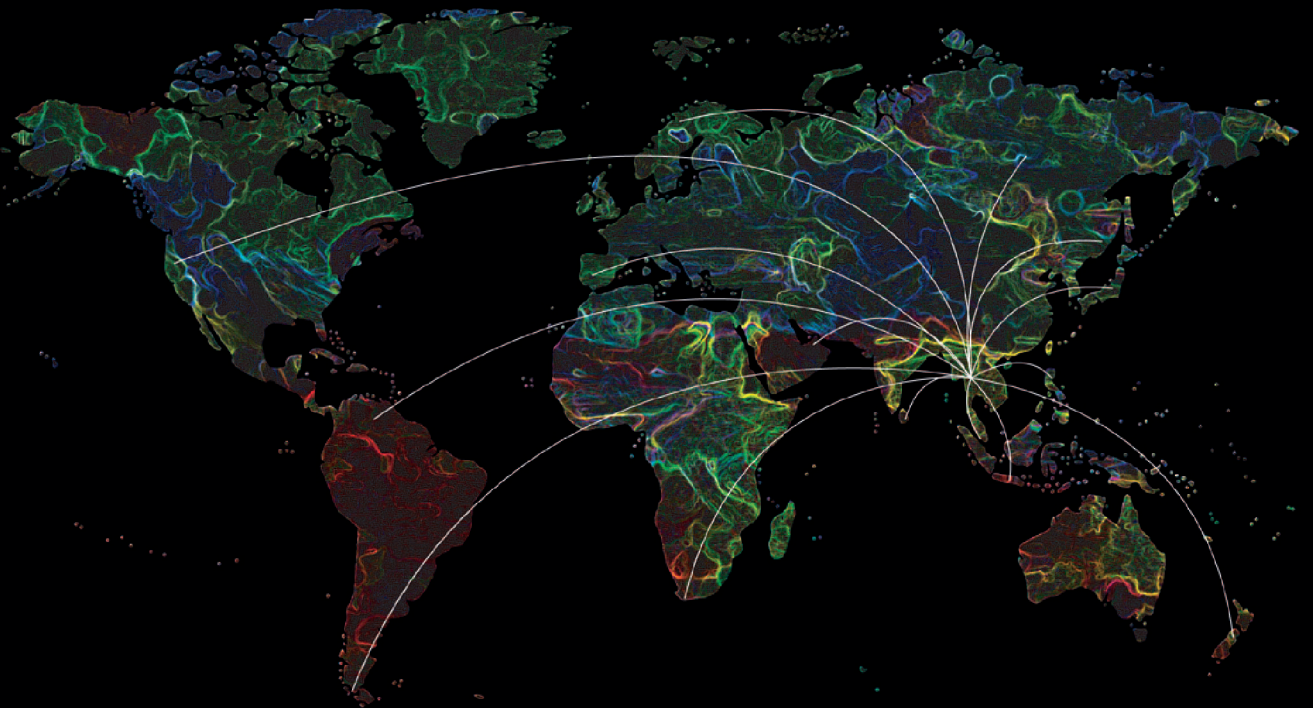


# VETERINARY INTEGRATIVE SCIENCES

ISSN 2629-9968

Volume 16  
Number 2  
Year 2018





# VETERINARY INTEGRATIVE SCIENCES

Volume 16 No.2 May-August 2018

ISSN 2629-9963

<http://www.vet.cmu.ac.th/cmvi/>

**Owner** Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University

---

## ABOUT JOURNAL

“Veterinary Integrative Sciences” is the official peer-reviewed journal of the Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand.

Aims to be a publisher of a wide range of high quality academic journals such as research articles, review articles, short communication, and case report in the field of veterinary, animal science and technology, including biology, physiology, anatomy&histology, microbiology, pathology, nutrition, genetics, internal medicine, surgery, obstetrics, biological science, basic science, one health and veterinary education.

Articles that are published under our journal are double-blind peer reviewed by at least two experts. The opinions of each author might not be agreed upon by the editorial board.

## EXECUTIVE EDITOR

Dean, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand

Associate Dean for Research Affairs, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand

## EDITOR-IN CHIEF

Assoc. Prof. Dr.Korakkot      Nganvongpanit      Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand

## ASSOCIATE EDITOR

Assist. Prof. Dr.Anucha      Sathanawongs      Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand

## EDITORIAL BOARD MEMBER NATIONAL EDITORIAL BOARD

Prof. Dr.Roongroj	Thanawongnuwech	Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University,Thailand
Prof. Dr.Padet	Tummaruk	Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University,Thailand
Assoc.Prof. Dr.Prapas	Patchanee	Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University,Thailand
Assist.Prof. Dr.Kumpanart	Soontornvipart	Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University,Thailand
Assist. Prof. Dr.Piyanan	Taweethavonsawat	Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University,Thailand
Assist. Prof. Dr. Win	Surachetpong	Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University,Thailand
Assist. Prof. Dr.Dilok	Wongsathein	Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Assist. Prof. Dr.Chatchote	Thitaram	Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Assist. Prof. Dr. Phongsakorn	Chuammitri	Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Assist. Prof. Dr.Siriporn	Khumsap	Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Lect. Dr. Nithidol	Buranapim	Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Lect. Dr. Charoonluk	Jirapattharasate	Faculty of Veterinary Medicine, Mahidol University, Thailand
Lect. Dr. Kittisak	Buddhachat	Faculty of Science, Naresuan University, Thailand
Dr. Piyaporn	Kongmakee	Zoological Park Organization under the Royal Patronage of His Majesty the King, Thailand
Dr. Patcharaporn	Kaewmong	Phuket Marine Biological Center, Thailand

## INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD

Prof. Dr. Kazuyoshi	Taya	Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan
Prof.Dr.Gen	Watanabe	Department of Veterinary Physiology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan
Prof. Dr. Ayona	Silva-Fletcher	Department of Clinical Sciences and Services, The Royal Veterinary College, University of London, UK
Prof.Dr.Thomas	Alter	Institute of Food Safety and Food Hygiene, Department of Veterinary Medicine, FreieUniversitaet Berlin, Germany
Prof. Dr. Karl	Schellander	InstitutfrTierwissenschaften, Universitt Bonn, Germany
Prof.Dr. Junpei	Kimura	College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Korea
Prof. Dr. Oswin	Perera	Sri Lanka Wildlife Health Centre, Sri Lanka
Prof. KushalKonwar	Sarma	Department of Surgery and Radiology, College of Veterinary Science, Assam Agricultural University, India

Assoc. Prof. Dr. Ashraf Abd El-Halim El-Sayed		Faculty of Agriculture, Cairo University, Egypt
Assoc. Prof. Dr. Nguyen TrongNgu		College of Agriculture & Applied Biology, Can Tho University, Vietnam
Dr. Janine L. Brown		Smithsonian Conservation Biology Institute, USA
Dr. Edward Peter		Snelling School of Physiology, University of the Witwatersrand, South Africa
Dr. Andrew Paul Shinn		Benchmark Animal Health, Scotland, UK
Dr. Khyne U Mar		Myanmar Elephant Research Project, Yangon, Myanmar
Dr. Nares Trakooljul		Leibniz-Institute for Farm Animal Biology (FBN), Institute for Genome Biology, Germany
Dr. Temidayo Olutayo Omobowale		Department of Veterinary Medicine, University of Ibadan, Nigeria
Dr. Scott B. Citino		White Oak Conservation, Florida, USA
Dr. Jeewan Thapa		Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University, Japan

#### MANAGING EDITORS

Mr. Thanapun Kankonsue		Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Miss Suludda Aimmak		Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Mrs. Thitirat Kosanasanti		Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Mr. Toranin Charungsuk		Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand
Miss Duannapa Ta-Inthu		Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand

#### ADDRESS

Edit-in chief Veterinary Integrative Sciences  
Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University  
Chonpratan Road, Maehia, Muang, Chiang Mai 50100 Thailand  
E-mail : cmuvetj@gmail.com  
Tel. (66)-5394-8057, 8070  
Fax. (66)-5327-4710



Filarial worms in dogs in Southeast Asia <i>Manusvee Kaikuntod, Kriangkrai Thongkorn, Saruda Tiwananthagorn, Chavalit Boonyapakorn</i>	1
Histiocytic sarcoma in dogs <i>Atigan Thongtharb</i>	19
Anti-adipogenesis activities of <i>Zingiber cassumunar</i> Roxb. rhizome extracts on L929 cells evaluated by image-based analysis <i>Rungnapa Sririwichitchai, Aroonchai Saiai, Kewalin Inthanon, Siriwadee Chomdej, Weerah Wongkham, Weerasak Roongruangwongse</i>	35
The anatomical study of water monitor ( <i>Varanus salvator</i> ) skin to apply for leatherwork production <i>Sirorat Sribanjam, Siripavee Charoenwattanasak, Thongchai Champasri, Chamaiporn Champasri, Budit Yuangsoi</i>	53
Detection for potentially zoonotic gastrointestinal parasites in long-tailed macaques, dogs and cattle at Kosamphi forest park, Maha Sarakham <i>Natapol Pumipuntu</i>	69
Structure of the heart wall and existence of the blood cells in the heart of the dog-faced water snake <i>Cerberus rynchops</i> (Schneider, 1799) <i>Lamai Thongboon, Sinlapachai Senarat, Jes Kettratad, Pisit Poolprasert, Sansareeya Wangkulangkul, Wanee Jiraungkoorskul, Ezra Mongkolchaichana, Theerakamol Pengsakul, Shuaiqin Huang, Chamnan Para</i>	79
Histopathology of kidney and liver in the captive broodstock ( <i>Rastrelliger brachysoma</i> ) during its juvenile stage <i>Sinlapachai Senarat, Jes Kettratad, Sasipong Tipdomrongpong, Theerakamol Pengsakul, Wanee Jiraungkoorskul, Piyakorn Boonyoung, Shuaiqin Huang</i>	87
The effect of Curcumin on growth performance, blood biochemistry and antioxidant activities in boiler chickens <i>Charinya Pimson, Phornnipa Bakban, Sunadda Suwanrat, Natedara Chanutsa</i>	95
Carcinogenicity and proteomic analysis of <i>N</i> -nitrosodiethylamine in rats <i>Orapin Insuan, Suphachai Charoensin, Sittiruk Roytrakul, Tarika Thumvijit, Piyawan Bunpo, Rawiwan Wongpoomchai</i>	109
Molecular detection of piroplasms in haematophagus flies in the Nakhon Pathom and Kanchanaburi Provinces, Thailand <i>Charoonluk Jirapattharasate, Tanasak Changbunjong, Poonyapat Sedwisai, Thekhawet Weluwanarak</i>	123





Vet Integr Sci  
**Veterinary Integrative Sciences**

ISSN: 2629-9968 (online)

Website: www.vet.cmu.ac.th/cmvi

**Review article****Filarial worms in dogs in Southeast Asia**Manusvee Kaikuntod<sup>1</sup>, Kriangkrai Thongkorn<sup>2</sup>, Saruda Tiwananthagorn<sup>3</sup> and Chavalit Boonyapakorn<sup>2,\*</sup><sup>1</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50100, Thailand<sup>2</sup>Department of Companion Animal and Wildlife Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50100, Thailand<sup>3</sup>Department of Veterinary Bioscience and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50100, Thailand**Abstract**

Filariasis is a public health problem in tropical and subtropical areas and thus an endemic is commonly found in Southeast Asian countries. The most frequently-found species of filarial worms in dogs in this region is *Dirofilaria immitis*, with the prevalence of infection rates ranges from 1- 46%. In 2017, the prevalence of dogs infected with *D. immitis* in Songkhla and Satun, Thailand, was 24.1%. In addition, the infections of *Brugia malayi* in both dogs and humans were reported in Malaysia, Brunei, Indonesia, Vietnam, Cambodia, Philippines, and Thailand. In 2011, the prevalence *B. malayi* infection in Malaysia was 36.20%. Infections of other species of filarial worms including *D. repens*, *B. pahangi* and *Acanthocheilonema reconditum* were reported in dogs in this region as well as Thailand. Filarial worms are both pathogenic and non-pathogenic. Some species such as *D. immitis* cause heartworm disease that is dangerous to their hosts and lead to zoonotic infection in its accidental host as evidenced in the previous report of lung lesion in human. Although *B. malayi* primarily causes elephantiasis in human, its infection is also found in reservoir animals. The purpose of this article is therefore to review literature related to filariasis by focusing on classification, biology, and life cycle of filarial worms, epidemiology of filarial worms in Southeast Asia, clinical sign and filariasis diagnosis. This review is expected to contribute to effective disease control and prevention strategies in the future.

**Keywords:** : Filarial worms, Microfilaria, Dogs, Southeast Asia

\*Corresponding author: Chavalit Boonyapakorn, Department of Companion Animal and Wildlife Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, 115 Mae Hia, Muang, Chiang Mai, 50100 E-mail: chavalit.b@cmu.ac.th

**Article history:** received manuscript: 2 February 2018, accepted manuscript: 16 May 2018, published online: 15 June 2018

**Academic editor:** Korakot Nganvongpanit

## บทนำ (INTRODUCTION)

พยาธิฟิลาเรีย (filarial worms) เป็นปรสิตที่มีความสำคัญทางคลินิกเนื่องจากเป็นภัยคุกคามต่อชีวิตสุนัขซึ่งเป็นสัตว์เลี้ยงที่มีความใกล้ชิดกับมนุษย์โดยเฉพาะกลุ่มประเทศที่อยู่ในพื้นที่เขตร้อนและกึ่งร้อน (Melrose and Goldsmid, 2005) เชื้อพยาธิฟิลาเรียที่สำคัญในภูมิภาคนี้ เช่น *Dirofilaria* spp., *Brugia* spp. และ *Wuchereria* spp. ซึ่งเป็นชนิดที่อันตรายต่อโฮสต์และนำไปสู่การป่วยและเสียชีวิต โดยเฉพาะการติดเชื้อ *D. immitis* ในสุนัข และการติดเชื้อ *B. malayi* และ *W. bancrofti* ในมนุษย์ (Kobasa et al., 2004; Anderson, 2000) นอกจากนี้มีพยาธิฟิลาเรียชนิดอื่นที่ติดเชื้อในสุนัขแต่ไม่อันตรายถึงแก่ชีวิต ได้แก่ *D. repens* มักทำให้เกิดก้อนอักเสบหรือตุ่มนูน และอาการคันที่ผิวหนัง (Jacobs et al., 2016) ส่วนชนิดที่ไม่ก่อโรค ได้แก่ *A. reconditum* (Bowman, 2009) การตรวจวินิจฉัยพยาธิฟิลาเรียเบื้องต้นทำได้จากการตรวจเลือดเพื่อหาไมโครฟิลาเรีย และการย้อมสีจิมซา (giemsa staining) เพื่อช่วยจำแนกชนิด พบว่าไมโครฟิลาเรียของพยาธิบางชนิดมีลักษณะคล้ายคลึงกัน เช่น *D. immitis* และ *A. reconditum* ไม่พบปลอกหุ้ม (unsheathed microfilaria) และมีความยาวใกล้เคียงกันทำให้จำแนกได้ยาก ให้ผลคลาดเคลื่อน ดังนั้นการแยกชนิดของพยาธิฟิลาเรียในสุนัขจึงมีความจำเป็นเพื่อนำผลที่ได้ไปใช้ในการรักษา ควบคุมป้องกันโรคให้ถูกต้อง และมีประสิทธิภาพต่อไป

## ชีววิทยาของพยาธิฟิลาเรีย (BIOLOGY of FILARIAL WORMS)

พยาธิฟิลาเรีย เป็นพยาธิตัวกลม (round worms) จัดอยู่ใน Phylum Nematoda; Class Secernentea; Order Spirurida; Superfamily Filarioidea (Taylor et al., 2016) มีลักษณะค่อนข้างยาวและบาง สีขาวถึงครีมแตกต่างกันไปแต่ละสปีชีส์ ส่วนหัวเรียบ ช่องปากเล็ก ไม่มีริมฝีปาก (lip) ผนังลำตัวมีชั้นคิวติเคิล (cuticle) ปกคลุม ปลายหางมี phasmids เป็นอวัยวะรับรู้เกี่ยวกับสารเคมี (chemoreceptor) ส่วนหางของพยาธิตัวผู้โค้งงอ (spiral flexure) และมีอวัยวะทำหน้าที่ช่วยเกาะขณะผสมพันธุ์ (spicules) (Jacobs et al., 2016; Anderson, 2000) พยาธิฟิลาเรียมีวงจรชีวิตทางอ้อม (indirect life cycle) โดยพยาธิตัวเมียให้กำเนิดตัวอ่อนเรียกว่า ไมโครฟิลาเรีย (microfilariae) จากนั้นตัวอ่อนจะพัฒนาอยู่ภายในโฮสต์กึ่งกลาง (intermediate host) ซึ่งเป็นแมลงพาหะ (vector) คือ แมลงดูดเลือด (blood sucking insects) จนถึงระยะติดตอ (infective stage) แล้วจึงถูกปล่อยเข้าสู่เนื้อเยื่อหรือระบบเลือดของสัตว์มีกระดูกสันหลังซึ่งโฮสต์จำเพาะ (definitive host) ผ่านทางการกัด (Bowman, 2009) ไมโครฟิลาเรียเจริญในมดลูกของพยาธิตัวเมีย ลักษณะทั่วไปของไมโครฟิลาเรียจะเรียวยาว ซึ่งอาจยาวได้ถึง 500 ไมโครเมตร หรืออ้วนสั้น ความยาวน้อยกว่า 100 ไมโครเมตร ส่วนหัวกลม ส่วนปลายหางมีทั้งลักษณะกลมที่อกรวย บาง หรือเป็นเส้น บางชนิดมีปลอกหุ้มตัว (sheathed microfilariae) ซึ่งเป็นส่วนของเปลือกไข่ที่ยาวออกไป (elongated egg membrane) แต่บางชนิดไม่มีปลอกหุ้ม ดังนั้นจึงใช้การมีปลอกหุ้มตัวช่วยในการจำแนกสปีชีส์ได้ (Taylor et al., 2016; Bowman, 2009; Anderson, 2000) พยาธิฟิลาเรียที่พบในสุนัขและแมวประกอบด้วย *D. immitis* (Taylor et al., 2016; Iamsa-ard et al., 2015; Wongkamchai et al., 2014; Chungpivat and Taweethavonsawat, 2008; Anderson, 2000), *D. repens* (Taylor et al., 2016; Wongkamchai et al., 2014; Chungpivat and Taweethavonsawat, 2008; Anderson, 2000), *A. reconditum* (Wongkamchai et al., 2014; Anderson, 2000), *A. grassii* (Anderson, 2000), *A. dracunculoides* (Anderson, 2000), *B. pahangi* (Iamsa-ard et al., 2015; Chungpivat and Taweethavonsawat, 2008),



*B. malayi* (Iamsa-ard et al., 2015; Ambily et al., 2011; Chungpivat and Taweethavonsawat, 2008; Chantud, 2003; Chansiri et al., 2002), *B. ceylonensis* (Anderson, 2000) และ *B. patei* (Anderson, 2000) แต่ละสปีชีส์มีความหลากหลายทางชีวภาพ ตำแหน่งที่อยู่ในร่างกาย และประเภทของโฮสต์กึ่งกลางและโฮสต์จำเพาะ (Table 1)

### วงชีวิตของพยาธิฟิลาเรีย (LIFE CYCLE of FILARIAL WORMS)

วงชีวิตของพยาธิฟิลาเรียจะแตกต่างกันไปในแต่ละสปีชีส์ แต่โดยทั่วไปแล้วพยาธิฟิลาเรียจะมีโฮสต์กึ่งกลางเป็นแมลงดูดเลือด ได้แก่ ยุง และมีโฮสต์จำเพาะเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลัง วงจรชีวิตเริ่มจากยุงดูดเลือดโฮสต์จำเพาะที่ติดเชื้อ ก็จะได้รับตัวอ่อนพยาธิระยะไมโครฟิลาเรีย แล้วพัฒนาต่อไปเป็นตัวอ่อน (larvae) ระยะที่ 2 (L2) และระยะที่ 3 (L3) ซึ่งเป็นระยะติดต่อกัน เมื่อยุงที่มีตัวอ่อนระยะติดต่อกินเลือดโฮสต์จำเพาะอื่นต่อ ตัวอ่อนระยะติดต่อกจะออกจากส่วนปากของยุงเข้าแผลที่ถูกกัด (bite wound) แล้วไชไปตำแหน่งจำเพาะของแต่ละสปีชีส์ ตัวอ่อนระยะติดต่อกจะลอกคราบเป็นตัวอ่อนระยะที่ 4 (L4) แล้วลอกคราบอีกครั้งเข้าสู่ระยะโตเต็มวัย (juvenile adult) เพื่อผสมพันธุ์ โดยเรียกระยะเวลาตั้งแต่โฮสต์ติดตัวอ่อนพยาธิระยะติดต่อกจนสามารถเริ่มตรวจพบตัวอ่อนระยะไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดว่า prepatent period ซึ่งมีระยะเวลาต่างกันในแต่ละสปีชีส์ (Jacobs et al., 2016; Lamb, 2012)

### ระบาดวิทยาของพยาธิฟิลาเรียในสุนัขในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (EPIDEMIOLOGY of FILARIAL in SOUTHEAST ASIA)

พบรายงานการติดเชื้อพยาธิฟิลาเรียในสุนัขจากหลายประเทศทั่วโลก (Table 1) สำหรับในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบรายงานการติดเชื้อ *D. immitis* ได้ทั้งภูมิภาค นอกจากนี้ยังพบรายงานการติดเชื้อ *D. repens* ได้เช่นกัน (Iamsa-ard et al., 2015; Noordin et al., 2013; Pakpitcharoen et al., 2006) การติดเชื้อพยาธิฟิลาเรียมีความสำคัญต่อสัตว์แพทย์ เนื่องจากเป็นสาเหตุของโรคพยาธิหนอนหัวใจในสุนัข (Patricia et al., 2014; Nithiuthai, 2003)

เนื่องจากภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้อยู่ใกล้บริเวณเส้นศูนย์สูตร ซึ่งมีภูมิอากาศแบบร้อนและร้อนชื้น จึงพบการระบาดของพยาธิฟิลาเรียมาก พยาธิฟิลาเรียที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขของมนุษย์คือ *Brugia* spp. และ *Wuchereria* spp. ซึ่งทำให้เกิดโรคเท้าช้างในมนุษย์ (lymphatic filariasis) ประเทศที่พบการระบาดของ *B. malayi* ได้แก่ บรูไน อินโดนีเซีย มาเลเซีย เวียดนาม กัมพูชา ฟิลิปปินส์ ติมอร์-เลสเต และประเทศไทย ในประเทศไทยพบรายงานการติดเชื้อ *B. malayi* ในจังหวัดปัตตานี สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง และนราธิวาส ซึ่งมีสุนัขและแมวเป็นสัตว์รังโรคที่สำคัญสามารถตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดของสัตว์ที่อยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดได้ (Iamsa-ard et al., 2015; Siripong, 2009; Chungpivat and Taweethavonsawat, 2008; Nuchprayoon et al., 2006; Pakpitcharoen et al., 2006; Kobasa et al., 2004; Chantud, 2003; Nuchprayoon et al., 2003; Chansiri et al., 2002; Kanjanopas et al., 2001)

Table 1 Filarial nematodes in dogs and cats

Species: Diseases	Site of parasites	Site of microfilaria / Prepatent period	Morphology of microfilaria	Intermediate host	Definitive host	Geographical distribution	References
<i>Dirofilaria immitis</i> *: Canine heartworm disease	Cardiovascular system: pulmonary artery, right ventricle, right atrium and posterior vena cava	Blood circulation/ 6-9 months	Filarioid mf., slender, 300 ± 15 µm., tapered tails, unsheathed mf.	Mosquitoes (Genus: <i>Aedes</i> , <i>Anopheles</i> , <i>Culex</i> & <i>Mansonia</i> )	Dogs, foxs, wild canids and cats (Human, accidental host)	Tropical & subtropical areas of the world	Taylor et al., 2016; Iamsa-ard et al., 2015; Patricia et al., 2014; Wongkamchai et al., 2014; Wongkamchai et al., 2012; Megat Abd Rani et al., 2010; Anderson, 2000; Chungpiwat and Taweethavonsawat, 2008
<i>Dirofilaria repens</i> * (syn. <i>Noctuellella repens</i> ): Cutaneous dirofilariosis	Subcutaneous, intramuscular tissues	Blood circulation/ 27-34 weeks (Experimental)	Slender, 290 ± 20 µm., tapered tails, unsheathed mf.	Mosquitoes (Genus: <i>Aedes</i> , <i>Anopheles</i> , <i>Culex</i> & <i>Mansonia</i> )	Dogs, cats, lions, foxes and bear (Human, accidental host)	Southern Europe, Africa & Southeast Asia	Taylor et al., 2016; Wongkamchai et al., 2014; Megat Abd Rani et al., 2010; Chungpiwat and Taweethavonsawat, 2008; Anderson, 2000
<i>Acanthocheilonema reconditum</i> * (syn. <i>Dipetalanema reconditum</i> ): Nonpathogenic	Subcutaneous tissues, kidney & body cavity	Blood circulation/ 61-68 days	269-283 µm., attenuated & pointed tails, unsheathed mf.	Fleas (fat body cells), louse, lice & mosquitoes	Dogs and various canids	Europe, Africa, North America & Asia; India, Thailand (Narathiwat)	Taylor et al., 2016; Wongkamchai et al., 2014; Megat Abd Rani et al., 2010; Anderson, 2000
<i>Acanthocheilonema grassi</i> (syn. <i>Dipetalanema grassi</i> , <i>Cercopithifilaria grassi</i> ): Nonpathogenic	Subcutaneous & intramuscular tissue	Skin	Slender, 570 µm., attenuated tails, unsheathed mf.	Tick, flea	Dogs	Europe & Africa	Taylor et al., 2016; Anderson, 2000
<i>Acanthocheilonema dracunculoides</i> (syn. <i>Dipetalanema dracunculoides</i> ): Nonpathogenic	Peritoneal cavity	Blood circulation/ 69 & 76 days	300 µm., unsheathed mf.	Ticks, louse, fly & fleas	Dogs and hyenas	Africa, Spain & Portugal	Taylor et al., 2016; Anderson, 2000

Table 1 Filarial nematodes in dogs and cats (con't)

Species: Diseases	Site of parasites	Site of microfilaria / Prepatent period	Morphology of microfilaria	Intermediate host	Definitive host	Geographical distribution	References
<b>Brugia pahangi</b> *: Nonpathogenic or swelling of lymph nodes	Lymphatic system	Blood circulation/3-6 months	186-280 µm., Sheathed mf.	Mosquitoes (Genus; <i>Aedes</i> , <i>Anopheles</i> , <i>Culex</i> & <i>Mansonia</i> )	Dogs, cats and leaf monkeys (Human; accidental host)	Asia, Southeast Asia: Malaysia and Thailand (Rayong, Surat Thani, Narathiwat)	Iamsa-ard et al., 2015; Wongkamchai et al., 2014; Wongkamchai et al., 2013; Noordin et al., 2013; Chungpivat and Taweethavonsawat, 2008; Nuchprayoon et al., 2003
<b>Brugia malayi</b> *: Elephantiasis	Lymphatic system	Blood circulation	177-260 µm., Terminal nuclei of tail, sheathed mf.	Mosquitoes (Genus; <i>Aedes</i> , <i>Anopheles</i> , <i>Culex</i> & <i>Mansonia</i> )	Humans (Dog, cats, leaf-monkey ; reservoir animals)	Tropical & subtropical areas, South East Asia: Brunei Darussalam, Indonesia, Malaysia, Vietnam & Thailand	Iamsa-ard et al., 2015; Wongkamchai et al., 2014; Wongkamchai et al., 2013; Noordin et al., 2013; Saeung et al., 2013; Ambily et al., 2011; Chungpivat and Taweethavonsawat, 2008; Chantud, 2003; Chansiri et al., 2002; Kanjanopas et al., 2001
<b>Brugia ceylonensis</b>	Lymph nodes	Blood circulation	220-275 µm., Sheathed mf., Blunt tail	Mosquitoes (Genus; <i>Anopheles</i> & <i>Mansonia</i> )	Dogs, cats	Sri Lanka, India	Anderson, 2000
<b>Brugia pateri</b>	Lymph nodes	Blood circulation	Similar to <i>B. malayi</i>	Mosquitoes (Genus; <i>Aedes</i> & <i>Mansonia</i> )	Dogs, cats, viverridae	Kenya Africa	Anderson, 2000

\* Species found in Thailand, mf=microfilaria

มีรายงานการพบ *B. malayi* จากแมวที่ติดเชื้อโดยธรรมชาติ (Wongkamchai et al., 2013; Areekit et al., 2009) การติดเชื้อ *B. pahangi* มักพบในประเทศมาเลเซีย ส่วนในประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้อที่จังหวัดนราธิวาส และระนอง (Iamsa-ard et al., 2015; Noordin et al., 2013; Wongkamchai et al., 2013; Areekit et al., 2009; Pakpitcharoen et al., 2006) ซึ่งหากพบความชุกของพยาธิฟิลาเรียต่างๆ สูงทั้งในสัตว์และคน ก็อย่างยิ่งเพิ่มความเสี่ยงในการติดเชื้อและการถ่ายทอดเชื้อระหว่างสัตว์สู่คน (Tiawsirisup, 2010) รายละเอียดแสดงการติดพยาธิฟิลาเรียในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Table 2)

### อาการทางคลินิก (Clinical sign)

พยาธิฟิลาเรียที่พบว่าเป็นปรสิตที่สำคัญในมนุษย์ ได้แก่ *W. bancrofti*, *B. malayi* และ *B. timori* ทำให้เกิดท่อน้ำเหลืองอักเสบ (lymphangitis) ในระยะเรื้อรังจะเกิดโรคเท้าช้าง (elephantiasis) ซึ่งเป็นโรคติดต่อที่สำคัญ (WHO, 2013) นอกจากกลุ่มพยาธิเท้าช้าง มีรายงานการติดเชื้อ *D. immitis*, *D. repens* ในมนุษย์โดยเป็นโฮสต์บังเอิญ (accidental host) (Eberhard et al., 2013; Foissac et al., 2013; Vakalis and Himonas, 1997)

Table 2 Prevalence of filarial worms in dogs in Southeast Asia

Species	Geographical distribution	Prevalence (%)	Reference	
<i>D. immitis</i>	Malaysia	1.33	Ng et al., 2012	
		28.8	Retnasabapathy and San, 1976	
	Myanmar	18.7	Aung, 2014	
	Thailand	Songkhla & Satun	24.1	Kamyingkird et al., 2017
		Bangkok	13.90	Jittapalaponget et al., 2005
		Chiang Mai	46.17	Nithiuthai and Chungpivat, 1992
		18.20	Boonyapakorn et al., 2008	
		45.67	Choochote et al., 1987	
<i>B. malayi</i>	Cambodia	0.81	Leang et al., 2004	
	Malaysia	36.20	Malaysia Ministry of Health Annual Report, 2011	
		39.00	Noordin et al., 2010	

ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *D. immitis* มักพบลักษณะรอยโรคที่ปอด (pulmonary dirofilariasis) เนื่องจากตัวอ่อนพยาธิไม่สามารถพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยได้ และตายในที่สุดทำให้เกิดกลไกการอักเสบเฉพาะที่ (local inflammation) เป็นก้อนแกรนูโลมา (granuloma formation) ที่ปอด เรียกรอยโรคที่พบจากภาพถ่ายรังสีช่องอกว่า “coin lesion” ลักษณะรอยโรคของ pulmonary dirofilariasis ในผู้ป่วยมีลักษณะคล้ายคลึงกับรอยโรคของเนื้องอกหรือมะเร็งในปอด เช่น benign pulmonary nodules หรือ malignant tumors (Fuehrer et al., 2016; Morchón et al., 2012; Bowman, 2009; Asimacopoulos et al., 1992) ผู้ป่วยอาจไม่แสดงอาการ หรือพบอาการปวดหน้าอก มีไข้ ไอ ไอเป็นเลือด และหายใจลำบาก (Campos et al., 1997) ในประเทศไทยมีรายงาน pulmonary dirofilariasis ซึ่งเกิดจาก *D. immitis* ในผู้ป่วยที่เสียชีวิตจาก multisystem Langerhans cell histiocytosis (Sukpanichnant et al., 1998) นอกจากรอยโรคที่ปอดแล้ว ยังสามารถตรวจพบรอยโรคบริเวณต่อมน้ำเหลืองที่คอด้วย (cervical lymph node) (Choochote et al., 1992) Otranto และคณะ (2011) ได้รายงานการตรวจพบพยาธิฟิลาเรียในตาผู้ป่วย (intraocular filariasis) ผู้ป่วยจะแสดงอาการปวดตาเนื่องจากความดันลูกตาสูง กระจกตาบวมน้ำ (corneal edema) ตาแดง (episcleral hyperemia) ผลการตรวจพยาธิในตาพบว่า มีลักษณะทางพันธุกรรมคล้ายคลึงกับ *D. immitis* (Otranto et al., 2011) ส่วนการติดเชื้อ *D. repens* ในมนุษย์มักทำให้เกิด subcutaneous nodule และ ocular dirofilariasis (Fuehrer et al., 2016; Bowman, 2009; Poppert et al., 2009; Anderson, 2000; Vakalis and Himonas, 1997) ในประเทศไทยพบรายงานการเกิด subconjunctival dirofilariasis จาก *D. repens* ในจังหวัดพังงาและนครศรีธรรมราช โดยพบรอยโรคบริเวณตาและเปลือกตาของผู้ป่วย (Jariya and Sucharit, 1983; Pradatsundarasar, 1955) ระยะโตเต็มวัยของ *D. immitis* ในสุนัข จะอาศัยอยู่ในหลอดเลือดแดงที่ปอด (main pulmonary artery) สุนัขอาจแสดงอาการไอแห้ง หอบ น้ำหนักลด ท้องมาน เป็นลม หัวใจวาย นอกจากนั้นตัวเต็มวัยของพยาธิยังสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้เกิดการอักเสบ เช่น การอักเสบของหลอดเลือดฝอย (glomerulonephritis) เป็นต้น ส่วนการติดเชื้อในแมวอาจไม่ทำให้สัตว์แสดงอาการหรือความผิดปกติ หรืออาจแสดงอาการของระบบทางเดินหายใจ เช่น ไอเรื้อรัง หายใจลำบาก บางรายพบเลือดออกทางจมูก อาการทางระบบทางเดินอาหาร (เช่น อาเจียนเรื้อรัง) หรือตายเฉียบพลัน รอยโรคที่สามารถพบในแมว เช่น การหนาตัวของหลอดเลือดแดงพัลโมนารี (pulmonary artery hypertrophy) (Patricia et al., 2014; Tachampa et al., 2011; Tiawsirisup, 2010) แต่การติดเชื้อ *D. repens* ระยะโตเต็มวัยในสัตว์มักจะเกิดรอยโรคเป็นตุ่มนูนใต้ผิวหนัง หรือกล้ามเนื้อ และอาจแสดงอาการคันผิวหนัง (Megat Abd Rani et al., 2010; Bowman, 2009; Chungpivat and Taweethavonsawat, 2008; Anderson, 2000)

ประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ประเทศมาเลเซีย ประเทศเวียดนาม ประเทศอินโดนีเซีย ประเทศฟิลิปปินส์ ประเทศอินเดีย ประเทศศรีลังกา และประเทศไทย พบรายงานการติดเชื้อ *W. bancrofti* และ *B. malayi* ซึ่งก่อโรคเท้าช้างในมนุษย์ โดยในสัตว์ เช่น สุนัข แมว ลิง พบรายงานการติดเชื้อเฉพาะ *B. malayi* (Anderson, 2000) ในประเทศไทยเคยมีรายงานการพบ *B. malayi* ทั้งในมนุษย์และแมว โดยมีพาหะเป็นยุง *Mansonia uniformis* (Kobasa et al., 2004) แต่การติดเชื้อในสัตว์อาจไม่แสดงอาการ หรือพบต่อมน้ำเหลืองอักเสบและบวมโต (Taylor et al., 2016; Bowman, 2009; Anderson, 2000)

ในสุนัข และแมวการติดเชื้อ *B. pahangi* มักไม่ทำให้แสดงอาการทางคลินิก อาจพบเพียงต่อมน้ำเหลืองอักเสบ บวมโต ในมนุษย์จัดเป็นโรคดัดบังเอิญสำหรับ *B. pahangi* (Kobasa et al., 2004) อย่างไรก็ตามพบรายงาน lymphatic filariasis จากการติดเชื้อ *B. pahangi* ในประเทศมาเลเซีย (Tan et al., 2011) และพบรายงานการตรวจพบไมโครฟิลาเรียของ *B. pahangi* ในกระแสเลือดในเด็กที่แสดงอาการต่อมน้ำเหลืองที่ขาหนีบโตทั้งสองข้างที่จังหวัดระยอง (Iamsa-ard et al., 2015)

## การวินิจฉัย (DIAGNOSIS)

### การตรวจทางกล้องจุลทรรศน์ (Microscopic examination)

เป็นการตรวจหาไมโครฟิลาเรียในเลือด ซึ่งมักเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ใช้เวลาน้อย ราคาถูก แต่ข้อเสียคือมีความไว (sensitivity) ต่ำ เนื่องจากใช้เลือดปริมาณน้อยในการตรวจ จึงมีโอกาสได้ผลลบเทียม (Nuchprayoon et al., 2003; Sangvaranond, 1997) วิธีการตรวจทางกล้องจุลทรรศน์ ประกอบด้วย การตรวจหาการเคลื่อนที่ของไมโครฟิลาเรียจากเลือดสด (wet mount preparation) ซึ่งวิธีนี้ไม่สามารถจำแนกชนิดพยาธิได้ (Nuchprayoon et al., 2003) การตรวจหาไมโครฟิลาเรียจากฟิล์มเลือดแบบหนา (thick smear technique) ซึ่งย้อมด้วยสีซีจิมซ่า อาจจำแนกชนิดของพยาธิได้จากลักษณะโครงสร้างการติดสีที่ต่างกัน อย่างไรก็ตามอาจเกิดความผิดพลาดในการจำแนกชนิดพยาธิหากปอกหม้อมั่วตัวลอกหลุดระหว่างขั้นตอนการย้อม วิธีนี้มีความไวต่ำโดยอาจตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียถ้ามีปริมาณน้อยกว่า 15-60 ตัวต่อมิลลิเมตร (Sasa, 1976; Denham et al, 1971) นอกจากนี้ยังมีเทคนิคที่ทำให้เชื้อเข้มข้นมากขึ้น (concentration techniques) ได้แก่ การนำส่วนตะกอน (sediment) จากการปั่นเหวี่ยงมาย้อมสีดูลักษณะโครงสร้างของพยาธิ (modified Knott's method) วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่ช่วยเพิ่มความไวในการวินิจฉัยได้ (Knott, 1939) การตรวจหาไมโครฟิลาเรียที่อยู่บริเวณเนื้อพลาสมา (buffy coat) จากเลือดที่ถูกปั่นแยกโดยใช้หลอดคะปิลลารี (capillary tube) ที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (Haematocrit capillary tube technique หรือ Woo's technique) (Woo, 1971) หรือการย้อมสีทางฮิสโตเคมี (histochemical staining) โดยสามารถพบการติดสีเกิดจากการกระจายตัวของปฏิกิริยาของเอนไซม์ acid phosphatase ในส่วนต่างๆ ของไมโครฟิลาเรีย โดยไมโครฟิลาเรียแต่ละชนิดมีการติดสีต่างตำแหน่งกัน จึงสามารถจำแนกชนิดของพยาธิได้ และมีความจำเพาะ (specificity) สูงกว่าวิธีที่กล่าวมาข้างต้น แต่ต้องอาศัยผู้ตรวจที่มีประสบการณ์และมีความชำนาญ (Sasa, 1976; Chalifoux and Hunt, 1971)

### การวินิจฉัยทางอณูชีววิทยา (Molecular diagnosis)

เป็นการตรวจหาสารพันธุกรรมของพยาธิ ซึ่งมีความจำเพาะ และความไวสูง มีค่าใช้จ่ายสูง วิธีการตรวจซับซ้อน ต้องอาศัยความชำนาญของเจ้าหน้าที่ และทำในห้องปฏิบัติการที่ได้มาตรฐาน จึงเป็นข้อจำกัดในการนำไปใช้ทางคลินิก แต่จุดเด่นของวิธีนี้คือสามารถยืนยันการจำแนกชนิดพยาธิได้ในระดับชีวโมเลกุล และใช้ปริมาณตัวอย่างน้อย การวินิจฉัยการติดพยาธิฟิลาเรียทางอณูชีววิทยามีหลายวิธีด้วยกัน เช่น

#### ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR)

เป็นการใช้หาและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในตำแหน่งยีนที่จำเพาะ โดยอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) เป็นจุดเริ่มต้น เพื่อใช้ในการหาลำดับเบสเป้าหมาย (gene target) ด้วยไพรเมอร์ วิธีการนี้สามารถใช้ในการจำแนกชนิดของพยาธิได้ (Brown, 2010) เช่น การใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 5.8S-ITS2-28S ด้วยไพรเมอร์ชุด DIDR ซึ่งสามารถใช้ในการจำแนกชนิดของหนอนพยาธิ 6 ชนิดได้แก่ *D. immitis*, *D. repens*, *B. malayi*, *B. pahangi*, *A. reconditum* และ *A. dracunculoides* โดยจะได้ขนาดของผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR product) ที่แตกต่างกัน ได้แก่ 542, 484, 615, 664, 578 และ 584 คู่เบส ตามลำดับ (Rishniw et al., 2006) หรือไพรเมอร์เฉพาะ A.rec-F1 และ A.rec-R1 มียีนเป้าหมายที่ตำแหน่ง internal transcribed spacer 2 (ITS2) สามารถตรวจหา *A. reconditum* ได้ (Rishniw et al., 2006) จุดเด่นของวิธีนี้คือสามารถตรวจสอบเชื้อได้อย่างรวดเร็วแม้มีปริมาณน้อย แต่ก็มีข้อจำกัดในการนำไปใช้กับตัวอย่างจำนวนมาก

การศึกษาองค์ประกอบของยีนซึ่งเป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ได้แก่ วิธีการหาลำดับเบสในสายนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) วิธีนี้สามารถยืนยันความถูกต้องของผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส วินิจฉัยชนิดแยกแยะสายพันธุ์ของหนอนพยาธิฟิลาเรียจากการเปรียบเทียบกับลำดับของนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอของเชื้อ ใน GenBank (Benson et al., 2013) และสามารถอธิบายความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยการสร้างรูปแบบวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต (phylogenetic tree) เช่น การประยุกต์ใช้เทคนิคพีซีอาร์ และการหาลำดับเบสในสายนิวคลีโอไทด์ ในการวินิจฉัยการติดเชื้อ *Brugia* spp. ในแมวจากพื้นที่การระบาดของโรคในจังหวัดนราธิวาส (Pakpitcharoen et al., 2006) การหาลำดับเบสในสายนิวคลีโอไทด์ สามารถทำได้ง่าย และไม่ซับซ้อน โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า automate machine (Brown, 2010; Mulhardt, 2007) ปัจจุบันเทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสมีความก้าวหน้าขึ้นมากเช่น เทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่ (next-generation sequencing) ซึ่งใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นเพียงเล็กน้อย ใช้เวลารวดเร็วและมีประสิทธิภาพ สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสจำนวนมากในการทำงานครั้งเดียว และทำหลายตัวอย่างในเวลาเดียวกันได้ซึ่งต่างกับวิธีการหาลำดับเบสของแซงเกอร์ (Ukoskit et al., 2015)

#### ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ในสภาพจริง (Real-time PCR)

เป็นเทคนิคที่ประยุกต์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบดั้งเดิมโดยติดฉลากผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยสารเรืองแสง (fluorophore) ทำให้ติดตามปฏิกิริยาที่กำลังดำเนินอยู่ได้ สามารถคำนวณและวิเคราะห์ปริมาณของดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนขึ้นในเวลาเดียวกันซึ่งช่วยลดขั้นตอนหลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เช่น ตรวจสอบผลผลิตบนเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แต่จำเป็นต้องมีเครื่องมือเฉพาะและราคาสูง (Loftis and Reeves, 2012) มีรายงานการใช้เทคนิค real-time PCR เพื่อตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอของไมโครฟิลาเรียในการเปรียบเทียบวิธีสกัดดีเอ็นเอของ *D. immitis* ที่แตกต่างกันโดยมี glutathione-S-transferase (gst) เป็นยีนเป้าหมาย (Sungpradit et al., 2010)

### Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

เป็นการนำผลจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากการเพิ่มปริมาณชิ้นตำแหน่งที่ต้องการมาตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ (restriction enzyme) (Pankla et al., 2013; Nuchprayoon et al., 2005) ทำให้ได้สายดีเอ็นเอที่สั้นลง โดยผลจากปฏิกิริยา PCR-RFLP ของพยาธิต่างชนิดกัน จะมีขนาดที่แตกต่างกัน เมื่อนำมาแยกด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จะพบรูปแบบที่แตกต่างกัน (Padungtod, 2007; Williams, 1989) เช่น Nuchprayoon และคณะ (2005) ได้พัฒนาเทคนิค PCR-RFLP ของยีน ITS1 และใช้เอนไซม์ Ase I ในการตัดสายดีเอ็นเอ เพื่อการจำแนกชนิดของไมโครพลาเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *W. bancrofti*, *B. malayi*, *B. pahangi*, *D. immitis* และ *D. repens*

### Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)

เป็นอีกเทคนิคที่ใช้เพิ่มดีเอ็นเอจำนวนมากและมีประสิทธิภาพมีความไวสูงในการตรวจจับดีเอ็นเอมากกว่าปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน 10-100 เท่า (Romphruk, 2011) ทำได้ง่าย ใช้เวลาน้อย และไม่ต้องใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (thermocycler) เนื่องจากปฏิกิริยาทั้งหมดเกิดขึ้นในช่วงอุณหภูมิเดียว และสามารถติดตามและวิเคราะห์ยีนที่กำลังเพิ่มจำนวนได้ จึงสามารถทำการทดสอบได้ในภาคสนาม แต่ข้อเสียคือ ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์มีความซับซ้อน เนื่องจากต้องใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับลำดับเบสเป้าหมายถึง 3 คู่หรือ 6 สาย (Romphruk, 2011) เช่น Poole และคณะ (2012) ได้พัฒนาเทคนิค colorimetric non-instrumented nucleic acid amplification (NINA)-LAMP assays ในการตรวจหา *B. malayi*, *Onchocerca volvulus* และ *W. bancrofti* ซึ่งพบว่าเทคนิคนี้มีความแม่นยำ มีความไวและความจำเพาะสูง ใช้เวลาน้อย และเกิดภายใต้อุณหภูมิเดียวกันตลอดปฏิกิริยาจึงเหมาะแก่การนำไปใช้ (Poole et al., 2012)

### Biosensor

เป็นเครื่องมือตรวจวัดทางชีวภาพ ติดตามสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ (sensor element) ได้อย่างจำเพาะเจาะจง ประกอบด้วยสองส่วนคือ สารชีวภาพ (bioelement) ได้แก่ เอนไซม์ แอนติบอดี แอนติเจน กรดนิวคลีอิก และดีเอ็นเอ เป็นต้น ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์อย่างจำเพาะแล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพหรือเคมี โดยมีทรานสดิวเซอร์ (transducer) เป็นตัวแปลงสัญญาณที่เกิดขึ้นเป็นสัญญาณไฟฟ้า ข้อดีคือใช้งานง่าย มีความจำเพาะสูง มีความถูกต้องสูง ลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ใช้เวลาน้อย และอาจใช้ทดแทนวิธีที่มีราคาแพง (Ali et al., 2017; Samphao, 2011) เช่น การพัฒนา Nucleic Acid Based Biosensors (NABs) ในการตรวจหา *D. immitis* (Jaratsing et al., 2016)



## การควบคุมและป้องกันพยาธิฟิลาเรียในสัตว์เลี้ยง (Control and prevention of filariasis in domestic animals)

พยาธิฟิลาเรียในสุนัขที่มีความสำคัญทางคลินิกคือ *D. immitis* เนื่องจากก่อให้เกิดโรคพยาธิหนอนหัวใจในสัตว์เลี้ยง (Patricia et al., 2014) การป้องกันสามารถเริ่มได้ตั้งแต่อายุ 2 เดือน แต่สำหรับสุนัขและแมวอายุ 7 เดือนขึ้นไปหรือในสัตว์เลี้ยงที่ขาดการป้องกันอย่างต่อเนื่อง รวมถึงสัตว์เลี้ยงที่เคยติดเชื้อมาก่อน ควรตรวจแอนติเจนและตรวจหาไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดก่อนทำการป้องกัน ยาที่นิยมใช้เพื่อการป้องกันในปัจจุบันได้แก่ ยาในกลุ่ม macrocyclic lactone ได้แก่ ivermectin, milbemycin oxime, moxidectin และ selamectin โดยจะออกฤทธิ์จับกับ glutamate-gated chloride receptor channel บนเซลล์ประสาทของไมโครฟิลาเรียระยะ L3 และ L4 รวมถึงตัวเต็มวัยระยะแรก ทำให้พยาธิเป็นอัมพาต (Barr et al., 2011; Tachampa et al., 2011) ส่วนยาที่ใช้รักษาและควบคุม *Brugia* spp. ได้แก่ Diethylcarbamazine (DEC) เป็นหลัก ซึ่งสามารถทำลายพยาธิตัวอ่อนและตัวเต็มวัยได้ (Al-Azzam et al., 2007; Jaijakul and Nuchprayoon, 2005) การป้องกันยังรวมถึงไม่ให้ยุงกัด กางมุ้ง และกำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ยุง เป็นการป้องกันทางอ้อมได้ผลดีเช่นกัน (Nithikathkul et al., 2006)

## สรุป (CONCLUSION)

ปัจจุบัน แม้บางพื้นที่จะมีการควบคุมโรค แต่จากการทบทวนวรรณกรรมยังพบการระบาดของพยาธิฟิลาเรียในสุนัขของประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมถึงประเทศไทย โดยสายพันธุ์ที่มีการรายงาน ไม่ได้พบเพียงชนิดที่ก่อให้เกิดโรคพยาธิหนอนหัวใจเท่านั้น แต่ยังพบไมโครฟิลาเรียของพยาธิชนิดอื่นด้วย การจำแนกประเภทของพยาธิฟิลาเรียจึงมีความจำเป็นเพื่อวางแผนการรักษาและควบคุมที่เหมาะสม วิธีทางอนุชีววิทยาเป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวสูงในการวินิจฉัยแยกชนิดไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดของสุนัขอย่างมีประสิทธิภาพและมีความน่าเชื่อถือ สามารถนำมาใช้ในการควบคุมและป้องกันการระบาดของโรคต่อไป

## REFERENCES

- Al-Azzam, S.I., Fleckenstein, L., Cheng, K.J., Dzimianski, M.T., McCall, J.W., 2007. Comparison of the pharmacokinetics of moxidectin and ivermectin after oral administration to beagle dogs. *Biopharm. Drug. Dispos.* 28, 431-438.
- Ali, J., Najeeb, J., Ali, M.A., Aslam, M.F., Raza, A., 2017. Biosensors: their fundamentals, designs, types and most recent impactful applications: a review. *J. Biosens. Bioelectron.* 8:235.
- Ambily, V.R., Pillai, U.N., Arun, R., Pramod, S., Jayakumar, K.M., 2011. Detection of human filarial parasite *Brugia malayi* in dogs by histochemical staining and molecular techniques. *Vet. Parasitol.* 181, 210-214.
- Anderson, R.C., 2000. Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission. 2nd ed. CABI Publishing, Wallingford, pp. 467-532.
- Areekit, S., Khuchareontaworn, S., Kanjanavas, P., Sriyapai, T., Pakpitchareon, A., Khawsak, P., Chansiri, K., 2009. Molecular genetics analysis for co-infection of *Brugia malayi* and *Brugia pahangi* in cat reservoirs based on internal transcribed spacer region 1. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 40, 30-34.

- Asimacopoulos, P.J., Katras, A., Christie, B., 1992. Pulmonary dirofilariasis: the largest single-hospital experience. *Chest*. 102, 851-855.
- Aung, S.T., 2014. Prevalence and associated risk factors of *Dirofilaria immitis* in dogs with in Nay Pyi Taw area. Master of science thesis, department of pharmacology and parasitology, university of veterinary science, Yezin, Nay Pyi Taw.
- Barr, M.C., Boynton, E.P., Schmidt, P., Bossong, F., Johnston, G.R., 2011. Diagnosis of canine heartworm infection. *Today's Vet. Pract.* 1, 30-37.
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J. Sayers, E.W., 2013. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 41, D36-D42.
- Boonyapakorn, C., Srikitjakarn, L., Morakote, N., Hoerchner, F., 2008. The epidemiology of *Dirofilaria immitis* infection in outpatient dogs at Chiang Mai University Small Animal Hospital, Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 39, 33-38.
- Bowman, D.D., 2009. *Georgis' parasitology for veterinarians*. 9th ed. Saunders Elsevier, Missouri, pp. 115-239.
- Brown, T.A., 2010. *Gene cloning and DNA analysis, an introduction*. 6th ed. Blackwell Publishing, West Sussex, pp. 147-183.
- Campos, J.R.M., Barbas, C.S.V., Filomeno, L.T.B., Fernandez, A., Minamoto, H., Filho, J. V.B., Jatene, F.B., 1997. Human pulmonary dirofilariasis analysis of 24 cases from Sao Paulo, Brazil. *Chest*. 112, 729-733.
- Chalifoux, L., Hunt, R.D., 1971. Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 158, 601-605.
- Chansiri, K., Tejangkura, T., Kwaosak, P., Sarataphan, N., Phantana, S., Sukhumsirichart, W., 2002. PCR based method for identification of zoonotic *Brugia malayi microfilariae* in domestic cats. *Mol. Cell. Probes.* 16, 129-135.
- Chantud, N., 2003. Public perception affecting awareness and selfcare behavior towards the prevention of lymphatic filariasis: a case study of tambon Lubokbusa, Yi-ngo district, Narathiwat province. Thammasat University, Bangkok, pp. 20-70. (In Thai)
- Choochote, W., Sukhvat, K., Keha, P., Somboon, P., Khamboonruang, C., Suwanpanit, P., 1987. The prevalence of *Dirofilaria immitis* in stray dog and its potential vector in amphur Muang Chiang Mai, Northern Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 18, 131-134.
- Choochote, W., Suttajit, P., Rongsriyam, Y., Likitvong, K., Tookyang, B., Pakdicharoen, A., 1992. The prevalence of *Dirofilaria immitis* in domestic dogs and their natural vectors in amphur Muang Chiang Mai, Northern Thailand. *J. Trop. Med. Parasitol.* 15, 11-17.
- Chungpivat, S., Taweethavonsawat, P., 2008. The differentiation of microfilariae in dogs and cats using Giemsa's staining and the detection of acid phosphatase activity. *J. Thai Vet. Pract.* 20, 47-55. (In Thai)
- Denham, D.A., Dennis, D.T., Ponnudurai, T., Nelson, G.S., Guy, F., 1971. Comparison of counting chamber and thick smear methods of counting microfilariae. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 65, 521-526.

- Eberhard, M.L., 2013. Subcutaneous infection with *Dirofilaria* spp. nematode in human, France. *Emerging Infect. Dis.* 19, 1904-1905.
- Foissac, M., Million, M., Mary, C., Dales, J., Souraud, J., Piarroux, R., Parola, P., 2013. Subcutaneous infection with *Dirofilaria immitis* nematode in human, France. *Emerging Infect. Dis.* 19, 171-172.
- Fuehrer, H., Auer, H., Leschnik, M., Silbermayr, K., Duscher, G., Joachim, A., 2016. *Dirofilaria* in humans, dogs, and vectors in Austria (1978–2014)—From imported pathogens to the endemicity of *Dirofilaria repens*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10: e0004547.
- Iamsa-ard, W., Waewwab, P., Pukdeeprayoon, S., Wiriyaalongkorn, W., Songklin, P., Thamcharoen T, et al., 2015. An outbreak investigation of autochthonous lymphatic filariasis in Wangchan district, Rayong, Thailand, December 2013 – July 2014. *Wkly. Epidemiological Surveill. Rep.* 2015, 46, 385-392. (In Thai)
- Jacobs, D., Fox, M., Gibbons, L., Hermosilla, C., 2016. Principles of veterinary parasitology. John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex, pp. 474-480, 463-466.
- Jaijakul, S., Nuchprayoon, S., 2005. Treatment of lymphatic filariasis: an update. *Chula. Med. J.* 49, 401-421.
- Jaratsing, P., Viseshakul, N., Areekit, S., Chansiri, K., 2016. Comparative studies on nucleic acid based biosensors for identification of filarial nematode. *J. Med. Assoc. Thai.* 99, 216-221.
- Jariya, P., Sucharit, S., 1983. *Dirofilaria repens* from the eyelid of a woman In Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 1456-1457.
- Jittapalapong, S., Pinyopanuwat, N., Chimnoi, W., Nimsupan, B., Saengow, S., Simking, P., Kaewmongkol, G., 2005. Prevalence of heartworm infection of stray dogs and cats in Bangkok metropolitan areas. *Agri. Nat. Resour.* 39, 30-34.
- Kamyngkird, K., Junsiri, W., Chimnoi, W., Kengradomkij, C., Saengow, S., Sangchuto, K., Ka jeerum, W., Pangjai, D., Nimsuphan, B., Inpankeaw, T., Jittapalapong, S., 2017. Prevalence and risk factors associated with *Dirofilaria immitis* infection in dogs and cats in Songkhla and Satun provinces, Thailand. *Agric. Nat. Resour.* 51, 299-302.
- Kanjanopas, K., Choochote, W., Jitpakdi, A., Suvannadabba, S., Loymak, S., Chungpivat, S., Nithiuthai, S., 2001. *Brugia malayi* in a naturally infected cat from Narathiwat province, southern Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 32, 585-587.
- Knott, J.A., 1939. Method for making microfilarial surveys on day blood. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 33, 191-196.
- Kobasa, T., Thammapalo, S., Suvannalabha, S., Armesombun, A., Loymak, S., Sawat, L., Choochote, W., 2004. Identification of *Brugia malayi* like microfilaria in naturally infected cats from Narathiwat province, South Thailand. *J. Trop. Med. Parasitol.* 27, 21-25.
- Lamb, T.J., 2012. Immunity to parasitic. John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex, pp. 201-202.

- Leang, R., Socheat, D., Bin, B., Bunkea, T., Odermatt, P., 2004. Assessment of disease and infection of lymphatic filariasis in Northeastern Cambodia. *Trop. Med. Int. Health.* 9, 1115-1120.
- Loftis, A.D., Reeves, W., 2012. Principles of real-time PCR. In: Chengming, W., Bernhard, K., Mark, D.F. (Eds.), *Veterinary PCR Diagnostics*, Bentham Science, Sharjah, pp. 3-17.
- Megat Abd Rani, P.A., Irwin, P.J., Gatne, M., Coleman, G.T., McInnes, L.M., Traub, R.J., 2010. A survey of canine filarial diseases of veterinary and public health significance in India. *Parasit. Vectors.* 3:30.
- Melrose, W., Goldsmid, J.M., 2005. Infections of the lymphatic system. The Australasian College of Tropical Medicine, *Primer of Tropical Medicine*. [Online] <http://www.tropmed.org/wp-content/uploads/2014/07/chapter24.pdf>
- Ministry of health (Malaysia), 2011. Malaysia ministry of health annual report 2011. [Online] [http://www.moh.gov.my/images/gallery/publications/md/ar/2011\\_en.pdf](http://www.moh.gov.my/images/gallery/publications/md/ar/2011_en.pdf)
- Morchón, R., Carretón, E., González-Miguel, J., Mellado-Hernández, I., 2012. Heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe – new distribution trends. *Front. Physiol.* 3:196.
- Mulhardt, C., 2007. *Molecular biology and genomics*. 4th ed. Oxford Elsevier Inc, London, pp. 476.
- Ng, K.L., Lee, E.L., Sani, R.A., 2012. Low prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs in Johor Bahru, Malaysia as a reflection of vector availability. *Trop. Biomed.* 29, 187-190.
- Nithikathkul, C., Wannapinyosheep, S., Saichua, P., Nithikathkul, M., 2006. Filariasis: the disease will come to be the problem of Thailand. *Songkla Med J.* 24, 53-58.
- Nithiuthai, S., 2003. Risk of canine heartworm infection in Thailand. Paper presented at the 28th congress of the world small animal veterinary association (WSAVA), Bangkok, Thailand. [Online] <http://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?meta=Generic&pid=8768&id=3850268>
- Nithiuthai, S., Chungpivat, S., 1992. Lymphatic filarial (*Brugia pahangi*) in dogs. *J.Thai Vet. Pract.* 4, 123-133.
- Noordin, R., Shenoy, R.K., Lim, B.H., Ramachandran, C.P., 2013. Filarial worms in southeast Asia. In: Lim Y., Vythilingam I. (Eds.) *Parasites and Their Vectors*. Springer, Vienna. pp. 33-56.
- Noordin, R., Othman, N., Norhayati, S., Zulkarnain, I., Norizan, M., 2010. Comparison of conventional versus real-time PCR detection of *Brugia malayi* DNA from dried blood spots from school children in a low endemic area. *Trop. Biomed.* 27, 54-59.
- Nuchprayoon, S., Sangprakarn, S., Junpee, A., Nithiuthai, S., Chungpivat, S., Poovorawan, Y., 2003. Differentiation of *Brugia malayi* and *Brugia pahangi* by PCR-RFLP of ITS1 and ITS2. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 34, 67-73.
- Nuchprayoon, S., Junpee, A., Poovorawan, Y., Scott, A. L., 2005. Detection and differentiation of filarial parasites by universal primers and polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73, 895-900.

- Nuchprayoon, S., Junpee, A., Nithiuthai, S., Chungpivat, S., Suvannadabba, S., Poovorawan, Y., 2006. Detection of filarial parasites in domestic cats by PCR-RFLP of ITS1. *Vet. Parasitology*. 140, 366-372.
- Otranto, D., Diniz, D.G., DantasTorres, F., Casiraghi, M., Negrão Frota de Almeida, I., Negrão Frota de Almeida, L., Nascimento dos Santos, J., Adriano Penha Furtado, Forta de Almeida Sobrinho, E., Bain, O., 2011. Human intraocular filariasis caused by *Dirofilaria* sp. nematode, Brazil. *Emerging Infect. Dis.* 17, 863-866.
- Pakpitcharoen, A., Phasook, S., Khawsak, P., Khuchareontaworn, S., Chansiri, K., 2006. Genetic diversity of filaria in cat reservoirs. *J. Med. Health Sci.* 13, 147-155. (In Thai)
- Pankla, R., Jeekeeree, W., Khaoplab, J., Laypak, S., Chopel, K., Panomket, P., 2013. Detection of microfilaria in Myanmar immigrant workers by modified Knott's concentration technique. *J. Med. Tech. Phy. Ther.* 25, 43-49. (In Thai)
- Patricia, P., Rehm, C., Nelson, C.T. et al., 2014. Current canine guidelines for the prevention, diagnosis, and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. American Heartworm Society (revised July 2014). [Online] [www.heartwormsociety.org](http://www.heartwormsociety.org)
- Padungtod, P., 2007. *Veterinary epidemiology*. Moh Chao Ban press, Bangkok. pp. 214-215. (In Thai)
- Poole, C.B., Tanner, N.A., Zhang, Y., Evans, T.C.Jr., Carlow, C.K.S., 2012. Diagnosis of brugian filariasis by loop-mediated isothermal amplification. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 6. e1948.
- Poppert, S., Hodapp, M., Krueger, A., Hegasy, G., Niesen, W., Kern, W.V., Tannich, E., 2009. *Dirofilaria repens* infection and concomitant meningoencephalitis. *Emerging Infect. Dis.* 15, 1844-1845.
- Pradatsundarasar, A., 1955. *Dirofilaria* infection in man: report of a case. *J. Med. Assoc. Thai.* 38, 378-379.
- Retnasabapathy, A., San, K.T., 1976. Incidence of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) in Malaysia. *Vet. Rec.* 98, 68-69.
- Rishniw, M., Barr, S.B., Simpson, K.W., Frongillo, M.F., Franz, M., Alpizar, J.L.D., 2006. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Vet. Parasitol.* 135, 303-314.
- Romphruk, A., 2011. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *J. Hematology Transfus. Med.* 21, 201-206. (In Thai)
- Saeung, A., Hempolchom, C., Baimai, V., Thongsahuan, S., Taai, K., Jariyapan, N., Chaithong, U., Choochote, W., 2013. Susceptibility of eight species members of *Anopheles hyrcanus* group to nocturnally subperiodic *Brugia malayi*. *Parasit. Vectors.* 6:5.
- Samphao, A., 2011. *Biosensor: fabrication, operation and its applications*. MTEC publisher, Bangkok. (In Thai)
- Sangvaranond, A., 1997. *Veterinary clinical parasitology*. Kasetsart University Press, Bangkok, pp. 143-186. (In Thai)

- Sasa, M., 1976. Methods in filariasis study. In: human filariasis- a global survey of epidemiology and control. University Park Press, Baltimore, pp. 593–599.
- Siripong, S., 2009. Bednet use to prevent elephantitis of people in Takbai district Narathiwat province. Master thesis, Faculty of Public Health, Burapha University. (In Thai)
- Sukhumsirichart, W., Tananyutthawongese, C., Phantana, S., Sarataphan, N., Chansiri, K., 2000. Differentiation of microfilariae and third stage larva of *Brugia malayi* and *Brugia pahangi* using PCR-RFLP. Kasetsart University, Bangkok.
- Sukpanichnant, S., Leenuttapong, V., Dejsomritrutai, W., Thakerngpol, K., Wanachiwanawin, W., Kachintorn, U., Nitiyanant, W., 1998. Pulmonary dirofilariasis in a patient with multisystem langerhans cell histiocytosis - the first reported case in Thailand. J. Med. Assoc. Thai. 81, 722-727.
- Sungpradit, S., Nuchprayoon, S., Chatsuwat, T., 2010. Cost-effectiveness analysis of alkaline lysis, MagNA Pure, and phenol-chloroform DNA extraction methods followed by measurement of single gene copy number using quantitative real-time PCR for *Dirofilaria immitis* microfilaria. Chula. Med. J. 54, 549-561.
- Tachampa, K., Sukhumavasi, W., Tiawsirisup, S., Kittawornrat, A., Surachetpong, S., Pusoonthornthum, P., Sawangkoon, S., 2011. Guideline for diagnosis, prevention and treatment of canine heartworm disease: An update. Thai Vet. Pract. 24, 61-77.
- Tan, L.H., Fong, M.Y., Mahmud, R., Muslim, A., Lau, Y.L., Kamarulzaman, A., 2011. Zoonotic *Brugia pahangi* filariasis in a suburbia of Kuala Lumpur City, Malaysia. Parasitol. Int. 60, 111-113.
- Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., 2016. Veterinary parasitology. 4th ed. Wiley Blackwell. West Sussex, pp. 1-109.
- Tiawsirisup, S., 2010. Canine heartworm (*Dirofilaria immitis*, Leidy) and risk of infection in human. Chula. Med. J. 54, 625-635.
- Ukoskit, K., Raksusombat, M., Khanbo, S., 2015. Second and third generation sequencing technologies. Thai J. of Sci. Tech. 23, 633-650. (In Thai)
- Vakalis, N.C., Himonas, C.A., 1997. Human and canine dirofilariasis in Greece. Parasitologia. 39, 389-391.
- WHO, 2013. Lymphatic filariasis: a handbook of practical entomology for national lymphatic filariasis elimination programmes. WHO Press, Italy, pp. 17-21.
- Williams, R., 1989. Restriction fragment length polymorphism (RFLP). Am. J. Phys. Anthropol. 32,159-184.
- Wongkamchai, S., Monkong, N., Mahannol, P., Taweethavonsawat, P., Loymak, S., Foongladda, S., 2013. Rapid detection and identification of *Brugia malayi*, *B. pahangi*, and *Dirofilaria immitis* by high-resolution melting assay. Vector Borne Zoonotic Dis. 13, 31-36.
- Wongkamchai, S., Nochotea, H., Foongladda, S., Dekumyoy, P., Thammapalo, S., Boitanao, J.J., Choochotee, W., 2014. A high resolution melting real time PCR for mapping of filaria infection in domestic cats living in brugian filariasis-endemic areas. Vet. Parasitol. 201, 120-127.

Woo, T.P.K., 1971. Miscellanea: evaluation of the haematocrit centrifuge and other techniques for the field diagnosis of human trypanosomiasis and filariasis. *Acta Tropica*. 28, 298-303.

---

**How to cite this article;**

Manusvee Kaikuntod, Kriangkrai Thongkorn, Saruda Tiwananthagorn and Chavalit Boonyapakorn. Filarial worms in dogs in Southeast Asia. *Veterinary Integrative Sciences*. 2018; 16(2): 1-17.

---







**Vet Integr Sci**  
**Veterinary Integrative Sciences**

ISSN: 2629-9968 (online)

Website: www.vet.cmu.ac.th/cmvi

**Review article****Histiocytic sarcoma in dogs****Atigan Thongtharb<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Department of Companion Animal and Wildlife Clinics, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50100, Thailand

<sup>2</sup> Oncology Clinic, Small Animal Hospital, Animal Health Service Center, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University Chiang Mai 50200, Thailand

**Abstract**

Canine histiocytic sarcoma (CHS), also known as malignant histiocytosis is a very aggressive hematologic malignancy that has a high metastatic rate and mortality rate. CHS originates from white blood cells, namely histiocytes that commonly reside in soft tissue and connective tissue throughout the body. Microscopically, the cell morphology of this tumor sometimes is indistinguishable from other round cell tumors and carcinomas by using routine hematoxylin and eosin staining. Currently, immunohistochemistry is a valuable diagnostic tool for identifying types and cell of origin of the tumor that most CHS cells have dendritic cell immunophenotype (CD18+, CD11c+, MHCII+, CD11d-). The most currently available treatments for CHS are the combination of surgical excision, radiotherapy and chemotherapy, known as multimodal therapy, in order to increase treatment efficacy and survival time of dogs with CHS. Furthermore, the palliative treatment should be considered in CHS cases to improve the quality of life.

**Keywords:** : Dog, Histiocytic sarcoma, Immunohistochemistry, Treatment

\*Corresponding author: Atigan Thongtharb, Department of Companion Animal and Wildlife Clinics, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Mae Hia, Muang, Chiang Mai 50100, Thailand Tel (+66)53-948015, (+66)53-948055 Fax: (+66)53-948065 E-mail: attvet62@hotmail.com

*Article history:* received manuscript: 21 April 2018, accepted manuscript: 3 July 2018, published online: 13 July 2018

*Academic editor:* Korakot Nganvongpanit

## บทนำ

ฮิสติโอไซต์ (histiocyte) เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีต้นกำเนิดจากพลูริโพเทนท์สเต็มเซลล์ (pluripotent stem cell) ในไขกระดูก การเปลี่ยนสภาพของเซลล์ (cell differentiation) จากเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นฮิสติโอไซต์จะต้องอาศัยไซโตไคน์ (cytokine) และโกรทแฟกเตอร์ (growth factor) หลายชนิดในการพัฒนา เช่น granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), tumor necrotic factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-3, IL-4 และ transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) (Cline, 1994; Moore, 2014)

ฮิสติโอไซต์จะอยู่ในบริเวณเนื้อเยื่ออ่อนและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทั่วร่างกาย เกี่ยวข้องกับระบบเรติคูลู-เอนโดทีเลียล (reticuloendothelial system) ฮิสติโอไซต์แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ เซลล์มาโครฟาจ (macrophage) มีหน้าที่ทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายผ่านกระบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) และเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immune system) และเซลล์เดนไดรติก (dendritic cell) ทำหน้าที่นำเสนอ หรือส่งสัญญาณจากแอนติเจนให้กับลิมโฟไซต์ชนิดเซลล์ที (T-cell lymphocyte) เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive หรือ acquire immune system) เซลล์เดนไดรติกสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดย่อย ขึ้นกับระยะการเจริญเต็มวัย (maturation stage) คือ Langerhans cell หรือ immature dendritic cell ซึ่งพบได้ในชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ของผิวหนัง ระบบขับถ่ายปัสสาวะ ระบบทางเดินอาหาร รวมถึงระบบทางเดินหายใจ และ interstitial dendritic cell เป็นเซลล์เดนไดรติกที่โตเต็มที่ (mature cell) และพบอยู่ในอวัยวะทั่วร่างกายรวมถึงผิวหนังชั้นหนังแท้ (dermis)

ฮิสติโอซิติค ซาร์โคมาในสุนัข (canine histiocytic sarcoma; CHS) จัดอยู่ในกลุ่มโรคฮิสติโอซิติค เจริญผิดปกติ (histiocytic proliferative disorder; HPD) ซึ่งเป็นมะเร็งเลือดขาวชนิดที่มีความรุนแรงมาก สัตว์ป่วยจะเสียชีวิตภายใน 2 ถึง 4 เดือน มะเร็งชนิดนี้พบบ่อยในสุนัขอายุปานกลางถึงอายุมาก อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าสุนัขอายุน้อยสามารถเป็น CHS ได้ (Denstedt, 2014; Mastroilli et al., 2012) อุบัติการณ์การเกิด CHS พบมากในสุนัขสายพันธุ์เบอร์นีส เมาน์เทนด็อก (Bernese Mountain Dog) ร็อตไวเลอร์ (Rottweiler) และกลุ่มรีทรีฟเวอร์ (Retriever) โดยเฉพาะพันธุ์แฟลท โคท รีทรีฟเวอร์ (Flat-coated retriever) (Abadie et al., 2009; Boerkamp et al., 2014; Constantino-Casas et al., 2011; Craig et al., 2002; Erich et al., 2013; Fidel et al., 2006) และยังพบรายงานในสุนัขพันธุ์อื่นอีกด้วย เช่น ทิเบตัน เทอร์เรีย (Tibetan Terrier) (Uchida et al., 2001) เพมโบรค เวลช คอร์กี้ (Pembroke Welsh Corgi) (Hirako et al., 2015; Ide et al., 2011; Thongtharb et al., 2016a) และมินเจอร์ ชเนาเซอร์ (Miniature schnauzer) (Lenz et al., 2017) รวมทั้งมีรายงานการพบในสัตว์ชนิดอื่น เช่น แมว (Friedrichs and Young, 2008; Ide et al., 2009; Ide et al., 2010) โค (Anjiki et al., 2000; Matsuda et al., 2010) ม้า (Paciello et al., 2013) กระต่าย (Ishimori et al., 2017; Karim et al., 2017; Leissingner et al., 2013) หนู (Ohnishi et al., 2012) เจอร์บิล (gerbil) (Chen et al., 1992) และเฟอร์เรท (ferret) (Thongtharb et al., 2016b)

เมื่อตรวจสอบรอยโรคของ CHS ด้วยตาเปล่า (gross examination) พบว่าก้อนเนื้อมีความแน่น (firm consistency) มีรูปร่างกลมหรือหลายกลีบ (multi-lobulated) พื้นผิวหน้าตัดของก้อนเนื้อค่อนข้างเรียบ มีสีขาวถึงสีครีม และอาจพบจุดเลือดออก หรือห่อมน้ำตายภายในก้อนเนื้อออกได้ เมื่อศึกษาตำแหน่งและรูปแบบการกระจายตัวของรอยโรค พบว่า CHS แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ แบบเกิดขึ้นเฉพาะที่ (localized histiocytic sarcoma) และ แบบกระจายทั่วร่างกาย (disseminated histiocytic sarcoma)

CHS แบบเกิดขึ้นเฉพาะที่ มักพบเป็นก้อนเดี่ยวบริเวณผิวหนัง และเนื้อเยื่อชั้นใต้หนังของปลายรยางค์ (Figure 1) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่พบได้บ่อย และอาจพบได้ที่ข้อต่อกระดูกรยางค์ ต่อมมน้ำเหลืองข้างเคียง (sentinel lymph node) ม้าม ปอด อัมพตะ สมอ และไขสันหลัง มะเร็งประเภทนี้สามารถลุกลามลงไปเนื้อเยื่อชั้นที่อยู่ลึกลงไป และสามารถพบการแพร่กระจายเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองข้างเคียงได้ ส่วน CHS แบบกระจายทั่วร่างกาย มักพบก้อนเนื้อกระจายอยู่ภายในอวัยวะของร่างกาย เช่น ม้าม ปอด ไช้กระดูก ตับ สมอ และไขสันหลัง มะเร็งประเภทนี้มีความรุนแรงมาก การพยากรณ์โรคไม่ดี และสัตว์ป่วยมีโอกาสเสียชีวิตสูง เมื่อศึกษาในระดับอิมมูโนฟีโนไทป์ (immunophenotype) พบว่าเซลล์มะเร็งฮิสติโอไซต์ในสุนัขส่วนใหญ่พัฒนามาจากเซลล์เดนไดรติก แต่ CHS สามารถแสดงลักษณะฟีโนไทป์ของโครมาทินได้ด้วย ซึ่งพบได้บ่อยในชนิดที่มีการเก็บกินเซลล์เม็ดเลือด (hemophagocytic histiocytic sarcoma) ที่ม้าม แต่โอกาสพบจะน้อยกว่า 2 ชนิดแรก (Moore et al., 2006) Thongtharb และคณะ (2016) พบว่าเซลล์มะเร็งฮิสติโอไซต์ที่พบในระบบประสาทส่วนกลางสามารถแสดงลักษณะฟีโนไทป์ของทั้งเซลล์เดนไดรติก และมาโครฟาจได้ แต่เหตุการณ์ดังกล่าวเกิดขึ้นได้ไม่บ่อยนัก ทั้งนี้ขึ้นกับระยะเวลาเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็งแต่ละเซลล์ นอกจากนี้ Hirako และคณะ (2015) ยังได้รายงานว่า CHS มีโอกาสพัฒนามาจากเซลล์แลงเกอร์ฮานส์ (Langerhans cell) ได้ เนื่องจากพบว่าเซลล์มะเร็งฮิสติโอไซต์ให้ผลบวกกับ E-cadherin บ่งบอกว่าเซลล์มะเร็งดังกล่าวมีลักษณะฟีโนไทป์ของเซลล์แลงเกอร์ฮานส์ ซึ่งเป็นเซลล์กลุ่มย่อย (subset) ของเซลล์เดนไดรติก และยังเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของฮิสติโอไซโตมาที่ผิวหนัง (cutaneous histiocytoma) (Baines et al., 2008)

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานสาเหตุที่แท้จริงที่ก่อให้เกิดการพัฒนา CHS อย่างไรก็ตามมีหลายการศึกษาอธิบายว่ามะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดนี้อาจมีความเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของยีน (Abadie et al., 2009; Boerkamp et al., 2013; Boerkamp et al., 2014; Sterenczak et al., 2011)



**Figure 1** A histiocytic sarcoma was presented on paw of left hind limb in dog. Gross appearance reveals a solitary mass at the left metatarsal area. Alopecia and ulcerative wounds (arrow) are also noted on the surface of the tumor.

## อาการทางคลินิก

อาการทางคลินิกของสุนัขที่ป่วยด้วย CHS มีความหลากหลาย และไม่จำเพาะ สุนัขมักแสดงอาการซึมอ่อนแรง เบื่ออาหาร ร่วมกับมีน้ำหนักตัวลดลง และมีต่อมน้ำเหลืองโต นอกจากนี้ยังสามารถพบอาการทางคลินิกประเภทอื่นได้คือ ขึ้นกับอวัยวะที่เซลล์มะเร็งแพร่กระจายเข้าไป โดยทั่วไปเซลล์มะเร็งฮีสตีโอไซต์สามารถแพร่กระจายไปยังอวัยวะทั่วร่างกายส่งผลให้เกิดความผิดปกติในหลายระบบร่วมกัน (Coomer and Liptak, 2008) เช่น การพบก้อนเนื้อที่เนื้อเยื่อปอด สุนัขมักแสดงอาการหอบหรือไอ ในขณะที่การมีก้อนเนื้อเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อสมอง จะทำให้สัตว์แสดงอาการชักหรือแสดงภาวะกล้ามเนื้อเสียสหการ (ataxia) นอกจากนี้ CHS ชนิดที่มีการเก็บกินเซลล์เม็ดเลือดยังส่งผลให้สัตว์เลี้ยงแสดงอาการคล้ายกับสัตว์ที่เป็นโรคมูมิต้านทานทำลายเม็ดเลือดแดงตนเอง (immune mediated hemolytic anemia; IMHA) ได้ แต่เมื่อทำการตรวจแอนติบอดีต่อเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี Coombs test พบว่าให้ผลลบ (Moore et al., 2006)

## การตรวจวินิจฉัย

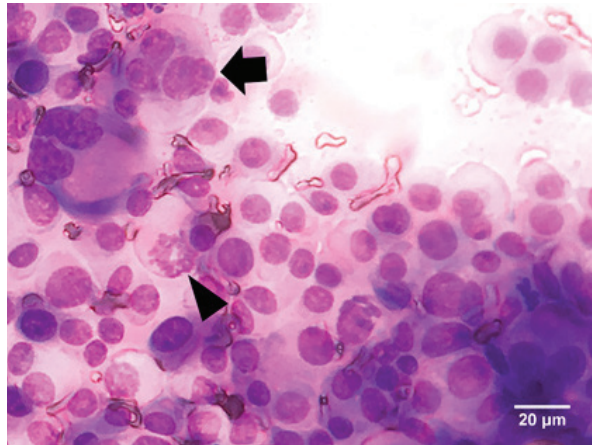
ข้อมูลเกี่ยวกับสัตว์ป่วย ประวัติการป่วย และผลการตรวจร่างกายเบื้องต้นเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการวินิจฉัยเนื่องอกทุกชนิดในสัตว์เลี้ยง การยืนยันว่าสัตว์ป่วยเป็นเนื่องอกชนิดใดมีความจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลเพิ่มเติมจากการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เช่น ผลตรวจทางโลหิตวิทยาและเคมีคลินิก ผลตรวจทางทัศนวินิจฉัย (diagnostic imaging) ผลตรวจทางเซลล์วิทยาวินิจฉัย (diagnostic cytology) ผลตรวจทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology) ผลตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry) ผลตรวจทางอณูชีววิทยา (molecular biology)

โดยทั่วไปแล้วค่าโลหิตวิทยา และเคมีคลินิกในสุนัขที่เป็น CHS โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิดที่มีการเก็บกินเซลล์เม็ดเลือด มักพบภาวะโลหิตจางแบบที่มีการตอบสนองของไขกระดูก (regenerative anemia) เกล็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia) อัลบูมินในเลือดต่ำ (hypoalbuminemia) โกลบูลินในเลือดต่ำ (hypoglobulinemia) และคอเลสเตอรอลในเลือดต่ำ (hypcholesterolemia) (Moore et al., 2006; Soare et al., 2012) นอกจากการตรวจทางโลหิตวิทยาและเคมีคลินิก พบว่าการตรวจสารบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) เป็นอีกเครื่องมือหนึ่งในการช่วยวินิจฉัย CHS ได้ โดยสุนัขที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดนี้ สามารถพบภาวะไฟบริโนเจนในเลือดสูง (hyperfibrinogenemia) ภาวะเฟอร์ริตินในเลือดสูง (hyperferritinemia) นอกจากนี้ยังอาจพบระดับซีรีแอคทีฟโปรตีน (c-reactive protein) และระดับโมโนไซต์ คีโมแทคติก โปรตีน-1 (monocyte chemotactic protein (MCP)-1) เพิ่มขึ้น (Friedrichs et al., 2010; Nielsen et al., 2013)

เนื่องจากพฤติกรรมทางคลินิกของ CHS มีความรุนแรง และมีอัตราการแพร่กระจายสูง การติดตามการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะหรือบริเวณอื่นของร่างกายจึงมีความจำเป็นอย่างมาก จึงมีการนำวิธีทางด้านทัศนวินิจฉัยมาใช้ โดยเครื่องมือที่นิยมใช้ประกอบด้วย อัลตราซาวด์ (ultrasound) การตรวจด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ (computed tomography scan; CT-scan) การตรวจเอกซเรย์ด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic resonance imaging; MRI) และการถ่ายภาพการกระจายตัวของสารเภสัชรังสีที่สลายตัวให้โพสิตรอน (positron emission tomography; PET) (Cruz-Arámbulo et al., 2004; Kang et al., 2009; Ramirez et al., 2002; Tamura et al., 2009; Taylor et al., 2015; Wada et al., 2017) การเลือกใช้เครื่องมือทางด้านทัศนวินิจฉัยควรพิจารณาถึงตำแหน่ง และการกระจายตัวของเนื้ออวัยวะร่วมด้วย

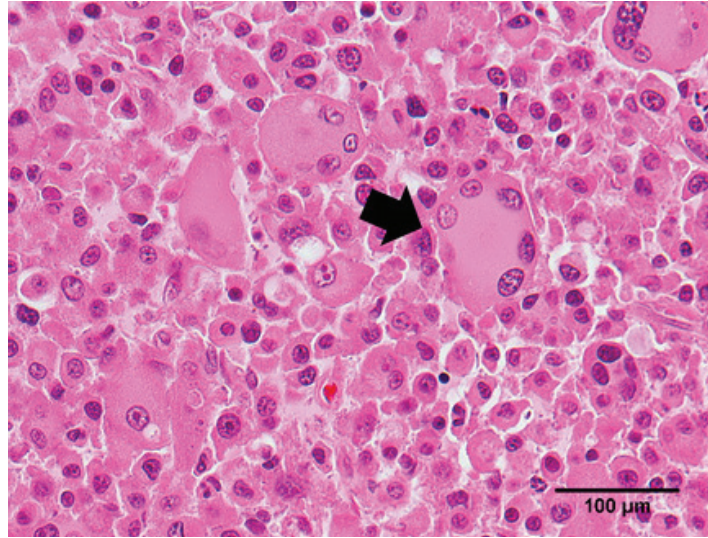
การเลือกวิธีการเก็บตัวอย่างเซลล์จากก้อนเนื้อ หรือรอยโรคที่สงสัยว่าเป็น CHS เพื่อนำไปตรวจวินิจฉัยทางด้านเซลล์วิทยานั้น ควรพิจารณาจากตำแหน่งและระดับความลึกของรอยโรค โดยทั่วไปลักษณะสัณฐานวิทยา (tumor cell morphology) ของเซลล์มะเร็งฮีสตีโอไซต์ พบว่าเซลล์มะเร็งส่วนใหญ่มีรูปร่างกลม ไปจนถึงรูปร่าง

หลายแบบ (round to pleomorphic-shaped) เซลล์มีขนาดไม่เท่ากัน (anisocytosis) สัดส่วนนิวเคลียสต่อไซโตพลาสซึม (nuclear:cytoplasm ratio) สูง ไซโตพลาสซึมมีปริมาณปานกลางถึงมาก และติดสีน้ำเงินอ่อน นิวเคลียสมีรูปร่างกลม และมักมีขนาดไม่เท่ากัน (anisokaryosis) โครมาตินเป็นแบบละเอียดถึงหยาบ (finely – coarse chromatin pattern) และพบการแบ่งตัวของเซลล์ที่ผิดปกติ (abnormal mitotic figure) ปริมาณมาก บางครั้งอาจพบเซลล์มะเร็งมีขนาดใหญ่ และมีนิวเคลียสอยู่รวมกันในเซลล์เดียว (multinucleated giant cell) (Figure 2)



**Figure 2** Histiocytic sarcoma in dog. Neoplastic histiocytes are discrete round cells. These cells have moderate amount to abundant cytoplasm. The nuclei are round to ovoid with finely to coarse chromatin pattern. Mitotic figure is found (arrowhead). Multinucleated giant cells are also noted (arrow). Fine Needle Aspiration. Diff-Quik®.

การตรวจทางจุลพยาธิวิทยาพบว่า ลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งฮีสตีโอไซตใน CHS แบบเกิดขึ้นเฉพาะที่ และแบบกระจายทั่วร่างกายมีความคล้ายคลึงกัน ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม (Constantino-Casas et al., 2011; Thongtharb et al., 2016a) คือ กลุ่มรูปร่างกลม/รูปร่างหลายแบบ (round/pleomorphic shape) เซลล์มะเร็งในกลุ่มนี้มีไซโตพลาสซึมติดสีแดง (eosinophilic cytoplasm) และขอบเขตของเซลล์ชัดเจน อาจพบแวคิวโอลภายในไซโตพลาสซึม (cytoplasmic vacuolation) นิวเคลียสมีรูปร่างกลม หรือรูปไข่ และมีนิวคลีโอลัสชัดเจน บางบริเวณอาจพบเซลล์มะเร็งมีขนาดใหญ่ และมีนิวเคลียสอยู่รวมกันในเซลล์เดียว (multinucleated giant cell) (Figure 3) ส่วนกลุ่มรูปร่างกระสวย (spindle shape) เซลล์มะเร็งมักมีการเรียงตัวด้วยรูปแบบที่ไม่แน่นอน ขอบเขตของเซลล์ไม่ชัดเจน นิวเคลียสมีรูปร่างตั้งแต่รูปไข่ จนถึงรูปกระสวย และมักไม่พบนิวคลีโอลัส นอกจากนี้ยังพบการแทรกตัวของเซลล์อักเสบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งลิมโฟไซต์ปะปนอยู่กับเซลล์มะเร็งด้วย Thongtharb และคณะ (2016) ได้อธิบายเพิ่มเติมว่า CHS ที่มีเซลล์มะเร็งรูปร่างกลม/รูปร่างหลายแบบจะมีความรุนแรงมากกว่ากลุ่มเซลล์มะเร็งรูปร่างกระสวย

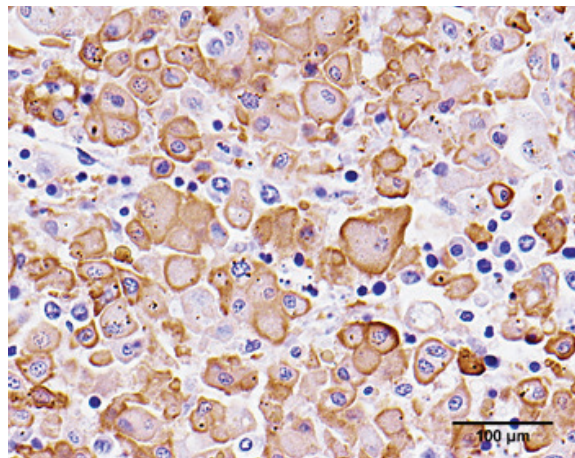


**Figure 3** Neoplastic histiocytes are round to pleomorphic. These cells have moderate to abundant eosinophilic cytoplasm. The nuclei are eccentric and round to ovoid. Nucleolar prominence is noted. Severe cellular atypia is seen. The multinucleated giant cells (arrow) are also found admixing with neoplastic histiocytes. HE.

แม้ว่าการตรวจทางด้านเซลล์วิทยาวินิจฉัย และจุลพยาธิวิทยาเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการยืนยันมะเร็งชนิดนี้ได้ แต่ในบางครั้งลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์อาจมีความคล้ายคลึงกับโรคอื่น ในกลุ่มโรคฮีสติโอไซต์เจริญผิดปกติ รวมถึงเนื้องอกชนิดอื่นได้ เช่น เนื้องอกมาสต์เซลล์ (mast cell tumor) ชนิด undifferentiated เนื้องอกพลาสมาเซลล์ (plasma cell tumor) มะเร็งต่อมน้ำเหลือง (lymphoma) และ undifferentiated carcinoma จึงมีการนำวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี หรืออิมมูโนไซโตเคมี (immunocytochemistry) มาใช้ตรวจวินิจฉัยแยกชนิดของมะเร็งต่อไป แต่ข้อจำกัดที่สำคัญของวิธีเหล่านี้ คือ แอนติบอดีที่มีความจำเพาะในการตรวจหาแอนติเจนที่อยู่บนผิวเซลล์ ไฮโดรพลาสซึม และนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งฮีสติโอไซต์ส่วนใหญ่เป็นแอนติบอดีที่ใช้สำหรับตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ถูกแช่แข็ง (frozen tissue) แต่การตรวจวิเคราะห์ทางวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี โดยใช้เนื้อเยื่อที่ถูกแช่แข็งไม่ได้เป็นวิธีที่ใช้กันอยู่ทั่วไป ดังนั้นในช่วงระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา มีหลายการศึกษาได้ค้นหา และรายงานแอนติบอดีที่จำเพาะสำหรับตรวจยืนยัน CHS จากเนื้อเยื่อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลิน และฝังในพาราฟิน และปัจจุบันมีการนำแอนติบอดีกลุ่มดังกล่าวมาใช้เพื่อยืนยัน CHS กันอย่างแพร่หลายมากขึ้น (Table 1 และ Figure 4) แม้ว่าวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสามารถวินิจฉัยแยก CHS ออกจากมะเร็งชนิดอื่นได้ แต่ก็ยังไม่สามารถแยก CHS แบบเกิดขึ้นเฉพะที่ออกจากแบบกระจายทั่วร่างกายได้ (Affolter and Moore, 2002; Fulmer and Mauldin, 2007; Ide et al., 2011)

**Table 1** Summary of primary antibodies used for immunohistochemistry in canine histiocytic sarcoma

Antibody	Cell origin	Author
CD18	Leukocyte, dendritic cell	Constantino-Casas et al., 2011; Hirako et al., 2015; Kuijk et al., 2013; Soare et al., 2012; Zimmerman et al., 2006
HLA-DR (MHC Class II)	Antigen presenting cell	Constantino-Casas et al., 2011; Hirako et al., 2015; Ide et al., 2011; Kato et al., 2013; Thongtharb et al., 2016a
Iba-1	Microglia, macrophage	Hirako et al., 2015; Ide et al., 2011; Pierezan et al., 2014; Thongtharb et al., 2016a
CD204	Monocyte, macrophage	Ide et al., 2011; Kato et al., 2013; Thongtharb et al., 2016a
CD163	Histiocyte	Ide et al., 2011; Kato et al., 2013; Thongtharb et al., 2016a
Lysozyme	Monocyte, macrophage	Fant et al., 2004; Soare et al., 2012; Thio et al., 2006; Thongtharb et al., 2016a; Zimmerman et al., 2006
CD11c	Dendritic cell	Affolter and Moore, 2002; Tzipory et al., 2009
CD11d	Red pulp macrophage	Constantino-Casas et al., 2011; Moore et al., 2006; Soare et al., 2012
E-cadherin	Langerhans cell	Hirako et al., 2015



**Figure 4** Histiocytic sarcoma in dog. Neoplastic histiocytes are immunopositive for Iba-1. IHC. Hematoxylin counterstain.

ในช่วงระยะเวลา 5 ปีที่ผ่านมา มีการนำวิธีทางอณูชีววิทยา (molecular biology) มาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัย CHS โดย Yamazaki และคณะ (2014) ได้วัดระดับการแสดงออกของ messenger RNA (mRNA) ของแอนติเจนที่ผิว (surface antigens; MHC class II, CD11b, CD11c และ CD86) ในเซลล์มะเร็งฮีสติโอไซต์ และพบว่าสุนัขที่เป็น CHS มีการแสดงออกของยีนกลุ่มดังกล่าวสูงกว่าสุนัขที่ป่วยด้วยโรคอื่น อย่างไรก็ตามการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีนี้แนะนำให้ใช้ร่วมกับการตรวจวินิจฉัยวิธีอื่นประกอบกันเพื่อเพิ่มความแม่นยำในการตรวจวินิจฉัย นอกจากนี้ Boerkamp และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาถึงการแสดงออกของยีน *C6*, *CLEC12A* และ *CCL5* ใน *CHS* และพบว่าสุนัขที่เป็น *CHS* แบบเกิดขึ้นเฉพาะที่มีการแสดงออกของยีน *C6* ลดลง และมีการแสดงออกของยีน *CLEC12A* และ *CCL5* สูงขึ้นเมื่อเทียบกับสุนัขที่เป็น *CHS* แบบกระจายทั่วร่างกาย

## การรักษา

การรักษา *CHS* มีหลายวิธี วิธีทางศัลยกรรมเป็นการรักษาที่นิยมใช้สำหรับรักษามะเร็งชนิดนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบบเกิดขึ้นเฉพาะที่ อย่างไรก็ตามภายหลังจากการผ่าตัดแล้วควรมีการพิจารณาให้การรักษาเพิ่มเติมด้วย เช่น รังสีรักษา (กรณีเนื้องอกที่ไม่สามารถผ่าตัดได้ หรือผ่าตัดได้ไม่หมด) การให้ยาต้านเนื้องอก (antitumor agent) (Derwis et al., 2017; Klahn et al., 2011) เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของสัตว์ป่วย

ช่วงระยะเวลา 20 ปีที่ผ่านมา มีการเลือกใช้ยาต้านเนื้องอกหลากหลายชนิดเพื่อใช้รักษา *CHS* โดยทั่วไปรูปแบบการรักษาด้วยยาต้านเนื้องอก มี 2 รูปแบบ คือ การให้ยาต้านเนื้องอกเพียงชนิดเดียวในการรักษา (single dose chemotherapy) และการให้ยาต้านเนื้องอกหลายชนิดร่วมกันในการรักษา (combination chemotherapy) ทั้งนี้การให้ยาหลายชนิดร่วมกันมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษามะเร็ง ตลอดจนเป็นการลดโอกาสที่เซลล์มะเร็งจะดื้อยาได้ การรักษา *CHS* โดยการให้ยาต้านเนื้องอกมักนิยมใช้ในกรณีเป็นมะเร็งแบบกระจายทั่วร่างกาย ปัจจุบันยา lomustine (CCNU) เป็นยาต้านเนื้องอกกลุ่มแรกที่แนะนำให้ใช้ในขนาด 60 – 90 mg/m<sup>2</sup> อัตราการตอบสนองเพียงร้อยละ 29 – 46 (Rassnick et al., 2010; Skorupski et al., 2007) และมีค่ามัธยฐานระยะเวลาการอยู่รอด (median survival time) อยู่ที่ 106 วัน (Skorupski et al., 2007) แม้ว่า lomustine เป็นยาต้านเนื้องอกที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลกในการรักษา *CHS* แต่โอกาสที่มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดนี้ไม่ตอบสนองต่อการรักษา ก็สามารถพบได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบรายงานการแพ้ยา ตลอดจนผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากการให้ยาต้านเนื้องอกชนิดนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลต่อปริมาณของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล ทำให้เกิดภาวะนิวโทรฟิลต่ำ (neutropenia) อย่างรุนแรง รวมถึงการมีผลกระทบต่อระบบทางเดินอาหาร การเป็นพิษต่อตับ (hepatotoxicity) และส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับเอนไซม์ alanine aminotransferase; ALT ในที่สุด (Heading et al., 2011; Kristal et al., 2004) ในปี 2018 Kezer และคณะ ได้นำยาต้านเนื้องอก dacarbazine มาใช้สำหรับรักษามะเร็งชนิดนี้ โดยให้ในขนาด 900 – 1000 mg/m<sup>2</sup> อัตราการตอบสนองอยู่ที่ร้อยละ 17.6 และมีค่ามัธยฐานอัตราการรอดชีวิตโดยปราศจากโรค (median event free survival) อยู่ที่ 21 วัน ผลข้างเคียงหลัก คือ การเกิดพิษต่อเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำ ยา vinorelbine ซึ่งเป็นยาต้านเนื้องอกในกลุ่มวินคาอัลคาลอยด์ (vinca alkaloid) ก็ถูกนำมาใช้สำหรับรักษา *CHS* เช่นเดียวกัน โดยให้ในขนาด 8 – 22 mg/m<sup>2</sup> ในรายที่มีการตอบสนองต่อการรักษาอย่างสมบูรณ์ (complete response) พบว่ามีค่ามัธยฐานระยะเวลาการอยู่รอดอยู่ที่ 277 วัน (Wouda et al., 2015) นอกจากนี้ยังพบรายงานการให้ยา paclitaxel ในขนาด 132 mg/m<sup>2</sup> ซึ่งให้ผลการตอบสนองต่อ การรักษาบางส่วน (partial response) เท่านั้น (Poirier et al., 2004) Mason และคณะ (2018) ได้รายงานการให้ยา epirubicin ในการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดนี้ (ให้ในขนาด 30



mg/m<sup>2</sup>) โดยพบอัตราการตอบสนองโดยรวม (overall response rate) อยู่ที่ร้อยละ 29 และมีค่ามัธยฐานระยะเวลาการอยู่รอดอยู่ที่ 185 วัน Vail และคณะ (1997) ได้นำ liposomal-encapsulated doxorubicin ในขนาด 0.75 – 1.1 mg/kg โดยพบว่าอัตราการตอบสนองโดยรวมอยู่ที่ร้อยละ 25.5

Cannon และคณะ (2015) ได้นำโลมัสทีน และด็อกโซรูบิซินมาใช้ร่วมกัน ในรูปแบบการให้ยาต้านเนื้องอกหลายชนิดร่วมกันในการรักษา เพื่อหวังผลเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา โดยพบว่าอัตราการตอบสนองอยู่ที่ร้อยละ 58 และมีค่ามัธยฐานระยะเวลาการอยู่รอดอยู่ที่ 185 วัน นอกจากนี้ยังพบรายงานการนำยาต้านเนื้องอกชนิดอื่น มาใช้ร่วมกันเพื่อรักษา CHS ด้วย เช่น cyclophosphamide, prednisolone, vincristine, mitoxantrone และ nimustin (ACNU) (Dervis et al., 2017; Klahn et al., 2011; Takahashi et al., 2014a; Takahashi et al., 2014b; Uno et al., 1993)

บิสฟอสโฟเนต (bisphosphonate) เป็นกลุ่มยาที่นิยมใช้ในวงกรแพทย์ เพื่อใช้ป้องกัน และรักษาภาวะกระดูกพรุน โดยการยับยั้งขบวนการสลายกระดูกของออสติโอคลาสต์ (osteoclast) ยาในกลุ่มนี้ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของมาโครฟาจ โดยเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการอะพอโตซิสได้อีกด้วย (Rogers et al., 1996) จากคุณสมบัติดังกล่าว Hafeman และคณะ (2010) ได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพของ liposomal clodronate (กลุ่มยาบิสฟอสโฟเนตรุ่นแรกที่ถูกห่อหุ้มด้วยไลโปโซม) กับเซลล์มะเร็งฮีสตีโอไซด์ พบว่ายาดังกล่าวสามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ โดยผ่านกระบวนการอะพอโตซิสของเซลล์มะเร็งในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*) นอกจากนี้การให้ยาในกลุ่มบิสฟอสโฟเนต ร่วมกับยาต้านเนื้องอกบางชนิดสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา CHS ได้ (Hafeman et al., 2012)

การรักษามะเร็งด้วยยาเคมีบำบัดในรูปแบบ metronomic chemotherapy เป็นการรักษามะเร็งอีกรูปแบบหนึ่งที่มีการให้ยาต้านเนื้องอกขนาดต่ำให้แก่สัตว์ป่วยในรูปแบบกิน โดยให้ต่อเนื่องเป็นประจำทุกวัน เพื่อหวังผลจากฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ (anti-angiogenesis) โดยการทำลายเซลล์เยื่อหลอดเลือดของหลอดเลือดที่อยู่ภายในก้อนเนื้องอก คุณสมบัติของการให้ยาในรูปแบบนี้คือ เพื่อเพิ่มความสะดวกสบายให้กับเจ้าของสัตว์ป่วยเนื่องจากรูปแบบการให้ยาเป็นแบบกิน และสามารถให้ด้วยตนเองที่บ้านได้ นอกจากนี้ผลข้างเคียง หรือพิษที่เกิดขึ้นจากการยาด้านเนื้องอกในรูปแบบเมโทรโนมิกมักเกิดขึ้นน้อย (Fonseca-Alves and Calazans, 2016; Gaspar et al., 2018; Mutsaers, 2009; Tripp et al., 2011) ในช่วงระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา พบรายงานการรักษา CHS โดยใช้ CCNU ในขนาด 2.84 mg/m<sup>2</sup> ให้กินวันละครั้ง ทุกวัน (Tripp et al., 2011) นอกจากนี้ยังพบรายงานการนำ toceranib (ขนาด 2.75 mg/kg) ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม tyrosine kinase inhibitor (TKI) มาใช้ร่วมกับ cyclophosphamide ขนาดต่ำ (15 mg/m<sup>2</sup>) ด้วย (Mitchell et al., 2012)

วงการสัตวแพทย์ ณ ปัจจุบัน ได้มีการนำยาในกลุ่มยา TKI มาใช้ในการรักษาเนื้องอกหลายชนิด ได้แก่ เนื้องอกมาสต์เซลล์ เนื้องอกเมลาโนมา (melanoma) คาร์ซิโนมา (carcinoma) และซาร์โคมา (sarcoma) เป็นต้น (Bernabe et al., 2013; Hahn et al., 2008; Horta et al., 2018; Kim et al., 2016; London, 2009) ทาง Ito และคณะ (2013) ได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพของ dasatinib ซึ่งเป็นยาในกลุ่มยา TKI ในการรักษา CHS ในระดับหลอดทดลอง และพบว่ายาดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงจาก CHS ได้ และการศึกษาในหนูทดลองที่ถูกปลูกถ่าย CHS (xenotransplantation) พบว่า dasatinib สามารถระงับการเจริญเติบโตของมะเร็งชนิดนี้ได้ (Ito et al., 2018) นอกจากนี้ยังมีการรักษาด้วยภูมิคุ้มกันบำบัด (immunotherapy) โดยนำเซลล์เพาะเลี้ยง human cytotoxic T-cell (TALL-104) มาใช้สำหรับรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดนี้พบว่าสามารถให้ผลการตอบสนองต่อการรักษาอย่างสมบูรณ์ (Visonneau et al., 1997)

## การพยากรณ์โรค

สุนัขที่เป็น CHS การพยากรณ์โรคโดยส่วนใหญ่จะแย่ (poor prognosis) เนื่องจากเป็นเนื้องอกที่มีความรุนแรง และมีอัตราการแพร่กระจายสูงถึงร้อยละ 70 – 90 โดยมีรายงานว่า CHS แบบเกิดขึ้นเฉพาที่ การพยากรณ์โรคมักดีกว่าแบบกระจายทั่วร่างกาย (Fulmer and Mauldin, 2007) อย่างไรก็ตามอัตราการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปตามอวัยวะในร่างกาย สามารถพบได้ในมะเร็งทั้ง 2 ประเภท (Schultz et al., 2007) ส่วน CHS ชนิดที่มีการเก็บกินเซลล์เม็ดเลือดสัตว์มักเสียชีวิตในเวลาไม่นาน (มีค่ามัธยฐานระยะเวลาการอยู่รอดอยู่ที่ 7 สัปดาห์) และจากการศึกษาของ Skorupski และคณะ (2007) พบว่าสุนัขที่เป็น CHS และมีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (<100,000/ $\mu$ l) ร่วมกับระดับอัลบูมินในเลือดต่ำ การพยากรณ์โรคมักไม่ค่อยดี โดยสัตว์ป่วยจะเสียชีวิตภายในระยะเวลา 1 เดือน

## บทสรุป

CHS เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่มีความรุนแรงและส่งผลให้สัตว์เสียชีวิตในที่สุด เซลล์มะเร็งส่วนใหญ่มีต้นกำเนิดจากเซลล์ต้นโดรติก อย่างไรก็ตามมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดนี้สามารถแสดงลักษณะ อิมมูโนฟีโนไทป์ของมาโครฟาจได้ สาเหตุการเกิด CHS มักสัมพันธ์กับความผิดปกติของยีน การตรวจวินิจฉัยโรคนี้ต้องอาศัยข้อมูลหลายส่วนประกอบกัน เช่น การตรวจทางโลหิตวิทยาและเคมีคลินิก การตรวจทางด้านทัศนวินิจฉัย พยาธิวิทยา และอนุชีววิทยา การรักษามะเร็งชนิดนี้ควรทำการรักษาโดยใช้หลายวิธีร่วมกัน (multimodal therapy) ทั้งการผ่าตัด ร่วมกับการฉายรังสี และ/หรือการให้ยาด้านเนื้องอก โดย CCNU เป็นยาด้านเนื้องอกกลุ่มแรกที่นิยมใช้สำหรับรักษา CHS และให้ผลการตอบสนองอยู่ที่ร้อยละ 29 – 46 ปกติแล้วการรักษาสัตว์ที่ป่วยด้วยโรคมะเร็งนอกเหนือจากการรักษาดังกล่าวมาข้างต้น ควรมีการดูแลรักษา สัตว์ป่วยแบบประคับประคอง (palliative treatment) ร่วมด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การให้ยาระงับปวด เพื่อเป็นการปรับปรุง และเพิ่มคุณภาพชีวิตให้กับสัตว์ป่วยต่อไป

## REFERENCES

- Abadie, J., Hédan, B., Cadieu, E., De Brito, C., Devauchelle, P., Bourgain, C., Parker, H.G., Vaysse, A., Margaritte-Jeannin, P., Galibert, F., Ostrander, E.A., André, C., 2009. Epidemiology, pathology, and genetics of histiocytic sarcoma in the Bernese mountain dog breed. *J Hered.* 100, S19 - S27.
- Affolter, V.K., Moore, P.F., 2002. Localized and disseminated histiocytic sarcoma of dendritic cell origin in dogs. *Vet Pathol.* 39, 74 - 83.
- Anjiki, T., Wada, Y., Honma, H., Niizeki, H., Shibahara, T., Kadota, K., 2000. Malignant histiocytosis in cattle. *J Vet Med Sci.* 62, 1235 - 1240.
- Baines, S.J., McInnes, E.F., McConnell, I., 2008. E-cadherin expression in canine cutaneous histiocytomas. *Vet Rec.* 162, 509 - 513.
- Bernabe, L.F., Portela, R., Nguyen, S., Kisseberth, W.C., Pennell, M., Yancey, M.F., London, C.A., 2013. Evaluation of the adverse event profile and pharmacodynamics of toceranib phosphate administered to dogs with solid tumors at doses below the maximum tolerated dose. *BMC Vet Res.* 9, 1 - 10.
- Boerkamp, K.M., van der Kooij, M., van Steenbeek, F.G., van Wolferen, M.E., Groot Koerkamp, M.J., van Leenen, D., Grinwis, G.C., Penning, L.C., Wiemer, E.A., Rutteman, G.R., 2013. Gene expression profiling of histiocytic sarcomas in a

- canine model: the predisposed flatcoated retriever dog. *PLoS One*. 8, e71094.
- Boerkamp, K.M., van Steenbeek, F.G., Penning, L.C., Groot Koerkamp, M.J., van Leenen, D., Vos-Loohuis, M., Grinwis, G.C., Rutteman, G.R., 2014. The two main forms of histiocytic sarcoma in the predisposed Flatcoated retriever dog display variation in gene expression. *PLoS One*. 2, e98258.
- Cannon, C., Borgatti, A., Henson, M., Husbands, B., 2015. Evaluation of a combination chemotherapy protocol including lomustine and doxorubicin in canine histiocytic sarcoma. *J Small Anim Pract*. 56, 425 - 429.
- Chen, H.C., Slone, T.W., Jr Frith, C.H., 1992. Histiocytic sarcoma in an aging gerbil. *Toxicol Pathol*. 20, 260 - 263.
- Cline, M.J., 1994. Histiocytes and histiocytosis. *Blood* 84, 2840 - 2853.
- Constantino-Casas, F., Mayhew, D., Hoather, T.M., Dobson, J.M., 2011. The clinical presentation and histopathologic-immunohistochemical classification of histiocytic sarcomas in the Flat Coated Retriever. *Vet Pathol*. 48, 764 - 771.
- Coomer, A.R., Liptak, J.M., 2008. Canine histiocytic diseases. *Compend Contin Educ Vet*. 30, 202 - 204, 208 - 216.
- Craig, L.E., Julian, M.E., Ferracone, J.D., 2002. The diagnosis and prognosis of synovial tumors in dogs: 35 cases. *Vet Pathol*. 39, 66 - 73.
- Cruz-Arámulo, R., Wrigley, R., Powers, B., 2004. Sonographic features of histiocytic neoplasms in the canine abdomen. *Vet Radiol Ultrasound*. 45, 554 - 558.
- Denstedt, E., 2014. Suspected disseminated histiocytic sarcoma in a 3-year-old Perrode Presa Canario dog. *Can Vet J*. 55, 181 - 184.
- Dervisiz, N.G., Kiupel, M., Qin, Q., Cesario, L., 2017. Clinical prognostic factors in canine histiocytic sarcoma. *Vet Comp Oncol*. 15, 1171 - 1180.
- Erich, S.A., Rutteman, G.R., Teske, E., 2013. Causes of death and the impact of histiocytic sarcoma on the life expectancy of the Dutch population of Bernese mountain dogs and Flat-coated retrievers. *Vet J*. 198, 678 - 683.
- Fant, P., Caldin, M., Furlanello, T., De Lorenzi, D., Bertolini, G., Bettini, G., Morini, M., Masserdotti, C., 2004. Primary gastric histiocytic sarcoma in a dog – a case report. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 51, 358 - 362.
- Fidel, J., Schiller, I., Hauser, B., Jausi, Y., Rohrer-Bley, C., Roos, M., Kaser-Hotz, B., 2006. Histiocytic sarcomas in flat-coated retrievers: a summary of 37 cases (November 1998–March 2005). *Vet Comp Oncol*. 4, 63 - 74.
- Fonseca-Alves, C.E., Calazans, S.G., 2016. Metronomic chemotherapy in small animal practice: an update. *Asian J Anim Vet Adv*. 11, 17 - 23.
- Friedrichs, K.R., Thomas, C., Plier, M., Andrews, G.A., Chavey, P.S., Young, K.M., 2010. Evaluation of serum ferritin as a tumor marker for canine histiocytic sarcoma. *J Vet Intern Med*. 24, 904 - 911.
- Friedrichs, K.R., Young, K.M., 2008. Histiocytic sarcoma of macrophage origin in a cat: case report with a literature review of feline histiocytic malignancies and comparison with canine hemophagocytic histiocytic sarcoma. *Vet Clin Pathol*. 37, 121 - 128.

- Fulmer, A.K., Mauldin, G.E., 2007. Canine histiocytic neoplasia: An overview. *Can Vet J.* 48, 1041 - 1043.
- Gaspar, T.B., Henriques, J., Marconato, L., Queiroga, F.L., 2018. The use of low-dose metronomic chemotherapy in dogs-insight into a modern cancer field. *Vet Comp Oncol.* 16, 2 - 11.
- Hafeman, S., London, C., Elmslie, R., Dow, S., 2010. Evaluation of liposomal clodronate for treatment of malignant histiocytosis in dogs. *Cancer Immunol Immunother.* 59, 441 - 452.
- Hafeman, S.D., Varland, D., Dow, S.W., 2012. Bisphosphonates significantly increase the activity of doxorubicin or vincristine against canine malignant histiocytosis cells. *Vet Comp Oncol.* 10, 44 - 56.
- Hahn, K.A., Oglivie, G., Rusk, T., Devauchelle, P., Leblanc, A., Legendre, A., Powers, B., Leventhal, P.S., Kinet, J.P., Palmerini, F., Dubreuil, P., Moussy, A., Hermine, O., 2008. Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *J Vet Intern Med.* 22, 1301 - 1309.
- Heading, K.L., Brockley, L.K., Bennett, P.F., 2011. CCNU (lomustine) toxicity in dogs: a retrospective study (2002-07). *Aust Vet J.* 89, 109 - 116.
- Hirako, A., Sugiyama, A., Sakurai, M., Ozaki, K., Sakai, H., Takeuchi, T., Morita, T., Moore, P.F., 2015. Cutaneous histiocytic sarcoma with E-cadherin expression in a Pembroke Welsh Corgi dog. *J Vet Diagn Invest.* 27, 589 - 595.
- Horta, R.D.S., Giuliano, A., Lavallo, G.E., Costa, M.P., de Araújo, R.B., Constantino-Casas, F., Dobson, J., 2018. Clinical, histological, immunohistochemical and genetic factors associated with measurable response of high-risk canine mast cell tumours to tyrosine kinase inhibitors. *Oncol Lett.* 15, 129 - 136.
- Ide, K., Setoguchi-Mukai, A., Nakagawa, T., Uetsuka, K., Nakayama, H., Fujino, Y., Ohno, K., Tsujimoto, H., 2009. Disseminated histiocytic sarcoma with excessive hemophagocytosis in a cat. *J Vet Med Sci.* 71, 817 - 820.
- Ide, T., Uchida, K., Kagawa, Y., Suzuki, K., Nakayama, H., 2011. Pathological and immunohistochemical features of subdural histiocytic sarcoma in 15 dogs. *J Vet Diagn Invest.* 23, 127 - 132.
- Ide, T., Uchida, K., Tamura, S., Nakayama, H., 2010. Histiocytic sarcoma in the brain of a cat. *J Vet Med Sci.* 72, 99 - 102.
- Ishimori, M., Michishita, M., Yoshimura, H., Azakami, D., Ochiai, K., Ishiwata, T., Takahashi K., 2017. Disseminated histiocytic sarcoma with hemophagocytosis in a rabbit. *J Vet Med Sci.* 79, 1503 - 1506.
- Ito, K., Kuroki, S., Kobayashi, M., Ono, K., Washizu, T., Bonkobara, M., 2013. Identification of dasatinib as an in vitro potent growth inhibitor of canine histiocytic sarcoma cells. *Vet J.* 196, 536 - 540.
- Ito, K., Miyamoto, R., Tani, H., Kurita, S., Kobayashi, M., Tamura, K., Bonkobara, M., 2018. Effect of dasatinib in a xenograft mouse model of canine histiocytic sarcoma and in vitro expression status of its potential target EPHA2. *J Vet Pharmacol Ther.* 41, e45 - e48.

- Kang, B.T., Park, C., Yoo, J.H., Gu, S.H., Jang, D.P., Kim, Y.B., Woo, E.J., Kim, D.Y., Cho, Z.H., Park, H.M., 2009. 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography and magnetic resonance imaging findings of primary intracranial histiocytic sarcoma in a dog. *J Vet Med Sci.* 71, 1397 - 1401.
- Karim, M.R., Izawa, T., Pervin, M., Sasai, H., Kuwamura, M., Yamate, J., 2017. Cutaneous histiocytic sarcoma with regional lymph node metastasis in a Netherland dwarf rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J Comp Pathol.* 156, 169 - 172.
- Kato, Y., Murakami, M., Hoshino, Y., Mori, T., Maruo, K., Hirata, A., Nakagawa, T., Yanai, T., Sakai, H., 2013. The class A macrophage scavenger receptor CD204 is a useful immunohistochemical marker of canine histiocytic sarcoma. *J Comp Pathol.* 148,188 - 196.
- Kezer, K.A., Barber, L.G., Jennings, S.H., 2018. Efficacy of dacarbazine as a rescue agent for histiocytic sarcoma in dogs. *Vet Comp Oncol.* 16, 77 - 80.
- Kim, J.H., Kim, H.J., Kim, D.H., Yim, J.H., Lee, S.J., Park, K.H., Yoon, H.Y., 2016. Successful response to imatinib in two dogs with inoperable grade III infiltrating mast cell tumours: a case report. *Vet Med (Praha).* 61, 467 - 473.
- Klahn, S.L., Kitchell, B.E., Dervisiz, N.G., 2011. Evaluation and comparison of outcomes in dogs with periarticular and nonperiarticular histiocytic sarcoma. *J Am Vet Med Assoc.* 239, 90 - 96.
- Kristal, O., Rassnick, K.M., Gliatto, J.M., Northrup, N.C., Chretien, J.D., Morrison-Collister, K., Cotter, S.M., Moore, A.S., 2004. Hepatotoxicity associated with CCNU (lomustine) chemotherapy in dogs. *J Vet Intern Med.* 18, 75 - 80.
- Kuijk, L., van Ginkel, K., de Vos, J.P., Brearley, M.J., Butinar, J., Gielen, I., van Garderen, E., Chiers, K., Verhoeven, P.S., 2013. Peri-articular histiocytic sarcoma and previous joint disease in Bernese Mountain Dogs. *J Vet Intern Med.* 27, 293 - 299.
- Leissingner, M., Brandão, J., Wakamatsu, N., Le Roux, A., Rich, G., Gaunt, S., 2013. Pulmonary histiocytic sarcoma in a rabbit. *Vet Clin Pathol.* 42, 364 - 367.
- Lenz, J.A., Furrow, E., Craig, L.E., Cannon, C.M., 2017. Histiocytic sarcoma in 14 miniature schnauzers - a new breed predisposition? *J Small Anim Pract.* 58, 461 - 467.
- London, C.A., 2009. Tyrosine kinase inhibitors in veterinary medicine. *Top Companion Anim Med.* 24, 106 - 112.
- Mason, S.L., Finotello, R., Blackwood, L., 2018. Epirubicin in the treatment of canine histiocytic sarcoma: sequential, alternating and rescue chemotherapy. *Vet Comp Oncol.* 16, E30 - E37.
- Mastrorilli, C., Spangler, E.A., Christopherson, P.W., Aubry, O.A., Newton, J.C., Smith, A.N., Kennis, R.A., Weismann, J.L., Moore, P.F., 2012. Multifocal cutaneous histiocytic sarcoma in a young dog and review of histiocytic cell immunophenotyping. *Vet Clin Pathol.* 41, 412 - 418.
- Matsuda, K., Nomoto, H., Kawamura, Y., Someya, Y., Koiwa, M., Taniyama, H., 2010. Hemophagocytic histiocytic sarcoma in a Japanese black cow. *Vet Pathol.* 47, 339 - 342.

- Mitchell, L., Thamm, D.H., Biller, B.J., 2012. Clinical and immunomodulatory effects of toceranib combined with low-dose cyclophosphamide in dogs with cancer. *J Vet Intern Med.* 26, 355 - 362.
- Moore, P.F., 2014. A review of histiocytic diseases of dogs and cats. *Vet Pathol.* 51, 167 - 184.
- Moore, P.F., Affolter, V.K., Vernau, W., 2006. Canine hemophagocytic histiocytic sarcoma: a proliferative disorder of CD11d+ macrophages. *Vet Pathol.* 43, 632 - 645.
- Mutsaers, A.J., 2009. Metronomic chemotherapy. *Top Companion Anim Med.* 24, 137 - 143.
- Nielsen, L.N., Kjelgaard-Hansen, M., Kristensen, A.T., 2013. Monocyte chemotactic protein-1 and other inflammatory parameters in Bernese Mountain dogs with disseminated histiocytic sarcoma. *Vet J.* 198, 424 - 428.
- Ohnishi, K., Tanaka, S., Oghiso, Y., Takeya, M., 2012. Immunohistochemical detection of possible cellular origin of hepatic histiocytic sarcoma in mice. *J Clin Exp Hematop.* 52, 171 - 177.
- Paciello, O., Passantino, G., Costagliola, A., Papparella, S., Perillo, A., 2013. Histiocytic sarcoma of the nasal cavity in a horse. *Res Vet Sci.* 94, 648 - 650.
- Pierezan, F., Mansell, J., Ambrus, A., Rodrigues Hoffmann, A., 2014. Immunohistochemical expression of ionized calcium binding adapter molecule 1 in cutaneous histiocytic proliferative, neoplastic and inflammatory disorders of dogs and cats. *J Comp Pathol.* 151, 347 - 351.
- Poirier, V.J., Hershey, A.E., Burgess, K.E., Phillips, B., Turek, M.M., Forrest, L.J., Beaver, L., Vail, D.M., 2004. Efficacy and toxicity of paclitaxel (Taxol) for the treatment of canine malignant tumors. *J Vet Intern Med.* 18, 219 - 222.
- Ramirez, S., Douglass, J.P., Robertson, I.D., 2002. Ultrasonographic features of canine abdominal malignant histiocytosis. *Vet Radiol Ultrasound.* 43, 167 - 170.
- Rassnick, K.M., Moore, A.S., Russell, D.S., Northrup, N.C., Kristal, O., Bailey, D.B., Flory, A.B., Kiselow, M.A., Intile, J.L., 2010. Phase II, open-label trial of single-agent CCNU in dogs with previously untreated histiocytic sarcoma. *J Vet Intern Med.* 24, 1528 - 1531.
- Rogers, M.S., Chilton, K.M., Coxon F.P., Lawry, J., Smith, M.O., Suri, S., Russell, R.G., 1996. Bisphosphonates induce apoptosis in mouse macrophage-like cells in vitro by a nitric oxide-independent mechanism. *J Bone Miner Res.* 11, 1482 - 1491.
- Schultz, R.M., Puchalski, S.M., Kent, M., Moore, P.F., 2007. Skeletal lesions of histiocytic sarcoma in nineteen dogs. *Vet Radiol Ultrasound.* 48 539 - 543.
- Skorupski, K.A., Clifford, C.A., Paoloni, M.C., Lara-Garcia, A., Barber, L., Kent, M.S., LeBlanc, A.K., Sabhlok, A., Mauldin, E.A., Shofer, F.S., Couto, C.G., Sørenmo, K.U., 2007. CCNU for the treatment of dogs with histiocytic sarcoma. *J Vet Intern Med.* 21, 121 - 126.
- Soare, T., Noble, P.S., Hetzel, U., Fonfara, S., Kipar, A., 2012. Paraneoplastic syndrome in haemophagocytic histiocytic sarcoma in a dog. *J Comp Pathol.* 146, 168 - 174.

- Sterenczak, K.A., Kleinschmidt, S., Wefstaedt, P., Eberle, N., Hewicker-Trautwein, M., Bullerdiek, J., Nolte, I., Escobar, H.M., 2011. Quantitative PCR and immunohistochemical analyses of HMGB1 and RAGE expression in canine disseminated histiocytic sarcoma (malignant histiocytosis). *Anticancer Res.* 31, 1541 - 1548.
- Takahashi, M., Goto-Koshino, Y., Fukushima, K., Kanemoto, H., Nakashima, K., Fujino, Y., Ohno, K., Endo, Y., Tsujimoto, H., 2014a. Phase I dose-escalation study of nimustine in tumor-bearing dogs. *J Vet Med Sci.* 76, 895 - 899.
- Takahashi, M., Tomiyasu, H., Hotta, E., Asada, H., Fukushima, K., Kanemoto, H., Fujino, Y., Ohno, K., Uchida, K., Nakayama, H., Tsujimoto, H., 2014b. Clinical characteristics and prognostic factors in dogs with histiocytic sarcomas in Japan. *J Vet Med Sci.* 76, 661 - 666.
- Tamura, S., Tamura, Y., Nakamoto, Y., Ozawa, T., Uchida, K., 2009. MR imaging of histiocytic sarcoma of the canine brain. *Vet Radiol Ultrasound.* 50, 178 - 181.
- Taylor, A., Eichelberger, B., Hodo, C., Cooper, J., Porter, B., 2015. Imaging diagnosis--spinal cord histiocytic sarcoma in a dog. *Vet Radiol Ultrasound.* 56, E17 - E20.
- Thio, T., Hilbe, M., Grest, P., Pospischil, A., 2006. Malignant histiocytosis of the brain in three dogs. *J Comp Pathol.* 134, 241 - 244.
- Thongtharb, A., Uchida, K., Chambers, J.K., Kagawa, Y., Nakayama, H., 2016a. Histological and immunohistochemical studies on primary intracranial canine histiocytic sarcomas. *J Vet Med Sci.* 78, 593 - 599.
- Thongtharb, A., Uchida, K., Chambers, J.K., Miwa, Y., Murata, Y., Nakayama, H., 2016b. Histological and immunohistochemical features of histiocytic sarcoma in four domestic ferrets (*Mustela putorius furo*). *J Vet Diagn Invest.* 28, 165 - 170.
- Tripp, C.D., Fidel, J., Anderson, C.L., Patrick, M., Pratt, C., Sellon, R., Bryan, J.N., 2011. Tolerability of metronomic administration of lomustine in dogs with cancer. *J Vet Intern Med.* 25, 278 - 284.
- Tzipory, L., Vernau, K.M., Sturges, B.K., Zabka, T.S., Highland, M.A., Petersen, S.A., Wisner, E.R., Moore, P.F., Vernau, W., 2009. Antemortem diagnosis of localized central nervous system histiocytic sarcoma in 2 dogs. *J Vet Intern Med.* 23, 369 - 374.
- Uchida, K., Morozumi, M., Yamaguchi, R., Tateyama, S., 2001. Diffuse leptomeningeal malignant histiocytosis in the brain and spinal cord of a Tibetan Terrier. *Vet Pathol.* 38, 219 - 222.
- Uno, Y., Momoi, Y., Watari, T., Goitsuka, R., Tsujimoto, H., Shimada, T., Ono, K., Goto, N., Hasegawa, A., 1993. Malignant histiocytosis with multiple skin lesions in a dog. *J Vet Med Sci.* 55, 1059 - 1061.
- Vail, D.M., Kravis, L.D., Cooley, A.J., Chun, R., MacEwen, E.G., 1997. Preclinical trial of doxorubicin entrapped in sterically stabilized liposomes in dogs with spontaneously arising malignant tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 39, 410 - 416.
- Visonneau, S., Cesano, A., Tran, T., Jeglum, K.A., Santoli, D., 1997. Successful treatment of canine malignant histiocytosis with the human major histocompatibility complex nonrestricted cytotoxic T-cell line TALL-104. *Clin Cancer Res.* 3, 1789 - 1797.

- Wada, M., Hasegawa, D., Hamamoto, Y., Yu, Y., Fujiwara-Igarashi, A., Fujita, M., 2017. Comparisons among MRI signs, apparent diffusion coefficient, and fractional anisotropy in dogs with a solitary intracranial meningioma or histiocytic sarcoma. *Vet Radiol Ultrasound*. 58, 422 - 432.
- Wouda, R.M., Miller, M.E., Chon, E., Stein, T.J., 2015. Clinical effects of vinorelbine administration in the management of various malignant tumor types in dogs: 58 cases (1997-2012). *J Am Vet Med Assoc*. 246, 1230 - 1237.
- Yamazaki, H., Takag, S., Oh, N., Hoshino, Y., Hosoya, K., Okumura, M., 2014. Comparative analysis of mRNA expression of surface antigens between histiocytic and nonhistiocytic sarcoma in dogs. *J Vet Intern Med*. 28, 204 - 210.
- Zimmerman, K., Almy, F., Carter, L., Higgins, M., Rossmesl, J., Inzana, K., Duncan, R., 2006. Cerebrospinal fluid from a 10-year-old dog with a single seizure episode. *Vet Clin Pathol*. 35, 127 - 131.

---

**How to cite this article;**

Atigan Thongtharb. Histiocytic sarcoma in dogs. *Veterinary Integrative Sciences*. 2018; 16(2): 19-34.

---





Vet Integr Sci  
**Veterinary Integrative Sciences**

ISSN: 2629-9968 (online)

Website: www.vet.cmu.ac.th/cmvi

**Research article**

## Anti-adipogenesis activities of *Zingiber cassumunar* Roxb. rhizome extracts on L929 cells evaluated by image-based analysis

Rungnapa Sririwichitchai<sup>1</sup>, Aroonchai Saiai<sup>2</sup>, Kewalin Inthanon<sup>3</sup>, Siriwadee Chomdej<sup>1</sup>,  
 Weerah Wongkham<sup>1</sup>, Weerasak Roongruangwongse<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

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

<sup>3</sup> Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Lampang Campus, Lampang 52190 Thailand

**Abstract**

Some species in family Zingiberaceae have been reported as having anti-adipogenesis activity, but to date *Zingiber cassumunar* has not been investigated. Therefore, this paper investigates of *Z. cassumunar* extracts on mouse pre-adipocytes, L929 cell line; the first time this cell has been used as a non-inductive in vitro model. Dry rhizome was extracted by dichloromethane, absolute ethanol, and hot water obtaining the crude extracts: ZCD, ZCE and ZCW respectively. A non-cytotoxic activity was shown on the 24 h exposed cells to all extracts, evaluated by using the MTT (methyl-thiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) assay. An anti-proliferation assay was carried out to each of the extracts for 72 h, to determine the non-toxic inhibition-concentration (IC<sub>20</sub>). The quantity of lipid droplets in the cells, exposed to the IC<sub>20</sub> or IC<sub>20</sub>/2 of each extract, was assessed by using photomicrographs and image-based assay under the ImageJ computer software. Cellular lipid accumulation was significantly decreased in the exposed cells to each of the extract in a concentration-dependent manner, in comparison to the unexposed cells, by which ZCE was the most effective followed by ZCW and ZCD respectively. Expression of adipogenesis-related genes of the exposed cells to each extraction was evaluated through real-time PCR. All of the extracts down-regulated the activity of PPAR $\gamma$  (the key regulator of adipogenesis) while ZCE up-regulated Pref-1 (the pre-adipocyte regulatory gene inhibiting lipid accumulation). Four groups of genes were down-regulated by at least one or more of the extracts. These findings verified the anti-adipogenesis potential of *Z. cassumunar* in mammalian adipocyte.

**Keywords:** Adipogenesis, *Zingiber cassumunar*, Image-based analysis, L929

\*Corresponding author: Weerasak Roongruangwongse, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand; Tel: 6653943346 E-mail address: weerasak\_air@hotmail.com

*Article history:* received: 12 February 2018, accepted: 27 February 2018, published online: 5 April 2018

*Academic editor:* Korakot Nganvongpanit

## INTRODUCTION

Fat tissue, containing lipid droplets (LDs), plays an important metabolic and signal function that regulates body homeostasis. LDs, in the form of triglycerides, are accumulated in mature adipocytes, most of which are defined as white adipose tissue (WAT). Adipogenesis and adipolysis occur equally through coupled biochemical pathways to maintain homeostasis. Disproportion of the pathways generally leads to metabolic abnormality which eventually causes obesity syndrome (Lefterova and Lazar 2009). Initiation of the syndrome is further related to incidence of several chronic diseases including hyperlipidemia, hypertension, atherosclerosis, fatty liver, diabetes mellitus, cancer and cardiovascular disease (Mukherjee, 2003). Thus the regulation of the coupled pathway is probably an essential route for obesity control. There are few FDA approved anti-obesity medications or weight loss drugs, including Orlistat (Xenical), lorcaserin (Belviq) and a combination of phentermine and topiramate (Qsymia®) (Lefterova and Lazar 2009). Although these drugs are effective, adverse side effects can occur including gastro-esophageal reflux diseases, depression, liver failure, increased heart rate, psychiatric and cognitive effects, and even death (Buyukhatipoglu, 2008; Shin and Gadde, 2013). Traditional natural medicines have progressively become an alternative option for healing many diseases, including obesity, (Hasani-Ranjbar et al., 2013). Also Natural medicines usually have fewer side effects (Najafian et al, 2014).

*Cassumunar ginger* (Plai or Phlai in Thai) or *Zingiber cassumunar* Roxb. (Family Zingiberaceae), a synonym of *Zingiber montanum* (J.König) Link ex A. Dietr (Sharma et al., 2011), is a perennial herb distributing mainly in India, Indochina and tropical Southeast Asia. Its rhizome has been applied to treat inflammation, muscle and joint problems, menstrual disorders, abscesses and skin diseases and for wound healing (Farnsworth and Bunyaphatsara, 1992). Phytochemical investigations of *Z. cassumunar* (ZC) rhizomes have revealed the presence of phenylbutanoids, cyclohexene derivatives, naphthoquinones, vanillin, vanillic acid, veratric acid, terpenoids,  $\beta$ -sitosterol, and curcuminoid (Koparde and Magdum, 2017). Previous studies also reported that some plants in the family Zingiberaceae decreased blood glucose and lipids, which further helped in reducing body weight, by lessening lipid peroxidation without inhibiting pancreatic lipase (Mahmoud and Elnour, 2013).

Many strategies for obesity treatment have been evaluated by focusing on mechanisms of adipocyte differentiation, adipogenesis and adipolysis (or lipolysis) at cellular levels. Two classes of cell lines have been applied as precursors for adipocyte differentiation; pluripotent fibroblasts (10T1/2, Balb/c 3T3, 1246, RCJ3.1 and CHEF/18 fibroblasts) and unipotent preadipocytes (3T3-L1, 3T3-F422A, 1246, Ob1771, TA1 and 30A5) (Ntambi and Young-Cheul, 2000). Both can be induced to mature adipocytes by using some chemical agents and maintaining them under appropriate culture conditions. However, the in vitro inductive adipogenesis usually takes a long time, e.g., up to 12 days on 3T3-L1 (Stoecker et al., 2017) and 14 days on human preadipocytes (Bombrun et al., 2017).

This research was the first trial that used the L929 mouse fibroblast cell line as a model for adipogenesis. L929 is a mouse pre-adipocyte that spontaneously differentiates *in vitro* to mature adipocytes, without requiring for any inducing agent (Jeney et al., 2000). Indeed, L929 has never been reported in any broadly applied for adipogenesis experiments, but the cells becomes more attractive to be used in a laboratory due to their abilities to accumulate lipid droplets within a few days. Also the spontaneous differentiation of the cells to mature adipocytes offer a benefit to avoid any unexpected interactions between the adipocyte inductive-agents and the herb extracts.

Consequently, this research examined *Z. cassumunar* on L929 cell lines and determined the non-toxic concentrations for downstream experiments. Lipid content in the cells was evaluated by conventional Oil Red O (ORO) staining, with image-based analysis verification. Adipogenic-related gene expression profiles were evaluated to get a better understanding how the extracts control through targeted gene regulation of adipocyte development.

## MATERIALS and METHODS

### Chemicals and reagents

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) and 100X antibiotics/antimycotics were purchased from GIBCO® (Grand Island, NY, USA). Isopropanol, dimethyl sulfoxide (DMSO), gelatin Type B from bovine skin and methylene blue (MB) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Oil Red O (ORO) was from Bio Basic (Amherst, NY, USA). Dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), absolute ethanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) and formaldehyde (CH<sub>2</sub>O) were from RCI Labscan (Samutsakorn, Thailand). Methyl-thiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT; 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide) was from Invitrogen® (Carlsbad, CA, USA).

Crude extracts of *Z. cassumunar* were prepared from the dry powder of the rhizome using three solvents under two standard methods. Soxhlet extraction was setup through dichloromethane and absolute ethanol to obtain ZCD and ZCE extracts, respectively. Water heat reflux was also performed to obtain a ZCW extract. The percentage yield of each extract was calculated relative to the rhizome dry weight.

### Preparation of the extracts used in experiments

Each extract was dissolved in DMSO, as a stock solution, to reach a maximum concentration at 30 mg/ml (w/v) prior to preparation of working concentrations by mixing in the completed media. The working concentrations ranged from 7 to 200 µg/ml, depending on the requirement of each experiment.

### Cell culture

The mouse fibroblast cell line, L929, was purchased from American Type Culture Collection (ATCC®, Manassas, VA, USA). Cells were cultured in 25 cm<sup>2</sup> culture flasks with the completed media (DMEM supplemented with 10% (v/v) FBS and 1% (v/v) antibiotics / antimycotics). Cells were maintained under standard culture conditions at 37°C and 95% relative humidity in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The medium was changed every 2-3 days and sub-culturing was performed at 70% spatial confluency by trypsinization.

From our preliminary study, the seeding density of L929 at 50,000 cell/ml has given the best result of intracellular lipid accumulation within 5 days culture period. The cells in 6 and 7 days culture periods were observed with cell death and detachment from the culture surface (data not shown).

### Pre-coating the 96-well culture plates

The surface of 96-well plates was pre-coated with 0.1% (w/v) gelatin solution, as suggested by ATCC® (PCS-999-027™). Briefly, the gelatin solution was prepared by dissolving gelatin type B from bovine skin in deionized water, followed by sterilization in autoclaving (121°C, 15 psi, 15 min). The solution was cooled to room temperature, before adding 60 µl of gelatin solution into each well and incubation for 30 min under standard culture conditions. After that, the solution was aspirated and discarded prior to adding serum free DMEM (100 µl/well). The coated plates were kept in a CO<sub>2</sub> incubator for at least an hour, but not exceeding 3 days after coating. Whenever cell seeding was required, the media was discarded beforehand.

### Couple staining of Oil Red O and methylene blue (MB)

Cells were seeded in gelatin-coated 96-well plates at a density of 50,000 cell/ml. The cultures were maintained under standard culture conditions for 5 days and the medium renewed every couple of days. The progression of L929 differentiation to adipocytes was primarily stained by ORO, as previously described by Kinkel et al. (2004). In short, the cells were gently rinsed with phosphate buffer saline twice, fixed by 10% (w/v) formaldehyde for an hour and then washed thoroughly with distilled water. Isopropanol (60% v/v) was added to wash and dehydrate the cells and discarded afterward. The cells were then completely air-dried at room temperature. ORO (1.4 g ORO, 400 ml isopropanol, 144 ml distilled water) was added to the cells, incubated for 15 min and afterward completely rinsed with distilled water 4 times. After that, MB counter staining was performed and the cultures were then incubated for 3 min before rinsing with distilled water 3 times as described by Todoric et al. (2011).

### Cytotoxicity screening

L929 (50,000 cell/ml) were seeded in gelatin-coated 96-well plates and incubated for 24 h under standard culture conditions. The cultures were exposed to *Z. cassumunar* extracts (ZCE, ZCD and ZCW) at concentrations of 7, 13, 25, 50, 100 and 200 µg/ml and incubated for 24 h. A control was the cells received completed media in equivalent volume to the extracts. Cell viability was evaluated by MTT assay. Shortly, MTT (12 mM) was added into each well and incubated for 4 h at 37°C. Afterwards, 100 µl of 10% (w/v) SDS-0.01 M HCl was added and the culture further incubated at 37°C overnight. The amounts of viable cells were measured indirectly through the value of optical density at 570 nm (OD<sub>570</sub>) acquired under a microplate-reader (Rayto TR-2100C, Shenzhen, China). The half of maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of each crude extract was determined by the PriProbit program ver. 1.63 (Sakuma, 1998). The relative viable-cell was calculated by using mean of OD<sub>570</sub> value of the exposed cells to each extract in percentage comparing to the control.

### Anti-proliferation assay

This test was performed as described in the cytotoxic screening subtopic with seeding cell density at 50,000 cell/ml. Cells were exposed to the extracts for up to 72 h before OD570 measurement. The PriProbit program methodically predicted an  $IC_{20}$  concentration which was further applied in the other experiments.

### Evaluation of anti-adipogenesis efficacy from the extracts

#### Lipid content measurement by image-based analysis

Cells were seeded in the coated 96-well plates, at a density of 50,000 cell/ml, and incubated for 24 h under standard culture conditions. Cells were exposed to the extracts at concentrations of  $IC_{20}$  and half of  $IC_{20}$  ( $IC_{20}/2$ ) for 72 h with media + extracts and refreshed every 48 h. During that time, assuming that the cells had differentiated to mature adipocytes and accumulated LDs in their cytoplasm under the extract influences. Thereafter, the ORO-stained mature adipocytes were counter stained with MB, as described above. The ORO-MB-stained cells from all treatments were randomly photomicrograph-taken under an Olympus CK40 equipped with CCD camera (Olympus, Japan), with approximately at least 200 cells per image. Images were stored as tagged image format files (\*.TIFF). To detect and measure LDs area using the ImageJ software (<https://imagej.nih.gov>), the images were adjusted and processed, as described in Broeke et al. (2015). In brief, the images were normalized and calibrated before setting up a color threshold. A background subtraction was applied to reduce some background noises, resulting in vivid LDs, the areas of which were automatically detected by using the ‘analyze particle’ commands in the software. The LD areas from the treatments were further compared with the controls, resulting in percentage of relative LD areas.

#### Adipogenesis related gene expression

After the cells had been exposed to the extracts at concentrations of  $IC_{20}$  for 72 h, they were harvested for RNA extraction, using a NucleoSpin® RNA isolation kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the manufacturer’s instructions.

The mRNA was reverse transcribed to cDNA, using ReverTra Ace® qPCR RT master mix (Toyobo Co., Osaka, Japan). Four groups of adipogenesis-related genes were examined: (1) adipocyte differentiation genes; C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , ADD-1, Pref-1, (2) glucose uptake genes; IRS-1, GLUT4, Adiponectin, (3) lipid metabolism genes; FAS, aP2 and (4) fatty acid oxidation genes; ATGL, HSL, PGC-1 $\beta$ .  $\beta$ -actin was used as a housekeeping gene or internal control. Primers (Table 1) were designed by using Primer 3, a primer design tool, followed by the primer specificity confirmation using nucleotide BLAST which both tools are available on NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Target gene expression was quantitatively evaluated by real-time PCR (SensiFASTTM SYBER® No-ROX Kit (Bioline, London, UK)), performed in the EcoTM Real-Time PCR System (Illumina, Inc. SD, USA). The PCR mixtures were denatured at 94°C for 3 min, followed by 35 thermal cycles: 40 sec at 94°C, 30 sec at 60°C and 30 sec at 72°C. CT values were normalized by an internal and an external control or an experimental control. The expression levels of the genes were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method as described by Livak and Schmittgen (2001). Data were presented as relative gene expression by comparison of the treatments with the controls.

**Table 1** Designed primers of adipogenesis related genes, using Primer 3 and BLAST available from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) with accession number.

Gene	Accession number		Sequence (5'-3')
<i>C/EBP<math>\alpha</math></i>	NM_007678	fw	GGA TAC TCA AAA CTC GCT CC
		rv	CTA AGT CCC TCC CCT CTA AA
<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	NM_011146	fw	TTT TCA AGG GTG CCA GTT TC
		rv	AAT CCT TGG CCC TCT GAG AT
<i>ADD-1</i>	NM_011480.3	fw	TGT TGG CAT CCT GCT ATC TG
		rv	AGG GAA AGC TTT GGG GTC TA
<i>Pref-1</i>	L12721.1	fw	CTA ACC CAT GCG AGA ACG AT
		rv	GCT TGC ACA GAC ACT CGA AG
<i>IRS-1</i>	NM_133249.2	fw	CAT GCA GAT AGG TTG TCC TC
		rv	CAG CAA GGA AGA GTG AGT AG
<i>GLUT4</i>	AB008453	fw	ACC TCT ACA TCA TCC GGA AC
		rv	TTG ATG CCT GAG AGC TGT TG
<i>Adiponectin</i>	U49915	fw	GCA ACT ACT CAT AGC CCA TA
		rv	CAT GTA AGA GTC GTG GAG AC
<i>FAS</i>	NM_007988.3	fw	TTG CTG GCA CTA CAG AAT GC
		rv	AAC AGC CTC AGA GCG ACA AT
<i>aP2</i>	NM_024406.2	fw	TCA CCT GGA AGA CAG CTC CT
		rv	AAT CCC CAT TTA CGC TGA TG
<i>ATGL</i>	AY894805	fw	TAT TGA GGT GTC CAA GGA GG
		rv	GTA CAC CGG GAT AAA TGT GC
<i>HSL</i>	NM_010719.5	fw	GAG GGA CAC ACA CAC ACC TG
		rv	CCC TTT CGC AGC AAC TTT AG
<i>PGC-1<math>\beta</math></i>	NM_133249.2	fw	GGA AGA ACT TCA GAC GTG AG
		rv	CAC CTG GCA CTC TAC AAT CT
<i><math>\beta</math>-actin</i>	NM_007393.4	fw	CCA CAG CTG AGA GGG AAA TC
		rv	AAG GAA GGC TGG AAA AGA GC

## Statistical analysis

All data were represented as means  $\pm$  standard errors (SE). Data were statistically evaluated by a one-way analysis of variance. Significant difference ( $p \leq 0.05$ ) among the groups was analyzed by Duncan's multiple range tests. All experiments were repeated 3 times, each with 5 replicates of the designed concentration.

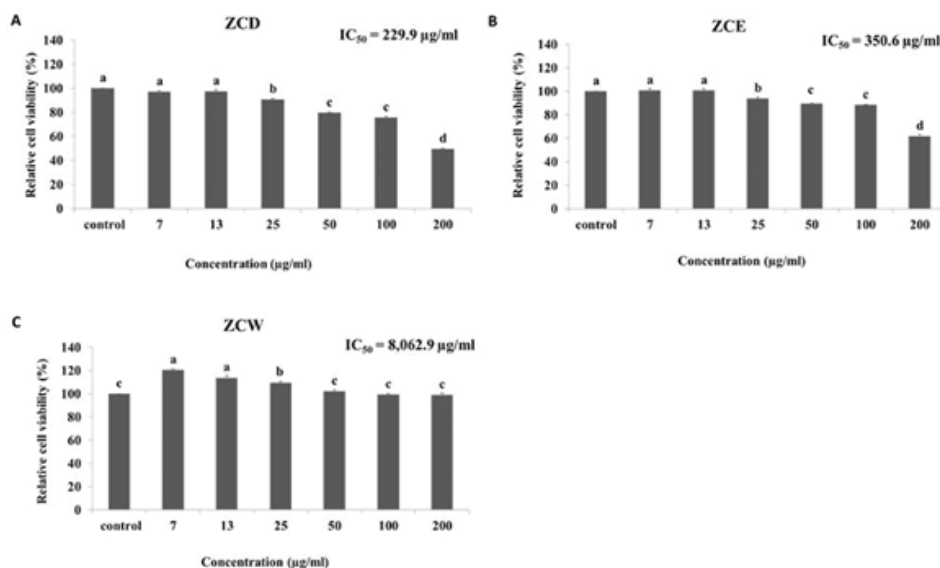
## RESULTS

### Crude extraction

Water was the most effective solvent. The percentage yields of ZCD, ZCE and ZCW were 4.8%, 1.7% and 14.7%, respectively.

### Cytotoxicity and anti-proliferation effects of *Z. cassumunar*

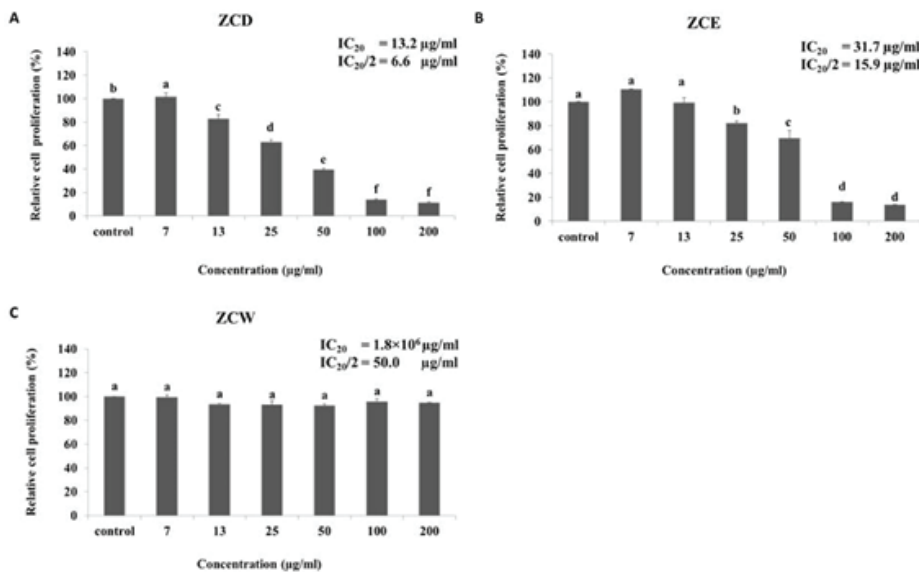
After the cells had been exposed to the various concentrations of ZCD, ZCE and ZCW for 24 h, acute cytotoxicity was quantified as a percentage of the number of viable-cells relative to the controls (Figure 1A-1C). Cell-viability when exposed to ZCD (Figure 1A) and ZCE (Figure 1B) was concentration-dependent manner. In contrast, the effects of ZCW showed an astonishment of variability ranging from non-toxicity to slightly increases in cell-viability (Figure 1C). As the  $IC_{50}$  of each crude extract was  $>100 \mu\text{g/ml}$  in which classified by U.S. National Cancer Institute (NCI) as the non-acute-cytotoxic to the exposed cells (Iswantini et al., 2011). However, the most active extract, in according to  $IC_{50}$ , was ZCD and followed by ZCE and ZCW.



**Figure 1** Cytotoxic effect after 24 h exposure of (A) ZCD, (B) ZCE and (C) ZCW at varied concentration.  $IC_{50}$  values, obtained from the Probit analysis, were shown on the top right of the graphs. Control was the cells received completed media in equivalent volume to the extracts. The small alphabets (a, b, c, d) indicate the statistical difference among the concentrations of each extracts ( $p \leq 0.05$ ).

The anti-proliferation potential was also evaluated after the cells had been exposed to the extracts for 72 h. ZCD (Figure 2A) and ZCE (Figure 2B) tended to inhibit cell proliferation in the concentration-dependent manner in a similar pattern to that of cytotoxicity (Figure 1). In contrast, ZCW again exhibited no anti-proliferation effect (Figure 2C).

In this experiment the  $IC_{20}$  was calculated to determine the non-toxic concentrations on cellular proliferation, to be used in the anti-adipogenesis experiments.  $IC_{20}$  was individually obtained from the Probit analysis and is shown on each graph in figure 2 with ZCW as the most effective extract, followed by ZCE and ZCD.  $IC_{20}/2$  was then calculated, which would also be used in the anti-adipogenesis efficacy evaluation.



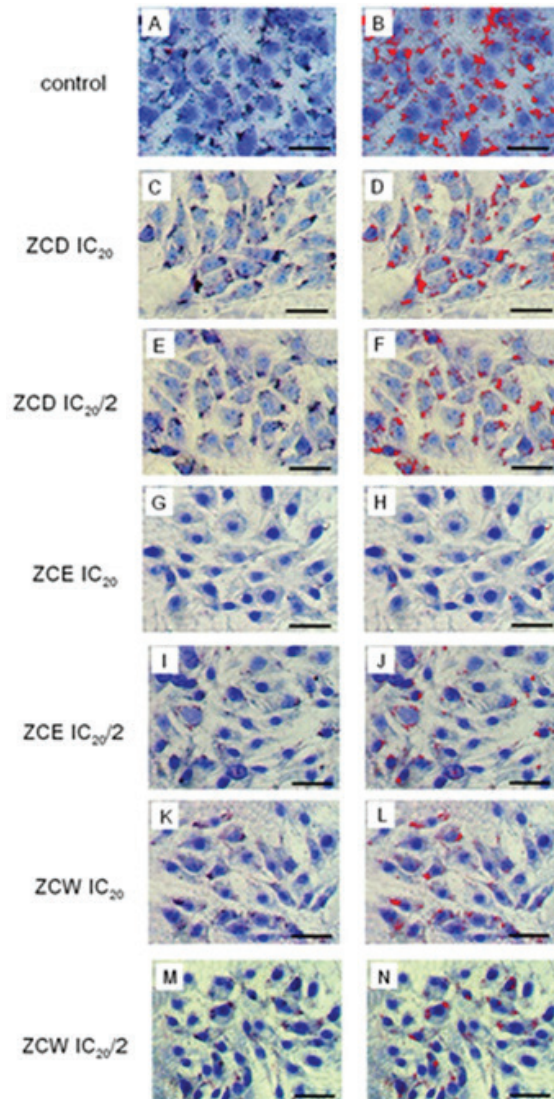
**Figure 2** Anti-proliferation effect on the cells after 72 h of exposure to (A) ZCD, (B) ZCE and (C) ZCW at varied concentrations.  $IC_{20}$  and  $IC_{20}/2$  values, obtained from the Probit analysis, were shown on the top right of the graphs. Control was the cells received completed media in equivalent volume to the extracts. The small alphabet (a, b, c, d) indicated the statistical difference among the concentrations of each extracts ( $p \leq 0.05$ ). On (C) the  $IC_{20}$  of ZCW,  $1.8 \times 10^6 \mu\text{g/ml}$ , was far too much to be used in the experiment and was speculated for the possible preparation at  $100 \mu\text{g/ml}$  with  $IC_{20}/2$  at  $50 \mu\text{g/ml}$ .

## Evaluation of anti-adipogenesis efficacy of the *Z. cassumunar* extracts

### Lipid content measurement by image-based analysis

Photomicrographs of the cells, before and after the Image J program processing, have been taken and presented in figure 3. Lesser LDs areas were observed in the exposed cells to the extracts in comparison to the unexposed control cells. The LDs areas were then quantified by the program and summarized in figure 4. All of the extracts significantly inhibited LDs accumulation. The most effective extract was ZCE, followed by ZCW and ZCD.





**Figure 3** Samples of photomicrography taken before (A, C, E, G, I, K, M) and after (B, D, F, H, J, L, N) the processing under ImageJ computer program (Scale bar = 100  $\mu$ m). Note that the nucleus was displayed in blue color of MB while LDs stained in darken red-dots with ORO (A, C, E, G, I, K, M) and appeared in vivid red cluster after the processing (B, D, F, H, J, L, N).

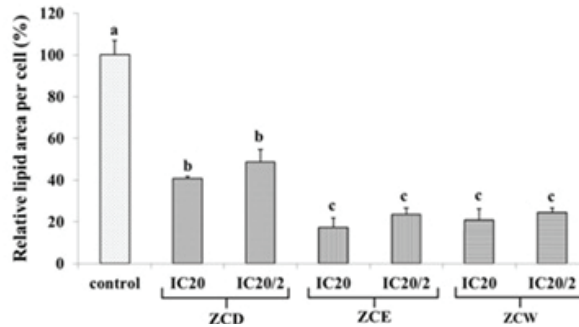
### Adipogenesis related gene expression

Adipocyte differentiation genes; ZCD (Figure 5A) and ZCW (Figure 5C) significantly down-regulated the expression of all genes in this group, the lowest one was PPAR $\gamma$ . Whilst ZCE (Figure 5B) resulted in a different pattern of gene expression, with ADD-1 as the lowest down-regulated and Pref-1 up-regulated.

Glucose uptake genes; all extracts down-regulate these genes (Figure 5D, 5E, 5F). IRS-1 was expressed the least, followed by GLUT-4 and Adiponectin. ZCD and ZCW resulted in slightly greater down-regulation effect compared with ZCE.

Lipid metabolism genes; all extracts down-regulated FAS (Figure 5G, 5H, 5I), whilst expression of aP2 was similar in both the control cells and those exposed to ZCD.

Fatty acid oxidation genes; expression of these genes decreased after exposure to the extracts (Figure 5J, 5K, 5L). Expression was lowest for ATGL. ZCW was the most effective at decreasing ATGL expression.

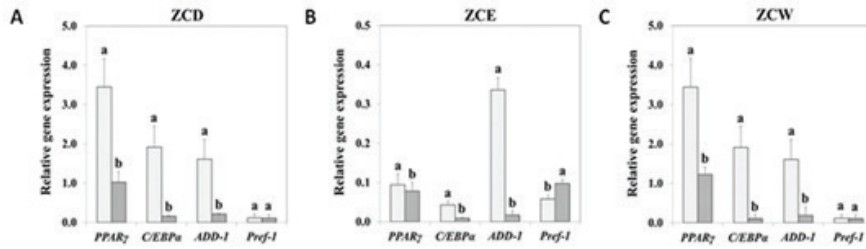


**Figure 4** Relative percentage of LDs area derived from image-based assay. All extracts exhibited an inhibition potency of LDs accumulation in L929. The small alphabets (a, b, c) indicate the statistical difference among the treatments ( $p \leq 0.05$ ).

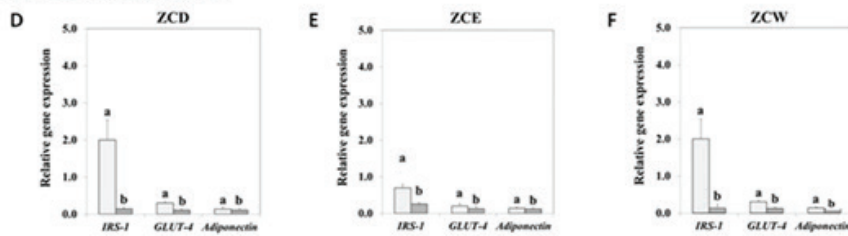
## DISCUSSION

The cytotoxicity and anti-proliferation assays of *Z. cassumunar* extracts were performed on L929. Percent yields of the extracts performed in this work were differed from those in previous records. Water as solvent resulted in the highest percent yield (Koparde and Magdum, 2017; Iswantini et al., 2011). Differences in polarity of solvents and extraction method achieved difference kinds of active ingredients from the rhizome. Dichloromethane, the lowest solvent polarity used in this work, had been reported to yield more effective compounds than ethanol and water extracts derived by Soxhlet extraction (Koparde and Magdum, 2017).

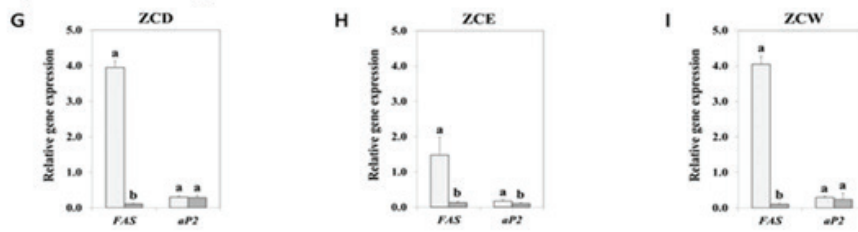
**Adipocytes differentiation genes**



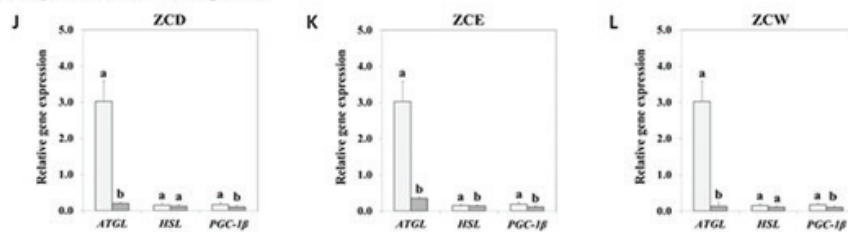
**Glucose uptake genes**



**Lipid metabolism genes**



**Fatty acid oxidation genes**



control
  ZC treatment

**Figure 3** Relative gene expression of anti-adipogenic effects on L929 exposed to ZCD, ZCE and ZCW at IC20 concentration for 72 h. Expression level of the genes, in comparison to  $\beta$ -actin (given value as 1, but not shown in these graphs), presented in 4 groups; adipocyte differentiation genes (A, B, C), glucose uptake (D, E, F), lipid metabolism (G, H, I) and fatty acid oxidation (J, K, L). The small alphabets (a, b) indicate the significance of statistical difference with  $p \leq 0.05$  on each of the gene between the controls and the exposed cells to ZC treatment.

Maceration in ethanol also collected more active compounds than in water (Iswantini et al., 2011). In other words, extraction of active ingredients from the rhizomes may probably comprise the most in dichloromethane followed by ethanol, and the least in water. However, all extracts (ZCD, ZCE and ZCW) exhibited non-cytotoxicity to the cells referred to Kalantari et al. (2017). At the  $IC_{50}$  concentration of any crude extracts which  $>100 \mu\text{g/ml}$  was considered to contain any non-toxic substance to the cells (Iswantini et al., 2011). In other studies also revealed a non- to low- toxicity to other mouse fibroblast cell lines although different kinds of solvent were used (Sharma et al., 2007). In contrast, ZCD in this work, at the concentration of  $IC_{20}$ , showed the highest activity to L929 followed by ZCE and ZCW. From previous report, ZCD may contain some compounds which would harm the cells including alkaloid, fat and oil (Koparde and Magdum, 2017). One of main constitute in non-polar soluble extracts from dichloromethane was in the form of oil (terpene) contains several phenylbutenoids which have been denoted as a cell proliferation inhibitor, apoptosis inducer and mitochondria disruptor in various cancer cell lines (Anasamy et al., 2013; Singh et al., 2015).

ZCD, ZCE and ZCW inhibited adipogenesis of L929 cells by significantly decreasing the expression of adipocyte differentiation genes: PPAR $\gamma$ , C/EBP $\beta$  and ADD-1. C/EBP $\alpha$ . PPAR $\gamma$ , the master regulator of adipogenesis, can induce their own expression and also activate a large number of downstream target genes, whose expression determines the adipocyte differentiation (Wang et al., 2006). ADD-1 is the coordinately activate the gene, responsible for maintaining the adipocyte phenotype. Its expression increases PPAR $\gamma$  transcriptional activity (Kim et al., 1998). Moreover, ZCE showed anti-adipogenic activity by increasing expression of Pref-1, the inhibitor of adipocyte differentiation, that was expressed in pre-adipocytes but was absent in adipocytes (Kim et al., 2007).

Expression of glucose uptake genes, IRS-1, Glut4 and Adiponectin was also evaluated. IRS-1 plays an important role in transmitting signals from insulin and insulin-like growth factor-1 receptors to the intracellular pathways and also to the glucose transporter, Glut4, to activate the uptake of glucose (Copps and White, 2012). Adiponectin is a protein hormone that is exclusively secreted from adipocytes into the bloodstream to modulate several metabolic processes, including glucose regulation and fatty acid oxidation (Diez and Iglesias, 2003; Chen et al., 2006). In this study, the three extracts significantly decreased expression of IRS-1 and Glut4. ZCD and ZCE also significantly down-regulated Adiponectin.

ATGL and HSL are key genes encoding the enzymes involved in intracellular degradation of triacylglycerols (Zimmermann et al., 2004). Both expressed predominantly in adipose tissue. ATGL regulates the initial hydrolysis of intracellular triglycerides into diacylglycerol. Then HSL continues breaking down to glycerol and free fatty acids (Morak et al., 2012). PGC-1 $\beta$  is a coactivator of PPAR $\alpha$  in the transcriptional control of mitochondrial fatty acid oxidations that regulate the break-down of fatty acids into acetyl-Co-A and prevent insulin resistance by decreasing lipid storage (Serra et al., 2013). All kind of extracts inhibited adipocyte differentiation, by reducing expression of all genes in this group. ZCE significantly decreased ATGL, HSL and PGC-1 $\beta$ ; ZCD significantly decreased both HSL and PGC-1 $\beta$ , while ZCW significantly decreased only ATGL.

To study activation of lipid metabolism genes by *Z. cassumunar* crude extracts, FAS and aP2 were focused. FAS is responsible for the synthesis of fatty acids from acetyl-CoA and malonyl-CoA resulting from the TCA cycle (Lodhi et al., 2012). Besides, aP2 is the pre-dominant fatty acid-binding protein, found in adipose tissue and plays an important role in the intracellular metabolism and the transport of fatty acids (Coe and Bernlohr, 1998). This protein responds to and regulates PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  (Shan et al., 2013). All the extracts significantly reduced expression of FAS, while only ZCE reduced aP2.

Adipogenesis is a multi-step process, involving a cascade of gene expressions. As described earlier, all *Z. cassumunar* extracts (ZCD, ZCE and ZCW) reduced expression of adipogenic-related genes, adipocyte differentiation, glucose uptake, fatty acid oxidation and lipid metabolism. Such examinations have been extensively reported for rhizomes of other plant species in the same family (Zingiberaceae), such as ginger (*Zingiber officinale*), bitter ginger (*Zingiber zerumbet*) and turmeric (*Curcuma longa*) (Ejaz et al., 2009; Ahn and Oh, 2013; Tzeng and Liu, 2013). Two major bioactive compounds of ginger rhizome, 6-shogaol inhibited adipogenesis and increased glycerol release, but decreased intracellular lipid content, without any cytotoxic activity in 3T3-L1 cells (Suk et al., 2016). On the other hand, 6-gingerol inhibited adipocyte proliferation in concentration- and time-dependent manners, with more effective inhibition of adipocyte differentiation of 3T3-L1 (Seo, 2015). Furthermore, active compounds in bitter ginger rhizome (zerumbone and 6-gingerol) decreased expression of adipogenic-related genes in 3T3-L1 cells (Tzeng and Liu, 2013; Tzeng et al., 2014). Moreover, the active compound in turmeric rhizome, curcumin, also decreased expression of adipogenic-related genes (Ejaz et al., 2009).

Although, L929 cells have been used as an in vitro model for several fields of research, for example; monoclonal antibody production (Harada et al., 2014), biocompatibility (Serrano et al., 2004) and chemical compound testing models (Eljezi et al., 2017), but investigation of anti-adipogenic activity by image-base analysis, has never been reported. The ImageJ software was used effectively on the 3T3-L1 cell model, stained with ORO, on the purposes to study LDs accumulation (Kirchner et al., 2010; Li et al., 2011). We proposed in this study the successful of using L929 culture system to study the activity of herbal ingredients to inhibit adipogenesis. Significant decreases of LDs in cells exposed to *Z. cassumunar* extractions could be clearly monitored.

Spontaneous adipocyte differentiation in pre-adipocytes of L929 mouse fibroblasts was verified in this work through the photomicrographs of LD accumulation and ORO staining. This study also applied gelatin-coated surfaces for culture instead of glass as mentioned previously (Jeney et al., 2000). In contrast, most of the recent reports on the in vitro model for anti-adipogenesis study generally focus on the 3T3-L1, mouse pre-adipocytes cell line, with the inevitable of using the inductive chemical reagents (Kwon et al., 2017; Hwang et al., 2017; Lauvai et al., 2017). However, one has to keep in mind that L929 was cultured in the completed media, containing 10% FBS, which was approximately composed of 10  $\mu$ U/ml of insulin (range 6-14  $\mu$ U/ml) (Gstraunthaler, 2003). As insulin is the key hormone involved in mammalian fibroblast adipogenesis (Romao et al., 2011), most of the cells in the L929 population should be very sensitive to respond to such a small amount of insulin and initialize accumulation of LDs. More evidence is required to decide which of the two cell lines serves as the better model for studying of lipid metabolism.

## CONCLUSION

Rhizomes of *Zingiber cassumunar* Roxb. have been shown to have anti-adipogenesis effects using the in vitro model of L929, mouse pre-adipocytes cell line. Non-cytotoxic activity was evaluated on the extracts using 3 types of solvent including dichloromethane, absolute ethanol and warm water. Lipid droplet accumulation was inhibited by the extracts in a concentration-dependent manner. This anti-adipogenesis activity was verified by down-regulation of pertinent genes, via the key regulator of adipogenesis, PPAR $\gamma$ . This study showed that L929 has high potential as an alternative for the in vitro model for the study of adipogenesis compared with the other cell lines.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to the National Research Council of Thailand (Project code: 130031-2556A10402008). We also thank the Human and Animal Cell Technology Research Unit and Medicinal Plant and Reproductive Research Unit of the Department of Biology and the Department of Chemistry, both in the Faculty of Science, Chiang Mai University and also for institutional support. Finally, thanks Dr. Stephen Elliott for kindly revising the first draft of this article and for lots of useful comments.

## REFERENCES

- Ahn, E.K., Oh, J. S., 2013. Lupenone isolated from *Adenophora triphylla* var. *japonica* extract inhibits adipogenic differentiation through the down-regulation of PPAR $\gamma$  in 3T3-L1 Cells. *Phytother. Res.*, 27, 761–766.
- Anasamy, T., Abdul, A.B., Sukari, M.A., Abdelwahab, S.I., Mohan, S., Kamalidehghan, B., Azid, M.Z., Muhammad Nadzri, N., Andas, A.R., Kuan Beng, N., Hadi, A.H., Sulaiman Rahman, H. 2013. A phenylbutenoid dimer, *cis*-3-(3', 4'-dimethoxyphenyl)-4-[(*E*)-3''', 4'''-dimethoxystyryl] cyclohex-1-ene, exhibits apoptogenic properties in T-acute lymphoblastic leukemia cells via induction of p53-independent mitochondrial signalling pathway. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.* 2013.
- Bombrun, M., Gao, H., Ranefall, P., Mejhert, N., Arner, P., Wählby, C. 2017. Quantitative high-content/high-throughput microscopy analysis of lipid droplets in subject specific adipogenesis models. *Cytometry A*. 91, 1068-1077.
- Broeke, J., Pérez, J.M.M., Pascau, J., 2015. Image processing with ImageJ. Packt Publishing Ltd.
- Buyukhatipoglu, H. 2008. A possibly overlooked side effect of Orlistat: gastroesophageal reflux disease. *J. Natl. Med. Assoc.* 100, 1207.
- Chen, T.G., Chen, J.Z., Wang, X.X. 2006. Effects of rapamycin on number activity and eNOS of endothelial progenitor cells from peripheral blood. *Cell Prolif.* 39, 117-125.

- Coe, N.R., Bernlohr, D.A. 1998. Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1391, 287-306.
- Copps, K.D., White, M.F. 2012. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia.* 55, 2565-2582.
- Díez, J.J., Iglesias, P. 2003. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur. J. Endocrinol.* 148, 293-300.
- Eljezi, T., Pinta, P., Richard, D., Pinguet, J., Chezal, J.M., Chagnon, M.C., Sautou, V., Grimandi, G., Moreau, E. 2017. In vitro cytotoxic effects of DEHP-alternative plasticizers and their primary metabolites on a L929 cell line. *Chemosphere.* 173, 452-459.
- Ejaz, A., Wu, D., Kwan, P., Meydani, M. 2009. Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice. *J. Nutr.* 139, 919-925.
- Farnsworth, R.N., Bunyapraphatsara, N., 1992. *Garcinia mangostana* Linn. Thai Medicinal Plants. Prachachon Co., Ltd.: Bangkok, pp.160-162.
- Gstraunthaler, G. 2003. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *ALTEX.* 20, 275-281.
- Harada, A., Okazaki, E., Okada, S., Tachibana, T., Ohkawa, Y. 2014. Production of a monoclonal antibody for C/EBP $\beta$ : the subnuclear localization of C/EBP $\beta$  in mouse L929 cells. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* 33, 34-37.
- Hasani-Ranjbar, S., Jouyandeh, Z., Abdollahi, M. 2013. A systematic review of anti-obesity medicinal plants – an update. *J. Diabetes Metab. Disord.* 12, 28.
- Hwang, D.I., Won, K.J., Kim, D.Y., Kim, B., Lee, H.M. 2017. Cinnamyl Alcohol, the bioactive component of chestnut flower absolute, inhibits adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells by downregulating adipogenic transcription factors. *Am. J. Chin. Med.* 45, 833-846.
- Iswantini, D., Silitonga, R.F., Martatilofa, E., Darusman, L.K., 2011. *Zingiber cassumunar*, *Guazuma ulmifolia*, and *Murraya paniculata* extracts as antiobesity: in vitro inhibitory effect on pancreatic lipase activity. *HAYATI J. Biosci.* 18, 6-10.
- Jeney, F., Bazsó-Dombi, E., Oravecz, K., Szabó, J., Nagy, I.Z. 2000. Cytochemical studies on the fibroblast-preadipocyte relationships in cultured fibroblast cell lines. *Acta. Histochem.* 102, 381-389.
- Kalantari, K., Moniri, M., Boroumand Moghaddam, A., Abdul Rahim, R., Bin Ariff, A., Izadiyan, Z., Mohamad, R. 2017. A review of the biomedical applications of zerumbone and the techniques for its extraction from ginger rhizomes. *Molecules.* 22, pii: E1645.
- Kim, J.B., Sarraf, P., Wright, M., Yao, K.M., Mueller, E., Solanes, G., Lowell, B.B., Spiegelman, B.M. 1998. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest.* 101, 1-9.
- Kim, K.A., Kim, J.H., Wang, Y., Sul, H.S. 2007. Pref-1 (preadipocyte factor 1) activates the MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway to inhibit adipocyte differentiation. *Mol. Cell Biol.* 27, 2294-308.
- Kinkel, A.D., Fernyhough, M.E., Helterline, D.L., Vierck, J.L., Oberg, K.S., Vance, T.J., Hausman, G.J., Hill, R.A., Dodson, M.V., 2004. Oil red-O stains non-adipogenic cells: a precautionary note. *Cytotechnology.* 46, 49-56.

- Kirchner, S., Kieu, T., Chow, C., Casey, S., Blumberg, B. 2010. Prenatal exposure to the environmental obesogen tributyltin predisposes multipotent stem cells to become adipocytes. *Mol. Endocrinol.* 24, 526-539.
- Koparde, A., Magdum, Cs. 2017. Phytochemical studies and pharmacognostical evaluation of *Zingiber cassumunar* Roxb. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 10, 129-135.
- Kwon, J.H., Hwang, S.Y., Han, J.S. 2017. Bamboo (*Phyllostachys bambusoides*) leaf extracts inhibit adipogenesis by regulating adipogenic transcription factors and enzymes in 3T3-L1 adipocytes. *Food Sci. Biotechnol.* 26, 11037–11044.
- Lauvai, J., Schumacher, M., Finco, F. D. B. A., Graeve, L. 2017. Bacaba phenolic extract attenuates adipogenesis by down-regulating PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  in 3T3-L1 cells. *NFS Journal.* 9, 8-14.
- Lefterova, M.I., Lazar, M.A. 2009. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* 20, 107-114.
- Li, X., Ycaza, J., Blumberg, B. 2011. The environmental obesogen tributyltin chloride acts via peroxisome proliferator activated receptor gamma to induce adipogenesis in murine 3T3-L1 preadipocytes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 9-15.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> method. *Methods.* 25, 402-408.
- Lodhi, I.J., Yin, L., Jensen-Urstad, A.P., Funai, K., Coleman, T., Baird, J.H., El Ramahi, M.K., Razani, B., Song, H., Fu-Hsu, F., Turk, J., Semenkovich, C.F. 2012. Inhibiting adipose tissue lipogenesis reprograms thermogenesis and PPAR $\gamma$  activation to decrease diet-induced obesity. *Cell Metab.* 16, 189-201.
- Mukherjee, M., 2003. Human digestive and metabolic lipases—a brief review. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 22, 369-376.
- Mahmoud, R.H., Elnour, W.A. 2013. Comparative evaluation of the efficacy of ginger and Orlistat on obesity management, pancreatic lipase and liver peroxisomal catalase enzyme in male albino rats. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 17, 75-83.
- Morak, M., Schmidinger, H., Riesenhuber, G., Rechberger, G.N., Kollroser, M., Haemmerle, G., Zechner, R., Kronenberg, F., Hermetter, A. 2012. Adipose triglyceride lipase (ATGL) and hormone-sensitive lipase (HSL) deficiencies affect expression of lipolytic activities in mouse adipose tissues. *Mol. Cell Proteomics.* 11, 1777-1789.
- Najafian, J., Abdar-Esfahani, M., Arab-Momeni, M., Akhavan-Tabib, A., 2014. Safety of herbal medicine in treatment of weight loss. *ARYA atheroscler.* 10, 55-58.
- Ntambi, J.M., Young-Cheul, K., 2000. Adipocyte differentiation and gene expression. *J. Nutr.* 130, 3122S-3126S.
- Romao, J.M., Jin, W., Dodson, M.V., Hausman, G.J., Moore, S.S., Guan, L.L., 2011. MicroRNA regulation in mammalian adipogenesis. *Exp. Biol. Med.* 236, 997-1004.
- Sakuma, M., 1998. Probit analysis of preference data. *Appl. Entomol. Zool.* 33, 339-347.
- Seo, E.Y., 2015. Effects of (6)-gingerol, ginger component on adipocyte development and differentiation in 3T3-L1. *J. Nutr. Health.* 48, 327-334.



- Serra, D., Mera, P., Malandrino, M.I., Mir, J.F., Herrero, L., 2013. Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 269-284.
- Serrano, M.C., Pagani, R., Vallet-Regi, M., Pena, J., Ramila, A., Izquierdo, I., Portolés, M.T., 2004. In vitro biocompatibility assessment of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. *Biomaterials.* 25, 5603-5611.
- Shan, T., Liu, W., Kuang, S., 2013. Fatty acid binding protein 4 expression marks a population of adipocyte progenitors in white and brown adipose tissues. *FASEB. J.* 27, 277-287.
- Sharma, G.J., Chirangini, P., Kishor, R., 2011. Gingers of Manipur: diversity and potentials as bioresources. *Genet. Resour. Crop Evol.* 58, 753-767.
- Sharma, G.J., Chirangini, P., Mishra, K.P., 2007. Evaluation of antioxidant and cytotoxic properties of tropical ginger, *Zingiber montanum* (J. Konig) A Dietr. Gard. Bull Sing. 59, 189-202.
- Shin, J.H., Gadde, K.M., 2013. Clinical utility of phentermine/topiramate (Qsymia™) combination for the treatment of obesity. *DiabetesMetab. Syndr. Obes.* 6, 131-139.
- Singh, C., Manglembi, N., Swapana, N., Chanu, S., 2015. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Zingiber cassumunar* Roxb. (Zingiberaceae). *J. Pharmacogn. Phytochem.* 4.
- Stoecker, K., Sass, S., Theis, F.J., Hauner, H., Pfaffl, M.W., 2017. Inhibition of fat cell differentiation in 3T3-L1 pre-adipocytes by all-trans retinoic acid: Integrative analysis of transcriptomic and phenotypic data. *Biomol. Detect. Quantif.* 11, 31-44.
- Suk, S., Seo, S.G., Yu, J.G., Yang, H., Jeong, E., Jang, Y.J., Yaghoor, S.S., Ahmed, Y., Yousef, J.M., Abualnaja, K.O., Al-Malki, A.L., 2016. A bioactive constituent of ginger, 6-shogaol, prevents adipogenesis and stimulates lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J. Food Biochem.* 40, 84-90.
- Todoric, J., Strobl, B., Jais, A., Boucheron, N., Bayer, M., Amann, S., Lindroos, J., Teperino, R., Prager, G., Bilban, M., Ellmeier, W., 2011. Cross-talk between interferon- $\gamma$  and hedgehog signaling regulates adipogenesis. *Diabetes.* 60, 1668-1676.
- Tzeng, T.F., Chang, C.J., Liu, I.M., 2014. 6-Gingerol inhibits rosiglitazone-induced adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Phytother Res.* 28(2), 187-192.
- Tzeng, T.F., Liu, I.M., 2013. 6-Gingerol prevents adipogenesis and the accumulation of cytoplasmic lipid droplets in 3T3-L1 cells. *Phytomedicine.* 20, 481-487.
- Wang, G.L., Shi, X., Salisbury, E., Sun, Y., Albrecht, J.H., Smith, R.G., Timchenko, N.A., 2006. Cyclin D3 maintains growth-inhibitory activity of C/EBP $\alpha$  by stabilizing C/EBP $\alpha$ -cdk2 and C/EBP $\alpha$ -Brm complexes. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2570-2582.
- Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., Zechner, R., 2004. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science.* 306, 1383-1386.

---

#### How to cite this article;

Rungnapa Sririvichitchai, Aroonchai Saijai, Kewalin Inthanon, Siriwadee Chomdej, Weerah Wongkham, Weerasak Roongruangwongse. Anti-adipogenesis activities of *Zingiber cassumunar* Roxb. rhizome extracts on L929 cells evaluated by image-based analysis. *Veterinary Integrative Sciences.* 2018; 16(2): 35-51.

---





Vet Integr Sci  
**Veterinary Integrative Sciences**

ISSN: 2629-9968 (online)

Website: www.vet.cmu.ac.th/cmvi

**Research article**

## The anatomical study of water monitor (*Varanus salvator*) skin to apply for leatherwork production

Duangmanee Boonchuay, Sirirak Chantakru, Sirin Theerawatanasirikul and Urai Pongchairerk\*

*Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand*

### Abstract

The study of anatomical structures relating to durability and flexibility of water monitor (*Varanus salvator*) skin was useful for improvement of tanning process and leatherwork production. For this objective, the skin at dorsocervical region, dorsal thoracolumbar region, lateral region of body and ventroabdominal region were observed for characteristics and collected to perform paraffin section with hematoxylin and eosin (H&E) and Masson's trichrome staining for histological study and dermal thickness measurement. Density and location of alpha keratin in epidermis were also examined by immunohistochemistry. The substantial results revealed that deep dermis of dorsocervical and dorsal thoracolumbar regions comprised of moderate and large sized collagen bundles in multi-directional arrangement, while large transverse uni-directionally arranged collagen bundles were found at lateral and ventroabdominal regions. However, the collagen bundles in interscale dermis of all regions were appeared only in transverse pattern. The interscale dermal thickness showed no differences among dorsocervical, dorsal thoracolumbar and lateral regions of body, whereas ventroabdominal dermis was significantly thicker. Moreover, immunohistochemical study of alpha keratin, which indicated epidermal pliability, was weakly expressed in dorsocervical interscale region. From the results, we concluded that leathers from dorsocervical and dorsal thoracolumbar regions were extendable, but easily torn at interscale position. They were suitable for leatherworks that needed large sheet of leather and unique pattern, but external forces endurance was not required. Meanwhile, large covering scales and dense collagen bundles within interscale dermis caused rigidity and endurance of ventroabdominal skin. Therefore, this part of leather was appropriate for stable shaped and durable leatherworks.

**Keywords:** Alpha keratin, Collagen bundle, Histology, Skin, Water monitor

\*Corresponding author: Urai Pongchairerk, Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, 50 Ngamwongwan Rd., Lad Yao, Chatuchak, Bangkok 10900 E-mail: au\_urai@yahoo.com, fveturp@ku.ac.th

*Article history:* received manuscript: 4 February 2018, accepted manuscript: 3 May 2018, published online: 15 June 2018

*Academic editor:* Korakot Nganvongpanit

## บทนำ

หนังสือพิมพ์ที่ผลิตในประเทศไทยเป็นที่ต้องการของตลาดเครื่องหนังทั้งในและต่างประเทศ เนื่องจากมีความสวยงาม ละเอียดและประณีต สามารถสร้างรายได้ให้กับประเทศไทยได้มาก หนังสือพิมพ์ที่ส่งออกมากที่สุดประเภทหนึ่งคือหนังสือพิมพ์ประเภทหายาก (exotic skin) เช่น หนังจระเข้ หนังปลากระเบน และหนังตัวเงินตัวทอง ทั้งนี้หนังจากตัวเงินตัวทองได้รับความสนใจจากผู้เพาะเลี้ยงและผู้ค้าเครื่องหนังจำนวนมาก เนื่องจากมีลวดลายที่สวยงามและเป็นเอกลักษณ์ (Office of Industrial Economics, 2011) ตัวเงินตัวทอง (ชื่อสามัญ: water monitor; ชื่อวิทยาศาสตร์: *Varanus salvator*) ถูกจัดให้อยู่ในบัญชีหมายเลข 2 ของอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพันธุ์พืชป่าใกล้สูญพันธุ์ (CITES) และเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 (CITES Secretariat, 2014) ทำให้การค้าหนังตัวเงินตัวทองต้องอยู่ภายใต้การควบคุม มีผลให้หนังตัวเงินตัวทองเป็นที่ต้องการมากขึ้นและมีมูลค่าสูง

ในการผลิตงานเครื่องหนังนั้นนอกจากจะคำนึงถึงความสวยงามและความประณีตแล้วยังต้องคำนึงถึงความแข็งแรงทนทานและความยืดหยุ่นของหนังด้วย ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้เกิดจากโครงสร้าง ที่เป็นองค์ประกอบอยู่ภายในผิวหนัง จากการศึกษาผิวหนังของสัตว์เลื้อยคลานในกลุ่มกิ้งก่าและตุ๊กแก (lizard) พบว่าผิวหนังแบ่งเป็นชั้นหนังกำพร้า (epidermis) และชั้นหนังแท้ (dermis) โดยชั้นหนังกำพร้าประกอบด้วย 5 ชั้นย่อย คือ ชั้นฐาน (basal) ชั้นเหนือฐาน (suprabasal) ชั้นแอลฟา (alpha) ชั้นเบตา (beta) และชั้นโอเบอร์ฮาวเทิน (oberhautchen) (Alibardi, 2000; Pough et al., 2004; Alibardi and Toni, 2006; Paterson, 2006) ส่วนชั้นหนังแท้ประกอบด้วยชั้นสตราตัม แลคซิม (stratum laxum) ซึ่งมีเส้นใยคอลลาเจน (collagen fiber) และมัดคอลลาเจน (collagen bundle) จัดเรียงตัวกันอย่างหลวม อยู่เหนือชั้นสตราตัม คอมแพคตัม (stratum compactum) ที่มีการเรียงตัวของมัดคอลลาเจนอย่างหนาแน่น (Mader-son, 1965; Alibardi, 2000; Alibardi and Toni, 2006; Paterson, 2006) ลักษณะดังกล่าวคล้ายกับที่พบในหนังแท้ชั้นผิว (superficial dermis) และชั้นลึก (deep dermis) ของสัตว์เลื้อยคลานด้วยนมส่วนใหญ่ (Monteiro-Riviere, 2006) และที่พบบริเวณขากรรไกรของงู *Nerodia sipedon* (Close and Cundall, 2014) เส้นใยและมัดคอลลาเจนทำหน้าที่ช่วยเสริมสร้างความแข็งแรงให้กับผิวหนัง และแนวการเรียงตัวของโครงสร้างเหล่านี้มีผลต่อการเคลื่อนไหวของผิวหนัง (Sanggaard et al., 2012; Yang et al., 2013; Close and Cundall, 2014) ส่วนที่ชั้นหนังกำพร้าจะพบเซลล์ที่บรรจุแอลฟา เคอราติน (alpha keratin) หรือ ไซโตเคอราติน (cytokeratin) ซึ่งทำหน้าที่ในการป้องกันการสูญเสียน้ำจากบริเวณผิวหนัง รวมถึงสร้างกลไกที่ทำให้เซลล์สามารถทนต่อแรงเหยียดที่เกิดขึ้น (Alibardi and Toni, 2006; Gu and Cou-lombe, 2007) และยังมีเซลล์ที่บรรจุเบตา เคอราติน (beta keratin) ซึ่งมีลักษณะแข็งทำหน้าที่ช่วยปกป้องผิวหนัง (Alibardi, 2000) จากการศึกษาผิวหนังขณะลอกคราบของกิ้งก่า *Podarcis muralis* พบแอลฟา เคอราติน ภายในเซลล์ชั้นฐาน เหนือฐาน และ แอลฟา โดยในขณะลอกคราบน้ำมันชั้นแอลฟาจะประกอบด้วยชั้นย่อย ได้แก่ ชั้นมีซอส (mesos) ลาคูนาร์ (lacunar) และ เคลียร์ (clear) ซึ่งพบว่ามีแอลฟา เคอราตินอยู่ภายในเซลล์ของทุกชั้นสำหรับในชั้นเบตาจะพบแอลฟา เคอราตินขณะที่ชั้นนี้กำลังพัฒนาเท่านั้น เมื่อมีการลอกคราบออกไปแล้ว ชั้นเบตาที่เจริญเต็มที่จะพบแอลฟา เคอราตินจำนวนน้อย

มากหรือไม่พบเลย แต่กลับพบเบตา เคอราตินอยู่เป็นปริมาณมาก (Alibardi, 2000; Alibardi et al., 2000) ลักษณะเช่นนี้ยังพบได้ในผิวหนังของ กิ้งก่าหัวทาร์รา (*Sphenodon punctatus*) รวมถึงสัตว์เลื้อยคลานที่อยู่ในอันดับ squamata ได้แก่ งู และสัตว์ในกลุ่มกิ้งก่าและตุ๊กแกทุกชนิด (Alibardi and Gill, 2007) มีการวิจัยเกี่ยวกับคุณสมบัติขององค์ประกอบภายในหนังกำพร้าของผิวหนังบริเวณท้องของงู 4 ชนิด ได้แก่ *Lampropeltis getula californicae*, *Epicrates cenchria cenchria*, *Morelia viridis* และ *Gongylophis colubrinus* พบว่าผิวหนังนอกที่สัมผัสกับพื้นผิวที่เคลื่อนที่ผ่านอันประกอบไปด้วยเบตาเคอราตินภายในชั้นเบตาและโอเบอฮาวเทน จะมีค่าโมดูลัสของสภาพยืดหยุ่น (elastic modulus) และความแข็ง (hardness) มากที่สุดและจะลดลงในชั้นแอลฟาที่อยู่ลึกลงไป (Klein et al., 2010; Klein and Gorb, 2012) ซึ่งโครงสร้างที่มีโมดูลัสของสภาพยืดหยุ่นสูงบ่งชี้ถึงความคงรูปและทนทานต่อแรงดึงและแรงกดจากภายนอกแต่จะมีความยืดหยุ่นต่ำ จึงเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้ยาก (Guthold et al., 2007; Lima et al., 2018) ในขณะที่ชั้นแอลฟาซึ่งมีแอลฟา เคอราตินเป็นองค์ประกอบจะมีความอ่อนนุ่มและยืดหยุ่นสูง (Klein et al., 2010; Klein and Gorb, 2012) นอกจากการศึกษาในผิวหนังสัตว์แล้ว โมดูลัสของสภาพยืดหยุ่นยังใช้ในการประเมินความทนทานและความยืดหยุ่นของโครงสร้างในเซลล์และเนื้อเยื่อชนิดอื่น เช่น ขนที่อยู่บริเวณผิวเซลล์ชนิดยูคาริโอท (eukaryotic cell) และโพรคาริโอท (prokaryotic cell) (Sokolov et al., 2013) และเส้นใยคอลลาเจน รวมถึงเนื้อเยื่อพันด้วย (Bar-On and Wagner, 2012)

จะเห็นได้ว่าองค์ประกอบที่พบภายในชั้นของผิวหนังรวมถึงปริมาณและลักษณะที่พบล้วนแต่มีผลต่อคุณสมบัติของผิวหนัง เช่น ความสวยงาม ความทนทาน ความสามารถในการถูกยืดขยายและความยืดหยุ่น ซึ่งผิวหนังแต่ละบริเวณนั้นย่อมมีความแตกต่างกันของปัจจัยเหล่านี้ ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของผิวหนังตัวเงินตัวทองแต่ละบริเวณ โดยสอดคล้องกับการนำไปใช้ประโยชน์ต่อการผลิตงานเครื่องหนัง ได้แก่ การสังเกตลักษณะของเกล็ดและผิวหนังเพื่อทำให้เห็นความแตกต่างของลวดลายและความยากง่ายในการเลาะผิวหนังแต่ละบริเวณ และการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคเพื่อดูโครงสร้างภายในผิวหนังแต่ละชั้นโดยเฉพาะเส้นใยและมัดคอลลาเจนภายในชั้นหนังแท้รวมถึงการวัดความหนาของชั้นนี้ ซึ่งมีความสำคัญต่อความทนทานและความสามารถในการถูกยืดขยายออกของแผ่นหนัง นอกจากนี้ ยังต้องการศึกษาการปรากฏและการกระจายตัวของแอลฟา เคอราตินภายในชั้นหนังกำพร้าของตัวเงินตัวทอง ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่มีผลต่อความยืดหยุ่นของผิวหนังด้วย ทั้งนี้ เนื่องจากประเทศไทยยังขาดแคลนงานวิจัยเพื่อพัฒนาวัตถุดิบในการผลิตเครื่องหนัง เช่น หนังดิบ หนังฟอก ถึงแม้ว่าจะเป็นแหล่งผลิตหนังที่สำคัญให้กับประเทศในแถบยุโรปที่เป็นเจ้าของตลาดสินค้าที่มีชื่อเสียงระดับโลก เช่น อิตาลีและฝรั่งเศส รวมถึงผลิตหนังสัตว์ประเภทหายากส่งออกให้กับประเทศจีนก็ตาม แต่หนังที่ไทยส่งออกไปนั้นยังมีคุณภาพอยู่ในระดับปานกลางถึงค่อนข้างต่ำ (Office of Industrial Economics, 2011) สำหรับตัวเงินตัวทองนั้นยังไม่พบว่ามีการวิจัยที่ให้องค์ความรู้เกี่ยวกับการพัฒนาคุณภาพของหนัง ในขณะที่ปัจจุบันแนวโน้มการผลิตและส่งออกหนังสัตว์จากประเทศไทยนั้นเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Office of Industrial Economics, 2017) จึงควรใช้โอกาสในการสร้างงานวิจัยเพื่อให้การผลิตหนังและเครื่องหนังจากตัวเงินตัวทองมีคุณภาพและเป็นที่แพร่หลายมากขึ้น โดยงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลสำหรับพัฒนาระบบการผลิตหนังฟอกจากตัวเงินตัวทอง และคัดเลือกบริเวณของหนังให้เหมาะสมกับการผลิตเครื่องหนังแต่ละประเภท อีกทั้งเป็นการนำหนังสัตว์มาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

## อุปกรณ์และวิธีการ

### สัตว์ทดลองและการเก็บตัวอย่าง

ตัวเงินตัวทองอายุประมาณ 1 ถึง 1 ปีครึ่ง จำนวน 6 ตัว เป็นเพศผู้ 4 ตัว และเพศเมีย 2 ตัว ได้รับการวางยาสลบโดยใช้ Zoletil®100 (250 mg Tiletamine และ 250 mg Zolazepam) ฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณขาหลังในขนาด 4-10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Schumacher and Mans, 2014) ภายหลังจากที่สัตว์หมดความรู้สึกแล้ว ทำการเก็บตัวอย่างผิวหนังขนาด 1x1 เซนติเมตรที่บริเวณหลังคอ (dorsocervical region) กลางหลัง (dorsal thoracolumbar region) ข้างลำตัว (lateral region of body) และใต้ท้อง (ventroabdominal region) ในสารละลาย Bouin's solution จากนั้นจึงเย็บปิดบาดแผลและนำไปแยกเลี้ยงภายในคอกพักสัตว์เพื่อดูแผล และฉีดยาปฏิชีวนะ เอนโรฟลอกซาซิน (enrofloxacin) ขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเข้ากล้ามเนื้อ (Mitchell, 2006) และ มีลอกซิแคม (meloxicam) ขนาด 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเข้ากล้ามเนื้อเพื่อลดการอักเสบ (Schumacher and Mans, 2014) เป็นเวลา 7 วัน จึงทำการตัดไหม สำหรับกระบวนการเก็บตัวอย่างผิวหนังตัวเงินตัวทองนั้นได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในวันที่ 24 กรกฎาคม 2558 (เลขที่ ACKU 01757)

### การศึกษาลักษณะผิวหนังของตัวเงินตัวทองในแต่ละบริเวณ

สังเกตลักษณะผิวหนังภายนอกร่างกายของตัวเงินตัวทองด้วยตาเปล่า ได้แก่ รูปร่างของเกล็ดขนาด และสีของเกล็ดในแต่ละบริเวณ รวมไปถึงลักษณะการยึดติดระหว่างผิวหนังกับชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous) และเอ็นหุ้มกล้ามเนื้อ (aponeurosis) ที่ผิวหนังแต่ละบริเวณขณะทำการเก็บตัวอย่างผิวหนัง

### การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาลักษณะจุลกายวิภาค

ตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังตัวเงินตัวทองจะถูกนำมาคงสภาพใน Bouin's solution นาน 8 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเนื้อเยื่อมาล้างด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 จนกระทั่ง Bouin's solution ถูกล้างออกจากเนื้อเยื่อจนหมด จึงผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อจนได้เป็นบล็อกพาราฟินและนำไปตัดเป็นแผ่นบางที่ความหนา 5 ไมโครเมตร แล้วย้อมด้วยสี hematoxylin and eosin (H&E) และ Masson's trichrome (Romeratanaphan, 2002) เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างทางจุลกายวิภาคโดยทั่วไปของผิวหนังตัวเงินตัวทอง รวมถึงความหนาแน่น ขนาด และการเรียงตัวของเส้นใยคอลลาเจนและมัดคอลลาเจนที่ชั้นหนังแท้ของผิวหนังแต่ละบริเวณ

### การวัดความหนาของชั้นหนังแท้

การวัดความหนาของผิวหนังตัวเงินตัวทองในแต่ละบริเวณ กระทำโดยถ่ายภาพลักษณะทางจุลกายวิภาคของผิวหนังที่ย้อมด้วยสี H&E ของตัวเงินตัวทองทั้ง 6 ตัว โดยการใช้โปรแกรม Cell D (Olympus® Japan) วัดระยะความหนาของชั้นหนังแท้ตั้งแต่วางของหนังกำพร้าถึงรอยต่อชั้นใต้ผิวหนังหรือกล้ามเนื้อที่อยู่ด้านล่าง ชั้นหนังแท้ของผิวหนังบริเวณใต้เกล็ดแต่ละเกล็ดจะถูกวัดความหนาจำนวน 7 จุด ส่วนพื้นที่บริเวณระหว่างเกล็ดจะถูกวัดจำนวน 3 จุด จากนั้นจึงนำค่าความหนาที่ได้ทั้งหมดมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error, SE)

### การศึกษาทางอิมมูโนฮิสโตเคมี

การใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีเพื่อศึกษาตำแหน่งและความหนาแน่นของแอลฟา เคอราติน (ไซโตเคอราติน) ที่ชั้นหนังกำพร้าของผิวหนังตัวเงินตัวทองกระทำโดยการนำแผ่นเนื้อเยื่อที่ติดบนสไลด์มากำจัดพาราฟิน แล้วทำวิธีคืนสภาพแอนติเจน (antigen retrieval) โดยการใช้สารละลาย 0.1 M citrate buffer (pH 6.0) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส และบ่มสไลด์ใน 2% bovine serum albumin (BSA) เพื่อป้องกันการจับกันของแอนติบอดีอย่างไม่เจาะจง จากนั้นทำการบ่มสไลด์เนื้อเยื่อใน mouse monoclonal anti-cytokeratin antibody (Novocastra, UK) และยับยั้งเอนไซม์ alkaline phosphatase ในเนื้อเยื่อโดยใช้ 0.4 mM Tetramisole (Sigma, USA) ตามด้วย alkaline phosphatase conjugated anti-mouse IgG (Vector Laboratories, USA) และใช้ Vector® Red alkaline phosphatase substrate (Vector Laboratories, USA) เพื่อทำให้เกิดสีแดงขึ้นตรงตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยา การติดสีภายในเซลล์แต่ละชั้นของหนังกำพร้าทั้ง 4 บริเวณจะถูกประเมินเป็น 5 ระดับ ได้แก่ การติดสีมากที่สุด มาก ปานกลาง น้อย และไม่พบการติดสี โดยอาศัยผู้ประเมินที่มีความเชี่ยวชาญด้านจุลกายวิภาคศาสตร์จำนวน 3 คน

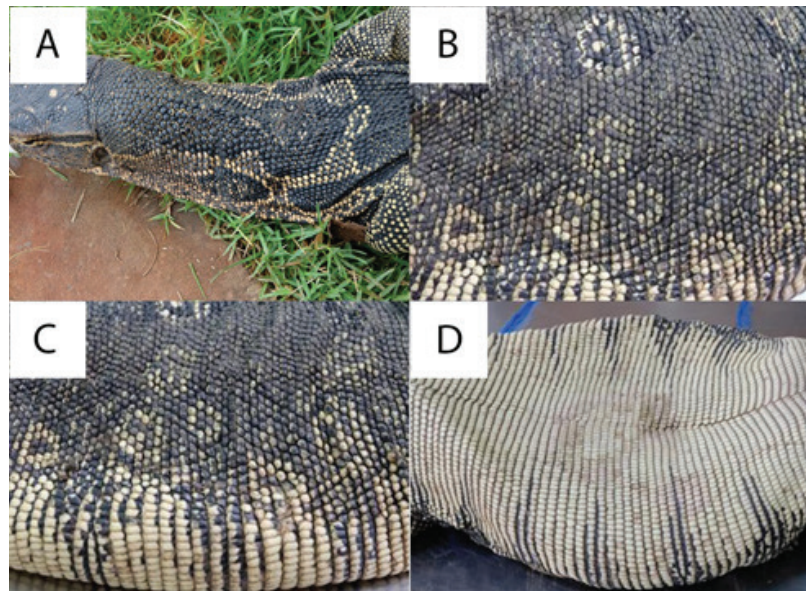
### การวิเคราะห์ข้อมูล

ค่าความหนาของชั้นหนังแท้ในผิวหนังทั้ง 4 บริเวณ ถูกนำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ one way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างความหนาของผิวหนังแต่ละบริเวณด้วย Tukey's Multiple Comparison Test โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism Version 5.0

## ผลการศึกษา

### ลักษณะผิวหนังของตัวเงินตัวทองในแต่ละบริเวณ

ผิวหนังของตัวเงินตัวทองส่วนใหญ่มีสีดำ โดยส่วนหลัง (dorsal area) ของร่างกายจะมีลายดอกเป็นรูปวงกลมหรือวงรีสีขาวเรียงกันเป็นแถวตามขวางจำนวนหลายแถวตั้งแต่บริเวณหลังคอ (dorsocervical region) ไปจนถึงโคนหาง (dorsococcygeal region) หลังจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นลายพาดตามขวางต่อไปจนถึงปลายหาง ที่ส่วนท้อง (ventral area) ตั้งแต่ใต้คอ (ventrocervical region) ลงไปจนถึงใต้หาง (ventrococcygeal region) จะมีสีขาวหรือเหลืองอ่อนและไม่มีลาย ส่วนด้านข้างของลำตัว (lateral region of body) เป็นบริเวณรอยต่อระหว่างผิวหนังที่แผ่นหลัง (dorsal thoracolumbar region) และใต้ท้อง (ventroabdominal region) จึงมีลายริ้วสีดำที่ต่อเนื่องลงมาจากด้านหลังปะปนอยู่กับพื้นสีขาวซึ่งเป็นลักษณะของผิวหนังด้านท้อง (Figure 1) ผิวหนังของตัวเงินตัวทองถูกปกคลุมไปด้วยเกล็ดทั่วทั้งร่างกาย โดยเกล็ดที่พบบริเวณส่วนหลังจะมีขนาดเล็ก รูปร่างค่อนข้างกลมเรียงชิดกันเป็นแถวตามขวางของลำตัว และไม่มีการซ้อนเกยกัน พื้นผิวของเกล็ดแต่ละอันนูนขึ้นมาเป็นสันบริเวณตรงกลาง เกล็ดส่วนใหญ่เป็นสีดำ ยกเว้นในส่วนที่เป็นลายดอกจะมีสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน (Figure 1A, B) ส่วนเกล็ดที่ผิวหนังด้านท้องของลำตัวจะเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาดใหญ่กว่าเกล็ดที่ส่วนหลัง ขอบด้านยาวของเกล็ดจะชิดกันเรียงเป็นแถวตามขวางซึ่งต่อเนื่องมาจากเกล็ดบริเวณหลัง พื้นผิวของเกล็ดแบนเรียบมีสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน (Figure 1D) สำหรับเกล็ดบริเวณข้างลำตัวส่วนบน (dorsolateral region) จะมีลักษณะเหมือนกับเกล็ดบริเวณหลัง แต่ส่วนล่าง (ventrolateral region) จะเหมือนกับเกล็ดส่วนท้อง (Figure 1C) นอกจากความแตกต่างของเกล็ดแล้ว ความหนาของชั้นใต้ผิวหนังในแต่ละบริเวณก็มีความแตกต่างกันด้วย โดยผิวหนังที่ค่อมมีชั้นใต้ผิวหนังกว้างที่สุด ทำให้สามารถแยกผิวหนังออกได้ง่ายกว่าบริเวณอื่น ส่วนข้างลำตัวมีชั้นใต้ผิวหนังที่กว้างรองลงมา บริเวณใต้ท้องพบชั้นใต้ผิวหนังค่อนข้างบาง ส่วนที่กลางหลังพบว่าผิวหนังจะอยู่แนบชิดกับเอ็นยึดกล้ามเนื้อที่อยู่ข้างใต้ ทำให้สามารถแกะแยกผิวหนังออกได้ยาก

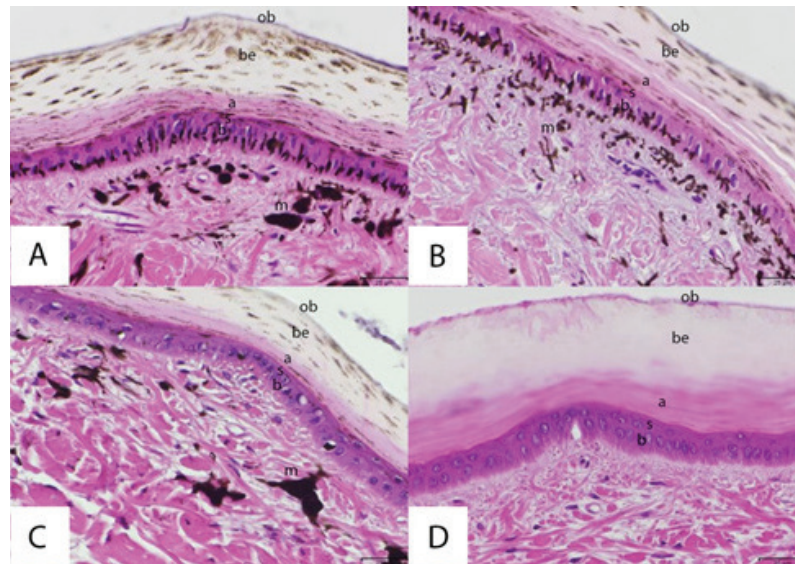


**Figure 1** Anatomy of water monitor skin at dorsocervical region (A), dorsal thoracolumbar region (B), lateral region of body (C) and ventroabdominal region (D)



### การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของผิวหนัง

จากการย้อมสีเนื้อเยื่อด้วย H&E พบว่าผิวหนังของตัวเงินตัวทองประกอบด้วยชั้นหนังกำพร้า และชั้นหนังแท้ โดยชั้นหนังกำพร้าของผิวหนังบริเวณหลังคอ กลางหลัง ข้างลำตัว และได้ท้องประกอบด้วยเซลล์รูปร่าง cuboidal หรือ columnar เรียงตัวชั้นเดียวอยู่ที่ฐาน และมีเซลล์รูปร่าง squamous หรือ low cuboidal จำนวน 1 ถึง 2 ชั้น ในชั้นเหนือฐาน ถัดขึ้นมาคือชั้นแอลฟา ซึ่งเซลล์มีรูปร่างแบนดิสสีแดง (acidophilic) เรียงตัวซ้อนกันแน่นหลายชั้น และชั้นเบตาเป็นชั้นหนาที่สุดประกอบด้วยเซลล์ดิสสีแดงซึ่งมีชั้นบางอยู่ที่ผิวบนเรียกว่าชั้นโอเบอร์ฮาวเทน (Figure 2)



**Figure 2** Light micrographs of water monitor skin from dorsocervical region (A), dorsal thoracolumbar region (B), lateral region of body (C) and ventroabdominal region (D) stained with H&E. The histological feature showed basal (b), suprabasal (s), alpha (a), beta (be) and oberhautchen (ob) layers of epidermis. Various size and distribution of melanophore (m) were found in epidermis and superficial dermis of dorsocervical, dorsal thoracolumbar and lateral regions but absent at ventroabdominal region. Scale bar 25  $\mu$ m (40x magnification)

ส่วนชั้นหนังแท้ประกอบด้วยชั้นผิว (superficial dermis) ซึ่งมีองค์ประกอบที่มีลักษณะคล้ายกันในทั้ง 4 บริเวณ คือพบเส้นใยคอลลาเจน และ มัดคอลลาเจนขนาดเล็ก (ความหนาประมาณ 5-10 ไมครอน) เรียงตัวกันอย่างหลวม และชั้นลึก (deep dermis) ซึ่งประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจน และ มัดคอลลาเจนขนาดปานกลาง (ความหนาประมาณ 10-20 ไมครอน) ถึงขนาดใหญ่ (ความหนามากกว่า 20 ไมครอน) เรียงตัวแตกต่างกันระหว่าง 4 บริเวณที่ศึกษาในครั้งนี้ โดยผิวหนังบริเวณหลังคอคและกลางหลังพบมัดคอลลาเจนเรียงตัวหนาแน่นไปในหลายทิศทาง (Figure 3A, B) ส่วนที่ข้างลำตัวและใต้ท้องพบว่าเฉพาะบริเวณที่ต่อจากชั้นผิวลงมาเล็กน้อยเท่านั้นที่พบมัดคอลลาเจนเรียงตัวหนาแน่นหลายทิศทาง แต่ในตำแหน่งต่ำกว่านั้นพบว่ามัดคอลลาเจนมีขนาดใหญ่และเรียงตัวอย่างหนาแน่นขนานกันไปทิศทางเดียว (Figure 3C-D)

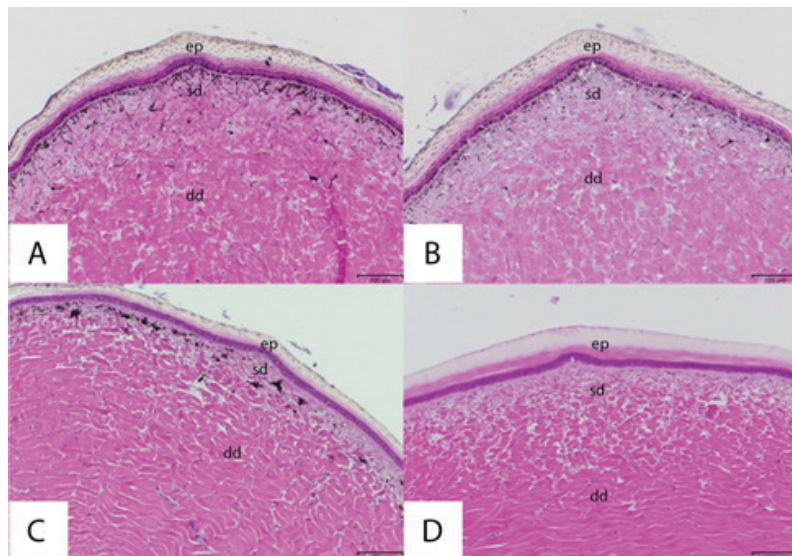
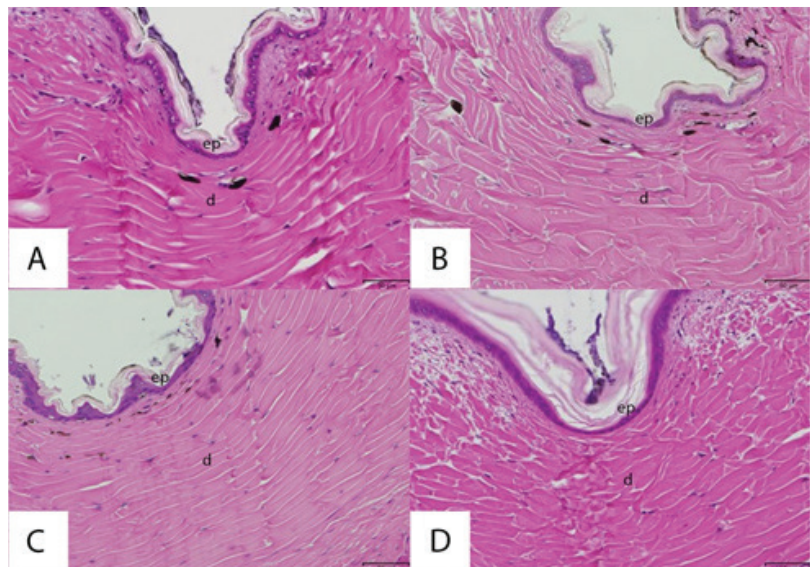


Figure 3 Histological morphology of water monitor skin showed collagen bundle arrangement in superficial and deep dermis at dorsocervical region (A), dorsal thoracolumbar region (B), lateral region of body (C) and ventroabdominal region (D) stained with H&E. Superficial dermis (sd) of all regions composed of collagen fiber and small loosely arranged collagen bundles. However, deep dermis (dd) at dorsocervical and dorsal thoracolumbar regions presented moderate and large collagen bundles in multidirectional arrangement, where as those of skin in lateral and ventroabdominal regions were arranged unidirectionally. Scale bar 100  $\mu$ m (10x magnification); ep = epidermis

ระหว่างเกล็ดของผิวหนังทั้ง 4 บริเวณ มีชั้นหนังกำพร้าลักษณะบาง ที่ชั้นหนังแท้พบมัดคอลลาเจนขนาดปานกลางถึงขนาดใหญ่จำนวนมากเรียงตัวในทิศทางเดียวกัน (Figure 4) จากการย้อมด้วยสี Masson's trichrome พบว่าการเรียงตัวและขนาดของเส้นใยและมัดคอลลาเจนภายในชั้นผิวและชั้นลึกของหนังแท้ในผิวหนังทั้ง 4 บริเวณสอดคล้องกับผลที่พบโดยการย้อมด้วยสี H&E นอกจากนี้ ผิวหนังบริเวณหลังคอ กลางหลัง และข้างลำตัวยังพบเซลล์เมลานोฟอร์ (melanophore) ซึ่งเป็นเซลล์ผลิตเม็ดสีอยู่ด้วย โดยที่หลังคอและกลางหลังสามารถพบเซลล์นี้ทั้งที่ชั้นหนังกำพร้าและชั้นผิวของหนังแท้ และเซลล์ที่พบในหนังแท้บริเวณหลังคอจะมีขนาดใหญ่กว่าที่กลางหลัง (Figure 2A, B) ส่วนที่ผิวหนังข้างลำตัวจะพบเซลล์ขนาดใหญ่จำนวนมากเล็กน้อยอยู่ในชั้นผิวของหนังแท้เท่านั้น (Figure 2C) ในขณะที่ผิวหนังใต้ท้องจะไม่พบเซลล์นี้ (Figure 2D)



**Figure 4** Light micrographs of water monitor interscale skin from dorsocervical region (A), dorsal thoracolumbar region (B), lateral region of body (C) and ventroabdominal region (D) stained with H&E. In all regions, the epidermis (ep) was thin and collagen bundles in dermis (d) were arranged in parallel. Scale bar 50  $\mu$ m (20x magnification)

### การวัดความหนาของชั้นหนังแท้

เมื่อวัดความหนาของชั้นหนังแท้ในผิวหนังส่วนที่อยู่ใต้เกล็ด (Table 1) พบว่า บริเวณหลังคอ กลางหลัง ข้างลำตัว และใต้ท้องมีความหนาเฉลี่ย เท่ากับ  $856.20 \pm 56.13$ ,  $834.80 \pm 68.31$ ,  $663.70 \pm 60.24$  และ  $562.40 \pm 54.65$  ไมโครเมตร ตามลำดับ พบว่าที่หลังคอ และกลางหลังมีความหนาของชั้นหนังแท้มากกว่าใต้ท้องอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) แต่ที่ด้านข้างลำตัวไม่มีความแตกต่างจากบริเวณอื่น ส่วนค่าเฉลี่ยของชั้นหนังแท้ตรงผิวหนังระหว่างเกล็ดที่บริเวณหลังคอ กลางหลัง และข้างลำตัว มีค่าเท่ากับ  $287.90 \pm 27.90$ ,  $295.60 \pm 15.28$  และ  $334.70 \pm 13.36$  ไมโครเมตร ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าที่ใต้ท้องซึ่งหนา  $476 \pm 60.32$  ไมโครเมตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

**Table 1** The average thickness of dermis at dorsocervical region (DC), dorsal thoracolumbar region (DTL), lateral region of body (LB) and ventroabdominal region (VA) measured below the scale and between scales (interscale)

AREA	REGION			
	DC	DTL	LB	VA
Below scale	$856.20 \pm 56.13^a$	$834.80 \pm 68.31^a$	$6-63.70 \pm 60.24^{ab}$	$562.40 \pm 54.65^b$
Interscale	$287.90 \pm 27.90^a$	$295.60 \pm 15.28^a$	$334.70 \pm 13.36^a$	$476.60 \pm 60.32^b$

Data are presented as mean  $\pm$  SE (n = 6).

<sup>a,b</sup> indicate significant difference among regions within a row ( $P < 0.05$ )

### การศึกษาทางอิมมูโนฮิสโตเคมี

จากการย้อมสีด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีพบว่าการติดสีของไซโตเคอรานินในเซลล์ชั้นฐาน และเหนือฐานของทุกบริเวณจะพบระดับการติดสีมากที่สุด ยกเว้นชั้นเหนือฐานของผิวหนังหลังคอที่จะพบการติดสีในระดับมาก และชั้นแอลฟาพบการติดสีมากในทุกบริเวณ ยกเว้นที่ข้างลำตัวซึ่งมีการติดสีระดับปานกลาง ส่วนในชั้นเบตาและโอเบอฮาวเทนของทุกบริเวณจะไม่พบการติดสี (Table 2) เมื่อพิจารณาผิวหนังบริเวณระหว่างเกล็ดพบว่าเซลล์ชั้นฐาน และ เหนือฐานของผิวหนังกลางหลัง ข้างลำตัว และใต้ท้องพบระดับการติดสีมากที่สุด ส่วนหลังคอพบการติดสีระดับปานกลาง ในขณะที่ชั้นแอลฟาของทุกบริเวณพบระดับการติดสีน้อย (Table 3)

**Table 2** Alpha keratin expression in epidermis of water monitor skin at dorsocervical region (DC), dorsal thoracolumbar region (DTL), lateral region of body (LB) and ventro-abdominal region (VA)

REGION	LAYER				
	Basal	Suprabasal	Alpha	Beta	Oberhautchen
DC	++++	+++	+++	-	-
DTL	++++	++++	+++	-	-
LB	++++	++++	++	-	-
VA	++++	++++	+++	-	-

Level of intensity: + + + + very high, + + + high, + + moderate, + low, – absent

**Table 3** Alpha keratin expression in interscale epidermis of water monitor skin at dorsocervical region (DC), dorsal thoracolumbar region (DTL), lateral region of body (LB) and ventroabdominal region (VA)

REGION	LAYER				
	Basal	Suprabasal	Alpha	Beta	Oberhautchen
DC	++	++	+	-	-
DTL	++++	++++	+	-	-
LB	++++	++++	+	-	-
VA	++++	++++	+	-	-

Level of intensity: + + + + very high, + + + high, + + moderate, + low, – absent

## วิจารณ์

จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อผิวหนังตัวเงินตัวทอง พบว่าชั้นหนังกำพร้าประกอบด้วยชั้นฐาน เหนือฐาน แอลฟา เบตา และโอเบอฮาวเทน ตามลำดับ ซึ่งลักษณะดังกล่าวคล้ายกับที่พบในผิวหนังของสัตว์เลื้อยคลานที่อยู่ในอันดับ squamata ชนิดอื่น เช่น กิ้งก่า *Anolis carolinensis* และ *Podarcis muralis* (Alibardi, 2000; Alibardi, 2012) ส่วนชั้นหนังแท้แบ่งเป็นชั้นผิว และชั้นลึก ซึ่งมีเส้นใยคอลลาเจนและมัดคอลลาเจนที่มีขนาดและการจัดเรียงตัวที่แตกต่างกัน กล่าวคือชั้นผิวของหนังแท้จะพบเส้นใยคอลลาเจนและมัดคอลลาเจนขนาดเล็กเรียงตัวกันแบบหลวมทุกบริเวณ ส่วนชั้นลึกของหนังแท้บริเวณหลังคอและกลางหลังจะพบมัดคอลลาเจนขนาดปานกลางและขนาดใหญ่ จัดเรียงตัวหลายทิศทางอย่างหนาแน่น ซึ่งแตกต่างจากบริเวณข้างลำตัวและใต้ท้องที่จะพบมัดคอลลาเจนขนาดใหญ่เป็นหลักและมีการเรียงตัวไปในทิศทางเดียวกัน ลักษณะเช่นนี้สามารถพบได้ที่ชั้นหนังแท้ของผิวหนังบริเวณขากรรไกรของงู *Nerodia sipedon* ซึ่งเป็นบริเวณที่เคลื่อนไหวในแนวเดียวขณะที่งูอ้าปากเพื่อกินเหยื่อแล้วจึงบงเพื่อกลืน (Close and Cundall, 2014) และหากพิจารณาจากหน้าตัดของชั้นเนื้อเยื่อผิวหนังตัวเงินตัวทองขณะทำการฝังเป็นบล็อกพาราฟินแล้ว จะเห็นว่ามัดคอลลาเจนที่พบในชั้นลึกของหนังแท้บริเวณข้างลำตัวและใต้ท้องของตัวเงินตัวทองมีการเรียงตัวในแนวขวางลำตัว (transverse) จึงสันนิษฐานได้ว่าหนังตัวเงินตัวทองที่ได้จากบริเวณดังกล่าวสามารถถูกดึงได้ในแนวขวางของลำตัวเพียงแนวเดียว

เมื่อเปรียบเทียบความหนาของชั้นหนังแท้ในผิวหนังของตัวเงินตัวทองทั้ง 4 บริเวณแล้ว พบว่าบริเวณหลังคอและกลางหลังมีความหนาของชั้นหนังแท้ส่วนที่อยู่ใต้เกล็ดมากกว่าบริเวณใต้ท้อง แต่ความหนาของชั้นหนังแท้ในผิวหนังข้างลำตัวนั้นไม่แตกต่างจากบริเวณอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ชั้นหนังแท้ตรงผิวหนังที่อยู่ระหว่างเกล็ดบริเวณใต้ท้องมีความหนามากกว่าบริเวณหลังคอ กลางหลัง และข้างลำตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงลักษณะเกล็ดบนผิวหนังของตัวเงินตัวทอง จะเห็นว่าเกล็ดที่พบบริเวณหลังคอ และกลางหลังนั้นมีลักษณะนูนขึ้นมากกว่าเกล็ดที่พบบริเวณข้างลำตัว และใต้ท้อง ซึ่งมีผลให้ชั้นหนังแท้บริเวณดังกล่าวมีความหนามากกว่า นอกจากนี้การที่เกล็ดของตัวเงินตัวทองมีลักษณะเรียงต่อกัน ไม่มีการซ้อนทับหรือเกยกัน ทำให้ขณะที่ผ่านกระบวนการฟอกหนังซึ่งต้องยืดแผ่นหนังเพื่อให้เกิดความนิ่มและขนาดกว้างขึ้นนั้น (Tienprateep, 2012) ผิวหนังที่อยู่ระหว่างเกล็ดจะเป็นส่วนที่ถูกดึงให้ยืดออกได้มากกว่าผิวหนังบริเวณที่มีเกล็ดปกคลุม เมื่อพิจารณาร่วมกับขนาดและการจัดเรียงตัวของมัดคอลลาเจนที่พบในชั้นลึกของหนังแท้ทั้ง 4 บริเวณแล้ว จึงสันนิษฐานได้ว่าผิวหนังที่ได้ทั้งจะถูกยืดออกได้ในแนวขวางลำตัวเพียงแนวเดียว และจะมีความต้านทานต่อแรงดึงสูง เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีมัดคอลลาเจนขนาดใหญ่เรียงตัวขนานกัน อีกทั้งยังมีความหนาของชั้นหนังแท้ตรงบริเวณระหว่างเกล็ดมากกว่าผิวหนังส่วนอื่นของร่างกาย ส่วนผิวหนังบริเวณหลังคอและกลางหลังจะสามารถถูกยืดออกได้หลายแนวจนเป็นแผ่นกว้างได้ง่ายกว่าเนื่องจากมีมัดคอลลาเจนเรียงตัวหลายทิศทาง แต่จากการที่พบมัดคอลลาเจนขนาดใหญ่และปานกลางปะปนกัน รวมถึงการที่มีชั้นหนังแท้ส่วนที่อยู่ระหว่างเกล็ดบางกว่า จึงทำให้ผิวหนังบริเวณนี้มีความทนทานต่อแรงดึงต่ำกว่า โดยในขณะที่ถูกยืดออกอาจเกิดรอยขาดตรงบริเวณระหว่างเกล็ดได้ง่าย อย่างไรก็ตาม ผิวหนังบริเวณคอและหลังนั้นมีลวดลายเฉพาะตัวที่สวยงาม ในขณะที่บริเวณใต้ท้องจะมีเกล็ดแข็งขนาดใหญ่และไม่ลวดลาย สำหรับผิวหนังบริเวณข้างลำตัวนั้นแม้ว่าจะมีความหนาน้อยกว่าผิวหนังใต้ท้องแต่สามารถถูกดึงได้ในแนวเดียว และมีลวดลายส่วนบนคล้ายกับบริเวณหลังแต่ส่วนล่างเป็นเกล็ดแข็งเช่นเดียวกับส่วนใต้ท้อง จากคุณลักษณะเหล่านี้ทำให้สามารถคัดเลือกหนังจากบริเวณที่เหมาะสมกับการผลิตเครื่องหนังแต่ละชนิดได้

สำหรับการศึกษาดำรงและตำแหน่งของแอลฟา เคอราติน ภายในชั้นหนังกำพร้าทั้ง 4 บริเวณของตัวเงินตัวทอง พบว่าชั้นฐาน และเหนือฐานของทุกบริเวณมีการติดสีของแอลฟา เคอราติน ในระดับมากถึงมากที่สุด ส่วนชั้นแอลฟา มีการติดสีระดับรองลงมา และชั้นเบตา และโอเบอฮาวเทน นั้นไม่พบการติดสีเลย ในขณะที่ชั้นฐาน และเหนือฐานของชั้นหนังกำพร้าที่อยู่ระหว่างเกล็ดก็พบการติดสีในระดับมากที่สุดเช่นกัน ยกเว้นบริเวณหลังคอกที่พบการติดสีระดับปานกลาง ส่วนชั้นแอลฟา นั้นพบการติดสีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จากการติดสีในลักษณะดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งที่พบ แอลฟา เคอราติน ในผิวหนังชั้นหนังกำพร้าของตัวเงินตัวทองนั้นมีความแตกต่างกับในผิวหนังของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม กล่าวคือ การสร้างโทโนฟิลาเมนต์ (tonofilament) ในผิวหนังสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะเริ่มขึ้นในชั้นสตราตัม สพายโนซัม (stratum spinosum) ซึ่งเปรียบเทียบกับชั้นเหนือฐานของผิวหนังตัวเงินตัวทอง และเพิ่มมากขึ้นจนแผ่กระจายเต็มเซลล์ในชั้นบน โดยอาศัยการทำงานร่วมกันกับโปรตีนไฟแลกริน (filaggrin) (Monteiro-Riviere, 2006) ในขณะที่ผิวหนังของตัวเงินตัวทองจะพบแอลฟา เคอราตินในชั้นฐานและเหนือฐานมากกว่าชั้นที่อยู่เหนือขึ้นไป โดยเฉพาะในชั้นเบตา และโอเบอฮาวเทนจะไม่พบแอลฟา เคอราตินเลย แต่กลับพบเบตา เคอราตินปริมาณมากอันทำให้ชั้นเบตา และโอเบอฮาวเทนมีลักษณะแข็งเป็นเกล็ด (Alibardi and Toni, 2006) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาแอลฟา เคอราตินด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีพบว่าเนื้อเยื่อสามารถติดสีต่อแอนติบอดีของไซโตเคอราตินหรือแอลฟา เคอราตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ จึงเชื่อว่าแอลฟา เคอราตินที่พบในผิวหนังตัวเงินตัวทองน่าจะมิโครสร้างโมเลกุลที่ใกล้เคียงกับที่พบในผิวหนังของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงเชื่อได้ว่าหน้าที่ของแอลฟา เคอราติน ในผิวหนังของตัวเงินตัวทองนั้นไม่ต่างไปจากในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือทำหน้าที่เสริมโครงสร้างให้กับเซลล์ชั้นหนังกำพร้า ปกป้องเซลล์จากแรงเสียดทานที่เกิดขึ้นกับเซลล์ และมีบทบาทในการป้องกันการสูญเสียน้ำจากทางผิวหนัง (Alibardi, 2000; Alibardi et al., 2000) นอกจากนี้ จากการคำนวณโมดูลัสของสภาพยืดหยุ่นในหนังกำพร้าของงูพบว่ามีความสูงสุดในชั้นที่มีลักษณะแข็งเช่นชั้นเบตาและต่ำลงในชั้นแอลฟาซึ่งมีความอ่อนนุ่มและยืดหยุ่นสูง (Klein et al., 2010; Klein and Gorb, 2012) จึงทำให้สันนิษฐานได้ว่าบริเวณของผิวหนังตัวเงินตัวทองที่พบแอลฟา เคอราตินในแต่ละชั้นของหนังกำพร้าเป็นปริมาณมากจะมีความยืดหยุ่นสูงกว่าบริเวณที่พบปริมาณน้อยกว่า ดังนั้นหากเปรียบเทียบกับผลการศึกษาที่ได้ในครั้งนี้จะพบว่าผิวหนังส่วนที่มีเกล็ดปกคลุมในบริเวณที่ทำการศึกษาทั้ง 4 บริเวณนั้น มีระดับแอลฟา เคอราตินไม่แตกต่างกันมากนัก จึงไม่น่าจะมีความแตกต่างของระดับความยืดหยุ่น แต่หากพิจารณาผิวหนังตรงระหว่างเกล็ดจะพบว่าที่บริเวณกลางหลัง ข้างลำตัว และใต้ท้องน่าจะมีความยืดหยุ่นมากกว่าบริเวณหลังคอก ดังนั้น ถ้าต้องการทำการยึดผิวหนังบริเวณดังกล่าวจะมีการหดตัวกลับได้มากกว่าบริเวณหลังคอก จึงต้องออกแรงยึดมากกว่า เพื่อให้เกินขีดจำกัดของสภาพยืดหยุ่นจึงจะทำให้แผ่นหนังยืดออกได้ อย่างไรก็ตาม เซลล์ในแต่ละชั้นของหนังกำพร้าในสัตว์เลื้อยคลานอันดับกิ้งก่าและงู (squamata) นั้นไม่ได้พบแต่แอลฟา เคอราติน หรือเบตา เคอราตินเพียงอย่างเดียวอย่างใดอย่างหนึ่ง แต่มักพบว่าแอลฟา เคอราตินซึ่งเป็น intermediate filament ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ (40-68 กิโลดาลตัน) มักจะพบร่วมกับเบตา เคอราตินซึ่งมีขนาดเล็ก (10-25 กิโลดาลตัน) ดังนั้น เบตา เคอราตินจึงถูกเรียกว่า keratin-associated beta proteins (KbetaPs) ซึ่งหากพิจารณาตามสัดส่วนของกรดอะมิโนที่พบเป็นองค์ประกอบหลักคือไกลซีน (gly) และซิสเทอีน (cys) แล้วจะถูกแบ่งเป็น 3 วงศ์ได้แก่ HgG5 (glycine rich; 28% gly, 3.6% cys) HgGC10 (glycine-cysteine medium rich; 13% gly, 14.5% cys) และ HgGC3 (glycine-cysteine rich; 30.4% gly, 8.7% cys) (Alibardi et al., 2012) ในการศึกษาพัฒนาการของชั้นหนังกำพร้าในกิ้งก่า *Anolis carolinensis* พบว่า HgG5 ปริมาณมากจะอยู่ที่ชั้นเบตา โดย cys ที่พบบริเวณ N และ C terminals ของ HgG5 นั้นมักสร้าง

พันธะโคเวเลนต์กับโปรตีนอื่นรวมทั้ง HgGC10 ซึ่งประกอบด้วย cys จำนวนมาก ทำให้ขึ้นดั่งกล่าวเกิดความแข็งแรง มีความต้านทานต่อแรงกลสูง และมีความยืดหยุ่นต่ำ นอกจากนี้ ชั้นเบตาที่เจริญเต็มที่แล้วจะไม่พบแอลฟา เคอราตินอยู่ ซึ่งแตกต่างจากชั้นแอลฟาที่จะไม่พบ HgG5 แต่จะมี HgGC10 และ HgGC3 อยู่ร่วมกับแอลฟา เคอราตินจำนวนมากที่มีลักษณะเป็นเส้นใยหนา ซึ่งส่งผลให้มีคุณสมบัติความยืดหยุ่นเกิดขึ้นได้มากกว่า นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาพบว่า KabetaPs ชนิดที่มี cys เป็นองค์ประกอบเหล่านี้ หากไม่ได้อยู่ร่วมกับ HgG5 ก็มักจะไม่สามารถสร้างพันธะไดซัลไฟด์อันแข็งแรงซึ่งกันและกัน และการเกิดพันธะระหว่าง KabetaPs เหล่านี้กับแอลฟา เคอราตินนั้นส่งผลให้มีลักษณะยืดหยุ่นเกิดขึ้นที่ชั้นนั้นเช่นกัน (Alibardi, 2012; Alibardi, 2013) ดังนั้น การสันนิษฐานว่าปริมาณแอลฟา เคอราตินในแต่ละชั้นของหนังกำพร้าชั้นแปรผันตรงกับความยืดหยุ่นที่เกิดขึ้นจึงมีความเป็นไปได้ อย่างไรก็ตาม หากมีการศึกษาร่วมกับการกระจายตัวของ KabetaPs แต่ละชนิดด้วยก็จะทำให้สามารถสรุปลักษณะดังกล่าวได้อย่างชัดเจนยิ่งขึ้น ซึ่งการศึกษาระดับความยืดหยุ่นของผิวหนังตัวเงินตัวทองโดยอาศัยปริมาณแอลฟา เคอราตินภายในหนังกำพร้านั้นเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากในการผลิตหนังสัตว์ระดับอุตสาหกรรมนั้นจะมีการใช้เอนไซม์ย่อยสลายเคอราติน (keratinase) ซึ่งผลิตจากเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เพื่อจุดประสงค์ในการทำลายหนังที่อยู่บนแผ่นหนังและทำให้เกิดความนุ่ม จึงมักใช้ในการผลิตหนังที่ได้จากโค กระบือ (Zhang et al., 2016a; Zhang et al., 2016b) แต่สำหรับการผลิตหนังสัตว์เลี้ยงคลานั้นต้องการคงรูปร่างและลดตายของเกล็ดไ่ว้จึงไม่ใช้สารประเภทนี้ ดังนั้นเคอราตินที่อยู่บนผิวหนังจึงไม่ถูกทำลายไป และมีผลต่อคุณสมบัติต่าง ๆ ของหนังสัตว์ตามชนิดและปริมาณของเคอราตินที่เป็นองค์ประกอบอยู่ตามที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น

## สรุป

จากการศึกษาผิวหนังตัวเงินตัวทองบริเวณหลังคอ กลางหลัง ด้านข้างลำตัวและใต้ท้อง โดยการสังเกตลักษณะผิวหนังและเกล็ด การศึกษาการเรียงตัวและความหนาแน่นของเส้นใยและมัดคอลลาเจนรวมถึงการวัดความหนาของชั้นหนังแท้ และการประเมินระดับแอลฟา เคอราตินในแต่ละชั้นของหนังกำพร้า สามารถสรุปได้ว่าแผ่นหนังจากบริเวณหลังของตัวเงินตัวทองมีลักษณะและคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการผลิตงานเครื่องหนังประเภทที่ต้องการความสวยงามและไม่จำเป็นต้องรับน้ำหนักหรือถูกแรงดึงหรือแรงกดมากนัก เช่น กระเป๋าถือ รองเท้า หมวก และเครื่องนุ่งห่ม เป็นต้น เนื่องจากบริเวณนี้มีลวดลายที่เป็นเอกลักษณ์ ผืนหนังสามารถถูกยืดขยายได้มากและหลายทิศทาง เช่นเดียวกับบริเวณคอซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกันแต่ความยืดหยุ่นจะต่ำกว่า อีกทั้งผืนหนังยังมีขนาดเล็กและมีลวดลายน้อยกว่าด้วย ส่วนหนังบริเวณใต้ท้องมีลักษณะค่อนข้างแข็งเนื่องจากมีเกล็ดขนาดใหญ่ หนังยืดขยายได้ไม่มากและสามารถยืดออกได้ในแนวเดียว จึงเหมาะกับการผลิตเครื่องหนังที่ต้องการการคงรูปร่างและความแข็งแรง เช่น ทำกระเป๋าถนบัตร ฐานกระเป๋าถือ และพื้นผิวเครื่องเรือน เป็นต้น ส่วนหนังข้างลำตัวจะมีลักษณะผสมระหว่างที่หลังและใต้ท้องคือส่วนบนจะคล้ายกับบริเวณหลัง แต่ส่วนล่างจะมีเกล็ดแข็งเหมือนใต้ท้อง จึงเหมาะสำหรับการนำมาตัดต่อลายบริเวณขอบหรือสันกระเป๋า เป็นต้น ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลสำหรับพัฒนากระบวนการผลิตหนังฟอกจากตัวเงินตัวทองโดยเฉพาะการเพิ่มความระมัดระวังในการดึงหนังแต่ละบริเวณเพื่อไม่ให้เกิดความสูญเสีย และใช้ในคัดเลือกแผ่นหนังแต่ละบริเวณให้เหมาะสมกับการผลิตเครื่องหนังแต่ละประเภทด้วย

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัยสำหรับพัฒนาบัณฑิตศึกษาบางส่วน (ทวพบ.) จากเงินกองทุนพัฒนาคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ รวมถึงขอขอบคุณฟาร์มวารานีส มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน สำหรับความอนุเคราะห์ให้เก็บตัวอย่างผิวหนังจากตัวเงินตัวทองเพื่อการทำงานวิจัยครั้งนี้



## REFERENCES

- Alibardi, L., 2000. Ultrastructural localization of alpha-keratins in the regenerating epidermis of the lizard *Podarcis muralis* during formation of the shedding layer. *Tissue Cell.* 32, 153-162.
- Alibardi, L., Maurizii, M.G., Taddei, C., 2000. Immunocytochemical and electrophoretic distribution of cytokeratins in the regenerating epidermis of the lizard *Podarcis muralis*. *J. Morphol.* 246, 179-191.
- Alibardi, L., Toni, M., 2006. Cytochemical biochemical and molecular aspects of the process of keratinization in the epidermis of reptilian scales. *Prog. Histochem. Cytoc.* 40, 73-134.
- Alibardi, L., Gill, B.J., 2007. Epidermal differentiation in embryos of the tuatara *Sphenodon punctatus* (*Reptilia Sphenodontidae*) in comparison with the epidermis of other reptiles. *J. Anat.* 211, 92-103.
- Alibardi, L., 2012. Immunolocalization of keratin-associated beta-proteins (beta-keratins) in the regenerating lizard epidermis indicates a new process for the differentiation of the epidermis in Lepidosaurians. *J. Morphol.* 273, 1272-1279.
- Alibardi, L., Segalla, A., Dalla Valle, L., 2012. Distribution of specific keratin-associated beta-proteins (beta-keratins) in the epidermis of the lizard *Anolis carolinensis* helps to clarify the process of cornification in Lepidosaurians. *J. Exp. Zool.* 318B, 388-403.
- Alibardi, L., 2013. Immunolocalization of alpha-keratins and associated beta-proteins in lizard epidermis shows that acidic keratins mix with basic keratin-associated beta-proteins. *Protoplasma.* 251, 827-837.
- Bar-On, B., Wagner, H.D., 2012. Elastic modulus of hard tissues. *J. Biomech.* 45, 672-678.
- CITES Secretariat, 2014. Index of CITES Species. International Environment House, Geneva, pp. 413.
- Close, M., Cundall, D., 2014. Snake lower jaw skin: extension and recovery of a hyperextensible keratinized integument. *J. Exp. Zool.* 321, 78-97.
- Gu, L.H., Coulombe, P.A., 2007. Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 13-23.
- Guthold, M., Liu, W., Sparks, E.A., Jawerth, L.M., Peng, L., Falvo, M., Superfine, R., Hantgan, R.R., Lord, S.T., 2007. A comparison of the mechanical and structural properties of fibrin fibers with other protein fibers. *Cell Biochem. Biophys.* 49, 165-181.
- Klein, M-C.G., Deuschle, J.K., Gorb, S.N., 2010. Material properties of the skin of the Kenyan sand boa *Gongylophis colubrinus* (Squamata, Boidae). *J. Comp. Physiol. A.* 196, 659-668.
- Klein, M-C.G., Gorb, S.N., 2012. Epidermis architecture and material properties of the skin of four snake species. *J. R. Soc. Interface.* 9, 3140-3155.
- Lima, K.M.M.E., Costa Júnior, J.F.S., Pereira, W.C.A., Oliveira, L.F., 2018. Assessment of the mechanical properties of the muscle-tendon unit by supersonic shear wave imaging elastography: a review. *Ultrasonography.* 37, 3-15.
- Maderson, P.A.P., 1965. The embryonic development of the squamate integument. *Acta Zool. Bulgar.* 46, 275-295.

- Mitchell, M.A. 2006. Therapeutics. In: Mader, D.R. Reptile medicine and surgery. Elsevier Inc., Missouri, pp 631-664.
- Monteiro-Riviere, N.A., 2006. Integument. In: Eurell, J.A., Frappier, B.L. (Eds.). Text book of veterinary histology, Blackwell Publishing, Iowa, pp 320-349.
- Office of Industrial Economics, 2011. Fundamental knowledge in shoes and leather industries. Wongasawang Publishing and Printing, Bangkok. (in Thai)
- Office of Industrial Economics, 2017. Industrial economic situation report in 2017 and trends in 2018. Ministry of Industry, Bangkok, (in Thai)
- Paterson, S., 2006. Skin diseases of exotic pets. Blackwell Publishing. Oxford, pp 75-80.
- Pough, H.F., Andrew, R.M., Cadle, J.E., Crump, M.L., Savitzky, A.H., Wells, K.D., 2004. Herpetology, systematics and diversity of extant reptiles, Pearson Education, Inc. New Jersey, pp 116-120.
- Romeratanaphan, S., 2002. Animal tissue technique. Kasetsart University Press, Bangkok. (in Thai)
- Sanggaard, K.W., Danielsen, C.C., Wogensen, L., Vinding, M.S., Rydtoft, L.M., Mortensen, M.B., Karring, H., Nielsen, N.C., Wang, T., Thogersen, I.B., Enghild, J.J., 2012. Unique structural features facilitate lizard tail autotomy. Plos one. 7, 1-8.
- Schumacher, J., Mans, C. 2014. Anesthesia. In: Mader, D.R., Divers, S.J. (Eds.). Current therapy in reptile medicine & surgery, Elsevier Inc., Missouri, pp 134-153.
- Sokolov, I., Dokukin, M.E., Guz, N.V., 2013. Method for quantitative measurements of the elastic modulus of biological cells in AFM indentation experiments. Methods. 60, 202-213.
- Tienprateep, T., 2012. Type and leather characteristic. In : Tienprateep, T., The leather bag products, Mitrampun Graphic, Bangkok, pp. 37-47. (in Thai)
- Yang, W., Chen, I.H., Gludovatz, B., Zimmermann, E.A., Ritchie, R.O., Meyers, M.A., 2013. Natural flexible dermal armor. Adv. Mater. A. 25, 31-48.
- aZhang, R.X., Gong, J.S., Zhang, D.D., Su, C., Hou, Y.S., Li, H., Shi, J.S., Xu, Z.H., 2016. A metallo-keratinase from a newly isolated *Acinetobacter* sp. R-1 with low collagenase activity and its biotechnological application potential in leather industry. Bioprocess Biosyst. Eng. 39, 193-204.
- bZhang, R.X., Gong, J.S., Su, C., Zhang, D.D., Tian, H., Dou, W.F., Li, H., Shi, J.S., Xu, Z.H., 2016. Biochemical characterization of a novel surfactant-stable serine keratinase with no collagenase activity from *Brevibacillus parabrevis* CGMCC 10798. Int. J. Biol. Macromol. 93, 843-851.

---

**How to cite this article;**

Duangmanee Boonchuay, Sirirak Chantakru, Sirin Theerawatanasirikul and Urai Pongchairerk. The anatomical study of water monitor (*Varanus salvator*) skin to apply for leather-work production. Veterinary Integrative Sciences. 2018; 16(2): 53-68.

---



**Vet Integr Sci**  
**Veterinary Integrative Sciences**

ISSN: 2629-9968 (online)

Website: www.vet.cmu.ac.th/cmvi

**Research article**

## Detection for potentially zoonotic gastrointestinal parasites in long-tailed macaques, dogs and cattle at Kosamphi forest park, Maha Sarakham

Natapol Pumipuntu\*

*One Health Research Unit, Faculty of Veterinary Sciences, Mahasarakham University, Muang, Maha Sarakham, 44000 Thailand***Abstract**

Gastrointestinal parasites are the most important and common infectious agents of human and animals worldwide especially in tropical areas. Humans can be infected with the parasites as zoonoses by shedding their infective stage and eggs via feces of animal reservoirs resulting in environmental contamination of food and water. In Maha Sarakham, Kosamphi forest park is an interesting area which has close interaction and coexistence between wildlife, domestic animals and humans where it is possible to transmit some zoonotic pathogens including gastrointestinal parasites among them. This study was conducted to investigate the occurrence of gastrointestinal parasites present in feces of long-tailed macaques, dogs and cattle shed on the environment in and around Kosamphi forest park. A total of 134 fecal samples collected from 3 animal species were processed to detect helminth eggs using the formalin-ethyl acetate technique. Three species of parasitic helminthes including *Strongyloides* spp., *Trichuris* spp. and hookworm's eggs have been detected and assessed for their prevalence. *Strongyloides* spp., were the most common zoonotic parasite found in monkeys and cattle (52.24% and 45.71%) followed by hookworms (26.87% and 34.29%) while hookworms were the most common zoonotic parasite in dogs (31.25%) followed by *Strongyloides* spp. (25%). This study provides baseline information on potentially zoonotic gastrointestinal parasites in animal reservoirs at Kosamphi forest park and emphasizes the importance of both wildlife and domestic animals as reservoir hosts for zoonotic disease. A One Health Approach is necessary for prevention and control.

**Keywords:** Gastrointestinal parasite, Prevalence, Zoonosis, Kosamphi forest park, Reservoir

\*Corresponding author: Natapol Pumipuntu, One Health Research Unit, Faculty of Veterinary Sciences, Mahasarakham University, Nakhon Sawan road, Talad sub-district, Muang, Maha Sarakham 44000, Thailand Tel: 0898621950, Fax: 043712832 E-mail: film.natapol@gmail.com, natapol.p@msu.ac.th

*Article history:* received: 6 February 2018, accepted: 15 March 2018, published online: 5 April 2018

*Academic editor:* Korakot Nganvongpanit

## INTRODUCTION

Gastrointestinal parasites are the most common infectious agents of human and animals including livestock, companion animals and also wildlife predominantly in rural areas in Southeast Asia (Odermatt et al., 2010). Many gastrointestinal (GI) parasites including *Trichuris* spp., *Strongyloides* spp., *Ascaris* spp., *Schistosoma* spp. and hookworms often infect both humans and animals. Infection by these GI parasites can cause sub clinical symptoms to clinical symptoms of long duration with abdominal pain, diarrhea, dysentery and weight loss (Hechenbleikner and McQuade, 2015). Most of them have been reported to be zoonotic agents which have the ability to transmit between humans, livestock, companion animals and wildlife especially in their larval stage of infection (Lavikainen, 2010). Domestic animals and wildlife play crucial roles as reservoirs that maintain zoonotic parasites under natural conditions from which humans can become infected (Youssef and Uga, 2014). Animal reservoirs often shed zoonotic parasites as oocysts, eggs and larvae in their feces into the environment. Humans are infected with the GI parasites by ingestion of contaminated water and food which contain oocysts or eggs as food or water-borne pathogens. In addition, direct transmission can occur by contact with feces of reservoir animals that contain larval infective stages of the parasites (Ayinmode et al., 2016). This neglected zoonotic transmission of parasites between animals and humans is the major concern for One Health problem worldwide (Thompson, 2013).

In Thailand, long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) occur widely including at Kosamphi Forest Park in Maha Sarakham, in the northeast of the country. A One Health problem is emerging because of increases in their population, habitat loss from urbanization and reduction of natural food sources (Malaivijitnond and Hamada, 2008). This is resulting in increased interaction and conflict between humans in the community around the forest park and the long-tailed macaques. The monkeys often invade houses, schools, temples and markets near the park for foraging and inhabiting, so that, they have a potential to shed zoonotic pathogens such as those parasites from their feces or excreta to humans via contaminated foodstuffs and drinking water. Moreover, the presence of domestic animals such as dogs and cattle around and inside the forest park areas suggests that it might be possible for them to acquire disease from the monkeys. Therefore, both domestic animals and wildlife seem to be potentially zoonotic reservoirs and spillover hosts which should be included as essential components of monitoring and surveillance programs.

This study was designed to investigate the occurrence of gastrointestinal parasites presented in animal reservoirs; long-tailed macaques, dogs and cattle feces shed on the shared environment at Kosamphi forest park in Maha Sarakham, Northeast Thailand. The study will provide useful provide baseline data on fecal parasites in those reservoirs which potentially cause zoonotic diseases to human including tourists, researchers, park staffs and people who live close to this area. The results will be beneficial for further developing suitable one health strategies to prevent and control zoonotic diseases.

## MATERIALS and METHODS

The sample collection was performed without disturbing or contact with the animals. Fresh stool (feces) samples were collected, using gloves from 67 long-tailed macaques, 32 dogs and 35 cattle in Kosamphi Forest Park, Kosum Phisai district, Maha Sarakham, Northeast Thailand at N16° 15' 12.6" E103° 04' 02.0" (Figure 1) and selected locations close and around the park during November, 2015 to April, 2016. All feces samples were collected in labelled plastic universal bottles and rapidly transported to the laboratory where they were preserved in 10% formalin.

Fecal material was processed for detecting the presence of GI nematode eggs by formalin-ethyl acetate procedure and the identification of parasitic eggs was carried out by microscopic examination (Gracia, 2011). Different diagnostic procedure for detection of *Strongyloides stercoralis* larvae was done by fresh stool examination under a microscope. Results were recorded in Windows Excel (Microsoft, USA). The occurrence of GI parasitic eggs which referred to infected animals was used to calculate an occurrence using the descriptive statistics on MS Excel version 2013 (Microsoft, USA).

All data were represented as means  $\pm$  standard errors (SE). Data were statistically evaluated by a one-way analysis of variance. Significant difference ( $p \leq 0.05$ ) among the groups was analyzed by Duncan's multiple range tests. All experiments were repeated 3 times, each with 5 replicates of the designed concentration.



**Figure 1** Geographical location of sampling points; Kosamphi forest park in Kosum Phisai district, Maha Sarakham province, Northeast Thailand (from Google Earth). Yellow line: a forest park area (a habitat of long-tailed macaques), blue line: urban and rural areas (habitats of dogs and cattle)

## RESULTS

Out of total 134 fecal samples collected from long-tailed macaques, dogs and cattle, parasitic eggs were identified in 79 (58.96%) indicating the prevalence of parasitic infection. Gastrointestinal parasite eggs were found in 42 out of 67 long-tailed macaque samples (62.69%), 14 out of 32 dog samples (43.69%) and 23 out of 35 cattle samples (65.71%). Three species of parasitic helminthes including *Strongyloides* spp., *Trichuris* spp. and hookworm's eggs which have been reported to be potentially zoonotic helminthes were identified in all three animal species as indicated in Table 1. Among the positive samples, multiple parasitic infections (infection with more than one species of parasite) were found in most long-tailed macaques, dogs and cattle (68.66%, 56.25% and 57.14%, respectively). In addition, the study revealed the highest prevalence of *Strongyloides* spp. infection was in long-tailed macaques and cattle, while, hookworm infection had the highest prevalence in dogs. However, *Trichuris* spp. was the least prevalent of GI parasitic infections in all animal species. Besides, 12 feces samples (17.91%) from long-tailed macaques were found with rhabditiform larvae of *Strongyloides stercoralis* as shown in Figure 2. Overall prevalence of parasitic infection and the prevalence of each parasite species in each animal reservoirs are also showed in Table 1.

**Table 1** Prevalence of gastrointestinal parasite eggs in feces of animal reservoirs in Kosamphi Forest Park, Maha Sarakham, Thailand.

Animal species (No. examined)	Species of parasite eggs identified	Number of positive (Prevalence %)
<b>Long-tailed macaques</b> (67 samples)	<i>Strongyloides</i> spp.	35 (52.24)
	<i>Trichuris</i> spp.	9 (13.43)
	Hookworms	18 (26.87)
	<b>Total</b>	42 (62.69)
<b>Dogs</b> (32 samples)	<i>Strongyloides</i> spp.	8 (25.00)
	<i>Trichuris</i> spp.	3 (9.38)
	Hookworms	10 (31.25)
	<b>Total</b>	14 (43.69)
<b>Cattle</b> (35 samples)	<i>Strongyloides</i> spp.	16 (45.71)
	<i>Trichuris</i> spp.	7 (20.00)
	Hookworms	12 (34.29)
	<b>Total</b>	23 (65.71)
<b>Total 134 samples</b>		



**Figure 2** Rhabditiform larvae of *Strongyloides stercoralis* in the feces sample of long-tailed macaques under 10X under microscope.

## DISCUSSION

There is concern about the prevalence of gastrointestinal helminthes infection in many animal reservoirs. This study highlights and emphasizes the presence of zoonotic potential of these parasites which can transmit infection between animals and humans as well between animal reservoirs such as monkeys, dogs and cattle inhabiting this study area as has been mentioned in many previous reports (Inpankaew et al., 2015; Parmar et al., 2012; Squire et al., 2012). The result clarified the view that all of these parasitic infections (Strongyloidiasis, Trichuriasis and hookworm) are predominant diseases of tropical and humid areas especially in Southeast Asia (Puthiyakunnon et al., 2014; Bethony et al., 2006).

Many previous studies also mentioned a possibility of zoonotic diseases at high risk interfaces between humans and animals especially where humans, domestic animals and wildlife coexist, as is the case at Kosamphi forest park (Malaivijitnond et al, 2006; Klaus et al., 2017). At the present, The potential risk factors which promote the transmission of zoonotic helminthes in the studied area are variables associated with human-wildlife-domestic animals coexistence leading to close interaction among them, an increasing number of monkeys, expanding human populations and urbanization, a behavioral changing from food restriction leads to people community invasion or peri-urban environment, increasing of physical contact to macaques from tourists who attempt to feed them by hand and lack of knowledge in parasitic zoonoses as well as their transmission. Also, severe flooding occur regularly because the forest park is located very close to Chi-river. Therefore, disaster is also a vital factor that affects the problem by decreasing their living space and natural food.

All of these factors can contribute to close relationship (Figure 3) and conflict between human-animal reservoirs and also influence the transmission of zoonotic diseases by increasing the potential risk of zoonotic parasite diseases spreading in ways similar to many previous studies (Priston and McLennan, 2013; Malaivijitnond et al., 2005; Parmar et al., 2012). Therefore, it is important to pursue some further studies on the dynamics between human wildlife and domestic animal species in this area in order to prepare proper preventions and controlling strategies.



**Figure 3** Long-tailed macaques were invading the human community near Kosamphi forest park. Monkeys were invading outdoor cooking areas near the forest park and foraging for food (A, B). Some monkeys lived in a school in front of the forest park (C, D).

Interestingly, this examination found rhabditiform larvae of *Strongyloides stercoralis* in 12 feces samples of long-tailed macaques. They can be passed along with the feces, contaminate soil or water, and live as a free-living parasite in the environment. On the other hand, the rhabditiform larvae can develop to be an infective stage as filariform larvae which is a significant cause of autoinfection within the animal reservoirs. It usually penetrates either the skin of perianal region (external autoinfection) or the intestinal mucosa (internal autoinfection) of the hosts (Toledo et al., 2015). In the case of rhabditiform larvae, this autoinfection provides an opportunity for persistent long-term infection of long-tailed macaques in the forest park. It is crucial that this knowledge be used assessing a chronic strongyloidiasis and fatal *Strongyloides* hyperinfection that affect



animals and also human health in the study area (Kassalik and Mönkemüller, 2011).

The detection of hookworm and whipworm eggs implies the current dynamics and consequences of their infections in domestic animal and wildlife. Hookworms (Ancylostomatidae) are blood-feeding parasitic nematodes that penetrate through the digestive system of mammalian (Popova, 1964). Previous studies mentioned that most hookworms usually parasitize in the small intestine of the host and cause blood loss, inflammation in the mucous membrane, impairing digestion and absorption, secondary bacterial infections. Domestic animals, wildlife and human whom infected with the hookworms will have various significant adverse effects as anemia, poor growth, secondary bacterial infection, tissue damage and also mortality (Seguel et al., 2017). Likewise, Whipworm (*Trichuris* spp.) is known globally as one of the most common soil-transmitted helminth which causes trichuriasis, neglected tropical diseases. The infection can lead to chronic diarrhea, anemia, retarded growth (Stephenson et al., 2000) and also potentially transmit to human as zoonotic trichuriasis which has occasionally been reported such as *Trichuris trichuira* that usually found in human and other non-human primates in many regions around the world (Yao et al., 2018).

This finding revealed the significance of hookworm and whipworm infection which are some of the most common helminth infection in domestic animals and wildlife. In addition, they could be potential important zoonotic pathogens as a previous study (Smout et al., 2013), while, those domestic animals and wildlife play an essential role as maintaining source of zoonotic infections in this area, as well.

## CONCLUSION

This study provides clear evidence that there is a high prevalence of zoonotic GI parasites detected in feces sampled from wildlife (long-tailed macaques) and domestic animals (dogs and cattle) living in or near Kosamphi Forest Park. They seem to be the important reservoir hosts for zoonotic GI parasites found in the study area including *Strongyloides* spp., *Trichuris* spp. and hookworms that spillover among many different animal hosts and contribute a potential risk to health status of humans living near the forest park with regard to be health hazardous to humans as zoonoses. Therefore, it is necessary to plan suitable strategies of prevention and a control program for such parasitic diseases in animal reservoirs. Improvements a sanitation are also required to inhibit transmission of these zoonoses and improved future education to increase risk awareness and knowledge of parasitic zoonoses. An important point is that one health collaboration between veterinarians, physicians, public health staff, forest park staff and also environmental health staff is quite appropriate for better operational approach. However, follow-up studies of GI parasitic prevalence in people living near Kosamphi forest park are needed.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The work was supported by Research Fund (Instructor), Faculty of Veterinary Sciences, Maharakham University. Author thanks Asst. Prof. Dr. Supawadee Piratae, One Health Research Unit, Faculty of Veterinary Sciences, Maharakham University for her valuable advice. Author grateful to Nichanan Wimonsrinarachai for figure management and data assistance. Author would like to thank all the staff at Kosamphi forest park for their assistance at the sampling field. Finally, thank the Department of National Parks Wildlife and Plant Conservation (DNP), Thailand for permission to work in the area.

## REFERENCES

- Ayinmode, A.B., Obebe, O.O., Olayemi, E., 2016. Prevalence of potentially zoonotic gastrointestinal parasites in canine faeces in Ibadan, Nigeria. *Ghana Med J.* 50, 201-206.
- Bethony, J., Brooker, S., Albonico, M., Geiger, SM., Loukas, A., Diemert, D., Hotez, P.J., 2006. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet.* 367, 1521-32.
- Gracia, L., 2011. Examination of Fecal Specimens. In: Garcia, L.S. (Eds.), *Diagnostic medical parasitology.* American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Hechenbleikner, E.M., McQuade, J.A., 2015. Parasitic colitis. *Clinics in Colon and Rectal Surgery.* 28, 79-86.
- Inpankaew, T., Murrell, K.D., Pinyopanuwet, N., Chhoun, C., Khou, K., Sem, T., Sorn, S., Dalsgaard, A., 2015. A survey for potentially zoonotigastrointestinal parasites of dogs and pigs in Cambodia. *Acta Parasitol.* 60, 601-604.
- Kassalik, M., Mönkemüller, K., 2011. Strongyloides stercoralis hyperinfection syndrome and disseminated disease. *Gastroenterol Hepatol.* 7, 766-768.
- Klaus, A., Zimmermann, E., Röper, K.M., Radespiel, U., Nathan, S., Goossens, B., Strube, C., 2017. Co-infection patterns of intestinal parasites in arboreal primates (proboscis monkeys, *Nasalis larvatus*) in Borneo. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 6, 320-329.
- Lavikainen, A., 2010. Human medical view on zoonotic parasites. *Acta Vet Scand.* 52.
- Malaivijitnond, S., Hamada, Y., Varavudhi, P., Takenaka, O., 2005. The current distribution and status of macaques in Thailand. *The National History Journal of Chulalongkorn University.* 1, 35-45.
- Malaivijitnond, S., Chaiyabutr, N., Nontakorn, U., Hamada, Y., 2006. Intestinal nematode parasites of long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) in habiting some tourist attraction sites in Thai-land. Retrieve from: [http://www.vet.chula.ac.th/vet2014/Ebook/ebook/Proceedings 32/proceedings/.P73-78](http://www.vet.chula.ac.th/vet2014/Ebook/ebook/Proceedings%2032/proceedings/.P73-78).
- Malaivijitnond, S., Hamada, Y., 2008. Current situation and status of longtailed macaques (*Macaca fascicularis*) in Thailand. *NHJCU.* 8, 185-204.
- Odermatt, P., Shan, L., Sayasone, S., 2010. Less common parasitic infections in Southeast Asia that can produce outbreaks. *Adv Parasitol.* 72, 409-435.

- Parmar, S.M., Jani, R.G., Mathakiya, R.A., 2012. Study of parasitic infections in non-human primates of Gujarat state, India. *Vet World*. 5, 362-364.
- Popova, T.I., 1964. Strongyloids of animals and man (strongylidae). *Essentials of nematodology*, The USDA and The National Science Foundation, Washington DC. 5, 236.
- Seguel, M., Munoz, F., Navarrete, M.J., Paredes, E., Howerth, E., Gottdenker, N., 2017. Hookworm infection in South American fur seal (*Arctocephalus australis*). *Pups Vet Pathol*. 54, 288-297.
- Smout, F.A., Thompson, R.C.A., Skerratt, L.F., 2013. First report of *Ancylostoma ceylanicum* in wild canids. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2, 173-177.
- Squire, S.A., Amafu-Dey, H., Beyuo, J., 2013. Epidemiology of gastrointestinal parasites of cattle from selected locations in Southern Ghana. *Livestock Res Rural Dev*. 25.
- Stephenson, L.S., Holland, C.V., Cooper, E.S., 2000. The public health significance of *Trichuris trichiura*. *Parasitology*. 121, 73-95.
- Priston, N.E.C., McLennan, M.R., 2013. Managing humans, managing macaques: Human-Macaque conflict in Asia and Africa. In: Radhakrishna S., Huffman M., Sinha A. (eds) *The macaque connection. Developments in primatology: progress and prospects*, vol 43. Springer, New York, NY.
- Puthiyakunnon, S., Boddu, S., Li, Y., Zhou, X., Wang, C., Li, J., Chen, X., 2014. Strongyloidiasis—An insight into its global prevalence and management. *PLoS Negl Trop Dis*. 8, e3018.
- Thompson, R.C., 2013. Parasite zoonoses and wildlife: One Health, spillover and human activity. *Int J Parasitol*. 43, 1079-1088.
- Toledo, R., Muñoz-Antoli, C., Esteban, J.G., 2015. Strongyloidiasis with emphasis on human infections and its different clinical forms. *Adv Parasitol*. 88, 165-241.
- Yao, C., Walkush, J., Shim, D., Cruz, K., Ketzis, J., 2018. Molecular species identification of *Trichuris trichiura* in African green monkey on St. Kitts, West Indies. *Vet Parasitol*. 11, 22-26.
- Youssef, A.I., Uga, S., 2014. Review of parasitic zoonoses in Egypt. *Trop Med Health*. 42, 3-14.

---

#### How to cite this article;

Natapol Pumipuntu. Detection for potentially zoonotic gastrointestinal parasites in long-tailed macaques, dogs and cattle at Kosamphi forest park, Maha Sarakham. *Veterinary Integrative Sciences*. 2018; 16(2): 69-77.

---





Vet Integr Sci

# Veterinary Integrative Sciences

ISSN: 2629-9968 (online)

Website: www.vet.cmu.ac.th/cmvi



## Research article

### Structure of the heart wall and existence of the blood cells in the heart of the dog-faced water snake *Cerberus rynchops* (Schneider, 1799)

Lamai Thongboon<sup>1</sup>, Sinlapachai Senarat<sup>2,\*</sup>, Jes Kettratad<sup>2</sup>, Pisit Poolprasert<sup>3</sup>,  
Sansareeya Wangkulangkul<sup>1</sup>, Wanee Jiraungkoorskul<sup>4</sup>, Ezra Mongkolchaichana<sup>5</sup>,  
Theerakamol Pengsakul<sup>6</sup>, Shuaiqin Huang<sup>7</sup> and Chamnan Para<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90110, Thailand

<sup>2</sup>Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

<sup>3</sup>Program of Biology, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Mueang, Phitsanulok, 65000, Thailand

<sup>4</sup>Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

<sup>5</sup>Institute of Metropolitan Development, Navamindrahiraj University, Rongmuang, Pathumwan, Bangkok, 10330, Thailand

<sup>6</sup>Faculty of Medical Technology, Prince of Songkla University, Songkhla, 90110, Thailand

<sup>7</sup>State Key Laboratory of Cellular Stress Biology, and Parasitology Research Laboratory, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian, China

<sup>8</sup>Department of Western Languages and Linguistics, Faculty of Humanities and Social Sciences, Mahasarakham University, Mahasarakham 44150, Thailand

## Abstract

A plurality of investigations on the heart structure of reptiles has been extensively reported; however, it has yet to conduct studies in *Cerberus rynchops*, the so-called common estuarine water-snake. In this current study, we histologically started to examine the heart wall of the atrium, ventricle chambers, and study the existence of the blood cells in the heart of sexually mature females. The selected samples were those *C. rynchops* from the Paknam Pranburi Estuary in Thailand using accurate histochemical techniques. The results showed that the heart structure of *C. rynchops* consisted of three primary compartments (sinus venosus, atrium, and ventricle). All compartments were surrounded by the heart wall, which was typically classified into three layers (the epicardium, the myocardium, and the endocardium), as likely seen in underlying patterns of reptilian heart. In particular, the myocardium of the ventricle in this snake was the thickest layer of the heart wall. Major components of the cardiac muscle fibers in the myocardium with green/ pinkness colors were associated with Masson's trichrome and Periodic Shift reagent methods, indicating to present various fibers and glycoproteins. Consequently, several blood cells were also detected in different areas. The normal and atretic red blood cells were seen in the cardiac fluid, as referred to the fluid inside the heart sac, whereas the mast cell was also observed in the heart wall especially myocardium.

**Keywords:** Blood cell, Estuarine snake, Heart structure, Histology, Myocardium

\*Corresponding author: Sinlapachai Senarat, Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand  
E-mail: Senarat.S@hotmail.com

Article history: received: 31 January 2018, accepted: 26 March 2018, published online: 5 April 2018

Academic editor: Korakot Nganvongpanit

## INTRODUCTION

Extensive reviews showed that vertebrate heart, including its sac-like structure, is an involuntary striated muscle and is thus considered as an extraordinary organ (Olson 2000; Farrell et al., 1998; Roberts 2012). This organ is involved in supplying the blood pressure and oxygen transport efficiency to all part of the body (Olson 2000; Farrell et al., 1998; Roberts 2012). Regarding the reptilian heart, it is one of the most intriguing groups due to its complex internal structure (Jensen et al., 2014; Jensen et al., 2013). Previous observations underscored that the localization of the heart varied in individual snakes and their species; however, their basic structures are similar. A combination of both anatomy and histological techniques revealed that there had been five or six chambers, including the sinus venosus, the left and right atria, and two or three sub-chambers of the ventricle of the heart. This feature has provided clear evidence in most reptiles such as lizards and snakes (Farrell et al., 1998; Webb et al., 1974; Wyneken, 2009). Due to the unique morphology, the heart structure of the reptile differed from that of mammals (Qayyum, 1972) and fish (Senarat et al., 2016). All of these chambers are enclosed by the heart wall, which is typically classified into three layers (the epicardium, the myocardium, and the endocardium). The immensely important component of the cardiac muscle fibers in the heart wall was that they predominantly regulated to allow for the synchronization of the heartbeat (Farrell et al., 1998; Webb et al., 1974). Furthermore, the cardiac muscular tissue/fiber are also considered to be electrically coupled, referring to pass action potential (depolarization and repolarization) (Perni et al., 2012), which was observed in *Python molurus bivittatus* (Snyder et al., 1999) and *Pantherophis guttatus* (Jensen et al., 2013).

Following the literature reviews, they extensively reported that snake heart structure had been found and present in the terrestrial snakes and sea snakes (Farrell et al., 1998; Burggren, 1987; White, 1968; Jensen et al., 2014). However, little is known about the availability of the estuarine snake. It is not clear to us that what the heart structure of the estuarine snake is, including the dog-faced water snake *Cerberus rynchops*? This species is widely found along the coastal South Asia, Sri Lanka, Bangladesh, Myanmar, the Andaman Islands, Malaysian Peninsulas and Thailand (Murphy, 2010) and is listed on Appendix III of CITES and conservative species (UNEP-WCMC, 2013). Hence, we initiated to examine the structure of the heart wall together with the existence of the blood cells in the heart of *C. rynchops*. Our observation aims to bring about the additional information about the structure of estuarine heart snakes, and we expected that the robust findings of this study will be of benefits and might be of use in the further studies on the cardiac evolution and reptilian lineages.

## MATERIALS and METHODS

### Snake samples and study area

Carcasses of five dead female, *Cerberus rynchops* during adult stage with the snout-vent length  $74.00 \pm 4.06$  cm were generously donated from local fisheries at two stations (N 12°24'15.8"/E 99°58'25.6" 2 and N 12°24'21.6"/E 99°58'37.1") in the Paknam Pranburi Estuary, Thailand.

## Histochemical observations

All samples were dissected, and they were then fixed in Davidson's fixative (about 24 - 36 h) (Dietrich and Krieger, 2009), dehydrated through a series of increasing concentrations of ethanol and infiltrated with liquid paraffin (Paraplast) at 58-60 °C, as previously followed a standard histological technique (Presnell and Schreiber, 1997; Suvarna et al., 2013). To examine the heart wall and composition of blood cells, the heart tissue blocks were to be trimmed, sectioned at 4 µm thickness, and subsequently stained with Masson's trichrome (MT) and periodic acid-schiff (PAS) (Presnell and Schreiber, 1997; Suvarna et al., 2013). Then, they, the heart wall and blood cell composition, were observed and brought to photograph with a light microscope (Leica DM750).

## RESULTS and DISCUSSION

There have been some previous studies on heart histology in the snakes. Unfortunately, the number of these studies was relatively low, and they are discontinuously published (Farrell et al., 1998; Jensen et al., 2014; Jensen et al., 2013; Webb et al., 1974; Wyneken, 2009). Hence, this study was certainly the first study and had thus the most up-to-date information on histological property of the *C. rynchops* heart in Thailand.

### Histology of the heart wall

The heart in *C. rynchops* was located within the pericardium. Normally, it was composed of three basic chambers: the sinus venosus, two atria and the ventricle, as previously seen in *P. molurus bivittatus* (Snyder et al., 1999) and *Pa. guttatus* (Jensen et al., 2013). According to histological techniques, all chambers were enclosed by the heart wall (Figure 1A). A primary observation showed that there are three layers in the heart wall: the epicardium, myocardium and endocardium in longitudinal sections (Figures 1A-1E). Based on observations at high magnification, the characteristics of the epicardium found that it contained a single sub-layer of flattened epithelial cells and a thin layer of the connective tissue (Figure 1C). A good development of the myocardium was the largest layer of the heart wall (Figure 1C). At the high magnification, specialized cardiac muscle containing a great syncytium of anastomosing fiber (cardiomyocytes) was observed (Figures 1E-1F). The structure of cardiomyocytes is considered to play an important role in the bind natriuretic peptides (Cerra et al., 1997) and the anti-freeze mucins (Icardo, 2012). The presence of the endocardium was characterized by a thin layer of loose connective tissue together with epithelial cells (Figures 1C-1F).

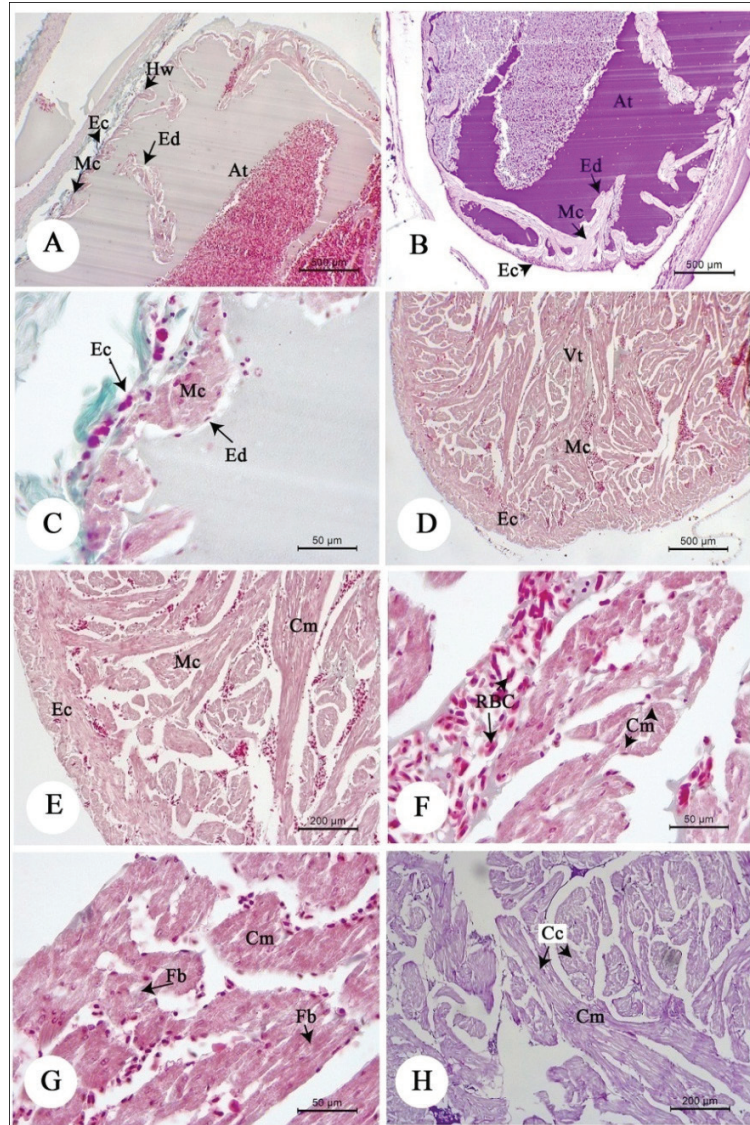
In this study, we were firmly interested in the heart wall of the atrium-ventricle structures due to their largest chambers. The atrium-ventricle structures were similarly known and identified in *P. molurus bivittatus* (Snyder et al., 1999) and *Pa. guttatus* (Jensen et al., 2013). The wall of the left and right atria was similar in structure. A thin layer of the epicardium and endocardium was seen (Figure 1C), and a thicker layer of the myocardium contained the cardiac muscular tissue and fiber (Figure 1C). Additionally, our observation showed that the cardiac muscular tissue and cardiac cell also reacted positively with MT and PAS methods (Figures 1C, 1H), indicating the presence of fiber and glycoprotein.

The roles of the atrium were similar to those of other vertebrates which were involved to support the atrial architecture and blood pump (Icardo, 2012; Snyder et al., 1999). The blood from the fish body entered the atrium via the sinus venosus. Like in some vertebrates, the atrium played a significant role in the contractions for pumping the blood into the ventricle (Icardo, 2012). In the ventricle, the results further showed that its heart wall was thicker than that of the atrium (Figures 1D-1E), as likely reported in higher vertebrates (Jensen et al., 2014; Jensen et al., 2013; Wyneken, 2009) and fish (*Rastrelliger brachysoma* (Senarat et al., 2016). In particular, the thickest layer of cardiomyocytes was observed in the myocardium (Figures 1F-1H). Thus the evidence strongly favored the conclusion that cardiomyocytes had the important roles and involved in supporting the pumping action in some vertebrates (Genten et al., 2008; Roberts 2012). Moreover, a report regarding the function of the cardiac cell concerns to electrically coupled, as suggested to pass action potential (depolarization and repolarization) (Perni et al., 2012).

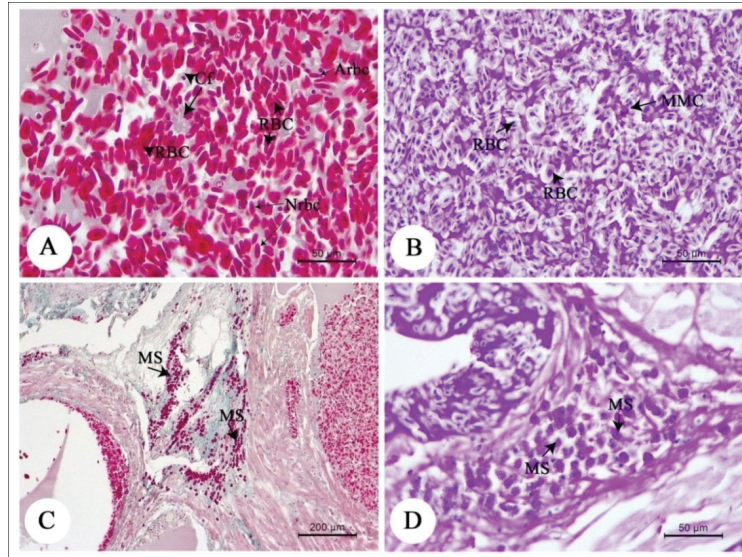
### **The existence of the blood cells in the heart**

The red blood cells were seen in the cardiac fluid (Figure 2A). The size of the mature erythrocyte of *C. chanos* was about 8  $\mu\text{m}$  in diameter and an eclipse shape (Figures 2A-2B). The surface of the normal red blood cell was smooth-shape, whereas the middle of the oval to round nucleus of this cell was shown and surrounded by the red/ pinkness cytoplasm (MT and PAS methods) (Figures 2A-2B). Atretic red blood cells were also observed (Figure 2A). All samples showed that the mast cell (MC) was observed in the heart wall especially myocardium (Figure 2C). Oval-shaped Mc contained the middle nucleus. MC had a distinct feature because of containing the large secretory granules, in which these granules positively reacted to PAS method (Figure 2D). It was possible that their secretory granules deposited of heparin proteoglycan - a weak anticoagulant and histamine, resulting to promote the inflammatory reactions (chronic inflammation and tissue remodeling) (Metz et al., 2007; Galli et al., 2008). Additionally, a few melano-macrophage centers (MMCs) were available in all collected specimens; they were relatively brown color (Figure 2D).





**Figure 1** Light micrograph of the heart wall (Hw) in the atrium-ventricle of the heart in *Cerberus rynchops*. A-C. Structure and histochemistry of the atrium (At) was composed of thin layer of the epicardium (Ec) and endocardium (Ed), whereas thicker layer of the myocardium (Mc) was observed. D-H. Structure and histochemistry of the ventricle (Vt) was showed consisting of three layers (epicardium (Ec), myocardium (Mc) and a thick endocardium (Ed) that the MC was thicker than that of the atrium. Note: Cc = cardiac cell, Cm = cardiac muscle, Fb = fibers, RBC = red blood cell. Note: A, C-G = Masson's trichrome (MT) and B, H = periodic acid-Schiff (PAS).



**Figure 2** Light micrograph of red blood cells (RBC) and mast cell (MS) in *Cerberus rynchops*. A. Both normal (Nrbc) and atretic (Arbc) red blood cell and melano-macrophage centers (MMC) were found in the cardiac fluid (Cf). C-D. Several mast cells (MS) were detected in the heart wall. Note: A, C = Masson's trichrome (MT) and B, D = periodic acid-Schiff (PAS).

The presence of this phenomenon could have a link with phagocytosis of the parasites because this reaction was the basic response to an infection which suggested host immune responses and chronic inflammatory lesions (Agius and Roberts, 2003). Consequently, we assumed that the presence of MC and MMCs in *C. rynchops* could be of help in the future regarding the responses to the parasite infections, as previously supported by Alvarez-Pellitero et al. (2007) and Sitja-Bobadilla (2008). Prior to the year 2008, there has been little known about the benefits of MC and MMC; they might lead to the answers of a potential health risk, which needs to be investigated in further studies.

## CONCLUSION

The present study showed that the heart structure of *C. rynchops* was typically composed of the sinus venosus, atrium, and ventricle. Three layers including the epicardium, the myocardium and the endocardium of the heart wall were observed. Strikingly interesting, major components of the cardiac muscle (or heart muscle) with consisting of the cardiac muscle cells, or fibers in the myocardium were recorded. Several blood cells were also detected with different areas. The red blood cells, the mast cell and a few melano-macrophage centers were observed in the heart. Although this was a characterization of the heart structure in the estuarine snake, as similar to other reptiles, our observation would be applied to further study, such as ultrastructure and physiology as well as reptilian lineages.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We specially thank the members of the Microtechnique laboratory, Department of Biology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Thailand for their technical support in laboratory.

## REFERENCES

- Alvarez-Pellitero, P., Palenzuela O., Sitjà-Bobadilla A. 2007. Histopathology and cellular response in *Enteromyxum leei* (Myxozoa) infections of *Diplodus puntazzo* (Teleostei). *Parasitol. Int* 57, 110-120.
- Agius, C., Roberts, R.J. 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J. Fish Dis.* 26, 499–509.
- Burggren, W.W. 1987. Form and function in reptilian circulations. *Am. Zool.* 27, 5–19.
- Cerra, M.C., Canonaco, M., Acierno, R., Tota, B. 1997. Different binding activities of A- and B-type natriuretic hormones in the heart of two Antarctic teleosts, the red-blooded *Trematomus bernacchii* and the hemoglobinless *Chionodraco hamatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 118A, 993–999.
- Dietrich, D., Krieger, H.O., 2009. Histological analysis of endocrine disruptive effects in small laboratory fish. Wiley-Interscience, Hoboken, N.J.
- Farrell, A.P., Graperil, A.K., Frances, E.T.B. 1998. Comparative aspects of heart morphology. In: Gans, C., Gaunt, A.S. (Eds.), *Biology of the Reptilia, Visceral organs*. New York: Society for the Study of Amphibians and Reptiles. 19, 375–424.
- Galli, S.J., Tsai M. 2008. Mast cells: Versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defense and homeostasis. *J. Dermatol. Sci.* 49, 7–19.
- Genten, F., Terwinghe, E., Danguy, A., 2008. *Atlas of fish histology*. Science Publishers, Enfield, NH.
- Icardo, J.M. 2012. The teleost heart: A morphological approach. In: Sedmera, D., Wang, T. (Eds.), *Ontogeny and Phylogeny of the Vertebrate Heart* Springer Science, Business Media, LLC, pp. 35–53.
- Jensen, B., Moorman, A.F., Wang, T. 2014. Structure and function of the hearts of lizards and snakes. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 89, 302–336.
- Jensen, B., ven den Berg, G., ven den Doel, R., Wang, T. and Moorman, A.F. 2013. Development of the hearts of lizards and snakes and perspective to cardiac evolution. *Plos One.* 8, e63651.
- Metz, M., Grimbaldston, M.A., Nakae, S., Piliponsky, A.M., Tsai, M., Galli, S.J. 2007. Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. *Immunol. Rev.* 217, 304–328
- Murphy, J. 2010. *Cerberus rynchops*. The IUCN red list of threatened species. Version 2014. 2. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org), 18 September 2016.
- Olson, K.R. 2000. Circulation system. In: Ostrander, G.K. (ed.), *The Laboratory Fish*. 2nd ed, United Kingdom, Academic Press. pp. 369–378.

- Presnell, M.J.K., Schreiber, P.M.P., 1997. Humason's animal tissue techniques, 5th edition. ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Perni, S., Lyer, V.R. Franzini-Armstrong, C. 2012. Ultrastructure of cardiac muscle in reptiles and birds: optimizing and/or reducing the probability of transmission between calcium releases unites. *J Muscle. Res. Cell. Motil.* 33, 145-152.
- Qayyum, M.A. 1972. Anatomy and histology of the specialized tissues of the heart of the domestic cat (*Felis catus*). *Acta. Hictomica.* 82, 352-367.
- Roberts, R.J. (Ed.), 2012. Fish pathology, 4th ed. ed. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex ; Ames, Iowa.
- Senarat, S., Kettretad, J., Jiraungkoorskul, W. 2016. Histological evidence of the heart and ovarian vessels in the short mackerel, *Rastrelliger brachysoma*. *EurAsian J. BioSci.* 10, 13-21.
- Sitja-Bobadilla, A. 2008. Fish immune response to myxozoan parasites. *Parasite*, 15, 420-425.
- Snyder, P.S., Shaw, N.G., Heard, D.J. 1999. Two-dimensional echocardiographic anatomy of the snake heart (*Python molurus bivittatus*). *Vet Radiol. Ultrasound.* 40, 66-72.
- Suvarna, S.K., Layton, C., Bancroft, J.D. (Eds.), 2013. Bancroft's theory and practice of histological techniques, 7th ed. Churchill Livingstone, Oxford.
- UNEP-WCMC. 2013. The Checklist of CITES Species Website. CITES Secretariat, Geneva, Switzerland. Compiled by UNEPWCMC, Cambridge, UK. <http://checklist.cites.org>, 18 September 2016
- Webb, G.J.W., Heatwole, H., de Bavay, J. 1974. Comparative cardiac anatomy of the Reptilia. II. A critique of the literature on the Squamata and Rhynchocephalia. *J. Morphol.* 142, 1-20.
- White, F.N. 1968. Functional anatomy of the heart of reptiles. *Amer. Zool.* 8, 211-219.
- Wyneken, J. 2009. Normal reptile heart morphology and function. *Vet. Clin. North Am. Exo. Anim. Pract.* 12, 51-63.

---

**How to cite this article;**

Lamai Thongboon, Sinlapachai Senarat, Jes Kettratad, Pisit Poolprasert, Sansareeya Wangkulangkul, Wannee Jiraungkoorskul, Ezra Mongkolchaichana, Theerakamol Pengsakul, Shuaiqin Huang and Chamnan Para. Structure of the heart wall and existence of the blood cells in the heart of the dog-faced water snake *Cerberus rynchops* (Schneider, 1799). *Veterinary Integrative Sciences.* 2018; 16(2): 79-86.

---



Vet Integr Sci  
**Veterinary Integrative Sciences**

ISSN: 2629-9968 (online)

Website: www.vet.cmu.ac.th/cmvi

**Research article**

## Histopathology of kidney and liver in the captive broodstock *(Rastrelliger brachysoma)* during its juvenile stage

Sinlapachai Senarat<sup>1,\*</sup>, Jes Kettratad<sup>1</sup>, Sasipong Tiptomrongpong<sup>2</sup>, Theerakamol Pengsakul<sup>3</sup>,  
 Wannee Jiraungkoorskul<sup>4</sup>, Piyakorn Boonyoung<sup>5</sup>, Shuaiqin Huang<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

<sup>2</sup>Samut Songkhram Marine Fisheries Research and Development Station, Department of Fisheries, Samut Songkhram 75000, Thailand

<sup>3</sup>Faculty of Medical Technology, Prince of Songkla University, Songkhla, 90110, Thailand

<sup>4</sup>Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

<sup>5</sup>Department of Anatomy, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90110, Thailand

<sup>6</sup>State Key Laboratory of Cellular Stress Biology, and Parasitology Research Laboratory, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian, China

### Abstract

This is the first study which explained the histopathology in kidney and liver of the captive broodstock (*Rastrelliger brachysoma*) during its juvenile stage, to assess the health status. All fishes (n = 24) with a mean of 5.02±0.87 (SD) cm in total length, were collected during October to December 2013 and processed using standard histological protocols. Conforming to histological observation, kidney and liver parenchyma in this species were clearly altered. The most melanomacrophage center had found to be highly organized in these tissues, whereas a large number of the vacuolar structure in the hepatocyte was shown as an empty space, as also called the hepatocellular lipidosis. All lesions in the abnormal kidney and liver may be related to their reduced functions as well as health status of *R. brachysoma* under captive conditions.

**Keywords:** Captive fish, Histopathology, Kidney, Liver, Short-mackerel

\*Corresponding author: Sinlapachai Senarat, Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand, E-mail: Senarat.S@hotmail.com

**Article history;** received manuscript: 19 March 2018, accepted manuscript: 30 May 2018, published online: 19 June 2018

**Academic editor:** Korakot Nganvongpanit

## INTRODUCTION

Histopathological biomarker is one of the most important tools to reflect the health status and assess environmental effects of fish for long periods (Fatma, 2009; Nikalje et al., 2012). This biomarker has been widely used to investigate and to predict the vital changes of specific tissues and organs (Hinton et al., 2001; Adams, 2002; Dietrich and Krieger, 2009). Among several organs, the kidney and liver tissue in fish is a key organ and very sensitive to the environmental changes (Hinton et al., 2001; Genten et al., 2008). The alteration of kidney and liver structures can hence reflect the fish health and ecosystem as a whole (Hinton et al., 2001; Adams, 2002). Similarly, evidences of the liver/kidney histopathologies of fish have been extensively investigated to evaluate the effects of organic compounds and heavy metals on teleost fish in both wild and captive fishes (Hinton et al., 1992; Senarat et al., 2015a).

The captive broodstock (*Rastrelliger brachysoma*) belongs to Family Scombridae and it is now considered to be the most important fishery resources in Thailand. At the same time, it is noted that this fish has become the endangered/threatened species (Senarat et al., 2017) due to the increase of overfishing and deterioration of its habitat causing a serious decline in its number (Senarat et al., 2015a; 2015b). To solve this problem, the aquacultural development must be developed to produce the *R. brachysoma* and subsequently, its culture project is continuously supervised by the Samut Songkhram Coastal Fisheries Research and Development Center, Samut Sakhon province, Thailand (Senarat, 2015c). Although successful fertilization of the egg and optimum offspring survival have been documented, the developmental rate of *R. brachysoma* during its juvenile stages still decreased for an unknown reason. Comprehensive evaluation of the introduced health status in the fish is here required as primary phase before entering to further studies in other factors. In this study, we assessed the health status of *R. brachysoma* during juvenile stage in captivity, using histopathological biomarker. Surely, our information is vital for the provision of scientific knowledge to health status of *R. brachysoma* juvenile in captivity, implying that can provide an early monitoring in the aquaculture system.

## MATERIALS and METHODS

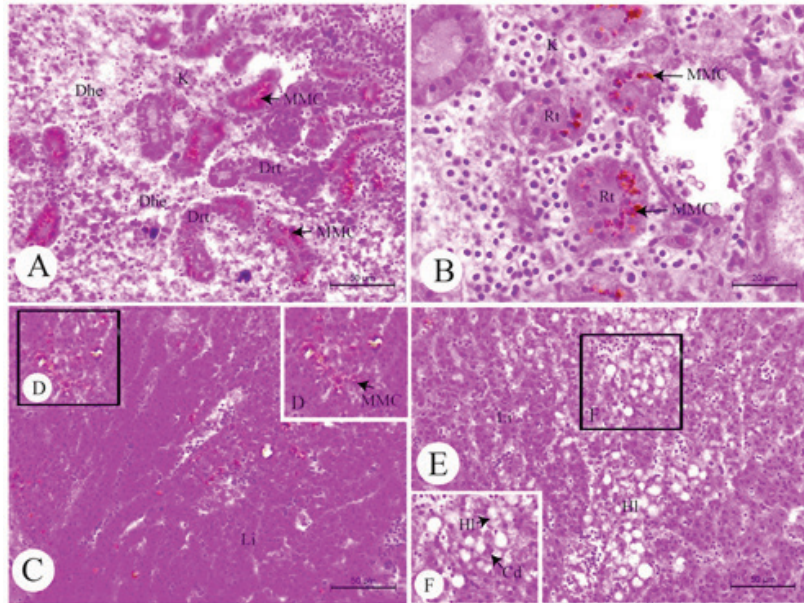
Fixed twenty-four individuals' short mackerel (*R. brachysoma*) during juvenile stages were randomly collected during October to December 2013 and exclusively donated from the Samut Songkhram Marine Fisheries Research and Development Station, Samut Songkhram, Thailand. All fish were reared in a closed recirculating aquaculture system. The fishes with a mean of  $5.02 \pm 0.87$  (SD) cm in total length were maintained in mechanically circulated filtered seawater with constant aeration, a temperature ranging from 26-28°C, a salinity level ranging from 25-30 ppt, and a photoperiod of 12:12 h light-dark. The short mackerel broodstock was fed with fresh squid and polychaetes, and artificial feed twice daily. The whole fish was processed using standard histological protocols (Presnell and Schreiber, 1997). The paraffin blocks were trimmed, sectioned at a thickness of 4 µm and stained with Harris's hematoxylin and eosin (H&E). Histological sections were mounted with Permount and the histopathological lesions were observed and photographed under the light microscope (Leica digital 750 Boston Industries, Inc; USA). The percent prevalence in each lesion was calculated through this experiment.

## RESULTS and DISCUSSION

A few comprehensive data are focused on the histopathological assessment of the juvenile fishes in captivity (Cusack et al., 2001; Miyazaki et al., 2011; Kizhakudan et al., 2015; Gosh et al., 2016). This study is the first to report and to increased information on the important histopathological alterations of the kidney and liver in *R. brachysoma* during juvenile stages (Figures 1A-1F).

The degeneration of renal tubule and disorganization of the hematopoietic tissue was observed and is depicted in Figure 1A. The results revealed the infiltration of the melanomacrophage center (MMC), which had been found to be highly organized in the kidney and liver tissues (n = 20 individual fishes, 83.33% prevalence) (Figures 1A-1D). In an earlier report on *Hypophthalmichthys molitrix* from farming system, the presence of MMCs were identified, suggesting to associate with the disease as well as bacterial infection (Gosh et al., 2016). Similar was reported in the kidney teleosts (Agius, 1979; Agius, 1980; Agius, 1981a) such as *Salmo gairdneri* (Agius, 1981b), *Morone saxatilis* (Harper and Wolf, 2009) and *Sparus aurata* (Meseguer et al., 1994), in *R. brachysoma* liver (Senarat et al., 2015a). Several studies have investigated that the appearance of the MMC is directly concerned with fishes after it is exposed or suffered a more severe type of stress (overcrowding, excessive noise and aggression) and that is supported by previous studies (Agius and Roberts, 2003; Alvarez-Pellitero et al., 2007; Sitja-Bobadilla, 2008). The problems in the aquaculture system (environment contaminants and poor water quality) (Patiño et al., 2003), the inflected-tissue from tuberculosis (Chinabut, 1999), nocardiosis (Chen, 1992) and antibacterial phagocytic capacity (Agius and Roberts, 2003) stimulated the occurrence of the MMC. Reports regarding the detection of the MMC indicated that if the increased MMC was detected, it could be related to a positive stimulation from the infectious diseases throughout the change of environmental quality or stress responses resulting from exposure to toxicants (Wolke, 1992; Marty et al., 2003; van Dyk et al., 2010). It could be hence mentioned that insights of the influence of microbial organisms, identification of diagnose parasitic diseases and water quality in a culture system of *R. brachysoma* are still required in further work.

The incidence of the intracytoplasmic vacuoles in the liver, also called “hepatocellular lipidosis” was recognized in *R. brachysoma* juvenile (n = 10 individual fishes, 41.66% prevalence) (Figures 1E-1F). The above-described results indicated that we observed liver pathology in this fish and, to the best of our knowledge, this is the first report. Major degenerative changes including hepatocellular lipidosis and cellular degeneration were recorded (Figure 1F), which were probably related to liver damage, as similarly suggested by Greenfield et al. (2008). Hinton and Laurén (1990) speculated that a derangement in lipid and protein metabolism (lipidosis) is related to abnormal accumulating triglycerides in hepatocytes. Moreover, malnourishment may also raise fat mobilization and impair apoprotein synthesis. In actual fact, the occurrence of the hepatocellular lipidosis was associated with exposure to chlorinated hydrocarbons and other contaminants (Hendricks et al., 1984; Hinton et al., 1992; Robertson and Bradley 1992; Schrank et al., 1997), including polychlorinated biphenyls (Teh et al., 1997; Anderson et al., 2003). Therefore, it is possible that *R. brachysoma* juvenile might be contaminated by the pollutants as mentioned above (Hinton and Laurén 1990). However, several factors involving hepatic effects have been reported to cause high mortality rate in fishes in captivity. It might be caused by ageing, nutritional value and other environmental conditions (Hinton et al., 1992; Robertson and Bradley, 1992).



**Figure 1** Light photomicrograph of histopathological lesions in the kidney (A-B) and liver (C-F) of *Rastrelliger brachysoma* during juvenile stage. A: The degeneration of renal tubule (Drt) and disorganization of the hematopoietic tissue (Dhe) in the kidney (K) were observed. A-D: Several melanomacrophage centers (MMCs) were widely distributed in the kidney (K) and liver (Li). E-F: The hepatocellular lipidosis (HI) and cellular degeneration (Cd) appeared in the liver. Note: Rt = renal tubule.

## CONCLUSION

For the current data, we did not have any robust information to support the cause of kidney and liver histopathology of this fish; however, it is plausible to conclude that all histopathological observations including MMC and hepatocellular lipidosis might provide more information on the total loss of the function of both organs. Our observation could be helpful to imply histopathological changes in liver and kidney may be an early event from culture system, suggesting that this situation may be related a decreased growth rate and a reduced health of *R. brachysoma* during juvenile stage. To fulfill other information regarding the histopathological effects, a part of our results could also be incorporated into quality monitoring in the aquaculture system.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant to SS from The 100<sup>th</sup> Anniversary Chulalongkorn University Fund for Doctoral Scholarship. Many thanks to all staffs of the members of the Aquatic Toxicology, Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University for their help in the laboratory. We also specially thank Dr. Anna Chatthong for critically reading the manuscript.



## REFERENCES

- Adams, S.M. 2002. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. American Fisheries Society: Maryland, 104-112.
- Agius, C. 1979. The role of melano-macrophage centres in iron storage in American Fisheries Society: Maryland, 104-112.
- Agius, C. 1980. Phylogenetic development of melano-macrophage centres in fish. *J. Zoo.*, 191, 11-31.
- Agius, C. 1981a. Preliminary studies on the ontogeny of the melanomacrophages of teleost haemopoietic tissues and age-related changes. *Dev. Comp. Immunol.*, 5, 5597-5606.
- Agius, C. 1981b. The effects of splenectomy and subsequent starvation on the storage of haemosiderin by the melano-macrophages of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* 18, 41-44.
- Agius, C., Roberts, R.J. 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J. Fish Dis.* 26, 499-509.
- Alvarez-Pellitero, P., Palenzuela, O., Sitjà-Bobadilla, A. 2007. Histopathology and cellular response in *Enteromyxum leei* (Myxozoa) infections of *Diplodus puntazzo* (Teleostei). *Parasitol. Int.* 57, 110-120.
- Anderson, M.J., Cacula, D., Beltman, D., Teh, S.J., Okihiro, M.S., Hinton, D.E., Denslow, N., Zelikoff, J.T. 2003. Biochemical and toxicopathic biomarkers assessed in smallmouth bass recovered from a polychlorinated biphenyl-contaminated river. *Biomarkers.* 8, 371- 393.
- Chen, S.C. 1992. Study on the pathogenicity of *Nocardia asteroides* to the Formosa snakehead, *Channa maculate* (Lacepede), and the largemouth bass, *Micropterus salmoides* (Lacepede). *J. Fish Dis.* 15, 47-53.
- Chinabut, S. 1999. Mycobacteriosis and nocardiosis. In: Bruno, K., Bruno, D. W., (Eds), *Fish Diseases and Disorders*. Woo, P. T. CAB International: Wallingford. 319-340.
- Cusack, R.R., Groman, D.B., MacKinnon, A., Kibenge, F.S.B., Wadowska, D. and Brown, N. 2001. Pathology associated with an aquareovirus in captive juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* and an experimental treatment strategy for a concurrent bacterial infection. *Dis. Aquat. Org.* 44, 7-16.
- Dietrich, D.R., Krieger, H.O. 2009. *Histological analysis of endocrine disruptive effects in small laboratory fish*. John Wiley and Sons: New Jersey.
- Fatma, A.S.M. 2009. Histopathological studies on *Tilapia zillii* and *Solea vulgaris* from Lake Qarun, Egypt. *World J. Fish Marine Sci.* 1, 29-39.
- Genten, F., Terwinghe, E., Danguy, A. 2008. *Atlas of fish histology*. Science Publishers, Enfield.
- Gosh, K., Ahmed, G.U. and Akter, M.N. 2016. Investigation on changing pattern of health status of juvenile *Hypophthalmichthys molitrix* from farming systems in Bangladesh. *J. Fisheries.* 4, 420-427.
- Greenfield, B.K., Teh, S.J., Ross, J.R., Hunt, J., Zhang, G., Davis, J.A., Ichikawa, G., Crane, D., Hung, S.S., Deng, D., The, F.C., Green, P.G. 2008. Contaminant concentrations and histopathological effects in *Sacramento splittail* (*Pogonichthys macrolepidotus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 270-281.

- Harper, C., Wolf, J.C. 2009. Morphologic effects of the stress response in fish. *ILAR J.* 50, 387-396.
- Hendricks, J.D., Meyers, T.R., Shelton, D.W. 1984. Histological progression of hepatic neoplasia in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 65, 321-336.
- Hinton, D.E., Laurén, D.J. 1990. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. In: Mc Carthy, J.F., Shugart, L.R. (Eds.), *Biomarkers of environmental contamination*. Lewis, Boca Raton, FL, 17-57.
- Hinton, D.E., Baumann, P.C., Gardner, G.R., Hawkins, W.E., Hendricks, J.D., Murchelano, R.A., Okihira, M.S. 1992. Histopathologic biomarkers. *Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. Biomarkers, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 155-209.
- Hinton, D.E., Segner, H., Braunbeck, T. 2001. Toxic responses of the liver. In: Schlenk, D., and Benson, W.H. (Eds.), *Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts*. Taylor and Francis, London, 224-268.
- Kizhakudan, J.K., Praveena, P.E., Maran, V., Otta, S.K., Bhuvanewari, T., Rajan., Krishnamoorthi, S. & Jithengran, K.P. 2015. Investigation on the mortality of juveniles in captive stock of the Indian halibut *Psettodes erumei*. *Indian J Geo-Marine Sci.* 44, 1217-1223.
- Marty, G.D., Hoffmann, A., Okihira, M.S., Hepler, K., Hanes, D. 2003. Retrospective analyses: Bile hydrocarbons and histopathology of demersal rockfish in Prince William sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. *Mar. Environ. Res.* 56, 569-584.
- Meseguer, J., Lopez-Ruiz, A., Esteban, M.A. 1994. Melano-macrophages of the seawater teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function. *Cell Tissue Res.* 277, 1-10.
- Miyazaki, T., Fujiwara, K., Kobara, J., Matsumoto, N., Abe, M. Nagano, T. 2011. Histopathology associated with two viral diseases of larval and juvenile fishes: epidermal necrosis of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* and epithelial necrosis of black sea bream *Acanthopagrus schlegeli*. *J. Aquat. Anim. Health.* 1, 85-93.
- Nikalje, S.B., Muley, D.V., Angadi, S.M. 2012. Histopathological changes in gills of a freshwater major carp, *Labeo rohita* after acute and chronic exposure to textile mill effluent (tme). *Int. J. Environ. Sci.* 3, 108-118.
- Patiño R., Goodbred, S., Draugelis-Dale, R., Barry, C., Foott, J., Wainscott, M. 2003. Morphometric and histopathological parameters of gonadal development in adult common carp from contaminated and reference sites in Lake Mead, Nevada. *J. Aquat Anim Health.* 15, 55-68.
- Presnell, J.K., Schreiber, M.P. 1997. *Humason's Animal Tissue Techniques*. 5th ed. Johns Hopkins University Press: Baltimore.
- Robertson, J.C., Bradley, T.M. 1992. Liver ultrastructure of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Morphol.* 211, 41-54.
- Schrank, C.S., Cormier, S.M., Blazer, V.S. 1997. Contaminant exposure, biochemical, and histopathological biomarkers in white suckers from contaminated and reference sites in the Sheboygan River, Wisconsin. *J. Great Lakes Res.* 23, 119-130.

- Senarat, S., Kettratad, J., Poolprasert, P., Boonyoung, P., Kangwanrangsan, N., Jiraungkoorskul, W. 2015a. Hepatic histopathology in *Rastrelliger brachysoma* (Bleeker, 1851) from The Upper Gulf of Thailand. Proceeding in APCEAS: Osaka. 369-374.
- Senarat, S., Kettretad, J., Jiraungkoorskul, W. 2015b. Morpho-histology of the reproductive duct in short mackerel *Rastrelliger brachysoma* (Bleeker, 1865). Adv. Environ. Biol. 9, 210-215.
- Senarat, S. 2015c. Structure and alteration of gonadotropin releasing hormone – 1 peptidergic neuronal system during breeding season of short mackerel, *Rastrelliger brachysoma* (Bleeker, 1851) from Sumut Sonkhram Province. Dissertation, Chulalongkorn University.
- Senarat, S., Kettretad, J., Jiraungkoorskul, W. 2017. Ovarian histology and reproductive health of short mackerel, *Rastrelliger brachysoma* (Bleeker, 1851), as threatened marine fish in Thailand. Songklanakarin J. Sci. Technol. 39, 225-235.
- Sitja-Bobadilla, A. 2008. Fish immune response to myxozoan parasites. Parasite. 15, 420- 425.
- Teh, S.J., Adams, S.M., Hinton, D.E. 1997. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. Aquat. Toxicol. 37, 51-70.
- van Dyk, J.C., Marchanda, M.J., Smita, N.J., Pietersea, G.M. 2010. A histology-based fish health assessment of four commercially and ecologically important species from the Okavango Delta panhandle, Botswana. Afr. J. Aquat Sci. 34, 273–282.
- Wolke, R.E. 1992. Piscine macrophage aggregates: A review. Ann. Rev. Fish Dis. 2, 91-108.

---

**How to cite this article;**

Sinlapachai Senarat, Jes Kettratad, Sasipong Tipdomrongpong, Theerakamol Pengsakul, Wannee Jiraungkoorskul, Piyakorn Boonyoung, Shuaiqin Huang. Histopathology of kidney and liver in the captive broodstock (*Rastrelliger brachysoma*) during its juvenile stage. Veterinary Integrative Sciences. 2018; 16(2): 87-93.

---





Vet Integr Sci  
**Veterinary Integrative Sciences**

ISSN: 2629-9968 (online)

Website: www.vet.cmu.ac.th/cmvi

**Research article**

## The effect of Curcumin on growth performance, blood biochemistry and antioxidant activities in boiler chickens

Charinya Pimson<sup>\*1</sup>, Phornnipa Bakban<sup>1</sup>, Sunadda Suwanrat<sup>1</sup> and Natedara Chanutsa<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of animal health science, Faculty of Agro industrial technology, Kalasin University, Kalasin 46000, Thailand

<sup>2</sup> Department of science and mathematics, Faculty of Agro industrial technology, Kalasin University, Kalasin 46000, Thailand

### Abstract

The antioxidant effects of Curcumin that extracted from *Curcuma longa* not only reduce free radical but also improve growth performances in broilers. A study was conducted to investigate the effects of Curcumin on blood biochemistry parameters and antioxidant status of broilers exposed to varies of raising systems. The 180 boilers were randomly assigned into 6 categories compose of 3 raising systems; semi-intensive and stocking densities of 10 and 16 birds/m<sup>2</sup> in each group fed with control diet mixed with and without 10% Curcumin. The result show that the activities of antioxidant systems, lipid peroxidation were gradually increased in highest stocking density (16 birds/m<sup>2</sup>). However, the level of lipid peroxidation was reduced while, catalase and superoxide dismutase activities were significantly increased in blood chickens as also the growth performances and blood biochemistry that improved after fed with 10% Curcumin. This finding indicates that Curcumin has potentiated to reducing the oxidative stress, activated antioxidant enzyme activities and improve the growth performance of broilers raised under stress condition.

**Keywords:** : Antioxidant, Boilers, Curcumin, High stocking density

**\*Corresponding author:** Charinya Pimson, Faculty of Agroindustrial technology, Kalasin University, Kalasin 46000, Thailand  
 E-mail: sine.charin@gmail.com

**Article history:** received manuscript: 10 April 2018, accepted manuscript: 30 May 2018, published online: 9 July 2018

**Academic editor:** Korakot Nganvongpanit

## บทนำ

การเลี้ยงไก่ในพื้นที่จำกัด ส่งผลต่อการจัดการด้านการเลี้ยง การให้อาหาร การสุขภาพบาลและการป้องกันโรค รวมถึงลดต้นทุนการผลิต ในทางตรงข้ามการเลี้ยงในรูปแบบนี้ทำให้สัตว์มีโอกาสนในการแสดงพฤติกรรมธรรมชาติที่ลดลง ส่งผลให้ไก่มีน้ำหนักตัวน้อย ผลผลิตเนื้อและประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลง มีคุณภาพต่ำและอัตราการตายเพิ่มขึ้น (Houshmand et al., 2012) ปัจจุบันมีการศึกษาความหนาแน่นเฉลี่ยที่พอเหมาะต่อการเลี้ยงไก่เนื้อสูงสุด 14 ตัวต่อตารางเมตร (Feddes et al., 2002; Simitzis et al., 2012; Kang et al., 2016) แต่หากเพิ่มความหนาแน่นส่งผลให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) กระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระ (free radicals) ในไก่มากขึ้น (Papadopoulou et al., 2017) อนุมูลอิสระเหล่านี้ก่อให้เกิดความเสียหายกับเซลล์ ดีเอ็นเอ โปรตีน ไขมัน รวมไปถึงสภาวะความสมดุลของร่างกาย (Akbarian et al., 2016) ภาวะเครียดออกซิเดชันเรื้อรังนำไปสู่การลดความสามารถของกระบวนการเมตาบอลิซึมในไมโทคอนเดรีย ซึ่งถือว่าเป็นส่วนสำคัญในการผลิตพลังงานให้แก่เซลล์ร่างกาย ส่งผลให้เซลล์เสื่อมสภาพ แตกและปล่อยเอนไซม์ออกมาทำลายเซลล์ข้างเคียง อีกทั้งยังรบกวนการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant enzyme activities) เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase; SOD) คาตาเลส (catalase; CAT) และกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase, GPX) เมื่ออนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion,  $O_2^-$ ) เกิดขึ้นภายในเซลล์ เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสจะเปลี่ยนอนุมูลอิสระดังกล่าวให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide;  $H_2O_2$ ) และจะถูกเปลี่ยนเป็นออกซิเจนและน้ำ ด้วยเอนไซม์คาตาเลส และกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (Pamplona and Costantini, 2011)

ภาวะเครียดออกซิเดชันมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเม็ดเลือดขาวหลายชนิด (Jiang et al., 2017) ขึ้นแรกกระตุ้นการทำงานของแกนไฮโปทาลามิกพิทูอิทารีอะดรีนัล (hypothalamic-pituitary-adrenal axis; HPA) ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ควบคุมความสัมพันธ์และการตอบสนองต่อกันและกัน ระหว่างต่อมใต้สมองส่วนไฮโปทาลามัส ต่อมพิทูอิทารี และต่อมหมวกไต ซึ่งเป็นส่วนหลักส่วนหนึ่งของระบบประสาทต่อมไร้ท่อ ที่ควบคุมการตอบสนองของร่างกายต่อความเครียดและการทำงานเช่น การย่อยอาหาร ระบบภูมิคุ้มกัน อารมณ์ ความรู้สึกทางเพศ และการเก็บและใช้พลังงานของร่างกาย นอกจากนี้ยังรบกวนการทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติ (sympathetic nervous system; SNS) ทำให้การเจริญเติบโตของร่างกายลดลง ส่งผลให้น้ำหนักลด (Dhabhar, 2002) ต่อมารบกวนระบบไหลเวียนเลือดโดยกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ (cytokine) ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของอินเตอร์เฟียร์รอนแกมมา (interferon- $\gamma$ ) อินเตอร์ลิวคิน-12 (interleukin-12) และทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา (tumor necrosis factor หรือ TNF- $\alpha$ ) ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานผิดปกติไป และยับยั้งการทำงานของกลูโคคอร์ติคอยด์ฮอร์โมน (glucocorticoids) ซึ่งมีผลต่อการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติซอล (cortisol) ฮัยโดรคอร์ติซอล (hydrocortisol) คอร์ติโซน (cortisone) คอร์ติโคสเตอรอน (corticosterone) อีกทั้งยังกระตุ้นการทำงานของ Natural killer cells (NK cells) ให้มากขึ้น (Dhabhar et al., 2012) การยับยั้งการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายนี้ส่งผลให้การเจริญเติบโตของไก่ลดลง (Tankson et al., 2001)

ปัจจุบันการเลี้ยงไก่อินทรีย์ เช่น การเลี้ยงแบบมีพื้นที่ปล่อยออกสู่ภายนอก (free-range) เพื่อผลิตไข่ที่มีคุณภาพ จากกระบวนการผลิตที่อ้างอิงสวัสดิภาพสัตว์ เลี้ยงด้วยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติร่วมกับการเสริมสารสกัดจากสมุนไพรในอาหารไก่ เพื่อช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตและลดภาวะเครียดออกซิเดชัน จากรูปแบบการเลี้ยงที่เกิดขึ้น สารสกัดเคอร์คูมินเป็นสารประกอบสำคัญในสมุนไพรขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ฆ่าเชื้อจุลชีพ ลดอาการอักเสบ เพิ่มภูมิคุ้มกัน อิมมูโนโกลบูลินชนิดจี (IgG) และเพิ่มประสิทธิภาพด้านการเจริญเติบโต (Guil-Guerrero et al., 2017; Lee et al., 2017) รายงานความเป็นพิษ (toxicity) ในสัตว์ทดลองพบว่า เคอร์คูมินเป็นสารที่ไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (nonmutagenic agent) เมื่อให้อาหารที่มีส่วนผสมของสารสกัดเคอร์คูมินความเข้มข้นร้อยละ 30 แบบครั้งเดียว หรือให้ปริมาณ 1.8 กรัมต่อกิโลกรัมทุกวันเป็นเวลา 90 วันในหนูแรท และ 0.8 กรัมต่อกิโลกรัมทุกวันเป็นเวลา 90 วัน ในลิง พบว่าไม่ก่อให้เกิดพิษ (Chainani-Wu, 2003) เช่นเดียวกับการศึกษาในมนุษย์ที่พบว่าเมื่อให้สารสกัดเคอร์คูมิน 8000 มิลลิกรัมครั้งเดียวในคนปกติและ 1200 มิลลิกรัมต่อวัน ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 2 สัปดาห์ในผู้ป่วยข้ออักเสบจากโรครุมมาตอยด์ พบว่าช่วยลดการอักเสบได้และไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกาย (Cheng et al., 2001) ขนาดที่แนะนำให้ใช้เพื่อลดภาวะเครียดออกซิเดชันในหนูทดลองที่ก่อให้เกิดพิษแบบฉับพลัน (acute) ไม่ควรเกิน 2000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน และขนาดที่ก่อให้เกิดพิษแบบกึ่งเรื้อรัง (subchronic toxicity) ไม่ควรเกิน 800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน (Liju et al., 2013; Gopi et al., 2016) ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาความเป็นพิษของเคอร์คูมินในสัตว์ปีก แต่พบรายงานการศึกษาการใช้สารสกัดขมิ้นชันในด้านอื่น เช่น ลดการเกิดพิษจากอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) ซึ่งเป็นสารพิษจากเชื้อรา (Yarru et al., 2009; Rangsz and Ahangaran, 2011) หรือการทดสอบประสิทธิภาพของเคอร์คูมินความเข้มข้นร้อยละ 10 ในอาหารเพื่อการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในไก่ (Abou-Elkhair et al., 2014; Sayrafi et al., 2017) จึงเป็นที่มาของการศึกษาการเสริมสารสกัดเคอร์คูมินในอาหารเพื่อลดภาวะเครียดออกซิเดชันและผลกระทบจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น และสามารถพัฒนาองค์ความรู้สู่กระบวนการผลิตไก่เนื้อได้ในอนาคต

## อุปกรณ์และวิธีการ

ไก่กระທงสายพันธุ์คอบบ์ (Cobb) จำนวน 180 ตัว อายุ 3 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ 2x3 Factorial in Completely Randomized Design (CRD) ปัจจัยที่ 1 คือ อาหารผสมและไม่ผสมสารสกัดเคอร์คูมินร้อยละ 10 ปัจจัยที่ 2 คือ รูปแบบการเลี้ยง 3 แบบ คือ 1) รูปแบบเลี้ยงกึ่งปล่อยอิสระ ชังคอกพื้นที่ 2 ตารางเมตรต่อตัว ช่วงเวลา 18.00-6.59 น. และปล่อยแปลงหญ้าพื้นที่ 4 ตารางเมตรต่อตัว ช่วงเวลา 7.00-17.59 นาฬิกา 2) รูปแบบเลี้ยงชังคอกหนาแน่น 10 ตัวต่อตารางเมตร และ 3) รูปแบบเลี้ยงชังคอกหนาแน่น 16 ตัวต่อตารางเมตร

ไก่ทุกตัวได้รับวัคซีนตามโปรแกรมของกรมปศุสัตว์ ได้รับอาหารไก่สำเร็จรูปโปรตีนหยาบร้อยละ 20 ได้รับอาหารและน้ำไม่จำกัด (ad libitum) วันละ 2 ครั้งเวลาเช้าและเย็น ทำการทดลองในโรงเรือนระบบปิด (evaporative cooling system) ภายใต้การควบคุมดูแลโดยสัตวแพทย์ การทดลองแบ่งเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ซ้ำ 10 ตัวต่อหนึ่งซ้ำ กลุ่มที่ 1 อาหารสำเร็จรูปเลี้ยงกึ่งปล่อยอิสระ (0C-semi) กลุ่มที่ 2 อาหารสำเร็จรูปเลี้ยงชังคอก 10 ตัวต่อตารางเมตร (0C-10 birds) กลุ่มที่ 3 อาหารสำเร็จรูปเลี้ยงชังคอก 16 ตัวต่อตารางเมตร (0C-16 birds) กลุ่มที่ 4 อาหารผสมสารสกัดเคอร์คูมินร้อยละ 10 เลี้ยงกึ่งปล่อยอิสระ (10C-semi) กลุ่มที่ 5 อาหารผสมสารสกัดเคอร์คูมินร้อยละ 10 เลี้ยงชังคอก 8 ตัวต่อตารางเมตร (10C-10 birds) กลุ่มที่ 6 อาหารผสมสารสกัดเคอร์คูมินร้อยละ 10 เลี้ยงชังคอก 16 ตัวต่อตารางเมตร (10C-16 birds)

เก็บข้อมูลน้ำหนักไก่ ปริมาณอาหารที่กิน เพื่อคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโต (average daily gain; ADG) และอัตราการแลกน้ำหนัก (feed conversion ratio; FCR) ที่อายุสัปดาห์ที่ 6 เก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำบริเวณปีก (wing vein) เพื่อส่งตรวจวัดค่าโลหิตวิทยา ณ ห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา โรงพยาบาลสัตว์คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และตรวจวัดสมรรถนะการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ณ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น งานวิจัยชิ้นนี้ผ่านการรับรองจรรยาบรรณสัตว์ทดลอง โดยคณะกรรมการพิจารณาการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์และวิจัย มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ เลขที่ใบอนุญาต 11/2559

### การเตรียมสารสกัดเคอร์คูมินจากสมุนไพรขมิ้นชัน

เหง้าขมิ้นชันได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น นำมาทำความสะอาด ผึ่งแห้งและหั่นเป็นแผ่นบาง อบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บดให้เป็นผงหยาบ แช่วัยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หมักซ้ำ 3 ครั้ง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นนำไปประเหยด้วยเครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศ (Rotary Evaporator R-II, Buchi, Switzerland) แล้วนำสารละลายที่ได้ทั้งหมดทำให้แห้งด้วยเครื่องทำให้แห้งด้วยความเย็นและสูญญากาศ (Freeze dryer-lyolab, Thermo Scientific, USA) ชั่งน้ำหนักสารและคำนวณหาปริมาณเนื้อสารสกัดที่ได้ (% yield) ซึ่งเท่ากับ  $31.74 \pm 2.67$  เตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ความเข้มข้น 20 mg/L เพื่อศึกษาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดซึ่งเท่ากับ 425 nm ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer (Cary 1E, Varian, USA) ซึ่งใช้เป็นค่าดูดกลืนแสงมาตรฐานในการระบุ (identification) ชนิดของขมิ้นชันและใช้ความยาวคลื่นนี้ในการตรวจวัดตลอดการวิเคราะห์ จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินโดยใช้เทคนิค HPLC ด้วยเครื่อง เครื่อง High performance liquid chromatography (SDP-M10A VP, Shimadzu, USA) ด้วยคอลัมน์ Reverse phase column C18 (Thermo Scientific, USA) ขนาด 4.6x150 มิลลิเมตร โดยใช้ 2% acetic acid และ acetonitrile เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที เวลาในการวิเคราะห์ 6 นาที (Jayaprakasha et al., 2002)

### การวิเคราะห์สมรรถนะการทำงานของเอนไซม์คาตาเลส ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส และระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน

ตัวอย่างเลือดไก่กระທးถูกนำมาเจือจางในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้เป็น 300 เท่า วิเคราะห์สมรรถนะการทำงานของเอนไซม์คาตาเลส โดยใช้  $H_2O_2$  เป็นสารตั้งต้นทำปฏิกิริยากับ ammonium molybdate ได้สารประกอบสีเหลือง เดิมตัวอย่างเลือดลงในปฏิกิริยาและเปรียบเทียบการยับยั้งปฏิกิริยากับหลอดควบคุมและคำนวณสมรรถนะของเอนไซม์คาตาเลส ที่ได้เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน นอกจากนี้ปฏิกิริยาระหว่าง xanthine และ xanthine oxidase ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์สมรรถนะการทำงานของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส โดยการวัดอัตราการยับยั้ง formazan และทำให้เกิดสีด้วย nitroterazolium blue chloride (NBT) จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส ในขณะที่อัตราการเปลี่ยนแปลง reduced glutathione (GSH) ไปเป็น oxidized glutathione (GSSG) โดยการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส ถูกนำมาใช้วิเคราะห์สมรรถนะการทำงานของเอนไซม์ที่เกิดขึ้น (Stukelj et al., 2013) เพื่อศึกษาความแตกต่างของระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันซึ่งบ่งชี้ถึงการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายสิ่งมีชีวิต ตัวอย่างเลือดไก่กระທးถูกนำไปปมพร้อมสารมาตรฐาน standard malondialdehyde (MDA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารผสมที่ประกอบด้วย trichloroacetic acid, 2-thiobarbituric acid (TBA) และกรดอะซิติก และแช่ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใส่ส่วนบนแล้วนำไปวัดอัตราการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 551 นาโนเมตร และ 528 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน MDA (Pimson et al., 2014)



### การทดสอบทางสถิติ

แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean  $\pm$  SD) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี ANOVA ร่วมกับการทดสอบด้วย Tukey's test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า  $P < 0.05$  ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17.1

### ผลการศึกษา

เมื่อเปรียบเทียบสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่ในรูปแบบการเลี้ยงทั้ง 3 แบบ ได้แก่ รูปแบบเลี้ยงกึ่งปล่อยอิสระ รูปแบบเลี้ยงขังคอกหนาแน่น 10 และ 16 ตัวต่อตารางเมตร พบว่าปริมาณการกินอาหาร และน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ของไก่ทั้งสามรูปแบบการเลี้ยงไม่แตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อเสริมสารสกัดเคอร์คูมินความเข้มข้นร้อยละ 10 ในอาหาร ปริมาณการกินอาหารและน้ำหนักตัวที่เพิ่มของไก่ทั้งสามกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่อัตราการเจริญเติบโตและอัตราการแลกน้ำหนักของไก่ที่ถูกเลี้ยงในกลุ่มขังคอกหนาแน่น 16 ตัวต่อตารางเมตร มีค่าต่ำกว่ากลุ่มกึ่งปล่อยอิสระและกลุ่มขังคอกหนาแน่น 10 ตัวต่อตารางเมตรอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเสริมสารสกัดเคอร์คูมินความเข้มข้นร้อยละ 10 พบว่าอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการแลกน้ำหนักสูงขึ้นไม่แตกต่างจากการเลี้ยงในกลุ่มอื่น (Table 1)

**Table 1** Growth performances of broilers fed with Curcumin under three raising systems. The data are presented as the mean  $\pm$  SD. Different lower-case letters indicate a significant difference among different precipitation levels ( $P < 0.05$ )

Groups	Growth performances			
	Feed intake	Body weight gain (g/bird)	Average daily gain (g/bird/day)	Feed conversion ratio (feed/gain)
0C-semi	2713.45 $\pm$ 23.20	1151.20 $\pm$ 8.23	83.38 $\pm$ 2.20a	2.26 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>
0C-10 birds	2664.80 $\pm$ 17.50	1132.50 $\pm$ 4.34	79.93 $\pm$ 3.33a	2.18 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>
0C-16 birds	2025.20 $\pm$ 26.40	1095.40 $\pm$ 5.25	69.78 $\pm$ 1.75b	1.89 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>
10C-semi	2835.50 $\pm$ 11.30	1223.80 $\pm$ 7.25	88.62 $\pm$ 2.25a	2.34 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>
10C-10 birds	2819.20 $\pm$ 15.50	1211.50 $\pm$ 6.75	87.17 $\pm$ 2.45a	2.30 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>
10C-16 birds	2796.75 $\pm$ 16.40	1203.00 $\pm$ 3.33	86.76 $\pm$ 3.75a	2.29 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>

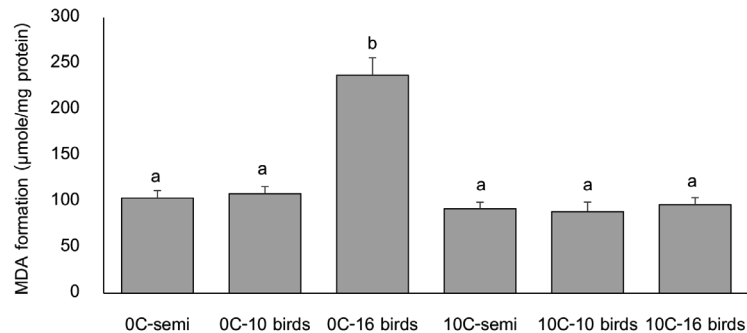
นอกจากสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่แล้ว การศึกษาผลของรูปแบบการเลี้ยงและการเสริมสารสกัดเคอร์คูมินความเข้มข้นร้อยละ 10 ในอาหารไก่ต่อค่าโลหิตวิทยา ช่วยยืนยันผลสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่ได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งพบว่าผลของจำนวนเม็ดเลือดแดง (red blood cell) ในไก่ทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่การเลี้ยงแบบขังคอกหนาแน่น 16 ตัวต่อตารางเมตร ทำให้ฮีโมโกลบิน (hemoglobin) และเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit value) ต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ในส่วนของผลต่อเม็ดเลือดขาว (white blood cell) การเลี้ยงแบบขังคอกหนาแน่น 16 ตัวต่อตารางเมตร มีผลทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (lymphocyte) และโมโนไซต์ (monocyte) ต่ำ จำนวนเฮเทอโรฟิล (heterophil) สูงขึ้น มีผลทำให้อัตราส่วนระหว่างเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ต่อเฮเทอโรฟิล (H/L ratio) มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) แต่เมื่อเสริมสารสกัดเคอร์คูมินความเข้มข้นร้อยละ 10 ในอาหาร ส่งผลเปลี่ยนแปลงค่าโลหิตวิทยาให้อยู่ในระดับปกติ (Table 2)

**Table 2** Hematology parameters of broilers fed with Curcumin under three raising systems. The data are presented as the mean ± SD. Different lower-case letters indicate a significant difference among different precipitation levels (P<0.05)

Parameters	Groups					References*	
	0C-semi	0C-10 birds	0C-16 birds	10C-semi	10C-10 birds		10C-16 birds
Red blood cell characteristics							
RBCs (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	2.16 ± 0.06	2.13 ± 0.06	2.08 ± 0.16	2.22 ± 0.13	2.21 ± 0.24	2.17 ± 0.16	2.15 ± 0.06
Hemoglobin (g/Dl)	9.48 ± 0.83 <sup>a</sup>	9.54 ± 0.94 <sup>a</sup>	7.83 ± 0.74 <sup>b</sup>	9.52 ± 0.27 <sup>a</sup>	9.50 ± 0.54 <sup>a</sup>	9.47 ± 0.54 <sup>a</sup>	9.50 ± 0.38
Hematocrit value (%)	28.90 ± 1.98 <sup>a</sup>	27.59 ± 1.74 <sup>a</sup>	23.50 ± 0.90 <sup>b</sup>	29.10 ± 0.65 <sup>a</sup>	28.80 ± 0.80 <sup>a</sup>	28.00 ± 0.35 <sup>a</sup>	28.90 ± 1.98
White blood cells characteristics							
WBCs (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	21.50 ± 1.12	22.50 ± 0.61	23.80 ± 0.85	22.00 ± 0.35	22.40 ± 1.10	22.60 ± 1.02	22.50 ± 0.85
Lymphocytes (%)	48.40 ± 0.85 <sup>a</sup>	47.15 ± 0.55 <sup>a</sup>	42.20 ± 1.10 <sup>b</sup>	48.90 ± 0.46 <sup>a</sup>	48.00 ± 0.50 <sup>a</sup>	47.80 ± 0.25 <sup>a</sup>	48.40 ± 0.85
Monocyte (%)	1.70 ± 0.35 <sup>a</sup>	1.72 ± 0.50 <sup>a</sup>	0.92 ± 0.50 <sup>b</sup>	1.67 ± 0.25 <sup>a</sup>	1.72 ± 0.45 <sup>a</sup>	1.70 ± 0.33 <sup>a</sup>	1.70 ± 0.35
Basophil (%)	0.35 ± 0.20	0.31 ± 0.33	0.28 ± 0.75	0.29 ± 0.45	0.33 ± 0.50	0.33 ± 0.20	0.81 ± 0.36
Eosinophil (%)	2.10 ± 0.75	2.21 ± 0.25	2.45 ± 0.33	2.00 ± 0.50	2.32 ± 0.40	2.20 ± 0.43	2.27 ± 0.39
Heterophil (%)	31.90 ± 1.89 <sup>a</sup>	32.7 ± 0.57 <sup>a</sup>	43.3 ± 0.46 <sup>b</sup>	33.0 ± 0.24 <sup>a</sup>	32.6 ± 1.04 <sup>a</sup>	33.1 ± 1.10 <sup>a</sup>	32.0 ± 1.89
H/L ratio	0.68 ± 0.26 <sup>a</sup>	0.72 ± 0.43 <sup>a</sup>	1.13 ± 0.33 <sup>b</sup>	0.62 ± 0.77 <sup>a</sup>	0.71 ± 0.32 <sup>a</sup>	0.69 ± 0.66 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.20

\*References: Orawan and Aengwanich, 2007; Kuttappan et al., 2013; Attia et al., 2017

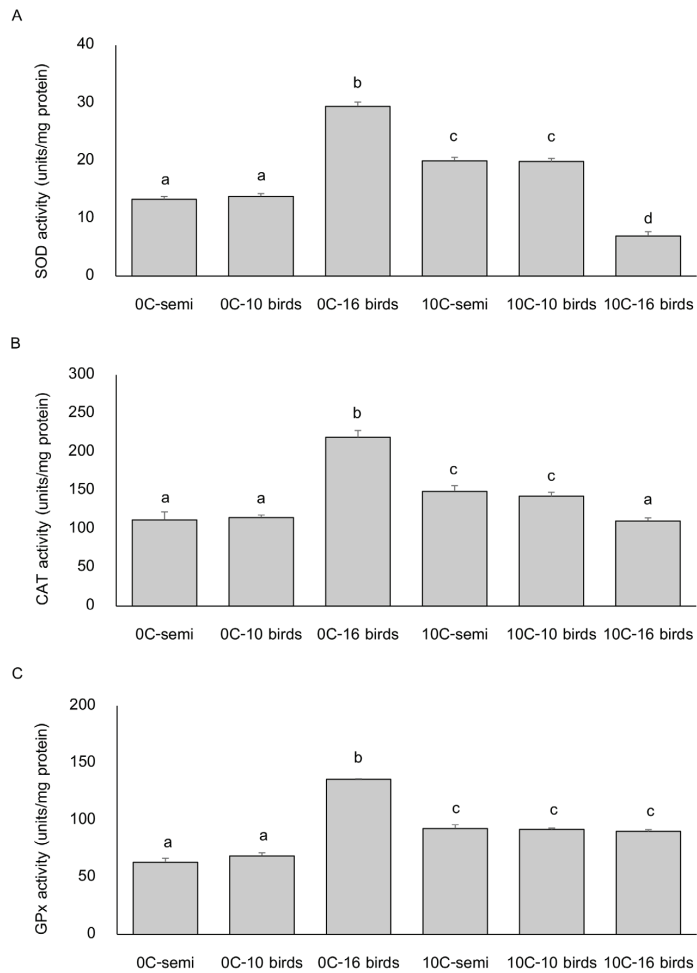
ระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชันบ่งชี้ถึงการเกิดอนุมูลอิสระในไก่ พบว่ารูปแบบการเลี้ยงขังคอกหนาแน่น 16 ตัวต่อตารางเมตร ส่งผลให้ระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชันสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มกึ่งปล่อยอิสระและขังคอกหนาแน่น 10 ตัวต่อตารางเมตร (Figure 1) แต่เมื่อไก่ได้รับอาหารที่เสริมสารสกัดเคอร์คูมินความเข้มข้นร้อยละ 10 พบว่าระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชันต่ำลงจนไม่แตกต่างกับทุกกลุ่ม ( $P<0.05$ ) สอดคล้องกับการศึกษาสมรรถนะการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่ประกอบไปด้วย เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส คาตาเลส และกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส พบว่าทั้งสามชนิดสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มเลี้ยงขังคอกหนาแน่น 16 ตัวต่อตารางเมตร และลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $P<0.05$ ) เมื่อได้รับสารสกัดเคอร์คูมิน โดยเอนไซม์ ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส ต่ำกว่าการเลี้ยงในทุกรูปแบบ (Figure 2A) เอนไซม์คาตาเลส ลดลงเทียบเท่ากับกลุ่มกึ่งปล่อยอิสระ และเลี้ยงขังคอกหนาแน่น 10 ตัวต่อตารางเมตร (Figure 2B) ในขณะที่เอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส กลับสูงขึ้นใกล้เคียงกับไก่กลุ่มที่ไม่เครียดแต่ได้รับอาหารเสริม (10C-semi และ 10C-10 birds) อย่างมีนัยสำคัญ ( $P<0.05$ ) (Figure 2C)



**Figure 1** The level of lipid peroxidation of broilers fed with Curcumin under three raising systems. The data are presented as the mean  $\pm$  SD. Different lower-case letters indicate a significant difference among different precipitation levels ( $P<0.05$ )

## วิจารณ์

รูปแบบเลี้ยงกึ่งปล่อยอิสระ รูปแบบเลี้ยงขังคอกหนาแน่น 10 และ 16 ตัวต่อตารางเมตร ส่งผลต่อระดับความเครียดในไก่ได้แตกต่างกัน พบว่ารูปแบบเลี้ยงกึ่งปล่อยอิสระและรูปแบบเลี้ยงขังคอกหนาแน่น 10 ตัวต่อตารางเมตร ทำให้ไก่มีสมรรถนะการเจริญเติบโตที่มีประสิทธิภาพ ปริมาณของเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวในแต่ละชนิดอยู่ในเกณฑ์ปกติ เมื่อยืนยันผลด้วยระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชันที่บ่งชี้ถึงปริมาณอนุมูลอิสระ และสมรรถนะของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าการเลี้ยงไก่ทั้งสองแบบไม่มีผลต่อความเครียด สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าการเลี้ยงแบบขังคอกความหนาแน่นไม่เกิน 10-12 ตัวต่อตารางเมตร ช่วยลดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Simitzis et al. 2012; Kang et al., 2016) และเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตได้ดีใกล้เคียงกับการเลี้ยงกึ่งปล่อยอิสระ (Thomas et al., 2004; Gupta., 2017) แต่เมื่อเพิ่มความหนาแน่นถึง 16 ตัวต่อตารางเมตร การเพิ่มผลผลิตและสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่กระทดลง



**Figure 2** Antioxidant enzyme activity of broilers fed with Curcumin under three raising systems. The data are presented as the mean  $\pm$  SD. Different lower-case letters indicate a significant difference among different precipitation levels ( $P < 0.05$ )

เนื่องจากความหนาแน่นที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ไก่มีภาวะความเครียด การกินอาหารลดลง เพิ่มปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde หรือ MDA) หรือระดับของลิปเปอร์ออกซิเดชัน บ่งชี้ภาวะเครียดออกซิเดชันจากระดับอนุมูลอิสระที่สูงขึ้น ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส คาตาเลส และกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส เพิ่มมากขึ้น หากเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดแรกที่ทำหน้าที่เปลี่ยนอนุมูลอิสระ ไม่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดได้ เอนไซม์คาตาเลส จะเข้ามาทำปฏิกิริยาต่อ แต่หากอยู่ในภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่มากนัก เอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส จะทำหน้าที่หลักในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Birben et al., 2012) สอดคล้องกับระดับการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลในกลุ่มที่เลี้ยงขังคอกความหนาแน่นไก่ 16 ตัวต่อตารางเมตร

สูงขึ้นมากเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น ในการศึกษาพฤติกรรมสัตว์ เมื่อใดเกิดความเครียดจากพฤติกรรมทางสังคมของสัตว์โดยการเพิ่มความหนาแน่นในการเลี้ยง (social stress) จะแสดงออกพฤติกรรม เช่น เบื่ออาหาร จิกชน ก้าวร้าว เหยียบหรือขับไล่ตัวอื่นออกจากรางอาหารซึ่งถือเป็นพฤติกรรมการจัดอันดับทางสังคม (Ericsson et al., 2016; Marino, 2017) นอกจากนี้ความเครียดยังมีผลต่อการกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์ที่ส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Dhabhar, 2002) ทำให้พบการลดลงของฮีโมโกลบินและปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น จากอิทธิพลของฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์ที่มีผลต่อระบบการสร้างเม็ดเลือด (hemopoietic system) โดยเฉพาะฮีโมโกลบินที่เป็นส่วนประกอบของเม็ดเลือดแดง การสร้างเม็ดเลือดขาว ความเครียดมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์และการเมทาบอลิซึมของเซลล์เม็ดเลือด จึงพบการลดลงของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (Post et al., 2003; Lin et al., 2004) แต่เพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิดเอทโทโรฟิล ดังนั้นเมื่อคำนวณหา H/L ratio จึงพบว่ามีความเพิ่มขึ้น ช่วยยืนยันภาวะเครียดที่เกิดขึ้นในไก่ได้ (Thaxton and Puvadolpirod, 2000; Tankson et al., 2001)

การเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดจากรูปแบบการเลี้ยงขังคอกหนาแน่น 16 ตัวต่อตารางเมตร ที่พบว่าระดับความเครียดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อการศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารเคอร์คูมินที่เป็นส่วนประกอบหลักในขมิ้นชันต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่ การเปลี่ยนแปลงของค่าโลหิตวิทยาและผลต่อระบบต้านอนุมูลอิสระ แสดงให้เห็นว่าการเสริมสารสกัดเคอร์คูมินในไก่กลุ่มที่ไม่เครียดช่วยเพิ่มสมรรถนะการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส คาตาเลส และกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส ในไก่กลุ่มที่เลี้ยงในรูปแบบขังปล่อยอิสระและกลุ่มขังคอกหนาแน่น 10 ตัวต่อตารางเมตร เปรียบเทียบกับไก่ที่เลี้ยงรูปแบบเดียวกันแต่ไม่ได้เสริมสารเคอร์คูมิน สอดคล้องกับหลายการศึกษาที่พบว่านอกจากทำหน้าที่ในการกำจัดอนุมูลอิสระแล้วเคอร์คูมินยังมีฤทธิ์ในการช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในร่างกายได้อีกด้วย (Arshami et al., 2013; Zhang et al., 2015) และเมื่อเสริมสารเคอร์คูมินในอาหารไก่กลุ่มขังคอกหนาแน่น 16 ตัวต่อตารางเมตรที่พบว่ามีความเครียดและภาวะเครียดออกซิเดชันสูงขึ้น สารเคอร์คูมินช่วยเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตให้มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับกลุ่มอื่น เพิ่มปริมาณของเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวในแต่ละชนิดอยู่ในเกณฑ์ปกติ เพิ่มการทำงานของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส กำจัดอนุมูลอิสระเป็นผลให้ลิปิดเปอร์ออกซิเดชันลดลง นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มสมรรถนะของเอนไซม์คาตาเลส และกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส ให้มีประสิทธิภาพพร้อมทำงานมากยิ่งขึ้น (Abou-Elkhair et al., 2014; Zhang et al., 2014; Zhang et al., 2015)

การลดลงของภาวะเครียดออกซิเดชันนี้เป็นผลจากกลไกการทำงานของสารเคอร์คูมิน โดยอาศัยการทำงานพร้อมกันสองส่วน ส่วนแรกเคอร์คูมินสามารถจับกับอนุมูลอิสระไม่ว่าจะเป็น ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion; O<sup>-</sup>) เปอร์ออกซีไนไตร (peroxynitrite; NOO) ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide; NO) เปอร์ออกซิลแรดดิคัล (peroxyl radicals; ROO) หรือ ไฮดรอกซิล (hydroxyl; OH<sup>-</sup>) เป็นผลทำให้อนุมูลอิสระลดจำนวนลง ควบคู่กับการทำงานของกลไกที่สองที่กระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์ (cytoprotective gene) ทำงานโดยการเพิ่มการแสดงออกของ ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส คาตาเลส กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส กลูตาไธโอนรีดักเตส (glutathione reductase; GR) และ กลูตาไธโอนเอสทรานเฟอเรส (glutathione-S-transferase; GST) ซึ่งเป็นโปรตีนต้านอนุมูลอิสระ ผลิตเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อปกป้องเซลล์จากการทำลายของภาวะเครียดออกซิเดชัน (Panchal et al., 2008; Trujillo et al., 2013) และทำหน้าที่รักษาสสมดุลรีดอกซ์ภายในเซลล์ โดยมีเอนไซม์ในระบบต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเป้าหมายสำคัญ คือ NADPH-quinone oxidoreductase-1 หรือ NQO1 และฮีโมออกซิจีเนส (heme oxygenase-1; HO-1) ทำให้ร่างกายมีการสร้างสารต้าน

อนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น (Jeong et al., 2006; Yarru et al., 2009) และยังกระตุ้นการแสดงออกของยีน  $\gamma$ -glutamylcysteine ligase หรือ  $\gamma$ -GCL เพื่อกระตุ้นการสร้างกลูตาไธโอนซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญของร่างกาย (Hewlings and Kalman, 2017) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yarru และคณะในปี 2009 ที่พบว่าสารสกัดเคอร์คูมินช่วยลดความเป็นพิษของอะพลาที่อกซินในไก่เนื้อโดยการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่นเดียวกับ Rangsz และ Ahangaran (2011) ที่พบว่าสารเคอร์คูมินที่พบในขมิ้นชันกระตุ้นการเจริญเติบโตได้ดีในไก่เนื้อ และ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sayrafi และคณะ (2017) ที่ทดสอบประสิทธิภาพของเคอร์คูมินในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในไก่ พบว่าเคอร์คูมินจะปกป้องเบอร์ซาออฟฟาบริเชียส (Bursa of Fabricius) ซึ่งเป็นอวัยวะสำคัญที่ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ปีก

## สรุป

ปัจจุบันมีการศึกษาถึงประสิทธิภาพของการเสริมขมิ้นชันที่มีสารประกอบที่สำคัญคือ เคอร์คูมิน ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่อย่างแพร่หลาย แต่ยังไม่พบการศึกษาที่บ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของสารสกัดเคอร์คูมินต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าโลหิตวิทยาและผลต่อระบบต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดจากรูปแบบการเลี้ยง จากผลการทดลองนี้พบว่าสารสกัดเคอร์คูมินมีประสิทธิภาพในการปรับค่าโลหิตวิทยาของไก่ที่อยู่ในสภาวะเครียดออกซิเดชันให้เป็นปกติ ช่วยลดอนุมูลอิสระและเพิ่มสมรรถนะการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระได้ จึงสามารถใช้สารสกัดเคอร์คูมิน ซึ่งเป็นส่วนประกอบทางเคมีหลักในขมิ้นชันนี้เสริมในอาหารเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเลี้ยงไก่กระทอง ให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพมากยิ่งขึ้น

## REFERENCES

- Abou-Elkhair, R., Ahmed, H.A., Selim, S., 2014. Effects of black pepper (*Piper nigrum*), turmeric powder (*Curcuma longa*) and coriander seeds (*Coriandrum sativum*) and their combinations as feed additives on growth performance, carcass traits, some blood parameters and humoral immune response of broiler chickens. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 27, 847-854.
- Akbarian, A., Michiels, J., Degroote, J., Majdeddin, M., Golian, A., De Smet, S., 2016. Association between heat stress and oxidative stress in poultry; mitochondrial dysfunction and dietary interventions with phytochemicals. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 7, 37.
- Arshami, J., Pilevar, M., Aami Azghadi, M., Raji, A.R., 2013. Hypolipidemic and antioxidative effects of curcumin on blood parameters, humoral immunity, and jejunum histology in Hy-line hens. *Avicenna J. Phytomed.* 3, 178-185.
- Attia, Y.A., Al-Harhi, M.A., El-Shafey, A.S., Rehab, Y.A., Kim, W.K., 2017. Enhancing tolerance of broiler chickens to heat stress by supplementation with vitamin E, vitamin c and/or probiotics. *Ann. Anim. Sci.* 17, 1155–1169.

- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* 5, 9–19.
- Chainani-Wu, N., 2003. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). *J. Altern. Complement Med.* 9, 161–168.
- Cheng, A.L., Hsu, C.H., Lin, J.K., Hsu, M.M., Ho, Y.F., Shen, T.S., Ko, J.Y., Lin, J.T., Lin, B.R., Ming-Shiang, W., Yu, H.S., Jee, S.H., Chen, G.S., Chen, T.M., Chen, C.A., Lai, M.K., Pu, Y.S., Pan, M.H., Wang, Y.J., Tsai, C.C., Hsieh, C.Y., 2001. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res.* 21, 2895–2900.
- Dhabhar, F.S., 2002. Stress-induced augmentation of immune function—the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Brain. Behav. Immun.* 16, 785–798.
- Dhabhar, F.S., Malarkey, W.B., Neri, E., McEwen, B.S., 2012. Stress-induced redistribution of immune cells—from barracks to boulevards to battlefields: a tale of three hormones—Curt Richter Award winner. *Psychoneuroendocrinology.* 37, 1345–1368.
- Ericsson, M., Henriksen, R., Bélteky, J., Sundman, A., Shionoya, K., Jensen P., 2016. Long-term and transgenerational effects of stress experienced during different life phases in chickens (*Gallus gallus*). *PLoS One.* 11, e0153879.
- Feddes, J.J., Emmanuel, E.J., Zuidhof, M.J., 2002. Broiler performance, body weight variance, feed and water intake, and carcass quality at different stocking densities. *Poult. Sci.* 81, 774–779.
- Gopi, S., Jacob, J., Mathur, K.Y., 2016. Acute and subchronic oral toxicity studies of hydrogenated curcuminoid formulation ‘CuroWhite’ in rats. *Toxicol. Rep.* 3, 817–825.
- Guil-Guerrero, J.L., Ramos, L., Zúñiga Paredes J.C., Carlosama-Yépez, M., Moreno, C., Ruales P., 2017. Effects of turmeric rhizome powder and curcumin in poultry production. A review. *J. Anim. Feed. Sci.* 26, 293–302.
- Gupta, K., Behera, K., Pradhan, C.R., Acharya, A.P., Sethy, K., Behera, D., Lone, S.A., Shinde, K.P., 2017. Influence of stocking density on the performance, carcass characteristics, hemato-biochemical indices of Vanaraja chickens Shailesh. *Indian J. Anim. Res.* 51, 939–943.
- Hewlings, S.J., Kalman, D.S., 2017. Curcumin: A review of its' effects on human health. *Foods.* DOI: 10.3390/foods6100092.
- Houshmand, M., Azhar, K., Zulkifli, I., Bejo, M.H., Kamyab, A., 2012. Effects of probiotic, protein level, and stocking density on performance, immunity, and stress indicators of broilers. *Poult. Sci.* 91, 393–401.
- Jayaprakasha, G.K., Jagan Mohan Rao, L., Sakariah, K.K., 2002. Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin. *J. Agric Food Chem.* 50, 3668–3672.
- Jeong, G.S., Oh, G.S., Pae, H.O., Jeong, S.O., Kim, Y.C., Shin, M.K., Seo, B.Y., Han, S.Y., Lee, H.S., Jeong, J.G., Koh, J.S., Chung, H.T., 2006. Comparative effects of curcuminoids on endothelial heme oxygenase-1 expression: ortho-methoxy groups are essential to enhance heme oxygenase activity and protection. *Exp. Mol. Med.* 38, 393–400.

- Jiang, W., Li, Y., Sun, J., Li, L., Li, J.W., Zhang, C., Huang, C., Yang, J., Kong, G.Y., Li, Z.F., 2017. Spleen contributes to restraint stress induced changes in blood leukocytes distribution. *Sci. Rep.* 7, 6501. DOI: 10.1038/s41598-017-06956-9.
- Kang, H.K., Park, S.B., Kim, S.H., Kim, C.H., 2016. Effects of stock density on the laying performance, blood parameter, corticosterone, litter quality, gas emission and bone mineral density of laying hens in floor pens. *Poult. Sci.* 95, 2764-2770.
- Kuttappan, V.A., Huff, G.R., Huff, W.E., Hargis, B.M., Apple, J.K., Coon, C., Owens, C.M., 2013. Comparison of hematologic and serologic profiles of broiler birds with normal and severe degrees of white striping in breast fillets. *Poult. Sci.* 92, 339-345.
- Lee, M.T., Lin, W.C., Yu, B., Lee, T.T., 2017. Antioxidant capacity of phytochemicals and their potential effects on oxidative status in animals - A review. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 30, 299-308.
- Liju, V.B., Jeena, K., Kuttan, R., 2013. Acute and subchronic toxicity as well as mutagenic evaluation of essential oil from turmeric (*Curcuma longa* L). *Food Chem. Toxicol.* 53, 52-61.
- Lin, H., Decuypere, E., Buyse, J., 2004. Oxidative stress induced by corticosterone administration in broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*) 1. Chronic exposure. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 139, 737-744.
- Marino, L., 2017. Thinking chickens: a review of cognition, emotion, and behavior in the domestic chicken. *Anim. Cogn.* 20, 127-147.
- Orawan, C., Aengwanich, W., 2007. Blood cell characteristics, hematological values and average daily gained weight of Thai indigenous, Thai indigenous crossbred and broiler chickens. *Pak. J. Biol. Sci.* 10, 302-309.
- Pamplona, R., Costantini, D., 2011. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301, R843-R863.
- Panchal, H.D., Vranizan, K., Lee, C.Y., Ho, J., Ngai, J., Timiras, P.S., 2008. Early anti-oxidative and anti-proliferative curcumin effects on neuroglioma cells suggest therapeutic targets. *Neurochem. Res.* 33, 1701-1710.
- Papadopoulou, A., Petrotos, K., Stagos, D., Gerasopoulos, K., Maimaris, A., Makris, H., Kafantaris, I., Makri, S., Kerasioti, E., Halabalaki, M., Briuedes, V., Ntasi, G., Kokkas, S., Tzimas, P., Goulas, P., Zakharenko, A.M., Golokhvast, K.S., Tsatsakis, A., Kouretas, D., 2017. Enhancement of antioxidant mechanisms and reduction of oxidative stress in chickens after the administration of drinking water enriched with polyphenolic powder from olive mill waste waters. *Oxid. Med. Cell. Longev.* DOI: 10.1155/2017/8273160.
- Pimson, C., Chatuphonprasert, W., Jarukamjorn, K., 2014. Improvement of antioxidant balance in diabetes mellitus type 1 mice by glutathione supplement. *Pak. J. Pharm. Sci.* 27, 1731-1737.
- Post, J., Rebel, J.M., ter Huurne, A.A., 2003. Physiological effects of elevated plasma corticosterone concentrations in broiler chickens. An alternative means by which to assess the physiological effects of stress. *Poult. Sci.* 82, 1313-1318.



- Rangsz, N., Ahangaran, M.G., 2011. Evaluation of turmeric extract on performance indices impressed by induced aflatoxicosis in broiler chickens. *Toxicol. Ind. Health.* 27, 956-960.
- Sayrafi, R., Mirzakhani, N., Mobaseri, R., 2017. Effects of turmeric (*Curcuma longa*) and vitamin E on histopathological lesions induced in bursa of Fabricius of broiler chicks by salinomycin. *Vet. Res. Forum.* 8, 231-236.
- Simitzis, P.E., Kalogeraki, E., Goliomytis, M., Charismiadou, M.A., Triantaphyllopoulos, K., Ayoutanti, A., Niforou, K., Hager-Theodorides, A.L., Deligeorgis, S.G., 2012. Impact of stocking density on broiler growth performance, meat characteristics, behavioural components and indicators of physiological and oxidative stress. *Br. Poult. Sci.* 53, 721-730.
- Stukelj, M., Toplak, I., Svete, A.N., 2013. Blood antioxidant enzymes (SOD, GPX), biochemical and haematological parameters in pigs naturally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Pol. J. Vet. Sci.* 16, 369-376.
- Tankson, J.D., Vizzier-Thaxton, Y., Thaxton, J.P., May, J.D., Cameron, J.A., 2001. Stress and nutritional quality of broilers. *Poult. Sci.* 80, 1384-1389.
- Thaxton, J.P., Puvadolpirod, S., 2000. Model of physiological stress in chickens 5. Quantitative evaluation. *Poult. Sci.* 79, 391-395.
- Thomas, D.G., Ravindran, V., Thomas, D.V., Camden, B.J., Cottam, Y.H., Morel, P.C., Cook, C.J., 2004. Influence of stocking density on the performance, carcass characteristics and selected welfare indicators of broiler chickens. *N. Z. Vet. J.* 52, 76-81.
- Trujillo, J., Chirino, Y.I., Molina-Jijón, E., Andérica-Romero, A.C., Tapia, E., Pedraza-Chaverri, J., 2013. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. *Redox. Biol.* 17, 448-456.
- Yarru, L.P., Settivari, R.S., Gowda, N.K., Antoniou, E., Ledoux, D.R., Rottinghaus, G.E., 2009. Effects of turmeric (*Curcuma longa*) on the expression of hepatic genes associated with biotransformation, antioxidant, and immune systems in broiler chicks fed aflatoxin. *Poult. Sci.* 88, 2620-2627.
- Zhang, J., Hou, X., Ahmad, H., Zhang, H., Zhang, L., Wang, T., 2014. Assessment of free radicals scavenging activity of seven natural pigments and protective effects in AAPH-challenged chicken erythrocytes. *Food Chem.* 145, 57-65.
- Zhang, J., Hu, Z., Lu, C., Bai, K., Zhang, L., Wang, T., 2015. Effect of various levels of dietary curcumin on meat quality and antioxidant profile of breast muscle in broilers. *J. Agric. Food Chem.* 63, 3880-3886.

---

#### How to cite this article;

Charinya Pimson, Phornnipa Bakban, Sunadda Suwanrat and Natedara Chanutsa. The effect of Curcumin on growth performance, blood biochemistry and antioxidant activities in boiler chickens. *Veterinary Integrative Sciences.* 2018; 16(2): 95-107.

---





Vet Integr Sci  
**Veterinary Integrative Sciences**

ISSN: 2629-9968 (online)

Website: www.vet.cmu.ac.th/cmvi

**Research article**

## Carcinogenicity and proteomic analysis of *N*-nitrosodiethylamine in rats

Orapin Insuan<sup>1,2</sup>, Suphachai Charoensin<sup>3</sup>, Sittiruk Roytrakul<sup>4</sup>, Tarika Thumvijit<sup>5</sup>, Piyawan Bunpo<sup>2</sup>  
 and Rawiwan Wongpoomchai<sup>1,\*</sup>

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

<sup>2</sup>Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200 Thailand

<sup>3</sup>Division of Nutrition, School of Medical Sciences, University of Phayao, Phayao 56000 Thailand

<sup>4</sup>National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency,  
 Thailand Science Park, Pathum Thani 12120 Thailand

<sup>5</sup>Department of Radiologic Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200 Thailand

### Abstract

*N*-nitrosodiethylamine (NDEA), a probable human carcinogen, is commonly used in rodent experimental hepatocarcinogenesis research. We evaluated both clastogenicity and carcinogenicity in rats using various concentrations of NDEA via a liver micronucleus assay and a medium-term carcinogenicity test. The administration of repeated NDEA injections ranging from 10 to 50 mg/kg bw together with partial hepatectomy resulted in significantly more liver micronuclei compared to control rats, while the mitotic index was indifferent. However, the highest dose (50 mg/kg bw) was lethal to the rats. Similarly, medium-term exposure at 100 mg/kg bw of NDEA increased the formation of glutathione *S*-transferase placental form (GST-P) positive foci, a preneoplastic lesion of liver cancer in rats. A proteomic analysis revealed overexpression of hepatic proteins involved in the PI3K/Akt/mTOR pathway after treatment with NDEA. This pathway may play a key role in the mechanisms that influence NDEA-initiated hepatocarcinogenesis in this model. In conclusion, the amount of NDEA used in the present study can be considered as clastogenic and carcinogenic to rat hepatocytes. This finding can further our knowledge concerning the establishment of experimental cancer chemoprevention models in rats.

**Keywords:** Clastogenicity, Carcinogenicity, *N*-nitrosodiethylamine, Proteomics

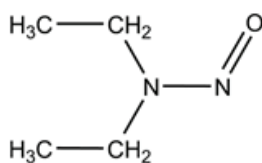
\*Corresponding author: Rawiwan Wongpoomchai, Ph.D., Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200 Thailand Tel: 66 53 945225, Fax: 66 53 894031, E-mail: rawiwan.wong@cmu.ac.th

*Article history:* received manuscript: received manuscript: 21 May 2018, accepted manuscript: 3 July 2018, published online: 20 July 2018

*Academic editor:* Korakot Nganvongpanit

## INTRODUCTION

In everyday life, we are exposed to a number of food-borne carcinogens. Nitrosamines are mainly present in smoked foods, fermented foods, and many alcoholic beverages as well as in tobacco smoke (Brunnemann et al., 1978; Sen et al., 1980). *N*-nitrosodiethylamine (NDEA), also known as diethylnitrosamine (Figure 1), is an extensively occurring nitrosamine. It is commonly used as a rodent carcinogen to induce either preneoplastic lesions or liver tumors in experimental carcinogenesis. NDEA, when metabolized to carbonium ion by CYP2E1, is capable of initiating DNA mutations and subsequent liver tumor formation in mice and rats via the formation of DNA adducts with either a nitrogenous base or the oxygen of guanine, resulting in *N*<sup>7</sup>-ethylguanine or *O*<sup>6</sup>-ethylguanine (Appel et al., 1984; Kang et al., 2007; Tolba et al., 2015). As a result, long-term consumption has been associated with hepatocellular carcinoma (HCC) in humans (Tolba et al., 2015). However, liver carcinogenesis is step-wise and can be reversed or attenuated by certain substances, including dietary antioxidants and anticarcinogens (Glauert et al., 2010; Thumvijit et al., 2014; Punvittayagul et al., 2016). In this study, we applied short-term micronucleus tests (Krishna et al., 2000; Charoensin et al., 2010) and a medium-term liver carcinogenesis bioassay (Thumvijit et al., 2014; Punvittayagul et al., 2016) to determine dose-response and molecular alterations of NDEA during the early stages of hepatocarcinogenesis. The concept is based on the two-step initiation and promotion of carcinogenesis. Evaluation of micronucleus frequency *in vivo* is the primary assay in a battery of genotoxicity tests (Krishna et al., 1992; Krishna et al., 2000). Such *in vivo* medium-term carcinogenesis assays have been extensively exploited to quantify the carcinogenic and/or tumor-promoting potential of test compounds (Ito et al., 1989; Puatanachokchai et al., 2006; Tolba et al., 2015). Data from the present work would allow us to set up a suitable model for further investigation of cancer chemopreventive properties of indigenous medicinal plants.



**Figure 1** Structure of *N*-nitrosodiethylamine.

## MATERIALS and METHODS

### Chemicals and reagents

*N*-nitrosodiethylamine (NDEA) was purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan. Collagenase type IV prepared from *Clostridium histolyticum* and 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) as a fluorescent dye were purchased from Invitrogen Corp. (CA, USA). The rabbit polyclonal anti-GST-P antibody was purchased from Medical and Biological Laboratories

Co., Ltd (Nagoya, Japan). The Vectastain Elite ABC kit was purchased from Vector Laboratories Inc. (CA, USA). Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). The other reagents used were analytical grade.

### Animals

Six-week-old male outbred Wistar rats (190-200 g) were obtained from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Salaya, Nakhon-Prathom, Thailand. Three rats per cage were acclimatized for at least seven days prior to the start of the study. Animals were kept in the Animal House, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. They were maintained at an environmental condition of about 25°C, with 12 hours of an alternate light and dark cycle. Commercial pellet diet and chlorinated tap water were available *ad libitum*. All rats were housed and treated with the permission of the Animal Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Chiang Mai University (AEC number 17/2556).

### Experimental design for the dose-response study of NDEA clastogenicity

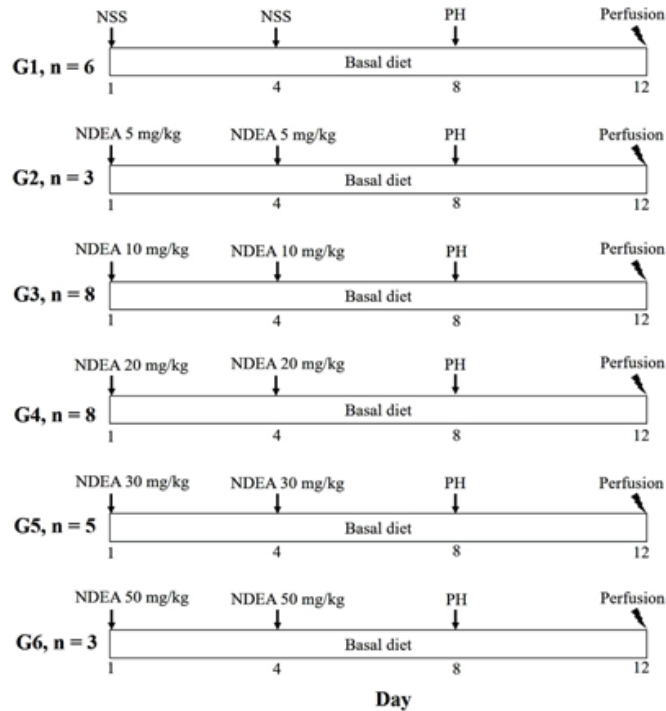
Rats were placed at random into six groups (Figure 2). Control rats (G1) were intraperitoneally administered normal saline solution (NSS). Treated groups (G2-G6) were administered NDEA ranging from 5-50 mg/kg twice on the first and fourth days. After the second NDEA injection, partially hepatectomy (PH) was applied to all rats according to published methods (Higgins et al., 1931). All rats were left for four consecutive days for compensatory proliferation of hepatocytes after liver incision. At the end of protocol, rats were sacrificed by two-step collagenase perfusion.

### Isolation of hepatocytes by two-step collagenase perfusion

Isolation of hepatocytes was done essentially according to Tates et al. (1980) with several modifications. In brief, anesthetized rats were first perfused with preperfusion medium, pH 7.4, 37 °C, at a flow rate of 15 ml/min to remove blood. Secondly, collagenase medium in the same conditions was continuously perfused to isolate hepatocytes. The isolated hepatocytes were washed with phosphate buffer saline, pH 7.4 followed by 10% buffered formalin, pH 7.4 three times. The hepatocytes were suspended in 10% buffered formalin, pH 7.4 and kept in a 4 °C refrigerator until the micronucleus analysis.

### Micronucleated hepatocyte analysis

Prior to the micronucleus analysis, the hepatocyte suspension was mixed with 20 µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) stain solution for fluorescence microscopy. Stained hepatocytes were dropped onto a glass slide and covered with a coverslip. The number of micronucleated hepatocytes was counted and recorded based on analysis of 2,000 hepatocytes from each animal under a fluorescence microscope (x400, excitation/emission (nm): 358/461) equipped with an ultraviolet system. Round or distinct nuclei (fragmented chromosomes) stained with the same color as the nucleus and having with diameters of ¼ or less than that of the main nucleus were scored as micronuclei (Cliet et al., 1989). Mitotic index (MI), indicative of mitotic activity, was calculated from mitotic cells in 2,000 hepatocytes.



**Figure 2** Treatment protocol for testing clastogenic effects of *N*-nitrosodiethylamine in Wistar rat livers. Rats were divided into six groups. NSS: normal saline solution (G1), NDEA: *N*-nitrosodiethylamine (G2-G6). PH: partial hepatectomy, G: group, and n: numbers of rats.

### Experimental design for proteomic analysis of NDEA carcinogenicity

Six-week-old male Wistar rats were divided into two groups, 6-8 rats per group. Group 1, a negative control group, was injected with NSS. Another group was twice intraperitoneally injected with 100 mg/kg body weight of NDEA at weeks 1 and 2 of the experiment. Body weight, water and food intake were recorded weekly. All rats were anesthetized with isoflurane at nine weeks after the last injection. After rats were sacrificed, the final body weights and liver weights were recorded. Rat livers were collected and used for determination of GST-P positive foci and proteomic analysis.

### Immunohistochemistry for GST-P positive foci in rat livers

Liver sections 4  $\mu$ m in thickness on prepared slides were immunohistochemically analyzed for GST-P positive foci by the avidin-biotin complex method according to Thumvijit et al. (2014). After deparaffinization, liver sections were treated with hydrogen peroxide to inactivate endogenous peroxidase. Skim milk was applied to block non-specific staining, and slides were sequentially incubated with rabbit polyclonal anti-rat GST-P antibody. Reactivity with the primary antibody was determined with anti-rabbit IgG biotinylated

antibody conjugated with the avidin-biotin-peroxidase complex. Finally, the sites of peroxidase binding were visualized with the substrate diaminobenzidine tetrahydrochloride. The tissue sections were lightly counterstained with hematoxylin to facilitate orientation under microscopic examination.

### Proteomic analysis of NDEA-initiated rat livers

The liver protein was extracted with 0.5% SDS, and total protein was determined by the Lowry method. Proteins were separated on SDS-PAGE mini slab gels (8×9×0.1 cm) and a separating gel containing 12.5% acrylamide. One-dimensional gel electrophoresis was performed in SDS electrophoresis buffer (25mM Tris-HCl, pH 8.3, 192 mM glycine, 0.1% SDS) followed by silver staining of the gels (Blum et al., 1987). The protein bands were excised, the gel plugs were dehydrated, and in-gel digestion of proteins was performed using trypsin solution containing 10 ng/μl trypsin in 50% ACN/10 mM ammonium bicarbonate. The peptides were extracted by adding of 30 μl of 50% ACN in 0.1% formic acid and were then dried by vacuum centrifugation. The peptide suspension was injected to LC-MS/MS (ESI-QUAD-TOF mass spectrometry). The MS/MS data were analyzed by the Mascot software and identified using the NCBI database. The molecular and biological functions of the identified proteins were assigned according to the Uniprot database (<http://www.uniprot.org>).

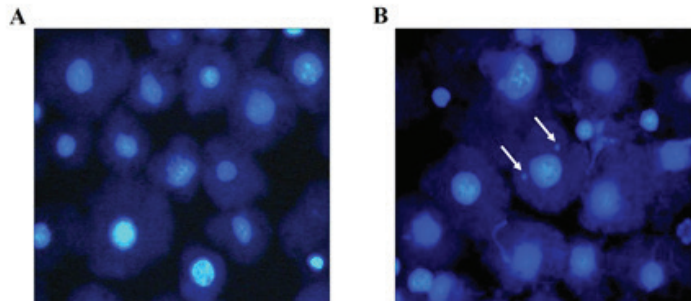
### Statistical analysis

The experimental data were reported as mean ± S.D. of each variable for each group. Differences between treated groups and the control group were determined by one-way ANOVA;  $p < 0.05$  was considered as significant.

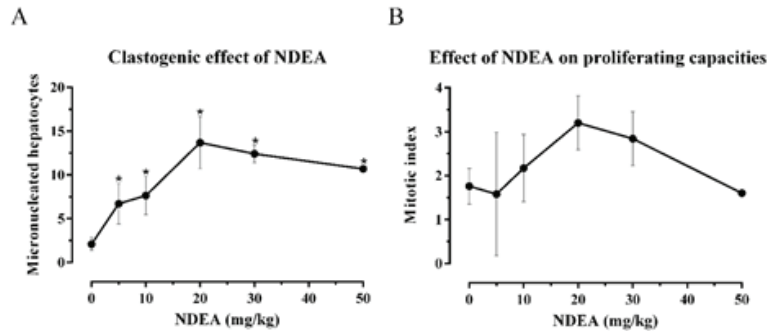
## RESULTS

### Clastogenicity of NDEA in rat livers

As the endpoint marker of liver cancer during the initiation stage, we visualized micronuclei using the fluorescent dye DAPI. Figure 3 shows a representative DAPI imaging of normal nuclei (A) and micronuclei (B, white arrows), which were separated from cellular nuclei and suspended in the cytosolic compartment. The concentration of NDEA ranged from 10 to 50 mg/kg bw, which significantly induced hepatic micronucleus formation when compared with the control group ( $P < 0.05$ ) (Figure 4A), whereas there was no significant difference in mitotic indices between control and NDEA-treated rats (Figure 4B). In addition, two of three rats injected with 50 mg/kg of NDEA were dead two days after partial hepatectomy.



**Figure 3** Representative DAPI visualizations of normal hepatic nuclei (A) and hepatic micronuclei (B, white arrows) from rats administered 30 mg/kg of NDEA. Cells were stained with DAPI for fluorescence imaging (x400 magnification, excitation/emission (nm): 358/461).



**Figure 4** Micronucleated hepatocytes and mitotic index. Curves showing average number of micronucleated hepatocytes from control and NDEA-treated rats (A) and proliferating capacities of liver cells (B). Averages were numbers of micronucleated hepatocytes per 1,000 hepatocytes with respective standard deviations. Significant differences were observed between control and NDEA-treated rats ( $P < 0.05$ ),  $n = 5$  (control),  $n = 3$  (5 mg/kg NDEA),  $n = 6$  (10 mg/kg NDEA),  $n = 6$  (20 mg/kg NDEA),  $n = 4$  (30 mg/kg NDEA) and  $n = 1$  (50 mg/kg NDEA, two rats died from NDEA hepatotoxicity).

### Carcinogenicity of NDEA in rats

After NDEA treatment, the body weights of rats tended to decrease, but this difference did not reach statistical significance compared to negative control rats. Moreover, there was no significant difference in relative liver weight between NDEA and negative control groups (Table 1). GST-P positive foci were only found after NDEA treatment. The number and area of GST-P positive foci were significantly increased in NDEA-treated rats compared to negative control rats. The results suggest that treatment with NDEA could induce the formation of preneoplastic lesions in rat livers.



**Table 1** General appearance and number of GST-P positive foci in rats.

Parameters	NSS	NDEA
Initial body weight (g)	206 ± 15	206 ± 12
Final body weight (g)	448 ± 21	409 ± 31
Relative liver weight (%)	2.70 ± 0.24	2.74 ± 0.34
Number of GST-P <sup>+</sup> foci/cm <sup>2</sup>	0.00 ± 0.00	2.96 ± 1.42 <sup>a</sup>
Area of GST-P <sup>+</sup> foci/liver area (mm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> )	0.00 ± 0.00	0.12 ± 0.06 <sup>a</sup>

The results are shown as mean ± SD. GST-P<sup>+</sup>: Glutathione *S*-transferase placental form positive foci. <sup>a</sup>significantly different from negative control (NSS) group (P <0.05).

### Proteomic profile of proteins in the liver of NDEA-initiated rats

A total of 152 differentially expressed proteins were identified. Of these, 44 up-regulated and 108 down-regulated proteins were detected in NDEA-initiated rats compared to negative control rats. These proteins could be categorized into 14 groups according to their molecular and biological functions. The up-regulated proteins involved signal transduction and cell growth; this group included phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 6 (Pik3r6) and eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E), which were found in NDEA-treated rats (Table 2). In contrast, the expressed proteins involved in DNA repair such as X-ray repair cross-complementing protein 5 (XRCC5) and UV excision repair protein RAD23 homolog A isoform X1 were down-regulated in NDEA-treated rats (Table 3). Protein network association and other correlated proteins were analyzed via the STRING database version 10.5 (<http://string-db.org/>). Seven major proteins were expressed after treatment with NDEA, including Pik3r6, eIF4E, XRCC5, sister chromatid cohesion protein homolog A (Pds5a), CLIP-associating protein 2 (Clasp2), Nipped-B homolog (Nipbl) and mismatch repair endonuclease PMS2 (Pms2). Notably, the interaction of proteins involved in the cell signaling pathway and cell growth, especially Pik3r6 and eIF4E were observed (Figure 5). The signal transduction pathway in NDEA-induced rats was related to phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K/Akt) and the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways.

**Table 2** Some upregulated hepatic proteins in NDEA-induced rats.

Protein name	Accession number	ID score	Fold change	Function
Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 6	gi124517728	6.05	22.26	Signal transduction
RAS protein activator like-3	gi197381464	15.21	17.53	Signal transduction
Latent-transforming growth factor beta-binding protein 4 precursor	gi281371412	2.49	19.72	Proliferation/differentiation
Interferon-related developmental regulator 1	gi53733404	3.24	18.05	Proliferation/differentiation
Eukaryotic translation initiation factor 4E	gi13540382	8.99	20.36	Cell cycle/cell division
MHC class II transactivator isoform 1	gi399154119	5.41	20.94	Inflammatory/immune response
MHC class II antigen	gi18958188	8.59	19.81	Inflammatory/immune response
COX assembly mitochondrial protein homolog isoform 2	gi207080032	4.56	15.75	Inflammatory/immune response
Polyhomeotic-like protein 1	gi157823775	7.85	22.62	Ubiquitin conjugation pathway
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 26	gi157818981	9.45	18.48	Ubiquitin conjugation pathway

## DISCUSSION

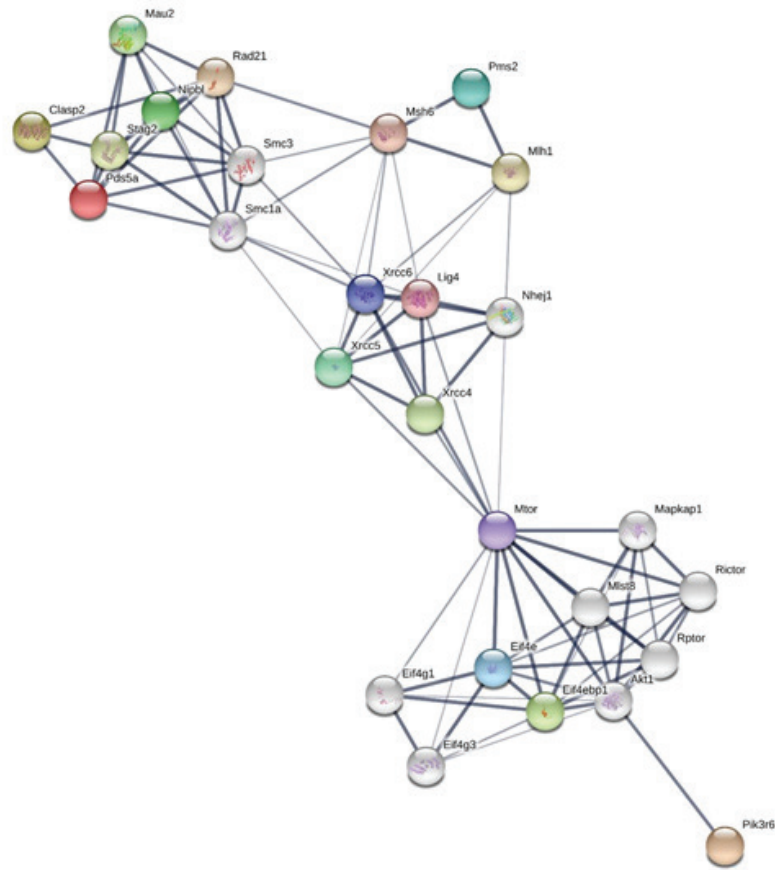
Numerous *in vitro* and *in vivo* protocols are available to evaluate the carcinogenic potential of environmental chemicals. The liver micronucleus assay is an acceptable method of choice for testing mutagenicity and cancer-inducing ability of chemical compounds. When performed appropriately, the assay can detect both clastogenicity associated with chromosome breakage and aneugenicity as indicated by dysfunction of the mitotic apparatus caused by chromosome lagging (Krishna et al., 1992; Krishna et al., 2000). Clastogenicity of various chemicals has been considered as the classical hallmark of initiation of chemical carcinogenesis (Clivet et al., 1989; Krishna et al., 2000). In this study, we investigated the *in vivo* clastogenic and carcinogenic potential of NDEA. Fluorescence visualization via DAPI clearly identified the morphology of fragmented chromosomes forming round-shaped micronuclei (Figure 3). Our results are comparable to those reported by Charoensin and colleagues (2010). NDEA administration ranging from 10-30 mg/kg bw was sufficient to induce initiation stage of liver chromosomal damage as seen by significant increased number of micronucleated hepatocytes (Figure 4).

Although the LD50 of intraperitoneal NDEA injection is approximately 216 mg/kg bw (Heath et al., 1962), two-thirds of the partially hepatectomized rats did not survive after double injection of 50 mg/kg bw of NDEA. This may have been due to poor detoxifying ability of the remaining liver. This dose is therefore not suitable for rat liver micronucleus induction models.

**Table 3** Some downregulated hepatic proteins in NDEA-induced rats.

Protein name	Accession number	ID score	Fold change	Function
Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3, isoform CRA_b	gi149036361	3.94	22.78	Apoptotic process
Death associated transcription factor 1, isoform CRA_b	gi149034011	2.30	16.23	Apoptotic process
Ran GTPase-activating protein 1	gi349501086	9.92	24.30	Cell adhesion
SH3-domain GRB2-like endophilin B2, isoform CRA_b	gi149039098	10.77	24.17	Cell adhesion
Integrin alpha-4	gi157819949	11.67	20.12	Cell adhesion
X-ray repair cross-complementing protein 5	gi41056215	7.12	17.18	DNA damage/DNA repair
UV excision repair protein RAD23 homolog A isoform X1	gi564394955	9.55	23.69	DNA damage/DNA repair
Mismatch repair endonuclease PMS2	gi157787060	6.01	18.55	DNA damage/DNA repair
Protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide	gi149019691	7.23	14.97	DNA damage/DNA repair
Acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain, isoform CRA_b	gi149016010	2.30	22.04	Lipid metabolism
Lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase	gi20138456	3.24	18.53	Lipid metabolism
Sterol regulatory element-binding protein 2	gi76096332	4.57	17.97	Lipid metabolism
Homeobox protein PKNOX2 isoform 1	gi404312683	6.85	22.44	Transcription/translation
Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-6 alpha	gi157821879	6.19	16.43	Transcription/translation
4F2 cell-surface antigen heavy chain isoform 1	gi402743472	13.60	23.01	Transport

Medium-term (within 8 weeks) carcinogenicity tests in rats have been established for analysis of chemical compounds. Such tests are able to detect both genotoxic and non-genotoxic carcinogens in rat livers (Ito et al., 2003; Tsuda et al., 2003). NDEA is a potent hepatocarcinogen that can act a tumor initiator and promoter in multistage of hepatocarcinogenesis models (Aparicio-Bautista et al., 2013).



**Figure 5** The protein network complex using the STRING database. Protein-protein interactions are indicated by the bold black lines.

Glutathione *S*-transferase placental form (GST-P) positive foci, a sign of preneoplastic lesions of HCC in rats, is widely used as the endpoint marker (Ito et al., 1998; Ichihara et al., 1999). Normally, GST-P is strongly up-regulated in placental tissues, absent in adult tissues, and is increased in preneoplastic and neoplastic cells (Higashi et al., 2004). A previous study showed that only single GST-P positive hepatocytes in rats were found after treatment with 30 mg/kg body weight of NDEA (Wang et al., 2009), and this may not develop into malignant tumors. From our preliminary observation, the number of GST-P positive foci induced by the twice injection of 100 mg/kg body weight of NDEA was comparable to the administration of NDEA in the standard protocol for medium-term rat carcinogenicity test (Ito et al., 2003). Therefore, NDEA at the repeated dose of 100 mg/kg body weight was selected to use in our study. We found that NDEA enhanced the formation of preneoplastic lesions by increasing both the number and size of GST-P positive foci in rat livers.

Interestingly, our proteomic analysis revealed the overexpression of phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 6 (Pik3r6) and eukaryotic

translation initiation factor 4E (eIF4E), which are involved in PI3K/Akt/mTOR signaling in NDEA-initiated rats. The PI3K/Akt/mTOR pathway is a well-known oncogenic kinase that plays an important role in cell growth, survival and cancer development (Buphathi et al., 2015; Golob-Schwarzl et al., 2017). PI3K is usually found in various types of human cancer (Matsuda et al., 2013). Activation of PI3K induces the phosphorylation and activation of Akt, which further phosphorylates multiple downstream targets to control cell proliferation, including the mTOR complex (Fortin et al., 2016). The mTOR phosphorylates the ribosomal protein S6 kinases and eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 leading to the release of the eIF4E (Huo et al., 2011), which plays a vital role in the control of the initiation step of protein translation and is strongly expressed in HCC (Golob-Schwarzl et al., 2017). Moreover, overexpression of mTOR and pAKT have also been found in non-virus-related HCC (Golob-Schwarzl et al., 2017). The PI3K/Akt/mTOR pathway is most often involved in NDEA-induced hepatocarcinogenesis (Zhou et al., 2011; Wang et al., 2016), and may be another factor influencing preneoplastic formation in NDEA-induced hepatocarcinogenesis in rats of the present study.

In conclusion, we can reconfirm that NDEA is potentially clastogenic and carcinogenic to rat hepatocytes. The PI3K/Akt/mTOR pathway may play an essential role in preneoplastic formation in NDEA-initiated hepatocarcinogenesis in rats. Importantly, this study has established an experimental animal model for further cancer chemoprevention studies.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the grants from the National Research Council of Thailand, the Faculty of Medicine Research Fund and the Functional Food Research Center for Well-being, Chiang Mai University, Thailand. We would like to thank Dr. Pichapat Piamrojnanabhat for suggesting proteomic analysis, Dr. Tadashi Noguchi and Ms. Jarumon Kamkon for a technical assistance and Dr. Dale E. Taneyhill for editing the manuscript in English.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Insuan, O., Charoensin, S., and Wongpoomchai, R. conceived and designed the experiments; Insuan, O., and Charoensin, S. performed the experiments; Insuan, O., Charoensin, S., Wongpoomchai, R., and Roytrakul, S. analyzed the data; Wongpoomchai, R., Roytrakul, S., Thumvijit, T., and Bumpo, P. contributed reagents/materials/analysis tools; Insuan, O., Charoensin, S., and Wongpoomchai, R. wrote the paper.

## CONFLICT OF INTEREST

There is no conflict of interest.

## REFERENCES

- Aparicio-Bautista, D.I., Pérez-Carreón, J.I., Gutiérrez-Nájera, N., Reyes-Grajeda, J.P., Arellanes-Robledo, J., Vásquez-Garzón, V.R., Jiménez-García, M.N., Villa-Treviño, S., 2013. Comparative proteomic analysis of thiol proteins in the liver after oxidative stress induced by diethylnitrosamine. *Biochim. Biophys. Acta.* 1834, 2528-2838.
- Appel, K.E., Ruhl, C.S., Hildebrandt, A.G., 1984. Metabolic inactivation of N-nitrosamines by cytochrome P-450 *in vitro* and *in vivo*. *IARC Sci. Publ.* 57, 443-451.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J., 1987. Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* 8, 93-99.
- Brunnemann, K.D., Hoffmann, D., 1978. Chemical studies on tobacco smoke LIX. Analysis of volatile nitrosamines in tobacco smoke and polluted indoor environments. *IARC Sci. Publ.* 19, 343-356.
- Bupathi, M., Kaseb, A., Meric-Bernstam, F., Naing, A., 2015. Hepatocellular carcinoma: Where there is unmet need. *Mol Oncol.* 9, 1501-1509.
- Charoensin, S., Punvittayakul, C., Pompimon, C., Mevatee, U., Wongpoomchai, R., 2010. Toxicological and clastogenic evaluation of pinocembrin and pinostrobin isolated from *Boesenbergia pandurata* in Wistar rats. *Thai J. Toxicol.* 25, 29-40.
- Cliet, I., Fournier, E., Melcion, C., Cordier, A., 1989. *In vivo* micronucleus test using mouse hepatocytes. *Mutat. Res.* 216, 321-326.
- Fortin, J., Mak, T.W., 2016. Targeting PI3K signaling in cancer: A cautionary tale of two AKTs. *Cancer Cell.* 29, 429-431.
- Glauert, H., Calfee-Mason, K., Stemm, D.N., Tharappel, J.C., Spear, B.T., 2010. Dietary antioxidants in the prevention of hepatocarcinogenesis: A review. *Mol Nutri Food Res.* 54, 875-896.
- Golob-Schwarzl, N., Krassnig, S., Toeglhofer, A.M., Park, Y.N., Gogg-Kamerer, M., Vierlinger, K., Schröder, F., Rhee, H., Schicho, R., Fickert, P., Haybaeck, J., 2017. New liver cancer biomarkers: PI3K/AKT/mTOR pathway members and eukaryotic translation initiation factors. *Eur. J. Cancer.* 83, 56-70.
- Heath, D.F., Magee, P.N., 1962. Toxic properties of dialkyl nitrosamines and some related compounds. *Br J Ind Med.* 19, 276-282.
- Higashi, K., Hiai, H., Higashi, T., Muramatsu, M., 2004. Regulatory mechanism of glutathione S-transferase P-form during chemical hepatocarcinogenesis: old wine in a new bottle. *Cancer Lett.* 209, 155-163.
- Higgins, G.M., Anderson, R.M., 1931. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol.* 12, 186-192.
- Huo, Y., Iadevaia, V., Proud, C.G., 2011. Differing effects of rapamycin and mTOR kinase inhibitors on protein synthesis. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 446-450.

- Ichihara, T., Wanibuchi, H., Lee, C.C., Nakajima, K., Yano, Y., Taniyama, T., Otani, S., Shimizu, Y., Fukushima S., 1999. Lack of inhibitory effects of the Ju-myo protein on development of glutathione S-transferase placental form-positive foci in the male F344 rat liver. *J Toxicol Sci.* 24, 27-31.
- Ito, N., Tatematsu, M., Haegawa, R., Tsuda, H., 1989. Medium-term bioassay system for detection of carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis utilizing the GST-P positive liver cell focus as an endpoint marker. *Toxicol Pathol.* 17, 630-641.
- Ito, N., Imaida, K., Tamano, S., Hagiwara, A., Shirai, T., 1998. Medium-term bioassays as alternative carcinogenicity test. *J Toxicol Sci.* 23, 103-106.
- Ito, N., Tamano, S., Shira T., 2003. A medium-term rat liver bioassay for rapid in vivo detection of carcinogenic potential of chemicals. *Cancer Sci.* 94, 3-8.
- Kang J.S., Wanibuchi H., Morimura K., Gonzalez F.J., Fukushima S., 2007. Role of CYP2E1 in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis *in vivo*. *Cancer Res.* 67, 11141-11146.
- Krishna, G., Fiedler, R., Theiss, J. C., 1992. Simultaneous evaluation of clastogenicity, aneugenicity and toxicity in the mouse micronucleus assay using immunofluorescence. *Mutat. Res.* 282, 159-167.
- Krishna, G., Hayashi, M., 2000. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res.* 455, 155-166.
- Matsuda, S., Kobayashi, M., Kitagishi, Y., 2013. Roles for PI3K/AKT/PTEN pathway in cell signaling of nonalcoholic fatty liver disease. *ISRN Endocrinol.* doi:10.1155/2013/472432.
- Puatanachokchai, R., Kakuni, M., Wanibuchi, H., Kinoshita, A., Kang, J.S., Salim, E.I., Morimura, K., Tamano, S., Merlino, G.T., Fukushima, S., 2006. Lack of promoting effects of phenobarbital at low dose on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in TGF- $\alpha$  transgenic mice. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 7, 274-278.
- Punvittayagul, C., Sankam, P., Taya, S., Wongpoomchai, R., 2016. Anticlastogenicity and anticarcinogenicity of purple rice extract in rats. *Nutr. Cancer.* 68, 646-653.
- Sen, N.P., Seaman, S., McPherson, M., 1980. Further studies on the occurrence of volatile and non-volatile nitrosamines in foods. *IARC Sci. Publ.* 31, 457-465.
- Tates, A.D., Neuteboom, I., Hofker, M., 1980. A micronucleus technique for detecting clastogenic effects of mutagens/carcinogens (DEN, DMN) in hepatocytes of rat liver in vivo. *Mutat. Res.* 74, 11-20.
- Thumvijit, T., Taya, S., Punvittayagul, C., Peerapornpisal, Y., Wongpoomchai, R., 2014. Cancer chemopreventive effect of *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15, 1611-1616.
- Tolba, R., Kraus, R., Liedtke, C., Schwarz, M., Weiskirchen, R., 2015. Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice. *Lab. Anim.* 49, 59-69.

- Tsuda, H., Fukushima, S., Wanibuchi, H., Morimura, K., Nakae, D., Imaida, K., Tatematsu, M., Hirose, M., Wakabayashi, K., Moore, M.A., 2003. Value of GST-P positive preneoplastic hepatic foci in dose-response studies of hepatocarcinogenesis: evidence for practical thresholds with both genotoxic and nongenotoxic carcinogens. A review of recent work. *Toxicol Pathol.* 31, 80-86.
- Wang, P.W., Hung, Y.C., Li, W.T., Yeh, C.T., Pan, T.L., 2016. Systemic revelation of the protective effect and mechanism of *Cordycepsinensis* on diethylnitrosamine-induced rat hepatocellular carcinoma with proteomics. *Oncotarget.* 7, 60270-60289.
- Wang, Y., Ausman, L.M., Greenberg, A.S., Russell, R.M., Wang, X.D., 2009. Nonalcoholic steatohepatitis induced by a high-fat diet promotes diethylnitrosamine-initiated early hepatocarcinogenesis in rats. *Int. J. Cancer.* 124, 540-546.
- Zhou, Q., Lui, V.W., Yeo, W., 2011. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma. *Future Oncol.* 7, 1149-1167.

---

**How to cite this article;**

Orapin Insuan, Suphachai Charoensin, Sittiruk Roytrakul, Tarika Thumvijit, Piyawan Bunpo and Rawiwan Wongpoomchai. Carcinogenicity and proteomic analysis of *N*-nitrosodiethylamine in rats. *Veterinary Integrative Sciences.* 2018; 16(2): 109-122

---





Vet Integr Sci  
**Veterinary Integrative Sciences**

ISSN: 2629-9968 (online)

Website: www.vet.cmu.ac.th/cmvi

**Research article**

## Molecular detection of piroplasms in haematophagus flies in the Nakhon Pathom and Kanchanaburi Provinces, Thailand

Charoonluk Jirapatharasate<sup>1,\*</sup>, Tanasak Changbunjong<sup>1</sup>, Poonyapat Sedwisai<sup>2</sup>, Thekhawet Weluwanarak<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pre-clinic and Applied Animal Science, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Salaya, Nakhon Pathom 73170, Thailand

<sup>2</sup>The monitoring and Surveillance Center for Zoonotic Diseases in Wildlife and Exotic Animals, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Salaya, Nakhon Pathom 73170, Thailand

### Abstract

*Theileria* spp. and *Babesia* spp are tick-borne protozoan parasites that infect a wide range of domestic and wild animals. In this study, the haematophagus flies (*Stomoxys* and tabanids) from Kanchanaburi and Nakhon Pathom Provinces, Thailand were investigated for the presence of piroplasm DNA. All specimens were morphologically identified. The piroplasms in the insect specimens were first screened by PCR using *Babesia* and *Theileria* 18S rRNA gene and species-specific sequences based on *B. bovis* spherical body protein 2, *B. bigemina* rhoptry-associated protein 1a and *Theileria* spp. Sequencing was used to confirm the identity of all amplicons. In total, 68 blood sucking insects were morphologically identified as *Tabanus* spp. (79.41%), *Stomoxys* spp. (13.24%), *Haematobosca* spp. (5.88%) and *Chrysops* spp. (1.47%). PCR results showed only 2 samples were positive for *Theileria* spp. while all specimens were negative for *Babesia* spp. Based on sequence and phylogenetic analysis, *Theileria* spp. 18S rRNA sequences were classified into *T. ovis* and *T. sinensis* which share high identity and similarity with isolates from other countries. In this study, we describe for the first time the detection of *T. sinensis* in tabanid fly. We therefore recommend further investigations to confirm the biting flies as a biological or mechanical vector of these pathogens, particularly *Tabanus* spp, which should be regarded as a potential vector for transmission of *Theileria* among domestic animals in Thailand.

**Keywords:** Haematophagus flies, *Theileria* spp., *Babesia* spp., Thailand

\*Corresponding author: Charoonluk Jirapatharasate, Department of Pre-clinic and Applied Animal Science, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Salaya, Nakhon Pathom 73170, Thailand Tel (+66)2-441-5242 ext 1535, E-mail: Charoonluk.jir@mahidol.edu,

**Article history;** received: 22 June 2018, accepted: 3 August 2018, published online: 20 August 2018  
**Academic editor:** Korakot Nganvongpanit

## INTRODUCTION

Piroplasmosis caused by *Babesia* and *Theileria* are significant tick-borne protozoan blood parasites that infect a wide range of both domestic and wild animals worldwide (Uilenberg, 1995). *Babesia bovis*, *B. bigemina* are important tick-borne parasites of livestock in tropical and subtropical regions (Bock *et al.*, 2004). Disease manifests as high fever, anorexia and anemia with resultant production losses and mortalities (Bock *et al.*, 2004). Moreover, infection with *B. bovis* cause neurological and respiratory symptoms (Everitt *et al.*, 1986).

*Theileria* can be grouped into transforming and non-transforming species based on the ability of schizont to invade leukocyte (Sivakumar *et al.*, 2014). The important transforming parasites are *T. annulata* and *T. parva* that are associated with tropical theileriosis and east coast fever, respectively (Mukhebi *et al.*, 1992). *T. orientalis* is responsible for benign or non-transforming theileriosis which is widely distributed in Southeast Asia (Watts, 2016). Although, the parasite is considered to have low pathogenicity it is still able to cause disease which result in weakness, anemia, diarrhea, abortion and poor milk production (Kamau *et al.*, 2011, Izzo *et al.*, 2010).

Generally, *Babesia* and *Theileria* parasites are transmitted by Ixodid ticks (Mehlhorn and Schein, 1985). However, other biting arthropods including mosquitoes, tabanid flies and lice can serve as mechanical vectors for *Theileria* spp. and may be responsible for disease transmission in livestock (Fujisaki *et al.*, 1993; Baldacchino *et al.*, 2013; Hammer *et al.*, 2016). Distribution and abundance of haematophagus flies (*Stomoxys* and tabanids) in Thailand have been reported previously (Tumrasvin, 1989; Changbunjong *et al.*, 2018). Most molecular studies on the biology of the biting flies are focused on identification and genetic variation. However, information on the blood protozoan parasites in the insects have not yet been elucidated. Therefore, our current work is investigating the presence of piroplasm in haematophagus flies that were found in animal farms using polymerase chain reaction (PCR) technique. Phylogenetic relationship among the isolates identified in this study and those isolated from different countries were compared.

## MATERIALS and METHODS

### Study site and sample collection

A cross sectional study was employed to collect flies sample between June and July, 2015. This study was carried out in three different locations in Kanchanaburi and Nakhon Pathom Provinces. All locations were situated near beef cattle farms.

In each study location, fly samples were collected by using Nzi trap. Flies were collected and all samples were labeled separately by location and date. Those samples were placed into a cooler containing cool ice packs and transported to the laboratory. Collected flies were identified based on morphology of the flies as previously described (Zumpt, 1973; Tumrasvin and Shinonaga, 1978). Only female flies were included in this study. The samples were preserved in 95% ethanol and stored at -20°C until further use.

## DNA extraction

Each fly was washed three times in 70% ethanol and once in sterile water and then dried. Individual fly bodies were homogenized with a sterile pellet mixer in 1.5 ml tubes. The DNA was then extracted after the flies were crushed using standard proteinase K digestion, phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation (Hunt, 1997). The pellets were resuspended in 100 µl of double distilled water. The DNA concentration was measured using Nano-Drop™ 2000/2000c spectrophotometers (ThermoFisher Scientific, USA) and then stored at -30°C until processed.

## PCR detection of *Babesia* and *Theileria*-specific DNA

Sixty-eight specimens detected for the presence of blood protozoan parasites using PCR assay with genus-specific primers followed by species-specific primers (Table 1). All samples were first screened for the presence of *Babesia* and *Theileria* species by targeting the hypervariable V4 region of the 18S rRNA gene (Georges *et al.*, 2001). Single-step PCR assays were performed in a final volume of 20 µl, containing 100 ng of DNA sample, 0.25 mM of dNTPs, 1X of PCR buffer, 1 pmol of each primer (Sigma Aldrich, Japan) and 0.1 U of Taq-polymerase (Ex-taq DNA polymerase, Takara, Japan).

Positive samples for the piroplasm were then detected for *B. bovis*, *B. bigemina* and *Theileria* species. Previously described specific PCR primers for *B. bovis* spherical body protein 2, *B. bigemina* rhoptry-associated protein-1a and *Theileria* 18S rRNA were used as markers in this study (AbouLaila *et al.*, 2010; Terkawi *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2013). Nested PCR assays were performed in 20 µl of reaction mixture containing 100 ng of extracted DNA, 0.25 mM of dNTPs, 1X of PCR buffer, 1 pmol of each primer (Sigma-Aldrich, Japan), 1 U of Taq-polymerase (Ex-Tag DNA polymerase, Takara, Japan) and topped up with distilled water to the final volume. For the inner primer reaction, 2 µl of the outer PCR products were added into the reaction mixture. Positive and negative quality controls were include in each experiment. The PCR product were subjected to electrophoresis on 1.5% agarose gel in 1X TAE buffer, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light.

## Identification of *Babesia* and *Theileria* DNAs

PCR products of the correct size were identified by sequencing. Amplification products were purified from agarose gel by using Nucleospin® Extract II (Macherey Nagel, Germany). The fragments were cloned into a pGEM-T Easy Vector (Promega, USA). After transformation, two recombinant clones were selected for sequencing using a Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) and the DNA sequences were determined using ABI PRISM 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems, USA). The sequence analysis was performed using Bioedit version 7.2.5 (Tom Hall Ibis Biosciences, USA). The nucleotide sequence identities and similarities of obtained sequence were analyzed by BLASTn search in GenBank and percent identities between nucleotide sequences were compared by Pairwise distance based on p-distance method using MEGA version 6.0 program (Tamura *et al.*, 2013).

## Nucleotide sequence accession numbers

The nucleotide sequences obtained in this study were registered in the GenBank under the accession numbers MH156035 and MH156036.

**Table 1** List of primers used for PCR assays.

Target	Primer sequences (5'-3')	Fragment (bp)	Reference
<i>Theileria</i> and <i>Babesia</i> species 18S rRNA gene (PCR)	For-CTAAGAATTTACCTCTGACAGT Rev-GACACAGGGAGGTAGTGACAAG	403	Georges <i>et al.</i> , 2001
<i>B. bovis</i> SBP2 gene (nPCR)	For <sup>a</sup> -CTGGAAGTGGATCTCATGCAACC For <sup>b</sup> -GAATCTAGGCATATAAAGCAT Rev-TCACGAGCACTCTACGGCTTTGCAG ATCCCCTCCTAAGGTTGGCTAC	1,236 580	AbouLaila <i>et al.</i> , 2010
<i>B. bigemina</i> RAP-1a gene (nPCR)	For <sup>a</sup> -GAGTCTGCCAAATCCTTAC For <sup>b</sup> AGCTTGCTTTCACAACCTCGCC Rev-TCCTCTACAGCTGCTTCG TTGGTGCTTTGACCGACGACAT	879 412	Terkawi <i>et al.</i> , 2011
<i>Theileria</i> 18S rRNA gene (nPCR)	<sup>a</sup> GAAACGGTACCACATCT <sup>b</sup> TTAAACCTCTTCCAGAGT Rev-AGTTTCCCCGTGTTGAGT TCAGCCTTGCGACCATAC	778 581	Cao <i>et al.</i> , 2013

nPCR = Nested PCR, <sup>a</sup> = Outer primers, <sup>b</sup> = Inner primers

## RESULTS

### Species identification

A total 68 blood sucking samples were identified to 5 genera and 10 species. The most abundant species in this study were *Tabanus oxybeles* (45.59%) followed by *Tabanus megalops* (22.06%), *Stomoxys calcitrans* (8.82%), *Tabanus rubidus* (7.35%), and *Chrysops dispar* (2.94%). Number and percentage of blood sucking flies are described in [Table 2](#).

### Detection of *Babesia* and *Theileria* spp.

Two samples from the 68 specimens produced an amplicon of a size corresponding with the 18S rRNA of piroplasms. The 2 positive samples were further tested for *B. bovis*, *B. bigemina* and *Theileria* spp. The PCR results revealed that both samples were positive with *Theileria* 18S rRNA while *B. bovis* and *B. bigemina* were not detected ([Table 2](#)). Species of *Theileria* spp. were identified by sequencing and compared with GenBank database. The sequence analysis showed that one partial sequence (MH156035) shared high similarity with *T. ovis* isolates and shared 98.80-98.97% identity with published sequences ([Table 3](#)). The other partial sequence (MH156036) showed high similarity with *Theileria* spp and *T. sinensis* and shared 99.48-99.83% identity value with database sequences ([Table 4](#)).

**Table 2** The results of PCR method showing positive results for *Theileria* spp. in haematophagous flies

Province	District	Species	Total number of collected samples (%)	Number of positive samples (%)
Nakhon Pathom	Kumpangsan	<i>Tabanus megalops</i>	14 (20.59)	2 (14.28)
		<i>Tabanus rubidus</i>	2 (2.94)	0
		<i>Stomoxys calcitrans</i>	2 (2.94)	0
		<i>Chrysops dispar</i>	2 (2.94)	0
Kanchanaburi	Thongphaphum	<i>Tabanus oxybeles</i>	31 (45.59)	0
	Loakwan	<i>Tabanus rubidus</i>	3 (4.41)	0
		<i>Tabanus megalops</i>	1 (1.47)	0
		<i>Tabanus rhinargus</i>	1 (1.47)	0
		<i>Tabanus rubicundus</i>	1 (1.47)	0
		<i>Tabanus tamthaiorum</i>	1 (1.47)	0
		<i>Stomoxys pullus</i>	2 (2.94)	0
		<i>Stomoxys calcitrans</i>	4 (5.88)	0
		<i>Stomoxys</i> sp.	1 (1.47)	0
		<i>Haematobosca sanguinolenta</i>	3 (4.41)	0

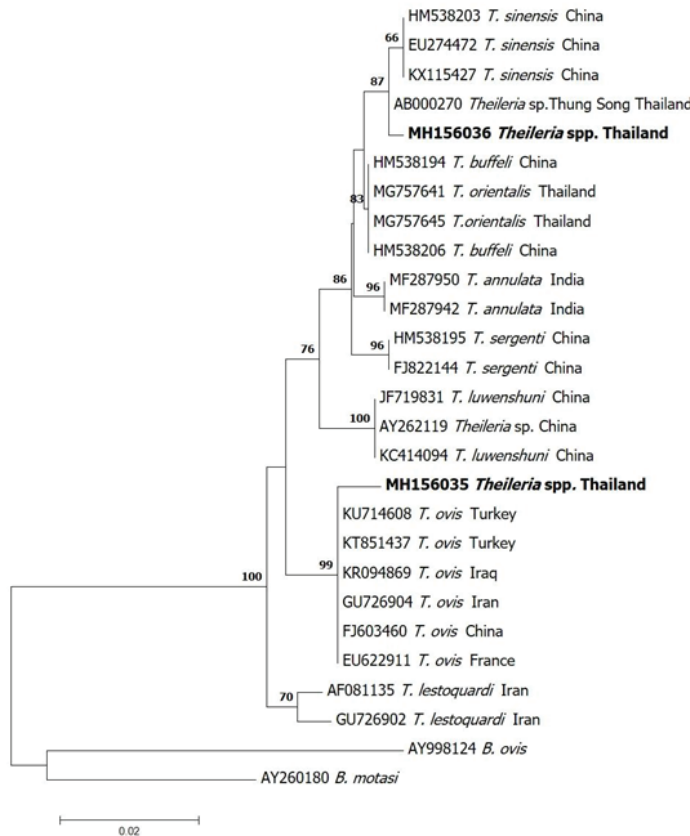
**Table 3** Percent identity of *T. ovis* from GenBank database and Thai *Theileria* spp. by Clustal W.

Accession number	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>1. MH156035, <i>Theileria</i> spp., Thailand</b>								
2. JQ737135, <i>T. ovis</i> , Iran	98.97							
3. KR094869, <i>T. ovis</i> , Iraq	98.97	100.00						
4. KM924444, <i>T. ovis</i> , Tunisia	98.97	100.00	100.00					
5. FJ603460, <i>T. ovis</i> , China	98.97	100.00	100.00	100.00				
6. EU622911, <i>T. ovis</i> , France	98.97	100.00	100.00	100.00	100.00			
7. AY533144, <i>T. ovis</i> , Spain	98.97	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00		
8. AY260172, <i>T. ovis</i> , Turkey	98.97	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	
9. AY260171, <i>T. ovis</i> , Germany	98.80	99.83	99.83	99.83	99.83	99.83	99.83	99.83

**Table 4** Percent identity of *T. sinensis* from GenBank database and Thai *Theileria* spp. by Clus-tal W.

Accession number	1	2	3	4
1. MH156036, <i>Theileria</i> spp. Thailand				
2. AB000270, <i>Theileria</i> spp. Thung Song, Thailand	99.83			
3. KX115427, <i>T. sinensis</i> , China	99.48	99.65		
4. HM538203, <i>T. sinensis</i> , China	99.48	99.65	100.00	
5. EU274472, <i>T. sinensis</i> , China	99.48	99.65	100.00	100.00

A phylogenetic tree of *T. ovis* and *Theileria* spp. was constructed from *Theileria* spp. 18S rRNA gene sequences of our amplicons and those available in GenBank. As shown in Figure 1, the isolate from Kampangsarn (MH156035) formed a cluster with the *T. ovis* gene sequences previously isolated from Turkey, Iraq, Iran, China and France. The sequence MH156036 was clustered into the same clade together with *Theileria* spp. from Thailand and *T. sinensis* from China.



**Figure 1** Phylogenetic analysis of *Theileria* spp. 18S rRNA gene sequences in *Tabanus* spp. samples (boldface letters) and previously registered sequences in the GenBank database. Phylogenetic tree were constructed based on neighbor-joining method with 1,000 replicates. GenBank accession number are shown. Bootstrap values are provided at the beginning of each branch. The 18S rRNA gene of *B. ovis* (AY998124) and *B. motasi* (AY260180) were used as outgroups.

## DISCUSSION

A previous molecular detection of *Theileria* and *Babesia* in tabanids and Stomoxyini flies was carried out in Khao Yai National Park, Thailand (Changbunjong *et al.*, 2016). However, the presence of the above parasites in biting flies in farm livestock has not yet been reported. In this study, we collected 68 insect samples from three animal farms and 10 species were identified (Table 2). The distribution of those species has been reported throughout of Thailand (Tumrasvin, 1989; Changbunjong *et al.*, 2018). Among them, *Tabanus* spp. were observed with the greatest numbers in the study area. Thus, our result was similar with the finding of Changbunjong *et al.* (2018) who reported *Tabanus* spp. was the most abundant occurring fly on beef cattle and buffalo farms. The number of *Stomoxys* flies in this study was lower than previous observation on animal farms (Phasuk *et al.*, 2013). The authors attributed this to the effectiveness of trap type. Tunnakundacha *et al.* (2017) reported that the Nzi trap caught significantly higher numbers of *Tabanus* spp. than the other traps. In addition, factors such as the season and temperature have been shown to determine the abundance of *Tabanus* and *Stomoxys* flies in Thailand (Phasuk *et al.*, 2010).

The sequence analysis of hypervariable V4 region of the 18S rRNA gene in this study revealed that 2 DNA samples of *Tabanus* spp. were positive for *Theileria* spp. This was consistent with Changbunjong *et al.* (2016) reporting that *Theileria* spp. and *Babesia* spp. were detected in blood sucking insect samples. However, we could not detect *Babesia* spp. positive samples from the surveyed areas probably due to the low number of samples. Therefore, a large-scale study with an increased number of samples from different areas needs to be undertaken.

Generally, *Theileria* spp. are transmitted by ixodid ticks of the genera *Amblyomma*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma* and *Rhipicephalus*. Previous study of Hadi and Al-Amery (2011) reported *Theileria* and *Babesia* parasites detected in midgut of *S. calcitrans* by Giemsa staining. Therefore, the presence of the parasite DNA probably due to host blood meal consumed from infected animals. To confirm the mechanical transmission, the DNA extraction from specific organs such as salivary gland, mouthparts or digestive tracts should be examined. Recently, previous studies have shown the evidence for mechanical transmission by other biting arthropods including mosquitoes, tabanid flies, and lice (Hammer *et al.*, 2016; Fernández de Marco *et al.*, 2016). In this study, we detected *Theileria* spp. in several samples but it is unclear that tabanid flies can serve as mechanical vector for *Theileria* spp. Further studies on the modes of transmission of the pathogen in blood sucking insects are required to clarify our finding.

Different *Theileria* spp., so far, including *T. luwenshuni*, *T. orientalis*, *T. separate*, *T. ovis*, *T. lestoquardi*, *T. uilenbergi*, *T. recondite*, *T. annulata* and *T. parva* have been reported in livestock animals (Mans *et al.*, 2015). The 18S small subunit ribosomal RNA (18S rRNA) gene is widely used in the detection of *Theileria* spp. Furthermore, the 18S rRNA gene has been successfully applied to distinguish previously unknown *Theileria* spp. (Cao *et al.*, 2013). Hence, we used *Theileria* 18S rRNA gene for the detection and genetic characterization of the parasite.

*T. ovis* is responsible for ovine theileriosis and cause benign infections in small ruminants worldwide (Mans *et al.*, 2015). In Thailand, there is some published information of *Theileria* infection in goat from Sa Kaeo Province reported by Kaewhom and Thitasan (2017). Furthermore, the species has not yet been identified. Here, we report the first identification of *T. ovis* isolated from an insect specimen. The sequence of *T. ovis* in this study showed 98% identity to *T. ovis* that was detected from goat and sheep in Turkey, Iraq, Tran, China and France. Recently, *T. ovis* was observed in deer keds (*Lipoptena fortisetosa*) from South Korea and also the sequence showed 100% identity to the parasite obtained from Chinese water deer (Lee *et al.*, 2016). According to these findings, the high similarity between the obtained sequence and previous published sequence indicates this fly could potentially play a significant role in the parasite transmission in animals.

The *Theileria* 18S rRNA gene sequence in this study shared a high identity with *T. sinensis* that was isolated from cattle in China. Moreover, the obtained sequence also formed one cluster with the other *T. sinensis* sequences in phylogenetic analysis. According to the findings, the sequence MH156036 that was originally submitted simply as *Theileria* sp., we now propose that sequence is *T. sinensis*. This parasite is a new species that was first isolated from cattle in China (Bai *et al.*, 2002) and classified as benign *Theileria* species (Liu *et al.*, 2012). In Thailand, *T. orientalis* has long been considered a benign parasite and widely distributed in dairy and beef cattle (Jirapatharasate *et al.*, 2017; Altangeral *et al.*, 2011). Here, we report the first detection of *T. sinensis* in the tabanid fly from Thailand. This finding could be attributed to the circulation of parasite infection on animal farms, therefore, further studies on *T. sinensis* prevalence in cattle and arthropod vectors in Thailand should be performed.

## CONCLUSION

In conclusion, *T. ovis* and *T. sinensis* were detected in tabanid flies. However, further investigations are required to confirm the biting flies as a biological or mechanical vector of these pathogens. We therefore recommend further studies on the prevalence of these 2 parasites in livestock animals. In addition, natural vectors in animal farms or an environment should be investigated and examined the parasites. These information could be improved the understanding of the blood parasites circulating in animal herds in Thailand

## ACKNOWLEDGEMENTS

Authors would like to thank veterinarians, staff and cattle owners in Kanchanaburi and Nakhon Pathom Provinces for their help in term of collecting studied samples. We would like to acknowledge the contribution of the staff of Monitoring and surveillance Center for Zoonotic Disease in Wildlife and Exotic Animals (MoZWE) and Kanchanaburi Provincial Livestock Office. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declared that there is no conflict of interest.



## REFERENCES

- AbouLaila, M., Yokoyama, N., Igarashi, I., 2010. Development and evaluation of a nested PCR based on spherical body protein 2 gene for the diagnosis of *Babesia bovis* infection. *Vet. Parasitol.* 169, 45-50.
- Altangerel, K., Sivakumar, T., Inpankaew, T., Jittapalpong, S., Terkawi, M.A., Ueno, A., Xuan, X., Igarachi, I., Yokoyama, N., 2011. Molecular prevalence of different genotypes of *Theileria orientalis* detected from cattle and water buffaloes in Thailand. *J Parasitol.* 97, 1075-1079.
- Bai, Q., Liu, G.Y., Yin, H., Zhao, Q.Z., Liu, D.K., Ren, J.X., Li, X., 2002. *Theileria sinensis* nov: study on molecular taxonomy. *Acta. Anim. Husb. Vet. Sci.* 33, 185-190.
- Baldacchino, F., Muenworn, V., Desquesnes, M., Desoli, F., Charoenviriyaphap, T., Duvallet G., 2013. Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review. *Parasite.* 20, 26.
- Bock, R., Jackson, L., de Vos, A., Jorgensen, W., 2004. Babesiosis of cattle. *Parasitology.* 129 (Suppl), 247-269.
- Cao, S., Zhang, S., Jia, L., Xue, S., Yu, L., Kamyngkird, K., Moumouni, P.F., Moussa, A.A., Zhou, M., Zhang, Y., Terkawi, M.A., Masatani, T., Nishikawa, Y., Xuan, X., 2013. Molecular detection of *Theileria* species in sheep from northern China. *J. Vet. Med. Sci.* 75, 1227-1230.
- Changbunjong, T., Sungpradit, S., Kanthasaeewee, O., Sedwisai, P., Tangsudjai, S., Ruangsittichai, J., 2016. Molecular detection of *Theileria* and *Babesia* in a diversity of Stomoxyini flies (Diptera: Muscidae) from Khao Yai National Park, Thailand. *Thai. J. Vet. Med.* 46, 227-234.
- Changbunjong, T., Sedwisai, P., Weluwanarak, T., Nitiyamatawat, E., Sariwongchan, R., Chareonviriyaphap T., 2018. Species diversity and abundance of *Tabanus* spp. (Diptera: Tabanidae) in different habitats of Thailand. *J. Asia Pac. Entomol.* 21, 134-139.
- Everitt, J.I., Shaddock, J.A., Steinkamp, C., Clabaugh, G., 1986. Experimental *Babesia bovis* infections in Holstein Calves. *Vet. Pathol.* 23, 556-562.
- Fernández de Marco, M., Brugman, V.M., Hernández-Triana, L.M., Thorne, L., Phipps, L.P., Nikolov, N.I., Fooks, A.R., Johnson, N., 2016. Detection of *Theileria orientalis* in mosquito blood meals in the United Kingdom. *Vet. Parasitol.* 229, 31-36.
- Fujisaki, K., Kamio, T., Kawazu, S., Shimizu, S., Shimura, K., 1993. *Theileria sergenti*: experimental transmission by the long-nosed cattle louse, *Linognathus vituli*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 87, 217-218.
- Georges, K., Loria, G.R., Riili, S., Greco, A., Caracappa, S., Jongejan, F., Sparagano, O., 2001. Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridization with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Vet. Parasitol.* 99, 273-286.
- Hammer, J.F., Jenkins, C., Bogema, D., Emery, D., 2016. Mechanical transfer of *Theileria orientalis*: possible roles of biting arthropods, colostrum and husbandry practices in disease transmission. *Parasit Vector.* 9: 34.
- Hunt, G.J., 1997. Insect DNA extraction protocol. Fingerprinting methods based on arbitrarily primed PCR (ed. by M. R. Micheliand R. Bova), Springer-Verlag, Berlin. pp. 21-24.

- Izzo, M.M., Poe, I., Horadagoda, N., de Vos, A.J., House, J.K., 2010. Haemolytic anemia in cattle in NSW associated with *Theileria* infections. *Aust. Vet. J.* 88, 45-51.
- Jirapattharasate, C., Adjou Moumouni, P.F., Cao, S., Iguchi, A., Liu, M., Wang, G., Zhou, M., Vudriko, P., Efstratiou, A., Changbunjong, T., Sungpradit, S., Ratanakorn, P., Moonarmart, W., Sedwisai, P., Weluwanarak, T., Wongsawang, W., Suzuki, H., Xuan, X., 2017. Molecular detection and genetic diversity of bovine *Babesia* spp., *Theileria orientalis*, and *Anaplasma marginale* in beef cattle in Thailand. *Parasitol. Res.* 116, 751-762.
- Kaewhom, P and Thitasarn, W., 2017. The prevalence of *Theileria* spp. of goat in Watthana Nakhon District, Sa Kaeo Province. *Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine.* 12, 57-66. (In Thai)
- Kamau, J., de Vos, A.J., Platford, M., Salim, B., Kinyajui, P., Sugimoto, C., 2011 Emergence of new types of *Theileria orientalis* in Australian cattle and possible cause of theileriosis outbreaks. *Parasit Vector.* 4, 22.
- Lee, S.H., Kim, K.T., Kwon, O.D., Ock, Y., Kim, T., Choi, D., Kwak, D., 2016. Novel detection of *Coxiella* spp., *Theileria luwenshuni*, and *T. ovis* endosymbionts in deer keds (*Lipoptena fortisetosa*). *PLoS ONE*, DOI: 10.1371/journal.pone.0156727
- Liu, J., Guan, G., Liu, Z., Liu, A., Ma, M., Bai, Q., Yin, H., Luo J., 2012. Additional data for a new *Theileria* sp. from China based on the sequences of ribosomal RNA internal transcribed spacers. *Exp. Parasitol.* 133, 217-221.
- Mans, B.J., Pienaar, R., Latif, A.A., 2015. A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 4, 104-118.
- Mehlhorn, H., Schein, E., 1985. The piroplasms: Life cycle and sexual stages. *Advances in Parasitology APL*, 23, 4th edition. Academic Press, pp. 38-105.
- Mukhebi, A.W., Perry, B.D., Kruska, R., 1992. Estimated economics of theileriosis control in Africa. *Prev. Vet. Med.* 12, 78-85.
- Phasuk, J., Sa-nguansab, S., Pinyopanuwat, N., Chimnoi, W., Jittapalapong, S., 2010. Diversity and seasonal abundance of blood-sucking flies in dairy farms in Amphur Muaklek of Saraburi province. *Proceedings of 48th Kasetsart University Annual Conference: Veterinary Medicine*, 128-137.
- Phasuk, J., Prabaripai, A., Chareonviriyaphap, T., 2013. Seasonality and daily flight activity of stable flies (Diptera: Muscidae) on dairy farms in Saraburi Province, Thailand. *Parasite.* 20, 17.
- Sivakumar, T., Hayashida, K., Sugimoto, C., Yokoyama, N., 2014. Evolution and genetic diversity of *Theileria*. *Infect. Genet. Evol.* 27, 250-263.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetic analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729.
- Terkawi, M.A., Huyen, N.X., Cao, S., Inpankaew, T., Maklon, K., Aboulaila, M., Ueno, A., Goo, Y.K., Yokoyama, N., Jittapalapong, S., Xuan, X., Igarashi, I., 2011. Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. *Vet. Parasitol.* 178, 201-207.

- Tumrasvin, W. and Shinonaga, S., 1978. Studies on medically important flies in Thailand. V. On 32 species belonging to the subfamilies Muscinae and Stomoxyinae including the taxonomic keys (Diptera: Muscidae). Bull Tokyo Med Dent Univ. 25, 201-227.
- Tumrasvin, W., 1989. *Tabanus* species and their distribution in Thailand (Diptera: Tabanidae). Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 20, 319-323.
- Tunnakundacha, S., Desquesnes, M., Masmeatathip, R., 2017. Comparison of Vavoua, Malaise and Nzi traps with and without attractants for trapping of *Stomoxys* spp. (Diptera: Muscidae) and tabanids (Diptera: Tabanidae) on cattle farms. Agriculture and Natural Resources. 51, 319-323.
- Uilenberg, G., 1995. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. Vet Parasitol. 57, 19-41.
- Watts, J.G., Playford, M.C., Hickey, K.L., 2016. *Theileria orientalis*: a review. N Z Vet J. 64, 3-9.
- Zumpt, F., 1973. Stomoxyine biting flies of the world. Gustav Fisher Verlag, pp. 175.
- 

**How to cite this article;**

Charoonluk Jirapatharasate, Tanasak Changbunjong, Poonyapat Sedwisai and Thekhawet Weluwanarak. Molecular detection of piroplasms in haematophagus flies in the Nakhon Pathom and Kanchanaburi provinces, Thailand. Veterinary Integrative Sciences. 2018; 16(2): 123-133.

---





Vet Integr Sci  
**Veterinary Integrative Sciences**

Web site; [www.vet.cmu.ac.th/cmvi](http://www.vet.cmu.ac.th/cmvi)



## Guide for Authors

“**Veterinary Integrative Sciences**” (Vet Integr Sci) was established since 2003. For the 15 years, we published science journal articles under the “Chiang Mai Veterinary Journal” before changing to an electronic title issuing in the year 2018 with free open access.

- ✚ 2003-2018 (volume 16, number 1) as the “Chiang Mai Veterinary Journal” (ISSN-print is 1685-9502 and ISSN-online is 2465-4604)
- ✚ 2018-presently, the “Veterinary Integrative Sciences”, since volume 16, number 2 and onwards.

Thank you for your interest in Veterinary Integrative Sciences. Note that submission implies that the content has not been published or submitted for publication elsewhere except as a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting on the symposium.

Once you have prepared your submission in accordance with the Guidelines, manuscripts should be submitted online at “<http://cmvj.info>”

For help with submissions, please contact: [cmuvtj@gmail.com](mailto:cmuvtj@gmail.com)  
We look forward to your submission.

## Scope

“Veterinary Integrative Sciences” is the official peer-reviewed journal of the Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand.

Aims to be a publisher of a wide range of high quality academic journals such as research articles, review articles, short communication, and case report in the field of veterinary, animal science and technology, including biology, physiology, anatomy&histology, microbiology, pathology, nutrition, genetics, internal medicine, surgery, obstetrics, biological science, basic science, one health and veterinary education.

Articles that are published under our journal are double-blind peer reviewed by at least two experts. The opinions of each author might not be agreed upon by the editorial board.

## Online publication

Veterinary Integrative Sciences will end paper publication and will be published online only for prompt publication. Annually, the Journal publishes three issues: the 1st issue during January-April, the 2<sup>nd</sup> issue during May-August, and the 3<sup>rd</sup> during September-December. Accepted article did not assign issues issue yet, will publish as “Online first”.

## Manuscript Format

**Research articles** is a report of original research which has never been published by any publisher before. The article is composed of an introduction, materials and methods, results, discussion, and conclusion.

**Review articles** is an academic article that presents issues of interests or is academically useful.

**Short communications** is a concise study report due to the limits of the study but is complete in terms of content. The format is similar to the original thesis, but is a brief report instead.

**Case reports** is a report of a rare case of ill animals that are thoroughly diagnosed. The topics include introduction, clinical history and symptoms, diagnosis and treatment, discussion, and conclusion. The case presentation is different from that in textbooks.

## Manuscript Preparation

The Veterinary Integrative Sciences welcome English articles. English manuscripts must be “Times New Roman” font of 12-point type should be used along with double spacing between lines, line numbering continually along the manuscripts. English articles from corresponding author does not belong to the English native speaker, author must be send a document to confirm that article was proofed by an English native speaker or authorized organization.

Submission files of all the four types of manuscripts must compose of four separate files: cover letter file, title page file, main manuscript file and figure file(s).

## Cover letter

Cover letter from the corresponding author, assuring that the article has never been published before and also not in consideration of other publishers.

In the cover letter, the author has to suggest a list of potential reviewers (at least 3 reviewers) with their names, company/organization, and email address for the editorial board's consideration. The list of reviewers must not be shown in the submitted manuscript.

## Title Page

Title page is composed of the followings.

1. Title of the article in English and Thai language (article in Thai). The title should be concise and refers to the content of the article.
2. Name of author(s) and corresponding author in English and Thai language (article in Thai)
3. List of Email addresses of all authors.
4. Acknowledgements and author contribution section

Authors name

- ✚ First names (or first initials in combination with full middle names)
- ✚ Middle names (or initials, if used)
- ✚ Last names (surname, family name)

Affiliations (indicate multiple affiliations, or current addresses where appropriate)

- ✚ Department, university, or organizational affiliation
- ✚ Location: city, state/province (if applicable)/poscost
- ✚ Country

Corresponding Author

- ✚ First and Last name
- ✚ Tellophone number, Fax number (if applicable)
- ✚ Email address

## Main Manuscript

Main manuscript will be sent to reviewers and will not show name and address of all the author(s). It is composed of the followings.




1. Title in English language
2. Abstract in English language an abstract of the original article and a review article should not exceed 250 words.  
Abstract of short communication and case report should not exceed 200 words.
3. Keywords of 3-5 words must be listed below the abstract in English language.
4. Content

Research articles and short communication should comprise of the topics respectively as follows: introduction, materials and methods, results, discussion, conclusion, conflict of interest, references, table and figure legends.

If there is any mathematical equation, "Microsoft equation editor" or "Math Type" software should be employed.

5. Figures and tables should be listed at the end of the article.
6. If animals were used in the study, permission to use animals for scientific study from the Animal Ethics Committee must be identified. The organization of the Committee, the date of the permit, and license number (if available) must be mentioned under the topic of Materials and Method.

## Figure

1. Figure tile, captions and information in figures must be in English only. Use “Figure 1 XXXX” for figure tile and used “(e.g. Fig. 1) or “..as shown in figure 1.” in the text.
2. Figure legend should be listed at the end of manuscript following table.
3. Figures should be in TIFF or JPEG format and each figure submitted separately. The file’s name should be “figure\_1.jpg”, figure\_2.jpg”.
4. CMYK format for color figures and the resolution of the figures should be higher, but size should not larger than 2 MB.
  -  600 DPI/PPI for picture-only (without text of any kind) figure files
  -  600 DPI/PPI for figures containing pictures and lie elements (i.e., text labels, thin lines, arrows, etc.)
  -  1200 DPI/PPI for black and white images such as line drawings, graphs, or charts
5. Order and format of the figures should be in order as they appear in the content.
6. If figures display scale, scale bar must be accompanied.
7. The panels of each multi-part figure should be arranged however the figure is intended to be published and saved in a single file. Each part should be labeled with an uppercase letter for each figure part (e.g. Fig. 1C) and a single number for the whole figure group.
8. The author must show document(s) giving permission to use licensed figure(s).

### Accepted and preferred file formats

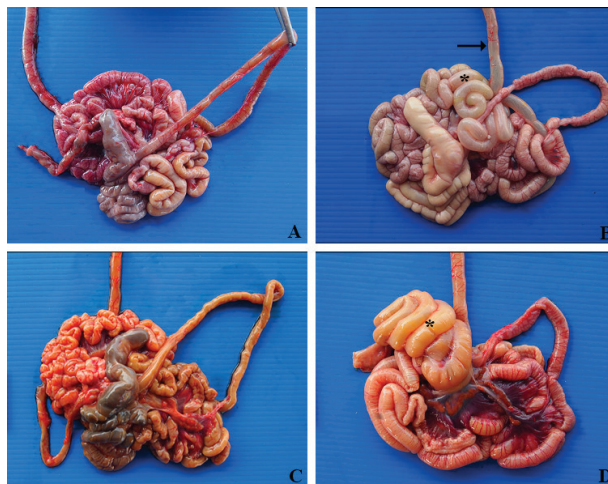
Figures	Use the original file format and image size whenever possible.
Vector images (e.g. charts, diagrams):	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PDF</li> <li>• JPG (preferred)</li> <li>• PNG</li> <li>• TIF</li> </ul>
Raster/bitmap images (e.g. drawings, screenshots):	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PNG</li> <li>• JPEG (preferred)</li> <li>• PDF</li> <li>• TIF (preferred)</li> </ul>



## Table

1. Table can embed in main manuscript after “References” section.
2. Table should create using function “Table” in Microsoft word. Please, do not use excel of insert table as figure.
3. Accepted and preferred file formats for table is Microsoft word.
4. Table caption and content in the tables must be in English only.
5. Numbers and table captions must be above tables.
6. Place footnotes below the table; these may be used to explain abbreviations.
7. Include units in column and row headings, in parentheses.
8. Tables must fit in a single 21.6 x 28 cm page with 2.5 cm margins.
9. Vertical table lines should be avoided; horizontal lines should be used to separate topics from content.

### Sample figure



**Figure 1** The necropsy results of piglets at different ages; 3-day old and 10-day-old piglets, (A); 250 normal 3-day-old piglet, (B); 3-day-old PEDV-infected piglet, (C); normal 10-day-old piglet, (D); 10-day-old PEDV-infected piglet. The 3-day-old piglet infected with PEDV shows thin intestinal wall (B, arrow). Intestinal dilatation with fluid accumulation (\*) is shown in 3-day old and 10-day-old PEDV-infected piglets (B and D, respectively).

## Sample table

**Table 1** Villous height (VH), crypt depth (CD) and ratio of VH to CD in small intestine of normal and PEDV-infected piglets at 3 and 10 days of age.

	Group			
	A (n=5)	B (n=5)	C (n=5)	D (n=5)
<b>Duodenum</b>				
Villous height (µm)	387.6 ± 22.91	336.1 ± 18.63	423.3 ± 18.83	436.6 ± 23.86
Crypt depth (µm)	185.8 ± 8.99	196.8 ± 6.99	210.6 ± 10.08	171.4 ± 6.26
Villous: Crypt ratio	2.17:1	1.80:1	2.20:1	2.43:1
<b>Jejunum</b>				
Villous height (µm)	358.9 ± 24.00	200.5 ± 9.03	459 ± 31.51	321.1 ± 22.47
Crypt depth (µm)	119.7 ± 4.70	143.4 ± 4.58	181.5 ± 7.24	182.7 ± 4.95
Villous: Crypt ratio	3.11:1	1.41:1	2.69:1	1.73:1
<b>Ileum</b>				
Villous height (µm)	284.4 ± 17.99	176.2 ± 10.95	271.6 ± 13.73	248.7 ± 19.36
Crypt depth (µm)	134.2 ± 7.88	137.2 ± 4.31	153.8 ± 5.41	162.5 ± 4.50
Villous: Crypt ratio	2.07:1	1.26:1	1.77:1	1.49:1

## References

The name-year system should be employed for in-text citations. All referenced documents should be in English. If referenced documents are in other languages, the author must translate them into English. Authors are welcome to use reference managers such as Endnote, Reference manager, or Zotero, which allow faster proofreading and publishing. **Endnote template is available for downloading from our's website.**

1. All in-text citations must have corresponding citations in the reference list.
2. The name - year system must be employed for in-text citations. For example, "Based on the study of Toyoki (2010), it was shown that..." or "... corresponding to the study in canines (Hirada, 2010), horse (Maki and Hida, 2011) which discovered the level..."
3. If citing more than one name of authors, the first author must be cited and followed by *et al.* For example, "... High level of Oct-4 gene expression was discovered in blastocyst (Nganvongpanit *et al.*, 2006)"
4. Reference list should be in alphabetical order.
5. References by the same author and same year of publication should be cited, for example, as 2010a, 2010b.
6. If referenced documents are not in English, they must be translated into English, but with permission of the authors of such documents.
7. Studies that have been published but are during preparation should be identified as "in press" at the end of the reference.

8. Referenced documents in Thai or other languages such as German, Chinese, Japanese must be translated into English. Their references must be followed by (in Thai, in German, in China, in Japan) depending on the language of the documents.
9. Studies that have not been published cannot be used as reference.
10. Studies that are published online without volume and page number must be identified by the Digital Object Identifier (DOI).
11. The title abbreviation must, in accordance with Title Word Abbreviations: ([http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-Itwa/.](http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-Itwa/))
12. Sample references
  - 12.1. Journals
    - Maneepitaksanti, W., Worananthakij, W., Sriwilai, P., Laoprasert, T., 2014. Identification and distribution of gill monogeneans from Nile tilapia and red tilapia in Thailand. *Chiang Mai Vet. J.* 12, 57–68.
    - Tongkamsi, S., Singasa, K., Tubtim, T., Nakbubpa, K., Chansilpa, T., Kayee, S., 2015. Effects of storage time at 32.5 °C on amount of *Bacillus cereus* in UHT milk for school in Chonburi province. *Chiang Mai Vet. J.* 13, 1–6. (In Thai)
  - 12.2. Conference reports
    - Caffrey, J.P., 1994. Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. In: Wood, P.R.,
    - Monaghan, M.L., Rothel, J.S. (Eds.), *Bovine Tuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 40, 1–4.
  - 12.3 Books
    - Armitage, P., Berry, G., 1987. *Statistical Methods in Medical Research*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 94–100, 411–416.
    - AUTHOR INFORMATION PACK 4 Oct 2015  
[www.elsevier.com/locate/vetmic](http://www.elsevier.com/locate/vetmic) 12
  - 12.4 Chapters from book
    - Butler, J.E., 1981. A concept of humoral immunity among ruminants and an approach to its investigation. In: Butler, J.E., Nielson, K., Duncan, J.R. (Eds.), *The Ruminant Immune System*, Plenum Press, New York, pp. 3–55.

## Acknowledgements

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission, from the contributor, in an Acknowledgements section. Financial and material support should also be mentioned. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate. The Acknowledgements statement should be included within “the title page file” of your submission.

## Conflict of Interest Statement

The Conflict of Interest statement should be included within the main text file (before reference section) of your submission.

## Author contribution

The author contribution statement should be included within “the title page file” of your submission.

## Plagiarism

English articles submitted for publication will be checked for plagiarism with Turn it in software by the editorial board. If any duplication that might indicate plagiarism is detected, the editorial board might reject the article.

## Copy right transfer

By default, we publish these open access articles under a Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial.

## Manuscript submission checklist

- Cover letter file
- Title page file
- Main manuscript file
- Figures files (captions and content in figures and tables in English)

### Editorial office:

Editor in Chief

Korakot Nganvongpanit, B.Sc., D.V.M., Ph.D.

Department of Veterinary Biosciences and Veterinary Public Health, Chiang Mai University, Mae-Hia, Muang, Chiang Mai 50100, Thailand

E-mail: [cmuvtj@gmail.com](mailto:cmuvtj@gmail.com) or [korakot.n@cmu.ac.th](mailto:korakot.n@cmu.ac.th)

-----





## THE FACULTY OF VETERINARY MEDICINE CHIANG MAI UNIVERSITY

---

ADDRESS : MAE HIA, MUANG, CHIANG MAI, 50100  
THAILAND

WEBSITE : [HTTP://WWW.VET.CMU.AC.TH/CMUJ](http://www.vet.cmu.ac.th/cmuj)

EMAIL : [CMUVETJ@GMAIL.AC.TH](mailto:CMUVETJ@GMAIL.AC.TH)