ฮอร์โมนเอสโตรเจน: บทบาทในงานวิจัยกุ้ง

Role of Estrogen in Shrimp Research

นพคุณ ภักดีณรงค์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อ. กันทรวิชัย จ. มหาสารคาม 44150

Email: noppakun241@yahoo.com

บทคัดย่อ

บทความวิชาการนี้กล่าวถึงฮอร์โมนเอสโตรเจนที่มีผลต่อกุ้งและกลุ่มครัสเตเชียน โดยพบว่าฮอร์โมนกลุ่มเอสโตรเจนซึ่งมีเอสตร้าไดออลแสดงฤทธิ์สูงสุดในฮอร์โมนกลุ่มนี้ นอกจากจะพบในสัตว์มีกระดูกสันหลังแล้วยังพบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง โดยมีบทบาทเกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ ทำหน้าที่ในการกระตุ้นให้ตับและตับอ่อนสังเคราะห์ไข่แดง โดยยีน VTG mRNA ส่งผลทำให้สร้างวิเทลโลจินินและวิเทลลินในรังไข่และฮีโมลิมฟ์ ทำให้ไข่เจริญพัฒนาขึ้น โดยทั่วไปฮอร์โมนเอสโตรเจนมีผลกับไข่ในระยะไข่อ่อน (early previtellogenic stage) มากกว่าระยะไข่สุก (full previtellogenic stages) ดังนั้นถ้าหากกุ้งได้รับเอสโตรเจนจะทำให้การเจริญและการพัฒนาโอโอไซต์เร็วขึ้น นั่นแสดงว่าถ้าหากมีการปนเปื้อนเอสโตรเจนลงสู่แหล่งน้ำอาจจะมีผลต่อการพัฒนาของไข่ ส่งผลทำให้เพิ่มจำนวนประชากรของสัตว์น้ำ ซึ่งอาจจะเป็นสัตว์น้ำที่มนุษย์ต้องการหรือไม่ต้องการก็ตาม

คำสำคัญ : เอสโตรเจน กุ้ง วิเทลโลจินิน เอสตร้าไดออล

Abstract

This study investigated the effects of estrogen on shrimp and other crustaceans. It found that estradiol has the strongest effects within the group of estrogen hormones, being found in vertebrates and invertebrates. It plays an important role in reproductive systems in the yolk synthesis from the hepatopancreas stimulated by VTG mRNA resulting in vitellogenin and vitellin synthesis in the ovaries and hemolymph. Vitellogenin circulates to the ovary resulting in oocyte maturation. Generally, estrogen has a greater effect on the early pre-vitellogenic stage. Therefore if shrimps are stimulated by estrogen, oocytes experience faster growth and development. It is concluded that water resources contaminated with estrogen probably accelerate oocyte development, resulting in increased populations of aquatic animals.

Keywords: Estrogen; Shrimps; Vitellogenin; Estradiol

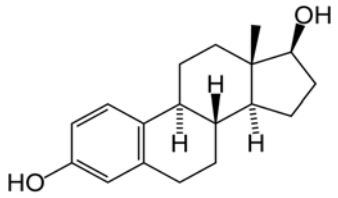
1. บทนำ

เป็นที่น่าแปลกใจว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนซึ่งเป็นฮอร์โมนเพศหญิงซึ่งเป็นสเตอรอยด์ฮอร์โมนพบในสัตว์มีกระดูกสันหลังแทบทุกชนิด ในปัจจุบันพบว่ามีในกลุ่มสัตว์ครัสเตเชียน ได้แก่ กุ้ง [1] โคปิปอด [2] โดยมีการค้นพบเมื่อประมาณ 20 ปีก่อน [3] นักวิทยาศาสตร์พบว่ามีฮอร์โมนเอสโตรเจนในกุ้ง greasy back shrimp และกุ้งก้ามกราม giant freshwater prawn ตรวจหาโดยวิธี radioimmunoassay เอสโตรเจน มีมากในช่วงของวัยเจริญพันธุ์ของกุ้ง ทำให้เห็นว่าฮอร์โมนนี้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญพัฒนาของไข่ ฮอร์โมนเอสโตรเจนประกอบไปด้วยโครงสร้างวงแหวน 4 อัน สร้างจากรังไข่ของสัตว์มีกระดูกสันหลังทุกชนิด ควบคุมการเจริญของระบบสืบพันธุ์เพศหญิงและการแสดงออกของลักษณะเพศหญิง [4], [5] แล้วยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ วัตถุประสงค์ของบทความวิชาการฉบับนี้เพื่อให้ทราบถึงบทบาทของเอสโตรเจนต่อการวิจัยกุ้ง ซึ่งนักวิทยาศาสตร์ได้ศึกษาบทบาทของเอสโตรเจนต่อระบบสืบพันธุ์ [6] เอสโตรเจนกับเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ [7] เอสโตรเจนกับการเจริญ [8] เอสโตรเจนกับระบบต่อมไร้ท่อ [9] และเอสโตรเจนกับระบบกล้ามเนื้อ [10] ซึ่งจะกล่าวถึงโครงสร้างและหน้าที่ของเอสโตรเจน ประวัติการค้นพบเอสโตรเจน กลไกการออกฤทธิ์ บทบาทและหน้าที่ของเอสโตรเจนต่อกุ้ง เอสโตรเจนกับงานวิจัยกุ้ง เอสโตรเจนกับสร้างไข่แดงของกุ้ง ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากบทความนี้ เพื่อเป็นแนวทางการใช้ประโยชน์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนในอนาคตต่อการปรับปรุงพันธุ์กุ้ง การจัดการควบคุมและระวังป้องกันการปนเปื้อนในแหล่งน้ำเพื่อป้องกันหรือทำให้มีการเพิ่มจำนวนสัตว์น้ำที่มนุษย์ไม่ต้องการ สอดคล้องกับการเกิดสภาวะโลกร้อนที่จะส่งผลให้กลุ่มสิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสเตเชียนเพิ่มจำนวนมากขึ้น

2. โครงสร้างและหน้าที่ของเอสโตรเจน

ฮอร์โมนกลุ่มเอสโตรเจน ได้แก่ เอสโตรน เอสตร้าไดออล17เบต้า มีสูตรโครงสร้างคือ $C_{18}H_{24}O_2$ (รูปที่ 1)

1. มีวงแหวน aromatic ที่มีหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 3
2. มีกลุ่ม methyl ที่ตำแหน่ง คาร์บอนที่ 3
3. มีกลุ่ม beta hydroxyl หรือ ketone ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 17 ของวงแหวน เอสโตรเจนที่สำคัญคือ



รูปที่ 1. โครงสร้างฮอร์โมนเอสโตรเจน
ที่มา: ดัดแปลงจาก Niece, 2012 [11]

เอสตร้าไดออล-17เบต้า (estradiol 17β) เป็นเอสโตรเจนในรูปแบบที่ทำงานได้สังเคราะห์จากสารตั้งต้นคือคอเลสเตอรอล ซึ่งได้จากเลือดในรูปของไลโพโปรตีนและจากการเปลี่ยนคอเลสเตอรอลเอสเตอร์ภายในรังไข่ให้เป็นเพรคนิโนโลน (pregnenolone) เป็นขั้นตอนที่กำหนดอัตราการสังเคราะห์และถูกกระตุ้นด้วยลูทีไนซิงฮอร์โมน(LH) จากต่อมใต้สมองส่วนหน้า เพรคนิโนโลนจะถูกเปลี่ยนภายในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (ER) ตามกระบวนการเป็นขั้นตอนโดยมี 17-hydroxyprogesteroneเป็นสารเร่งปฏิกิริยาในไซโตโครม P450 ทำงานร่วมกับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนกระตุ้นการเจริญของต่อมน้ำนม อวัยวะเพศ มดลูก ท่อนำไข่ การเกิดขนบริเวณรักแร้ อวัยวะเพศ และการเกิดพฤติกรรมการแสดงออกของเพศหญิง กระตุ้นการปิดของกระดูก (epiphysis)

ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยเฉพาะสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เอสโตรเจนของแม่มีผลกระตุ้นการสร้างโครงสร้างของอวัยวะเพศและเป็นกำหนดเพศในระยะเอมบริโอของสัตว์มีกระดูกสันหลัง [12] ในกุ้งเชื่อว่าเอสโตรเจนเกิดจากรังไข่ ตับและตับอ่อน (Hepatopancreas) โดยสมองส่วนที่เกี่ยวข้องกับต่อมไร้ท่อ(Endocrine gland) จะผลิต Gonad stimulating hormone (GSH) และ Vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH) จากนั้นจึงทำให้อวัยวะเป้าหมายคืออวัยวะสืบพันธุ์ ตับและตับอ่อน ให้หลั่งสารออกมา [13] นักวิทยาศาสตร์พบว่าในระยะที่กุ้งมีรังไข่เจริญเต็มที่จะมีปริมาณของเอสโตรเจนในรังไข่และในตับและตับอ่อน จะสูงกว่าปกติ และจากนั้นจะทำให้ระดับของเอสโตรเจนในฮีโมลิมฟ์สูง [14]

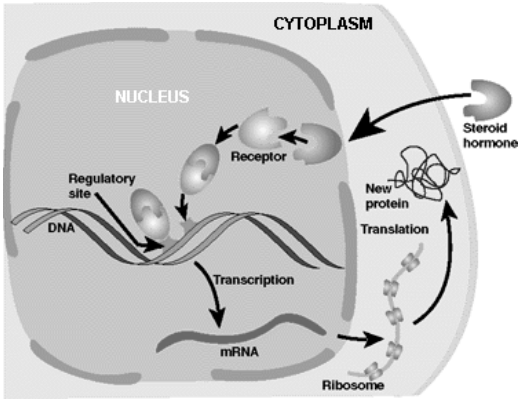
3. ประวัติการค้นพบเอสโตรเจน

วิวัฒนาการและการทำงานวิจัยเกี่ยวกับฮอร์โมนในกลุ่มสเตอรอยด์ เช่นกลุ่มเอสโตรเจนที่นำมาใช้กันทุกวันนี้ได้ดำเนินมาตั้งแต่ปี 1900 โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวออสเตรียชื่อ Emil Knauer ซึ่งเป็นผู้ค้นพบว่าหนูที่ถูกตัดรังไข่จะมีการฝ่อของมดลูก แต่เมื่อนำรังไข่ไปฝังในหนูที่ถูกตัดรังไข่ทิ้งจะช่วยป้องกันการฝ่อได้ ต่อมา Joseph Halban (1900) แสดงให้เห็นว่า เมื่อนำรังไข่ไปฝังในสัตว์ทดลองที่ยังไม่เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์แต่ถูกตัดรังไข่ไป พบว่าสัตว์ทดลองดังกล่าวคงมีพัฒนาการของลักษณะทางเพศได้ตามปกติ ต่อมา Mac Corquodale (1935) พบฮอร์โมนเอสตราไดออล หรือ เอสตราไดออล 17เบต้า ซึ่งเป็นเอสโตรเจนที่มีความสำคัญที่สุด โดยวิเคราะห์แยกได้จากรังไข่ของหมู ปริมาณ 4,000 กิโลกรัม แต่มีข้อจำกัดว่าเอสตราไดออล 17เบต้า มีฤทธิ์แรงจึงสูญเสียฤทธิ์ได้เร็ว อย่างไรก็ตามเอสตร้าไดออล 17เบต้ามีฤทธิ์สูงสุด จะทำหน้าที่เกี่ยวกับการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ในเพศหญิงผลิตที่รังไข่เป็นหลัก นอกจากนั้นยังมีการผลิตขึ้นที่ต่อมหมวกไต (adrenal glands) และมีการแปรรูปจาก steroid precursors มาเป็นเอสโตรเจน ฮอร์โมนเอสตร้าไดออลทำหน้าที่กระตุ้นหรือชักนำให้มีการเจริญเติบโตของท่อนำไข่และการสร้างไข่

ส่วนประวัติการค้นพบฮอร์โมนเอสโตรเจนในกุ้งพบว่าเอสโตรเจนมีศักยภาพในการเจริญของระบบสืบพันธุ์ในกุ้ง ปลาและสัตว์น้ำชนิดอื่นๆโดยเรียกฮอร์โมนกลุ่มนี้ในช่วงแรกๆของการค้นพบว่า Vertebrate-like steroids ในกุ้งมีฮอร์โมนในกลุ่มเอสโตรเจน ได้แก่ estrone estriol และ estradiol ถูกรายงานว่าพบในตับและตับอ่อน รังไข่และฮีโมลิมฟ์ ซึ่งมีความเกี่ยวข้องใกล้ชิดกับวงรอบของการเจริญพัฒนาของโอโอไซต์ ปี ค.ศ. 1994 Quinitio และคณะได้รายงานว่าพบฮอร์โมนนี้ในกุ้งกุลาดำ [15] ในปีเดียวกัน Ghosh และ Ray [16] ก็ได้รายงานว่าการให้เอสโตรเจนกับกุ้งก้ามกรามมีผลทำให้กระตุ้นการสร้างเม็ดไข่แดงในรังไข่ได้ซึ่งเป็นการพบกระบวนการสำคัญที่จะทำให้เกิดการนำฮอร์โมนนี้ไปใช้ในการเร่งการเจริญของไข่และกระตุ้นให้ตับสร้างวิลเทลโลจินิน ไปตามกระแสเลือดไปเก็บสะสมที่โอโอไซต์ ในรังไข่จะเต็มไปด้วยเซลล์ต้นกำเนิดของทั้งเพศผู้และเพศเมียหลายๆ ระยะ แต่ลักษณะเพศจะขึ้นอยู่กับวิลเทลโลจินินในซีรัมที่ถูกสร้างจากตับแล้วไปกระตุ้นอวัยวะสืบพันธุ์ให้เปลี่ยนเซลล์ต้นกำเนิด (germ cells) แล้วจึงเปลี่ยนไปเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้หรือเพศเมียต่อไป ถ้าหากตับถูกกระตุ้นด้วยเอสโตรเจนตับจะสร้างสารวิลเทลโลจินินส่งไปยังระบบเลือดแล้วจึงส่งไปยังโอโอไซต์ต่อไป ในปัจจุบันมีการใช้เอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำบ่งบอกสภาวะการปนเปื้อนหรือเป็น biomarker สำหรับดัชนีการเพิ่มจำนวนประชากรสัตว์น้ำ [17]

4. กลไกการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนเอสโตรเจน

กลไกการออกฤทธิ์ของสเตอรอยด์ฮอร์โมน(รูปที่ 2)จะดำเนินผ่านตัวรับ (estradiol-estrogen receptor) ที่อยู่ภายในเซลล์ เนื่องจากเป็นฮอร์โมนประเภทสเตอรอยด์จึงสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดย simple diffusion และจับกับตัวรับที่อยู่ในนิวเคลียส เกิดเป็น estrogen gene-receptor complex ซึ่งจะมีการปรับเปลี่ยนรูปทรงที่เรียกว่า conformational change ทำให้เกิดตำแหน่งบนตัวรับที่สามารถจับกับ DNA ที่ตำแหน่ง Estrogen responsive element (ERE) และกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ messenger RNA (mRNA) ต่อจากนั้น mRNA จะออกจากนิวเคลียสสู่ไซโตพลาสซึม จับกับไรโบโซม (Ribosome) และเกิดการสังเคราะห์โปรตีนซึ่งจะมีผลทำให้เกิดฤทธิ์ของเอสตราไดออลต่อไป เมื่อเอสตราไดออลทำงานภายในเซลล์แล้วจะถูกเปลี่ยนกลับเข้าสู่กระแสเลือด และมีผลต่อเมตาบอลิซึมต่อไป

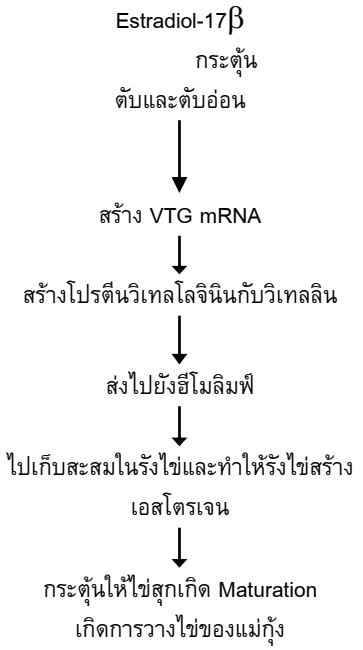


รูปที่ 2 กลไกการออกฤทธิ์ของสเตอรอยด์ฮอร์โมน
ที่มา: ดัดแปลงจาก Campbell, Reece and Mitchell,1999 [18].

5. บทบาทของเอสโตรเจนต่อกุ้ง

ฮอร์โมนนี้พบว่าเกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนในกุ้งโดยเฉพาะการสร้างโปรตีนในไข่แดงที่เรียกว่า วิลเทลโลจินิน (Vitellogenin) [19] ฮอร์โมนในกลุ่มเอสโตรเจน

(vertebrate-like steroids) จะไปกระตุ้นตับและตับอ่อนสร้างวิลเทลโลจินิน แล้วส่งไปยังรังไข่กระตุ้นให้เกิดความสมบรูณ์ของโอโอไซต์ (Oocyte maturation) (รูปที่ 3) ส่วนงานวิจัยในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอื่นๆ อาทิ เอสตร้าไดออล17เบต้าถูกค้นพบในปูทหารหรือปูลม *Scylla serrata* [20] และในโคปิปอด *Acartia tensa* พบว่าเอสตร้าไดออลสามารถกระตุ้นให้เกิดความสมบรูณ์เพศ (sexual maturation) และพบว่ากระตุ้นการผลิตไข่ในแมลงวัน [21] โดยพบว่าเอสตร้าไดออลกระตุ้นการสังเคราะห์ไข่แดงในปะการัง *Montipora verrucosa* เพิ่มขึ้น [22] และในเนื้อเยื่อของดาวทะเล [23] โดยมีบทบาทในการควบคุมการสร้างเซลล์สืบพันธุ์และการวางไข่ของฟองน้ำ ดังนั้นจึงถือได้ว่าเอสโตรเจนเป็นเสมือน bioregulator สำหรับการสืบพันธุ์ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง [24] ผลการทดลองเปรียบเทียบขนาดของไข่และระดับโปรตีนของดาวทะเล *Sclerasterias mollis* เมื่อได้รับและไม่ได้รับเอสตร้าได-ออล พบว่า กลุ่มที่ได้รับเอสตร้าไดออลมีไข่ขนาดใหญ่กว่าและปริมาณโปรตีนสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [23] ข้อมูลเหล่านี้ทำให้เกิดงานวิจัยกุ้งกับการใช้ฮอร์โมนในกลุ่มของเอสโตรเจน



รูปที่ 3 สรุปกลไกการกระตุ้นด้วยเอสโตรเจนต่อการทำงานของตับและตับอ่อน รังไข่ และการวางไข่

6. เอสโตรเจนกับงานวิจัยกุ้ง

6.1. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการนำเอสโตรเจนไปใช้ประโยชน์

มีการค้นพบเอสตร้าไดออลในฮีโมลิมฟ์รังไข่ ตับและตับอ่อนของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* เพศเมีย [24] เอสตร้าไดออลสามารถกระตุ้นให้เกิด lipogenic activity ในรังไข่และทำให้เกิด sexual maturation และการเพิ่มผลผลิตของกุ้งก้ามกราม [25] ผลของเอสตร้าไดออลต่อการพัฒนาเอมบริโอและลูกกุ้งวัยอ่อนของกุ้งก้ามกรามพบว่า ช่วยเร่งการเจริญและอัตราการฟักมากขึ้นและจำนวนระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะฟักของเอมบริโอน้อยลง อัตราการรอดตายก็ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมทำให้ทราบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อลูกกุ้ง มีผลเพียงแต่เฉพาะอวัยวะๆ ไป ซึ่งอวัยวะที่ศึกษาก็คืออวัยวะสืบพันธุ์ของกุ้งพบว่ามีเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์มากในอวัยวะสืบพันธุ์ที่กำลังเจริญ ซึ่งต่างจากกลุ่มควบคุม ในขณะเดียวกันก็ได้ทำการทดลองกับลูกกุ้งวัยอ่อนพบว่าทั้งอัตราการรอด การเจริญของลูกกุ้งไม่ถูกกระตุ้น แต่อวัยวะสืบพันธุ์ พบว่าเจริญเติบโตแตกต่างจากลูกกุ้งที่ไม่ได้รับเอสโตรเจนอย่างชัดเจน แสดงว่าเอสโตรเจนมีผลกับกุ้งก้ามกรามแน่นอน การใช้สารเอสโตรเจนในกุ้งเพื่อหาคำตอบว่ามีผลอย่างไรต่อการสืบพันธุ์โดยนำรังไข่ที่ยังไม่เจริญ นำมาใส่สารเอสโตรเจนก็พบว่าในกุ้งคูรุม่ามีการเจริญพัฒนาของรังไข่เกิดขึ้นพร้อมกับปริมาณของสารสร้างไข่แดง (vitellogenin) ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าโอโอไซต์ที่เจริญมาแล้ว ในระยะ primary vitellogenic stage ปรากฏ oil globule ซึ่งเป็นแสดงถึงการพัฒนาที่ดีของไข่เมื่อได้รับเอสโตรเจน นั่นแสดงว่าเอสโตรเจนสามารถทำให้เกิดการสังเคราะห์ Vitellogenin และพบว่ากระตุ้น primary vitellogenic oocyte ในรังไข่ของกุ้งก่อนวัยเจริญพันธุ์ [26]

6.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอสโตร-เจน

งานวิจัยเพื่อค้นหาแหล่งหรืออวัยวะที่สร้าง vitellin และ vitellogenin ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง [27] พบว่า vitellin และ vitellogeninสร้างมาจากรังไข่และตับและตับอ่อนของกุ้งก้ามกราม ซึ่งการเจริญของรังไข่มีระยะ Ovarian development อยู่ 5 ระยะ จากผลการวิจัยพบหน่วยย่อยของ vitellin 2-3 หน่วยย่อยอยู่ในรังไข่ทั้งในระยะ early- (I-II), mid- และ late- (III-V) stages แสดงว่าเอสโตรเจนมีผลต่อการสร้างไข่แดงและการเจริญของรังไข่ ดังนั้นจึงมีงานวิจัยเกี่ยวกับเอสโตรเจนในน้ำทิ้งพบว่าเกิด

ความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ในปลาโดยพบว่าทำให้เสียระยะการเจริญพันธุ์ ซึ่งงานวิจัยประเภทนี้ได้รับความสนใจมากขึ้น [18] โดยเฉพาะสารที่เป็น analogs กับเอสโตรเจน เช่นเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส 17beta - hydroxysteroid (17 beta - HSD) ในตับและรังไข่ของกุ้งก้ามกราม พบว่าขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์นี้เพิ่มขึ้นมากในรังไข่ของกุ้งก้ามกรามจะส่งผลทำให้มีค่าดัชนีรังไข่ (GSI) เพิ่มขึ้น และปริมาณโปรตีนในรังไข่ก็สูงขึ้นด้วย

จากการวัดโดยradioimmunoassay พบว่าปริมาณเอสตร้าไดออล 17เบต้า สูงสุดในเลือดและรังไข่ แต่ในเลือดและน้อยกว่าในรังไข่ประมาณ 10 เท่า เช่นเดียวกับในกุ้งก้ามกราม เอสตร้าไดออล 17เบต้า สามารถ เหนี่ยวนำการสังเคราะห์ vitellogenin และการพัฒนาโอโอไซต์ในรังไข่ของกุ้งคุรุม่าในระยะก่อนไข่สุก (previtellogenic stage) ผลการศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าเอสตร้าไดออล 17เบต้า ก่อให้เกิดการสังเคราะห์และการพัฒนาลักษณะของไข่ในรังไข่ โดยพัฒนาการสร้าง vitellogenin เป็นหลัก วัตถุประสงค์ของการศึกษาคือเพื่อตรวจหาแหล่งที่มาของ vitellogenin ในกุ้งก้ามกราม จากผลการศึกษาจึงสรุปได้ว่าตับและตับอ่อนเป็นอวัยวะที่การสังเคราะห์ vitellogenin ในกุ้งก้ามกรามมากที่สุด ความเข้มข้น vitellogenin ในเลือดจะเพิ่มขึ้นตามระยะการพัฒนาของไข่ และรักษาอยู่ในระดับสูงจนถึงระยะที่ 5 ขั้นตอนการพัฒนาของรังไข่ของกุ้งมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับดัชนีรังไข่และความเข้มข้นของ vitellin ในรังไข่และโปรตีนในเลือด ระดับ vitellogenin ในตับต่ำมากอยู่ในขั้นตอนการพัฒนารังไข่ของกุ้ง แม้ว่าระดับของ vitellogenin ในรังไข่สูงสุดในระยะที่ 5 แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับ vitellogenin ในเลือดและ vitellin ในรังไข่

ผลของ เอสตร้าไดออล 17เบต้า ในการสังเคราะห์ vitellogenin และการพัฒนาไข่ในรังไข่ของกุ้ง *Marsupenaeus japonicus* ก็ให้ผลเช่นเดียวกับกุ้งก้ามกรามกล่าวคือเอสตร้าไดออล 17เบต้า สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด vitellogenin และกระตุ้นการพัฒนาโอโอไซต์ในรังไข่ของกุ้งคุรุม่าช่วงระยะก่อนไข่สุก (previtellogenic stage) ผลการศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าเอสตร้าไดออล 17เบต้า ก่อให้เกิดการสังเคราะห์ vitellogenin และลักษณะของไข่ในรังไข่ ซึ่งให้ผลของเอสตร้าไดออล17เบต้า เช่นเดียวกับโปรเจสเตอโรน ต่อระบบสืบพันธุ์ของกุ้งก้ามกราม อย่างไรก็ตามผลของฮอร์โมนเอสตร้าไดออล 17เบต้า จะมากกว่าโปรเจสเตอโรนที่มีผลต่อการผลิต vitellogenin โดยเฉพาะผลต่อรังไข่ในระยะสุกเต็มที่ (full vitellogenic stage) ส่วนโปรเจสเตอโรนจะมีประสิทธิภาพมากกว่าเอสตร้าไดออล 17เบต้า โดยทำให้ vitellogeninในเลือดเพิ่มขึ้นและในรังไข่แต่เป็นระยะไข่อ่อน (Early-vitellogenic stage) เมื่อนำตับและตับอ่อนไปตัดดูพบว่าโครงสร้างมีการเปลี่ยนแปลงไป แต่สำหรับกุ้งที่ยังไม่มีไข่ระยะ vitellogenic stage จะไม่มีการเปลี่ยนแปลง สรุปแล้วเอสตร้าไดออล 17เบต้าและโปรเจสเตอโรนมีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์ vitellogenin ในกุ้งก้ามกรามและกุ้งคุรุม่า ถ้าไม่มีฮอร์โมนมากระตุ้นโครงสร้างของตับและตับอ่อนและรังไข่ของกุ้งก็จะไม่เปลี่ยนแปลง

6.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่ของฮอร์โมนเอสโตรเจน

เอสตร้าไดออล 17เบต้า ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นเมตาบอลิซึมของเซลล์ ให้สูงขึ้นเพราะว่าทำให้ mitochondrial ATP-ase, cytosolic malate dehydrogenase และ glucose-6-phosphate dehydrogenase ในตับและตับอ่อนเพิ่มมากขึ้น [28] และมีรายงานว่าเอสตร้าไดออล 17เบต้าและ 17α-hydroxyprogesteroneทำให้ดัชนีรังไข่ (gonadosomatic index) และขนาดของโอโอไซต์เพิ่มขึ้น [29] แต่อย่างไรก็ตามก็มีสารยับยั้ง เช่นถ้าฉีด17α-hydroxyprogesterone กับ methyl farnesoate ใส่ไปในปู *Procambarus clarkia* กลับยับยั้งการเจริญของโอโอไซต์ในรังไข่ [30] แต่ถ้าฉีดเฉพาะ 17α-hydroxyprogesterone ให้กับ *Cherax quadricarinatus* จะทำให้ความถี่ในการวางไข่ลดลง [31] แสดงว่าไม่เพียงแต่ส่งเสริมการกระตุ้นแต่ยังมีบทบาทในการยับยั้งในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิด การวัดกิจกรรมของเอนไซม์สามารถบ่งบอกถึงการทำงานของระบบสืบพันธุ์ได้กิจกรรมของ17β-hydroxysteroid dehydrogenase สามารถใช้เป็นตัววัดเมตาบอลิซึมของฮอร์โมนสเตอรอยด์ในตับ ตับอ่อนและรังไข่ของกุ้งก้ามกราม ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์นี้จะทำงานได้ต้องอาศัยการกระตุ้นจากเอสตร้าไดออล 17เบต้าจะพบมากในตับและตับอ่อนของแม่กุ้งตัวเต็มวัย [32]

7. กลไกการสร้างไข่แดงโดยเอสโตรเจนในกุ้ง

การศึกษากลไกของเอสโตรเจนของสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนด้วยวิธีอิมมูโนโลยี่ พบว่าเกิดในตับและตับอ่อนและรังไข่ ของ crayfish *Austropotamobius pallipes* พบว่าทั้งสองฮอร์โมนทำหน้าที่สร้างไข่แดง [33] และมีรายงานว่าครัสเตเชียนหลายชนิด มีแหล่งสร้างไข่แดงมาจากเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนและรังไข่ [34] สารไข่แดงมี

สารประกอบของไลปิด คาร์โบไฮเดรตและโปรตีน [35] ซึ่งแพร่กระจายแทรกซึมไปในรูปของสาร vitellogenin ในกระแสเลือดซึ่งเป็นไลโพโปรตีน ประเภทhigh-density lipoprotein (HDL) [36], [37] HDL นี้มีชื่อเรียกว่า LPII พบใน *Cherax quadricarinatus* และพบจำเพาะในแม่กุ้งที่รังไข่เจริญพร้อมผสมพันธุ์แล้ว LPII นี้ประกอบไปด้วย polypeptide 4 สายซึ่งแต่ละสายมีมวลเท่ากับ 80-208 kDa [38], [39] ในฤดูผสมพันธุ์จะพบ LPII มากในฮีโมลิมฟ์ของแม่กุ้งวางไข่และแม่กุ้งไม่วางไข่ แสดงว่า อาจจะใช้ LPII เป็นดัชนีบ่งบอกกระบวนการสร้างไข่แดงด้วยก็ได้ ยีนที่ควบคุมคือ Vitellogenin (VTG) cDNA ได้จากตับและตับอ่อนของแม่กุ้ง *Cherax quadricarinatus* ที่มีรังไข่อยู่ในระยะที่สะสมไข่แดง [40], [41] อย่างไรก็ตามต่อมที่เรียกว่า X-organ-sinus gland (XO-SG) ทำหน้าที่ยับยั้ง VTG gene ทำให้พบว่าทำไมจึงไม่มีการสร้างไข่แดงในตัวผู้ [42], [43] การสร้างไข่แดงในกลุ่มครัสเตเชียนจะอยู่ภายใต้การควบคุมของเอสตร้าไดออล 17เบต้า และโปรเจสเตอโรน ทั้งนี้ก็ขึ้นกับชนิดของสัตว์ด้วย การศึกษาผลของเอสตร้าไดออล 17เบต้า และ โปรเจสเตอโรน ต่อการสืบพันธุ์ของ crayfish โดยดูจาก VTG gene เป็นตัวบ่งชี้การทำงาน มีการประยุกต์ใช้ทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ทั้งโปรเจสเตอโรนและเอสโตรเจนสามารถชักนำให้เกิดการสังเคราะห์ vittelogenin ได้เช่นเดียวกัน งานวิจัยโดย Rodriguez *et al*., 2002b[29] และ Reddy *et al*., (2006) [42] ได้ทดสอบผลของ17α-hydroxyprogesterone ต่อการสร้างไข่แดงของปูน้ำจืด *Oziotelphusa senex senex* พบว่าฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนทำให้รังไข่เจริญและชักนำให้รังไข่สร้าง vitellogenin [42] การศึกษาฮอร์โมนของกุ้งพบว่าเอสตร้าไดออล 17เบต้า และ โปรเจสเตอโรน ทำให้เพิ่ม VTG mRNA ในแม่กุ้งไข่อ่อน (early-vitellogenic females) และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในแม่กุ้ง ในระยะไข่สุกเต็มที่ (full-vitellogenic females) พบว่าเอสตร้าไดออล 17เบต้า จะมีผลหรืออิทธิพลต่อการสังเคราะห์ VTG mRNA ในตับและตับอ่อนมากกว่ารังไข่ พบว่าเมื่อเอา เอสตร้าไดออล 17เบต้า กับโปรเจสเตอโรนมาใส่ตับและตับอ่อนของกุ้ง *Metapenaeus ensis* ปรากฏว่าสามารถกระตุ้นการทำงานของ VTG gene expression [43], [44] และพบว่าเอสตร้าไดออล 17เบต้า มีประสิทธิภาพมากกว่าโปรเจสเตอโรน [47] เอสตร้าไดออล 17เบต้า กับ โปรเจสเตอโรน กระตุ้นการสังเคราะห์ VTG mRNAแล้วแต่ช่วงระยะเวลาและอายุของกุ้ง และเมื่อใส่เอสตร้าไดออล 17เบต้า กับโปรเจสเตอโรนในตับและตับอ่อนมีผลต่อ mRNA VTG transcription แต่ว่าในฮีโมลิมฟ์ระดับเอสตร้าไดออล 17เบต้า และ โปรเจสเตอโรนไม่พบใน crayfish และ mud crab *Scylla serrata* [17] และในกุ้ง *Marsupenaeus japonicus* [45] และ red mud crab *Scylla serrata* สร้าง ไข่แดงโดย พบว่าความเข้มข้นของเอสตร้าไดออล 17เบต้า มากในตับและตับอ่อน แต่พบโปรเจสเตอโรนมากในรังไข่ของปู mud crab [46] นอกจากนี้ยังพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างเอสโตรเจนกับการแสดงออกของ heatshock protein HSP90 ซึ่งมีบทบาททำให้กุ้งเกิดความเครียด มีความเกี่ยวข้องกันแสดงว่าการควบคุมการแสดงออกขึ้นอยู่กับเอสโตรเจน [47] ซึ่งในกุ้ง*Metapenaeus ensis* คล้ายกับพวกมีกระดูกสันหลัง [50]ยีนที่รับการกระตุ้นจากเอสโตรเจนพบว่าตัวรับจะอยู่ในนิวเคลียสซึ่งศึกษาจากแมลงหวี่ [48] แต่ไม่พบ estrogen binding sites เหมือนในแอมฟิปอด *Hyalella azteca* [49]การแสดงออกของยีน VTG expressionเกิดจากการกระตุ้นจากฮอร์โมนเอสโตรเจน พบว่ามีการตอบสนองได้ดีในช่วงไข่สุกมากกว่าช่วงระยะเวลาไข่ยังอ่อน ถ้าให้เอสโตรเจนกับแม่กุ้งที่ยังไม่ออกไข่ ผลคือไม่พบ VTG mRNA ใน ฮีโมลิมฟ์ โปรเจสเตอโรน, 17α-hydroxyprogesterone และเอสตร้าไดออล 17เบต้า ก็ไม่ปรากฏว่า yolk protein precursor เพิ่มขึ้นในฮีโมลิมฟ์ [49] เราพอจะสรุปได้ว่าโปรเจสเตอโรน และเอสตร้าไดออล 17 เบต้า ที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์ VTG synthesis ในกุ้ง *Cherax albidus* ตำแหน่งของ VTG mRNA พบว่าอยู่ในตับและตับอ่อน ตัวที่สังเคราะห์ VTG คือตับและตับอ่อน และตำแหน่งการสังเคราะห์ VTG synthesis พบใน รังไข่ [50] ตับและตับอ่อน [51] เนื้อเยื่อไขมัน [52] สำหรับกุ้งก้ามกรามแหล่งสร้าง VTG mRNA อยู่ที่ตับและตับอ่อน [53] โปรตีน VTG mRNAถูกควบคุมด้วยเอสตร้าไดออล 17 เบต้า ทั้งกระตุ้นให้เกิดและทำให้คงอยู่ได้นาน

8. บทสรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปได้ว่า เอสตร้าไดออล 17เบต้า ในกุ้งและครัสเตเชียนอื่นๆ สร้างที่ตับและตับอ่อน เพิ่มอัตราของ gene transcription ทำให้ mRNA คงทนเพราะการควบคุมกลไกการ translation โปรตีนไข่แดงแต่โปรเจสเตอโรนชักนำให้มีการสังเคราะห์ไข่แดงด้วยกระบวนการ vitellogenin synthesis จากงานวิจัยพบว่าเอสตร้าไดออล 17เบต้า กับโปรเจสเตอโรน ทำให้ลักษณะเนื้อเยื่อของรังไข่ของกุ้งออก

ไข่และไม่ออกไข่เปลี่ยนแปลงไปคือขนาดไข่ใหญ่ขึ้น เซลล์ตับและตับอ่อนมีขนาดหยดไขมันใหญ่ขึ้นและเพิ่มขึ้น แต่กุ้งที่ไม่มีไข่จะไม่มีการเปลี่ยนแปลง ถ้าให้ฮอร์โมนกับแม่กุ้งทีมีไข่ผลคือผนังท่อของตับและตับอ่อนจะไม่แข็งแรง และจะเห็นเป็นท่อนๆ เปราะขาดง่าย เอสตร้าไดออล 17เบต้าจะมีผลต่อการสังเคราะห์ไลปิดในตับและตับอ่อนและฮีโมลิมฟ์ แต่ก็ไม่ได้หมายความว่าจะมีผลต่อการสืบพันธุ์เสมอไป อย่างไรก็ตามความผิดปกติในการสืบพันธุ์มักจะพบเสมอหากมีการปนเปื้อนของเอสโตรเจนในแหล่งน้ำ แม้ว่าจะทำให้เพิ่มการผลิตของสัตว์น้ำก็ตาม แต่ไม่สามารถควบคุมได้ในสภาวะธรรมชาติ ถ้ามีการฉีดหรือให้ฮอร์โมนเอสตร้าไดออล 17เบต้าและโปรเจสเตอโรนจะไปมีผลต่อระบบสืบพันธุ์ของสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนอย่างแน่นอน [17] ผลที่สำคัญก็คือเปลี่ยนแปลงในระดับการแสดงออกของยีนภายในตับและตับอ่อน และสัมพันธ์กับระดับของ ความเข้มข้นของ vitellogenin ในฮีโมลิมฟ์ ซึ่งมีผลและเกี่ยวเนื่องอยู่กับวงรอบของการสืบพันธุ์ ดังนั้นทั้งฮอร์โมนเอสตร้าไดออล 17เบต้า และโปรเจสเตอโรนจึงเป็นสาเหตุทำให้ vitellogenin expression และปริมาณความเข้มข้นสูงขึ้น แต่ก็ไม่สามารถชี้ชัดได้ว่ามีผลต่อช่วงของ reproductive cycle ดังนั้นคงเป็นเพราะว่าฮอร์โมนนี้เป็น vertebrate sex steroids อาจจะต้องศึกษาให้ลึกลงไปยังระดับโมเลกุลและการแสดงออกของยีนเฉพาะในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังให้เพิ่มมากขึ้น งานวิจัยที่น่าสนใจต่อไปคือในกรณีของต่อมหรือแหล่งหรือสิ่งเร้าที่กระตุ้นตับและตับอ่อนให้สร้างเอส - ตร้าไดออลหรือ analogs ของเอสโตรเจนของกุ้งหรือครัส - เตเชียนอื่นๆ

9. บรรณานุกรม

[1] Quinitio, E.T. and *et al*. 1994. “Changes in the Steroid hormone and Vitellogenin levels during the Gametogenic cycle of the Giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*”. **Comparative Biochemistry and Physiology.** Part C 109: 21-26.

[2] Anderson, D.T. (1982). “Embryology**”. The Biology of Crustacean V 2, Embryology, Morphology and Genetics.** Edited by Abele L.G. New York: Academic Press, p.1-36.

[3] Emmerson, J. and *et al*. 1979. “ Dose response kinetics of Serum vitellogenin, Liver DNA, RNA, Protein and Lipid after Induction by Estradiol-17β in Male flounders (*Platicthys flesus*)”. **Comparative Biochemistry and Physiology** Part B 63: 1-6.

[4] Wade, J., Gong, A. and Arnold, A.P. 1997. “Effects of Embryonic estrogen on Differentiation of the Gonads and Secondary sexual characteristics of Male zebra finches”. **Journal of Experimental Zoology** 278: 405-411.

[5] Cooper, G.M. (2000). **The Cell: a Molecular Approach.** 2nd editor. ASM press, Washington DC. p. 525.

[6] Petrini, S. and Zaccanti, F. 1998. “The Effects of aromatase and 5 α-reductase inhibitors, antiandrogen, and sex steroids on Bidder’s organs development and gonadal differentiation in Bufo bufo tadpoles”. **Journal of Experimental Zoology** 280: 245-259.

[6] Pakdeenarong,N. and Damrongphol, P. 2006. “Effects of Estradiol- 17 β on Embryos and Larvae of the Giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda, Palaemonidae)” **Crustaceana** 79: 563-572.

[7] Hamad, A., M. and *et al*. 2007. “The Effects of Aromatase Inhibitors and Selective Estrogen Receptor Modulators on Eye Development in the Zebrafish (*Danio rerio*)”. **Current Eye Research** 32 : 819-827

[8] Engelmann, F. 1994. “Invertebrates: hormone-regulated gonadal activity”**. Prospective in Comparative Endocrinology**. Edited by K. G. Davey, R. E. Peter, and S. S. Tobe. National Research Council of Canada, Ottawa, Pp. 36–40.

[9] Floyd, C.L., 2010. "Estrogen as a Therapeutic for Spinal cord injury: Evaluation in rodent models". **Proceedings of 27th Annual Conferences**. **Microscopy Society of Thailand.** 20-22 January 2010, Samui, Thailand: 6-10.

[10] Smith, D. F. and *et al*. 1978. "Oestrogen-induced Cholesterol and Fatty acid biosynthesis in Xenopus laevis liver during vitellogenic response". **Biochemistry Journal.** 174:353–361.

[11] Niece, K. 2012. **Chemical structure of estrogen**. Http://www.ehow.com/about_6319403_chemical-structure-estrogen.html. 7 May.

[12] Coveney, D. and *et al*. 2001. "Estrogen-induced Gonadal sex reversal in the Tammar wallaby". **Biology of Reproduction** 65: 613-621.

[13] Herberman, A. 2000. "Shrimp endocrinology. A review" **Aquaculture** 191: 191-208.

[14] Subramoniam, T. 2000. Crustacean ecdystroids in Reproduction and Embryogenesis. C**omparative Biochemistry and Physiology Part C** 125: 135-156.

[15] Quinitio, E.T. and *et al*. 1994. "Changes in the Steroid hormone and Vitellogenin levels during the Gametogenic cycle of the Giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*". **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**. 109: 21-26.

[16] Ghosh, D., and A. K. Ray. 1993b. "17β-Hydroxysteroid dehydrogenase activity of Ovary and Hepatopancreas of Freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: Relation to Ovarian condition and Estrogen treatment". **General and Compalative Endocrinology.** 89:248–254.

[17] Anderson, H.R. and *et al.* 1999. "A Parameter for Detecting estrogenic exposure in the Copepod Acartia tonsa". **Ecotoxicity and Environmental Safety.** 41: 56-61.

[18] Campbell, N.A., Reece, J.B. and Mitchell, L.G. 1999. **Biology**. 5th edition. New York: AddisonWesley Longman, Inc.

[19] Warrier, S.R. and *et al*. 2001. "Occurrence of Vertebrate steroids, Estradiol-17β and Progesterone in the Reproducing females of the Mud crab Scylla serrata". **Comparative Biochemistry and Physiology.** Part A 130: 283-294.

[20] De Loof, A., and *et al*. 1998. "Reproduction and Love: stragies of the organism's cellular defense system". **Comparative and Biochemistry and Physiology Part C**. 120: 167-176.

[21] Tarrant, A.M. and *et al*. 1999. "Estrone and Estradiol-17β concentration in Tissue of the Scleractinian coral, *Montipora verrucosa*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A.** 122: 85-92.

[22] Barker, M.F. and Xu, R.A. 1993. "Effects of Estrogens on Gametogenesis and Steroid levels in the Ovaries and Pyloric caeca of *Scleasterias mollis* (Echinodermata: Asteroidea)". **Invertebrate Reproduction and Development.** 24: 53-58.

[23] Quinitio, E.T. and *et al*. 1994. "Changes in the Steroid hormone and Vitellogenin levels during the Gametogenic cycle of the Giant tiger shrimp, *Penaeus monodon* ". **Comparative Biochemistry and Physiology Part C.** 109: 21-26.

[24] Ghosh, D. and Ray, A.K., 1994. "Estrogen Stimulated Lipogenic activity in the Ovary of the Freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*". **Invertebrate Reproduction and Development**". 25: 43-47.

[25] Shafir, S., M. and *et al*. 1992. "Protein, Vitellogenin, and Vitellin levels in the Hemolymph and Ovaries during Ovarian development in *Penaeus semisulcatus* (de Haan)". **Biological Bulletin.** 183:394–400.

[26] Ghosh, D., and A. K. Ray. 1993b. "17β-Hydroxysteroid dehydrogenase activity of Ovary and Hepatopancreas of Freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: Relation to Ovarian condition and Estrogen treatment". **General and Compalative Endocrinology**. 89:248–254.

[27] Rodriguez, E. M. and *et al*. 2002b. « Effects of some Steroids and Other compounds on Ovarian growth of the Red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, during early vitellogenesis". **Journal of Experimental Zoology.** 125: 61-65.

[28] Rodriguez, E. M. and *et al*. 2002a. "Effect of Methyl farnesoate, Alone and in Combination with Other hormones, on Ovarian growth of the Red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, during Vitellogenesis". **General and Compalative Endocrinology.** 125:34–40.

[29] Abdu, U. and *et al*. 2000. "Oocyte development and Polypeptide dynamics during Ovarian maturation in the Red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*".**Invertebrate Reproduction and Development.** 37:75–83.

[30] Ghosh, D., and A. K. Ray. 1993a. "Subcellular action of Estradiol-17β in a Freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*". **General and Compalative Endocrinology**. 90:274–281.

[31] Paolucci, M. and *et al*. 2002. "Immunological evidence for Progesterone and Estradiol receptors in the Freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes*". **Molecular Reproduction and Development.** 63:55–*62.*

[32] Adiyodi, R. G., and T. Subramoniam. 1983. Arthropoda-Crustacea. **Reproductive Biology of Invertebrates,** Edited by Oogenesis, Oviposition and Oosorption, K. G. Adiyodi and R. G. Adiyodi, New York: Wiley. Pp. 443–495

[33] Adiyodi, R.G. (1985). Reproduction and Its control. In: Bliss D.E., Mantel L.H.,editors. **The biology of crustacean V 9,** Embryology, morphology and genetics. Academic Press, New York. p.1-36.

[34] Charniaux-Cotton, H., and G. Payen. 1988. Crustacean reproduction. **Endocrinology of Selected Invertebrate Types,** Edited by H. Laufer, and R. G. H. Downer. New York: Alan R. Liss. pp. 279–303 in

[35] Lee, R. F., and D. L. Puppione. 1988. "Lipoproteins I and II from the Hemolymph of the Blue crab *Callinectes sapidus*: Lipoprotein II associated with vitellogenesis". **Journal of Experimental Zoology** 248:278–289.

[36] Komatsu, M. and *et al*. 1993. "Comparison of Hemolymph lipoprotein from Four species of Crustacean". **Journal of Experimental Zoology.** 266:257–265.

[37] Yehezkel, G. and *et al*. 2000. "High-density lipoprotein Associated with Secondary vitellogenesis in the Hemolymph of the Crayfish *Cherax quadricarinatus*". **Compalative Biochemistry and Physiology. Part B** 127:411–421.

[38] Serrano-Pinto, V. and *et al*. 2004. "Vitellogenin mRNA expression in *Cherax quadricarinatus* during Secondary vitellogenic at First maturation females". **Molecular Reproduction and Development** 69:17–21.

[39] Shechter, A., E. D. and *et al*. 2005. "Expression of the Reproductive female-specific vitellogenin gene in Endocrinologically induced male and Intersex *Cherax quadricarinatus* crayfish". **Biology of Reproduction.** 73:72–79.

[40] Reddy, P. R., P. Kiranmayi, K. T. Kumari, and P. S. Reddy. 2006. "17β-Hydroxyprogesterone Induced Ovarian growth and Vitellogenesis in the Freshwater rice field crab *Oziotelphusa senex senex".* **Aquaculture.** 254:768–775.

[41] Yano, I. 2000. "Endocrine control of Reproductive maturation in Economically important crustacea for Aquaculture". **Reproductive Biology of Invertebrates**. Edited by K. G. Adiyodi and R. G. Adiyodi. New York: Wiley. Pp. 161–194.

[42] Yano, I., and R. Hoshino. 2006. Effect of 17 β-estradiol on the Vitellogenin synthesis and Oocyte development in the Ovary of Kuruma prawn *(Marsupenaeus japonicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**. 144:18–23.

[43] Tiu, S. H. K., J.-G. He, S. S. Tobe, and S.-M.Chan. 2006. "Characterization of Vitellogenin in the Shrimp *Metapenaeus ensis*: Expression studies and Hormonal regulation of MeVg1 transcription in vitro". **Molecular Reproduction and Development.** 73:424–436.

[44] Okumura, T., and K. Sakiyama. 2004. "Hemolymph levels of Vertebrate-type steroid hormones in Female kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae) during Natural reproductive cycle and Induced ovarian development by Eyestalk ablation". **Fishery Science** 70:372–380.

[45] Wu, L. T., and K. H. Chu. 2008. "Characterization of Heat shock protein 90 in the Shrimp *Metapenaeus ensis*: Evidence for Its role in the Regulation of Vitellogenin synthesis". **Molecular Reproduction and Development.** 75:952–959.

[46] Maglich, J. M. and *et al*. 2001. "Comparison of Complete nuclear receptor sets from the Human, *Caenorhabditis elegans* and Drosophila genomes". **Genome Biology.** 2:0029.1–0029.7.

[47] Koheler, H.-R. and *et al*. 2007. "Sex steroid receptor evolution and Signalling in Aquatic invertebrates". **Ecotoxicology.** 16:131–143.

[48] Tsukimura, B. 2001. "Crustacean vitellogenesis: Its role in Oocyte development". **American Zoologist.** 41:465–476.

[49] Lui, C. W., B. A. Sage, and J. D. O'Connor. 1974. "Biosynthesis of Lipovitellin by the Crustacean ovary". **Journal of Experimental Zoology.** 188:289–296.

[50] Browdy, C. L., M. Fainzilber, M. Tom, Y. Loya, and E. Lubzens. 1990. "Vitellin synthesis in Relation to Oogenesis in In vitro-incubated ovaries of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae)". **Journal of Experimental Zoology.** 255:205–215.

[51] Lee, C. Y., and R. D. Watson. 1995. "In vitro study of Vitellogenesis in the Blue crab (*Callinectes sapidus*): Site and Control of vitellin synthesis". **Journal of Experimental Zoology.** 271:364–372.

[52] Tom, M., M. Goren, and M. Ovadia. 1987. "Localization of the Vitellin and Its Possible precursors in Various organs of *Parapenaeus longirostris* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae)". **Invertebrate Reproduction and Development.** 12:1–12.

[53] Vance, D. E., and J. E. Vance. 2002. **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes.** Elsevier Science, Amsterdam.