1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide Dismutase; SOD) เป็นเอนไซม์ที่ป้องกันการออกซิไดส์ (antioxidative enzyme) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาดิสมิวเทชัน (dismutation reaction) ดังสมการ $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$ พบ SOD ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป มีความสำคัญในการป้องกันองค์ประกอบของเซลล์ถูกทำลายเนื่องจาก O_2^- เช่น ป้องกันการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) และ ไลโปโปรตีน (lipoprotein), ทำลาย DNA, การแบ่งเซลล์ (Kowaltowski and Vercesi 1999), ลดความว่องไวของเอนไซม์ (Kono and Fridovich, 1982), ทำลายโปรตีน, คาร์โบไฮเดรต, ยับยั้งการถอดรหัส (Yakes and Van Houten, 1997), การเสื่อมตามกาล, เนื้อตาย (necrosis) และ การเสียสภาพทางธรรมชาติของโปรตีน (Copin *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น ความแก่ (Keogh, 1999),เส้นเลือดอุดตัน, อิสคิเมีย (ischemia) (Francis *et al.*, 1997), มะเร็ง, ต้อกระจก, เลนส์แก้วตาถูกทำลาย, ความดันโลหิตสูง, อะมายลอยโดซีส (amyloidosis) และ ภูมิคุ้มกันบกพร่องเพราะความแก่ (Armstrong, 1994 อ้างโดย Ozturk *et al.*, (1999)) การอักเสบ (Housset and Junod, 1981; Beckman and Flohe, 1981), ไอ, หวัด, ไข้, ปวดตามข้อ (รูมาตอยด์), ดิสเมโนเรีย (dysmenorrhoea) (Halliwell and Gutteridge, 1989)

ในพืช SOD ช่วยป้องกันการยับยั้งเนื่องจากแสง (photoinhibition) เพราะ O_2^- ที่มากเกินไปจะยับยั้ง photosystem II reaction center และป้องกันพืชถูกทำลายเพราะสภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidative stress) ด้วยสาเหตุต่าง ๆ (Foyer and Harbinson, 1999)

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* (H.B.K.) Mull. Arg.) เป็นพืชยืนต้นในวงศ์ Euphorbiaceae ที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศบราซิล นำมาปลูกครั้งแรกในประเทศไทยที่จังหวัดตรัง เมื่อปี พ.ศ. 2443 (สมพงษ์, 2536) ปัจจุบันประเทศไทย ส่งออกยางพาราเป็นอันดับ 1 ของโลก และมีมูลค่าการส่งออกเป็นอันดับ 7 ของประเทศ ในปี พ.ศ. 2543

เท่ากับ 1,525.4 ล้านเหรียญสหรัฐต่อปี ซึ่งแบ่งออกเป็นยางแผ่นรมควัน, ยางแท่ง และน้ำยางข้น มูลค่าส่งออก 743.5, 542.3 และ 233 ล้านเหรียญสหรัฐ ตามลำดับ ซึ่งมีมูลค่าส่งออกเพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2542 เท่ากับ 31.6% (ธนาคารเพื่อการส่งออกและนำเข้าแห่งประเทศไทย; www.exim.go.th) ปัจจุบันได้มีการศึกษาเอนไซม์ในยางพาราโดยมุ่งเน้นการศึกษาในเอนไซม์มีบทบาทเกี่ยวกับสังเคราะห์เนื้อยาง เช่น HMG-CoA reductase และ HMG-CoA synthase (Lynen, 1969) ซึ่งเอนไซม์ทั้งคู่ มีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำยางและเนื้อยางแห้งมากที่สุด เมื่อมีความว่องไวของเอนไซม์สูง ปริมาณเนื้อยางจะสูงด้วย (Wititsuwannakul, 1986; Suvachittanont and Wititsuwannakul, 1995) รวมทั้งเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase, POx) จากเปลือกยางที่มีความสัมพันธ์กับน้ำยางสดและเนื้อยางแห้ง (Sattayasevana, 1990) และระดับของ SOD จะต่ำในต้นยางที่เป็นโรคเปลือกยางแห้ง (Miao and Gaynor, 1993) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเอนไซม์ POx ในใบยางพารา (พัชรากร, 2543)

การศึกษาเรื่องของไอโซไซม์ในการจำแนกพันธุ์ยาง (วัลลี และ คงพัฒน์, 2535) พบว่านอกจากใบยางพาราจะมี POx สูงแล้วยังพบว่ามี SOD ในใบยางเป็นปริมาณสูงด้วย แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาและแยกเอนไซม์ SOD ในใบยางพาราให้บริสุทธิ์ เพื่อศึกษาสมบัติต่าง ๆ มาก่อน งานวิจัยในครั้งนี้จึงศึกษาปริมาณ SOD ในใบยางพาราและความสัมพันธ์ระหว่างความว่องไวของ SOD ในใบยางพารากับผลผลิตในรูปของยางพารา และ สมบัติของ SOD ในใบยาง หากสามารถแยก SOD จากใบยางพาราโดยวิธีทางชีวเคมี เช่น การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต, การแยกสารโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟฟีแบบแยกประจุ DEAE-Sephacel และโครมาโตกราฟฟีแบบแยกตามขนาด Sephadex G-100 และเพื่อหาแนวทางในการนำ SOD มาใช้ประโยชน์และมาประยุกต์ใช้ต่อไปในอนาคต

การตรวจเอกสาร

1.1 ประวัติการค้นพบ SOD

ในปี ค.ศ. 1938 Mann และ Keilin อ้างโดย McCord and Fridovich, (1969a) สกัดฮีโมคิวปรีน (hemocuprein) ซึ่งเป็นผลึกโปรตีนสีเขียวแกมน้ำเงินจากเม็ดเลือดแดงของวัว ประกอบด้วยทองแดง 0.34% มีขนาด 34,000 ดาลตัน แต่ไม่ทราบหน้าที่ ต่อมามีรายงานการค้นพบโปรตีนนี้ในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ซึ่งมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไปตามอวัยวะของสิ่งมีชีวิตที่พบเช่น อีริโธรคิวปรีน (erythrocuprein) จากเม็ดเลือดแดงของคน (Kimmet *et al.*, 1959 อ้างโดย McCord and Fridovich, (1969a); Markowitz *et al.*, 1959 อ้างโดย McCord and Fridovich, (1969a)), เฮพาโตคิวปรีน (hepatocuprein) จากตับวัว (Mann and Keilin, 1939 อ้างโดย McCord and Fridovich, (1969a)), ตับม้า (Mohamed and Greenberg, 1953 อ้างโดย McCord and Fridovich, (1969a)) และ ซีรีโบรคิวปรีน (cerebrocuprein) จากสมองคน (Porter and Folch, 1957 อ้างโดย McCord and Fridovich, (1969a)) เป็นต้น ต่อมา McCord and Fridovich, 1969a รายงานว่าโปรตีนที่กล่าวถึงข้างต้นนั้น นอกจากมีทองแดงเป็นองค์ประกอบเหมือนกันแล้ว ยังพบเฉพาะในส่วนไซโตซอลเท่านั้น และฮีโมคิวปรีนเร่ง ปฏิกิริยาดิสมิวเทชัน ที่ทำให้ O_2^- เป็น H_2O_2 และตั้งชื่อโปรตีนดังกล่าวว่า ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (EC 1.15.1.1) อย่างไรก็ตามมีนักวิทยาศาสตร์ (Halliwell and Gutteridge, 1989) ได้พยายามหาว่านอกจาก O_2^- แล้วว่ามีสารตั้งต้นอื่นอีกหรือไม่ แต่ก็ไม่พบ จึงสรุปว่า O_2^- เป็นสารตั้งต้นจำเพาะเพียงอย่างเดียวของ SOD

การค้นพบของ McCord and Fridovich, 1969a ที่ว่า SOD สามารถกำจัด O_2^- ได้ ทำให้เกิดการตื่นตัวศึกษา SOD ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย, ยีสต์, เห็ด, รา, สาหร่าย, พืช, สัตว์ และ คน

1.2 แหล่งที่พบ SOD

SOD พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ตั้งแต่สิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ เช่น แบคทีเรีย, ยีสต์, เห็ด, รา, โปรโตซัว, พยาธิ, สาหร่าย, พืชชั้นต่ำที่ไม่มีท่อลำเลียง จนถึงพืชชั้นสูงทั้งพืชใบเลี้ยงคู่และใบเลี้ยงเดี่ยว และสัตว์ต่าง ๆ เช่น ปลา, แมลง, นก และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (ดังตารางที่ 1-4)

ตารางที่ 1 ขนาดของ SOD, หน่วยย่อย และค่า pI ในแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ

ลำดับที่	ชื่อวิทยาศาสตร์	เอนไซม์	MW (D)	Sub	pI	อ้างอิง
1.	*Acanthamoeba castellanii*	FeSOD	50,000	2	6.4	Choi *et al.*, 2000
		CuZnSOD	35,000	2	3.5	
2.	*Aeromonas salmonicida*; iron-replete	FeSOD	50,400	-	-	Barnes *et al.*, 1996
	iron-limited	MnSOD	45,600	-	-	
3.	*Anacystis nidulans*	FeSOD	37,500	2	-	Cseke *et al.*, 1979
4.	*Azotobacter vinelandii*	FeSOD	42,000	2	4.1	Pagani *et al.*, 1995
5.	*Bacillus sp.* KSM-K16	MnSOD	50,000	2	4.5	Hakamada *et al.*, 1997
6.	*B. gingivalis* 381 (anaerobe)	FeSOD	46,000	2	-	Amano *et al.*, 1990
	(aerobe)	MnSOD	46,000	2	-	
7.	*Caulobacterium cresentus* CB15	CuZnSOD	29,000	2	6.5	Steinman, 1982
8.	*Desulfovibrio gigas*	FeSOD	44,000	2	-	Dos Santos *et al.*, 2000
9.	*Escherichia coli* B	MnSOD	39,500	2	-	Keele *et al.*, 1970
10.	*E. coli*; strain ไม่สร้าง MnSOD และ FeSOD	CuZnSOD	17,000	2	-	Battistoni and Rotilio, 1995
11.	*Mycoplasma hyopneumoniae*	CuZnSOD	17,000	-	-	Chen *et al.*, 2000
12.	*Nocardia asteroides* GUH-2	Mn,FeSOD	100,000	4	-	Beaman *et al.*, 1983
13.	*Streptomyces griseus*	NiSOD	52,000	4	-	Youn *et al.*, 1996a
		FeSOD	88,000	4	-	

ตารางที่ 2 ขนาดของ SOD, หน่วยย่อย และค่า pI ในเห็ดและราชนิดต่าง ๆ

ลำดับที่	ชื่อวิทยาศาสตร์	เอนไซม์	MW (D)	Sub	pI	อ้างอิง
1.	*Aspergillus flavus, A. niger, A. nidulans* และ *A. terreus*	CuZnSOD	55,000-123,000	-	-	Holdom *et al.*, 1996
2.	*Aspergillus mycelia* และ *A. niger*	CuZnSOD	76,000	4	-	Hatzinikolaou *et al.*, 1997
3.	*Fusarium moniliform*	MnSOD	29,000	2	-	Kou *et al.*, 1997
4.	*Ganoderma microsporum*	MnSOD	98,000	4	-	Pan *et al.*, 1997
5.	*Humicola lutea* 110	CuZnSOD	32,000	2	-	Dolashka-Angelova *et al.*, 1999
6.	*Lentinus edodes* (เห็ดหอม)	FeSOD	54,000	2	-	Park and Hwang, 1999
7.	*Penicillium chrysogenum*	MnSOD	23,130	-	-	Diez *et al.*, 1998
8.	*Phanerochaete chrysosporium*	MnSOD	44,000	2	-	Ozturk-Urek *et al.*, 1999
9.	*Pleurotus olearius*	MnSOD	76,000	4	-	Lavelle *et al.*, 1974

ตารางที่ 3 ขนาดของ SOD ,หน่วยย่อย และค่า pI ในสัตว์ชนิดต่าง ๆ

ลำดับที่	ชื่อวิทยาศาสตร์	เอนไซม์	MW (D)	Sub	pI	อ้างอิง
1.	Bovine erythrocyte; haemocuprein	CuZnSOD	34,000	-	-	Mann and Keilin, 1939 อ้างโดย McCord and Fridovich, (1969a)
2.	Bullfrog liver; *Rana catesbeiana*	MnSOD	84,000	4	-	Abe and Okazaki, 1987
3.	Carp liver; *Cyprinus carpio* L.	CuZnSOD	-	-	-	Vig *et al.*, 1989
4.	Chicken liver	CuZnSOD	32,000	2	-	Ozturk-Urek and Tarhan, 2001
5.	Cockroach; *Perioplaneta americana*	CuZnSOD	30,000	2	-	Kostron *et al.*, 1999
6.	Fruit fly; *Drosophila melanogaster*	CuZnSOD	32,000	2	5.3	Lee *et al.*, 1981
7.	Giant hemoglobin earthworm; *Lumbricus terrestris*	CuZnSOD	-	12	-	Liochev *et al.*, 1996
8.	Goose ceruloplasmin; blood plasma	SOD	121,300	-	-	Hilewicz-Grabska *et al.*, 1988
9.	*Paralichthys olivaceus*; hepato-pancreas	CuZnSOD	36, 000	2	5.9, 6.0, 6.2	Osatomi *et al.*, 2001
10.	Monkey intestinal mucosa; *Macaca radiata*	CuZnSOD	32,000	2	-	Manohar and Balasubramaniau, 1991

ตารางที่ 4 ขนาดของ SOD, หน่วยย่อย และค่า pI ในพืชชนิดต่าง ๆ

ลำดับที่	ชื่อวิทยาศาสตร์	เอนไซม์	MW (D)	Sub	pI	อ้างอิง
1.	Citrus leaf; *Citrus limonum* R.	FeSOD	47,500	-	-	Almansa *et al.*, 1991
2.	Germinated rice seed	CuZnSOD	32,000	2	-	Padiglia *et al.*, 1996
3.	Ginger rhizome; *Zingiber officinale*	MnSOD	-	-	-	Suvachittanont and Kasisadapan, 1996
4.	Kidney bean leaf; *Phaseolus vulgaris*	CuZnSOD MnSOD	32,000 44,000	2 -	- -	Kono *et al.*, 1979
5.	*Marchantia peleacea* var. *diptera*	CuZnSOD	32,600	2	5.1	Tanaka *et al.*, 1996
6.	Mustard leaf; *Brassica campestris*	FeSOD	41,000	2	4.5	Salin and Bridges, 1980
7.	Pea plant leaf; *Pisum sativum* L. cv. Thomas Laxton	CuZnSOD I CuZnSOD II	33,600 35,800	2 2	4.9 4.5	Duke and Salin, 1983
8.	Raw wheat germ; *Triticum aestivum* L. Cult. Var. Arthur	CuZnSODI CuZnSODII MnSOD	31,000 30,900 34,000	2 2 2	- - -	Beauchamp and Fridovich, 1973
9.	Scot pine needle; *Pinus sylvestris*	CuZnSOD	24,800	2	10.2	Karpinska *et al.*, 2001
10.	Water lily leaf; *Nuphar luteum* (L.) Sibth. and Smith subsp. *macrophyllum* (Small) Beal.	FeSOD	46,000	2	4.8	Salin and Bridges, 1982
11.	Watermelon cotyledon *Citrullus vulgaris* Schrad	CuZnSOD	34,000	2	4.63, 4.66	Palma *et al.*, 1997

SOD ในสิ่งชีวิตต่าง ๆ จำแนกตามชนิดของโลหะที่เป็นองค์ประกอบได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่คือ CuZnSOD, MnSOD และ FeSOD ตัวอย่างเช่น พบ CuZnSOD, MnSOD และ FeSOD ในแบคทีเรีย (ตารางที่ 1), สาหร่ายพบ MnSOD และ FeSOD (Asada *et al.*, 1975; Misra and Fridovich, 1977), โปรโตซัวพบ CuZnSOD และ FeSOD (Le Trant *et al.*, 1983; Barra *et al.*, 1990; Piacenza *et al.*, 1998), หนอนพยาธิพบ CuZnSOD (Sato *et al.*, 1994; Sanchez-Moreno *et al.*, 1994), ยีสต์พบ CuZnSOD, MnSOD และ AgZnSOD (Ravindranath and Fridovich, 1975; Tesfa-Selase and Hay, 1995; Hernandez-Saavedra and Ochoa, 1999; Rhie *et al.*, 1999), เห็ดและรา (ตารางที่ 2), สัตว์ (ตารางที่ 3) และ พืช (ตารางที่ 4) นอกจาก SOD 3 กลุ่มหลัก ๆ คือ CuZnSOD, MnSOD และ FeSOD แล้ว ยังพบ MnFeSOD ใน *Nocardia asteroides* (Beaman *et al.*, 1983) และ SOD ที่มีนิกเกิลอยู่ด้วย (NiSOD) ในแบคทีเรีย *Streptomyces* หลายชนิด (Kim *et al.*, 1996) เช่น *Streptomyces griseus* และ *S. sp.* IMSNU-1 (Youn *et al.*, 1996b)

1.3 รีแอคทีฟออกซิเจนสปีชีส์ (Reactive Oxygen Species, ROS)

อนุมูลอิสระ (free radical) เป็นสารที่มีอิเล็กตรอนรอบนอกที่ยังไม่ได้จับคู่ (unpaired electron) มีความว่องไวสูงทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในสิ่งมีชีวิตได้เร็ว ตัวอย่างเช่น O_2^- เป็นอนุมูลอิสระภายในเซลล์ทั่วไป ส่วนใหญ่เกิดขึ้นระหว่างการส่งถ่ายอิเล็กตรอนจากโมเลกุลของออกซิเจน ไปยังโมเลกุลของน้ำ O_2^- บางครั้งเรียกว่า รีแอคทีฟออกซิเจนสปีชีส์ หรือ ROS ตัวอย่างของ ROS ได้แก่ O_2^-, H_2O_2 และ OH^- สิ่งมีชีวิตได้รับ O_2^- จากภายในสิ่งมีชีวิตเอง, จากภายนอกเนื่องจากสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ รอบตัว และสารเคมีต่าง ๆ O_2^- ภายในร่างกายเกิดจาก 2 สาเหตุใหญ่ ๆ คือ การออกซิไดส์ที่เกิดขึ้นเอง (autoxidation) และ การออกซิไดส์โดยเอนไซม์ (enzymatic oxidation) (Fridovich, 1983)

1.3.1 การออกซิไดส์ที่เกิดขึ้นเอง

ซีวโมเลกุลภายในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ทำให้เกิด O_2^- ได้ เช่น ฮีโมโกลบิน (hemoglobin) (Misra and Fridovich, 1972a), มายโอโกลบิน (myoglobin) (Gotoh and Shikama, 1976), **รีดิวซ์ไซโตโครมซี** (reduced cytochrome c) (Cassell and Fridovich, 1975), **รีดิวซ์เฟอริดอกซินส์** (reduced ferredoxins) (Misra and Fridovich, 1971), ลิวโคเฟลวินส์ (leukoflavins) (Ballou *et al.*, 1969), เตตระไฮดรอเทอริน (tetrahydropterins) (Nishikimi, 1975), แคทิโคลามีนส์ (catecholamines) (Misra and Fridovich, 1972b; Cohen and Heikkila, 1974) และ โพลิไฮดริกฟีนอลส์ (polyhydric phenols) (Marklund and Marklund, 1974) การออกซิไดส์ที่เกิดขึ้นเองนอกจากจะทำให้เกิด O_2^- แล้วยังอาจเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ได้เป็น OH^-, H_2O_2 โดยมีโลหะไดวาเลนท์ (divalent metal) อยู่ด้วย O_2^- อาจทำปฏิกริยากับไนตริกออกไซด์ ได้เป็นเพอร์ออกซิไนไตรท์ (peroxynitrite) และ OH^- (Copin *et al.*, 2001) การออกซิไดส์ที่เกิดเองของสารในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน ในไมโทคอนเดรีย, คลอโรพลาสต์, ไมโครโซม (microsome) และ นิวเคลียส (nuclei) ทำให้เกิด O_2^- ประมาณ 2-4% (Chance *et al.*, 1979)

1.3.2 การออกซิไดส์โดยเอนไซม์

เอนไซม์หลายชนิดผลิต O_2^- ได้ เช่น 1) กลุ่มออกซิเดส (oxidase) ที่ออกซิไดส์แซนทีน (xanthine), อัลดีไฮด์ (aldehyde), เซลโลไบโอส (cellobiose) และกาแลคโตส (galactose) 2) กลุ่มไดออกซีจิเนส (dioxygenase) ที่ออกซิไดส์สาร อินโดลเอมีน (indoleamine), ทริปโทแฟน (tryptophan) และไนโตรโพรเพน (nitropropane) และ 3) กลุ่มดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) เช่น ไดไฮโดรออโรติก (dihydro-orotic) และเฟลวิน (flavin) ล้วนสร้าง O_2^- ได้

ปกติ O_2^- ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จะถูกกำจัดโดย SOD และไม่ออกมานอกเซลล์ แต่ถ้าพบ O_2^- นอกเซลล์ อาจเกิดจากสารในสภาวะรีดิวซ์ที่ถูกปล่อยออกมาภายนอกเกิดออกซิไดส์เอง เช่น พบ O_2^- ในอาหารเลี้ยง *E. coli* ที่มีพาราควอท (paraquat)

จะพบว่ามีการขับพาราควอทที่ถูกรีดิวซ์ออกมา แล้วเกิดการออกซิไดส์เอง ได้เป็น O_2^- ในที่สุด พบปรากฏการณ์นี้ในพืชเช่นกัน (Halliwell and Gutteridge, 1989)

1.4 ผลของ O_2^- ต่อสิ่งมีชีวิต

Copin *et al.*, 2001 พบว่า O_2^- ปริมาณน้อย ๆ มีผลต่อปัจจัยที่จำเป็นต่อการการถอดรหัส (transcription factor) เช่น *AP-1* และ *NF-kB* ซึ่งเป็นยีนควบคุมภายในเซลล์และระหว่างเซลล์รวมทั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) อีกด้วย และถ้า O_2^- มากเกินกว่าจะกำจัดออกได้ จะก่อให้เกิดผลเสียต่อเซลล์ได้หลายรูปแบบ (Fridovich, 1983) เช่น

1.4.1 O_2^- ทำปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะกับสารต่าง ๆ

O_2^- มีความว่องไวสูงทำปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะ กับสารภายในสิ่งมีชีวิตหรือร่างกายโดยตรงได้ เช่น ทำปฏิกิริยากับ epinephrine (McCord and Fridovich, 1969b), 6-hydroxydopamine (Cohen and Heikila, 1974), catechols (Greenstock and Miller, 1975), pamoate (Hassan *et al.*, 1980), bile pigments (Robertson and Fridovich, 1982), oxyhemoglobins (Lynch *et al.*, 1976), hydroxy amines (Elstner and Heupel, 1976), phenylhydrazine (Misra and Fridovich, 1976), lipid peroxide (Sutherland and Gebicki, 1982), α-tocopherol (Nishikimi *et al.*, 1980) และ 1,2-dihydroxyethylthiamine-pyrophosphate ในปฏิกิริยา Transketolase (Asami and Akazawa, 1977) นอกจากนี้ยังไปออกซิไดส์ [4Fe-4S] cluster ของ อะโคนิเทส (aconitase) (Srinivasan *et al.*, 2000)

1.4.2 เป็นคอนจูเกตเบสของ $OH_2^{\cdot}$

O_2^- เป็นคอนจูเกตเบสของ $OH_2^{\cdot}$ ซึ่งเป็นกรดอ่อน ซึ่ง $OH_2^{\cdot}$ สามารถทำปฏิกิริยากับลิโนลิเอต (linoleate) และ อาแรคิโดเนท (arachidonate) ได้ (Gebicki and Bielski, 1981)

1.4.3 O_2^- มีความเป็นเบสสูง

O_2^- มีความเป็นเบสสูง ทำให้ดึงโปรตอนออก (proton abstraction) ได้เป็นคาร์แบนไอออน (cabanion) ซึ่งทำปฏิกิริยากับ O_2 ได้อย่างรวดเร็ว เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ได้ ROS ที่เป็นพิษเพิ่มขึ้น (Nanni *et al.*, 1980) เช่น O_2^- สามารถออกซิไดส์ [4Fe-4S] cluster ของเอนไซม์ในกลุ่มดีไฮโดรจีเนส (เช่น Aconitase)ให้เป็น Fe^{2+} อิสระ ซึ่งไปรีดิวซ์ H_2O_2 เป็น OH^- และ $OH^{\cdot}$ ดังสมการ $H_2O_2 + O_2^- \xrightarrow{Fe^{2+}} OH^- + OH^{\cdot}$ โดยมี lactoferrin ซึ่งเป็น iron complex ที่พบในสิ่งมีชีวิตเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Fridovich, 1995)

1.4.4 ผลของ O_2^- ในแบคทีเรียและคน

การเคลื่อนไหวของแบคทีเรีย *E. coli*, *Photobacterium leiognathi*, *Staphylococcus aureus* และ *Neisseria gonorroeae* ถูกยับยั้งได้โดย O_2^-

คนที่อยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนบริสุทธิ์ ความดัน 1 บรรยากาศ นาน 6 ชั่วโมงพบว่ามี O_2^- ในเซลล์สูงขึ้น มีอาการเจ็บหน้าอก, ไอ และเจ็บคอในบางราย ต่อมาถุงลมถูกทำลาย ทำให้ปริมาตรของปอดทั้งสองข้างไม่เท่ากัน เกิดอาการบวมน้ำ (oedema) ในปอดพบชิ้นส่วนของเซลล์ปอดที่ถูกทำลาย (Halliwell and Gutteridge, 1989)

1.5 แอนติออกซิแดนท์ (antioxidant)

แอนติออกซิแดนท์คือ สารที่ทำหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน รวมถึงสารที่ยับยั้งและควบคุมอนุมูลอิสระไม่ให้กระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชันในสิ่งมีชีวิต มีระบบแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant defense system) 3 กลุ่มคือ 1) เอนไซม์ เช่น แคตาเลส (catalase, CAT), เปอร์ออกซิเดส และกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase, GPX) 2) สารโมเลกุลเล็ก เช่น กลูตาไธโอน, ยูเรต (urate), บิลิรูบิน (bilirubin), ยูบิควิโนน (ubiquinone), อัลบูมิน (albumin), เซรูโลพลาสมิน (ceruloplasmin) และ ทรานส์เฟอริน (transferin) 3) สารที่มีพันธะคู่ เช่น วิตามินซี, วิตามินอี และ แคโรทีนอยด์ ปัจจุบัน Copin *et al.*, 2001 แบ่งกลุ่มระบบ

แอนติออกซิแดนท์ต่าง ๆ ใหม่เป็น 1) เอนไซม์ต่าง ๆ และ 2) โมเลกุลที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavengers) สารกลุ่มที่สองนี้ยังแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ละลายน้ำ เช่น แอสคอเบต, ยูเรต และกลูตาไธโอน และกลุ่มที่ละลายในไขมัน เช่น โทโคเฟอรอล (tocopherols, vitamin E), ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และยูบิควินอล (ubiquinol); สารกำจัดอนุมูลอิสระที่กำจัด O_2^- เรียกว่า superoxide scavenger เช่น อนุมูลอิสระ nitroxide เป็นสารน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ที่กำจัด O_2^- (Offer *et al.*, 1998) และ โปรตีนที่ละลายน้ำได้ในถั่ว *Vicia faba* (Okada *et al.*, 2000)

1.6 บทบาทและความสำคัญของ SOD

SOD เป็นเอนไซม์ ที่มีความสามารถในการกำจัด O_2^- ได้สูง (Fridovich, 1997) โดยเปลี่ยน O_2^- ให้เป็น H_2O_2 ซึ่งถูก POx และ CAT กำจัดต่อไป (Hernandez-Saavedra and Ochoa, 1999) SOD ป้องกันออกซิเดชันของ L-ascorbic acid (Miyake *et al.*, 1999)

บทบาทของ SOD ส่วนใหญ่ พบจากการทดลองที่ทำให้เกิด O_2^- ในสิ่งมีชีวิตในปริมาณที่สูงกว่าปกติ เกินความสามารถของ SOD ที่จะกำจัดออก โดยให้สิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาอยู่ในสภาวะที่ความดันหรือ % ของออกซิเจนสูง ร่วมกับสารบางชนิดที่ทำให้เกิด O_2^- เช่นพาราควอทหรืออาจให้สารยับยั้ง SOD ในร่างกาย เช่น ไดเอทิลไดไธโอคาบาเมท (diethyldithiocarbamate) หรือทำให้เกิดสภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันเนื่องจากสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ปัจจุบันอาจใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมสร้างสิ่งมีชีวิตที่ไม่มี SOD เพื่อศึกษาบทบาทของ SOD ทั้งในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำและสิ่งมีชีวิตชั้นสูง

1.6.1 บทบาทของ SOD ในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ

ในแบคทีเรีย เช่น *Streptococcus faecalis* จะมีการสังเคราะห์ SOD ขึ้นเมื่อมี O_2^- เพิ่มขึ้นภายในเซลล์โดยเพิ่มความดันของออกซิเจน, เติมเมทิลไวโอโลเจน, ควิโนน (quinone) หรือ สเตรปโตไนกริน (streptonigrin) (Gregory and Fridovich, 1973) SOD มีบทบาทในการป้องกันความเครียดเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน และ

ควบคุมการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ เช่น *E. coli* และ anaerobe bacteria ที่ไม่สร้างทั้ง MnSOD และ FeSOD แม้ในสภาวะที่มีออกซิเจนความเข้มข้นต่ำไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ทั้งคู่ (Bowler *et al.*, 1994) เมื่อเลี้ยง *Streptococcus faecalis*, *E. coli* และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในสภาวะมี O_2 สูงกว่าปกติ จะมี SOD เพิ่มขึ้น ยกเว้นใน *Bacillus subtilis*, *E. coli* K12 ที่สร้าง CAT และ POx แทน (Halliwell and Gutteridge, 1989)

1.6.2 บทบาทของ SOD ในยีสต์และสัตว์

การสร้าง SOD มีความสัมพันธ์กับ O_2^- ที่เพิ่มขึ้น เพราะเกิดความเครียดเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในยีสต์ที่ไม่มีการสร้าง CuZnSOD และ MnSOD พบว่ามีความไวต่อ O_2^- เกิดการกลายพันธุ์สูง, มีความผิดปกติในการสร้าง สปอร์ และแสดงอาการขาด Met และ Lys (Fridovich, 1995) SOD ช่วยป้องกันไม่ให้ DNA ในแมลงหวี่ถูกทำลายจากรังสีที่สูงถึง 64,000 rad โดยไม่ตาย อาจจะเนื่องจากมี CuZnSOD สูงกว่าสิ่งมีชีวิตทั่วไป 1.5 เท่า (Lee *et al.*, 1981)

SOD ช่วยป้องกัน การทำลายระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system; CNS) (Halliwell and Gutteridge, 1989), ควบคุมการเจริญเติบโตของสัตว์, ป้องกันเซลล์ถูกทำลายจากรังสี (Fridovich, 1983) และยืดอายุของสัตว์ (Bowler *et al.*, 1994; Kitani *et al.*, 1996) ในแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) ที่ผลิต CuZnSOD ได้น้อยกว่าปกติพบว่าจะมีอายุสั้นกว่าปกติ (Phillips *et al.*, 1989; Kliebenstein *et al.*, 1998) นอกจากนี้เมื่อเติม SOD ใน fetal calf myoblast พบว่าเซลล์ถูกทำลายน้อยกว่ากลุ่มควบคุมมาก (Fridovich, 1983) ยีสต์ที่ไม่มียีนสำหรับ CuZnSOD ในสภาวะที่มีออกซิเจนจะโตช้าและค่อย ๆ ตายในระยะการเจริญเติบโตถึงจุดคงที่ (stationary phase)

1.6.3 บทบาทของ SOD ในคน

SOD ช่วยลดและป้องกันโรคต่าง ๆ เช่น มะเร็ง, ถุงลมโป่งพอง, ภูมิคุ้มกันผิดปกติ, ความผิดปกติทางประสาท เช่น amylotrophic lateral sclerosis (ALS) และการแก่ตามวัย (Hernandez-Saavedra and Ochoa, 1999) SOD มีความสัมพันธ์

กับโรคสมองเสื่อม (familial amyotrophic lateral sclerosis; FALS หรือ Lou Gehring's disease) จากการสลายของ motor neuron บริเวณคอร์เทกซ์ (cortex), ก้านสมอง และไขสันหลัง นอกจากนี้ในหนูที่ CuZnSOD ถูกเปลี่ยนแปลงจะมีอาการคล้ายกับคนเป็น FALS (Bowler *et al.*, 1994) 10-20% ผู้ป่วยโรค FALS เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *SOD1* ซึ่งเป็นรหัสสำหรับสังเคราะห์ CuZnSOD ในไซโตซอล เมื่อ *SOD1* กลายพันธุ์ จะมีโปรตีนเกาะกลุ่มกัน พบ neurofilament สูงในไซโตซอลของ motor neuron ทำให้การถ่ายทอดสัญญาณประสาทเสียไป เกิดอาการชา ถ้าเป็นมากอาจเป็นอัมพาตและถึงแก่ชีวิตได้ (Johnston *et al.*, 2000)

1.6.4 บทบาทของ SOD ในพืช

SOD มีบทบาทในการควบคุมและป้องกันอันตรายจาก O_2^- ซึ่งเป็นผลผลิตของวิถีเมทาบอลิสมในเซลล์ตามปกติ หรือในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น มลภาวะทางอากาศ (O_3, SO_2), ยากำจัดวัชพืช, ความแห้งแล้ง, น้ำท่วม, มีโลหะ, ความเค็ม, อากาศหนาว, ร้อน และ ปริมาณแสงที่มากเกินไป รวมทั้งสารเคมีต่าง ๆ เช่น พาราควอท ซึ่งทำให้พืชอยู่ในสภาวะเครียดเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน และ ผลิต O_2^- มากขึ้น (Bowler *et al.*, 1994) นอกจากนี้ยังป้องกันไม่ให้ O_2^- ยับยั้งการพัฒนาของคลอโรพลาสต์, ลดการงอกของเมล็ด, การเจริญของราก, การทำลายเยื่อหุ้มเซลล์, ใบเหี่ยว และร่วง (Halliwell and Gutteridge, 1989)

SOD มีความสัมพันธ์กับโรคเปลือกยางแห้งในยางพารา ที่ทำให้น้ำยางไหลน้อยเนื่องจากการแก่ก่อนเวลาอันควรของเซลล์ผลิตน้ำยาง ซึ่งอยู่ใต้เปลือกต้นยาง (Chrestin, 1989) โดยพบว่า ในต้นยางพาราที่เป็นโรคเปลือกยางแห้งมี SOD และ CAT อยู่ในระดับต่ำกว่าปกติ (Miao and Gaynor, 1993)

1.7 สมบัติทั่วไปของ SOD

CuZnSOD เป็นเอนไซม์ที่มีสีเขียวแกมน้ำเงิน จนถึงเขียวอมฟ้า (McCord and Fridovich, 1969a) CuZnSOD ในสารละลายที่สกัดจากตับไก่เข้มข้นแช่แข็งที่อุณหภูมิ $-70^{\circ}C$ จะเกิดออกซิเดชันได้เองเป็น Cu^{2+} สีเหลือง และ กลายเป็นโพลิเมอร์

โดยไม่มีผลต่อความว่องไวของ SOD (Weisiger and Fridovich, 1973) MnSOD มีสีชมพูจนถึงม่วงแดง (Weisiger and Fridovich, 1973; Keele *et al.*, 1970; McCord, 1976) ส่วน FeSOD มีสีเหลือง (McCord, 1976)

1.7.1 น้ำหนักโมเลกุล

CuZnSOD ส่วนใหญ่มีขนาด 32,000 ดาลตัน เช่น CuZnSOD ในพืชส่วนใหญ่มีขนาด 31,000-33,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ที่มีขนาด 16,000 ดาลตันเท่ากัน เช่น ต้นข้าว (Padiglia *et al.*, 1996), ใบถั่วแดง kidney bean (Kono *et al.*, 1979), ต้นลิเวอร์เวิร์ต (Tanaka *et al.*, 1996), ใบถั่วลันเตา (Duke and Salin, 1983), วีทเจิร์ม (Beauchamp and Fridovich, 1973), ใบสน (Karpinska *et al.*, 2001) และใบเลี้ยงของเมล็ดแตงโม (Palma *et al.*, 1997) ในสัตว์ เช่น แมลงสาบ (Kostron *et al.*, 1999), แมลงหวี่ (Lee *et al.*, 1981), ปลาลิ้นหมา (Osatomi *et al.*, 2001), ปลาคาร์ป (Vig *et al.*, 1989), ไส้เดือน (Liochev *et al.*, 1996), เม็ดเลือดแดงของวัว (Mann and Keilin, 1939 อ้างโดย McCord and Fridovich (1969a)), ตับไก่ (Ozturk-Urek *et al.*, 2001), และเยื่อบุลำไส้ลิง (Manohar and Balasubramaniau, 1991) นอกจากนี้ยังพบในหนอนพยาธิ (Sanchez-Moreno *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1994), ในรา (Holdom *et al.*, 1996; Hatzinikolaou *et al.*, 1997; Dolashka-Angelova *et al.*, 1999) ในยีสต์ (Hernandez-Saavedra and Ochoa, 1999) และพบบ้างในแบคทีเรีย เช่น *Acanthamoeba castellanii* (Choi *et al.*, 2000) และ *Caulobacteria cresentus* CB15 (Steinman, 1982)

SOD แต่ละหน่วยประกอบด้วย ไอออนของทองแดงและสังกะสี ชนิดละ 2 กรัมอะตอมต่อโมเลกุล (Lumsden and Hall, 1974) ไอออนของสังกะสี ไม่เกี่ยวกับการเร่งปฏิกิริยา แต่ช่วยให้เอนไซม์มีความเสถียร ส่วน Cu^{2+} เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยา เพราะเมื่อแทนที่ Cu^{2+} ตรงบริเวณเร่งด้วย Mn^{2+} ความว่องไวของ SOD หายไป และถ้าแทนที่ Zn^{2+} ด้วยไอออนของโลหะทรานสิชันตัวอื่นเช่น โคบอลต์, ปรอท หรือแคดเมียม จะเพิ่มความเสถียรให้แก่เอนไซม์ และพบว่ามีความว่องไวของ SOD บ้างเล็กน้อย นอกจากนี้ยังพบ CuZnSOD ซึ่งมีขนาด 65,000-76,000 ดาลตัน ประกอบด้วย

หน่วยย่อย 4 หน่วยที่มีขนาดเท่ากัน เช่น ในรา (Hatzinikolaou *et al.*, 1997; Holdom *et al.*, 1996) และ ปลา *Paralichthys olivaceus* (Osatomi *et al.*, 2000) CuZnSOD เล็กที่สุดมีขนาด 15,000 - 17,000 ดาลตัน พบใน *Escherichia coli* B (Battistoni and Rotilio, 1995), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Chen *et al.*, 2000) และโปรโตซัว *Fasciola hepatica* (Piacenza *et al.*, 1998) ส่วน CuZnSOD ที่พบภายนอกเซลล์เป็นไกลโคโปรตีนที่ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยขนาด 16,000 ดาลตัน (Hernandez-Saavedra and Ochoa, 1999)

MnSOD แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกมีขนาด 40,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่มีขนาด 20,000 ดาลตันเท่ากัน พบในแบคทีเรีย (Barnes *et al.*, 1996; Hakamada *et al.*, 1997; Amano *et al.*, 1990; Keele *et al.*, 1970) ในสาหร่ายแดง (Misra and Fridovich, 1977), สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Asada *et al.*, 1975) ในรา (Kou *et al.*, 1997; Diez *et al.*, 1998; Ozturk-Urek *et al.*, 2001) ในสัตว์ เช่น ตับสุนัข (Ikeda *et al.*, 1995) ในพืช เช่น ใบถั่วแดง kidney bean (Kono *et al.*, 1979) และ วีทเจิร์ม (Beauchamp and Fridovich, 1973) ส่วน MnSOD ที่พบภายนอกเซลล์มีหน่วยย่อยขนาด 22,000-29,000 ดาลตัน (Yamahara *et al.*, 1999; Carter and Thornburg, 2000)

MnSOD กลุ่มที่สองมีขนาด 80,000-100,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยที่มีขนาดเท่ากัน มีไอออนของแมงกานีส 2-3 กรัมอะตอม/โมเลกุล (Weisiger and Fridovich, 1973) เช่น ในยีสต์ (Rhie *et al.*, 1999; Tesfa-Selase and Hay, 1995; Ravindranath and Fridovich, 1975) ในรา (Pan *et al.*, 1997) ในกลุ่มเห็ดนางรม (Lavelle *et al.*, 1974) ในสัตว์ เช่น กบ Bullfrog (Abe and Okazaki, 1987) SOD ในแบคทีเรีย, รา, ตับไก่, หัวใจวัวมักพบไอออนของแมงกานีส 2 กรัมอะตอม/เอนไซม์สี่หน่วยย่อย ส่วนในยีสต์และสัตว์เลี้ยงลูกทั่วไปพบไอออนของแมงกานีส 4 กรัมอะตอม /เอนไซม์สี่หน่วยย่อย ในการทดลองใช้โลหะทรานสิชันอื่น เช่น เหล็ก แทนแมงกานีส ใน MnSOD พบว่าไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ (Halliwell and Gutteridge, 1989) แต่ต่อมา Yamano *et al.*, 1999 พบแบคทีเรียในธรรมชาติ 6 ชนิดคือ

Streptococcus mutans, *Bacteriodes fragilis*, *Methylomonas* strain J, *Propionibacterium shermanii*, *Porphyromonas gingivalis* และ *Mycobacterium smegmatis* ซึ่งมีความว่องไวของ SOD โดยใช้แมงกานีสหรือเหล็กเป็นโคแฟกเตอร์ก็ได้เรียกว่า Cambialistic SOD

FeSOD แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่หนึ่งมีขนาดประมาณ 40,000 ดาลตัน ส่วนใหญ่ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่มีขนาดเท่ากัน และมีไอออนของเหล็ก 1-2 กรัมอะตอม/โมเลกุลของโปรตีน (Halliwell and Gutteridge, 1989) พบในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย (Choi *et al.*, 2000; Barnes *et al.*, 1996; Cseke *et al.*, 1979; Pagani *et al.*, 1995; Amano *et al.*, 1990; Dos Santos *et al.*, 2000) โปรโตซัว (La Trant *et al.*, 1983) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Asada *et al.*, 1975), เห็ดหอม (Park and Hwang, 1999) พืชชั้นสูง เช่น มัสตาร์ด (Salin and Bridges, 1980), ส้ม (Almansa *et al.*, 1991) และบัว (Salin and Bridges, 1982) นอกจากนี้ Barra *et al.*, 1990 พบ FeSOD ในแป๊ะก๊วย

กลุ่มที่สอง FeSOD มีขนาด 80,000-90,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยที่มีขนาดเท่ากัน และมีไอออนของเหล็ก 2-4 กรัมอะตอม/โมเลกุล (Barra *et al.*, 1990) พบในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ 3 ชนิดคือ *Methanobacterium bryantii* (Kirby *et al.*, 1981), *Streptomyces griseus* (Youn *et al.*, 1996b) และโปรโตซัว *Tetrahymena pyriformis* (Barra *et al.*, 1990)

1.7.2 ความทนต่อสิ่งแวดล้อม

FeSOD จากแบคทีเรีย *Methanobacterium bryanthii* เก็บที่อุณหภูมิ -70°C ได้นานถึง 2 เดือนโดยไม่สูญเสียความว่องไว แต่ถ้านำไปแช่แข็งแล้วระเหิดให้แห้ง (lyophilized) ความว่องไวลดลง 30% (Kirby *et al.*, 1981) แต่ MnSOD จากใบถั่วลันเตา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20°C ที่ pH 7.5 ได้นานถึง 4 เดือนโดยเหลือความว่องไวสูงถึง 80% แต่ถ้าเก็บที่อุณหภูมิ 4°C พบว่าความว่องไวลดลงเหลือ 75% (Sevilla *et al.*, 1972)

1.7.3 pI ของ SOD

pI ของ SOD ในพืชส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 4.2-4.9 (Palma *et al.*, 1997) ดังตารางที่ 1-4 pI ของ CuZnSOD ในใบสนมีค่า 10.2 สูงกว่าค่า pI ของ SOD ในคลอโรพลาสต์และไซโตซอลของพืชทั่วไปคือ 5.5 (Karpinska *et al.*, 2001)

1.8 SOD Isozyme

ไอโซไซม์ เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาเดียวกัน แต่มีโครงสร้างแตกต่างกัน เช่น CuZnSOD, MnSOD และ FeSOD ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีโลหะเป็นองค์ประกอบแตกต่างกัน นับได้ว่าเป็นไอโซไซม์ นอกจากนี้ CuZnSOD, MnSOD และ FeSOD แต่ละตัวยังอาจมีรูปแบบที่แตกต่างอีกหลายรูปแบบขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์และแหล่งพบ สิ่งมีชีวิตบางชนิดมีไอโซไซม์หลายชนิด บางชนิดก็มีไอโซไซม์ไม่มาก

CuZnSOD จากราดำ *Neurospora crassna* ที่เก็บไว้อุณหภูมิต่ำจะมีไอโซไซม์จำนวนมาก หรือ CuZnSOD ในคลอโรพลาสต์ของพืชส่วนใหญ่ เช่น ในผักโขมพบเพียง 1 ไอโซไซม์ (Asada *et al.*, 1973) แต่ในไซโตซอลมีหลายไอโซไซม์ (Tanaka *et al.*, 1996) SOD จากจมูกข้าวสาลี พบ CuZnSOD I, CuZnSOD II และ MnSOD พบว่า CuZnSOD ทั้ง 2 ไอโซไซม์นอกจากจะมีกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบและขนาดที่แตกต่างกันแล้ว (Beauchamp and Fridovich, 1973) ยังไม่พบพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างสายเปปไทด์ (Interchain disulfide bond) ใน CuZnSOD I แต่พบใน CuZnSOD II ใบและก้านต้นข้าวสาลีพบเพียง CuZnSOD II ใบถั่วแดง kidney bean (*Phaseolus*

Central Library
Prince of Songkla University

vulgaris) มีทั้งหมด 3 ไอโซไซม์ คือ CuZnSOD I, CuZnSOD II และ MnSOD (Kono *et al.*, 1979), ใบถั่วลันเตาพบ CuZnSOD ทั้งหมด 2 ไอโซไซม์ (Duke and Salin, 1983), เมล็ดข้าวโพด (*Zea mays*) พบ 4 ไอโซไซม์ คือ CuZnSOD 3 ไอโซไซม์ในไซโตซอล และ MnSOD ในไมโทคอนเดรีย (Baum and Scandalios, 1981)

1.9 กลไกการเกิดปฏิกิริยา

ในการเกิดปฏิกิริยาของทั้ง CuZnSOD, MnSOD และ FeSOD จะมีการเปลี่ยนระหว่าง Cu^{2+} กับ Cu^{+} และ Mn^{3+} กับ Mn^{2+} และ Fe^{3+} และ Fe^{2+} ในขณะเกิด ปฏิกิริยาดิสมิวเทชัน ดังสมการ

$$Enzyme\text{-}Cu^{2+} + O_2^{\cdot-} \rightarrow Enzyme\text{-}Cu^{+} + O_2$$

$$Enzyme\text{-}Cu^{+} + O_2^{\cdot-} + 2H^{+} \rightarrow Enzyme\text{-}Cu^{2+} + H_2O_2$$

ปฏิกิริยารวม $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^{+} \rightarrow H_2O_2 + O_2$

ในกรณีของ Mn^{3+} และ Fe^{3+} ก็จะเกิดปฏิกิริยาในลักษณะเดียวกับปฏิกิริยาของ Cu^{2+}

CuZnSOD และ MnSOD เร่งปฏิกิริยาด้วยอัตราเร็วใกล้เคียงกันที่ pH 7.0 แต่เมื่อ pH เพิ่มขึ้น ค่าคงที่อัตราเร็วปฏิกิริยา (rate constant) ของ CuZnSOD คงที่ แต่ของ MnSOD กลับลดลงเช่นเดียวกับ FeSOD มีค่าคงที่อัตราเร็วปฏิกิริยาต่ำที่สุดในบรรดา SOD ทั้งสามชนิด (Halliwell and Gutteridge, 1989) ค่าคงที่อัตราเร็วปฏิกิริยาของ MnSOD จากถั่วลันเตา, *E. coli* และ *Rhodopseudomonas spheroides* มีค่าใกล้เคียงกันคือ 1.61, 1.80 และ 1.72 X 10^{9} $M^{-1}s^{-1}$ ตามลำดับ (Sevilla *et al.*, 1982)

1.10 วิธีการหาความว่องไวของ SOD

ในปี ค.ศ. 1969 McCord และ Fridovich หาความว่องไวของ SOD เป็นครั้งแรกโดยการตรวจวัดทางอ้อม (indirect method) แต่เนื่องจาก $O_2^{\cdot-}$ เป็นโมเลกุลที่เกิดขึ้นและสลายตัวได้ง่ายมาก จึงยากที่จะหาเครื่องที่ตรวจและวัดปริมาณ $O_2^{\cdot-}$ ได้แม่นยำ (Fridovich, 1997) ต่อมามีการปรับปรุงวิธีการหา SOD โดยวัด $O_2^{\cdot-}$ โดยตรง (direct

method) มีความแม่นยำ แต่ยุ่งยาก ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง ไม่เป็นที่นิยม จึงมีการพัฒนาการตรวจวัดทางอ้อม ซึ่งมีข้อบกพร่องอยู่บ้าง ให้สะดวก และง่ายไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพงอีกด้วย ซึ่งในปัจจุบันนิยมใช้วิธีการตรวจวัดทางอ้อม กันอย่างแพร่หลาย

1.10.1 การหา SOD โดยวัด O_2^- โดยตรง

วิธีการวัด O_2^- โดยตรงจะมีวิธีการทำให้เกิด O_2^- โดยใช้ pulse radiolysis ซึ่งภายในเซลล์บรรจุสารละลาย โดยใช้ ionizing radiation ในช่วง 1-30 mega electron volt เป็นช่วงสั้น ๆ ด้วยเครื่องมือที่เหมาะสม เนื่องจาก O_2^- ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 250 นาโนเมตร แตกต่างจากสารตั้งต้น จึงใช้ติดตามการเกิดปฏิกิริยาในสภาวะที่เป็นด่าง เพราะปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเองต่ำ

1.10.2 การหา SOD ทางอ้อม

วิธีนี้มีตัวให้กำเนิดซูปเปอร์ออกไซด์ (superoxide generating system) ที่ให้ O_2^- ไปทำปฏิกิริยากับตัวจับ O_2^- และ SOD จะยับยั้งไม่ให้ O_2^- ไปทำปฏิกิริยากับตัวจับ O_2^- (Halliwell and Gutteridge, 1989) ตัวจับ O_2^- แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ 1) กลุ่มที่ถูกรีดิวซ์ เช่น NBT, adrenalin และ cytochrome c 2) กลุ่มที่ถูกออกซิไดส์ เช่น adrenalin 3) กลุ่มที่ออกซิไดส์และรีดิวซ์ได้เอง (autoxidation reduction) คือ 6-hydroxydopamine, pyrogallol, sulphite ion (SO_3^{2-}) และ adrenalin ในด่าง

การหาความว่องไวโดยทางอ้อมมีหลายวิธี แต่ละวิธีมีข้อจำกัดที่ แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของตัวอย่างที่จะหา SOD แต่มีข้อเสียคือ สารน้ำหนักโมเลกุลต่ำทำให้เข้าใจว่าเป็น SOD มากกว่าค่าที่ได้จากวิธีการวิเคราะห์โดยตรงโดย pulse radiolysis (Halliwell and Gutteridge, 1989) การหา SOD ในสารสกัดหยาบ มักจะถูกสารประกอบอื่น ๆ เช่น แอสคอเบต, กลูตาเมต, ไอออนของโลหะ, องค์ประกอบที่ส่งถ่ายอิเล็กตรอนในการสังเคราะห์แสง (photosynthetic electron transport component), กรดปาโมอิก (pamoic acid) (Lastra *et al.*, 1982; Halliwell and Gutteridge, 1989) ในตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ O_2^- ได้

ตัวอย่างวิธีการหาความว่องไวของ SOD โดยทางอ้อม ได้แก่

1) photochemical nitroblue tetrazolium (NBT) ใช้ Met และ riboflavin เป็นตัวให้ O_2^- โดยมี NBT เป็นตัวตรวจจับ O_2^- รีดิวซ์ NBT ให้เป็นฟอร์มาแซน (formazan) ซึ่งมีสีน้ำเงินวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร 1 หน่วย (U) หมายถึง ความสามารถของ SOD ในการยับยั้งรีดักชันของ NBT ได้ 50% (Beyer and Fridovich, 1987) วิธีนี้ไม่สามารถใช้ในการหา SOD ของเนื้อเยื่อตาได้ เพราะมีเอนไซม์อื่น ๆ ซึ่งสามารถไปรีดิวซ์ NBT ได้โดยตรง (Halliwell and Gutteridge, 1989)

2) xanthine/xanthine oxidase (XO)/cytochrome c ใช้ xanthine/XO เป็นตัวให้ O_2^- โดยมี cytochrome c เป็นตัวตรวจจับ โดย O_2^- ไปรีดิวซ์ออกซิไดส์ไซโตโครมซี วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร 1 หน่วย หมายถึง ความสามารถของ SOD ในการยับยั้งการรีดิวซ์ของไซโตโครมซี ได้ 50% (McCord and Fridovich, 1969a) ค่าความว่องไวที่ได้จากวิธีนี้ มีค่าสูงกว่าวิธี NBT ถึง 2.5 เท่า (Ravindranth and Fridovich, 1975)

1.11 กรดอะมิโนและการเรียงตัวของกรดอะมิโนใน SOD

Salin and Bridges, 1982 รายงานว่า FeSOD จากใบบัว มีปริมาณ Ser, Gly และ Met สูง แต่มี Thr, Ala และ Val ต่ำกว่า ใน FeSOD จากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ

การเรียงของลำดับกรดอะมิโนของ SOD ทั้ง 3 ชนิดคือ CuZnSOD, MnSOD และ FeSOD ไม่มีความคล้ายคลึงกัน (homology) (Steinman, 1978) Bowler, 1994 พบว่า FeSOD และ MnSOD มีความคล้ายคลึงกัน สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ CuZnSOD สอดคล้องกับการศึกษาโครงสร้างสามมิติโดยใช้เทคนิค x-ray crystallography แสดงว่า CuZnSOD มีต้นกำเนิดแตกต่างกับ MnSOD และ FeSOD นอกจากนี้ ลำดับกรดอะมิโนของ MnSOD ในแบคทีเรีย, พืช และสัตว์มีความคล้ายคลึงกันมาก แต่แตกต่างจาก CuZnSOD

สำหรับ CuZnSOD ในไซโตซอลของพืชชนิดเดียวกัน ถ้าต่างต้นกันมีการ เรียงตัวของกรดอะมิโนคล้ายกัน 90% ถ้าต่างชนิดกันมีความคล้ายกันอย่างน้อย 70% (Karpinska *et al.*, 2001)

Bowler *et al.*, 1994 พบว่าบริเวณที่นำเปปไทด์สู่เปอร์ออกซิโซม (peroxisomal targeting sequence; PTS) ของ FeSOD ตรงปลาย C (c terminal) มีการเรียงลำดับที่เหมือนกัน (consensus sequence) ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 3 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งแรกมีลำดับเป็น Ser (S), Ala (A) หรือ Cys (C) ส่วนตำแหน่งที่สองมีลำดับเป็น Lys (K), His (H) หรือ Arg (R) และตำแหน่งที่สามมีลำดับเป็น Leu (L) หรือ Met (M) ซึ่ง PTS ของ FeSOD ในยาสูบมีลำดับเป็น SRL, ส่วนใน อะราบิดอปซิสเป็น ARL และในถั่วเหลืองเป็น SRL ส่วน CuZnSOD ของคน, หนู และปลา เช่น ปลาดาบ และปลาฉลาม พบ SRL ทางด้านปลาย C ซึ่งทำหน้าที่คล้าย PTS สำหรับ CuZnSOD ในคลอโรพลาสต์ทุกชนิดรวมทั้งในใบสน มีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 18 เป็น Glu (Streller and Wingsle, 1994)

1.12 SOD กับวิวัฒนาการ

SOD สนับสนุนทฤษฎีที่ว่า ไมโทคอนเดรียมีวิวัฒนาการมาจากแบคทีเรีย *Paracoccus denitrificans* ซึ่งมี MnSOD และ ดำรงชีวิตร่วมกับสิ่งมีชีวิตชั้นสูงซึ่งมี CuZnSOD แล้วแทรกตัวเข้าไปในไซโตซอลและถูกห่อหุ้มอยู่ภายในเยื่อชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย เนื่องจาก *P. denitrificans* มีโครงสร้างและองค์ประกอบคล้ายกับไมโทคอนเดรีย ทั้ง MnSOD และ FeSOD เป็นเอนไซม์โบราณที่พัฒนามาจากบรรพบุรุษเดียวกัน ก่อนที่จะแยกเป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำและสูง ส่วน CuZnSOD พบในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ปลายยุค Precambrian หรือต้นยุค Cambrian (เมื่อ 600 ล้านปีที่ผ่านมา) (Bannister *et al.*, 1987) ซึ่ง Kitayama *et al.*, 1999 เสนอว่า MnSOD อาจแยกจาก FeSOD ก่อนที่จะมี cyanobacteria เกิดขึ้น Fridovich, 1989; Matsumoto *et al.*, 1991 รายงานว่าทั้ง CuZnSOD และ ECSOD มีวิวัฒนาการมาจากบรรพบุรุษเดียวกัน แตกต่างจาก MnSOD และ FeSOD

ในไซโตซอลของสาหร่ายสีแดงเซลล์เดียว ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตชั้นสูงที่โบราณที่สุด พบ MnSOD และพบ FeSOD ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินซึ่งมีวิวัฒนาการสูงที่สุด ไม่พบ CuZnSOD ในพืชน้ำ แต่พบในพืชบก เช่น มอส และ เฟิร์น (Lee *et al.*, 1981) ส่วน FeSOD ในพืช อาจเกิดจากการถ่ายยีน จากแบคทีเรียหรือสาหร่ายสู่พืชบางชนิด ลำดับกรดอะมิโนของ FeSOD ในพืชกับแบคทีเรียคล้ายกัน อย่างน้อย 20% แสดงว่ายีนที่สร้าง FeSOD อยู่ในคลอโรพลาสต์แล้วจึงเคลื่อนสู่นิวเคลียส และพบว่า FeSOD ในพืชและสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีลำดับกรดอะมิโน AAATQ (ลำดับที่ 125-129) และ QNRRPDYI (ลำดับที่ 201-208) ใน FeSOD ซึ่งไม่พบในแบคทีเรียที่ไม่สังเคราะห์แสงหลายตำแหน่ง (Bowler *et al.*, 1994)

SOD ในพืช สนับสนุนทฤษฎีการอยู่ร่วมกันโดยแทรกเข้าไป (endosymbiont) ในการกำเนิดของ ไมโทคอนเดรีย และคลอโรพลาสต์ เช่น พบเฉพาะ MnSOD ในไมโทคอนเดรีย และพบ FeSOD เฉพาะใน พลาสติด (*plastid*) แสดงว่ายีนที่ควบคุม SOD ทั้งสองแยกกันนานแล้ว (Bowler *et al.*, 1994) ลำดับกรดอะมิโนของ MnSOD ในพืช 3 ชนิดคือ ข้าวโพด, ยาสูบ และถั่วลันเตา มีลักษณะคล้ายกับ MnSOD ของแบคทีเรีย, ยีสต์ และ คน โดยการเรียงลำดับกรดอะมิโน บริเวณที่จับกับ Mn^{3+} คือ His26, His81 (*E. coli* His80), Asp175 และ His179 นอกจากนี้ได้มีการศึกษา MnSOD ในยาสูบ และถั่วลันเตา พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงสูงถึง 84% มากกว่า MnSOD ในข้าวโพด และลำดับกรดอะมิโนของ MnSOD จากพืชทั้งสามชนิดคือ ยาสูบ, ถั่วลันเตา และข้าวโพด มีความใกล้ชิดกับ MnSOD ในคนมากกว่า ยีสต์ และแบคทีเรีย

1.13 โครงสร้างสามมิติของ SOD

CuZnSOD มีโครงสร้างสามมิติที่เสถียร และทนความร้อนสูง อาจเนื่องจากส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ของโปรตีนมีส่วนช่วยทำให้มีความเสถียร CuZnSOD มี Val สูงและ Phe ต่ำ (Osatomi *et al.*, 2001) ในการศึกษาโครงสร้างสามมิติโดยใช้เทคนิค x-ray crystallography พบว่าหน่วยย่อยของ CuZnSOD แต่ละหน่วย ประกอบ

ด้วยแผ่นพลีทเบต้า (β-pleated sheet) ซึ่งมีลักษณะสวนทางกัน (antiparallel) ขด 8 รอบทำให้เกิดเป็นทรงกระบอกแบนและเกิดเป็นวง 3 วง โดยมีไอออนของทองแดงยึดกับไนโตรเจน ตรงวงแหวนอิมิดาโซล (imidazole ring) ของ Hisตำแหน่ง 44, 46, 61 และ 118 ซึ่งเป็นบริเวณเร่ง (active site) ส่วนไอออนของสังกะสี ยึดกับไอออนของทองแดงผ่านวงแหวนอิมิดาโซล ของ His61 และยึดกับ His69, His78 และหมู่คาร์บอกซิลของ Asp81 His61 อาจทำหน้าที่ยึดโลหะทั้งสอง โดยส่งโปรตอนให้แก่ไอออนของทองแดงในปฏิกิริยา (Halliwell and Gutteridge, 1989)

1.14 ปัจจัยที่มีผลต่อความว่องไวของ SOD

การเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์นั้น อัตราเร็วของปฏิกิริยา ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น pH, อุณหภูมิ, ตัวยับยั้งเอนไซม์หรือสารที่ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาช้าลง รวมทั้งสภาพแวดล้อม เช่น ปริมาณโลหะ, ความเค็ม

CuZnSOD จากเม็ดเลือดแดงของวัวจัดว่าเป็นเอนไซม์ที่มีความเสถียร ทนต่อการสกัดด้วยตัวทำละลาย tsuchihashi (ethanol 0.25 : chloroform 0.15 v/v) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาหลายชั่วโมง และ 10 M urea, 4% SDS, 6 M guanidine hydrochloride ไม่มีผลต่อความว่องไวของ SOD (McCord and Fridovich, 1969a) แต่ SOD ที่สกัดจากใบถั่วลันเตา ด้วยตัวทำละลาย tsuchihashi และตกตะกอนด้วย acetone จะสูญเสียความว่องไวทั้งหมด (Duke and Salin, 1983) การนำ CuZnSOD จากเม็ดเลือดแดงของวัวไปไดอะไลซ์ ใน 0.05 M sodium acetate buffer pH 3.8 ที่มี 1 mM EDTA ค้างคืน ความว่องไวของ SOD ลดลงถึง 85% (McCord and Fridovich, 1969a) CuZnSOD จากสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันจะเสียสภาพทางธรรมชาติได้เร็วช้าแตกต่างกันได้ เช่น CuZnSOD จากแมลงหวี่สูญเสียความว่องไวอย่างรวดเร็วเมื่อสกัดด้วย K_2HPO_4 ที่มีเอทานอลอยู่สูง (Lee *et al.*, 1981)

1.14.1 Cyanide (CN^-)

SOD ต่างชนิดกันจะถูกยับยั้ง โดยสารที่แตกต่างกัน เช่น CN^- ยับยั้ง CuZnSOD แต่ไม่ยับยั้ง FeSOD และ MnSOD ส่วน H_2O_2 ยับยั้ง CuZnSOD และ FeSOD แต่ไม่ยับยั้ง MnSOD จึงใช้ CN^- และ H_2O_2 เป็นตัวแยกความแตกต่างของ SOD ทั้งสามชนิดได้

SOD ในพืชวงศ์ขิงส่วนใหญ่ เป็นเอนไซม์ที่ทนต่อไซยาไนด์ (CN^-) (วัลลีและบุญรัตน์, 2536) H_2O_2 ยับยั้ง CuZnSOD อย่างรวดเร็วในสภาวะที่เป็นด่าง เนื่องจาก Cu^{2+} ถูกรีดิวซ์เป็น Cu^+ โดย Cu^+ และ H_2O_2 ทำให้เกิด OH^- ไปทำลาย His ซึ่งมีความสำคัญในการเร่งปฏิกิริยา เมื่อ Cu^+ หลุดออก เอนไซม์จะสูญเสียสภาพไป (Jewett *et al.*, 1999) H_2O_2 ยังยับยั้ง FeSOD ด้วย (Halliwell and Gutteridge, 1989)

1.14.2 Azide (N_3^-)

N_3^- เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันกับ O_2^- ในการจับกับ His46 และ His118 ที่บริเวณเร่งของ CuZnSOD N_3^- 10 mM ยับยั้งการทำงานของ CuZnSOD และ MnSOD เช่น ที่ pH 7.8 ได้ 10 และ 30% ตามลำดับ แต่ยับยั้ง FeSOD ได้ถึง 70% (Beaman *et al.*, 1983) FeSOD จาก *Methanobacterium bryantii* ต้องใช้ N_3^- 15 mM จึงจะยับยั้งได้ 50% (La Trant, 1983) ซึ่ง FeSOD ในสิ่งมีชีวิตอื่นใช้ N_3^- เพียงแค่ 4 mM (Kirby *et al.*, 1981)

1.14.3 Sodium dodecyl sulfate (SDS)

SDS ยับยั้งการทำงานของ SOD โดยทำลาย พันธะนอนโควาเลนท์ (noncovalent interaction) ทั้งหมด (Stryer, 1995) β-mercaptoethanol และ dithiothreitol (DTT) เป็นรีดิวซิ่งเอเจนท์ (reducing agent) ที่รีดิวซ์พันธะไดซัลไฟด์ ทำให้สายโพลีเปปไทด์ (polypeptide) ยืดออก ส่งผลให้รัศมีการหมุนของโมเลกุล (radius of gyration) เพิ่มขึ้น ทำให้เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ช้าลง (Beauchamp and Fridovich, 1973; Baum and Scandalios,1981) 1mM *p*-hydroxymercuribenzoate (PHMB) เป็นสารที่ทำปฏิกิริยากับ SH (sulhydryl reagent) ยับยั้ง MnSOD 92.4%

1.14.4 *o*-phenanthroline และ EDTA

o-phenanthroline และ EDTA เป็นตัวจับโลหะ (metal chelator) ทั้งคู่นอกจากยับยั้ง SOD ได้แล้ว (Sevilla *et al.*, 1982) ยังเป็นตัวยับยั้งวิถีเมทาบอลิสม โดย 1 และ 5 mM NaF ยับยั้ง SOD ในต้นถั่วเขียว 10 และ 40% ตามลำดับ (Wilde and Yu, 1998) นอกจากนี้ไดฟีนอล (diphenol) ยับยั้ง CuZnSOD โดยรีดิวซ์ Cu^{2+} ในบริเวณเร่งเป็น Cu^{+} (Halliwell and Gutteridge, 1989)

1.14.5 pH

pH มีผลต่อความว่องไวของ SOD พบว่าค่าความว่องไวของ CuZnSOD ใกล้เคียงกันในช่วง pH 7.8-10.2 ส่วนค่าความว่องไวของ MnSOD และ FeSOD ลดลงเมื่อสภาวะเป็นด่าง สอดคล้องกับ Barra *et al.*, 1986 ที่พบว่า ถ้า pH เกิน 10 ความว่องไวของ CuZnSOD จากวัวตัวผู้, หมู, แกะ และปลาฉลาม จะลดลง เนื่องจาก Lys ถูกดึงโปรตอนออก ยกเว้น MnSOD จากใบถั่วลันเตาซึ่งทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 8.6 แต่สูญเสียความว่องไวอย่างรวดเร็วที่ pH 4.1 (Sevilla *et al.*, 1982)

1.14.6 อุณหภูมิ

อุณหภูมิ มีผลต่อความว่องไวของ SOD พบว่าถ้าเก็บ FeSOD ที่บริสุทธิ์จากใบมัสตาร์ดในตู้เย็นเป็นเวลา 1 สัปดาห์พบว่าค่าความว่องไวจำเพาะ (specific activity) ลดลงครึ่งหนึ่ง (Salin and Bridges, 1980)

FeSOD จากแบคทีเรีย *Sulfolobus solfataricus* ซึ่งทนความร้อนได้ดี ความว่องไวของ FeSOD จะลดลงเพียงครึ่งเดียวเท่านั้นเมื่อทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 100 ^{o}C นาน 2 ชั่วโมง FeSOD นี้ไม่มี Cys แต่อัตราส่วนของกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ สูงกว่าค่าเฉลี่ยในสิ่งมีชีวิตทั่วไป (Dello *et al.*, 1997)

1.14.7 ความแรงของไอออน

ความแรงของไอออน (ionic strength) ที่สูงขึ้น จะมีผล ยับยั้งความว่องไวของ CuZnSOD แต่ผลของความแรงไอออนจะลดลงเมื่อเกิด acylation ของ Lys ในเอนไซม์ (Cudd and Fridovich, 1982)

1.15 ผลของสภาวะแวดล้อมต่อ SOD ในสิ่งมีชีวิต

สิ่งแวดล้อมมีผลต่อชนิดและปริมาณ ของ SOD ในสิ่งมีชีวิต เนื่องจากปริมาณโลหะ, ความเค็ม, อุณหภูมิ, แสง ล้วนทำให้เกิดความเครียดเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งไปกระตุ้นให้สิ่งมีชีวิต ผลิต O_2^- เพิ่มขึ้น แต่สิ่งมีชีวิตมีกลไกในการควบคุมปริมาณ ROS ให้อยู่ในระดับที่ปกติได้โดยการทำงานของ SOD

1.15.1 ปริมาณโลหะ

โลหะมีผลต่อชนิดของ SOD ในสิ่งมีชีวิต เช่น ในรา *Dactylium dendroides* ปกติ พบ CuZnSOD 80% และ MnSOD 20% แต่เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่ขาดทองแดงหรือ เติมตัวจับทองแดงลงไป จะมี MnSOD เพิ่มขึ้น ส่วนไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ขาดแมงกานีส มี CuZnSOD เพิ่มสูงขึ้น ในแบคทีเรีย *E. coli* พบทั้ง MnSOD และ FeSOD ในขณะที่แบคทีเรียบางชนิด เช่น *Bacillus cereus* พบเฉพาะ FeSOD และ *Streptococcus sanguis* พบเฉพาะ MnSOD แบคทีเรียบางชนิดซึ่งปกติมี FeSOD แต่ในสภาวะที่ขาดเหล็ก พบ MnSOD ได้เช่นกัน ในการสังเคราะห์ SOD ของแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* เริ่มจากอะโปเอนไซม์ (apoenzyme) ก่อนจะสังเคราะห์ เป็น MnSOD หรือ FeSOD ทั้งนี้ ขึ้นกับว่ามีไอออนของโลหะชนิดใดในอาหาร ซึ่งเหมือนกับ *Propionibacterium leiognathi* ที่อาจสังเคราะห์ FeSOD หรือ CuZnSOD ก็ได้ (Halliwell and Gutteridge, 1989)

1.15.2 ความเค็ม

ความเค็มกระตุ้นให้พืชสร้าง SOD เพิ่มขึ้น เห็นได้จากการทดลองเพาะเมล็ดถั่วเขียว (*Phaseolus aureus* Roxb.) ในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ส่วนในพันส่วน (ppt) พบว่าที่ระดับความเค็ม 6 ppt เป็นค่าความเค็มสูงกว่าดินเค็มถึง 2.5 เท่านั้นไม่มีผลต่อการงอก แต่การเจริญและพัฒนาของต้นกล้าช้าลง และส่วนของต้นกล้ามีแถบ SOD เพิ่มขึ้น (สุพร และคณะ., 2536)

1.15.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อจำนวนไอโซไซม์ในแบคทีเรีย กริช และคณะ, 2540 พบว่า *Chaetomium globosum* ซึ่งเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C แถบของ FeSOD I ไม่เปลี่ยนแปลงตามอายุ แต่ FeSOD II, MnSOD I และ MnSOD II เปลี่ยนแปลงตามอายุ โดย MnSOD I จะลดลงเมื่ออายุมากขึ้น และเมื่อเปลี่ยนมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35°C พบแถบ FeSOD I และ MnSOD I แต่ไม่พบแถบ FeSOD II และ MnSOD II ในทุกระยะการเจริญ

1.15.4 ฮอร์โมน

ฮอร์โมนมีผลต่อการสังเคราะห์ SOD โดยพบว่า ต้นถั่วเหลือง (*Glycine max*) ที่ขาดทั้ง ไซโตไคนิน (cytokinin) และออกซิน (auxin) มีการสังเคราะห์ FeSOD เพิ่มขึ้น (Kitayama *et al.*, 1999)

1.15.5 อาหาร

น้ำมันมะกอก มีผลต่อระดับ CuZnSOD และ MnSOD ในสมองหนูเพศเมีย ตั้งแต่แรกเกิดและอายุ 8, 15, 30, 45, 60 และ 75 วัน ที่ได้รับน้ำมันมะกอก พบว่าในหนูแรกเกิด CuZnSOD และ MnSOD ในสมองหนูจะลดลงเมื่อได้รับน้ำมันมะกอก แต่ถ้าให้น้ำมันมะกอกแก่หนูอายุ 8 วันผลของน้ำมันมะกอกต่อ SOD จะหายไป และถ้าหนูอายุ 15 วัน ได้รับน้ำมันมะกอกทั้ง CuZnSOD และ MnSOD จะลดลงอีกครั้ง, ในหนูอายุ 1 เดือนที่ได้รับน้ำมันมะกอกCuZnSOD เท่านั้นที่ลดลง และสำหรับหนูที่มีอายุ 45, 60 และ 75 วันน้ำมันมะกอกจะไม่มีผลต่อ CuZnSOD และ MnSOD แสดงว่าผลของน้ำมันมะกอกต่อ SOD ในสมองหนูที่แตกต่างกันตามอายุนั้น เนื่องจากความไวของ SOD ในเซลล์สมองหนูที่มีการเปลี่ยนแปลงตามการเจริญเติบโตและการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ (Peji *et al.*, 1999)

1.16 การศึกษา SOD ในระดับโมเลกุล

การศึกษาเรื่องราวของ SOD ในระดับโมเลกุล โดยถ่ายยีนที่เป็นรหัสของ SOD สู่ *E. coli* ซึ่งถูกทำให้ไม่มีความว่องไวของ SOD พบว่าทำให้ *E. coli* มีความสามารถในการสังเคราะห์ SOD ได้ มีการศึกษาลำดับของ cDNA สำหรับ CuZnSOD ในยีสต์ *Devaryomyces hansenii* ซึ่งเป็นยีสต์ที่พบในทะเล และศึกษาความสัมพันธ์ของยีน CuZnSOD ในกลุ่มยีสต์และสิ่งมีชีวิตอื่นรวมทั้งหมด 17 ชนิด (Hernandez-Saavedra, 1999) และยังมีการศึกษา cDNA ที่ เป็นรหัสของ CuZnSOD ในไซโตซอลของพืชหลายชนิดเช่น ข้าวโพด (Canon *et al.*, 1987,1989) และcDNA ที่ เป็นรหัสของ CuZnSOD ในคลอโรพลาสต์ของพืชหลายชนิดเช่น ถั่วลันเตา (Scioli *et al.*, 1988), เพทูเนีย (*Petunia hybrid* Linn.) (Tepperman *et al.*, 1988) Van Camp *et al.*, 1990 ได้ทำการแยก cDNA ที่เป็นรหัสของ FeSOD จากต้น *Arabidopsis thaliana* และยาสูบ (*Nicotiana plumbaginifolia*) ซึ่งเป็น SOD กลุ่มแรก Kaminaka *et al.*, 1999 ได้ศึกษา cDNA ของ FeSOD ในข้าว (*Oryza sativa* L. cv Nipponbare)

การศึกษาเรื่องราวของยีน การแสดงออกของยีน MnSOD ของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 พบว่าสามารถแยก cDNA ของ MnSOD ได้ 2 ชนิดซึ่งคล้ายกันมาก และเมื่อศึกษานิวเคลียร์ยีนของ MnSOD พบว่ามีอย่างน้อย 2 ยีน จากการศึกษาพบว่า มี mRNA ของ MnSOD ในเนื้อเยื่อทุกชนิด เช่น ใบอ่อนและแก่, ก้านอ่อนและแก่, ราก, น้ำยาง, และแคลลัสของใบยางพาราอ่อน พบว่าในแคลลัสและใบอ่อนอายุ 7 วัน มีการแสดงออกของยีนสำหรับ MnSOD มากที่สุดถึง 30-50 และ 4-6 เท่าตามลำดับเมื่อเทียบกับในใบแก่ นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำตาลซูโครส, สารเร่งน้ำยางและอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนสำหรับ MnSOD ในยางพารา RRIM 600 ได้ 3-5 เท่า MnSOD ในยาสูบ และยางพาราถูกชักนำด้วยน้ำตาล mannitol แต่เกลือ Murashige-Skoog จะชักนำให้มีการแสดงออกเฉพาะยางพารา (Miao and Gaynor, 1993)

1.17 การนำ SOD ไปประยุกต์ใช้

ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสเป็นเอนไซม์ที่มีประโยชน์ด้านต่าง ๆ เช่นทางการแพทย์, ด้านการเกษตรและอุตสาหกรรม

1.17.1 ในทางการแพทย์

SOD ถูกใช้ในการบ่งชี้ (marker) ความเสี่ยงของการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น พิการทางสมอง (Down Syndrome; DS), ธาลัสซีเมีย ได้ นอกจากนี้ยังช่วยทำให้การเก็บรักษาตัวอย่างของชิ้นส่วนของมนุษย์ให้นานและเสียหายน้อย ตลอดจนลดอาการไม่พึงประสงค์หลังการผ่าตัดหัวใจมนุษย์

1.17.1.1 การนำ SOD มาใช้ในการบ่งชี้ความเสี่ยงของโรค เช่น พบว่าในคนที่เป็นธาลัสซีเมียมีปริมาณ SOD ในเลือดสูงกว่าคนปกติประมาณ 2 เท่า (สุพัตรา และอุดม, 2536) นอกจากนี้ยังพบว่า SOD ในซีรัมของแม่ที่บุตรเป็น DS มี SOD สูงกว่ากลุ่มปกติ อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.001$) (Ognibene *et al.*, 1999) ในการศึกษาผู้ป่วยด้วยโรค familial amyotropic lateral sclerosis (FALS) และ sporadic amyotropic lateral sclerosis (SALS) ซึ่งเป็นโรคที่มีความผิดปกติของ motor neuron ส่งผลทำให้เกิดอาการชา และอาจถึงตายได้ พบว่า CuZnSOD มีความสัมพันธ์กับ FALS และ SALS (Johnston *et al.*, 2000)

MnSOD ยังช่วยจำแนกผู้ป่วย โรคเยื่อหุ้มปอด 2 ชนิด คือ malignant mesothelioma และ metastatic adenocarcinoma โดยผู้ป่วยที่เป็น mesothelioma พบ MnSOD สูงกว่าผู้ป่วยที่เป็น metastatic ซึ่งแทบไม่พบ MnSOD (Kahlos *et al.*, 2000) นอกจากนี้ Dr. Verspaget และคณะ ใช้ MnSOD ในการทำนายว่าจะมีชีวิตอยู่อีกนานเท่าใดของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer) พบว่า ถ้า MnSOD สูงกว่า 330 ng/mg protein ผู้ป่วยมีชีวิตอยู่ประมาณ 35.5 เดือน แต่ถ้า MnSOD ต่ำกว่า 330 ng/mg protein อยู่ได้นานถึง 64.5 เดือน (Reuters Health Information, http://www.wcn.org)

1.17.1.2 SOD ช่วยเก็บรักษาตัวอย่าง ไขกระดูกของคนที่เก็บไว้ที่ 4°C โดยทดลองแช่แข็งไขกระดูกของคนใน RPMI1640 ซึ่งเป็น hypothermic storage media ซึ่งมี 10% human AB serum และ SOD 6 U/ml พบว่าชุดที่เติม SOD มี % Recovery ของไขกระดูกมากกว่าชุดควบคุม (Ma *et al.*, 1998) นอกจากนี้ช่วยยืดอายุของเอนไซม์ human 5-lipoxygenase (5LO) ที่แยกได้จากคน ซึ่งปกติจะเสื่อมสภาพเร็ว พบว่าถ้าเติม SOD 1 μg/ml ลงไปใน 5LO 300-500 μg/ml ทำให้เก็บเอนไซม์ 5LO ได้นานอย่างน้อย 12 วันที่อุณหภูมิ 25°C (Zhang *et al.*, 1994)

1.17.1.3 SOD ช่วยลดอาการไม่พึงประสงค์หลังผ่าตัด (cardiac dysfunction) เนื่องจากปริมาณ O_2^- ที่เพิ่มขึ้นหลังจากการผ่าตัด cardiopulmonary bypass (Prasad *et al.*, 1996)

1.17.1.4 ยารักษาโรค

ปรสิตหลายชนิดอยู่ในคนได้เพราะไปยับยั้งการสร้าง O_2^- ของแมคโครฟาจ (macrophage) หรือสร้าง SOD มาต่อต้านต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย แต่ SOD ในปรสิตเป็นคนละชนิดกับในคน เช่น เชื้อที่ทำให้เกิดไข้มาลาเรีย มีการขับ ECSOD ขนาด 30,000 ดาลตัน (Hong *et al.*, 1992) การยับยั้ง SOD ของปรสิต ทำให้ปรสิตทนต่อระบบภูมิคุ้มกันของคนไม่ได้ และตายในที่สุด นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในการกำจัดเซลล์มะเร็ง โดยทำให้เกิดพิษ เนื่องจาก O_2^- ซึ่งมีความเฉพาะในการทำลายองค์ประกอบและชนิดของเซลล์มะเร็ง เช่น benzo (c) fluorene antineoplastic agent (Horakova *et al.*, 2001) 2-methoxyestradiol (2-ME) เป็นยารักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ยับยั้ง SOD โดยไม่มีผลต่อเซลล์ปกติ ซึ่งเป็นประโยชน์เพราะ เมื่อ SOD ลดลงทำให้ ROS เพิ่มขึ้น ทำให้ลิวคีเมีย (leukemia) ถูกทำลายมากขึ้น (OncoLink Cancer News, http://www.oncolink.upenn.edu)

1.17.2 ทางด้านการเกษตร

การศึกษาเปรียบเทียบความไม่ชอบน้ำ และขนาด ของเอนไซม์ SOD ในแบคทีเรียพบว่ามีความสัมพันธ์โดยตรงกับการทนความร้อนและความเค็ม โดย FeSOD จาก *Sulfolobus solfataricus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทนความร้อนและความเค็ม มี

อัตราส่วนของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ และ สูงกว่าค่าเฉลี่ยทั่วไปแล้วยังพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้มี FeSOD สูงกว่าแบคทีเรียทั่วไป จึงมีความคิดที่จะนำ FeSOD จากแบคทีเรียชนิดนี้ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนเค็มต่อไปในอนาคต (Dello *et al.*, 1997)

1.17.3 ทางด้านอุตสาหกรรม

อุตสาหกรรมอาหารกระป๋องเพื่อการส่งออก มักมี ROS เกิดขึ้น เนื่องจากสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการขนส่ง ทำให้อาหารเน่าเสีย SOD จะยับยั้งการเน่าเสียนี้ได้ (Donnelly *et al.*, 1989 อ้างโดย Ochoa *et al.*, (1995)) SOD ส่วนใหญ่ที่ใช้ในทางการค้าสกัดมาจากเลือด, ตับวัว,ยีสต์ และจุลินทรีย์อื่น ๆ เช่น *Debaryomyces hansenii* ซึ่งพบทั่วไปในน้ำทะเล, พืชน้ำและสัตว์น้ำ (Ochoa *et al.*, 1995) และ SODยังเป็นส่วนประกอบของแชมพูเพื่อช่วยลดการร่วงและเร่งให้ผมยาวเร็วขึ้น (Picard, 1995)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาว่า ใบยางแก่และอ่อนจะมีซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสแตกต่างกันหรือไม่ เพื่อจะได้นำมาใช้ในการสกัดซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส เพื่อทำให้บริสุทธิ์ต่อไป
2. เพื่อศึกษาการทำให้ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสบริสุทธิ์จากใบยางพาราโดยวิธีการทางชีวเคมี
3. เพื่อศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสบริสุทธิ์ที่แยกได้

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิด Analytical Grade ที่สั่งซื้อจากบริษัทต่าง ๆ ดังนี้

ลำดับที่	สารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	บริษัท
1	Acrylamide (C_3H_5NO)	71.08	Fluka
2	Ammonium sulfate $(NH_4)_2SO_4$	132.14	MERCK
3	Ammonium persulfate $(NH_4)_2S_2O_8$	228.7	Fluka
4	Bovine serum albumin (BSA)	67,000	SIGMA
5	Bromophenol blue	-	SIGMA
6	Carboxymethyl cellulose (Cation exchanger)	-	SIGMA
7	Carboxymethyl cellulose (Sodium salt)	-	SIGMA
8	Coomassie brilliant blue G	854.0	SIGMA
9	Coomassie brilliant blue R 250 ($C_{45}H_{44}N_3O_7S_2Na$)	826.0	SIGMA
10	Copper sulfate pentahydrate ($CuSO_4.5H_2O$)	249.68	Fluka
11	Cytochrome c	12,384	SIGMA
12	DEAE-Sephacel	-	SIGMA
13	EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2.2H_2O$)	372.24	Fluka
14	Folin & Ciocalteau's phenol reagent	70.07	SIGMA
15	HEPES ($C_8H_{18}N_2O_4S$)	238.3	SIGMA
16	Hydrogen peroxide (H_2O_2)	34.02	Fluka
17	Hydrogen phosphate (KH_2PO_4)	136.1	SIGMA
18	β-mercaptoethanol (C_2H_6OS)	78.13	MERCK
19	L-Methionine ($C_5H_{11}NO_2S$)	149.2	SIGMA
20	Nitroblue Tetrazolium (NBT) ($C_{40}H_{30}Cl_2N_{10}O_6$)	817.6	SIGMA

ลำดับที่	สารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	บริษัท
21	N,N′-Methylene-bis-Acrylamide ($C_4H_{10}N_2O_2$)	154.17	Fluka
22	N,N,N′,N′-Tetramethylethylenediamine($C_6H_{16}N_2$)	116.21	Fluka
23	Phenazine methosulfate ($C_{13}H_{11}N_2.CH_3SO_4$)	306.3	SIGMA
24	Potassium phosphate (KH_2PO_4)	372.24	SIGMA
25	Riboflavin (Vitamin B_2) ($C_{17}H_{20}N_4O_6$)	376.37	BDH
26	Sephadex G-75	-	SIGMA
27	Sephadex G-100	-	SIGMA
28	Sodium dodecyl sulfate (SDS) ($C_{12}H_{25}O_4SNa$)	288.38	Riedel-deHaen
29	Sodium tetraborate ($Na_2B_4O_7.10H_2O$)	381.4	SIGMA
30	Triton X-100	-	USB
31	Tris (hydroxymethyl) aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$)	121.1	SIGMA
32	Urea (CH_4N_2O)	60.06	SIGMA
33	Xanthine ($C_5H_4N_4O_2$)	152.1	SIGMA
34	Xanthine oxidase	-	SIGMA

อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ส่วนใหญ่เป็นอุปกรณ์ของห้อง PR. 422 ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ดังต่อไปนี้

1. Automatic fraction collector : Biorad 2110
2. Centrifuge : Beckman TJ-6
3. Micropipette : Eppendorf
4. Peristaltic pump : Eyela MP-3
5. Power supply : Biorad 1000/500
6. Refrigerated superspeed centrifuge : Beckman JA-21
7. Refrigerator : Sanyo SR-F152
8. Refrigerator deep freezer (-20 ^{o}C) : Sanyo SF-C65
9. Refrigerator deep freezer (-70 ^{o}C) : Ravco Ult2186-7-UBA
10. Slab gel electrophoresis apparatus : Atto, Hoefer Scienctific Instruments
11. UV-VIS Spectrophotometer : Shimadzu 160A