อย่างรวดเร็วเมื่อได้รับสารละลาย physiological saline อีกครั้ง อย่างไรก็ดีผลที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาของการ aggregation ของเมลาโนฟอร์ขึ้นกับความเข้มข้นของสารละลาย norepinephrine

จากการที่ norepinephrine สามารถทำให้เมลาโนฟอร์ของปลาทั้งสามชนิดเกิด aggregation ได้แสดงว่า receptor ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์เมลาโนฟอร์ของปลานิล ปลาช่อน และปลาหมอเทศ เป็น alpha-adrenoceptor ซึ่งคล้ายกับเมลาโนฟอร์ของปลากระดูกแข็งอื่นๆที่ถูกควบคุมโดย adrenergic melanosome aggregating nerves โดยมี neurotransmitters คือ norepinephrine ทำงานกับ alpha-adrenoceptors บนเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เมลาโนโซมในเมลาโนฟอร์เกิดการ aggregation (Fujii, 1993, Fujii และ Miyashita, 1975)

สำหรับการทดสอบว่า receptors ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์เมลาโนฟอร์ของปลาทั้งสามชนิดเป็น alpha-adrenoceptors จริงไม่ใช่ beta-adrenoceptors หรือมีทั้ง alpha และ beta-adrenoceptors อยู่ร่วมกันทดสอบโดยใช้สารละลาย phentolamine hydrochloride ซึ่งเป็น alpha-adrenoceptor blocker (CSMC NICU, 1996; Nickerson และ Hollenberg, 1967; Exton, 1985; Burton และ Everard, 1989;

Green และ Baker, 1989) และสารละลาย propranolol hydrochloride ซึ่งเป็น beta-adrenoceptor blocker (Exton, 1985) พบว่า phentolamine ที่ความเข้มข้น 10^{-5} M สามารถยับยั้งการทำงานของ norepineprine ได้อย่างสมบูรณ์ ทำให้เมลาโนฟอร์เกิด aggregation ไม่ได้ (ตารางที่ 3 และรูปที่ 6) ส่วน propranolol ไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของ norepinephrine ถึงแม้จะใช้ความเข้มข้นมากถึง 10^{-2} M เมลาโนฟอร์ยังคงเกิด maximal aggregation ได้

ส่วนการทดสอบหา muscarinic cholinoceptors บนเมลาโนฟอร์ของปลาทั้งสามชนิดโดยการใช้สารละลาย acetylcholine นั้น พบว่าเมลาโนฟอร์ไม่เกิด aggregation ถึงแม้จะใช้ความเข้มข้นของ acetylcholine มากถึง 10^{-5}M แสดงว่าเมลาโนฟอร์ของปลาทั้งสามชนิดไม่มี muscarinic chalinoceptors ในขณะที่ความเข้มข้นของ acetylcholine เพียง $5x10^{-12}$ M สามารถทำให้เมลาโนฟอร์ของ mailed catifish (*Corydoras paleatus*) เริ่มเกิด aggregation ได้ (Kasukawa และ Fujii, 1985)

จากผลที่ได้แสดงว่าชนิดของ receptors ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์เมลาโนฟอร์ของปลานิล ปลาหมอเทศและปลาช่อนเป็น alpha-adrenoceptor เพียงอย่างเดียว ไม่มี beta-adrenoceptor และ muscarinic cholinoceptor ทั้งนี้เพราะเมลาโนฟอร์ไม่ตอบสนองต่อสารละลาย propranolol hydrochloride ที่เป็น beta-adrenoceptor blocker และไม่ตอบสนองต่อสารละลาย acetylcholine chloride ที่เป็น muscarinic cholinoceptor agonist.

สำหรับเมลาโนฟอร์ของปลานิลนั้นได้ถูกนำมาใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาถึงกลไกของการเคลื่อนที่ของเมลาโนโซมในด้านที่เกี่ยวกับ Signal transduction (Fujii และคณะ, 1991; Oshima และ Wannitikul, 1996) และด้านผลของฮอร์โมน prolactin ที่มีต่อ chromatophores ในผิวหนังของปลานิล (Kitta และคณะ, 1993) การที่นำมาปลานิลมาศึกษาในการวิจัยครั้งนี้ เพื่อจะใช้เป็นต้นแบบมาตรฐานของ melanophore index รวมทั้งความเข้มข้นของ norepinephrine ที่ใช้และระยะเวลาในการเกิด maximal aggregation เพื่อที่จะนำเอาค่า melanophore index ของปลาชนิดอื่นๆที่ใช้ในการวิจัยมาเปรียบเทียบได้

จากผลการวิจัยครั้งนี้ทำให้ได้ทราบว่า นอกจากเมลาโนฟอร์ของปลานิลที่นิยมใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาสรีรวิทยาของเซลล์แล้ว เมลาโนฟอร์ของปลาช่อนและปลาหมอเทศยังเป็นตัวอย่างที่จะนำมาใช้ได้ในเมืองไทย ทั้งนี้เพราะเซลล์เมลาโนฟอร์มีขนาดใหญ่ ปฏิกิริยาการตอบสนองรวดเร็ว และความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้ในการทดสอบไม่สูงมาก และไม่ต่างจากของปลานิลมากนัก นอกจากนี้ยังเป็นปลาที่หาซื้อได้ง่าย ราคาถูก และเป็นปลาในประเทศไทยที่กรมประมงสนับสนุนให้มีการเพาะเลี้ยงเป็นปลาเศรษฐกิจอยู่แล้วโดยเฉพาะลูกปลาช่อน เหตุผลประการสำคัญคือ ยังไม่มีรายงานการศึกษากลไกการเคลื่อนที่ของเมลาโนโซมในเมลาโนฟอร์ของปลาช่อนมาก่อน ดังนั้นเมลาโนฟอร์ของปลาช่อนจึงเป็นตัวอย่างที่น่าจะมีการทำวิจัยต่อไปเป็นอย่างยิ่ง ส่วนเมลาโนฟอร์ของปลาหมอเทศนั้นในขณะที่มี maximal aggregation เซลล์จะแตกแขนงมากมาย ทำให้เห็นรูปร่างเซลล์ไม่ชัดเจนเท่ากับเซลล์ของปลาช่อน แต่เป็นตัวอย่างที่น่าสนใจและน่าทำการวิจัยต่อไปเช่นกัน

บรรณานุกรม

Anderson, R.G.G., J.O. Karlsson and N. Grunstrom. 1984. Adrenergic nerves and alpha$_2$–adrenoceptor system regulating melanosome aggregation within fish melanophores. *Acta. Physiol. Scand.* 121: 173-179.

Burton, D. and B.A. Everard. 1989. A new analysis of *in vitro* Na^+ and K^+ induction of teleost melanosome movements. *Comp. Biochem. Physiol.* 94 C: 631-633.

CSMC NICU: Phentolamine(Regitine).1996. http://external.csmc.edu/neonatology/ref/meds/med84.html

Exton, J.H. 1985. Mechanisms involved in α-adrenergic phenomena. *Am. J. Physiol.: Endocrinol. Metab.:* E633-E647.

Fujii, R. 1993. Cytophysiology of fish chromatophores. *Int. Rev. Cytol.* 143: 191-255.

Fujii, R. and Y. Miyashita. 1975. Receptor mechanisms in fish chromatophores - I. Alpha nature of adrenoceptors mediating melanosome aggregation in guppy melanophores. *Comp. Biochem. Physiol.* 51C : 171-178.

Fujii, R. and N. Oshima. 1986. Control of chromatophore movements in teleost fishes. *Zool. Sci.* 3: 13-47.

Fujii, R. and N. Oshima. 1994. Factors influencing motile activities of fish chromatophores. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 20: 1-54.

Fujii, R., H. Wakatabi and N. Oshima. 1991. Inositol 1,4,5-triphosphate signals the motile responses of fish melanophores. I. Aggregation of pigment in the tilapia melanophore. *J. Exp. Zool.* 259: 9-17.

Green, J.A. and B.I. Baker . 1989. Influence of nerves and hormones on the control of trout melanophores. *Life Sci.* 45: 1127-1132.

Hayashi, H. and R. Fujii. 1993. Muscarinic cholinoceptors that mediate pigment aggregation are present in the melanophores of cyprinids (*Zacco* spp.). *Pigment Cell Res.* 6: 37-44.

Hogben, L.T., and D. Slome. 1931. The pigmentary effector system VI. The dual character of endocrine co-ordination in amphibian colour change. *Proc. R. Soc. London B.* 108: 10-53.

Kasukawa, H. and R.Fujii. 1985. Receptor mechanisms in fish melanophores –VII . Muscarinic cholinoceptors and alpha adrenoceptors, both mediating pigment aggregation, strangely coexist in *Corydoras* melanophores. *Comp. Biochem. Physiol.* 80C: 211-215.

Kasukawa, H., N. Oshima and R. Fujii. 1986. A comparative survey on the type of sympathetic neuromelanophore transmission in catfishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 85C: 115-120.

Kitta, K., M. Makino, N. Oshima and H.A. Bern. 1993. Effect of prolactin on the chromatophores of the tilapia, *Oreochromis niloticus. Gen. & Comp. Endocrinol.* 9: 355-365.

Nagaishi, H., N. Oshima and R. Fujii. 1992. Effect of atropine on the melanophores and light-reflecting chromatophores of some teleost fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 103C: 363-368.

Nickerson, M. and N.X. Hollenberg. 1967. Blockade of α-adrenergic receptors. In: Root, W.S. and F.G.Hoffman (eds.) **Physiological Pharmacology, Vol. IV. The Nervous System.** Academic Press, New York, pp. 243-305.

Oshima, N. and P. Wannitikul. 1996. Signal transduction of MCH in melanophores of the tilapia, *Oreochromis niloticus. Zool. Sci.* 13: 351-356.

ภาคผนวก

ตัวอย่างเซลล์เมลาโนฟอร์ของปลาชนิดต่างๆ

ตัวอย่างเซลล์เมลาโนฟอร์ของปลาชนิดต่างๆที่นำมาทดลองศึกษาการตอบสนองของเมลาโนฟอร์ของปลาต่อยาบางชนิดในระยะเริ่มต้นการศึกษา (รูปที่ 7A-7L) แต่ไม่ได้นำมาใช้ในการทดลองในระยะสุดท้ายของการศึกษา เพราะไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการศึกษา เนื่องจาก :

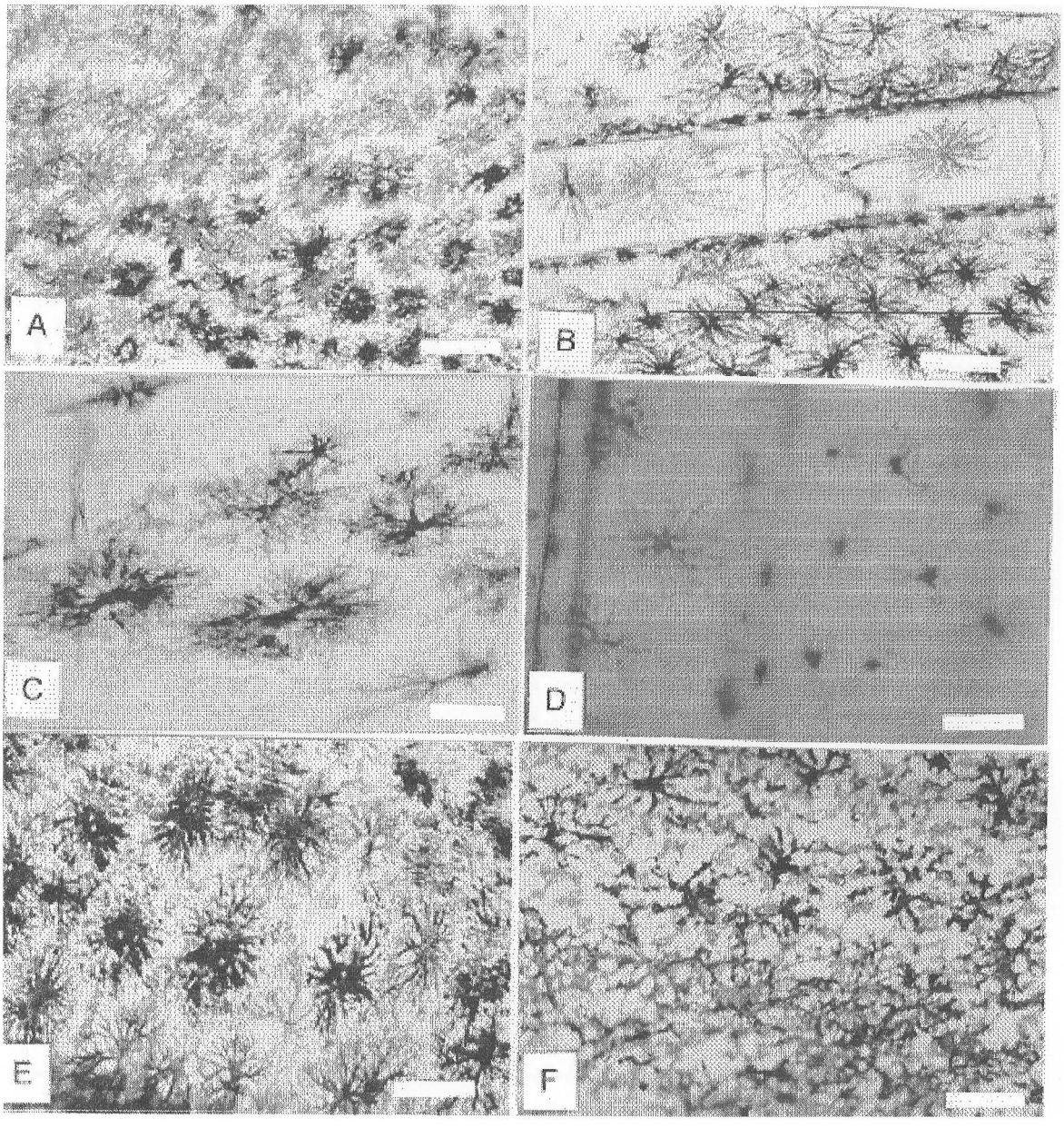
1. เมลาโนฟอร์ของปลาเหล่านี้ บางชนิดมีขนาดเล็กและ/หรือมีการตอบสนองช้า
2. ปลาบางชนิดมีเมลาโนฟอร์น้อยมาก
3. ปลาบางชนิดไม่มีเมลาโนฟอร์ มีเฉพาะ Erythrophores (เซลล์สีแดง) และ/ หรือ Xanthophores (เซลล์สีเหลือง)
4. หางปลาบางชนิดมีโครงกระดูกที่เป็นครีบหางอ่อนนิ่ม ทำให้ทำ Split-tail fin ได้ยาก
5. โครงกระดูกที่เป็นครีบหางของปลาบางชนิดหักง่าย จึงทำ Split-tail fin ได้ยาก

ปลาที่ใช้ในระยะเริ่มต้นการศึกษา ได้แก่

1. ปลากระดี่นาง (*Trichogaster microlepis* (Gunther)) Family Osphronemidae
2. ปลากระดี่หม้อ (*Trichogaster trichopterus* (Pallas)) Family Osphronemidae
3. ปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus* (Bleeker)) Family Cyprinidae
4. ปลาตะเพียนทอง, กระแหทอง (*Puntius altus* (Gunther)) Family Cyprinidae
5. ปลาเทวดา (*Pterophyllum* spp.) Family Cichlidae
6. ปลาเทศบาล (*Plecotomus* spp.)
7. ปลาไน (*Cyprinus caprio*) Family Cyprinidae
8. ปลาแรด (*Osphronemus goramy* (Lacepede)) Family Osphronemidae
9. ปลายี่สก (*Probarbus julllieni*) Family Cyprinidae
10. ปลาหมอไทย (*Anabas testudineus* (Block)) Family Anabantidae
11. ปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) Family Poeciliidae
12. ปลานิลแดง (ปลานิลจิตรลดา) ยังไม่ทราบชื่อวิทยาศาสตร์ ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างปลาจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปลาที่นำมาใช้ในการทดลองระยะสุดท้าย ซึ่งได้แสดงผลการทดลองไว้แล้วในส่วนต้นของรายงานวิจัยนี้ ได้แก่

13. ปลาช่อน (*Channa striatus* (Bloch)) Family Chanidae
14. ปลาหมอเทศ (*Tilapia mossambica*) Family Cichlidae
15. ปลานิล (*Tilapia nilotica*) Family Cichlidae



รูปที่ 7 เมลาโนฟอร์ของปลาชนิดต่างๆ (Bar = 100 μm)

A. กระดี่นาง (*Trichogaster microlepis* (Gunther))

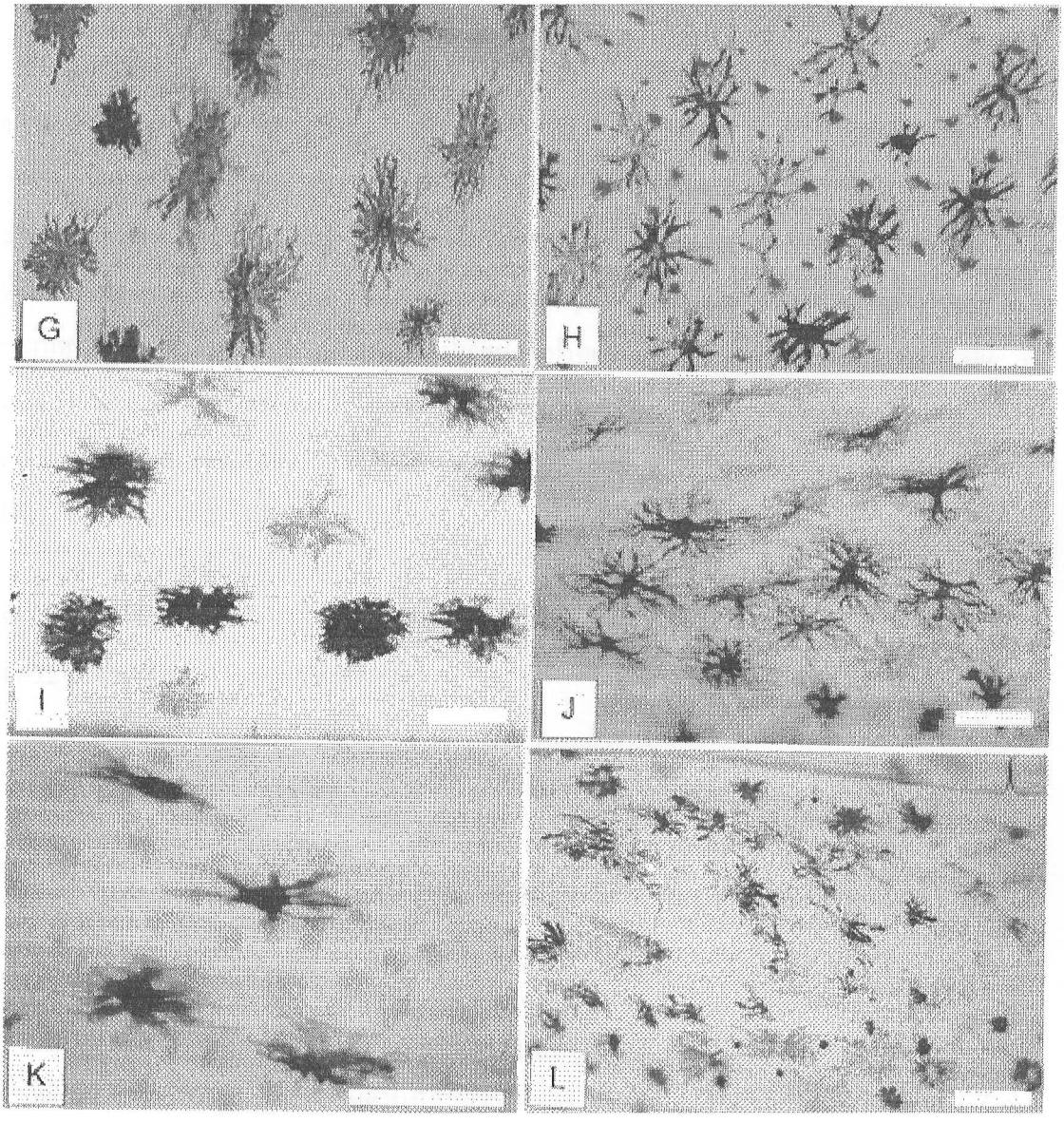
B. กระดี่หม้อ (*Trichogaster trichopterus* (Pallas))

C. ตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus* (Bleeker))

D. ตะเพียนทอง (*Puntius altus* (Gunther))

E. เทวดา (*Pterophyllum* spp.)

F. เทศบาล (*Plecotomus* spp.)



รูปที่ 7 (ต่อ) เมลาโนฟอร์ของปลาชนิดต่างๆ (Bar = 100 μm)

G. ไน (*Cyprinus caprio*)

H. แรด (*Osphronemus goramy* (Lacepede))

I. ยี่สก (*Probarbus julllieni*)

J. หมอไทย (*Anabas testudineus* (Block))

K. หางนกยูง (*Poecilia reticulata*)

L. นิลแดง

ประวัติผู้วิจัย

ดร. พาณี วรรณนิธิกุล ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จบการศึกษาระดับปริญญาตรี เกียรตินิยมอันดับสอง จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้รับทุนการศึกษาจากโครงการผลิตและพัฒนาอาจารย์ (UDC) ไปเรียนต่อระดับปริญญาโท ที่คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้รับทุนโคลัมโบรัฐบาลญี่ปุ่นให้ไปฝึกอบรมทางเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN) ประเทศญี่ปุ่น ได้รับทุนรัฐบาลโปแลนด์ไปเรียนต่อปริญญาเอก ที่ Agricultural University in Szczecin ประเทศโปแลนด์ และปี พ.ศ. 2538 ได้รับทุนจาก Fund for the Advancement of Science in Commemoration of Toho University's 60th Anniversary. จาก Toho University ประเทศญี่ปุ่น ไปทำวิจัยเกี่ยวกับเมลาโนฟอร์ของปลา

ที่อยู่ปัจจุบันที่ติดต่อได้คือ สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถนนมหาวิทยาลัย นครราชสีมา 30000 โทรศัพท์ 044-22-4299 โทรสาร 044-22-4185 หรือทาง E-mail: panee@ccs.sut.ac.th

รองศาสตราจารย์ ยุทธนา สมิตะสิริ จบการศึกษาระดับปริญญาตรีและโท จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทำงานวิจัยไว้มากมาย ที่มีชื่อเสียงคือเรื่องของกวาวเครือ ปัจจุบันดำรงตำแหน่งรองศาสตราจารย์ ประจำอยู่ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย

นางสาววิมลพร โสภณ จบการศึกษาระดับปริญญาตรี จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางเขน ปัจจุบันเป็นนักวิทยาศาสตร์ ประจำอยู่ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา