

พัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และการประเมินสุขภาพของอวัยวะของหอยขึ้นนก

Cerithidea cingulata (Gmelin, 1791) ที่อาศัยอยู่บริเวณปากแม่น้ำปราณบุรีของประเทศไทย

Spermatogenic differentiation and assessment of the testicular health of girdled horn shell

Cerithidea cingulata (Gmelin, 1791) inhabiting in Pranburi River Estuary of Thailand

เอสร่า มงคลชัยชนะ¹ ทศพร กาญจนเรชา² ศิลปชัย เสนารัตน์^{2*} เจษฎ์ เกษตระทัต^{2,3} พิสิษฐ์ พูลประเสริฐ⁴ ณัฐกิตติ โตอ่อน⁵
ชาญยุทธ์ สุดทองคง⁶ วรณีย์ จีระอังกูรสกุล⁷ และวิชฌู ธงไชย⁸

Ezra Mongkolchaichana¹, Tassaporn Kanjanarakha², Sinlapachai Senarat^{2*}, Jes Kettratad^{2,3}, Pisit Poolprasert⁴,
Natthakitt To-orn⁵, Chanyut Sudtongkong⁶, Wannee Jiraungkoorskul⁷ and Wisanu Thongchai⁸

¹ภาควิชาการศึกษาทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสุขภาพ มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช กรุงเทพฯ 10300 ประเทศไทย

²ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 10330 ประเทศไทย

³สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330 ประเทศไทย

⁴สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม พิษณุโลก 65000 ประเทศไทย

⁵สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ออยุธยา 13000 ประเทศไทย

⁶สาขาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ศรีวิชัย ตรัง 92150 ประเทศไทย

⁷ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400 ประเทศไทย

⁸สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม พิษณุโลก 65000, ประเทศไทย

¹Department of General Science, Faculty of Science and Health Technology, Navamindrahajiraj University, Bangkok 10300, Thailand

²Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

³Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

⁴Program of Biology, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok 65000, Thailand

⁵Program of Fishries Science, Faculty of Agricultural Technology and Agro-Industry, Rajamangala University of Technology
Suvamabhumhi, Ayutthaya 13000 Thailand

⁶Department of Marine Science, Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology
Srivijaya, Trang 92150, Thailand

⁷Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

⁸Program of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok 65000, Thailand

Corresponding author, e-mail: senarat.s@hotmail.com

(Received: Sep 17, 2019; Revised: Dec 2, 2019; Accepted: Dec 4, 2019)

บทคัดย่อ

แม้สถานการณ์ปัญหาสิ่งแวดล้อมในบริเวณปากแม่น้ำปราณบุรี ประเทศไทยเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่ผลกระทบต่อสุขภาพของสัตว์น้ำในบริเวณนี้ยังมีการศึกษาน้อยมาก การศึกษาครั้งนี้สนใจถึงโครงสร้างและสุขภาพของอวัยวะของหอยขึ้นนก *Cerithidea cingulata* (Gmelin, 1791) ที่อาศัยใกล้กับแหล่งกิจกรรมมนุษย์ บริเวณปากน้ำปราณบุรี ประเทศไทย ด้วยการใช้อวัยวะพยาธิวิทยาเป็นตัววัดทางชีวภาพ ทำการเก็บตัวอย่างหอยขึ้นนก จำนวน 3 ครั้งในรอบปี (เดือนกุมภาพันธ์ มิถุนายน และพฤศจิกายน พ.ศ. 2560) จำนวน 20 ตัวต่อครั้ง ที่มีขนาดความยาวเปลือกอยู่ในช่วง 3.5-4 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำตัวอย่างหอยทั้งตัวมาผ่านกระบวนการทางพยาธิวิทยา ผลการศึกษายืนยันได้ว่าตัวอย่างหอยขึ้นนกทั้งหมดมีอวัยวะจัดอยู่ในช่วงพัฒนาขั้นสมบูรณ์ เนื่องจากมีสเปอร์มาโทซูนเป็นจำนวนมาก ภายในท่อสร้างอสุจิยังสามารถพบเซลล์รูปร่างคล้ายเซอร์โทลิและพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ตั้งแต่ระยะสเปอร์มาโทโกเนียมถึงสเปอร์มาโทซูน ขณะที่การปรากฏของ

จุลกายพยาธิวิทยาภายในเนื้อเยื่ออันตะพบได้น้อยมาก มีเพียงการหดตัวของนิวเคลียสและการเสื่อมของเซลล์สืบพันธุ์ระยะสเปอร์มาโทโกเนียมที่พบได้ตลอดการศึกษา

คำสำคัญ : จุลพยาธิวิทยา หอยฝาเดียว ตัววัดทางชีวภาพ อันตะ ประเทศไทย

Abstract

Since the environmental problems in Pranburi River Estuary (PRE), Thailand have been continuously documented, the impact of this situation above on the aquatic organisms are scanty. In this study, the testicular structure and health assessment of testis in the girdled horn shell *Cerithidea cingulata*, as the most common gastropod, living near the human activity along the PRE, using histopathology as biomarker were investigated. All samples were collected from three times during annual period (February, June and November 2017) (n = 20 per sampling time) with shell length ranging 3.5-4 cm. After dissected whole body, they were performed using the routine histological examination. The results from our observation revealed that all samples showed as the testicular maturation because of containing in several spermatozoa. Within the seminiferous tubule, the Sertoli-like cell and spermatogenic differentiation classifying into the spermatogonium to spermatozoon were recorded. A few histopathological alterations including the pyknotic nuclei and degeneration of the spermatogonia were also noted.

Keywords: Histopathology, Gastropods, Biomarker, Testis, Thailand

บทนำ

ปากแม่น้ำปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เป็นบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงทางสภาพแวดล้อมอยู่ตลอดเวลา หลายปีที่ผ่านมาปากแม่น้ำปราณบุรีถือว่าเป็นพื้นที่ที่มีความสมบูรณ์ เนื่องจากจัดเป็นแหล่งทรัพยากรประมงและที่อยู่ของสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญ (ณัฐรัตน์ ปภาวสิทธิ์ และคณะ, 2550) เหตุนี้จึงทำให้มีการตั้งถิ่นฐานชุมชนประมง บ้านเรือน สะพาน ปลา และโรงงานอุตสาหกรรมขนาดเล็กอยู่อย่างหนาแน่น ตลอดแนวของปากแม่น้ำปราณบุรี จนทำให้คุณภาพน้ำบริเวณปราณบุรีไม่เหมาะสำหรับการใช้ประโยชน์ เนื่องจากมีการสะสมสารอินทรีย์หรือไนเตรตเป็นจำนวนมาก จนเกินค่ามาตรฐาน ยังมีการปนเปื้อนของสารตกค้างจากยากำจัดศัตรูพืชและโลหะหนักอีกหลายชนิดที่มีความคงทนสลายตัวได้ยาก โดยเฉพาะตะกั่วที่มีค่าสูงถึงค่ายอมรับมาตรฐาน (0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร) (Cheevaporn & Menasveta, 2003) เชื่อว่าปัญหาเหล่านี้อาจมีผลกระทบต่อสัตว์น้ำในบริเวณนี้ สอดคล้องกับการรายงานถึงพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อไตของปลาไหลงู *Pisodonophis boro* (Na Lampang *et al.*, 2016) และเนื้อเยื่อตับของปลาบู๊ไล *Neostethus lankesteri* (Palasai *et al.*, 2016) ที่ดำรงชีวิตอยู่ในปากแม่น้ำปราณบุรี แต่ยังไม่มีการรายงานถึงผลกระทบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

จากการสำรวจของนักวิจัยเบื้องต้นพบหอยฝาเดียวสกุล *Cerithidea* เป็นจำนวนมาก มีการกระจายบริเวณหาดโคลนและอาศัยในพื้นที่คาบเกี่ยวกับการปนเปื้อนของมลพิษของปากแม่น้ำปราณบุรี โดยเฉพาะหอยขี้นก *Cerithidea cingulata* (Gmelin, 1791) (ณัฐรัตน์ ปภาวสิทธิ์ และคณะ, 2550) ซึ่งจัดเป็นหอยฝาเดียว ในวงศ์ Cerithiidae และเป็นหอยที่ชาวประมงในพื้นที่เริ่มนำไปรับประทานอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้ยังมีการใช้หอยชนิดนี้ติดตามถึงพื้นที่ที่มีปัญหาสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Kan-atireklap, *et al.*, 1997; Swennen, *et al.*, 2001; Ranjan & Babu, 2016) แต่ยังไม่มีการรายงานถึงสุขภาพ

ของอวัยวะของหอยขึ้นชนิดนี้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกหอยขึ้น *C. cingulata* ที่อาศัยในบริเวณหาดโคลนของปากแม่น้ำปราณบุรี เพื่อศึกษาโครงสร้างของอวัยวะและการประเมินสุขภาพของอวัยวะ ด้วยการใช้ปรากฏจุลพยาธิวิทยาเป็นตัววัดทางชีวภาพ เช่นเดียวกับการรายงานที่สำคัญก่อนหน้านี้ ที่กล่าวว่าอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์จัดเป็นอวัยวะที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม (Chesman & Langto, 2006; Gomes *et al.*, 2009; Oehlmann *et al.*, 2000) ดังการพบภาวะสองเพศ (Intersex or Ovo-Testis) ในกลุ่มหอยฝาเดียวหลายชนิดที่อาศัยในบริเวณท่าเรือของประเทศอังกฤษ (Janob, 2009) ยังมีการรายงานการพบจุลพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์และความเสียหายกับระยะเซลล์สืบพันธุ์เป็นจำนวนมากในหอยฝาเดียว *Fanus ater* ที่อาศัยในพื้นที่ที่มีการสะสมของกลุ่มโลหะหนักบางชนิดในดินตะกอน (Agustina *et al.*, 2019) สะท้อนให้เห็นถึงความเสี่ยงต่อการลดลงของสุขภาพระบบสืบพันธุ์และความสำเร็จของการสืบพันธุ์ (Chesman & Langto, 2006; Gomes *et al.*, 2009)

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่างหอยขึ้นและพื้นที่ศึกษา

สุ่มเก็บตัวอย่างหอยขึ้น *Cerithidea cingulata* เพศผู้ที่มีขนาดความยาวเปลือกอยู่ในช่วง 3.5-4 เซนติเมตร จำนวน 3 ครั้งในรอบปี ได้แก่ เดือนกุมภาพันธ์ มิถุนายน และพฤศจิกายน พ.ศ. 2560 จากบริเวณหาดโคลนของปากแม่น้ำปราณบุรี ประเทศไทย (12°24'38.4"N 99°59'24.5"E) จำนวน 20 ตัว ต่อเดือนที่ทำการเก็บตัวอย่าง และเก็บปัจจัยสิ่งแวดล้อมในบริเวณที่หอยขึ้นอาศัยอยู่ ได้แก่ อุณหภูมิน้ำ (องศาเซลเซียส) ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved oxygen, DO) ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความเค็ม ด้วยเครื่อง EC900 AMTAST Waterproof DO Kit 9-in-1 Meter (บริษัท AMTAST, Lakeland, FL, USA)

ในแต่ละครั้งของการเก็บตัวอย่างนำตัวอย่างหอยทั้งหมดมาทำการสลับด้วยการแช่น้ำแข็ง (Rapid cooling method) (Wilson, *et al.*, 2009) หลังจากนั้นทำการแกะเนื้อเยื่อหอยออกจากเปลือกและนำตัวอย่างหอยทั้งตัวมาเก็บในน้ำยาเดวิดสัน (Davidson's fixative) เพื่อรักษาสภาพเนื้อเยื่อ ประมาณ 48 ชั่วโมง ภายใต้อุณหภูมิห้อง และย้ายไปเก็บใน 70 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ ก่อนนำไปศึกษาทางด้านมิถุนวิทยา

การศึกษาทางด้านมิถุนวิทยา

นำตัวอย่างหอยขึ้นทั้งตัว (Fixed tissue) มาผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสไลด์ถาวรด้วยวิธี Paraffin method (Presnell & Schreiber, 1997; Suvarna *et al.*, 2013) หลังจากนั้นนำบล็อกมาตัดบางด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Rotary microtome) ที่มีความหนาประมาณ 4 ไมโครเมตร แล้ววางแผ่นบางบนสไลด์ และนำมาย้อมสี Harris's hematoxylin และ Eosin (H&E) ท้ายสุดนำสไลด์เนื้อเยื่อหอยขึ้นมาศึกษาโครงสร้างและจุลพยาธิวิทยาที่เกิดขึ้นภายในอวัยวะ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงส่องผ่านและบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพรูปสไลด์รุ่น Leica TE2000-U โดยการเปรียบเทียบกับโครงสร้างอวัยวะของหอยขึ้นชนิดนี้ จากการรายงานของ Sreenivasan (1997) นอกจากนี้ยังทำการคำนวณรอยโรคที่เกิดขึ้นเป็นร้อยละความชุก (Percent prevalence)

ผลและอภิปรายผล

ปัจจัยทางสภาพแวดล้อม

จากผลการเก็บค่าพารามิเตอร์จากบริเวณที่หอยขึ้นอาศัยอยู่ ที่แสดงข้อมูลในแต่ละเดือนและค่าเฉลี่ย ในตารางที่ 1 พบว่ามีความแตกต่างกันไปตามเดือนที่ได้ทำการศึกษา ทั้งนี้เมื่อพิจารณาจากค่าออกซิเจนละลายในน้ำพบว่าทุก ๆ เดือนมีค่าสูงกว่าค่ามาตรฐาน (มากกว่าหรือเท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร) (Mechenthum, 1969) สะท้อนให้เห็นว่ายังเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตอยู่ของหอยขึ้น

ตารางที่ 1 ปัจจัยสิ่งแวดล้อมในบริเวณที่หอยขึ้นก *Cerithidea cingulata* อาศัยอยู่บริเวณหาดโคลนของปากแม่น้ำปราณบุรี

เดือน/พารามิเตอร์	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณออกซิเจน ละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความเป็นกรด-ด่าง	ความเค็ม (พีพีที)
กุมภาพันธ์	26.93	7.33	7.96	20.00
มิถุนายน	30.1	2.92	7.53	20.10
พฤศจิกายน	28.32	3.46	8.36	14.26
ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐาน	22.15 $\pm$ 1.42	3.80 $\pm$ 2.15	6.09 $\pm$ 0.37	14.95 $\pm$ 2.99

โครงสร้างของอวัยวะและพัฒนาการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าตัวอย่างทั้งหมดของหอยขึ้นก *Cerithidea cingulata* แสดงอวัยวะที่เจริญในขั้น สมบูรณ์ (Testicular Maturation) (ภาพที่ 1A) ซึ่งให้เห็นว่าจัดอยู่ในการฤดูสืบพันธุ์ (Breeding Season) เนื่องจาก สามารถพบการสเปิร์มาโทซูนภายในลูเมนของท่อสร้างอสุจิ และยังอาจสันนิษฐานว่าความยาวเปลือกของหอยขึ้นกช่วง 3.5-4 เซนติเมตร อยู่ในช่วงตัวเต็มวัย

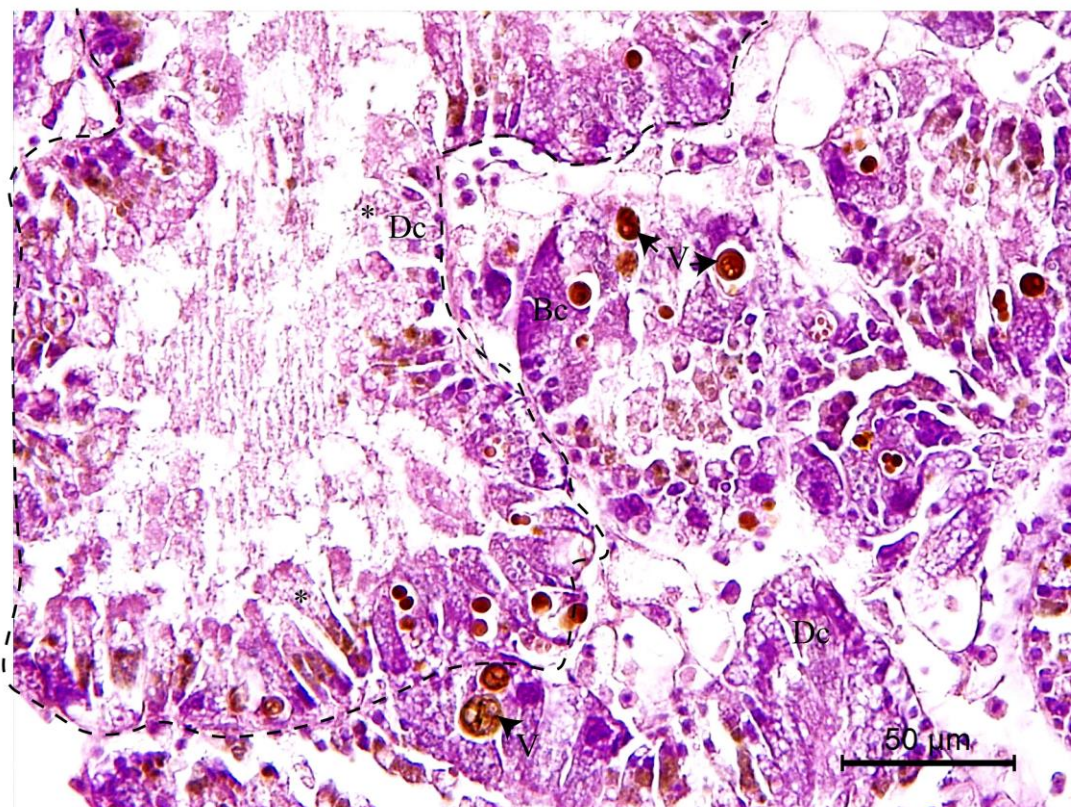


ภาพที่ 1 โครงสร้างเนื้อเยื่ออวัยวะของหอยขึ้นก *Cerithidea cingulata* จากบริเวณส่วนสไปร์ (Spire) ตามแนวยาว (Longitudinal views)

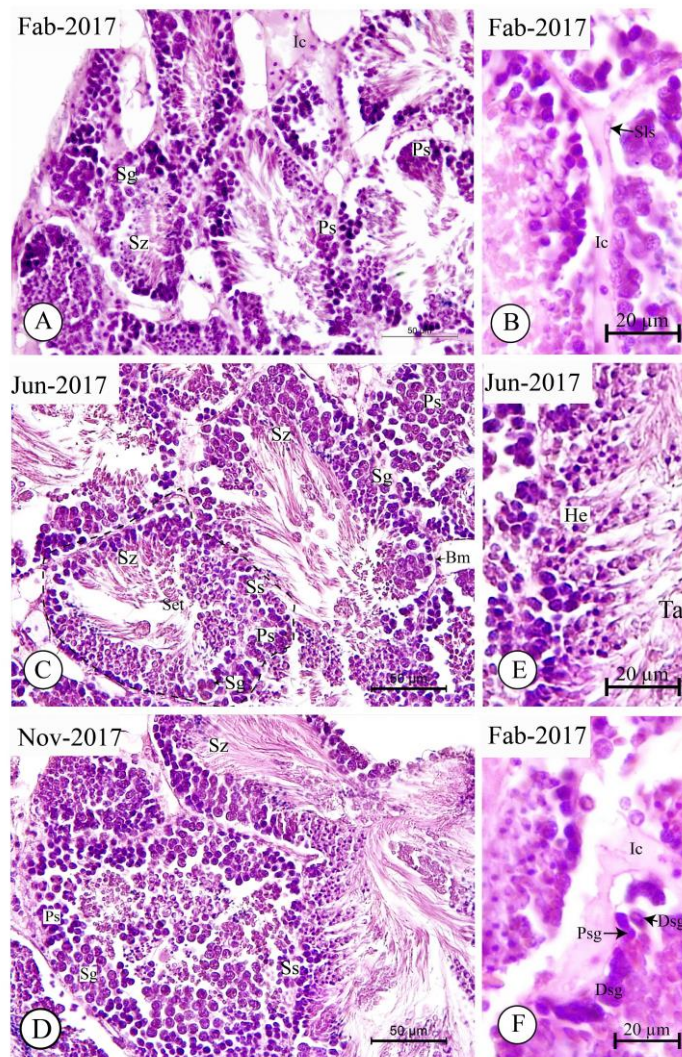
A-B: เนื้อเยื่ออวัยวะ (Testis, T) เจริญขั้นสมบูรณ์ (Testicular maturation) ประกอบด้วยท่อสร้างอสุจิเป็นจำนวนมาก ภายในเต็มไปด้วยสเปิร์มาโทซูน (Spermatozoa, Sz) เป็นจำนวนมาก เนื้อเยื่อนี้แนบอยู่กับต่อมสร้างน้ำย่อย (Digestive gland, Dg)

C: อวัยวะบริเวณส่วนปลายสุดของสไปร์ พบเพียงแคเนื้อเยื่ออวัยวะเท่านั้น

ลักษณะทางนิเวศวิทยาของอวัยวะพบว่ามีรูปร่างตัวอยู่ในบริเวณสปายร์ (Spire) ของเปลือก (ภาพที่ 1A-1C) และบริเวณปลายสุดพบได้เพียงแค่น้ำเยื่ออวัยวะเท่านั้น (ภาพที่ 1C) อวัยวะนี้ที่แนบชิดอยู่กับต่อมสร้างน้ำย่อย จึงแยกส่วนระหว่างสองระบบนี้ได้ชัดเจน (ภาพที่ 1A-1B) โครงสร้างของต่อมสร้างน้ำย่อยจัดเป็นโครงสร้างงูปลายตัน (Blind-ending tubules) หรือถุงอะซิน่า (Acini) ที่มีการจัดเรียงด้วยเซลล์จำนวน 2 ชนิด (ภาพที่ 2) ได้แก่ เซลล์ย่อยอาหาร (Digestive cell) และเซลล์เบโซฟิลิก (Basophilic cell) ลักษณะของเซลล์ย่อยอาหารเป็นเซลล์ทรงสูง มีนิวเคลียสติดสีฮีมาทอกซิดินจางและวางตัวอยู่ใกล้ฐานของเซลล์ ภายในไซโทพลาซึมมีการสะสมของแวคิวโอลไม่ติดสีในบริเวณส่วนปลายของเซลล์ (Foamy apical area) และติดสีน้ำตาลเข้มที่มีรูปร่างหลากหลายขนาดเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 23A) หน้าที่เซลล์ชนิดนี้เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับย่อยอาหารโดยการย่อยภายในเซลล์ ดังการรายงานในหอยฝาเดียว *Adelomelon beckii* (Arrighetti, et al., 2015) ขณะที่เซลล์เบโซฟิลิกมีลักษณะเป็นเซลล์ทรงเตี้ยฐานของเซลล์ มีรูปร่างคล้ายพีระมิด (Pyramid-like structure) และมีไซโทพลาซึมติดสีฮีมาทอกซิดินเข้มมาก (ภาพที่ 2) คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Gros, et al. (2009) รายงานถึงองค์ประกอบของชนิดเซลล์ภายในต่อมสร้างน้ำย่อยของหอยฝาเดียว *Strombus gigas*



ภาพที่ 2 โครงสร้างเนื้อเยื่อต่อมสร้างน้ำย่อยของหอยขึ้นก *Cerithidea cingulata* มีลักษณะเป็นงูปลายตัน (Blind-Ending Tubule) ประกอบด้วยเซลล์ย่อยอาหาร (Digestive Cell, Dc) และเซลล์เบโซฟิลิก (Basophilic Cell, Bc) ภายในไซโทพลาซึมมีการสะสมของแวคิวโอลไม่ติดสีในบริเวณส่วนยอดของเซลล์ (Apical Area, Aa) และแวคิวโอลติดสีน้ำตาลเข้ม (Vacuole, V) มีขนาดของรูปร่างที่หลากหลายเป็นจำนวนมาก



ภาพที่ 3 โครงสร้างเนื้อเยื่ออวัยวะและการพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยขี้ก *Cerithidea cingulata* จากบริเวณสไปร์ (Spire)

A: ถุงของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้จำนวนมาก (Multicellular cysts) อยู่ภายในท่อสร้างอสุจิ และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแทรกตัวอยู่ระหว่างท่อสร้างอสุจิ (Interacinar compartment, Ic) จากตัวอย่างในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2560

B: เซลล์รูปร่างคล้ายเซอร์โทลี (Sertoli-like structure, Sls) พบอยู่ในบริเวณขอบของท่อสร้างอสุจิ (Seminiferous tubule, Set) จากตัวอย่างในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2560

C-D: พัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ประกอบด้วยสเปิร์มาโทโกเนียม (Spermatogonium, Sg), สเปิร์มาโทไซด์ปฐมภูมิ (Primary spermatocyte, Ps), สเปิร์มาโทไซด์ทุติยภูมิ (Secondary Spermatocyte, Ss), สเปิร์มาทิด (Spermatid, St) และสเปิร์มาโทซูน (Spermatozoa, Sz) จากตัวอย่างในเดือนมิถุนายน (C) และเดือนพฤศจิกายน (D) พ.ศ. 2560

E: กำลังขยายสูงแสดงสเปิร์มาโทซูนประกอบด้วยส่วนหัว (Head, He) และหาง (Tail, Tai) จากตัวอย่างในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2560

F: การหดตัวของนิวเคลียส (Pyknotic nuclei of the spermatogonia, Psg) และการเสื่อมสภาพ (Degeneration of spermatogonia, Dsg) ของระยะสเปิร์มาโทโกเนียม จากตัวอย่างในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2560

หมายเหตุ Bm, Basement membrane, Feb-2017, กุมภาพันธ์ 2560, Jun-2017, มิถุนายน 2560, Nov-2017, พฤศจิกายน 2560

จากลักษณะของเนื้อเยื่ออันทะประกอบด้วยโครงสร้างคล้ายท่อเป็นจำนวนมาก โดยมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแทรกตัวอยู่ระหว่างท่อเรียกว่า Interacinar compartment (ภาพที่ 3A) โครงสร้างดังกล่าวคล้ายคลึงกับการรายงานหอยฝาเดียวทั่วไป เช่น *Tegula atra* (Coloma), *T. tridentata* (Brown) และ *T. rustica* (Kulikova & Omel'yanenko, 2000) และหอยฝาเดียว *Echinolittorina peruviana* (Castillo & Brown, 2008) แต่ละท่อมีการจัดเรียงด้วยเซลล์สองประเภทคือ เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่มีลักษณะเป็นถุงจำนวนมาก (Multicellular cysts) และเซลล์รูปร่างคล้ายเซอร์โทลี (Sertoli-like cell) (ภาพที่ 3A-3B) ทั้งนี้เซลล์รูปร่างคล้ายเซอร์โทลี วางตัวแนบอยู่กับขอบท่อ และแนบชิดกับเซลล์สืบพันธุ์ มีนิวเคลียสรูปร่างคล้ายสามเหลี่ยมติดสีชมพูอ่อน แต่ขอบเขตไซโทพลาซึมไม่สามารถแยกได้อย่างชัดเจน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงส่องผ่าน (ภาพที่ 3B) เซลล์ชนิดนี้พบการรายงานไว้ในทั้งในกลุ่มหอยฝาเดียวและหอยสองฝา ตัวอย่างเช่น หอยสองฝาในสกุล *Saccostrea* (Franco *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2010) และในชนิด *C. gigas* (Franco *et al.*, 2008) คาดว่าเซลล์รูปร่างคล้ายเซอร์โทลี มีหน้าที่เกี่ยวกับการกำจัดส่วนไซโทพลาซึมส่วนเกิน (Residual Body) ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการสเปิร์มมิโอเจเนซิส (Spermiogenesis) หรืออาจช่วยในการกำจัดเซลล์สืบพันธุ์ที่ผิดปกติ (Franco *et al.*, 2011) ดังนั้น การยืนยันหน้าที่ที่ชัดเจนและถูกต้องของเซลล์ชนิดนี้จึงควรมีการศึกษาทั้งโครงสร้างละเอียด (Fine structure) และเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry) ในอนาคตต่อไป

การจัดจำแนกพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยขึ้นสามารถแบ่งเป็น 5 ระยะ ด้วยการพิจารณาจากขนาดเซลล์ และรูปแบบของโครมาติน ได้แก่ สเปิร์มาโทโกเนียม (Spermatogonium) สเปิร์มาโทไซด์ปฐมภูมิ (Primary Spermatocyte) สเปิร์มาโทไซด์ทุติยภูมิ (Secondary spermatocyte) สเปิร์มาทิด (Spermatid) และ สเปิร์มาโทซูน (Spermatozoon) (ภาพที่ 3C-3E) คล้ายคลึงกับการรายงานของพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในหอยฝาเดียวทั่วไป (Tair-Abbaci *et al.*, 2017) ตัวอย่างเช่น หอยฝาเดียว *Littorina saxatilis* (Demin *et al.*, 2019) หอยฝาเดียว *Dendropoma petraeum* (Lunetta & Damiani, 2002) และหอยฝาเดียว *Onchidium struma* (Chen *et al.*, 2015) ตลอดจนหอยสองฝา ตัวอย่างเช่น หอยกาน้ำจืด *Margaritifera margaritifera* (Smith, 1980) และหอยกาน้ำจืด *Prisodon alatus* (Matos *et al.*, 1998) แต่ละระยะมีรายละเอียด ดังต่อไปนี้

ระยะสเปิร์มาโทโกเนียม จัดเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (Stem cell) ที่พบอยู่ในบริเวณขอบของท่อและแนบชิดกับเยื่อฐาน (Basement membrane) เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด (ขนาดเฉลี่ย 15.34 ± 0.98 ไมโครเมตร) คล้ายกับการศึกษาในหอยฝาเดียว *Radix balthica* และหอยฝาเดียว *Lymnaea stagnalis* (Tair-Abbaci, *et al.*, 2017) แต่ละเซลล์มีนิวเคลียสรูปร่างกลมเกือบเต็มเซลล์ อาจพบกลุ่มของโครมาตินติดสีม่วงอ่อนกระจายอยู่ภายในนิวคลีโอพลาซึม ส่วนไซโทพลาซึมติดสีชมพูอ่อน (ภาพที่ 3C)

ระยะสเปิร์มาโทไซด์ปฐมภูมิ เซลล์ในระยะนี้พัฒนาเข้ามายังช่องว่างมากขึ้นและมีขนาดใกล้เคียงกับระยะสเปิร์มาโทโกเนียม (ขนาดเฉลี่ย 14.02 ± 1.24 ไมโครเมตร) ลักษณะทั่วไปเซลล์ในระยะนี้มีรูปร่างค่อนข้างกลม นิวเคลียสติดสีเข้ม บางเซลล์เริ่มสังเกตเห็นโครมาตินขดตัวมากขึ้นและมักอยู่รวมกันใกล้กับเยื่อหุ้มนิวเคลียส (ภาพที่ 3C-3D)

ระยะสเปิร์มาโทไซด์ทุติยภูมิ จัดเป็นระยะเซลล์ที่ค่อนข้างหายาก มีรูปร่างกลมและมีขนาดเล็กกว่าระยะสเปิร์มาโทไซด์ปฐมภูมิขนาดเฉลี่ยประมาณ 7.34 ± 1.43 ไมโครเมตร เนื่องจากเกิดจากการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (Meiosis) และยื่นเข้าไปในช่องว่างมากขึ้น โครมาตินติดสีเบสขดตัวแน่นขึ้นเกือบเต็มเซลล์ ต่างจากไซโทพลาซึมที่มีปริมาณลดลง (ภาพที่ 3C-3D)

ระยะสเปิร์มาทิด จัดเซลล์ระยะนี้เกิดจากการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของระยะสเปิร์มาโทไซด์ทุติยภูมิ ทำให้สังเกตเห็นเซลล์มีขนาดเล็กลงอย่างชัดเจน และสีม่วงเข้มมาก เนื่องจากโครมาตินภายในนิวเคลียสมีการขดตัวแน่นเกือบเต็มเซลล์ แต่บางบริเวณของเซลล์อาจพบไซโทพลาซึมติดสีชมพูอ่อน ๆ (ภาพที่ 3C-3D)

ระยะสเปอร์มาโทซูน เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็ก หรืออาจเรียกว่า Mature euspermatozoon (Suwanjarat & Suwaluk, 2003) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง สามารถแยกได้ว่าระยะสเปอร์มาโทซูน ประกอบด้วยส่วนหัวติดสีเข้ม ขนาดเฉลี่ย 2 ไมโครเมตร รูปร่างของและหางติดสีชมพูอ่อนชี้เข้าไปบริเวณตรงกลางของถุง (ภาพที่ 3E)

จุลพยาธิวิทยาของอวัยวะ

จุลพยาธิวิทยาภายในเนื้อเยื่ออวัยวะของหอยขึ้นก็สามารถพบได้น้อยมาก การหดตัวของนิวเคลียสและการเสื่อมสภาพในระยะสเปอร์มาโทโกเนียมในบางเซลล์เท่านั้น (ภาพที่ 3F) คิดเป็นร้อยละ 10 ของความชุก ในเดือนกุมภาพันธ์ และ พฤศจิกายน พ.ศ. 2560 แต่ในเดือนมิถุนายนเกิดเป็นร้อยละเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ของความชุก เชื่อว่าพยาธิวิทยาดังกล่าวเป็นหนึ่งในกลไกที่เกิดขึ้นในช่วงสืบพันธุ์ เพื่อคัดเลือกเซลล์สืบพันธุ์ที่แข็งแรงและเหมาะสมสำหรับการปฏิสนธิ (Leino & McCormil, 1997) นอกจากนี้ การจุลพยาธิวิทยาดังกล่าวอาจเชื่อมโยงกับอาหารที่ไม่เหมาะสม (Bayne, 1976; Newell, 1989) และมลพิษบางชนิด เช่น ซีโนไบโอติกและโลหะหนักบางชนิด (Maung & Tyler, 1982; Rasmussen, *et al.*, 1983) จุลพยาธิวิทยาที่เกิดขึ้นไม่รุนแรง จึงยืนยันเบื้องต้นได้ว่าสุขภาพอวัยวะของหอยขึ้นในบริเวณหาดโคลนจากบริเวณปากน้ำปราณบุรียังคงที่ดีและเหมาะสมต่อการดำรงชีวิต

สรุป

จุลกายพยาธิวิทยาในอวัยวะของหอยขึ้นที่เกิดขึ้นได้น้อยมาก ชี้ให้เห็นว่าหอยชนิดนี้ที่อาศัยในบริเวณปากแม่น้ำปราณบุรี ยังคงเหมาะสมต่อการกำเนิดตัวอ่อนและดำรงชีวิต

เอกสารอ้างอิง

- นิฐวรรตน์ ปภาวสิทธิ์, อธิฌิกา ศิวยพราหมณ์, กรร วรชก้าแหง, พรเทพ พรณรักษ์ และบัญชา สบายตัว. (2550). การประเมินความอุดมสมบูรณ์ของปายายเลนปลุกบนพื้นที่นาทุ่งรวง อำเภอปราณบุรีจังหวัดประจวบคีรีขันธ์. ใน *การประชุมวิชาการระบบนิเวศปายายเลนแห่งชาติ “ปายายเลน: รากฐานเศรษฐกิจพอเพียงของชุมชนชายฝั่ง”*, วันที่ 12-14 กันยายน พ.ศ. 2550 ณ โรงแรมฮอเลียอันน์ รีสอร์ท รีเจนทียะ ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี.
- Agustina, R., Sarong, M. A., Yulianda, F., Suhendrayatna, S. & Dewi, E. (2019). Histological damage at gonad of *Fanus ater* (Gastropod Mollusk) obtained from heavy metal contaminated river. *Journal of Ecological Engineering*, 20(8), 114-119.
- Arrighetti, F., Teso, V. & Penchaszadeh, P. E. (2015). Ultrastructure and histochemistry of the digestive gland of the giant predator snail *Adelomelon beckii* (Caeno gastropoda: Volutidae) from the SW Atlantic. *Tissue Cell*, 47(2), 171-177.
- Castillo, V. M. & Brown, D. I. (2008). Microscopic anatomy of the male reproductive system in *Echinolittorina peruviana* (Mollusca: Caenogastropoda). *International Journal of Morphology*, 26(2), 423-432.
- Cheevaporn, V. & Menasveta, P. (2003). Water pollution and habitat degradation in the Gulf of Thailand. *Marine Pollution Bulletin*, 47, 43-51.
- Chen, S. H., Xia, L. P., Dahma, H. U., Peng, X. & Ying, X. P. (2015). The ultrastructural characteristics of spermatogenesis in *Onchidium struma* (Pulmonata: Onchidiidae) and its functional adaptation. *Italian Journal of Zoology*, 82, 1-10.

- Chesman, B. S. & Langto, W. J. (2006). Intersex in the clam *Scrobicularia plana*: a sign of endocrine disruption in estuaries?. *Biol. Lett.*, 22, 420–422.
- Demin, S. L., Stefanova, V. N., Granovitch, A. I., Mikhailova, N. A., et al. (2019). Spermatogenesis and lobular cyst type of testes organization in marine gastropod *Littorina saxatilis* (Olivi 1792). *Cell Tissue and Research*, 376, 457-470.
- Franco, A., Berthelin, C. H., Goux, D., Sour Daine, P. & Mathieu, M. (2008). Fine structure of the early stages of spermatogenesis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Tissue and Cell*, 40, 251–260.
- Franco, A., Kellner, K., Goux, D., Mathieu, M. & Berthelin, C. H. (2011). Intragonadal somatic cells (ISCs) in the male oyster *Crassostrea gigas*: Morphology and contribution in germinal epithelium structure. *Micron*, 42, 718–725.
- Gomes, T., Gonzalez-Rey, M. & Bebianno, M. J. (2009). Incidence of intersex in male clams *Scrobicularia plana* in the Guadiana Estuary (Portugal). *Ecotoxicology*, 18, 1104-1109.
- Gros, O., Frenkiel, L. & Aldana, D. A. (2009). Structural analysis of the digestive gland of the queen conch *Strombus gigas* Linnaeus, 1758 and its intracellular parasites. *Journal of Molluscan Studies*, 75(1), 59–68.
- Janob, S. (2009). Review of intersex in gastropods and other molluscs: Chapter 9.3 In: Report of the Working Group on Biological Effects of Contaminants (WGBEC), Weymouth Laboratory, UK, 16-20 March 2009. *International Council for the Exploration of the Sea*, p. 44-55.
- Kan-atireklap, S., Tanabe, S., Sanguansin, J., Tabucanonand, M. S. & Hungspreugs, M. (1997). Contamination by butyltin compounds and organochlorine residues in green mussel (*Perna viridis* L.) from Thailand coastal waters. *Env. Poll.*, 97, 79-89.
- Kim, J. H., Chung, E. Y., Choi, K. H., Lee, K. Y. & Choi, M. S. (2010). Ultrastructure of the testis and germ cell development during spermatogenesis in male *Crassostrea gigas* (Bivalvia: Ostreidae) in Western Korea. *Korean Journal of Malacology*, 26, 235–244.
- Kulikova, V. A. & Omel'yanenko, V. A. (2000). Reproduction and larval development of the gastropod mollusk *Tegula rustica* in Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Russian Journal of Marine Biology*, 26(2), 128-130.
- Leino, R. L. & McCormik, J. H. (1997). Reproductive characteristics of the ruffe, *Gymnocephalus cernuus*, in the St. Louis River estuary on western Lake Superior: a histological examination of the ovaries over one annual cycle. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54, 256-263.
- Matos, E., Corral, L. & Azevedo, C. (1998). Fine structure of spermiogenesis with special reference to the spermatid morulae of the freshwater mussel *Prisodon alatus* (Bivalvia, Unionoidea). *Journal of Morphology*, 238, 63-70.
- Maung, M. U. & Tyler, P. A. (1982). Effects of temperature, nutritive and metal stressors on the reproductive biology of *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 67, 209-223.
- Na Lampang, P., Palasai, A., Kettratad, K., Senarat, S. & Jiraungkoorskul, W. (2016). Renal histology and histopathology of the snake eel (*Pisodonophis boro* (Hamilton, 1822) from Pranburi River, Thailand. The 5th Marine Science Conference, 1-3 June 2016 at Rama Gardens Hotel, Bangkok, Thailand



- Newell, R. I. E. (1989). *Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (North and Mid-Atlantic)—blue mussel*. US Fish Wildlife Service for Biology and Reproduction 82 (11.102). US Army Corps of Engineers, TREL. pp. 82-84.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M. & Markert, B. (2000). Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) In the laboratory. Part I: Bisphenol A and octyphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicology*, 9, 383-397.
- Palasai, A., Kettratad, J., Na Lampang, P., Senarat, S. & Jiraungkoorskul, W. (2016). Structure and histopathological findings in hepatic tissue of the *Neostethus lankesteri* Regan, 1916 from Pranburi River, Thailand. *Poster Presentation in The 5th Marine Science Conference*, 1-3 June 2016, Bangkok, Thailand.
- Presnell, J. K. & Schreibman, M. P. (1997). *Humason's Animal Tissue Techniques* (5th ed.). USA: Johns Hopkins University Press.
- Ranjan, T. J. U. & Babu, K. R. (2016). Heavy Metal Risk Assessment in Bhavanapadu Creek Using Three Potamidid Snails - *Telescopium telescopium*, *Cerithidea obtusa* and *Cerithidea cingulate*. *J. Environ Anal Toxicol*, 6, 4.
- Rasmussen, L. P. D., Hage, E. & Karlog, O. (1983). Light and electron microscopic studies of the acute chronic toxic effects of N-nitroso compounds on the marine mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Aquatic Toxicology*, 3, 285-299.
- Sreenivasan, P. V. (1997). Maturity, spawning and larval development in an intertidal snail, *Cerithidea cingula* (Gmelin) (Mesogastropoda: Potamididae). *Journal of the Marine Biological Association of India*, 39, 118-127.
- Suvarna, K. S., Layton, C. & Bancroft, J. D. (2013). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques* (7th ed.). Canada: Elsevier.
- Suwanjarat, J. & Suwaluk, S. (2003). Euspermatozoon structure and euspermiogenesis in *Cerithidea cingulata* (Gmelin, 1791) (Caenogastropoda: Potamididae). *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 25, 413-422.
- Swennen, C., Moolenbeek, R. C., Ruttanadukul, N., Hobbelink, H., Dekker, H. & Hajisamae, S. (2001). The Molluscs of the Southern Gulf of Thailand. Bangkok: Thai Studies in Biodiversity.
- Tair-Abbaci, K., Joachim, S., Garric, J., Boisseaux, P., Exbrayat, J. M., Porcher, J. M. & Geffard, O. (2017). Anatomical and histological characterization of the gametogenesis of *Radix balthica* (Linnaeus, 1758) in comparison with *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758). *Journal of Histology and Histopathology*, 4, 5.
- Wilson, J. M., Bunte, R. M. & Carty, A. J. (2009). Evaluation of rapid cooling and tricainemethanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 48, 785-789.