



อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระในปู

ภัทราวดี ศรีมีเทียน^{1, #}¹คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ อ. เมือง จ. นราธิวาส 96000

บทคัดย่อ: อนุมูลอิสระสามารถทำลายสารชีวโมเลกุลในเซลล์ของปู ได้แก่ DNA, RNA โปรตีน และไขมัน อนุมูลอิสระ เช่น superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) hydroxyl ($\bullet OH$) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) อนุมูลอิสระในปูเกิดขึ้นได้จากกระบวนการ metabolism เช่น การหายใจ และการลอกคราบ นอกจากนี้อนุมูลอิสระในปูเกิดจากการกระบวนการทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม เช่น แบคทีเรีย ไวรัส สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และโลหะหนัก อนุมูลอิสระสามารถถูกกำจัดได้ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase และ glutathione

คำสำคัญ: อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ ปู

#ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2563. 15(2): 245-257.

E-mail address: srimeetian1212@gmail.com

Free Radicals and Antioxidants in Crabs

Pattarawadee Grimeetian^{1,#}

¹Faculty of Agriculture, Princess of Naradhiwas University, Naradhiwas 96000, Thailand

Abstract: Free radicals can cause damage biomolecule of crab cells such as DNA, RNA, proteins and lipids. Superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) hydroxyl ($\bullet OH$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) are some of free radicals. The occurrence of free radicals in crabs are produced in process of metabolism (such as respiration and molt cycle). Moreover, the free radicals are produced in the processes to eliminate the pathogens and xenobiotic (such as bacteria, virus, cyanobacteria and heavy metals). Free radicals are inhibited by antioxidants such as superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione.

Keywords: Free radicals, Antioxidants, Crabs

#Corresponding author

J. Mahanakorn Vet. Med. 2020 15(2): 245-257.

E-mail address: grimeetian1212@gmail.com

บทนำ

อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจนที่มีพิษต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยอนุมูลอิสระสามารถเข้าทำลายสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ ได้แก่ DNA, RNA โปรตีน และไขมัน เป็นต้น ซึ่งอนุมูลอิสระทำให้โปรตีนเสียสภาพ ส่งผลให้สารภายในร่างกายที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ เช่น เอนไซม์ที่มีบทบาทในการเร่งปฏิกิริยาต่างๆ และโปรตีนซึ่งทำหน้าที่ในการขนส่งสารต่างๆ ภายในร่างกายไม่สามารถทำงานได้ตามปกติหรือมีประสิทธิภาพการทำงานลดลง เมื่อโปรตีนเสื่อมสภาพลงทำให้การเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์เสื่อมลงไป (Michael and Dariush, 2006) การทำลาย DNA ของอนุมูลอิสระนั้นซึ่งอนุมูลอิสระทำให้โครงสร้างของ DNA เปลี่ยนแปลงไป โดยทำให้การจับคู่เบสของ DNA ผิดไป Wang et al. (2011) รายงานว่าอนุมูลอิสระสามารถทำลาย DNA

fragmentation และทำให้ DNA แตกหัก (DNA strand breaks) (Luqing and Zhang, 2006) อนุมูลอิสระยังทำให้การจัดเรียงตัวของ nucleotides ผิดไปด้วย เป็นผลให้ nucleotides บางส่วนเพิ่มขึ้นหรือลดลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของ DNA เหล่านี้ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) นั้นเอง นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังสร้างความเสียหายแก่ไขมันซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของ cell membrane โดยอนุมูลอิสระเข้าทำลายไขมันทำให้มีปฏิกิริยา lipid peroxidation (LPO) เกิดขึ้น ซึ่ง LPO ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพหรือเสียหายของ cell membrane (Hermes-Lima et al., 1995)

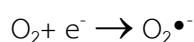
อนุมูลอิสระได้สร้างความเสียหายให้สารชีวโมเลกุลทำให้เซลล์เกิดความเสียหายตามไปด้วย โดยความเสียหายที่เกิดขึ้นนี้ทำให้เซลล์ตกอยู่ในภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งเป็นภาวะที่เซลล์ได้รับบาดเจ็บหรือถูกทำลาย ส่งผลให้เซลล์ตาย (cell

death) (Halliwell and Gutteridge, 1998) ทั้งแบบ necrosis และ แบบ apoptosis (Wang et al., 2011) ภาวะเครียดออกซิเดชันเป็นสาเหตุให้เกิดความเสียหายต่อการทำงานของเนื้อเยื่อ เช่น สูญเสียความยืดหยุ่น เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งการทำงานของ receptors บนผิว membrane รวมถึงการเปลี่ยนแปลง ion channel และการซึมผ่าน (permeability) ของ Ca^{2+} (Lombardi et al., 1991) เป็นต้น ส่งผลให้การทำงานของอวัยวะต่าง ๆ ล้มเหลวลง (multiple-system organ failure) (Griswold et al., 1993) ดังนั้นเพื่อให้เซลล์คงอยู่ในภาวะเครียดออกซิเดชัน เมื่อมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นร่างกายจึงสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) เพื่อยับยั้งและทำลายอนุมูลอิสระ โดยสารต้านอนุมูลอิสระทำหน้าที่ในการปกป้องเซลล์และรักษาสมดุลของอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Sies, 1993; Sole et al., 1998) สารต้านอนุมูลอิสระเข้าทำลายอนุพันธ์ของอนุมูลอิสระจากสารที่มีพิษให้เป็นสารที่ไม่มีพิษต่อเซลล์ (Halliwell and Gutteridge, 1998) อนุมูลอิสระเกิดจากกระบวนการต่างๆ ที่มีการใช้ออกซิเจนภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ปุก็เช่นเดียวเป็นสัตว์ในกลุ่ม crustacean ที่มีกระบวนการต่างๆ ภายในร่างกายที่มีการใช้ออกซิเจน เช่น กระบวนการ metabolism และกระบวนการทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย ซึ่งกระบวนการต่างๆ เหล่านี้ล้วนก่อให้เกิดอนุมูลอิสระภายในร่างกายของปู

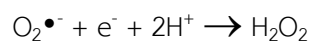
อนุมูลอิสระ (Free radicals)

อนุมูลอิสระเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ (Guzman and Solter, 1999) เช่น superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hydroxyl ($\bullet\text{OH}$) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) เป็นต้น

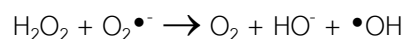
อนุมูลอิสระ $\text{O}_2^{\bullet-}$ เกิดจากการรับอิเล็กตรอน (e^-) เพิ่มเข้ามาในปฏิกิริยา reduction ของออกซิเจน (O_2) ดังสมการ



อนุมูลอิสระ H_2O_2 เกิดขึ้นได้ดังสมการ (Griswold et al., 1993)



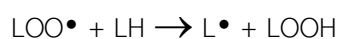
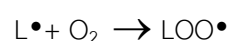
อนุมูลอิสระ $\bullet\text{OH}$ เกิดได้จาก 2 ปฏิกิริยาดังกล่าว คือ ปฏิกิริยา Haber-Weiss ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่าง H_2O_2 และ $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Michael and Dariush, 2006) ดังสมการ



และปฏิกิริยา Fenton ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาการ oxidation ระหว่าง H_2O_2 และเหล็ก (Fe) ดังสมการ



อนุมูลอิสระก่อให้เกิดปฏิกิริยา LPO ซึ่ง LPO เป็นปฏิกิริยาที่อนุมูลอิสระเข้าทำลายไขมันชนิดต่างๆ เช่น triglyceride, diglyceride และ phospholipid รวมถึงกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid; PUFAs) เช่น linoleic acid, linolenic acid และ arachidonic acid ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของ cell membrane การเกิด LPO ทำให้เซลล์คงอยู่ในภาวะเครียดออกซิเดชัน กระบวนการเกิดปฏิกิริยาของ LPO เกิดขึ้นได้ดังต่อไปนี้ เมื่อมีอนุมูลอิสระเข้ามาทำปฏิกิริยากับไขมัน (autooxidation of lipid; LH) ทำให้เกิด fatty acid radical ($\text{L}\bullet$) เมื่อมี $\text{L}\bullet$ เกิดขึ้นแล้วทำปฏิกิริยากับ O_2 ได้ผลิตภัณฑ์เป็น fatty acid peroxy radical ($\text{LOO}\bullet$) เมื่อ $\text{LOO}\bullet$ ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของไขมันอื่น ทำให้ได้ผลผลิตเป็น lipid hydroperoxides (LOOH) และ LOOH สามารถแตกปฏิกิริยาออกได้สาร aldehydes ดังสมการ (Jeejeebhoy, 1991)



ปฏิกิริยา LPO ที่เกิดขึ้นทำให้ได้สารประกอบพวก reactive carbonyl compounds เช่น malondialdehyde ซึ่งสารประกอบนี้เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญถึงภาวะที่เซลล์หรือเนื้อเยื่อของสัตว์ได้รับความบาดเจ็บหรือเกิดภาวะเครียดออกเดชั่น โดยอาจกล่าวได้ว่า LPO เป็นดัชนีบ่งชี้ปริมาณของอนุมูลอิสระได้ (Esterbauer et al., 1991) Hermes-Lima et al. (1995) รายงานว่า LPO เป็นหนึ่งในตัวหลักที่สร้างความเสียหายให้แก่เซลล์ ซึ่ง LPO สามารถบอกถึงปริมาณของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้

การเกิดอนุมูลอิสระในปู

อนุมูลอิสระเกิดจากกระบวนการต่างๆ ที่มีการใช้ออกซิเจนภายในร่างกายของปู เช่น กระบวนการ metabolism และกระบวนการทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายปู เป็นต้น

การเกิดอนุมูลอิสระจากกระบวนการ metabolism ซึ่งกระบวนการ metabolism คือ กระบวนการทางเคมีที่เปลี่ยนอาหารให้เป็นพลังงานภายในเซลล์ ซึ่งเป็นกระบวนการที่ต้องอาศัยออกซิเจนเข้ามามีส่วนช่วยในกระบวนการนี้ด้วย จึงทำให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นจากกระบวนการ metabolism ต่างๆ ภายในร่างกาย (Kashiwagi et al., 1997) พลังงานที่ได้จากกระบวนการ metabolism ถูกนำไปใช้ในกิจกรรมการทำงานต่างๆ เช่น การกินอาหาร การหายใจ การไหลเวียนเลือด การขับของเสีย การลอกคราบเพื่อการเจริญเติบโต และการเคลื่อนที่เคลื่อนไหว เป็นต้น Carolina et al. (2007) ศึกษา muscle ของปูชนิด *Paralomis granulosa* โดยแบ่งปูออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ให้ปูอยู่ในน้ำทะเลซึ่งปูสามารถเคลื่อนที่ในน้ำอย่างคล่องแคล่วและปราดเปรียวได้ตามปกติ กลุ่มที่ 2 นำปูไปวางไว้บนที่แห้ง (aerial exposure) ซึ่งปูเคลื่อนที่บ้างแต่ไม่ค่อยมากส่วนใหญ่นั่งนิ่งๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าหลัง 3 ชั่วโมง ปูกลุ่มที่ 1 มีกิจกรรมของ LPO ใน muscle สูงกว่าปูกลุ่มที่ 2 เนื่องมาจากกลุ่มที่ 2 ปูมีการเคลื่อนที่น้อย

จึงทำให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นน้อย แต่กลุ่มที่ 1 ปูมีการเคลื่อนที่เคลื่อนไหวมากจึงทำให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นเพิ่มขึ้นด้วย โดยระหว่างการทำงานของกระบวนการ metabolism ทำให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก

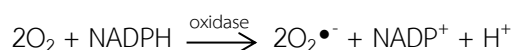
กระบวนการ metabolism แบ่งออกเป็น 2 กระบวนการด้วยกัน กระบวนการแรก คือ กระบวนการสลาย (catabolism) ซึ่งเป็นกระบวนการทางเคมีที่สลายส่วนประกอบหรือสารอาหารของอาหารที่บริโภคเข้าไป เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน เป็นต้น กระบวนการนี้สลายสารอาหารที่มีโมเลกุลใหญ่ให้อยู่ในรูปแบบพลังงานที่พร้อมนำไปใช้เพื่อเสริมสร้างการเจริญเติบโตหรือซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของร่างกาย ส่วนกระบวนการที่ 2 คือ กระบวนการสร้าง (anabolism) กระบวนการนี้ต้องนำพลังงานที่ได้จากการบริโภคอาหารมาใช้ หากได้รับพลังงานที่ร่างกายต้องการในแต่ละวันมากเกินไป ร่างกายนำสารอาหารส่วนเกินมาเก็บสะสมในรูปของไขมัน โดยปูมีการสะสมพลังงานไว้ใน hepatopancreas ซึ่ง hepatopancreas นับเป็นแหล่งของพลังงานสำรองและเป็นอวัยวะที่มีการสะสมสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ต่างๆ รวมถึงเป็นอวัยวะที่มีกระบวนการเผาผลาญพลังงานสูงของปู (Adalto and Monserrat, 2007) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวก่อให้เกิดอนุมูลอิสระเกิดขึ้น Phillips et al. (1997) รายงานว่า hepatopancreas นั้นเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ metabolism และยังทำหน้าที่ในการสะสมสารอาหาร เช่น ไกลโคเจน และไขมัน (Verri et al., 2001) Chang (1995) รายงานว่าปูสะสมอาหารไว้ใน hepatopancreas เพื่อเก็บไว้ใช้เป็นพลังงานสำรอง Adalto and Monserrat et al. (2007) และ Pinho et al. (2003) รายงานว่าอนุมูลอิสระก่อให้เกิดกิจกรรม LPO เพิ่มขึ้นใน hepatopancreas ของปูชนิด *Chasmagnathus granulatus* โดย LPO เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงปริมาณของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น Arun and Subramanian (1998) กล่าวว่า hepatopancreas ของ

สัตว์กลุ่ม crustacean เป็นอวัยวะที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นมากที่สุด เช่นเดียวกับ Luqing and Zhang (2006) รายงานว่าในปูชนิด *Charybdis japonica* พบ $O_2^{\bullet-}$ สูงใน hepatopancreas

ปูมีการเจริญเติบโตโดยการลอกคราบ ปูมีการลอกคราบตลอดทั้งปีและตลอดชีวิต ซึ่งปูมีระยะในการลอกคราบ 3 ระยะด้วยกัน คือ ระยะปูกระดองแข็งปกติ ระยะก่อนการลอกคราบ และระยะหลังการลอกคราบ (Strimeetian, 2010) โดย Ana et al. (2003) กล่าวว่า metabolism เป็นกระบวนการการเผาผลาญพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างเนื้อเยื่อในตัวอ่อนระยะ adults ของปูชนิด *Palaeomonetes argentinus* และชนิด *Carcinus maenas* ซึ่งทำให้มีอนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการเจริญเติบโต ส่วน Skinner (1962) อธิบายว่าในระยะก่อนการลอกคราบเนื้อเยื่อกระดองชั้น epidermis มีปริมาณ O_2 สูง โดยผลของกระบวนการต่างๆ ที่มีการใช้ O_2 ทำให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นเพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้ในระยะก่อนการลอกคราบบริเวณใต้กระดองยังมีการย่อยและดัดสารที่เป็นอนุพันธ์ของไคตินจากกระดองเก่าไปใช้เพื่อสร้างกระดองใหม่ จึงทำให้ปูในระยะนี้มีกระดองที่เปราะบาง และแตกหักง่ายกว่าปูปกติ (Strimeetian, 2019) ซึ่งเป็นการดัดกลับสารอินทรีย์จากกระดองเก่าไว้สำหรับสร้างกระดองใหม่ ผลจากกระบวนการดังกล่าวก่อให้เกิดอนุมูลอิสระเกิดขึ้นตามมาด้วย (Strimeetian, 2010)

การเกิดอนุมูลอิสระจากกระบวนการทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม อนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นจากกระบวนการทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม เช่น แบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา ปรสิต สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และโลหะหนัก เป็นต้น โดยระหว่างกระบวนการดังกล่าวก่อให้เกิดอนุมูลอิสระเกิดขึ้น Rameshthangam and Ramasamy (2006) กล่าวว่าเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมทำให้อนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นในร่างกายของสัตว์กลุ่ม crustacean ปูมีการทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม

โดยปูมีระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immune system) ซึ่งประกอบด้วย 2 ระบบด้วยกันคือ ระบบภูมิคุ้มกัน humoral response ซึ่งเป็นการทำงานของโปรตีนต่าง ๆ ที่อยู่ในน้ำเลือด ได้แก่ lectins, lysosomal enzymes และ antimicrobial peptides เป็นต้น และระบบภูมิคุ้มกัน cellular response ซึ่งเป็นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) ได้แก่ การทำลายสิ่งแปลกปลอมแบบห่อหุ้มเชื้อโรค (encapsulation) และการกลืนกินเซลล์สิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) เป็นต้น (Söderhäll and Cerenius, 1992) กระบวนการทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมของระบบภูมิคุ้มกันมีการดึงโมเลกุลของ O_2 มาใช้เป็นจำนวนมาก ซึ่งระหว่างกระบวนการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันดังกล่าวมีการปลดปล่อยอนุมูลอิสระ $O_2^{\bullet-}$ โดยอาศัยปฏิกิริยาของ NADPH oxidase ดังสมการ



หลังจากนั้น $O_2^{\bullet-}$ เปลี่ยนเป็น H_2O_2 ด้วยปฏิกิริยาของ superoxide dismutase มีรายงานเกี่ยวกับการเกิดอนุมูลจากกระบวนการทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม โดย Sun et al. (2017) รายงานว่าไวรัส white spot syndrome virus (WSSV) ทำให้มีอนุมูลอิสระในปูชนิด *Scylla Paramamosain* สำหรับ Liu et al. (2010) รายงานว่าแบคทีเรียชนิด *Escherichia coli* ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระในปูชนิด *S. Paramamosain* ขณะที่ Shan et al. (2016) กล่าวว่ากรดไขมันที่แบคทีเรียชนิด *Vibrio parahaemolyticus* ทำให้อนุมูลอิสระเกิดขึ้นในปูชนิด *S. paramamosain* เช่นเดียวกับ Zhao et al. (2015) ที่รายงานว่าในปูชนิด *S. paramamosain* มีอนุมูลอิสระก่อเกิดขึ้นเมื่อมีเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* นอกจากนี้ Kankamol and Salaenoi (2018) ยังรายงานว่าใน hemolymph ของปูชนิด *S. serrata* ที่มีการติดเชื้อ

ที่เรียกว่า red sternum syndrome พบอนุมูลอิสระสูงใน hemolymph กว่าปกติ

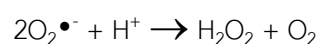
นอกจากนี้ยังมีการรายงานของ Warren et al. (2005) ที่รายงานว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด *Nodularia spumigena* ทำให้อนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นได้ในเซลล์ สอดคล้องกับ Pinho et al. (2003) ที่รายงานว่าใน hepatopancreas และ gills ของปูชนิด *C. granulatus* มีอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นหลังจากถูกเหนี่ยวนำด้วยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สำหรับ Pinho et al. (2005) รายงานว่า gills ของปูชนิด *C. granulatus* เมื่อเหนี่ยวนำด้วยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ชนิด *Microcystis aeruginosa* เป็นเวลา 7 วัน พบว่า LPO เพิ่มขึ้น เนื่องจากมีอนุมูลอิสระปริมาณมากใน gills ของปู ขณะที่ Adalto and Monserrat (2007) ยังรายงานว่าสาร methyl parathion ทำให้ปูชนิด *C. granulatus* มีอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ขณะที่ Luqing and Zhang (2006) รายงานว่าเมื่อเหนี่ยวนำด้วย cadmium พบว่าอนุมูลอิสระใน gills ของปูชนิด *C. japonica* มีค่ามากกว่า gills ในปูกลุ่มที่ไม่ได้มีการเหนี่ยวนำด้วย cadmium สำหรับ Vijayavel et al. (2004) กล่าวว่า gills ปูชนิด *S. serrate* ทำหน้าที่ในการกรองและดูดซับสารพิษ (naphthalene) ซึ่งมีการปลดปล่อยอนุมูลอิสระออกมาจากกระบวนการทำลายพิษดังกล่าว ส่วน Feng et al. (2019) รายงานว่าเมื่อปูชนิด *Eriocheir sinensis* ระยะ juvenile ถูกเหนี่ยวนำด้วย polychlorinated biphenyl (PCBs) ส่งผลให้ค่า LPO (malondialdehyde MDA) เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Wang et al. (2011) ยังรายงานว่าใน testis ของปูชนิด *Sinopotamon henanensis* หลังทำการเหนี่ยวนำด้วย cadmium ที่ความเข้มข้น 7.25, 14.50, 29.00, 58.00 และ 116.00 mg L⁻¹ เป็นเวลา 7 วัน ผลการศึกษาพบว่าค่า H₂O₂ และ MDA เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามความเข้มข้นของ cadmium ในขณะที่ Wang et al. (2013) ทดสอบ

cadmium ใน gills ของปู *S. henanense* พบว่า H₂O₂ เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับปูที่ไม่ได้ทดสอบ cadmium

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) ในปู

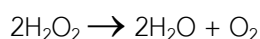
เมื่ออนุมูลอิสระเกิดขึ้นในร่างกายปู ปูจะสร้างสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระและรักษาสมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ ถ้าเซลล์มีความสมดุลระหว่างอนุมูลอิสระกับสารต้านอนุมูลอิสระ เซลล์ก็จะไม่เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน สารต้านอนุมูลอิสระ หมายถึงสารที่ช่วยต่อต้านหรือกำจัดอนุมูลอิสระ โดย Digiulio et al. (1989) ได้แบ่งสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกายได้ออกเป็น 2 ประเภท คือ สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ (Livingstone, 1990) เช่น superoxide dismutase, catalase และ glutathione peroxidase เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ (Hermes-Lima et al., 1998) เช่น glutathione, vitamin C และ vitamin E เป็นต้น Vinagre et al. (2003) รายงานความสัมพันธ์ระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระเมื่อปูชนิด *C. granulatus* มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นมากพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระก็เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน สาเหตุที่สารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากเซลล์จะรักษาความสมดุลระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระและอนุมูลอิสระ ถ้าเกิดความไม่สมดุลภายในเซลล์ เซลล์เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันซึ่งนำไปสู่การตายของเซลล์ได้ โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในเซลล์ของปู ได้แก่

Superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ โดย SOD ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน O₂^{•-} ให้เป็น H₂O₂ ดังสมการ (Zollner, 1993)

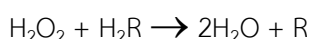


Catalase (CAT; EC 1.11.1.6) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ CAT ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา

การเปลี่ยน H_2O_2 ให้เป็นน้ำ (H_2O) และ O_2 (White and White, 1997) ดังสมการ



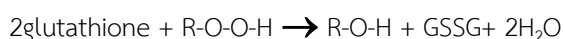
เอนไซม์ CAT สามารถ oxidizes สารพิษต่างๆ (H_2R) ได้ เช่น phenols, formaldehyde, formic acid และ ethanol เป็นต้น โดยจะทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ทำให้ได้ H_2O 2 โมเลกุล และสารที่ไม่มีพิษ (R) ดังสมการ



Glutathione preoxidase (GPx; EC 1.11.1.9) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ GPx ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน H_2O_2 ให้กลายเป็น H_2O โดยอาศัย glutathione เป็นตัว reduce (Maddipati and Marnett, 1987) ดังสมการ



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



Glutathione (GSH) หรือ γ -glutamylcysteinylglycine เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่เป็นเอนไซม์ GSH เป็นสารพวกไตรเปปไทด์ (tripeptide) โครงสร้างประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 ชนิดคือ กรดกลูตามิก (glutamic acid) ซิสเทอีน (cysteine) และไกลซีน (glycine) จับกับหมู่ซัลเฟอร์ (sulfur; SH) ด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent) (Struznka et al., 2005) GSH

ภายในเซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในรูป reduced form (GSH) ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ และอยู่ในรูปของ oxidized form (GSSG) ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ GSH ยังทำหน้าที่เป็น co-enzyme ของเอนไซม์ GPx ซึ่ง GSH ยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ในการสลายอนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการที่มีการใช้ O_2 (Jagneshwer et al., 2000) Pinho et al. (2005) รายงานว่า GSH มีบทบาทในการควบคุมการเกิดปฏิกิริยาการเกิด LPO ซึ่ง LPO สร้างความเสียหายให้แก่ cell membrane และทำให้ cell membrane เสื่อมสภาพไป โดย GSH จะทำให้ปฏิกิริยาถูกชะลอของการเกิด LPO ภายในเซลล์สิ้นสุดลง (Storey, 1996)

สารต้านอนุมูลอิสระมีบทบาทที่สำคัญเป็นอย่างยิ่งในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากกระบวนการต่างๆ ที่มีการใช้ออกซิเจนภายในเซลล์ เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์ตกอยู่ในภาวะเครียดออกซิเดชัน สารต้านอนุมูลอิสระสามารถเข้าทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการ metabolism ในปู เช่น กระบวนการการลอกคราบเพื่อการเจริญเติบโต Primeetian (2010) ทำการศึกษา กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ CAT, GPx และ GSH ในวงจรการลอกคราบของปูชนิด *Scylla serrata* โดยแบ่งปูออกเป็นระยะปูกระดองแข็งปกติ ระยะก่อนการลอกคราบ และระยะหลังการลอกคราบ ทำการศึกษาใน haemolymph, gill, hepatopancreas, muscle และ integument ผลการศึกษาพบว่ากิจกรรมของ CAT, GPx และ GSH เพิ่มขึ้นในระยะก่อนการลอกคราบและระยะหลังการลอกคราบเมื่อเทียบกับระยะปูกระดองแข็งปกติ ใน haemolymph, gill, hepatopancreas, muscle และ integument เนื่องจาก CAT, GPx และ GSH ทำหน้าที่ในการทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ metabolism ที่เกิดขึ้นในวงจรการลอกคราบของปู ซึ่งระยะก่อนการลอกคราบนั้นปูมีกระบวนการการสะสมสารอาหารที่จำเป็นเพื่อเอาไว้ใช้เป็นพลังงานสำรองสำหรับใช้ในระหว่างที่มีการลอก

คราบ (ซึ่งช่วงนั้นเป็นช่วงที่ปูไม่กินอาหาร) นอกจากนี้
ระยะก่อนการลอกคราบยังมีการกระบวนการสลายและ
ดึงกลับแคลเซียมจากกระดูกเก่าเพื่อเก็บไว้ใช้ในการ
สร้างกระดูกใหม่ด้วย ผลจากกระบวนการดังกล่าวก่อให้เกิด
มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น ดังนั้นในระยะก่อนการลอกคราบ
สารต้านอนุมูลอิสระ CAT, GPx และ GSH จึงถูกผลิต
ออกมาเพื่อทำหน้าที่ในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น
นอกจากนี้ในระยะหลังการลอกคราบของปูยังมี
กระบวนการสะสมแคลเซียมในกระดูกใหม่เพื่อให้โครง
ร่างใหม่มีความแข็งแรงขึ้นหรือกระบวนการสร้างคราบใหม่
ทำให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นจากกระบวนการดังกล่าว
เช่นกัน จึงทำให้ปูผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ CAT, GPx
และ GSH เพื่อทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น

สารต้านอนุมูลอิสระสามารถทำลายอนุมูลอิสระที่
เกิดจากกระบวนการทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม
โดย Liu et al. (2010) ศึกษาการแสดงออกของยีน CAT
และกิจกรรมของเอนไซม์ CAT และ SOD ใน hemocyte
และ hepatopancreas ในปูชนิด *S. paramamosain*
ที่เหนี่ยวนำ lipopolysaccharide จาก *E. coli* เป็นเวลา
6 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าการแสดงออกของยีน CAT
ใน hemocyte และ hepatopancreas สูงกว่าปูที่ไม่ได้
เหนี่ยวนำด้วย lipopolysaccharide เช่นเดียวกันกับ
กิจกรรม CAT และ SOD ที่พบว่าเพิ่มขึ้นใน hemocyte
และ hepatopancreas เช่นกัน สำหรับ Sun et al.
(2017) รายงานว่าการแสดงออกของโปรตีน GSH และ
GPx ใน hemocytes ของปูชนิด *S. paramamosain* ที่
เหนี่ยวนำด้วย WSSV แต่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน
ดังกล่าวในปูปกติ ขณะที่ Shan et al (2016) พบการ
แสดงออกของยีน CAT, GPx และ SOD ในปู *S.*
paramamosain หลังทำการเหนี่ยวนำด้วย *V.*
parahaemolyticus เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นอกจากนี้
Kankamol and Salaenoi (2018) ยังรายงานไว้ใน
hemolymph ของปูชนิด *S. serrata* ที่มีอาการผิดปกติ
ที่เรียกว่า red sternum syndrome พบกิจกรรมของ

SOD มีค่าสูงกว่าปูปกติ ในขณะที่ Zhao et al. (2015)
พบการแสดงออกของยีน SOD ในปูชนิด *S.*
paramamosain เมื่อเหนี่ยวนำด้วย *V.*
parahaemolyticus เป็นเวลา 42 ชั่วโมง สำหรับ
Pinho et al. (2003) รายงานว่าใน hepatopancreas
ของปูชนิด *C. granulatus* เมื่อเหนี่ยวนำ microcystins
(*Microcyst aeruginosa*) เป็นเวลา 3 วัน พบว่าสารต้าน
อนุมูลอิสระ SOD และ CAT เพิ่มขึ้นเพื่อเข้าทำลายอนุมูล
อิสระที่เกิดขึ้นจากกระบวนการทำลายเชื้อโรคและสิ่ง
แปลกปลอม เช่นเดียวกับ Pinho et al. (2005) ที่
รายงานไว้ใน hepatopancreas ของปูชนิด *C.*
granulatus เมื่อเหนี่ยวนำด้วย *M. aeruginosa* ที่ความ
เข้มข้นต่ำ (1.06 ไมโครกรัม) และความเข้มข้นสูง (5.32
ไมโครกรัม) เป็นเวลา 3 วัน ผลการศึกษาพบว่า CAT มี
ค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ *M. aeruginosa*

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารต้าน
อนุมูลอิสระในปูได้แก่ การศึกษาของ Vijayavel et al.
(2004) ที่ทำการศึกษาค้นหาการเหนี่ยวนำด้วย naphthalene
ใน hepatopancreas, haemolymph และ ovary ของ
ปูชนิด *S. serrata* พบว่า CAT, GPx, SOD และ GSH
ลดลงใน hepatopancreas และ ovary สำหรับ Adalto
and Monserrat (2007) ศึกษา GSH ใน
hepatopancreas ของปูชนิด *C. granulatus* เมื่อทำ
การเหนี่ยวนำด้วยสาร 3,4-methylenedioxyphenol
(0.05 mg/kg) เป็นเวลาเป็นเวลา 3 วัน ผลการศึกษา
พบว่า GSH มีกิจกรรมเพิ่มมากขึ้นกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ทำการ
เหนี่ยวนำด้วยสารดังกล่าว นอกจากนี้ Feng et al.
(2019) ยังรายงานสารต้านอนุมูลอิสระในปูชนิด *E.*
sinensis ระยะ juvenile ที่ทำการเหนี่ยวนำด้วย
polychlorinated biphenyl (PCBs; aroclor 1254) ผล
การศึกษาพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระ SOD, CAT และ
GPx มีค่าสูงขึ้นกว่ากลุ่มปูที่ไม่ได้เหนี่ยวนำด้วย PCBs
ในขณะที่ Wang et al. (2011) รายงาน SOD และ GPx
ใน testes ของปูชนิด *S. henanensis* หลังทำการ

เหนียวนำด้วย cadmium ที่ความเข้มข้น 14.50 mg L^{-1} เป็นเวลา 7 วัน ผลการศึกษาพบว่า SOD และ GPx มีค่าสูงขึ้นกว่าปูที่ไม่ได้เหนียวนำ ส่วน Pugazhendy et al. (2015) ศึกษา hepatopancreas ของปูชนิด *Paratelmusa hydrodromaus* ที่ทำการเหนียวนำด้วย cadmium เป็นเวลา 14 วัน ผลการศึกษาพบว่ากิจกรรม SOD เพิ่มขึ้นจากปูที่ไม่ได้เหนียวนำด้วย cadmium คล้ายคลึงกับ Wang et al. (2013) ที่ทำการทดสอบ cadmium ที่ความเข้มข้น 58 mgL^{-1} ใน gills ของปู *S. henanense* พบว่า SOD, CAT และ GPx เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม Liu et al. (2014) รายงานว่า hepatopancreas ของปูชนิด *S. henanense* ที่ทำการเหนียวนำด้วย lead (Pb) ความเข้มข้น 9.188, 18.375, 36.76, 73.5 และ 147 mg/L เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า SOD เพิ่มขึ้นที่ lead ความเข้มข้น 9.188, 18.375, 36.76 และ SOD ลดลงที่ lead ความเข้มข้น 73.5 และ 147 mg/L เทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วน CAT เพิ่มขึ้นในความเข้มข้น 9.188 18.375 และลดลง 36.76 73.5 และ 147 mg/L นอกจากนี้ Li et al. (2015) ยังรายงานว่า SOD และ CAT ใน testes และ accessory glands ของปูชนิด *S. henanense* เมื่อถูกเหนียวนำด้วย lead ความเข้มข้น 3.675, 7.35, 14.7, 29.4 และ 58.8 mg/L เป็นเวลา 3 วัน ผลการศึกษาพบว่า SOD และ CAT เพิ่มขึ้นในทุกความเข้มข้นของ lead ทั้งใน testes และ accessory glands เมื่อเทียบกับ testes และ accessory glands ของปูที่ไม่ได้ถูกเหนียวนำด้วย lead

อนุมูลอิสระได้สร้างความเสียหายให้แก่เซลล์ปูซึ่งทำให้เซลล์ตกอยู่ในภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยภาวะเครียดออกซิเดชันทำให้เซลล์ตายส่งผลให้อวัยวะต่างๆ ทำงานล้มเหลว อนุมูลอิสระในปูเกิดขึ้นได้จากกระบวนการ metabolism ต่างๆ และอนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้จากการกระบวนการกำจัดเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมของร่างกายปู ดังนั้นเพื่อให้เซลล์ตกอยู่ใน

ภาวะเครียดออกซิเดชันปูจึงผลิตสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระสำคัญที่พบในปู เช่น superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase และ glutathione เป็นต้น บทความวิชาการนี้เป็นความรู้พื้นฐานของอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระในปูซึ่งเป็นการสร้างความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับปูมากยิ่งขึ้น โดยสามารถนำความรู้นี้ไปใช้ในการป้องกันปูจากอนุมูลอิสระเพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงปูต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Adalto, B. and J. M. Monserrat. 2007. Effects of methyl parathion on *Chasmagnathus granulatus* hepatopancreas: Protective role of sesamol. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 67(1): 100-108.
- Ana, D. C., M. H. Costa, J. L. Orlando and R. L. David. 2003. Age- related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 289(1): 83-101.
- Arun, S., P. Krishnamoorthy and P. Subramanian. 1999. Properties of glutathione peroxidase from the hepatopancreas of freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31(6): 725-732.
- Arun, S., and P. Subramanian. 1998. Antioxidant enzymes in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during embryonic and larval development. *Comp. Biochem. Physiol.* 121(3): 273-277.

- 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). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 146(1-2): 54-59.
- Chang, E. S. 1995. Physiological and biochemical changes during the molt cycle in decapod crustaceans: an overview. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 193(1-2): 1-14.
- 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(1): 53-63.
- Digiulio, R., P. C. Washburn, R. J. Wenning, G. W. Winston and C. S. Jewell. 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 8(12): 1103-1123.
- Esterbauer, H., R. J. Schaur and H. Zollner. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 11(1): 81-128.
- Feng, D., X. Wang, E. Li, X. Bu, F. Qiao, J. Qin and L. Chen. 2019. Dietary aroclor 1254-induced toxicity on antioxidant capacity, immunity and energy metabolism in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: amelioration by vitamin A. *Front. Physiol.* 10(722): 1-12.
- 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(3): 781-788.
- Guzman, R. E. and P. F. Solter. 1999. Hepatic oxidative stress following prolonged sublethal microcystin LR exposure. *Toxicol. Pathol.* 27(5): 582-588.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge. 1998. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford University Press, New York. 980 pp.
- Hermes-Lima, M., W. G. Willmore and K. B. Storey. 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylene orange complex formation. *Free Radic. Biol. Med.* 19(3): 271-280.
- Hermes-Lima, M., J. M. Storey and K. B. Storey. 1998. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 120(3): 437-448.
- Jagneshwer, D., G. B. N. Chainy and K. J. Rao. 2000. Dietary vitamin- E modulates antioxidant defence system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 127(1): 101-115.
- Jeejeebhoy, K. N. 1991. In vivo breath alkane as an index of lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 10(3-4): 191-193.
- Kankamol C. and J. Salaenoi. 2018. Enzymes involved in immunity and characteristics

- of hemolymph in red sternum syndrome mud crabs (*Scylla serrata*). Agr. Nat. Resour. 52(5): 489-496.
- Kashiwagi, A., K. Kashiwagi, M. Takase, H. Hanada and M. Nakamura. 1997. Comparison of catalase in diploid and haploid *Rana rugosa* using heat and chemical inactivation techniques. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 118(3): 499-503.
- Klotz, M. G., G. R. Klassen and P. C. Lowen. 1997. Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. Mol. Biol. Evol. 14(9): 951-958.
- Li N, Y. H. Hou, D. D. Ma, W. X. Jing, H. U. Dahms and L. Wang. 2015. Lead accumulation, oxidative damage and histopathological alteration in testes and accessory glands of freshwater crab, *Sinopotamon henanense*, induced by acute lead exposure. Ecotoxicol. Environ. Saf. 117: 20-27.
- Liu, H. P., F.Y. Chen, S. Gopalakrishnan, K. Qiao, J. Bo and K. J. Wang. 2010. Antioxidant enzymes from the crab *Scylla paramamosain*: gene cloning and gene/protein expression profiles against LPS challenge. Fish. Shellfish. Immunol. 28(5-6): 862-871.
- Liu, N., L. Wang, B. Yan, Y. Li, F. Ye, J. Li and Q. Wang. 2014. Assessment of antioxidant defense system responses in the hepatopancreas of the freshwater crab *Sinopotamon henanense* exposed to lead. Hydrobiologia. 741(1): 3-12.
- Livingstone, D. R., P. G. Martinez, X. Michel, J. F. Narbonne, S. O'Hara, D. Ribera and G. W. Winston. 1990. Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other molluscs. Funct. Ecol. 4(3): 415-424.
- Lombradi, B., N. Chandard and J. Locker. 1991. Nutritional model of hepatocarcinogenesis. Rats fed choline-devoid diet. Dig. Dis. Sci. 36(7): 979-984.
- 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. C Toxicol. Pharmacol. 144(1): 67-75.
- Maddipati, K. R. and L. J. Marnett. 1987. Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. Purification and properties of a selenium-dependent glutathione peroxidase. J. Biol. Chem. 262(36): 17398-17403.
- Marius, B. and T. H. Brouwer. 1998. Biochemical defense mechanisms against copper-induced oxidative damage in the blue crab, *Callinectes sapidus*. Arch. Biochem. Biophys. 351(2): 257-264.
- Michael S. and H. F. Dariush. 2006. Peroxisomes and oxidative stress. Biochim. Biophys. Acta. 1763(12): 1755-1766.
- Phillips, J. W., R. J. W. McKinney, F. J. R. Hird and D. L. Macmillan. 1997. Lactic acid

- formation in crustaceans and the liver function of the midgut gland questioned. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 56(4): 427-433.
- Pinho, G. L. L., C. M. D. Rosa, J. S. Yunes, C. M. Luquet, A. Bianchini and J. M. Monserrat. 2003. Toxic effects of microcystins in the hepatopancreas of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 135(4): 459-468.
- Pinho, G. L. L., M. D. Rosa, F. E. Maciel, A. Bianchini, J. S. Yunes, L. A. O. Proenca and J. M. Monserrat. 2005. Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61(3): 353-360.
- Pugazhendy, K., A. Revathi, K. Murugan and J. S. Hwang. 2015. Chelating properties of *Cardiospermum halicacabum* against cadmium toxicity on antioxidant enzyme activities in the fresh water crab, *Paratelphusa hydrodromaus*. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 2(5): 183-188.
- Rameshthangam, P. and P. Ramasamy. 2006. Antioxidant and membrane bound enzymes activity in WSSV- infected *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture.* 254(1-4): 32-39.
- Shan, Z., K. Zhu, H. Peng, B. Chen, J. Liu, F. Chen, X. Ma, S. Wang, K. Qiao and K. Wang. 2016. The new antimicrobial peptide SpHyastatin from the mud crab *Scylla paramamosain* with multiple antimicrobial mechanisms and high effect on bacterial infection. *Front. Microbiol.* 7(1140): 1-14.
- Sies, H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215(2):213-219.
- Skinner, D. M. 1962. The structure and metabolism of a crustacean integumentary tissue during a molt cycle. *Biol. Bull.* 123(3): 635-647.
- Söderhäll, K. and L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. *Annu. Rev. Fish Dis.* 2: 3-23.
- Sole, M., L. D. Peters, K. Magnusson, A. Sjölin, A. Granmo and D. R. Livingstone, 1998. Responses of the cytochrome P450 dependant monooxygenase and other protective enzyme systems in digestive gland of transplanted common mussel (*Mytilus edulis* L.) to organic contaminants in the Skagerrak and Kattegat (North Sea). *Biomarkers.* 3(1): 49-62.
- Grimeetian, P. 2010. Antioxidant and lipid peroxidation in molting cycle of mud crab (*Scylla serrata* Forskål 1775). MS Thesis, Kasetsart University, Bangkok. 91 pp. (in Thai)
- Grimeetian, P. and J. Suwanmala. 2019. Growth rate of mud crabs (*Scylla* spp.) after molting. *J. Fish. Tech. Res.* 13(2): 25-36. (in Thai)
- Storey, K. B. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29(12): 1715-1733.

- Struznka L, M. Chalimoniuk and G. Sulkowski. 2005. The role of astroglia in Pb-exposed adult rat brain with respect to glutamate toxicity. *Toxicology*. 212(2-3): 185-194.
- Sun, B., Z. Wang, Z. Wang, X. Ma and F. Zhu. 2017. A proteomic study of hemocyte proteins from mud crab (*Scylla paramamosain*) infected with white spot syndrome virus or *Vibrio alginolyticus*. *Front. Immunol.* 8(468): 1-15.
- Verri, T., A. Mandal, L. Zilli, D. Bossa, P. K. Mandal, L. Ingrosso, V. Zonno, S. Vilella and G. A. Ahearn. 2001. D- glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 130(3): 585-606.
- Vijayavel, K., R.D. Gomathi, K. Durgabhavani and M. P. Balasubramanian. 2004. Sublethal effect of naphthalene on lipid peroxidation and antioxidant status in the edible marine crab *Scylla serrata*. *Mar. Pollut. Bull.* 48(5-6): 429-433.
- Vinagre, T. M., J. C. Alciati, F. Regoli, R. Bocchetti, J. S. Yunes, A. Bianchini and J. M. Monserrat. 2003. Effect of microcystin on ion regulation and antioxidant system in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 135(1): 67-75.
- Wang L., T. Xu, W. Lei, D. Liu, Y. Li, R. Xuan, and J. Ma. 2011. Cadmium-induced oxidative stress and apoptotic changes in the testis of freshwater crab, *Sinopotamon henanense*. *PLoS One.* 6(11): 1-8.
- Wang, J., P. Zhang, Q. Shen, Q. Wang, D. Liu , J. Li and L. Wang. 2013. The effects of cadmium exposure on the oxidative state and cell death in the gill of freshwater crab *Sinopotamon henanense*. *PLoS One.* 8(5): 1-9.
- Warren, R. D., H. L. S. William, R. W. Jack, R. S. S. Wu, P. K. S. Lam and D. Nugegoda. 2005. Comparative effects of the blue green algae *Nodularia spumigena* and a lysed extract on detoxification and antioxidant enzymes in the green lipped mussel (*Perna viridis*). *Mar. Pollu. Bulle.* 51(8-12): 1026-1033.
- White, J. S. and D. C. White. 1997. Source book of enzymes. CRC Press, Boca Raton, FL. 1,008 pp.
- Zhao Z., S. Li, C. Xie, L. Zhou, C. Li, W. Liu and X. Wen. 2015. Innate immune response and gene expression of *Scylla paramamosain* under *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Aquaculture Research.* 46(2): 462-471.
- Zollner, H. 1993. Handbook of Enzyme Inhibitors, 2nd Edition. VCH Publishers, New York. 1,065 pp.

