โครงสร้างและโครงสร้างละเอียดของลำไส้ของพยาธิใบไม้ตับอ่อน *Eurytrema pancreaticum*

Histology and ultrastructure of caeca of *Eurytrema pancreaticum*

อาดูลย์ มีพูล* และ สุติรัตน์ ปุ่นประเสริฐ

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ต. แสนสุข อ. เมือง จ. ชลบุรี 20131

Ardool Meepool* and Sutiratana Poonprasert

Department of Medical Science, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, Thailand, 20131

บทคัดย่อ

จากการนำพยาธิใบไม้ตับอ่อน *Eurytrema pancreaticum* ระยะตัวเต็มวัยมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าลำไส้พยาธิชนิดนี้มีลักษณะเป็นท่อยาวปลายตัน 2 ท่อ ส่วนต้นต่อมาจากหลอดอาหาร (esophagus) ซึ่งต่อมาจากคอหอย (pharynx) และช่องปาก (mouth cavity) ที่ล้อมรอบด้วย oral sucker ตามลำดับ ผนังลำไส้บุด้วยเซลล์เยื่อบุชั้นเดียวล้อมรอบด้วยกล้ามเนื้อบางๆ และเซลล์ค้ำจุน (parenchymal cell) รูปร่างและองค์ประกอบของเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้มีลักษณะแตกต่างกันตามภาวการณ์หดหรือขยายตัวของลำไส้ ในขณะที่ลำไส้หดตัวเซลล์เยื่อบุมีลักษณะคล้ายปิรามิด นิวเคลียสอยู่บริเวณฐานเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์บริเวณฐานพับไปมา (basal infolding) และยื่นเข้าไปประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของไซโตพลาซึม ผิวด้านบนของเซลล์ประกอบด้วย cytoplasmic process และ cytoplasmic lamella จำนวนมากยื่นเข้าไปภายในช่องว่างของลำไส้ ภายในไซโตพลาซึมพบ secretory granules, lipid droplets, mictochodria และ rough endoplasmic reticulum (RER) จำนวนมากกระจายอยู่ทั่วไป ในขณะที่ลำไส้ขยายตัวเต็มที่นั้นบุด้วยเซลล์เยื่อบุผิวทรงสั้น ไม่พบการพับตัวของเยื่อหุ้มเซลล์บริเวณฐานเซลล์ที่ผิวด้านบนของเซลล์พบ cytoplasmic process ขนาดเล็กและสั้น ระยะห่างระหว่าง cytoplasmic lamella กว้างขึ้น และภายในไซโตพลาซึมพบ secretory granule กระจายอยู่ห่างๆ และพบ endocytic vacuole และ lipid droplets กระจายอยู่ทั่วไป จากข้อมูลนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาผลกระทบของยาฆ่าพยาธิ หรือสมุนไพรต่างๆ ที่ออกฤทธิ์ผ่านเซลล์เยื่อบุลำไส้ตลอดจนการศึกษาชนิดของสารคัดหลั่งจากลำไส้พยาธิชนิดนี้ต่อไป

คำสำคัญ : พยาธิใบไม้ตับอ่อน ลำไส้ โครงสร้างละเอียด

***Corresponding author.** E-mail: ameepool@yahoo.com

Abstract

Histology and ultrastructure of the gut epithelium of the pancreatic fluke, *Eurytrema pancreaticum,* are revealed by the light and transmission electron microscopes. This parasite has two close-end tubular caeca which continue from the esophagus, pharynx and oral sucker respectively, and extends to the posterior part of the body. The caeca line with a single layer of epithelial cells and surround with thin muscle and parenchymal cells. The shapes and structure of epithelial cell of the caeca depended on their dilated condition. For the constricted caecum, the epithelial cells have pyramidal shape with large and long cytoplasmic processes and lamellae at the apical domain, and numerous basal inflolding at the basal domain. Their cytoplasm contains numerous secretory granules and lipid droplets. In case of fully-dilated caecum, the wall is lined with flat epithelial cells with short and small cytoplasmic processes at the apical surface and smooth basal plasma membrane. They contain numerous endocytic vacuoles in all part of the cell, some excretory granules at the apical surface, and some large lipid droplets particularly in the basal domain of their cytoplasm. This finding will be used as a basic knowledge for studying effects of drugs and herbs reacted to the gut wall and types of excretory-secretory antigens secreted from the gut epithelium.

Keywords : *Eurytrema pancreaticum,* caecum, ultrastructure

บทนำ

โรคพยาธิใบไม้ตับอ่อน (Eurytremiasis) เกิดจากการติดเชื้อพยาธิ *Eurytrema pancreaticum* (Class: Trematoda, Family: Dicrocoeliidae) ซึ่งเป็นโรคหนึ่งที่สร้างปัญหาให้กับอุตสาหกรรมสัตว์เลี้ยงในประเทศไทย และภาคพื้นเอเชียโดยเฉพาะอย่างยิ่งในโคและกระบือ (Min, 1981) นอกจากนี้ยังพบการเกิดโรค Eurytremiasis ในคนด้วย (Ishii *et al.,* 1983) เมื่อพยาธิเข้าสู่ร่างกายของโฮสต์จะมีการผลิตและคัดหลั่งสาร (excretory-secretory materials) เข้าสู่ร่างกายของโฮสต์ จากการศึกษาในพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* พบว่า ลำไส้และเนื้อเยื่อปกคลุม (tegument) เป็นแหล่งผลิตสารคัดหลั่งเข้าสู่โฮสต์ (Sobhon *et al.,* 1996) ซึ่งโปรตีนที่คัดหลั่งมาจากพยาธิสามารถนำไปศึกษาและพัฒนาเป็นวัคซีนหรือตัวชี้วัดการติดเชื้อพยาธิด้วยวิธีทางอิมมูนวิทยาได้ เช่น cathepsin L protease (cat-L) และ leucine aminopeptidase ซึ่งเป็นโปรตีนหลักที่คัดหลั่งจากลำไส้ของพยาธิ *F. gigantica* และ *F. hepatica* และมีศักยภาพในการเป็นวัคซีนและตัวชี้วัดการติดเชื้อสูง (Smith *et al.,* 1993; Dowd *et al.,* 1994; Dalton *et al.,* 1996; Mulcahy & Dalton, 2001; Sriveny *et al.,* 2006) และจากการศึกษาแหล่งผลิตสารคัดหลั่งของพยาธิ E. *pancreaticum* พบว่าลำไส้เป็นอวัยวะหนึ่งที่ผลิตและคัดหลั่งสาร (อาดูลย์ มีพูล และกมลชนก งามสม, 2550) นอกจากลำไส้จะเป็นแหล่งคัดหลั่งแอนติเจนที่สำคัญของพยาธิแล้วยังมีรายงานว่ายา Clorsulon และ Nitroxynil สามารถออกฤทธิ์ในการทำลายเซลล์เยื่อบุลำไส้พยาธิ *F. hepatica* (Meaney *et al.,* 2004; McKinstry *et al.,* 2007) ซึ่งในการศึกษาชนิด การผลิต และคัดหลั่งแอนติเจนจากลำไส้ตลอดจนผลของยาฆ่าพยาธิและสมุนไพรต่างๆ ต่อเซลล์เยื่อบุลำไส้ของพยาธิชนิดนี้จำเป็นต้องใช้ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับโครงสร้างและโครงสร้างละเอียดของเซลล์เยื่อบุลำไส้ในภาวะปกติ แต่จนถึงปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับลำไส้ของพยาธิชนิดนี้ มีเพียงการศึกษาในพยาธิ *Schistosoma mansoni* (Morris, 1967), *F. hepatica* (Robinson & Treadgold, 1975), *Paramphistomum cervi* (Vijaya *et al.,* 1978) และ *Diplodiscus subclavatus* (Halton, 1997) ดังนั้นงานวิจัยนี้มุ่งที่จะศึกษาโครงสร้างและโครงสร้างละเอียดของลำไส้ของพยาธิ *E. pancreaticum* เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำวิจัยเกี่ยวกับโปรตีนที่คัดหลั่งจากลำไส้พยาธิเพื่อการพัฒนาวัคซีนและตัวชี้วัดการติดเชื้อพยาธิชนิดนี้ต่อไป

วิธีการทดลอง

1. การเก็บรวบรวมพยาธิ

พยาธิตัวเต็มวัยถูกเก็บรวบรวมจากท่อตับอ่อนของโคที่ถูกฆ่าจากโรงฆ่าสัตว์และล้างด้วย 0.9% NaCl ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมออก จากนั้นแบ่งพยาธิออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 นำพยาธิทั้งตัวมาประกบด้วยกระจกสไลด์ 2 แผ่น เพื่อให้ลำตัวพยาธิแบนและบาง แล้วแช่ในน้ำยาคงสภาพ AFA (70% ethanol, 10% formalin, 5% glacial acetic acid) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง กลุ่มที่ 2 แช่ในน้ำยาคงสภาพ 2.5% glutaraldehyde ใน PBS (0.1 M phosphate buffer saline, pH 7.4) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นล้างและเก็บรักษาใน PBS ที่อุณหภูมิ 4 °C

2. การย้อมสีพยาธิทั้งตัว

นำพยาธิที่ผ่านการคงสภาพด้วย AFA มาล้างด้วย 70% ethanol และย้อมด้วยสี Semicon's carmine นาน 2-3 ชั่วโมง นำพยาธิมาล้างสีส่วนเกินใน 70% ethanol และ 1% hydrochloric acid ใน 70% ethanol จนเห็นอวัยวะภายในชัดเจน จากนั้นแช่ใน 70, 80, 90, 95 และ 100% ethanol ขั้นละ 15 นาที ตามลำดับ และแช่ใน xylene 3 ครั้งๆ ละ 15 นาที จากนั้นปิดด้วยกระจกปิดสไลด์โดยใช้ Permount™ เป็นตัวกลาง สุดท้ายนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ (BX51, Olympus)

3. การย้อมไขมัน

นำพยาธิที่ผ่านการคงสภาพด้วย 2.5% glutaraldehyde แช่ในสารละลายน้ำตาลซูโครสในน้ำเข้มข้น 5% และ 30% ตามลำดับอย่างละ 30 นาที จากนั้นฝังเนื้อเยื่อพยาธิใน freezing medium (Tissue Tex®) แช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 °C และนำไปตัดด้วยเครื่อง cryostat ที่อุณหภูมิ -20 °C ให้มีความหนาประมาณ 5-10 ไมโครเมตร และนำตัวอย่างที่ตัดได้ยึดติดกับสไลด์ที่ผ่านการเคลือบด้วยสารละลาย 1% เจลลาติน จากนั้นนำสไลด์แช่ใน 1% Oil Red O ใน isopropanol เป็นเวลา 10 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นย้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วย Mayer's hematoxylin เป็นเวลา 1-2 นาที ล้างน้ำประปานาน 10-15 นาที จากนั้นปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยใช้ glycerol ผสมกับ PBS อัตรา 9:1 เป็นตัวกลาง และนำไปศึกษาและถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์

4. การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ และจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

นำพยาธิที่ผ่านการรักษาสภาพใน glutaraldehyde นำมาตัดเป็นชิ้นประมาณ 1x1 มิลลิเมตร และแช่ในสารละลาย 1% osmium tetroxide ใน PBS ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาล้างด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 °C จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นกำจัดน้ำในเนื้อเยื่อโดยการแช่ใน ethyl alcohol ที่ความเข้มข้น 70%, 80%, 90%, 95% 2 ครั้ง, 100% 2 ครั้งๆ ละ 30 นาทีตามลำดับ ตามด้วยการแทนที่ ethyl alcohol ด้วย propylene oxide (PO) 2 ครั้งๆ ละ 30 นาที, PO: Araldite 502 resin อัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และอัตราส่วน 2:1 เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง จากนั้นฝังเนื้อเยื่อพยาธิใน pure Araldite 502 resin และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 45 °C และที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลาอย่างละ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นตัดเนื้อเยื่อที่ฝังอยู่ใน resin blocks ด้วยเครื่อง ultramicrotome ที่ความหนา 500-700 นาโนเมตร ตรึงบนแผ่นสไลด์แก้ว แล้วนำไปย้อมด้วย 1% aqueous methylene blue และนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง และตัดที่ความหนา 60-90 นาโนเมตร ตรึงบน copper grid และย้อมด้วย saturated urenyl acetate ใน 70% methanol และ 0.1% aqueous lead citrate อย่างละ 15 นาที จากนั้นนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ณ ศูนย์ปฏิบัติการกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

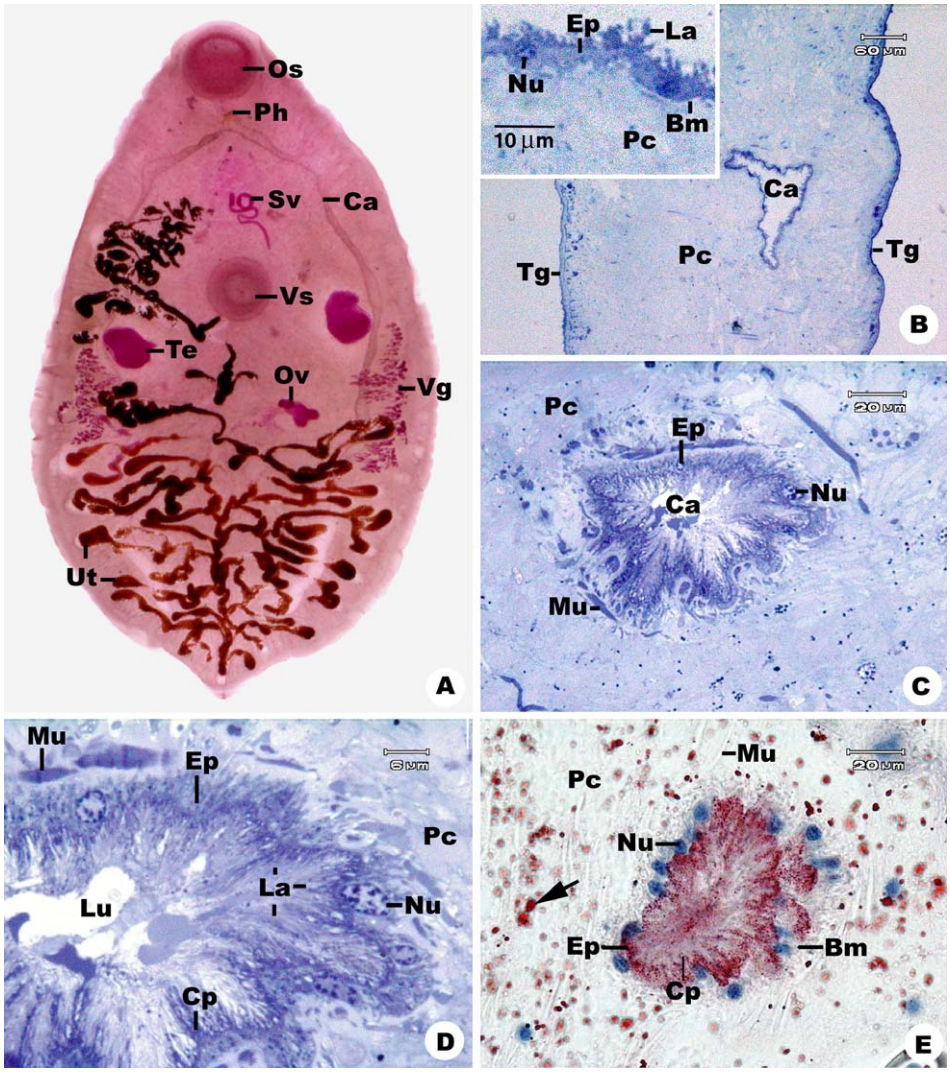
ผลการทดลอง

โครงสร้างของลำไส้พยาธิ *E. pancreaticum*

พยาธิ *E. pancreaticum* เป็นพยาธิใบไม้ตับอ่อนลักษณะลำตัวแบนไม่มีข้อและปล้อง ลำตัวด้านหลังและด้านท้องแบนเข้าหากัน หัวท้ายมน ยาวประมาณ 8-16 มิลลิเมตร และกว้าง 5-5.8 มิลลิเมตร มีอวัยวะสำหรับยึดเกาะลักษณะคล้ายถ้วย 2 อัน ได้แก่ oral sucker อยู่รอบปากทางส่วนหัว และ ventral sucker หรือ aceta-bulum อยู่บริเวณ 1 ใน 3 ด้านท้องของลำตัว (ภาพที่ 1A) อวัยวะในระบบทางเดินอาหารเริ่มจาก oral sucker ต่อมาคือ คอหอย (pharynx) ซึ่งมีลักษณะเป็นท่อสั้นๆ ล้อมรอบด้วยกล้ามเนื้อ จากนั้นเป็นท่อหลอดอาหาร (esophagus) ซึ่งมีปลายแยกออกเป็นลำไส้ (caecum) สองท่อ ท่อของลำไส้นี้ไม่มีการแตกแขนงทอดยาวลงทั้งสองข้างของลำตัวและสิ้นสุดที่ประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของลำตัว ด้านนอกของลำไส้ล้อมรอบด้วยกล้ามเนื้อบางๆ และเซลล์ค้ำจุน (parenchymal cells) ผนังของท่อบุด้วยเซลล์บุผิวชั้นเดียว นิวเคลียสเป็นรูปรีอยู่ชิดไปทางด้านฐานของเซลล์ซึ่งติดกับ basement membrane ส่วนบนของเซลล์มี cytoplasmic process และ lamella ยื่นเข้าไปภายในช่องว่างของลำไส้ (ภาพที่ 1B-D) รูปร่างและขนาดของเซลล์เยื่อบุขึ้นอยู่กับภาวการณ์หดหรือขยายตัวของลำไส้ ลำไส้ที่หดตัวเซลล์จะมีลักษณะเป็นเซลล์ทรงสูง ส่วนยอดมี cytoplasmic process ยาวแหลมยื่นเข้าไปภายในท่อ ส่วนฐานของเซลล์หยักไปมา (ภาพที่ 1C, D) ในขณะที่ลำไส้ที่ขยายตัวเซลล์เยื่อบุจะมีลักษณะแบน cytoplasmic process สั้น ส่วนฐานของเซลล์และ basement membrane เหยียดตรง (ภาพที่ 1B) ย้อมไขมันด้วยสี Oil Red O (ภาพที่ 1E) พบว่า ลำไส้มีก้อนไขมัน (lipid droplet) กระจายตัวอยู่เป็นจำนวนมากโดยเฉพาะอย่างยิ่ง บริเวณ cytoplamic processes และ lamella ซึ่งไขมัน เหล่านี้จะมีขนาดเล็กกว่าก้อนไขมันที่พบสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อค้ำจุน

โครงสร้างละเอียดของลำไส้พยาธิ *E. pancraticum*

เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า caecum บุด้วยเซลล์เยื่อบุผิวชั้นเดียวล้อมรอบ caecum ซึ่งในขณะที่ลำไส้หดตัวเซลล์มีรูปร่างคล้ายปิรามิดเนื่องจากมี cytoplasmic process ขนาดใหญ่และสูง และมี cytoplasmic lamella ยาวจำนวนมากยื่นเข้าไปภายในท่อของลำไส้ (ภาพที่ 2A) ส่วนฐานของเซลล์ยึดติดกับ basement membrane ที่หยักไปมา มี basal lamina ที่หนา และมี cytoplasmic process ของเซลล์ค้ำจุนแทรกตัวทะลุ basal lamina เข้าไปสัมผัสโดยตรงกับเยื่อหุ้มเซลล์ด้านฐาน (basal plasma membrane) ของเซลล์เยื่อบุลำไส้ นอกจากนี้เยื่อหุ้มเซลล์ด้านฐานยังมีการพับตัวแทรกเข้าไปในไซโตพลาซึมเกิดเป็น basal infolding ประมาณ 2 ใน 3 ของเซลล์ (ภาพที่ 2A-C, E, F) ภายในไซโตพลาซึมมี mitochondria และ rough endoplasmic reticulum จำนวนมากส่วนใหญ่แทรกตัวอยู่ระหว่าง basal infolding นอกจากนี้ยังพบ secretory granule กระจายตัวอยู่ทั่วทั้งเซลล์และมีความหนาแน่นมากบริเวณส่วนบนของเซลล์ และ cytoplasmic process (ภาพที่ 2B-E) และพบถุงไขมันขนาดใหญ่บริเวณฐานของเซลล์ และบางถุงมีการเชื่อมต่อกับเยื่อหุ้มเซลล์ด้านฐาน (ภาพที่ 2F) นิวเคลียสของเซลล์มี heterochromatin กระจายอยู่ห่าง ๆ

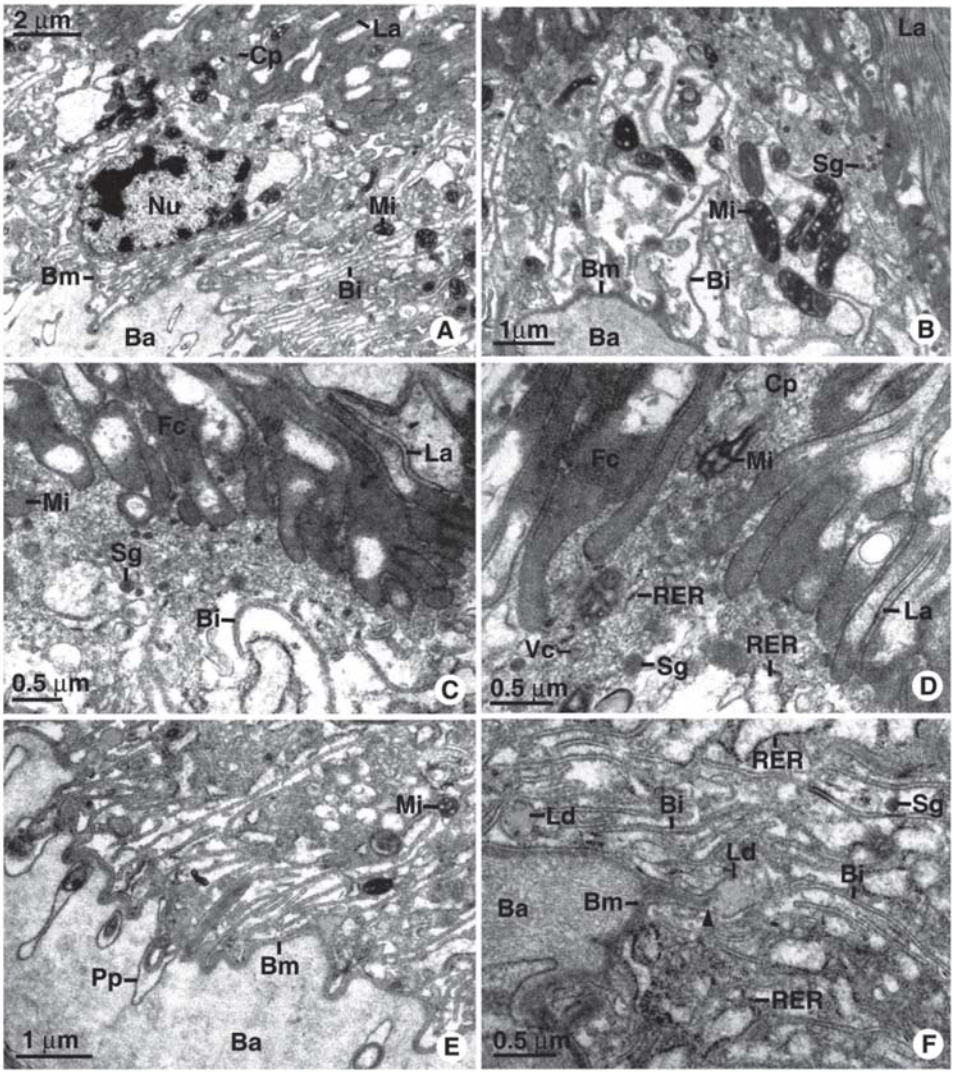


ภาพที่ 1 **A)** ภาพพยาธิตัวเต็มวัยทั้งตัวย้อมด้วย Semicon's carmine แสดงตำแหน่ง oral sucker (Os), ventral sucker (Vs) และตำแหน่งของอวัยวะภายใน ได้แก่ คอหอย (Ph), ลำไส้ (Ca); Sv - Seminal vesicle, Te - testes, Ov - Ovary, Vg - Vitelline gland และ Ut - Uterus

B) ภาพ semithin section ย้อมด้วย Methyline Blue ของลำตัวพยาธิตัดตามขวางแสดง dilated caecum (Ca) ที่ล้อมรอบด้วย เซลล์ค้ำจุน (Pc) และภาพขยาย (ภาพแทรก) แสดงลักษณะของ epithelial cell (Ep) ที่มี cytoplasmic lamella (La) ยื่นเข้าไปภายใน lumen และ Basement membrane (Bm) ที่ยึดเซลล์เยื่อบุให้ติดกับ เซลล์ค้ำจุน (Pa); Nu - นิวเคลียส, Tg -Tegument.

C, D) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลาง (C) และกำลังขยายสูง (D) บริเวณลำไส้ (Ca) ที่ไม่มีอาหาร แสดงลักษณะของ epithelial cell (Ep) ที่มี cytoplasmic process (Cp) และ cytoplasmic lamella (La) ยื่นเข้าไปใน lumen (Lu) ส่วนฐานเซลล์มีลักษณะหยักไปมา และด้านนอกถูกล้อมรอบด้วยกล้ามเนื้อ (Mu)

E) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางจากกล้องจุลทรรศน์ของลำไส้ของพยาธิใบไม้ตับอ่อน ย้อมด้วย Oil Red O และ Mayer's Hematoxilin แสดงการกระจายตัวของก้อนไขมันขนาดเล็กจำนวนมากบริเวณ Cytoplasmic process และ cytoplasmic lamella (La) ของเซลล์เยื่อบุ (Ep) และก้อนไขมันขนาดใหญ่ (ลูกศร) บริเวณ basement membrane (Bm) และเซลล์ค้ำจุน (Pc); Mu - กล้ามเนื้อ, Nu - นิวเคลียส

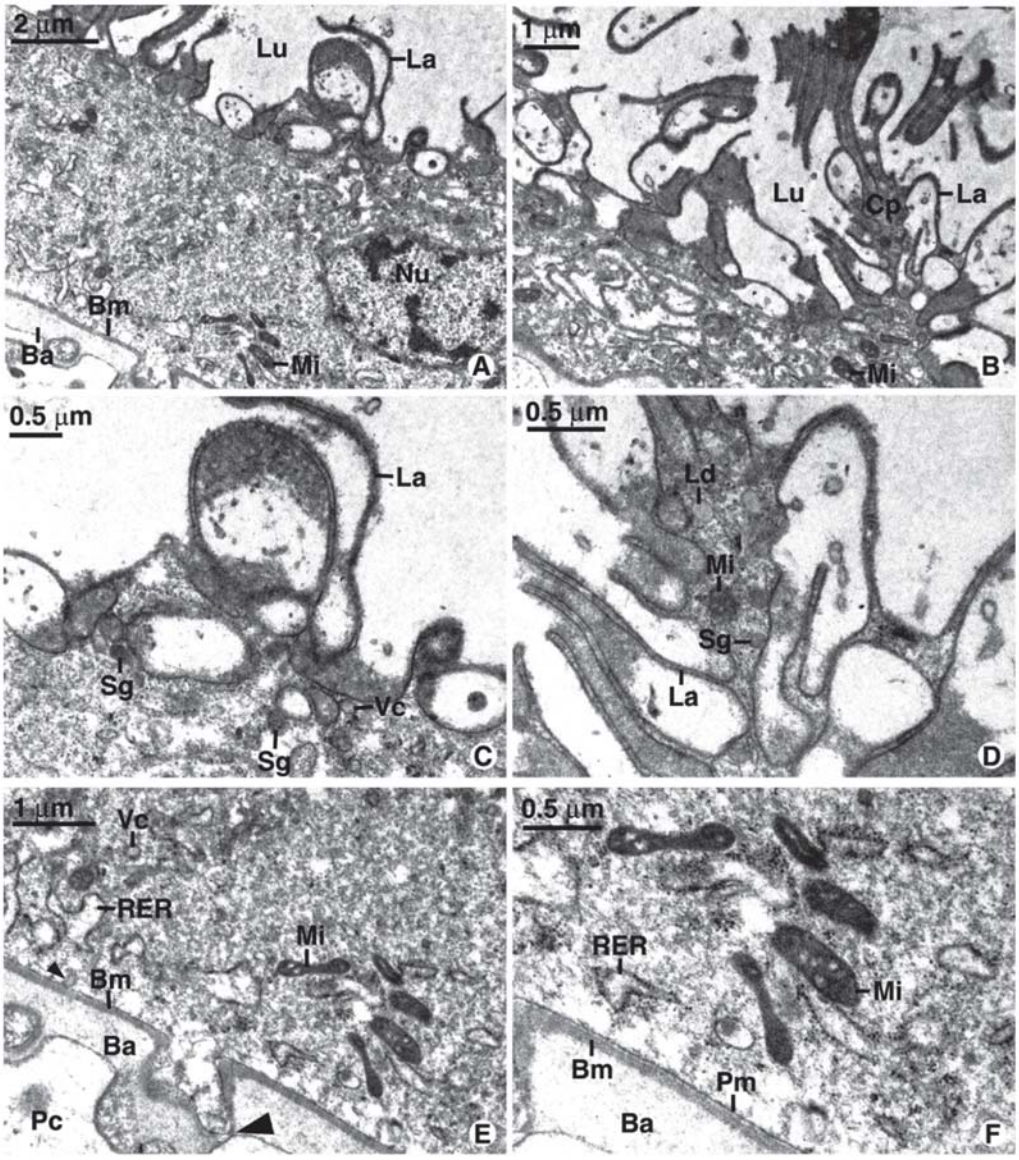


ภาพที่ 2 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของพยาธิใบไม้ในตับอ่อนบริเวณ epithelium ของ empty caecum

A,B) ภาพกำลังขยายต่ำแสดงเซลล์เยื่อบุลำไส้ซึ่งมี cytoplasmic process (Cp) และ cytoplasmic lamella (La) อยู่บริเวณ apical surface ภายในเซลล์ประกอบด้วย นิวเคลียส (Nu) ที่มี heterochromatin กระจายอยู่ห่างๆ ภายในไซโตพลาซึมมี mitochondria (Mi) รวมกันอยู่บริเวณส่วนกลาง และ secretory granule (Sg) จำนวนมาก และบริเวณ basal domain ยึดติดกับ basement membrane (Bm) ที่หยักไปมา และ basal plasma membrane (Pm) พับทบไปมา (basal infolding, Bi) และแทรกเข้าไปประมาณ 2/3 ของ ไซโตพลาซึม; Ba - basal lamina

C, D) ภาพขยายบริเวณ apical surface ของเซลล์เยื่อบุลำไส้แสดง cytoplasmic process (Cp) และ cytoplasmic lamella (La) ที่ยื่นเข้าไปใน lumen และ food content (Fc) ที่แทรกอยู่ระหว่าง cytoplasmic lamella ภายในไซโต-พลาซึมมี secretory granule (Sg), endocytic vacuole (Vc), mitochondria (Mi) และ rough endoplasmic reticulum (RER); Bi -Basal infolding.

E, F) ภาพขยายบริเวณ basal domain ของเซลล์เยื่อบุลำไส้ แสดง basement membrane (Bm) ที่หยักไปมาและแทรกตัวเข้าไปใน basal lamina (Ba) ไปสัมผัสกับ parenchymal cell process (Pp) และ basal plasma membrane (ลูกศร) มีการพับตัวเข้าไปในไซโตพลาซึม (Basal infolding, Bi) โดยมี rough endoplasmic reticulum (RER) ก้อนไขมัน (Ld) secretory granule (Sg) แทรกอยู่



ภาพที่ 3 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของพยาธิใบไม้ในตับอ่อน บริเวณเยื่อบุลำไส้ที่มีอาหารอยู่

A, B) ภาพกำลังขยายต่ำบริเวณเซลล์เยื่อบุประกอบด้วย นิวเคลียส (Nu) ที่มี heterochromatin เป็นขดทึบ ยอดเซลล์มีการยื่นเป็น lamella (La) เข้าไปใน lumen (Lu) ภายในไซโตพลาซึมมี mitochondria (Mi) กระจายอยู่ทางด้านฐานของเซลล์ ส่วน basal plasma membrane ยึดติดกับ basement membrane (Bm) และ basal lamina (Ba) และไม่พบ basal infolding และ apical surface มี cytoplasmic lamella (La) จำนวนมากยื่นเข้าไปภายใน lumen นอกจากนี้ยังพบ cytoplasmic process (Cp) ขนาดเล็กกระจายตัวอยู่ห่างๆ

C, D) ภาพกำลังขยายสูงบริเวณ cytoplasmic process (Cp) และ cytoplasmic lamella (La) แสดง secretory granule (Sg), endocytic vacuole (Vc), ก้อนไขมัน (Ld) และ mitochondria (Mi) อยู่ภายในไซโตพลาซึม

E, F) ภาพกำลังขยายปานกลาง (E) และกำลังขยายสูง (F) บริเวณฐานของเซลล์เยื่อบุแสดง endocytosis vacuole (Vc), Mitochondria (Mi), rough endoplasmic reticulum (RER) อยู่ภายในไซโตพลาซึมโดยมี endocytic vacuole บางส่วนสัมผัสกับ plasma membrane (ลูกศรเล็ก) และ basal plasma membrane (Pm) และ basement membrane (Bm) ที่มีการยื่นออกไปสัมผัสกับ เซลล์ค้ำจุน (Pc) ทำให้ basal lamina (Bl) บริเวณนั้นบางลง

ลักษณะของเซลล์เยื่อบุในขณะที่ขยายมีลักษณะเป็นเซลล์รูปร่างแบน ผิวด้านบนประกอบด้วย cytoplasmic process ขนาดเล็กและสั้น และ cyto-plasmic lamella แยกกันอยู่อย่างหลวมๆ (ภาพที่ 3A-D) ส่วนฐานของเซลล์ไม่พบ basal infolding, basement membrane เหยียดตรง และ basal lamina บางและบางตำแหน่งมีการเชื่อมต่อกันระหว่างเซลล์เยื่อบุ และเซลล์ค้ำจุน (ภาพที่ 3A, E, F) ภายในไซโตพลาซึมมี mitochondria และ rough endoplasmic reticulum จำนวนมากกระจายตัวหนาแน่นทางด้านฐานของเซลล์ และ secretory granule จำนวนน้อยส่วนใหญ่อยู่ทางด้านบนของเซลล์และใน cytoplasmic process นอกจากนี้ยังพบ endocytic vacuole กระจายอยู่ทั่วเซลล์ซึ่งบางส่วนสัมผัสกับเยื่อหุ้มเซลล์ส่วนฐาน (ภาพที่ 3E) และพบถุงไขมันขนาดเล็ก บริเวณส่วนบนของเซลล์ (ภาพที่ 3D)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ระบบทางเดินอาหารประกอบด้วยช่องปาก (mouth cavity) ซึ่งถูกล้อมรอบด้วย oral sucker คอหอย หลอดอาหาร และลำไส้ ทางเดินอาหารสามารถแบ่งได้เป็น 2 ส่วน ตามชนิดของเซลล์เยื่อบุที่บุภายใน คือทางเดินอาหารส่วนหน้า (foregut) และทางเดินอาหารส่วนหลัง (hindgut) ทางเดินอาหารส่วนหน้าประกอบด้วย ปาก คอหอย และหลอดอาหาร บุด้วย syncytial epithelium แบบเดียวกับที่พบในเนื้อเยื่อปกคลุม (tegument) (อาดูลย์ มีพูล และคณะ, 2549) จึงเป็นไปได้ว่าทางเดินอาหารส่วนนี้อาจจะมีการพัฒนามาจากเนื้อเยื่อปกคลุมที่มีการเว้าตัวเข้าไป (Bennett, 1975) ทางเดินอาหารส่วนหลัง (hind gut) คือส่วนที่ต่อมาจากหลอดอาหารแยกออกเป็นท่อลำไส้ 2 แขนง (ceacal bification) แต่ละแขนงไม่มีการแตกแขนงย่อยซึ่งเหมือนกับพยาธิใบไม้ขนาดเล็กทั่วไป แต่แตกต่างกับลำไส้ของพยาธิใบไม้ขนาดใหญ่ เช่นพยาธิ *F. gigantica* ที่มีการแตกแขนงย่อยเป็นจำนวนมาก (Sobhon *et al.,* 1996)

รูปร่างของเซลล์เยื่อบุลำไส้พยาธิชนิดนี้มี 2 แบบ คือ pyramidal cell และ simple cuboidal ขึ้นอยู่กับปริมาณอาหารที่อยู่ภายใน ด้านบนของเซลล์มีส่วนของ cytoplasmic process และ cytoplasmic lamella ยื่นเข้าไปภายใน lumen ในขณะที่ด้านฐานของเซลล์มีการพับตัวของเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปภายในไซโตพลาซึมโครงสร้างทั้งสองส่วนนี้ทำหน้าที่เป็นเยื่อหุ้มเซลล์สำรองสำหรับการยืดขยายของท่อลำไส้ซึ่งลักษณะเช่นนี้สามารถพบได้ในลำไส้พยาธิ *F. hepatica* (Gresson *et al.,* 1959; Meaney *et al.,* 2004) และพยาธิ *Paramphistomum cervi* (Vijaya *et al.,* 1978)

เยื่อบุลำไส้ของพยาธิใบไม้ตับอ่อนนี้พบเพียงชนิดเดียว และทำหน้าที่เป็นทั้ง absorptive function และ secretory function เนื่องจากสามารถพบทั้ง secretory granule และ endocytic vacuole ภายในเซลล์เดียวกันแต่ปริมาณของโครงสร้างดังกล่าวมีความแตกต่างกันโดยเมื่อลำไส้มีอาหารน้อยหรือไม่มีเลยจะมีปริมาณของ secretory granule มากตั้งแต่บริเวณส่วนฐาน จนถึงส่วนยอดของเซลล์ และพบ endocytic vacuole จำนวนน้อย ซึ่งเปรียบเทียบได้กับ group I epithelial cell ในลำไส้ของพยาธิ *F. hepatica* ในขณะที่ลำไส้มีอาหารมากหรือระยะที่ลำไส้มีการขยายตัวเต็มที่เซลล์จะมีปริมาณของ secretory granule จำนวนน้อยและส่วนใหญ่จะอยู่บริเวณส่วนยอดของเซลล์ และมี endocytic vacuole เกิดขึ้นที่บริเวณยอดของเซลล์จำนวนมาก เซลล์ในระยะนี้ อาจเทียบได้กับ group II epithelial cells ของพยาธิ *F. hepatica* อย่างไรก็ตามไม่พบเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายกับ group III epithelial cell ซึ่งพบใน main caeca ของพยาธิ *F. hepatica* (Robinson & Threadgold, 1975)

ลำไส้เป็นช่องทางในการนำไขมันเข้าสู่ร่างกายพยาธิ เนื่องจากพบไขมันกระจายตัวอยู่ระหว่าง cytoplasmic lamella, cytoplasmic process และไซโตพลาซึมของเซลล์เยื่อบุ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพยาธิชนิดนี้อาศัยอยู่ภายในท่อของตับอ่อนซึ่งเป็นท่อที่ลำเลียงน้ำย่อยจากตับอ่อน เช่น lipase ไปยังลำไส้ของโฮสต์ โดยมีการลำเลียงไขมันเป็น lipid droplet ขนาดเล็กจากส่วนโคนของ cytoplasmic lamella เข้าไปใน cytoplasmic process และลำเลียงผ่านไซโตพลาซึมไปยังส่วนฐานของเซลล์ ในระหว่างนี้ lipid droplet ขนาดเล็กเหล่านั้นอาจมีการรวมตัวกันเป็นขนาดที่ใหญ่ขึ้น จากนั้นนำ lipid droplet ไปเปิดเข้าสู่ basal lamina และ parenchymal cell ที่อยู่ด้านนอก ซึ่ง parenchymal cell เหล่านี้จะทำการเก็บสะสมไขมันในรูปของ lipid droplet ขนาดใหญ่ และอาจจะมีบทบาทในการส่งไขมัน เหล่านี้ให้กับเซลล์หรืออวัยวะใกล้เคียงต่อไป

เนื่องจากลำไส้ของพยาธิใบไม้ตับอ่อนนี้ มีขนาดเล็ก เมื่อเทียบกับขนาดลำตัวพยาธิ และไม่มีการแตกแขนงแทรกไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย ประกอบกับโครงสร้างภายในเซลล์เยื่อบุลำไส้มีการผลิต secretory granule จำนวนน้อย เมื่อเทียบกับของพยาธิ *F. hepatica* จึงเป็นไปได้ว่าลำไส้ของพยาธิชนิดนี้อาจจะไม่ใช่อวัยวะหลักในการย่อยและดูดซึมสารอาหาร ซึ่งจากการศึกษาในพยาธิ *F. hepatica* และ *S. mansoni* พบว่าเนื้อเยื่อปกคลุมสามารถดูดซึมสารอาหารบางชนิดเข้าสู่ร่างกายพยาธิได้ (Halton, 1997) แต่ในพยาธิชนิดนี้ยังไม่ได้มีการพิสูจน์ว่าเนื้อเยื่อปกคลุมสามารถดูดซึมสารอาหารได้หรือไม่

นอกจากนี้ลำไส้ยังเป็นแหล่งผลิตและคัดหลั่งสารต่างๆ เข้าสู่ระบบไหลเวียนของโฮสต์ ดังการศึกษาในพยาธิ *F. hepatica* และ *F. gigantica* พบว่ามีการคัดหลั่ง cat-L (Grams *et al.,* 2001), fatty acid binding protein (Sririsriro et al, 2002) และ glutathione S transferase (Creaney *et al.,* 1995; Khawsuk *et al.,* 2002) ในขณะที่ลำไส้ของพยาธิใบไม้ตับอ่อน *E. pancreaticum* ยังไม่ทราบว่ามีการผลิตและคัดหลั่งสารชนิดใดบ้างนั้นยังต้องมีการศึกษาต่อไป

จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นโครงสร้างและองค์ประกอบภายในเซลล์เยื่อบุลำไส้พยาธิ *E. pan-creaticum* ในภาวะปกติ ซึ่งข้อมูลนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาผลกระทบของยาฆ่าพยาธิ หรือสมุนไพรต่างๆ ที่ออกฤทธิ์ผ่านเซลล์เยื่อบุลำไส้ ตลอดจนการศึกษาแหล่งผลิต สะสม และคัดหลั่งแอนติเจนจากลำไส้พยาธิชนิดนี้ในระดับโครงสร้างละเอียดต่อไป

เอกสารอ้างอิง

อาดูลย์ มีพูล และกมลชนก งามสม. (2550). การผลิตและศึกษาคุณลักษณะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารคัดหลั่งจากพยาธิใบไม้ตับอ่อน *Eurytrema pancreaticum. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว., 23,* 126-144.

อาดูลย์ มีพูล, อัครพล อุดคำมี และชุลีพร เพ็งจันทร์. (2549). เนื้อเยื่อวิทยาของผิวพยาธิใบไม้ตับอ่อน *Eurytrema pancreaticum ตัวเต็มวัย. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา, 11,* 32-38.

Bennett, C.E. (1975). *Fasciola hepatica:* development of caecal epithelium during migration in the mouse. *Experimental Parasitology, 37,* 426-441.

Creaney, J., Wijffels, G. L., Sexton, J. L., Sandeman, R. M., Spithill, T. W., & Parsons, J. C. (1995). *Fasciola hepatica:* Localization of Glutathione S-Transferase isoenzymes in adult and juvenile liver fluke. *Experimental Parasitology, 81,* 106-116.

Dalton, J.P., McGonigle, S., Rolph, T.P., & Andrews, S.T. (1996). Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infect. Immun., 64,* 5066-5074.

Dowd, A.J., Smith, A.M., McGonigle, S., & Dalton, J.P. (1994). Purification and characterisation of a second cathepsin L proteinase secreted by the parasitic trematode *Fasciola hepatica. Eur. J. Biochem., 223,* 91-98.

Grams, R., Vichasri-Grams, S., Sobhon, P., Upatham, E. S., & Viyanant, V. (2001). Molecular cloning and characterization of cathepsin L encoding genes from *Fasciola gigantica. Parasitology International, 50,* 105-114.

Gresson, R.A.R., & Threadgold, L.T. (1959). A light and electron microscope study of the epithelial cells of the gut of *Fasciola hepatica.The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, 6,* 157-167.

Halton, D.W. (1997). Nutritional adaptations to parasitism within the platyhelminthes. *International Journal for Parasitology, 27,* 693-704.

Ishii, Y., Koga, M., & Hiigo, T. (1983). Human infection with the pancreas fluke, *Eurytrema pancreaticum. American Journal of Tropical Medicine, 32,* 1019-1022.

Khawsuk, W., Soonklang, N., Gram, R., Gram, S.V., Wanichanon, C., Meepool, A., Chaithirayanon, K., Ardseungnoen, P., Viyanant, V., Upatham, E.S., & Sobhon, P. (2002). Production and characterization of a monoclonal antibody against recombinant glutathione S-transferase (GST) of *Fasciola gigantica. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology, 20,* 257-266.

McKinstry, B., Brennan, G. P., Halferty, L., Forbes, A. B., & Fairweather, I. (2007). Ultrastructural changes induced in the tegument and gut of *Fasciola hepatica* following in vivo and in vitro drug treatment with nitroxynil (Trodax). *Parasitol Research, 101,* 929-941.

Meaney, M., Fairweather, I., Brennan, G. P., & Forbes, A. B. (2004). Transmission electron microscope study of the ultrastructural changes induced in the tegument and gut of *Fasciola hepatica* following in vivo drug treatment with clorsulon. *Parasitol. Res., 92,* 232-241.

Min, HK. (1981). An epidemiological study on Zoonoses in Korea. *Kisaengchunghak Chapchi., 19,* 60-75.

Morris, G. P. (1967). Fine structure of the gut epithelium of *Schistosoma mansoni. Experientia, 24* (15), 480-482.

Mulcahy, G., & Dalton, J.P. (2001). Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. *Res. Vet Sci., 70,* 83-86.

Robinson, G., & Threadgold, L.T. (1975). Electron microscope studies of Fasciola hepatica. XIII. The fine structure of the gastrodermis. *Experimental Parasitology, 37,* 20-36.

Sirisriro, A., Grams, R., Vichasri-Grams, S., Ardseungneon, P., Pankao, V., Meepool, A., Chaithirayanon, K., Viyanant, V., Tan-Ariya, P., Upatham, E.S., & Sobhon, P. (2002). Production and characterization of a monoclonal antibody against recombinant fatty acid binding protein of *Fasciola gigantica. Veterinary Parasitology, 105,* 119-129.

Smith, A.M., Dowd, A.J., McGonigle, S., Keegan, P.S., Brennan, G., Trudgett , A., & Dalton, J.P. (1993). Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica. Mol. Biochem. Parasitol., 62,* 1-8.

Sriveny, D., Raina, O.K., Yadav ,S.C., Chandra, D., Jayraw, A.K., Singh, M., Velusamy, R., & Singh, B.P. (2006). Cathepsin L cysteine proteinase in the diagnosis of bovine *Fasciola gigantica infection. Vet. Parasitol., 135,* 25-31.

Sobhon, P., Anantavara, S., Dangprasert, T., Meepool, A., Wanichanon, C., Viyanant, V., Upatham, S., Kusanran, T., Chompoochan, T., Thammasart, S., & Prasittirat, P. (1996). *Fasciola gigantca:* Identitication of adult antigens, their tissue sources and possible origins. *J. Sci. Soc. Thailand, 22,* 143-162.

Vijaya ,V.L., & Hanumantha, K.R. (1978). Observations on the structure and histology of the gut in some digenetic trematodes. *Parasitenkd, 56,* 55-61.