บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การทำ bioassay และ LT_{50}

นำเอาตัวเต็มวัยอายุ 1 วันสายพันธุ์ RddtSper มาทดสอบด้วยดีดีที โดยใช้ยุงตัวเมียอายุ 1 วันจำนวน 25 ตัวต่อการทดสอบ 1 ครั้งกับอุปกรณ์ทดสอบความไวของ WHO ทำทั้งสิ้น 4 ครั้ง มีอัตราการตายเท่ากับเท่ากับ 0 % ทุกครั้ง ในการทดสอบกับเพอร์เมทรินก็ทำเช่นเดียวกับทดสอบกับดีดีที พบว่ายุงมีอัตราการตาย 100% ทุกครั้ง ในขณะที่สายพันธุ์ RddtRper ทดสอบกับดีดีทีมีอัตราการตาย 0 % ทดสอบกับเพอร์เมทรินมีอัตราการตาย 0 % โดยทดสอบครั้งละ 25 ตัว จำนวน 4 ครั้งการทดสอบ ส่วนสายพันธุ์ SddtSper ทำเช่นเดียวกันคือทำครั้งละ 25 ตัวจำนวน 4 ครั้ง พบว่ายุงมีอัตราการตาย 100 % เมื่อทดสอบกับดีดีทีและเพอร์เมทรินทุกครั้งที่ทดสอบ ในยุงตัวเต็มวัยเมื่อมีอายุมากขึ้นคือ 7 และ 14 วัน อัตราการตายไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงในตารางที่ 3.1

<u>ตารางที่ 3.1</u> อัตราตายของยุง *Ae. aegypti* เพศเมียอายุ 1, 7 และ 14 วัน เมื่อสัมผัสกับสารเคมีฆ่าแมลงดีดีทีและเพอร์เมทริน

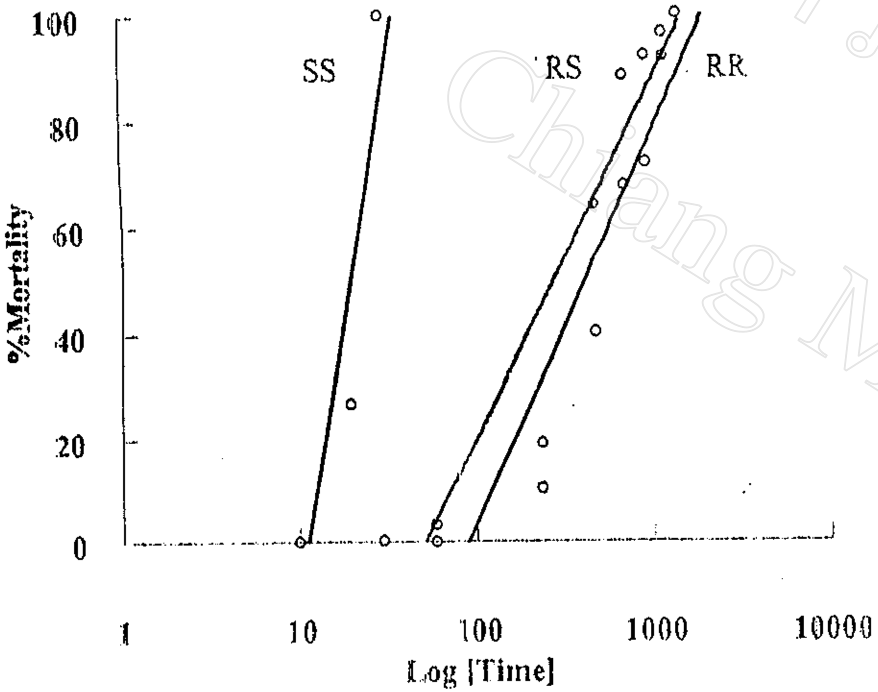
สารเคมีฆ่าแมลง	ตัวเต็มวัยอายุ 1 วัน			ตัวเต็มวัยอายุ 7 วัน			ตัวเต็มวัยอายุ 14 วัน		
	Sddt Sper	Rddt Sper	Rddt Rper	Sddt Sper	Rddt Sper	Rddt Rper	Sddt Sper	Rddt Sper	Rddt Rper
DDT	100	0	0	100	2	0	100	5	0
Permetrin	100	100	0	100	100	0	100	100	0
control	0	0	0	0	0	0	0	0	0

หลังจากนั้นแปรผันเวลาที่ยุงตัวเต็มวัยเพศเมียอายุ 1วันได้รับสารเคมีฆ่าแมลง ดีดีทีหรือเพอร์เมทรินตามความเข้มข้นของ WHO คือดีดีที 4 % และเพอร์เมทริน 0.25 % ที่ได้รับในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ นำอัตราการตายและค่า log ของเวลาที่ทดสอบจากตารางที่ 3.2 และนำค่าเฉลี่ยอัตราการตายจากตารางที่ 3.2 ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % mortality กับระยะเวลาที่ยุงได้รับสารเคมีฆ่าแมลงดีดีที (รูปที่ 3.1) และเพอร์เมทริน (รูปที่ 3.2)

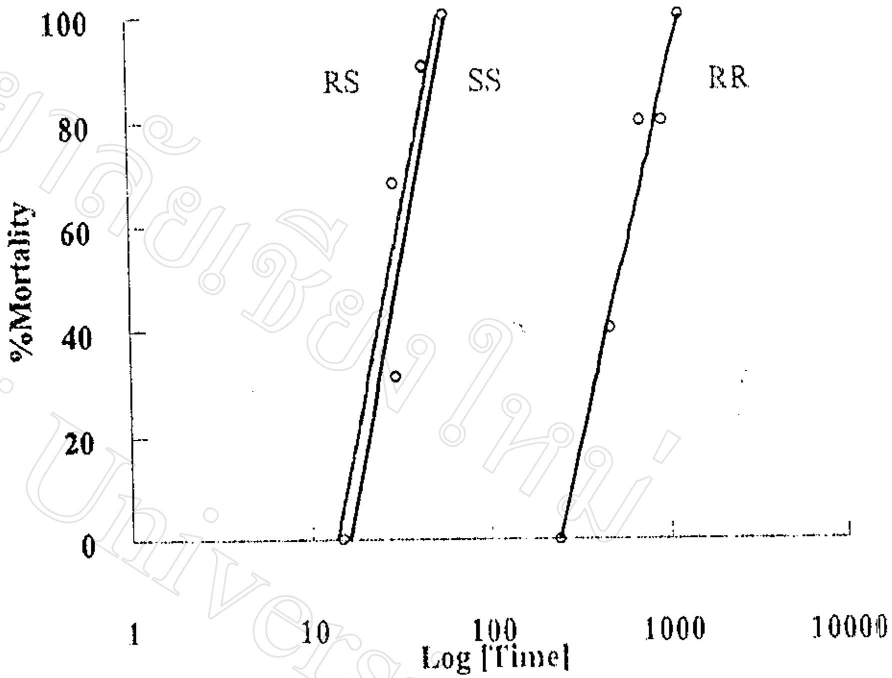
<u>ตารางที่ 3.2</u> อัตราตายของยุง *Ae. aegypti* ที่สัมผัสกับดีดีทีและเพอร์เมทรินด้วยระยะเวลาที่ต่างกัน

เวลาที่ได้รับสารเคมีฆ่าแมลง (นาที)	อัตราการตาย(%) สารเคมีฆ่าแมลง ดีดีที			อัตราการตาย(%) สารเคมีฆ่าแมลง เพอร์เมทริน		
	Sddt Sper	Rddt Sper	Rddt Rper	Sddt Sper	Rddt Sper	Rddt Rper
10	0	0	0	0	0	0
20	26.7	0	0	0	68	0
30	100	0	0	30.67	90	0
60	100	3	0	100	100	0
240	100	10	19	100	100	0
480	100	64	40	100	100	40
720	100	88	68	100	100	80
960	100	92	72	100	100	80
1200	100	96	92	100	100	100
1440	100	100	100	100	100	100

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



รูป 3.1 Log-time mortality probit (LT $_{50}$) ของ *Ae. aegypti* ต่อสารเคมีฆ่าแมลงดีดีที



รูป 3.2 Log-time mortality probit(LT_{50}) ของ *Ae. aegypti* ต่อสารเคมีฆ่าแมลงเพอร์เมทริน

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

3.2 การทำ enzyme assay

ตารางที่ 3.3 แสดงค่าแอคติวิตี้เฉลี่ยของเอนไซม์ GSTs, DDTase และ EST ที่วัดจากยุงทั้งสามสายพันธุ์ในระยะต่างๆ พบว่าค่าแอคติวิตี้เฉลี่ยของเอนไซม์ GSTs และ EST ของยุงทั้งสามสายพันธุ์มีความแตกต่างกันไม่มากนัก (น้อยกว่า 1 เท่า) โดยสายพันธุ์ SddtSper มักมีแอคติวิตี้ต่ำกว่าเล็กน้อย ยกเว้นบางระยะที่เท่า ๆ กันหรือมากกว่านิดหน่อย ซึ่งอาจเกิดจากความผิดพลาดของการสุ่มหรือเทคนิคการตรวจวัดเอนไซม์ อย่างไรก็ตามสิ่งที่เห็นความแตกต่างได้ชัดเจนคือระดับแอคติวิตี้เฉลี่ยของเอนไซม์ DDTase ซึ่งในสายพันธุ์ RddtSper หรือ RddtRper สูงกว่าสายพันธุ์ SddtSper หลายเท่าตัวทั้งในเพศเมียและเพศผู้ แต่แอคติวิตี้ของ DDTase ลดลงเมื่อยุงมีอายุเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 3.4)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

<u>ตารางที่ 3.3</u> แสดงค่าแอคติวิตี้เฉลี่ย(mean ± SD) ของเอนไซม์ Glutathione S-transferase, DDTase และ carboxylesterase

ระยะ		glutathione S-transferase (µmol/min/mg)			DDTase(nmol/min)			Carboxylesterase(µmol/min/mg)		
สายพันธุ์		Sddt Sper	Rddt Sper	Rddt Rper	Sddt Sper	Rddt Sper	RddtR per	Sddt Sper	Rddt Sper	Rddt Rper
ลูกน้ำ	mean	0.319[b]	0.434[a]	0.315[b]	ND	ND	ND	0.248[c]	0.321[b]	0.425[a]
	±SD	0.024	0.082	0.038				0.047	0.055	0.074
ตัวโม่ง	mean	0.327[b]	0.462[a]	0.453[a]	ND	ND	ND	0.298[c]	0.426[b]	0.645[a]
	±SD	0.062	0.047	0.085				0.038	0.046	0.053
ยุงอายุ 1 วัน										
ตัวเมีย	mean	0.215[b]	0.384[a]	0.370[a]	3.23[b]	31.03[a]	26.85[a]	0.198[c]	0.335[a]	0.257[b]
	±SD	0.053	0.085	0.039	1.23	13.88	5.12	0.03	0.069	0.039
ตัวผู้	mean	0.235[b]	0.268[b]	0.317[a]	5.13[c]	16.82[b]	20.02[a]	0.235*	0.232*	0.219*
	±SD	0.043	0.046	0.069	1.82	5.84	6.21	0.043	0.044	0.013
ยุงอายุ 7 วัน										
ตัวเมีย	mean	0.217[b]	0.335[a]	0.234[b]	1.18[c]	13.05[a]	8.75[b]	0.146[b]	0.152[b]	0.193[a]
	±SD	0.039	0.049	0.043	0.68	4.04	3.64	0.055	0.022	0.033
ตัวผู้	mean	0.236[b]	0.292[a]	0.270[a]	2.46[b]	9.66[a]	9.10[a]	0.178[a]	0.114[b]	0.134[b]
	±SD	0.036	0.064	0.049	1.75	2.63	2.24	0.046	0.018	0.024
ยุงอายุ 14 วัน										
ตัวเมีย	mean	0.264[b]	0.225[a]	0.243[b]	0.91[c]	7.57[a]	6.28[b]	0.187[a]	0.188[a]	0.162[b]
	±SD	0.02	0.037	0.033	0.96	1.70	1.20	0.025	0.013	0.029
ตัวผู้	mean	0.272*	0.267*	0.244*	1.91[c]	4.50[b]	6.09[a]	0.186[a]	0.115[b]	0.119[b]
	±SD	0.012	0.032	0.068	1.21	0.84	1.76	0.068	0.012	0.022

[a,b,c] ตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้ ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

*ไม่มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ND ไม่ได้ทดลอง

ตารางที่ 3.4 ความแตกต่างแอคติวิตี้ของเอนไซม์กับยุง *Ae. aegypti* ระยะต่างๆ

สายพันธุ์	เอนไซม์	ระยะ				
		ลูกน้ำ	ตัวโม่ง	ตัวเมียอายุ 1 วัน	ตัวเมียอายุ 7 วัน	ตัวเมียอายุ 14 วัน
Sddt Sper	GSTs	0.3187^{a}	0.3273^{a}	0.2152^{c}	0.2174^{c}	0.2645^{b}
	DDTase	ND	ND	3.228^{a}	1.1775^{b}	0.9145^{b}
	EST	0.2479^{a}	0.2976^{b}	0.1984^{c}	0.1461^{d}	0.1870^{c}
Rddt Sper	GSTs	0.4340^{a}	0.4615^{a}	0.3839^{b}	0.3352^{c}	0.2251^{d}
	DDTase	ND	ND	31.0275^{a}	13.049^{b}	7.5685^{c}
	EST	0.3207^{b}	0.4263^{b}	0.3351^{b}	0.1519^{d}	0.1876^{c}
Rddt Rper	GSTs	0.3150^{a}	0.4532^{a}	0.3695^{b}	0.2340^{d}	0.2466^{d}
	DDTase	ND	ND	26.8515^{a}	8.7455^{b}	6.2800^{c}
	EST	0.4249^{a}	0.6540^{a}	0.2567^{c}	0.1933^{d}	0.1622^{c}

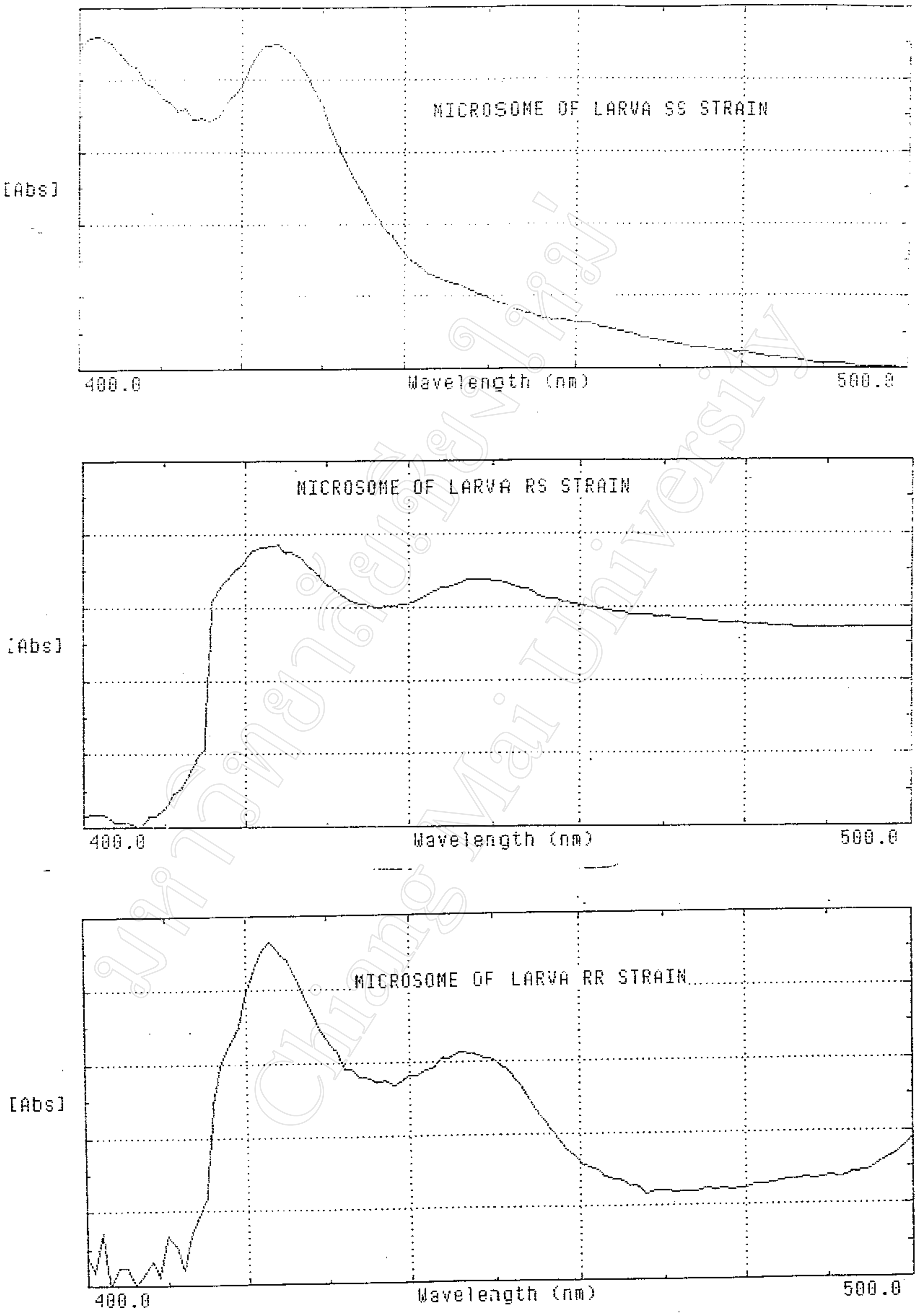
ND ไม่ได้ทำ

^{a,b,c} ตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 95 % เมื่อใช้ ANOVA

ตารางที่ 3.5 แสดงการตรวจวัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์ Cytochrome P450 พบว่าลูกน้ำสายพันธุ์ SddtSper มีระดับเอนไซม์นี้ต่ำมาก แทบจะไม่เกิดพีค(peak) ที่ 450 nm เลย ในขณะที่ทั้งสายพันธุ์ RddtSper และ RddtRper มีพีคสูงที่ 450 nm เป็นที่น่าสังเกตว่าในการศึกษาครั้งนี้มีพีค 420 nm ค่อนข้างสูงในทุกสายพันธุ์ที่ศึกษา ซึ่งเข้าใจว่าเป็นส่วนโปรตีนที่สูญเสียสภาพ ขณะทำการตรวจวัดหาเอนไซม์นี้ (รูปที่ 3.3)

ตารางที่ 3.5 ปริมาณเอนไซม์ cytochrome P 450 ระยะลูกน้ำ

จำนวนครั้งการทดสอบ	ปริมาณ cytochrome P450 (nmol/mg protein)		
	SddtSper	RddtSper	RddtRper
1	0.078	0.214	0.205
2	0.048	0.245	0.322
3	0.087	0.230	0.286
4	0.069	0.252	0.300
5	0.065	0.265	0.276
mean	0.069^{a}	0.241^{b}	0.278^{b}
%CV	0.015	0.020	0.044



<u>รูป 3.3</u> แสดงพีคของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 จากไมโครโซมของลูกน้ำ *Ae. aegypti* สายพันธุ์ Sddt, RddtSper และ RddtRper

3.3Altered acetylcholinesterase

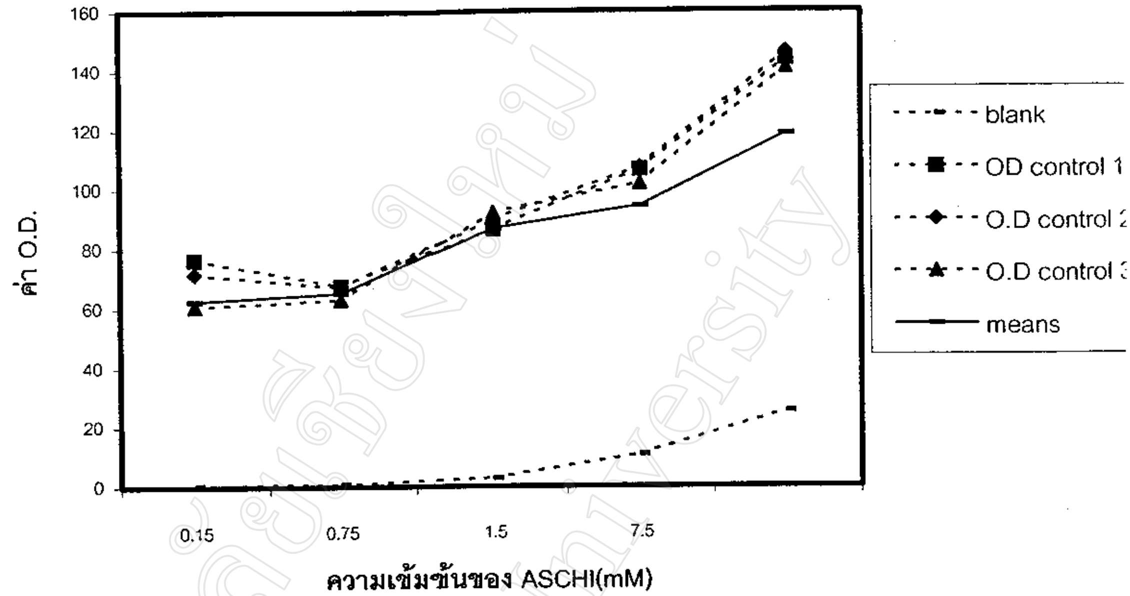
การเตรียมความเข้มข้นของสารเคมีและวิธีการทดลอง

(1) ผลของความเข้มข้นสับสเตรท

โดยทั่วไปอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสับสเตรท ในการศึกษาครั้งนี้ต้องการทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา พบว่าถ้าความเข้มข้นของสับสเตรทสูงเกินไป ค่า O.D.จะสูงมากเกินกว่าที่เครื่อง Ceres UV microplate reader สามารถอ่านได้ นอกจากนี้ค่าO.D. ของ blank ก็สูงเกินไปด้วยเช่นกัน ซึ่งทำให้เกิด false positive ได้ ดังนั้นในการทดลองจึงแปรผันความเข้มข้นของสับสเตรทคือ acetylthiochlorine iodide ใช้แนวทางการทดลองของ Ffrench-constant and Bonning (1989) เป็นหลัก ซึ่งทำในยุงก้นปล่องและยุงรำคาญ คือ 0.036 M เตรียมความเข้มข้นสูงขึ้น 10 เท่า และเจือจางลงคือตั้งแต่ 0.36 - 0.036 M จากรูปที่ 3.4 และตารางที่ 3.6 พบว่าความเข้มข้นของ acetylthiochlorine iodide ที่เหมาะสมคือ 0.036 M (final conc. = 1.5 mM) ให้ค่า O.D. สูง 86.7 mO.D./min และ O.D. ของ blank ก็ต่ำเท่ากับ 2 .7 mO.D./min ในขณะที่ถ้าใช้ความเข้มข้น acetylthiochlorine iodide 0.36 M พบว่าค่า O.D. ของ blank มีค่าสูงเกินไปคือ 25.17 mO.D./min ในขณะที่ถ้าใช้ความเข้มข้น 0.0036 M ค่าO.D. ของ blank ต่ำก็จริง (O.D. = 0.586 mO.D./min) แต่ค่าO.D.ของตัวอย่างก็ต่ำด้วย โดยที่ค่า O.D. เท่ากับ 62.61 mO.D./min

ตารางที่ 3.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า O.D กับสับสเตรทความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น ASCHI (mM)	blank	O.D control 1	O.D control 2	O.D control 3	means
0.15	0.586	76.48	71.62	60.91	62.61
0.75	0.789	67.42	67.02	62.94	65.03
1.5	2.701	86.47	89.64	92.08	86.70
7.5	10.87	106.5	107.10	101.80	94.26
15	25.17	143.7	146.00	140.80	118.36



รูปที่ 3.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า O.D กับความเข้มข้นของ ASCHI

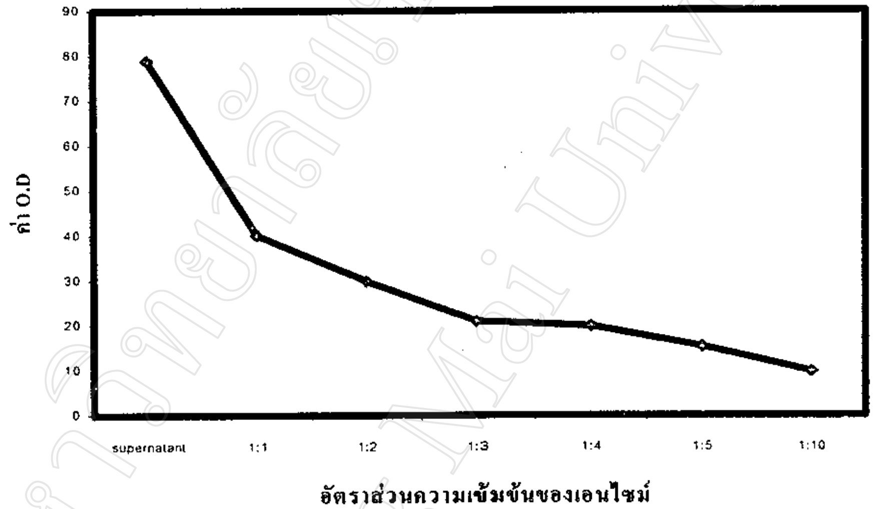
(2) ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์

อัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์ด้วยเช่นกัน เอนไซม์บางชนิดเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์มากขึ้น อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะลดลง ทั้งนี้เนื่องจากการรวมตัวกันของเอนไซม์หรืออาจเกิดจากความจำกัดของสับสเตรท ดังนั้นเมื่อเราเลือกความเข้มข้นของ acetylthiochlorine iodide ที่เหมาะสมแล้วคือ 1.5 mM (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยา) ก็ต้องเอามาทำปฏิกิริยากับสารละลายเอนไซม์ สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสับสเตรทกับสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อสร้างกราฟออกมาพบว่าเป็นไปตามกฎ Michaelis-Menten แสดงในตารางที่ 3.8 และรูปที่ 3.5 ดังนั้นในการทดลองนี้เราสามารถเอาส่วน supernatant ไปทำปฏิกิริยาได้เลย ไม่ต้องเจือจางลงอีก

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางที่ 3.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า O.D กับสารละลายเอนไซม์ที่เจือจาง

อัตราส่วนเอนไซม์	1:0	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:10
ค่า O.D	78.87	40.03	24.90	20.87	19.83	15.31	9.72



รูปที่ 3.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า O.D. กับเอนไซม์ความเข้มข้นต่างๆ

(3) ผลของตัวยับยั้ง

การทำงานของเอนไซม์หลายชนิดถูกยับยั้งโดยสารชนิดต่างๆ ซึ่งเรียกว่าตัวยับยั้ง (inhibitor) ซึ่งตัวยับยั้งสามารถทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลงโดย (1) ไปมีผลต่อการจับกับของสับสเตรทกับเอนไซม์ (2) ทำให้สับสเตรทมีโครงสร้างที่ไม่เหมาะสมกับเอนไซม์หรือ (3) ทำให้อัตราการสลาย (turn over) ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น จากการศึกษาที่ผ่านมา (พาลาภ สิงหเสนี, 2536) เราพบว่าสารออร์แกโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตมีกลไกการเกิดพิษที่คล้ายกันมาก คือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเตอเรส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ทำลายสารสื่อประสาทอะซิติลคลอรีนให้เป็นคลอรีนกับกรดอะซิติก โดยที่ active center ของเอนไซม์นี้มี 2 binding site คือ anionic site กับ esteratic site และ binding site ที่สำคัญคือ esteratic site ซึ่งมีกรดอมิโนชื่อ serine เป็นที่จับของสารเคมีฆ่าแมลงออร์แกโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต เมื่อ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเตอเรสถูกจับไว้ก็ไม่สามารถทำหน้าที่ได้อีก แต่ความเร็วในการแย่งจับพบว่าสารเคมีฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตจะแย่งจับช้ากว่ากลุ่มคาร์บาเมต และสารเคมีฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเตอเรสแบบไม่ผันกลับ (irreversible process) โดยมีขบวนการ " aging " เกิดตามมาภายหลัง กล่าวคือเมื่อเอนไซม์จับกับสารออร์แกโนฟอสเฟตแล้วจะเป็นสารประกอบ complex เมื่อทิ้งไว้นานๆ complex นี้จะค่อยๆละลายน้ำและถูกไฮโดรไลซ์ ทำให้สูญเสีย alkyl group ไป 1 ตัว ซึ่งการสูญเสียนี้ทำให้ complex นี้มีความคงทนมาก ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพปกติได้ ในขณะที่กลุ่มคาร์บาเมตเกิดปฏิกิริยายับยั้งแบบชั่วคราว (reversible process) และไม่มีขบวนการ aging (พาลาภ สิงหเสนี, 2536) ในการทดลองนี้ใช้ตัวยับยั้งซึ่งสารเคมีฆ่าแมลงกลุ่มต่างๆ คือ abate, diazenon, sumithion, bendiocarb และ permethrin ความเข้มข้นเดียวกันหมดคือ 0.24 M พบว่า bendiocarb ซึ่งเป็นสารเคมีฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตให้ % inhibition สูงสุด คือ 88.82 %ในระยะลูกน้ำ ในขณะที่ abate, diazenon, sumithion เป็นสารเคมีฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต และ permethrin เป็นกลุ่มไพรีทรอยด์ให้ % inhibition ต่ำกว่าคือ 67.10, 65.57, 66.35 และ 65.85 % ตามลำดับ ส่วนระยะตัวเต็มวัยพบว่า bendiocarbให้ % inhibition เท่ากับ 80.28 ส่วน abate, diazenon, sumithion และ permethrin คือ 25.07, 29.96, 20.23 และ 30.61 % ตามลำดับแสดงในตารางที่ 3.8ในสารเคมีฆ่าแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์ยังไม่มีรายงานว่ามีผลต่อเอนไซม์อะซติลคลอรีนเอสเตอเรสหรือไม่

<u>ตารางที่ 3.8</u> แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition ของเอนไซม์ acetylcholinesterase ใน *Ae. aegypti* ระยะลูกน้ำและตัวเต็มวัย เมื่อใช้สารเคมีฆ่าแมลงชนิดต่างๆ เป็นตัวยับยั้ง

Inhibitor (0.24 mM)	% inhibition in larva			% inhibition in adult		
	O.D Control	O.D remain	% inhibition	O.D Control	O.D remain	% inhibition
Temephos	94.921	31.227	67.10	96.707	72.459	25.07
Bendiocarb	72.088	8.0615	88.82	93.218	18.387	80.28
Diazenon	84.027	28.933	65.57	87.668	61.404	29.96
Sumithion	85.737	28.848	66.35	88.985	70.982	20.23
Permethrin	85.261	29.115	65.85	94.738	65.735	30.81

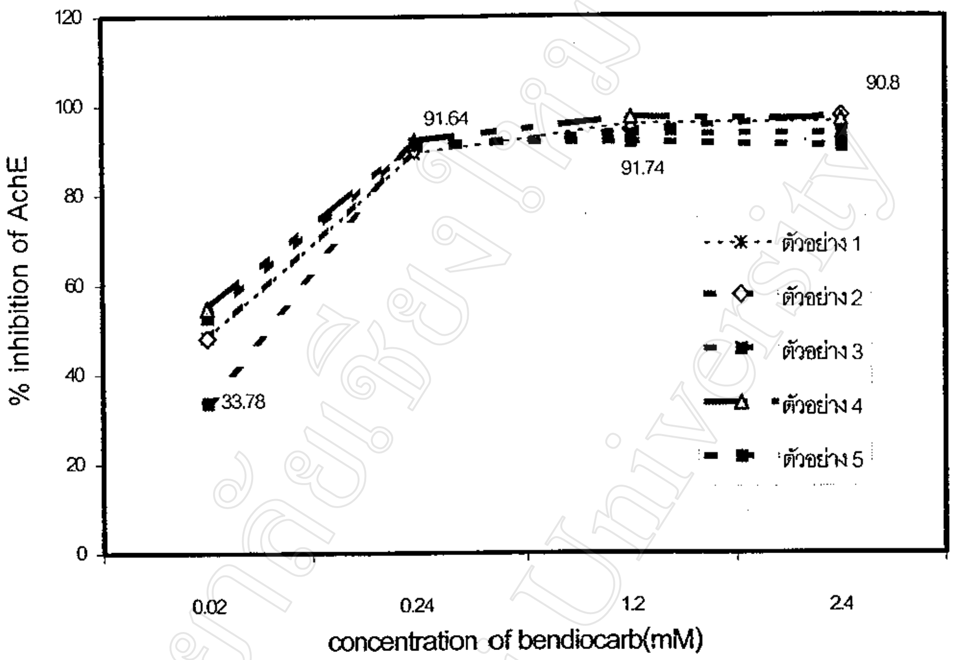
(4) ความเข้มข้นที่เหมาะสมของตัวยับยั้ง bendiocarb

ในการทดลองนี้ต้องการหา optimum concentration ของ bendiocarb ซึ่งใช้เป็นตัวยับยั้ง ส่วนใหญ่นิยมให้มีความเข้มข้นมากเกินพอ แต่ในการทดลองนี้ต้องการหาระดับที่เหมาะสมที่สุด จึงทำการแปรผันปริมาณความเข้มข้นของสารเคมีฆ่าแมลง bendiocarb ตั้งแต่ 0.02, 0.24, 1.2 และ 2.4 M ตามลำดับ โดยใช้ absolute ethanol เป็นตัวทำละลาย ทำการเปรียบเทียบในลูกน้ำสองสายพันธุ์ คือ RddtSper และ RddtRper จากตารางที่ 3.9 และรูปที่ 3.6 จะเห็นว่า bendiocarb ที่ความเข้มข้น 0.02 M นั้นให้ % inhibition ต่ำ ส่วนระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.24 M ขึ้นไป ให้ %inhibition สูงขึ้น และคงที่ไม่ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นเป็น 1.2 M หรือมากกว่านี้ ดังนั้น ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับตัวยับยั้ง bendiocarb ในการทดลอง altered acetylcholinesterase นี้ คือ 0.24 M

สรุปในการจัดเตรียมสารเคมีและความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ในการทำ assay นี้คือ เตรียมสับสเตรท acetylthiochlorine iodide ความเข้มข้น 0.036 M DTNB 0.1 M และ bendiocarb 0.24 M ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานของ Penilla et al., (1997) : Hemingway and Peiris (1990) และ Ffrench – constant and Bonning (1989)

ตารางที่ 3.9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับสับสเตรทความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น bendiocarb(mM)	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	ตัวอย่างที่ 4	ตัวอย่างที่ 5
0.02	48.24	48.05	52.85	54.83	33.78
0.24	89.28	90.08	91.13	92.18	91.64
1.20	95.81	94.30	93.48	97.29	91.74
2.40	96.30	97.60	93.65	96.74	90.80



รูปที่ 3.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า O.D กับ bendiocarb ความเข้มข้นต่าง ๆ

3.3.2 การทำ altered acetylchlorinesterase

ในการทดลองนี้ทำเพื่อหา % inhibition เนื่องจากสารประกอบออร์แกโนฟอสเฟต เป็น cholinesterase inhibiting insecticide จะจับกับเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเตอเรส และสกัดกั้นปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของอะซิติลคลอรีน ที่ตำแหน่ง post - synaptic junction การยับยั้งนี้ทำให้มีการคั่งของสารสื่อประสาทอะซิติลคลอรีน ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ acetylthiochlorine iodide เป็นสับสเตรท และใช้ bendiocarb เป็นตัวยับยั้ง ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นดังนี้คือ

$$\text{acetylthiochlorine} \xrightarrow{\text{AchE}} \text{thiochlorine} + \text{acetate}$$

$$\text{thiochlorine} + \text{DTNB} \longrightarrow \text{thionitrobenzoic acid}$$

สารเคมีฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเตอเรส ทำให้เกิด thiochlorine น้อยลง เมื่อทำปฏิกิริยากับ 5,5'-dithio-bis – 2 - nitrobenzoate (Ellman's reagent) ได้ผลิตภัณฑ์คือ 5-thio-nitrobenzoate ในสภาวะด่างอ่อน (pH 7.8) มีสีเหลือง ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm แอคติวิตี้ของเอนไซม์จะเป็นสัดส่วนกับผลิตภัณฑ์ ถ้าเอนไซม์นี้เปลี่ยนแปลงไป ก็จะลดความไวในการยับยั้งสารเคมีฆ่าแมลง (Hemingway et al., 1990) เนื่องจากการทดลอง altered acetylcholinesterase ในยุงทุกระยะนี้มีรูปแบบเหมือนกัน คือพบว่า % inhibition มากกว่า 80 % ขึ้นไปทุกระยะและทุกอายุ ทั้งเพศผู้และเพศเมียไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นยุงลาย *Ae.aegypti* ที่ทำการศึกษา ไม่มีกลไกการดื้อสารเคมีฆ่าแมลงแบบ altered acetylchlorinesterase เลย แสดงในตารางที่ 3.11

<u>ตารางที่ 3.11</u> สรุป % inhibition ของยุง *Ae. aegypti* ในระยะต่างๆทั้งสามสายพันธุ์

ระยะ	% inhibition (mean ± SD)		
	SddtSper	RddtSper	RddtRper
ลูกน้ำ	96.06 ±2.45^{a}	82.65± 8.49^{c}	87.25 ±3.69^{b}
ตัวโม่ง	89.90± 3.10*	88.23± 4.50*	88.67 ±5.78*
ยุงอายุ 1 วัน			
ตัวเมีย	87.78± 3.53^{a}	80.66 ±3.58^{c}	85.12± 4.53^{b}
ตัวผู้	91.48± 2.99^{a}	91.12 ±11.88^{a}	88.83± 3.75^{b}
ยุงอายุ 7 วัน			
ตัวเมีย	89.30± 4.53^{a}	81.67 ±2.19^{b}	80.36± 4.21^{b}
ตัวผู้	83.31 ±2.58^{b}	85.61± 4.76^{a}	80.29± 2.58^{c}
ยุงอายุ 14 วัน			
ตัวเมีย	82.50 ±6.03^{b}	82.74 ±3.50^{a}	87.48± 5.23^{c}
ตัวผู้	91.67± 5.23^{a}	81.39± 2.37^{c}	84.95± 2.84^{b}

^{a,b,c} ตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้ ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

* ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95%