

คุณสมบัติของพิษปลากระเบนราหู (*Himantura chaophraya*, Monkolprasit and Roberts,
1990)
ในประเทศไทย

นางสาวพนมพร แสนประเสริฐ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

Characterizing venom from giant freshwater stingray
(*Himantura chaophraya*, Monkolprasit and Roberts, 1990) in Thailand.

Miss Panomporn Saenprasert

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Medicine

Department of Veterinary Medicine

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

คุณสมบัติของพิษปลากระเบนราหู (*Himantura
chaophraya*, Monkolprasit and Roberts, 1990)

ในประเทศไทย

โดย

นางสาวพนมพร แสนประเสริฐ

สาขาวิชา

อายุรศาสตร์สัตวแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.นันทริกา ชันช้อย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม (ถ้ามี)

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.มงคล เตชะกำพูน)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.รสมา ภูสุนทรธรรม)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.นันทริกา ชันช้อย)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล)

พนมพร แสนประเสริฐ : คุณสมบัติของพิษปลากระเบนราหู (*Himantura chaophraya*, Monkolprasit and Roberts, 1990) ในประเทศไทย. (Characterizing venom from giant freshwater stingray (*Himantura chaophraya*, Monkolprasit and Roberts, 1990) in Thailand.) อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.สพ.ญ.ดร. นันทริกา ชันช้อย, 60 หน้า.

ปลากระเบนเป็นปลากระดูกอ่อนเช่นเดียวกับปลาฉลาม ในบางตัวพบว่าบนหางมีเงี่ยงที่มีหนามแหลมลักษณะคล้ายเลื่อยและมีเยื่อบุผิวปกคลุมโดยรอบ เงี่ยงของปลากระเบนบางสายพันธุ์มีพิษ จากรายงานที่ผ่านมาพบว่ามีปลากระเบนกว่า 70 สายพันธุ์ทั่วโลก โดยที่พบปลากระเบนจำนวน 7 สายพันธุ์ในประเทศไทย ซึ่งปลากระเบนราหูเป็นปลากระเบนสายพันธุ์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดและถูกจัดอยู่ในกลุ่มสัตว์ที่หายากและมีความเสี่ยงสูงต่อการสูญพันธุ์ โดยสมัชชาการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมโลก งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาถึงความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับเนื้อเยื่อบริเวณรอบเงี่ยงโดยอาศัยวิธีการโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์อิเล็กโทรโฟรีซิส (SDS-PAGE หรือ Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ซึ่งผลการทดลองบ่งชี้ว่าเนื้อเยื่อที่ขูดได้จากเงี่ยงและเมือกที่ขูดได้จากบริเวณรอบตัวกเว้นส่วนของเงี่ยงนั้นประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดที่คล้ายกัน (น้ำหนักโมเลกุล 25 kDa, 50 kDa และมากกว่า 75 kDa) พบแถบโปรตีนอย่างต่ำ 16 แถบอยู่บนเจลที่ได้จากเนื้อเยื่อหุ้มรอบเงี่ยง ส่วนแถบโปรตีนที่พบเฉพาะในเจลที่ได้จากเนื้อเยื่อรอบเงี่ยงแต่ไม่พบบนเจลที่ได้จากเมือกรอบตัวมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ประมาณ 15 kDa งานวิจัยนี้ยังได้นำเอาเงี่ยงของปลากระเบนราหูมาวิเคราะห์โดยวิธีการทางพยาธิวิทยาและย้อมสีพิเศษได้แก่ PAS และ Alcian blue พบว่าเซลล์คัดหลังพิษชนิดพิเศษกระจายอยู่ในเยื่อบุผิวรอบเงี่ยงและย้อมไม่ติดสีทั้ง PAS และ Alcian blue แต่เซลล์เยื่อบุผิวทั่วไปย้อมติดสี PAS และ Alcian blue

ภาควิชา อายุรศาสตร์.....	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา อายุรศาสตร์สัตวแพทย์.....	ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก
ปีการศึกษา 2555.....	ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5175580531 : MAJOR VETERINARY MEDICINE

KEYWORDS : GIANT FRESHWATER STINGRAY / THAILAND / TOXICOLOGY /
MUCUS

PANOMPORN SAENPRASERT : CHARACTERIZING VENOM FROM GIANT
FRESHWATER STINGRAY (*HIMANTURA CHAOPHRAYA*, MONKOLPRASIT
AND ROBERTS, 1990) IN THAILAND. ADVISOR : ASSOC. PROF.
NANTARIKA CHANSUE, D.V.M., Ph.D., 60 pp.

The stingray is a cartilaginous fish like a shark. There are more than 70 species of stingrays reported from around the world. Seven species of stingrays have been found in Thailand. The biggest species of stingray found in Thailand is *Himantura chaophraya* (Giant freshwater stingray) which is listed as vulnerable on the IUCN (International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources) Red List of threatened species. This study emphasizes basic knowledge of properties of sting's tissue and mucus of *Himantura chaophraya* extracts by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE). The results indicated that many similar components in both tissue extracts (25 kDa, 50 kDa, and above 75 kDa). The band around 15 kDa was observed exclusively in venom extract. This study also used the stings of *H.chaophraya* for histological methods and indicated that there were many specialized venom secretory cells distributed in upper layers of epidermis of stings. The specialized venom secretory cells had negative results using PAS and Alcian blue stain but the staining of epidermal cells had positive results to PAS and Alcian blue stain.

Department : VETERINARY MEDICINE Student's Signature

Field of Study : VETERINARY MEDICINE Advisor's Signature

Academic Year : 2012 Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือ และความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รศ.สพ.ญ.นันทริกา ชันชื้อ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ภาสัชกรหญิงพรธัญญา จุลสุคนธ์ ผู้เชี่ยวชาญเภสัชกร 9 ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย ผู้ให้คำแนะนำและเป็นที่ปรึกษาด้านพิษวิทยาอย่างละเอียด ดร.อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล ผู้ให้ความช่วยเหลือข้อมูลทางการประมงและช่วยเหลือในการทำวิจัย

ขอขอบคุณที่มตปลาจากบริษัทฟิชสยามจำกัด ที่อำนวยความสะดวกและช่วยเหลือในด้านการจับบังคับและให้ข้อมูลเรื่องปลากระเบนซึ่งเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์และสำคัญต่องานวิจัยเป็นอย่างมาก

ขอขอบพระคุณบิดามารดา ที่คอยเป็นแรงผลักดันช่วยเหลือ ให้ความสนับสนุนทั้งกำลังกายและกำลังใจตลอดมา รวมทั้งญาติพี่น้อง และ เพื่อน พี่ ทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลือ จนทำให้ข้าพเจ้าสำเร็จลุล่วงมาได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	6
1.3 สมมุติฐานการวิจัย.....	6
1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดของงานวิจัย.....	6
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
2.1 ความรู้ทั่วไปของปลากระเบนราหู.....	7
2.2 รายงานการวิจัยเกี่ยวกับพิษของปลากระเบน.....	13
2.3 การศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเงี่ยงพิษปลากระเบน.....	23
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	32
3.1 สัตว์ทดลอง.....	32
3.2 การบันทึกข้อมูลลักษณะทั่วไป.....	32
3.3 การเก็บตัวอย่าง.....	32
3.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบพิษของปลากระเบนราหู.....	34
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	35
4.1 ผลของการวิเคราะห์เงี่ยงพิษทางกล้องจุลทรรศน์.....	35
4.2 วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนในพิษของปลากระเบนราหู.....	40
4.3 วิเคราะห์องค์ประกอบของพิษปลากระเบนราหู.....	41
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย ข้อเสนอ และข้อเสนอแนะ.....	43
5.1 อภิปรายผลการวิจัย.....	43
5.2 ข้อเสนอและข้อเสนอแนะ.....	45

	หน้า
รายการอ้างอิง.....	47
ภาคผนวก.....	50
ภาคผนวก ก ตารางแสดงคุณภาพน้ำที่ตรวจในแหล่งน้ำที่จับปลากะเบนราหู มาทำการวิจัย ณ แม่น้ำแม่กลองอำเภอเมือง จังหวัด สมุทรสงคราม.....	52
ภาคผนวก ข ตารางแสดงข้อมูลปลากะเบนที่จับมาทำงานวิจัย ได้แก่ วันที่จับ ปลากะเบนได้ รหัสประจำตัว เลขที่ไม่โครซีพ ความยาวทั้งตัว ตั้งแต่ปลายจมูกจรดปลายหาง (Total length หรือ TL) ความยาว ตั้งแต่ปลายจมูกจนถึงกระดูกสะโพก (Girdle length หรือ GL) ความกว้างของลำตัว (Width) และเพศของปลากะเบน ในช่วง ระยะเวลาที่ทำการวิจัย.....	54
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	60

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงร้อยละของปริมาณอะคริลาไมด์และขนาดของโมเลกุลของโปรตีนที่สามารถแยกได้.....	15

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงแผนภาพจำแนกชนิดของปลากระเบน.....	3
2	แสดงลักษณะของเงี่ยงปลากระเบน.....	4
3	แสดงลักษณะทางอนุกรมวิธานของปลากระเบนราหู.....	8
4	แสดงลักษณะภายนอกของปลากระเบนราหูด้านบนลำตัว.....	9
5	แสดงลักษณะภายนอกของปลากระเบนราหูด้านใต้ลำตัว.....	10
6	แสดงลำดับของความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์.....	12
7	แสดงการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธี PAGE.....	16
8	แสดงผลการทดสอบพิษของปลากระเบนสายพันธุ์ <i>Potamotrygon falkneri</i> ที่จับได้บริเวณแม่น้ำของประเทศบราซิล.....	17
9	แสดงผลของการทดสอบพิษของปลากระเบน <i>Potamotrygon falkneri</i> และ <i>Dasyatis guttata</i> ในประเทศบราซิล โดยวิธี SDS-PAGE ที่ใช้ casein gelatin fibrinogen และ hyaluronic acid เป็น substrate.....	18
10	แสดงผลการทดสอบพิษของปลากระเบน <i>Potamotrygon falkneri</i> ที่พบในประเทศเม็กซิโก.....	18
11	แสดงผลของการทดสอบพิษปลากระเบน <i>Potamotrygon falkneri</i> ที่พบในประเทศเม็กซิโกโดยใช้ casein (A) gelatin (B) และ hyaluronic acid (C) เป็น substrate.....	19
12	แสดงผลของการทดสอบพิษปลากระเบน <i>Dasyatis guttata</i>	20
13	แสดงผลการทดสอบพิษของปลากระเบน <i>Potamotrygon orbignyi</i> (2) และ <i>Potamotrygon scobina</i> (3) โดยวิธีการ SDS-PAGE.....	21
14	แสดงผลของการศึกษาพิษปลากระเบน <i>Potamotrygon motoro</i> จาก crude venom extract (1) purified enzyme หลังจากผ่านการกรองโดยใช้ Sephacryl S-100 chromatography (2) และ purified enzyme หลังจากผ่านการกรองโดยใช้ SP-Sepharose chromatography.....	22
15	แสดงลักษณะเงี่ยงของปลากระเบนที่มีจำนวนมากกว่า 1 เงี่ยง จะเห็นว่าเงี่ยงทั้งสองชิ้นมีความแตกต่างกัน นักวิจัยเลือกเงี่ยงที่มีความสมบูรณ์นั้นคือเงี่ยงที่มีเยื่อหุ้มโดยรอบนั้นคือเงี่ยงที่งอกใหม่อยู่ทางด้านล่างของเงี่ยงเก่า.....	24

ภาพที่		๗ หน้า
16	แสดงผลของการศึกษาทางจุลกายวิภาคของเงี่ยงปลากระเบนสายพันธุ์ <i>Potamotrygon falkneri</i>	27
17	แสดงผลการศึกษาทางจุลกายวิภาคในเงี่ยงปลากระเบนสายพันธุ์ <i>Potamotrygon orbignyi</i>	28
18	แสดงผลการศึกษาทางจุลกายวิภาคในเงี่ยงปลากระเบนสายพันธุ์ <i>Potamotrygon leopodi</i>	29
19	แสดงผลการศึกษาทางจุลกายวิภาคในเงี่ยงปลากระเบนสายพันธุ์ <i>Aetobatus narinari</i>	30
20	แสดงผลการศึกษาทางจุลกายวิภาคในเงี่ยงปลากระเบนสายพันธุ์ <i>Dasyatis guttata</i>	31
21	แสดงแบบบันทึกข้อมูลทั่วไปของปลากระเบนราหู.....	32
22	แสดงขั้นตอนการใช้มีดผ่าตัดชุดเยื่อหุ้มรอบเงี่ยงพิษของปลากระเบนราหู.....	33
23	แสดงภาพจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4x แสดงให้เห็นถึงภาพตัดขวางของเงี่ยงปลากระเบนราหูซึ่งฝั่งซ้ายคือด้านใต้เงี่ยง ฝั่งขวาที่เห็นคือด้านบนของเงี่ยงปลากระเบนราหูที่ถูกย้อมด้วยสี PAS ซึ่งแสดงให้เห็นส่วนแกนของกระดูกเงี่ยงปลากระเบนราหู (MR) อย่างชัดเจน.....	35
24	แสดงภาพจากกล้องจุลทรรศน์จากกรอบของภาพที่ 23 แสดงให้เห็นถึงภาพตัดขวางของเงี่ยงปลากระเบนราหูที่ถูกย้อมด้วยสี PAS บริเวณเยื่อบุผิวรอบเงี่ยงและส่วนของกระดูกแกนเงี่ยงในส่วนด้านใต้เงี่ยงที่พบเซลล์ค้ำหลังพิษชนิดพิเศษอยู่โดยรอบ (SC) ในชั้นของเยื่อบุผิวรอบเงี่ยง (E) และเห็นส่วนของกระดูกแกนของเงี่ยงปลากระเบนราหู (MR) ชัดเจน.....	36
25	แสดงภาพจากกล้องจุลทรรศน์ แสดงให้เห็นถึงภาพตัดขวางของเงี่ยงปลากระเบนราหูซึ่งฝั่งซ้ายคือด้านใต้เงี่ยง ฝั่งขวาที่เห็นคือด้านบนของเงี่ยงปลากระเบนราหูที่ถูกย้อมด้วยสี Alcian blue ซึ่งแสดงให้เห็นส่วนแกนของกระดูกเงี่ยงปลากระเบนราหู (MR).....	36

ภาพที่		หน้า
26	แสดงภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสดงให้เห็นถึงภาพตัดขวางของเงี่ยงปลา กระเบนราหูที่ถูกย้อมด้วยสี Alcian blue บริเวณเยื่อบุผิวรอบเงี่ยงและส่วนของ กระดูกแกนเงี่ยงในส่วนด้านใต้เงี่ยงที่พบเซลล์คัดหลังพิเศษชนิดพิเศษอยู่โดยรอบ (SC) ในชั้นของเยื่อบุผิวรอบเงี่ยง (E) และเห็นส่วนของกระดูกแกนของเงี่ยงปลา กระเบนราหู (MR) ชัดเจน.....	37
27	แสดงภาพตัดตามแนวยาวของเงี่ยงปลากระเบนราหูจากกล้องจุลทรรศน์ แสดง ให้เห็นส่วนของแกนกระดูกของเงี่ยง (MR) ส่วนของกล้ามเนื้อ (M) และเซลล์คัด หลังพิเศษชนิดพิเศษ (SC) ซึ่งจะพบเซลล์คัดหลังนี้ในบริเวณด้านล่างของเงี่ยง เป็นจำนวนมาก.....	37
28	แสดงภาพขยายจากกล้องจุลทรรศน์ของเงี่ยงปลากระเบนราหูในบริเวณ ด้านล่างที่ถูกตัดตามแนวยาวและย้อมสี PAS จากในกรอบสี่เหลี่ยมในภาพที่ 27 แสดงให้เห็นรายละเอียดของเซลล์คัดหลังพิเศษ (SC) ที่แทรกอยู่ในชั้นเยื่อ บุผิวรอบเงี่ยง (E) กล้ามเนื้อ (M) และส่วนที่เป็นกระดูก (MR) ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น.....	38
29	แสดงภาพขยายจากกล้องจุลทรรศน์ของเงี่ยงปลากระเบนราหูในบริเวณ ส่วนบนที่ถูกตัดตามแนวยาวและย้อมสี PAS ในกรอบวงกลมของภาพที่ 27 แสดงให้เห็นรายละเอียดชั้นเยื่อบุผิวรอบเงี่ยง (E) กล้ามเนื้อ (M) และส่วนที่เป็น กระดูก (MR) ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น.....	38
30	แสดงภาพตัดตามแนวยาวของเงี่ยงปลากระเบนราหูจากกล้องจุลทรรศน์ แสดง ให้เห็นส่วนของแกนกระดูกของเงี่ยง (MR) ส่วนของกล้ามเนื้อ (M) และเซลล์คัด หลังพิเศษชนิดพิเศษ (SC) ซึ่งจะพบเซลล์คัดหลังนี้ในบริเวณด้านล่างของเงี่ยง เป็นจำนวนมาก.....	39
31	แสดงภาพขยายจากกล้องจุลทรรศน์ของเงี่ยงปลากระเบนราหูในบริเวณ ด้านล่างที่ถูกตัดตามแนวยาวและย้อมสี Alcian blue จากในกรอบสี่เหลี่ยมใน ภาพที่ 30.....	39

ภาพที่		
32	แสดงภาพขยายจากกล้องจุลทรรศน์ของเงี่ยงปลากระเบนราหูในบริเวณส่วนบนที่ถูกตัดตามแนวยาวและย้อมสี Alcian blue ในกรอบวงกลมของภาพที่ 30 แสดงให้เห็นรายละเอียดชั้นเยื่อบุผิวรอบเงี่ยง (E) ก้ามเนื้อ (M) และส่วนที่เป็นกระดูก (MR) ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น โดยจะสังเกตได้ว่าไม่พบเซลล์ค้ำหลังพิษชนิดพิเศษแทรกอยู่ในชั้นของเยื่อบุผิวรอบเงี่ยงบริเวณส่วนบนของเงี่ยงปลากระเบนราหูเลย.....	40
33	แสดงภาพของเจลจากการทดสอบโดยหลักการ SDS-PAGE ซึ่งเลนแรกคือโปรตีนมาตรฐาน หรือ อัลบูมินซีรัมของโค เลนที่สองคือพิษของปลากระเบนราหู ส่วนเลนที่สามคือเมือกตามร่างกายของปลากระเบนราหู.....	41
34	แสดงลักษณะของเจลตามหลักการ SDS-PAGE หลังจากย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue โดยเลนที่ 1 คือโปรตีนมาตรฐานอัลบูมินซีรัมของโค เลนที่สองคือพิษของปลากระเบนราหูที่ผ่านอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เลนที่สามคือพิษของปลากระเบนราหูที่อยู่ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และเลนที่ 4 คือพิษของปลากระเบนที่ผ่านอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที.....	42

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลากะเบนเป็นสัตว์น้ำที่มีพิษรุนแรงและก่ออุบัติเหตุการได้รับบาดเจ็บต่อนักท่องเที่ยวหรือชาวประมงในชายหาดเกือบทั่วโลก มักพบมากและมีรายงานการได้รับบาดเจ็บทุกสัปดาห์ในช่วงฤดูหนาวซึ่งจะมีนักท่องเที่ยวจำนวนมากตามชายหาดต่างๆ (Taylor, 2000) เหตุที่พบการได้รับบาดเจ็บจากเงี่ยงปลากะเบนมากในบริเวณชายหาดนั้น เนื่องจากปลากะเบนเป็นสัตว์น้ำที่มักอาศัยอยู่ในบริเวณน้ำตื้นของชายหาด โดยมักจะฝังตัวอยู่บนพื้นทรายหรือโคลนตามแถบชายหาด (Scharf, 2002; Uzel et al., 2002; Barbaro et al., 2007) ด้วยเหตุดังกล่าวจึงมักพบรายงานผู้ป่วยได้รับบาดเจ็บจากเงี่ยงปลากะเบนขณะเดินเล่นตามชายหาดเป็นจำนวนมาก (Haddad Jr. et al., 2004) จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าประเทศที่มีผู้ได้รับบาดเจ็บจากการถูกเงี่ยงปลากะเบนที่มแทงมากที่สุดคือประเทศสหรัฐอเมริกา โดยพบว่ามีจำนวนผู้บาดเจ็บมากที่สุดถึง 2,000 รายต่อปี (Germain et al., 2000) ซึ่งหน่วยงาน Emergency Department (ED) ของประเทศสหรัฐอเมริการายงานการได้รับบาดเจ็บจากเงี่ยงปลากะเบนจำนวนเฉลี่ย 1,500 รายต่อปี (Clark et al., 2007) และมีรายงานผู้ได้รับบาดเจ็บจากปลากะเบนบริเวณชายหาดทางตอนเหนือของสหรัฐอเมริกาเฉลี่ย 750 รายต่อปี (Russell, 1959)

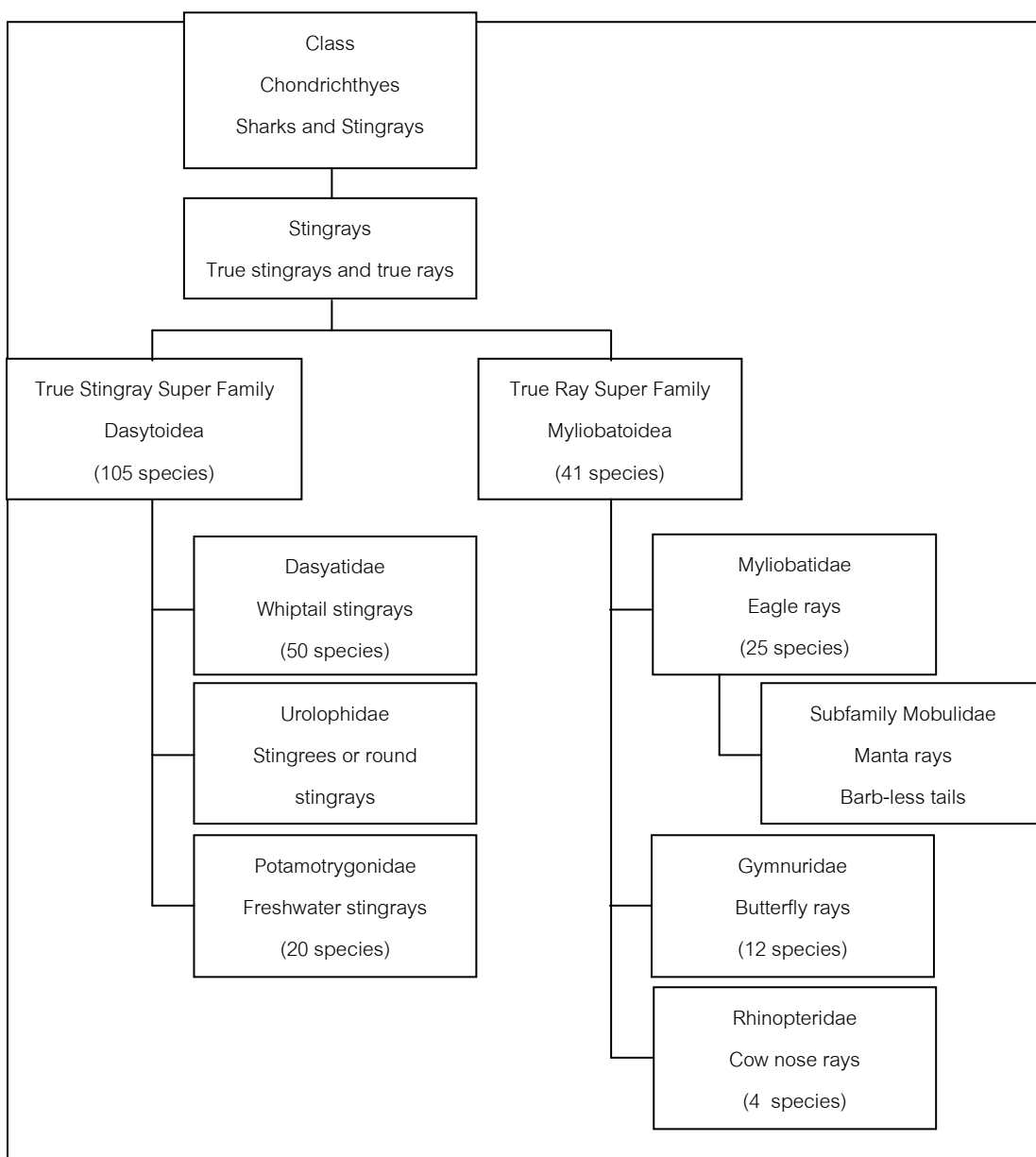
ในประเทศบราซิลพบรายงานการได้รับบาดเจ็บจากการถูกเงี่ยงปลากะเบนแทงเป็นจำนวนมากเช่นกัน ซึ่งผู้ที่ได้รับบาดเจ็บส่วนมากอยู่ในเมืองโครัมบาแถบแม่น้ำปารากวัย แม่น้ำปารานา แม่น้ำโทแคนทิน และแม่น้ำอารากวัย ซึ่งจากการศึกษาพบว่าตั้งแต่เดือนมกราคม ปี 2000 ถึงเดือนมีนาคม ปี 2003 มีผู้เข้ารับการศึกษาในศูนย์สุขภาพหรือโรงพยาบาลท้องถิ่นจำนวนมากถึง 84 ราย พบว่าผู้ที่ได้รับบาดเจ็บและเข้ารับการรักษาส่วนมากได้รับบาดเจ็บจากบริเวณแม่น้ำปารานาและปารากวัยเป็นจำนวน 59 ราย จากปลากะเบนสายพันธุ์ *Potamotrygon motoro* และ *Potamotrygon falkneri* โดยเป็นเพศชายถึงร้อยละ 90 และเกิดขึ้นมากในช่วงเวลากลางวันของฤดูหนาว ผู้เข้ารับการรักษาจำนวน 25 รายได้รับบาดเจ็บจากเงี่ยงปลากะเบนในแถบแม่น้ำอารากวัยและแม่น้ำโทแคนทิน โดยพบมากในช่วงบ่ายของเดือนกรกฎาคมจนถึงเดือนสิงหาคม ซึ่งช่วงเวลาดังที่ได้กล่าวไปนี้เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมในการทำกิจกรรมต่างๆ เช่น ตกปลา ซักผ้า ทำความสะอาดอุปกรณ์ต่างๆ หรือ อาบน้ำ เป็นต้น โดยผู้ที่ได้รับบาดเจ็บส่วนมากในแถบแม่น้ำนี้ได้รับบาดเจ็บจากปลากะเบนสายพันธุ์ *Potamotrygon orbignyi* (Haddad Jr. et al., 2004)

รายงานการได้รับบาดเจ็บจากปลากะเบนในประเทศเม็กซิโกจำนวนสูงสุด 60 รายในระยะเวลา 3 วัน (Rodríguez et al., 2008) มีการศึกษาถึงจำนวนผู้ที่ได้รับบาดเจ็บจากการถูกเงี่ยงปลาที่มแทงและได้เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลรอยัลดาร์วิน (Royal Darwin Hospital, RDH) ซึ่งอยู่ทางตอนเหนือของประเทศออสเตรเลียตั้งแต่เดือนกรกฎาคม ปี 1999 จนถึงเดือนมิถุนายน ปี 2000 พบว่า มีผู้ได้รับบาดเจ็บจากเงี่ยงปลาทั้งหมด 22 ราย และ 9 รายในนั้นเป็นผู้ที่ได้รับบาดเจ็บจากเงี่ยงของปลากะเบน (Isbister, 2001) นอกจากรายงานการบาดเจ็บจากเงี่ยงปลากะเบนในคนแล้วยังมีรายงานการได้รับบาดเจ็บจากเงี่ยงปลากะเบนในสัตว์ด้วยเช่นกัน พบว่ามีม้าได้รับบาดเจ็บจากการถูกเงี่ยงปลากะเบนที่มีไปบริเวณข้อระหว่างการเดินทางออกกำลังกายบริเวณน้ำตื้นที่ชายหาดทางฝั่งตะวันออกของประเทศออสเตรเลีย ม้ามีอาการขากระดูกแตก และอ่อนแรงทันที มีอาการบวมที่บริเวณข้อเข่าและข้อเท้า (Riggs et al., 2003) นอกจากนี้ยังพบรายงานการได้รับบาดเจ็บจากเงี่ยงปลากะเบนในหลายประเทศของทวีปยุโรปอีกด้วย (Brisset et al., 2006)

ปลากะเบนเป็นปลากะดุกอ่อนอยู่ในตระกูลเดียวกับปลาฉลาม โดยมีสายพันธุ์กว่า 70 สายพันธุ์ทั่วโลก สามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ (ดังแสดงในภาพที่ 1) ได้แก่

1. Dasytoidea ซึ่งเป็น True stingray super family ประกอบด้วย Dasyatidae (Whip-tailed stingray) Urolophidae (Round stingray) และ Potamotrygonidae (Freshwater stingray)
2. Myliobatoidea ซึ่งเป็น True ray super family ได้แก่ Myliobatidae (Eagle rays) Gymnuridae (Butterfly ray) และ Rhynopteridae (Cow nose ray) (Diaz, 2007)

ปลากะเบนชนิด Dasyatidae เป็นปลากะเบนชนิดที่มีพิษรุนแรงมาก พบมากบริเวณมหาสมุทรอินเดีย มหาสมุทรแอตแลนติก และมหาสมุทรแปซิฟิก อาศัยในน้ำทะเล น้ำจืด และน้ำกร่อย ปลากะเบนชนิดนี้มักจะมีเงี่ยงที่มีลักษณะคล้ายหนามแหลมและมีขอบเป็นหยัก (ดังแสดงในภาพที่ 2) คล้ายเล็บมือ พร้อมทั้งมีเนื้อเยื่อหุ้มตลอดทั่วทั้งเงี่ยงพิษ เรียกเนื้อเยื่อหุ้มนี้ว่าอินเทกูเมนเธอริชีท (Integumentary sheath) ซึ่งเยื่อหุ้มนี้ปกคลุมเงี่ยงและต่อมบรรจุพิษไว้โดยรอบเงี่ยง



ภาพที่ 1 แสดงแผนภาพจำแนกชนิดของปลากะเบน

ที่มา: Diaz (2007)

สำหรับประเทศไทย มีรายงานพบปลากะเบนทั้งหมด 7 สายพันธุ์ ได้แก่ ปลากะเบนบัว (*Himantura bleekeri*, Blyth, 1860 cited in Monkolprasit and Roberts, 1990) ปลากะเบนลายเสือ (*H. krempfi* หรือ *H. oxyrhyncha*, Chabanaud, 1923 cited in Monkolprasit and Roberts, 1990) ปลากะเบนราหู (*H. chaophraya*, Monkolprasit and Roberts, 1990) ปลากะเบนแม่กลอง (*H. kittipongi*, Vidthayanon and Roberts, 2005) ปลากะเบนชายธง (*Pastinachus sephen*) ปลากะเบนขาว (*H. signifier*, Compagno and Roberts, 1982 cited

in Monkolprasit and Roberts, 1990) และปลากะเบนลาว (*Dasyatis laosensis*, Roberts and Karnasuta, 1987) โดยที่ปลากะเบนราหูเป็นปลากะเบนสายพันธุ์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะของเงี่ยงปลากะเบน

มงคลประสิทธิ์และโรเบิร์ต (Monkolprasit and Roberts, 1990) รายงานการพบปลากะเบนราหูครั้งแรกในปี พ.ศ. 2526 ในแม่น้ำเจ้าพระยาและแม่น้ำโขง จำนวน 3 ตัว และนำมาใช้เป็นตัวต้นแบบในการศึกษา ซึ่งปัจจุบันปลากะเบนราหู 3 ตัวนี้ยังอยู่ที่พิพิธภัณฑ์ของคณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร

ปลากะเบนราหูถูกจัดอยู่ในกลุ่มของสัตว์น้ำที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในอนาคต โดยสมัชชาการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมโลก หรือ IUCN (International Union for The Conservation of Nature and Natural Resources) ได้ประกาศให้ปลากะเบนราหูเป็นสัตว์หายากและมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ โดยในสถานะเชิงประชากรของปลากะเบนยังไม่เป็นที่ทราบจำนวนที่แน่นอน แต่เป็นที่คาดการณ์ว่ามีจำนวนลดลงอย่างต่อเนื่อง และมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ไปในอนาคตอันใกล้ (IUCN, 2010) นอกจากนี้จะเป็นสัตว์ที่ตกอยู่ในสถานะใกล้จะสูญพันธุ์แล้ว การได้รับบาดเจ็บจากเงี่ยงพิษปลากะเบนก็มีความสำคัญและเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการศึกษาและวิจัยอีกด้วย

การที่ปลากะเบนมีเงี่ยงพิษและสามารถทำอันตรายต่อผู้คนมากมายจากที่ได้รายงานไปในตอนต้น จึงมีนักวิจัยบางส่วนทำการศึกษาเกี่ยวกับการทำร้ายเหยื่อของปลากะเบน โดยนักวิจัยเหล่านี้เรียกการทำร้ายนี้ว่าปฏิกิริยาการป้องกันตัว (defensive whip reflex) นั่นคือ เป็นการป้องกันตัวหลังจากที่โดนรบกวนหรือถูกทำร้าย แทนที่จะเป็นการเข้าทำร้ายเหยื่อ

เมื่อปลากะเบนถูกรบกวนปลากะเบนจะป้องกันตัวโดยแทงเงี่ยงพิษนี้เข้าสู่ร่างกายของผู้รบกวน หลังจากเงี่ยงพิษถูกแทงเข้าไปในเหยื่อแล้วเยื่อหุ้มรอบเงี่ยงจะฉีกขาด ส่งผลให้ต่อมที่บรรจุพิษอยู่ภายใต้เยื่อหุ้มนั้นฉีกขาดและปล่อยพิษที่บรรจุอยู่ภายในออกมา เยื่อจะได้รับความเจ็บปวดมากบริเวณแผล โดยที่ลักษณะของการเจ็บปวดจะคล้ายกับการเจ็บปวดที่ได้รับจากแผล

ไฟไหม้ บริเวณแผลจะเกิดเนื้อตายรุนแรงและมักจะเกิดการติดเชื้อแทรกซ้อนตามมา (Germain et al., 2000; Weiss and Wolfenden, 2001; Campbell et al., 2003; Malgalhães et al., 2006) ต่อมาเกิดจุดเลือดออกบริเวณรอบแผล เกิดเลือดคั่ง เกิดแผลหลุมและบริเวณเนื้อเยื่อรอบแผล เปื่อยยุ่ย (Germain et al., 2000) หากถูกเงี่ยงปลากระเบนที่บริเวณอวัยวะสำคัญของร่างกาย เช่น อวัยวะในช่องอกหรือช่องท้อง อาจทำให้เกิดอาการทางระบบอื่นๆตามมาได้ ได้แก่ อาการคลื่นไส้ อาเจียน น้ำลายไหล การทำงานของระบบทางเดินหายใจล้มเหลว กล้ามเนื้อกระตุก ตัวสั่น บวมหน้า และการเกิดเนื้อตายเนื่องจากขาดเลือดไปเลี้ยง (Russell, 1953; Weiss and Wolfenden, 2001; Scharf, 2002; Perkins and Morgan, 2004; Forrester, 2005; Pedroso et al., 2007; Hadded Jr. et al., 2004; Dehghani et al., 2009) ในบางรายมีอาการทางระบบประสาท พบเลือดออกภายในกระโหลกศีรษะ และ เกิดความผิดปกติของเส้นเลือดแดงและดำในซีรีบรัม (undiagnosed cerebral arterial-vascular malformation หรือ AVM) ในเด็กที่ได้รับบาดเจ็บจากเงี่ยงปลากระเบนในแม่น้ำของประเทศเม็กซิโก พบอาการเริ่มแรกคือเจ็บปวดที่บริเวณแผลอย่างรุนแรง ต่อมามีอาการอาเจียนและปวดศีรษะ ตามมาด้วยอาการชักและหยุดหายใจ ตรวจพบว่าเกิดเลือดออกหรือความผิดปกติของเส้นเลือดในสมอง ส่งผลให้เกิดอาการชัก แต่สันนิษฐานว่าอาการเหล่านั้นไม่ได้เกิดขึ้นจากพิษของเงี่ยงปลากระเบนโดยตรง แต่เป็นผลจากความเจ็บปวดอย่างรุนแรง ทำให้เกิด Hyperadrenergic แล้วเกิดอาการดังกล่าวขึ้น (Jackson and Ruha, 2008)

ด้วยเหตุนี้การศึกษาด้านพิษวิทยาของปลากระเบนจึงมีความสำคัญและมีประโยชน์ในทางการแพทย์ ในขณะที่การศึกษาย้อนหลังถึงรายงานการศึกษาพิษวิทยาของปลากระเบนยังมีจำนวนน้อย ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเกิดจากความยากลำบากของการเก็บตัวอย่าง และไม่สามารถมองเห็นต่อมที่บรรจุพิษของปลากระเบนได้ด้วยตาเปล่า จึงยากต่อการนำพิษของปลากระเบนนั้นมาสกัดเพื่อใช้ในงานวิจัย (Diaz, 2007) ส่งผลให้ปัจจุบันยังไม่มียาแก้พิษที่ได้ผลและจำเพาะเจาะจงต่อพิษของปลากระเบน (Pedroso et al., 2007)

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาหาความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับพิษของปลากระเบนราหู เพื่อหวังจะได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์และสามารถนำข้อมูลเหล่านี้ไปต่อยอดพัฒนางานวิจัยต่อเนื่องได้อีก อาทิ เช่น การศึกษาถึงยาแก้พิษของปลากระเบนราหูหรือแม้แต่การวิจัยเพื่อการผลิตวัคซีนป้องกันการได้รับบาดเจ็บจากพิษปลากระเบนได้อีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาองค์ประกอบโปรตีนของพิษปลากระเบนราหู
2. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบโปรตีนของพิษปลากระเบนราหูกับเมือกในส่วนอื่นของปลากระเบนราหู
3. เพื่อศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิที่แตกต่างกันต่อพิษปลากระเบนราหู
4. เพื่อศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของต่อมบรรจุพิษปลากระเบนราหู

1.3 สมมุติฐานการวิจัย

โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเมือกที่เลี้ยงปลากระเบนราหูมีคุณสมบัติเป็นพิษและพบว่า มีต่อมบรรจุพิษอยู่ในเนื้อเยื่อหุ้มรอบบริเวณเงี่ยงพิษของปลากระเบนราหู

1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดของงานวิจัย

ทำการศึกษาองค์ประกอบโปรตีนของพิษปลากระเบนราหู โดยศึกษาเปรียบเทียบโปรตีนจากเมือกบริเวณเงี่ยงพิษปลากระเบนราหูกับเมือกบริเวณอื่นของปลากระเบนราหูเพื่อทราบถึงองค์ประกอบโปรตีนที่แตกต่างกัน ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่อคุณสมบัติของพิษปลากระเบนราหู โดยใช้วิธีการเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส และศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของต่อมบรรจุพิษปลากระเบนราหูโดยเทคนิควิทยาเนื้อเยื่อแล้วส่งดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบลักษณะของพิษปลากระเบนราหูในประเทศไทยซึ่งเป็นสัตว์น้ำที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในอนาคต เพื่อเป็นแนวทางการศึกษาต่อเนื่องเพื่อผลิตสารแก้พิษปลากระเบนได้อย่างถูกวิธี

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้ทั่วไปของปลากะเบนราหู

ปลากะเบนราหูน้ำจืด หรือ ปลากะเบนราหู (*Himantura chaophraya*) เป็นปลากะเบนน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในโลก โดยพบว่ากะเบนราหูมีน้ำหนักได้มากถึง 600 กิโลกรัม มีความกว้างลำตัวได้ถึง 2.5 - 3 เมตร และเนื่องจากขนาดลำตัวที่ใหญ่เหมือนราหูอมจันทร์ตามคติของคนโบราณ จึงได้ชื่อว่า "ราหู" ด้วยชื่อของปลากะเบนที่คล้าย "พระราหู" ซึ่งเป็นเทวดาดาวนพเคราะห์ประเภทบาปเคราะห์ ให้ผลในทางลุ่มหลงมัวเมา ส่งผลให้เกิดทั้งคุณและโทษแก่ความอยู่รอด และความเสี่ยงในการถูกล่าของปลากะเบนเหล่านี้ จากความเชื่อโบราณ ที่กลัวเกรงต่อคำว่า "ราหู" และความไม่รู้จักต่อตัวตนที่แท้จริงของปลากะเบนยักษ์นี้ทำให้ชาวบ้านมีความเชื่อว่าหากบ้านเรือนใด พบเห็นเงาดำขนาดใหญ่แหวกว่ายผ่านมาบริเวณบ้าน นั่นคือราหู ที่บ่งบอกถึงเคราะห์ภัยร้ายที่จะเกิดขึ้นกับผู้พบเห็น หรือหากในยามที่ออกหาปลา หากปลากะเบนราหูติดเบ็ดนั่นคือหายนะ จำเป็นที่จะต้องรีบไปสะเดาะห์เคราะห์ หรือขอขมาต่อพระราหูทันที รวมทั้งความเชื่อที่ว่าปลากะเบนราหูนี้เป็นเจ้าผู้คุ้มครองแหล่งน้ำ ซึ่งไม่ควรถูกลบหลู่ จึงเป็นข้อดีที่ทำให้ปลากะเบนราหูเหล่านี้ยังคงอยู่ได้ในสายน้ำแห่งวัฒนธรรมมาได้ยาวนาน ในทางตรงกันข้าม ชื่อราหูกลับเป็นจุดเด่นให้แก่ผู้ล่าที่มีความเชื่อผิดๆ ในทางไสยศาสตร์ จึงมีการล่าเพื่อนำหางปลากะเบนมาเป็นเครื่องรางกันภัยในรูปแบบต่างๆ เช่น แหวน ตะกรุด เป็นต้น ทำให้จำนวนของปลากะเบนราหูลดลงอย่างรวดเร็ว และมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ดังเช่นในปัจจุบัน

นอกเหนือไปจากนั้น ความลึกลับ และมหัศจรรย์ของปลากะเบนราหูเป็นจุดสนใจแก่ผู้ล่า นอกพื้นที่ที่ตื่นตกกับความใหญ่มหึมา อีกทั้งการล่าปลากะเบนเหล่านี้สามารถทำได้อย่างเสรีในประเทศไทยเนื่องจากยังไม่มีกฎหมายคุ้มครอง ทำให้มีการล่าปลากะเบนราหูยักษ์ทั้งเพื่อเป็นอาหารและเพื่อเป็นเกมกีฬาเกิดขึ้น อีกทั้งยังมีการจับตามใบสั่งของลูกค้าทั้งในและต่างประเทศ เพื่อนำไปเป็นปลาสวยงามเพื่อการจัดแสดงในสถานที่ต่างๆ อันเป็นสาเหตุที่สำคัญในการทำให้ปลากะเบนราหูเหล่านี้มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ไปจากแหล่งน้ำอย่างรวดเร็ว

ปลาคระเบนราหูมีหางเรียวยาวลักษณะคล้ายแฉี่ (whiptail) จึงเป็นที่นิยมนำมาทำเป็นเครื่องราง มีรายงานพบปลาคระเบนชนิดนี้ครั้งแรกในแม่น้ำเจ้าพระยาจึงถูกตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ (Scientific name) ว่า "เจ้าพระยา" (*Himantura chaophraya*) อย่างไรก็ตามสามารถพบรายงานของปลาชนิดนี้ได้เช่นกันในแม่น้ำสายอื่น ๆ เช่น แม่น้ำแม่กลอง แม่น้ำบางปะกง แม่น้ำโขง แม่น้ำในเกาะบอร์เนียว นิวกินี จนถึง ออสเตรเลียตอนเหนือ

2.1.1 ลักษณะทางอนุกรมวิธานของปลาคระเบนราหู (Taxonomic theory)

ลักษณะทางอนุกรมวิธานของปลาคระเบนราหู ดังแสดงใน ภาพที่ 3

Kingdom Animalia
Phylum Chondrichthyes
Subclass Elasmobranchii
Order Rajiformes
Family Dasyatidae

ภาพที่ 3 แสดงลักษณะทางอนุกรมวิธานของปลาคระเบนราหู

ที่มา: IUCN (2010)

2.1.2 ลักษณะภายนอกของปลาคระเบนราหู (Morphology character)

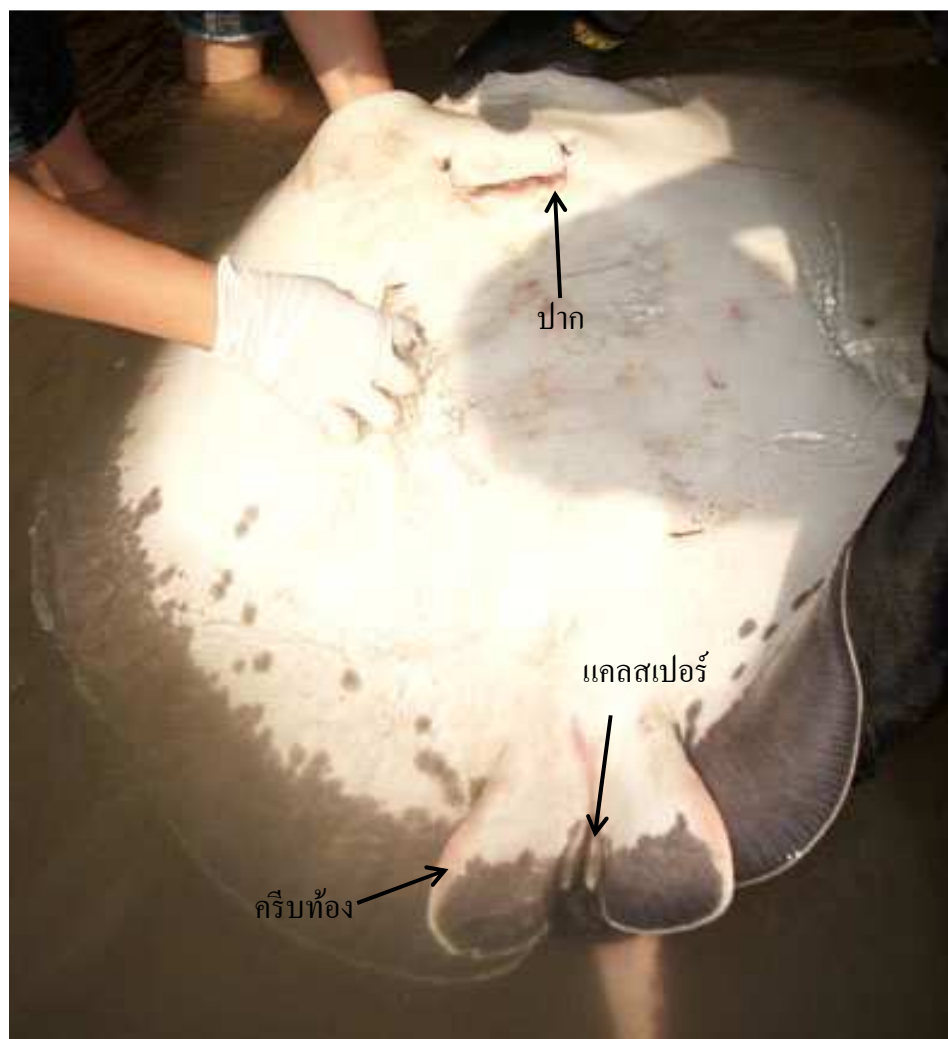
ปลาคระเบนมีลักษณะลำตัวแบนในแนวราบรูปร่างแบนจากการเปลี่ยนรูปแผ่ออกของ ครีบอก (pectoral fin) เป็นแผ่นกลมคล้ายจาน ไม่มีครีบหลัง ขนาดลำตัวอาจมีเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่ได้ถึง 3 เมตร หากวัดความยาวลำตัวรวมหางอาจยาวมากถึง 6 เมตร ลักษณะเฉพาะของปลาคระเบนราหูน้ำจืดคือ ด้านบนของลำตัวเป็นสีน้ำตาลเข้ม หรือเทา (น้ำตาลเทา) ผิวหยาบ เนื่องจากมีหนามแหลมขนาดเล็กจำนวนมากตลอดทั่วตัว ด้านท้องเป็นสีขาวเนียน โดยมีบริเวณขอบเป็นสีดำ ปลาคระเบนราหูมีตาขนาดเล็ก จมูก (snout) มีแผ่นปิดจากด้านท้าย ฐานของจมูกกว้างและแคบแหลมในส่วนปลาย มีช่องหายใจกว้าง บริเวณปากประกอบด้วย short papillae จำนวน 4 ถึง 7 ซี่เรียงตัวกึ่งตามขวาง มี lateral papillae ขนาดเล็ก 1 ถึง 2 ซี่ อยู่ด้านข้าง และมี papillae ขนาดใหญ่ จำนวน 2 ถึง 4 ซี่ อยู่ตรงกลางของปาก ฟันกรามของปลาคระเบนราหูมีลักษณะเป็นสันแข็ง มีสันอยู่ที่เพดานปากจำนวน 5 สัน ได้แก่ anteromedian longitudinal ridge 1 สัน anteroposteriorly oblique ridge 2 คู่ ทางด้านข้างและสันส่วนท้ายมีลักษณะเป็นแผ่นจำนวน 1 คู่

ปลากะเบนราหูเพศผู้ที่โตเต็มวัยจะมีแคลสเปอร์ (Clasper) ซึ่งเป็นอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศผู้ มีขนาดใหญ่อยู่ที่ฐานของหางจำนวน 1 คู่ ซึ่งไม่พบในปลากะเบนเพศเมีย การผสมพันธุ์ของปลากะเบนเป็นการผสมพันธุ์แบบภายในร่างกาย โดยยังไม่พบรายงานระยะเวลาการคุ้มท้องของปลากะเบนราหู กระเบนราหูออกลูกเป็นตัวเช่นเดียวกับปลากะเบนสายพันธุ์อื่น คือตัวอ่อนจะพัฒนาภายในไข่อยู่ในตัวแม่ ได้รับสารอาหารและพลังงานจากไข่แดง (yolk) แต่เมื่อใกล้คลอดไข่จะแตกออกแล้วคลอดออกมาเป็นตัว จำนวนลูกที่ออกมาจะแตกต่างกันไปขึ้นกับสภาพแวดล้อมอายุที่ผสม และขนาดของปลา จากการวิจัยปลากะเบนในที่เพาะเลี้ยงพบว่า ปลากะเบนราหูน้ำจืดออกลูกครั้งละ 1-7 ตัว และพบว่าลูกมีขนาดเฉลี่ยประมาณ 34 เซนติเมตร แต่ในธรรมชาติยังไม่มีรายงานการศึกษาอย่างแน่ชัด

ปลากะเบนราหูน้ำจืดเป็นปลากินเนื้อ ชนิดอาหารและปริมาณการกินขึ้นกับสภาพของแหล่งน้ำ และความเหมาะสมของสภาพแวดล้อมที่อยู่ อาหารที่กินมีตั้งแต่สิ่งมีชีวิตในน้ำทั้งที่มีกระดูกสันหลัง เช่น ปลาชนิดต่างๆ และไม่มีกระดูกสันหลังอย่างพวก กุ้ง หอย หนอน เป็นต้น นอกจากนี้อาจจะ ปลายจะขับถ่ายของเสียไนโตรเจนออกทางเหงือกและไต ซึ่งการขับถ่ายของเสียของปลากะเบนนี้ส่วนมากจะอยู่ในรูปแอมโมเนีย (ammonia) และยูเรีย (urea) ส่วนในรูปไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ (trimethylamine oxide) พบได้น้อย



ภาพที่ 4 แสดงลักษณะภายนอกของปลากะเบนราหูด้านบนลำตัว



ภาพที่ 5 แสดงลักษณะภายนอกของปลากระเบนราหูด้านใต้ลำตัว

2.1.3 แหล่งอาศัยและขอบเขตการกระจายในภาคพื้นที่มีรายงาน

พบปลากระเบนราหูได้ในแหล่งน้ำจืด หรือน้ำกร่อย ที่มีการไหลเวียนดี โดยปลาจะชุกตัว อยู่บริเวณพื้นน้ำที่เป็นแอ่งหลุมหรือแทรกตัวอยู่ในพื้นที่ทรายใต้ท้องน้ำ ปลากระเบนเป็นสัตว์ที่ไวต่อ ความเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดความสมบูรณ์ของสิ่งแวดล้อม และ คุณภาพน้ำได้เป็นอย่างดี สามารถพบปลากระเบนได้เฉพาะในแหล่งน้ำที่มีความอุดมสมบูรณ์ และไร้มลพิษ ด้วยเหตุที่ปลากระเบนมักชุกตัวอยู่ในโคลนใต้แม่น้ำ จึงทำให้การปนเปื้อนสารพิษที่ ตกตะกอนอยู่ก้นแม่น้ำเป็นอันตรายอย่างมากต่อปลากระเบนเหล่านี้

มงคลประสิทธิ์และโรเบิร์ต (Monkolprasit and Roberts, 1990) ได้รายงานลักษณะของปลากะเบนชนิดนี้จากปลากะเบน 3 ตัวที่พบในแม่น้ำเจ้าพระยา ซึ่งปลากะเบนราหูตัวแรกที่มีการบันทึกข้อมูลเป็นเพศเมีย ขนาด 78 เซนติเมตร พบในแม่น้ำเจ้าพระยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ตัวที่สองเป็นเพศผู้ ขนาด 107 เซนติเมตร พบในแม่น้ำน่าน จังหวัดพิจิตร และตัวที่สามเป็นเพศเมีย ขนาด 192 เซนติเมตร ในแม่น้ำน่าน จังหวัดนครสวรรค์

ลักษณะพิเศษในการจำแนกปลากะเบนราหู คือ ลักษณะลำตัวที่มีขนาดใหญ่แผ่กว้างและแบนเป็นรูปไข่ จมูกยื่นยาวออกไปจากฐานที่มีลักษณะกว้าง ตามีขนาดเล็ก ผิวด้านบนของลำตัวเป็นสีน้ำตาลหรือเทาและเต็มไปด้วยปุ่มเล็กๆ ผิวด้านใต้ลำตัวมีสีขาวและมีขอบเป็นสีดำ

การระบุการกระจายตัวและแหล่งที่พบปลากะเบนราหูต้องอาศัยข้อมูลจากข่าว หนังสือพิมพ์และชาวประมง ซึ่งข้อมูลที่ได้มักจะไม่ครบถ้วน เช่น ไม่ระบุเพศของปลากะเบนหรือไม่มีรูปภาพประกอบ ทำให้ไม่สามารถระบุได้อย่างแน่ชัดว่าปลากะเบนที่พบคือปลากะเบนราหู

– ในเดือนมกราคม ปี ค.ศ. 1983 (พ.ศ.2526) พบปลากะเบนเพศเมียหนัก 300 กิโลกรัม ที่แม่น้ำเจ้าพระยาจังหวัดสิงห์บุรีออกไปทางต้นน้ำห่างจากอ่าวไทยประมาณ 200 กิโลเมตร ปลากะเบนตัวนี้คลอดลูกขนาดความกว้างลำตัว 30 เซนติเมตร จำนวน 4 ตัว หลังจากรูถูกจับ

– วันที่ 25 เดือนเมษายน ปี ค.ศ. 1983 (พ.ศ.2526) หนังสือพิมพ์ไทยรัฐเผยแพร่ภาพของปลากะเบนหนัก 185 กิโลกรัม ที่ถูกจับได้ที่จังหวัดอ่างทองในแม่น้ำเจ้าพระยา

– วันที่ 1 เดือนมิถุนายน ปี ค.ศ. 1983 (พ.ศ.2526) หนังสือพิมพ์บางกอกโพสต์ตีพิมพ์รูปของปลากะเบนหนัก 242 กิโลกรัม ที่ถูกจับได้ในแม่น้ำแม่โขงจังหวัดนครพนม ซึ่งภาพถ่ายแสดงให้เห็นชัดเจนว่าด้านใต้ลำตัวของปลากะเบนมีสีดำบริเวณขอบ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของกลุ่มปลากะเบนที่จับปลากะเบนราหูอยู่ในกลุ่มนี้ด้วย

– เดือนมีนาคมปี ค.ศ. 1985 (พ.ศ.2528) มีรายงานการจับปลากะเบนหนัก 500 กิโลกรัมได้ในแม่น้ำแม่โขงจังหวัดนครพนม และมีการสัมภาษณ์ชาวประมงกลุ่มแม่น้ำโขง จังหวัดหนองคาย จังหวัดนครพนม และจังหวัดมุกดาหาร ในปี ค.ศ. 1988 (พ.ศ.2531) ถึง 1989 (พ.ศ.2532) ได้ข้อมูลว่าพบปลากะเบนหนัก 500 หรือ 600 กิโลกรัม ที่จังหวัดมุกดาหาร

– ในปี ค.ศ. 1986 (พ.ศ.2529) นักศึกษาคณะประมง แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ชื่อสมพงษ์ ดุลจินดาชบาพร ได้ถ่ายภาพปลากะเบนเพศผู้โตเต็มวัย มีขนาดความกว้างของลำตัว 1 เมตร ที่พบในแม่น้ำบางปะกง ซึ่งภาพถ่ายนั้นแสดงให้เห็นชัดเจนถึงสีดำบริเวณขอบลำตัวด้านล่าง หางเรียวยาว และลักษณะอีกหลายประการที่เป็นลักษณะเฉพาะของปลากะเบนราหู

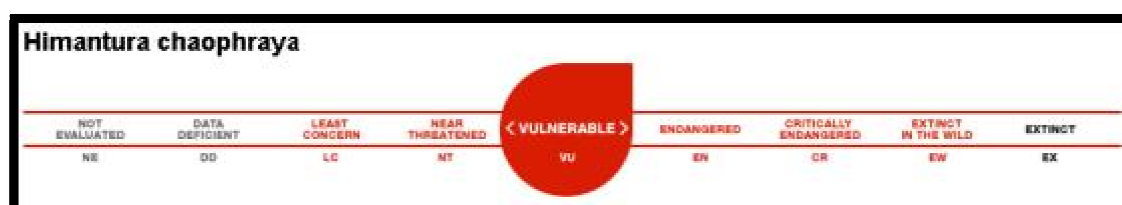
- วันที่ 25 กันยายน ค.ศ. 1988 (พ.ศ.2531) หนังสือพิมพ์เดลินิวส์รายงานว่าพบปลากระเบน 2 ตัว น้ำหนัก 288 และ 295 กิโลกรัม ในแม่น้ำตาจีน ซึ่งเป็นแขนงของแม่น้ำเจ้าพระยา
- หนังสือพิมพ์บางกอกโพสต์ฉบับวันที่ 31 พฤษภาคม ปี ค.ศ. 1990 (พ.ศ.2533) ลงภาพถ่ายของปลากระเบนที่พบในแม่น้ำตาปี น้ำหนัก 185 กิโลกรัม ถูกจับได้ที่เขื่อนรัชชประภา (เขื่อนเชี่ยวหลาน) จังหวัดสุราษฎร์ธานีในวันที่ 23 เมษายน ค.ศ. 1990 (พ.ศ.2533) โดยภาพถ่ายแสดงให้เห็นชัดเจนถึงสีดำบริเวณขอบด้านล่างลำตัวซึ่งบ่งบอกว่าเป็นปลากระเบนราหู
- นอกจากนี้ ยังมีรายงานการพบปลากระเบนที่มีลักษณะเข้าข่ายเป็นปลากระเบนสายพันธุ์เดียวกันนี้ที่อำเภอมหาคาม บอร์เนียว ซึ่งเป็นปลากระเบนเพศผู้ที่ยังไม่โตเต็มวัย ขนาด 57 เซนติเมตร ถูกจับได้วันที่ 28 ตุลาคม 1984 (พ.ศ.2527) (Monkolprasit and Roberts, 1990)

2.1.4 อาหาร

ปลากระเบนราหูเป็นปลากินเนื้อ ซึ่งชนิดของอาหารและปริมาณการกินขึ้นอยู่กับสภาพของแหล่งน้ำและความเหมาะสมของสภาพแวดล้อมที่อยู่ อาหารที่ปลากระเบนกินมีหลายชนิด เช่น ปลาชนิดต่างๆ กุ้ง หอย และหนอน เป็นต้น

2.1.5 กฎหมายคุ้มครองและสถานภาพเชิงอนุรักษ์

ปลากระเบนราหูถูกจัดอยู่ในกลุ่มของสัตว์น้ำที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในอนาคต โดยสมาชิชาการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมโลก หรือ IUCN (International Union for The Conservation of Nature and Natural Resources) ได้ประกาศให้ปลากระเบนราหูเป็นสัตว์หายากและมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ โดยในสถานะเชิงประชากรของปลากระเบนยังไม่เป็นที่ทราบจำนวนแน่นอน แต่เป็นที่คาดการณ์ว่าน่าจะมีจำนวนลดลงอย่างต่อเนื่อง และมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ไปในอนาคตอันใกล้ (IUCN, 2010)



ภาพที่ 6 แสดงลำดับของความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์

ที่มา: IUCN (2010)

2.2 รายงานการวิจัยเกี่ยวกับพิษของปลากระเบน

2.2.1 การเก็บและเตรียมตัวอย่างพิษปลากระเบน

หลังจับปลากระเบนมาได้ ตัดส่วนของเงี่ยงพิษใส่ถังน้ำแข็งแล้วส่งไปยังห้องปฏิบัติการ (Kumar et al., 2011) หรือจะใช้มีดผ่าตัดหรือกระจกสไลด์ขูดเยื่อหุ้มรอบเงี่ยงพิษออกมา นำสิ่งที่ได้มาผสมกับ PBS pH 7.4 (Magalhães et al., 2006; Conceição et al., 2006; Kumar et al., 2011; Magalhães et al., 2008; Hadded Jr. et al., 2004) หรือน้ำกลั่น (Conceição et al., 2009) หรือน้ำเกลือ (Santos et al., 2011) เพื่อละลายเนื้อเยื่อที่ขูดมาได้ หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000xg เป็นเวลา 15 นาที (Magalhães et al., 2006; Conceição et al., 2009; Conceição et al., 2006) หรือ 5000xg เป็นเวลา 10 นาที (Kumar et al., 2011; Magalhães et al., 2008; Hadded Jr. et al., 2004) เมื่อได้สารแยกชั้นแล้ว จึงแยกส่วนที่ลอยอยู่ด้านบนออก เก็บไว้ในตู้อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำตัวอย่างที่ได้นั้นมาใช้

ก่อนที่จะดำเนินการสู่ขั้นตอนการวิเคราะห์ส่วนประกอบของพิษอื่นๆ เช่น การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ หรือ การวิเคราะห์ส่วนประกอบโปรตีน เป็นต้น จะต้องทำการวัดความเข้มข้นของโปรตีนก่อน ซึ่งการวัดความเข้มข้นของโปรตีนในปัจจุบันมีหลายวิธี และมีความเหมาะสมกับโปรตีนแตกต่างกันไป วิธีการวัดความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้กันมากในงานวิจัยพิษของปลากระเบนคือการวัดความเข้มข้นของโปรตีนตามหลักการของ Bradford (1976) และ Lowry (1951) ตามลำดับ

หลักการวัดความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธีของ Bradford (1976) คือการวัดความเข้มแสงของสีที่เกิดจากการที่โปรตีนในตัวอย่างนั้นทำปฏิกิริยากับสี Coomassie Brilliant Blue G-250 ที่เติมลงไปในช่วงขั้นตอนการปฏิบัติการ โดยเมื่อสีจับกับโปรตีนในตัวอย่างจะเปลี่ยนสีจากสีแดงหรือน้ำตาล (มีค่าการดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ 465 นาโนเมตร) ไปเป็นสีน้ำเงิน (มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 610 นาโนเมตร) ซึ่งจะเห็นความแตกต่างได้ชัดเจนที่สุดสำหรับการดูดกลืนแสงของสองสีที่เกิดขึ้นที่ 595 นาโนเมตร ดังนั้นความยาวคลื่นแสงที่เหมาะสมที่สุดในการวัดสีที่เกิด คือความยาวคลื่นแสงตั้งแต่ 575 นาโนเมตร ถึง 615 นาโนเมตร สี Coomassie Brilliant Blue G-250 ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยากับโปรตีนในตัวอย่างแล้วเกิดสีภายในระยะเวลา 2 นาทีและสีที่เกิดขึ้นสามารถคงตัวอย่างได้เป็นเวลานานถึง 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นสีจะค่อยๆจางลง อีกทั้งวิธีการนี้มีความคลาดเคลื่อนจากการถูกรบกวนจากสารอื่นต่ำ ซึ่งสารที่ไม่มีผลกระทบต่อการศึกษาความเข้มข้นของโปรตีนวิธีนี้ได้แก่ แมกนีเซียมคลอไรด์ (Magnesium chloride) โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride) โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) เอทานอล (Ethanol) และ แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate) เป็นต้น ส่วนสารที่สามารถทำให้ผลของการหาความเข้มข้นโดยวิธีนี้คลาดเคลื่อนได้เล็กน้อย ได้แก่ ทริส (Tris) กรดอะซิติก (Acetic acid) 2-เมอแคพโทเอทานอล (2-

Mercaptoethanol) ซูโครส(Sucrose) กลีเซอรอล(Glycerol) และ EDTA เป็นต้น แต่สิ่งสำคัญคือ หลอดบรรจุสารที่ใช้เพื่อวัดความเข้มข้นควรเป็นหลอดที่ทำจากวัสดุชนิดที่ไม่ได้ทำจากควอทส์ เนื่องจากหากใช้หลอดที่ทำจากควอทส์สารละลายในตัวอย่างจะทำปฏิกิริยากับหลอดแล้วทำให้หลอดติดสีและทำให้การอ่านผลคลาดเคลื่อนได้

ส่วนหลักการวัดความเข้มข้นของโปรตีนตามทฤษฎีของลอร์รี่ (Lowry et al., 1951) คือการวัดความเข้มข้นโปรตีนโดยใช้สารฟอลิน ฟีนอลเป็นสารสำคัญในการวัด หลักการนี้ถูกพัฒนาตั้งแต่ปี 1922 เป็นต้นมาโดยมักใช้วัดโปรตีนในตะกอนของแอนติเจนกับแอนติบอดีในซีรัมและอินซูลิน ซึ่งใช้หลักการวัดโปรตีนในสารละลายและโปรตีนที่ทำให้ถูกตกตะกอนด้วยกรดต่างๆ โดยที่วิธีนี้สามารถวัดโปรตีนที่มีความเข้มข้นน้อยได้ดี ขั้นตอนการปฏิบัติงานง่ายและรวดเร็ว รวมทั้งมีความไวสูง แต่วิธีการนี้ทำให้เกิดสีที่หลากหลายจากโปรตีนที่ต่างชนิดกัน และถูกรบกวนได้จากสารหลายชนิด เช่น guanine จะสามารถทำให้สีที่เกิดจากปฏิกิริยานี้เข้มข้นได้ถึงร้อยละ 50 อะดีนีน (adenedine) อะดีโนซีน(adenosine) ไซโทซีน(cytosine) ไซทีดีน(cytidine) ยูราซิล(uracil) ไธมีน (thymine) หรือ ไธมิดีน(thymidine) จะทำให้ไม่เกิดสีขึ้นในปฏิกิริยา ส่วนไกลซีน(glycine)จะลดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นลงร้อยละ 50 หากมีแอมโมเนียมซัลเฟตมากกว่าร้อยละ 0.15 จะลดการเกิดสี ซึ่งส่วนหนึ่งเกิดจากการลดหรือเพิ่มความเป็นด่าง นั่นคือความเป็นด่างส่งผลต่อผลของการวัดโปรตีนในหลักการวัดความเข้มข้นของโปรตีนโดยสารฟอลินฟีนอลนี้ โดยที่ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นได้ดีและสมบูรณ์ที่สุดที่ความเป็นกรด-ด่างที่ pH 10

การวัดความเข้มข้นของโปรตีนที่ประกอบอยู่ในสารที่ได้จากการขูดเมือกและพิษของปลากระเบนเป็นประโยชน์ในขั้นตอนการทดลองอื่นๆเพิ่มเติม โดยวิธีการที่นักวิจัยเกี่ยวกับพิษของปลากระเบนนิยมใช้มากที่สุดคือการวัดความเข้มข้นของโปรตีนตามหลักการของแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976) โดยใช้อัลบูมินซีรัมของโค(Bovine serum albumin หรือ BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน (Conceição et al., 2006; Magalhães et al., 2006; Santos et al., 2011) แต่ยังมี การวัดความเข้มข้นของโปรตีนตามหลักการของลอร์รี่ (Lowry et al., 1951) ที่นักวิจัยเกี่ยวกับพิษของปลากระเบนใช้อยู่ด้วยเช่นกัน (Magalhães et al., 2008; Kumar et al., 2011)

2.2.2 การแยกโปรตีนโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส(Protein Gel Electrophoresis)

เป็นการแยกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุลของโปรตีนแต่ละชนิดด้วย เจลพอลิอะคริลามิเดซึ่งมีลักษณะเป็นโครงข่ายเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโคเวเลนต์ของอะคริลามิเด และอาศัยลักษณะที่เป็นรูพรุนของเจลนี้ในการแยกโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลต่างกันไป เมื่อมีการปล่อยกระแสไฟฟ้าเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาในการแยกโปรตีน โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ไปบนเจลได้เร็วกว่าโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ การเคลื่อนที่ของโปรตีนขึ้นกับขนาดของรูพรุน

ของเจลว่าใกล้เคียงกับขนาดโมเลกุลของโปรตีนมากน้อยเพียงใด ซึ่งขนาดรูพรุนของเจลพอลิอะคริลาไมด์นั้นแปรผกผันกับความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ในเจล นั่นคือเมื่อความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ในเจลมีมากขึ้นเจลที่ได้จะมีรูพรุนที่แคบลงและสามารถแยกโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลงได้มากขึ้น ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการแยกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุลของโปรตีนนั้นส่วนมากมักใช้เจลพอลิอะคริลาไมด์ที่มีความเข้มข้นของอะคริลาไมด์อยู่ร้อยละ 5-15 นอกจากอาศัยขนาดโมเลกุลของโปรตีนในการแยกแล้ว การที่โปรตีนจะสามารถเคลื่อนที่ไปบนเจลได้นั้นต้องอาศัยความมีประจุของโปรตีนนั้นๆ และอาศัยกระแสไฟฟ้าที่ถูกปล่อยบนสนามไฟฟ้าจากขั้วหนึ่งไปยังอีกขั้วหนึ่ง นั่นคือโปรตีนที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่มีทั้งประจุบวกและลบต่างกันไปทำให้โปรตีนแต่ละชนิดมีประจุที่แตกต่างกัน ดังนั้นโปรตีนแต่ละชนิดที่มีประจุต่างกันนั้นจะใช้เวลาเคลื่อนที่บนสนามไฟฟ้าจากขั้วหนึ่งไปยังขั้วไฟฟ้าตรงกันข้ามได้ต่างกัน ทั้งนี้การเคลื่อนตัวของโปรตีนไปบนเจลนั้นต้องอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ (non-dissociating buffer หรือ non-denaturing buffer) เช่น ทริสคลอไรด์(Tris/HCl)

สารเคมีสำคัญในการเกิดโพลีเมอร์ของเจลพอลิอะคริลาไมด์คือไลคโตรฟอริซิส(PAGE)

ได้แก่

1. อะคริลาไมด์ (Acrylamide)
2. N,N'-เมทิลีน บิสอะคริลาไมด์ (N,N'-methylene bisacrylamide หรือบิสอะคริลาไมด์)
3. เทตระเมทิลีนไดอะมีน (Tetramethylenediamine, TEMED) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา
4. แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (Ammonium persulfate) เป็นตัวเริ่มต้น
5. บัฟเฟอร์ (Tris-Buffer)

ร้อยละของปริมาณอะคริลาไมด์ (%)	ขนาดรูพรุน (A°)	ขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่แยกได้
3	85	100-1,000
7.5	50	10-100
30	20	0.2-2

ตารางที่ 1 แสดงร้อยละของปริมาณอะคริลาไมด์และขนาดของโมเลกุลของโปรตีนที่สามารถแยกได้

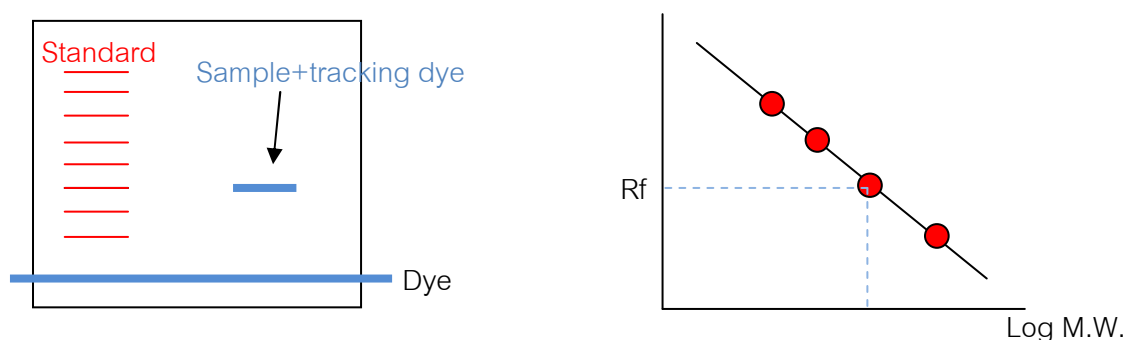
สามารถเตรียมแผ่นเจลได้ 2 แบบ ได้แก่

1. แบบที่มีความเข้มข้นของอะครีลาไมด์เท่ากันทั่วทั้งแผ่น
2. แบบที่มีความเข้มข้นของปริมาณอะครีลาไมด์ไม่เท่ากันทั่วทั้งแผ่น (gradient gel)

ในการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE นั้นสารละลายโปรตีนจะถูกทำให้เสียสภาพด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ถึง 5 นาที ในสารละลายที่มีปริมาณ SDS และมีสารประเภทไทออล (thiol) เป็นองค์ประกอบ เช่น 2-mercaptoethanol เพื่อทำลายพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีน ซึ่งในสภาวะนี้โปรตีนส่วนมากจะเกาะกับ SDS ในสัดส่วนคงที่

จากนั้นนำส่วนผสมของโปรตีน (โปรตีนตัวอย่างผสมกับสีย้อมที่จะสามารถทำให้เห็นโปรตีนเคลื่อนที่ไปยังตำแหน่งใดบนเจล) แต่ละตัวอย่างใส่ลงบนเจลแล้วนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ใช้โปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลเป็นตัวเทียบเคียงในการแยกด้วยวิธี SDS-PAGE นั้นอาศัยความแตกต่างของขนาดโปรตีนเพียงอย่างเดียว กล่าวคือ SDS จะจับกับโปรตีนในสัดส่วนคงที่ตลอดทั้งเจล นั่นคือโปรตีนที่มีขนาดใหญ่จะมี SDS เกาะอยู่ปริมาณมากทำให้โปรตีนทุกชนิดที่ถูกแยกมีความหนาแน่นของประจุเท่ากัน ดังนั้นประจุของโปรตีนจะไม่ส่งผลให้เกิดความแตกต่างจึงไม่สามารถแยกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างของประจุได้ในวิธีการนี้

การตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่แยกได้นั้นต้องอาศัยการคำนวณจากกราฟมาตรฐานระหว่างค่า \log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนกับระยะทางที่โปรตีนมาตรฐานนั้นเคลื่อนที่ไปบนเจล ซึ่งกราฟนี้จะมีความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรง ดังนั้นเมื่อทราบระยะทางที่โปรตีนที่ถูกแยกได้นั้นเคลื่อนที่ไปบนเจลแล้วจะสามารถอ่านน้ำหนักโมเลกุลได้จากกราฟเส้นตรงนั้น ดังแสดงในภาพ

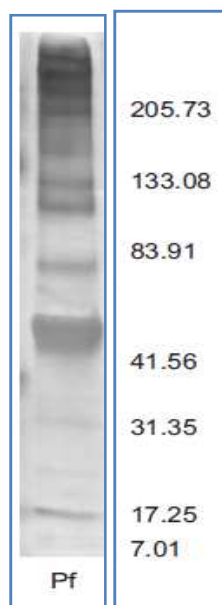


ภาพที่ 7 แสดงการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธี PAGE

จากภาพที่ 7 ด้านซ้ายคือลักษณะของเจลหลังจากทำปฏิกิริยาแล้ว แถบด้านซ้ายที่เห็นคือ โปรตีนมาตรฐาน ส่วนแถบสีน้ำเงินด้านขวาคือแถบของโปรตีนที่แยกออกมาซึ่งถูกย้อมติดสี ด้านขวาคือกราฟที่วาดได้จากผลของปฏิกิริยา ซึ่ง Rf คือ Relative mobility หรือ การเคลื่อนที่สัมพัทธ์ ได้จากการนำระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้ไปหาระยะทางที่ Dye เคลื่อนที่ได้

งานวิจัยเกี่ยวกับพิษของปลากระเบนที่อาศัยเทคนิค SDS-PAGE มีเผยแพร่ออกมาอย่างต่อเนื่องแต่มีไม่มากนัก เนื่องจากการวิจัยเกี่ยวกับพิษของปลากระเบนต้องอาศัยความเชี่ยวชาญและความพยายามอย่างหนักเพื่อให้ได้ตัวอย่างปริมาณเพียงพอต่อการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ อีกทั้งความไวต่อการแปรสภาพของพิษปลากระเบนยังเป็นอุปสรรคสำคัญต่อการวิจัยเกี่ยวกับพิษของปลากระเบนอีกด้วย

นักวิจัยเกี่ยวกับเรื่องของพิษปลากระเบนส่วนมากเลือกใช้วิธีการ SDS-PAGE เพื่อศึกษาหาข้อมูลพื้นฐานของพิษปลากระเบนว่าประกอบด้วยโปรตีนชนิดใดได้บ้าง ส่วนมากใช้เจลอะคริลาไมด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 12 และย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue เพื่อระบุตำแหน่งที่โปรตีนเคลื่อนไปถึง

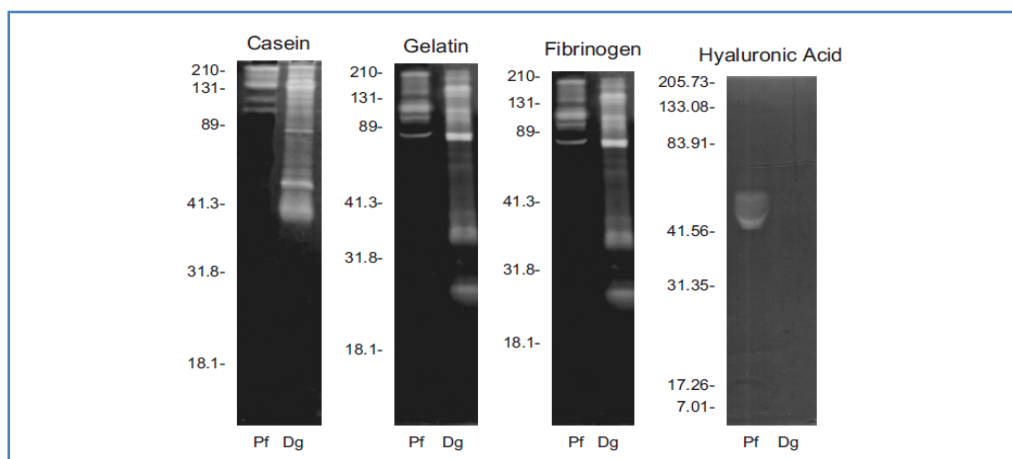


ภาพที่ 8 แสดงผลการทดสอบพิษของปลากระเบนสายพันธุ์ *Potamotrygon falkneri* ที่จับได้ บริเวณแม่น้ำของประเทศบราซิล

ที่มา: Barbaro et al.(2007)

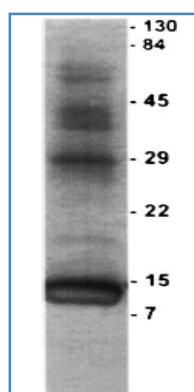
จากการรวบรวมงานวิจัยต่างๆที่เกี่ยวกับการวิเคราะห์พิษของปลากะเบนจากวิธีการ SDS-PAGE ที่ผ่านมาสามารถนำมาเปรียบเทียบได้ดังต่อไปนี้

1. ผลของการทดสอบพิษของปลากะเบนสายพันธุ์ *Potamotrygon falkneri* โดยวิธีการ SDS-PAGE



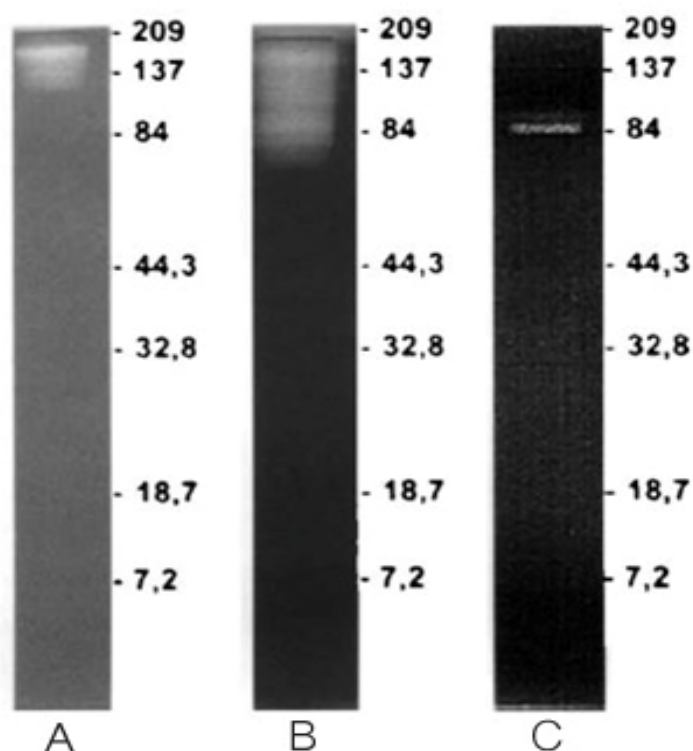
ภาพที่ 9 แสดงผลของการทดสอบพิษของปลากะเบน *Potamotrygon falkneri* และ *Dasyatis guttata* ในประเทศบราซิล โดยวิธี SDS-PAGE ที่ใช้ casein gelatin fibrinogen และ hyaluronic acid เป็น substrate

ที่มา: Barbaro et al.(2007)



ภาพที่ 10 แสดงผลการทดสอบพิษของปลากะเบน *Potamotrygon falkneri* ที่พบในประเทศเม็กซิโก

ที่มา: Hadded Jr. et al.(2004)



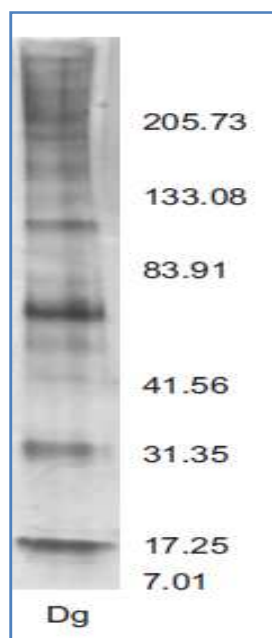
ภาพที่ 11 แสดงผลของการทดสอบพิษปลากระเบน *Potamotrygon falkneri* ที่พบในประเทศเม็กซิโกโดยใช้ casein(A) gelatin(B) และ hyaluronic acid(C) เป็น substrate

ที่มา: Hadded Jr. et al.(2004)

จากภาพที่ 8 พบว่ามีแถบของโปรตีนที่เห็นจางตั้งแต่ 43-65 kDa และมีแถบที่ชัดเจนที่ 22 kDa และที่ 18 kDa ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบเพิ่มเติมถึงการออกฤทธิ์ โดยใช้ casein gelatin fibrinogen และ hyaluronic acid เป็น substrate ดังแสดงในภาพที่ 9 ก็พบว่าแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 83 kDa ขึ้นไปนั้นออกฤทธิ์ caseinolytic gelatinolytic และ fibrinolytic ส่วนแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 41-65 kDa นั้นออกฤทธิ์ hyaluronidase (Barbaro et al., 2007) ส่วนภาพที่ 3 ซึ่งแสดงผลของการทดสอบพิษปลากระเบน *Potamotrygon falkneri* ที่พบในประเทศเม็กซิโกนั้นพบว่ามีแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ 15-130 kDa เป็นแถบจาง และเห็นแถบชัดเจนที่แถบโมเลกุล 12 kDa และเมื่อนำพิษของปลากระเบนนั้นมาทดสอบเพิ่มเติมในภาพที่ 4 โดยใช้ casein gelatin และ hyaluronic acid เป็น substrate พบว่า โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 80-100 kDa ขึ้นไปออกฤทธิ์ caseinolytic และ gelatinolytic ส่วนโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ 84 kDa นั้นออกฤทธิ์ hyaluronic acid (Hadded et al., 2004)

สรุปได้ว่า พิษของปลากะเบน *Potamotrygon falkneri* นี้ไม่ว่าจะเป็นปลาที่จับได้จากแม่น้ำของประเทศบราซิลหรือเม็กซิโกก็ตาม ก็จะได้ผลการทดสอบจากวิธีการ SDS-PAGE คล้ายคลึงกันในแง่ของการออกฤทธิ์ นั่นคือพิษของปลากะเบนชนิดนี้มีเอนไซม์โปรตีนที่ออกฤทธิ์ caseinolytic gelatinolytic และ hyaluronidase คล้ายคลึงกัน ซึ่งจากรายงานของการได้รับบาดเจ็บจากปลากะเบนสายพันธุ์นี้ที่ผ่านมาทั้งในประเทศบราซิลและเม็กซิโกแสดงว่าการได้รับบาดเจ็บจากปลากะเบนนี้จะได้รับความเจ็บปวดมาก บวมบริเวณแผล เกิดเนื้อตาย และบางครั้งพบว่ามิใช่ อาเจียน ตัวเย็น และมีเหงื่อออก

2. ผลของการทดสอบพิษของปลากะเบนสายพันธุ์ *Dasyatis guttata* โดยวิธีการ SDS-PAGE



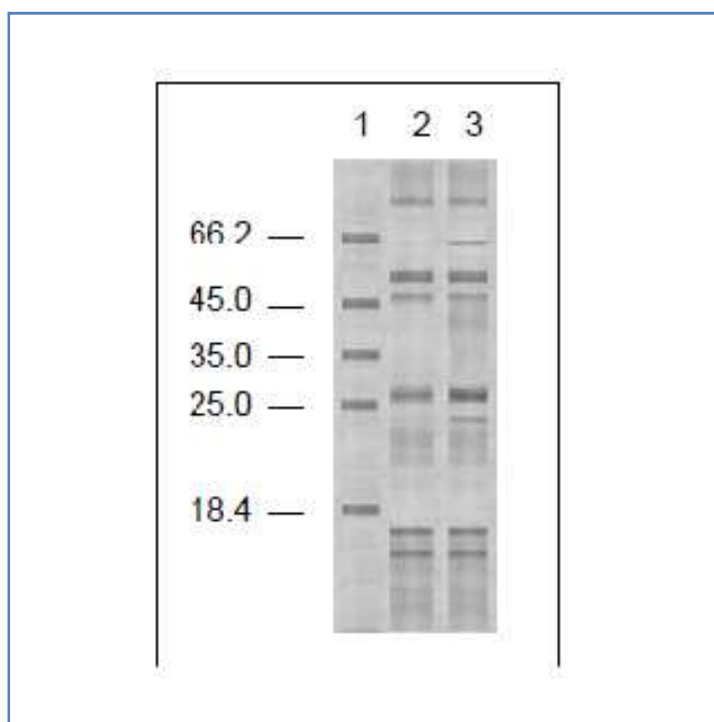
ภาพที่ 12 แสดงผลของการทดสอบพิษปลากะเบน *Dasyatis guttata*

ที่มา: Barbaro et al.(2007)

จากภาพที่ 11 แสดงแถบโปรตีนชัดเจนที่น้ำหนักโมเลกุล 18 kDa และ 84 kDa ขึ้นไป และจากภาพที่ 12 ที่ศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้ casein gelatin fibrinogen และ hyaluronic acid เป็น substrate พบว่า โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 83 kDa ขึ้นไปและที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 60 kDa นั้นออกฤทธิ์ caseinolytic gelatinolytic และ fibrinolytic แต่ไม่มีโปรตีนส่วนใดเลยที่ออกฤทธิ์

hyaluronidase และจากรายงานที่ผ่านมา ผู้ได้รับบาดเจ็บจากปลากระเบนสายพันธุ์นี้จะได้รับความเจ็บปวดรุนแรง และเกิดการบวมที่บริเวณแผลแต่ไม่พบว่าเกิดเนื้อตายที่แผล (Barbaro et al., 2007)

3. ผลของการทดสอบพิษของปลากระเบนสายพันธุ์ *Potamotrygon scobina* และ *Potamotrygon orbignyi* โดยวิธีการ SDS-PAGE



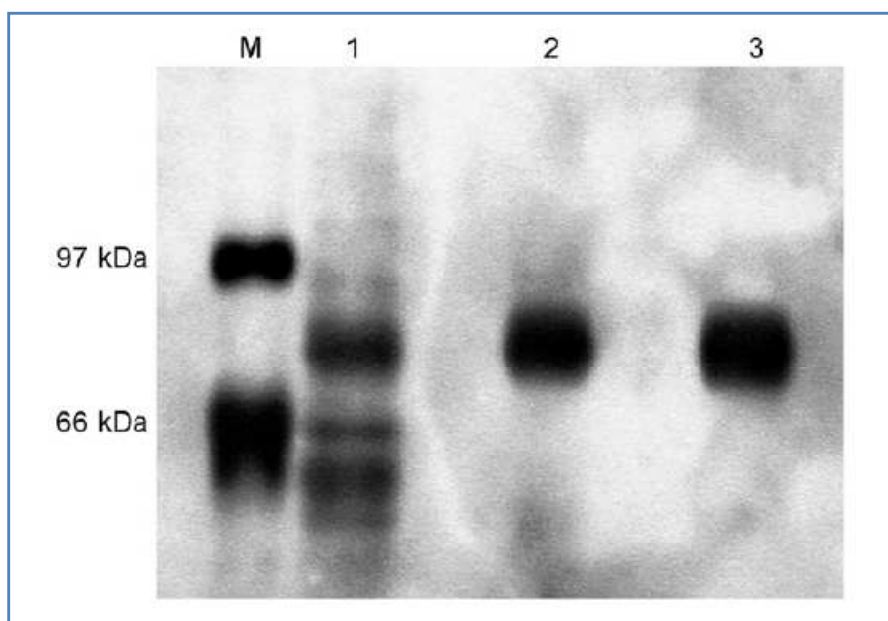
ภาพที่ 13 แสดงผลการทดสอบพิษของปลากระเบน *Potamotrygon orbignyi* (2) และ *Potamotrygon scobina*(3) โดยวิธีการ SDS-PAGE

ที่มา: Magalhães et al.(2006)

พบว่าพิษของปลากระเบนทั้ง 2 ชนิดนี้มีรูปแบบคล้ายคลึงกันยกเว้นแถบโปรตีนที่เห็นเด่นขึ้นมาแตกต่างกันที่น้ำหนักโมเลกุล 66.2 kDa และที่น้ำหนักโมเลกุล 25 kDa ซึ่งพบในปลากระเบนสายพันธุ์ *Potamotrygon scobina* เท่านั้น แต่พิษจากปลากระเบนทั้ง 2 ชนิดนี้ออกฤทธิ์คล้ายกันนั่นคือ ทำให้เกิดความเจ็บปวดอย่างรุนแรง เกิดการบวมที่แผลและเกิดเนื้อตาย และจะมีอาการรุนแรงมากยิ่งขึ้นเมื่อพิษรวมกับเมือกที่บริเวณรอบหาง (Magalhães et al., 2006) และต่อมามีผู้ศึกษาถึงพิษของปลากระเบน *Potamotrygon orbignyi* เพิ่มเติมทำให้พบว่ามีโปรตีนที่มี

น้ำหนักโมเลกุล 1001.52 Da อยู่ในพิษของปลาดกระเบนสายพันธุ์นี้ซึ่งออกฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดตีบอย่างรุนแรง (Conceição et al., 2006) และพบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 2006.09 Da ที่ออกฤทธิ์เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่เกิดจากการได้รับบาดเจ็บจากเงี่ยงพิษปลาดกระเบน (Conceição et al., 2009)

4. ผลของการทดสอบพิษของปลาดกระเบนสายพันธุ์ *Potamotrygon motoro* โดยวิธีการ SDS-PAGE



ภาพที่ 14 แสดงผลของการศึกษาพิษปลาดกระเบน *Potamotrygon motoro* จาก crude venom extract(1) purified enzyme หลังจากผ่านการกรองโดยใช้ Sephacryl S-100 chromatography(2) และ purified enzyme หลังจากผ่านการกรองโดยใช้ SP-Sepharose chromatography

ที่มา: Magalhães et al.(2006)

จากภาพที่ 14 พบว่าโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบในพิษของปลาดกระเบน *Potamotrygon motoro* มีมากมาย แต่เมื่อทำให้โปรตีนนั้นบริสุทธิ์ขึ้นโดยการใช้ chromatography พบว่ามีโปรตีนที่ออกฤทธิ์ hyaluronidase ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 79 kDa โดยพิษของปลาดกระเบนชนิดนี้ออกฤทธิ์ก่อให้เกิดการเจ็บปวดมาก บวมบริเวณแผล เกิดเนื้อตาย และบางรายมีไข้ ตัวเย็น เหงื่อออกได้ (Magalhães et al., 2008)

2.3 การศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเงี่ยงพิษปลากระเบน

การศึกษาเพื่อทราบถึงลักษณะของต่อมพิษที่อยู่ในเงี่ยงปลากระเบนจะต้องอาศัยหลักการทางพยาธิวิทยา ที่ผ่านมามีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับจุลกายวิภาคของเงี่ยงพิษปลากระเบนหลายสายพันธุ์ ทั้งปลากระเบนน้ำจืดและปลากระเบนน้ำเค็ม

2.3.1 การเก็บตัวอย่างเงี่ยงพิษปลากระเบนและการศึกษาโครงสร้างทั่วไป

งานวิจัยที่เกี่ยวกับลักษณะทางจุลกายวิภาคของเงี่ยงพิษปลากระเบนที่เปรียบเทียบลักษณะของเงี่ยงพิษปลากระเบนหลากหลายสายพันธุ์มากที่สุดนั้นเผยแพร่ในปี 2010 คือมีการเก็บตัวอย่างเงี่ยงพิษของปลากระเบน 5 สายพันธุ์ ในน่านน้ำทางตอนเหนือของอ่าวเปอร์เซียและโอมาน โดยสายพันธุ์ของปลากระเบนที่นำมาศึกษา ได้แก่ *Himantura walga* (Dwarf whipray), *Himantura SP.1*, *Pastinachus sephen* (Cowtail stingray) ซึ่งสามสายพันธุ์นี้อยู่ในกลุ่ม Dasyatidae อีกสองสายพันธุ์ได้แก่ *Aetobatus flagellum* (Long headed eagle ray) อยู่ในกลุ่ม Myliobatidae และ *Gymnura poecilura* (Long-tail butterfly ray) อยู่ในครอบครัว Gymnura นักวิจัยตัดเงี่ยงของปลากระเบนออกมาโดยเลือกเงี่ยงที่สมบูรณ์ที่สุดดังภาพที่ 15 แล้วนำเงี่ยงไปเก็บโดยแช่ไว้ในสารละลายฟอर्मัลดีไฮด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ทันที หลังจากผ่านไป 48 ชั่วโมงจึงเปลี่ยนมาเก็บในสารละลายฟอर्मัลดีไฮด์ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ แล้วส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการทางพยาธิวิทยา ณ คณะสัตวแพทย์แห่งมหาวิทยาลัยชิราซ ณ ประเทศบราซิล เพื่อปฏิบัติการขั้นตอนต่อไป นั่นคือ มีการตัดแบ่งตัวอย่างเงี่ยงของปลากระเบนที่เก็บมาได้นั้นออกเป็นสามส่วน ได้แก่ ส่วนปลาย ส่วนกลาง และส่วนฐานของเงี่ยง หลังจากนั้นใช้สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์เป็นสารที่ใช้สำหรับขจัดแคลเซียมออกจากเงี่ยง โดยแช่ตัวอย่างเงี่ยงที่ถูกตัดแบ่งออกเป็นสามส่วนนั้นแล้วมาแช่ไว้ในสารละลาย EDTA ที่เตรียมไว้จนกว่าแคลเซียมในตัวอย่างนั้นถูกย่อยสลายหมดไป เมื่อมั่นใจว่าแคลเซียมถูกขจัดออกแล้ว นำตัวอย่างเงี่ยงนั้นมาตัดแบ่งเป็นชิ้นบางขนาด 6 ไมโครเมตร เพื่อนำไปศึกษาต่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเบื้องต้นก็นำชิ้นส่วนที่ถูกตัดแบ่งนั้นมาย้อมสี Hematoxylin-Eosin แล้วศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์คัดหลั่งพิเศษ (Specialized secretory cells) ของปลากระเบนสายพันธุ์ *H. walga* นั้นอยู่ใน epidermis รอบเงี่ยงทั้งเงี่ยงโดยส่วนมากจะอยู่บริเวณด้านล่างใต้เงี่ยงและในร่องของเงี่ยงที่อยู่ทางด้านข้าง เซลล์คัดหลั่งพิเศษนี้มีรูปร่างทรงกระบอกและมีนิวเคลียสรูปร่างกลม พบเวสิเคิลรูปร่างกระสวยอยู่ในไซโตพลาสซึม ส่วนที่เป็นเยื่อบุผิวประกอบด้วยเซลล์ที่มีลักษณะทรงกระบอกในชั้นฐาน และเซลล์ลักษณะกลมในชั้นนอก พบว่าไซโตพลาสซึมเต็มไปด้วยเซลล์ต่อมที่ทำหน้าที่คัดหลั่งและมีการยึดกันระหว่างเซลล์อย่างหนาแน่นแข็งแรง



ภาพที่ 15 แสดงลักษณะเงี่ยงของปลากระเบนที่มีจำนวนมากกว่า 1 เงี่ยง จะเห็นว่าเงี่ยงทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกัน นักวิจัยเลือกเงี่ยงที่มีความสมบูรณ์นั่นคือเงี่ยงที่มีเยื่อหุ้มโดยรอบนั่นคือเงี่ยงที่งอกใหม่อยู่ทางด้านล่างของเงี่ยงเก่า

ที่มา: Pedroso et al.(2007)

ในปลากระเบนสายพันธุ์ *Himantura SP.1* พบเซลล์ค้ำหลังพิเศษในด้านล่างก่อนไปทางด้านข้างของเงี่ยง และทางด้านบนก่อนไปทางด้านล่างของเงี่ยง ไม่พบเซลล์ค้ำหลังพิเศษที่บริเวณด้านบนของเงี่ยง เซลล์ค้ำหลังพิเศษที่พบในปลากระเบนสายพันธุ์นี้มีลักษณะทรงกระบอกและมีนิวเคลียสรูปร่างกลม ในไซโตพลาสซึมเต็มไปด้วยเวสิเคิล และพบว่าส่วนปลายของเงี่ยงมีชั้นของเซลล์ค้ำหลังพิเศษนี้ไม่สมบูรณ์เท่ากับในส่วนฐานและส่วนกลางของเงี่ยง

เซลล์ค้ำหลังพิเศษของปลากระเบนสายพันธุ์ *P.sephen* อยู่บริเวณด้านล่างก่อนไปทางด้านข้างและด้านบนก่อนไปทางด้านข้างของเงี่ยง อยู่ใต้ชั้นของเซลล์ชั้นเยื่อบุผิวโดยที่เซลล์ค้ำหลังพิเศษของปลากระเบนสายพันธุ์นี้มีรูปร่างกลมหรือทรงกระบอกมีนิวเคลียสรูปไข่ และติดอยู่กับเซลล์อื่นโดย desmosomes ซึ่งเซลล์อื่นๆที่อยู่ในชั้นเยื่อบุผิวมีลักษณะเป็นเซลล์ต่อมรูปร่างกลม และพบว่าเซลล์เมือกขนาดใหญ่อยู่ในเยื่อบุผิวด้วย

ส่วนปลากระเบนสองสายพันธุ์ที่เหลือ ได้แก่ สายพันธุ์ *Aetobatus flagellum* และ *Gymnura poecilura* นั้นไม่พบเซลล์ค้ำหลังพิเศษอยู่เลย (Dehghani et al., 2010)

งานวิจัยเกี่ยวกับลักษณะทางจุลกายวิภาคของเงี่ยงปลากระเบนในประเทศบราซิลงานหนึ่งได้เปรียบเทียบลักษณะของเงี่ยงปลากระเบนตามสายพันธุ์ที่แตกต่างกันด้านสภาพแวดล้อมของถิ่นที่อยู่อาศัย นั่นคือศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางจุลกายวิภาคของเงี่ยงปลากระเบนระหว่างปลากระเบนทะเลและปลากระเบนน้ำจืด ซึ่งปลากระเบนทะเลที่ถูกจับมาเพื่อเก็บตัวอย่างได้แก่ ปลากระเบนสายพันธุ์ *Dasyatis guttata* และ *Aetobatus narinari* โดยจับได้จาก Ubatuba ประเทศบราซิล ปลากระเบนน้ำจืดที่ถูกจับมาเพื่อเก็บตัวอย่างได้แก่ ปลากระเบนสายพันธุ์ *Potamotrygon falkneri* จาก Três Lagoas สายพันธุ์ *Potamotrygon orbignyi* จาก Colares และสายพันธุ์ *Potamotrygon leopodi* จาก Altumira ประเทศบราซิล ผู้วิจัยตัดเงี่ยงของปลากระเบนมาเก็บไว้โดยการแช่ในสารที่เรียกว่า Karnowsky fixative ทันทีและส่งตัวอย่างนั้นไปยังห้องปฏิบัติการของ Cellular Biology of Institute Butantan ซึ่งหลังจากแช่ตัวอย่างในสาร Karnowsky fixative เป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้วต้องนำตัวอย่างเงี่ยงออกมาขจัดแคลเซียมออกโดยนำตัวอย่างไปแช่ใน EDTA ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อขจัดแคลเซียมออกแล้วนำตัวอย่างมาตัดแบ่งเป็นสามส่วนใหญ่ ได้แก่ ส่วนฐาน ส่วนกลาง และส่วนปลาย แล้วจึงตัดแบ่งเป็นชิ้นส่วนเล็กตามขวางและย้อมสี Toluidine-fuchsin เพื่อศึกษาลักษณะทั่วไปทางจุลกายวิภาคของเงี่ยง นอกจากนี้ผู้วิจัยยังนำส่วนของหนังทั้งด้านบนและด้านล่างของปลากระเบนสายพันธุ์ *Potamotrygon falkneri* จากบริเวณตัวและหางของปลากระเบนมายืดด้วยพาราฟินลงบนกระจกสไลด์เพื่อศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคด้วยเช่นกัน ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเซลล์คัดหลังพิเศษที่พบในเงี่ยงของปลากระเบนสายพันธุ์ *Dasyatis guttata* นั้นอยู่ที่เยื่อบุผิวโดยรอบทั่วทั้งเงี่ยงรวมทั้งในร่องด้านข้างของเงี่ยงด้วยเช่นกัน ส่วนของepidermisประกอบด้วยเซลล์ที่มีลักษณะกลมและไนโทพลาสซึมเต็มไปด้วยเซลล์ต่อมที่ทำหน้าที่คัดหลังสาเช่นเดียวกับผลจากการศึกษาทางจุลกายวิภาคของเงี่ยงปลากระเบนสายพันธุ์ *Aetobatus narinari* นั่นคือพบเซลล์คัดหลังพิเศษอยู่ในร่องของเงี่ยงเช่นกัน ซึ่งเซลล์คัดหลังพิเศษนี้มีรูปร่างเป็นรูปไข่และรวมตัวกันอยู่อย่างไม่มีรูปแบบที่แน่นอน ทำให้ง่ายต่อการกระจายจากชั้นฐานของชั้นเซลล์เยื่อบุผิวไปยังชั้นนอกสุด เซลล์คัดหลังนี้มีไนโทพลาสซึมที่เต็มไปด้วยเวสิเคิลรูปร่างหลากหลายที่ประกอบไปด้วยสิ่งที่มีลักษณะเป็นเส้นใย

ผลการศึกษาทางจุลกายวิภาคในปลากระเบนสายพันธุ์ *Potamotrygon falkneri* มีความคล้ายคลึงกันกับผลการศึกษาในเงี่ยงของปลากระเบนสายพันธุ์ *Potamotrygon* คือ พบเซลล์คัดหลังพิเศษอยู่ในชั้นของเยื่อบุผิวรอบเงี่ยง ซึ่งเซลล์epidermisชั้นฐานและชั้นนอกประกอบด้วยรูปร่างกลมเช่นกันกับเซลล์เยื่อบุผิวของปลาทะเล มีไนโทพลาสซึมที่เต็มไปด้วยเซลล์ต่อมที่ทำหน้าที่คัดหลัง พบชั้นของเซลล์คัดหลังพิเศษมากที่บริเวณร่องของเงี่ยงที่อยู่ทางด้านข้างเยื้องที่ทาง

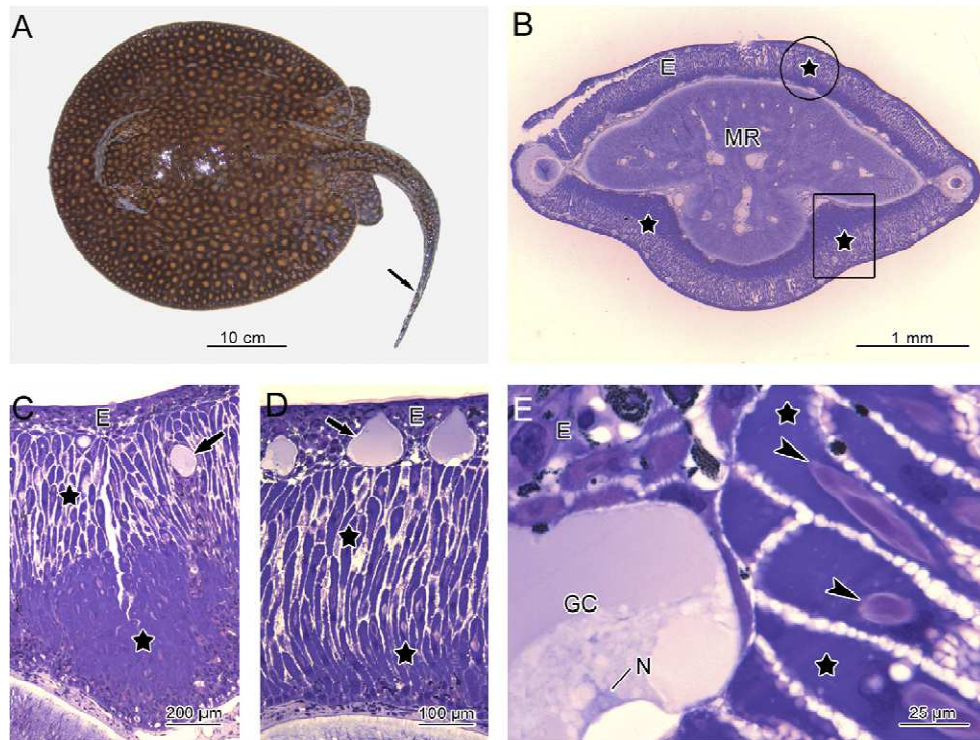
ด้านข้าง อีกทั้งยังพบว่าเซลล์มีเวลิเคิลรูปทรงกระสวย ซึ่งลักษณะที่พบเวลิเคิลรูปทรงกระสวยในไฮโดพลาสซึมนี้เป็นลักษณะที่พบได้ในการศึกษาทางจุลกายวิภาคในเงี่ยงของปลากระเบนสายพันธุ์ที่พบในทะเลเช่นเดียวกัน เซลล์คัดหลังพิเศษที่พบในส่วนนอกของเยื่อบุผิวมีลักษณะเป็นขบวนการที่พบซึ่งจะต่อเนื่องไปกับบริเวณด้านนอก นอกจากนี้จะพบเซลล์คัดหลังพิเศษในเงี่ยงของปลากระเบนแล้วยังพบเซลล์คัดหลังพิเศษในส่วนอื่นของร่างกายปลากระเบนอีกด้วย นั่นคือพบเซลล์คัดหลังพิเศษอยู่ในเยื่อบุผิวที่ส่วนอื่นโดยเฉพาะด้านบนของลำตัวปลากระเบนซึ่งพบว่ามีความมากอีกด้วย(ผลการศึกษาไม่แสดง) (Pedroso et al., 2007)

2.3.2 การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของเงี่ยงทางพยาธิวิทยาโดยการย้อมสีพิเศษ (histochemistry)

การนำตัวอย่างจากเงี่ยงปลากระเบนที่ตัดเป็นชิ้นเล็กแล้วมาย้อมสีจะทำให้เห็นส่วนต่างๆ ของเงี่ยงและประเมินแยกชนิดของเซลล์ในเงี่ยงได้ โดยงานวิจัยที่ศึกษาถึงลักษณะทางจุลกายวิภาคของเงี่ยงพิษปลากระเบนส่วนมากย้อมด้วยสี Periodic-acid Schiff(PAS) และ Alcian blue pH 2.5 เพื่อประเมินแยกชนิดของเซลล์โดยอาศัยความเป็นกลางและเป็นกรดของ mucosubstances

การศึกษาในปลากระเบน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Himantura walga*(Dwarf whipray) *Himantura SP.1*, *Pastinachus sephen*(Cowtail stingray), *Aetobatus flagellum*(Long headed eagle ray) และ *Gymnura poecilura*(Long-tail butterfly ray) แสดงให้เห็นว่าไฮโดพลาสซึมของเซลล์คัดหลังพิเศษย้อมไม่ติดสีของ PAS และ Alcian blue แต่แวกิวโอลของเซลล์คัดหลังติดสีทั้ง PAS และ Alcian blue นอกจากนี้ยังมีmucus cellที่ย้อมติดสีทั้ง PAS และ Alcian blue เช่นเดียวกัน (Dehghani et al., 2010)

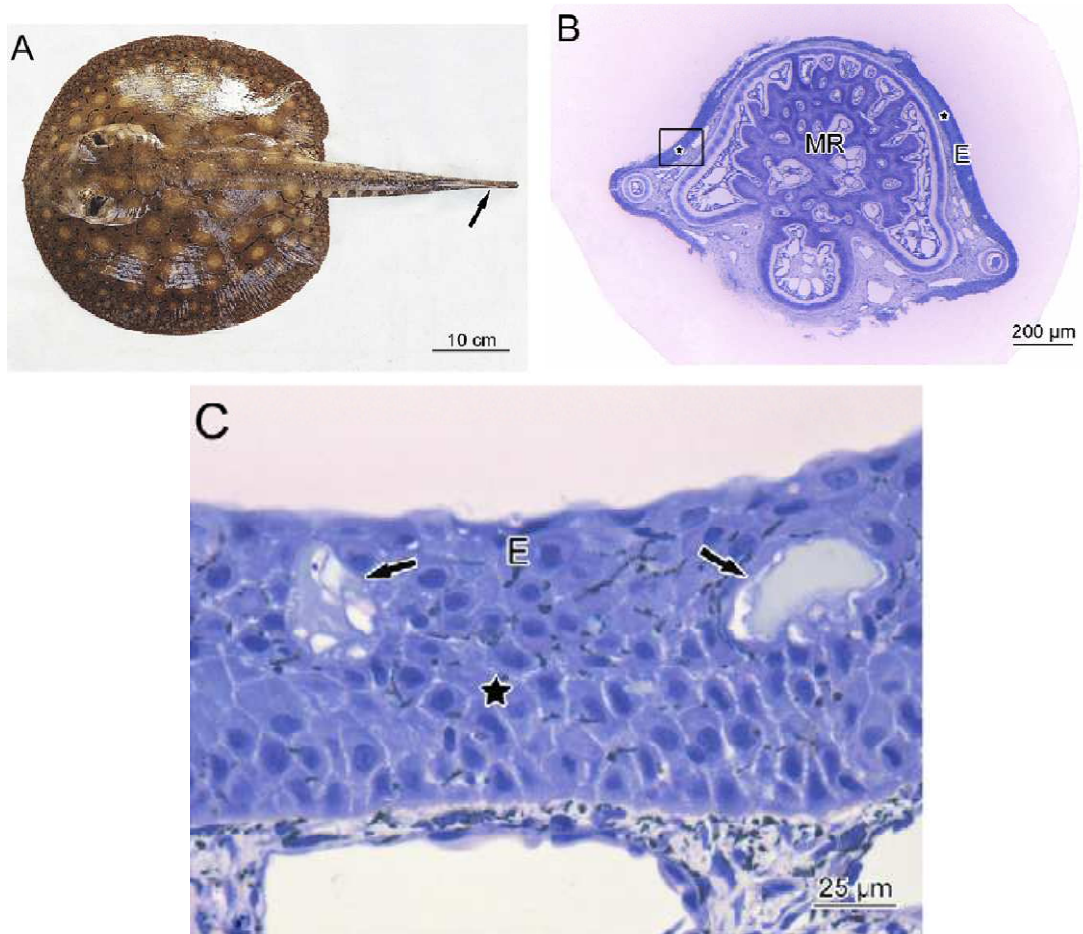
การศึกษาเซลล์คัดหลังพิเศษที่พบในปลากระเบนสายพันธุ์ *Dasyatis Sabinar* พบว่าโครงสร้างที่คล้ายไมโครทิวบูลที่พบในการศึกษาโดยการย้อมสี PAS มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่าไมโครทิวบูลที่พบในไฮโดพลาสซึมของเซลล์ปกติ และมีแนวโน้มว่าจะเป็นไมโครทิวบูลที่มีส่วนประกอบเป็นโปรตีนเชิงซ้อนของพิษ ซึ่งอาจต้องเก็บไว้แยกส่วนจากไฮโดพลาสซึม แต่ยังไม่ทราบถึงหน้าที่ทางเคมีของโครงสร้างที่เห็นนี้อย่างแน่ชัด (Smith et al., 1974, 1981)



ภาพที่ 16 แสดงผลของการศึกษาทางจุลกายวิภาคของเหงือกปลากระเบนสายพันธุ์ *Potamotrygon falkneri*

ที่มา: Pedroso et al.(2007)

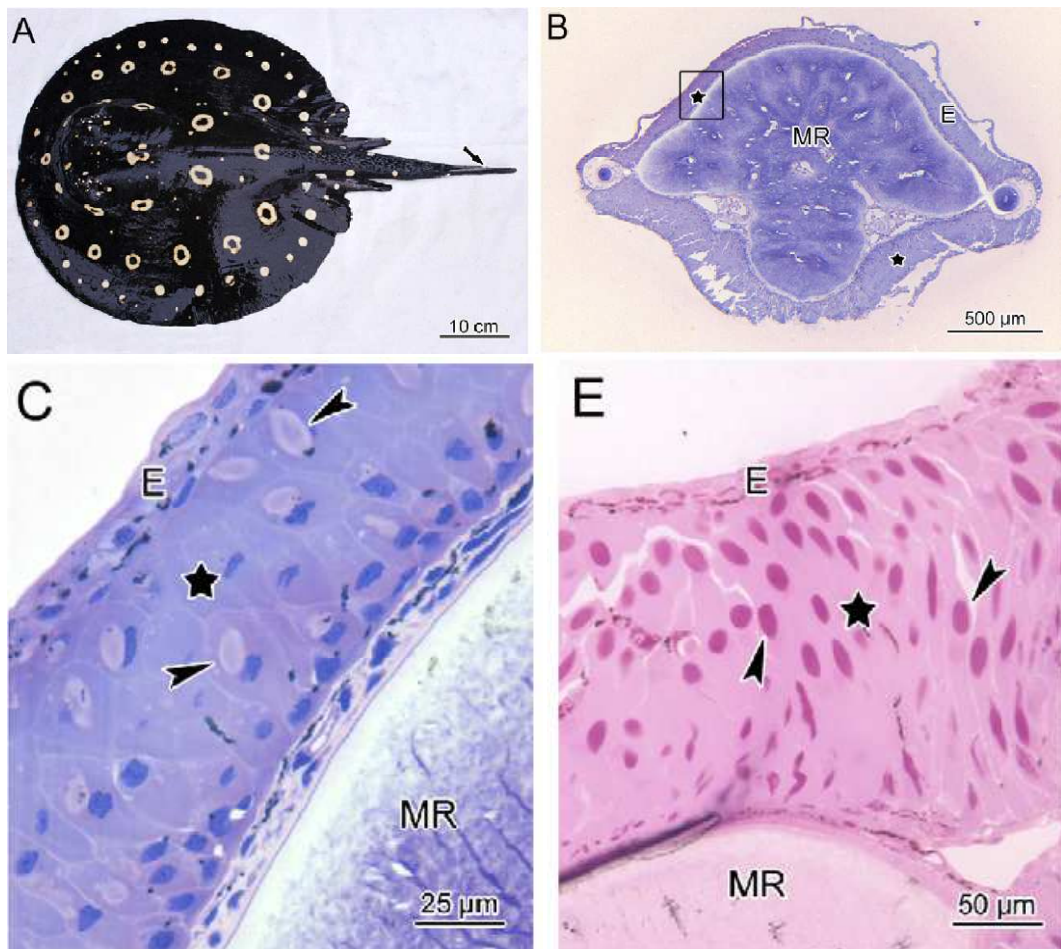
(A) คือภาพของปลากระเบนที่ถูกนำมาเป็นตัวอย่าง (B) คือภาพตัดขวางของเหงือกปลากระเบนที่ถูกย้อมด้วยสี Toluidine blue-fuchsin แสดงเซลล์คัดหลังพิเศษชนิดพิเศษ (*) ในเยื่อหุ้ม(E) รอบเหงือก (C) ภาพขยายส่วนของเหงือกบริเวณด้านล่างเยื่อไปทางด้านข้างจากกรอบสี่เหลี่ยมในภาพ (B) ที่ย้อมด้วยสี Toluidine blue-fuchsin แสดงให้เห็นเซลล์คัดหลังพิเศษชนิดพิเศษ (*) กระจายอยู่ในแต่ละชั้นของเยื่อหุ้มรอบเหงือกและลูกศรชี้ไปยังเซลล์ที่คาดว่าเป็นต่อมแทรกในชั้นนอกของเยื่อหุ้ม (E) (D)ภาพขยายของเยื่อหุ้มส่วนบนของเหงือกจากกรอบสี่เหลี่ยมในภาพ(B)ที่ย้อมด้วยสี Toluidine blue-fuchsin แสดงเซลล์คัดหลังพิเศษชนิดพิเศษ(*) อยู่ในชั้นต่างๆของเยื่อหุ้ม หัวลูกศรชี้ไปยังเซลล์ต่อมที่แทรกอยู่ในเซลล์เยื่อหุ้ม(E) (E)แสดงรายละเอียดของชนิดเซลล์แต่ละชนิดในเยื่อหุ้ม ที่ย้อมด้วยสี Toluidine blue-fuchsin ได้แก่ เซลล์เยื่อหุ้ม (E) เซลล์ต่อม หรือ glandular cell(GC) และเซลล์คัดหลังพิเศษชนิดพิเศษ(*) ซึ่งแยกออกโดยลักษณะที่เป็นรูปกระสวยของเวสิเคิล (หัวลูกศร) ซึ่ง N คือ นิวเคลียส



ภาพที่ 17 แสดงผลการศึกษาทางจุลกายวิภาคในเงี่ยงปลากระเบนสายพันธุ์ *Potamotrygon orbignyi*

ที่มา: Pedroso et al.(2007)

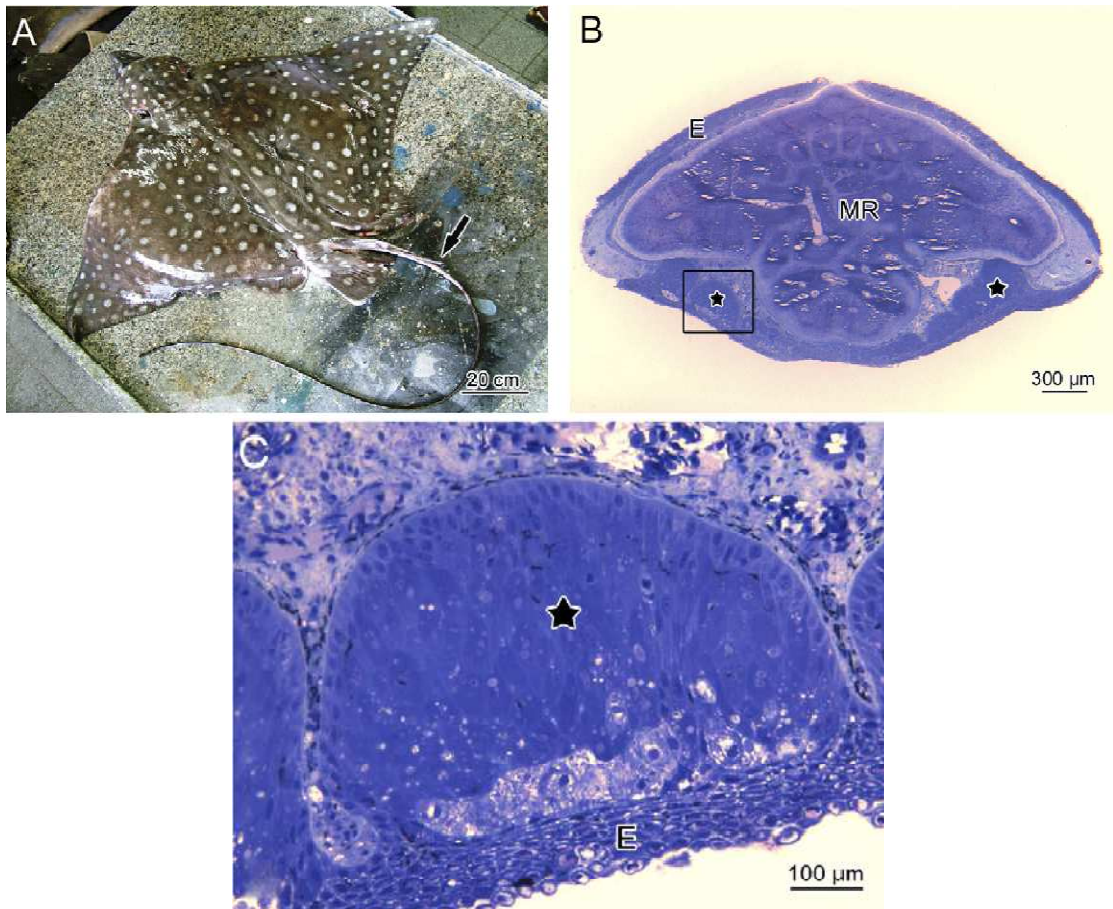
(A) คือภาพของปลากระเบนที่ถูกนำมาเป็นตัวอย่าง (B)แสดงภาพตัดขวางของเงี่ยงปลากระเบนที่ถูกย้อมด้วยสี Toluidine blue-fuchsin แสดงเซลล์ค้ำหลังพิษชนิดพิเศษ(*) ในเยื่อบุผิวบริเวณรอบเงี่ยง MR คือส่วนแข็งของเงี่ยงที่เป็นกระดูก (C)แสดงภาพขยายของเงี่ยงส่วนเยื่อบุผิวจากกรอบสี่เหลี่ยมในภาพ (B) ย้อมด้วยสี Toluidine blue-fuchsin แสดงเซลล์เยื่อบุผิว(*) และเซลล์ต่อม (ลูกศร) ส่วน E คือเยื่อบุผิว



ภาพที่ 18 แสดงผลการศึกษาทางจุลกายวิภาคในเงี่ยงปลากระเบนสายพันธุ์ *Poramotrygon leopodi*

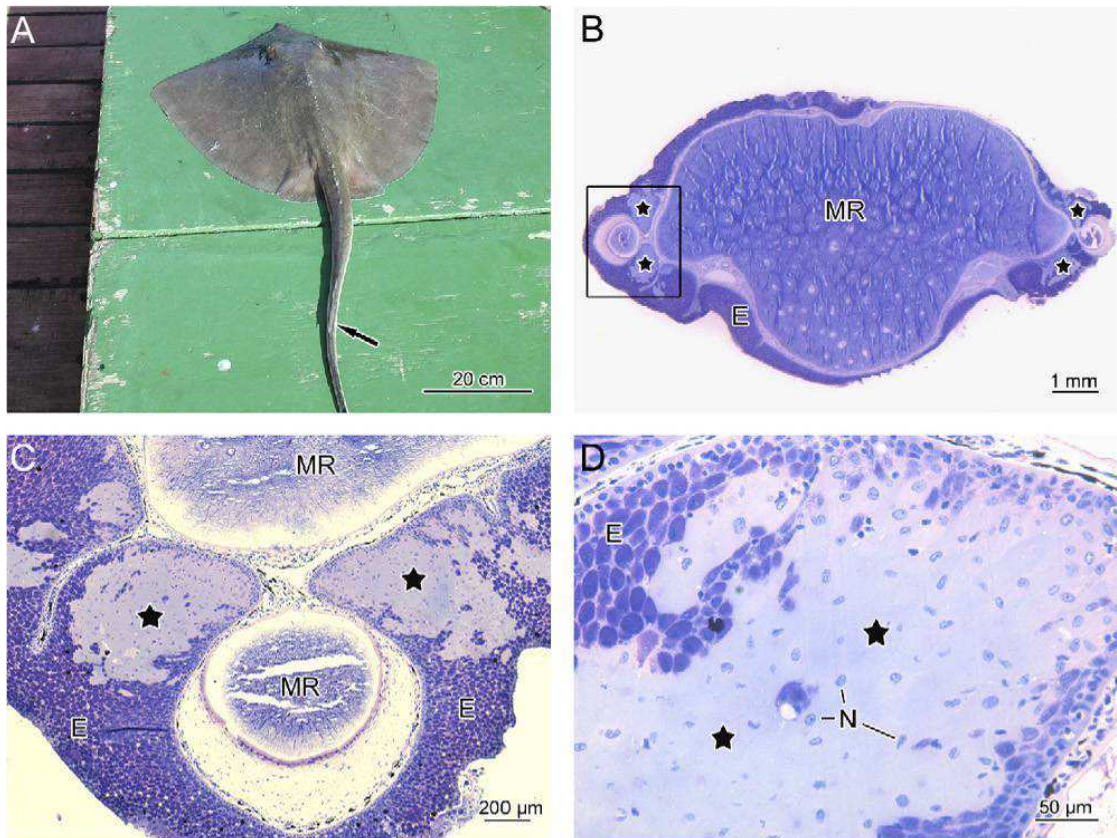
ที่มา: Pedroso et al.(2007)

(A) ภาพปลากระเบนที่ถูกนำมาเป็นตัวอย่าง (B)แสดงภาพตัดขวางของเงี่ยงที่ถูกย้อมด้วยสี Toluidine blue-fuchsin แสดงให้เห็นเซลล์ค้ำหลังพิเศษ(*) ในเยื่อบุผิว(E) ที่กระจายอยู่รอบเงี่ยง MR คือส่วนแข็งที่เป็นกระดูกแกนของเงี่ยง (C)แสดงภาพขยายของเงี่ยงส่วนของเยื่อบุผิวจากกรอบสี่เหลี่ยมในภาพ (B) ที่ถูกย้อมด้วยสี Toluidine blue-fuchsin แสดงให้เห็นเซลล์ค้ำหลังพิเศษ(*) และเวสิเคิลที่มีลักษณะเป็นกระสวย(หัวลูกศร) (E)แสดงภาพตัดขวางของเงี่ยงที่ถูกย้อมด้วยสี PAS แสดงให้เห็นว่าเซลล์เยื่อบุทั่วไป (E) ย้อมติดสีPASแต่เซลล์ค้ำหลังพิเศษพิเศษย้อมไม่ติดสี PAS ยกเว้นส่วนของเวสิเคิลรูปกระสวยภายในเซลล์ค้ำหลังพิเศษที่ย้อมติดสี PAS



ภาพที่ 19 แสดงผลการศึกษาทางจุลกายวิภาคในเงี่ยงปลากระเบนสายพันธุ์ *Aetobatus narinari* ที่มา: Pedroso et al.(2007)

(A)แสดงภาพปลากระเบนที่ถูกนำมาเป็นตัวอย่าง โดยมีลูกศรชี้ไปทางปลายเงี่ยงบนหาง
 (B)แสดงภาพตัดขวางของเงี่ยงปลากระเบนที่ย้อมด้วยสี Toluidine blue-fuchsin แสดงให้เห็นเซลล์ค้ำหลังพิษชนิดพิเศษ(*) ที่แทรกอยู่ในชั้นของเยื่อหุ้ม(E) ซึ่งตำแหน่งที่พบเซลล์ค้ำหลังพิษชนิดพิเศษในเงี่ยงปลากระเบนสายพันธุ์นี้คล้ายกับที่พบในปลากระเบนสายพันธุ์ *Dasyatis guttata*(ภาพที่ 20) MR หรือ Mineralized region คือส่วนของกระดูกแกนของเงี่ยงปลากระเบน
 (C) ภาพตัดขวางที่ขยายจากบริเวณกรอบสี่เหลี่ยมในภาพ (B) ที่ย้อมด้วยสี Toluidine blue-fuchsin แสดงเซลล์ค้ำหลังพิษชนิดพิเศษ(*) ถัดจากร่องใต้เงี่ยงค่อนไปทางด้านข้างของเงี่ยงและ E คือ Epidermis หรือเยื่อหุ้มรอบเงี่ยงนั่นเอง



ภาพที่ 20 แสดงผลการศึกษาด้านจุลกายวิภาคในเงี่ยงปลากระเบนสายพันธุ์ *Dasyatis guttata*
ที่มา: Pedroso et al.(2007)

จากภาพ (A) แสดงตัวอย่างปลากระเบนที่นำมาทำการวิจัย โดยที่ลูกศรชี้ไปยังปลายเงี่ยงบนทาง (B) คือภาพตัดขวางของเงี่ยงย้อมสี Toluidine blue-fuchsin โดยที่ดอกจัน (*) แสดงถึงเซลล์คัดหลังพิษชนิดพิเศษ (Specialized venom secretory cells) ในชั้นของหนัง(E)ถัดจากร่องใต้เงี่ยงที่ค่อนข้างโปร่ง MR หรือ Mineralized region แสดงถึงส่วนที่แข็งเป็นกระดูกแกนของเงี่ยง (C) ภาพขยายบริเวณร่องใต้เงี่ยงที่ค่อนข้างโปร่งจากกรอบสี่เหลี่ยมในภาพ (B) โดยที่ดอกจัน (*) คือ เซลล์คัดหลังพิษชนิดพิเศษ (D) ภาพขยายของเซลล์คัดหลังพิษชนิดพิเศษที่ย้อมด้วยสี Toluidine blue-fuchsin แสดงให้เห็นว่าไซโทพลาสซึมมีลักษณะใสและประกอบด้วยนิวเคลียสที่มีรูปร่างต่างกันไป (N)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

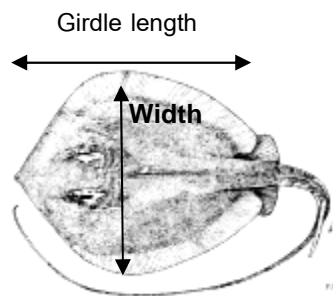
3.1 สัตว์ทดลอง

ปลากระเบนราหูที่จับจากแม่น้ำในภาคกลางของประเทศไทยจำนวน 20 ตัว

3.2 การบันทึกข้อมูลลักษณะทั่วไป

3.2.1 บันทึกข้อมูลด้านขนาดลำตัวปลากระเบนราหู ได้แก่

- ความกว้าง (Width) วัดจากขอบครีบอกด้านซ้ายจนถึงขอบครีบอกด้านขวา
- ความยาว (Total length) โดยวัดจากส่วนหัวถึงปลายสุดของหาง
- ความยาวลำตัวจากหัวจนถึงกระดูกฐานครีบท้อง (Girdle length) (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 แสดงแบบบันทึกข้อมูลทั่วไปของปลากระเบนราหู

3.2.2 บันทึกช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่าง

3.2.3 บันทึกเพศของปลากระเบนราหู ซึ่งใช้วิธีการสังเกต โดยเพศผู้จะมีแคลสเปอร์อยู่บริเวณท้ายลำตัว ใกล้รูทวาร

3.2.4 บันทึกเครื่องหมายติดตามบนเครื่องหมายติดตามตัวปลากระเบนราหู

3.3 การเก็บตัวอย่าง

3.3.1 ตัวอย่างพิษของปลากระเบนราหู

เก็บตัวอย่างพิษจากปลากระเบนราหู โดยการใช้มีดผ่าตัดขูดเยื่อหุ้มรอบเงี่ยงพิษ (ภาพที่ 22) จะได้ทั้งเยื่อหุ้มและเมือกออกมา นำสิ่งที่ได้มาละลายใน PBS pH 7.4 ด้วยปริมาตร 1 เท่าตัว แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000 g เป็นเวลา 15 นาที เก็บรักษาตัวอย่างนี้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 22 แสดงขั้นตอนการใช้มีดผ่าตัดขูดเยื่อหุ้มรอบเงี่ยงพิษของปลากะเบนราหู

3.3.2 ตัวอย่างเมือกที่บริเวณลำตัว

เก็บตัวอย่างเมือกที่บริเวณลำตัว(ยกเว้นบริเวณหางและเงี่ยง)ของปลากะเบนราหู โดยการใช้มีดผ่าตัดขูดเมือกออกมา นำสิ่งที่ได้มาละลายใน PBS pH 7.4 ด้วยปริมาตร 1 เท่าตัว แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000 g เป็นเวลา 15 นาที เก็บรักษาตัวอย่างนี้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3.3.3 ตัวอย่างเงี่ยงพิษของปลากะเบนราหู

เก็บเงี่ยงพิษปลากะเบนราหูที่มีเยื่อหุ้มเงี่ยงสมบูรณ์ โดยการตัดเงี่ยงเก็บไว้ในสารละลายฟอร์มอลดีไฮด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์(ฟอร์มอลินเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเงี่ยงออกมาใส่ลงในสารละลายฟอร์มอลดีไฮด์ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (ฟอร์มอลินเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์) แบ่งเงี่ยงออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ส่วนปลาย ส่วนกลาง และส่วนฐาน ผ่านขั้นตอนการตัดขึ้นเนื้อให้มีขนาด 6 ไมโครเมตร เพื่อนำไปย้อมสีวิเคราะห์โดยกล้องจุลทรรศน์แบบแสงสว่างต่อไป

3.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบพิษของปลากระเบนราหู

3.4.1 วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนในพิษของปลากระเบนราหู

นำตัวอย่างพิษ ข้อ 3.1 และ ตัวอย่างเมือก ข้อ 3.2 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของโปรตีนตามหลักการของ Bradford (1976) โดยใช้อัลบูมินซีรัมของโค (Bovine serum albumin หรือ BSA) เป็นมาตรฐาน วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ คำนวณความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มแสง 595 นาโนเมตร ของตัวอย่างพิษเปรียบเทียบกับกราฟค่าการดูดกลืนแสงของอัลบูมินซีรัมของโคที่ใช้เป็นมาตรฐาน

3.4.2 วิเคราะห์องค์ประกอบของพิษปลากระเบนราหู

3.4.2.1 ใช้เทคนิค Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) มาช่วยในการวิเคราะห์ โดยนำโปรตีนที่สกัดได้จากพิษของปลากระเบนข้อ 3.3.1 และตัวอย่างเมือก ข้อ 3.3.2 ปริมาณ 10 ไมโครกรัม มาวิเคราะห์โดย SDS-PAGE (12% acrylamide resolution gels) ตามวิธีของ Laemmli (1970) เพื่อวิเคราะห์โปรตีนในพิษของปลากระเบนราหูโดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักมวลโปรตีน

3.4.2.2 คุณสมบัติการถูกทำลายด้วยความร้อนของพิษปลากระเบนราหู โดยบ่มพิษของปลากระเบนราหูเป็นเวลา 30 นาทีในอุณหภูมิต่างๆ ดังนี้

- อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)
- อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส
- อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

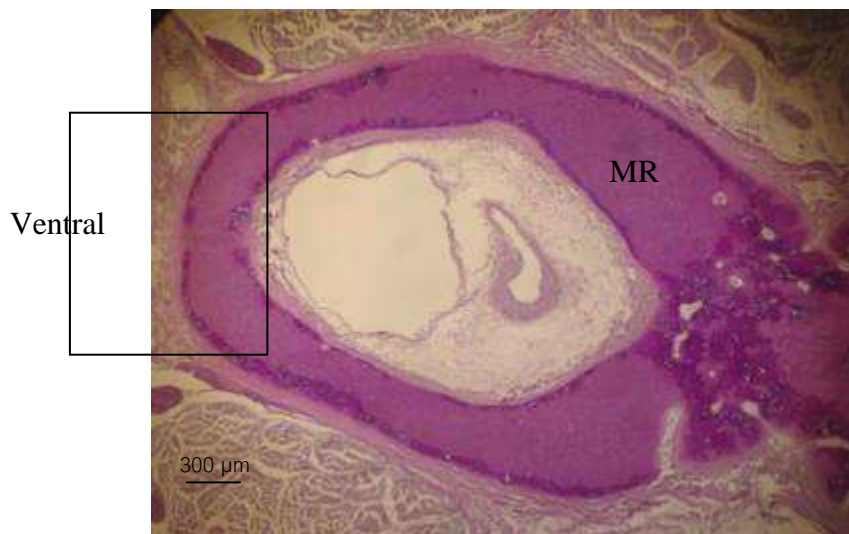
นำตัวอย่างดังกล่าว มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE เช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.1

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลของการวิเคราะห์เจี๊ยงพิษทางกล้องจุลทรรศน์

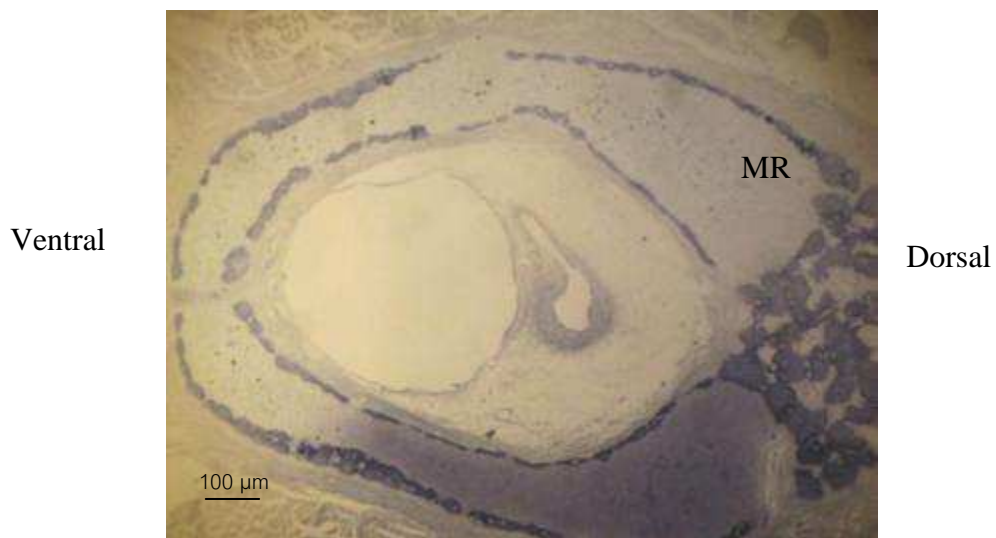
จากการวิเคราะห์เจี๊ยงพิษของปลากะเบนราหูโดยการย้อมด้วยสี PAS และ Alcian blue แสดงให้เห็นว่ามีเซลล์ค้ำหลังพิษชนิดพิเศษที่อยู่ในเยื่อบุผิวของเจี๊ยงพิษโดยรอบเจี๊ยง โดยที่เซลล์ค้ำหลังพิษชนิดพิเศษนี้จะย้อมไม่ติดสีทั้ง PAS และ Alcian blue ซึ่งแตกต่างจากเซลล์เยื่อบุผิวทั่วไปที่อยู่รอบเจี๊ยง ดังแสดงในภาพที่ 23



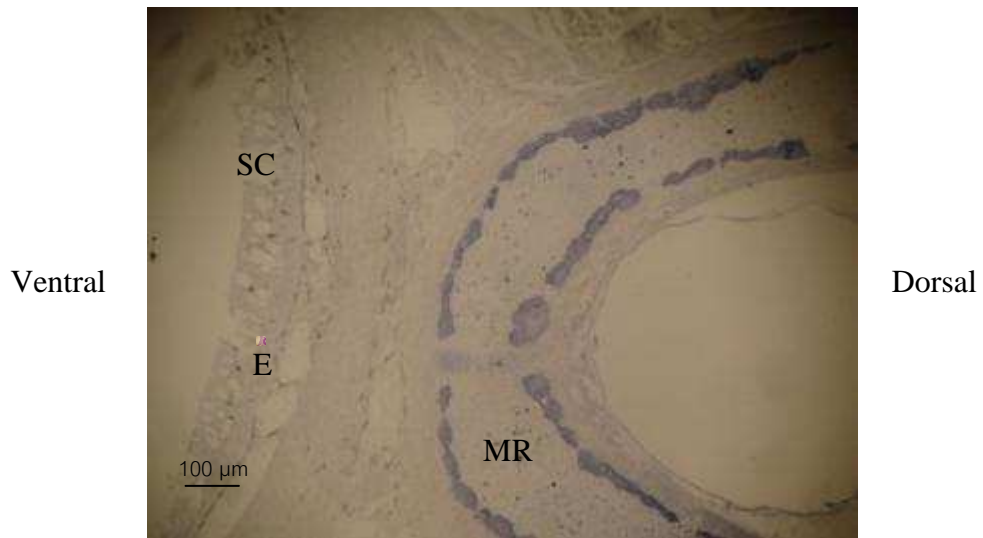
ภาพที่ 23 แสดงภาพจากกล้องจุลทรรศน์ แสดงให้เห็นถึงภาพตัดขวางของเจี๊ยงปลากะเบนราหูซึ่งฝั่งซ้ายคือด้านใต้เจี๊ยง ฝั่งขวาที่เห็นคือด้านบนของเจี๊ยงปลากะเบนราหูที่ถูกย้อมด้วยสี PAS ซึ่งแสดงให้เห็นส่วนแกนของกระดูกเจี๊ยงปลากะเบนราหู (MR) อย่างชัดเจน



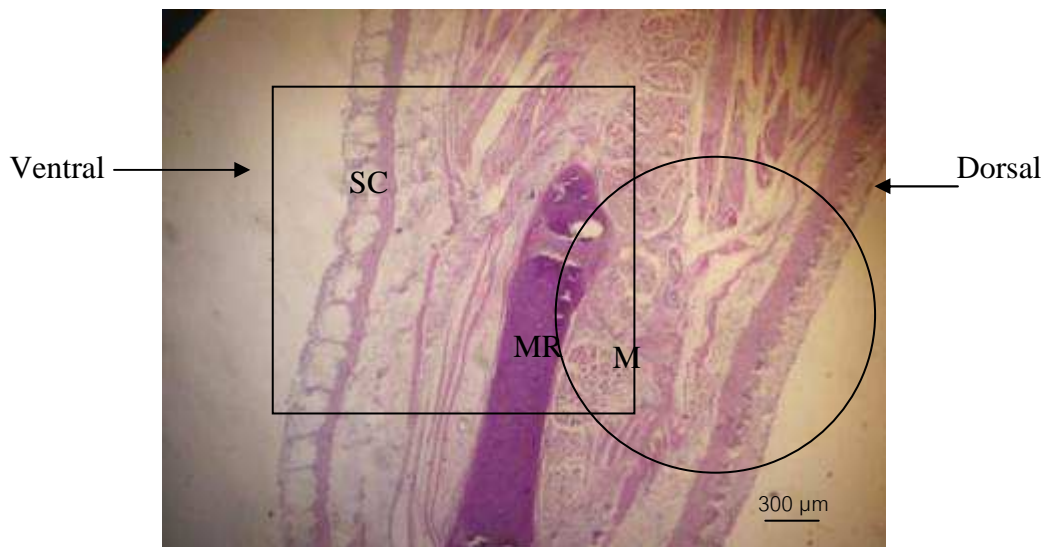
ภาพที่ 24 แสดงภาพจากกล้องจุลทรรศน์ จากกรอบของภาพที่ 23 แสดงให้เห็นถึงภาพตัดขวางของเงี่ยงปลากระเบนราหูที่ถูกย้อมด้วยสี PAS บริเวณเยื่อบุผิวรอบเงี่ยงและส่วนของกระดูกแกนเงี่ยงในส่วนด้านใต้เงี่ยงที่พบเซลล์ค้ำหลังพิชชนิดพิเศษอยู่โดยรอบ (SC) ในชั้นของเยื่อบุผิวรอบเงี่ยง (E) และเห็นส่วนของกระดูกแกนของเงี่ยงปลากระเบนราหู (MR) ชัดเจน



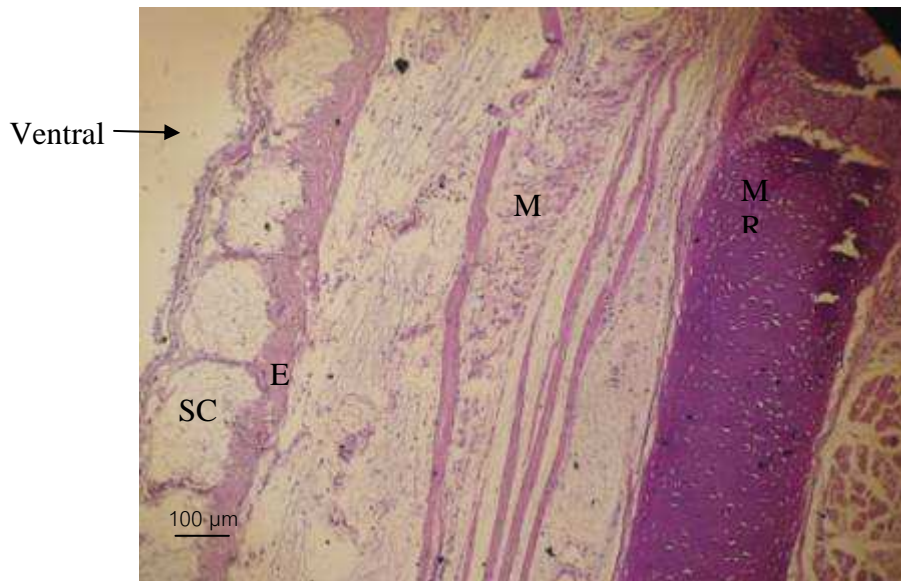
ภาพที่ 25 แสดงภาพจากกล้องจุลทรรศน์ แสดงให้เห็นถึงภาพตัดขวางของเงี่ยงปลากระเบนราหูซึ่งฝั่งซ้ายคือด้านใต้เงี่ยง ฝั่งขวาที่เห็นคือด้านบนของเงี่ยงปลากระเบนราหูที่ถูกย้อมด้วยสี Alcian blue ซึ่งแสดงให้เห็นส่วนแกนของกระดูกเงี่ยงปลากระเบนราหู (MR)



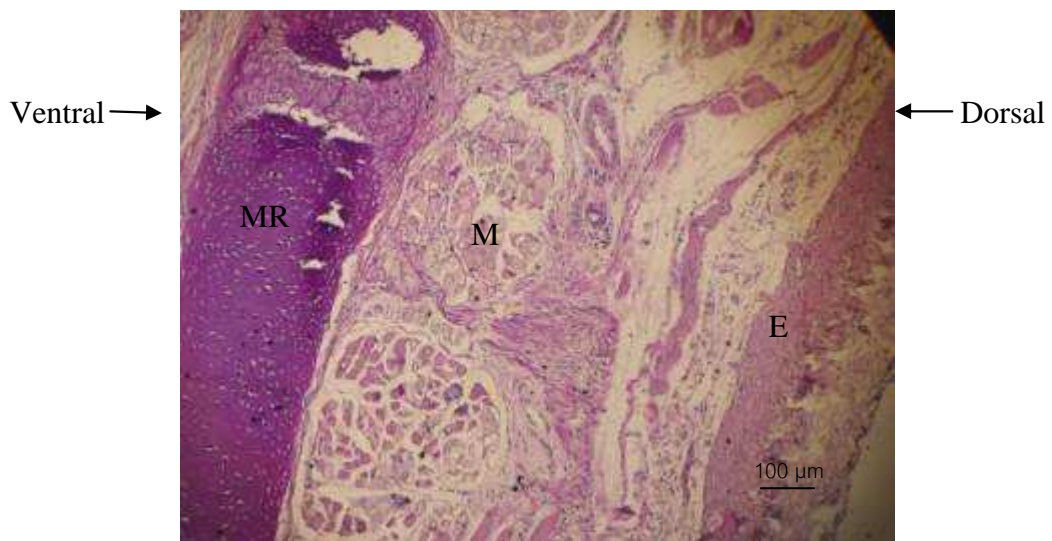
ภาพที่ 26 แสดงภาพจากกล้องจุลทรรศน์ แสดงให้เห็นถึงภาพตัดขวางของเงี่ยงปลากระเบนราหูที่ถูกย้อมด้วยสี Alcian blue บริเวณเยื่อบุผิวรอบเงี่ยงและส่วนของกระดูกแกนเงี่ยงในส่วนด้านใต้เงี่ยงที่พบเซลล์ค้ำหลังพิเศษชนิดพิเศษอยู่โดยรอบ (SC) ในชั้นของเยื่อบุผิวรอบเงี่ยง (E) และเห็นส่วนของกระดูกแกนของเงี่ยงปลากระเบนราหู (MR) ชัดเจน



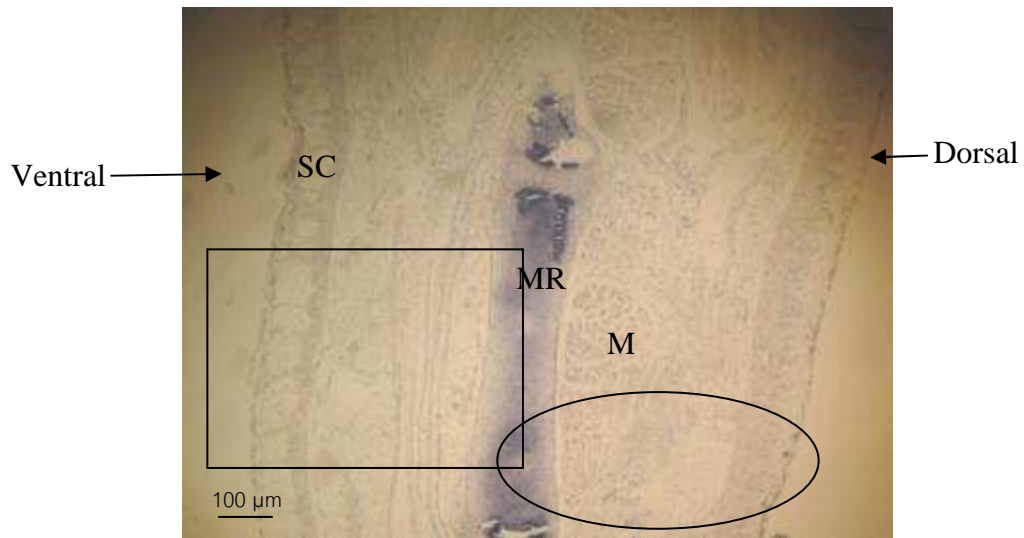
ภาพที่ 27 แสดงภาพตัดตามแนวยาวของเงี่ยงปลากระเบนราหูจากกล้องจุลทรรศน์ แสดงให้เห็นส่วนของแกนกระดูกของเงี่ยง (MR) ส่วนของกล้ามเนื้อ (M) และเซลล์ค้ำหลังพิเศษชนิดพิเศษ (SC) ซึ่งจะพบเซลล์ค้ำหลังนี้ในบริเวณด้านล่างของเงี่ยงเป็นส่วนมาก



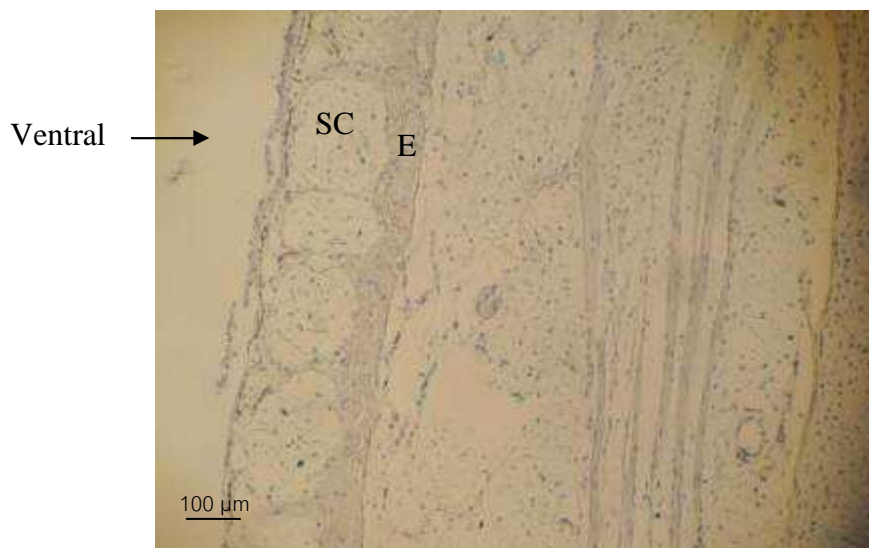
ภาพที่ 28 แสดงภาพขยาย จากกล้องจุลทรรศน์ของเงี่ยงปลากระเบนราหูในบริเวณด้านล่างที่ถูกตัดตามแนวยาวและย้อมสี PAS จากในกรอบสี่เหลี่ยมในภาพที่ 27 แสดงให้เห็นรายละเอียดของเซลล์ค้ำหลังพิเศษ (SC) ที่แทรกอยู่ในชั้นเยื่อบุผิวรอบเงี่ยง (E) กล้ามเนื้อ (M) และส่วนที่เป็นกระดูก (MR) ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น



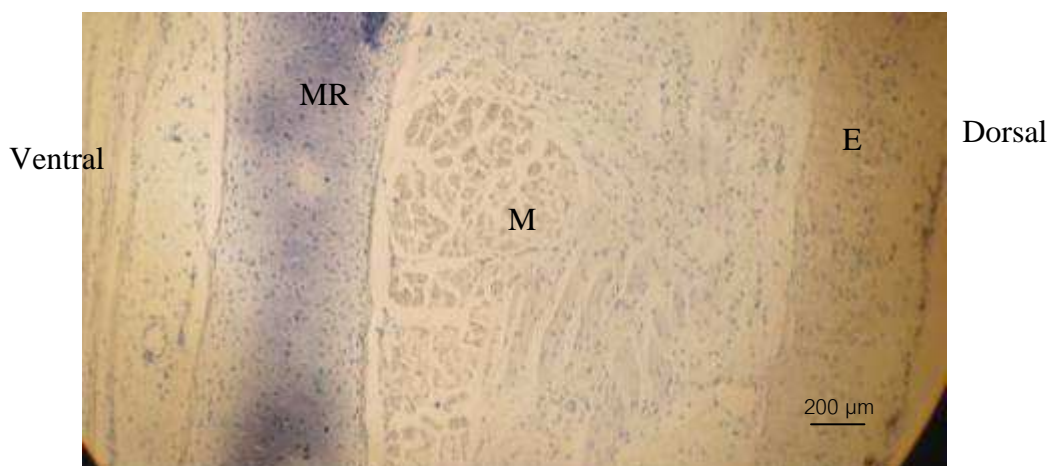
ภาพที่ 29 แสดงภาพขยาย จากกล้องจุลทรรศน์ของเงี่ยงปลากระเบนราหูในบริเวณส่วนบนที่ถูกตัดตามแนวยาวและย้อมสี PAS ในกรอบวงกลมของภาพที่ 27 แสดงให้เห็นรายละเอียดชั้นเยื่อบุผิวรอบเงี่ยง (E) กล้ามเนื้อ (M) และส่วนที่เป็นกระดูก (MR) ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น โดยจะสังเกตได้ว่าไม่พบเซลล์ค้ำหลังพิเศษชนิดพิเศษแทรกอยู่ในชั้นของเยื่อบุผิวรอบเงี่ยงบริเวณส่วนบนของเงี่ยงปลากระเบนราหูเลย



ภาพที่ 30 แสดงภาพตัดตามแนวยาวของเงี่ยงปลากระเบนราหูจากกล้องจุลทรรศน์ แสดงให้เห็น ส่วนของแกนกระดูกของเงี่ยง (MR) ส่วนของกล้ามเนื้อ (M) และเซลล์ค้ำหลังพิเศษ (SC) ซึ่งจะพบเซลล์ค้ำหลังนี้ในบริเวณด้านล่างของเงี่ยงเป็นจำนวนมาก



ภาพที่ 31 แสดงภาพขยาย จากกล้องจุลทรรศน์ของเงี่ยงปลากระเบนราหูในบริเวณด้านล่างที่ถูก ตัดตามแนวยาวและย้อมสี Alcian blue จากในกรอบสี่เหลี่ยมในภาพที่ 30 แสดงให้เห็น รายละเอียดของเซลล์ค้ำหลังพิเศษ (SC) ที่แทรกอยู่ในชั้นเยื่อหุ้มเงี่ยง (E) ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น



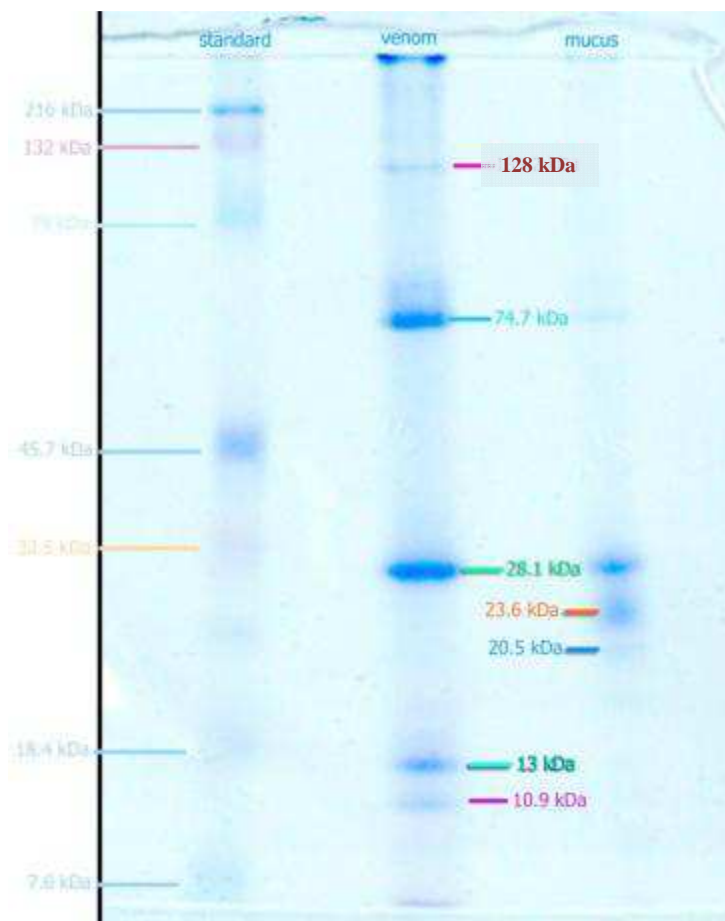
ภาพที่ 32 แสดงภาพขยายจากกล้องจุลทรรศน์ของเงี่ยงปลากระเบนราหูในบริเวณส่วนบนที่ถูกตัดตามแนวยาวและย้อมสี Alcian blue ในกรอบวงกลมของภาพที่ 30 แสดงให้เห็นรายละเอียดชั้นเยื่อบุผิวรอบเงี่ยง (E) กล้ามเนื้อ (M) และส่วนที่เป็นกระดูก (MR) ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น โดยจะสังเกตเห็นว่าไม่พบเซลล์คัดหลังพิเศษชนิดพิเศษแทรกอยู่ในชั้นของเยื่อบุผิวรอบเงี่ยงบริเวณส่วนบนของเงี่ยงปลากระเบนราหูเลย

4.2 วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนในพิษของปลากระเบนราหู

จากการวิเคราะห์ความเข้มข้นโปรตีนในพิษของปลากระเบนราหูตามหลักการของแบรดฟอร์ด(1976) โดยใช้อัลบูมินซีรัมของโคมาเป็นมาตรฐานแล้วได้ค่าของความเข้มข้นโปรตีนในพิษปลากระเบนราหูที่ 1.59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนความเข้มข้นของเมือกที่ขูดได้บริเวณอื่นของร่างกายปลากระเบนราหูมีค่า 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.3 วิเคราะห์องค์ประกอบของพิษปลากะเบนราหู

4.3.1 จากการนำพิษและเมือกของปลากะเบนราหูมาวิเคราะห์เปรียบเทียบโดยใช้หลักการ SDS-PAGE ทำให้ได้แผ่นเจลดังภาพที่ 29

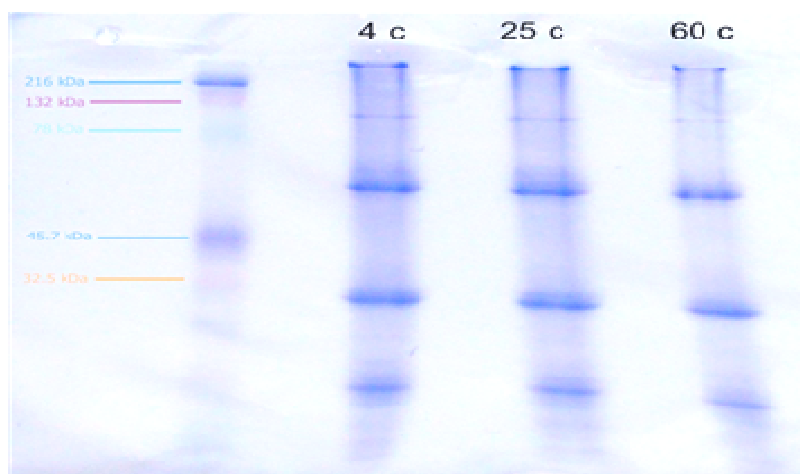


ภาพที่ 33 แสดงภาพของเจลดจากการทดสอบโดยหลักการ SDS-PAGE ซึ่งเลนแรกคือโปรตีนมาตรฐาน หรือ อัลบูมินซีรัมของโค เลนที่สองคือพิษของปลากะเบนราหู ส่วนเลนที่สามคือเมือกตามร่างกายของปลากะเบนราหู

ผลของการทดสอบพิษของปลากะเบน *Himantura chaophraya* แสดงแถบโปรตีนที่ชัดเจน 2 แถบ ได้แก่ แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 74.7 kDa และ 28.1 kDa และมีแถบจางที่ 128 kDa 13 kDa 10.9 kDa และ 75 kDa ขึ้นไป ส่วนเมือกที่ตัวของปลากะเบนสายพันธุ์นี้มีแถบโปรตีนชัดเจนที่น้ำหนักโมเลกุล 28.1 kDa และ 23.6 kDa และมีแถบจางอยู่ที่ 20.5 kDa ซึ่งหากจะเปรียบเทียบว่า

ส่วนของโปรตีนที่มีเฉพาะในพืชแต่ไม่มีในเมล็ดที่บริเวณตัวนั้นเป็นที่สนใจและคาดว่าเป็นโปรตีนที่ออกฤทธิ์เป็นพิษนั้นคือโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 128 kDa 75 kDa ขึ้นไป 13 kDa และ 10.9 kDa

4.3.2 คุณสมบัติการถูกทำลายด้วยความร้อนของพิษปลากระเบนราหู ดังแสดงในภาพที่ 34



ภาพที่ 34 แสดงลักษณะของเจลตามหลักการ SDS-PAGE หลังจากย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue โดยเลนที่ 1 คือโปรตีนมาตรฐานอัลบูมินซีรัมของโค เลนที่สองคือพิษของปลากระเบนราหูที่ผ่านอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เลนที่สามคือพิษของปลากระเบนราหูที่อยู่ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และเลนที่ 4 คือพิษของปลากระเบนที่ผ่านอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

จากการเปรียบเทียบผลของการทดสอบความทนต่ออุณหภูมิของพิษปลากระเบนราหูดังภาพที่ 24 นั้นแสดงให้เห็นว่าลักษณะของการติดสีบนแผ่นเจลของพิษปลากระเบนราหูที่ผ่านความร้อนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีนั้นติดสีจางลง

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย ข้อสรุป และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการวิจัย

5.1.1 การวิจัยเกี่ยวกับโปรตีนของพิษปลากะเบนราหูโดยอาศัยวิธีการ SDS-PAGE

5.1.1.1 ผลของการวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการของ SDS-PAGE ระหว่างพิษของปลากะเบนราหูกับเมือกของปลากะเบนราหู พิษของปลากะเบนราหูสายพันธุ์นี้โดยรวมแล้วมีรูปแบบของแถบโปรตีนที่เห็นคล้ายคลึงกันและคล้ายกับรูปที่พบในรายงานวิจัยจากปลากะเบนราหูสายพันธุ์ *Dasyatis guttata* (ซึ่งผู้ได้รับบาดเจ็บจากเงี่ยงปลากะเบนราหูสายพันธุ์นี้จะได้รับความเจ็บปวดรุนแรง และเกิดการบวมที่บริเวณแผลแต่ไม่พบว่าเกิดเนื้อตายที่แผล) โดยที่ผลของการทดสอบพิษของปลากะเบนราหูแสดงแถบโปรตีนที่ชัดเจน 2 แถบ ได้แก่ แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 74.7 kDa และ 28.1 kDa และมีแถบจางที่ 128 kDa 13 kDa 10.9 kDa และ 75 kDa ขึ้นไป ส่วนเมือกที่ตัวของปลากะเบนราหูสายพันธุ์นี้มีแถบโปรตีนชัดเจนที่น้ำหนักโมเลกุล 28.1 kDa และ 23.6 kDa และมีแถบจางอยู่ที่ 20.5 kDa ซึ่งหากจะวิเคราะห์ว่าส่วนของโปรตีนที่มีเฉพาะในพิษแต่ไม่มีในเมือกที่บริเวณตัวนั้นเป็นที่สนใจและคาดว่าเป็นโปรตีนที่ออกฤทธิ์เป็นพิษนั้นคือโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 128 kDa 75 kDa ขึ้นไป 15 kDa และ 10.9 kDa ซึ่งโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 74.7 kDa นี้เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเดียวกันกับโปรตีนที่พบใน *Salmonella enteric subsp. Enterica serovar Typhi*(Accession NO: CAD08010) และที่ขนาด 28.1 kDa เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเดียวกันกับโปรตีนที่พบใน *Salmonella enteric subsp. Enterica serovar Choleraesuis str. SC-B67*(Accession NO: AAS58876)

5.1.1.2 แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 74.7 kDa และ 28.1 kDa และมีแถบจางที่น้ำหนักโมเลกุล 128 kDa 13 kDa 10.9 kDa และ 75 kDa ขึ้นไปที่พบบนเจลจากพิษของปลากะเบนราหูนั้นมีลักษณะคล้ายรูปแบบของโปรตีนที่เห็นบนเจลที่ได้จากพิษของปลากะเบนราหูสายพันธุ์ *Potamotrygon falkneri* และ *Potamotrygon cf. scobina* ซึ่งพิษของปลากะเบนราหูสายพันธุ์ *P. falkneri* นี้มีเจลที่เห็นแถบของโปรตีนชัดเจนที่ 22 kDa 43 kDa และ 65 kDa และแถบของโปรตีนที่ตั้งแต่ 84 kDa ขึ้นไป พิษของปลากะเบนราหูสายพันธุ์นี้ออกฤทธิ์ทำให้เกิดการเจ็บปวดมาก เกิดการบวม อักเสบรุนแรงและเกิดเนื้อตายที่บริเวณแผล และหากได้รับพิษปริมาณมากขึ้นจะทำให้อาการเหล่านี้รุนแรงมากขึ้นไปด้วย (Barbaro et al., 2007; Antoniazzi et al., 2011) ส่วนพิษของปลากะเบนราหูสายพันธุ์ *P. cf. scobina* มีรูปแบบของโปรตีนบนเจลที่ได้ดังนี้ คือมีแถบ

ชัดเจนที่ 15 kDa 66.2 kDa และ 25 kDa ซึ่งพิษของปลากระเบนสายพันธุ์นี้มีฤทธิ์คล้ายกับพิษของปลากระเบนสายพันธุ์ *P. falkneri* นั่นคือก่อให้เกิดอาการเจ็บปวดมากบริเวณแผล เกิดเนื้อตายที่บริเวณแผล ก่อให้เกิดการอักเสบรุนแรงที่บริเวณแผล แต่หากพิษถูกความร้อนที่ 56 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีแล้ว จะมีฤทธิ์รุนแรงต่ำลง ทำให้เกิดอาการเจ็บปวดหรือเกิดเนื้อตายบริเวณแผลลดลง (Magalhães et al., 2006)

5.1.1.3 จากรูปแบบของโปรตีนที่พบบนเจลจากพิษของปลากระเบนราหู พบว่าโปรตีนแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 74.7 kDa และ 28.1 kDa ใกล้เคียงกับโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 79 kDa ของพิษปลากระเบนสายพันธุ์ *Potamotrygon motoro* ที่มีรายงานการวิจัยพบว่าออกฤทธิ์ hyaluronidase และใกล้เคียงกับโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 15 kDa ของปลากระเบนสายพันธุ์ *Potamotrygon orbignyi* ที่คาดว่าน่าจะเป็นโปรตีนที่ช่วยเสริมให้แผลที่ได้รับการบาดเจ็บจากปลากระเบนสายพันธุ์นี้เกิดเนื้อตายได้รุนแรงขึ้น มีแนวโน้มแสดงให้เห็นว่าปลากระเบนราหูนี้ที่เคยมีรายงานการได้รับบาดเจ็บว่าเกิดการเจ็บปวดรุนแรงและเกิดเนื้อตายบริเวณแผลนั้นเป็นไปได้ว่ามีส่วนประกอบของโปรตีนที่ออกฤทธิ์ hyaluronidase และมีโปรตีนที่ทำให้เกิดเนื้อตายได้รุนแรงมากขึ้นด้วย (Magalhães et al., 2008)

5.1.2 ด้านพยาธิวิทยาทางเคมีของเงี่ยงพิษปลากระเบนราหู

5.1.2.1 จากผลของการย้อมด้วยสี PAS และ Alcian blue ทำให้เห็นเซลล์คัดหลังพิษชนิดพิเศษและเซลล์เยื่อบุผิวธรรมดาที่มีความแตกต่างกัน โดยที่สีย้อมทั้งสองสีนี้ติดได้ดีในเซลล์เยื่อบุผิวแต่ไม่ติดในเซลล์คัดหลังพิษชนิดพิเศษ แต่เซลล์บางเซลล์ที่คาดว่าป็นเซลล์คัดหลังพิษชนิดพิเศษนี้ก็กลับย้อมติดสีบ้างในบางเซลล์ ทั้งนี้อาจเกิดจากความผิดพลาดทางการย้อมสี หรือการที่ใช้เวลาในการย่อยสลายกระดูกในเงี่ยงมากเกินไป เหตุเพราะเงี่ยงของปลากระเบนราหูนั้นเป็นกระดูกที่มีความแข็งแรงมาก ซึ่งแข็งแรงกว่าเงี่ยงของปลากระเบนของประเทศบราซิลหลายเท่า ทำให้ต้องใช้สารย่อยสลายกระดูกที่มีความเข้มข้นสูงกว่า รวมทั้งใช้เวลาในการย่อยสลายกระดูกนานกว่า จึงมีผลต่อการย้อมสี ทำให้สีที่ได้ไม่ชัดเจนเท่าที่ควรและยังส่งผลต่อเซลล์ทำให้เซลล์เสียหาย หรือเซลล์แตกส่งผลให้การวิเคราะห์จากการย้อมสีผิดพลาดได้ ในงานวิจัยต่อไปควรจะต้องพิจารณาสารย่อยสลายกระดูกที่ใช้เวลาในการย่อยสลายสั้นลง อาจทำให้เซลล์เสียหายน้อยลงและสามารถวิเคราะห์ได้แม่นยำมากขึ้น

5.1.2.2 จากผลของการย้อมสีพิเศษซึ่งได้แก่ PAS และ Alcian blue พบว่าเซลล์คัดหลังพิษชนิดพิเศษย้อมไม่ติดสีทั้ง PAS และ Alcian blue ยกเว้นในเซลล์คัดหลังพิษชนิดพิเศษบางเซลล์ที่ยังคงมีเวสิเคิลอยู่ภายในที่ย้อมติดสี PAS ซึ่งเป็นผลเช่นเดียวกับที่เคยมีรายงานในปลา

กระเบน *P.falkneri* *P.orbignyi* *P.leopodi* *A.narinari* และ *D.guttata* (Pedroso et al., 2007) ส่วนเซลล์เยื่อบุผิวทั่วไปนั้นย้อมติดสีทั้ง PAS และ Alcian blue บ่งชี้ว่าเซลล์เยื่อบุผิวทั่วไปนั้นประกอบด้วยสารไกลโคเจน

5.2 ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

5.2.1 เกี่ยวกับความเข้มข้นของโปรตีน

5.2.1.1 จากผลของการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนในพิษและเมือกบริเวณตัวของปลากกระเบนราหู พบว่ามีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดว่าในพิษของปลากกระเบนราหูที่มีความเข้มข้นของโปรตีนมากกว่า ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าพิษของปลากกระเบนที่ประกอบขึ้นจากโปรตีนนั้นมีความเข้มข้นพอสมควร หรือกล่าวได้อีกนัยหนึ่งว่าในเมือกที่ขูดได้จากบริเวณรอบลำตัวของปลากกระเบนราหูนั้นก็อาจมีโปรตีนที่สามารถออกฤทธิ์ที่เป็นพิษได้ด้วยเช่นกัน

5.2.1.2 ในงานวิจัยนี้ได้เนื้อเยื่อพิษและตัวอย่างเมือกมาปริมาณน้อยมาก เนื่องจากความยากลำบากในการจับบังคับและการคำนึงถึงความปลอดภัยต่อผู้จับปลาและผู้วิจัยมากเป็นอันดับต้นๆ ดังนั้นจึงขอเสนอแนะว่าในงานวิจัยต่อไปภายหน้าอาจต้องการวิธีการขูดเมือกและเนื้อเยื่อหุ้มรอบเงี่ยงออกมาให้มีประสิทธิภาพและความปลอดภัยมากขึ้น

5.2.2 เกี่ยวกับส่วนประกอบโปรตีนของพิษปลากกระเบนราหู

5.2.2.1 จากการทดสอบพิษของปลากกระเบนโดยวิธีการ SDS-PAGE นั้นสามารถทำให้ทราบว่าพิษของปลากกระเบนแต่ละสายพันธุ์นั้นประกอบด้วยโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลหลากหลายออกไป แต่มีบางส่วนที่คล้ายคลึงกันซึ่งแสดงว่ามีแนวโน้มว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันนั้นๆจะออกฤทธิ์เช่นเดียวกัน หากต้องการผลทดสอบที่แน่นอนควรจะต้องมีการทดสอบเพิ่มเติมโดยละเอียดขึ้น ไม่ว่าจะเป็นการใช้วิธีการโครมาโตกราฟีหรือเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสสองมิติก็ตาม ดังนั้น หากจะให้การทดสอบสมบูรณ์ ควรจะต้องมีการนำพิษของปลากกระเบนหลายชนิดมาเปรียบเทียบโดยการทดสอบครั้งเดียวกัน ในสภาวะการทดลองในห้องปฏิบัติการเดียวกัน และมีการทดสอบเพิ่มเติมจากวิธีการที่ได้กล่าวไปแล้ว

5.2.2.2 เนื่องจากการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ขูดมาจากเงี่ยงพิษของปลากกระเบนมีปริมาณน้อยมากต่อตัว ส่งผลให้วิธีการวิจัยของงานวิจัยในส่วนนี้ต้องนำเนื้อเยื่อที่ขูดได้จากปลากกระเบนราหูจำนวนหลายตัวมารวมกัน จึงจะทำให้สามารถสกัดและนำมาทำการวิจัยได้ เป็นการนำเอาเนื้อเยื่อเก่ามารวมกับเนื้อเยื่อที่เก็บได้ใหม่เพื่อมาทำงานวิจัย อาจส่งผลให้ความแม่นยำหรือ

โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อบางส่วนสูญเสียไปไม่ว่าจะเป็นเพราะการเก็บรักษาตัวอย่าง หรือการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิบ่อยครั้งจากการนำออกมาทำการทดลอง

5.2.3 คุณสมบัติการทนความร้อนของพิษปลากระเบนราหู

จากผลของงานวิจัยที่ได้ ทำให้ทราบเบื้องต้นว่าภายใต้อุณหภูมิที่เปลี่ยนไป ส่วนประกอบของพิษก็ยังคงเหมือนเดิม แต่ความสามารถในการออกฤทธิ์หลังจากผ่านอุณหภูมิสูงที่ 60 องศาเซลเซียสไปแล้วอาจจะน้อยลงกว่าที่ระดับอุณหภูมิต่ำกว่านั้น นั้นบ่งชี้ว่าหากเกิดการได้รับบาดเจ็บจากปลากระเบนแล้วจะสามารถใช้ความร้อนประคบเพื่อลดฤทธิ์ของพิษในเบื้องต้นได้ ในงานวิจัยชิ้นต่อไปภายหน้าอาจมีการทดสอบการออกฤทธิ์ในหนูทดลองโดยใช้พิษของปลากระเบนที่ผ่านอุณหภูมิสูงกว่าที่งานวิจัยนี้ได้ทำ จะเป็นประโยชน์มากขึ้นต่อวงการการแพทย์

5.2.4 พยาธิวิทยาทางเคมีของเงี่ยงปลากระเบนราหู

5.2.4.1 พบว่ามีเซลล์ค้ำหลังพิษชนิดพิเศษแทรกอยู่ในชั้นของเยื่อบุผิวของเงี่ยง ปลากระเบนราหูเป็นจำนวนมากโดยอยู่ที่บริเวณด้านล่างของเงี่ยง กระจุกตัวรวมกันเป็นกลุ่ม โดยไม่มีรูปแบบ เซลล์เหล่านี้มีไซโทพลาสซึมที่มีลักษณะกลมกลืนกันและแบ่งแยกเซลล์แต่ละเซลล์ออกได้ยากเนื่องจากไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์ที่เห็นชัดเจน เซลล์ค้ำหลังพิษชนิดพิเศษนี้ย้อมไม่ติดสี ทั้ง PAS และ Alcian blue แต่เวสิเคิลของเซลล์เหล่านี้ที่มีรูปร่างรีย้อมติดสี PAS ซึ่งแยกจากเซลล์เยื่อบุผิวทั่วไปโดยที่เซลล์เยื่อบุผิวจะย้อมติดสี ทั้ง PAS และ Alcian blue มีลักษณะทรงกระบอก ในชั้นฐาน มีลักษณะกลมในชั้นนอก และมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่แข็งแรงสามารถเห็นได้ชัดเจนจากกล้องจุลทรรศน์

5.2.4.2 ข้อเสนอแนะจากการทำงานจริงคือการเก็บตัวอย่างเงี่ยงปลากระเบนราหู เนื่องจากปลากระเบนราหูมีกระดูกที่แข็งกว่าปลากระเบนสายพันธุ์ที่พบในประเทศบราซิลมาก การเก็บตัวอย่างเงี่ยงจากปลากระเบนที่พบในประเทศบราซิลอาจใช้มือเปล่าหักได้แต่สำหรับเงี่ยงปลากระเบนราหูนั้นจะต้องอาศัยคีมตัดเหล็กและต้องตัดโดยผู้ที่มีความแข็งแรงมากจึงจะตัดได้ ซึ่งกระบวนการตัดนี้อาจทำให้เยื่อบุผิวรอบเงี่ยงเสียหาย อีกทั้งขณะที่จับปลากระเบนเพื่อมาเก็บตัวอย่างจะมีการพันเงี่ยงด้วยผ้าเสมอเพื่อความปลอดภัยของผู้จับและผู้เก็บตัวอย่าง สิ่งเหล่านี้ทำให้เยื่อบุผิวรอบเงี่ยงปลากระเบนเสียหายทั้งสิ้น ดังนั้นในงานวิจัยต่อไปควรวหาวิธีการที่จะเก็บเงี่ยงปลากระเบนราหูที่สมบูรณ์มากกว่าที่เก็บได้ในงานวิจัยนี้

รายการอ้างอิง

- Antoniazzi, M.M., Benvenuti, L.A., Lira, M.S., Jared, S.G.S., Neto, D.G., Jared, C., and Barbaro, K.C. 2011. Histopathological changes induced by extracts from the tissue covering the stingers of *Potamotrygon falkneri* freshwater stingrays. *Toxicon*. 57: 297-303.
- Barbaro, K.C., Lira, M.S., Malta, M.B., Soares, S.L., Neto, D.G., Cardoso, J.L.C., Santoro, M.L. and Hadded, Jr. V. 2007. Comparative study on extracts from the tissue covering the stingers of freshwater (*Potamotrygon falkneri*) and marine (*Dasyatis guttata*) stingrays. *Toxicon*. 50: 676-687.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72: 248-254.
- Brisset, I.B., Schaper, A., Pommier, P., and Haro, L. 2006. Envenomation by Amazonian freshwater stingray *Potamotrygon motoro*: 2 cases reported in Europe. *Toxicon*. 47(1): 32-34.
- Campbell, J., Grenon, M., and You, C.K. 2003. Psuedoaneurysm of the superficial femoral artery resulting from stingray envenomation. *Int. J. Vasc. Surg*. 17: 217-220.
- Clark, R.F., Girard R.H., Rao, D., Ly, B.T., and Davis, D.P. 2007. Stingray envenomation: A retrospective review of clinical presentation and treatment in 119 cases. *J. Emerg. Med*. 33(1): 33-37.
- Conceição, K., Konno, K., Melo, R.L., Marques, E.E., Hiruma-Lima, C.A., Lima, C., Richardson, M., Pimenta, D.C., and Lopes-Ferreira, M. 2006. Orpotrin: a novel vasoconstrictor peptide from the venom of the Brazilian stingray *Potamotrygon* gr. *orbignyi*. *Peptides*. 27(12): 3039-3046.
- Conceição, K., Santos, J.M., Bruni, F.M., Klitzke, C.F., Marques, E.E., Borges, M.H., Melo, R.L., Fernandez, J.H., and Lopes-Ferreira, M. 2009. Characterization of a new bioactive peptide from *Potamotrygon* gr. *Orbignyi* freshwater stingray venom. *Peptides*. 30(12): 2191-2199.

- Dehghani, H., Sajjadi, M.M., Parto, P., Rajaian, H., and Mokhlesi, A. 2010. Histological characterization of the special venom secretory cells in the stinger of rays in the northern waters of Persian Gulf and Oman Sea. *Toxicon*. 55: 1188-1194.
- Diaz, J.H. 2007. The epidemiology, evaluation, and management of stingray injuries. *J. La. State. Med. Soc.* 159: 198-204.
- Fenner, J.P. 1998. Dangers in the ocean: the traveler and marine envenomation. II. Marine vertebrate. *J. Travel. Med.* 5: 213-216.
- Forrester, M.B. 2005. Pattern of stingray injuries reported to Texas poison centers from 1998 to 2004. *Hum. Exp. Toxicol.* 24(12): 639-642.
- Germain, M., Smith, K.J., and Skelton, H. 2000. The cutaneous cellular infiltrate to stingray envenomization contains increased TIA+ cells. *Brit. J. Dermatol.* 143: 1074-1077.
- Haddad, Jr.V., Neto, D.G., Neto, J.B.P., Marques, F.P.L., and Barbaro, K.C. 2004. Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 84 envenomings in humans and some enzymatic activities of the venom. *Toxicon*. 43: 287-294.
- Isbister, G.K. 2001. Venomous fish stings in tropical northern Australia. *Am. J. Emerg. Med.* Nov. 19(7): 561-565.
- IUCN. 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2.
- Jackson, S., and Ruha, A.M. 2008. Intracranial hemorrhage following stingray envenomation in a child with undiagnosed cerebral AVM. (Venomous Animals Other) (Case study). *J. Med. Toxicol.* 14: 3-7.
- Kumar, K.R., Vennila, R., Kanchana, S., Arumugam, M., and Balasubramaniam, T. 2011. Fibrinolytic and anticoagulant activities in the tissue covering the stingers of marine stingrays *Dasyatis sephen* and *Aetobatis narinari*. *J. Thromb. Thrombolysis.* 31(4): 464-471.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randal, R.J. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-274.

- Magalhães, K.W., Lima, C., Soares, A.A.P., Marques, E.E., Lima, C.A.H., and Ferreira, M.L. 2006. Biological and biochemical properties of the Brazilian *Potamotrygon* stingrays: *Potamotrygon* cf. *scobina* and *Potamotrygon* gr. *orbignyi*. *Toxicon*. 47: 575-583.
- Magalhães, M.R., Silva, Jr. N.J., and Ulhoa, C.J. 2008. A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (freshwater stingrays) venom: Isolation and characterization. *Toxicon*. 51: 1060-1067.
- Meyer, P.K. 1997. Stingrays injuries. *Wild. Environ. Med.* 8: 24-28.
- Monkolprasit, S., and Roberts, T.R. 1990. *Himantura chaopraya*, a New Giant Freshwater Stingray from Thailand. *Jpn. J. Ichthyol.* 37(3): 203-208.
- Pedroso, C.M., Jared, C., Almeida, P.C., Almeida, M.P., Neto, D.G., Lira, M.S., Hadded Jr.V., Barbaro, K.C., and Antoniazzi, M.M. 2007. Morphological characterization of the venom secretory epidermal cells in the stinger of marine and freshwater stingrays. *Toxicon*. 50: 688-697.
- Perkins, R.A., and Morgan, S.S. 2004. Poisoning, envenomation, and trauma from marine creatures. *Am. Fam. Physician.* 69(4): 885-890.
- Riggs, C.M., Carrick, J.B., O'Hagan, B.J., Rayner, S., Pascoe, R.R.R., and Fishcher, A.B.P. 2003. Stingray injury to a horse in coastal water off eastern Australia. *Vet. Rec.* 1(2): 114-115.
- Roberts, T.R., and Karnasuta, J. 1987. *Dasyatis laoensis*, a new whiptailed stingray (family Dasyatidae), from the Mekong River of Laos and Thailand. *Environ. Biol. Fish.* 20(3): 161-167.
- Rodríguez, H.G.R., Sánchez, E.C., and Méndez, J.D. 2008. Stingray poisoning, a careless aspect in México. *Adv. Environ. Biol.* 2(2): 54-62.
- Russell, F.E. 1959. Stingray injuries. *Public Health Report.* 74(10): 855-860.
- Santos, M.J., Conceição, K., Seibert, C.S., Marques, E.E., Silva, P.I., Soares, A.B., Lima, C., and Ferreira, M.L. Studies on pharmacological properties of mucus and sting venom of *Potamotrygon* cf. *henlei*. *Int. Immunopharmacol.* 11(9): 1368-1377.

- Scharf, M.J. 2002. Cutaneous injuries and envenomations from fish, sharks and rays. *Dermatol. Ther.* 15: 47-57.
- Taylor, D.M. 2000. An analysis of marine animal injuries presenting to emergency departments in Victoria, Australia. *Wild. Environ. Med.* 13(2): 106-112.
- Uzel, A.P., Massicot, R., and Jean, M. 2002. Stingray injury to the ankle. *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* 12(2): 115-116.
- Vidthayanon, C., and Roberts, T.R. 2005. *Himantura kittipongi*, a new species of freshwater whiptailed stingray from the maekhleng river of Thailand (elasmobranchii, Dasyatidae). *Nat. Hist. Bull. Siam. Soc.* 53(1): 123-132.
- Weiss, B.F., and Wolfenden, H.D. 2001. Survivor of a stingray injury to the heart. *Med. J. Australia.* 175: 33-34.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วัน/เดือน/ปี (ที่เก็บน้ำ)	Temp.	Sal. (ppt)	pH	Alk. (mg/l.)	ความ ขุ่นใส	PO4 (mg/l.)	DO (mg/l.)	NH3 (mg/l.)	NO2 (mg/l.)	BOD (mg/l.)
20/10/51	27.00	7	7.63	107	40	0.0973	3.85	0.2726	0.018	1.25
20/11/51	26.70	4	7.88	100	30	0.1056	4.44	0.2139	0.0230	1.75
20/12/51	24.30	27	8.07	95	120	0.0573	4.43	0.119	0.0031	0.60
20/1/52	21.10	20	7.95	104	150	0.0541	4.96	0.0754	0.0058	1.20
10/2/52	29.60	16	7.85	105	60	0.0609	6.15	0.2434	0.0104	1.15
16/3/52	29.6	16	7.85	105	60	0.0609	6.15	0.2434	0.0104	1.15
21/4/52	31.00	5	7.97	112	100	0.0592	4.24	0.176	0.0104	1.10
12/5/52	30.36	24	7.99	120	60	0.0748	4.35	0.1494	0.0129	1.40

ตารางแสดงคุณภาพน้ำที่ตรวจในแหล่งน้ำที่จับปลากระเบนราหูมาทำการวิจัย ณ แม่น้ำแม่กลองอำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสงคราม

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงข้อมูลปลากะเบนที่จับมาทำงานวิจัย ได้แก่ วันที่จับปลากะเบนได้ รหัสประจำตัว เลขที่ไม่โครซิฟ ความยาวทั้งตัว ตั้งแต่ปลายจมูกจรดปลายหาง (Total length หรือ TL) ความยาวตั้งแต่ปลายจมูกจนถึงกระดูกสะโพก (Girdle length หรือ GL) ความกว้างของลำตัว (Width) และเพศของปลากะเบน ในช่วงระยะเวลาที่ทำการวิจัย

Date	HN	Ship number	TL	GL	Width	Sex
17/3/2009	MK170309-2M	-	3.1	1.12	1.15	Male
17/3/2009	MK170309-3M	-	3.36	1.28	1.35	Male
17/3/2009	MK170309-1F	-	3.86	1.55	1.64	Female
18/3/2009	MK180309-1M	-	2.28	0.9	0.95	Male
18/3/2009	MK180309-2M	-	2.57	1.05	1.17	Male
7/5/2009	MK070509-2M	-	3.33	1.3	1.24	Male
7/5/2009	MK070509-1M	-	2.85	1.05	1.14	Male
21/5/2009	FWR(F)21-05-09 /MK3	1022000000028200	4.03	1.88	2.01	Female
22/5/2009	FWR Baby 1 22-05-2009	-	0.52	1.01	0.51	Female
22/5/2009	FWR Baby 2 22-05-2009	-	0.98	-	0.46	Male
22/5/2009	FWR 22-05-2009 /MK4	1022000000022931	3.4	1.8	1.91	Female
23/5/2009	FWR23-05-2009	1022000000020019	3.24	1.71	1.77	Female
25/5/2009	MK250509-1F	1022000000017512	3.05	1.05	1.16	Female
26/5/2009	FWR 26-05-2009	1022000000021159	1.57	0.68	0.72	Female
2/6/2009	02-06-2009-1F	-	2.96	1.08	1.07	Female
2/6/2009	02-06-2009-2M	1022000000028628	3.03	1.26	1.33	Male
3/6/2009	03-06-2009F1	1022000000004658	3.9	1.08	1.26	Female
3/6/2009	03-06-2009F2	1022000000004172	2.56	0.9	0.95	Female
5/8/2009	MK050809-1M	-	1.32	0.78	0.84	Male
5/8/2009	MK050809-2M	-	1.17	0.56	0.64	Male
5/8/2009	MK050809-3M	-	1.53	0.65	0.7	Male
6/8/2009	MK060809-1F	-	1.95	0.89	0.95	Female
7/8/2009	MK070809-1F	-	2.26	0.9	0.97	Female
7/8/2009	MK070809-2F	-	2.36	0.84	0.91	Female
2/9/2009	MK020909-1F	1022000000007096	3.55	1.35	1.53	Female
9/11/2009	MK091109-1F	1022000000025796	3.76	1.97	2.3	Female

9/11/2009	MK091109-3M	1022000000018116	3.39	1.24	1.39	Male
9/11/2009	MK091109-2M	1022000000018903	3.21	1.14	1.16	Male
10/11/2009	MK101109-2M	1022000000012515	3.2	1.23	1.33	Male
10/11/2009	MK101109-1M	1022000000022494	3.4	1.23	1.38	Male
11/11/2009	MK111109-1M	1022000000011981	2.3	0.7	0.7	Male
11/11/2009	MK111109-2F	1022000000020988	2.94	1.2	1.34	Female
12/11/2009	SOW121109-1F	1022000000009857	1.27	0.77	0.74	Female
12/11/2009	SOW121109-2M	1022000000013774	1.26	0.65	0.73	Male
12/11/2009	SOW121109-3F	1022000000006104	1.17	0.56	0.64	Female
12/11/2009	SOW121109-4M	1022000000004821	1.2	0.61	0.69	Male
12/11/2009	SOW121109-5F	1022000000005020	1.5	0.64	0.67	Female
21/11/2009	MK211109-1F	1022000000021925	4.32	1.8	1.96	Female
21/11/2009	MK211109-2M	1022000000004426	3.08	1.1	1.2	Male
21/11/2009	MK211109-3F	1022000000022419	4.18	1.86	1.2	Female
22/11/2009	MK221109-1F	1022000000011848	3.24	1.28	1.45	Female
3/12/2009	MK031209-1M	1022000000026846	3.28	1.13	1.24	Male
3/12/2009	MK031209-2M	1022000000048425	3.33	1.22	1.32	Male
4/12/2009	MK041209-1M	1022000000051188	3.08	1.02	1.24	Male
21/12/2009	MK211209-1F	1022000000032730	2.63	0.8	1.65	Female
21/12/2009	MK211209-2F	1022000000035721	3.46	1.25	1.3	Female
21/12/2009	MK211209-3F	-	3.5	1.32	1.49	Female
22/12/2009	MK221209-1M	1022000000024850	3.29	1.14	1.26	Male
22/12/2009	MK221209-2M	1022000000006910	1.4	1.27	1.4	Male
24/12/2009	MK241209-1F	1022000000011639	2.24	1.16	1.21	Female
24/12/2009	MK241209-2_	1022000000006184	2.68	0.8	1	Unk
28/12/2009	MK281209-1F	1022000000020234	4.58	1.87	2	Female
29/12/2009	MK291209-1M	1022000000022095	2.3	0.72	0.8	Male
29/12/2009	MK291209-2M	1022000000023123	3.04	1.17	1.23	Male
30/12/2009	MK301209-1F	1022000000012614	2.78	0.8	0.95	Female
8/1/2010	MK080110-1M	900012000503222	2.97	1.14	1.27	Male
8/1/2010	MK080110-2M	900012000587611	3.03	1.06	1.18	Male
9/1/2010	MK090110-1F	900012000597724	stumped tail	1.13	1.03	Female

9/1/2010	MK090110-2M	900012000591124	1.33	0.38	0.4	Male
9/1/2010	MK090110-3F	-	1.3	0.39	0.42	Female
9/1/2010	MK090110-4M	-	1.36	0.38	0.41	Male
9/1/2010	MK090110-5F	900012000588848	2.57	2	2.8	Female
9/1/2010	MK090110-6F	900012000603106	1.07	0.38	0.39	Female
9/1/2010	MK090110-7F	-	1.25	0.35	0.4	Female
15/1/2010	MK150110-1M	900012000597699	3.09	1.16	1.3	Male
19/1/2010	MK190110-1F	900012000585602	3.5	1.37	1.5	Female
22/1/2010	MK220110-1F	900012000589293	4.02	2.21	2.32	Female
7/2/2010	MK070210-1F	-	1.25	0.45	0.49	Female
7/2/2010	MK070210-2M	-	1.14	0.39	0.42	Male
2/7/2010	MK070210-5M	-	0.95	0.39	0.44	Male
4/3/2010	MK040310-1M	900012000590752	3.18	1.8	1.3	Male
19/3/2010	MK190310-1M	900012000502736	2.76	1.17	1.23	Male
19/3/2010	MK190310-2F	900012000596579	4.37	0.94	2	Female
16/9/2010	MK160910-1F	900012000105152	2.33	0.77	0.96	Female
16/9/2010	MK160910-2F	900012000532319	3.3	1.69	1.87	Female
16/9/2010	MK160910-M	900012000301504	2.96	1.28	1.43	Male
18/11/2010	BPK181110-1M	900012000300343	3.13	1.23	1.39	Male
21/11/2010	MK211110-1M	114967457A	2.55	0.85	0.97	Male
21/11/2010	MK211110-2M	977200001055935	3.18	1.1	1.23	Male
4/1/2011	MK040111-2F	900012000731220	2.72	0.91	1.02	Female
4/1/2011	MK040111-1M	900012000730085	2.3	0.75	0.83	Male
4/1/2011	MK040111-3M	900012000730528	2.82	0.89	0.99	Male
15/1/2011	MK150111-1M	900012000731199	2.35	0.73	2	Male
15/1/2011	MK150111-2F	900012000730236	2.76	0.92	1.06	Female
15/1/2011	MK150111-3F	900012000730710	2.9	1.47	1.61	Female
22/1/2011	MK220111-1M	900012000729999	3.07	1.13	1.21	Male
24/1/2011	MK240111-1F	900012000506019	3.42	1.57	1.75	Female
11/2/2011	MK110211-1M	900012000731118	3.55	1.16	1.3	Male
8/3/2011	MK080311-1M	900012000730024	1.37	0.78	0.84	Male
10/3/2011	MK100311-1M	900012000730123	3.23	1.22	1.27	Male
18/3/2011	MK180311-1M	900012000731120	3.27	1.2	1.34	Male

20/4/2011	MK200411-1M	900012000730530	2.95	1.12	1.2	Male
18/5/2011	MK180511-1F	900012000729962	2.22	0.7	0.7	Female
18/5/2011	MK180511-2M	900012000503222	stumped tail	1.18	1.27	Male
2/6/2011	MK020611-1F	900012000730038	2.65	0.8	0.97	Female
20/6/2011	MK200611	900012000730514	2.47	0.75	0.86	Male
20/6/2011	MK200611-1F	900012000731320	2.33	0.8	0.88	Female
20/6/2011	MK200611-1M	1022000000004426	2.38	1.12	1.15	Male
20/6/2011	MK200611-2M	900012000730545	2.38	0.78	0.84	Male
20/6/2011	MK200611-3M	900012000730923	1.22	0.74	0.83	Male
8/8/2011	MK080811-1M	900012000730573	1.5	0.87	1	Male
8/8/2011	MK080811-2M	900012000308909	2.1	0.71	0.77	Male
8/8/2011	MK080811-1F	1022000000018355	1.85	1.1	1.19	Female
27/8/2011	MK270811-1F	900012000729908	3.67	1.77	1.68	Female
27/8/2011	MK270811-1M	900012000731318	2.18	0.76	0.81	Male
14/9/2011	MK140911-1M	900012000589477	2.4	0.9	0.99	Male
14/9/2011	MK140911-2M	900012000731441	3.48	1.32	1.34	Male
10/9/2011	MK091011-1F	900012000735151	2.83	1.2	1.3	Female
10/9/2011	MK091011-1M	900012000735073	2.9	1.06	1.2	Male
26/1/2012	MK260112-1M	900012000732901	3.1	1.2	1.27	Male
26/1/2012	MK260112-2M	900012000732214	3.2	1.1	1.25	Male
26/1/2012	MK260112-1F	900012000735183	2.42	1.1	1.08	Female
15/2/2012	MK150212-1F	900012000308925	2.35	0.75	0.83	Female
15/2/2012	MK150212-2F	900012000733375	2.06	0.68	0.76	Female
15/2/2012	MK150212-1M	977200001055935	3.18	1.11	1.25	Male
16/2/2012	MK160212-1F	900012000735147	2	0.67	0.73	Female
16/2/2012	MK160212-1M	900012000733083	2.16	0.7	0.79	Male
16/2/2012	MK160212-2M	900012000735172	2.17	0.7	0.72	Male
16/2/2012	MK160212-3M	900012000732982	2.11	0.65	0.72	Male
16/2/2012	MK160212-4M	900012000731318	2.2	0.77	0.86	Male
3/3/2012	MK030312-1F	900012000735206	3.55	1.54	1.65	Female
3/3/2012	MK030312-2M	900012000733312	1.72	1.1	1.2	Male
3/3/2012	MK030312-3M	900012000735164	2.97	1.2	1.22	Male
6/3/2012	MK060312-1F	900012000733295	3.75	1.5	1.56	Female

6/3/2012	MK060312-2M	900012000735123	1.99	0.73	0.82	Male
6/3/2012	MK060312-3M	900012000730604	3.07	1.05	1.18	Male
29/3/2012	MK290312-1M	900012000731120	3.3	1.24	1.39	Male
29/3/2012	MK290312-2F	900012000730641	2.93	1.1	1.22	Female
9/5/2012	MK090512-1F	900012000732968	2.67	0.92	0.99	Female
13/05/2012	MK130512-1F	900012000506019	3.42	1.62	1.78	Female

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพนมพร แสนประเสริฐ เกิดวันที่ 18 เดือนตุลาคม พ.ศ.2526 ที่จังหวัดขอนแก่น เข้ารับการศึกษที่โรงเรียนสาธิตแห่งมหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น ตั้งแต่ชั้นอนุบาลที่ 1 จนถึงมัธยมที่ 6 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปี พ.ศ.2551 เข้าทำงานในตำแหน่งสัตวแพทย์ประจำคลินิกและโรงพยาบาลสัตว์ที่เชี่ยวชาญทางด้านสัตว์เลี้ยงชนิดพิเศษหลายแห่งในจังหวัดกรุงเทพฯ ปัจจุบันเป็นเจ้าของกิจการธุรกิจสินค้าสัตว์เลี้ยงที่จังหวัดขอนแก่น