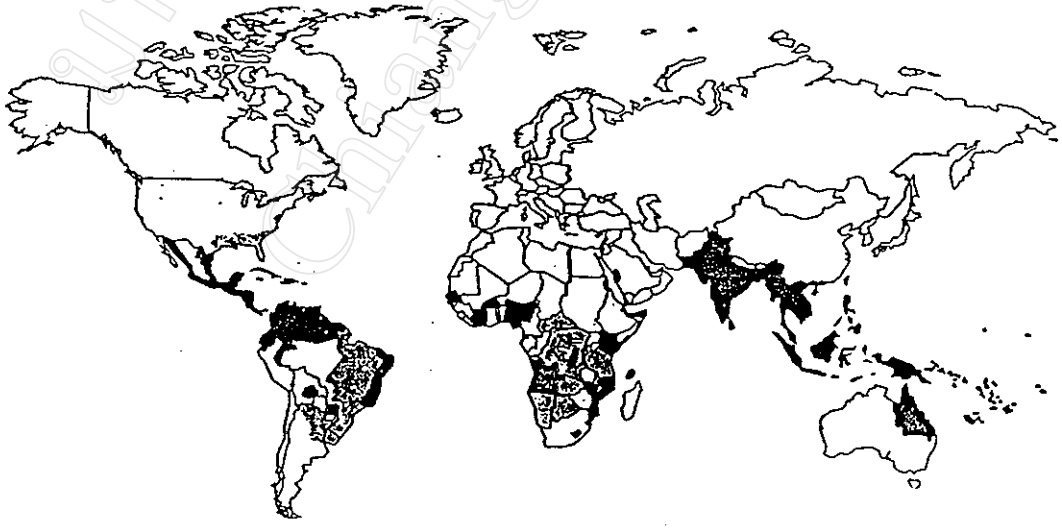
บทที่ 1

บทนำ

1.1 โรคไข้เลือดออก

โรคไข้เลือดออกเป็นโรคติดเชื้อไวรัสชนิดเฉียบพลัน ผู้ป่วยจะมีไข้และเลือดออกที่ผิวหนังและ/หรืออวัยวะภายใน เชื้อที่เป็นสาเหตุคือเชื้อ dengue virus serotype 1, 2, 3, 4 (arbovirus group B) ทำให้เกิด dengue hemorrhagic fever (DHF) หรือกลุ่มอาการช็อค (dengue shock syndrome : DSS) มักเกิดจากการติดเชื้อ dengue โดยเฉพาะเมื่อเป็นการติดเชื้อครั้งที่สองและอาจทำให้ถึงแก่กรรมได้ (Gubler, 1998) โรคนี้เกิดขึ้นในเขตร้อนทั่วโลก (รูปที่ 1) มีประชากรที่อยู่ในเขตการระบาดของโรคนี้ 2.5 พันล้านคน และป่วยเป็น DHF/DSS ตามโรงพยาบาลประมาณ 500,000 ราย อัตราการตายเฉลี่ย 5 % มีคนตาย 24,000 คน ต่อปี (WHO, 1997) พบในเด็กอายุต่ำกว่า 15 ปีถึง 90 % มักเป็นในช่วงอายุเฉลี่ย 5-9 ปี (Chareonsook et al., 1999) เชื้อไวรัสชนิดนี้มาสู่คนโดยยุงลาย *Aedes aegypti* สำหรับในประเทศไทยเริ่มมีรายงานโรคไข้เลือดออกตั้งแต่ พ.ศ. 2493 (ประเสริฐ ทองเจริญ, 2520) แต่ในขณะนั้นได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นไข้หวัดใหญ่ที่มีภาวะแทรกซ้อน การระบาดใหญ่เกิดขึ้นครั้งแรกในกรุงเทพมหานคร พ.ศ 2501 มีผู้ป่วย 2,500ราย และมีอัตราการตายประมาณ 10 % ต่อจากนั้นก็พบโรคประปรายทุกปี และมีการระบาดเกิดขึ้นปีเว้นปี แต่ในระยะหลังนี้การระบาดในแต่ละปีเริ่มไม่แน่นอน ทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือใน พ.ศ.2507 โรคนี้จัดเป็นโรคติดต่อสำคัญที่ต้องแจ้งสาธารณสุขจังหวัดต่าง ๆ ทั่วราชอาณาจักร (นิภา จรูญเวสม์ และคณะ, 2532)



▒ บริเวณที่มีการกระจายของยุงลาย *Aedes aegypti*

■ บริเวณที่มียุงลาย *Aedes aegypti* และเกิดการระบาดของโรคไข้เลือดออก

รูป 1.1 แผนที่แสดงการกระจายของยุงลาย *Aedes aegypti* และเชื้อไวรัส dengue

1.2 ชีววิทยาของ *Aedes aegypti* และการนำเชื้อไข้เลือดออก

เชื่อกันว่ายุงลาย *Ae. aegypti* มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปอาฟริกา ต่อมากระจายไปยังทวีปต่าง ๆ ในเขตร้อนชื้นทั่วโลกโดยติดกับเรือที่ใช้ในการคมนาคม ยุงลายอยู่ใน class Diptera, family Culicidae และ subfamily Culicinae วงจรชีวิตแบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ ไข่ (egg) ลูกน้ำ (larva) ตัวโม่ง (pupa) และตัวเต็มวัย (adult) ไข่ของยุงลายมีขนาดที่มองเห็นด้วยตาเปล่า เป็นเม็ดรูปไข่สีดำสนิทขนาดไม่เกิน 1 มม. ระยะตั้งแต่ยุงวางไข่จนกลายเป็นลูกน้ำจะกินเวลาประมาณ 3 วัน ไข่ของยุงลายมีลักษณะพิเศษอยู่อย่างหนึ่งคือคงทนต่อความแห้งแล้งได้ดีมาก อาจอยู่ในที่แห้งได้นานเป็นเดือนโดยไม่ฟักตัวเป็นลูกน้ำและไข่ก็ยังมีชีวิตอยู่ ถ้าทิ้งไว้ในที่แห้งประมาณ 2 เดือน เมื่อได้รับความชื้นที่เหมาะสมก็สามารถแตกออกเป็นลูกน้ำถึง 50 % ถ้าทิ้งไข่ไว้นาน 4 เดือนก็ยังมีชีวิตและแตกออกเป็นลูกน้ำ 1.6 % (ประเสริฐ ทองเจริญ, 2520) ลูกน้ำของยุงลายที่แตกออกมาจากไข่จะต้องลอกคราบทั้งหมด 4 ครั้งภายในระยะเวลาเฉลี่ย 6-10 วัน จึงจะกลายเป็นตัวโม่ง หลังจากนั้น 2 วันก็เจริญเติบโตเป็นยุงลาย มีลักษณะเฉพาะคือลำตัวมีขนาดเล็กสีดำสนิท มีทางขาวๆรูปด่างเดียว 1 คู่ ที่หลังอก มีทางขาวที่ด้านข้างอก ท้อง ขา และ หัว ทำให้แลดูเป็นลายขาวสลับดำ ตัวเมียมีขนาดใหญ่กว่าตัวผู้ ยุงตัวเมียเท่านั้นที่ดูดเลือดเป็นอาหาร เพื่อประโยชน์ในการผลิตไข่ ชอบดูดเลือดคน (anthropophilic) เริ่มหากินตั้งแต่เช้าจนถึงเวลาย่ำค่ำ (diurnal feeding) ส่วนยุงลายตัวผู้กินน้ำหวานจากเกสรดอกไม้ ยุงลายออกหากินทั้งในที่สว่างและที่มืด มักเข้าหากินในบ้าน (endophagic) และไม่ชอบหากินไกลจากแหล่งเพาะพันธุ์ มีแหล่งเกาะพักอยู่ตามที่เย็น เงียบ มืดและอับ ยุงลายตัวเมียหากดูดเลือดและได้รับการผสมพันธุ์จะวางไข่ครั้งหนึ่งๆ ประมาณ 100 –140 ฟอง หลังจากวางไข่แล้วจำเป็นต้องดูดเลือดกินเป็นอาหารอีก เพื่อให้รังไข่เจริญจนสามารถที่จะวางไข่ต่อไปได้ และแต่ละตัวสามารถวางไข่ได้หลายชุด แต่จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับอายุของมัน ยุงลายจะวางไข่ในน้ำนิ่งและสะอาดเท่านั้น แหล่งเพาะพันธุ์ส่วนใหญ่ของมันจึงเป็นภาชนะเก็บน้ำในบ้านเรือน เช่น กระป๋อง แจกัน ตุ่ม ถัง กะลา น้ำหล่อขาตู้ มักพบยุงลายเฉพาะในที่ชุมชนในเขตเทศบาล สุขาภิบาล หมู่บ้าน มากกว่าชนบทหรือป่า (Rattanarithikul and Panthusiri, 1994) จึงมีผู้ขนานนามว่า “domestic mosquito” ยุงลายแพร่โรคโดยกัดคนป่วยที่มีอาการของโรคไข้เลือดออกในช่วง 1 - 5 วันแรก มีระยะพักโรค (incubation period) 8-11 วันจึงแพร่เชื้อได้ ยุงตัวเมียเท่านั้นที่เป็นพาหะและเป็น nervous feeder คือ สามารถกัดคนได้หลายๆคนในระยะเวลาอันสั้นโดยไม่ดูดเลือด (Gubler, 1998)

1.3 กลไกการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลง

คำจำกัดความของกลไกการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงโดยผู้เชี่ยวชาญขององค์การอนามัยโลก (1957) หมายถึง การที่แมลงได้รับปริมาณสารพิษเข้าไปในระดับที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อแมลง

ในกลุ่มประชากรที่ปกติ แต่มีแมลงกลุ่มหนึ่งที่สามารถทนทานและมีชีวิตรอดได้ ลักษณะเช่นนี้พบได้ในทุกกลุ่มประชากรของสิ่งมีชีวิต ซึ่งต่อมามีการคัดเลือกโดยธรรมชาติ (natural selection) สามารถถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์ได้ และสร้างกลไกในการกำจัดสารพิษของสารเคมีฆ่าแมลง (Brown, 1971) ปัจจุบันนี้พบว่ามีการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงทุกกลุ่มรวมไปถึง microbial drugs และ insect growth regulators (Brogdon and McAllister, 1998)

1.3.1 ประเภทของกลไกการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลง (Insecticide resistance mechanisms)

กลไกการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงแบ่งออกเป็น 2 ชนิดใหญ่ ๆ (Busvine, 1971: Plapp, 1976) คือ

1.3.1.1 การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม เช่น หลีกเลี่ยงหรือลดโอกาสการสัมผัสหรือได้รับสารเคมีฆ่าแมลง เช่น ยุงเปลี่ยนนิสัยจากชอบเกาะพักในบ้านเป็นชอบเกาะพักอยู่นอกบ้าน

1.3.1.2 การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา แบ่งออกเป็น 3 หัวข้อใหญ่ๆ

(ก) ลดการดูดซึมสารพิษเข้าสู่ลำตัว (reduced penetration) พบว่าแมลงมีผนังลำตัวหนาขึ้น หรือมีการเปลี่ยนแปลงชั้นเนื้อเยื่อไขมัน ให้อยู่ในสภาวะที่สารพิษไม่สามารถซึมผ่านเข้าสู่ร่างกายได้ หรือซึมผ่านได้น้อยลง

(ข) ทำให้บริเวณเป้าหมายหมดความไว (target site insensitivity) โดยเปลี่ยนแปลงบริเวณเป้าหมายไม่ให้โมเลกุลของสารพิษทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้ แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้คือ

- การเปลี่ยนแปลงเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเตอเรส (altered acetylcholinesterase) เอนไซม์นี้มีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนสารสื่อประสาทอะซิติลคลอรีนให้เป็นกรดอะซิติกกับคลอรีน เมื่อส่งกระแสประสาทเสร็จแล้ว แต่สารเคมีฆ่าแมลงพวกออร์แกโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตสามารถแย่งจับกับตัวรับ (receptor) ของเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเตอเรส ได้ทำให้สารสื่อประสาทอะซิติลคลอรีนคงอยู่และส่งสัญญาณประสาทต่อเนื่องตลอดเวลา ก่อให้เกิดการกระตุกของกล้ามเนื้อและอวัยวะเป้าหมาย ยุงจึงมีกลไกการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเตอเรส เพื่อไม่ให้สารพิษนั้นจับกับตัวรับของเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเตอเรสได้หรือจับได้น้อยลง

-knock-down resistance หรือ kdr โดยปกติเซลล์ประสาทแต่ละเซลล์จะมีส่วนแอกซอน (axon) ที่ยื่นออกไปแตะกับเซลล์ประสาทอีกเซลล์หนึ่ง สิ่งเร้าภายนอกจะกระตุ้นเซลล์ประสาทให้ส่งสัญญาณอิออนไปตามช่วงยาวของแอกซอน เมื่อสัญญาณอิออนไปถึงปลายของแอกซอนจะไม่สามารถวิ่งข้ามไปยังเซลล์ประสาทต่อไป แต่จะต้องแปรสภาพเป็นสัญญาณเคมีไปกระตุ้นให้เกิดสัญญาณอิออนสลับกับสัญญาณเคมีเช่นนี้ ระบบประสาทก็สามารถรับการกระตุ้นจากสิ่งเร้าภายนอก และเยื่อเซลล์ประสาทบริเวณแอกซอน มีช่องอิออน (ion channel) ชนิดต่างๆ ได้แก่ช่อง

โซเดียมอิออน (Na^+-channel) และช่องโปตัสเซียมอิออน(K^+-channel) นอกจากนั้นเยื่อเซลล์ประสาทยังมี Na^+ / K^+-ATPase หรือ Na^+ / K^+ pump เช่นเดียวกับเยื่อหุ้มเซลล์ชนิดอื่นๆ Na^+ / K^+-ATPase จะทำหน้าที่ขับโซเดียมออกสู่ภายนอกและสูบเอาโปตัสเซียมเข้ามาภายในเซลล์โดยอาศัยพลังงานจาก ATP ดังนั้นความเข้มข้นของโซเดียมภายนอกเซลล์จะสูงกว่าภายในเซลล์ ส่วนความเข้มข้นของโปตัสเซียมภายในเซลล์จะสูงกว่าภายนอกเซลล์สัญญาณ อิออนจะเกิดขึ้นเมื่อช่องโซเดียมเปิดกว้างออก ทำให้โซเดียมซึ่งมีระดับสูงภายนอกเซลล์ทะลักเข้ามาภายในเซลล์บางส่วน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงประจุบริเวณผิวด้านนอกของเยื่อเซลล์ประสาท การเปลี่ยนแปลงนี้ทำให้เกิด action potential โซเดียมทะลักเข้ามาเพิ่มขึ้นภายในเซลล์จะกระตุ้นให้ช่องโปตัสเซียมเปิดกว้างออก ปล่อยให้โปตัสเซียมภายในเซลล์แพร่เข้าสู่ภายนอกเซลล์ และ Na^+/K^- ATPase ต้องสูบเอาโซเดียมที่ทะลักเข้ามาออกสู่ภายนอก และขณะเดียวกันก็สูบเอาโปตัสเซียมที่แพร่ออกไปภายนอกกลับคืนมาสู่ภายในเซลล์ เพื่อให้ประจุบนผิวของเซลล์ประสาทกลับสู่สภาพเดิม การเปลี่ยนแปลงระดับโซเดียมและโปตัสเซียม อันเนื่องมาจากการปิดเปิดของช่องโซเดียมอิออนและช่องโปตัสเซียมอิออนเพียงชั่วคราว จะทำให้เกิดความต่างศักย์ซึ่งสามารถเคลื่อนที่ไปตามแนวยาวของแอกซอนได้ และเมื่อสัญญาณมาถึงปลายแอกซอนซึ่งมีลักษณะเป็นรูปบานแฉกออกไป สัญญาณนี้กระตุ้นให้ช่องแคลเซียมอิออนซึ่งมีอยู่ในบริเวณนี้เปิดกว้างออกปล่อยให้แคลเซียมที่อยู่ภายนอกเซลล์เข้ามาในเซลล์ แคลเซียมจะทำให้ถุง (vesicle) ภายในเซลล์ที่บรรจุสารสื่อประสาท (neurotransmitter) มาเชื่อมกับเยื่อเซลล์บริเวณนั้น ทำให้สารส่งสัญญาณประสาทกระจายออกสู่ภายนอก ซึ่งเป็นช่องว่าง (synapse) ระหว่างปลายของเซลล์ประสาทหนึ่งกับเซลล์ประสาทถัดไป ในการดื้อต่อสารเคมีกลุ่มดีดีทีและไพรีทรอยด์ พบว่ามีฤทธิ์ทำให้แมลงสลบอย่างเฉียบพลัน (knock down) เนื่องจากขัดขวางการปิดเปิดของช่องอิออน (ion – chanel) โดยเฉพาะดีดีที ซึ่งมีผลต่อระบบประสาทส่วน peripheral sensory และ motor fiber unit และระบบประสาทส่วนกลางโดยมีผลต่อ reflex arc ซึ่งเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณประสาท

- การเปลี่ยนแปลง GABA receptor ซึ่ง GABA (γ- aminobutyric acid) เป็นตัวยับยั้งสัญญาณประสาท พบในระบบประสาทส่วนกลางและะระบบโครงร่างของสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง GABA เป็นบริเวณเป้าหมายออกฤทธิ์ของ lindane ซึ่ง GABA receptor เป็นโปรตีนเดี่ยวมี 3 บริเวณ บริเวณแรกจับกับ GABA บริเวณที่สองทำหน้าที่ควบคุม ion-chanel และบริเวณที่สามเป็นบริเวณที่จับกับสารพิษ พบว่า lindane และcyclodiene ยับยั้งการทำงานของ GABA receptor เหนี่ยวนำให้มีการนำ Cl^- เข้าสู่เซลล์ เมื่อการทำงานของสารสื่อประสาท GABA ถูกสกัดกั้น ก่อให้เกิด CNS excitation ทำให้แมลงหรือสิ่งมีชีวิตชักกระตุก ในแมลงจะทำให้การทรงตัวของปีกเสียไปและไม่สามารถบินได้ ในยุงที่ดื้อสารเคมีฆ่าแมลงมีการเปลี่ยนแปลงโครง

สร้างของ GABA receptor เป็นผลให้ลดความสามารถในการจับกับสารเคมีฆ่าแมลง (Hassall, 1990)

(ค) การกำจัดสารพิษโดยขบวนการเมตาโบลิซึม (metabolic detoxification)

หลักในการกำจัดสารพิษออกนอกร่างกายในแมลง คือ เมื่อได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกายแมลงมีกลไกการป้องกันตัวเองโดยกำจัดหรือลดปริมาณสารพิษนั้น ขั้นแรกคือพยายามขับออกทันที แต่ถ้ามีปริมาณน้อยมันจะสะสมไว้จนกว่าจะถึงระดับความเป็นพิษ ซึ่งสารเคมีฆ่าแมลงส่วนใหญ่เป็นพวกละลายได้ดีในไขมัน (lipophillic) จึงสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ทันที และไปยังอวัยวะต่าง ๆ ในแมลง แบ่งกระบวนการเมตาโบลิซึมของสารพิษเป็น 2 phases ดังนี้ คือ phase I และ phase II โดยที่ phase I มีกลุ่มเอนไซม์พวก microsomal oxidase ทำหน้าที่เติมออกซิเจนโมเลกุลเดี่ยวให้กับสารพิษ และทำหน้าที่ย้ายหมู่อัลคิล (alkyl) จากหมู่ methoxy และ ethoxy group ได้สารเมตาโบไลต์ที่สามารถละลายน้ำได้มากขึ้น เพื่อขับออกนอกร่างกายหรือเกิดปฏิกิริยา conjugation และ oxidase ยังสามารถเติมหมู่ hydroxyl groupในโมเลกุลของสารประกอบ aromatic ได้ ระบบ microsomal oxidase ในแมลงที่สำคัญ คือ cytochrome P 450 เหมือนในสัตว์ชั้นสูง (Terriere, 1984) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์กลุ่ม hydrolase ได้แก่ esterase, carboxylesterase ทำให้เกิดปฏิกิริยา reduction, hydroxylation ทำหน้าที่ไฮโดรไลซ์หมู่ carboxyl ester เช่น natural และ synthetic ester ตรง ester linkage (Brogdon and McAllister, 1998) ทำให้สารพิษเกิดสภาวะมีขั้วมากขึ้นและมีความเป็นพิษน้อยลง จากนั้นเอนไซม์ใน phase II ซึ่งทำหน้าที่หลักในการคอนจูเกตสารพิษที่เปลี่ยนแปลงจาก phase I กับสารตั้งต้นในร่างกาย (endogenous substance) อาทิเช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอมิโน ได้สารประกอบที่ละลายน้ำได้ง่ายสามารถกำจัดออกนอกร่างกายที่สำคัญ เช่น เอนไซม์ glutathione-S-transferase เอนไซม์นี้อยู่ได้หลายรูปทำหน้าที่เร่งหมู่ alkyl, aryl และ epoxy ของพวก electrophilic substrate (Clark and Dauterman, 1982) และจับกับโปรตีนกลูตาไธโอนได้สารที่ละลายน้ำได้คือ mercapturic acid ส่วน DDT dehydrochorinase หรือ DDTase เป็น reduced glutathione (GSH) dependent enzyme ต้องอาศัยโปรตีนกลูตาไธโอน แล้วเกิดปฏิกิริยาสลาย DDT ให้เป็น DDE หรือ DDD ที่มีพิษน้อยลง (Hassall, 1990) ซึ่งกลไกการกำจัดสารพิษ หมายถึง ปริมาณและคุณภาพของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เมตาโบไลซ์หรือเปลี่ยนแปลงสารเคมีฆ่าแมลงก่อนที่สารพิษนั้นจะไปสู่อวัยวะเป้าหมาย แบ่งเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ดังต่อไปนี้คือ cytochrome P 450, hydrolase และ glutathione S-transferase

- Cytochrome P450 เป็นระบบเอนไซม์แรกที่ทำหน้าที่เมตาโบลิซึมสารพิษต่างๆมีชื่อเรียกต่าง ๆ กันดังนี้ mixed function oxidase, cytochrome P-450 system และ cytochrome P-450 dependent monooxygenase system แต่ละชื่อนั้นเกี่ยวข้องกับหน้าที่และกลไกทางชีวเคมีที่จำเพาะ

ของเอนไซม์ ระบบนี้ทำหน้าที่เติมออกซิเจน 1 อะตอม และชื่อ cytochrome P450 คือ เม็ดสีในไมโครโซมที่ที่ถูกรีดิวซ์และจับกับก๊าซคาร์บอนมอนน๊อกไซด์ แล้วดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm เป็น B-type cytochrome ไมโครโซมอยู่ในส่วน endoplasmic reticulum ทั้งส่วน rough และ smooth endoplasmic reticulum (Omura and Sato, 1964 : Hodgson and Levi, 1994) แต่ส่วน smooth endoplasmic reticulum ให้ค่า specific activity สูงกว่า (Hayes, 1994) ระบบ monoxygenase ประกอบด้วย 2 ส่วน (Hassall, 1990 : Hodgson and Levi, 1994) คือ cytochrome P 450 และ flavoprotein ซึ่งมีเอนไซม์ NADPH-cytochrome P450 redutase ทั้งสองส่วนนี้ฝังอยู่ในผนังชั้นไขมัน ซึ่งมีฟอสฟอไลปิดประกอบไปด้วย phosphatidylcholine ทำหน้าที่รวมไซโตโครมกับเอนไซม์ reductase และจับสับสเตรท เอนไซม์นี้สามารถเกิดปฏิกิริยาได้มากมาย ได้แก่ aromatic และ aliphatic carbon atom, epoxidation, desulfuration และ oxidation

-Hydrolase สารพิษที่อยู่ในกลุ่ม ester, amide หรือ substitute phosphate ที่มีเอสเทอร์บอนด์ เช่น สารประกอบพวกออร์แกโนฟอสเฟต คาร์บาเมต หรือ ไพรีทรอยด์ มักเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ไม่อาศัยพลังงานและโคเอนไซม์ แต่บางครั้งก็อาศัย cation ร่วมด้วย (Hassall, 1990) เอนไซม์ esterase ในเนื้อเยื่อแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ A-type esterase และ B-type esterase ซึ่ง B-type esterase จะไวและถูกยับยั้งโดยสารเคมีฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต ในขณะที่สารประกอบกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตไม่มีผลต่อที่ A-type esterase เลย กลุ่ม A-type esterase ได้แก่ arylesterase ส่วน B-type esterase ได้แก่ cholinesterase, acetylcholinesterase และ carboxylesterase รูปแบบทั่วไปของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแสดงดังนี้

$$RCOOR' + H_2O \longrightarrow RCOOH + R'OH$$

เอสเทอร์ กรด อัลกอฮอล์

$$RCONH_2 + H_2O \longrightarrow RCOOH + NH_3$$

เอไมด์ กรด แอมโมเนีย

Hassall (1990) อธิบายกลไกการทำงานของ A-type และ B-type ว่าแตกต่างกันนั้น เนื่องจากอัตราการ dephosphorylation ของ 2 กลุ่มที่ site of action โดย B-type จับ binding site ตรงกรดอมิโนserine ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) อย่างแน่นหนา ในขณะที่ A-type จับตรงหมู่ thiol (-SH group) ซึ่งหลุดออกง่าย ในแมลงพบว่าระดับแอคติวิตี้ของ A-type esterase ต่ำกว่าของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Hayes, 1994) ในยุงมีการจำแนกเอนไซม์เอสเตอเรสโดยอาศัยอิเลคโตฟอริซิส และปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส สารประกอบเอสเทอร์สังเคราะห์ เช่น α และ β-napthyl acetate (Raymond

et al., 1997 :Takahashi and Yasutomi, 1987) ซึ่ง esterase ทำหน้าที่ไฮโดรไลซ์ α-napthyl ester เรียกว่า esterase A ส่วนกลุ่มที่ไฮโดรไลซ์ β-napthyl ester เรียกว่า esterase B ปัจจุบันนี้ esterase ในแมลงเกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อสารเคมีฆ่าแมลงโดยเฉพาะสารเคมีฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต เช่น malathion (Hodgson and Levi, 1994) parathion (Terriere, 1984) B-type esterase เรียกว่า carboxylesterase (E.C.3.1.1.1) มีการศึกษากันมากในยุงรำคาญ (*Culex*) ทั้งใน *Cx. pipiens* และ *Cx. quinquefasciatus*

- Glutathione S-transferase (GSTs) เอนไซม์นี้จัดอยู่ในกลุ่ม supergene family มีหลาย isozyme และเป็น dimeric enzymes ซึ่งแต่ละส่วนประกอบด้วย monomer 2 subunit ที่เหมือนและ/หรือแตกต่างกัน คือมีทั้ง homodimeric และ heterodimeric form (Hodgson and Levi, 1994) ทำหน้าที่กำจัดสารพิษพวก electrophilic substrate เช่น ยาปฏิชีวนะ, ยาขยายหลอดเลือด, สารเคมีฆ่าแมลง, ยาระงับปวด, ยารักษามะเร็งและสารก่อมะเร็ง (Hayes, 1994) โดยสามารถเร่งปฏิกิริยาของสับสเตรทที่มีโครงสร้างแบบ alkyl และ arylhalide, lactone, epoxide, quinones, ester และ alkene เอนไซม์ชนิดนี้พบได้ทั้งในคน สัตว์ พืช แมลง ยีสต์ และแบคทีเรีย (Wlice and Parker, 1994) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม (class) คือ alpha, mu, pi, theta และ microsomal GSTs มีความแตกต่างกันในความจำเพาะต่อสับสเตรทและตัวยับยั้ง, antibody cross-reactivity และโครงสร้างปฐมภูมิ เอนไซม์ GSTs มีขนาด monomer ใกล้เคียงกันราว ๆ 24-26 kDa มีลำดับกรดอมิโนเหมือนกันประมาณ 60-80% (Beckett and Hayes, 1993) ใน cytosolic enzyme มีสอง active site ต่อ dimer ซึ่งเป็นอิสระต่อกัน แต่ละ active site มีอย่างน้อย 2 ligand binding region คือ glutathione binding site (G-site) จำเพาะต่อโปรตีนกลูตาไธโอน (γ-glutamyl cysteiny glycine) ซึ่งเป็น tripetide มีกรดอมิโน glutamic acid, cysteine และ glycine ต่อกัน ในขณะที่ substrate binding site (S-site) ทำหน้าที่จับกับสารพิษพวก electrophilic และเกิดปฏิกิริยา conjugation กับกลูตาไธโอนได้ cystenyl glycine conjugate หลังจากนั้นเอนไซม์ γ- glutamyltranspeptidase เอา glutamic acid ออก และมีเอนไซม์ cystenyl glycine dipeptidase นำ glycine ออกไป หรืออาจมีเอนไซม์ aminopeptidase จับกับ cysteine conjugate เกิดเป็น premercapturic acid และเกิดกระบวนการ acetylation กับ cysteiene S-conjugate โดยเอนไซม์ N-acetyltransferase ได้ N-acetyl deriavative เช่น mercapturic acid ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายแล้วกำจัดออกนอกร่างกาย นอกจากเร่งปฏิกิริยาทำลายสารพิษแล้ว GSTs ยังทำหน้าที่ส่งสารในเซลล์ (intracellular transporter) ให้แก่สับสเตรทที่ละลายน้ำได้ เช่น บิลิรูบิน สเตียรอยด์ ฮอร์โมนไทรอยด์และเกลือน้ำดี ส่วน GSTs ในแมลงพบว่ามี 3 กลุ่มคือ alpha, theta และ pi (Pemble and Taylor, 1992) มวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 37,000 ถึง 63,000 dalton ส่วนหน่วยย่อยมีขนาด

16,000-35,000 dalton มีบทบาทสำคัญในการกำจัดสารเคมีฆ่าแมลงหลายชนิด อาทิเช่นกลุ่มออร์แกโนคลอรีน ออร์แกโนฟอสเฟต และ ไพรีทรอยด์ ก่อให้เกิดกลไกการดื้อต่อต่อสารเคมีฆ่าแมลง (Plapp, 1976 : Prapanthadara et al., 1993 : Prapanthadara et al., 1996: Ranson et al., 1997)

-DDT dehydrochlorinase activity หรือ DDTase เป็น reduced glutathione (GSH) - dependent enzyme (Hodgson and Levi, 1994) เป็นเอนไซม์ชนิด lipoprotein อยู่ในรูป monomer มีน้ำหนักโมเลกุล 36,000 dalton แต่ถ้าอยู่ในรูป tetramer มีน้ำหนักโมเลกุล 120,000 dalton ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลายสารเคมีฆ่าแมลง *p,p'* DDT ไปเป็น *p,p'* DDE หรือ *p,p'* DDD (2,2,2-bis(*p*-chlorophenyl) -1,1-dichloroethane) หรือ DDT ethylene โดยอาศัยกลูตาไธโอนเป็นตัวร่วมปฏิกิริยาแต่ปริมาณกลูตาไธโอนเมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดนั้นไม่เปลี่ยนแปลง (Hassall, 1990) Clark and Shamaan (1984) พบหลักฐานว่ามีเอนไซม์นี้ในแมลงที่ดื้อต่อดีดีที มีมวลโมเลกุลเท่ากับเอนไซม์ GSTs และอาศัยกลูตาไธโอนเหมือนเอนไซม์ GSTs มีค่า pI เท่ากับ 7.1 มีแอคติวิตี้สูงสุดกับ DDT ถ้าอยู่ในรูป heterodimer ที่ประกอบด้วย polypeptide 2 ส่วนที่แตกต่างกันมีน้ำหนักโมเลกุล 23 และ 25 kDa แต่ถ้าเป็น homodimer จะมีแอคติวิตี้ต่ำ

1.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษากลไกการดื้อของสารเคมีฆ่าแมลงในยุง

กลไกการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรม ซึ่งมีทั้งลักษณะเด่น (dominant) เช่นการดื้อต่อสารประกอบออร์แกโนฟอสเฟต ลักษณะด้อย (recessive) เช่นการดื้อต่อดีดีที หรือลักษณะเด่นร่วมกัน (codominant) เช่นการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงกลุ่มอัลดริน (Plapp, 1976) ซึ่งกระบวนการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงในยุงนั้นเกิดจากขบวนการคัดเลือกโดยธรรมชาติ (Collaghan et al., 1990) นอกจากนี้การดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงเหนี่ยวนำให้มีการดื้อข้าม (cross resistance) ขึ้นอยู่กับโครงสร้างโมเลกุลและกลไกการออกฤทธิ์ของสารเคมีฆ่าแมลง เช่น การดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนคลอรีนกับกลุ่มไพรีทรอยด์ กลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตกับกลุ่มคาร์บาเมต หรือกลุ่มดีลดรินกับ gamma-HCH และ lindane (Brown, 1986) ซึ่งประชากรแมลงที่พบในท้องถิ่นต่าง ๆ มักมียีนแบบ heterozygous และ susceptible allele ในขณะที่สายพันธุ์แมลงในห้องปฏิบัติการมักเป็นแบบ homozygous (Crow, 1978) ปัจจุบันมีผู้ศึกษากลไกการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงกันมาก เนื่องจากเกิดปัญหาการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงในแมลงชนิดต่างๆมากมาย ทำให้การใช้สารเคมีฆ่าแมลงกำจัดไม่ได้ผล โดยเฉพาะยุงเนื่องจากยุงเป็นพาหะนำโรคติดต่อที่สำคัญต่างๆ อาทิเช่น ยุงลายนำโรคไข้เลือดออก ยุงก้นปล่องนำโรคมาเลเรีย และยุงรำคาญนำโรคไข้สมองอักเสบมาสู่คน (WHO, 1997) การศึกษากลไกการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงส่วนใหญ่นิยมศึกษาหาค่า LD_{50} ในระยะลูกน้ำ และ LT_{50} ในระยะตัวเต็มวัย ต่อสารเคมีฆ่าแมลงชนิดต่างๆ ดูการ

เปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสารพิษ (detoxified enzymes) อาทิเช่น glutathione- S-transferase, DDT dehydrochlorinase, carboxylesterase, cytochrome P450 และ altered acetylcholinesterase

การศึกษากลไกการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงในยุงรำคาญ (*Culex*) พบว่าส่วนใหญ่ดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต ยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* ในประเทศซาอุดิอาราเบีย (Hemingway et al., 1990) ประเทศศรีลังกา (Herrath et al., 1988) และ French Polynesia (Failloux et al., 1994) พบว่าระดับเอนไซม์ esterase สูงขึ้น โดยเฉพาะ A2-B2 และ B1 และมีบทบาทสำคัญในกลไกการกำจัดสารพิษกลุ่มนี้ ในยุง *Cx. pipiens* ทางตอนกลางและตะวันออกของประเทศฝรั่งเศส พบว่ามี over-produced esterase A1, A2-B2 และ A4-B4 โดยกระบวนการ gene amplification และมีกลไก insensitive acetylcholinesterase (Ace^R) (Rivet et al., 1985) เช่นเดียวกับประเทศไซปรัส (Wirth and Georghiou, 1996) และประเทศอิตาลี (Villani and Hemingway, 1987 : Severini et al., 1997) ในยุง *Cx. tritaeniorhynchus* ซึ่งเป็นพาหะนำโรคไข้สมองอักเสบในญี่ปุ่น พบว่ามีระดับเอนไซม์ carboxylesterase สูงขึ้น และเมื่อศึกษาทางพันธุกรรมพบว่ามีรหัสของยีน carboxylesterase 2 ตำแหน่ง และ acetylcholinesterase 1 ตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 2 (Takahashi and Yasutomi, 1987)

ยุงก้นปล่อง *Anopheles gambiae* ที่ดื้อต่อดีดีที พบว่ามีระดับเอนไซม์ DDT dehydrochlorinase สูงขึ้น (Clark and Shamaan, 1984) ซึ่งเอนไซม์นี้ทำหน้าที่สลายดีดีทีให้เป็นดีดีอีซึ่งมีพิษน้อยลง เช่นเดียวกับ *An. culicifacies* และ *An. subpictus* ในประเทศศรีลังกา (Herrath and Jayawardena, 1988) และใน *An. albimanus* พบว่าระดับเอนไซม์ glutathione S-transferase สูง และเพิ่มอัตราเมตาโบลิซึมสลายดีดีทีให้เป็นดีดีอี และมีกลไกแบบ altered acetylcholinesterase และ kdr gene ซึ่งต้องอาศัยวิธีการทาง molecular method (Penilla et al., 1997)

ยุงลาย *Ae. aegypti* ก็มีกลไกการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงดีดีที McDonald and Wood (1981) พบว่าในยุงที่ดื้อต่อดีดีทีมีอัตราการสลายดีดีทีไปเป็น *p,p'*DDE และมีความคงทนต่อ unmetabolised DDT ในร่างกาย ลดปริมาณ DDT+ *p,p'* DDE ซึ่งปัจจัยนี้อยู่ที่ยีน R^{DDTI} และ y บางครั้งยุงลายมีการดื้อข้ามระหว่างดีดีทีกับไพรีทรอยด์ กลไกการดื้อพบว่ามีระดับเอนไซม์ oxidase และ DDT dehydrochlorinase สูงขึ้น (Prasittisuk and Busvine, 1977 : Chadwick et al., 1977) และอาจมีกลไกอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น kdr gene (Chadwick et al., 1984 : Breadley et al., 1984) ใน *Ae. aegypti* ระยะลูกน้ำมีกลไกการซึมผ่านสารเคมีฆ่าแมลงช้าเพราะเพิ่มปริมาณไขมัน

และเร่งการขับออกตรงบริเวณ periotropic membrane (Maargham and Wood, 1984) และขึ้นกับพันธุกรรม เพราะจากการศึกษาของ Rathor and Wood (1981) พบว่ายุง *Ae. aegypti* สายพันธุ์ที่มีแหล่งกำเนิดในทวีปเอเชียและอาฟริกามีการดื้อในระยะลูกน้ำเท่านั้น ส่วนสายพันธุ์จากทวีปอเมริกากลางและใต้มีการดื้อต่อดีดีทีทั้งระยะลูกน้ำและตัวเต็มวัย

ดังนั้นวิธีการศึกษาทางชีวเคมี (biochemical assay) เป็นวิธีที่นิยมใช้เพื่อหาปัจจัยในการกำจัดสารพิษที่จำเพาะ (specific detoxication factor) และเป็นตัวเฝ้าระวังการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงในกลุ่มประชากรยุง (Casida et al., 1983 : Herrath et al., 1988 : Hemingway et al., 1989 : Penilla et al., 1998 : Chandre et al., 1999)

1.5 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

(1) เพื่อศึกษาค่า LT_{50} ของยุงลาย *Ae. aegypti* ระหว่างสายพันธุ์ที่ดื้อและไม่ดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลง เพื่อนำไปสู่การคำนวณหาค่า resistance ratio (RR)

(2) เพื่อศึกษากลไกการดื้อสารเคมีฆ่าแมลงแบบ metabolic detoxication โดยการศึกษาหาค่า specific activity ของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ในยุงลายระยะต่างๆดังต่อไปนี้

2.1) glutathione S-transferase

2.2) DDT dehydrochlorinase

2.3) carboxylesterase

2.4) cytochrome P450

(3) เพื่อศึกษากลไกการดื้อสารเคมีฆ่าแมลงแบบ target site insensitivity โดยทดสอบหาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเตอเรส