กิจกรรมของซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสในวงจรการลอกคราบของปูทะเล

Superoxide dismutase activities during the molting cycle of mud crab

รพีพร ฤกษพุฒิ[1] และ จินตนา สแลน้อย[1*]

Rapeeporn Reaksputi[1] and Jintana Salaenoi[1*]

บทคัดย่อ: การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสในปูทะเล จำนวน 12 ระยะ (ระยะปูปกติ ระยะก่อนลอกคราบ 3 ระยะ และระยะหลังลอกคราบ 8 ระยะ) ตลอดวงจรการลอกคราบ พบว่า กิจกรรมของซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส ในเฮพาโตแพนเครียส เหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง และฮีโมลิมป์ มีค่าอยู่ในช่วง 5.25 ± 1.46 ถึง 52.56 ± 17.05, 8.67 ± 1.33 ถึง 29.52 ± 9.53, 2.48 ± 0.49 ถึง 14.14 ± 7.25 และ 0.53 ± 0.16 ถึง 1.20 ± 0.37 ยูนิต/ มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ โดยค่ากิจกรรมสูงสุดพบในเฮพาโตแพนเครียส และเนื้อเยื่อใต้กระดองของปูระยะกระดองแข็งปกติ ในขณะที่กิจกรรมที่พบในฮีโมลิมป์ และเหงือกมีค่าสูงสุดในระยะหลังลอกคราบ 6 และ 12 ชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนที่ได้จากเมทาบอลิซึมและขบวนการหายใจ ผลงานวิจัยแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของกิจกรรมของเอนไซม์ที่ส่งผลต่อเมทาบอลิซึม และระบบภูมิคุ้มกันของปูทะเลในระยะต่างๆ ตลอดวงจรการลอกคราบ

คำสำคัญ: ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส, การลอกคราบ, ปูทะเล

ABSTRACT: The observation focuses on superoxide dismutase activities in mud crabs throughout the 12 stages (normal stage, three stages of premolt, and eight stages of postmolt) of the molting cycle. The results showed that superoxide dismutase activities in the hepatopancreas, gill, integument and haemolymp ranged from 5.25 ± 1.46 to 52.56 ± 17.05, 8.67 ± 1.33 to 29.52 ± 9.53, 2.48 ± 0.49 to 14.14 ± 7.25, and 0.53 ± 0.16 to 1.20 ± 0.37 units per mg protein^{-1}, respectively. The highest activities were observed in the hepatopancreas and integument during intermolt, while the activities in the haemolymph and gill were at the highest level at 6 and 24 hours postmolt, respectively. Superoxide dismutase is responsible for the eradication of superoxide anions released from metabolic processes and respiratory burst. This research demonstrated the relationship between the enzyme activities affecting metabolism, and the immune system of mud crabs throughout the 12 stages of the molting cycle.
Keywords: Superoxide dismutase, Molting, Mud crab

บทนำ

ปูทะเลจัดเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญในทางเศรษฐกิจ และนับเป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้ดี และเป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั้งภายในและภายนอกประเทศ เนื่องจากการเจริญเติบโตของปูต้องอาศัยการลอกคราบ เพราะกระดองของปูเป็นสารประกอบพวกหินปูนที่มีความแข็งมาก จึงไม่สามารถขยายเพิ่มขนาดตัวออกไปได้ ดังนั้นปูจะมีขนาดใหญ่ขึ้นได้ก็ต่อเมื่อได้สลัดเปลือกเก่าทิ้งและสร้างเปลือกใหม่ ปัจจุบัน

[1] ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900
Department of Marine Science, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok 10900

* Corresponding author: ffisjid@ku.ac.th

การเลี้ยงปูนิยมเลี้ยงในกล่องลอยน้ำเพื่อความสะดวกในการเก็บผลผลิตและป้องกันการกินกันเอง สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมภายในบ่อ เช่น สารอินทรีย์ที่สะสมอยู่ก้นบ่อ จุลชีพและวิธีการเลี้ยง นับเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นภายในเซลล์ ถ้ามีอนุมูลอิสระเป็นจำนวนมากอาจส่งผลให้เซลล์ตกอยู่ในสภาวะเครียด ซึ่งจะส่งผลกระทบโดยตรงต่อการลอกคราบและอาการผิดปกติในปู อย่างไรก็ตามปูมีวิธีการรักษาสมดุลของอนุมูลอิสระ ทำให้สามารถมีชีวิตรอดและดำรงชีวิตต่อไปได้

เนื่องจากปูมีระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดเพียงอย่างเดียว กลไกการป้องกันตัวที่มีประสิทธิภาพของปูคือ ระบบหมุนเวียนเลือด ซึ่งประกอบไปด้วยเซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย (Smith and Söderhäll, 1986 อ้างถึง Bauchau, 1981) อนุมูลอิสระมีทั้งที่เกิดจากสภาพแวดล้อมภายนอก เช่น รังสี สารเคมี และยา และอนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการภายในร่างกาย เช่น การหายใจ การต่อต้านเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกาย เป็นต้น ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้จะส่งผลเสียหายต่อองค์ประกอบภายในเซลล์และนำไปสู่การเกิดโรคได้ แต่ร่างกายมีกลไกการควบคุมอนุมูลอิสระให้อยู่ในสภาวะสมดุลโดยอาศัยเอนไซม์บางชนิด เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) (Fridovich, 1995)

ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสจัดเป็น antioxidative enzyme ที่ทำหน้าที่ในการกำจัดหรือต้านอนุมูลอิสระ (free radical) อันได้แก่ superoxide anion (O_2^-) ซึ่งเป็นอนุมูลเริ่มแรกที่เกิดขึ้นจากเมทาโบลิซึมของเซลล์ที่มีการใช้ออกซิเจน และจากกระบวนการ respiratory burst ที่เกิดระหว่างการกำจัดสิ่งแปลกปลอมแบบ phagocytosis หรือ encapsulation ของเซลล์เม็ดเลือด (**Figure 1**) (Holmblad and Söderhäll, 1999) โดย peroxinectin จะทำหน้าที่ส่งเสริมการกำจัดสิ่งแปลกปลอม ซึ่งเอนไซม์ NADPH oxidase จะเปลี่ยนโมเลกุลของ oxygen (O_2) เป็น superoxide anion จากนั้นซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสจะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน superoxide anion เพื่อให้เปลี่ยนไปเป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) โดย peroxinectin ซึ่งเป็นโปรตีนที่ช่วยส่งเสริมกระบวนการ phagocytosis จะเปลี่ยน hydrogen peroxide ให้อยู่ในรูปของ hypochlorous acid (HOCl) เพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอม

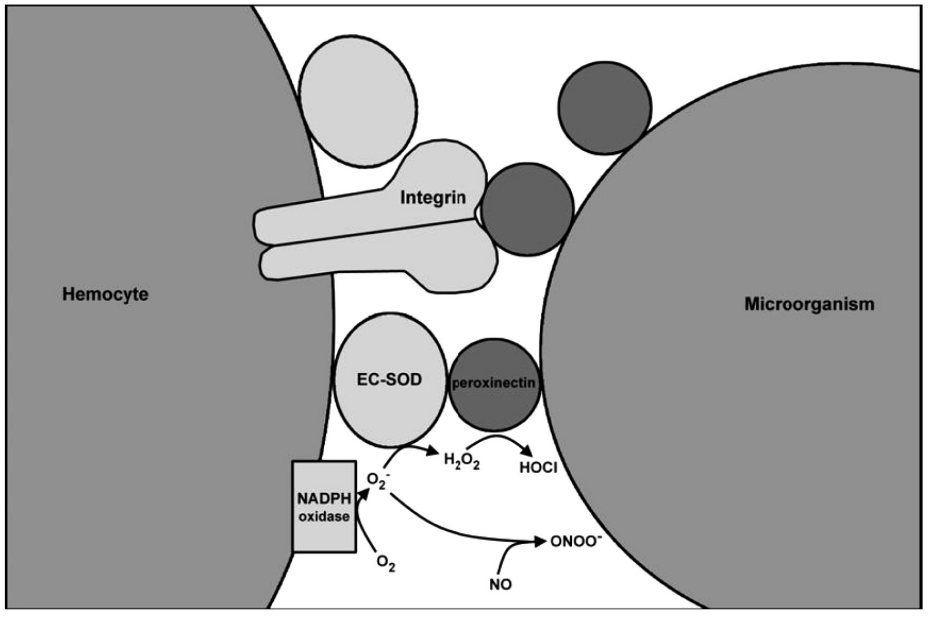

Figure 1 Function of superoxide dismutase during defend mechanism of blood cells (Holmblad and Söderhäll, 1999)

กลไกการทำงานของเอนไซม์ในการกำจัดอนุมูลอิสระนั้น จะมีความสัมพันธ์กันเป็นห่วงโซ่ โดยซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสจะทำหน้าที่เร่งปฏิกริยาระหว่าง superoxide anion กับน้ำ ให้เปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) และ oxygen (O_2) จากนั้น hydrogen peroxide จะถูกกำจัดต่อโดยเอนไซม์ catalase และ peroxidase ดังสมการ

Superoxide dismutase: $2O_2^- + 2H^- \longrightarrow H_2O_2 + O_2$

Catalase: $2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$

Peroxidase: $H_2O_2 + AH_2 \longrightarrow 2H_2O + A$

ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส จะถูกแบ่งกลุ่มตามชนิดโลหะที่อยู่บริเวณแอคทีฟ (active site) เป็น 3 กลุ่ม คือ manganese superoxide dismutase (MnSOD) พบใน mitochondria, iron superoxide dismutase (FeSOD) พบในแบคทีเรีย และ copper/zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) พบใน eukaryote โดย CuZnSOD ถูกแบ่งเป็น extracellular และ cytosolic SOD (Holmblad and Söderhäll, 1999) นอกจากนี้ มีการรายงานว่า เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสเมื่อทำหน้าที่ร่วมกับรงควัตถุบางชนิด สามารถลดการเกิดมะเร็ง ลดการอักเสบ และเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระด้วย (Shingu et al., 1994; Aggarwal et al., 2006) ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล ทั้งนี้เพื่อใช้องค์ความรู้นี้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบในการอธิบายหน้าที่ของกิจกรรมของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันและสรีรวิทยาในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียต่อไป

วิธีการศึกษา

การเก็บตัวอย่างปูทะเล

เก็บตัวอย่างปูทะเลจากฟาร์มปูนิ่ม อ.ขลุง จ.จันทบุรี ที่มีขนาดความกว้างของกระดองประมาณ 6.5-9.5 เซนติเมตร นำปูที่ได้มาพักในตู้เลี้ยง ซึ่งเป็นระบบปิดมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำสัปดาห์ละ 2 ครั้ง อาหารที่เลี้ยงปู ได้แก่ เนื้อปลาสับ และให้อาหารปริมาณที่มากเกินพอทุกๆ 2 วัน จากนั้นรอจนกระทั่งปูเข้าสู่ระยะที่ต้องการศึกษาจำนวน 12 ระยะ ได้แก่ ระยะปูปกติ (C) ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D1) ระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D2) ระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D3) ระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A1) ระยะหลังลอกคราบ 12 ชั่วโมง (A2.1) ระยะหลังลอกคราบ 24 ชั่วโมง (A2.2) ระยะหลังลอกคราบ 2 วัน (B1) ระยะหลังลอกคราบ 3 วัน (B2.1) ระยะหลังลอกคราบ 5 วัน (B2.2) ระยะหลังลอกคราบ 7 วัน (B2.3) และระยะหลังลอกคราบ 10 วัน (B2.4) โดยเก็บตัวอย่างปูระยะละ 3 ซ้ำๆ ละ 3 ตัว แล้วนำตัวอย่างไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส

การศึกษากิจกรรมเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส

1. การเตรียมสารสกัดหยาบ

หลังจากทำความสะอาดปูด้วยผ้าชุบน้ำสะอาด แล้วจึงเตรียมตัวอย่างฮีโมลิมป์และเนื้อเยื่อจากปู โดยใช้เอธานอล 70% ทำความสะอาดบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 4 และ 5 จากนั้นใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 21 เจาะฮีโมลิมป์บริเวณโคนขาเดิน นำเก็บในหลอดพลาสติกที่มี 10% trisodium citrate บรรจุอยู่ (อัตราส่วนระหว่าง 10% trisodium citrate : ฮีโมลิมป์ เท่ากับ 1:5) จากนั้นนำปูไปแช่ในน้ำเย็นจัดเพื่อทำให้ปูสลบ แล้วใช้กรรไกรตัดเปิดขอบกระดอง (carapace) โดยรอบ แล้วใช้ปากคีบดึงเนื้อเยื่อใต้กระดอง (integument) และเฮพาโตแพนเครียส (hepatopancreas) ส่วนเหงือก (gill) ให้ใช้กรรไกรตัดบริเวณโคนเหงือกแล้วนำเหงือกรวมถึงเนื้อเยื่ออื่นที่ถูกตัดไปบดในโกร่งที่เติม liquid nitrogen และ 1 M Tris-HCl, pH 8 ที่เย็นจัด เพื่อช่วยรักษาสภาพเนื้อเยื่อ จากนั้นนำฮีโมลิมป์และเนื้อเยื่อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 xg อุณหภูมิ 4 °C นาน 20 นาที แล้วจึงเก็บเฉพาะส่วนใส เพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ต่อไป

2. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส

วิเคราะห์กิจกรรมของซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสตามวิธีการของ Marklund and Marklund (1974) โดย

นำส่วนผสมของปฏิกิริยา 2 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 97.5 mM Tris-HCl pH 7, 0.4 mM pyrogallol และสารสกัดหยาบ 100 ไมโครลิตร นำส่วนผสมของปฏิกิริยาบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 5 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 325 นาโนเมตร คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) โดย 1 ยูนิต คือ ความสามารถของเอนไซม์ในการยับยั้งกระบวนการออกซิเดชั่นที่เพิ่มขึ้น 0.01 หน่วย ในเวลา 1 นาที ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารสกัดหยาบดำเนินตามวิธีของ Bradford (1976)

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

เปรียบเทียบกิจกรรมของซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสกับระยะต่างๆ ตลอดวงจรการลอกคราบ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design; CRD) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Least Significant Difference โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติสำเร็จรูป (SPSS)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากการศึกษากิจกรรมของซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสในเฮพาโตแพนเครียส เหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง และฮีโมลิมป์ของปูทะเล จำนวน 12 ระยะตลอดวงจรการลอกคราบ พบว่า กิจกรรมของซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสในเฮพาโตแพนเครียสมีค่าอยู่ในช่วง 5.25±1.46 ถึง 52.56±17.05 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน (Table 1) โดยในปูระยะกระดองแข็งปกติ (C) มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 52.56±17.05 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งเมื่อปูเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D1) พบว่า ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสมีค่าลดลงอย่างรวดเร็ว (16.84±8.92 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) ผ่านระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D2) (10.79±2.35 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) และระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D3) (11.08±3.33 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) แต่เมื่อเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A1) พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าสูงขึ้นเป็น 16.56±8.14 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์ลดลงและมีค่าคงที่ตั้งแต่ระยะหลังลอกคราบ 12 ชั่วโมง (A2.1) ถึงระยะหลังลอกคราบ 10 วัน (B2.4)

กิจกรรมของซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสในเหงือกพบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 8.67±1.33 ถึง 29.52±9.53 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน (Table 1) โดยซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสของปูกระดองแข็งปกติ (C) มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 10.92±2.72 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน และมีค่าคงที่จนถึงระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D2) (10.16±1.99 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) แต่กิจกรรมเอนไซม์เริ่มเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D3) (14.53±5.36 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) ผ่านระยะหลังลอกคราบ 24 ชั่วโมง (A2.2) ซึ่งมีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 29.52±9.53 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน หลังจากนั้นกิจกรรมของซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสจะลดลง และมีค่าค่อนข้างคงที่เมื่อพ้นระยะหลังลอกคราบ 2 วัน (B1)

กิจกรรมของซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสในเนื้อเยื่อใต้กระดองมีค่าอยู่ในช่วง 2.48±0.49 ถึง 14.14±7.25 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน (Table 1) ซึ่งในระยะกระดองแข็งปกติ (C) มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 14.14±7.25 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D1) ถึงระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D2) พบว่า กิจกรรมของซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสมีค่าเท่ากับ 4.85±1.94 และ 3.47±1.88 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ แต่กิจกรรมเอนไซม์เริ่มเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D3) (7.48±1.19 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) จนผ่านเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A1) (6.95±1.94 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) ระยะหลังลอกคราบ 12 ชั่วโมง (A2.1) (6.85±1.96 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) จนถึงระยะหลังลอกคราบ 24 ชั่วโมง (A2.2) (9.60±1.86 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์ค่อนข้างแปรปรวนในระยะหลังลอกคราบ 2 วัน (B1) ถึง ระยะหลังลอกคราบ 10 วัน (B2.4) ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 2.48±0.49 ถึง 9.25±2.97 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน

Table 1 Superoxide dismutase specific activities over the molting cycle of mud crab.

Stage	Superoxide dismutase specific activities (units mg protein^{-1})			
	Hepatopancreas	gill	integument	haemolymph
Intermolt (C)	52.56^{a} ±17.05	10.92^{b} ±2.72	14.14^{a} ±7.25	0.53^{b} ±0.16
2 weeks before molting (D1)	16.84^{b} ±8.92	10.08^{b} ±3.70	4.85^{c} ±1.94	0.55^{b} ±0.09
1 week before molting (D2)	10.79^{b} ±2.35	10.16^{b} ±1.99	3.47^{c} ±1.88	0.66^{b} ±0.07
2 days before molting (D3)	11.08^{b} ±3.33	14.53^{b} ±5.36	7.48^{b} ±1.19	0.53^{b} ±0.13
6 h after molting (A1)	16.56^{b} ±8.14	18.80^{b} ±3.98	6.95^{b} ±1.94	1.07^{a} ±0.07
12 h after molting (A2)	9.08^{b} ±2.33	16.46^{b} ±4.05	6.85^{b} ±1.96	0.74^{b} ±0.21
24 h after molting (A2.2)	7.75^{b} ±4.55	29.52^{a} ±9.53	9.60^{b} ±1.86	0.63^{b} ±0.04
2 days after molting (B1)	8.11^{b} ±3.38	8.67^{c} ±1.33	2.48^{c} ±0.49	0.57^{b} ±0.10
3 days after molting (B2.1)	11.51^{b} ±0.43	20.19^{b}±5.03	9.25^{b} ±2.97	0.65^{b} ±0.12
5 days after molting (B2.2)	5.25^{c} ±1.46	12.08^{b} ±1.06	4.73^{c} ±0.95	1.17^{a} ±0.16
7 days after molting (B2.3)	15.38^{b} ±3.06	14.27^{b} ±1.67	8.85^{b} ±1.56	1.20^{a} ±0.37
10 days after molting (B2.4)	13.25^{b} ±0.64	12.80 ^{b}±2.05	7.96^{b} ±2.71	0.58^{b} ±0.05

Note: Variation of alphabets in the same column showed the significant differences (P<0.05) of the activities

กิจกรรมของซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสในฮีโมลิมป์มีค่าอยู่ในช่วง 0.53±0.16 ถึง 1.20±0.37 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ในปูกระดองแข็งปกติ (C) มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 0.53±0.16 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน โดยกิจกรรมมีค่าคงที่ตั้งแต่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D1) (0.55±0.09 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) ผ่านระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D2) (0.66±0.07 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) ถึงระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D3) (0.53±0.13 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) แต่เมื่อปูพัฒนาเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A1) พบว่า กิจกรรมเพิ่มสูงขึ้นเป็น 1.07±0.ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน หลังจากนั้นกิจกรรมจะลดลงและมีค่าคงที่ตั้งแต่ระยะหลังลอกคราบ 12 ชั่วโมง (A2.1) ถึงระยะหลังลอกคราบ 3 วัน (B2.1) ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.57±0.10 ถึง 0.74±0.21 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน กิจกรรมจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งเมื่อเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ 5 วัน (B2.2) และระยะหลังลอกคราบ 7 วัน (B2.3)

เลือดเป็นแหล่งของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส ชนิด extracellular CuZnSOD (ecCuZnSOD) เพียงชนิดเดียว (Brouwer et al., 2003) เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสในฮีโมลิมป์ พบว่า กิจกรรมมีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดวงจรการลอกคราบ แต่กิจกรรมมีค่าต่ำกว่ากิจกรรมในอวัยวะอื่นๆ โดยเมื่อปูเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A1) ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสในฮีโมลิมป์มีค่ากิจกรรมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ซึ่งอาจเป็นเพราะร่างกายปูเกิดกระบวนการ phagocytosis เพื่อป้องกันตัวจากจุลชีพในขณะที่ปูลอกคราบ โดย phagocytosis ที่เกิดจากเซลล์เม็ดเลือดชนิด hyaline cell จะก่อให้เกิดอนุมูลจากขั้นตอนการ respiratory burst โดยสิ่งแปลกปลอมจะกระตุ้นให้เกิดปฏิกริยา reduction ใน oxygen consumption โดยมี NADPH-oxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่บน membrane ของเม็ดเลือดเป็นตัวเร่งปฏิกริยาทำให้เกิด superoxide anion, hydrogen peroxide

(H_2O_2), singlet oxygen ($^1O_2$), hydroxyl radical (.OH) เพิ่มขึ้น (Bachère et al., 1995) โดย ecSOD ที่ถูกผลิตจากเม็ดเลือดและอยู่บริเวณผิวเซลล์ (Brouwer et al., 2003) จะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน superoxide anionให้เป็น hydrogen peroxide โดย ecSOD จับอยู่กับ peroxinectin ซึ่ง peroxinectin จะเปลี่ยน hydrogen peroxide ให้เป็นสารประกอบที่เป็นพิษ เช่น hypochlorus acid เพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอมต่อไป

Brouwer et al. (2003) รายงานถึงการพบซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส 3 ชนิดในเฮพาโตแพนเครียสของปูชนิด *Callinectes sapidus* คือ mtMnSOD, cytMnSOD และ ecCuZnSOD โดย mtMnSOD พบทุกระยะของวงจรการลอกคราบ ส่วนเอนไซม์ชนิด cytMnSOD พบว่า มีค่ากิจกรรมสูงในระยะกระดองแข็งปกติ ในขณะที่ ecCuZnSOD พบในระยะก่อนและหลังลอกคราบ และพบว่ากิจกรรมของซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส ที่พบใน เฮพาโตแพนเครียสของปูที่อยู่ระยะกระดองแข็งปกติจะมีค่ามากกว่าในปูที่เข้าสู่ระยะปูกระดาษ (papershell crab) สอดคล้องกับผลการศึกษาที่พบว่า รูปแบบกิจกรรมซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสในเฮพาโตแพนเครียสปูทะเลในระยะปกติที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด ($P<0.05$) แต่ในระยะอื่นๆ มีค่ากิจกรรมค่อนข้างคงที่ทั้งวงจรการลอกคราบ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเฮพาโตแพนเครียสน่าจะทำหน้าที่ผลิตซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสบางชนิด ซึ่งคล้ายกับในกุ้งก้ามกราม *(Macrobrachium rosenbergii)* ที่เฮพาโตแพนเครียสเป็นอวัยวะที่ใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์ชนิด CuZnSOD (Cheng et al., 2006) ทั้งนี้กิจกรรมของซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสที่เพิ่มขึ้นในเฮพาโตแพนเครียสน่าจะเป็นผลมาจากการที่ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสช่วยลดความเป็นพิษของออกซิเจน (Tainer et al., 1982) ที่เกิดจากเมทาโบลิซึมในร่างกายสัตว์ เนื่องจากเฮพาโตแพนเครียสเป็นอวัยวะที่สะสมอินทรียสารและแร่ธาตุหลายชนิด เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรอง (Chang, 1995)

สำหรับซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสที่พบในเหงือกมีกิจกรรมค่อนข้างคงที่ตลอดวงจร ยกเว้นในระยะหลังลอกคราบ 24 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าสูงกว่าระยะอื่นๆ ($P<0.05$) อาจเนื่องมาจากซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสในเหงือกแสดงบทบาทในการทำลาย O_2^- ในระหว่างกระบวนการหายใจ ทั้งนี้เหงือกเป็นอวัยวะที่ใช้ในการขนส่งออกซิเจน โดยทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยวิธีการแพร่ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Mangum et al. (1985) ที่พบว่า ความดันออกซิเจน (blood PO_2) ในเหงือกเพิ่มขึ้นในระยะก่อนลอกคราบ และมีค่าต่ำสุดเมื่อปูกำลังลอกคราบ แต่จะมีค่าสูงสุดในระยะหลังลอกคราบ นอกจากนี้ในเนื้อเยื่อของเหงือกที่มีแบคทีเรียอยู่ส่งผลให้เกิดการ phagocytosis ของ hyalinocyte เพิ่มขึ้น (Hauton et al., 1997)

ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสที่พบในเนื้อเยื่อใต้กระดองมีกิจกรรมในระยะก่อนและหลังลอกคราบต่ำกว่าในระยะปกติ แต่อย่างไรก็ตาม แนวโน้มของกิจกรรมมีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ ถึงระยะหลังลอกคราบ 24 ชั่วโมง อย่างเห็นได้ชัดเจน ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาของ Mangum et al. (1985) และ Skinner (1962) ที่อธิบายว่า ปริมาณออกซิเจนของเนื้อเยื่อใต้กระดองในชั้นเอพิเดอมิสของปูจะเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะก่อนลอกคราบจนถึงระยะหลังลอกคราบใหม่ๆ ซึ่งมีปริมาณการใช้ออกซิเจนสูงกว่าปูปกติ โดยปริมาณออกซิเจนที่เพิ่มขึ้นเกิดจากกิจกรรมเมตาบอลิสม (metabolic activity) ในช่วงสร้างกระดองใหม่ (Mangum et al. (1985) พบว่า มีการสร้างไกลโคเจนในเนื้อเยื่อใต้กระดองเพิ่มขึ้นในช่วงก่อนการลอกคราบ เนื่องจากปูเกิดการย่อยและดึงกลับสารอินทรีย์จากกระดองเก่าเพื่อสร้างกระดองใหม่ขึ้นมาแทน โดยมีฮีโมลิมป์เป็นแหล่งของกลูโคส (Skinner, 1962)

สรุป

จากผลการศึกษาพบว่า กิจกรรมเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสในเฮพาโตแพนเครียสมีค่ากิจกรรมค่อนข้างคงที่ตลอดวงจรการลอกคราบ ยกเว้นในระยะปูกระดองแข็งปกติที่มีค่าสูงมากอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่กิจกรรมในเหงือกมีค่าค่อนข้างสูงตลอดวงจรการลอกคราบ แต่กิจกรรมของซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสในเนื้อเยื่อใต้กระดองพบว่า มีค่ากิจกรรมค่อนข้างแปรปรวนตลอดวงจรการลอกคราบ ในขณะที่รูปแบบกิจกรรมซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสของฮีโมลิมป์ในระยะก่อนลอกคราบ พบว่า มีรูปแบบค่อนข้างคงที่และมีค่าน้อยกว่าระยะหลังลอกคราบ โดยเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดจากเมทาโบลิซึม และกระบวนการหายใจในระหว่างการทำลายจุลชีพแบบ phagocytosis ของเซลล์เม็ดเลือดปู ซึ่งผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและระบบภูมิคุ้มกันของปูทะเลตลอดวงจรการลอกคราบได้

เอกสารอ้างอิง

Aggarwal, S., M. Subberwal, S. Kumar, and M. Sharma. 2006. Brain tumor and role of β-carotene, α-tocopherol, superoxide dismutase and glutathione peroxidase. J. Can. Res. Ther. 2: 24-27.

Bachere, E., E. Mialhe, and J. Rodriguez. 1995. Identification of defense effectors in the haemolymph of crustaceans with particular reference to the shrimp Penaeus japonicus (bate) prospects and applications. Fish Shellfish Immunol. 5: 597-612.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

Brouwer, R., I. Langford, I. Bateman, and R.K. Turner. 2003. A meta-analysis of wetland ecosystem valuation studies. Chapter 5 in Turner, R.K., Jeroen, C., van den Bergh, J.M., Brouwer, R., 2003. Managing Wetlands: An Ecological Economics Approach. Edward Elgar, Cheltenham, UK.

Chang, E.S. 1995. Physiological and biochemical changes during the molt cycle in decapod crustaceans: an overview. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 193: 1-14.

Cheng, Y.S. Tung, C.H. Liu, and J.C. Chen. 2006. Molecular cloning and characterization of copper/zinc superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Fish Shellfish Immunol. 21: 102-112.

Fridovich, I., 1995. Superoxide radicak and superoxide dismutase. Annu. Rev. Biochem. Eng. 64: 97-112.

Hauton, C., J.A. Williams, and L.E. Hawkins. 1997. The effects of a live in vivo pathogenic infection on aspects of the immunocompetence of the common shore crab, *Carcinus maenas* (L.). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 211: 115-128.

Holmblad,T., and K. Söderhäll. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. Aquaculture 172: 111-123

Mangum, C.P., P.L. deFur, J.H.A. Fields, R.P. Henry, G.A. Kormanik, B.R. Mcmahon, J. Ricci, D.W. Towle, and M.G. Wheatly. 1985. Physiology of the blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun during a molt, pp. 1-12. In H.M. Perry and R.F. Malone, eds. Proceedings of the national symposium on the soft-shelled blue crab fishery. Mississippi-Alabama Sea Grant Consortium and Louisiana Sea Grant College Program.

Marklund S., and G. Marklund. 1974. Involvement of the superoxyde anion radical in the auto oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxyde dismutase. Eur.J Biochem. 47: 469-474.

Shingu, M., S. Takahashi, M. Ito, N. Hamamatu, Y. Suenaga, Y. Ichibangase, and M. Nobunaga. 1994. Anti-inflammatory effects of recombinant human manganese superoxide dismutase on adjuvant arthritis in rats. Rheumatol. Int. 14: 77-81.

Skinner, D.M. 1962. The structure and metabolism of a crustacean integumentary tissue during a molt cycle. Biol. Bull. 123: 635-647.

Smith, V.J., and K. Söderhäll. 1986. Cellular immune mechanisms in the crustacea. Symp. Zool. Soc. London 56: 59-79.

Tainer J.A., E.D. Getzoff, K.M. Beem, J.S. Richardson, and D.C. Richardson. 1982. Determination and analysis of the 2 A-structure of copper, zinc superoxide dismutase. J. Mol. Biol. 160: 181-217.