บทที่ 1

บทนำ

สารกีดขวางช่องโซเดียม (sodium channel blocking substances) เป็นสารพิษต่อระบบประสาทที่ไม่ใช่โปรตีน (nonpeptidic neurotoxin) โดยมีกลไกจำเพาะในการกีดขวางการผ่านเข้าออกของโซเดียมอิออนทางช่องโซเดียมซึ่งอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ส่วนแอกซอนของเซลล์ประสาท (Bower et al., 1981) ทำให้เกิดกระบวนการดีโพลาไรเซชั่น (depolarization) ของการเกิดกระแสประสาท ตามปกติเมื่อมีการกระตุ้นเส้นประสาท โซเดียมซึ่งอยู่ภายนอกเซลล์จะผ่านเข้าไปภายในเซลล์ เกิดการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ที่ผิวของเซลล์ ทำให้เกิดคลื่นกระแสไฟฟ้ากระจายไปตามเส้นประสาท ในส่วนของกล้ามเนื้อ จะทำให้กล้ามเนื้อหดตัว แต่ในกรณีที่ได้รับพิษสารพิษนี้จะไปปิดกั้นช่องโซเดียมไว้ เมื่อโซเดียมเข้าไปในเซลล์ไม่ได้ จะรู้สึกชาที่ปลายประสาท ส่วนกล้ามเนื้อก็จะไม่หดตัวเกิดเป็นอัมพาต และถ้าหากได้รับสารพิษในปริมาณมากอาจถึงแก่ชีวิตได้ (Kao และ Levinson, 1986)

สารกีดขวางช่องโซเดียมประกอบด้วยสารที่สำคัญหลายกลุ่มและมีการศึกษากันมาก ได้แก่สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน (tetrodotoxins, TTXs) และสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย (paralytic shellfish poisons, PSPs) ซึ่งมีรายละเอียดต่อไปนี้

1. ประวัติความเป็นมา

1.1 สารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่มเทโทรโดทอกซิน (Tetrodotoxins,TTXs)

พบครั้งแรกในปลาวงศ์ Tetraodontiformes ซึ่งเป็นปลาจำพวกปลาปักเป้า (puffer fish) (Tsuda et al., 1964) ต่อมาพบเทโทรโดทอกซินหรือทาริคาทอกซิน (tarichatoxin) ใน Califonia newts (*Taricha torasa*) (Mosher et al ., 1964) นอกจากนี้ยังพบในสัตว์อื่นๆ อีกหลายชนิดได้แก่ กบ (*Atelopus chiriquiensis*) (Kim et al ., 1975; Pavelka et al., 1975), คางคก (*Atelopus oxyrhynchus*) (Yamashita et al., 1992) และปลาบู่ (*Gobius criniger*)

(Noguchi and Hashimoto, 1973) และพบในสัตว์ทะเลหลายชนิดได้แก่ ปู (xanthid crab ; *Atergatis floridus*) (Noguchi et al., 1984), แมงดาทะเล (horseshoe crab; *Carcinoscorpius rotundicauda*) (Kungsuwan et al., 1987) และหมึกยักษ์ (blue-ringed octopus; *Hapalochlaena maculosa*) (Sheumack et al ., 1988) เป็นต้น จากการศึกษาต่อมาพบว่าสารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่มเทโทรโดทอกซินสร้างโดยแบคทีเรียหลายสกุลเช่น *Vibrio* (Narita et al., 1987), *Bacillus* (Do et al., 1990), *Alteromonas* (Yasumoto et al., 1986), *Pseudomonas* (Yotsu et al., 1987) เป็นต้น

1.2 สารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย (paralytic shellfish poison, PSPs)

พบครั้งแรกในหอยกาบ (butter clam; *Saxidomus giganteus*) (Kao and Nishiyama et al., 1965) ต่อมาพบในไดโนแฟลกเจลเลตสกุล *Protogonyaulax* (Proctor et al., 1975) ภายหลังมีการเปลี่ยนชื่อสกุลเป็น *Alexandrium* (Shimizu et al., 1990) และพบว่า *Alexandrium tamarensis, A. catenell* (Harada et al., 1982) สามารถสร้างสารพิษกลุ่มนี้ได้ และพบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) (Kodama, Noguchi et al., 1983) นอกจากนี้ยังพบในสัตว์ทะเลหลายชนิดได้แก่ หอยแมลงภู่ (*Mytilus* sp.) (Shimizu et al., 1978), California sea-mussel (*Mytilus californianus*) (Bower et al., 1981), หอยกาบ (soft shell clam; *Mya arenaria*) (Shimizu et al., 1975) และปู (Xanthid crab; *Zosious aeneus*) (Noguchi et al., 1986) เป็นต้น และยังพบว่าแบคทีเรีย *Moraxella* sp. ที่แยกจาก *A. tamarensis* สามารถสร้างสารพิษกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยได้ (Kodama et al., 1990)

2. สมบัติของสาร

2.1 สารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่มเทโทรโดทอกซินมีชื่อสามัญหลายชื่อ เช่น พิษจากปลาปักเป้า (puffer fish poison), ทาริคาทอกซิน (tarichatoxin), มาคูโลทอกซิน (maculotoxin) และสเฟียรอยดีน (spheroidine) เป็นต้น โดยมีสมบัติดังในตารางที่ 1ในปัจจุบันพบอนุพันธ์ของสารในกลุ่มเทโทรโดทอกซิน มากกว่า 6 อนุพันธ์ เช่น เทโทรโดทอกซิน (tetrodotoxin; TTX),

เทโทรโดนิคแอซิด (tetrodonic acid), แอนไฮโดรเทโทรโดทอกซิน (anhydro-tetrodotoxin; anh-TTX), 4-อีพิเทโทรโดทอกซิน (4-epi TTX), 6-อีพีเทโทรโดทอกซิน (6-epi TTX) และ 11-ดีออกซีเทโทรโดทอกซิน (11-deoxy TTX) เป็นต้น ซึ่งแต่ละอนุพันธ์มีระดับความเป็นพิษต่างกันคือมีความสามารถในการกีดขวางช่องโซเดียมได้แตกต่างกัน

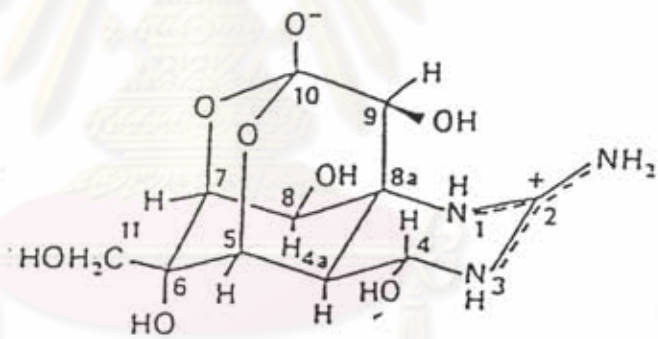
ตารางที่ 1 สมบัติของสารกีดขวางช่องโซเดียมอนุพันธ์เทโทรโดทอกซิน (tetrodotoxins, TTXs)

สมบัติของเทโทรโดทอกซิน	
1. สูตรโมเลกุล	: $C_{11}H_{17}N_3O_8$ (Evans, 1972)
2. น้ำหนักโมเลกุล	: 319.28 (Evans, 1972)
3. โครงสร้างโมเลกุล	: ประกอบด้วย คาร์บอน 41.38%, ไฮโดรเจน 5.37%, ไนโตรเจน 13.16% และออกซิเจน 40.09% (Budavari et al., 1989)
4. ค่าคงที่ของการแตกตัวในน้ำ	: ในน้ำ 8.84 และใน 50% เอทธานอล 9.54
5. การละลาย	: ละลายได้ดีในกรดอะซิติคเจือจางและละลายได้บางส่วนในน้ำ แอลกอฮอล์ และอีเทอร์ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่น
6. ความเสถียร	: ถูกทำลายได้ในกรดแก่และด่าง
7. ความเป็นพิษ	: ค่า LD_{50} เมื่อฉีดเข้าท้องหนู (mice)คือ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนค่า LD_{50}เมื่อให้หนูกินมีค่า 322ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Evans et al., 1987)

สารกลุ่มเทโทรโดทอกซินมีลักษณะโครงสร้างเฉพาะตัว (unique structure) ซึ่งไม่พบในสารประกอบชนิดอื่นๆ โดยมีโครงสร้างแบบ iminoperhydroquinazoline ประกอบด้วยหมู่กัวนิดิเนียม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

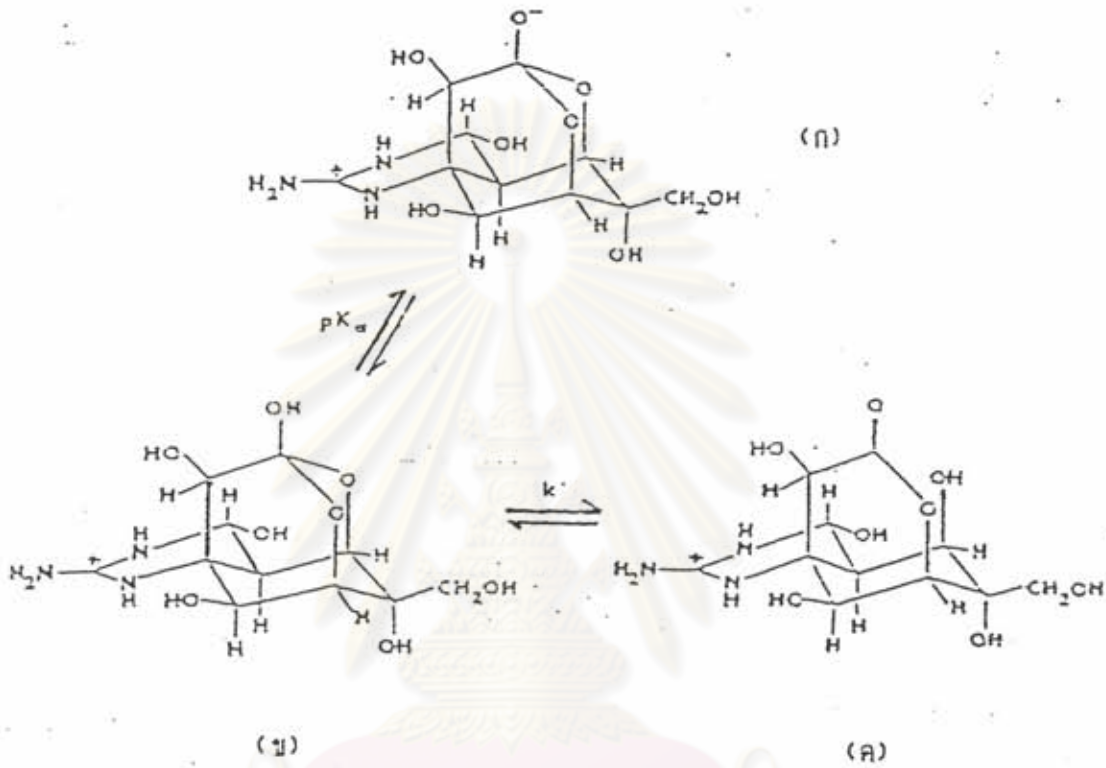
(guanidinium) 1 หมู่ และพันธะเฮมิแลคตัล (hemilactal linkage) ดังแสดงโครงสร้างโมเลกุลของเทโทรโดทอกซินในรูปที่1 และโครงสร้างโมเลกุลของเทโทรโดทอกซินสามารถเกิด zwitterion ที่หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 10 ได้ (Bower et al., 1981) ดังแสดงในรูปที่ 2 สำหรับอนุพันธ์ของสารกลุ่มเทโทรโดทอกซินที่ศึกษากันมากมี 4 อนุพันธ์คือ เทโทรโดทอกซิน ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่มีความเป็นพิษมากที่สุด รองลงมาคือ 4-อีพิเทโทรโดทอกซิน และ แอนไฮโดรเทโทรโดทอกซิน ตามลำดับ ส่วนเทโทรโดนิคแอซิดไม่มีความเป็นพิษ (Nagamura and Yasumoto, 1985) โดยแต่ละอนุพันธ์มีความแตกต่างกันตรงบริเวณหมู่ข้างเคียง (side-chain group) โดยมีจำนวน 4 หมู่ คือ R_1-R_4 แสดงโครงสร้างอนุพันธ์ของเทโทรโดทอกซินแต่ละชนิดดังรูปที่ 3



รูปที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของเทโทรโดทอกซิน

(Kao and Walker, 1982)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 โครงสร้างโมเลกุลของเทโทรโดทอกซินในสารละลาย

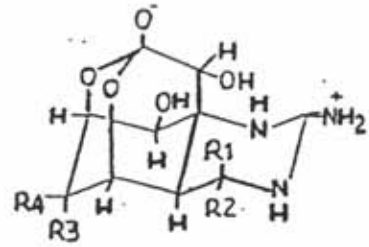
ก. cationic lactone form

ข. cationic hemilactal form

ค. zwitterionic hemilactal form

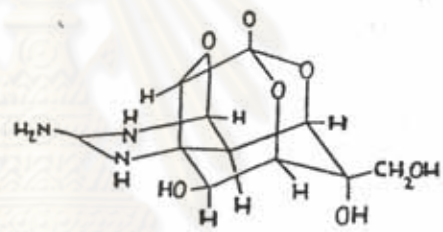
(Evans, 1972)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

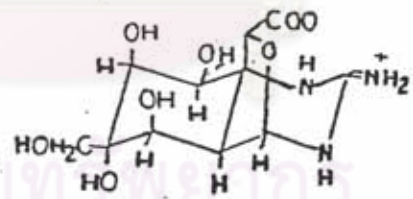


	R_1	R_2	R_3	R_4
tetrodotoxin	H	OH	OH	CH_2OH
4epi tetrodotoxin	OH	H	OH	CH_2OH
6epi tetrodotoxin	H	OH	CH_2OH	OH
11-deoxy tetrodotoxin	H	OH	OH	CH_3

anhydrotetrodotoxin



tetrodonic acid



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 โครงสร้างโมเลกุลของอนุพันธ์เทโทรโดทอกซิน

(Nagashima et al., 1988)

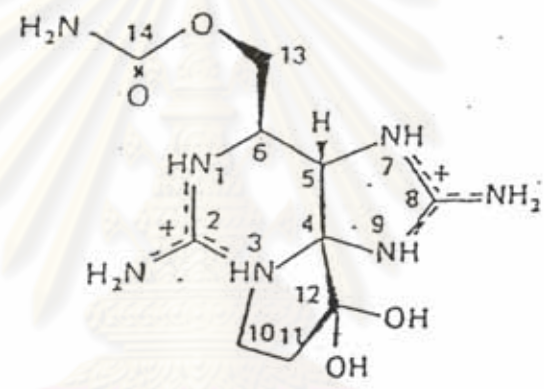
2.2 สารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยประกอบด้วยอนุพันธ์ที่สำคัญ 2 กลุ่มคือ อนุพันธ์ซัคซิทอกซิน (saxitoxins, STXs) และอนุพันธ์กอนิออทอกซิน (gonyautoxins, GTXs) โดยใช้อนุพันธ์ซัคซิทอกซินเป็นตัวแทนของสารกลุ่มนี้ซึ่งมีชื่อสามัญอื่นๆ อีกได้แก่ mussel poison, clam poison, gonyaulax toxin และ paralytic shellfish poison เป็นต้น และมีสมบัติของสารดังแสดงในตารางที่2

ตารางที่2 สมบัติของสารกีดขวางช่องโซเดียมอนุพันธ์ซัคซิทอกซิน (saxitoxins, STXs)

สมบัติของสารอนุพันธ์ซัคซิทอกซิน	
1. สูตรโมเลกุล	: $C_{10}H_{17}N_7O_4$ (Evans, 1972)
2. น้ำหนักโมเลกุล	: 299.30
3. ค่าคงที่ของการแตกตัวในน้ำ	: มีค่า 8.25 และ 11.60 (Kao, 1986)
4. การละลาย	: ละลายได้ในน้ำและเมทธานอล และละลายบางส่วนในเอทธานอลและกรดอะซิติคเข้มข้น (glacial acetic acid) แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายไขมัน
5. ความเสถียร	: เสถียรในสารละลายกรดแต่ถูกทำลายอย่างรวดเร็วในสารละลายด่าง และเมื่อนำไปต้มในน้ำที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 3.0 เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง จะเสียสภาพ (Evans, 1972)
6. ความเป็นพิษ	: ค่า LD_{50} เมื่อฉีดเข้าท้องหนู (mice)คือ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนค่า LD_{50} เมื่อฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำของหนูคือ 3.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมและค่า LD_{50} เมื่อให้หนูกินคือ 263 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Budavari et al., 1989)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงสร้างโมเลกุลของอนุพันธ์ซัคซิทอกซิน ประกอบด้วยหมู่กัวนิดิเนียม 2 หมู่แต่ละหมู่เชื่อมกันด้วยพันธะอาซาคีตัล (azaketal linkage) ที่เสถียร ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่ไม่พบในสารประกอบธรรมชาติชนิดอื่นๆ (Bower et al., 1981) และมีหน้าที่เข้าไปจับกับช่องโซเดียม (Kao, 1986) โครงสร้างโมเลกุลของอนุพันธ์ซัคซิทอกซินแสดงในรูปที่ 4



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 โครงสร้างโมเลกุลของอนุพันธ์ซัคซิทอกซิน

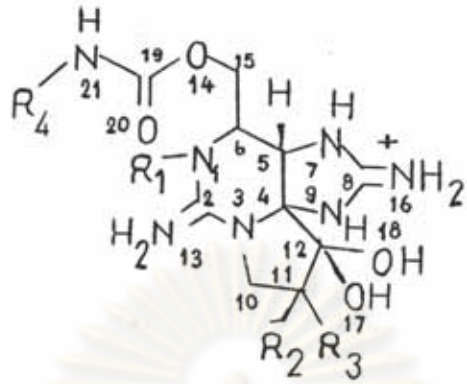
(Kao and Walker, 1982)

สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยแต่ละกลุ่มยังมีอนุพันธ์ย่อยต่างๆ อีกได้แก่

สารกลุ่มซัคซิทอกซิน (STXs) ประกอบด้วยอนุพันธ์ซัคซิทอกซิน (saxitoxin, STX), นีโอซัคซิทอกซิน (neosaxitoxin, NSTX) และดีคาร์บาโมอิลซัคซิทอกซิน (decarbamoyl-saxitoxin, DSTX)

สารกลุ่มกอนิออทอกซิน (GTXs) ประกอบด้วยกอนิออทอกซิน GTX1, GTX2, GTX3, GTX4, GTX5, GTX6, GTX8 หรือ C1, epi GTX8 และ C2 โดยแต่ละอนุพันธ์มีความแตกต่างกันที่หมู่ข้างเคียง ซึ่งมีจำนวน 4 หมู่คือ R1 ถึง R4 ทำให้มีความสามารถในการกีดขวางช่องโซเดียมได้แตกต่างกัน จึงทำให้แต่ละอนุพันธ์มีระดับความเป็นพิษแตกต่างกันโดย GTX3 มีความเป็นพิษสูงสุดรองลงมาคือ STX และ GTX1 ส่วน GTX5, GTX6 และ GTX8 มีความเป็นพิษต่ำ (Oshima et al., 1987) และเมื่อจัดกลุ่มของสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยตามหมู่ข้างเคียงที่แตกต่างกันสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม ดังแสดงในรูปที่ 5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



		R_1	R_2	R_3	R_4
กลุ่ม1	saxitoxin	H	H	H	H
	neosaxitoxin	OH	H	H	H
	decarbamoylsaxitoxin	H	H	H	OH
กลุ่ม2	GTX3	H	OSO^{3-}	H	H
	GTX2	H	H	OSO^{3-}	H
	GTX4	OH	OSO^{3-}	H	H
	GTX1	OH	H	OSO^{3-}	H
กลุ่ม3	GTX5(B1)	H	H	H	SO^{3-}
	GTX6(B2)	OH	H	H	SO^{3-}
กลุ่ม4	epiGTX8(C1)	H	H	OSO^{3-}	SO^{3-}
	GTX8(C2)	OH	OSO^{3-}	H	SO^{3-}
	C3	OH	H	OSO^{3-}	SO^{3-}
	C4	OH	OSO^{3-}	H	SO^{3-}

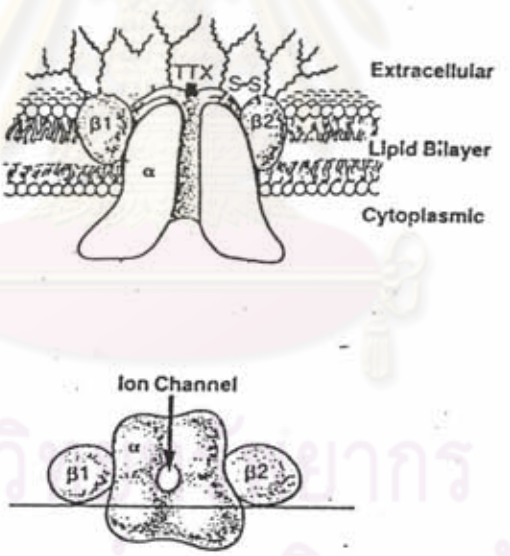
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5 โครงสร้างสูตรโมเลกุลของอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอย

(Kodama and Ogata, 1988)

3. กลไกทางชีวภาพ

สารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่มเทโทรโดทอกซินและกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยมีหมู่กัวนิดิเนียมในโมเลกุลเช่นเดียวกัน จึงมีกลไกทางชีวภาพคล้ายคลึงกัน โดยหมู่กัวนิดิเนียมจะเข้าไปจับกับช่องโซเดียมอย่างจำเพาะตรงบริเวณเยื่อหุ้มแอกซอนของเซลล์ประสาท (Kao,1986) ซึ่งช่องโซเดียมของเซลล์ประสาทหนูประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ (polypeptide) 3 subunit ดังนี้คือ α subunit (น้ำหนักโมเลกุล 260000 ดาลตัน), β_1 subunit (น้ำหนักโมเลกุล 36000 ดาลตัน) และ β_2 subunit (น้ำหนักโมเลกุล 33000 ดาลตัน) โดย α และβ_2 subunit จะจับกันด้วย disulfide bonds ในขณะที่ β_1 subunit จะจับกับโมเลกุลอื่นๆ ด้วยพันธะ noncovalent ดังแสดงภาพจำลองโครงสร้างของช่องโซเดียมเมื่อถูกขัดขวางด้วยสารกีดขวางช่องโซเดียมในรูปที่ 6



รูปที่ 6 โครงสร้างของช่องโซเดียมที่ถูกขัดขวางด้วยสารกีดขวางช่องโซเดียม

(Catterall, 1985)

Kao และ Nichiyama (1965) พบว่า หมู่กัวนิดิเนียมซึ่งมีประจุบวก (Cationic charges) จะเข้าไปจับกับช่องโซเดียมบนเยื่อเซลล์ประสาทที่มีประจุลบ (Anionic charges) โดยแรงดึงดูดทางไฟฟ้าสถิตย์ (electrostatic attraction) แต่ไม่สามารถผ่านเข้าไปได้เพราะมีขนาดโมเลกุลใหญ่และสร้างพันธะอย่างจำเพาะจับกันระหว่างโมเลกุลของสารกีดขวางช่องโซเดียมกับเยื่อหุ้มเซลล์บริเวณติดกับช่องโซเดียมทำให้ไปกีดขวางทางผ่านของโซเดียมอิออน

Kao และ Walker (1982) ศึกษาหมู่ของสารกีดขวางช่องโซเดียมที่ทำให้เกิดกลไกการกีดขวางช่องโซเดียมอย่างจำเพาะ พบว่าหมู่กัวนิดิเนียมของเทโทรโดทอกซินที่เข้าไปจับกับช่องโซเดียมคือคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1, 2 และ3 และหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxy group) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 4, 8, 9 และ 10 ของโมเลกุล ส่วนหมู่กัวนิดิเนียม 2 หมู่ของซัคซิ-ทอกซินอาจเข้าไปจับกับช่องโซเดียม 1 หมู่ หรือ 2 หมู่โดยหมู่กัวนิดิเนียมที่จับกับช่องโซเดียมคือ บริเวณคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 7, 8, 9 และหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 12 แสดงให้เห็นว่าการจับระหว่างโมเลกุลของอนุพันธ์สารกีดขวางช่องโซเดียมแต่ละชนิดกับช่องโซเดียมแตกต่างกันจึงมีผลต่อกลไกในการออกฤทธิ์ของสาร ตัวอย่างเช่น สารอนุพันธ์ anhydro-TTX มีความสามารถในการกีดขวางช่องโซเดียมต่ำกว่าสารเทโทรโดทอกซิน เนื่องจากเกิดการสูญเสียไฮโดรเจนอะตอมที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับช่องโซเดียมที่หมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 4

4. ประโยชน์ของสารกีดขวางช่องโซเดียม

สารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่มเทโทรโดทอกซินและกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยเป็นสารพิษที่มีกลไกที่จำเพาะต่อช่องโซเดียมของเซลล์ประสาท เมื่อสัตว์หรือมนุษย์ได้รับสารเหล่านี้เข้าไปในปริมาณหนึ่ง กล้ามเนื้อจะเกิดอาการอัมพาตและอาจทำให้ตายได้ เนื่องจากสารทั้งสองกลุ่มมีสมบัติทางเภสัชวิทยา และทางเคมีคล้ายคลึงกัน (Kodama et al., 1983) จึงมีการนำสารกีดขวางช่องโซเดียมมาใช้ประโยชน์ในด้านประสาทสรีรวิทยา (neurophysiology) และประสาทเภสัชวิทยา (neuropharmacology) เช่นใช้ในการนับจำนวนช่องโซเดียมของเซลล์ประสาทและกล้ามเนื้อของสัตว์ชนิดต่างๆ โดยการจับของสารกับช่องโซเดียมแบบหนึ่งต่อหนึ่งและนำมาใช้ในการศึกษาปรากฏการณ์การถูกกระตุ้นของเซลล์ประสาทและเยื่อเซลล์ได้ (Kao, 1966) นอกจากนี้ยังมีการทดลองนำสารประเภทนี้ มาประยุกต์ใช้เป็นยาชาเฉพาะที่ (local anesthetic drug) (Kao และ Nishiyama, 1965) ที่มีความจำเพาะสูง

ธารา ตริตระการ และคณะ (2523) ทดลองใช้สารกีดขวางช่องโซเดียมชนิดเทโทรโดทอกซินเป็นยาชาเฉพาะที่ โดยใช้สุนัขเป็นสัตว์ทดลองพบว่า เมื่อฉีดเทโทรโดทอกซินปริมาณ 5 ไมโครกรัม จะทำให้สุนัขมีอาการชาที่ขา และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นยาชาที่ไขสันหลัง (spinal anesthesia) ได้รวมทั้งอาจใช้ระงับความเจ็บปวดได้

Narahashi และคณะ (1960) ศึกษาผลของเทโทรโดทอกซินต่อกล้ามเนื้อของกบโดยอาศัย intracellular microelectrodes พบว่าเทโทรโดทอกซิน จะไปปิดกั้นช่องโซเดียมให้อยู่ในสภาพเสถียร (stabilized) ทำให้ไม่เกิดกลไกขนส่งโซเดียมอิออนซึ่งจะมีผลให้กล้ามเนื้อไม่หดตัว

Kao และ Fuhrman (1962) ทดลองใช้ทาริคาทอกซิน (tarichatoxin) ที่สกัดได้จากไข่ california salamander (*Taricha torosa*) เป็นยาชาเฉพาะที่ในแมวพบว่า ทาริคาทอกซินจะทำให้แมวหมดความรู้สึก มีความดันโลหิตต่ำ และกล้ามเนื้ออ่อนล้า

Narahashi และคณะ (1964) พบว่าเทโทรโดทอกซินจะยับยั้งกลไกการขนส่งโซเดียมอิออน (sodium-carring mechanism) ซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของกล้ามเนื้อและเส้นประสาทของกุ้งทะเลใหญ่ (lobster giant axons)

Kao (1982) พบว่า nortetrodotoxin ที่เตรียมโดยวิธีออกซิเดชั่น (oxidation) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของเทโทรโดทอกซิน จะมีผลต่อกล้ามเนื้อกบและเซลล์ประสาทของพวกปลาหมึก (squid axon) ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ใหม่ๆ ที่มีความสำคัญต่อกิจกรรมด้านชีวภาพ

Matsumura (1995) ศึกษาการ neutralization เทโทรโดทอกซิน โดย monoclonal antibody ทดลองโดยการฉีดการฉีดเทโทรโดทอกซินความเข้มข้น 1.5 mouse units เข้าไปในหนู หลังจากนั้น 3 นาทีฉีด monoclonal antibody เข้าไปในหนู พบว่า เทโทรโดทอกซินถูก neutralize จึงทำให้หนูรอดชีวิตได้

5. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญ ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบแตกต่างกันไปโดยองค์ประกอบของอาหารเหล่านั้นจะถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์ เช่น การหายใจ การเคลื่อนไหว การทำงานของเอนไซม์ และภารสังเคราะห์สารเมตาบอไลท์ต่างๆ ซึ่งองค์ประกอบที่สำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่

5.1 แหล่งคาร์บอน

แบคทีเรียจะใช้แหล่งคาร์บอนสำหรับสร้างโครงสร้างของเซลล์และยังใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการสร้างสารเมตาบอไลท์ชนิดต่างๆ โดยแบคทีเรียสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ทั้งในรูปสารประกอบอินทรีย์ เช่น คาร์โบไฮเดรต, แอลกอฮอล์, กรดอินทรีย์, ไฮโดรคาร์บอน เป็นต้น และในรูปอนินทรีย์ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ (สมใจ ศิริโภค, 2537) โดยมีรายงานเกี่ยวกับการใช้แหล่งคาร์บอนดังนี้

Macleoad และคณะ (1954) ศึกษาความต้องการอาหารของแบคทีเรียทะเลที่แยกจากน้ำทะเล ที่ผิวหนังและลำไส้ของปลาและหอยกาบ จุลินทรีย์ที่แยกได้ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล*Corynebacterium, Flavobacterium* และสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารประกอบอินทรีย์ (organic compound) หลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน เช่น กรดซัคซินิก (succinic acid), กรดกลูตามิก (glutamic acid), กรดแอสพาติก (aspartic acid) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่า แบคทีเรียทะเลบางชนิดในกลุ่มนี้สามารถใช้กลีเซอรอล (glycerol) เป็นแหล่งคาร์บอนได้

Simidu และคณะ (1990) ทำการจัดจำแนกแบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากสาหร่าย สีแดงและปลาปักเป้า โดยแบคทีเรียเหล่านี้สามารถสร้างเทโทรโดทอกซินได้เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกูลโคส 0.1 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

Do และคณะ (1991) พบว่า *Actinomycetes* ที่แยกจากดินตะกอนในทะเลสามารถใช้สารละลายแป้ง (soluble starch) เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อใช้ในการสร้างเทโทรโดทอกซินได้

Juntongjin และคณะ (1993) ทำการแยกแบคทีเรียทะเลที่สามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมจากสัตว์ทะเล, น้ำทะเล และดินตะกอน บริเวณอ่าวไทยโดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลวที่มีกูลโคส 0.2 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และพบว่า แบคทีเรียที่แยกได้ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Vibrio* และ *Pseudomonas*

Gallacher และBirkbeck (1993) ศึกษาการสร้างเทโทรโดทอกซินของ *Alteromonas tetraodonis* ในน้ำทะเล และmarine broth พบว่า เมื่อเลี้ยงในน้ำทะเลเชื้อสามารถสร้างเทโทรโดทอกซินได้สูง (ต่อเซลล์) กว่าเมื่อเลี้ยงใน marine broth แสดงว่าอาจจะมีองค์ประกอบบางประการในน้ำทะเลและใน marine broth ที่มีผลต่อการสร้างเทโทรโดทอกซิน

5.2 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์สามารถใช้แหล่งไนโตร เจนได้ทั้งในรูปสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ เช่นเดียวกับธาตุคาร์บอน โดยไนโตรเจนส่วนใหญ่จะถูกนำไปใช้สร้างเป็นโปรตีน กรดนิวคลีอิก และโพลิเมอร์ของผนังเซล ได้มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม เช่น

Zobell และ Feltham (1935) พบว่า แบคทีเรียที่แยกจากทะเลจะใช้ยูเรีย (urea) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญ นอกจากนี้แบคทีเรียทะเลยังสามารถใช้สารอนินทรีย์ไนโตรเจนเป็นแหล่งไนโตรเจนได้อีกด้วยเช่น แอมโมเนียมคลอไรด์ [NH_4Cl] (Ostroff และ Henry, 1939), แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] (Macleod et al ., 1954)

Yasumoto และคณะ (1986) ได้ศึกษาการสร้างเทโทรโดทอกซินและแอนไฮโดรเทโทรโดทอกซินโดยแบคทีเรีย *Pseudonas sp.* ที่แยกได้จากสาหร่าย โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่ใช้โพลีเปปโตน 1 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และเมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณเทโทรโดทอกซินและแอนไฮโดเทโทรโดทอกซินใน supernatant จะพบปริมาณสารน้อยกว่า 10 ไมโครกรัม

Noguchi และคณะ (1986) ทำการแยกแบคทีเรีย *Vibrio* sp. ได้จากลำไส้ปู [Xanthid crab (*Atergatis floridus*)] และนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี ไฟโตนเปปโตน (phytone peptone) เป็นแหล่งไนโตรเจนจะพบว่า เมื่อทำการวิเคราะห์สารกีดขวางช่องโซเดียมภายในเซลล์และภายนอกเซลล์จะพบว่า เชื้อสามารถสร้างเทโทรโดทอกซินและแอนไฮโดรเทโทรโดทอกซินได้

Yotsu และคณะ (1987) ได้ศึกษาการสร้างเทโทรโดทอกซินและอนุพันธ์โดย *Pseudomonas sp.* ที่แยกได้จากผิวหนังของปลาปักเป้า โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีโพลีเปปโตน 0.5 เปอร์เซนต์ และสารสกัดจากยีสต์ 0.25 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน

Simidu และคณะ (1987) ได้นำแบคทีเรียทะเลจีนัส *Vibrionaceae, Alteromnas* และ *Escherichia coli* มาเลี้ยงในอาหารเหลว seawater medium ที่มีโปรติโอสเปปโตน หมายเลข 3 (proteose peptone no.3), สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 0.2 เปอร์เซนต์ และไฟโตน (phytone) 0.1 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อทดสอบการสร้างเทโทรโดทอกซิน พบว่าแบคทีเรียทะเลส่วนใหญ่ที่สร้างเทโทรโดทอกซิน และแอนไฮโดรเทโทรโดทอกซิน หรือสร้างสาร

ได้ทั้ง 2 ชนิด และแบคทีเรียทะเลที่อยู่ในจีนัส *Alteromonas* จะมีบางสายพันธุ์เท่านั้นที่สร้างเทโทรโดทอกซินหรือ แอนไฮโดรเทโทรโดทอกซินอย่างใดอย่างหนึ่งส่วนแบคทีเรีย *Escherichia coli* จะ ไม่สามารถสร้างเทโทรโดทอกซินและอนุพันธ์ได้

Kodama และคณะ (1988) ทำการแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างซัคซิทอกซิน (saxitoxin) จากไดโนแฟลกเจลเลต *Alexandrium tamarense* และเมื่อนำแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลว T1 medium ที่เติมยาปฏิชีวนะ (antibiotics) และมี meat extract 1เปอร์เซนต์ และเปปโตน (peptone) 1 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าแบคทีเรียจะสร้างซัคซิทอกซิน เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC, HPLC และ electrophoresis

Do และคณะ (1990) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียที่สามารถสร้างเทโทรโดทอกซิน จำนวน 49 สายพันธุ์ที่แยกมาจากดินตะกอนใต้ทะเลลึก เมื่อนำแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลว L-medium ที่มีโพลีเปปโตน 0.5 เปอร์เซนต์ และสารสกัดจากยีสต์ 0.1 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่า มีแบคทีเรีย 22 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้ ซึ่งทำการวิเคราะห์โดยวิธีการทดสอบกับเนื้อเยื่อ (tissue culture assay) และเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC จะพบว่าแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่มเทโทรโดทอกซินได้

5.3 แหล่งเกลือแร่

นอกจากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนแล้วจุลินทรีย์ยังต้องการแหล่งเกลือแร่ เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตด้วย โดยเกลือแร่ชนิดต่างๆ ที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม ได้แก่ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl), แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Juntongjin et al., 1993)

6. ภาวะในการเลี้ยงเชื้อ

6.1 ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

จุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดด่างแตก

ต่างกัน เช่น ราและยีสต์จะเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดด่างเริ่มต้นค่อนข้างต่ำ แบคทีเรียจะเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เป็นกลาง องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญอันหนึ่งที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากจุลินทรีย์จะมีการย่อยสลายสารอาหารเพื่อเป็นแหล่งพลังงาน และจะปล่อยสารออกมาซึ่งสิ่งที่ขับออกมานี้จะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อยังมีความสำคัญต่อสารกีดขวางช่องโซเดียม ซึ่งสารกีดขวางช่องโซเดียมจะเสียสภาพ (toxicity) เมื่ออยู่ในสารละลายที่เป็นด่าง (Evans et al., 1972) และจากรายงานของเนาวรัตน์ กุลพัณน์ และวรรณิพา วิเวโก (2537) พบว่าเมื่อเติม Morpholine propane sulfonic acid buffer (MoPs) ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว จะสามารถรักษาสภาวะกรดด่างให้คงที่ในระหว่างการผลิตสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมสำหรับเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะแตกต่างกันไปตัวอย่างเช่น เชื้อสกุล *Vibrio* และ *Pseudomonas* จะสามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.5-7.6 (Juntongjin et al., 1993)

6.2 อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

ในการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมของจุลินทรีย์จะต้องมีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วงที่พอเหมาะ เพราะอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมจะแตกต่างกันไป เช่น แบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus, Micrococcus, Pseudomonas* และ *Vibrio* ซึ่งแยกได้จากดินตะกอนใต้ทะเลจะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในขณะที่ *Actinomycetes* ที่แยกได้จากดินตะกอนทะเลจะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส(Do et al., 1991) และแบคทีเรียทะเลในวงศ์ *Vibrionaceae* จะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส (Simidu et al., 1987)

6.3 การให้อากาศ

การกวนหรือการให้อากาศเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับจุลินทรีย์ อยู่ในสภาพ

แขวนลอย ทำให้สามารถดูดซึมออกซิเจนไปใช้ได้มากขึ้น ออกซิเจนที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้นั้น ต้องอยู่ในรูปของโมเลกุลออกซิเจนที่ละลาย ซึ่งการละลายของออกซิเจนในน้ำมีปริมาณจำกัด ดังนั้นต้องทำให้มีออกซิเจนละลายเข้าไปในอาหารเหลวอยู่ตลอดเวลาโดยการเขย่าหรือการกวนเพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยปริมาณออกซิเจนที่ให้ต้องอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อความต้องการของจุลินทรีย์แต่ละชนิด สำหรับการผลิตสารกีดขวางช่องโซเดียมจะมีการให้อากาศโดยการเขย่าตัวอย่างเช่น เลี้ยงเชื้อ *Alteromonas tetraodonis* ใน marine broth ปริมาตร 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที (Gallacher et al., 1993) นอกจากนี้ Juntongjin และคณะ 1993 ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสกุล *Vibrio* และ *Pseudomonas* ใน liquid medium ปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดเขย่าขนาด 500 มิลลิลิตร และนำไปบ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที (Juntongjin et al ., 1993)

6.4 ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

ระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แต่ละชนิดเพื่อสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมจะแตกต่างกันไป โดยแบคทีเรียจะใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 1-10 วัน (Simidu et al., 1987; Do et al., 1990; Juntongjin et al., 1993; Noguchi et al., 1986) ส่วนจุลินทรีย์กลุ่ม *Actinomycetes* จะใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 5-7 วัน (Do et al ., 1991)

7. การวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียม

วิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์มีทั้งวิธีทางชีวภาพและวิธีทางเคมี ดังนี้

7.1 วิธีทางชีวภาพโดยการทดสอบกับเนื้อเยื่อ (tissue culture assay) อาศัยหลักกลไกทางชีวภาพของสารคือการกีดขวางช่องโซเดียม โดยนำสารสกัดมาทดสอบกับเซลล์ประสาทหนูที่เป็นเซลล์เพาะเลี้ยง (mouse neuroblastoma cell line Neuro 2A ATCC CCL 131) และเติมสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบอีก 2 ชนิดคือ เวอราตริดีน (veratridine) ซึ่งมีผลทำให้โซเดียมอิออนผ่านเข้าไปในเซลล์ได้เพิ่มขึ้น และวอบาย (ouabain) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งจำเพาะของเอนไซม์โซเดียมโปตัสเซียมเอทีพีเอส (Na^+-K^+ ATPase) สารทั้งสองชนิดนี้จะทำให้โซเดียมอิออนผ่านเข้าไปในเซลล์

ประสาทหนูมากขึ้น จนทำให้เซลล์เกิดการบวมและตาย แต่เมื่อมีสารกีดขวางช่องโซเดียมหรือสารที่มีสมบัติเหมือนสารกีดขวางช่องโซเดียมอยู่ด้วย สารนี้จะไปกีดขวางที่ช่องโซเดียมของเซลล์ประสาทหนู ทำให้โซเดียมอิออนผ่านเข้าไปไม่ได้ เซลล์จึงไม่เกิดการบวมและยังคงมีชีวิต จากนั้นคำนวนหาร้อยละของเซลล์ประสาทหนูที่ยังมีชีวิต ถ้าการอยู่รอดของเซลล์เกิน 20 เปอร์เซนต์ขึ้นไป จึงถือว่าสารนี้มีสมบัติเป็นสารกีดขวางช่องโซเดียม (กาญจณา จันทองจีน, 2536) และนำไปหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมได้จากกราฟมาตรฐาน และใช้หน่วย mouse unit (MU) บอกความเป็นพิษ โดย 1 mouse unit หมายถึงปริมาณของสารที่ทำให้หนูตัวผู้น้ำหนัก 20 กรัม ตายภายในเวลา 30 นาที (Kawabata, 1978)

7.2 วิธีอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis)

ทำการทดลองตามวิธีการของ Fallon และ Shimizu (1977) ซึ่งอาศัยหลักการมีประจุบนโมเลกุลและขนาดของสาร สารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่มเทโทรโดทอกซินและกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยมีขนาดโมเลกุลไม่เกิน 400 ดาลตัน และมีหมู่กัวนิดิเนียมซึ่งมีประจุเป็นบวก และสารบางอนุพันธ์ยังมีหมู่อื่นเช่น หมู่ซัลโฟคาร์บาโมอิล (sulfocabamoyl group) ซึ่งมีประจุลบ ทำให้สารแต่ละอนุพันธ์มีประจุสุทธิ (net charge) ไม่เท่ากัน จึงแยกจากกันได้โดยอาศัยกระแสไฟฟ้า ซึ่งใช้วิธีอิเลคโตรโฟรีซีสบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตท (cellulose acetate membrane) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ และกระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมเป็นเวลาพอสมควร จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับตัวออกซิ-ไดซ์ (oxidizing reagent) เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) และให้ความร้อนเพื่อให้เกิดสารฟลูออโรฟลอร์ (fluorophore) ตรวจสอบการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบระยะและทิศทางที่สารเคลื่อนที่กับสารมาตรฐาน

7.3 วิธีไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography HPLC)

เป็นวิธีที่อาศัยหลักการมีขั้ว (polarity) ของสารแต่ละอนุพันธ์ ซึ่งระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์มี 2 ระบบคือ

การวิเคราะห์สารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่มเทโทรโดทอกซิน (Yasumoto et al., 1985)

โดยใช้วิธี HPLC แบบรีเวอร์สเฟสชนิดอิออนคู่ (paired-ion reverse phase HPLC) ซึ่งใช้คอลัมน์ชนิด ODS (octadecanoylsilyl) และใช้สารละลายเฮปตาฟลูออโรบิวทิริคแอซิด (heptafuorobutyric acid) เป็นสารแลกเปลี่ยนคู่อิออน (ion-pairing reagent) เมื่อสารผ่านออกจากคอลัมน์ จะเกิดปฏิกิริยากับตัวออกซิไดซ์คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นจึงให้ความร้อนเพื่อให้เกิดสารฟลูออโรฟลอร์ และตรวจสอบความเข้มข้นของการเรืองแสงด้วยเครื่อง fluorometer ซึ่งจะทำให้ทราบถึงชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียม

การวิเคราะห์สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย (Oshima et al., 1989) โดยใช้วิธี HPLC แบบรีเวอร์สเฟสชนิดอิออนคู่ โดยใช้คอลัมน์ชนิด ODS และมีสารละลายเฮปเทนซัลโฟนิคแอซิค (heptanesulfonic acid)เป็นสารแลกเปลี่ยนคู่อิออน และสารที่ผ่านออกจากคอลัมน์จะเกิดปฏิกิริยากับตัวออกซิไดซ์ได้แก่ กรดเปอร์ไอออดิก (periodic acid) หรือกรดเปอร์คลอริค (perchloric acid) ตรวจสอบการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ด้วยวิธีเดียวกับการวิเคราะห์สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน

จากการที่สารกีดขวางช่องโซเดียมเป็นสารที่มีผลต่อระบบประสาทของสัตว์ชั้นสูง จึงได้มีการนำมาประยุกต์ใช้เป็นยาชาเฉพาะที่ (local anesthetic agent) แต่ยังไม่เป็นที่แพร่หลาย เนื่องจากไม่สามารถหาสารมาใช้ในการทดลองได้อย่างเพียงพอและสารประเภทนี้ที่นำมาใช้ผลิตได้จากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีหรือสกัดจากสัตว์จึงมีราคาแพงเพราะมีกรรมวิธีการผลิต ซับซ้อนยุ่งยาก นอกจากนี้สารกีดขวางช่องโซเดียมบางอนุพันธ์ เช่นเทโทรโดทอกซินยังไม่เสถียรในสารละลายด่างและมีสมบัติที่ไม่สามารถแทรกผ่าน (penetrate) เยื่อหุ้มเซลล์ประสาท (nerve sheath) ได้ (ธารา ตริตระการและคณะ, 2523) แต่สามารถนำสารชนิดนี้ไปใช้เป็นยาชาเฉพาะที่ในตำแหน่งอื่นที่ไม่ต้องแทรกผ่านเช่น ที่ไขสันหลังได้ โดยมีข้อดีคือ สารประเภทนี้จะไม่แพร่ไปยังเนื้อเยื่อ และเข้าสู่กระแสเลือดเหมือนยาชาเฉพาะที่ชนิดอื่นๆ และมีกลไกที่จำเพาะต่อช่องโซเดียมเท่านั้น ดังนั้นถ้ามีการผลิตสารกีดขวางช่องโซเดียมให้เพียงพอ ซึ่งจะทำให้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้กว้างขวางขึ้น ต่อมามีรายงานเกี่ยวกับการผลิตสารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่มพิษ อัมพาตจากหอยโดยแบคทีเรีย *Moraxella sp.* ที่แยกได้จากไดโนแฟลกเจลเลต *A. tamarense* โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะในการเพาะเลี้ยงต่างๆกัน พบว่าในภาวะปกติ *Moraxella sp.* จะผลิตสารกีดขวางช่องโซเดียมอนุพันธ์

ซัคซิทอกซิน (STX) แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในภาวะขาดแคลน (starved conditions) เชื้อจะสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้เพิ่มขึ้น โดยอนุพันธ์ที่สร้างในภาวะนี้คือ GTX1 และ GTX4 (Kodama et al ., 1990) สำหรับ ในประเทศไทย ศิริโฉม เหลืองอ่อน (2534) แยกแบคทีเรีย *Vibrio sp.* ได้จากเนื้อหอยแมลงภู่ ซึ่งสามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้ โดยนำแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลว L-medium ในภาวะที่มีการเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม. พบว่า *Vibrio* sp. สร้างสารได้ 0.837 นาโนกรัมต่อสารสกัดจากเซลล์แห้ง 1 มก. โดยสารที่สร้างขึ้นเป็นอนุพันธ์ เทโทรโดทอกซิน และแอนไฮโดรเทโทรโดทอกซิน และจากการที่มีผู้ค้นพบว่า แบคทีเรียสามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้ โดยการผลิตสารกีดขวางช่องโซเดียมจากแบคทีเรีย สามารถผลิตเป็นปริมาณมากได้ถ้ามีการควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งเชื้อแบคทีเรียสามารถควบคุมการเพาะเลี้ยงได้ง่าย สะดวก และไม่ต้องใช้เนื้อที่ในการเพาะเลี้ยงมากจึงมีประโยชน์ยิ่งในการใช้ผลิตสารนี้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมให้ผลิตสารนี้ได้ปริมาณที่สูงขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย