

การเปลี่ยนแปลงจุลกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของปลาดตะเพียนทอง

Barbonymus altus จากแม่น้ำตาปี จังหวัดนครศรีธรรมราชHistological Changes of Gonadal Tissues in Red-tailed Tinfoil, *Barbonymus altus*
from Tapee River, Nakhon Sri Thammarat Provinceคิลปชัย เสนารัตน์¹ พิชญ์ พลประเสริฐ² และ วชิพร เป็นน้ำ³¹ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330²สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จ. พิษณุโลก 65000³ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ชีวภาพ ฝ่ายมาตรวิทยาเคมีและชีวภาพ สถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ จ. ปทุมธานี 12120

*E-mail: oumhisto@hotmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาโครงสร้างพื้นฐานของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และสภาวะของปลาดตะเพียนทอง *Barbonymus altus* ที่อาศัยอยู่บริเวณใกล้พื้นที่การเกษตรและชุมชนเมืองของแม่น้ำตาปี ช่วงที่ไหลผ่านจังหวัดนครศรีธรรมราช โดยใช้การเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคเป็นตัววัดทางชีวภาพ ผลการศึกษาพบว่า อัณฑะของปลาดตะเพียนทองเป็นชนิด unrestricted spermatogonial testis มีการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์อยู่ในถุงสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (spermatocyste) ซึ่งแต่ละถุงจะมีการพัฒนาขึ้นพร้อมกัน ส่วนในเพศเมียพบว่าภายในรังไข่ประกอบด้วยเซลล์ไข่ระยะต้น oogonia หรือระยะ previtellogenic (chromatin nucleolar, perinucleolar และ cortical alveolar stage) เท่านั้น สำหรับจุลกายวิภาคในเพศผู้พบ eosinophilic cytoplasm ในระยะ spermatogonia และเพศเมียพบการฝ่อของเซลล์ไข่ (atresia) ร่วมกับการเสื่อมของเซลล์ไข่แบบมีแวคิวโอล (vacuolar degeneration) ในเซลล์ไข่ระยะต้น โดยเฉพาะระยะ perinucleolar ที่แสดงถึงความเสียหายอย่างชัดเจน ดังนั้นหากปลาดตะเพียนทองยังคงดำรงชีวิตในสิ่งแวดล้อมใกล้กับบริเวณพื้นที่เกษตรกรรมขนาดใหญ่อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลายาวนาน ย่อมก่อให้เกิดปัญหาต่อสภาวะอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ ดังนั้นการศึกษาดังนี้ยังพิสูจน์ได้ว่าปลาดตะเพียนทองสามารถใช้เป็นสัตว์เฝ้าระวังและสามารถใช้จุลกายวิภาค (histopathology) เป็นตัววัดทางชีวภาพที่เหมาะสมสำหรับประเมินผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมในแม่น้ำตาปีเบื้องต้นได้

คำสำคัญ : จุลกายวิภาค เนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ ปลาดตะเพียนทอง แม่น้ำตาปี มลพิษทางน้ำ

Abstract

The study investigated the normal structure of gonadal tissue and assessed the healthy condition of red-tailed tinfoil, *Barbonymus altus* (Günther, 1868) in the Tapee River in agricultural and urban areas of Nakhon Sri Thammarat Province. Histo-pathological changes were used as bio-markers of the health of *B. altus*. The male fish have unrestricted spermatogonial testes that have synchronous development within spermatocytes. The female ovaries contain the oocytes at the oogonia and previtellogenic stages (chromatin nucleolar stage, perinucleolar stage, and cortical alveolar stage). The study showed that the eosinophilic cytoplasm in the spermatogonia stage, atresia together with the pre-vitellogenic stage, especially the peri-nucleolar stage, showed prominent damage. The study shows that *B. altus* can be used as a sentinel species and histopathology as a bio-marker for monitoring changes in the environment of the Tapee River.

Keywords: Histopathology, Gonad, *Barbonymus altus*, Tapee River, Aquatic pollution

1. บทนำ

การตรวจสอบระดับการปนเปื้อนของสารเคมีทางการเกษตรหรือสารเคมีที่สามารถออกฤทธิ์รบกวนการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อ (endocrine-disrupting chemicals; EDCs) ในแหล่งน้ำธรรมชาติ วิธีการทางเคมีเพื่อตรวจวัดปริมาณสารปนเปื้อน โดยสุ่มตรวจจากตัวอย่างน้ำ ดินตะกอน หรือสัตว์ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่นั้นๆ การตรวจวิเคราะห์สารเคมีดังกล่าวมักตรวจพบได้ในระดับต่ำกว่าค่ามาตรฐานหรือบางครั้งก็ไม่สามารถตรวจพบได้เลยหากการปนเปื้อนนั้นมีระดับต่ำมาก ระดับการปนเปื้อนของสารดังกล่าวมีความเชื่อว่าอาจมีผลต่อสิ่งที่มีชีวิตที่อาศัยในบริเวณนั้น การใช้วิธีทางเคมีเพียงอย่างเดียวจึงอาจไม่สามารถประเมินความเสี่ยงได้ครอบคลุมในทุกมิติ งานวิจัยในปัจจุบันจำนวนมากจึงมีการนำเอาสัตว์ที่อาศัยในพื้นที่ที่ปนเปื้อนมาใช้เป็นสัตว์เฝ้าระวัง (sentinel species) กันอย่างแพร่หลาย โดยอาศัยตัววัดทางชีวภาพ (biomarker) ที่มีความเหมาะสมมาช่วยในการประเมินผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นกับสัตว์ดังกล่าว [1],[2]

อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonad) ถือเป็นอวัยวะที่มีความไวต่อผลกระทบของสารเคมี ทั้งแบบเฉียบพลัน (acute toxicity) ในกรณีที่ได้รับสารพิษความเข้มข้นสูงระยะสั้น และแบบเรื้อรัง (chronic toxicity) เมื่อได้รับสารพิษความเข้มข้นต่ำเป็นระยะเวลานาน ซึ่งทั้งสองแบบล้วนแล้วแต่ทำให้เกิดความผิดปกติต่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และมัก

บริเวณใกล้เคียงพื้นที่เกษตรกรรมที่มีการใช้สารฆ่าวัชพืชอย่างต่อเนื่อง สามารถพบการปนเปื้อนของสารอะทราซีนในเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และเกิดจุลกายพยาธิภายในเนื้อเยื่อ เช่น เกิดการฝ่อของอัณฑะ (testicular atrophy) การเสื่อมของเซลล์เลย์ดิก (Leydig cell degeneration) ในปลาเพคู้ การฝ่อของเซลล์ไข่ (atresia) ระยะ previtellogenic และการเสื่อมของเซลล์ไข่แบบมีแวคิวโอล (vacuolar degeneration) ในปลาเพคเมียบ ซึ่งจุลกายพยาธิดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับปริมาณอะทราซีนในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในทิศทางเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [9] ระบบสืบพันธุ์ของปลาได้รับทั้งผลโดยตรงและโดยอ้อมจากมลพิษทางน้ำ ซึ่งมีผลต่อสุขภาพทางเพศของปลาและมียอดต่อจำนวน (fecundity) และการอยู่รอดของลูกปลา (survival) ในรุ่นถัดไปด้วย

ปลาตะเพียนทอง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Barbonymus altus* จัดเป็นปลาเศรษฐกิจในวงศ์ Cyprinidae ที่บริโภคกันอย่างแพร่หลาย สามารถพบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำรวมทั้งในแม่น้ำตาปีของประเทศไทย การศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างปลาตะเพียนทองจากแม่น้ำตาปี ช่วงที่ไหลผ่าน อำเภอดง จังหวัดนครราชสีมา บริเวณใกล้เคียงพื้นที่เกษตรกรรมที่มีการปลูกยางพารา ข้าวโพดและพืชเศรษฐกิจอีกหลายชนิด เนื่องจากมีรายงานการใช้สารเคมีทางการเกษตรในปริมาณสูงและหมุนเวียนติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน จึงมีโอกาที่สารเคมีดังกล่าว อาจปนเปื้อนลง

ผลของพาราควอตต่อปลา *Oreochromis niloticus* ที่ความเข้มข้นระดับ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าปลาเพคคูมีปริมาณ spermatozoa ลดลง ในขณะที่ปลาเพคเมียบมีเซลล์ไข่ระยะ late-vitellogenic เพิ่มขึ้น แต่กลับพบระยะ primary oocytes น้อยลงอย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าสารชนิดนี้มีผลและยับยั้งเซลล์ไข่ในระยะไข่อ่อนมากกว่าไขแก่ [7] อีกทั้งการศึกษาผลของยาฆ่าแมลงคาร์โบฟูเรนท์ต่อปลาหางนกยูงที่ความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเกิดจุลกายพยาธิเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ทั้งเพคคูและเพคเมียบ โดยพบการตายของเซลล์ไข่และสเปิร์ม [8] นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงปลากะมัง *Puntius proctozysron* ที่อาศัยในแม่น้ำน่าน จังหวัดน่าน

ตะเพียนทองเป็นตัวแทนของสงฆฆตเนมมนนาพบบโดยศึกษาโครงสร้างพื้นฐานของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เพื่อทราบถึงชีววิทยาการสืบพันธุ์พื้นฐาน (normal reproductive biology) และจุลกายพยาธิทั้งโครงสร้างและเซลล์สืบพันธุ์เบื้องต้น เพื่อคัดเลือกเป็นตัววัดทางชีวภาพที่เหมาะสมต่อไป ซึ่งข้อมูลส่วนนี้ทำให้ทราบถึงสุขภาพของปลาชนิดนี้ที่อาศัยในแม่น้ำตาปี

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

สุ่มเก็บตัวอย่างปลาตะเพียนทองตัวเต็มวัย ความยาวมาตรฐาน (standard length) 16-20 เซนติเมตร จำนวน 20 ตัว จากสองฤดูกาล คือ ต้นฤดูแล้ง (เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2554) และฤดูฝน

(เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2554) ด้วยวิธีการลงตาข่ายจากแม่น้ำคำปี บริเวณตำบลฉวาง อำเภอฉวาง จังหวัดนครราชสีมา (8° 25' 21" N 99° 30' 12" E) จำนวน 3 จุด ความยาวประมาณ 1 กิโลเมตร นำปลามาสดับด้วยการแช่น้ำแข็ง (rapid cooling method) ตามวิธีของ Wilson *et al.* [10] วัดความยาวของปลา (total length) ชั่งน้ำหนัก (weight) ทำการผ่าตัดเปิดช่องท้องเก็บอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และนำตัวอย่างเก็บในน้ำยารักษาสภาพเนื้อเยื่อ Davidson's fixative เตรียมตัวอย่างสไลด์ถาวรตามวิธีมาตรฐานของ paraffin method ตัด section ด้วยความหนา 5 μ m ย้อมสี hematoxylin และ eosin [11] นำสไลด์เนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเพื่อดูโครงสร้างพื้นฐานของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ระยะของเซลล์สืบพันธุ์ และสังเกตความผิดปกติของเนื้อเยื่อและเซลล์สืบพันธุ์ โดยตัดแปลงจากหลักเกณฑ์ของ Dietrich และ Krieger [12] และ OECD [13]

3. ผลการวิจัย

น้ำหนัก ความยาว (Total length) และ ค่าดัชนีความสมบูรณ์ทางเพศ (Gonado Somatic Index) หรือ GSI ของปลาตะเพียนจากแม่น้ำคำปีแสดงในตารางที่ 1

การศึกษาจุลกายวิภาค (Histology)

โครงสร้างอวัยวะและระยะของเซลล์สืบพันธุ์

(tunica albuginea) ภายในอวัยวะพบหลอดสร้างอสุจิ (semiferous lobules) เป็นจำนวนมาก แต่ละท่อจะเปิดรวมกันกลายเป็นท่อนำอสุจิ (vasa efferentia) ผั่งด้านในของหลอดสร้างอสุจิประกอบด้วยเซลล์สืบพันธุ์หลายระยะ จัดเป็นแบบ unrestricted spermatogonial testis และพบเซลล์เซอร์โทไล (sertoli cells) แทรกอยู่ระหว่างเซลล์สืบพันธุ์แต่เห็นได้ไม่ชัดเจน มีนิวเคลียสที่มีขอบเขตที่ไม่แน่นอนและนิวคลีโอลัส 1 อัน ระหว่างหลอดสร้างอสุจิยังพบกลุ่มเซลล์เลย์ดิก (Leydig cells) เป็นเซลล์ขนาดเล็กไซโทพลาสซึมติดสีชมพูจางๆ เห็นขอบเขตของเซลล์ไม่ชัดเจน นิวเคลียสกลมขนาดใหญ่ติดสีม่วงเข้ม จากการศึกษาครั้งนี้สามารถแบ่งระยะของเซลล์สืบพันธุ์ของ

ปลาตะเพียนทองสามารถแบ่งออกได้ดังนี้ (ภาพที่ 1A-C)

Primary spermatogonia เซลล์มีลักษณะกลมและขนาดใหญ่ที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์สืบพันธุ์ระยะอื่นๆ โดยที่ไซโทพลาสซึมติดสีชมพูจางๆ นิวเคลียสติดสีชมพูไม่สม่ำเสมอภายในบรรจุนิวคลีโอลัส 1 อัน เซลล์ในระยะนี้จะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ บริเวณผนังของหลอดสร้างอสุจิ

Secondary spermatogonia เซลล์ในระยะนี้มีขนาดและโครงสร้างคล้ายกับ primary spermatogonia เพียงแต่ไซโทพลาสซึมติดสีชมพูเข้มกว่าและเซลล์จะรวมอยู่กันเป็นกลุ่มภายใน spermatocysts โดยเซลล์สืบพันธุ์ภายใน spermatocyst จะมีการเจริญไปพร้อมกัน (synchronous development)

Primary spermatocyte เป็นระยะที่เกิดจากการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของ spermatogonia ทำให้มีขนาดเล็กลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับเซลล์ในระยะ spermatogonia ไซโทพลาสซึมติดสีชมพูจาง นิวเคลียสติดสีชมพูเห็นเยื่อหุ้มนิวเคลียสอย่างชัดเจน ภายในบรรจุนิวคลีโอลัส 1 อันอยู่ตรงกลางเซลล์

Secondary spermatocyte เซลล์มีขนาดเล็กลงเมื่อเปรียบเทียบกับระยะ primary spermatocyte เนื่องจากมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสครั้งที่ 1 ทำให้ปริมาณของไซโทพลาสซึมลดลง โครมาตินภายในนิวเคลียสหนาติดสีม่วงเข้ม แต่เซลล์ยังคงอยู่รวมกันภายใน spermatocyst

ไซโทพลาสซึมมีปริมาณน้อยมาก นิวเคลียสติดสีม่วงเข้มขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ เซลล์ในระยะนี้ยังคงอยู่รวมกันภายใน spermatocyst

Spermatozoon เซลล์ในระยะนี้ไม่ได้รวมกันอยู่ภายใน spermatocyst แต่จะถูกปล่อยเข้าไปใน lumen เซลล์ระยะนี้ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนหัวติดสีม่วงเข้ม ซึ่งเป็นส่วนที่มีนิวเคลียสอยู่ และหางติดสีชมพูเข้ม

จุลกายพยาธิ (histopathology) ของอวัยวะ

การศึกษาจุลกายพยาธิของเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ของปลาตะเพียนทองจากแม่น้ำคำปี ได้ผลเบื้องต้นคือ พบการเสื่อมของอวัยวะ (testicular degeneration) การสลายของนิวเคลียส (karyolysis)

เป็นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โดยที่ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์จะไม่ปรากฏนิวเคลียส เกิดการตายของเซลล์เซโทไลและเซลล์เลย์ดิก ในขณะที่ eosinophilic cytoplasm ในระยะ spermatogonia โดยที่เซลล์มีลักษณะติดสีชมพูเข้มกว่าเซลล์ปกติและการขยายของหลอดเลือด (dilation of blood vessel) ภายในอวัยวะของปลาเพศผู้ (ภาพที่ 1D)

โครงสร้างรังไข่และระยะเซลล์สืบพันธุ์

รังไข่ทั้งสองข้างถูกยึดด้วยชั้นมีโซวาเรียม (mesovarium) และถูกห่อหุ้มด้วยชั้นทูนิกา อัลบูจินี (tunica albuginea) ซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีกล้ามเนื้อเรียบแทรกตัวอยู่ด้วย ผังด้านในมีโอวี - เกอร์ริสโฟลด์ (ovigerous folds) ลักษณะคล้ายนิ้วมือยื่นเข้าไปในช่องว่างของรังไข่ ไข่ที่อยู่ในระยะไข่อ่อน (early developmental stage oocytes) ถูกบรรจุอยู่ในบริเวณขอบ (germinal epithelium) ของโอวีเกอร์ริสโฟลด์ จากการศึกษาครั้งนี้สามารถพบเซลล์ไข่หลายระยะ (ภาพที่ 2A-C) ได้แก่

Oogonia เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กมากแทรกอยู่ในบริเวณผนังของโอวีเกอร์ริสโฟลด์ โดยที่ไซโตพลาสซึม (ooplasm) ติดสีชมพูจาง นิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางเซลล์ ในปลาชนิดนี้มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม 2-6 เซลล์

Chromatin nucleolar stage เซลล์ไข่มีขนาด

(prefollicular cell) แต่ไม่ชัดเจน

Early perinucleolus stage เซลล์ไข่มีขนาดใหญ่กว่าระยะก่อนหน้าอย่างเห็นได้ชัด ไซโตพลาสซึมติดสีม่วงเข้มน้อยกว่าระยะ chromatin nucleolar บริเวณใกล้นิวเคลียสจะพบเป็นบอดี้ (baibiani body) นิวเคลียสมีขนาดใหญ่อยู่ข้างใดข้างหนึ่งของเซลล์ นิวคลีโอลัสกระจายอยู่ในนิวเคลียส ระยะนี้เห็นเซลล์ฟอลลิเคิล (follicular cell) ได้อย่างชัดเจน

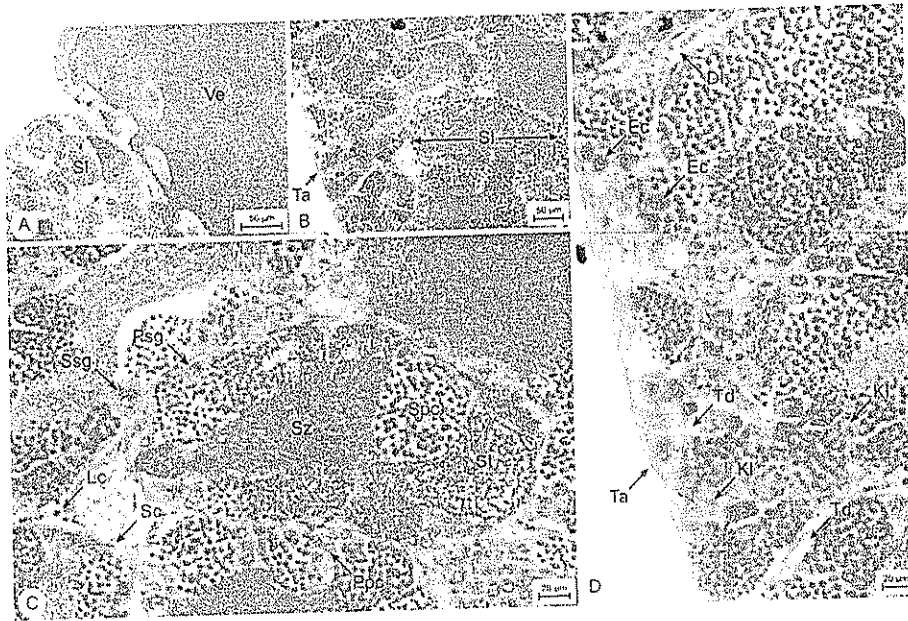
Late perinucleolus stage ในระยะนี้มีโครงสร้างเหมือนกับระยะ early perinucleolus เพียงแต่นิวคลีโอลัสจะเรียงอยู่รอบเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane)

Cortical alveolar stage เซลล์ในระยะนี้มีขนาดใหญ่กว่าระยะ late perinucleolus นิวเคลียสเริ่มติดสีชมพูมากขึ้น ภายในไซโตพลาสซึมเริ่มพบถุงใสที่เรียกว่า โยลค์ เวสสิเคิล (yolk vesicle หรือ cortical alveolar) บริเวณใกล้ๆ กับขอบเซลล์ไข่

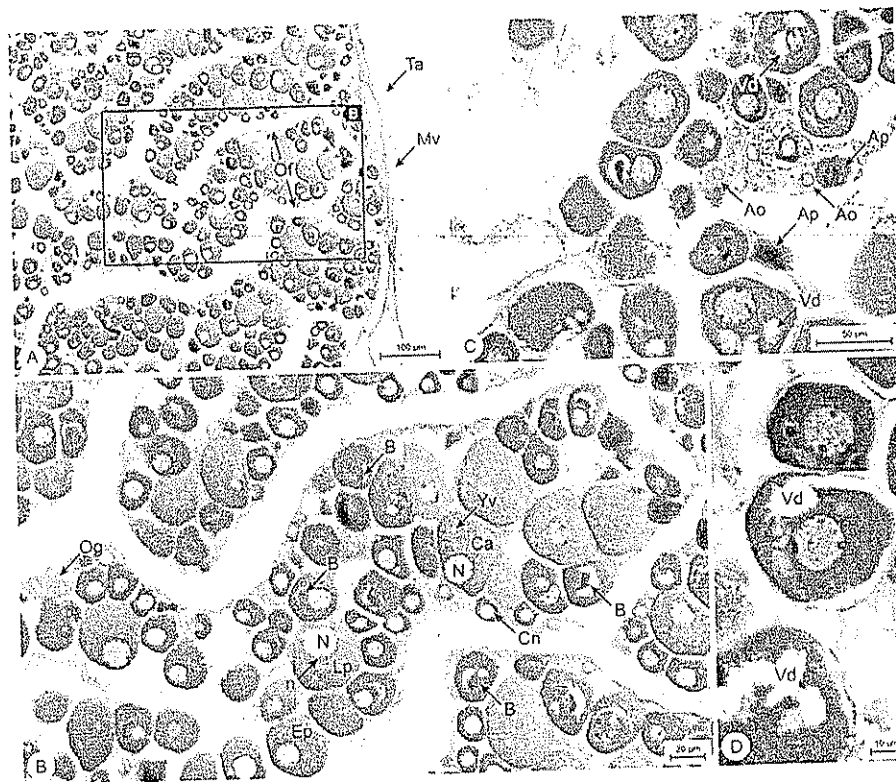
Vitellogenic stage และ mature stage ไม่พบในการศึกษาครั้งนี้

จุลกายพยาธิ (histopathology) ของรังไข่

จุลกายพยาธิของรังไข่ปลาเพศเมียจากแม่น้ำตาปีพบการฝ่อของเซลล์ไข่ (atresia) ในระยะ oogonia และ previtellogenic โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะ perinucleolar และการเสื่อมของเซลล์ไข่แบบมีแวคิวโอล (vacuolar degeneration) ซึ่งเป็นการเสื่อมของเซลล์ เนื่องจากเกิดแวคิวโอลภายในไซโตพลาสซึม



ภาพที่ 1 โครงสร้าง (A-C) และจุลกายพยาริของอัณฑะ (D) แสดงท่อสร้างอสุจิ (seminiferous; SI) ท่อนำอสุจิ (vasa efferentia), Psg = primary spermatogonia, Ssg = secondary, spermatogonia, Psc = primary spermatocytes, Spc = secondary spermatocytes, St = spermatids, Sz = spermatozoa, Sc = sertoli cell, Lc = Leydig cells, การขยายตัวของหลอดเลือด (dilation of blood vessel), Ec = eosinophilic cytoplasm, Ta = tunica albuginea, การเสื่อมของอัณฑะ (testicular degeneration = Td), KI = karyolysis



ภาพที่ 2 โครงสร้าง (A-B) และจุลกายพยาริของรังไข่ (C-D) แสดง Ta = tunica albuginea, Mv = mesovarium, of = ovigerous fold, Og = oogonia, B = bulbous body, N = nucleus, Ca = cortical alveolar stage, Lp = late perinucleolar stage, Ep = early perinucleolar stage, n = nucleolus, Cn = chromatin nucleolar stage, Yv = yolk granule, Vd = vacuolar degeneration, การฝ่อของไข่ในระยะ oogonia (Ao), การฝ่อของไข่ใน

ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนัก ความยาว และค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (GSI) ของปลาตะเพียนทอง

	เพศผู้		เพศเมีย	
	ฤดูแล้ง	ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	ฤดูฝน
น้ำหนัก (กรัม)	169.70 ± 5.20	171.40 ± 4.36	204.22 ± 3.62	184.24 ± 6.82
ความยาว (เซนติเมตร)	17.42 ± 0.87	17.24 ± 0.58	18.76 ± 6.70	18.25 ± 0.18
ค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (GSI)	2.51 ± 0.31	3.01 ± 0.15	1.50 ± 1.09	1.40 ± 0.71

4. อภิปรายผล

จากการศึกษาจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ พบว่าอวัยวะของปลาตะเพียนเป็นแบบโลบูลาร์ (lobular type) ซึ่งต่างจากปลาหางนกยูง *Poecilia reticulata* เป็นแบบทิวบูลาร์ (tubular type) [14] อวัยวะแต่ละข้างประกอบด้วยหลอดสร้างน้ำอสุจิ (seminiferous lobules) เป็นจำนวนมากก่อนที่จะรวมกันเป็นท่อน้ำอสุจิ ซึ่งเป็นลักษณะเดียวกับที่พบในอวัยวะของปลากระดุกเขี้ยวส่วนใหญ่ [14] แต่ละหลอดสร้างอสุจิประกอบด้วยเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น spermatogonia, primary spermatocyte, secondary spermatocyte, spermatid และ spermatozoa สอดคล้องกับปลาหลายชนิดดังเช่น ปลากะมัง *Puntius proctozysron* ปลา European pike ปลา striped bass ปลา *Gerres rappa*, *G. acinaces* และ *G. filamentosus* [15],[16],[17],[18]

อวัยวะของปลาตะเพียนทองเป็นแบบ unrestricted spermatogonia testis คือ มีเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่างๆ

โครงสร้างหรือองค์ประกอบที่แตกต่างกันไป พบว่าระยะ perinucleolar ภายในไซโตพลาสซึมพบลักษณะเป็นเม็ดกลมติดสีน้ำเงินเข้มที่เรียกว่า บัลเบียนนิ บอดี้ (bulbiani body หรือ yolk nucleus หรือ juxtanuclear complex) มีลักษณะเป็นแกรนูลเป็นสารพวกไรโบนิวคลีโอโปรตีน (ribonucleoprotein) มักรวมอยู่กับออร์แกเนลล์หลายชนิดทั้งเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม (granular endoplasmic reticulum) กอลจิ แอปพาราตัส (golgi apparatus) ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) และ ไลโซโซม (lysosome) หน้าที่ของเซลล์ชนิดนี้เชื่อว่าอาจเกี่ยวข้องกับ metabolic activities โดยที่ลักษณะโครงสร้างดังกล่าวพบได้ในปลากระดุกเขี้ยวทั่วไป [19],[20],[21],[22],[23] หลังจากนั้นเซลล์ไซเข้าสู่ระยะ cortical alveolar จะเริ่มเห็นเป็นถุงใสบริเวณขอบด้านนอกติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ ถุงใสที่สร้างขึ้นไม่ใช่โวลล์ที่แท้จริง (yolk vesicle หรือ cortical alveoli) จัดเป็นพวกไกลโคโปรตีน มีบทบาทในการป้องกัน polyspermic ช่วงผสมพันธุ์ [23] ช่วงท้ายของเซลล์ไซมี

จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่า เซลล์ชนิดนี้มีหน้าที่เลี้ยงดูและเซลล์สืบพันธุ์ โดยที่ไซโตพลาสซึม (cytoplasmic process) จะยื่นโอบล้อมเซลล์สืบพันธุ์กลายเป็น spermatocyst และยังมีบทบาทในการทำลายอสุจิที่ตกค้างเมื่อสิ้นสุดฤดูกาลผสมพันธุ์อีกด้วย [12] จากการศึกษาครั้งนี้พบ spermatozoa ได้ทั้งสองฤดูกาล ดังที่ทราบแล้วว่าเซลล์ระยะนี้แสดงถึงความพร้อมสืบพันธุ์ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าปลาชนิดนี้มีการสืบพันธุ์ในช่วงนี้ แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาทางจุลชีววิทยาในรอบปียังจะต้องดำเนินการวิจัยต่อไป เพื่อที่จะทำได้ข้อมูลที่ได้ถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

โครงสร้างและเซลล์สืบพันธุ์ของรังไข่ปลาตะเพียนทอง มีลักษณะเช่นเดียวกับปลากระดุกเขี้ยวทั่วไป [15],[19] โดยที่การเจริญของเซลล์ไซในแต่ละระยะมีลักษณะ

ก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ไม่พบระยะ vitellogenic และไซแนก แต่กลับพบเซลล์สืบพันธุ์ในระยะไซ่อน (ระยะ chromatin nucleolar, perinucleolar และ cortical alveolar) ทุกตัวอย่าง ทั้งที่ควรสอดคล้องกับเพศผู้ที่ปรากฏ spermatozoa จากเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นอาจเป็นเพราะหลายปัจจัยทั้งตัวอย่างที่เก็บน้อยเกินไป กลไกในตัวปลาเพศเมียที่อาจจะมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมภายนอก ดังเช่น อุณหภูมิ ความยาวกลางวันกลางคืน ปริมาณน้ำฝนและอาหารในธรรมชาติ [24],[25] หรือแม้กระทั่งสารเคมีที่ปนเปื้อนในแม่น้ำลำคลองก็อาจจะมีผลต่อการเจริญของรังไข่ทั้งสิ้น

จุลกายพยาสภาพของอวัยวะเพศของปลาสอดคล้องกับ รายงานของ Spanò และคณะ [26] ซึ่งศึกษาปลาทอง *Carassius auratus* ที่เลี้ยงในสารอะทราซีน พบการเสื่อมของอวัยวะ (testicular degeneration) เมื่อเปรียบเทียบกับ กลุ่มควบคุม และอวัยวะของปลากะมัง[9] ตลอดไปจนถึง ปลาอีกหลายชนิดหลังได้รับสารเคมีในกลุ่มที่สามารถออกฤทธิ์รบกวนการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อ [27],[28],[29]. [30] eosinophilic cytoplasm ในระยะ spermatogonia แสดงให้เห็นว่าเซลล์เข้าสู่สภาวะเซลล์ตาย (death cell) โดยที่ไฮโดรพลาสซึมติดสีชมพูเข้มมากผิดปกติ เนื่องจาก โครงสร้างของโปรตีนภายในเซลล์เกิดความเสียหาย [31] ดังนั้นสภาวะสิ่งแวดล้อมที่ปลาอาศัยอยู่อาจชักนำให้เกิดจุลกายพยาสภาพในระยะ spermatogonia และอาจนำไปสู่ปัญหา การลดลงของเซลล์สืบพันธุ์ในระยะอื่นการศึกษา ครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์สืบพันธุ์ในระยะต้น (spermatogonia) มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของ สิ่งแวดล้อมอย่างเห็นได้ชัด

จุลกายพยาสภาพรังไข่ของเพศเมียที่เกิดขึ้นคล้ายกับปลา อีกหลายชนิดในห้องปฏิบัติการและสิ่งแวดล้อม [31],[32], [33],[34] การฝ่อของเซลล์ไข่ในระยะ oogonia และการ perinucleolar ลักษณะอาการดังกล่าวคล้ายกับการศึกษา ของ Spanò และคณะ [26] พบการเกิดเสื่อมของรังไข่ (ovarian degeneration) และการฝ่อของเซลล์ไข่เพิ่มขึ้นใน รังไข่ปลา *Carassius auratus* เมื่อเปรียบเทียบกับควบคุม หลังได้รับสารอะทราซีน (100 และ 1000 g/L) [26] นอกจากนี้ การเสื่อมแบบเมียวคิวโกล เป็นอาการที่เกิดขึ้น

และจำนวนไม่เท่ากัน การศึกษาจุลกายพยาสภาพอวัยวะสร้าง เซลล์สืบพันธุ์ ถึงแม้ว่าการที่พบอาจไม่รุนแรง แต่อย่างไร ก็ตามการพบ eosinophilic cytoplasm ในระยะ spermatogonia และการฝ่อของเซลล์ไข่ระยะต้น แสดงถึง ความเสียหายต่อเซลล์สืบพันธุ์อย่างชัดเจน ดังนั้นหากปลา ตะเพียนทองยังอาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่อาจจะมีการ ปนเปื้อนของสารเคมีหรือมีการเปลี่ยนแปลงของ สภาพแวดล้อมอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลายาวนาน ย่อม ก่อให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพการสืบพันธุ์อย่างหลีกเลี่ยง ไม่ได้ และอาจนำไปสู่ปัญหาการลดลงของจำนวนประชากร ปลาชนิดนี้ในแม่น้ำตาปีต่อไปในอนาคต จากการศึกษาพบ การฝ่อของเซลล์ไข่ระยะต้น แต่เรายังไม่อาจสรุปผลได้ 100% ว่าเกิดจากปัญหามลภาวะในแหล่งน้ำ เพราะไม่ได้ เก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนมาวิเคราะห์สารพิษตกค้าง จึง ยังไม่มีหลักฐานเพียงพอที่จะสรุปได้ แต่จากบททวน วรรณกรรม (literature review) จะเห็นแนวโน้มของ การศึกษาว่าพอจะเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ค้นคว้าได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ยังขาดข้อมูลทางด้าน สิ่งแวดล้อมทั้งคุณภาพน้ำและสารเคมีที่ปนเปื้อนในบริเวณ ที่ทำการการศึกษา จึงจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาปัจจัย ที่อาจเป็นสาเหตุหลักของการเกิดการเปลี่ยนแปลงของ เซลล์ของปลาต่อไป

แควคิวโกล มักเป็นอาการร่วมกับการฝ่อของเซลล์ไข่ในระยะ previtellogenic ซึ่ง Blazer [36] อธิบายไว้ถึงการเพิ่มขึ้น ของการฝ่อของเซลล์ไข่ในระยะ previtellogenic เป็นอาการ ทางจุลกายพยาสภาพที่สอดคล้องกับการปนเปื้อนของสารเคมี ในสิ่งแวดล้อมได้

5. สรุปและเสนอแนะ

การศึกษานี้เป็นงานวิจัยเบื้องต้น ทำให้ทราบถึง ชีวิตวิทยาการสืบพันธุ์และสภาวะของปลาตะเพียนที่อาศัย ในแม่น้ำตาปี จากข้อมูลทำให้ทราบว่าอวัยวะของปลา เป็นแบบ unrestricted spermatogonial testis ที่มีการ เจริญของเซลล์สืบพันธุ์อยู่ภายใน spermatocyst โดย ประกอบด้วยเซลล์สืบพันธุ์หลายระยะ ขณะที่เพศเมีย ภายในรังไข่ประกอบด้วยเซลล์ไข่ระยะต้นเท่านั้นที่มีขนาด

6. บรรณานุกรม

- [1] Frame, L.; Dickerson, R. L. 2006. "Fish and wildlife as sentinels of environment contamination." In D.O. Norris and J.A. Carr (eds.), *Endocrine disruption: biological bases for health effects in wildlife and humans*; New York: Oxford University Press, Vol. 1.
- [2] National Research Council (NRC). 1991. *Animals as sentinel of environmental health hazards*; Washington D.C.: National Academy Press, Vol. 1.
- [3] Blazer, V. S. 2002. "Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes." *Fish Physiol. Biochem.*, 26, 85-101.
- [4] Loomis, T. A.; Hayes, A. W. Loomis. 1996. *Essentials of Toxicology*; Academic Press: San Diego, Vol. 1.
- [5] Damstra, T.; Barlow, S.; Bergman, A.; Kavlock, R.; Van Der Kraak, G. 2002. *Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors. International Programme on Chemical Safety*. <http://www.inchem.org>. 18 ธันวาคม
- [6] Novillo, A.; Kitana, N.; Won S. J.; Callard, I. P. 2006. "Comparative environmental
Malaivijitnond, C. Chanchao and N. Kitana (eds.), *Comparative Endocrinology and Biodiversity in Asia and Oceania*, pp. 77-82. Chulalongkorn University Press, Bangkok, Thailand.
- [7] Figueiredo-Fernandes, A.; Fontainhas-Fernandes, A.; Rocha, E.; Reis-Henriques, M. A. 2006. "The effect of paraquat on hepatic EROD activity, liver, and gonadal histology in males and females of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed at different temperatures." *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 51, 626-632.
- [8] Yenchum, W. 2010. *Histological effects of carbofuran on guppy *Poecilia reticulata** Peters. Ph.D Thesis, Graduate school Chulalongkorn University, Thailand.
- [9] Senarat, S. 2011. *Correlation between herbicide contamination and effects on reproductive system of cyprinid fish *Puntius proctozysron* in Nan River, Wiangsa District, Nan Province*. M.Sc. Thesis, Graduate school Chulalongkorn University, Thailand.
- [10] Wilson, J. M.; Bunte, R. M.; Carty, A. J. 2009. "Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*)." *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 48, 785-789.
- [11] Bancroft, J. D.; Gamble, M. 2002. *Theory and Practical of Histological Techniques*. Churchill Livingstone, Vol. 5.
- [12] Dietrich, D. R.; Krieger, H. O. 2009. *Histological Analysis of Endocrine Disruptive Effects in Small Laboratory Fish*. New Jersey: John Wiley & Sons, Vol. 1.
- [13] Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), 2009. *OECD gonads*. <http://www.oecd.org/dataoecd/07/42/42140701.pdf>. 23 October.
- [14] Grier, H. J.; Linton, J. R.; Leatherland, J. F.; de Vlaming, V. L. 1980. Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. *Am. J. Anat.*, 159, 331-345.
- [15] Senarat, S.; Kitana, N.; Varanusupakul, P.; Kitana, J. 2011. Abstract, 37th Congress on Science and Technology of Thailand.
- [16] Hoffmann, R.; Wondrak, P. J. 1980. "Seasonal anatomical variations in the testes of European pike, *Esax lucius* L." *Fish. Biol.*, 16, 475-482.

- [17] Groman, D. B. 1982. Histology of the Striped Bass; American Fisheries Society: Maryland, Vol. 1.
- [18] Cyrus, D. P.; Blaber, J. M. 1984. The reproductive biology of Gerres in Natal estuaries. J. Fish. Biol., 24, 491-504.
- [19] Mayer, I.; Shackley, S. E.; Ryland, J. S. 1988. "Aspects of the reproductive biology of the bass, *Dicentrarchus labrax* L. I. : An histological and histochemical study of oocyte development." J. Fish. Biol., 33, 609-622.
- [20] Begovac, P. C.; Wallace, R. A. 1988. Stages of oocyte development in the pipefish, *Syngnathus scovelli*. J. Morphol., 197, 353-369.
- [21] Clérot, J. C. 1976. "Development of Balbiani's vitelline body in the oocytes of the Atlantic Mackerel, *Scomber scombrus* L." J. Fish. Biol., 36, 265-267.
- [22] Bruslé, S. 1980. "Fine structure of early previtellogenic oocytes in mugil (*Iiza*) auratus Risso, 1810 (Teleostei, Mugilidae)." Cell Tissue Res. 207, 123-134.
- [23] Selman, K.; Wallace, R. A. 1989. "Cellular aspects of oocyte growth in teleosts." Zool. 1974. "The yolk nucleus of fish oocytes. J. Microsc. Sci., 105, 353-358.
- [25] Smith, L. S. 1982. Introduction to Fish Physiology; T.F.H. Publication, Inc.: Neptune. Vol. 1.
- [26] Spanò, L.; Tyler, C. R.; Aerie, R. V.; Devos, P.; Mandiki, S. N. M.; Silvestre, F.; Thomé, J. P.; Kestemont, P. 2004. "Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*)." Aqua. Toxicol., 66, 369-379.
- [27] Jobling, S.; Sheahan, D.; Osborne, J. A.; Matthiessen P.; Sumpter, J. P. 1996. "Inhibition of testicular growth in rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals." Environ. Toxicol. Chem., 15, 194-202.
- [28] Kime, D. E. 1998. Endocrine disruption in fish. Kluwer London: Academic Publishers; Vol. 1.
- [29] Pait, A. S.; Nelson, J. O. 2002. Endocrine disruption in fish: an assessment of recent research and results. NOAA Tech. Memo. NOS NCCOS CCMA 149. Silver Spring, MD: NOAA, NOS, Center for Coastal Monitoring and Assessment
- [30] Thomas, P. 1999. "Nontraditional sites of endocrine disruption by chemicals on the hypothalamus-pituitary-gonadal axis: interactions with steroid membrane receptors, monoaminergic pathways, and signal transduction systems." In Naz, R. K. (ed.), Endocrine disruptors: Effects on male and female reproductive systems, pp. 3-38 Boca Raton, FL: CRC Press, Vol. 1.
- [31] Yong, B.; Stewart, W.; O'Dowd, G. 2005. Wheater's basic pathology, a text, atlas and atlas of histopathology. China: Churchill
2004. Effects of atrazine on fathead minnow in a short-term reproduction assay. Environ. Toxicol. Chem., 23, 1019-1025.
- [33] Du Preez, H. H.; Van Vuren, J. H. J. 1992. "Bioconcentration of atrazine in the banded tilapia, *Tilapia sparrmanii*." Compare. Biochem. Physio., 101, 651-655.
- [34] Tillitt, D. E.; Papoulias, D. M.; Whyte, J. J.; Richter, C. A. 2010. "A. Atrazine reduces reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*)." Aqua. Toxicol., 99, 149-159.

[35] Ateeq, B.; Abul Farah, M.; Ahmad, W, 2006.

"Evidence of apoptotic effects of 2, 4-D and butachlor on walking catfish, *Clarias batrachus*, by transmission electron

microscopy and DNA degradation studies."

Life Sci. 78, 977-986.

[36] Blazer, V.S.2002. "Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes." Fish Physio. Biochem., 26, 85-101.

ISSN	ชื่อเดิม	ชื่ออังกฤษ	เจ้าของ	อยู่ในฐานข้อมูล	หมายเหตุ
0858-0855	ABAC Journal	ABAC Journal	Assumption University		
2287-0741	Applied Environmental Research	Applied Environmental Research	สถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย		ISSN (เดิม) : 0125-6939
2351-0307	ASEAN Journal of Management	ASEAN Journal of Management	Research Center, Stamford International University		ชื่อวารสาร (เดิม) : Journal of Environmental Research
0217-5460	ASEAN Journal on Science and Technology for Development	ASEAN Journal on Science and Technology for Development	ASEAN Committee on Science and Technology		ISSN (เดิม) : 1906-1638
1905-7415	Asian Biomedicine	Asian Biomedicine	Faculty of Medicine, Chulalongkorn University	WoS, SCOPUS	ชื่อวารสาร (เดิม) : Stamford Journal
1513-4121	Asian Journal of Energy and Environment	Asian Journal of Energy and Environment	The Joint Graduate School of Energy and Environment		
1905-856x	Asian Journal of Literature, Culture and Society	Asian Journal of Literature, Culture and Society	Assumption University, Graduate School of English		Vol. 1 (2007)
0125-877X	Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology	Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology	The Allergy and Immunology Society of Thailand	WoS, PubMed, SCOPUS, SciFinder CAPUS, Biological Abstracts, AgBiotechNet	
1686-0039	AU Journal of Management	AU Journal of Management	Assumption university		
1513-0886	AU Journal of Technology	AU Journal of Technology	Assumption University		
1906-3296	AU-GSB e-Journal	AU-GSB e-Journal	Assumption University, Graduate School of Business		
1685-4322	BU Academic Review	BU Academic Review	มหาวิทยาลัยกรุงเทพ	WoS, SCOPUS, Biological Abstracts	ชื่อเดิมคือ วารสารคณาจารย์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยกรุงเทพ (Journal of Bangkok University Faculty)
	Chiang Mai Journal of	Chiang Mai Journal of	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่		

ISSN	ชื่อเดิม	ชื่ออังกฤษ	เจ้าของ	อยู่ในฐานข้อมูล	หมายเหตุ
0857-9512	วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง	Journal of Science Ladkrabang	มหาวิทยาลัยลาดกระบัง		
1686-9664	วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยมหาสารคาม	Journal of Science and Technology Mahasarakham University	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม		
1685-7941	วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรเวศน์	Journal of Science and Technology Ubon Ratchathani University	โครงการจัดตั้งกองส่งเสริมการวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรเวศน์		เดิมชื่อ วารสารวิชาการ ม.บ. (Journal of Ubon Rajathane University)
0858-4435	วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี	Thai Science and Technology Journal	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต		
1513-7201	วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการกีฬา	Journal of Sports Science and Technology	สมาคมวิทยาศาสตร์การกีฬาแห่งประเทศไทย		
1686-4530	วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี	The Science Journal of Phetchaburi Rajabhat University	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี		
2228-8864	วารสารเอเชียศึกษา	Journal of International Studies	คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตภูเก็ต		
0857-2933	วารสารวิจัยทางเภสัชวิทยา	Journal of Research Methodology	คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย		
0857-2178	วารสารวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	Engineering Journal Chiang Mai University	คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่		
1905-4548	วารสารวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ	Srinakharinwirot Engineering Journal	คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ		
1513-4652	วารสารวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม	Engineering Journal of Siam University	มหาวิทยาลัยสยาม		
1685-5280	วารสารวิศวกรรมศาสตร์ ราชภัฏจันทรเกษม	Journal of Engineering, Rajabhat	คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี		
1906-3636	วารสารวิศวกรรมศาสตร์	Engineering Journal	คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย		
1686-2981	วารสารวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมประเทศไทย	Thai Environmental Engineering Journal	สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย (สวสท.)		
	วารสารศึกษาศาสตร์	Journal of	มหาวิทยาลัย		