



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ กายวิภาคและสัณฐานของสภาพวิรูปของรยางค์ในกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* ในบ่อเลี้ยงของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่

Anatomy and morphology of limb malformation in the captive rice field frog *Hoplobatrachus rugulosus* at Huai Hong Khrai Royal Development Study Center, Chiang Mai Province

ชื่อนิสิต นางสาวอรยา อรรถจินดา เลขประจำตัว 5932058023

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กายวิภาคและสัณฐานของสภาพิรูปของรยางค์ในกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* ในบ่อเลี้ยง
ของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่

Anatomy and morphology of limb malformation in the captive rice field frog
Hoplobatrachus rugulosus at Huai Hong Khrai Royal Development Study Center,
Chiang Mai Province

นางสาวอรยา อรรถจินดา

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพดล กิตนะ

โครงการวิทยาสตรระดับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2562

โครงการวิทยาสตรระดับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	: กายวิภาคและสัณฐานของสภาพวิรูปของรยางค์ในกบนา <i>Hoplobatrachus rugulosus</i> ในบ่อเลี้ยงของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วย ฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	: นางสาวอรยา อรรถจินดา
อาจารย์ที่ปรึกษา	: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพดล กิตนะ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรารัช กิตนะ อาจารย์ ดร.ว่าที่ ร.ต.ภาณุพงศ์ ธรรมโชติ
ภาควิชา	: ชีววิทยา

บทคัดย่อ

การมีรูปร่างผิดปกติ หรือสภาพวิรูป (malformation) มีผลต่อการดำรงชีวิตของสัตว์และอาจเกี่ยวข้องกับการลดลงของประชากรสัตว์ สาเหตุที่เป็นไปได้สำหรับการเกิด malformation ในกบคือเกิดจากการติดเชื้อปรสิต *Ribeiroia ondatrae* ที่บริเวณ limb bud ของลูกอ๊อด ซึ่งเป็นบริเวณที่จะเจริญเป็นรยางค์ต่อไป ในปี พ.ศ. 2562 มีรายงานการพบ malformation ในกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* ในบ่อเลี้ยงของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ โดยพบกบมี 5-7 ขา มีลักษณะเป็นการเพิ่มจำนวนขึ้นทั้งเป็นตุ่มกระดูกหรือเป็นขาที่เกือบสมบูรณ์ จึงได้นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้โดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อ 1) ศึกษาลักษณะทางกายวิภาคและสัณฐานภายนอกของกบนาที่พบสภาพวิรูปของรยางค์ และ 2) ตรวจสอบร่องรอย metacercaria cyst เพื่อคาดการณ์สาเหตุการเกิดสภาพวิรูปของรยางค์ของกบนาในบ่อเลี้ยงของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ โดยนำกบนาจำนวน 84 ตัว มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานจากการเก็บข้อมูลความยาว snout ถึง vent (SVL) และความยาวของขาที่ผิดปกติ ก่อนนำมาศึกษากายวิภาคโดยเปรียบเทียบจากภาพ x-ray และดองใส พร้อมทั้งจัดจำแนกลักษณะ malformation ของกระดูกรยางค์ที่พบพร้อมทั้งบันทึกเป็นภาพวาดทางวิทยาศาสตร์ (scientific illustration) และตรวจสอบหา metacercaria cyst จากการผ่าในบริเวณกล้ามเนื้อส่วนโคนขา ส่วนที่หางหดตัว และอวัยวะภายในต่าง ๆ ผลการศึกษาพบว่ากบนาอายุประมาณ 2 เดือน มีค่า SVL อยู่ที่ 4.79 ถึง 8.14 cm ส่วนกบนาอายุประมาณ 9 เดือน มีค่า SVL อยู่ที่ 8.58 ถึง 12.43 cm พบความผิดปกติที่ขาหลังทั้งหมดเป็นจำนวน 1-3 ขา ซึ่งจำนวนขาหลังที่พบมากที่สุดคือ 3, 4, 2 และ 5 ตามลำดับ โดยสามารถจัดจำแนกระดับความรุนแรงได้ 9 ระดับ จำแนกลักษณะสภาพวิรูปที่พบได้เป็น 16 ลักษณะ และไม่พบ metacercaria cyst ในบริเวณที่ตรวจสอบ ทั้งจากวิธีการดองใส และการผ่า ผลจากงานวิจัยนี้สามารถนำไปจัดจำแนกลักษณะกบนาออกเป็นระดับความรุนแรงเพื่อประเมินสภาพความรุนแรงในพื้นที่ นอกจากนี้สามารถนำ protocol การดองใสใช้เพื่อตรวจสอบ metacercaria cyst ได้ ทำให้สามารถคาดการณ์สาเหตุการเกิดสภาพวิรูปของรยางค์ของกบนาได้ และเมื่อพิจารณาพร้อมกับข้อมูลสภาพการเพาะเลี้ยงที่ผ่านมาจะช่วยให้เข้าใจสาเหตุและนำไปป้องกันปัญหาการเกิดสภาพวิรูปในกบนาทั้งในบ่อเลี้ยงและในธรรมชาติ

คำสำคัญ: metacercaria cyst, x-ray, กบหลายขา, ดองใส, สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

Research Title : Anatomy and morphology of limb malformation in the captive rice field frog *Hoplobatrachus rugulosus* at Huai Hong Khrai Royal Development Study Center, Chiang Mai Province

Student name : Miss Oraya Auttajinda

Advisor : Assistant Professor Noppadon Kitana, Ph.D.

Co-Advisor : Assistant Professor Jirarach Kitana, Ph.D.
Panupong Thammachoti, Ph.D.

Department of : Biology

Abstract

Deformed shape or malformation of body could interfere with animal well being and may be related to population decline. The possible cause of malformation in frogs is an infection of parasite *Ribeiroia ondatrae* in limb bud of tadpole or the region that will develop into appendages. In 2019, malformation has been reported in rice field frog *Hoplobatrachus rugulosus* raised in captivity at the Huai Hong Khrai Royal Development Study Center, Doi Saket District, Chiang Mai Province. The frogs have 5-7 legs, with the appearance of an increase in either bone or almost complete leg. This research thus aims 1) to examine anatomy and external morphology of malformed frogs, and 2) to investigate the signs of metacercaria cyst and speculated the causes of limb malformation in captive rice field frog at Huai Hong Khrai Royal Development Study Center. Eighty four rice field frogs were measured for snout to vent length (SVL) and malformed leg length. Anatomy of the frogs were studied by x-ray imaging and clearing and staining techniques. Severity of limb malformation were recorded and the illustration was made scientifically. The trace of metacercaria cyst were examined by dissecting the thigh muscle, cloacal muscle, and various internal organs. The results indicated that the rice field frogs had SVL 4.79 to 8.14 cm (2 months old), about 8.58 to 12.43 cm (9 months old). There were 1-3 malformed legs solely at the hind limb. The most common number of hind legs was 3, 4, 2 and 5, respectively. The severity level could be classified into 9 levels, and the total of 16 malformed characteristics were described. However, trace of metacercaria cyst was not found in the inspected area neither by clearing and staining nor dissection. The result from this research can be used identify malformation severity level based on the rice field frogs morphology and anatomy. In addition, clearing and staining protocol can be used to investigate the metacercaria cyst, and used for predicting the cause of limb malformation of the rice field frogs. Combining this with the retrospective data of culture condition, the cause of limb malformation could be identified and prevented from occurring with the frogs both in pond and nature.

Keywords: amphibian, clearing and staining, metacercaria cyst, multilegged frog, x-ray

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพดล กิตนะ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้ความกรุณาในการให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือ ทั้งในส่วนการให้คำแนะนำ ติดต่อหน่วยงานต่าง ๆ แก้ไขเนื้อหา ตรวจสอบความถูกต้องทั้งในส่วนของการนำเสนอ และรายงานการวิจัย ตลอดจนแก้ปัญหาในงานวิจัยครั้งนี้ทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรารัช กิตนะ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงการ ที่ให้ความกรุณาในการให้คำปรึกษา ทั้งในส่วนของขั้นตอนการปฏิบัติงาน การดองใส ตลอดจนแก้ไขความถูกต้องในการนำเสนองานจนมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ว่าที่ ร.ต.ภาณุพงศ์ ธรรมโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงการ ที่ให้ความช่วยเหลือ ทั้งในส่วนการปฏิบัติงานที่ถูกต้องในขั้นตอนต่าง ๆ ช่วยเหลือหาอุปกรณ์ที่จำเป็นในงานวิจัย ตลอดจนให้คำปรึกษาในข้อมูลที่ควรศึกษาเพิ่มเติม

ขอขอบคุณ ดร.ธงชัย จิตติภูมิ ที่ช่วยเหลือในการสอนและให้คำปรึกษาแก้ปัญหาที่พบในการดองใส ตลอดจนช่วยเหลือในทุกขั้นตอนของการปฏิบัติงาน น.ส.ธฤชวรรณ ไตรจิตต์ ที่ให้ตัวอย่างบช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่าง ๆ น.ส.ลลิตา ศรีอ่อน ที่คอยช่วยเหลือ และให้กำลังใจในการทำงาน นายปณิธิ ปาลกะวงศ์ ณ อยุธยา ที่ให้อุปกรณ์ถ่ายรูป นายรชตะ มณีอินทร์ ที่ให้ความช่วยเหลือสอนการถ่ายรูปบดองใส จัดหาอุปกรณ์สำหรับถ่ายรูป ตลอดจนช่วยเหลือให้คำแนะนำในการทำงาน และสมาชิก BioSentinel Laboratory ทุกคน

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ นิสิตปี 4 ปีการศึกษา 2562 ที่ให้กำลังใจ แשרข่าวสารต่าง ๆ และขอเป็นกำลังใจแก่ทุกคนให้ผ่านสถานการณ์ที่กำลังเผชิญไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการเนื้อเยื่อวิทยาและไมโครเทคนิค ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่รวมถึงสารเคมีและอุปกรณ์ ในการปฏิบัติงานวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาชีววิทยา และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการทำโครงการในครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	ก
ABSTRACT	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ.....	1
1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ.....	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	3
2.1. กบนา <i>Hoplobatrachus rugulosus</i>	3
2.1.1. สัณฐานวิทยาภายนอก	3
2.1.2. ลักษณะทางกายวิภาคของกระดูก.....	4
2.2. การมีรูปร่างผิดปกติ หรือสภาพวิรูปในกบ (malformation).....	5
2.3. การพบสภาพวิรูปของกบในธรรมชาติ.....	5
2.4. สาเหตุการเกิดสภาพวิรูปในกบ	5
2.4.1. ปรสิต <i>Ribeiroia ondatrae</i>	6
2.4.2. สารเคมี	8
2.4.3. รังสี Ultraviolet.....	9
2.4.4. ปัจจัยร่วมกัน.....	9
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน.....	10
3.1. การดำเนินการเกี่ยวกับสัตว์ทดลอง.....	10
3.1.1. ตัวอย่างสัตว์ทดลอง	10
3.1.2. การดำเนินการกับกบนาที่ยังมีชีวิต.....	10
3.2. การศึกษาสัณฐานวิทยา (morphological study).....	10
3.3. การศึกษากายวิภาค (anatomical study)	10
3.3.1. การเอกซเรย์	11
3.3.2. การผ่าเพื่อตรวจสอบร่องรอยของโรค	11
3.3.3. การดองใส	11

บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	13
4.1. การศึกษาสัณฐานวิทยา และกายวิภาค (morphological and anatomical studies)....	13
4.1.1. ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา	13
4.1.2. การจัดกลุ่มระดับความรุนแรงของสภาพวิรูปของกบนา.....	13
4.1.3. ลักษณะสภาพวิรูปของกบนา	33
4.2. การตรวจสอบหาร่องรอยของโรค	39
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา.....	42
5.1. การศึกษาสัณฐานวิทยาและกายวิภาค	42
5.2. การตรวจสอบร่องรอย metacercaria cyst จากการศึกษากายวิภาค	43
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ.....	45
6.1. สรุปผลการศึกษา	45
6.2. ข้อเสนอแนะ	46
6.2.1. ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์	46
6.2.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต	46
เอกสารอ้างอิง.....	47
ภาคผนวกที่ 1 ขั้นตอนการดองใสกบนา.....	52
ภาคผนวกที่ 2 กบนาดองใสจำแนกตามระดับความรุนแรง.....	54

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4-1 ข้อมูลการวิรูปของขาหลังเมื่อพิจารณาจากจำนวนและตำแหน่งของขาหลังในกบนา ที่มีสภาพวิรูปทั้งหมด 73 ตัว	36
ตารางที่ 4-2 จำนวนตัวอย่างกบนาที่พบสภาพวิรูปของขาหลังแบบต่าง ๆ และร้อยละของกบนา ที่แสดงสภาพวิรูปนั้นต่อจำนวนกบนาที่มีสภาพวิรูปทั้งหมด 73 ตัว	37

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2-14
ภาพที่ 2-24
ภาพที่ 2-37
ภาพที่ 2-48
ภาพที่ 4-1 14
ภาพที่ 4-2 15
ภาพที่ 4-3 15
ภาพที่ 4-4 16
ภาพที่ 4-5 16
ภาพที่ 4-6 17
ภาพที่ 4-7 18
ภาพที่ 4-8 18
ภาพที่ 4-9 19

ภาพที่ 4-10	SCIENTIFIC ILLUSTRATION ของกบนาที่มีขาผิปกติ 1 ขา, F. = FEMUR, T.F. = TIBIOFIBULA, T. = TARSAL และ P. = PHALANGES; (กบหมายเลข PT 1327)	19
ภาพที่ 4-11	สัณฐานกบนาที่มีลักษณะขาหลังผิปกติ 1 ขา และมีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL ด้าน DORSAL (A) และด้าน VENTRAL (B); (กบหมายเลข PT 1342)..	20
ภาพที่ 4-12	ภาพ X-RAY ของกบนาที่มีลักษณะขาหลังผิปกติ 1 ขา และมีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL ด้าน DORSAL (A) และด้าน VENTRAL (B); (กบหมายเลข PT 1342)	20
ภาพที่ 4-13	กบนาตองใสที่มีลักษณะขาหลังผิปกติ 1 ขา และมีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL ด้าน DORSAL (A) และด้าน VENTRAL (B); (กบหมายเลข PT 1342)..	21
ภาพที่ 4-14	SCIENTIFIC ILLUSTRATION ของกบนาที่มีลักษณะขาหลังผิปกติ 1 ขา และมีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL, F. = FEMUR, T.F. = TIBIOFIBULA, T. = TARSAL และ P. = PHALANGES; (กบหมายเลข PT 1342)	21
ภาพที่ 4-15	สัณฐานกบนาที่มีขาหลังผิปกติ 2 ขา ด้าน DORSAL (A) และด้าน VENTRAL (B); (กบหมายเลข PT 1317).....	22
ภาพที่ 4-16	ภาพ X-RAY ของกบนาที่มีขาหลังผิปกติ 2 ขา ด้าน DORSAL (A) และด้าน VENTRAL (B); (กบหมายเลข PT 1317).....	22
ภาพที่ 4-17	กบนาตองใสที่มีขาหลังผิปกติ 2 ขา ด้าน DORSAL (A) และด้าน VENTRAL (B); (กบหมายเลข PT 1317).....	23
ภาพที่ 4-18	SCIENTIFIC ILLUSTRATION ของกบนาที่มีขาหลังผิปกติ 2 ขา, F. = FEMUR, T.F. = TIBIOFIBULA และ P. = PHALANGES; (กบหมายเลข PT 1317).....	23
ภาพที่ 4-19	สัณฐานกบนาที่มีขาหลังผิปกติ 2 ขา และมีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL ด้าน VENTRAL; (กบหมายเลข PT 1329)	24
ภาพที่ 4-20	ภาพ X-RAY ของกบนาที่มีขาหลังผิปกติ 2 ขา และมีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL ด้าน DORSAL (A) และด้าน VENTRAL (B); (กบหมายเลข PT 1329)	24
ภาพที่ 4-21	กบนาตองใสที่มีขาหลังผิปกติ 2 ขา และมีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL ด้าน DORSAL (A) และด้าน VENTRAL (B); (กบหมายเลข PT 1329).....	25
ภาพที่ 4-22	SCIENTIFIC ILLUSTRATION ของกบนาที่มีขาหลังผิปกติ 2 ขา และมีความยาวกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL, F. = FEMUR, T.F. = TIBIOFIBULA, T. = TARSAL และ P. = PHALANGES; (กบหมายเลข PT 1329).....	25

ภาพที่ 4-23	สัณฐานกบนาที่มีขาหลังผิดปกติ 2 ขา มีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL และมีกล้ามเนื้อส่วนต้นขาติดกับขาเดิม ด้าน VENTRAL ด้าน DORSAL (A) และด้าน VENTRAL (B); (กบหมายเลข PT 1336).....	26
ภาพที่ 4-24	ภาพ X-RAY ของกบนาที่มีขาหลังผิดปกติ 2 ขา มีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL และมีกล้ามเนื้อส่วนต้นขาติดกับขาเดิม ด้าน DORSAL (A) และด้าน VENTRAL (B); (กบหมายเลข PT 1336).....	26
ภาพที่ 4-25	กบนาตองใสที่มีขาหลังผิดปกติ 2 ขา มีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL ด้าน และมีกล้ามเนื้อส่วนต้นขาติดกับขาเดิม ด้าน DORSAL (A) และด้าน VENTRAL (B); (กบหมายเลข PT 1336).....	27
ภาพที่ 4-26	SCIENTIFIC ILLUSTRATION ของกบนาที่มีขาหลังผิดปกติ 2 ขา มีความยาวกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL และมีกล้ามเนื้อส่วนต้นขาติดกับขาเดิม, F. = FEMUR, T.F. = TIBIOFIBULA, T. = TARSAL และ P. = PHALANGES; (กบหมายเลข PT 1336)	27
ภาพที่ 4-27	สัณฐานกบนาที่มีขาหลังผิดปกติ 3 ขา ด้าน DORSAL (A) และด้าน VENTRAL (B); (กบหมายเลข PT 1349).....	28
ภาพที่ 4-28	ภาพ X-RAY ของกบนาที่มีขาหลังผิดปกติ 3 ขา ด้าน DORSAL (A) และด้าน VENTRAL (B); (กบหมายเลข PT 1349).....	28
ภาพที่ 4-29	กบนาตองใสที่มีขาหลังผิดปกติ 3 ขา ด้าน DORSAL (A) และด้าน VENTRAL (B); (กบหมายเลข PT 1349).....	29
ภาพที่ 4-30	SCIENTIFIC ILLUSTRATION ของกบนาที่มีขาหลังผิดปกติ 3 ขา มี, F. = FEMUR, T.F. = TIBIOFIBULA, T. = TARSAL และ P. = PHALANGES; (กบหมายเลข PT 1349)	29
ภาพที่ 4-31	สัณฐานกบนาที่มีขาหลังเดิมผิดปกติ 1 ขาด้าน DORSAL (A) และด้าน VENTRAL (B); (กบหมายเลข PT 1344).....	30
ภาพที่ 4-32	ภาพ X-RAY ของกบนาที่มีขาหลังเดิมผิดปกติ 1 ขา ด้าน DORSAL (A) และด้าน VENTRAL (B); (กบหมายเลข PT 1344).....	30
ภาพที่ 4-33	กบนาตองใสที่มีลักษณะขาหลังเดิมผิดปกติ 1 ขา ด้าน DORSAL (A) และด้าน VENTRAL (B); (กบหมายเลข PT 1344).....	31
ภาพที่ 4-34	SCIENTIFIC ILLUSTRATION ของกบนาที่มีขาหลังเดิมผิดปกติ 1 ขา, F. = FEMUR, T.F. = TIBIOFIBULA, T. = TARSAL และ P. = PHALANGES; (กบหมายเลข PT 1344).....	31

ภาพที่ 4-35	สัณฐานกบนาที่มีขาหลังผิดปกติ 2 ขา มีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL และมีกล้ามเนื้อส่วนต้นขาติดกับขาเดิม ด้าน VENTRAL ด้าน DORSAL (A) และด้าน VENTRAL (B); (กบหมายเลข PT 1339).....	32
ภาพที่ 4-36	ภาพ X-RAY ของกบนาที่มีขาหลังผิดปกติ 2 ขา มีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL และมีกล้ามเนื้อส่วนต้นขาติดกับขาเดิม ด้าน DORSAL (A) และด้าน VENTRAL (B); (กบหมายเลข PT 1339).....	32
ภาพที่ 4-37	กบนาตองใสที่มีขาหลังผิดปกติ 2 ขา มีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL ด้าน และมีกล้ามเนื้อส่วนต้นขาติดกับขาเดิม ด้าน DORSAL (A) และด้าน VENTRAL (B); (กบหมายเลข PT 1339).....	33
ภาพที่ 4-38	SCIENTIFIC ILLUSTRATION ของกบนาที่มีขาหลังผิดปกติ 2 ขา มีความยาวกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL และมีกล้ามเนื้อส่วนต้นขาติดกับขาเดิม, F. = FEMUR, T.F. = TIBIOFIBULA, T. = TARSAL และ P. = PHALANGES; (กบหมายเลข PT 1339)	33
ภาพที่ 4-39	กบนาตองใสที่มีสภาพวิรูปของรยางค์หลัง 2 ขา (A), 3 ขา (B), 4 ขา (C) และ 5 ขา (D)	35
ภาพที่ 4-40	ลักษณะที่ผิดปกติของกบนา กระดูกสามเหลี่ยมส่วน FEMUR และ TIBIOFIBULA, PHALANGES ขาด (A); กระดูกสามเหลี่ยมส่วน FEMUR และ TIBIOFIBULA (B); ขาที่เจริญเกินอยู่บริเวณข้อต่อ TIBIOFIBULA กับ TARSAL (C); PHALANGES เกิน, TARSAL ผิดรูป (D); PHALANGES กุด, TARSAL ผิดรูป, ขาที่เจริญเกินอยู่บริเวณข้อต่อ FEMUR กับ TIBIOFIBULA (E); ขาใหม่เจริญด้านหลังขาเดิม (F); กระดูกสามเหลี่ยมส่วน FEMUR, TIBIOFIBULA แบน (G); ขาที่เจริญเกินอยู่บริเวณข้อต่อ FEMUR กับ TIBIOFIBULA, PHALANGES FUSED (H); กระดูกสามเหลี่ยมส่วน FEMUR, TARSAL ผิดรูป, PHALANGES กุด (I); ขาสมบูรณ์, กระดูกเจริญภายในท้อง (J); ตุ่มกระดูก (K) และกระดูกสามเหลี่ยมส่วน FEMUR, TARSAL FUSED, PHALANGES ขาด (L).....	38-39
ภาพที่ 4-41	กล้ามเนื้อบริเวณต้นขาของกบนาที่มีสภาพวิรูป	40
ภาพที่ 4-42	กล้ามเนื้อบริเวณก้นของกบนาที่มีสภาพวิรูป.....	40
ภาพที่ 4-43	กล้ามเนื้อภายในต้นขาของกบนาที่มีสภาพวิรูป ขาขวา (A), ขาซ้าย (B).....	40
ภาพที่ 4-44	เปรียบเทียบลักษณะอวัยวะภายใน กบนาปกติ (A), กบนามีสภาพวิรูป (B).....	41
ภาพที่ 4-45	ลักษณะผิดปกติที่พบในกบนาที่มีสภาพวิรูป ก้อนเนื้อบริเวณข้อกระดูก (A), ตุ่มที่ผิวหนัง (B).....	41

บทที่ 1

บทนำ

การมีรูปร่างผิดปกติ หรือสภาพวิรูป (malformation) ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเป็นหนึ่งในปัญหาสิ่งแวดล้อมที่โดดเด่นมากที่สุดในรอบสิบห้าปีที่ผ่านมา โดยรูปร่างผิดปกติอาจเกี่ยวข้องกับการลดจำนวนของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกทั่วโลกด้วย ในปัจจุบันพบหลักฐานที่แสดงถึงสาเหตุที่เป็นไปได้สำหรับการเกิด malformation ของรยางค์ส่วนเกินว่าเกิดจากการติดเชื้อปรสิตขนาดใหญ่ในกลุ่ม trematode ชนิด *Ribeiroia ondatrae* (Sessions and Ballengee, 2010) ที่ตำแหน่งกลุ่มเนื้อเยื่อที่จะเจริญไปเป็นรยางค์ (limb bud) ซึ่งในปัจจุบันมีรายงานการพบ malformation จากการติดเชื้อปรสิตในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเพิ่มขึ้น เนื่องจากปรสิตดังกล่าวพบได้โดยทั่วไปในธรรมชาติ และในสภาพแวดล้อมที่ก่อให้เกิดความเครียดต่อสัตว์จะมีผลเร่งการติดเชื้อปรสิตในธรรมชาติได้ (Johnson et al., 1999; Pathirana et al., 2019)

วงจรชีวิตของ trematode *Ribeiroia ondatrae* เริ่มจากไข่ของปรสิตจะฟักตัวเป็นระยะ miracidia ที่สามารถเข้าไปติดเชื้อในหอยน้ำจืด หลังจากนั้นจะเจริญไปเป็นระยะ free swimming หรือ cercaria โดยจะออกจากหอยน้ำจืดและว่ายน้ำไปฝังตัวใกล้กับ limb bud ของลูกอ๊อดซึ่งจะเจริญไปเป็นรยางค์ แล้วจะเจริญไปเป็นระยะ metacercaria ที่มีถุงหุ้ม (metacercaria cyst) โดยจะไปขัดขวางการเจริญของรยางค์ทำให้ลูกอ๊อดงอกขาเพิ่มออกมาเมื่อเจริญไปเป็นกบระยะตัวเต็มวัย ซึ่งกบที่พิการเหล่านี้จะเคลื่อนที่ได้ช้าลงและกลายเป็นเหยื่อที่ถูกรบกวนหรือจนกระทั่งตายได้ง่ายขึ้น ซึ่งคาดว่านกเหล่านี้เป็นโฮสต์สุดท้ายในวงจรชีวิตของปรสิต ทำให้ปรสิตเข้าไปเติบโตและสืบพันธุ์ภายในร่างกายนก ก่อนที่นกจะปล่อยไข่ของปรสิตลงในน้ำพร้อมกับมูลของมัน เมื่อไข่ฟักตัววงจรชีวิตก็จะเริ่มใหม่อีกครั้ง (Blaustein and Johnson, 2003)

กิจกรรมของมนุษย์สามารถทำให้การติดเชื้อปรสิตเกิดรุนแรงขึ้น เช่น การปล่อยปุ๋ยคอกหรือปุ๋ยหมักลงสู่น้ำจะทำให้สาหร่ายมีจำนวนมากขึ้น ส่งผลให้ประชากรหอยตกเพิ่มขึ้นตามไปด้วย การที่รังสีอัลตราไวโอเล็ตมีปริมาณมากเกินไปและการใช้สารกำจัดศัตรูพืช ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของลูกอ๊อดอ่อนแอลงจึงติดเชื้อจากปรสิตง่ายขึ้นทำให้เกิด malformation ในประชากรกบทั่วไป (Blaustein and Johnson, 2003)

ในประเทศไทย ยังไม่มีรายงานการพบสภาพวิรูปของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในธรรมชาติ แต่พบในบ่อเลี้ยงโดยพบกบมีลักษณะ 5-6 ขา ในจังหวัดต่าง ๆ เช่น พระนครศรีอยุธยา, สกลนคร, ขอนแก่น, นครพนม และร้อยเอ็ด นอกจากนี้ในปี พ.ศ. 2562 มีรายงานการพบลักษณะผิดปกติในกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* ในบ่อเลี้ยงของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ โดยพบกบมี 5-7 ขา โดยเฉพาะที่ขาหลังมีการเพิ่มจำนวนขึ้น

ทั้งเป็นตุ่มกระดูกหรือเป็นขาที่เกือบสมบูรณ์ แต่ยังไม่ทราบสาเหตุของการเกิด และยังขาดการบรรยายลักษณะของสภาพวิรูปโดยสมบูรณ์

การศึกษากายวิภาคและสัณฐานของกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* ที่พบ limb malformation สามารถใช้เป็นหลักฐานสำคัญสำหรับการทดสอบสมมติฐานการเกิด malformation ว่าเป็นผลมาจากการติดเชื้อปรสิต trematode หรือไม่และมีความเป็นไปได้มากเพียงใดที่เกิด limb malformation จะทำให้ประชากรสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในธรรมชาติจะมีจำนวนลดลง โดยสามารถนำข้อมูลส่วนนี้ไปใช้ในการควบคุมและบรรเทาผลกระทบจาก trematode ในอนาคตได้ (Ankley et al., 2004)

งานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะศึกษาและบรรยายลักษณะทางกายวิภาคของกระดูกและสัณฐานวิทยาภายนอกของกบนาที่พบสภาพวิรูปของรยางค์ร่วมกับการ x-ray และการดองใส เพื่อให้เข้าใจถึงรูปแบบการเจริญและลักษณะของกระดูกของขาหลังที่เจริญเพิ่มขึ้นมา ตลอดจนประเมินความเป็นไปได้ของสมมติฐานการติดเชื้อ trematode ว่าเป็นสาเหตุของการเกิด limb malformation ของกบนาในประเทศไทยได้หรือไม่

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาลักษณะทางกายวิภาคและสัณฐานวิทยาภายนอกของกบนาที่พบสภาพวิรูปของรยางค์
2. เพื่อตรวจสอบร่องรอย metacercaria cyst และคาดการณ์สาเหตุการเกิดสภาพวิรูปของรยางค์ของกบนาในบ่อเลี้ยงของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม

2.1. กบนา *Hoplobatrachus rugulosus*

กบนา *Hoplobatrachus rugulosus* เป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ในวงศ์ Ranidae พบในประเทศจีน ไต้หวัน ฮองกง พม่า ลาว เวียดนาม กัมพูชา มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ และไทย สำหรับในประเทศไทยสามารถพบกบนาได้ในทุกภูมิภาค โดยมักจะพบในบริเวณพื้นที่ชุ่มน้ำ เช่น ห้วย, หนอง, คลอง, บึง, นาข้าว และอ่างเก็บน้ำ กบนาสามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งระบบนิเวศน้ำไหล และน้ำนิ่ง ในฤดูแล้งมักจะหลบซ่อนตัวอยู่ในโคลน หรือในโพรงดิน และจะออกจากที่ซ่อนในฤดูฝน (เฉิดฉัน อมาตยกุล, 2538; สมโภชน์ อักคะทวิวัฒน์, 2540) กบนาไม่ได้เป็นสัตว์ป่าคุ้มครองตามพระราชบัญญัติสงวนและสัตว์ป่าคุ้มครอง พ.ศ. 2535 และไม่มีสถานภาพเพื่อการอนุรักษ์ตามเกณฑ์ของ Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning (2005) และตามเกณฑ์ของ IUCN (2008) ปัจจุบันประเทศไทยมีแหล่งเลี้ยงกบขนาดใหญ่อยู่ในภาคตะวันออก, ภาคกลาง และภาคเหนือ เนื่องจากกบนาเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และเป็นที่ยอมรับไปทั่วโลกทั่วไป อีกทั้งยังมีการส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศอีกด้วย (ยงยุทธ ทักษิณ, 2554)

2.1.1. ลักษณะวิทยาภายนอก

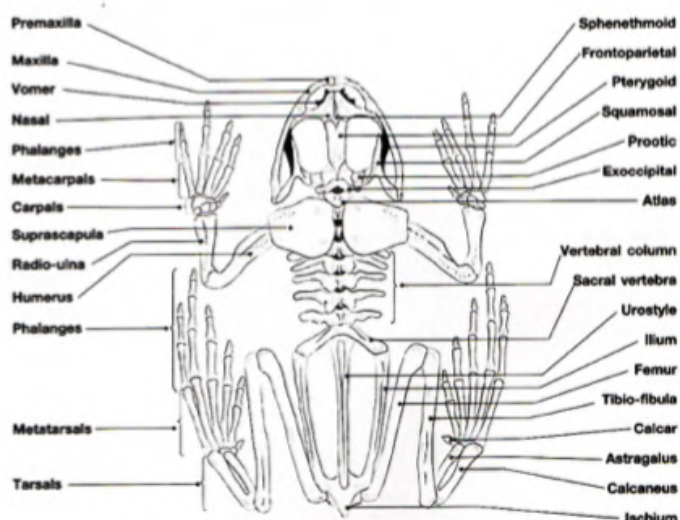
กบนามีลักษณะผิวหนังลำตัวด้านหลังมีตุ่มยาวเรียงตัวเป็นแถวขนานกัน 9-10 แถว ผิวหนังลำตัวด้านหลังเรียบ ผิวหนังด้านหลังสีน้ำตาลอมเขียวหรือสีน้ำตาลเหลือง สีที่ด้านข้างลำตัวจางกว่าที่ด้านหลัง มีปื้นสีเข้มกระจายอยู่บนหลัง ด้านท้องสีขาว ใต้คางสีเทาและมีจุดหรือขีดสีดำกระจาย คางของเพศผู้ย้วยผสมพันธุ์มีถุงเสียง 1 คู่ชัดเจน (external vocal sacs) มีขนาดลำตัวยาวประมาณ 90-180 มิลลิเมตร มีน้ำหนักประมาณ 100-350 กรัม หัวสั้นเป็นรูปสามเหลี่ยม ขาคู่หน้าสั้นมี 4 นิ้ว ขาคู่หลังยาวมี 5 นิ้ว นิ้วตีนหน้าไม่มีแผ่นหนังระหว่างนิ้ว นิ้วตีนหลังมีแผ่นหนังประมาณ 3/4 ของความยาวนิ้ว (เฉิดฉัน อมาตยกุล, 2538; สมโภชน์ อักคะทวิวัฒน์, 2540)



ภาพที่ 2-1 สัณฐานวิทยาภายนอกของกบนา

2.1.2. ลักษณะทางกายวิภาคของกระดูก

ลักษณะโครงกระดูกของกบนาปกติในด้าน anterior ประกอบด้วย skull, sternum, pectoral girdle และ fore limb ส่วนในด้าน posterior ประกอบด้วย pelvic girdle นอกจากนี้ในส่วน of fore limb ประกอบด้วย humerus, radioulna, carpal, metacarpal และ phalanges 4 นิ้ว ตามลำดับ และ hind limb ประกอบด้วย femur, tibiofibula, tarsal, metatarsal และ phalanges 5 นิ้ว ตามลำดับ



ภาพที่ 2-2 ระบบโครงกระดูกของกบ (คลุ้ม วัชโรบล, 2510)

2.2. การมีรูปร่างผิดปกติ หรือสภาพวิรูปในกบ (malformation)

การมีรูปร่างผิดปกติ หรือสภาพวิรูปในกบ (malformation) คือ กบที่มีลักษณะทางกายภาพ ผิดรูปร่างไปจากเดิม เช่น การมีริยางค์ที่เพิ่มขึ้นหรือขาดหายไป การเรียงตัวของกระดูกที่ผิดปกติ การโค้งงอของกระดูก เป็นต้น ซึ่ง malformation นี้สามารถแสดงให้เห็นถึงความผิดปกติในระหว่างการเจริญของตัวอ่อน โดยการเจริญจะเริ่มตั้งแต่ไข่มีการปฏิสนธิและเริ่มกระบวนการโดยการสื่อสารทางเคมีระหว่างเซลล์กับชั้นของเซลล์ผ่านการแสดงออกของยีน ดังนั้น malformation สามารถแสดงถึงการเกิดความผิดปกติระหว่างการเจริญ, ความผิดปกติของการสื่อสารทางเคมี หรือ translation ของ genetic information การมีรูปร่างผิดปกติมักจะเกิดหลังจากการเจริญ และมักจะเกิดหลังจากการกระทำทางเชิงกล เช่น การตัดรยางค์ การกระทำเช่นนี้จะสามารถปรับเปลี่ยนรูปร่าง หรือลักษณะทางกายวิภาคหลังจากเกิดการฟื้นฟู (Meteyer, 2000)

2.3. การพบสภาพวิรูปของกบในธรรมชาติ

รายงานการพบ malformation ในกบสปีชีส์ *Rana pipiens* ในปี 1921 (Colton, 1922) ต่อมาในปี 1958 พบที่ Montana (Lunde and Johnson, 2012) ในปี 1995 พบที่ Minnesota หลังจากนั้นมีการรายงานการพบสภาพวิรูปในกบในประเทศสหรัฐอเมริกา 44 รัฐ โดยเป็นกบ 38 สปีชีส์ และคางคก 19 สปีชีส์ ประมาณ 60% ของประชากรพบสภาพวิรูป (Meteyer et al., 2000) ซึ่งการพบกบที่มีสภาพวิรูปในประเทศสหรัฐอเมริกานั้น มักจะพบที่บริเวณพื้นที่ชุ่มน้ำหลายแห่งทั่วประเทศแสดงให้เห็นว่าการเกิดสภาพวิรูปนั้นสามารถพบได้ง่าย (Sessions and Ruth, 1990; Helgen et al., 1998; Kaiser, 1999a, b; Converse et al., 2000; Hoppe, 2000; Johnson et al., 2002, 2003; Kiesecker, 2002; McCallum and Trauth, 2003; Vandenslangen et al., 2003; Johnson and Lunde, 2005) รายงานเหล่านี้ครอบคลุมจำนวนประชากรของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่พบสภาพวิรูปสัตว์ตั้งแต่ 10% ถึง 95% ซึ่งความผิดปกติส่วนใหญ่ส่งผลที่รยางค์ (Lunde and Johnson, 2012) รายงานในต่างประเทศกล่าวว่าลักษณะ malformation สามารถพบได้ทั้งในทวีปเอเชีย, ยุโรป และออสเตรเลีย (Blaustein and Johnson, 2003)

สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการพบกบที่มีสภาพวิรูปในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา (ข้าวสนุก, 2553), สกลนคร (ข้าวสนุก, 2555), ขอนแก่น (เรื่องเล่าเช้านี้, 2556), นครพนม (ไทยรัฐออนไลน์, 2560) และ ร้อยเอ็ด (อมรินทร์ทีวี, 2563)

2.4. สาเหตุการเกิดสภาพวิรูปในกบ

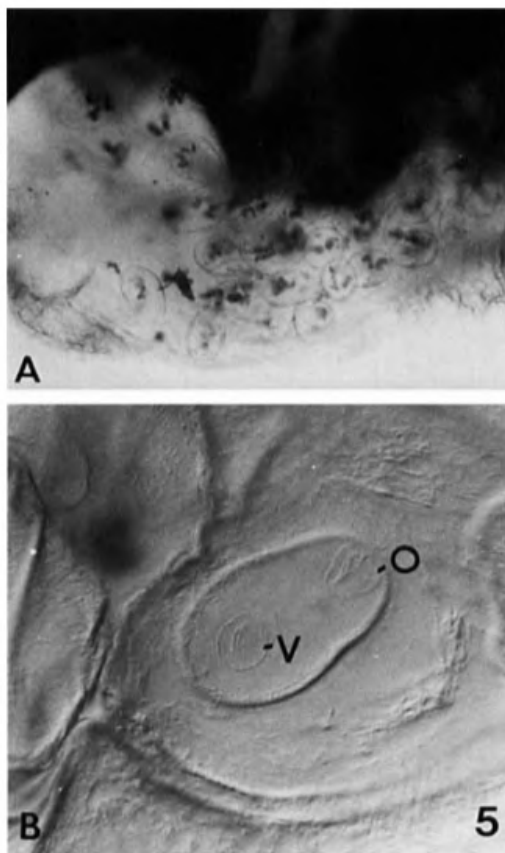
สาเหตุการเกิดสภาพวิรูปในกบอาจเกิดได้จากหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น genetic mutation, การบาดเจ็บ, รังสี ultraviolet, การปนเปื้อนจากสารเคมีในแหล่งน้ำ, การแพร่ระบาดของปรสิต หรือ

ความผิดปกติในการเจริญ สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกสามารถเป็นตัวบ่งชี้ถึงสุขภาพของสภาพแวดล้อมของโลกได้ เนื่องจากไข่ที่ไม่มีเปลือกแข็งหุ้ม และผิวหนังที่ดูดซับได้ดีทำให้มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมสูง (USGS, 2001; Blaustein and Johnson, 2003)

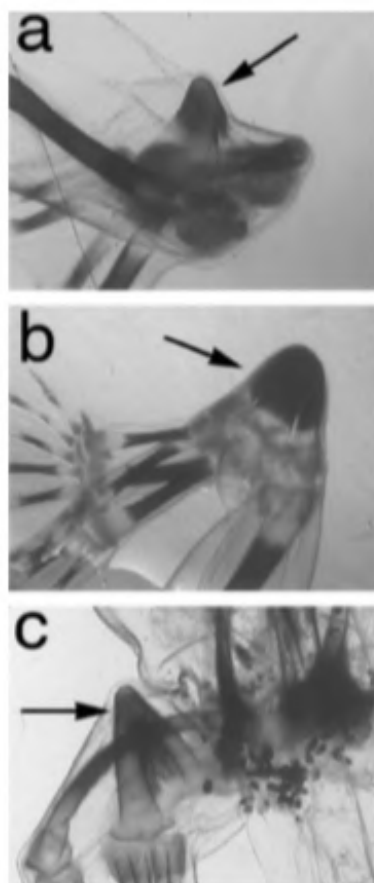
2.4.1. ปรสิต *Ribeiroia ondatrae*

สาเหตุของกบที่มีสภาพวิรูปที่พบในภาคตะวันตกของประเทศสหรัฐอเมริกาจากการติดเชื้อปรสิต *Ribeiroia ondatrae* (Johnson et al., 1999; Johnson and Lunde, 1999) ซึ่งเป็น trematode (หนอนตัวแบน) ที่เจริญภายในหอยน้ำจืดก่อนจะไปฝังตัวในลูกอ๊อด และเจริญเป็น metacercaria cyst สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกหลายสปีชีส์จะมีการเจริญที่ผิดปกติเมื่อติดเชื้อ *Ribeiroia* ส่งผลให้เกิดยางค์ที่ผิดปกติ (Johnson et al., 2001) metacercaria cyst มักจะฝังตัวอยู่ภายในกล้ามเนื้อบริเวณต้นขาหลังและสามารถพบได้ในบริเวณต่าง ๆ ภายในร่างกาย โดยเฉพาะบริเวณ cloaca ซึ่ง cyst จะรบกวนการเจริญของขาหลัง (ภาพที่ 2-3) (Gardiner and Hoppe, 1999) และมีผลต่อรูปแบบของ chondrogenesis ของ skeleton element ในการเจริญของยางค์ (Session and Ruth, 1990) หลายพื้นที่ในรัฐ Minnesota พบการติดเชื้อ *Ribeiroia* ในกบจำนวนมาก แต่มีบางพื้นที่ที่พบกบสภาพวิรูปแต่ไม่พบปรสิต *Ribeiroia* (Sutherland, 2005) ซึ่งหลายปีที่ผ่านมาได้มีการพบการติดเชื้อที่ก่อให้เกิดสภาพวิรูปมากขึ้น อาจเพราะการมีปริมาณสารอาหารที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ปรสิตเจริญเติบโต และแพร่กระจายได้ดี (USGS, 2001)

การศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อ *Ribeiroia* ของลูกอ๊อด genus *Rana* ที่บริเวณ limb bud ในห้องปฏิบัติการ สามารถทำให้กบมีลักษณะผิดปกติได้ ส่งผลให้เกิดลักษณะกระดูกสามเหลี่ยม โค้งงอ (ภาพที่ 2-4) ซึ่งลักษณะที่ผิดปกตินี้มีความคล้ายคลึงกับกบที่มีสภาพวิรูปในธรรมชาติ (Stopper et al., 2002) นอกจากนี้จากการศึกษาของ David M. Gardiner และ David M. Hoppe (1999) กล่าวว่ากบที่มีสภาพวิรูปนั้นไม่ได้เกี่ยวข้องกับ cyst ของปรสิตเสมอไป และ cyst ถูกพบได้ยากในบริเวณ distal ของ femur จึงอนุมานได้ว่าผลของการเจริญของขาไม่ทำให้ cyst เคลื่อนที่ ดังนั้นความผิดปกติที่บริเวณ distal ของขาจึงมักปรากฏในตัวเต็มวัยที่มีความเกี่ยวข้องกับ cyst และลักษณะของกระดูกที่ผิดปกติมีลักษณะกระดูกสามเหลี่ยม และขาเจริญเกิน



ภาพที่ 2-3 Metacercaria cyst ปริมาณมากบริเวณฐานขาหลัง หรือ cloaca ของ froglet (A) และ ภาพกำลังขยายสูงของ metacercaria cyst ที่ฝังตัวในบริเวณ hind limb bud ของลูกอ๊อด (B); oral (O) และ ventral adhesive organ (V) (Gardiner and Hoppe, 1999)



ภาพที่ 2-4 กระจกสามเหลี่ยมจากการศึกษาโดย วิธี limb bud rotation (a) การทดลอง cyst-induction (b) กบที่มีสภาพวิรูปที่ติดเชื้อจากธรรมชาติ โดยสามารถเห็น cyst ลักษณะเป็นจุดสีดำ (c) (Stopper et al., 2002)

2.4.2. สารเคมี

แหล่งน้ำหลายแห่งในรัฐ Minnesota ตรวจพบสารเคมี และกบที่มีสภาพวิรูป ซึ่งสารเคมีดังกล่าว เช่น สารกำจัดศัตรูพืช สามารถส่งผลให้กบมีลักษณะผิดปกติหรือตายเมื่อมีความเข้มข้นมาก (Harfenist et al., 1989) Methoprene ยาฆ่าแมลงที่มีการใช้อย่างแพร่หลายเพื่อควบคุมยุงก็อาจเป็นสารเคมีที่ก่อให้เกิดสภาพวิรูปในกบได้ (Sparling, 2000) retinoic acid สามารถทำให้กบเกิดลักษณะผิดปกติได้ (Bryant and Gardiner, 1992) ซึ่ง retinoic acid ถูกตรวจพบในแหล่งน้ำบางแห่งที่รัฐ Minnesota เป็นผลทำให้กบ *Rana septentrionalis* มีความผิดปกติที่ขาหลังทั้งหมดเนื่องจาก retinoids ในธรรมชาติ สามารถกระตุ้นรอยางค์ให้เกิดการเจริญซ้ำอีกได้ (limb duplication) (Gardiner and Hoppe, 1999) นอกจากนี้ estrogen ซึ่งปกติเกี่ยวข้องกับ sexual development แต่หากมีความเข้มข้นสูงอาจส่งผลให้เกิด limb malformation ได้ (Hayes, 2000)

2.4.3. รังสี Ultraviolet

ปริมาณของรังสี ultraviolet ที่มาถึงผิวโลกจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และปริมาณรังสีในปัจจุบันสามารถส่งผลให้เกิดความผิดปกติของกบในห้องปฏิบัติการได้ (Ankley et al., 1998) การศึกษาบริเวณแหล่งน้ำที่พบกบที่มีสภาพวิรูปที่รัฐ Minnesota พบว่าปริมาณรังสี UV ที่ระดับความลึก 10 เซนติเมตร เกี่ยวข้องกับการเกิดสภาพวิรูปในกบ (Little, 1999)

2.4.4. ปัจจัยร่วมกัน

ปัจจัยทางเคมี และปัจจัยทางกายภาพสามารถร่วมกันเป็นสาเหตุที่ทำให้กบมีลักษณะผิดปกติได้ ปัจจัยทางเคมีร่วมกันอาจเป็นการผสมระหว่างสารอินทรีย์จากธรรมชาติ และที่มนุษย์สร้างขึ้น ซึ่งจะมีคุณสมบัติเป็นพิษเมื่อรวมตัวกัน (USGS, 2001)

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน

3.1. การดำเนินการเกี่ยวกับสัตว์ทดลอง

3.1.1. ตัวอย่างสัตว์ทดลอง

รับตัวอย่างกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* ระยะตัวเต็มวัยในบ่อเลี้ยงของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ ที่พบสภาพวิรูปของรยางค์ (limb malformation) ในปี 2562 โดยเป็นกบนาที่ยังมีชีวิตเพื่อใช้ตรวจสอบ metacercaria cyst จำนวน 9 ตัว และเป็นซากกบนาจำนวน 75 ตัว ทั้งที่มีลักษณะปกติ และพบสภาพวิรูป รวมทั้งสิ้น 84 ตัว

3.1.2. การดำเนินการกับกบนาที่ยังมีชีวิต

ส่งข้อเสนอโครงการวิจัยเพื่อขอใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ต่อคณะกรรมการการควบคุมการดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Animal Use Protocol No. 2023002)

3.2. การศึกษาสัณฐานวิทยา (morphological study)

ศึกษาลักษณะสัณฐานของกบนาที่พบ malformation โดยเก็บข้อมูลน้ำหนัก ความยาว snout ถึง vent (SVL) และความยาวของขาที่มีลักษณะ malformation โดยใช้ vernier caliper และถ่ายภาพลักษณะภายนอกทั้งด้าน dorsal และ ventral โดยในกรณีที่เป็นกบที่ยังมีชีวิตจะการุณยฆาตกบในสารละลาย MS-222 ก่อน (Conroy, 2009; Torreilles, 2009; Padauno et al., 2013)

3.3. การศึกษากายวิภาค (anatomical study)

ศึกษากายวิภาคของลักษณะกระดูกรยางค์ที่พบ malformation เทียบกับกระดูกรยางค์ปกติจากการศึกษาเปรียบเทียบภาพ x-ray และการดองใส และตรวจสอบหาร่องรอยของโรคจากการผ่าและจากการดองใส โดย

3.3.1. การเอกซเรย์

ส่งซากกบนาทั้งหมด 84 ตัว ไป x-ray ที่โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.2. การผ่าเพื่อตรวจสอบร่องรอยของโรค

นำตัวอย่างกบนาจำนวน 9 ตัว ที่ถูกการุณยฆาตด้วย MS-222 1.0% (Padauno et al., 2013) ทำการผ่าเพื่อตรวจสอบร่องรอยของ metacercaria cyst ในกล้ามเนื้อส่วนโคนขาและส่วนที่หางหดตัว (Szuroczi and Richardson, 2009) โดยหากพบ metacercaria cyst จะนำตัวอย่างชิ้นเนื้อ fix ในสารละลาย neutral buffered formalin 10% ก่อนนำไปศึกษาทางจุลกายวิภาค โดยผ่านกระบวนการ dehydration ด้วย graded ethanol ที่ความเข้มข้นร้อยละ 70, 80 และ 95 ตามด้วย isopropanol ความเข้มข้นละ 45 นาที แล้วนำไปผ่านกระบวนการ clearing ด้วย xylene เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อไป embed ใน paraffin และนำไปตัดด้วย rotary microtome ให้ได้ชิ้นเนื้อขนาด 5 ไมโครเมตร แล้วย้อมสีด้วย hematoxylin และ eosin (Sanderson, 1994) แล้วนำไปเปรียบเทียบลักษณะของ metacercaria cyst ที่พบกับงานวิจัยของ Johnson and McKenzie (2009) และ Calhoun et al. (2015)

3.3.3. การดองใส

นำซากกบมาผ่านกระบวนการดองใส แล้วบันทึกภาพด้าน dorsal และ ventral และนำข้อมูลมาศึกษากายวิภาคของกระดูก โดยจัดจำแนกลักษณะ malformation ของกระดูกยางค์ที่พบ และบันทึกเป็นภาพวาดทางวิทยาศาสตร์ (scientific illustration) เพื่อความสะดวกต่อการศึกษา ซึ่งระหว่างการดองใสในแต่ละขั้นตอนจะทำการสังเกตและบันทึกภาพ เพื่อตรวจสอบหาร่องรอยของโรคควบคู่ไปด้วย

โดยขั้นตอนการดองใสมีดังนี้

1. นำตัวอย่างกบที่เก็บรักษาใน 10% formalin ผ่านน้ำเป็นเวลา 1 วัน แล้วนำผิวหนัง ตา อวัยวะภายในออก
2. นำตัวอย่างกบแช่ในสารผสมของ 10% KOH กับ 1% H₂O₂ ในอัตราส่วน 1:9 เป็นเวลา 2 วัน
3. เปลี่ยนถ่ายตัวอย่างกบลงในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70% และ 95% (2 ครั้ง) ครั้งละ 2 ชั่วโมง เพื่อดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ
4. นำตัวอย่างกบแช่ในสารละลาย alcian blue จนกว่าสีฟ้าจะติดบริเวณข้อต่อ (กระดูกอ่อน) ทั้งหมด

5. เปลี่ยนถ่ายตัวอย่างกบลงในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70%, 40% และ 15% ครั้งละ 2 ชั่วโมง เพื่อนำน้ำกลับเข้าเนื้อเยื่อ
6. นำตัวอย่างกบแช่ในสารละลาย alizarin red เป็นเวลา 1-2 วัน สังเกตบริเวณกระดูกจะติดสีแดง
7. แช่ในสารละลาย 0.5% KOH เป็นเวลา 30 นาที เพื่อล้างสี alizarin red ที่ติดบริเวณกล้ามเนื้อออก หลังจากนั้นปรับสภาพเนื้อเยื่อโดยแช่ในสารผสม saturated sodium borate กับ dH₂O เป็นเวลา 1 วัน
8. แช่ในสารละลาย trypsin เป็นเวลา 6 วัน หรือจนกว่าสารละลายย่อยกล้ามเนื้อบริเวณต้นขาหมด
9. นำตัวอย่างกบแช่ในสารละลาย 0.5% KOH เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วแช่ในสารละลาย alizarin red เป็นเวลา 1 วัน
10. นำตัวอย่างมาผ่านกระบวนการ clearing โดยแช่ในสารผสม 0.5% KOH กับ glycerine อัตราส่วน 3:1 1:1 และ 1:3 ตามลำดับ เป็นเวลาสารละ 1 วัน
11. เก็บรักษาตัวอย่างกบใน pure glycerine ผสมเกลือ thymol เล็กน้อย เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อรา และแบคทีเรีย

บทที่ 4 ผลการศึกษา

ผลการศึกษาแบ่งออกเป็น 3 หัวข้อหลัก ดังนี้

ส่วนที่ 4.1 การศึกษาสัณฐานวิทยา และกายวิภาค (morphological and anatomical studies) นำเสนอข้อมูลต่าง ๆ ของกบนาที่พบสภาพวิรูป โดยกล่าวถึงความยาว snout ถึง vent (SVL), น้ำหนัก และลักษณะของสภาพวิรูปของรยางค์จากการศึกษาสัณฐานภายนอก และนำเสนอการจัดกลุ่มระดับความรุนแรงของสภาพวิรูปของกบนา ตำแหน่งของรยางค์ที่เจริญเกิน และลักษณะความผิดปกติที่พบ จากการเปรียบเทียบข้อมูลภาพสัณฐานภายนอก, ภาพ x-ray, ภาพการดองใส และภาพวาดทางวิทยาศาสตร์ (Scientific illustration)

ส่วนที่ 4.2 การตรวจสอบหาร่องรอยของโรค นำเสนอผลการตรวจสอบร่องรอยของ metacercaria cyst ในกบนาที่มีสภาพวิรูปจากวิธีการผ่า และการดองใส โดยนำเสนอภาพกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ

4.1.การศึกษาสัณฐานวิทยา และกายวิภาค (morphological and anatomical studies)

4.1.1. ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา

จากการเก็บข้อมูลทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ความยาว snout ถึง vent (SVL) และน้ำหนัก ได้ผลดังนี้ ข้อมูลความยาว snout ถึง vent (SVL) ของซากกบนาจำนวน 75 ตัว อายุประมาณ 2 เดือน มีช่วงอยู่ที่ 4.79 ถึง 8.14 cm มีค่าเฉลี่ย (\bar{X}) อยู่ที่ 6.49 cm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) มีค่า 0.62 ในส่วนของกบนาที่ยังมีชีวิต 9 ตัว มีช่วงอยู่ที่ 8.58 ถึง 12.43 cm มีค่าเฉลี่ย (\bar{X}) อยู่ที่ 10.15 cm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) มีค่า 1.11 และข้อมูลน้ำหนักของกบนาที่ยังมีชีวิตจำนวน 9 ตัว อายุประมาณ 9 เดือน มีช่วงอยู่ที่ 107.92 ถึง 313.99 g มีค่าเฉลี่ย (\bar{X}) อยู่ที่ 174.87 g

4.1.2. การจัดกลุ่มระดับความรุนแรงของสภาพวิรูปของกบนา

จากการศึกษาสัณฐานวิทยา, ภาพ x-ray และการดองใสของกบนาทั้ง 84 ตัว ทำให้สามารถจัดกลุ่มระดับความรุนแรงของสภาพวิรูป โดยมีเกณฑ์การจัดกลุ่มดังนี้

4.1.2.1. จำนวนขาที่เจริญเกิน

4.1.2.2. ความยาวของขาที่เจริญเกินมีขนาดเกินกว่าความยาวครึ่งหนึ่งของค่า SVL หรือไม่

4.1.2.3. ขาที่เจริญเกินส่งผลต่อขาหลังเดิมทำให้มีความผิดปกติหรือไม่

4.1.2.4. ขาเดิมผิดปกติ หรือขาที่เจริญเกินส่งผลต่อขาเดิมทำให้ผิดปกติ ทำให้กบมีการเคลื่อนที่ยากขึ้นหรือไม่

จากการพิจารณาเกณฑ์การจัดกลุ่มระดับความรุนแรงของสภาพวิรูป ทำให้สามารถจัดกลุ่มได้ทั้งหมด 9 ระดับ ดังนี้

ระดับ 0

กบนาที่มีลักษณะปกติ คือ ไม่มีการเจริญของขาหลังเกิน ไม่พบ pigment ที่บริเวณผิวหนังท้องขาหลัง การเจริญของ femur, tibiofibula, tarsal และ phalange ปกติ มีจำนวน 11 ตัว ซึ่งใช้เป็นกลุ่มอ้างอิง

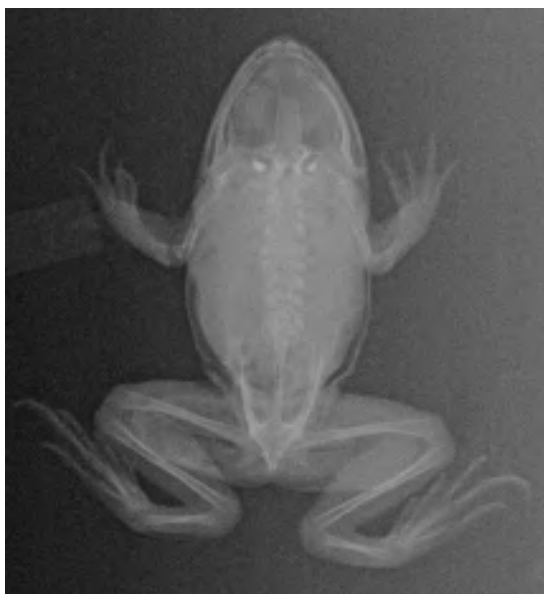


(a)

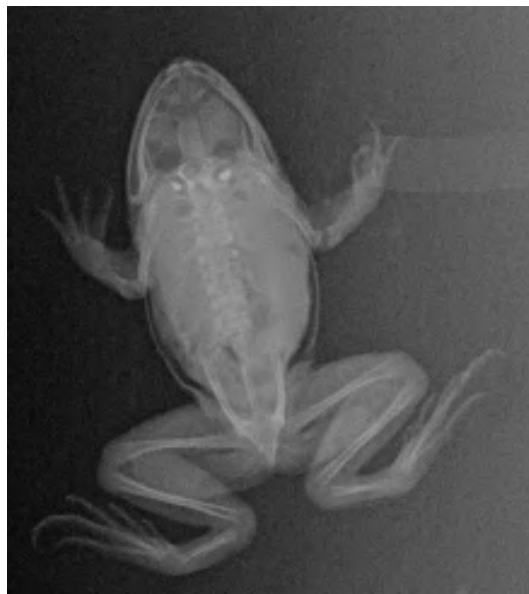


(b)

ภาพที่ 4-1 สันฐานของกบนาที่มีลักษณะปกติ ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1367)



(a)



(b)

ภาพที่ 4-2 ภาพ x-ray ของกบนาที่มีลักษณะปกติ ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1367)

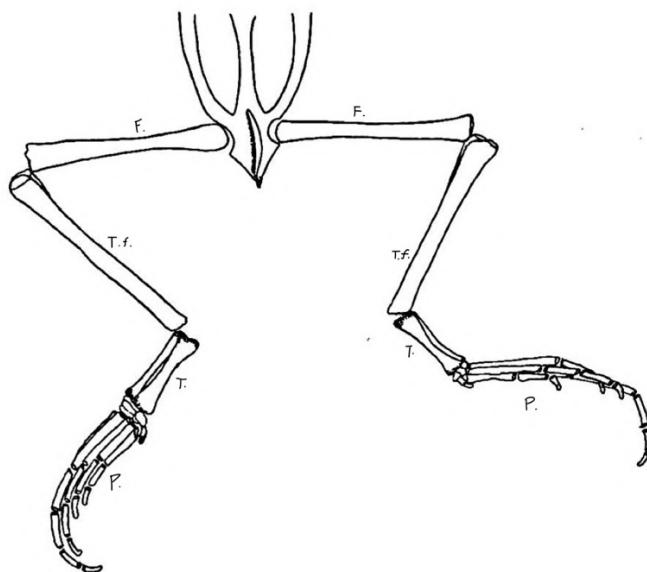


(a)



(b)

ภาพที่ 4-3 กบนาดองใสที่มีลักษณะปกติ ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1367)



ภาพที่ 4-4 Scientific illustration ของกบนาปกติ, F. = Femur, T.f. = Tibiofibula, T. = Tarsal และ P. = Phalanges; (กบหมายเลข PT 1367)

ระดับ 1

กบนาที่มีลักษณะไม่มีขาหลังเจริญเกิน ไม่มีความผิดปกติของกระดูก แต่พบ pigment ได้ที่องขาหลัง สภาพวิรูปลักษณะนี้ไม่ส่งผลกระทบต่อการศึกษาเคลื่อนที่ และมีโครงสร้างของกระดูกเหมือนกับกบนาลักษณะปกติทุกประการ มีจำนวน 1 ตัว จากกบที่มีสภาพวิรูป 73 ตัว (1.37%)

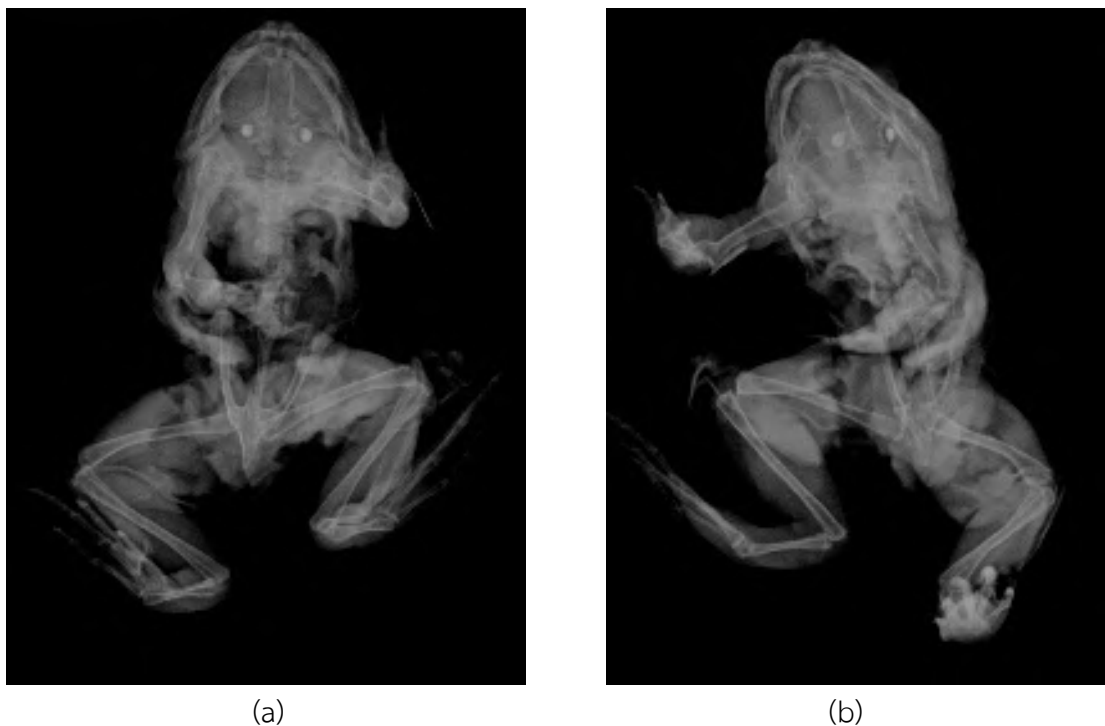


(a)



(b)

ภาพที่ 4-5 กบนาที่พบ pigment ได้ที่องขาหลัง ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1594)



ภาพที่ 4-6 ภาพ x-ray ของกบนาที่พบ pigment ใต้ท้องขาหลัง ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1594)

ระดับ 2

กบนาที่มีลักษณะมีขาหลังผิดปกติ 1 ขา โดยเป็นกระดูกที่เจริญเกินออกมาจากบริเวณ pubis มีลักษณะเป็นตุ่มกระดูก หรือมีการเจริญใหม่ตั้งแต่ femur จนอาจเกิดเป็นขาสมบูรณ์ โดยขาที่เจริญเกินนั้นไม่ส่งผลให้ขาหลังเดิมมีความผิดปกติ และมีความยาวไม่เกินครึ่งหนึ่งของค่า SVL นอกจากนี้ บางตัวยังพบ pigment ที่ใต้ท้องขาหลัง หรือมีกล้ามเนื้อของขาที่เจริญเกินติดกับขาเดิม มีจำนวน 16 ตัว จากกบที่มีสภาพวิรูป 73 ตัว (21.92%)

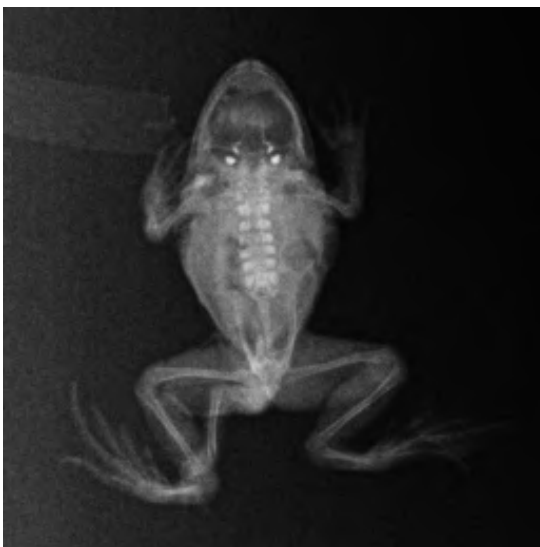


(a)

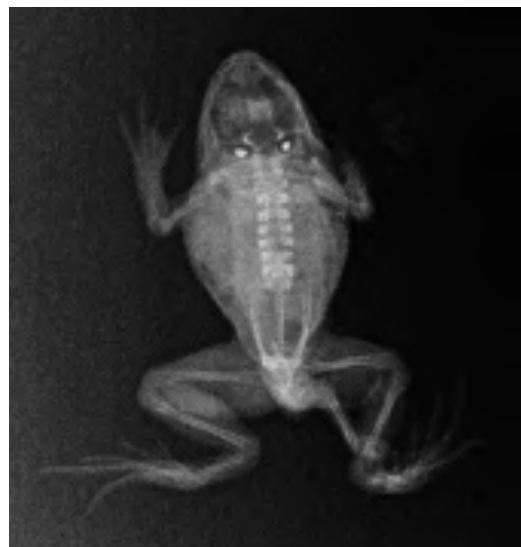


(b)

ภาพที่ 4-7 สัณฐานของกบนาที่มีลักษณะขาหลังผิดปกติ 1 ขา ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1327)

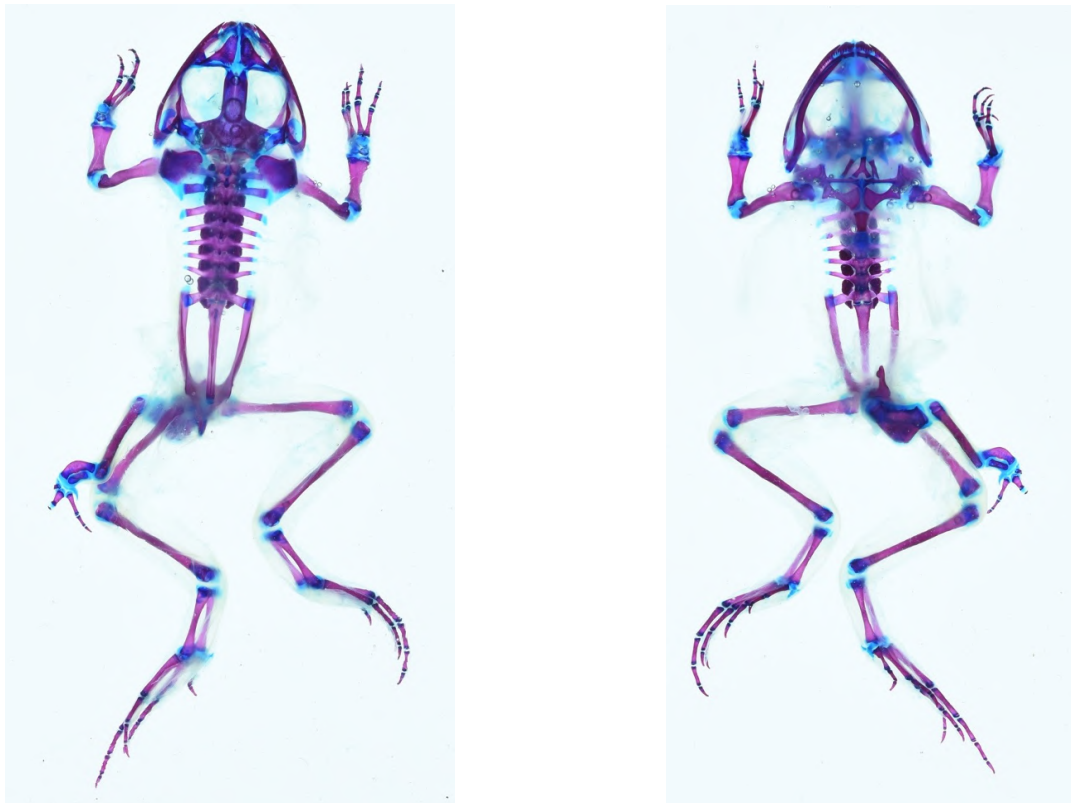


(a)



(b)

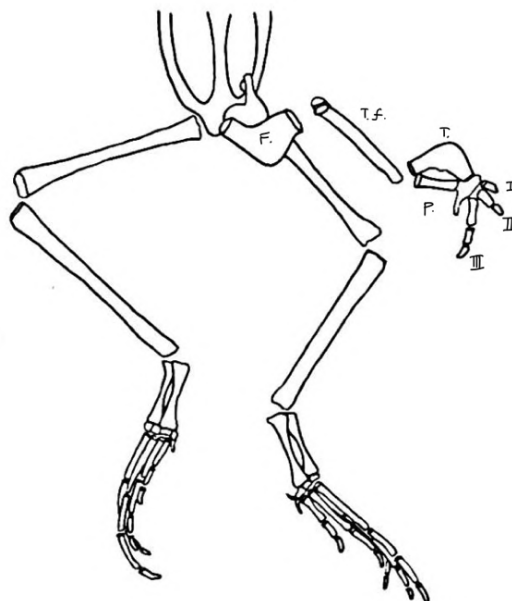
ภาพที่ 4-8 ภาพ x-ray ของกบนาที่มีลักษณะขาหลังผิดปกติ 1 ขา ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1327)



(a)

(b)

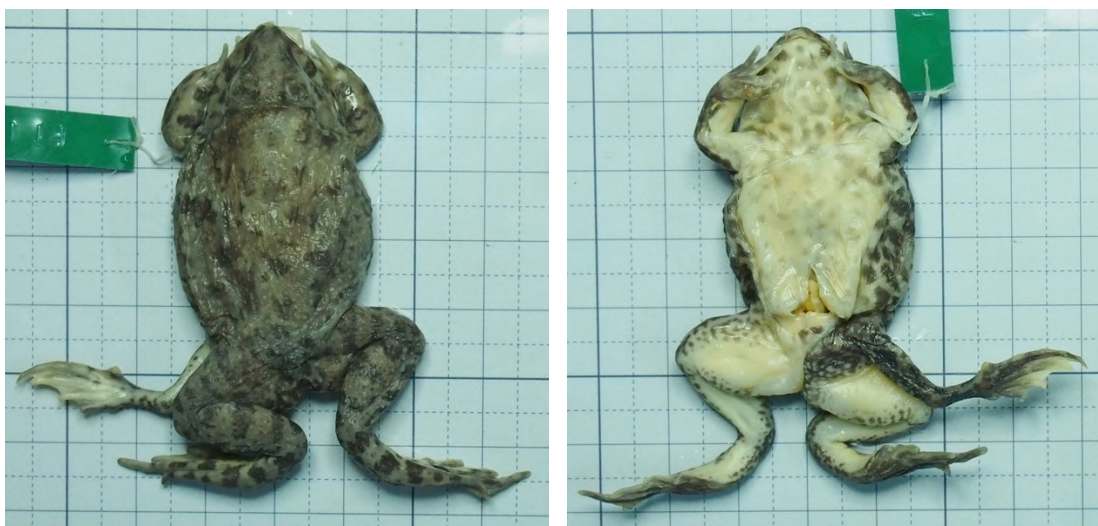
ภาพที่ 4-9 กบนาทองใสที่มีลักษณะขาหลังผิดปกติ 1 ขา ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b);
(กบหมายเลข PT 1327)



ภาพที่ 4-10 Scientific illustration ของกบนาที่มีขาผิดปกติ 1 ขา, F. = Femur, T.f. = Tibiofibula, T. = Tarsal และ P. = Phalanges; (กบหมายเลข PT 1327)

ระดับ 3

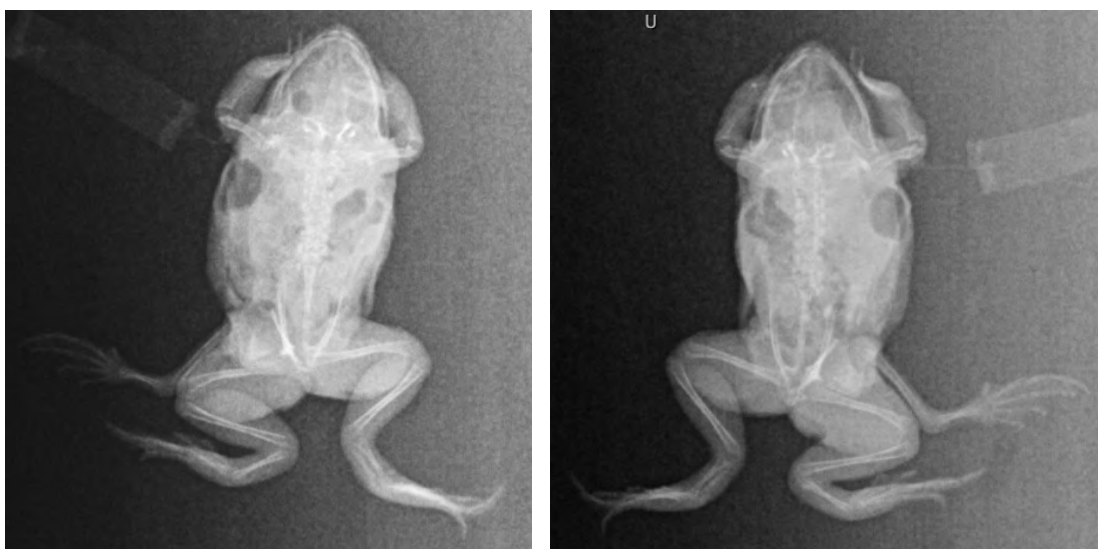
กบนาที่มีลักษณะขาหลังผิดปกติ 1 ขา โดยขาที่ผิดปกติมีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL และไม่ส่งผลให้ขาหลังเดิมผิดปกติ บางตัวมีกล้ามเนื้อบริเวณต้นขาติดกับขาหลังเดิม มีจำนวน 24 ตัว จากกบที่มีสภาพวิรูป 73 ตัว (32.88%)



(a)

(b)

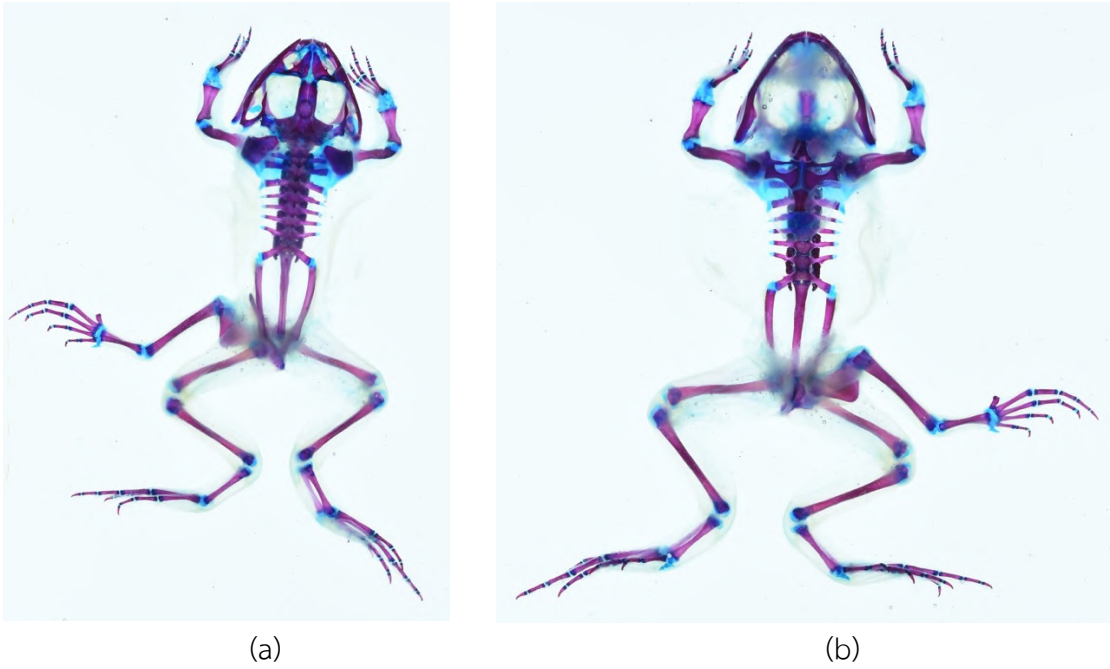
ภาพที่ 4-11 สัตว์ฐานกบนาที่มีลักษณะขาหลังผิดปกติ 1 ขา และมีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1342)



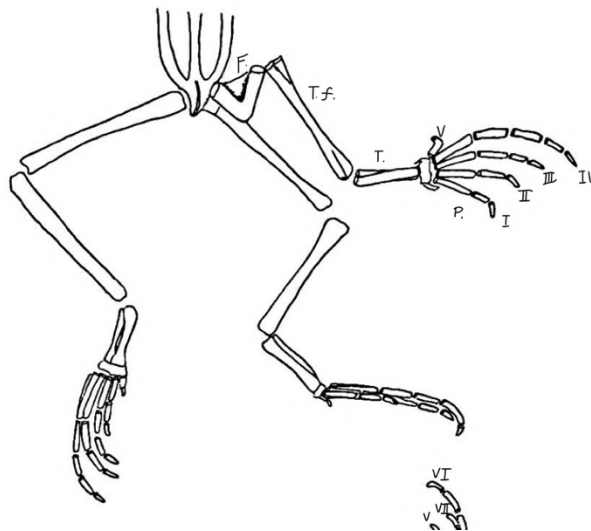
(a)

(b)

ภาพที่ 4-12 ภาพ x-ray ของกบนาที่มีลักษณะขาหลังผิดปกติ 1 ขา และมีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1342)



ภาพที่ 4-13 กบขนาดองุ่นที่มีลักษณะขาหลังผิดปกติ 1 ขา และมีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1342)



ภาพที่ 4-14 Scientific illustration ของกบนาที่มีลักษณะขาหลังผิดปกติ 1 ขา และมีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL, F. = Femur, T.f. = Tibiofibula, T. = Tarsal และ P. = Phalanges; (กบหมายเลข PT 1342)

ระดับ 4

กบนาที่มีลักษณะขาหลังผิดปกติ 2 ขา โดยเป็นขาที่เจริญใหม่ทั้งหมด มีจุดกำเนิดอยู่บริเวณ pubis และมีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL มีจำนวน 1 ตัว จากกบที่มีสภาพวิรูป 73 ตัว (1.37%)



(a)



(b)

ภาพที่ 4-15 สัตว์ฐานกบนาที่มีขาหลังผิดปกติ 2 ขา ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1317)

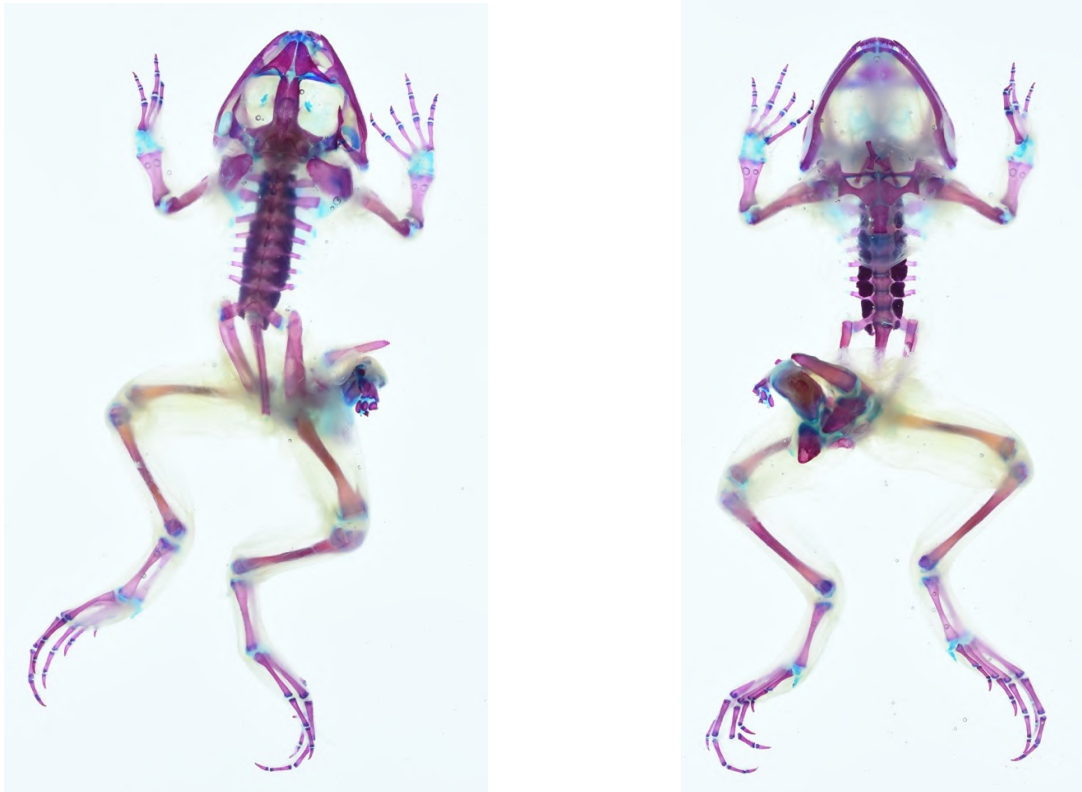


(a)



(b)

ภาพที่ 4-16 ภาพ x-ray ของกบนาที่มีขาหลังผิดปกติ 2 ขา ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1317)



(a)

(b)

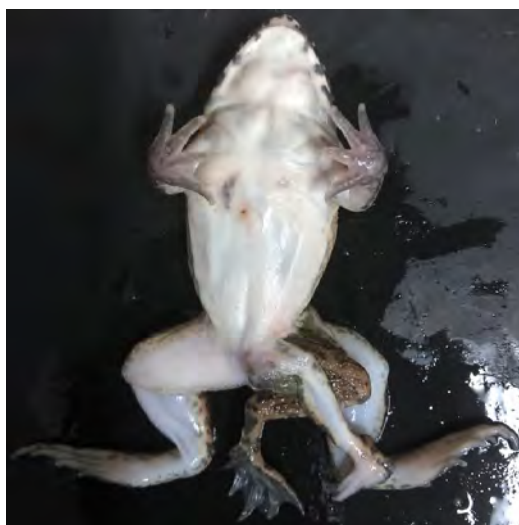
ภาพที่ 4-17 กบนาดองใสที่มีขาหลังผิดปกติ 2 ขา ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1317)



ภาพที่ 4-18 Scientific illustration ของกบนาที่มีขาหลังผิดปกติ 2 ขา, F. = Femur, T.f. = Tibiofibula และ P. = Phalanges; (กบหมายเลข PT 1317)

ระดับ 5

กบนาที่มีลักษณะขาหลังผิดปกติ 2 ขา โดยเป็นขาที่เจริญใหม่ทั้งหมด มีจุดกำเนิดอยู่บริเวณ pubis และมีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL บางตัวกล้ามเนื้อส่วนต้นขามีการเชื่อมกันกับกล้ามเนื้อของขาที่เจริญใหม่ ซึ่งการเชื่อมกันของกล้ามเนื้อนี้จะส่งผลต่อการเคลื่อนที่ โดยจะเคลื่อนที่ลำบากมากยิ่งขึ้นหากมีการเชื่อมกันของกล้ามเนื้อตั้งแต่ femur ถึง tarsal บางตัวพบกระดูกมีลักษณะสามเหลี่ยม มีจำนวน 19 ตัว จากกบที่มีสภาพวิรูป 73 ตัว (26.03%)



ภาพที่ 4-19 สัตว์ฐานกบนาที่มีขาหลังผิดปกติ 2 ขา และมีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL ด้าน ventral; (กบหมายเลข PT 1329)

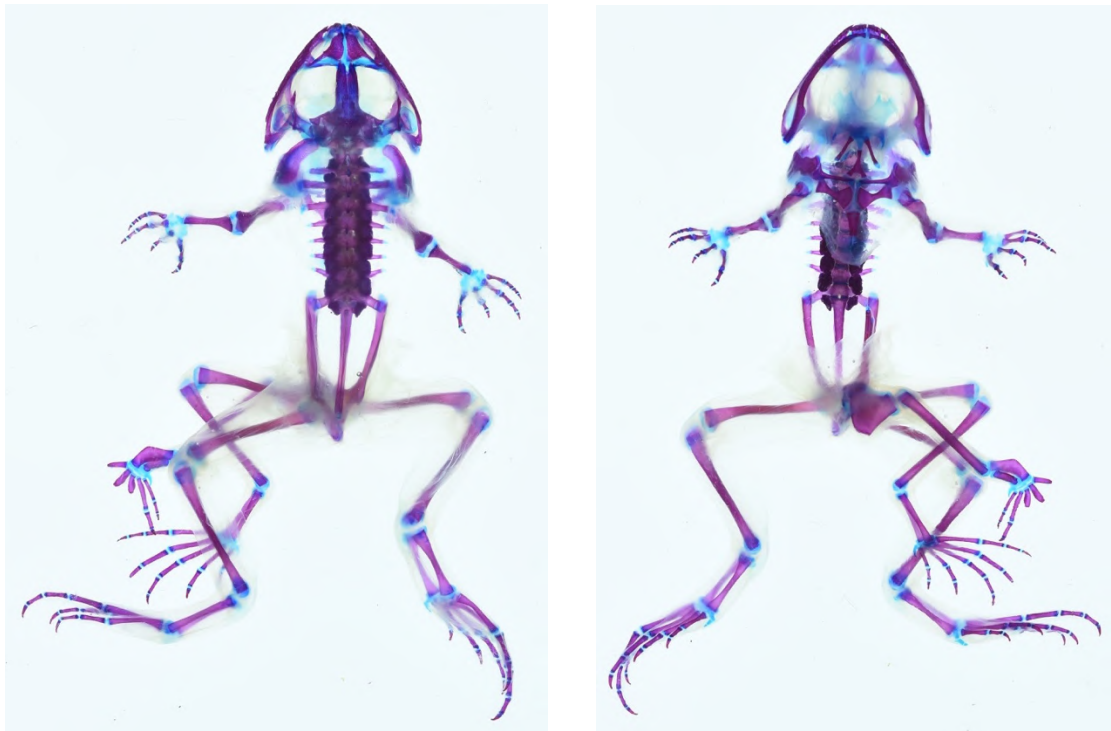


(a)



(b)

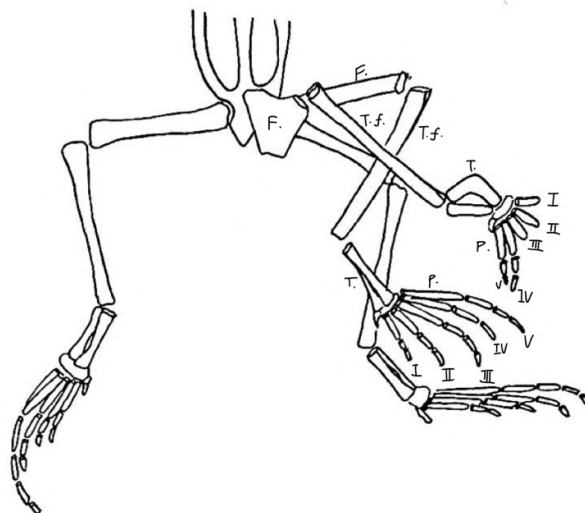
ภาพที่ 4-20 ภาพ x-ray ของกบนาที่มีขาหลังผิดปกติ 2 ขา และมีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1329)



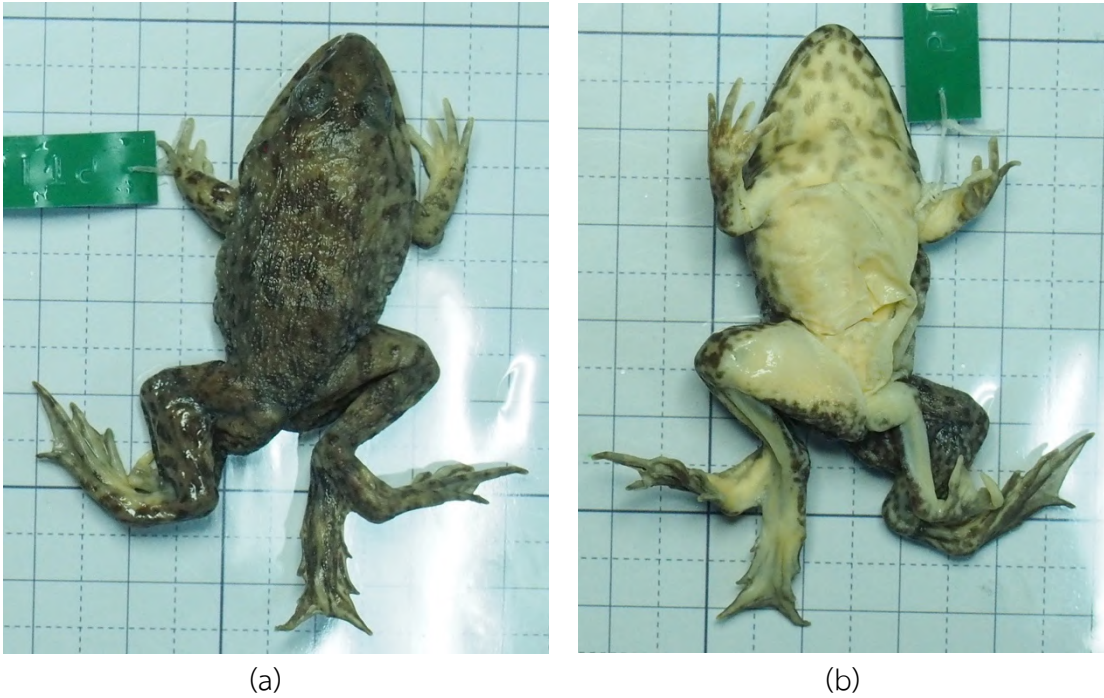
(a)

(b)

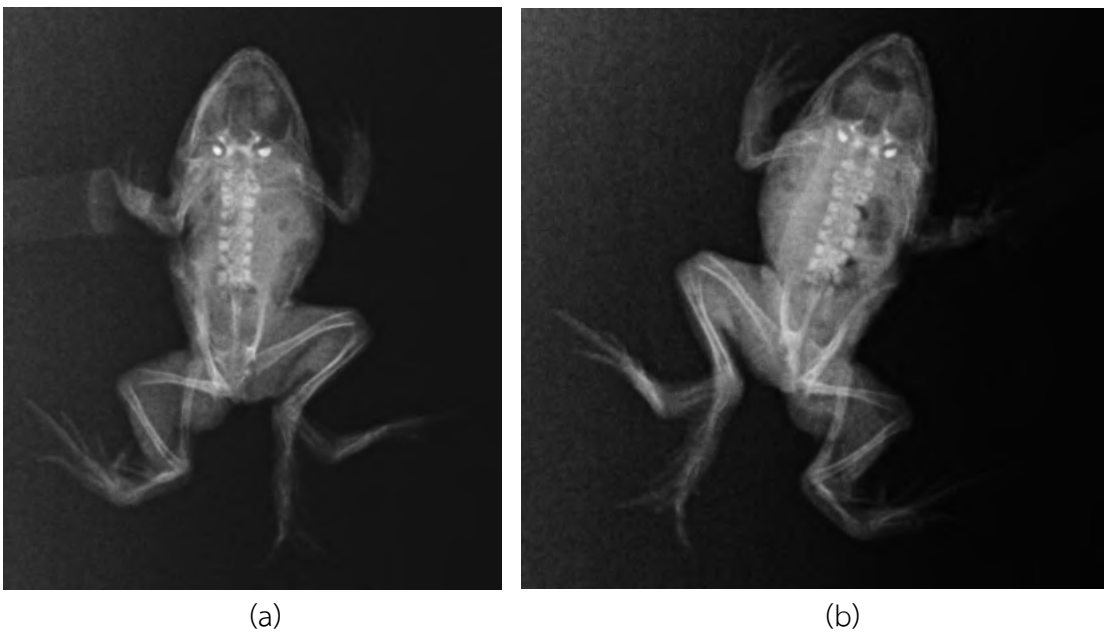
ภาพที่ 4-21 กบขนาดงูสโลที่มีขาหลังผิดปกติ 2 ขา และมีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1329)



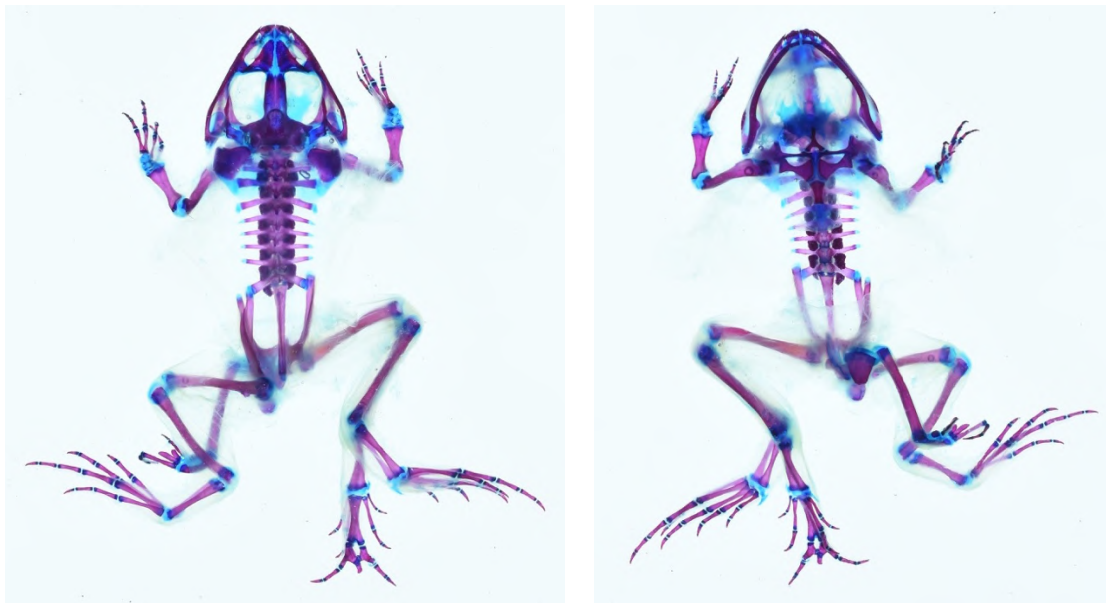
ภาพที่ 4-22 Scientific illustration ของกบนาที่มีขาหลังผิดปกติ 2 ขา และมีความยาวกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL, F. = Femur, T.f. = Tibiofibula, T. = Tarsal และ P. = Phalanges; (กบหมายเลข PT 1329)



ภาพที่ 4-23 สัตว์ฐานกบนาที่มีขาหลังผิดปกติ 2 ขา มีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL และมีกล้ามเนื้อส่วนต้นขาติดกับขาเดิม ด้าน ventral ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1336)



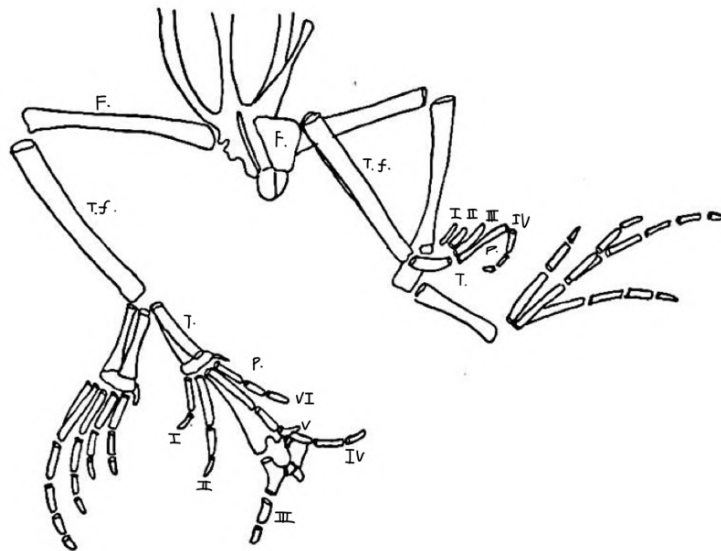
ภาพที่ 4-24 ภาพ x-ray ของกบนาที่มีขาหลังผิดปกติ 2 ขา มีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL และมีกล้ามเนื้อส่วนต้นขาติดกับขาเดิม ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1336)



(a)

(b)

ภาพที่ 4-25 กบขนาดออสี่ที่มีขาหลังผิดปกติ 2 ขา มีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL ด้าน และมีกล้ามเนื้อส่วนต้นขาติดกับขาเดิม ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1336)



ภาพที่ 4-26 Scientific illustration ของกบนาที่มีขาหลังผิดปกติ 2 ขา มีความยาวกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL และมีกล้ามเนื้อส่วนต้นขาติดกับขาเดิม, F. = Femur, T.f. = Tibiofibula, T. = Tarsal และ P. = Phalanges; (กบหมายเลข PT 1336)

ระดับ 6

กบนาที่มีลักษณะขาหลังผิดปกติ 3 ขา โดยขาหลังเดิมมีลักษณะปกติ บางตัวมีกล้ามเนื้อของขาที่เจริญติดกับขาเดิม มีจำนวน 2 ตัว จากกบที่มีสภาพวิรูป 73 ตัว (2.74%)



(a)



(b)

ภาพที่ 4-27 สัณฐานกบนาที่มีขาหลังผิดปกติ 3 ขา ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1349)

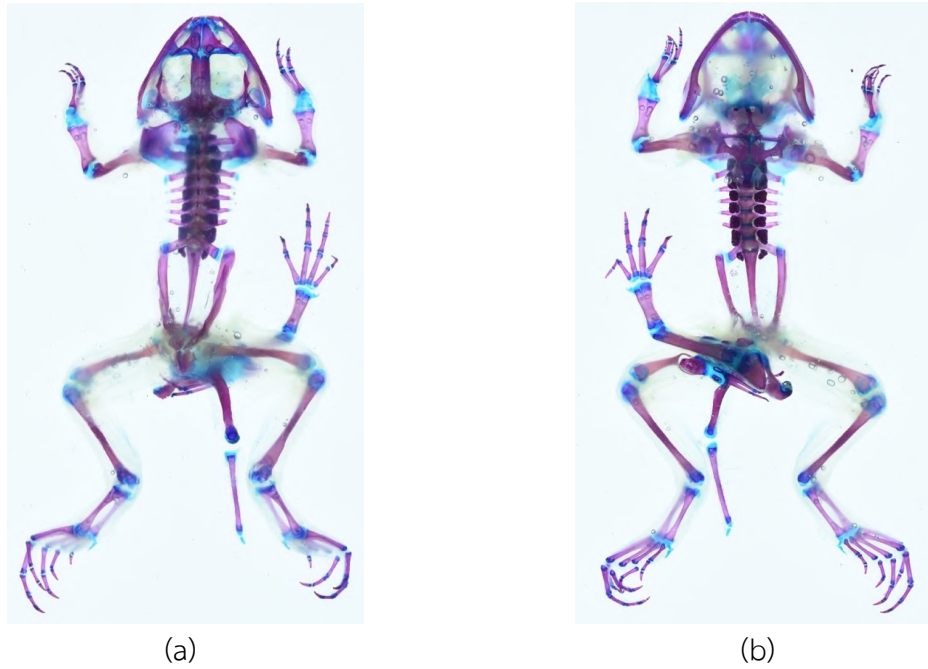


(a)

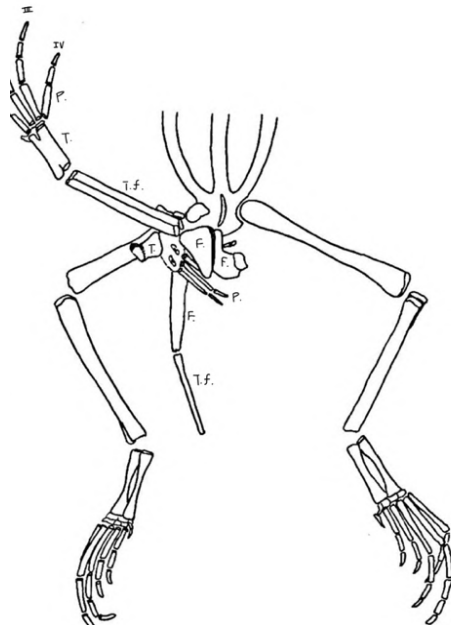


(b)

ภาพที่ 4-28 ภาพ x-ray ของกบนาที่มีขาหลังผิดปกติ 3 ขา ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1349)



ภาพที่ 4-29 กบนาดองใสที่มีขาหลังผิดปกติ 3 ขา ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1349)



ภาพที่ 4-30 Scientific illustration ของกบที่มีขาหลังผิดปกติ 3 ขา มี, F. = Femur, T.f. = Tibiofibula, T. = Tarsal และ P. = Phalanges; (กบหมายเลข PT 1349)

ระดับ 7

กบนาที่มีลักษณะขาหลังผิดปกติ 1 ขา โดยขาที่ผิดปกติเป็นส่วนของขาหลังเดิม ทำให้มีการส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของกบนาโดยจะส่งผลให้กบนากระโดดลำบากขึ้น หรือไม่สามารถกระโดดได้เลย บางตัวพบกระดูกมีลักษณะสามเหลี่ยม มีจำนวน 7 ตัว จากกบที่มีสภาพวิรูป 73 ตัว (9.59%)

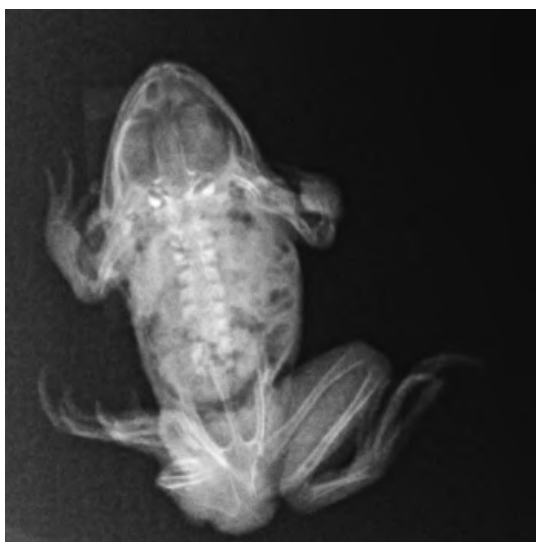


(a)

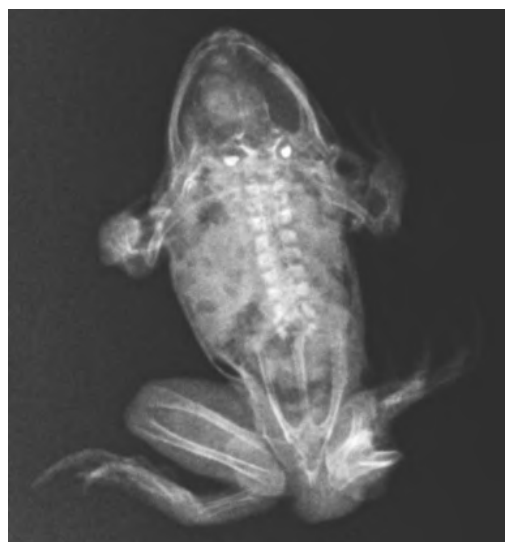


(b)

ภาพที่ 4-31 สัตว์ฐานกบนาที่มีขาหลังเดิมผิดปกติ 1 ขาด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1344)

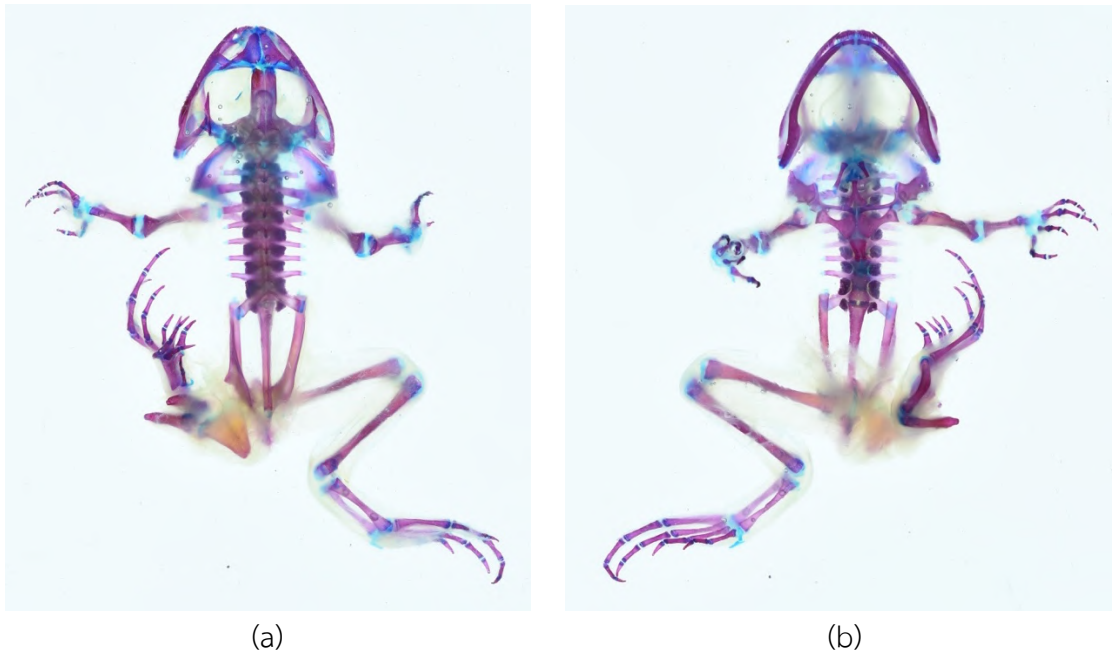


(a)

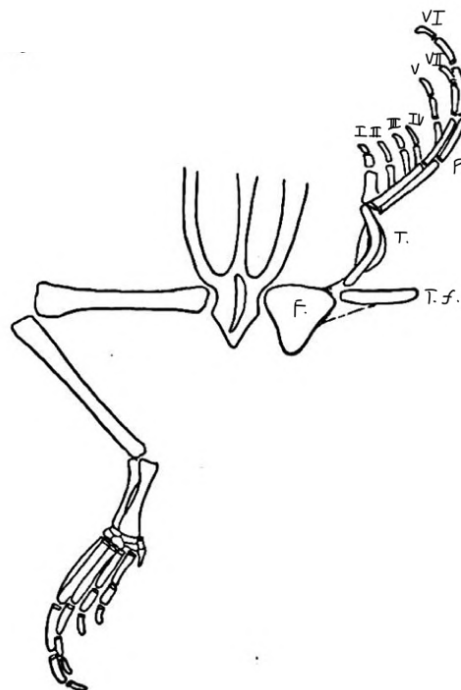


(b)

ภาพที่ 4-32 ภาพ x-ray ของกบนาที่มีขาหลังเดิมผิดปกติ 1 ขา ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1344)



ภาพที่ 4-33 กบนาดองใสที่มีลักษณะขาหลังเดิมผิดปกติ 1 ขา ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1344)



ภาพที่ 4-34 Scientific illustration ของกบนาที่มีขาหลังเดิมผิดปกติ 1 ขา, F. = Femur, T.f. = Tibiofibula, T. = Tarsal และ P. = Phalanges; (กบหมายเลข PT 1344)

ระดับ 8

กบนาที่มีลักษณะขาหลังผิดปกติ 2 ขา โดยขาที่ผิดปกติเกี่ยวข้องกับขาหลังเดิมส่งผลให้ขาหลังเดิมมีความผิดปกติด้วยทำให้เคลื่อนที่ลำบากขึ้น บางตัวมีลักษณะขาที่เจริญเกินมีกล้ามเนื้อติดกับกล้ามเนื้อขาเดิม มีจำนวน 3 ตัว จากกบที่มีสภาพวิรูป 73 ตัว (4.11%)

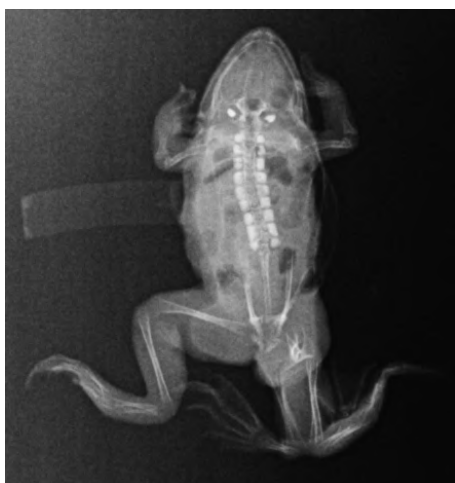


(a)

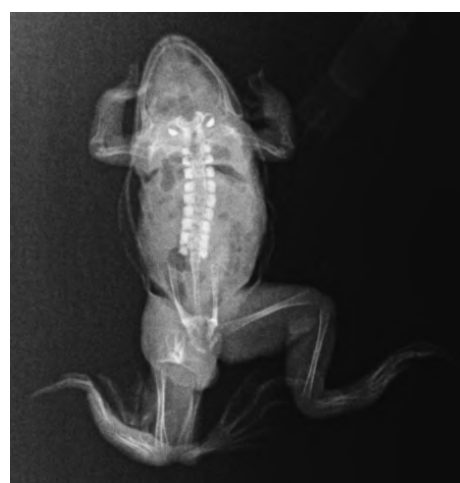


(b)

ภาพที่ 4-35 สันฐานกบนาที่มีขาหลังผิดปกติ 2 ขา มีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL และมีกล้ามเนื้อส่วนต้นขาติดกับขาเดิม ด้าน ventral ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1339)

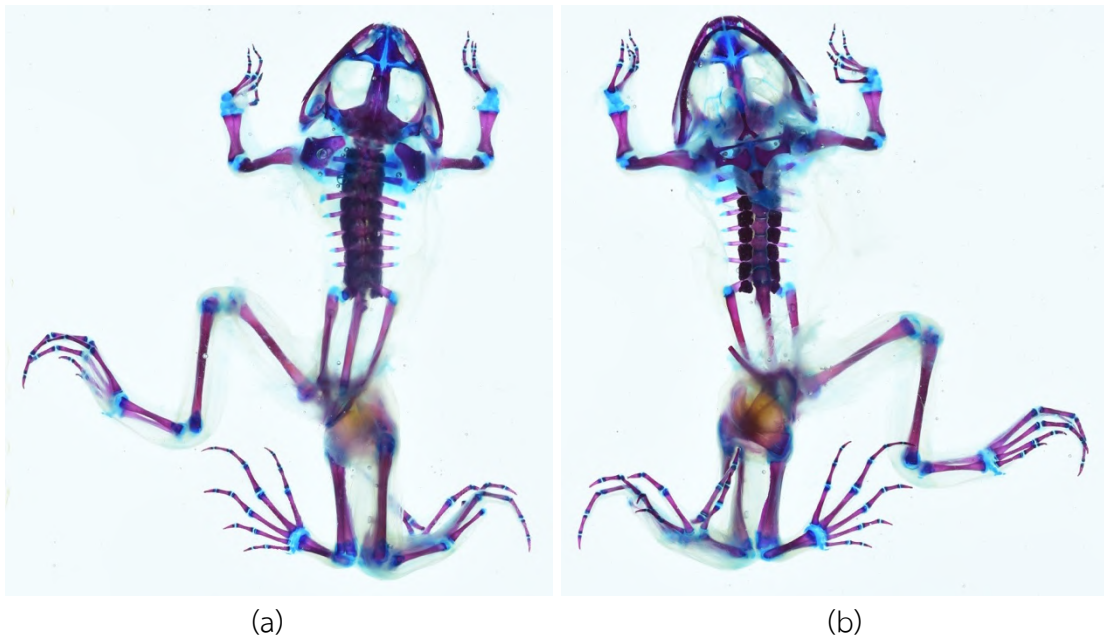


(a)

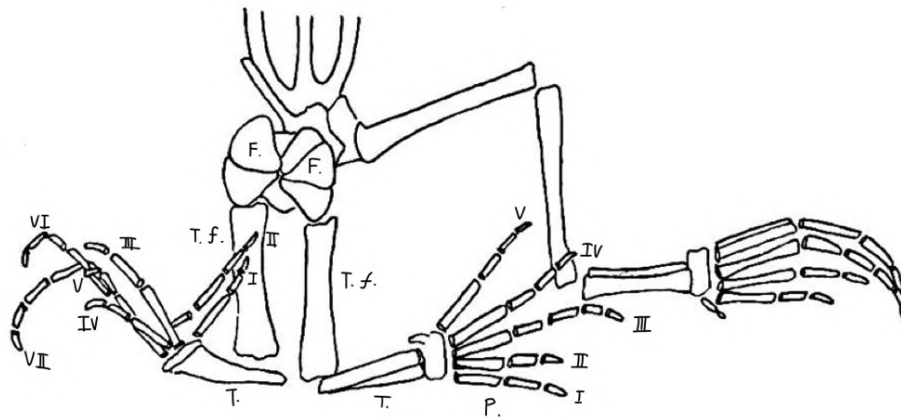


(b)

ภาพที่ 4-36 ภาพ x-ray ของกบนาที่มีขาหลังผิดปกติ 2 ขา มีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL และมีกล้ามเนื้อส่วนต้นขาติดกับขาเดิม ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1339)



ภาพที่ 4-37 กบนาดองใสที่มีขาหลังผิดปกติ 2 ขา มีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL ด้าน และมีกล้ามเนื้อส่วนต้นขาติดกับขาเดิม ด้าน dorsal (a) และด้าน ventral (b); (กบหมายเลข PT 1339)



ภาพที่ 4-38 Scientific illustration ของกบนาที่มีขาหลังผิดปกติ 2 ขา มีความยาวกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL และมีกล้ามเนื้อส่วนต้นขาติดกับขาเดิม, F. = Femur, T.f. = Tibiofibula, T. = Tarsal และ P. = Phalanges; (กบหมายเลข PT 1339)

4.1.3. ลักษณะสภาพวิรูปของกบนา

จากการวิเคราะห์ลักษณะกบนาจากข้อมูลพื้นฐาน และกายวิภาคจากภาพ x-ray และการดองใส พบว่ากบนาปกติมีลักษณะ ดังนี้ ลักษณะทางสัณฐานผิวหนังด้าน dorsal มีสีน้ำตาลอมเหลือง ส่วนในด้าน ventral ไม่มีสี ลักษณะโครงกระดูกของกบนาปกติ ได้แก่ ด้าน anterior ประกอบด้วย

pelvic girdle, humerus, radioulna, carpal, metacarpal และ phalanges 4 นิ้ว และ ด้าน posterior ประกอบด้วย pelvic girdle, femur, tibiofibula, tarsal, metatarsal และ phalanges 5 นิ้ว นอกจากนี้กบนาที่พบสภาพวิรูปจำนวน 73 ตัวมีลักษณะผิดปกติต่าง ๆ ซึ่งพบเป็นความผิดปกติที่ขาหลังทั้งหมด และมีจำนวนขาหลังตั้งแต่ 2 ถึง 5 ขา (ภาพที่ 4-39) ส่วนใหญ่เจริญจากบริเวณระหว่าง femur ทั้งสองข้าง มีจำนวนมากกว่าครึ่งที่มีการเจริญของขาหลังเกินคิดเป็น 93.15% สามารถจำแนกกบนาโดยใช้จำนวนขาหลังได้ ดังนี้จำนวนขาหลัง 2 ขา มี 8 ตัว (10.96%), 3 ขา มี 43 ตัว (58.90%), 4 ขา มี 20 ตัว (27.40%) และ 5 ขา มี 2 ตัว (2.74%) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 3.22 และขาหลังที่เจริญเกินเจริญเป็นขาข้างซ้าย 46.57%, ข้างขวา 31.51%, ขาสองข้าง 10.96% และไม่มีขาเจริญเกิน 10.96% (ตารางที่ 4-1) สามารถจำแนกลักษณะที่ผิดปกติในกบนาที่มีสภาพวิรูปนั้นได้ทั้งหมด 16 ลักษณะ (ตารางที่ 4-2 และภาพที่ 4-40) โดยแบ่งลักษณะผิดปกติของกระดูกส่วนต่าง ๆ ได้ดังนี้ phalanges, femur, tibiofibular, tarsal, กระดูกเจริญจากข้อต่อส่วนต่าง ๆ และลักษณะอื่น ๆ เช่น ตุ่มกระดูก, กระดูกเจริญภายในช่องท้อ และกระดูกเจริญด้านหลังขาเดิม

จากการศึกษาพบลักษณะผิดปกติที่น่าสนใจ ได้แก่ ขาเจริญเกินเฉพาะขาหลังเท่านั้น, การมีกล้ามเนื้อเชื่อมติดกัน และกระดูกสามเหลี่ยม ซึ่งลักษณะเหล่านี้มีสามารถคาดการณ์ได้ว่ามีความเป็นไปได้ที่จะเกิดจาก parasite เข้ามาฝังตัวระยะที่มีการเจริญของ hind limb bud หรือ Gosner stage 26 ถึง 30



(a)



(b)



(c)



(d)

ภาพที่ 4-39 กบนาดองใสที่มีสภาพวิรูปของรยางค์หลัง 2 ขา (a), 3 ขา (b), 4 ขา (c) และ 5 ขา (d)

ตารางที่ 4-1 ข้อมูลการวิรูปร่างของขาหลังเมื่อพิจารณาจากจำนวนและตำแหน่งของขาหลังในกบนาที่มีสภาพวิรูปร่างทั้งหมด 73 ตัว

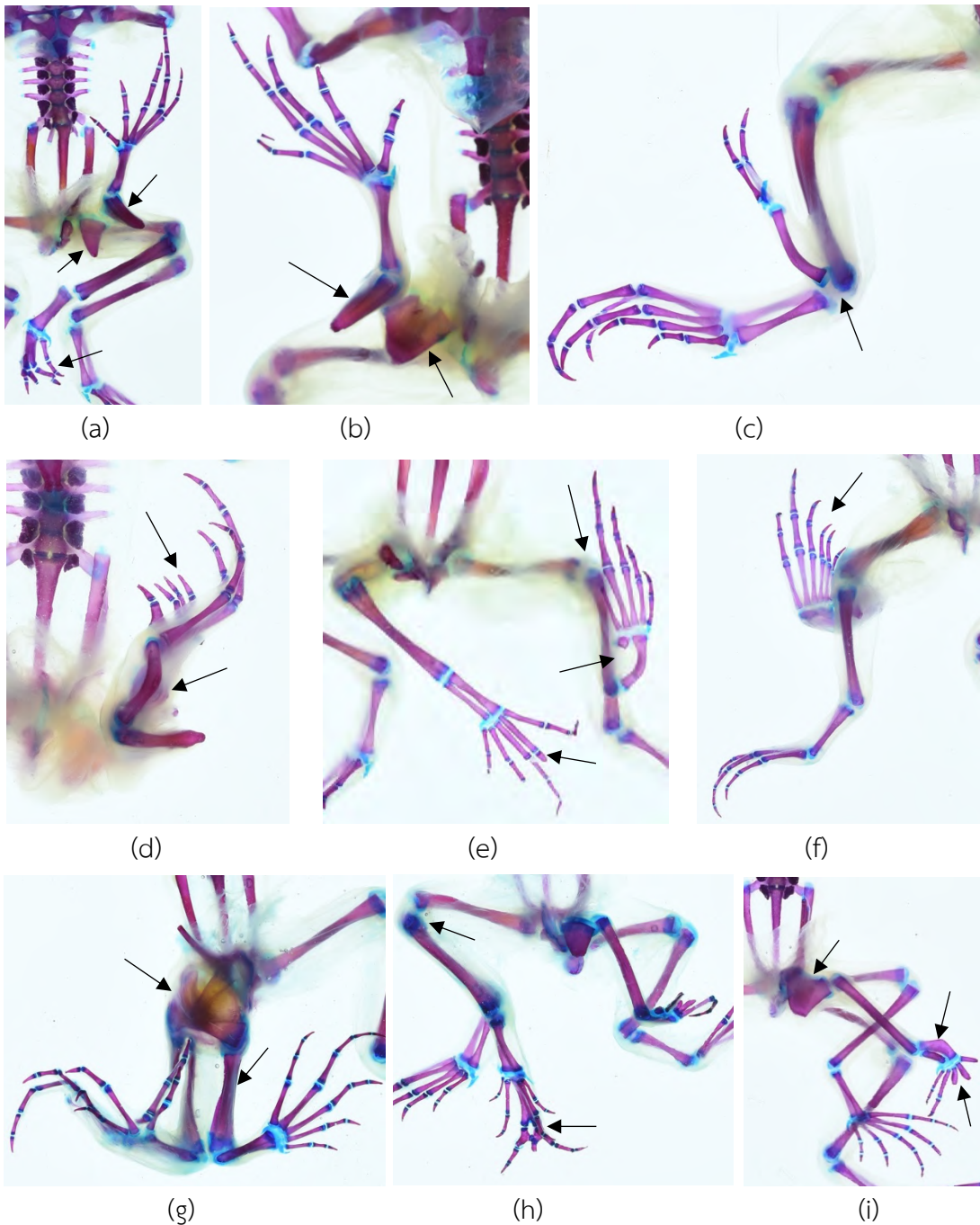
จำนวน ขาขวา ขาซ้าย	จำนวน	1	2	3	4
1	8 ตัว (10.96%)	18 ตัว (24.66%)	4 ตัว (5.48%)	1 ตัว (1.37%)	
2	26 ตัว (35.61%)	8 ตัว (10.96%)	-	-	
3	7 ตัว (9.59%)	1 ตัว (1.37%)	-	-	

ตารางที่ 4-2 จำนวนตัวอย่างกบนาที่พบสภาพวิรูปของขาหลังแบบต่าง ๆ และร้อยละของกบนาที่แสดงสภาพวิรูปนั้นต่อจำนวนกบนาที่มีสภาพวิรูปทั้งหมด 73 ตัว

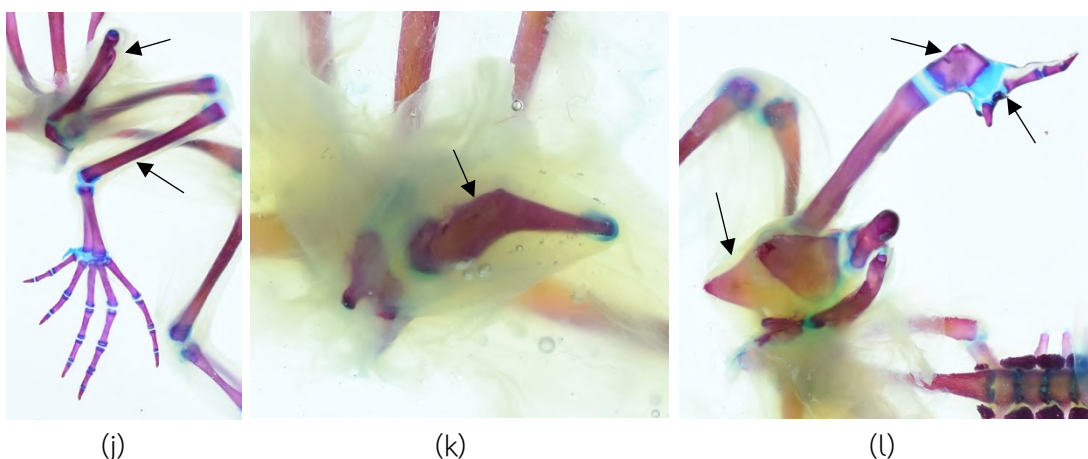
ลักษณะที่ผิดปกติ	จำนวนตัวอย่างที่พบ (ตัว)			รวม (ตัว)	ร้อยละของกบที่มีสภาพวิรูป (%)
	ข้างซ้าย	ข้างขวา	ทั้งสองข้าง		
Phalanges เกิน	4	4	-	8	10.96
Phalanges ขาด*	15	15	3	33	45.21
Phalanges fused	3	7	1	11	15.07
Phalanges กุด**	5	3	1	9	12.33
กระดูกสามเหลี่ยม (femur)	14	13	4	31	42.47
กระดูกสามเหลี่ยม (tibiofibula)	5	8	-	13	17.81
Femur ผิดรูป (แบน)	4	3	-	7	9.59
Tarsal ผิดรูป (fused, ขาด, กุด)	9	8	7	24	32.88
ขาที่เจริญเกินอยู่บริเวณข้อต่อ femur กับ tibiofibula	9	9	-	18	24.66
ขาที่เจริญเกินอยู่บริเวณข้อต่อ tibiofibula กับ tarsal	0	1	-	1	1.37
ตุ่มกระดูก	2	0	-	2	2.74
กระดูกเจริญภายในช่องท้อง	1	2	-	3	4.11
เจริญตั้งแต่ femur ถึง tibiofibula	2	2	1	5	6.85
เจริญตั้งแต่ femur ถึง tarsal	2	0	-	2	2.74
เจริญด้านหลังขาเดิม	0	1	-	1	1.37
เจริญเป็นขาสมบูรณ์	6	0	-	6	8.22

* Phalanges ขาด คือ มีจำนวนไม่ครบ 5 นิ้ว

** Phalanges กุด คือ มีจำนวนครบ 5 นิ้ว แต่นิ้วมีลักษณะกุด ไม่สมบูรณ์



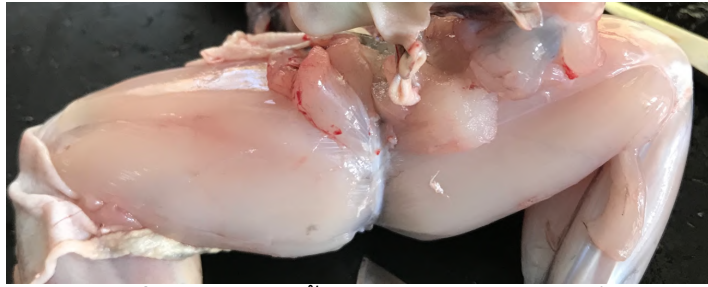
ภาพที่ 4-40 ลักษณะที่ผิดปกติของกบนา กระดูกสามเหลี่ยมส่วน femur และ tibiofibula, phalanges ขาด (a); กระดูกสามเหลี่ยมส่วน femur และ tibiofibula (b); ขาที่เจริญเกินอยู่บริเวณข้อต่อ tibiofibula กับ tarsal (c); phalanges เกิน, tarsal ผิดรูป (d); phalanges กุด, tarsal ผิดรูป, ขาที่เจริญเกินอยู่บริเวณข้อต่อ femur กับ tibiofibula (e); ขาใหม่เจริญด้านหลังขาเดิม (f); กระดูกสามเหลี่ยมส่วน femur, tibiofibula แบน (g); ขาที่เจริญเกินอยู่บริเวณข้อต่อ femur กับ tibiofibula, phalanges fused (h); กระดูกสามเหลี่ยมส่วน femur, tarsal ผิดรูป, phalanges กุด (i)



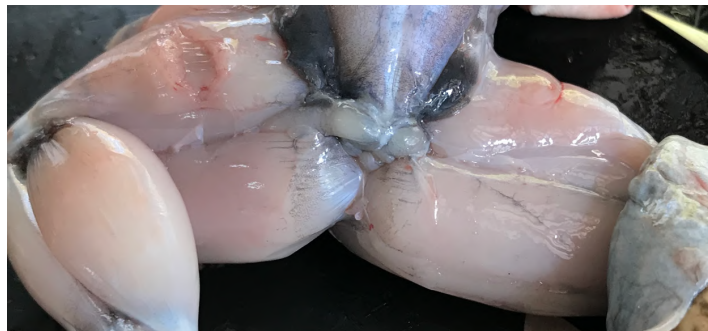
ภาพที่ 4-41 ลักษณะที่ผิดปกติของกบนา ขาสสมบูรณ์, กระดูกเจริญภายในท้อง (j); ตุ่มกระดูก (k) และกระดูกสามเหลี่ยมส่วน femur, tarsal fused, phalanges ขาด (l)

4.2. การตรวจสอบหาร่องรอยของโรค

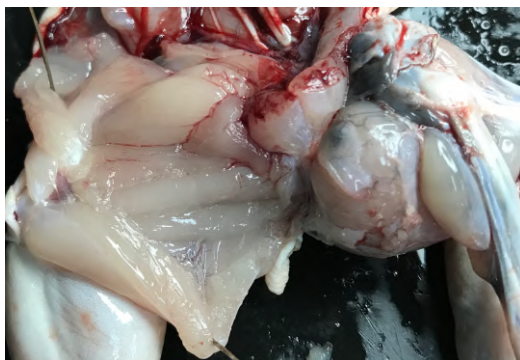
จากการตรวจสอบหาร่องรอยของโรค โดยอาจมีลักษณะเป็น metacercaria cyst ฝังตัวอยู่ในเนื้อเยื่อ หรือเป็นร่องรอยของเนื้อเยื่อที่ผิดปกติ โดยบริเวณที่ตรวจสอบ ได้แก่ กล้ามเนื้อของขาที่ผิดปกติ, กล้ามเนื้อส่วนอื่น และอวัยวะภายใน ได้แก่ ตับ, ตับอ่อน, ลำไส้, ปอด และหัวใจ จากกบนาที่ยังมีชีวิตจำนวน 9 ตัว โดยประกอบด้วยกบนาปกติ 1 ตัว และกบนาที่มีสภาพวิรูป 8 ตัว พบว่าไม่พบ metacercaria cyst ในกล้ามเนื้อและอวัยวะทุกส่วนของกบนา (ภาพที่ 4-41, 4-42, 4-43 และ 4-44b) โดยเมื่อลองเปรียบเทียบลักษณะเนื้อเยื่อกับกบนาที่ปกติแล้ว ไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 4-44) นอกจากนี้ยังพบลักษณะที่ผิดปกติไปในกบนาที่มีสภาพวิรูป เช่น พบตุ่มก้อนเนื้อที่บริเวณข้อต่อกระดูก (ภาพที่ 4-45a) หรือ พบตุ่มที่ผิวหนังภายนอก (ภาพที่ 4-45b) นอกจากนี้จากการสังเกตในขั้นตอนตอนโตใส อย่างไรก็ตามไม่อาจสรุปได้ว่าสาเหตุของการพบสภาพวิรูปในกบนานั้นมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *Ribeiroia ondatrae* หรือไม่ เนื่องจากกบนาที่นำมาศึกษาอยู่ในระยะตัวเต็มวัย และมีอายุประมาณ 9 เดือน ซึ่งเลยจากระยะลูกออดที่มีการเจริญของ limb bud ที่ปรสิตจะเข้าไปติดเชื้อ แต่สามารถสรุปได้ว่าในระยะตัวเต็มวัยนั้นไม่สามารถตรวจสอบร่องรอยของโรคได้



ภาพที่ 4-42 กล้ามเนื้อบริเวณต้นขาของกบนาที่มีสภาพวิรูป



ภาพที่ 4-43 กล้ามเนื้อบริเวณก้นของกบนาที่มีสภาพวิรูป



(a)



(b)

ภาพที่ 4-44 กล้ามเนื้อภายในต้นขาของกบนาที่มีสภาพวิรูป ขาขวา (a), ขาซ้าย (b)

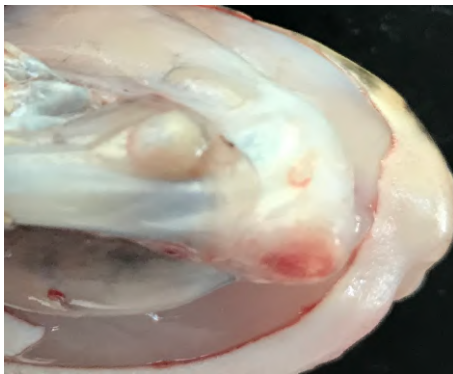


(a)



(b)

ภาพที่ 4-45 เปรียบเทียบลักษณะอวัยวะภายใน กบนาปกติ (a), กบนาที่มีสภาพวิรูป (b)



(a)



(b)

ภาพที่ 4-46 ลักษณะผิดปกติที่พบในกบนาที่มีสภาพวิรูป ก้อนเนื้อบริเวณข้อกระดูก (a), ตุ่มที่ผิวหนัง (b)

บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

5.1. การศึกษาสัณฐานวิทยาและกายวิภาค

จากวัตถุประสงค์ของงานวิจัยเพื่อศึกษาลักษณะทางกายวิภาค และสัณฐานภายนอกของกบนาที่พบสภาพวิรูปของรยางค์ พบว่ากบนาในบ่อเลี้ยงของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ ทั้ง 84 ตัว โดยเป็นกบนาอายุประมาณ 2 เดือน 75 ตัว และอายุประมาณ 9 เดือน 9 ตัว ซึ่งกบนาอายุประมาณ 2 เดือน มีค่า SVL อยู่ที่ 4.79 ถึง 8.14 cm สำหรับกบนาอายุประมาณ 9 เดือน มีค่า SVL อยู่ที่ 8.58 ถึง 12.43 cm

กบนาที่พบสภาพวิรูปสามารถจัดกลุ่มระดับความรุนแรงตามจำนวนขาหลังที่เจริญ, ความยาวของขา และขาที่มีสภาพวิรูปส่งผลต่อการเคลื่อนที่ จึงจัดกลุ่มได้ 9 ระดับ โดยระดับ 0 คือ กบนาปกติ ซึ่งใช้เป็นกลุ่มอ้างอิง และระดับที่มีลักษณะผิดปกติส่งผลต่อการเคลื่อนที่ได้แก่ ระดับที่ 2 ถึง 6 เนื่องจากมีลักษณะขาหลังเจริญเกิน นอกจากนี้ระดับที่ 7 ถึง 9 ที่มีลักษณะขาหลังเดิมผิดปกติจะมีระดับความรุนแรงมากกว่า เนื่องจากลักษณะผิดปกติดังกล่าวทำให้กบนาไม่สามารถเคลื่อนที่ในการใช้เท้าเพื่อกระโดด หรือว่ายน้ำได้ สามารถเรียงลำดับจำนวนกบนาตามระดับความรุนแรงได้ดังนี้ ระดับ 3 (32.88%), ระดับ 5 (26.03%), ระดับ 2 (21.92%), ระดับ 7 (9.59%), ระดับ 8 (4.11%), ระดับ 6 (2.74%), ระดับ 1 (1.37%) และระดับ 4 (1.37%) ตามลำดับ ระดับ 3 ที่พบมากที่สุดนั้นมีลักษณะขาหลังเจริญใหม่ผิดปกติ 1 ขา มีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL และระดับที่พบน้อยที่สุด ได้แก่ ระดับ 1 มีลักษณะพบ pigment ที่ท้องขาหลัง และระดับ 4 มีลักษณะขาหลังผิดปกติ 2 ขา มีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL

จากการศึกษา กบนาที่มีลักษณะปกติมีการเรียงตัวของกระดูก ได้แก่ ด้าน anterior ประกอบด้วย pelvic girdle, humerus, radioulna, carpal, metacarpal และ phalanges 4 นิ้ว และด้าน posterior ประกอบด้วย pelvic girdle, femur, tibiofibula, tarsal, metatarsal และ phalanges 5 นิ้ว ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะกบนาปกติจากการศึกษาของกลุ่ม วัชโรบล (2510) กล่าวถึงลักษณะการเรียงตัวของกระดูกกบนา สำหรับกบนาที่พบสภาพวิรูปพบการเจริญที่ขาหลังทั้งหมดเป็นจำนวน 1-3 ขา จึงคาดการณ์ได้ว่าระยะที่อาจมีการติดเชื้อระยะที่มีการเจริญของ hind limb bud หรือ Gosner stage 26 ถึง 30 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Stopper และคณะ (2002) ศึกษาเกี่ยวกับการติดเชื้อของ trematode *Ribeiroia* ในลูกอ๊อด genus *Rana* ระยะที่มีการเจริญของ limb bud (stage 51-52; Nieuwkoop and Faber, 1994) ส่งผลให้เกิดสภาพวิรูป ซึ่งพบลักษณะสภาพวิรูปที่ขาหลังทั้งหมด

ในส่วนของกบนาที่มีสภาพวิรูปทั้ง 73 ตัว สามารถจำแนกจากจำนวนขาหลัง โดยเรียงลำดับจำนวนขาที่พบจากมากไปน้อยคือ 3 ขา (58.90%), 4 ขา (27.40%), 2 ขา (10.96%) และ 5 ขา (2.74%) ตามลำดับ ซึ่งขาที่เจริญเกินเจริญเป็นขาซ้าย (46.57%), ขาขวา (31.51%), ขาสองข้าง (10.96%) และไม่มีขาเจริญเกิน (10.96%) ซึ่งขัดแย้งกับงานวิจัยของ Session และ Ruth (1990) พบขาหลังจำนวนมากที่สุดคือ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 1, 8 และ 12 ตามลำดับ

สามารถจำแนกลักษณะสภาพวิรูปได้เป็น 16 ลักษณะ ซึ่งเป็นความผิดปกติของกระดูกส่วน phalanges, femur, tibiofibular, tarsal, กระดูกเจริญจากข้อต่อส่วนต่าง ๆ และลักษณะอื่น ๆ เช่น ตุ่มกระดูก, กระดูกเจริญภายในช่องข้อ และกระดูกเจริญด้านหลังขาเดิม ลักษณะผิดปกติที่พบมากที่สุดคือ phalanges ขาด, กระดูกสามเหลี่ยมส่วน femur, tarsal ผิดรูป, ขาที่เจริญเกินอยู่บริเวณข้อต่อ femur กับ tibiofibula, กระดูกสามเหลี่ยมส่วน tibiofibula, phalanges fused, phalanges กุด, phalanges เกิน, Femur มีลักษณะแบน, ขาหลังเจริญเป็นขาสมบูรณ์, ขาหลังเจริญตั้งแต่ femur ถึง tibiofibula, กระดูกเจริญภายในช่องข้อ, ตุ่มกระดูก, ขาหลังเจริญตั้งแต่ femur ถึง tarsal, ขาที่เจริญเกินอยู่บริเวณข้อต่อ tibiofibula กับ tarsal และขาหลังเจริญด้านหลังขาเดิม ตามลำดับ ซึ่งตรงตามงานวิจัยของ Session และ Ruth (1990) พบกบสปีชีส์ *Hyla regilla* มีความผิดปกติที่ขาหลังเนื่องจากติดเชื้อจาก *Ribeiroia* โดยมีลักษณะกระดูกบางส่วนขาดหายหรือเจริญเพิ่มขึ้นมาเป็นขาสมบูรณ์ เช่น ulyang ที่เพิ่มขึ้น, กล้ามเนื้อเชื่อมกัน ซึ่งการเจริญของขาส่วนเกินสามารถเจริญจากทุกส่วนของรยางค์ปกติ หรือเจริญจากบริเวณกระดูกส่วน pelvic และจำนวนประมาณครึ่งหนึ่งของตัวอย่างกบมีขาหลังเจริญเกินอย่างน้อย 1 ขา นอกจากนี้ลักษณะสำคัญที่พบ ได้แก่ กระดูกสามเหลี่ยม ซึ่งตรงกับงานวิจัยของ Stopper (2002) พบลักษณะกระดูกสามเหลี่ยมเป็นผลมาจากการติดเชื้อ *Ribeiroia* ในลูกอ๊อด genus *Rana* นอกจากนี้ลักษณะกระดูกสามเหลี่ยมยังตรงกับงานวิจัยของ Gardiner และ Hoppe (1999) ที่ลักษณะผิดปกติเป็นผลมาจาก retinoic acid และงานวิจัยของ Johnson (2003) เป็นผลมาจากปรสิต การพบความผิดปกติที่ขาหลังเท่านั้น และกระดูกสามเหลี่ยม จึงมีความเป็นไปได้ที่สาเหตุของการเกิดสภาพวิรูปเป็นผลมาจากการติดเชื้อของ parasite

5.2. การตรวจสอบร่องรอย metacercaria cyst จากการศึกษากายวิภาค

จากวัตถุประสงค์ของงานวิจัยเพื่อตรวจสอบร่องรอย metacercaria cyst และคาดการณ์สาเหตุการเกิดสภาพวิรูปของรยางค์ของกบนาในบ่อเลี้ยงของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จากการผ่าตรวจสอบ และการสังเกตในขั้นตอนดองใส ผลการวิจัยพบว่าไม่พบ metacercaria cyst ในบริเวณที่ผ่าตรวจสอบ ได้แก่ กล้ามเนื้อส่วนต้นขาหลัง, กล้ามเนื้อส่วนก้น, ตับ, ตับอ่อน, ลำไส้, ปอด และหัวใจ สาเหตุที่ไม่พบ metacercaria cyst อาจเพราะไม่มีการติดเชื้อ *Ribeiroia* หรือระยะเวลาที่ตรวจสอบนานกว่าที่จะสามารถพบ cyst ได้ ซึ่งโดยปกติระยะที่มีการติดเชื้อคือ

ระยะลูกอ๊อดที่มีการสร้าง hind limb bud จากการทดลองใช้กบนาอายุประมาณ 9 เดือน ดังนั้นจึงไม่อาจสรุปได้ว่ากบนาที่มีสภาพวิรูปจากฟาร์มเลี้ยงเป็นผลจากการติดเชื้อปรสิตหรือไม่ แต่สรุปได้ว่ากบนาในระยะตัวเต็มวัยไม่สามารถตรวจสอบ metacercaria cyst ได้ นอกจากนี้ผลการทดลองเป็นไปในทางเดียวกับจากงานวิจัยของ Stopper และคณะ (2002) ทำการศึกษาโดยวิธี cyst-induced พบว่า cyst มันจะไม่ปรากฏใน specimen ดองใส ถึงแม้ว่าจะเป็นการติดเชื้อในระยะเริ่มต้นของลูกอ๊อดบริเวณ hind limb ก็ไม่พบ cyst เช่นเดียวกัน เป็นจำนวน 7 ตัวใน 21 ตัว (33.3%) ที่ไม่พบ cyst บริเวณ hind limb โดย 6 ตัวไม่พบ cyst ที่บริเวณใด ๆ ในร่างกาย แต่ 1 ตัวพบ cyst ที่บริเวณปาก แสดงให้เห็นว่าความผิดพลาดในการตรวจสอบ cyst ไม่เกี่ยวข้องกับวิธีดองใส ดังนั้นการตรวจสอบตัวอย่างเพื่อตรวจหา cyst นั้น ยากที่จะพบบริเวณ distal ของ femur จากงานวิจัยของ Kaiser (1999b) กล่าวว่ากบที่มีสภาพวิรูปจากบางบ่อน้ำไม่ตรวจพบปรสิต จึงอาจเกิดจากสาเหตุอื่น ๆ เช่น สารเคมี หรือรังสี UV และมีรายงานกล่าวว่าไม่พบ cyst ของปรสิต *Ribeiroia* ในกบที่มีสภาพวิรูปในหลายพื้นที่ นอกจากนี้ในช่วงที่ผสมพันธุ์กบนาของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำรินั้น คือ ช่วงเดือนพฤษภาคม ปี 2562 เป็นช่วงที่ไม่มีฝนตก เกิดภาวะแห้งแล้ง จนอ่างเก็บน้ำมีน้ำอยู่น้อยและมีสภาพน้ำไม่ตื้นลึก ดังนั้นมีโอกาสที่เชื้อจะแพร่มาผ่านน้ำ และในช่วงกลางเดือนพฤษภาคมเริ่มมีการฟักตัวของลูกอ๊อด และเลี้ยงจนถึงเดือนมิถุนายนจนเป็นตัวเต็มวัย จึงคาดว่าหากมีการเข้าติดเชื้ออาจเป็นช่วงเดือนพฤษภาคมถึงมิถุนายน แต่เนื่องจากไม่มีรายงานการศึกษาเรื่องระยะเวลาการเจริญของกบนาจึงไม่สามารถคาดการณ์ระยะเวลาที่แน่ชัดได้

บทที่ 6

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

6.1. สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาลักษณะทางกายวิภาคและสัณฐานของกบนาที่มีสภาพวิรูปพบว่า กบนาในบ่อเลี้ยงของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ อายุประมาณ 2 เดือน มีค่า SVL อยู่ที่ 4.79 ถึง 8.14 cm มีค่าเฉลี่ย (\bar{X}) อยู่ที่ 6.49 cm สำหรับกบนาอายุประมาณ 9 เดือน มีค่า SVL อยู่ที่ 8.58 ถึง 12.43 cm มีค่าเฉลี่ย (\bar{X}) อยู่ที่ 10.15 cm มีน้ำหนักอยู่ที่ 107.92 ถึง 313.99 g มีค่าเฉลี่ย (\bar{X}) อยู่ที่ 174.87 g

การจัดกลุ่มระดับความรุนแรงโดยมีเกณฑ์ที่ใช้ในการจัดกลุ่มคือ จำนวนขาหลังที่เจริญ, ความยาวของขา และขาที่มีสภาพวิรูปส่งผลต่อการเคลื่อนที่หรือไม่ จึงจัดกลุ่มได้ 9 ระดับ ได้แก่ ระดับ 0 มีลักษณะปกติ เป็นกลุ่มอ้างอิง, ระดับ 1 มีลักษณะ pigment ใต้ท้องขาหลัง ไม่มีขาเจริญ, ระดับ 2 มีลักษณะขาหลังผิดปกติ 1 ขา โดยขาที่เจริญเกินนั้นไม่ส่งผลให้ขาหลังเดิมมีความผิดปกติ และมีความยาวไม่เกินครึ่งหนึ่งของค่า SVL, ระดับ 3 มีลักษณะขาหลังผิดปกติ 1 ขา โดยขาที่ผิดปกติมีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL และไม่ส่งผลให้ขาหลังเดิมผิดปกติ, ระดับ 4 มีลักษณะขาหลังผิดปกติ 2 ขา โดยเป็นขาที่เจริญใหม่ทั้งหมด และมีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL, ระดับ 5 มีลักษณะขาหลังผิดปกติ 2 ขา โดยเป็นขาที่เจริญใหม่ทั้งหมด และมีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า SVL, ระดับ 6 มีลักษณะขาหลังผิดปกติ 3 ขา โดยขาหลังเดิมมีลักษณะปกติ, ระดับ 7 มีลักษณะขาหลังผิดปกติ 1 ขา โดยขาที่ผิดปกติเป็นส่วนของขาหลังเดิมส่งผลต่อการเคลื่อนที่, ระดับ 8 มีลักษณะขาหลังผิดปกติ 2 ขา โดยขาที่ผิดปกติเกี่ยวข้องกับขาหลังเดิมส่งผลให้ขาหลังเดิมมีความผิดปกติจึงเคลื่อนที่ลำบากขึ้น สามารถเรียงลำดับจำนวนกบนาตามระดับความรุนแรงได้ดังนี้ ระดับ 3 (32.88%), ระดับ 5 (26.03%), ระดับ 2 (21.92%), ระดับ 7 (9.59%), ระดับ 8 (4.11%), ระดับ 6 (2.74%), ระดับ 1 (1.37%) และระดับ 4 (1.37%) ตามลำดับ และการจำแนกจากจำนวนขาหลังสามารถเรียงลำดับจำนวนขาที่พบจากมากไปน้อยคือ 3 ขา (58.90%), 4 ขา (27.40%), 2 ขา (10.96%) และ 5 ขา (2.74%) ตามลำดับ ซึ่งขาที่เจริญเกินเจริญเป็นขาซ้าย (46.57%), ขาขวา (31.51%), ขาสองข้าง (10.96%) และไม่มีขาเจริญเกิน (10.96%) ซึ่งจากการพบสภาพวิรูปที่ขาหลังทั้งหมด จึงคาดการณ์ได้ว่าระยะที่อาจมีการติดเชื่อระยะที่มีการเจริญของ hind limb bud หรือ Gosner stage 26 ถึง 30

นอกจากนี้สามารถจำแนกลักษณะสภาพวิรูปได้เป็น 16 ลักษณะ ลักษณะผิดปกติที่พบมากที่สุดคือ phalanges ขาด, กระดูกสามเหลี่ยมส่วน femur, tarsal ผิดรูป, ขาที่เจริญเกินอยู่บริเวณข้อต่อ femur กับ tibiofibula, กระดูกสามเหลี่ยมส่วน tibiofibula, phalanges fused, phalanges

กูด, phalanges เกิน, Femur มีลักษณะแบน, ขาหลังเจริญเป็นขาสมบูรณ์, ขาหลังเจริญตั้งแต่ femur ถึง tibiofibular, กระดูกเจริญภายในช่องท้อง, ตุ่มกระดูก, ขาหลังเจริญตั้งแต่ femur ถึง tarsal, ขาที่เจริญเกินอยู่บริเวณข้อต่อ tibiofibula กับ tarsal และขาหลังเจริญด้านหลังขาเดิมตามลำดับ ซึ่งลักษณะสำคัญที่พบ ได้แก่ กระดูกสามเหลี่ยม จึงคาดการณ์ได้ว่าอาจมีการติดเชื้อจาก parasite ทำให้เกิดความผิดปกติในกบนาได้

จากการศึกษาเพื่อตรวจสอบร่องรอย metacercaria cyst และคาดการณ์สาเหตุการเกิดสภาพวิรูปของรยางค์ของกบนาในบ่อเลี้ยงของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ผลการวิจัยพบว่าไม่พบ metacercaria cyst ในบริเวณที่ตรวจสอบ อาจเพราะไม่มีการติดเชื้อ *Ribeiroia* หรือระยะที่ตรวจสอบนานกว่าที่จะสามารถพบ cyst ได้ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่ากบนาในระยะตัวเต็มวัยไม่สามารถตรวจสอบ metacercaria cyst ได้

6.2. ข้อเสนอแนะ

6.2.1. ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์

ข้อมูลลักษณะทางกายวิภาคและสัณฐานของกบนาที่มีสภาพวิรูปในบ่อเลี้ยง สามารถช่วยในการจัดจำแนกลักษณะกบนาที่มีสภาพวิรูปออกเป็นระดับความรุนแรงต่าง ๆ เพื่อประเมินสภาพความรุนแรงในพื้นที่ที่พบกบนาที่มีสภาพวิรูป นอกจากนี้สามารถนำ protocol การดองใส้ใช้เพื่อตรวจสอบ metacercaria cyst ได้ ทำให้สามารถคาดการณ์สาเหตุการเกิดสภาพวิรูปของรยางค์ของกบนาในประเทศไทย เพื่อเป็นกรณีศึกษาที่นำไปป้องกันปัญหาการเกิดสภาพวิรูปในกบนาทั้งในบ่อเลี้ยงและในธรรมชาติ

6.2.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต

ข้อมูลลักษณะทางกายวิภาคและสัณฐานของกบนาที่มีสภาพวิรูปนั้นศึกษาจากในฟาร์มเลี้ยงซึ่งมีความแตกต่างกับกบนาในธรรมชาติ เช่น อาหาร, น้ำ, สารเคมี, จำนวนประชากร, ปฏิสัมพันธ์กับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ และสภาพแวดล้อม เป็นต้น ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมหากพบกรณีสภาพวิรูปนี้ในธรรมชาติ นอกจากนี้เนื่องจากผลการศึกษาไม่พบ metacercaria cyst ในระยะตัวเต็มวัย ดังนั้นควรศึกษาในระยะที่มีการเจริญของ hind limb bud (Gosner stage 26-30)

เอกสารอ้างอิง

- ข่าวสนุก. 2553. พิสดาร กบ 5 ขา โผล่กรุงเก่า. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:
<https://www.sanook.com/news/944010/>
- ข่าวสนุก. 2556. ฮือฮา คราวนี้ กบ 7 ขาโผล่ที่สกลนคร คอหอยดีเลขเด็ด. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:
<https://www.sanook.com/news/1164145/>
- คลังม วัชโรบล. 2510. สัตววิทยาภาคปฏิบัติ. ไทยวัฒนาพานิชย์.
- เจ็ดฉัน อมาตยกุล และคณะ. 2538. กบนา *Common Lowland Frog (Rana rugulosa, Wiegman)*. กองประมงน้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 130 หน้า.
- ไทยรัฐออนไลน์. 2560. กบ 5 ขามหาโชค เลขเด็ดตัวดังใกล้ห้วยออก รีบรอดูกันรัว ๆ. [ออนไลน์].
แหล่งที่มา: <https://www.thairath.co.th/news/local/northeast/974512>
- ยงยุทธ ทักขิณ. 2554. เทคนิคการเลี้ยงกบนาเชิงพาณิชย์. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:
https://www.fisheries.go.th/technical_group/ดาวโหลด/เทคนิคการเลี้ยงกบนาเชิงพาณิชย์.pdf
- เรื่องเล่าเช้านี้. 2556. ขอนแก่น พบกบ 5 ขา กว่า 40 ตัวในบ่อเลี้ยง. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:
<https://ch3thailandnews.bectero.com/news/1335>
- สมโภชน์ อักกะทวีวัฒน์. 2540. ภาพปลาและสัตว์น้ำของไทย. องค์การค้าคุรุสภา, กรุงเทพฯ. 325 หน้า
- อมรินทร์ ทีวี. 2563. รอลุ้นงวดนี้ พบกบแปดขามี 5 ขา ที่ร้อยเอ็ด. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:
<https://today.line.me/th/pc/article/รอลุ้นงวดนี้+พบกบแปดขามี+5+ขา+ที่ร้อยเอ็ด-5WJx7x>
- Ankley, G.T., Tietge, J.E., DeFoe, D.L., Hjensen, K.M., Holcombe, G.W., Durhan, E.J. and Diamond, A. 1998. Effects of ultraviolet light and methoprene on survival and development of *Rana pipiens*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 2530-2542.
- Ankley, G.T., Degitz, S.J., Diamond, S.A. and Tietge, J.E. 2004. Assessment of environmental stressors potentially responsible for malformations in North American anuran amphibians. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58: 7-16.
- Blaustein, A.R. and Johnson, P.T. 2003. Explaining frog deformities. *Scientific American* 288: 60-65.

- Bryant, S.V. and Gardiner, D.M. 1992. Retinoic acid, local cell-cell interactions, and pattern formation in vertebrate limbs. *Developmental Biology* 152: 1-25.
- Calhoun, D.M., Schaffer, P.A., Gregory, J.R., Hardy, K.M. and Johnson, P.T. 2015. Experimental infections of bluegill with the trematode *Ribeiroia ondatrae* (Digenea: Cathaemasiidae): Histopathology and hematological response. *Journal of Aquatic Animal Health* 27: 185-191.
- Colton, H.S. 1922. The anatomy of a five legged frog. *The Anatomical Record* 24(4): 246-253.
- Conroy, C.J., Papenfuss, T., Parker, J. and Hahn, N.E. 2009. Use of tricaine methanesulfonate (MS222) for euthanasia of reptiles. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 48: 28-32.
- Converse, K.A., Mattsson, J. and Eaton-Poole, L. 2000. Field surveys of Midwestern and Northeastern fish and wildlife service lands for the presence of abnormal frogs and toads. *Journal of the Iowa Academy of Science* 107: 160-167.
- Gardiner, D.M. and Hoppe, D.M. 1999. Environmentally induced limb malformations in mink frogs (*Rana septentrionalis*). *Journal of Experimental Zoology* 284(2): 207-216.
- Harfenist, A., Power, K., Clark, L. and Peakall, D.B. 1989. A review and evaluation of the amphibian toxicological literature. *Canadian Wildlife Service Technical Report Series* 61: 222.
- Hayes, T.B. 2000. Endocrine disruption in amphibians. *Ecotoxicology of Amphibians and Reptile*. Pensacola, FL: SETAC Press. pp. 573-593.
- Helgen, J., Mckinnell, R.G. and Gernes, M.C. 1998. Investigation of malformed Northern Leopard Frogs in Minnesota. *Status and Conservation of Midwestern Amphibians* 288-297.
- Hoppe, D.M. 2000. History of Minnesota frog abnormalities: do recent findings represent a new phenomenon. *Journal of the Iowa Academy of Science* 107: 86-89.
- Johnson, P.T.J. and Lunde, K.B. 1999. The role of parasite infection in amphibian deformities across the northwestern U.S.. *Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Philadelphia, Pa* November 14-18: 40.

- Johnson, P.T.J., Lunde, K.B., Ritchie, E.G. and Launer, A.E. 1999. The effect of trematode infection on amphibian limb development and survivorship. *Science* 284: 802-804.
- Johnson, P.T.J., Lunde, K.B., Haight, R.W., Bowerman, J. and Blaustein, A.R. 2001. *Ribeiroia ondatrae* (Trematoda: Digenea) infection induces severe limb malformations in Western Toads (*Bufo boreas*). *Canadian Journal of Zoology* 79: 370-379.
- Johnson, P.T.J., Lunde, K.B., Thurman, E.M., Ritchie, E.G., Wray, S.N., Sutherland, D.R., Kapfer, J.M., Frest, T.J., Bowerman, J. and Blaustein, A.R. 2002. Parasite (*Ribeiroia ondatrae*) infection linked to amphibian malformations in the western United States. *Ecological Monographs* 72: 151-168.
- Johnson, P.T.J., Lunde, K.B., Zelmer, D.A. and Werner, J.K. 2003. Limb deformities as an emerging parasitic disease in amphibians: evidence from museum specimens and resurvey data. *Conservation Biology* 17: 1724-1737.
- Johnson, P.T.J. and Lunde, K.B. 2005. Parasite infection and limb malformations: a growing problem in amphibian conservation. *Amphibian Declines: the Conservation Status of United States Species*. University of California Press. pp. 124-138.
- Johnson, P.T.J. and McKenzie, V.J. 2009. Effects of environmental change on helminth infections in amphibians: Exploring the emergence of *Ribeiroia* and *Echinostoma* infections in North America. *The Biology of Echinostomes* 9: 249-280.
- Kaiser, J. 1999a. Frog declines: a trematode parasite causes some frog deformities. *Science* 284: 731.
- Kaiser, J. 1999b. Deformed frogs: link to parasites grows stronger. *Science* 286: 2434.
- Kiesecker, J.M. 2002. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 9900-9904.
- Little, E.E. 1999. Report on UV-B penetration in selected ponds in Minnesota. *Minnesota Pollution Control Agency Interim Report* 1: 10.
- Lunde, K.B. and Johnson, P.T. 2012. A practical guide for the study of malformed

- amphibians and their causes. *Journal of Herpetology* 46(4): 429-441.
- Mccallum, M.L. and Trauth, S.E. 2003. A forty-three year museum study of northern Cricket Frog (*Acris crepitans*) abnormalities in Arkansas: upward trends and distributions. *Journal of Wildlife Diseases* 39: 522-528.
- Meteyer, C.U. 2000. Field guide to malformations of frogs and toads with radiographic interpretations. *Biological Science Report USGS/BRD/BSR-2000-0005*.
Available from:
http://www.nwhc.usgs.gov/publications/fact_sheets/pdfs/frog.pdf
- Meteyer, C.U., Loeffler, I.K., Fallon, J.F., Converse, K.A., Green, E., Helgen, J.C. and Burkhart, J.G. 2000. Hind limb malformations in free-living northern leopard frogs (*Rana pipiens*) from Maine, Minnesota, and Vermont suggest multiple etiologies. *Teratology* 62(3): 151-171.
- Nieuwkoop, P.D. and Faber, J. 1994. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin): a systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. New York and London: Garland Publishing Inc..
- Paduano, M., Colafrancesco, K.C., Wong, S.A., Caldwell, M.S. and Gridi-Papp, M. 2013. The response of gray treefrogs to anesthesia by tricaine methanesulfonate (TMS or MS-222). *ISRN Zoology* 2013: 2-9.
- Pathirana, N.U., Meegaskumbura, M. and Rajakaruna, R.S. 2019. Infection sequence alters disease severity - Effects of the sequential exposure of two larval trematodes to *Polypedates cruciger* tadpoles. *Ecology and Evolution* 9: 1-11.
- Sanderson, J.B. 1994. *Biological Microtechnique*. Milton Park: BIOS Scientific Publishers.
- Sessions, S.K. and Ruth, S.B. 1990. Explanation for naturally-occurring supernumerary limbs in amphibians. *Journal of Experimental Zoology* 254: 38-47.
- Sessions, S.K. and Ballengee, B. 2010. Developmental deformities in amphibians. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 312: 665-788.
- Sparling, D.W. 2000. Effects of altosid and abate-4e on deformities and survival in southern leopard frogs under semi-natural conditions. *Journal of the Iowa Academy of Science: JIAS* 107(3-4): 90-91.

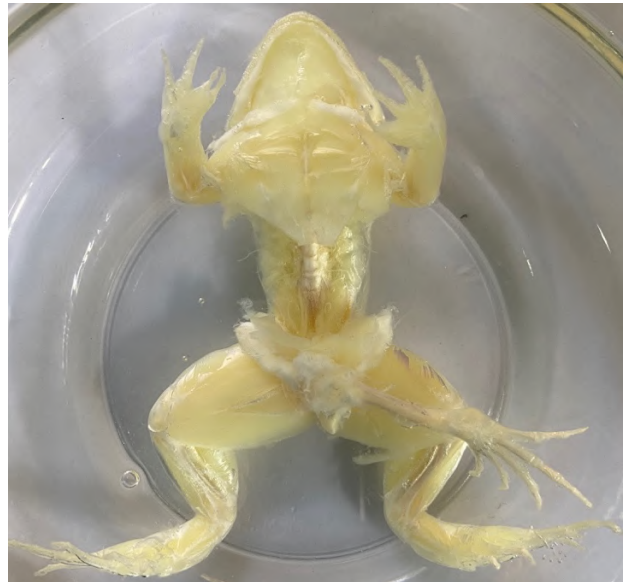
- Stopper, G.F., Hecker, L., Franssen, R.A. and Sessions, S.K. 2002. How trematodes cause limb deformities in amphibians. *Journal of Experimental Zoology* 294(3): 252-263.
- Sutherland, D.R. 2005. Parasites of North American anurans. *Status and Conservation of US Amphibians*. Berkeley, CA: University of California Press. pp. 109-123.
- Szuroczki, D. and Richardson, J.M. 2009. The role of trematode parasites in larval anuran communities: An aquatic ecologist's guide to the major players. *Oecologia* 161: 371-385.
- Torreilles, S.L., McClure, D.E. and Green, S.L. 2009. Evaluation and refinement of euthanasia methods for *Xenopus laevis*. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 48: 512-516.
- U.S. Geological Survey. 2001. *Malformed frogs in Minnesota: an update*. Available from: <https://doi.org/10.3133/fs04301>
- Vandenlangenberg, S.M., Canfield, J.T. and Magner, J.A. 2003. A regional survey of malformed frogs in Minnesota (USA) (Minnesota malformed frogs). *Environmental Monitoring and Assessment* 82: 45-61.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 ขั้นตอนการดองใสกบนา



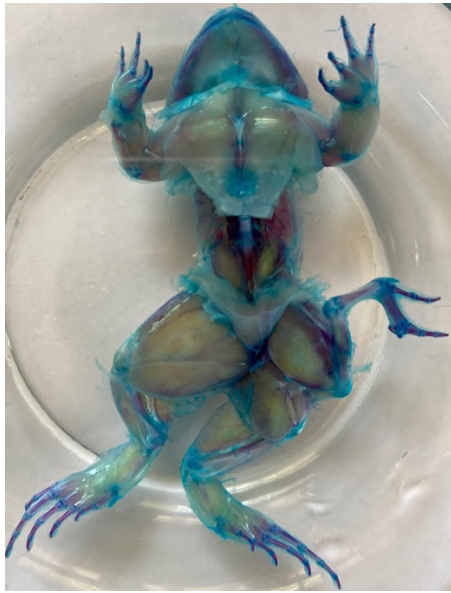
การนำผิวหนัง ตา และอวัยวะภายในออก

แช่กบนาใน (1:9) 10%KOH:1%H₂O₂

ขั้นตอนดึงนำออกจากเนื้อเยื่อโดยใช้แอลกอฮอล์



แช่กบนาในสารละลาย alcian blue



กบนาหลังจากแช่ในสารละลาย alizarin red



แช่ในสารละลาย trypsin



แช่ในสารละลาย alizarin red



เก็บรักษาใน pure glycerin

ภาคผนวกที่ 2 กบนาดองใสจําแนกตามระดับความรุนแรง

ระดับ 1

PT 1594

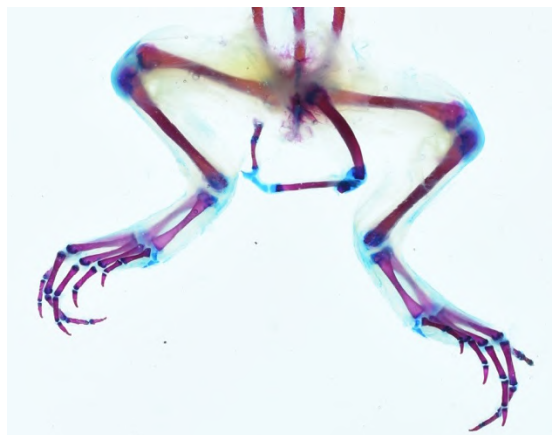
ระดับ 2



PT 1321



PT 1358



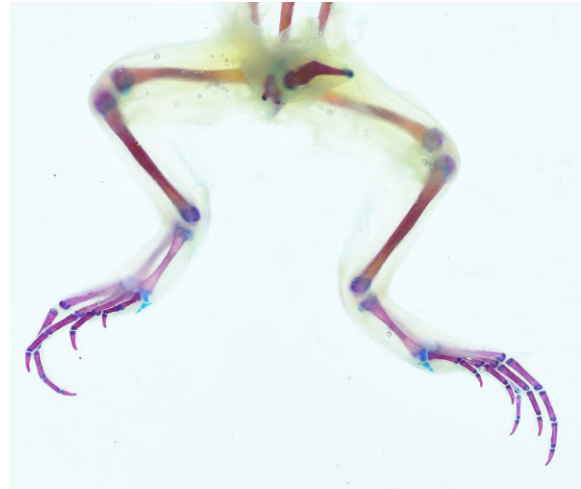
PT 1346



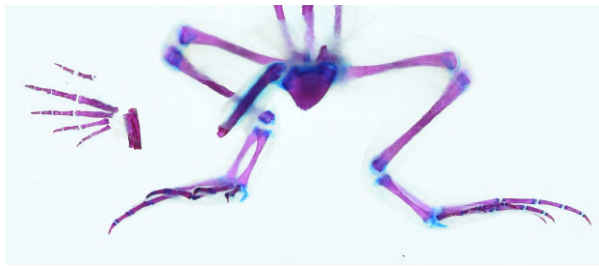
PT 1353



PT 1327



PT 1308



PT 1332



PT 1335



PT 1362



PT 1363



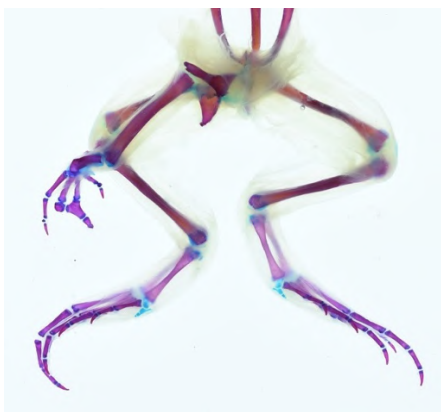
PT 1333



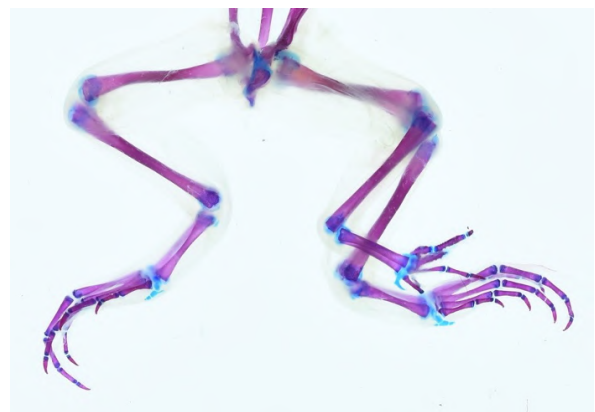
PT 1312

PT 1593, PT 1601, PT 1609, PT 1335

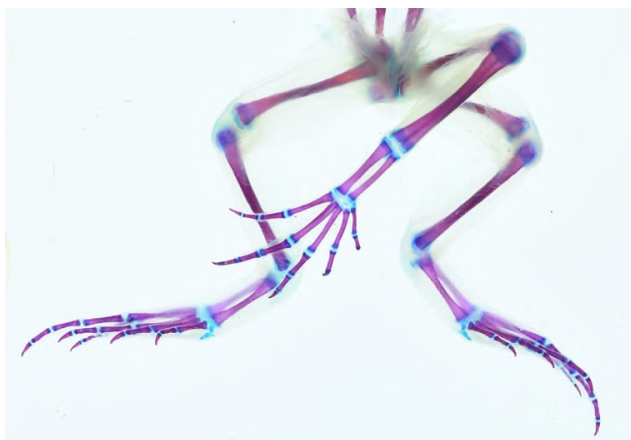
ระดับ 3



PT 1310



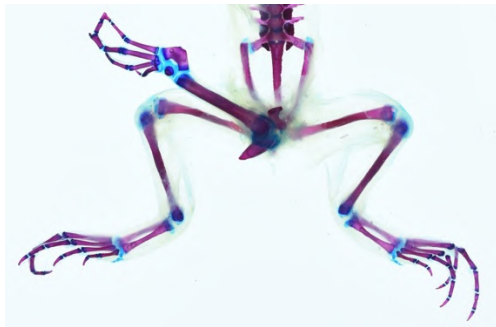
PT 1311



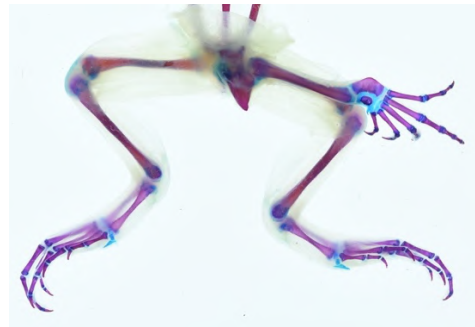
PT 1313



PT 1315



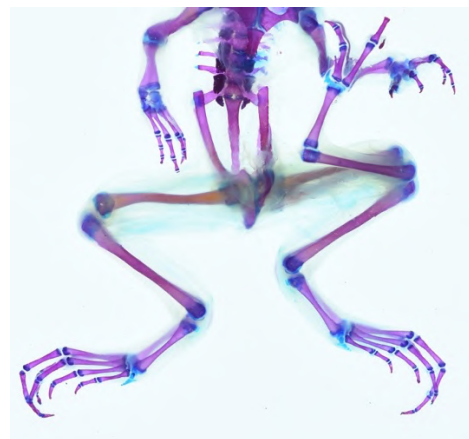
PT 1357



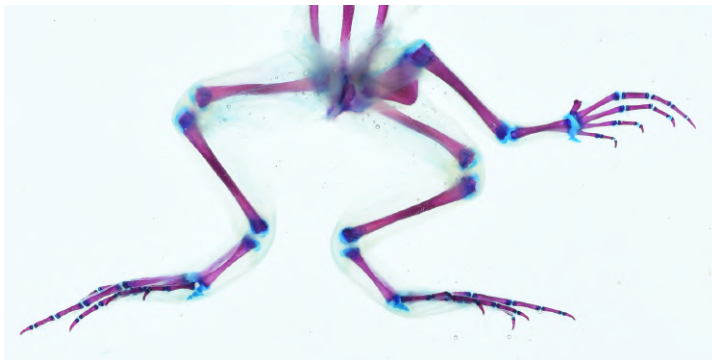
PT 1326



PT 1675



PT 1680



PT 1342



PT 1307



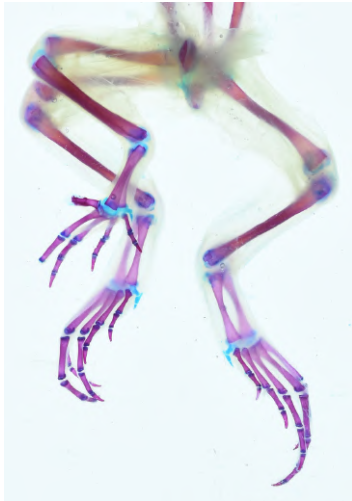
PT 1322



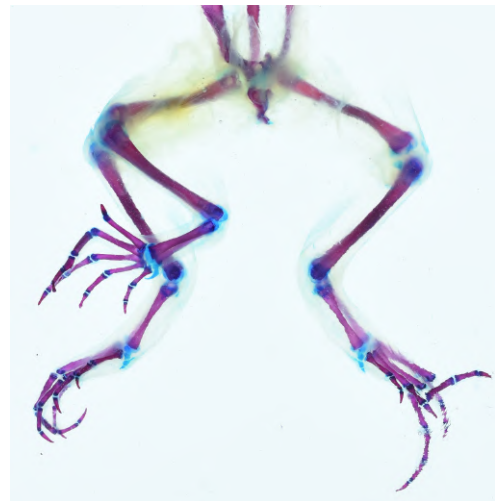
PT 1324



PT 1325



PT 1328



PT 1331



PT 1334



PT 1341

PT 1361



PT 1351

PT 1359, PT 1608, PT 1610, PT 1363, PT 1359

ระดับ 4



PT 1317

ระดับ 5



PT 1316



PT 1343



PT 1345



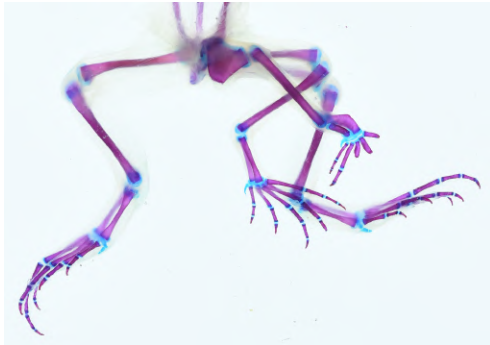
PT 1337



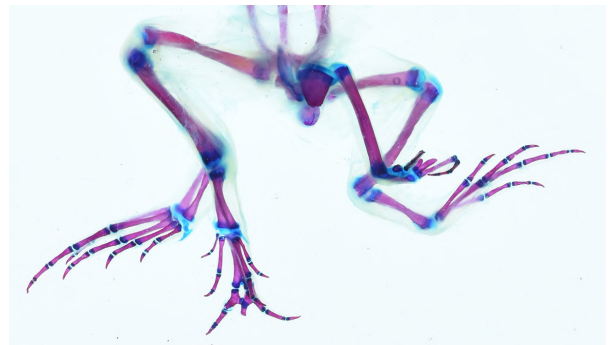
PT 1350



PT 1355



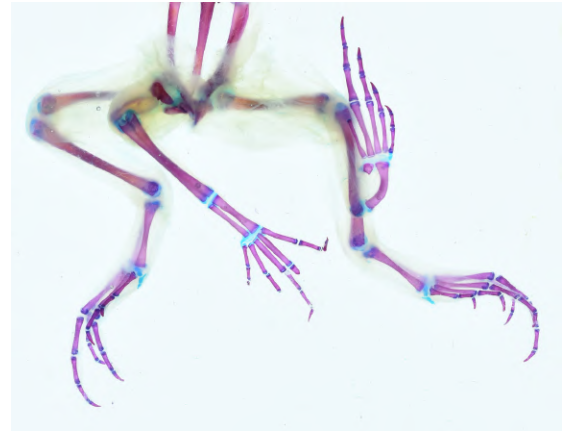
PT 1329



PT 1336



PT 1309



PT 1314



PT 1330



PT 1347



PT 1352



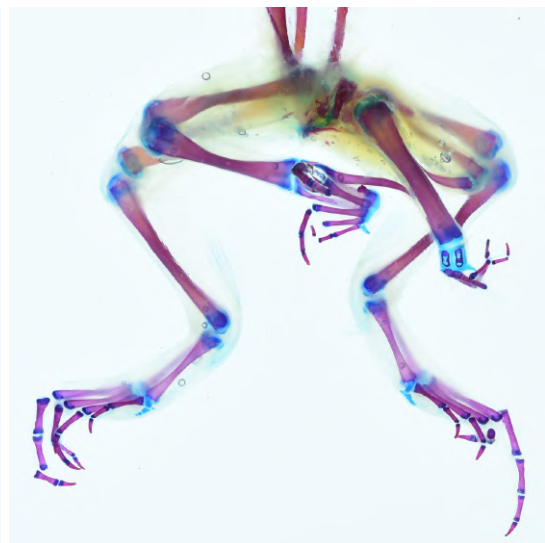
PT 1364

PT 1348, PT 1354, PT 1360, PT 1592, PT 1681

ระดับ 6

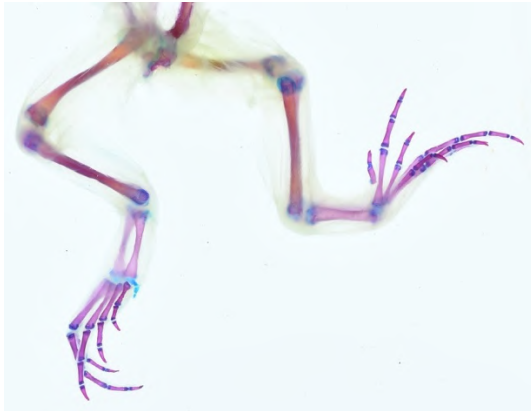


PT 1349



PT 1338

ระดับ 7



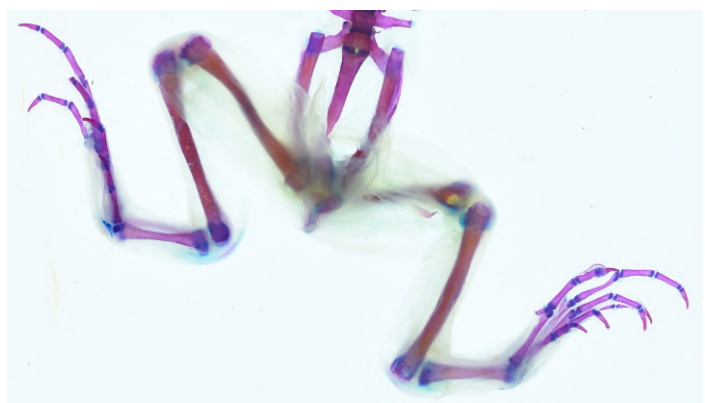
PT 1678



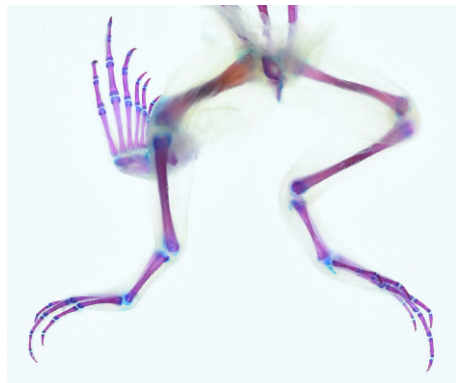
PT 1677



PT 1318



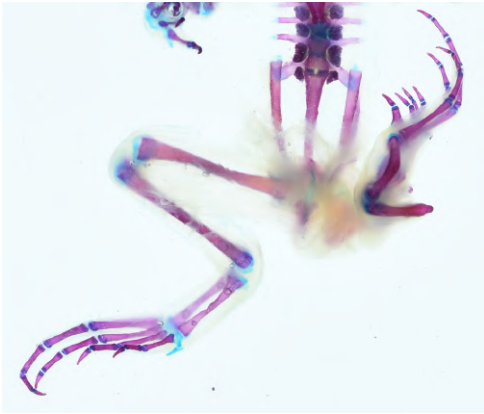
PT 1319



PT 1320



PT 1356

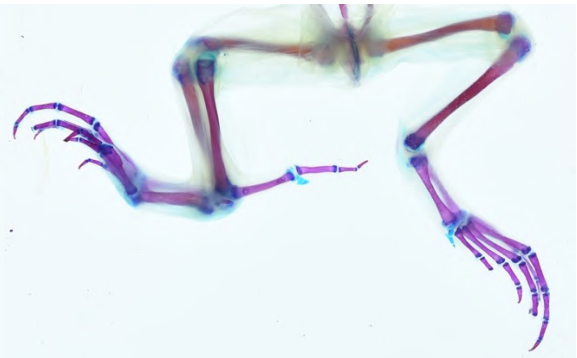


PT 1344

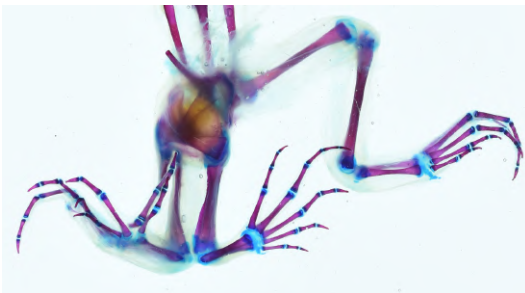
ระดับ 8



PT 1323



PT 1679



PT 1339