

ผลกระทบของดีดีทีต่อเซลล์สร้างเมือกจากหอยนางรมปากจیب (*Saccostrea cucullata*)*

Effect Of Ddt On Mucous Cell From Hooded Oyster (*Saccostrea Cucullata*)

ปาริชาติ สิงห์โตทอง (Parichat Singtothong)**

สุภัททา ฉ่อยฉ่ำ (Supatta Chueycham)***

สุทิน กิ่งทอง (Sutin Kingtong)****

บทคัดย่อ

โครงสร้างทางมิยชีววิทยาของเซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจیب hooded oyster, *Saccostrea cucullata* ยังไม่มีรายงานการวิจัยจวบจนปัจจุบัน งานวิจัยฉบับนี้จึงศึกษาถึงโครงสร้างทางมิยชีววิทยาของอวัยวะดังกล่าวผ่านกระบวนการทางมิยชีววิทยา และมิยเคมี ผลการศึกษาระบุว่าภายในเซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลมีรูปร่างหลายแบบ โดยเซลล์มีรูปร่างคล้ายกับเซลล์ก๊อบเล็ต แทรกอยู่ในชั้นเยื่อบุผิว (epithelial layer) มีนิวเคลียส และออร์แกเนลล์อื่นอยู่บริเวณฐานของเซลล์ใกล้กับ basement membrane พบมีซินแกรนูลขนาดใหญ่เต็มพื้นที่ของไซโทพลาสซึมบริเวณด้านบนของเซลล์สร้างเมือกที่เปิดออกสู่สิ่งแวดล้อม นอกจากนี้พบเซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) กระจายแทรกภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เซลล์สร้างเมือกติดสีม่วงแดง PAS และติดสีฟ้า AB pH 2.5 การศึกษาถึงผลกระทบของสารดีดีที พบว่าจำนวนเซลล์สร้างเมือกในเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิลของหอยนางรมปากจیبได้รับสารดีดีทีที่มีมากกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} \leq 0.05$) การศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบถึงโครงสร้างพื้นฐานของเซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจیب การศึกษาต่อไปควรศึกษาหน้าที่ของเซลล์สร้างเมือก

คำสำคัญ : เซลล์สร้างเมือก, มิยชีววิทยา, ดีดีที

* เพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัย

** นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยาศึกษา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
email: peemai_q@hotmail.com

Major of Biology Education, Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University.
.email: peemai_q@hotmail.com, 09-55582144

*** นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
email: benz_biot@hotmail.com

**** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา email: sutin@buu.ac.th

Assistant Professor Dr., Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University. .email: sutin@buu.ac.th

Abstract

Histological structures of mucous cell in the hooded oyster (*Saccostrea cucullata*) have never been reported. Therefore, this structure of this organ was investigated using histological and histochemical analysis. The results revealed that the mucous cells were mainly located at the superficial layer of epidermis. Mucous cells were varied from rounded to goblet shape with nucleus and other organelle towards the basement membrane and much more mucin granule in cytoplasm. In addition, several hemocytes were found in connective tissue. However, the mucous cells demonstrated weak positive reaction with both PAS (magenta) and AB pH 2.5 (blue). Finally, the toxicity test of DDT and histopathological investigation revealed alterations in the mucous cells demonstrated an increase in number of mucus cells mean at $P < 0.05$ level of significance. The current study may provide a basic information about structural histology of mucous cell from the hooded oyster (*S. cucullata*). For further study, the functions of the oyster mucous cells will be investigate of.

Keywords: Mucous cell, Histology, DDT

บทนำ

หอยนางรมจัดอยู่ในชั้นหอยสองฝา (bivalve) หอยนางรมมีคุณค่าทางโภชนาการค่อนข้างสูง เป็นที่ต้องการของตลาดจัดเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญ หอยนางรมดำรงชีวิตด้วยการเกาะติดอยู่กับที่ (sessile organism) และกินอาหารผ่านกระบวนการกรองกิน (filter feeding) ซึ่งเกิดขึ้นบริเวณช่องพาเลียล (pallial cavity) ประกอบด้วย เหงือก (gill) แมนเทิล (mantle) และแผ่นปาก (labial palp) ซึ่งบริเวณเหล่านี้จะถูกปกคลุมไปด้วยเมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือก (mucous cell) ซึ่งอยู่ในชั้นเยื่อผิวของอวัยวะดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบเซลล์สร้างเมือกในสิ่งมีชีวิตอื่น ซึ่งมีรูปร่างคล้ายคลึงกับแบบก๊อบเล็ตหรือถ้วยทรงสูง จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า goblet cell เช่น ไก่วง นกกระจอกเทศ หู (Durit & A. Mugurevics, 2015) และหอยทากโรมัน (*Helix pomatia*) (Greistorfer et al., 2017) ทั้งนี้เมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือกจัดเป็นสารประกอบโมเลกุลใหญ่ที่เรียกว่ามิวซิน (mucin) มีไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ที่เรียกว่ามิวโคโพลีแซคคาไรด์ (mucopolysaccharides) เป็นองค์ประกอบหลัก และสามารถให้คุณสมบัติทางเคมีของสารประกอบโมเลกุลใหญ่นี้แยกประเภทของเซลล์สร้างเมือกได้เมื่อทำการศึกษด้วยเทคนิคมิวซินเคมี โดยหน้าที่ของเมือกมีหลายประการ และมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของหอยสายพันธุ์ที่อาศัยอยู่ในน้ำ เช่น เป็นปราการป้องกันด่านระหว่างตัวหอยและสิ่งแวดล้อม เมือกยังทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการกรองกิน เนื่องจากมีความเหนียวทำให้สามารถดักจับอาหารที่ถูกคัดเลือกขนาดไว้โดยเหงือกไม่ให้อาหารเหล่านี้ถูกพัดพาออกไปจากตัวหอยด้วยการไหลของน้ำทะเล ก่อนจะส่งผ่านอาหารไปยังแผ่นปาก และเข้าสู่ปากเพื่อเกิดกระบวนการย่อยอาหารต่อไป ขณะเกิดกระบวนการกรองกินนี้อาจทำให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ปรสิต และสารเคมีที่ปะปนมากับการไหลของกระแส น้ำไปสู่การติดเชื้อและก่อโรค ดังรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ระบุว่าเมื่อหอยนางรมได้รับสารทีบีที (TBT) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50 และ 150

ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าระดับความเข้มข้นของสารที่บีบีเพิ่มสูงขึ้น สามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้างเมือกบริเวณเหงือก และแมนเทิล มีขนาด และจำนวนเพิ่มขึ้นส่งเสริมการผลิตเมือกเพิ่มขึ้นเพื่อต้านทานต่อสารพิษที่จะเข้าสู่ตัวหอยนางรม (Khondee et al, 2016) เมือกหอยนางรมจึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างมากต่อการดำรงชีวิตของหอยนางรม แมนเทิลมีความสำคัญต่อการสร้างและหลั่งแคลเซียมคาร์บอเนตในกระบวนการสร้างเปลือกของหอยนางรม และการกระบวนการกรองกินของหอยนางรมจะไม่สามารถเกิดขึ้นได้ หากปราศจากการโบกพัดของแมนเทิล ซึ่งจะทำให้เกิดการไหลของกระแส น้ำทะเลเข้าสู่ภายในตัวหอยนางรมแบบมีทิศทาง ปัจจุบันยังไม่มียางานลักษณะและหน้าที่ของเซลล์สร้างเมือกบริเวณแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ ด้วยเหตุนี้ทางผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาลักษณะของเซลล์สร้างเมือกที่พบบริเวณแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ ด้วยเทคนิคภูมิคุ้มกันวิทยา ซึ่งเป็นเทคนิคการย้อมสีเนื้อเยื่อที่ใช้ในการระบุชนิดและการกระจายตัวขององค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ภายในเนื้อเยื่อ เนื่องด้วยหอยนางรมปากจีบเป็นสายพันธุ์ที่มีถิ่นอาศัยทั่วไปตามแนวชายฝั่งภาคตะวันออกของประเทศไทย จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาผลกระทบจากการปนเปื้อนของสารเคมีที่จากพื้นดินที่ถูกชะล้างลงสู่ระบบนิเวศทางทะเล (กรมควบคุมมลพิษ, 2541) โดยผู้วิจัยจะศึกษาถึงผลกระทบที่อาจทำให้เกิดลักษณะของเซลล์สร้างเมือกบริเวณแมนเทิลของนางรมปากจีบเปลี่ยนแปลงไป เมื่อได้รับสารเคมี ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการประเมินถึงผลกระทบของสารเคมีที่เป็นพิษต่อลักษณะของเซลล์สร้างเมือกของหอยนางรมที่ได้รับการปนเปื้อนจากแหล่งน้ำต่อไป

วิธีการศึกษา

1. ตัวอย่างหอยนางรม

เก็บตัวอย่างหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) ระยะตัวเต็มวัย ขนาดประมาณ 5-7 เซนติเมตร จากฟาร์มหอยนางรมบริเวณตำบลอ่างศิลา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ล้างเปลือกเพื่อกำจัดสาหร่ายและเพรียงหินออก วัดขนาดความกว้างและความยาวของเปลือก ชั่งน้ำหนัก บันทึกผล เลี้ยงในตู้กระจก กว้าง 30 เซนติเมตร ยาว 60 เซนติเมตร น้ำทะเลที่มีความเค็ม 30 ppt ให้อาหารเป็นแพลงก์ตอนพืช *Nannochloropsis* sp. (Kingtong et al., 2007) และเปลี่ยนน้ำทุกวัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์

2. การทดสอบความเป็นพิษของสารเคมีเพื่อหาค่า LC₅₀ (Lethal concentrations for 50% mortality)

เตรียม stock solution ของสารเคมีที่มีความเข้มข้น 1×10^4 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยละลาย 0.10 กรัม ดีดีที ในเอทานอล 10 มิลลิลิตร หลังจากเลี้ยงปรับสภาพหอยนางรมปากจีบเป็นเวลา 2 สัปดาห์แล้ว จึงนำมาตรวจสอบอัตราการตาย เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เพื่อหาค่า LC₅₀ โดยจะนำหอยนางรมปากจีบมาเลี้ยงในน้ำทะเล 20 ลิตร ที่มีความเข้มข้นของสารเคมีที่ต่างกัน ทั้งหมด 7 ความเข้มข้น ได้แก่ 0, 10, 50, 100, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยจะใช้หอยนางรม จำนวน 20 ตัว/ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ชั่วโมง ให้อาหาร และเปลี่ยนน้ำทะเลที่ผสมสารเคมีทุกวัน และบันทึกผล จากนั้นใช้โปรแกรม Probit analysis เพื่อคำนวณหาค่า LC₅₀ (Dumme et al., 2015) โดยจะใช้ค่าความเข้มข้นที่ระดับ 10% LC₅₀ ของสารเคมี ที่เวลา 96 ชั่วโมง ในการศึกษาผลกระทบของสารเคมีต่อเซลล์สร้างเมือกจากเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ ใช้หอยนางรมแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ 1. นางรมปากจีบควบคุม จำนวน 20 ตัวต่อตู้ในน้ำทะเล 20 ลิตร

ทั้งหมด 3 ซ้ำ และ 2. หอยนางรมปากจีบที่ได้รับสารดีดีทีความเข้มข้น 10% ของค่า LC_{50} จำนวน 20 ตัวต่อตู้ในน้ำทะเล 20 ลิตร ทั้งหมด 3 ซ้ำ ให้อาหารและเปลี่ยนน้ำทะเลที่ผสมสารดีดีทีทุกวัน

การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ทดสอบด้วยสารดีดีทีนั้น เลือกเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อหอยนางรมบริเวณแมนเทิล เพื่อใช้สำหรับการศึกษาลักษณะของเซลล์สร้างเมือก ด้วยเทคนิคด้วยเทคนิคมิวชีววิทยา และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM) โดยตัดตามขวาง (cross section) การตัดเก็บเนื้อเยื่อต้องทำบนน้ำแข็ง และต้องใช้ความรวดเร็ว เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำเยื่อได้รับความเสียหายจากเอนไซม์โปรตีเอส แล้วจึงนำเนื้อเยื่อที่ได้มาแช่ในสารละลาย Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อคงสภาพเนื้อเยื่อไม่ให้ถูกทำลาย

3. การศึกษาเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคมิวชีววิทยา

การศึกษาด้วยเทคนิคมิวชีววิทยาทำเพื่อให้เห็นสัณฐานวิทยาของเซลล์สร้างเมือกโดยวิธีการฝังเนื้อเยื่อตัวอย่างในพาราฟลาสต์ (paraffin-embedded section) กล่าวโดยย่อนำชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างที่แช่ในสารละลาย Davidson's fixative จากข้างต้นมาตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ล้างเนื้อเยื่อด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 70% จนกระทั่งเนื้อเยื่อไม่มีสีเหลือทิ้ง นำเนื้อเยื่อมาผ่านกระบวนการดึงน้ำออก (dehydration) โดยการใช้เอทานอลที่มีความเข้มข้นต่ำไปจนถึงเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูง ขึ้นตอนละหนึ่งครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง แช่ใน Absolute ethanol จำนวน 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง แช่ในไดออกเซน 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง แช่ในพาราฟลาสต์ 3 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ฝังเนื้อเยื่อลงในพาราฟลาสต์ ตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (Microtome รุ่น HESTION ERM 3000, Hestion, Australia) ความหนา 6 ไมโครเมตร นำเนื้อเยื่อที่ตัดแล้วมาติดลงบนแผ่นสไลด์โดยใช้เจลลาตินเป็นตัวช่วยให้เนื้อเยื่อติดลงบนแผ่นสไลด์ นำสไลด์ที่ติดชิ้นเนื้อเยื่อแล้วมาวางให้แห้งบนเครื่องอุ่นแผ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.1 การย้อมสี

(ก) ย้อมด้วยสี Haematoxylin และ Eosin (H&E)

นำสไลด์แช่ในโซลิน 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เพื่อกำจัดพาราฟิน แช่สไลด์ในแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 99.9, 95, 80 และ 70 ตามลำดับ โดยใช้เวลาครั้งละ 5 นาที แช่สไลด์ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที ย้อมสีฮีมาทอกโซลิน 1 นาที ล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำประปาที่ไหลผ่านตลอด แช่สไลด์ในเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 5 นาที เพื่อปรับสภาพเนื้อเยื่อให้มีสภาพเป็นกลาง (Neutralization) ย้อมสีอีโอซิน (Counter stain) เป็นเวลา 30 วินาที จุ่มสไลด์ในเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 อย่างรวดเร็ว และจุ่มสไลด์ในเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 99.9 เป็นเวลา 5 นาที เพื่อขจัดน้ำออกจากเซลล์ (Dehydration) จุ่มสไลด์ในบิวทานอล 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที และจุ่มสไลด์ในโซลินอีก 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เพื่อขจัดแอลกอฮอล์ออก และทำให้น้ำเยื่อใส (Clearing) ปิดกระจกปิดสไลด์ โดยใช้เปอร์เมาต์ (Permount) ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และบันทึกภาพด้วยโปรแกรม Optika Microscopy Digital USB Camera

(ข) ย้อมด้วยสี Periodic acid Schiff และ Alcian blue pH 2.5 (PAS/AB pH 2.5)

นำสไลด์แช่ในโซลิน 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เพื่อกำจัดพาราฟิน แช่สไลด์ในเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 90, 80 และ 70 ตามลำดับ โดยใช้เวลาครั้งละ 5 นาที แช่สไลด์ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที แช่สไลด์ใน Periodic acid เป็นเวลา 3 นาที แช่สไลด์ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที แช่สไลด์ใน Schiff reagent เป็นเวลา 3 นาที ล้างสไลด์ด้วยน้ำประปาที่ไหลผ่านตลอดเป็นเวลา 10 นาที ย้อมสี Alcian blue เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างสไลด์ด้วย

น้ำประปาที่ไหลผ่านตลอดอีกครั้งเป็นเวลา 5 นาที ย้ายสไลด์ไปไว้ในเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 และ 80 ตามลำดับ โดยใช้เวลาค้างละ 5 นาที แสสไลด์ในเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 90, 95 และ 99.9 ตามลำดับ โดยใช้เวลาค้างละ 10 นาที จุ่มสไลด์ในบิวทานอล 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที และจุ่มสไลด์ในไซลีนอีก 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เพื่อกำจัดแอลกอฮอล์ออก และทำให้เนื้อเยื่อใส ปิดกระจกปิดสไลด์ โดยใช้เปอร์เมตต์ ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และบันทึกภาพด้วยโปรแกรม Optika Microscopy Digital USB Camera

3.2 การศึกษาเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

แช่เนื้อเยื่อใน 2.5% Glutaraldehyde ใน 0.1 M Phosphate buffer saline (PBS) ที่ 4 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นจึงล้างใน 0.1 M PBS ที่ 4 °C 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ใน 0.1 M PBS ที่ 4 °C นำตัวอย่างที่เก็บไว้มาตัดเป็นชิ้นเล็กให้มีขนาดประมาณ 1 x 1 มิลลิเมตร² แล้วคงสภาพด้วย 1 % Osmium tetroxide ใน 0.1 M PBS ที่ 4 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.1 M PBS ที่ 4 องศาเซลเซียส 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ดึงน้ำออกด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70%, 80%, 90% และ 95% ความเข้มข้นละ 2 ครั้ง และ 100% 3 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที ตามลำดับนำ Propylene oxide (PO) เข้าสู่เซลล์ 2 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที ตามด้วย PO : Araldite 502 resin (2:1) 1 ชั่วโมง และ PO : Araldite 502 resin (1:2) 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นฝังเนื้อเยื่อใน Pure Araldite 502 Resin และ Polymerize ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และที่ 45 °C และ 60 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ นำเนื้อเยื่อไปตัดด้วยเครื่อง Ultramicrotome ให้มีความหนา 500 นาโนเมตร ย้อมสีด้วย Methylene blue เพื่อศึกษาเนื้อเยื่อโดยทั่วไป (Semi-thin section) และตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง Ultramicrotome ที่ความหนา 60 นาโนเมตร (Ultra-thin section) แล้วนำเนื้อเยื่อที่ตัดได้วางลงบน Copper grid ที่จุ่มย้อมสีด้วย Saturated uranyl acetate ใน 70% Methanol และ 0.1% Lead citrate ในน้ำอย่างละ 15 นาที ทั้งไว้จนแห้งนำไปศึกษา และบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM รุ่น TECHNI 20, Philips) ที่ 75 kV

4. การวิเคราะห์ผล

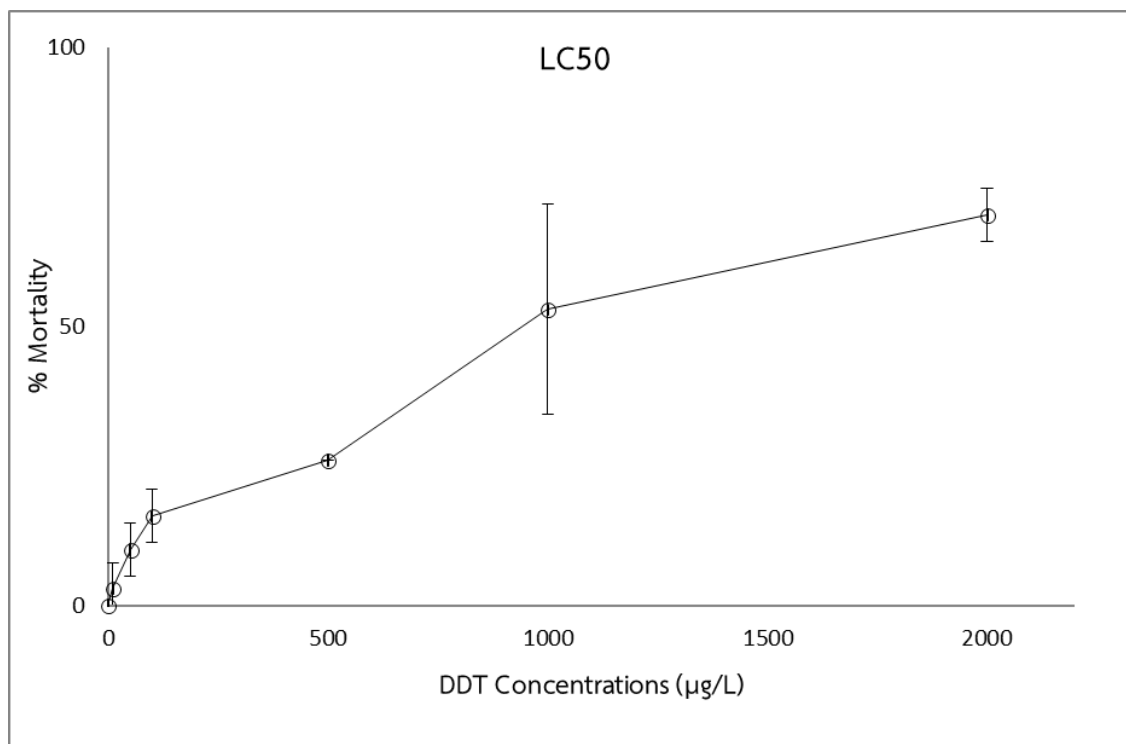
การวิเคราะห์ข้อมูลการตอบสนองต่อสารดีทีที ด้วยโปรแกรม Probit analysis สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลของการศึกษา ใช้สถิติเชิงพรรณนาสำหรับอธิบายค่าเฉลี่ย, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, ร้อยละ และความถี่ โดยทำการทดสอบหาค่าเฉลี่ยของข้อมูลพื้นฐานระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองที่ถูกเลี้ยงในน้ำทะเล ซึ่งมีความเข้มข้นของสารดีทีทีที่ระดับความเข้มข้น 10% ของค่า LC₅₀ เช่น จำนวนเซลล์สร้างเมือก ขนาดของเซลล์สร้างเมือก เป็นต้น แบบเป็นอิสระต่อกัน (Independent t-test) ระดับนัยสำคัญทางสถิติ (P-Value ≤ 0.05) ด้วยโปรแกรมซอฟต์แวร์ Minitab 17

ผลการศึกษา

1. ผลกระทบของสารดีทีทีต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจีบ

เลี้ยงหอยนางรมปากจีบในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยง ทดสอบความเป็นพิษของสารดีทีทีที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง นับจำนวนหอยนางรมที่ตายจากแต่ละความเข้มข้น ณ เวลาที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ปรากฏผลดังนี้

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารดีดีทีที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 1 อัตราการตายของหอยนางรมปากจีบมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสารดีดีทีที่ถูกผสมอยู่ในน้ำทะเล จากการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Probit analysis ได้ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของดีดีทีที่ทำให้หอยนางรมปากจีบตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 96 ชั่วโมง (96-h LC_{50}) มีค่าเท่ากับ $1,000 \pm 0.08$ ดังนั้นค่าประมาณ 10% ของค่า LC_{50} มีค่าเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ทดลองเกิดความเครียด นำไปใช้กับกลุ่มทดลองเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

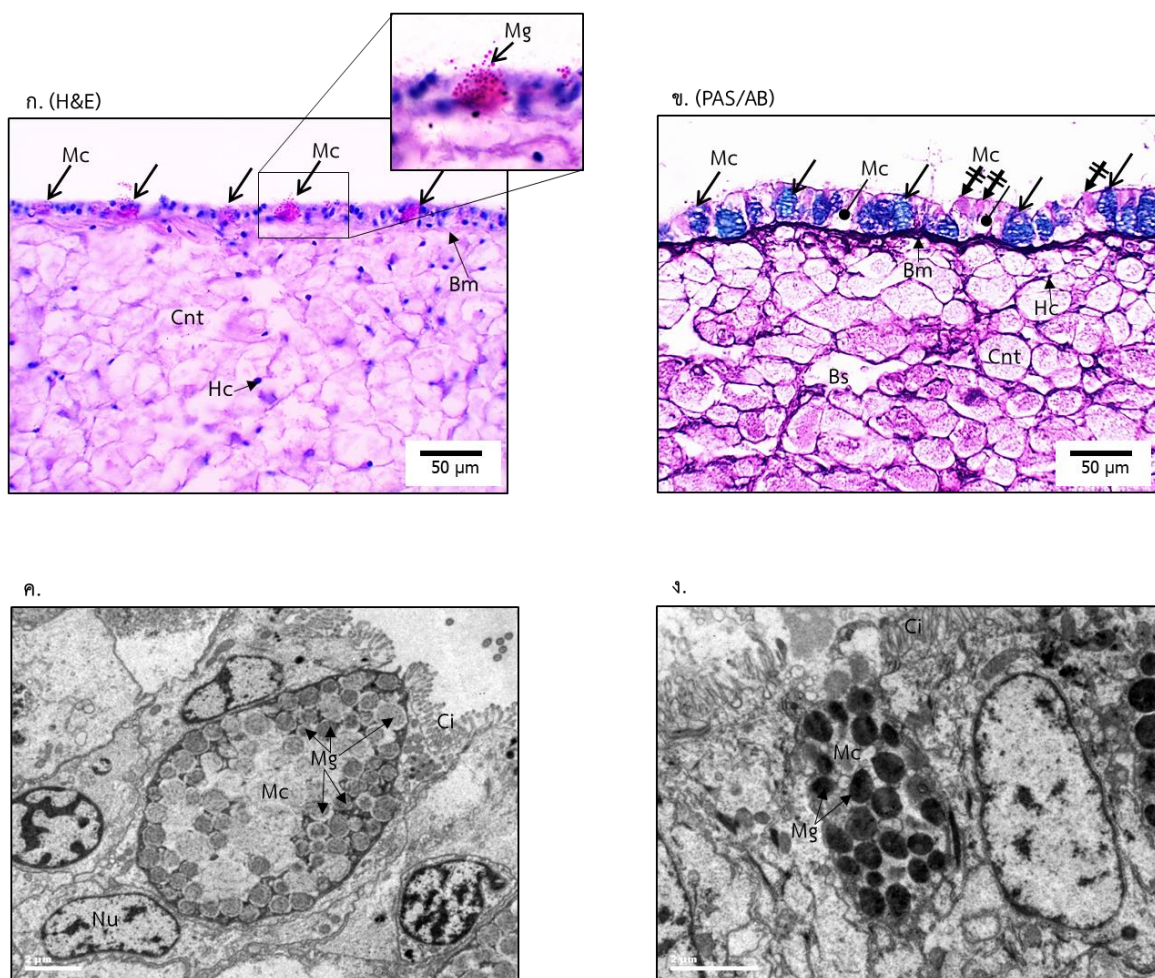


ภาพที่ 1 อัตราการตายของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) จากการทดสอบความเป็นพิษของสารดีดีทีที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ณ เวลาที่ 96 ชั่วโมง

2. ลักษณะของเซลล์สร้างเมือกจากเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ ในสถานะที่ไม่มีสารทดสอบ

เทคนิคทางมิววิทยาด้วยการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) ระบุว่าชั้น Epithelium ประกอบด้วยเยื่อผิวชั้นเดียวชนิด pseudostratified columnar epithelium มีเซลล์สร้างเมือก ซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่มีซิเลียแทรกตลอดความยาวของเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิล เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ รูปร่างไม่แน่นอน แต่ส่วนใหญ่มีรูปร่างค่อนข้างกลมคล้ายคลึงกับถ้วยหรือแก้วไวน์ พบนิวเคลียสอยู่บริเวณฐานของเซลล์ติดสีม่วงของสีย้อม Hematoxylin มี secretory granules ซึ่งเป็นถุงขนาดเล็กจำนวนมากที่มี mucin อยู่ภายใน เรียกว่า mucin granules ติดสีแดงอมชมพูของสีย้อม Eosin ที่กำลังหลั่งออกนอกเซลล์สร้างเมือก (ภาพที่ 2-ก) มีเซลล์ชนิดมีซิเลียบริเวณขอบนอกของเซลล์ที่เปิดออกสู่สิ่งแวดล้อม (ภาพที่ 2-ค และ ภาพที่ 2-ง) เซลล์ที่พบทั้ง 2 ชนิด เรียง

ตัวตั้งอยู่บนเยื่อฐาน (Basement membrane) เป็นเยื่อบางที่รองรับชั้น epithelium ใต้เยื่อฐานมีเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue cell) ที่มีลักษณะการเรียงตัวของเซลล์แบบหลวมๆ บริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีแองเจลิอด (Blood sinus) ขนาดเล็กแทรกอยู่ทั่วไป มีเซลล์เม็ดเลือด (Hemocyte) กระจายตัวแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (ภาพที่ 3) เมื่อตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์โดยใช้เทคนิคทางมิวสิกวิทยาเคมีด้วยการย้อมสี Periodic acid–Schiff และ Alcian blue pH 2.5 (PAS/AB 2.5) ระบุว่าพบเซลล์สร้างเมือกย้อมติดสีได้ 2 รูปแบบ คือ กลุ่มที่ติดสีแดงของสี Periodic acid–Schiff (PAS) สร้างเมือกที่มีคุณสมบัติเป็นกลาง และกลุ่มที่ติดสีน้ำเงินของสี Periodic acid–Schiff และ Alcian blue pH 2.5 (PAS/AB 2.5) สร้างเมือกที่มีคุณสมบัติเป็นกลาง และเป็นกรดภายในเซลล์เดียว ยืนยันว่าเซลล์สร้างเมือกมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบอยู่ภายในเซลล์ แสดงว่าสารที่อยู่ภายในเซลล์สร้างเมือกมีคุณสมบัติเป็นกลาง รวมถึงมีคุณสมบัติเป็นกลาง และเป็นกรดภายในเซลล์เดียวกันอีกด้วย (ภาพที่ 2-ข) ทั้งนี้ยังพบเซลล์สร้างเมือกที่แตกต่างกัน 3 ประเภท เมื่อทำการย้อมด้วยสี Haematoxylin และ Eosin (H&E) ได้แก่ Eosinophilic (ติดสีแดงของสี Eosin) ดังแสดงในภาพที่ 4-ก Basophilic (ติดสีม่วงของสี Hematoxylin) ดังแสดงในภาพที่ 4-ข และ Neutrophilic (ไม่ติดสีทั้ง 2 สี) ดังแสดงในภาพที่ 4-ค



ภาพที่ 2 เซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ควบคุม

ก. ภาพขยายของเซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ ขณะกำลังหลั่งเมือกที่อยู่ในรูปของมิวซินแกรนูลออกนอกเซลล์ ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

ข. เซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ สร้างเมือกที่มีคุณสมบัติเป็นกลางและเป็นกรดภายในเซลล์เดียว (PAS/AB2.5) ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

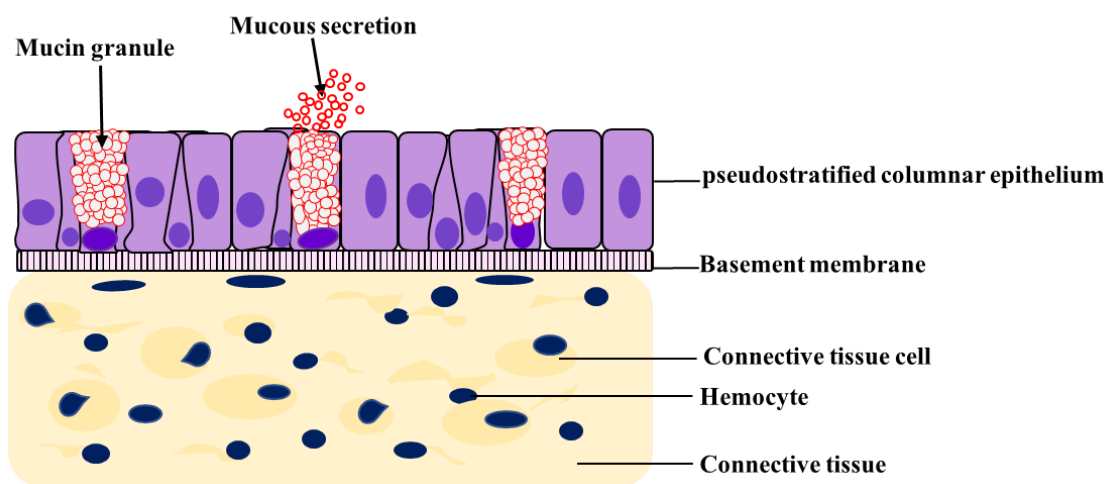
ค. และ ง. เซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ มีรูปร่างแตกต่างกัน ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

ลูกศร 3 แบบ แสดงถึงเซลล์สร้างเมือกที่มีคุณสมบัติทางเคมีที่แตกต่างกัน 3 ประเภท

สัญลักษณ์ Bm = Basement membrane, Bs = Blood sinus, Ci = Cilia,

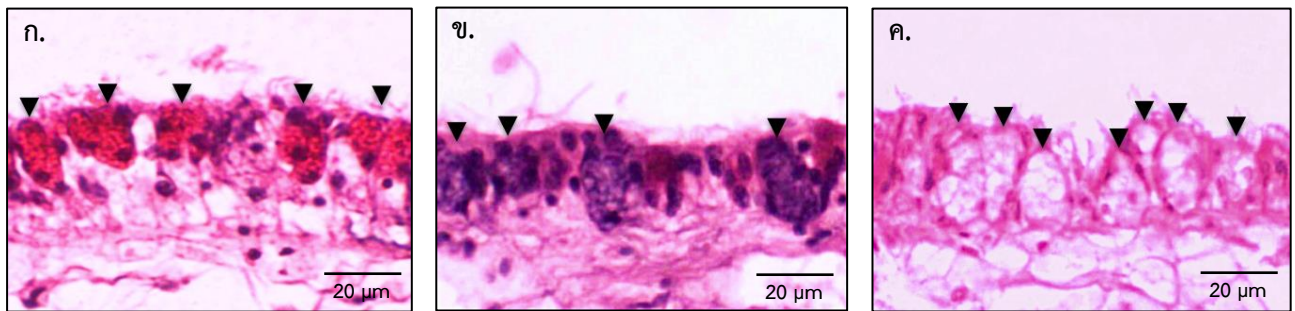
Cnt = Connective tissue, Hc = Hemocyte, Mg = Mucin granule, Mc = Mucous cell,

Nu = Nucleus



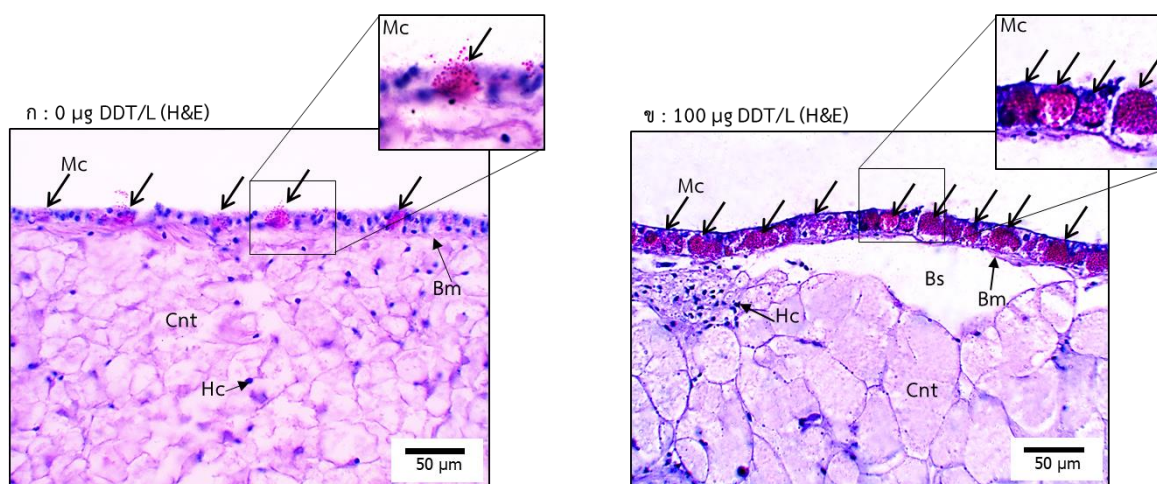
ภาพที่ 3 ไดอะแกรมของเซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*)

ควบคุม



ภาพที่ 4 เซลล์สร้างเมือกแทรกบริเวณเยื่อผิวในแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ควบคุม
ติดสีต่างกัน 3 ประเภท เมื่อย้อมด้วยสี Haematoxylin และ Eosin (H&E)
ก. ติดสีแดง (Eosinophilic) ข. ติดสีม่วง (Basinophilic) ค. ไม่ติดสี (Neutrophilic)
ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3. ผลกระทบของสารดีดีทีต่อเซลล์สร้างเมือกจากเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ
จากการศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อเซลล์สร้างเมือกจากเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ โดยเทคนิคทางมิวซิววิทยาด้วยการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) เปรียบเทียบที่เวลา 96 ชั่วโมง ระหว่างหอยนางรมปากจีบควบคุม (ภาพที่ 5-ก) กับหอยนางรมปากจีบที่ได้รับสารดีดีทีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 5-ข) ระบุว่าภายในเซลล์สร้างเมือกมี mucin granules ติดสีแดงอมชมพูของสีย้อม Eosin และพบการเพิ่มขึ้นของ mucin granule เซลล์สร้างเมือก เซลล์เม็ดเลือด และแองเกล็ด (ภาพที่ 5-ข) มากกว่าหอยนางรมปากจีบควบคุม (ภาพที่ 5-ก) ยืนยันว่าหอยนางรมปากจีบมีการตอบสนองต่อความเครียดที่ถูกกระตุ้นด้วยสารดีดีที



ภาพที่ 5 เซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ในสภาวะ (ก) ไม่มีสารดีดีที และ (ข) มีสารดีดีที (100 ไมโครกรัมต่อลิตร)

ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

สัญลักษณ์ Bm = Basement membrane, Bs = Blood sinus, Cnt = Connective tissue,

Hc = Hemocyte, Mc = Mucous cell

สรุปและอภิปรายผล

การศึกษาความเป็นพิษของสารดีดีทีที่ทำให้หอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ตายครึ่งหนึ่งใช้เวลา 96 ชั่วโมง ระบุว่าหอยนางรมปากจีบมีเปอร์เซ็นต์การตายเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสารดีดีทีในความเข้มข้นที่สูงขึ้น หลังจากวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Probit analysis ค่าความเข้มข้นของดีดีทีที่ทำให้หอยนางรมปากจีบตาย 50 % ภายใน 96 ชั่วโมง (96-h LC₅₀) มีค่าเท่ากับ 1,000±0.08 ดังนั้นค่าประมาณ 10% ของค่า LC₅₀ มีค่าเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร จากการศึกษาลักษณะของเซลล์สร้างเมือกของเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ โดยเทคนิคทางมิวชีววิทยาด้วยการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) ระบุว่าเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบมีลักษณะเป็นเยื่อบุผิวชั้นเดียวชนิด pseudostratified columnar epithelium ประกอบด้วยเซลล์รูปทรงกระบอกสูงเรียงตัวชั้นเดียวคล้ายกับมีหลายชั้น เนื่องจากเซลล์อยู่ชิดติดกันมาก และเซลล์มีความยาวมากทำให้เบียดกันจนดูเหมือนมีหลายชั้น มีเซลล์สร้างเมือกแทรกอยู่ตลอดความยาวของเนื้อเยื่อ บริเวณแมนเทิล สอดคล้องกับรายงานการศึกษาในหอยน้ำจืดฝาเดียวสองชนิด คือ *Lymnaea stagnalis* และ *Biomphalaria pfeifferi* (Zylstra, 1972) ที่พบเซลล์สร้างเมือกแทรกในเยื่อบุผิวชั้นเดียวชนิด pseudostratified columnar epithelium บริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิล เซลล์สร้างเมือกที่พบในหอยนางรมปากจีบ มีขนาดใหญ่ รูปร่างไม่แน่นอน แต่ส่วนใหญ่มีรูปร่างค่อนข้างกลมคล้ายคลึงกับถ้วยหรือแก้วไวน์ พบนิวเคลียสอยู่บริเวณฐานของเซลล์ติดสีม่วงของสีย้อม Hematoxylin ลักษณะของเซลล์สร้างเมือกที่พบในครั้งนี้ ตรงกับ รายงานการศึกษาโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกบริเวณเหงือกและแมนเทิลของหอยสองฝาน้ำเค็ม (Allam & Espinosa, 2015) ในเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิล และเหงือกของหอยนางรมปากจีบ (Khondee et al., 2016) ตรงกับรายงานการศึกษาโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกบริเวณเท้าของหอยทากบก (*Helix pomatia*) (Greistorfer et al., 2017) และตรงกับรายงานการศึกษาโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกบริเวณเหงือกของปลา ปลากดหมูรีต้า (*Rita rita*) (Yashpal et al., 2007, 2014) การหลั่ง mucin granule ของเซลล์สร้างเมือกที่บริเวณผิวด้านนอกของเซลล์ (apical surface) ติดสีแดงอมชมพูของสีย้อม Eosin ตรงกับรายงานการศึกษาของ เมธิยา อุฑากา และคณะในปี พ.ศ. 2560 ระบุว่าพบ mucin granules จำนวนมากในเซลล์สร้างเมือกภายในท่อ รวมของต่อมย่อยอาหารของหอยนางรมปากจีบ จากผลการศึกษาข้างต้นที่พบเซลล์สร้างเมือกที่แตกต่างกัน 3 ประเภทตามการติดสีย้อม เมื่อทำการย้อมด้วยสีย้อม Haematoxylin และ Eosin (H&E) ตรงกับการศึกษาเซลล์สร้างเมือกบริเวณเหงือกของปลาน้ำจืด *Abramis brama* ที่ได้รับการปนเปื้อนน้ำมันดิบ ระบุว่าพบเซลล์สร้างเมือกที่ แตกต่างกัน 3 ประเภทตามลักษณะการติดสี ได้แก่ เซลล์สร้างเมือกที่ติดสีย้อม Eosin เซลล์สร้างเมือกที่ติดสีย้อม Haematoxylin และเซลล์สร้างเมือกที่ไม่ติดสีย้อมทั้งสองชนิด (Giari et al., 2012) เซลล์สร้างเมือกจะเรียงตัว ตั้งอยู่บนเยื่อฐาน (Basement membrane) ซึ่งเป็นเยื่อบางที่รองรับชั้น epithelium และได้เยื่อฐานนี้พบเซลล์ของ

เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue cell) ที่มีลักษณะการเรียงตัวของเซลล์แบบหลวมๆ เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่สะสมสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต (Bhagavan & Ha, 2011) ในบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันนี้พบแองเจลิโอด (Blood sinus) ขนาดเล็กแทรกอยู่ทั่วไป เพื่อนำเลือดมาเลี้ยงอวัยวะในส่วนนี้ ลักษณะของแองเจลิโอดยังช่วยในการยืนยันว่าหอยนางรมมีระบบเลือดแบบเปิดอีกด้วย และพบเซลล์เม็ดเลือด (Hemocyte) กระจายตัวแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เมื่อใช้เทคนิคทางมิวซิกวิทยาเคมีด้วยการย้อมสี Periodic acid-Schiff และ Alcian blue pH 2.5 (PAS/AB 2.5) พบเซลล์สร้างเมือกบริเวณแมนเทิลของหอยนางรมปากจับย้อมติดสีได้ 2 รูปแบบ คือ กลุ่มที่ติดสีแดงของสี Periodic acid-Schiff (PAS) จะสร้างเมือกที่มีคุณสมบัติเป็นกลาง และกลุ่มที่ติดสีน้ำเงินของสี Periodic acid-Schiff และ Alcian blue pH 2.5 (PAS/AB 2.5) ซึ่งเซลล์สร้างเมือกที่พบส่วนใหญ่ติดสีย้อมนี้จะสร้างเมือกที่มีคุณสมบัติเป็นกลาง และเป็นกรดภายในเซลล์เดียวกัน ลักษณะเชิงเคมีดังกล่าวตรงกับรายงานการศึกษาโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกบริเวณเท้าในหอยทากบก (*Helix pomatia*) โดยเทคนิคทางมิวซิกวิทยาเคมี (Greistorfer et al., 2017) ผลจากการย้อมด้วยสี PAS/AB 2.5 ยืนยันว่าเซลล์สร้างเมือกที่พบในเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิลของหอยนางรมปากจับ ทำหน้าที่สร้าง และหลั่งมิวซิน ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรต สอดคล้องกับรายงานการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของเซลล์สร้างเมือกบริเวณลำไส้ใหญ่ของนกกกระจอกเทศที่ยืนยันถึงการพบ mucopolysaccharides ตามการติดสีย้อมชนิดนี้ (Duritits & Mugurevics, 2016) ดังนั้นด้วยคุณสมบัติทางเคมีของเมือกที่สร้างและหลั่งออกจากเซลล์สร้างเมือก จึงอาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการป้องกันตัวเองจากอันตรายที่ได้รับจากสารเคมีหรือสิ่งแวดล้อมที่หอยนางรมอาศัยอยู่ (defensive mechanism) (Arrighetti et al., 2015) ป้องกันการติดเชื้อโรคที่ปนเปื้อนมากับน้ำ ป้องกันไม่ให้เชื้อโรคสัมผัสกับเนื้อเยื่อโดยตรง สอดคล้องกับรายงานการศึกษาหน้าที่ของเมือกต่อระบบภูมิคุ้มกันที่หลั่งออกมาปกคลุมผิวหนังของปลา (Benhamed et al., 2014) และสอดคล้องกับการศึกษาเมือกที่หลั่งออกมาปกคลุมผิวหนังของปลา olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) เพื่อดักจับจุลชีพ (Jang et al., 2017) เมื่อต่อกระบวนการกรองกินอาหารของหอยนางรม เมื่อมิวซินหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือก และสัมผัสกับน้ำจะพองตัวกลายเป็นชั้นเมือกปกคลุมเนื้อเยื่อผิว สอดคล้องกับรายงานการศึกษาในปลา corallivorous ซึ่งเป็นปลากินพืชที่อาศัยอยู่ในน้ำเค็ม จะหลั่งเมือกออกมาปกคลุมบริเวณผิวปากป้องกันอันตรายจากการกินพืชขณะผิวปากสัมผัสกับพืช (Huertas & Bellwood, 2017) เมือกที่พบในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันอาจมีหน้าที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมในการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์สร้างเมือกบริเวณแมนเทิลของหอยนางรมปากจับ ที่ความเข้มข้นของสารละลายดีดีที 100 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยเทคนิคทางมิวซิกวิทยาด้วยการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) เปรียบเทียบที่เวลา 96 ชั่วโมง ระหว่างหอยนางรมปากจับควบคุม กับหอยนางรมปากจับที่ได้รับสารดีดีทีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร พยาธิสภาพที่พบเป็นตัวบ่งชี้ถึงภาวะเสี่ยงต่ออันตรายในเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิลของหอยนางรมปากจับที่ตอบสนองต่อการปนเปื้อนของสารดีดีทีในน้ำทะเล ได้แก่ เซลล์สร้างเมือกมีจำนวนเพิ่มขึ้น (hyperplasia) และมีขนาดเซลล์ใหญ่ขึ้นในหอยนางรมปากจับที่ได้รับสารดีดีทีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ตรงกับรายงานการศึกษาเซลล์สร้างเมือกบริเวณเหงือกของปลา Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) ด้วยเทคนิคทางมิวซิกวิทยาเคมี ระบุว่าเซลล์สร้างเมือกบริเวณเหงือกมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเมื่ออาศัยอยู่ในน้ำที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนีย (ammonia) 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เป็นเวลา 90 วัน และเมื่ออาศัยอยู่ในน้ำที่มีความเข้มข้นของเกาลิน (kaolin) 7000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 64 วัน เทียบกับกลุ่มควบคุม (Ferguson et al., 1992) จำนวนเซลล์สร้างเมือกที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้เกิดการสร้างและหลั่งเมือกเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ตรงกับรายงานการศึกษาเมือกบริเวณท่อน้ำเดินหายใจของหนูเมื่อได้รับควันบุหรี่เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ระบุว่ามีการหลั่งเมือกออกมาตามท่อน้ำเดินหายใจเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับควันบุหรี่ จัดเป็นการตอบสนองต่อความเครียดจากสารเคมีที่ได้รับ (Ueha et al., 2017) mucin granule ที่อยู่ในเซลล์สร้างเมือกติดสีแดงชมพูของสีย้อม Eosin มีจำนวนเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับหอยนางรมปากจیبควบคุม ตรงกับการศึกษาในมนุษย์ ระบุว่าในสภาวะที่เซลล์สร้างเมือกถูกกระตุ้นส่งผลให้เซลล์สร้างเมือกสร้าง mucin granule เพิ่มขึ้น เช่น เมื่อเซลล์สร้างเมือกบริเวณระบบทางเดินหายใจถูกกระตุ้นด้วยฝุ่นละออง ควัน ไวรรัส หรือ แบคทีเรีย จึงเป็นที่มาของอาการน้ำมูกไหลเวลาเป็นหวัด (Gómez et al., 2014) นอกจากนี้ยังพบการรวมกลุ่มกันของเซลล์ฮีโมไซท์ (Hemocyte infiltration) บริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของอวัยวะแมนเทิล และพบแอ่งเลือดที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเทียบกับหอยนางรมปากจیبควบคุม พยาธิสภาพที่แสดงออกในระดับเนื้อเยื่อจากผลการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นนั้น เป็นสัญญาณบ่งชี้ว่าเซลล์กำลังเกิดการอักเสบ เช่นเดียวกับการศึกษาถึงผลกระทบของสารทีบีที (TBT) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50 และ 150 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นเวลาที่ 48 ชั่วโมง ในเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิล และเหงือกของหอยนางรมปากจیب (Khondee et al., 2016) ดังนั้นการเพิ่มทั้งจำนวน และขนาดของเซลล์เมือกนี้จึงเป็นการยืนยันว่าหอยนางรมปากจیب มีการตอบสนองต่อความเครียดที่ถูกกระตุ้นด้วยสารดีดีที และเหตุที่พบเซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลจำนวนมาก เมื่อเทียบกับหอยนางรมปากจیبควบคุม เนื่องจากแมนเทิลเป็นส่วนที่ปกคลุมอวัยวะภายในทั้งหมดของหอยนางรม เมื่อหอยมีการเปิดเปลือกเพื่อหายใจหรือกรองกินอาหารอวัยวะส่วนนี้ก็สัมผัสกับสารปนเปื้อนเป็นส่วนแรก ซึ่งจากการทดสอบผลต่างของค่าเฉลี่ยด้วยโปรแกรม Minitab 17 ได้ค่า T-Value = 6.87 และ P-Value = 0.000 ยืนยันว่าจำนวนเซลล์สร้างเมือกในเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิลของหอยนางรมปากจیبในกลุ่มที่ถูกทดสอบด้วยสารดีดีทีที่มีมากกว่ากลุ่มควบคุม ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ($P\text{-Value} \leq 0.05$)

งานวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาทางด้านมิวชีววิทยาของเซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจیب จัดเป็นรายงานแรกของประเทศไทย ซึ่งนอกจากจะทำให้เข้าใจถึงชีววิทยาของเซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจیبแล้ว ยังทำให้ทราบถึงการตอบสนองต่อสารดีดีที ทำให้ตระหนักถึงสิ่งแวดล้อมที่อาจไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในทะเล และเกิดการเฝ้าระวังในอนาคตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ทุนโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

- กรมควบคุมมลพิษ. (2541). *ดีดีที (DDT)*. กรุงเทพฯ: ฝ่ายศูนย์ข้อมูลสารอันตรายและอนุสัญญา กองจัดการสารอันตรายและกากของเสีย กรมควบคุมมลพิษ: 15-16.
- เมธิยา อุทากา สุภัททา ฉ่อยฉ่ำ กุณิษฐ์ ธนอมจิตร และสุทิน กิ่งทอง. (2560). กายวิภาคและเนื้อเยื่อวิทยาของต่อมย่อยอาหารในหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* (Born, 1778). *วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้*, 8(1), 18-26.

ภาษาต่างประเทศ

- Allam, B., and Espinosa, E. P. (2015). **Mucosal immunity in mollusks**. Stony Brook, New York, USA : School of Marine and Atmospheric Sciences, Stony Brook University. 327-329
- Arrighetti, F., Teso, V., and 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 and Cell**, 47(2), 171-177.
- Benhamed, S., Guardiola, F. A., Mars, M., and Esteban, M. A. (2014). Pathogen bacteria adhesion to skin mucus of fishes. **Veterinary Microbiology**, 171(1-2), 1-12.
- Bhagavan, N. V., and Ha, C.-E. (2011). Chapter 10 - Connective Tissue: Fibrous and Non-Fibrous Proteins and Proteoglycans. In N. V. Bhagavan & C.-E. Ha (Eds.), **Essentials of Medical Biochemistry**, 85-96.
- Dumme, V., Tanhan, P., Kruatrachue, M., Damrongphol, P., and Pokethitiyook, P. (2015). Histopathological changes in snail, *Pomacea canaliculata*, exposed to sub-lethal copper sulfate concentrations. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 122, 290-295.
- Duritis, I., and Mugurevics, A., (2016). Distribution and characterisation of goblet cells in the large Intestine of ostriches during the pre- and post-hatch period. **Anatomia Histologia Embryologia**, 45(6), 457-462.
- Ferguson, H. W., Morrison, D., Ostland, V. E., Lumsden, J., and Byrne, P. (1992). Responses of Mucus-Producing Cells in Gill Disease of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) **Journal of Comparative Pathology**, 106, 255-265.
- Giari, L., Dezfali, B. S., Lanzoni, M., and Castaldelli, G. (2012). The impact of an oil spill on organs of bream *Abramis brama* in the Po River. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 77, 18-27.
- Gómez, D., Bartholomew, J., and Sunyer, J. O. (2014). Biology and mucosal immunity to myxozoans. **Developmental and Comparative Immunology**, 43(2), 243-256.

- Greistorfer, S., Klepal, W., Cyran, N., Gugumuck, A., Rudoll, L., Suppan, J., and von Byern, J. (2017). Snail mucus - glandular origin and composition in *Helix pomatia*. **Zoology (Jena)**, 122, 126-138.
- Huertas, V., and Bellwood, D. R. (2017). Mucus-secreting lips offer protection to suction-feeding corallivorous fishes. **Current Biology Magazine**, 27(11), 406-407.
- Jang, Y. H., Subramanian, D., Won, S. H., and Heo, M. S. (2017). Immune response of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) infected with the myxosporean parasite *Kudoa septempunctata*. **Fish & Shellfish Immunology**, 67, 172-178.
- Khondee, P., Srisomsap, C., Chokchaichamnankit, D., Svasti, J., Simpson, R. J., and Kingtong, S. (2016). Histopathological effect and stress response of mantle proteome following TBT exposure in the Hooded oyster *Saccostrea cucullata*. **Environmental Pollution**, 218, 855-862.
- Kingtong, S., Chitramvong, Y., and Janvilisri, T. (2007). ATP-binding cassette multidrug transporters in Indian-rock oyster *Saccostrea forskali* and their role in the export of an environmental organic pollutant tributyltin. **Aquatic Toxicology**, 85(2), 124-132.
- Laryngeal mucus hypersecretion is exacerbated after smoking cessation and ameliorated by glucocorticoid administration. **Toxicology Letters**, 265, 140-146.
- Ueha, R., Ueha, S., Kondo, K., Nito, T., Fujimaki, Y., Nishijima, H., and Yamasoba, T. (2017).
- Yashpal, M., and Mittal, A. K. (2014). Serous goblet cells: the protein secreting cells in the oral cavity of a catfish, *Rita rita* (Hamilton, 1822) (Bagridae, Siluriformes). **Tissue and Cell**, 46(1), 9-14.
- Yashpal, M., Kumari, U., Mittal, S., and Mittal, A. K. (2007). Histochemical characterization of glycoproteins in the buccal epithelium of the catfish, *Rita rita*. **Acta histochemica**, 109(4), 285-303.
- Zylstra, U. (1972). Histochemistry and ultrastructure of the epidermis and the subepidermal gland cells of the freshwater snails *lymnaea stagnalis* and *Biomphalaria pfeifferi*. **Z. Zellforsch**, 93-134.