Glutathione-*S*-transferase ในวงจรการลอกคราบของปูทะเล (*Scylla serrata*)

Gutathione-*S*-transferase in Molting Cycle of Mud Crab (*Scylla serrata*)

ภัทราวดี ศรีมีเทียน (Pattarawadee Srimeetian)* จินตนา สแลน้อย (Jintana Salaenoi) **

บทคัดย่อ

Glutathione-*S*-transferase (GST) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าในการกำจัดสารที่มีพิษ และอนุมูลอิสระในเซลล์ ผลการศึกษากิจกรรมของ GST ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล (*Scylla serrata*) พบว่า GST มีค่าสูงในตับ (18.90±0.75 ถึง 133.93±0.63 units mg protein^{-1}) เมื่อเปรียบเทียบกับในเลือด เหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง และกล้ามเนื้อ ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.08±0.05 ถึง 1.27±0.13, 0.46±0.09 ถึง 10.09±0.74, 4.01±0.17 ถึง 10.79±0.23 และ 1.97±0.23 ถึง 8.09±0.07 units mg protein^{-1} ตามลำดับ เมื่อปูระยะกระดองแข็งปกติเข้าสู่ระยะก่อนการลอกคราบ พบว่า กิจกรรมของ GST จะมีค่าค่อย ๆ เพิ่มขึ้นในทุกอวัยวะ และกิจกรรมจะมีค่าลดลงต่ำสุดในขณะที่ปูลอกคราบ กิจกรรมของ GST จะมีค่าเพิ่มขึ้นอีกครั้งหลังจากปูลอกคราบ 6 ชั่วโมงซึ่งในเนื้อเยื่อใต้กระดอง และกล้ามเนื้อแสดงกิจกรรมของ GST ที่เด่นชัดในระยะหลังการลอกคราบ 2-5 วัน

ABSTRACT

Glutathione-*S*-transferase (GST) is an anti-oxidative enzyme involved in detoxified toxic substances and eliminated free radicals in cells. The activity of GST over the molting cycle of mud crab (*Scylla serrata*) was observed and the results showed that GST activity in hepatopancreas (18.90±0.75 to 133.93±0.63 units mg protein^{-1}) was higher than those in haemolymph, gill, integument and muscle which were occurred at 0.08±0.05 to 1.27±0.13, 0.46±0.09 to 10.09±0.74, 4.01±0.17 to 10.79±0.23 and 1.97±0.23 to 8.09±0.07 units mg protein^{-1}, respectively. Crabs at intermolt stage showed the high GST activity comparing to the premolt stages in all tissues while the minimum activity was revealed at the time of ecdysis. GST activity was slowly increased after 6-h postmolt and became the maximum point during 2-5 days postmolt distinctively in integument and muscle.

คำสำคัญ: ปูทะเล วงจรการลอกคราบ เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ

Key Words: Mud crab, Molting cycle, Enzyme antioxidant

** มหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*

*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*

คำนำ

ปูทะเลจัดเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจ ที่สำคัญมีการเจริญเติบโตโดยการเพิ่มขนาดและน้ำหนัก ซึ่งอาศัยการลอกคราบ เนื่องจากกระดองปูเป็นสารประกอบจำพวกหินปูนที่มีความแข็ง ดังนั้นปูจะขยายขนาดได้ ก็ต่อเมื่อได้สร้างกระดองใหม่ขึ้นมาทดแทนกระดองเก่าที่สลัดทิ้งไป ตามปกติจะมีการหมุนเวียนน้ำผ่านเข้าออก ร่างกายปูอยู่เสมอ แต่ในระยะที่ปูลอกคราบใหม่ ๆ น้ำจะถูกดึงเข้าสู่ร่างกายในปริมาณที่มากกว่าปกติ เพื่อเป็นการขยายขนาด ซึ่งในน้ำนั้นอาจมีจุลชีพ เชื้อโรคหรือสารพิษปะปนอยู่ การที่ร่างกายปูได้รับสิ่งแปลกปลอมมากกว่าปกติร่วมกับมีกระดองที่นิ่มและเคลื่อนไหวช้า ยิ่งทำให้ปูตกอยู่ในสภาพเครียด และปูจะมีกระบวนการกำจัดทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีมาแต่กำเนิดเท่านั้น เช่น กระบวนการห่อหุ้มเชื้อโรค กระบวนการกลืนกินเซลล์ เป็นต้น ซึ่งกระบวนดังกล่าวล้วนก่อให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในเซลล์ ถ้ามีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายมาก กระบวนการทำลายสิ่งแปลกปลอม ก็จะมีการปลดปล่อยอนุมูลอิสระออกมามาก นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังเกิดได้จากสาเหตุอื่นอีก เช่น กระบวนการหายใจ กระบวนการเผาพลาญพลังงาน (Chun-Hung *et al*., 2007) ความเครียด อุณหภูมิ อากาศ (Dorval *et al*., 2005) เป็นต้น ถ้าอนุมูลอิสระไม่ถูกทำลายหรือกำจัดทิ้งไป เซลล์จะตกอยู่ในสภาวะเครียดออกซิเดชั่น (Griswold *et al*., 1993) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการตายของเซลล์ ส่งผลให้การทำงานของระบบต่าง ๆ เกิดความผิดปกติ และอาจทำให้สัตว์ตายได้ ปูจึงมีการผลิตเอนไซม์ต้าน อนุมูลอิสระ เพื่อทำหน้าที่ในการกำจัดและทำลายอนุมูลอิสระ เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่มีความ สำคัญ ได้แก่ glutathione-*S*-transferase (GST; EC 2.5.1.18) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ไม่มีความเฉพาะเจาะจง (non-specific enzyme) มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระได้อย่างกว้างขวาง (Helmward, 1999) และยังมีความสำคัญในการบำรุงรักษาเซลล์ (Eaton and Bammler, 1999) จากผลของกระบวนการเมทาบอ-ลิซึม และ electrophilic (Kensler, 1997) นอกจากนี้GST ยังทำหน้าที่ในการทำลายพิษของ lipid peroxidase โดย GST พบได้ทั่วไปใน cytosolic, mitochondrial, microsomal protein, plasma และในเนื้อเยื่อต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต (Ray *et al*., 1996) เมื่อได้รับสิ่งแปลกปลอมหรือสารพิษ ร่างกายจะมีขั้นตอนในการทำลายสารดังกล่าวให้มีความเป็นพิษลดลง หรือหมดความเป็นพิษโดยมีเอนไซม์ เข้ามามีส่วนร่วมในการทำลายพิษ ซึ่งเอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของสารพิษ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง จนสามารถละลายน้ำได้และสามารถกำจัดออกจากร่างกาย ได้ง่ายขึ้น (Pflugmacher *et al*.,1998) หากสารพิษนั้นมีความเป็นพิษสูงจะเกิดปฏิกิริยาการรวมตัวกับสารจำพวก glutathione และ amino acid ก่อน GST เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญ ในการเร่งปฏิกิริยาดังกล่าว (Storey, 1996) ซึ่งผลจากปฏิกิริยาทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ละลายน้ำได้ดี และขจัดออกจากร่างกายได้ง่ายขึ้น จากข้อมูลข้างต้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษากิจกรรมของ GST ในรอบวงจรการลอกคราบ ซึ่ง GST น่าจะเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการช่วยให้ปูผ่านช่วงเวลาที่วิกฤติได้ โดยจะเป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่ นอกจากนี้คาดว่าความรู้ที่ได้รับจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่มีประโยชน์ และมีความสำคัญต่อการศึกษาทางด้านสรีระวิทยา ของสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย ทำให้สามารถอธิบายถึงกลไกการป้องกันตนเองในสภาพที่สัตว์มีการสร้าง และสลายโครงร่างเดิม ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาการเลี้ยงปูต่อไป

วัตถุประสงค์

ศึกษากิจกรรมเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ชนิด glutathione-*S*-transferase (GST) ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล (*Scylla serrata*)

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

ตัวอย่างปูทะเลขนาดความกว้างกระดอง 9.6-10.6 ซม. น้ำหนัก 310-390 กรัม ได้จากฟาร์มปูนิ่ม อ.ขลุง จ.จันทบุรี นำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์ที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จนกระทั่งปูเข้าสู่ระยะที่ต้องการ จึงทำการสุ่มจับปูมา 3 ตัว ต่อ 1 ซ้ำ โดยทำ 5 ซ้ำต่อ 1 ระยะ หลังจากนั้นทำการเก็บเลือด (haemolymph) เหงือก (gill) ตับ (hepatopancreas) กล้ามเนื้อ (muscle) และเนื้อเยื่อใต้กระดอง (integument) ไปวิเคราะห์กิจกรรมของ GST ระยะของปูที่นำมาศึกษามีจำนวน 12 ระยะ ได้แก่ ระยะปูกระดองแข็งปกติ (C) ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D_1) ระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D_2) ระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D_3) ระยะหลังการลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A_1) ระยะหลังการลอกคราบ 12 ชั่วโมง($A_{2.1}$) ระยะหลังการลอกคราบ 24 ชั่วโมง ($A_{2.2}$) ระยะหลังการลอกคราบ 2 วัน (B_1) ระยะหลังลอกคราบ 3 วัน ($B_{2.1}$) ระยะหลังลอกคราบ 5 วัน($B_{2.2}$) ระยะหลังลอกคราบ 7 วัน ($B_{2.3}$) และระยะหลังลอกคราบ 10 วัน($B_{2.4}$)

การเตรียม crude extract

ตัวอย่างเลือดปูเตรียมโดยการเจาะเลือดบริเวณโคนขาเดินและนำเลือดเก็บในหลอดทดลองที่มี 10 % trisodium citrate (Salaenoi *et al*., 2006a) จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 6,000 g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บเฉพาะส่วนใสเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อ ส่วนเนื้อเยื่ออื่น ๆ ได้แก่ เหงือก ตับ เนื้อเยื่อใต้กระดอง และกล้ามเนื้อ นำไปแช่ใน Tris-HCl buffer pH 8 ที่เย็นจัด จากนั้นบดให้ละเอียดโดยเติมไนโตรเจนเหลวเพื่อรักษาสภาพเนื้อเยื่อ จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 6000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที แล้วนำเฉพาะส่วนใสไปวิเคราะห์ต่อไป

วิธีวิเคราะห์ Glutathione-*S*-transferase

กิจกรรมของGST ดำเนินตาม Habig *et al.* (1974) โดยใช้ reduced glutathione (GSH) และ 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) เป็น substrate ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย 100 mM buffer, 0.7 mM CDNB, 1 mM GSH และ crude extract ระยะเวลาในการบ่มนาน 3 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติแบบ LSD

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

จากการศึกษากิจกรรมของ GST ของปูทะเลตลอดวงจรการลอกคราบ ในเลือด เหงือก ตับ เนื้อเยื่อใต้กระดอง และกล้ามเนื้อ พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 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} ตามลำดับ (ตารางที่ 1) กิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้แสดงออกเด่นชัดในตับมากกว่าอวัยวะอื่น ๆ เนื่องมาจากตับเป็นแหล่งสะสมสารอาหารและเป็นอวัยวะที่มี metabolism สูง Adalto and Monserrat (2006) กล่าวว่าตับของสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย เป็นจุดศูนย์กลางของกระบวนการ metabolism นอกจากนี้ตับยังทำหน้าที่ในการ ทำลายสารพิษ ซึ่งกระบวนการดังกล่าวก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์อนุมูลอิสระเป็นจำนวนมาก ดังนั้นตับจึงเป็นอวัยวะที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก กิจกรรมของ GST ในตับจึงมีค่าสูงเพื่อทำหน้าที่ป้องกันและกำจัดอนุมูลอิสระออกจากเซลล์ Adalto and Monserrat (2006) ยังพบกิจกรรมของ GST สูงในตับของปูชนิด *Chasmagnathus granulatus* เมื่อมีอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นจากการเหนี่ยวนำด้วยสารพิษชนิด methyl parathion เช่นเดียวกันกับ Blat *et al* (1988) ที่ศึกษาผลของอนุมูลอิสระกับกิจกรรมของ GST ในตับของ American red crayfish, *Procambarus clarkia* หลังจากเหนี่ยวนำด้วยยาฆ่าแมลงกลุ่ม organophosphorus ผลการศึกษาพบว่า

ตารางที่ 1 กิจกรรมของ Glutathione-*S*-transferase ตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล

ระยะ	กิจกรรมของ Gluathione-*S*-transferase (units mg protein $^{-1}$)				
	เลือด	เหงือก	ตับ	เนื้อเยื่อใต้กระดอง	กล้ามเนื้อ
ปูกระดองแข็งปกติ (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^{c}	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^{d}	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^{d}	133.93±0.63^{f}	8.81±0.24^{c}	3.85±0.11^{b}
หลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (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 ชั่วโมง ($A_{2.1}$)	0.27±0.07^{b}	0.76±0.04^{b}	36.61±0.56^{c}	4.93±0.93^{a}	4.59±0.23^{b}
หลังลอกคราบ 24 ชั่วโมง ($A_{2.2}$)	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^{f}	98.36±0.80^{e}	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^{c}	95.32±1.96^{e}	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^{e}	95.61±1.26^{e}	10.79±0.23^{d}	8.09±0.07^{e}
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^{e}	0.81±0.16^{b}	35.98±0.71^{c}	7.98±0.27^{c}	4.30±0.23^{b}

หมายเหตุ: อักษรตัวยกภาษาอังกฤษ (Superscript) ในแนวตั้ง (Column) ที่ต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

เมื่ออนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น จากการเหนี่ยวนำจะส่งผลให้เอนไซม์ GST เพิ่มสูงขึ้นในตับ ส่วน Carolina *et al*. (2007) ศึกษากิจกรรมของ GST ในตับและเลือดของปูชนิด *Paralomi granulose* เมื่อทำให้อนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นด้วยการทำ air exposure พบว่ากิจกรรมของ GST มีค่าสูงในตับมากกว่าในเลือด

ผลการศึกษากิจกรรม GST ในเลือดเมื่อปูระยะกระดองแข็งปกติ (C) เข้าสู่ระยะก่อนการลอกคราบ (D_1-D_3) พบว่ากิจกรรมมีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเนื่องมาจากระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D_3) เป็นระยะเปลือกใหม่ที่อยู่ใต้กระดองเก่า มีการพัฒนาขึ้นอย่างสมบูรณ์ กระดองใหม่ที่เกิดขึ้นแยกออกจากกระดองเก่า ทำให้เกิดช่องว่างระหว่างกระดองใหม่และกระดองเก่าอย่างชัดเจน ซึ่งเชื้อโรคและสารพิษต่างๆ สามารถเข้าสู่กระดองใหม่ได้ง่ายจากช่องว่างดังกล่าว GST จึงถูกปล่อยออกมาในเลือดเป็นจำนวนมากในระยะนี้ โดยปกติเม็ดเลือดของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียทำหน้าที่ทำลายสิ่งแปลกปลอม โดยเป็นระบบภูมิคุ้มกันแบบ cellular immunity (Smith and Soderhall, 1986) ซึ่งระบบนี้ประกอบ ด้วยเม็ดเลือด 3 ชนิด ได้แก่ hyaline cell เป็นเม็ดเลือดที่มีหน้าที่ในกระบวนการกลืนกินเซลล์สิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) semigranular เป็นเม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในกระบวนการกลืนกินเซลล์สิ่งแปลกปลอม และทำลายสิ่งแปลกปลอมแบบห่อหุ้มเชื้อโรค (encapsulation) granular cell เป็นเม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในการเก็บ และปลดปล่อยเอนไซม์ prophenoloxidase (Soderhall and Cerenius, 1992) ซึ่งการที่เชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายมาก เลือดของปูซึ่งทำหน้าที่ในการกำจัด และทำลายสิ่งแปลกปลอมก็จะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นมากเช่นกัน จากกระบวนการทำลายเชื้อโรค ดังนั้นกิจกรรม GST จึงสูงเพื่อทำหน้าที่ในการกำจัดอนุมูลอิสระ ที่เกิดจากกระบวนการทำลายสิ่งแปลกปลอมของเลือด Hose *et al.* (1992) รายงานว่าในระหว่างการลอกคราบของกุ้งชนิด *Sicyonia ingentis* จะพบเม็ดเลือดชนิด hyaline cell และ granular cell เพิ่มขึ้น

ผลการศึกษากิจกรรมของ GST ในเหงือกปูทะเลพบว่า ระยะหลังการลอกคราบตั้งแต่ 6 ชั่วโมงถึง 10 วัน (A_1-$B_{2.4}$) มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น เมื่อเทียบกับปูระยะกระดองแข็งปกติ (C) เนื่องมาจากเหงือกเป็นอวัยวะที่สัมผัสกับน้ำ โดยตรงทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซ ด้วยวิธีการแพร่ผ่าน นอกจากนี้เหงือกยังเป็นปราการด่านแรกที่ช่วยปกป้องร่างกายปูจากเชื้อโรค และสารพิษต่างๆ ที่ปะปนมากับน้ำ บวกกับระยะหลังการลอกคราบนั้นปูยังมีโครงร่างที่นิ่มอ่อนแอ และไม่สามารถช่วยเหลือตัวเองได้ ทำให้สิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายได้ง่ายขึ้น ดังนั้นกิจกรรมของ GST ในระยะดังกล่าว จึงมีค่ามากกว่าระยะปูปกติ (C) ซึ่งสอดคล้องกับ Pinho *et al*. (2003) ที่รายงานว่าในเหงือกของปูชนิด *Chasmagnathus granulatus* มีกิจกรรมของ GST เพิ่มสูงขึ้นหลังจากปูถูกเหนี่ยวนำด้วย cyanobacteria (*Microcystis*) ส่วน Luqing and Zhang (2006) รายงานว่าเมื่อเหนี่ยวนำด้วยสารละลายแคดเมี่ยม พบว่ากิจกรรมของ GST ในเหงือกของปูชนิด *Charybdis japonica* มีค่าสูงมากกว่าเหงือกปูในกลุ่มที่ไม่ได้มีการเหนี่ยวนำ

ส่วนในเนื้อเยื่อใต้กระดอง พบว่ากิจกรรมของ GST ในระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D_3) มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจน จากปูระยะกระดองแข็งปกติ (C) ซึ่ง Skinner (1962) รายงานว่าในระยะก่อนการลอกคราบ เนื้อเยื่อกระดองชั้น epidermis จะมีปริมาณ ออกซิเจนสูง ซึ่งบริเวณที่มีออกซิเจนสูงแสดงว่าบริเวณนั้น จะมีกระบวนการที่ต้องใช้ออกซิเจนปริมาณมาก ซึ่งผลของกระบวนการต่าง ๆ จะทำให้อนุมูลอิสระเกิดเพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้ในระยะก่อนการลอกคราบ บริเวณใต้กระดองยังมีการย่อยชั้น endocuticle จากกระดองเก่าและมีการดึงสารที่เป็นอนุพันธ์ของไคตินจากกระดองเก่าไปใช้เพื่อสร้างกระดองใหม่ จึงทำให้ปูในระยะนี้มีกระดองที่

เปราะ นอกจากนั้นยังมีการสะสมสารจำพวกไกลโคเจนในเนื้อเยื่อใต้กระดองเพิ่มขึ้น (Salaenoi *et al*, 2006b) โดยมีการดึงกลับสารอินทรีย์ จากกระดองเก่าไว้สำหรับสร้างกระดองใหม่ ซึ่งในกระบวนการดังกล่าวจะก่อให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น เป็นจำนวนมาก (Mangum *et al*., 1985) ดังนั้นในระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน (D_3) เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ จึงถูกผลิตออกมามากเพื่อทำหน้าที่ในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้

ส่วนผลการศึกษากิจกรรมของ GST ในกล้ามเนื้อปูทะเล พบว่าระยะหลังการลอกคราบมีแนวโน้มกิจกรรมของ GST เพิ่มขึ้น โดยกล้ามเนื้อของปูนั้นทำหน้าที่ช่วยในการเคลื่อนไหว และเป็นแหล่งสะสมไกลโคเจน ซึ่งหลังการลอกคราบพบว่าปูจะมีขนาดเพิ่มขึ้น ประมาณหนึ่งในสามเท่าของขนาดเดิม (Salaenoi, 2004) สาเหตุที่กล้ามเนื้อของปูในระยะหลังการลอกคราบมีกิจกรรมของ GST สูงขึ้นอาจเนื่องมาจากมีกระบวนการเผาผลาญพลังงานเกิดขึ้นมาก ดังนั้นอนุมูลอิสระจึงเกิดขึ้นจากกระบวนดังกล่าว ซึ่ง Carolina *et al*. (2007) รายงานว่าเมื่อปูชนิด *Parolomis granulose* มีอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น จะทำให้กล้ามเนื้อปูมีกิจกรรมของ GST สูงขึ้นตามไปด้วยด้วย ส่วน Mohankumar and Ramasamy (2006) รายงานว่า เชื้อ WSSV (white spot syndrome virus) เมื่อเข้าสู่ตัวกุ้งชนิด *Fenneropenaeus indicus* จะมีผลทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระในกล้ามเนื้อไม่สมดุลกับกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านั้นได้ทำลายเนื้อเยื่อชั้น mesoderm และ ectodermal ของกุ้ง ส่งผลให้กระบวนการเผาผลาญพลังงานเสียไป ทำให้เซลล์กล้ามเนื้อตกอยู่ในสภาวะเครียดออกซิเดชั่นและกุ้งตายในที่สุด (Rajan *et al*., 2000)

สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า กิจกรรมของ GST มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของร่างกายปูที่เกิดขึ้นในวงจรการลอกคราบรวมทั้งระยะปูกระดองแข็งปกติ ระยะก่อนการลอกคราบและระยะหลังการลอกคราบ ส่วนการต้านอนุมูลอิสระในปูทะเล พบว่าเกิดขึ้นในระยะก่อนการลอกคราบและระยะหลังการลอกคราบ มากกว่าระยะปูกระดองแข็งปกติ และตับเป็นอวัยวะที่มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระมากกว่า เลือด เหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง และกล้ามเนื้อ

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

เอกสารอ้างอิง

Adalto B. and J. M. Monserrat. 2006. Effects of methyl parathion on *Chasmagnathus granulatus* hepatopancreas: Protective role of Sesamol. Ecotoxicol. Environ. Safety 67: 100-108.

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 transpeotidase activities in midgut gland of the American red crayfish *Procambarus clarkia*. Drug Metab. Drug Interact. 6: 383-394.

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.

Chun-Hung, L., M. Tseng, C. and W. Cheng. 2007. Identification and cloning of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its expression following *Vibrio alginolyticus* infection. Fish&Shellfish Immunol. 23; 34-45

Dorval, J., Leblond, V., D., Deblois and C., Hontela, A., 2005. Oxidative stress and endocrine endpoints in white sucker (*Catostomus commersoni*) from a river impacted by agricultural chemicals. Environ. Toxicol. Chem. 24, 1273-1280.

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.

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.

Helmward Zollner. 1999. Handbook of enzyme inhibitors. Weinheim : Wiley-VCH.

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.

Kensler, T.W. 1997. Chemoprevention by inducers of carcinogen detoxication enzymes. Environ. Health Perspect. 105:964–970.

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.

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.

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.

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 hepatoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. Biochim. Biophys. Acta. 1425: 527–533.

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

Rajan, P.R., P. Ramasamy, V. Purusothaman and G. P. Brennan. 2000. White spot baculovius syndrome virus in the Indian shrimp *Penaeus monodon* and *Penaeus indicus*. Aquaculture. 184: 31-44.

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. 77:404-4004-407.

Salaenoi, J. 2004. Changes of enzymes activities and epidermal components during molting stages of mud crab (Scylla serrata Forskål 1775). Ph.D. Thesis. Kasetsart University.

Salaenoi, J., Thongpan, A 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 (Nat.Sci.) 40(3): 668-679.

Salaenoi, J., Butpugdeethum, J., Mingmuang, M. and A. Thongpan. 2006b. Chitobiase, proteinase, glycogen and some trace elements during molting cycle of mud crab (*Scylla serrata* Forskål 1775). Kasetsart Journal (Nat.Sci.) 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.

Smith, V.J. and K. Soderhall. 1986. Cellular immune mechanisms in the Crustacea. Symp. zool. Soc. Lond. (56): 59-79.

Soderhall, K. and Cerenius. 1992. Crustacean immunity. Annu. Rev. Fish Dis.: 3-23.

Storey, K.B. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. Braz. J. Med. Biol. Res. 29: 1715–1733.