

# รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง "การศึกษาโครงสร้าง หน้าที่ และ  
ความสัมพันธ์ของระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์  
ของหอยเป่าชื่อพันธุ์พื้นเมือง *Haliotis asinina* Linnaeus"

Studies of the structures, roles and relationships between the  
nervous and reproductive systems of a tropical abalone,  
*Haliotis asinina* Linnaeus

หัวหน้าโครงการ: ศ.ดร. ประเสริฐ ไสยภณ  
หน่วยงาน: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุน  
การวิจัย (สกว) ประเภท "ทุนวิจัยองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานต่อการ  
พัฒนา" สัญญาเลขที่ BRG4/2540 ลงวันที่ 1 มกราคม 2540

# รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง "การศึกษาโครงสร้าง หน้าที่ และ  
ความสัมพันธ์ของระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์  
ของหอยเป๋าฮื้อพันธุ์พื้นเมือง *Haliotis asinina* Linnaeus"

Studies of the structures, roles and relationships between the  
nervous and reproductive systems of a tropical abalone,  
*Haliotis asinina* Linnaeus

หัวหน้าโครงการ: ศ.ดร. ประเสริฐ ไสยกุล  
หน่วยงาน: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุน  
สนับสนุนการวิจัย (สกว) ประเภท "ทุนวิจัยองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานต่อการ  
พัฒนา" ตามสัญญาเลขที่ BRG4/2540 ลงวันที่ 1 มกราคม 2540

## 2 บทคัดย่อ

ระบบประสาทของหอยเป่าฮือ *H. asinina* เป็นแบบดั้งเดิม (primitive type) กล่าวคือ ยังไม่มีกระบวนการ centralization และ cephalization เป็นระบบประสาทกลาง ระบบประสาทจึงประกอบด้วยปมประสาทที่โยงต่อกันด้วยแท่งประสาท (nerve cords) ปมประสาทที่สำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ คือ ปมประสาท cerebral, pleuropedal และ visceral

ปมประสาทแต่ละปมแบ่งออกเป็นชั้น cortex และ medulla ชั้น cortex เป็นขอบนอกที่ประกอบด้วยเซลล์ประสาท (neuron-NR) เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neurosecretory cell-NS) และเซลล์ประสาทที่เลี้ยง (neuroglia-NG) ส่วน medulla ประกอบด้วยมัดของใยประสาท (nerve bundles) ที่สานกันไปมา และเซลล์ neuroglia ที่แทรกอยู่ระหว่างใยประสาท

จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาโดยการย้อมด้วยสีพิเศษ ทำให้เราสามารถแยกเซลล์ NR ออกได้เป็น 4 ชนิด เซลล์ NS 3 ชนิด เซลล์ NG 3 ชนิด การศึกษาด้วยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงความแตกต่างในไซโตพลาสซึมของเซลล์ NS<sub>1</sub>, NS<sub>2</sub> ในปมประสาท cerebral และ pleuropedal โดยเซลล์เหล่านี้ผลิตแกรนูลที่มีขนาดและรูปร่างแตกต่างกัน ส่วน NS<sub>3</sub> มีลักษณะเหมือนกัน จึงคาดว่า NS<sub>1</sub> กับ NS<sub>2</sub> น่าจะเป็นเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนที่กำลังสร้างและหลั่งฮอร์โมน ส่วน NS<sub>3</sub> อาจจะเป็นเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนที่กำลังจะสลายตัว

การศึกษากการกระจายของฮอร์โมนที่คล้าย human GH, insulin, LH และ FSH พบว่า มีฮอร์โมนคล้าย GH ปริมาณมากที่สุด และมี insulin-liked, FSH-liked hormone น้อยมากในปมประสาท cerebral การกระจายของ GH-liked hormone พบอยู่ในเซลล์ NS<sub>1</sub> กับ NS<sub>3</sub> และในมัดใยประสาทกลาง medulla ส่วนในปมประสาท pleuropedal กับ visceral ไม่มี GH และ insulin-liked hormone แต่อาจจะมี FSH-liked และ LH-liked hormone อยู่บ้าง แต่ไม่สามารถบอกปริมาณได้ เนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องของส่วนอนุรักษ์ที่มีเหลืออยู่ในฮอร์โมนของมนุษย์และของหอยอาจจะน้อยมาก ทำให้การย้อมด้วยแอนติบอดีต่อฮอร์โมนของมนุษย์ไม่ติดสีเท่าที่ควร การศึกษาโดยวิธี immunoblotting สามารถชี้ชัดได้เฉพาะ GH-liked hormone ซึ่งมีอยู่ในปริมาณสูงในปมประสาท cerebral โดยอาจจะปรากฏเป็น 2 แถบ คือ ที่ MW 95 และ 130 kD

รังไข่และอวัยวะของหอยเป่าฮือ ไม่มีการแยกหน่วยผลิตเซลล์สืบพันธุ์ออกจากกันเด็ดขาด แต่จะมีการแบ่ง gonad ออกเป็นห้องเล็ก ๆ (compartments) โดยแผ่นเยื่อเกี่ยวพัน trabeculae ที่ยึดระหว่าง gonadal capsule กับ hepatopancreatic capsule เซลล์สืบพันธุ์พัฒนามาจาก gonia เซลล์ที่เกิดและอยู่ติดกับแผ่น trabeculae โดยเฉพาะทางด้านฐานที่ติดกับ gonadal capsule

เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้แบ่งออกเป็น 13 ชั้น คือ spermatogonia (Sg), primary spermatocytes (LSc, ZSc, PSc, DSc, MSc), secondary spermatocytes (SSc), spermatids 4 ชั้น ( $St_{1-4}$ ), spermatozoa 2 ชั้น ( $Sz_{1-2}$ ), เซลล์สืบพันธุ์เพศเมียแบ่งเป็น 6 ชั้นคือ oogonia (Og), และ primary oocytes 5 ชั้น ( $Oc_{1-5}$ )

การศึกษาเซลล์สืบพันธุ์ในเพศผู้โดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ทำให้เข้าใจวิถีชีวิตของเส้นใยโครมาตินในนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์ซึ่งเป็นแบบ "fibrous to granular type" การพัฒนาของ acrosome ในระยะ  $St_3$  และ  $St_4$  เกิดขึ้นจากการรวมตัวของ proacrosomal granules ที่อาจจะถูกสร้างขึ้นตั้งแต่ระยะ PSc การเรียงตัวของ centriole และไมโทคอนเดรียที่ด้านท้ายของนิวเคลียสของเซลล์  $St_3$  และ  $St_4$  เป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนาทาง

การศึกษาเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียด้วยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ทำให้สามารถแยกเซลล์ตามกระบวนการสังเคราะห์ (synthetic activities) ออกเป็นช่วงต่าง ๆ คือ  $Oc_1$  สังเคราะห์ ribosomes เป็นหลักจึงเรียกว่า ribosomal phase  $Oc_2$  มี organelles ที่ประกอบด้วย RER และ Golgi complexes เป็นหลักจึงเรียกว่า Golgi-RER phase  $Oc_3$  มีการสังเคราะห์ jelly coat granules และ cortical granules เป็นหลักจึงเรียกว่า synthetic phase  $Oc_4$  มีการสร้าง vitelline-jelly coat เป็นหลักจึงเรียกว่า vitelline-jelly coat phase  $Oc_5$  พัฒนาเต็มที่จึงเรียกว่า mature phase

วงจรการสืบพันธุ์ของอذنทะเลและรังไข่ในรอบหนึ่งปี แบ่งออกเป็น 5 ช่วง คือ proliferative, premature, mature, spawning และ spent โดยเพศเมียมี spawning 2 ช่วงในรอบปี คือ ประมาณเดือนมีนาคมถึงเมษายน และสิงหาคมถึงตุลาคม หอยเพศผู้มีช่วงการ spawning ที่ยาวกว่า และบางตัวสามารถ spawn ได้เกือบตลอดปี

จากการศึกษารังไข่ด้วยวิธี immunohistochemistry พบว่าอาจจะมี LH-like hormone และ Egg Laying hormone ในรังไข่ โดยอาจจะมีกลุ่มเซลล์ในแผ่น trabeculae ที่เป็นแหล่งผลิตฮอร์โมนเหล่านี้

ระบบประสาทโดยเฉพาะปมประสาทของหอยเป่าฮื้อ มีการพัฒนา 2 ช่วงคือ ช่วง juvenile ระหว่าง 1-5 เดือน ในช่วงนี้มหากายวิภาคของระบบประสาทพัฒนาเป็นรูปแบบสมบูรณ์ แต่ในส่วน cortex ของปมประสาทยังมีจำนวนเซลล์ประสาทไม่มากนัก โดยเฉพาะเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก และช่วง premature ระหว่าง 6-11 เดือน ซึ่งมีการเพิ่มของจำนวนเซลล์ NS และ NR<sub>1</sub> มาก และการติดสี chrome-hematoxylin และ paradehyde fuchsin ของแกรนูลในเซลล์ NS ระบบประสาทและปมประสาทพัฒนาสมบูรณ์เมื่อหอยอายุได้ 12 เดือนขึ้นไป

### 3 สารบัญ

|                                                              | หน้า |
|--------------------------------------------------------------|------|
| 1. กิตติกรรมประกาศ                                           |      |
| 2. บทคัดย่อ                                                  | i    |
| 3. สารบัญ                                                    | iv   |
| 4. บทนำ                                                      | 1    |
| 4.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย                   | 1    |
| 4.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ                                   | 3    |
| 5. วิธีการทดลอง                                              | 4    |
| 5.1 การเลี้ยงและการเลือกหอยเป่าเพื่อการทดลอง                 | 4    |
| 5.2 การศึกษากายวิภาคของระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์            | 4    |
| 5.3 การศึกษากายวิภาคของระบบประสาทในระดับ                     |      |
| จุลทรรศน์ธรรมดาและจุลทรรศน์อิเล็กตรอน                        | 5    |
| 5.3.1 การศึกษาในระดับจุลทรรศน์ธรรมดา                         | 5    |
| 5.3.2 การศึกษาในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอน                     | 5    |
| 5.4 การศึกษาชนิด ลักษณะ และหน้าที่ของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน  |      |
| และประเภทของสารฮอร์โมนในปมประสาทต่าง ๆ                       | 5    |
| 5.4.1 การศึกษากายวิภาคและการกระจายของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน  | 5    |
| 5.4.2 การศึกษาและแยกประเภทของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน          |      |
| โดยการย้อมด้วยสีพิเศษ                                        | 6    |
| 5.4.3 การตรวจหาเซลล์ในปมประสาทที่ผลิตฮอร์โมนที่กระตุ้น       |      |
| การเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์โดยวิธี immunohistochemistry    | 7    |
| 5.4.4 การวิเคราะห์สารฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต   |      |
| และการสืบพันธุ์ในปมประสาทโดยวิธี immunoblotting              | 7    |
| 5.5 การศึกษากายวิภาคของระบบสืบพันธุ์และการผลิตเซลล์สืบพันธุ์ |      |
| ในระดับจุลทรรศน์ธรรมดาและจุลทรรศน์อิเล็กตรอน                 | 8    |
| 5.5.1 การศึกษาด้วยจุลทรรศน์ธรรมดา                            | 8    |
| 5.5.2 การศึกษาด้วยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน                        | 8    |

|                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.6 การศึกษาวงจรการสืบพันธุ์ในหอยตัวเต็มวัยในรอบ 1 ปี                                                                        | 9  |
| 5.7 การศึกษาการเจริญเติบโตและพัฒนาการของระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์                                                           | 9  |
| 6. ผลการทดลอง                                                                                                                | 10 |
| 6.1 มหกายวิภาคของระบบประสาทและปมประสาท                                                                                       | 10 |
| 6.2 จุลกายวิภาคของปมประสาท                                                                                                   | 13 |
| 6.2.1 ปมประสาท cerebral                                                                                                      | 13 |
| 6.2.2 ปมประสาท pleuropedal                                                                                                   | 13 |
| 6.2.3 ปมประสาท visceral                                                                                                      | 14 |
| 6.3 การจำแนกชนิดของเซลล์ในปมประสาทโดยการย้อมด้วยสีพิเศษ                                                                      | 14 |
| 6.3.1 ปมประสาท cerebral                                                                                                      | 14 |
| 6.3.2 ปมประสาท pleuropedal                                                                                                   | 17 |
| 6.3.3 ปมประสาท visceral                                                                                                      | 20 |
| 6.3.4 จุลกายวิภาคและชนิดของเซลล์ในปมประสาท pedal cord                                                                        | 21 |
| 6.4 การศึกษาลักษณะของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนโดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน                                                            | 27 |
| 6.4.1 ปมประสาท cerebral                                                                                                      | 27 |
| 6.4.2 ปมประสาท pleuropedal                                                                                                   | 30 |
| 6.5 การศึกษาลักษณะการกระจายของฮอร์โมน GH-liked, Insulin-liked, FSH liked และ LH liked ในปมประสาทโดยวิธี immunohistochemistry | 36 |
| 6.5.1 ปมประสาท cerebral                                                                                                      | 36 |
| 6.5.2 ปมประสาท pleuropedal                                                                                                   | 36 |
| 6.5.3 ปมประสาท visceral                                                                                                      | 38 |
| 6.6 การศึกษาฮอร์โมน GH-liked ในปมประสาท cerebral ด้วยวิธี immunoblotting                                                     | 42 |
| 6.7 มหกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์                                                                                               | 45 |
| 6.8 ลักษณะจุลกายวิภาคของอวัยวะและรังไข่                                                                                      | 45 |
| 6.9 การศึกษาลักษณะและการจำแนกชั้นของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในระดับจุลทรรศน์ธรรมดา                                               | 48 |
| 6.10 การศึกษาโครงสร้างละเอียดของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่อยู่ในต่อมอวัยวะ                                                      | 51 |
| 6.10.1 เซลล์ในช่วง Spermatogenesis                                                                                           | 51 |
| 6.10.2 เซลล์ในช่วง Spermiogenesis และการขาดของไฮโครมาติน                                                                     | 55 |
| 6.10.3 เซลล์ Spermatozoa                                                                                                     | 58 |

|                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.11 การศึกษาลักษณะและการจำแนกชั้นของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย<br>ในรังไข่โดยจุลทรรศน์ธรรมดา                                                      | 61  |
| 6.12 การศึกษาโครงสร้างละเอียดของเซลล์สืบพันธุ์ชั้นต่าง ๆ ในรังไข่โดย TEM                                                                      | 65  |
| 6.13 การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของต่อมอวัยวะและรังไข่<br>ของหอยที่เลี้ยงในระบบปิดซึ่งเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลในรอบ 1 ปี                         | 72  |
| 6.14 การศึกษาการกระจายของ FSH-like, LH-like และ Egg Laying hormone<br>ของหอยเป่าฮื้อในรังไข่และอวัยวะด้วยวิธี immunohistochemistry            | 75  |
| 6.14.1 FSH-like และ LH-like hormone                                                                                                           | 75  |
| 6.14.2 Egg Laying hormone (ELH) ของหอยเป่าฮื้อ                                                                                                | 75  |
| 6.15 การพัฒนาของระบบประสาท                                                                                                                    | 79  |
| 6.16 การพัฒนาของระบบสืบพันธุ์                                                                                                                 | 87  |
| 7. บทวิจารณ์                                                                                                                                  | 91  |
| 7.1 มหกายวิภาคของระบบประสาทและปมประสาท                                                                                                        | 91  |
| 7.2 จุลกายวิภาคของปมประสาท                                                                                                                    | 92  |
| 7.3 การจำแนกชนิดของเซลล์ประสาทและเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน                                                                                       | 92  |
| 7.4 การศึกษาลักษณะโครงสร้างละเอียดของเซลล์ประสาท<br>และเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนโดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน                                           | 94  |
| 7.5 การศึกษาลักษณะการกระจายของฮอร์โมนที่คล้ายฮอร์โมน GH, insulin, FSH และ<br>LH ของสัตว์มีกระดูกสันหลังในปมประสาทโดยวิธี immunohistochemistry | 95  |
| 7.6 การศึกษา GH-like ฮอร์โมนในปมประสาท cerebral ด้วยวิธี immunoblotting                                                                       | 96  |
| 7.7 มหกายวิภาคของรังไข่และอวัยวะ                                                                                                              | 97  |
| 7.8 ลักษณะจุลกายวิภาคของอวัยวะและรังไข่                                                                                                       | 97  |
| 7.9 การศึกษาลักษณะและการจำแนกชั้นของเซลล์สืบพันธุ์<br>ในหอยเพศผู้โดยจุลทรรศน์ธรรมดา                                                           | 98  |
| 7.10 การศึกษาโครงสร้างละเอียดของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้โดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน                                                                    | 99  |
| 7.11 การสังเกตลักษณะและการจำแนกชั้นของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย<br>โดยจุลทรรศน์ธรรมดา                                                             | 102 |
| 7.12 การศึกษาโครงสร้างละเอียดของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียโดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน                                                                   | 103 |
| 7.13 การศึกษาลักษณะจุลกายวิภาคของอวัยวะและรังไข่ของหอย<br>ในระบบปิดซึ่งเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลในรอบ 1 ปี                                         | 105 |

|                                                                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 7.14 การศึกษาการกระจายของ FSH-like, LH-like hormone<br>และ Egg Laying Hormones (ELH) ในรังไข่และอวัยวะของหอยเป่าฮื้อ | 105 |
| 7.15 การพัฒนาของระบบประสาท                                                                                           | 106 |
| 7.16 การพัฒนาของระบบสืบพันธุ์                                                                                        | 107 |
| 8. หนังสืออ้างอิง                                                                                                    | 108 |
| 9. ผลลัพธ์                                                                                                           | 113 |
| 10. ภาคผนวก                                                                                                          | 120 |

## 4 บทนำ

### 4.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

หอยเป๋าฮื้อ หอยโข่งทะเล หรือหอยร่ายรุ (abalone) เป็นหอยชนิดหนึ่งที่ชาวจีนและชาวญี่ปุ่นนิยมนำมาปรุงเป็นอาหารเป็นเวลานานกว่า 1500 ปี แต่เริ่มมีการบริโภคอย่างแพร่หลายและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจในประเทศต่าง ๆ ทั่วโลกเมื่อประมาณ 30 กว่าปีที่ผ่านมา

หอยเป๋าฮื้อเป็นหอยกาบเดียว มีประมาณ 100 สปีชีส์ พบแพร่กระจายอยู่ตามชายฝั่งทะเลของทวีปต่าง ๆ ในเขตร้อน เขตอบอุ่น และเขตหนาว โดยทั่วไปหอยเป๋าฮื้อที่อาศัยอยู่ในเขตอบอุ่นและเขตหนาวมักมีขนาดใหญ่ และสปีชีส์ที่อาศัยอยู่ในเขตร้อนมักมีขนาดเล็ก (Ino, 1980; Uki, 1989; Hahn, 1989) หอยเป๋าฮื้อที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมีอยู่ประมาณ 20 สปีชีส์ ส่วนใหญ่มีขนาดใหญ่ และถูกจับจากแหล่งอาศัยธรรมชาติ ขณะนี้ได้เริ่มมีการเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมที่ทำรายได้สูงเช่นในประเทศญี่ปุ่น ออสเตรเลีย เม็กซิโก สหรัฐอเมริกา นิวซีแลนด์ และแอฟริกาใต้ (Uki, 1989) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงประเทศที่ประกอบกิจการเพาะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis* spp.) สายพันธุ์ต่าง ๆ ในเชิงอุตสาหกรรม (Cox, 1962; Ino, 1980; Fallu, 1991; Shepherd *et al.*, 1992)

| ประเทศที่เพาะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อ | ชื่อวิทยาศาสตร์ของหอยเป๋าฮื้อ     | ชื่อทั่วไป                                     | ขนาด (ซ.ม.) | แหล่งอาศัยในธรรมชาติ |
|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------|-------------|----------------------|
| ญี่ปุ่น                        | <i>H. discus hannai</i>           | ezo abalone<br>Pacific abalone<br>disc abalone | 13-14       | temperate            |
| สหรัฐอเมริกา                   | <i>H. rufescens</i>               | red abalone                                    | 7-20        | temperate            |
| เม็กซิโก                       | <i>H. corrugata</i>               | pink abalone                                   | 15-18       | temperate            |
|                                | <i>H. fulgens</i>                 | green abalone                                  | 12-20       | temperate            |
| ออสเตรเลีย                     | <i>H. rubra</i>                   | blacklip abalone                               | 12-14       | warm                 |
|                                | <i>H. laevigata</i>               | greenlip abalone                               | 13-14       | temperate            |
| นิวซีแลนด์                     | <i>H. iris</i>                    | black-footed paua                              | 18          | temperate            |
| ไต้หวัน                        | <i>H. diversicolor supertexta</i> | small abalone                                  | 5           | tropical             |
| ฝรั่งเศส                       | <i>H. tuberculata</i>             | ormer abalone                                  | 12          | temperate            |

เนื่องจากการนิยมนิคมบริโภคหอยเป่าอื้อกันอย่างแพร่หลาย การทำประมงหอยเป่าอื้อจากแหล่งอาศัยธรรมชาติอย่างเดียวจึงไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค เนื่องจากปริมาณของหอยเป่าอื้อในแหล่งอาศัยธรรมชาติมีแนวโน้มลดลงเรื่อย ๆ จึงมีความจำเป็นที่ต้องมีการเพิ่มผลผลิตของหอยเป่าอื้อ โดยการพัฒนาด้านการเพาะเลี้ยงเพื่อสนองความต้องการของตลาดโลก

ในน่านน้ำไทยซึ่งอยู่ในเขตร้อนพบหอยเป่าอื้อ 3 ชนิด คือ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* (Tookwinas et al., 1986; Nateewathana and Hylleberg, 1986; Nateewathana and Bussawarit, 1988; Kahkai and Petjamrat, 1992) *H. asinina* พบที่จังหวัดชลบุรี จังหวัดระยอง จังหวัดตราด และที่ทะเลฝั่งอันดามัน เปลือกมีลักษณะบาง ยาว เรียว ผิวเรียบ สีเขียวมะกอกหรือสีเขียวปนน้ำตาล มีความยาวเฉลี่ย 8 ซม. และความกว้างเฉลี่ย 4 ซม. *H. ovina* พบที่จังหวัดชลบุรี จังหวัดระยอง จังหวัดตราด และที่ทะเลฝั่งอันดามัน เปลือกมีลักษณะค่อนข้างแข็งแรง รี สีม่วงหรือสีเขียวมะกอก มีความยาวเฉลี่ย 5 ซม. และความกว้างเฉลี่ย 4 ซม. *H. varia* พบที่เกาะภูเก็ตและที่ฝั่งทะเลอันดามัน เปลือกมีลักษณะกลมรี ค่อนข้างแข็ง ผิวขรุขระ สีเขียวมะกอกหรือสีน้ำตาลแดง มีความยาวเฉลี่ย 4 ซม. และความกว้างเฉลี่ย 3 ซม. ดังนั้น *H. asinina* จึงมีขนาดใหญ่ที่สุด หอยเป่าอื้อเป็นสัตว์ที่เคลื่อนไหวช้า กินพืชประเภทสาหร่ายสีแดงเป็นอาหาร และหากินในเวลากลางวัน *H. asinina* อาศัยอยู่ตามโขดหินและซากปะการัง ส่วน *H. ovina* และ *H. varia* อาศัยอยู่ตามซอกของโขดหิน หอยเป่าอื้อทั้งสามชนิดพบในระดับน้ำขึ้นน้ำลงจนถึงระดับความลึก 1-7 เมตร

ในประเทศไทย ศูนย์พัฒนาประมงทะเลฝั่งตะวันออกได้ประสบผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยง *H. asinina* ในระดับหนึ่ง (Singhagraiwan, 1989; Singhagraiwan and Sasaki, 1991) สำหรับการเพาะเลี้ยง *H. ovina* ได้เริ่มมีการศึกษาโดย Jarayabhand et al., (1991) ส่วน *H. varia* นั้นยังไม่มีการศึกษา ข้อมูลพื้นฐานต่างๆ เกี่ยวกับหอยเป่าอื้อที่พบในประเทศไทยยังมีน้อยมาก จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการศึกษาวิจัย ในประเด็นที่สามารถนำเอาความรู้ขั้นพื้นฐานไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงหอยเป่าอื้อได้ โดยเฉพาะในเรื่องวงสืบพันธุ์ของหอย ระยะเวลาการสร้างและการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ชนิดและหน้าที่ของปมประสาท ตลอดจนชนิดของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนที่ควบคุมการสืบพันธุ์ของหอย วิธีการกระตุ้นการตกไข่และสเปิร์ม วิธีการกระตุ้นให้หอยมีอัตราการเกาะเพิ่มขึ้น การเร่งอัตราการเติบโตและการอยู่รอดของลูกหอย ตลอดจนการศึกษอาหารตามธรรมชาติ และการผลิตอาหารเสริมของหอย ทั้งนี้เพื่อจะได้นำข้อมูลพื้นฐานดังกล่าวมาเป็นแนวทางประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงหอยเป่าอื้อในเชิงพาณิชย์ต่อไป

## 4.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

โครงการวิจัยนี้มุ่งที่จะศึกษาชีววิทยาการสืบพันธุ์และระบบประสาทของหอยเป่าฮื้อ โดยเน้นประเด็นต่าง ๆ ดังนี้

4.2.1 ศึกษามหากายวิภาค (gross anatomy) ของระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์ของตัวเต็มวัยของหอยเป่าฮื้อ *H. asinina*

4.2.2 ศึกษากายวิภาคในระดับจุลทรรศน์ธรรมดาและจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของปมประสาทที่ควบคุมการสืบพันธุ์ของตัวเต็มวัยของหอยเป่าฮื้อ *H. asinina*

4.2.3 ศึกษาชนิดลักษณะและหน้าที่ของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neuro-secretory cells) และประเภทของสารฮอร์โมนในปมประสาทต่างๆ ของหอยเป่าฮื้อ *H. asinina*

4.2.4 ศึกษากายวิภาคในระดับจุลทรรศน์ธรรมดาและจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของระบบสืบพันธุ์และกระบวนการผลิตเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเป่าฮื้อ *H. asinina*

4.2.5 ศึกษาวงจรการสืบพันธุ์ในรอบ 1 ปีของหอยเป่าฮื้อ *H. asinina*

4.2.6 ศึกษาการเจริญเติบโตและพัฒนาการของระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์ของหอยเป่าฮื้อ *H. asinina*

## 5 วิธีการทดลอง

### 5.1 การเลี้ยงและการเลือกหอยเป่าฮือ *H. asinina* เพื่อการทดลอง

การเพาะเลี้ยงหอยกระทำที่ศูนย์พัฒนาประมงทะเลฝั่งตะวันตก (โดยกลุ่มของ นายธนศ พุ่มทอง) และที่สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอ่างศิลา จ.ชลบุรี ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (โดยกลุ่มของ รศ. ดร. เติมศักดิ์ จารยะพันธุ์) โดยเลี้ยงหอยเป่าฮือในบ่อซีเมนต์ที่มีน้ำไหลถ่ายเทตลอดเวลา และให้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Gracilaria* spp. เป็นอาหารหลัก พร้อมกับให้อาหารเสริมที่ผลิตขึ้นเอง จะเลือกใช้หอยเป่าฮือโตเต็มวัยที่แข็งแรงสมบูรณ์ มีขนาดเปลือกใกล้เคียงกัน และใช้ทั้งหอยเพศผู้และเพศเมีย การแยกเพศหอยสามารถทำได้โดยค่อย ๆ เปิดส่วนแมนเทิลที่อยู่ใต้เปลือกขึ้น จะเห็นอวัยวะสืบพันธุ์หอยอยู่รอบ ๆ hepatopancreas ซึ่งรวมเรียกว่า conical organs ซึ่งอยู่ก่อนมาทางด้านซ้ายของลำตัว หอยเพศเมียมี ovary สีเขียวเข้ม และหอยเพศผู้มี testis สีขาวหรือเหลืองนวล

นำหอยเป่าฮือตัวเต็มวัยมาใส่ขามแก้วหรือพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 12 ซม. สูง 6.5 ซม. ขามละหนึ่งตัว ใส่น้ำทะเลให้เต็มภาชนะและใส่เกล็ดเมนทอลลงไปประมาณ 2-3 เกล็ด หากกระจกมาปิดด้านบนภาชนะเพื่อไม่ให้เมนทอลระเหย ทิ้งไว้ประมาณ 10-30 นาที แล้วค่อย ๆ เพิ่มปริมาณเกล็ดเมนทอลเป็นระยะ ๆ และทิ้งไว้ประมาณ 1-1.5 ชั่วโมง กล้ามเนื้อของหอยจะคลายตัวเต็มที่ หลังจากนั้นค่อย ๆ เอาใบมีดผ่าตัดสอดไปที่บริเวณระหว่างเปลือกด้านในและตัวหอยเพื่อตัดกล้ามเนื้อที่ยึดระหว่างเปลือกกับตัวหอย จะทำให้สามารถแยกส่วนเปลือกและตัวหอยออกมาศึกษาได้

### 5.2 การศึกษามหากายวิภาคของระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์

นำหอยเป่าฮือตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย อย่างละประมาณ 10 ตัวมาทำให้สลบ แกะเปลือกออก นำมาใส่จานสำหรับผ่าตัดที่มีน้ำเกลือ 0.6% ศึกษาลักษณะภายนอก เช่น รูปร่าง ลักษณะ และรงควัตถุของส่วนหัว แผ่นเท้า หนวด และแมนเทิล เป็นต้น แล้วศึกษาลักษณะภายในโดยเฉพาะมหากายวิภาคของระบบสืบพันธุ์เพศผู้ เช่น testis, vas deferens และ prostate gland และเพศเมีย เช่น ovary, oviduct และ albumen gland ฯลฯ เป็นต้น และระบบประสาทกับปมประสาท เช่น cerebral ganglia, pleuropedal ganglia, visceral ganglia และปมประสาทอื่น ๆ เป็นต้น การศึกษาตัวหอยกระทำภายใต้กล้องสเตอริโอ และบันทึกผลโดยใช้ camera lucida และถ่ายภาพจากกล้องสเตอริโอ วัดขนาดอวัยวะต่างๆ โดยใช้ map measurer และ ocular micrometer และคำนวณหาขนาดที่แท้จริงโดยใช้ stage micrometer

### 5.3 การศึกษากายวิภาคของระบบประสาทในระดับจุลทรรศน์ธรรมดาและจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

#### 5.3.1 การศึกษาในระดับจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope)

สลับหอยเป่าอื้อตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมียด้วย  $MgCl_2$  แล้วตัด cerebral ganglia, pleuropedal ganglia และ visceral ganglia จากตัวของหอย แล้วนำไปแช่ในน้ำยา Bouin เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 70% ethanol หลาย ๆ ครั้ง หลังจากนั้น dehydrate ด้วย 70%, 80%, 95%, 100% ethanol ตามลำดับ และ dioxane 2 ครั้ง โดยแช่ในสารแต่ละชนิดเป็นเวลาครั้งละ 20 นาที เมื่อเสร็จสิ้นขั้นตอนดังกล่าวแล้ว นำเนื้อเยื่อไปฝังใน paraplast ตัดเนื้อเยื่อหนา 6 ไมครอน แล้วนำไปย้อมด้วยสี Harris' Hematoxylin และ eosin และศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาเพื่อตรวจหาชนิด ลักษณะ การกระจายตัว และการต่อเนื่องของเซลล์ประสาทและเส้นประสาทระหว่างปมต่าง ๆ

#### 5.3.2 การศึกษาในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope)

สลับหอยด้วย  $MgCl_2$  ตัดเนื้อเยื่อ cerebral ganglia และ pleuropedal ganglia แช่เนื้อเยื่อใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M cacodylate buffer ที่  $4^{\circ}C$  เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย cacodylate buffer 3 ครั้ง ต่อจากนั้น fix ด้วย 1% osmium tetroxide ใน buffer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง และ fix ใน 1% uranyl acetate ใน ethanol เป็นเวลา 0.5 ชั่วโมง แล้วจึงล้างในน้ำกลั่นและ dehydrate ใน 50%, 70%, 90% และ 100% ethanol ตามลำดับขั้นตอนละ 10 นาที ต่อจากนั้นนำก้อนเนื้อเยื่อไป embed ในพลาสติก Araldite และตัดชิ้นเนื้อเยื่อด้วย ultramicrotome แล้วศึกษาด้วย transmission electron microscope (TEM) เพื่อสังเกตดูโครงสร้างละเอียดของเซลล์ประสาท กิ่งประสาท รวมทั้งการต่อเนื่องของมันและโครงสร้างละเอียดของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ

### 5.4 การศึกษาชนิด ลักษณะ และหน้าที่ของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนและประเภทของสารฮอร์โมนในปมประสาทต่าง ๆ

#### 5.4.1 การศึกษาจุลกายวิภาคและการกระจายของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน

นำ paraffin sections ที่ย้อมด้วยสี Harris's hematoxylin และ eosin จากข้อ 5.3.1 มาศึกษาจุลกายวิภาคของปมประสาทชนิดต่าง ๆ และการกระจายตัวของเซลล์ผลิตฮอร์โมนในปมประสาทแต่ละปมโดยละเอียด โดยการสังเกตด้วยจุลทรรศน์ธรรมดา แล้วถ่ายรูปและทำแผน ที่การกระจายของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน

#### 5.4.2 การศึกษาและแยกประเภทของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนโดยการย้อมด้วยสีพิเศษ

การแดงเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนในปมประสาทของหอย กระทำได้โดยใช้วิธี การย้อมด้วยสี Chrome-hematoxylin-phloxine และ Paraldehyde-fuchsin

##### 5.4.2.1 การย้อมสี Chrome-hematoxylin-phloxine

นำ section มาสกัดสารพาราฟินออกโดยแช่ใน xylene แล้วนำไปแช่ในสารละลาย 3% potassium permanganate และกรด sulfuric ล้าง sections ในน้ำประปา แล้วฟอกสีโดยแช่ใน 5% sodium bisulfite นำ section ที่ผ่านขบวนการดังกล่าวแล้วไปย้อมสีในสารละลายที่ส่วนผสม 1:1 ของ 1% aqueous hematoxylin และ 3% chrome alum ที่ทิ้งไว้อย่างน้อย 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์จนเห็นว่า section ติดสีน้ำเงินเข้ม ซึ่งมักใช้เวลา ย้อมประมาณ 25-30 นาที จากนั้นนำ section ไปแช่ใน 1% (0.125 N) HCl ประมาณ 30 นาที แล้วล้างในน้ำประปาจน section ปรากฏเป็นสีน้ำเงินใส หลังจากนั้นนำ section ไปย้อมในสารละลาย 0.5% phloxine B ในน้ำ โดยใช้เวลาประมาณ 15 นาที ล้างด้วยน้ำประปา แล้วแช่ในสารละลาย 5% phosphotungstic acid 1 นาที และล้างในน้ำประปาจนสีแดงเริ่มปรากฏขึ้น แล้วนำ section ไปล้างใน 95% และ 100% แอลกอฮอล์ตามลำดับ แช่ในสาร xylene แล้วปิด section ได้ผ่านกระจกปิด

##### 5.4.2.2 การย้อมสี Paraldehyde-fuchsin

นำ section ที่ล้างพาราฟินออกแล้วมาแช่ในสารละลาย Gomori (0.15 g  $\text{KMnO}_4$  ในน้ำ 50 ml และ 0.1 ml conc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) ประมาณ 1 นาที ฟอกสี permanganate ออกโดยล้างใน 2.5% sodium bisulfite ประมาณ 2-3 นาที แล้วล้างในน้ำกลั่น นำ section ไปแช่ในแอลกอฮอล์ 30%-70% แล้วจึงนำไปย้อมในสารละลาย paraldehyde fuchsin (0.5 g basic fuchsin + 1 ml paraldehyde ใน 70% แอลกอฮอล์ + 1.5 ml conc. HCl) นำ slide ไปล้างใน 90% และ 95% แอลกอฮอล์ประมาณ 3 นาที นำ section ไป rehydrated ใน 70% และ 30% แอลกอฮอล์ และย้อมสีในสารละลาย Halmi (10.2 g light green yellow + 1% orange G + 0.5 g chromotrope 2R + 0.5 g phosphotungstic acid + 1 ml glacial acetic acid ในน้ำกลั่น 100 ml) เป็นเวลา 5 นาที ล้าง section ใน 95% และ 100% แอลกอฮอล์ 2 ครั้ง แช่ใน xylene แล้วจึงปิดทับด้วยแผ่นกระจกปิด

จากการย้อมด้วยสีดังกล่าวแล้ว จะทำให้เซลล์ประสาทติดสีม่วงใน chrome-hematoxylin-phloxine และสีเขียวเหลืองใน paraldehyde-fuchsin ซึ่งแสดงเม็ดแกรนูลกระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม เมื่อแยกประเภทของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนโดยการย้อมสีพิเศษได้

แล้ว ก็ทำการนับจำนวนและทำแผนที่การกระจายของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ จากภาพถ่ายจุลทรรศน์

#### 5.4.3 การตรวจหาเซลล์ในปมประสาทที่ผลิตฮอร์โมนที่กระตุ้นการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์โดยวิธี immunohistochemistry

นอกจากการจำแนกเซลล์ผลิตฮอร์โมนในปมประสาทโดยการย้อมด้วยสีพิเศษตามข้อ 5.4.1 และ 5.4.2 ซึ่งจะได้ผลที่ไม่ค่อยจำเพาะแล้ว เราได้ตรวจหาเซลล์ที่ผลิตฮอร์โมนแต่ละชนิดโดยใช้วิธี immunohistochemistry ซึ่งมีความจำเพาะยิ่งขึ้น โดยการนำซีรัมของหนูที่มีแอนติบอดีต่อ human GH, insulin, LH และ FSH และโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ frog LH, FSH มาเป็น primary antibody ย้อม paraffin หรือ frozen section ของปมประสาทต่าง ๆ โดยวิธี immunohistochemistry แล้วตรวจสอบตำแหน่งการเกาะของแอนติบอดีกับสารฮอร์โมนในเซลล์ประเภทต่าง ๆ ของปมประสาท โดยการใช้แอนติบอดีระดับสอง (secondary antibody) ต่อ IgG ของหนูที่ติดสลากรับ HRP หลังจากทำปฏิกิริยากับสาร substrate ซึ่งทำให้เกิดสีน้ำตาล แล้วก็นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา นอกจากนั้นแล้วเรายังได้พยายามใช้วิธี immunocytochemistry ตรวจสอบเซลล์ที่ผลิตฮอร์โมนในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยการใช้ LR White embedded plastic sections ของปมประสาทย้อมด้วยแอนติบอดีระดับแรกต่อฮอร์โมนต่าง ๆ ตามที่กล่าวมาแล้ว ตามด้วยแอนติบอดีระดับสองที่ติดสลากรับ HRP หรือ gold particles ตามวิธี immunoenzyme cytochemistry (Childs, 1983) และ immunogold cytochemistry (Joshi, 1993; Kiss and McDonald, 1993) จากการทดลองนี้ทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับการกระจายของฮอร์โมนที่คล้าย GH, FSH และ LH ในปมประสาท cerebral, pleuropedal และ visceral

#### 5.4.4 การวิเคราะห์สารฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ในปมประสาทโดยวิธี immunoblotting

ตัดปมประสาท cerebral และ pleuropedal จากหอยตัวเต็มวัย รวบรวมปมประสาทประมาณ 10-20 ปมต่อหนึ่งตัวอย่าง แล้วนำไปบดให้ละเอียดโดยวิธี mechanical homogenization และ ultrasonication สกัดสารจากปมประสาทโดย physiological saline แล้วนำไปแยกหาแถบโปรตีนและไกลโคโปรตีนด้วยวิธี 12.5% SDS-PAGE ย้ายแถบโปรตีนและไกลโคโปรตีนลงไปในแผ่น nitrocellulose โดยวิธี electroblotting แล้วย้อมแผ่น nitrocellulose ด้วยสีย้อมโปรตีน amido black หลังจากนั้นจะทำการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของแถบโปรตีนกับไกลโคโปรตีนต่างๆ ซึ่งอาจจะเป็นสารฮอร์โมนในต่อม โดยการใช้กรรมวิธี immunoblotting (Towbin *et al.*, 1979; Legocki and Verma, 1981) กล่าวคือ แยกสารโปรตีนและไกลโคโปรตีนจากปมประสาทดังกล่าวข้างต้นด้วย 12.5% SDS-PAGE แล้วย้ายแถบโมเลกุล

เหล่านี้ลงบนแผ่น nitrocellulose (NC) แชนแผ่น NC ใน non-immune serum ของหนูหรือกระต่าย แล้วแชนแผ่น NC ในสารละลายที่มีแอนติบอดีของหนูหรือกระต่ายต่อฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองของมนุษย์ ซึ่งได้แก่ growth hormone (GH), insulin, luteinizing hormone (LH) และ follicle stimulating hormone (FSH) นอกจากนี้ยังใช้แอนติบอดีของหนูต่อฮอร์โมนของต่อมใต้สมองในกบย้อมแผ่น NC ด้วย แชนแผ่น NC ที่มีแอนติบอดีต่อฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ เกาะอยู่ในสารละลายแอนติบอดีระดับสอง (เช่น goat anti-rabbit IgG หรือ rabbit anti-mouse IgG) ซึ่งติดสลาเข้ากับ HRP เพื่อย้อมหาแถบโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่มี epitopes ร่วมกับฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ ดังกล่าว แล้วเปรียบเทียบแถบสารฮอร์โมนที่วิเคราะห์ได้กับแถบโมเลกุลโปรตีนและไกลโคโปรตีนที่ตรวจพบในชั้นแรก การที่คาดว่าจะสามารถใช้แอนติบอดีต่อฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและกบ เป็นตัววิเคราะห์หาแถบฮอร์โมนที่คล้ายคลึงกันในหอยเป่าฮือได้นั้น เนื่องจากการศึกษาพบว่าฮอร์โมนต่าง ๆ ในสัตว์เหล่านี้ ยังคงมีส่วนของโมเลกุลที่ยังอนุรักษ์ (conserved part) เนื่องมาจากมียีนที่ควบคุมการสร้างฮอร์โมนซึ่งยังมีส่วนของรหัสที่คล้ายคลึงกัน (common ancestral genes) (Mathieu *et al.*, 1991; Morse, 1984; Paynter and Chen, 1991)

## 5.5 การศึกษากายวิภาคของระบบสืบพันธุ์และการผลิตเซลล์สืบพันธุ์ในระดับจุลทรรศน์ธรรมดาและจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

### 5.5.1 การศึกษาด้วยจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope)

สลบหอยเป่าฮือตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียด้วย  $MgCl_2$  แล้วตัด gonad ของหอยออกมาแช่น้ำยา Bouin เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เตรียมตัวอย่าง gonad โดยวิธีพาราฟิน แชนย้อมสี section ด้วย Harris' Hematoxylin และ eosin (ดูข้อ 5.3.1) แล้วศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา เพื่อสังเกตจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ และจำแนกชนิดตลอดจนความต่อเนื่องของเซลล์สืบพันธุ์ชั้นต่าง ๆ ซึ่งทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับขั้นตอนของเซลล์สืบพันธุ์และขบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอย

### 5.5.2 การศึกษาด้วยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Transmission Electron Microscope-TEM)

สลบหอยด้วย  $MgCl_2$  ตัด gonad เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปแช่ใน 2.5% glutaraldehyde ที่  $4^{\circ}C$  เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เตรียมตัวอย่าง gonad เพื่อสังเกตด้วย TEM (ตามวิธีในข้อ 5.3.2) ศึกษาโครงสร้างละเอียดของเซลล์สืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งทำให้เราเข้าใจลักษณะของเซลล์เหล่านี้โดยละเอียด ตลอดจนการพัฒนาระดับสภาพของเซลล์สืบพันธุ์ชั้นต่าง ๆ ขบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่ต่อเนื่องและสรีรวิทยาการสืบพันธุ์ของหอยเป่าฮือได้ดียิ่งขึ้น

## 5.6 การศึกษาวงจรการสืบพันธุ์ในหอยตัวเต็มวัยในรอบ 1 ปี

นอกจากการศึกษานิตและลักษณะของเซลล์สืบพันธุ์แล้ว เรายังได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยตัวเต็มวัยที่อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงฤดูกาลต่าง ๆ ตลอดปี โดยการคัดเลือกหอยตัวเต็มวัยทุก ๆ เดือนของช่วงปี แล้วนำมาเก็บตัวอย่าง gonads เพื่อเตรียม sections สำหรับศึกษาด้วยวิธีจุลทรรศน์ธรรมดา ทั้งนี้เพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับช่วงของปีที่หอยอาจจะมีการผลิตเซลล์สืบพันธุ์สูงที่สุดที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์โดยวิธีต่าง ๆ ต่อไป

## 5.7 การศึกษาการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์

5.7.1 เก็บตัวอย่างหอยเป่าฮืออายุต่าง ๆ กันตั้งแต่ 1, 2, 3 ถึง 12 เดือน ที่ได้จากการผสมพันธุ์ในบ่อโดยวิธีธรรมชาติ แล้วเลี้ยงในระบบปิดตามที่กล่าวมาแล้ว

### 5.7.2 การศึกษาในระดับจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope)

สลับหอยด้วย  $MgCl_2$  แล้วตัด cerebral ganglia, pleuropedal ganglia, visceral ganglia และ gonads ของหอย นำมาแช่ในน้ำยา Bouin เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เตรียมตัวอย่างโดยวิธีพาราฟินและย้อมสี section ด้วย Harris' Hematoxylin และ eosin (ตามวิธีในข้อ 5.3.1) แล้วศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาเพื่อเปรียบเทียบการพัฒนาด้านโครงสร้าง ปริมาณ และชนิดของเซลล์ของระบบประสาท และการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์และเซลล์สืบพันธุ์ในช่วงอายุต่าง ๆ ของหอย โดยเฉพาะช่วงที่เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์

## 6 ผลการทดลอง

### 6.1. มหายวิภาคของระบบประสาทและปมประสาท (รูปที่ 2 และ 3)

ระบบประสาทของหอยเป่าอื้อตัวเต็มวัยประกอบด้วยแท่งประสาท (nerve cords หรือ commissures) และใยประสาทเกี่ยวพัน (nerve connectives) ที่โยงระหว่างปมประสาท (nerve ganglia) ต่าง ๆ ที่สำคัญอยู่ 3 วง คือ cerebral nerve cords หรือ commissures ซึ่งโยงระหว่าง cerebral ganglia ทั้งสองด้าน โดยมีแท่งบน (dorsal cerebral commissure) และแท่งล่าง ventral cerebral commissure ล้อมรอบท่ออาหารส่วนต้น (esophagus) จาก cerebral ganglia มีเส้นประสาทที่สำคัญส่งไปทางด้านหน้า 2 คู่คือ optic nerves ไปสู่ตา และ tentacle nerves ไปสู่หนวด (tentacles) ซึ่งมีอยู่ 2 คู่ที่อยู่ด้านในต่อตา ได้แก่ คู่สั้นอยู่ติดกับก้านตา และคู่ยาวอยู่ในสุด ตรงกลางของ cerebral commissure อันล่างพองออกเป็น buccal ganglion ซึ่งเป็นปมประสาทขนาดเล็กที่ควบคุมกล้ามเนื้อ buccal mass สำหรับการเคี้ยวอาหาร

จาก cerebral ganglion แต่ละข้างมีแท่งประสาทคู่ เรียกว่า cerebropedal และ cerebropleural cords หรือ connectives โยงไปยัง pleuropedal ganglion ซึ่งเป็นปมประสาทขนาดใหญ่ที่อยู่ด้านหลังต่อ cerebral ganglia จาก pleuropedal ganglion มีวงของแท่งประสาทแยกออกไป 2 วง คือ visceral (หรือ abdominal) nerve cord โยงไปยัง visceral (หรือ abdominal ganglion) วงประสาท visceral มีลักษณะคล้ายเลข 8 จากการไขว้ของแท่งประสาท เนื่องจากการบิดตัวของหอย (torsion) จากวงประสาทนี้มีเส้นประสาทขนาดเล็กแตกออกไปเลี้ยงอวัยวะภายในของร่างกาย เช่น อวัยวะของระบบย่อยอาหารและระบบสืบพันธุ์ นอกจากนี้แล้วยังมีแท่งประสาทคู่ขนาดใหญ่จาก pleuropedal ganglion ทอดไปบนกล้ามเนื้อเท้า (pedal muscle) ของหอยตามแนวกลางของลำตัวซึ่งเรียกว่า pedal nerve cords มีเส้นประสาทเล็ก ๆ เชื่อมระหว่างคู่ของแท่งประสาท pedal nerve cord ทั้งสองเป็นระยะ ๆ pedal nerve cord เป็นแหล่งกำเนิดของเส้นประสาทขนาดเล็กจำนวนมากที่แตกออกไปเลี้ยงกล้ามเนื้อ pedal muscle ซึ่งเป็นกล้ามเนื้อขนาดใหญ่ที่มองเห็นจากด้านล่างของตัวหอย (รูปที่ 1) ซึ่งหอยใช้เป็นกล้ามเนื้อหลักในการเคลื่อนที่ไปมา

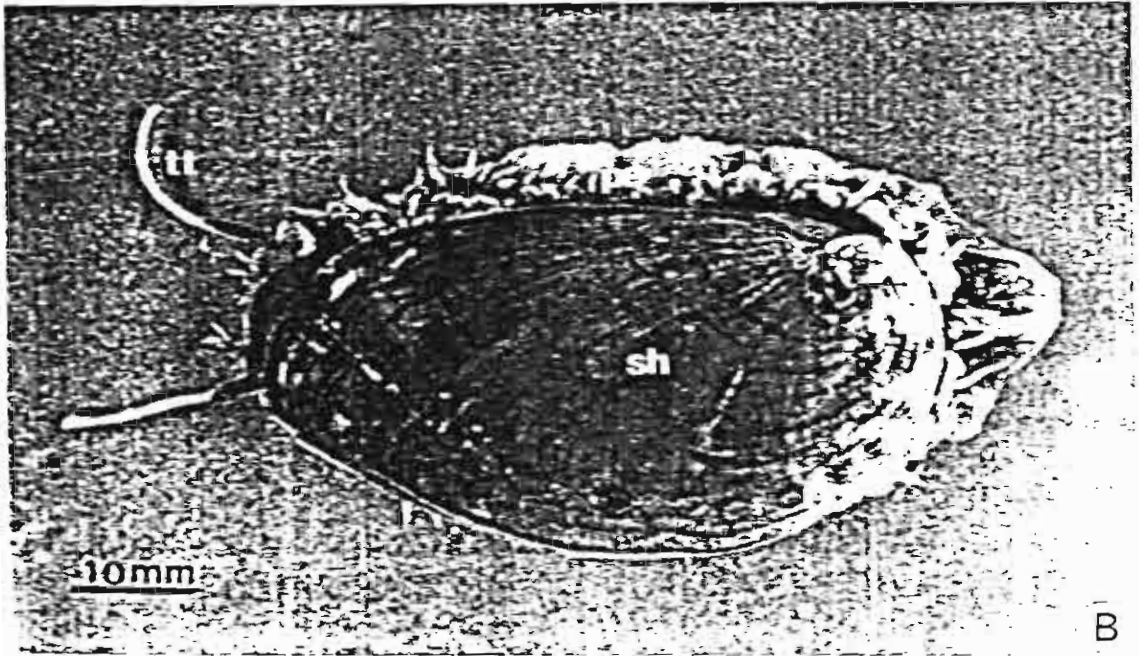
ปมประสาทที่มีขนาดใหญ่ และที่น่าจะมีความสำคัญมากในการควบคุมขบวนการทางสรีรวิทยาของหอยมีอยู่ 3 ปม คือ cerebral ganglia ทำหน้าที่คล้ายกับสมองของหอย ซึ่งเป็นศูนย์ประสาทบัญชาการที่รับทราบการกระตุ้นจากสิ่งเร้าภายนอกผ่านหน่วยรับสัมผัส (receptors) ต่าง ๆ เช่น จากตาโดยผ่าน optic nerve และจากหนวดโดยผ่าน tentacle nerve แล้วออกคำสั่งให้เกิดการตอบสนอง โดยส่งสัญญาณไปยัง pleuropedal ganglion และ pedal

nerve cord ซึ่งเป็นเสมือนหนึ่ง spinal cord ที่ควบคุม pedal muscle ซึ่งเป็นกล้ามเนื้อหลักในการเคลื่อนไหวของหอย จาก pleuropedal ganglion ยังมีเส้นประสาทที่แตกออกไปควบคุมอวัยวะภายในอีกด้วย นอกจากนั้นแล้วทั้งประสาทและปมประสาทซึ่งเป็นหน่วยหลักอีกแหล่งหนึ่งที่ส่งเส้นประสาทไปควบคุมอวัยวะภายใน คือ visceral หรือ abdominal cords และ ganglion ซึ่งเปรียบได้กับระบบประสาทอัตโนมัติ (autonomic nervous system) ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง

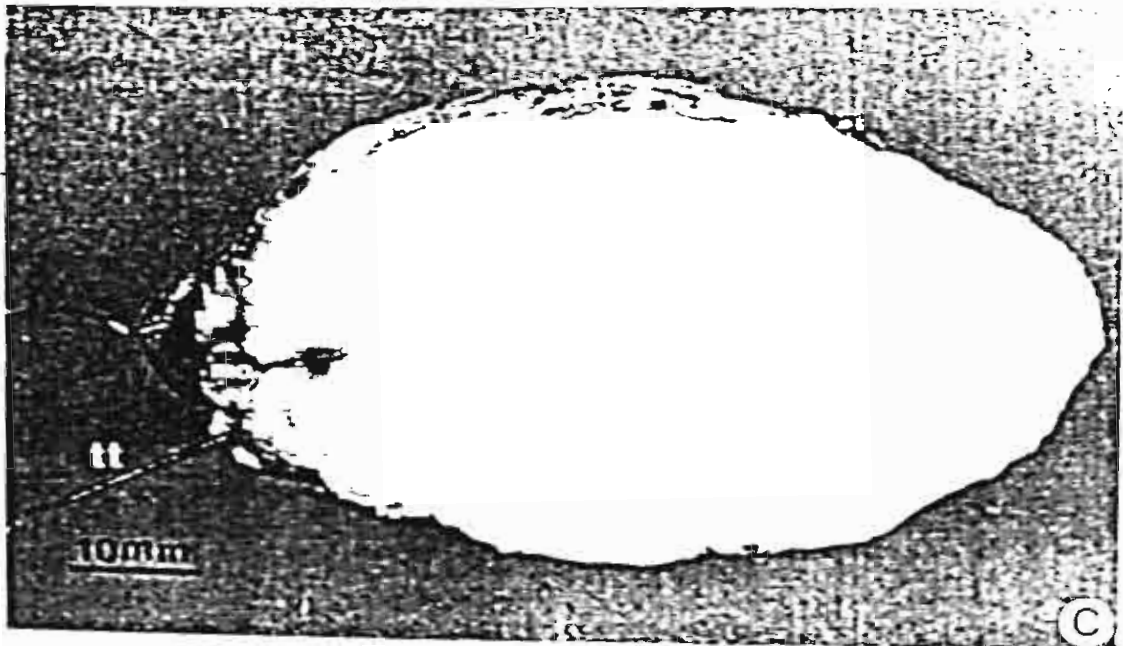
- รูปที่ 1 A) กลุ่มของหอยเป่าอื้ออายุประมาณ 18 เดือน ซึ่งเลี้ยงในถังซีเมนต์โดยใช้ระบบปิด  
B) หอยเป่าอื้อที่กำลังเคลื่อนไหว แสดงหนวด (tentacle-Tt) และเท้า (pedal muscle-Pe) คลุมโดยเปลือกแข็งที่มีรูหายใจเรียงเป็นแถว  
C) หอยเป่าอื้อที่ถูกหงายขึ้นเพื่อแสดงแผ่นกล้ามเนื้อเท้า (pedal muscle-Pe)
- รูปที่ 2 หอยเป่าอื้อที่ถูกผ่าแสดงตำแหน่งและลักษณะของปมประสาท cerebral ganglia (cg) และ cerebral commissure (cc) ซึ่งวางตัวอยู่รอบท่ออาหารส่วนต้น bc-buccal mass, sa-salivary gland
- รูปที่ 3 ภาพวาดแสดงมหกายวิภาคของระบบประสาท ซึ่งประกอบด้วยปมประสาท (ganglia) และแท่งประสาท (nerve cords) ต่าง ๆ



A



B



C

Figure 2

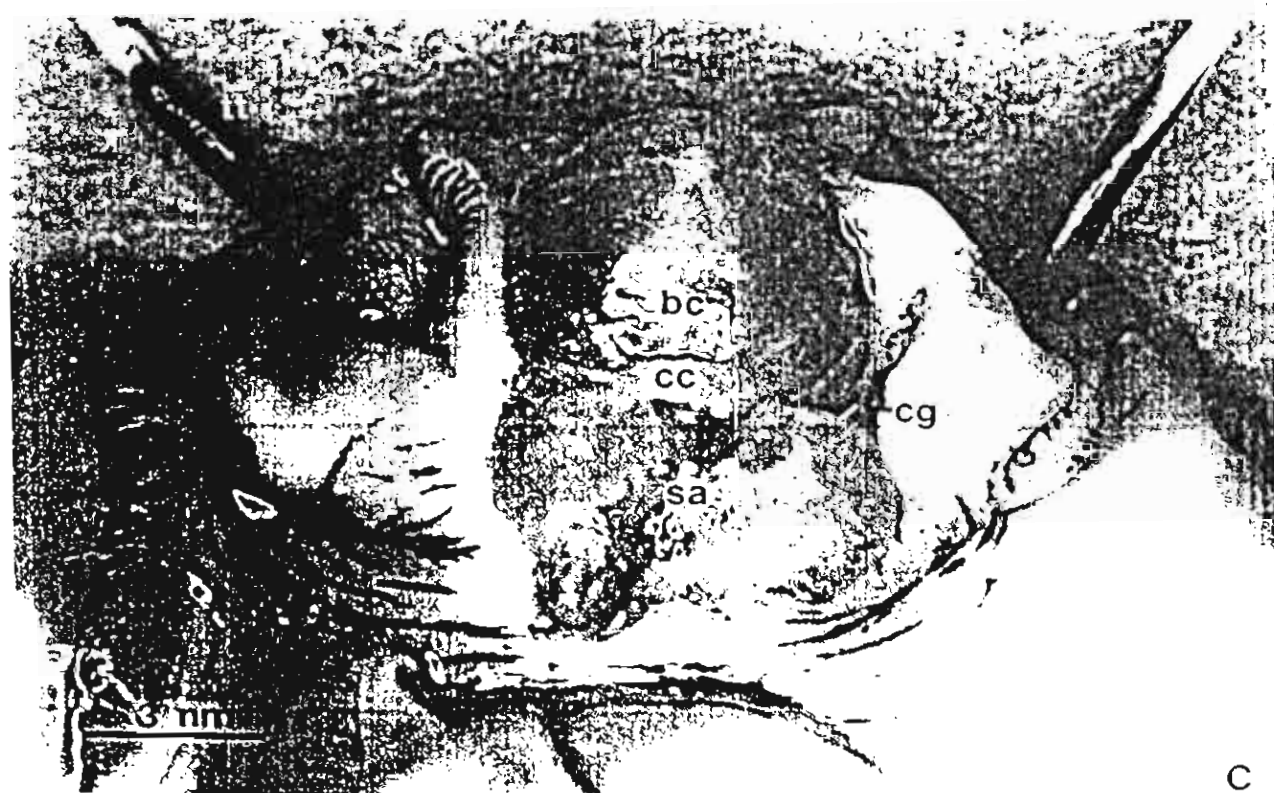
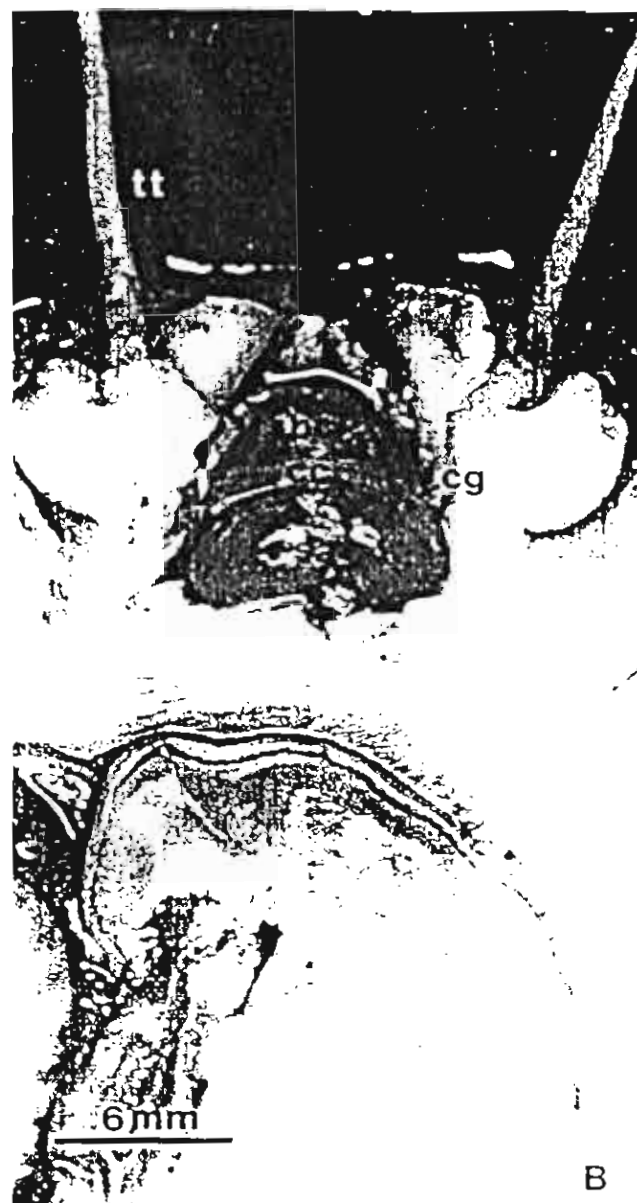
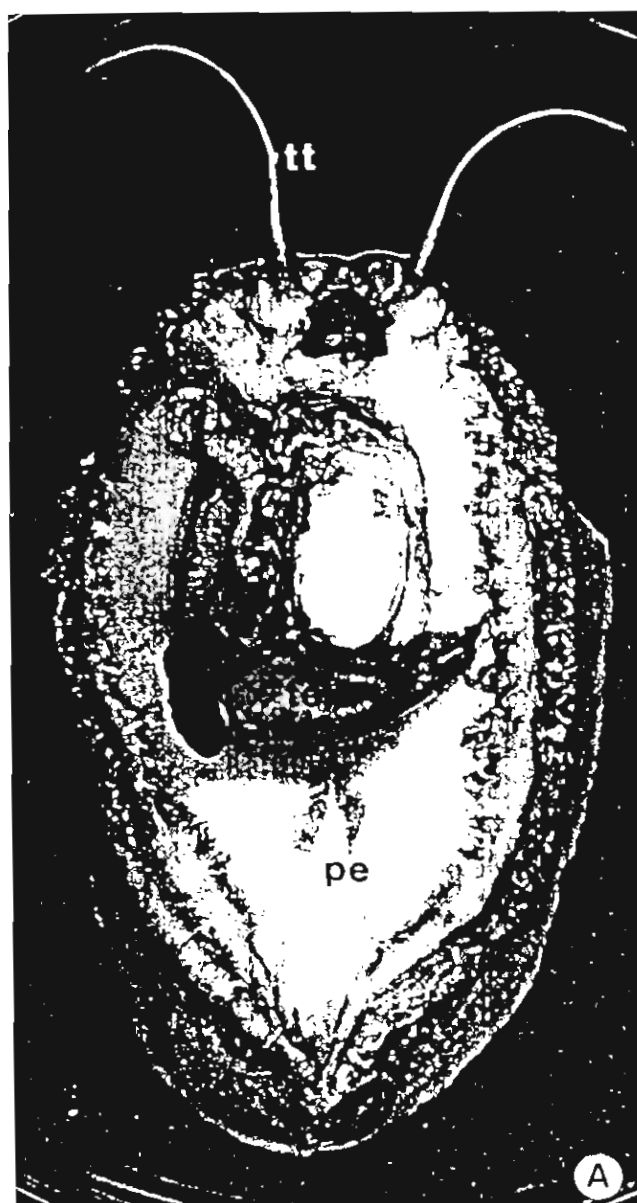
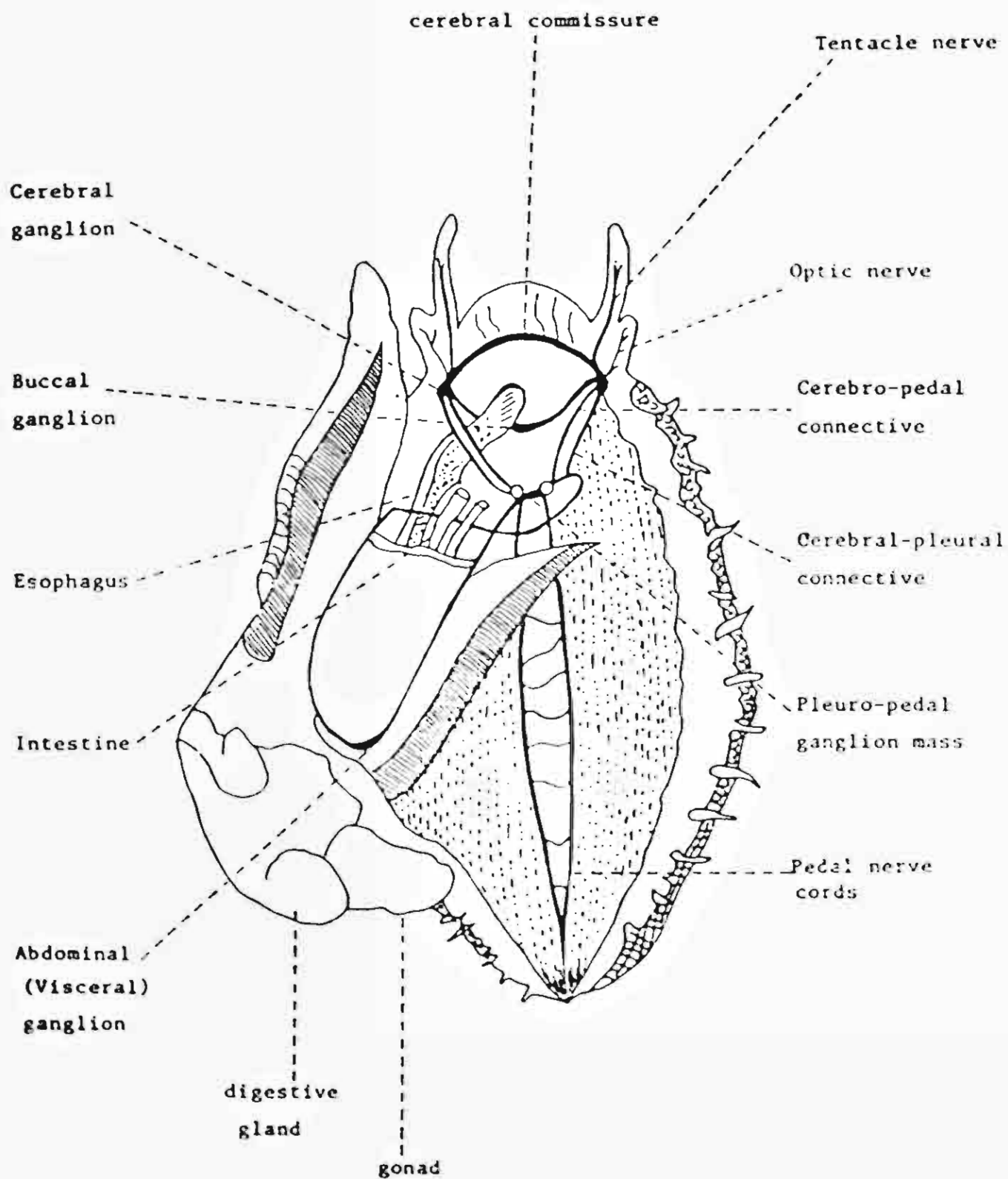


Figure 3



## 6.2. จุลกายวิภาคของปมประสาท

ปมประสาทที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมอวัยวะภายในและกระบวนการเจริญเติบโตกับการสืบพันธุ์ที่สามารถชี้ตำแหน่งได้ชัดเจน และได้ตัดออกมาศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคแล้วในรายงานนี้ คือ cerebral ganglia, pleuropedal ganglia และ visceral ganglia

### Cerebral ganglia (รูปที่ 4, 5, 6, 7, 8)

cerebral ganglia มีอยู่ข้างละ 1 ปม แต่ละปมมีลักษณะเป็นแท่งยาวแทรกอยู่ระหว่างชั้นผิวหนังและ dermis กับชั้นกล้ามเนื้อที่หุ้มรอบ jaw กับ radula (รูปที่ 4A-C) ส่วนบนและล่างของปมประสาททั้งคู่โยงต่อกันโดยแท่งประสาท dorsal และ ventral cerebral commissures cerebral ganglion ถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อเกี่ยวพันบาง ๆ (loose connective tissue) ซึ่งมีเส้นใยคอลลาเจน (collagen) สานไปมา และแนบชิดกับถุงหุ้มปมประสาทมีหลอดโลหิตฝอยบางหุ้มอยู่โดยรอบ (รูปที่ 4C; 5A) ขอบนอก (cortex) ของปมประสาทประกอบด้วยเซลล์ประสาท (neuron-NR) และเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neurosecretory cells-NS) ประปนกันอยู่ ชั้นของเซลล์เหล่านี้ตั้งอยู่บนแผ่น basement membrane บาง ๆ ซึ่งประกอบด้วยเยื่อเกี่ยวพันและสาร matrix ประปนกัน โดยมีส่วนที่ยื่นแทรกเข้าไปในเนื้อของ cerebral ganglion เพื่อเสริมความแข็งแรงทำให้ปมประสาทคงสภาพอยู่ได้ ชั้น cortex มีความหนาตามจำนวนชั้นของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปตามตำแหน่งต่าง ๆ โดยทั่วไปแล้วชั้น cortex ด้านขอบนอก (lateral edge) มีความหนามากกว่าทางขอบใน (medial edge) (รูปที่ 4C; 5A,B) ชั้น cortex มักจะหนาเป็นพิเศษในบริเวณขอบบน (dorsal horn) ขอบล่าง (ventral horn) และส่วนของขอบ ณ บริเวณที่มีรากของเส้นประสาทแตกออกไปจากปมประสาท ส่วนในรากของเส้นประสาทเองและใน commissure เปลือก cortex และชั้นของเซลล์ประสาท NR และ NS จะลดความหนาลงทันที (รูปที่ 4C) เนื้อในหรือ medulla ของ cerebral ganglion ประกอบด้วยมัดของใยประสาท (nerve bundles หรือ tracts) ที่ทอดไปตามความยาวของปมประสาทสอดแทรกด้วยใยประสาทที่วิ่งตามขวาง ภายในเนื้อ medulla มีเซลล์แทรกอยู่น้อยมาก ซึ่งส่วนมากเป็นเซลล์ขนาดเล็กที่มีนิวเคลียสเรียวและติดสีเข้ม (รูปที่ 5A,B; 6A,D)

### Pleuropedal ganglia (รูปที่ 9, 10, 11, 12)

ปมประสาท pleuropedal เป็นปมประสาทขนาดใหญ่ มีตำแหน่งค่อนข้างไปทางด้านหน้าของตัวหอยและแทรกอยู่ระหว่างกล้ามเนื้อ pedal muscle ซึ่งอยู่ทางด้านล่าง (ventral side) ต่อปมประสาท และกลุ่มของอวัยวะภายในซึ่งอยู่ด้านบน (dorsal side) ต่อปมประสาท pleuropedal ganglion มีลักษณะคล้ายรูปตัวอักษร H โดยมีเขา (horns) อยู่ 4 ข้าง ตัวปมประสาทถูกล้อมรอบด้วยถุงหุ้มที่เป็นเยื่อเกี่ยวพันแบบหลวม และชิดกับถุงหุ้มปมประสาทมี

ช่องว่างคล้ายหลอดเลือดแนบอยู่จำนวนมาก (รูปที่ 9A) เส้นประสาทจากปมประสาท pleuropedal แตกออกไปเลี้ยงกล้ามเนื้อ pedal muscle และอวัยวะที่อยู่ด้านบนต่อปมประสาท

ตัวปมประสาทประกอบด้วยเปลือกนอกหรือชั้น cortex และเนื้อในหรือชั้น medulla ชั้น cortex ประกอบด้วยของเซลล์ประสาทและเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน ซึ่งมีจำนวนชั้นและความหนาเปลี่ยนแปลงไปตามบริเวณต่าง ๆ โดยทั่วไปชั้น cortex ตามขอบด้านบน (dorsal edge) และด้านข้าง (lateral edge) ประกอบด้วยเซลล์ 4 ถึง 6 ชั้น ซึ่งหนากว่าขอบด้านล่าง (ventral edge) ที่ประกอบด้วยเซลล์เพียง 2-3 ชั้น (รูปที่ 9A,B) ภายใน medulla มีเส้นประสาทสานกันอยู่ทั่วไปทั้งในแนวนอนและแนวตั้ง โดยไม่ปรากฏเป็นมัดของเส้นประสาทขนาดใหญ่อย่างที่สังเกตได้ใน medulla ของ cerebral ganglia

ณ บริเวณที่มีเส้นประสาทแตกออกจากปมประสาท ชั้น cortex ของปมประสาท มักจะมีความหนาเป็นพิเศษ และเซลล์ประกอบด้วยทั้ง NR และ NS ส่วนในโคนของเส้นประสาทเอง ชั้น cortex ไม่เหลืออยู่เลย (รูปที่ 9C,D)

#### Visceral ganglia (รูปที่ 13, 14)

ปมประสาท visceral เป็นปมประสาทที่เป็นส่วนหลังสุดของ visceral nerve cord ซึ่งพองออกมา (รูปที่ 3) จากปมประสาทนี้ และจาก visceral nerve cord มีเส้นประสาทแตกแขนงออกไปเลี้ยงอวัยวะภายในของหอย ได้แก่ อวัยวะของระบบทางเดินอาหาร และระบบสืบพันธุ์ ปมประสาท visceral มีรูปร่างคล้าย dumbbell โดยมีส่วนด้านข้างพองออกทั้งสองข้างซึ่งเชื่อมต่อกันโดยท่อนกลาง (รูปที่ 13A) บริเวณ cortex ของด้าน lateral และ ventral ของกระเปาะทั้งสองด้าน และบางส่วนของด้าน ventral ของท่อนกลางมีความหนามากกว่าบริเวณอื่น โดยมีเซลล์อยู่ 2-3 ชั้น (รูปที่ 13B,C) ส่วนบริเวณที่เหลือมีชั้น cortex ที่บางมาก และบางแห่งอาจมีเพียงชั้นของ glia cells (NG<sub>2</sub>) เรียงตัวอยู่เพียงชั้นเดียว ภายในบริเวณ medulla ของปมประสาทมีมัดเล็ก ๆ ของเส้นประสาทสานกันไปมาทั้งตามยาวและตามขวาง โดยทั่วไปปมประสาท visceral มีจำนวนเซลล์ในชั้น cortex น้อยกว่าปมประสาท cerebral และ pleuropedal มาก

### 6.3 การจำแนกชนิดของเซลล์ในปมประสาทโดยการย้อมด้วยสีพิเศษ

#### Cerebral ganglia (รูปที่ 5, 6, 7, 8)

ขอบในของชั้น cortex ประกอบด้วยเซลล์ประสาท 1 หรือ 2-3 ชั้น โดยมีเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนปะปนอยู่น้อยมาก ส่วนที่ขอบบน ขอบล่าง และขอบนอกของชั้น cortex มีเซลล์อยู่ 4-5 ชั้น (รูปที่ 5B) ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ประสาทและเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนปะปนกันอยู่ โดยบริเวณขอบบนและขอบล่างมักมีจำนวนชั้นของเซลล์และปริมาณของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนมากกว่าบริเวณอื่น ๆ

จากการย้อมด้วยสีพิเศษชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Hematoxylin และ eosin (H & E), Gomori's stain หรือ chrome-hematoxylin-phloxine (CA), paraldehyde fuchsin (PF) ทำให้เราสามารถแยกชนิดของเซลล์ ตามลักษณะและการติดสีออกได้เป็น 10 ชนิด คือ เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนมี 3 ชนิด เซลล์ประสาทมี 4 ชนิด และเซลล์ประสาทที่เลี้ยง (neuroglia) มี 3 ชนิด

#### เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่หนึ่ง (NS<sub>1</sub>) (รูปที่ 5C,D; 6B-D; 8)

เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ประมาณ 10 x 20  $\mu\text{m}$  ตัวเซลล์มีรูปร่างรีคล้ายไข่ และมักเรียงตัวอยู่ด้านนอกสุดของชั้น cortex ติดกับชั้น basement membrane นิวเคลียสกลมขนาดประมาณ 8  $\mu\text{m}$  และอยู่ไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ นิวเคลียสมี euchromatin เกือบทั้งนิวเคลียส โดยมีขอบบาง ๆ ของ heterochromatin เกาะอยู่ตามด้านในของถุงหุ้มนิวเคลียส โครมาตินที่เหลือส่วนมากเป็น euchromatin ซึ่งมีลักษณะโปร่ง และเนื้อนิวคลีโอลัสซึม (nucleoplasm) ใสและโปร่งแสง จึงทำให้เห็นนิวคลีโอลัส (nucleolus) ซึ่งมีลักษณะเด่นชัดจนไซโตพลาสซึมคงรูปอยู่อย่างสมบูรณ์และแสดงขอบเขตชัดเจน เนื้อไซโตพลาสซึมติดสีชมพูแดงด้วยสี H & E (รูปที่ 6B-D) หรือสีชมพูม่วงด้วยสี CA (รูปที่ 7D) หรือปรากฏเป็นแกรนูลสีม่วงด้วยสี PF ซึ่งกระจายอยู่ทั่วไปในเนื้อไซโตพลาสซึม

#### เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่สอง (NS<sub>2</sub>) (รูปที่ 5C,D; 6B-D; 8)

เป็นเซลล์ที่เล็กกว่า NS<sub>1</sub> และกระจายอยู่ในชั้นเดียวกันกับ NS<sub>1</sub> และชั้นถัดเข้าไปเซลล์ NS<sub>2</sub> มีขนาดของตัวเซลล์ประมาณ 10 x 12  $\mu\text{m}$  และมีขนาดของนิวเคลียสประมาณ 7  $\mu\text{m}$  ภายในนิวเคลียสมีก้อนหนาของ heterochromatin เกาะอยู่ตามขอบในของเยื่อหุ้มนิวเคลียสและบางก้อนกระจายอยู่ในส่วนกลางของนิวเคลียส ทำให้มีลักษณะดูคล้ายหน้าปัทมนาฬิกา (clock-faced pattern) นิวคลีโอลัสไม่เด่นชัด ไซโตพลาสซึมมีรูปร่างเป็นวงรี เนื้อไซโตพลาสซึมมีลักษณะการติดสีเช่นเดียวกับ NS<sub>1</sub> โดยก้อนแกรนูลอาจจะมีจำนวนน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ NS<sub>1</sub>,

#### เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 3 (NS<sub>3</sub>) (รูปที่ 5C; 6B-D; 7D; 8)

เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กที่สุดในกลุ่ม NS เซลล์ โดยมีรูปไข่หรือสามเหลี่ยมขนาดประมาณ 8 x 10  $\mu\text{m}$  นิวเคลียสมีแท่ง heterochromatin หนาแน่นต่อกันไปมา จึงปรากฏคล้ายเป็นร่างแหทั้งนิวเคลียส นิวคลีโอลัสไม่ปรากฏ ไซโตพลาสซึมมักมีก้อนแกรนูลขนาดใหญ่ รูปร่างไม่แน่นอนอัดอยู่เต็มเซลล์

#### เซลล์ประสาทขนาดยักษ์ (Giant neuron-NR<sub>1</sub>) (รูปที่ 5D; 6D; 7C,D; 8)

เป็นเซลล์ประสาทขนาดใหญ่ มีรูปร่างคล้ายกับปิระมิด (pyramidal shape) โดยมีขนาดของเซลล์ประมาณ 15 x 30  $\mu\text{m}$  นิวเคลียสมีรูปร่างกลมขนาดประมาณ 10  $\mu\text{m}$

มี euchromatin เกือบทั้งหมด และมีนิวคลีโอลัสเด่น ไฮโดรพลาสซึมด้านฐานกว้างและตั้งอยู่บน basement membrane ด้านปลายเรียวและยื่นเข้าไปในเนื้อ medulla ไฮโดรพลาสซึมติดสีแดงชมพูอ่อน ๆ สม่ำเสมอจากสี H & E และสีชมพูม่วงเรื่อ ๆ จากสี CA และไมติดสี PF เลย จึงไม่แสดงแกรนูลอย่างสังเกตเห็นได้ในเซลล์ NS<sub>1</sub> และ NS<sub>2</sub>

#### เซลล์ประสาทชนิดที่สอง (NR<sub>2</sub>) (รูปที่ 5C,D; 6A-C; 8)

เป็นเซลล์ประสาทที่มีจำนวนมากที่สุด และเป็นเซลล์หลักของ cortex ซึ่งกระจายอยู่ในชั้นกลางของ cortex ตัวเซลล์และนิวเคลียสมีรูปร่างกลม โดยนิวเคลียสมีขนาดประมาณ 4-6  $\mu\text{m}$  เนื้อไฮโดรพลาสซึมที่ล้อมรอบนิวเคลียสมีขนาดเล็ก และไม่แสดงขอบเขตชัดเจน นิวเคลียสประกอบด้วยก้อน heterochromatin กระจายอยู่ทั่วไปอย่างสม่ำเสมอ

#### เซลล์ประสาทชนิดที่สาม (NR<sub>3</sub>) (รูปที่ 5C,D; 6A-C; 8)

เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กกว่า NR<sub>2</sub> เล็กน้อย และมักกระจายอยู่ที่ชั้นในสุดของ cortex นิวเคลียสมีขนาดประมาณ 3-4  $\mu\text{m}$  และมีรูปร่างรี ภายในมีก้อน heterochromatin ขนาดใหญ่และเข้มข้น อยู่ติดกันจนทำให้นิวเคลียสดูทึบกว่า NR<sub>2</sub>

เซลล์ประสาทชนิดที่ 4 (NR<sub>4</sub>) เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสกลมหรือรี ขนาดใกล้เคียงกับ NR<sub>2</sub> แต่ภายในนิวเคลียสประกอบด้วย euchromatin ซึ่งค่อนข้างใส แต่ขอบของนิวเคลียสมีแถบ heterochromatin ค่อนข้างหนา นิวเคลียสจึงมีลักษณะคล้ายวงแหวน (รูปที่ 6B) เซลล์ชนิดนี้มีจำนวนน้อยมากใน cerebral ganglia

#### เซลล์ประสาทฟิเลียชนิดที่ 1 (neuroglia 1-NG<sub>1</sub>) (รูปที่ 6B; 7D; 8)

เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสรูปร่างกระสวย (spindle-shaped) ขนาดเล็กประมาณ 3 x 6  $\mu\text{m}$  ขอบเรียบหรือหยักเล็กน้อย มีแถบ heterochromatin บาง ๆ เกาะอยู่ตามขอบในของถุงหุ้มนิวเคลียส ภายในนิวเคลียสโปร่งใส เซลล์ NG<sub>1</sub> นี้อาจเป็น neuroglia ชนิดหนึ่งที่แทรกอยู่ในชั้น cortex

#### เซลล์ประสาทฟิเลียชนิดที่ 2 (neuroglia 2-NG<sub>2</sub>) (รูปที่ 5C; 6A; 8)

เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างและขนาดของนิวเคลียสคล้ายกับเซลล์ NG<sub>1</sub> แต่โครมาตินที่บ่งแสงกว่า และเป็นเซลล์ที่เรียงตัวติดกับขอบในของ basement membrane โดยมักเรียงตัวเป็นแถวขนานกับเซลล์บุผิวหลอดเลือดฝอย (endothelial cells) และ fibroblast ที่อยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่รองรับ basement membrane

#### เซลล์ประสาทฟิเลียชนิดที่สาม (neuroglia 3-NG<sub>3</sub>) (รูปที่ 5B; 6A; 7B-D; 8)

เซลล์ชนิดนี้แทรกอยู่ระหว่าง nerve bundles และกระจายอยู่ทั่วไปในชั้น medulla ของปมประสาท นิวเคลียสมีรูปร่างคล้ายกระสวย (spindle) ขนาดเล็กที่สุดประมาณ 2-3  $\mu\text{m}$

และมี heterchromatin จัดอยู่แน่น จึงทำให้นิวเคลียสปรากฏทึบแสง เซลล์ชนิดนี้อาจจะเป็นกลุ่มเซลล์ประสาทที่เลี้ยง (neuroglia) อีกกลุ่มหนึ่งที่แทรกอยู่ทั่วไปกับใยประสาท และไฮโดพลาสซึมของมันมักแสดงกึ่งแทรกอยู่กึ่งกับใยประสาทในชั้น medulla เซลล์ชนิดนี้เป็นเพียงชนิดเดียวที่พบทั่ว ๆ ไปในเส้นประสาท

#### Pleuropedal ganglia (รูปที่ 9, 10, 11, 12)

จากการศึกษาในระดับจุลทรรศน์ธรรมดาด้วยสี H & E, Gomori (CA), และ PF สามารถจัดเซลล์ใน pleuropedal ganglion ออกได้เป็น 3 กลุ่มเช่นเดียวกับที่พบในปมประสาท cerebral คือ เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neurosecretory cell-NS) เซลล์ประสาท (neuron-NR) และเซลล์ประสาทที่เลี้ยง (neuroglia-NG)

**เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน มี 3 ชนิด ตามลักษณะของนิวเคลียสและขนาดของเซลล์ คือ**

#### เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 1 (NS<sub>1</sub>) (รูปที่ 9B-D; 10A-D; 11A)

เป็นเซลล์ NS ขนาดใหญ่ที่สุด โดยมีขนาดของเซลล์ประมาณ 10 x 20  $\mu\text{m}$  และขนาดของนิวเคลียสประมาณ 8  $\mu\text{m}$  นิวเคลียสอยู่ค่อนข้างไปด้านหนึ่งของเซลล์และประกอบด้วย euchromatin ส่วนมาก ยกเว้นแถบ heterochromatin บาง ๆ ติดอยู่กับด้านในของถุงหุ้มนิวเคลียส ตรงกลางนิวเคลียสอาจมีท่อนโครมาตินที่ไม่ค่อยทึบแสงนักกระจายอยู่ นิวเคลียสจึงมีลักษณะโปร่งแสงและแสดงนิวคลีโอลัสที่เล็กแต่เด่นชัด ไฮโดพลาสซึมมีรูปร่างกลมหรือรูปไข่แสดงขอบเขตชัดเจนและติดสีชมพูแดงโดยสี H & E ชมพูม่วงโดยสี CA (รูปที่ 10A-D; 11A) และมีแกรนูลสีม่วงโดยสี PF (รูปที่ 12B,C) เซลล์ NS<sub>1</sub> มักจะอยู่ติดกับด้านถุงหุ้มปมประสาท pleuropedal โดยวางตัวอยู่บนชั้น basement membrane

#### เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 2 (NS<sub>2</sub>) (รูปที่ 10A-D; 11A)

เป็นเซลล์ NS ขนาดรองลงมาจาก NS<sub>1</sub> ตัวเซลล์และนิวเคลียสมีรูปร่างกลม โดยตัวเซลล์มีขนาด 10 x 12  $\mu\text{m}$  และนิวเคลียสมีขนาด 7  $\mu\text{m}$  นิวเคลียสมีก้อน heterochromatin ขนาดเล็กและทึบแสง เกาะอยู่ตามขอบในของเยื่อหุ้มนิวเคลียสคล้ายหน้าปัทมนาฬิกา (clock-faced pattern) และมีบางก้อนกระจายอยู่ภายในนิวเคลียส นิวคลีโอลัสปรากฏทึบแสงมากขึ้น ไฮโดพลาสซึมติดสีเช่นเดียวกับ NS<sub>1</sub> แต่มีขนาดเล็กลง เซลล์ NS<sub>2</sub> มักจะอยู่ในชั้นถัดเข้าไปสู่ medulla จากเซลล์ NS<sub>1</sub>

#### เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 3 (NS<sub>3</sub>) (รูปที่ 10A-C)

เป็น NS ขนาดเล็กที่สุด โดยมีขนาดของเซลล์ประมาณ 8 x 10  $\mu\text{m}$  และขนาดของนิวเคลียสประมาณ 6  $\mu\text{m}$  นิวเคลียสมักจะอยู่กระเจิดไปด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์

ไฮโดรพลาสซึมติดสีคล้าย  $NS_1$  และ  $NS_2$  แต่ขอบเขตไม่ชัดเจน โครมาตินในนิวเคลียสปรากฏเป็นแถบ heterochromatin ที่หนาและยาวสานต่อกันไปมา โดยมีส่วนที่ปรากฏเป็นแถบหนาเกาะอยู่ตามขอบในของถุงหุ้มนิวเคลียส และส่วนที่เป็นแถบที่บวมไว้วางกันไปมาที่ปรากฏในส่วนกลางของนิวเคลียส

เซลล์  $NS_1$ ,  $NS_2$  และ  $NS_3$  มีลักษณะเช่นเดียวกับเซลล์  $NS$  ทั้งสามประเภทที่พบในปมประสาท cerebral แต่ในปมประสาท pleuropedal เซลล์ประสาทผลิตฮอริโมน  $NS_2$  และ  $NS_3$  มักมีจำนวนมากกว่าเซลล์  $NS_1$

**เซลล์ประสาท (neuron-NR)** แยกออกเป็น 4 ชนิดเช่นเดียวกับในปมประสาท cerebral กล่าวคือ

**เซลล์ประสาทขนาดยักษ์ ( $NR_1$ )** (รูปที่ 10C,D; 11A,B) เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่มาก โดยทั้งตัวเซลล์และนิวเคลียสอาจปรากฏเป็นรูปวงรี หรือตัวเซลล์เป็นรูปปิรามิดซึ่งมีกิ่งประสาทออกจากตัวเซลล์แทรกเข้าไปในชั้น medulla ขนาดของตัวเซลล์ประมาณ  $25 \times 40 \mu m$  และขนาดของนิวเคลียสประมาณ  $13 \mu m$  ภายในนิวเคลียสมีแถบ heterochromatin บาง ๆ และก้อนโครมาตินขนาดเล็กเกาะติดอยู่ตามขอบในของถุงหุ้มนิวเคลียส โครมาตินภายในส่วนที่เหลือของนิวเคลียสเป็น euchromatin เนื้อนิวคลีโอลัสมีลักษณะโปร่งแสง จึงทำให้นิวเคลียสโดยรวมค่อนข้างใส นิวคลีโอลัสปรากฏเด่นชัดและติดสีแดง ซึ่งชี้บ่งว่าน่าจะมี nucleolar activities เกิดขึ้นในอัตราสูง เซลล์  $NR_1$  มีลักษณะเช่นเดียวกับ  $NR_1$  ในปมประสาท cerebral แต่มีจำนวนมากกว่าและขนาดใหญ่กว่า

**เซลล์ประสาทชนิดที่สอง ( $NR_2$ )** (รูปที่ 10B; 11A,C,D)

เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสกลมขนาดประมาณ  $4-6 \mu m$  ไฮโดรพลาสซึมมีน้อยและไม่แสดงขอบเขตที่เด่นชัดเหมือนเซลล์  $NR_1$  ภายในนิวเคลียสมี heterochromatin ปรากฏเป็นแถบหนาอยู่ติดกับขอบในของถุงหุ้มนิวเคลียส และก้อนโครมาตินหนากระจ่ายในส่วนกลางของนิวเคลียส เนื้อนิวคลีโอลัสมีค่อนข้างโปร่งแสง เซลล์  $NR_2$  เป็นเซลล์ประสาทที่มีจำนวนมากที่สุดในชั้น cortex ของ pleuropedal ganglion เซลล์ชนิดนี้มีลักษณะเช่นเดียวกับเซลล์ประสาท  $NR_2$  ในปมประสาท cerebral

**เซลล์ประสาทชนิดที่สาม ( $NR_3$ )** (รูปที่ 10A,C,D; 11A,C,D)

เป็นเซลล์ประสาทที่มีลักษณะคล้ายเซลล์  $NR_2$  แต่นิวเคลียสมีรูปไข่และมีขนาดเล็กลงเหลือประมาณ  $3-5 \mu m$  โครมาตินขดพันเป็นก้อน heterochromatin หนา ปริมาณมากขึ้นเมื่อเทียบกับ  $NR_2$  และเนื้อนิวคลีโอลัสมีทึบแสงมากกว่า  $NR_2$  ภายในบางเซลล์โครมาตินขด

พันกันแน่นและปรากฏทึบแสงเกือบเต็มที่ เซลล์ชนิดนี้มีจำนวนรองจาก  $NR_2$  และมีลักษณะเช่นเดียวกับ  $NR_3$  ในปมประสาท cerebral แต่มีจำนวนมากกว่า

#### เซลล์ประสาทชนิดที่สี่ ( $NR_4$ ) (รูปที่ 10C)

เป็นเซลล์ที่มีจำนวนน้อยที่สุด โดยตัวเซลล์ไม่ปรากฏขอบเขตชัดเจน นิวเคลียสมีลักษณะกลมหรือรีขนาดประมาณ  $4-6\ \mu m$  ภายในมี heterochromatin เป็นแถบหนาเฉพาะตามขอบในของเยื่อหุ้มนิวเคลียส แต่เนื้อนิวคลีโอลัสสีเข้มและโครมาตินในส่วนกลางของนิวเคลียสโปร่งใส จึงทำให้เห็นนิวคลีโอลัสเด่นชัด เซลล์  $NR_4$  มีจำนวนน้อยมากในปมประสาท cerebral เมื่อเทียบกับปมประสาท pleuropedal

#### เซลล์กลุ่ม neuroglia-NG แยกออกได้เป็น 3 ชนิด คือ

##### เซลล์ neuroglia ชนิดที่หนึ่ง ( $NG_1$ ) (รูปที่ 10B; 11A,C)

เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสรูปกระสวย โดยมีขนาดประมาณ  $3 \times 6\ \mu m$  มีขอบนิวเคลียสเรียบหรือหยักไปมาเล็กน้อย โครมาตินปรากฏเป็นแถบบาง ๆ เกาะติดอยู่ตามขอบในของถุงหุ้มนิวเคลียส โครมาตินในส่วนกลางของนิวเคลียสและเนื้อนิวคลีโอลัสสีเข้มโปร่งแสง ส่วนเนื้อไซโตพลาสซึมและขอบของมันไม่ปรากฏชัดเจน เซลล์ชนิดนี้แทรกอยู่กับ NS และ NR ในระดับต่าง ๆ ของ cortex และเซลล์กลุ่มนี้มีลักษณะเช่นเดียวกับ  $NG_1$  ในปมประสาท cerebral

##### เซลล์ neuroglia ชนิดที่สอง ( $NG_2$ ) (รูปที่ 10B-D)

เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสรูปกระสวยคล้าย  $NG_1$  ซึ่งแบน ยาว เรียว แต่มีโครมาตินทึบแสงกว่าเซลล์  $NG_1$  เซลล์กลุ่มนี้มักเกาะเป็นแนวอยู่ตามขอบในของถุงหุ้มปมประสาท pleuropedal โดยปรากฏเป็นชั้นชัดเจนแยกจากเซลล์บุผิวของหลอดเลือด (endothelial cells) และเซลล์เยื่อเกี่ยวพัน (fibroblast) ซึ่งมักแทรกตัวอยู่ในเยื่อเกี่ยวพันของถุงหุ้ม เซลล์ชนิดนี้อาจจะเป็น neuroglia ที่ทำหน้าที่กั้นระหว่างส่วนของเนื้อเยื่อในระบบประสาทกับส่วนของเลือด (blood-brain barrier) ในหลอดเลือดฝอยที่หุ้มอยู่รอบ ๆ ปมประสาท

##### เซลล์ neuroglia ชนิดที่สาม ( $NG_3$ ) (รูปที่ 9B-D)

เป็นเซลล์ขนาดเล็กที่สุด นิวเคลียสรูปรีหรือรูปกระสวยขนาดประมาณ  $2-3\ \mu m$  ภายในมีโครมาตินขดพันกันแน่นและทึบแสงตลอด เซลล์  $NG_3$  มีมากที่สุดในกลุ่ม neuroglia และมีกระจายอยู่ทั่วไปทั้งในชั้น medulla หรือ neuropil ของปมประสาท pleuropedal โดยแทรกอยู่ระหว่างใยประสาทที่สานกันไปมา เซลล์กลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่ปรากฏในเส้นประสาทที่แตกออกมาจากปมประสาท และมีลักษณะเช่นเดียวกับเซลล์  $NG_3$  ใน neuropil ของปมประสาท cerebral

Visceral ganglia (รูปที่ 13, 14, 15, 16, 17)

เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neurosecretory cells-NS) เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนในปมประสาท visceral ที่สังเกตได้จากการย้อมด้วยสี Hematoxylin & eosin (H & E), Gomori (CA) และ Paraldehyde-fuschin (PF) มีอยู่ 3 ชนิด เช่นเดียวกับที่พบในปมประสาท cerebral และ pleuropedal กล่าวคือ

NS<sub>1</sub> เป็นเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนที่มีขนาดใหญ่ที่สุด โดยเซลล์มีขนาดประมาณ 15-17  $\mu\text{m}$  นิวเคลียสมีขนาดประมาณ 5-7  $\mu\text{m}$  และมีรูปร่างกลมเป็นแบบ vesicular โดยมีก้อน heterochromatin ขนาดเล็กเกาะตามขอบในของถุงหุ้มนิวเคลียส และมีท่อนหรือแถบบาง ๆ ของ heterochromatin กระจายอยู่ประปรายในนิวเคลียส ซึ่งมีนิวคลีโอปลาสซึมค่อนข้างใส นิวคลีโอลัสเด่นชัด (รูปที่ 14A) ไฮโดรปลาสซึมติดสีชมพูอ่อนโดยสี H & E (รูปที่ 14A) ติดสีชมพูเข้มปนม่วงโดยสี CA (รูปที่ 15C; 16A,C) และแสดงแกรนูลละเอียดติดสีม่วงโดยสี PF (รูปที่ 17C,D)

NS<sub>2</sub> เป็นเซลล์ที่มีขนาดประมาณ 8-13  $\mu\text{m}$  นิวเคลียสมีขนาดประมาณ 5-6  $\mu\text{m}$  รูปร่างกลม และมีการกระจายของก้อน heterochromatin เป็นแบบหน้าปัทมนาฬิกา (clock-faced pattern) เนื่องจากมีก้อน heterochromatin ค่อนข้างกลมที่มีขนาดใหญ่กระจายอยู่ตามขอบนิวเคลียส และบางส่วนกระจายอยู่ภายในนิวเคลียส (รูปที่ 14A,B) ไฮโดรปลาสซึมแสดงลักษณะการติดสีเช่นเดียวกับ NS<sub>1</sub> โดยสีทั้งสามชนิด

NS<sub>3</sub> เป็นเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนที่มีขนาดเล็กที่สุด โดยตัวเซลล์มีขนาดประมาณ 6-10  $\mu\text{m}$  นิวเคลียสมีขนาดประมาณ 4-6  $\mu\text{m}$  และมีรูปร่างรี heterochromatin ปรากฏเป็นขอบหนาตามด้านในของถุงหุ้มนิวเคลียส และมีลักษณะเป็นท่อนหรือเส้นหนาต่อเนื่องกันและสานกันไปมาในส่วนกลางของนิวเคลียส (รูปที่ 14B; 16A-C) ไฮโดรปลาสซึมมีลักษณะการติดสีเช่นเดียวกับ NS<sub>1</sub> และ NS<sub>2</sub> แต่ไฮโดรปลาสซึมมีปริมาณน้อยกว่า

เซลล์ประสาท (neuron-NR) เซลล์ประสาทมี 4 ชนิด ซึ่งมีขนาดและลักษณะเช่นเดียวกับที่พบในปมประสาท cerebral และ pleuropedal กล่าวคือ

NR<sub>1</sub> เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่สุดในปมประสาท โดยมีขนาดของเซลล์ประมาณ 25-30  $\mu\text{m}$  มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ประมาณ 10-12  $\mu\text{m}$  รูปร่างกลม และมีนิวคลีโอปลาสซึมใส เนื่องจากมีโครมาตินเป็นแบบ euchromatin ไฮโดรปลาสซึมติดสีชมพูจางและไม่มีแกรนูล (รูปที่ 14D; 16A,D) เซลล์เหล่านี้มีจำนวนน้อยมากเมื่อเทียบกับที่พบในปมประสาท pleuropedal และ pedal

NR<sub>2</sub> และ NR<sub>3</sub> เป็นเซลล์ประสาทขนาดเล็กประมาณ 4-6  $\mu$ m นิวเคลียสเป็นรูปไข่หรือค่อนข้างรี heterochromatin ปรากฏเป็นแถบหนาอยู่ตามขอบนิวเคลียสและสานกันอยู่ในส่วนกลางของนิวเคลียส โดยมีปริมาณ heterochromatin เพิ่มขึ้นตามลำดับจาก NR<sub>2</sub> ถึง NR<sub>3</sub>

NR<sub>4</sub> เป็นเซลล์ประสาทที่มีขนาดและรูปร่างใกล้เคียงกับ NR<sub>2</sub> และ NR<sub>3</sub> แต่มีแถบหนาของ heterochromatin เกาะอยู่ตามด้านในของถุงหุ้มนิวเคลียส โดยส่วนกลางของนิวเคลียสมีลักษณะใส และมีก้อน heterochromatin อยู่น้อยมาก (รูปที่ 14C) ส่วนไซโตพลาสซึมของ NR<sub>2</sub>, NR<sub>3</sub> และ NR<sub>4</sub> มีปริมาณน้อยมากจนไม่ปรากฏชัดเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

#### เซลล์ประสาทที่เลี้ยง neuroglia-NG

เซลล์ NG มีอยู่ 3 ชนิดเช่นเดียวกับที่พบในปมประสาท cerebral และ pleuropedal กล่าวคือ NG<sub>1</sub> เป็น neuroglia ที่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์ประสาทและเซลล์ประสาทผลิตฮอริโมนในชั้น cortex NG<sub>2</sub> วางตัวเป็นแนวประกบกับแผ่น basement membrane และถุงหุ้ม (capsule) ของปมประสาท ส่วน NG<sub>3</sub> เป็น neuroglia ที่แทรกอยู่ระหว่างเส้นประสาทในชั้น medulla ของปมประสาท (รูปที่ 14B-D; 16A,C) โดยทั่วไปแล้วทั้งเซลล์ NR และ NG มีปริมาณและความหนาแน่นน้อยกว่าในปมประสาท cerebral และ pleuropedal มาก

#### จุลกายวิภาคและชนิดของเซลล์ในปมประสาท Pedal cord

pedal cord ganglia เป็นปมประสาทที่ปรากฏเป็นคู่ ๆ อยู่เป็นระยะ ๆ ตามความยาวของ pedal cord (รูปที่ 3) มักมีเส้นประสาทขนาดใหญ่และยาว แตกแขนงออกจากปมประสาทและจาก pedal cord ไปเลี้ยงกล้ามเนื้อ pedal muscle ซึ่งอยู่ทางด้านล่างของปมประสาท ด้าน ventral ของปมประสาท pedal มีบริเวณ cortex หนา ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ประมาณ 4-5 ชั้น (รูปที่ 18A-C; 19B,C) เซลล์ NS, NR และ NG มีการจำแนกประเภทและลักษณะของเซลล์เช่นเดียวกับที่พบในปมประสาท cerebral และ pleuropedal (รูปที่ 21) โดยทั่วไปแล้วปมประสาท pedal cord มีเซลล์ NS<sub>3</sub> มากกว่าเซลล์ประสาทผลิตฮอริโมนชนิดอื่น ๆ (รูปที่ 20A-C) และเซลล์ NR<sub>1</sub> มีจำนวนและการกระจายที่หนาแน่นกว่าในปมประสาท visceral และ cerebral โดยเซลล์เหล่านี้มีขนาดใหญ่และมีลักษณะเช่นเดียวกับที่พบในปมประสาท pleuropedal (รูปที่ 18C; 20A,D) ส่วนเซลล์ NR<sub>2,4</sub> และ NG<sub>1,3</sub> มีลักษณะความหนาแน่นและการกระจายเช่นเดียวกับที่พบในปมประสาท cerebral และ pleuropedal

#### การเปรียบเทียบเซลล์ประสาทในปมประสาททั้งสามปม

โดยสรุปแล้ว เซลล์ประสาทและเซลล์ neuroglia ในปมประสาท cerebral, pleuropedal, visceral และ pedal cord ganglia มีชนิดและลักษณะคล้ายคลึงกัน กล่าวคือมีเซลล์ประสาท 3 ชนิดหลัก (NR<sub>1</sub>, NR<sub>2</sub>, NR<sub>3</sub>) และมีเซลล์ neuroglia 3 ชนิดเช่นกัน (NG<sub>1</sub>, NG<sub>2</sub>,

NG<sub>3</sub>) เซลล์ NG<sub>1</sub> กับ NG<sub>2</sub> อาจเป็นกลุ่มเดียวกันที่ทำหน้าที่คล้ายกับ astroglia ในระบบประสาทของสัตว์มีกระดูกสันหลัง ซึ่งเป็นทั้งแนวของ blood-brain barrier และเป็นเซลล์ที่เลี้ยงของเซลล์ประสาททั่วไปในชั้น cortex ด้วย ส่วน NG<sub>3</sub> อาจทำหน้าที่คล้ายกับ oligodendroglia ซึ่งสร้างเยื่อไมอีลิน (myelin) ทั้งในระบบประสาทกลางและในเส้นประสาทรอบนอก ส่วนเซลล์ประสาท NR<sub>1</sub> ซึ่งเป็น multipolar cell ขนาดใหญ่ อาจจะเป็น motor neuron ของระบบประสาท และเป็นที่น่าสังเกตว่ามันมีจำนวนมากเป็นพิเศษและขนาดใหญ่กว่าในปมประสาท pleuropedal ในขณะที่มีจำนวนน้อยและขนาดเล็กกว่าในปมประสาท cerebral และปมประสาท visceral ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากปมประสาท pleuropedal ทำหน้าที่ควบคุมกล้ามเนื้อเท้า (pedal muscle) ซึ่งเป็นกล้ามเนื้ออันใหญ่สุดของร่างกาย ซึ่งต้องมี motor neuron ขนาดใหญ่จำนวนมาก ส่วน NR<sub>2</sub>, NR<sub>3</sub> อาจจะเป็นกลุ่มของเซลล์ประสาทรับความรู้สึก (sensory neurons) และ/หรือเซลล์ประสาทประสานงาน (association neurons) ของปมประสาทดังกล่าว

- รูปที่ 4 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาแสดงตำแหน่งและลักษณะของปมประสาท cerebral โครงสร้างที่แสดงในภาพ ได้แก่ cg-cerebral ganglia, ra-radula, ja-jaw, mu-jaw muscle, ep-epithelium, ey-eyes, te-tentacle, ca-capillary
- รูปที่ 5 A&B) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำและปานกลางของส่วนตัดตามยาวของปมประสาท cerebral ที่ย้อมด้วยสี H & E แสดงขอบนอก (La) ขอบใน (Me) และขอบบน (Do) ขอบนอกและขอบบนมีชั้น cortex (Co) หนากว่าขอบใน C&D) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงแสดงชนิดของเซลล์ต่าง ๆ ในชั้น cortex ของขอบนอก
- รูปที่ 6 ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางของ section ของปมประสาท cerebral ที่ย้อมด้วยสี H & E (A) และกำลังขยายสูง (B,C,D) แสดงเซลล์ประเภทต่าง ๆ ในชั้น cortex ได้แก่ ns<sub>1</sub>-neurosecretory cell type 1, ns<sub>2</sub>-neurosecretory cell type 2, nr<sub>1</sub>-neuron type 1 (giant neuron), nr<sub>2</sub>-neuron type 2, nr<sub>3</sub>-neuron type 3, ng<sub>1</sub>-neuroglia type 1, ng<sub>2</sub>-neuroglia type 2, ng<sub>3</sub>-neuroglia type 3, np-neuropil, nt-nerve tract
- รูปที่ 7 ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำ (A) ปานกลาง (B) และสูง (C,D) ของปมประสาท cerebral ที่ย้อมด้วย Gomori stain แสดงเซลล์ชนิดต่าง ๆ ในชั้น cortex (Co) ของปมประสาท และชั้น medulla หรือ neuropil (Np)
- รูปที่ 8 ภาพวาดของชั้น cortex และ medulla ของปมประสาท cerebral แสดงเซลล์ประสาทผลิตภัณฑ์ฮอร์โมน (neurosecretory cells-ns) ซึ่งมี 3 ชนิด คือ ns<sub>1</sub> และ ns<sub>2</sub> เซลล์ประสาท (neuron-nr) ซึ่งมีอยู่ 4 ชนิด คือ nr<sub>1</sub>, nr<sub>2</sub>, nr<sub>3</sub> และ nr<sub>4</sub> กับเซลล์ประสาทที่เลี้ยง (neuroglia-ng) ซึ่งมี 3 ชนิด ng<sub>1</sub>, ng<sub>2</sub>, ng<sub>3</sub>

Figure 4

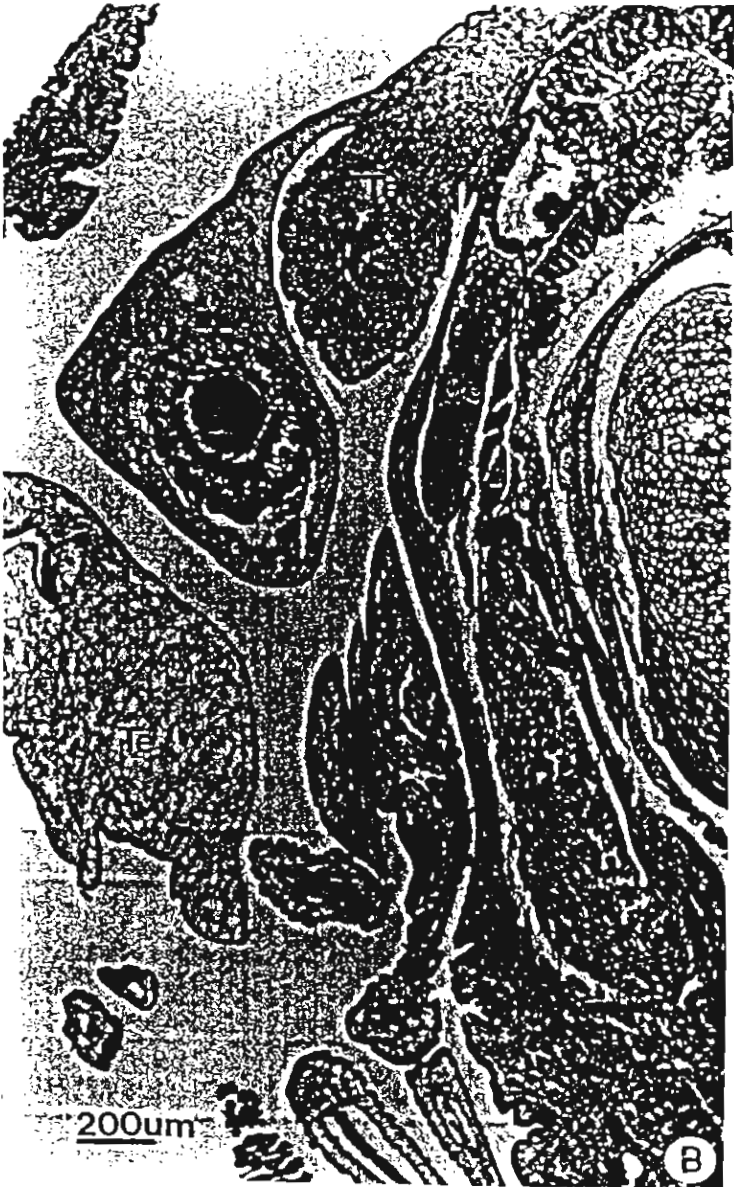
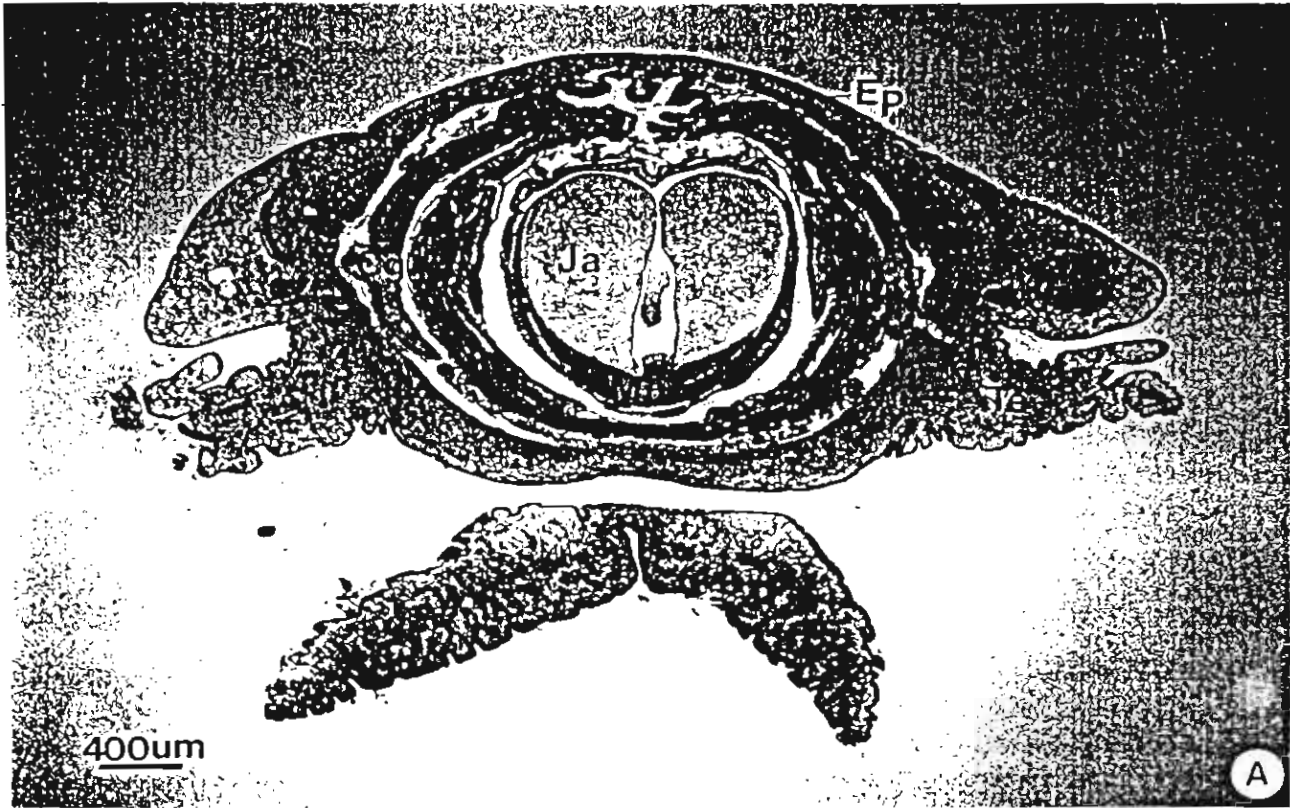
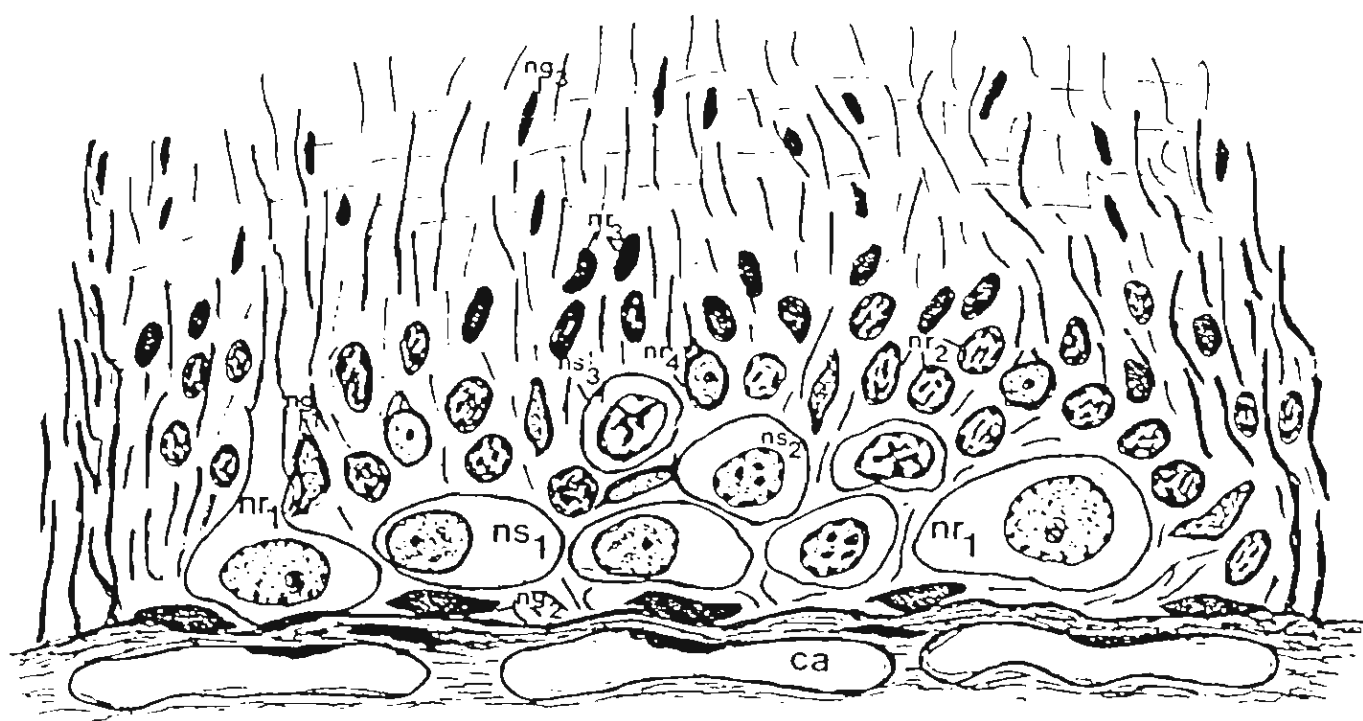


Figure 8



รูปที่ 9 ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำ (A) ปานกลาง (C) และสูง (B,D) ของปมประสาท pleuropedal ที่ย้อมด้วยสี Gomori แสดงขอบนอก (La) ขอบบน (Do) และขอบล่าง (Ve) ในรูป A ชั้น cortex ที่ขอบนอกและขอบบนหนากว่า cortex ที่ขอบล่าง (A,B) และชั้น cortex บริเวณที่เส้นประสาทแตกออกจากปมประสาท (ลูกศร) จะมีความหนาและจำนวนชั้นของเซลล์มากกว่าแห่งอื่น (C,D)

รูปที่ 10 ภาพถ่ายกำลังขยายสูงแสดงชั้น cortex ของปมประสาท pleuropedal ที่ย้อมด้วยสี Gomori แสดงเซลล์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ns<sub>1</sub>-neurosecretory cell type, ns<sub>2</sub>-neurosecretory cell type 2, ns<sub>3</sub>-neurosecretory cell type 3, nr<sub>1</sub>-neuron type 1, nr<sub>2</sub>-neuron type 2, nr<sub>3</sub>-neuron type 3, nr<sub>4</sub>-neuron type 4, ng<sub>1</sub>-neuroglia type 1, ng<sub>2</sub>-neuroglia type 2, ng<sub>3</sub>-neuroglia type 3, และโครงสร้างอื่น ๆ คือ ca-capillary, bm-basement membrane

รูปที่ 11 ภาพถ่ายกำลังขยายสูงของปมประสาท pleuropedal ซึ่งย้อมด้วยสี Gomori เพื่อแสดงเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neurosecretory cell-ns) เซลล์ประสาท (neuron-nr) และเซลล์ neuroglia (ng) ชนิดต่าง ๆ

รูปที่ 12 ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำ (A) ปานกลาง (B) และสูง (C,D) ของปมประสาท pleuropedal ซึ่งย้อมด้วยสี paraldehyde-fuschin แสดงการติดสีม่วงของแกรนูลในไซโตพลาสซึมของ neurosecretory cells (ns) (รูป B,C) ส่วน neuron (nr, nr<sub>1,2</sub>) ติดเพียงสีเขียว เช่นเดียวกับโครงสร้างอื่น ๆ (รูป C,D)

Figure 9

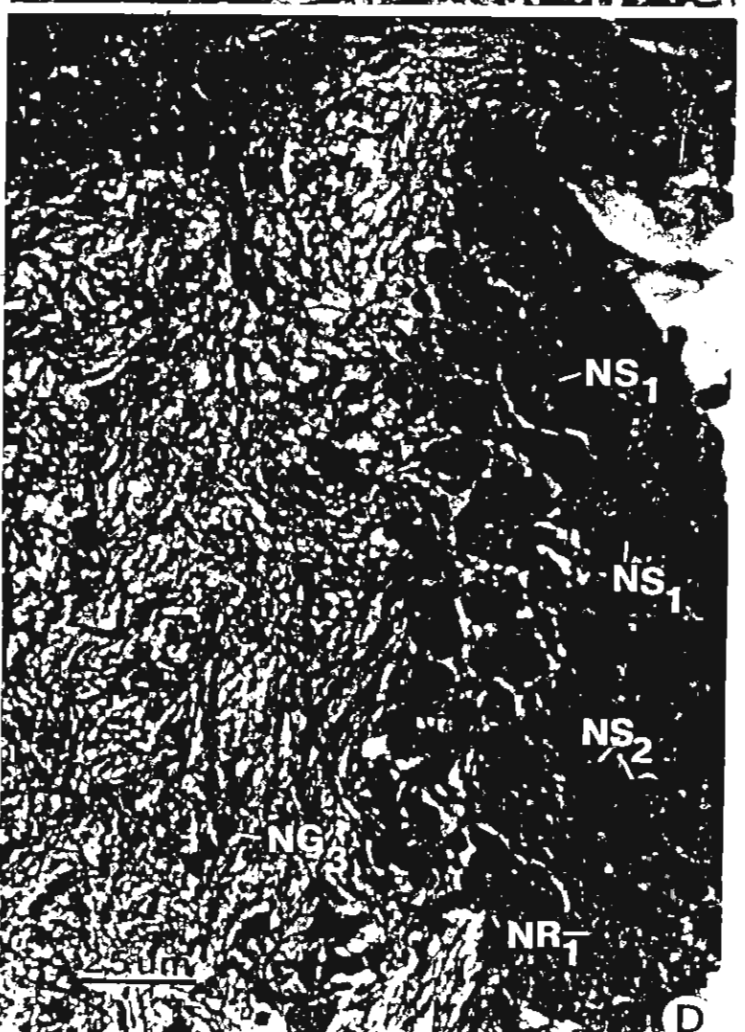
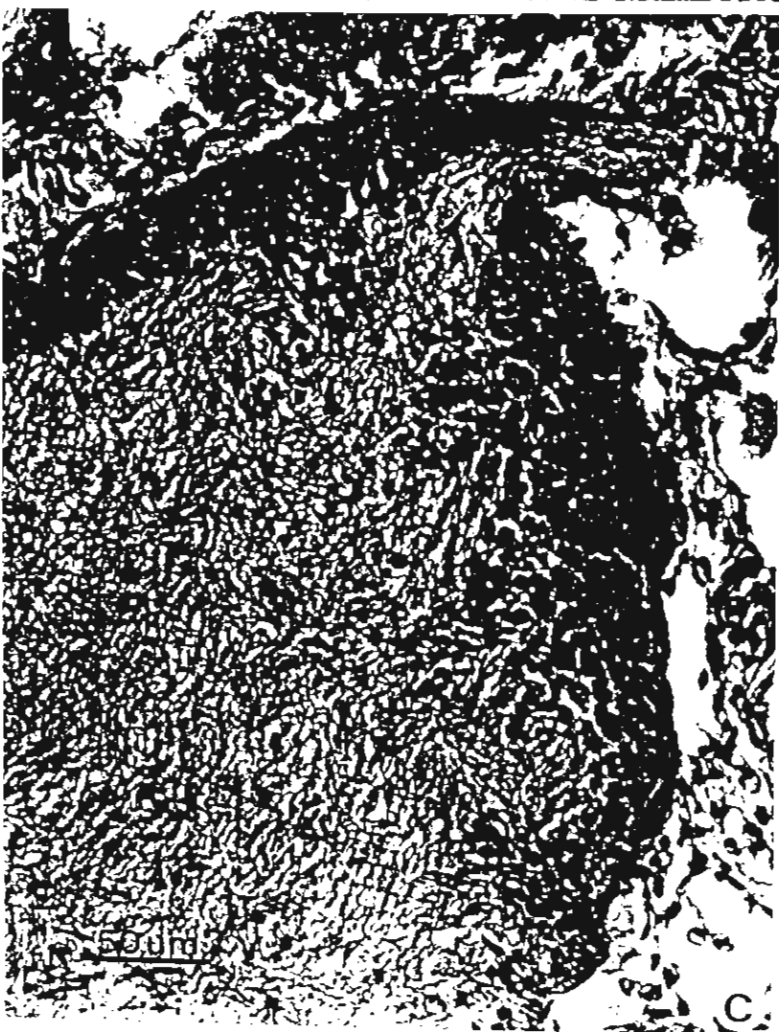
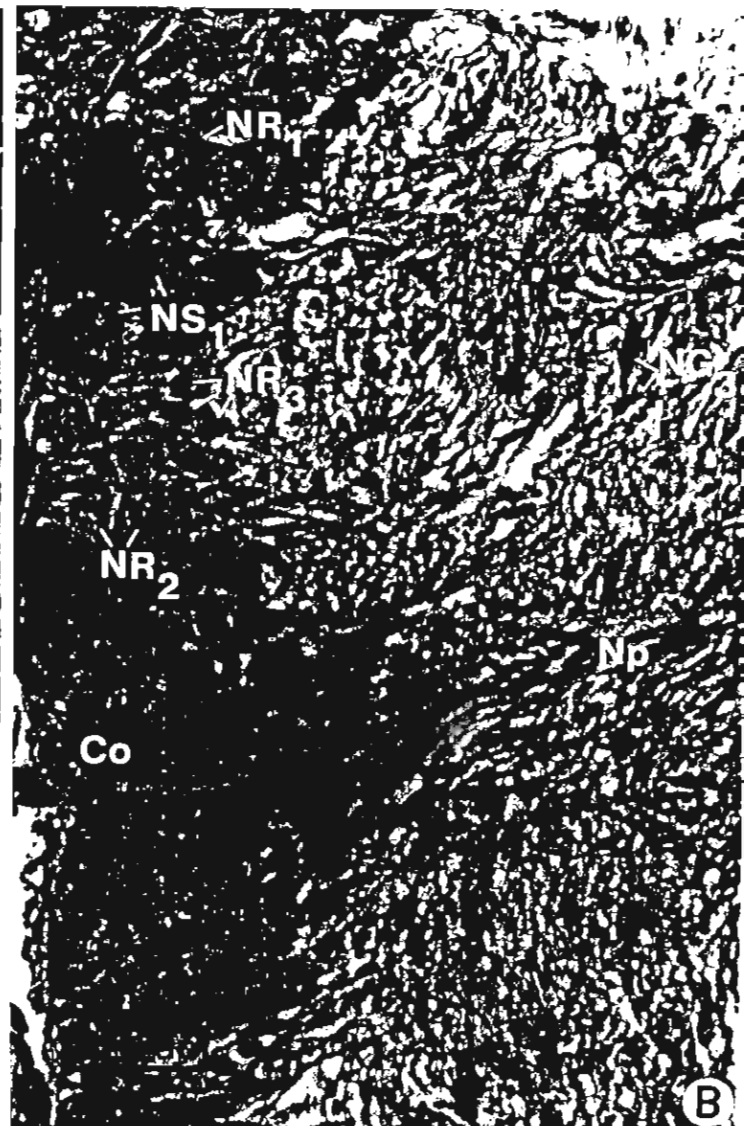


Figure 10

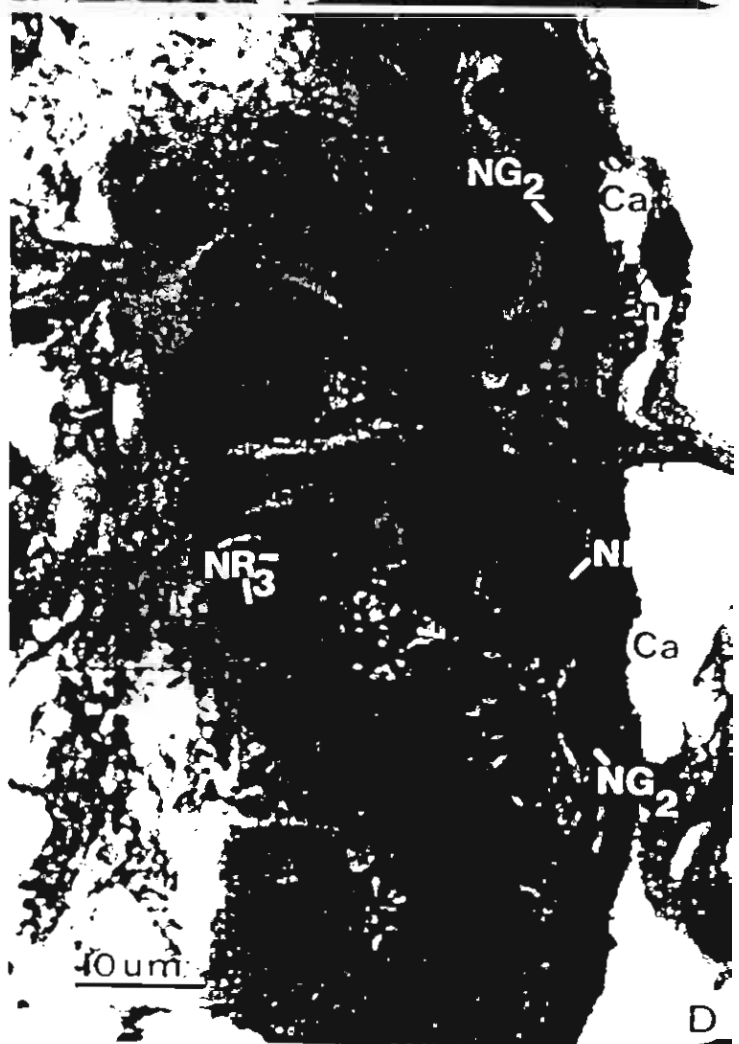
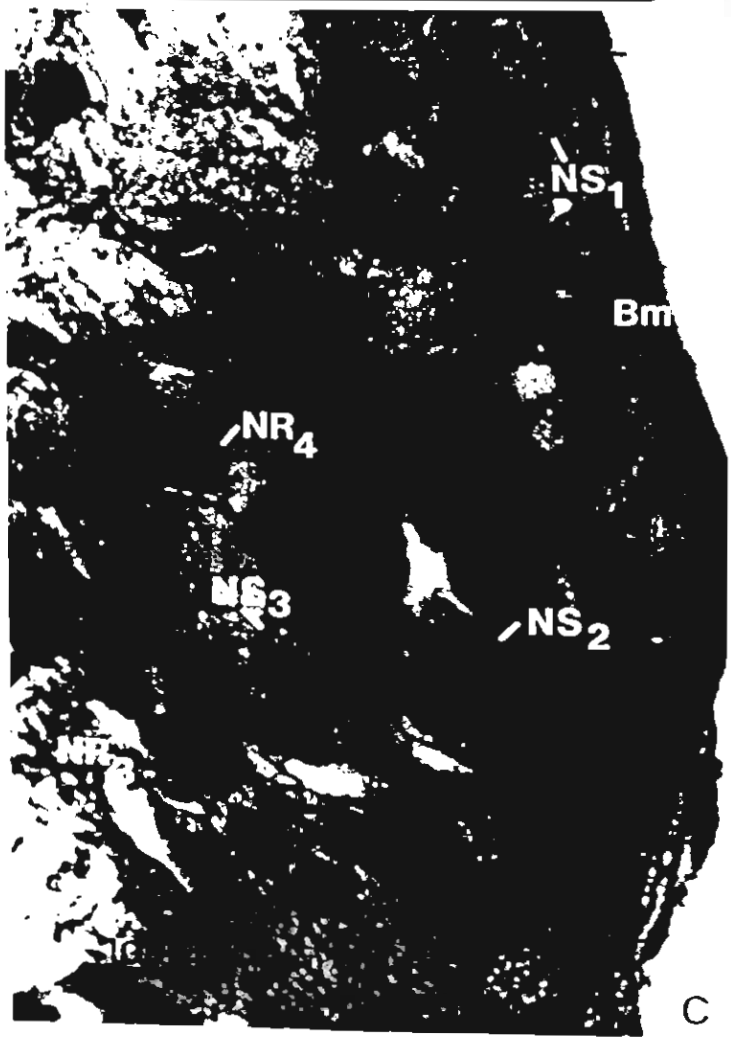
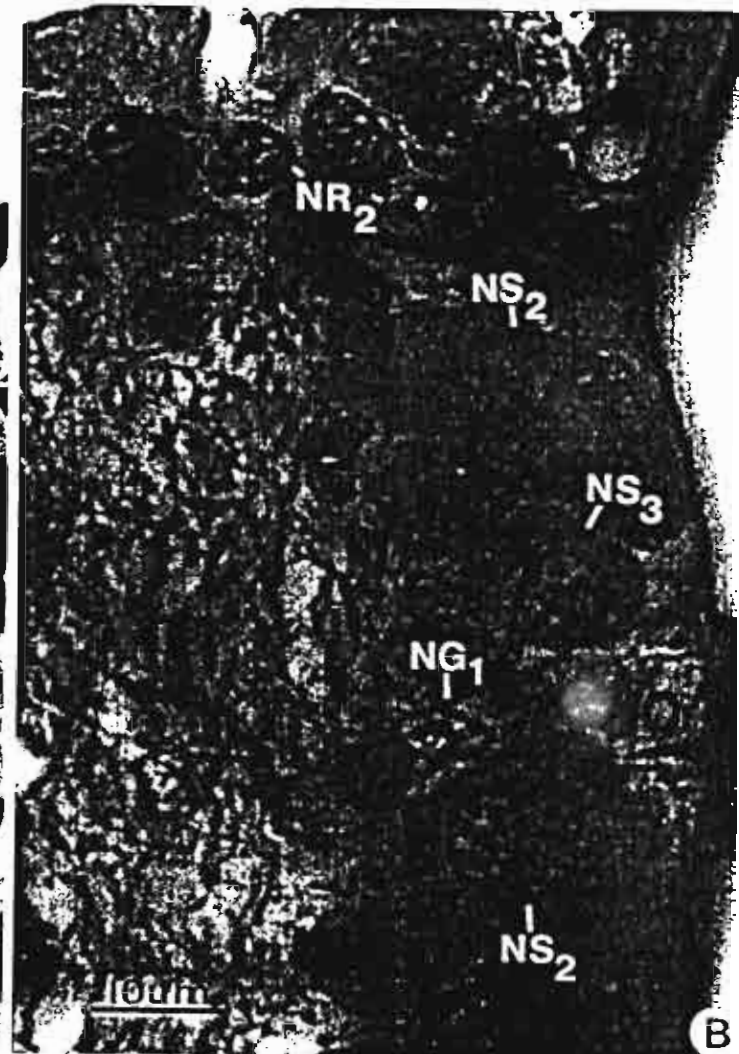
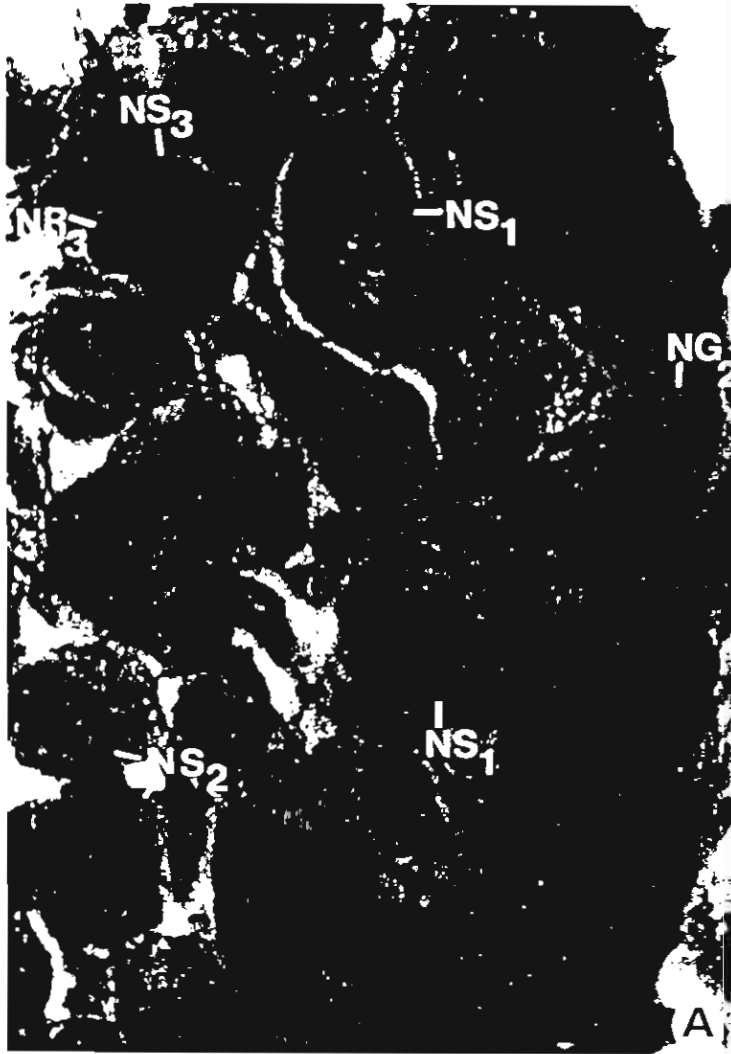


Figure 11

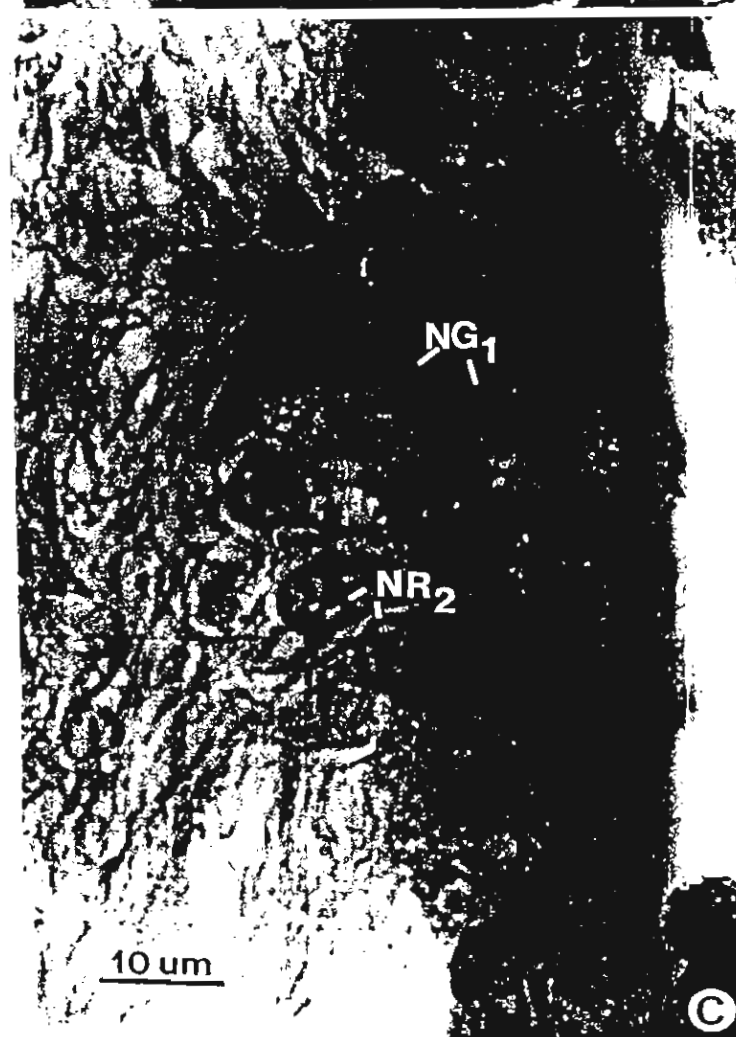
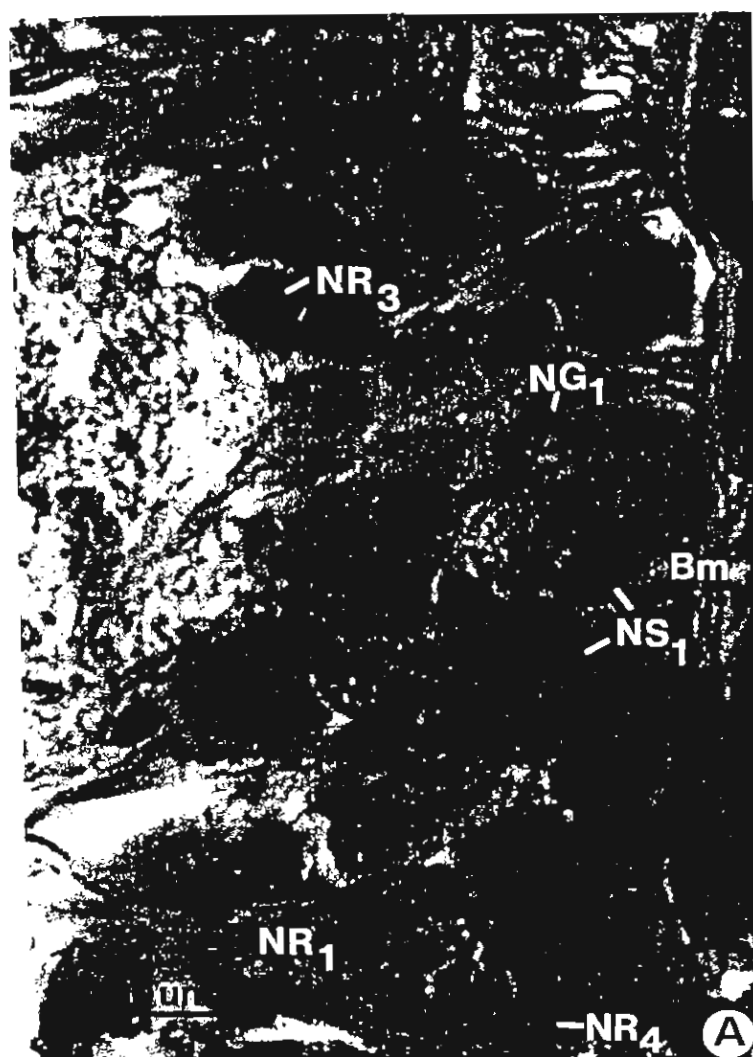


Figure 12



รูปที่ 13 ภาพกำลังขยายต่ำ (A) และ ปานกลาง (B,C) ของส่วนตัดขวางปมประสาท visceral ที่ย้อมด้วยสี H & E แสดงลักษณะคล้าย dumbbell และชั้น cortex มีความหนาเป็นพิเศษในบริเวณด้าน lateral และ ventral ของปมประสาท Bm-Basement membrane, Ca-capillary, Co-cortex, Gu-gut, Ma-mantle, Md-medulla, Mu-muscle, Np-neuropil, Nt-nerve tract, Vg-visceral ganglia

รูปที่ 14 ภาพกำลังขยายสูงของปมประสาท visceral ที่ย้อมด้วยสี H & E แสดงเซลล์ประสาทผลิตฮอริโมนชนิดต่าง ๆ ( $NS_1$ ,  $NS_2$ ,  $NS_3$ ) เซลล์ประสาท ( $NR_1$ ,  $NR_2$ ,  $NR_3$ ,  $NR_4$ ) และเซลล์ประสาทที่เลี้ยง ( $NG_1$ ,  $NG_2$ ,  $NG_3$ )

รูปที่ 15 ภาพกำลังขยายต่ำ (A) และ ปานกลาง (B,C) ของปมประสาท visceral ย้อมด้วยสี Gomori

รูปที่ 16 ภาพกำลังขยายสูงของปมประสาท visceral ย้อมด้วยสี Gomori แสดงเซลล์ประสาทผลิตฮอริโมน ( $NS_{1,3}$ ) เซลล์ประสาท ( $NR_{1,4}$ ) และเซลล์ประสาทที่เลี้ยง ( $NG_{1,3}$ )

รูปที่ 17 ภาพกำลังขยายต่ำ (A) และสูง (B,C) ของปมประสาท visceral ย้อมด้วยสี paraldehyde-fuschin เซลล์ติดสีม่วงคือ เซลล์ NS ซึ่งส่วนใหญ่อาจเป็น  $NS_3$

Figure 13

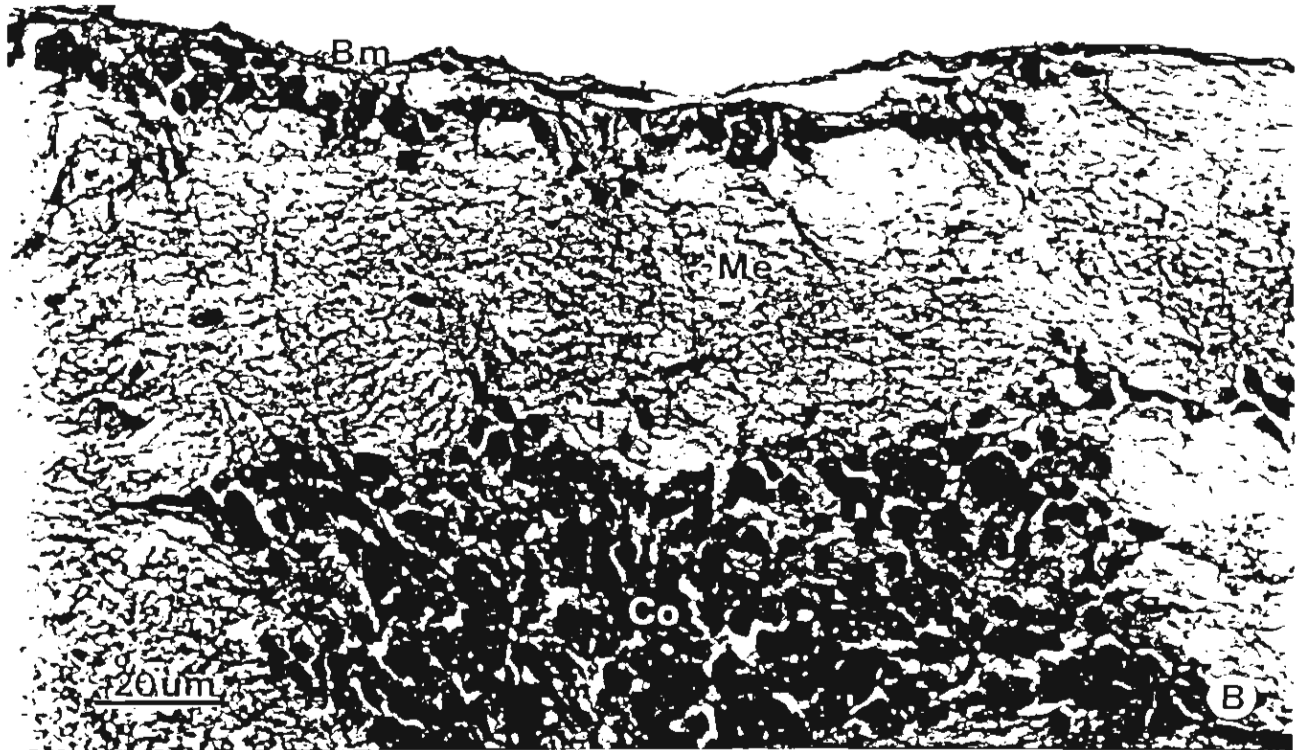
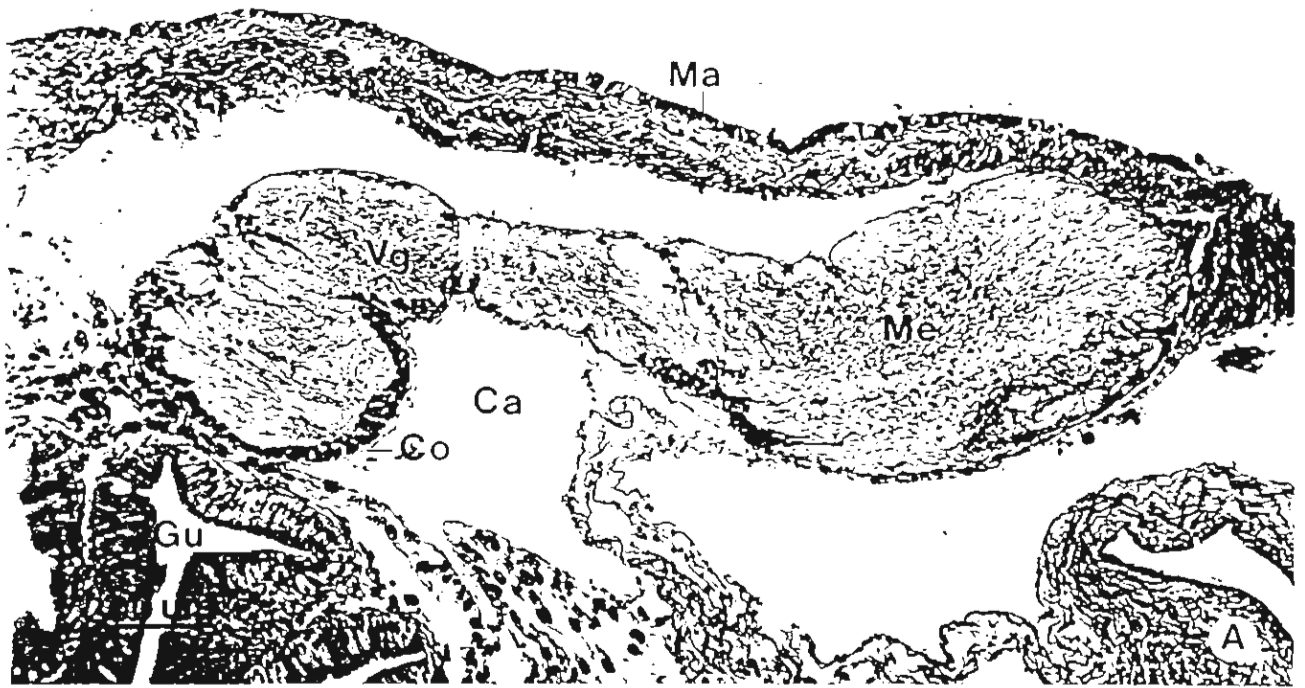
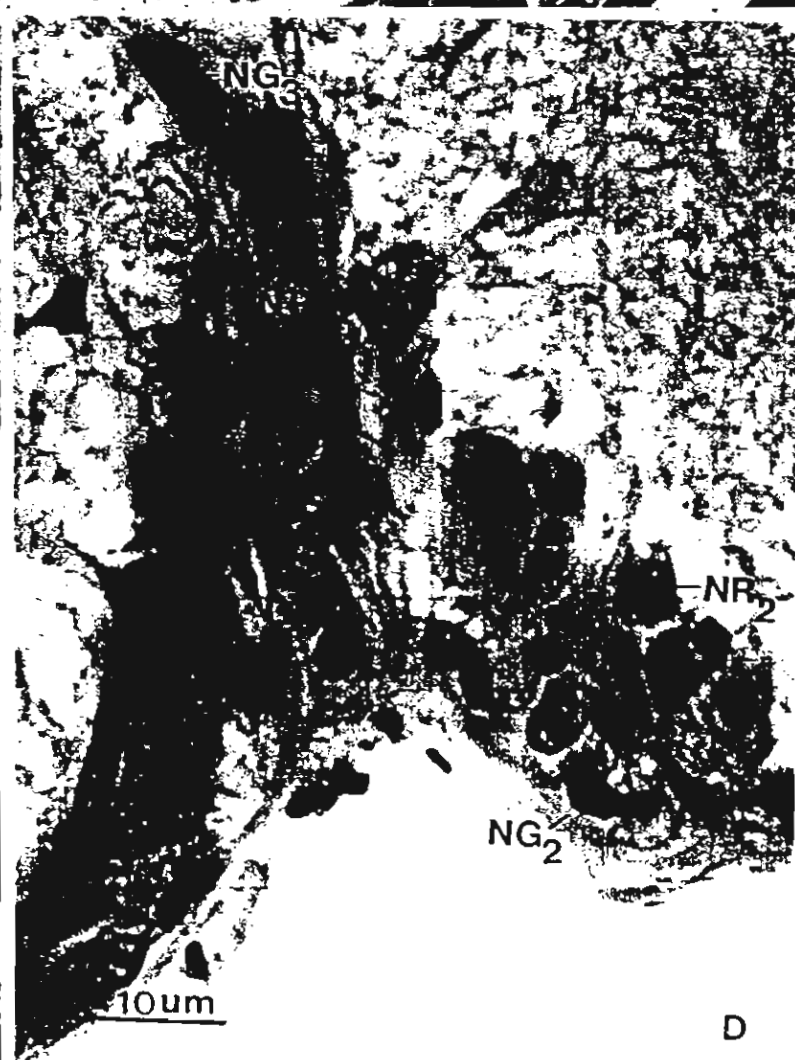
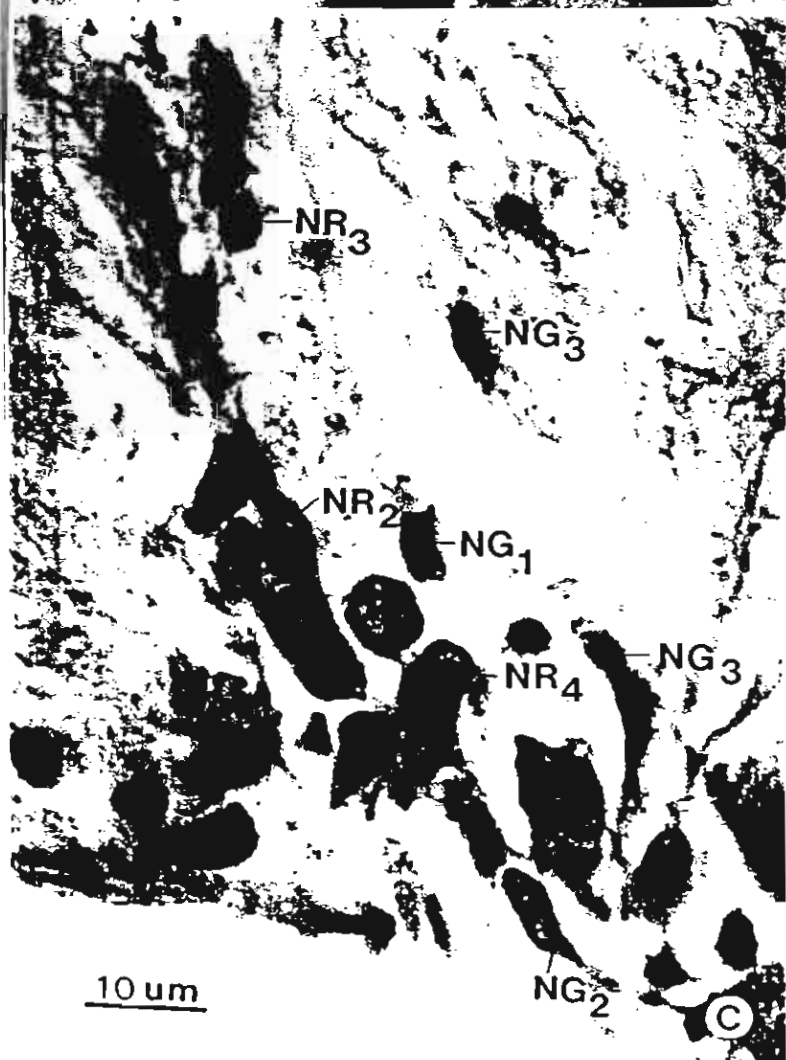
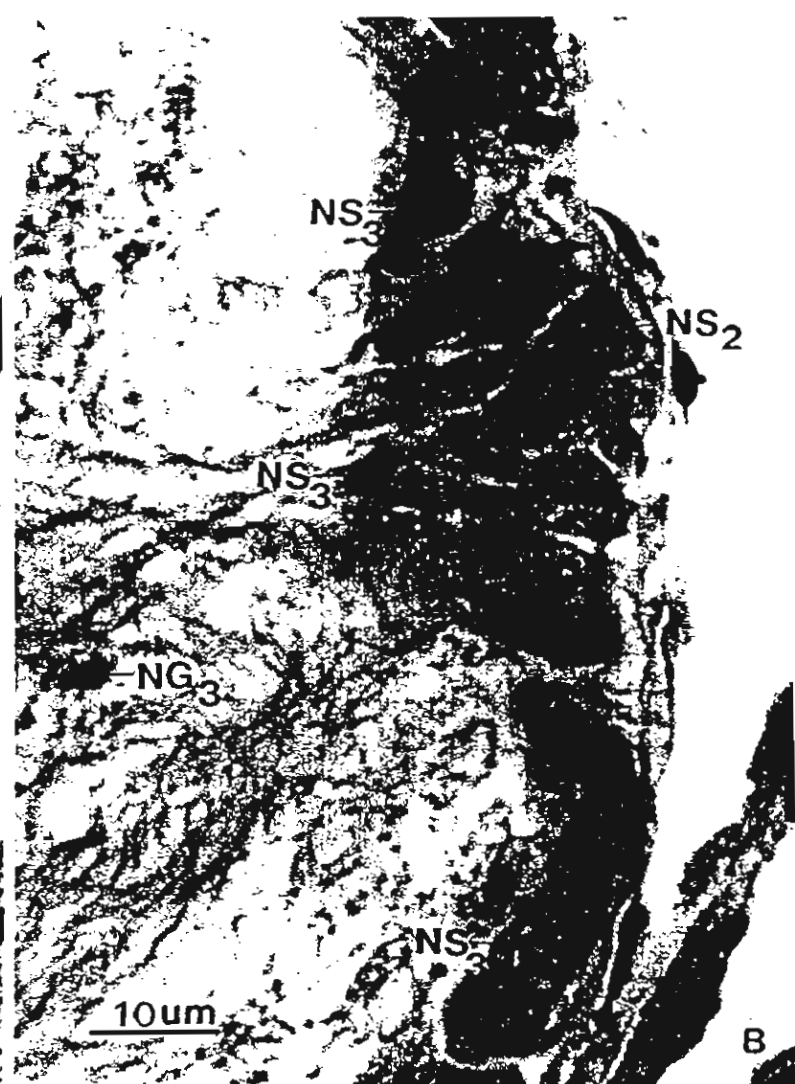
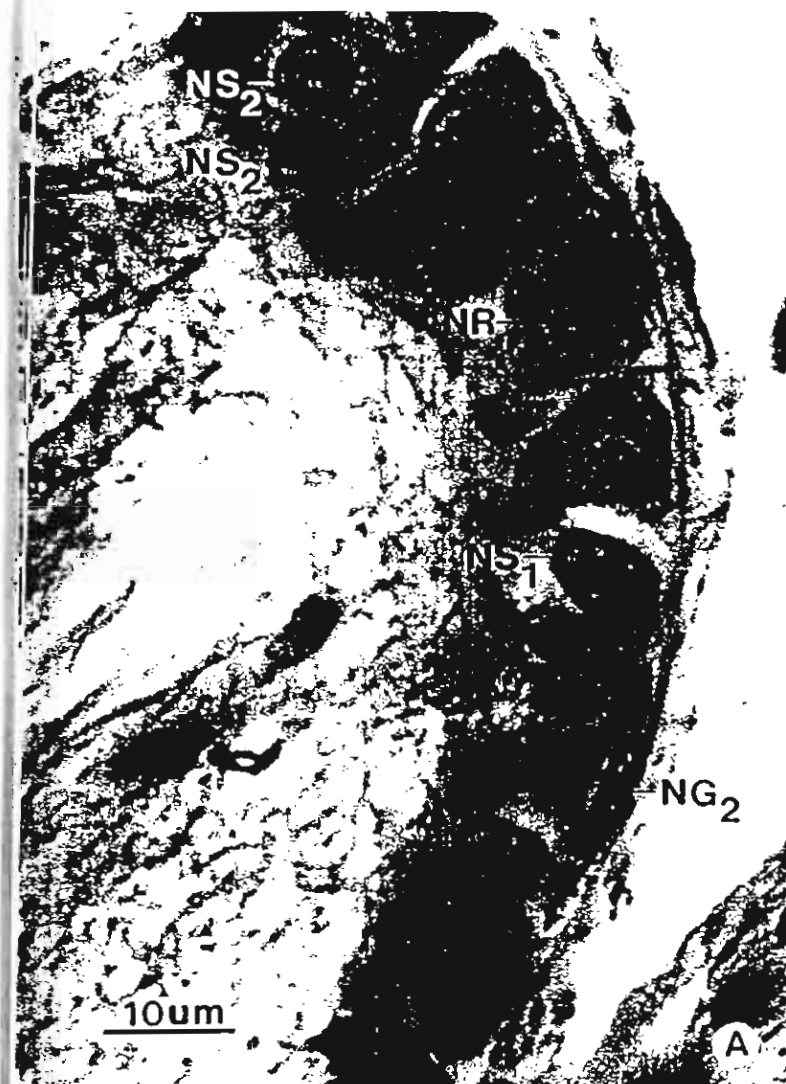


Figure 14



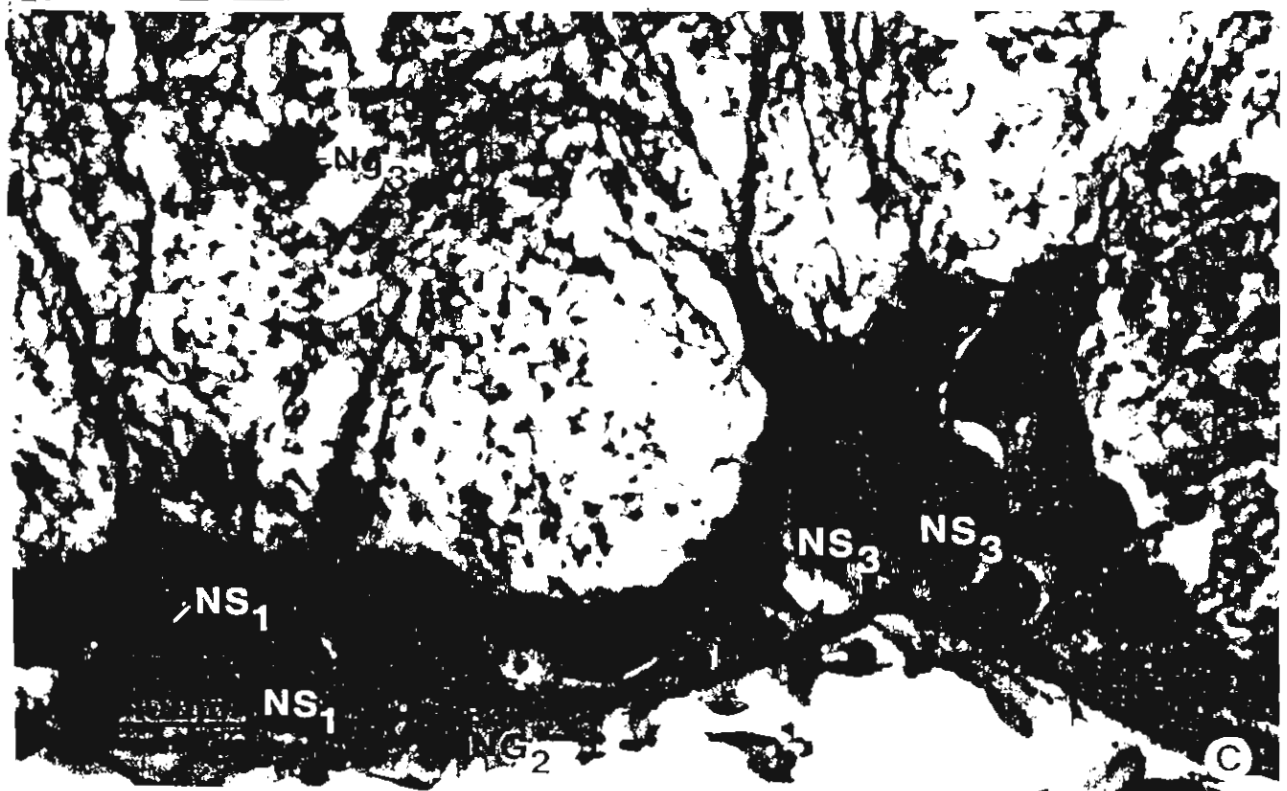
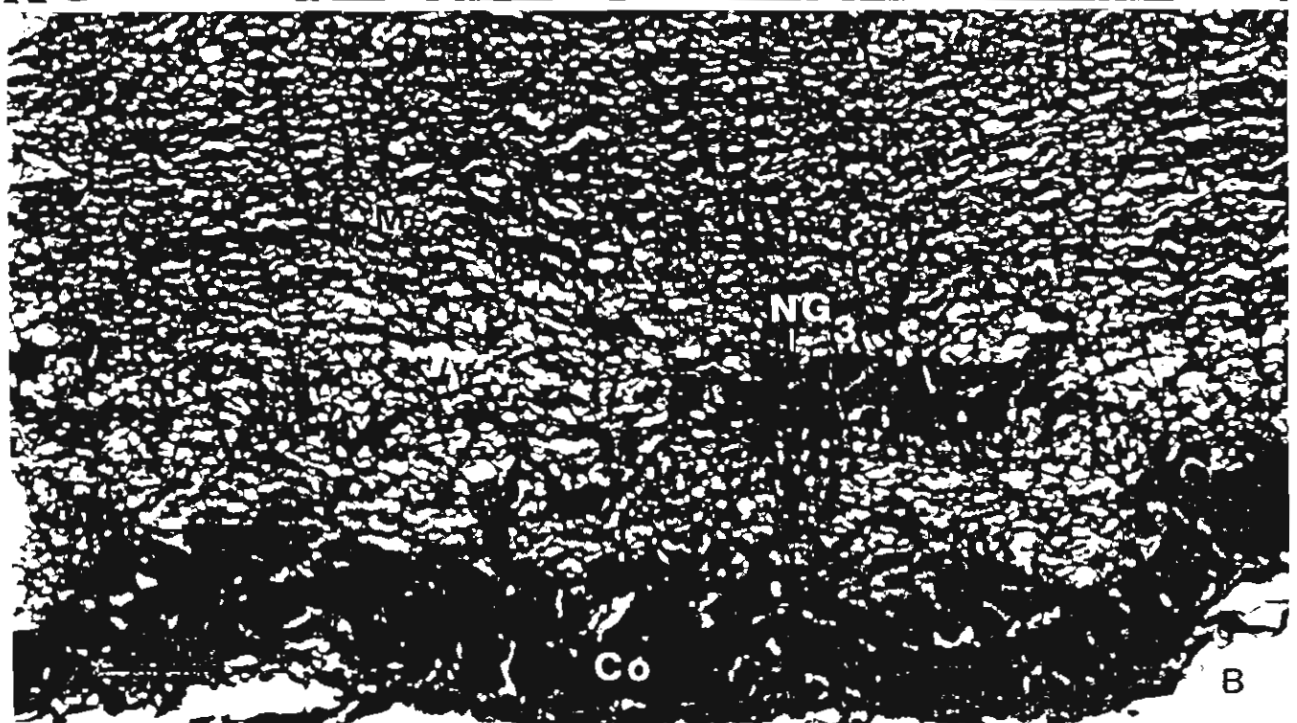


Figure 16

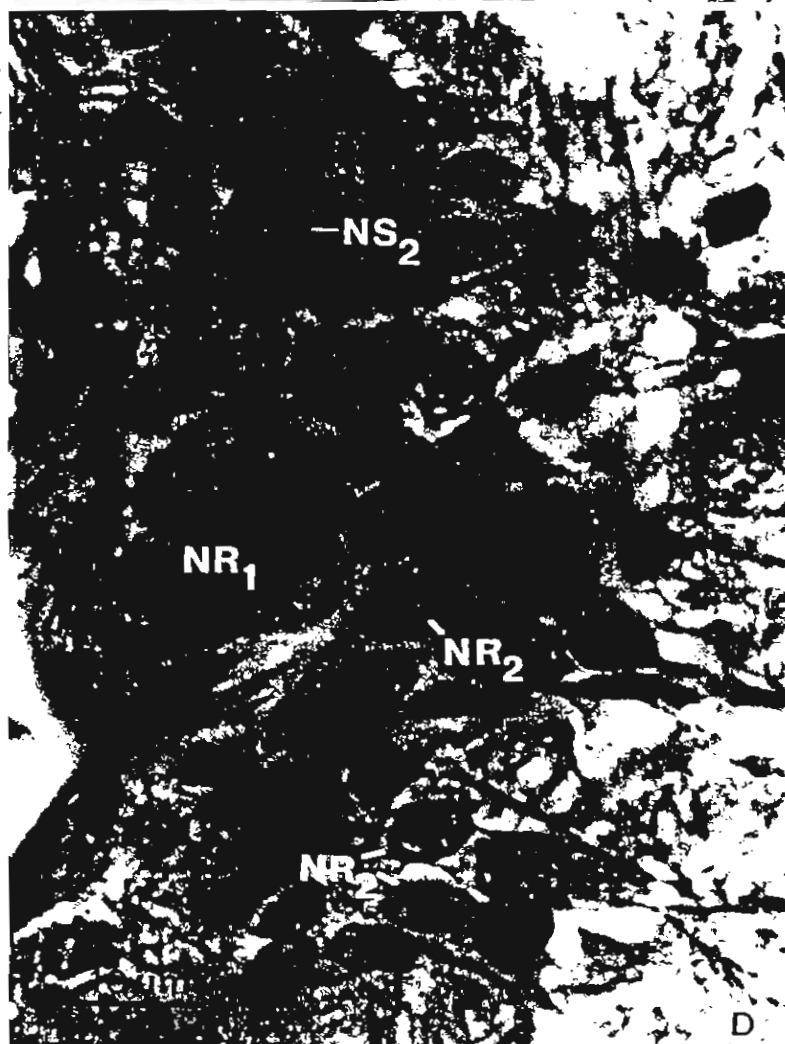
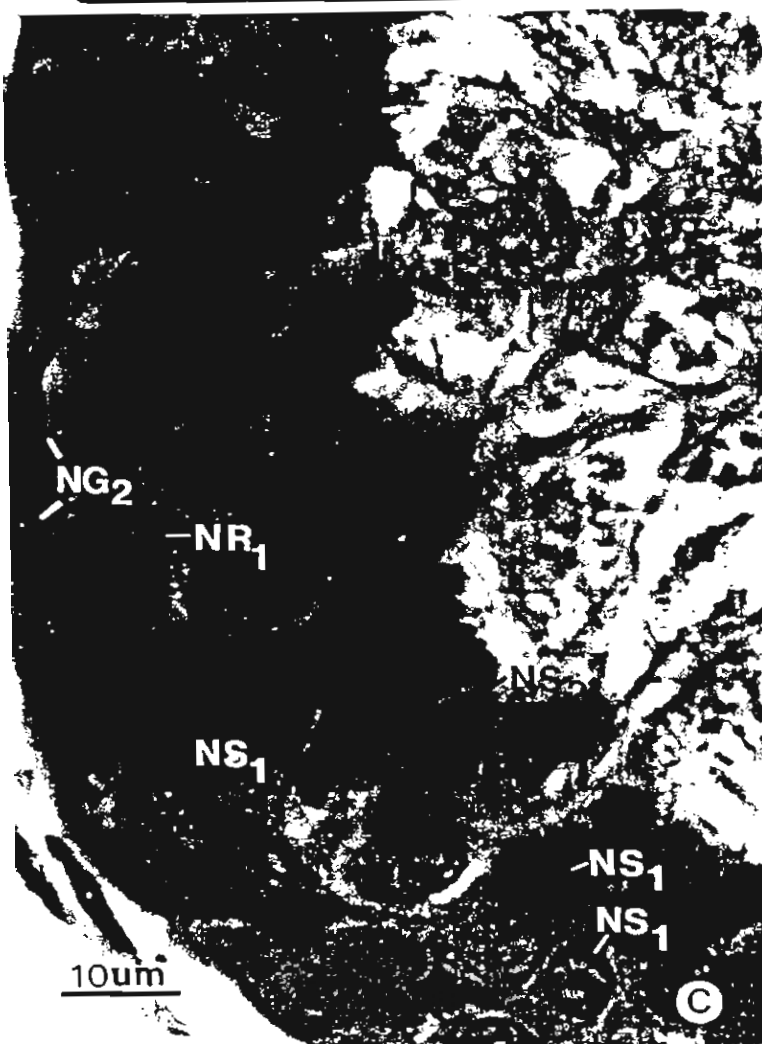
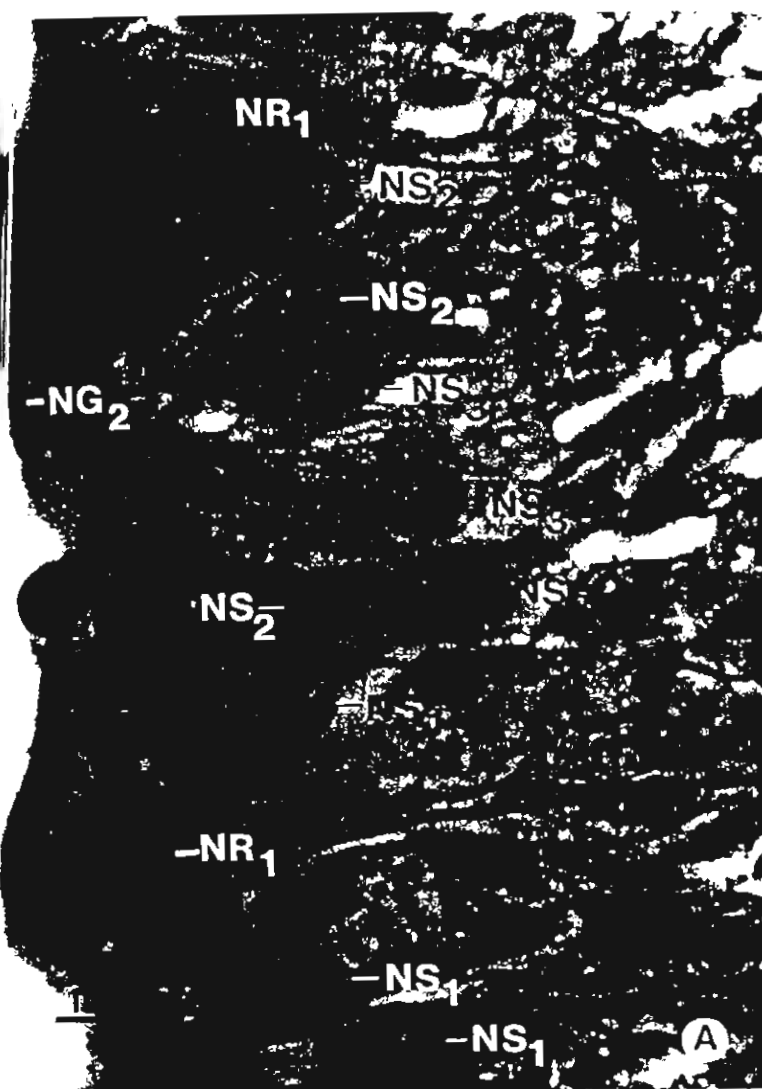


Figure 17



รูปที่ 18 ภาพกำลังขยายต่ำ (A) ปานกลาง (B) และสูง (C) ของปมประสาท pedal ย้อมด้วย  
สี H & E แสดงชั้น cortex มีความหนาทางด้าน ventral มากกว่าด้านอื่น และมี  
เส้นประสาท (Nr) วิ่งออกจากปมประสาท ในรูป C แสดงเซลล์ชนิดต่าง ๆ ในกลุ่ม NS,  
NR และ NG, Pd-pedal ganglion

รูปที่ 19 ภาพกำลังขยายต่ำ (A) ปานกลาง (B) และสูง (C) ของปมประสาท pedal ย้อมด้วย  
สี Gomori

รูปที่ 20 ภาพขยายกำลังสูงของปมประสาท pedal ย้อมด้วยสี Gomori แสดงเซลล์ชนิดต่าง ๆ  
ในกลุ่ม NS, NR และ NG

รูปที่ 21 ภาพกำลังขยายต่ำ (A) และกำลังขยายสูง (B,C,D) ของปมประสาท pedal ย้อมด้วย  
สี paraldehyde-fuschin เซลล์ที่ติดสีม่วงน่าจะเป็น NS โดยเฉพาะ NS<sub>3</sub> ส่วนเซลล์  
ประสาท เช่น NR, ไม่ติดสีเลย

Figure 18

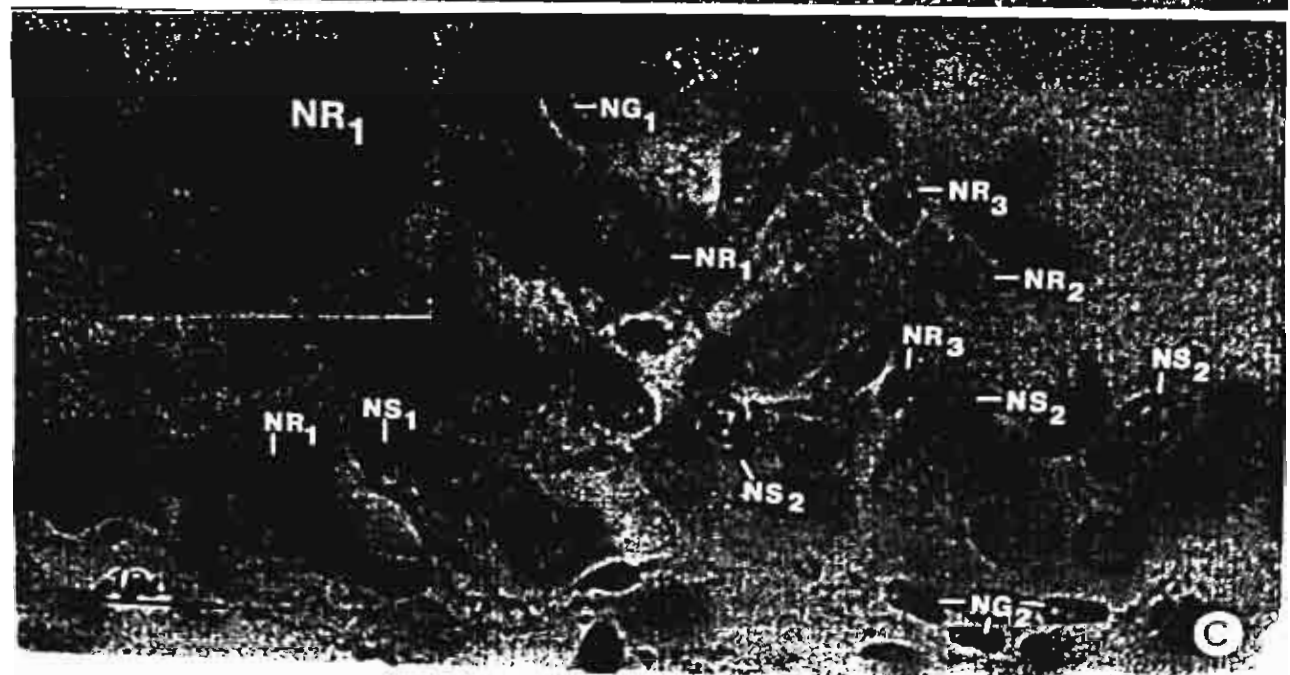
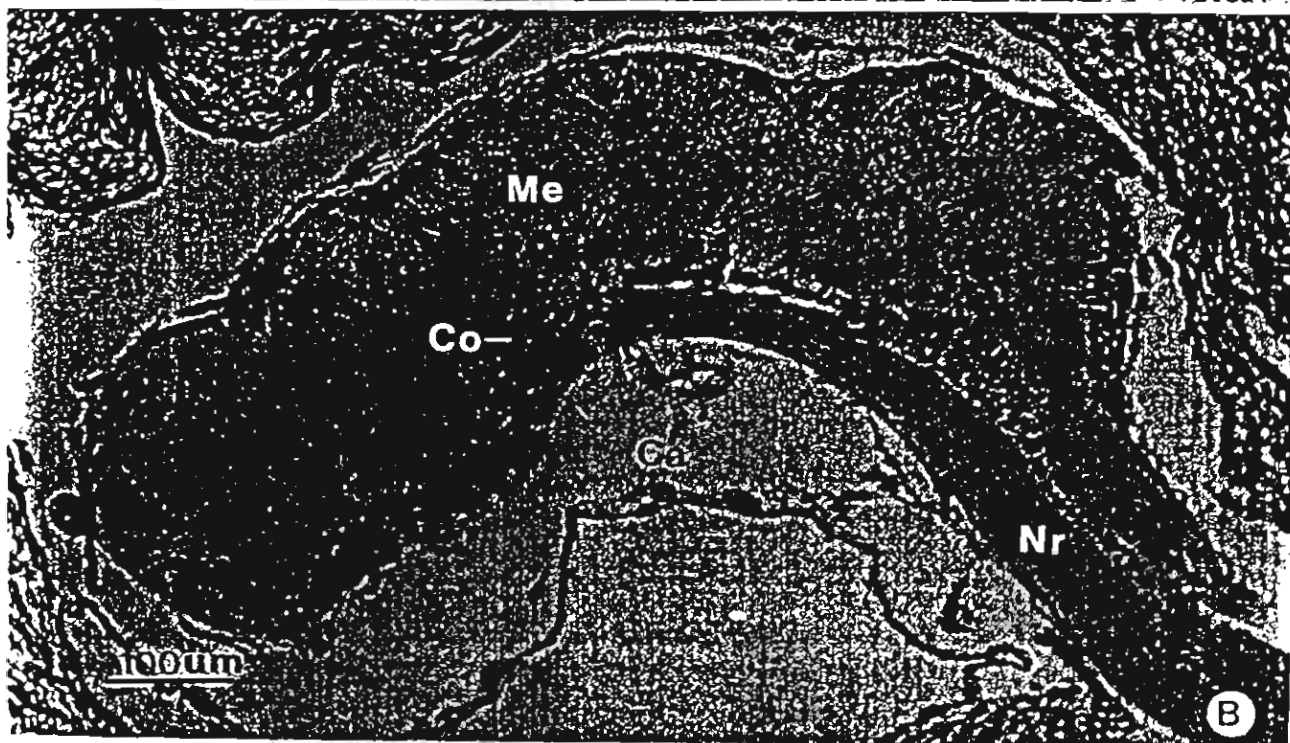


Figure 19

