

## Cleidohyoid Muscle in Human : A Case Report

Kowit Chaisiwamongkol, Kittisak Sripanidkulchai, Porntip Boonruangsri, Yanyong Toomsan, Somsuda Teepsawang\*, Lawan Songserm

Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 4002, Thailand

\*Corresponding author, e-mail: tsomsuda@kku.ac.th

---

### Abstract

A primitive cleidohyoid muscle was discovered in one human cadaver. It is the muscle in avian which must disappear somewhere along the course of evolution. The muscle functions in the mechanism of feeding to continue life. In doing so, the muscle connects the pectoral girdle, specifically the clavicle, to the tongue skeleton especially the hyoid so that the swallowing of food is possible. The incidence of this variation is rare, 0.01% in this series. The developmental history and the use for surgery were presented. The evolution of the clavicle was discussed.

**Key words:** gross anatomy variation, cleidohyoid muscle, mechanism of feeding, developmental history, evolution

---

## กล้ามเนื้อ cleidohyoid ในมนุษย์ : กรณีศึกษา

โกวิท ไชยศิวิมมงคล, กิตติศักดิ์ ศรีพานิชกุลชัย, พรทิพย์ บุญเรืองศรี, ยรรยง ทุมแสน, สมสุดา ทีปสว่าง, ลาววัลย์ สงเสริม

### บทคัดย่อ

พบการเจริญผิดปกติของกล้ามเนื้อที่เรียกว่า cleidohyoid ในร่างศพดอง 1 ร่าง กล้ามเนื้อนี้เป็นกล้ามเนื้อที่พบในสัตว์ตระกูลนก ซึ่งหายไปในช่วงวิวัฒนาการ กล้ามเนื้อนี้ทำหน้าที่ในกลไกการกินอาหารเพื่อการดำรงชีวิต เพื่อให้ทำกิจกรรมดังกล่าวได้ กล้ามเนื้อนี้ยึดระยะยั้งคี่ก โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือ กระดูกไหปลาร้า กับกระดูก hyoid ของลิ้น ทำให้สามารถกลืนอาหารได้ โอกาสการเกิดการผันแปรเช่นนี้ พบได้น้อยมากประมาณ 0.01%

## Left Sided Inferior Vena Cava: A Case Report

Kimaporn Khamanarong\*, Supawadee Teerakul, Worawut Woraputtaporn, Parichat Prachaney  
Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

\*Corresponding author, e-mail: kkimap@kku.ac.th

---

### Abstract

A case of the left sided inferior vena cava (IVC) in the male donated cadaver aged 65 yrs was studied. The reference point of L5 vertebra is where IVC formed behind the left common iliac artery and coursed proximally on the left of the aorta, until it reached the left renal vein and then crossed obliquely anterior to the abdominal aorta to assume the normal right side. At the point of crossing, it received the left renal vein. The right renal vein was shown clearly emptying into the inferior vena cava on the right side at the normal position. The surgical significance of this variation and its development were described briefly.

**Keywords:** left sided inferior vena cava, development of IVC, surgical significance

---

## หลอดเลือดดำอินฟีเรียร์วีนาคาวาข้างซ้าย: กรณีศึกษา

กิมพร ขมะณรงค์ สุภาวดี ธีระกุล วรวุฒิ วรพุทธิพร ปาริฉัตร ประจะเนย์

### บทคัดย่อ

พบหลอดเลือดดำอินฟีเรียร์วีนาคาวา ด้านซ้าย ในร่างศพดองเพศชายอายุ 65 ปี ตำแหน่งกระดูกสันหลัง เอวระดับที่ 5 พบว่าจุดกำเนิดของหลอดเลือดดำอินฟีเรียร์วีนาคาวา อยู่หลังหลอดเลือดแดงคอมมอนไอลิแอดด้านซ้าย และวางตัวอยู่ด้านซ้ายต่อหลอดเลือดแดงเอออร์ตา ตำแหน่งที่รับเลือดดำจากหลอดเลือดดำรีนอลข้างซ้าย เป็นตำแหน่งที่หลอดเลือดดำอินฟีเรียร์วีนาคาวาด้านซ้าย ทอดข้ามด้านหน้าหลอดเลือดแดงเอออร์ตา จากนั้นกลับมามีอยู่ในตำแหน่งด้านขวาต่อหลอดเลือดแดงเอออร์ตา หลอดเลือดดำรีนอลข้างขวา เทเข้าสู่หลอดเลือดดำอินฟีเรียร์วีนาคาวาข้างขวาในตำแหน่งปกติ พัฒนาการผิดปกติของหลอดเลือดดำอินฟีเรียร์วีนาคาวา มีความสำคัญในการทำหัตถกรรมของศัลยแพทย์

## Trifurcation of the Abdominal Aorta : A Case Report

P. Prachaney\*, K. Khamanarong, S. Teera kul, C. Arunyanart

Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

\*Corresponding author, e-mail: parpra@kku.ac.th

---

### Abstract

A rare anomaly of the terminal of the abdominal aorta was observed in a 55-year-old female cadaver. Instead of dividing into two common iliac arteries, the abdominal aorta terminated by dividing into three branches, the right common iliac, left internal iliac and left external iliac arteries at the level of the fifth lumbar vertebra. In other words, the left common iliac artery was not formed. The right common iliac artery still gave two branches, an internal iliac and an external iliac arteries. The proximal part of these arteries gives rise to the common iliac arteries. The possible embryological explanations of this anomaly, therefore, are 1) the initial connection between the left umbilical artery and the left dorsal aorta was in the abdominal region rather than in the sacral region and did not obliterate and 2) the initial connection between the left umbilical artery and the left dorsal aorta was still in the sacral region, but after the obliteration of this connection, a new junction still took place with the left dorsal aorta just inferiorly to the fifth lumbar intersegmental artery resulting in no formation of the common iliac artery. This unique case of the abdominal trifurcation is important for surgeons to keep in mind during surgical approach in this area.

**Keywords:** anatomical variation, abdominal aorta, common iliac artery

---

## การแตกสามแขนงปลายของหลอดเลือดแดง abdomen: กรณีศึกษา

ปาริฉัตร ประจະเนย์, กิมาพร ชมะณะรงค์, สุภาวดี ธีระกุล, ชาญณรงค์ อรัญนารถ

### บทคัดย่อ

พบการแปรผันของส่วนปลายของหลอดเลือดแดง abdomen ในร่างศพดองหญิงอายุ 55 ปี ซึ่งลักษณะการแปรผันนี้พบไม่บ่อยนัก โดยหลอดเลือดแดง abdomen ไม่ได้แตกแขนงออกเป็นสองแขนงตามปกติ แต่แตกแขนงปลายเป็น 3 แขนง ที่ระดับกระดูกสันหลังระดับเอวที่ 5 ได้แก่ หลอดเลือดแดง common iliac ข้างขวา หลอดเลือดแดง internal และ external iliac ข้างซ้าย ไม่ปรากฏหลอดเลือดแดง common iliac ข้างซ้าย อย่างไรก็ตาม หลอดเลือดแดง common iliac ข้างขวา ยังแตกแขนงตามปกติเป็นสองแขนงคือ internal และ external iliac ข้างขวา การอธิบายด้านการพัฒนาของหลอดเลือดถึงความแปรผันของหลอดเลือดที่พบนี้ อาจเป็นไปได้ 2 ทาง คือ 1) การเชื่อมกันเริ่มแรกของหลอดเลือดแดง umbilical กับ หลอดเลือดใหญ่ dorsal ข้างซ้าย เกิดบริเวณช่องท้องแทนที่จะเกิดบริเวณอุ้งเชิงกราน และไม่มีการสลายไป หรือ 2) การเชื่อมกันเริ่มแรกของหลอดเลือดแดง umbilical กับ หลอดเลือดแดงใหญ่ dorsal ข้างซ้าย ยังเกิดบริเวณอุ้งเชิงกราน และมีการสลายไปตามปกติ แต่ยังคงเชื่อมต่อกับหลอดเลือดแดงใหญ่ dorsal ข้างซ้ายดั้งเดิม ล่างต่อหลอดเลือดแดง lumbar intersegment ที่ 5 ข้างซ้าย จึงไม่มีหลอดเลือดแดง common iliac ข้างซ้าย ศัลยแพทย์ที่จะทำหัตถการในบริเวณช่องและอุ้งเชิงกรานควรระวังถึงการแปรผันของหลอดเลือดแดงนี้

# A Clinico-Anatomical Study in Basal Ganglia Disorder Using T2\*-Weighted Gradient-Recalled Echo Magnetic Resonance Imaging: A Lesson from a Cirrhotic Patient

Permphan Dharmasaroja\*

Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok, Thailand

\*Corresponding author, e-mail: tepdm@mahidol.ac.th

## Abstract

T2\*-weighted gradient-recalled echo magnetic resonance imaging (GRE-MRI) is dependent on magnetic susceptibility effect and is highly sensitive to static magnetic field inhomogeneity. Field distortions caused by material with high magnetic susceptibility induce signal intensity loss, resulting in typical signal intensity voids. Manganese, which escapes hepatic clearance because of a portosystemic shunt or liver dysfunction, is thought to be involved in alterations of signal intensity on MRIs, and exerts neurotoxicity. A patient with hepatic cirrhosis presenting with a gradual onset of parkinson-like symptoms was therefore subjected to computed tomography (CT) brain scan and MRI including T2\*-weighted GRE-MRI. Whereas T1-weighted MRIs showed symmetrical hyperintensity in the globus pallidus (GP) and the midbrain and T2-weighted images showed normal signal intensity, T2\*-weighted GRE-MRI revealed hypointensity in the GP, bilaterally, with more anterior extension in the right than the left. The CT scan revealed tiny symmetrical increased signals in the basal ganglia, which were disproportional to the signals from the MRIs. These findings suggest that T2\*-weighted GRE-MRI could represent the most sensitive technique for detection of the extent of signal intensity abnormalities in the basal ganglia of cirrhotic patients.

**Keywords:** basal ganglia, liver, brain imaging, neurotoxicity

## การศึกษาทางคลินิกและกายวิภาคในภาวะผิดปกติของ basal ganglia โดยใช้วิธีการถ่ายภาพแม่เหล็กไฟฟ้าแบบ T2\*-weighted gradient-recalled echo: บทเรียนจากผู้ป่วยโรคตับแข็ง

เพิ่มพันธุ์ ธรรมสโรช

### บทคัดย่อ

การถ่ายภาพแม่เหล็กไฟฟ้าแบบ T2\*-weighted gradient-recalled echo (GRE) ขึ้นอยู่กับผลของ magnetic susceptibility และไวอย่างสูงต่อความไม่สม่ำเสมอของสนามแม่เหล็กไฟฟ้าแบบคงที่ การบิดเบี้ยวของสนามแม่เหล็กที่มีสาเหตุมาจากสารที่มี magnetic susceptibility จะสูงชันทำให้เกิดการสูญเสีย signal intensity สารแมงกานีสซึ่งหลบจากการกำจัดโดยตับอันเนื่องมาจาก portosystemic shunt หรือภาวะการทำงานของตับบกพร่องถูกเชื่อว่าเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของความเข้มของสัญญาณแม่เหล็กในการถ่ายภาพแม่เหล็กไฟฟ้าและส่งผลต่อการเกิดพิษต่อระบบประสาท ผู้ป่วยโรคตับแข็งรายหนึ่งมาพบแพทย์ด้วยอาการคล้ายอาการของโรคพาร์คินสัน จึงได้รับการตรวจสอบด้วยวิธีเอ็กซเรย์คอมพิวเตอร์และคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าอันรวมถึง T2\*-weighted GRE ผลพบว่าขณะที่ภาพถ่าย T1-weighted แสดง hyperintensity ที่สมองส่วน globus pallidus และ midbrain ทั้งสองข้างเท่าๆกันและ T2-weighted ไม่พบความผิดปกติ ภาพถ่าย T2\*-weighted GRE แสดง hypointensity ที่ globus pallidus ทั้งสองข้างโดยทางด้านขวามีความผิดปกติครอบคลุมมาถึงส่วนหน้า ส่วนภาพถ่ายเอ็กซเรย์คอมพิวเตอร์แสดงการเพิ่มของสัญญาณเล็กน้อยที่ basal ganglia ทั้งสองข้างโดยไม่เป็นสัดส่วนกับภาพถ่ายคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า การค้นพบนี้สื่อว่าการถ่ายภาพแม่เหล็กไฟฟ้าแบบ T2\*-weighted GRE อาจเป็นวิธีที่ไวที่สุดในการใช้ตรวจหาขอบเขตของความผิดปกติของ signal intensity ในสมองส่วน basal ganglia ของผู้ป่วยโรคตับแข็ง

# The Coexistence of a Complete Metopic Suture and Supernumerary Bones in a Thai Skull

Nutcharin Ongkana<sup>1\*</sup>, Yoshiyuki Tohno<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

<sup>2</sup> Department of Anatomy, Nara Medical University School of Medicine, Nara, Japan

\*Corresponding author, e-mail: nongkana@med.cmu.ac.th

---

## Abstract

A dry skull of a 72-year-old man was found to have an unusual anterior cranial suture coexisted with a single bone below the lambda and multiple sutural bones. Radiographs revealed asymmetrical frontal sinuses. No past history was related to any disease. The simultaneous occurrence of such multiple variations in a single braincase is very rare. It may result from a complex developmental process of the human skull. The embryological and clinical aspect of the aforementioned structures is discussed

**Keywords:** inca bone, metopic suture, sutural bone, wormian bone

---

## การอยู่ร่วมกันของรอยประสานกระดูก metopic แบบสมบูรณ์กับกระดูกเกินในกะโหลกศีรษะของคนไทยชั้นหนึ่ง

นุชรินทร์ อ่องคณา, Yoshiyuki Tohno

### บทคัดย่อ

กะโหลกศีรษะของเพศชายอายุ 72 ปีถูกพบว่ามีรอยประสานกระดูกทางด้านหน้าปิดปกติร่วมกับกระดูกชิ้นเดียวและกระดูกภายในรอยประสานหลายชิ้น ภาพถ่ายทางรังสีพบโพรงไซนัสฟรอนทัลเจริญไม่สมดุลกัน ไม่พบประวัติในอดีตที่เกี่ยวข้องกับการเจ็บป่วย การเกิดร่วมกันของสิ่งที่แตกต่างกันไปจากรูปแบบปกติดังกล่าวในกะโหลกศีรษะหนึ่งชั้นพบได้ยากมาก ลักษณะดังกล่าวอาจเกิดจากกระบวนการเจริญที่ซับซ้อนของกะโหลกศีรษะมนุษย์ ลักษณะเฉพาะในแง่ของการเจริญและความสำคัญทางคลินิกของโครงสร้างดังกล่าวได้ถูกอภิปราย

## Osteometry of Coxal Bone for Sex Determination in Thais

Jureeporn U-pathi<sup>1,2</sup>, Supap Saenphet<sup>2</sup>, Karnchana Harnsiriwattanakit<sup>1</sup>, Paiwan Sudwan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

\*Corresponding author, e-mail: pasudwan@med.cmu.ac.th

### Abstract

Sex determination using osteometric analysis of the coxal (hip) bone in Thais was made on 8 parameters, namely maximum depth of greater sciatic notch (mdg), ischial length (isl), total height (th), acetabulum diameter (acd), iliac breadth (ilib), obturator foramen width (obfw), obturator foramen height (obfh) and width of greater sciatic notch (wgn). There were 230 hip bones, consisting of 83 males and 32 females. Data obtained from these measured parameters were statistically analyzed. All of the hip parameters measured, except the obfw and obfh foramen height, could be used to determine the sex dimorphism. Additionally, by logistic regression analysis, the accuracy of the left and right sides of the hip bones for sex determination was 92.2%. The accuracy of the right female and male hip bones was 93.9% and 90.4% in left. It could be, therefore, concluded from our results from osteometric data can be used in the fields of human anatomy and forensic science for determining sex dimorphism.

**Keywords:** sex determination, coxal bone, osteometric analysis, Thais

## การวัดกระดูกสะโพกเพื่อใช้ในการแยกเพศของคนไทย

จรีพร อุปธิ, สุภาพ แสนเพชร, กาญจนา หาญศิริวัฒนกิจ, ไพวรรณ สูดวรรณ

### บทคัดย่อ

การศึกษากายวิภาคศาสตร์โดยการวัดข้อมูล 8 ประการของกระดูกสะโพก (coxal หรือ hip bone) ในคนไทย โดยวิธีการวัดค่าของกระดูก ได้แก่ maximum depth of greater sciatic notch (mdg), ischial length (isl), total height (th), acetabulum diameter (acd), iliac breadth (ilib), obturator foramen width (obfw), obturator foramen height (obfh), width of greater sciatic notch (wgn) จากโครงกระดูกสะโพกจำนวน 230 ชิ้น (เพศชาย 83 คนและเพศหญิง 32 คน) ช่วงอายุระหว่าง 19 - 88 ปี นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติเพื่อศึกษาความแตกต่างของกระดูกสะโพกในเพศชายและเพศหญิง พบว่าการวัดกระดูกสะโพกในทุกพารามิเตอร์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้น obfw และ obfh และจากการวิเคราะห์ด้วยสถิติ logistic regression การแยกเพศด้วยกระดูกสะโพกทั้งข้างซ้ายและขวามีเปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง 94.6% การแยกเพศด้วยกระดูกสะโพกข้างซ้ายมีเปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง 93.9% ข้างขวามีเปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง 93.9% ดังนั้นผลการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่าข้อมูลจากการวัดค่าของกระดูกสะโพกสามารถใช้เป็นประโยชน์ในทางกายวิภาคศาสตร์และนิติวิทยาศาสตร์สำหรับการแยกเพศได้

### Acknowledgements

This work was supported by Faculty of Medicine Research Fund, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.

# Perforating Point of Terminal Branch of the Profunda Femoris Artery through Adductor Magnus

Pattama Amarttayakong<sup>1</sup>, Worawut Woraputtaporn<sup>1</sup>, Krissana Radapat<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Anatomy, <sup>2</sup> Department of Orthopaedics, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

\*Corresponding author, e-mail:

## Abstract

The profunda femoris artery provides major blood supply to the posterior compartment of the thigh and its terminal branch distributes arterial anastomosis of the knee. There is little mention in current textbooks of Anatomy about the exact position of the perforating point of terminal branch of the profunda femoris artery (TPFA) through the adductor magnus muscle to access the posterior thigh. The objective of the study is to locate the perforating point of the TPFA. One hundred lower extremities of embalmed cadavers were dissected. The distance between the perforating point of the TPFA to the knee was  $22.61 \pm 3.04$  cm, which was relatively  $48.93 \pm 5.54$  % of the distance measured from the knee to the anterior superior iliac spine. These anatomical data may be useful for designing amputation strategies and also the prognosis of arterial occlusion of the lower extremities.

**Keywords:** profunda femoris artery

## จุดที่แขนงปลายของหลอดเลือดแดง profunda femoris ทะลุกล้ามเนื้อ adductor magnus

ปัทมา อมาตยคง, วรวัฒ วรพุตพร, กฤษณะ ระดาพัฒน์

### บทคัดย่อ

หลอดเลือดแดง profunda femoris เป็นหลอดเลือดหลักของต้นขาด้านหลังและให้แขนงปลายไปประสานกับหลอดเลือดบริเวณข้อเข่า ในตำราศัลยกรรมกายวิภาคศาสตร์ปัจจุบันไม่ได้กล่าวถึงตำแหน่งแน่นอนของจุดที่แขนงปลายของหลอดเลือดแดง profunda femoris (TPFA) แทะลุกล้ามเนื้อ adductor magnus ไปยังต้นขาด้านหลัง การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจตำแหน่งของจุดดังกล่าวโดยการชำแหละต้นขาของศพจำนวน 100 ซ้าง พบว่าระยะทางจากจุดที่ TPFA ทะลุกล้ามเนื้อ adductor magnus ถึงข้อเข่าวัดได้  $22.61 \pm 3.04$  ซม. คิดเป็น  $48.93 \pm 5.54$  % ของระยะทางที่วัดจากข้อเข่าถึง anterior superior iliac spine ข้อมูลทางกายวิภาคนี้อาจเป็นประโยชน์ในการวางแผนการตัดขาออกและการพยากรณ์โรคหลอดเลือดต้นขาอุดตัน

## Relation of the Dorsal Scapular Artery to the Brachial Plexus in Thais

Wunnee Chaijaroonkhanarak<sup>1\*</sup>, Somsiri Ratanasuwan<sup>1</sup>, Pattama Amarttayakong<sup>1</sup>, Jariya Umka<sup>1</sup>, Parichat Prachaney<sup>1</sup>, Nantaya Kunatippapong<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Department of Anatomy, <sup>2</sup>Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, 40002  
\* Corresponding author, e-mail: wunnee\_chai@yahoo.com

### Abstract

We aimed to study the dorsal scapular artery (DSA) in relation to the brachial plexus. Lateral neck dissections were performed in both sides of the posterior cervical triangles and the axillary regions of 126 Thai cadavers. We found the DSA arose from three sites. The most common source was the transverse cervical artery of thyrocervical trunk of the first part of subclavian artery (69%). Other origins were as direct branches from the second part (3%) or the third part (28%) of the subclavian artery. When it was a branch of the transverse cervical artery, its course was always posterior and above the brachial plexus. If it arose from the second part or the third part of the subclavian artery, it always passed between branches of nerves of the brachial plexus in various sites. The most highly frequent sites were passed between the upper and middle trunks of the brachial plexus (61.8%). Other infrequent positions were found to pass above the lateral cord of the brachial plexus or between root of C<sub>5</sub> and T<sub>1</sub> with the same frequency of 1.3 % .

**Key words:** Brachial plexus, dorsal scapular artery, subclavian artery, transverse cervical artery

## ความสัมพันธ์ของหลอดเลือดแดง dorsal scapular กับ brachial plexus ในคนไทย

วรรณิ ชัยจรรยาคุณารักษ์, สมศิริ รัตนสุวรรณ, ปัทมา อมาตยคง, จริยา อากาศ, ปาริฉัตร ประจะเนย์, นันทยา คุณาธิปพงษ์

### บทคัดย่อ

การศึกษาหาความสัมพันธ์ของหลอดเลือดแดง dorsal scapular กับ brachial plexus ในคนไทย โดยการชำแหละหาหลอดเลือดแดง subclavian บริเวณ posterior cervical triangle ทั้ง 2 ข้าง และ หา brachial plexus บริเวณรักแร้ จากร่างครุใหญ่ 126 ร่าง สืบหาตำแหน่งเริ่มต้นของหลอดเลือดแดง dorsal scapular บนแต่ละส่วนของหลอดเลือดแดง subclavian และหลอดเลือดแดงอื่นๆ บริเวณใกล้เคียง ผลการศึกษาพบหลอดเลือดแดง dorsal scapular มีจุดเริ่มต้นจากหลอดเลือดแดง transverse cervical ของ thyrocervical trunk ของหลอดเลือดแดง subclavian ส่วนที่ 1 ร้อยละ 69 จากส่วนที่ 3 ของหลอดเลือดแดง subclavian ร้อยละ 28 และจากส่วนที่ 2 ของหลอดเลือดแดง subclavian เพียงร้อยละ 3 เท่านั้น ในรายที่เป็นแขนงของหลอดเลือดแดง transverse cervical หลอดเลือดแดง dorsal scapular มักพาดข้าม brachial plexus แต่ในรายที่เป็นแขนงจากส่วนที่ 2 หรือ 3 ของหลอดเลือดแดง subclavian พบว่าตำแหน่งที่หลอดเลือดแดง dorsal scapular ลอดผ่าน brachial plexus อยู่ระหว่าง upper trunk กับ middle trunk (ร้อยละ 61.8) ส่วนตำแหน่งอื่นที่หลอดเลือดแดง dorsal scapular สัมพันธ์กับ brachial plexus ขณะลอดผ่าน คือพาดข้ามเหนือส่วน lateral cord หรืออยู่ระหว่าง root ของ C<sub>5</sub> กับ T<sub>1</sub> ซึ่งพบได้น้อยเพียงร้อยละ 1.3 เท่ากันทั้งสองแบบ

## Ultrastructural Organization of the Exo-endocrine Gland in the Zona Glomerulosa in Rats

Malivalaya Namking<sup>1\*</sup>, Jariya Umka<sup>1</sup>, Kovit Chaisiwamongkol<sup>1</sup>, Sam Poolsawat<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand

<sup>2</sup> Department of Life Sciences, East Los Angeles College, Monterey Park, CA 90640, USA.

\*Corresponding author, e-mail: malnam@kku.ac.th

### Abstract

The adrenal gland consists of two portions; the cortex and medulla. Both portions are recognized as the endocrine glands that produce steroid hormones in the cortex and catecholamines in the medulla. The cortex was divided into three zones; the zona glomerulosa, the zona fasciculata, and the zona reticularis. The objective of this study was to demonstrate the ultrastructural organization of the exo-endocrine gland in the zona glomerulosa in rats. Our studies demonstrated that the zona glomerulosa was composed of four types of glandular cells encircled by the basement membrane, and arranged as an acinus-like structure forming a lumen containing secretory contents. Type I cell contained numerous large osmiophilic granules in the apical region and rested on the basement membrane. Its apical surface joined to the luminal space. Type II cell contained numerous terminal vesicles and rested on the basement membrane and contact with the basal intercellular capillary. Its apical end was in contact with the luminal space. Type III cell, containing small and highly osmiophilic granules, was small and dispersed in between the basal region and in contact with the intercellular capillary. Type IV cell, containing target-like granules, was small and associated with the basal end of type I and type II cells and contact with the intercellular capillary. In conclusion, Type I cell showed the ultrastructural organization of the exocrine gland, whereas, type II, III and IV cells were characteristic of the endocrine gland. Their biochemical activities are currently investigated.

**Keywords:** exo-endocrine gland, ultrastructural organization, zona glomerulosa, adrenal gland

## การจัดระเบียบโครงสร้างระดับอัลตราในชั้น Zona Glomerulosa ของหนู เป็นลักษณะต่อมชนิด Exo-endocrine

มะลิวัลย์ นามกิ่ง, จริยา อัครา, โกวิท ไชยศิวามงคล, สมพงษ์ พูลสวัสดิ์

### บทคัดย่อ

ต่อมหมวกไตประกอบด้วยสองส่วนคือส่วน cortex และ medulla เป็นที่ทราบกันว่าทั้งสองส่วนเป็นต่อมไร้ท่อโดยส่วน cortex สร้างสเตียรอยด์ฮอร์โมนและส่วน medulla สร้าง catecholamines ส่วน cortex แบ่งเป็นสามแถบได้แก่ zona glomerulosa, zona fasciculata, และ zona reticularis วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อแสดงการจัดระเบียบโครงสร้างระดับอัลตราในชั้น Zona glomerulosa ของหนูว่ามีลักษณะเป็นต่อมชนิด Exo-endocrine ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าในชั้น Zona glomerulosa ประกอบด้วยเซลล์สี่ชนิดรวมกลุ่มกันเป็นกระเปาะของต่อมล้อมรอบด้วย basement membrane ภายในกระเปาะมีท่อกลางตรงกลางที่บรรจุสิ่งคัดหลั่ง เซลล์ชนิดที่หนึ่งมีขนาดใหญ่ที่สุดวางตัวอยู่บน basement membrane ไซโทพลาซึมด้าน apical บรรจุ osmiophilic granules ขนาดใหญ่จำนวนมากชิดด้าน apical ติดกับท่อกลางต่อม เซลล์ชนิดที่สองวางตัวอยู่บน basement membrane ภายในบรรจุ terminal vesicles จำนวนมากชิดด้านฐานสัมผัสกับหลอดเลือดฝอย เซลล์ชนิดที่สามมีขนาดเล็กกระจายอยู่ทางด้านฐานภายในบรรจุ osmiophilic granules สีเข้มขนาดเล็ก เซลล์ชนิดที่สี่มีขนาดเล็กกระจายอยู่ระหว่างเซลล์ชนิดที่หนึ่งและชนิดที่สองภายในบรรจุ target-like granules เซลล์ชนิดที่สามและสี่มีผิวสัมผัสกับหลอดเลือดฝอยทางด้านฐาน สรุปผลการศึกษาพบว่าเซลล์ชนิดที่หนึ่งมีลักษณะโครงสร้างและจัดระเบียบเป็นแบบต่อมมีท่อ ส่วนเซลล์ชนิดที่สองสามและสี่เป็นแบบต่อมไร้ท่อ หน้าที่ของเซลล์เหล่านี้กำลังอยู่ระหว่างการศึกษาค้นคว้า

# Evidences of Insulin-Producing Cells Derived from Buffalo (*Bubalus bubalis*) Embryonic Stem Cell Line

Phetcharat Phanthong<sup>1</sup>, Yindee Kitiyanant<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

<sup>2</sup> Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Salaya, Nakhonpathom, 73170, Thailand

\*Corresponding author, e-mail: scykt@mahidol.ac.th

## Abstract

Diabetes mellitus (DM) type I is characterized by cell loss, resulting in insulin deficiency. Nowadays, islet transplantation is effective in treatment of DM but the major problem is the lack of donor tissues. Thus, embryonic stem (ES) cells are alternative sources of insulin-producing cells because of their abilities in self-renewal and capable of differentiating into all three germ layers. The aim of this study is to produce and characterize the insulin-producing cells derived from buffalo (*Bubalus bubalis*) embryonic stem (bES) cells. We have reported the establishment of bES cells in the lab which were characterized and tested their both in vitro and in vivo properties. The bES cells were differentiated using 2-step procedures by spontaneous differentiation via embryoid bodies (EBs) in ES medium without leukemia inhibitory factor (LIF) in hanging drops at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> incubator. The following step, those cells were induced by culturing in serum-free DMEM/F12 medium containing 10 mM nicotinamide and 1 µg/ml laminin for 26 days. We detected insulin-producing cells by zinc-chelating dithizone staining and RT-PCR analysis of pancreatic transcription factors PDX1 and PAX4. Under this in vitro differentiating condition, generated insulin-producing cells were indicated by crimson red of dithizone. These results suggest that bES cells can be differentiated into insulin-producing cells, which can be a potential source for treatment of DM via this model for a stem cell therapeutic approach. The further studies regarding increase yield of differentiated cells, function test in vitro as well as in vivo leading to cell replacement therapy should be performed.

**Keywords:** insulin-producing cells, buffalo, ES cells

## การเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของกระบือ (*Bubalus bubalis*) ไปเป็นเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน

เพชรรัตน์ พานทอง, ยินดี กิตยานันท์

### บทคัดย่อ

โรคเบาหวานประเภทที่ 1 เกิดจากการสูญเสียเซลล์  $\beta$  ในตับอ่อน ซึ่งนำไปสู่ความบกพร่องของอินซูลิน ปัจจุบันการรักษาโรคนี้ด้วยการเปลี่ยนถ่ายกลุ่มเซลล์ islet ของตับอ่อนถือว่ามีประสิทธิภาพมาก แต่ปัญหาที่สำคัญคือขาดแคลนผู้บริจาคเนื้อเยื่อเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (ES) จึงเป็นอีกทางเลือก เนื่องจากเซลล์ ES นั้นมีความสามารถแบ่งตัวเองได้ใหม่และสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อคัพภะได้ทั้งสามชั้น การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อผลิตและทดสอบคุณลักษณะของเซลล์ที่ผลิตอินซูลินซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของกระบือ (bES) ในการทดลองนี้เซลล์ bES ถูกชักนำด้วยวิธีการ 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรกปล่อยให้เซลล์พัฒนาตัวเองด้วยการทำ hanging drop เพื่อให้เป็น embryoid bodies (EBs) ใน ES medium ที่ปราศจาก leukemia inhibitory factor (LIF) ที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มี 5% CO<sub>2</sub> ขั้นตอนต่อมาชักนำเซลล์เหล่านี้ด้วย DMEM/F12 ที่ปราศจากซีรัม และมีส่วนผสมของ 10 mM nicotinamide และ 1 µg/ml laminin เป็นเวลา 26 วัน ตรวจสอบเซลล์ที่ผลิตอินซูลินโดยการย้อมด้วย dithizone ซึ่งเป็นสีที่จับกับ zinc และวิเคราะห์การแสดงออกของยีน pancreatic transcription factors PDX1 and PAX4 ด้วยเทคนิค RT-PCR จากการทดลองดังกล่าวสามารถสร้างเซลล์ที่ผลิตอินซูลินซึ่งสังเกตได้จากการติดสีแดงเข้มของ dithizone ผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ bES สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ผลิตอินซูลินได้ และสามารถนำไปทำเป็นแบบจำลองในการรักษาโรคเบาหวานด้วยเซลล์ต้นกำเนิด อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการเพิ่มปริมาณเซลล์ที่ต้องการให้มากขึ้น รวมถึงต้องมีการทดสอบหน้าที่ของเซลล์ทั้งในระดับ in vitro และ in vivo เพื่อนำไปสู่การบำบัดโรคด้วยเซลล์ทดแทน

### Acknowledgements

This work was supported by Thailand Research Fund (Mahidol Grant No. 02011868-0004) and the grant from under the program Strategic Scholarships for Frontier Research Network for the Ph.D. Program Thai Doctoral degree from the Commission on Higher Education, Thailand.

# Functional Analysis of Recombinant Cathepsin B Proteases, a Vaccine Candidate against *Fasciola gigantica*

Manussabhron Sethadavit<sup>1</sup>, Krai Meemon<sup>1</sup>, Prasert Sobhon<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok, Thailand

\*Corresponding author, e-mail: scpsso@mahidol.ac.th

## Abstract

The aims of this study are to analyze the functions of recombinant cathepsin B that could potentially be developed as vaccine against *Fasciola gigantica*. Cathepsin B proteases (FgCatB2 and FgCatB3) were expressed predominantly by metacercariae and newly excysted juvenile (NEJs) of this parasite. Recombinant *F. gigantica* cathepsin B proteases were expressed in the *Pichia pastoris* system and purified using Ni-NTA resin. Purified recombinant cathepsin B proteases were shown to be enzymatically active since they were able to undergo autoprocessing. The recombinant enzyme (rFgCatB3) was able to digest Z-Phe-Arg-AMC at pH 4.5 in the presence of DTT and dextran sulfate (500K). Zymography of recombinant cathepsin B proteases showed clear area of protease activity. The putative function of rFgCatB3 was shown by its ability to cleave fibronectin which suggested that this enzyme may be involved in digesting host connective tissues during penetration and migration on the host. The recombinant FgCatB3 was antigenic in mice and it elicited a high level of IgG1 antibody response. The antibodies to the protein were detected early after infection of mice and rats with *F. gigantica* metacercariae. The kinetics of the response to cathepsin B after infection of mice and rats confirmed the temporal expression of these proteins during the life cycle of the parasite. In addition, rFgCatB3/FA vaccine in mice conferred 41.8% protection against *F. gigantica* infection.

**Keywords:** cathepsin B, *Fasciola gigantica*, liver fluke

## การคุณลักษณะการเป็นเอ็นไซม์ของโปรตีนคาเทปซิน บี สังเคราะห์ เพื่อการพัฒนาวัคซีนต่อโรคพยาธิใบไม้ตับ

มนัสพร เศรษฐดารัตย์, ไกร มีมล, ประเสริฐ โศภน

### บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ เพื่อศึกษาคุณลักษณะและหน้าที่ของโปรตีนคาเทปซิน บี ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการพัฒนาเป็นวัคซีนต่อโรคพยาธิใบไม้ตับ โปรตีนคาเทปซิน บี เป็นโปรตีนหลักที่มีมากที่สุดในพยาธิใบไม้ตับระยะเมตาเซอร์คาเรียและระยะแรกเริ่ม ในการศึกษาครั้งนี้ใช้โปรตีนคาเทปซิน บี ที่สังเคราะห์ขึ้นในยีสต์ *P. pastoris* เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โปรตีนคาเทปซิน บี สามารถแสดงคุณลักษณะการเป็นเอ็นไซม์ โดยสามารถย่อยเจลาตินเจลและย่อยสับสเตรทเรืองแสงสังเคราะห์ นอกจากนี้โปรตีนคาเทปซิน บี ยังสามารถย่อยไฟโบรเนกติน (fibronectin) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของโฮสต์ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าโปรตีนคาเทปซิน บี มีส่วนช่วยพยาธิใบไม้ตับซ่อนไซเนื้อเยื่อของโฮสต์ไปสู่ตับ

โปรตีนคาเทปซิน บี ถูกตรวจพบได้ในซีรัมของหนูแรทและหนูเม้าส์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่าพยาธิใบไม้ตับหลังโปรตีนคาเทปซิน บี ในโฮสต์ การฉีดกระตุ้นหนูเม้าส์ด้วยโปรตีนคาเทปซิน บี3 สังเคราะห์ร่วมกับ Freund's adjuvant ผ่านทางช่องท้อง พบว่าโปรตีนคาเทปซิน บี3 สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองแบบ humoral ได้ โดยพบว่าหนูเม้าส์มีระดับของ IgG1 ในกระแสเลือดสูงขึ้นและผลการทดสอบวัคซีนเบื้องต้น พบว่าโปรตีนคาเทปซิน บี3 สามารถป้องกันหนูเม้าส์จากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับได้ร้อยละ 41.8

### Acknowledgements

This research was supported by the Thailand Research Fund (Senior Research Scholar Fellowship to Prasert Sobhon), the Commission on Higher Education (Ph.D. Scholarship to Manussabhron Sethadavit). We also acknowledge Mahidol University for its financial support.

## Midgut Function in *Aedes Aegypti* Mosquito after Dengue Virus-Blood Ingestion

<sup>1</sup>Leardkamolkarn, V., <sup>2</sup>Kitthawee, S., <sup>3</sup>Ubol, S., <sup>1</sup>Rojananeunnit, S., Sripairojthikoon, W.

<sup>1</sup>Departments of Anatomy, <sup>2</sup>Biology and <sup>3</sup>Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University

<sup>4</sup>Departments of Anatomy, Faculty of Dentistry, Mahidol University

\* Corresponding author, e-mail: scv1k@mahidol.ac.th

### Abstract

Mosquito transmission of virus is via ingestion of virus-blood meal into the gut lumen and processing it to virus multiplication. Therefore, inhibition of virus absorption in the midgut is considered a strategy to control the viral transmission. To understand dengue-vector interaction, we study midgut alteration in respond to the virus-blood meal ingestion. Adult female *Aedes aegypti* mosquitoes were fed with blood meals containing dengue virus type 2 (DEN2), or without the virus, and with 10% sucrose (non-infected control). After 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 and 48 h of the feeding, the whole mosquitoes were collected and fixed in paraformaldehyde. Mosquito tissues were processed for histological staining and examined under the conventional microscope. The results showed various extended in thickness of peritrophic membrane (PM) in the posterior midgut of the virus blood-meal fed mosquitoes which was well correlated to its physiological function. Distribution and amount of the secretory granules in the main enzyme secreting region was increased in infected mosquitoes. Increasing of heme products was also revealed in the virus-infected mosquitoes relative to the non-infected control. The blood meals were fully absorbed into the ovaries by 24 h post feeding. The process of egg formation and maturation in the ovary was not affected by the virus, since eggs were observed in all mosquitoes during 24 h. The complete cycle of blood meals ingestion occur by 48 h. This finding suggested that dengue virus increased mosquito enzyme secretion that enhance viral penetration across the PM. Dengue virus also interfered the vector digestive function by reducing nutrients absorption.

**Keywords:** dengue virus, *Aedes aegypti*, midgut, secretory granules, peritrophic membrane (PM)

## การทำงานของมิดกัตในยุงลายพาหะไข้เลือดออก หลังจากได้รับเชื้อไวรัสเด็งกี

วิจิตรา เลิศกมลกาญจน์, สังวร กิจทวี, ศุภธิดา อุบล, ศศิธร โรจนเนืองนิตย์, วนิดา ศรีไพโรจน์ธิกุล

### บทคัดย่อ

ยุงทำหน้าที่เป็นพาหะนำเชื้อไวรัสได้โดยการกินเลือดที่มีเชื้อไวรัส เมื่อเชื้อไวรัสผ่านเข้าไปในลำไส้ยุงจะมีการเจริญและเพิ่มจำนวนของเชื้อมากขึ้น ดังนั้นการยับยั้งการดูดซึมไวรัสในลำไส้ยุงจึงเป็นกลยุทธ์ในการป้องกันการแพร่เชื้อไวรัสทางหนึ่งซึ่งวิธีการที่จะทำได้จนสำเร็จนั้น จำเป็นต้องอาศัยความรู้เกี่ยวกับยุงและการตอบสนองต่อเชื้อไวรัสที่ยุงกินเข้าไป ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาความเปลี่ยนแปลงในลำไส้ส่วนที่เรียกว่า มิดกัตของยุง ภายหลังจากกินเลือดที่มีเชื้อไวรัส โดยทำการเลี้ยงยุงลายพาหะของไวรัสไข้เลือดออกในกรงภายในห้องทดลองที่ควบคุมได้ ป้อนอาหารที่ประกอบด้วยเลือดและเชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ 2 และให้กลุ่มควบคุมกินเลือด หรือกินน้ำหวานอย่างเดียว ภายหลังจากให้อาหาร 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง นำยุงทดลองทั้งหมดไปแช่ในน้ำยาฟอรมาดีไฮด์ และผ่านขบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ ตัดเนื้อเยื่อ และย้อมสี เพื่อการศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์ ผลการทดลองพบว่า เนื้อเยื่อส่วนที่เรียกว่า เพอริโทรฟิคเมมเบรน ที่อยู่ในมิดกัตส่วนหลังของยุงที่ได้รับเชื้อไวรัสเด็งกีมีความหนาแน่นกว่ายุงที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัส ซึ่งมีความสัมพันธ์กับสภาวะการทำงานของมิดกัต คือมีการดูดซึมของอาหารและเชื้อไวรัสที่ยุงกินเข้าไป นอกจากนี้พบว่าการกระจายของแกรนูลที่มีลักษณะเป็นเม็ดๆ ซึ่งสอดคล้องกับการหลั่งของเอนไซม์จากเซลล์เยื่อบุกระเพาะอยู่ในบริเวณนี้ด้วย และพบว่าการเพิ่มเม็ดสีของฮีโม ที่มาจากการเผาผลาญเม็ดเลือดในกลุ่มยุงที่กินเชื้อไวรัส มากกว่ากลุ่มยุงที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัส ภายหลังจาก 24 ชั่วโมงของการกินอาหารที่มีเชื้อไวรัส ไม่ปรากฏอาหารตกค้างอยู่ในมิดกัต แต่ถูกดูดซึมเข้าไปในรังไข่ของยุง กระบวนการสร้างไข่ และการเจริญเติบโตในรังไข่ของยุงเป็นไปอย่างปกติในยุงกลุ่มติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ การกินอาหารที่ติดเชื้อไวรัสของยุงจบสิ้นกระบวนการภายใน 48 ชั่วโมง สรุพบพบว่าเชื้อไวรัสเด็งกีกระตุ้นการสร้างเพอริโทรฟิคเมมเบรน และ กระตุ้นการหลั่งน้ำย่อยในมิดกัตของยุงลาย ซึ่งมีผลต่อการเร่งการนำไวรัสผ่านเข้าสู่เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารของยุง และมีการชะลอการดูดซึมสารอาหารในกระเพาะของยุง



# The Antimicrobial Activity of *Gracilaria fisheri* Extracts against *Vibrio harveyi* Infection in Shrimp *Penaeus monodon*

Kulwadee Karnjana<sup>1</sup>, Somluk Asuvapongpatana<sup>1</sup>, Boonsirm Withyachamnarnkul<sup>1,2</sup>, Kanokpan Wongprasert<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy and <sup>2</sup>Centex Shrimp, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6<sup>th</sup>. Road, Bangkok 10400, Thailand

\*Corresponding author e-mail: sckbp@mahidol.ac.th

## Abstract

Vibriosis is a common problem world-wide to shrimp culture. It is a bacterial disease responsible for mortality of cultured shrimp and mainly due to vibrio species particularly *Vibrio harveyi* (*V. harveyi*). Probiotics are widely used directly into the water or via feeds to reduce shrimp mortality associated with vibriosis, being the immunostimulant. Numerous studies revealed that compounds from seaweed possess potential antimicrobial activity. Thus, prevention and treatment of bacterial infectious diseases by applying products from seaweed might be a possible alternative. Therefore, the aim of the present study was to explore the antimicrobial activity of the extracts from red seaweed, *Gracilaria fisheri* (*G. fisheri*) against the bacteria *V. harveyi*. The organic solvents including ethanol, methanol, chloroform and hexane were used to extract antimicrobial compounds from *G. fisheri*. The antibacterial activities of all crude extracts were evaluated against the virulence strains of *V. harveyi*; strain 1114, 15326, and 39864 with the disc diffusion method. The minimal inhibitory concentrations of the extracts were also determined. Brine Shrimp Bioassay was performed to investigate the cytotoxicity of the ethanol extract. The antimicrobial effect of the ethanol extract was studied in shrimp *P. monodon*. *P. monodon* injected with the ethanol extract were challenged with the *V. harveyi* strain 1114 and the survival rates of the shrimp were monitored. The survival rate of the shrimp that did not receive the extract and then challenged with the bacteria was used as a control. By disc diffusion method, all extracts showed active antimicrobial activities against the three strains of *V. harveyi*. The ethanol, methanol and chloroform extracts showed antibacterial activities against *V. harveyi* as good as that of norfloxacin and better than the hexane extract. The minimal inhibitory concentrations (MIC) of the four extracts were in the range of 75-200 µg/ml. Toxicity test of the ethanol extract with brine shrimp showed the LC50 at 3 mg/ml. When challenged with the bacteria, the shrimp injected with the ethanol extract showed significant survival rate than that of the control. The results suggested that the ethanol extract of *G. fisheri* are not toxic to brine shrimp and exhibited antimicrobial activity against *V. harveyi* in *P. monodon*.

**Keywords:** antimicrobial activity, *Gracilaria fisheri*, *Penaeus monodon*, *Vibrio harveyi*, cytotoxicity test

## ฤทธิ์การต้านเชื้อของสารสกัดจากสาหร่ายพมนาง ต่อเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง (*Vibrio harveyi*) ในกุ้งกุลาดำ

กุลวดี กาญจนะ, สมลักษณ์ อสุวพงษ์วัฒนา, บุญเสริม วิทยชานานกุล, กนกพรรณ วงศ์ประเสริฐ

### บทคัดย่อ

การติดเชื้อแบคทีเรียเป็นปัญหาที่พบได้บ่อยในการเพาะเลี้ยงกุ้ง โดยจะส่งผลโดยตรงต่ออัตราการตายของกุ้งที่ติดเชื้อส่วนใหญ่ที่พบคือแบคทีเรียเรืองแสง *Vibrio harveyi* มีการใช้โปรไบโอติก (Probiotic) อย่างกว้างขวางเพื่อลดอัตราการตายของกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียโดยใส่ลงในน้ำโดยตรงหรือการให้ในรูปแบบของอาหาร พบว่าโปรไบโอติกเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้กับกุ้ง มีรายงานว่าสารสกัดจากสาหร่ายมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นการใช้สารที่สกัดจากสาหร่ายจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการป้องกันและแก้ปัญหาการติดเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง เป้าหมายในการวิจัยครั้งนี้คือสกัดสารจากสาหร่ายพมนาง (*Gracilaria fisheri*) และศึกษาการต้านเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง *Vibrio harveyi* โดยสกัดสาหร่ายพมนางด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ เมทานอล เอทานอล คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน นำมาทดสอบคุณสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงในงานเลี้ยงเชื้อและทำการทดลองหาความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยที่สุด (Minimal inhibitory concentration, MIC) ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ 50% โดยศึกษากับ แบคทีเรียเรืองแสงที่มีความรุนแรงสายพันธุ์ 1114, 15326 และ 39864 จากนั้นเลือกสารสกัดจากสาหร่ายพมนางที่ให้ผลดีมาทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดในตัวอ่อนของ brine shrimp และทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ ผลการวิจัยพบว่าสารที่สกัดจากเอทานอลและคลอโรฟอร์มให้ผลต้านเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงที่ใกล้เคียงกันกับ Norfloxacin และมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อดีกว่าสารสกัดจากเฮกเซน ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยที่สุดในการต้านเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงของสารสกัดทั้ง 4 ชนิดอยู่ในช่วง 75 -200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นพิษของสารสกัดจากเอทานอลในตัวอ่อนของ brine shrimp (LC 50) มีค่าประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และอัตราการรอดของกุ้งที่ฉีดสารสกัดจากเอทานอลและให้ติดเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงพบว่ามีอัตราการรอดสูงกว่ากลุ่มควบคุม จากผลการวิจัยสรุปได้ว่าสารสกัดจากสาหร่ายพมนางมีความเป็นพิษน้อยมาก (LC50=3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียเรืองแสงในงานเลี้ยงเชื้อ และต้านเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ

# The Effects of Cryoprotectants on Sperm Morphology, Viability and Motility of Polychaete *Perinereis nuntia* Using Vitrification Technique

Werayuth Srithumsuk<sup>1,2</sup>, Duangjai Boonkusol<sup>3</sup>, Pisit Poltana<sup>4</sup>, Kanokphan Wongprasert<sup>1</sup>, Boonsirm Withyachumnarnkul<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok, Thailand

<sup>2</sup> Center of Excellence for Shrimp Molecular Biology and Biotechnology (Centex Shrimp), Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok, Thailand

<sup>3</sup> Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23, Bangkok, Thailand

<sup>4</sup> Department of Adult Nursing, Boromarajajonani College of Nursing, Changwat Nonthaburi, Tiwanon Road, Nonthaburi, Thailand

\*Corresponding author, e-mail: boonsirm@yahoo.com

## Abstract

Capturing of wild polychaete as feed for shrimp and fish broodstock causes serious problems to environmental conservation. Thus it is better to culture polychaete for sustainable shrimp and fish maturation diets and providing a positive solution to the environment. One of the problems in production of polychaete *P. nuntia*, the species mostly found in Thailand, is that male and female rarely spawn on the same day, which severely constrains the chances of fertilization. Thus if sperm and egg can be reserved will facilitate hatchery production. Sperm vitrification of *P. nuntia* has not been studied and there is little knowledge about cryoprotectants that vitrify at non-toxic concentrations. The purpose of this study was to determine the effects of cryoprotectants on sperm morphology, viability and motility of *P. nuntia* using vitrification technique. Six cryoprotectants: dimethylsulfoxide (DMSO), dimethylacetamide (DMA), dimethylformamide (DMF), ethylene glycol (EG), methanol and glycerol were evaluated at 20, 30, 40 and 50% concentrations and the cryoprotectants plus 0.3M trehalose were also determined. After exposed with each cryoprotectant, sperm were placed on vapor liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>) for 5 min and stored in LN<sub>2</sub> for at least 7 days. Sperm were thawed in 30°C filter seawater (FSW) for 25-30 sec and rinsed with FSW. The viabilities of fresh and treated sperm were evaluated. The results demonstrated that sperm exposed to cryoprotectants combined with trehalose exhibited higher sperm viability and motility than those exposed with cryoprotectants without trehalose. Sperm treated with 30% glycerol plus trehalose showed the highest percentages of viability and percentages of motility (64.67±5.92 and 59.83±7.84, respectively). The sperm viabilities and motilities slightly decreased in groups treated with 30%DMSO plus trehalose or 30%EG plus trehalose. Whereas sperm treated with 30% methanol plus trehalose, 30%DMF plus trehalose, 30%DMA plus trehalose, showed less than 50% viabilities and motilities. The post thawed dead sperm showed abnormal morphology including acrosome eversion, head swelling and abnormal flagellum. In conclusion, among the six cryoprotectants, 30%glycerol, 30%DMSO and 30%EG showed less toxicity (60-65 cell viability) for *P. nuntia* sperm cryopreservation. The combination of these cryoprotectants with trehalose enhanced a better sperm viability and motility.

**Keywords:** cryopreservation; cryoprotectants; *Perinereis nuntia*; spermatozoa; vitrification

## ผลของสารแช่แข็งต่อโครงสร้าง, อัตราการรอดและอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิเพรียงทราย *Perinereis nuntia* โดยวิธีวิทริฟิเคชัน

วีรยุทธ ศรีทุมสุข, ดวงใจ บุญกุลศล, พิศิษฐ์ พลธนะ, กนกพรพรรณ วงศ์ประเสริฐ, บุญเสริม วิทยชานาญกุล

### บทคัดย่อ

การจับเพรียงทราย *P. nuntia* จากธรรมชาติเพื่อเป็นอาหารของพ่อแม่พันธุ์กุ้งและปลาทะเลนั้นทำให้ปริมาณเพรียงทรายในธรรมชาติลดลงหรือสูญพันธุ์ไป เพื่อป้องกันการเกิดปัญหาดังกล่าวการเพาะเลี้ยงเพรียงทรายจึงเป็นวิธีการที่ดี ทำให้มีเพรียงทรายที่เพียงพอ ปัญหาหนึ่งในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงเพรียงทราย *P. nuntia* ในประเทศไทยคือโอกาสที่อสุจิและไข่ของเพรียงทรายจะออกมาในวันและเวลาเดียวกันนั้นน้อยมาก จึงทำให้การปฏิสนธิเกิดขึ้นได้ค่อนข้างยาก ดังนั้นการเก็บรักษาอสุจิและไข่ของเพรียงทรายน่าจะเป็นวิธีการที่ช่วยในการเพาะฟักได้ วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือเพื่อศึกษาผลของสารแช่แข็งต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอสุจิ อัตราการรอดและอัตราการเคลื่อนที่ของเพรียงทราย โดยวิธีแช่แข็งแบบวิทริฟิ

เกชััน ใช้สารแช่แข็ง 6 ชนิดคือ dimethylsulfoxide (DMSO) dimethylacetamide (DMA) dimethylformamide (DMF) ethylene glycol (EG) methanol และ glycerol ที่ความเข้มข้น 20, 30, 40 และ 50% และยัังศึกษาผลของสารแช่แข็งแต่ละชนิดเมื่อผสมกับ trehalose 0.3 M อีกด้วย การทดลองทำโดยนำอสุจิของเพรียงทรายผสมสารแช่แข็งแต่ละชนิดแล้ววางไว้ในไธระเหยของไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 5 นาที เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลาอย่างน้อย 7 วัน จากนั้นนำมาละลายด้วยน้ำทะเลที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25-30 วินาทีและล้างด้วยน้ำทะเลจำนวน 4 ครั้ง ประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิได้กัล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ผลการทดลองพบว่าอสุจิที่แช่ในสารแช่แข็งที่ผสมกับ trehalose มีอัตราการรอดและอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ผสมกับ trehalose โดยอสุจิที่แช่ใน 30% glycerol+trehalose ให้ผลดีที่สุดคืออัตราการรอด  $64.67 \pm 5.92\%$  และอัตราการเคลื่อนที่  $59.83 \pm 7.84\%$  อัตราการรอดและการเคลื่อนที่ลดลงเล็กน้อยในกลุ่มของอสุจิที่แช่ใน 30% DMSO+trehalose และ 30% EG+trehalose ในขณะที่อสุจิที่แช่ใน 30% methanol+trehalose 30% DMF+trehalose และ 30% DMA+trehalose มีอัตราการรอดและการเคลื่อนที่น้อยกว่า 50 % การศึกษาโครงสร้างของอสุจิหลังแช่แข็งพบว่าการหลุดของ acrosome ส่วนหัวของอสุจิบวมและมีความผิดปกติของส่วนหาง สรุปได้ว่า จากสารแช่แข็งทั้ง 6 ชนิดนั้น 30% glycerol 30% DMSO และ 30% EG ให้ผลอัตราการรอดและการเคลื่อนที่ของอสุจิที่แช่แข็งแบบวิธีที่เกชัันดีกว่ากลุ่มอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าสารแช่แข็งเหล่านี้เมื่อผสมกับ trehalose จะมีอัตราการรอดและการเคลื่อนที่ของอสุจิมากขึ้น

# The Level of Molt-Inhibiting Hormone (MIH) In Small Growth and Normal Growth Shrimp *Penaeus Monodon*

Benjamart Pratoomthai<sup>1,2</sup>, Waraporn Sakaew<sup>1,2</sup>, Apinunt Udomkit<sup>3</sup>, Kanokpan Wongprasert<sup>1</sup>, Boonsirm Withyachumnarnkul<sup>1,2,4\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand

<sup>2</sup> Centex Shrimp, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand

<sup>3</sup> Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Salaya Campus, Nakhon Pathom 73170, Thailand

<sup>4</sup> National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency, Klong 1, Klong Luang, Pratum Thani 12120, Thailand

\*Corresponding author, e-mail: boonsirm@yahoo.com

## Abstract

Monodon slow growth syndrome (MSGs) is an important problem that causes the reduction of shrimp production. Recently, it has been reported about the retinopathy in stunted black tiger shrimp *Penaeus monodon* and possible association with LSNV. How retinopathy involves in stunted shrimp is unknown. The objectives of this study are to compare molt interval and molt frequency, including the transcription level of molt-inhibiting hormone (MIH) between small shrimp and large shrimp from MSGS pond and normal growth shrimp from normal growth pond by using real-time PCR. The results showed that the molt frequency of small shrimps was higher than other groups. The average of molt interval was  $12.83 \pm 1.92$  days for small shrimps,  $16.45 \pm 2.67$  days for large shrimp from the slow growth pond and  $15.95 \pm 2.43$  days for normal growth shrimp from normal growth pond. When compared the level of MIH by real-time PCR the result showed that the transcription of MIH in small shrimps was lower than other groups in all stages of molting (postmolt, intermolt, early premolt, late premolt). The results from this study suggest that retinopathy may be involved in the reduction of MIH levels.

**Keywords:** monodon slow growth syndrome, molt-inhibiting hormone

## ระดับ Molt-Inhibiting Hormone ในกุ้งกุลาดำโตช้าและโตปกติ

เบญจมาศ ประทุมไทยม, วรภรณ์ สากแก้ว, อภินันท์ อุดมกิจ, กนกพรรณ วงศ์ ประเสริฐ, บุญเสริม วิทยชานาญกุล

### บทคัดย่อ

โรคกุ้งโตช้าเป็นปัญหาที่สำคัญที่พบในประเทศไทยและเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้มีการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยน้อยลง ปัจจุบันสาเหตุของการโตช้าในกุ้งกุลาดำยังไม่ทราบแน่ชัดและเมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีการพบการติดเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ในดากุ้งซึ่งถือว่าเป็นอวัยวะที่สำคัญในการสร้างฮอร์โมนต่างๆ รวมถึงฮอร์โมนที่ยับยั้งการลอกคราบ (molt-inhibiting hormone (MIH)) จุดประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือต้องการเปรียบเทียบอัตราการลอกคราบ และ ระดับ MIH ในกุ้งกุลาดำที่โตช้าและโตปกติจากบ่อโตช้า และกุ้งโตปกติจากบ่อโตปกติโดยใช้เทคนิค real-time PCR ซึ่งผลจากการทดลองพบว่ากุ้งโตช้ามีอัตราการลอกคราบเร็วกว่ากุ้งโตปกติ โดยมีช่วงระยะเวลาการลอกคราบเฉลี่ยในกุ้งโตช้า  $12.83 \pm 1.29$  วัน กุ้งโตปกติจากบ่อโตช้า  $16.45 \pm 2.67$  วัน กุ้งโตปกติจากบ่อโตปกติ  $15.95 \pm 2.43$  วัน ซึ่งผลจาก real-time PCR พบว่าในกุ้งโตช้ามีระดับ MIH น้อยกว่า ในกุ้งกุลาดำที่โตปกติในทุกๆระยะของการลอกคราบ ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการติดเชื้อไวรัสในดากุ้งอาจเกี่ยวข้องกับการลดลงของระดับ MIH

# Vertical and Horizontal Transmission of Laem-Singh Virus (LSNV) in the Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon*

Waraporn Sakaew<sup>1,2</sup>, Benjamart Pratoomthai<sup>1,2</sup>, Kanokpan Wongprasert<sup>1</sup>, Boonsirm Withyachumnarnkul<sup>1,1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand

<sup>2</sup> Centex Shrimp, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand

<sup>3</sup> National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency, Klong 1, Klong Luang, Pratum Thani 12120, Thailand

\*Corresponding author, e-mail: boonsirm@yahoo.com

## Abstract

In 2005, it has been reported about the new virus that found in monodon slow growth shrimp (MSGs) that is called laem-singh virus (LSNV). Recently, it has been reported about the retinopathy in stunted black tiger shrimp *Penaeus monodon* and possible association with LSNV. The objective of this study is to study the vertical and horizontal transmission of LSNV that may be helpful to prevent the infection of this virus. To study the vertical transmission, swimming leg from broodstock female and shrimp from various stages of shrimp development; nauplius, zoea, mysis, postlava 5 (PL5) and PL15 were used for RNA extraction and RT-PCR. The RT-PCR showed positive results of swimming leg broodstock female, shrimp from zoea and mysis stage. To study horizontal transmission, juvenile shrimps infected with LSNV were co-cultured with non-infected LSNV shrimp, and RT-PCR was performed from swimming legs every week. The results showed 100% positive at the 5<sup>th</sup> weeks after co-culture. The results from this study can conclude that LSNV infection occurs through both vertical and horizontal transmission.

**Key words:** LSNV, vertical transmission, horizontal transmission

## การติดเชื้อไวรัสแหลมสิงห์จากแม่สู่ลูก และจากกุ้งตัวหนึ่งสู่กุ้งอีกตัวหนึ่ง

วารภรณ์ સાઁก้ว, เบญจมาศ ประทุมไทย, กนกพรพรณ วงศ์ ประเสริฐ, บุญเสริม วิทย์ชานาญกุล

### บทคัดย่อ

ปัจจุบันสาเหตุของการโตช้าในกุ้งกุลาดำยังไม่ทราบแน่ชัด ซึ่งในปี พ.ศ 2549 ได้มีการพบไวรัสแหลมสิงห์ในกุ้งโตช้า ซึ่งต่อมามีรายงานว่าพบความผิดปกติในตาของกุ้งที่โตช้าและน่าจะเกี่ยวข้องกับไวรัสแหลมสิงห์ จุดประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อที่จะศึกษาการติดเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ว่าสามารถติดต่อจากแม่ไปสู่ลูก และสามารถติดเชื้อจากกุ้งตัวหนึ่งไปยังกุ้งอีกตัวได้หรือไม่ ซึ่งการศึกษาการติดเชื้อจากแม่ไปสู่ลูกนั้น ได้นำขาวว่ายน้ำของกุ้งแม่พันธุ์ และลูกกุ้งระยะ nauplius, zoea, mysis, postlava 5 (PL5) and PL15 มาศึกษาโดยวิธี RT-PCR ซึ่งผลจากการทดลองพบว่าให้ผลบวกในแม่พันธุ์ และลูกกุ้งในระยะ zoea and mysis สำหรับการศึกษาการติดเชื้อจากกุ้งตัวหนึ่งไปยังกุ้งอีกตัวได้หรือไม่ นั้น ได้นำกุ้งลาดำที่ไม่ติดเชื้อไวรัสแหลมสิงห์มาเลี้ยงรวมกับกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ และได้นำขาวว่ายน้ำมาทำการตรวจโดยวิธี RT-PCR ทุกอาทิตย์ จากผลการทดลองพบว่าให้ผลบวก 100% ในอาทิตย์ที่ 5 ของการเลี้ยง ซึ่งจากผลการทดลองในครั้งนี้พบว่าการติดเชื้อไวรัสแหลมสิงห์สามารถถ่ายทอดจากแม่สู่ลูกได้ และสามารถติดต่อจากกุ้งตัวหนึ่งไปยังกุ้งอีกตัวได้

## Characterization of the Nacre Organic Matrix Extracted from *Haliotis asinina*

Supita Tanasawet<sup>1</sup>, Somluk Asuvapongpatana<sup>1</sup>, Wattana Weerachayanukul<sup>1</sup>, Boonsirm Withyachamnarnkul<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy and <sup>2</sup>Center of Excellence for Shrimp Molecular Biology and Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

\*Corresponding author, e-mail: boonsirm@yahoo.com

### Abstract

The nacre, or mother-of-pearl, is derived from the inner shell layer. It is a biomaterial consisting mainly calcium carbonate and, to a minor extent, organic matrix. The organic matrix, containing proteins and polysaccharides, has been classified into two categories water-soluble and water-insoluble materials. Physiologically, nacre exerts the ability in stimulating bone repair after implantation into sheep femur at the interface between bone and nacre. Based on the *in vitro* studies, the water-soluble matrix (WSM) extracted from nacre generally displays a biological activity on osteogenic cell lineage, in addition to its biocompatible property. It has been generally known that nacre of *Haliotis asinina*, abundantly available in Thailand is one of an indispensable ingredient of Chinese medicine. In this study, we therefore aimed to extract and purify nacre WSM from *H. asinina*. WSM was obtained from the nacre of whole shells or from inner nacreous layer of the shells. The powdered nacre was resuspended in distilled water, dialysed against 0.02 M Tris-buffer and analyzed by SDS-PAGE. Interestingly, WSM extracted from the inner nacreous layer revealed some predominant proteins with the molecular masses of 60 and 70 kDa. A soluble 60 kDa protein band was also shown as a protein extractable from *Pinctada fucata*, whereas a 70 kDa protein appeared to be a unique protein in *H. asinina* species. On the other hand, the nacre of whole shells revealed more protein bands, most of which had low molecular masses ranging from 15-30 kDa. Role of these proteins in osteoinduction both *in vitro* and *in vivo* system is currently under investigation.

**Keywords:** nacre; organic matrix; *Haliotis asinina*

## การศึกษาการสกัดสารอินทรีย์จากมุกของหอยเป่าชื่อ *Haliotis asinina*

ศุภิดา ธนะเศวตร, สมลักษณ์ อสุวพงษ์พัฒนา, วัฒนา วีระชาติยานุกูล, บุญเสริม วิทย์ชำนานกุล

### บทคัดย่อ

มุกที่ได้มาจากเปลือกหอยชั้นในเป็นองค์ประกอบทางชีวภาพ ซึ่งมีแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นองค์ประกอบหลักและมีสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ อีกเล็กน้อย สารประกอบอินทรีย์เหล่านี้ประกอบด้วยโปรตีนและโพลีแซคคาไรด์ โดยแบ่งออกเป็นสองส่วนที่สามารถละลายน้ำได้ และส่วนที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ ในด้านสรีระวิทยามีการศึกษาโดยการปลูกถ่ายชั้นมุกลงไปใ้ในกระดูกขาท่อนบนของแกะ พบว่ากระดูกตำแหน่งที่เชื่อมต่อกับชั้นมุกได้รับการกระตุ้นให้มีการซ่อมแซม การศึกษาทดลองทางห้องปฏิบัติการ สารสกัดที่ละลายน้ำได้จากมุกมีคุณสมบัติในการแสดงลักษณะทางชีวภาพต่อเซลล์จำพวกกระดูก นอกจากนี้มุกยังมีความสามารถในการเข้ากันทางชีวภาพได้อีกด้วย มุกจากหอยเป่าชื่อ *Haliotis asinina* ซึ่งพบได้มากในประเทศไทย เป็นหนึ่งในองค์ประกอบที่จำเป็นของการแพทย์แผนจีน วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อสกัดและแยกสารสกัดที่ละลายน้ำได้จากมุกของหอยเป่าชื่อ *Haliotis asinina* สารสกัดที่ละลายน้ำได้นั้นได้มาจากเปลือกหอยทั้งเปลือกหรือจากชั้นในของหอยมุกโดยจะนำมาละลายด้วยน้ำและไดอะไลซ์ต่อ 0.02 M Tris-buffer และถูกวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE จากการศึกษาพบว่าสารสกัดที่ละลายน้ำได้จากมุกนั้นพบโปรตีนโมเลกุลที่ 60 และ 70 กิโลดัลตัน โดยโปรตีนที่ 60 กิโลดัลตันที่พบนี้สอดคล้องกับการโปรตีนที่สกัดได้จาก *Pinctada fucata* ในขณะที่โปรตีนโมเลกุลที่ 70 กิโลดัลตันนั้นเป็นโปรตีนที่อาจจะพบเฉพาะใน *H. asinina* อย่างไรก็ตามมุกที่สกัดจากเปลือกหอยทั้งเปลือกนั้นพบโปรตีนที่หลายระดับซึ่งส่วนมากแล้วจะมีช่วงของมวลโมเลกุลอยู่ที่ 15-30 กิโลดัลตัน บทบาทของโปรตีนนี้ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของกระดูกทั้งทางห้องปฏิบัติการและสัตว์ทดลองกำลังอยู่ในระหว่างการดำเนินการ

## Isolation of Sulfated Galactans from *Gracilaria fisheri* and Its Antiviral Activity against White Spot Syndrome Virus (WSSV)

Tawut Rudtanatip<sup>1</sup>, Boonsirm Withyachamnarnkul<sup>1,2</sup>, Kanokpan Wongprasert<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Anatomy and <sup>2</sup> Centex Shrimp, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6<sup>th</sup>. Road, Bangkok 10400, Thailand

\*Corresponding author e-mail: sckbp@mahidol.ac.th

### Abstract

Previous studies revealed a kind of polysaccharides, sulfated galactans, presented in the extracellular matrix of red algae has an anti-viral property. In this study, sulfated galactans was isolated from marine red algae *Gracilaria fisheri* (*G. fisheri*) and screened for the anti-viral activity in shrimp *Penaeus monodon* (*P. monodon*). *G. fisheri* was collected from the farm of Charoen Pokphand Foods Public Co. Ltd. in Nakhonsrithammarat province, Thailand. The sulfated galactans was isolated by cold water extraction and the soluble polymers were retrieved by the freeze-thaw processes. The cytotoxicity assay of sulfated galactans was performed in brine shrimp larvae and the anti WSSV activity was evaluated by injection of two concentrations of sulfated galactans to the shrimp *P. monodon*. *P. monodon* weight about 15-20 g, were divided into four groups of 25 shrimp each: 1) normal control, 2) WSSV infection control, 3) sulfated galactans at 10 µg/g body weight (BW) injected and 4) sulfated galactans at 100 µg/g of BW injected. Three days after the first injection, the shrimp were injected again with the same concentrations of the sulfated galactans. The shrimp were challenged with WSSV on day 3 after the second injection and the mortality rate was monitored for a period of 7 days. The result revealed that sulfated galactans extracted from *G. fisheri* showed no toxicity to brine shrimp at the concentration ranging from 100-5,000 µg/ml. For the challenge test, at day 2 post-challenge the infection control group reached 100% mortality whereas shrimp injected with sulfated galactans both at 10 and 100 µg/g BW showed much less mortality rates (25% and 12.5% respectively). At the end of the experiment, day 7 post-challenge, the accumulated mortality rates of 10 and 100 µg/g BW sulfated galactans injected shrimp were about 35 % and 25 %, respectively. The results suggested that the sulfated galactans showed a very less toxicity and helped to delay the mortality of shrimp infected with WSSV. In conclusions, the sulfated galactans isolated from *G. fisheri* might exhibits antiviral activity against WSSV or increases defense mechanisms in shrimp. The optimum conditions for sulfated galactans injection and the mechanism of protection need to be clarify further.

**Keywords:** *Gracilaria fisheri*, sulfated galactans, WSSV, *Penaeus monodon*, toxicity test

### การสกัดสาร Sulfated Galactans จากสาหร่ายผมนางและฤทธิ์ความต้านการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

ทวัฐ รัดนทีพิทย์, บุญเสริม วิทย์ชำนานกุล, กนกพรพรรณ วงศ์ประเสริฐ

#### บทคัดย่อ

Sulfated galactans เป็นสารโพลีแซคคาไรด์ที่อยู่ใน extracellular matrix ของสาหร่ายสีแดง ฤทธิ์ทางชีวภาพของ sulfated galactans ที่สำคัญอย่างหนึ่งคือฤทธิ์การต้านไวรัส ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสกัด sulfated galactans จากสาหร่ายผมนาง *Gracilaria fisheri* (*G. fisheri*) และตรวจหาฤทธิ์การต้านเชื้อไวรัสของสารสกัดในกึ่งกุลาดำ ตัวอย่างสาหร่ายผมนาง *G. fisheri* ได้มาจากฟาร์มของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช นำมาสกัดสาร sulfated galactans ด้วยน้ำเย็น จากนั้นแช่ให้แข็งที่อุณหภูมิ -10 องศาและนำมาละลายเพื่อให้ได้สาร sulfated galactans นำสารสกัดไปทดสอบความเป็นพิษกับ brine shrimp และตรวจหาฤทธิ์การต้านทานเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกุลาดำ ทำการฉีดสารสกัด sulfated galactans ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 2 ค่าให้กับกึ่งกุลาดำที่มีน้ำหนัก 15-20 กรัม โดยแบ่งกึ่งเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 25 ตัว กลุ่มที่ 1 กึ่งกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 2 กึ่งที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว กลุ่มที่ 3 กึ่งที่ฉีดสารสกัด sulfated galactans 10 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัม และกลุ่มที่ 4 กึ่งที่ฉีดสารสกัด sulfated galactans 100 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัม หลังฉีด sulfated galactans 3 วัน ฉีดสารสกัดซ้ำอีกครั้ง 3 วันต่อมาจึงฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวให้กึ่งกุลาดำ สืบวจอัตราการตายของกึ่งหลังจากได้รับเชื้อไวรัสต่อไปอีก 7 วัน ผลการทดลองพบว่า sulfated galactans ที่ความเข้มข้น 100 – 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรไม่เป็นพิษต่อ brine shrimp ผลการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวพบว่า วันที่ 2 หลังฉีดเชื้อไวรัส กึ่งที่ได้รับเชื้อไวรัสมีอัตราการตาย 100% ในขณะที่กึ่งที่ฉีดสารสกัด sulfated galactans 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมก่อนได้รับเชื้อไวรัสมีอัตราการตายที่น้อยกว่า (25% และ 12.5% ตามลำดับ) เมื่อเสร็จสิ้นการทดลองในวันที่ 7 หลังฉีดเชื้อไวรัส อัตราการตายของกึ่งกลุ่มฉีดสารสกัด sulfated galactans 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมเป็น 35% และ 25% ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัด sulfated galactans มีความเป็นพิษน้อยมาก และช่วยชะลอการตายของกึ่งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ ดังนั้นสารสกัด sulfated galactans ที่สกัดจากสาหร่าย *G. fisheri* อาจมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อไวรัส หรือเพิ่มภูมิคุ้มกันในกึ่ง อย่างไรก็ตามความเหมาะสมของความเข้มข้น ช่วงเวลา และระยะเวลาการฉีดสารสกัด sulfated galactans รวมถึงกลไกในการป้องกันการติดเชื้อ WSSV ของ sulfated galactans ในกึ่งกุลาดำยังต้องมีการศึกษาต่อไป