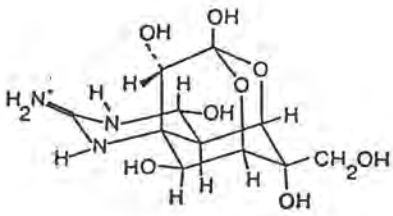
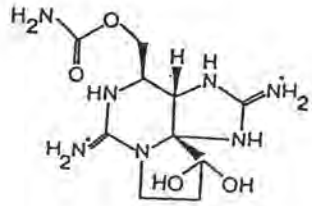
บทที่ 1

บทนำ

สัตว์หลายชนิดสามารถสร้างและสะสมสารพิษที่มีผลต่อระบบประสาท(nerve poisons)โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสัตว์ทะเลซึ่งจัดได้ว่าเป็นแหล่งอาหารสำคัญของมนุษย์พบว่าสัตว์ทะเลหลายชนิดสามารถสะสมสารพิษไว้ในระดับที่เป็นอันตราย สารพิษทางทะเลที่ไม่ใช่โปรตีนมีผลต่อระบบประสาทที่มีความสำคัญและมีการศึกษากันมากได้แก่ สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน(tetrodotoxins,TTXs) และสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย (paralytic shellfish poisons, PSPs) ถึงแม้ว่าสารพิษทั้งสองชนิดนี้จะมีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกันดังแสดงโครงสร้างโมเลกุลของเทโทรโดทอกซินและพิษอัมพาตจากหอยในรูปที่ 1 แต่พบว่ามีกลไกทางชีวภาพเหมือนกันคือมีคุณสมบัติเป็นสารกีดขวางช่องโซเดียม (sodium channel blocker,SCB) โดยมีหมู่heterocyclic guanidineเป็นส่วนที่กีดขวางที่จำเพาะเจาะจงต่อการขนส่งอิออนในช่องโซเดียม (Catterall, 1985) ทำให้ไม่เกิดขบวนการโพลาไรเซชั่น(polarlization)ของกระแสประสาทความดันโลหิตลดลง(hypotension)(Kao, 1972) กล้ามเนื้อทำงานไม่ได้จึงเกิดอัมพาตเมื่อหมดฤทธิ์ร่างกายจะคืนสู่สภาพเดิมแต่ถ้าได้รับมากในระดับหนึ่งอาจถึงแก่ชีวิตได้ (Kao and Levinson, 1986)



ก



ข

รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ ก. เทโทรโดทอกซิน

ข. พิษอัมพาตจากหอย

(Leake and Walker, 1980)

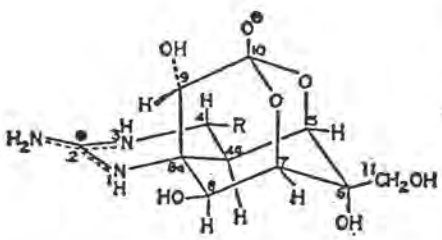
สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน

สารอนุพันธ์ที่เป็นตัวแทนของสารในกลุ่มนี้ได้แก่ เทโทรโดทอกซิน (TTX) หรือเดิมเป็นที่รู้จักกันในชื่อพิษปลาปักเป้าโดยปลาปักเป้าที่สร้างพิษจะอยู่ในวงศ์Tetraodontiformes (Plectognathi) รวมทั้งปลาในสกุล Canthigasteridae, Diodontidae, Tetrodontidae ทำให้เกิดการเสียชีวิตเนื่องจากการบริโภคปลาเหล่านี้ พิษพบมากในรังไข่ ตับ ผิวหนัง กระเพาะ และลำไส้ (Mosher and Fuhrman, 1984; Saitanu et al., 1991) ด้วยเหตุนี้เองทำให้นักวิทยาศาสตร์ได้พยายามศึกษาวิจัยหาสารพิษนี้ โดยในปีค.ศ.1909 Yoshizumi Tahara ได้สกัดสารพิษครั้งแรกมีความบริสุทธิ์เพียง 0.2 เปอร์เซนต์ และให้ชื่อสารพิษนี้ว่าเทโทรโดทอกซิน ต่อมาในปี 1950 Aikira Yookoo ได้ทำให้สารนี้บริสุทธิ์ในรูปของแข็ง (crystalline) โครงสร้างทางเคมีของเทโทรโดทอกซินได้ถูกตรวจสอบ และรายงานโดย IUPAC Natural Products Symposium ในปี ค.ศ. 1964 โดยนักวิทยาศาสตร์ 3 กลุ่ม คือ Tasuda และคณะ (Sankyu Company, และมหาวิทยาลัยโตเกียว) Goto และคณะ(มหาวิทยาลัยนาโกย่า) และWookward (มหาวิทยาลัยโตเกียว) โครงสร้างนี้เป็นโครงสร้างที่ไม่มีส่วนใดคล้ายหรือ สัมพันธ์กับสารสกัดจากธรรมชาติของพืช หรือสัตว์ (Mosher and Fuhrman, 1984) โดยมีสมบัติดังนี้

ชื่อสามัญ	:	spheroidine, tarichatoxin, tetrodotoxin, Fugu poison
สูตรโมเลกุล	:	$C_{11}H_{17}N_3O_8$
น้ำหนักโมเลกุล	:	319.28
โครงสร้างทางโมเลกุล	:	ประกอบด้วย คาร์บอน 41.38%, ไฮโดรเจน 5.3%, ไนโตรเจน13.16%, และออกซิเจน 40.09% (Budavari et al., 1989)
ค่าคงที่ของการแตกตัว (pKa) ในน้ำ	:	มีค่า 8.84 และใน 50% เอทานอลมีค่า 9.54
การละลาย(solubility)	:	ละลายได้ดีในกรดอะซิติคเจือจาง และละลายได้บางส่วนในน้ำ แอลกอฮอล์ และอีเทอร์ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่น
ความเสถียร (stability)	:	ถูกทำลายในกรดแก่ และด่างแก่ (Evan, 1972)

ความเป็นพิษ (toxicity) : ค่า LD_{50} เมื่อฉีดเทโทรโดทอกซินเข้าท้องหนูเท่ากับ 9.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และเมื่อให้โดยการกิน มีค่าเท่ากับ 435ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Narahashi, Moore and Poston, 1967)

ในปัจจุบันพบอนุพันธ์ของเทโทรโดทอกซินหลายชนิดซึ่งแต่ละอนุพันธ์มีความแตกต่างกันที่หมู่ข้างเคียง(side-chain group)ทำให้มีความสามารถในการกีดขวางช่องโซเดียมได้แตกต่างกัน สำหรับอนุพันธ์ที่ทำการศึกษากันมาก ได้แก่ TTX ($C_{11}H_{17}O_8$, M.W. 319), deoxytetrodotoxin ($C_{11}H_{17}O_7N_3$,M.W. 303) anhydrotetrodotoxin ($C_{11}H_{15}O_7N_3$, M.W. 301) tetrodaminotoxin ($C_{11}H_{18}O_7N_4$, M.W. 318) และ tetrodonic acid ($C_{11}H_{17}O_8N_3$, M.W. 337) โครงสร้างทางเคมีแสดงดังรูปที่ 2



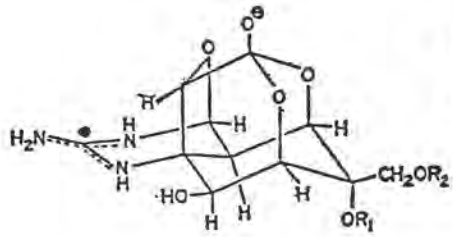
R=OH, Tetrodotoxin

R=H, Deoxytetrodotoxin

R=OMe, Methoxytetrodotoxin

R=OEt, Ethoxytetrodotoxin

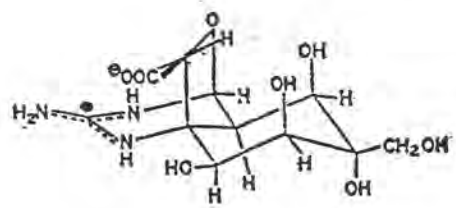
$R=NH_2$, Tetrodaminotoxin



$R_1=R_2=H$, Anhydrotetrodotoxin

$R_1=H, R_2=HCO$, 11-Monoformylanhydrotetrodotoxin

$R_1=R_2=Ac$, 6,11-Diacetylanhydrotetrodotoxin

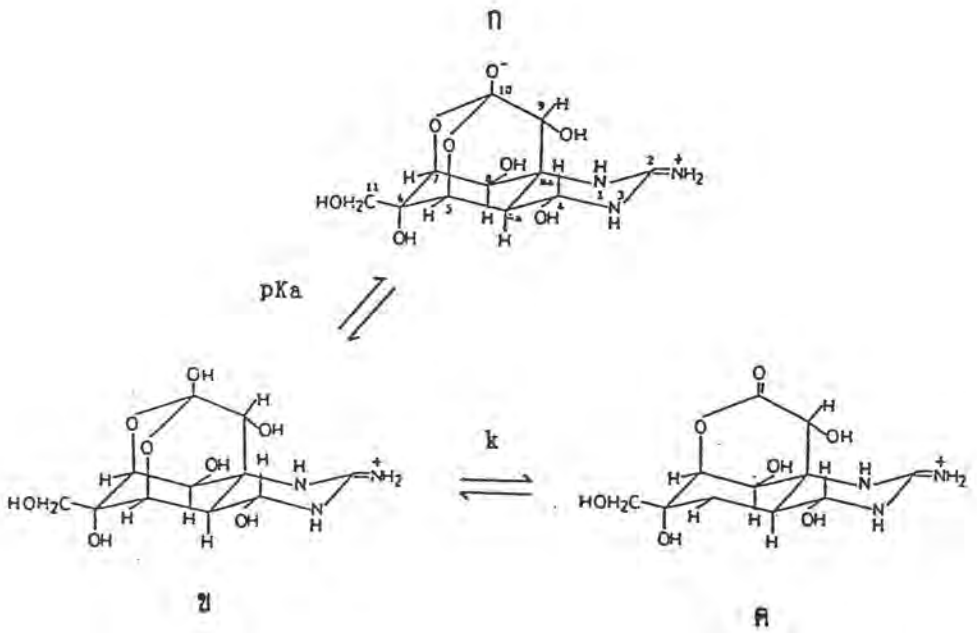


Tetrodonic acid

รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีอนุพันธ์ของเทโทรโดทอกซิน

(Narahashi, Moore and Posten, 1967)

โครงสร้างของเทโทรโดทอกซินเป็นโครงสร้างเฉพาะตัว (unique structure) ที่ไม่พบในสารประกอบอื่น ๆ คือมีลักษะโครงสร้างแบบ aminoperhydroquinaxoline ที่มีหมู่กัวนิดิเนียม (guanidinium) 1 หมู่ซึ่งสามารถเกิด zwitterion ที่หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxy group) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 10 ซึ่งจะมีผลต่อค่า pKa เมื่ออยู่ในรูปสารละลาย (Kao, 1972) แสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 โครงสร้างโมเลกุลของเทโทรโดทอกซินในสารละลาย

ก. รูปที่มีประจุบวก และประจุลบ (switterion form)

ข. และ ค. รูปที่มีประจุบวก (cationic form)

(Bower, et al., 1981)

การเกิดพิษในสัตว์เดิมเข้าใจว่าเกิดจากการที่สัตว์สร้างขึ้นมาเองเพื่อความอยู่รอด (Fuhrman, 1986) แต่ต่อมาพบว่าเทโทรโดทอกซินไม่ได้พบเฉพาะในปลาปักเป้าเท่านั้นโดยมีรายงานว่าสามารถพบสารพิษนี้ในสัตว์อีกหลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่1 สิ่งมีชีวิตที่มีผู้รายงานว่ามีการสะสมสารพิษกลุ่มเทโทรโดทอกซิน

ชื่อสามัญ	ชื่อทางวิทยาศาสตร์	เอกสารอ้างอิง
California newts	*Taricha torasa*	Mosher et al., 1964
ปลาปู่	*Gobius criniger*	Noguchi and Hashimoto, 1973
กบคอสตาริกา	*Atelopus chiriquiensis*	Kim et al., 1975
		Pavelka et al., 1975
หมึกยักษ์	*Hapalochlaena maculosa*	Sheumack et al., 1978
Xantid crab	*Atergatis floridus*	Noguchi et al., 1984
แมงดาทะเล	*Carcinoscorpius rotundicauda*	Kungsuwan et al., 1987
ribbon worm	*Lineus fuscoviridis*	Miyazawa et al., 1988
	Tubulanus punctatus	Miyazawa et al., 1988
หอยทะเล		
trumpet shell	*Charonia sauliae*	Narita et al., 1981
ivory shell	*Babylonia japonica*	Noguchi et al., 1981
frog shell	*Tutufa lissostoma*	Noguchi et al., 1984
purple clam	*Solletellina diphos*	Hwang et al., 1987
line moon shell	*Natica lineata*	Hwang et al., 1990
calf moon shell	*Natica vitellus*	Hwang et al., 1991
bladder moon shell	*Polinices didyma*	Hwang et al., 1991
pear-shaped moon shell	*P. tumidus*	Hwang et al., 1991
Nassariidae	*Zeuxis scalaris , Z. castus-like*	Hwang et al., 1992
	Z. scalaris, Niota clathrata	Hwang et al., 1995
ปลาปักเป้าน้ำจืด	*Tetraodon fangi*	Laobhripatr et al., 1990
	T. palembangensis	Saitanu et al., 1991
คางคก	*Atelopus oxyrhynchus*	Yamashita et al., 1992

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ซึ่งสัตว์ที่มีพิษเหล่านี้ไม่มีความใกล้ชิดกันทางด้านพันธุกรรม และมีความแตกต่างของระดับความเป็นพิษในสัตว์ชนิดต่างๆ รวมทั้งสถานที่และฤดูกาลที่มีผลต่อการสร้างสารพิษในสัตว์ รวมทั้งสัตว์มีพิษสามารถมีชีวิตได้ทั้งที่มีปริมาณสารพิษอยู่ในร่างกายปริมาณสูงแต่กลับเป็นพิษต่อสัตว์และมนุษย์ที่บริโภคสัตว์พิษเหล่านี้เข้าไป มีกลุ่มนักวิทยาศาสตร์ได้พยายามศึกษาถึงแหล่งกำเนิดของสารพิษนี้โดยมีการตั้งสมมติฐานว่าการเกิดสารพิษภายในสัตว์เหล่านี้ไม่น่าที่จะเป็นลักษณะที่ควบคุมโดยยีนแต่อาจมาจากสิ่งแวดล้อมภายนอก (Hashimoto et al., 1990) มีการทำการทดลองเพาะเลี้ยงปลาปักเป้าชนิดไม่มีพิษด้วยเทโทโดทอกซินบริสุทธิ์จะไม่พบการสร้างพิษในปลาปักเป้าแต่เมื่อให้อาหารด้วยตับของปลาปักเป้าชนิดมีพิษจะพบว่ามีการเกิดพิษขึ้นทำให้เข้าใจว่าเทรโทรโดทอกซินบริสุทธิ์นั้นอาจจะไม่ถูกดูดซึม หรืออาจถูกทำลายในระบบทางเดินอาหาร และเมื่อทำการตรวจสอบตับของปลาปักเป้าชนิดมีพิษที่ให้เป็นอาหารพบว่ามีจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารพิษนี้ได้(Mosher and Fuherman, 1984) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าสารพิษนี้อาจถูกสะสมผ่านห่วงโซ่อาหารโดยเริ่มต้นจากแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์อื่นๆทั้งนี้เนื่องจากการศึกษาต่อมาพบว่ามีแบคทีเรียหลายชนิดสามารถสร้างสารพิษนี้ได้ ซึ่งมีงานวิจัยดังต่อไปนี้

Noguchi และคณะ(1986) สามารถแยกเชื้อ*Vibrio* sp.ได้จากลำไส้ปู(xanthid crab; *Altergatis folridus* และพบว่าเป็นเชื้อที่สามารถสร้างเทโทรโดทอกซินและอนุพันธ์แอนไฮโดร-เทโทรโดทอกซิน (anhydrotetrodotoxin) ได้

Yotsu และคณะ(1987) พบว่าเชื้อ *Psudomonas* sp. ที่แยกได้จากผิวหนังของปลาปักเป้า (*Fugu poecilonotus)* มีความสามารถผลิตเทรโทรโดทอกซิน และอนุพันธ์ได้

Shimidu และคณะ(1987) พบว่ามีแบคทีเรียหลายสกุลสามารถสร้างเทโทรโดทอกซินและอนุพันธ์ได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตระกูล Vibrionaceaeได้แก่ *Vibrio* spp., *Pelsiomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Photobacterium* spp. เป็นต้น โดยทำการทดสอบการสร้างสารพิษนี้ในแบคทีเรียสกุลเหล่านี้จากแหล่งเก็บรักษาเชื้อ (culture collection)

Narita และคณะ(1987) สามารถแยกเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ที่สร้างเทโทรโดทอกซินและอนุพันธ์ได้จากลำไส้ของดาวทะเล (starfish; *Astropecten polyacanthus)*

Do, Koqure และSimidu (1990) ได้แยกแบคทีเรียสกุลต่าง ๆ ถึง 22 สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษนี้ได้จากดินตะกอนในทะเล

Do และคณะ (1991) ทำการแยกเชื้อ actinomyces จากดินตะกอนในทะเล ซึ่งพบว่าสามารถผลิตสารพิษได้ ต่อมาในปี 1993 ได้รายงานถึงเทโทรโดทอกซิน และแบคทีเรียที่สร้าง

เทโทรโดทอกซินในดินตะกอนน้ำจืดซึ่งแบคทีเรียที่ตรวจพบได้แก่ *Bacillus, Micrococcus, Alcaligenes, Caulobacter* และ *Flavobacterium*

Juntongjin et al. (1993) ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่แยกจากสัตว์ น้ำทะเล และดินตะกอนบริเวณอ่าวไทยพบว่าแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* และ*Pseudomonas* ที่แยกได้มีความสามารถสร้างเทโทรโดทอกซิน และอนุพันธ์ได้

Hwang (1994) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจาก lined moon shell ที่มีการสะสมสารพิษเทโทรโดทอกซินสามารถตรวจพบแบคทีเรียสกุล *Vibrio, Aeromonas, Flavobacterium* และ *Pseudomonas* ซึ่งในสกุล *Vibrio* พบว่าเป็น *Vibrio alginolyticus* ถึง 46% และมีความสามารถสร้างเทโทรโดทอกซินและอนุพันธ์ได้เช่นเดียวกันในสกุล *Aeromonas* spp.

Matsumura (1995) ได้ทำการตรวจสอบเชื้อ *V. alginolyticus* ที่มีความสามารถสร้างเทโทรโดทอกซินได้ แต่พบว่าทอกซินที่สกัดจากแบคทีเรียนี้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับ monoclonal antibody ต่อเทโทรโดทอกซินที่มาจากสัตว์ได้

<u>สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย</u> (paralytic shellfish poisons, PSPs)

สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยจัดเป็นสารกีดขวางช่องโซเดียมชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นสาเหตุของความสูญเสียในแง่เศรษฐกิจที่สำคัญของโลกเนื่องจากขาดแหล่งอาหารโปรตีนจากการที่เกิดพิษขึ้นในสัตว์จำพวกหอย สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยนี้มีอนุพันธ์อยู่มากกว่า 18 อนุพันธ์ (Jellett et al., 1992) แต่ที่มีการศึกษากันมากได้แก่ อนุพันธ์กลุ่มซัคซิทอกซิน (saxitoxins, STXs) และอนุพันธ์กลุ่มกอนิออทอกซิน (gonyautoxins, GTXs) อนุพันธ์กลุ่มซัคซิทอกซินนี้ครั้งแรกสกัดได้จาก Alaska butter clam (*Saxidomas giganteus*) ส่วนอนุพันธ์กลุ่มกอนิออทอกซินครั้งแรกสกัดได้จากไดโนแฟลกเจลเลตสกุล *Gonyaulax* (Kao, 1972) มีไดโนแฟลกเจลเลตหลายสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตสารพิษนี้แต่พบว่าสกุล *Alexandrium catenella* (= *Gonyaulax catenella*), *A. tamarense* (= *G. excavata*) และ *Pyrodinium bahamense* var. *comprissa* เป็นแหล่งกำเนิดของสารพิษกลุ่มนี้มากที่สุด (Mee et al. 1986) ลักษณะโครงสร้างทางโมเลกุลของอนุพันธ์ซัคซิทอกซินซึ่งใช้เป็นตัวแทนของสารกลุ่มนี้จะมีลักษณะเฉพาะที่ไม่พบในสารประกอบในธรรมชาติ เช่นพืช หรือสัตว์เช่นเดียวกับเทโทรโดทอกซิน แต่ประกอบด้วยหมู่กัวนิดิเนียม 2 หมู่ แต่ละหมู่เชื่อมกันด้วยพันธะอเซคีตัล (azaketal linkage) ที่เสถียร (Bower et al., 1981) สมบัติของสารแสดงดังนี้

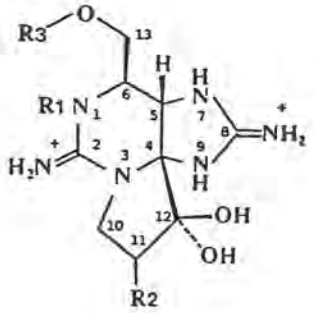
ชื่อสามัญ	:	mussel poison, clam poison, gonyaulax toxin และ paralytic shellfish poison
สูตรโมเลกุล	:	$C_{10}H_{17}N_7O_4$
น้ำหนักโมเลกุล	:	299.30
ค่าคงที่ของการแตกตัวในน้ำ	:	8.25 และ 11.06 (Kao, 1986)
การละลาย	:	ละลายได้ในน้ำและเมธานอล และละลายบางส่วนในเอทธานอล และกรดอะซิติคเข้มข้น แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายไขมัน
ความเสถียร	:	เสถียรในสารละลายกรด แต่ถูกทำลายอย่างรวดเร็วในสารละลายด่าง
ความเป็นพิษ	:	ค่า LD_{50} เท่ากับ10ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมเมื่อฉีดเข้าท้องหนู และเท่ากับ 3.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมเมื่อฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำของหนู และเท่ากับ 263 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อให้หนูกิน (Budavari et al., 1989)

สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยประกอบด้วยอนุพันธ์ที่สำคัญ 2 กลุ่ม ซึ่งแต่ละกลุ่มประกอบด้วยอนุพันธ์ย่อยต่าง ๆ อีก ได้แก่

กลุ่มซัคซิทอกซิน (STXs)	- ซัคซิทอกซิน (saxitoxin, STX)
	- นีโอซัคซิทอกซิน (neosaxitoxin, neoSTX)
กลุ่มกอนิออทอกซิน (GTXs)	- กอนิออทอกซิน 1 (gonyaytoxin, GTX1)
	- กอนิออทอกซิน 2 (gonyaytoxin, GTX2)
	- กอนิออทอกซิน 3 (gonyaytoxin, GTX3)
	- กอนิออทอกซิน 4 (gonyaytoxin, GTX4)
	- กอนิออทอกซิน 5 (gonyaytoxin, GTX5)
	- กอนิออทอกซิน 6 (gonyaytoxin, GTX6)
	- กอนิออทอกซิน 8 (gonyaytoxin, GTX8)
	หรือ C1

แต่ละอนุพันธ์มีระดับความเป็นพิษแตกต่างกันเนื่องมาจากความแตกต่างกันของหมู่ข้างเคียงโดย GTX3 มีความเป็นพิษสูงสุดรองลงมาคือ STX และ GTX1 ส่วน GTX6 และGTX8 มีความเป็นพิษต่ำ (Oshima et al., 1987)จากการศึกษาต่อมาโดย Yasumoto พบว่ามีอนุพันธ์ที่ประกอบด้วย sulfocarbamoyl และ decarbamoylsaxitoxin ซึ่งพบว่ามีระดับความเป็นพิษต่ำและสลายตัวได้ง่าย เนื่องจากแต่ละอนุพันธ์ของพิษอัมพาตจากหอยจะมีความแตกต่างกันที่หมู่ข้างเคียงทำให้มีความสามารถในการกีดขวางช่องโซเดียมได้แตกต่างกัน อนุพันธ์ของสารกลุ่มนี้แสดงดังรูปที่ 4

นอกจากนี้Yang,Kaoและ Oshima(1992)ได้รายงานถึงอนุพันธ์ใหม่ของอนุพันธ์ decarbamoylsaxitoxin (dcSTX) โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงบริเวณหมู่ไฮดรอกซี(-OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่13เป็นหมู่คาร์บอกซี(-CH_3)ให้ชื่อว่า decarmoyloxysaxitoxin(doSTX) และdecarbamoyl-neosaxitoxin (dcneoSTX) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของหมู่ carbamoyl บริเวณ side chain ของอนุพันธ์ neosaxitoxin (neoSTX)



	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-VI	-OH	$-\beta OSO_3^-$	$-CONHSO_3^-$
decarbamoylsaxitoxin	-H	-H	-H

รูปที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์ของพิษอัมพาตจากหอย และหมู่ข้างเคียง

(Yasumoto, 1985)

นอกจากไดโนแฟลกเจลเลตแล้ว จากการศึกษาต่อมาพบมีการสร้างสารพิษกลุ่มนี้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สิ่งมีชีวิตที่มีผู้รายงานว่ามีการสะสมสารพิษกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย

สิ่งมีชีวิตที่มีพิษ	ชื่อวิทยาศาสตร์	เอกสารอ้างอิง
Cyanophyte	*Aphanizomenon flos-aquae*	Ikawa et al., 1985
Macroalga	*Jania* sp.	Ikawa et al., 1985
ปลาปักเป้า	*Takifugu pardalis*	Kodama et al., 1983
หอยกาบ	*Mytilus* sp	Shimizu et al., 1978
Soft-shell clams	*Mya arenaria*	White et al., 1985
Calilfonia sea-mussel	*Mytilus californianus*	Bower et al., 1981
หอยนางรม	*Crassostrea gigas*	Jonas-Davies and Liston, 1985
หอยแครง	*Placopecten magellanicus*	Bower et al., 1987
หอยกาบน้ำจืด	*Corbicula* sandai	Ogata, Sato and Kodama,1989
ปู	*Altergates floridus*	Noguchi et al., 1985
	Zosimus aeneus	Noguchi et al., 1985
	Emerita analoga	Jonas-Davies and Liston, 1985
	Platypodia granulosa	Noguchi et al., 1985
	Hemigrapsus oregonesis	Baber et al., 1988

การเกิดพิษอัมพาตจากหอยนั้นไม่ใช่ปัญหาเฉพาะถิ่นเท่านั้น แต่เป็นปัญหาทั่วโลก เนื่องจากพบว่าการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว (bloom) ของไดโนแฟลกเจลเลตสร้างพิษจะเกิดขึ้นทั่วโลกโดยที่การเกิดพิษอัมพาตจากหอยนั้นมักจะเกิดควบคู่ไปกับการเกิดปรากฏการนี้ และทำให้สัตว์ทะเลจำพวกหอยซึ่งเป็นสัตว์ประเภทที่มีนิสัยการกินแบบกรองกินอาหาร (filter feeding) มีการสะสมสารพิษนี้ในร่างกายเมื่อประชาชนบริโภคสัตว์ทะเลที่มีพิษเข้าไปจะทำให้เกิดภาวะอาหารเป็นพิษ State Departments of Health ประเทศสหรัฐอเมริกา กำหนดมาตราฐานความเป็นพิษของอาหารทะเลต้องมีค่าไม่เกิน 80 ไมโครกรัมต่อเนื้อ 100 กรัม (Ross, Siger และ

Abbot, 1985) นักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มพยายามศึกษาถึงสาเหตุการแพร่กระจายของสารพิษชนิดนี้นอกจากจะพบว่าไดโนแฟลกเจลเลตเป็นแหล่งกำเนิดของสารพิษอัมพาตที่สำคัญแล้วยังพบแบคทีเรียหลายสกุลที่สามารถสร้างสารพิษชนิดนี้ได้ดังมีรายงานดังนี้

Ogata และคณะ (1987) พบว่าการสร้างพิษอัมพาตจากหอยโดยไดโนแฟลกเจลเลตไม่ใช่ลักษณะที่ควบคุมทางพันธุกรรม โดยศึกษาการสร้างพิษอัมพาตจากหอยใน *Alexandrium tamarense* พบว่า *A. tamarense* ที่เจริญมาจากเซลล์เดียวกัน แต่เมื่อนำมาเลี้ยงที่สภาวะต่างกันจะมีการสร้างสารพิษต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน ดังนั้นจึงตั้งสมมติฐานว่าการเกิดพิษในไดโนแฟลกเจลเลตอาจมาจากแหล่งภายนอกโดยได้รับพิษจากห่วงโซ่อาหารและมีการสะสมอยู่ในเซลล์

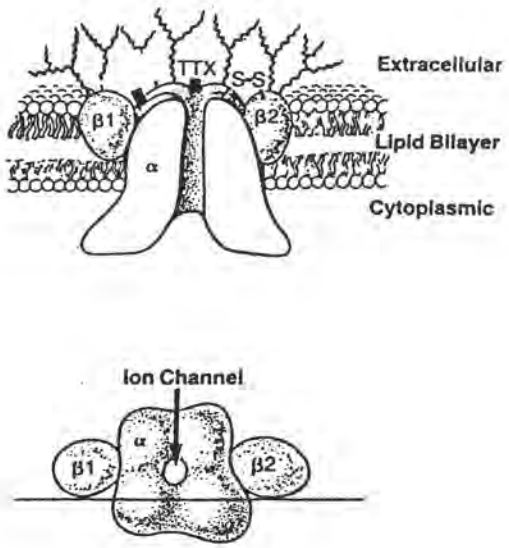
Kodama, Ogata และ Sato(1988) ทำการศึกษาถึงแบคทีเรียที่แยกได้จากไดโนแฟลกแจลเลต *A. tamarense* มีความสามารถในการสร้างซัคซิทอกซิน โดยตั้งสมมติฐานว่าแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารพิษนี้จะมีการเจริญอยู่ภายในเซลล์ของ *A. tamarensis* แบบ symbiosis หรือ parasitism และ *A. tamarense* จะได้รับสารพิษจากแบคทีเรียที่เป็นผู้สร้าง

Kodama และOgata(1988)ทำการตรวจสอบไดโนแฟลกเจลเลตสร้างพิษ *A. tamarense* โดยทำภาคตัดขวางและดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนพบแบคทีเรียภายในเซลล์ซึ่งจากการตรวจสอบพบว่าเป็นแบคทีเรียสกุล *Moraxella* sp. ที่สามารถสร้างพิษอัมพาตจากหอยได้ แต่เมื่อทำภาคตัดขวางดูภายในเซลล์ของ *A. tamarense* ชนิดไม่มีพิษไม่พบแบคทีเรียชนิดดังกล่าว เพื่อทดสอบสมมติฐานว่าการเกิดพิษในไดโนแฟลกเจลเลตชนิดนี้เกิดจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในเซลล์นั่นเอง

Kodama และคณะ (1990) ศึกษาสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Moraxells sp.* ที่แยกได้จาก *A. tamarense* พบว่าที่สภาวะขาดแคลนสารอาหาร (nutrition-deficient environments) เชื้อจะสามารถสร้างพิษอัมพาตจากหอยได้สูงขึ้น โดยเป็นอนุพันธ์ในกลุ่มกอนิออทอกซิน1และ4 (GTX1 และ GTX4)

กลไกทางชีวภาพ และการนำมาใช้ประโยชน์

สารพิษที่ส่งผลต่อระบบประสาทที่มีผลต่อช่องโซเดียม และมีโครงสร้างเป็นอนุพันธ์ heterocyclic guanidine ได้แก่ เทโทโดรทอกซิน และพิษอัมพาตจากหอย มีคุณสมบัติเป็นสารกีดขวางที่จำเพาะเจาะจงกับการขนส่งของอิออนในช่องโซเดียมซึ่งจะไม่มีผลต่อช่องโพแทสเซียมหรือเนื้อเยื่อบริเวณอื่นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสามารถเปลี่ยนกลับได้ (reversible) อย่างรวดเร็วแต่แสดงความจำเพาะเจาะจงสูง เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารพิษ และ receptor แบบ ligand binding methodsจากการศึกษาของCatterall (1985)พบว่า[^{3}H] ของเทโทรโดทอกซิน และ [^{3}H] ของซัคซิทอกซินจะจับกับบริเวณreceptorของช่องโซเดียมโดยแสดงภาพจำลองของช่องโซเดียมเมื่อถูกกีดขวางด้วยสารกีดขวางช่องโซเดียมในรูปที่ 5



รูปที่ 5 โครงสร้างของช่องโซเดียมที่ถูกกีดขวางด้วยสารกีดขวางช่องโซเดียมของเซลล์ประสาทหนูโดยช่องโซเดียมนี้จะประกอบด้วยโปรตีน 3 subunit ได้แก่ α , β_1และβ_2 ซึ่ง α, β_2 subunit นั้นจะจับกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (s-s) (Catterall, 1985)

Kao และNishiyama (1965) ศึกษาพบว่าบริเวณหมู่กัวนิดิเนียมที่มีประจุบวก(cationic charges) ของสารกีดขวางช่องโซเดียมจะเข้าไปจับกับประจุลบของช่องโซเดียมบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ประสาทโดยอาศัยแรงดึงดูดทางไฟฟ้าสถิตย์ (electrostatic attraction) แต่เนื่องจากโมเลกุลของสารกีดขวางช่องโซเดียมมีขนาดใหญ่ และจะสร้างพันธะที่จำเพาะกับเยื่อหุ้มเซลล์บริเวณใกล้เคียงจึงมีผลไปกีดขวางบริเวณทางผ่านของโซเดียมอิออน

Kao และWalker(1982) ศึกษาหมู่ของสารกีดขวางช่องโซเดียมที่ทำให้เกิดการกีดขวางอย่างจำเพาะเจาะจง โดยพบว่าหมู่กัวนิดิเนียมของซัคซิทอกซินอาจจะเข้าไปจับกับช่องโซเดียมโดยอาจจะจับ 1 หมู่ หรือทั้ง 2 หมู่บริเวณคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 7, 8 และ9 และหมู่ไฮดรอกซิล ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 12 ของหมู่กัวนิดิเนียมสำหรับเทโทรโดทอกซินหมู่กัวนิดิเนียมที่เข้าไปจับกับช่องโซเดียมที่บริเวณคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1,2 และ 3 และหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 4,8,9 และ 10

Narahashi, Moor และ Posten (1976) ศึกษาพบว่าบริเวณหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 เป็นบริเวณที่มีผลต่อค่าประจุบวกของหมู่กัวนิดิเนียมของสารกีดขวางช่องโซเดียมการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณนี้อาจจะทำให้ความเป็นพิษของสารพิษลดลง เช่นดีออก-ซีเทโทรโดทอกซินที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 เปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนอะตอม(H) ทำให้มีความเป็นพิษน้อยกว่าเทโทรโดทอกซินที่มีคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 เป็นหมู่ไฮดรอกซี (-OH)

เทโทรโดทอกซินและซัคซิทอกซินมักเกิดในสัตว์ทะเลซึ่งเป็นสัตว์ที่มนุษย์นิยมนำไปบริโภคในคนที่ได้รับพิษนี้จะแสดงอาการทางระบบประสาทภายในเวลา 2-3 ชั่วโมง และจะเสียชีวิตภายในเวลา 7-8 ชั่วโมง ปริมาณน้อยที่สุดที่ทำให้เสียชีวิต (minimum lethal dose) เมื่อทดลองในหนูเท่ากับ8ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งพบว่ามีความรุนแรงมากกว่าโซเดียมไซยานายด์ (sodium cyanide) ที่มีค่าเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้นจึงมีการศึกษาถึงการผลิต monoclonal antibody ต่อเทโทรโดทอกซิน เพื่อจะ neutralize เทโทรโดทอกซินในสัตว์ทดลอง และMatsumura พบว่า monoclonal antibody ที่เขาผลิตได้ต่อเทโทรโดทอกซินมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ polyclonal antibody (Matsumura, 1995)

<u>รายงานที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา</u>

มีการศึกษาถึงการเกิด การแพร่กระจายของสารพิษ และปัจจัยที่มีผลทำให้เกิดพิษในสัตว์ทะเล โดยศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างสัตว์ทะเล และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดพิษหรือมีผลต่อระดับพิษ ดังรายงานต่อไปนี้

Matsui Hamada และKonosu (1981) ทำการเลี้ยงปลาปักเป้าด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ ได้แก่รังไข่ของปลาปักเป้ามีพิษ สารสกัดจากปลาปักเป้าสร้างพิษโดยใช้เมธานอล และเทโทรโดทอกซินบริสุทธิ์ในรูปผงโดยจากการทดลองพบว่ารังไข่ของปลาปักเป้ามีพิษจะสามารถทำให้ปลาปักเป้าที่ไม่มีพิษเกิดพิษขึ้นได้ภายในเวลา 5 วันหลังจากการเลี้ยงและมีพิษสูงกว่าการให้อาหารด้วยสารสกัดจากปลาปักเป้า ส่วนปลาที่เลี้ยงด้วยเทโทรโดทอกซินบริสุทธิ์ไม่พบการสร้างพิษตลอดการทดลอง

Kotaki และคณะ (1985) พบว่าเชื้อแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* sp. และ *Vibrio* sp. มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงของอนุพันธ์ GTXs ไปเป็นอนุพันธ์ STXs ซึ่งมีความเป็นพิษสูงกว่า ในเนื้อเยื่อปูมีพิษ (*Altergatis floridus*)

Boyer และคณะ (1985) ทำการเลี้ยง copepod (*Tegriopus californicus*) ด้วย *A. catenella* พบว่ามีการสะสมสารพิษได้อย่างรวดเร็วจนมีสารพิษปริมาณมากที่สุดภายในเวลา 14 ชั่วโมง สารพิษที่พบมากได้แก่ GTX 2 และ GTX 3

Yasumoto และคณะ (1986) เลี้ยงปลาปักเป้าสายพันธุ์ที่มีพิษในสภาพปลอดเชื้อจะไม่พบการสร้างพิษ แต่เมื่อนำกลับมาเลี้ยงในสภาพซึ่งมีเชื้อแบคทีเรียตามธรรมชาติตามเดิมจะพบสารพิษขึ้น

Kodama, Ogata, Sato และคณะ (1990) พบว่าแบคทีเรียสร้างพิษ *Moraxella* sp. ที่พบในน้ำทะเลมีผลทำให้หอยพัดมีความเป็นพิษมากขึ้น โดยที่ในบริเวณนั้นมีไดโนแฟลกเจลเลตสร้างพิษ *A. tamarense* ซึ่งจะทำให้เกิดพิษในหอยได้จำนวนน้อยแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียน่าจะเป็นแหล่งของสารพิษนี้ หรือคาดว่าอาจมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องระหว่างแบคทีเรียกับสัตว์มีพิษ

BeitlerและListon (1990) ทำการทดลองเลี้ยงหอย butter clam ที่ไม่มีพิษด้วย *A. catenella* ที่พบว่ามีการสะสมกอนิออทอกซิน (GTX) 1-4 และนีโอซัคซิทอกซิน (neosaxitoxin) หลังจากการเลี้ยงพบปริมาณ GTX 1-4 ภายในอวัยวะต่างๆใกล้เคียงกับในไดโนแฟลกเจลเลตที่ให้เป็นอาหารและลดลงในวันหลังๆ ของการทดลอง ซึ่งพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ GTX 1-4 neosaxitoxin เป็น saxitoxin

Wisessang และคณะ (1991) ทำการเลี้ยงหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) ด้วยไดโนแฟลกเจลเลตสร้างพิษ *Alexandrium cohorticula* พบการสร้างพิษหลังจากการเลี้ยงโดยส่วนใหญ่เป็น GTX 1 และ2 อาจเนื่องมาจากการเกิด 11-sulfate ของGTX 3 และ4 นั้นเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ ในหอย แต่อนุพันธ์ neoSTX ที่ไม่พบในไดโนแฟลกเจลเลตกลับพบในหอยเนื่องมาจากการหลุดออกของ11-sulfate ใน GTX1 และ GTX4 หรือเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ STX ที่ไนโตรเจนตำแหน่งที่ 1 ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายในหอยหลังจากการกินไดโนแฟลกเจลเลต

เบญจภรณ์ (2538) ศึกษาถึงผลของน้ำสกัดจากหอยสองฝาชนิดมีพิษ และไม่มีพิษต่อการสร้างเทโทรโดทอกซิน และพิษอัมพาตจากหอย พบว่าน้ำสกัดจากหอยทรายในระยะพิษสูงมีสารบางชนิดที่มีผลไปส่งเสริมให้แบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษสูง และสร้างพิษต่ำสามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้สูงขึ้น แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียกลุ่มไม่สร้างพิษ และสารนี้ไม่พบในน้ำสกัดจากหอยทรายในระยะพิษต่ำ และน้ำสกัดจากหอยไม่มีพิษทั้งสองชนิด โดยคาดว่าอาจมีสารบางชนิดในน้ำสกัดนั้นไปเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ที่มีความเป็นพิษต่ำให้เปลี่ยนเป็นอนุพันธ์ที่มีความเป็นพิษสูงขึ้น

นักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มได้มีการศึกษาถึงสาเหตุการเกิดสารกีดขวางช่องโซเดียมในสัตว์หลายชนิดแต่สาเหตุของการเกิดพิษยังไม่มีคำตอบที่แน่ชัด Mosher และ Fuhrman (1984) สรุปสาเหตุที่อาจเป็นไปได้ในการเกิดพิษในสัตว์ทะเลดังนี้

1. Endogenous สารพิษที่ถูกสร้างในสัตว์แต่ละชนิดอาจเป็นสารที่เกิดจากกระบวนการเมตาโบลิซึมที่ผิดพลาด (accidental metabolic product) ที่เกิดขึ้นเพื่อความอยู่รอด หรือเพื่อควบคุมการสร้างสารที่จำเป็นในสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ

2. Exogenous สารพิษอาจจะไม่ถูกสร้างโดยตัวสัตว์เอง แต่เกิดมาจากห่วงโซ่อาหารบางชนิดที่มีการสะสมสารพิษ ทำให้สัตว์ที่กินอาหารเข้าไปได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกาย

3. Symbiotic Microorganism สารพิษนั้นอาจสร้างจากจุลินทรีย์ที่อยู่ร่วมกับสัตว์ชนิดที่มีความจำเพาะแบบ symbiosis

4. Multiple origins การเกิดสารพิษในสัตว์อาจเกิดจากทั้งสามสาเหตุข้างต้นรวมกัน

ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ใช้หอยทราย (*Asaphis violascens*) ซึ่งเป็นหอยสองฝาที่มีพฤติกรรมการกินอาหารแบบการกรอง (filter feeding) เป็นตัวแทนสัตว์ทะเลที่ใช้ศึกษา เนื่องจากพบว่าเป็นหอยที่มีระดับความเป็นพิษในระดับต่างๆกันในช่วงปีหนึ่งๆ Saitanu et al. (1992) ได้รายงานถึงระดับความเป็นพิษของหอยทรายบริเวณเกาะสีชังของประเทศไทย พบว่า TTXs มีระดับสูงในช่วงเดือนมกราคม ถึงเดือนมิถุนายน และพบสารพิษระดับต่ำตลอดเดือนกรกฎาคม ถึงเดือนธันวาคม 2531 และจากการศึกษาของ Juntongjin et al. (1996) พบว่าในช่วงที่หอยทรายมีพิษสูงจะมีแบคทีเรียสร้างพิษในตัวหอย และดินตะกอนในปริมาณสูง ซึ่งต่างจากในช่วงที่หอยทรายมีพิษต่ำจะมีแบคทีเรียสร้างพิษในตัวหอยและในดินตะกอนน้อยลง ดังนั้นแบคทีเรียสร้างพิษอาจมีส่วนร่วมในการทำให้หอยทรายมีพิษได้โดยหอยทรายอาจได้รับแบคทีเรียสร้างพิษจากการกินอาหารทำให้มีการสะสมของแบคทีเรียสร้างพิษแต่มีข้อแย้งว่าถ้าในดินตะกอนมีจำนวนแบคทีเรียสร้างพิษอยู่มากเหตุใดหอยสองฝาชนิดอื่นๆที่อยู่ในบริเวณนั้นและมีวิธีการกินอาหารเช่นเดียวกับหอยทรายควรได้รับแบคทีเรียสร้างพิษเข้าไปในตัวมากเช่นกันน่าจะมีพิษสะสมอยู่ในตัวเช่นเดียวกับหอยทราย แต่ในหอยเหล่านั้นกลับไม่มีพิษและผู้คนสามารถนำมาใช้รับประทานได้จึงเป็นที่น่าสนใจว่าหอยที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกัน ได้รับอาหารแบบเดียวกันแต่มีพิษและไม่มีพิษแตกต่างกัน จึงได้ตั้งสมมุติฐานว่าการที่หอยทรายแตกต่างไปจากหอยชนิดอื่นอาจมีปัจจัยร่วมบางประการระหว่างหอยทรายกับแบคทีเรียสร้างพิษ สมมุติฐานประการแรกคืออาจมีปัจจัยบางประการที่มาจากหอยทรายมีผลทำให้แบคทีเรียสร้างพิษอยู่แล้วสามารถสร้างพิษได้สูงขึ้น ประการที่สองคือแบคทีเรียสร้างพิษที่เข้าไปอยู่ในหอยทรายมีส่วนร่วมทำให้หอยทรายซึ่งมีพิษอยู่แล้วสร้างพิษได้สูงขึ้น หรือเกิดการเปลี่ยนอนุพันธ์ที่มีพิษต่ำให้เป็นอนุพันธ์ที่มีพิษสูงขึ้น

โครงการวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียสร้างพิษกับหอยมีพิษโดยหอยมีพิษที่นำมาศึกษาคือ หอยทรายที่เก็บตัวอย่างในช่วงที่หอยมีพิษในตัวสูงและในช่วงที่มีพิษต่ำทำการทดลองเปรียบเทียบระดับความเป็นพิษของอนุพันธ์ที่มีการเปลี่ยนแปลง ก่อนและหลังการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียทะเลที่สร้างพิษ และไม่สร้างพิษ