รายงานวิจัย

การเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างโดยละเอียดของเซลล์สืบพันธุ์และระดับ APGWamide ในหอยหวานแปลงเพศ

Ultrastructural changes of germ cell and APGWamide level in imposex *Babylonia areolata* effected by TBT (Gastropoda: Buccinidae)

ณะผู้วิจัย

รศ. จินตมาศ สุวรรณจรัส

าจารย์ เศวต ไชยมงคล

ะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

บทคัดย่อ

ศึกษากระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์และการทำงานของฮอร์โมน APGWamide ในหอยหวาน *Babylonia areolata* ที่ถูกชักนำให้เกิดลักษณะสองเพศหรือแปลงเพศ (imposex) ด้วยสาร tributyltin (TBT) ที่มีความเข้มข้นของสารแตกต่างกัน 7 ชุด (1, 10, 50, 100, 500 ng TBT as Sn/L) เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 6 เดือน โดยแบ่งความรุนแรงของอาการแปลงเพศเป็น 6 ระดับ และจากการประเมินค่าต่าง ๆ ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ของการแปลงเพศ ค่าเฉลี่ยของระยะของการแปลงเพศ (VDSI) ค่าเฉลี่ยของความยาวพีนีสของเพศเมีย (FPL) และขนาดพีนีสแบบสัมพัทธ์ของเพศเมีย (RPSI) พบว่าระดับของการแปลงเพศมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาและความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ในการทดลองพบการเจริญเติบโตอย่างผิดปกติของท่อนำอสุจิในหอยเพศผู้ที่ได้รับสาร TBT และพบการเจริญของพีนีส 2 อันในหอยเพศเมียแปลงเพศในระดับ 4 นอกจากนี้พบว่าความยาวพีนิสที่เกิดขึ้นใหม่ของหอยหวานสองเพศ สามารถมีขนาดยาวสุดใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยของความยาวพีนิสในหอยหวานเพศผู้ปกติ และมีโครงสร้างภายในเนื้อเยื่อเหมือนกัน แต่ไม่พบการเจริญของเนื้อเยื่ออัณฑะในรังไข่ของหอยหวานแปลงเพศเหล่านี้ เมื่อศึกษาผลของสาร TBT ที่ต่อกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน (TEM) พบว่าหอยหวานเพศผู้ที่ได้รับสาร TBT มีกระบวนการสร้างอสุจิเหมือนกับในหอยเพศผู้ปกติ และไม่มีความผิดปกติของโครงสร้างเนื้อเยื่อสืบพันธุ์ ทำนองเดียวกัน หอยหวานเพศเมียแปลงเพศ มีโครงสร้างพื้นฐานของกระบวนการสร้างเซลล์ไข่เหมือนหอยปกติ อย่างไรก็ตาม พบว่าหอยหวานสองเพศแสดงลักษณะของเซลล์ไข่ฝ่อ โดยพบหยดไลปิดที่มีขนาดใหญ่จำนวนมากในไซโตพลาสซึมของเซลล์ไข่ในเกือบทุกระยะของการพัฒนา

การศึกษาการทำงานและระดับของฮอร์โมน APGWamide ใน 5 ปมประสาท (ซีรีบรัล พลูรัล พาริเอทัล พีดัลและบัคคัล) ของหอยหวาน *B. areolata* ด้วยวิธีอิมมิวโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry) พบว่า หอยหวานเพศเมียแปลงเพศในระยะที่ 1 - 4 มีจำนวนเซลล์ประสาทที่มีปฏิกิริยาอิมมูโนต่อ APGWamide ใน 3 ปมประสาทหลัก (ซีรีบรัล พลูรัล และพาริเอทัล) เท่ากับหอยเพศเมียปกติ ($p > 0.05$) ในขณะที่หอยแปลงเพศในระยะที่ 5 มีระดับของ APGWamide เท่ากับหอยเพศผู้ปกติ ($p > 0.05$) และสูงกว่าในหอยเพศเมียปกติและหอยเพศเมียที่แปลงเพศในระยะอื่นที่ระดับรุนแรงต่ำกว่า อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนในปมประสาทพีดัลและบัคคัล มีระดับของ APGWamide ไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่ม ($p > 0.05$) แสดงว่าการสังเคราะห์สาร APGWamide ของหอยหวาน *B. areolata* เกี่ยวข้องกับการทำงานของปมประสาทซีรีบรัม ปมประสาทพลูรัล ปมประสาทพาริเอทัล

การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า สาร TBT สามารถชักนำให้หอยเพศเมียเกิดลักษณะสองเพศ ในระดับความรุนแรงต่างๆตามความเข้มข้นสาร โดยที่ความเข้มข้นสูงสุด ชักนำให้เกิด

ลักษณะสองเพศระยะรุนแรง และในปริมาณมากที่สุด ถึงแม้ว่าสาร TBT ไม่มีผลกระทบต่อกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในหอยหวาน *B. areolata* แต่การเสื่อมของเซลล์ไข่และการแทรกซึมของเซลล์เม็ดเลือดในรังไข่ ทำให้ยืนยันถึงผลกระทบในด้านลบของสาร TBT ที่มีต่อระบบสืบพันธุ์ การศึกษาครั้งนี้เป็นการรายงานการทำงานและระดับของฮอร์โมน APGWamide ในปมประสาทเป็นครั้งแรกในหอยฝาเดียวที่แปลงเพศ และผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า สาร TBT ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ประสาทที่มีปฏิกิริยาอิมมูโนต่อ APGWamide ในปมประสาทหลักซึ่งเกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดการแปลงเพศในหอย และทำให้เกิดความผิดปกติต่อระบบสืบพันธุ์ ซึ่งเป็นการขัดขวางการแพร่พันธุ์ ดังนั้นสาร TBTที่ยังพบปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการลดลงของจำนวนประชากรหอยหวานในอ่าวไทย

Abstract

The study investigateded the gametogenesis and distribution of APGWamide in the spotted babylon, *Babylonia areolata*, laboratory reared in 5 different nominal aqueous TBT concentrations (1, 10, 50, 100, and 500 ng as Sn/L) for a period of 6 months to induce imposex, to which the imposex intensity was divided into six stages based on the degree of violence. The estimation of the values of imposex incidence (%), VDSI (vas deferens sequence index), average FPL (female penis length) and RPSI (relative penis size index), showed that the imposex intensity tended to be increased in a concentration-and time-dependent pattern. The experiment found the malformations of being an excrescence on vas deferens in a TBT-treated male, and a double penis in imposex female stage 4. In addition, the average length of new developed penis in imposex female was close to that of normal male, and possessed similar tissue structure. The possible effect of TBT on the gametogenesis clearly showed that the spermatogenesis as well as oogenesis were not different to those of the normal snails with no evidence of histological and ultrastrucural changes; however, an oocyte degeneration and diffused hemocytic infiltrations were occasionally observed in the ovarian tissue. The TEM finding of numerous large lipid droplets in the cytoplasm at all stages of the oocyte development and of the follicle cells, supporting a sign of oocyte degeneration in the ovarian tissue of imposex females.

The immunohistochemical study on the activity of APGWamide in 5 ganglia (cerebral, pleural, parietal, pedal and buccal) in *B. areolata* revealed the significantly high number of APGWamide in neuron of 3 main ganglia (cerebral, pleural, and parietal). The APGWamide immunoreactive neuron of these ganglia in imposex female stage 1- 4 was not different to that of normal female ($p > 0.05$), while imposex stage 5 had the distribution of APGWamide close to that of normal male ($p > 0.05$) and significantly higher than those of normal females and other lower stages of imposex female ($P < 0.05$). In contrast to the main ganglia, the number of APGWamide immunoreactive neuron in the pedal and buccal ganglia were not different between groups of *B. areolata* ($p > 0.05$). Thus, the cerebral, pleural, and parietal ganglia mainly involved in APGWamide activities in *B. areolata*.

In conclusion, this study confirms the ability of TBT to induce imposex in laboratory reared *B. areolata*, related to the TBT concentration and exposure time. The

histological and ultrastructural investigations of gametogenesis in TBT-exposed *B. areolata* suggest that TBT does not affect on either spermatogenesis or the oogenesis. However, the findings of oocyte degeneration and hemocytic infiltration support the negative impact of TBT on reproductive system. This study is the first report about the activity and particular number of APGWamide immunoreactive neuron in ganglia of gastropod imposex and it is suggested that an increase in APGWamide level in the main ganglia influenced by TBT appeared to play an important role involving in imposex induction that may eventually lead to the declining snail population in the Gulf of Thailand.