



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ทางทะเล)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์ทางทะเล

วิทยาศาสตร์ทางทะเล

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง สารต้านอนุมูลอิสระและลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในวงจรการลอกคราบของปูทะเล
(*Scylla serrata* Forskål 1775)

Antioxidant and Lipid Peroxidation in Molting Cycle of Mud Crab
(*Scylla serrata* Forskål 1775)

نامผู้วิจัย นางสาวภัทราวดี ศรีมีเทียน

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จินตนา สและน้อย, วท.ค.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จินตนา กาญจนกมล, วท.ค.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เรืองวิทย์ ชื่นพันธ์, D.Tech.Sc.)

หัวหน้าภาค

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุนันท์ ภัทรจินดา, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D. Arg.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่..... เดือน..... พ.ศ.....

สิงสีทงี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

สารต้านอนุมูลอิสระและลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในวงจรการลอกคราบของปูทะเล

(*Scylla serrata* Forskål 1775)

Antioxidant and Lipid Peroxidation in Molting Cycle of Mud Crab

(*Scylla serrata* Forskål 1775)

โดย

นางสาวภัทราวดี ศรีมีเทียน

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อขอความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ทางทะเล)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภัทราวดี ศรีมีเทียน 2553: สารต้านอนุมูลอิสระและลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในวงจรการลอกคราบของปูทะเล (*Scylla serrata* Forskål 1775) ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ทางทะเล) สาขาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์จินตนา สและน้อย, วท.ค. 91 หน้า

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ 3 ชนิด ได้แก่ catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) และ glutathione peroxidase (GPx) กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระชนิด glutathione (GSH) ลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation; LPO) รวมทั้งกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในปูทะเล (*Scylla serrata*) ที่เก็บตัวอย่างจากฟาร์มปูน้ำจืด อำเภอลำลูกเกด จังหวัดจันทบุรี จำนวน 12 ระยะตลอดวงจรการลอกคราบ พบว่า CAT ซึ่งมีหน้าที่ทำลายอนุมูลอิสระจำพวกไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) มีกิจกรรมค่อนข้างสูงในตับและกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะกิจกรรมในตับมีค่าสูงมากในระยะก่อนการลอกคราบ 2 สัปดาห์จนถึงก่อนลอกคราบ 2 วัน และระยะหลังการลอกคราบ 3 วัน และ 5 วัน และกิจกรรมในระยะก่อนการลอกคราบมีค่าสูงกว่าระยะกระดองแข็งปกติ ส่วน GST ซึ่งทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระได้หลายชนิดและมีความสำคัญในการบำรุงรักษาเซลล์ แสดงกิจกรรมสูงสุดในตับ ทั้งนี้กิจกรรมของ GST ในเลือด ตับ เหงือก เนื้อเยื่อได้กระดอง และกล้ามเนื้อ มีค่าสูงทั้งในระยะก่อนการลอกคราบและระยะหลังการลอกคราบ สำหรับ GPx ซึ่งทำหน้าที่ในการกำจัดและทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการที่มีการใช้ออกซิเจนนั้น พบว่ากิจกรรมจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นในระยะก่อนการลอกคราบ และเมื่อปูลอกคราบกิจกรรมจะลดลงทันทีและจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งหลังการลอกคราบ กิจกรรมส่วนใหญ่แสดงออกในตับและเนื้อเยื่อได้กระดอง ส่วน GSH ซึ่งมีฤทธิ์ในการสลายสารอนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการที่มีการใช้ออกซิเจน พบว่ากิจกรรมค่อนข้างแปรปรวนตลอดทั้งวงจรการลอกคราบ กิจกรรมในเลือด เหงือก เนื้อเยื่อได้กระดอง และกล้ามเนื้อมีค่าสูงในระยะก่อนการลอกคราบและหลังการลอกคราบ สำหรับกิจกรรมของ LPO ในอวัยวะต่างๆ พบว่ากิจกรรมในระยะก่อนการลอกคราบมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และเมื่อปูพัฒนาเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบ พบว่ากิจกรรมลดลงเมื่อเทียบกับระยะปกติ ผลการวิจัยสรุปได้ว่า กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในปูทะเลมีความเด่นชัดในระยะก่อนการลอกคราบ เนื่องจากมีกระบวนการสลายสารอินทรีย์เพื่อนำกลับไปใช้ใหม่เกิดขึ้น และในระยะหลังการลอกคราบเนื่องจากการสะสมสารอาหารเพื่อสร้างกระดองใหม่ซึ่งก่อให้เกิดอนุมูลอิสระมากในสองระยะดังกล่าว

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Pattarawadee Srimeetian 2010: Antioxidant and Lipid Peroxidation in Molting Cycle of Mud Crab (*Scylla serrata* Forskål 1775). Master of Science (Marine Science), Major Field: Marine Science, Department of Marine Science. Thesis Advisor: Assistant Professor Jintana Salaenoi, Ph.D.
91 pages.

The activity of 3 anti-free radical enzymes; catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and glutathione peroxidase (GPx), anti-free radical substance; glutathione (GSH), lipid peroxidation (LPO) and the anti-oxidative power in mud crab (*Scylla serrata*) were studied. The crab samples including 12 stages over the molting cycle were collected from the soft-shell crab farm at Klung District, Chanthaburi Province. The results showed that CAT, which is responsible for destroying hydrogen peroxide (H_2O_2), had relatively high activity in hepatopancreas and muscle. CAT activity in the hepatopancreas was higher at 2 weeks until 2 days prior to molting and 3-5 days after molting. For GST, which normally acts to eliminate free radicals and is important in cell maintenance, the activity showed the maximum content in the hepatopancreas. GST activity in hemolymph, hepatopancreas, gills, integument and muscle were high both period of premolt and postmolt. For GPx, which acts to remove and destroy the free radicals caused by processes involving oxygen, the activity revealed the gradually increased in the period of premolt. At the time of molting, GPx activity abruptly decreased and then increased immediately after molting occurred and the activities mostly expressed in the hepatopancreas and integument. For GSH, which has the effect to free radicals caused by processes that use oxygen, the activity was quite variable throughout the molting cycle. GSH activities in haemolymph, gills, integument and muscle were high both the period of premolt and postmolt stage. Activity of LPO in various organs found gradually increased at premolt stage and the activity was slightly decreased when the crabs became postmolt stage, comparing to the normal crab stage. The research was concluded that the activity of anti-free radicals in mud crab was clearly evidenced in 2 periods; the time prior to the molting process due to the decomposition of organic substances to return a new figure, and also at the period of postmolt stage due to the nutrients accumulated to create new figure.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จินตนา สและน้อย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้คำปรึกษาทั้งทางด้านการศึกษา การวางแผนงานวิจัย ตลอดจนแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จันทนา กาญจนกมล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เรืองวิทย์ ยืนพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ความกรุณาแนะนำและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย โดยสำนักงานคณะกรรมการการสภานโยบายแห่งชาติ (วช.) เลขที่สัญญา ภค./2551-40 ขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้ รวมทั้งขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. มิ่งขวัญ มิ่งเมือง ภาควิชาวิทยาศาสตร์พื้นพิภพ คณะวิทยาศาสตร์ และรองศาสตราจารย์ ดร. นนทวิทย์ อริย์ชน ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ สารเคมี อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ ครอบครัวสและน้อย ที่ให้ความกรุณาช่วยเหลือในเรื่องของการเก็บตัวอย่างสัตว์ทดลอง ตลอดจนขอขอบพระคุณอาจารย์ เพื่อน พี่ น้อง และเจ้าหน้าที่จากภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง และสาขาวิชาชีววิทยาของเซลล์และโมเลกุล คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำจนเสร็จสิ้นวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณนายประสาน ศรีมีเทียน นางทองพูน ศรีมีเทียน พร้อมด้วยนางสาวจริยาดี ศรีมีเทียน และสิบโทปณิธาน ศรีมีเทียน ที่ให้การสนับสนุนในการศึกษา จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ภัทราวดี ศรีมีเทียน

มีนาคม 2553

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	19
ผลและวิจารณ์	24
สรุป	65
ข้อเสนอแนะ	67
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	69
ภาคผนวก	83
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	91

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	กิจกรรมเอนไซม์ catalase ในเลือด เหยือก ตับ เนื้อเยื่อใต้กระดูก และกล้ามเนื้อ ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล	26
2	กิจกรรมเอนไซม์ glutathione-S-transferase ในเลือด เหยือก ตับ เนื้อเยื่อใต้กระดูก และกล้ามเนื้อ ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล	35
3	กิจกรรมเอนไซม์ glutathione peroxidase ในเลือด เหยือก ตับ เนื้อเยื่อใต้กระดูก และกล้ามเนื้อ ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล	44
4	กิจกรรม glutathione ในเลือด เหยือก ตับ เนื้อเยื่อใต้กระดูก และกล้ามเนื้อ ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล	51
5	กิจกรรม lipid peroxidation ในเลือด เหยือก ตับ เนื้อเยื่อใต้กระดูก และกล้ามเนื้อ ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล	58

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กิจกรรมเอนไซม์ catalase ในเลือด เหยือก และตับ ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล	29
2	กิจกรรมเอนไซม์ catalase ในเนื้อเยื่อใต้กระดอง และกล้ามเนื้อ ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล	30
3	กิจกรรมเอนไซม์ glutathione-S-transferase ในเลือด เหยือก และตับ ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล	38
4	กิจกรรมเอนไซม์ glutathione-S-transferase ในเนื้อเยื่อใต้กระดอง และกล้ามเนื้อ ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล	39
5	กิจกรรมเอนไซม์ glutathione peroxidase ในเลือด เหยือก และตับ ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล	46
6	กิจกรรมเอนไซม์ glutathione peroxidase ในเนื้อเยื่อใต้กระดอง และกล้ามเนื้อ ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล	47
7	กิจกรรม glutathione ในเลือด เหยือก และตับ ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจร การลอกคราบของปูทะเล	53
8	กิจกรรม glutathione ในเนื้อเยื่อใต้กระดอง และกล้ามเนื้อ ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล	54
9	กิจกรรม lipid peroxidation ในเลือด เหยือก และตับ ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจร การลอกคราบของปูทะเล	61
10	กิจกรรม lipid peroxidation ในเนื้อเยื่อใต้กระดอง และกล้ามเนื้อ ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล	62

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
1 การวัดขนาดความกว้างและความยาวของปู	84
2 การเก็บเลือดที่โคนขาคู่ที่ 5 และอวัยวะภายในของปู	85
3 รอยต่อระหว่างกระดูกกับข้อของปูระยะก่อนการลอกคราบ 1 สัปดาห์ และรอยต่อระหว่างกระดูกกับข้อของปูระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน	86
4 กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin	87
5 กราฟมาตรฐานของเอนไซม์ catalase	88
6 กราฟมาตรฐานของเอนไซม์ glutathione-S-transferase	88
7 กราฟมาตรฐานของเอนไซม์ glutathione peroxidase	89
8 กราฟมาตรฐานของ glutathione	89
9 กราฟมาตรฐานของ lipid peroxidation	90

สารต้านอนุมูลอิสระและลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในวงจรการลอกคราบของปูทะเล
(*Scylla serrata* Forskål 1775)

Antioxidant and Lipid Peroxidation in Molting Cycle of Mud Crab
(*Scylla serrata* Forskål 1775)

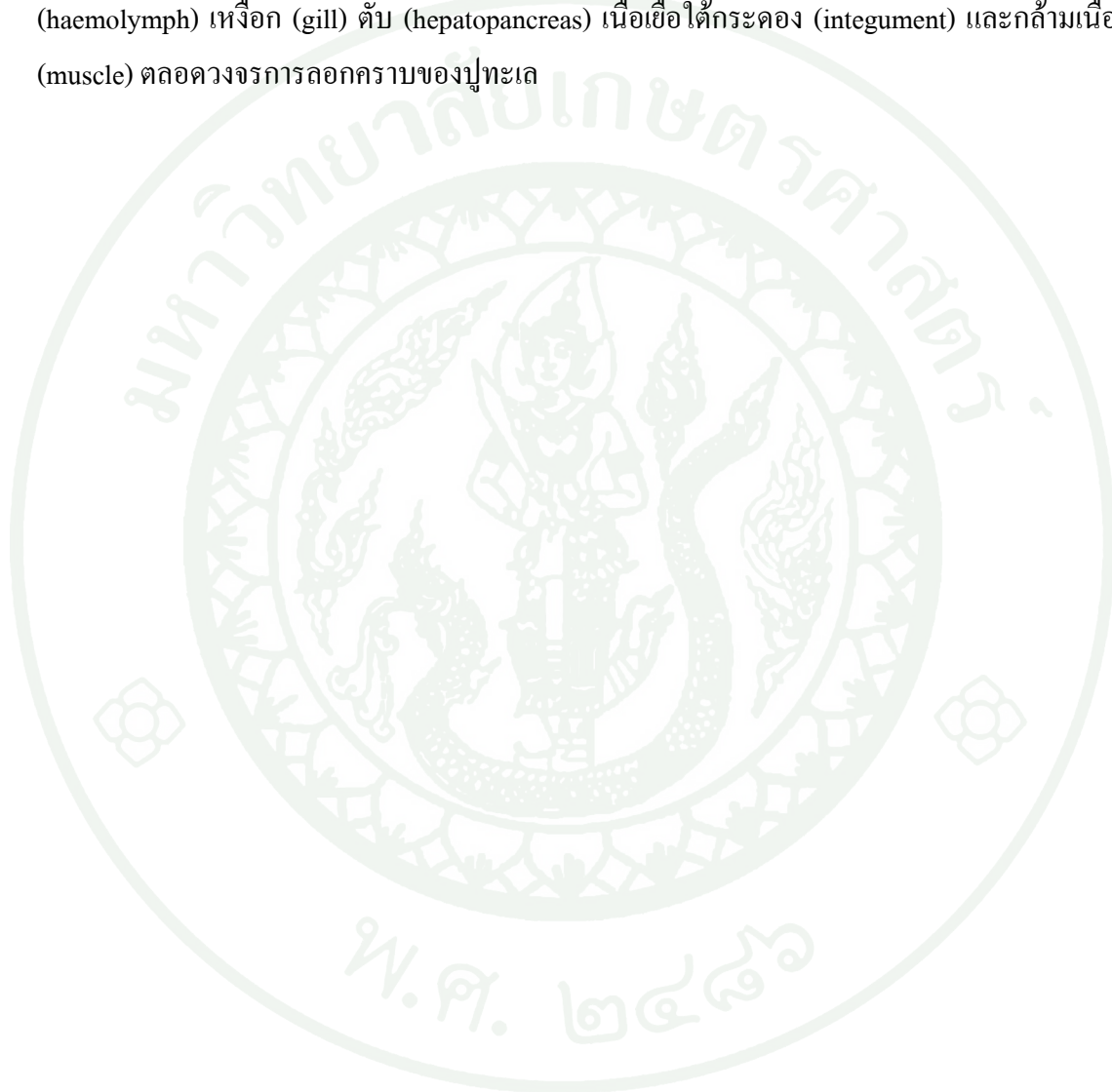
คำนำ

ปูทะเลเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากมีรสชาติดีและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง จึงเป็นที่นิยมบริโภคทั้งชาวไทยและต่างประเทศ แต่อย่างไรก็ตามผลผลิตปูทะเลยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด เนื่องจากผลผลิตส่วนใหญ่จะได้รับการจับปูในธรรมชาติ ซึ่งนับวันจะมีปริมาณลดลงไปเรื่อย ๆ ปูทะเลจัดเป็นอาหารเพื่อสุขภาพด้วย เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง คลอเรสเตอรอลต่ำ อุดมไปด้วยแร่ธาตุต่าง ๆ ได้แก่ แคลเซียม โคลีน ฟอสฟอรัส สังกะสี เหล็ก ไอโอดีนและแมกนีเซียม จึงเป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับทุกเพศทุกวัย ปูนึ่งที่วางขายอยู่ในท้องตลาดเป็นปูทะเลแทบทั้งสิ้นและส่วนใหญ่จะเป็นปูดำ การเลี้ยงปูนี้มนับเป็นธุรกิจที่มีศักยภาพสูงในเชิงพาณิชย์ จังหวัดที่มีการเลี้ยงปูนี้ได้แก่ จันทบุรี ตราด ระนอง สมุทรปราการ สมุทรสาคร กรุงเทพมหานคร (ที่เขตบางขุนเทียน) สตูล ชุมพร ตรังและปัตตานี การเลี้ยงปูเป็นธุรกิจที่สร้างรายได้และเป็นทางเลือกใหม่ให้แก่เกษตรกร เช่น เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งที่ประสบกับปัญหาการขาดทุนในการเลี้ยงกุ้ง หรือชาวประมงรายย่อยที่มีปัญหาในเรื่องแหล่งประมง และต้องการที่จะเปลี่ยนวิถีประกอบอาชีพ เนื่องจากการเจริญเติบโตของปูต้องอาศัยการลอกคราบ เพราะกระดองของปูเป็นสารประกอบพวกหินปูนที่มีความแข็งมาก จึงไม่สามารถขยายเพิ่มขนาดตัวออกไปได้ ดังนั้นปูจะมีขนาดใหญ่ขึ้นได้ก็ต่อเมื่อได้สลัดเปลือกเก่าทิ้งและสร้างเปลือกใหม่ ปูมีการลอกคราบตลอดทั้งปีและตลอดชีวิต การเลี้ยงปูนี้มนิยมเลี้ยงในคลองล่อยน้ำเพื่อความสะดวกในการเก็บผลผลิตและป้องกันการกินกันเอง ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ปูเครียดได้ง่าย นอกจากนี้สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมภายในบ่อ เช่น สารอินทรีย์ที่สะสมอยู่ก้นบ่อ จุลชีพและวิธีการเลี้ยง สิ่งต่าง ๆ เหล่านี้นับเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นภายในเซลล์ร่างกายปู ถ้ามีอนุมูลอิสระเป็นจำนวนมากแล้วไม่ถูกกำจัดออกไป อาจส่งผลให้เซลล์ตกอยู่ในสภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อวงจรการลอกคราบและอาการผิดปกติในปู เช่น อาการท้องและออกเป็นสีแดง อาการอัมพาตในปู เป็นต้น อย่างไรก็ตามปูมีวิธีการรักษาสมดุลของอนุมูลอิสระ ทำให้สามารถมีชีวิตรอด

และดำรงชีวิตต่อไปได้เมื่อต้องพบกับสภาวะต่าง ๆ ที่ก่อเกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งตามปกติสัตว์ในกลุ่ม ครัสเตเชียจะมีระบบภูมิคุ้มกันเป็นแบบที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) ไม่สามารถสร้างขึ้น มาได้เองภายหลัง ดังนั้นเมื่อมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น ร่างกายสัตว์จะสร้างสารต้านอนุมูลอิสระออกมา ปกป้องเซลล์ภายในร่างกายไม่ให้เซลล์เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่ง Pinho *et al.* (2003) รายงาน ว่า สภาพแวดล้อมที่ผิดปกติ เช่น มีสิ่งมีชีวิตจำพวก cyanobacteria เช่น *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia* และ *Oscillatoria* จะทำให้ปูทะเล *S. serrata* สร้างสารต้านอนุมูลอิสระออกมามากกว่า ปกติ จากเหตุผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารต้านอนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญในการป้องกันตนเอง จากอนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการต่าง ๆ ทำให้ปูสามารถดำรงชีวิตและผ่านช่วงเวลาวิกฤติ ใน กระบวนการลอกคราบมาได้ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการลอกคราบของ ปูทะเลกับการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ และ lipid peroxidation ทั้งนี้เพื่อจะได้ ทราบถึงความสัมพันธ์การทำงานของสารดังกล่าว ในขณะที่ปูมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทาง กายภาพภายนอก การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมี และสรีระวิทยาภายในร่างกาย โดยนำผลที่ ได้ไปประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงปูทะเล โดยช่วงใดที่พบว่าปูมีระดับของสารต้านอนุมูลอิสระต่ำหรือ ลดลง อาจมีการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระเข้าไปในอาหารปู เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณสารต้านอนุมูล อิสระ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้ปูสามารถดำรงชีวิต และผ่านกระบวนการลอกคราบมาได้โดยที่ปูไม่ ตาย ทำให้เกษตรกรสามารถหามาตรการในการป้องกันตนเอง และลดความเสี่ยงในการเลี้ยงปู ซึ่ง จะทำให้ได้ผลผลิตเป็นไปตามความต้องการ อันจะทำให้ธุรกิจการเลี้ยงปูนี้ของเกษตรกรเป็นไป ตามกลไกของตลาดต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ catalase, glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase สารต้านอนุมูลอิสระ glutathione และ lipid peroxidation ในเลือด (haemolymph) เหงือก (gill) ตับ (hepatopancreas) เนื้อเยื่อใต้กระดอง (integument) และกล้ามเนื้อ (muscle) ตลอดจนวงจรการลอกคราบของปูทะเล



การตรวจเอกสาร

1. ชีววิทยาของปูทะเล

1.1 อนุกรมวิธานปูทะเล

Barnes (1987) ได้จำแนกลักษณะปูทะเลทางอนุกรมวิธานไว้ดังนี้

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Malacostraca

Superorder Eucarida

Order Decapoda

Suborder Reptantia

Section Brachyura

Subsection Brachygnatha

Family Portunidae

Subfamily Portuninae

Genus *Scylla*

Species *Scylla serrata* (Forskål 1775)

1.2 ลักษณะที่สำคัญของปูทะเล

ปูทะเลมีลักษณะเด่นคือ มีกระดองที่เรียบและนูนมีรูปทรงคล้ายรูปหกเหลี่ยม มีสีน้ำตาลเขียวหรือน้ำตาลปนเทา (Dai and Yang, 1991) เมื่อเปิดกระดองของปูออกจะเห็นเหงือก 2 ข้างอย่างเด่นชัด ซึ่งทำหน้าที่ช่วยในการหายใจ โดยการพัดผ่านของกระแสน้ำ ปูเพศผู้ส่วนท้องจะมีลักษณะเรียวยาวเป็นรูปสามเหลี่ยม แต่ปูเพศเมียท้องจะขยายกว้างออกมาจนเกือบเต็มส่วนอก ปูทะเลเป็นสัตว์ที่กินเนื้อเป็นอาหาร เช่น ปลา กุ้ง หอย ปู พวกหนอนต่าง ๆ ตลอดจนตัวอ่อน ของแมลง นอกจากนี้ปูยังกินซากสัตว์ที่ตายแล้วอีกด้วย

ปูทะเลจะเริ่มเข้าสู่ระยะสืบพันธุ์เมื่อมีขนาดของกระดองกว้างประมาณ 9.2-12.1 เซนติเมตร และมีอายุประมาณ 44-52 วัน (บรรจง และบุญรัตน์, 2545) การผสมพันธุ์ของปูทะเลเป็นการผสมแบบภายใน (internal fertilization) โดยปูเพศผู้จะขึ้นคร่อมปูเพศเมียไว้เพื่อเป็นการจับคู่ และเมื่อปูเพศเมียลอกคราบปูเพศผู้ก็จะทำการผสมพันธุ์กับปูเพศเมีย โดยในขณะที่กระดองของปูเพศเมียยังนิ่มอยู่ปูเพศผู้จะสอดอวัยวะสืบพันธุ์ (gonopod) ซึ่งมีลักษณะเรียวยาวแหลม เล็ก เข้าไปในรูเปิดของปูเพศเมีย (gonopore) ได้จับปิ้ง หลังจากนั้นปูเพศผู้จะปล่อยถุงน้ำเชื้อ (spermatophore) ไปเก็บไว้ในรูเปิดของปูเพศเมีย ซึ่งปูเพศเมียสามารถเก็บน้ำเชื้อได้นานประมาณ 3-4 เดือน เมื่อผสมพันธุ์แล้วปูทะเลจะออกไปวางไข่ในทะเลที่ระดับน้ำลึก แล้วเดินทางกลับมาอาศัยอยู่บริเวณชายฝั่งน้ำกร่อยตามป่าชายเลนดั้งเดิม ปูจะเจริญเติบโตได้ต้องอาศัยการลอกคราบเพื่อเพิ่มขนาด และน้ำหนักของร่างกาย (บรรจง และบุญรัตน์, 2545)

1.3 วงจรการลอกคราบของปูทะเล

Drach (1939) อ้างถึงใน (บรรจง และบุญรัตน์, 2545) แบ่งการลอกคราบของปูออกเป็น 5 ระยะด้วยกันคือ

1. ระยะ A (Newly molted) เป็นระยะที่ปูเพิ่งลอกคราบเสร็จใหม่ ๆ โดยใช้เวลาในระยะนี้ทั้งหมดคิดเป็นประมาณ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ของระยะเวลาทั้งหมดในวงจรการลอกคราบ ซึ่ง

ระยะนี้ปูจะไม่กินอาหาร โครงสร้างภายนอกมีลักษณะอ่อนนุ่ม ลื่น และหยาบๆ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ระยะ คือ

A-1 (newly molt) ระยะนี้กระดองของปูทะเลจะนิ่มมาก ขาไม่สามารถพองร่างกายให้อยู่ในน้ำได้และเคลื่อนไหวไม่ได้ โดยใช้เวลาคิดเป็นประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ของเวลาในระยะ A

A-2 (soft) ระยะนี้กระดองของปูทะเลเริ่มแข็งขึ้น หยุดการดูดซึมน้ำเข้าสู่ร่างกาย มีน้ำหนักตัวคงที่ ระยะนี้ปูทะเลมีน้ำในร่างกายประมาณ 86 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เวลาคิดเป็นประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ของเวลาในระยะ A

2. ระยะ B (Post molt หรือ Recently molted) ระยะหลังการลอกคราบ เป็นระยะที่โครงสร้างภายนอกของปูเริ่มแข็งขึ้น แต่ระยะนี้ปูก็ยังไม่กินอาหาร โดยใช้เวลาในระยะนี้ทั้งหมดคิดเป็นประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ ของระยะเวลาทั้งหมดในวงจรการลอกคราบ ซึ่งสามารถแบ่งได้ 2 ระยะด้วยกัน คือ

B-1 ระยะนี้ขาของปูทะเลแข็งขึ้น มีน้ำในร่างกายประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ โดยระยะนี้ใช้เวลาคิดเป็นประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ ของเวลาในระยะ B

B-2 ระยะนี้โครงสร้างภายนอกของปูทะเลแข็งมากขึ้น ปริมาณน้ำในร่างกายลดลงเหลือประมาณ 83 เปอร์เซ็นต์ โดยระยะนี้ใช้เวลาคิดเป็นประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ของเวลาในระยะ B

3. ระยะ C (Intermolt) ระยะระหว่างการลอกคราบ ระยะนี้โครงสร้างภายนอกมีความแข็งแรงสมบูรณ์ ปูทะเลสามารถเคลื่อนไหวได้อย่างคล่องแคล่ว และคุ้ยหา โดยระยะนี้ใช้เวลาคิดเป็นประมาณ 66 เปอร์เซ็นต์ ของระยะเวลาทั้งหมดในวงจรการลอกคราบ สามารถแบ่งได้ 4 ระยะ คือ

C-1 ระยะนี้ปูทะเลเริ่มกินอาหาร โครงสร้างภายนอกแข็งเกือบเป็นปกติ ปริมาณน้ำในร่างกายของปูทะเลมีประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ โดยระยะนี้ใช้เวลาคิดเป็นประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ของเวลาในระยะ C

C-2 ระยะนี้ปูทะเลมีปริมาณน้ำในร่างกายประมาณ 76 เปอร์เซ็นต์ โครงสร้างภายนอกแข็ง โดยใช้เวลาคิดเป็นประมาณ 13 เปอร์เซ็นต์ของเวลาในระยะ C

C-3 ระยะนี้ปูทะเลมีปริมาณน้ำในร่างกายประมาณ 68 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เวลาคิดเป็นประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ของเวลาในระยะ C

C-4 ระยะนี้ปูทะเลกินอาหารเป็นปกติ มีการเคลื่อนไหวอย่างคล่องแคล่ว ว่องไว และดุร้าย ระยะนี้ปูทะเลจะทำการเริ่มสะสมสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ต่าง ๆ เพื่อเตรียมไว้สำหรับการลอกคราบครั้งต่อไป ระยะนี้ปูทะเลมีปริมาณน้ำในร่างกายประมาณ 61 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เวลาคิดเป็นประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของเวลาในระยะ C

4. ระยะ D (Premolt) ระยะก่อนการลอกคราบ ระยะนี้เป็นระยะที่โครงสร้างภายนอกทั้งกระดองและเปลือกมีความแข็งแรงสมบูรณ์เต็มที่ การสะสมสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่จำเป็นในการลอกคราบครั้งต่อไปยังคงดำเนินไป ระยะนี้ปูเริ่มเคลื่อนไหวช้าและกินอาหารได้น้อยลง ระยะนี้ปูทะเลมีปริมาณน้ำในร่างกายเหลือเพียงประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เวลาคิดเป็นประมาณ 24 เปอร์เซ็นต์ของระยะเวลาทั้งหมดในวงจรการลอกคราบ

D-1 ระยะนี้เปลือกใหม่เริ่มแยกออกจากเปลือกเก่า เปลือกใหม่และเปลือกเก่าจะเกิดเป็นลักษณะของชั้นที่ขนานกัน เปลือกใหม่ที่สร้างขึ้นจะมีลักษณะใส ปริมาณน้ำในตัวของปูทะเลในระยะนี้จะคงที่ โดยใช้เวลาคิดเป็นประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ของเวลาในระยะ D

D-2 เกิดช่องว่างที่กว้างมากขึ้นระหว่างเปลือกใหม่ที่แยกออกจากเปลือกเก่า โดยใช้เวลาคิดเป็นประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของเวลาในระยะ D

D-3 เปลือกใหม่มีการพัฒนาที่สมบูรณ์มากขึ้น ช่องว่างระหว่างเปลือกใหม่ที่แยกเปลือกเก่าเห็นได้อย่างชัดเจน ระยะนี้ปูทะเลจะหยุดกินอาหาร การเคลื่อนไหวช้าลง โดยใช้เวลาคิดเป็นประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ ของเวลาในระยะ D

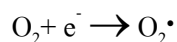
D-4 ระยะนี้น้ำหนักตัวของปูทะเลเพิ่มขึ้น รอยต่อต่าง ๆ ตามเปลือกเริ่มแตก โดยใช้เวลาคิดเป็นประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ของเวลาในระยะ D

5. ระยะ E (Ecdysis) ระยะนี้ปูอยู่ในกระบวนการลอกคราบ เป็นระยะที่ปูสลัดโครงสร้างเก่าทิ้ง เมื่อออกมาจากกระดองเก่า ปูจะดึงน้ำเข้าสู่ร่างกายทันทีและอย่างรวดเร็ว ปูจะไม่เคลื่อนที่และไม่กินอาหาร เป็นช่วงวิกฤติที่สุดของปู เนื่องจากระยะนี้ปูจะอ่อนแอมาก อาจถูกสัตว์อื่นทำร้ายหรือกินเป็นอาหารได้ ระยะนี้ใช้เวลาเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยคิดเป็นประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ของระยะเวลาทั้งหมดในวงจรการลอกคราบ

2. ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) และอนุมูลอิสระ (Free radical)

ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) เป็นภาวะที่เซลล์ภายในร่างกายได้รับบาดเจ็บหรือถูกทำลาย ซึ่งเป็นสาเหตุให้การทำงานของอวัยวะต่าง ๆ ล้มเหลว (multiple-system organ failure) เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ (Free radical) หรือเกิดจากการที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ลดลง ทำให้เกิดความไม่สมดุลกันระหว่างอนุมูลอิสระและ สารต้านอนุมูลอิสระ จึงเป็นสาเหตุให้เซลล์เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ผลของการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันทำให้เซลล์ตาย ซึ่งการตายของเซลล์ส่งผลให้การทำงานของอวัยวะต่าง ๆ ล้มเหลวลง (Griswold *et al.*, 1993)

อนุมูลอิสระ (Free radical) เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อในสัตว์ (Guzman and Solter, 1999) โมเลกุลของอนุมูลอิสระเช่น superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) hydroxyl ($\cdot OH$) hydroperoxyl ($HO_2^{\cdot}$) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) เป็นต้น (Rudneva, 1999) อนุมูลอิสระ $O_2^{\cdot}$ เกิดจากการรับอิเล็กตรอนเพิ่มเข้ามาในปฏิกิริยา reduction ของออกซิเจน (O_2) ดังสมการ



ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระโดย dismutation reaction ของ $\text{O}_2^\bullet$ ซึ่งทำให้ได้อนุมูลอิสระ $\text{HO}_2^\bullet$ และเมื่อ $\text{HO}_2^\bullet$ 2 โมเลกุลรวมกัน ได้ผลิตภัณฑ์คือ H_2O_2 (Arun *et al.*, 1999) ดังสมการ



ส่วนอนุมูลอิสระ $\bullet\text{OH}$ เกิดได้จาก 2 ปฏิกิริยาคือ

ปฏิกิริยา Haber-Weiss ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่าง H_2O_2 และ $\text{O}_2^\bullet$ (Michael and Dariush, 2006) ดังสมการ



ปฏิกิริยา Fenton ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาการ oxidation ระหว่าง H_2O_2 และเหล็ก (Fe) ดังสมการ



อนุมูลอิสระเกิดได้จากกระบวนการทั้งภายในและจากภายนอกร่างกาย ภายในร่างกายเกิดจากกระบวนการ metabolism ต่าง ๆ (Kashiwagi *et al.*, 1997) เช่น การเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation (LPO) ของไขมัน สภาวะทางอารมณ์ เช่น ความเครียด ภาวะอดอาหารและขบวนการทางภูมิคุ้มกัน เช่น การทำลายเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคต่าง ๆ เช่น โพรโตซัว แบคทีเรีย ไวรัส เป็นต้น แหล่งอนุมูลอิสระจากภายนอกร่างกายเช่น อนุภาคอินทรีย์ สารพิษ และมลภาวะต่าง ๆ เป็นต้น (Halliwell and Gutteridge, 1999)

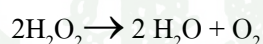
อนุมูลอิสระเป็นอนุพันธ์ของออกซิเจนที่มีพิษต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ถ้าอนุมูลอิสระเกิดขึ้นแล้วไม่ถูกทำลายหรือกำจัดออกไป อนุมูลอิสระจะเข้าทำลายสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ ได้แก่ โปรตีน คีเอนเอ และไขมัน โดยอนุมูลอิสระจะทำให้โปรตีนเสียสภาพ ส่งผลให้สารภายในร่างกายที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบเช่น เอนไซม์ที่มีบทบาทในการเร่งปฏิกิริยาต่าง ๆ ภายในร่างกายไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ หรือมีประสิทธิภาพการทำงานลดลง นอกจากนี้โปรตีนซึ่งทำหน้าที่ในการขนส่งสารต่าง ๆ ภายในเซลล์ ร่างกายเมื่อโปรตีนเสื่อมสภาพลงทำให้การเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์เสื่อมลงไปด้วย (Michael and Dariush, 2006)

การทำลายคีเอนเอของอนุมูลอิสระ ทำให้โครงสร้างของคีเอนเอเปลี่ยนแปลงไป โดยอนุมูลอิสระจะทำให้การจับคู่เบสของคีเอนเอผิดไป การจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ผิดไป ทำให้นิวคลีโอไทด์บางส่วนเพิ่มขึ้นหรือลดลงไป ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของคีเอนเอเหล่านี้ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ และการสร้างความเสียหายแก่ไขมัน โดยอนุมูลอิสระจะเข้าทำลายไขมันทำให้เกิดปฏิกิริยา LPO เกิดขึ้น ซึ่ง LPO จะทำลายไขมันชนิดไม่อิ่มตัว ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพหรือเสียหายของเซลล์เมมเบรน ลิพิดในเลือดหรือในของเหลวในร่างกาย ซึ่งเมื่อเกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์เมมเบรน เป็นสาเหตุทำให้องค์ประกอบอื่น ๆ ภายในเซลล์เกิดความเสียหายด้วย ซึ่งความเสียหายที่เกิดขึ้นนี้ทำให้เกิดการตายของเซลล์ (cell death) (Halliwell and Gutteridge, 1999)

ถ้าในเซลล์มีอนุมูลอิสระมากจะทำให้เซลล์ตกอยู่ในภาวะเครียดออกซิเดชัน อนุมูลอิสระเป็นตัวสร้างความเสียหายต่าง ๆ ให้แก่เซลล์ ดังนั้นร่างกายจึงสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ เพื่อยับยั้งและทำให้เกิดสมดุลภายในเซลล์ระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จากการถูกทำลายของอนุมูลอิสระ (Sies, 1993; Sole *et al.*, 1998) โดยทำให้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสิ้นสุดลง (Halliwell and Gutteridge, 1999) Digiulio *et al.* (1989) แบ่งสารต้านอนุมูลอิสระ ที่พบในร่างกายได้ออกเป็น 2 ประเภท คือ สารต้านอนุมูลอิสระ ที่พบในร่างกายและจัดเป็นเอนไซม์ ได้แก่ คาตาเลส (catalase) กลูตาไธโอน-เอส-ทรานสเฟอเรส (glutathione-S-transferase) (Storey, 1996) กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) (Livingstone, 1990) เป็นต้น ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกายและไม่จัดเป็นเอนไซม์ ได้แก่ กลูตาไธโอน (glutathione) วิตามินซี (ascorbic acid) และวิตามินอี (vitamin E) (Hermes-Lima *et al.*, 1998) เป็นต้น สิ่งมีชีวิตสามารถสร้างสารต้านอนุมูลอิสระชนิดที่เป็นเอนไซม์ และสารต้านอนุมูลอิสระชนิดที่

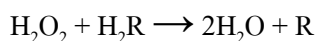
ไม่ใช่เอนไซม์ได้บางชนิดภายในร่างกาย ถ้าเซลล์มีความสมดุลระหว่างอนุมูลอิสระกับสารต้านอนุมูลอิสระ เซลล์ก็จะไม่เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน Vinagre *et al.* (2003) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ โดยพบว่าเมื่อปูน้ำกร่อยชนิด *Chasmagnathus granulatus* มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นมาก (โดยการเหนี่ยวนำด้วยสาหร่าย *Microcystin aeruginosa* เพื่อให้อนุมูลอิสระเกิดขึ้นในตัวปูมากกว่าปกติ) พบว่าสารต้านอนุมูลอิสระก็เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน สาเหตุที่สารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเซลล์จะรักษาความสมดุลระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระและอนุมูลอิสระ ถ้าเกิดความไม่สมดุลภายในเซลล์ เซลล์จะเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่งจะนำไปสู่การตายของเซลล์ได้ โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญ ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ได้แก่

1. Catalase (CAT; EC 1.11.1.6) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน hydrogen peroxide (H_2O_2) ให้เป็นน้ำและออกซิเจนอิสระ (John and Dorothy, 1997) ดังสมการ



เอนไซม์ CAT มีโครงสร้างเป็น tetramer มีสปีชีส์ ferriprotoporphyrin เป็นองค์ประกอบ โครงสร้างเอนไซม์ CAT ประกอบด้วยหน่วยย่อยของโปรตีนฮีโม (hemoprotein) 4 หน่วยย่อย (subunit) ที่เหมือนกัน (Wu and Shad, 1995) แต่ละหน่วยจะมีขนาดประมาณ 50-60 กิโลดาลตัน (Klotz *et al.*, 1997) การจัดเรียงตัวของหน่วยทั้งสี่เป็นแบบเตตระฮีดรัล ดังนั้นเอนไซม์นี้จึงมีฮีโม 4 กลุ่มต่อ 1 โมเลกุลของเอนไซม์ มีน้ำหนักโมเลกุลรวมประมาณ 240 กิโลดาลตัน

เอนไซม์ CAT พบอยู่ภายใน organelle ของเซลล์ทุกเซลล์ที่มีชีวิต (John and Dorothy, 1997) โดยส่วนใหญ่จะอยู่ในเนื้อเยื่อ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะพบปริมาณมากในตับ (Nord and Werkman, 1941) ส่วนสัตว์ในกลุ่มครึ่งบกครึ่งน้ำ ก็พบมากในตับ เช่นกัน (Damdanpat *et al.*, 2000) เอนไซม์ CAT สามารถ oxidize สารพิษต่าง ๆ (H_2R) ได้ เช่น formaldehyde, formic acid และ alcohol โดยจะทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ทำให้ได้ น้ำ 2 โมเลกุล และสารที่ไม่มีพิษ (R) ดังสมการ



เอนไซม์ CAT เป็นเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ โดยจะทำหน้าที่ต่อต้านและขจัดอนุมูลอิสระออกจากเซลล์ (Olga *et al.*, 2004) ซึ่งเมื่อมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น โดยเฉพาะ H_2O_2 เอนไซม์ CAT เป็นเอนไซม์ชนิดแรกที่จะเข้าทำการสลาย H_2O_2 ทำให้ความเป็นพิษหายไปอย่างรวดเร็ว ทำให้เซลล์ไม่เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Hermes-Lima *et al.*, 1998)

เอนไซม์ CAT มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อโรค (John and Dorothy, 1997) มีรายงานว่าเอนไซม์ CAT จากเลือดและเนื้อเยื่อสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการทำลายแบคทีเรียได้ เมื่อเซลล์มีการติดเชื้อ pathogen เช่น *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila* และ *Campylobacter jejuni* เอนไซม์ CAT จะทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากกระบวนการทำลายและขจัด pathogen ต่าง ๆ ออกจากเซลล์ และยังทำหน้าที่รักษาเซลล์ที่บาดเจ็บจากการติดเชื้ออีกด้วย นอกจากนี้เอนไซม์ CAT ยังมีส่วนช่วยในกระบวนการกลืนกินเซลล์สิ่งแปลกปลอม (phagocytes) (Helmward, 1999) มีรายงานว่าเอนไซม์ CAT เป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูง ในการทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการทำลายแบคทีเรียของกุ้งขาว *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Olga *et al.*, 2004)

Arun and Subramanian (1998) รายงานว่าพบเอนไซม์ CAT ในกุ้ง *Macrobrachium malcolmsonii* เพิ่มขึ้นจากระยะ embryonic larval จนถึงระยะ sub-adult ตามลำดับ ส่วน Luqing and Zhang (2006) ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ CAT ในเหงือกของปูทะเล (*Charybdis japonica*) เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยโลหะแคดเมียม เป็นเวลา 15 วัน ผลการศึกษาพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CAT สูงสุดเมื่อทำการเหนี่ยวนำในระยะที่ 0.5 วัน แล้วค่อย ๆ ลดลงเรื่อย ๆ จนในที่สุดกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ลดลงต่ำสุดในระยะที่ 15 วัน

2. Glutathione-S-transferase (GST; EC 2.5.1.18) เป็นเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่มี 4 คลาสหลัก (alpha, mu, pi และ theta) 4 คลาสรอง (zeta, sigma, omega และ kappa) และ

1 microsomal (Mannervik *et al.*, 1992) เอนไซม์ชนิดนี้มีน้ำหนักของโมเลกุลประมาณ 45-55 กิโลดาลตัน (Mannervik *et al.*, 1992) เป็นเอนไซม์ที่ไม่มีความเฉพาะเจาะจง (non-specific enzyme) จึงทำให้มีฤทธิ์ในการกำจัดได้อย่างกว้างขวาง (Helmward, 1999)

GST เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการบำรุงรักษาเซลล์ (Eaton and Bammler, 1999) จากผลของกระบวนการ metabolism และ electrophilic (Kensler, 1997) และยังทำหน้าที่ในการทำลายพิษที่เกิดจากกระบวนการ LPO เอนไซม์ GST พบได้ทั่วไปใน cytosolic, mitochondria, microsomal, protein, plasma และพบในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต (Ray *et al.*, 1996; Stine and Brown, 1996) โดย Helmward (1999) แบ่งเอนไซม์ GST ออกเป็น 3 ชนิดด้วยกันคือ ชนิด A 1-1 เป็นชนิดที่ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จากปฏิกิริยา oxidation โดยไซโตโครม P-450 ชนิด P 1-1 เป็นชนิดที่พบแพร่กระจายทั่วไปภายในร่างกายยกเว้นในตับ และชนิด M 1-1 เป็นชนิดที่พบในตับ

เมื่อเซลล์ภายในร่างกายได้รับสิ่งแปลกปลอมหรือสารพิษ ร่างกายนั้นจะมีขั้นตอนในการทำลายสิ่งแปลกปลอม หรือสารพิษเหล่านี้ให้มีความเป็นพิษลดลง หรือหมดความเป็นพิษไป โดยมีเอนไซม์เข้ามาเป็นส่วนร่วมในการทำลายพิษ ซึ่งมีสองระยะ (phase) ด้วยกัน (Adalto and Monserrat, 2007) คือ ระยะที่ 1 (phase I) เอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของสารพิษ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสิ่งแปลกปลอมให้สามารถละลายน้ำได้ดีขึ้น และสามารถกำจัดออกจากร่างกายได้ง่ายขึ้น บางครั้งสารพิษที่เข้าสู่ร่างกายมีความเป็นพิษสูง โดยที่ phase I ไม่สามารถทำลายพิษได้หมด หรือไม่สามารถขับออกจากร่างกายได้ phase I ก็จะทำให้สารพิษและสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ เหล่านั้น กลายเป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมแล้วเข้าสู่ phase II เพื่อเกิดปฏิกิริยาทำลายสารพิษต่อไป เมื่อได้ผลผลิต (product) จาก phase I แล้วจะเกิดปฏิกิริยาการรวมตัว (conjugation) กับสารจำพวกกลูตาไธโอน และกรดอะมิโน โดยจะเกิดปฏิกิริยาการรวมตัวได้ต้องอาศัยเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ผลของปฏิกิริยาทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่สามารถละลายน้ำได้ดียิ่งขึ้นและถูกขับออกจากร่างกายได้ดียิ่งขึ้น เอนไซม์ที่มีความสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวของ phase II ได้แก่ เอนไซม์ GST (Storey, 1996) โดยเอนไซม์ GST จะทำหน้าที่ในการขจัดและทำลายพิษออกจากเซลล์ (Pflugmacher *et al.*, 1998) ใน phase II โดยเอนไซม์ GST จะเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวกันระหว่าง กลูตาไธโอนกับ 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) ซึ่งทำหน้าที่เป็น substrate ผลจากการรวมตัวกันโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ GST ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ละลายน้ำได้ดีซึ่งสามารถขจัดออกจากร่างกายได้ดียิ่งขึ้นและได้ผลิตภัณฑ์ที่หมดความเป็นพิษ

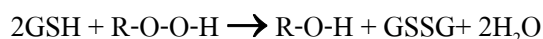
Pflugmacher *et al.* (1998) รายงานว่า เมื่อ microcystin ซึ่งเป็นสารพิษที่ได้มาจากสิ่งมีชีวิตพวก cyanobacteria เข้าสู่ร่างกายจะรวมตัวกับ GSH โดยมีเอนไซม์ GST เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและผลจากการรวมตัวทำให้สามารถขจัด microcystin ออกจากร่างกายได้ ส่วน Adalto and Monserrat (2007) ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ GST ในตับของปูทะเลชนิด *Chasmagnathus granulatus* เมื่อทำการเหนี่ยวนำด้วยสารพิษ 3,4-methylenedioxyphenol (0.05 mg/kg) ทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลาเป็นเวลา 3 วัน ผลการศึกษาพบว่าเมื่อครบ 3 วัน เอนไซม์ GST มีกิจกรรมเพิ่มมากขึ้นกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ทำการเหนี่ยวนำด้วยสารพิษ สาเหตุที่กิจกรรมของเอนไซม์ GST เพิ่มขึ้นเนื่องมาจากมีกิจกรรมของสารพิษในเซลล์มากขึ้น ดังนั้นกิจกรรมของเอนไซม์จึงมากขึ้นตาม เพื่อทำลายสารพิษ Pinho *et al.* (2003) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ GST เพิ่มขึ้นในตับของปู *C. granulatus* หลังจากถูกเหนี่ยวนำด้วย *Microcystin aeruginosa*

3. Glutathione peroxidase (GPx; EC 1.11.1.9) เป็น tetrameric glycoprotein โครงสร้างประกอบด้วย 4 โมเลกุลของ selenocysteine amino acid ที่เหมือนกัน แต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 22-23 กิโลดาลตัน ดังนั้น GPx จึงมีน้ำหนักโมเลกุลรวมประมาณ 84-94 กิโลดาลตัน (Maddipati and Marnett, 1987; Takahashi *et al.*, 1987)

เอนไซม์ GPx เป็นเอนไซม์ที่สามารถขจัดพิษออกจากเซลล์ (Ursini *et al.*, 1995) และปกป้องเซลล์จากอนุมูลอิสระ เช่น H_2O_2 (Arun and Subramanian, 1998) โดย GPx จะ เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำโดยอาศัย GSH เป็นตัวรีดิวส์ (Helmward, 1999) ดังสมการ



จากสมการจะเห็นได้ว่า GPx มีคุณสมบัติในการทำลายพิษของ H_2O_2 ให้หมดไป (Halliwell and Gutteridge, 1999) นอกจากนี้เอนไซม์ GPx ยังสามารถปกป้องเซลล์จากการเกิด LPO โดยเอนไซม์ GPx เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา organic peroxides (R-O-O-H) ให้กลายเป็น alcohols (R-O-H) โดยใช้ GSH ร่วมในปฏิกิริยาดังเช่นกัน (Marius and Brouwer, 1998) ดังสมการ



เอนไซม์ GPx เป็นเอนไซม์ที่พบในเนื้อเยื่อทั่วทั้งร่างกาย (Aceto *et al.*, 1994) ความแตกต่างของยีนทำให้ GPx มีหลากหลายชนิดด้วยกัน เช่น Cellular Glutathione Peroxidase (cGPx), Phospholipid Hydroperoxidase Glutathione Peroxidase (PHGPx) และ Plasma Glutathione Peroxidase (pl•GPx) เป็นต้น ชนิด cGPx พบใน cytosol และ mitochondria cGPx ทำหน้าที่ในการทำลายและลดความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจาก peroxidase ภายในเซลล์ให้หมดไป (Ursini *et al.*, 1995) ส่วนชนิด PHGPx พบอยู่ที่ membrane เป็นชนิดที่สามารถกำจัดลิพิดเปอร์ออกไซด์ออกจากรูขุมขนได้ (Minotti and Aust, 1989) โดยจะทำหน้าที่สลาย Phospholipid Hydroperoxidase ที่เกิดจากกระบวนการ LPO ให้มีความเป็นพิษน้อยลงหรือหมดความเป็นพิษ และชนิด pl•GPx เป็น primary sequence อาศัยอยู่ในบริเวณ glycosylated N-terminal และ extra-cellular (Avissar *et al.*, 1991) นอกจากนี้ยังพบ pl•GPx ปริมาณมากในตับ (Avissar *et al.*, 1989)

Livingstone (1990) รายงานว่าเอนไซม์ GPx ทำหน้าที่เป็นตัวบ่งชี้ ตรวจตรา และคอยเตือนเซลล์ เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม โดย GPx จะเป็นตัวชี้ให้เซลล์ทราบถึงภาวะที่กำลังตกอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงหรือมีพิษ

Arun and Subramanian (1998) ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ GPx ในตับ กล้ามเนื้อ และเหงือกของกุ้งชนิด *M. malcolmsonii* โดยพบการทำงานของเอนไซม์ GPx สูงสุดในตับ กล้ามเนื้อ และเหงือก ตามลำดับ ในขณะที่ Jagdishwer *et al.* (2000) ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ CAT GPx ในเหงือกและตับของกุ้ง *M. rosenbergii* ผลการศึกษาพบว่าทั้งสองอวัยวะมีกิจกรรมของเอนไซม์ GPx มากที่สุด เมื่อเทียบกับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้ Arun *et al.* (1999) ยังศึกษาอิทธิพลของ pH ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ GPx ในตับของกุ้ง *M. malcolmsonii* ซึ่งพบว่า เอนไซม์ GPx สามารถทำงานได้ดีที่ pH 8.0 และพลังงานการยับยั้ง (energy inhibition) ของเอนไซม์ GPx มีค่าเท่ากับ 13.71 กิโลแคลอรี/โมล

4. Glutathione (GSH) หรือ γ -glutamylcysteinylglycine เป็นสารพวกไตรเปปไทด์

(tripeptide) โครงสร้างประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 ชนิดคือ กรดกลูตามิก (glutamic acid) ซิสเทอีน (cysteine) และไกลซีน (glycine) จับกับหมู่ซัลเฟอร์ (sulfur; SH) ด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent) (Struznka *et al.*, 2005)

GSH ภายในเซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในรูปรีดิวซ์ (reduced form) (GSH) ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ และอีกประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในรูปของ oxidized form (GSSG) กลูตาไธโอนสามารถพบได้ภายในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง และในเซลล์ของพืช โดยจะพบปริมาณมากในเนื้อเยื่อของสัตว์ GSH เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีบทบาทภายใน cytoplasm มีความสำคัญในการคงสภาพของเซลล์ให้ดำรงอยู่ และสามารถทำงานได้อย่างปกติ GSH ยังมีบทบาทในการช่วยเร่งประสิทธิภาพการทำงานของวิตามินซี และวิตามินอี ให้อยู่ในรูปที่สามารถดูดซึมได้เร็วขึ้น นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ป้องกันเนื้อเยื่อจากภาวะเครียดออกซิเดชัน และภาวะบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ (tissue injury) ที่เกิดจากการทำลายของอนุมูลอิสระ ซึ่ง GSH มีคุณสมบัติในการปกป้องเซลล์จากอนุมูลอิสระสูง GSH สามารถปกป้องเซลล์จากความเป็นพิษของ microcystin (Pinho *et al.*, 2005) และยังมีบทบาทในการควบคุมการเกิดปฏิกิริยาการเกิด LPO ซึ่ง LPO สร้างความเสียหายให้แก่เซลล์เมมเบรนและทำให้เซลล์เมมเบรนเสียสภาพไป โดย GSH จะทำให้ปฏิกิริยาถูกชะของการเกิด LPO ภายในเซลล์สิ้นสุดลง (Storey, 1996) นอกจากนี้ GSH ยังทำหน้าที่ในการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่จะเข้ามาทำลายเซลล์ โดยอาศัยเอนไซม์ GST ในการเร่งปฏิกิริยา (Stine and Brown, 1996)

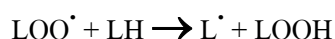
Pinho *et al.* (2005) รายงานว่า GSH มีความสำคัญในการปกป้องเซลล์ของ ปูน้ำจืด *C. granulatus* จากการทำลายของสารพิษ *M. aeruginosa* ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจาก cyanobacteria

Jagneshwer *et al.* (2000) ศึกษาอิทธิพลของวิตามินอีในอาหารที่ระดับความเข้มข้น 200, 400 และ 600 ppm ในอาหารที่มีต่อระดับ GSH ในตับของกุ้ง *M. rosenbergii* พบว่ากิจกรรมของ GSH ในตับจะเพิ่มสูงโดยแปรผันตามปริมาณของวิตามินอีที่มีอยู่ในอาหาร

Vijayavel *et al.* (2004) ศึกษากิจกรรมของ GSH ในตับของปูทะเล (*S. serrata*) โดยแบ่งปูทะเลออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเหนียวน้ำด้วยน้ำเกลือ 0.7 เปอร์เซ็นต์ เป็นกลุ่มควบคุม ส่วนกลุ่มที่ 2 ทำการเหนียวน้ำด้วย สาร naphthalene 100 mgL⁻¹ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่า GSH ในกลุ่มที่ 2 ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

5. Lipid peroxidation (LPO) LPO เป็นปฏิกิริยาที่เกิดจากไขมันชนิดต่าง ๆ เช่น triglyceride diglyceride และ phospholipid รวมถึงกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid ; PUFAs) เช่น linoleic acid, linolenic acid และ arachidonic acid ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์เมมเบรนถูกอนุมูลอิสระเข้าทำลายจะเกิดปฏิกิริยา LPO ขึ้น และอาจทำให้เซลล์ตกอยู่ในภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่งสภาวะดังกล่าวอาจก่อให้เกิดการตายของเซลล์ การตายของเซลล์นั้นเป็นสาเหตุให้เกิดความเสียหายต่อการทำงานของเนื้อเยื่อเช่น สูญเสียความยืดหยุ่น เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ และ receptors บนผิวเมมเบรน รวมถึงการเปลี่ยนแปลง ion channel และการซึมผ่าน (permeability) ของ Ca²⁺ ฯลฯ (Lombradi *et al.*, 1991)

กระบวนการเกิดปฏิกิริยาของ LPO เกิดขึ้นได้ดังต่อไปนี้ เมื่อมีอนุมูลอิสระเข้ามาทำปฏิกิริยากับลิพิด (autoxidation of lipid; LH) ทำให้เกิดอนุมูลลิพิด (L[•] หรือ R[•]) เช่น [•]OH เมื่อมี L[•] เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ O₂ ได้ผลิตภัณฑ์เป็น lipid peroxide (LOO[•]) และ LOO[•] จะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของลิพิดอื่นทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น lipid peroxide (LOOH) สามารถเขียนสมการได้ดังนี้ (Jeejeebhoy, 1991)



เมื่อภายในเซลล์เกิด LPO ขึ้นแสดงว่าเซลล์มีความไม่สมดุลเกิดขึ้น ระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ ปฏิกิริยา LPO ที่เกิดขึ้นทำให้ได้สารประกอบพวก reactive

carbonyl compounds เช่น 4-hydroxyalkenals และ malondialdehyde ซึ่งสารประกอบ 2 ชนิดนี้เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญ ถึงภาวะที่เซลล์หรือเนื้อเยื่อของสัตว์ได้รับความบาดเจ็บหรือเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่น อาจกล่าวได้ว่า LPO เป็นดัชนีบ่งชี้ปริมาณของอนุมูลอิสระได้ (Esterbauer *et al.*, 1991) มีรายงานการศึกษาของ Hermes-Lima *et al.* (1995) พบว่า LPO เป็นหนึ่งในตัวหลักที่สร้างความเสียหายให้แก่เซลล์ และ Rameshthangam and Ramasamy (2006) ตรวจสอบว่าระดับกิจกรรมของ LPO เพิ่มขึ้นในตับ เหงือก กล้ามเนื้อ และเลือดของกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) หลังจากถูกเหนี่ยวนำด้วย เชื้อ White spot syndrome virus (WSSV)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

เก็บตัวอย่างปูทะเลจากฟาร์มปูน้ำจืดซึ่งอยู่ในระยะ (stage) ต่าง ๆ ซึ่งมีขนาดความกว้างของกระดอง 9.6-10.6 ซม. ความยาว 6.8-7.6 ซม. ความหนา 4.1-4.5 ซม. และน้ำหนัก 310-390 กรัม นำปูมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์ที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มีการให้อาการตลอดเวลา และให้น้ำเปลี่ยนเป็นอาหารวันละครั้ง รอจนกระทั่งปูปรับสภาพได้แล้ว จึงเก็บเนื้อเยื่อไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ได้แก่ catalase, glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase สารต้านอนุมูลอิสระได้ชนิด glutathione และ lipid peroxidation ระยะของปูที่นำมาศึกษามีจำนวน 12 ระยะ ตาม Salaenoi *et al.* (2006a) ได้แก่

1. ระยะปูปกติที่มีกระดองแข็ง
2. ระยะก่อนการลอกคราบ 2 สัปดาห์
3. ระยะก่อนการลอกคราบ 1 สัปดาห์
4. ระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน
5. ระยะหลังการลอกคราบ 6 ชั่วโมง
6. ระยะหลังการลอกคราบ 12 ชั่วโมง
7. ระยะหลังการลอกคราบ 24 ชั่วโมง
8. ระยะหลังการลอกคราบ 2 วัน
9. ระยะหลังการลอกคราบ 3 วัน
10. ระยะหลังการลอกคราบ 5 วัน
11. ระยะหลังการลอกคราบ 7 วัน
12. ระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน

2. การเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extract)

การเตรียมเลือดปู โดยทำความสะอาดบริเวณขาเดินคู่ที่ 4 และ 5 ด้วยน้ำสะอาดและเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 21 เจาะเลือดปูบริเวณโคนขาเดิน นำเลือดเก็บในหลอดพลาสติกที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ trisodium citrate (อัตราส่วนระหว่าง 10 เปอร์เซ็นต์ trisodium citrate กับเลือดเท่ากับ 1:5) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 30 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

การเตรียมเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้แก่ ตับ เหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง และกล้ามเนื้อ โดยการนำไปแช่ในน้ำเย็นจัดประมาณ 1 นาที เพื่อให้ปูสลบ จากนั้นนำขึ้นไปวางบนภาชนะที่สะอาด ซับตัวปูให้แห้งด้วยผ้าสะอาด แล้วเก็บเนื้อเยื่อใต้กระดองโดยใช้กรรไกรตัดขอบกระดอง (carapace) โดยรอบ ดึงส่วนของกระดองที่ถูกตัดออก ใช้ปากคีบดึงเนื้อเยื่อใต้กระดองออกระวังมิให้เนื้อเยื่อฉีกขาด นำเนื้อเยื่อที่ถูกตัดไปแช่ใน Tris-HCl buffer, pH 8 ที่เย็นจัด (อัตราส่วนระหว่างเนื้อเยื่อกับ Tris buffer, pH 8 เท่ากับ 1 g: 5 ml) จากนั้นบดเนื้อเยื่อในโกร่ง ขณะที่บดให้เติมไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) เพื่อรักษาสภาพเนื้อเยื่อและช่วยทำให้บดได้ง่ายขึ้น ส่วนการเก็บเหงือก เริ่มจากทำความสะอาดเหงือกและใช้มีดผ่าตัด ตัดเหงือกมิให้ฉีกขาดจากนั้นนำเหงือกแช่ลงใน Tris-HCl buffer, pH 8 ที่เย็นจัด นำมาบดในโกร่งที่เติมไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำเนื้อเยื่อที่บดแล้วไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 6,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที เก็บส่วนใสไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป ส่วนตับและกล้ามเนื้อทำตามวิธีการเช่นเดียวกัน

3. การหาสภาพที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ catalase และการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ catalase

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ CAT ดัดแปลงจากวิธีการของ Takahara *et al.* (1960) โดยส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย 50 mM buffer (ศึกษา buffer ในช่วง pH 3-12), crude extract และ 3 mM H_2O_2 จากนั้นนำส่วนผสมไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ในช่วง 30 40 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 240 นาโนเมตร โดย 1 unit คิดจากความสามารถของ

เอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 240 nm ของ H_2O_2 ลดลง 0.01 ในเวลา 1 นาที โดยรายงานเป็นค่า $\text{units min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$

4. การหาสภาพที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ glutathione-S-transferase และการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ glutathione-S-transferase

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ GST ดัดแปลงจากวิธีการของ Habig *et al.* (1974) โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย crude extract, 1 mM reduced glutathione (GSH), 0.7 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) และ buffer (ศึกษา buffer ในช่วง pH 3-12) หลังจากนั้นนำส่วนผสมไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ในช่วง 30 40 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร โดย 1 unit คิดจากความสามารถของเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione ที่ความยาวคลื่น 340 nm เพิ่มขึ้น 0.1 ในเวลา 1 นาที โดยรายงานเป็นค่าเป็น 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione $\text{units min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$

5. การหาสภาพที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ glutathione peroxidase และการวิเคราะห์เอนไซม์ glutathione peroxidase

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ GPx ดัดแปลงจากวิธีการของ Rotruck *et al.* (1973) โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย crude extract, GSH, EDTA, sodium azide, H_2O_2 และ buffer (ศึกษา buffer ในช่วง pH 3-12) นำส่วนผสมไปบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสม (ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ในช่วง 30 40 50 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม 5 % trichloroacetic acid เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นตกตะกอนที่ 4,500 g เป็นเวลา 10 นาที นำเฉพาะส่วนใสมาผสมรวมกับ 0.1% DTNB และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 422 นาโนเมตร โดย 1 unit คิดจากความสามารถของเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ oxidized glutathione ที่ความยาวคลื่น 422 nm เพิ่มขึ้น 0.001 ในเวลา 1 นาที โดยรายงานเป็นค่า oxidized glutathione $\text{units min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$

6. การวิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระชนิด glutathione

การวิเคราะห์กิจกรรมของ GSH คัดแปลงวิธีการของ Anderson (1985) โดยนำ crude extract มาเติมด้วย 5 % trichloroacetic acid หลังจากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 4,500 g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาผสมรวมกับ 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) ใน 100 mM buffer pH 7 จากนั้นวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 นาโนเมตร โดย 1 unit คิดเทียบจากค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ 2-nitro-5-mercatobenzoic acid (TNB) ที่เพิ่มขึ้น 0.001 ในเวลา 1 นาที โดยรายงานเป็น $\mu\text{moles 2-nitro-5-mercatobenzoic acid (TNB) min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$

7. การศึกษากิจกรรมของ Lipid peroxidation

การวิเคราะห์กิจกรรมของ LPO คัดแปลงจากวิธีการของ Buege and Aust (1978) โดยนำส่วนผสมของปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย crude extract, trichloroacetic acid, thiobarbituric acid (TBA) และ hydrochloric acid ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นด้วยเครื่องปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 4,500 g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตร โดย 1 unit คิดเทียบจากค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ malondialdehyde (MDA)-TBA ที่เพิ่มขึ้น 0.001 ในเวลา 1 นาที โดยรายงานเป็น $\mu\text{moles malondialdehyde-TBA min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$

8. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของเลือด และเนื้อเยื่อแต่ละชนิด แล้ววัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยเทียบการดูดแสงของโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) ที่ทราบความเข้มข้นแล้ว ตามวิธีการของ Bradford (1976)

9. การวางแผนการทดลอง

การวางแผนการทดลองเป็นแบบสุ่มตลอด (completely randomized design) โดยตัวอย่างผู้นำมาศึกษาจะใช้จำนวน 3 ตัวต่อซ้ำซึ่งมีทั้งหมด 5 ซ้ำ ต่อ 1 ระยะในช่วงการลอกคราบ

10. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยขององค์ประกอบที่ศึกษาในระยะเวลาต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบ แล้ววิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

ผลและวิจารณ์

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระชนิด catalase, glutathione-S-transferase และ glutathione peroxidase กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระชนิด glutathione และกิจกรรมของ lipid peroxidation ในเลือด เหยือก ตับ เนื้อเยื่อใต้กระดอง และกล้ามเนื้อ ของปูทะเล จำนวน 12 ระยะตลอดวงจรการลอกคราบ โดยเก็บตัวอย่างจากฟาร์มปูน้ำ อ. ชลุม จ. จันทบุรี ซึ่งทำการศึกษา ตั้งแต่เดือน พฤศจิกายน 2551 ถึง กันยายน 2552 พบว่า ลักษณะภายนอกของปูในระยะปกติ ระยะก่อนการลอกคราบ และระยะหลังการลอกคราบ มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยที่ปูในระยะปกติ มีกระดองแข็งมาก มีสีน้ำตาลเข้ม กินอาหารได้เป็นปกติ ปูในระยะนี้มีพฤติกรรมคร่ำๆ ปราดเปรียวและเคลื่อนที่ได้อย่างรวดเร็ว จึงไม่สามารถนำมาขังรวมกันได้เนื่องจากปูจะทำร้ายกันเอง เมื่อปูเข้าสู่ระยะก่อนการลอกคราบ กระดองจะมีการเปลี่ยนแปลงโดยกระดองจะมีลักษณะกรอบเปราะ และแตกง่าย โดยปูที่อยู่ในระยะใกล้ลอกคราบจะมีพฤติกรรมเคลื่อนไหวน้อยลง หรืออาจจะไม่มีการเคลื่อนที่ และไม่กินอาหาร ส่วนบริเวณรอยต่อระหว่างกระดองและขาจะมีอาการบวม และปริออก ยิ่งใกล้ลอกคราบบริเวณดังกล่าวจะบวมออกมาอย่างเห็นได้ชัดเจน ขณะที่กำลังจะลอกคราบน้ำมันปูจะค่อย ๆ ถอยหลังออกจากส่วนท้ายบริเวณรอยต่อระหว่างกระดองกับขา เมื่อออกจากกระดองแล้วปูจะดึงน้ำเข้าสู่ร่างกายในปริมาณที่มากกว่าปกติ ซึ่งทำให้ปูขยายขนาดของร่างกายและน้ำหนักเพิ่มขึ้น การลอกคราบจึงเป็นวิธีการเพิ่มการเจริญเติบโตของปู ปูที่ลอกคราบใหม่ ๆ จะไม่กินอาหาร ไม่เคลื่อนที่หรือเคลื่อนที่ได้ช้า นอกจากนี้ร่างกายของปูที่ลอกคราบใหม่ ๆ จะอ่อนนุ่ม ไม่สามารถช่วยเหลือตัวเองได้ หลังจากลอกคราบแล้วประมาณ 2 วัน ปูจะเคลื่อนไหวน้อยลง เริ่มกินอาหาร และกระดองจะเริ่มแข็งขึ้นเรื่อย ๆ

1. เอนไซม์ catalase

1.1 สภาพที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ CAT

ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ CAT ในเลือด เหยือก ตับ เนื้อเยื่อใต้กระดอง และกล้ามเนื้อของปูทะเล พบว่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ CAT ในเลือด เหยือก ตับ และกล้ามเนื้อ เป็น pH 7 ส่วนในเนื้อเยื่อใต้กระดอง คือ pH 8

จากผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ CAT ในส่วนต่าง ๆ ของปูทะเลสอดคล้องกับการศึกษาของ Arun and Subramanian (1998) ที่รายงานว่า pH ที่เหมาะสมที่นำมาใช้ในการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ CAT ในตับ กล้ามเนื้อ และเหงือกของกุ้งชนิด *Macrobrachium malcolmsonii* คือ pH 7 และ Carolina *et al.* (2007) ยังพบว่า pH 7 ยังเหมาะสมกับกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ในกล้ามเนื้อ ตับ เหงือก และเลือดของปู *Paralomis granulose* อีกด้วย อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า pH 8 มีความเหมาะสมในการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ CAT ในตับ (Pinho *et al.*, 2005) และเหงือก (Ubirajara *et al.*, 2005) ของปูชนิด *Chasmagnathus granulatus*

ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ CAT ในเนื้อเยื่อได้กระดอง เหงือก ตับ กล้ามเนื้อ และเลือดของปูทะเล พบว่า เลือด ตับ เนื้อเยื่อได้กระดอง และกล้ามเนื้อมีอุณหภูมิที่เหมาะสมเดียวกัน คือ 30 องศาเซลเซียส ส่วนในเหงือกพบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

จากผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ CAT ในส่วนต่าง ๆ ของปูทะเล ผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Adalto and Monserrat (2007) ที่ศึกษากิจกรรมของ CAT ในตับของปูชนิด *Chasmagnathus granulatus* และพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส ส่วน Pinho *et al.* (2005) รายงานว่าอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CAT ในเหงือกของปูชนิดเดียวกัน

1.2 กิจกรรมเอนไซม์ catalase ในเลือด

จากการวิเคราะห์กิจกรรม CAT ในเลือดมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.56 ± 0.32 ถึง 3.30 ± 0.47 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 1) ในปูกระดองแข็งปกติ (C) พบว่ามีกิจกรรม CAT เท่ากับ 2.01 ± 0.09 units mg protein⁻¹ และในระยะก่อนการลอกคราบ 2 สัปดาห์มีกิจกรรมเพิ่มขึ้น (D₁) (2.72 ± 0.48 units mg protein⁻¹) เมื่อเข้าสู่ระยะก่อนการลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D₂) กิจกรรม CAT มีค่าลดลงเท่ากับ 1.50 ± 0.15 units mg protein⁻¹ หลังจากนั้นกิจกรรมมีค่าเพิ่มขึ้นและคงที่ตั้งแต่ระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D₃) (3.28 ± 0.50 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะหลังการลอกคราบ 2 วัน (B₁) (2.70 ± 0.04 units mg protein⁻¹) กิจกรรมเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็วในระยะหลังการลอกคราบ 3 วัน

ตารางที่ 1 กิจกรรมของ catalase ในส่วนต่าง ๆ ตลอดจนการลอกคราบของปูทะเล

ระยะ	กิจกรรมของ catalase (units mg protein ⁻¹) ในส่วนต่าง ๆ ของปูทะเล				
	เลือด	เหงือก	ตับ	เนื้อเยื่อใต้ กระดอง	กล้ามเนื้อ
กระดองแข็งปกติ (C)	2.01±0.09 ^b	0.56±0.01 ^a	29.62±1.09 ^c	10.59±0.13 ^b	20.47±0.33 ^d
ก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D ₁)	2.72±0.48 ^c	5.30±0.13 ^b	47.86±0.35 ^c	11.05±0.31 ^b	23.81±0.88 ^d
ก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D ₂)	1.50±0.15 ^b	6.05±0.13 ^b	29.71±1.71 ^c	11.13±0.27 ^b	29.31±0.50 ^c
ก่อนลอกคราบ 2 วัน (D ₃)	3.28±0.50 ^c	5.58±0.06 ^b	46.42±0.57 ^c	22.39±0.31 ^d	19.38±0.17 ^c
หลังลอกคราบ 6 ชม. (A ₁)	3.13±0.14 ^c	0.88±0.04 ^a	5.07±0.18 ^a	15.15±0.69 ^c	19.59±0.31 ^c
หลังลอกคราบ 12 ชม. (A _{2,1})	2.02±0.06 ^b	0.56±0.04 ^a	27.56±0.19 ^c	8.05±0.38 ^a	4.65±0.10 ^a
หลังลอกคราบ 24 ชม. (A _{2,2})	1.97±0.28 ^b	0.52±0.21 ^a	8.89±1.13 ^b	11.22±1.02 ^b	8.01±0.16 ^a
หลังลอกคราบ 2 วัน (B ₁)	2.70±0.04 ^c	5.06±0.22 ^b	10.93±0.26 ^b	16.80±1.19 ^c	13.78±0.45 ^b
หลังลอกคราบ 3 วัน (B _{2,1})	0.56±0.32 ^a	0.66±0.01 ^a	56.58±0.31 ^f	22.91±1.11 ^d	32.88±0.99 ^c
หลังลอกคราบ 5 วัน (B _{2,2})	2.94±0.39 ^c	8.42±0.36 ^c	37.90±0.54 ^d	17.08±1.19 ^c	18.67±0.67 ^c
หลังลอกคราบ 7 วัน (B _{2,3})	2.85±0.46 ^c	1.45±0.37 ^a	10.78±0.20 ^b	9.14±0.25 ^a	16.79±0.44 ^b
หลังลอกคราบ 10 วัน (B _{2,4})	3.30±0.47 ^c	1.33±0.29 ^a	26.73±0.68 ^c	12.91±0.83 ^b	18.13±0.31 ^d

หมายเหตุ: ตัวอักษร (Superscript) ในแนวนอน (Column) แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

(B_{2,1}) (0.56±0.32 units mg protein⁻¹) หลังจากนั้นค่าเพิ่มขึ้นอย่างคงที่ในระยะหลังการลอกคราบ 5 วัน (B_{2,2}) (2.94±0.39 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน (B_{2,4}) (3.30±0.47 units mg protein⁻¹)

1.3 กิจกรรมเอนไซม์ catalase ในเหงือก

จากการวิเคราะห์กิจกรรม CAT ในเหงือกมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.52 ± 0.21 ถึง 8.42 ± 0.36 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 1) โดยปุกระดองแข็งปกติ (C) มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 0.56 ± 0.01 units mg protein⁻¹ และมีค่าเพิ่มขึ้นจนกระทั่งคงที่เมื่อเข้าสู่ระยะก่อนการลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) (5.30 ± 0.13 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D₃) (5.58 ± 0.06 units mg protein⁻¹) หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์ลดลง เมื่อเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) (0.88 ± 0.04 units mg protein⁻¹) ถึงระยะหลังการลอกคราบ 24 ชั่วโมง (A_{2,2}) (0.52 ± 0.21 units mg protein⁻¹) แต่ในระยะหลังการลอกคราบ 2 วัน (B₁) พบว่ากิจกรรมมีค่าเพิ่มขึ้นเท่ากับ 5.06 ± 0.22 units mg protein⁻¹ และลดลงอีกครั้งเมื่อพัฒนาเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบ 3 วัน (B_{2,1}) (0.66 ± 0.01 units mg protein⁻¹) กิจกรรมของ CAT เพิ่มขึ้นสูงสุดในระยะหลังการลอกคราบ 5 วัน (B_{2,2}) (8.42 ± 0.36 units mg protein⁻¹) และลดลงในระยะหลังการลอกคราบ 7 วัน (B_{2,3}) (1.45 ± 0.37 units mg protein⁻¹) ถึงระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน (B_{2,4}) (1.33 ± 0.29 units mg protein⁻¹)

1.4 กิจกรรมเอนไซม์ catalase ในตับ

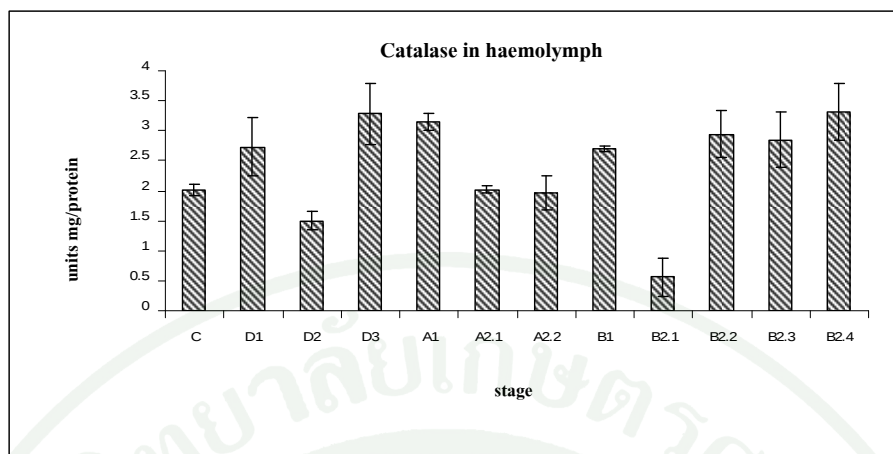
จากการวิเคราะห์กิจกรรมของ CAT ในตับมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 5.07 ± 0.18 ถึง 56.58 ± 0.31 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 1) โดยปุกระดองแข็งปกติ (C) มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 29.62 ± 1.09 units mg protein⁻¹ โดยเพิ่มขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะก่อนการลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) (47.86 ± 0.35 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D₃) (46.42 ± 0.57 units mg protein⁻¹) พบกิจกรรม CAT ต่ำสุดในระยะหลังการลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) (5.07 ± 0.18 units mg protein⁻¹) และเพิ่มขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบ 12 ชั่วโมง (A_{2,1}) (27.56 ± 0.19 units mg protein⁻¹) หลังจากนั้นกิจกรรมลดลงและมีค่าค่อนข้างคงที่ในระยะหลังการลอกคราบ 24 ชั่วโมง (A_{2,2}) (8.89 ± 1.13 units mg protein⁻¹) ถึงระยะหลังการลอกคราบ 2 วัน (B₁) (10.93 ± 0.26 units mg protein⁻¹) แต่เมื่อเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบ 3 วัน (B_{2,1}) กิจกรรมมีค่าสูงสุดเท่ากับ (56.58 ± 0.31 units mg protein⁻¹) หลังจากนั้นพบว่ากิจกรรม CAT ลดลงในระยะหลังการลอกคราบ 5 วัน (B_{2,2}) (37.90 ± 0.54 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน (B_{2,4}) (26.73 ± 0.68 units mg protein⁻¹)

1.5 กิจกรรมเอนไซม์ catalase ในเนื้อเยื่อไตกระดอง

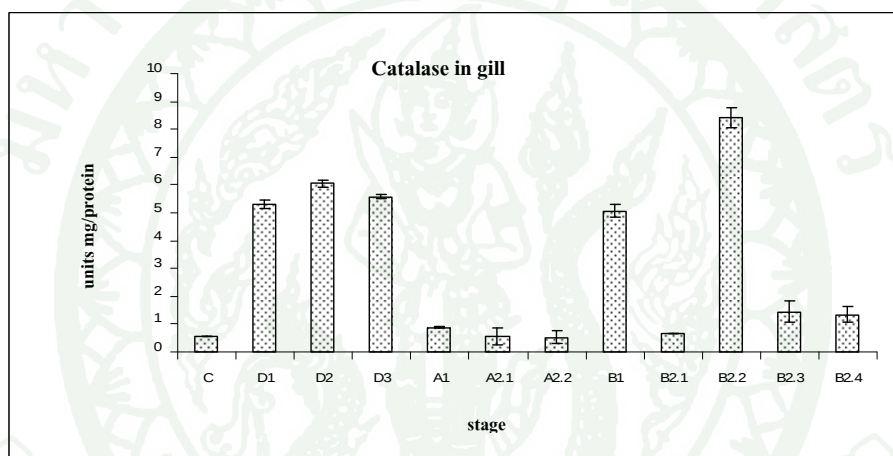
จากการวิเคราะห์กิจกรรม CAT ในเนื้อเยื่อไตกระดองมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 8.05 ± 0.38 ถึง 22.91 ± 1.11 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 1) ในปูกระดองแข็งแรงปกติ (C) มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 10.59 ± 0.13 units mg protein⁻¹ โดยในระยะก่อนการลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) และระยะก่อนการลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D₂) พบว่ากิจกรรมมีค่าคงที่เท่ากับ 11.05 ± 0.31 units mg protein⁻¹, 11.13 ± 0.27 units mg protein⁻¹ ตามลำดับ เมื่อเข้าสู่ระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D₃) กิจกรรม CAT เพิ่มขึ้นเท่ากับ 22.39 ± 0.31 units mg protein⁻¹ แต่ลดลงในระยะหลังการลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) (15.15 ± 0.69 units mg protein⁻¹) และระยะหลังการลอกคราบ 12 ชั่วโมง (A_{2,1}) (8.05 ± 0.38 units mg protein⁻¹) หลังจากนั้นกิจกรรม CAT เพิ่มขึ้นในระยะหลังการลอกคราบ 24 ชั่วโมง (A_{2,2}) (11.22 ± 1.02 units mg protein⁻¹) จนถึงหลังการลอกคราบ 10 วัน (B_{2,4}) (12.91 ± 0.83 units mg protein⁻¹)

1.6 กิจกรรมเอนไซม์ catalase ในกล้ามเนื้อ

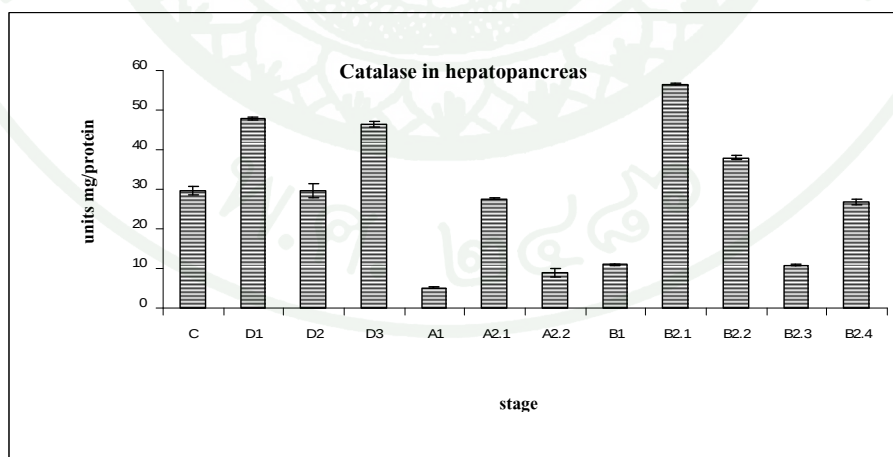
จากการวิเคราะห์กิจกรรมของ CAT ในกล้ามเนื้อ มีค่าระหว่าง 4.65 ± 0.10 ถึง 32.88 ± 0.99 units mg protein⁻¹ (ตารางที่1) ในปูกระดองแข็งแรงปกติ (C) มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 20.47 ± 0.33 units mg protein⁻¹ โดยระยะก่อนการลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) และระยะก่อนการลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D₂) มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 23.81 ± 0.88 units mg protein⁻¹ และ 29.31 ± 0.50 units mg protein⁻¹ ตามลำดับ หลังจากนั้นกิจกรรม CAT ลดลงในระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D₃) (19.38 ± 0.17 units mg protein⁻¹) ระยะหลังการลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) (19.59 ± 0.31) และลดลงต่ำในระยะหลังการลอกคราบ 12 ชั่วโมง (A_{2,1}) (4.65 ± 0.10 units mg protein⁻¹) กิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นอีกครั้งเมื่อปูพัฒนาเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบ 24 ชั่วโมง (A_{2,2}) (8.01 ± 0.16 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน (B_{2,4}) (18.13 ± 0.31 units mg protein⁻¹)



(A)

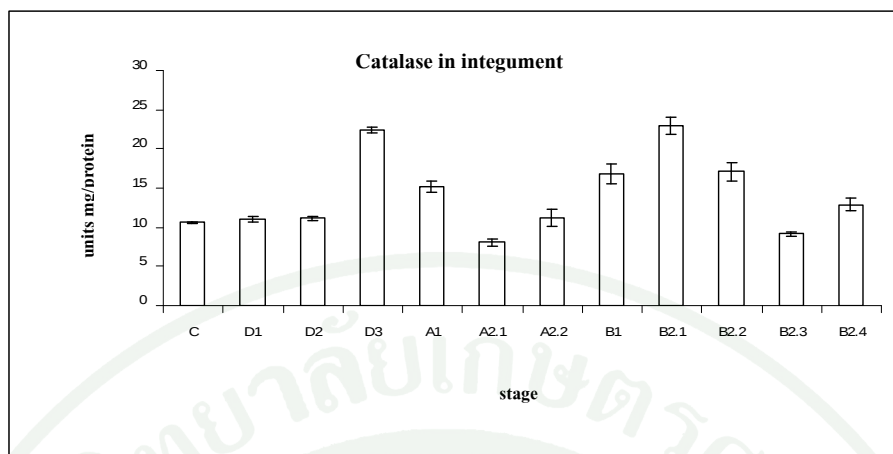


(B)

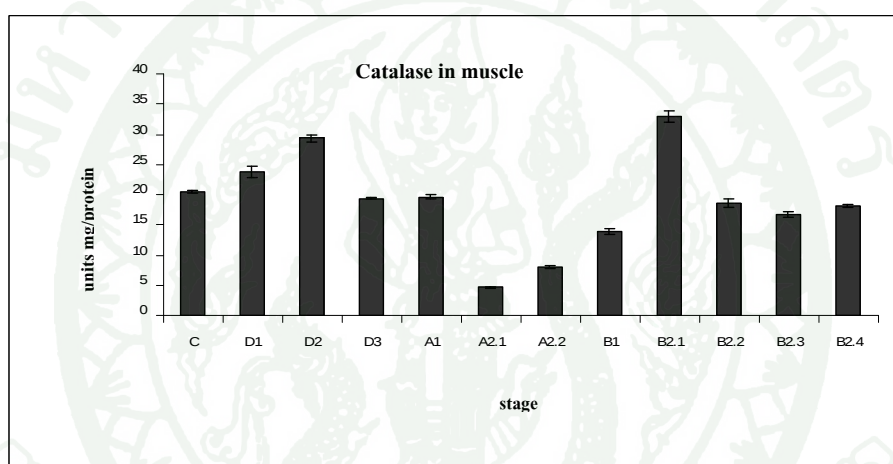


(C)

ภาพที่ 1 กิจกรรม catalase ในเลือด (A) เหงือก (B) และตับ (C) ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล



(D)



(E)

ภาพที่ 2 กิจกรรม catalase ในเนื้อเยื่อใต้กระดอง (D) และกล้ามเนื้อ (E) ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล

CAT เป็นเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่พบอยู่ภายใน cytoplasm, erythrocytes, nucleus, mitochondria ของเซลล์ทุกเซลล์ที่มีชีวิต (Michael and Dariush, 2006) โดยเอนไซม์ CAT จะทำหน้าที่ในการทำลาย H_2O_2 ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มีพิษ H_2O_2 เป็นอนุมูลอิสระที่เกิดได้จากกระบวนการภายในร่างกาย เช่น กระบวนการเผาผลาญพลังงาน กระบวนการหายใจ และกระบวนการทำลายสิ่งแปลกปลอม เป็นต้น เมื่อร่างกายเกิดกระบวนการดังกล่าวจะทำให้ได้ superoxide anion (O_2^-) หลังจากนั้น (O_2^-) จะทำปฏิกิริยาต่อไปกับเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ผลจาก

ปฏิกิริยาทำให้ได้ $\text{HO}_2^{\cdot}$ และเมื่อ $\text{HO}_2^{\cdot}$ 2 โมเลกุลรวมกันจะได้ผลิตภัณฑ์คือ H_2O_2 ถ้า H_2O_2 ไม่ถูกกำจัดหรือทำลายทิ้งไป H_2O_2 จะเข้าสู่ปฏิกิริยา Haber-Weiss ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่าง H_2O_2 และ $\text{O}_2^{\cdot-}$ ทำให้ได้ $\text{OH}^{\cdot}$ $\text{OH}^{\cdot}$ เป็นอนุมูลอิสระที่มีพิษต่อเซลล์มาก ถ้าไม่ถูกกำจัดทำลายออกไปอาจทำให้เซลล์ตายได้ ดังนั้นก่อนที่ H_2O_2 จะเกิดปฏิกิริยากลายเป็น $\text{OH}^{\cdot}$ ร่างกายจึงมีกระบวนการทำลาย H_2O_2 โดยใช้เอนไซม์ CAT เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน H_2O_2 ให้เป็นน้ำและออกซิเจนอิสระ (John and Dorothy, 1997)

จากผลการศึกษากิจกรรม CAT ตลอดระยะการลอกคราบของปูทะเล พบว่า กิจกรรม CAT ในเลือดระยะก่อนการลอกคราบ มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น และเมื่อเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบ ก็ยังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นกัน เมื่อเทียบกับระยะกระดองแข็งปกติ ซึ่งอาจเนื่องจากเม็ดเลือดของปูทำหน้าที่ในการทำลายสิ่งแปลกปลอม ซึ่งเป็นระบบภูมิคุ้มกันแบบ cellular immunity (Soderhall and Cerenius, 1992) โดยระบบภูมิคุ้มกันดังกล่าว ประกอบด้วยเม็ดเลือด 3 ชนิดด้วยกันคือ hyaline cell เป็นเม็ดเลือดที่มีหน้าที่ในกระบวนการ phagocytosis หรือกระบวนการกลืนกินเซลล์สิ่งแปลกปลอม เม็ดเลือดชนิด semigranular ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ phagocytosis และทำลายสิ่งแปลกปลอมแบบห่อหุ้มเชื้อโรค (encapsulation) ส่วนเม็ดเลือดชนิด granular cell จะทำหน้าที่ในการเก็บและปลดปล่อยเอนไซม์ prophenoloxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำลายสิ่งแปลกปลอม (Soderhall and Cerenius, 1992) โดยระหว่างกระบวนการทำลายสิ่งแปลกปลอมดังกล่าวก่อให้เกิด H_2O_2 เกิดขึ้น ซึ่งระยะหลังการลอกคราบเป็นระยะที่ปูมีกระดองที่นิ่ม สภาพร่างกายอ่อนแอ เชื้อโรคอาจเข้าสู่ร่างกายได้ง่ายและมากกว่าระยะกระดองแข็งปกติ ดังนั้นในเลือดจึงมีแนวโน้มของกิจกรรม CAT เพิ่มขึ้นกว่าปกติ เพื่อทำหน้าที่ในการทำลาย H_2O_2 ที่เกิดจากกระบวนการทำลายสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด สอดคล้องกับ Cheng and Chen (2001) ที่รายงานว่าในระยะหลังการลอกคราบของกุ้งชนิด *P. stylirostris* จะพบจำนวนเม็ดเลือดสูงสุดในระยะดังกล่าว ส่วน Arun and Subramanian (1998) ศึกษากิจกรรม CAT ในเลือด กล้ามเนื้อ และเหงือก ของกุ้งชนิด *M. malcolmsonii* ระยะ sub-adult ผลการศึกษาพบว่ากิจกรรมในเลือดสูง เนื่องจากเลือดต้องทำหน้าที่ในกระบวนการทำลายสิ่งแปลกปลอม ดังนั้นในเลือดจึงมีกิจกรรมของ CAT มากกว่าในเหงือก และกล้ามเนื้อ

กิจกรรม CAT ในเหงือกกระช่อนการลอกคราบ พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจนกว่าประยุกระดองแข็งปกติ โดยในระยะหลังการลอกคราบกิจกรรม CAT ก่อนข้างแปรปรวน อาจด้วยระยะก่อนการลอกคราบต้องการออกซิเจนมากกว่าระยะปกติ เพื่อที่ออกซิเจนจะถูกส่งไปช่วยในกระบวนการคั้งกลับและสลายแคลเซียมจากกระดองเก่า โดยผ่านทางเลือดซึ่งเหงือกเป็นบริเวณแลกเปลี่ยนก๊าซ เมื่อร่างกายมีความต้องการออกซิเจนสูงและออกซิเจนถูกนำไปใช้ในปฏิกิริยาต่าง ๆ เป็นผลทำให้บริเวณเหงือกมี H_2O_2 เกิดขึ้นด้วย ซึ่ง Carolina *et al.* (2007) รายงานว่าเมื่อเหงือกของปูชนิด *Paralomis granulose* ต้องการออกซิเจนมากขึ้น เหงือกจะปลดปล่อย O_2^- ออกมามาก ส่งผลให้เหงือกมีกิจกรรมของ CAT สูง เพื่อทำหน้าที่ในการยับยั้งและทำลาย H_2O_2 ที่เกิดจากปฏิกิริยาการสลาย O_2^-

ส่วนกิจกรรม CAT ในตับพบว่า ในระยะก่อนการลอกคราบกิจกรรมมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับประยุกระดองแข็งปกติ และเมื่อเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบ พบว่ากิจกรรม CAT ในตับค่อนข้างแปรปรวนและมีค่าสูง อาจเนื่องมาจากระยะก่อนการลอกคราบ ปูมีการสะสมพลังงานสำรองเพื่อใช้ในระหว่างที่มีการลอกคราบ (ซึ่งช่วงนั้นเป็นช่วงที่ปูไม่กินอาหาร) ตับนับเป็นแหล่งของพลังงาน สำรองและเป็นอวัยวะที่มีการสะสมสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ต่าง ๆ รวมถึงเป็นอวัยวะที่มีกระบวนการเผาผลาญพลังงานสูง (Adalto and Monserrat, 2007) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวก่อให้เกิด H_2O_2 เกิดขึ้นมากเช่นกัน ดังนั้นกิจกรรม CAT ในตับจึงมีค่าสูงขึ้นตามไปด้วยเพื่อที่จะนำไปใช้ในการสลายและทำลาย H_2O_2 Arun and Subramanian (1998) กล่าวว่า ตับของสัตว์กลุ่มครัสเตเชียเป็นอวัยวะที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นมากที่สุด เช่นเดียวกับ Pan *et al.* (2004) ที่รายงานว่าพบกิจกรรมของ CAT มีค่าสูงในตับ มากกว่าในเหงือกของปูชนิด *Eriocheir sinensis* ส่วน Luqing and Zhang (2006) รายงานว่าในปูชนิด *Charybdis japonica* พบ O_2^- สูงในตับ ซึ่งเมื่อ O_2^- เข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ SOD จะได้ผลิตภัณฑ์ H_2O_2 ออกมา

กิจกรรมของ CAT ในเนื้อเยื่อได้กระดองพบว่า ในระยะก่อนการลอกคราบและระยะหลังการลอกคราบกิจกรรมมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับระยะปูกระดองแข็งปกติ ซึ่งอาจเนื่องมาจากในระยะก่อนการลอกคราบ ปูมีการกระบวนการสลายและคั้งกลับแคลเซียมจากกระดองเก่า และระยะหลังการลอกคราบจะมีกระบวนการสะสมแคลเซียมในกระดองใหม่ เพื่อให้โครงร่างใหม่มีความแข็งแรงขึ้น นอกจากนี้ในกระบวนการสร้าง chitin ที่ชั้น cuticle ในเนื้อเยื่อได้กระดองของปู ยังมีการเผาผลาญพลังงานเกิดขึ้นซึ่งสารตั้งต้นในกระบวนการดังกล่าวได้มาจากย่อย

สลายน้ำตาล trehalose โดยเอนไซม์ trehalase (Chung, 2008) ดังนั้นผลจากกระบวนการดังกล่าวทำให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก กิจกรรมของ CAT จึงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น

ส่วนในกล้ามเนื้อพบว่า ก่อนการลอกคราบกิจกรรม CAT มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นกว่าระยะปูกระดองแข็งปกติ จากนั้นกิจกรรมลดลงในระยะหลังการลอกคราบใหม่ ๆ (A_1 - $A_{2.2}$) และค่อย ๆ เพิ่มขึ้นในระยะหลังการลอกคราบ จนมีค่าสูงสุดในระยะหลังการลอกคราบ 3 วัน ($B_{2.1}$) หลังจากนั้นเมื่อเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบ 5 ถึง 10 วัน ($B_{2.2}$ - $B_{2.4}$) กิจกรรมของ CAT ก่อนข้างคงที่ เนื่องจากกล้ามเนื้อของปูทำหน้าที่ในการเคลื่อนไหว เมื่อปูลอกคราบได้ 2 วัน ปูจะมีการเคลื่อนไหวได้มากขึ้น และมีพัฒนาการเคลื่อนไหวเพิ่มขึ้นจนสามารถเคลื่อนไหว ได้อย่างคล่องแคล่วหลังการลอกคราบประมาณ 7 วัน (บรรจง และบุญรัตน์, 2545) จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่ากิจกรรมของ CAT ในระยะหลังการลอกคราบ 5 ถึง 10 วัน ก่อนข้างจะใกล้เคียงกับระยะปกติ อาจเนื่องมาจากปูเริ่มมีการเคลื่อนไหวได้ใกล้เคียงกับระยะปกติ ซึ่งการเคลื่อนไหวของปูต้องอาศัยพลังงานที่ได้จากการสลายไกลโคเจนที่สะสมอยู่ในกล้ามเนื้อโดยจะสลายให้ glucose (Dutra *et al.*, 2008) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวก่อให้เกิดอนุมูลอิสระเกิดขึ้น Mohankumar and Ramasamy (2006) รายงานว่ากล้ามเนื้อของกุ้งชนิด *Fenneropenaeus indicus* ที่มีร่างกายแข็งแรง เคลื่อนไหวได้อย่างคล่องแคล่ว มีกิจกรรมของ CAT สูงกว่ากุ้งที่มีสภาพร่างกายอ่อนแอ เช่นเดียวกับ Rameshthangam and Ramasamy (2006) ก็พบว่าในกล้ามเนื้อของกุ้งชนิด *P. monodon* ที่มีสภาพร่างกายสมบูรณ์แข็งแรงกิจกรรมของ CAT สูงกว่ากุ้งที่มีสภาพร่างกายอ่อนแอ

2. เอนไซม์ glutathione-S-transferase

2.1 สภาพที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ glutathione-S-transferase

ผลการศึกษาสภาพ pH ที่มีความเหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ GST ในเลือด เหงือก ตับ เนื้อเยื่อใต้กระดอง และกล้ามเนื้อของปูทะเล พบว่า pH ที่เหมาะสมสำหรับเหงือก ตับ และเนื้อเยื่อใต้กระดอง คือ pH 7 ส่วนในเลือด และกล้ามเนื้อ คือ pH 8

จากผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ GST ในส่วนต่าง ๆ ของปูทะเล สอดคล้องกับ Adalto and Monserrat (2007) ที่พบว่า pH 7 เป็น pH ที่เหมาะสมที่ใช้ในการศึกษากิจกรรมของ GST ในตับของปูชนิด *Chasmagnathus granulatus* เช่นเดียวกับ Vinagre *et al.* (2003) ที่ได้ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ในเหงือกของปูชนิด *Chasmagnathus granulatus* และพบว่า pH 7 เป็น pH ที่เหมาะสม นอกจากนี้ Pinho *et al.* (2003) รายงานว่า pH 7 เป็น pH ที่เหมาะสมในการศึกษากิจกรรมของ GST ในตับของปูชนิด *Chasmagnathus granulatus* ซึ่งใกล้เคียงกับผลของ Yahia *et al.* (2007) ที่พบว่า pH 7.4 มีความเหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ GST ในเหงือกของปูชนิดเดียวกัน

ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ GST ในเนื้อเยื่อได้กระดอง เหงือก ตับ กล้ามเนื้อ และเลือดของปูทะเล พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในเนื้อเยื่อได้กระดอง กล้ามเนื้อ และเลือด เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส ส่วนในเหงือก และตับ พบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จากผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ GST ในส่วนต่าง ๆ ของปูทะเล มีรายงานของ Pinho *et al.* (2003) ว่าอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่มีความเหมาะสมในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ GST ในตับของปูชนิด *Chasmagnathus granulatus* เช่นเดียวกับผลของ Vinagre *et al.* (2003) ที่พบในเหงือกของปูชนิดเดียวกัน

2.2 กิจกรรมเอนไซม์ glutathione-S-transferase ในเลือด

จากการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ GST ในเลือดมีค่าเฉลี่ยอยู่ช่วง 0.08 ± 0.05 ถึง 1.27 ± 0.13 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 2) ในปูกระดองแข็งปกติ (C) มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 0.24 ± 0.03 units mg protein⁻¹ โดยเพิ่มขึ้นในระยะก่อนการลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) (0.45 ± 0.04 units mg protein⁻¹) ถึงระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D₂) (0.51 ± 0.09 units mg protein⁻¹) หลังจากนั้นกิจกรรมลดลงในระยะหลังการลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) (0.08 ± 0.05 units mg protein⁻¹) ถึงระยะหลังการลอกคราบ 12 ชั่วโมง (A_{2,1}) (0.27 ± 0.07 units mg protein⁻¹) แล้วกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นอีกครั้งในระยะหลังการลอกคราบ 24 ชั่วโมง (A_{2,2}) (0.49 ± 0.06 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะหลังการ

ตารางที่ 2 กิจกรรมของ glutathione-S-transferase ในส่วนต่าง ๆ ตลอดจนการลอกคราบของปูทะเล

ระยะ	กิจกรรมของ glutathione-S-transferase (units mg protein ⁻¹)				
	ในส่วนต่าง ๆ ของปูทะเล				
	เลือด	เหงือก	ตับ	เนื้อเยื่อใต้ กระดอง	กล้ามเนื้อ
กระดองแข็งปกติ (C)	0.24±0.03 ^b	0.63±0.03 ^b	28.24±0.95 ^b	4.84±0.30 ^a	2.78±0.26 ^a
ก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D ₁)	0.45±0.04 ^c	2.33±0.23 ^b	26.50±0.39 ^b	6.94±0.26 ^b	3.92±0.13 ^b
ก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D ₂)	0.25±0.06 ^b	4.85±0.11 ^c	50.06±0.88 ^d	6.36±0.41 ^b	2.24±0.57 ^a
ก่อนลอกคราบ 2 วัน (D ₃)	0.51±0.09 ^c	4.99±0.11 ^c	133.93±0.63 ^f	8.81±0.24 ^c	3.85±0.11 ^b
หลังลอกคราบ 6 ชม. (A ₁)	0.08±0.05 ^a	0.46±0.09 ^a	18.90±0.75 ^a	4.01±0.17 ^a	1.97±0.23 ^a
หลังลอกคราบ 12 ชม. (A _{2,1})	0.27±0.07 ^b	0.76±0.04 ^a	36.61±0.56 ^c	4.93±0.93 ^a	4.59±0.23 ^b
หลังลอกคราบ 24 ชม. (A _{2,2})	0.49±0.06 ^c	1.53±0.10 ^b	52.39±1.15 ^d	9.43±0.11 ^c	3.79±0.56 ^b
หลังลอกคราบ 2 วัน (B ₁)	0.76±0.05 ^d	10.09±0.74 ^c	98.36±0.80 ^c	10.62±0.15 ^d	6.53±0.24 ^d
หลังลอกคราบ 3 วัน (B _{2,1})	0.60±0.07 ^d	2.39±0.24 ^b	95.32±1.96 ^c	10.49±0.17 ^d	6.13±0.06 ^d
หลังลอกคราบ 5 วัน (B _{2,2})	0.65±0.07 ^d	6.66±0.36 ^d	95.61±1.26 ^c	10.79±0.23 ^d	8.09±0.07 ^c
หลังลอกคราบ 7 วัน (B _{2,3})	0.63±0.08 ^d	1.21±0.26 ^b	53.39±1.48 ^d	6.87±0.41 ^b	5.17±0.14 ^c
หลังลอกคราบ 10 วัน (B _{2,4})	1.27±0.13 ^c	0.81±0.16 ^a	35.98±0.71 ^c	7.98±0.27 ^c	4.30±0.23 ^b

หมายเหตุ: ตัวอักษร (Superscript) ในแนวตั้ง (Column) แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ลอกคราบ 7 วัน (B_{2,3}) (0.63±0.08 units mg protein⁻¹) และเพิ่มขึ้นสูงสุดในระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน (B_{2,4}) (1.27±0.13 units mg protein⁻¹)

2.3 กิจกรรมเอนไซม์ glutathione-S-transferase ในเหงือก

จากการวิเคราะห์กิจกรรม GST ในเหงือกมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.46 ± 0.09 ถึง 10.09 ± 0.74 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 2) ในปลูกกระดองแข็งปกติ (C) มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 0.63 ± 0.03 units mg protein⁻¹ โดยกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นในระยะหลังการลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) (2.33 ± 0.237 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะหลังการลอกคราบ 2 วัน (D₃) (4.99 ± 0.110 units mg protein⁻¹) เมื่อปูพัฒนาเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงเป็น 0.46 ± 0.09 units mg protein⁻¹ หลังจากนั้นพบว่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นในระยะหลังการลอกคราบ 12 ชั่วโมง (A_{2,1}) (0.76 ± 0.04 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน (B_{2,4}) (0.81 ± 0.16 units mg protein⁻¹)

2.4 กิจกรรมเอนไซม์ glutathione-S-transferase ในตับ

จากการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ GST ในตับมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 18.90 ± 0.75 ถึง 133.93 ± 0.63 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 2) ในปลูกกระดองแข็งปกติ (C) มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 28.24 ± 0.95 units mg protein⁻¹ โดยมีกิจกรรมเอนไซม์คงที่ในระยะก่อนการลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) (26.50 ± 0.39 units mg protein) จากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะก่อนการลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D₂) มีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น (50.06 ± 0.88 units mg protein) และระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D₃) (133.93 ± 0.63 units mg protein) แต่ในระยะหลังการลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงเป็น 18.90 ± 0.7 units mg protein⁻¹ หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อปูพัฒนาเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบ 12 ชั่วโมง (A_{2,1}) (36.61 ± 0.56 units mg protein) จนถึงระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน (B_{2,4}) (35.98 ± 0.71 units mg protein⁻¹)

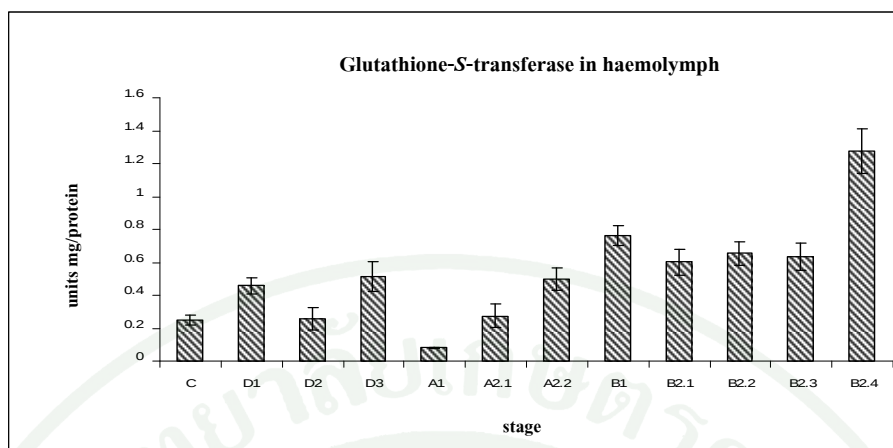
2.5 กิจกรรมเอนไซม์ glutathione-S-transferase ในเนื้อเยื่อได้กระดอง

จากการวิเคราะห์กิจกรรม GST ในเนื้อเยื่อได้กระดองมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 4.01 ± 0.17 ถึง 10.79 ± 0.23 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 2) ในปูกระดองแข็งปกติ (C) มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 4.84 ± 0.30 units mg protein⁻¹ กิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อผ่านระยะก่อนการลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) (6.94 ± 0.26 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D₃) (8.81 ± 0.24 units mg protein⁻¹) เมื่อเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) กลับพบว่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงเป็น 4.01 ± 0.17 units mg protein⁻¹ หลังจากนั้นกิจกรรมเพิ่มขึ้นในระยะหลังการลอกคราบ 12 ชั่วโมง (A_{2,1}) (4.93 ± 0.93 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน (B_{2,4}) (7.98 ± 0.27 units mg protein⁻¹)

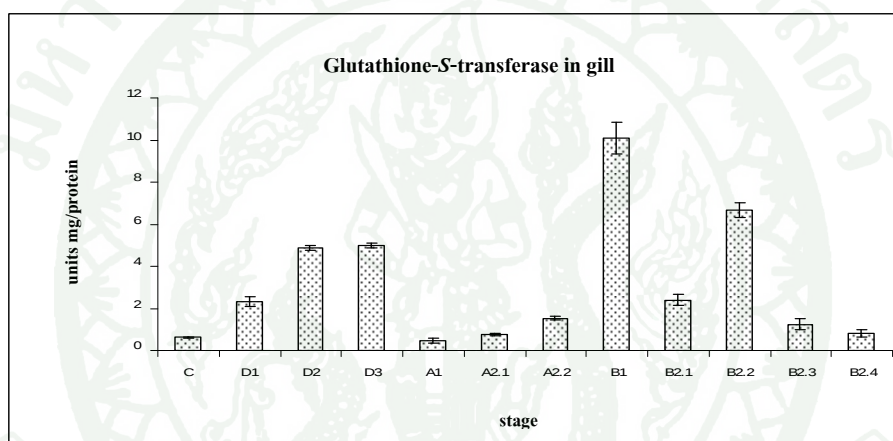
2.6 กิจกรรมเอนไซม์ glutathione-S-transferase ในกล้ามเนื้อ

จากการวิเคราะห์กิจกรรม GST ในกล้ามเนื้อมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 1.97 ± 0.23 ถึง 8.09 ± 0.07 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 2) ในปูกระดองแข็งปกติ (C) มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 2.78 ± 0.26 units mg protein⁻¹ กิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นในระยะก่อนการลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) 3.92 ± 0.13 units mg protein⁻¹ และระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D₃) 3.85 ± 0.11 units mg protein⁻¹ แต่ในระยะหลังการลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) กลับพบว่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงเป็น 1.97 ± 0.23 units mg protein⁻¹ หลังจากนั้นกิจกรรมเพิ่มขึ้นในระยะหลังการลอกคราบ 12 ชั่วโมง (A_{2,1}) (4.59 ± 0.23 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน (B_{2,4}) (4.30 ± 0.23 units mg protein⁻¹)

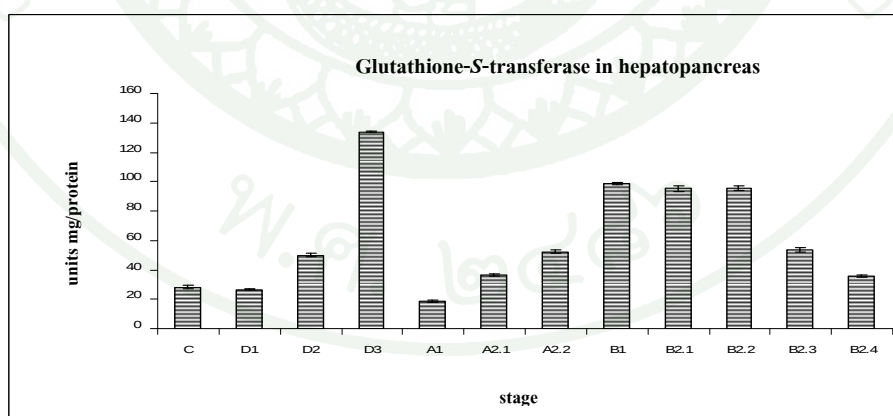
GST เป็นเอนไซม์ที่ไม่มีความเฉพาะเจาะจง (non-specific enzyme) มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระได้อย่างกว้างขวาง (Helmward, 1999) และยังมีความสำคัญในการบำรุงรักษาเซลล์ (Eaton and Bammler, 1999) จากผลของกระบวนการ metabolism และ electrophilic (Kensler, 1997) และทำหน้าที่ในการทำลายพิษ ซึ่ง GST พบได้ทั่วไปใน cytosolic, mitochondria, microsomal protein, plasma และในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต (Ray *et al.*, 1996) ตามปกติเมื่อได้รับสิ่งแปลกปลอมหรือสารพิษ ร่างกายจะมีขั้นตอนในการทำลายสารดังกล่าวให้มีความเป็นพิษลดลงหรือหมดความเป็นพิษโดยมีเอนไซม์เข้ามามีส่วนร่วมในการทำลายพิษ ซึ่งเอนไซม์จะทำ



(A)

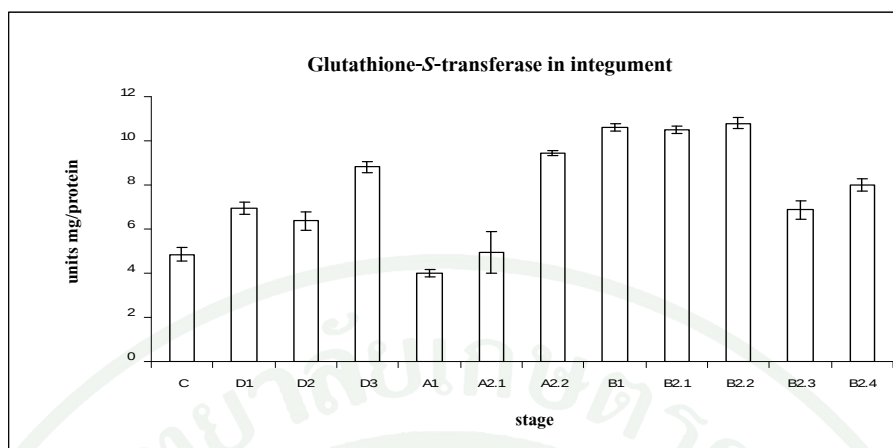


(B)

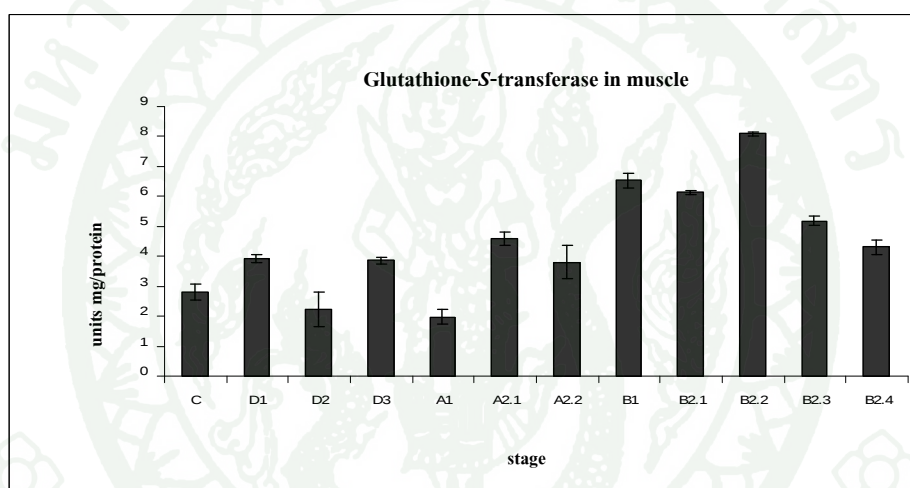


(C)

ภาพที่ 3 กิจกรรม glutathione-S-transferase ในเลือด (A) เหงือก (B) ตับ (C) ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล



(D)



(E)

ภาพที่ 4 กิจกรรม glutathione-S-transferase ในเนื้อเยื่อได้กระดอง (D) และกล้ามเนื้อ (E) ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล

ปฏิกิริยากับโมเลกุลของสารพิษ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจนสามารถละลายน้ำได้และสามารถกำจัดออกจากร่างกายได้ง่ายขึ้น (Pflugmacher *et al.*, 1998) หากสารพิษนั้นมีความเป็นพิษสูงจะเกิดปฏิกิริยาการรวมตัวกับสารจำพวกกลูตาไธโอน และกรดอะมิโนก่อน ซึ่ง GST เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาดังกล่าว (Storey, 1996) และผลจากปฏิกิริยาทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ละลายน้ำได้ดีและขจัดออกจากร่างกายได้ง่ายขึ้น

จากผลการศึกษากิจกรรมของ GST ในเลือด ตลอดจนวงจรการลอกคราบ พบว่าในระยะก่อนการลอกคราบและระยะหลังการลอกคราบ กิจกรรม GST มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากเอนไซม์ต้องทำหน้าที่ในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดจาก กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม และกระบวนการห้อมล้อมสิ่งแปลกปลอม โดยกระบวนการห้อมล้อมเซลล์เป็นกระบวนการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่ เกินกว่าที่กระบวนการกลืนกินเซลล์จะทำลายได้ โดยทั้งสองกระบวนการเป็นการทำลายเชื้อโรคโดยเซลล์เม็ดเลือด (Soderhall and Cerenius, 1992) Hose *et al.* 1992 รายงานว่าในระหว่างการลอกคราบของกุ้งชนิด *Sicyonia ingentis* จะพบเซลล์เม็ดเลือดเพิ่มขึ้น เพราะร่างกายจะส่งเม็ดเลือดออกมาเพื่อทำหน้าที่ช่วยในการทำลายเชื้อโรคต่าง ๆ ที่เข้าสู่ร่างกายได้ง่ายในระยะหลังการลอกคราบ ซึ่ง Rameshthangam and Ramasamy (2006) รายงานว่า เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายกุ้งชนิด *P. monodon* จะทำให้มีอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นในเลือด

กิจกรรม GST ในเหงือกปูทะเลพบว่า ระยะหลังการลอกคราบตั้งแต่ 6 ชั่วโมง ถึง 10 วัน (A_1 - $B_{2.4}$) กิจกรรมเอนไซม์มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเหงือกเป็นอวัยวะที่สัมผัสกับน้ำโดยตรง นอกจากนี้เหงือกยังทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซด้วยวิธีการแพร่ผ่านและยังเป็นปราการด่านแรกที่ช่วยปกป้องร่างกายปูจากเชื้อโรคและสารพิษต่าง ๆ ที่ปะปนมากับน้ำ Pinho *et al.* (2003) รายงานว่าในเหงือกของปูชนิด *C. granulatus* มีกิจกรรมของ GST เพิ่มขึ้นหลังจากปูถูกเหนี่ยวนำด้วย cyanobacteria (*Microcystis*) เนื่องจากเหงือกเป็นอวัยวะแรกที่ทำหน้าที่ในการกรองสารต่าง ๆ ก่อนที่จะถูกส่งต่อไปยังอวัยวะอื่น ๆ ส่วน Luqing and Zhang (2006) รายงานว่าเมื่อเหนี่ยวนำด้วยสารละลายแคลเซียม พบว่ากิจกรรมของ GST ในเหงือกของปูชนิด *C. japonica* มีค่าสูงมากกว่าเหงือกปูในกลุ่มที่ไม่ได้มีการเหนี่ยวนำ

ผลการศึกษาพบว่า กิจกรรม GST ในตับตลอดทั้งวงจรการลอกคราบนั้น ในระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน มีกิจกรรม GST สูงสุด และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในระยะหลังการลอกคราบ ซึ่งอาจเนื่องจาก GST เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการทำลายสารพิษต่าง ๆ และกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการทำลายสารพิษเหล่านั้น โดยเฉพาะสารพิษพวกกลุ่มโลหะหนัก ซึ่งเมื่อปูเข้าสู่ระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D_3) เป็นระยะที่ปูมีการสะสมสารอาหารที่จำเป็น เพื่อเอาไว้ใช้เป็นพลังงานสำรองสำหรับช่วงการลอกคราบ โดยตับเป็นแหล่งของการสะสมสารอาหารต่าง ๆ ซึ่งอาจจะมีสารแปลกปลอมถูกส่งมายังตับด้วย ดังนั้น GST จึงทำหน้าที่ในการสลายและทำลายสารพิษเหล่านั้นให้หมดสภาพความเป็นพิษ Adalto and Monserrat (2007) รายงานว่าเมื่อมีสารพิษชนิด

methyl parathion เข้าสู่ร่างกายของปูชนิด *C. granulatus* จะมีการสะสมสารพิษดังกล่าวในตับ ส่งผลให้ตับมีกิจกรรมของ GST สูง เช่นเดียวกับกับ Blat *et al.* (1988) ที่รายงานว่าหลังจากกึ่งมังกรชนิด *Procambarus clarkia* ได้รับยาฆ่าแมลงกลุ่ม organophosphorus ที่ปะปนมากับน้ำ ตับของกึ่งจะแสดงกิจกรรมของ GST สูง เนื่องจาก GST ทำหน้าที่ในการสลายและทำลาย organophosphorus ให้กลายเป็นสารที่ไม่มีพิษและสามารถขับออกจากเซลล์ได้

ในเนื้อเยื่อใต้กระดอง พบว่ากิจกรรมของ GST ในระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D₃) มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากปูระยะกระดองแข็งปกติ (C) ซึ่ง Skinner (1962) อธิบายว่าในระยะก่อนการลอกคราบ เนื้อเยื่อกระดองชั้น epidermis จะมีปริมาณออกซิเจนสูง ซึ่งบริเวณที่มีออกซิเจนสูงแสดงว่าบริเวณนั้นจะมีกระบวนการที่ต้องการใช้ออกซิเจนมาก โดยผลของกระบวนการต่าง ๆ จะทำให้อนุมูลอิสระเกิดขึ้นด้วย นอกจากนี้ในระยะก่อนการลอกคราบ บริเวณใต้กระดองยังมีการย่อยและดีดสารที่เป็นอนุพันธ์ของไคตินจากกระดองเก่าไปใช้เพื่อสร้างกระดองใหม่ จึงทำให้ปูในระยะนี้มีกระดองที่เปราะบาง แตกหักง่ายกว่าปูปกติ และระยะดังกล่าวยังมีการสะสมไกลโคเจนในเนื้อเยื่อใต้กระดองเพิ่มขึ้น (Salaenoi *et al.*, 2006b) โดยมีการดึงกลับสารอินทรีย์จากกระดองเก่าไว้สำหรับสร้างกระดองใหม่ ซึ่งผลจากกระบวนการดังกล่าวจะก่อให้เกิดอนุมูลอิสระเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก (Mangum *et al.*, 1985) ดังนั้นในระยะก่อนการลอกคราบ เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระจึงถูกผลิตออกมามากเพื่อทำหน้าที่ในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น

ผลการศึกษากิจกรรมของ GST ในกล้ามเนื้อปูทะเล พบว่าระยะหลังการลอกคราบ มีแนวโน้มกิจกรรมของ GST เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จากการที่กล้ามเนื้อเป็นแหล่งสะสมไกลโคเจนซึ่งในระยะหลังการลอกคราบ พบว่าปูจะมีขนาดเพิ่มขึ้นประมาณหนึ่งในสามเท่าของขนาดเดิม สาเหตุที่กล้ามเนื้อของปูในระยะหลังการลอกคราบมีกิจกรรมของ GST สูง ขึ้นอาจเนื่องมาจากมีกระบวนการเผาผลาญพลังงานเกิดขึ้นมาก ดังนั้นอนุมูลอิสระจึงเกิดขึ้นจากกระบวนการดังกล่าว ซึ่ง Carolina *et al.* (2007) รายงานว่าเมื่อปูชนิด *P. granulose* มีอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น จะทำให้กล้ามเนื้อปูมีกิจกรรมของ GST สูงขึ้นตามไปด้วย

3. เอนไซม์ glutathione peroxidase

3.1 สภาพที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ glutathione peroxidase

ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ GPx ในเลือด เหงือก ตับ เนื้อเยื่อใต้กระดูก และกล้ามเนื้อของปูทะเล พบว่า pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ชนิดนี้ในเลือด คือ pH 6 ส่วนใน เหงือก ตับ เนื้อเยื่อใต้กระดูก และกล้ามเนื้อ คือ pH 8 ส่วนในเลือด คือ pH 6

จากผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการทำงานของ GPx ในส่วนต่างๆ ของปูทะเล สอดคล้องกับ Arun *et al.* (1999) ที่รายงานว่า pH 8 มีความเหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ GPx ในตับของกุ้งชนิด *Macrobrachium malcolmsonii* และ Marius and Brouwer (1998) ยังพบว่า pH 7 เป็น pH ที่เหมาะสมกับกิจกรรม GPx ในตับของปูทะเลชนิด *Callinectes sapidus* ส่วน Luqing and Zhang (2006) รายงานว่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานของ GPx ในเหงือกและตับของปูชนิด *Charybdis japonica* คือ pH 7 สอดคล้องกับ Ana *et al.* (2003) ที่พบว่า pH 7 มีความเหมาะสมในการทำงานของ GPx ในกุ้งชนิด *Gammarus locusta* ระยะ juveniles

ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ GPx พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในเนื้อเยื่อใต้กระดูก ตับ และเลือด พบที่ 50 องศาเซลเซียส ส่วนในเหงือก และกล้ามเนื้อ พบที่ 40 องศาเซลเซียส

Luqing and Zhang (2006) พบว่าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีความเหมาะสมในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ GPx ในตับและเหงือกของปูชนิด *Charybdis japonica* เช่นเดียวกับ Rameshthangam and Ramasamy (2006) ที่พบในตับ เหงือก กล้ามเนื้อ และเลือดของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ส่วน Arun *et al.* (1999) รายงานว่า อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เหมาะสมในการทำงานของ GPx ในตับกุ้งชนิด *Macrobrachium malcolmsonii*

3.2 กิจกรรมเอนไซม์ glutathione peroxidase ในเลือด

จากการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ GPx ในเลือด มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.23 ± 0.03 ถึง 1.67 ± 0.06 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 3) ในปูกระดองแข็งปกติ (C) มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 0.62 ± 0.01 units mg protein⁻¹ โดยกิจกรรมเพิ่มขึ้นในระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) (0.93 ± 0.07 units mg protein⁻¹) และระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D₃) กิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.90 ± 0.11 units mg protein⁻¹ กิจกรรม GPx ลดลงในระยะหลังการลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) (0.46 ± 0.07 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะหลังการลอกคราบ 7 วัน (B_{2,3}) (1.54 ± 0.05 units mg protein⁻¹) และกิจกรรมกลับมาเพิ่มขึ้นอีกครั้งในระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน (B_{2,4}) (2.00 ± 0.11 units mg protein⁻¹)

3.3 กิจกรรมเอนไซม์ glutathione peroxidase ในเหงือก

จากการวิเคราะห์กิจกรรม GPx ในเหงือก มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.34 ± 0.16 ถึง 3.97 ± 0.53 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 3) ในปูกระดองแข็งปกติ (C) มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 0.35 ± 0.05 units mg protein⁻¹ และมีค่าคงที่ในระยะหลังการลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) (0.35 ± 0.08 units mg protein⁻¹) หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นในระยะก่อนการลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D₂) (1.53 ± 0.10 units mg protein⁻¹) ถึงระยะหลังการลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) (2.34 ± 0.45 units mg protein⁻¹) เมื่อเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบ 12 ชั่วโมง (A_{2,1}) (0.69 ± 0.08 units mg protein⁻¹) ถึงระยะหลังการลอกคราบ 5 วัน (B_{2,2}) (1.07 ± 0.16 units mg protein⁻¹) หลังจากนั้นกิจกรรมเพิ่มขึ้นสูงสุดในระยะหลังการลอกคราบ 7 วัน (B_{2,3}) (3.97 ± 0.53 units mg protein⁻¹) แต่กลับลดลงอีกครั้งในระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน (B_{2,4}) (1.87 ± 0.14 units mg protein⁻¹)

3.4 กิจกรรมเอนไซม์ glutathione peroxidase ในตับ

จากการวิเคราะห์กิจกรรม GPx ในตับมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 2.78 ± 0.60 ถึง 34.02 ± 0.43 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 3) ในปูกระดองแข็งปกติ (C) มีค่ากิจกรรมเป็น 20.31 ± 0.30 units mg protein⁻¹ โดยในระยะหลังการลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) กิจกรรมเอนไซม์ลดลงเท่ากับ

ตารางที่ 3 กิจกรรมของ glutathione peroxidase ในอวัยวะต่าง ๆ ตลอดจนวงจรการลอกคราบของปูทะเล

ระยะ	กิจกรรมของ glutathione peroxidase (units mg protein ⁻¹)				
	ในส่วนต่าง ๆ ของปูทะเล				
	เลือด	เหงือก	ตับ	เนื้อเยื่อใต้ กระดอง	กล้ามเนื้อ
กระดองแข็งปกติ (C)	0.62±0.01 ^b	0.35±0.05 ^a	20.31±0.30 ^c	4.47±0.25 ^b	3.70±0.06 ^d
ก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D ₁)	0.93±0.07 ^c	0.35±0.08 ^a	15.81±0.42 ^d	2.21±0.92 ^a	2.99±0.37 ^c
ก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D ₂)	0.52±0.07 ^b	1.53±0.10 ^c	30.02±0.90 ^f	4.36±0.81 ^b	1.96±0.24 ^b
ก่อนลอกคราบ 2 วัน (D ₃)	1.90±0.11 ^d	2.74±0.48 ^d	15.33±0.77 ^d	10.82±0.52 ^d	1.96±0.36 ^b
หลังลอกคราบ 6 ชม. (A ₁)	0.46±0.07 ^b	2.34±0.45 ^d	5.81±0.51 ^b	5.89±0.08 ^b	4.35±0.01 ^c
หลังลอกคราบ 12 ชม. (A _{2,1})	1.04±0.14 ^c	0.69±0.08 ^b	7.29±0.10 ^b	4.90±0.21 ^b	3.58±0.02 ^d
หลังลอกคราบ 24 ชม. (A _{2,2})	0.23±0.03 ^a	0.34±0.16 ^a	2.78±0.60 ^a	1.75±0.40 ^a	6.93±0.17 ^f
หลังลอกคราบ 2 วัน (B ₁)	0.36±0.02 ^b	0.83±0.06 ^b	4.59±0.15 ^a	1.17±0.13 ^a	1.91±0.35 ^b
หลังลอกคราบ 3 วัน (B _{2,1})	0.55±0.03 ^b	0.87±0.10 ^b	8.74±0.50 ^c	8.02±0.25 ^c	0.78±0.01 ^a
หลังลอกคราบ 5 วัน (B _{2,2})	1.67±0.06 ^d	1.07±0.16 ^b	16.87±0.29 ^d	10.15±0.10 ^d	1.03±0.50 ^a
หลังลอกคราบ 7 วัน (B _{2,3})	1.54±0.05 ^d	3.97±0.53 ^c	23.17±0.24 ^c	15.58±0.53 ^c	2.50±0.14 ^c
หลังลอกคราบ 10 วัน (B _{2,4})	2.00±0.11 ^d	1.87±0.14 ^d	34.02±0.43 ^f	10.82±0.11 ^d	5.95±1.0 ^f

หมายเหตุ: ตัวอักษร (Superscript) ในแนวนอน (Column) แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

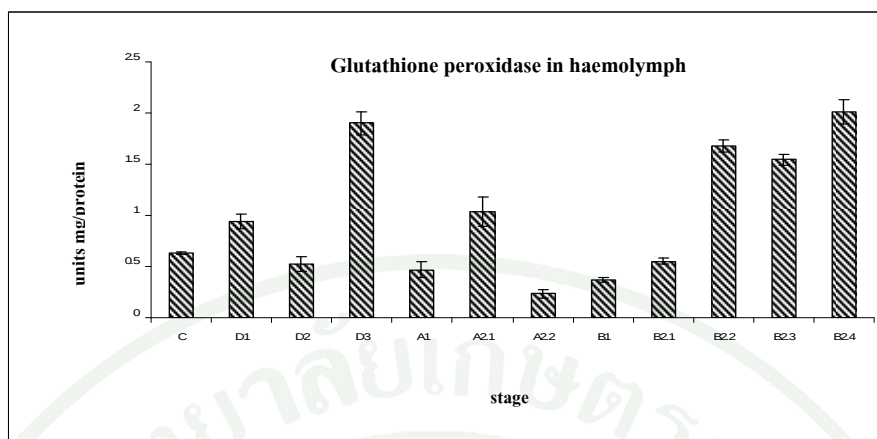
15.81±0.42 units mg protein⁻¹ และเพิ่มขึ้นในระยะก่อนการลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D₂) (30.02±0.90 units mg protein⁻¹) หลังจากนั้นพบว่ากิจกรรม GPx ลดลงในระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D₃) (15.33±0.77 units mg protein⁻¹) ถึงระยะหลังการลอกคราบ 3 วัน (B_{2,1}) (8.74±0.50 units mg protein⁻¹) จากนั้นกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในระยะหลังการลอกคราบ 5 วัน (B_{2,2}) (16.87±0.29 units mg protein⁻¹) ถึงระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน (34.02±0.43 units mg protein⁻¹) (B_{2,4})

3.5 กิจกรรมเอนไซม์ glutathione peroxidase ในเนื้อเยื่อใต้กระดูก

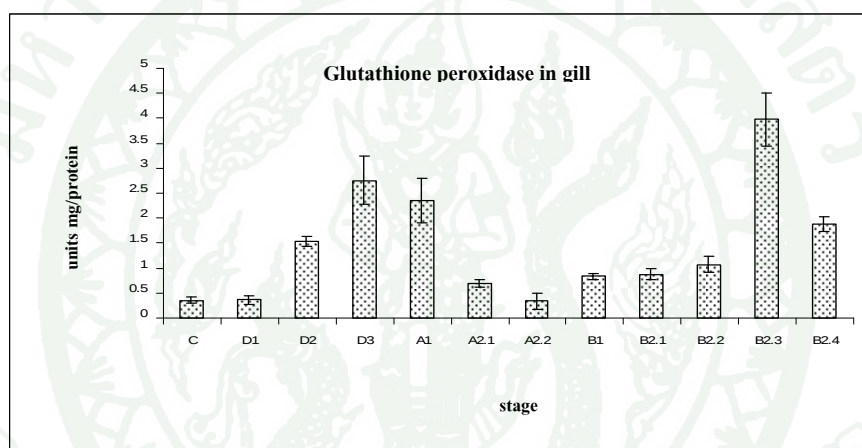
จากการวิเคราะห์กิจกรรม GPx ในเนื้อเยื่อใต้กระดูกมีค่าระหว่าง 1.17±0.13 ถึง 15.58±0.53 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 3) ในปูกระดองแข็งปกติ (C) มีค่ากิจกรรมเป็น 4.47±0.25 units mg protein⁻¹ โดยในระยะก่อนการลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) กิจกรรมเอนไซม์ลดลงเท่ากับ 2.21±0.92 units mg protein⁻¹ เมื่อเข้าสู่ระยะก่อนการลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D₂) และ ระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D₃) พบว่ากิจกรรมเพิ่มขึ้นเป็น 4.36±0.81 units mg protein⁻¹ และ 10.82±0.52 units mg protein⁻¹ ตามลำดับ หลังจากนั้นพบว่ากิจกรรม GPx ลดลงในระยะหลังการลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) (5.89±0.08 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะหลังการลอกคราบ 5 วัน (B_{2,2}) (10.15±0.10 units mg protein⁻¹) และกิจกรรมเพิ่มขึ้นสูงสุดในระยะหลังการลอกคราบ 7 วัน (B_{2,3}) (15.58±0.53 units mg protein⁻¹) เมื่อเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน (B_{2,4}) เอนไซม์ลดลงเป็น 10.15±0.10 units mg protein⁻¹

3.6 กิจกรรมเอนไซม์ glutathione peroxidase ในกล้ามเนื้อ

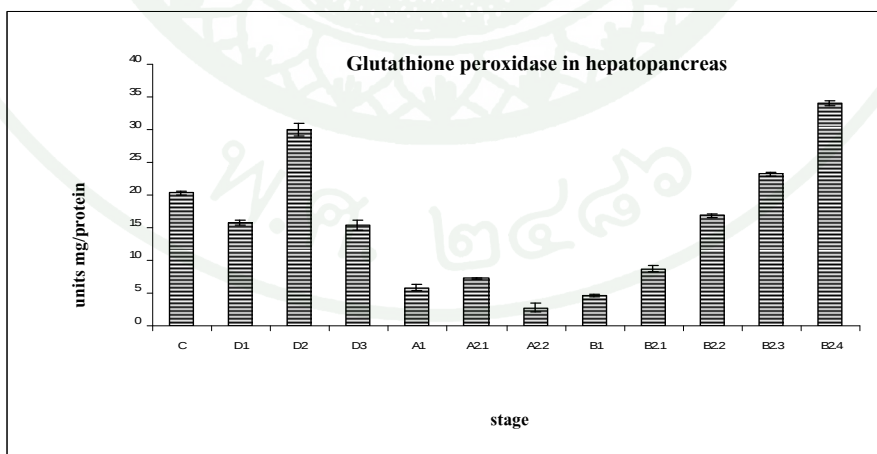
จากการวิเคราะห์กิจกรรม GPx ในเนื้อเยื่อใต้กระดูกมีค่าเฉลี่ยในช่วง 0.78±0.01 ถึง 6.93±0.17 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 3) ในปูกระดองแข็งปกติ (C) มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 3.70±0.06 units mg protein⁻¹ และลดลงในระยะก่อนการลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) (2.99±0.37 units mg protein⁻¹) ถึงระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D₃) (1.96±0.36 units mgprotein⁻¹) จากนั้นกิจกรรม



(A)

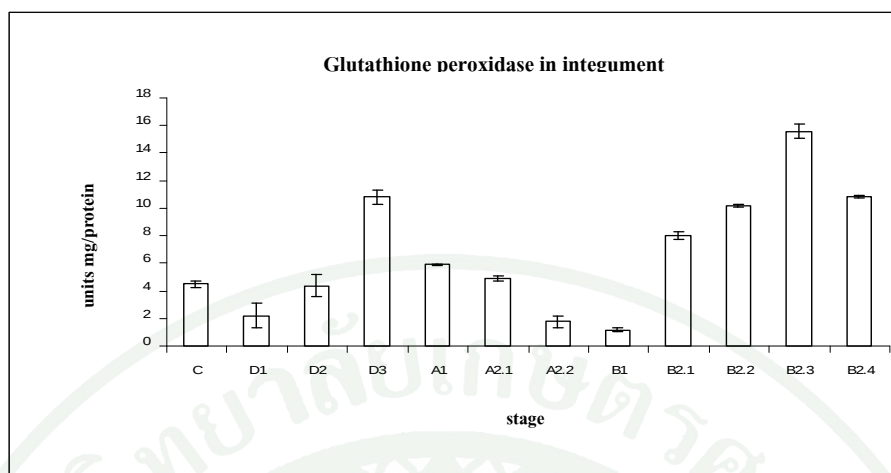


(B)

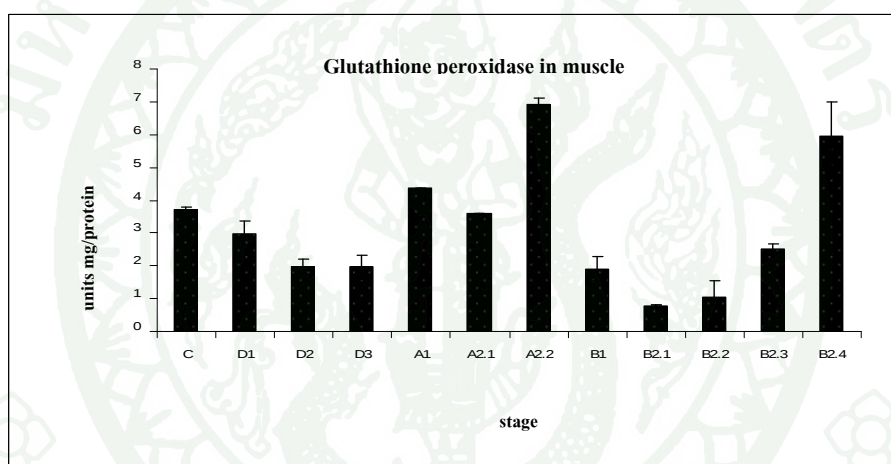


(C)

ภาพที่ 5 กิจกรรม glutathione peroxidase ในเลือด (A) เหงือก (B) ตับ (C) ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล



(D)



(E)

ภาพที่ 6 กิจกรรม glutathione peroxidase ใน เนื้อเยื่อได้กระดอง (D) และกล้ามเนื้อ (E) ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล

GPx เพิ่มขึ้นในระยะหลังการลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A_1) (4.35 ± 0.01 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะหลังการลอกคราบ 24 ชั่วโมง ($A_{2.2}$) (6.93 ± 0.17 units mg protein⁻¹) หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์ลดลงเมื่อเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบ 2 วัน (B_1) (1.91 ± 0.35 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน ($B_{2.4}$) (5.95 ± 1.0 units mg protein⁻¹)

GPx เป็นเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่ในการกำจัดและทำลายอนุมูลอิสระ เช่น O_2^- , H_2O_2 และ $^{\bullet}OH$ เป็นต้น ให้เป็นสารที่ไม่มีพิษต่อเซลล์ โดย GPx จะอาศัย reduced glutathione เป็น co-enzyme ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ oxidized glutathione นอกจากนี้ GPx ยังสามารถปกป้องเซลล์จากการเกิด LPO ซึ่ง GPx จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา organic peroxides กับ reduced glutathione ให้ได้ alcohols, oxidized glutathione และน้ำ โดย GPx เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในเซลล์ทุกเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (Halliwell and Gutteridge, 1999)

ผลการศึกษากิจกรรม GPx ในเลือดตลอดวงจรการลอกคราบ พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในระยะก่อนการลอกคราบ (D1-D3) ซึ่งมีค่าสูงกว่าระยะปูกระดองแข็งปกติ อาจเนื่องมาจากระยะก่อนการลอกคราบ สัตว์จำพวกครัสเตเชียจะเพิ่มความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ในเลือด เช่น น้ำตาล แคลเซียม และโปรตีน เป็นต้น เพื่อสำรองไว้ใช้ในช่วงการลอกคราบ และสำหรับการสร้างเปลือกใหม่ โดยน้ำตาลในเลือดเป็นแหล่งของพลังงานในกระบวนการเมทาบอลิซึม (ประจวบ, 2537) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระเกิดขึ้น นอกจากนี้การขนถ่ายออกซิเจนยังเกิดขึ้นมากในระยะก่อนการลอกคราบ โดยประจวบ (2537) กล่าวว่าสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียจะพบฮีโมไซยานิน ซึ่งเป็นสารสีที่อยู่ในเลือดที่ทำหน้าที่ในการจับและขนส่งออกซิเจน หากพบว่าการกิจกรรมของ GPx มีปริมาณสูงในระยะก่อนการลอกคราบ นั้นแสดงว่ามีออกซิเจนปริมาณมากเช่นกัน Mangum *et al.* (1985) ตรวจพบว่าปูชนิด *Callinectes sapidus* ในระยะก่อนการลอกคราบมีระดับออกซิเจนในเลือดเพิ่มขึ้น

จากผลการศึกษากิจกรรม GPx ในเหงือกของปูระยะก่อนการลอกคราบ พบว่าการกิจกรรมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับปูระยะกระดองแข็งปกติ ซึ่งเหงือกทำหน้าที่ในการช่วยระบายอากาศ โดยน้ำเคลื่อนที่ผ่านเหงือก นอกจากนี้เหงือกยังเป็นอวัยวะแรกๆ ที่ช่วยในการกรอง และดูดซึมสารอาหารและแร่ธาตุต่าง ๆ จากน้ำทะเลผ่านเหงือกไปยังอวัยวะต่างๆ เช่น ตับ และเนื้อได้กระดอง เป็นต้น โดยอาศัยเลือดเป็นตัวกลางในการขนส่งสารอาหารและแร่ธาตุต่าง ๆ (Xiao *et al.*, 2002) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าระยะก่อนการลอกคราบเป็นระยะที่ปูต้องสะสมสารอาหาร กิจกรรมการทำงานของเหงือกจะเพิ่มสูงขึ้น เพื่อที่จะได้กรองอาหารและดูดซึมธาตุอาหารได้มากขึ้น เมื่อปูเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบ (A₁-B_{2,4}) พบว่าการกิจกรรมของ GPx มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นกว่าปูระยะกระดองแข็งปกติ ซึ่งเหงือกอาจจะกรองเชื้อโรคและสารพิษเพิ่มมากกว่าปกติ เนื่องจากเมื่อคราบเก่าของปู

หลุดออกจากกระดองเดิม ปูจะดึงน้ำเข้าสู่ร่างกายในปริมาณที่มากกว่าปกติ เป็นผลให้มีอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นในเหงือก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Luqing and Zhang (2006) ที่ศึกษาเหงือกของปูชนิด *C. japonica* ในขณะที่มีสารพิษ (cadmium) เข้าสู่ร่างกายปู ที่ความเข้มข้น 0, 0.025 และ 0.05 mg/l ผลการศึกษาพบว่ากิจกรรมของ GPx จะเพิ่มสูงที่ความเข้มข้น 0.05, 0.025 และ 0 mg/l ตามลำดับ เนื่องมาจากเหงือกจะทำหน้าที่ในการกรองและดูดซับสารพิษนั้นไว้ หลังจากนั้นจะมีกระบวนการทำลายพิษดังกล่าว ซึ่งจะมีการปลดปล่อยอนุมูลอิสระออกมา ดังนั้นกิจกรรมของ GPx จะมีค่าสูงเพื่อทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นให้หมดไปจากเซลล์

จากผลการศึกษากิจกรรมของ GPx ในตับ ผลการศึกษาพบว่ากิจกรรม GPx ในระยะหลังการลอกคราบมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากสารอาหารที่สะสมไว้ ถูกใช้ไปกับกระบวนการลอกคราบ และกระบวนการสร้างคราบใหม่ บวกกับไม่ได้รับสารอาหารเพิ่ม เนื่องจากระยะดังกล่าวปูยังไม่กินอาหาร อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดกระบวนการเผาผลาญพลังงานในระดับลดน้อยลง ดังนั้นจึงทำให้ระยะหลังการลอกคราบ 6-24 ชั่วโมง มีกิจกรรมของ GPx ต่ำ แต่หลังจากนั้นกิจกรรมของ GPx ก็ค่อย ๆ เพิ่มขึ้น จนสูงสุดในระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน ซึ่งอาจเนื่องมาจาก ปูเริ่มมีการกินอาหารในช่วงระยะดังกล่าว ซึ่งอาหารที่ได้รับจะเปลี่ยนไปเป็นพลังงานต่อไป Boonyarath *et al.* (2002) รายงานว่าในระยะหลังการลอกคราบใหม่ ๆ (early post molt) ปูชนิด *S. serrata* มีปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไกลโคเจน (Salaenoi *et al.*, 2006b) ลดน้อยลง เมื่อเปรียบเทียบกับปูระยะกระดองแข็งปกติ

ผลการศึกษากิจกรรม GPx ในเนื้อเยื่อใต้กระดอง พบว่า GPx มีกิจกรรมสูงในระยะก่อนการลอกคราบ 2 วันอย่างเด่นชัด หลังจากนั้นกิจกรรม GPx จะลดลงเมื่อปูลอกคราบ เมื่อปูพัฒนาเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบ 3 ถึง 10 วันพบว่ากิจกรรม GPx เพิ่มขึ้นสูงอีกครั้ง โดยกิจกรรมที่เพิ่มขึ้นสูงในระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน อาจเนื่องมาจากระยะดังกล่าวมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นมาก เนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของชั้น cuticle (Espie and Roff, 1995)

จากการศึกษากิจกรรมของ GPx ในกล้ามเนื้อ พบว่ากิจกรรมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในระยะหลังการลอกคราบใหม่ ๆ (A_1 - $A_{2,2}$) หลังจากนั้นกิจกรรม GPx จะลดลง และเพิ่มขึ้นสูงอีกครั้ง

เมื่อปูพัฒนาเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน ซึ่งในระยะนั้นกล้ามเนื้อมีการเคลื่อนไหวได้อย่างคล่องแคล่วแล้ว Ana *et al.* (2003) รายงานว่า GPx มีส่วนช่วยในการทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการเผาผลาญพลังงาน เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างเนื้อเยื่อในตัวอ่อนระยะ adults ของสัตว์กลุ่มครัสเตเชียหลายชนิด ได้แก่ กุ้งชนิด *M. malcolmsonii* ปูชนิด *Palaemonetes argentinus* และชนิด *Carcinus maenas* เช่นเดียวกับ Jagneshwer *et al.* (2000) ที่รายงานว่า GPx มีความสำคัญมากในการกำจัดและทำลาย H_2O_2 และ peroxide ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญเติบโตของกุ้งระยะ larval (zoea larvae และ post-larvae) ชนิด *M. rosenbergii*

4. สารต้านอนุมูลอิสระ glutathione

4.1 กิจกรรม glutathione ในเลือด

จากการวิเคราะห์กิจกรรม GSH ในเลือดมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.02 ± 0.01 ถึง 0.22 ± 0.06 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 4) ในปูกระดองแข็งปกติ (C) เท่ากับ 0.11 ± 0.02 units mg protein⁻¹ โดยมีกิจกรรมคงที่ในระยะก่อนการลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) เท่ากับ 0.17 ± 0.02 units mg protein⁻¹ เมื่อเข้าสู่ระยะก่อนการลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D₂) พบว่ากิจกรรมลดลงเป็น 0.07 ± 0.01 units mg protein⁻¹ และกลับมาเพิ่มขึ้นในระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D₃) (0.22 ± 0.06 units mg protein⁻¹) หลังจากนั้นกิจกรรมของ GSH ลดลงในระยะหลังการลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) (0.06 ± 0.02 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน (B_{2,4}) (0.07 ± 0.02 units mg protein⁻¹)

4.2 กิจกรรม glutathione ในเหงือก

จากการวิเคราะห์กิจกรรม GSH ในเหงือกมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.47 ± 0.04 ถึง 4.54 ± 0.08 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 4) ในปูกระดองแข็งปกติ (C) เท่ากับ 0.47 ± 0.04 units mg protein⁻¹ โดยมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นในระยะก่อนการลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) (2.187 ± 0.50 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D₃) (3.11 ± 0.16 units mg protein⁻¹) หลังการลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) (1.06 ± 0.03 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะหลังการลอกคราบ 24 ชั่วโมง (A_{2,2}) (0.70 ± 0.03

ตารางที่ 4 กิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione ในส่วนต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล

ระยะ	กิจกรรมของ glutathione (units mg protein ⁻¹) ในส่วนต่าง ๆ ของปูทะเล				
	เลือด	เหงือก	ตับ	เนื้อเยื่อใต้ กระดอง	กล้ามเนื้อ
กระดองแข็งปกติ (C)	0.11±0.02 ^c	0.47±0.04 ^a	1.38±0.14 ^a	9.64±0.44 ^d	12.28±0.32 ^d
ก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D ₁)	0.17±0.02 ^d	2.18±0.50 ^c	1.33±0.39 ^a	7.38±0.87 ^c	16.67±0.50 ^c
ก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D ₂)	0.07±0.01 ^b	4.11±0.06 ^c	1.22±0.34 ^a	9.23±0.33 ^d	10.74±0.82 ^c
ก่อนลอกคราบ 2 วัน (D ₃)	0.22±0.06 ^c	3.11±0.16 ^d	2.44±0.08 ^b	17.88±1.05 ^g	14.65±0.47 ^d
หลังลอกคราบ 6 ชม. (A ₁)	0.06±0.02 ^b	1.06±0.03 ^b	6.82±0.16 ^d	15.16±0.96 ^f	6.16±0.17 ^b
หลังลอกคราบ 12 ชม. (A _{2,1})	0.04±0.05 ^b	0.55±0.04 ^a	10.00±0.35 ^c	2.38±0.48 ^a	4.41±0.25 ^a
หลังลอกคราบ 24 ชม. (A _{2,2})	0.05±0.07 ^b	0.70±0.03 ^a	5.51±0.36 ^c	7.22±0.13 ^c	4.58±0.24 ^a
หลังลอกคราบ 2 วัน (B ₁)	0.11±0.02 ^c	4.54±0.08 ^c	12.69±0.40 ^c	13.21±0.11 ^c	17.54±0.19 ^c
หลังลอกคราบ 3 วัน (B _{2,1})	0.02±0.01 ^a	1.45±0.15 ^c	7.95±0.44 ^d	10.89±0.89 ^d	5.69±0.58 ^b
หลังลอกคราบ 5 วัน (B _{2,2})	0.05±0.01 ^b	4.05±0.28 ^c	11.46±0.39 ^c	10.25±0.33 ^d	12.56±0.80 ^d
หลังลอกคราบ 7 วัน (B _{2,3})	0.09±0.02 ^c	1.10±0.05 ^b	3.27±0.20 ^b	3.86±0.09 ^b	6.09±0.33 ^b
หลังลอกคราบ 10 วัน (B _{2,4})	0.07±0.02 ^b	0.94±0.04 ^b	4.65±0.18 ^c	7.85±0.36 ^c	6.22±0.17 ^b

หมายเหตุ: ตัวอักษร (Superscript) ในแนวนอน (Column) แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

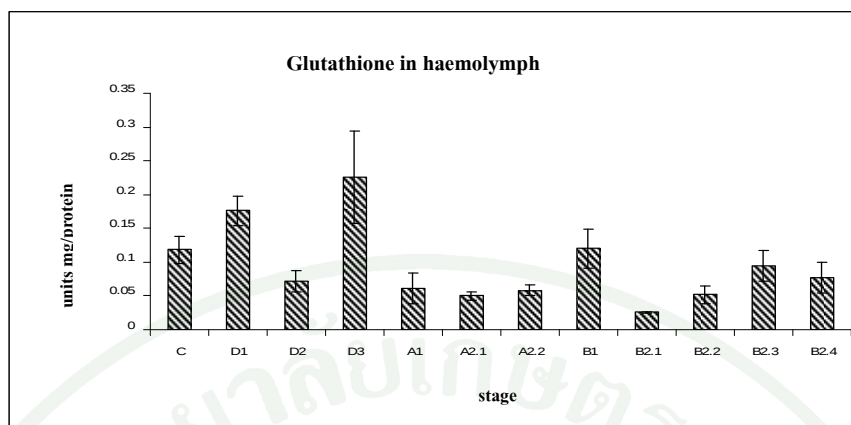
units mg protein⁻¹) แต่เมื่อเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบ 2 วัน (B₁) พบว่ากิจกรรมเพิ่มขึ้นเท่ากับ 4.54 ± 0.08 units mg protein⁻¹ แล้วลดลงในระยะหลังการลอกคราบ 3 วัน (B_{2,1}) (1.45 ± 0.15 units mg protein⁻¹) ถึงระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน (B_{2,4}) (0.94 ± 0.04 units mg protein⁻¹)

4.3 กิจกรรม glutathione ในตับ

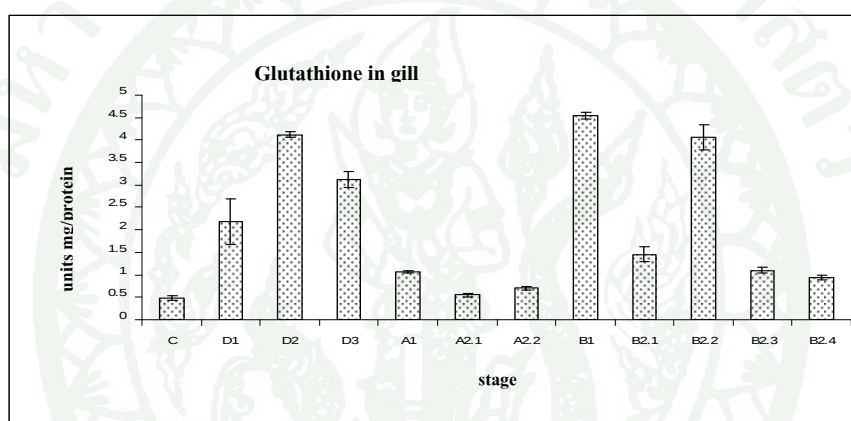
จากการวิเคราะห์กิจกรรม GSH ในตับมีค่าระหว่าง 1.22 ± 0.34 ถึง 12.69 ± 0.40 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 4) ในปูกระดองแข็งปกติ (C) เท่ากับ 1.38 ± 0.14 units mg protein⁻¹ โดยกิจกรรมมีค่าคงที่ในระยะก่อนการลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) (1.33 ± 0.39 units mg protein⁻¹) และระยะก่อนการลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D₂) (1.22 ± 0.34 units mg protein⁻¹) หลังจากนั้นกิจกรรมของ GSH เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D₃) (2.44 ± 0.08 units mg protein⁻¹) ถึงระยะหลังการลอกคราบ 12 ชั่วโมง (A_{2,1}) (10.00 ± 0.35 units mg protein⁻¹) เมื่อปูพัฒนาเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบ 24 ชั่วโมง (A_{2,2}) พบว่ากิจกรรมลดลงเป็น 5.51 ± 0.36 units mg protein⁻¹ แต่กลับเพิ่มขึ้นอีกครั้งในระยะหลังการลอกคราบ 2 วัน (B₁) (12.69 ± 0.40 units mg protein⁻¹) แล้วลดลงในระยะหลังการลอกคราบ 3 วัน (B_{2,1}) (7.95 ± 0.44 units mg protein⁻¹) จนระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน (B_{2,4}) (4.65 ± 0.18 units mg protein⁻¹)

4.4 กิจกรรม glutathione ในเนื้อเยื่อใต้กระดอง

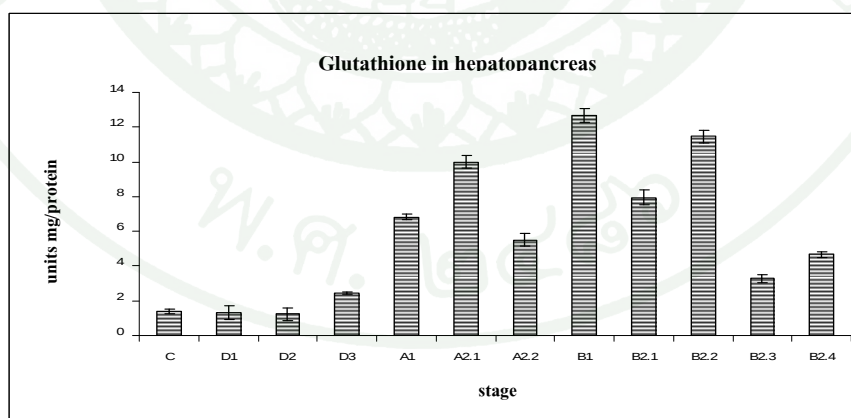
จากการวิเคราะห์กิจกรรม GSH ในเนื้อเยื่อใต้กระดองมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 2.38 ± 0.48 ถึง 17.88 ± 1.05 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 4) ในปูกระดองแข็งปกติ (C) เท่ากับ 9.64 ± 0.44 units mg protein⁻¹ โดยในระยะก่อนการลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) กิจกรรมลดลงเป็น 7.38 ± 0.87 units mg protein⁻¹ แล้วเพิ่มขึ้นในระยะก่อนการลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D₂) (9.23 ± 0.33 units mg protein⁻¹) ถึงระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D₃) (17.88 ± 1.05 units mg protein⁻¹) จากนั้นกิจกรรม GSH ลดลงในระยะหลังการลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) (15.16 ± 0.96 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน (B_{2,4}) (7.85 ± 0.36 units mg protein⁻¹)



(A)

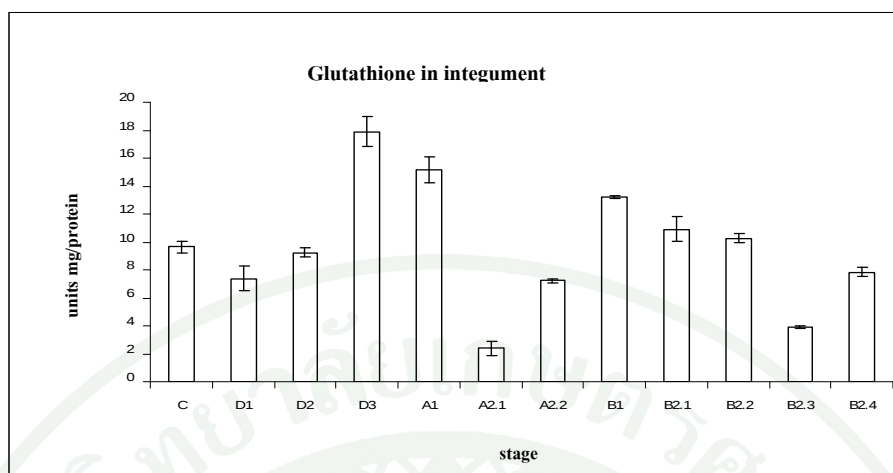


(B)

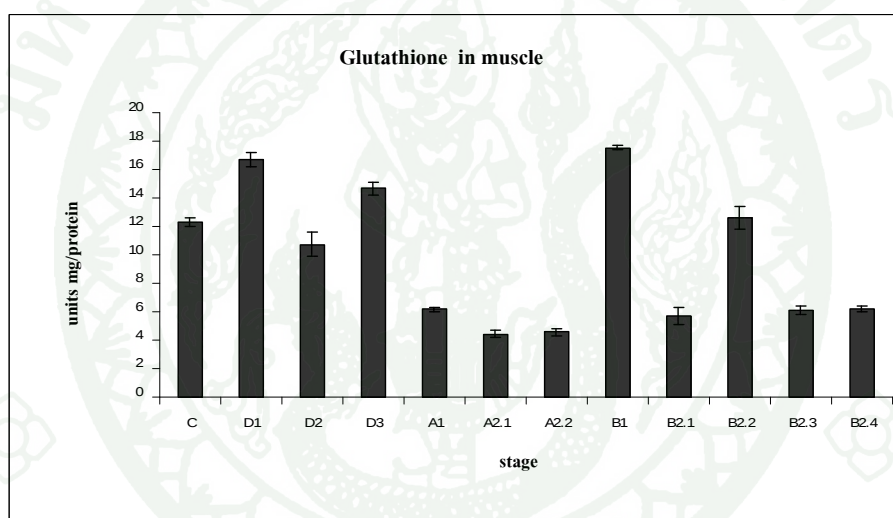


(C)

ภาพที่ 7 กิจกรรม glutathione ในเลือด (A) เหงือก (B) ตับ (C) ในระยะต่างๆตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล



(D)



(E)

ภาพที่ 8 กิจกรรม glutathione ในเนื้อเยื่อได้กระดอง (D) และกล้ามเนื้อ (E) ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล

4.5 กิจกรรม glutathione ในกล้ามเนื้อ

จากการวิเคราะห์กิจกรรม GSH ในกล้ามเนื้อ มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 4.41 ± 0.25 ถึง 17.54 ± 0.19 units mg protein⁻¹ ในปูกระดองแข็งปกติ (C) เท่ากับ 12.28 ± 0.32 units mg protein⁻¹ โดยในระยะก่อนการลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) กิจกรรมเพิ่มขึ้นเป็น 16.67 ± 0.50 units mg protein⁻¹ แล้วลดลงในระยะหลังการลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D₂) (10.74 ± 0.82 units mg protein⁻¹) เมื่อเข้าสู่ระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D₃) พบว่ากิจกรรมเพิ่มขึ้นเป็น 14.65 ± 0.47 units mg protein⁻¹ จากนั้นกิจกรรม GSH ลดลงในระยะหลังการลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) (6.16 ± 0.17 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะหลังการลอกคราบ 24 ชั่วโมง (4.58 ± 0.24 units mg protein⁻¹) แต่กลับเพิ่มขึ้นอีกครั้งในระยะหลังการลอกคราบ 2 วัน (B₁) (17.54 ± 0.19 units mg protein⁻¹) แล้วลดลงในระยะหลังการลอกคราบ 3 วัน (B_{2,1}) (5.69 ± 0.58 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน (B_{2,4}) พบว่ากิจกรรมลดลงเป็น 6.22 ± 0.17 units mg protein⁻¹ ตามลำดับ

GSH เป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดที่ไม่ใช่เอนไซม์ พบได้ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต มีหน้าที่ในการทำลายสารที่มีพิษให้กลายเป็นสารที่ไม่มีพิษ ทำให้สามารถกำจัดออกนอกร่างกายได้ง่ายขึ้น GSH ยังเป็น co-enzyme ของเอนไซม์หลายชนิด เช่น GST GPx และ glutathione reductase (GR) เป็นต้น นอกจากนี้ GSH ยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ที่มีฤทธิ์ในการสลายอนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการที่มีการใช้ออกซิเจน นอกจากนี้ GSH และวิตามินซี และวิตามินอี ยังช่วยส่งเสริมการทำงานกันด้วย (Jagneshwer *et al.*, 2000)

จากการวิเคราะห์กิจกรรม GSH ในเลือดตลอดวงจรการลอกคราบของปู พบว่า GSH แสดงค่าเด่นชัดในระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D₃) ซึ่งเป็นช่วงที่กระดองใหม่ (ซึ่งอยู่ใต้กระดองเก่า) มีการพัฒนาขึ้น กระดองใหม่ที่เกิดขึ้นแยกออกจากกระดองเก่าทำให้เกิดช่องว่างระหว่างกระดองใหม่และกระดองเก่าอย่างชัดเจน ซึ่งเชื้อโรคและสารพิษต่าง ๆ สามารถเข้าสู่กระดองใหม่ได้ง่ายจากช่องว่างดังกล่าว จึงทำให้เลือดมีกิจกรรม GSH สูงในระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน ซึ่งจากการศึกษาของ Mohankumar and Ramasamy (2006) ที่ตรวจสอบเลือดกุ้งชนิด *F. indicus*

เมื่อเหนี่ยวนำด้วยสิ่งแปลกปลอม ได้แก่เชื้อ white spot syndrome virus (WSSV) เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่า กิจกรรมของ GSH ลดลงเรื่อย ๆ ตามลำดับ และหลังจากชั่วโมงที่ 72 กุ้งก็ตาย แสดงถึงประสิทธิภาพการทำงานของเม็ดเลือดในการทำลายสิ่งแปลกปลอมได้ลดลงจนไม่สามารถทำงานได้

จากการศึกษากิจกรรมของ GSH ในเหงือกตลอดวงจรการลอกคราบ พบว่ากิจกรรม GSH มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในระยะหลังการลอกคราบเมื่อเทียบกับระยะกระดองแข็งปกติ เนื่องจากในช่วงเวลาของการลอกคราบน้ำหนักรวมของเหงือกจะถูกลอกออกไปพร้อมกับคราบเก่า พอหลุดจากคราบเก่าจะดึงน้ำเข้าสู่ร่างกายในปริมาณที่มากกว่าปกติ เมื่อน้ำผ่านเหงือกใหม่ที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม เหงือกอาจได้รับเชื้อโรคและสารพิษง่ายกว่าปกติ ซึ่งกระบวนการทำลายสิ่งแปลกปลอมดังกล่าวทำให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น Warren *et al.* (2005) ศึกษาในระดับของ GSH ในเหงือกของหอย *Perna viridis* เมื่อทดสอบด้วยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด *Nodularia spumigena* ผลการศึกษาพบว่าระดับ GSH เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ทดสอบด้วยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ส่วน Eduardo *et al.* (2005) รายงานว่าเมื่อมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในเหงือกของหอยแมลงภู่นก *Perna perna* จะส่งผลให้ GSH มีปริมาณสูงขึ้นเช่นกัน

จากผลการศึกษากิจกรรม GSH ในตับตลอดวงจรการลอกคราบ พบว่าปริมาณ GSH มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในระยะหลังการลอกคราบ ซึ่งปูหลังลอกคราบมีโครงร่างที่นุ่ม นับเป็นการเปิดโอกาสให้สิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายได้ง่ายขึ้นโดยผ่านทางโครงร่างที่นุ่ม ดังนั้นเชื้อโรคต่าง ๆ อาจเข้าไปสะสมอยู่ในตับ ซึ่ง Burgents *et al.* (2005) รายงานว่า พบแบคทีเรียเป็นจำนวนมากในตับของกุ้งชนิด *Litopenaeus vannamei* นอกจากนี้ Vogan *et al.* (2001) ยังรายงานว่าในตับของปูชนิด *Cancer pagurus* พบร่องรอยของกระบวนการทำลายเชื้อโรคแบบ encapsulation ซึ่งเป็นการทำลายเชื้อโรคแบบห่อหุ้มของเซลล์เม็ดเลือด โดยเซลล์เม็ดเลือดจะห่อหุ้มเชื้อโรคแล้วเกิดเป็นปมขนาดใหญ่ Rameshthangam and Ramasamy (2006) รายงานว่าเมื่อมีเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายกุ้งชนิด *P. monodon* จะพบระดับของ GSH ที่ตับ มากกว่าในกล้ามเนื้อ และหัวใจ เนื่องมาจากตับเป็นแหล่งสะสมของเชื้อโรคต่าง ๆ

ผลการศึกษากิจกรรม GSH ในเนื้อเยื่อได้กระดองตลอดวงจรการลอกคราบของปู พบว่า มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในระยะก่อนการลอกคราบ เนื่องจากระยะก่อนการลอกคราบปูจะมีการย่อยสลาย และการดึงกลับของสารอินทรีย์จากกระดองเก่า เพื่อเก็บไว้ใช้ในการสร้างกระดองใหม่ Mangum *et al.* (1985) พบว่าในระยะก่อนการลอกคราบ บริเวณเนื้อเยื่อได้กระดองจะมีปฏิกิริยาของการย่อยสลายโครงสร้างเดิมและการสร้างกระดองใหม่เกิดขึ้น ดังนั้นจึงพบระดับของ GSH สูงตามไปด้วย ซึ่ง Boonyarath *et al.* (2002) พบว่าในชั้น epidermal ของเนื้อเยื่อได้กระดองมีการสะสมคาร์โบไฮเดรต ในระยะก่อนการลอกคราบมากกว่าในระยะหลังการลอกคราบ และยังพบการสะสมของไคติน ในชั้น epidermal ในระยะก่อนการลอกคราบมากกว่าระยะหลังการลอกคราบอีกด้วย

ส่วนในกล้ามเนื้อพบกิจกรรม GSH สูงสุดในระยะหลังการลอกคราบ 2 วัน ซึ่งเนื่องจากในระยะก่อนการลอกคราบเป็นระยะสะสมสารอาหารของปู และกล้ามเนื้อก็เป็นแหล่งสะสมไกลโคเจน Boonyarath *et al.* (2002) รายงานว่าปูทะเลชนิด *S. serrata* ในระยะก่อนการลอกคราบจะมีปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และ glycosaminoglycans สูงกว่าในระยะหลังการลอกคราบ ซึ่งทำให้มีกระบวนการเผาผลาญพลังงานสูง ดังนั้นก็จะก่อให้เกิดอนุมูลอิสระเกิดขึ้นตามมา Jennifer and Key (2007) รายงานว่า GSH มีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตของกุ้งวัยอ่อน ชนิด *P. pugio* ในระยะ newly hatched larvae, 18-day larvae และระยะ juvenile ยังพบระดับ GSH เพิ่มขึ้นตามลำดับ เนื่องจาก GSH ทำหน้าที่ในการกำจัดอนุมูลอิสระและทำลายสารพิษต่าง ๆ ที่เข้าสู่ร่างกาย นอกจากนี้ Jagneshwer *et al.* 2000 ยังทำการศึกษากิจกรรม GSH หลังจากทำการเหนี่ยวนำด้วยวิตามินอีในกุ้ง *M. rosenbergii* ผลการศึกษาพบว่ากิจกรรมของ GSH เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า GSH และวิตามินอี ส่งเสริมการทำงานซึ่งกันและกัน โดยวิตามินอีช่วยให้มี GSH เพิ่มขึ้น ส่วน GSH ช่วยเร่งประสิทธิภาพในการดูดซึมวิตามินอีให้อยู่ในรูปที่สามารถดูดซึมได้เร็วขึ้น (Jagneshwer *et al.*, 2000)

5. กิจกรรม lipid peroxidation

5.1 กิจกรรม lipid peroxidation ในเลือด

จากการวิเคราะห์กิจกรรม LPO ในเลือดพบว่ามีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.32 ± 0.02 ถึง 1.50 ± 0.10 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 5) ในปูกระดองแข็งปกติ (C) เท่ากับ 0.48 ± 0.01 units mg

ตารางที่ 5 กิจกรรม lipid peroxidation ในส่วนต่าง ๆ ตลอดจนการลอกคราบของปูทะเล

ระยะ	กิจกรรมของ lipid peroxidation (units mg protein ⁻¹)				
	ในส่วนต่าง ๆ ของปูทะเล				
	เลือด	เหงือก	ตับ	เนื้อเยื่อใต้ กระดอง	กล้ามเนื้อ
กระดองแข็งปกติ (C)	0.48±0.01 ^b	0.22±0.09 ^b	6.62±0.43 ^c	2.74±0.12 ^d	2.16±0.12 ^d
ก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D ₁)	0.73±0.02 ^c	0.99±0.09 ^d	14.61±0.45 ^c	4.24±0.30 ^c	3.40±0.23 ^c
ก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D ₂)	0.78±0.01 ^c	1.48±0.08 ^d	10.29±0.41 ^d	3.46±0.27 ^c	4.78±0.25 ^f
ก่อนลอกคราบ 2 วัน (D ₃)	1.50±0.10 ^c	3.78±0.26 ^c	10.21±0.61 ^d	11.03±0.62 ^f	3.34±0.15 ^c
หลังลอกคราบ 6 ชม. (A ₁)	0.45±0.01 ^b	0.33±0.02 ^b	2.36±0.53 ^a	1.42±0.04 ^c	1.47±0.12 ^b
หลังลอกคราบ 12 ชม. (A _{2,1})	0.89±0.04 ^d	0.68±0.01 ^c	1.78±0.33 ^a	1.43±0.05 ^c	1.46±0.04 ^b
หลังลอกคราบ 24 ชม. (A _{2,2})	1.03±0.04 ^d	0.08±0.09 ^a	1.41±0.09 ^a	1.55±0.06 ^c	1.01±0.03 ^a
หลังลอกคราบ 2 วัน (B ₁)	1.11±0.03 ^d	6.35±0.25 ^f	4.98±0.39 ^b	0.43±0.03 ^a	1.5±0.06 ^b
หลังลอกคราบ 3 วัน (B _{2,1})	0.32±0.02 ^a	0.47±0.03 ^c	2.96±0.25 ^a	0.46±0.02 ^a	1.13±0.05 ^a
หลังลอกคราบ 5 วัน (B _{2,2})	0.52±0.04 ^b	2.68±0.12 ^c	3.21±0.10 ^a	0.76±0.06 ^b	1.27±0.09 ^b
หลังลอกคราบ 7 วัน (B _{2,3})	0.53±0.03 ^b	1.08±0.10 ^d	1.31±0.05 ^a	1.77±0.07 ^c	1.99±0.17 ^d
หลังลอกคราบ 10 วัน (B _{2,4})	0.91±0.08 ^d	1.27±0.06 ^d	3.43±0.06 ^a	0.74±0.03 ^b	1.75±0.05 ^c

หมายเหตุ: ตัวอักษร (Superscript) ในแนวนอน (Column) แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

protein⁻¹ กิจกรรม LPO เพิ่มขึ้นในระยะก่อนการลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) (0.73 ± 0.02 units mg protein⁻¹) ถึงระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D₃) (1.50 ± 0.10 units mg protein⁻¹) และลดลงในระยะหลังการลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) (0.45 ± 0.01 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน (B_{2,4}) (0.91 ± 0.08 units mg protein⁻¹)

5.2 กิจกรรม lipid peroxidation ในเหงือก

จากการวิเคราะห์กิจกรรม LPO ในเหงือกมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.08 ± 0.09 ถึง 6.35 ± 0.25 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 5) ในปูกระดองแข็งปกติ (C) เท่ากับ 0.22 ± 0.09 units mg protein⁻¹ โดยในระยะก่อนการลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) (0.99 ± 0.09 units mg protein⁻¹) เพิ่มขึ้นจนถึงระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D₃) (3.78 ± 0.26 units mg protein⁻¹) แล้วลดลงในระยะหลังการลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) (0.33 ± 0.02 units mg protein⁻¹) ถึงระยะหลังการลอกคราบ 24 ชั่วโมง (A_{2,2}) (0.08 ± 0.09 units mg protein⁻¹) แต่กิจกรรมเพิ่มขึ้นในระยะหลังการลอกคราบ 2 วัน (B₁) (6.35 ± 0.25 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน (B_{2,4}) (1.08 ± 0.10 , 1.27 ± 0.06 units mg protein⁻¹)

5.3 กิจกรรม lipid peroxidation ในตับ

จากการวิเคราะห์กิจกรรม LPO ในตับมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 1.31 ± 0.05 ถึง 14.61 ± 0.45 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 5) ในปูกระดองแข็งปกติ (C) เท่ากับ 6.62 ± 0.43 units mg protein⁻¹ โดยในระยะก่อนการลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) 14.61 ± 0.45 units mg protein⁻¹ มีกิจกรรมเพิ่มขึ้น ถึงก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D₃) 10.21 ± 0.61 (unit mg protein⁻¹) หลังจากนั้นกิจกรรม LPO ลดลง ในระยะหลังการลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) (2.36 ± 0.53 unit mg protein⁻¹) จนถึงระยะหลังการลอกคราบ 10 วันกิจกรรมเพิ่มขึ้นเป็น 3.43 ± 0.06 unit mg protein⁻¹

5.4 กิจกรรม lipid peroxidation ในเนื้อเยื่อไตกระดอง

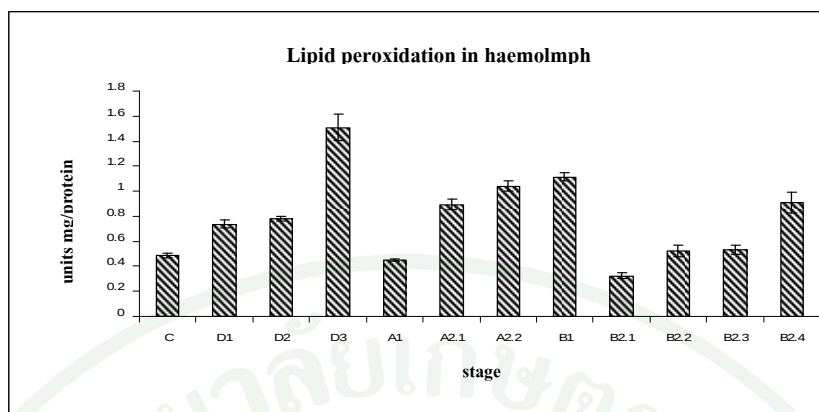
จากการวิเคราะห์กิจกรรม LPO ในเนื้อเยื่อไตกระดอง มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 11.03 ± 0.62 ถึง 0.43 ± 0.03 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 5) ในปูกระดองแข็งแรงปกติ (C) เท่ากับ 2.74 ± 0.12 units mg protein⁻¹ โดยในระยะก่อนการลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) กิจกรรมเพิ่มขึ้นเป็น 4.24 ± 0.30 units mg protein⁻¹ และลดลงในระยะก่อนการลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D₂) (3.46 ± 0.27 units mg protein⁻¹) กิจกรรม LPO เพิ่มขึ้นมากในระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D₃) (11.03 ± 0.62 units mg protein⁻¹) หลังจากนั้นกิจกรรมลดลงถึงครึ่งหนึ่งในระยะหลังการลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) (1.42 ± 0.04 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน (B_{2,4}) พบว่ากิจกรรมลดลงเป็น 0.74 ± 0.03 units mg protein⁻¹

5.5 กิจกรรม lipid peroxidation ในกล้ามเนื้อ

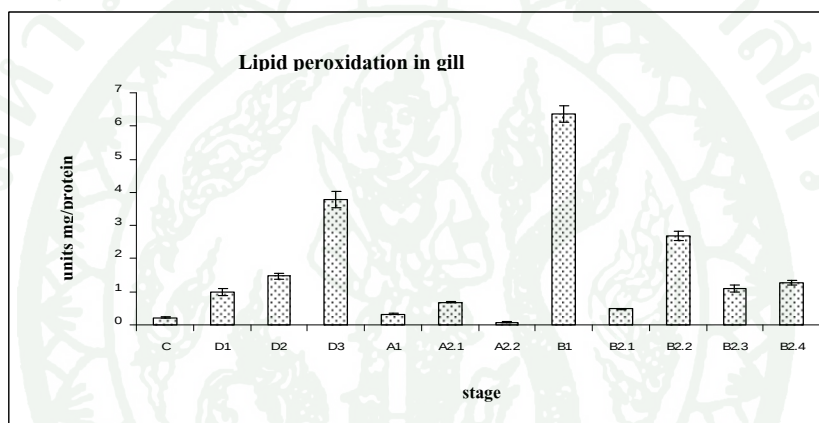
จากการวิเคราะห์กิจกรรม LPO ในเนื้อเยื่อไตกระดอง มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 1.01 ± 0.03 ถึง 4.78 ± 0.25 units mg protein⁻¹ (ตารางที่ 5) ในปูกระดองแข็งแรงปกติ (C) เท่ากับ 2.16 ± 0.12 units mg protein⁻¹ โดยในระยะก่อนการลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D₁) 3.40 ± 0.23 , 4.78 ± 0.25 units mg protein⁻¹ ถึงระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D₃) (3.34 ± 0.15 units mg protein⁻¹) หลังจากนั้นกิจกรรมลดลงในระยะหลังการลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A₁) (1.47 ± 0.12 units mg protein⁻¹) จนถึงระยะหลังการลอกคราบ 10 วัน (B_{2,4}) (1.75 ± 0.05 units mg protein⁻¹)

LPO เป็นกระบวนการที่อนุมูลอิสระเข้าทำลายไขมันชนิดต่าง ๆ เช่น triglyceride, diglyceride และ phospholipid รวมถึงกรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น linoleic acid, linolenic acid และ arachidonic acid ทำให้ได้ lipid peroxides โดย lipid peroxides เป็นผลิตภัณฑ์อันตรายที่มักคงรูปสามารถเปลี่ยนเป็น 4-hydroxyalkenals และ malondialdehyde ซึ่งเป็นสารที่มีพิษต่อเซลล์ โดย LPO สามารถบ่งชี้บอกถึงปริมาณของอนุมูลอิสระในเซลล์ได้ (Yusong *et al.*, 2003)

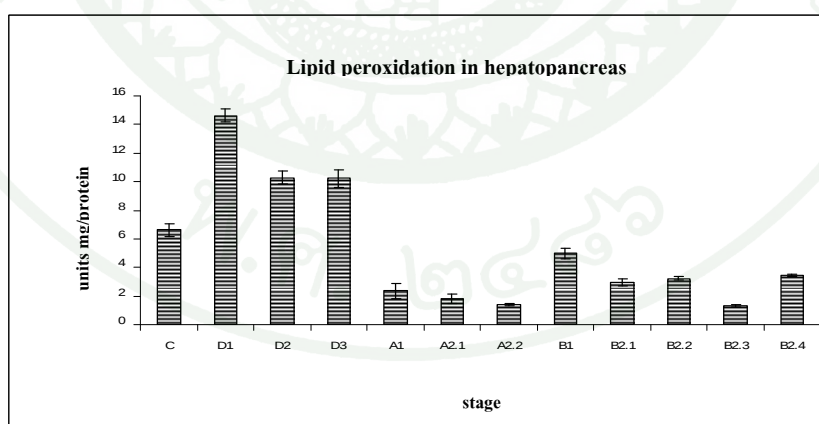
ผลการศึกษา LPO ในเลือด ตลอดวงจรการลอกคราบ พบว่ากิจกรรม LPO มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดวงจรการลอกคราบ (D₁-B_{2,4}) โดยระบบไหลเวียนเลือดของปูนั้นเป็นระบบไหลเวียน



(A)

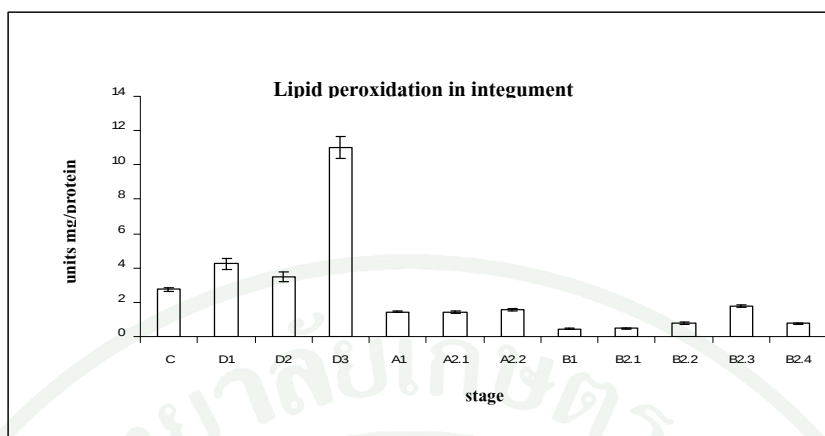


(B)

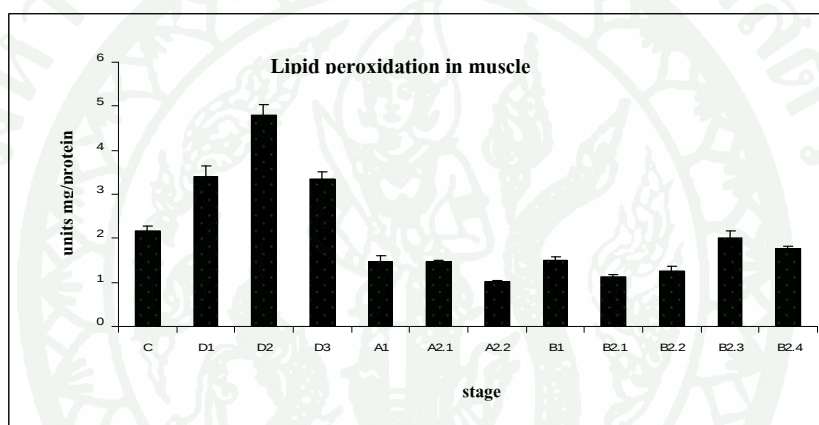


(C)

ภาพที่ 9 กิจกรรม lipid peroxidation ในเลือด (A) เหงือก (B) ตับ (C) ในระยะต่างๆตลอดวงจรลอกคราบของปูทะเล



(D)



(E)

ภาพที่ 10 กิจกรรม lipid peroxidation ในเนื้อเยื่อได้กระดอง (D) และกล้ามเนื้อ (E) ในระยะต่าง ๆ ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล

เลือดแบบเปิด (open circulatory system) เลือดที่อยู่ในแอ่งเลือด (infrabranchial sinus) เป็นเลือดที่ไหลมาจากโพรงเลือด (haemoceal) เพื่อที่จะคอยส่งเลือดไปยัง lamellae ของเหงือกแต่ละอัน และเส้นเลือด hepatic artery ที่ทำหน้าที่ในการส่งเลือดจากหัวใจไปยังตับ (Ceccaldi, 1989) นอกจากเลือดจะทำหน้าที่ในขนส่งออกซิเจนแล้ว เลือดยังเป็นตัวกลางในการลำเลียงแร่ธาตุและสารอาหารต่าง ๆ เช่น ฟอสเฟต และแคลเซียม (Cheng and Rodirick, 1975) เป็นต้น จากอวัยวะที่ปลดปล่อยออกมาจากนั้นเลือดจะนำพาสารอาหารไปเก็บสะสมไว้ในอวัยวะที่ทำหน้าที่ในการสะสม

สารอาหาร หรืออาจถูกนำไปใช้เป็นองค์ประกอบในเนื้อเยื่อต่าง ๆ (Morris and Greenaway, 1992) โดยระยะก่อนการลอกคราบเป็นระยะที่ปูมีการสะสมสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ เพื่อเก็บไว้เป็นพลังงานสำรองในการลอกคราบ กระบวนการดังกล่าวอาจก่อให้เกิดมีอนุมูลิสระเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากจึงทำให้มีกิจกรรม LPO เพิ่มขึ้นในระยะดังกล่าว เช่นเดียวกับ Rameshthangam and Ramasamy (2006) และ Vijayavel *et al.* (2004) ที่รายงานว่าเมื่อมีอนุมูลิสระเพิ่มขึ้นในเลือดของกุ้งชนิด *P. monodon* และปูชนิด *S. serrata* กิจกรรมของ LPO จะเพิ่มสูงขึ้นเช่นกัน

ผลการศึกษากิจกรรมของ LPO ในเหงือกตลอดวงจรการลอกคราบของปู พบว่ากิจกรรม LPO มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในระยะก่อนการลอกคราบ และระยะหลังการลอกคราบกิจกรรมค่อนข้างแปรปรวน เหงือกของปูมีโครงสร้างเป็นแขนง ลักษณะของเหงือกเป็นเส้นหรือมีลักษณะคล้ายซี่เป็นจำนวนมากเรียงตัวอยู่รอบ ๆ แกนเหงือก Chen *et al.* (1974) รายงานว่าเคลือบผิวส่วนใหญ่ในตัวปูได้มาจากน้ำทะเลเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการต่าง ๆ โดยน้ำทะเลผ่านทางช่องเปิดที่อยู่บริเวณรอยต่อของโคนขาและกระดอง ซึ่งน้ำทะเลจะเข้าสู่ตัวปูโดยการผ่านทางเหงือก จากนั้นจะถูกขับออกทางปาก ซึ่งปูจะมีการดึงเคลือบผิวจากน้ำทะเลนำไปเก็บสะสมไว้ในอวัยวะต่าง ๆ (Morris and Greenaway, 1992) เพื่อร่อนำเอาไปใช้ในกระบวนการเพิ่มความแข็งแรงให้กระดองในระยะหลังการลอกคราบ นอกจากนั้นเหงือกยังเป็นอวัยวะที่สัมผัสกับน้ำโดยตรง ซึ่งอาจทำให้ต้องสัมผัสกับเชื้อโรคและสารพิษต่างด้วย Pinho *et al.* (2005) ศึกษาเหงือกของปูชนิด *C. granulatus* เมื่อเหนี่ยวนำด้วย cyanobacteria ชนิด *Microcystis aeruginosa* เมื่อผ่านไป 7 วันพบว่า กิจกรรมของ LPO เพิ่มขึ้น เนื่องมาจากมีอนุมูลิสระปริมาณมากในเหงือก ซึ่งแตกต่างจาก Carolina *et al.* (2007) ที่รายงานว่าเมื่อนำปูชนิด *P. granulose* มาวางบนที่แห้งเป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรม LPO ลดลง

ผลการศึกษากิจกรรมของ LPO ในตับตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล พบว่าระยะก่อนการลอกคราบมีแนวโน้มของกิจกรรมเพิ่มขึ้น และเมื่อปูพัฒนาเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบพบว่ากิจกรรมลดลงเมื่อเทียบกับระยะปกติ โดยตับนั้นเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ metabolism ของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ (Phillips *et al.*, 1997) และยังทำหน้าที่ในการสะสมสารอาหาร เช่น ไกลโคเจน ลิพิด (Verri *et al.*, 2001) และการย่อยสลายของโปรตีนโดยเอนไซม์ proteinase ยังเกิดขึ้นที่ตับด้วยด้วย ซึ่งกระบวนการต่าง ๆ เหล่านี้ล้วนก่อให้เกิดมีอนุมูลิสระเกิดขึ้นทั้งสิ้น โดยระยะก่อนการลอกคราบเป็นระยะที่ปูสะสมอาหาร เพื่อเก็บไว้ใช้เป็นพลังงาน

ถำรอง (Chang, 1995) Adalto and Monserrat *et al.* (2007) และ Pinho *et al.* (2003) รำงำนว่ำ อนุมูลอิสระก่อให้มีกิจกรรม LPO เพิ่มสูงขึ้นในดับของปูชนิด *C. granulatus* โดย LPO เป็นดัชนี บ่งชี้ถึงปริมาณของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในดับได้

ส่วนเนื้อเยื่อได้กระดอง พบว่ำกิจกรรมของ LPO มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในระยะก่อน การลอกครำบ และมีแนวโน้มลดลงในระยะหลังการลอกครำบ ซึ่งมีลักษณะของกิจกรรมเช่นเดียวที่ แสดงออกในดับ เนื้อเยื่อได้กระดองประกอบด้วยชั้นต่ง ๆ หลำยชั้น เช่น basement membrane เป็นชั้นในสุดของเนื้อเยื่อได้กระดอง ชั้น epidermis เป็นชั้นที่ทำหน้าที่ในการขำบสำรต่ง ๆ เพื่อที่ ชั้น cuticle จะนำสำรต่ง ๆ เหล่านั้นไปใช้ในกระบวนการสร้ำงโครงรำงให้แข็งขึ้น ส่วนชั้น cuticle เป็นชั้นที่จะเกิดการย่อยสลายของกระดองเก่ำและสร้ำงกระดองใหม่ (Sugumaran, 1996) ในระยะ หลังการลอกครำบ โดยจะเกิดปฏิกิริยการจับตัวกันระหว่างโปรตีนกับไคติน ซึ่งชั้น cuticle ประกอบด้วย 4 ชั้นย่อยด้วยกันคือชั้น epicuticle เป็นชั้นที่อยู่นอกสุดมี ไขมัน โปรตีน และ calcium salt เป็นส่วนประกอบ ถัดมำเป็นชั้นที่มีไคติน และ โปรตีนเป็นองค์ประกอบคือชั้น exocuticle และ ชั้น endocuticle และสุดท้ายเป็นชั้น membranous layer (Rosomer and Stoffolano, 1998) โดยที่ เนื้อเยื่อได้กระดองชั้น epidermis จะปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยสลายโปรตีนในชั้น endocuticle ให้ได้โปรตีนที่มีขนาดเล็กจนสมำรถดูดซึมเก็บไว้ใช้ในระยะหลังการลอกครำบ (Espie and Roff, 1995) กระบวนการเปลี่ยนแปลงของชั้นดังกล่าวเกิดขึ้นในระยะก่อนการลอกครำบ ซึ่ง เป็นกระบวนการที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น ดังนั้นกิจกรรม LPO จึงมีค่ำสูงในระยะก่อนการลอกครำบ

กิจกรรมของ LPO ในกล้ำมเนื้อ พบว่ำกิจกรรมมีแนวโน้มสูงในระยะก่อนการลอก ครำบ และลดลงในระยะหลังการลอกครำบ โดยกิจกรรมของ LPO มีค่ำสูงสุดในระยะก่อนการลอก ครำบ 1 สัปดาห์ เนื่องจำกระยะดังกล่าวยังมีการเคลื่อนที่และกินอำหำรเป็นปกติ ซึ่งจะมี กระบวนการใช้ออกซิเจนโดยสลายไกลโคเจนที่อยู่ในกล้ำมเนื้อ เพื่อให้ได้เป็นพลังงานออกมาใช้ การเคลื่อนไหวต่อไป ซึ่ง Carolina *et al.* (2007) ศึกษากล้ำมเนื้อปูชนิด *P. granuloze* โดยแบ่งปู ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกให้ปูอยู่ในน้ำทะเล ซึ่งปูเคลื่อนที่ในน้ำอย่ำงคล่องแคล่ว และปรำดเปรียว ได้ตำมปกติ กลุ่มที่สองนำปูไปวางไว้บนที่แห้ง (aerial exposure) ซึ่งปูจะเคลื่อนที่บ้ำงแต่ไม่ค่อย มำก ส่วนใหญ่จะอยู่นิ่ง ๆ เป็นเวลำ 3 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าหลัง 3 ชั่วโมง ไปแล้วในกลุ่มแรกมี กิจกรรมของ LPO ในกล้ำมเนื้อสูงกว่ากลุ่มที่สองที่มีกิจกรรมของการเคลื่อนที่น้อย เนื่องมำจำกไม่ มีอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจำกการใช้พลังงานในการเคลื่อนไหว

สรุป

1. กิจกรรมของ catalase (CAT) ในเลือด เหยือก ตับ เนื้อเยื่อใต้กระดอง และกล้ามเนื้อ มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.56 ± 0.32 ถึง 3.30 ± 0.47 , 0.52 ± 0.21 ถึง 8.42 ± 0.36 , 5.07 ± 0.18 ถึง 56.58 ± 0.31 , 8.05 ± 0.38 ถึง 22.91 ± 1.11 และ 4.65 ± 0.10 ถึง 32.88 ± 0.99 units mg protein⁻¹ CAT ซึ่งมีหน้าที่ทำลายอนุมูลอิสระจำพวกไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) มีกิจกรรมค่อนข้างสูงในตับและกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะกิจกรรมในตับมีค่าสูงมากในระยะก่อนการลอกคราบ 2 สัปดาห์จนถึงก่อนลอกคราบ 2 วัน และระยะหลังการลอกคราบ 3 วัน และ 5 วัน และกิจกรรมในระยะก่อนการลอกคราบมีค่าสูงกว่าระยะกระดองแข็งปกติ

2. กิจกรรมของ glutathione-S-transferase (GST) ในเลือด เหยือก ตับ เนื้อเยื่อใต้กระดอง และกล้ามเนื้อ มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.08 ± 0.05 ถึง 1.27 ± 0.13 , 0.46 ± 0.09 ถึง 10.09 ± 0.74 , 18.90 ± 0.75 ถึง 133.93 ± 0.63 , 4.01 ± 0.17 ถึง 10.79 ± 0.23 และ 1.97 ± 0.23 ถึง 8.09 ± 0.07 units mg protein⁻¹ GST ซึ่งทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระได้หลายชนิดและมีความสำคัญในการบำรุงรักษาเซลล์ แสดงกิจกรรมสูงสุดในตับ ทั้งนี้กิจกรรมของ GST ในเลือด ตับ เหยือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง และกล้ามเนื้อ มีค่าสูงทั้งในระยะก่อนการลอกคราบและระยะหลังการลอกคราบ

3. กิจกรรมของ glutathione peroxidase (GPx) ในเลือด เหยือก ตับ เนื้อเยื่อใต้กระดอง และกล้ามเนื้อ มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.23 ± 0.03 ถึง 1.67 ± 0.06 , 0.34 ± 0.16 ถึง 3.97 ± 0.53 , 2.78 ± 0.60 ถึง 34.02 ± 0.43 , 1.17 ± 0.13 ถึง 15.58 ± 0.53 และ 0.78 ± 0.01 ถึง 6.93 ± 0.17 units mg protein⁻¹ ตามลำดับ GPx ซึ่งทำหน้าที่ในการกำจัดและทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการที่มีการใช้ออกซิเจนนั้น พบว่ากิจกรรมจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นในระยะก่อนการลอกคราบ และเมื่อปลูลอกคราบ กิจกรรมจะลดลงทันทีและจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งหลังการลอกคราบ กิจกรรมส่วนใหญ่แสดงออกในตับและเนื้อเยื่อใต้กระดอง

4. กิจกรรมของ glutathione (GSH) ในเลือด เหยือก ตับ เนื้อเยื่อใต้กระดอง และกล้ามเนื้อ มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.02 ± 0.01 ถึง 0.22 ± 0.06 , 0.47 ± 0.04 ถึง 4.54 ± 0.08 , 1.22 ± 0.34 ถึง 12.69 ± 0.40 , 2.38 ± 0.48 ถึง 17.88 ± 1.05 และ 4.41 ± 0.25 ถึง 17.54 ± 0.19 units mg protein⁻¹ ตามลำดับ GSH ซึ่งมีฤทธิ์ในการสลายสารอนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการที่มีการใช้ออกซิเจน พบว่ากิจกรรมค่อนข้างแปรปรวนตลอดทั้งวงจรการลอกคราบ กิจกรรมในเลือด เหยือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง และกล้ามเนื้อมีค่าสูงในระยะก่อนการลอกคราบและหลังการลอกคราบ

5. กิจกรรมของไลโปเปอร์ออกซิเดชัน (LPO) ในเลือด เหยือก ตับ เนื้อเยื่อใต้กระดอง และกล้ามเนื้อในปูทะเล ตลอดวงจรการลอกคราบ มีค่าอยู่ในช่วง 0.32 ± 0.02 ถึง 1.50 ± 0.10 , 0.08 ± 0.09 ถึง 6.35 ± 0.25 , 1.31 ± 0.05 ถึง 14.61 ± 0.45 , 0.43 ± 0.03 ถึง 11.03 ± 0.62 และ 1.01 ± 0.03 ถึง 4.78 ± 0.25 units mg protein⁻¹ ตามลำดับ สำหรับ LPO พบว่ากิจกรรมในระยะก่อนการลอกคราบมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และเมื่อปูพัฒนาเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบพบว่าการลอกคราบมีแนวโน้มลดลงเมื่อเทียบกับระยะปกติ

6. ผลการวิจัยสรุปได้ว่า กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในปูทะเลมีความเด่นชัดในระยะก่อนการลอกคราบเนื่องจากมีกระบวนการสลายสารอินทรีย์เพื่อนำกลับไปใช้ใหม่เกิดขึ้น และในระยะหลังการลอกคราบเนื่องจากการสะสมสารอาหารเพื่อสร้างกระดองใหม่ซึ่งก่อให้เกิดอนุมูลอิสระมากในสองระยะดังกล่าว

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์และสารต้านอนุมูลอิสระที่ศึกษาในเนื้อเยื่อต่าง ๆ มีรูปแบบคล้ายคลึงและค่อนข้างจะเป็นไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือ กิจกรรมมีแนวโน้มมากในระยะก่อนการลอกคราบ และระยะหลังการลอกคราบ จากผลการวิจัยจะเห็นได้ชัดว่ากิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน แสดงออกอย่างชัดเจนในระดับมากกว่าวัยอื่น ๆ ซึ่งเนื่องมาจากตับเป็นแหล่งสะสมสารอาหาร เป็นอวัยวะที่มี metabolism สูง และยังทำหน้าที่ในการกรองสารพิษ และเชื้อโรคต่าง ๆ ที่เข้าสู่ร่างกาย จากเหตุผลดังกล่าวตับน่าจะเป็นตัวแทนของอวัยวะที่นำมาศึกษาการทำงานของเอนไซม์และสารต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี ซึ่งจะเป็นการช่วยลดค่าใช้จ่ายจากค่าสารเคมี หรืออุปกรณ์ต่าง ๆ ที่เพิ่มขึ้นได้ หากต้องการต่อยอดงานวิจัยในขั้นสูงต่อไป

2. จากผลการวิจัยจะเห็นได้ว่าเอนไซม์สารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และลิปิดเปอร์ออกซิเดชันมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นสูงในระยะก่อนการลอกคราบ ซึ่งสาเหตุที่ทำให้กิจกรรมต่าง ๆ สูงในระยะดังกล่าว อาจเนื่องมาจากมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากจากกระบวนการที่เกิดขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงโครงร่างเก่า และการสร้างโครงร่างใหม่ของปู ดังนั้นเกษตรกรผู้เลี้ยงปูควรมีความระมัดระวังและควบคุมในเรื่องของคุณภาพน้ำ สิ่งแวดล้อม ความเครียดต่าง ๆ ที่มีผลกระทบต่อปูในช่วงระยะดังกล่าว ซึ่งอาจทำให้ปูลอกคราบไม่ออก จนเป็นสาเหตุให้มีการตายของปูเกิดขึ้น

3. ความเครียดและสิ่งแวดล้อมเป็นตัวก่ออนุมูลอิสระ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุการลอกคราบไม่ออกของปู ตามปกติปูมีระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีมาแต่กำเนิด ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดได้ในภายหลัง ดังนั้นถ้าปูเป็นโรคหรือมีสิ่งผิดปกติเกิดขึ้นแล้ว อาจไม่สามารถรักษาให้หายจากโรคดังกล่าวได้ในทันที ดังนั้นการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการป้องกันและสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่ปู ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระที่สร้างขึ้นมาร่างกายปูอาจไม่เพียงพอ ดังนั้นการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระในรูปแบบต่าง ๆ เข้าไปในปูในช่วงระยะเวลาที่เหมาะสม ที่ปูสามารถนำสารต้านอนุมูลอิสระไปใช้ให้เกิดประโยชน์แก่ร่างกายได้ดีที่สุด โดยไม่จำเป็นต้องเสริมสาร

ด้านอนุมัติสระตลอดวงจรการลอกคราบ ทั้งนี้จะช่วยลดค่าใช้จ่ายและเป็นประโยชน์สูงสุดให้แก่เกษตรกร



เอกสารและสิ่งอ้างอิง

บรรจง เทียนสงรัศมิ และบุญรัตน์ ประทุมชาติ. 2545. ปู่ทะเล: ชีววิทยา การอนุรักษ์ทรัพยากรและการเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์แบบยั่งยืน. สำนักงานกองทุนสนับสนุนวิจัย, กรุงเทพฯ

ประจวบ หล้าอุบล. 2537. สรีรวิทยาของกุ้ง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

Aceto, A., F. Amicarelli, P. Sacchetto, B. Dragani, T. Bucciarelli, L. Masciocco, M. Miranda and C.D. Ilio. 1994. Developmental aspects of detoxifying enzymes in fish (*Salmo iridaeus*). **Free Radic. Res.** 21: 285-294.

Adalto, B. and J.M. Monserrat. 2007. Effects of methyl parathion on *Chasmagnathus granulatus* hepatopancreas: Protective role of Sesamol. **Ecotoxicol. Environ. Safety.** 67: 100-108.

Ana, D.C., M.H. Costa, J.L. Orlando and R.L. David. 2003. Age-related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 289: 83-101.

Anderson, M. E. 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Meth. Enzymol.** 113:548-553.

Arun, S., P. Krishnamoorhty and P. Subramanian. 1999. Properties of glutathione peroxidase from the hepatopancreas of freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii*. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 31: 725-732.

Arun, S., and P. Subramanian. 1998. Antioxidant enzymes in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during embryonic and larval development. **Comp. Biochem. Physiol.** 121(B): 273-277.

Avissar, N., J.R. Slemmon, I.S. Plamer and H.J. Cohen. 1991. Partial sequence of human plasma glutathione peroxidase and immunologic identification of milk glutathione peroxidase as the plasma enzyme. **J. Nutr.** 21: 1243-1249.

_____, J.C. Whitin, P. Z. Allen, D.D. Wagner, P. Liegey and H.J. Cohen. 1989. Plasma seleniumdependent glutathione peroxidase. Cell of origin and secretion. **Biol. Chem.** 264: 15850-15855.

Barnes, R.D. 1987. **Invertebrate Zoology**. CBS College Publishing, New York.

Blat, A., M.M. Almar and F.J. Romero. 1988. The effect of two sulphurcontaining pesticides, fenitrothion and endosulphan, on glutathione (GSH) content and on GSH-S-transferase and gamma-glutamyl transpeptidase activities in midgut gland of the American red crayfish *Procambarus clarkia*. **Drug Metab. Drug Interact.** 6: 383-394.

Boonyarath, P., P. Sawangwong, P. Pakkong and J. Machado. 2002. Organic and inorganic compound variations in haemolymph, epidermal tissue and cuticle over the molt cycle in *Scylla serrata* (Decapoda). **Comp. Biochem. Physiol.** 131(A): 243-255.

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.

Burgents, J.E., L.E. Burnett, E.V. Stabb and K.G. Burett. 2005. Localization and bacteriostasis of *Vibrio* introduced in to the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*.

Dev. Comp. Immunol. 29:681-691.

Buege, J.A. and S.D. Aust. 1978. Microsomal lipid peroxidation. **Meth. Enzymol.**

52: 302-310

Carolina, R.M., M. Ansaldo and G.A. Lovrich. 2007. Effect of aerial exposure on the antioxidant status in the subantarctic stone crab *Paralomis granulose*

(Decapoda: Anomura). **Com. Biochem. Physiol.** 146: 54-59.

Ceccaldi, H.J. 1989. Anatomy and physiology of digestive tract of crustaceans decapods reared in aquaculture. **Adv. Trop. Aqua.** 9: 243-259.

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.

Chen, C.H., J.W. Greenwalt and A.L. Lehninger. 1974. Biochemical and ultrastructural aspects of Ca^{2+} transport by mitochondria of hepatopancrease of the blue crab, *Callinectes sapidus*. **Cell Biol.** 61: 301-305.

Cheng, T. C. and G. E. Rodirick. 1975. Lysosome and other enzymes in the haemolymph of *Crassostrea virgiica* and *Mercenaria mercenaria*. **Comp. Biochem. Physiol.**

52(B): 443-447.

- Cheng, W. and J.C. Chen. 2001. Effects of intrinsic and extrinsic factors on the haemocyte profile of the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Fish Shellfish Immunol.** 11: 53-63.
- Chung, J.S. 2008. A trehalose 6-phosphate synthase gene of the hemocytes of the blue crab, *Callinectes sapidus*: cloning, the expression, its enzyme activity and relationship to hemolymph trehalose levels. **Saline Systems.** 4(18): 1-8
- Damdanpat, J., D.B.N. Chainy and K.J. Rao. 2000. Dietary vitamin-E modulates antioxidant defence system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Comp. Biochem. Physiol.** 127(C): 101-115.
- Dai, A. and S. Yang. 1991. Crabs of the China Seas. **China Ohina Press Beijing and Springer Verlag Berlin Heidellberg.** New York and Tokyo.
- Digiulio, R., P.C. Washburn, R.J. Wenning, G.W. Winston and C.S. Jewell. 1989. Biochemical responses in aquatic animals: A review of determinants of oxidative stress. **Environ. Toxicol. Chem.** 8: 1103-1123.
- Dutra, B.K., F.A. Fernandes and G.T. Oliveira. 2008. Carbofuran-induced alterations in biochemical composition, lipoperoxidation, and Na^+/K^+ ATPase activity of *Hyaella pleoacuta* and *Hyaella curvispina* in bioassays. **Comp. Biochem. Physiol.** 147(C):179-188.
- Eaton, D.L. and T.K. Bammler. 1999. Concise review on the glutathione *S*-transferases and their significance to toxicology. **Toxicol. Sci.** 49:156-164.

- Eduardo, A.A., A.C.D. Bainy, A.L. Dafre, O.F. Gomes, M.G. Medeiros and P.D. Mascio. 2005. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel(*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. **J. Exp. Mar. Biol.** 318: 21-30.
- Esterbauer, H., R.J. Schaur and H. Zollner. 1991. Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and Related Aldehydes. **Free Radic. Biol. Med.** 11: 81-128.
- Espie, P.J. and J.C. Roff. 1995. Characterization of chitobiase from *Daphnia magna* and its relation to chitin flux. **Physiol. Zool.** 68: 727-748.
- Griswold, C., A.L. Mathews, K.E. Bewly and J.M. Mahaffey. 1993. Molecular characterization and rescue of acatalasemic mutants of *Drosophila melanogaster*. **Genetics** 134: 781-788.
- Guzman, R.E. and P.F. Solter. 1999. Hepatic oxidative stress following prolonged sublethal microcystin LR exposure. **Toxicol. Pathol.** 27: 582-588.
- Habig, W., M.J. Pabst and W.B. Jakoby. 1974. Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.** 249: 7130-7139.
- Halliwell, B. and J.C.M. Gutteridge. 1999. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 3rd ed. Oxford University Press, New York.
- Helmward Zollner. 1999. **Handbook of enzyme inhibitors.** Weinheim : Wiley-VCH.

Hermes-Lima, M., J.M. Storey and K.B. Storey. 1998. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails.

Comp. Biochem. Physiol. 120(B): 437-448.

Hermes-Lima, M., W.G. Willmore and K. B. Storey. 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylenol orange complex formation.

Free Radic. Biol. Med. 19: 271-280.

Hose, J.E., G.G. Martin, S. Tiu and N. Mckrell. 1992. Patterns of hemocyte production and release throughout the molt cycle in the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*. **Biol. Bull.** 183: 185-199.

Jagneshwer, D., B. Gagan, N. Chainy and K. J. Rao. 2000. Dietary vitamin-E modulates antioxidant defence system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*.

Comp. Biochem. Physiol. 127: 101-115.

Jeejeebhoy, K.N. 1991. In vivo breath alkane as an index of lipid peroxidation.

Free Radic. Biol. Med. 10: 191-193.

Jennifer, H. and P.B. Key. 2007. Activities of biomarkers in multiple life stages of the model crustacean, *Palaemonetes pugio*. **J. Exp Mar. Biol. Ecol.** 353: 235-244.

John, S.W. and C.W. Dorothy. 1997. **Source book of enzymes**. Boca Raton, Fla.

- Kashiwagi, A., K. Kashiwagi, M. Takase, H. Hanada and M. Nakamura. 1997. Comparison of catalase in diploid and haploid *Rana rugosa* using heat and chemical inactivation techniques. **Comp. Biochem. Physiol.** 118(B) 499-503.
- Kensler, T.W. 1997. Chemoprevention by inducers of carcinogen detoxication enzymes. **Environ. Health Perspect.** 105:964-970.
- Klotz, M.G., G.R. Klassen and P.C. Lowen. 1997. Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. **Mol. Biol. Evol.** 14:951-958.
- Livingstone, D.R. 1990. Oxyradical production as a pollution mediated mechanism of toxicity in the common muscle, *Mytilus edulis* and other molluscs. **Funct. Ecol.** 4: 415-424.
- Lombradi, B., N. Chandard and J. Locker. 1991. Nutritional model of hepatocarcinogenesis. Rat fed choline-devoid diet. **Dig. Dis. Sci.** 36: 979-84.
- Luqing, P. and H. Zhang. 2006. Metallothionein, antioxidant enzymes and DNA strand breaks as biomarkers of Cd exposure in a marine crab, *Charybdis japonica*. **Comp. Biochem. Physiol.** 144(C): 67-75.
- Maddipati, K.R. and L.J. Marnett. 1987. Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. Purification and properties of a selenium-dependent glutathione peroxidase. **J. Biol. Chem.** 262: 17398-17403.

- 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..
- Mannervik, B., Y.L. Awasthi, P.G. Board, J.P. Hayes, C. Dillio and B. Ketterer. 1992. Nomenclature for human glutathione transferase (letter). **Biochem. J.** 282:305-306.
- Marius, B. and T.H. Brouwer. 1998. Biochemical Defense Mechanisms against Copper-Induced Oxidative Damage in the Blue Crab, *Callinectes sapidus*. **Arch. Biochem. Biophys.** 351: 257-264.
- Michael S. and H.F. Dariush. 2006. Peroxisomes and oxidative stress. **Biochim. Biophys. Acta.** 1763: 1755-1766.
- Minotti, G and S.D. Aust. 1989. The role of iron in oxygen radical-mediated lipid peroxidation. **Chem. Biol. Interact.** 71: 1-19.
- Morris, M.A. and P. Greenaway. 1992. High affinity, Ca^{2+} specific ATPase and Na^+/K^+ ATPase in the gill of a supralittoral crab *Leptograpsus variegates*. **Comp. Biochem. Physiol.** 102(A): 15-18.
- Mohankumar, K. and P. Ramasamy. 2006. Activities of membrane bound phosphatases, transaminases and mitochondrial enzymes in white spot syndrome virus infected tissues of *Fenneropenaeus indicus*. **Virus Res.** 118: 130-135.

Nord, F.F. and C.H. Werkman. 1941. **Advances in enzymology and related subjects photosynthesis**. Interscience publishers New York.

Olga, L.T., G.A. Gómez-Anduro, X. Felipe-Ortega, M.A. Islas-Osuna, R.R. Sotelo-Mundo, C. Barillas-Mury and G. Yepiz-Plascencia. 2004. Catalase from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: molecular cloning and protein detection. **Comp. Biochem. Physiol.** 138: 331-337

Pan, L.Q., J.Y. Ren and Z.W. Wu. 2004. Effects of heavy metal ions on SOD, CAT activities of hepatopancreas and gill of the crab *Eriocheir sinensis*. **J. Ocean. Univ. Chin.** 34: 189-194.

Pflugmacher, S., C. Wiegand, A. Oberemm, K.A. Beattie, E. Krause, G.A. Codd and C.E.W. Steinberg. 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. **Biochim. Biophys. Acta.** 1425: 527-533.

Phillips, J.W., R.J.W. McKinney, F.J.R. Hird and D.L. Macmillan. 1997. Lactic acid formation in crustaceans and the liver function of the midgut gland questioned. **Comp. Biochem. Physiol.** 56(B): 427-433.

Pinho, G.L.L., C.M.D. Rosa, J.S. Yunes, C.M. Luquet, A. Bianchini and J.M. Monserrat. 2003. Toxic effects of microcystins in the hepatopancreas of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). **Comp. Biochem. Physiol.** 135: 459-468.

- Pinho, G.L.L., M.D. Rosa, F.E. Maciel, A. Bianchini, J.S. Yunes, L.A.O. Proenca and J.M. Monserrat. 2005. Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. **Ecotoxicol. Environ. Safety.** 61: 353-360.
- Rameshthangam, P., and P. Ramasamy . 2006. Antioxidant and membrane bound enzymes activity in WSSV-infected *Penaeus monodon* Fabricius. **Aquaculture** 254: 32-39.
- Ray, D.C., R. Bomont, A. Mizush-Ima, T. Kugimiya, A.F. Howie and G.J. Beckett .1996. Effect of seroflurane anaesthesia on plasma concentration of glutathione-S-transferase. **Br. J. Anaesth.** 77: 404-407.
- Rosomer, W.S. and J.G. Stoffolano. 1998. **The Science of Entomology.** 4th ed. McGraw-Hill Inc., New York.
- Rotruck J.T., A.L. Pope, H.E. Ganther, A.B. Swanson, D.G. Hafeman and W.G. Hoekstra. 1973. Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science** 179: 588-590.
- Salaenoi, J., A. Thongpan and M. Mingmuang. 2006a. Variation of calcium, N-acetyl glucosamine and glucosamine content during molting cycle of mud crab (*Scylla serrata* Forskal 1775) **Kasetsart Journal** 40(3): 668-679.
- _____, J. Butpugdeethum, M. Mingmuang and A. Thongpan. 2006b. Chitobiase, proteinase, glycogen and some trace elements during molting cycle of mud crab (*Scylla serrata* Forskal 1775). **Kasetsart Journal** 40(2): 1-12.

- Skinner, D.M. 1962. The structure and metabolism of a crustacean integumentary tissue during a molt cycle. **Biol. Bull.** 123: 635-647.
- Sies, H. 1993. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.** 215: 213-219.
- Soderhall, K. and L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. **Annu. Rev. Fish Dis.** 2: 3-23.
- Sole, M., L.D. Peters, K. Magnusson, A. Sjolín, A. Granmo and D.R. Livingstone, 1998. Responses of the cytochrome *P450*- dependant monooxygenase and other protective enzyme systems in digestive glands of transplanted common mussel (*Mytilus edulis* L.) to organic contaminants in the Skagerrak and Kattegat (North Sea). **Biomarkers** 3: 49-62.
- Stine, K.B. and T.M. Brown. 1996. **Principles of Toxicology**. Lewis Publishers CRC Press Inc., Florida.
- Storey, K.B. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 29: 1715-1733.
- Struznka L, M. Chalimoniuk and G. Sulkowski. 2005. The role of astroglia in Pb-exposed adult rat brain with respect to glutamate toxicity. **Toxicology** 212(3): 185-194.
- Sugumaran, M. 1996. Role of the insect cuticle in host defense reactions, pp 355-374. In K. Soderhall, S. Iwanaga and G. R. Vasata, eds. **New Directions in Invertebrates Immunology**. SOS Publications, Fair Heaven, New Jersey.

- Takahashi, K., N. Avissar, J. Whitin and H.J. Cohen. 1987. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. **Arch. Biochem. Biophys.** 256: 677-686.
- Takahara, S., B.H. Hamilton, J.V. Nell, T.Y. Kobra, Y. Ogura and T.Y. Nishimura. 1960. Hypocatalasemia a new genetic carrier state. **J. Clin. Invest.** 29: 610-619.
- Ubirajara, O.O., A. Sander, R. Arau, A. Bello'-Kleinb, S.M.S. Roselis and L.C. Kucharskia. 2005. Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. **Comp. Biochem. Physiol.** 140: 51-57.
- Ursini, F., M. Maiorino, R. Brigelius-Flohé, K.D. Aumann, A. Roveri, D. Schomburg, and L. Flohé. 1995. Diversity of glutathione peroxidases. **Methods Enzymol.** 252: 38-53.
- Verri, T., A. Mandal, L. Zilli, D. Bossa, P.K. Mandal, L. Ingrosso, V. Zonno, S. Vilella and G.A. Ahearn. 2001. D-glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. **Comp. Biochem. Physiol.** 130(A): 585-606.
- Vijayavel, K., R.D. Gomathi, K. Durgabhavani and M. P. Balasubramanian. 2004. Sublethal effect of naphthalene on lipid peroxidation and antioxidant status in the edible marine crab *Scylla serrata*. **Marine Poll. Bull.** 48: 429-433.

- Vinagre, T.M., J.C. Alciati, F. Regoli, R. Bocchetti, J.S. Yunes, A. Bianchini and J. M. Monserrat. 2003. Effect of microcystin on ion regulation and antioxidant system in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). **Comp. Biochem. Physiol.** 135: 67-75.
- Vogan, C.L., C. Costa-Ramos and A.F. Rowley. 2001. A histological study of shell disease syndrome in the edible crab *Cancer pagurus*. **Dis. Aquat. Org.** 47: 209-217.
- Warren, R.D., H.L.S. William, R.W. Jack, R.S.S. Wu, P.K.S. Lam and D. Nugegoda. 2005. Comparative effects of the blue green algae *Nodularia spumigena* and a lysed extract on detoxification and antioxidant enzymes in the green lipped mussel (*Perna viridis*). **Mar. Pollu. Bulle.** 51: 1026-1033.
- Wu, G. and D.M. Shad. 1995. Isolation and characterization of potato catalase cDNA. **Plant Physiol.** 108: 1740-1748.
- Xiao, X., L.P. Xie, J.Y. Lin, C.H. Li, Q.X. Chen, H.M. Zhou and R.Q. Zhang. 2002. Purification and enzymatic characterization of alkaline phosphatase from *Pinctada fucata*. **J. Mol. Catal. Enzyme.** 17:65-74.
- Yahia, Y.M., S.P. Palacios, M.T. Ahmed, F.M. Mahmoud, M.A. Osman and S.B. Risbourg. 2007. Effects of chitosan on oxidative stress and metallothioneins in aquatic worm *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae). **Chemosphere** 67: 167-175.

Yusong, Y., R. Sharma, A. Shaema, S. Awasthi and Y.C. Awasthi. 2003. Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. **Acta Biochim. Polonica.** 50: 319-336.







(A)

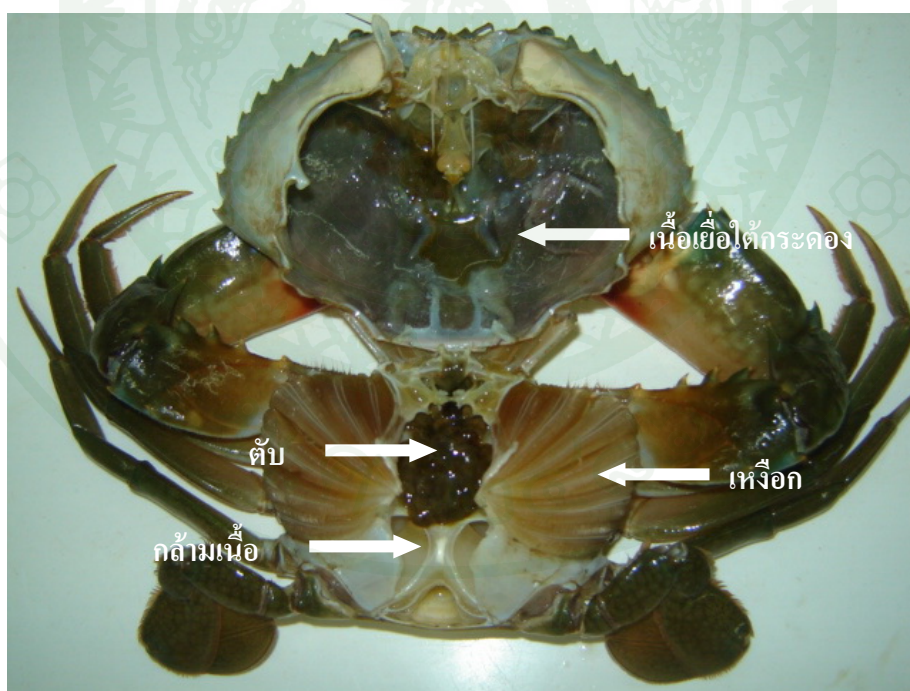


(B)

ภาพผนวกที่ 1 การวัดขนาดความกว้างของปู (A) และความยาวปู (B)



(A)



(B)

ภาพที่ 2 การเก็บเลือดที่ขาตู้ที่ 5 (A) และ อวัยวะภายในของปู (B)



(A)



(B)

ภาพผนวกที่ 3 รอยต่อระหว่างกระดูกกับข้อขาของปูระยะก่อนการลอกคราบ 1 สัปดาห์
และรอยต่อระหว่างกระดูกกับข้อขาของปูระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน

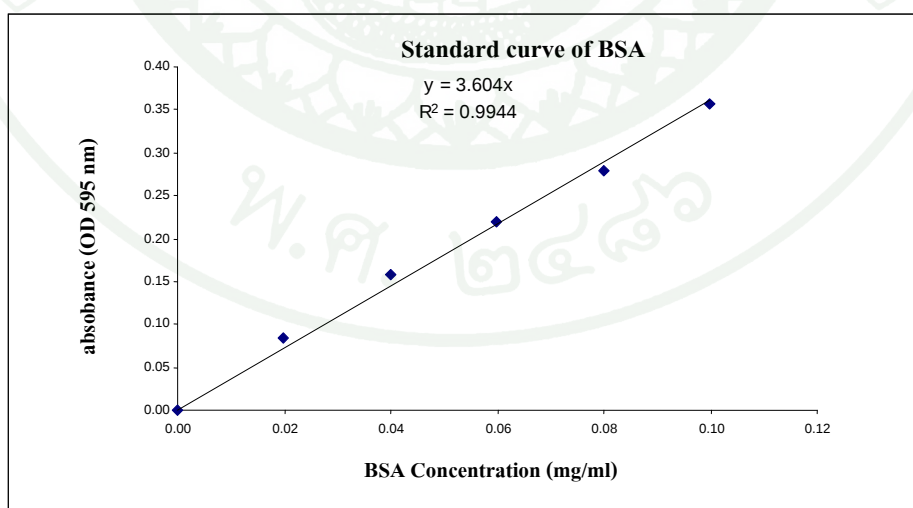
กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA)

สารเคมี

- 1.0 mg/ml BSA (stock solution)
- Bradford reagent

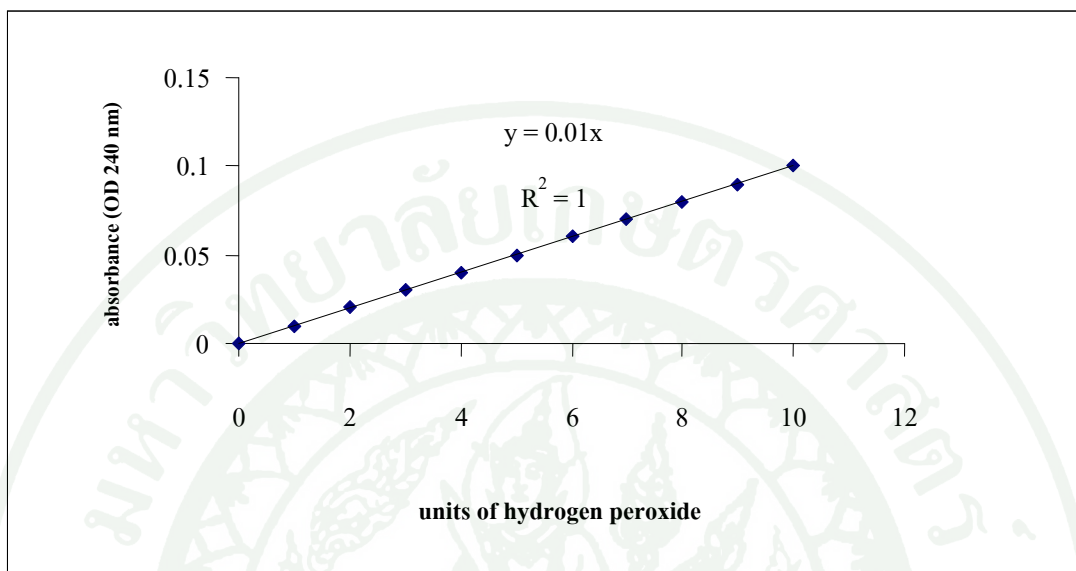
วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลาย BSA เจือจางที่ระดับความเข้มข้น 0.00, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mg/ml ตามลำดับ จากสารละลาย BSA เข้มข้น (stock solution) (โดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank)
2. เติม Bradford reagent ปริมาตร 1 ml ลงใน 100 μ l ของสารละลายเจือจางระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที
3. จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm
4. นำผลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm กับความเข้มข้นระดับต่างๆ ของ BSA

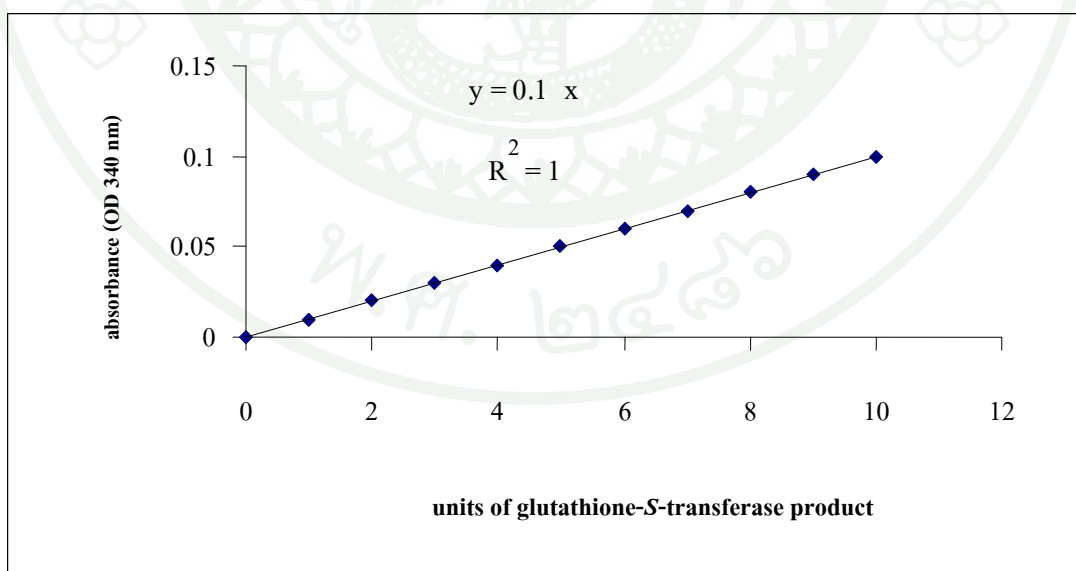


ภาพผนวกที่ 4 กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin

กราฟมาตรฐานของเอนไซม์ catalase และ glutathione-S-transferase

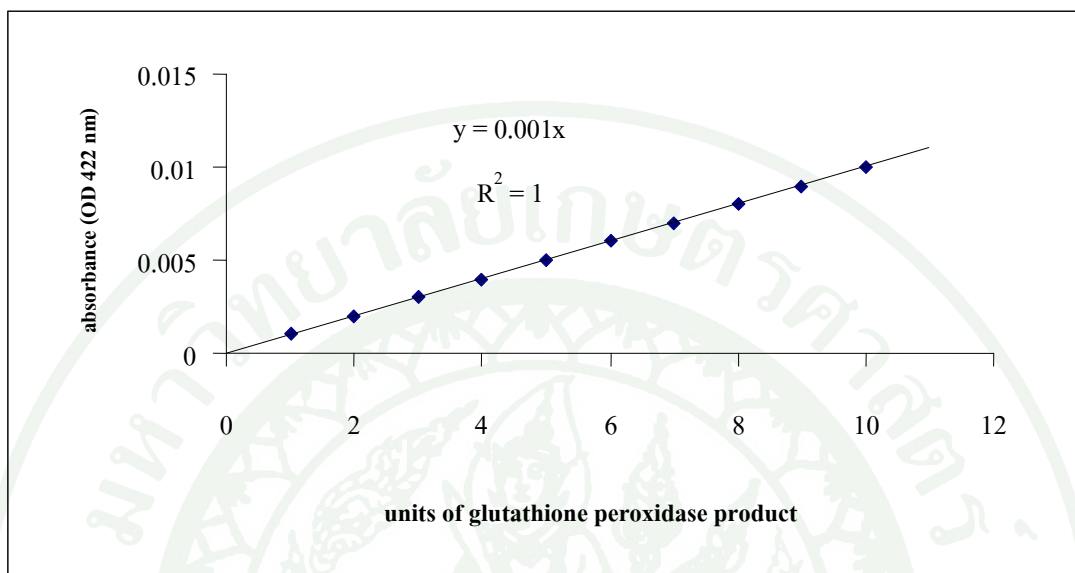


ภาพผนวกที่ 5 กราฟมาตรฐานของเอนไซม์ catalase

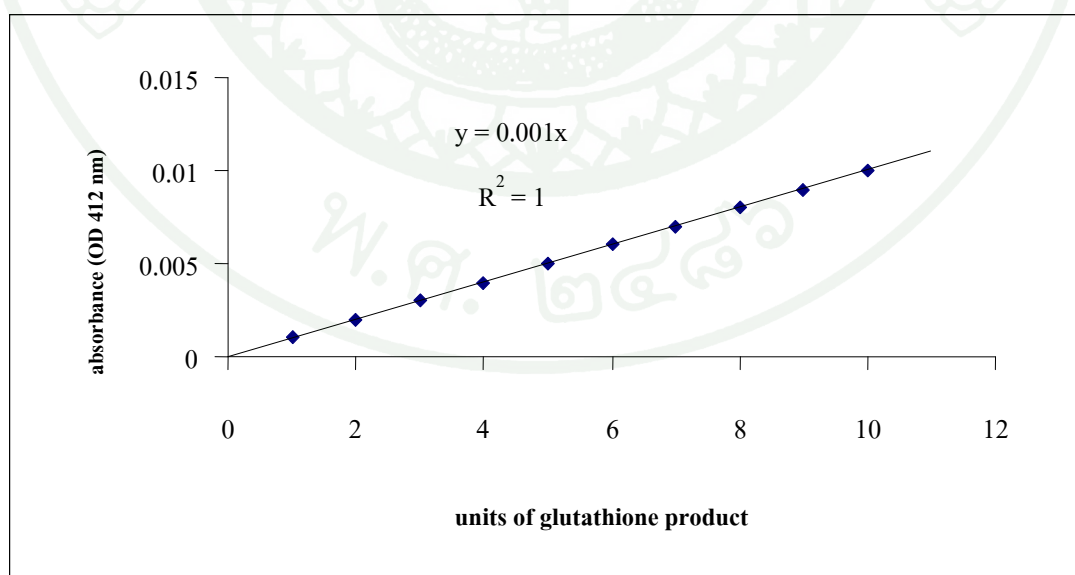


ภาพผนวกที่ 6 กราฟมาตรฐานของเอนไซม์ glutathione-S-transferase

กราฟมาตรฐานของเอนไซม์ glutathione peroxidase และสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione

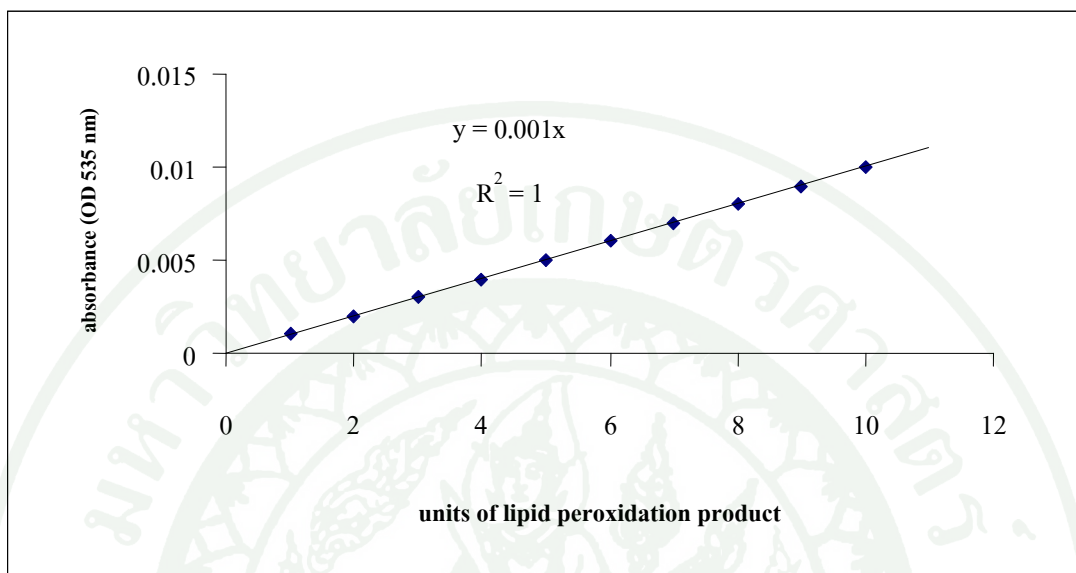


ภาพผนวกที่ 7 กราฟมาตรฐานของเอนไซม์ glutathione peroxidase



ภาพผนวกที่ 8 กราฟมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione

กราฟมาตรฐานของ lipid peroxidation product



ภาพผนวกที่ 9 กราฟมาตรฐานของ lipid peroxidation product

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	ภัทราวดี ศรีมีเทียน
วัน เดือน ปี ที่เกิด	12 ธันวาคม 2525
สถานที่เกิด	อำเภอรามีสโล จังหวัดศรีสะเกษ
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (วิทยาศาสตร์การประมง) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) เลขที่สัญญา ภค./2551-40