บทนำ

วงจรการลอกคราบของสัตว์พวกปูและกุ้ง (crustacean) ถูกแบ่งออกเป็น 5 ระยะหลัก (ระยะ A, B, C, D และ E) และอีกหลายระยะย่อย (Drach, 1939; Skinner, 1962) ดังได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย การลอกคราบของสัตว์ในกลุ่ม Crustacean ถูกควบคุมด้วยระบบฮอร์โมน ฮอร์โมนที่มากระตุ้นให้เกิดการลอกคราบ คือกลุ่มฮอร์โมน ecdysteroids หรือ ecdysone ซึ่งสังเคราะห์มาจากโคเลสเตอรอล (Cholesterol) ใน Y-organ (Carlisle, 1957; Charmantier and Trilles, 1973; 1979; Chaix et al., 1976) และหลั่งออกสู่ระบบเลือด เพื่อไปออกฤทธิ์ยังอวัยวะเป้าหมายทั่วร่างกาย เช่น เปลือก ผิวหนัง และตับ เป็นต้น การหลั่ง ecdysone ของ Y-organ จะถูกยับยั้งโดย molt-inhibiting hormone (MIH) จาก X-organ (Keller and Schmid, 1979; Soumoff and O'Connor, 1982) ทุกวงจรการลอกคราบขนาดของสัตว์ก็จะเพิ่มขึ้น ดังนั้นอัตราการเจริญเติบโตของสัตว์พวก Crustacean นี้จึงขึ้นอยู่กับความถี่หรือจำนวนครั้งของการลอกคราบ

มีรายงานว่าตลอดวงจรการลอกคราบอวัยวะต่าง ๆ ภายในร่างกายของ crustacean มีการเปลี่ยนแปลงทั้งด้านโครงสร้าง (structures และ microstructures) และองค์ประกอบทางชีวเคมี (intracellular biochemistry) โครงสร้างในระบบทางเดินอาหารที่ถูกรายงานว่ามีการเปลี่ยนแปลงตลอดวงจรการลอกคราบ ได้แก่ ความยาวและการจัดเรียงตัวของ microvilli ของ epithelial cells ในลำไส้ส่วนกลาง (midgut) และ axial filaments ในแกนกลางของ microvilli ของกุ้งน้ำจืด *Cardina denticulate* (Miyawaki and taketomi, 1984), และระดับความเข้มข้นของ gastrin/cholecystokinin-like peptides ที่พบในกระเพาะอาหารของกุ้งทะเล *Palaemon serratus* (Favrel et al., 1987) นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ในเนื้อเยื่อตับ (hepatopancreas) ของกุ้งทะเล *Palaemoneles argentinus* และ *Artemesia longinaris* มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (cell morphology) และโครงสร้างภายในเซลล์ (ultrastructures) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างรูปร่างที่พบในระยะ premolt (D1) และในระยะ postmolt (A) ยิ่งไปกว่านี้ยังพบว่าปริมาณการสะสมของ mucopolysaccharides และ glycogen ในเนื้อเยื่อตับมีมากขึ้นในระยะก่อนการลอกคราบ (premolt) proteolytic activity สูงสุดในระยะหลังการลอกคราบ (postmolt) และ trypsin และ chymotrypsin activities สูงสุดในระยะระหว่างการลอกคราบ (intermolt) (Fernandez et al., 2001; Sousa and Petriella, 2001) ระดับของฮอร์โมนในระบบต่อมไร้ท่อ (neuroendocrine) ที่ถูกรายงานว่ามีการเปลี่ยนแปลงตลอดวงจรการลอกคราบ ได้แก่ serotonin (5-hydroxytryptamine ; 5-HT) analogue ใน organ of Bellonci ในก้านตา (eyestalk) ของกุ้ง *Palaemon serratus* (Bellon-Humbert and Van Herp, 1988) Bursicon hormone ซึ่งมีการหลั่งออกมามากในระยะ postmolt สัมพันธ์กับการเกิด sclerotization (tanning) ของเปลือกใหม่ ecdysone (molt-stimulating

hormone) ซึ่งพบว่าเพิ่มมากขึ้นในระยะก่อนการลอกคราบ (premolt) ของกุ้งกลุ่ม Palaemonetes (Hubschman and Armstrong, 1972) การเปลี่ยนแปลงในระบบไหลเวียนเลือดและน้ำเหลือง (haemolymph) ที่พบตลอดวงจรการลอกคราบ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ gastrin/cholecystokinin-like peptides ของกุ้งทะเล *Palaemon serratus* (Favrel et al., 1987) การเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาล โปรตีน และ pH ของกุ้ง *Penaeus monodon* (Supamattaya et al., 2000) และความแตกต่างของอัตราส่วนระหว่าง cholesterol และ desmosterol ของกุ้ง *Palaemon serratus* Pennant (Teshima et al., 1975) การเปลี่ยนแปลงในระบบห่อหุ้มร่างกาย (Integumentary system) ตลอดวงจรการลอกคราบ ได้แก่ ลักษณะโครงสร้าง และ องค์ประกอบของสารอนินทรีย์ในเปลือก (กระดอง) ของปูทะเล *Scylla serrata* ในระยะหลังการลอกคราบ (postmolt) จากระยะ A ไประยะ B ทั้งนี้พบว่าการสะสมของเกลืออนินทรีย์ในกระดองปูนี้เกิดขึ้นสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงสมดุลย์ของปริมาณการแสดงออก (gene expression) ของ α-chitin และ β-keratin (Pratoomchat et al., 2002b) มีรายงานเพิ่มเติมว่าการสะสมของเกลือแคลเซียม (calcification) ในเนื้อเยื่อผิวหนังในระยะหลังการลอกคราบ (postmolt) ถูกควบคุมโดย DD9A และ DD9B genes พบใน epithelial cells ของแพนหาง (tail fan) ของกุ้ง *Penaeus japonicus* (Watanabe et al., 2000) และ การแสดงออกของ mRNA ของ chitinase protein หรือ Pjchi-2 ในเปลือกและเนื้อเยื่อผิวหนัง ซึ่งเพิ่มมากขึ้นในระยะก่อนการลอกคราบ (premolt) และ ลดลงในระยะระหว่างการลอกคราบ (intermolt) ดังนั้นจึงเชื่อว่า Pjchi-2 มีบทบาทสำคัญต่อกลไกการลอกคราบ (Watanabe and Kono, 1997)

จะเห็นว่าการศึกษาในอดีต ได้ให้ความสำคัญต่อความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดการลอกคราบ (ของสัตว์หลากหลายสปีชีส์ (species) ในกลุ่ม crustacean) กับ การแสดงออกของสารพันธุกรรมและโปรตีนชนิดต่างๆ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอวัยวะต่างๆ องค์ประกอบของสารอินทรีย์และอนินทรีย์ในเปลือกและเนื้อเยื่อผิวหนัง และระบบฮอร์โมนที่มาควบคุมการลอกคราบ ผลของการศึกษาเหล่านี้ทำให้มีการเริ่มต้นเข้าใจถึงกลไกการเกิดการลอกคราบในเชิงลึก อย่างไรก็ตามยังมีความไม่รู้และคำถามอีกมากมายที่ยังไม่ได้ทำการศึกษาและต้องการคำตอบ

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งทำให้ภาพรวมของกลไกการลอกคราบในเชิงลึกของสัตว์ในกลุ่ม crustacean มีความชัดเจนขึ้น (การศึกษาครั้งนี้จะทำการศึกษาในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ซึ่งเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจของประเทศไทย) ทั้งนี้คาดว่าภาพรวมของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบจะถูกค้นพบด้วยการใช้เทคนิคการแยกโปรตีนแบบ two dimensional SDS-PAGE และ คุณสมบัติของโปรตีนจะถูกศึกษาด้วยวิธีทาง proteomics นอกจากนี้ยังจะศึกษาถึงโครงสร้างอย่างละเอียดของเนื้อเยื่อผิวหนังที่เปลี่ยนแปลงไปตามวงจรการลอกคราบ โดยการใช้วิธีทาง histochemistry เพื่อศึกษาลักษณะของเซลล์ (cell morphology) ของเนื้อเยื่อผิวหนังที่เปลี่ยนแปลงในแต่ละ

ระยะของวงจรการลอกคราบ และ ศึกษาโครงสร้างภายในเซลล์ของเนื้อเยื่อผิวหนัง (ultra-structures) ที่เปลี่ยนแปลงไปตามบทบาทของเนื้อเยื่อผิวหนังในแต่ละระยะของการลอกคราบ ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนในกลุ่มสัตว์ crustacean