

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 บทนำต้นเรื่อง

การนำผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ เกษตรกรรม และอุตสาหกรรม เริ่มมีความสำคัญมากขึ้นในปัจจุบัน ประโยชน์ทางการแพทย์ที่สำคัญประการหนึ่ง คือ การใช้เป็นยารักษาและป้องกันโรค เพราะถึงแม้จะสามารถสังเคราะห์ยาได้เป็นส่วนใหญ่แล้วก็ตาม แต่ก็ยังมีส่วนประกอบที่สำคัญอีกมากจากธรรมชาติที่ยังไม่สามารถสังเคราะห์ได้ หรือขบวนการผลิตซับซ้อนยุ่งยากและยังต้องใช้ต้นทุนในการสังเคราะห์สูง รวมทั้งยาบางชนิดก็ยังต้องใช้สารสำคัญที่สกัดได้จากธรรมชาติเป็นสารเริ่มต้นของการสังเคราะห์เพื่อให้ได้ยาชนิดใหม่ นอกจากนี้ยังพบว่ายาสังเคราะห์บางชนิดทำให้เกิดอาการแทรกซ้อน การนำผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรค จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะลดผลกระทบอันเกิดจากผลข้างเคียงจากการใช้ยาสังเคราะห์ อีกทั้งยังมีราคาถูกและยังช่วยลดการเสียดุลการค้าในการนำเข้ายารักษาโรคจากต่างประเทศอีกด้วย

สารกลุ่มซัลเฟตโพลีแซคคาไรด์ (sulfate polysaccharide) เป็นสารที่ได้จากธรรมชาติ สามารถละลายน้ำได้ดี มีความหนืดสูง พบอยู่ระหว่างชั้นเนื้อเยื่อของผนังเซลล์สาหร่าย ช่วยคงความชุ่มชื้นและป้องกันการระเหยของน้ำออกจากเซลล์ในสภาวะอากาศแห้งแล้ง จึงทำให้สาหร่ายกลุ่มที่เจริญในเขตร้อนมีปริมาณ sulfate polysaccharide อยู่จำนวนมาก (Doner and Whistler, 1973) สาร sulfate polysaccharide จากสาหร่าย ที่เรียกว่า ฟุคอยแดน (fucoidan) มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่สำคัญ ได้แก่ คุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งได้มีการศึกษาผลของฟุคอยแดนในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดหยาบ (crude fucoidan) ของสาหร่ายสีน้ำตาล *Dictyota dichotoma*, *Dictyota sp.* และ *Padina gymnospora* สามารถ

ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก คือ *Bacillus megatherium* และ *Staphylococcus aureus* ได้ แต่ไม่ยับยั้งการเจริญในแบคทีเรียแกรมลบ (Rao et al., 1981) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงคุณสมบัติในยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งโดยจากการศึกษาพบว่า ฟุคอยแดนที่สกัดได้จากสาหร่าย *Sargassum thunbergii* สามารถยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็ง Ehrlich ascites carcinoma ในหนูทดลอง (Itoh et al., 1993) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Koyanagi และคณะ (2002) ที่พบว่าฟุคอยแดนจากสาหร่าย *Fucus vesiculosus* สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Sarcoma 180, Lewis lung carcinoma และ B16 melanoma ในหนูทดลองได้เช่นกัน และคุณสมบัติของฟุคอยแดนที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ คุณสมบัติด้านการแข็งตัวของเลือด โดย Pereira และคณะ (1999) ศึกษาคุณสมบัติในการต้านการแข็งตัวของเลือดของฟุคอยแดนที่สกัดได้จากสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม echinoderm สามารถต้านการแข็งตัวของเลือด โดยมีกลไกที่ซับซ้อนกว่าที่ได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงได้มีการศึกษาคุณสมบัติของสารฟุคอยแดนจากสาหร่ายข้าวเหนียว ซึ่งเป็นพืชน้ำจืดที่มีการกระจายทั่วไปในประเทศไทยและมนุษย์ไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์มากนัก เพื่อใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติและการพัฒนางานทางด้านการแพทย์ ทั้งนี้เพื่อช่วยลดผลกระทบจากการใช้ยาที่สังเคราะห์จากสารเคมีและลดต้นทุนในการผลิตยาที่ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคต่อไปในอนาคต

## 1.2 การตรวจเอกสาร

### 1.2.1 ลักษณะและโครงสร้างของฟুকอยแดน

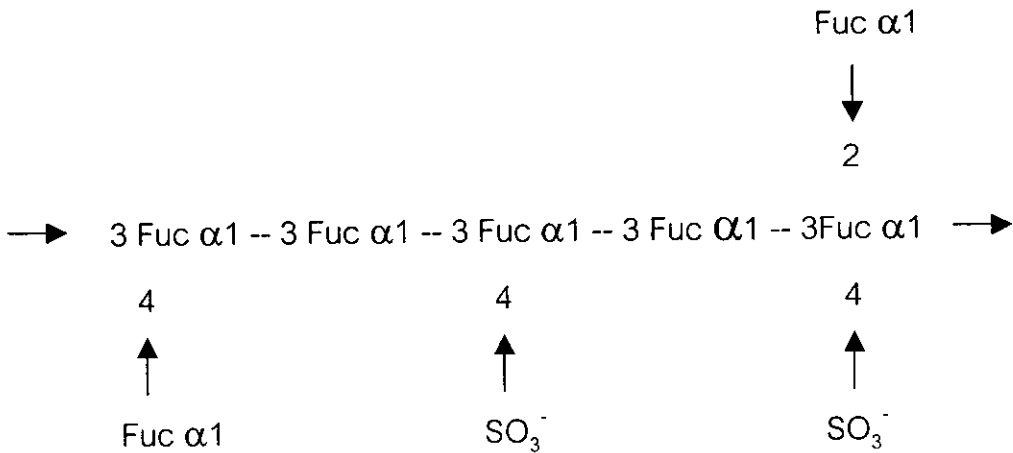
ฟুকอยแดน (fucoidan) หรือ ซัลเฟตฟูกอยแดน (sulfated fucan) เป็นสาร sulfate polysaccharide สามารถละลายน้ำได้ดี และมีความหนืดสูง สูตรทั่วไปของฟুকอยแดน คือ  $(C_6H_9O_3, SO_4, Ca_{1/2})_n$  ซึ่งประกอบด้วย  $\alpha$ -L-fucopyranosyl-L-fucose เรียงต่อกันเป็นหน่วยซ้ำกัน เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic linkage) และมีหมู่ sulfate เป็นองค์ประกอบ พบได้ทั่วไปในสาหร่าย โดยเฉพาะสาหร่ายสีน้ำตาล และสิ่งมีชีวิตกลุ่ม echinoderm ซึ่งในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีตำแหน่งของพันธะไกลโคซิดิกและรูปแบบในการจัดเรียงตัวของหมู่ sulfate รวมทั้งองค์ประกอบภายในโมเลกุลที่แตกต่างกัน

#### 1.2.1.1 ฟुकอยแดนจากสาหร่ายสีน้ำตาล

ฟुकอยแดนจากสาหร่ายสีน้ำตาล เช่น *Fucus vesiculosus*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Sargassum thunbergii*, *Cladosiphon okamuranus* และ *Chorda filum* เป็นต้น จะพบอยู่ระหว่างชั้นเนื้อเยื่อของผนังเซลล์ มีหน้าที่ช่วยคงความชุ่มชื้นและป้องกันการระเหยของน้ำในสภาวะแห้งแล้ง จึงเป็นสาเหตุให้สาหร่ายที่เจริญในเขตร้อนมีปริมาณฟুকอยแดนอยู่สูง ปริมาณฟুকอยแดนยังขึ้นกับฤดูกาล โดยพบว่า *Laminaria* sp. จะมีปริมาณฟুকอยแดนสูงสุดในฤดูใบไม้ร่วงและต้นฤดูหนาว (Doner and Whistler, 1973) องค์ประกอบของฟुकอยแดนจากสาหร่ายสีน้ำตาลจะมี sulfate เชื่อมพันธะ ester กับ L-fucose และมี galactose, xylose รวมทั้ง glucuronic acid เป็นองค์ประกอบ จากความหลากหลายขององค์ประกอบภายในโมเลกุลของฟुकอยแดน ทำให้สามารถแบ่งฟुकอยแดนออกได้เป็นสองชนิด คือ F-fucoidan ซึ่งมี sulfate fucose เป็นองค์ประกอบและ U-fucoidan ที่มีองค์ประกอบเป็น glucuronic acid อยู่ประมาณ 20% ([http://www.takara.co.jp/english/bio\\_e/news\\_e/1996/06/17.htm](http://www.takara.co.jp/english/bio_e/news_e/1996/06/17.htm)) โดยในสาหร่ายสีน้ำตาลแต่ละชนิดจะมีการจัดเรียงตัวของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุลรวมทั้งการจัดเรียงตัวของ

sulfate แตกต่างกันอย่างออกไป จึงทำให้โครงสร้างของฟুকอยแดนที่ได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล มีความหลากหลายและความซับซ้อนมากกว่าฟুকอยแดนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ซึ่งโครงสร้างหลักของฟুকอยแดนที่ได้จากสาหร่ายสีน้ำตาลใน Class Cyclosporophyceae Order Fucales ซึ่งได้แก่ *Fucus vesiculosus*, *Fucus evanescens* และ *Ascophyllum nodosum* โครงสร้างหลักประกอบด้วย L-fucopyranose เรียงต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha(1-3)$  และ  $\alpha(1-4)$  ส่วนฟুকอยแดนจากสาหร่ายสีน้ำตาลใน Class Phaeosporophyceae Order Chordariales และ Laminariales ประกอบด้วยสายโพลิเมอร์ของ L-fucopyranose เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha(1-3)$  เป็นสายหลัก และอาจมีส่วนที่เป็นแขนงที่ตำแหน่งที่ 2 ของน้ำตาล fucose โดยในสาหร่าย *Cladosiphon okamuranus* ส่วนที่เป็นแขนงจะเป็นหน่วยของ  $\alpha$ -D- glucopyranosyluronic acid และในสาหร่าย *Chorda filum* ส่วนที่เป็นแขนงจะเป็นหน่วยของ  $\alpha$ -L- fucopyranosyl (Bilan, et al. 2002 )

Patankar และคณะ (1993) ศึกษาฟুকอยแดนที่ได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Fucus vesiculosus* พบว่าประกอบด้วย homopolymer ของ sulfate L-fucose โดยสายหลักประกอบด้วยโพลิเมอร์ของ fucose เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha(1-3)$  ที่มีหมู่ sulfate จับที่ C-4 ของโมเลกุล fucose โดยมี sulfate ทุกๆ 3-4 โมลของ fucose (0.3 โมล ของ sulfate / โมล ของ fucose) และมีแขนง fucose ต่อกับสายหลักโดยเชื่อมผ่านพันธะ  $\alpha(1-2)$  หรือ  $\alpha(1-4)$  ทุกๆ 2-3 โมเลกุลของ fucose ดังรูปที่ 1 และเมื่อผ่านกระบวนการ methylation และ hydrolysis พบว่าจะให้ 3-O methyl-L-fucose (pyranose form และ furanose form) ปริมาณ 60%, 3,4-di-O-methyl-fucose ปริมาณ 20% และ fucose ปริมาณ 20%

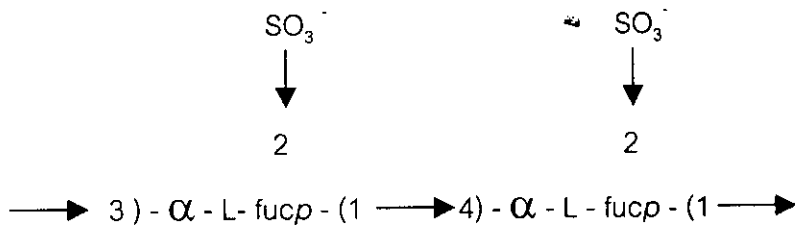


รูปที่ 1 โครงสร้างของฟুকอยแดนจากสาหร่าย *Fucus vesiculosus*  
(Patankar et al., 1993)

จากการสกัดฟুকอยแดนจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Fucus evanescens* โดยแยกส่วนที่เป็นรงควัตถุและสารโมเลกุลเล็กอื่นๆ ออกด้วย MeOH-CHCl<sub>3</sub>-น้ำ ในอัตราส่วน 4:2:1 แล้วสกัดส่วนโพลีแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ (water soluble polysaccharide) ด้วยสารละลาย CaCl<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 85 °C และตกตะกอนโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นกรด (acid polysaccharide) โดยใช้สารละลาย hexadecyltrimethyl ammonium bromide จากนั้นละลายตะกอนที่ได้ใน sodium salt และนำมาทำบริสุทธิ์โดยวิธี ion-exchange chromatography ด้วย DEAE-sephacel ได้องค์ประกอบของฟুকอยแดนดังตารางที่ 1 ซึ่งใน fraction ที่ 4 จะได้ส่วนที่เป็น homofucan sulfate ที่ประกอบด้วย L-fucose, sulfate และ acetate ในอัตราส่วน (molar ratio) 1:1.23:0.36 และจากการศึกษาโครงสร้างโดยวิธี <sup>13</sup>C NMR spectroscopy ได้โครงสร้างหลักประกอบด้วยโพลิเมอร์ของ α-L-fucopyranose 2- sulfate เชื่อมต่อดัวยพันธะ (1-3) และ (1-4) (Bilan et al., 2002) ดังรูปที่ 2 และอาจพบ sulfate ที่ตำแหน่งที่ 4 ในโมเลกุลของ fucose ที่เชื่อมด้วยพันธะ (1-3)

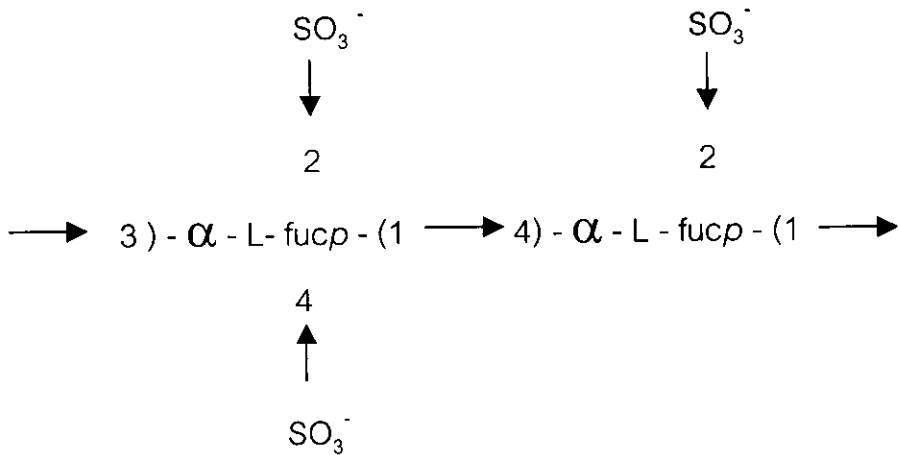
ตารางที่ 1 ปริมาณและองค์ประกอบของฟুকอยแดนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์โดยวิธี ion-exchange chromatography ของสารสกัดหยาบฟুকอยแดน (F) จากสาหร่าย *Fucus evanescens* (Bilan *et al.*, 2002)

fraction	Yield (% of F)	Neutral monosaccharides (%)					SO <sub>3</sub> Na(%)	Uronic acid (%)
		Fuc	Xyl	Gal	Man	Glc		
F1	3.9	35.4	6.1		0.8	4.0	n.d.	n.d.
F2	2.6	10.7	17.4	3.0	3.7	1.1	19.6	15.6
F3	21.4	33.2	8.1	4.5	3.5		28.9	11.4
F4	47.4	58.7	1.6	1.6			46.5	
F5	4.5	34.0	3.8	5.4			32.5	



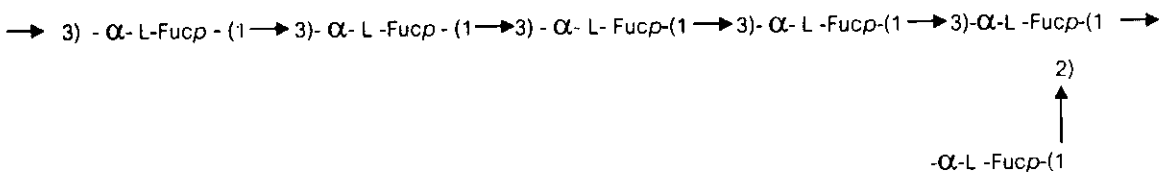
รูปที่ 2 โครงสร้างของฟুকอยแดนจากสาหร่าย *Fucus evanescens*  
(Bilan *et al.*, 2002)

นอกจากนี้ Bilan และคณะ(2004) ยังได้ทำการสกัดฟুকอยแดนจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Fucus distichus* ด้วยวิธีเดียวกับที่ใช้ในการสกัดสาหร่าย *Fucus evanescens* ได้โครงสร้างคล้ายกับสาหร่าย *Fucus evanescens* ได้ส่วนที่เป็น homofucan sulfate ที่ประกอบด้วย L-fucose, sulfate และ acetate ในอัตราส่วน (molar ratio) 1:1.21:0.08 และมีโครงสร้างภายในโมเลกุลประกอบด้วยหน่วยของ 3-linked  $\alpha$ -L-fucopyranose 2,4 - disulfate และ 4-linked  $\alpha$ -L-fucopyranose 2-disulfate ดังรูปที่ 3



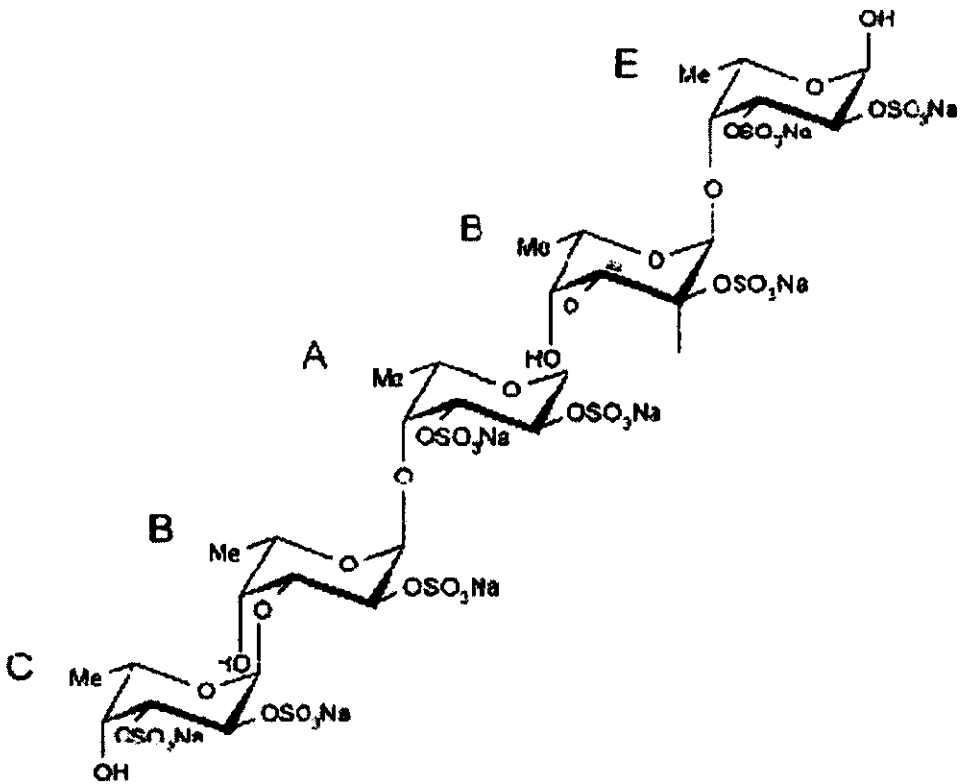
รูปที่ 3 โครงสร้างของฟูกอยแดนจากสาหร่าย *Fucus distichus* (Bilan et al., 2004)

ฟูกอยแดนจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Chorda filum* มีโครงสร้างที่เป็นสายหลักประกอบด้วย โพลิเมอร์ของ L-fucopyranose เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$  (1-3) ดังรูปที่ 4 โดยมีระดับของแขนงข้างสูง โดยจะมีแขนงที่ประกอบด้วย L-fucopyranose แยกออกไปทุกๆ 5 หน่วยของ fucose สายหลัก ซึ่งตรงจุดที่เกิดแขนงจะต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$  (1-2) และพบ sulfate ที่ O-4 และ O-2 หรือ 2-O-acetylated ของสายหลัก (Chizhov et al., 1999)



รูปที่ 4 โครงสร้างของฟูกอยแดนจากสาหร่าย *Chorda filum* (Chizhov et al., 1999)

จากการสกัดฟুকอยแดนจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Ascophyllum nodosum* โดยใช้การย่อยด้วยกรดและทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี centrifugal partition chromatography มีโครงสร้างที่ประกอบด้วย  $[ \rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-L-Fuc}(2\text{SO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-Fuc}(2,3\text{diSO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow ]_n$  เรียงต่อกัน มีส่วนที่เป็นแขนงในตำแหน่ง O-4 ของ  $1\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-L-Fuc}(2\text{SO}_3^-)$  โดยส่วนที่เป็นแขนงอาจเป็น sulfate, xylose, fucose หรือ sulfated fucose (Chevolet *et al.*, 2001) ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 โครงสร้างของฟুকอยแดนจากสาหร่าย *Ascophyllum nodosum* ประกอบด้วย  $1\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-L-Fuc}(2\text{SO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-Fuc}(2,3\text{diSO}_3^-)$  4-7 หน่วยเรียงต่อกัน เป็นโครงสร้างหลัก และมีส่วนที่เป็น reducing end (E) และ non-reducing end (C) ต่ออยู่กับสายหลักภายในโมเลกุล (Chevolet *et al.*, 2001)



Ponce และคณะ (2002) ศึกษาสารฟุคอยแดนจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Adenocystis utricularis* ซึ่งจัดอยู่ใน Family Adenocystaceae Order Ectocarpales โดยทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำกลั่น, สารละลาย calcium chloride 2% และ HCl เจือจาง pH 2 ทำการสกัดที่อุณหภูมิห้อง และ 70 °C พบว่าปริมาณและคุณลักษณะของสารที่ได้คล้ายคลึงกัน สารที่ได้จากการสกัดที่อุณหภูมิห้อง จัดอยู่ในกลุ่ม galactofucan ประกอบด้วย L-fucose, D-galactose และ sulfate ส่วนสารที่สกัดที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นสารในกลุ่ม uronofucoidan ประกอบด้วย fucose เป็นองค์ประกอบหลัก รองลงมาคือ mannose และมีน้ำตาลชนิดอื่นประกอบอยู่เป็นส่วนน้อย ได้แก่ galactose, xylose, rhamnose และ glucose นอกจากนี้ยังพบ uronic acid และ sulfate ภายในโมเลกุล โดยสารกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้ง herpes simplex virus I และ II คือ galactofucan มีโครงสร้างที่ประกอบด้วย L-fucopyranose เชื่อมด้วยพันธะ  $\alpha$  (1-3) มี sulfate จับอยู่ที่ C-4 และมีแขนงเป็น fucopyranose และ 2-sulfate fucopyranose เชื่อมที่ C-2 ของสาย fucopyranose และยังพบ D-galactopyranose เชื่อมด้วยพันธะ(1-3) และ (1-6) โดยมี sulfate ที่ C-4

โครงสร้างฟุคอยแดนจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Spatoglossum schroederi* สายหลักประกอบด้วย glucuronic acid เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ (1-3) และมีส่วนแขนงที่ประกอบด้วยโพลีเมอร์ของ fucose ที่เชื่อมต่อดัวยพันธะ  $\alpha$ (1-3) โดยมี sulfate จับที่ C-4 และ  $\beta$ (1-4) xylose จับที่ C-2 ของโมเลกุล fucose ซึ่งสารประกอบดังกล่าวจัดอยู่ในกลุ่ม xylofucoglucuronan มีขนาดโมเลกุล 21 kDa และพบว่าเป็นฟุคอยแดนชนิดที่สามารถยับยั้งการแพร่กระจาย (metastasis) ของเซลล์มะเร็งได้ (Rocha et al., 2001)

น้ำหนักโมเลกุลของฟุคอยแดนที่ได้จากสาหร่าย *Pelvitia canaliculata* โดยผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ มีค่าเท่ากับ 30 kDa (Colliece et al., 1994) ซึ่งภายในโมเลกุลของฟุคอยแดน มีองค์ประกอบของน้ำตาล L-fucose ปริมาณมากที่สุด คือ 31-72% รองลงมาคือ galactose 3-5 %, mannose 4-20% และ arabinose 0.25% (Doner and Whistler , 1993)

### 1.2.1.2 ฟูกอยแดนจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่ม

#### echinoderm

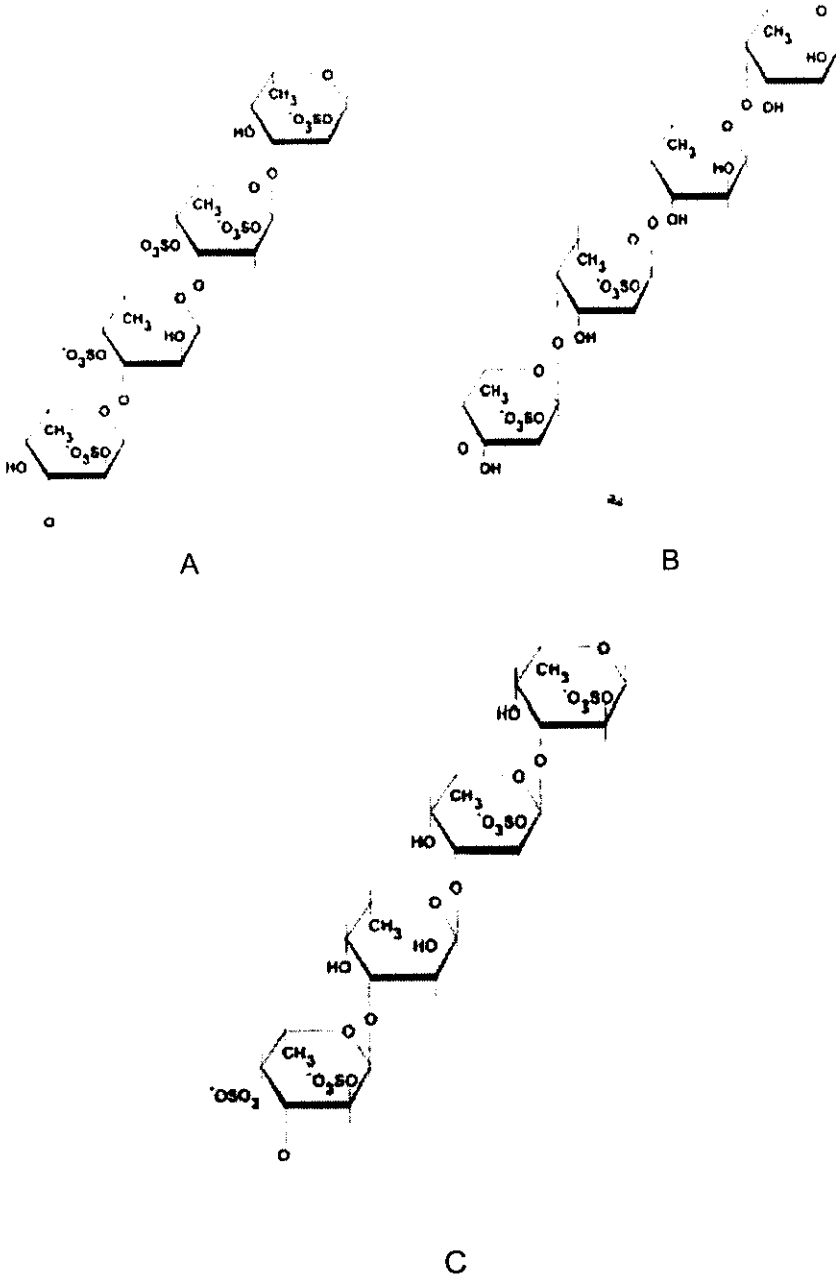
Pereira และคณะ (1999) ศึกษาโครงสร้างของฟูกอยแดนที่แยกจากชั้นเยื่อเมือกของไข่ (egg jelly layer) ในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม echinoderm ได้แก่ เม่นทะเล (sea urchin) คือ *Lytechinus variegatus*, *Arbacia lixula* และแตงกวาทะเล (sea cucumber) *Ludwigothurea grisea* มีโครงสร้างหลักประกอบด้วย L-fucopyranose เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha(1-3)$  หรือ  $\alpha(1-4)$  และมี sulfate ที่ตำแหน่งที่ 2 และ 4 ของโมเลกุล fucose ดังนี้

*Lytechinus variegatus* ประกอบด้วย  $[3-\alpha\text{-L-Fucp-2}(\text{OSO}_3)\text{-1} \rightarrow 3-\alpha\text{-L-Fucp-4}(\text{OSO}_3)\text{-1} \rightarrow 3-\alpha\text{-L-Fucp-2,4}(\text{OSO}_3)\text{-1} \rightarrow 3-\alpha\text{-L-Fucp-2}(\text{OSO}_3)\text{-1}]_n$

*Arbacia lixula* ประกอบด้วย  $[4-\alpha\text{-L-Fucp-2}(\text{OSO}_3)\text{-1} \rightarrow 4-\alpha\text{-L-Fucp-2}(\text{OSO}_3)\text{-1} \rightarrow 4-\alpha\text{-L-Fucp-1} \rightarrow 4-\alpha\text{-L-fucp-1}]_{n_m}$

*Ludwigothurea grisea* ประกอบด้วย  $[3-\alpha\text{-L-Fucp-2,4}(\text{OSO}_3)\text{-1} \rightarrow 3-\alpha\text{-L-Fucp-1} \rightarrow 3-\alpha\text{-L-Fucp-2}(\text{OSO}_3)\text{-1} \rightarrow 3-\alpha\text{-L-Fucp-2}(\text{OSO}_3)\text{-1}]_n$

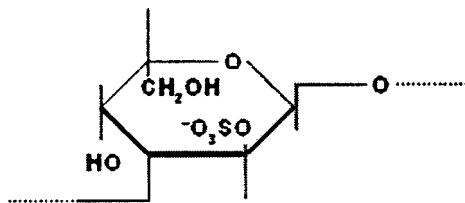
รูปแบบการจัดเรียงตัวของฟูกอยแดนจากสิ่งมีชีวิตกลุ่ม echinoderm ประกอบด้วยโครงสร้างหลัก 4 หน่วย เรียงต่อเป็นหน่วยซ้ำๆ กัน (tetrasaccharide repeat unit) ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 โครงสร้างของฟูกอยแดนจากเม่นทะเล *Lytechinus variegatus* (A), *Arbacia lixula* (B) และเตังกวาทะเล *Ludwigothurea grisea* (C) ( Mulloy et al., 2000)



จากโครงสร้างของ echinoderm ดังกล่าว นอกจากจะเป็น sulfated L-fucose แล้ว ยังพบว่า เม่นทะเล *Echinodermetra lucunter* มีโครงสร้างเป็น sulfated L-galactan ประกอบด้วย L-galactan เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha(13)$  และมี sulfate ที่ตำแหน่งที่ 2 (Alves *et al.*, 1997) ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 โครงสร้างของ sulfate L-galactan ที่แยกได้จากเม่นทะเล *Echinodermetra lucunter* (Alves *et al.*, 1997)

จากการศึกษาของ Alves และคณะ (1997) โดยเปรียบเทียบองค์ประกอบที่พบในเม่นทะเลทั้ง 3 ชนิด คือ *Arbacia lixula*, *Lytechinus variegatus* และ *Echinodermetra lucunter* พบว่ามีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของฟูกอยแดนจากเม่นทะเล *Lytechinus variegatus*, *Arbacia lixula* และ *Echinodermetra lucunter* (Alves *et al.*, 1997)

Species	Chemical composition		
	L-fucose	L-galactose	Sulfate/total sugar
<i>A. lixula</i>	1.00	<0.01	0.42
<i>L. variegatus</i>	1.00	<0.01	1.46
<i>E. lucunter</i>	<0.01	1.00	1.30

## 1.2.2. คุณสมบัติของพลาสมา

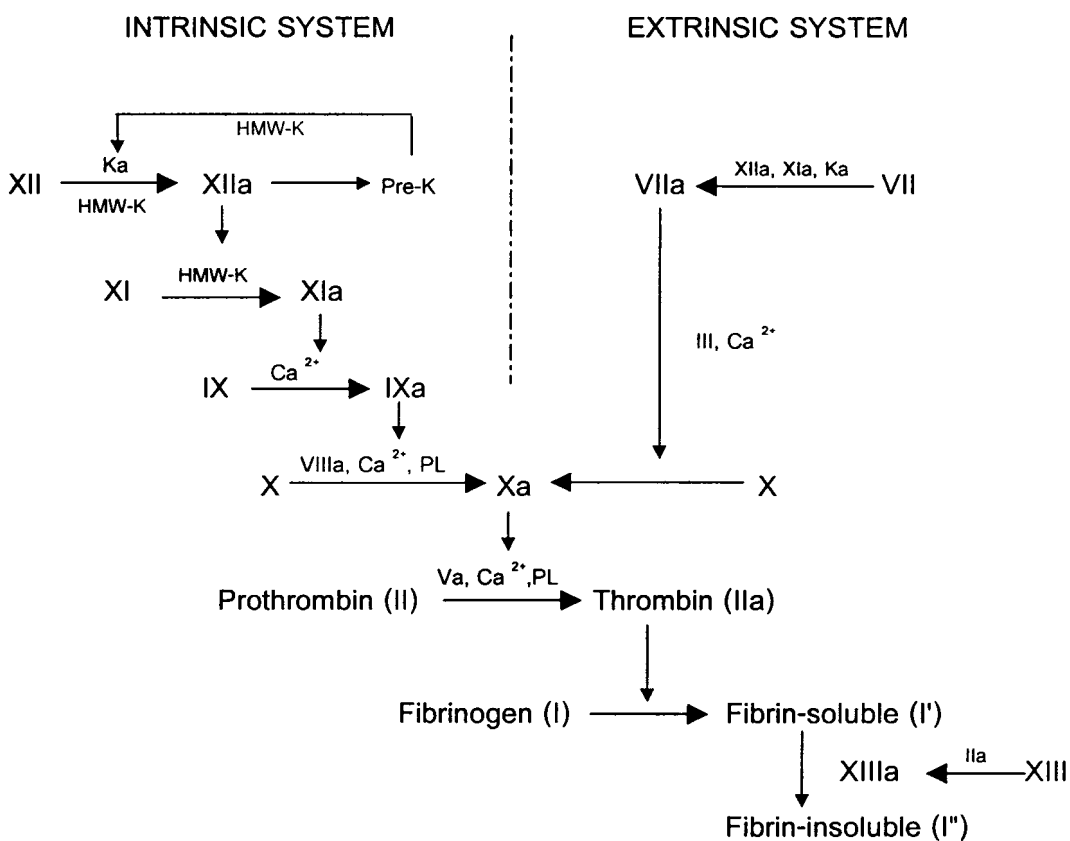
### 1.2.2.1 คุณสมบัติด้านการแข็งตัวของเลือด (Anticoagulant activity)

#### ก. กระบวนการแข็งตัวของเลือด (blood coagulation)

กระบวนการแข็งตัวของเลือด (blood coagulation) เกิดขึ้นเมื่อมีการฉีกขาดของผนังหลอดเลือด ซึ่งในสภาวะปกติ เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดจะไม่กระตุ้นให้เกิดการสร้างลิ่มเลือด เนื่องจากเกล็ดเลือดและปัจจัยในการแข็งตัวของเลือดไม่ได้เกาะติดกับเซลล์บุหลอดเลือด แต่เมื่อมีการฉีกขาดของผนังหลอดเลือด จะทำให้หลอดเลือดหดตัวโดยทันที ส่งผลให้เกร็ดเลือดเกาะติดกับคอลลาเจน เรียกกระบวนการนี้ว่า platelet adhesion เกร็ดเลือดในสภาพถูกกระตุ้นจะมีการสร้างสารสำคัญ ได้แก่ ADP, Serotonin, Thromboxane A<sub>2</sub> ฯลฯ เพื่อเหนี่ยวนำให้เกร็ดเลือดบริเวณข้างเคียงมาเกาะกลุ่มกับเกร็ดเลือดที่เกาะติดกับคอลลาเจน เรียกกระบวนการนี้ว่า platelet aggregation หลังจากนั้นเยื่อหุ้มเซลล์ของเกร็ดเลือดจะหายไปและรวมกันเกิดเป็นก้อนเหนียวใสเรียก platelet plug อุดรอยฉีกขาดของหลอดเลือด ในขณะที่เดียวกันระบบการแข็งตัวของเลือดก็จะกระตุ้นปัจจัยการแข็งตัวของเลือดให้สลาย prothrombin เป็น thrombin และ thrombin ที่ได้จะสลาย fibrinogen ซึ่งเป็นโปรตีนที่ละลายได้ ให้เป็น fibrin เกิดเป็นลิ่มเลือดที่ไม่ละลาย ลิ่มเลือดที่เกิดขึ้นจะฉาบรอยฉีกขาดของหลอดเลือดบริเวณดังกล่าว เพื่อเป็นการห้ามเลือด (Hemostasis) Thrombin ที่เกิดขึ้นจากระบบการแข็งตัวของเลือดนอกจากจะกระตุ้นการเปลี่ยน fibrinogen ให้เป็น fibrin แล้วยังมีผลกระตุ้นเกร็ดเลือดให้มีการหลั่ง ADP และ thromboxane A<sub>2</sub> ซึ่งสารทั้งสองนี้จะกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือดได้เช่นกัน (พยางค์, 2539)

ในกระบวนการแข็งตัวของเลือด ประกอบด้วย 2 ระบบ คือ intrinsic system และ extrinsic system ดังรูปที่ 9 โดยจะมีปัจจัยการแข็งตัวของเลือดหลายชนิดทำปฏิกิริยาต่อเนื่องกันเป็นขั้นตอนจนกระทั่งเลือดกลายเป็นลิ่มเลือด ปัจจัยต่างๆ ดังกล่าวเป็น glycoprotein ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่ม zymogens และปัจจัยร่วมของ zymogens (ตารางที่ 3) โดยกลุ่ม zymogens เป็นเอนไซม์ protease ในรูปที่ไม่มีฤทธิ์

ประกอบด้วย factor II (prothrombin), VII, IX, X, XI, XII และ prekallikrein ในแต่ละขั้นตอน zymogen จะถูกกระตุ้นให้อยู่ในรูปที่มีฤทธิ์ซึ่งจะกระตุ้น zymogen ตัวต่อไป ส่วนกลุ่มปัจจัยร่วมของ zymogen ได้แก่ factor V และ VIII ปัจจัยร่วมทั้งสองนี้จะถูกเปลี่ยนให้เป็นรูปที่มีฤทธิ์ (factor Va และ VIIIa) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของ factor Xa และ IXa ตามลำดับ



รูปที่ 9 ระบบการแข็งตัวของเลือด ประกอบด้วยระบบ intrinsic และ extrinsic (พยางค์, 2539)

ตารางที่ 3 ปัจจัยต่างๆ ของการแข็งตัวของเลือด (พยางค์, 2539)

ปัจจัยของการ แข็งตัวของเลือด	ชื่อ
I	Fibrinogen
I'	Fibrin monomer
I''	Fibrin polymer
II	Prothrombin
III	Tissue thrombospondin
IV	Calcium, Ca <sup>2+</sup>
V	Proaccelerin
VII	Proconvertin
VIII	Antihemophilic globulin, AHG
IX	Christmas factor; plasma thromboplastin component
X	Stuart-Prower factor
XI	Plasma thromboplastin antecedent, PTA
XII	Hageman factor
XIII	Fibrin-stabilizing factor
HMW-K	High-molecular-weight kininogen, Fitzgerald factor
Pre-k	Prekallikrein, Fletcher factor
Ka	Kallikrein
PL	Platelet phospholipid



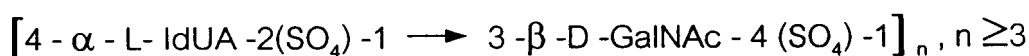
## ข. สารต้านการแข็งตัวของเลือด (Anticoagulants)

สารต้านการแข็งตัวของเลือดประกอบด้วยสารหลายชนิด ที่พบส่วนใหญ่ได้แก่ heparin, dermatan sulfate, fucosylate chondroitin sulfate และ ฟุกคอยแดน

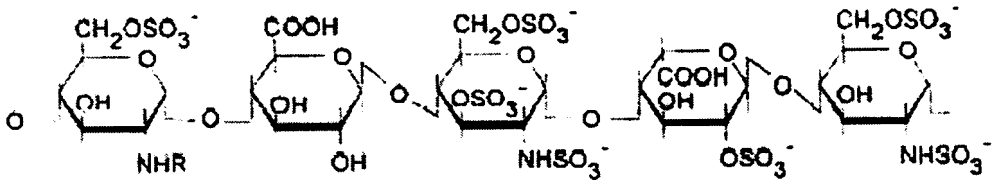
Heparin เป็นสาร sulfated mucopolysaccharide สกัดได้จากเยื่อぶลาไส้หมูและปอดวัว พบในแกรนูลของ mast cell มีน้ำหนักโมเลกุล 60,000-100,000 Da โมเลกุลประกอบด้วยโพลิเมอร์ของกรด D-glucuronic เรียงสลับกับ glucosamine โพลิเมอร์นี้จะถูกเปลี่ยนแปลงด้วยกระบวนการต่างๆ เช่น N-deacetylation และ N-Sulfation ที่ glucosamine และมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรด D-glucuronic ด้วยกระบวนการ O-sulfation ที่กรด iduronic และที่ glucosamine แต่ปฏิกิริยาทั้งหมดเหล่านี้ไม่ได้เกิดเหมือนกันในทุกๆ หน่วยย่อยภายในโมเลกุล ทำให้ได้ความหลากหลายในสูตรโครงสร้างของ heparin (พยางค์, 2539) ฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเลือดที่สำคัญของ heparin คือยับยั้งการทำงานของ thrombin และ factor Xa ทำให้ fibrin เกิดน้อยลง โดยการยับยั้งของ heparin อาจมีข้อแตกต่างกันในส่วนของกลไกการยับยั้งผ่านปัจจัยการแข็งตัวของเลือดดังกล่าว ซึ่งในการยับยั้ง factor Xa นั้น การจับของ heparin กับ antithrombin III (ATIII) เพียงอย่างเดียวก็สามารถที่จะยับยั้ง factor Xa ได้ แต่ในการยับยั้ง thrombin นั้น heparin จะต้องทำหน้าที่เป็น catalytic template ให้ทั้ง thrombin และ AT III มาจับ จึงจะสามารถยับยั้ง thrombin ได้ โดย heparin จะเข้าจับกับ AT III มีผลทำให้ ATIII เกิด conformational change ที่ reactive site ทำให้สามารถเข้าจับกับ thrombin และปัจจัยการแข็งตัวของเลือดอื่นๆ ได้แก่ factor Xa, IXa, XIa, XIIa และ kallikrein ได้ดีขึ้น ซึ่งเมื่อ thrombin หรือ factor ดังกล่าวจับกับ AT III ได้เป็นสารประกอบ heparin จะหลุดออก ซึ่ง heparin ที่มีจำนวนโมโนแซคคาไรด์ น้อยกว่า 18 หน่วยไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาการยับยั้ง thrombin โดย AT III ได้ ส่วน heparin ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะต้านการแข็งตัวของเลือดได้โดยเร่งปฏิกิริยาการยับยั้ง factor Xa โดย AT III แต่เมื่อความเข้มข้นของ heparin ในพลาสมาเป็น 0.1-1.0 unit/ml จะมีการยับยั้ง thrombin และ factor Xa โดย AT III

อย่างรวดเร็ว สำหรับผลด้านการแข็งตัวของเลือดของ heparin ในขนาดสูง (มากกว่า 5.0 unit/ml) ส่วนหนึ่งเป็นผลจากการยับยั้ง thrombin โดย heparin cofactor II ซึ่งมีกลไกคล้ายกับ AT III แต่มีความสามารถในการจับกับ heparin ได้ต่ำกว่า AT III (พยางค์, 2539 และ ศรีจันทร์, 2542) เนื่องจาก heparin มี pentasaccharide sequence ภายในสาย (รูปที่ 10) รวมทั้งองค์ประกอบของน้ำตาลและการจัดเรียงตัวของหมู่ซัลเฟตที่มีความจำเพาะกับ AT III มากกว่า (Mulloy *et al.* 2000)

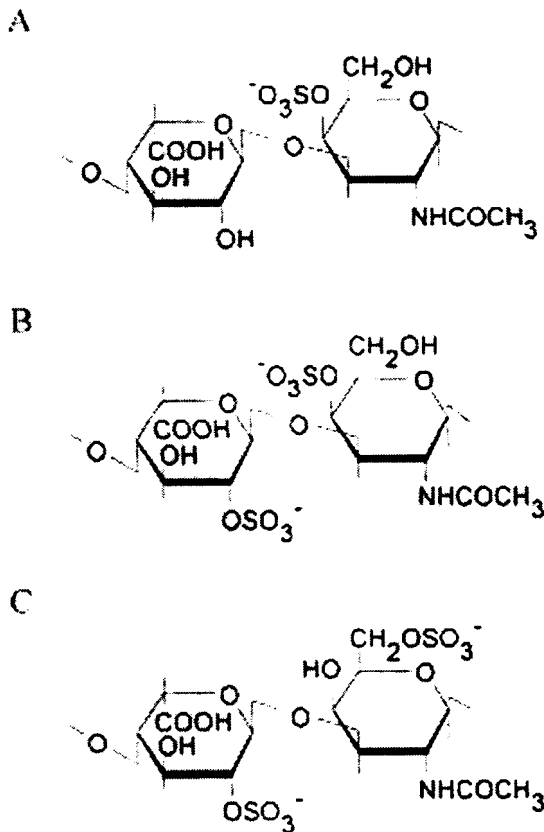
Dermatan sulfate เป็นสาร glycosaminoglycan ประกอบด้วย  $\alpha$ -L-iduronic acid และ N-acetyl  $\beta$ -D-galactosamine โดยมี sulfate ที่ตำแหน่งที่ 2 ของ iduronic acid และตำแหน่งที่ 4 ของ galactosamine ซึ่งเป็นส่วนที่จับกับ heparin cofactor II (รูปที่ 11) คุณสมบัติด้านการแข็งตัวของเลือดของ dermatan sulfate ขึ้นกับตำแหน่งของ sulfate บน galactosamine ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีความจำเพาะกับ heparin cofactor II โดยไม่เกี่ยวข้องกับระดับ sulfate ในโมเลกุล จากการศึกษาค้นสมบัติด้านการแข็งตัวของเลือดของ dermatan sulfate จาก *Ascidia nigra* โดยการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของ sulfate ที่จับอยู่กับ galactosamine จากตำแหน่งที่ 4 เป็นตำแหน่งที่ 6 จะไม่พบคุณสมบัติด้านการแข็งตัวของเลือด แม้จะเพิ่มปริมาณซัลเฟตในตำแหน่งที่ 2 ของ iduronic acid สูงขึ้น 80 % ก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับ dermatan sulfate ที่มีคุณสมบัติด้านการแข็งตัวของเลือดจาก ascidian ชนิดอื่น คือ *Styela plicata* และ *Halocynthia pyriformis* พบว่ามีระดับ sulfate ตำแหน่งที่ 2 ของ iduronic acid อยู่สูง และมี sulfate ที่ตำแหน่งที่ 4 ของ galactosamine ซึ่งสามารถจับกับ heparin cofactor II ได้ดีกว่า Dermatan sulfate จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mulloy *et al.* 2000) ซึ่งโครงสร้างของ dermatan sulfate ที่มีความจำเพาะกับ heparin cofactor II เป็นดังนี้



(Maimone *et al.*, 1990)

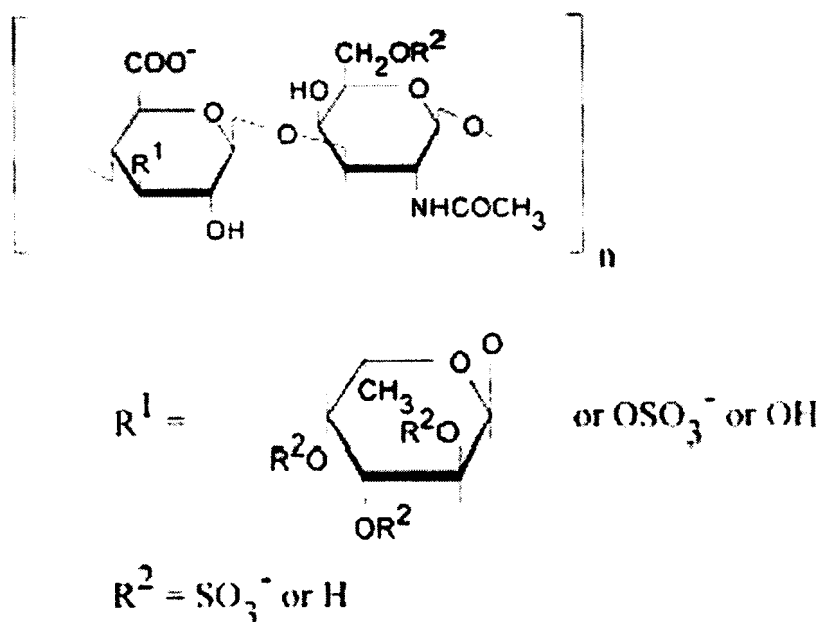


รูปที่ 10 ตำแหน่งในสูตรโครงสร้างของ Heparin ที่จับกับ antithrombin III (Mulloy *et al.* 2000)



รูปที่ 11 โครงสร้างของ dermatan sulfate: dermatan sulfate ที่ได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (A), โครงสร้างที่เรียงเป็นหน่วยซ้ำๆกันของ dermatan sulfate จากสิ่งมีชีวิตกลุ่ม Ascidian ได้แก่ *Styela plicata* และ *Halocynthia pyriformis* แสดงส่วนที่จับกับ heparin cofactor II (B), โครงสร้างหลักที่เรียงต่อเป็นหน่วยซ้ำๆกันของ dermatan sulfate จาก *Ascidia nigra* ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ไม่มีคุณสมบัติด้านการแข็งตัวของเลือด (C) (Mulloy *et al.* 2000)

Fucosylate chondroitin sulfate เป็น glycosaminoglycan ที่มี *N*-acetyl  $\beta$ -D-galactosamine และ  $\beta$ -D-glucuronic acid โดยมี sulfate ที่ตำแหน่งที่ 4 หรือ 6 ของ galactosamine เป็นสารประกอบที่แยกได้จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล เช่น squid ink และ แดงกวาทะเล โครงสร้างของ Chondroitin sulfate จาก แดงกวาทะเล *Ludwigothurea grisea* สายหลักจะเป็น *N*-acetyl  $\beta$ -D-galactosamine ที่มี sulfate ในตำแหน่งที่ 6 ซึ่งคล้ายกับ Chondroitin sulfate จาก สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่มีส่วนที่เป็นแขนงเป็น sulfate หรือ fucose ที่มี sulfate (sulfated fucose) ในตำแหน่งที่ 3 ของ glucuronic acid (รูปที่ 12) ซึ่งส่วน sulfate fucose ที่เป็นแขนงนี้เป็นส่วนที่ทำให้เกิดคุณสมบัติด้านการแข็งตัวของเลือด โดยมีค่า APTT เท่ากับ 40 IU/mg ในขณะที่ Chondroitin -6 -sulfate จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีค่า APTT น้อยกว่า 1 IU/mg และเมื่อมีการย้ายสาย sulfate fucose โดยการย่อยด้วยกรด จะทำให้คุณสมบัติด้านการแข็งตัวของเลือดลดลง เนื่องจาก sulfate fucose ที่เป็นส่วนแขนง มีความสำคัญต่อการกระจายตัวของ protein ligand ในสาย Chondroitin ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการจับกับกับ heparin cofactor II ในกระบวนการยับยั้ง thrombin (Mulloy et al. 2000)



รูปที่ 12 โครงสร้างของ fucosylate chondroitin sulfate จากเตังกวาทะเล *Ludwigothurea grisea* มีสายหลักเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่เรียงต่อกันเป็นเส้นตรง คล้าย Chondroitin-6-sulfate จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่มีส่วนที่เป็น glucuronic acid มากกว่า ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ให้ sulfated fucose 1 หรือ 2 โมเลกุล เข้าจับ โดยส่วน sulfated fucose ที่เป็นแขนงนี้ เป็นส่วนที่มีผลต่อคุณสมบัติด้านการแข็งตัวของเลือด และคุณสมบัติในการยับยั้ง thrombin (Mulloy *et al.* 2000)

สารฟุกอยแดน จากสาหร่ายสีน้ำตาล ประกอบด้วย fucose จับกันด้วยพันธะ 1-3 และ 1-4 โดยมี sulfate ในตำแหน่งที่ 3 และ 4 ของโมเลกุล fucose และมีส่วนที่เป็นแขนง ซึ่งโครงสร้างดังกล่าวจะมีความซับซ้อนกว่าโครงสร้างจาก echinoderm เช่น เม่นทะเลและแตงกวาทะเล ซึ่งมีโครงสร้างเป็น tetrasaccharide ที่เรียงเป็นหน่วยซ้ำกัน โดยมีลำดับการจัดเรียงตัวของ polysaccharide และ sulfate อย่างเป็นระเบียบไม่ซับซ้อนเหมือนโครงสร้างจากสาหร่ายสีน้ำตาล จึงทำให้มีคุณสมบัติการต้านการแข็งตัวของเลือดแตกต่างกัน โดยในสาหร่ายสีน้ำตาลสามารถต้านการแข็งตัวของเลือดได้สูงกว่า echinoderm โดยฟุกอยแดนจากสาหร่ายสีน้ำตาลมีค่า APTT เท่ากับ 14-30 IU/mg ในขณะที่ฟุกอยแดนจาก echinoderm มีค่า APTT เท่ากับ 8 IU/mg ทั้งนี้เนื่องจากรูปแบบการจัดเรียงตัวของฟุกอยแดนที่เป็นแขนง ซึ่งจะไม่พบใน echinoderm (Mulloy *et al.*, 2000) จากการศึกษาคุณสมบัติในการต้านการแข็งตัวของเลือดของฟุกอยแดนจากสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม echinoderm ที่มีโครงสร้างที่เป็นหน่วยซ้ำๆกันของ fucan (repetitive fucans) จะมีกลไกที่ซับซ้อนกว่าที่ได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล ซึ่งพบว่าโครงสร้างที่โมเลกุลเรียงต่อกันเป็นเส้นตรง (linear fucoidan) จาก echinoderm ยับยั้ง thrombin โดยอาศัย antithrombin หรือ heparin cofactor II ในขณะที่ส่วนที่มีแขนงข้าง (branched fucan) จากสาหร่ายสีน้ำตาลจะยับยั้ง thrombin ได้โดยตรง (Pereira *et al.*, 1999) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Church และคณะ (1989) พบว่าฟุกอยแดนจากสาหร่ายสีน้ำตาลสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้ง thrombin ผ่าน heparin cofactor II ได้มากกว่า 3500 เท่า โดยยับยั้งได้สูงสุดที่ความเข้มข้นของฟุกอยแดน 10  $\mu\text{g/ml}$  ซึ่งผลการยับยั้งคล้ายกับผลของ heparin และ dermatan sulfate ส่วนผลของฟุกอยแดนในการยับยั้ง thrombin และ factor Xa ผ่าน glycosaminoglycan – binding proteinase inhibitors antithrombin III นั้น สามารถยับยั้งได้สูงสุด 285 และ 35 เท่า ที่ความเข้มข้นของฟุกอยแดน 30  $\mu\text{g/ml}$  และ 500  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ และจากการใช้พลาสมาที่ได้จากเลือดคนปกติในการศึกษาการติดฉลากของ thrombin ด้วย  $^{125}\text{I}$  พบว่าที่ความเข้มข้นของฟุกอยแดน 10  $\mu\text{g/ml}$  ทั้ง thrombin และฟุกอยแดนสามารถเกิดสารประกอบ

เชิงซ้อนกับ heparin cofactor II ได้ดีกว่า antitrombin III ซึ่งแสดงให้เห็นว่าคุณสมบัติในการต้านการแข็งตัวของเลือดของสารฟุกคอยแดนจากสาหร่ายสีน้ำตาล จะยับยั้งผ่าน heparin cofactor II เป็นหลัก เช่นเดียวกับการทดลองของ Minix และคณะ (1997) ที่สกัดฟุกคอยแดนจากสาหร่าย *Fucus vesiculosus* มีคุณสมบัติต้านการแข็งตัวของเลือด โดยการยับยั้ง thrombin ผ่าน Heparin cofactor II และการกระตุ้นการละลายลิ่มเลือด (fibrinolysis) ซึ่งพบว่าฟุกคอยแดนที่มีการเพิ่มปริมาณ sulfate ในโมเลกุล จะช่วยกระตุ้น tissue plasminogen activator (t-PA) และ urokinase มีผลชักนำให้เกิดการย่อยลิ่มเลือด ( plasma clot lysis) โดยฟุกคอยแดนจะป้องกันการถูกยับยั้งของ plasmin จาก  $\alpha_2$ -antiplasmin ซึ่งช่วยลดการเกิดลิ่มเลือด รวมทั้งเป็นตัวยับยั้ง plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) จึงช่วยป้องกันการถูกยับยั้งของ t-PA และ urokinase จาก PAI-1 ทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของ t-PA หรือ urokinase ในการกระตุ้น glutamic plasminogen (Glu-Plg) ส่งผลให้การละลายลิ่มเลือดเกิดได้ดีขึ้น

จากการศึกษาคุณสมบัติต้านการแข็งตัวของเลือดของสารกลุ่ม sulfate polysaccharide ดังกล่าว พบว่ามีคุณสมบัติในต้านการแข็งตัวของเลือดแตกต่างกัน (Pereira *et al.*, 1999) แสดงดังตารางที่ 4 ซึ่งจากการศึกษาของ Mourao และคณะ (2001) พบว่าจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติในการยับยั้ง thrombin ผ่าน Antithrombin และ Heparin cofactor II ของสารแต่ละชนิด ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 4 คุณสมบัติในการต้านการแข็งตัวของเลือดของสาร sulfate polysaccharide จาก echinoderm, สาหร่ายสีน้ำตาลและสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Pereira *et al.*, 1999)

Source	Species	Polysaccharide	APTT (IU/mg)
Echinoderm	<i>L. variegatus</i>	sulfate fucan	8
	<i>L. grisea</i>	sulfate fucan	2
	<i>A. lixula</i>	sulfate fucan	<1
Brown algae	<i>L. brasiliensis</i>	crude sulfate polysaccharide	10
		purified sulfated fucan	30
		desulfated fucan	<1
	<i>F. vesiculosus</i>	crude sulfate polysaccharide	7
		purified sulfated fucan	16
		<i>A. nodosum</i>	crude sulfate polysaccharide
Vertebrates		purified sulfated fucan F1	14
		purified sulfated fucan F2	16
		unfractionated heparin	193
		low molecular weight heparin	30
		dermatan sulfate from porcine mucosa	4



ตารางที่ 5 คุณสมบัติในการยับยั้ง Thrombin ผ่าน Antithrombin และ Heparin cofactor II ของสาร sulfate polysaccharide ( Mourao *et al.*, 2001)

Polysaccharide	Chemical modification	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	
		Antithrombin	Heparin cofactor II
Fucosylated CS	Native	ND <sup>a</sup>	2.0
	Desulfated	>100	>100
	Defucosylated	>100	>100
Unfractionated heparin		0.01	0.40
Low-molecular weight heparin		0.03	ND
Sulfated fucan		2.00 <sup>b</sup>	0.90 <sup>b</sup>
Dermatan sulfate		>100	7.0

ND = not determined

<sup>a</sup> The IC<sub>50</sub> for fucosylated chondroitin sulfate inhibition of thrombin in the presence of antithrombin was not determined because total inhibition was not achieved.

<sup>b</sup> Sulfated fucan from brown algae are direct inhibitors of thrombin, in absence of antithrombin or heparin cofactor II. Thus, these values of IC<sub>50</sub> need a more careful interpretation.

### ค. การทดสอบเกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด

(พยางค์, 2539)

การทดสอบเกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือดสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ Whole blood clotting time, One-stage prothrombin time และ Activated partial thromboplastin time

Whole blood clotting time(Lee-white clotting time) เป็นการทดสอบความบกพร่องในการแข็งตัวของเลือด และใช้ตรวจสอบผลการรักษาของ Heparin โดยจับเวลาตั้งแต่ที่เลือดเริ่มเข้าสู่ระบบอกซิดยา จนกระทั่งเลือดแข็งตัวกลายเป็นลิ่มเลือด โดยปกติ whole blood clotting time มีค่า 6-21 นาที ถ้านานกว่านี้แสดงถึงมีการขาดหรือพร่องในปัจจัยการแข็งตัวของเลือดในกระบวนการ intrinsic system

One-stage prothrombin time (PT) เป็นการทดสอบการแข็งตัวของเลือดในกระบวนการ extrinsic system ซึ่งทำได้โดยใช้ tissue thromboplastin ซึ่งส่วนมากสกัดจากเนื้อเยื่อสมองหรือปอดสัตว์ ประกอบด้วย tissue factor และฟอสโฟลิปิด ซึ่งเริ่มจับเวลาตั้งแต่เริ่มเติมผงสกัด thromboplastin จนพลาสมาแข็งตัว โดยปกติมีค่า PT 12-14 วินาที ถ้านานกว่านี้แสดงว่าอาจมีภาวะขาดหรือพร่องปัจจัยต่างๆ ได้แก่ prothrombin, factor V, VII, X เป็นต้น หรืออาจเกิดจากได้รับสารต้านการแข็งตัวของเลือด

Activated partial thromboplastin time (APTT) เป็นการทดสอบการทำงานของกระบวนการแข็งตัวของเลือดในกระบวนการ intrinsic system การทดสอบนี้ต้องอาศัยปัจจัยการแข็งตัวของเลือดทุกชนิดใน intrinsic system ยกเว้นเกร็ดเลือด โดยปกติ APTT มีค่า 40-70 วินาที ค่านี้จะไวต่อการขาด factor VIII และ IX มาก ซึ่งนิยมใช้ทดสอบผลการรักษาของ heparin

### 1.2.2.2 คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

(Antitumor activity)

#### ก. ชีววิทยาของเซลล์มะเร็ง (นิสิตา, 2542)

เนื้องอก เกิดจากการที่เนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตผิดปกติ มีการแบ่งเซลล์เป็นจำนวนมาก โดยร่างกายไม่สามารถควบคุมได้ ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ เนื้องอกชนิดธรรมดา (Benign tumor) และเนื้องอกชนิดร้ายแรง (Malignant tumor) โดยทั่วไปเนื้องอกชนิดธรรมดา (Benign tumor) สามารถรักษาให้หายขาดได้โดยการผ่าตัดเอาก่อนเนื้องอก และมักไม่กลับมาเป็นอีก ส่วนเนื้องอกชนิดร้ายแรง หรือ มะเร็ง มีลักษณะสำคัญที่ผิดปกติ ได้แก่

(1) Angiogenesis เกิดจากการที่เซลล์มะเร็งสามารถหลั่งสารที่มีชื่อว่า Tumor Angiogenesis Factor (TAF) ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นเยื่อหลอดเลือดฝอย (capillary endothelium) ที่มีอยู่เดิมให้สร้างเส้นเลือดใหม่ขึ้นเพื่อหล่อเลี้ยงมะเร็งให้สามารถแบ่งเซลล์และเจริญเติบโต

(2) No encapsulation คือ การที่ก้อนมะเร็งไม่มี fibrous tissues ห่อหุ้ม ทำให้ก้อนมะเร็งสามารถขยายตัวไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียงได้โดยไม่มีขอบเขตจำกัด

(3) Invasion คือ การเจริญเติบโตแบบแทรกซึม (invade) เข้าไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง ลักษณะเช่นนี้ทำให้มะเร็งมีรูปร่างไม่แน่นอน (irregular) มีลักษณะเป็นก้อนกลม (mass) ที่ไม่มีขอบเขต ขอบไม่เรียบ มีชิ้นส่วนยื่นไปรอบๆ

(4) Metastasis คือ การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปเจริญเติบโตยังอวัยวะอื่น ทำให้เซลล์มะเร็งสามารถหลุดออกจากตำแหน่งเดิม (primary site) และเคลื่อนที่ไปตามหลอดเลือด (blood vessel) หรือหลอดน้ำเหลือง (lymphatic vessel) แล้วสามารถไปฝังตัวและเจริญเติบโต (lodge and grow) ยังอวัยวะอื่นที่ไกลออกไป (secondary site) ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติที่ไม่มี capsule ห่อหุ้ม และมีการเจริญแบบ invasion รวมทั้งคุณสมบัติของการยึดเกาะกันระหว่างเซลล์ไม่เหนียวแน่นเหมือนเซลล์ปกติ

## ข. การยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารฟุคอยแดน

การศึกษาผลของฟุคอยแดนต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งพบว่าฟุคอยแดนช่วยควบคุมการเจริญของเซลล์มะเร็งโดยมีกลไกที่สำคัญ ได้แก่ การกระตุ้นการสร้าง macrophage, การยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังเนื้อเยื่ออื่น และการยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยลดคุณสมบัติในการเจริญของเซลล์มะเร็ง เช่น การสร้างเส้นเลือดใหม่ (<http://www.slim4health.com/limu/fucoidan2.html>)

จากการศึกษาฟุคอยแดนที่สกัดได้จากสาหร่าย *Sargassum thunbergii* สามารถยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็ง Ehrlich ascites carcinoma ในหนูทดลองได้ที่ความเข้มข้น 20 mg/kg/วัน โดยฟุคอยแดนเป็นตัวกระตุ้น reticuloendothelial system รวมทั้งเพิ่ม phagocytosis และ chemiluminescence ของ macrophage ซึ่งช่วยให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายดีขึ้น (Itoh et al., 1993)

Koyanagi และคณะ (2002) ศึกษาฟุคอยแดนจากสาหร่าย *Fucus vesiculosus* พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Sarcoma 180, Lewis lung carcinoma และ B16 melanoma ในหนูทดลองได้ ซึ่งฟุคอยแดนจะยับยั้งกระบวนการ mitotactic และ chemotactic ของ vascular endothelial growth factor 165 (VEGF<sub>165</sub>) ต่อ human umbilical vein endothelial cells (HVEC) โดยฟุคอยแดนจะจับกับ VEGF<sub>165</sub> ทำให้ growth factor ดังกล่าวไม่สามารถจับกับ receptor บนผิวเซลล์ ส่งผลให้ไม่สามารถสร้างเส้นเลือดใหม่ที่เกิดจากการชักนำของเซลล์มะเร็ง เซลล์มะเร็งจึงไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เนื่องจากขาดเส้นเลือดในการลำเลียงสารอาหารและออกซิเจน และในการศึกษาองค์ประกอบของฟุคอยแดน พบว่าฟุคอยแดนที่สกัดได้จากธรรมชาติประกอบด้วย L-fucose เรียงต่อกันและมีหมู่ sulfate จับอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 หรือ 4 ของโมเลกุล fucose ส่วนฟุคอยแดนที่มีการเพิ่มปริมาณ sulfate ในโมเลกุล จะพบหมู่ sulfate อยู่ทั้งตำแหน่งที่ 3 และ 4 ของโมเลกุล fucose ซึ่งพบว่าจะช่วยเพิ่มประจุลบบนโมเลกุลฟุคอยแดน ทำให้ความสามารถในการจับกับ growth

ประมาณ 7 เท่า ดังนั้นฟูคอยแดนที่มีปริมาณ sulfate ในโมเลกุลสูงจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

นอกจากนี้พบว่าฟูคอยแดนจาก *Sargassum stenophyllum* สามารถยับยั้งการแพร่กระจาย (metastasis) ของเซลล์มะเร็ง โดยฟูคอยแดนสามารถขัดขวางการเกาะติดของเซลล์มะเร็ง (HeLa cell) กับ laminin, vitronectin และ collagen ชนิด IV ซึ่งเป็นโปรตีนใน extracellular matrix ได้ 86.4%, 53.6% และ 28% ตามลำดับ (Steven *et al.*, 2000 อ้างโดย Rocha *et al.*, 2001) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาฟูคอยแดนจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Spatoglossum schroederi* ที่สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในรังไข่ของหนูแฮมสเตอร์ (tumorigenic chinese hamster ovary-K1 cell) โดยขัดขวางการเกาะติดของเซลล์มะเร็งกับ vitronectin และ fibronectin และจากการศึกษาโครงสร้างของฟูคอยแดนชนิดที่มีผลต่อเซลล์มะเร็งดังกล่าวจากสาหร่าย *Spatoglossum schroederi* พบว่าอยู่ในกลุ่ม xylofucoglucuronan มีมวลโมเลกุลขนาดเล็กประมาณ 21 kDa ประกอบด้วย glucuronic acid เป็นองค์ประกอบหลัก รวมทั้ง fucose, xylose และ sulfate (Rocha *et al.*, 2001)

### 1.2.2.3 คุณสมบัติในการยับยั้งไวรัส (Antiviral activity)

ฟูคอยแดนมีคุณสมบัติในการยับยั้ง enveloped virus ที่เข้าไปใน human cell line รวมทั้งยับยั้ง human immunodeficiency virus (HIV), herpes simplex virus และ cytomegalovirus (Baba *et al.*, 1988 อ้างโดย Patanka *et al.*, 1993) นอกจากนี้ยังพบว่า ฟูคอยแดนมีคุณสมบัติยับยั้ง HIV reverse transcriptase activity อีกด้วย (Clerk *et al.*, 1992 อ้างโดย Patanka *et al.*, 1993) จากการศึกษาของ Ponce และคณะ (2003) พบว่าฟูคอยแดนจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Adenocystis utricularia* ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง herpes simplex virus I และ II จัดอยู่ในกลุ่ม galactofucan ประกอบด้วย L-fucose, D-galactose และ sulfate โดยกลไกการยับยั้งไวรัสของสารฟูคอยแดนเกิดจากประจุลบของ sulfate ในโมเลกุล จะไปจับกับ amino acid site chain

บริเวณ V3 loop ของ Gp 120 ที่มีประจุบวก ทำให้ไวรัสไม่สามารถเกาะติดกับเซลล์เจ้าบ้าน (host) จึงไม่สามารถก่อโรคได้ (Witvrouw and Clercp, 1997)

คุณสมบัติของฟุกคอยแดน ประการหนึ่งที่มีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำคือ ฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัส โดยได้มีการศึกษาถึงประสิทธิภาพในการควบคุมโรคในกุ้งกุลาดำ พบว่า สารฟุกคอยแดนที่สกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Sargassum* sp. มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิดโรคตัวแดงดวงขาว โดยที่ความเข้มข้น 100 mg/kg/วัน กุ้งมีอัตราการรอด 42 % และที่ความเข้มข้น 200 mg/kg/วัน กุ้งมีอัตราการรอด 93 % (Chotigeat *et al.*, 2004) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Takahashi และคณะ (1998) พบว่าสารฟุกคอยแดน ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Cladosiphon okamuranus* มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิดโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งครุมา (*Penaeus japonicus*) และป้องกันการติดเชื้อจากไวรัสชนิดนี้ได้ โดยที่ความเข้มข้น 60 mg/kg/วัน กุ้งมีอัตราการรอด 77 % และที่ความเข้มข้น 100 mg/kg/วัน จะมีอัตราการรอด 76.2% ซึ่งสารกลุ่มนี้จะไปยับยั้งการดูดซึมสารอาหารของ enveloped viruses จากเซลล์เจ้าบ้าน ทำให้กระบวนการดูดซึมสารอาหารของเซลล์ผิดปกติและทำให้ไวรัสตายในที่สุด นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ของสารฟุกคอยแดน ในการยับยั้งเชื้อไวรัสจากสาหร่าย 10 ชนิด คือ *Porphyridium cruentum*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis suecica*, *Chlorella autotrophica*, *Dunaliella tertiolecta*, *Dunaliella barddawil*, *Isochrysis galbana*, *Isochrysis galbana* var *Tiso*, *Ellipsoidan* sp. และ *Tetraselmis tetrathele* พบว่าสารที่สกัดได้เป็นกลุ่ม sulfate polysaccharide สามารถยับยั้งการเกิดโรคของ Haemorrhagic Septicemia Virus ในปลาชาลมอน และ African swine fever virus ได้ (Fabregas *et al.*, 1999)

Mutsuda และคณะ(1999) ศึกษาสารในกลุ่ม sulfate polysaccharide ที่สกัดจาก marine *Pseudomonas* สายพันธุ์ WAK1 พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1.4 µg/ml สามารถต้านการเจริญของ Herpes Simplex Virus type 1 (HSV1) ในเซลล์ RPMI 8226 และต้านการเจริญของ influenza virus type 1 ที่ระดับความเข้มข้น 11.0 µg/ml ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Preeprame และคณะ

(2001) พบว่าสารฟุคอยแดน จากสาหร่าย *Sargassum horneri* สามารถยับยั้งการเจริญของไวรัส HSV1

#### 1.2.2.4 คุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรีย (Antibacterial activity)

Rao และคณะ (1981) ได้ศึกษาสารสกัดจากสาหร่ายทะเลที่อุณหภูมิ 50-55 °C พบว่าสาหร่ายสีน้ำตาล *Dictyota dichotoma*, *Dictyota* sp. และ *Padina gymnospora* สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกสองชนิด คือ *Bacillus megatherium* และ *Staphylococcus aureus* โดยไม่มีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากนี้การใช้สารสกัดที่แตกต่างกันยังให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียที่แตกต่างกันด้วย ดังตารางที่ 6

#### 1.2.2.5 คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของกล้ามเนื้อเรียบในหลอดเลือดแดง

Religa และคณะ (2000) ศึกษาผลของฟุคอยแดนในการยับยั้งการเจริญของกล้ามเนื้อเรียบในหลอดเลือดแดง โดยเปรียบเทียบกับ heparin พบว่า ฟุคอยแดนสามารถยับยั้งการเจริญของกล้ามเนื้อเรียบในหลอดเลือดแดงของหนูทดลองได้ดีกว่า heparin โดยจะยับยั้งผ่าน mitogen activated protein kinase pathway คล้ายๆกับ heparin

ตารางที่ 6 การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาลโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ( Roa *et al.*, 1981)

Algal sp.	Test organisms	Width of inhibition zone (mm) in difference solvent used for extraction			
		Diethyl ether	Acetone	Alcohol	Chloroform
<i>Dictyota dichotoma</i>	<i>B. megatherium</i>	13	14	12	-
	<i>S. aureus</i>	20	14	15	11
<i>Dictyota sp.</i>	<i>B. megatherium</i>	18	14	19	T
	<i>S. aureus</i>	17	13	18	T
<i>Padina gymnospora</i>	<i>B. megatherium</i>	12	14	16	-
	<i>S. aureus</i>	11	7	10	-

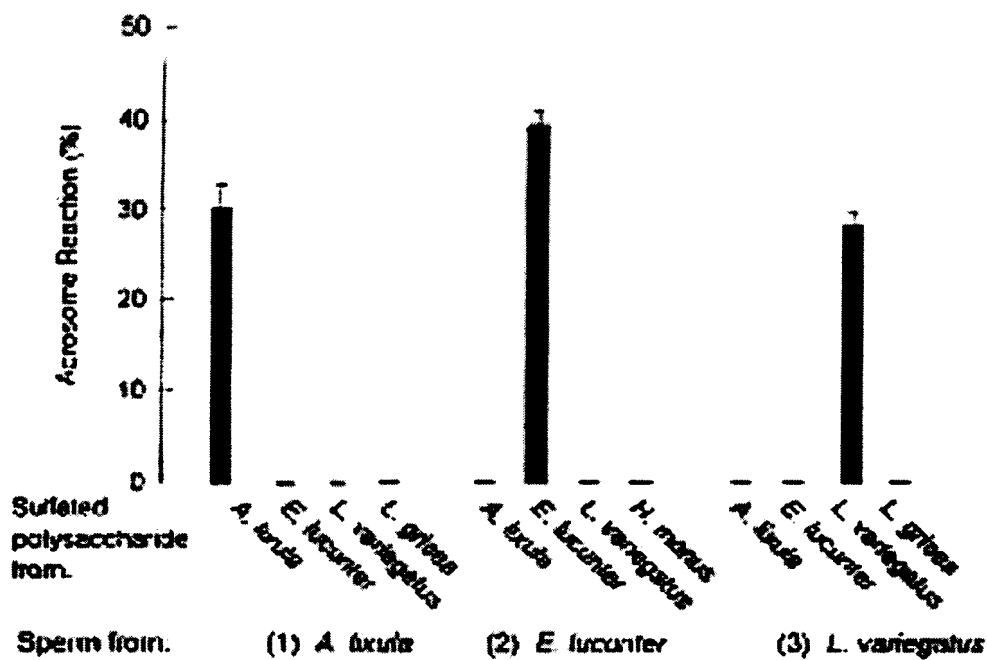
- = Negative test

T = Trace activity

#### 1.2.2.6 คุณสมบัติในการยับยั้งการจับกันของไข่และสเปิร์ม

ฟูคอยแดน ที่ความเข้มข้นต่ำๆ (1-10  $\mu$ M) ทำให้การจับกันของสเปิร์มและผิวชั้นนอกของไข่ (zona pelucida) ในคนลดลงประมาณ 60-95% และยังป้องกันไม่ให้สเปิร์มตัวอื่นผ่านผนังของไข่ ภายหลังจากที่สเปิร์มตัวแรกผ่านเข้าไปในไข่ได้แล้ว (Patankar *et al.*, 1993) นอกจากนี้ Alves และคณะ (1997) พบว่าสารฟูคอยแดนที่แยกจากชั้นเยื่อเมือกของไข่เม่นทะเล สามารถเหนี่ยวนำให้ acrosome ที่อยู่ส่วนหัวของสเปิร์มในเพศผู้ผสมกับไข่ของเพศเมียได้อย่างจำเพาะเจาะจงในแต่ละสปีชีส์ (species specificity) ดังรูปที่ 13 จึงช่วยป้องกันการผสมพันธุ์ข้ามสปีชีส์ได้





รูปที่ 13 การเหนี่ยวนำ acrosome ของฟูกอยแดนที่ได้จากชั้นเยื่อเมือกของไข่ม้วนทะเล (Alves *et al.*, 1997)

### 1.2.3 สาหร่ายข้าวเหนียว

#### 1.2.3.1 อนุกรมวิธานของสาหร่ายข้าวเหนียว

ชื่อไทย: สาหร่ายข้าวเหนียว

ชื่อสามัญ: Leafy bladderwort

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Utricularia aurea* Lour.

Kingdom Plantae

Division Magnoliophyta

Class Magnoliopsia

Subclass Asteridae

Order Scrophulariales

Family Lentibulariaceae

Genus *Utricularia*

#### 1.2.3.2 ชีวิตวิทยาของสาหร่ายข้าวเหนียว

สาหร่ายข้าวเหนียวเป็นพรรณไม้น้ำจืด ชอบขึ้นในที่ตื้นที่มีน้ำนิ่ง มีส่วนที่ทำหน้าที่คล้ายราก 4-6 เส้น ลำต้นยาว มีลำต้นใต้ดินที่คืบคลานไปและสามารถจะออกกิ่งและแขนงออกมาเป็นต้นใหม่ได้ ใบลดรูปเห็นเป็นเส้นสีเขียวลักษณะคล้ายท่อขนาดเล็กมากเรียงตัวกันเป็นคู่หรือเป็นกระจุก 4 ใบ เป็นพืชที่กินสัตว์เป็นอาหารโดยที่โคนก้านใบจะพองออกมาเป็นถุงเล็กๆ มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือค่อนข้างกลมยาว 1-4 mm. กระจายอยู่ทั่วต้น ใช้ดักจับสัตว์น้ำขนาดเล็กกินเป็นอาหาร ภายในถุงมีต่อมเล็กๆ สร้างน้ำย่อย ใช้ย่อยสัตว์น้ำขนาดเล็กที่หลุดเข้าไป ดอกมีสีเหลืองขนาดใหญ่เห็นได้ชัด ช่อดอกโผล่ขึ้นมาเหนือผิวน้ำ ก้านช่อดอกยาว 5-15 cm. ออกดอกเป็นช่อ ในแต่ละช่อมีดอกย่อย 5-10 ดอก มีใบประดับรองรับช่อดอก กลีบเลี้ยงไม่เท่ากันทุกกลีบมีสีเขียวปนน้ำตาลแดงและมีขีดสีแดงกระจายอยู่โดยทั่วของกลีบ ยาว 3-4 mm. กลีบดอกอันใหญ่สุดอยู่ทางด้านล่าง กลีบดอกอื่นจะมีขนาดเป็น 2-3 เท่าของกลีบเลี้ยง ก้านชูอับเรณูโดยเฉลี่ยยาว 2 mm. รังไข่รูปร่างกลม ผลรูปร่างยาวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4-5

mm. เมล็ดแบนกว้าง 1.5-2 mm. และมีลวดลายบนเมล็ด ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดหรือลำต้น (ช่อทิพย์ อาหารมาศ, 2521 และ กองประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์: [www.ku.ac.th/Agr\\_Info/thaifish/aqplant/AQPT112](http://www.ku.ac.th/Agr_Info/thaifish/aqplant/AQPT112)) ลักษณะของสาหร่ายข้าวเหนียวแสดงดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 สาหร่ายข้าวเหนียว *Utricularia aurea* Lour. (กองประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์: [www.ku.ac.th/Agr\\_Info/thaifish/aqplant/AQPT112](http://www.ku.ac.th/Agr_Info/thaifish/aqplant/AQPT112))

### 1.3 วัตถุประสงค์

1.3.1 ศึกษาวิธีการสกัดสารฟุคอยแดนจากสาหร่ายข้าวเหนียว

1.3.2 ศึกษาคุณลักษณะของสารฟุคอยแดน

1.3.3 ศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของสารฟุคอยแดน