พระมหากรุณาธิคุณ สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

สารกีดขวางช่องโซเดียม

1. ประวัติความเป็นมา

ก. สารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่ม tetrodotoxin (TTXs)

สารกลุ่มนี้ พบครั้งแรกในปลาวงศ์ Tetraodontiformes (2) หรือเรียกชื่อทั่วไปในภาษาไทยว่า ปลาปักเป้า ต่อมาในปี 1968 Wakely และคณะ (24) รายงานการพบสารกลุ่ม TTXs ในสัตว์ชนิดอื่น ได้แก่ California newts จากนั้น มีผู้พบสารกลุ่มนี้ในสัตว์ชนิดอื่นๆ อีกหลายชนิด เช่น กบ Atelopus varius (25), ปลาหมึก Hepatochlaena maculosa (26) เป็นต้น ซึ่งสัตว์ที่พบว่ามีสารกลุ่ม TTXs เหล่านี้ไม่มีความใกล้ชิดกันทางด้านพันธุกรรม ดังนั้นจึงคิดว่าสารกลุ่ม TTXs ที่พบในสัตว์อาจมาจากแหล่งกำเนิดภายนอก โดยมีหลักฐานสนับสนุนความคิดนี้ เช่น Yasumoto และคณะ (4) พบว่าปลาปักเป้าชนิดที่มีสารกลุ่ม TTXs เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ (axenic culture) จะไม่พบสารกลุ่มนี้เปรียบเทียบกับเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในสภาพธรรมชาติ จะพบสารกลุ่ม TTXs นอกจากนั้น กลุ่มผู้วิจัยยังได้สังเกตพบอีกว่า ความเป็นพิษ (toxicity) เนื่องจากสารกลุ่ม TTXs ของปลาปักเป้าแต่ละตัวจะแตกต่างกันตามสถานที่อยู่และขึ้นกับปลาแต่ละตัว และได้วิเคราะห์พบสารกลุ่ม TTXs ในปูทะเลชนิดหนึ่ง คือ Altergatis floridis รวมทั้งในสาหร่ายสีแดง Jania sp. ที่เป็นอาหารของปูชนิดดังกล่าวด้วย ดังนั้นจึงตั้งสมมุติฐานว่าปูได้รับสารกลุ่ม TTXs จากสาหร่ายที่กินเป็นอาหาร จากนั้นได้ศึกษาแบคทีเรีย Pseudomonas sp. ที่แยกได้จากสาหร่ายสีแดงชนิดนี้ พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่ม TTXs คือ tetrodotoxin และอนุพันธ์บางชนิด ในเซลล์ได้เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว ที่อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 12 วันโดยไม่ให้อากาศ ซึ่งเป็นครั้งแรกที่มีรายงานว่าแบคทีเรียบางชนิดสร้างสารกลุ่ม TTXsได้

ต่อมา Noguchi และคณะ (5) แยกแบคทีเรียจากลำไส้ของปู ชนิดที่ Yasumoto และคณะทำการศึกษา (4) พบว่าแบคทีเรียชนิดที่พบมาก คือ Vibrio sp. เมื่อนำแบคทีเรียดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเหลว ที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 10 วัน และวิเคราะห์ส่วนที่สกัดได้จากภายในเซลล์แบคทีเรียทางเคมีพบว่ามี tetrodotoxin ดังนั้นจึงสรุปว่าแบคทีเรียสกุล Vibrio บางสายพันธุ์สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมชนิด TTX ได้ และตั้งสมมุติฐานว่า แบคทีเรียอาจเป็นต้นกำเนิดของการพบสารกลุ่ม TTXs ในสัตว์ชนิดต่างๆ โดยสัตว์ได้รับผ่านทางลูกโซ่อาหาร (food chain)

นอกจากนั้น Yotsu และคณะ (7) รายงานว่าแบคทีเรีย Pseudomonas sp. ที่แยกได้จากผิวหนังของปลาปักเป้าชนิดหนึ่งสร้าง TTX ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 6 วัน โดยมีการเขย่า และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 5°ซ อีกเป็นเวลา 4 วัน

การศึกษาเพื่อพิสูจน์ว่าแบคทีเรียบางชนิดสร้างสารกลุ่ม TTXs ได้นั้น ส่วนใหญ่มักจะศึกษาแบคทีเรียที่แยกได้จากส่วนต่าง ๆ ของสัตว์ที่มีสารกลุ่มนี้ ต่อมา Shimidu และคณะ (6) ศึกษาแบคทีเรียตระกูล Vibrionaceae สกุลต่างๆ ได้แก่ Vibrio, Aeromonas, Photobacterium , Alteromonas และ Plesiomonas ซึ่งปกติจะพบแบคทีเรียพวกนี้ได้ในน้ำทะเลและสัตว์ทะเล โดยนำแบคทีเรียมาจากแหล่งเก็บรักษาเชื้อ (culture-collections) และเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่อุณหภูมิ 20°ซ เป็นเวลา 24-30 ชม. และนำส่วนที่สกัดได้จากภายในเซลล์แบคทีเรียมาวิเคราะห์พบสาร TTX และอนุพันธ์ของ TTX บางชนิด

นอกจากนั้น Do และคณะ (8) แยกแบคทีเรียจากตะกอนในทะเลลึก (deep-sea sediment) และนำแบคทีเรียที่แยกได้มาตรวจสอบการสร้างสารกลุ่ม TTXs ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่อุณหภูมิ 25°ซ โดยมีการเขย่าเป็นเวลา 3 วัน ผลปรากฏว่า จากจำนวนแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 49 สายพันธุ์ สามารถสร้างสารกลุ่ม TTXs ได้ถึง 22 สายพันธุ์ และเมื่อนำแบคทีเรียดังกล่าวมาจัดจำแนกพบว่า มีทั้งชนิดกรัมบวกและกรัมลบ ตัวอย่างเช่น Bacillus, Micrococcus , Acenetobacter , Aeromonas , Moraxella และ Vibrio เป็นต้น

จะเห็นได้ว่า แบคทีเรียที่สร้างสารกลุ่ม TTXs ได้ มีการกระจายอยู่ในแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ อย่างไม่จำเพาะเจาะจง โดยมีข้อสังเกตว่าแบคทีเรียเหล่านี้ อาจเป็นแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ในการเจริญก็ได้ เช่น Bacillus sp. (8) เป็นต้น

จากการศึกษาทั้งหมดที่กล่าวมาแล้ว จึงมีความเป็นไปได้ที่แบคทีเรียอาจเกี่ยวข้องกับการพบสารกลุ่ม TTXs ในสัตว์ชนิดต่างๆ ซึ่งควรจะต้องมีการศึกษาให้แน่ชัดต่อไป

ข. สารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่ม saxitoxin (STXs)

พบครั้งแรกในหอย Saxidomonas gigantius ซึ่งเป็นหอยกาบน้ำเค็มชนิดหนึ่ง โดยพบอนุพันธ์ saxitoxin(STX) (10) ต่อมาพบอนุพันธ์ของ STX คือ gonyautoxin (GTX) ในแพลงตอนพืชพวกไดโนแฟลเจลเลต (dinoflagellate) บางชนิด (12,13) และพบสารกลุ่มนี้ในสัตว์น้ำอีกหลายชนิดซึ่งส่วนใหญ่เป็นสัตว์พวกหอยสองฝา ได้แก่ หอยกาบ (clam) (13) และหอยแมลงภู่ (green mussel) เป็นต้น (11) จากการศึกษาต่อมาพบว่า สารกลุ่ม STXs สร้างโดยไดโนแฟลเจลเลตบางชนิด และการที่สัตว์น้ำมีสารพิษกลุ่มนี้ เนื่องจากกินแพลงตอนที่มีพิษนี้เข้าไป

Boyer และคณะ (27) ศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารกลุ่ม STXs อนุพันธ์ GTX ในไดโนแฟลเจลเลต Protogonyaulax tamarensis พบว่าการสร้างขึ้นกับปัจจัยทางสรีรวิทยา และสิ่งแวดล้อมบางประการ เช่น ขึ้นกับช่วงระยะต่างๆของการเจริญ (growth-stage) ความเค็ม อุณหภูมิ และปริมาณสารอาหารในน้ำทะเล รวมทั้ง ความเข้มของแสงที่ได้รับ

มีผู้เสนอความคิดที่ว่า อาจมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่ม STXs ได้ โดยเริ่มจากการศึกษาของ Ogata และคณะ (14) ที่กล่าวว่าการสร้างสารกลุ่ม STXs ในไดโนแฟลเจลเลตไม่ใช่ลักษณะทางพันธุกรรมเนื่องจากพบว่าความเป็นพิษของไดโนแฟลเจลเลต P. tamarensis ในแต่ละเซลล์ที่เจริญมาจากเซลล์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด นอกจากนั้น Nelinda (16) ได้ตั้งสมมุติฐานว่า สารกลุ่ม STXs ในไดโนแฟลเจลเลตชนิดนี้มาจากแบคทีเรียที่อยู่ภายในเซลล์ของมัน แต่ยังไม่สามารถแยกแบคทีเรียดังกล่าวมาศึกษาได้

Kodama และ Ogata (17) ได้ ตรวจดูภาคตัดขวาง (section) ของเซลล์ไดโนแฟลเจลเลต P.tamarensis ที่มีพิษด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน และพบเซลล์ของแบคทีเรียอยู่ภายใน เมื่อแยกแบคทีเรียดังกล่าวมาศึกษาพบว่า เป็นแบคทีเรียสกุล Moraxella จากนั้นจึงนำมาตรวจสอบการสร้างสารกลุ่ม STXs ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลานาน 4 วัน โดยมีการเขย่า และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ อีกเป็นเวลา 4 วัน พบว่าแบคทีเรีย Moraxella สร้างสาร STX ได้ ซึ่งเป็นรายงานแรกที่พบว่ามีจุลินทรีย์ชนิดอื่น คือ แบคทีเรียสร้างสารกลุ่ม STXs ได้ แม้ว่าปริมาณที่พบจะน้อยกว่าในไดโนแฟลเจลเลตมากก็ตาม (20) และต่อมาเขายังได้แยกแบคทีเรีย Moraxella sp. ที่สร้างสารกลุ่ม STX ได้จากน้ำทะเลด้วย (28) รวมทั้งเสนอสมมุติฐานว่า พิษของหอยบางชนิดเนื่องจากสารกลุ่ม STXs ที่เกิดขึ้นในขณะที่ไม่มีไดโนแฟลเจลเลตที่มีพิษ อาจมาจากแบคทีเรียที่หอยกินเข้าไป

นอกจากนั้น Kodama และคณะ (28) ศึกษาการสร้างสารกลุ่ม STXs ในแบคทีเรีย Moraxella sp. ที่เขาแยกได้ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อต่างๆ พบว่าในสภาวะที่ขาดอาหาร Moraxella ซึ่งเดิมพบว่าสร้างอนุพันธ์ saxitoxin (STX) ได้ (18) จะสร้างสารอนุพันธ์ gonyautoxin (GTX) ในปริมาณที่สูง ซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัดถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องและกลไกในการสร้างสารกลุ่มนี้ในแบคทีเรีย

ตารางที่ 1 แสดงสกุลของแบคทีเรียที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่ม TTXs หรือ STXs และอนุพันธ์ได้ (*)

	แหล่งที่มา	เอกสารอ้างอิง
แบคทีเรียที่สร้างสารกลุ่ม TTXs		
Pseudomonas	สาหร่ายทะเลบางชนิด,ปลาปักเป้าบางชนิด	4,7
Vibrio	แหล่งเก็บรักษาเชื้อ (ATCC,NCMB), ตะกอนใต้ทะเล, ปูทะเลบางชนิด	5,6,8
Aeromonas	แหล่งเก็บรักษาเชื้อ (ATCC,NCMB), ตะกอนใต้ทะเล	6,8
Plesiomonas	แหล่งเก็บรักษาเชื้อ (ATCC)	6
Alteromonas	แหล่งเก็บรักษาเชื้อ (ATCC)	6
Acinetobacter	ตะกอนใต้ทะเล	8
Moraxella	ตะกอนใต้ทะเล	8
Bacillus	ตะกอนใต้ทะเล	8
Micrococcus	ตะกอนใต้ทะเล	8
แบคทีเรียที่สร้างสารกลุ่ม STXs		
Moraxella	ไดโนแฟลเจลเลตบางชนิด ,น้ำทะเล	18,28

* = รวบรวมได้จากการตรวจเอกสาร

ATCC = The American Type of Culture Collection

NCMB = The National Collection of Marine Bacteria

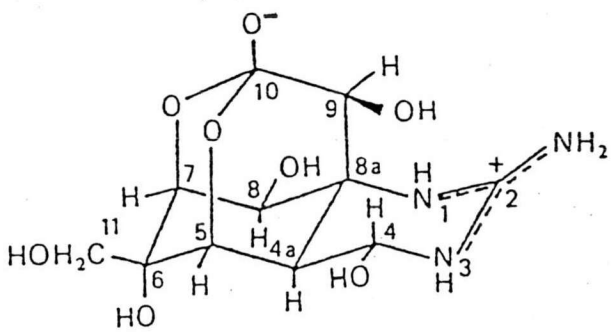
2. สมบัติของสารกีดขวางช่องโซเดียม

ก. สารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่ม tetrodotoxin (TTXs) (29)

สารอนุพันธ์ที่เป็นตัวแทนของสารในกลุ่มนี้ได้แก่สาร tetrodotoxin (TTX) ซึ่งมีชื่อสามัญอื่นๆ เช่น maculotoxin, spheroidine, tarichatoxin และ fugu poison เป็นต้น

สูตรโมเลกุล	$C_{11}H_{17}N_3O_8$
น้ำหนักโมเลกุล	319.28
โครงสร้างโมเลกุล	ดังรูปที่ 1

รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสารกีดขวางช่องโซเดียมอนุพันธ์ tetrodotoxin (TTX)



จากโครงสร้างโมเลกุลของสารดังรูปที่ 1 จะพบหมู่กัวนิดิเนียม (guanidinium-group) 1 หมู่ ในโมเลกุล

ค่าคงที่ของการแตกตัว (pKa) 8.76

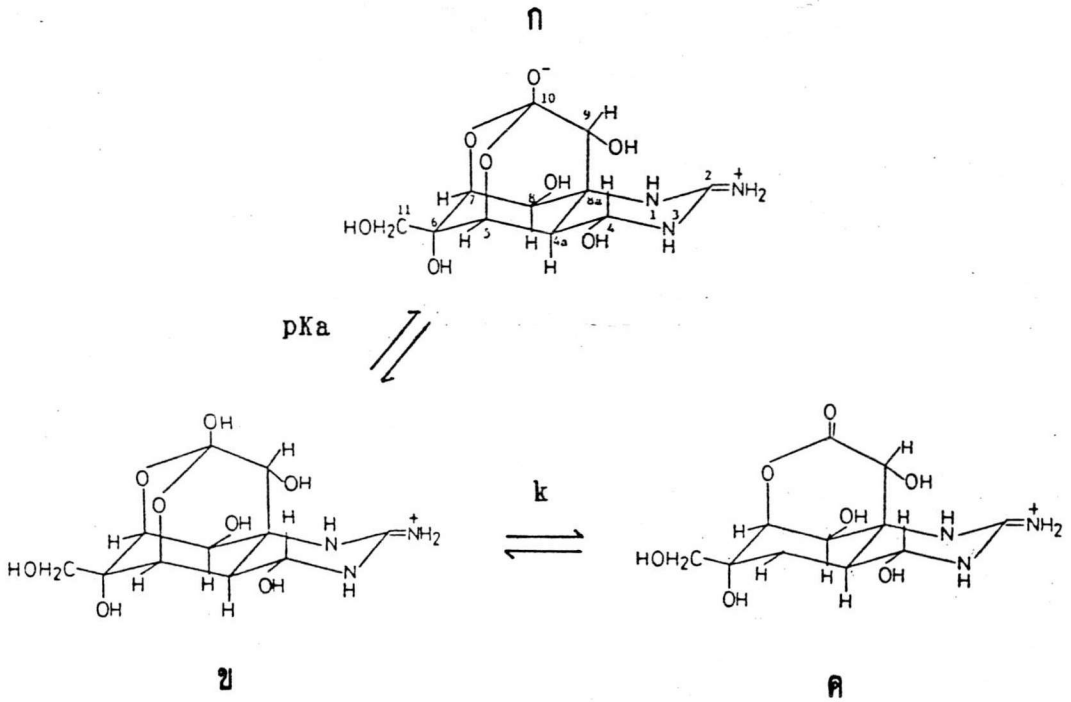
การละลาย(solubility) ละลายได้ดีในกรดอะซีติคเจือจาง(dil.acetic acid) ละลายได้บางส่วนในน้ำ,แอลกอฮอล์ (alcohol) และอีเทอร์ (ether)ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ชนิดอื่นๆ

ความเสถียร(stability) ถูกทำลายอย่างรวดเร็วในกรดแก่และด่าง

ความเป็นพิษ(toxicity) ค่า LD 50 ในหนูเมื่อฉีดเข้าช่องท้อง (i.p.) คือ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

จากการศึกษาพบว่าโครงสร้างโมเลกุลของ tetrodotoxin มีลักษณะพิเศษ (unique structure) ที่ไม่พบในสารประกอบชนิดอื่นๆ กล่าวคือ มีลักษณะโครงสร้างแบบ aminoperhydroquinazoline ที่มีหมู่กัวนิดิเนียม (guanidinium group) 1 หมู่ และสามารถเกิดโครงสร้างแบบ switterion ที่หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 10 ได้ (2) ดังรูปที่ 2

รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างโมเลกุลสารกีดขวางช่องโซเดียมอนุพันธ์ tetrodotoxin (TTX) ในสารละลาย (2)

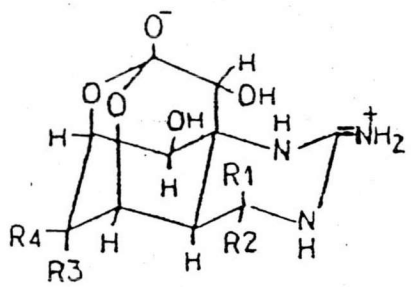


ก. รูปที่มีทั้งประจุบวกและประจุลบ (switterion form)

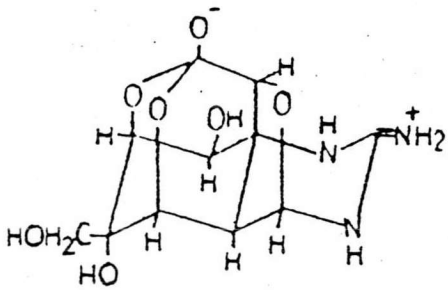
ข และ ค รูปที่มีประจุบวก (cationic form)

สารกลุ่ม TTXs พบในธรรมชาติแล้วมากกว่า 6 อนุพันธ์ (10) ดังรูปที่ 3 โดยจะสังเกตุเห็นว่า สารแต่ละอนุพันธ์มีความแตกต่างกันที่หมู่ข้างเคียง (side- chain group) ซึ่งมีจำนวน 4 หมู่ คือ R_1 ถึง R_4

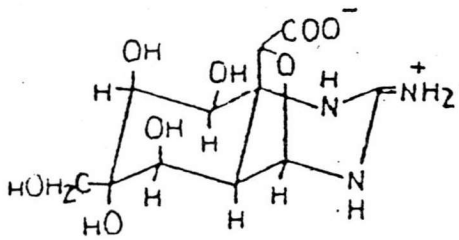
รูปที่ 3 แสดงตัวอย่างโครงสร้างโมเลกุลของสารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่ม tetrodotoxins 6 อนุพันธ์ (10)



อนุพันธ์	หมู่ข้างเคียง			
	R1	R2	R3	R4
tetrodotoxin	H	OH	OH	CH_2OH
4-epi-tetrodotoxin	OH	H	OH	CH_2OH
6-epi-tetrodotoxin	H	OH	CH_2OH	OH
11-deoxy-tetrodotoxin	H	OH	OH	CH_3



anhydrotetrodotoxin



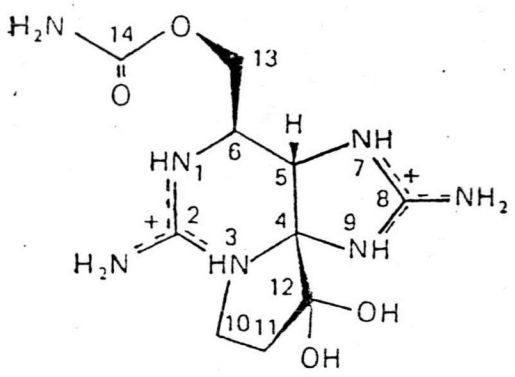
tetrodonic acid

ข. สารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่ม saxitoxins (STXs) (29)

สารอนุพันธ์ที่เป็นตัวแทนของสารกลุ่มนี้ คือ สาร saxitoxin (STX) ซึ่งมีชื่อสามัญอื่นๆ เช่น mussel poison , clam poison และ gonyaulax toxin เป็นต้น

สูตรโมเลกุล	$C_{10}H_{17}N_7O_4$
น้ำหนักโมเลกุล	299.30
โครงสร้างโมเลกุล	ดังรูปที่ 3

รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสารกีดขวางช่องโซเดียมอนุพันธ์ saxitoxin (STX) (30)



จากรูปที่ 4 จะเห็นว่าภายในโมเลกุลของสารจะมีหมู่กัวนิดิเนียม 2 หมู่

ค่าคงที่การแตกตัว(pKa) 8.24 และ 11.60

การละลาย ละลายได้ดีในน้ำและเมทธานอล ละลายได้บางส่วนในเอทธานอลและแกลเซียลอะซีติคแอซิด ไม่ละลายในตัวทำละลายไขมัน (lipid solvents)

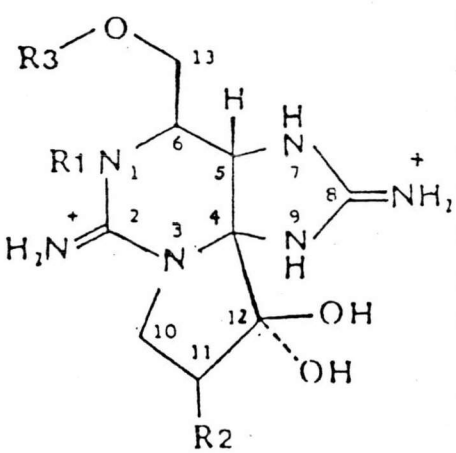
ความเสถียร เสถียรในสารละลายกรด สลายตัวอย่างรวดเร็วในสารละลายด่างและในกรดค่าความเป็นกรดด่าง 3 จะสูญเสียแอคติวิตี (activity)เมื่อต้ม 3-4 ชม.

ความเป็นพิษ ค่า LD50 ในหนูเมื่อฉีดเข้าช่องท้องคือ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

จะเห็นได้ว่าโครงสร้างโมเลกุลของสารกลุ่ม STXs มีลักษณะเป็นอนุพันธ์ของสารเพียวรีน (purine derivative) โดยมีหมู่กัวนิดิเนียม 2 หมู่ และมีลักษณะพิเศษคือหน่วยกัวนิดีน (guanidine unit) 2 หน่วยหลอมรวมกันเกิดเป็น azaketal linkage ที่เสถียร ซึ่งไม่พบในสารประกอบจากธรรมชาติชนิดอื่นๆ (2)

สารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่ม STXs ประกอบด้วยสารหลายอนุพันธ์ดังรูปที่ 5

รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสารกลุ่ม STXs อนุพันธ์ต่างๆ ที่พบในธรรมชาติ (30)



อนุพันธ์	หมู่ข้างเคียง		
	R1	R2	R3
saxitoxin	-H	-H	$-CONH_2$
neosaxitoxin	-OH	-H	$-CONH_2$
gonyautoxin-I	-OH	$-\alpha OSO_3^-$	$-CONH_2$
gonyautoxin-II	-H	$-\alpha OSO_3^-$	$-CONH_2$
gonyautoxin-III	-H	$-\beta OSO_3^-$	$-CONH_2$
gonyautoxin-IV	-OH	$-\beta OSO_3^-$	$-CONH_2$
gonyautoxin-V	-H	-H	$-CONHSO_3^-$
gonyautoxin-VI	-OH	-H	$-CONHSO_3^-$
gonyautoxin-VIII	-H	$-\beta OSO_3^-$	$-CONHSO_3^-$
sulfocarbamoyl gonyautoxin-II	-H	$-\alpha OSO_3^-$	$-CONHSO_3^-$
sulfocarbamoyl gonyautoxin-I	-OH	$-\alpha OSO_3^-$	$-CONHSO_3^-$
sulfocarbamoyl gonyautoxin-IV	-OH	$-\beta OSO_3^-$	$-CONHSO_3^-$
decarbamoylsaxitoxin	-H	-H	-H

จะพบว่าสารกลุ่ม STXs แต่ละอนุพันธ์ จะแตกต่างกันตรงหมู่ข้างเคียง จำนวน 3 หมู่ (R_1 ถึง R_3) ซึ่งมีผลต่อความสามารถในการกีดขวางช่องโซเดียม

3. กลไกทางชีวภาพ

ปัจจุบันนี้ยังไม่เป็นที่ทราบกันอย่างแน่ชัด ถึงปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของสารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่ม TTXs และ กลุ่ม STXs กับช่องโซเดียม ในการเกิดการกีดขวางช่องโซเดียม แต่จากการศึกษาสามารถตั้งสมมุติฐานได้ว่า การที่สารทั้งสองกลุ่มซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกันแต่มีกลไกทางชีวภาพเหมือนกัน เนื่องจากการมีหมู่กัวนิดิเนียม (guanidinium group) ในโมเลกุลเช่นเดียวกัน (31)

Kao และ Nishiyama (32) เสนอสมมุติฐานว่าหมู่กัวนิดิเนียม จะเข้าไปในช่องโซเดียมได้โดยการเกิดแรงดึงดูดทางไฟฟ้าสถิตย์ (electrostatic attraction) ระหว่างประจุบวกของหมู่กัวนิดิเนียมกับประจุลบของช่องโซเดียมบนเยื่อเซลล์ประสาท และกล่าวว่าส่วนของโมเลกุลของสารที่เหลือจะมีขนาดใหญ่จนไม่สามารถผ่านเข้าไปในช่องโซเดียมได้ นอกจากนั้นยังเกิดการสร้างพันธะระหว่างหมู่บางหมู่ของสาร กับหมู่บนเยื่อเซลล์อีกด้วย ทำให้การจับกันระหว่างสารกับช่องโซเดียมมีความจำเพาะและแข็งแรง

ต่อมา Kao และ Walker (33) ทำการทดลองหาหมู่บนสารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่ม TTXs และกลุ่ม STXs ที่เป็นตัวทำให้เกิดกลไกจำเพาะนี้ และพบว่าในกรณีของสารกลุ่ม TTXs หมู่บนโมเลกุลที่เกี่ยวข้องคือหมู่กัวนิดิเนียมซึ่งอยู่ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1,2 และ 3 และหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 4,9 และ 10 ของโมเลกุล ส่วนหมู่บนสารกลุ่ม STXs ที่เกี่ยวข้องได้แก่ หมู่กัวนิดิเนียมที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 7,8,และ 9 และหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 12 ของโมเลกุล ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงที่หมู่ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดกลไกดังกล่าว จึงมีผลต่อกลไกในการออกฤทธิ์ของสาร ซึ่งเป็นเหตุผลหนึ่งที่ใช้อธิบายการที่สารกีดขวางช่องโซเดียมอนุพันธ์ต่างๆ มีความสามารถในการกีดขวางช่องโซเดียมได้แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่นการที่สารกลุ่ม TTXs อนุพันธ์หนึ่งคือ anhydro-TTX มีความสามารถในการกีดขวางช่องโซเดียมต่ำกว่าสาร TTX เนื่องจากเกิดการสูญเสียไฮโดรเจนอะตอมที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับช่องโซเดียมที่หมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 4 นั่นเอง (33)

4. การวิเคราะห์ชนิดของสารและการทำให้สารบริสุทธิ์

การวิเคราะห์ชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียมอาศัยหลักการในเรื่องกลไกทางชีวภาพรวมทั้งคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของสาร เช่น ขนาดของโมเลกุล ประจุ และการละลาย เป็นต้น วิธีที่นิยมใช้มีหลายวิธี ดังนี้

4.1 วิธีทางชีวภาพ mouse bioassay (34)

โดยสกัดสารออกมาจากตัวอย่าง และนำไปฉีดหนูขาว (swiss mice) สังเกตอาการของหนูและบันทึกเวลาที่หนูตาย นำมาคำนวณหาความเป็นพิษ (toxicity) ได้จากตาราง dose-death time หน่วยที่ใช้บอกความเป็นพิษ ได้แก่ mouse unit(MU) โดย 1 mouse unit หมายถึง ปริมาณของสารที่ทำให้หนูตัวผู้น้ำหนัก 20 กรัม ตายภายในเวลา 30 นาที

วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้วิเคราะห์แบบคร่าวๆ ได้อย่างรวดเร็ว แต่มีข้อเสียคือมีความไวต่ำ นอกจากนั้นยังมีความถูกต้อง (accuracy) ต่ำ และไม่สามารถจำแนกชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียมแต่ละกลุ่มได้ จึงมักใช้เป็นวิธีตรวจสอบเบื้องต้น และต้องใช้วิธีวิเคราะห์ชนิดอื่นควบคู่ไปด้วย

4.2 วิธีทางชีวภาพ tissue culture assay (42)

อาศัยหลักกลไกทางชีวภาพของสารคือการกีดขวางช่องโซเดียมอิออนเช่นเดียวกับวิธี mouse bioassay ที่ได้กล่าวมาแล้ว โดยใช้เซลล์ประสาทของหนูที่เป็นเซลล์เพาะเลี้ยง (mouse neuroblastoma cell line) เมื่อมีสารอีกสองชนิดอยู่ด้วย คือ สารเวอราติดีน (veratridine) ซึ่งมีผลในการเพิ่มการผ่านเข้าไปในเซลล์ของโซเดียมอิออน และสารวอบาย (ouabain) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งจำเพาะ (specific inhibitor) ของเอนไซม์โซเดียมโปตัสเซียมเอทีพีเอส ($Na^+ - K^+$ ATPase) สารทั้งสองชนิดดังกล่าวจะทำให้มีโซเดียมอิออนผ่านเข้าไปในเซลล์ประสาทหนูมากขึ้น จนทำให้เซลล์เกิดการบวมและตายในที่สุด แต่เมื่อมีสารกลุ่ม TTXs หรือกลุ่ม STXs อยู่ด้วย สารนี้จะกีดขวางที่ช่องโซเดียมของเซลล์ประสาทหนู ทำให้โซเดียมอิออนผ่านเข้าไปไม่ได้ ดังนั้นเซลล์จึงไม่เกิดการบวมและยังคงมีชีวิต (survival cell)

คำนวณหาร้อยละของเซลล์ประสาทหนูที่ยังมีชีวิต และนำไปหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมได้จากกราฟมาตรฐาน

วิธีนี้จัดเป็นวิธีทางชีวภาพที่มีความไวสูงและสะดวกกว่าวิธี mouse bioassay แต่มีข้อจำกัดคือไม่สามารถจำแนกชนิดของสารแต่ละอนุพันธ์ได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงต้องใช้วิธีนี้ควบคู่กับวิธีวิเคราะห์ทางเคมีอื่นๆ

4.3 วิธีโครมาโตกราฟีชนิดผิวบาง (thin layer chromatography, TLC) (9,20,35,36)

เป็นวิธีที่อาศัยหลักความสามารถของสารกัดขวางช่องโซเดียมในการละลายในส่วนที่เคลื่อนที่ (mobile phase) และส่วนที่ไม่เคลื่อนที่ (stationary phase) โดยใช้สารละลายที่ประกอบด้วยไพริดีน (pyridine),เอทธิลอะซิเตต (ethyl acetate),กรดอะซีติคและน้ำในอัตราส่วนที่เหมาะสม และใช้ซิลิกาเจล (silica gel) เป็นตัวดูดซับ (supporter) จากนั้นจึงนำมาทำปฏิกิริยากับตัวออกซิไดซ์ (oxidizing reagent) เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) หรือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) เป็นต้น และให้ความร้อนเพื่อให้เกิดสารฟลูออโรฟลอร์ (fluorophore) (37) และตรวจสอบการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตช่วงความยาวคลื่นยาว

คำนวณหาค่า retention factor (Rf) ของสารเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

วิธีนี้มักใช้ร่วมกับวิธีอื่นๆในการวิเคราะห์ชนิดของสารกัดขวางช่องโซเดียม

4.4 วิธีอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis, EP) (38)

วิธีนี้อาศัยหลักการมีประจุบนโมเลกุลและขนาดของสาร ซึ่งสารประเภทกัดขวางช่องโซเดียมทั้งสองกลุ่ม จะมีหมู่กัวนิดิเนียมซึ่งมีประจุบวกอยู่ภายในโมเลกุล นอกจากนี้สารบางอนุพันธ์ยังมีหมู่อื่นๆ เช่น หมู่ซัลโฟคาร์บาโมอิล (sulfocabamoyl group) ซึ่งมีประจุลบในโมเลกุลอีกด้วย ทำให้สารแต่ละอนุพันธ์มีประจุสุทธิ (net charge) ไม่เท่ากัน จึงแยกจากกันได้โดยอาศัยกระแสไฟฟ้า นอกจากนั้น สารกลุ่มกัดขวางช่องโซเดียมยังมีขนาดโมเลกุลเล็ก คือมีขนาดไม่เกิน 400 ดาลตัน (29) จึงใช้วิธีอิเลคโตรโฟรีซีสบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตต (cellulose acetate membrane) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ และกระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมเป็นเวลาพอสมควร ตรวจสอบสารเรืองแสงโดยวิธีเดียวกับในวิธีโครมาโตกราฟีชนิดผิวบาง เปรียบเทียบระยะและทิศทางที่สารเคลื่อนที่กับสารมาตรฐาน

วิธี EP นี้ใช้วิเคราะห์สารกัดขวางช่องโซเดียมร่วมกับวิธีอื่นๆ เช่นเดียวกัน

017518

4.5 วิธีไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC)

วิธีนี้เป็นวิธีทางเคมีที่นิยมใช้วิเคราะห์ชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียมมากวิธีหนึ่งในปัจจุบัน โดยอาศัยหลักการมีขั้ว (polarity) ของสารแต่ละอนุพันธ์

การวิเคราะห์สารกลุ่ม TTXs (39)

ใช้วิธี HPLC แบบรีเวอร์สเฟสชนิดอิออนคู่ (paired-ion reverse phase HPLC) โดยใช้คอลัมน์ชนิด ODS (octadecanoylsilyl)โดยมีสารละลายเฮปตาฟลูออโรบิวทิริคแอซิด (heptafluorobutyric acid) เป็นสารแลกเปลี่ยนคู่อิออน (ion-pairing reagent) เมื่อสารผ่านออกจากคอลัมน์ จะเกิดปฏิกิริยากับตัวออกซิไดซ์ซึ่งได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) จากนั้นจึงให้ความร้อนเพื่อให้เกิดสารฟลูออโรฟลอร์ และตรวจสอบความเข้มของการเรืองแสงด้วยเครื่อง fluorometer

วิธี HPLC แบบดังกล่าวนี้มีความไวสูงกว่าวิธี HPLC แบบเดิมที่ใช้คือ แบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange HPLC) (40)

การวิเคราะห์สารกลุ่ม STXs (41)

นิยมใช้วิธี HPLC แบบ paired-ion reverse phase เช่นเดียวกับการวิเคราะห์สารกลุ่ม TTXs โดยใช้คอลัมน์ชนิด ODS และมีสารละลายเฮปเทนซัลโฟนิคแอซิด (heptanesulfonic acid) เป็นสารแลกเปลี่ยนคู่อิออน ปรับค่าความเป็นกรดด่างและโพลาริตีของโมบายล์เฟส (mobile phase) ให้เหมาะสมต่อการแยกสารแต่ละอนุพันธ์ สารที่ผ่านออกจากคอลัมน์จะเกิดปฏิกิริยากับตัวออกซิไดซ์ซึ่งได้แก่ กรดเปอร์ไอออดิก(periodic acid) หรือ กรดเปอร์คลอริค (perchloric acid) จากนั้นจึงตรวจสอบการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ด้วย วิธีเดียวกับการวิเคราะห์สารกลุ่ม TTXs

วิธีไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟีนี้ เป็นวิธีที่มีข้อได้เปรียบเหนือกว่าวิธีวิเคราะห์ทางชีวภาพและทางเคมีอื่นๆ กล่าวคือมีความไวสูง และสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งชนิดและปริมาณของสาร

นอกจากนี้ยังมีวิธีการวิเคราะห์โครงสร้างของสารด้วยวิธี Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) (43) อีกด้วยซึ่งสารตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์แต่ละวิธีควรมีความบริสุทธิ์ในระดับหนึ่ง วิธีที่นิยมใช้ในการทำให้สารกึดขวางช่องโซเดียมทั้งสองกลุ่มบริสุทธิ์ขึ้นได้แก่ วิธีโครมาโตกราฟีชนิดคอลัมน์ (column chomatography) โดยใช้คอลัมน์ 3 แบบ คือ แบบแลกเปลี่ยนอิออน (ion-exchange chromatography) แบบกรองผ่านเจล (gel filtration chromatography) และแบบรีเวอร์สเฟส (reverse phase chromatography) ตัวอย่างของคอลัมน์ที่ใช้มีดังนี้

แบบแลกเปลี่ยนอิออน : ไบโอเร็กซ์ 70 (Bio-Rex 70) (7)

: แอมเบอไลต์ จีซี 50 (Amberlite GC-50) (18,40)

แบบกรองผ่านเจล : ไบโอเจลพี 2 (Bio-Gel P-2) (5,7,20,24)

: เซฟฟาเด็กซ์ จี 15 (Sepphadex G-15) (4)

แบบรีเวิร์สเฟส ; เซพแพคซี 18 (Sep-Pak C18 cartridge) (14)

ซึ่งโครมาโตกราฟีชนิดคอลัมน์ทั้งสามแบบดังกล่าว สามารถทำให้สารกึดขวางช่องโซเดียมบริสุทธิ์ขึ้นโดยอาศัยคุณสมบัติในการมีขั้ว และขนาดโมเลกุลของสาร

5. ความสำคัญและการนำสารไปใช้ประโยชน์

เนื่องจากสารกีดขวางช่องโซเดียมทั้งสองกลุ่มคือกลุ่ม tetrodotoxin และ กลุ่ม saxitoxin เป็นสารประเภทที่มีกลไกต่อที่เฉพาะช่องโซเดียมของเซลล์เท่านั้น ดังนั้นสารทั้งสองกลุ่มจึงจัดเป็นสารพิษที่มีผลต่อระบบประสาทของสัตว์ชั้นสูง โดยเมื่อสัตว์ชนิดต่างๆ รวมทั้งมนุษย์ ได้รับสารเหล่านี้เข้าไปในปริมาณหนึ่ง จะเกิดอาการอัมพาตของกล้ามเนื้อ และอาจทำให้ตายได้ (2) และจากกลไกที่จำเพาะของสารดังกล่าว จึงสามารถนำสารมาใช้ประโยชน์ในด้านที่เกี่ยวข้องได้ เช่น ใช้ในการนับจำนวนของช่องโซเดียมในเซลล์ประสาทและกล้ามเนื้อของสัตว์ชนิดต่างๆ (2,31) โดยการจับของสารกับช่องโซเดียมจะเป็นแบบหนึ่งต่อหนึ่ง และนำมาใช้ศึกษาปรากฏการณ์การการถูกกระตุ้นของเซลล์ประสาทและเยื่อเซลล์ที่ถูกกระตุ้นได้ (31)

มีการทดลองนำสารประเภทนี้มาใช้เป็นยาชาเฉพาะที่ (local anesthetic agent) เนื่องจากมีความจำเพาะและความไวในการจับกับช่องโซเดียมสูง เช่น ธารา ตริตระการ และคณะ (22) ทดลองใช้สารกีดขวางช่องโซเดียมชนิด tetrodotoxin เป็นยาชาเฉพาะที่ โดยใช้สุนัขเป็นสัตว์ทดลอง พบว่าได้ผลดี และกล่าวว่าสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นยาชาที่ไขสันหลัง (spinal anesthesia) ได้ รวมทั้งอาจใช้ระงับความเจ็บปวดแก่ผู้ป่วยเป็นมะเร็งชนิดต่างๆ ได้ เมื่อปรับปริมาณที่ให้ (dose) และความเป็นกรดด่างของสารให้เหมาะสม

การนำสารทั้งสองกลุ่มมาใช้ประโยชน์ยังมีขีดจำกัดในวงแคบ เนื่องจากไม่สามารถหาสารมาใช้ในการทดลองได้อย่างเพียงพอ นอกจากนั้นสารบางอนุพันธ์ เช่น TTX ยังไม่เสถียรในสารละลายด่างและคุณสมบัติที่ไม่สามารถแทรกผ่าน (penetrate) เยื่อหุ้มเซลล์ประสาท (nerve sheath) ได้ (22) อย่างไรก็ดีสารนี้อาจนำมาใช้ในตำแหน่งอื่นที่ไม่ต้องแทรกผ่าน เช่นที่ไขสันหลัง เป็นต้น ซึ่งการใช้สารกีดขวางช่องโซเดียมเป็นยาชาเฉพาะที่มีข้อดีคือ สารนี้ไม่แพร่ไปยังเนื้อเยื่อและเข้าสู่กระแสเลือดเหมือนยาชาเฉพาะที่ชนิดอื่นๆ นอกจากนั้น เนื่องจากสารประเภทนี้มีกลไกต่อเฉพาะช่องโซเดียมเท่านั้น ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงบางอย่างที่โมเลกุลของสารให้ได้สารอนุพันธ์ใหม่จึงมีผลโดยตรงต่อช่องโซเดียมเท่านั้น และสามารถควบคุมได้ ดังนั้นถ้ามีการผลิตสารกีดขวางช่องโซเดียมให้เพียงพอ และควบคุมปัจจัยบางอย่างที่มีผลต่อกลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารต่อช่องโซเดียม จะทำให้สามารถนำสารประเภทนี้มาใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์ได้กว้างขวางยิ่งขึ้น

การที่มีผู้พบว่าแบคทีเรียสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมทั้งสองกลุ่มดังกล่าวได้ อาจเป็นแนวทางในการผลิตสารประเภทนี้จากแบคทีเรียเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ ซึ่งการผลิตสารจากแบคทีเรียมีข้อได้เปรียบคือ สามารถผลิตเป็นปริมาณมากได้ถ้ามีการควบคุมปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้อง ดังนั้นการวิจัยนี้จึงได้คัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างสารประเภทนี้ โดยแยกแบคทีเรียจากหอยแมลงภู่

ซึ่งมีแนวโน้มที่จะพบแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติดังกล่าว ทั้งนี้นอกจากจะเป็นแนวทางในการผลิตสารแล้วยังเป็นการพิสูจน์ว่า ความเป็นพิษที่เกิดขึ้นในบางครั้งของหอยแมลงภู่ อาจมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียได้

หอยแมลงภู่

หอยแมลงภู่ (Perna viridis Linn.) เป็นหอยสองฝาที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจและนิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายชนิดหนึ่งในประเทศไทย มีชื่อสามัญว่า green mussel หอยแมลงภู่สามารถจัดเรียงตามอนุกรมวิธานได้ดังนี้

Phylum Mollusca

Class Bivalvia

Subclass Filibranchia

Order Anisomyaria

Family Mytilidae

Genus Perna

Species Perna viridis

หอยแมลงภู่มีหลายสกุล เช่น Mytilus edulis Linn. มีการแพร่กระจายตามชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิคและแอตแลนติค สำหรับหอยแมลงภู่ที่พบในประเทศไทย คือ Perna viridis Linn. ซึ่งเป็นชนิดที่แพร่กระจายในบริเวณอินโดแปซิฟิค หอยแมลงภู่เป็นสัตว์ที่กินอาหารโดยวิธีกรอง ซึ่งอาหารส่วนใหญ่เป็นแพลงตอนพืช แบคทีเรีย และอินทรีย์สาร (44) บริเวณที่มีการเพาะเลี้ยงหอยแมลงภู่ที่ส่วนใหญ่มักอยู่ตามชายฝั่งทะเลที่มีระดับน้ำทะเลลึกประมาณ 4-6 เมตร ในเขตจังหวัดชลบุรี ฉะเชิงเทรา สมุทรปราการ สมุทรสงคราม เพชรบุรี และ ชุมพร

หอยแมลงภู่ที่เลือกมาใช้ในการวิจัยนี้นำมาจากแหล่งเพาะเลี้ยงบริเวณชายฝั่งทะเลของจังหวัดชลบุรี บริเวณนี้จัดเป็นทะเลส่วนในของอ่าวไทย ซึ่งมีอาณาเขตรวมถึงบริเวณชายฝั่งทะเลของจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ซึ่งเป็นสถานที่ที่เคยมีปรากฏการณ์การพบสารกีดขวางช่องโซเดียมในกลุ่ม STXs อนุพันธ์ gonyautoxin (GTX) ในหอยแมลงภู่มาแล้วในปี 1983 (11) โดยตรวจพบสารนี้ทั้งในหอยแมลงภู่และในไดโนแฟลเจลเลตที่คาดว่าเป็นสาเหตุของสารดังกล่าว แต่ในครั้งนั้น ไม่มีการศึกษาถึงความเป็นไปได้ของความเกี่ยวข้องของแบคทีเรีย ต่อการพบสารดังกล่าวในหอยเลย และจากประวัติความเป็นมาของสารประเภทกีดขวางช่องโซเดียม ดังที่

กล่าวมาแล้วในตอนต้น จะเห็นได้ว่า แบคทีเรียมีส่วนเกี่ยวข้องกับการพบสารทั้งสองกลุ่มดังกล่าวในสัตว์ชนิด ต่างๆ ดังนั้น การวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะตรวจหาแบคทีเรียที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมจากหอยแมลงภู่ตัวอย่าง และคัดเลือกแบคทีเรียมาศึกษาต่อไปโดยวิเคราะห์ชนิดของสารประเภทที่แบคทีเรียสร้างว่าเป็นสารในกลุ่มใด ตลอดจนศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารดังกล่าวในระหว่างการเจริญของแบคทีเรีย ทั้งนี้ผลที่ได้อาจใช้เป็นแนวทางในการหาความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียกับการพบสารประเภทนี้ในหอยแมลงภู่ และเพื่อเป็นแนวทางในการผลิตสารนี้จากแบคทีเรียเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ดังที่กล่าวมาแล้วต่อไป