

ผลของเมทิลพาราไธออนต่อค่าการทำงานของเอนไซม์ โคลีนเอสเทอเรสในกล้ามเนื้อหอยแครง

ญาณิน ลิมปานนท์ สุกัญญา พลิตกุล เกรียงยุทธ ทัพเจริญ
เจนนุช ว่องรัชชัย ปิยะรัตน์ ศุภชลัสต์

Abstract

Yanin limpanon Sukanya Phalitakul Griangyut Tapcharoen
Janenuj Wongtavatchai Piyarat Subhachalat

THE EFFECT OF METHYLPARATHION ON CHOLINESTERASE ACTIVITY IN COCKLE (*ANADARA GRANOSA L.*) MUSCLE TISSUES

The effect of methylparathion on cholinesterase activity in foot muscle tissues of cockle were evaluated. Ninety - five healthy cockle were randomly divided into control and experimental groups. The experimental group was exposed to 10 ppb of methylparathion for 90 hours. Measurements of cholinesterase activity revealed increasing enzyme activity in foot muscle ($p < 0.05$) in the exposed animals while clinical observations showed no differences between the groups. The results indicate that methylparathion affects the observed activity of cholinesterase in cockle. However, it should be noted that the data do not correlate with those of previous studies reported in other aquatic animal species.

Keywords : cholinesterase, cockle, methylparathion

Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Henri-Dunant Road, Pathumwon, Bangkok 10330

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนอังรีดูนังต์ ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

บทคัดย่อ

ญาณิน ลิมปานนท์ สุภัญญา ผลิตกุล เกรียงยุทธ ทัพเจริญ เจนนุช ว่องรัชชัย ปิยะรัตน์ สุขชลัสต์

ผลของเมททิลพาราไรซอนต่อค่าการทำงานของเอนไซม์โคลีเนสเทอเรสในกล้ามเนื้อหอยแครง

ศึกษาผลของเมททิลพาราไรซอนต่อค่าการทำงานของเอนไซม์โคลีเนสเทอเรสในกล้ามเนื้อหอยแครง แบ่งหอยแครงจำนวน 95 ตัวออกเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง โดยให้หอยแครงในกลุ่มทดลองสัมผัสกับเมททิลพาราไรซอนความเข้มข้น 10 พีพีบี เป็นเวลา 90 ชั่วโมง ผลการตรวจวัดค่าการทำงานของเอนไซม์โคลีเนสเทอเรสพบว่า หอยแครงในกลุ่มทดลองซึ่งสัมผัสกับเมททิลพาราไรซอนมีค่าการทำงานของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) และพบว่าหอยแครงที่สัมผัสเมททิลพาราไรซอนสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้โดยไม่แสดงอาการทางคลินิกที่ผิดปกติ ผลการศึกษาชี้ให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงค่าการทำงานของเอนไซม์โคลีเนสเทอเรสในกล้ามเนื้อหอยแครงเมื่อสัมผัสเมททิลพาราไรซอนซึ่งแตกต่างจากสัตว์น้ำชนิดอื่นที่ได้มีรายงานไว้

คำสำคัญ : โคลีเนสเทอเรส หอยแครง เมททิลพาราไรซอน

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม การใช้สารกำจัดศัตรูพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารฆ่าแมลงจึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อป้องกันผลผลิตจากความเสียหายที่อาจจะเกิดขึ้นจากแมลงศัตรูพืชชนิดต่างๆ อย่างไรก็ตามการใช้สารฆ่าแมลงอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมได้เมื่อมีการปนเปื้อนของสารดังกล่าวสู่ธรรมชาติ ปริมาณสารฆ่าแมลงที่มีการใช้ภายในประเทศมากที่สุดในปี พ.ศ. 2542 สามอันดับแรก ได้แก่ methamidophos monocrotophos และ methylparathion (ฝ่ายวัตถุมีพิษ กรมวิชาการเกษตร, 2542) ซึ่งสารทั้ง 3 ชนิดเป็นสารฆ่าแมลงที่จัดอยู่ในกลุ่ม organophosphate (OP) ที่มีความเป็นพิษสูง มีราคาไม่แพง และมีประสิทธิภาพดีในการกำจัดแมลง จึงเป็นที่นิยมอย่างกว้างขวางในงานเกษตรกรรม (ไพฑูริย์

และคณะ, 2538) สารฆ่าแมลงในกลุ่ม OP มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cholinesterase (ChE) ในสัตว์หลายชนิด ดังนั้น การลดลงของการทำงานของ ChE จึงเป็นสิ่งบ่งชี้ถึงการสัมผัสสารกลุ่ม OP การวัดค่าการทำงานของ ChE ที่ลดลงในปลาเป็นที่รู้จักกันดีว่าเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ของการปนเปื้อน OP ในแหล่งน้ำ (Halbrook et al., 1992) มีการศึกษาถึงค่าการทำงานของ ChE ในสัตว์น้ำหลายชนิด เช่น Ceron et al., (1996) ศึกษาผลของ diazinon ซึ่งเป็นสารฆ่าแมลงกลุ่ม OP ในปลาไหลยุโรป พบว่า diazinon มีผลทำให้ค่าการทำงานของ ChE ลดลง สภาวะ และ คณะ (2535) พบว่า methylparathion ทำให้ค่าการทำงานของ ChE ในเส้นประสาทและกล้ามเนื้อของกุ้งกุลาดำที่ได้สัมผัสสารดังกล่าวลดลง นอกจากการศึกษาในปลาและ

กึ่งแล้ว หอยสองฝาที่เป็นสัตว์น้ำอีกชนิดหนึ่งที่มีผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับ ChE เช่นการศึกษาของ Gilles et al., (1990) ในหอยแมลงภู่ (*Mytilus edulis*) และหอยนางรม (*Crassostrea gigas*) พบว่ามีค่าการทำงานของ ChE ใน adductor muscle และ mantle ดังนั้นถ้ามีการปนเปื้อนของสารฆ่าแมลงกลุ่ม OP ในน้ำก็น่าจะมีผลต่อการทำงานของ ChE ในหอยสองฝาได้เช่นเดียวกับในสัตว์น้ำชนิดอื่น

สัตว์น้ำจำพวกหอยสองฝาคตามธรรมชาติจะใช้ชีวิตอยู่กับที่หรือเคลื่อนที่เพียงเล็กน้อย เช่น หอยแมลงภู่ และหอยนางรม จะใช้ชีวิตโดยการยึดเกาะกับวัสดุใต้น้ำ หอยแครง (*Anadara granosa* L.) ใช้ชีวิตโดยการฝังตัวในโคลนบริเวณเขตน้ำตื้นขึ้นลงชายฝั่งทะเลใกล้กับป่าโกงกางชายเลน (Broom, 1985) เพราะลักษณะตามธรรมชาติของหอยสองฝาที่มีการเคลื่อนที่ต่ำและกินอาหารโดยผ่านน้ำเข้ามาทางเหงือก (filter feeder) จึงทำให้สัมผัสกับมลภาวะในน้ำหรือดินบริเวณนั้นๆ อยู่ตลอดเวลา แตกต่างจากสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ เช่น ปลา และ กุ้ง ซึ่งสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระและรวดเร็ว จึงใช้ชีวิตอยู่ในบริเวณที่กว้างโอกาสที่จะสัมผัสกับมลภาวะในบริเวณที่กำหนดก็ลดลงไป หอยสองฝาจึงเป็นสัตว์น้ำที่สามารถนำมาศึกษาถึงการปนเปื้อนของแหล่งน้ำบริเวณที่กำหนด

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ methylparathion ต่อค่าการทำงานของ ChE ในกล้ามเนื้อหอยแครง เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการใช้หอยแครงเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพถึงการปนเปื้อนของสารฆ่าแมลงกลุ่ม OP ในแหล่งน้ำ

วัสดุและวิธีการ

เก็บตัวอย่างหอยแครงอายุ 65 วันที่มีสุขภาพดีจำนวน 100 ตัวอย่างจากฟาร์มหอยแครงในจังหวัดสมุทรสาครมาทำการศึกษา โดยแบ่งหอยแครงออกเป็น 2 กลุ่ม เลี้ยงไว้บนตะแกรงพลาสติกในตู้กระจกขนาด 36 x 36 x 60 ซม. ที่บรรจุน้ำทะเลสะอาดมีความเค็ม 10 ppt มีค่า pH 8.5 หอยแครงกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่ให้สัมผัส methylparathion และหอยแครงกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มทดลองที่ให้สัมผัส methylparathion ที่มีความเข้มข้น 10 ppb สังเกตอาการของหอยแครงทั้ง 2 กลุ่มจนครบ 90 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อบริเวณเท้า (foot muscle) มาบดในฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 M pH 8 เตรียมตัวอย่างกล้ามเนื้อหอยแครงตามวิธีการของ ระเบิด และคณะ (2543) และวัดค่าการทำงานของ ChE ในกล้ามเนื้อหอยแครงโดยประยุกต์ใช้วิธีการของ Ellman et al., (1961) เปรียบเทียบความแตกต่างค่าการทำงานของ ChE ทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยใช้ Student's t test

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการทำงานของ ChE ในกล้ามเนื้อหอยแครง กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่สัมผัส methylparathion (unit = μ mole of substrate hydrolyzed/min/g of tissues)

ความเข้มข้นของ methylparathion (ppb)	จำนวนหอยแครง (ตัว)	ค่าการทำงานของ ChE (unit)	พิสัยค่าการทำงานของ ChE (unit)
0	45	1.28 \pm 0.43	0.64 - 2.40
10	50	1.79 \pm 0.91*	0.88 - 2.19

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลการทดลอง

หอยแครงทุกตัวในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่สัมผัส methylparathion ไม่แสดงอาการผิดปกติทางคลินิกตลอดการทดลอง แต่เมื่อวัดค่าการทำงานของ ChE ในกล้ามเนื้อหอยแครงพบว่า ค่าการทำงานของ ChE ในกล้ามเนื้อหอยแครงกลุ่มทดลองที่สัมผัสกับ methylparathion ขนาด 10 ppb เป็นเวลา 90 ชั่วโมง มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 1

วิจารณ์

สารฆ่าแมลงในกลุ่ม OP มีผลยับยั้งการทำงานของ esterase enzyme ซึ่งรวมทั้ง acetylcholinesterase (AChE) และ pseudocholinesterase (PChE) AChE มีความสำคัญต่อการควบคุมการทำงานของระบบประสาทในสิ่งมีชีวิต คือ เป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยน acetylcholine ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทในระบบประสาท ไปเป็น choline และ acetate เพื่อไม่ให้ปลายประสาทถูกกระตุ้นโดย acetylcholine มากเกินไป (cholinergic overload) (Corbett et al., 1986) PChE เป็น non-specific esterase enzyme ซึ่งทำหน้าที่ hydrolyze พันธะ ester (ester bond) ในสารต่างๆ การตรวจวัดค่าการทำงานของ esterase enzyme มีรายงานไว้ในสัตว์หลายชนิด เช่น แมลง สัตว์บก และสัตว์น้ำ (Clarke, 1981) Gilles et al., (1990) ศึกษาการทำงานของ ChE ทั้ง AChE และ PChE โดยใช้ substrate ที่จำเพาะต่อเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ในสัตว์น้ำจำพวก ปลา กุ้ง และหอย พบว่าโดยส่วนใหญ่แล้วจะพบการทำงานของ AChE มากกว่า PChE ในเนื้อเยื่อเกือบทุกชนิดที่นำมาทดสอบ ระเบิด และคณะ (2543) รายงานการตรวจวัดค่าการทำงานของ ChE ในกล้ามเนื้อเท้าของหอยแครงอายุระหว่าง 150-180 วันจากแหล่งเลี้ยงในจังหวัดสมุทรสาคร โดยประยุกต์วิธีการของ Ellman et al., (1961) พบว่ามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.49 ± 1.55 unit

การศึกษาครั้งนี้พบว่าการทำงานของ ChE ในกล้ามเนื้อหอยแครงกลุ่มที่ได้สัมผัส methylparathion ที่เข้มข้น 10 ppb นาน 90 ชั่วโมง มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสสาร ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Wongtavatchai et al., (2000) ที่รายงานการลดลงของค่าการทำงานของ ChE ในกล้ามเนื้อกึ่งกลางที่สัมผัส methylparathion ในระดับความเข้มข้น 3 ppb เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง การที่ methylparathion ในระดับ 10 ppb 90 ชั่วโมง ไม่มีผลทำให้ค่าการทำงานของ ChE ในหอยแครงลดลง อาจอธิบายโดยผลการศึกษาของ Mohan et al., (1987) ซึ่งกล่าวว่า การที่หอยสองฝาชนิด Lamarck ไม่มีความไวต่อสารฆ่าแมลงกลุ่ม OP อาจเนื่องมาจากความสามารถในการปรับเมตาบอลิซึม ทำให้ methylparathion ถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็น methylparaoxon น้อยลง หรืออาจเป็นไปได้ว่า หอยแครงมีความทนทานต่อสารฆ่าแมลงกลุ่ม OP ในระดับต่ำ (10 ppb) สามารถสร้าง ChE ขึ้นมาทดแทนส่วนที่มีการสูญเสียไปในการ detoxify สารฆ่าแมลงซึ่งมีพันธะเอสเทอร์เป็นส่วนประกอบ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Day and Scott (1990) ที่พบว่าค่าการทำงานของ AChE ในแมลง amphipod (*Hyalella azteca*) มีค่าเพิ่มขึ้นหลังจากสัมผัสกับสารฆ่าแมลงในกลุ่ม OP ชนิด azinphosmethyl ที่ระดับความเข้มข้น 2 ppb ระยะเวลา 96 ชั่วโมง มีการแนะนำให้ใช้ dichlorvos ซึ่งเป็นสารฆ่าแมลงในกลุ่ม OP ในการกำจัดปรสิต copepod ในหอยแมลงภู่ที่ระดับความเข้มข้น 30 ppm เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง (Blateau et al., 1992) ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่สูงมากเมื่อเทียบกับ LC_{50} ของ dichlorvos ในหอยแมลงภู่ที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งเท่ากับ 8.2 ppm (McHenery et al., 1996) แสดงให้เห็นว่าหอยสองฝามีความทนทานต่อสารกลุ่ม OP

ผลการศึกษาครั้งนี้กล่าวได้ว่าการปนเปื้อนของสารฆ่าแมลง methylparathion ในน้ำทำให้เกิดการเปลี่ยน

แปลงค่าการทำงานของ ChE ในกล้ามเนื้อหอยแครงที่สัมผัสกับแหล่งน้ำนั้น แม้ว่าผลการศึกษายังแตกต่างจากที่มีรายงานไว้ในสัตว์ชนิดอื่นแต่เนื่องจากลักษณะทางชีวภาพของหอยแครงมีศักยภาพต่อการนำมาศึกษาสภาพมลภาวะทางน้ำของประเทศไทย ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจศึกษาต่อไปถึงการเปลี่ยนแปลงค่าการทำงานของเอนไซม์นี้ในหอยแครงเมื่อให้สัมผัสสารฆ่าแมลงกลุ่ม OP ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อนำมาประกอบการพิจารณานำหอยแครงมาเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของการปนเปื้อนสารฆ่าแมลงในแหล่งน้ำ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ โครงการเสริมทักษะการวิจัย ปีการศึกษา 2543 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนสนับสนุน ผศ. อัจฉรา รัชสิน ที่ช่วยวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ และรศ. ดร. นิคม ชัยศิริ ที่ให้ข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์

เอกสารอ้างอิง

ฝ่ายวัดภูมิพิษ กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 1999 (2542). ข้อมูลการนำเข้าวัตถุอันตรายประจำปี 2542, 19 หน้า.

ไพฑูริย์ พิศุทธิ์สินธุ์ บุญส่ง หุตังคบดี นิคม รัตนพงศ์ และประยูร ศรีเจริญ. 1995 (2538). การนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืช พ.ศ. 2538. ฝ่ายวัดภูมิพิษ กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร : 12-15.

ระบิล รัตนพานี ปิยะรัตน์ สุขขลัสถ์ และ เจนนุช ว่องรัชชัย. 2000 (2543). สมรรถนะของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสในกล้ามเนื้อหอยแครง. ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ครั้งที่ 26, กรุงเทพมหานคร, 15-17 พฤศจิกายน : 434-441.

สถาพร สุวรรณรักษ์ สุพัตรา ศรีไชยรัตน์ และจิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. 1992 (2535). พืชเทียบปล้นของเมททิลพาราไรธอนในกุ้งกุลาดำ. เวชสารสัตวแพทย์ 22(4): 189 - 201.

Blateau, D., Coguic, Y., Le. Mialhe, E. and Grizel, H. 1992. Mussel (*Mytilus edulis*) treatment against the red copepod *Mytilicola intestinalis*. *Aquaculture* 107: 2-3

Broom, M.J. 1985. General biology and ecology. The biological and culture of marine bivalve molluscs of the genus *Anadara*. The international center for living aquatic resources management. Manila, 4.

Ceron, J.J., Ferrando, M.D., Sancho, E., Gutierrez-Panizo, C. and Andreu-Moliner, E. 1996. Effects of diazinon exposure on cholinesterase activity in different tissues of European eel (*Anguilla anguilla*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35: 222-225.

Clarke, M. L. 1981. Organic compounds : II. Pesticide. In : *Veterinary Toxicology*. 2 ed. London: Bailliere tindall. 147-152.

Corbett, J.R., Wright, K. and Baillie, A.C. 1986. Insecticides inhibiting acetylcholinesterase. In : *The biochemical mode of action of pesticides*. 2 ed. London: Academic Press. 99-101.

Day, K.K. and Scott, I.M. 1990. Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. *Aquatic Toxicol.* 18: 101-114.

- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. and Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.
- Gilles, B., Francois, G. and Philippe, T. 1990. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in polluting monitoring. *Marine Environ. Res.* 12: 75-89.
- Halbrook, R.S., Shugart, L.R., Watson, A.P., Munro, N.B. and Linnabary, R.D. 1992. Characterizing biological variability in livestock blood cholinesterase activity for biomonitoring organophosphate nerve agent exposure. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 201: 714-725.
- McHenery, J.G., Linley-Adame, G.E., Moore, D.C., Rodger, G.K. and David, I.M. 1997. Experimental and field studies of effects of dichlorvos exposure on acetylcholinesterase activity in the gills of the mussel (*Mytilus edulis L.*). *Aquatic Toxicol.* 38: 125-143.
- Mohan, P.K., Reddy, L.V., Shankara, C.R. and Indira, K. 1987. Metabolic consequences of methylparathion exposure in the bivalve *Lamellidens marginalis* (Lamarck). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 38(3): 509-541.
- Wongtavatchai, J., Subhachalat, P., Panichkriangkrai, W. and Tangtrongpiros, J. 2000. Acetylcholinesterase activity as a biomarker for organophosphorus pesticides contamination in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Proceedings of the Regional Conference on Consumer Safety and Residues in Animal Products.* Chiangmai, July 26-28: 118-122.