



27 MAR 1990

ULTRASTRUCTURAL AND IMMUNOCYTOCHEMICAL
STUDIES OF THE TEGUMENT AND CYTOSKELETON OF
SCHISTOSOMA JAPONICUM AND *SCHISTOSOMA MEKONGI*

BY

CHINNAVAT TARASUB

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FUIFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
(ANATOMY)

อภิวัฒน์ ทารุส

จาก

ภาควิชาสัตววิทยา และ สัตวแพทย์

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University 1989

13861

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาโครงสร้างและไซโตสเกเลตันของผิวพยาธิใบไม้ในเลือด Schistosoma japonicum และ Schistosoma mekongi โดยวิธีจุลทัศน์อิเล็กตรอนและอิมมูโนไซโตเคมี

ผู้วิจัย ชินวัฒน์ ชาราทพันธ์

ปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ประเสริฐ โศภน, Ph.D.
ชาติชาย ตระกูลรังสี, Ph.D.
ชัยทิพย์ วณิชานน, Ph.D.
สุชาติ อุลัมภ์, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 29 มีนาคม 2532

บทคัดย่อ

จากการศึกษาชั้นผิว (Tegument) ของพยาธิใบไม้ในเลือด Schistosoma japonicum และ S. mekongi ในระยะตัวอ่อน (Cercaria และ schistosomula) และตัวแก่ (adult) พบว่า ชั้นผิวมีลักษณะเป็นไซโตพลาสซึมชั้นเดียวเชื่อมต่อกันตลอด (syncytium) ซึ่งเกิดจากการเชื่อมเข้าด้วยกันของแขนงเท็กิวเมนต์เซลล์ (Tegument cell) ที่มีตำแหน่งอยู่ใต้ชั้นกล้ามเนื้อ ชั้นผิวของระยะเชอคาเรีย (cercaria) หุ้มด้วยเยื่อชั้นนอก (outer membrane) ที่มีชั้นเคลือบเยื่อหุ้มหรือกลัยโคคาลิกซ์ (glycocalyx) คลุมอยู่ภายนอกและเยื่อชั้นใน (inner membrane) ซึ่งอยู่ติดกับชั้นรองรับผิวหรือเบซิล ลามินา (basal lamina) เยื่อชั้นนอกและชั้นในมีลักษณะเป็นเยื่อสามชั้น (trilaminar membrane) หลังขบวนการเปลี่ยนรูปร่างจากเชอคาเรียเป็นซิสโตโซมูลา (schistosomula) ชั้นผิวมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น เยื่อชั้นนอกมีการลอกหลุดออกไปพร้อมกับชั้นกลัยโคคาลิกซ์ โดยการเกิดปุ่ม ไมโครวิลไล (microvilli) และชั้นของเยื่อหุ้มที่พองหลุดออกไป (membrane puff) ต่อมาเยื่อชั้นนอกถูกแทนที่ด้วยเยื่อใหม่ที่มีลักษณะเป็น 7 ชั้น (heptalaminar membrane) ทั้งนี้เชื่อว่าชั้นส่วนของเยื่อหุ้มใหม่มาจากแผ่นอินตราไซโตพลาสซึม เมมเบรน ชีท (intracytoplasmic membrane sheet) และจากก้อนเมมบรานัส บอดีส์ (membranous bodies) ที่ถูกสร้างเก็บไว้ในเท็กิวเมนต์เซลล์ในระยะเชอคาเรียแล้วถูกทำลายทิ้งชั้นสู่ชั้นผิวในระยะซิสโตโซมูลา เยื่อชั้นนอกมีการเพิ่มเนื้อที่มากขึ้น เมื่อพยาธิระยะซิสโตโซมูลามีอายุประมาณ 12-24 ชั่วโมง โดยส่วนบนของชั้นผิวยื่นออกสู่ภายนอกกลายเป็นสัน (ridges) และบุ๋มลงไปเป็นร่อง

(pit) เยื่อชั้นในมีการยื่นเข้าสู่ชั้นผิวกลายเป็นเบซิล อินโฟลดิ้ง (basal infolding) ซึ่งจะมีไมโทคอนเดรียเคลื่อนมาเรียงตัวอยู่ข้างๆ เมมเบรานีส บอดีส์ถูก ลำเลียงขึ้นมาเชื่อมกับแผ่นอินตราไซโตพลาสติก เมมเบรน หรือลอยขึ้นไป เชื่อมต่อโดยตรงกันได้ เยื่อชั้นนอก ในตัวแก่เยื่อชั้นนอกทั้งหมดมีลักษณะเป็นเยื่อที่มี 7 ชั้น สั้นและ ร่องเจริญเต็มที่ เมมพราณีส บอดีส์ ยังคงถูกลำเลียงมาสู่เยื่อผิวนอกและมีการเชื่อมต่อ แบบเดียวกับที่พบในระยะซิสโตโซมูลา

จากการศึกษาชนิดและปริมาณของประจุไฟฟ้าบนผิวของ เยื่อชั้นนอกและบนชั้น เคลือบหรือกลัยโคคาลิคของพยาธิทั้งสองสปีชีส์ โดยใช้สารคอลลอยด์ที่มีประจุบวกและ สารคอลลอยด์ที่มีประจุลบของเหล็ก (positive and negative colloidal iron) และรูทีเนียม เรด (ruthenium red) ในระยะเซอคาเรียของพยาธิทั้งสองสปีชีส์ คอลลอยด์เหล็กที่มีประจุบวกและรูทีเนียม เรด ย้อมติดเข้มตลอดชั้นกลัยโคคาลิค ส่วนในระยะซิสโตโซมูลาความ เข้มของสีลดลงไปขณะที่พยาธิมีอายุเพิ่มขึ้น จน เหลือเป็นชั้นบาง ๆ ในซิสโตโซมูลาที่มีอายุมากกว่า 12 ชั่วโมงและในตัวแก่ นอกจากนี้ยังพบการย้อมติดของสีทั้งสองรอบ ๆ ปุ่ม ไมโครวิลไล และชั้นของเยื่อชั้นนอกที่หลุด ออกมาจากชั้นผิว เยื่อชั้นนอกแสดงการติดสีด้วยรูทีเนียม เรด ในระยะเซอคาเรียและ ซิสโตโซมูลา ในขณะที่ไม่พบการย้อมติดสีด้วยคอลลอยด์เหล็กที่มีประจุบวกในระยะทั้งสอง ในตัวแก่สีทั้งสองย้อมติดผิวนอกของชั้นผิวโดยมีลักษณะเป็นชั้นบาง ๆ ที่ปรากฏทางด้าน ข้างและด้านหลังแต่ย้อมติดน้อยหรือไม่ติดเลยในร่องกลัยโคพอร์รัล (gynecophoral canal) นอกจากนี้ *S. mekongi* ย้อมติดสีเข้มกว่า *S. japonicum* บริเวณเส้น ของพยาธิทั้งสองสปีชีส์ย้อมติดสีทางด้านข้าง เข้มที่สุดและลดน้อยลงไปเรื่อย ๆ จากยอด สันถึงบริเวณคอของร่อง โดยที่ส่วนล่างสุดของร่องจะไม่ติดสีเลย เมื่อทดลองย้อมด้วย คอลลอยด์เหล็กที่มีประจุลบไม่พบการย้อมติดบนกลัยโคคาลิคและเยื่อชั้นนอกของผิวทั้งใน ระยะเซอคาเรีย ซิสโตโซมูลาและตัวแก่ใน *S. japonicum* ส่วนใน *S. mekongi* พบการย้อมติดสีเฉพาะในตัวแก่เท่านั้น ผลการทดลองจึงสรุปได้ว่า บนชั้นผิวและชั้นกลัยโคคาลิคของพยาธิทั้งสองสปีชีส์มีประจุไฟฟ้าส่วนใหญ่เป็นประจุไฟฟ้าลบ

จากการศึกษาชนิดของน้ำตาลบนเยื่อชั้นนอกของชั้นผิวและชั้นเคลือบกลัยโคคาลิคโดยใช้เลคตินได้แก่ concanavalin A (Con A) และ wheat germ agglutinin (WGA) เลคตินทั้งสองจับติดทั่วทั้งชั้นกลัยโคคาลิคและเยื่อผิวนอกของ ชั้นผิวของพยาธิทั้งสองสปีชีส์ในระยะเซอคาเรีย ส่วนซิสโตโซมูลาการจับของเลคตินทั้งสองชนิดลดน้อยลงไปขณะที่อายุของตัวอ่อนมากขึ้น จนเหลือเป็นชั้นบาง ๆ ขณะที่เยื่อผิวนอกยังคงมีการจับติด เข้ม ในตัวแก่การจับของเลคตินทั้งสองชนิดมีมากทางหลังและด้าน ข้างของลำตัว ขณะที่ทางด้านร่องกลัยโคพอร์รัลมีน้อย การจับของ คอน เอ (Con A) ในตัวแก่ของพยาธิทั้งสองสปีชีส์มีรูปแบบคล้ายกัน โดยมีการจับอย่างมากที่เยื่อด้านข้าง

ของเส้นและลดน้อยลงไปเรื่อย ๆ จากยอดสันถึงบริเวณคอของร่อง ส่วนล่างสุดของร่อง จะไม่มีการจับของ คอน เอ เลย ลักษณะการจับแบบนี้เหมือนกับผลที่ได้จากการทดลอง ย้อมด้วยคอลลอยด์เหล็กที่มีประจุบวก การจับของ ดับบลิว จี เอ (WGA) ที่สันและ ร่องในพยาธิทั้งสองสปีชีส์มีรูปแบบคล้ายกันแต่แตกต่างจากรูปแบบการจับของ คอน เอ โดยที่มีการจับที่เชื่อมผิวด้านนอกครึ่งบนของสันมากที่สุด แต่ไม่มีการจับในร่องและมีน้อย ในครึ่งส่วนล่างของสัน ลักษณะการจับของเลคตินทั้งสองบ่งบอกถึงการกระจายของน้ำ ตาลแต่ละชนิดบนเยื่อชั้นนอกของชั้นผิวและกลัยโคคาลิก

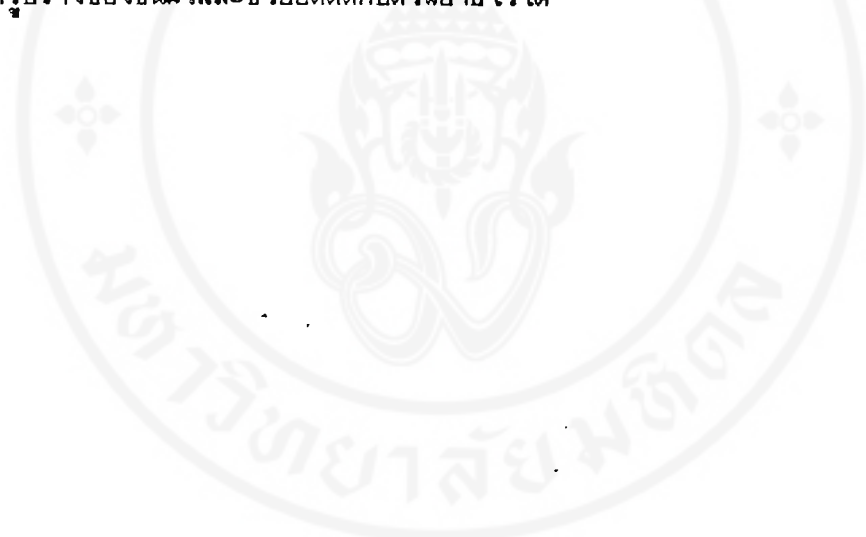
ไซโตสเกเลตัน (cytoskeleton) ของพยาธิทั้งสองสปีชีส์ประกอบด้วย โครงสร้างหลัก 2 ประเภท ประเภทแรกมีลักษณะเป็นจุด เรียงกันอยู่แน่นทับไซโตพลาส ซิมของชั้นผิว เรียกว่า ไมโครทราบีคูลี (microtrabeculae) และประเภทที่สองคือ ไมโครทิวบูล (microtubule) ทั้งสองประเภทพบในพยาธิทั้งสองชนิด แต่ใน *S. mekongi* ยังพบอีกประเภทหนึ่งเป็นเส้นใยที่มีความหนา 10 nm โดยพบในโครงสร้าง ที่เรียกว่า พรูโอมอร์ฟิค ปาปิลี (pleomorphic papillae) ผลการศึกษาพบว่าไม โครทราบีคูลี แน่นทับที่สุดในระยะเซอคาเรียและลดน้อยลงตามลำดับในซิสโตโซมูลา และตัวแก่ ไมโครทิวบูลพบเฉพาะในแขนงของเทกิวเมนต์เซลล์ในระยะเซอคาเรีย แต่จะ พบเพิ่มในชั้นผิวในระยะซิสโตโซมูลาและตัวแก่ เมื่อสกัดผิวหนังพยาธิในเวลาอันเหมาะสม ด้วยไตรตรอน เอ็กซ์-100 (triton x-100) ไซโตพลาสซึมบางส่วนละลายออกไป เยื่อชั้นนอกและชั้นในตลอดจนสารภายในก้อนเมมเบรานิส บอดีส์ ละลายออกไปแต่ชั้น ผิวยังคงลักษณะอยู่ด้วยชั้นของไซโตพลาสซึมที่แน่นทับได้เยื่อชั้นนอกของชั้นผิว ขณะที่ไม โครทราบีคูลีเห็นชัดเจน ความแน่นทับยังคงมากที่สุดในระยะเซอคาเรีย และลดลงใน ระยะซิสโตโซมูลาและตัวแก่ ไมโครทราบีคูลีเห็นเป็นร่างแหของเส้นใยขนาดเล็กที่มี คู่่มอยู่เป็นระยะ ๆ (knobby fiber) สานกันและเชื่อมโยงด้วยเส้นใยบาง ๆ ใน บางบริเวณไมโครทราบีคูลีปรากฏเป็นใยเรียบขนาดเล็กที่สานไปมา (cob-web) ประกอบด้วยเส้นใยที่เป็นเส้นตรงบางสานกันและเชื่อมโยงกันด้วยเส้นใยบาง ๆ ในตัวแก่ สามารถแบ่งชั้นผิวออกเป็น 3 ชั้นตามลำดับความแน่นทับและการสานกันของเส้นใยของ ไมโครทราบีคูลีชั้นกลางมีความแน่นมากที่สุดรองลงมาคือ ชั้นบนและล่างตามลำดับ เส้น ใยจากไมโครทราบีคูลีสอดแทรกเข้า ไปยังชั้นไซโตพลาสซึมได้เยื่อชั้นนอก เชื่อมกับ เมมเบรานิส บอดีส์ และไมโครทิวบูล เมมเบรานิส บอดีส์ยังเชื่อมกับไมโครทิวบูลด้วยเส้น ใยบางๆ นอกจากนี้ยังมีเส้นใยจากส่วนอื่น เช่นจากเฮมิเดสโมโซม (hemidesmosome) มาสานสอดกับเส้นใยของไมโครทราบีคูลี ลักษณะเช่นนี้บ่งชี้ให้เห็นถึงบทบาทของไซ โตสเกเลตันในเทกิวเมนต์ ต่อการยึดเหนี่ยวชั้นผิวไว้กับตัวพยาธิ รักษารูปร่างและ ความคงทนเคลื่อนที่ขององค์ประกอบภายในชั้นผิวของพยาธิทั้งสองชนิด ไมโครทราบีคูลี ประกอบขึ้นมาจากเส้นใยบาง ๆ เชื่อมยึดกันในชั้นแรกและขดตัวเห็นเป็นเส้นใยที่มีตุ่มอยู่

เป็นระยะสานกันไปมาและเชื่อมยึดกันด้วยเส้นใยบาง ๆ ในระดับที่สอง (knobby fibers) และในชั้นที่สาม จะมีการหดตัวและหดตัวเป็นกลุ่มซึ่งเห็นเป็นจุดอยู่กันแน่นทึบ เมื่อตรวจดูด้วยวิธีธรรมดาไม่ได้ทำการสกัดด้วยสารโครตรอนเอ็กซ์ -100 นอกจากนั้นเส้นใยชนิดหนา 10 nm ใน S. mekongi ที่เห็นชัดหลังการสกัดพบอยู่ในพรีโอมอร์ฟิด ปาปิลี และในเส้นบางเส้นเท่านั้น

เมื่อศึกษาไซโตสเกเลตันด้วยวิธีอิมมูโนอิเล็กตรอน โดยใช้แอนติบอดีจำเพาะต่อแอกติน (actin) และทิวบูลิน (tubulin) พบว่าเมื่อย้อมด้วยแอนติบอดีจำเพาะแอกติ การย้อมติดปรากฏบนร่างแหของไมโครทราบีคูลีและชั้นของไซโตพลาสซึม ไม่พบการย้อมติดบนหนาม (spine) และบนเส้นใยหนา 10 nm ที่พบใน S. mekongi เมื่อย้อมด้วยแอนติบอดีจำเพาะทิวบูลินพบว่าการย้อมติดบนส่วนที่เห็นเป็นไมโครทิวบูลในแขนงของเทกิวเมนต์ เซลล์และในชั้นผิวและบนส่วนของไมโครทราบีคูลีติดกับไมโครทิวบูล ไม่พบการย้อมบนหนามและเส้นใยที่หนา 10 nm ผลการทดลองบ่งชี้ว่าไมโครทราบีคูลีประกอบด้วยแอกตินเป็นส่วนใหญ่และยังพบว่าไมโครทิวบูลในชั้นผิวของพยาธิประกอบด้วยทิวบูลิน

จากการศึกษาความสำคัญของไซโตสเกเลตันโดยใช้ยาบางชนิดได้แก่ คอลชิซิน (colchicine) ซึ่งสามารถสลายไมโครทิวบูล และไซโตคาลาซิน บี (cytochalasin B) ซึ่งสามารถสลายพวกไมโครฟิลาเมนต์ (microfilament) โดยเฉพาะแอกติน ผลการทดลองหลังจากแช่พยาธิทั้งสองสปีชีส์ในน้ำยาเลี้ยงพยาธิที่ผสมยาตัวใดตัวหนึ่ง พบว่าผลการทดลองเมื่อใช้คอลชิซินเมื่อแช่พยาธินาน 30 นาที ไมโครทิวบูลในแขนงของเทกิวเมนต์ เซลล์และในชั้นผิวสลายไปเกิดแควคิวโอลในสันและส่วนล่างของชั้นผิว นอกจากนี้ยังมีแควคิวโอลที่มีเยื่อหุ้มที่เกิดจากเมมเบรนส์ บอดีส์ในส่วนชั้นกลางของเทกิวเมนต์ เมื่อแช่นาน 60 นาที ขบวนการลอกหลุดของเยื่อชั้นนอกได้แก่การเกิดตุ่ม, ไมโครวิลไล และชั้นของเยื่อชั้นนอกยังเกิดขึ้นแต่ในปริมาณน้อยกว่าปกติที่สันจะพบเวสสิเคิล (vesicles) ที่มีชั้นส่วนของเยื่อมีวนตัวอยู่หลวมที่ต่อมาจะเปิดและขับออกภายนอกผิวพยาธิแล้วกลายเป็นแควคิวโอล ดิสคอลลด์ บอดีส์ ปกติเพียงมีอาการบวม เมื่อสิ้นสุดการทดลองความผิดปกติเกิดขึ้นมากจนชั้นผิวหลุดออกจากตัวพยาธิในพยาธิทั้งสองในระยะซิสโตไซมูลานพบว่า ขบวนการเปลี่ยนรูปร่างเกิดขึ้นช้า ตุ่มไมโครวิลไลและการลอกหลุดของชั้นเยื่อชั้นนอก ตลอดจนอินตราไซโตพลาสซึมเมมเบรนส์ เกิดน้อยกว่าปกติ มีเวสสิเคิล (vesicle) ภายในชั้นของเยื่อมีวนตัวอยู่หลวม ๆ เวสสิเคิลนี้จะเปิดและขับสิ่งบรรจุภายในออกไปภายนอกกลายเป็นแควคิวโอล ไมโครทิวบูลสลายตัว ภายใน 24-48 ชั่วโมง ความผิดปกติเกิดขึ้นมากจนชั้นผิวหลุดออกจากตัวพยาธิ สำหรับตัวแก่พยาธิที่แช่ในน้ำยาเลี้ยงพยาธิที่ผสมยาไซโตคาลาซิน บี ผลของยาต่อพยาธิคล้ายกันโดยที่ภายใน 20 นาที ไมโครทราบีคูลีสลายทำให้เกิดแควคิวโอล

ในส่วนชั้นบนตามสัน ภายใน 30 นาทีเกิดแควคิ้วโอลิในส่วนชั้นกลางของชั้นผิว คี สคอร์ด บอดี้ส์ บวมและสิ่งบรรจุกายในสลายหาย ไปกลายเป็นเวสลิเคิลและแควคิ้วโอลิ ตามลำดับ เมมเบรานส์ บอดี้ส์ ปกติ ไมโตคอนเดรียและไมโครทิวบูลปกติ หลังจาก 60 นาทีเส้นใยจากเฮมิเดสโมโซมสลายตัว ภายใน 24-48 ชั่วโมงชั้นผิวหลุดลอกออกไป ในพยาธิระยะซิสโตโซมูลา พบแควคิ้วโอลิหลังจากแช่ในน้ำยานาน 30 นาที แล้ว เพิ่มปริมาณชั้นพร้อมกับมีการสลายของไมโครทราบีคูลี ตุ่มไมโครวิลไลและชั้นส่วนของ เยื่อชั้นนอก พบน้อยกว่าปกติแต่ไม่พบอินตราไซโตพลาสซึม เมมเบรนพีก ไมโครทิวบูล ในแขนงของเททิวเมนต์เซลล์ยังคงปกติภายใน 3 ชั่วโมง แควคิ้วโอลิเพิ่มปริมาณชั้นจน ชั้นผิวเริ่มหลุดลอกออกไป ภายใน 24-48 ชั่วโมงชั้นผิวหลุดลอกจากพยาธิ ผลของ ยาทั้งสองบ่งชี้ให้เห็นถึงการสลายของไมโครทราบีคูลีและไมโครทิวบูลขัดขวางกระบวนการ ลำเลียงเยื่อไปทดแทน เยื่อชั้นนอกที่หลุดลอกไปเมื่อพยาธิระยะ เซอคาเรียเจริญเข้าสู่ระยะซิสโตโซมูลาและผลของการสลายทำให้ไมโครทราบีคูลีและไมโครทิวบูลไม่สามารถรักษารูปร่างของชั้นผิวและช่วยยึดติดกับตัวพยาธิไว้ได้



Thesis Title ULTRASTRUCTURAL AND IMMUNOCYTOCHEMICAL
STUDIES OF THE TEGUMENT AND
CYTOSKELETON OF *SCHISTOSOMA JAPONICUM*
AND *SCHISTOSOMA MANSONI*.

Name Chinnavat Tarasub

Degree Doctor of Philosophy (Anatomy)

Thesis Supervisory Committee

 Prasert Sobhon, Ph.D.
 Suchart Upatham, Ph.D.
 Chatchai Trakulrungsi, Ph.D.
 Chaitip Wanichanon, Ph.D.

Date of Graduation 29 March B.E. 2532 (1989)

ABSTRACT

The ultrastructure of the tegument of cercariae, schistosomula and adult of *S. japonicum* and *S. mekongi* are studied by transmission electron microscopy. In cercariae, the tegument is a syncytium that is bound externally by trilaminate membrane with glycocalyx coating the external surface and internally by the trilaminate basal membrane that is attached to basal lamina and underlying connective tissue by hemidesmosomes. In both species, there are numerous spines, discoid and dense spherical bodies. After transformation to schistosomula, the glycocalyx and the trilaminate outer membrane are

replaced by the heptalaminate membrane within 48 h. The original trilaminate membrane and associated glycocalyx are shed away by the formation of blebs, microvilli and membrane puffs that are detached from the surface of parasites' tegument. At the same time, membranous bodies (Mb) that are presynthesized in the tegument cells during cercarial stage are transported to the tegument. Under high resolution TEM, membranous bodies contain whorls of heptalaminate membrane. These bodies are fused with the intracytoplasmic membrane sheets and their membranous content is rolled out to join with the surface membrane, thus replacing the original membrane. After 24-h post-transformation, the outer membrane increases surface area by forming ridges and pits, which become more elaborate in adult. Mb bodies are seen later to fuse with the surface membrane at the bottom of pits either directly or via intracytoplasmic membrane sheets.

The surface membrane has abundant carbohydrate constituents as revealed by the ultrastructural localization of carbohydrate residues and polyelectrolytes by colloidal iron and ruthenium red stainings and lectin bindings. In colloidal iron and ruthenium red stainings, the cercariae of both species show the highest binding to positive colloidal iron and ruthenium red. Both stains exhibit strong intensity on the whole thickness of glycocalyx. After transformation, the intensity of stains are significantly decreased and remain only on blebs,

microvilli and membrane puffs. The surface membrane of cercariae and schistosomula are stained by ruthenium red but not by positive colloidal iron, perhaps due to different degree of penetration of the dye molecules. In adult of both species, the staining of positive colloidal iron is evenly distributed over the entire the dorsal - lateral aspects of the surface of parasites' bodies while in both species, ruthenium red stains the surface only sparingly, and *S. mekongi* is generally more intensely stained than *S. japonicum*. In both species, the surface of the gynecophoral canal exhibits very little or no staining at all. The pattern of staining of colloidal iron and ruthenium red on dorsal - lateral aspects is similar. They bind heavily to the surface membrane of ridges, especially on their sides; whereas the binding decreases towards the tips. In pits, the neck regions close to the ridges are intensely stained, whereas the staining decreases towards the bottom part. By contrast, there is no staining on the surface membrane and glycocalyx of cercariae and schistosomula and adult surface membrane of *S. japonicum* by the negative colloidal iron while it shows very little and only spotty staining on the surface membrane of *S. mekongi*. These results suggest that the glycocalyx and the surface membrane of cercariae, schistosomula are highly - negatively charged, and in adult when the glycocalyx is completely shed, there is still fairly high negative charge intrinsically present on the surface membrane.

In the experiments using lectin stain, the cercariae of both species bind concanavalin A (Con A) and wheat germ agglutinin (WGA) very intense throughout the whole thickness of the glycocalyx and on the surface membrane. In schistosomula, the bindings are significantly decreased and remain only around blebs, microvilli and membrane puffs. In adult of both species, the pattern of Con A binding is similar. The binding is strong on dorsal - lateral aspects of the body surface, as in the case of the positive colloidal iron, the intensity of staining in the neck region of pits is high and progressively decreases towards the bottom of pits, which may not be stained at all. The intensity is strong on the membrane at sides of ridges whereas the binding decreases towards their tips. The pattern of WGA binding in both species is similar, and is strong on dorsal - lateral aspects of the body. In contrast to Con A, the binding of WGA is confined mostly to the upper half of ridges, while the pit membrane does not bind the WGA. Furthermore, both lectins show only little binding on the surface of the gynecophoral canal.

The cytoskeleton of both species is studied by TEM using both conventional preparation and extraction methods with Triton X-100. In conventional preparation, the cytoskeleton is observed to be composed of two components: the major one, which forms the scaffold of the cytoplasm, appears as a network of dense dots closely

packed together, this scaffold is called microtrabecula, and the other major element of the cytoskeleton is microtubules. In addition, in *S. mekongi* adult, there are 10 nm thick filaments that appear only in pleomorphic papillae and some ridges. The microtrabecula is most densely - packed in cercariae and becomes loosen later in schistosomula and adult. Microtubules are confined in the processes of tegument cells in cercariae and radiate out into the basal and the middle part of the tegument in schistosomula and adult. In extraction experiment, soluble parts of the cytoplasm, the outer and inner membranes and membranous bodies' content are dissolved away. The contour of ridges and pits is still retained by the condensed lamina that line the cytoplasmic side of the surface membrane. The microtrabecula is loosened up and appears as network of knobby - fibers which are highly cross - linked by fine fibers. Microtubules still retain normal appearance and distribution in the processes of tegument cells and in tegument. In *S. mekongi*, the 10 nm fibers is intact and always kept in normal orientation. In adults, the compactness of microtrabecula varies from tight, moderate to loose in the middle, the apical and the basal layers, respectively. In some areas of the tegument, knobby - fibers of microtrabecula are unravelled such that cobweb appearance which is composed of thinner and straighter fibers are exhibited. Fibers from microtrabecula insert into the dense lamina

underneath the outer surface membrane. Membranous and discoid bodies are also linked and kept in position by the fibers of microtrabecula. Some membranous bodies are also linked to microtubules by fine fibers. Fibers radiating from hemidesmosomes also are inserted and enmeshed with the network of microtrabecula.

From this observation, it is interpreted that the microtrabecula may be composed at the primary level of thin and straight fibers that are partly coiled up to form knobby - fibers that are highly cross - linked at the secondary level. At the tertiary level, these knobby - fibers may be coiled up further and form closely aggregated dots that appear in most normal tegument. The microtrabecula may be the principal instrument in maintaining the shape of the tegument, and together with the dense lamina help to maintain the surface membrane integrity. It may also help to anchor the tegument to the parasites' bodies through hemidesmosomes within the tegument. The microtrabecula and microtubules are linked to membranous and discoid bodies, thus they may control the distribution and movement of these bodies.

Immunoelectron microscopic studies are performed by using monoclonal antibody (MAB) anti - actin and MAB anti - β - tubulin and secondary antibody - HRP to stain the adult parasites sections. In the experiment using MAB anti actin, electron - dense reaction products are observed on the knobby - fibers of microtrabecular network

throughout the whole thickness of the tegument and the thin lamina lining the surface membrane, while the spines in both species and 10 nm fibers in *S. mekongi* are not stained. In parasite samples that are treated with MAB anti - β - tubulin, the electron - dense reaction products are observed on the microtubules in the processes of tegument cells and those that radiate out from the processes into the tegument, and there is a positive staining on the microtrabecular network adjacent or linked to the microtubules. It is, therefore, concluded that most of the microtrabecula and the thin lamina are made up of actin, while spines and 10 nm fibers are not. The tegument microtubules are made of tubulin.

The roles of the cytoskeleton are further studied by using colchicine, a drug known to depolymerize microtubules and cytochalasin B, a drug known to depolymerize microfilaments (especially actin filaments). In colchicine experiment, the responses to the drug of adults of both species are quite similar. At 30 min, microtubules in the tegument and the processes of tegument cells are depolymerized and disappear, whereas most of the microtrabecular system remain intact, except at the basal layer where it tends to dissolve away and forms vacuoles. In the middle zone, there are numerous small membrane bound vacuoles which are derived from membranous bodies, whose content is dissolved out. Discoid bodies are swollen but still retain their homogenous content. Ridges

and pits maintain their shapes but there may be few small vacuoles at the tips of some ridges. These changes increase in quantity as the longer incubation time. At the end of experiment (120 min), the general breakdown occurs and parts of tegument are sloughed off. In schistosomula, following 30 - to 60 - min incubation the microtrabecular network appears intact; microvilli and blebs can still form, but in comparison to the normal parasites, most are very slender and lack surrounding glycocalyx. The most pronounced change is the appearance of very large vesicles containing scrolls of membranous materials which are highly osmiophilic. Some vacuoles are opened and appear to lose their content to the exterior. The narrow intracytoplasmic membranous sheets, as seen in normal schistosomula at this stage, are not present. After 3 - h incubation, large empty vacuoles are formed from the vesicles that lose their content to the exterior. Microtubules in the cell processes are also depolymerized. Therefore, it is interpreted that the normal mechanism that control the transport and addition of new membrane to the surface membrane is impaired, hence the existing membranous bodies may fuse together and the membrane scrolls inside lose their heptalaminated appearance and released to the exterior. At 48 - h incubation, the microtubules and microtrabeculae are depolymerized resulting the sloughing of the tegument from the parasites' bodies. The spines of both species

and the 10 nm fibers in *S. mekongi* are unaffected.

In cytochalasin B experiment, the responses to the drug in the adults of both species are quite similar. The earliest sign of change which occurs at 20 min is the depolymerization of the microtrabecular network in the apical layer, particularly, near the tips of the ridges and in the basal layer adjacent to the basal infoldings. This results in the formation of vacuoles that are not surrounded by the membrane. At 30 min, vacuoles are also formed in the middle layer. At this time, vacuoles at the tips of ridges are invariably disrupted. Discoid bodies are swollen, and their content is dissolved out, leaving only empty vesicles, whereas membranous bodies are still numerous and their content appears intact. Basal infoldings and associated mitochondria are not altered. Microtubules in the tegument and in the processes of tegument cells remain intact, and so are the spines and the 10 nm fibers in *S. mekongi*. At 60 min, hemidesmosomes and associated fibers are also disrupted resulting in the detachment of the tegument from the parasites' bodies. In newly - transformed schistosomula, at 30 min of incubation in cytochalasin B most of the tegument appears normal except for few small vacuoles that arise from the enlarging membranous bodies. There are no intracytoplasmic membrane sheets as observed in the control, and very few microvilli and blebs are formed. After 60 min, the microtrabecula is depolymerized,

particularly in the basal zone, thus the infoldings stand out sharply. Microtubules in the cell processes remain intact, and membranous bodies can still be transported and accumulated in the tegument. At 3 - h incubation, the vacuolization becomes more pronounced. The tegument begins to disrupt and detach from the parasites' bodies. From these experiments, it is concluded that the drugs that cause the depolymerization of microtubules and microtrabuculae can disrupt the process of membrane replacement, and the maintenance of the structural integrity of the parasites' tegument.