

รูปที่ 37 ภาพการย้อมโดยวิธี immunoperoxidase แสดงการกระจายของ anti-insulin (A) ใน
ปมประสาท pleuropedal ซึ่งไม่มีการติดสีเลย ส่วนการย้อมด้วย anti-LH (B-D) ใน
ปมประสาท pleuropedal มีสีติดจาง ๆ ในเซลล์บางเซลล์ของชั้น cortex (ลูกศร)

รูปที่ 38 ภาพการย้อมโดยวิธี immunoperoxidase แสดงการกระจายของฮอร์โมนคล้าย FSH
ในปมประสาท pleuropedal ซึ่งแสดงมีการติดสีพอประมาณในกลุ่มเซลล์ของ cortex
(ลูกศร) ส่วนในชั้น medulla ไม่ติดสีเลย

Figure 37

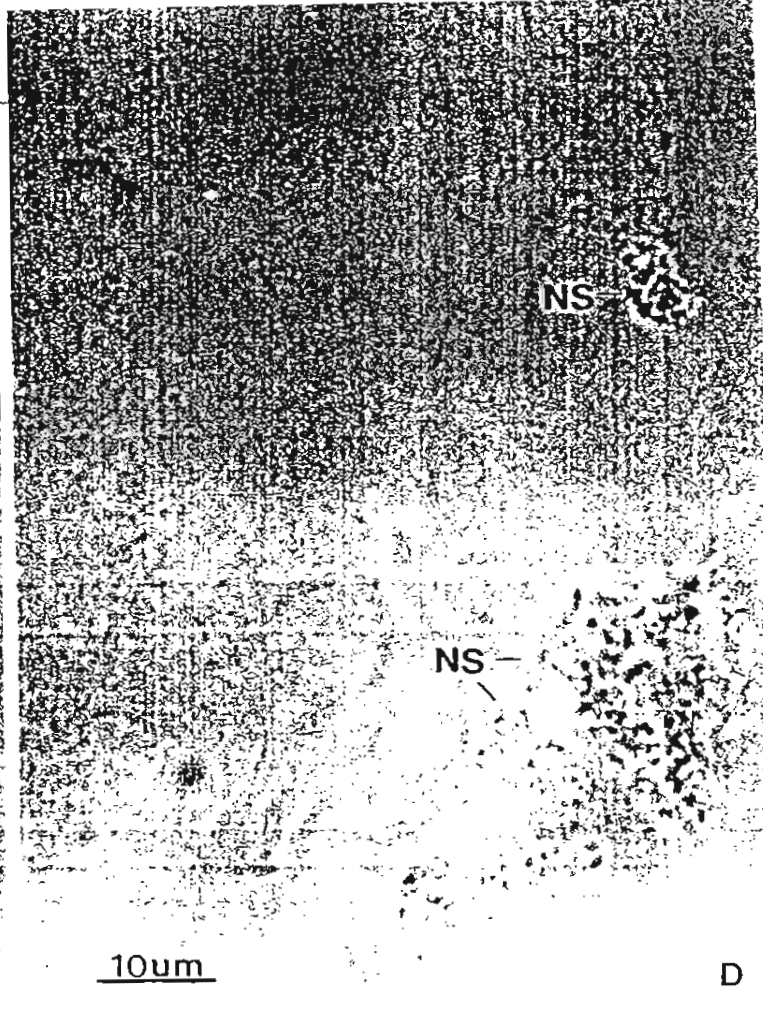
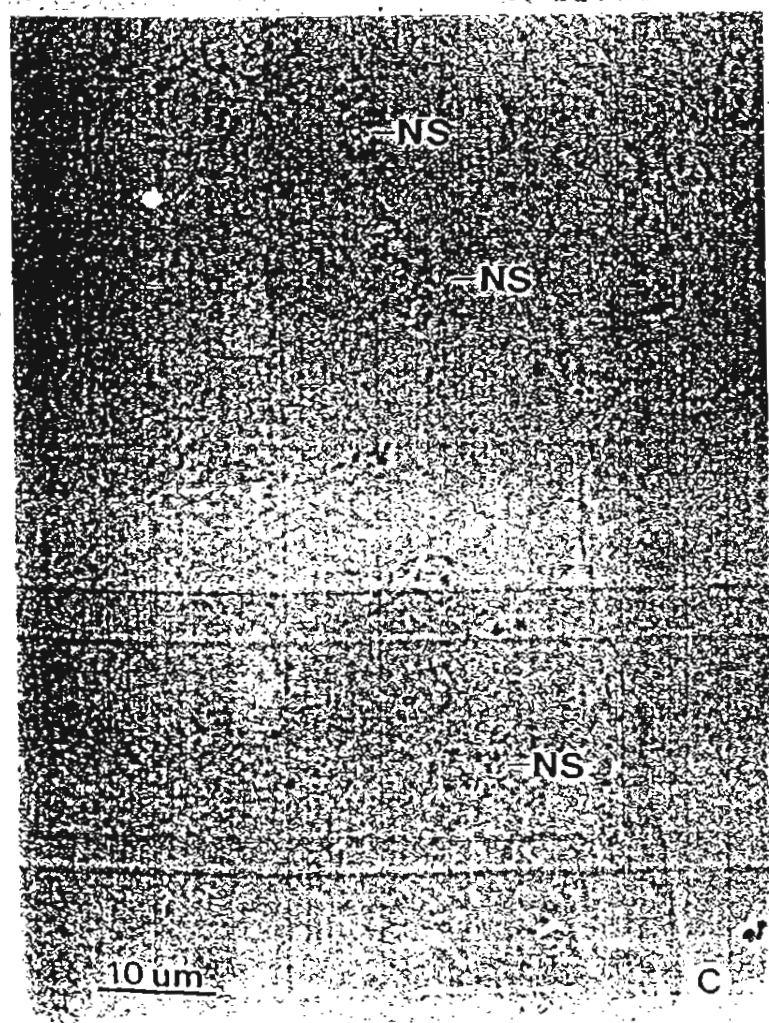
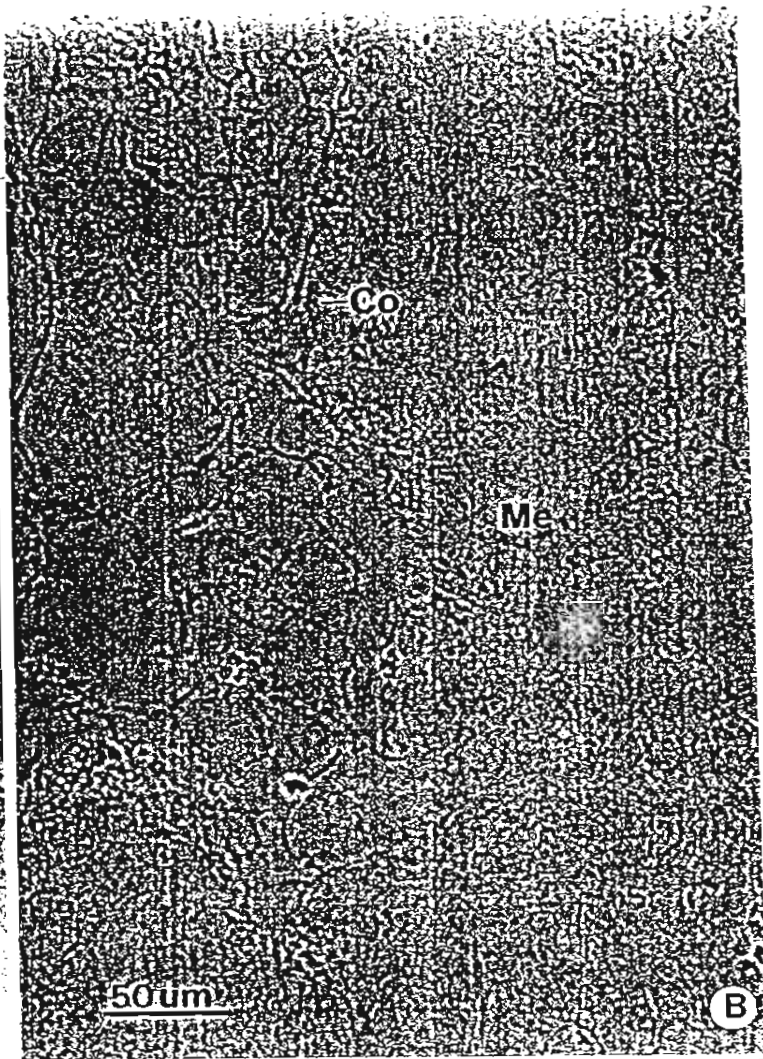
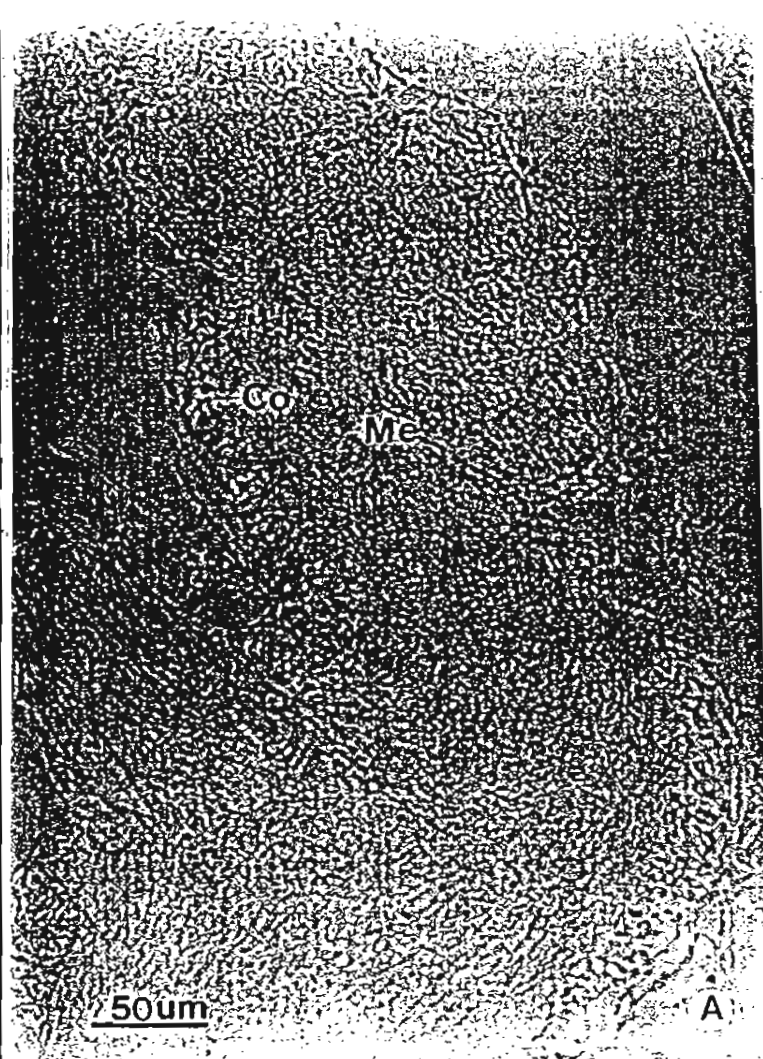
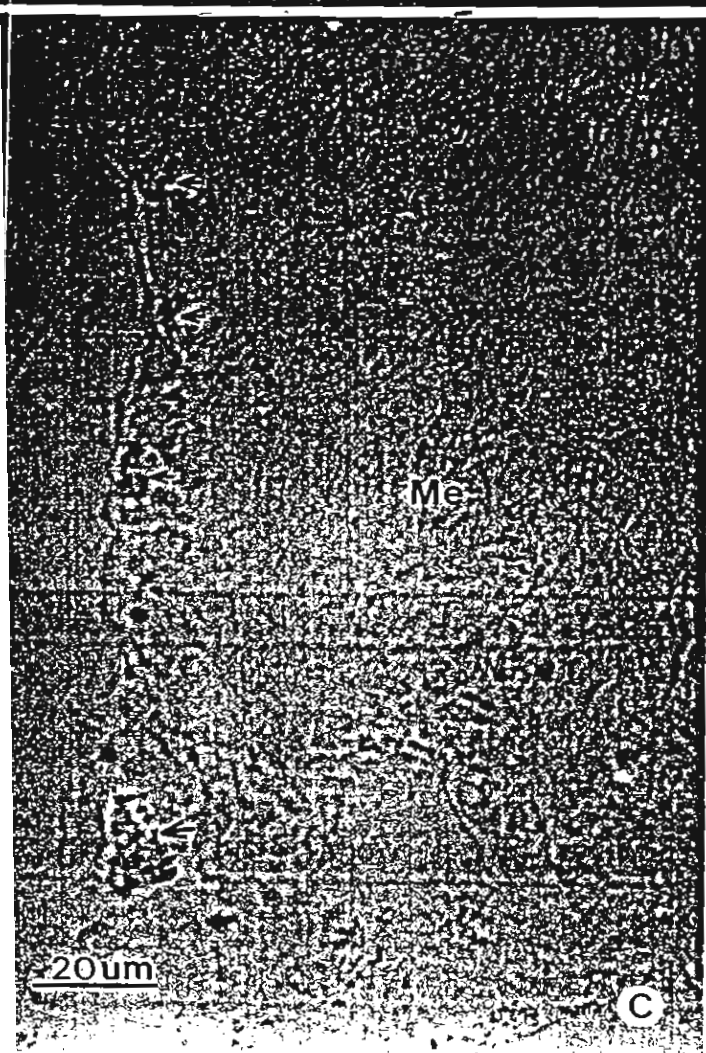
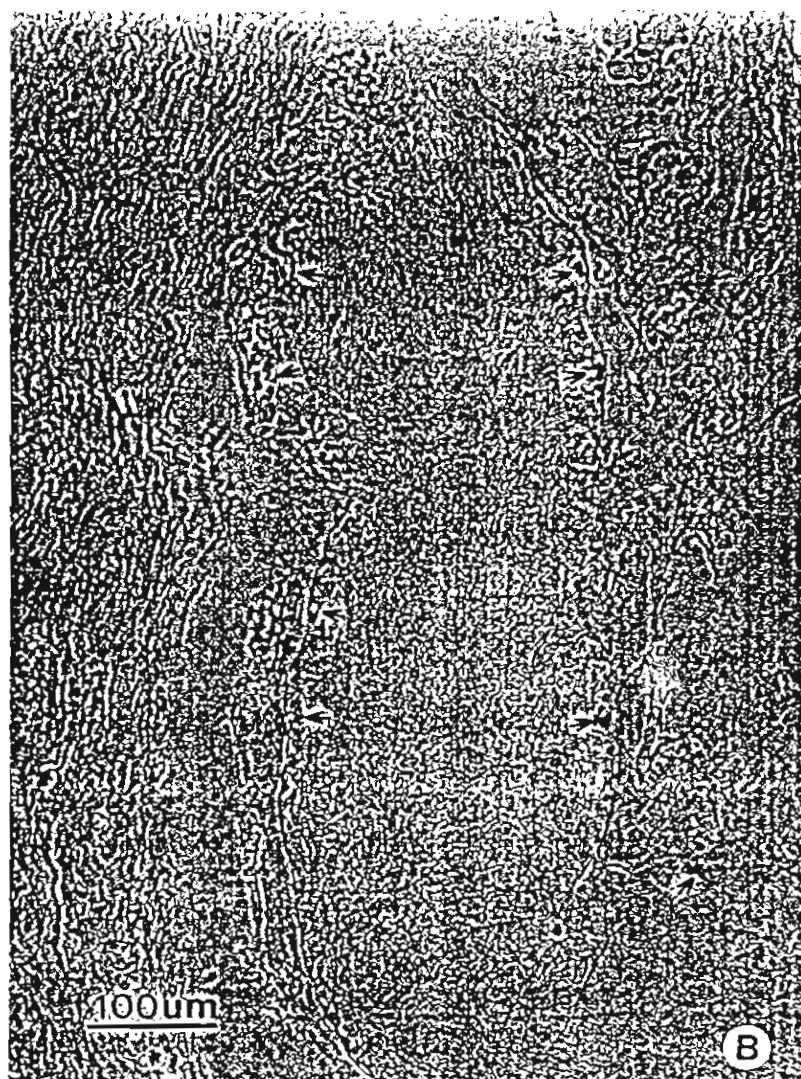
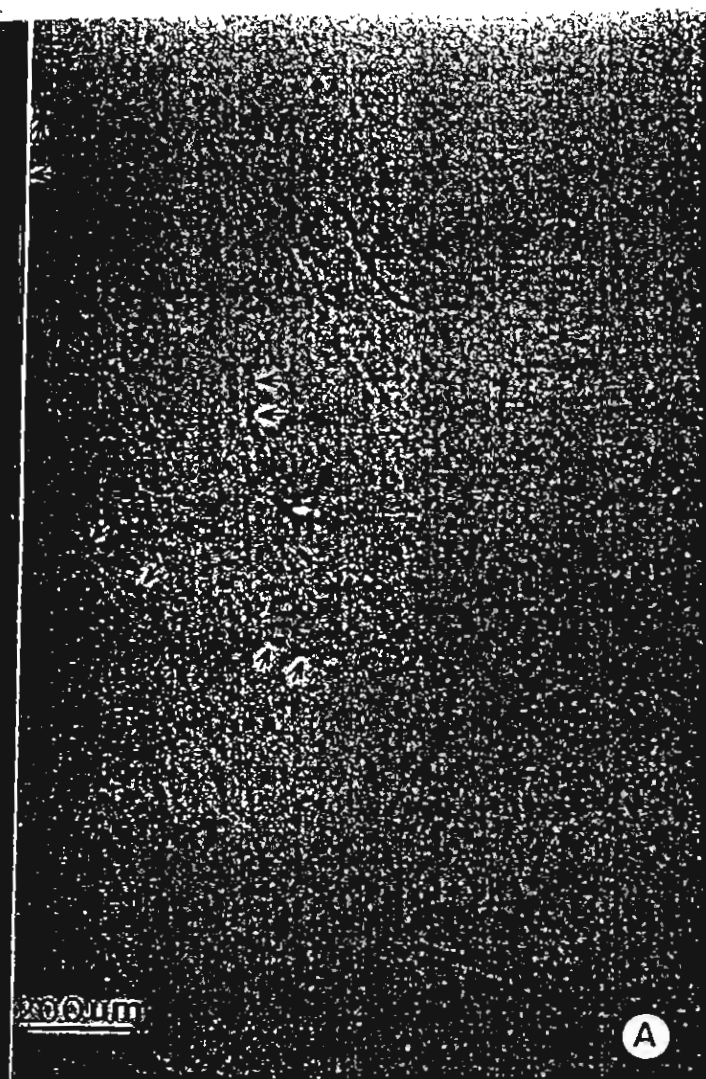


Figure 38



รูปที่ 39 Sections ของปมประสาท visceral ที่ย้อมด้วย rabbit anti-human GH (A) และ mouse anti-human insulin (B) ซึ่งไม่แสดงเซลล์ที่ติดสีเลย

รูปที่ 40 Sections ของปมประสาท visceral ที่ย้อมด้วย mouse anti-human LH (A) และ mouse anti-human FSH (B) แสดงการติดสีในเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (NS)

Figure 39

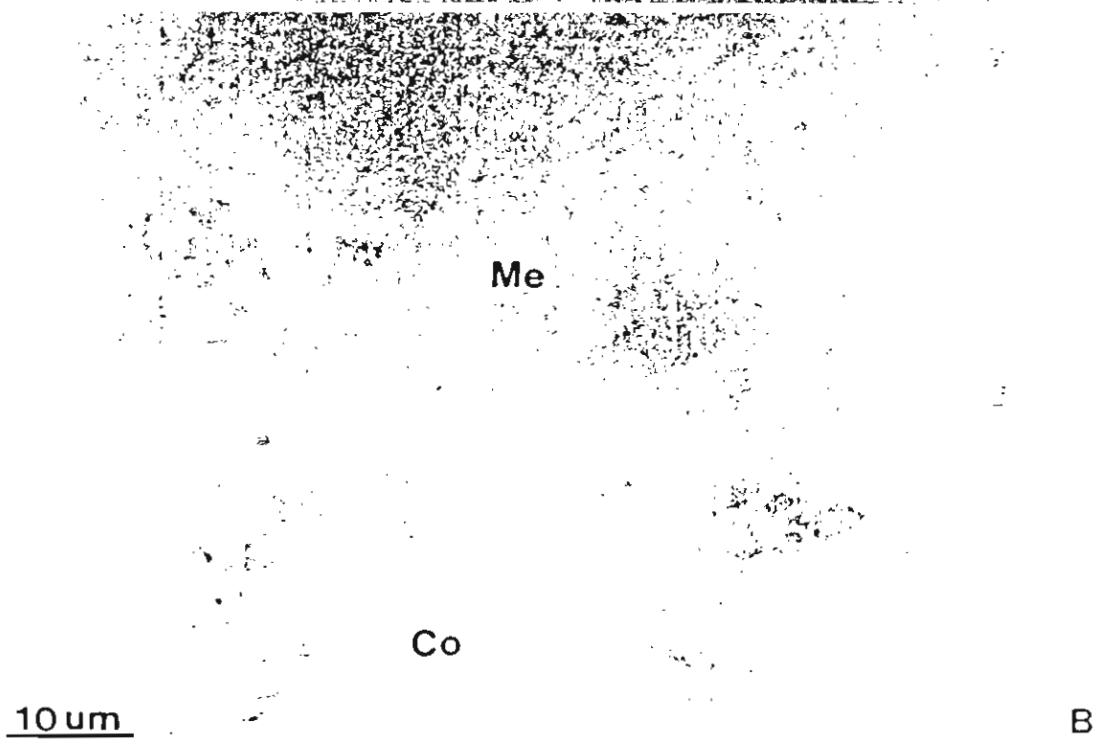
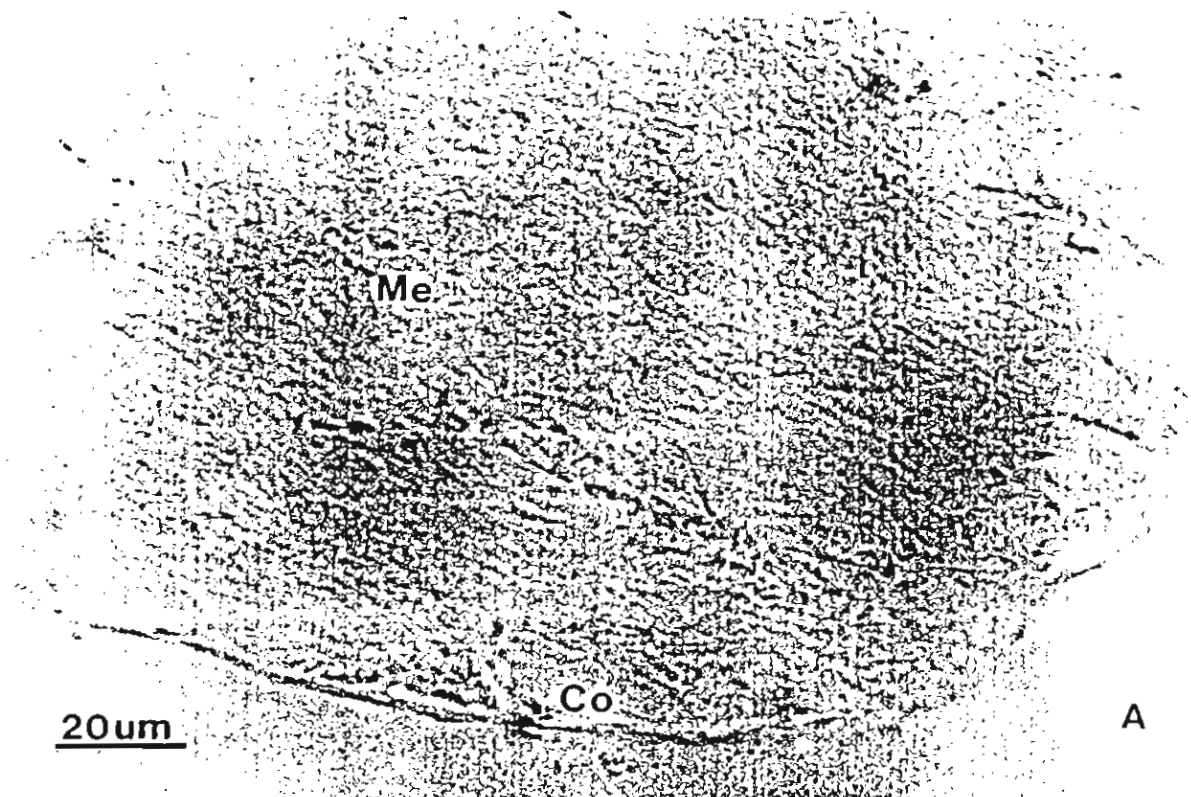
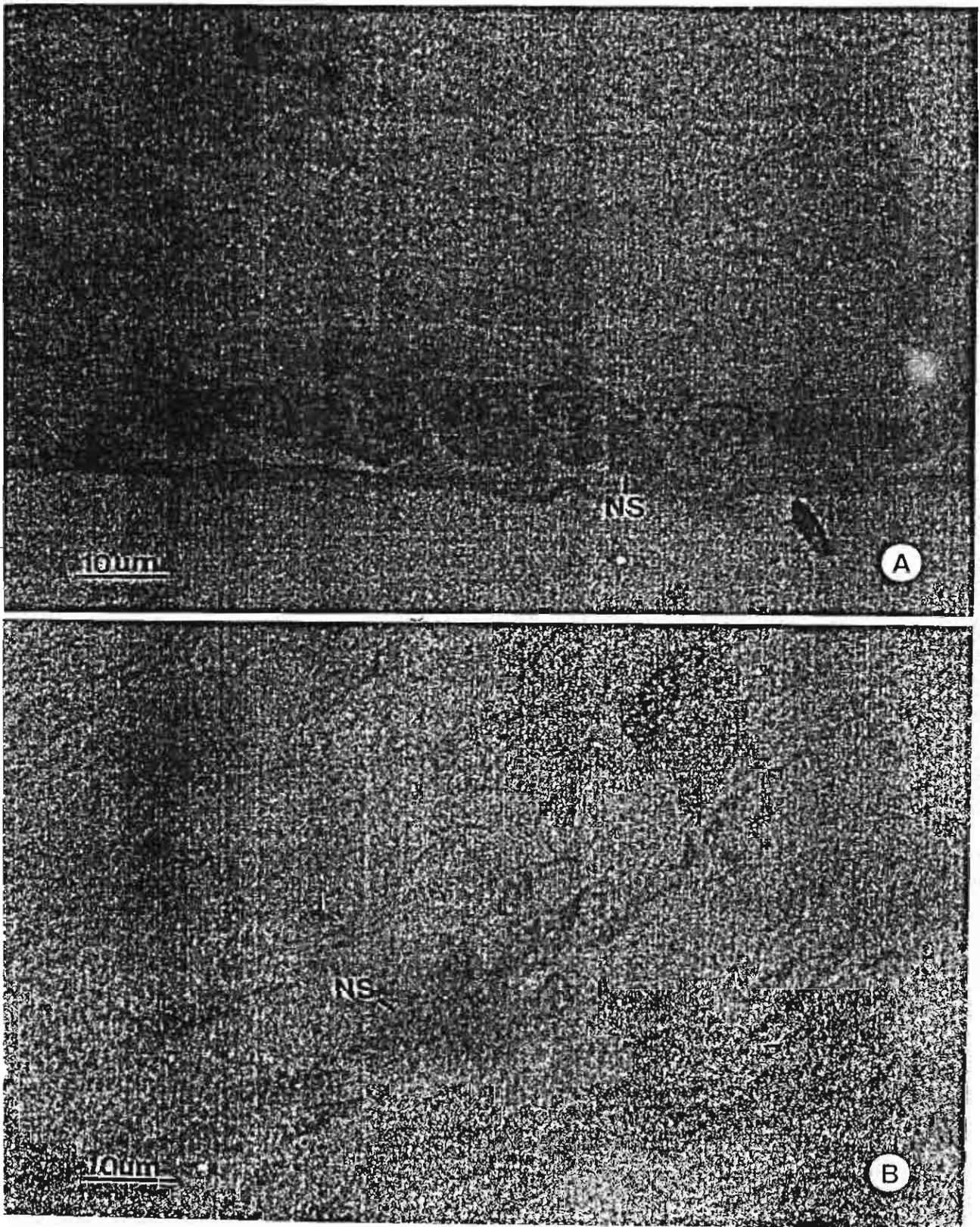


Figure 40



6.6 การศึกษาฮอร์โมนกระตุ้นการเจริญเติบโต (GH-liked hormone) ในปมประสาท Cerebral ด้วยวิธี immunoblotting

เราได้ทำการศึกษาโดยผ่าเอาปมประสาท cerebral จากหอยเป่าอื้อตัวเต็มวัย บดให้ละเอียดใน PBS buffer แล้วนำไปวิเคราะห์แยกแถบโปรตีนโดยใช้ 10% SDS-PAGE จากนั้นนำ gel ที่ได้แผ่นหนึ่งไปย้อมด้วยสี Coomassie blue เพื่อวิเคราะห์หาแถบโปรตีนทั้งหมด ที่สกัดได้จากปมประสาท cerebral และนำ gel อีกแผ่นหนึ่งไปตรวจสอบแถบโปรตีนที่อาจมี แอนติเจนซึ่งทำปฏิกิริยากับ rabbit anti-human GH โดยวิธี immunoblotting โดยการย้ายแถบ โปรตีนจาก gel ลงบนแผ่น nitrocellulose แล้วย้อมด้วย rabbit anti-human GH ตามด้วย biotinylated goat anti-rabbit IgG และ streptavidin-HRP จากนั้นแสดงแถบแอนติเจนที่มีผล บวกด้วยการย้อมด้วย 3, 3 diaminobenzidine (DAB) กับ H_2O_2 สำหรับแผ่น control ใช้ normal rabbit serum แทน primary antibody แล้วย้อมด้วย secondary antibody, streptavidin-HRP และ substrates

6.6.1 การวิเคราะห์แถบโปรตีนสกัดจากปมประสาท Cerebral บนแผ่น gel ที่ย้อม ด้วยสี Coomassie Blue (รูปที่ 41A)

การวิเคราะห์การแยกแถบโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่สกัดได้จากปมประสาท cerebral ganglion ด้วยกรรมวิธี SDS-PAGE เป็นการแยกแถบโปรตีนตามขนาดน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) โดยมีการใช้แถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐานขนาดสูงและขนาดต่ำ (high and low molecular weight markers) เป็นแถบโปรตีนเปรียบเทียบ SDS-PAGE ถูกนำมา ย้อมด้วยสี Coomassie blue เพื่อแสดงโปรตีนที่ติดเป็นแถบสีน้ำเงินในแผ่น gel (รูปที่ 41A) แถบโปรตีนต่าง ๆ ที่ถูกแยกตามน้ำหนักโมเลกุลจากปมประสาท cerebral ganglion ใน lanes 2, 3 และ 4 ซึ่งบรรจุโปรตีนจาก cerebral ganglia ในปริมาณต่าง ๆ กัน มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล ต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน มีจำนวนประมาณ 8 แถบ ซึ่งรวมทั้งโปรตีนที่เป็นฮอร์โมนและโปรตีนโครงสร้างอื่น ๆ เช่น จากเยื่อเกี่ยวพันของปมประสาท โดยวิธีนี้จึงยังไม่สามารถบอกได้ว่าแถบโปรตีนใดเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของ หอยเป่าอื้อ

6.6.2 การวิเคราะห์แถบโปรตีนที่เป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตใน หอยเป่าอื้อโดยกรรมวิธี Immunoblotting (รูปที่ 41B,C)

แถบโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กัน ถูกย้ายจาก SDS-PAGE ลงบนแผ่น nitrocellulose โดยวิธี electroblotting และถูกย้อมอย่างเฉพาะเจาะจงด้วย primary antibody คือ rabbit anti-human growth hormone ที่เจือจางในสัดส่วน 1:100 และ 1:500 ตามด้วย secondary antibody คือ biotinylated goat anti-rabbit IgG ที่เจือจางในสัดส่วน

1:500 จากนั้นนำแผ่น nitrocellulose ไปย้อมด้วย HRP-streptavidin และ DAB substrates ตามลำดับ

แถบโปรตีนที่มี epitope ร่วมกับฮอร์โมน GH เท่านั้น ที่จะสามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างเฉพาะเจาะจงระหว่าง primary antibody และ secondary antibody โดยแสดงแถบสีน้ำตาลบนแผ่น nitrocellulose ใน lanes 3 และ 4 ของแผ่น nitrocellulose มีแถบสีน้ำตาลอย่างชัดเจนจำนวน 2 แถบ ซึ่งเป็นแถบโปรตีนที่น่าจะเป็นฮอร์โมนคล้ายกับ human GH ที่สกัดได้จากปมประสาท cerebral ganglion โดยมีน้ำหนักโมเลกุลปรากฏที่ระดับ 130 และ 95 kD (รูปที่ 41C)

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าปมประสาท cerebral ผลิตฮอร์โมนที่มีกลุ่ม epitopes คล้ายกับ human GH จากความเข้มข้นของสีที่ติดแถบโปรตีนดังกล่าว GH-like hormone ในหอยน่าจะมีความคล้ายคลึงกับฮอร์โมน GH ของคนและสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูงอื่น ๆ มาก ผลจากการทดลองนี้สนับสนุนผลจากการย้อม sections ของปมประสาท cerebral โดยวิธี immunoperoxidase ดังที่กล่าวมาแล้วในข้อ 6.5 ซึ่งพบว่ามี GH-like hormone ปริมาณสูง ใน neurosecretory cells ชนิด NS₁ และ NS₃ และในมัดของเส้นประสาทที่อยู่ส่วนกลางของ medulla

เราได้ทำการทดลองในลักษณะเดียวกันใน cerebral ganglia โดยใช้ mouse anti-human insulin, LH และ FSH แต่ยังไม่ปรากฏผลบวกตามที่คาดไว้ และในกรณีของ pleuropedal ganglia ก็ยังไม่พบผลบวกอย่างที่ปรากฏในวิธี immunoperoxidase ที่ใช้โดยตรงกับ tissue sections ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าปริมาณฮอร์โมน ILH, LH และ FSH-like ที่อาจจะมีอยู่นั้นมีปริมาณน้อยมาก และอาจจะเป็นไปได้ว่ามี conserved part ระหว่างฮอร์โมนของมนุษย์และของหอยอยู่น้อยอีกด้วย จึงทำให้การศึกษาโดยวิธี immunoblotting ไม่ได้ผล เนื่องจากความไว (sensitivity) ต่ำกว่าวิธี immunoperoxidase

รูปที่ 41 A) ภาพของ 10% SDS-PAGE แสดงตำแหน่งแถบโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่สกัดได้จาก cerebral ganglion และถูกแยกตามขนาดของน้ำหนักโมเลกุล แล้วย้อมด้วยสี Coomassie blue

lane 1: แถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐานขนาดใหญ่ (high molecular weight marker-HMW) ขนาด 205, 116, 97, 66 และ 45 kD

lane 2-4: แถบโปรตีนชนิดต่าง ๆ จาก cerebral ganglion โดยมีการใส่ตัวอย่าง 20, 30 และ 40 µl ตามลำดับ แถบโปรตีนที่ติดสี Coomassie blue เด่นชัดมีประมาณ 8 แถบ

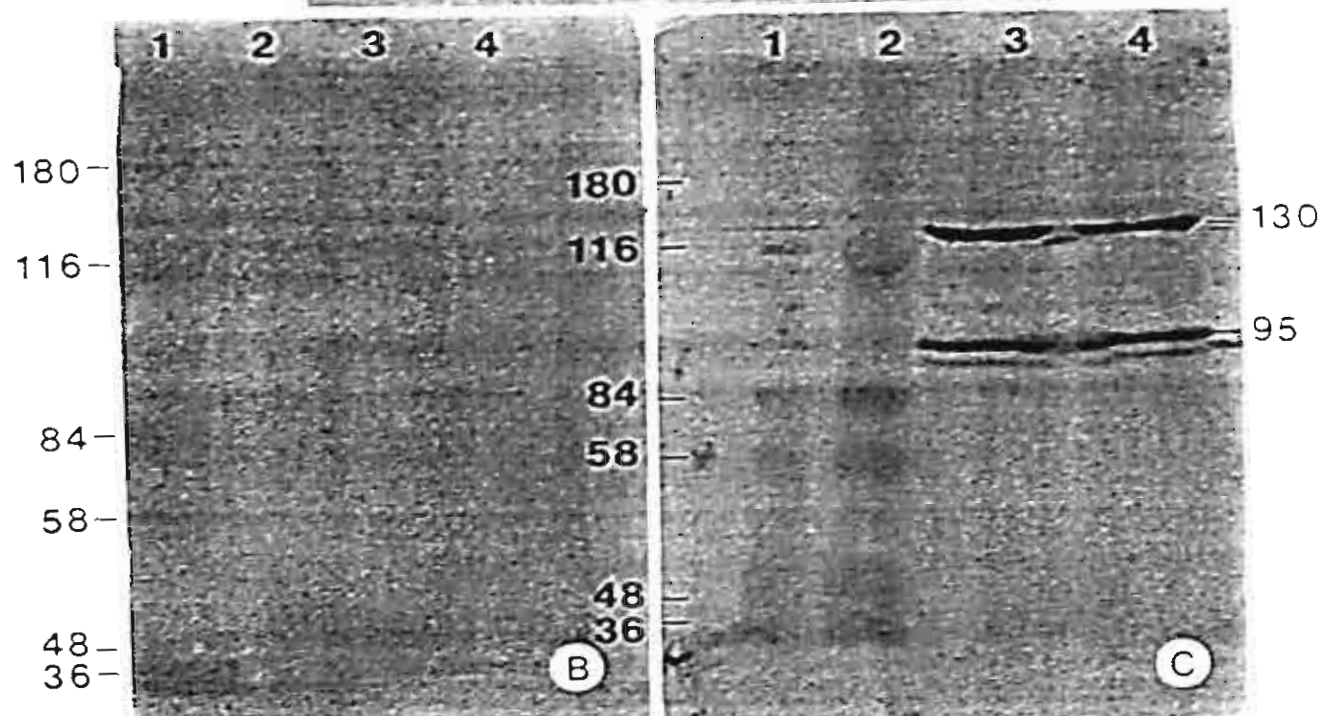
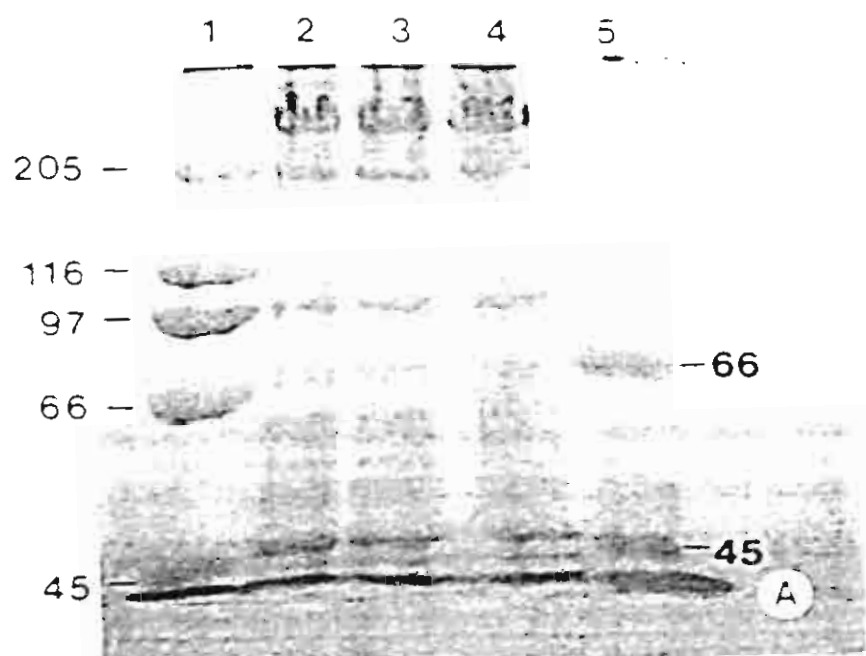
lane 5: แถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐานขนาดเล็ก (low molecular weight markers-LMW) ขนาด 66 และ 45 kD

B,C) Immunoblot แสดงตำแหน่งของแถบโปรตีนที่คล้ายกับฮอร์โมน GH ซึ่งน่าจะเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของหอยเป่าฮื้อ ที่มี epitopes คล้ายกับ human GH แถบโปรตีนนี้สกัดมาจาก cerebral ganglion และทำปฏิกิริยาโดยวิธี immunoblotting กับ rabbit anti-human growth hormone (primary antibody), biotin-goat anti-rabbit IgG (secondary antibody), HRP-streptavidin และ substrate DAB (รูป C) และ control gel ที่ใช้ normal rabbit serum แทน primary antibody (รูป B)

lanes 1-2: แถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน: ขนาด 180, 116, 84, 58, 48 และ 36 kD

lanes 3-4: แถบโปรตีนที่สกัดจาก cerebral ganglion ของหอยเป่าฮื้อ และทำปฏิกิริยา immunoblotting โดยใส่ตัวอย่างในปริมาตร 30 และ 40 µl ตามลำดับ แถบโปรตีนที่ควรจะเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของหอยเป่าฮื้อ ย้อมติดสีน้ำตาลเข้มตรงกับระดับน้ำหนักโมเลกุล 130 และ 95 kD ตามลำดับ

Figure 41



6.7 มหกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์

หอยเป่าถือเป็นสัตว์ที่มี 2 เพศ ซึ่งแยกจากกันอย่างชัดเจน อวัยวะสืบพันธุ์ของหอยตัวเต็มวัยที่เห็นเด่นชัด คือ ต่อมอินทนะและรังไข่ ซึ่งเป็นอวัยวะที่ห่อหุ้ม hepatopancreas และมีลักษณะเป็นรูปกรวย (cone-shaped) จึงรวมเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า conical organs ในหอยตัวผู้ต่อมอินทนะมีสีเหลืองอ่อน ห่อหุ้มส่วนของทางเดินอาหารและ hepatopancreas ด้านปลายมีลักษณะแหลม (รูปที่ 42A,B) ในหอยตัวเมียรังไข่มีสีเขียวแก่ มีรูปร่างคล้ายกรวยและห่อหุ้ม hepatopancreas กับลำไส้เช่นเดียวกับต่อมอินทนะ (รูปที่ 43A,B)

6.8 ลักษณะจุลกายวิภาคของอินทนะและรังไข่

อินทนะ (testis)

อินทนะถูกห่อหุ้มด้วยถุงหุ้ม (capsule) (รูปที่ 44A,B; 45A,B) ซึ่งประกอบด้วยใยคอลลาเจนที่เรียงตัวแน่น ปรากฏเป็นแผ่นบาง ๆ อย่างชัดเจน เยื่อเกี่ยวพันจากถุงหุ้มที่มีลักษณะเป็นแผง (trabeculae) ยื่นเข้าไปในเนื้ออินทนะ ภายในแผง trabeculae แต่ละอันมีหลอดเล็ก ๆ แทรกอยู่ ซึ่งอาจเป็นหลอดโลหิตฝอย (รูปที่ 45A,B) ปลายในสุดของ trabeculae ยื่นเข้าไปติดกับชั้นของเยื่อเกี่ยวพันที่ห่อหุ้ม hepatopancreas ต่อมอินทนะส่วนต้นของ conical organs มีเนื้ออินทนะบาง ๆ หุ้ม hepatopancreas ซึ่งมีขนาดใหญ่และห่อหุ้มหลอดลำไส้อีกต่อหนึ่ง (รูปที่ 44A) ทางด้านปลายของกรวยเนื้ออินทนะจะมีมากขึ้นเรื่อย ๆ ในขณะที่เนื้อของ hepatopancreas ลดลง (รูปที่ 44B) จนกระทั่งที่ปลายสุดไม่มีเนื้อของ hepatopancreas อยู่เลย

แผง trabeculae เป็นแหล่งเกาะของเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่าง ๆ โดยเซลล์สืบพันธุ์ขั้นต้น ได้แก่ spermatogonia และ primary spermatocytes วางตัวติดอยู่กับทั้งสองด้านของแผ่นเยื่อเกี่ยวพัน trabeculae เซลล์สืบพันธุ์ขั้นท้าย ๆ (secondary spermatocyte และ spermatids) จะอยู่ถัดออกไป ส่วนเซลล์สุจิ (spermatozoa) จะกระจายอยู่รอบนอกสุด โดยหางของมันจะชี้ออกไปปะปนกับหางของเซลล์สุจิที่มีกำเนิดมาจากหน่วยข้างเคียง ทำให้ปรากฏเป็นกลุ่มของเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่าง ๆ ครอบคลุมที่มี trabecula แต่ละอันเป็นแกนกลาง จึงเรียกว่า spermatogenic unit (รูปที่ 45A,B)

รังไข่ (Ovary)

ส่วนตัดขวางของรังไข่ แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาคคล้ายกับของอินทนะ (รูปที่ 44C; 65B-D) กล่าวคือ รังไข่ถูกห่อหุ้มด้วยถุง capsule ที่เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแบบทึบ (dense collagenous connective tissue) โดยมีแผง trabeculae ยื่นเข้าไปประกบกับถุงหุ้ม hepatopancreas ที่ถูกรังไข่ล้อมรอบอยู่ รังไข่จึงถูกแบ่งออกเป็นห้อง ๆ (compartments) (รูปที่ 65A) โดยแผง trabeculae ที่มีหลอดเลือดเล็ก ๆ แทรกอยู่พร้อมกับเซลล์ที่มีนิวเคลียสเข้ม

ขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วไป เซลล์สืบพันธุ์ระยะต้น เช่น oogonia และ primary oocytes ขั้นต้น จะติดอยู่กับเยื่อเกี่ยวพันของ trabeculae ส่วนเซลล์สืบพันธุ์ระยะปลาย จะกระจายและหลุดออกจากแผ่น trabeculae กลุ่มเซลล์ดังกล่าวจึงมีลักษณะคล้ายพวงอุ้งน โดยที่มี trabecula แต่ละอัน เป็นแกนกลางจึงถือเป็น 1 หน่วย oogenetic unit ซึ่งเทียบได้กับ spermatogenic unit (รูปที่ 65A,C,D)

รูปที่ 42 A&B) หอยเป่าฮือตัวผู้ที่ถูกผ่าแสดงอวัยวะภายในที่อยู่เหนือต่อ (dorsal) ผ่านกล้ามเนื้อเท้า (Pe-pedal muscle) อวัยวะต่าง ๆ ที่แสดงคือ te-testis (สีเหลือง), ad-adductor muscle, hp-hepatopancreas, kd-kidney, ma-mantle, gi-gill, bc-buccal mass, sa-salivary gland, ey-eyes, tt-tentacle

รูปที่ 43 A&B) หอยเป่าฮือตัวเมียที่ถูกผ่าแสดงอวัยวะภายในที่อยู่เหนือต่อผ่านกล้ามเนื้อเท้า อวัยวะต่าง ๆ ที่แสดงคือ ov-ovary (สีเขียวแก่) และอวัยวะอื่นๆ เช่นเดียวกับที่แสดงในรูปที่ 2

รูปที่ 44 ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำแสดงส่วนตัดขวางของต่อมอินทะ (รูป A,B) และรังไข่ (รูป C) ซึ่งห่อหุ้มด้วยถุงหุ้ม (capsule-cp) ทั้งอินทะและรังไข่หุ้มรอบ hepatopancreas (HP) และลำไส้ (IN)

Figure 42

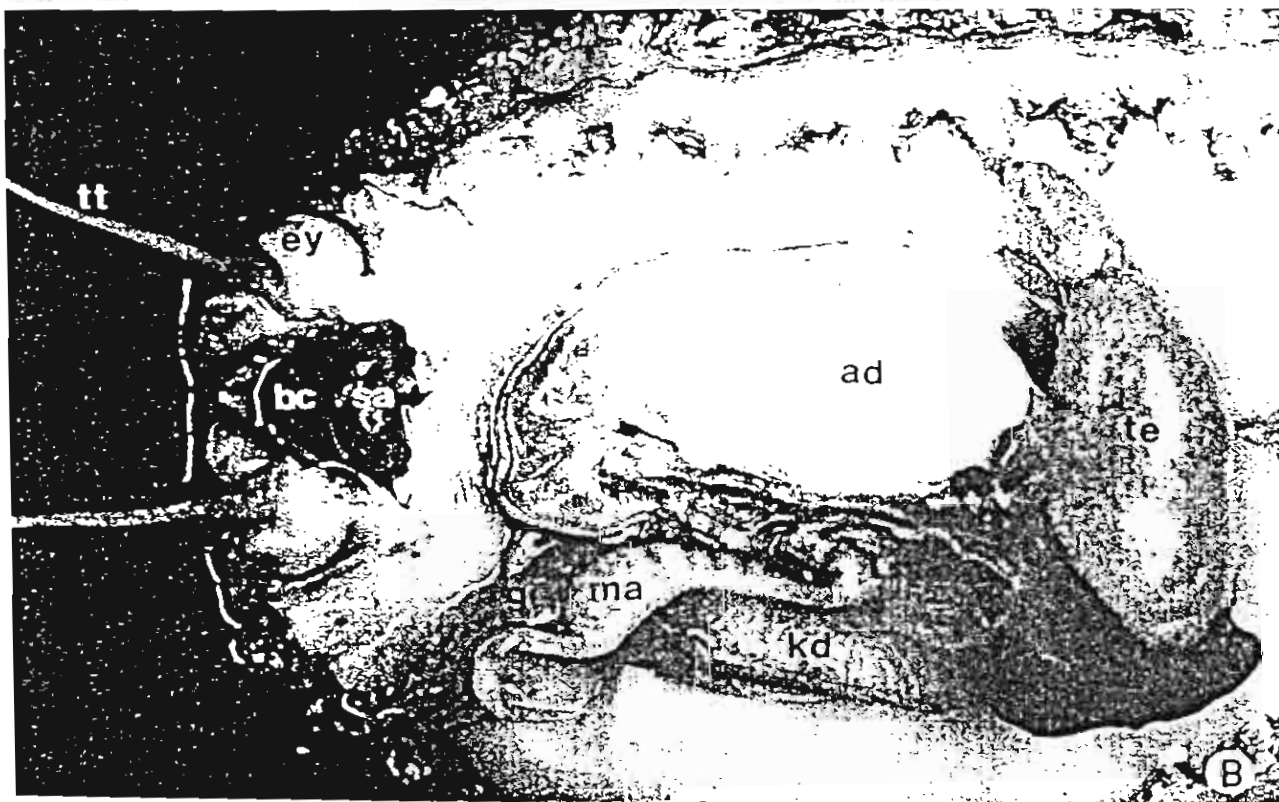
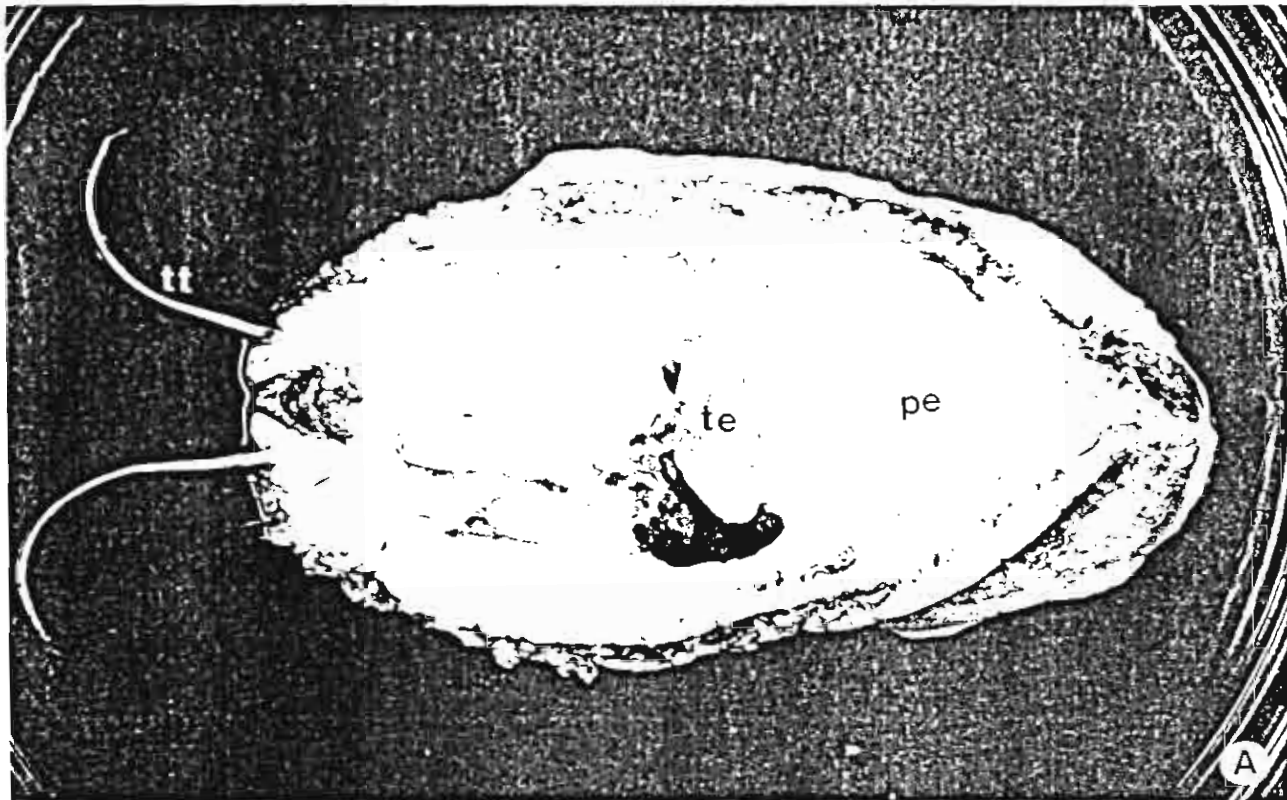


Figure 43

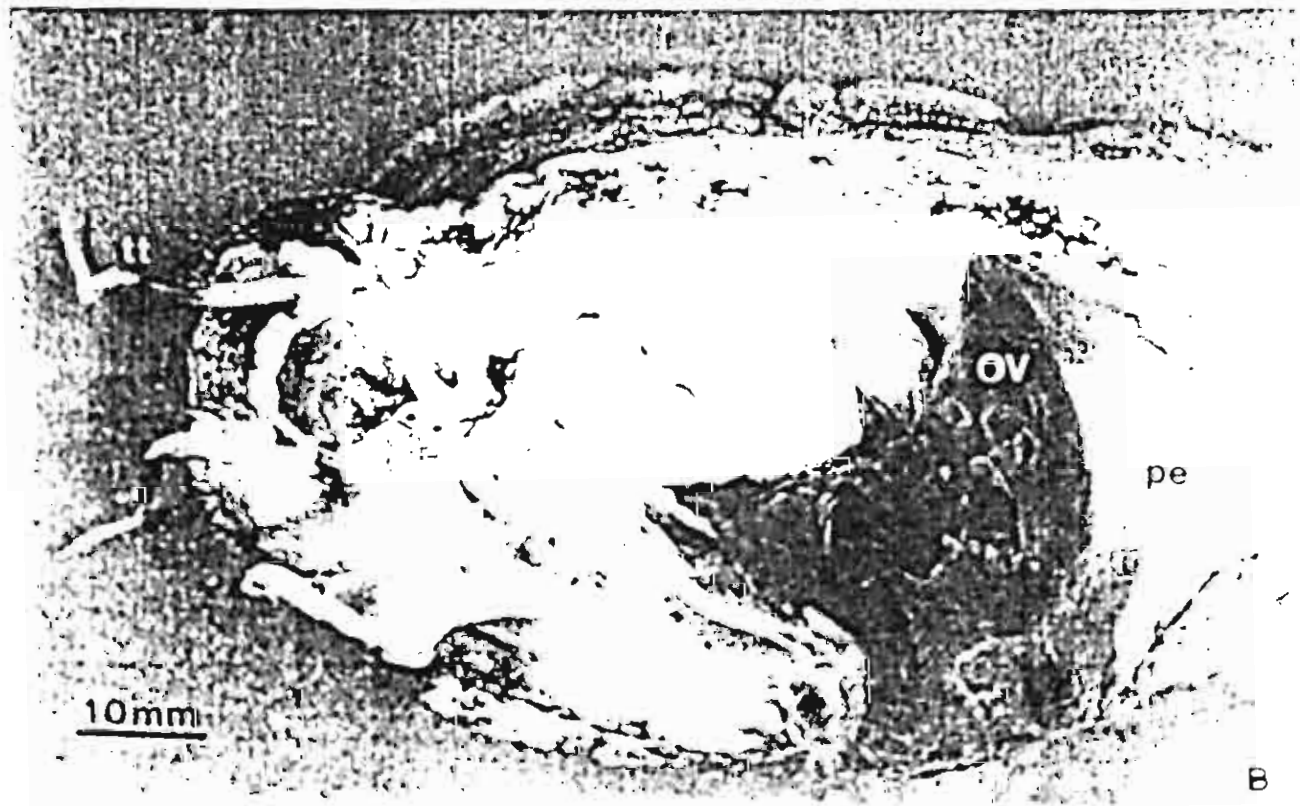
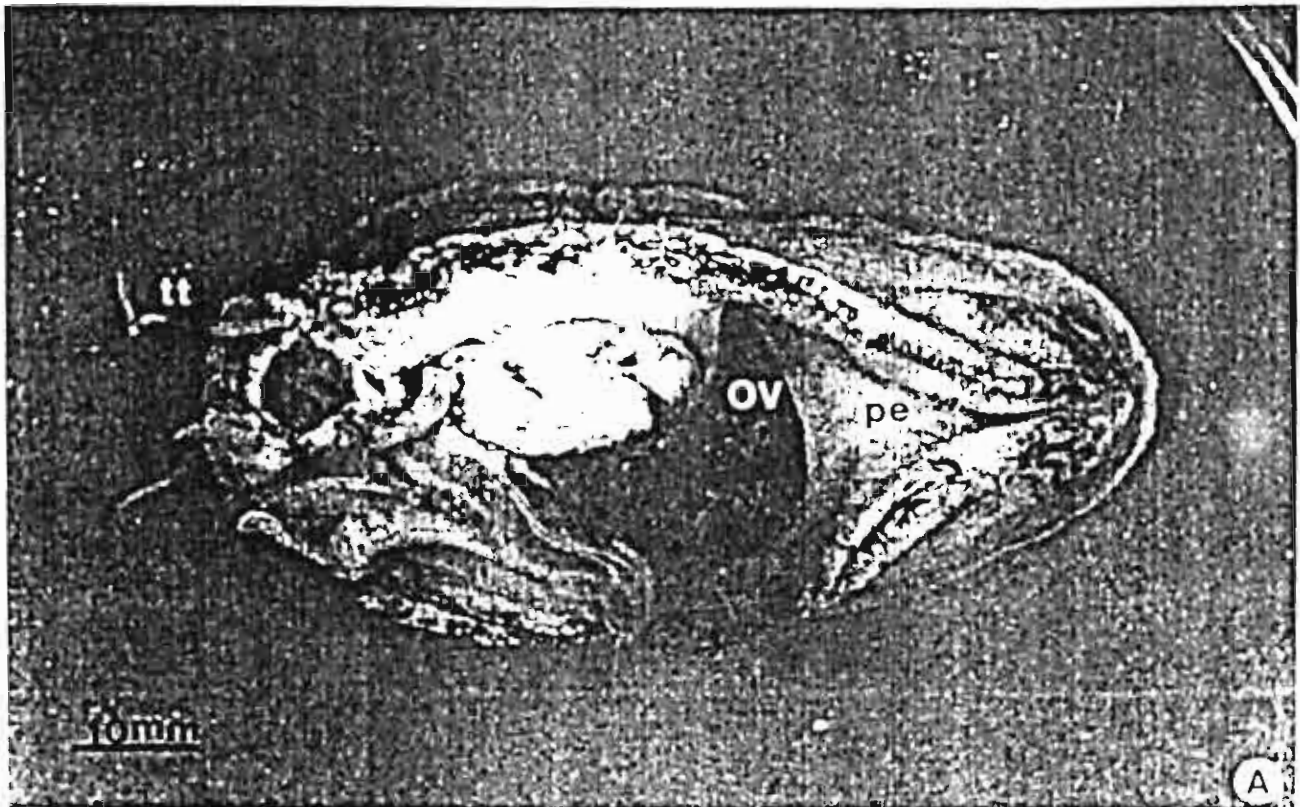
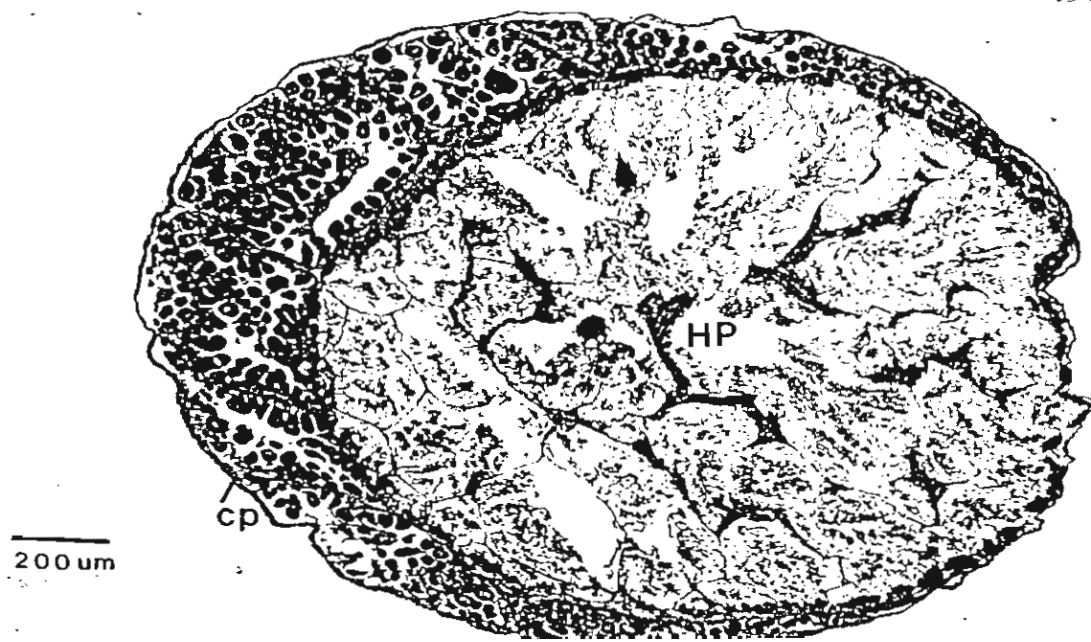
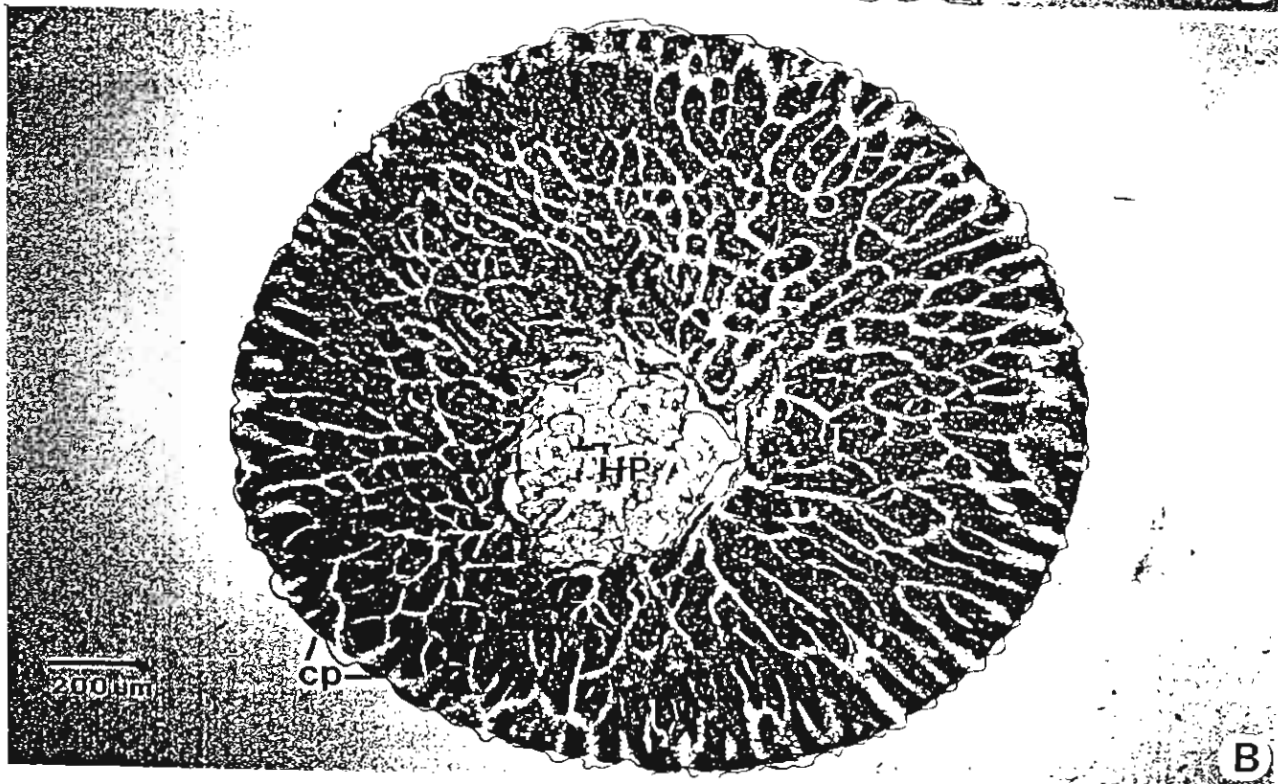
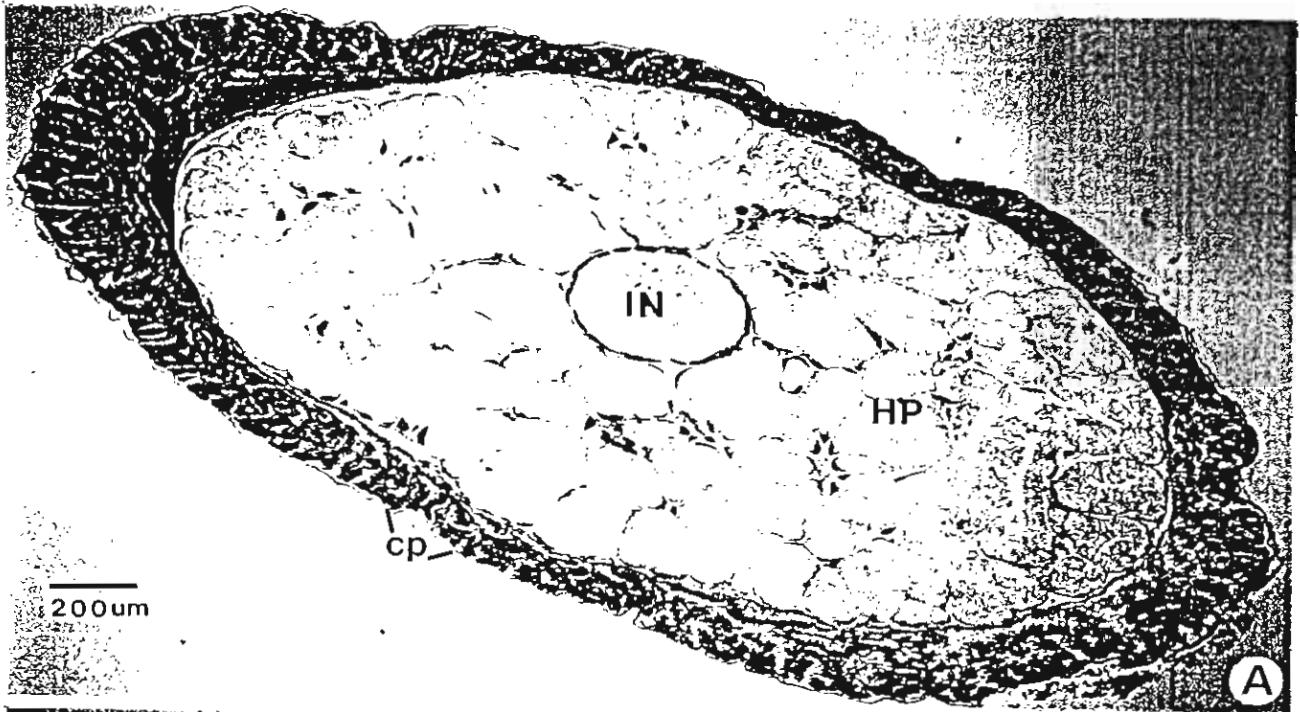


Figure 44



6.9 การศึกษาลักษณะและการจำแนกชั้นของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในระดับจุลทรรศน์ธรรมดา

การศึกษาด้วยจุลทรรศน์ธรรมดาจากเนื้อเยื่อที่เตรียมด้วยพาราฟินและ semithin เทคนิค ทำให้เราสามารถแยกเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ออกได้เป็น 13 ชั้น คือ

Spermatogonia (Sg) (รูปที่ 45C; 46A,D)

Sg เป็นเซลล์ที่มีขนาดประมาณ 10-12 μm และมีนิวเคลียสขนาดประมาณ 6-7 μm ซึ่งเป็นรูปไข่หรือว่าเข้าทางด้านใดด้านหนึ่ง นิวเคลียสประกอบด้วย euchromatin เป็นส่วนมาก และ heterochromatin ปรากฏเป็นแถบบาง ๆ เกาะติดกับด้านในของถุงหุ้มนิวเคลียส เนื้อนิวคลีโอพลาสซึมโปร่งแสง นิวคลีโอลัสจึงปรากฏเด่นชัด

Primary spermatocytes (รูปที่ 45B-D; 46A,B)

มี 5 ระยะ คือ ระยะ Leptotene (LSc) ระยะ Zygotene (ZSc) ระยะ Pachytene (PSc) ระยะ Diplotene (DSc) และระยะ Metaphase (MSc) เซลล์เหล่านี้มีขนาดใหญ่ที่สุดในระยะ LSc ถึง PSc โดยมีขนาดเซลล์ประมาณ 12-15 μm และขนาดนิวเคลียสประมาณ 8-10 μm เซลล์มีขนาดเล็กลงเรื่อย ๆ จนถึงชั้น DSc ซึ่งตัวเซลล์มีขนาดประมาณ 7 μm และนิวเคลียสมีขนาดประมาณ 4 μm จากนั้นเซลล์จะมีขนาดขยายใหญ่ขึ้นอีกใน MSc และ DSc ข้อแตกต่างที่เห็นได้ชัดในเซลล์ระยะต่าง ๆ คือ การขดตัวของโครมาตินเป็นก้อนหรือเส้นที่มีความทึบแสงและขนาดต่าง ๆ กัน ในระยะ LSc ก้อน heterochromatin มีขนาดเล็กและกระจายอยู่ทั่วทั้งนิวเคลียสอย่างสม่ำเสมอ นิวคลีโอลัสมีขนาดเล็กลงมากและไม่เด่นชัดเมื่อเทียบกับ Sg ในระยะ ZSc ก้อน heterochromatin มีขนาดใหญ่และเข้มข้น และกระจายอยู่ทั่วนิวเคลียส นิวคลีโอลัสไม่ปรากฏ ในระยะ PSc โครมาตินปรากฏเป็นเส้นหนาไขว้กันไปมา ซึ่งมีลักษณะคล้ายช่อดอกไม้หรือ bouquet pattern ในระยะ DSc เส้นโครมาตินหนาตัวและทึบแสงขึ้นอีก นิวเคลียสมีขนาดเล็กลง ทำให้เนื้อนิวคลีโอพลาสซึมทึบแสงยิ่งขึ้น ในระยะ MSc เส้นโครมาตินซึ่งกลายเป็นคู่ของโครมาติดเคลื่อนมาเรียงตัวกันที่แนวศูนย์สูตร (equatorial region)

Secondary spermatocyte (SSc) (รูปที่ 46A,D)

เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ประมาณ 8-10 μm และมีนิวเคลียสขนาดประมาณ 6 μm เส้นโครมาตินหนาขึ้นมากเมื่อเทียบกับระยะ DSc และไขว้กันไปมาเป็นรูปตาข่าย เนื้อนิวคลีโอพลาสซึมโปร่งแสงขึ้น

Spermatids (St) (รูปที่ 45D; 46C,D)

มี 4 ระยะ (St_{1-4}) ตามขนาดของนิวเคลียสและความทึบของโครมาติน นิวเคลียสของ St ทุกระยะมีรูปร่างกลม และมีขนาดตั้งแต่ 6 μm ใน St_1 ถึง 2-3 μm ใน St_4 โครมาตินปรากฏเป็นเม็ดละเอียดกระจายอยู่อย่างสม่ำเสมอและโปร่งแสงที่สุดใน St_1 และค่อย ๆ ปรากฏเป็นเม็ดหยาบที่มีขนาดใหญ่และทึบแสงขึ้นเรื่อย ๆ ใน St_2 และ St_3 จนกระทั่งในระยะ St_4 มีการหดแน่นของโครมาตินและนิวเคลียสที่ทึบแสงที่สุด

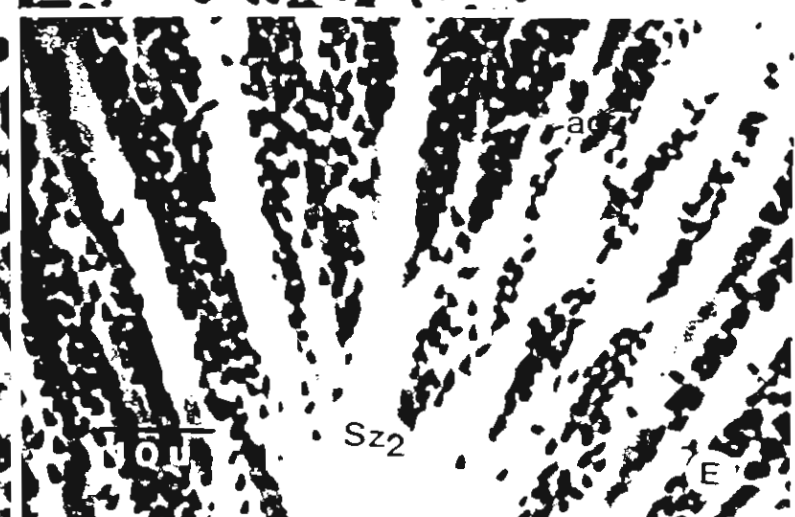
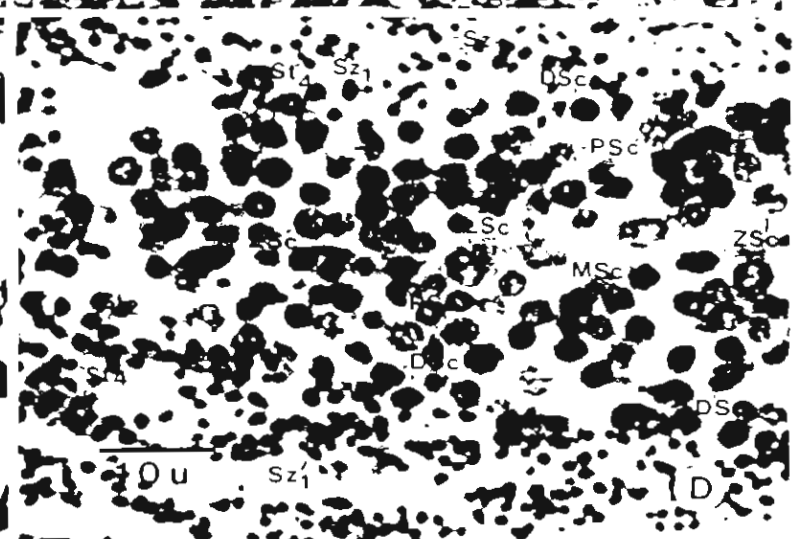
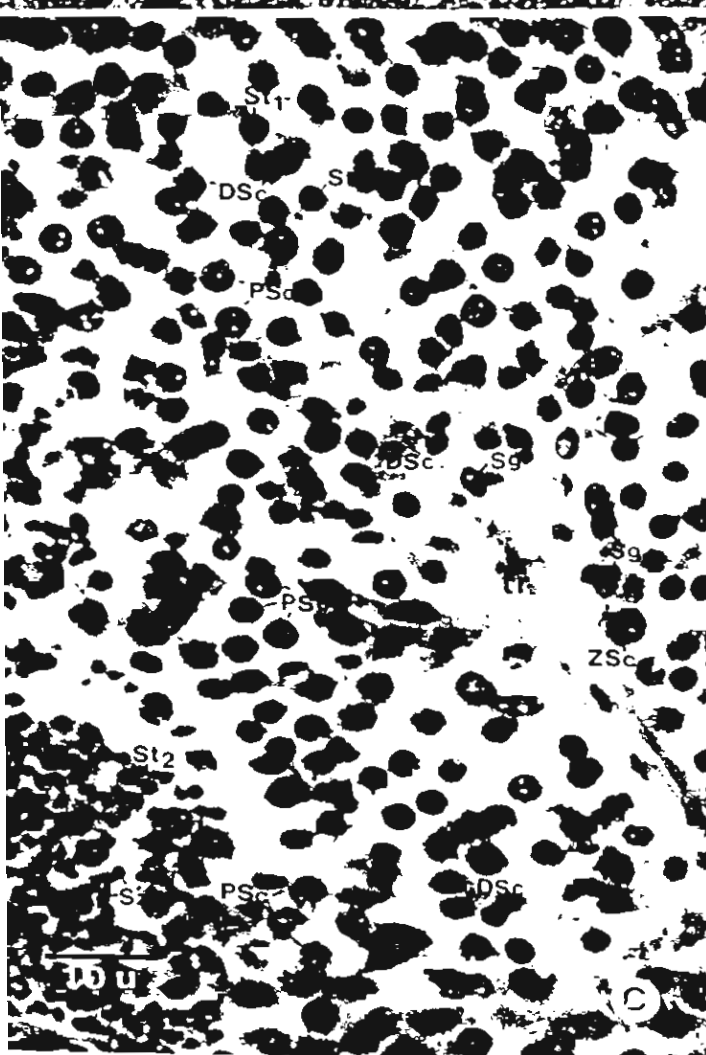
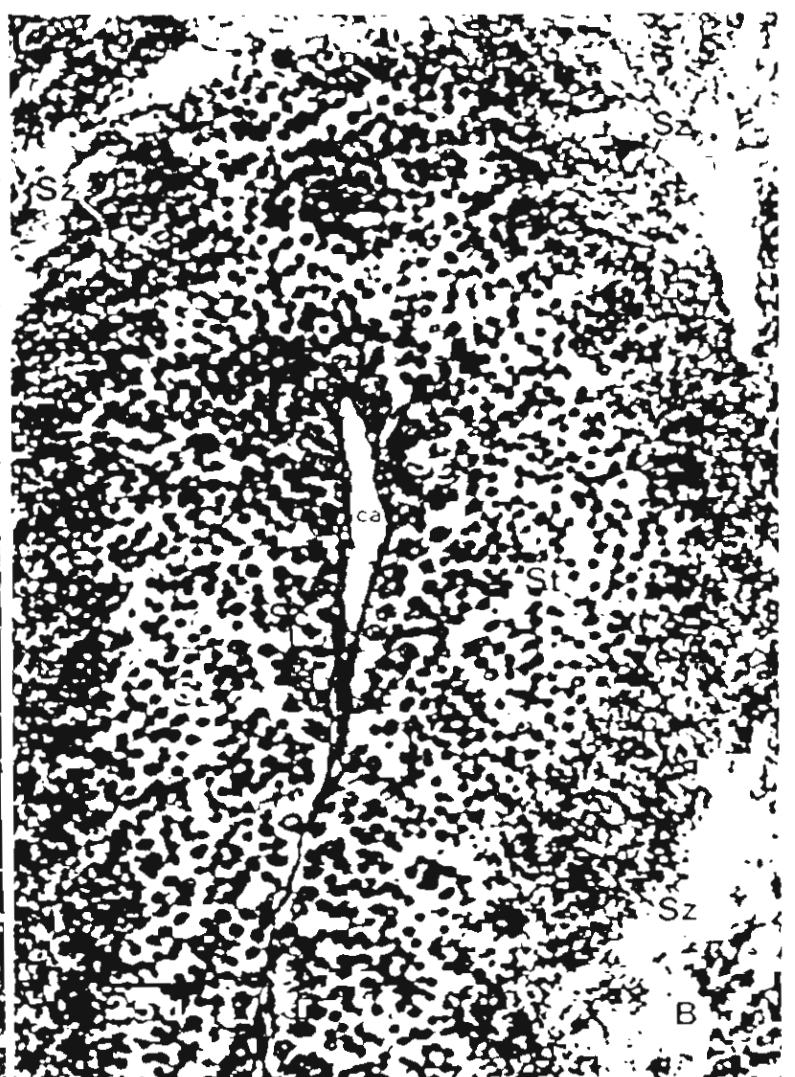
Spermatozoa (Sz) (รูปที่ 45C-E; 46C,D)

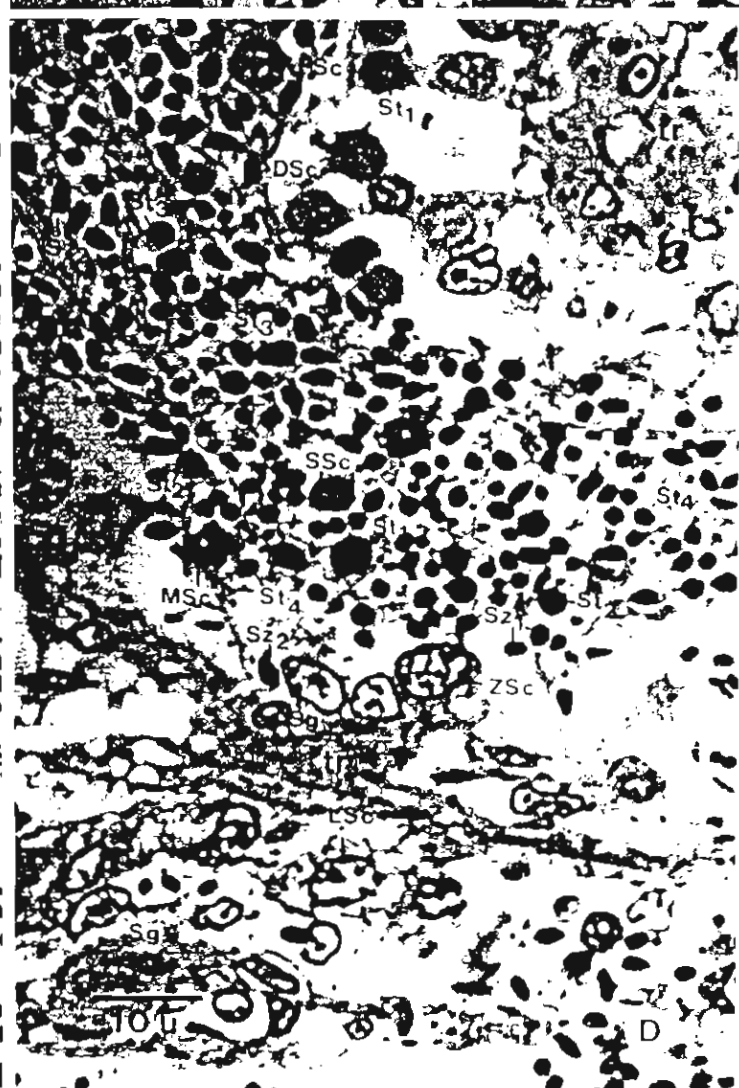
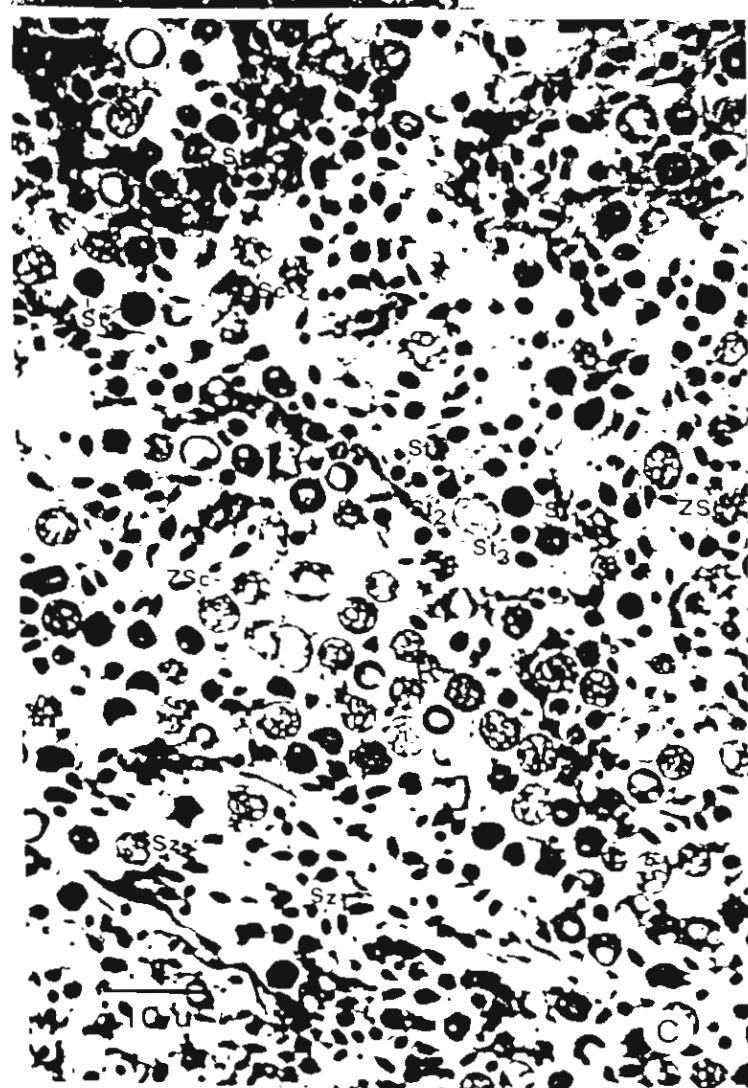
มี 2 ระยะคือ spermatozoa I (Sz_1) และ spermatozoa II (Sz_2) Sz_1 เป็นเซลล์ spermatozoa ที่ยังอ่อนอยู่ โดยมีนิวเคลียสรูปรีขึ้นเมื่อเทียบกับ St_4 และมีขนาดประมาณ 2-3 μm มีโครมาตินที่ยังไม่ทึบแสงเต็มที่ และมักปรากฏบริเวณใด ๆ คล้ายหมวกประกบกับด้านใดด้านหนึ่งของนิวเคลียส ซึ่งน่าจะเป็นส่วนของ acrosome ที่กำลังพัฒนาอยู่ ระยะ Sz_2 เป็นเซลล์ spermatozoa ที่พัฒนาเต็มที่แล้ว นิวเคลียสมีรูปร่างยาวเรียวและทึบแสงเต็มที่ขนาดประมาณ 1.5 x 3 μm เซลล์มีหางยาวและส่วนหัวยังฝังตัวอยู่กับเซลล์ที่เลี้ยง ที่ตั้งอยู่บนเยื่อเกี่ยวพันของ trabeculae ส่วนหางทอดออกไปปะปนกับหางของเซลล์ spermatozoa จาก spermatogenic unit ข้างเคียง (รูปที่ 45E)

รูปที่ 45 ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำ (A,B) และปานกลาง (C) แสดงส่วนตัดขวางของอัณฑะที่ย้อมด้วยสี PAS แสดงโครงสร้างต่าง ๆ คือ cp-capsule, tr-trabeculae, ca-capillary ภาพ C แสดง spermatogenic unit 1 หน่วย ซึ่งแต่ละอันประกอบด้วยเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่าง ๆ (Sc, St, Sz) หุ้มรอบ trabecula

รูปที่ 46 A) ภาพถ่ายกำลังขยายสูง semithin sections ของอัณฑะที่ย้อมด้วยสี methylene blue แสดงเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ชั้นต่าง ๆ จาก PrSc ถึง Sz

Figure 45





6.10 การศึกษาโครงสร้างละเอียด (Ultrastructure) ของเซลล์สืบพันธุ์ช่วง Spermatogenesis, Spermiogenesis และเซลล์สุจิที่อยู่ในต่อมอัณฑะด้วย จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope-TEM)

6.10.1 เซลล์ในช่วง Spermatogenesis

เซลล์ในช่วง Spermatogenesis มี 7 ชั้น ตามที่กล่าวมาแล้ว คือ spermatogonia (Sg), primary spermatocytes 5 ชั้น คือ leptotene (LSc), zygotene (ZSc), pachytene (PSc), diplotene (DSc), metaphase (MSc) และ secondary spermatocyte (SSc) เมื่อสังเกตด้วย TEM พบว่าเซลล์ชั้นต่าง ๆ เหล่านี้เรียงตัวเป็นชั้น ๆ ตามลำดับ โดยมี Sg, LSc ส่วนใหญ่เรียงตัว ใกล้แกนเยื่อเกี่ยวพัน trabeculae ชั้นถัดไปคือ PSc, DSc และ MSc (รูปที่ 47A-D) และชั้นสุดท้ายที่เซลล์ยังเกาะกลุ่มเป็น epithelium คือ ชั้น SSc ถัดจากชั้นนี้ออกไปคือกลุ่มของเซลล์ spermatids ชั้นต่าง ๆ ในช่วง spermiogenesis ซึ่งมักจะเป็นเซลล์ที่หลุดจากกัน (รูปที่ 47D; 53A)

Spermatogonia (Sg)

เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ขนาด 8-10 μm นิวเคลียสมีขนาด 6-7 μm บรรจุโครมาตินซึ่งส่วนมากเป็น euchromatin โดยมี heterochromatin ปรากฏเป็นก้อนเล็ก ๆ เกาะอยู่ตามด้านในของเยื่อหุ้มนิวเคลียสกับกระจายทั่วไปในนิวเคลียส นิวคลีโอลัสมีขนาดใหญ่ และลักษณะเด่น ไซโทพลาสซึมมี ribosome อยู่พอประมาณ และมี rough endoplasmic reticulum (rer) และไมโทคอนเดรียอยู่จำนวนน้อย โดยไม่มีแกรนูลอยู่เลย (รูปที่ 48A-D)

Leptotene primary spermatocyte (LSc)

เซลล์ในชั้นนี้อาจจะแบ่งออกเป็น 2 ชั้นย่อย คือ preleptotene (PLSc) และ leptotene (LSc) โดย PLSc เป็นเซลล์ขนาดเล็กเท่ากับ Sg แต่โครมาตินเริ่มก่อตัวเป็นก้อน heterochromatin ขนาดเล็ก ๆ ในส่วนกลางของนิวเคลียสจำนวนมากขึ้น (รูปที่ 49A-D) และมีนิวคลีโอลัสใหญ่และเด่นชัด โดยอาจจะปรากฏเป็น 2 ส่วนคือ ขอบนอกทึบและในส่วนในโปร่ง (รูปที่ 49B,C) ในระยะ LSc เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้นถึงประมาณ 12-15 μm โดยมีรูปร่างคล้ายรูปไข่ heterochromatin ที่ส่วนกลางของนิวเคลียสปรากฏเป็นท่อนยาวขึ้นแต่ยังค่อนข้างบาง ในขณะที่แถบ heterochromatin ตามขอบในของเยื่อหุ้มนิวเคลียสบางลงมาก (รูปที่ 50A-D) เส้นใยโครมาตินใน PLSc และ LSc มีการเรียงตัวเป็น 3 ระดับคือ เส้นใยเดี่ยวขนาด 30 nm ซึ่งเรียกว่าใยโครมาตินพื้นฐาน (fundamental chromatin fiber) หรือระดับที่ 2 ซึ่งอาจจะคลี่ออกเป็นใยเล็กลงขนาด 10-15 μm ซึ่งเรียกว่าระดับที่ 1 (รูปที่ 49F; 50E,F) ในทางกลับกันใยโครมาตินระดับ 2 อาจขดพันกันแน่นจนกลายเป็นก้อนหรือท่อน heterochromatin หรือระดับ 3 ซึ่งถึงแม้

ว่าจะปรากฏเป็นก้อนหรือท่อนขนาดต่าง ๆ กัน แต่ภายในก็ยังสามารถสังเกตเห็นใยระดับ 2 ที่อัดกันแน่นอยู่อย่างชัดเจน (รูปที่ 49F; 50E,F) ในระยะ LSc นิวเคลียสไม่ค่อยปรากฏชัด ส่วนไซโตพลาสซึมมี ribosomes และไมโทคอนเดรียหนาแน่นขึ้น และอาจจะมีก้อนแกรนูลที่บ่งแสดงอิเล็กตรอนกระจายอยู่อย่างประปราย

Zygotene primary spermatocyte (ZSc)

ZSc มีขนาดและรูปร่างใกล้เคียงกับ LSc แต่มีท่อน heterochromatin ที่หนาและยาวขึ้น ลักษณะเด่นของ ZSc คือการปรากฏตัวของ synaptonemal complexes ซึ่งเป็นแผ่นที่ประกอบด้วยแถบที่บ่งแสดงอิเล็กตรอน 3 แถบ สลับกับแถบโปร่งแสงอิเล็กตรอน 2 แถบเรียงติดกัน โดย synaptonemal complexes จะกระจายอยู่ในก้อน heterochromatin และเป็นที่ยึดของใยโครมาตินที่ชิดพันกันแน่นมาก

Pachytene primary spermatocyte (PSc)

เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างและขนาดใกล้เคียงกับ LSc แต่จะมีท่อน heterochromatin ที่หนามาก และปรากฏเป็นแท่งยาวต่อเนื่องกันทั่วทั้งนิวเคลียส (รูปที่ 51A-D) ใยโครมาตินยังปรากฏเป็น 3 ระดับเช่นเดียวกับในระยะ LSc ถึงแม้ว่าท่อน heterochromatin จะหนาและยาวขึ้น แต่ภายในก็ยังประกอบด้วยใย 30 nm ที่อัดกันอยู่แน่นเช่นเดียวกับในระยะ LSc (รูปที่ 51C-F) ภายในไซโตพลาสซึมมีแกรนูลขนาดเล็กที่บ่งแสดงอิเล็กตรอนจำนวนมากขึ้น และกระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม (รูปที่ 51A,B)

Diplotene primary spermatocyte (DSc)

DSc มีรูปร่างและลักษณะคล้าย PSc แต่ทั้งเซลล์และนิวเคลียสมีขนาดลดลงเหลือประมาณ 8 μm ท่อนโครมาตินกลับมีความหนามากขึ้นและกระชับเข้าหากันมากขึ้น (รูปที่ 50C)

Metaphase (diakinetic) primary spermatocyte (MSc)

เซลล์ MSc มีรูปร่างกลมขนาดขยายใหญ่ขึ้นเท่ากับ LSc ลักษณะเด่นคือ heterochromatin ปรากฏเป็นท่อนยาวต่อเนื่องกันจึงมีขนาดใหญ่ และมีจำนวนเพียง 1 หรือ 2 ท่อนอยู่ที่แถบกลางของเซลล์ โดยไม่มีถุงหุ้มนิวเคลียสล้อมรอบ ท่อน heterochromatin ก็ยังประกอบด้วยเส้นใยระดับ 2 ที่อัดกันอยู่แน่น ในไซโตพลาสซึมมีแกรนูลที่บ่งแสดงอิเล็กตรอนขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วไป (รูปที่ 52A-F)

Secondary spermatocyte (SSc)

SSc เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ใกล้เคียงกับ MSc ลักษณะเด่นคือ heterochromatin ปรากฏเป็นท่อนยาวหนา และสานกันเป็นรูปตาข่ายหรืออักษร Y ที่ต่อเนื่องกัน โดยแท่งโครมาติน

วางตั้งจากซึ่งกันและกัน (รูปที่ 53A-F) ภายในแท่งโครมาตินยังประกอบด้วยใยโครมาตินระดับ 2 แต่ใยโครมาตินเหล่านี้สานกันอยู่หลวมขึ้น เมื่อเทียบกับระยะ MSc และ DSc (รูปที่ 53D-F)

ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า ใยโครมาตินระดับ 2 เป็นระดับพื้นฐานที่อาจจะคลี่เป็นระดับ 1 ซึ่งเป็นส่วนของ euchromatin ซึ่งพบมากในเซลล์ชั้น Sg และ LSc เส้นใยระดับ 2 จะขดพันกันแน่นขึ้นเป็นก้อนที่มีขนาดใหญ่ และความแน่นทึบมากขึ้นเรื่อย ๆ ในชั้น PSc, DSc และ MSc เมื่อผ่านชั้น MSc ไปแล้ว ใยระดับ 2 จะค่อย ๆ คลายตัวออกอย่างสังเกตเห็นได้ในชั้น SSc และเมื่อเข้าสู่ระยะต้นของเซลล์ spermatids ใยระดับ 2 ก็จะคลี่ออกและกระจายอยู่อย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งนิวเคลียส โดยเฉพาะใน round spermatid ชั้นที่ 1 ซึ่งจะกล่าวถึงในตอนต่อไป

สิ่งที่น่าสังเกตอีกประการหนึ่งคือ ในไซโตพลาสซึมมีก้อนทึบแสงอิเล็กทรอนิกส์ขนาดเล็กที่เริ่มปรากฏขึ้นในเซลล์ชั้น LSc และแกรนูลเหล่านี้มีจำนวนเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ แม้กระทั่งใน MSc และมีปริมาณต่อเซลล์มากที่สุดใน round spermatid ชั้นที่ 1 ถ้าหากแกรนูลเหล่านี้เป็น proacrosomal granules ก็แสดงว่าการสร้าง acrosome เริ่มต้นเร็วกว่าที่มีผู้เคยเสนอความคิดกล่าวคือ เริ่มการสร้างในเซลล์ระยะต้น ๆ ตั้งแต่ชั้น LSc เมื่อเซลล์เริ่มสังเคราะห์ DNA และเริ่มเข้าสู่กระบวนการแบ่งเซลล์แบบ meiosis

- รูปที่ 47 ภาพ TEM แสดงการเรียงตัวของเซลล์ PrSc ชั้นต่าง ๆ ใกล้เคียงกับระดับ trabeculae (A,B) และ SSc กับ St (C,D) ซึ่งเริ่มกระจายออกไปสู่ช่องว่างภายในช่องกลวงระหว่าง spermatogenic units
- รูปที่ 48 A-D) ภาพ TEM ของเซลล์ spermatogonia แสดงลักษณะการกระจายของก้อน heterochromatin (Ch) ในนิวเคลียส และก้อน nucleolus (no) ที่ยังแน่นทึบ
- รูปที่ 49 ภาพ TEM ของเซลล์ primary spermatocytes ชั้น preleptotene (PLSc) (A,B) แสดงลักษณะการกระจายของก้อน heterochromatin และ nucleolus โยโครมาตินมีการจัดตัวเป็น 3 ระดับ (1, 2, 3 ใน C-F)
- รูปที่ 50 ภาพ TEM แสดงการเรียงตัวของ LSc ปะปนกับ PSc และ DSc (A-D) กับการจัดโยโครมาตินเป็น 3 ระดับในนิวเคลียสของเซลล์ LSc (1, 2, 3 ใน E,F)
- รูปที่ 51 ภาพ TEM แสดงการเรียงตัวของเซลล์ PSc และ DSc (A,B) กับภาพ TEM แสดงลักษณะของโครมาตินในนิวเคลียสของเซลล์ PSc (C-F) และการกระจายของ proacrosomal granules ในไซโตพลาสซึม (A,B)
- รูปที่ 52 ภาพ TEM ของเซลล์ MSc แสดงลักษณะการหดตัวของโยโครมาตินเป็นก้อนโครโมโซมขนาดใหญ่ (A-F) และการกระจายของ proacrosomal granules ในไซโตพลาสซึม (B)
- รูปที่ 53 ภาพ TEM แสดงการเรียงตัวของเซลล์ SSc ที่แฉกนอกสุด (A) และการไขว้ของแถบ heterochromatin เป็นตาราง (B-F) และการกระจายของ proacrosomal granules ในไซโตพลาสซึม (B,C)

Figure 47

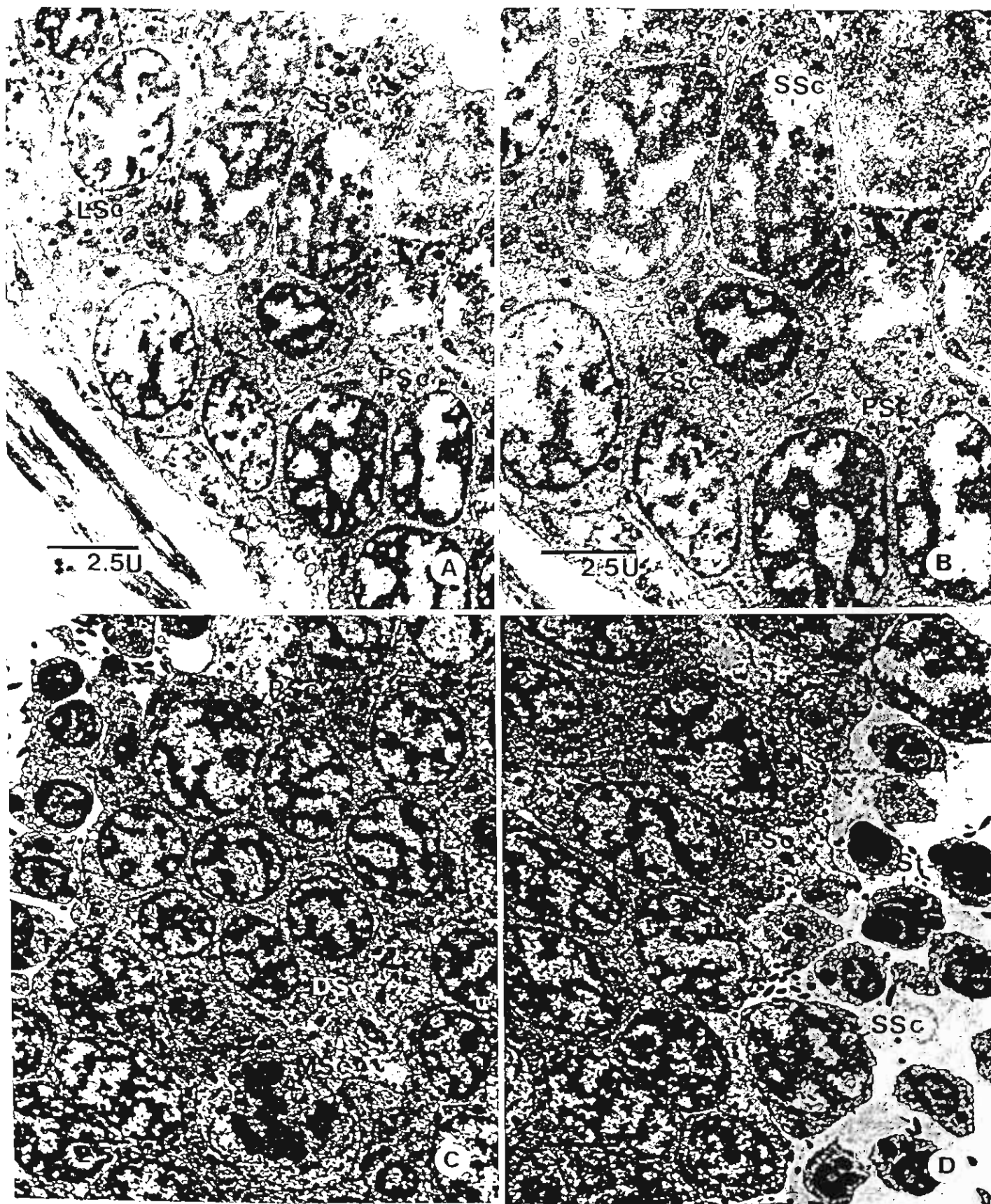


Figure 48

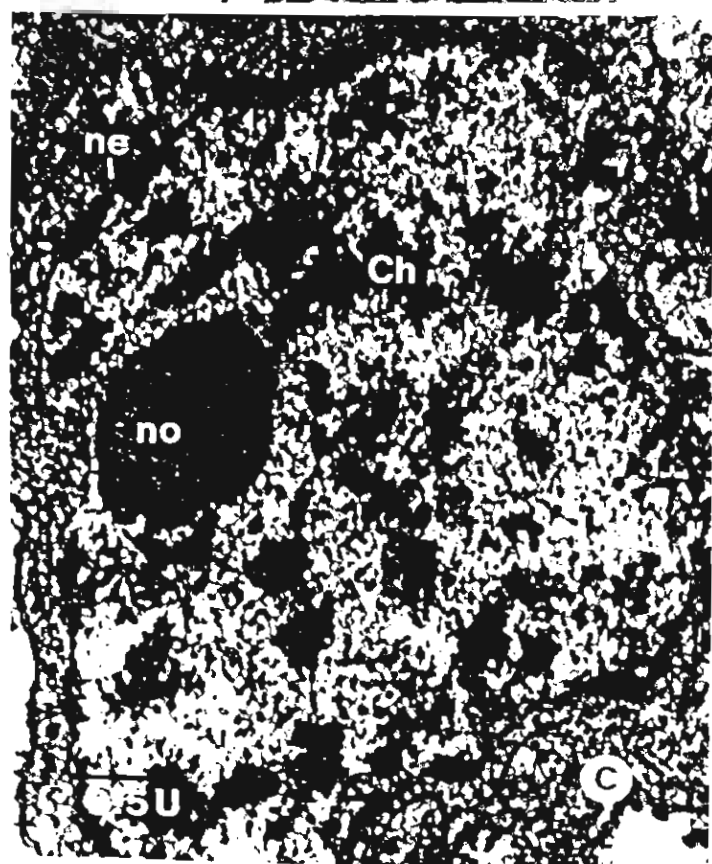
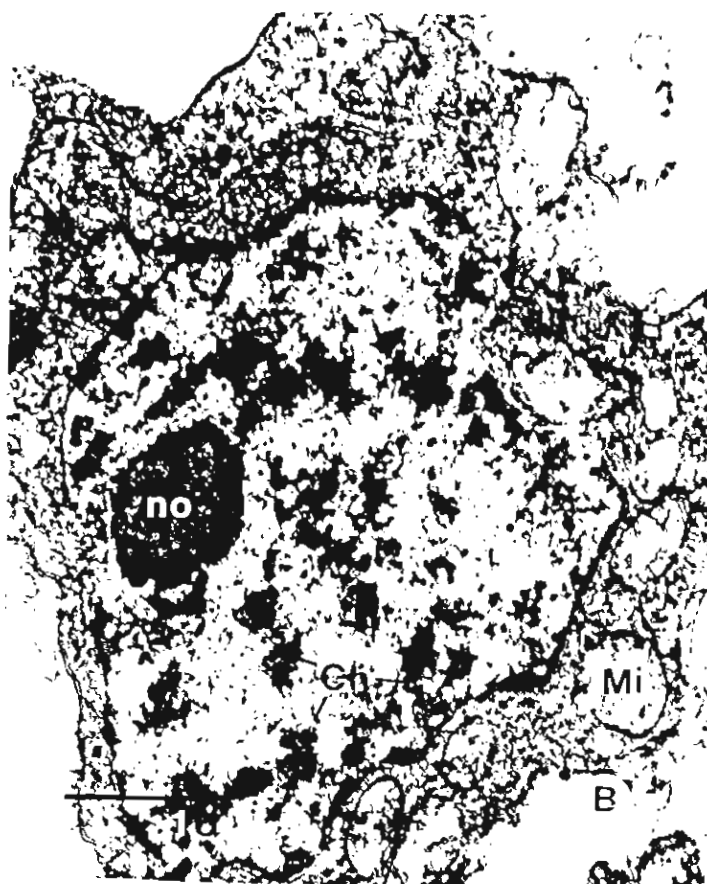


Figure 49

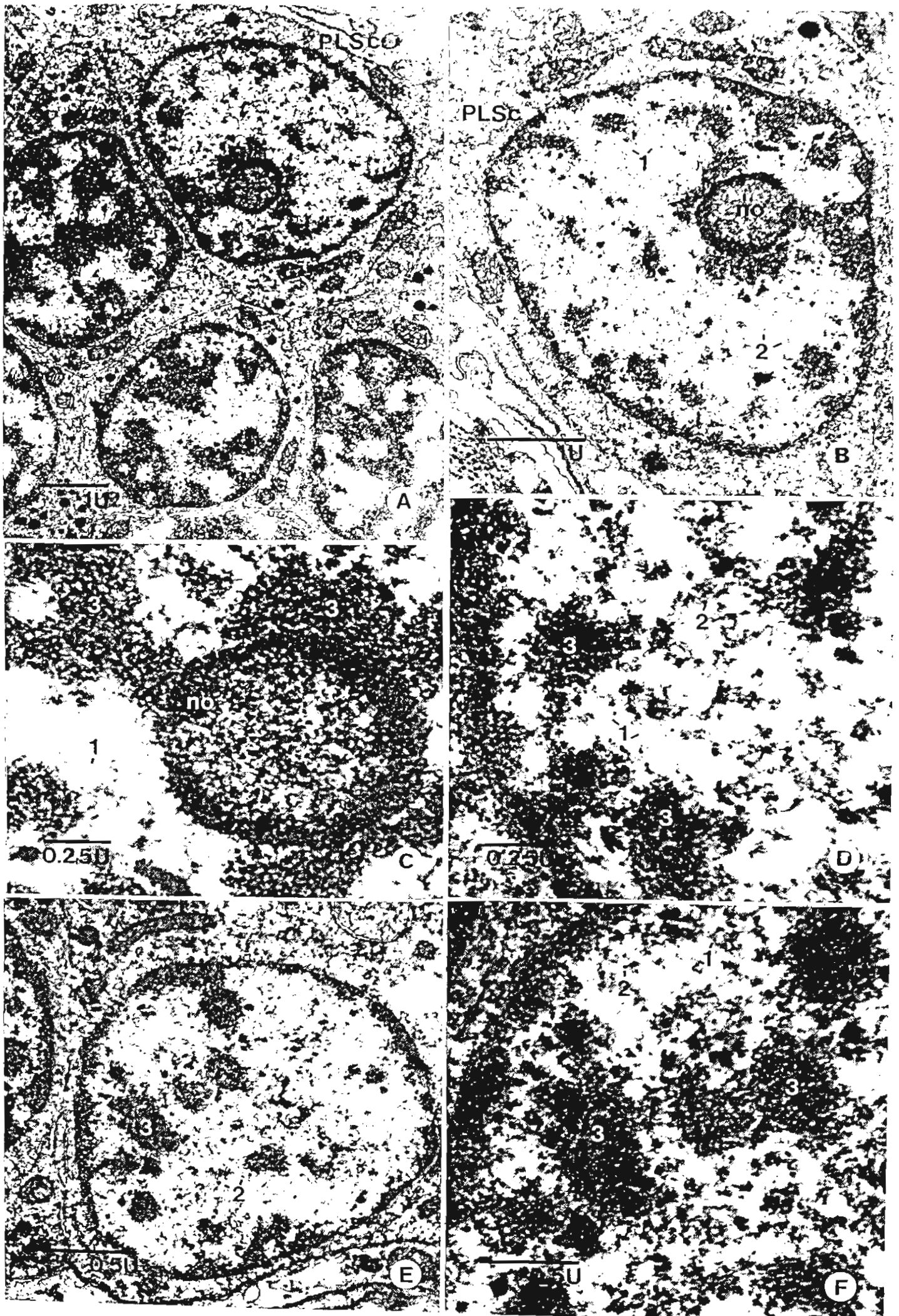


Figure 50

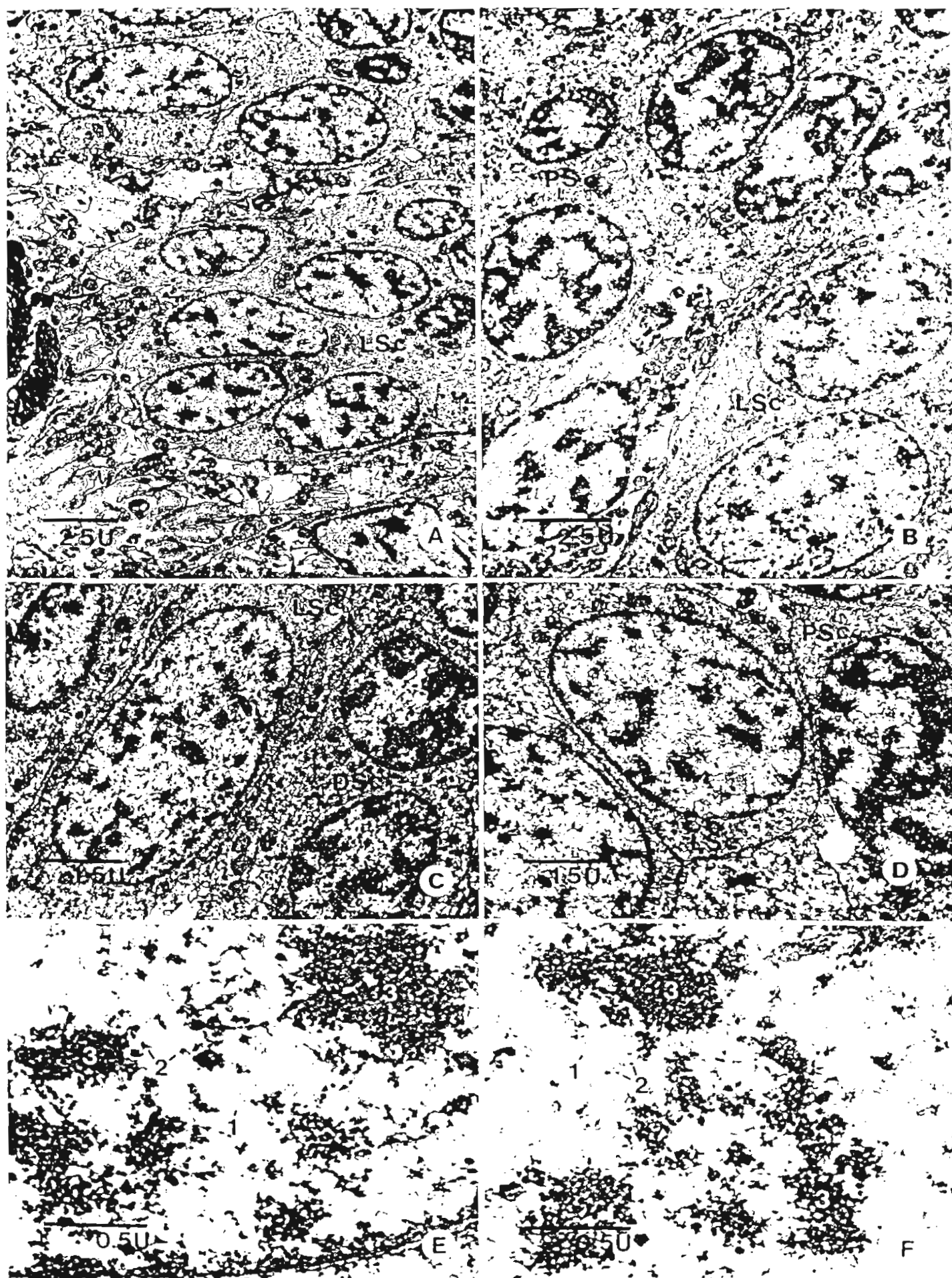


Figure 51

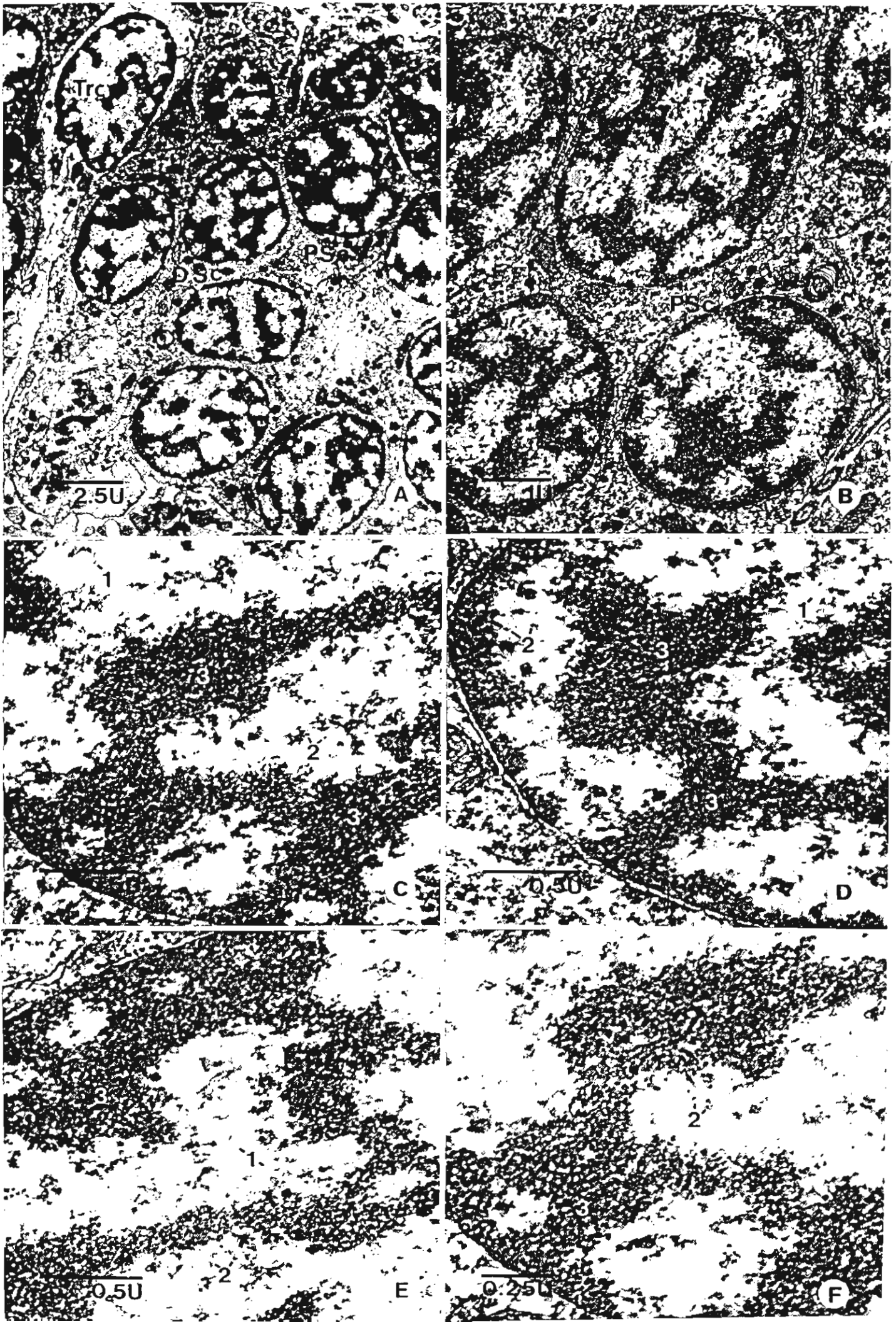


Figure 52

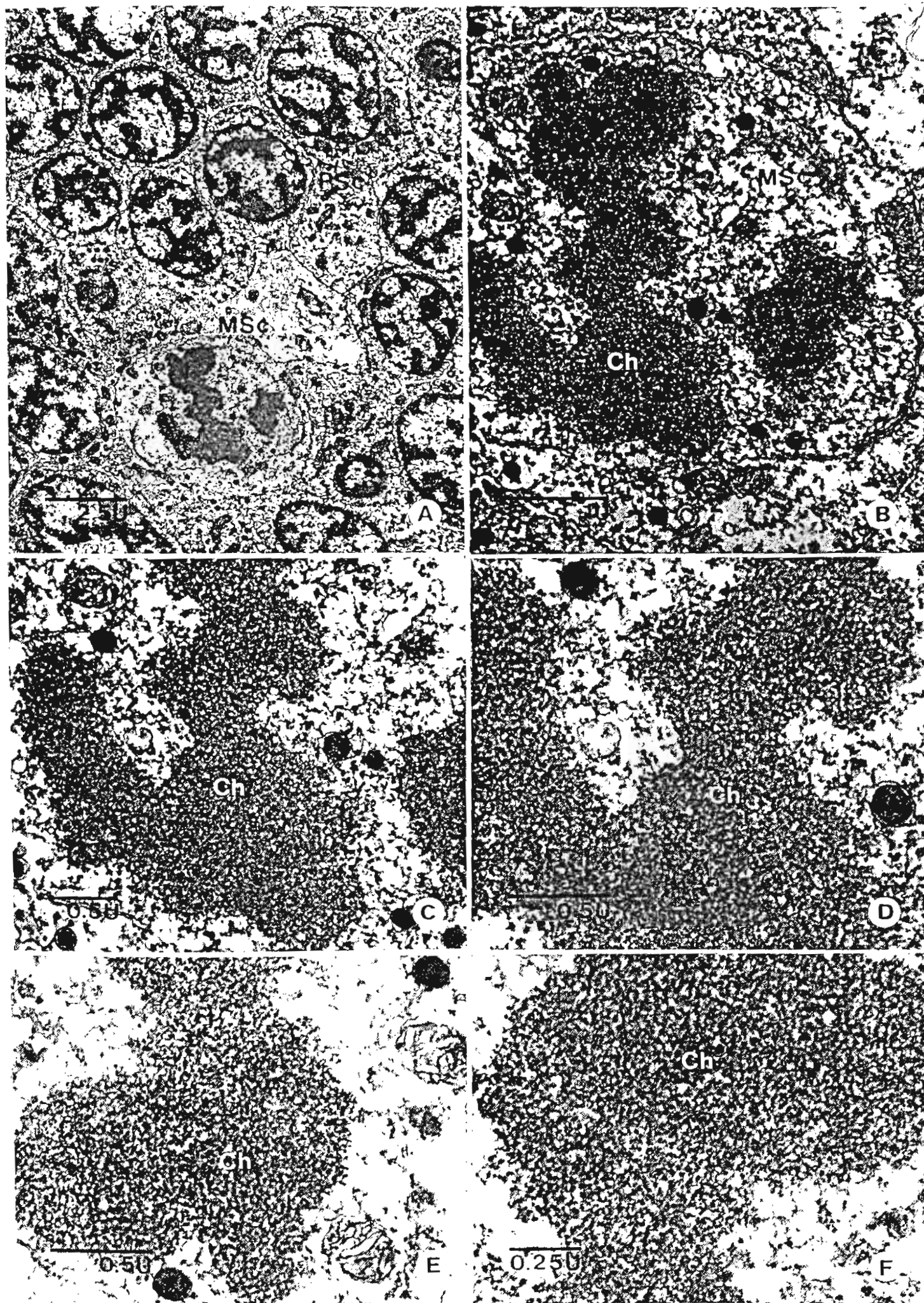
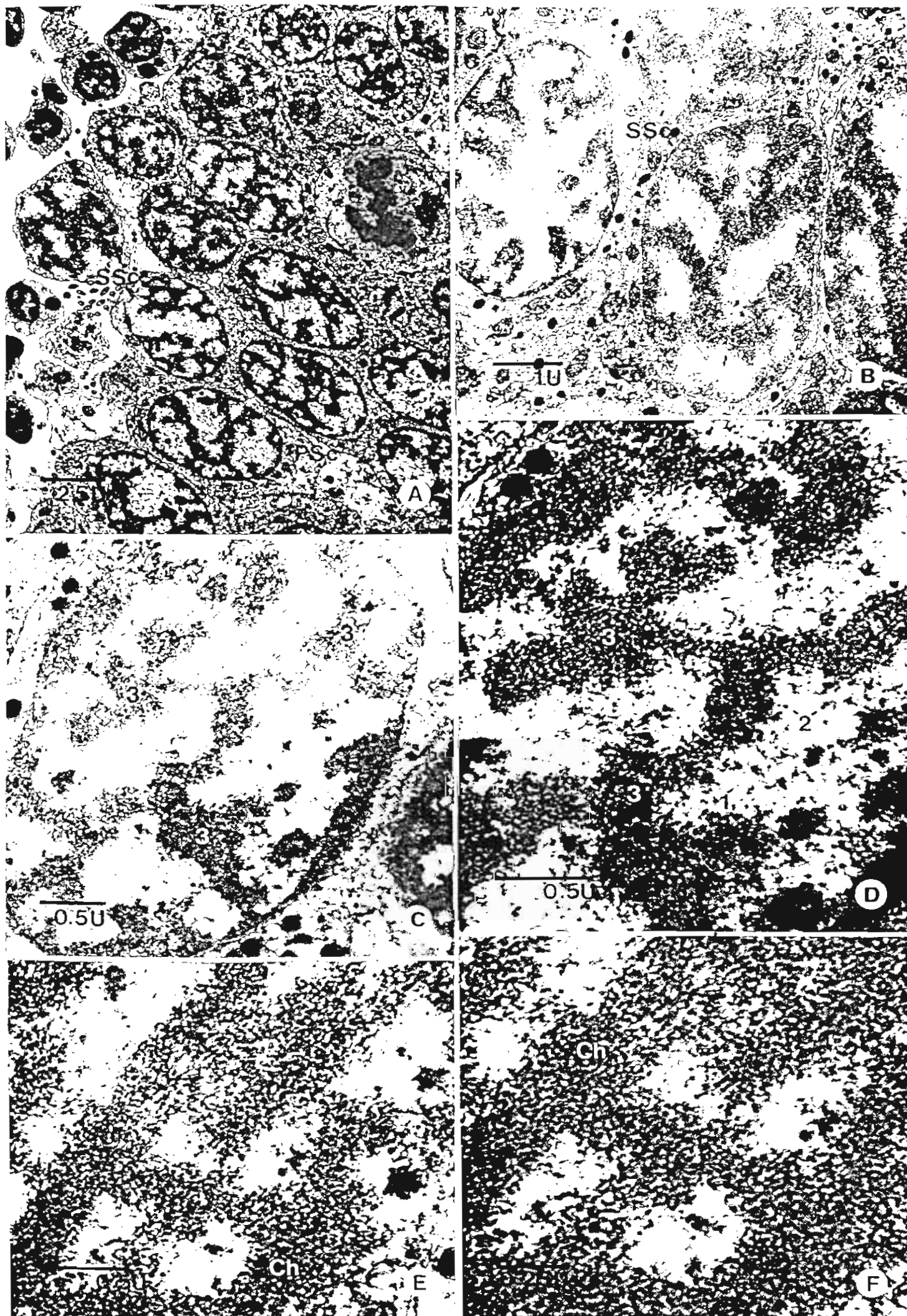


Figure 53



6.10.2 เซลล์ในช่วง Spermiogenesis และการขดของใยโครมาติน

เราได้แบ่งเซลล์ในช่วง spermiogenesis ของหอยเป่าอีกออกเป็น 4 ชั้น จากการศึกษาระดับ TEM (รูปที่ 54) และจากการศึกษาด้วยจุลทรรศน์ธรรมดาตามที่กล่าวมาแล้วในข้อ 6.9

Spermatid ชั้น I (St_1)

เมื่อสังเกตโดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน นิวเคลียสมีลักษณะกลม มีโครมาตินค่อนข้างโปร่งแสงและกระจายอยู่อย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งนิวเคลียส เส้นใยโครมาตินเป็นระดับที่มีขนาด 30 nm ซึ่งกระจายอยู่อย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งนิวเคลียส (รูปที่ 55A-F) ไซโตพลาสซึมมีเม็ดแกรนูลจำนวนมากรวมกลุ่มอยู่ทางด้านหนึ่งของเซลล์ ซึ่งอาจจะเป็น proacrosomal granules ซึ่งเริ่มมีการสร้างตั้งแต่เซลล์ชั้น LSc ตามที่กล่าวมาแล้ว (รูปที่ 55A,B) ไมโทคอนเดรียมีอยู่เพียงประปรายและกระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม (รูปที่ 55A,B)

Spermatid ชั้น II (St_2)

ตอนต้นนิวเคลียสมีขนาดเล็ก (รูปที่ 56A,B) จึงทำให้โครมาตินอัดกันแน่นขึ้น โดยใยโครมาตินสายเดี่ยวยังคงมีขนาด 30 nm เท่าเดิม ที่น่าสังเกตคือ มักมีบริเวณที่โครมาตินเริ่มขดพันกันแน่นทั้งที่บริเวณขอบและบริเวณส่วนกลางของนิวเคลียส บริเวณที่โครมาตินเริ่มขดตัวดังกล่าวมักมีเส้นทึบที่เป็นแกนกลาง (axis of condensation) โดยรอบ ๆ แกนจะมีเส้นใยโครมาตินขนาด 30 nm ขดเป็นปวงร้อยเข้ากับแกน (รูปที่ 56C,E,F) เส้นใยโครมาตินสายเดี่ยวในก้อนโครมาตินที่ขดตัวแน่นขึ้นยังคงมีขนาด 30 nm เท่าเดิม ในไซโตพลาสซึมมี proacrosomal granules จำนวนมากตั้งอยู่ทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (รูปที่ 56B) ในบางเซลล์เริ่มมี axoneme ของหางเซลล์สุจิปรากฏตัวขึ้น (รูปที่ 56A) ในนิวเคลียสของเซลล์ spermatid II ชั้นปลายบริเวณที่โครมาตินขดตัวขยายวงกว้างออกและแน่นทึบขึ้น จนไม่สามารถสังเกตเห็นแกนกลางได้อีกต่อไป บริเวณนิวคลีโอลัสมีระหว่างก้อนโครมาตินที่ขดตัวแน่นจะมีขนาดใหญ่และโปร่งแสงอิเล็กตรอนขึ้น (รูปที่ 57A-D; 58A-D) ในไซโตพลาสซึมมีก้อน proacrosomal granules ขนาดใหญ่ที่อาจเกิดจากการรวมตัวของก้อน proacrosomal granules ขนาดเล็กที่มีอยู่ในเซลล์ชั้นก่อนหน้านี้ ก้อน proacrosome ขนาดใหญ่ดังกล่าว เคลื่อนมาอยู่ทางด้านหน้าของเซลล์โดยประกบติดอยู่กับถุงหุ้มนิวเคลียส (รูปที่ 57C,D; 58A,C)

Spermatid ชั้น III (St_3)

บริเวณที่โครมาตินขดตัวแน่นขยายขนาดออกไปอีก และมีความทึบแสงอิเล็กตรอนมากขึ้น เส้นโครมาตินสายเดี่ยวที่ปรากฏอยู่ในก้อนมีขนาดใหญ่ขึ้นถึงประมาณ 40 nm นิวคลีโอลัสมีระหว่างก้อนโครมาตินปรากฏเป็นบริเวณใสมากขึ้น (รูปที่ 57E,F; 58E,F; 59A-E)

ในไซโตพลาสซึม proacrosomal granule มีขนาดใหญ่ขึ้นและประกอบอยู่ทางด้านใดด้านหนึ่งของนิวเคลียส ไมโทคอนเดรียขนาดใหญ่ 2-3 อัน เริ่มเคลื่อนไปประกอบอยู่กับขอบของนิวเคลียสด้านตรงกันข้ามกับ proacrosome (รูปที่ 59B,E,F)

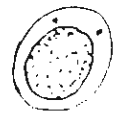
Spermatid ชั้น IV (St_4)

นิวเคลียสมีรูปร่างเรียวยาวมาก ด้านหน้า proacrosomal granules พัฒนาเป็น acrosome เกือบสมบูรณ์ (รูปที่ 60A,E) ภายในนิวเคลียสก่อนโครมาตินหดตัวแน่นขึ้น และเริ่มอัดกันแน่นจนทำให้บริเวณนิวคลีโอลัสที่โปร่งแสงมีขนาดลดลงมาก (รูปที่ 60A-C) ภายในก้อนโครมาตินยังพอสังเกตเห็นเส้นใยโครมาตินสายเดี่ยวที่อัดติดกันแน่น โดยใยโครมาตินแต่ละเส้นมีความหนาถึง 60 nm (รูปที่ 60D-F) ด้านหลังของนิวเคลียสมี centriole 1 คู่ วางตั้งฉากซึ่งกันและกัน โดยมี axoneme ของหางงอกออกไปทางด้านหลัง รอบ centriole มีไมโทคอนเดรีย 3 ถึง 5 อันมาเรียงตัวอยู่ (รูปที่ 60E,F)

- รูปที่ 54 ภาพวาดแสดงการหดตัวของไโครมาติน (chromatin condensation) และการพัฒนา acrosome จากก้อน acrosomal granules ในเซลล์ spermatids และ spermatozoa
- รูปที่ 55 ภาพ TEM ของเซลล์ St_1 แสดงการกระจายของไโครมาตินระดับที่ 2 (30 nm) อย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งนิวเคลียส (A-F) และจำนวนของ proacrosomal granules ที่มากขึ้น และกระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม (A,B)
- รูปที่ 56 ภาพ TEM ระยะต้นของเซลล์ St_2 (A,B) แสดงการเริ่มพันตัวของไโครมาตินระดับที่ 2 โดยเฉพาะรอบ ๆ บริเวณ condensation axis (ax) ซึ่งอาจจะติดอยู่กับถุงหุ้มนิวเคลียส หรือกระจายอยู่กลางนิวเคลียส (C-F)
- รูปที่ 57 ภาพ TEM ระยะปลายของเซลล์ St_2 แสดงการหดตัวเพิ่มขึ้นของไโครมาตินเป็นก้อน heterochromatin และการเริ่มรวมตัวของ proacrosomal granules เป็นก้อนใหญ่ขึ้น (Ac) (A-D) และภาพเซลล์ St_3 (E,F) แสดงการเริ่มทึบตัวของก้อนโครมาตินและช่องว่าง (vacuole-va) ที่เกิดขึ้นระหว่างก้อนโครมาติน
- รูปที่ 58 ภาพ TEM ระยะต้นของเซลล์ St_3 แสดงความทึบของก้อนโครมาตินจากการหดตัวแน่นของไโครมาติน (B-D) การรวมตัวของ proacrosomal granules ที่ด้านหน้าของนิวเคลียส ซึ่งกลายเป็นก้อน acrosome ขนาดใหญ่ (A,C) และการเคลื่อนของ mitochondria (Mi) ไปอยู่ทางด้านหลังของนิวเคลียส
- รูปที่ 59 ภาพ TEM ระยะปลายของเซลล์ St_3 แสดงความแน่นทึบของก้อน heterochromatin ที่เกิดจากการหดตัวแน่นของใยขนาด 40 nm (A,B,C,E) ช่องว่างระหว่างก้อน heterochromatin แคบลง (A,C,D,E,F) ไมโทคอนเดรียเคลื่อนไปอยู่ด้านหลังของนิวเคลียส (B,D,E)
- รูปที่ 60 ภาพ TEM ของเซลล์ St_4 แสดงก้อน heterochromatin ที่ทึบแสงเกือบเต็มที่จากการหดตัวของไโครมาตินขนาด 60 nm (C-F) ช่องว่างภายในนิวเคลียส (va) แคบลงมาก (A,B,C,E) ไมโทคอนเดรียล้อมรอบ centriole (ce) ซึ่งเป็นจุดกำเนิดของหาง (T) ยึดยาวออกไปทางด้านหลัง

Figure 54

ABALONE



I



II



III



IV



V

Figure 55

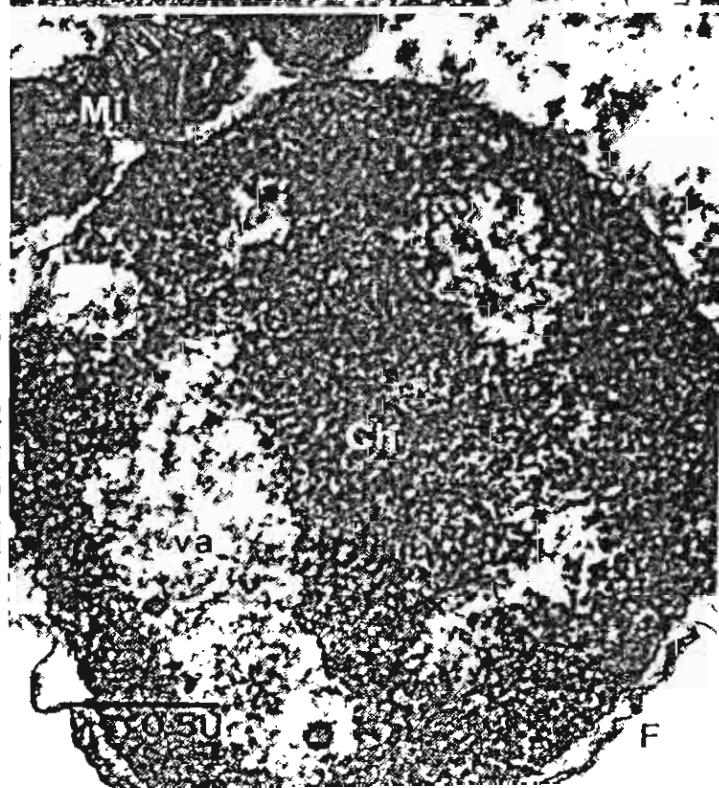
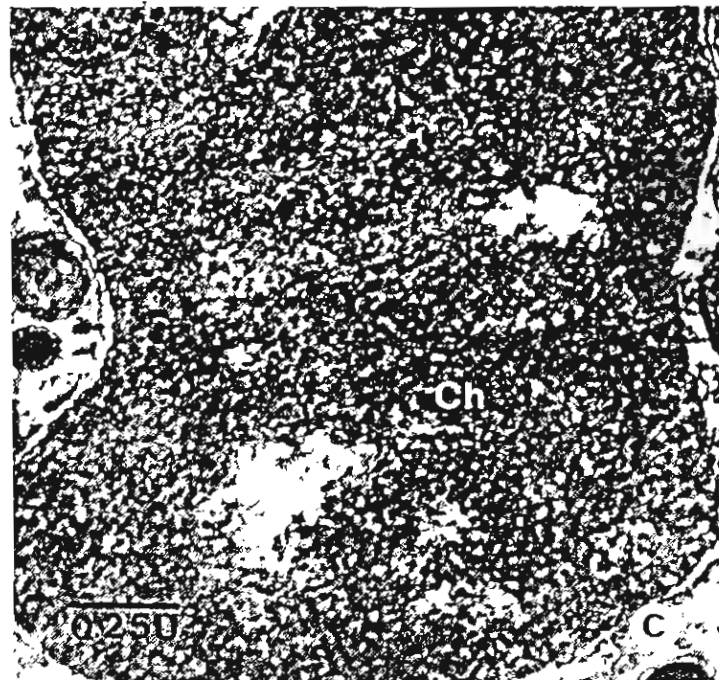
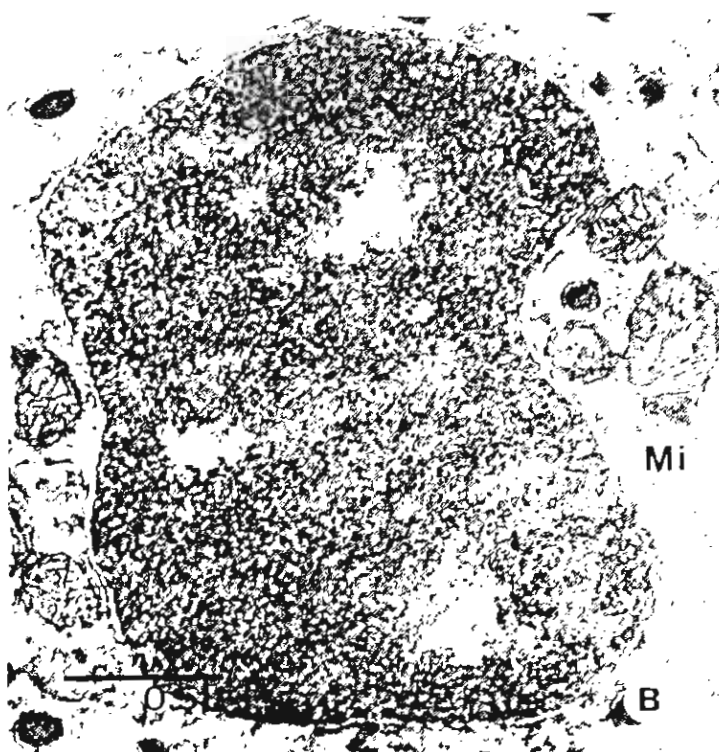
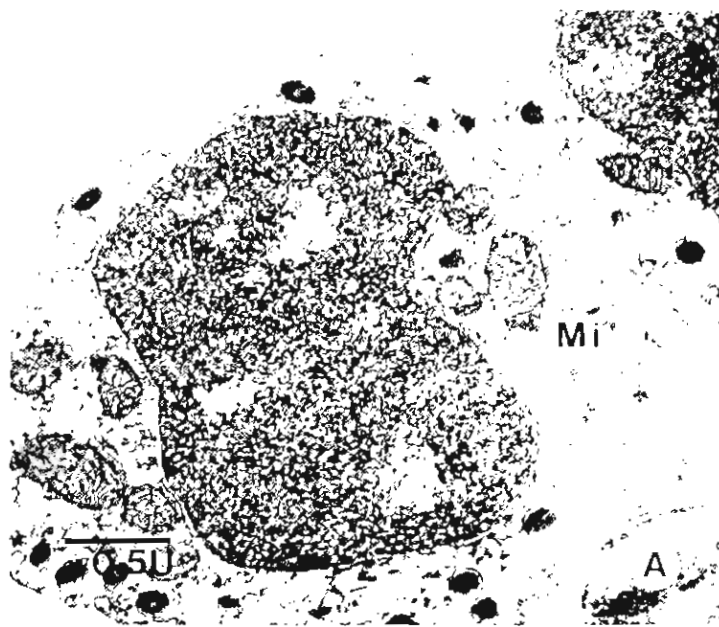


Figure 56

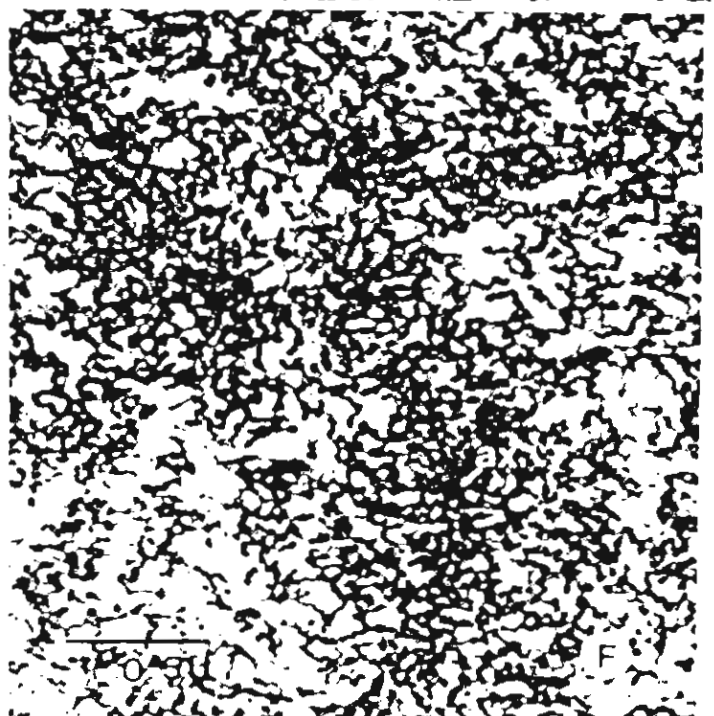
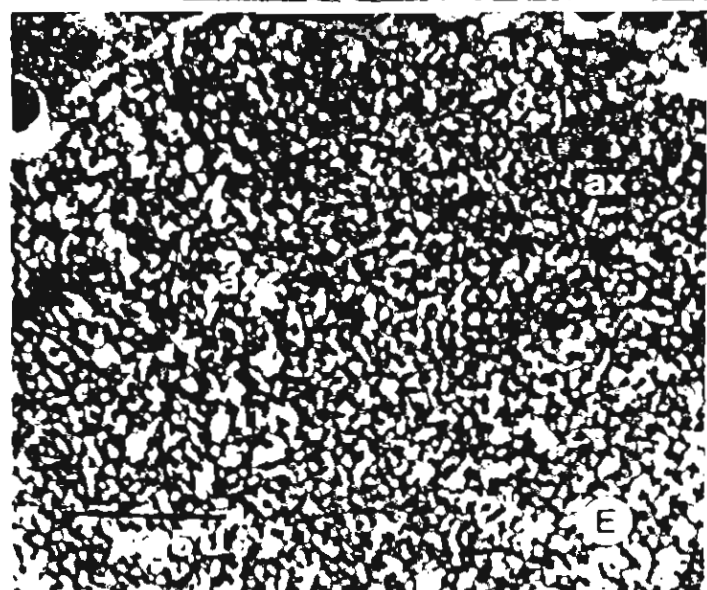
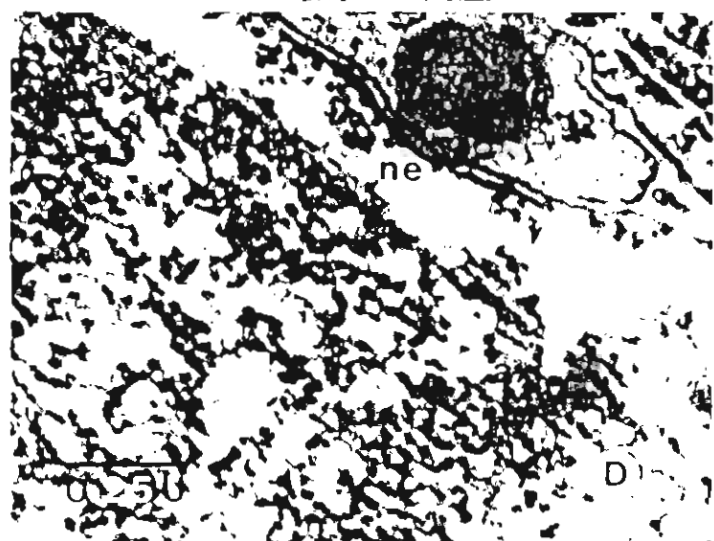
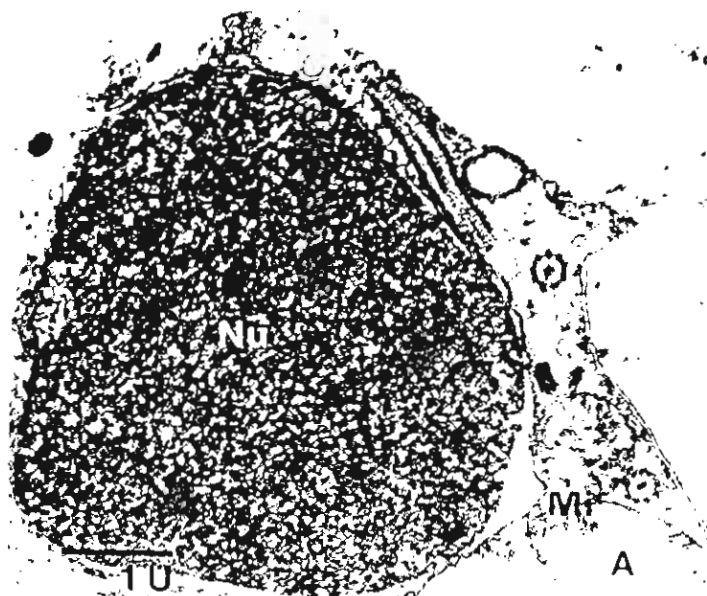


Figure 57

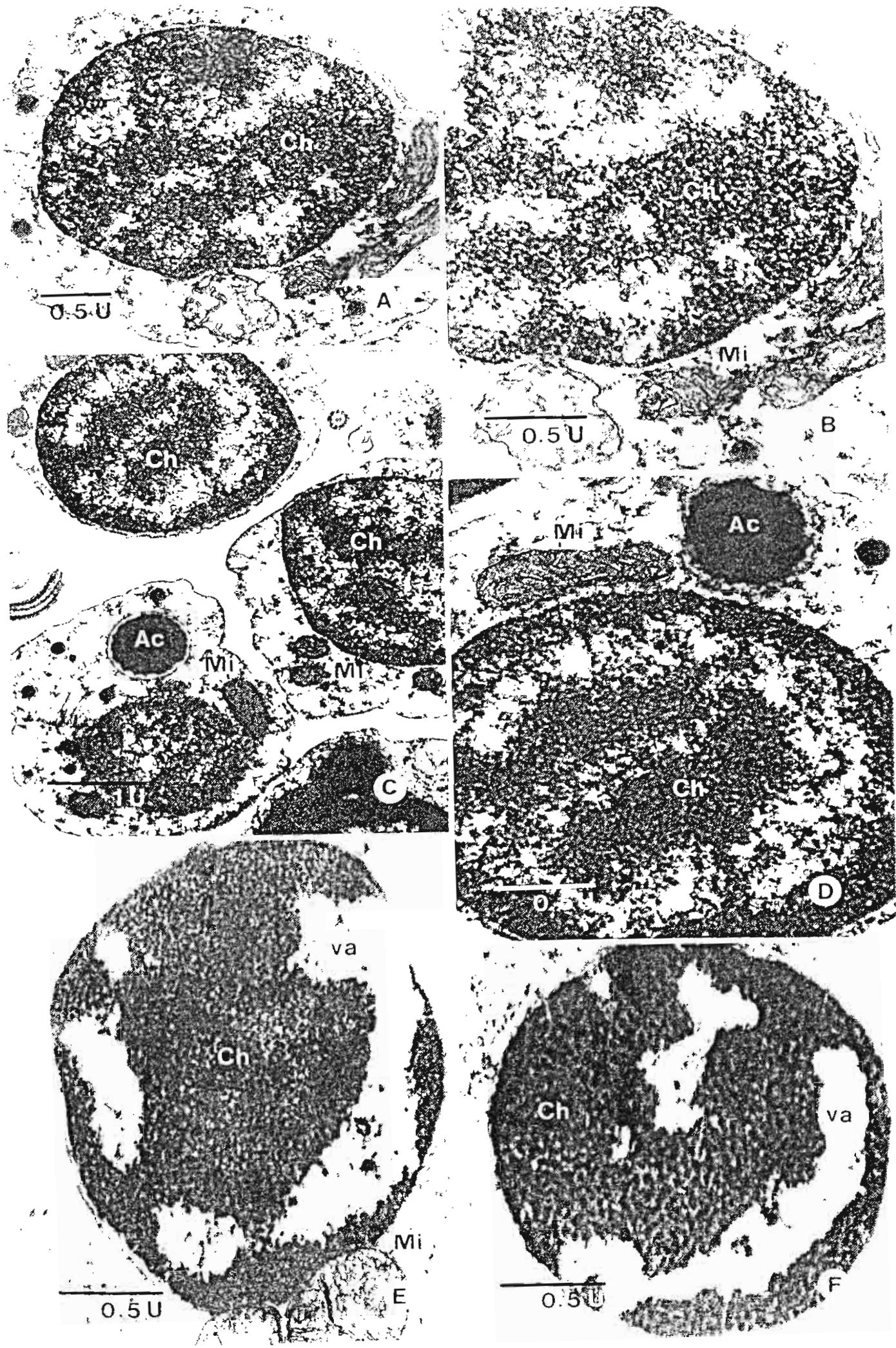


Figure 50

