



## บทที่ 2

### บทลอบสวนเอกลสาร

แมนเทิลของหอยมกเป็นอวัยวะที่ห่อหุ้มตัวหอยไว้ทำหน้าที่หลักในการสร้างเปลือก ประกอบด้วยเนื้อเยื่อผิวหนัง 2 ชั้นคือ เนื้อเยื่อผิวหนังชั้นนอก (outer mantle epithelium) และเนื้อเยื่อผิวหนังชั้นใน (inner mantle epithelium) ระหว่างเนื้อเยื่อผิวหนังทั้งสองเป็นส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เส้นเลือด กล้ามเนื้อเรียบ และเส้นประสาทเรียกส่วนนี้ว่า mesodermal tissue (Neff, 1972; Petit et al., 1978; Shi et al., 1985) เนื้อเยื่อผิวหนังชั้นในของแมนเทิลจะประกอบด้วยเซลล์เยื่อผิวหนัง (epithelial cells) ชั้นเดียว เซลล์สร้างน้ำเมือก (mucous cells) และเซลล์ต่อมที่ประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดียว (unicellular gland) เซลล์เยื่อผิวหนัง มีขนาดความยาวประมาณ 10  $\mu\text{m}$  กว้าง 3  $\mu\text{m}$  มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ ไม่มีไมโทคอนเดรีย มีไมโครวิลไล (microvilli) และซีเลีย (cilia) กระจายเป็นหย่อม ๆ แทรกอยู่กับไมโครวิลไล เซลล์สร้างน้ำเมือกมีหลายรูปร่างกระจายอยู่ระหว่างและด้านล่างของเซลล์เยื่อผิวหนังทำหน้าที่ผลิตน้ำเมือกที่มีความเข้มข้นสูงเพื่อคลุมผิวหน้าของเซลล์เยื่อผิวหนัง นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ในการดูดซับแคลเซียมจากแหล่งน้ำเข้าสู่ตัวหอย เซลล์ต่อมที่ประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดียวจะกระจายอยู่ด้านล่างของเซลล์เยื่อผิวหนังมีรูปร่างไม่แน่นอนภายในจะบรรจุแกรนูล (granules) จำนวนมาก (Tsuji, 1968; Wilbur and Saleuddin, 1983; Shi et al., 1985) เนื้อเยื่อผิวหนังชั้นนอกของแมนเทิลประกอบด้วยเซลล์บาง ๆ ชั้นเดียว รูป 3 มิติของเซลล์จะเป็นรูปทรงกระบอกหลายเหลี่ยม (polygonal columnar) มีความสูงประมาณ 30  $\mu\text{m}$  ที่ผิวด้านที่อิสระจะมีไมโครวิลไลขนาดเล็กจำนวนมากปกคลุมอยู่แต่ละเส้นมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.1  $\mu\text{m}$  ยาวประมาณ 2-3  $\mu\text{m}$  ภายในเซลล์จะพบไมโทคอนเดรีย เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม และโพลีโซมจำนวนมากกระจายอยู่ด้านบนและด้านล่างของเซลล์ (Neff, 1972; Li et al., 1988; Si et al., 1990) ระหว่างแมนเทิลชั้นนอกกับชั้นในจะมีความว่างเรียกว่า extrapallial space ภายในมีของเหลวเรียกว่า extrapallial fluid ซึ่งจะเป็จุดเริ่มต้นของการสร้างเปลือก (Bevelander and Nakahara, 1966; Wilbur and Saleuddin, 1983)

โดยปกติแล้วกระบวนการเกิดไข่มุกในธรรมชาติเป็นกระบวนการทำความสะอาดส่วนของเปลือกชั้นนาคเรียลกับแมนเทิลหรือส่วนของ extrapallial space เพื่อลดความระคายเคืองและป้องกันอันตรายต่าง ๆ ให้กับตัวหอย (McLean, 1980) จากสมบัติของแมนเทิลในการสะสมและเป็นบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาเคมีจนได้สารประกอบแคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเปลือกหอย ในกระบวนการสร้างเปลือกหอยพบว่าแคลเซียมคาร์บอเนตของเปลือกนั้นมาจาก haemolymph และ extrapallial fluid โดยที่แคลเซียมคาร์บอเนตเกิดจากคาร์บอนไดออกไซด์ในกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ของตัวหอยเองและแคลเซียมได้มาจากน้ำโดยตรงและถูกนำมาสะสมอยู่รอบ ๆ ขอบของแมนเทิล จากนั้นจะเกิดกระบวนการทางฟิสิกส์-เคมี (physico-chemical processes) ทำให้เกิดเป็นแคลเซียมคาร์บอเนตและเกิดการรวมตัวกับโปรตีนตกผลึกเป็นเปลือกหอยในที่สุด (Bevelander, 1952) Coimbra et al. (1993) พบว่าค่า electrical potential ของ ionic calcium ใน extrapallial fluid และ haemolymph มีค่าใกล้เคียงกัน แต่จะมีค่าสูงกว่าใน mantle cavity และสภาพแวดล้อม นอกจากนี้ pH และ คาร์บอนไดออกไซด์จะเป็นตัวควบคุมการสะสมของแคลเซียมใน extrapallial fluid ด้วย Hatano et al. (1955) พบว่าแคลเซียมจะถกตึงจากน้ำเข้าสู่เหงือกได้อย่างรวดเร็วและจะไปสะสมในเปลือกและไข่มุกเป็น calcium-protein complex Wada (1968) พบว่าแคลเซียมที่ใช้สำหรับกระบวนการสร้างเปลือกนั้นจะถูกขับออกจากแมนเทิลในรูป inorganic ion ปนออกมาด้วยสารประกอบ acid mucoprotein

สำหรับโปรตีนที่พบสะสมอยู่ในเปลือกนั้นจะทำหน้าที่คล้ายกับซีเมนต์ที่จะเชื่อมผลึกแคลเซียมคาร์บอเนตเข้าไว้ด้วยกัน จากการศึกษาของ Yano และ Machii (1975) พบว่ากรดอะมิโนที่ได้จากการสกัดชั้นแมนเทิลที่เลี้ยงใน culture medium ส่วนใหญ่เป็น Valine, Glutamic acid, Aspartic acid, Histidine, Leucine และ Glycine ซึ่งเหมือนกันกับส่วนประกอบของโปรตีน conchiolin ของเปลือก จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นจึงได้มีการนำชั้นแมนเทิลใส่เข้าไปในบริเวณ mesodermal tissue ของแมนเทิลและ gonad ของหอยมุกเพื่อให้เกิดการสร้างไข่มุกขึ้นมา (Aoki, 1959; Tsujii, 1968; Wada, 1968; Zahab et al., 1992) Kawakami (1952) ได้ปลูกถ่ายชั้นแมนเทิลเข้าไปใน gonad ของหอยมุกพบว่าชั้นเนื้อเยื่อผิวหนังนอกจะเจริญเป็นถุงไข่มุก โดยจะกระจายไปบนผิวหนังในของบาดแผลเจริญคลุมนิวเคลียสเป็นแผ่นบาง ๆ หลังจากปลูกถ่ายเข้าไป 7 วัน ถุงไข่มุกจะประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 1 ชั้นซึ่งมีความหนากว่าเยื่อผิวหนังนอกของแมนเทิลของหอยปกติเล็กน้อยหลัง

จากปลูกถ่ายได้ 15 วัน ผนังงูไข่มุกจะหลั่งสารประกอบเป็นชั้นเพอริออสตราคัม จากนั้นจะมีการสร้างเป็นชั้นพริสมาติคและชั้นนาเคเรียตามลำดับ

Kawakami (1953) ได้เปรียบเทียบกระบวนการเกิดงูไข่มุกของหอยมุกน้ำเค็ม *Pinctada martensii* กับหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis schlegelii* พบว่ามีความแตกต่างกันบางส่วนในกระบวนการเสื่อมสลาย (degeneration) ของชั้นเยื่อผิวหนังชั้นใน โดย *P. martensii* จะเห็นได้ชัดเจนในเวลา 7 วันหลังจากปลูกถ่าย แต่ของ *H. schlegelii* จะยังไม่พบและพบว่าการสร้างงูไข่มุกจะมีความแตกต่างกันเมื่ออุณหภูมิแตกต่างกัน โดยมีผลต่อการสร้างงูไข่มุกใน 3 กรณีคือ การเสื่อมสลายของ mesodermal tissue การเจริญของชั้นเนื้อเยื่อผิวหนังชั้นนอกและการหลั่งสารของงูไข่มุก ที่อุณหภูมิสูง (25-28 องศาเซลเซียส) จะมีการเจริญเป็นงูไข่มุกได้เร็วกว่าที่อุณหภูมิต่ำ (15 องศาเซลเซียส) และยังพบว่าชั้นแมนเทิลที่ตัดมาปลูกถ่ายทันทีทันทีที่ตัดมาแล้วรักษาสภาพไว้ไม่ให้แห้งเป็นเวลา 8 ชั่วโมงก่อนที่จะปลูกถ่ายจะสามารถสร้างงูไข่มุกได้เช่นเดียวกัน

Ojima และ Watanabe (1953) ได้รายงานถึงกระบวนการสร้างงูไข่มุกใน *Hyriopsis schlegelii* โดยใช้ชั้นเนื้อเยื่อผิวหนังชั้นนอกปลูกถ่ายเข้าไปในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของแมนเทิลสามารถเกิดงูไข่มุกได้ในเวลา 14 วันหลังจากปลูกถ่ายและยังพบว่าถ้ามีการติดเชื้อเกิดขึ้นจากการปลูกถ่ายจะไม่มีการสร้างเป็นงูไข่มุกของชั้นเนื้อเยื่อผิวหนังชั้นนอก

Kawakami (1954) ได้ศึกษาการเกิดงูไข่มุกในหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis schlegelii* และ *Anodonta woodiana lauta* พบว่า ชั้นเนื้อเยื่อผิวหนังชั้นนอกของหอยทั้ง 2 ชนิดสามารถสร้างงูไข่มุกล้อมรอบนิวเคลียสได้ภายใน 14 วันหลังจากปลูกถ่ายเนื้อเยื่อแมนเทิลลงใน gonad ของแต่ละชนิด

Kawakami (1957) ได้ทดสอบผลของอุณหภูมิต่อกระบวนการสร้างงูไข่มุกและคุณภาพของงูไข่มุกโดยใช้วิธี cold-shocked ภายใต้อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5-40 ชั่วโมงพบว่าระยะเวลาในการสร้างงูไข่มุกจะเป็นเช่นเดียวกับวิธีอื่น ๆ โดยที่การเสื่อมสลายของ mesodermal tissue จะช้าลงกว่าปกติ

Aoki (1957) พบว่าถ้าปลูกถ่ายชั้นแมนเทิลเข้าไปโดยให้ชั้นเนื้อเยื่อผิวหนังชั้นนอกสัมผัสกับนิวเคลียสจะเกิดงูไข่มุกคลุมนิวเคลียสแต่ถ้าให้ชั้นเนื้อเยื่อผิวหนังชั้นในสัมผัสกับนิวเคลียสพบว่าจะไม่เกิดงูไข่มุกคลุมนิวเคลียสแต่จะเกิดงูไข่มุกเล็ก ๆ อยู่ใกล้นิวเคลียส

Machii (1958) ศึกษาผลของชั้นแมนเทิลและนิวเคลียสในการเกิดงูไข่มุกพบว่าถ้าใส่ นิวเคลียสที่มีขนาดใหญ่จะทำให้ได้งูไข่มุกที่ใหญ่กว่านิวเคลียสขนาดเล็ก

เมื่อชั้นแมนเทิลมีขนาดเท่ากันและถ้านิวเคลียสขนาดเท่ากันชั้นแมนเทิลขนาดใหญ่กว่าจะมีถุงไข่่มกขนาดใหญ่กว่าชั้นแมนเทิลขนาดเล็ก

Machii (1959) พบว่าเมื่อปลุกถ่ายชั้นถุงไข่่มกเข้าไปแทนชั้นแมนเทิลพบว่า จะเกิดการสร้างถุงไข่่มกคล้ายกันกับการปลุกถ่ายด้วยชั้นแมนเทิลปกติ

Machii (1962) ศึกษาการเกิดถุงไข่่มกของชั้นแมนเทิลทั้งเยื่อผิวชั้นนอกและเยื่อผิวชั้นในพบว่า ชั้นเนื้อเยื่อชั้นนอกจะเจริญเป็นถุงไข่่มกได้สมบูรณ์ในเวลา 7-10 วัน สำหรับชั้นเนื้อเยื่อชั้นในพบว่ามีการม้วนตัวเป็นถุงไข่่มกได้แต่ไม่มีการสร้างสารมูกและจะสลายหมดไปในเวลา 1 เดือนหลังจากการปลุกถ่าย

Shi et al. (1985) ศึกษาการเกิดถุงไข่่มกในหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis cumingii* โดยใช้ชั้นของแมนเทิลและนิวเคลียสใส่เข้าไประหว่างชั้นของแมนเทิลพบว่าสามารถสร้างถุงไข่่มกได้ในเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และการเกิดถุงไข่่มกจะเกิดได้ดีเมื่อปลุกถ่ายเข้าไปบริเวณแมนเทิลด้านท้าย (posterior)

การศึกษาเนื้อเยื่อแมนเทิลที่ปลุกถ่ายเข้าไปจะมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงเกิดเป็นถุงไข่่มก

Nakahara และ Machii (1957) ได้ศึกษาการเกิดถุงไข่่มกพบว่า 1-6 วัน หลังจากปลุกถ่ายเนื้อเยื่อแมนเทิลชั้นนอกจะเปลี่ยนรูปร่างไปลักษณะคล้ายกับเท้าเทียม (pseudopodia) เคลื่อนที่ไปตามผิวของนิวเคลียสจากนั้นจะยึดเกาะกับเซลล์รอบขาดแผลของหอยตัวรับเกิดเป็นถุงไข่่มก

Aoki (1961) ศึกษาการเกิดถุงไข่่มกพบว่าระยะเวลา 2-3 วันหลังจากปลุกถ่ายเนื้อเยื่อแมนเทิลในช่องว่างระหว่างนิวเคลียสและเนื้อเยื่อหอยที่เป็นตัวรับ พบว่ามี wandering cells จำนวนมาก มีการเปลี่ยนรูปร่างเป็นเท้าเทียมของ wandering cells ขึ้นเป็นตาข่ายคลุมผิวในของขาดแผลเกิดเป็นเซลล์ใกล้เคียง (adjacent cells) ขึ้นมา

Machii (1968) ศึกษาการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่อแมนเทิลในการเกิดถุงไข่่มกของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis schlegelii* พบว่า wandering cells มีจุดกำเนิดจากเนื้อเยื่อแมนเทิลที่ปลุกถ่ายเข้าไปและเนื้อเยื่อจากขาดแผลของหอยเองผสมกัน จากนั้น wandering cells จะเจริญคลุมผิวด้านในขาดแผลและเจริญไปเป็นถุงไข่่มก

Wada (1972) พบว่าถุงไข่่มกที่ถูกสร้างขึ้นจากเซลล์เยื่อผิว ที่ผิวอิสระจะมีไมโครวิลไลจำนวนมากปกคลุมอยู่

Li et al. (1988) พบว่าถุงไข่่มกจะประกอบด้วยเซลล์ที่มีลักษณะเป็นเซลล์ทรงสูงรูปหลายเหลี่ยม (polygonal columnar) มีไมโครวิลไลอยู่บนผิวลัมผัสนิวเคลียส

ไมโครวิลโลมิขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 100  $\mu\text{m}$  ภายในเซลล์มีไมโทคอนเดรีย เอนโดพลาสมิครีติคูลัมจำนวนมากลักษณะคล้ายถุง (sac-like) เยื่อหุ้มของ กระจกไข่มุกจะทำหน้าที่ขับสารและสังเคราะห์สารต่าง ๆ ที่สำคัญในการสร้างไข่มุก หลังจากทีสร้างกระจกไข่มุกเสร็จสมบูรณ์แล้ว เซลล์เยื่อหุ้มของกระจกไข่มุกจะเริ่ม มีการสะสมของสารไข่มุก (pearl substance)

Hirata (1953) พบว่าในช่วง 2 สัปดาห์แรกหลังจากปลูกถ่ายเนื้อเยื่อจะเริ่ม มีการสะสมสารอินทรีย์เป็นแผ่นบาง ๆ และพบว่า การสะสมของผลึกใน *in vitro* มี อัตราการสะสมช้ากว่าใน *in vivo* มาก

Hatano (1955) พบว่าอัตราเร็วในการสะสมแคลเซียมของชั้นปริสมาติคและ ชั้นนาเคเรียสของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis schlegelii* มีความเร็วในการสะสม แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

Wada (1957) พบว่า 3-6 วันหลังจากปลูกถ่ายจะพบ material matrix จาก กระจกไข่มุกมาสะสมบนผิวนิวเคลียสจากนั้นจะเกิดเป็นชั้นปริสมาติคเจริญคลุมชั้น matrix และจะพบชั้นนาเคเรียสเจริญคลุมชั้นปริสมาติคอีก

Wada (1958 a, b) การสะสมสารมุกบนผิวของนิวเคลียสในระยะแรกของ กระบวนการสร้างไข่มุกจะพบชั้นหนาของ conchiolin เป็น membranous หรือ fibrous structure ต่อมาจึงจะพบชั้นปริสมาติคสะสมกระจัดกระจายบนผิว ของ conchiolin และพบว่าไข่มุกที่เป็นชั้นนาเคเรียสจะมีผลึกแคลเซียมเป็นแบบ อาราโกไนต์และไข่มุกที่เป็นชั้นปริสมาติคจะมีผลึกแคลเซียมเป็นแบบแคลไซต์

Wada (1959 a, b) รายงานว่าการเจริญของผลึกอาราโกไนต์จะเจริญเป็น ชั้น ๆ และเป็นผลมาจากสภาวะทางกายภาพและทางเคมี (physico-chemical conduction) ของกระจกไข่มุกและการสะสมของผลึกแคลเซียมบนผิวของไข่มุกจะ หยุดชะงักลงเมื่อมีความผิดปกติของตัวหอย

Wada (1972) พบว่า nacreous pearl เกิดจากการสร้างของกระจกไข่มุก เป็นชั้น ๆ รอบ ๆ นิวเคลียส การสะสมแคลเซียมจะเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับสภาพ ทางสรีรวิทยา ของหอย ฤดูกาลและสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง

Goetting (1979) พบว่ารูปร่างของไข่มุกจะเป็นทรงกลมเมื่อใช้นิวเคลียส ทรงกลมไล่ไว้ที่บริเวณ gonads และจะได้รูปไข่หรือรูปครึ่งซีกที่ผิวเปลือกชั้น นาเคเรียสเมื่อใช้นิวเคลียสครึ่งซีกไล่ไว้ที่บริเวณเปลือกของชั้นนาเคเรียส