กายวิภาคและเนื้อเยื่อวิทยาของระบบทางเดินอาหารในหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* (Born, 1778)

เมธิยา อุทำกา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา
คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพา
พฤษภาคม 2559
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ เมธิยา อุทำกา ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาชีววิทยาศึกษาให้คำปรึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิน กิ่งทอง)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธาน
(ดร.ปฐมฤกษ์ อิงสันเทียะ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิน กิ่งทอง)

.....กรรมการ
(ดร.สาลินี ขจรพิสิฐศักดิ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นงนุช ตั้งเกริกโอฬาร)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)
วันที่ 29 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2559

56920148: สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา; วท.ม. (วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต)
คำสำคัญ : ต่อมย่อยอาหาร / คริสตัลลีนสไตล์ / เซลล์สร้างเมือก / ลำไส้ / แกสตริกชิลด์
เมธิยา อุทำกา: กายวิภาคและเนื้อเยื่อวิทยาของระบบทางเดินอาหารในหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* (Born, 1778)(ANATOMY AND HISTOLOGY OF DIGESTIVE SYSTEM IN THE CUPPED-OYSTER*Saccostrea cucullata* (Born, 1778): คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: สุทิน กิ่งทอง, ปร.ด.78หน้า. ปี พ.ศ. 2559

งานวิจัยครั้งนี้ศึกษาอวัยวะในระบบทางเดินอาหารของหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* ประกอบด้วยหลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้ และต่อมย่อยอาหาร ด้วยเทคนิคทางมิญชวิทยาพบว่าเนื้อเยื่อของอวัยวะในระบบทางเดินอาหารทั้งหมดประกอบด้วยเนื้อเยื่อบุผิวชั้นเดียว (simple epithelium) พบการเรียงตัวของเซลล์ 2 แบบ ได้แก่ (1) pseudostratified columnar ciliated epithelium พบในหลอดอาหาร กระเพาะอาหารและลำไส้ และ (2) simple columnar epithelium พบบริเวณถุงสไตล์ มีซิเลียแข็งมากเป็นแบบ brush border ในกระเพาะพบ typhlosole เป็นส่วนของเนื้อเยื่อบุผิวที่หนาตัว เป็นบริเวณที่คาดว่าจะมีการสร้างแผ่นแกสตริกชีลด์รองรับการบดอาหาร ต่อจากกระเพาะอาหารเป็นส่วนของลำไส้ส่วนลง บริเวณลำไส้ส่วนลงพบมีการเชื่อมต่อกับถุงสไตล์ซึ่งมีแท่งคริสตัลลีนสไตล์ อยู่ภายในเพื่อช่วยย่อยอาหารเชิงกล บริเวณต่อมย่อยอาหารพบเยื่อบุผิวชั้นเดียวเช่นกัน ภายในต่อมย่อยอาหารประกอบด้วยเซลล์ 2 ชนิด คือ เซลล์ย่อยอาหารและคริปติกเซลล์นอกจากนี้ในระบบทางเดินอาหารยังพบเซลล์สร้างเมือก เป็นจำนวนมากแทรกอยู่ในชั้นเยื่อบุผิวทุกอวัยวะ เซลล์สร้างเมือกย้อมติดสีย้อมอีโอซิน และมีการหลั่งแกรนูลออกมาในบริเวณลูเมน เพื่อสร้างเมือกหล่อลื่นให้อาหารเคลื่อนที่ได้สะดวก รวมอาหารให้เป็นก้อน พบเซลล์เม็ดเลือดแทรกอยู่ภายในเนื้อเยื่อบุผิว และในลูเมนของทุกอวัยวะคาดว่าทำหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมที่ปนมากับอาหาร อวัยวะในระบบทางเดินอาหารทั้งหมดจะเชื่อมติดกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

56920148: MAJOR: BIOLOGY EDUCATION; M. Sc. (BIOLOGY EDUCATION)
KEYWORD: DIGESTIVE GLAND/ CRYSTALINE STYLE/ MUCOUS CELL/ INTESTINE/ GASTRIC SHIELD

METHIYA UTHAMKA: ANATOMY AND HISTOLOGY OF DIGESTIVE SYSTEM IN CUPPED-OYSTER *Saccostrea cucullata* (Born, 1778): ADVISORY COMMITTEE: SUTIN KINGTONG, Ph.D. 78 P. 2016.

This research studied digestive organs of the oyster *Saccostrea cucullata* which include mouth, esophagus, stomach, intestine and digestive gland by using histological techniques. The results showed that the all tissue in digestive organs are composed of 2 types of simple epithelium which are (1) pseudostratified columnar ciliated epithelium presented in the esophagus, stomach and intestine and (2) simple columnar epithelium presented in style sac. The style sac consists of brush border on epithelium which is a hard cilia type localizing at the lumen surface. In stomach, typhlosole was found as thick epithelium. Gastric shield is expected to be found on the top of typhlosole to perform mechanical food grinding. The next part is descending intestine which found in connecting with the style sac. Crystalline style rod was found inside style sac to perform the mechanical digestion. For digestive gland, the simple epithelium was also found. The digestive glands are composed of two cell types consisting of the digestive cells and the crypt cells. In addition, plenty of mucous cells were found inside the epithelial layer of all digestive organs. The mucous cells were stained with eosin. These cells secreted granules into the lumen to lubricate food movement and to form chyme. In addition, blood cells (haemocyte) were found inside the epithelial layer and in the lumen of all digestive organs. This implies its function to serve as phagocyte to digest microorganism contaminating in foods. All digestive organs are connected with connective tissue.

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย……		ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……....		จ
สารบัญ……..		ฉ
สารบัญตาราง……		ซ
สารบัญภาพ……...		ฌ
บทที่		
1	บทนำ…….……....	1
	ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา……..……...	1
	สมมติฐานของการวิจัย.....……...	2
	วัตถุประสงค์การวิจัย.....……..……..	2
	ขอบเขตการวิจัย.....……...	2
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย……..	2
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง…….....	3
	ชีววิทยาหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*)……..	3
	การศึกษาเซลล์และเนื้อเยื่อในระบบทางเดินอาหารของหอยสองฝา……...	18
3	วิธีดำเนินการวิจัย……...	23
	การเก็บตัวอย่าง……...	23
	ขั้นตอนการทดลอง…….....	23
	การย้อมสี (staining)…….....	28
	การปิดกระจกปิดสไลด์ (mounting)……	29
	การศึกษาเนื้อเยื่อทางมิญชวิทยา ด้วยวิธีการทางพาราฟินเทคนิค……	32
	การศึกษาเนื้อเยื่อด้วยวิธี Semi-thin section.....	33
4	ผลการวิจัย……..	34
	โครงสร้างทางกายวิภาคระบบทางเดินอาหารในหอยนางรมปากจีบ……..	34

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	เนื้อเยื่อในระบบทางเดินอาหารของหอยนางรมปากจีบ……..	35
	หลอดอาหาร (esophagus)……...	36
	กระเพาะอาหาร (stomach)……..	38
	ลำไส้ (intestine)……..	41
	ลำไส้ส่วนลง (descending intestine)……..	42
	ลำไส้ส่วนขึ้น (ascending intestine)และลำไส้ส่วนปลาย (terminal intestine)……	45
	ต่อมย่อยอาหาร (digestive diverticular or digestive gland)…….....	48
5	อภิปรายและสรุปผล.....	51
	อภิปรายผล.....	51
	สรุปผลการทดลอง……	57
	ข้อเสนอแนะ.....	59
บรรณานุกรม……..		60
ภาคผนวก…….....		62
	ภาคผนวกก…….……....	6**3**
ประวัติย่อของผู้วิจัย……		66

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3-1 คุณลักษณะของน้ำทะเลที่ใช้สำหรับเลี้ยงหอยนางรมในห้องปฏิบัติการ..... 24

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	ลักษณะทางกายวิภาคของ American oyster (*Crassostrea virginica*)……..……	5
2-2	ลักษณะทางกายวิภาคของหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea forskali*)……	7
2-3	ระบบย่อยอาหารของหอยนางรม (*Crassostrea virginica*)……...	9
2-4	อวัยวะที่เกี่ยวกับการย่อยอาหารของหอยนางรม *Crassostrea virginica*……..	11
2-5	แกสตริกชีลด์ (gastric shield) ในกระเพาะอาหาร (stomach) ของหอยนางรม (*Crassostrea virginica*)……	12
2-6	ตัดตามขวางผนังกระเพาะอาหารหอยนางรม(*Crassostrea virginica*) ที่อยู่ภายใต้แกสตริกชีลด์ (gastric shield)……...	13
2-7	ตัดตามขวางของถุงสไตล์ (style sac) ในหอยนางรม (*Crassostrea virginica*)…….	14
2-8	คริสตัลลีนสไตล์ (crystallinestyle)ในหอยนางรม (*Crassostrea virginica*) และ (*Crassostrea gigas*)……..	15
2-9	ถุงสไตล์ในหอย (*Polymesoda erosa*)……..	16
2-10	ตัดตามขวางลำไส้ส่วนกลาง (midgut) ของหอยนางรม (*Crassostrea virginica*)..……	17
2-11	ตัดตามขวางเรคตัม (rectum) ของหอยนางรม (*Crassostrea virginica*)…….……...	17
2-12	ตัดตามขวางทวารหนัก (anus) ของหอยนางรม (*Crassostrea virginica*)…..……	18
2-13	ตัดตามขวางต่อมย่อยอาหาร (digestive diverticulum) ของหอยนางรม (*Crassostrea virginica*)……	19
3-1	การตัดผ่านส่วนของระบบทางเดินอาหาร……	24
4-1	ลักษณะทางกายวิภาคตำแหน่งของอวัยวะที่พบในระบบทางเดินอาหารของหอยนางรมปากจีบ……...	34
4-2	อวัยวะที่พบในระบบทางเดินอาหารของหอยนางรมปากจีบ……	35
4-3	เนื้อเยื่อในระบบทางเดินอาหารของหอยนางรมปากจีบตัดตามขวางด้วยเทคนิคมิญชวิทยา……	36
4-4	ลักษณะเนื้อเยื่อหลอดอาหารของหอยนางรมปากจีบเมื่อตัดตามขวาง……..	37

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4-5	ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร (stomach) ของหอยนางรมปากจีบ เมื่อตัดตามขวาง..	39
4-6	บริเวณเยื่อบุผิวของกระเพาะอาหารของหอยนางรมปากจีบ……	40
4-7	ลักษณะทางกายวิภาคตำแหน่งของอวัยวะที่พบในระบบทางเดินอาหารของหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*)…….	41
4-8	ลักษณะเนื้อเยื่อถุงสไตล์ (style sac) ของหอยนางรมปากจีบ……	43
4-9	ลักษณะเนื้อเยื่อถุงสไตล์ (style sac) เชื่อมติดกับลำไส้ส่วนลง (descending intestine) ของหอยนางรมปากจีบ……	44
4-10	ลำไส้ส่วนขึ้น (ascending intestinal) และลำไส้ส่วนปลาย (terminal intestine) ของหอยนางรมปากจีบเมื่อตัดตามขวาง……..	46
4-11	ลักษณะเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหาร (digestive gland) ของหอยนางรมปากจีบ เมื่อตัดตาม	49
4-12	บริเวณเยื่อบุผิวของกระเพาะอาหารของหอยนางรมปากจีบ……	50

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

หอยนางรมที่นำมาบริโภคเกือบทั้งหมดเป็นหอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในธรรมชาติซึ่งในประเทศไทยมีพันธุ์หอยนางรมตามธรรมชาติอยู่หลายชนิดพบตามแถบชายฝั่งทะเล น้ำตื้น บริเวณอ่าว และปากแม่น้ำ แพร่กระจายอย่างกว้างขวางทั่วไปในเขตภูมิภาคต่าง ๆ (Klinbunga et al., 2005) แต่ชนิดที่นิยมเพาะเลี้ยงเพื่อนำมาบริโภคเป็นอาหารนั้น จำแนกได้เป็น 2 พวก คือ หอยนางรมพันธุ์เล็ก ซึ่งมีชื่อเรียกตามพื้นบ้านว่าหอยปากจีบ หอยเจาะ หรือ หอยอีรม ส่วนหอยนางรมอีกพวกหนึ่ง คือ หอยนางรมพันธุ์ใหญ่ได้แก่ หอยตะโกรมกรามขาว (*Crassostrea belcheri*) และหอยตะโกรมกรามดำ (*Crassostrea lugubris*) (อุมาพร แก้วมณี, *2555)* หอยนางรมเป็นหอยสองฝาที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง จึงมีผู้บริโภคหอยนางรมในปริมาณที่มาก และตลาดหอยนางรมนั้น มีแนวโน้มการขยายตัวที่สูงขึ้นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2537 เป็นต้นมาประเทศไทยมียอดการผลิตหอยนางรมสูงถึง 20,000 ตัน คิดเป็น 35% ของผลผลิตทางทะเลทั้งหมด สำหรับชายฝั่งทะเลอ่าวไทยทางภาคใต้มีการส่งออกหอยนางรมส่วนใหญ่มาจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี 10,782 ตัน ส่วนใหญ่เป็นหอยนางรมพันธุ์ *C. belcheri* และชายฝั่งทะเลบริเวณอ่าวไทยในภาคตะวันออก ผลผลิตหอยนางรมส่วนใหญ่มาจากจังหวัดชลบุรี 7,744 ตัน ส่วนใหญ่เป็นหอยนางรมในสกุล *Saccostrea* (Klinbunga et al., 2005) และกรมประมง (ม.ป.ป.) ได้มีการเผยแพร่ปริมาณผลผลิตหอยนางรม ในปีพ.ศ. 2555 ที่มีปริมาณการผลิตสูงถึง16,130 ตัน

หอยนางรมเป็นหอยสองฝามีการดำรงชีวิตแบบยึดเกาะอยู่กับที่ และมีการกรองกินแพลงก์ตอนพืช และแพลงก์ตอนสัตว์ที่ลอยมาในกระแสน้ำโดยใช้เหงือก (gill) และแลเบียลพัลพ์ (labial palp) ช่วยในการกรองอาหารที่อยู่ในน้ำเข้าสู่ปาก ระบบทางเดินอาหารประกอบด้วย 3 ส่วน คือ (1) ทางเดินอาหารส่วนต้น ประกอบด้วยหลอดอาหาร (esophagus) ซึ่งมีลักษณะสั้น และแบนเปิดเข้าสู่กระเพาะอาหาร (2) ทางเดินอาหารส่วนกลางประกอบด้วยส่วนของกระเพาะอาหารที่มีถุงสไตล์ (style sac) แท่งบดอาหาร (crystalline style) และแกสตริกชิลด์ (gastric shield) ทำหน้าที่ช่วยบดอาหาร จากกระเพาะอาหารจะมีท่อนำไปสู่ต่อมสร้างเอนไซม์ย่อยอาหาร (digestive gland) ที่ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ และหลั่งเข้าสู่ท่อรวมเพื่อย่อยอาหารในกระเพาะอาหาร และ (3) ทางเดินอาหารส่วนปลายประกอบด้วยลำไส้ (intestine) และทวารหนัก (anus) (ศศิภา นวลละออง, 2556)

โดยสารอาหารจะถูกเก็บไว้ในต่อมย่อยอาหารเป็นครั้งแรก ส่วนสารอาหารที่ผ่านการย่อยแล้วจะถูกดูดซึมผ่านเข้าไปในเซลล์เพื่อทำหน้าที่สร้างพลังงานสำหรับใช้ในกิจกรรมเมแทบอลิซึม (Berthelin et al., 2000) ในการศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาต่อมประกอบด้วย digestive tubules epithelial cells ซึ่งมีการย่อยแบบภายในเซลล์ (intracellular digestion) การศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้าง และองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในระบบทางเดินอาหารของหอยนางรมมีงานวิจัยจำกัด เมื่อเทียบกับงานวิจัยทางด้านสัณฐานวิทยาและการศึกษาหน้าที่ของต่อมย่อยอาหาร ที่มีงานวิจัยตีพิมพ์ออกมาอย่างกว้างขวาง (Usheva & Frolova, 2006)

การศึกษาในครั้งนี้เพื่อศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างของเนื้อเยื่อ และเซลล์ภายในระบบทางเดินอาหาร ของหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea. cucullata*) ที่มีถิ่นอาศัยและพบแพร่กระจายทั่วไปในพื้นที่ชายฝั่งทะเลอ่าวไทยในภาคตะวันออก(กรมประมง, ม.ป.ป.)

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาเนื้อเยื่อและเซลล์ในระบบทางเดินอาหารของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*)

1.3 ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาเนื้อเยื่อและเซลล์บริเวณอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) โดยใช้เทคนิคมิญชวิทยา (histological technique) และซึ่งเก็บตัวอย่างมาจากพื้นที่ชายฝั่งทะเลตำบลอ่างศิลา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ได้รับข้อมูลในระดับเนื้อเยื่อวิทยาในส่วนของระบบทางเดินอาหารของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการศึกษาพิษวิทยาของสารพิษต่อระบบทางเดินอาหารในหอยนางรมและหอยสองฝาต่อไป

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีววิทยาหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata)*

หอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) พบอยู่ตามชายฝั่งทะเลโดยเกาะอยู่ตามโขดหินหรือรากไม้ มีหลายชนิดอยู่ได้ตั้งแต่ความเค็มต่ำจนถึงความเค็มสูง เป็นหอยสองฝา เปลือกมีลักษณะเป็นสองชิ้นประกบกัน และยึดติดกันโดยฟันเปลือก (hinge teeth) ร่วมกับโครงสร้างคล้ายเอ็นหรือหนังเรียกว่า ลิกาเมนต์ (ligament) ที่อยู่ด้านบนของเปลือก มีกล้ามเนื้อยึดเปลือก (adductor muscle) เพียงอันเดียวเท่านั้น ลำตัวมีตำแหน่งอยู่ระหว่างเปลือก ไม่มีส่วนหัวที่ชัดเจน ไม่มีแผงฟัน และเท้า อาศัยเกาะอยู่บนวัตถุหรือพื้นใต้น้ำ โดยมีเปลือกด้านซ้ายติดอยู่กับวัสดุที่เป็นของแข็ง ดังนั้นหอยที่ลงเกาะแล้วจึงไม่มีการเคลื่อนที่อีกตลอดชีวิต หอยนางรม (*S. cucullata*) จัดอยู่ในอนุกรมวิธานดังนี้

Kingdom Animalia
Phylum Mollusca
Class Bivalvia
Order Ostreoida
Family Ostreidae
Genus *Saccostrea*
Species *S. cucullata*

ในประเทศไทยมีพันธุ์หอยนางรมตามธรรมชาติอยู่หลายชนิด แต่ชนิดที่นิยมเพาะเลี้ยงเพื่อนำมาบริโภคเป็นอาหารนั้น พอจำแนกได้เป็น 2 พวก คือ หอยนางรมพันธุ์ใหญ่ที่เรียกว่าหอยตะโกรม มี 2 ชนิด คือ หอยตะโกรมดำ (*C. lugubris*) และหอยตะโกรมขาว (*C. belcheri*)

ส่วนหอยนางรมพันธุ์เล็กเป็นชนิดที่มีการเพาะเลี้ยงในบริเวณชายฝั่งทะเลทางภาคตะวันออก มีชื่อสามัญว่า หอยนางรมปากจีบ โดยมีลักษณะเฉพาะ คือ เปลือกซ้ายซึ่งยึดติดกับโขดหิน มีขอบยกเป็นรูปถ้วย เปลือกขวาแบนรอยกล้ามเนื้อยึดเปลือกเป็นรูปรี และพบแถบสีเหลืองสลับกับสีขาวในรอยกล้ามเนื้อยึดเปลือก

หอยนางรมกินอาหารโดยการกรอง (*filter feeding)* ผ่านเหงือก อาหารของหอยนางรมได้แก่ แพลงก์ตอนพืชหรือแพลงก์ตอนสัตว์ที่ล่องลอยอยู่ในน้ำ อนินทรีย์สารขนาดเล็ก รวมทั้งตะกอนที่ปนอยู่กับทรายและโคลน อาหารหรืออนุภาคต่าง ๆ ที่ถูกพัดพามากับน้ำหรืออยู่ในโคลน

อาหารหรืออนุภาคต่าง ๆ ที่ถูกพัดพามากับน้ำ หรืออยู่ในโคลนจะติดอยู่บนซี่เหงือก และเข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร ที่ประกอบด้วยช่องปาก หลอดอาหาร กระเพาะอาหารที่มีถุงสไตล์ *(style sac)* ต่อมย่อยอาหาร ลำไส้เล็ก ลำไส้ตรง และช่องทวารหนัก หอยสองฝามีอวัยวะขับถ่าย คือ ไต จำนวน *1* คู่ เชื่อมต่อกับรอบหัวใจ โดยท่อไตทำหน้าที่ในการกำจัดของเสีย โดยไตแต่ละข้างจะมีท่อ *Ureter* ไปเปิดออกที่ด้านบนช่องแมนเทิล ภายในท่อทางเดินอาหารบุด้วยซิเลีย (*cilia)* และเยื่อเมือกที่ช่วยพัดพาอาหาร เข้าสู่ต่อมย่อยอาหาร การย่อยอาหาร และการดูดซึมอาหารเกิดขึ้นที่ต่อมย่อยอาหาร โดยย่อยแบบภายในเซลล์ (*intracellular digestion)* โดยกากอาหารจะถูกลำเลียงออกไปยังลำไส้เล็ก ลำไส้ตรง และช่องทวารหนัก (อุมาพร แก้วมณี, *2555)*

ลักษณะทั่วไป

ร่างกายจะแบ่งเป็น *3* ส่วน (บพิธ จารุพันธุ์, 2540) ได้แก่

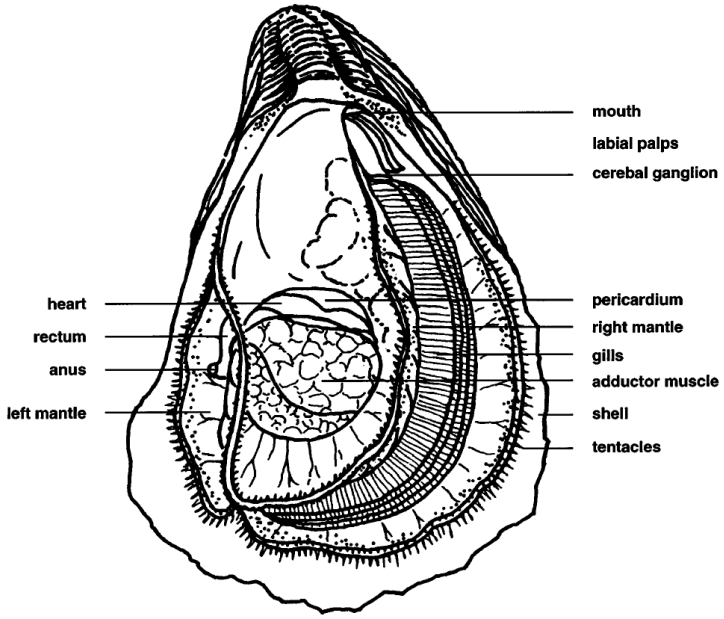
1. หัวและเท้า (head and foot) เป็นอวัยวะที่เจริญดีเห็นเด่นชัดและจะเชื่อมติดกัน ทำหน้าที่รับความรู้สึกและเคลื่อนที่เป็นหลัก ส่วนหัวของหอยสองฝาไม่เจริญ

2. ก้อนอวัยวะภายใน (visceral mass) อวัยวะภายในมักจะจับตัวกันเป็นก้อนใหญ่ก้อนเดียว ในก้อนอวัยวะภายในนี้จะประกอบด้วยระบบอวัยวะที่สำคัญ ได้แก่ ระบบย่อยอาหาร ระบบหมุนเวียน ระบบขับถ่าย และระบบสืบพันธุ์

3. แมนเติลหรือพาเลียม *(mantle or palium)* แมนเติลเป็นแผ่นเยื่อเจริญมาจากผนังตัวทางด้านหลังของก้อนอวัยวะภายใน เป็นแผ่นเยื่อห้อยลงมาด้านท้อง หอยฝาเดียวมีเยื่อแมนเติล แผ่นใหญ่แผ่นเดียวแนบติดอยู่กับเปลือกด้านใน หอยสองฝามีเยื่อแมนเติลสองแผ่นหุ้มก้อนอวัยวะภายในไว้ ช่องว่างระหว่างเยื่อแมนเติลกับก้อนอวัยวะภายในเรียกว่า ช่องแมนเติล *(mantle cavity)* ภายในช่องแมนเติลมีเหงือก *(gill)* (ภาพที่ 2-1)

ระบบทางเดินอาหารของหอยสองฝา

ระบบทางเดินอาหารของหอยสองฝาแตกต่างจากหอยชนิดอื่นในกลุ่มมอลลัสก์เพราะหอยสองฝากินอาหารที่มีขนาดเล็กมาก ดังนั้นจึงไม่มีต่อมน้ำลายหรือถุงหลอดอาหารซึ่งหลั่งเอนไซม์ออกมาย่อยอาหารในชั้นต้น การย่อยอาหารเกิดขึ้นทั้งภายในและภายนอกเซลล์ โดยการย่อยภายในเซลล์จะเกิดบริเวณต่อมย่อยอาหาร ส่วนการย่อยภายนอกเซลล์จะเกิดในกระเพาะอาหารและลำไส้ (สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ, 2538)



ภาพที่ 2-1 ลักษณะทางกายวิภาคของ American oyster (*Crassostrea virginica*)
(ที่มา: Lorio & Malone, 1994)

วิธีการกินอาหารของหอยสองฝา

อวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการกินอาหาร

อวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการกินอาหารของหอยสองฝาประกอบด้วย

(1) แมนเทิลและไซฟอน เนื่องจากหอยสองฝาสูญเสียส่วนหัวที่ทำหน้าที่รับความรู้สึกไป ดังนั้นบริเวณของของแมนเทิลจะทำหน้าที่แทนในการรับสัมผัสต่าง ๆ และในการนำน้ำผ่านเข้าไปในช่องแมนเทิล (mantle cavity) โดยทั่วไปแล้วน้ำจะผ่านเข้าช่องแมนเทิลทางไซฟอนนำน้ำเข้า (inhalant siphon) เพื่อหล่อเลี้ยงช่องแมนเทิลจนทั่ว แล้วผ่านเหงือกเพื่อกรองอาหาร และออกซิเจน และถูกปล่อยออกมาทางไซฟอนนำน้ำออก (exhalant siphon) ไซฟอนนำน้ำเข้าจะมีโครงสร้างที่ซับซ้อน มีขนาดใหญ่ มีเทนเทเคิล (tentacle) และซิเลียสำหรับโบกพัดน้ำเข้ามา เทนเทเคิล และซิเลียนี้ทำหน้าที่ในการรับสัมผัส และรับรู้ต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อม ในขณะเดียวกันยังเป็นส่วนที่ช่วยในการกรองอาหารขั้นต้นอีกด้วย ส่วนไซฟอนนำน้ำออกนั้นเป็นช่องเปิดธรรมดา

(2) เหงือก บรรจุอยู่ในส่วนปลายของช่องแมนเทิล ทำหน้าที่เกี่ยวกับการหายใจโดยตรง และอาจจะเกี่ยวข้องกับการเก็บรวบรวมอาหารบ้างแต่เป็นส่วนน้อย เหงือกชนิดนี้มีลักษณะเป็นแผ่นแบนเชื่อมกันโดยปุ่มที่มีซิเลีย ซิเลียที่อยู่ทางส่วนหน้าของเหงือกจะทำหน้าที่โบกพัดสารที่กรองโดยซิเลียด้านข้างไปสู่บริเวณช่องปาก หอยในวงศ์นิวคูลานิดี (Family Nuculanidae) เหงือกมี

ลักษณะเป็นเยื่อแบนบางที่มีฝากั้นเป็นช่อง มีซิเลียอยู่ภายใน ทำหน้าที่ในการคัดเลือกอาหารที่มีขนาดเล็กเพื่อกรองเข้าสู่บริเวณช่องปาก ส่วนอาหารที่มีขนาดใหญ่ ก็จะถูกทิ้งไป ในหอยสองฝาพวกอื่น ๆ จะมีเหงือกตัว V หรือ W ซึ่งเป็นลักษณะเป็นเยื่อบาง ๆ และมีซิเลีย

ขนาดของเลเบียลพัลพ์และเหงือกก็มีความสัมพันธ์กับวิธีการกินอาหารของหอยเหมือนกัน กล่าวคือ หอยที่กินอาหารอยู่ใต้น้ำจะมีเลเบียลพัลพ์ขนาดใหญ่ ส่วนหอยที่กินอาหารผิวน้ำจะมีเลเบียลพัลพ์ขนาดเล็กแต่มีเหงือกขนาดใหญ่

เหงือกชนิดที่พบในหอยซับคลาสเมลลิแบรงเคีย (Subclass Lamellibranchia) นั้น สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 แบบตามลักษณะของเหงือก คือ (1) เหงือกแบบฟิลิแบรงค์ (filibranch) มีลักษณะคล้ายขนนก มีแผ่นเหงือกเชื่อมติดกันแบบหลวม ๆ โดยมีแผ่นซิเลียที่มีรูปร่างคล้ายจานทำหน้าที่ในการเลือกและกรองสารอาหารในหอยสองฝาชั้นต่ำ เช่น หอยแครงญี่ปุ่นในวงศ์ Arcidae หอยเชลล์ในวงศ์ Pectinidae หอยนางรมในวงศ์ Ostreidae และหอยแมลงภู่ในวงศ์ Mytilidae (2) เหงือกแบบซูโดฟิลิแบรงค์ (pseudofilibranch) มีแผ่นเหงือกเชื่อมกันโดยครีบบาง ๆ ซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการทำงานของเหงือก เหงือกชนิดนี้มีซิเลียทั้งขนาดสั้นและยาวทำหน้าที่ในการคัดเลือกอาหาร เช่น ในหอยตะโกรมกรามดำ (Black-scar oyster) (รัตนา สมัญญา และสุทิน กิ่งทอง, 2557) และ (3) เหงือกแบบยูลาเมลลิแบรงค์ (eulamellibranch) ที่ติดเป็นแผ่นเดียวกัน เช่น หอยน้ำจืดในวงศ์ Unionidaeหอยแครงในวงศ์ Cardiida และหอยครางในวงศ์ Veneridae (Galtsoff, 1964)

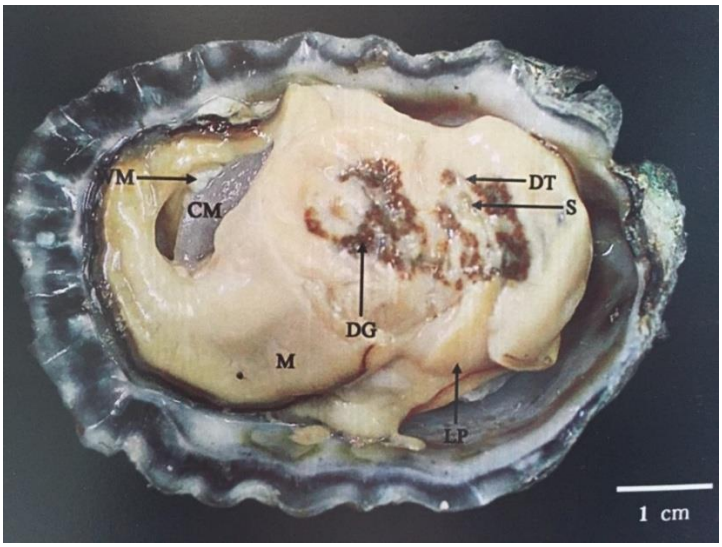
หอยในซับคลาสเซปติแบรงเคีย (Subclass Septibranchia) เช่น หอยในสกุล *Poromya* และ *Guspidaria* มีเหงือกชนิดพิเศษเรียก เหงือกเซปติแบรงค์ (septibranch) ทำหน้าที่ช่วยเร่งการเคลื่อนที่ของน้ำและอาหาร เป็นโครงสร้างที่มีความสัมพันธ์กับแมนเทิล มีซิเลียเป็นจำนวนน้อยมาก โดยซิเลียจะมีอยู่ในรูน้ำเข้า (ostium) หรืออยู่ในอวัยวะรับความรู้สึกออสเฟรเดียม (osphradium) ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบคุณภาพของน้ำที่ผ่านเข้ามา

(3) เลเบียลพัลพ์ (labial palp) เลเบียลพัลพ์มีลักษณะเป็นแผ่นสามเหลี่ยมแบน ๆ อยู่เป็นคู่สองข้างของร่องปาก (oral groove) เป็นส่วนที่เชื่อมระหว่างเหงือก และร่องปาก ทำหน้าที่ในการคัดเลือกอาหาร ในหอยซับคลาสโพรโทแบรงเคียจะมีพัลพ์โพรบอสซิส (palp proboscis) ซึ่งทำหน้าที่รวบรวมสารอาหาร และเลเบียลพัลพ์ที่มีขนาดเล็กจะทำการคัดเลือกอีกทีหนึ่งก่อนจะส่งผ่านเข้าร่องปาก หอยในซับคลาสลาเมลลิแบรงเคียนั้นไม่มีพัลพ์โพรบอสซิส เหงือกจะเชื่อมต่อโดยตรงกับเลเบียลพัลพ์ ผิวนอกของเลเบียลพัลพ์มักจะเรียบ และมีซิเลียสำหรับทำความสะอาด ส่วนผิวด้านในมีลักษณะเป็นร่องและแบ่งเป็นช่องทำหน้าที่คัดเลือกอาหารโดยอาศัยขนาดของสารอาหารนั้น กล่าวคือ สารอาหารที่มีขนาดเล็กก็จะผ่านร่องและเข้าไปในร่องปาก ส่วนอาหารขนาดใหญ่ก็จะถูกกรองทิ้งไป

ในหอยสองฝาที่กินสัตว์อื่นเป็นอาหาร เช่น หอยในวงศ์พาริลิไมอิดี (Parilimyidae) ในวงศ์คัสพิดารีดี (Cuspidariidae) และในวงศ์โพโรไมอิดี (Poromyidae) เลเบียลพัลพ์จะมีลักษณะเป็นกล้ามเนื้อ ไม่มีร่อง และเป็นส่วนที่ใช้ในการส่งอาหารเข้าสู่ปากโดยตรงมิได้ทำหน้าที่คัดเลือกอาหาร

(4) ปาก เลเบียลพัลพ์ติดต่อกับปากโดยร่องปาก ปากของหอยสองฝามีลักษณะเป็นช่องมีขอบบน และขอบล่าง ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับการทำความสะอาด บางครั้งขอบปากทั้งสองจะรวมกันมีลักษณะคล้ายริมฝีปากเพื่อป้องกันมิให้อาหารหลุดเข้าไปกับกระแสน้ำที่ไหลออก

(5) แผ่นเท้า ในหอยสองฝาส่วนใหญ่ ระบบไซฟอน และเหงือกมีหน้าที่เกี่ยวกับการแลกเปลี่ยนก๊าซในการหายใจและการกินอาหารโดยกรองอาหารจากน้ำที่ผ่านเข้ามาทางไซฟอนแต่ในหอยสองฝาบางชนิดมีวิธีการนำอาหารเข้าทางช่องแมนเทิล โดยแผ่นเท้าจะเปลี่ยนแปลงมีลักษณะคล้ายท่อทำหน้าที่ดูดน้ำพร้อมกับอาหารเข้ามาภายในซึ่งหอยนางรมไม่พบแผ่นเท้า



ภาพที่ 2-2 ลักษณะทางกายวิภาคของหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea. forskali*) CM = กล้ามเนื้อยึดเปลือกส่วนใส (clear adduuctor muscle) DG = ต่อมย่อยอาหาร (digestive gland) DT = ท่อทางเดินอาหาร (digestive tract) LP = เลเบียลพัลพ์ (labial palp) M = แมนเทิล (mantle) S = กระเพาะอาหาร (stomach) WM = กล้ามเนื้อยึดเปลือกส่วนขาว (white adductor muscle) (ที่มา: ศศิภา นวลละออง, 2556)

การย่อยอาหารของหอยสองฝา

กายวิภาคของระบบทางเดินอาหาร

ระบบทางเดินอาหารของหอยสองฝาประกอบด้วยสามส่วน คือ (1) ทางเดินอาหารส่วนต้น (foregut) ประกอบด้วยหลอดอาหารซึ่งสั้นและแบน เปิดสู่กระเพาะอาหารส่วนต้น (2) ทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) ประกอบด้วยส่วนของกระเพาะอาหารที่มีถุงสไตล์และคริสทัลลีนสไตล์ จากกระเพาะอาหารจะมีช่องเปิดเข้าไปสู่ตับ และ (3) ทางเดินอาหารส่วนปลาย (hindgut) ประกอบด้วยเรกตัม (rectum) และทวารหนัก (anus) (สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ, 2538) (ภาพที่ 2-2)

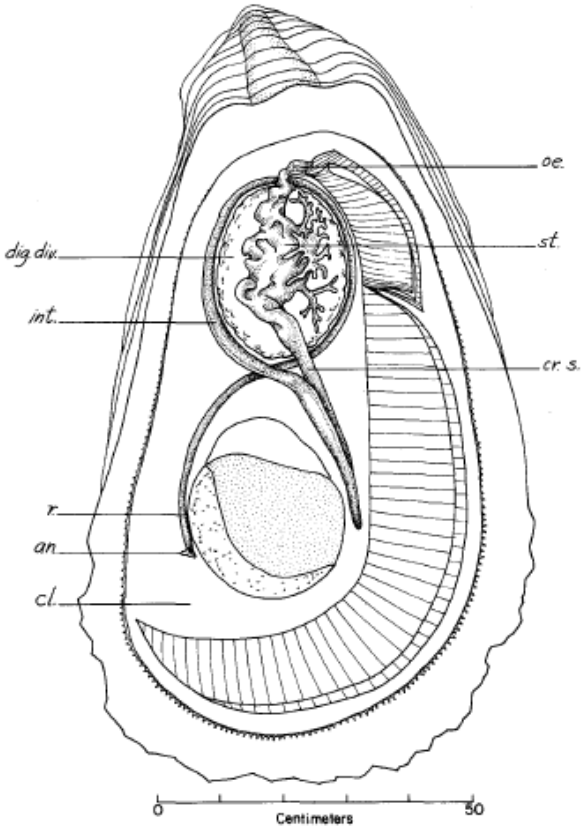
โดยทั่วไปแล้ว กระเพาะอาหารของหอยสองฝายกเว้นในหอยเซปติแบรงเคียจะมีลักษณะเป็นถุงที่มีผนังบาง บนผิวกระเพาะด้านหลังจะพบแกสตริกชีล์ด (gastric shield) ซึ่งเป็นแกนที่หมุนคริสทัลลีนสไตล์ ผนังที่บุกระเพาะอาหารประกอบด้วยเซลล์ที่มีซิเลียนี้จะม้วนพับเป็นร่องเพื่อทำหน้าที่ในการคัดเลือกอาหาร

ต่อมสร้างน้ำย่อย (digestive gland) ประกอบด้วยท่อเป็นจำนวนมากซึ่งมีปลายปิดข้างหนึ่ง มีหน้าที่เกี่ยวกับการย่อยภายในเซลล์และการดูดซึมอาหาร นอกจากนี้อวัยวะต่าง ๆ ในทางเดินอาหารส่วนกลาง และส่วนปลายก็มีหน้าที่ช่วยในการย่อย และการดูดซึมอาหารด้วย

ท่อทางเดินอาหารของหอยสองฝา ประกอบด้วย

1. ปาก (mouth) ภายในปากมีต่อมน้ำลาย 1 คู่ สร้างเมือกมาจับอาหาร และทำให้อาหารรวมตัวกันเป็นเส้น (mucus-food string)

2. หลอดอาหาร (esophagus) เป็นท่อสั้นต่อจากปาก ประกอบด้วยเยื่อบุผิวชนิดเซลล์รูปแท่งทรงสูงแบบมีซิเลีย (columnar ciliated epithelium) ตั้งอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ด้านฐาน (basal membrane) อาหารที่รวมตัวกันเป็นเส้น (mucus-food string) จะผ่านหลอดอาหารเข้าไปยังกระเพาะอาหาร ซึ่งมีตำแหน่งตรงกลางของก้อนอวัยวะภายใน (visceral mass)(ภาพที่ 2–3)

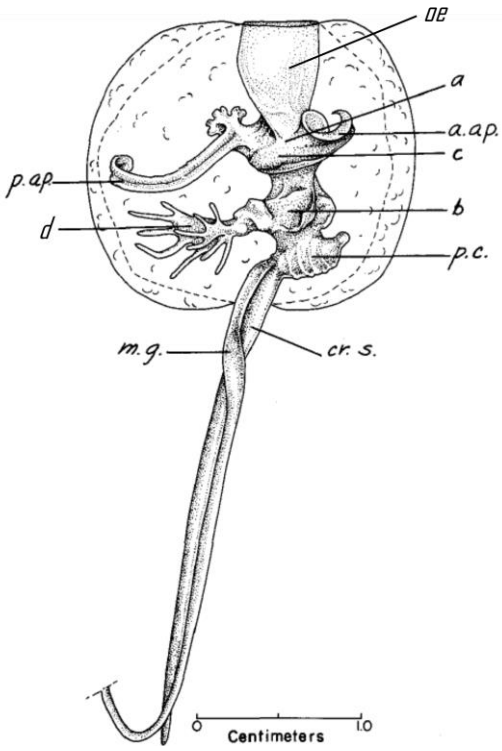


ภาพที่ 2-3 ระบบย่อยอาหารของหอยนางรม *Crassostrea virginica*ด้านขวามีการตัดเลเบียลพัลพ์ (labial palp) ออกเพื่อแสดง หลอดอาหาร (esophagus) an. = ทวารหนัก (anus) cl. = ทวารรวม (cloaca) cr.s. = ถุงคริสตัลลีนสไตล์ (crystalline style sac) div. = ต่อมย่อยอาหาร (digestive diverticula) int. = ลำไส้ส่วนกลาง (intestine) oe. = หลอดอาหาร (esophagus) r. = เรคตัม (rectum) st. = กระเพาะอาหาร (stomach) (ที่มา: Galtsoff, 1964)

3. กระเพาะอาหาร (stomach) อยู่ต่อจากหลอดอาหาร มีรูปร่างไม่แน่นอน เป็นถุงขนาดใหญ่มีการแตกกิ่งก้านสาขาออกไปเป็นถุงขนาดย่อย(ภาพที่ 2–4) ผนังกระเพาะอาหารแบ่งเป็นห้องด้านหน้า (anterior chamber, a) ซึ่งจะนำอาหารไปสู่ห้องด้านหลัง (posterior chamber, b) พบโครงสร้างที่เป็นท่อแตกแขนงออกมาเรียกว่า ซีกัม (caecum, c) ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ทางด้านท้อง (ventral side) ของห้องด้านหน้าของกระเพาะอาหาร ปลายของซีคัม (caecum, c) จะมีรูปร่างโค้งเป็นไส้ติ่งที่ม้วนด้านหน้า (anterior appendix, a.ap) และไส้ติ่งที่ม้วนด้านหลัง (posterior appendix, p.ap) ไส้ติ่งขนาดใหญ่จะโค้งไปด้านท้อง (ventral side) ไปทางขวาของกระเพาะอาหาร ร่องตามยาวของซีกัมจะไปเปิดเข้าสู่ลำไส้ส่วนกลาง (midgut, m.g.) ผนังกระเพาะอาหารส่วนห้อง

ด้านหลัง(posterior chamber, b) จะมี pyloric caecum (p.c) ยื่นออกไปทางด้านซ้าย ซึ่ง pyloric caecum มีการเจริญเป็นทางยาวควบคู่ไปกับลำไส้ส่วนกลาง (midgut, m.g.) ที่ยื่นออกมาเป็นถุง คริสตัลลีนสไตล์ (crystalline sac, cr.s.) เยื่อบุผิวของกระเพาะอาหารห้องด้านหน้า (anterior chamber, a) เป็นเยื่อบุผิวที่มีซิเลียอยู่ด้านบน (ciliated epithelium) ส่วนกระเพาะห้องด้านหลัง (posterior chamber, b) ปกคลุมด้วยเนื้อเยื่อที่มีลักษณะโปร่งใส (translucent membrane) เรียกว่า แกสตริกชีลด์ (gastric shield) อยู่ตรงข้ามกับแท่งคริสทัลลีนสไตล์ (crystalline style, cr.s.) (ภาพที่ 2–5) (Galtsoff, 1964)

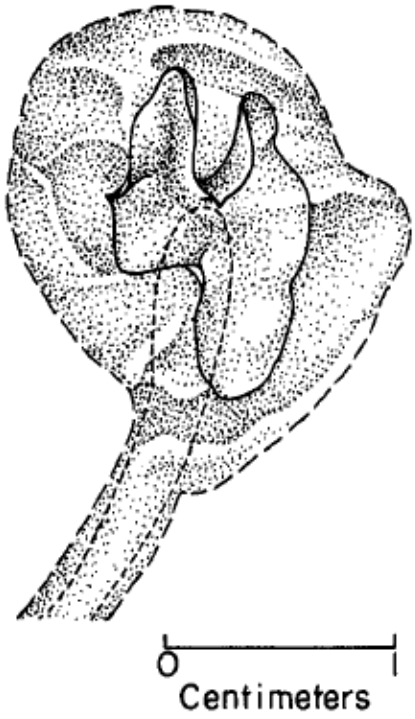
ต่อมสร้างน้ำย่อย (digestive gland) ในหอยสองฝาประกอบด้วยท่อที่มีปลายเปิดข้างเดียวและมีท่อติดต่อกับกระเพาะอาหารโดยตรง ท่อของต่อมสร้างน้ำย่อยนี้บุด้วยเนื้อเยื่อบุผิวที่มีไมโครวิลไล (microvilli) ต่อมสร้างน้ำย่อย ประกอบด้วยเซลล์ชนิดต่าง ๆ ที่เห็นเด่นชัดที่สุด คือ เซลล์ย่อยอาหาร (digestive cell) เซลล์ย่อยอาหารเหล่านี้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและขนาดไปตามขั้นตอนกระบวนการกินและการย่อยอาหาร กล่าวคือ ขณะที่ไม่มีอาหารในบริเวณนี้ เซลล์ย่อยอาหารในท่อของตับจะมีขนาดเล็กมาก เมื่ออาหารผ่านมาถึง เซลล์ย่อยอาหารก็จะเพิ่มขนาดขึ้น ดูดซึมอาหารและทำหน้าที่การย่อยภายในเซลล์โดยไลโซโซมของเซลล์ เมื่อการย่อยภายในเซลล์สิ้นสุดลง เซลล์ย่อยอาหารก็จะสลายตัวกลายเป็นเม็ดกลมเล็ก ๆ กลับเข้าไปในกระเพาะอาหาร ดังนั้นภายในตับจะมีการสร้างเซลล์ย่อยอาหารขึ้นมาใหม่ตลอดเวลาเพื่อทดแทนกับเซลล์ที่สลายตัวไป (สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ, 2538)



ภาพที่ 2-4 อวัยวะที่เกี่ยวกับการย่อยอาหารของหอยนางรม *Crassostrea virginica*

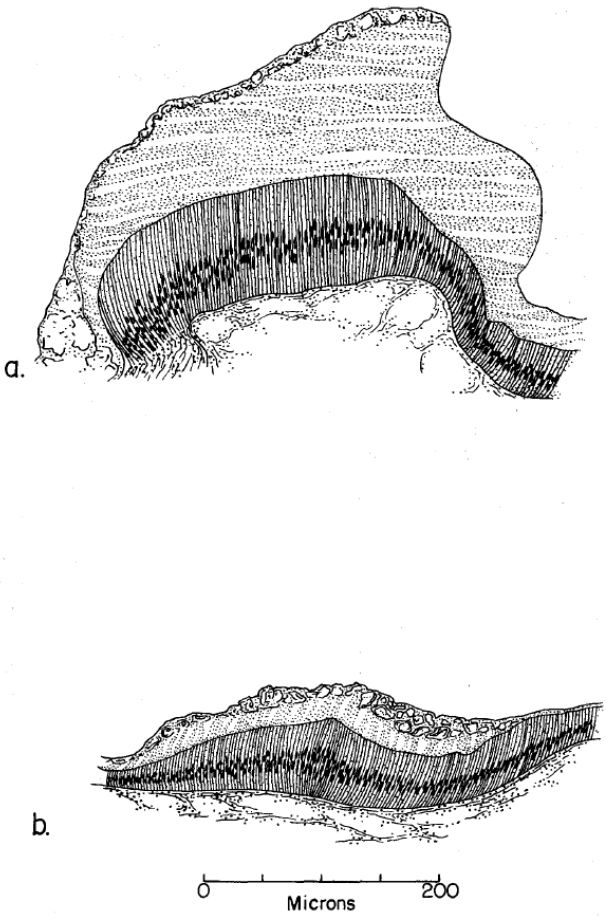
a = กระเพาะอาหารส่วนต้น (anterior chamber) a.ap. = ไส้ติ่งที่ม้วนด้านหน้า (anterior appendix) b = กระเพาะอาหารส่วนท้าย (posterior chamber) c = ซีคัม (caecum) cr.s = ถุงคริสตัลลีนสไตล์ (crystallinestyle sac) d = ท่อรวม (group of ducts of the digestive gland) m.g = ลำไส้ส่วนกลาง (midgut) oe = หลอดอาหาร (esophagus) p.ap = ไส้ติ่งที่ม้วนด้านหลัง (posterior appendix) (ที่มา: Galtsoff, 1964)

ซิเลีย (cilia) ที่อยู่บนเยื่อบุผิวในหลอดอาหารจะพัดอนุภาคของอาหารไปยังซีคัม (caecum, c) ซึ่งเป็นบริเวณที่อาหารจะถูกแยกไปตามขนาด อนุภาคอาหารที่มีขนาดใหญ่จะถูกส่งเข้าไปที่ลำไส้ส่วนกลาง (midgut, m.g.) ขณะที่อนุภาคขนาดเล็กจะถูกส่งไปที่แกสตริกชีลด์ (gastric shield) และส่งไปตามท่อของต่อมน้ำย่อย (digestive diverticula) บริเวณเนื้อเยื่อพื้นผิวของกระเพาะอาหารด้านในส่วนมากจะถูกปกคลุมไปด้วยซิเลีย (cilia) แต่บริเวณที่อยู่ภายใต้แกสตริกชีลด์ ใกล้กับปลายกระเพาะห้องส่วนท้าย (posterior chamber, b) จะไม่พบซิเลีย (cilia) ภายในกระเพาะอาหารมีเซลล์เมือก (mucous cells) เป็นจำนวนมากโดยเฉพาะตรงบริเวณใกล้ ๆ ทางแยกระหว่างกระเพาะอาหารกับลำไส้ส่วนกลาง (midgut, m.g.) ไม่มีการพัฒนาเป็นชั้นกล้ามเนื้อภายใต้เนื้อเยื่อบุผิว (epithelium) แต่มีเส้นใยกล้ามเนื้อเรียบพบในชั้นฐานเซลล์ (basement membrane)



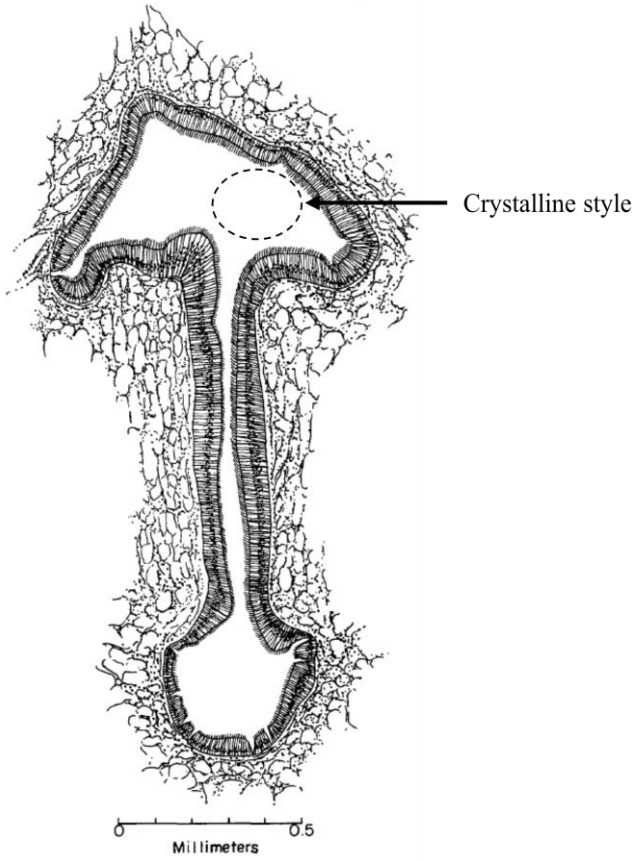
ภาพที่ 2-5 แกสตริกชีลด์ (gastric shield) ในกระเพาะอาหาร (stomach) ของหอยนางรม *Crassostrea virginica* เส้นประ คือ ตำแหน่งของคริสทัลลีนสไตล์ (crystalline style) (ที่มา: Galtsoff, 1964)

4. แกสตริกชีลด์ (gastric shield) ภายในผนังกระเพาะอาหารในส่วนที่เปิดออกสู่ลำไส้ส่วนกลาง (midgut, m.g.) และถุงสไตล์ (style sac) จะถูกปกคลุมด้วยเยื่อบาง ๆ โปร่งแสงที่เรียกว่า แกสตริกชีลด์ (gastric shield) ซึ่งตั้งอยู่บนเนื้อเยื่อบุผิวชนิดเซลล์รูปแท่งทรงสูง (columnar epithelium) (ภาพที่ 2-6) ส่วนที่หนาที่สุดของแกสตริกชีลด์ จะอยู่บนสันที่สูงที่สุด ผิวของแกสตริกชีลด์ จะขรุขระเนื่องมาจากการสะสมของเศษอาหารที่ฝังตัวอยู่ในนั้น ซึ่งโครงสร้างของแกสตริกชีลด์ เป็นแผ่นไคทินทำหน้าที่เป็นฐานป้องกันส่วนของทางเดินอาหารที่เสียดสีกับคริสทัลลีนสไตล์ในขณะที่เกิดการบดอาหาร นอกจากนั้นยังช่วยยึดส่วนหัวของคริสทัลลีนสไตล์ไว้ ให้หมุนเพื่อบดอาหาร (สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ, 2538)



ภาพที่ 2-6 ตัดตามขวางผนังกระเพาะอาหารหอยนางรม *Crassostrea virginica* ที่อยู่ภายใต้แกสตริกชีลด์ (gastric shield) a = ตำแหน่งที่หนาที่สุดของแกสตริกชีลด์ b = ตัดตามขวางตำแหน่งที่อยู่ใกล้เส้นรอบวงของแกสตริกชีลด์ ผิวของแกสตริกชีลด์ขรุขระเนื่องมาจากการฝังตัว (embossed) และอนุภาคของเศษอาหาร สามารถมองเห็นได้ใน b (ที่มา: Galtsoff, 1964)

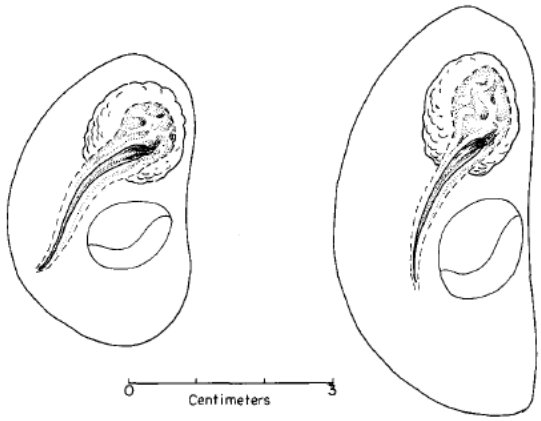
5. ถุงสไตล์ (style sac) และคริสทัลลีนสไตล์ (crystalline style) ผนังด้านหลังกระเพาะอาหารจะมีการเจริญยืดออกไปเป็นถุงตามยาวทางด้านล่าง (ventral) ของก้อนอวัยวะภายใน (visceral mass) และกล้ามเนื้อยึดเปลือก (adductor muscle)(ภาพที่ 2-3) ใกล้ ๆ กับทางเข้ากระเพาะอาหาร ถุงสไตล์ (style sac) จะถูกแยกออกจากลำไส้ส่วนกลาง โดยมีช่องแคบ ๆ (narrow slit) เป็นจุดเชื่อมต่อ เมื่อตัดเนื้อเยื่อตามขวาง (cross section) (ภาพที่ 2-7) โครงสร้างของถุงสไตล์จะบิดหมุนรอบลำไส้ส่วนกลางขึ้นไปอยู่ด้านบน (dorsal) (ภาพที่ 2-4)



ภาพที่ 2-7 ตัดตามขวางของถุงสไตล์ (style sac) คือ ส่วนบน และลำไส้ส่วนกลาง (midgut) คือ ส่วนล่าง และไม่พบคริสตัลลีนสไตล์ (crystalline style) ในหอยนางรม *Crassostrea virginica* (ที่มา: Galtsoff, 1964)

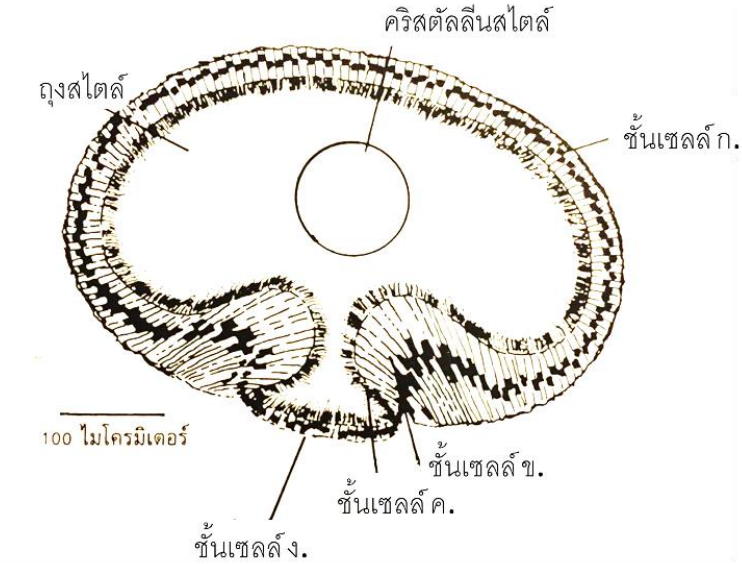
ถุงสไตล์ (style sac) จะมีขนาดใหญ่กว่าลำไส้ส่วนกลางซึ่งคล้ายกับในหอย *O. chilensis*, *O. edulisEnsis*, *Mytilus edulis*, *M. latus*, *M. magellanicus* และ *Anodonta* (Galtsoff, 1964) โครงสร้างภายในเซลล์ของถุงสไตล์ (style sac) เป็นเซลล์รูปทรงกระบอกที่เรียงตัวกันอย่างอัดแน่น มีนิวเคลียสเป็นรูปไข่ และซิเลียยาวมากวัดได้ประมาณ 20 μm เส้นใยเนื้อเยื่อประสาน (fibrillar apparatus) ภายในเซลล์ พัฒนาดีมาก เนื้อเยื่อฐาน (basal membrane) ตั้งอยู่บนเนื้อเยื่อบาง ๆ ที่เป็นเส้นใยคอลลาเจน (collagenous fibers) ในกระเพาะอาหารกล้ามเนื้อวงจะเบาบาง (circular muscle) และไม่มีชั้นที่แตกต่างกันของกล้ามเนื้อ เซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cells) ของทั้งถุงสไตล์และลำไส้ส่วนกลางมีขนาดและขนซิเลียสั้นกว่าภายในช่องแคบ ๆ (narrow slit) และสำหรับเซลล์สร้างเมือก (mucous cells) มีอยู่ในลำไส้ส่วนกลางมากกว่าในถุงสไตล์

เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ที่พันรอบถุงสไตล์ และลำไส้ส่วนกลาง (typhlosole) ประกอบด้วย vesicular cells อาหารที่หอยนางรมกินจะเข้ามาภายในลูเมน (lumen) ของถุงสไตล์ (style sac) ซึ่งจะพบแท่งเจลาตินอยู่ภายในนั้น ภายในกระเพาะอาหาร (ภาพที่ 2-8) มีหางแหลมยื่นออกไปยังส่วนปลายของถุงสไตล์ สีของรูปแบบแตกต่างกันไปจากสีขาวอมเทาเป็นสีเหลืองและสีน้ำตาลเข้มขึ้นอยู่กับชนิดอาหารที่หอยนางรมกินเข้าไป หัวของสไตล์ (style) มักจะเข้มกว่าส่วนอื่นเนื่องจากมีอาหารล้อมรอบ



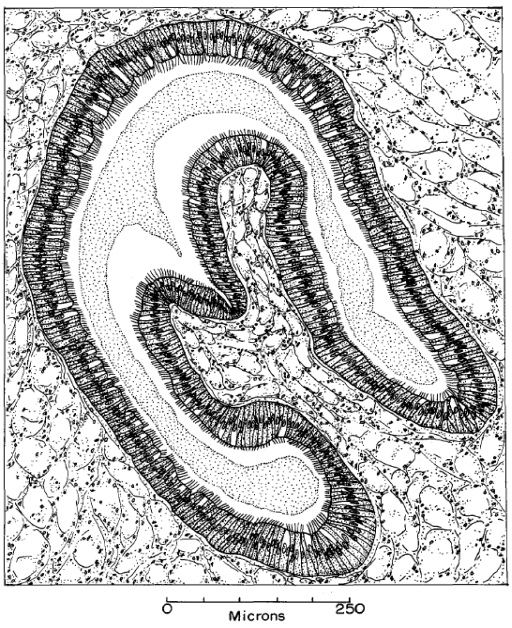
ภาพที่ 2-8 คริสตัลลีนสไตล์ (crystalline style) ของ *Crassostrea virginica* (ด้านซ้าย) และ *C. gigas* (ด้านขวา) เมื่อทำการผ่าผนังกระเพาะอาหารและถุงคริสตัลลีนสไตล์ (ที่มา: Galtsoff, 1964)

ภายในถุงสไตล์ (style sac) มีการเคลื่อนไหวแบบหมุนโดยเนื้อเยื่อบุผิว (epithelium) ซิเลียขนาดใหญ่ที่อยู่ในร่องของถุงสไตล์ของหอยแมลงภู่ *O. edulis* จะมีการเคลื่อนที่หมุนตามเข็มนาฬิกาอย่างช้า ๆ ตามแท่งสไตล์ (style) และซิเลียจะผลักดันอนุภาคอาหารลงไปยังลำไส้ส่วนกลาง ในขณะที่แท่งสไตล์หมุนเสียดสีกับแกสตริกชีลด์ (gastric shield) เพื่อบดอาหาร ก็จะมีการหลั่งเอนไซม์ย่อยอาหาร (digestive enzyme) ออกมาเพื่อผสมละลายอนุภาคอาหารให้มีขนาดเล็กลง (Galtsoff, 1964) ถุงสไตล์ (style sac) ประกอบด้วยเซลล์หลายชนิดต่าง ๆ กัน (ภาพที่ 2-9) ได้แก่ ชั้นเซลล์ (ก) เป็นชั้นเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวที่ทำหน้าที่ในการหมุนแท่งสไตล์ แต่ไม่มีหน้าที่ในการหลั่งสาร ชั้นเซลล์ (ข) เป็นชั้นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการหลั่งเอนไซม์ และในขณะเดียวกันก็มีหน้าที่ในการหมุนแท่งสไตล์ด้วย ชั้นเซลล์ (ค) มีเซลล์ที่มีซิเลียแข็ง ๆ ช่วยพัดพาสารเมือกที่หลั่งออก มาจากชั้นเซลล์ (ง) ซึ่งมีหน้าที่ในการผลิตสารเมือก สไตล์ประกอบด้วยสารโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต (สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ, 2538)



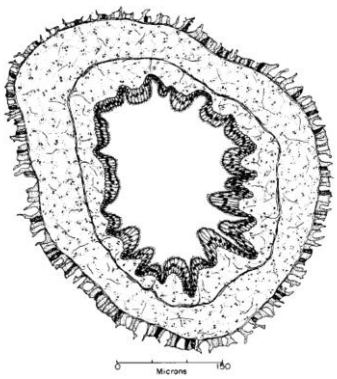
ภาพที่ 2-9 ถุงสไตล์ซึ่งภายในประกอบด้วยคริสทัลลีนสไตล์ และเซลล์ในชั้นต่าง ๆ (ก, ข, ค, และง) ในหอย *Polymesoda erosa* เมื่อตัดตามขวาง (ที่มา: สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ, 2538)

6. ลำไส้ส่วนกลาง (midgut) อยู่ระหว่างกระเพาะอาหารและเรคตัมซึ่งเริ่มต้นจากผนังด้านล่าง (ventral wall) เชื่อมกับทางเปิดของถุงคริสตัลลีนสไตล์ (crystalline sac) และขนานไปกับถุงคริสตัลลีนสไตล์ไปจนสุดปลายถุงแล้วหันย้อนกลับขนานไปตามทางเดิม (ภาพที่ 2-3) วนเป็นวงกลมล้อมรอบกระเพาะอาหาร และวนลงไปด้านล่างตรงปลายเชื่อมต่อกับเรคตัม (rectum) และทวารหนัก (anus) ตลอดทั้งความยาวของลำไส้ส่วนกลาง ผนังด้านในประกอบด้วยถุงไทโฟโซล (typhlosole) ที่พัฒนาการดี บุผนังด้านใน (ภาพที่ 2-10) เนื้อเยื่อบุผิวประกอบไปด้วยเซลล์รูปแท่งทรงสูงแบบมีซิเลีย (ciliated columnar epithelium) ซึ่งมีเซลล์สร้างเมือก (mucous cells) และเซลล์เม็ดเลือดขาว (leucocytes) เป็นจำนวนมาก ไม่พบชั้นของกล้ามเนื้อ

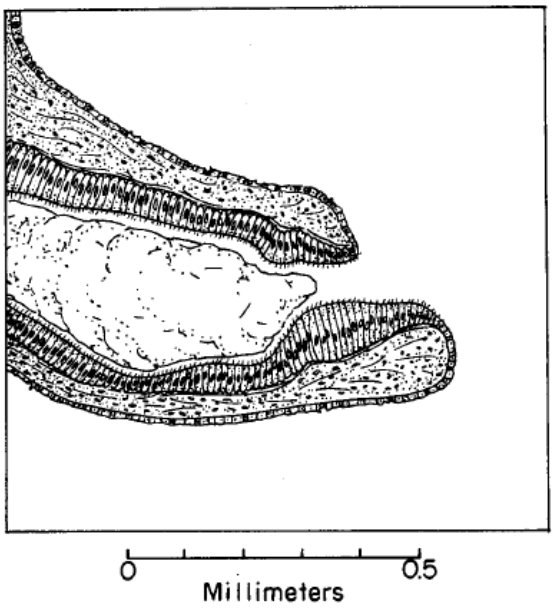


ภาพที่ 2-10 ตัดตามขวางลำไส้ส่วนกลาง (midgut) ของหอยนางรม *Crassostrea virginica* (ที่มา: Galtsoff, 1964)

7. เรคตัม (rectum) (ภาพที่ 2-3) มักจะโค้งลงมาทางด้านหลัง (dorsal) ของหัวใจ โครงสร้างของเรคตัมจะคล้ายกับลำไส้ส่วนกลาง แตกต่างกันที่พัฒนาการของไทโฟโซล (typhlosole) จะมีความใกล้เคียงกับทวารหนัก (anus) มากกว่า (ภาพที่ 2-11) โครงสร้างของเรคตัมเป็นชั้นวงกลมของกล้ามเนื้อเรียบ ไม่ใช่กล้ามเนื้อหูรูดแบบในทวารหนัก (ภาพที่ 2-12)

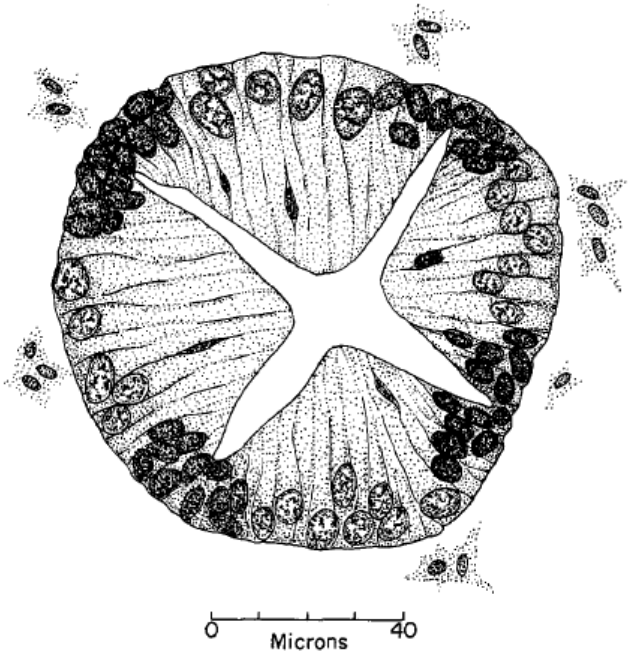


ภาพที่ 2-11 ตัดตามขวางเรคตัม (rectum) ที่อยู่ใกล้กับทวารหนัก (anus) ของหอยนางรม *Crassostrea virginica* (ที่มา: Galtsoff, 1964)



ภาพที่ 2-12 ตัดตามขวางทวารหนัก (anus) เมื่อผ่าตามยาว ซึ่งอยู่ติดกับเรคตัม (rectum) ไม่พบหูรูด (sphincter) (ที่มา: Galtsoff, 1964)

8. ต่อมย่อยอาหาร (digestive diverticula) ต่อมย่อยอาหารเป็นท่อปลายปิด มีรูปร่างไม่แน่นอน (irregular shape) มีตำแหน่งล้อมรอบกระเพาะอาหารซึ่งทำหน้าที่เทียบได้กับตับ (liver) หรือ hepatopancrease ซึ่งมีสีเหลือง น้ำตาลเขียว และดำ แตกต่างกันไป เหตุที่เรียกชื่อว่า ต่อมย่อยอาหาร (digestive diverticula) เนื่องจากการศึกษาในหอยสองฝา พบการดูดซึมและการย่อยอาหารภายในเซลล์ของโครงสร้างนี้ดังนั้นจึงถูกเรียกชื่อว่า ต่อมย่อยอาหาร (digestive diverticula) ซึ่งประกอบด้วยท่อขนาดเล็กปลายปิด โดยจะเชื่อมรวมกันเป็นท่อขนาดใหญ่และเปิดเข้าสู่กระเพาะอาหาร โครงสร้างของท่อเป็นแบบง่าย ๆ กลางท่อเป็นช่องว่าง (lumen) ท่อถูกล้อมรอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) แต่ไม่พบมัดกล้ามเนื้อ (ภาพที่ 2-13) เซลล์ย่อยอาหาร (digestive cells) ซึ่งอยู่ภายในท่อ จะพบแวคิวโอลจำนวนมาก และมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ที่ฐานของเซลล์ เซลล์ที่พบในท่อประกอบด้วย 2 แบบ คือ เซลล์ที่มีความสูงมาก นิวเคลียสติดสีจาง และเซลล์ที่มีขนาดสั้น นิวเคลียสติดสีเข้ม ซึ่งเป็นเซลล์ที่กำลังเจริญ และมีการแบ่งตัวเพื่อทดแทนเซลล์ที่มีขนาดยาว เซลล์ย่อยอาหาร ในหอยนางรม (American oyster) ไม่พบซิเลีย (cilia) แต่พบเซลล์ฟาโกไซต์จำนวนมาก (phagocytes) ล้อมรอบท่อของต่อมย่อยอาหาร (Galtsoff, 1964)



ภาพที่ 2-13 ตัดตามขวางต่อมย่อยอาหาร (digestive diverticula) ของหอยนางรม *Crassostrea virginica* (ที่มา: Galtsoff, 1964)

2.2 การศึกษาเซลล์และเนื้อเยื่อในระบบทางเดินอาหารของหอยสองฝา

เนื่องจากข้อมูลมิญชวิทยาของหอยนางรมมีอยู่จำกัด พบรายงานลักษณะทางเดินอาหารของ Galtsolf (1964) ซึ่งแสดงโครงสร้างโดยใช้ภาพวาด แต่ไม่พบข้อมูลมิญชวิทยา และรายละเอียดของเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นผู้วิจัยจึงขอยกตัวอย่างการศึกษาเซลล์ในหอยสองฝาชนิดอื่น คือ หอยแมลงภู่ (*Villosa nebulosa*)

Mcelwain and Bullard (2014) ศึกษาระบบทางเดินอาหารของหอยแมลงภู่ (*Villosa nebulosa*) พบว่าบริเวณหลอดอาหาร (esophagus) ซึ่งตั้งอยู่ทางด้านหลังต่อจากร่องปาก เป็นท่อสั้น ๆ เชื่อมต่อระหว่างร่องปาก (oral groove) กับกระเพาะอาหาร (stomach) และต่อมย่อยอาหาร (digestive gland) ตำแน่งที่ตั้งอยู่ของหลอดอาหาร อยู่ระหว่างแมนเทิล (mantle) และต่อมย่อยอาหาร (digestive diverticulum) พบซิเลียทั้งด้านบน (dorsal) และล่าง (ventral) ที่ผนังภายในท่อของหลอดอาหาร เนื้อเยื่อชั้น epithelium ประกอบด้วยเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นแบบเซลล์ที่มีซิเลียเรียงกันหลายชั้นเทียม (pseudostratified ciliated epithelium) มีนิวเคลียส และไซโทพลาซึมรูปไข่ ติดสีย้อมอีโอซิน ซิเลียที่อยู่บริเวณของหลอดอาหารมีขนาดสั้น และตรงบริเวณลูเมน (lumen) บรรจุเมือกและสารอาหารที่กินเข้าไปซึ่งย้อมติดสีอีโอซิน นอกจากนี้ภายใต้เนื้อเยื่อ epithelium พบเส้นใยที่ติดสีชมพูและแดงของอีโอซิน คือ ชั้น lamina propria

ต่อมย่อยอาหาร (digestive diverticula) คือ ส่วนของหลอดอาหารที่ขยายออกเป็นห้องทางด้านข้างเข้าไปในบริเวณอวัยวะภายใน (visceral mass) จุดเชื่อมต่อระหว่างหลอดอาหาร และกระเพาะอาหาร (esophageal-stomach junction) จะมี Typhlosole อยู่บริเวณพื้นผิวด้านท้อง (ventral) ของหลอดอาหาร มี plicae ซึ่งลักษณะคล้ายเซลล์เยื่อบุผิว (ciliated columnar epithelium) ที่พบในผนังกระเพาะอาหาร อยู่บริเวณช่วงรอยต่อ esophageal stomach junction ซึ่งมีเซลล์เยื่อบุผิวขนาดค่อนข้างใหญ่ อาหารที่มีอนุภาคขนาดเล็กจะถูกซิเลียพัดโบกเข้ามาในท่อซึ่งตั้งอยู่ทางด้านซ้ายและด้านขวาของลำตัว มีท่อที่มีลักษณะแตกต่างกัน 3 แบบ อยู่ภายในต่อมย่อยอาหาร (digestive diverticula) ท่อชนิดแรก (primary tubules) เป็นเซลล์รูปแท่งทรงสูงมีซิเลีย (ciliated columnar epithelium) ผนังท่อเป็นมีลักษณะเป็นคลื่นหยัก ท่อชนิดที่สอง (secondary tubules) พบซิเลียที่อยู่บนเยื่อบุผิวเปลี่ยนไปเป็นไมโครวิลลา (microvilla) ท่อชนิดที่สองนี้เชื่อมต่อกับท่อชนิดที่สาม (tertiary tubules) ซึ่งท่อชนิดที่สามนี้กระจายอยู่ทั่วไปในต่อมย่อยอาหาร (digestive diverticula) มากที่สุด โดยในท่อชนิดที่สองนี้มีไมโครวิลไลย้อมติดสีแดง ไซโทพลาซึมในเยื่อบุผิวมีลักษณะเป็นถุงใส พบนิวเคลียสย้อมติดสีน้ำเงิน และท่อชนิดที่สาม (tertiary tubules) นี้พบเซลล์ 2 ชนิด ชนิดแรก คือ เซลล์ที่มีลักษณะเป็นถุง (vesiculated cell) มีนิวเคลียสอยู่ภายในย้อมติดสีน้ำเงิน และเซลล์ชนิดที่สอง คือ เซลล์ที่มีลักษณะเป็นรูปร่างสามเหลี่ยม (triangular cell) ซึ่งนิวเคลียสและไซโทพลาซึมย้อมติดสีเข้มมากจนถึงดำ

กระเพาะอาหาร (stomach) เป็นถุงขนาดใหญ่ตั้งอยู่ระหว่างต่อมย่อยอาหาร (digestive diverticula) และถุงสไตล์ (style sac) ผนังกระเพาะอาหารด้านท้อง (ventral) มีสารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (matrix) ที่อยู่ในช่องว่าง (lumen) เป็นเจลาติน (gelatin) แผ่นบาง ๆ ปกคลุมเนื้อเยื่อบุผิวที่ประกอบด้วยเซลล์รูปแท่ง (columnar epithelium) เรียกว่า คิวติเคิล (cuticle) ซึ่งภายในลูเมน (lumen) ของกระเพาะอาหารจะบรรจุมวลของอาหาร (chyme) ภายใน chyme ประกอบด้วย เม็ดแกรนูล (granule) กลม ๆ ติดสีเข้ม ซึ่งติดสีย้อมอีโอซินมากกว่าบริเวณคิวติเคิล บริเวณคิวติเคิลเป็นแผ่นแกสตริกชิลด์ (gastric shield) ทำหน้าที่เคลือบภายในกระเพาะทั้งหมด ยกเว้นบริเวณตรงกลางของผนังกระเพาะด้านท้อง (ventral) พบรอยพับเป็นจีบมีลักษณะนูน (plicae) ซึ่งบริเวณนี้ไม่พบคิวติเคิล นอกจากนี้ ยังพบว่า plicae ที่พบด้านบน (dorsal) ของกระเพาะอาหารมีรูปร่างสูง และแคบกว่า plicae ที่พบในด้านท้อง (ventral) เซลล์ที่หลั่งเอนไซม์ย่อยอาหารภายในกระเพาะที่พบบริเวณผนังกระเพาะอาหารด้านบน (dorsal gastric wall) พบถุง (vesicle) บรรจุเอนไซม์ที่จะหลั่งออกมาภายในลูเมน บางบริเวณมีผนังที่เลื่อน (sinistral wall) เข้ามาภายในลูเมน ลักษณะโครงสร้างเป็นถุงสี่เหลี่ยมขยายขนาด มีลักษณะคด เรียกว่า typhlosole

ถุงคริสตัลลีนสไตล์ (crystalline style sac) มีรูปร่างของถุงเป็นทรงกระบอกทอดยาวเข้า

ไปข้างในกระเพาะอาหารไปจนสุดขอบเขตของอวัยวะภายในลักษณะของถุงสไตล์ (style sac) จะไม่มีสี แต่แท่งสไตล์ (style rod) จะติดสีย้อมอีโอซิน ซึ่งอยู่ภายในถุงสไตล์บริเวณด้านข้าง ถุงสไตล์อาจแนบชิดติดกับบริเวณซิเลียที่อยู่ทางผนังด้านท้อง (ventral) และมีเซลล์เยื่อบุผิว (epithelium) ที่แตกต่างกัน 3 ชนิดตลอดทั่วทั้งถุงสไตล์ ถุงคริสตัลลีนสไตล์มีชั้นลามินาโพรเพรีย (lamina propria) เป็นชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีความหนา ภายใต้เนื้อเยื่อบุผิวที่พับขึ้นมา (epithelial folds) ของถุงสไตล์ (style sac) จะพบเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีขนาดบาง (thin connective tissue) เยื่อบุผิวภายในถุงสไตล์ชนิดแรกเป็นแบบ เซลล์รูปแท่งทรงสูงมีซิเลีย (ciliated columnar epithelium) ไซโทพลาซึมติดสีแดงโดดเด่น ภายในนิวเคลียสเห็นนิวคลีโอลัสชัดเจน ซิเลียของชนิดที่ 1 นี้จะมีลักษณะตรงและค่อนข้างหนากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับซิเลียชนิดที่ 2 ถัดมาทางด้านซ้ายจะพบเยื่อบุผิวชนิดที่ 2 ซึ่งเป็นแบบธรรมดาทั่วไป มีลักษณะคล้ายส้อมบริเวณปลายถุง ไซโทพลาซึมติดสีน้ำเงินเข้ม (basophilic cytoplasm)และซิเลียมีความยืดหยุ่นกว่าเยื่อบุผิวชนิดที่ 1 ตรงบริเวณปลายส้อมพบเซลล์สร้างเมือก (goblet cell) กระจายตัวอยู่ภายในเยื่อบุผิว (ciliated columnarepithelium) บริเวณด้านบน (dorsal) ของถุงสไตล์จะพบเยื่อบุผิวชนิดที่ 3 ซึ่งเซลล์บีบตัวอยู่กันอย่างหนาแน่นมีซิเลียบาง ๆ มีความยืดหยุ่นเหมือนกันกับเยื่อบุผิวชนิดที่ 2

ลำไส้ (intestine) จะโค้งขึ้นไปด้านบน (dorsal) และทอดยาวไปจนสุดด้านหลัง (posterior) ของอวัยวะภายใน

ลำไส้ส่วนต้น (first intestinal limb) มีลักษณะเหมือนเซลล์ที่พบในถุงคริสตัลลีนสไตล์ (crystalline style sac) แต่ลักษณะของ plicae ที่เซลล์เยื่อบุผิวจะมีขนาดใหญ่กว่า และยื่นเข้าไปในลูเมน ลำไส้ส่วนปลาย (descending intestine) จะบรรจุแร่ธาตุ อาหาร (chyme) ซึ่งย้อมติดสีอีโอซิน ภายใน plicae พบการแตกตัวของอาหาร (chyme) ในส่วนของลำไส้ส่วนที่สองและส่วนที่สาม (second and third intestinal limbs) เมื่อตัดตามขวางจะพบว่าตำแหน่งของลำไส้ที่อยู่ทางด้านท้อง (ventral) อยู่ใกล้ชิดกับถุงคริสตัลลีนสไตล์ (crystalline style sac) การวิเคราะห์ขนาดของ plicae โดยวิธีมิญชวิทยาทำให้สามารถแยกส่วนของลำไส้ส่วนที่สองและส่วนที่สามได้ ในการตัดตามยาว

ลำไส้ส่วนที่สองและสาม (second and third intestinal limbs) จะทอดยาวไปด้านหลัง (posterior) จนสุดขอบของอวัยวะภายใน อยู่ต่ำลงมาถัดจากลำไส้ส่วนต้น จะพบ plicae เป็นรูปตัววาย (Y-shaped) บนเยื่อบุผิวแบบเซลล์รูปแท่งทรงสูงมีซิเลีย (ciliated columnar epithelium) แบบแคบ ๆ เห็นนิวคลีโอลัสภายในนิวเคลียส และมีเม็ดเลือด (hemocytes) อยู่ภายในเยื่อบุผิวย้อมติดสีอีโอซิน อยู่ในถุง และผนังเซลล์เยื่อบุผิวที่มีลักษณะเป็นที่ราบสูง วิลไล (villi) ถูกแทนที่ด้วย epithelium เตี้ย ๆ ที่ขยายขนาดออก (plateau-shaped) มีความยาวตั้งแต่ส่วนหน้า (anterior) ไปจนถึง

ส่วนหลัง (posterior) ถูกพบว่ามีการสร้างถุง (vesicle) ปล่อยออกมาในลูเมน ตรงใจกลางของลูเมนมีมวลขนาดใหญ่ถูกล้อมรอบไปด้วยถุงทำให้มองเห็นเป็นรูปร่างแบบพระจันทร์เสี้ยว (crescent-shaped bubbles) อย่างไรก็ตามเยื่อบุผิวส่วนใหญ่ในลำไส้ส่วนที่สองและสามยังคงเป็นแบบเซลล์รูปแท่งทรงสูงมีซิเลีย (ciliated columnar epithelium)

ลำไส้ส่วนที่สี่ (forth intestinal limb) ตั้งอยู่ตรงกลาง ด้านท้อง (ventral) มี typhlosole เป็นหลัก ความสูงของแต่ละพับ ความยาว และความกว้างของห้องที่อยู่ใต้รอยพับจะเพิ่มขึ้นได้มาจากฐานของ typhlosole จนถึงด้านท้อง (ventral) เนื้อเยื่อบุผิวที่ล้อมรอบลูเมนของ typhlosole เป็นแบบเซลล์รูปแท่งทรงสูงมีซิเลีย (ciliated columnar epithelium) เซลล์เยื่อบุผิวด้านบน (dorsal) และด้านท้อง (ventral) มีลักษณะคล้ายกัน แต่ด้านท้องจะพบแกรนูล (granulocytes) ติดสีแดงเข้ม มีลักษณะเป็นรูปหยดน้ำ พบบริเวณส่วนปลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่ภายใต้ typhlosole คือ lamina propria ล้อมรอบผนังด้านข้าง (lateral) และด้านท้อง (ventral) ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะพบแอ่งเลือด (hemolymph sinuses) ตลอดทั่วทั้งเนื้อเยื่อ

ลำไส้ส่วนที่ห้า (fifth intestinal limb) อยู่บริเวณตรงข้ามกับลำไส้ส่วนที่สี่ ลักษณะทางสัณฐานของลำไส้ส่วนที่ห้าจะเป็นวงกลม มีทางเปิดคล้ายบานพับรูปร่างแบน อยู่ใกล้กับบริเวณกล้ามเนื้อด้านหลัง (posterior adductor) ส่วนลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะพบรอยพับทั้งด้านบน (dorsal) และด้านข้าง (lateral) แต่ด้านบน (dorsal) ของลำไส้ส่วนที่ห้ามีรอยพับมากกว่าลำไส้ส่วนที่สี่ และบริเวณด้านท้องของลำไส้ส่วนที่ห้า มี typhlosole เหมือนในลำไส้ส่วนที่สี่ นิวเคลียสที่อยู่ภายในเยื่อบุผิวเซลล์มีชั้นเดียว (single layer) ทั้งผนังด้านบนและด้านล่าง แต่สิ่งที่ต่างจากลำไส้ส่วนที่สี่ คือไม่พบ granulocytes ในผนังเซลล์ของลำไส้ส่วนที่ห้า lamina propria ของลำไส้ส่วนที่ห้าประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และมี fibroblast เหมือนในลำไส้ส่วนที่สี่ แต่บริเวณ lamina propria ที่ล้อมรอบเนื้อเยื่อบุผิวทั้งบริเวณด้านบน และด้านข้างจะสูงกว่าลำไส้ส่วนที่สี่

Gosling (2014) ศึกษาระบบย่อยอาหารในหอยนางรม (*Crassostrea virginica*) พบเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวบริเวณปากประกอบด้วยซิเลียเชื่อมต่อกับหลอดอาหารซึ่งมีลักษณะเป็นช่องแคบ ๆ พบซิเลียตลอดแนวยาวของเซลล์เนื้อเยื่อบุผิว ซิเลียจะช่วยพัดให้อนุภาคอาหารเคลื่อนที่ไปยังกระเพาะอาหาร ซึ่งจะพบซิเลียตลอดตามแนวยาวของทางเดินอาหาร เนื่องจากอวัยวะในระบบทางเดินอาหารไม่มีผนังชั้นกล้ามเนื้อ (muscular wall) ส่วนกระเพาะอาหารมีขนาดใหญ่ รูปร่างเป็นรูปไข่ ถูกล้อมรอบด้วยต่อมย่อยอาหาร (digestive diverticula) ซึ่งกระเพาะอาหารจะมีท่อเปิดเชื่อมต่อกับต่อมย่อยอาหารบริเวณด้านหลังกระพาะอาหารมีแท่งเจลาตินมีลักษณะเป็นสารกึ่งแข็งโปร่งใส เรียกว่า แท่งคริสทัลลีนสไตล์ (crystalline style) ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ในถุงสไตล์ ซึ่งถุงสไตล์มีตำแหน่งตั้งอยู่ทางด้านหลังของกระเพาะอาหาร แท่งคริสทัลลีนสไตล์ยื่นข้ามาในกระเพาะอาหาร

หมุนบดอาหารต้านกับแผ่นแกสตริกชีลด์ (gastric shield) ซึ่งเซลล์เยื่อบุผิวของกระเพาะอาหารในบริเวณนี้จะหนา แท่งคริสทัลลีนสไตล์บริเวณในกระเพาะอาหารจะหมุนบดอาหารต้านกับแผ่นแกสตริกชีลด์ (gastric shield) การย่อยบริเวณนี้เป็นการย่อยภายนอกเซลล์ (extracellular digestion) ส่วนในถุงสไตล์จะมีการสร้างเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรตออกมาย่อยอนุภาคของอาหาร ซิเลียที่พบในร่อง (groove) ของกระเพาะอาหารทำหน้าที่คัดเลือกอนุภาคของอาหาร (sorting area) ซึ่งมีหน้าที่คล้ายกับ (labial palps) ส่วนอนุภาคอาหารขนาดเล็กที่อยู่บนสันบนสุดของเซลล์เยื่อบุผิวจะถูกซิเลียพัดเข้าสู่ท่อเปิดออกสู่ต่อมย่อยอาหาร ส่วนอนุภาคอาหารขนาดใหญ่จะตกไปในร่องของกระเพาะอาหาร เข้าสู่ถุงสไตล์ซึ่งเชื่อมต่อกับลำไส้

ปรียา วิบูลย์พันธ์ (2557) ศึกษาผลกระทบของน้ำมันดิบต่อระบบย่อยอาหารและระบบสืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) บริเวณเกาะเสม็ดโดยสุ่มเก็บตัวอย่างหอยนางรมจากบริเวณที่ได้รับการปนเปื้อนน้ำมันดิบได้แก่อ่าวพร้าวและบริเวณที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนน้ำมันดิบคืออ่าวทับทิมอ่าววงเดือนและอ่าวหวายซึ่งเป็นจุดอ้างอิงภายหลังปนเปื้อนน้ำมันดิบเป็นระยะเวลา 35 วันทำการศึกษาด้วยวิธีการทางมิญชวิทยาและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM) พบว่าเนื้อเยื่อระบบย่อยอาหารของหอยนางรมบริเวณอ่าวพร้าวได้รับผลกระทบจากน้ำมันดิบไม่รุนแรงไม่สามารถสังเกตเห็นความผิดปกติได้ทั้งในระดับเนื้อเยื่อและระดับเซลล์ เนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ทั้งในเพศเมียและเพศผู้ไม่สามารถสังเกตเห็นความผิดปกติในระดับเนื้อเยื่อได้แต่สามารถสังเกตเห็นความผิดปกติในระดับออร์แกเนลล์ในอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้โดยสังเกตเห็นความผิดปกติไมโทคอนเดรียในเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้แต่ยังพบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่เป็นปกติในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ทั้งเซลล์ไข่ในเพศเมียและเซลล์สเปิร์มในเพศผู้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

การศึกษาเนื้อเยื่อบริเวณอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารของหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* โดยเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ชายฝั่งทะเลตำบลอ่างศิลา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี โดยเทคนิคมิญชวิทยา (histological technique) มีขั้นตอน ดังนี้

3.1 การเก็บตัวอย่าง

ทำการซื้อหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ตัวเต็มวัยขนาด 5-7 เซนติเมตร จากฟาร์มเพาะเลี้ยงหอยนางรม ตำบลอ่างศิลา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี มาจำนวน 100 ตัว จากนั้นนำกลับมายังโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยบูรพา ทำความสะอาดเปลือกของหอยนางรม กำจัดเพรียงหินให้สะอาด และนำมาเลี้ยงในถังเพาะเลี้ยง ขนาด 250 ลิตร โดยเติมน้ำทะเล 200 ลิตร ความเค็ม 30 ppt แสดงในตารางที่ 3-1 ใส่หัวทรายพร้อมทั้งเป่าอากาศ ให้อาหารไดอะตอม(*Nannochloropsis* sp.) จากสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลมหาวิทยาลัยบูรพาวันละ 0.5 ลิตร โดยให้อาหารวันละ 1 ครั้งเลี้ยงปรับสภาพในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนทำการทดลอง

ตารางที่ 3-1 คุณลักษณะของน้ำทะเลที่ใช้สำหรับเลี้ยงหอยนางรมในห้องปฏิบัติการ

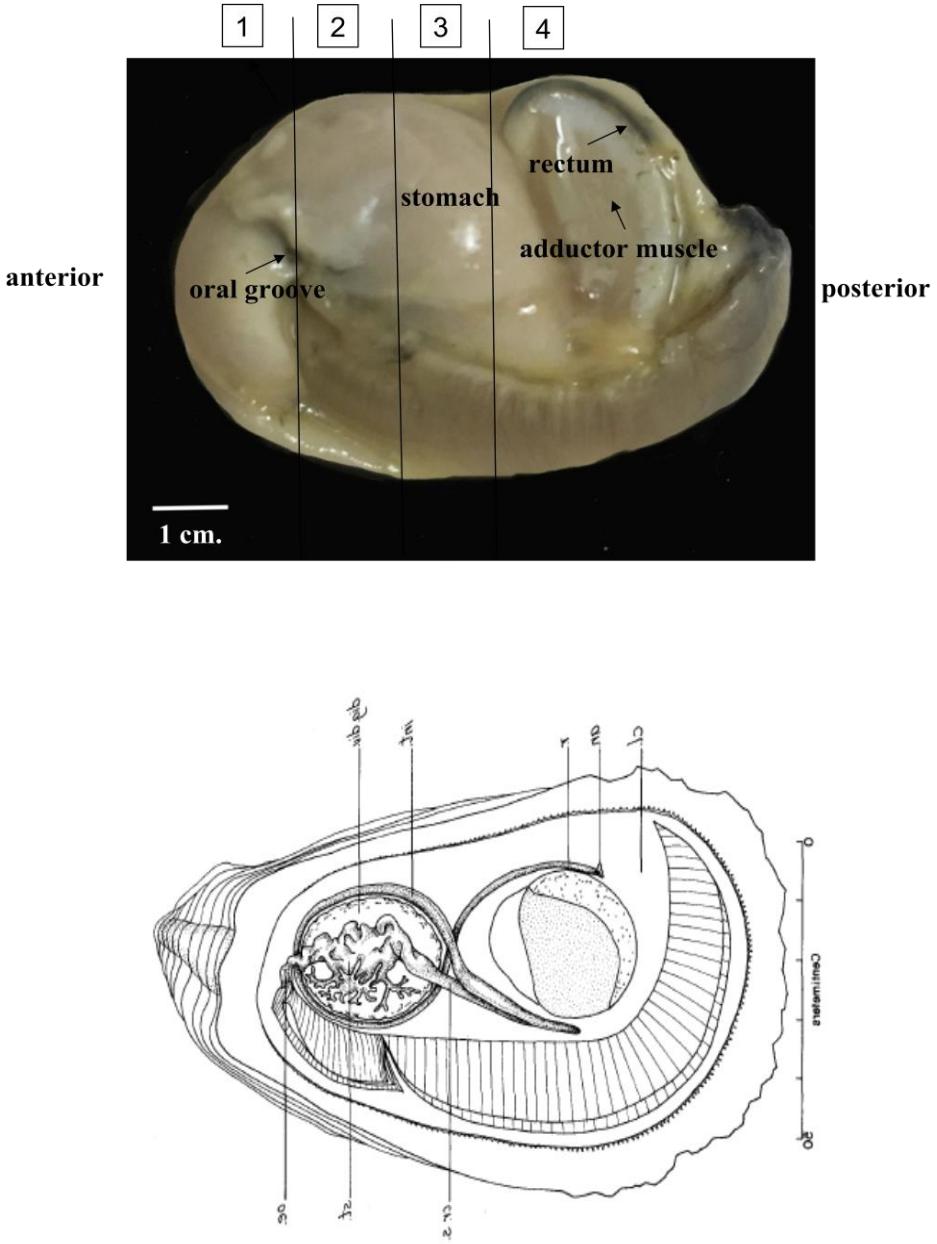
คุณลักษณะของน้ำทะเล	หน่วย
อุณหภูมิ	35 องศาเซลเซียส
ความเค็ม	30 ppt
pH	7.5-8.2
Dissolved oxygen (DO)	7.0-7.3 mg/l

3.2 ขั้นตอนการทดลอง

3.2.1 การตัดเนื้อเยื่อตัวอย่าง

นำตัวอย่างหอยนางรมมาผ่าตัดเพื่อศึกษาระบบทางเดินอาหาร โดยทำการตัด adductor muscleออกเริ่มทำการตัดชิ้นเนื้อโดยตัดตามขวาง (cross section) ตัดผ่านส่วนของระบบ

ทางเดินอาหารให้ได้ทั้งหมด 4 ส่วนส่วนที่ 1 ตัดระหว่างรอยต่อของเหงือกและแลเบียลพัลพ์ ส่วนที่ 2 3 และ 4 ตัดแบ่งให้มีขนาดเท่า ๆ กันให้ครอบคลุมพื้นที่ทางเดินอาหารทั้งหมด (ภาพที่ 3-1)



ภาพที่ 3-1 การตัดผ่านส่วนของระบบทางเดินอาหาร (ที่มา: Galtsoff, 1964)

3.2.2 การคงสภาพเนื้อเยื่อ (fixation)

เป็นกระบวนการที่ใช้ในการป้องกันเนื้อเยื่อจากการเสื่อมสภาพและยังช่วยรักษา

โครงสร้างและส่วนประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ เพื่อให้เซลล์อยู่ในสภาพที่ใกล้เคียงกับสภาพเดิมมากที่สุด

ขั้นตอนการศึกษา

นำเนื้อเยื่อไปแช่ในน้ำยาคงสภาพ สารละลาย Bouin's fluid นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียส

3.2.3 การล้าง (washing)

หลังจากคงสภาพเนื้อเยื่อแล้ว เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด ต้องนำเนื้อเยื่อมาล้างน้ำยาคงสภาพออก เรียกขั้นตอนนี้ว่าการล้าง (washing)

ขั้นตอนการศึกษา

หลังจากถูกนำไปคงสภาพเนื้อเยื่อด้วยสารละลาย Bouin's fluid แล้ว เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด ต้องนำเนื้อเยื่อมาล้างน้ำยาคงสภาพออกด้วย 70% เอทิลแอลกอฮอล์เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจนกว่าจะใส (ล้างแต่ละครั้งควรแช่น้ำกลั่นไว้ 30 นาที เพราะเป็นระยะแพร่สมดุล)

3.2.4 การขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration)

ขั้นตอนการขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อเพื่อเตรียมพร้อมให้สารที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ (embedding media) เข้าไปแทนที่น้ำในเนื้อเยื่อ สารที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อจะเป็นตัวค้ำจุนให้เนื้อเยื่อแข็งและมั่นคงขึ้น ซึ่งจะเป็นผลดีต่อการตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบาง ๆ สารที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อนี้ไม่สามารถละลายเข้ากับน้ำได้ ดังนั้นจึงต้องขจัดน้ำออกจากเซลล์ และเนื้อเยื่อให้หมดอย่างสมบูรณ์

ขั้นตอนการศึกษา

1. นำเนื้อเยื่อไปแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นจากระดับต่ำไปสูง เริ่มจากเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 80%, 90% และ 95% ขั้นตอนละหนึ่งครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ
2. นำไปแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 99.9% จำนวน 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง 30 นาที

3.2.5 การขจัดแอลกอฮอล์และทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing or dealcoholization)

การนำสารเคมีตัวใหม่เข้ามาแทนที่สารที่ใช้ขจัดน้ำ และสารเคมีตัวนี้จะเป็นตัวกลางนำสารที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อเข้าสู่ภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อ เพราะสารที่ใช้ในการฝังเนื้อเยื่อ เช่น พาราฟิน พาราพลาสต์ หรือขี้ผึ้ง (wax) ไม่สามารถละลายผสมกับแอลกอฮอล์ที่ใช้เป็นสารขจัดน้ำได้ จึงจำเป็นต้องหาสารเคมีที่เป็นตัวกลางสามารถละลายได้ดีทั้งในแอลกอฮอล์และพาราฟินมาเป็นตัวกลางเสียก่อน

ขั้นตอนการศึกษา

นำชิ้นเนื้อที่แห้งแช่ในสารละลายไดออกเซน 3 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมงโดยครั้งที่ 3 ให้แช่

สารละลายไดออกเซน ทิ้งไว้ข้ามคืน 24 ชั่วโมง

3.2.6 การแทรกซึมของพาราฟิน (infiltration) และการฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน (embedding)

การแทรกซึมของพาราฟิน (infiltration) คือ การทำให้สารที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อที่หลอมเหลวแทรกซึมเข้าไปในเซลล์และเนื้อเยื่อ ภายหลังการขจัดแอลกอฮอล์ และการทำให้เนื้อเยื่อใส วิธีการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้มีการเสริมสร้างเซลล์และองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเนื้อเยื่อให้มีความแข็งเท่าเทียมกันและสม่ำเสมอกันโดยตลอด

เมื่อเนื้อเยื่อผ่านการแทรกซึมของพาราฟินเรียบร้อยแล้ว จะมีพาราฟินแทรกอยู่ทั่วไปภายในเซลล์และเนื้อเยื่อ นำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟินที่หลอมเหลว แล้วทำให้พาราฟินรอบ ๆ เนื้อเยื่อมีอุณหภูมิลดลงจนแข็งตัว โดยมีเนื้อเยื่ออยู่ตรงกลาง วิธีนี้เรียกว่า การฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน

3.2.6.1 อุปกรณ์และสารเคมี

ตู้อบ (oven) ตู้เย็น (refrigerator) แผ่นร้อน (hot plate) กาโลหะขนาดเล็ก อ่างใส่น้ำเย็นบีกเกอร์ปากคีบพาราฟิน (paraffin) ขวดแก้วสำหรับการการแทรกซึมของพาราฟิน โมลด์เหล็ก (mold) และฉลากสำหรับเขียนปิดที่ถุง Zip lock (label) ถุง Zip lock

3.2.6.2 ขั้นตอนการศึกษา

1. นำพาราฟินใส่ในขวดแก้วสำหรับการแทรกซึมของพาราฟิน แล้วนำมาหลอมเหลวในตู้อบ โดยตั้งอุณหภูมิของตู้อบ 58 °C – 60 °C
2. แช่เนื้อเยื่อในพาราฟินที่หลอมเหลว 3 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง
3. นำพาราฟินมาหลอมเหลวในตู้อบเพื่อใช้สำหรับการฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน
4. นำโมลด์เหล็ก วางบน hot plate แล้วเทพาราฟินที่หลอมเหลวลงไปในโมลด์ประมาณ ¼ ของตัวโมลด์
5. นำปากคีบคีบเนื้อเยื่อที่แทรกซึมของพาราฟินแล้ววางลงบนโมลด์ ซึ่งต้องทำด้วยความรวดเร็ว แล้วเทพาราฟินที่หลอมเหลวลงไปในโมลด์ให้ท่วมเนื้อเยื่อ
6. ใช้ปากคีบวนไล่ฟองอากาศในโมลด์แล้วเริ่มทำให้โมลด์เย็นลงโดยนำโมลด์ไปแช่ในอ่างใส่น้ำเย็นทีละน้อย
7. พาราฟินจะเริ่มแข็งตัวจากด้านล่างของกระทงขึ้นมาเรื่อย ๆ เมื่อพาราฟินแข็งตัวทั่วโมลด์ แกะโมลด์ออกจากพาราฟินได้
8. นำบล็อกที่แกะออกจากโมลด์สำหรับตัดเนื้อเยื่อต่อไป

3.2.7 การตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบาง (sectioning) และติดเนื้อเยื่อแผ่นบางบนสไลด์ (affix)

3.2.7.1 ตัดแต่งหน้าบล็อก

3.2.7.1.1 อุปกรณ์และสารเคมี

มีดคัตเตอร์

3.2.7.1.2 ขั้นตอนการศึกษา

บล็อกที่แกะมาจากโมลด์ที่ได้จากการฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน (embedding) นั้นจะนำมาตัดแต่งหน้าบล็อกเสียก่อน การตัดแต่งจะใช้มีดโกนหรือมีดคัตเตอร์บาง ๆ ปาดพาราฟินที่ผิวหน้าของบล็อกออกจนเริ่มถึงเนื้อเยื่อ ผิวหน้าอาจจะไม่เรียบเพราะตัดแต่งด้วยมือ จากนั้นตัดด้านข้างทั้งสี่ของบล็อก โดยตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมู ต้องระวังให้คู่ขนานของสี่เหลี่ยมขนานกันจริง ๆ เวลาตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบางแต่ละแผ่นของเนื้อเยื่อจะติดกันตรงส่วนที่ขนานนี้เป็นแถบยาว (ribbon) ส่วนที่เป็นด้านเอียงของคางหมูก็เพื่อให้แถบเนื้อเยื่อแผ่นบางมีรอยหยัก จะได้ทราบขอบเขตของแต่ละเนื้อเยื่อว่าอยู่ระหว่างแต่ละรอยหยัก ถ้าไม่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมู เวลาได้แถบเนื้อเยื่อแผ่นบาง จะเป็นแผ่นยาวเสมอกันหมด

3.2.8 การตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบาง

3.2.8.1 อุปกรณ์และสารเคมี

ใบมีด (สำหรับเครื่องไมโครโตม) เครื่องไมโครโตม พู่กัน Xylene และกล่องกระดาษใส่เนื้อเยื่อ

3.2.8.2 ขั้นตอนการศึกษา

เมื่อตัดแต่งหน้าบล็อกเสร็จแล้ว นำบล็อกที่ได้ไปติดกับแท่งไม้ จากนั้นนำใบมีดมาใส่ในตัวจับมีดที่ไมโครโตมนำบล็อกมาใส่ในตัวจับบล็อก (block holder) โดยให้คู่ขนานด้านยาวเป็นด้านที่สัมผัสคมมีด เริ่มตัดเนื้อเยื่อ โดยค่อย ๆ เลื่อนมีดเข้าสัมผัสหน้าบล็อก ในขณะที่อีกมือค่อย ๆ หมุนล้อของไมโครโตมขึ้นลง จะเริ่มเห็นว่ามีดเริ่มติดหน้าบล็อกออกมาบาง ๆ แล้ว ตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นหนา ๆ ก่อนเพื่อให้หน้าบล็อกเรียบ จนกระทั่งเห็นเนื้อเยื่อทุกส่วน จากนั้นหมุนปุ่มไมครอนให้น้อยลงเหลือ 6 ไมครอน แล้วตัดด้วยความเร็วสม่ำเสมอ จะได้แถบของเนื้อเยื่อแผ่นบางติดกันเป็นแถบยาว ขณะที่ได้แถบเนื้อเยื่อแผ่นบาง มือซ้ายของผู้ตัดจะใช้พู่กันประคองแถบเนื้อเยื่อแผ่นบางไม่ให้สัมผัสกับใบมีด ในขณะที่มือขวาก็หมุนล้อไมโครโตม เมื่อได้ความยาวตามที่ต้องการแล้ว หยุดหมุนล้อไมโครโตม จากนั้นประคองแถบเนื้อเยื่อแผ่นบางด้วยพู่กัน 2 อันมาวางบนกระดาษสะอาด ใช้ใบมีดโกนบาง ๆ ตัดแผ่นเนื้อเยื่อที่หนาทิ้งไป หลังจากนั้นทำความสะอาดเนื้อเยื่อที่ไม่ต้องการด้วยไซลีน

3.2.9 การติดเนื้อเยื่อแผ่นบางบนสไลด์ (Affix)

3.2.9.1 อุปกรณ์และสารเคมี

สไลด์ที่สะอาดเจลาติน (gelatin) บีกเกอร์เครื่องอุ่นแผ่นสไลด์ (hot plate) หลอดหยด

(dropper) พู่กัน เข็มเขี่ย และใบมีดโกน

3.2.9.2 ขั้นตอนการศึกษา

1. แช่สไลด์ในเอทิลแอลกอฮอล์ เข้มข้น 70% ใส่กล่องกันฝุ่นละอองไว้เรียบร้อย
2. ชั่งเจลาติน 1 g / น้ำกลั่น 100 ml ใส่ลงในบีกเกอร์ ตั้งที่อุณหภูมิ 60 °C เพื่อละลาย 0.5% เจลาติน (gelatin)
3. การนำเนื้อเยื่อแผ่นบางที่ตัดไว้แล้วมาติดบนสไลด์ จากแถบเนื้อเยื่อแผ่นบางที่ตัดเรียงไว้ที่กระดาษ โดยใช้ใบมีดโกนตัดเนื้อเยื่อแผ่นบางแต่ละชิ้น โดยตัดตามรอยหยักของรูปสี่เหลี่ยมคางหมู
4. นำเนื้อเยื่อแผ่นบางแต่ละชิ้นมาลอยในบีกเกอร์สารละลาย 0.5% เจลาติน อุณหภูมิ 40°C นำสไลด์ลงไปช้อนเนื้อเยื่อที่ลอยอยู่ โดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จากนั้นนำสไลด์ที่ติดชิ้นเนื้อเยื่อแล้วมาวางบนเครื่องอุ่นแผ่นสไลด์นาน 24 ชั่วโมง

3.3 การย้อมสี (Staining)

หลังจากเนื้อเยื่อแผ่นบางที่ติดบนสไลด์แห้งสนิทดีแล้ว จะนำมาย้อมสีเพื่อให้เห็นความแตกต่างของเนื้อเยื่อชัดเจนขึ้น โดยใช้วิธีการย้อมสีฮีมาท็อกไซลีน (haematoxylin) และอิโอซิน (eosin)

3.3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

ภาชนะย้อมสี (staining jar) แผ่นสไลด์ (microscope slides) กระจกแผ่นสไลด์ (cover slips) ตู้ดูดไอสารเคมี (hood) เข็มเขี่ยปากคีบกระดาษทิชชูน้ำกลั่นเอทิลแอลกอฮอล์ เข้มข้น 70% เอทิลแอลกอฮอล์ เข้มข้น 80% เอทิลแอลกอฮอล์ เข้มข้น 95% เอทิลแอลกอฮอล์ เข้มข้น 99.9% ไซลีน (xylene) บิวทานอล (butanol) เปอร์เมาท์ (permount) สีฮีมาทอกไซลีน (haematoxylin) และสีอีโอซิน (eosin)

3.3.2 ขั้นตอนการย้อมสีฮีมาทอกไซลีนและอิโอซิน

3.3.2.1 การขจัดพาราฟิน (deparaffinization)

การล้างพาราฟินออกจากโครงร่างของเซลล์และเนื้อเยื่อ โดยการจุ่มในไซลีน 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

3.3.2.2 การเอาน้ำเข้าเนื้อเยื่อ (hydration)

การให้น้ำค่อย ๆ เข้าไปในเซลล์ และเนื้อเยื่อ โดยเริ่มจากแอลกอฮอล์ระดับสูงมาสู่ระดับต่ำ เริ่มจาก

1. เอทิลแอลกอฮอล์ เข้มข้น 99.9% เพื่อเป็นการล้างไซลีนออกจากเนื้อเยื่อ และมี

เอทิลแอลกอฮอล์ เข้มข้น 99.9% เข้าไปแทนที่ ใช้เวลา 5 นาที

2. เอทิลแอลกอฮอล์ เข้มข้น 95%, เอทิลแอลกอฮอล์ เข้มข้น 80% และ เอทิลแอลกอฮอล์ เข้มข้น 70% ใช้เวลาครั้งละ 5 นาที

3. น้ำกลั่น ใช้เวลา 5 นาที ในขั้นนี้จะมีน้ำเข้าไปในเซลล์และเนื้อเยื่อเต็มที่แทนแอลกอฮอล์

3.2.2.3 การย้อมสีครั้งแรกย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลีน (primary stain)

ย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลีนเป็นการย้อมนิวเคลียส ใช้เวลา 1 นาที

3.2.2.4 การล้างสีส่วนเกิน (differentiation)

ล้างในน้ำประปาที่ไหลผ่านตลอด เป็นการแยกให้เห็นความแตกต่าง ระหว่างส่วนประกอบของเนื้อเยื่อที่จับกับสีและไม่จับกับสี

3.2.2.5 การปรับเนื้อเยื่อให้มีสภาพเป็นกลาง (neutralization)

แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ เข้มข้น 70% เป็นเวลา 5 นาที

3.2.2.6 การย้อมสีซ้ำด้วยสีอีโอซิน (counterstain)

การใช้สีอีโอซินเพื่อย้อมไซโทพลาซึม สีอีโอซินเป็นสีประเภทกรด จึงจับกับส่วนที่เป็นด่างในไซโทพลาซึมจะใช้เวลา 30 วินาที

3.4. การปิดกระจกปิดสไลด์ (Mounting)

การใช้กระจกปิดสไลด์หรือคัพเวอร์สลิป ปิดบนเนื้อเยื่อแผ่นบางที่ย้อมสีแล้ว โดยมีสารละลายที่ใช้ในการปิดกระจกปิดสไลด์เป็นตัวเชื่อมให้ติดสนิทกับสไลด์ คือ เปอร์เมาต์ (permount) ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีดัชนีหักเหของแสงต่ำ ทำให้ไม่มีปัญหาในการปรับโฟกัสเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และเป็นสารเคมีที่ละลายเข้าได้กับไซลีน

ใช้ปากคีบ ๆ สไลด์ขึ้นมาจากไซลีน ใช้กระดาษทิชชูเช็ดด้านล่าง และรอบ ๆ เนื้อเยื่อหยดเปอร์เมาต์ข้าง ๆ เนื้อเยื่อ จากนั้นใช้กระจกปิดสไลด์วางเอียง 45 องศา กับสไลด์ โดยขอบด้านหนึ่งของกระจกปิดสไลด์แตะกับเปอร์เมาต์จากนั้นค่อย ๆ ปล่อยกระจกปิดสไลด์ให้เอียงลงสัมผัสสไลด์ต่ำลงเรื่อย ๆ ซึ่งเป็นการไล่ฟองอากาศที่แทรกอยู่ระหว่างสไลด์และกระจกปิดสไลด์ให้ออกมาด้านตรงข้ามที่หยดเปอร์เมาต์ เมื่อปิดกระจกปิดสไลด์ในตำแหน่งที่พอดี ให้ใช้ปากคีบหรือเข็มเขี่ยกดเบา ๆ บนกระจกปิดสไลด์ เพื่อไล่เปอร์เมาต์ที่มีมากเกินไปให้ล้นออกมาขอบสไลด์ แล้วเช็ดทำความสะอาดสไลด์ สาเหตุที่ต้องไล่เปอร์เมาต์ส่วนเกินออก เนื่องจากเปอร์เมาต์ที่แทรกอยู่ระหว่างสไลด์และกระจกปิดสไลด์หนาเกินไปเลนส์ใกล้วัตถุของกล้องจุลทรรศน์ใช้ส่องดูวัตถุที่มีความหนาของสไลด์และกระจกปิดสไลด์ไว้เท่านั้น ไม่ได้เผื่อความหนาของเปอร์เมาต์ไว้ด้วย

จากนั้นใช้น้ำยาทาเล็บสีใสทาปิดที่ขอบกระจกปิดสไลด์

แผนภาพการเตรียมเนื้อเยื่อ

ตัดเนื้อเยื่อหอยนางรมตามขวาง และตามยาวให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดยาวประมาณ 1 เซนติเมตร

↓

คงสภาพด้วยสารละลายบูแองส์ (24 ชั่วโมง)

↓

แช่ในแอลกอฮอล์ 70 % (30 นาที)

↓

ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำสะอาด จนกระทั่งเนื้อเยื่อไม่มีสีเหลือง

↓

แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 80% (1 ชั่วโมง)

↓

แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 90% (1 ชั่วโมง)

↓

แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% (1 ชั่วโมง)

↓

แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 99.9% ครั้งที่ 1 (1.30 ชั่วโมง)

↓

แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 99.9% ครั้งที่ 2 (1.30 ชั่วโมง)

↓

แช่ไดออกเซน ครั้งที่ 1 (1 ชั่วโมง)

↓

แช่ไดออกเซน ครั้งที่ 2 (1 ชั่วโมง)

↓

แช่ไดออกเซน ครั้งที่ 3 (24 ชั่วโมง)

↓

แช่ในพาราพลาสต์ ครั้งที่ 1 (1 ชั่วโมง)

↓

แช่ในพาราพลาสต์ ครั้งที่ 2 (1 ชั่วโมง)

↓

แช่ในพาราพลาสต์ ครั้งที่ 3 (24 ชั่วโมง)

↓

ฝังเนื้อเยื่อลงในพาราพลาสต์

↓

ตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (ให้ได้ชิ้นเนื้อเยื่อขนาด 6 μm)

↓

ติดเนื้อเยื่อลงบนแผ่นสไลด์

↓

วางสไลด์บนเครื่องอุ่นแผ่นสไลด์ (24 ชั่วโมง)

↓

ย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลีนและสีอีโอซีน

↓

ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

แผนภาพขั้นตอนการย้อมสี

สไลด์ที่มีแผ่นเนื้อเยื่อติดอยู่

↓

แช่ในไซลีน ครั้งที่ 1 (5 นาที)

↓

แช่ในไซลีน ครั้งที่ 2 (5 นาที)

↓

แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 99.9% (5 นาที)

↓

แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% (5 นาที)

↓

แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 80% (5 นาที)

↓

แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70% (5 นาที)

↓

ย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลีน (1 นาที)

↓

ล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลผ่านตลอด

↓

แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70% (5 นาที)

↓

ย้อมด้วยสีอิโอซีน (30 วินาที)

↓

จุ่มในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% อย่างรวดเร็ว

↓

แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 99.9% (5 นาที)

↓

แช่ในบิวทานอล ครั้งที่ 1 (5 นาที)

↓

แช่ในบิวทานอล ครั้งที่ 2 (5 นาที)

↓

แช่ในไซลีน ครั้งที่ 1 (5 นาที)

↓

แช่ในไซลีน ครั้งที่ 2 (5 นาที)

↓

ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

3.5 การศึกษาเนื้อเยื่อทางมิญชวิทยา ด้วยวิธีการทางพาราฟินเทคนิค

การส่องดูเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ยี่ห้อ Olympus รุ่น CH 30 โดยใช้โปรแกรม Optikam B1, B3, B5, B9 Ver. 1.9 ดูเนื้อเยื่อที่กำลังขยาย 40 เท่า 100 เท่า 400 เท่า 1000 เท่า พร้อมกับถ่ายรูป เพื่อดูลักษณะเนื้อเยื่อภายในระบบทางเดินอาหาร ของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*)

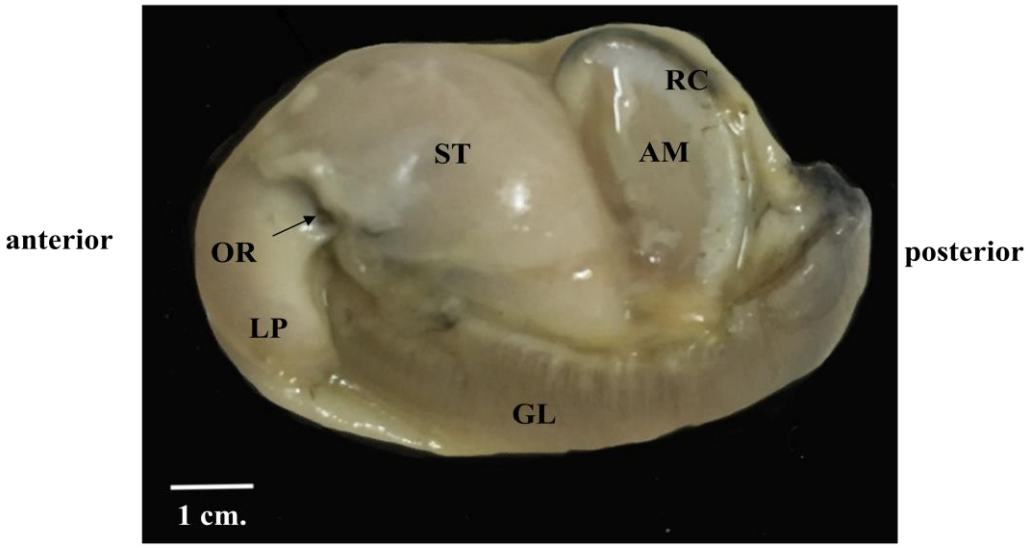
3.6 การศึกษาเนื้อเยื่อด้วยวิธี Semi-thin section (ใช้สำหรับศึกษา digestive glands)

ทำการตัดเนื้อเยื่อให้ได้ทั้งหมด 4 ส่วน และแช่เนื้อเยื่อใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M Phosphate buffer saline (PBS) จากนั้นส่งเนื้อเยื่อที่แช่ใน 2.5% glutaraldehyde ไปให้ศูนย์กล้องจุลทรรศน์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ทำการเตรียมเนื้อเยื่อต่อ โดยนำเนื้อเยื่อไปแช่ที่ 4 องศาเซลเซียสนาน 4 ชั่วโมงจากนั้นล้างใน 0.1 M PBS ที่ 4 องศาเซลเซียส 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาทีเก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ใน 0.1 M PBS ที่ 4 องศาเซลเซียสนำตัวอย่างที่เก็บไว้มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1 x 1 มิลลิเมตร คงสภาพด้วย 1% Osmium tetraoxide ใน 0.1M PBS ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.1 M PBS ที่ 4 องศาเซลเซียส 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาทีดึงน้ำออกด้วย เอทานอลความเข้มข้น 70 %, 80 %, 90 %, 95 % ความเข้มข้นละ 2 ครั้ง และ 100 % ครั้ง ๆ ละ 30 นาที ตามลำดับนำ Propylene oxide (PO) เข้าสู่เซลล์ 2 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที ตามด้วย PO : Araldite 502 resin (2:1) นาน 1 ชั่วโมง และ (1:2) นาน 12–14 ชั่วโมง ฝังเนื้อเยื่อใน Pure Araldite 502 resin ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมงที่ 45 องศาเซลเซียส และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างละ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ เพื่อให้เกิดกระบวนการ polymerization ที่สมบูรณ์จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปตัดด้วยเครื่องultramicrotome ให้มีความหนาประมาณ 500-700 นาโนเมตร แล้วนำเนื้อเยื่อที่ตัดไปวางลงบนสไลด์ ทิ้งไว้จนแห้ง แล้วย้อมด้วยสี methylene blue ในน้ำ (1% methylene blue, 1% sodium tetraborate) ทิ้งไว้จนแห้งนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

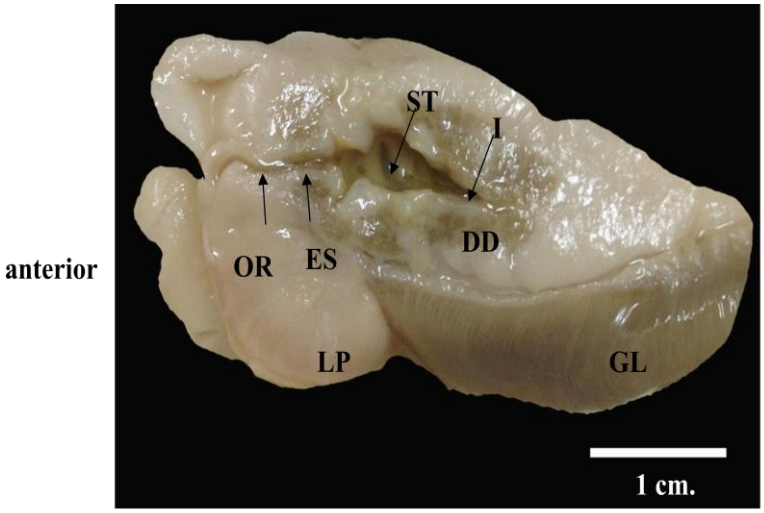
บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 โครงสร้างทางกายวิภาคระบบทางเดินอาหารในหอยนางรมปากจีบ

อวัยวะในระบบทางเดินอาหารของหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* ประกอบด้วยช่องเปิดของปาก (oral groove) หลอดอาหาร (esophagus) กระเพาะอาหาร (stomach) ลำไส้ (intestine) และไส้ตรง (rectum) ยังมีอวัยวะที่ช่วยในการย่อยอาหารได้แก่ ถุงคริสตัลลีนสไตล์ (crystalline stylesac) และต่อมย่อยอาหาร (digestive diverticula) โดยมีท่อรวม (collecting duct) เชื่อมระหว่างต่อมย่อยอาหารกับกระเพาะอาหารซึ่งอวัยวะในระบบทางเดินอาหารทั้งหมดจะอยู่ภายในก้อนอวัยวะภายใน (visceral mass) ยกเว้น ส่วนของไส้ตรงที่มีลักษณะเป็นท่อยื่นออกมาโค้งพาดผ่านทางด้านหลัง (dorsal) ของหัวใจ และกล้ามเนื้อยึดเปลือก (adductor muscle) (ภาพที่ 4-1 และ4-2)



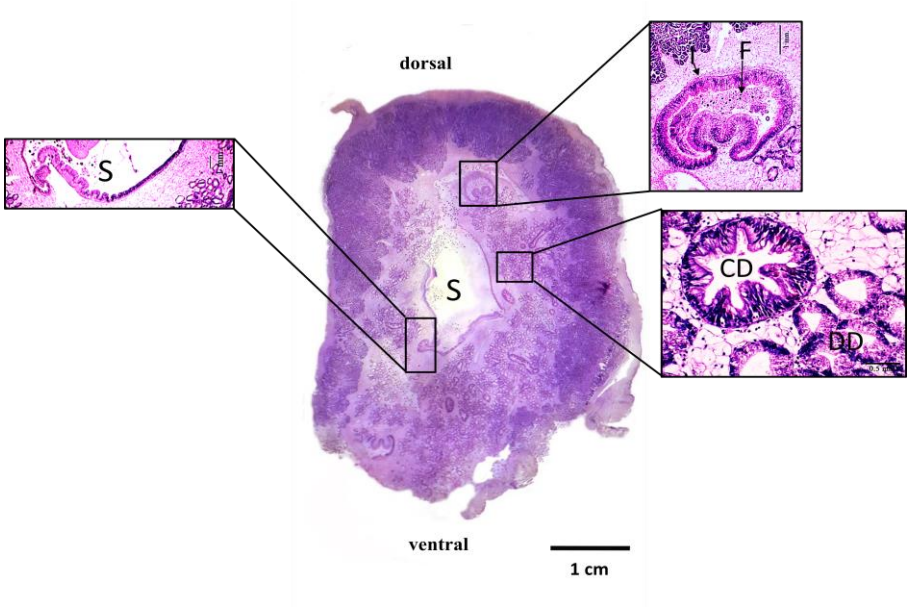
ภาพที่ 4-1 ลักษณะทางกายวิภาคตำแหน่งของอวัยวะที่พบในระบบทางเดินอาหารของหอยนางรมปากจีบ LP = เลเบียลพัลพ์ (labial palp) หรือแผ่นปาก GL = เหงือก (gill)
AM = กล้ามเนื้อยึดเปลือก (adductor muscle) OR = ร่องปาก (oral groove)
ST = กระเพาะอาหาร (stomach) RC = ไส้ตรง (rectum)



ภาพที่ 4-2 อวัยวะที่พบในระบบทางเดินอาหารของหอยนางรมปากจีบ LP = เลเบียลพัลพ์ (labial palp) GL = เหงือก (gill) OR = ร่องปาก (oral groove) ES = หลอดอาหาร (esophagus) ST = กระเพาะอาหาร (stomach) DD = ต่อมย่อยอาหาร (digestive diverticula) I = ลำไส้ (intestine)

4.2 เนื้อเยื่อในระบบทางเดินอาหารของหอยนางรมปากจีบ

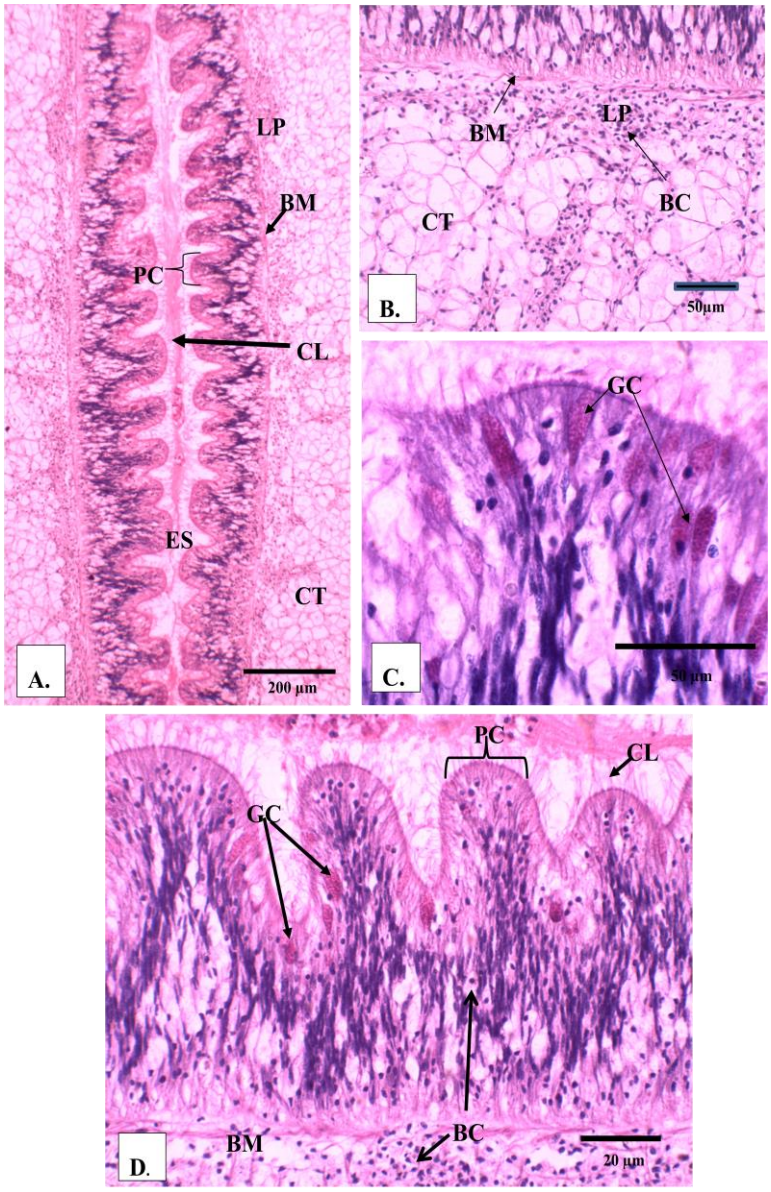
เมื่อทำการศึกษาเนื้อเยื่อด้วยวิธีพาราฟิน โดยทำการตัดตามขวางจะพบตำแหน่งที่อยู่ของอวัยวะในระบบทางเดินอาหาร ดังนี้ บริเวณท่อกลวงขนาดใหญ่ตั้งอยู่ใจกลาง คือกระเพาะอาหาร ถูกล้อมรอบด้วยต่อมย่อยอาหาร และพบลำไส้อยู่บริเวณด้านหน้าและด้านหลังกระเพาะอาหาร (ภาพที่4-3)



ภาพที่ 4-3 เนื้อเยื่อในระบบทางเดินอาหารของหอยนางรมปากจีบตัดตามขวางด้วยเทคนิคมิญชวิทยา S = กระเพาะอาหาร (stomach) F = อนุภาคอาหาร (food particle) I = ลำไส้ (intestine) DD= ต่อมย่อยอาหาร (digestive diverticula) CD = ท่อรวม (collecting duct)

4.2.1 หลอดอาหาร (esophagus)

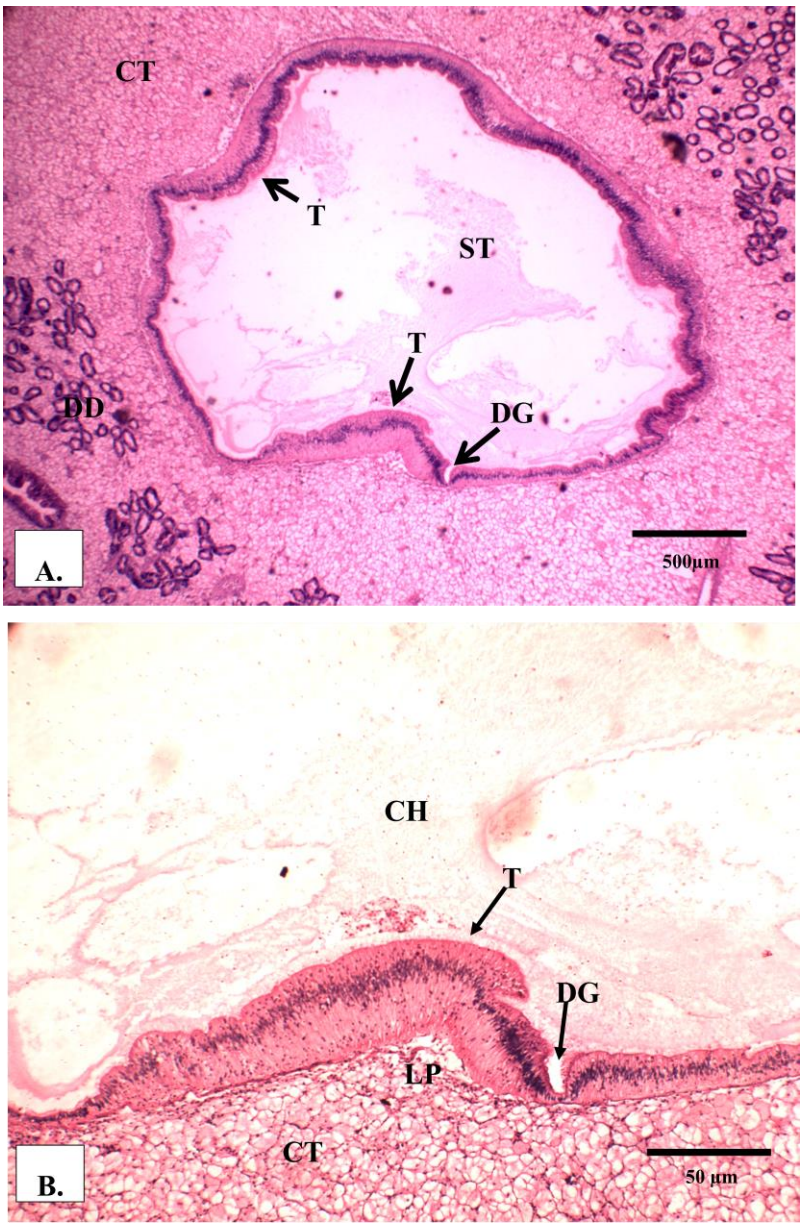
ลักษณะโครงสร้างทางกายวิภาคของหลอดอาหาร (esophagus) ของหอยนางรมปากจีบมีลักษณะเป็นท่อสั้น ๆ (short tubular) ที่ต่อมาจากปาก จากการศึกษาเนื้อเยื่อภายในหลอดอาหาร พบว่าภายในเนื้อเยื่อหลอดอาหารพบผนังชั้นในมีสันนูนยื่นเข้าไปในลูเมน เป็นเยื่อบุผิวชนิด Pseudostratified ciliated columnar epithelium ซึ่งเป็นเยื่อบุผิวที่ประกอบด้วยเซลล์ชั้นเดียวรูปร่างสูงเบียดกันหลายชั้นเทียมบางทีเรียกเซลล์ชนิดนี้ว่าเป็นพลิกา ปลายของเซลล์ด้านที่ติดลูเมนพบซีเลีย (cilia) มีรูปร่างยาวลักษณะเป็นใยขึ้นอยู่บนพลิกาอย่างสม่ำเสมอตามแนวยาวของผนังหลอดอาหาร และพบเซลล์สร้างเมือก (mucous cell) เป็นจำนวนมากมีรูปร่างยาวรี ย้อมติดสี eosin พบแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ชั้นเยื่อบุผิว บริเวณภายในลูเมนพบอนุภาคอาหารติดสี eosin ซึ่งพบว่าชั้นเยื่อบุผิวตั้งอยู่บนเยื่อฐาน (basement membrane) ใต้เยื่อฐานเป็นชั้น lamina propria เป็นชั้นที่พบเซลล์เม็ดเลือด (blood cell) กระจุกตัวอยู่บริเวณนี้เป็นจำนวนมาก ถัดจากบริเวณ lamina propria เป็นบริเวณประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เรียงตัวอย่างหลวมๆ (loose connective tissue) ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันส่วนนี้พบแอ่งเลือดขนาดเล็กแทรกอยู่ทั่วไป (ภาพที่ 4-4) เพื่อนำเลือดมาเลี้ยงอวัยวะในส่วนนี้ ซึ่งการพบแอ่งเลือดทำหน้าที่ลำเลียงเลือดเป็นลักษณะของระบบเลือดแบบเปิด (open circular system) และเป็นลักษณะของสัตว์ที่พบในไฟลัมมอลลัสกา (Mollusca)



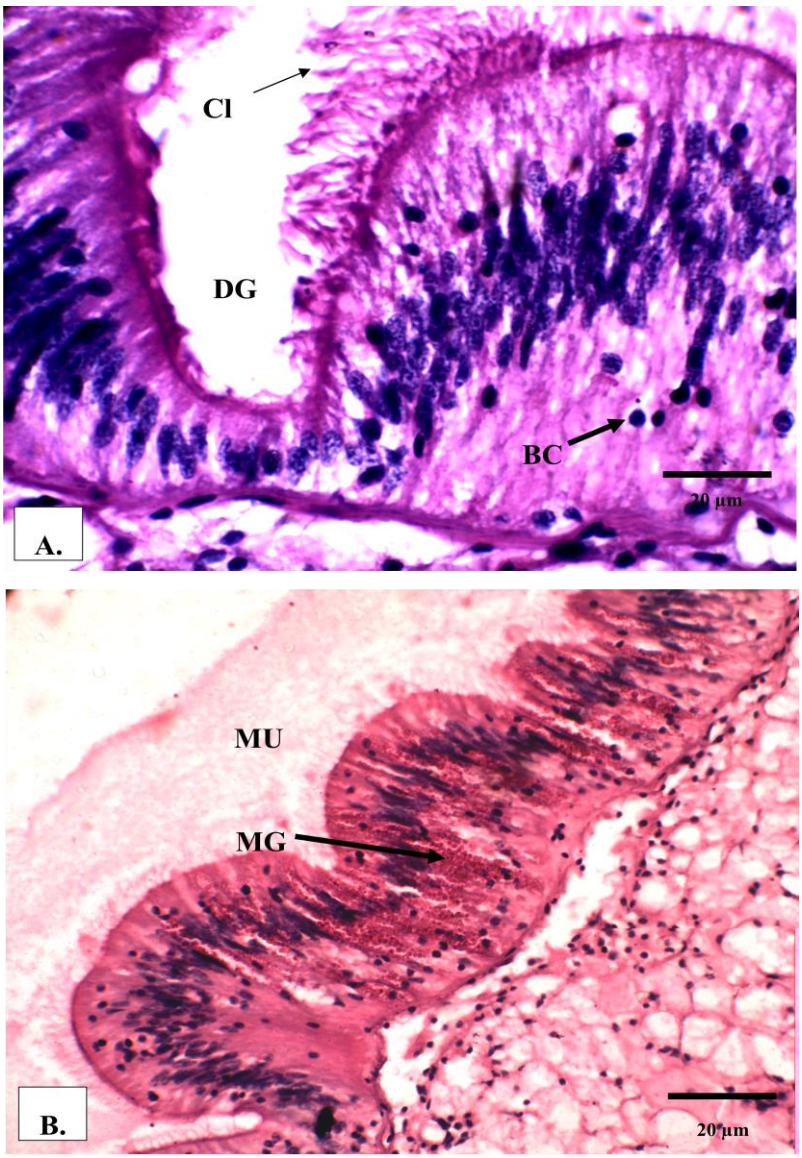
ภาพที่ 4-4 ลักษณะเนื้อเยื่อหลอดอาหารของหอยนางรมปากจีบเมื่อตัดตามขวาง A. (กำลังขยาย 100 เท่า) จะพบ ES = หลอดอาหาร (esophagus) PC = พลิกา (plicae) CL = ซิเลีย (cilia) CT = เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (loose connective tissue) BM = เยื่อฐาน (basement membrane)ใต้เยื่อฐานเป็นชั้น LP = ลามินาร์โพรเพีย (lamina propria) B. (กำลังขยาย 400 เท่า) จะพบ BM = เยื่อฐาน (basement membrane)ใต้เยื่อฐานเป็นชั้น LP = ลามินาร์โพรเพีย (lamina propria) ประกอบด้วย BC = เซลล์เม็ดเลือด (blood cell) แทรกอยู่ทั่วไป C. (กำลังขยาย 1000 เท่า) พบ GC = เซลล์กอบเบล็ต (goblet cell) ซึ่งเป็นเซลล์สร้างเมือก D. (กำลังขยาย 1000 เท่า) จะเห็น PC = พลิกา (plicae) สูง ที่มี CL = ซิเลีย (cilia) ติดอยู่อย่างหนาแน่น

4.2.2 กระเพาะอาหาร (stomach)

กระเพาะอาหารของหอยนางรมปากจีบพบต่อจากหลอดอาหาร มีลักษณะเป็นช่องว่างขนาดใหญ่ที่รับอาหารต่อมาจากหลอดอาหาร ภายในกระเพาะอาหารมีการเพิ่มพื้นที่โดยการม้วนพับของเนื้อเยื่อบุผิวในบางบริเวณทำให้เนื้อเยื่อบุผิวของกระเพาะอาหารมีลักษณะเป็นจีบทั่วทั้งกระเพาะ เยื่อบุผิวบางบริเวณจะหนาตัวมากเป็นพิเศษ เรียกว่า Typhlosole (ภาพที่ 4-5) โดย Typhlosole บริเวณกระเพาะอาหารด้านล่าง (ventral) จะพบร่องขนาดใหญ่ (deep groove) (ภาพที่ 4-5 B) เนื้อเยื่อภายในกระเพาะอาหารประกอบด้วยเยื่อบุผิวชั้นเดียวชนิด Pseudostratified ciliated columnar epithelium ซึ่งประกอบด้วยเซลล์รูปแท่งทรงสูงแบบมีซิเลียเซลล์เรียงกันแน่นจนเห็นเป็นลักษณะคล้ายหลายชั้น (หลายชั้นเทียม) เซลล์ที่พบในเนื้อเยื่อบุผิวเป็นเซลล์ที่มีรูปร่างไม่สม่ำเสมอ มีนิวเคลียสรูปไข่หรือกลม นอกจากนี้ยังพบมีเซลล์เม็ดเลือดแทรกอยู่เป็นระยะ (ภาพที่ 4-6 A) และพบเซลล์สร้างเมือกหรือเซลล์กอเบลต (goblet cell หรือ mucous cell) กระจายตัวอยู่ในชั้นเยื่อบุผิวสามารถสังเกตเห็นแกรนูลขนาดเล็ก(mucin granule) ติดสีย้อมอีโอซินภายในเซลล์สร้างเมือก นอกจากนี้ยังพบเมือกที่หลั่งออกมาคลุมเนื้อเยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร (ภาพที่ 4-6 B)



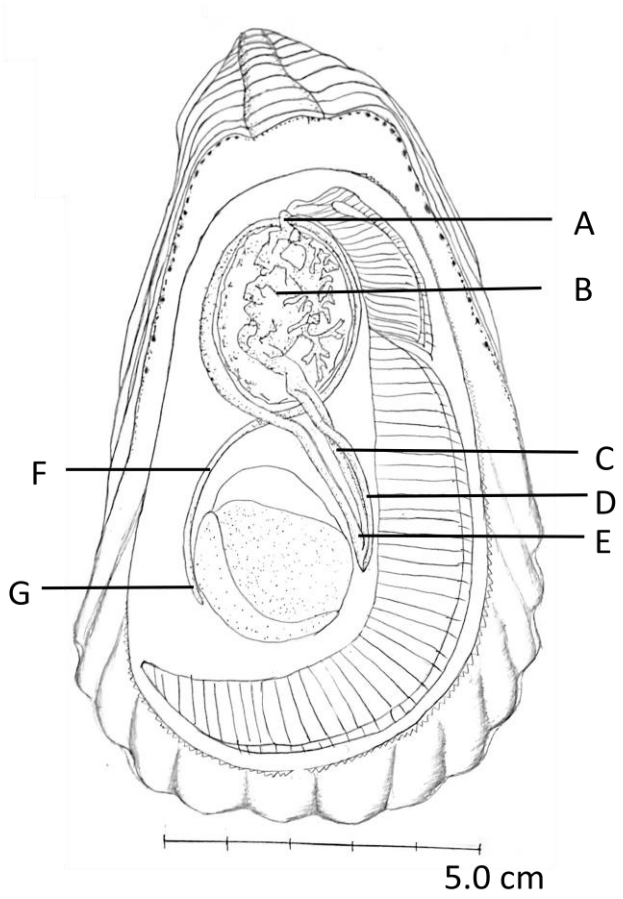
ภาพที่ 4-5 ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร (stomach) ของหอยนางรมปากจีบ เมื่อตัดตามขวาง A. (กำลังขยาย 40 เท่า) จะพบ DD = ต่อมย่อยอาหาร (digestive diverticula) ST = กระเพาะอาหาร (stomach) T = ไทโฟโซล (typhosole) DG = ร่องลึกบริเวณเนื้อเยื่อบุผิวส่วนกลางกระเพาะอาหาร (deep groove) CT = เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) B. (กำลังขยาย 400 เท่า) จะพบ LP = ลามินาร์โพรเพีย (lamina propria) DG = ร่องลึกบริเวณเนื้อเยื่อบุผิวส่วนกลางกระเพาะอาหาร (deep groove) CH = อาหาร (chyme)



ภาพที่ 4-6 บริเวณเยื่อบุผิวของกระเพาะอาหารของหอยนางรมปากจีบ A. (กำลังขยาย 1000 เท่า) CL = ซิเลีย (cilia) DG = ร่องลึกบริเวณเนื้อเยื่อบุผิวส่วนกลางกระเพาะอาหาร (deep groove) BC = เซลล์เม็ดเลือด (blood cell) B. (กำลังขยาย 400 เท่า) บริเวณผนังด้านล่าง (ventral) ของกระเพาะอาหารจะพบ MU = เมือก (mucous) MG = มิวซินแกรนูล (mucin granule)

4.2.3 ลำไส้ (Intestine)

ในการศึกษาครั้งนี้แบ่งลำไส้ของหอยนางรมปากจีบออกเป็น 3 ส่วนหลัก ๆ ประกอบด้วย ลำไส้ส่วนลง (descending intestine) ลำไส้ส่วนขึ้น (ascending intestine) และสำไส้ส่วนปลาย (terminal intestine) (ภาพที่ 4-7 C, E และ F) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบถุงสไตล์ (style sac) เชื่อมกับลำไส้ส่วนลง (ภาพที่ 4-7 D)



ภาพที่ 4-7 ลักษณะทางกายวิภาคตำแหน่งของอวัยวะที่พบในระบบทางเดินอาหารของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) A = หลอดอาหาร (esophagus) B = กระเพาะอาหาร (stomach) C = ลำไส้ส่วนลง (descending intestine) D = ถุงคริสตัลลีนสไตล์ (crystalline style sac) E = ลำไส้ส่วนขึ้น (ascending intestine) F = ลำไส้ส่วนปลาย (terminal intestine) G = ไส้ตรง (rectum)

4.2.3.1 ลำไส้ส่วนลง (descending intestine)

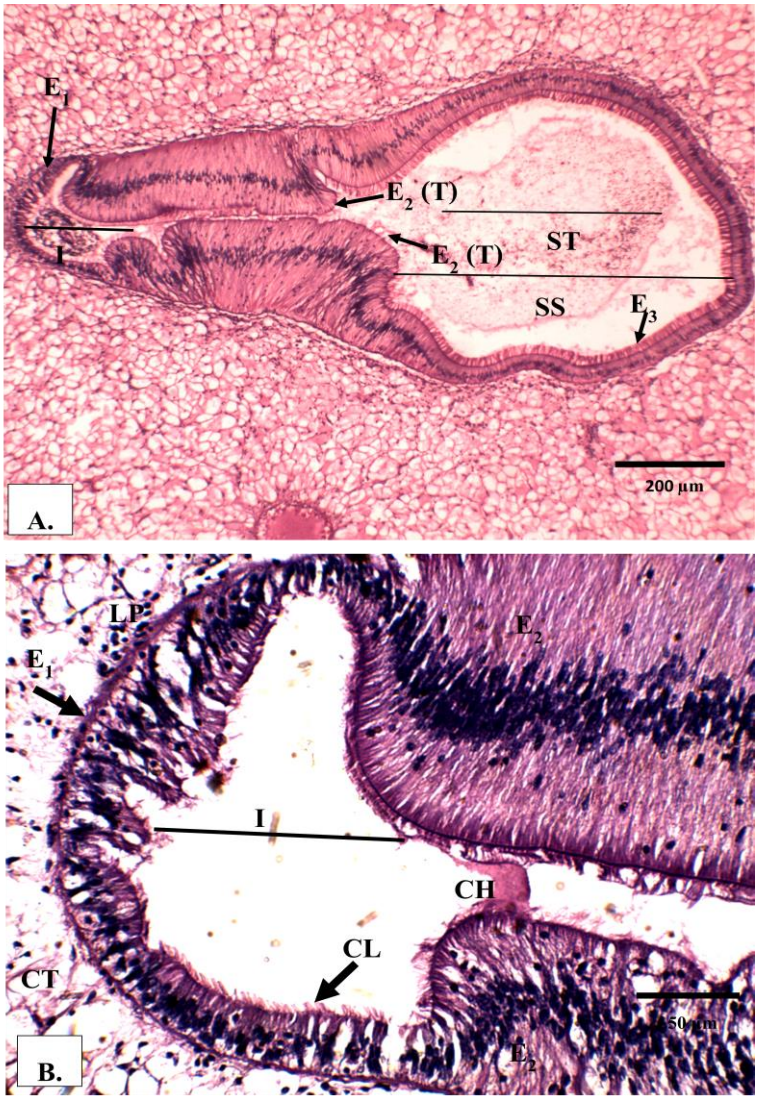
ลำไส้ส่วนลง (descending intestine) เป็นส่วนของท่อต่อออกมาจากกระเพาะอาหาร บริเวณลำไส้ส่วนลงจะพบถุงสไตล์ (style sac) เมื่อตัดเนื้อเยื่อตามขวางจะพบเนื้อเยื่อบุผิวของลำไส้ส่วนลงเชื่อมติดกับถุงสไตล์ (style sac) (ภาพที่ 4-7) ซึ่งพบว่าส่วนของลำไส้และถุงสไตล์เชื่อมติดเป็นท่อร่วมกัน พบเนื้อเยื่อบุผิวทั้งหมด 3 แบบ ได้แก่

เนื้อเยื่อบุผิวแบบ E_1 พบบริเวณลำไส้ส่วนลง บริเวณนี้เป็นเนื้อเยื่อบุผิวชนิดเซลล์รูปแท่งทรงสูงแบบมีซิเลียเรียงกันหลายชั้นเทียม (pseudostratified ciliated columnar epithelium) ขนาดของเซลล์ไม่สูงมากนัก พบซิเลียด้านที่ติดกับลูเมน พบนิวเคลียสด้านฐานที่ติดกับเยื่อฐาน (ภาพที่ 4-8)

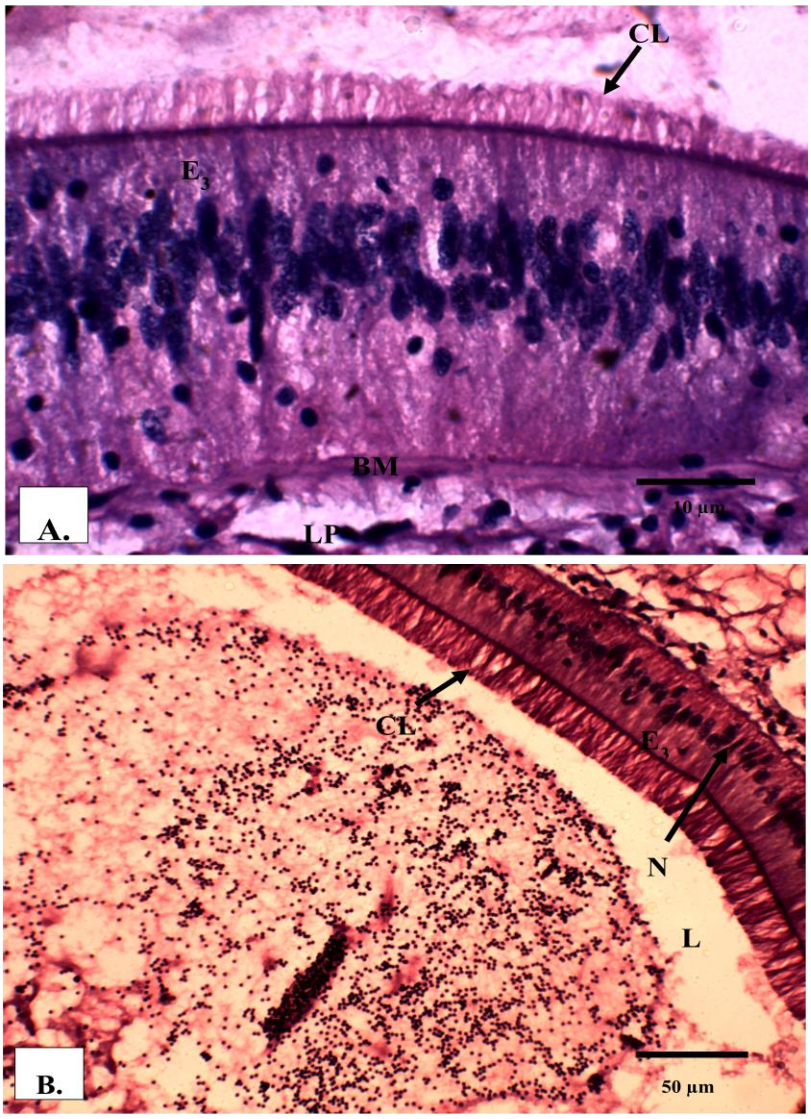
เนื้อเยื่อบุผิวแบบ E_2 การเรียงตัวของเซลล์เป็นเซลล์รูปแท่งแบบมีซิเลียเรียงกันหลายชั้นเทียม (pseudostratified ciliated columnar epithelium) เยื่อบุผิวบริเวณนี้หนาตัวมากกว่าบริเวณอื่นหรือที่เรียกว่า ไทโฟโซล (Typhlosole) พบนิวเคลียสอยู่บริเวณกลางเซลล์ไทโฟโซลมีขนาดแตกต่างกัน ไทโฟโซลด้านบน (dorsal) มีขนาดเล็กกว่าไทโฟโซลด้านล่าง (ventral) ซิเลียที่พบบนเยื่อบุผิวตำแหน่งที่พบเนื้อเยื่อบุผิวแบบ E_2 คือ บริเวณที่เชื่อมต่อระหว่างลำไส้ส่วนลงและถุงสไตล์ (ภาพที่ 4-8)

เนื้อเยื่อบุผิวแบบ E_3เป็นเซลล์รูปทรงกระบอกเรียงกันชั้นเดียว (simple columnar brush border epithelium) การเรียงตัวของเซลล์สม่ำเสมอ ด้านบนของเซลล์เยื่อบุผิวมีซิเลียยาวเรียงตัวกันหนาแน่นคล้ายแปรง (brush border) ติดสีย้อม eosin เข้มมาก พบนิวเคลียสด้านฐานของเซลล์ ตำแหน่งที่พบเนื้อเยื่อบุผิวแบบ E_3 คือบริเวณถุงสไตล์ (ภาพที่ 4-9 A)

ภายในถุงสไตล์สามารถพบแท่งคริสตัลลีน (crystalline style) ติดสีย้อมอีโอซิน นอกจากนี้ยังพบแกรนูลขนาดเล็กจำนวนมากภายในแท่งคริสตัลลีนซึ่งติดสีย้อมฮีมาทอกไซลิน (ภาพที่ 4-9 B) แท่งคริสตัลลีนเป็นแท่งที่สร้างขึ้นภายในถุงสไตล์เพื่อทำหน้าที่ในการบดอาหารเพื่อช่วยย่อยอาหารเชิงกล



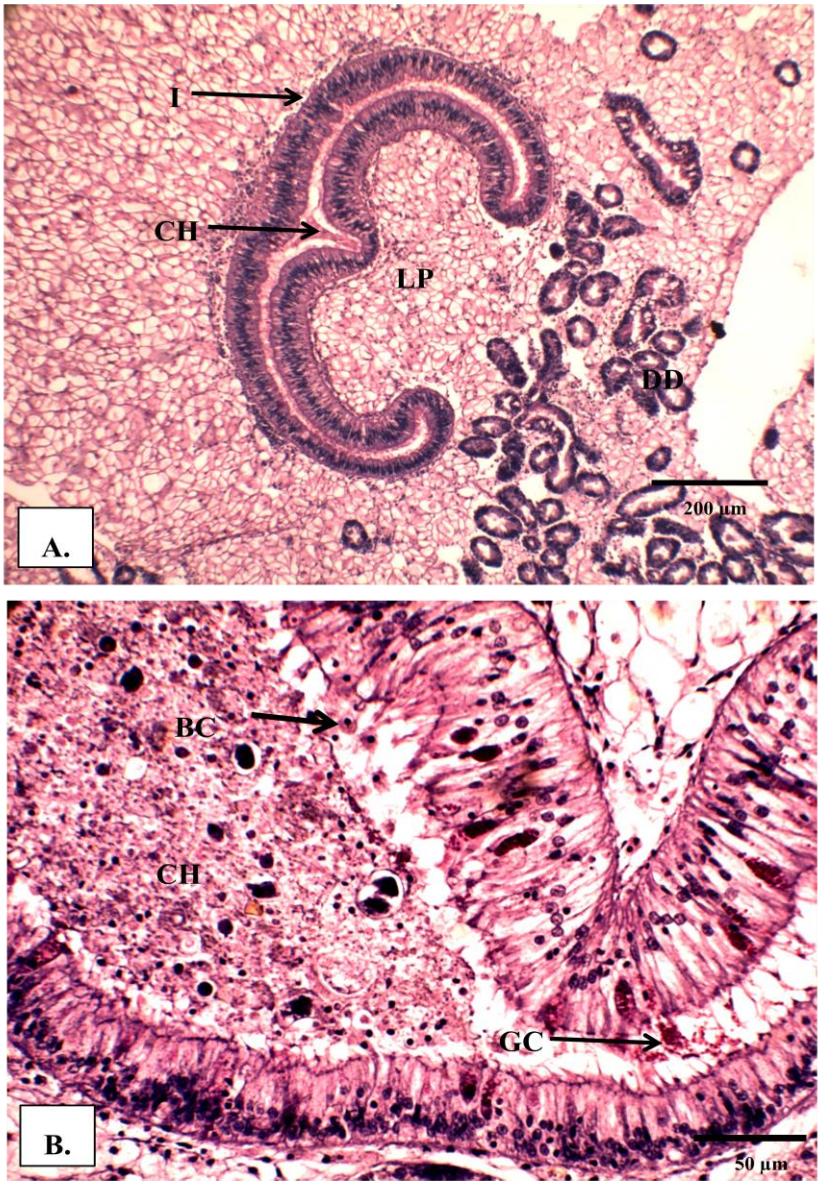
ภาพที่ 4-8 ลักษณะเนื้อเยื่อถุงสไตล์ (style sac) ของหอยนางรมปากจีบเมื่อตัดตามขวาง A. (กำลังขยาย 100 เท่า) จะพบ SS = ถุงสไตล์ (style sac) ST = แท่งคริสตัลลีนสไตล์ (crystalline style) E_3= เซลล์รูปทรงสูงเรียงกันชั้นเดียว (simple columnar epithelium) มีซิเลีย (cilia) แบบขนแปรง (brush borders) E_2= เซลล์รูปแท่งทรงสูงแบบมีซิเลียเรียงกันหลายชั้นเทียม (pseudostratified ciliated columnar epithelium) ซึ่งพบในบริเวณที่เชื่อมต่อระหว่างถุงสไตล์และลำไส้ E_1 = เซลล์รูปแท่งทรงสูงแบบมีซิเลียเรียงกันหลายชั้นเทียม (pseudostratified ciliated columnar epithelium) ซึ่งพบในบริเวณลำไส้ I = ลำไส้ (intestine) B. (กำลังขยาย 400 เท่า) บริเวณเซลล์ชนิด E_1 พบ CT = เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (loose connective tissue) CH = อาหาร (chyme) LP = ชั้นลามินาร์โพรเพีย (laminar propia) CL = ซิเลีย (cilia)



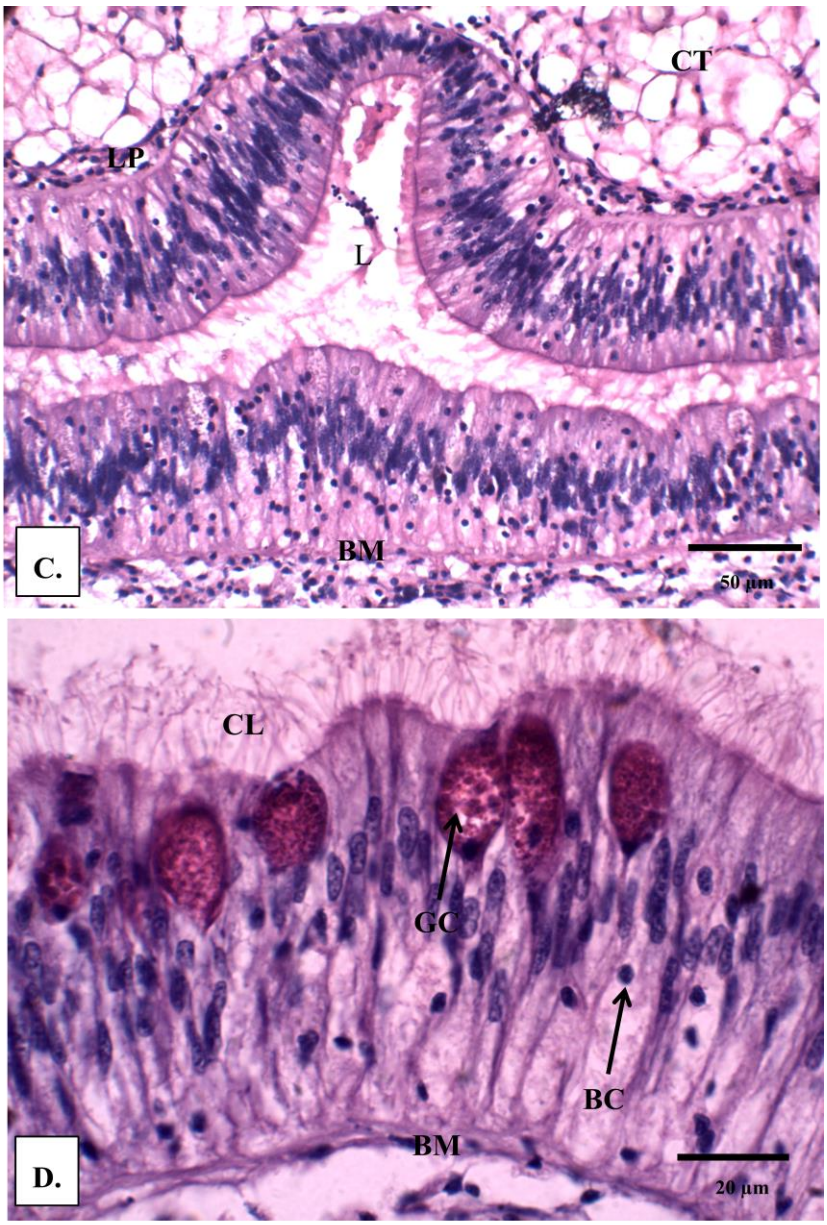
ภาพที่ 4-9 ลักษณะเนื้อเยื่อถุงสไตล์ (style sac) เชื่อมติดกับลำไส้ส่วนลง (descending intestine) ของหอยนางรมปากจีบ เมื่อตัดตามขวาง A. (กำลังขยาย 1000 เท่า) บริเวณเซลล์ชนิด E_3 พบ BC = เซลล์เม็ดเลือด (blood cell) BM = เนื้อเยื่อฐาน (basement membrane) LP = ชั้นลามินาร์โพรเพีย (laminar propia) CL = ซิเลีย (cilia) B. (กำลังขยาย 400 เท่า) บริเวณเซลล์ชนิด E_3 จะพบ CL = ซิเลีย (cilia) แบบขนแปรง (brush borders) N = นิวเคลียส (nucleus) L = ลูเมน (lumen) CH = อาหาร (chyme)

4.2.3.2 ลำไส้ส่วนขึ้น (ascending intestine)และลำไส้ส่วนปลาย (terminal intestine)

ลำไส้ส่วนขึ้น(ascending intestine) เป็นส่วนที่อยู่ถัดมาจากลำไส้ส่วนลงแยกออกจากถุงสไตล์ตวัดโค้งขึ้นไปด้านบนตรงไปทางด้านหน้า (anterior) วนโค้งเป็นวงกลมรอบกระเพาะอาหารลงมาทางด้านล่าง (ventral) และพาดขึ้นไปทางด้านบน (dorsal) อยู่เหนือกล้ามเนื้อทางด้านหลัง (posterior) และเชื่อมต่อกับไส้ตรง (rectum) (ภาพที่ 4-7) ลำไส้ทั้ง 2 ส่วนมีเนื้อเยื่อคล้ายกัน คือ ท่อภายในมองเห็นเป็นโครงสร้างคล้ายเลขสามอารบิค (เลข 3) (ภาพที่ 4-10 A) พบเนื้อเยื่อบุผิวมีการเรียงตัวของเซลล์เป็นเซลล์รูปแท่งแบบมีซิเลียเรียงกันหลายชั้นเทียม (pseudostratified ciliated columnar epithelium) ภายในชั้นเนื้อเยื่อบุผิวพบเซลล์กอบเบล็ต (goblet cells) ขนาดใหญ่ ติดสีย้อม eosin และพบเซลล์เม็ดเลือด (blood cell) แทรกอยู่ในชั้นเยื่อบุผิว และในบางบริเวณสามารถพบเม็ดเลือดในลูเมนของลำไส้ (ภาพที่ 4-10 B, C และ D) การหลั่งเม็ดเลือดเข้ามาในลูเมนแสดงให้เห็นว่าเม็ดเลือดดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็น macrophage ทำหน้าที่กำจัดจุลชีพที่เข้ามา โดยชั้นลามินาร์โพรเพีย (laminar propia) พบเซลล์เม็ดเลือดมาหล่อเลี้ยงจำนวนมาก



ภาพที่ 4-10 ลำไส้ส่วนขึ้น (ascending intestine) และลำไส้ส่วนปลาย (terminal intestine) ของหอยนางรมปากจีบเมื่อตัดตามขวาง A. (กำลังขยาย 100 เท่า) LP = ชั้นลามินาร์โพรเพีย (laminar propia) CH = อาหาร (chyme) I = ลำไส้ (intestine) DD = ต่อมย่อยอาหาร (digestive diverticula) B. (กำลังขยาย 400 เท่า) พบ GC = เซลล์กอบเบล็ต (goblet cell) BC = เซลล์เม็ดเลือด (blood cell) CH = อาหาร (chyme)



ภาพที่ 4-10 ลำไส้ส่วนขึ้น (ascending intestine) และลำไส้ส่วนปลาย (terminal intestine) ของหอยนางรมปากจีบเมื่อตัดตามขวาง (ต่อ) C. (กำลังขยาย 400 เท่า) LP = ชั้นลามินาร์โพรเพีย (laminar propia) CT = เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (loose connective tissue) BM = เนื้อเยื่อฐาน (basement membrane) L = ลูเมน (lumen) D. (กำลังขยาย 1000 เท่า) พบ GC = เซลล์กอบเบล็ต (goblet cell) BC = เซลล์เม็ดเลือด (blood cell) BM = เนื้อเยื่อฐาน (basement membrane) CL = ซิเลีย (cilia)

4.2.4 ต่อมย่อยอาหาร (digestive gland)

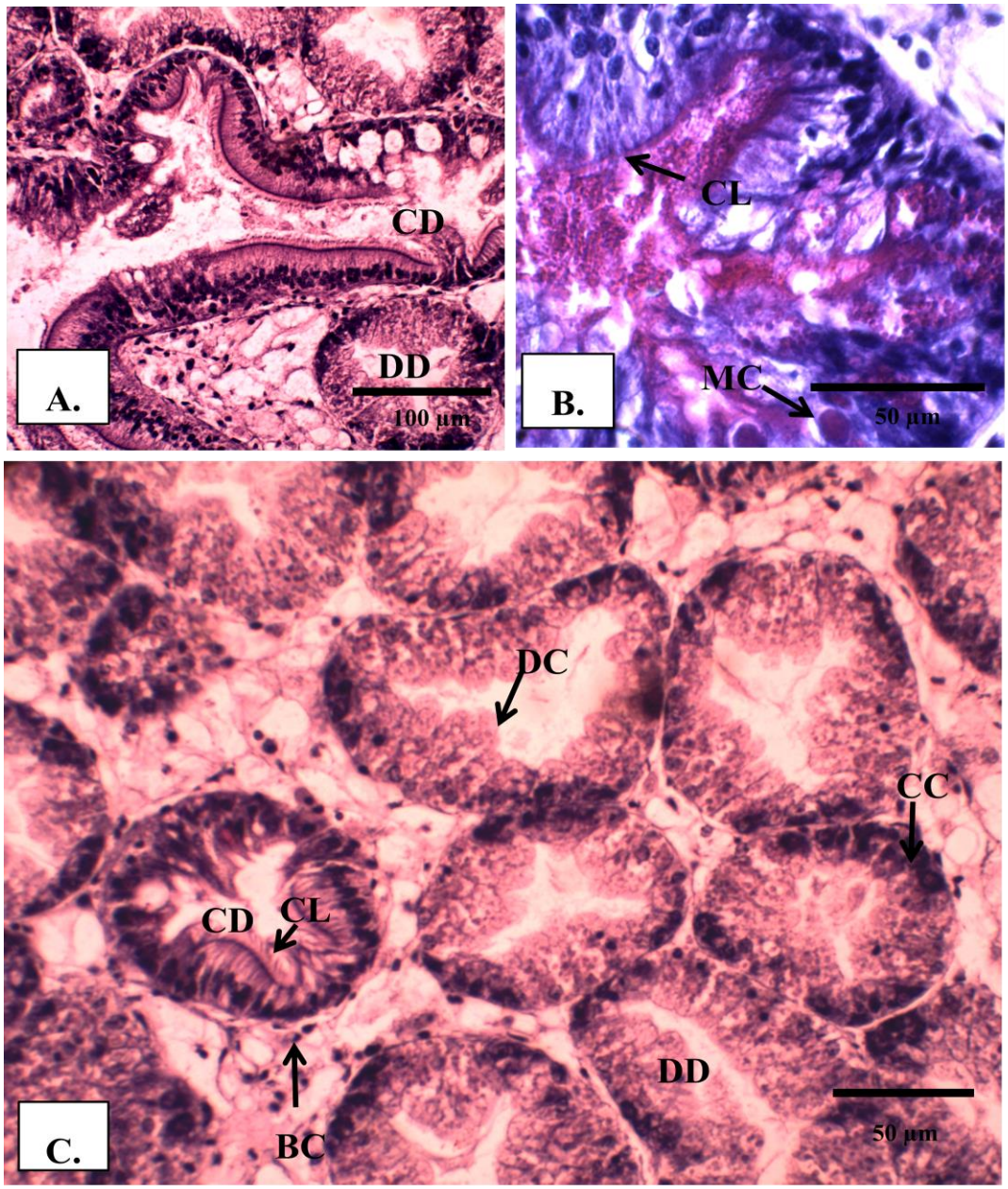
ต่อมย่อยอาหารมีลักษณะเป็นถุงปลายปิดขนาดเล็กจำนวนมากพบล้อมรอบกระเพาะอาหาร โดยมีปลายข้างหนึ่งเปิดเชื่อมต่อกับท่อรวม (collecting duct) ซึ่งเป็นท่อขนาดใหญ่ ท่อรวมนี้จะเชื่อมระหว่างต่อมย่อยอาหารกับกระเพาะอาหาร (ภาพที่ 4-11 A) จากการตัดเนื้อเยื่อตามขวางพบต่อมย่อยอาหารกระจายตัวอยู่ล้อมกระเพาะอาหารและลำไส้ และท่อที่เชื่อมต่อกับต่อมย่อยอาหารมีลักษณะดังนี้

ท่อรวม (collecting duct) มีรูปร่างไม่แน่นอน บริเวณเนื้อเยื่อบุผิวพบพลิกา (plicae) ยกตัวสูงแหลมยื่นเข้าไปในลูเมน (deeply infolding plicae) ตรงปลายพบซิเลีย มีเซลล์สร้างเมือก (mucous cells) ติดสีย้อม eosin กระจายอยู่ในชั้น epithelium เป็นจำนวนมาก เมือกที่สร้างขึ้นช่วยหล่อลื่นอาหารให้เคลื่อนที่ได้สะดวกขึ้น บริเวณด้านฐานของชั้น epithelium พบแอ่งเลือดที่มีเซลล์เม็ดเลือด (blood cells) อยู่ภายใน อาจทำหน้าที่เป็นเซลล์ฟาโกไซต์ (phagocyte) เพื่อดักจับทำลายเชื้อโรคที่ติดมากับอาหาร (ภาพที่ 4-11 B)

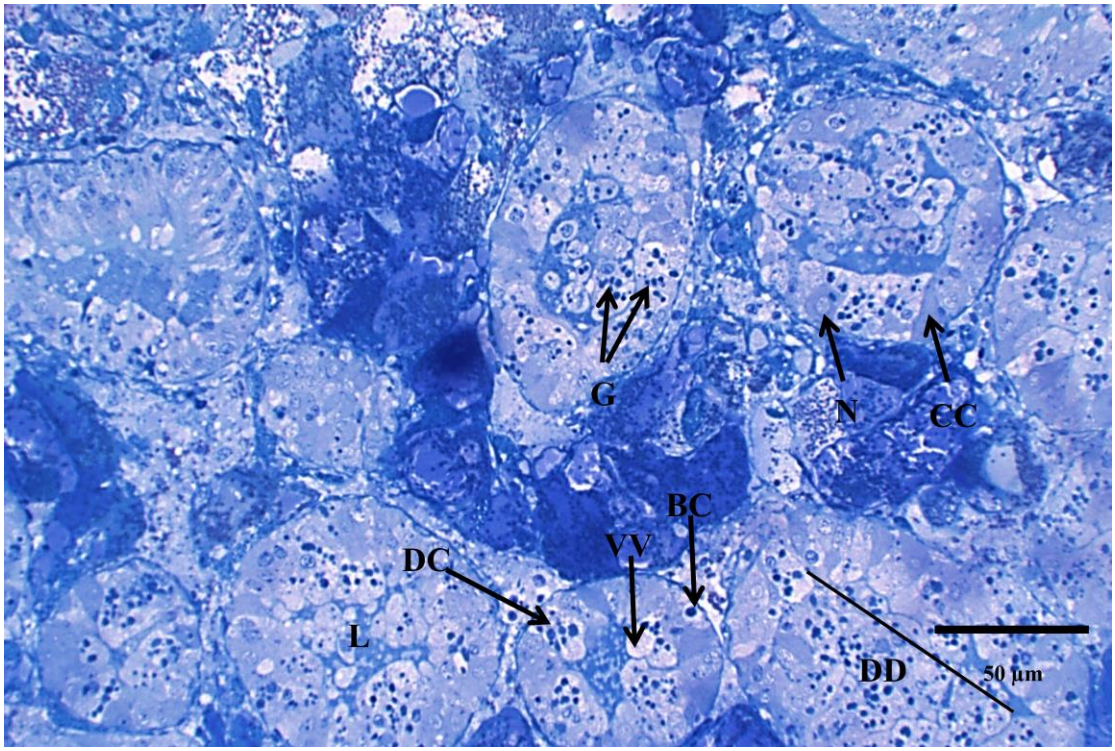
ต่อมย่อยอาหาร (digestive diverticula) ประกอบด้วยเยื่อบุผิวเพียงชั้นเดียว (simple layer epithelium) แยกตัวออกจากชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) อย่างชัดเจนพบว่าตรงบริเวณกลางลูเมนกลวง เนื้อเยื่อบุผิวไม่พบซิเลีย (non-ciliated epithelium) ชั้นเนื้อเยื่อบุผิวประกอบด้วยเซลล์ 2 ชนิดคือ เซลล์ย่อยอาหาร (digestive cells) และคริปติกเซลล์ (crypt cells or vacuolated cells or basophilic) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

เซลล์ย่อยอาหาร (digestive cells)เป็นเซลล์รูปแท่ง เป็นถุงไซโทพลาซึมที่มีนิวเคลียสอยู่บริเวณฐาน ภายในไซโทพลาซึมพบแกรนูลขนาดใหญ่ติดสีของ haematoxylin และยังพบแกรนูล (ภาพที่ 4-11 C) กระจายออกมาในบริเวณลูเมนซึ่งมีถุงแวคิวโอลล้อมรอบแกรนูล

คริปติกเซลล์ (crypt cells) มีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยมพีระมิดมีฐานกว้างปลายด้านบนเรียวแหลมภายในเซลล์เยื่อบุผิว พบนิวเคลียสรูปไข่ขนาดค่อนข้างใหญ่อยู่บริเวณกลางเซลล์ (ภาพที่ 4-12)



ภาพที่ 4-11 ลักษณะเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหาร (digestive gland) ของหอยนางรมปากจีบ เมื่อตัดตามขวาง A. (กำลังขยาย 400 เท่า) จะพบ CD = ท่อรวม (collecting duct) DD = ต่อมย่อยอาหาร(digestive diverticula) B. (กำลังขยาย 1000 เท่า) จะพบลักษณะของเซลล์ภายในท่อรวม CL = ซิเลีย (cilia) MC = เซลล์สร้างเมือก (mucus cell) C. (กำลังขยาย 400 เท่า) จะพบ CL = ซิเลีย (cilia) MC = เซลล์สร้างเมือก (mucus cell) BC = เซลล์เม็ดเลือด (blood cell) DC = เซลล์ย่อยอาหาร (digestive cells) CC = คริปติกเซลล์ (crypt cells)



ภาพที่ 4-12 ลักษณะเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหาร (digestive gland) ของหอยนางรมปากจีบจากการศึกษาด้วยวิธี semithin-section (กำลังขยาย 400 เท่า) DD = ต่อมย่อยอาหาร (digestive diverticular) DC = เซลล์ย่อยอาหาร (digestive cells) CC = คริปติกเซลล์ (crypt cells) L =ลูเมน (lumen) G = แกรนูล (granule) V= ถุงแวคิวโอล (vacuole vesicle) BC = เซลล์เม็ดเลือด (blood cell) N = นิวเคลียส (nucleus)

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

5.1 อภิปรายผลการศึกษา

5.1.1 หลอดอาหาร (esophagus)

หลอดอาหารของหอยนางรมปากจีบพบเนื้อเยื่อบุผิวชนิด Pseudostratified ciliated columnar epithelium ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ที่มีความสูงไม่สม่ำเสมอทำให้เห็นลักษณะเป็นคลื่น เรียกว่า พลิกา (plicae) ซึ่งพลิกาช่วยเพิ่มพื้นที่ภายในหลอดอาหารเมื่อมีอาหารเข้าสู่กระเพาะอาหาร บนเยื่อบุผิวพบซิเลียกระจายอยู่อย่างสม่ำเสมอซึ่งซิเลียที่พบจะทำหน้าที่ช่วยพัดอาหารให้เคลื่อนที่ในหลอดอาหาร และพบเซลล์สร้างเมือกหรือเซลล์กอเบลต (mucous cell หรือ goblet cell) แทรกอยู่ระหว่างชั้นเนื้อเยื่อบุโดยเมือกที่ผลิตขึ้นช่วยในการหล่อลื่นเพื่อการเคลื่อนที่ของอนุภาคอาหารและรวมอาหารให้เป็นก้อน ลักษณะเยื่อบุผิวของหลอดอาหารใน *S. cucullata* คล้ายกับที่พบในหอยสองฝา *Fusconaia cerina* (Mcelwain & Bullard, 2014) และในหอยฝาเดียว *Bulla striata* มีการรายงานว่า พบเซลล์สร้างเมือกแทรกอยู่ในเซลล์เยื่อบุผิวของหลอดอาหารในกลุ่มหอยฝาเดียวบางชนิดจะพบกึ๋น (gizzard) ต่อออกไปทางด้านหลังของหลอดอาหาร ทำหน้าที่ช่วยในการบดอาหารเชิงกลแต่ไม่พบกึ๋นในหอยสองฝา (Lobo-da-Cunha et al., 2011) ซึ่งตรงกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่ไม่พบโครงสร้างของกึ๋นในบริเวณหลอดอาหาร

บริเวณที่ล้อมรอบเนื้อเยื่อหลอดอาหารจะเป็นชั้น lamina propria ซึ่งเป็นส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีการเรียงตัวของเซลล์แบบหลวม ทำให้มีระบบเลือดเข้ามาหล่อเลี้ยงรอบหลอดอาหาร โดยสังเกตได้จากการพบเซลล์เม็ดเลือด จำนวนมากล้อมรอบบริเวณหลอดอาหาร เม็ดเลือดบางส่วนแทรกตัวเข้าไปในเยื่อบุผิวตรงตำแหน่ง intercellular space ทำให้พบเม็ดเลือดกระจายอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อบุผิวและเคลื่อนที่เข้าสู่ลูเมน ซึ่งพฤติกรรมของเม็ดเลือดที่ดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าเม็ดเลือดกลุ่มนี้อาจมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการกำจัดจุลชีพแปลกปลอมที่ปนมากับอาหาร หรือทำหน้าที่เป็น phagocyte นั่นเอง ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาในหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea glomerata* ด้วยเทคนิคการ blood smears พบว่าเซลล์เม็ดเลือด (haemocyte) ติดสีย้อม haematoxylin ทั้งภายในเซลล์ epithelium และลูเมนของอวัยวะในระบบทางเดินอาหารตั้งแต่บริเวณหลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้ และต่อมย่อยอาหาร โดย haemocyte ทำหน้าที่เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ (large macrophage-like cells) ในการดักจับเชื้อโรคที่ติดเข้ามาในระบบทางเดินอาหาร (Rivers, 2006)

5.1.2 กระเพาะอาหาร (stomach)

กระเพาะอาหารของหอยนางรมปากจีบต่อจากหลอดอาหาร มีลักษณะเป็นช่องว่างขนาดใหญ่ที่รับอาหารต่อมาจากหลอดอาหาร ภายในกระเพาะอาหารมีการเพิ่มพื้นที่โดยการม้วนพับของเนื้อเยื่อบุผิวในบางบริเวณทำให้เนื้อเยื่อบุผิวของกระเพาะอาหารมีลักษณะเป็นจีบทั่วทั้งกระเพาะ คาดว่าบริเวณที่เป็นจีบนี้เป็นบริเวณที่ช่วยในการคัดเลือกขนาดอนุภาคของอาหารจากการศึกษาในหอยฝาเดียว *B. striata* พบว่าบริเวณที่คัดเลือกอาหารอยู่ล้อมรอบทางเข้าของลำไส้ (Lobo-da-Cunha et al., 2011) การศึกษาในหอยสองฝา *Crassostrea virginica* แสดงให้เห็นว่าอาหารที่ส่งมาตามหลอดอาหาร จะถูกซิเลียพัดอาหารเข้าสู่บริเวณกระเพาะอาหารส่วนบน (dorsal) และส่วนล่าง (ventral) จากนั้นอนุภาคอาหารจะถูกคัดแยกเข้าสู่ต่อมย่อยอาหาร (digestive gland) จะเกิดการย่อยภายในเซลล์ (intracellular digestion) และการดูดซึม (absorption) ขึ้นภายในต่อมย่อยอาหาร และ basophilic cells ซึ่งเป็นเซลล์ภายในต่อมย่อยอาหารจะมีการสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน (protease) หลั่งเข้าสู่ลูเมนไปยังกระเพาะอาหารเพื่อทำการย่อยภายนอกเซลล์ (extracellular digestion) (Gosling, 2014)

เยื่อบุผิวที่พบในกระเพาะอาหารเป็นชนิด Pseudostratified columnar ciliated epithelium เช่นเดียวกับที่พบในหลอดอาหาร แต่มีการเรียงจัดตัวแตกต่างกัน เยื่อบุผิวบางบริเวณจะหนาตัวมากเป็นพิเศษ เรียกว่า Typhlosole โดย Typhlosole บริเวณกระเพาะอาหารด้านล่าง (ventral) จะพบร่องร่องขนาดใหญ่ (deep groove) เซลล์ที่พบในเนื้อเยื่อบุผิวเป็นเซลล์ที่มีรูปร่างไม่สม่ำเสมอ มีนิวเคลียสรูปไข่หรือกลม และพบเซลล์สร้างเมือกหรือเซลล์กอเบลต (mucous cell หรือ goblet cell) กระจายตัวอยู่ในชั้นเยื่อบุผิวคาดว่าบริเวณที่พบเมือก (mucous) ปกคลุม เป็นบริเวณเนื้อเยื่อบุผิวถูกปกคลุมด้วยแผ่นคิวติเคิล (cuticle) เป็นแผ่นหนาเรียกว่าแกสตริกชีลด์ (gastric shield) จากการศึกษาในหอยสองฝาพบว่าแกสตริกชิลด์เป็นโครงสร้างที่มีองค์ประกอบเป็นไคตินในธรรมชาติที่ช่วยป้องกันผนังกระเพาะอาหารสร้างจากเยื่อบุผิวที่ประกอบด้วยเซลล์ชั้นเดียวรูปร่างสูงเบียดกันหลายชั้นเทียมและมีซิเลียจะทำหน้าที่ยึดแผ่นไคตินไว้ (Begum, 2002) การศึกษาในหอยสองฝา *Crassostrea virginica* รายงานว่าอนุภาคอาหารที่มีขนาดใหญ่จะถูกแยกไปที่บริเวณแกสตริกชีลด์ บริเวณที่พบแผ่นแกสตริกชิลด์บริเวณ Typhlosole ซึ่งบริเวณนี้จะมีแท่งคริสตัลลีนสไตล์ (crystalline style) จากถุงสไตล์ (style sac) มาช่วยบดอาหารให้มีขนาดเล็กลง อาหารที่ถูกบดให้มีขนาดเล็กลงจะตกลงไปในร่อง (major groove) เข้าสู่ถุงสไตล์ซึ่งเชื่อมอยู่กับลำไส้ส่วนลง (Gosling, 2014) ภายในชั้นเยื่อบุผิวบริเวณกระเพาะอาหารพบเซลล์เม็ดเลือดแทรกตัวอยู่ซึ่งคาดว่าจะทำหน้าที่เป็น macrophage เช่นเดียวกับที่พบในหลอดอาหาร ดังที่ได้กล่าวไปแล้ว

ภายในกระเพาะอาหารสามารถสังเกตเห็นเซลล์สร้างเมือกได้ชัดเจนและมีจำนวนมาก

ภายในเซลล์สร้างเมือก พบแกรนูลขนาดเล็กติดสีย้อมอีโอซิน ซึ่งแกรนูลดังกล่าวเป็นแกรนูลที่ประกอบด้วยสารมิวซิน (mucin granule) โดยเซลล์สร้างเมือกจะสร้างสารเมือกในรูปมิวซินซึ่งเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตขนาดใหญ่ที่เชื่อมต่อกับโปรตีน (glycoprotein)โมเลกุลมีการแตกกิ่ง เมื่อแกรนูมิวซินหลั่งออกจากเซลล์สร้างเมือก และสัมผัสกับน้ำก็จะทำให้เกิดการพองตัว และหนืดกลายเป็นเมือกจากรายงานการศึกษาในหอยหอยฝาเดียว *Bulla striata* พบว่ากระเพาะอาหารมีการหลั่งเมือกออกมาจากเซลล์สร้างเมือก (mucus secreting cells) ที่แทรกอยู่ภายใน typhlosole (Lobo-da-Cunha et al., 2011) และจากการศึกษาในหอยนางรม *C. virginica* พบว่าบริเวณลูเมนในกระเพาะอาหารมีแท่งคริสทัลลีนสไตล์ ยื่นเข้ามาจากถุงสไตล์ เป็นแท่งยาวกึ่งแข็งเป็นสารประกอบพวก mucins (Galtsoff, 1964)

5.1.3 ลำไส้ (intestine)

การศึกษาครั้งนี้แบ่งลำไส้ของหอยนางรมปากจีบ ออกเป็น 3 ส่วนตามลักษณะโครงสร้างของเยื่อบุผิว และตำแหน่งของลำไส้ ได้แก่ (1) ลำไส้ส่วนลง (descending intestine) (2) ลำไส้ส่วนขึ้น (ascending intestine) และ (3) ลำไส้ส่วนปลาย (terminal intestine)

(1) ลำไส้ส่วนลง (descending intestine)

เป็นส่วนที่ติดกับกระเพาะอาหาร อาหารที่เคลื่อนออกจากกระเพาะจะเข้าสู่ลำไส้ส่วนนี้ บริเวณลำไส้ส่วนลงนี้จะพบถุงสไตล์ (style sac) ขนานไปกับลำไส้ พบว่าส่วนของลำไส้และถุงสไตล์เชื่อมติดกันกลายเป็นท่อร่วมกัน โดยภายในท่อร่วมนี้ พบเนื้อเยื่อบุผิวทั้งหมด 3 แบบ ได้แก่ (1) ชนิด E_1พบในลำไส้ (2) ชนิด E_2 พบระหว่างลำไส้และถุงสไตล์ และ (3) ชนิด E_3 พบในถุงสไตล์

เนื้อเยื่อบุผิวแบบ E_1 พบบริเวณลำไส้ส่วนลง บริเวณนี้เป็นเนื้อเยื่อบุผิวชนิด pseudostratified ciliated columnar epithelium ขนาดของเซลล์ไม่สูงมากนัก พบซิเลียด้านที่ติดกับลูเมน พบนิวเคลียสด้านฐานที่ติดกับเยื่อฐานซึ่งเป็นลักษณะที่คล้ายกับที่พบในลำไส้ส่วนอื่น ๆ พบซิเลียตลอดทั่วทั้งเนื้อเยื่อบุผิว มีแกรนูล (granule) ติดสีย้อม haematoxylin จากรายงานการศึกษาในหอยสองฝา *Fusconaia cerina* คาดว่าเซลล์เยื่อบุผิวที่อยู่ภายในบริเวณลำไส้ส่วนลง (descending intestine) อาจทำหน้าที่เกี่ยวกับการหลั่งสาร (Mcelwain & Bullard, 2014)

เนื้อเยื่อบุผิวแบบ E_2 พบระหว่างลำไส้และถุงสไตล์ เป็นเยื่อบุผิวชนิด pseudostratified ciliated columnar epithelium ที่เยื่อบุผิวบริเวณนี้หนาตัวมากกว่าบริเวณ เรียกว่า ไทโฟโซล (Typhlosole) จากการศึกษาในหอยสองฝา *Fusconaia cerina* มีการรายงานว่าเซลล์เยื่อบุผิวบริเวณไทโฟโซล มีการหลั่งสารเพื่อสร้างแท่งคริสทัลลีนสไตล์ สารที่หลั่งออกมาจากเซลล์จะล้อมรอบแท่งคริสทัลลีนสไตล์เป็นชั้นวงแหวนหนาขึ้นเรื่อยๆ สามารถเห็นเป็นวงเมื่อตัดเนื้อเยื่อตามขวาง (Mcelwain & Bullard, 2014) อย่างไรก็ตามการศึกษาในหอยนางรมปากจีบ พบแท่งคริสทัลลีน

สไตล์แต่ไม่พบลักษณะเป็นวงแหวนในแท่งคริสทัลลีนสไตล์ อาจเกิดจากขั้นตอนในการเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาเนื้อเยื่อ ทำให้แท่งคริสทัลลีนสไตล์เริ่มสลายไปบ้างเล็กน้อย เนื่องจากมีรายงานว่า ในหอยนางรม *C. virginica* แท่งคริสทัลลีนสไตล์จะสลายไปภายใน 1 ชั่วโมง หากนำขึ้นจากน้ำ (Galtsoff, 1964)

เนื้อเยื่อบุผิวแบบ E_3พบบริเวณบริเวณถุงสไตล์เป็นเซลล์รูปทรงกระบอกเรียงกันชั้นเดียวแบบ simple columnar brush border epithelium การเรียงตัวของเซลล์เป็นระเบียบ ด้านบนของเซลล์พบซิเลียเรียงตัวกันหนาแน่นคล้ายแปรง (brush border) ติดสีย้อม eosin เข้ม สอดคล้องกับการศึกษาในหอยสองฝา *Fusconaia cerina* (Mcelwain & Bullard, 2014) ซึ่งการเรียงตัวของซิเลียชนิด brush border นี้ จะเกี่ยวข้องกับการหมุนของแท่งคริสทัลลีนสไตล์ ทำให้เกิดการหมุนเพื่อบดย่อยอาหารภายในถุงสไตล์ และกระเพาะอาหารบริเวณแกสตริกชิลด์ ทำให้เกิดการย่อยเชิงกล

จากการศึกษาในหอยนางรม *Ostrea edulis* เผยให้เห็นกลไกการทำงานของแท่งคริสทัลลีนสไตล์ที่อยู่ภายในถุงสไตล์ โดยระบุว่าแท่งคริสทัลลีนสไตล์ที่อยู่ภายในถุงสไตล์เป็นแท่งยาวกึ่งแข็งเป็นสารประกอบพวก mucin ยื่นเข้ามาในบริเวณลูเมนของกระเพาะอาหารเพื่อทำการบดอาหารให้มีขนาดเล็กลง โดยภายในถุงสไตล์ (style sac) ยังพบอีกว่ามีการเคลื่อนไหวแบบหมุนเกิดขึ้น โดยบริเวณเนื้อเยื่อบุผิว ที่เกิดการหมุนจะพบซิเลียขนาดใหญ่อยู่ในร่องซึ่งบริเวณกระเพาะอาหารส่วนนี้จะมีการเชื่อมต่อกับถุงสไตล์ โดยแท่งสไตล์จะมีการเคลื่อนที่แบบหมุนตามเข็มนาฬิกาอย่างช้าๆและซิเลียจะผลักดันอนุภาคอาหารให้ลงไปยังลำไส้ และในขณะที่แท่งสไตล์หมุนเสียดสีกับแกสตริกชีลด์ โครงสร้างของแกสตริกชีลด์จะทำหน้าที่เป็นฐานป้องกันส่วนของกระเพาะเสียดสีกับคริสทัลลีนสไตล์ในขณะที่เกิดการบดอาหาร นอกจากนั้นแผ่นแกสตริกชีลด์ (gastric shield) ยังช่วยยึดส่วนหัวของคริสทัลลีนสไตล์ไว้ ให้หมุนเพื่อบดอาหาร และเซลล์ในถุงสไตล์จะมีการหลั่งเอนไซม์ย่อยอาหาร (digestive enzyme) เข้ามาในกระเพาะอาหารเพื่อทำให้อนุภาคอาหารมีขนาดเล็กลง (Galtsoff, 1964)

จากรายงานการศึกษาในหอยสองฝา *Pinna nobilis* พบว่าแท่งคริสตัลลีนสไตล์มีองค์ประกอบเป็นสารคาร์โบไฮเดรตที่เรียกว่า mucin (glucosamine 49% และ galactosamine 51%) ซึ่งสารมิวซินนี้ถูกหลั่งออกมาจาก epithelial mucins ของถุงสไตล์ (Bailey & Worboys, 1960)

(2) ลำไส้ส่วนขึ้น (ascending intestine) และ(3) ลำไส้ส่วนปลาย (terminal intestine)

โดยลำไส้ส่วนขึ้น (ascending intestine) และลำไส้ส่วนปลาย (terminal intestine) มีโครงสร้างเนื้อเยื่อคล้ายกัน คือ พบลูเมนมีลักษณะโค้งงอเว้าเป็นเลขสาม ลักษณะดังกล่าวเกิดจากบริเวณลามินาร์โพรเพีย (laminar propia) ของผนังลำไส้ด้านบน (dorsal) เกิดการเว้าเข้าไปในลูเมน ซึ่งมีลักษณะเหมือนกับที่พบในหอยนางรม *Crassostrea virginica* (Galtsoff, 1964) โครงสร้าง

ดังกล่าวเป็นลักษณะที่พบได้ในกลุ่มหอยนางรมซึ่งแตกต่างจากหอยสองฝาอื่น ๆ เช่น ในหอย *F. cerina* พบลูเมนมีลักษณะโค้งรูปตัวซี แต่ไม่โค้งเป็นเลขสาม (Mcelwain & Bullard, 2014)

ภายในลำไส้ของหอยนางรมปากจีบพบเนื้อเยื่อบุผิวแบบ pseudostratified columnar epithelium ซึ่งมีความแตกต่างจากที่พบในหอยสองฝาชนิดอื่นที่เคยมีรายงาน เช่น ใน *F. cerina* เป็นชนิด simple columnar ciliated epithelium (Mcelwain & Bullard, 2014) พบเซลล์สร้างเมือกเป็นจำนวนมากมีรูปร่างยาวจากฐานเซลล์จนถึงปลายบนของเซลล์ย้อมติดอีโอซินแทรกอยู่ในชั้นเนื้อเยื่อบุผิว และมีการหลั่งแกรนูลออกมาในบริเวณลูเมนและพบเซลล์เม็ดเลือด (blood cell หรือ hemocyte) แทรกอยู่ภายในเนื้อเยื่อบุผิว และมีการหลั่งเม็ดเลือดออกมาในลูเมนของลำไส้คาดว่าเม็ดเลือดที่หลั่งออกมานี้ทำหน้าที่กำจัดเชื้อโรคที่ปนมากับอาหาร

การศึกษาในหอยฝาเดียว *Bulla striata* พบว่าบริเวณเยื่อบุผิวของลำไส้นอกจากจะสร้างเมือกแล้วยังสามารถสร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่ย่อยอาหารได้อีกด้วย (Lobo-da-Cunha et al., 2011)

5.1.4 ต่อมย่อยอาหาร (digestive gland)

ต่อมย่อยอาหารเป็นถุงปลายปิดมีปลายข้างหนึ่งเปิดเชื่อมต่อกับท่อรวม (collecting duct) ซึ่งเป็นท่อเชื่อมต่อกับผนังกระเพาะอาหารอนุภาคอาหารจากกระเพาะอาหารที่มีขนาดเล็กจะถูกซิเลียบนผนังเซลล์พัดเข้าสู่ต่อมย่อยอาหาร

ภายในท่อรวม พบลูเมนมีลักษณะเป็นแฉก เนื่องจากพลิกายื่นเข้าไปในลูเมน พบซิเลียในท่อรวมตลอดความยาวของท่อรวม ซิเลียที่พบในท่อรวมนี้มีความสำคัญในการพัดอาหารเข้าและออกจากระหว่างกระเพาะอาหารและต่อมย่อยอาหาร นอกจากนี้ภายในท่อรวมยังพบเซลล์สร้างเมือกเป็นจำนวนมาก เมือกที่สร้างขึ้นช่วยหล่อลื่นอาหารให้เคลื่อนที่ได้สะดวกขึ้น อาหารจากท่อรวมจะถูกส่งต่อไปยังต่อมย่อยอาหาร ซึ่งบริเวณปลายของต่อมย่อยอาหารจะมีลักษณะเป็นถุงปลายตันจำนวนมากดังที่กล่าวไปแล้ว เรียกแต่ละถุงว่า digestive diverticula ซึ่งเป็นบริเวณที่พบการย่อยภายในเซลล์และการดูดซึมสารอาหารที่ย่อยแล้ว digestive diverticulaประกอบด้วยเยื่อบุผิวเพียงชั้นเดียว (simple layer epithelium) อยู่ติดกับชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ภายในประกอบด้วยเซลล์เยื่อบุผิวชนิดไม่พบซิเลีย (non-ciliated epithelium) 2 ชนิดคือ เซลล์ย่อยอาหาร (digestive cells) มีลักษณะเป็นรูปทรงสูง และคริปติกเซลล์ (crypt cells or vacuolated cells or basophilic cell) มีลักษณะเป็นรูปพีระมิดมีฐานกว้างปลายด้านบนเรียวแหลมลูเมนของ digestive diverticula มีลักษณะเป็นแฉก เนื่องจาก เซลล์ย่อยอาหารและคริปติกเซลล์มีความสูงไม่เท่ากัน

เซลล์ย่อยอาหาร (digestive cells)

เมื่อย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลินจะพบว่าลักษณะของเซลล์ย่อยอาหารเป็นรูปแท่ง

ทรงกระบอก ไซโทพลาสซึมติดสีจาง

เมื่อย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู จะพบเซลล์ย่อยอาหารที่มีไซโทพลาซึมมีลักษณะเป็นถุงใส ๆ บรรจุแกรนูลติดสี haematoxylin เข้มอยู่ภายใน ถุงนี้มีการแตกออกจากปลายยอดของเซลล์ย่อยอาหารเข้ามาในลูเมน และพบ haemocyte แทรกอยู่ภายในเซลล์ และล้อมรอบต่อมย่อยอาหาร

บริเวณด้านฐานของชั้น epithelium พบแอ่งเลือดที่มีเซลล์เม็ดเลือด (blood cells) ทำหน้าที่เป็นเซลล์ฟาโกไซต์ (phagocyte) เพื่อดักจับทำลายเชื้อโรคที่ติดมากับอาหาร และย่อยภายในเซลล์รวมทั้งดูดซึมสารอาหารที่ย่อยแล้วจากการศึกษาในหอยฝาเดียว *Strombus gigas* พบว่าถุงแวคิวโอลที่ล้อมรอบแกรนูลคือสารประเภทลิพิดที่เป็นเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ย่อยอาหาร ภายในบรรจุแกรนูลที่บรรจุเอนไซม์เป็นสารประเภท proteoglycans เพื่อส่งเข้าสู่กระเพาะอาหาร ด้วยวิธีการหลั่งแบบ holocrine secretion (Gros, Frenkiel & Aldana, 2009) โดยสารที่มีการหลั่งแบบ holocrine secretion ถูกสร้างขึ้นมาจาก Holocrine gland ซึ่งเป็นต่อมที่สร้างและเก็บสารที่สร้างเอาไว้ในไซโตพลาสซึม เมื่อต้องการคัดหลั่งสารที่สร้างขึ้น เซลล์จึงต้องมีการสลายตัวหรือหลุดออกมาทั้งเซลล์ ดังนั้นต่อมชนิดนี้จึงมีการแบ่งตัวที่รวดเร็วเพื่อทดแทนเซลล์ที่สลายตัวหรือหลุดออกไป เช่น ต่อมไขมัน (sebaceous gland) (คณะกายวิภาคศาสตร์, ม.ป.ป.) จากรายงานในหอยนางรม *Crassostrea virginica* พบเซลล์ฟาโกไซต์จำนวนมาก (phagocytes) ล้อมรอบท่อของต่อมย่อยอาหาร (Galtsoff, 1964) และจากรายงานการศึกษาในหอยฝาเดียว *Adelomelon beckii* พบบริเวณยอดของเซลล์ epithelium มีไมโครวิลไล (microvilli) และซิเลีย (cilia) ซึ่งเป็นหลักฐานที่แสดงถึงเกิดการย่อยภายในเซลล์ (intracellular digestion) ซึ่งมีขั้นตอนคือ (1) อนุภาคอาหารจะถูกนำเข้าเซลล์แบบ endocytosis โดยเยื่อหุ้มเซลล์ (2) ถุงบรรจุอนุภาคอาหาร (heterolysosomes or phagolysosomes or digestivevacuoles or apical granules) จะรวมกับถุงเอนไซม์ (3) หลังจากเกิด catabolism แล้วจะพบlipofuscin และ pigment แตกกระจายอยู่ภายในลูเมนของต่อมย่อยอาหาร เนื่องจากการย่อยของไลโซโซม และในระหว่างที่มีการดูดซึมอาหาร (Arrighetti, Teso, & Penchaszadeh, 2015)

คริปติกเซลล์ (crypt cells)

เมื่อย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลินจะติดสีเข้ม มีลักษณะคล้ายเป็นรูปสามเหลี่ยม ไซโทพลาซึมติดสีทึบกว่าเซลล์ย่อยอาหารคริปติกเซลล์จะทำหน้าที่แบ่งเซลล์เพื่อสร้างเซลล์ย่อยอาหารที่ทำงานและเสื่อมสภาพเนื่องจากพบรายงานการศึกษา ในหอยนางรม *Crassostrea virginica* พบว่าเซลล์ที่มีขนาดสั้น นิวเคลียสติดสีเข้ม ซึ่งเป็นเซลล์ที่กำลังเจริญ แบ่งตัวเพื่อทดแทนเซลล์ที่มีขนาดยาว บริเวณคริปติกเซลล์ (Galtsoff, 1964) นอกจากนี้การศึกษาในหอยฝาเดียว *A. beckii* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (TEM) พบว่าบริเวณฐานเซลล์มี Rough Endoplasmic Reticulum

(RER) อยู่เป็นจำนวนมาก และพบการสร้างโปรตีนในเซลล์นี้จึงคาดว่า คริปติกเซลล์ นอกจากจะทำหน้าที่แบ่งเซลล์เพื่อทดแทนเซลล์ย่อยอาหารแล้ว ยังอาจทำหน้าที่สร้างเอนไซม์เพื่อย่อยอาหารภายนอกเซลล์ได้อีกด้วย (Arrighetti et al., 2015)

5.2 สรุปผลการทดลอง

หลอดอาหาร (esophagus) เยื่อบุผิวของผนังหลอดอาหาร เป็นเซลล์เยื่อบุผิวชนิด pseudostratified columnar epithelium เซลล์มีความสูงไม่สม่ำเสมอทำให้เห็นลักษณะเป็นคลื่นเรียกว่า พลิกา ซึ่งพลิกาช่วยเพิ่มพื้นที่ภายในหลอดอาหาร และพบเซลล์สร้างเมือก (mucous cell) มีลักษณะรูปยาวรี ติดสีย้อมอีโอซิน เป็นจำนวนมากแทรกอยู่ภายในเซลล์ เพื่อช่วยหล่อลื่นอาหารให้เคลื่อนที่สะดวก และรวมอาหารให้เป็นก้อน และพบเม็ดเลือดกระจายอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อบุผิวและเคลื่อนที่เข้าสู่ลูเมน เพื่อทำหน้าที่กำจัดจุลชีพแปลกปลอมที่ปนมากับอาหาร (phagocyte)

กระเพาะอาหาร (stomach) เนื้อเยื่อบุผิวมีลักษณะเป็นจีบทั่วทั้งกระเพาะ เป็นบริเวณที่ช่วยในการคัดเลือกขนาดอนุภาคของอาหารบริเวณกระเพาะอาหารด้านล่าง (ventral) จะพบร่องร่องขนาดใหญ่ (deep groove) และพบเซลล์สร้างเมือกแทรกอยู่ใน Typhlosole ซึ่งเป็นเยื่อบุผิวบางบริเวณที่หนาตัวมากเป็นพิเศษ โดยเซลล์สร้างเมือกจะสร้างสารเมือกในรูปมิวซิน (mucin) ปกคลุมเป็นบริเวณเนื้อเยื่อบุผิวถูกปกคลุมด้วยแผ่นคิวติเคิล (cuticle) เป็นแผ่นหนาเรียกว่าแกสตริกชีลด์ (gastric shield) ซึ่งแผ่นแกสตริกชีลด์นี้เป็นสารประเภทไคติน (chitin) ซึ่งบริเวณนี้จะมีแท่งคริสตัลลีนสไตล์ (crystalline style) จากถุงสไตล์ (style sac) ยื่นเข้ามาเพื่อช่วยบดอาหารให้มีขนาดเล็กลง โดยโครงสร้างของแกสตริกชีลด์จะทำหน้าที่เป็นฐานป้องกันส่วนของกระเพาะเสียดสีกับคริสทัลลีนสไตล์ในขณะที่เกิดการบดอาหารรวมทั้งยังช่วยยึดส่วนหัวของคริสทัลลีนสไตล์ไว้ และอาหารที่ถูกบดให้มีขนาดเล็กลงจะตกลงไปในร่อง (major groove) เข้าสู่ถุงสไตล์ซึ่งเชื่อมอยู่กับลำไส้ส่วนลง

ลำไส้ (intestine) แบ่งออกเป็น 3 ส่วนตามลักษณะโครงสร้างของเยื่อบุผิว และตำแหน่งของลำไส้ ได้แก่ (1) ลำไส้ส่วนลง (descending intestine) (2) ลำไส้ส่วนขึ้น (ascending intestine) และ (3) ลำไส้ส่วนปลาย (terminal intestine)

(1) ลำไส้ส่วนลง (descending intestine) บริเวณลำไส้ส่วนลงนี้ พบว่าส่วนของลำไส้และถุงสไตล์เชื่อมติดกันกลายเป็นท่อร่วมกัน พบเนื้อเยื่อบุผิวทั้งหมด 3 แบบ ได้แก่ (1) ชนิด E_1 พบในลำไส้ (2) ชนิด E_2 พบระหว่างลำไส้และถุงสไตล์ และ (3) ชนิด E_3 พบในถุงสไตล์เนื้อเยื่อบุผิวแบบ E_1และ E_2 เป็นเนื้อเยื่อบุผิวชนิด pseudostratified ciliated columnar epithelium ส่วน E_3 เป็นเนื้อเยื่อบุผิวชนิด simple columnar brush border epithelium พบซิเลียเรียงตัวกันหนาแน่นคล้ายแปรง (brush border)

(2) ลำไส้ส่วนขึ้น (ascending intestine) และ (3) ลำไส้ส่วนปลาย (terminal intestinal) พบลำไส้มีลักษณะเป็นเลขสาม ซึ่งเกิดจากบริเวณลามินาร์โพรเพีย (laminar propia) ของผนังลำไส้ด้านบน (dorsal) เว้าเข้าไปในลูเมน ซึ่งแตกต่างจากหอยสองฝาอื่น ๆ เช่น ในหอย *F.cerina* พบลูเมนมีลักษณะโค้งรูปตัวซี แต่ไม่โค้งเป็นเลขสาม และเนื้อเยื่อบุผิวของหอยนางรมปากจีบมีลักษณะของเซลล์เป็นแบบ pseudostratified columnar epithelium ซึ่งต่างจากที่พบในหอยสองฝาชนิดอื่นที่เคยมีรายงาน เช่น ใน *F. cerina* เป็นชนิด simple ciliated columnar epithelium พบเซลล์สร้างเมือกเป็นจำนวนมาก และมีการหลั่งแกรนูลออกมาในบริเวณลูเมน และพบเซลล์เม็ดเลือด (blood cell หรือ hemocyte) แทรกอยู่ภายในเนื้อเยื่อบุผิว และในลูเมนของลำไส้

ต่อมย่อยอาหาร (digestive gland) มีลักษณะเป็นถุงปลายปิดขนาดเล็กจำนวนมากพบล้อมรอบกระเพาะอาหาร โดยมีปลายข้างหนึ่งเปิดเชื่อมต่อกับท่อรวม (collecting duct) ท่อรวมนี้จะเชื่อมระหว่างต่อมย่อยอาหารกับกระเพาะอาหาร โดยท่อรวม (collecting duct) มีรูปร่างไม่แน่นอน บริเวณเนื้อเยื่อบุผิวพบพลิกา (plicae) มีเซลล์สร้างเมือก (mucous cells) กระจายอยู่ในชั้น epithelium เป็นจำนวนมาก และพบแอ่งเลือดที่มีเซลล์เม็ดเลือด (blood cells) อยู่ภายใน ส่วนต่อมย่อยอาหาร (digestive gland) ประกอบด้วยเยื่อบุผิวเพียงชั้นเดียว (simple layer epithelium) ตรงบริเวณกลางลูเมนกลวง เนื้อเยื่อบุผิวไม่พบซิเลีย (non-ciliated epithelium) ประกอบด้วยเซลล์ 2 ชนิดคือ เซลล์ย่อยอาหาร (digestive cells) และคริปติกเซลล์ (crypt cells or vacuolated cells or basophilic)

เซลล์ย่อยอาหาร (digestive cells)เป็นเซลล์รูปแท่ง ทำหน้าที่ย่อยภายในเซลล์รวมทั้งดูดซึมสารอาหารที่ย่อย และพบแกรนูลกระจายออกมาในบริเวณลูเมน คาดว่าเป็นเอนไซม์ประเภท proteoglycans เพื่อส่งเข้าสู่กระเพาะอาหาร ด้วยวิธีการหลั่งแบบ holocrine secretion (Arrighetti et al., 2015)

คริปติกเซลล์ (cryptic cells) มีลักษณะคล้ายเป็นรูปสามเหลี่ยม ไซโทพลาซึมติดสีทึบกว่าเซลล์ย่อยอาหารคริปติกเซลล์จะทำหน้าที่แบ่งเซลล์เพื่อสร้างเซลล์ย่อยอาหารที่ทำงานและเสื่อมสภาพ (Galtsoff, 1964)

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการย้อม PAS (Periodic Acid Schiff Stain) และ alcian blue ซึ่งจะติดสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ลิพิด และทำให้เห็นสร้างเซลล์เมือก (mucous cell) ชัดเจน

2. ควรทำการศึกษาโครงสร้างของแกสตริกชีลด์ (gastric shield) และแท่งคริสตัลลีนสไตล์ (crystalline style) ให้ชัดเจนยิ่งขึ้นด้วยวิธี semithin-section (SEM)

บรรณานุกรม

กรมประมง. (ม.ป.ป.). *สถิติประมง*. เข้าถึงได้จาก http://www.fisheries.go.th/it-stat/

คณะกายวิภาคศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. (ม.ป.ป.). *Glands.*4. เข้าถึงได้จาก http://elearning. dt.mahidol.ac.th/departments/anatomy/course/DTAN233/sheet/Gland.pdf

บพิธ จารุพันธุ์ และนันทพร จารุพันธุ์. (2528). *ปฏิบัติการสัตววิทยาทั่วไป*. กรุงเทพฯ: บูรพาสาส์น

รัตนา สมัญญา และสุทิน กิ่งทอง. (2557). กายวิภาคและมิญชวิทยาของเหงือกหอยตะโกรมกราม ดำ *Crassostrea iredalie. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพาฉบับพิเศษการประชุมวิชาการระดับชาติวิทยาศาสตร์วิจัยครั้งที่ 6,* 422-433.

ปรียา วิบูลย์พันธ์. (2557). *ผลของการปนเปื้อนน้ำมันดิบต่อระบบย่อยอาหารและระบบสืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบ (Saccostrea cucullata): กรณีศึกษาบริเวณเกาะเสม็ดจังหวัดระยอง ประเทศไทย.*วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์,มหาวิทยาลัยบูรพา.

สุชาติ อุปถัมภ์, มาลียา เครือตาชู, เยาวลักษณ์ จิตรามวงศ์ และศิริวรรณ จันทเตมีย์. (2538). *สังขวิทยา*. (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: ศักดิโสภาการพิมพ์.

ศศิภา นวลละออง. (2556). *กายวิภาคและเนื้อเยื่อวิทยาเปรียบเทียบของระบบย่อยอาหารของหอยนางรมปากจีบ (Saccostrea forskali)และหอยตะโกรมกรามดำ (Crassostrea iredalie).* ปริญญาการศึกษาบัณฑิต, สาขาการสอนชีววิทยา, คณะศึกษาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

อุมาพร แก้วมณี. (2555). *การลดการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและโลหะหนักในหอยนางรมปากจีบ (Saccostrea cucullata) ด้วยระบบน้ำวน Depuration แบบน้ำวน*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

Arrighetti, F., Teso, V., & Penchaszadeh, P. E. (2015). Ultrastructure and histochemistry of the digestive gland of the giant predator snail *Adelomelon beckii* (Caenogastropoda: Volutidae) from the SW Atlantic. *Tissue Cell*, *47*(2), 171–177.

Bailey, K., & Worboys, B. D. (1960). The lamellibranch crystalline style. *Biochemical Journal*, *76*(3), 487–491.

Begum, S. (2002). Structural and funtional anatomy of stomach. *The Zoological Survey of India*, *100*, 201–207.

Berthelin, C., Kellner, K., & Mathieu, M. (2000). Histological characterization and glucose incorporation into glycogen of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* storage cells. *Marine Biotechnology*, *2*(2), 136–145.

Galtsoff, P. S. (1964). The American Oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. Washington, D.C.: United States Government Printing Office.

Gosling, E. (2014). *Marine Bivalve Molluscs* (2nd ed.). Oxford, UK: Blackwell Publishing.

Gros, O., Frenkiel, L., & Aldana Aranda, D. (2009). Structural analysis of the digestive gland of the queen conch *Strombus gigas* Linnaeus, 1758 and its intracellular parasites. *Journal of Molluscan Studies*, *75*(1), 59–68.

Klinbunga, S., Khamnamtong, B., Puanglarp, N., Jarayabhand, P., Yoosukh, W., & Menasveta, P. (2005). Molecular taxonomy of cupped oysters (*Crassostrea*, *Saccostrea*, and *Striostrea*) in Thailand based on COI, 16S, and 18S rDNA polymorphism. *Marine Biotechnology*, *7*(4), 306-317.

Lobo-da-Cunha, A., Malheiro, A. R., Alves, A., Oliveira, E., Coelho, R., & Calado, G. (2011). Histological and ultrastructural characterisation of the stomach and intestine of the opisthobranch *Bulla striata* (Heterobranchia: Cephalaspidea). *Thalassas*, *27*(2), 61–75.

Lorio, W. J., & Malone, S. (1994). The Cultivation of American Oysters., (*Crassostreavirginica*). SRAC Publication, (432).

Mcelwain, A., & Bullard, S. A. (2014). Histological atlas of freshwater mussels (bivalvia,unionidae): *Villosa nebulosa* (Ambleminae: Lampsilini), *Fusconaia cerina* (Ambleminae: Pleurobemini) and *Strophitus connasaugaensis* (Unioninae: Anodontini). *Malacologia*, *57*(1), 99-239.

Morton, B. (1996). The biology and functional morphology of *Minnivola pyxidatus* (Bivalvia: Pectinoidea). *Journal of Zoology*, *240*(4), 735–760.

Rivers, H. (2006). NAAHTWG Slide of the Quarter (July – September 2006 – Translocated Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*) exposed to Marteilia sydneyi (QX disease). Department of Fisheries, Government of Western Australia. Retrieved from http://www.fish.wa.gov.au/Documents/aquatic_animal_health/translocated_sydney_rock_oysters_exposed_to_marteilia_sydneyi_jul_sep_2006.pdf.

Usheva, L. N., & Frolova, L. T. (2006). Morphofunctional changes of the digestive gland in the bivalve mollusk *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) in normal conditions and after parasitic invasion by trematodes. *Russian Journal of Marine Biology*, *32*(2), 96–105.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลาย

การเตรียมสารเพื่อคงสภาพเนื้อเยื่อ

Bouin's fluid

- สารละลายอิ่มตัวของกรดพิคริกในน้ำ 75 ml
- ฟอร์มาลิน 25 ml
- กรดแอซีติกล้วน 5 ml

วิธีการ

1. ชั่งกรดพิคริก จำนวน 1.2 g ละลายในน้ำ 100 ml
2. คนให้ละลาย ตวงมาใช้เพียง 75 ml
3. เติมฟอร์มาลิน จำนวน 25 ml และกรดแอซีติกล้วน จำนวน 5 ml ลงไปตามลำดับ

การเตรียมสีย้อม

Harris Haematoxylin (Apply for 50 ml)

Stock I

Potassium or ammoniu (alum) 5 g

Distilled water 50 ml

Mixture, heat 90 °C stir 550

Stock II

Absolute alcohol 5 ml

Haematoxylin 0.5 g

Mix heat 100°C stir 550Until deep purple ~ 10 min

Mix stockI and stockII

Add (prepare for 50-100 ml, Use stockIII 1.5 ml) ต้มต่อจนเป็นสีม่วง ~ 2-3 min

StockIII (1% Sodium Iodate)

Sodium Iodate 0.1 g

Distilled water 10 ml

Boiling until deep purple

Cooling under Ice or water bath

Add glacial acid 1 ml

Filter Before in use

Eosin

Counterstain Eosin (stock 100 ml)

Eosin 0.5 % in 70 % ethanol

Preparation 50 ml/time

Eosin Yellowish 0.25 g

70 ethanol alcohol 50 ml