

เม็ดเลือดและกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดส ในวงจรการลอกคราบของปูทะเล

Haemocytes and phenoloxidase activities during the molting cycle of mud crab

รพีพร ฤกษ์วุฒิ¹ และ จินตนา สและน้อย^{1*}

Rapeeporn Reaksputi¹ and Jintana Salaenoi^{1*}

บทคัดย่อ: การศึกษาจำนวนเม็ดเลือดรวมและกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสในปูทะเล จำนวน 12 ระยะตลอดวงจรการลอกคราบ พบว่า จำนวนเม็ดเลือดรวมมีค่าอยู่ในช่วง $(5.02 \pm 1.90) \times 10^6$ ถึง $(17.64 \pm 9.98) \times 10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร โดยจำนวนเม็ดเลือดรวมในประะยะหลังการลอกคราบ มีค่ามากกว่าในประะยะปกติและระยะก่อนลอกคราบอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสในเฮพาโตแพนแครีเยส เหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดองและฮีโมลิมพ์ พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.65 ± 0.13 ถึง 3.93 ± 2.48 , 2.27 ± 0.33 ถึง 7.40 ± 0.85 , 0.52 ± 0.29 ถึง 4.89 ± 1.72 และ 0.93 ± 0.21 ถึง 3.65 ± 1.80 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ฟีนอลออกซิเดสแสดงค่ากิจกรรมเด่นชัดในเหงือกและเนื้อเยื่อใต้กระดองในช่วงหลังการลอกคราบ แต่ในเฮพาโตแพนแครีเยส มีค่ากิจกรรมเด่นชัดในช่วงก่อนการลอกคราบ สำหรับฮีโมลิมพ์พบว่ากิจกรรมของฟีนอลออกซิเดส มีค่าสูงสุดในระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง ผลการศึกษาแสดงให้เห็นความสัมพันธ์การทำงานของเม็ดเลือดและกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดส ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการสเคโรไทเซชัน เมลานีเซชัน และระบบภูมิคุ้มกันในปูทะเล

คำสำคัญ: เม็ดเลือด, ฟีนอลออกซิเดส, การลอกคราบ, ปูทะเล

ABSTRACT: The total haemocyte count and phenoloxidase activities of mud crabs throughout the 12 stages in the molting cycle were observed. The results showed that total haemocyte counts ranged from $(5.02 \pm 1.90) \times 10^6$ to $(17.64 \pm 9.98) \times 10^6$ cellml⁻¹. Haemocyte numbers were higher in the postmolt ($P < 0.05$) than those in the intermolt and premolt stages. Levels of phenoloxidase activities ranged from 0.65 ± 0.13 to 3.93 ± 2.48 , 2.27 ± 0.33 to 7.40 ± 0.85 , 0.52 ± 0.29 to 4.89 ± 1.72 and 0.93 ± 0.21 to 3.65 ± 1.80 units mg proteins⁻¹ in the hepatopancreas, gill, integument and haemolymph, respectively. Phenoloxidase clearly showed activities in the gill and integument during the postmolt stage while that in the hepatopancreas was obviously found at the premolt stage. However, phenoloxidase activity in the haemolymph was distinctively high at 6 h early postmolt. This research has demonstrated that haemocyte count and phenoloxidase played an important role in the sclerotization, melanization and immunity system of crabs.

Keywords: haemocytes, phenoloxidase, molting, mud crab

¹ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

Department of Marine Science, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok 10900

* Corresponding author: ffsjid@ku.ac.th

บทนำ

ปูทะเล (*Scylla serrata*) จัดเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากมีรสชาติดี มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และสามารถหาบริโภคได้ง่าย นับเป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้ดีและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคทั้งภายในและภายนอกประเทศ ซึ่งปริมาณการส่งออกในปี พ.ศ. 2550 เท่ากับ 12,584.89 ตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 3,700 ล้านบาท (กรมประมง, 2551)

ปูทะเลเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่มครัสเตเชียนที่มีกระดองแข็งห่อหุ้มตัว จึงทำให้ปูต้องอาศัยการลอกคราบเป็นกลไกในการเจริญเติบโต ซึ่งความถี่ของการลอกคราบจะขึ้นอยู่กับอายุและขนาด เมื่อปูเข้าสู่ระยะที่ต้องลอกคราบเพื่อเพิ่มขนาด ปูจะสร้างกระดองอันใหม่ขึ้นมาห่อหุ้มตัว แล้วสลัดกระดองเก่าทิ้ง โดยในขณะที่ยังลอกคราบเสร็จใหม่ๆ จะอยู่ในสภาพอ่อนแอ ไม่เคลื่อนไหว และต้องดื่มน้ำเข้าไปเป็นจำนวนมากเพื่อขยายขนาดโครงร่าง ซึ่งอาจทำให้ร่างกายปูได้รับจุลินทรีย์หรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้าไปพร้อมกับน้ำได้โดยง่าย จึงมีความเป็นไปได้ว่าปูน่าจะมีระบบภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันตัวเองและรักษาร่างกายให้แข็งแรงพร้อมที่จะเข้าสู่ระยะกระดองแข็ง เนื่องจากปูมีเพียงระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) ที่ไม่มีความสามารถในการจดจำ แอนติเจนและปฏิกิริยาแอนติเจน-แอนติบอดี (acquired immunity) ที่ใช้ต่อต้านสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย ซึ่งแตกต่างจากสัตว์มีกระดูกสันหลัง ทำให้ปูจำเป็นต้องพัฒนากลไกการป้องกันตัวที่มีประสิทธิภาพ อีกทั้งระบบหมุนเวียนเลือดของปูเป็นแบบเปิด ซึ่งในเลือดประกอบด้วยเซลล์เม็ดเลือดและเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส โดยเซลล์เม็ดเลือดและเอนไซม์จะทำงานร่วมกันอย่างสัมพันธ์ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายของปู อันเป็นกระบวนการป้องกันตัวที่สำคัญ โดยจากรายงานพบว่า ในเลือดมีการทำงานของกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมากกว่า 80% (Perazzolo

and Barracco, 1997; Söderhäll and Cerenius, 1992) ในขณะที่ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสจะทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จากอนุมูลอิสระ (free radical) และกระตุ้นกระบวนการกลืนกินเซลล์และห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสกับจำนวนเม็ดเลือด เพื่อใช้อ้างอิงความรู้นี้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา และระบบภูมิคุ้มกันของปูทะเลตลอดวงจรการลอกคราบได้

วิธีการศึกษา

การเก็บตัวอย่างปูทะเล

เก็บตัวอย่างปูทะเลจากฟาร์มปูนิม อำเภอลำลูกเกด จังหวัดจันทบุรี ที่มีขนาดความกว้างของกระดองประมาณ 6.5-9.5 เซนติเมตร นำปูที่ได้มาพักในตู้เลี้ยงซึ่งเป็นระบบปิด ความเค็ม 30 ppt ที่อุณหภูมิห้อง และมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำสัปดาห์ละ 2 ครั้ง อาหารที่เลี้ยงปูได้แก่ เนื้อปลาสด และให้อาหารปริมาณที่มากเกินพอทุกๆ 2 วัน จากนั้นรอจนกระทั่งปูเข้าสู่ระยะที่ต้องการจึงเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์จำนวนเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดยเก็บตัวอย่างปูจำนวน 12 ระยะ ระยะละ 3 ซ้ำๆ ละ 3 ตัว ได้แก่ ระยะปูปกติ (C) ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D1) ระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D2) ระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D3) ระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A1) ระยะหลังลอกคราบ 12 ชั่วโมง (A2.1) ระยะหลังลอกคราบ 24 ชั่วโมง (A2.2) ระยะหลังลอกคราบ 2 วัน (B1) ระยะหลังลอกคราบ 3 วัน (B2.1) ระยะหลังลอกคราบ 5 วัน (B2.2) ระยะหลังลอกคราบ 7 วัน (B2.3) และระยะหลังลอกคราบ 10 วัน (B2.4)

การเก็บฮีโมลิมฟ์และการนับจำนวนเม็ดเลือดรวม

วิธีการเก็บฮีโมลิมฟ์ (haemolymph) ทำได้โดยใช้เอธานอล 70% ทำความสะอาดบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 4 และ 5 จากนั้นใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 21 ฉีดฮีโมลิมฟ์

บริเวณโคนขาเดินของปู นำฮีโมลิมพ์เก็บในหลอดพลาสติก ที่มี 10% trisodium citrate บรรจุอยู่ (อัตราส่วนระหว่าง 10% trisodium citrate กับฮีโมลิมพ์ เท่ากับ 1:1) จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3,000 xg นาน 10-15 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส แล้วนำไปศึกษาจำนวนเม็ดเลือดรวม

วิธีการนับจำนวนเม็ดเลือดรวม (Total Haemocyte Counts: THC) ด้วย haemocytometer คัดแปลงจากวิธีการของ Thompson (1966) โดยนำตัวอย่างฮีโมลิมพ์ หยดลงเป็นแผ่นบางๆ บนแผ่นกระจกใส ทิ้งไว้ให้แห้ง นำมาจุ่มใน absolute methanol นาน 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นและย้อมด้วย Wright's stain 15-20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นซ้ำอีกครั้ง นำแผ่นกระจกมาซับน้ำให้แห้งแล้วนำมานับจำนวนเม็ดเลือดรวมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20x

การศึกษากิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

1. การเตรียมสารสกัดหยาบ

หลังจากทำความสะอาดปูแล้วจึงเตรียมตัวอย่างฮีโมลิมพ์และเนื้อเยื่อจากปู โดยเจาะฮีโมลิมพ์บริเวณโคนขาเดิน นำฮีโมลิมพ์เก็บในหลอดพลาสติกที่มี 10% trisodium citrate บรรจุอยู่ (อัตราส่วนระหว่าง 10% trisodium citrate ฮีโมลิมพ์เท่ากับ 1:5) จากนั้นนำไปแช่ในน้ำเย็นจัดเพื่อทำให้ปูสลบ แล้วตัดเปิดขอบกระดอง (carapace) โดยรอบ ใช้ปากคีบดึงเนื้อเยื่อได้กระดอง (integument) และเฮพาโตแพนแครียส (hepatopancreas) ออกโดยมิให้เนื้อเยื่อฉีกขาด ส่วนเหงือกให้ใช้กรรไกรตัดบริเวณโคนเหงือกแล้วนำส่วนที่ถูกตัดไปดมในโถงที่เติม liquid nitrogen และ 1 M Tris-HCl, pH 8 ที่เย็นจัดเพื่อช่วยรักษาสภาพเนื้อเยื่อ จากนั้นนำฮีโมลิมพ์และเนื้อเยื่อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 xg อุณหภูมิ 4 °C นาน 20 นาที แล้วจึงเก็บเฉพาะส่วนใส เพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ต่อไป

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของฟีนอลออกซิเดส

วิเคราะห์กิจกรรมฟีนอลออกซิเดส ตามวิธีการของ Christopher et al. (2006) โดยส่วนผสมของปฏิกิริยา

ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ประกอบด้วย 2% SDS (ปมลง ในสารสกัดหยาบ 100 µl ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที) 100 mM Tris-HCl, pH 7 และ 2 mM L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA ใน 100 mM phosphate buffer, pH 6.5) นำไปปมที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 nm และคำนวณหากิจกรรมฟีนอลออกซิเดส (ยูนิต/ มิลลิกรัมโปรตีน) โดยกำหนดให้ 1 unit คือ ความสามารถของเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของ dopamine ที่ 475 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 0.01 หน่วย ในเวลา 1 นาที ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารสกัดหยาบดำเนินการตามวิธีของ Bradford (1976)

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

เปรียบเทียบจำนวนเม็ดเลือดรวม และกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสกับระยะต่างๆ ตลอดจนวงจรการลอกคราบ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design; CRD) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Least Significant Difference โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติสำเร็จรูป (SPSS)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การศึกษาจำนวนเม็ดเลือดรวม กิจกรรมฟีนอลออกซิเดสในเฮพาโตแพนแครียส เหงือก เนื้อเยื่อได้กระดอง และฮีโมลิมพ์ของปูทะเลจำนวน 12 ระยะ ตลอดจนวงจรการลอกคราบ พบว่า ปูที่อยู่ในระยะปกติ (C) ระยะก่อนลอกคราบ (D) และระยะหลังลอกคราบ (A และ B) จะมีลักษณะภายนอกที่มีความแตกต่างกัน สังเกตได้จากปูที่อยู่ในระยะกระดองแข็งปกติ กระดองจะมีความแข็งแรง มีสีน้ำตาลเข้ม ปูสามารถเคลื่อนไหวได้อย่างรวดเร็ว และมีพฤติกรรมที่ก้าวร้าว ไม่สามารถเลี้ยงให้อยู่รวมกันได้ ปูในระยะนี้กินอาหารได้ตามปกติ ฮีโมลิมพ์ของปูระยะนี้จะมีสีใส แต่เมื่อปล่อยทิ้งไว้ ฮีโมลิมพ์จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศทำให้เปลี่ยนเป็นสีฟ้า ตามปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

Cuprous (Cu^+) Cupric (Cu^{2+})
 โล สีฟ้า

ส่วนปูที่เข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ (D) จะพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของกระดอง กล่าวคือกระดองจะมีความกรอบมากขึ้นเมื่อเข้าใกล้ระยะลอกคราบ ปูที่ใกล้ลอกคราบจะไม่กินอาหาร เคลื่อนไหวช้าหรือเกือบไม่เคลื่อนที่ เมื่อสังเกตที่ขาคู่สุดท้าย บริเวณ propodus และ dactylus จะปรากฏเป็นแถบสีส้มถึงแดง (ecdysial line) บริเวณรอยต่อระหว่างกระดองกับจับปิ้ง พบว่า มีการยืดออกและยกตัวขึ้น ฮีโมลิมพ์ของปู ในระยะที่ใกล้ลอกคราบ (D) จะมีสีชมพูจาง เนื่องจากมีการดึงกลับของรงควัตถุเพื่อไปสะสมในคราบใหม่ที่อยู่ภายในตัว ขณะที่ปูกำลังลอกคราบ ปูจะค่อยๆ ถอยออกทางส่วนท้ายของลำตัว ขณะเดียวกันก็จะมีการดึงน้ำเข้าสู่ร่างกายในปริมาณมาก ทำให้ปูมีกระดองใหม่ที่มีขนาดเพิ่มขึ้นกว่ากระดองเก่าประมาณ 1/3 ถึง 2/3 เท่า ซึ่งปูที่ลอกคราบเสร็จใหม่ๆ (A) จะมีร่างกายที่อ่อนนุ่ม เคลื่อนไหวได้ช้าหรือไม่เคลื่อนไหวและไม่กินอาหาร โดยฮีโมลิมพ์ของปูในระยะนี้จะค่อนข้างแข็งตัวช้ากว่าฮีโมลิมพ์ปูในระยะกระดองแข็งปกติ (C) และปูจะเริ่มเคลื่อนไหวและกินอาหารตามปกติ หลังจากลอกคราบแล้วประมาณ 2 วัน (B1)

จำนวนเม็ดเลือดรวมตลอดวงจรการลอกคราบของปูทะเล

ผลการนับจำนวนเม็ดเลือดรวมของปูทะเลภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20x พบว่า จำนวนเม็ดเลือดรวมตลอดวงจรการลอกคราบมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง $5.02 \pm 1.90 \times 10^6$ ถึง $17.64 \pm 9.98 \times 10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร (Table 1) ปูที่อยู่ในระยะกระดองแข็งปกติ (C) มีจำนวนเม็ดเลือดรวมเท่ากับ $5.02 \pm 1.90 \times 10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร นับเป็นระยะที่มีจำนวนเม็ดเลือดรวมต่ำสุดเมื่อเปรียบเทียบกับทุกระยะ ซึ่งพบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จำนวนเม็ดเลือดเริ่มเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D1) ผ่านระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D2) จนถึงระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D3) และระยะ

หลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A1) หลังจากนั้น จำนวนเม็ดเลือดรวมจะค่อยๆ ลดลงจากระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง จนถึงระยะหลังลอกคราบ 24 ชั่วโมง (A2.2) และมาเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วอีกครั้งในระยะหลังลอกคราบ 2 วัน (B1) ถึงระยะหลังลอกคราบ 5 วัน (B2.2) ซึ่งเป็นระยะที่มีจำนวนเม็ดเลือดรวมสูงสุดมีความแตกต่างจากระยะอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนเม็ดเลือดรวมของปูทะเลระยะปกติ (C) ($5.02 \pm 1.90 \times 10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร) กับจำนวนเม็ดเลือดรวมของกุ้งในระยะเดียวกัน พบว่าปูมีจำนวนเม็ดเลือดรวมน้อยกว่ากุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*, $(50.9 \pm 17.7) \times 10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร) กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*, $(14.2 \pm 8.2) \times 10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร) และกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*, $(9.8 \pm 11) \times 10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร) ตามลำดับ (van de Braak et al., 1996; Cheng and Chen, 2001; Cheng et al., 2005)

เมื่อปูเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ (D1-D3) พบว่าจำนวนเม็ดเลือดรวมมีมากกว่าระยะกระดองแข็งปกติ (C) อย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Le Moullac et al. (1997) ที่พบว่า เซลล์เม็ดเลือดของกุ้งชนิด *P. stylirostris* ในระยะกระดองแข็งปกติมีจำนวนน้อยกว่าเม็ดเลือดในระยะก่อนลอกคราบอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากในช่วงก่อนลอกคราบ กระดองที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ซึ่งอยู่ภายใต้กระดองเก่าของปูมีโอกาสติดเชื้อโรคได้ง่าย เม็ดเลือดจึงถูกสร้างเพิ่มขึ้นเพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอมเหล่านี้ โดยการทำงานของเม็ดเลือดในลักษณะนี้เป็นระบบภูมิคุ้มกันแบบ cellular immunity ซึ่งเม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิด จะแบ่งหน้าที่ในการทำงานโดย hyaline cell ทำหน้าที่ phagocytosis และยังมีส่วนในการส่งเสริมการทำงานแบบ humoral immunity คือ ช่วยกระตุ้นการแข็งตัวของเลือด ในขณะที่ semigranular cell ทำหน้าที่ในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) การห่อหุ้มเชื้อโรค (encapsulation) เก็บและปลดปล่อยเอนไซม์ ฟีนอลออกซิเดส ส่วน granular cell ทำหน้าที่เก็บและปลดปล่อยเอนไซม์โปรตีนออกซิเดส (Söderhäll and Cerenius, 1992)

Table 1 Total haemocytes count over the molting cycle of mud crab

Stage	Average of total haemocytes count ($\times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$)
Intermolt (C)	$5.02^c \pm 1.90$
2 weeks before molting (D1)	$9.72^c \pm 4.65$
1 week before molting (D2)	$10.81^b \pm 6.46$
2 days before molting (D3)	$12.30^b \pm 6.20$
6 h after molting (A1)	$12.03^b \pm 4.03$
12 h after molting (A2)	$8.58^c \pm 3.67$
24 h after molting (A2.2)	$7.36^c \pm 3.02$
2 days after molting (B1)	$14.35^a \pm 6.08$
3 days after molting (B2.1)	$13.54^a \pm 6.97$
5 days after molting (B2.2)	$17.64^a \pm 9.98$
7 days after molting (B2.3)	$9.11^c \pm 6.21$
10 days after molting (B2.4)	$12.33^b \pm 6.03$

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

นอกจากนี้ในระยะก่อนลอกคราบ เม็ดเลือดชนิดที่ภายในมีเม็ด granule ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์และเก็บโปรตีนออกซิเดส จะปลดปล่อยเอนไซม์สู่ชั้นเอพิเดอมิส (Terwilliger and Ryan, 2006) ซึ่งโปรตีนออกซิเดสมีความสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาสเคโรไทเซชัน (sclerotization) หรือควิโนนแทนนิง (quinone tanning) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ก่อให้เกิดการจับกัน (cross-linked) ระหว่างโปรตีนกับควิโนน เพื่อช่วยคงสภาพ protein matrix และก่อให้เกิดความแข็งแรงของชั้นคิวติเคิล รวมทั้งช่วยยับยั้งไฮโดรไลติกเอนไซม์ (hydrolytic enzymes) ที่ผลิตจากเชื้อโรค (Klowden, 2007) โดย Krishnan (1951) พบว่า กระบวนการสเคโรไทเซชันในชั้นคิวติเคิลของปูชนิด *Carcinus maenas* เกิดขึ้นหลังการลอกคราบเสร็จใหม่ๆ ซึ่ง Vacca and Fingerman (1983) อธิบายว่า เม็ดเลือดชนิด hyaline cell มีหน้าที่ผลิต diphenol ส่วนเม็ดเลือดชนิด granular cell จะทำหน้าที่ผลิต protein ที่ก่อให้เกิดกระบวนการ สเคโรไทเซชันในคิวติเคิลของปู โดยช่วงที่ปูกำลังลอกคราบจนกระทั่งทำการลอกคราบเสร็จใหม่ๆ พบว่า บริเวณใกล้กับ

เอพิเดอมิสเต็มไปด้วย hyaline cell ที่รวมตัวกันเป็นกลุ่มใหญ่ หรือบางครั้งอาจพบกลุ่มเม็ดเลือด hyaline cell รวมตัวล้อมรอบเม็ดเลือด granulocyte ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่พบว่า จำนวนเม็ดเลือดของปูในระยะหลังการลอกคราบใหม่ๆ ยังคงมีจำนวนมากกว่าระยะกระดองแข็งปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

Hose et al. (1992) พบว่า จำนวนเม็ดเลือดชนิด hyaline cell และ granular cell ที่เพิ่มขึ้นของกุ้ง penaeid shrimp (*Sicyonia ingentis*) ในระหว่างการลอกคราบนั้น เกิดขึ้นเพื่อช่วยในการซ่อมแซม (repair) exoskeleton และต่อสู้กับสิ่งแปลกปลอมหลังจากก้างลอกคราบเสร็จ เนื่องจากกระดองมีลักษณะอ่อนนุ่มและสามารถติดเชื้อง่าย มีความเป็นไปได้ว่าการที่ปูลอกคราบใหม่ๆ มีโครงร่างที่อ่อนนุ่มและมีการดึงน้ำเข้าสู่ร่างกายในปริมาณมากเพื่อเพิ่มขนาดร่างกายนั้น อาจส่งผลทำให้ปูเสี่ยงต่อการติดเชื้อง่าย เม็ดเลือดซึ่งทำหน้าที่ในการปกป้องและต่อสู้กับสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกจะมีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันแบบ non-self immunity นอกจากนี้

Hose et al. (1992) พบว่า เม็ดเลือดชนิด hyaline cell มีความสามารถในการ phagocytosis แบบที่เรีย (Walton and Smith, 1999) ในขณะที่เม็ดเลือดชนิด semi-granular cell และ granular cell ซึ่งภายในเซลล์มี granule ที่นอกจากจะสร้างและเก็บโปรตีนออกซิเดสแล้วภายใน granule ยังสามารถสังเคราะห์และเก็บสาร peroxinectin (Liu et al., 2005) และ antimicrobial peptide เช่น penaeidins (Destoumieux et al., 2000), crustin-like antibacterial peptide หรือ single whey-acidic-domain antibacterial peptide (Hauton et al., 2006) เป็นต้น

เมื่อพิจารณาปูที่ลอกคราบแล้วเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (A2.1) และ 24 ชั่วโมง (A2.2) พบว่า จำนวนเม็ดเลือดค่อยๆ ลดลง แต่อย่างไรก็ตามจำนวนเม็ดเลือดรวมก็ยังคงมีจำนวนสูงกว่าปูในระยะกระดองแข็งปกติ (C) ($P<0.05$) ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาในกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ที่มีจำนวนเม็ดเลือดรวมใน 2 ระยะนี้น้อยกว่ากุ้งระยะปกติ (C) อย่างมีนัยสำคัญ (Cheng and Chen, 2001) โดยจากผลของจำนวนเม็ดเลือดที่ลดลงนี้อาจเป็นไปได้ว่าในช่วงเวลาก่อนการลอกคราบ จนถึงระยะหลังลอกคราบ 12 ชั่วโมง (A2.1) และ 24 ชั่วโมง (A2.2) ปูจะไม่ค่อยกินอาหารหรือกินอาหารน้อยลงซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Verghese et al. (2008) ที่พบว่า สภาพการขาดอาหารของกุ้งมังกร Indian spiny lobster (*Panulirus homarus*) ส่งผลให้จำนวนเม็ดเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

เมื่อปูพัฒนาเข้าสู่วันที่ 2 หลังจากการลอกคราบ (B1) ปูเริ่มมีพฤติกรรมการกินอาหารและพบว่าเม็ดเลือดมีจำนวนเพิ่มขึ้นจนกระทั่งมีจำนวนเม็ดเลือดรวมสูงสุดในวันที่ 5 (B2.2) ซึ่งแตกต่างจากระยะอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และให้ผลที่สอดคล้องกับ Cheng and Chen (2001) ที่พบว่า กุ้ง *P. stylirostris* มีจำนวนเม็ดเลือดสูงสุดในระยะหลังลอกคราบ (B) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า ในช่วงหลังลอกคราบนี้ ปูเกิดกระบวนการ melanization เพื่อเพิ่มรงควัตถุชนิด melanin ที่ก่อให้เกิดสีดำในชั้นคิวติเคิล (Krishnan, 1951)

ปัจจัยทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิและความเค็ม ก็มีอิทธิพลต่อจำนวนเม็ดเลือดของสัตว์ในกลุ่ม crustacean โดย Wang and Chen (2006b) พบว่า กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำทะเลอุณหภูมิ 22 และ 34 °C ทำให้จำนวนเม็ดเลือดและกิจกรรม phagocytosis ลดลง ($P<0.05$) คล้ายกับกุ้งกุลาดำที่ถูกนำไปเลี้ยงในความเค็มต่ำ (5-15 ppt) ก็ทำให้จำนวนเม็ดเลือดลดลง (Wang and Chen, 2006a) สำหรับผลกระทบต่อเม็ดเลือดที่เกิดจากการติดเชื้อโรคพบว่า ปูชนิด *Callinectes sapidus* ที่เป็นโรค shell disease syndrome จะมีเม็ดเลือดล้อมรอบบริเวณที่เกิดบาดแผลเป็นจำนวนมากเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ melanization (Noga et al., 2000) แต่ Vogan and Rowley (2002) พบว่า โรค shell disease syndrome ไม่ส่งผลกระทบต่อจำนวนเม็ดเลือดรวมของปูชนิด *Cancer pagurus* ในขณะที่กุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ที่เป็นโรค white spot syndrome ก็พบเม็ดเลือดบริเวณที่ติดเชื้อเช่นกัน (van de Braak et al., 2002) ซึ่ง Liu et al. (2005) อธิบายว่า กุ้งชนิด *Litopenaeus vannamei* ที่ติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* นั้น เม็ดเลือดจะมีบทบาทในการสร้างสาร antibacterial peptide เพื่อกำจัดเชื้อโรค

กิจกรรมของฟีนอลออกซิเดส

กิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสในเฮฟาโตแพนแครีล เหงือก เนื้อเยื่อใต้กระดอง และฮีโมลิมฟ์ มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.65 ± 0.13 ถึง 3.93 ± 2.48 , 2.27 ± 0.33 ถึง 7.40 ± 0.85 , 0.52 ± 0.29 ถึง 4.89 ± 1.72 และ 0.93 ± 0.21 ถึง 3.65 ± 1.80 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน (Table 2) ในเฮฟาโตแพนแครีล พบว่า เมื่อปูพัฒนาเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D1) กิจกรรมมีค่าลดลงจากเดิมจนผ่านเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D2) แต่กิจกรรมจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งเมื่อเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D3) หลังจากปูลอกคราบแล้วพบว่า กิจกรรมลดลงและมีค่าค่อนข้างคงที่ตั้งแต่ระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A1) ถึงระยะหลังลอกคราบ 7 วัน (B2.3) และกิจกรรมจะเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งเมื่อปูลอกคราบได้ 10 วัน (B2.4)

Table 2 Phenoloxidase activities over the molting cycle of mud crab

Stage	Phenoloxidase specific activities (units mg protein ⁻¹)			
	Hepatopancreas	gill	integument	haemolymph
Intermolt (C)	3.93 ^a ±2.48	2.27 ^c ±0.33	1.41 ^c ±0.70	1.42 ^b ±0.31
2 weeks before molting (D1)	2.61 ^a ±1.23	2.89 ^c ±0.88	1.54 ^c ±0.68	1.09 ^c ±0.19
1 week before molting (D2)	1.35 ^b ±0.44	3.77 ^b ±0.54	0.52 ^d ±0.29	1.31 ^c ±0.14
2 days before molting (D3)	2.63 ^a ±1.34	6.02 ^a ±2.91	2.37 ^b ±0.93	1.31 ^c ±0.41
6 h after molting (A1)	1.46 ^b ±0.71	6.00 ^a ±2.18	2.47 ^b ±0.77	3.65 ^a ±1.80
12 h after molting (A2)	0.65 ^b ±0.13	2.66 ^c ±0.11	1.47 ^c ±0.12	2.14 ^b ±0.48
24 h after molting (A2.2)	0.89 ^b ±0.23	5.97 ^a ±1.56	0.94 ^d ±0.47	1.04 ^c ±0.26
2 days after molting (B1)	1.23 ^b ±0.30	6.57 ^a ±2.62	1.87 ^c ±0.58	2.00 ^b ±0.41
3 days after molting (B2.1)	0.98 ^b ±0.09	6.11 ^a ±2.43	3.03 ^a ±0.71	2.21 ^b ±0.82
5 days after molting (B2.2)	1.18 ^b ±0.45	5.59 ^a ±2.12	2.30 ^b ±0.42	2.82 ^b ±0.45
7 days after molting (B2.3)	1.38 ^b ±0.51	7.40 ^a ±0.85	3.11 ^a ±1.14	1.67 ^c ±0.54
10 days after molting (B2.4)	3.84 ^a ±1.91	5.02 ^a ±0.22	4.89 ^a ±1.72	0.93 ^c ±0.21

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

ในเห็อกจะพบว่า จะมีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D1) 1 สัปดาห์ (D2) และระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน โดยจะมีค่าคงที่จนกระทั่งปูเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A1) หลังจากนั้นกิจกรรมจะลดลงอย่างรวดเร็วในระยะหลังลอกคราบ 12 ชั่วโมง (A2.1) และมีค่าค่อนข้างคงที่ตั้งแต่ระยะหลังลอกคราบ 24 ชั่วโมง (A2.2) จนถึงระยะหลังลอกคราบ 10 วัน (B2.4) ในเนื้อเยื่อใต้กระดอง พบว่า กิจกรรมมีค่าลดลงอย่างมากเมื่อเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 1 สัปดาห์ (D2) แต่เมื่อปูพัฒนาเข้าสู่ระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D3) พบว่า กิจกรรมกลับเพิ่มสูงขึ้นและมีค่าคงที่จนปูลอกคราบเสร็จ (A1) หลังจากนั้นกิจกรรมจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจากระยะหลังลอกคราบ 24 ชั่วโมง (A2.2) ถึงระยะหลังลอกคราบ 10 วัน (B2.4) ซึ่งมีค่าสูงสุดเท่ากับ 4.89 ± 1.72 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน

ส่วนกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสในฮีโมลิมพ์ในปูระยะกระดองแข็งปกติ (C) มีค่าเท่ากับ 1.42 ± 0.31 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน โดยกิจกรรมจะมีค่าคงที่ตั้งแต่ระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ (D1) ถึงระยะก่อนลอกคราบ 2 วัน (D3) เมื่อปูเข้าสู่ระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง (A1) พบว่า กิจกรรมมีค่าสูงสุด หลังจากนั้นกิจกรรมจะลดลงและมีค่าค่อนข้างคงที่จนถึงระยะหลังลอกคราบ 10 วัน (B2.4)

จากผลการศึกษากิจกรรมฟีนอลออกซิเดสในฮีโมลิมพ์ตลอดวงจรการลอกคราบ พบว่า กิจกรรมในระยะหลังลอกคราบใหม่ๆ (A1) มีค่ากิจกรรมมากกว่าปูในระยะกระดองแข็งปกติ (C) และระยะก่อนลอกคราบ (D1-D3) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ซึ่งผลที่ได้แตกต่างจากผลการศึกษาของ Verghese et al. (2008) และ Le Moullac et al. (1997) ที่พบว่า ระยะปกติ (C) ของกั้ง *Penaeus stylirostris* และ Indian spiny lobster (*Panulirus homarus*) มีกิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าระยะก่อนและหลังลอกคราบอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ในขณะที่ปูอยู่ในช่วงสลัดคราบเก่าออกนั้นปูจะมีการดื่มน้ำปริมาณมากเข้าสู่ร่างกายเพื่อขยายขนาดลำตัวไปพร้อมกัน และเมื่อการลอกคราบเสร็จสิ้น ร่างกายของปูจะมีลักษณะอ่อนนุ่ม ด้วยสาเหตุเหล่านี้โอกาสส่งผลให้ปูมีความไวต่อการติดเชื้อโรคได้มากขึ้น (Le Moullac et al., 1997) จึงอาจส่งผลให้กิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสในฮีโมลิมพ์เพิ่มขึ้นในระยะหลังลอกคราบเสร็จใหม่ๆ โดยเมื่อเม็ดเลือดได้รับการกระตุ้นจากสารที่เป็นโครงสร้างของจุลชีพ เช่น lipopolysaccharides ในแบคทีเรียแกรมลบ (Cárdenas et al., 2004), β -1,3-glucans ของยีสต์ หรือรา (Vargas-Albores et al., 1996) และ peptidoglycan จากแบคทีเรียแกรมบวกที่รวมกับ pattern-recognition protein

ทำให้เกิดการปลดปล่อยโปรตีนออกซิเดสจากเม็ด granule (degranulation) สู่อิมูโนลิมพ์ หลังจากนั้น โปรตีนออกซิเดสจะถูกกระตุ้นการทำงานจาก prophenoloxidase-activating factor (PPAF) (Buda and Shafer, 2005) หรือ serine proteinase ในเม็ดเลือดของปูทะเล (Vaseeharan et al., 2006) เพื่อเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของฟีนอลออกซิเดสที่สามารถทำงานได้ (Smith et al., 2003)

ฟีนอลออกซิเดสในอิมูโนลิมพ์จะทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยา เพื่อเปลี่ยน monophenol และ diphenol ให้เป็น quinone อันเป็นสารสำคัญที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดโครงร่างแข็งในกระบวนการ sclerotization บริเวณคิวติเคิลของปู ซึ่งอาจส่งผลให้กิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสในเนื้อเยื่อได้กระดองของปูที่อยู่ในระยะก่อนลอกคราบ 2 วันและระยะที่เป็นปูใหม่มีกิจกรรมสูงกว่าปูที่มีกระดองแข็งอย่างชัดเจน โดย Terwilliger and Ryan (2006) อธิบายว่า ในช่วงก่อนลอกคราบ granule ที่อยู่ภายในเม็ดเลือดจะปลดปล่อยโปรตีนออกซิเดสสู่อิมูโนลิมพ์ หลังจากนั้น เอนไซม์จะถูกส่งผ่านชั้นเฮมิเดอมิสไปยังชั้นคิวติเคิลที่ถูกสร้างขึ้นมาใหม่โดยโปรตีนออกซิเดสจะถูกกระตุ้นให้เป็น ฟีนอลออกซิเดสที่อยู่ในสภาพพร้อมทำงานในระยะหลังลอกคราบใหม่ๆ โดยสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Buda and Shafer (2005) ที่พบ mRNA ของ PPAF ที่มีหน้าที่กระตุ้นการทำงานของโปรตีนออกซิเดสในระยะก่อนลอกคราบและหลังลอกคราบเสร็จ และการศึกษาของ Krishnan (1951) ยังพบการเกิด phenolic tanning ในชั้นคิวติเคิลของปูที่ลอกคราบเสร็จใหม่ๆ ด้วย

นอกจาก quinone จะเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของฟีนอลโดยเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสแล้ว quinone ยังสามารถเปลี่ยนโครงสร้างเป็นเมลานินที่มีลักษณะเป็นเม็ดสีดำ (melanization) สะสมอยู่ในชั้นคิวติเคิลและมีความสามารถในการจับกับ protein matrix fiber อีกทั้งยังพบเมลานินบริเวณคิวติเคิลที่เกิดบาดแผลด้วย (Ghidalia, 1985) ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่ากิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ตั้งแต่ระยะหลังลอกคราบ 2 วัน จนถึงค่าสูงสุดในระยะหลังลอกคราบ 10 วัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า

ในช่วงนี้เนื้อเยื่อได้กระดองของปูเกิดกระบวนการ melanization เพื่อเพิ่มรงควัตถุชนิดเมลานินที่ก่อให้เกิดสีดำในชั้นคิวติเคิล

กระบวนการ melanization นอกจากจะมีบทบาทในกระบวนการ sclerotization และช่วยในการสร้างเม็ดสีดำในเนื้อเยื่อได้กระดองแล้ว Cerenius et al. (2008) พบว่า กระบวนการ melanization ยังมีความสัมพันธ์กับการกระตุ้นกระบวนการ phagocytosis และ encapsulation รวมทั้งยังเป็นกระบวนการสุดท้ายที่เกิดขึ้น ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยการสร้าง nodule (nodule formation) (Söderhäll and Cerenius, 1992) ซึ่งกระบวนการทั้งหมดนี้นับเป็นกลไกที่สำคัญในระบบการป้องกันตัวแบบ cellular defense ของปู

ผลการศึกษาฟีนอลออกซิเดสในเฮฟาโตแพนแครีซและเหงือกของปูทะเล อาจกล่าวได้ว่า กิจกรรมที่พบนั้นน่าจะเป็นกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในอิมูโนลิมพ์ที่ไปหล่อเลี้ยงอวัยวะทั้งสอง เนื่องจากโปรตีนออกซิเดสจะถูกสังเคราะห์และเก็บอยู่ภายในเม็ดเลือด (Sritunyalucksana et al., 1999) และระบบการไหลเวียนเลือดของปูเป็นแบบระบบเปิด (open circulatory system) โดยเลือดจะถูกส่งไปยังตับด้วยเส้นเลือด hepatic artery ที่ไหลออกจากหัวใจ ในขณะที่เลือดที่อยู่ในโพรงเลือด (haemocoel) จะไหลไปที่แอ่งเลือด infrabranchial sinus เพื่อส่งเลือดไปยังเหงือก โดยเลือดจะไหลผ่าน lamellae ของเหงือกแต่ละอัน (Ceccaldi, 1989)

เมื่อปูเข้าสู่ช่วงใกล้ลอกคราบ พบว่า กิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสในเฮฟาโตแพนแครีซเพิ่มขึ้น อาจเป็นเพราะใกล้ระยะลอกคราบ ปูจะเสี่ยงต่อการติดเชื้อได้ง่าย เพราะกระดองอันใหม่ที่สร้างอยู่ภายใต้กระดองอันเก่า มีลักษณะอ่อนนุ่มและอาจมีความสามารถในการป้องกันอวัยวะภายในร่างกายจากการรุกรานของเชื้อโรคน้อยกว่าปกติ จึงอาจส่งผลให้ปูมีการสร้างภูมิคุ้มกันมากขึ้น Burgents et al. (2005) พบว่า ตัวเป็นอวัยวะที่พบแบคทีเรียเป็นจำนวนมาก และ Vogan et al. (2001) พบว่า ภายใน haemal spaces ของตับจะมีการสร้าง nodules ซึ่งเกิดจากเซลล์เม็ดเลือดที่รวมตัวกันเป็นจำนวนมาก เพื่อล้อมรอบเชื้อโรค (encapsulation) ที่มีขนาดใหญ่เกินกว่าที่เม็ดเลือดจะ

ทำลายด้วยวิธี phagocytosis โดยผลของการเกิด nodules formation จะเนี่ยยวนำให้เกิดกระบวนการเมลาไนเซชันเพื่อกำจัดเชื้อโรคต่อไป (Jiravanichpaisal et al., 2006) สำหรับเหียงกนั้น เนื่องจากเป็นอวัยวะที่ช่วยในการป้องกันจุลชีพจากภายนอก โดยมีกลไกในการต่อสู้กับจุลชีพด้วยการสร้าง nodule เช่นเดียวกับเฮฟาโตแพนแครีซ ซึ่ง Martin et al. (1998) พบว่าแบคทีเรียที่อยู่ในฮีโมลิมพ์จะถูกส่งไปยังเหียงก ซึ่งหลังจากนั้นเม็ดเลือดจะรวมตัวกันเพื่อสร้างกลไกการป้องกันตัวแบบ nodule ภายใน vessels ของเหียงก โดย Vogan et al. (2001) พบว่า โรค shell disease syndrome ที่เกิดบนกระดอง ส่งผลให้เกิด nodule formation ใน haemal sinus ของเหียงก

สรุป

จากการศึกษาจำนวนเม็ดเลือดรวมในปูทะเลตลอดวงจรการลอกคราบพบว่า ระยะหลังลอกคราบมีจำนวนเม็ดเลือดรวมโดยเฉลี่ยสูงกว่าระยะก่อนลอกคราบ โดยจำนวนเม็ดเลือดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น 2 ช่วง คือ ช่วงระยะก่อนลอกคราบ 2 สัปดาห์ ถึงระยะหลังลอกคราบ 6 ชั่วโมง และช่วงระยะหลังลอกคราบ 2 วัน ถึงระยะหลังลอกคราบ 5 วัน โดยเม็ดเลือดทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสสังเคราะห์น้ำตาล และมีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันสำหรับรูปแบบกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสในเฮฟาโตแพนแครีซพบว่า มีค่าค่อนข้างต่ำตลอดวงจรการลอกคราบ เมื่อเปรียบเทียบกับในเหียงกเนื้อเยื่อใต้กระดอง และฮีโมลิมพ์ โดยกิจกรรมในเฮฟาโตแพนแครีซของระยะกระดองแข็งปกติมีค่าสูงสุด สำหรับเหียงกพบว่า กิจกรรมมีค่าค่อนข้างสูงตลอดวงจรการลอกคราบ ในขณะที่กิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสในเนื้อเยื่อใต้กระดองมีค่าแปรปรวนตลอดวงจรการลอกคราบ ส่วนฮีโมลิมพ์พบว่าระยะก่อนลอกคราบมีกิจกรรมค่อนข้างคงที่และมีค่าน้อยกว่าระยะหลังลอกคราบ ซึ่งฟีนอลออกซิเดสช่วยเนี่ยยวนำให้เกิดกระบวนการ sclerotization, melanization และช่วยทำลายสิ่งแปลกปลอมในระบบภูมิคุ้มกันของปูทะเล

เอกสารอ้างอิง

- กรมประมง. 2551. Available Source: <http://www.fisheries.go.th/foreign/doc/excel/totalexportm.xls>. ค้นเมื่อ 2 กุมภาพันธ์ 2552.
- 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.
- Buda, E.S., and T.H. Shafer. 2005. Expression of a serine proteinase homolog prophenoloxidase-activating factor from the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 140: 521-531.
- Burgerts, J.E., L.E. Burnett, E.V. Stabb, and K.G. Burnett. 2005. Localization and bacteriostasis of *Vibrio* introduced into the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Dev. Comp. Immunol.* 29: 681-691.
- Cárdenas, W., J.R. Dankert, and J.A. Jenkins. 2004. Flow cytometric analysis of crayfish haemocytes activated by lipopolysaccharides. *Fish Shellfish Immunol.* 17: 223-233.
- Ceccaldi, H.J. 1989. Anatomy and physiology of digestive tract of crustaceans decapods reared in aquaculture. *Adv. Trop. Aqua.* 9: 243-259.
- Cerenius, L., B.L. Lee, and K. Söderhäll. 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.* 29: 263-271.
- 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.
- Cheng, Y.S., L.U. Wang, and J.C. Chen. 2005. Effect of water temperature on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture* 250: 592-601.
- Christopher, A.T., E.B. Louis, and G.B. Karen. 2006. The effects of hypoxia and pH on phenoloxidase activity in Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 144: 218-223.
- Destoumieux, D., M. Muñoz, C. Cosseau, J. Rodriguez, P. Bulet, M. Comps, and E. Bachère. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J. Cell Sci.* 113: 461-469.
- Ghidalia, W. 1985. Structural and biological aspects of pigments, pp. 301-394. *In* D.E. Bliss and L.H. Mantel, eds. *The Biology of Crustacea* vol. 9. Academic Press, Inc., London.

- Hauton, C., V. Brockton, and V.J. Smith. 2006. Cloning of a crustin-like, single whey-acidic-domain, antibacterial peptide from the haemocytes of the European lobster, *Homarus gammarus*, and its response to infection with bacteria. *Mol. Immunol.* 43: 1490-1496.
- 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.
- Jiravanichpaisal, P., B.L. Lee, and K. Söderhäll. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis: coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 211: 213- 236.
- Klowden, M.J. 2007. *Physiology Systems in Insects*. Academic Press, Amsterdam.
- Krishnan, G. 1951. Phenolic tanning and pigmentation of the cuticle in *Carcinus maenas*. *Q.J. Microsc. Sci.* 92: 333-342.
- Le Moullac, G., M. Le Groumellec, D. Ansquer, S. Froissard, P. Levy, and Aquacop. 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. *Fish Shellfish Immunol.* 7: 227-234.
- Liu, C.H, W. Cheng, and J.C. Chen. 2005. The peroxinectin of white shrimp *Litopenaeus vannamei* is synthesized in the semi-granular and granular cells, and its transcription is up-regulated with *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 18: 431- 444.
- Martin, G.G., J. Kay, D. Poole, and C. Poole. 1998. *In vitro* nodule formation in the ridgeback prawn, *Sicyonia ingentis*, and the American lobster, *Homarus americanus*. *Invertebr. Biol.* 117: 155-168.
- Noga, E.J., R. Smolowitz, and L.H. Khoo. 2000. Pathology of shell disease in the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun, (Decapod: Portunidae). *J. Fish Diseases* 23: 389-399.
- Perazzolo, L.M., and M.A. Barracco. 1997. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. *Dev. Comp. Immunol.* 21: 385-395.
- Smith, J.H. Brown, and C. Hauton. 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection?. *Fish Shellfish Immunol.* 15: 71-90.
- Söderhäll, K., and L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. *Annu. Rev. Fish Dis.*: 3-23.
- Sritunyalucksana, K., L. Cerenius, and K. Söderhäll. 1999. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 23: 179-186.
- Terwilliger, N.B., and M.C. Ryan. 2006. Functional and phylogenetic analyses of phenoloxidase from brachyuran (*Cancer magister*) and branchiopod (*Artemia franciscana*, *Triops longicaudatus*) crustaceans. *Biol. Bull.* 210: 38-50.
- Thompson, S.W. 1966. *Selected Histochemical and Histopathological Methods*. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois.
- Vacca, L.L., and M. Fingerman. 1983. The roles of hemocytes in tanning during the molting cycle: a histochemical study of the fiddler crab, *Uca pugnator*. *Biol. Bull.* 165: 758-777.
- van de Braak, C.B.T., M.H.A. Botterblom, E.A. Huisman, J.H.W.M. Rombout, and W.P.W. van der Knaap. 2002. Preliminary study on haemocyte response to white spot syndrome virus infection in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 51: 149-155.
- van de Braak, C.B.T., R. Faber, and J.H. Boon. 1996. Cellular and humoral characteristics of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1789) haemolymph. *Comp. Haematol Int.* 6: 194-203.
- Vargas-Albores, F., F. Jiménez, and K. Söderhäll. 1996. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by β -1,3-glucan. *Dev. Comp. Immunol.* 20: 299-306.
- Vaseeharan, B., Y.C. Lin, C.F. Ko, and J.C. Chen. 2006. Cloning and characterization of a serine proteinase from the haemocytes of mud crab *Scylla serrata*. *Fish Shellfish Immunol.*:1-12.
- Verghese, B., E.V. Radhakrishnan, and A. Padhi. 2008. Effect of moulting, eyestalk ablation, starvation and transportation on the immune response of the Indian spiny lobster, *Panulirus homarus*. *Aquac. Res.* 39: 1009-1013.
- Vogan, C.L., and A.F. Rowley. 2002. Effects of shell disease syndrome on the haemocytes and humoral defences of the edible crab, *Cancer pagurus*. *Aquaculture* 205: 237-252.
- 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.
- Walton, A., and V.J. Smith. 1999. Primary culture of the hyaline haemocytes from marine decapods. *Fish Shellfish Immunol.* 9: 181-194.
- Wang, F.I., and J.C. Chen, 2006a. Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Fish Shellfish Immunol.* 20: 671-681.
- Wang, F.I., and J.C. Chen. 2006b. The immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* under temperature stress. *Aquaculture* 258: 34-41.