บทที่ 1

บทนำ

สารกีดขวางช่องโซเดียมเป็นสารพิษที่ไม่ใช่โปรตีนมีผลต่อระบบประสาท (nonprotein neurotoxin) และที่ศึกษากันอย่างกว้างขวางมี 2 กลุ่ม คือ สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน (tetrodotoxins , TTXs) และสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย (paralytic shellfish poisons, PSPs) โครงสร้างโมเลกุลของสารกีดขวางช่องโซเดียม ประกอบด้วย หมู่กัวนิดิเนียม(guanidinium group) ภายในโมเลกุล (Kao and Walker , 1982) ซึ่ง Bower และคณะ (1981) ศึกษาพบว่า หมู่กัวนิดิเนียมเป็นหมู่ที่สำคัญในการจับกับบริเวณจำเพาะบนช่องโซเดียม

สารกีดขวางช่องโซเดียมทั้งสองกลุ่มนี้สร้างโดยสัตว์ทะเลหลายชนิด จึงมักเกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุขจากการที่มีผู้นำเอาสัตว์ทะเลที่มีพิษมาบริโภค แต่เนื่องจากสารชนิดนี้มีคุณสมบัติในการจับอย่างจำเพาะต่อช่องโซเดียม จึงได้มีการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น เป็นเครื่องมือที่ใช้ศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างของช่องโซเดียมในงานวิจัยด้านประสาทวิทยา และอาจนำสารชนิดนี้มาใช้เป็นยาระงับความรู้สึกหรือยาชาเฉพาะที่ที่มีความจำเพาะสูง เป็นต้น

จากการศึกษาต่อมาพบว่า แบคทีเรียหลายชนิดสามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้ เช่น *Pseudomonas* sp. (Yasumoto et al., 1986 ; Yotsu et al., 1987) , *Vibrio alginolyticus* (Attaya Kungsuwan et al., 1988) , *Bacillus* sp. , *Micrococcus* sp. , *Moraxella* sp., *Vibrio* sp., *Actinetobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Alteromonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Caulobacter* sp., *Actinomycetes* sp. (Do et al.,1993) จึงมีการสันนิษฐานว่าแบคทีเรียอาจมีบทบาทในการเกิดพิษในสัตว์ทะเล เช่น Juntongjin และคณะ (1993) สันนิษฐานการเกิดการสะสมของเทโทรโดทอกซินในสัตว์ทะเลว่า อาจเกิดจากการอาศัยอยู่ร่วมกัน (symbiosis) ระหว่างแบคทีเรียสร้างพิษกับสัตว์มีพิษ หรือสัตว์ได้รับสารพิษจากสายใยอาหาร (food web) แต่โครงสร้างและสมบัติของสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างจากแบคทีเรียยังไม่มีการศึกษามากเท่ากับสารที่ผลิตจากสัตว์ จึงทำให้การศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของสารกีดขวางช่องโซเดียมจากทั้งสองแหล่งรวมทั้งกลไกการสร้างยังไม่ทราบแน่ชัด

Matsumura (1995) ได้ทดลองพบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ที่ผลิตโดยใช้เทโทรโดทอกซินที่สกัดจากปลาปักเป้าเป็นแอนติเจน ไม่สามารถทำลายฤทธิ์ (neutralized) เทโทรโดทอกซินที่ผลิตจากแบคทีเรียได้ ซึ่งการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC และ GC-MS ไม่สามารถพบความแตกต่างระหว่าง เทโทรโดทอกซินที่ผลิตจากแบคทีเรียและที่ผลิตจากสัตว์ ดังนั้นขั้นตอนการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมที่ผลิตจากแบคทีเรียมีความบริสุทธิ์เพียงพอเพื่อที่ใช้ในการศึกษาโครงสร้างของสาร จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจและมีความสำคัญในการศึกษาความแตกต่างระหว่างสารที่ผลิตจากแบคทีเรียและสารที่ผลิตจากสัตว์

การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของสารกีดขวางช่องโซเดียมส่วนใหญ่มีรายงานที่ทำจากสัตว์ เช่น Sheumack และ Howden (1978) ได้แยก maculotoxin จากปลาหมึกยักษ์ (*Hapalochlae maculosa*) โดยใช้ CM-Sephadex C-25 column ซ้ำกัน 3 ครั้ง จึงได้เทโทรโดทอกซินที่มีความบริสุทธิ์ Narita และคณะ (1981) แยก boshubora toxin (BST) จาก trumpet Shell , " Boshubora ", *Charonia sauliae* และทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านขั้นตอนดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์ , Amberlite IRC-50 column , CM- Sephadex C-25 column และ crystallization ตามลำดับ จนได้ผลึกของเทโทรโดทอกซิน ส่วน Noguchi และคณะ (1984) ทำให้สารพิษจาก frog shell , *Tutufa lissostoma* มีความบริสุทธิ์โดยผ่านขั้นตอนดูดซับด้วย ผงถ่านกัมมันต์ , Amberlite IRC-50 , CM-Sephadex C-25 และ Bio-Rex 70 column

นอกจากนั้นในปี ค.ศ. 1991 Noguchi และคณะ (1991) ได้ทำให้สารที่มีลักษณะคล้ายอนุพันธ์หนึ่งของกลุ่มเทโทรโดทอกซิน (tetrodonic acid-like substance) ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีความเป็นพิษมีความบริสุทธิ์ โดยใช้ผงถ่านกัมมันต์ดูดซับ และ Bio-Gel P-2 column Arakawa และคณะ (1994) แยก derivatives ของ saxitoxin และ neosaxitoxin จาก Xanthid Crab, *Zosimus aeneus* โดยใช้ผงถ่านกัมมันต์ดูดซับ , Bio-Gel P-2 column และ Bio-Rex 70 column เป็นต้น

ส่วนรายงานการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมจากแบคทีเรียให้มีความบริสุทธิ์ ยังมีน้อย เช่น Kodama และคณะ (1988) ใช้วิธีดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์ และ Bio-Gel P-2 column ทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมที่แยกจาก ไดโนแฟลกเจลเลต *Alexandrium tamarense* ให้มีความบริสุทธิ์ แต่พบว่า สูญเสียปริมาณสารพิษในแต่ละขั้นตอนมาก จึงเปลี่ยนไปใช้ Amberlite CG-50 และ การดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์

โครงการวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะหาวิธีทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมที่ผลิตโดยแบคทีเรียทะเล *Vibrio* sp. ที่แยกจากหอยทราย มีความบริสุทธิ์ และวิเคราะห์เปรียบเทียบความบริสุทธิ์กับสารที่ผลิตเพื่อการค้าเป็นสารมาตรฐาน โดยทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธีทดสอบกับเนื้อเยื่อ (tissue culture assay) รวมทั้งศึกษาสมบัติของสารด้วยวิธี อิเลกโทรโฟริซิส (electrophoresis) , การหาค่าความเป็นพิษจำเพาะโดยการทดสอบกับเนื้อเยื่อและการทดสอบความเสถียรของสาร

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาวิธีการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมจากเชื้อแบคทีเรียทะเล *Vibrio* sp. มีความบริสุทธิ์ โดยเปรียบเทียบความบริสุทธิ์กับสารที่ผลิตเพื่อการค้าเป็นสารมาตรฐาน
2. ศึกษาสมบัติของสารที่มีความบริสุทธิ์ด้วยวิธี อิเลกโทรโฟริซิส (electrophoresis) , การหาค่าความเป็นพิษจำเพาะโดยการทดสอบกับเนื้อเยื่อและการทดสอบความเสถียรของสาร

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทะเล *Vibrio* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมในปริมาณมาก เพื่อสกัดสารกีดขวางช่องโซเดียมจากภายในเซลล์และในอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. หาวิธีที่เหมาะสมในการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมที่ผลิตจากแบคทีเรียมีความบริสุทธิ์ โดยเปรียบเทียบความบริสุทธิ์แต่ละขั้นตอนกับสารมาตรฐาน ด้วยวิธีทดสอบกับเนื้อเยื่อและ อิเลกโทรโฟริซิส
3. วิเคราะห์ชนิดและศึกษาสมบัติของสารกีดขวางช่องโซเดียมที่มีความบริสุทธิ์ โดยใช้วิธีอิเลกโทรโฟริซิส , หาค่าความเป็นพิษจำเพาะและทดสอบความเสถียรของสาร

ความสำคัญหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยนี้

ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างจากแบคทีเรียทะเล *Vibrio* sp. มีความบริสุทธิ์ โดยวิธีการดังกล่าวจะทำให้สูญเสียสารพิษน้อยที่สุด และได้สารที่มีความบริสุทธิ์เพื่อที่จะใช้ในการศึกษาสมบัติและเป็นพื้นฐานในการศึกษาโครงสร้างของสาร อันจะเป็นประโยชน์ในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสารชนิดที่สร้างโดยแบคทีเรียและสารที่สร้างโดยสัตว์ที่มีพิษซึ่งผลิตเพื่อการค้าในปัจจุบัน