บทที่ 8 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. ปลาปักเป้าจำนวนทั้งสิ้น 155 ตัว ที่นำมาศึกษาในการวิจัยนี้ จับมาจากทะเลของประเทศไทย ในช่วงเดือนเมษายน ถึง มิถุนายน พ.ศ. 2552 คือจับมาจากอ่าวไทยจำนวน 125 ตัว ประกอบด้วยปลาปักเป้าหลังเขียว (*Lagocephalus lunaris*) จำนวน 18 ตัว และ ปลาปักเป้าหลังน้ำตาล (*L. spadiceus*) จำนวน 107 ตัว ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์เป็นสายพันธุ์เดิมที่เคยพบมาก่อนจากอ่าวไทย (Briliantes *et al.*, 2003) ส่วนปลาปักเป้าที่จับมาได้จากทะเลอันดามันจำนวน 30 ตัว พบว่าเป็นปลาปักเป้าเขียวจุด (*Tetraodon nigroviridis*) จำนวน 28 ตัว และปลาปักเป้าลายร่างแห (*Arothron reticularis*) จำนวน 2 ตัว ซึ่งปลาปักเป้าลายร่างแหทั้ง 2 ตัวนี้ยังเป็นลูกปลาเนื่องจากมีขนาดเล็กและเนื่อเยื่อของระบบสืบพันธุ์ยังไม่เจริญเต็มที่ ทั้งปลาปักเป้าเขียวจุดและปลาปักเป้าลายร่างแหไม่เคยพบมาก่อนในทะเลอันดามันของประเทศไทย กล่าวคือสายพันธุ์ของปลาปักเป้าที่เคยพบในทะเลอันดามันของประเทศไทยจากการสำรวจในปี พ.ศ. 2536 (Kungsuwan, 1993) มี 9 สายพันธุ์ ได้แก่ ปลาปักเป้าหางไหม้ (*Arothron immaculates*) ปลาปักเป้าลายหินอ่อน (*Chelonodon patoca*) ปลาปักเป้าหลังเขียว (*Lagocephalus lunaris*) ปลาปักเป้าหลังด่าง (*L. sceleratus*) ปลาปักเป้าเหลืองทอง (*Xenopterus naritus*) ปลาปักเป้าดาว (star pufferfish; *Arothron stellatus*) ปลาปักเป้าจุดดำ (black spot puffer; *Diodon hystrix*) ปลาปักเป้าหลังเรียบ (*Lagocephalus inermis*) และปลาปักเป้าหลังน้ำตาล (*Lagocephalus spadiceus*) แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมในทะเลทะเลอันดามันของประเทศไทยอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของโลกส่วนหนึ่ง และ/หรือผลกระทบจาก Tsunami เมื่อปี พ.ศ. 2547 อีกส่วนหนึ่ง ทำให้นิเวศน์ของปลาปักเป้าเปลี่ยนไปมากคือสายพันธุ์ที่เคยมีในทะเลทะเลอันดามันของประเทศไทยเมื่อปี พ.ศ. 2536 ทั้ง 9 สายพันธุ์หายไปหมด แต่มีสองสายพันธุ์ใหม่คือ *T. nigroviridis* และ *A. reticularis* มาแทน

2. ปลาปักเป้าจากอ่าวไทย คือปลาปักเป้าหลังเขียว (*L. lunaris*) จำนวน 18 ตัว พบว่ามีเพียงตัวเดียว (5.56%) ที่มี tetrodotoxin (TTX) ในเนื้อเยื่อต่างๆ คือ เนื้อเยื่อของระบบสืบพันธุ์ ตับ เนื้อเยื่อของทางเดินอาหาร และ กล้ามเนื้อ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่มีมาก่อนว่าปลาปักเป้าหลังเขียวจากอ่าวไทยมีสารพิษ TTX (Briliantes *et al.*, 2003) ส่วนปลาปักเป้าหลังน้ำตาล (*L. spadiceus*) จำนวน 107 ตัว พบว่ามีเพียงตัวเดียว (0.93%) ที่มี TTX ในตับเท่านั้น แต่ไม่พบ TTX ในเนื้อเยื่อของระบบสืบพันธุ์ เนื้อเยื่อของทางเดินอาหาร และ กล้ามเนื้อ อย่างไรก็ดีการพบว่าตับของปลาปักเป้าหลังน้ำตาล (*L. spadiceus*) มีสารพิษ TTX นี้ เป็นการพบครั้งแรกว่าปลาปักเป้าหลังน้ำตาล (*L. spadiceus*) มีสารพิษ TTX ได้ เพราะเท่าที่ผ่านมายังไม่เคยมีรายงานที่พบว่าปลาปักเป้าหลังน้ำตาล (*L. spadiceus*) มีสารพิษ TTX (Briliantes *et al.*, 2003)

ปลาปักเป้าเขียวจุด (*Tetraodon nigroviridis*) จำนวน 28 ตัว มีสารพิษ TTX ในทุกเนื้อเยื่อที่ทดสอบและมีปริมาณสารพิษ TTX มากกว่าปริมาณที่พบในปลาปักเป้าสายพันธุ์อื่น ส่วนปลาปักเป้าลายร่างแห (*Arothron reticularis*) จำนวน 2 ตัวมีสารพิษ TTX เฉพาะในตับ เนื้อเยื่อของทางเดินอาหาร และ กล้ามเนื้อเท่านั้น และไม่มีสารพิษ TTX ในเนื้อเยื่อของระบบสืบพันธุ์ เพราะยังเป็นลูกปลาที่เนื้อเยื่อของระบบสืบพันธุ์ยังไม่เจริญเต็มที่

3. TTX มาตรฐาน (sTTX) ที่ซื้อมาจากบริษัทซิกม่าและบริษัทเออาร์ซี ประเทศสหรัฐอเมริกา ประกอบด้วย authentic TTX (*m/z* 319.15 และ *m/z* 319.10) และ TTX analogs คือ 11-anhydro-TTX (*m/z* 304), anhydro-TTX และ/หรือ 6-epianhydro-TTX (*m/z* 302) และ 4-epi-TTX (*m/z* 284)

ส่วน TTX และ analogs ในเนื้อเยื่อของปลาปักเป้าที่มาจากทะเลของประเทศไทยในการศึกษานี้ มีดังนี้

ปลาปักเป้าหลังเขียว (*L. lunaris*) นอกจากจะมี authentic TTX แล้วยังมี 6,11-dideoxy-TTX (*m/z* 288) และ trideoxy-TTX ที่สูญเสีย H^+ 2 อะตอม (*m/z* 270) อีกด้วย

ปลาปักเป้าหลังน้ำตาล (*L. spadiceus*) ตัวเดียวที่มี TTX เฉพาะในตับ นอกจากมี authentic TTX, anhydro-TTX และ/หรือ 6-epianhydro-TTX (*m/z* 302) และ 4-epi-TTX (*m/z* 284) เหมือนใน sTTX แล้วยังมี TTX analogs คือ 6,11 dideoxy-TTX (*m/z* 288) อีกด้วย

ปลาปักเป้าเขียวจุด (*T. nigroviridis*) มี authentic TTX (*m/z* 320) และ anhydro-TTX และ/หรือ 6-epianhydro-TTX (*m/z* 302) เหมือนใน sTTX

ปลาปักเป้าลายร่างแห (*A. reticularis*) มี authentic TTX และ TTX anlogs คือ *m/z* 302 (anhydro-TTX และ/หรือ 6-epianhydro-TTX และ *m/z* 284 (4-epi-TTX) เหมือนใน sTTX

4. เมื่อใช้ sTTX เป็นแอนติเจนในฟาจไบโอแพนนิงกับฟาจในแอนติบอดีไลบรารีของมนุษย์ พบว่า สามารถคัดเลือกอีโคไลที่ถูกทรานซฟอร์มด้วยฟาจมิดที่มียีนของแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์สอดอยู่ และเป็นอีโคไลที่สามารถผลิตแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ที่จับกับ sTTX ได้ 2 โคลนให้ชื่อว่าโคลน s16 และ s35

เมื่อใช้ TTX ที่สกัดจากปลาปักเป้า (pTTX) เป็นแอนติเจนในฟาจไบโอแพนนิงกับฟาจในแอนติบอดีไลบรารีของมนุษย์ พบว่า สามารถคัดเลือกอีโคไลที่ถูกทรานซฟอร์มด้วยฟาจมิดที่มียีนของแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์สอดอยู่ และเป็นอีโคไลที่สามารถผลิตแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ ได้ 9 โคลนให้ชื่อว่า p1, p2, p4, p5, p6, p8, p9, p11 และ p12 และมีแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ที่จับกับ sTTX ได้ 2 โคลน คือ p6 และ p12

5. สายดีเอ็นเอที่เป็นรหัสพันธุกรรมของแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดสายเดี่ยวของอีโคไลที่ถูกทรานซฟอร์มด้วยฟาจมิดที่มียีนของแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์สอดอยู่ ทั้ง 11 โคลนมี อาร์เอฟแอลพี (restriction fragment length polymorphism; RFLP) จากการตัดด้วยเอนโดนิวคลีเอส

ชนิดเอ็มวาหนึ่ง (*Mva*I) แตกต่างกัน 8 แบบ ให้ชื่อว่า แบบ A ถึง แบบ H โดยโคลน s16 เป็นแบบ A โคลน s35 และ p11 ซึ่งเหมือนกันเป็นแบบ B โคลน p1 เป็นแบบ C โคลน p2 และ p8 ซึ่งเหมือนกันเป็นแบบ D โคลน p4 เป็นแบบ E โคลน p5 เป็นแบบ F โคลน p6 และ p9 ซึ่งเหมือนกันเป็นแบบ G และโคลน p12 เป็นแบบ H

6. ได้ศึกษาและแสดง nucleotide และ deduced amino acid sequences ของ immunoglobulin frameworks และ CDRs ของ HuScFv ของ clones s16 และ s35

7. ยีนของแอนติบอดีสายเดี่ยวของโคลน s16 และ s35 ถูกซับโคลนเข้าสู่ระบบพลาสมิดชนิด pET23b^{+} และใช้อีโคไลสายพันธุ์ BL21 (DE23) ในการผลิต แอนติบอดีสายเดี่ยว และสามารถแยกแอนติบอดีสายเดี่ยวบริสุทธิ์ออกมาจากลัยเซทของอีโคไลได้ด้วยแอฟฟินิทีเรซิน

8. แอนติบอดีของมนุษย์ชนิดสายเดี่ยวทั้งจากจากโคลน s16 และ s35 สามารถลบล้างพิษของสารพิษ TTX จากปลาปักเป้าไทย (pTTX) ได้ ในเซลล์เพาะเลี้ยง กล่าวคือแอนติบอดีจากโคลน s16 และ s35 ปริมาณ 2.5 ไมโครกรัม สามารถลบล้าง (neutralized) สารพิษ TTX ปริมาณ 200 นาโนโมลาร์ ได้ร้อยละ 95.15 และ 67.08 ตามลำดับ

9. เมื่อผสมสารพิษเทโทรโดบริสุทธิ์ จากปลาปักเป้า (pTTX) ปริมาณ 1.5 MU หรือ 0.3 ไมโครกรัม กับแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดสายเดี่ยวจากโคลน s16 (60 ไมโครกรัม) (จำนวนโมเลกุลแอนติบอดีสายเดี่ยว : สารพิษ = 2.32 : 1) ก่อนฉีดเข้าช่องท้องหนูไมซ์ ซึ่งเป็นวิธีทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีแบบมาตรฐาน พบว่าแอนติบอดีจากโคลน s16 สามารถยืดเวลาตายของหนูไมซ์จาก 8.02 $\pm$ 0.08 นาทีในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแอนติบอดี เป็น 13.95 $\pm$ 1.49 นาที ในกลุ่มที่ได้รับแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดสายเดี่ยว ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า $p <$ 0.0001

ในกลุ่มที่ได้รับแอนติบอดีจากโคลน s35 (100 ไมโครกรัม) ผสมกับสารพิษ pTTX (1 MU หรือ 0.2 ไมโครกรัม) (จำนวนโมเลกุลแอนติบอดีสายเดี่ยว : สารพิษ = 5.42 : 1) พบว่าแอนติบอดีจากโคลน s35 สามารถยืดเวลาตายของหนูไมซ์ จาก 19.19 $\pm$ 1.84 นาที เป็น 24.35 $\pm$ 2.82 นาทีในกลุ่มที่ไม่ได้รับแอนติบอดี ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า p = 0.028)

10. เมื่อให้หนูทดลองกินสารพิษเทโทรโดทอกซินว่าแม้จะให้ pTTX ในปริมาณมากถึง 10 MU ของเมื่อฉีดเข้าช่องท้อง ก็ไม่สามารถทำให้หนูตายได้ด้วยการกิน

เมื่อฉีด 1.5 MU หรือ 0.3 ไมโครกรัม pTTX เข้าช่องท้อง และหลังจากนั้น 2 นาทีฉีดแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดสายเดี่ยวจากโคลน s16 ปริมาณ 180 ไมโครกรัมใน PBS 900 ไมโครลิตร เข้าช่องท้อง พบว่าสามารถยืดเวลาการตายของหนูทดลองออกไปจาก 12.75 $\pm$ 2.24 นาทีในกลุ่มที่

ไม่ได้รับแอนติบอดี เป็น 26.59 ± 10.47 นาทีเมื่อได้รับแอนติบอดี (ยืดเวลาตายออกไปประมาณ 13.84 นาที) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า $p = 0.037$)

เมื่อลดปริมาณสารพิษที่ใช้ฉีดเข้าช่องท้องของหนูไมซ์ลงเหลือ 0.9 MU (0.18 ไมโครกรัม) pTTX และฉีดแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดสายเดี่ยวจากโคลน s16 เข้าช่องท้อง ปริมาณ 96.83 ไมโครกรัมในพีบีเอส 900 ไมโครลิตร (อัตราส่วนแอนติบอดีต่อสารพิษ 6.20 : 1) พบว่าหนูที่ได้รับแอนติบอดีรอดชีวิตทุกตัว ส่วนหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแอนติบอดีตายทั้งหมดโดยเวลาตายเฉลี่ยของหนูในกลุ่มนี้ คือ 44.17 ± 9.89 นาที

จากกิจกรรมและผลการวิจัยสรุปได้ว่าสามารถผลิตแอนติบอดีสายเดี่ยวชนิดโมโนโคลนาลที่เป็นโปรตีนของมนุษย์โดยสมบูรณ์จากคลังของฟาจที่ดิสเพลย์แอนติบอดีของมนุษย์ และแอนติบอดีดังกล่าวสามารถลบล้างพิษของสารพิษเทโทรโดและอะนาลอกส์ได้ทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงและในหนูทดลอง