จุลกายวิภาคและสุขภาวะของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยกาบแหลม ในแม่น้ำซองกาเลีย ช่วงไหลผ่านอำเภอสังขละบุรี จังหวัดกาญจนบุรี ประเทศไทย

Gonadal histology and its health of *Ensidens ingallsianus ingallsianus* (Lea, 1852) in Songgaria River during Sangkhlaburi District, Kanchanaburi Province, Thailand

ละม้าย ทองบุญ[1], ศิลปชัย เสนารัตน์[2,*], เจษฎ์ เกษตระทัต[2], พิสิษฐ์ พูลประเสริฐ[3]
เอสรา มงคลชัยชนะ[4], ณัฐกิตติ์ โตอ่อน[5], วิษณุ ธงไชย[6] และวรรณีย์ จิรอังกูรสกุล[7]

Lamai Thongboon[1], Sinlapachai Senarat[2,*], Jes Kettratad[2], Pisit Poolprasert[3],
Ezra Mongkolchaichana[4], Natthakitt To-orn[5], Wisanu Thongchai[6],
and Wannee Jiraungkoorskul[7]

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90110

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90110, Thailand

[2]ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

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

Corresponding author: Senarat.S@hotmail.com

[3]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม พิษณุโลก 65000

[3]Program of Biology, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok, 65000, Thailand

[4]วิทยาลัยพัฒนามหานคร มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช กรุงเทพฯ 10300

[4]Institute of Metropolitan Development, Navamindrahiraj University, Rongmuang, Pathumwan, Bangkok, 10330

[5]สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ อยุธยา 13000

[5]Program of Marine Science, Faculty of Agricultural Technology and Agro-Industry, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi, Ayutthaya, 13000 Thailand

[6]สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม พิษณุโลก 65000

[6]Program of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok, 65000, Thailand

[7]ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400 ประเทศไทย

[7]Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University, Thung Phaya Thai, Ratchathewi, Bangkok 10400

บทคัดย่อ

ความเข้าใจเรื่องการประเมินสุขภาวะของหอบกาบแหลม (*Ensidens ingallsianus ingallsianus*) บริเวณใกล้แหล่งกิจกรรมมนุษย์และพื้นที่เกษตรกรรมจากแม่น้ำซองกาเลีย อำเภอสังขละบุรี จังหวัดกาญจนบุรี ประเทศไทย เป็นสิ่งที่ต้องศึกษา แต่ยังไม่มีรายงานมาจวบจนถึงปัจจุบัน วัตถุประสงค์ครั้งนี้เพื่อศึกษาจุลกายวิภาคและประเมินสุขภาวะของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยกาบแหลม โดยการใช้จุลกายพยาธิวิทยามาเป็นตัววัดทางชีวภาพ ทำการเก็บตัวอย่างหอยกาบแหลมจากฤดูหนาว (เดือนธันวาคม พ.ศ. 2558 ถึงมกราคม พ.ศ. 2559) และฤดูแล้ง (เดือนเมษายนถึงมิถุนายน พ.ศ. 2559) จำนวน 20 ตัวต่อฤดูกาล (เพศละ 10 ตัว) มีขนาดความยาวเปลือกอยู่ในช่วง 4-8 เซนติเมตร และนำตัวอย่างทั้งหมดมาผ่านกระบวนการทางมิญชวิทยา ผลการวิจัยพบว่าหอยทั้งสองเพศจัดอยู่ในช่วงสืบพันธุ์ โครงสร้างจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออัณฑะหอยกาบ

แหลมเพศผู้ ประกอบด้วยโครงสร้างคล้ายถุงเป็นจำนวนมาก แต่ละถุงมีการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ตั้งแต่ระยะสเปอร์มาโทโกเนียมถึงสเปอร์มาโทซูน สำหรับจุลกายพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่ออัณฑะเกิดขึ้นได้น้อยมาก มีเพียงการหดตัวของนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์ระยะสเปอร์มาโทโกเนียมในบางบริเวณ เนื้อเยื่อรังไข่ของหอยกาบแหลมเพศเมียประกอบด้วยโครงสร้างคล้ายถุงเป็นจำนวนมาก ภายในถุงประกอบด้วยระยะการพัฒนาของเซลล์ไข่ที่แบ่งเป็น 4 ระยะ คือ โอโอโกเนีย ระยะก่อนสะสมไข่แดง ระยะสะสมไข่แดง และระยะไข่สุก สำหรับจุลกายพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อรังไข่พบได้น้อยมากเช่นกัน มีเพียงการฝ่อของเซลล์ไข่ในระยะสะสมไข่แดง ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้นอกจากทำให้ทราบถึงจุลกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่ถูกต้องแล้ว การพบจุลกายพยาธิวิทยาที่เกิดขึ้นน้อยมากชี้ให้เห็นว่าสุขภาวะของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ยังดีและอยู่ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการดำรงชีวิต

คำสำคัญ: จุลกายพยาธิวิทยา หอยสองฝา ตัววัดทางชีวภาพ เซลล์สืบพันธุ์

Abstract

Understanding of the health assessment of *Ensidens ingallsianus ingallsianus* living near the human activity and agricultural area from Songgaria River, Sangkhlaburi district, Kanchanaburi province, Thailand is required; however, it has never been reported. The objective of this study was to investigate the gonadal histology and its health of *E. ingallsianus ingallsianus*, using histopathological biomarker. All samples were collected from winter season (December 2015 to January 2016) and the dry season (April to June 2016) (n = 20 per season/ n = 10 per sex) with shell length during 4-6 cm. and then they were routinely processed by a standard histological techniques. The results showed that all specimens were considered as the breeding season. Histological structure of the testicular tissue in *E. ingallsianus ingallsianus* male consisted of several acini, which was different in the male germ cells from the spermatogonium to spermatozoon. Only histopathological alteration included the pynotic nuclei of the spermatogonia. The ovarian histology of the *E. ingallsianus ingallsianus* female composed of various follicles. Each follicle contained the oocyte differentiations, which was divided into four stages including oogonia, previtellogenic stage, vitellogenic stage and mature stage. The atretic follicle during vitellogenic stage was observed in the ovarian histopathology. The result from this observation was accurately received not only the gonadal histology, but also rare histopathologies with indicating to a good gonadal health under the environmental situation.

Keywords: Histopathology, Bivalve, Biomarker, Gametes

บทนำ

ในปัจจุบันการประเมินสุขภาวะของสัตว์น้ำในพื้นที่ในธรรมชาติที่มีการปนเปื้อนของสารเคมีและมลพิษได้รับความนิยมอย่างต่อเนื่อง (NRC, 1991; Frame *et al*., 2006) ถึงแม้ว่าวิธีการนี้มีข้อจำกัดในการอธิบายถึงความเชื่อมโยงในแง่เหตุและผลว่ามาจากปัจจัยใด (Frame *et al*., 2006) แต่ข้อมูลที่ได้นอกจากช่วยประเมินถึงความเสี่ยงหรือคาดการณ์อันตรายที่อาจจะเกิดขึ้นกับสัตว์น้ำ ยังทำให้ทราบถึงสถานการณ์ของสิ่งแวดล้อมในบริเวณนั้น ๆ ได้ทันท่วงที สำหรับการคัดเลือกหรือการนำเอาสัตว์น้ำมาเป็นสัตว์เฝ้าระวัง (sentinel species) เป็นสิ่งแรกที่ต้องกระทำ โดยสัตว์ชนิดนั้นควรมีคุณสมบัติหลัก คือ มีจำนวนมาก ง่ายต่อการจับและอาศัยในบริเวณคาบเกี่ยวกับพื้นที่การปนเปื้อน (NRC, 1991) ทั้งนี้หอยสองฝาจัดเป็นสัตว์น้ำกลุ่มเด่นที่กำลังนิยมใช้เป็นสัตว์เฝ้าระวังอย่างแพร่หลาย อาทิ หอยกาบ *Elliptio complanata* (Won *et al*., 2005) และหอยทราย *Corbicula australis* (Taylor *et al*., 2017) ด้วยลักษณะชีววิทยาของการดำรงชีวิตขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อมรอบตัว มีรูปแบบการกรองกินแพลงก์ตอนและสารอินทรีย์จากดินตะกอน (Dillon, 2000) จึงเอื้อต่อการได้รับผลกระทบจากมลพิษหลายกลุ่ม เช่น ซีโนไบโอติก (xenobiotic accumulation), โลหะหนัก (heavy metals) (Uno *et al*., 2001; Jacomini *et al*., 2003) และกลุ่มไตรบิวทิลทิน (tribultyltin) (Bettin *et al*., 1996) หลังจากการคัดเลือกสัตว์เฝ้าระวังจำเป็นอย่างยิ่งต้องมีการตรวจสอบจากตัววัดทางชีวภาพ (Biomarker) ที่เหมาะสม เพื่อใช้ประเมินผลกระทบจากการปนเปื้อนของมลพิษต่อร่างกายของสัตว์ โดยเฉพาะการใช้จุลกายพยาธิวิทยาในระบบสืบพันธุ์มาเป็นตัววัดทางชีวภาพ สอดคล้องกับการรายงานหลายฉบับที่กล่าวถึงอวัยวะสืบพันธุ์จัดเป็นอวัยวะที่มีความไวต่อผลกระทบของมลพิษ (Chesman and Langto, 2006; Gomes *et al*., 2009) ดังเช่น การพบภาวะสองเพศ (intersex) ในหอยกาบ *Scrobicularia plana* เพศผู้ ที่อาศัยในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนของซีโนไบโอติก ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าหอยชนิดนี้มีความเสี่ยงต่อการลดลงของสุขภาวะและมีแนวโน้มที่ทำให้เซลล์สืบพันธุ์ทั้งคุณภาพและปริมาณลดลง (Chesman and Langto, 2006; Gomes *et al*., 2009)

แม่น้ำซองกาเลียจัดเป็นแม่น้ำที่มีความสำคัญสายหนึ่งในจังหวัดกาญจนบุรีของประเทศไทยที่ตลอดทั้งสองฝั่งมีการพัฒนาเป็นแหล่งท่องเที่ยว การตั้งและขยายตัวของแหล่งชุมชนอย่างหนาแน่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณใกล้สะพานมอญ นอกจากนี้ยังมีแหล่งเกษตรกรรมที่สำคัญและมีการเพาะปลูกพืชเศรษฐกิจหลายชนิดหมุนเวียนกันในรอบปี อาจเป็นไปได้ว่ามีการใช้สารเคมีทางการเกษตรติดต่อกันเป็นระยะเวลายาวนาน ดังนั้นแม่น้ำแซงกาเลียจึงเป็นแหล่งรองรับของเสียจากบ้านเรือนและสารเคมีเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร อาจมีผลต่อเนื่องทำให้คุณภาพน้ำลดลงและมีผลกระทบต่อสุขภาวะสัตว์น้ำที่อาศัยในบริเวณนี้ จากการสำรวจของนักวิจัยพบว่าในแม่น้ำซองกาเลียมีหอยน้ำจืดหลากหลายชนิด มีอยู่จำนวนมากและง่ายต่อการเก็บตัวอย่าง โดยเฉพาะหอยกาบแหลม (*Ensidens ingallsianus ingallsianus*) ซึ่งจัดเป็นหอยสองฝา ในวงศ์ Unionidae และเป็นหอยเศรษฐกิจในฐานะแหล่งโปรตีนที่สำคัญของประชากรในอำเภอสังขละบุรี หอยกาบแหลมมีรูปร่างยาวรีคล้ายลิ่ม ด้านหน้ากลมมน ด้านท้ายเรียวแหลม ผิวเปลือกเรียบ สีเขียวอมน้ำตาลหรือน้ำตาล อัมโบ (umbo) โป่งออกค่อนไปทางปลายด้านหน้า และมักสึกกร่อน เปลือกด้านในเป็นมุกสีขาว มีความแวววาว (Nakjinda *et al*., 2005) จากข้อมูลการศึกษาหอยกาบแหลมในประเทศไทย Jivaluk *et al*. (2007) รายงานว่าหอยกาบแหลมที่พบมีความยาว ความสูง และความหนาของเปลือกในช่วง 1.7–7.2, 0.7–2.9 และ 0.4-2.4

เซนติเมตร แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงขนาดช่วงสืบพันธุ์ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกหอยกาบแหลมที่อาศัยในแม่น้ำซองกาเลีย ช่วงที่ไหลผ่านสะพานมอญ อำเภอสังขละบุรี ประเทศไทย เพื่อศึกษาจุลกายวิภาคและประเมินสุขภาวะของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ด้วยการใช้จุลกายพยาธิวิทยาของหอยมาเป็นตัววัดทางชีวภาพ

วิธีการศึกษา

การเก็บตัวอย่างหอยกาบแหลมและพื้นที่ศึกษา

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างหอยกาบแหลมถูกรวบรวมในช่วงฤดูหนาว (เดือนธันวาคม พ.ศ. 2558 ถึง มกราคม พ.ศ. 2559) และ ฤดูแล้ง (เดือนเมษายนถึงมิถุนายน พ.ศ. 2559) จากบริเวณแม่น้ำซองกาเลีย ช่วงที่ไหลผ่านสะพานมอญ อำเภอสังขละบุรี ประเทศไทย (15° 8'41.87"N 98°26'42.77"E) (จำนวนรวม 40 ตัว ต่อฤดูกาล (เพศละ 10 ตัว) และมีขนาดความยาวเปลือกอยู่ในช่วง 4-8 เซนติเมตร) หลังจากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดมาสลบด้วยการแช่น้ำแข็ง (rapid cooling method) (Wilson *et al*., 2006) และทำการแกะเนื้อเยื่อหอยออกจากเปลือก เพื่อนำมาศึกษาจุลกายวิภาคและความผิดปกติของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องสเตอริโอ หลังจากนั้นนำตัวอย่างนำมาเก็บรักษาสภาพเนื้อเยื่อในน้ำยาเดวิดสัน (Davidson's fixative) ประมาณ 48 ชั่วโมง ภายใต้อุณหภูมิห้อง

การศึกษาทางด้านมิญชวิทยา

นำตัวอย่างหอยกาบแหลม (fixed tissue) มาผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างสไลด์ถาวรด้วยวิธี paraffin method ตามหลักการมาตรฐานทางด้านมิญชวิทยา (Presnell and Schreibman, 1997; Suvarna *et al*., 2013) หลังจากนั้นนำบล็อคมาตัดบางด้วยความหนา 4 ไมโครเมตร และนำมาย้อมสี periodic acid-schiff (PAS) และ Masson's trichrome (MT) ท้ายสุดนำสไลด์เนื้อเยื่อหอยกาบมาวิเคราะห์ตำแหน่ง โครงสร้างจุลกายวิภาคและความผิดปกติที่เกิดขึ้นในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง บันทึกภาพและวัดขนาดเซลล์สืบพันธุ์ นอกจากนี้ยังทำการนับจำนวนของไข่ฝ่อ (atretic follicle) (จำนวน 100 เซลล์ จาก 5 แผ่นบาง (20 เซลล์ต่อ 1 แผ่นบาง)) ภายใต้กล้องถ่ายรูปสไลด์รุ่น Leica TE2000-U และคำนวณจำนวนของไข่ฝ่อเป็นเปอร์เซ็นต์

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าตัวอย่างหอยกาบแหลมทุกตัวที่เก็บจากฤดูหนาวและฤดูแล้ง อยู่ในช่วงการฤดูสืบพันธุ์ (breeding season) (Figure 1-2) นอกจากนี้การศึกษาครั้งนี้ยังยืนยันได้ว่าหอยกาบแหลมที่มีความยาวเปลือกช่วง 4-8 เซนติเมตร จัดเป็นช่วงวัยเจริญพันธุ์ โดยรายละเอียดของการจัดเรียงและองค์ประกอบทางด้านจุลกายวิภาคและจุลกายพยาธิวิทยาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Figures 1-2) มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

จุลกายวิภาคและจุลกายพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่ออัณฑะ (histology and histopathology of testicular tissue)

ลักษณะทางกายวิภาคอัณฑะของหอยกาบมีสภาพปกติ โครงสร้างทางด้านจุลกายวิภาคอัณฑะประกอบด้วยโครงสร้างคล้ายถุง หรือที่เรียกว่า อซินาร์ (acinar) จำนวนมากที่มีเนื้อเยื่อไขมันแทรกอยู่ (Figures 1A-1B) แต่ละถุงประกอบด้วยกลุ่มของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่มีการพัฒนาอยู่หลายระยะและสามารถแบ่งกระบวนการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ได้ 5 ระยะ คือ สเปอร์มาโทโกเนียม, ไพรมารี สเปอร์มาโทไซต์, เซคันดารี สปอร์มาโทไซท์, สเปอร์มาทิด และ สเปอร์มาโทซูน (Figure 1C) คล้ายคลึงกับระยะการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยกาบน้ำจืด *Margaritifera margaritifera* (Smith, 1980), หอยกาบน้ำเค็ม *Ostrea edulis* (Loosanoff, 1962), หอย *Spisula solidissima* (Ropes, 1968) และหอยกาบน้ำจืด *Prisodon alatus* (Matos *et al*., 1998) แต่ละระยะมีรายละเอียด ดังต่อไปนี้

สเปอร์มาโทโกเนียม (spermatogonium) เป็นเซลล์ที่พบในบริเวณฐานของถุงอซินาร์และแนบชิดกับเบสเมน เมมเบรน (basement membrane) จัดเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด (ขนาดเฉลี่ย 10 ไมโครเมตร) ลักษณะเด่นของระยะนี้คือ เซลล์และนิวเคลียสมีรูปร่างกลม ติดสีน้ำเงินอ่อน และถูกล้อมรอบด้วยไซโต-พลาสซึมสีชมพูจาง (Figure 1C)

ไพรมารีสเปอร์มาโทไซต์ (primary spermatocyte) เซลล์ระยะนี้มีขนาดเล็กกว่าสเปอร์มาโทโกเนียม เนื่องจากเกิดจากการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิส (ขนาดเฉลี่ย 8 ไมโครเมตร) นิวเคลียสติดสีเข้ม บางเซลล์สังเกตเห็นโครมาทินขดตัวและมักอยู่รวมกันใกล้กับเยื่อหุ้มนิวเคลียส (Figure 1C)

เซคันดารี สปอร์มาโทไซท์ (secondary spermatocyte) มีรูปร่างกลมและมีขนาดเล็กกว่าระยะ primary spermatocyte (ขนาดเฉลี่ย 6 ไมโครเมตร) เนื่องจากเกิดจากการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส (meiosis) และยื่นเข้าไปในลูเมนมากขึ้น ภายในนิวเคลียสประกอบด้วยการขดตัวของโครมาทินติดสีเบสทกระจายอยู่เต็มเซลล์ไซโตพลาสซึมมีปริมาณลดลง

สเปอร์มาทิด (spermatid) เซลล์ระยะนี้เกิดจากการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสของ secondary spermatocytes ทำให้เซลล์มีขนาดเล็กลงอย่างชัดเจน โครมาทินภายในนิวเคลียสกลมขดตัวแน่นเกือบเต็มเซลล์ และล้อมรอบด้วยไซโตพลาสซึมบาง ๆ (Figures 1C-1D)

สเปอร์มาโทซูน (spermatozoon) เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็ก ประกอบด้วยส่วนหัวติดสีเข้มขนาดเฉลี่ย 2 ไมโครเมตรและหางติดสีชมพูอ่อนชี้เข้าไปบริเวณตรงกลางของถุง (Figure 1C-1D) หลังจากนั้นสเปอร์มาโทซัว (spermatozoa) จากแต่ละถุงรวมกันกลายเป็นท่อนำอสุจิ (germinal duct หรือ gonadal duct) โดยท่อนี้ถูกบุ

ด้วยเซลล์บุผิวชั้นเดียวเป็นรูปทรงสูงที่มีซิเลีย (simple ciliated columnar epithelium) แต่ละเซลล์เยื่อบุมีนิวเคลียรีและไซโตพลาสซึมติดสีน้ำเงินจาง (Figures 1E-1F)

เมื่อทำการศึกษาจุลกายพยาธิหรือความผิดปกติพบการหดตัวในระยะสเปอร์มาโทโกเนียมในบางบริเวณของถุงอซินาร์ แต่ไม่มากนัก (Figure 1C)

จุลกายวิภาคและจุลกายพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อรังไข่ (histology and histopathology of ovarian tissue)

ลักษณะทางกายวิภาครังไข่ของหอยกาบแหลมไม่พบความผิดปกติ และเมื่อนำมาศึกษาทางด้านจุลกายวิภาคพบว่ามีโครงสร้างคล้ายถุงเรียกว่า ฟอลลิเคิล (follicle) (Figure 2A) แต่ละถุงประกอบด้วยระยะการพัฒนาของเซลล์ไข่หลายระยะคือ ระยะโอโอโกเนียม (oogonium) ระยะก่อนสะสมไข่แดง (previtellogenic stage) ระยะการสะสมไข่แดง (vitellogenic stage) และระยะไข่สุก (mature stage) คล้ายคลึงกับการศึกษาการพัฒนาของเซลล์ไข่ในหอยมุก *Hyriopsis bialatus* (Chatchavalcanich *et al*., 2006) แต่ละระยะมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ระยะโอโอโกเนียมพบในบริเวณขอบของถุงและแทรกตัวในส่วนเจอมินอล (germinal compartment) เซลล์มีขนาดเล็กที่สุด นิวเคลียสติดสีน้ำเงินและภายในประกอบด้วยนิวคลีโอลัส 1 อัน ส่วนของไซโตพลาสซึมติดสีชมพูจาง (Figure 2B)

ระยะก่อนสะสมไข่แดง เซลล์ในระยะนี้มีขนาดเซลล์ใหญ่ขึ้น (ขนาดเฉลี่ย 20 ไมโครเมตร) นิวเคลียสกลมหรือรี ติดสีน้ำเงินอ่อน บริเวณเยื่อหุ้มนิวเคลียสมีการจัดเรียงกันของโครมาทินคล้ายหน้าปัดนาฬิกา (clock face like-structure) ส่วนไซโตพลาสซึมติดสีน้ำเงินเข้มขึ้นอย่างชัดเจน เนื่องจากการติดสีเข้มของไมโทคอนเดรียที่มีเป็นจำนวนมากภายในเซลล์ เพื่อควบคุมการทำงานในช่วงการพัฒนาของเซลล์ไข่ (Bielefeld, 1991) และเริ่มปรากฏของชั้นฟอลลิเคิล (follicle layer) รอบเซลล์ไข่

ระยะการสะสมไข่แดง เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น (ขนาดเฉลี่ย 50 ไมโครเมตร) ภายในไซโตพลาสซึมมีการสะสมไข่แดง (yolk granule) ติดสีชมพูเป็นจำนวนมาก (Figure 2B) ตรงกันข้ามกับนิวเคลียสมีขนาดเล็กลงอย่างชัดเจน (ขนาดเฉลี่ย 5 ไมโครเมตร) และเคลื่อนที่ไปทางขอบเซลล์ (Germinal vesicle migration) (Figure 3C) ผนังของเซลล์ไข่พบชั้นฟอลลิเคิลได้อย่างชัดเจน

ระยะไข่สุก เป็นระยะที่มีขนาดเซลล์ใหญ่ที่สุด (ขนาดเฉลี่ย 60 ไมโครเมตร) เนื่องจากมีไข่แดงจำนวนมากและมีขนาดใหญ่ขึ้น มีรูปร่างไม่แน่นอน (polygonal shape) และไม่พบนิวเคลียสในระยะนี้ (Figures 2B-2D) หลังจากนั้นเซลล์ระยะนี้จะเคลื่อนที่ไปยังท่อนำไข่ (germinal duct) ซึ่งมีเซลล์บุผิวชั้นเดียวเป็นรูปทรงสูงที่มีซิเลีย (Figure 2C)

จากการศึกษาจุลกายพยาธิของเซลล์ไข่พบได้น้อยมาก แต่ยังพบการเสื่อมและฝ่อของเซลล์ไข่ในระยะสะสมไข่แดงในสองฤดูกาลเฉลี่ยจำนวน 7 เซลล์ไข่ (จากจำนวน 100 เซลล์ คิดเป็น 7 เปอร์เซ็นต์) (Figure 2B)

ถึงแม้ว่าการศึกษาครั้งนี้พบจุลกายพยาธิวิทยาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยกาบแหลมที่อาศัยอยู่แม่น้ำแซงกาเลียได้น้อยมาก การหดตัวของนิวเคลียสของสเปอร์มาโทโกเนียมในอัณฑะของหอยกาบแหลมจัดเป็นกระบวนการตายของเซลล์ (cell necrosis) และเป็นส่วนหนึ่งของการลดลงของเซลล์สืบพันธุ์ในระยะ

ต่อมา สำหรับการเสื่อมและฝ่อของเซลล์ไข่ถือว่าเป็นเรื่องปกติที่เกิดขึ้นในช่วงสืบพันธุ์ (Leino and Maccormil, 1997) แต่อย่างไรก็ตามการการเกิดอาการดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องอาหารที่ไม่เหมาะสม, อุณหภูมิต่ำ (Bayne, 1976; Newell, 1989) และมลพิษหลายชนิด เช่น ซีโนไบโอติกและโลหะหนักบางชนิด (Maung and Tyler,1982; Rasmussen *et al*., 1983) นอกจากนี้ยังพบว่าของการฝ่อของเซลล์ไข่เพิ่มขึ้นในหอยกาบน้ำเค็ม *Mytilus edulis* หลังได้รับสารกลุ่มไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันที่มีความเข้มข้นสูง (hydrocarbon, high oil เท่ากับ 127.7±28.3) เป็นเวลา 144 วัน (Lowe and Pipe, 1986) จากข้อมูลที่กล่าวมาทั้งหมดการพบจุลกายพยาธิวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์อาจไม่รุนแรง ดังนั้นผู้วิจัยจึงยืนยันเบื้องต้นพบว่าเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ยังแสดงให้เห็นว่าถึงสุขภาวะของหอยกาบแหลมในขณะนี้มีสุขภาวะที่ดีและอยู่ภายใต้สิ่งแวดล้อมที่ยังเหมาะสมต่อการดำรงชีวิต

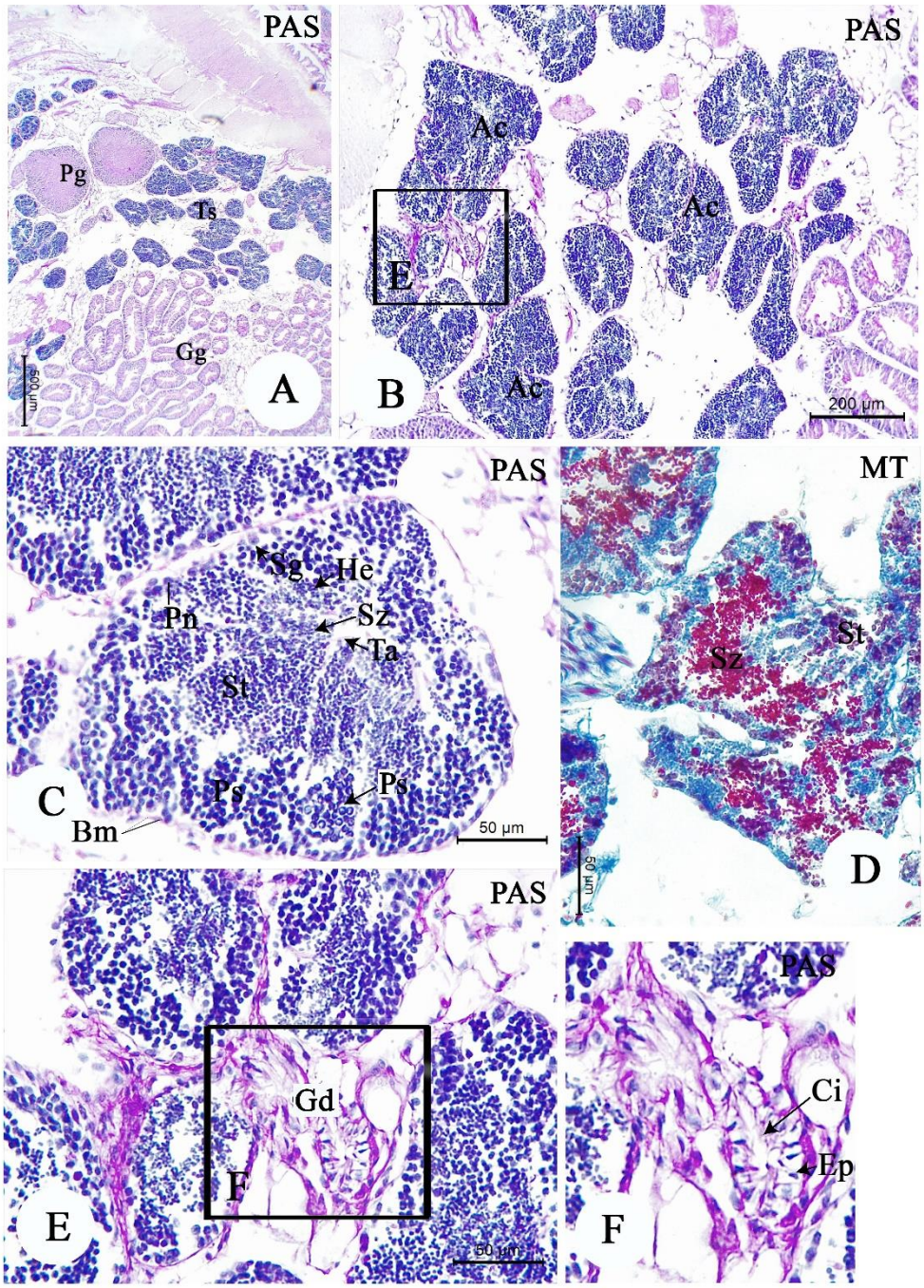

Figure 1 Light microscopic level showing the histological structure of the testicular tissue and spermatogenesis in *Ensidens ingallsianus ingallsianus* (Ac = acini, Bm = basement membrane, Ci = cilia, Ep = epithelium, Gc = germinal duct, Gg = digestive gland, He = head of spermatozoon, Pg = pedal ganglion, Pn = pynotic nuclei, Ps = primary spermatocytes, Sg = spermatogonium, St = spermatids, Sz = spermatozoa, Ta = tail of spermatozoon, Ts = testis) Note: MT = Masson's trichrome, PAS = periodic acid-schiff

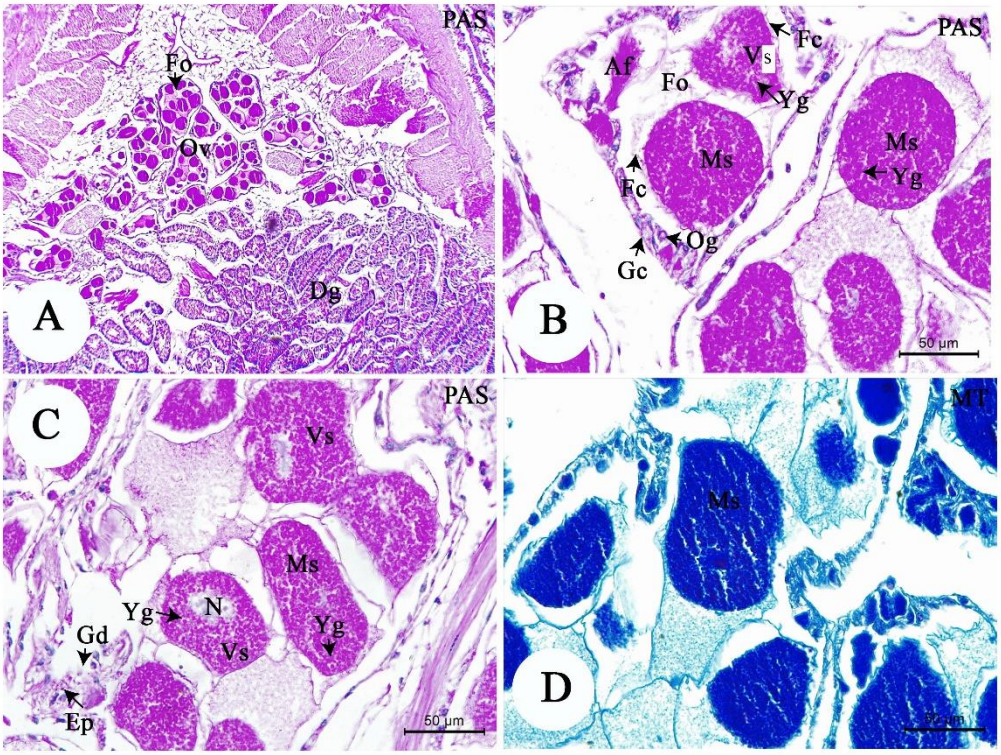

Figure 2 Light microscopic level showing the histological structure of the ovarian tissue and oogenesis in *Ensidens ingallsianus ingallsianus* (Af = atretic follicle, Dg = digestive gland, Ep = epithelium, Fc = follicle cell layer, Fo = follicle, Gd = germinal duct, Ms = mature stage, N = nucleus, Og = oogonium, Ov = ovary, Yg = yolk granule, Vs = vitellogenic stage) Note: MT = Masson's trichrome, PAS = periodic acid-schiff

สรุป

งานวิจัยครั้งนี้ได้ตอบคำถามถึงโครงสร้างจุลกายวิภาคและสุขภาวะของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เบื้องต้นของหอยกาบแหลมในแม่น้ำซองกาเลีย จังหวัดกาญจนบุรี ด้วยใช้จุลกายพยาธิวิทยามาเป็นตัววัดทางชีวภาพ ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าหอยกาบแหลมยังมีสุขภาวะของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการสร้างตัวอ่อนและดำรงชีวิต นอกจากนี้ผู้วิจัยแนะนำว่าสามารถใช้หอยกาบแหลมเป็นสัตว์เฝ้าระวังและใช้จุลกายพยาธิวิทยามาเป็นตัววัดทางชีวภาพ เพื่อใช้สำหรับการประเมินผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมเบื้องต้นได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามการเก็บข้อมูลทางด้านสิ่งแวดล้อมในบริเวณแม่น้ำซองกาเลียยังคงต้องมีการติดตามอย่างต่อเนื่องในอนาคตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ห้องปฏิบัติการไมโครเทคนิค ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ช่วยอนุเคราะห์การเตรียมตัวอย่างและถ่ายรูปสไลด์ตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

Bayne, B.L. 1976. Aspects of reproduction in bivalve molluscs. In: Estuarine Processes., edited by Wiley, M. Academic Press, New York, USA. pp. 432-448.

Bettin, C., Oehlman, J. and Stroben, E, 1996. TBT-induced imposex in marine neogastropods in mediated by an increasing androgen level. Helgoland Mar. Res. 50: 299-317.

Bielefeld, U. 1991. Histological observation of gonads and digestive gland in straving *Dreissena polynorpha* (Bivalvia). Malacologia. 33: 31-42.

Chatchavalcanich, K., Jindamongkon, P., Kovitadhi, U., Thongpan, A. and Kovitvadhi. 2006. Histological structure of gonads in the freshwater pearl mussel, *Hyriopsis* (Hyriopsis) *bialatus* Simpson, 1900. Invertebr. Repr. Dev. 49: 245-253.

Chesman, B.S. and Langto, W.J. 2006. Intersex in the clam *Scrobicularia plana*: a sign of endocrine disruption in estuaries?. Biol. Lett. 2006 Sep 22: 420–422.

Dillon, Jr. R.T. 2000. The Ecology of Freshwater Mollusks. UK: Cambridge University Press

Frame, L. and Dickerson, R.L. 2006. Fish and wildlife as sentinels of environment contamination. In D.O. Norris and J.A. Carr (eds.), Endocrine disruption: biological bases for health effects in wildlife and humans. 202-222. New York: Oxford University Press.

Gomes, T., Gonzalez-Rey, M. and Bebianno, M.J. 2009. Incidence of intersex in male clams *Scrobicularia plana* in the Guadiana Estuary (Portugal). Ecotoxicology. 18:1104-1109.

Jacomini, A.E., Bonato, P.S. and Avelar, W.E.P. 2003. HPLC method for the analysis of atrazine in freshwater bivalves. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 60: 452-461.

Jivaluk, J., Promprasri, P. and Nakjinda, O. 2007. Thai Inland Clam. Research Group on Biological Diversity, Inland Fisheries Resources Research and Development Institute, Inland Fisheries Resources Research and Development Office: Bangkok. 50 p.

Leino, R.L. and 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. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 54: 256-263.

Lowe, V.L. and Pipe, R.K. 1986. Hydrocarbon exposure in mussels: a quantitative study of the responses in the reproductive and nutrient storage cell systems. Aquat. Toxicol. 8: 265-272.

Loosanoff, V.L. 1962. Gametogenesis and spawning of the European oyster, *Ostrea edulis* in water of Maine. Biol. Bull. 122: 86-95.

Matos, E., Corral, L. and Azevedo, C. 1998. Fine structure of spermiogenesis with special reference to the spermatid morulae of the freshwater mussel *Prisodon alatus* (Bivalvia, Unionoidea). J. Morp. 238: 63-70.

Maung, M.U. and Tyler, P.A. 1982. Effects of temperature, nutritive and metal stressors on the reproductive biology of *Mytilus edulis*. Mar. Biol. 67: 209-223.

Nakjinda, O., Piemthipmanus, M., Jutamas, J., Poonyanok, V. and Tothanabhoka, J. 2005. Benefit Exploitation from Inland Mollusc in Thailand. Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives. Bangkok. 155 p.

National Research Council (NRC). 1991. Animals as sentinel of environmental health hazards. Washington D.C.: National Academy Press.

Newell, R.I.E. 1989. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Northand Mid-Atlantic)—blue mussel. US Fish Wildlife Service for Biology and Reproduction 82 (11.102). US Army CorpsofEngineers, TREL. pp. 82-84.

Presnell, J.K. and Schreibman, M.P. 1997. Humason's Animal Tissue Techniques. 5th ed. US, Johns Hopkins University Press, 600.

Rasmussen, L.P.D., Hage, E. and 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.). Aquat. Toxicol, 3: 285-299.

Ropes, J.W. 1968. Reproductive cycle of the surf clam, *Spisula solidissima*, in offshore New Jersey. Biol. Bull. 135: 349-365.

Smith, D.G. 1980. Sexual characteristics of *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus) populations in Central New England. The Veliger. 21: 381-383.

Suvarna, K.S., Layton, C. and Bancroft, J.D. 2013. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 7th ed. Canada, Elsevier, 654.

Taylor, A.M., Edge, K.J., Ubrihien, R.P. and Maher, W. 2017. The freshwater bivalve *Corbicula australis* as a sentinel species for metal toxicity assessment: An in situ case study integrating chemical and biomarker analyses. Environ. Toxicol. Chem. 36: 709-719.

Uno, S., Shiraishi, H.., Hatakeyama, S., Otsuki, A. and Koyama. 2001. Accumulation characteristics of pesticide residuals in organs of bivalves (*Anodonta woodiana* and *Corbicula leana*) under natural condition. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 40: 35-47.

Wilson, J.M., Bunte, R.M., Carty, A.J. 2009. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS 222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). Journal of the American Association for Laboratory Animal Science 48: 785-789.

Won, S.J., Novillo, A., Custodia, N., Rie, M.T., Fitzgerald, K., Osada, M. and Callard, I.P. 2005. The freshwater mussel (*Elliptio complanata*) as a sentinel species: Vitellogenin and steroid receptors. Integr. Comp. Biol. 45: 72-80.