

Figure 70

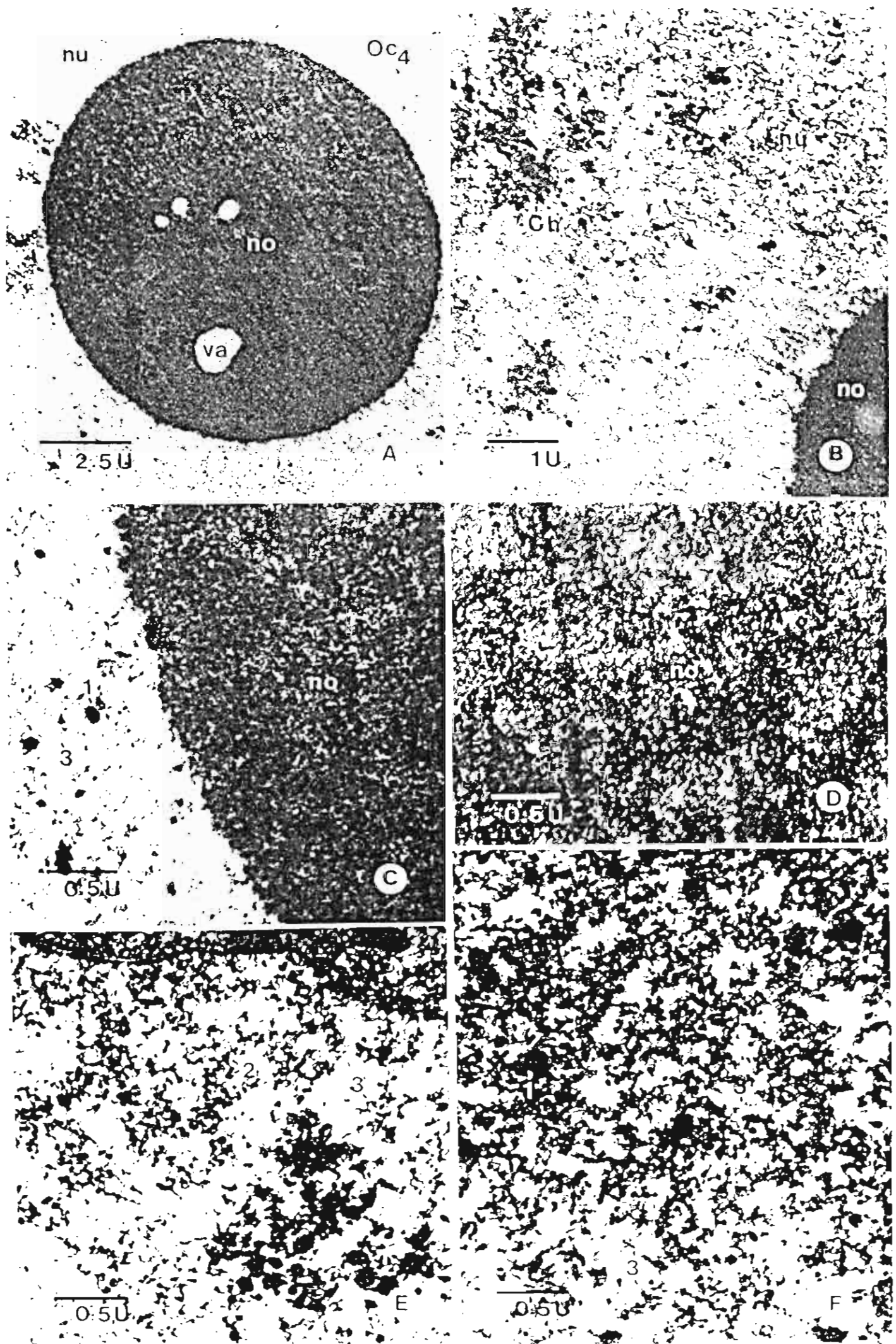


Figure 77

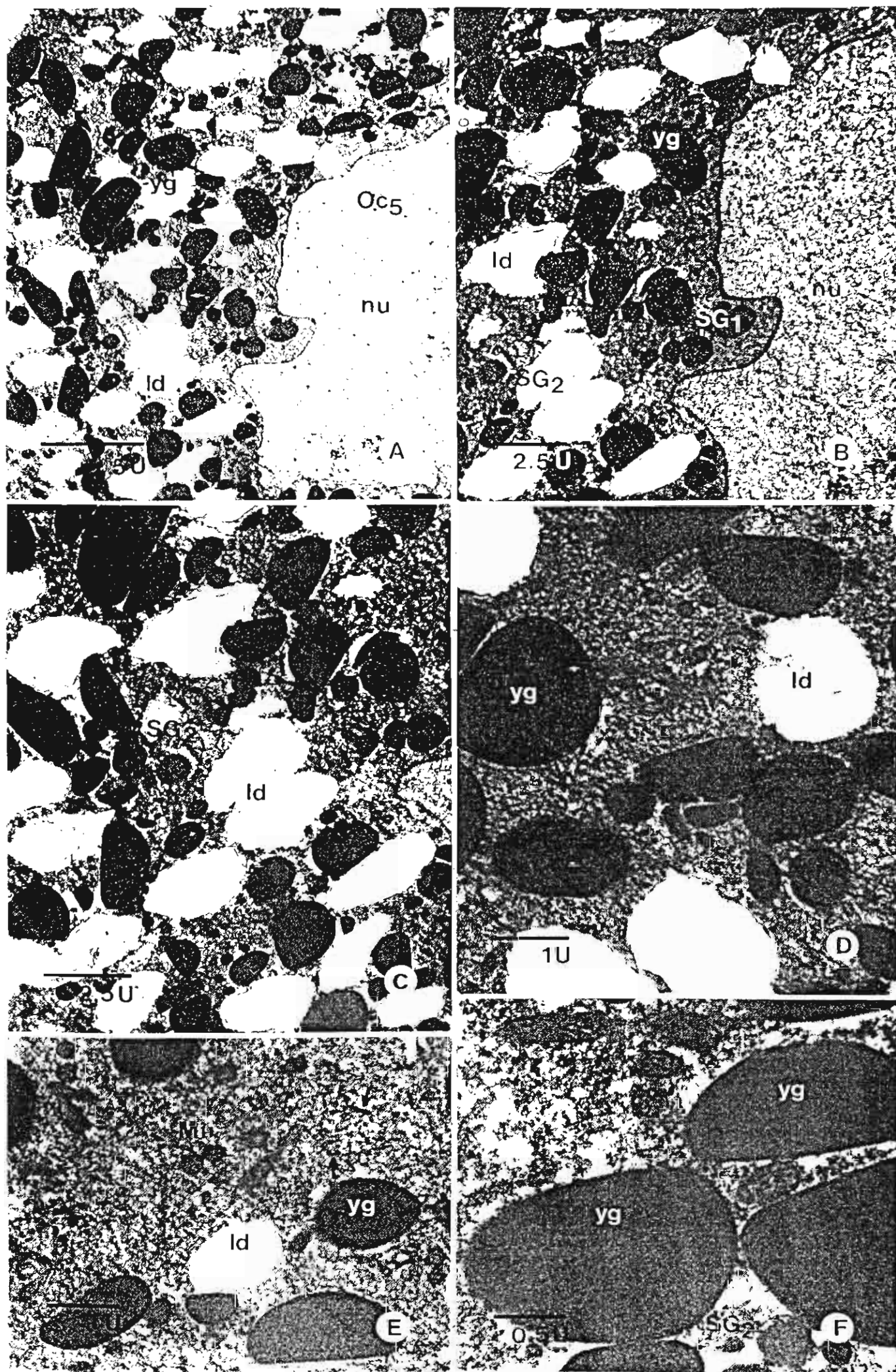
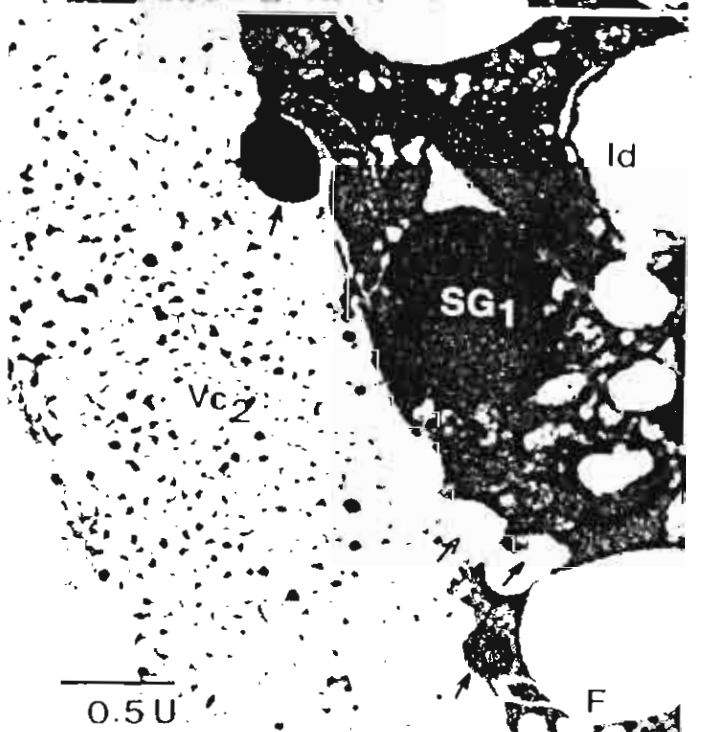
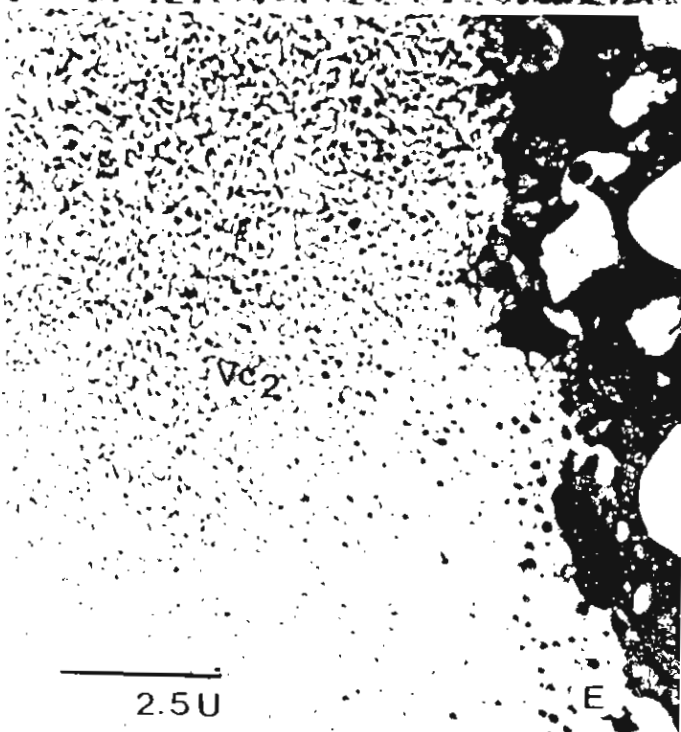
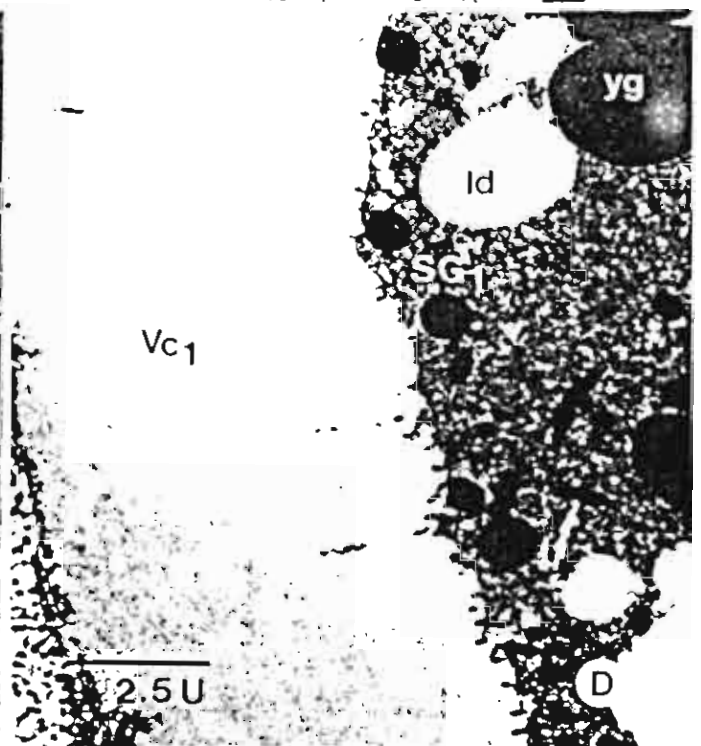
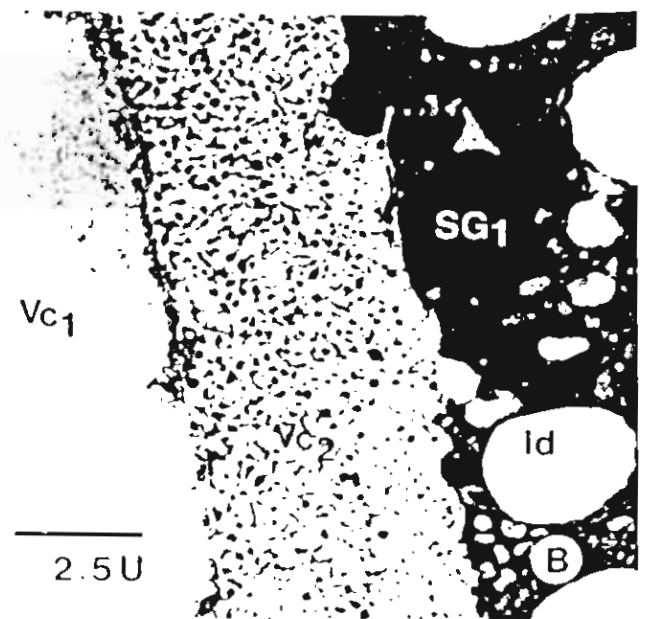
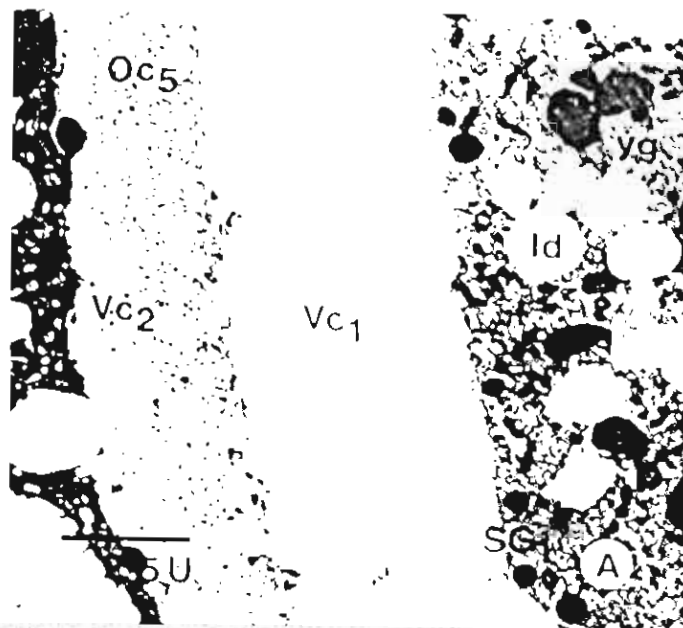


Figure 78



6.13 การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของต่อมอัณฑะและรังไข่ของหอยที่เลี้ยงในระบบปิดซึ่งเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลในรอบ 1 ปี

หอยที่เลี้ยงในระบบปิด เป็นกลุ่มที่ได้รับอาหารประเภทสาหร่ายและอาหารเสริมเต็มที่ และมีการไหลเวียนถ่ายเทของน้ำในปริมาณและคุณภาพความเค็มที่ควบคุมอย่างสม่ำเสมอ หอยเหล่านี้แสดงช่วง (phase) การพัฒนาของอัณฑะและรังไข่ออกได้เป็น 5 ช่วง ได้แก่ Proliferative phase, Premature phase, Mature phase, Spawn phase และ Spent phase ซึ่งแต่ละช่วงมีลักษณะทางจุลกายวิภาค โดยเฉพาะชนิดและปริมาณของเซลล์สืบพันธุ์ชั้นต่าง ๆ แตกต่างกันไป กล่าวคือ

Proliferative phase

เป็นช่วงที่ gonads เริ่มมีเซลล์ชั้นต้นอยู่รวมเป็นกระจุกโดยเกาะติดกับ trabeculae เซลล์ส่วนมากในรังไข่เป็นชั้น oogonia, stage I และ II oocytes (รูปที่ 79A,B) ส่วนในอัณฑะเซลล์ส่วนมากอยู่ในชั้น spermatogonia และ primary spermatocytes (รูปที่ 79C-E) trabeculae เริ่มงอกจากด้าน capsule ออกไปติดกับ capsule ของ hepatopancreas ซึ่งอยู่ตรงกลาง (รูปที่ 79A,B)

Premature phase

เป็นช่วงที่ gonads มีเซลล์อยู่เกือบเต็มพื้นที่และ trabeculae พัฒนากลับไปสู่สภาพที่เกือบสมบูรณ์เต็มที่ เซลล์ในรังไข่ส่วนมากเป็นเซลล์ชั้น oogonia, oocytes stage I, II และ oocytes stage III มีจำนวนเพิ่มขึ้นมาก oocyte IV และ V ยังมีจำนวนน้อยและกระจุกตัวเป็นหย่อม ๆ (รูปที่ 80A,B) ส่วนในอัณฑะเซลล์ส่วนมากเป็น spermatogonia และ spermatocytes ชั้นต่าง ๆ ส่วนเซลล์ spermatids และ spermatozoa ยังมีจำนวนน้อย (รูปที่ 80C-E) trabeculae งอกกลับไปสู่สภาพสมบูรณ์เช่นเดียวกันกับในช่วงก่อนหน้านี้ที่จะมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกจาก gonads

Mature phase

เป็นช่วงที่ gonads มีเซลล์อัดกันแน่นอยู่เต็มพื้นที่ ภายในรังไข่มีเซลล์ oocytes stage IV และ V อัดกันอยู่เต็ม โดยมี oocytes stage I ที่กระจายอยู่เป็นหย่อม ๆ ติดกับแผ่น trabeculae (รูปที่ 81A,B) ในอัณฑะเซลล์ส่วนมากประกอบด้วย late spermatids และ spermatozoa ที่เรียงตัวกันเป็นริ้ว ๆ ส่วนเซลล์ที่ติดกับ trabeculae เป็นพวก spermatogonia และ early spermatocytes โดยมีเซลล์ spermatocytes ชั้นกลางอยู่น้อยมาก (รูปที่ 81C-E)

Spawn phase

เป็นช่วงที่ gonads เริ่มปล่อยเซลล์ที่พัฒนาเต็มที่ออกจากตัวหอย . โดยในรังไข่ เซลล์ oocytes stage IV และ V กระจายออกสู่ช่องกลางของ compartment และได้ถูกปล่อยออกไปจากรังไข่ ทำให้เหลือเพียง oogonia, oocytes stage I และ II จำนวนไม่มากนักยังเกาะติดอยู่กับ trabeculae (รูปที่ 82A,B) ในอันทะเซลล์ spermatozoa แตกกระจายออกจากที่ที่เคยเรียงกันเป็นแถวอย่างมีระเบียบในชั้น mature phase เสมือนหนึ่งว่าเซลล์เหล่านี้กำลังหลุดออกจากที่เกาะ และจะถูกปล่อยออกไปจาก อันทะ (รูปที่ 82C-E) แกน trabeculae มีเซลล์สืบพันธุ์ชั้นต้นเหลือเกาะอยู่บ้าง หลังจากการปลดปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ Oc_5 และเซลล์ spermatozoa ออกไปเกือบหมดแล้ว มักจะมีก้อนสารสีเหลืองหรือน้ำตาลสะสมอยู่ในช่องกลางของ compartment

Spent phase

เป็นช่วงที่มีการปล่อยเซลล์เกือบทั้งหมดออกจาก gonads ภายใน gonads จึงว่างเปล่า แผง trabeculae ส่วนมากก็สลายไปด้วย ที่ยังคงอยู่ใน trabeculae ก็มีแต่หลอดเลือดฝอยที่บวมเต่ง ส่วนถุงหุ้ม gonads ยังอยู่ในสภาพสมบูรณ์ เซลล์ที่ยังคงมีเหลือคือ gonial cells ที่ติดตามขอบของ gonadal capsule (รูปที่ 83A-D)

จากการศึกษาที่ได้กระทำต่อเนื่องครบ 1 ปี พบว่า ช่วงเวลาที่เป็น spawning phase ซึ่งมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยในหอยเพศเมียที่เลี้ยงในระบบปิด มักเกิดขึ้น 2 ช่วง คือ ระหว่างเดือนมีนาคมถึงเมษายน และสิงหาคมถึงตุลาคม ส่วนในหอยเพศผู้มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกในช่วงเดียวกันแต่ก็มีช่วงเวลานานกว่า อีกทั้งบางตัวอาจจะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ทั้งปี จากข้อมูลเบื้องต้นจึงพอสรุปได้ว่า การพัฒนาของ gonads จากระยะ proliferative ถึง spawn phase ของหอยเป่าฮื้อที่เลี้ยงในระบบปิด โดยไม่ได้รับสารกระตุ้นใด ๆ ต้องการเวลาประมาณ 3-4 เดือนต่อ 1 รอบ

รูปที่ 79 ภาพถ่ายจุลทรรศน์ธรรมดาของช่วง Proliferative phase แสดงการเริ่มพัฒนาของ gonads อีกครั้งหลังจากช่วง spent เซลล์ในรังไข่ (A,B) ส่วนมากคือ stage I oocytes (Oc_1) และในอัณฑะ (C-E) คือ spermatogonia และ leptotene spermatocytes trabeculae (tr) เริ่มงอกกลับคืน

รูปที่ 80 ภาพถ่ายของช่วง Premature phase ในรังไข่ (A,B) เซลล์ส่วนมาก คือ oocytes stage I และ II (Oc_1 , Oc_2) ในอัณฑะ (C-E) ส่วนมากคือ spermatocytes ขั้นต่าง ๆ (Sc) spermatozoa (Sz) ยังมีจำนวนน้อย ส่วน trabecula (tr) งอกกลับเกือบคืนสู่สภาพเดิม

รูปที่ 81 ภาพถ่ายของช่วง Mature phase ในรังไข่ (A,B) เริ่มมี oocytes stage III, IV และ V แต่เซลล์ส่วนมากก็ยังคงเป็น oocytes stage I และ II ซึ่งอยู่ติดกับ trabeculae (tr) ส่วนในอัณฑะ (C-E) เซลล์ส่วนมากคือ late spermatids และ spermatozoa ซึ่งเรียงแถวกันเป็นริ้ว ๆ เซลล์ที่ติดกับ trabeculae มีจำนวนน้อยมากและส่วนมากเป็น spermatogonia (Sg) และ early spermatocytes (Sc)

รูปที่ 82 ภาพถ่ายของช่วง Spawn phase ในรังไข่ (A,B) เซลล์ส่วนมากเป็น oocytes stage IV และ V ($Oc_{4,5}$) โดยมีเซลล์ oocytes stage I (Oc_1) และ oogonia (Og) จำนวนน้อยติดอยู่กับ trabeculae (tr) ส่วนในอัณฑะ (C-E) เซลล์ส่วนมากคือ spermatozoa ซึ่งเริ่มกระจายออกจากริ้ว

รูปที่ 83 ภาพถ่ายของช่วง Spent phase เซลล์เกือบทั้งหมดถูกปล่อยออกจาก gonad ทำให้ทั้งรังไข่ (A,B) และอัณฑะ (C,D) ว่างเปล่า แผง trabeculae ส่วนมากก็สลายตัวด้วยส่วนที่ยังเหลืออยู่มักแสดงหลอดเลือดฝอย (ca) ที่บวมเต่ง (D)

Figure 79

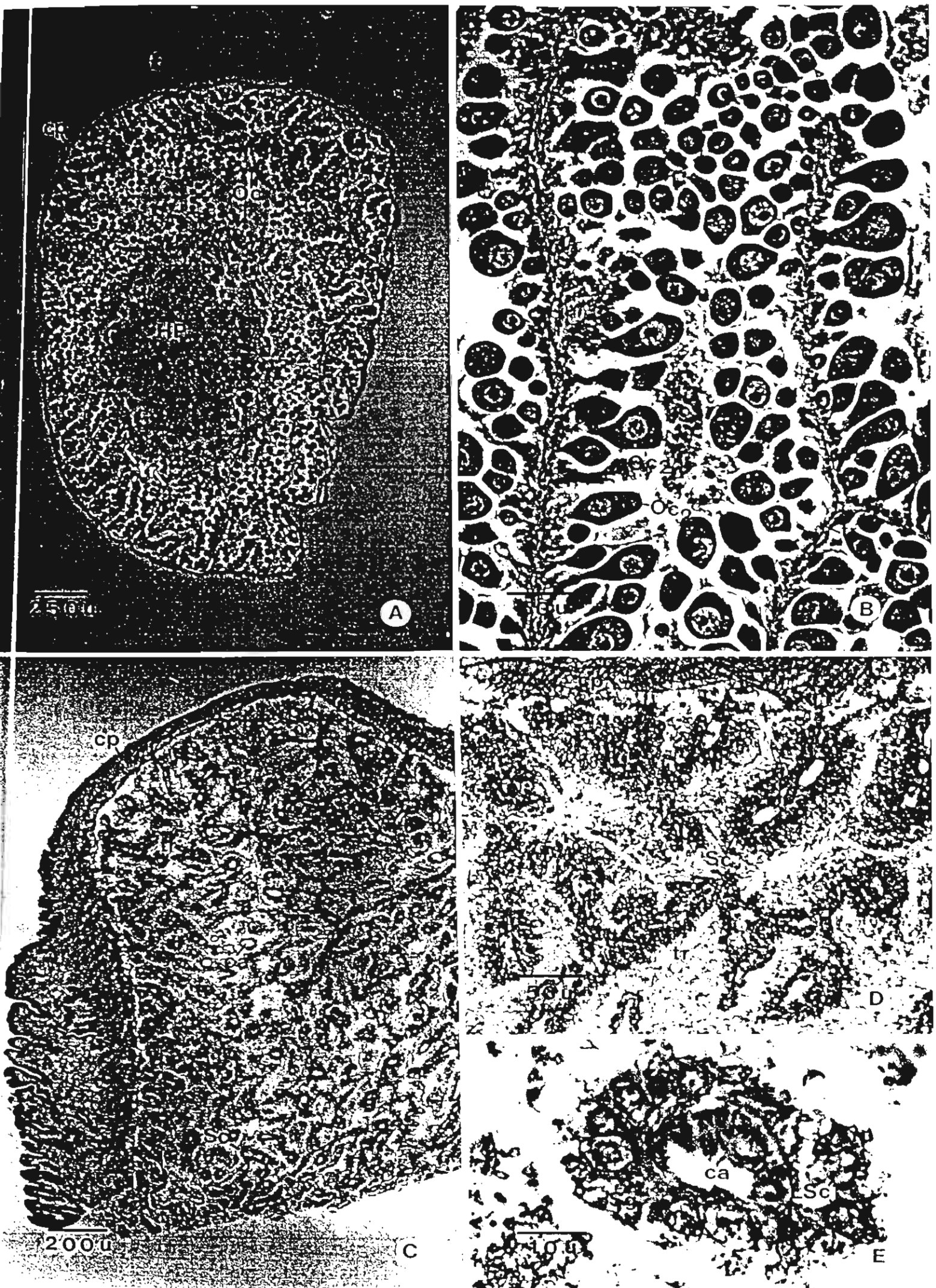
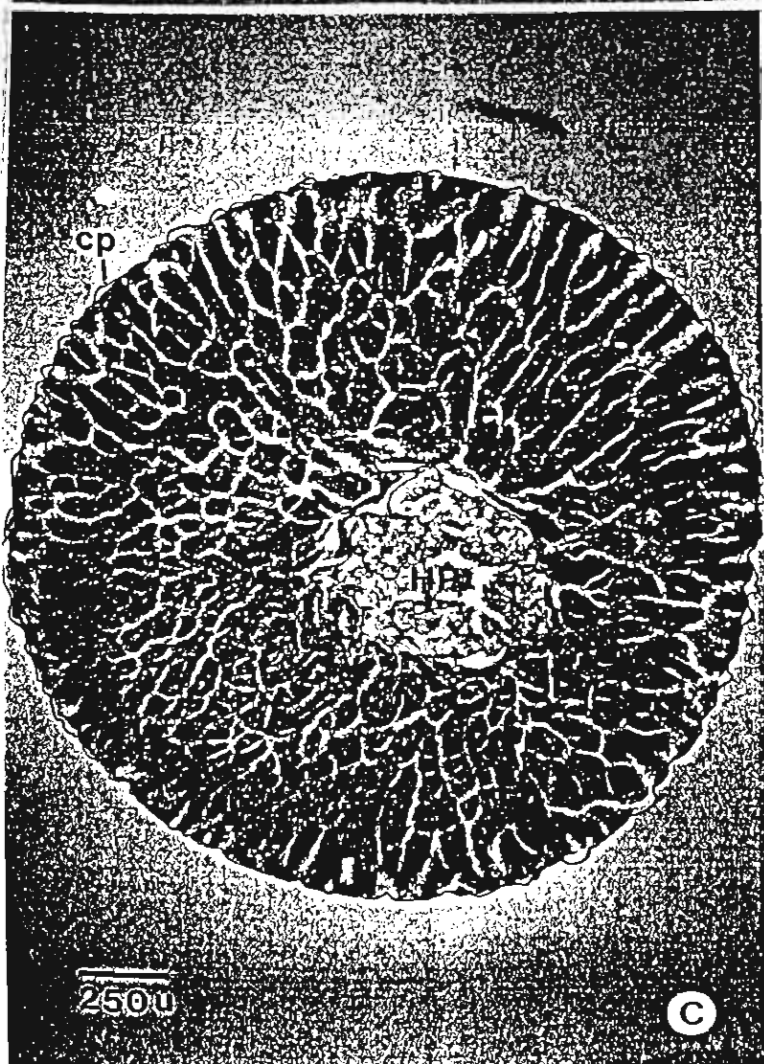
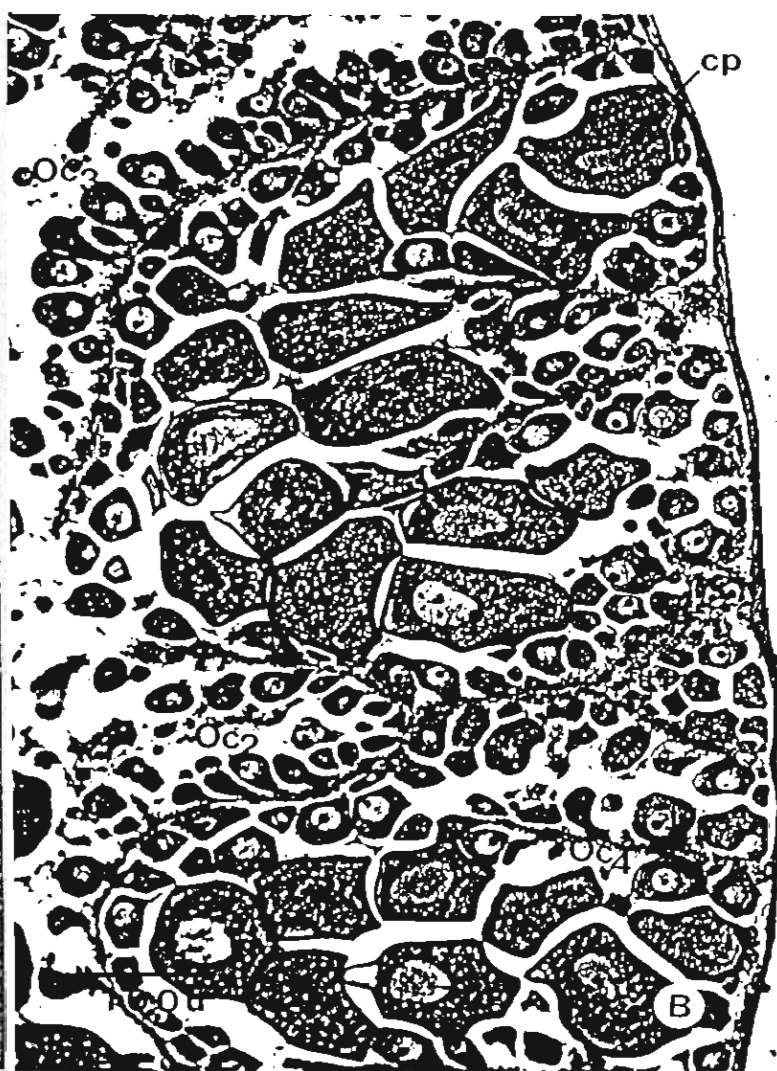
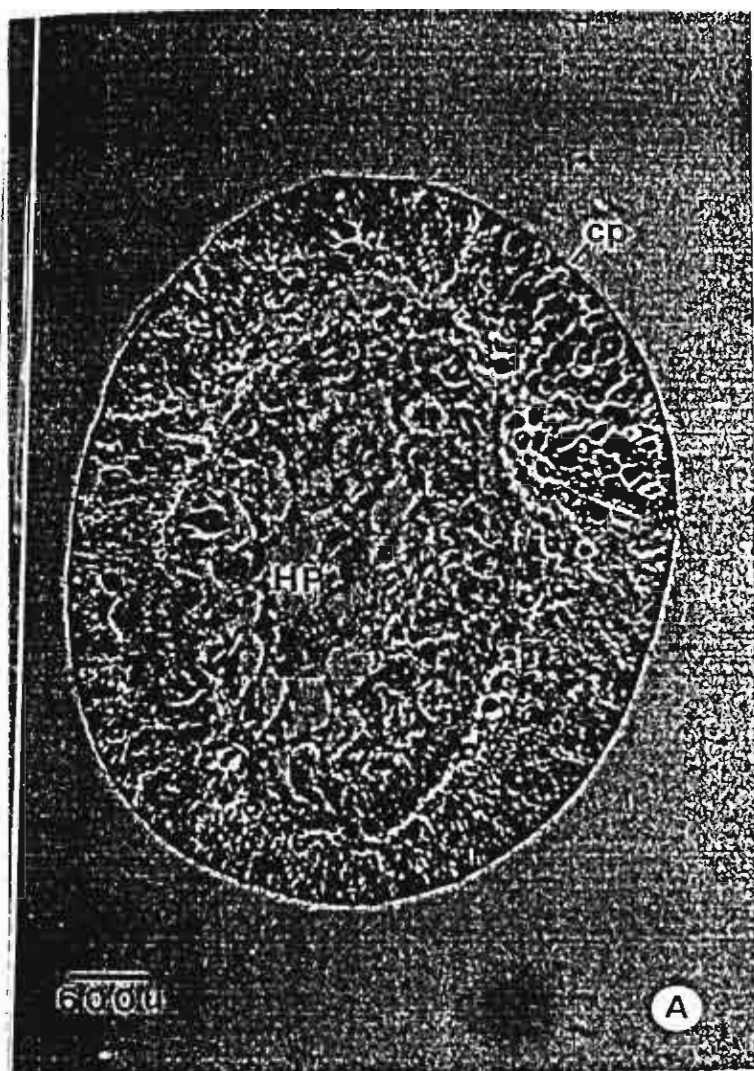


Figure 80



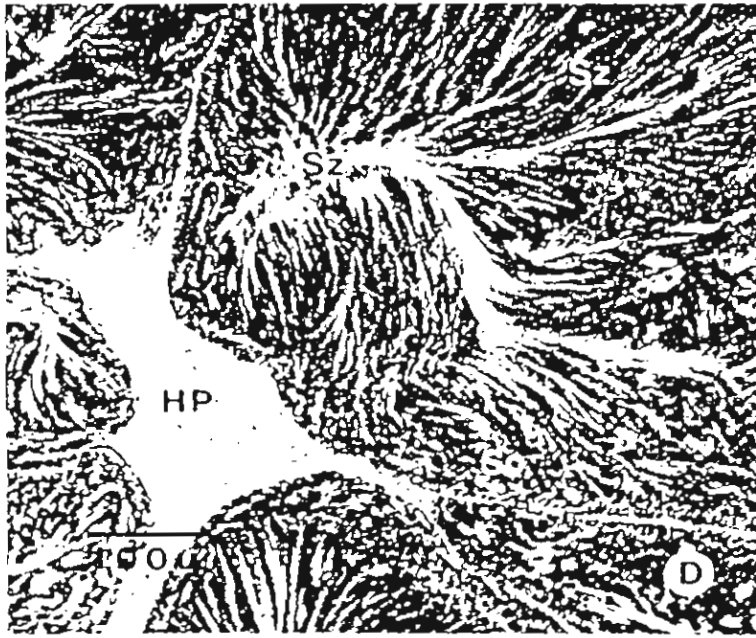
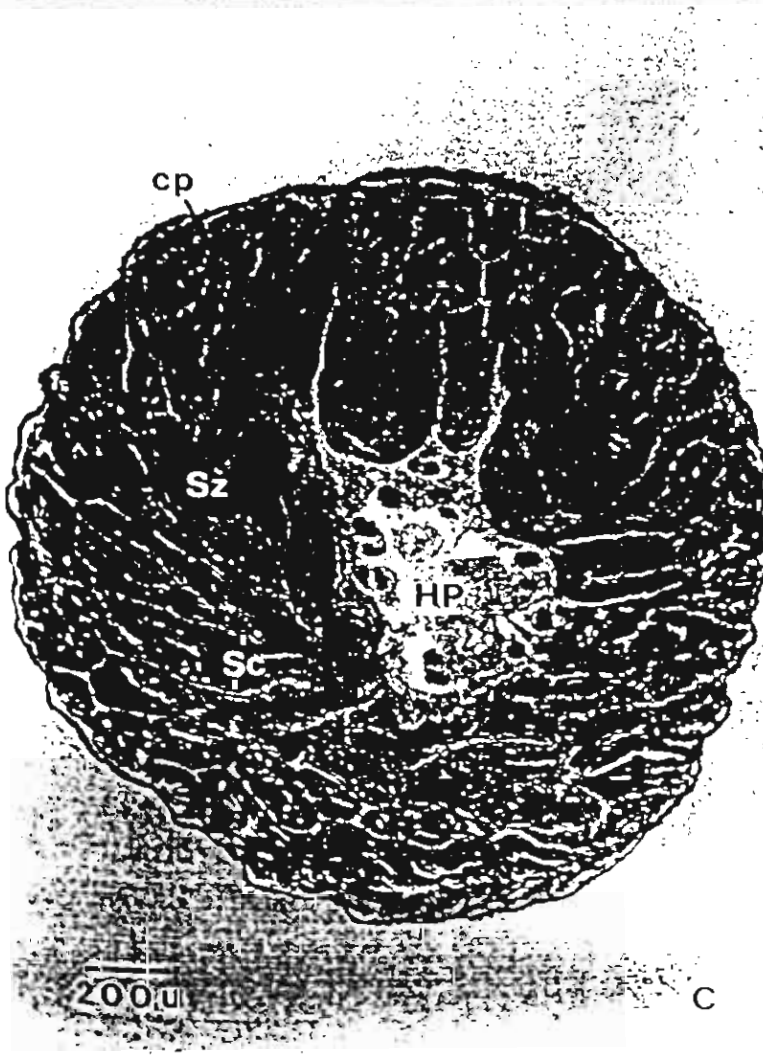
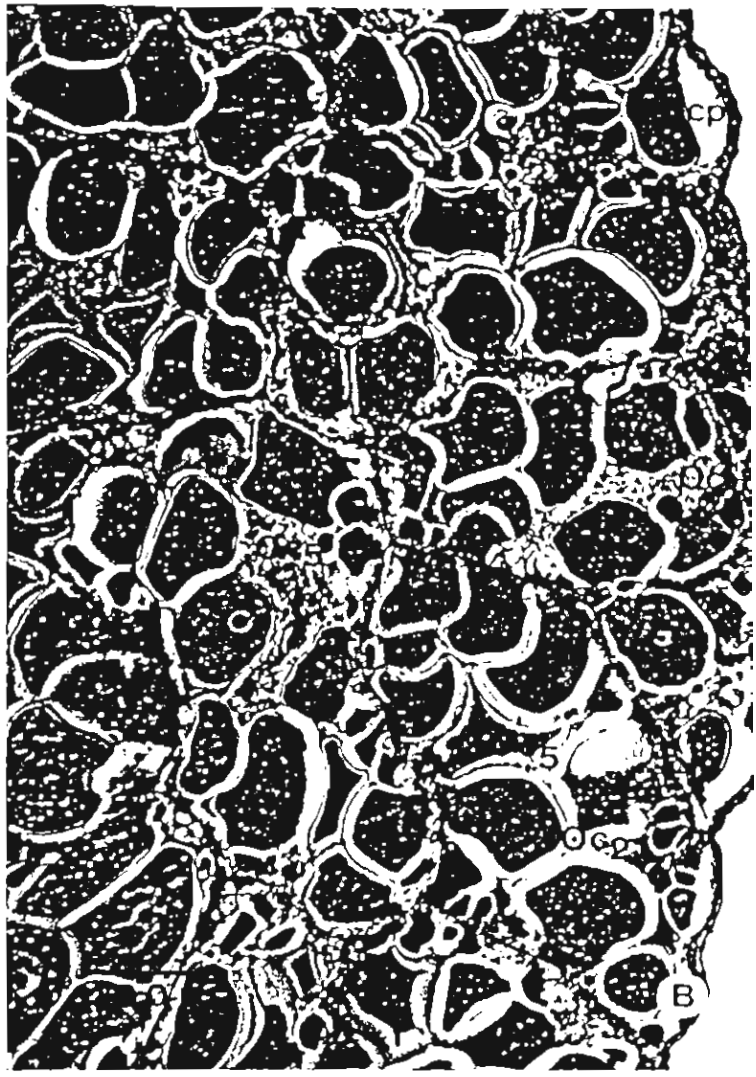
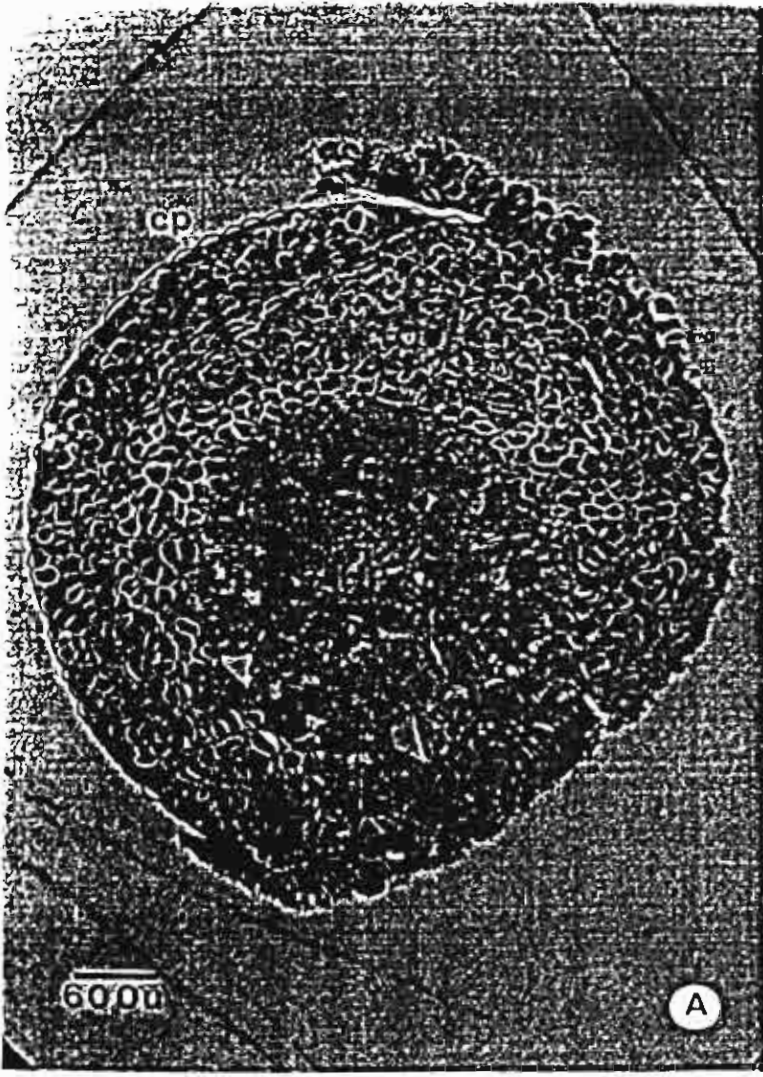


Figure 82

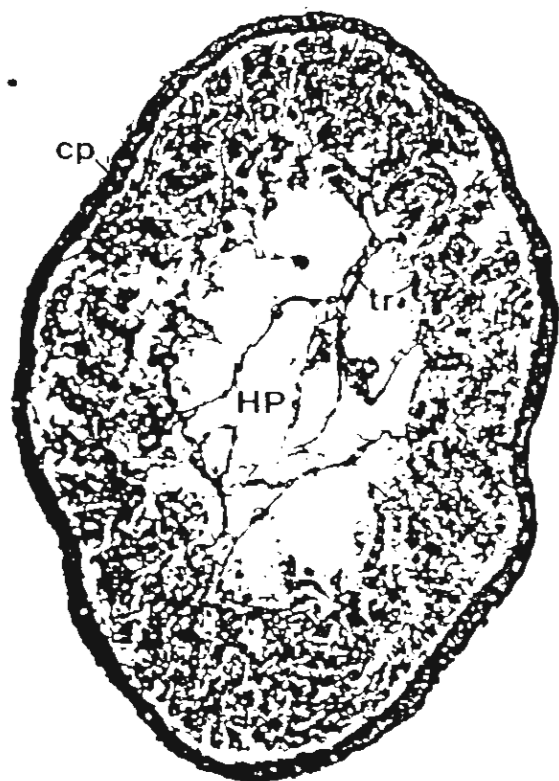
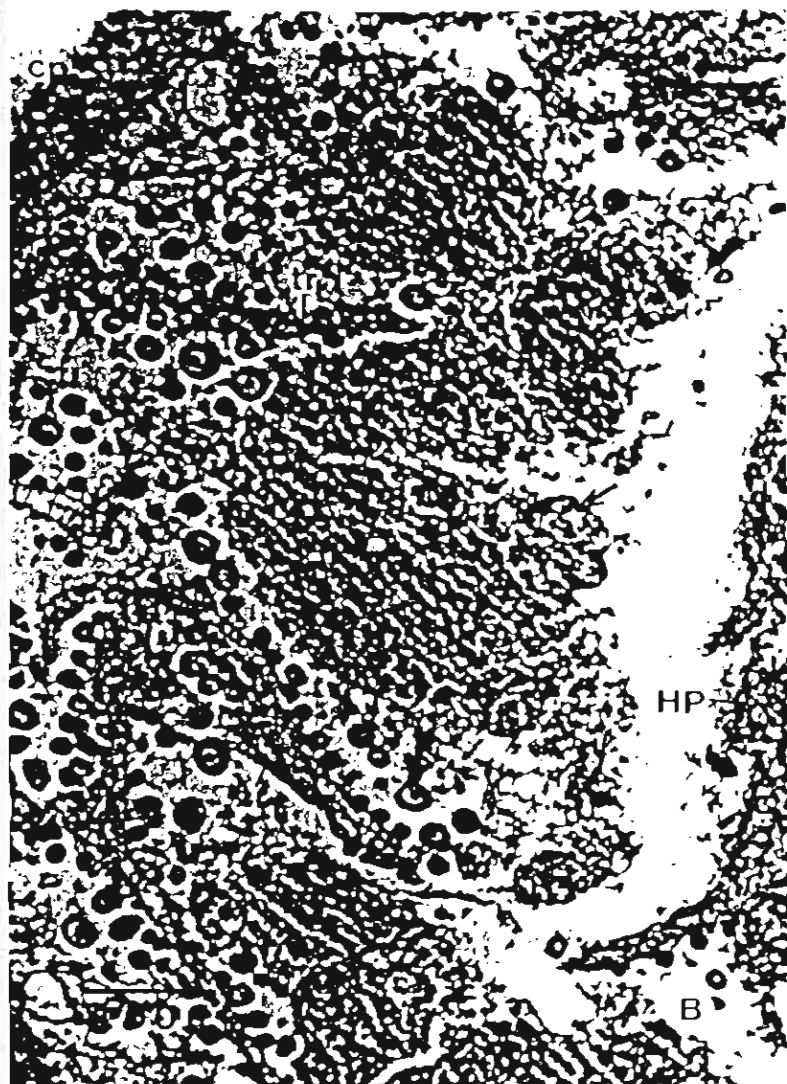
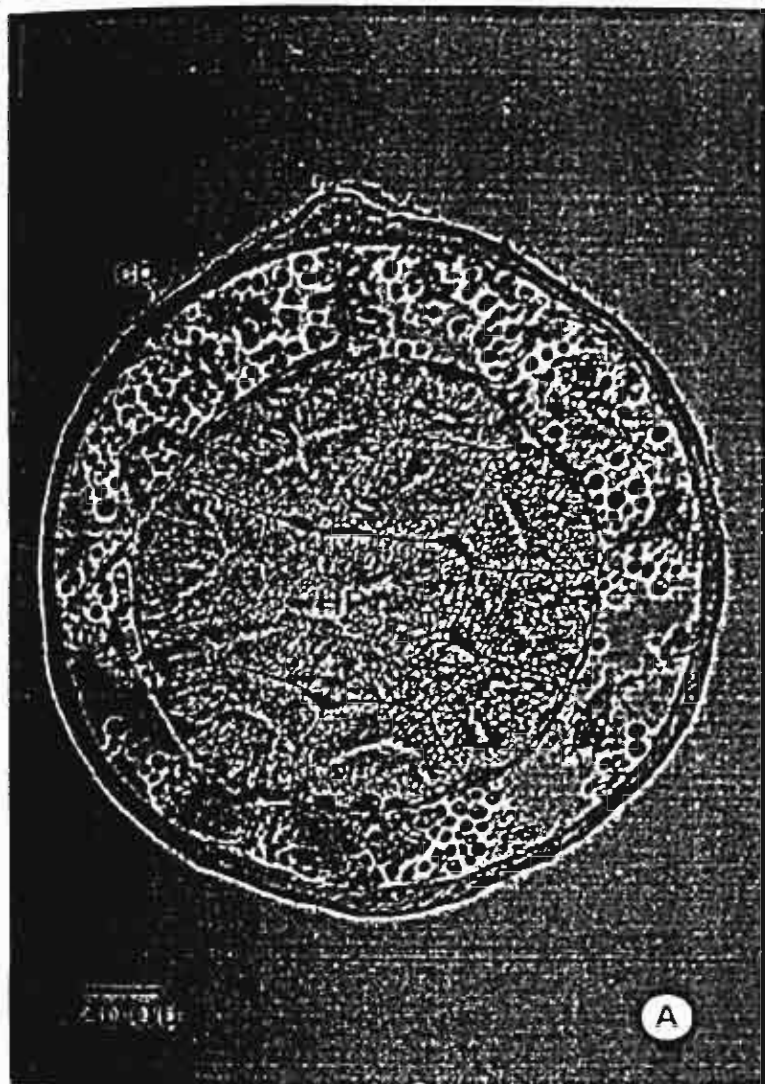
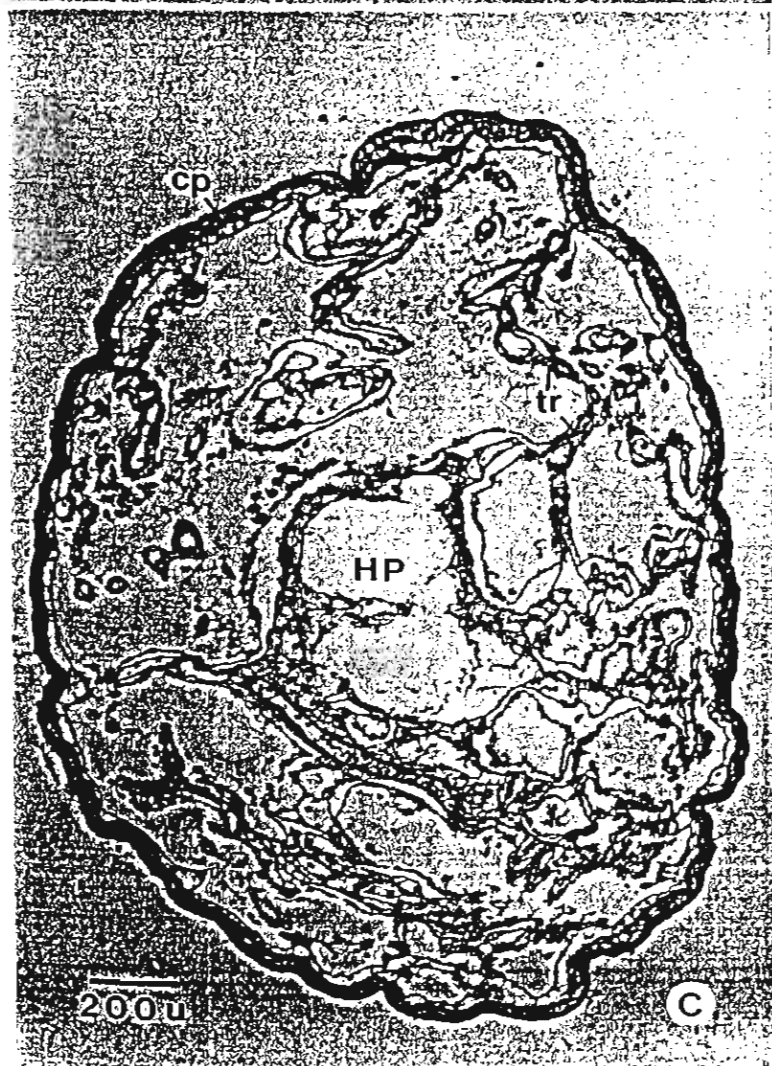
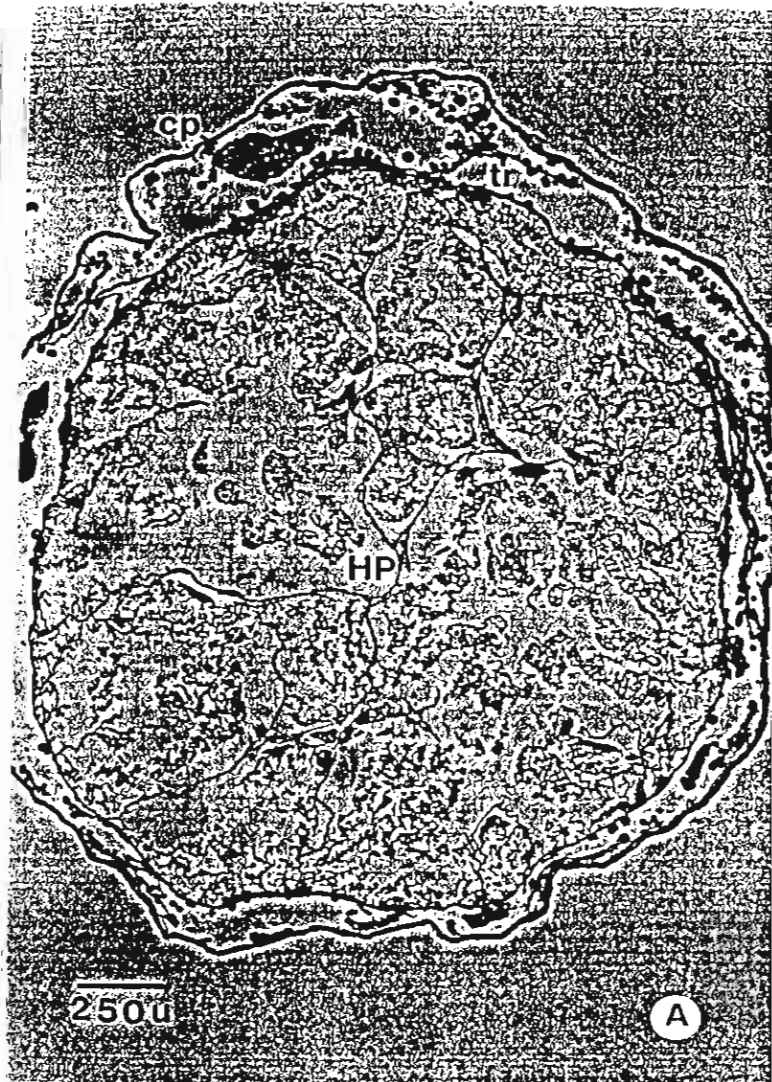


Figure 83



6.14 การศึกษาการกระจายของ FSH-like, LH-like และ Egg Laying hormone ของหอยเป่าฮือ ในรังไข่และอวัยวะด้วยวิธี immunohistochemistry

6.14.1 FSH-like และ LH-like Hormone

จากการศึกษาโดยจุลทรรศน์พบว่า gonads มีกลุ่มของเซลล์ที่มีลักษณะคล้าย endocrine cells อยู่ใน trabeculae โดยเฉพาะในรังไข่ จึงอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์เหล่านี้ผลิตฮอร์โมนที่ควบคุมขบวนการสืบพันธุ์ในหอย เราจึงได้ศึกษาตำแหน่งและการกระจายของฮอร์โมนที่อาจจะเหมือน LH กับ FSH ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง โดยการย้อม sections ของ gonads ด้วย primary antibodies (mouse anti-human FSH และ mouse anti-human LH) ตามด้วย biotinylated rabbit anti-mouse IgG-avidin-HRP ปรากฏว่าในรังไข่เมื่อย้อมด้วย anti-FSH เซลล์ oocytes ขั้นต้น ได้แก่ Oc₁ และ Oc₂ แสดงผลบวกโดยการติดสีน้ำตาลที่เกิดจากปฏิกิริยาของ substrates ซึ่ง catalysed ด้วย HRP ส่วนข้างต่ำและปานกลาง Oc₃ แสดงผลบวกสูง ส่วน Oc₄ และ Oc₅ ไม่แสดงผลบวกเลย นอกจากเซลล์ oocytes แล้ว trabecular cells บางกลุ่มยังแสดงผลบวกหรือการติดสีน้ำตาลอีกด้วย (รูปที่ 84A,B; 85A,B) เนื่องจากเซลล์เหล่านี้มีขนาดเล็กจึงยังไม่สามารถแยกชนิดของเซลล์ที่แสดงผลบวกได้ ซึ่งคงจะต้องมีการศึกษาในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนต่อไป

เมื่อย้อมด้วย anti-LH เซลล์ที่แสดงผลบวกโดยการติดสีน้ำตาลเข้มคือ เซลล์ระยะ Oc₄ และ Oc₅ ส่วน Oc₁₋₃ มีการติดสีพอประมาณถึงสีจาง ในขณะที่เซลล์ใน trabeculae ไม่ติดสีเลย (รูปที่ 85C,D)

ในต่อมอวัยวะที่ย้อมด้วย anti-FSH เซลล์ที่ติดสีจางพอยู่อ้างใน trabeculae ส่วนเซลล์สืบพันธุ์ชั้นต่าง ๆ ไม่ติดสีเลย (รูปที่ 86A,B) ในกรณีที่ย้อมด้วย anti-LH ไม่มีเซลล์ใดที่แสดงการติดสีอย่างชัดเจน

ข้อมูลเบื้องต้นนี้แสดงว่าอาจจะมี FSH และ LH-like hormones อยู่ใน gonads ของหอยโดยเฉพาะในรังไข่ gonads เองอาจจะเป็นแหล่งผลิต gonadotrophic hormones ที่มีส่วนควบคุมการสืบพันธุ์ของหอยอีกแหล่งหนึ่ง ซึ่งน่าจะได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมในรายละเอียดต่อไป

6.14.2 ฮอร์โมน Egg Laying Hormone (ELH) ของหอยเป่าฮือ

นอกจากการย้อมหา LH และ FSH-like hormone ในรังไข่และอวัยวะแล้ว เรายังได้ย้อมหาการกระจายของฮอร์โมน ELH ของหอยเป่าฮือ ซึ่งใช้แอนติบอดีชนิด mouse monoclonal anti-egg laying hormone (ที่ได้รับบริจาคจาก Professor Peter Hanna มหาวิทยาลัย Deakin ประเทศออสเตรเลีย) เป็น primary antibodies สำหรับเกาะกับเซลล์ที่อาจจะมีฮอร์โมนคล้ายกับฮอร์โมนดังกล่าว พบว่า anti-ELH ติดสีเข้มมากในส่วน trabeculae

(รูปที่ 87, 88) ซึ่งแสดงว่าอาจมีเซลล์ใน trabeculae ที่ผลิตฮอร์โมน ELH เราจึงได้ทำการศึกษาวิเคราะห์ชนิดของเซลล์ในเยื่อเกี่ยวพันของ trabeculae โดยเฉพาะกลุ่มที่อาจจะเป็นเซลล์ที่ผลิตฮอร์โมน เราพบว่าในระดับจุลทรรศน์ธรรมดา (รูปที่ 89) trabeculae ประกอบด้วยหลอดเลือดฝอยเป็นแกนที่ถูกหุ้มด้วยเซลล์กล้ามเนื้อซึ่งเรียงตัวตามยาว ที่ขอบของ trabeculae ประกอบด้วยเซลล์บุผิวชั้นเดียว และ follicular cells ซึ่งหุ้มรอบเซลล์ Oc_1 , Oc_2 และ Oc_3 แทรกอยู่กับเซลล์กล้ามเนื้อ ในชั้นกลางที่ประกอบด้วยเยื่อเกี่ยวพันชนิด collagen มี fibroblasts และเซลล์ที่มีแกรนูลกระจายอยู่ทั่วไป การศึกษาโดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในเบื้องต้นพบว่า กลุ่มเซลล์ที่มีแกรนูลอาจแยกออกได้เป็น 3 ชนิดตามขนาดของแกรนูล คือชนิดที่หนึ่ง เป็นเซลล์ที่มีแกรนูลรูปรีกบี่ ขนาด 270×500 nm และมีเนื้อในทึบแสงอิเล็กตรอน ชนิดที่สอง เป็นเซลล์ที่มีแกรนูลรูปร่างกลม ขนาด 165 nm และเนื้อในทึบแสงอิเล็กตรอน ชนิดที่สาม เป็นเซลล์ที่มีแกรนูลกลม ขนาดเล็กประมาณ 150 nm และมีเนื้อโปร่งแสงอิเล็กตรอน กิ่งของเซลล์ทั้งสามชนิดมักจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ๆ โดยลักษณะตัวเซลล์แต่ละชนิดยังต้องมีการศึกษาในรายละเอียดต่อไป ที่น่าสนใจคือ กลุ่มเซลล์เหล่านี้เกาะกับ anti-ELH จึงทำให้คิดว่าในรังไข่และอวัยวะน่าจะมีเซลล์ที่ผลิตฮอร์โมน ซึ่งส่วนมากอาจจะแฝงอยู่ใน trabeculae แล้วทำหน้าที่ควบคุมการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ใน gonads และการปลดปล่อยเซลล์ไข่และเซลล์สุจิออกจาก gonads ในช่วง spawning ซึ่งน่าจะทำการศึกษากลุ่มเซลล์เหล่านี้ และฮอร์โมนที่อาจจะเป็นผลิตภัณฑ์ของมัน ตลอดจนหน้าที่ของฮอร์โมนเหล่านี้โดยละเอียดต่อไป

รูปที่ 84 Control sections ของ ovary ที่ย้อมด้วย mouse anti-human FSH (ภาพ A) และ LH (ภาพ B)

รูปที่ 85 Sections ของรังไข่ที่ย้อมด้วย mouse anti-human FSH (ภาพ A,B) และย้อมด้วย mouse anti-human LH (ภาพ C,D) Oc-oocyte ชั้นต่าง ๆ tr-trabeculae, Cp-capsule

รูปที่ 86 Sections ของ testis ที่ย้อมด้วย mouse anti-human FSH, tr-trabeculae ลูกศร-เซลล์สืบพันธุ์ชั้นต่าง ๆ รอบ ๆ แถบ trabeculae Sz-เซลล์อสุจิ

Figure 84

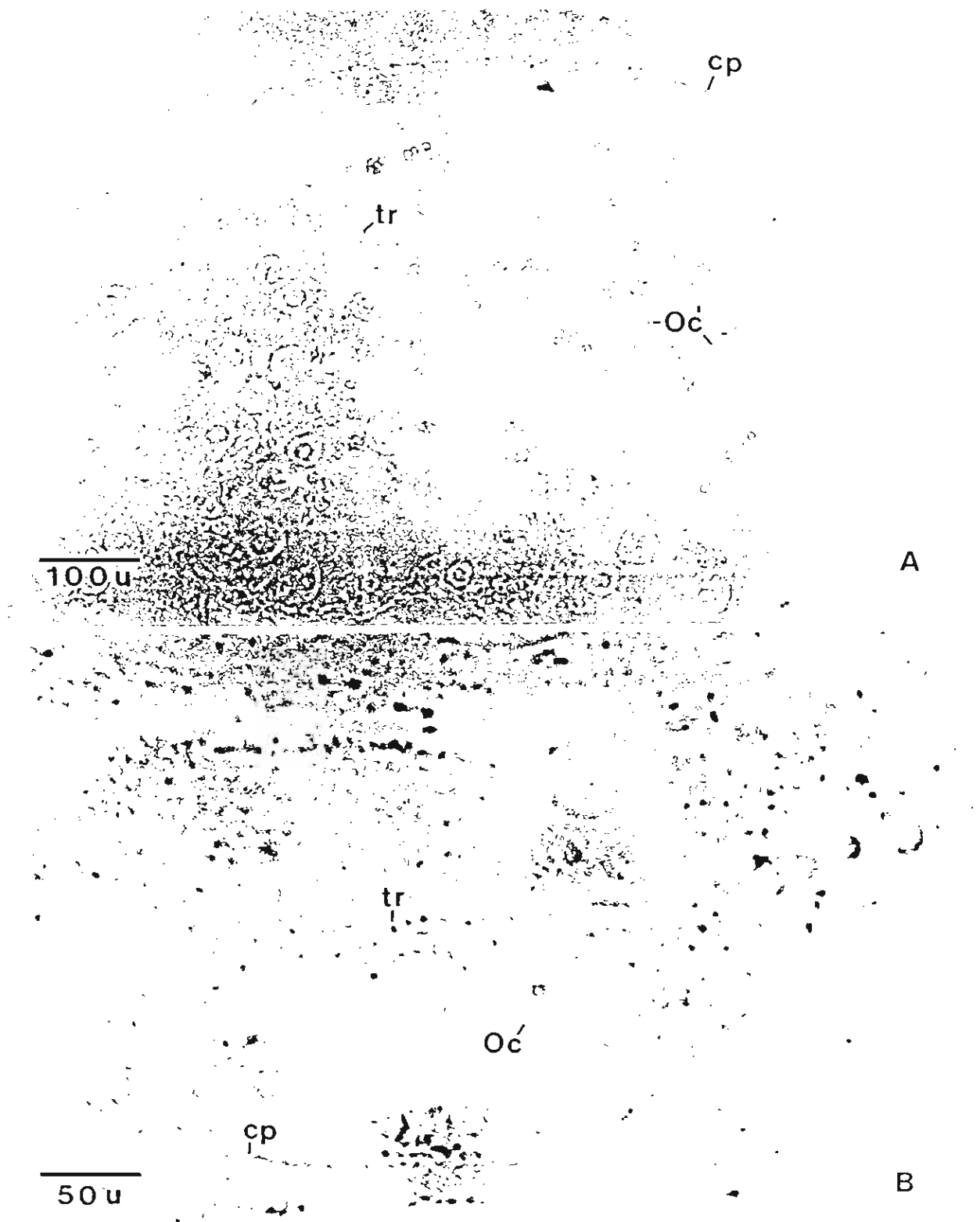


Figure 85

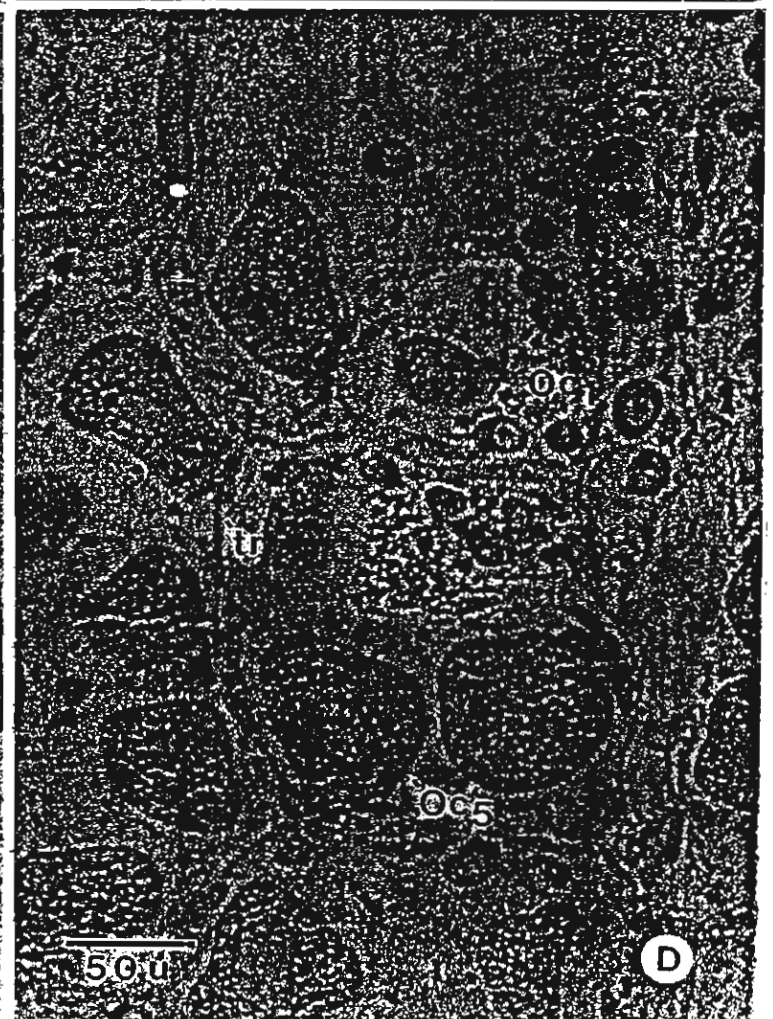
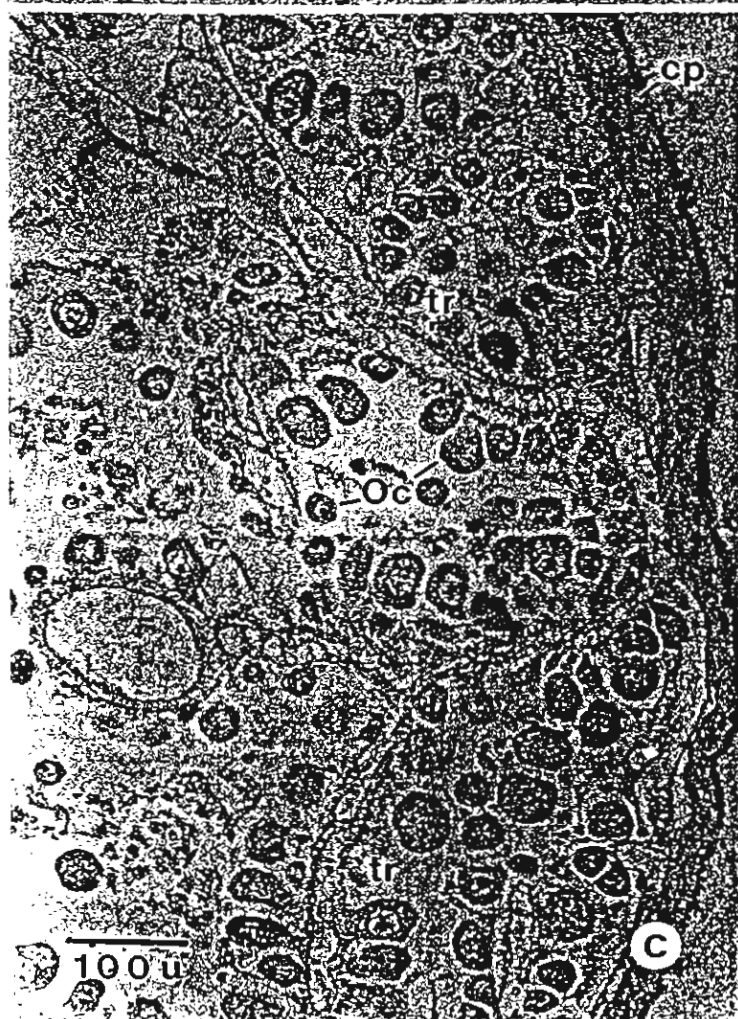
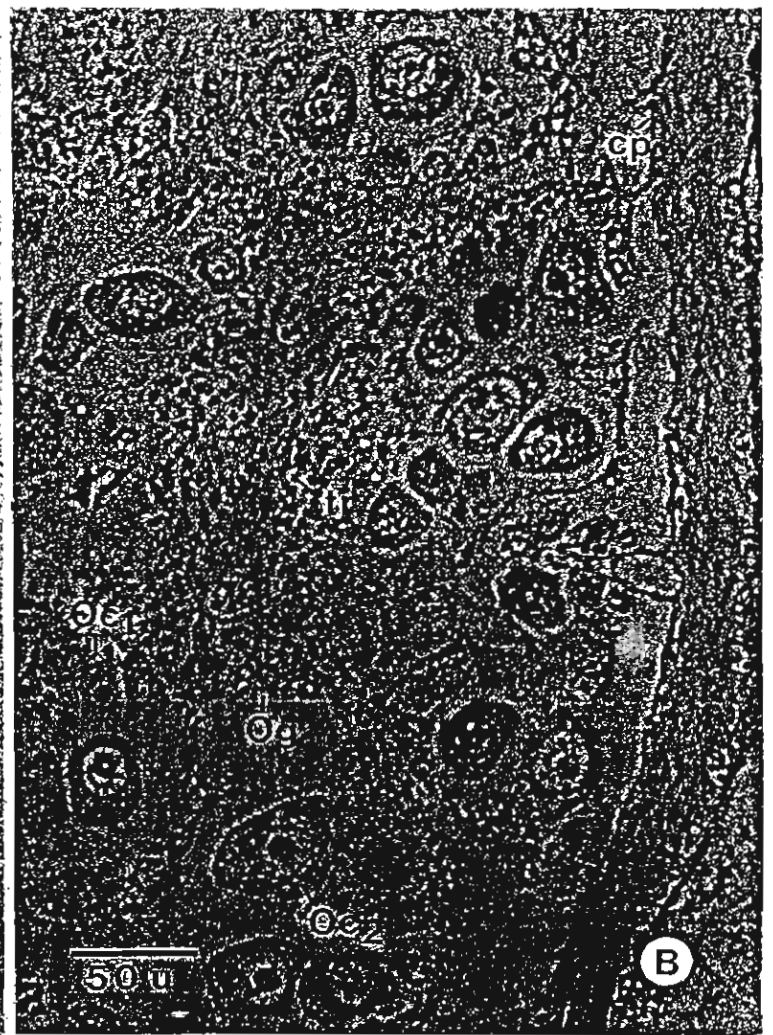
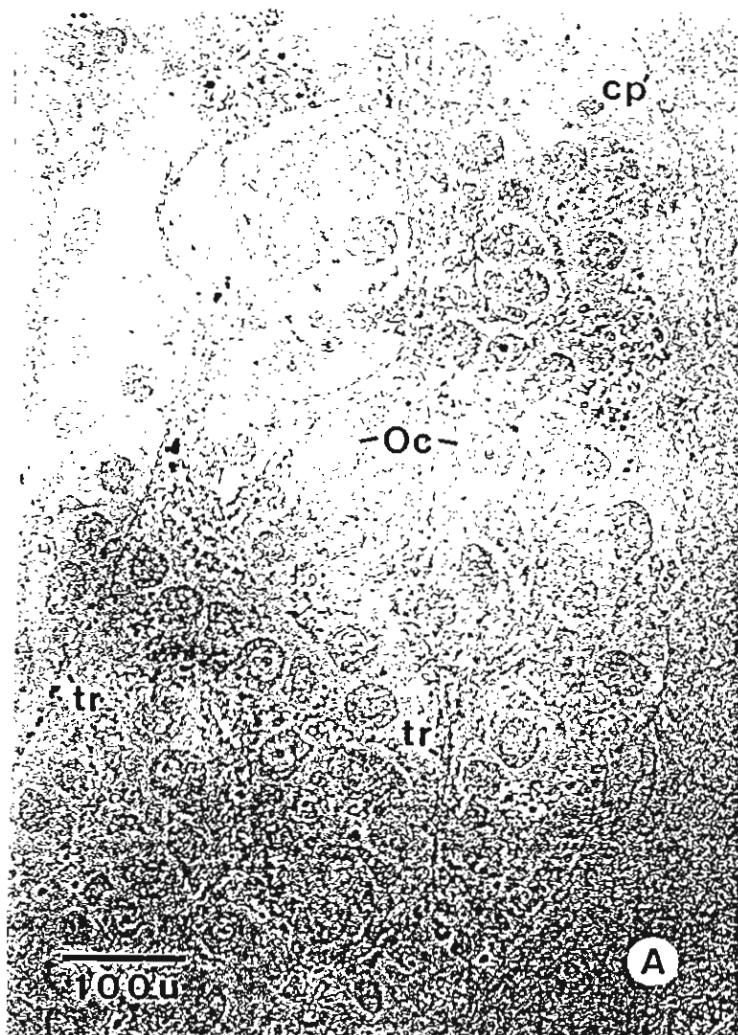
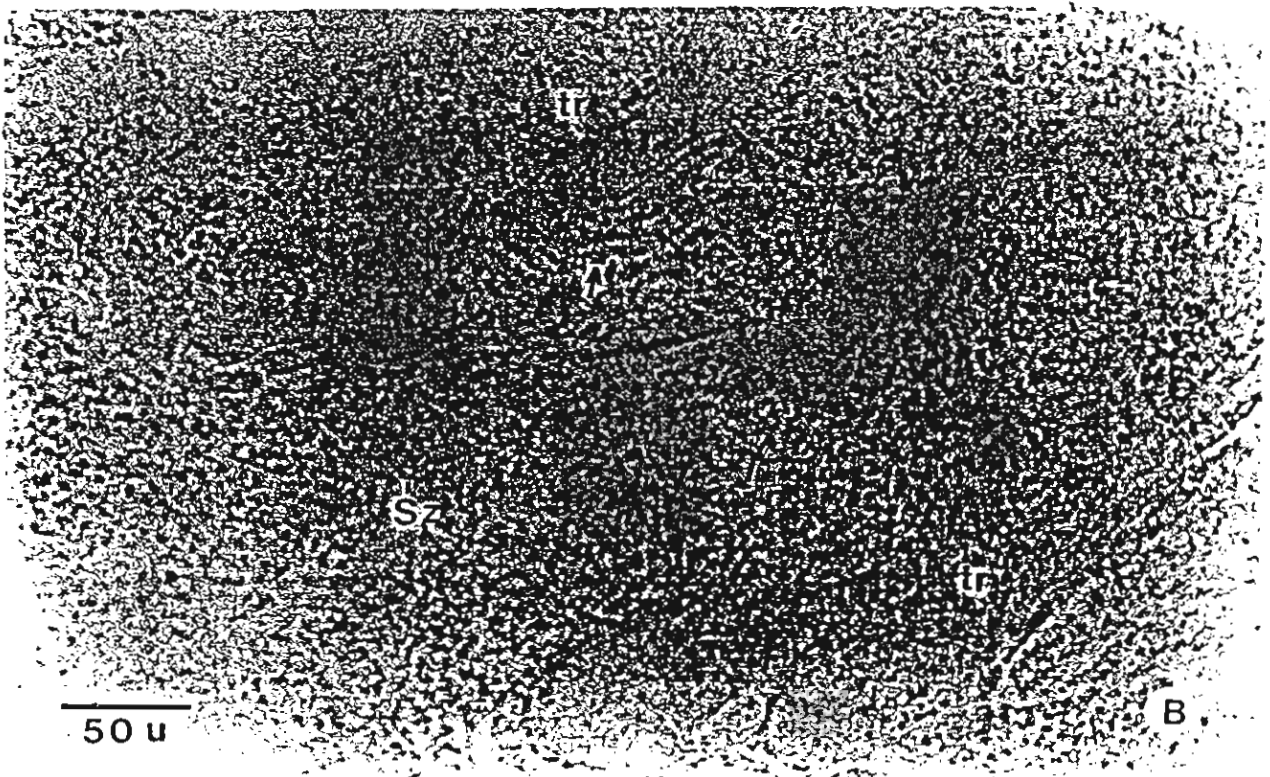
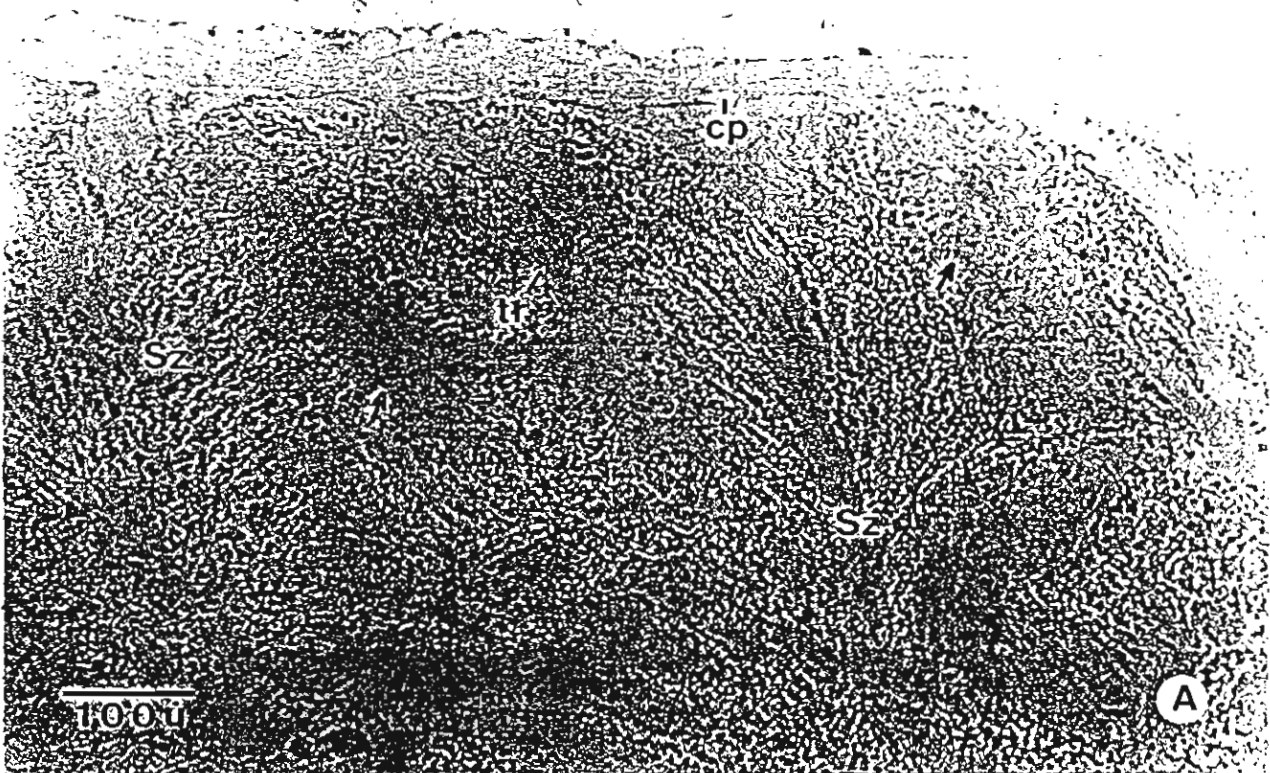


Figure 86



รูปที่ 87 ภาพ LM ของรังไข่ที่ย้อมด้วยวิธี immunohistogold โดยใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ Egg Laying Hormone (MAB-ELH) เป็น primary antibody แสดงการติดสี gold แบบจำเพาะในแกน trabeculae (A-D) ส่วน jelly coat ของเซลล์ Oc_5 ติดสี gold แบบไม่จำเพาะ (A,B) เมื่อเทียบกับกลุ่ม control

รูปที่ 88 ภาพ LM ของรังไข่ที่ย้อมด้วยวิธี immunofluorescence โดยใช้ MAB-ELH เป็น primary antibody แสดงการเรืองแสงจำเพาะในแผ่น trabeculae (B-D) ในขณะที่ jelly coatเรืองแสงแบบไม่จำเพาะใน control section (A)

รูปที่ 89 ไคอะแกรมแสดงลักษณะจุลกายวิภาคของแผ่น trabeculae ในรังไข่ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ชนิดต่าง ๆ รวมทั้งเซลล์ที่มีแกรนูล (granulated cells-gr) ที่อาจจะผลิตฮอร์โมน ELH

Figure 87

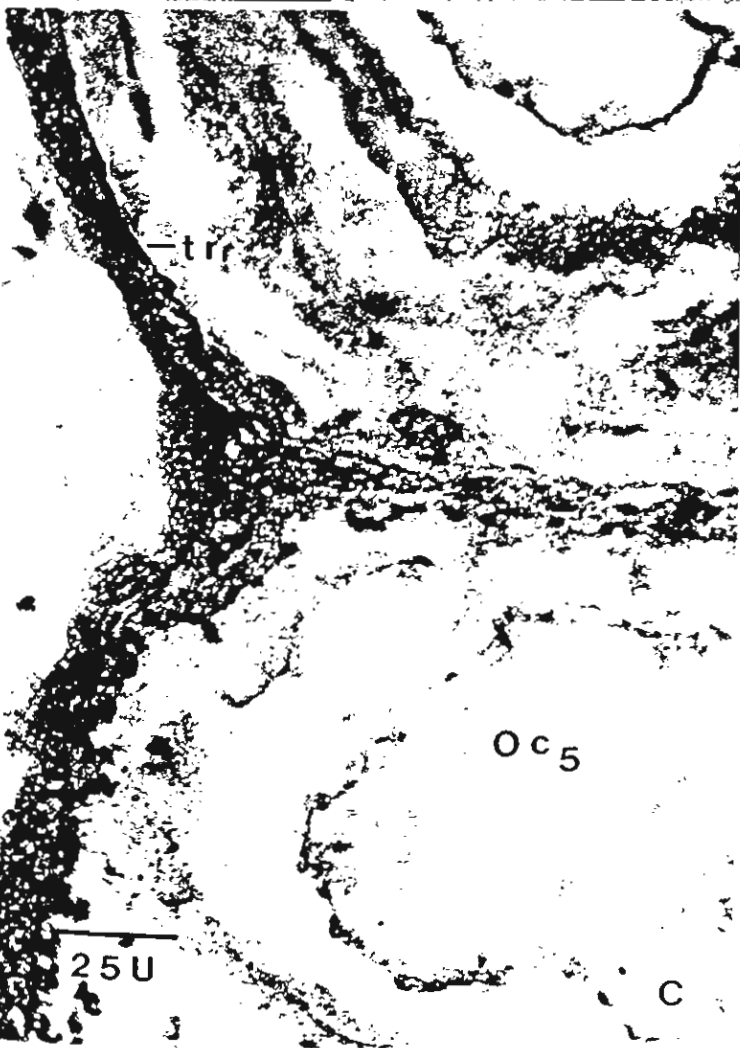
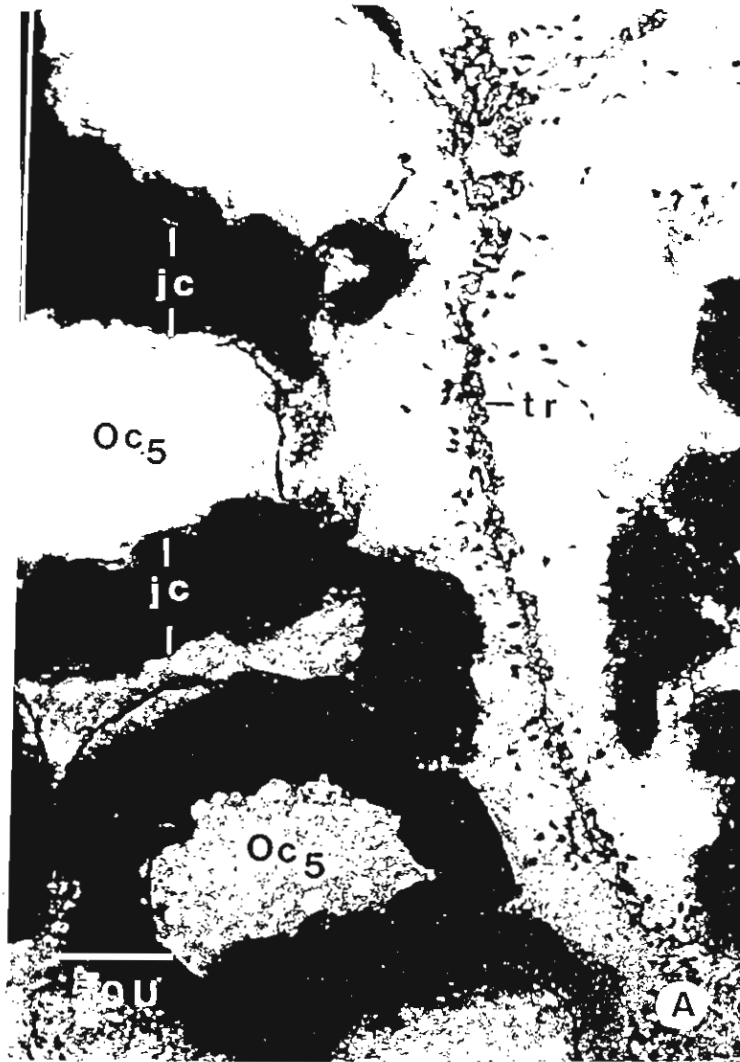
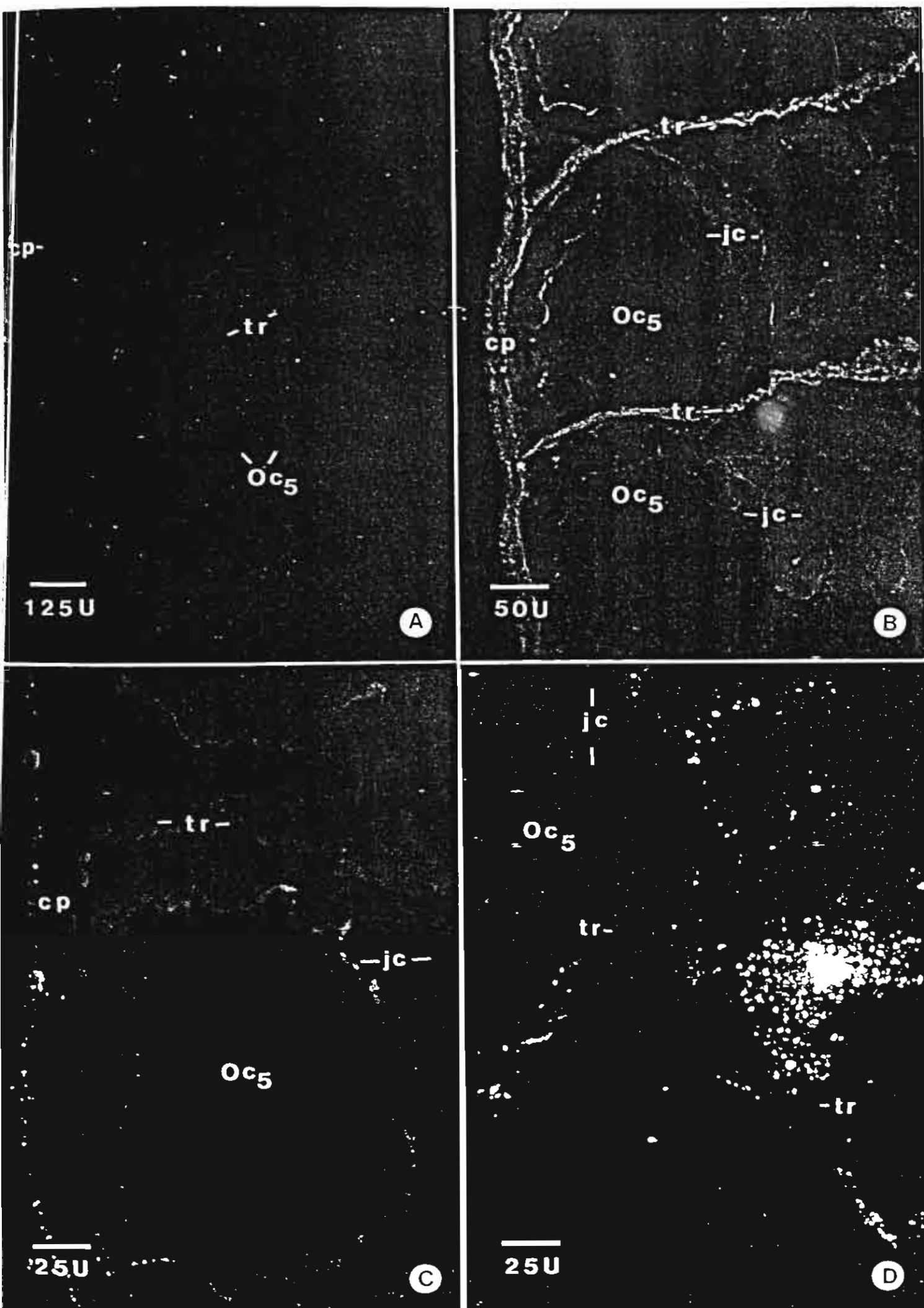


Figure 88



Cells in Trabeculae

Fibroblasts

Muscle cells

Follicular cells

Granulated cells (Neuroendocrine?)

- Type 1 (granule shape-rugby; size 270x550 nm; dense matrix)

- Type 2 (granule shape-spherical; size 165 nm; dense matrix)

- Type 3 (granule shape-spherical; size 150 nm; light matrix)

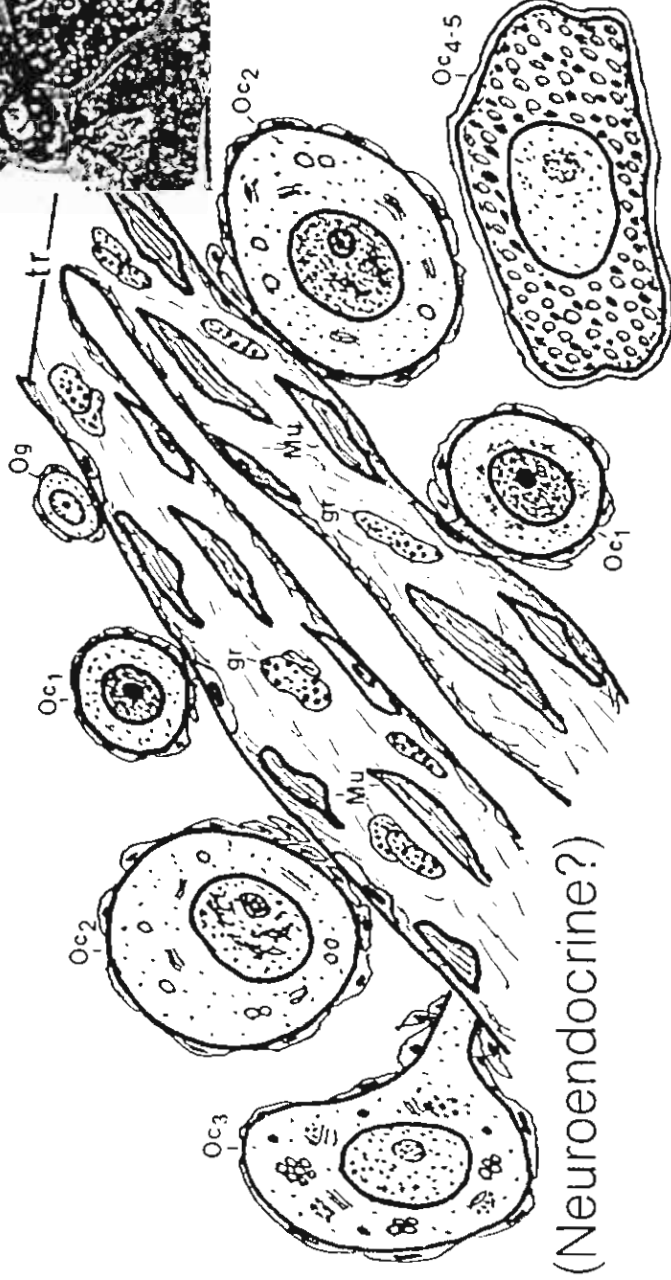


Figure 89

6.15 การพัฒนาของระบบประสาท

ปมประสาทที่มีส่วนสำคัญในการควบคุมกระบวนการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์น่าจะประกอบด้วย 3 ปมหลัก คือ ปมประสาท cerebral, pleuropedal และ visceral ganglia ดังนั้นเราจึงได้ศึกษาการพัฒนาของปมประสาทเหล่านี้ โดยเฉพาะสังเกตการเปลี่ยนแปลงของรูปร่าง ขนาด ปริมาณ และการกระจายของเซลล์ประสาท (neurons) และเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neurosecretory cells) ในส่วนต่าง ๆ ของปมประสาทดังกล่าว และได้ข้อสรุปดังนี้คือ

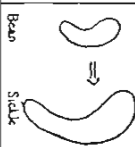
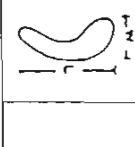
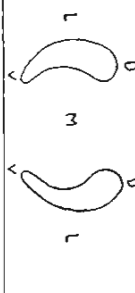
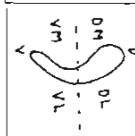
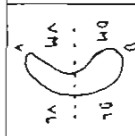
ปมประสาท Cerebral (ตารางที่ 3)

ปมประสาท cerebral ปรากฏชัดเจนเมื่อหอยมีอายุได้ 1 เดือน โดยแต่ละข้างมีรูปร่างคล้ายเมล็ดถั่ว (bean shape) ขนาดโดยเฉลี่ย $121 \times 471 \mu\text{m}$ ชั้น cortex ด้าน ventral และ dorsal มีความหนาที่สุด โดยมีชั้นของเซลล์ประมาณ 3-4 ชั้น ส่วนด้าน lateral หนากว่าด้าน medial โดยมีจำนวนชั้นของเซลล์ประมาณ 2-3 ชั้น จำนวนเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neurosecretory cell-NS) ยังมีจำนวนน้อย โดยมีแค่ 1-2 เซลล์ต่อ section และเริ่มปรากฏที่ด้าน dorsal ก่อน และส่วนมากเป็นชนิด NS_1 ส่วนเซลล์ประสาทชนิดที่ 1 (NR_1) ยังมีน้อยมาก โดยเริ่มปรากฏอยู่ที่ด้าน dorsal เช่นเดียวกันกับเซลล์ NS

ในระยะ 2-4 เดือน มีการเปลี่ยนแปลงที่คล้ายคลึงกัน กล่าวคือ ปมประสาทค่อย ๆ ขยายขนาดขึ้น และยังมีรูปร่างคล้ายเมล็ดถั่ว ชั้น cortex โดยรวมมีความหนาขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบกับ cortex ในส่วนต่าง ๆ แล้ว ยังมีลักษณะคล้ายกับเมื่ออายุ 1 เดือน จำนวน NS เซลล์เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ โดยมีจำนวนตั้งแต่ 2-10 เซลล์ต่อ section ซึ่งส่วนมากเป็น NS_1 และ NS_2 เซลล์เหล่านี้เริ่มปรากฏในบริเวณอื่น ๆ เช่น ด้าน dorso-lateral, dorso-medial แล้วไปปรากฏที่ด้าน ventral และ ventro-medial เซลล์ประสาทประกอบด้วย NR_2 และ NR_3 เป็นส่วนใหญ่ NR_1 ยังมีจำนวนน้อยและมีปรากฏที่ด้าน dorso-medial และ ventral ทั้งหมด (รูปที่ 90)

เมื่อหอยอายุได้ 5 เดือน มีการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างจากรยะ 1-4 เดือนอย่างชัดเจน กล่าวคือ ปมประสาท cerebral มีขนาดใหญ่ขึ้นมาก โดยมีรูปร่างคล้ายเมล็ดถั่วหรือรูปเคียว และมีขนาดเฉลี่ยประมาณ $202 \times 632 \mu\text{m}$ ชั้น cortex ในส่วนต่าง ๆ ของปมประสาทหนาขึ้นอย่างชัดเจนโดยเฉพาะด้าน ventral และ dorsal จำนวนเซลล์ NS ต่อ section เพิ่มขึ้นอย่างมาก โดยมีจำนวนเฉลี่ย 20 เซลล์ต่อ section และ NS เซลล์มีทั้ง 3 ชนิด คือ NS_1 , NS_2 และ NS_3 ซึ่งปรากฏขึ้นในแทบทุกส่วนของชั้น cortex ถึงแม้ว่าจะมีการรวมตัวอยู่ทางด้าน dorsal

Table 3 Key Events During the Development of Cerebral ganglion in *Haliois asinina*

Month	Shape	Size (µm) WxL	Number of cell layers				Number of NS /section	Location of NS	Relative number of NS			Chrome- alum	PAF	Relative Number of NR				Location of NR1
			Ventral (V)	Dorsal (D)	Medial (M)	Lateral (L)			NS1	NS2	NS3			NR1	NR2	NR3	NR4	
1	Bean shape	121x471	4	3	0-1	2-3	1-2	D	+	-	-	-	-	+	++++	++	++	D
2	Bean shape	182x607	5	4	0-3	1-3	2-5	D, DL, DM	+	-	-	-	-	+	++++	++	++	D, DM
3	Bean shape	182x644	5	4	0-3	1-3	2-5	D, DL, DM, V, VM	+	+	-	-	-	+	++++	++	++	D, DM, V
4	Bean shape	174x628	6	7	0-3	2-4	10	D, DL, DM, V, VM	+	+	+	-	-	+	++++	+++	++	D, DM, V
5	Bean shape	203x632	6	7-8	0-3	1-4	20	in all areas	++	++	+	+	+	++	++++	+++	++	D, DM, DL, V, VL, VM
6	Sickle shape	202x637	4-5	6-8	0-3	1-3	20	"	++	++	+	+	+	++	++++	+++	++	same
7	Sickle shape	206x808	4-5	5-7	1-2	1-3	20	"	++	++	+	+	+	++	++++	+++	++	"
8	Sickle shape	273x735	4-5	5-7	0-3	1-5	20	"	++	++	+	+	+	++	++++	+++	++	"
9	Sickle shape	286x690	4-5	5-7	0-3	1-5	20	"	++	++	+	+	+	++	++++	+++	++	"
10	Sickle shape	294x787	4	6	0-3	1-4	30	"	+++	+++	++	+	+	+++	++++	++++	++	"
11	Sickle shape	377x810	4	5-7	1-3	1-4	30-40	"	+++	+++	++	+	+	+++	++++	++++	++	"
12	highly elongated and convoluted	376x901	4-6	6-7	1-3	1-5	30-40	"	+++	+++	++	+	+	+++	++++	++++	++	"
									- =0 cell/section + =1-5 cells/section ++ =6-10 cells/section +++ =11-15 cells/section ++++ =>15 cells/section	- = nonreactive + = reactive								
Bean	Sickle																	

Significant changes were observed at 5, 10, 12 months:

5 month : numbers of neurosecretory cells (NS) are significant increased, and become both PAF and chrome alum positive ; numbers of neuron 1 (NR1) are significant increased

10 month : NS are increase further in size and number and become both PAF and chrome alum positive

12 month : ganglion become highly elongated and convoluted, NS reach maximal number

Abbreviations : NS = Neurosecretory cell (consisting of 3 types : NS1, NS2, NS3)
NR = Neuron (consisting of 4 types : NR1, NR2, NR3, NR4)
The number in the table represent means of the numbers estimated from examining 20 slides from at least 3 animals

และ ventral เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนั้นแล้ว NS เซลล์ยังเริ่มติดสี paraldehyde fuschin (PF) ซึ่งแสดงการสะสมของแกรนูลของฮอริโมนในเซลล์เหล่านี้ (รูปที่ 98) ส่วน NR เซลล์นั้นนอกจากจะมี NR_2 , NR_3 และ NR_4 ตามปกติแล้ว เซลล์ยังเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างเห็นได้ชัดโดยเฉพาะที่ด้าน ventral, ventro-lateral และ ventro-medial (รูปที่ 91)

จาก 6 ถึง 9 เดือน ปมประสาท cerebral ค่อย ๆ เพิ่มขนาดขึ้นและยืดออกตามยาว ทำให้ปรับเปลี่ยนเป็นรูปเคียว (sickle shape) ชั้น cortex ของส่วนต่าง ๆ หนาเท่าเดิม และจำนวนกับตำแหน่งการกระจายของ NS เซลล์ก็คล้ายกับในช่วงอายุ 5 เดือน เซลล์ประสาท NR ก็มีชนิด ปริมาณ และการกระจายคล้าย ๆ กับในช่วง 5 เดือน

ในช่วง 10 เดือน ปมประสาท cerebral ขยายใหญ่อย่างเห็นได้ชัด โดยมีขนาดเฉลี่ยประมาณ $294 \times 787 \mu m$ ลักษณะอื่น ๆ คล้ายคลึงกับปมประสาทในช่วง 5-9 เดือน แต่ที่แตกต่างชัดเจนคือ เซลล์ NS ทั้งสามชนิด และเซลล์ NR_1 เพิ่มจำนวนขึ้นมากอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 92)

เมื่อหอยมีอายุครบ 12 เดือน ปมประสาท cerebral พัฒนาเต็มที่คล้ายคลึงกับที่พบในหอยตัวเต็มวัย (รูปที่ 93)

ปมประสาท Pleuropedal (ตารางที่ 4)

ปมประสาท pleuropedal ปรากฏเป็นรูปผีเสื้อ (butterfly shape) ชัดเจนเมื่อหอยมีอายุ 1 เดือน โดยแยกเป็น 4 แฉกที่เชื่อมต่อกันโดยแถบกลาง ปมประสาทมีขนาดตามแนวยาวและกว้าง (ดูตารางที่ 4) โดยเฉลี่ย $189 \times 418 \mu m$ ด้าน ventral และ lateral มักมีจำนวนชั้นของเซลล์มากกว่าด้าน dorsal และ medial ในช่วงอายุนี้นี้มีเซลล์ NS อยู่่น้อยมากและเริ่มปรากฏในบริเวณ dorsal เซลล์ NS ทั้งหมดเป็นแบบ NS_1 ที่ยังไม่แสดงปฏิกิริยาติดสีต่อ paraldehyde fuchsin (PF) หรือ chrome-alum (CA) เซลล์ NS เริ่มปรากฏในแถบ dorsal sulcus ส่วนเซลล์ NR เกือบทั้งหมดเป็น NR_2 , NR_3 และ NR_4 โดยมี NR_1 อยู่่น้อยมากและถ้ามีก็มักจะปรากฏในแถบ dorso-medial (รูปที่ 94)

ในระหว่างช่วงอายุ 2-3 เดือน ปมประสาท pleuropedal ค่อย ๆ มีขนาดใหญ่ขึ้นแต่ยังคงรูปผีเสื้อตามเดิม ลักษณะโดยทั่วไปคล้ายกับในช่วง 1 เดือน ชั้น cortex โดยทั่วไปหนาขึ้นเล็กน้อย และจำนวน NS มีมากกว่าในช่วง 1 เดือน แต่ไม่แตกต่างอย่างชัดเจน โดยเริ่มมีการกระจายในส่วนอื่น ๆ มากขึ้น ได้แก่ บริเวณ dorso-medial และ lateral sulcus เซลล์ประสาท NR ส่วนใหญ่ประกอบด้วย NR_2 , NR_3 และ NR_4 ส่วน NR_1 ยังคงมีจำนวนน้อยและเริ่มปรากฏในส่วนอื่นเพิ่มเติมจากด้าน dorso-medial ได้แก่ ด้าน dorsal และ dorso-lateral

ในช่วงอายุ 4 เดือน ปมประสาท pleuropedal มีการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน กล่าวคือ ปมประสาทมีขนาดใหญ่ขึ้น โดยมีขนาดเฉลี่ย $337 \times 556 \mu\text{m}$ ชั้น cortex บริเวณด้านต่าง ๆ มีความหนามากขึ้น และจำนวน NS เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด โดยมีจำนวนเฉลี่ยประมาณ 20 เซลล์ต่อ section นอกจากส่วนต่าง ๆ ที่กล่าวมาแล้ว NS ยังปรากฏในแถบ dorso-lateral และ ventro-lateral เซลล์ NS ส่วนใหญ่เป็น NS₁ แต่ก็มี NS₂ และ NS₃ เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงการติดสี CA และ PF ชัดเจนขึ้น เซลล์ประสาทส่วนมากยังคงเป็นพวก NR₂, NR₃ และ NR₄ และมี NR₁ เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับระยะต้น โดยเริ่มปรากฏในส่วนอื่น ๆ เช่น dorso-lateral, dorsal, ventro-medial, ventro-lateral และ ventral sulcus (รูปที่ 95)

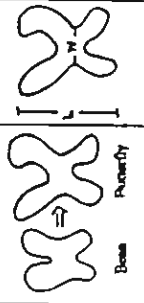
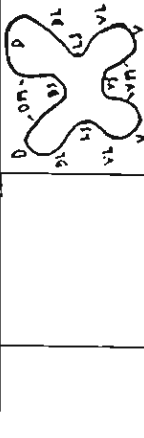
ในช่วงอายุ 5-6 เดือน ปมประสาท pleuropedal มีรูปร่างและลักษณะคล้ายคลึงกับในช่วง 4 เดือน แต่มีขนาดใหญ่ขึ้น เซลล์ NS และ NR มีจำนวนใกล้เคียงกับช่วง 4 เดือน แต่ปรากฏในแถบอื่น ๆ ด้วย เช่น NS เซลล์เริ่มปรากฏในแถบ ventral และ แถบ dorsal มากขึ้น ส่วนเซลล์ NR มีจำนวนและการกระจายคล้ายคลึงกับในช่วง 4 เดือน

ในช่วงอายุ 7 เดือน ปมประสาท pleuropedal มีลักษณะแตกต่างจากช่วง 4-6 เดือนชัดเจน กล่าวคือมีส่วนขา dorsal และ ventral ที่ยืดยาวออกไปและมีความยาวเท่า ๆ กัน จนทำให้ปมประสาทมีรูปร่างคล้ายอักษร H ปมประสาทมีขนาดเฉลี่ยประมาณ $544 \times 1615 \mu\text{m}$ ชั้น cortex ในบริเวณต่าง ๆ มีความหนาขึ้น เซลล์ NS มีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และมีจำนวนโดยเฉลี่ยประมาณ 30-40 เซลล์ต่อ section เซลล์ NS กระจายอยู่แทบทุกบริเวณของปมประสาท โดยมีเซลล์ NS₁ จำนวนมากที่สุด เซลล์ประสาท NR₁ เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และปรากฏตัวอยู่ในแทบทุกด้านของปมประสาท (รูปที่ 96)

ในช่วงอายุ 8 ถึง 10 เดือน ปมประสาท pleuropedal มีขนาดและรูปร่างใกล้เคียงกับในช่วง 7 เดือน ชั้น cortex ก็มีความหนาใกล้เคียงกัน NS เซลล์มีจำนวนเฉลี่ยเท่าเดิม แต่มีการกระจายอยู่ในแทบทุกบริเวณของชั้น cortex เซลล์ประสาท NR₂, NR₃, NR₄ มีจำนวนและการกระจายคล้ายคลึงกับในช่วง 7 เดือน แต่ NR₁ มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และกระจายอยู่ในเกือบทุกส่วนของชั้น cortex

ช่วงอายุ 11 เดือน เป็นช่วงที่ปมประสาท pleuropedal มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน โดยมีขนาดใหญ่ขึ้น อีกทั้งมีก้านและลำที่ยืดออกมากกว่าเดิม ปมประสาทมีขนาดโดยเฉลี่ยประมาณ $589 \times 2508 \mu\text{m}$ ชั้น cortex ด้านต่าง ๆ มีความหนาขึ้นชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงก่อน จำนวนของ NS เซลล์เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด โดยมีประมาณ 60 เซลล์ต่อ section และกระจายอยู่ในทุกส่วนของชั้น cortex เซลล์ประสาททุกชนิดมีจำนวนเพิ่มขึ้นมากโดยเฉพาะเซลล์ NR₁ เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงก่อน (รูปที่ 97, 98)

Table 4 Key Events During the Development of Pleuropedal ganglion in *Halilotia asinina*

Month	Shape	Size (µm) WxL	Number of cell layers				Number of NS /section	Location of NS	Relative number of NS			Chrom- -alum	PAF	Relative Number of NR				Location of NR1
			Ventral (V)	Dorsal (D)	Medial (M)	Lateral (L)			NS1	NS2	NS3			NR1	NR2	NR3	NR4	
1	Butterfly shape	189x418	2-4	0-3	1-3	0-5	1-2	DS	+	-	-	-	-	+	+++	++	++	DM
2	Butterfly shape	273x491	2-4	1-5	1-2	1-5	2-3	DS, DM, LS	+	+	-	+	-	+	+++	++	++	DM
3	Butterfly shape	269x522	4	1-5	1-3	2-4	2-3	DS, DM, LS	+	+	-	+	-	+	+++	++	++	DM, DL, D
4	Butterfly shape	337x556	5	2-5	2-3	2-7	20	DS, DM, LS, DL, VL	++	+	+	+	+	++	+++	+++	++	DM, DL, D, VM, VL, VS
5	Butterfly shape	455x572	5	2-5	2-3	1-7	20	DS, DM, LS, DL, VL, V	++	++	+	+	+	++	++++	+++	++	DM, DL, D, VM, VL, VS
6	Butterfly shape	488x707	5	2-5	2-3	1-7	20	DS, DM, LS, DL, VL, V, D	++	++	+	+	+	++	++++	+++	++	same
7	H shape	544x1615	4-6	2-5	5	3-10	30-40	in all area	+++	++	++	+	+	+++	++++	++++	++	"
8	H shape	546x1352	3-5	5	2-3	4-7	30-40	"	+++	++	++	+	+	+++	++++	+++	++	"
9	H shape	572x1061	4-5	2-5	3-4	1-8	30-40	"	+++	+++	++	+	+	+++	++++	++++	++	"
10	H shape	580x1300	4-5	2-5	3-4	2-7	30-50	"	++++	+++	++	+	+	+++	++++	++++	++	"
11	H shape, highly elongated and enlarged	589x2508	5-6	4-6	5	3-10	60	"	++++	++++	+++	+	+	+++	++++	++++	+++	"
12	H shape, similar	589x2943	5	5-6	3-4	7	60	"	++++	++++	+++	+	+	+++	++++	++++	+++	"
																		

Significant changes were observed at 4,7,11 months:

4 month : significant increase in numbers of cell layers and NS cells, NS become chrome alum positive
7 month : ganglion are much enlarged, cell layers increase, and number of NS cells increase even further.
11 month : NS reach maximal number and the ganglion become adult like.

Abbreviations : NS = Neurosecretory cell (consisting of 3 types : NS1, NS2, NS3)
NR = Neuron (consisting of 4 types : NR1, NR2, NR3, NR4)

The numbers in the table represent means of the number estimated from examining 20 slides from at least 3 animals

เมื่อหอยมีอายุได้ 12 เดือน ปมประสาท pleuropedal พัฒนาสมบูรณ์โดยมีขนาด ลักษณะ จำนวนเซลล์ และการกระจายของเซลล์เช่นเดียวกับที่พบในปมประสาทของหอยตัวเต็มวัย

ปมประสาท Visceral (ตารางที่ 5)

ในหอยอายุ 1 เดือน ปมประสาท visceral มีขนาดเล็กมากเมื่อเทียบกับปมประสาท cerebral และ pleuropedal โดยมีขนาดเฉลี่ยประมาณ $37 \times 72 \mu\text{m}$ และมีรูปร่างคล้ายเม็ดถั่ว (bean shape) cortex มีเซลล์เพียง 1 ชั้น หรือบางด้านโดยเฉพาะด้าน dorsal ไม่มีเลย เซลล์ NS ยังไม่ปรากฏ ส่วนเซลล์ NR มีเฉพาะ NR_2 , NR_3 และ NR_4 จำนวนไม่มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับปมประสาท cerebral และ pleuropedal (รูปที่ 99)

ในช่วง 2 ถึง 3 เดือน ปมประสาท visceral มีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อย ๆ และรูปร่างเปลี่ยนเป็น dumbbell shape ชั้น cortex ยังประกอบด้วย เซลล์เพียง 1-2 ชั้น โดยด้าน lateral มักจะมีจำนวนชั้นของเซลล์มากกว่าบริเวณอื่น NS เริ่มปรากฏแต่ยังมีจำนวนน้อยมากและมักพบในด้าน left lateral รวมถึง left latero-dorsal และ left latero-ventral เซลล์ประสาท NR ส่วนใหญ่คือ NR_2 , NR_3 และ NR_4 ซึ่งยังคงมีจำนวนไม่มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับปมประสาทอื่น ๆ NR₁ มีจำนวนน้อยมาก และมักพบในด้าน left lateral และ left latero-ventral (รูปที่ 100)

ช่วงอายุ 4 เดือน เป็นช่วงที่ปมประสาท visceral มีการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัดเนื่องจากมีขนาดใหญ่ขึ้นโดยเฉลี่ย $123 \times 454 \mu\text{m}$ cortex มีชั้นของเซลล์มากขึ้น และมีจำนวน NS เซลล์มากขึ้น ซึ่งเริ่มกระจายไปสู่ด้าน right lateral ด้วย โดยทั่วไปเซลล์ประสาทยังมีจำนวนและการกระจายเหมือนในช่วง 2-3 เดือน

ช่วงอายุ 5-8 เดือน ปมประสาท visceral มีรูปร่าง ขนาด ลักษณะ จำนวนเซลล์ NS, NR และการกระจายของเซลล์เหล่านี้คล้ายคลึงกับในช่วง 4 เดือน และเมื่อถึงช่วง 9-10 เดือน ปมประสาทมีขนาดใหญ่ขึ้นแต่ลักษณะอื่น ๆ ยังคงเดิม

ช่วงอายุ 11 เดือน เป็นช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน โดยปมประสาทมีความยาวมากขึ้นทั้ง ๆ ที่ความกว้างยังคงเดิม สิ่งที่สังเกตเห็นได้ชัดคือจำนวน NS เซลล์ โดยเฉพาะ NS₁ มีปริมาณเพิ่มขึ้นมากและกระจายอยู่ใน cortex เกือบทุกด้าน โดยมักมีการรวมตัวอยู่มากทางด้าน left lateral เมื่อหอยอายุได้ 12 เดือน ปมประสาท visceral ก็จะมีขนาดลักษณะ และปริมาณของเซลล์ NS และ NR ใกล้เคียงกับที่พบในหอยตัวเต็มวัย (รูปที่ 101)

รูปที่ 90 ภาพ LM (H & E stain) ของปมประสาท cerebral เมื่อหอยมีอายุได้ 4 เดือน

รูปที่ 91 ภาพ LM (H & E stain) ของปมประสาท cerebral เมื่อหอยมีอายุได้ 5 เดือน

รูปที่ 92 ภาพ LM (H & E stain) ของปมประสาท cerebral เมื่อหอยมีอายุได้ 10 เดือน

รูปที่ 93 ภาพ LM (H & E stain) ของปมประสาท cerebral เมื่อหอยมีอายุได้ 12 เดือน

รูปที่ 94 ภาพ LM (H & E stain) ของปมประสาท pleuropedal เมื่อหอยมีอายุได้ 1 เดือน

รูปที่ 95 ภาพ LM (H & E stain) ของปมประสาท pleuropedal เมื่อหอยมีอายุได้ 4 เดือน

รูปที่ 96 ภาพ LM (H & E stain) ของปมประสาท pleuropedal เมื่อหอยมีอายุได้ 7 เดือน

รูปที่ 97 ภาพ LM (H & E stain) ของปมประสาท pleuropedal เมื่อหอยมีอายุได้ 11 เดือน

รูปที่ 98 ภาพ LM ของ sections ของปมประสาท pleuropedal ที่ย้อมด้วยสี paraldehyde-fuchsin stain (A,B) และ chrome-alum stain (C,D) แสดงชั้น cortex ในปมประสาท pleuropedal เมื่อหอยมีอายุได้ 12 เดือน

รูปที่ 99 ภาพ LM (H & E stain) ของปมประสาท visceral เมื่อหอยมีอายุได้ 1 เดือน

รูปที่ 100 ภาพ LM (H & E stain) ของปมประสาท visceral เมื่อหอยมีอายุได้ 3 เดือน

รูปที่ 101 ภาพ LM (H & E stain) ของปมประสาท visceral เมื่อหอยมีอายุได้ 11 เดือน

Figure 90

