หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 5

## วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

1. ลักษณะทั่วไปของผิวหนัง

จากผลการศึกษาผิวหนังของอนุแรนทั้ง 5 ชนิด พบว่า กบนา, กบน้ำเค็มและอึ่งอ่าง มีผิวเรียบและชื้นมากกว่าพวกคางคกและจงโคร่ง ซึ่ง Noble (1931) กล่าวว่า การที่ผิวหนังมีลักษณะเช่นนี้เป็นส่วนหนึ่งที่ช่วยให้สัตว์มีการหายใจทางผิวหนังได้ดี ขณะเดียวกันก็เชื่อว่า มีผลทำให้ร่างกายมีการเสียน้ำออกทางผิวหนังชนิดเรียบและชื้นนี้ได้เร็วกว่าพวกที่มีผิวหนังหยาบและแห้ง สำหรับผลทางฮีสโตโลยีจากการศึกษานี้พบว่าจำนวนชั้นต่าง ๆ ของอีปิเดอร์มิสของผิวหนังด้านหลังทั้งส่วนหัวและส่วนท้ายของอนุแรนแต่ละชนิดจะคล้ายกัน ยกเว้นในคางคกที่พบว่า ชั้นอีปิเดอร์มีสของด้านหลังส่วนหัวจะมีชั้นสตราตัมสไปโนซัมมากกว่าส่วนอื่น ๆ 1 ชั้น และในจงโคร่งพบว่าในด้านหลังส่วนท้ายไม่มีชั้นสตราตัม สไปโนซัม ซึ่งต่างไปจากผิวหนังส่วนอื่น การที่ไม่พบชั้นสตราตัม สไปโนซัม หรือมีชั้นสตราตัม สไปโนซัม น้อยกว่าผิวหนังบริเวณอื่นเช่นนี้ ยังไม่มีผู้ใดรายงานละเอียดไว้ ส่วนในกบนา, กบน้ำเค็มและอึ่งอ่าง พบว่า ผิวหนังด้านหลังส่วนหัวและส่วนท้ายไม่แตกต่างกัน สำหรับผิวหนังด้านท้องส่วนหัวและผิวหนังบริเวณอนุแรนทั้งหมดนั้นจะมีลักษณะคล้ายกัน ดังนั้นการที่มีรายงานว่าผิวหนังบริเวณต้นขาหลังด้านท้องยอมให้น้ำผ่านเข้าออกได้ดีกว่าบริเวณต้นขาหน้า ด้านท้องและด้านหลังนั้น (Bentley และ Main, 1972) จึงไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับลักษณะของชั้นอีปิเดอร์มิส สำหรับความแตกต่างระหว่างชั้นอีปิเดอร์มิสของด้านหลังและด้านท้องนั้น พบว่า ผิวหนังด้านหลังของอนุแรนทุกชนิดจะมีเม็ดรงควัตถุอยู่ในเซลล์ชั้นอีปิเดอร์มิสทุกชั้น ส่วนในด้านท้องพบเม็ดรงควัตถุในเซลล์น้อยมาก และเซลล์ในชั้นสตราตัม คอร์เนียมของด้านท้องส่วนมากจะยังคงมีนิวเคลียสอยู่ แต่เป็นนิวเคลียสที่แสดงถึงอาการที่เริ่ม

จะเสื่อมแล้ว ซึ่งนิวเคลียสเช่นนี้เป็นนิวเคลียสที่มี DNA น้อยมาก (Spearman, 1968) สำหรับชั้นสตราตัม คอร์เนียมของด้านหลังโดยเฉพาะส่วนหัวของอนูแรนทั้ง 5 ชนิดนี้ ส่วนมากเป็นเซลล์ที่ตายแล้ว นอกจากจะทำหน้าที่ป้องกันเซลล์ที่มีชีวิตที่อยู่ลึกลงไปแล้ว ยังสามารถช่วยป้องกันการสูญเสียความชื้นของร่างกายได้อีกด้วย ดังนั้นการที่ Bentley (1966) รายงานว่า ผิวหนังของพวกอนูแรนไม่สามารถจำกัดการระเหยของน้ำออกจากร่างกายได้ และน้ำจะระเหยออกจากผิวหนังในอัตราเร็วเท่ากับผิวหน้าน้ำอิสระนั้น ทำให้เป็นที่น่าสงสัย ทั้งนี้เพราะผิวหนังโดยเฉพาะชั้นอีปิเดอร์มิสมีชั้นสตราตัมคอร์เนียม รวมทั้งสารเมือกจากต่อมเมือกมาช่วยป้องกันการระเหยของน้ำออกจากร่างกายได้ นอกจากนั้นยังพบความแตกต่างของชั้นอีปิเดอร์มิสในสัตว์แต่ละชนิดด้วยว่า กบนาและกบน้ำเค็มไม่มีชั้นสตราตัม กรานูโลซัม (SG) เนื่องจากไม่พบเม็ดเคอราโตไฮยาลิน (keratohyalin granule) ในเซลล์ใดชั้นหนึ่งของอีปิเดอร์มิสเลย ซึ่งสอดคล้องกับผลของ Spearman ที่ศึกษาใน Rana temporaria. (1968) และของ Andrew (1959; อ้างตาม Parakkal และ Matoltsy, 1964) ส่วนในคางคก, จงโคร่ง และ อึ่งอ่าง พบว่ามีชั้นสตราตัม กรานูโลซัม ซึ่งมีเม็ดเคอราโต ไฮยาลินปรากฏให้เห็นชัดเจน เหมือนกับที่พบในผิวหนังของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งเม็ดเคอราโตไฮยาลินนี้จะมีส่วนร่วมในขบวนการของการสร้าง เคอราตินอย่างอ่อน (soft keratin) เพื่อชั้นสตราตัม กรานูโลซัม จะเปลี่ยนแปลงเป็นชั้นสตราตัม คอร์เนียม ในเวลาต่อไป (Greep, 1966; Compenhaver et al, 1971; Bank, 1974; Leeson และ Leeson, 1976) จากผลการศึกษาในที่นี้จะเห็นได้ว่า ชั้นอีปิเดอร์มิสของอนูแรนทั้งหมดไม่มีชั้นสตราตัม ลูซิดัม (stratum lucidum)

สำหรับชั้นเดอร์มิสของอนูแรนทั้งหมดนั้น พบว่าในด้านท้องส่วนท้ายจะมีเส้นเลือดเข้ามาเลี้ยงมากกว่าในบริเวณอื่น ตรงกับผลของ Roth (1973) ซึ่งเขาคิดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับความสามารถในการดูดน้ำผ่านผิวหนังบริเวณนี้ ทำให้ผิวหนังบริเวณนี้ยอมให้น้ำผ่านเข้าออกได้ดีกว่าบริเวณอื่น ความแตกต่างที่พบในชั้นเดอร์มิส

ก็คือ ลักษณะของต่อมเมือกและต่อมกรานูลาร์ รวมทั้งลักษณะพิเศษ ที่พบในสัตว์แต่ละชนิด คือ แถบ A กลุ่ม B และแถบ C ซึ่งไม่ใช่กลุ่มหรือแถบของเซลล์ สำหรับแถบ A ซึ่งพบในกบนา, กบน้ำเค็ม, อึ่งอ่าง (รูปที่ 2a, 2d และ 2e, 2f) และคางคก (ยกเว้นบริเวณต่อมพาโรติด) (รูปที่ 12g) หรือกลุ่ม B ที่พบเฉพาะในคางคก (รูปที่ 3a, 3b และ 3c) และแถบ C ที่พบในจงโครง (รูปที่ 4a) นั้น จากรายงานของ Elkan (1968) ซึ่งศึกษาพวกอนูแรนประมาณ 112 ชนิด พบว่าผิวหนังของพวกอนูแรนส่วนมาก โดยเฉพาะพวกที่อยู่บนบก เช่นพวก Bufonidae และพวกครึ่งบกครึ่งน้ำ เช่น Ranidae จะมีลักษณะพิเศษเช่นนี้ปรากฏอยู่ และเรียกลักษณะเช่นนี้ว่า ชั้น Ground Substance (G) นอกจากนี้พบว่าชั้น ground substance นี้ไม่ใช่ชั้นเซลล์ (acellular) ไม่ได้เปลี่ยนแปลงมาจากชั้นใดชั้นหนึ่งของเอมบริโอ (embryo) และไม่พบในตัวอ่อน (larva) ชั้นนี้ปรากฏตัวในรูปของการตกตะกอนสะสมของสารที่คงตัวภายใต้หรือภายในชั้นสตราตัม สปองจิโอซัม (Ssp) แต่เดิมมีผู้เรียกชั้นนี้ว่า "Lamina cribosa" แต่ผู้รายงานเสนอว่าควรเรียก "Substantia amorpha" เพื่อให้เหมาะสมกับรูปแบบในกรณีที่มันไม่ได้ติดต่อกันเป็นชั้นยาว ๆ แบบแถบ A แต่อยู่ในรูปของกลุ่ม เช่น กลุ่ม B หรือในรูปของการสะสมอย่างไม่เป็นระเบียบภายในชั้นสตราตัม สปองจิโอซัม เช่น แถบ C เป็นต้น สำหรับผลการศึกษาในที่นี้สอดคล้องกับรายงานของ Elkan (1968) ยกเว้นคางคก ซึ่งผู้รายงานไม่ได้รายงานถึงกลุ่มของ ground substance (กลุ่ม B) เพียงแต่รายงานว่ามี ground substance อยู่ในผิวหนังเท่านั้น ส่วนของจงโครงนั้น ground substance (แถบ C) มีลักษณะเหมือนของ Bufo marinus มาก สำหรับการที่ไม่พบแถบ A ในส่วนของต่อมพาโรติดของคางคกนั้น อาจจะเนื่องมาจากในบริเวณนี้ต่อมกรานูลาร์มีการขยายตัวใหญ่มากขึ้น ทำให้แถบ A ขาดหายไป (Elkan, 1968)

สำหรับต่อมเมือกที่พบในอนูแรนแต่ละชนิดนั้น พบว่า ต่อมเมือกของกบนา, กบน้ำเค็ม และอึ่งอ่าง มี 2 ชนิด ซึ่งมีลักษณะของเซลล์บุผิวของต่อม, สารที่ต่อม

สร้างออกมาและผลของปฏิกิริยาของฮีสโตเคมี คือ Alcian blue และ PAS แตกต่างกัน คือในกบนามีต่อมเมือก a และ b (รูปที่ 2 b, 9a, 9b, 14c และ 14d กบน้ำเค็มมีต่อมเมือก a และ b (รูปที่ 2d, 9c และ 9d) และอึ่งอ่างมีต่อมเมือก e และ f (รูปที่ 2d, 9c และ 9d) สำหรับต่อมเมือก a และ b ของกบนาและกบน้ำเค็มนั้น พบว่า มีปฏิกิริยาของสารเมือกที่แสดงปฏิกิริยากับ Alcian blue และ PAS ที่ผิวนอกของชั้นอีปิเดอร์มิส ซึ่งแสดงว่าสารเมือกที่เป็นมิวโคโพลีแซคคาไรด์ฤทธิ์เป็นกรด และมิวโคโพลีแซคคาไรด์ฤทธิ์เป็นกลางนี้ เป็นสารเมือกชั้นสุดท้ายที่ต่อมแต่ละชนิดสร้างและหลั่งออกมา ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า ต่อมเมือก a และต่อมเมือก b ของกบนาและกบน้ำเค็ม เป็นต่อมต่างชนิดกัน ส่วนต่อมเมือก e และ f ของอึ่งอ่างนั้น เมื่อศึกษาจากผลของปฏิกิริยาทางฮีสโตเคมีแล้ว พบว่า ต่อมทั้ง 2 ชนิดนี้น่าจะเป็นต่อมชนิดเดียวกันแต่อยู่ต่างระยะของการสร้างและการหลั่งสารเมือก โดยที่ต่อมเมือก e น่าจะเป็นชั้นแรกของการทำงานของต่อม และต่อมเมือก f เป็นระยะหลังของการทำงานของต่อม

ส่วนต่อมกรานูลาร์หรือต่อมพิษนั้น เมื่อศึกษาจากลักษณะของสารที่ต่อมสร้างขึ้นมาและลักษณะการติดสีของสารแล้ว พบว่า ต่อมกรานูลาร์ทั้ง 4 ชนิดที่พบในอนูแรน 4 ชนิด มีความแตกต่างกันมากทั้งในด้านขนาดเม็ดสารและการติดสีที่ย้อม (รูปที่ 2b 2f, 3c, 4c, 6a - 6d, 9a, 9b, 9e, 9f และ 10a- 10d) ซึ่งอาจสรุปได้ว่าต่อมกรานูลาร์ทั้ง 4 ชนิดนี้ เป็นต่อมต่างชนิดกัน ถึงแม้ว่าจะมีผลของปฏิกิริยาทางฮีสโตเคมี (ตารางที่ 1 และ 2) ไม่ต่างกันมากนักก็ตาม และพบว่าต่อมกรานูลาร์ของอึ่งอ่าง (รูปที่ 2f และ 6d ) มีลักษณะคล้ายกับต่อมกรานูลาร์ของ Gastrophryne carolinensis ซึ่งอยู่ใน Family Microhylidae ด้วยกัน ตามที่Holloway และ Dapson (1971) ได้รายงานไว้ การที่งานวิจัยครั้งนี้ไม่พบต่อมกรานูลาร์ในกบน้ำเค็ม และการที่ Kramer (1970) ไม่พบต่อมกรานูลาร์ใน Rana angolensis น่าจะขึ้นอยู่กับลักษณะประจำตัวของสัตว์แต่ละชนิดอันอาจจะเกิดจากการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมก็ได้ เพราะว่าพวกกบซึ่งเป็นสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำที่แท้จริง และสามารถ

หนีจากศัตรูได้อย่างรวดเร็วจากสิ่งแวดล้อมอย่างหนึ่งไปยังสิ่งแวดล้อมอีกอย่างหนึ่ง เช่นจากบนบกลงน้ำอาจจะไม่จำเป็นต้องมีต่อมกรานูลาร์ซึ่งเป็นต่อมสร้างพิษไว้ป้องกันตัวก็ได้ แต่พวก Bufo ซึ่งส่วนมากมักอาศัยอยู่บนบก จะมีต่อมกรานูลาร์ซึ่งสามารถหลั่งสารที่เป็นพิษออกมาป้องกันตัวเสมอ

สำหรับต่อมพาโรติดของคางคกและจงโครง ซึ่งเป็นบริเวณที่รวมของต่อมกรานูลาร์ขนาดใหญ่ ๆ จำนวนมากไว้ด้วยกัน และแต่ละต่อมจะมีท่อเปิดของตนเองออกที่ชั้นอีปิเดอร์มิส ลักษณะเช่นนี้คล้ายกับลักษณะต่อมพาโรติดของ Bufo marinus (Hostetler และ Cannon, 1974) จากผลการศึกษาในที่นี้พบว่าต่อมกรานูลาร์ทั้ง 4 ชนิดจะถูกล้อมรอบด้วยเซลล์ 2 ชั้น (รูปที่ 6a -6d ) โดยที่เซลล์ชั้นในอาจจะเป็นตัวสร้างสารพิษแล้วหลั่งออกมาโดยการที่ส่วนบนของเซลล์แตกทำลาย เรียกวิธีการหลั่งแบบนี้ว่า อโปครายน์ (Apocrine) ส่วนเซลล์ชั้นนอกมีลักษณะคล้ายกล้ามเนื้ออาจจะเป็นตัวช่วยในการบีบเอาสารพิษที่เซลล์ชั้นในสร้างให้หลั่งออกมาภายนอก ซึ่งลักษณะเช่นนี้จะเหมือนกับต่อมกรานูลาร์ที่พบใน Bufo marinus ตามรายงานของ Hostetler และ Cannon (1974)

2. ลักษณะทางฮีสโตเคมี

2.1 การศึกษา แอสิด ฟอสฟาเตส

จากผลในตารางที่ 1 และ 2 พบว่าในกบนา, กบน้ำเค็ม และอึ่งอ่าง มีปฏิกิริยาของแอสิด ฟอสฟาเตสทั้งในชั้นอีปิเดอร์มิส และเดอร์มิส (รูปที่ 7a, 7 c ) ในชั้นอีปิเดอร์มิส ถึงแม้จะมีปฏิกิริยาของแอสิด ฟอสฟาเตสไม่มากเท่ากับต่อมเมือกและต่อมกรานูลาร์ ยกเว้นในด้านท้องและด้านหลังส่วนท้าย (จากตารางที่ 1 และ 2) แต่ก็สอดคล้องกับผลการศึกษาทางฮีสโตเคมีด้วยกล้องจุลทรรศน์ อีเลคตรอนของ Farquhar และ Palade (1965) และของ Lavker (1974) ใน Rana pipiens รวมทั้งผลทางฮีสโตเคมีที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาของ Spearman (1968) ซึ่งศึกษาใน Salamandra maculosa, Rana temporaria,

Xenopus laevis และ Ambystoma mexicanum โดยพบว่าปฏิกิริยาของเอนไซม์ แอสิด ฟอสฟาเตสจะเป็นตัวชี้ให้ทราบว่า มีไลโซโซมอยู่ในเซลล์ของชั้นอีปิเดอร์มิส เพราะเอนไซม์แอสิด ฟอสฟาเตส เป็นเอนไซม์ที่พบในไลโซโซม และไลโซโซมก็จะเป็นตัวย่อยพวกออร์กาเนลต่าง ๆ ที่อยู่ในเซลล์ เช่น ไมโตคอนเดรีย, กอลจิคอมเพลกซ์, ไรโบโซม และอื่น ๆ อีกมาก ในขบวนการการเกิดคอร์นิฟิเคชันของเซลล์ทำให้เกิดชั้นสตราตัม คอร์เนียมใหม่ขึ้นมาทดแทนชั้นสตราตัม คอร์เนียม ที่หลุดออกไปในระหว่างการลอกคราบ ซึ่งขบวนการเกิดคอร์นิฟิเคชั่นจะรวมเอาขบวนการ 2 อย่างมาไว้ด้วยกัน คือจะมีการสะสมพวกเคอราติน (keratin) ในเซลล์ และขณะเดียวกันจะมีการทำลายพวกส่วนประกอบต่าง ๆ และออร์กาเนลของเซลล์ทิ้งไปโดยการย่อยของเอนไซม์ ส่วนปฏิกิริยาของแอสิด ฟอสฟาเตสที่พบในเยื่อบุผิวของต่อมทั้งหมดนั้น อาจสันนิษฐานได้ว่า แอสิด ฟอสฟาเตส อาจเกี่ยวข้องในการหลั่งสารที่ต่อมสร้างขึ้นออกจากเซลล์ก็ได้ (Barka, 1962) จากการทดลองครั้งนี้พบว่า การมีปฏิกิริยาของแอสิด ฟอสฟาเตสมากหรือน้อย ไม่มีความสัมพันธ์เป็นเครื่องชี้ว่ามีขบวนการคอร์นิฟิเคชันเกิดขึ้นหรือไม่ เนื่องจากไม่พบปฏิกิริยาของแอสิด ฟอสฟาเตส ในผิวหนังของคางคกและจงโคร่ง แต่กลับพบในกบนา, กบน้ำเค็ม และอึ่งอ่าง ซึ่งมีการเกิดคอร์นิฟิเคชันน้อยกว่าคางคกและจงโคร่ง เมื่อดูจากลักษณะผิวหนังของด้านหลังและด้านท้องมีปฏิกิริยาของแอสิด ฟอสฟาเตสเท่ากัน ย่อมสนับสนุนได้ว่า แอสิด ฟอสฟาเตสไม่ใช่เครื่องชี้ถึงขบวนการคอร์นิฟิเคชัน เพราะเมื่อดูจากลักษณะทางฮีสโตโลยีจะเห็นว่าเซลล์ในชั้นสตราตัมคอร์เนียมของด้านท้องจะยังคงมีนิวเคลียสเหลืออยู่บาง ในขณะที่ของด้านหลังจะไม่พบนิวเคลียส ซึ่งแสดงว่าในด้านหลังควรจะมีคอร์นิฟิเคชันเกิดขึ้นมากกว่าในด้านท้อง ดังนั้นแอสิด ฟอสฟาเตสในด้านหลังน่าจะมีมากกว่าในด้านท้อง ไม่ใช่เท่ากัน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## 2.2 การศึกษาไขมันและฟอสโฟไลปิด

### 2.2.1 การศึกษาไขมัน

จากผลในตารางที่ 1 และ 2 จะเห็นว่า ผิวหนังของอนูแรนทั้งหมดยกเว้นกบน้ำเค็ม จะมีปฏิกิริยาของไขมันปรากฏอยู่มากทั้งในอีปิเดอร์มิสและชั้นเดอร์มิสรวมทั้งต่อมเมือกและต่อมกรานูลาร์ทั้งหมดด้วย (รูปที่ 8a และ 8b) สำหรับกบน้ำเค็มจะพบไขมันเฉพาะในชั้นสตราตัม คอมแพคตัม และชั้นทีลา สับคิวทานีเท่านั้น การพบไขมันในชั้นอีปิเดอร์มิสของอนูแรนทั้ง 4 ชนิดนั้น สอดคล้องกับผลของ Spearman (1968) ที่พบว่ามีไขมันในชั้นสตราตัม คอร์เนียมของพวกสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ ซึ่งไขมันที่พบในผิวหนังเหล่านี้จะมีส่วนช่วยในการลดการสูญเสียน้ำออกจากร่างกายของพวกอนูแรนได้ (Spearman, 1968; Jackson และ Sharaway, 1978)

### 2.2.2 การศึกษาฟอสโฟไลปิด

จากผลในตารางที่ 1 และ 2 จะเห็นว่า มีปฏิกิริยาของ Luxol Fast blue ในส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของคางคก, จงโคร่ง และอึ่งอ่าง แต่ไม่พบในกบนา และกบน้ำเค็ม นอกจากนั้นยังพบในแถบ A กลุ่ม B และแถบ C ชั้นสตราตัม คอมแพคตัม และชั้น ทีลา สับคิวทานี ของสัตว์ทั้ง 5 ชนิด (รูปที่ 11a 11e) ซึ่งแสดงว่าเนื้อเยื่อและชั้นต่าง ๆ ที่กล่าวมาแล้วนั้นมีฟอสโฟไลปิดประกอบอยู่ด้วย แต่ไม่พบฟอสโฟไลปิดในชั้นอีปิเดอร์มิสและต่อมทั้งหมด จากรายงานของ Spearman (1968) พบว่า มีฟอสโฟไลปิดชั้นสตราตัม คอร์เนียมของอีปิเดอร์มิสในพวกครึ่งบกครึ่งน้ำ รวมทั้งรายงานการวิเคราะห์ทางเคมีของ Watlington และ Harlan (1969) และ Watlington et al (1974) ซึ่งพบว่ามีฟอสโฟไลปิดในชั้นอีปิเดอร์มิสและเดอร์มิสในผิวหนังของ Rana pipiens โดยที่ Spearman (1968) เสนอว่าฟอสโฟไลปิดที่มีอยู่ในชั้นสตราตัม คอร์เนียม มีส่วนช่วยลดความเร็วของน้ำในการผ่านเข้าออกผิวหนังของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อันอาจจะนำมาอธิบายได้เกี่ยวกับผิวหนังของคางคกและจงโคร่ง ซึ่งฟอสโฟไลปิดที่พบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน,

แถบ A กลุ่ม B และแถบC รวมทั้งชั้นสตราตัม คอมแพคตัม และชั้นทีลา สับคิวทานี ก็น่าจะมีผลอย่างเดียวกันกับฟอสโฟไลปิดที่อยู่ในชั้นสตราตัม คอร์เนียมด้วย คือ ช่วยลดการสูญเสียน้ำออกจากร่างกายได้ โดยเฉพาะในคางคกและจงโคร่ง ซึ่งจะมีฟอสโฟไลปิดเพิ่มขึ้นมาในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ในขณะที่กบนา, กบน้ำเค็มและอึ่งอ่างไม่มี ซึ่งเมื่อดูจากสภาพที่อยู่ของอนูแรนทั้งหมด จะเห็นว่าคางคกและจงโคร่งส่วนใหญ่จะอยู่บนบก การเสียน้ำจะเกิดขึ้นเมื่อมีการระเหยของน้ำออกจากผิวหนัง ส่วนพวกกบนา กบน้ำเค็ม และอึ่งอ่างอาศัยอยู่ในน้ำหรือที่ชื้นเป็นส่วนใหญ่ การปรับสภาพสมดุลย์ของน้ำในร่างกายจะขึ้นอยู่กับการผ่านเข้าออกของน้ำและเกลือแร่ ดังนั้นในกรณีนี้การที่จะมีไขมันและฟอสโฟไลปิดเป็นเครื่องขัดขวางการผ่านเข้าออกของน้ำควรจะมีอยู่น้อยเพื่อสะดวกในการรักษาสมดุลย์ของน้ำและเกลือแร่ในร่างกาย

เมื่อศึกษาผลของไขมันและฟอสโฟไลปิดรวมกัน พบว่า ชั้นสตราตัม คอมแพคตัม, ชั้นทีลา สับคิวทานี และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของอนูแรนทั้งหมดน่าจะเป็นบริเวณที่สามารถช่วยลดการสูญเสียน้ำออกจากร่างกายได้ดีกว่าบริเวณอื่น เพราะมีทั้งไขมันและฟอสโฟไลปิด

2.3 <u>การศึกษาสารพวกมิวโคโพลีแซคคาไรด์</u>

2.3.1 <u>การศึกษาสารพวกมิวโคโพลีแซคคาไรด์ที่มีฤทธิ์เป็นกรด</u>

จากผลในตารางที่ 1 และ 2 จะเห็นได้ว่าไม่มีปฏิกิริยาของ Alcian blue ในชั้นอีปิเดอร์มิส และชั้นสตราตัม คอมแพคตัม ของผิวหนังสัตว์ทั้ง 5 ชนิด และในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของกบนา, จงโคร่ง และอึ่งอ่าง แสดงว่าไม่มีสารมิวโคโพลีแซคคาไรด์ฤทธิ์เป็นกรดในชั้นและเนื้อเยื่อเหล่านี้ สำหรับแถบ A ของกบนา, กบน้ำเค็ม และอึ่งอ่างไม่มีปฏิกิริยาเลย แต่แถบ A และกลุ่ม B ของคางคกและแถบC ของจงโคร่งจะมีปฏิกิริยาเพียงเล็กน้อย ซึ่งแสดงว่ามีสารมิโคโพลีแซคคาไรด์ฤทธิ์เป็นกรดอยู่บ้างเล็กน้อย ตรงกับผลของ Elkan (1968) ที่รายงานว่าชั้น ground substance (คือแถบ A กลุ่ม B และแถบ C ในที่นี้) มีสารมิวโคโพลีแซครมไรด์ฤทธิ์เป็นกรดอยู่

ซึ่ง Letterer (1959) และ Roger (1961) (อ้างตาม Elkan,1968) พบว่า สารพวกมิวโคโพลีแซคคาไรด์ฤทธิ์เป็นกรด สามารถเปลี่ยนความหนาแน่นของตัวเองไปตามจำนวนน้ำที่มีอยู่ได้ ทำให้มันสามารถจับกับน้ำจำนวนมาก ๆ ได้เมื่อมีน้ำมาก เป็นผลให้ชั้น ground substance สามารถทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมน้ำ (water regulator) ของร่างกายได้ ช่วยป้องกันการแห้งตายของสัตว์พวกครึ่งบกครึ่งน้ำได้เมื่อขึ้นมาอยู่บนบก ดังนั้นการที่ไม่พบปฏิกิริยาของ Alcian blue ในแถบ A ของกบนา, กบน้ำเค็ม และอึ่งอ่าง ก็อาจเป็นไปได้ว่า แถบ A ของสัตว์ทั้ง 3 ชนิดนี้มีสารมิวโคโพลีแซคคาไรด์ฤทธิ์เป็นกรดน้อยมาก ทั้งนี้เนื่องจากสัตว์ทั้ง 3 ชนิดนี้อยู่ในน้ำหรือในที่ชื้นเป็นส่วนใหญ่ จึงไม่จำเป็นต้องมีสารมิวโคโพลีแซคคาไรด์ฤทธิ์เป็นกรดในแถบ A มากเหมือนกับในคางคกและจงโครงที่อยู่บนบกมากกว่า ซึ่งสารมิวโคโพลีแซคคาไรด์ฤทธิ์เป็นกรดที่อยู่ในแถบ A กลุ่ม B และแถบ C นี้สามารถดูดน้ำจำนวนมากได้ อันเป็นประโยชน์ต่อคางคกและจงโครงมาก สำหรับปฏิกิริยาของ Alcian blue ที่พบในต่อมเมือกทั้งหมด (รูปที่ 9a, 9c, 9e, 10a, 10c) รวมทั้งในต่อมกรานูลาร์ของกบนา, คางคก และจงโครง (รูปที่ 9a, 10a 10cc) แสดงว่าสารเมือกของต่อมเมือกและสารของต่อมกรานูลาร์มีพวกมิวโคโพลีแซคคาไรด์ฤทธิ์เป็นกรดประกอบอยู่ด้วย ตรงกับผลของ Dapson (1970) และ Dapson et al (1973) ซึ่งสารเมือกจะทำหน้าที่เคลือบผิวหนังและการที่มันมีมิวโคโพลีแซคคาไรด์ แสดงว่าสารเมือกนี้สามารถดูดน้ำจำนวนมาก ๆ ไว้ได้ เป็นผลดีต่ออนูแรนเหล่านี้เมื่อขึ้นอยู่บนบก โดยเฉพาะในคางคกและจงโครงจะมีสารมิวโคโพลีแซคคาไรด์จากต่อมกรานูลาร์มาช่วยในการดูดน้ำไว้ที่ผิวหนังด้วย

2.3.2 การศึกษาสารพวกมิวโคโพลีแซคคาไรด์ที่มีฤทธิ์เป็นกลาง

จากผลในตารางที่ 1 และ 2 พบว่าผิวหนังทุกส่วนของอนูแรนทั้ง 5 ชนิด มีปฏิกิริยาของ PAS แต่ความเข้มของปฏิกิริยาแต่ละส่วนจะไม่เท่ากัน สำหรับปฏิกิริยา PAS ที่พบในชั้นอีปิเดอร์มิสสอดคล้องกับผลของ Voute (1963), Parakkal และ Matoltsy (1964) ส่วนสารเมือกของต่อมเมือกทั้งหมดจะมีปฏิกิริยากับ PAS มากพอสมควร (รูปที่ 9b, 9d, 9f, 10b, 10d ) คล้ายกับสารเมือกในต่อมเมือกของ Rana pipiens (Dapson, 1970) Rana angolensis และ Bufo regularis (Kramer, 1970) แสดงว่าสารเมือกเหล่านี้มีพวกมิวโคโพลีแซคคาไรด์ที่มีฤทธิ์เป็นกลางประกอบอยู่ด้วย สำหรับต่อมกรานูลาร์ทั้ง 4 ชนิด จะมีปฏิกิริยาของ PAS เกิดขึ้นเช่นกัน (รูปที่ 9b, 9f, 10b, 10d ) ซึ่ง Hostetler และ Cannon (1974) ได้เสนอว่าปฏิกิริยา PAS ที่พบในต่อมกรานูลาร์นี้น่าจะเป็นตัวชี้ให้ทราบว่า มีสารที่สามารถปล่อยกลุ่มอัลดีไฮด์อิสระ(free aldehyde group) ออกมาได้ ซึ่งอาจจะเป็นสารพิษพวกคาทีโคลามีนก็ได้ แต่จากการศึกษาวิจัยทางเคมีของ Henderson et al (1962) พบว่า ต่อมกรานูลาร์ในต่อมพาโรติดของคางคกและจงโครงไม่มีสารพวกคาทีโคลามีนประกอบอยู่ แต่จะมีสารพวกอินโดลเอทิลามีน (indolethylamine) ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับเซอโรโทนินเป็นส่วนประกอบ ซึ่งสารพิษเหล่านี้มีผลทำให้หัวใจแมวเต้นช้าลง และความดันเลือดเพิ่มขึ้นด้วย และพบว่าพิษของคางคกมีความเป็นพิษมากกว่าของจงโครง ดังนั้นจึงอาจสันนิษฐานได้ว่า สารพิษของต่อมกรานูลาร์ของคางคกและจงโครงที่ทำปฏิกิริยากับ PAS น่าจะเป็นพวกเซอโรโทนินมากกว่าคาทีโคลามีน เพราะสารพิษที่ Henderson et al (1962) ศึกษานั้นเป็นสารที่สกัดจากต่อมพาโรติดของคางคกและจงโครงโดยตรง แต่ของ Hostetler และ Cannon (1974) นั้นเป็นเพียงข้อเสนอของเขาเท่านั้น ส่วนการที่ปฏิกิริยา PAS ในต่อมกรานูลาร์ของคางคกน้อยกว่าจงโครงนั้นอาจจะเป็นเพราะว่าปริมาณของสารพิษในคางคกน้อยกว่าจงโครง แต่ความรุนแรงของพิษคางคกอาจจะมากกว่าพิษของ

จงโครงก็ได้ สำหรับต่อมกรานูลาร์ของกบนาและอึ่งอ่าง ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับพิษมาก่อน แต่จากผลการวิจัยครั้งนี้พบว่า ต่อมกรานูลาร์ของกบนา และอึ่งอ่างมีปฏิกิริยา PAS เช่นเดียวกับต่อมกรานูลาร์ของคางคก และจงโครง แสดงว่าต่อมกรานูลาร์ของกบนาและอึ่งอ่างจะต้องมีการสร้างสารพิษคล้ายกับของคางคกและจงโครงซึ่งสารพิษเหล่านี้อาจจะมีไม่มากพอที่จะทำอันตรายต่อมนุษย์ได้ แต่อาจจะเป็นอันตรายต่อสัตว์ขนาดเล็กได้

สำหรับปฏิกิริยาของ PAS นอกจากจะแสดงให้ทราบว่ามีสารมิวโคโพลีแซคคาไรด์ฤทธิ์เป็นกลางแล้ว ยังสามารถแสดงว่ามีโพลีแซคคาไรด์ (poly saccharide), มิวโคโปรทีน (mucoprotein), ไกลโคโปรทีน (glycoprotein) กรดเซียลิค (sialic acid), ไกลโคไลปิด (glycolipid), ฟอสโฟไลปิด และไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated lipid) ซึ่งเป็นสารที่ให้กลุ่มอัลดีไฮด์อิสระเช่นกัน แสดงว่าผิวหนังของอนูแรนเหล่านี้น่าจะมีกลุ่มของสารดังกล่าวอยู่ในผิวหนังด้วย

จากปฏิกิริยาของ Alcian blue และ PAS แสดงว่าสารที่ต่อมในผิวหนังสร้างขึ้นมานั้นประกอบด้วยมิวโคโพลีแซคคาไรด์ฤทธิ์เป็นกรด และฤทธิ์เป็นกลาง และสารพวกคาร์โบไฮเดรท, มิวโคโปรทีน, ไกลโคลโปรทีน, กรดเซียลิค ไกลโคไลปิด, ฟอสโฟไลปิด และไขมันไม่อิ่มตัว ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

ทั้งนี้สารที่สร้างขึ้นมาอาจทำปฏิกิริยากัน ทำให้ผิวหนังของอนูแรนมีสภาพเป็นด่าง ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเสียอีเลคโทรไลท์น้อยที่สุด (Fried et al,1967)

2.4 <u>การศึกษาแคลเซียม</u>

จากผลในตารางที่ 1 และ 2 พบว่ามีปฏิกิริยาของแคลเซียมเกิดขึ้น เฉพาะในแถบ A กลุ่ม B และแถบ C เท่านั้น ส่วนเนื้อเยื่ออื่น ๆ ไม่มีปฏิกิริยาเกิดขึ้น (รูปที่ 12 a-j) เช่นเดียวกับที่ Elkan (1968) พบ แต่บทบาทของแคลเซียมในบริเวณต่าง ๆ ดังกล่าวนี้ยังไม่มีข้อมูลที่จะสามารถสันนิษฐานได้ว่าทำหน้าที่อะไร

2.5 การศึกษาไมโตคอนเดรียด้วยวิธีของ Champy-Kull

จากผลในตารางที่ 1 และ 2 พบว่ามีปฏิกิริยาของไมโตคอนเดรียเกิดขึ้นในชั้นอีปิเดอร์มีสทุกชั้นของกบนา (รูปที่ 13 ) กบน้ำเค็ม และอึ่งอ่างส่วนในคางคก และจงโครงจะพบปฏิกิริยาเฉพาะในชั้นล่าง ๆ เท่านั้น ไม่พบในชั้นสตราตัม คอร์เนียม (รูปที่ 13 a ) แสดงให้เห็นว่า เซลล์ในชั้นอีปิเดอร์มิสของสัตว์ทั้ง 5 ชนิดเป็นเซลล์ที่มีไมโตคอนเดรียมากในทุกเซลล์ ยกเว้นในกบนา จะพบเคลียร์เซลล์ไม่ติดสีแดงของ acid fuchsinanilin แต่เซลล์อื่น ๆ จะมีปฏิกิริยาของไมโตคอนเดรียให้เห็นชัดเจน (รูปที่ 13b ) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า เซลล์ทุกเซลล์ในชั้นอีปิเดอร์มิสของสัตว์ทั้งหมดสามารถมีบทบาทในการลำเลียงน้ำและอีเลคโทรไลท์ผ่านผิวหนังได้ ไม่ใช่เฉพาะเคลียร์เซลล์ที่พบในกบนาดังที่ได้กล่าวมาแล้วในตอนต้น สำหรับการลำเลียงสารผ่านผิวหนังนั้นอาจจะเป็นได้ทั้งแบบ passive transport และ active transport ในกรณีของ passive transport ไม่จำเป็นต้องใช้พลังงาน แต่ในกรณีของ active transport จำเป็นจะต้องใช้พลังงานมาช่วยในการที่จะนำเอาน้ำและอีเลคโทรไลท์ผ่านผิวหนังต้านกับ concentration gradient ซึ่งพลังงานที่จะได้มานั้นน่าจะเป็นพลังงานที่ได้มาจากไมโตคอนเดรีย อันเป็นแหล่งกำเนิดของพลังงานของเซลล์ (Philpott และ Copeland, 1963) ดังนั้นการที่เซลล์ในชั้นอีปิเดอร์มิสมีไมโตคอนเดรียมากก็แสดงว่า active transport ย่อมสามารถเกิดขึ้นได้ดี

สำหรับเคลียร์เซลล์ที่พบเฉพาะในกบนานั้น ไม่ให้ปฏิกิริยาไมโตคอนเดรีย ตัวเซลล์ยังคงใสไม่ติดสีแดงซึ่งต่างไปจากเซลล์อื่น แสดงว่าเคลียร์เซลล์ไม่ควรจะเป็นไมโตคอนเดรีย-ริช-เซลล์ ตามที่ Farquhar และ Palade (1965) Ehrenfeld et al (1976) และคนอื่น ๆ อีกหลายคนเข้าใจกัน นอกจากนั้นการที่มีผู้คิดว่าเคลียร์ เซลล์มีลักษณะคล้ายกับคลอไรด์ เซลล์ในเหงือกของปลานั้น (Ehrenfeld et al, 1976)เป็นสิ่งที่น่าสงสัย เพราะจากการศึกษาของ Ahuja

(1970) ในเหงือกของปลา Gambusia affinis affinis พบว่าคลอไรด์เซลล์จะติดสี Eosin ชัดเจน และจะติดสีแดงเมื่อย้อมด้วย acid fuchsinanilin ติดสีน้ำเงินดำ เมื่อย้อมด้วย Heidenhain's haematoxylin และจากรายงานของ Philpott และ Copeland (1963) พบว่าคลอไรด์ เซลล์ในเหงือกของปลา Fundulus 3 species เป็นเซลล์ที่มีไมโตคอนเดรียมากที่สุด นอกจากนั้นจากการศึกษาคลอไรด์ เซลล์ ในเหงือกของปลา Fundulus heteroclitus (Karnaky, Kinter และ Kinter, 1976), ในปลา Pupfish (Cyprinodon variegata) (Karnaky, Ernst และ Philpott, 1976) และในปลา Pinfish (Hootman และ Philpott 1978) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเลคตรอน พบว่าคลอไรด์ เซลล์ในเหงือกปลาเหล่านี้ มีลักษณะเป็นเซลล์รูปทรงกระบอก มีนิวเคลียสอยู่ที่ฐาน และในไซโตพลาสซึมเต็มไปด้วยไมโตคอนเดรียขนาดใหญ่และมีจำนวนมาก ส่วนเคลียร์ เซลล์ของกบนานั้นไม่ติดสี Eosin, ไม่ติดสีแดงของ acid fuchsinanilin และเมื่อทดลองย้อมด้วย Heidenhain's haematoxylin พบว่าเคลียร์ เซลล์ไม่ติดสีเช่นกัน แต่เซลล์ปกติอื่น ๆ จะติดสีน้ำเงินดำ จากผลการทดลองครั้งนี้แสดงว่า เคลียร์ เซลล์ ไม่ใช่เซลล์ที่มีไมโตคอนเดรียมาก

จากผลการศึกษาไมโตคอนเดรียในที่นี้ ทำให้ทราบว่า เคลียร์ เซลล์ของกบนาไม่ใช่เซลล์ที่มีไมโตคอนเดรียมาก แต่ไม่สามารถบอกได้ว่า เคลียร์ เซลล์มีบทบาทเกี่ยวข้องกับขบวนการการลำเลียงน้ำและเกลือแร่ผ่านผิวหนังหรือไม่ แต่ในกบน้ำเค็มซึ่งอาศัยอยู่ในน้ำกร่อยและน้ำเค็ม ผิวหนังต้องทำหน้าที่เกี่ยวกับการรักษาสมดุลย์ของน้ำและเกลือแร่อยู่ตลอดเวลากลับไม่พบเคลียร์ เซลล์ อยู่ในผิวหนังของกบน้ำเค็มเลย ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาทดลองกันต่อไปเพื่อให้ได้ข้อมูลมากพอที่จะนำมาสรุปเกี่ยวกับบทบาทและหน้าที่ของเซลล์ชนิดนี้ ซึ่งปัจจุบันนี้ก็ยังไม่มีผู้ใดทราบถึงหน้าที่ที่แท้จริงของมัน

<u>สรุปผลการทดลอง</u>

ผิวหนังของอนูแรนทั้ง 5 ชนิด แบ่งออกเป็นชั้นใหญ่ ๆ 2 ชั้น คือชั้นอีปิเดอร์มิส และชั้นเดอร์มิส สำหรับชั้นอีปิเดอร์มิส ประกอบด้วยเซลล์หลายชั้น ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 4 สตราตัม คือเซลล์ชั้นล่างสุดที่อยู่ติดกับชั้นเดอร์มิสมีลักษณะเป็นเซลล์รูปกระบอก เรียกว่าชั้นสตราตัม เจอมินาติวัม ส่วนชั้นที่อยู่ถัดขึ้นมาเป็นเซลล์หลายเหลี่ยม เรียกว่าชั้นสตราตัม สไปโซัม และชั้นที่อยู่ติดกับชั้นบนสุดจะเป็นเซลล์แบน ภายในมีเม็ดเคอราโตไฮยาลินอยู่ เรียกว่า สตราตัมกรานูโลซัม ส่วนชั้นบนสุดเป็นเซลล์แบนบาง คือชั้นสตราตัม คอร์เนียมในกบนา และกบน้ำเค็มไม่พบชั้นสตราตัมกรานูโลซัม นอกจากนี้ในกบนาจะพบเซลล์ที่มีลักษณะเป็นถุงก้นกลมคอยาว ตัวเซลล์อยู่ในชั้นสตราตัม สไปโนซัม มีไซโตพลาสซึมใส เรียกว่า เคลียร์ เซลล์ สำหรับความแตกต่างระหว่างด้านหลังและด้านท้องนั้น พบว่าในเซลล์ด้านหลังจะมีเม็ดรงควัตถุสีน้ำตาลดำมาก แต่ในเซลล์ด้านท้างมีเพียงเล็กน้อย และในด้านท้องของกบนาจะมีเคลียร์ เซลล์ มากกว่าด้านหลัง ส่วนชั้นเดอร์มิส ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเป็นหลัก แบ่งเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นสตราตัม สปองจิโอซัม ซึ่งมีพวกต่อมต่าง ๆ , เซลล์รงควัตถุและเส้นเลือดเข้ามาอยู่ด้วย และชั้นสตราตัม คอมแพคตัม ซึ่งเป็นชั้นล่างสุด มีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอยู่รวมกันอย่างหนาแน่น ถัดลงไปเป็นชั้นทีลา สับคิวทานี ซึ่งเป็นชั้นบาง ๆ อยู่ติดกับกล้ามเนื้อของร่างกาย พบว่าผิวหนังด้านท้องมีเซลล์รงควัตถุน้อยกว่าด้านหลัง สำหรับต่อมที่พบมี 2 ชนิด คือ ต่อมเมือกและต่อมกรานูลาร์, ต่อมเมือกของอนูแรนทั้งหมดมีลักษณะแตกต่างกัน ส่วนต่อมกรานูลาร์จะพบเฉพาะในกบนา, อึ่งอ่าง, คางคก และจงโครงเท่านั้น ซึ่งต่อมกรนูลาร์ทั้งหมดจะมีลักษณะของเม็ดสารที่ต่อมสร้างแตกต่างกัน นอกจากนั้นยังพบสารพิเศษที่เรียกว่า สับสแตนเทีย อะมอร์ฟา (Substantia amorpha) กระจายอยู่ในตำแหน่งต่าง ๆ กันของชั้นเดอร์มิสด้วย ซึ่งสารนี้จะให้ปฏิกิริยาทางฮีสโตเคมีของแอสิด ฟอสฟาเตส, ฟอสโฟไลปิดแคลเซียม และมิวโคโพลีแซคคาไรด์

พบมิวโคโพลีแซคคาไรด์ในชั้นอีปิเดอร์มิส, ต่อมเมือก และต่อมกราบูลาร์ของอนูแรนทั้งหมด และจะพบไขมันในบริเวณที่กล่าวนี้ในอนูแรน 4 ชนิด ยกเว้นในกบน้ำเค็มและในต่อมกราบูลาร์ของผิวหนังด้านหลังของอึ่งอ่าง ส่วนแอสิด ฟอสฟาเตสพบในอีปิเดอร์มิส, ต่อมเมือก และต่อมกราบูลาร์ ของกบนา,กบน้ำเค็มและอึ่งอ่างเท่านั้น สำหรับปฏิกิริยาของไมโตคอนเดรียจะพบในเซลล์ชั้นอีปิเดอร์มิสของอนูแรนทั้งหมด ยกเว้นชั้นสตราตัม คอร์เนียมของคางคกและจงโคร่ง และ เคลียร์ เซลล์ของกบนา