การตรวจเอกสาร

หอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis* (*Hyriopsis*) *bialatus* Simpson, 1900 เป็นหอยสองฝาน้ำจืดที่มีการแพร่กระจายตามแหล่งน้ำต่างๆ ในประเทศไทย ซึ่งพบที่แม่น้ำมูลและลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยา (อุทัยวรรณ และสาธิต, 2545) โดย *H.* (*H.*) *bialatus* มีการจัดลำดับอนุกรมวิธานตาม (Brandt, 1974) ดังนี้

Phylum Mollusca

Class Bivalvia

Subclass Schizodontida

Order Unionoida

Superfamily Unionacea

Family Amblemidae

Subfamily Hyriopsinae

Genus *Hyriopsis*

Subgenus *Hyriopsis*

Species *Hyriopsis* (*Hyriopsis*) *bialatus*

1. รูปร่างและลักษณะของ *Hyriopsis* (*Hyriopsis*) *bialatus* Simpson, 1900

ลักษณะเปลือกภายนอก (ภาคผนวกที่ ก1) ทั้ง 2 ฝามีลักษณะเหมือนกันและขนาดเท่ากัน รูปร่างรูปไข่ (oval) ในตัวเต็มวัย เปลือกด้านซ้ายและขวาจะยึดติดกันทางด้านบน (dorsal) ด้วยเส้นเอ็น (ligament) ที่ยืดหดได้ เปลือกทั้งสองบริเวณใกล้เส้นเอ็นนี้จะนูนออกเป็นส่วนที่เรียกว่า อัมโบ จะค่อนข้างไปทางด้านหน้า (anterior) ซึ่งเป็นส่วนของเปลือกที่เกิดก่อน ใต้อัมโบลงมามีแนวเส้นโค้งเรียงเป็นชั้นๆ เรียกเส้นโค้งนี้ว่าเส้นการเจริญเติบโต (line of growth) เปลือกทางด้านหน้ามักจะมนส่วนเปลือกทางด้านท้ายจะเรียวยาว บริเวณตอนกลางของขอบเปลือกด้านบนเป็นรูปสามเหลี่ยมตั้งสูงขึ้นปลายแหลม เรียกว่า posterior wing ทางด้านหน้ามี anterior wing ขนาดเล็ก ในบางตัวอาจถูกทำลายไปเมื่ออายุมากขึ้น (จรัลธาดา, 2514; ธวัชชัย , 2546; Brandt, 1974)

ลักษณะเปลือกด้านใน (ภาคผนวกที่ ก2) มีความแวววาว ด้านหน้าของเปลือกด้านในทั้งสองฝาจะมีฟันยื่นลงมา เรียกว่า pseudocardinal teeth ส่วนทางด้านท้ายของเปลือกซีกขวามีฟันยื่นลงมา เรียกว่า lateral teeth มีลักษณะเรียวยาว ซึ่งจะสวมลงมากับเปลือกซีกซ้ายจะเป็นร่อง เรียกว่า pit หรือ groove ทางด้านหน้าและทางด้านท้ายมีรอยของกล้ามเนื้อซึ่งเป็นที่เกาะของกล้ามเนื้อเรียบ มี 3 รอย ดังนี้ คือ รอยกล้ามเนื้อแอดดักเตอร์ส่วนหน้า (anterior adductor scar) มีลักษณะกลมใหญ่ลึกเห็นชัดเจน พบอยู่ทางด้านหน้าของ pseudocardinal teeth ซึ่งเป็นบริเวณที่กล้ามเนื้อ anterior adductor มาเกาะทำหน้าที่ยึดระหว่างฝาทั้งสองให้ติดกัน ถัดเข้ามาด้านในอยู่ทางด้านล่างของ pseudocardinal teeth เป็นรอยกล้ามเนื้อรีแทรกเตอร์ส่วนหน้า (anterior retractor scar) เป็นที่ยึดเกาะของกล้ามเนื้อ anterior retractor ทำหน้าที่หดเท้าเข้ามา ส่วนรอยกล้ามเนื้อโพรแทรกเตอร์ส่วนหน้า (anterior protractor scar) อยู่ล่างสุด เป็นที่ยึดเกาะของกล้ามเนื้อ anterior protractor ทำหน้าที่ยืดเท้าออก รอยกล้ามเนื้อยึดฝาด้านท้าย (posterior muscle scar) เป็นรูปไข่ บางไม่ชัด แยกเป็น 2 รอย ดังนี้ คือ รอยกล้ามเนื้อ posterior adductor scar เป็นที่เกาะของกล้ามเนื้อ posterior adductor มีขนาดใหญ่แต่ไม่ลึกมาก และเหนือรอยกล้ามเนื้อนี้มีรอยกล้ามเนื้อเล็กๆ เรียกว่า posterior retractor scar เป็นที่เกาะของกล้ามเนื้อ posterior retractor นอกจากนี้มีรอยที่มีลักษณะที่เป็นเส้นโค้งอยู่ทางด้านล่างของเปลือกด้านใน ซึ่งเป็นส่วนของแมนเทิล (mantle) ที่ติดกับเปลือก และเชื่อมระหว่างรอยกล้ามเนื้อทางส่วนหน้า และส่วนหลัง เรียกรอยนี้ว่า เส้นพาลเลียล (pallial line)

ลักษณะลำตัวของ *H.* (*H.*) *bialatus* ด้านข้างของทั้งสองด้านมีแผ่นแมนเทิล (mantle) เป็นแผ่นเนื้อแบนบางซึ่งมีซีเลียโบกพัดอยู่ตลอดเวลาเพื่อช่วยให้น้ำไหลเข้าออก ผิวด้านในของแผ่นแมนเทิลติดอยู่กับลำตัว ทางด้านนอกติดกับเปลือก ส่วนขอบด้านล่างของแผ่นแมนเทิลจะเป็นอิสระ ทำหน้าที่สร้างเปลือกชั้นเพอริโอสตราคัม (periostracum) และชั้นพริสมาติก (prismatic layer) ช่องที่อยู่ระหว่างแผ่นแมนเทิลทั้งสองแผ่น เรียกว่า ช่องแมนเทิล (mantle cavity) เป็นที่อยู่ของเหงือก (gill) เลเบียลพาล์พ (labial palp) เท้า (foot) และก้อนอวัยวะภายใน (visceral mass) (ภาคผนวกที่ ก3) ซึ่งมีลักษณะอ่อนนุ่มเป็นสีเหลืองอ่อนอยู่เหนือส่วนเท้า (Brandt,1974; Chatchavalvanich *et al.,* 2006)

2. วงจรชีวิตของหอยสองฝาน้ำจืด

หอยสองฝาน้ำจืดมีการสืบพันธุ์แบบภายใน เริ่มต้นเมื่อหอยเพศผู้ปล่อยอสุจิลงในกระแสน้ำผ่านทางท่อนำน้ำออก (exhalant siphon) ไข่จะถูกปฏิสนธิจากสเปิร์มที่ปนมากับน้ำที่เข้า

มาในตัวหอยเพศเมียทางท่อน้ำเข้า (inhalant siphon) โดยจะปฏิสนธิกับไข่ในบริเวณท่อน้ำ (water tube) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่อยู่ภายในเหงือก ส่วนใหญ่ไข่ของหอยที่ได้รับการปฏิสนธิจะมีการพัฒนาและเจริญที่เหงือกชั้นนอก (outer demibranch) เช่น *H.* (*H.*) *bialatus*, *Anodonta cataracta, Chamberlainia hainesiana, Hyriopsis* (*Limnoscapha*) *myersian*a เป็นต้น (อรภา และคณะ, 2529; เพิ่มศักดิ์, 2540) แต่มีหอยบางชนิด เช่น *Hyriopsis* (*Limnoscapha*) *desowitzi* (อุทัยวรรณ และคณะ, 2541) จะพบทั้งเหงือกชั้นนอก (outer demibranch) และเหงือกชั้นใน (inner demibranch) โดยเหงือกบริเวณนี้จะพองออกเป็นถุงเลี้ยงตัวอ่อนเรียกว่า marsupia (Smith,2001) หรือ brood chamber และมีการพัฒนาจนกลายเป็นตัวอ่อนระยะโกลคิเดีย ในการพัฒนาของไซโกต (zygote) ของ *H.* (*H.*) *bialatus* ไปเป็นโกลคิเดีย สังเกตได้จากสีของตัวอ่อนที่อยู่ใน marsupia โดยเริ่มจากสีขาวจะเปลี่ยนไปเป็นสีเหลืองอ่อน, สีเหลือง, สีน้ำตาลอ่อน จนในที่สุดเป็นสีน้ำตาลหรือหรือน้ำตาลอมแดง (ธวัชชัย และคณะ, 2546) ลักษณะของโกลคิเดีย มีลักษณะเป็นฝา 2 ฝาขยับเปิดปิดได้ ที่ขอบฝาโกลคิเดียของหอยสองฝาบางชนิดจะมีโครงสร้างคล้ายตะขอและบริเวณกลางลำตัวมีเส้นใยยาว (thread) สำหรับยึดเกาะปลา (Miller and Harley, 1994) เมื่อแม่หอยปล่อยโกลคิเดียลงในกระแสน้ำซึ่งจะถูกปล่อยออกมาทางท่อน้ำออก โกลคิเดียจะเข้าไปอาศัยเป็นปรสิตในปลาน้ำจืด ซึ่งปลาที่เป็นโฮสต์จะมีความเฉพาะเจาะจง (specific host) กับโกลคิเดียของหอยแต่ละชนิด โดยเกาะและฝังตัว (encystment) อยู่บริเวณเหงือกและครีบโดยรับสารอาหารผ่านทางน้ำเลือดของปลาและพัฒนาจนเกิดการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นระยะจูวีไนล์ (juvenile)จึงเคลื่อนออกจากตัวปลาตกลงสู่พื้นท้องน้ำแล้วดำรงชีวิตเป็นอิสระเพื่อเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยต่อไป (อรภา, 2543; Kondo, 1987; Pennak, 1989; Jessop, 1995; Conn, 2000) (ภาคผนวกที่ก4) แต่หอยสองฝาน้ำจืดในกลุ่ม Dreissenid เช่น *Dreissena polymorpha* มีความแตกต่างจากหอยสองฝาน้ำจืดทั่วไป เนื่องจากมีการปฏิสนธิเกิดขึ้นภายนอก (external fertilization) จึงมีตัวอ่อนที่ว่ายน้ำเป็นอิสระ (free swimming larva) (Sprung, 1991)

ระยะเวลาที่ใช้ในการพัฒนาจากไซโกตจนเปลี่ยนแปลงไปเป็นโกลคิเดียจะแตกต่างกันโดยขึ้นกับชนิดของหอยและอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญ (สุชาติ และคณะ, 2538) เช่น หอยมุกน้ำจืด *H.* (*L.*) *myersiana* ใช้เวลา 5-9 วัน (อรภา และคณะ, 2537; อรภา, 2543) *C. hainesiana* และ *H.* (*H.*) *bialatus* ใช้เวลา 6-10 วัน (อรภา และคณะ, 2537; ธวัชชัย และคณะ, 2546; อรภา, 2543) โดย *H.* (*H.*) *bialatus* ใช้เวลาเฉลี่ย 7.67± 1.30 วัน (ธวัชชัย และคณะ, 2546) ขณะที่อุณหภูมิของน้ำมีค่าเท่ากับ 24-25 องศาเซลเซียล เช่นในช่วงเดือนธันวาคมประมาณ 9-10 วัน แต่ถ้าอุณหภูมิของน้ำเพิ่มสูงขึ้นจะใช้เวลาประมาณ 5-6 วัน (อรภา และคณะ, 2537; ธวัชชัย และคณะ, 2546; อรภา, 2543)

3. โครงสร้างทางกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ *Hyriopsis* (*Hyriopsis*) *bialatus*

ลักษณะทางกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonad) ของหอยสองฝาน้ำจืด *H.* (*H.*) *bialatus* ทั้งเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะคล้ายกัน โดยเป็นอวัยวะที่มีขนาดใหญ่ ครอบคลุมพื้นที่ประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของ visceral mass มีตำแหน่งอยู่บริเวณเหนือแผ่นเท้า ใต้หัวใจ เนื้อเยื่อมีลักษณะอ่อนนุ่มสีเหลืองอ่อน อยู่ติดกับ digestive gland และห่อหุ้มส่วนของลำไส้ (intestine) บางส่วนไว้ จากการศึกษาพบว่าหอยสองฝาน้ำจืด *H.* (*H.*) *bialatus* เป็นหอยที่มีเพศแยก (dioecious) และไม่มีการเปลี่ยนเพศ (sex reversal) เมื่อดูดของเหลวภายในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ออกมาตรวจสอบเพศ พบว่าของเหลวที่ได้จากหอยเพศผู้จะมีลักษณะข้นหนืด สีขาวขุ่น ส่วนหอยเพศเมียของเหลวที่ได้จะค่อนข้างใส และมีความข้นหนืดน้อยกว่า นอกจากนี้ยังสามารถมองเห็นเซลล์ไข่เป็นจุดสีขาวขนาดเล็กกระจายอยู่ในของเหลว (ธวัชชัย, 2546)

4. โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยสองฝาน้ำจืด *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus*

อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ประกอบด้วยโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายถุง ซึ่งเป็นที่อยู่ของ germ cells ที่กำลังพัฒนา สามารถเรียกได้หลายแบบ เช่น acinus (Jones *et al*., 1986; Tompa *et al.,* 1984; Heard, 1975; Henley, 2002) follicle (Loosanoff, 1962), germinal follicle (Hodgson and Bernard, 1986) และ seminiferous tubule (Morton,1990) เป็นต้น สำหรับการศึกษาของ Chatchavalvanich *et al.* (2006) ใช้คำว่า acinus ในการเรียกโครงสร้างดังกล่าว อวัยวะสืบพันธุ์ของหอยสองฝาเพศผู้ *H.* (*H.*) *bialatus* ที่เรียกว่า acinus ภายในมี germ cells ซึ่งมีการพัฒนา 2 แบบ คือ แบบ typical spermatogenesis ประกอบด้วย spermatogonia, primary spermatocytes, secondary spermatocytes, spermatids และ spermatozoa และแบบ atypical spermatogenesis ซึ่งแบ่งการพัฒนาของ morulae เป็น 3 ระยะ คือ early stage (a few large spermatogonia), middle stage (spermatocytes) และ late stage (spermatids, spermatozoa) ที่พัฒนาอยู่ในระยะต่างๆ สำหรับ spermatid morulae ก็พบในหอยสองฝากลุ่ม Unionacea และหอยทะเลบางชนิด (Tompa *et al*., 1984) เช่น หอยสองฝาน้ำจืด *Prisodon alatus* (Matos *et al.,* 1998) หอยสองฝาน้ำเค็ม *Spisula solidissima* (Ropes, 1968) เป็นต้น จากการศึกษาของ Matos *et al.* (1998) พบ spermatid morulae ประกอบด้วย early spermatid ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มในจำนวนที่แตกต่างกัน ซึ่งพบตั้งแต่ 4-60 เซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่า spermatid morulae จะเจริญอยู่ในเซลล์พี่เลี้ยง (sertoli cell) มีหน้าที่ให้สารอาหารแก่ spermatid morulae เมื่อ

sertoli cell เกิดการสลาย spermatid morulae จะแยกออกมาเป็นอิสระ หลังจากนั้น spermatid ที่อยู่ใน spermatid morulae จะแยกตัวออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว และพัฒนาไปเป็น spermatozoa ในที่สุด โดย spermatogonia จะพบอยู่ที่ผนังของ acinus ส่วน germ cells ระยะอื่นจะเคลื่อนที่เข้าใกล้ lumen ของ acinus เล็กน้อย spermatozoa จะเคลื่อนออกจาก acinus ผ่านทางท่อนำอสุจิ (germinal duct) ที่ผนังบุด้วย ciliated columnar epithelium โดยท่อนำอสุจิจากหลาย acini จะมารวมเป็นท่อเดียวกัน

Chatchavalvanich *et al.* (2006) ได้ศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของ *H.* (*H.*) *bialatus* พบว่าอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของ *H.* (*H.*) *bialatus* ประกอบด้วยโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายถุง เรียกว่า acinus ภายในมีเซลล์ไข่ที่เจริญในระยะต่างๆ มี 5 ระยะดังนี้ คือ oocyte ระยะที่ 1 เซลล์มีขนาดเล็ก เจริญติดกับผนังของ acinus oocyte ระยะที่ 2 เซลล์เจริญยกตัวสูงขึ้นจากผนังของfollicle เซลล์มีขนาดเล็ก และไม่มี yolk granule ส่วน oocyte ระยะที่ 3 เซลล์มี yolk granule เล็กน้อย โดยอยู่ล้อมรอบนิวเคลียสของ oocyte ระยะที่ 4 เซลล์มี yolk granule กระจายทั่วเซลล์มองเห็นเป็น granule หยาบ และระยะที่ 5 เซลล์มีขนาดใหญ่ที่สุด โดยมี yolk granule อยู่เต็มเซลล์มองเห็น vitelline layer ชัดเจน และเซลล์อยู่ใกล้กับตรงกลาง lumen ของ acinus แต่ละ acinus จะเชื่อมต่อกับท่อนำไข่ (geminal duct) ซึ่งท่อนำไข่จะมีผนังบุด้วย ciliated columnar epithelium โดยท่อนำไข่จากหลาย acinus จะมารวมกันเป็นท่อเดียว และจากการศึกษาของ (Chatchavalvanich *et al.,* 2006) พบว่าการเจริญของ germ cells มีความคล้ายกับที่พบในหอย *Spisula solidissima* (Ropes, 1968) เซลล์ไข่ที่อยู่ในระยะแรกของการพัฒนาจะอยู่ชิดติดกับผนังของ acinus และยังมองเห็นส่วนของ stalk ไม่ชัดเจน ต่อมาเมื่อเซลล์เจริญขึ้นก็จะเห็นชัดเจนขึ้น เซลล์ไข่จะเจริญยื่นเข้าไปใน lumen ของ acinus และเมื่อถึงระยะสุดท้ายส่วนของ stalk จะคอดเล็กลงและขาดออกจากกัน ปล่อยให้เซลล์ไข่หลุดเข้าไปสู่ lumen ของ acinus เพื่อเตรียมขับออกมาจากอวัยวะสืบพันธุ์ ส่วนของ stalk ทำหน้าที่ในการลำเลียงสารอาหาร (storage granule หรือ nutritive granule) ไปสู่เซลล์ไข่

ขนาดเซลล์ไข่ของหอยสองฝาแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของหอย เซลล์ไข่ของ *H.* (*H.*) *bialatus* มีขนาดตั้งแต่ 14.72±3.90 x 19.92±4.35 ถึง 87.16±13.83 x 113.06±23.87 ไมโครเมตร (Chatchavalvanich *et al*., 2006) ในขณะที่ *H.* (*L.*) *myersiana* มีขนาดเฉลี่ย 117.5 ไมโครเมตร (Nagachinta and Meejui, 1998)

5. ฤดูกาลสืบพันธุ์

หอยทั้งเพศผู้และเพศเมียของ *H.* (*H.*) *bialatus* มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ตลอดทั้งปี ในหอยเพศผู้โครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์มีลักษณะคล้ายคลึงกันตลอดทั้งปี ยกเว้นในเดือนกันยายนและตุลาคม พบว่าภายใน acinus ประกอบด้วย nutritive granule เป็นจำนวนมาก พบ germ cells เป็นจำนวนน้อยกว่าเดือนอื่นๆ สำหรับในเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนมกราคม germ cells จะอยู่ในระยะ spermatid morulae เป็นจำนวนมากกว่าหอยที่ทำการศึกษาในเดือนอื่น ในส่วนของโครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์ที่พบในหอยเพศเมียมีลักษณะคล้ายกันในทุกเดือน ยกเว้นในเดือนกันยายนและตุลาคม ซึ่งภายใน follicle ประกอบด้วย nutritive granules เป็นจำนวนมาก เซลล์ไข่ที่อยู่ภายใน follicle อยู่กันอย่างแน่นทึบ จนทำให้มองเห็นช่องว่างระหว่างเซลล์ไข่ได้น้อย (ธวัชชัย, 2546)

6. เหงือก

เหงือกของหอยสองฝาน้ำจืดส่วนใหญ่ จะเป็นแบบ lamellibranch สามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ eulamellibranch และ filibranch โดย gill filament แบบ eulamellibranch จะมีการหักงอทางด้านท้อง (ventral) ทำให้เกิดรูปร่างคล้ายอักษร “v” แขนทั้งสองข้างของ v-shape จะเรียกชื่อต่างกันโดยพิจารณาจากตำแหน่งการยึดเกาะ ถ้ายึดเกาะกับแกนกลาง (central axis) เรียกว่า descending limb of gill filament และถ้างอขึ้นจากทางด้านท้องและยึดเกาะกับแมนเทิลหรือก้อนอวัยวะภายใน เรียกว่า ascending limb of gill filament และเนื่องจากด้านซ้ายและด้านขวาของลำตัวหอยประกอบด้วย gill filament ซึ่งมีรูปร่างคล้ายอักษร “v” สองอันมาเชื่อมกันที่แกนกลาง ทำให้เกิดเป็นรูปร่างคล้ายอักษร “w” (Pechenik, 1996; Pechenik,2005; Hickman *et al.,*2006) (ภาคผนวกที่ ก5) โดยมีการเชื่อมกันของ gill filament ที่อยู่ติดกันด้วย interfilamental ciliary junction และ interfilamental tissue junction สำหรับ filibranch ก็มีลักษณะโครงสร้างแบบเดียวกับ eulamellibranch ยกเว้น จะไม่มี water tube เหมือน eulamellibranch ซึ่ง interfilamental tissue junction เป็นแผ่นเนื้อเยื่อที่มีบางบริเวณไม่ต่อเนื่องกัน ทำให้เกิดเป็นช่องขึ้น ช่องดังกล่าวจะอยู่ระหว่าง gill filament เรียกว่า water canal (Gardiner *et al.,* 1991)หรือ interfilamental canal (Tankersley and Dimock, Jr, 1992) ช่องของท่อเปิดสู่ช่องแมนเทิล (mantal cavity) เรียกว่า ostium การเชื่อมกันของ gill filament ทำให้เกิดแถวของ ascending limb และ descending limb

ที่ต่อเนื่องกันคล้ายแผ่นเรียกแต่ละแผ่นว่า lamella โดย lamellae สองอันที่เกิดจากแถวของ ascending limb และ descending limb ที่อยู่ใกล้กัน จะประกอบเป็นแผ่นเหงือกแต่ละแผ่นซึ่งเรียกว่า demibanch ดังนั้นด้านซ้ายและด้านขวาของลำตัวหอยสองฝาน้ำจืดจึงประกอบด้วยแผ่นเหงือกสองแผ่น เรียกแผ่นเหงือกที่ติดกับ foot และ visceral mass ว่า inner demibranch และเรียกอีกแผ่นซึ่งติดกับแมนเทิลว่า outer demibranch แต่ละ demibranch จะมีการเชื่อมติดกันของ lamella ด้วยโครงสร้างที่เป็นแผ่นประกอบด้วยเนื้อเยื่อเพื่อให้เกิดความแข็งแรงของเหงือก เรียกว่า interlamellar septum หรือ interlamellar junction ทำให้เกิดการแบ่งเหงือกออกเป็นท่อจำนวนมาก เรียกแต่ละท่อว่า water tube แต่ละ water tube จะติดต่อกับช่องแมนเทิลโดย water canal นอกจากนี้ water tube แต่ละท่อจะเปิดรวมกันเข้าสู่ช่องทางด้านหลัง (dorsal) ซึ่งเรียกว่า suprabranchial chamber เซลล์เยื่อบุผิวของ gill filament ซึ่งเปิดสู่ช่องแมนเทิล มีการเปลี่ยนแปลงที่ซับซ้อน โดยมีโครงสร้างของซิเลีย (ภาคผนวกที่ ก6) ซึ่งสามารถจำแนกตามตำแหน่งได้ 3 ชนิด คือ frontal cilia, fronto-lateral cilia และ lateral cilia ทำหน้าที่ช่วยในการกรองอาหาร อาหารจะถูกส่งไปเป็นทอดๆ จนถึงเลเบียลพาล์พ (labial palp) ซึ่งพบว่าซิเลียบนเลเบียลพาล์พจะทำหน้าที่คัดเลือกขนาดอนุภาค แล้วส่งส่วนที่คัดเลือกขนาดแล้วผ่านร่องปากลงสู่ช่องปาก (Morton, 1983; Barnes, 1987) นอกจากนี้ Kays *et al.* (1990) พบว่าเนื้อเยื่อบุผิวของเหงือกหอย *Ligumia subrostrata* แต่ละ demibranch ประกอบด้วย ascending lamella, descending lamella และ central water cavity รอยพับทางด้านท้องส่วนหลังเป็นรอยพับเพื่อเกิดเป็นซี่เหงือก บริเวณใต้เยื่อบุผิวประกอบด้วยกล้ามเนื้อลายที่เรียงตัวในแนวเฉียง และเนื้อเยื่อประสาท พบ branchial nerve อยู่บริเวณ suprabranchial ซึ่งมีแขนงส่งไปบริเวณเหงือกด้านท้อง branchial nerve เชื่อว่ามีความสำคัญกับน้ำที่ไหลผ่านเหงือกและ นอกจากนี้ Gardiner *et al.* (1991) พบว่ากล้ามเนื้อที่พบในหอยสองฝาน้ำจืด *Anodonta grandis* และ *Ligumia subrostratag* เป็นกล้ามเนื้อลายที่เรียงตัวในแนวเฉียงซึ่งควบคุมการทำงานของ ostia นอกจากเหงือกของหอยสองฝาน้ำจืดจะทำหน้าที่แลกเปลี่ยนแก๊ส และกรองอาหาร (ภาคผนวกที่ ก7) ยังทำหน้าที่เป็นถุงเลี้ยงตัวอ่อนระยะโกลคิเดีย ที่เรียกว่า marsupia (สุชาติและคณะ, 2538; Kondo, 1987; Tompa *et al.,* 1984) โดยเหงือกที่เปลี่ยนไปเป็น marsupia จะมีการสร้างเป็นแผ่นกั้นแยกจาก water tube เดิม ที่เรียกว่า secondary septum เพื่อสร้างท่อน้ำใหม่ที่เรียกว่า secondary water tube ทำให้เห็นลักษณะท่อน้ำเป็นแบบ tripartite water tube หรือ tripartite organization (ภาคผนวกที่ ก8) ซึ่งประกอบด้วย primary water tube เรียงตัวอยู่แถวกลางระหว่าง secondary water tube และ primary water tube ทำหน้าที่เป็นถุงไข่ (ovisac) สำหรับตัวอ่อนระยะที่เรียกว่า โกลคิเดีย (Heard, 1975; Tompa *et al.*, 1984)

7. ระบบประสาท (Nervous system)

ระบบประสาทของหอยสองฝา (bivalve) จะมีส่วนประกอบที่สำคัญ คือ ปมประสาท (ganglion) สามคู่ ได้แก่ ปมประสาทเซรีโบรพลูรัล (cerebro-pleural ganglion) ปมประสาทวิสเซอรัล (visceral ganglion) และปมประสาทพีดัล (pedal ganglion) มีเส้นประสาทชนิดยาวสองคู่ โดยที่ตำแหน่งของปมประสาทเซรีโบรพลูรัลจะสามารถพบอยู่เหนือต่อหลอดอาหาร (esophagus) และเชื่อมต่อกันโดยเส้นประสาทขนาดเล็ก และจากปมประสาทเซรีโบรพลูรัลจะมีเส้นประสาททอดยาวสองคู่ คู่หนึ่งเชื่อมต่อระหว่างปมประสาทเซรีโบรพลูรัลและปมประสาทวิสเซอรัล ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ใต้กล้ามเนื้อแอดดักเตอร์บริเวณด้านหลังของหอย ส่วนอีกคู่หนึ่งเชื่อมต่อระหว่างปมประสาทเซรีโบรพลูรัลและปมประสาทพีดัลซึ่งอยู่ในแผ่นเท้า (foot) ของหอย ปมประสาทหอยสองฝานี้จะสามารถสังเกตเห็นได้ค่อนข้างชัดเจนเนื่องจากมีสีค่อนข้างเหลืองหรือสีส้มสด (White, 1937) ดังเช่นที่เคยรายงานในหอย geoduck clam (*Panopea abrupta*) และ blue mussel (*Mytilus edulus*) ปมประสาทเซรีโบรพลูรัลมีหน้าที่ควบคุมการทำงานของเลเบียลพัลพ์ (labial palp) กล้ามเนื้อแอดดักเตอร์ส่วนหน้า ทางด้านหน้าบางส่วนของแมนเทิล (mantle) และอวัยวะรับความรู้สึก (sense organ) ที่เรียกว่า สตาโทซิสต์ (statocyst) และออสเฟรเดียม (osphradium) ในขณะที่ปมประสาทพีดัลมีหน้าที่ควบคุมการทำงานของแผ่นเท้า และปมประสาทวิสเซอรัลมีหน้าที่ควบคุมการทำงานของเหงือก หัวใจ เยื่อหุ้มหัวใจ (pericardium) กล้ามเนื้อแอดดักเตอร์ส่วนหลัง แมนเทิลและอวัยวะรับความรู้สึกบริเวณแมนเทิลและไซฟอน (siphon) ในหอยสองฝาชั้นสูง เช่น *Pecten muller, Spondylus linnaeus* และ *Lima bruguiere* ปมประสาทวิสเซอรัลมีการรวมตัวกับปมประสาทเซรีโบรพลูรัลประกอบกันเป็นศูนย์กลางระบบประสาทหรือสมอง (สุชาติ และคณะ, 2538; White, 1937) จากการศึกษาเกี่ยวกับสารสื่อประสาทในระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system ; CNS) ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิดโดยวิธี Immunohistochemistry ผลการศึกษาพบสารสื่อประสาทชนิดซีโรโทนินในระบบประสาทส่วนกลางของหอย *Neanthes japonica* (Annelida), *Helice tridens* (Arthropoda), *Limax marginatus* (Mollusca) (Fujii and Takeda, 1988) และ *Tritonia diomedea* and *Aplysia californica* (Fickbohm *et al*., 2001)

8. Neurotransmitter , Neurosecretory cell และ Neurohormone

ระบบประสาทมีการส่งสัญญาณไปยังเซลล์เป้าหมาย (target organs) โดยผ่านทางตัวเซลล์และเส้นใยประสาทโดยอาศัยสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ที่มีลักษณะการสั่งงานที่รวดเร็วฉับไว (rapid action) ให้ผลในระยะสั้นและเป็นการส่งสัญญาณแบบจำเพาะเจาะจง (specific signal) คุณสมบัติที่เด่นชัดของ neurotransmitter คือ เป็นสารเคมีที่สร้างจากเซลล์ประสาทหรือตัวประสาทแล้วถูกขนส่งไปเก็บไว้ที่ปลายประสาท เมื่อมีการถูกกระตุ้นสารสื่อประสาทนี้ก็จะถูกหลั่งออกจากปลายประสาทเพื่อเป็นตัวนำสัญญาณประสาทผ่านจุดเชื่อมต่อของปลายประสาทที่ เรียกว่า ซินแนปส์ (synapse) หรือช่องว่างระหว่างเซลล์ประสาทกับเซลล์กล้ามเนื้อ (neuromuscular junction) หรือเซลล์ประสาทกับเซลล์ประสาท (Brown, 1991; Kandel *et al.*, 2000) เราสามารถแบ่งซินแนปส์ได้เป็น 2 ชนิด คือ chemical synapse และ electrical synapse ซินแนปส์ที่พบในระบบประสาทส่วนใหญ่จะเป็น chemical synapse ซึ่งมีสารเคมีเป็น neurotransmitter เป็นตัวสั่งการ แต่สำหรับ electrical synapse ไม่ต้องอาศัยสารเคมีใดๆ เป็นสื่อในการส่งสัญญาณประสาท ปกติการสื่อสัญญาณประเภทนี้จะเกิดที่ gap junction ระหว่างเซลล์ประสาทสองตัวและเหนี่ยวนำให้เกิดแอคชั่นโพเทนเชียล (action potential) ขึ้นในเซลล์ประสาทที่อยู่ถัดไป ทำให้เซลล์ประสาททั้งกลุ่มทำงานพร้อม ๆ กัน ผลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการการส่งสัญญาณประสาท ถ้าผลรวมออกมาเป็น depolarization จะมีผลกระตุ้นจนถึงระดับ เทรดโฮลด์ (threshold) ก็จะเกิดแอคชั่นโพเทนเชียล แต่ถ้าผลรวมออกมาเป็น hyperpolarization จะมีผลไปยับยั้ง post-synaptic membrance และไม่มีแอคชั่นโพเทนเชียลเกิดขึ้น เนื่องจากตัวเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทไวต่อการกระตุ้น คือมี excitability สูง ซึ่งในภาวะปกติเส้นใยประสาทจะมีความต่างศักย์ไฟฟ้าเกิดขึ้นระหว่างภายในและภายนอกเมมเบรน (membrane) ที่หุ้มอยู่ โดยภายในเส้นใยประสาทจะมีโปตัสเซียมไอออน (K^+) ในปริมาณความเข้มข้นที่สูง และมีโซเดียมไอออน (Na^+) รวมถึงแคลเซียมไอออนในปริมาณที่ต่ำ ส่วนภายนอกจะมีความเข้มข้นกลับกันกับภายในกล่าวคือจะมีโปตัสเซียมไอออน (K^+) ในปริมาณความเข้มข้นที่ต่ำ และและมีโซเดียมไอออน (Na^+) รวมถึงแคลเซียมไอออนในปริมาณที่สูง จึงเรียกภาวะปกตินี้ว่า ศักย์ไฟฟ้าในระยะพัก(resting membrance potential) ซึ่งมีค่าประมาณ -70 ถึง -90 มิลลิโวลท์ เมื่อถูกกระตุ้นแรงพอถึงจุดๆ หนึ่งที่เรียกว่า เทรดโฮลด์ จะทำให้ช่องจำเพาะต่อโซเดียม (Na^+ channel) ที่เยื่อหุ้มเซลล์เปิดออกทำให้โซเดียมไอออนวิ่งเข้าสู่เซลล์ส่งผลให้เกิด depolarization หลังจากนั้นจะเกิดการเปิดของช่องโปตัสเซียมไอออน (K^+channel) ทำให้โปตัสเซียมไอออนวิ่งออกจากเซลล์ส่งผลให้เกิด repolarization การเปลี่ยนแปลงของความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (membrance potential) เรียกว่า แอคชั่นโพเทนเชียล และความแรงของการกระตุ้นที่น้อยที่สุดที่ทำ

ให้เกิดแอคชั่นโพเทนเชียล เรียกว่า เทรดโฮลด์ ถ้าความแรงของศักย์ไฟฟ้ามีค่าน้อยกว่าเทรดโฮลด์ จะไม่มีแอคชั่นโพเทนเชียลเกิดขึ้น แต่ถ้าใช้ความแรงสูงกว่าเทรดโฮลด์ก็จะเกิดแอคชั่นโพเทนเชียลที่มีขนาดเท่ากันกับตอนกระตุ้นด้วยแรงเท่าเทรดโฮลด์ จึงเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า all or none law ในขณะเกิดแอคชั่นโพเทนเชียลจะมีการผ่านของโซเดียมไอออนและโปตัสเซียมไอออน คลื่นประสาทที่เกิดขึ้นจุดหนึ่งจะชักนำให้จุดถัดไปเกิดคลื่นใหม่ต่อเนื่องกันแบบลูกโซ่ จึงคล้ายกับว่าคลื่นประสาทวิ่งไปเรื่อยๆ ตามแอกซอน (axon) ตัวเซลล์ (cell body) และเดนไดรท์ (dendrite) ซึ่งทำหน้าที่แปลงพลังงานรูปต่างๆ ให้เป็นสัญญาณประสาท โดยส่วนที่นำคลื่นประสาทส่งไปปลายประสาทที่มีสารสื่อประสาท อยู่ คือ แอกซอน การกระตุ้นผ่านแอกซอนดังกล่าวจะส่งผลให้เกิดการหลั่งของ neurotransmitter ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด มีตั้งแต่ขนาดเล็ก ตัวอย่างเช่น acetylcholine (Ach), norepinephrine (NE), serotonin (5-HT), dopamine (DA) และกรดอะมิโนหลายชนิด เช่น glycine (Gly), glutamate (Glu) รวมไปจนถึงโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น substance P, vasopressin เป็นต้น (กาญจนา, 2536; Brown 1991; Kandal *et al*., 2000 and Squire, 2003)

คุณสมบัติของ neurotransmitter มีดังนี้ คือ

1. neurotransmitter ถูกสร้างจากเซลล์ประสาทหรือตัวประสาทและถูกส่งไปเก็บไว้ที่ปลายประสาทที่เรียกว่า presynaptic membrane หรือ boutanque

2. ที่ presynaptic element หรือตัวประสาทจะประกอบด้วย สารตั้งต้น (precursor) สารตัวกลาง (intermediate) และเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์รวมทั้งกลไกการหลั่งของสารสื่อจาก presynaptic membrane

3. เมื่อกระตุ้นเส้นประสาทจะมีการปลดปล่อยสารสื่อออกมาใน synaptic cleft

4. มีกลไกในการทำลาย neurotransmitter

เมื่อมีการส่งผ่านแอคชั่นโพเทนเชียลมาถึงปลายประสาท จะเกิดกระบวนการถ่ายทอดสัญญาณประสาทโดยอาศัย neurotransmitter ซึ่งมีขั้นตอนย่อๆ ดังนี้คือ

1. การสังเคราะห์ (synthesis) neurotransmitter จะถูกสร้างภายใน presynaptic neurons จากสารเริ่มต้น โดยอาศัยเอนไซม์ที่อยู่ในเซลล์ประสาทนั้น

2. การเก็บ (storage) neurotransmitter ที่ถูกสร้างจะถูกเก็บไว้ในรูปของ synaptic vesicles เพื่อป้องกันการทำลายโดยเอนไซม์ ซึ่ง vesicles อาจมีรูปร่างแตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิด

3. การปลดปล่อย (release) neurotransmitter จะถูกปล่อยจากปลายประสาทด้วยวิธี exocytosis โดยอาศัยการเหนี่ยวนำจากแคลเซียมไอออน (Ca^{++}) เมื่อสัญญาณประสาทมาถึงปลายเส้นประสาทจะทำให้ความไวของเยื่อหุ้มเซลล์ (permeability) ต่อแคลเซียมไอออนเพิ่มขึ้น แคลเซียมไอออนจากภายนอกจะเคลื่อนเข้าสู่ปลายประสาททำให้ vesicles เคลื่อนที่ไปยังเยื่อหุ้มเซลล์บริเวณซินแนปส์ ผนังของ vesicles จะหลอมรวมกันกับเมมเบรนของปลายประสาท (fusion) แล้วปล่อยส่วนประกอบภายในของ vesicles ลงสู่ synaptic cleft

4. การออกฤทธิ์ (action) neurotransmitter ที่หลั่งออกมาจะเคลื่อนผ่าน synaptic cleft ไปจับกับ receptor บน post-synaptic membrane มีผลกระตุ้นหรือยับยั้งขึ้นอยู่กับชนิดของ neurotransmitter หรือ post-synaptic elements

5. การทำลายฤทธิ์ (termination of action) การทำลายฤทธิ์ของ neurotransmitter จะกระทำโดยการดูดกลับ (re-uptake), การทำลายโดยเอนไซม์ (hydrolysis), การแพร่ (diffusion) (ยุวดี และคณะ, 2532; Kandel and Schiwartz, 1985; Squire *et al*., 2003)

เป็นที่ทราบว่า neurosecretory cell คือ เซลล์ประสาทที่เปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่ในการสร้าง hormones ที่เรียกว่า neurohormone หรือ neurosecretion หรือ neurohumor ซึ่งถูกสังเคราะห์เช่นเดียวกับการสร้างโปรตีนอื่นๆ โดยผ่าน rough endoplasmic reticulum (RER) และ golgi complex ซึ่งจะถูกบรรจุในรูปของถุงที่ภายในบรรจุสารที่เรียกว่า neurosecretory granules (NSG) (Maddrell and Nordmann , 1979; Brown, 1991; Reunova *et al.,* 1997) ซึ่งเป็นระบบสื่อสารภายในร่างกายที่ทำหน้าที่ควบคุมเชื่อมโยงติดต่อประสานกับการทำงานของระบบต่างๆ ภายในร่างกาย มีลักษณะการทำงานที่ค่อนข้างช้าแต่มีผลการทำงานนาน เนื่องจากการทำงานของอวัยวะบางอย่างไม่สามารถเปลี่ยนแปลงหรือเกิดผลได้อย่างฉับพลันทันทีตามที่ร่างกายต้องการ เช่น การเจริญเติบโตของร่างกาย การผลิตน้ำนม ต้องอาศัยเวลาจึงเกิดผลให้เห็นได้ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงการ

ทำงานของอวัยวะเหล่านี้เกิดขึ้นได้โดยสัญญาณเคมี ที่เรียกว่า ฮอร์โมน (hormones) ในที่นี้ neurohormone ก็คือฮอร์โมนประเภทหนึ่ง ซึ่งจะถูกนำไปสู่อวัยวะต่างๆ ทั่วร่างกาย โดยอาศัยระบบไหลเวียนของเลือด เนื่องจากไม่มีท่อนำออกมาโดยตรงจากปมประสาท นอกจากนี้อวัยวะบางอวัยวะเท่านั้นที่จะตอบสนองต่อฮอร์โมนซึ่งเรียกอวัยวะเหล่านี้ว่า อวัยวะเป้าหมายของแต่ละฮอร์โมน โดยปกติสารที่ทำหน้าที่เป็นฮอร์โมนจะมีการควบคุมตัวเอง (self regulation) ให้อยู่ในระดับคงที่หรือเปลี่ยนแปลงตามความเหมาะสมกับสภาวะต่างๆ ของร่างกายดังที่กล่าวข้างต้น โดยมีการควบคุมที่ neurosecretory cell ซึ่งเป็นแหล่งผลิต neurohormone (เลียงชัย และคณะ, 2525; Brown,1991; Reunova et al., 1997)

9. ซีโรโทนิน (Serotonin)

ซีโรโทนินเป็น neurotransmitter ในกลุ่ม biogenic amine ในมนุษย์ซีโรโทนินที่ถูกสร้างมาจากระบบประสาทส่วนกลาง โดยเริ่มจากกรดอะมิโน tryptophan ผ่านกระบวนการเติมหมู่-OH ที่เรียกว่า hydroxylation ไปเป็น 5-hydroxytryptophan (5-HTP) โดยเอ็มไซม์ tryptophan hydroxylase ซึ่งอาศัยออกซิเจนและ biopterin เป็น cofactor แล้วจึงถูกเปลี่ยนไปเป็น 5-hydroxytryptamine (5-HT) โดยเอ็มไซม์ 5-HTP decarboxylase ซึ่งเป็น aromatic L- amino acid decarboxylase ตัวหนึ่ง มี pyridoxal เป็น cofactor (ยุวดี และคณะ, 2532) (ภาคผนวกที่ ก9 กับ ก10) ตำแหน่งที่พบว่ามีปริมาณของซีโรโทนินอยู่มากในมนุษย์ คือใน CNS สำหรับในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น freshwater snail, *Biomphalaria glabrata* สามารถพบซีโรโทนินได้ใน CNS เช่นกัน (Santhanagopalan and Yoshino, 2000), chilean scallop, *Argopecten purpuratus* พบใน ganglia (Martinez and Rivera, 1994) ซีโรโทนินที่พบในCNS ของมนุษย์มีบทบาทในการควบคุมด้านอารมณ์ การอยากอาหาร (appetite) การเกิดโรคซึมเศร้า (depression) และโรคไมเกรน การกระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบในลำไส้ให้เกิดการบีบตัวเพื่อการเคลื่อนที่ของอาหาร การบีบตัวของหลอดเลือด ส่วนในหอยซีโรโทนินมีผลให้เกิดการเคลื่อนที่ (locomotion) เช่น terrestrial snail, *Helix lucorum* (Pavlova, 2001) และในกุ้งขาว (white shrimp) *Penaeus vannamei* มีบทบาทเกี่ยวกับ ovarian maturation และการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (Vaca and Alfaro, 2000) บทบาทของซีโรโทนินในระบบสืบพันธุ์ของหอยได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการกระตุ้นให้เกิด spawning โดยใช้ซีโรโทนินฉีดเข้าไปที่ gonad ในหอย surf clams, *Spisula solidissima, Spisula sachalinensis* ส่งผลให้เกิดการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในเพศเมียที่ถูกฉีดด้วยฮอร์โมนทั้งหมด (Hirai *et al.*, 1988) และในหอย window-pane shell, *Placuna placenta* ซีโรโทนินมีผลทำให้เกิดการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในเพศเมีย

โดยปล่อยไข่ออกมาจำนวนมากถึง $1.57x10^6$ ตัว ในหอย pismo clam (*Tivela stultoru*) ฮอร์โมนชนิดนี้มีผลทำให้เกิดการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย (Alvarado-Alvarez *et al.,* 1996), การกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์สืบพันธุ์ในเพศเมีย (ovarian maturation) ในหอย *Spisula solidissima, Spisula sacha-linensis* (Hirai *et al.,* 1988) และการเกิดการปล่อยตัวอ่อนใน freshwater mussel, *Anodonta cygnea* (Cunha and Machado, 2001) เป็นต้น

10. Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs)

Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs) เป็นยาที่รู้จักแพร่หลายในสรรพคุณการรักษาโรคซึมเศร้า (depression) ซึ่งมีอยู่หลายชนิด ยาเหล่านี้มีบทบาทในการเพิ่มระดับของซีโรโทนิน โดยการที่ SSRIs เช่น fluoxetine (ภาคผนวกที่ ก11) ซึ่งเป็น biogenic amine transport inhibitor (Sigma-Aldrich, 2008) ไปจับกับโปรตีนชื่อ 5-HT transport (SERT) ทำให้ซีโรโทนินไม่จับกับ SERT เป็นผลให้มีระดับของซีโรโทนินสูงขึ้น (Squire, 2003) สำหรับตัวยากลุ่มดังกล่าวที่ใช้ศึกษาในหอยที่นิยม คือ fluoxetine มีชื่อทางการค้าว่า nodep or prozac, fluvoxamine ซึ่งมีชื่อทางการค้าว่า dumyrox or luvox และ paroxetine มีชื่อทางการค้าว่า paxil มีรายงานว่า SSRIs ทำให้เกิดการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเพศผู้เพศเมียใน *Dreissena polymorpha* โดยการทดลองเลี้ยงที่อุณหภูมิ 22-25 ^{o}C ใช้น้ำในทะเลสาบ หลังจากนั้นจึงใส่ยาทั้งสามชนิด (fluoxetine, fluvoxamine และparoxetine) ลงไปในน้ำ โดย fluvoxamine ใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-5}- 10^{-11}M , fluoxetine ความเข้มข้น 10^{-2}- 10^{-8}M และ paroxetine ที่ความเข้มข้น 10^{-3}- 10^{-8}M โดยเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ ซีโรโทนินที่ความเข้มข้นที่ 10^{-3}M (positive control) และ น้ำทะลสาบ หรือ 0.1% ETOH (negative control) ผลการทดลองพบว่า fluvoxamine ให้ผลการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ดีที่สุด คือได้ 100% ของทั้งสองเพศที่ความเข้มข้น 10^{-5}- 10^{-6}M รองลงมาเป็น fluoxetine และ paroxetine ตามลำดับ (Fong, 1998) การศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการ parturition ของหอยได้มีรายงานจากการศึกษาของ Cunha and Machado (2001) โดยได้ทำการทดลองในหอยเพศเมีย (gravid female) *Anodonta cygnea* ที่มีตัวอ่อนฝังตัวในเหงือก โดยได้ทดสอบความเข้มข้นของ fluoxetine และ fluvoxamine ที่แตกต่างกัน คือ 10^{-2}- 10^{-9}M พบว่าความเข้มข้นที่ 10^{-6}M ของ fluoxetine เหมาะสมที่สุด ทำให้เกิดการปล่อยตัวอ่อนทั้งหมดในช่วงเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากการฉีด อีกทั้งมีการใช้ความเข้มข้นนี้ทดสอบที่สภาวะต่างๆกัน คือ แสง, pH และ อุณหภูมิ ได้ผลว่าที่สภาวะมี fluoxetine และใช้แสงจะมีการเหนี่ยวนำให้เกิดการปล่อยตัวอ่อนได้ 100% สำหรับยา fluvoxamine ให้ผลดีที่สุดในช่วงเวลาชั่วโมงที่ 18

หลังจากการฉีดและให้ประสิทธิผลของยาเพียง 20% และที่อุณหภูมิ 0, 10 ^{o}C ไม่เหนี่ยวนำให้เกิดการปล่อยตัวอ่อน และ ที่ pH 5 และ 9 เกิดการเหนี่ยวให้ปล่อยตัวอ่อนประมาณ 10% เท่านั้น

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างหอยสองฝาน้ำจืด

เก็บตัวอย่างหอยสองฝาน้ำจืด *Hyriopsis* (*Hyriopsis*) *bialatus* Simpson, 1900 ระยะตัวเต็มวัย จากบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ นำหอยที่เก็บได้มาแยกเพศ โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.1 ใช้คีมเปิดเปลือกหอยเปิดให้ฝาหอยแยกห่างจากกันประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร แล้วนำลิ่มสอดระหว่างฝาทั้งสองด้าน เพื่อป้องกันการปิดเปลือกหอย จากนั้นใช้กระบอกฉีดยา (syringe) ขนาด 1 มิลลิลิตร ติดกับเข็มเบอร์ (No.) 18 ดูดเอาของเหลวที่อยู่ภายใน visceral mass ซึ่งเป็นตำแหน่งที่อยู่ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonad) ออกมาในปริมาณเล็กน้อยประมาณ 0.1 มิลลิลิตร แล้วนำไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อแยกเพศ ในหอยเพศเมียจะพบเซลล์ไข่ส่วนหอยเพศผู้จะพบอสุจิ ทำเครื่องหมายแสดงเพศบนเปลือกหอย

1.2 นำหอยมุกน้ำจืดที่แยกเพศแล้ว ใส่ในภาชนะเลี้ยงหอยทรงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 เซนติเมตร สูง 50 เซนติเมตร ภาชนะละ 30 ตัว โดยใส่หอยเพศผู้ 15 ตัว และเพศเมีย 15 ตัว หลังจากนั้น นำไปแขวนเลี้ยงที่แพเลี้ยงหอยที่ระดับความลึก 1.5 เมตร ภายในบ่อดิน 5ไร่ ของภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การศึกษาโครงสร้างทางกายวิภาคและจุลกายวิภาคของระบบประสาท

2.1 นำหอยเพศผู้และเพศเมียจากข้อ1 มาสลบด้วยน้ำแข็ง จากนั้นตัดเอาส่วนของ ชิ้นเนื้อเยื่อของ cerebropleural ganglion, pedal ganglion และ visceral ganglion ออกจากตัวหอย แล้วนำไปแช่ในน้ำยาคงสภาพ (fixative) Bouin's solution เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างน้ำยาคงสภาพออกด้วย 70% Ethyl alcohol (EtOH) 3-4 ครั้ง จากนั้นจึงเก็บ cerebropleural ganglion, pedal ganglion และ visceral ganglion ไว้ใน 70% EtOH

2.2 นำเนื้อเยื่อไปผ่านการทำ paraffin technique โดยดึงน้ำออกด้วย EtOH เริ่มจาก 70%, 80% 95% และ 100% EtOH ตามลำดับ ตามด้วยการทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing) ด้วย xylene

จากนั้นจึงใช้วิธีการซึมแทรก (infiltration) และฝังตัวอย่าง (embedding) แล้วนำไปตัด (sectioning) ด้วยเครื่อง microtrome โดยใช้ความหนา 5 ไมโครเมตร

2.3 หลังจากนั้นจึงนำไปย้อมสี Harris's hematoxylin and eosin (Sheehan and Hrapchak, 1980)

3. การศึกษาโครงสร้างทางกายวิภาคและจุลกายวิภาคของเหงือก

ดำเนินการเตรียมเนื้อเยื่อเช่นเดียวกับข้อ 2.1, 2.2 และ 2.3 แต่เปลี่ยนมาเป็นเหงือกแทน

4. การศึกษาตำแหน่งการสร้างซีโรโทนินในระบบประสาทด้วยวิธี Immunoperoxidase และ Immunofluorescence

4.1 การเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับวิธี Immunoperoxidase มีขั้นตอนดังนี้

4.1.1 ดำเนินการเตรียมเนื้อเยื่อเช่นเดียวกับข้อ 2.1 และ 2.2

4.1.2 นำชิ้นเนื้อเยื่อของ ganglia ทั้งสามที่ผ่านการตัดมาทำ deparaffinized โดยแช่ใน xylene 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที หลังจากนั้น rehydration ด้วย 100% EtOH 5 นาที ตามด้วย 95% EtOH 5 นาที

4.1.3 เตรียม 1% H_2O_2 ละลายใน 70% EtOH ให้เตรียมก่อนใช้ หลังจากนั้นจึงแช่ชิ้นเนื้อเยื่อจากข้อ 4.1.2 โดยเขย่าเบา ๆ ด้วย shaker เป็นเวลา 20 นาที

4.1.4 นำชิ้นเนื้อเยื่อมาใส่ใน 1% litium carbonate ที่ละลายใน 70% EtOH เป็นเวลา 5 นาที และย้ายมาลงใน 70% EtOH เป็นเวลา 5 นาที ตามลำดับ หลังจากนั้น จึงแช่ลงใน 300 mM glycine ที่ละลายใน distilled water โดยเขย่าเบา ๆ ด้วย shaker เป็นเวลา 15 นาที

4.1.5 แช่ชิ้นเนื้อเยื่อใน 1% TritonX-100 ที่ละลายใน 0.1 M Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 เขย่าเบา ๆ ด้วย shaker เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นจึงนำชิ้นเนื้อมาหยดด้วย 4% BSA (Bovine serum albumin) ให้ท่วมชิ้นเนื้อเยื่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4.1.6 เตรียม primary antibody (1^{o}Ab) โดยใช้ rabbit polyclonal anti-5-HT (Zymed) หยดให้ท่วมชิ้นเนื้อเยื่อ แล้วนำชิ้นเนื่อเยื่อที่ใส่ 1^{o}Ab และชิ้นเนื่อเยื่อที่ไม่ใส่ 1^{o}Ab (control section) ไปเก็บที่ 4 ^{o}C นาน 24 ชั่วโมง

4.1.7 ล้าง 1^{o}Ab ด้วย 0.1% Tween 20 ที่ละลายใน 0.1M PBS pH 7.4 (PBST) 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วจึงหยด goat anti–rabbit with HRP (secondary antibody) ความเข้มข้น 1:500 ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง และล้าง secondary antibody ออกด้วย PBST 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

4.1.8 นำชิ้นเนื้อเยื่อมาย้อมด้วยสารละลาย 3, 3'-Diaminobenzidine (DAB) ที่ประกอบด้วย DAB 0.025 g, 30% H_2O_2 15 µl , immidazole 587.5 µl ละลายใน 0.1 M PBS pH 7.4 แล้วนำไปแช่ในน้ำกลั่น 5 นาที และ counter stained ด้วย hematoxylin (Modified from Panasophonkul, 2006)

4.1.9 นำชิ้นเนื้อเยื่อมา running water 15 นาที หลังจากนั้น dehydration จาก 70%, 95% ครั้งละ 5 นาที และ 100% EtOH 1 นาที แล้วนำไปแช่ใน xylene 5 นาที 3 ครั้ง และ mount slide และบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิตอล E600

4.2 การเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับวิธี Immunofluorescence มีขั้นตอนดังนี้

4.2.1 นำหอยเพศผู้และเพศเมียจากข้อ1 มาสลบด้วยน้ำแข็ง จากนั้นตัด visceral ganglion ออกจากตัวหอย แล้วนำไปแช่ในน้ำยาคงสภาพ (fixative) 4% paraformaldehyde ที่ละลายใน 0.1M PBS pH 7.4 ที่ 4 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย 0.1 M PBS 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที แล้วจึงแช่ใน 0.1% sodium azide ละลายใน 0.25% Triton X-100 ใน 0.1 M PBS ($PBST_{0.25\%}$) ทิ้งไว้ 1 คืนที่ 4 ^{o}C (Soonthornsumrith, 2006)

4.2.2 นำ visceral ganglion มาล้างด้วย $PBST_{0.25\%}$ 6 ครั้งๆละ 1 ชั่วโมง

4.2.3 จากนั้น dehydration ด้วย 0.1 M PBS 2 ครั้งๆ ละ 12 นาที และ 50%, 70%, 80%, 90%, 95% และ 100% EtOH ความเข้มข้นละ 12 นาที ตามลำดับ

4.2.4 แล้วนำมาแช่ใน Dent's solution (80% EtOH และ 20% DMSO) ที่ -20^{o}C เป็นเวลา 30 นาที

4.2.5 นำมา rehydration ด้วย EtOH จาก 100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 50% ความเข้มข้นละ 12 นาที และ 0.1 M PBS 2 ครั้งๆ ละ 12 นาที

4.2.6 เตรียม primary antibody (1^{o}Ab) โดยใช้ rabbit polyclonal anti-5-HT (Zymed) ความเข้มข้น 1: 200 ที่ละลายใน 0.1% sodium azide ใน $PBST_{0.1\%}$ เพื่อทดสอบกับ visceral ganglion โดยเอา visceral ganglion ใส่แช่ลงไปและเก็บที่ 4 ^{o}C เป็นเวลา 4 วัน (เทียบกับ control section ที่ไม่ใส่ 1^{o}Ab)

4.2.7 นำ visceral ganglion มาล้างด้วย $PBST_{0.1\%}$ 6 ครั้งๆ ละ 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงเตรียม Alexa 488-conjugated goat anti- rabbit IgG (secondary antibody) ที่มีความเข้มข้น 1: 200 ที่ละลายใน 0.1% sodium azide ใน $PBST_{0.1\%}$ ผสมกับ Topro-3 ที่มีความเข้มข้น 1:500 เก็บที่ 4 ^{o}C เป็นเวลา 1 วัน

4.2.8 แล้วนำมาล้างด้วย $PBST_{0.1\%}$ 6 ครั้งๆ ละ 1 ชั่วโมง

4.2.9 ทำ dehydration เหมือนข้อ 4.2.3 แต่ที่ 100% EtOH ใช้ความเข้มข้นนี้ 2 ครั้งๆละ 12 นาที หลังจากนั้นนำมาแช่ใน methyl salicylate 5 นาที และดูด้วย confocal laser scanning microscope (CLSM) Olympus FV 1000

4.3 ย้อมด้วยสีพิเศษ (Gomori's paraldehyde-fuchsin staining, PAF) ดูที่ภาคผนวก ข

5. การหาปริมาณความเข้มข้นของซีโรโทนินต่อการเกิดการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ใน *H.* (*H.*) *bialatus* เพศเมีย

5.1 หอยเพศเมียระยะตัวเต็มวัยจำนวน 6 ตัว ที่มีความยาวเฉลี่ย 9.76 ± 0.63 เซนติเมตร ความกว้างเฉลี่ย 5.10 ± 0.40 เซนติเมตร ความสูงเฉลี่ย 2.36 ± 0.23 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 60.30 ± 14.04 กรัม โดยคัดเลือกหอยที่ยังไม่มีการพัฒนาตัวอ่อนมาใส่ในภาชนะที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ความสูง 10 เซนติเมตร ซึ่งมีน้ำบ่อ จำนวน 5 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 ^{o}C นาน 30 นาที หลังจากนั้นจึงแบ่งหอยออกเป็น 3 กลุ่ม (treatment) คือ กลุ่มทดลอง จำนวน 4 ตัว กลุ่ม injected control จำนวน 1 ตัว และกลุ่มควบคุม จำนวน1 ตัว ใช้หอยเพศเมียทั้งหมด 30 ตัว

5.2 นำหอยของกลุ่มทดลองมาทดสอบปริมาณความเข้มข้นของซีโรโทนิน โดยฉีดซีโรโทนินความเข้มข้น 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, และ 10^{-6} M ความเข้มข้นละ 0.2 มิลลิลิตร โดยละลายใน Ringer's solution ตามลำดับ ที่ visceral mass บริเวณ gonad หลังจากนั้นนำกลุ่ม injected control มาฉีดด้วย Ringer's solution และกลุ่มควบคุมไม่ฉีดสาร

5.3 นำหอยจาก ข้อ 5.2 มาเลี้ยงรวมกัน พร้อมทั้งใส่หอยเพศผู้ในกลุ่มทดลอง จำนวน 4 ตัว กลุ่ม injected control จำนวน 1 ตัว และกลุ่มควบคุม จำนวน 1 ตัว ใช้หอยเพศผู้ทั้งหมด 30 ตัว หลังจากนั้นนำหอยทั้งหมดใส่ตะกร้าแล้วนำไปแขวนที่แพเลี้ยงหอย

5.4 ตรวจผลการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของเพศเมีย โดยดูจากการพัฒนาของตัวอ่อนภายในเหงือก ซึ่งสังเกตสีของระยะตัวอ่อนที่บริเวณเหงือกทุกๆ 3 วัน

5.5 แต่ละกรรมวิธี (treatment) ทำการทดลอง 5 ซ้ำ

6. การหาปริมาณความเข้มข้นของซีโรโทนิน และ fluoxetine (SSRIs) ต่อการเกิดการปล่อยตัวอ่อนใน *H.* (*H.*) *bialatus* เพศเมีย มีขั้นตอนดังนี้

6.1 นำหอยเพศเมียที่มีตัวอ่อนระยะโกลคิเดีย (gravid females) จำนวน 6 ตัว ความยาวเฉลี่ย 9.83 ± 0.57 เซนติเมตร ความกว้างเฉลี่ย 5.11 ± 0.35 เซนติเมตร ความสูงเฉลี่ย 2.36 ± 0.22 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 60.92 ± 12.25 กรัม โดยคัดเลือกหอยมาใส่ในภาชนะที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ความสูง 10 เซนติเมตร ซึ่งมีน้ำบ่อ จำนวน 5 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 ^{o}C นาน 30 นาที หลังจากนั้นจึงแบ่งหอยออกเป็น 3 กลุ่ม (treatment) คือ กลุ่มทดลอง จำนวน 4 ตัว กลุ่ม injected control จำนวน 1 ตัว และกลุ่มควบคุม จำนวน 1 ตัว ใช้หอยเพศเมียทั้งหมด 60 ตัว

6.2 นำหอยของกลุ่มทดลองมาทดสอบปริมาณความเข้มข้นของซีโรโทนิน โดยฉีดซีโรโทนิน ความเข้มข้น 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5}M, และ 10^{-6}M ความเข้มข้นละ 0.2 มิลลิลิตร โดยละลายใน Ringer's solution ตามลำดับ โดยฉีดที่ outer demibranch ข้างละ 0.1 มิลลิลิตร แล้วนำหอยที่ฉีดสารแล้วไปใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่ภายในบรรจุน้ำบ่อปริมาตร 500 มิลลิลิตร

6.3 หลังจากนั้นนำกลุ่ม injected control มาฉีดด้วยน้ำบ่อ หรือ Ringer's solution และกลุ่มควบคุม ไม่ฉีดสาร แล้วนำหอยที่ฉีดสารแล้วไปใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่ภายในบรรจุน้ำบ่อปริมาตร 500 มิลลิลิตร

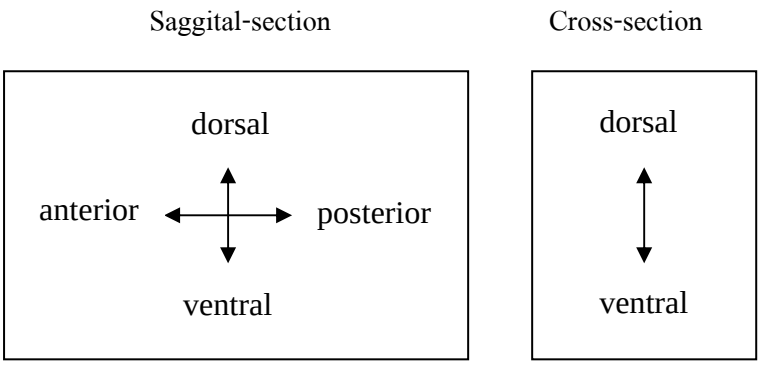
6.4 สังเกตตัวอ่อนระยะโกลคิเดียทั้งหมดที่ถูกปล่อยออกมาที่ 30 นาทีแรก 1 ชั่วโมง และทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6.5 นับจำนวนโกลคิเดียทั้งหมด โดยใช้สไลด์นับแพลงก์ตอน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า

6.6 แต่ละกรรมวิธี (treatment) ทำการทดลอง 10 ซ้ำ

6.7 เลือกความเข้มข้นที่ดีที่สุด คือ 10^{-3}M มาทำการทดสอบด้วย fluoxetine โดยดำเนินการทดลองเหมือนกับซีโรโทนิน

ในส่วนของแนวการตัด (plane) ของเนื้อเยื่อที่ใช้ทำการทดลอง มี 2 ระนาบ ดังนี้ คือ saggital-section และ cross-section



7. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการชีววิทยาการสืบพันธุ์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

ห้องปฏิบัติการกลาง ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร

บริเวณบ่อดินของภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร

ผล

1. การศึกษาโครงสร้างทางกายวิภาคและจุลกายวิภาคของระบบประสาท

จากการศึกษาโครงสร้างทางกายวิภาคของระบบประสาทของหอยมุกน้ำจืด *H.* (*H.*) *bialatus* สามารถแยกได้เฉพาะปมประสาทวิสเซอรัล (ภาพที่ 1) แต่จากการศึกษาทางจุลกายวิภาคพบว่าประกอบด้วย ปมประสาท (ganglion) สามคู่ ได้แก่ ปมประสาทเซรีโบรพลูรัล (cerebro- pleural ganglion) ปมประสาทวิสเซอรัล (visceral ganglion) และปมประสาทพีดัล (pedal ganglion) โดย cerebro- pleural ganglion อยู่ใกล้ทางด้านล่างของ anterior adductor muscle และจาก cerebro- pleural ganglion จะมีเส้นประสาททอดยาวสองคู่ โดยคู่หนึ่งเชื่อมต่อระหว่าง cerebro-pleural ganglion กับ visceral ganglion ซึ่ง visceral ganglion อยู่ติดกับทางด้านล่างของ posterior adducter muscle ส่วนอีกคู่หนึ่งเชื่อมต่อระหว่าง cerebro-pleural ganglion กับ pedal ganglion และ pedal ganglion ฝังอยู่บริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) เหนือเท้า (foot) ของหอย (ภาพที่ 2)

รูปร่างลักษณะของ cerebro-pleural ganglion ของเพศผู้จะมีลักษณะคล้ายลูกชมพู่ (ภาพที่ 3A) และเพศเมียมีลักษณะเป็นแท่งยาว (ภาพที่ 4A) ใน pedal ganglion ทั้งเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะคล้ายกัน โดย pedal ganglion จะเชื่อมรวมกันและมีเส้นประสาท (nerve) ยื่นออกไปสองข้าง ซึ่งในเพศผู้มีลักษณะคล้ายแว่นตา (ภาพที่ 5A) และในเพศเมียคล้ายรูปผีเสื้อ (ภาพที่ 6A) สำหรับ visceral ganglion ทั้งเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะคล้ายกันเมื่อมองจากภายนอก ซึ่งจะพบ visceral ganglion วางตัวอยู่ใต้ posterior adductor muscle ข้างละหนึ่งอัน และเห็นเส้นประสาทยื่นออกไปหลายอัน (ภาพที่ 7A และ 8A) โดย visceral ganglion ข้างหนึ่งจะมีขนาดใหญ่กว่าอีกข้างหนึ่งเล็กน้อย แต่ละ ganglion ประกอบด้วยเซลล์ประสาท (neuron) และ เส้นใยประสาท (nerve fiber) พบว่าเซลล์ประสาทส่วนใหญ่มีรูปร่างรี หรือ รูปกระสวย และนิวเคลียสของเซลล์ประสาทมีรูปร่างเป็นรูปไข่ หรือ ค่อนข้างกลม โดยนิวเคลียสมีขนาดใหญ่เห็นชัดเจนอยู่ค่อนไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์

2. การศึกษาโครงสร้างทางกายวิภาคและจุลกายวิภาคของเหงือก

เหงือกของ *H.* (*H.*) *bialatus* ประกอบด้วย demibranch ด้านซ้ายสองแผ่น และด้านขวาสองแผ่น มีความยาวของเหงือกเกือบเท่ากับความยาวของลำตัว โดยแต่ละข้างจะประกอบด้วย demibranch 2 แผ่นๆ ที่ติดกับแมนเทิล คือ outer demibranch และแผ่นที่ติดกับ visceral mass คือ inner demibranch ซึ่ง outer demibranch เมื่อดูจากลักษณะภายนอกจะพบว่ามีสีเหลืองอ่อนซ้อนอยู่ด้านนอกและมีขนาดเล็กกว่า inner demibranch โดยเฉพาะในส่วนของ outer demibranch ของ *H.* (*H.*) *bialatus* จะทำหน้าที่เลี้ยงตัวอ่อนระยะโกลคิเดีย เรียกว่า marsupia แผ่นเหงือกจะบวมพองขึ้น ซึ่งจะเห็นมีสีน้ำตาล (ภาพที่ 9) สำหรับ inner demibranch มีสีเหลืองอ่อนทางด้านบน แต่ปลายด้านด้านล่างจะมีสีน้ำตาลเข้ม เหงือกแต่ละแผ่นประกอบด้วย gill filament ที่มีลักษณะบางและยาว มีซิเลีย 3 ชนิด คือ lateral cilia ,frontal cilia และ fronto-lateral cilia (ภาพที่ 10B) ซิเลียเหล่านี้มีลักษณะเรียงตัวเป็นแผงสั้นยื่นออกไประหว่างแผ่นเหงือก แต่ละdemibranch จะมีการเชื่อมติดกันของ lamella ด้วยโครงสร้างที่เป็นแผ่นประกอบด้วยเนื้อเยื่อเพื่อให้เกิดความแข็งแรงของเหงือก เรียกว่า interlamellar septum ซึ่ง interlamellar septa เป็นรอยต่อระหว่าง 2 lamella ให้เชื่อมกันทำให้เกิดการแบ่งเหงือกออกเป็นท่อจำนวนมาก เรียกแต่ละท่อว่า water tube เมื่อดูลักษณะโครงสร้างทางจุลกายวิภาคพบว่าในหอยชนิดนี้มีเป็น primary water tube และ secondary water tube จะเห็นว่า primary water tube เป็นช่องที่มีขนาดใหญ่กว่า secondary water tube โดย primary water tube จะทำหน้าที่เป็นถุงสำหรับเลี้ยงตัวอ่อนระยะโกลคิเดีย (ภาพที่ 10C)

นอกจากนี้ยังมีโครงสร้างที่ค้ำจุน gill filament คือ calcified chitinous rod ซึ่งมีลักษณะเป็นแท่งยาวเมื่อย้อมด้วยสี Harris's hematoxylin และ eosin จะเห็นเป็นสีน้ำเงินม่วง (ภาพที่ 10B และ 10C) และจากภาพที่ 10C จะเห็น ostia ซึ่งเป็นช่องเปิดที่จะเข้าสู่ water canal และ water tube และยังเป็นช่องเปิดของ demibranch สู่ mantle cavity

3. การศึกษาตำแหน่งการสร้างซีโรโทนินในระบบประสาทด้วยวิธี Immunoperoxidase และ Immunofluorescence

ใช้วิธี Immunoperoxidase และ Immunofluorescence เพื่อบอกตำแหน่งการสร้างซีโรโทนิน โดย Immunoperoxidase จะเห็นการติดสีน้ำตาลเข้มในบริเวณที่มีซีโรโทนิน และ

เห็นลักษณะโครงสร้างของเซลล์ได้ชัดเจน ส่วน Immunofluorescence บริเวณที่มีซีโรโทนินจะเห็นการเรืองแสง ผลการศึกษาตำแหน่งของซีโรโทนินในระบบประสาทโดยวิธี Immunoperoxidase พบว่า cerebro-pleural ganglion, pedal ganglion และ visceral ganglion ของเพศผู้และเพศเมีย มีการติดสีของซีโรโทนินในเซลล์ประสาท และเส้นใยประสาท ซึ่ง ganglia ทั้งสามจะมีเซลล์ประสาทส่วนใหญ่อยู่ตามขอบของ ganglia (ภาพที่ 11-16) โดยเซลล์ที่ติดสีเห็นเป็นสีน้ำตาลเข้มติดอยู่ภายในของแต่ละเซลล์ ซึ่งส่วนใหญ่มักติดสีทั้งเซลล์ แต่มีบางเซลล์ที่ติดสีเฉพาะบางส่วน ซึ่งจะเห็นการติดสีของเซลล์ประสาทขนาดต่างๆ ดังภาพที่ 11C ในส่วนตรงกลางของ ganglia ทั้งสามซึ่งส่วนใหญ่เป็นที่อยู่ของเส้นใยประสาทพบว่ามีการติดสีน้อย เมื่อเปรียบเทียบการติดสีของซีโรโทนินระหว่างเพศผู้และเพศเมีย พบว่าเพศเมียจะมีการติดสีของเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทมากกว่า (ภาพที่ 15C กับ 16C) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบการติดสีระหว่าง ganglia พบว่า visceral ganglion จะติดสีมากกว่า cerebro-pleural ganglion และ pedal ganglion (ภาพที่ 11C, 12C, 13C, 14C, 15C และ 16C) แสดงว่า visceral ganglion มีปริมาณสารซีโรโทนินมากกว่า

สำหรับ Immunofluorescence วิธีนี้จะศึกษาเฉพาะ visceral ganglion เนื่องจากการศึกษาตำแหน่งของซีโรโทนินด้วยวิธี Immunoperoxidase พบว่ามีปริมาณของซีโรโทนินมากกว่า cerebro-pleural ganglion และ pedal ganglion ผลการศึกษาจะเห็นการเรืองแสงสีเขียวในส่วนของเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาท ใน visceral ganglion ผลของ positive staining เห็นเป็นเส้นสีเขียวจำนวนมากและแตกต่างกัน ซึ่งเห็นจำนวนมากทั้งในเพศผู้และเพศเมีย และสำหรับ negative control ไม่ปรากฏการเรืองแสงสีเขียว (ภาพที่ 17 กับ 18) สำหรับในเหงือกให้ผลทำนองเดียวกับ visceral ganglion (ภาพที่ 19 กับ 20) และพบว่ามีการเรืองแสงที่ outer demibranch มากกว่าใน inner demibranch ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย (ภาพที่ 19A กับ 20A และ ภาพที่ 19C กับ 20C) และเมื่อทำ Immunofluorescence ของ demibranch ที่ไม่ได้แยก outer demibranch และ inner demibranch ออกจากกัน จะปรากฏผลการเรืองแสงชัดเจนยิ่งขึ้น (ภาพที่ 21A) จะเห็นว่า visceral ganglion มีความสัมพันธ์ กับ outer demibranch มากกว่าใน inner demibranch นอกจากนี้ยังพบว่ามีการส่งกระแสประสาทจาก visceral ganglion ไปยัง demibranch ของทั้งสองเพศ (ภาพที่ 21B)

4. การย้อมด้วยสีพิเศษ Gomori's paraldehyde-fuchsin staining (PAF)

การย้อมสีด้วยวิธีนี้เพื่อตรวจหา neurosecretory cell จากผลการศึกษาพบว่าเซลล์ประสาท

ที่ย้อมติดสีน้ำตาลด้วยวิธี Immunoperoxidase เมื่อนำมาย้อมต่อด้วย PAF พบว่ากลุ่มเซลล์ที่ติดสีน้ำตาลของทั้งสาม ganglia ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย จะติดสีน้ำเงินม่วงที่ไซโตพลาสซึม แสดงว่าเป็น neurosecretory cell (ภาพที่ 22 และ 23) และจากการที่ย้อมเฉพาะ PAF อย่างเดียวโดยไม่ผ่านการย้อมด้วยวิธี Immunoperoxidase พบว่าเซลล์ประสาทของ *H.* (*H.*) *bialatus* ส่วนใหญ่ติดสีน้ำเงินม่วงที่ไซโตพลาสซึม มีเพียงส่วนน้อยที่ไม่ติด

5. ผลของซีโรโทนินต่อการเกิดการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ใน *H*. (*H.*) *bialatus* เพศเมีย

ความเข้มข้นของซีโรโทนินต่อการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ดีที่สุด คือ 10^{-3}M สามารถทำให้โกลคิเดียมีการพัฒนาโดยใช้เวลาเฉลี่ยน้อยสุด คือ 15.0 ± 4.30 วัน รองลงมา คือ ความเข้มข้น 10^{-5}M, 10^{-4}M, normal control, inject control และ 10^{-6}M เฉลี่ยเท่ากับ 16.2 ± 6.5 วัน, 17.6 ±7.8 วัน, 18.6±8.9 วัน, 19.0 ±8.8 วัน และ 19.2 ± 9.7วัน ตามลำดับ (ตารางที่ 1) แต่จากการสังเกตพบว่า activity ของโกลคิเดียค่อนข้างต่ำ โดยสังเกตจากการเปิดปิดของเปลือกของโกลคิเดียมีน้อยมากหรือไม่มี แสดงว่าการใช้สารซีโรโทนินในการเร่งการพัฒนาอาจเร็วเกินไป ซึ่งส่งผลทำให้การพัฒนาของโกลคิเดียไม่สมบูรณ์ สำหรับการพัฒนาเซลล์ไข่ที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นโกลคิเดียของ *H.* (*H.*) *bialatus* (ภาพที่ 24) เพื่อใช้แสดงเปรียบเทียบย้อนกลับไปหาแนวโน้มของปริมาณไข่ที่เกิดการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์พบว่าความเข้มข้นที่ 10^{-3}M และ 10^{-4}M มีจำนวนของโกลคิเดียใกล้เคียงกัน รองลงมา คือ inject control, 10^{-6}M, 10^{-5}M, และ normal contol ตามลำดับ

6. ผลของซีโรโทนิน และ fluoxetine ต่อการเกิดการปล่อยตัวอ่อนใน *H.* (*H.*) *bialatus* เพศเมีย

ความเข้มข้นของซีโรโทนินที่ทำให้เกิดการปล่อยตัวอ่อนดีที่สุด คือ 10^{-3}M เฉลี่ยภายใน 2.6 ±2.4 ชั่วโมง รองลงมา 10^{-4}M, 10^{-6}M, inject control, 10^{-5}M และ normal control เฉลี่ยเท่ากับ 12.1±6.7 ชั่วโมง, 15.4 ±5.6 ชั่วโมง, 17.5±6.2 ชั่วโมง, 18.3±6.8 ชั่วโมง และ 21.5±3.2 ชั่วโมง ตามลำดับ และจำนวนโกลคิเดียที่แม่หอยปล่อยเท่ากับ $21.6x10^4$ ตัว, $9.7x10^4$* ตัว, $8.2x10^4$* ตัว, $7.3x10^4$* ตัว, $8.1x10^4$* ตัว และ $6.3x10^4$* ตัว ตามลำดับ (ตารางที่ 2) สำหรับความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-4} M จนถึง normal control มีการปล่อยโกลคิเดียน้อย เนื่องจากแม่หอยบางตัวมีการปล่อยโกลคิเดียออกมาไม่หมดภายใน 24 ชั่วโมง สำหรับผลของซีโรโทนินต่อการปล่อยตัวอ่อนของ *H.* (*H.*) *bialatus* (n=10) พบว่าที่ความเข้มข้น 10^{-3}M มีแนวโน้มในการปล่อยตัวอ่อนดีที่สุด

รองลงมา คือ 10^{-4}M, 10^{-5}M, inject control, 10^{-6}M และ normal control ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 10^{-6}M และ normal control ให้ผลใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 25) ในส่วนของผลของความเข้มข้นของซีโรโทนินต่อการปล่อยตัวอ่อนระยะโกลคิเดียของ *H.* (*H.*) *bialatus* ภายใน 24 ชั่วโมง จะพบว่าความเข้มข้นที่ 10^{-3}M มีความโดดเด่นกว่าความเข้มข้นอื่นๆ กล่าวคือ มีเส้นกราฟที่สูงโด่งเด่นชัดและหอยปล่อยตัวอ่อนระยะโกลคิเดียออกหมดก่อน ในขณะที่ความเข้มข้นอื่นๆ ยังมีการปล่อยตัวอ่อนเป็นระยะๆ แต่จำนวนไม่มาก จนถึง 24 ชั่วโมงดังในภาพที่ 26 ซึ่งในส่วนของ inject control อาจจะใช้น้ำบ่อ หรือ Ringer's solution ก็ได้เนื่องจากให้ผลคล้ายกลุ่มควบคุมที่ไม่ฉีดสาร แต่การใช้น้ำบ่อจะเตรียมได้ง่ายและประหยัดกว่าการใช้ Ringer's solution

สำหรับ fluoxetine มีการปล่อยตัวอ่อนค่อนข้างน้อย โดยให้ผลใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ซึ่งแม่หอยปล่อยโกลคิเดียใช้เวลา 24 ชั่วโมง และบางตัวใช้เวลามากกว่า 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 27) โดย มีการปล่อยโกลคิเดียเป็นระยะๆแต่จำนวนที่ปล่อยมีจำนวนน้อย นอกจากนี้จากการสังเกตการปล่อยตัวอ่อน (ภาพที่ 28A) ลักษณะของตัวอ่อนระยะโกลคิเดียจะมีเปลือก 2 ฝา รูปร่างค่อนข้างเป็นรูปไข่ (semi-oval) มี adductor muscle และ external thread เด่นชัด (ภาพที่ 28B และ 28C)