บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

วิธีเลี้ยงและดำเนินการทดลอง ดัดแปลงจากวิธีของ Wurmbach (1954)

<u>การนำสัตว์ทดลองมาเลี้ยงในอ่าง</u>

นำไข่ดางคกชนิด <u>Bufo melanostictus</u> จากพ่อแม่คู่เดียวกันที่ผสมใหม่ ๆ มาเลี้ยงในอ่างใหญ่ในห้องทดลอง ใช้น้ำจากธรรมชาติที่เก็บไข่ได้ เมื่อตัวอ่อนฟักออกจากไข่แล้ว 3 วัน คัดตัวเท่า ๆ กันมาเลี้ยงในอ่างกระจกขนาดกว้าง 20 x ยาว 30 x สูง 20 เซนติเมตร อ่างละ 100 ตัว และใส่น้ำอ่างละ 3 ลิตร (วันแรกใช้น้ำจากอ่างธรรมชาติที่เก็บไข่ 1 ลิตร และจากห้องทดลอง 2 ลิตร) น้ำจากห้องทดลองที่ใช้เลี้ยงเป็นน้ำประปา (แผนกชีววิทยา จุฬา ฯ) ทิ้งค้างคืนไว้ในถังพลาสติคขนาดใหญ่และให้อากาศตลอดเวลาเพื่อเป็นการไล่ก๊าซคลอรีนในน้ำประปาออก และทำให้น้ำมีปริมาณอากาศมากเหมาะในการเลี้ยงตัวอ่อน ตัวอ่อนเลี้ยงในอ่างทดลองที่อุณหภูมิห้อง 27 - 31 องศาเซลเซียส ได้รับแสงจากธรรมชาติทางหน้าต่าง และหลอดไฟนีออนวันละ 12 ชั่วโมง น้ำในอ่างทดลองมีอากาศผ่านตลอดเวลาโดยใช้ท่อพลาสติคขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ปลายด้านหนึ่งติดกับเครื่องปั๊มอากาศ และปลายอีกด้านหนึ่งเป็นลูกปล่อยอากาศ จุ่มลงในอ่างทดลอง ใช้คลิปหนีบท่อพลาสติคเพื่อปรับปริมาณอากาศให้เหมาะ ถ้าปริมาณอากาศที่พ่นลงในน้ำที่มากหรือน้อยเกินไปจะมีผลต่อการเจริญตามปกติของตัวอ่อน

การให้อาหารและน้ำยาทดลอง

ภายหลังที่เหงือกภายนอกของตัวอ่อนหดสั้นหมดแล้ว ให้เมื่อตัวอ่อนอายุ 5 วัน น้ำยามีโอกาสจะเข้าทางปาก ผิวหนัง และสัมผัสกับนัยตาตลอดเวลา ให้ผักกาดหอมต้มเป็นอาหารวันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น ให้น้ำยาทดลองวันละครั้งในตอนเช้า

น้ำยาทดลองใช้สเตอร์รอยด์ฮอร์โมน 2 ชนิดคือ

ไฮโดรคอร์ติโซน อาซีเตท (Sigma chemical company)

stock solution
- 20 มิลลิกรัมใน 10 มิลลิลิตร Absolute alcohol = HCA_{20}
- 40 มิลลิกรัมใน 10 มิลลิลิตร Absolute alcohol = HCA_{40}

ดีออกซีคอร์ติโคสเตอร์โรน อาซีเตท (Sigma chemical company)

stock solution
- 10 มิลลิกรัมใน 10 มิลลิลิตร Absolute alcohol = $DOCA_{10}$
- 20 มิลลิกรัมใน 10 มิลลิลิตร Absolute alcohol = $DOCA_{20}$
- 40 มิลลิกรัมใน 10 มิลลิลิตร Absolute alcohol = $DOCA_{40}$

การให้น้ำยาทดลองโดยฉีดลงในน้ำเลี้ยงตัวอ่อน ด้วยกระบอกฉีดยาขนาดบรรจุ 1 มิลลิลิตร ครั้งละ 0.1 มิลลิลิตร/น้ำ 1 ลิตร ให้น้ำยาหลังจากล้างและทำความสะอาดอ่างประจำวันแล้ว

ตารางแสดงอ่างทดลอง

อ่างทดลองที่	จำนวนสัตว์ (ตัว)	ความเข้มข้นของน้ำยา (stock sol^{n})	ระยะเวลาที่รับน้ำยา (วัน)
1 control	100	-	-
2 HCA_{20}	100	0.2 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร	31
3 HCA_{40}	100	0.4 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร	31
4 $DOCA_{10}$	100	0.1 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร	35
5 $DOCA_{20}$	100	0.2 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร	35
6 $DOCA_{40}$	100	0.4 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร	35

<u>การล้างและทำความสะอาดอ่างทดลอง</u>

ใช้หลอดแก้วโป่งกลางดูดเศษอาหารที่เหลือและของเสียที่สัตว์ทดลองถ่ายออกทุกวัน ดูดออกประมาณวันละ 0.5 หรือ 1 ลิตร แล้วแต่ความสกปรกมากน้อยของอ่าง แล้วเติมน้ำลงไปเท่าปริมาณที่ดูดออก และทุกครั้งที่มีการเปลี่ยนน้ำจะต้องฉีดฮอร์โมนลงไปทุกครั้ง คำนวณปริมาณฮอร์โมนที่ต้องฉีดให้สัมพันธ์กับ dose ที่กำหนด การใส่น้ำต้องระมัดระวังเพื่อป้องกันการกระทบกระเทือนการเจริญของตัวอ่อน

การทำความสะอาดอ่างพิเศษ นอกเหนือจากปกติทำ 3 วันต่อครั้ง ใช้ผ้าเช็ดตามขอบอ่างและก้นอ่างซึ่งสกปรกเนื่องจากคราบอาหารและเนื่องจากสัตว์ทดลองติดค้างอยู่

การศึกษาการเติบโต (growth) และเปอร์เซนต์เมตามอร์โฟสิส (metamorphosis)

1. การศึกษาการเติบโต

ในที่นี้แสดงผลโดยค่าน้ำหนักเปียกและน้ำหนักแห้งเท่านั้น (ดังตารางในภาคผนวก สัตว์ทดลองที่นำมาศึกษานี้ ได้จากการจับสัตว์ทดลองอย่างปกติในแต่ละอ่าง โดยจับครั้งละ 4 ตัว ซึ่งสัตว์ทดลองที่จับนี้ถือเป็นตัวแทนประชากรในแต่ละอ่าง ถ้าพบว่าตัวอ่อนส่วนมากอยู่ในระยะใด ก็ให้จับสัตว์ทดลองระยะนั้น โดยอายุของตัวอ่อนจะเป็นกี่วันก็ตาม เช่น ถ้าในอ่างทดลองตัวอ่อนส่วนมากอยู่ในระยะขาหลัง ก็จับสัตว์ทดลองระยะขาหลัง 4 ตัว เป็นต้น ทำให้สลบด้วยน้ำยาสลบ (ethyl alcohol : ether : chloroform = 1 : 2 : 3) แล้วนำไปถ่ายรูป 2 ตัวนำไปทำให้รูปร่างคงที่ (fix) เพื่อตรวจผลทางเนื้อเยื่อวิทยา อีก 2 ตัวนำไปชั่งน้ำหนัก ใช้ข้อนพลาสติกเล็ก ๆ ช้อนสัตว์ทดลองที่สลบแล้ววางบนกระดาษซับเพื่อซับน้ำตามตัวออก แล้ววางบนกระดาษไขแห้งที่ลงรายการ (label) และชั่งน้ำหนักไว้ก่อนแล้ว ชั่งน้ำหนักทันทีด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดละเอียด ค่าน้ำหนักที่ได้นี้เป็นน้ำหนักเปียกรวมทั้งกระดาษที่วาง คำนวณหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักเปียกที่แท้จริง นำกระดาษไขที่มีสัตว์ทดลองที่ชั่งน้ำหนักแล้วเข้าตู้อบอุณหภูมิ 60 - 70 องศาเซลเซียส อบทิ้งไว้ 5 วัน แล้วนำมาชั่งเป็นน้ำหนักแห้งครั้งที่ 1 ต่อจากนั้นนำเข้าไปอบอีก 2 วัน นำมาชั่งน้ำหนักแห้งครั้งที่ 2

2. วิธีการคำนวณเปอร์เซนต์เมตามอร์โฟสิส

ผลการทดลอง ดังตารางที่ 1, 2, 3 ในภาคผนวก ได้จากการคำนวณหาเปอร์เซนต์เมตามอร์โฟสิส ดังนี้

จำนวนสัตว์ที่มีเมตามอร์โฟสิส หมายถึง จำนวนตัวสำเร็จที่เกิดขึ้นในแต่ละวัน ซึ่งจะถูกจับออกจากอ่างทดลองทุกวันและบันทึกจำนวนไว้

จำนวนตัวสำเร็จที่เกิดขึ้นทั้งหมด = จำนวนตัวสำเร็จใหม่ในวันนั้น + จำนวนตัวสำเร็จในวันก่อน ๆ

จำนวนสัตว์ที่ไม่มีเมตามอร์โฟสิส = จำนวนสัตว์ระยะ 0 + ระยะตุ่มขาหลัง + ระยะขาหลัง + ระยะขาหน้า + ระยะหางหดสั้น ที่มีในอ่างทดลองในแต่ละวัน

จำนวนสัตว์ทดลองที่นับ = จำนวนสัตว์ที่ไม่มีเมตามอร์โฟสิส + จำนวนตัวสำเร็จที่เกิดขึ้นทั้งหมด

$$\text{เปอร์เซนต์สัตว์ที่มีเมตามอร์โฟสิส} = \frac{\text{จำนวนสัตว์ทดลองที่มีเมตามอร์โฟสิส}}{\text{จำนวนสัตว์ทดลองที่นับ}} \times 100$$

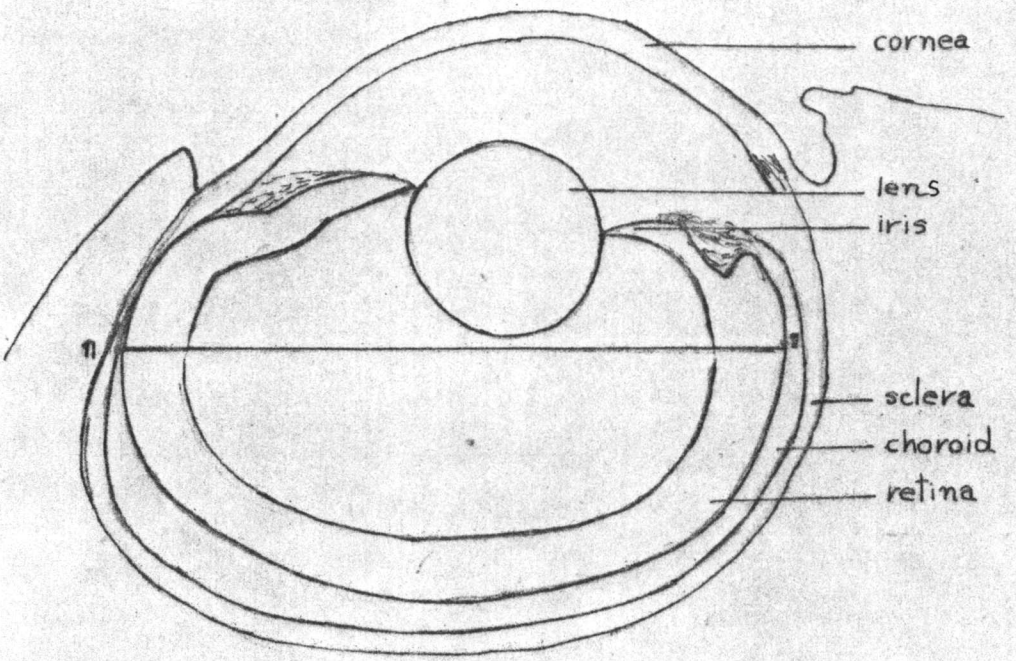
เปอร์เซนต์สัตว์ที่ไม่มีเมตามอร์โฟสิส = 100 - เปอร์เซนต์สัตว์ที่มีเมตามอร์โฟสิส

<u>การศึกษาผลทางฮิสโตโลยี (Histology)</u>

สัตว์ทดลองที่นำมาศึกษาเนื้อเยื่อนี้ มาจากสัตว์ทดลองที่สุ่มตัวแทนจากทุกระยะ ๆ ละ 2 ตัว (จาก 4 ตัว) และนอกจากนี้จับสัตว์ทดลองอื่น ๆ ที่พบว่ามีลักษณะภายนอกผิดปกติรุนแรงในระยะต่าง ๆ เช่นตัวที่มีอาการบวมน้ำ ตัวที่มีลักษณะโค้งงอคล้ายข้อน หรือตัวที่เกาะที่พื้นอ่างไม่ค่อยว่ายน้ำ หรือตัวที่ว่ายน้ำผิดปกติ ซึ่งในขณะที่จับตัวผิดปกติก็จับสัตว์ทดลองในอ่างปกติ (control) เป็นตัวเปรียบเทียบด้วย นำมาแช่ในน้ำยา Bouin แล้วนำไปฝัง paraffin และตัด serial section หนา 8 μ ในแนว dorso-ventral axis ย้อมสีโดย Heidenhain's Azan Technique จากนั้นนำมาศึกษาดูด้วยกล้องจุลทัศน์แล้วถ่ายรูป

<u>การศึกษาวัดขนาดของนัยตา</u>

นำ section ของสัตว์ทดลองที่ได้จากการสุ่มตัวแทนทุกระยะ ๆ ละ 2 ตัว (จาก 4 ตัว) ที่ได้ศึกษาทางฮิสโตโลยีแล้วนี้ วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของนัยตาขวา โดยวัดจาก section ที่ตัดผ่านกึ่งกลาง lens (median section) และวัดจากส่วนที่กว้างที่สุดของนัยตา (ดังไดอะแกรมหน้า 11 วัดจาก ก-ข) ตามวิธีการของ Hollyfield (1970) แล้วนำค่าที่ได้จากการวัดระยะละ 2 ตัวนี้ นำมาหาค่าเฉลี่ย ผลปรากฏ (ดังตารางที่ 10 ในภาคผนวก)



ไดอะแกรม แสดงโครงสร้างของนัยตาที่ซ่อนตางคก *Bufo melanostictus*