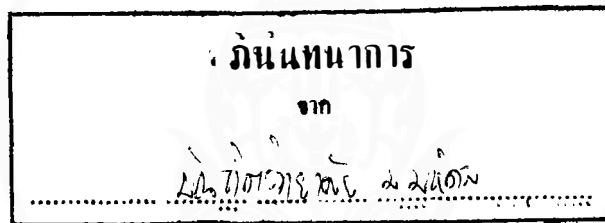




11 DEC 1991

ULTRASTRUCTURAL AND IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDIES
OF THE TEGUMENT AND CYTOSKELETON
OF *OPISTHORCHIS VIVERRINI*

WANDEE APINHASMIT



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

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

1991

Copyright by Mahidol University

17647

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาโครงสร้างละเอียด และอิมมูโนโพรโตเคมีของผิว และ ไซโตสเกเลตันในพยาธิใบไม้ตับ
ผู้วิจัย	วันดี อภินทสมิต
ปริญญา	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	ประเสริฐ โศภน , Ph.D. สุชาติ อุบัติ่มภ์ , Ph.D. ชัยทิพย์ วณิชานนท์ , Ph.D.
วันที่สำเร็จการศึกษา	๒๗ มีนาคม พ.ศ. ๒๕๓๔

บทคัดย่อ

การศึกษาโครงสร้างละเอียดของชั้นผิว ของพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* ระยะเมตาเซอคาเรีย ระยะอายุหนึ่งสัปดาห์ และ ระยะโตเต็มวัยด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดและชนิดส่องผ่าน พบว่าผิวของระยะเมตาเซอคาเรียประกอบด้วยสันทอดตามขวาง และหนาม ๒ ชนิด ชนิดแรกมีปลายเป็นพื้นเลื่อย และพบได้ที่บริเวณลำตัวส่วนหน้า ชนิดที่สองมีปลายแหลม พบบริเวณลำตัวส่วนกลาง และจะค่อยๆ หายไปเมื่อถึงลำตัวส่วนท้าย นอกจากนี้ยังพบปุ่มรับความรู้สึก ๓ ชนิด คือ ชนิดแรกมีซีเลียหนึ่งอันอยู่บนฐานรูปกรวย ชนิดที่สองเป็นกลุ่มของปุ่มรับความรู้สึกที่มีซีเลียอยู่บนฐานรูปโดมอันเดียวกัน และชนิดที่สามไม่มีซีเลีย สองชนิดแรกพบบริเวณรอบๆ ปากหน้ากับปากล่าง และยังพบเรียงเป็นแถวขนานกับด้านข้างของลำตัว ชนิดที่สามอยู่เฉพาะที่ขอบของปากล่าง เมื่อประสิทธิ์อายุหนึ่งสัปดาห์ หนามส่วนใหญ่หายไป ไมโครวิลลัสเริ่มปรากฏ และปุ่มรับความรู้สึกทั้งสามชนิดมีขนาดโตขึ้นกว่าระยะก่อน ในระยะโตเต็มวัย ผิวปกคลุมด้วยไมโครวิลลัสสั้น ปลายตัดเรียงตัวเบียดกันแน่น ปุ่มรับความรู้สึกทั้งสามชนิด มีขนาดโตขึ้นกว่าเดิม จำนวนและการกระจายของชนิดแรกเพิ่มขึ้น ส่วนชนิดที่สองมีจำนวนลดลง ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านแสดงว่า ชั้นผิวของประสิทธิ์ทั้งสามระยะ เห็นเป็นแผ่น ที่เกิดจากการรวมตัวของแขนง

ของเซลล์สร้างผิว ซึ่งวางเรียงเป็นแนวอยู่ใต้กล้ามเนื้อสองชั้น โดยชั้นนอกเรียงตามขวาง ส่วนชั้นในทอดตามยาวของลำตัว ชั้นผิวของปลาประกอบด้วยเยื่อหุ้มชั้นผิวส่วนนอก และส่วนในซึ่งต่างมีลักษณะ เป็นเยื่อสามชั้น เยื่อหุ้มชั้นผิวส่วนนอกเคลือบด้วยชั้นเคลือบบางๆ ในขณะที่เยื่อหุ้มผิวส่วนในพับเป็นหยักยื่นเข้าไปในชั้นผิว ภายใต้อันผิวของระยะ เมตาเซอคาเรียพบแกรนูลที่โปร่งแสงเป็นรูปรี รูปกลม และรูปคันทัน แกรนูลเหล่านี้จะเป็นชนิดเดียวกันซึ่งมีรูปร่างที่แท้จริงเป็นแผ่น และอาจช่วยในการสร้างเยื่อหุ้มชั้นผิวส่วนนอก พบไมโทคอนเดรียจำนวนมาก และส่วนใหญ่กระจายอยู่ในชั้นผิวส่วนล่าง ระยะอายุหนึ่งสัปดาห์และโตเต็มวัยพบแกรนูลที่แตกต่างจากระยะก่อน และแบ่งได้เป็น ๔ ชนิด คือ ชนิดแรกกลมและทึบแสง ชนิดที่สองรีและทึบแสง ชนิดที่สามกลมและมีเนื้อในเป็นเส้นใยสานกัน และชนิดที่สี่รีและมีเนื้อในเป็นเส้นใยสานกัน แกรนูลสองชนิดแรกมีเนื้อในทึบแสงเหมือนกันและอาจเป็นแกรนูลชนิดเดียวกัน แต่ตัดกันระนาบที่ต่างกัน รูปร่างที่แท้จริงของมันควรเป็นแผ่นที่เว้าเข้าไปทั้งสองด้าน แกรนูลชนิดนี้อาจนำสารไปประกอบเป็นเยื่อหุ้มชั้นผิวส่วนนอกและชั้นเคลือบ ส่วนแกรนูลชนิดที่สามและสี่น่าจะเป็นชนิดเดียวกัน และอาจปล่อยเนื้อในไปสร้างไมโครทราปิคูลี ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของชั้นผิว ไมโทคอนเดรียจำนวนมากเพิ่มขึ้นและส่วนใหญ่อยู่ในชั้นผิวส่วนบนโดยอยู่ใต้ หรือ ภายใต้อันผิวของไมโครวิลไลของระยะโตเต็มวัย เซลล์สร้างผิวมีรูปร่างไม่แน่นอน และพบนิวเคลียสหนึ่งอัน ซึ่งมีนิวคลีโอลัสเห็นชัดเจน นอกจากนี้ยังพบรีเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม กอลจิคอมเพล็กซ์ ฟูโรโซโซม และไมโทคอนเดรีย ลักษณะเหล่านี้บ่งชี้ว่าเซลล์นี้ทำหน้าที่สร้างแกรนูลเพื่อส่งไปยังชั้นผิว โดยผ่านแขนงของเซลล์ที่มีไมโครทิวบูลจำนวนมาก

ในการศึกษาโครงสร้าง และประจุไฟฟ้าของชั้นเคลือบและเยื่อหุ้มผิวส่วนนอกโดยย้อมด้วยสารคอลลอยด์ของเหล็กที่มีประจุบวก กับที่มีประจุลบ และ รูทีเนียมเรด พบว่ารูทีเนียมเรดทำให้เห็นชั้นนี้ได้ชัดเจน อันประกอบด้วย ๒ ส่วน คือ ส่วนในเป็นแถบทึบ และส่วนนอกเป็นเส้นใยสานกันหลวมๆ การที่ชั้นเคลือบ และเยื่อหุ้มผิวส่วนนอกของปลาทั้งสามระยะย้อมติดสารคอลลอยด์ของเหล็กที่มีประจุบวกและรูทีเนียมเรด แสดงว่า มันประกอบด้วยสารที่มีคาร์โบไฮเดรตจำนวนมาก และมีประจุลบจำนวนมาก ซึ่งเกิดจากกลุ่มคาร์บอกซิล กับซัลเฟต และกรดไขมัน กรดไขมัน ปริมาณการติดของสารทั้งสองลดลง เมื่อปลาโตขึ้นซึ่งอาจเกิดจากการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมที่ต่างกันในแต่ละส่วนของเจ้าบ้าน นอกจากนี้อาจพบประจุบวก

ได้บ้าง เมื่อย้อมด้วยสารคอลลอยด์ของ เหล็กที่มีประจุลบ

จากการศึกษาชนิดของน้ำตาลในชั้นเคลือบของปรีลิตระยะโตเต็มวัย โดยย้อมด้วยสาร เล็กตินส์ ๕ ชนิด พบว่าชั้นเคลือบสามารถจับอย่างจำเพาะได้กับ *Canavalia ensiformis*, *Triticum vulgare* และ *Ricinus communis* เป็นจำนวนมากกว่าจับกับ *Dolichos biflorus* แต่ไม่จับกับ *Ulex europaeus* ลักษณะการจับของ เล็กตินส์ทั้งสี่ชนิดกระจาย สม่ำเสมอตลอดลำตัวด้านหน้าและด้านหลัง แสดงว่าชั้นเคลือบนี้ประกอบด้วยน้ำตาลที่สำคัญ หลายชนิด คือ ดี-แมนโนส ดี-กลูโคส เอ็น-อะเซทิล-กลูโคซามีน กรดไซอะลิก ดี-กาแลคโตส และ เอ็น-อะเซทิล-ดี-กาแลคโตซามีน

โครงสร้างของ ไชโตสเกลเลตันในชั้นผิวของปรีลิต ศึกษาโดยการเตรียมเนื้อเยื่อด้วย วิธีต่างๆ ไป และวิธีสกัดด้วยไตรตัน เอ็กซ์-๑๐๐ พบว่าไชโตสเกลเลตันของปรีลิตทั้งสามระยะ ประกอบด้วยโครงสร้างหลัก ๒ ประเภท คือไมโครทราบิคูลี และไมโครทบูล ไมโครทราบิคูลี เป็นเส้นใยสานกันเป็นร่างแห อันประกอบเป็นโครงสร้างหลักในชั้นผิว โดยมีการจัดเรียงตัว แน่นทึบที่สุดในระยะ เมตาเซอคาเรีย และลดน้อยลงตามลำดับเมื่อปรีลิตโตขึ้น อีกทั้งการ จัดเรียงตัวจะแน่นในชั้นผิวส่วนบน กับส่วนกลางมากกว่าส่วนล่าง เมื่อสกัดผิวปรีลิตด้วย ไตรตัน เอ็กซ์-๑๐๐ พบว่า ในชั้นแรกไมโครทราบิคูลีประกอบด้วยเส้นใยบางๆ ซึ่งในชั้นที่สองจะ ชดตัวเป็นเส้นใยที่มีบวมแทรกอยู่เป็นระยะๆ ทอดสานกันไปมา และเชื่อมยึดกันด้วยเส้นใยบางๆ และจะชดตัวมากขึ้นจนเห็นเป็นจุดอยู่กันแน่นทึบในชั้นที่สาม ส่วนไมโครทบูลมักพบในแขนงของ เซลล์สร้างผิว แล้วกระจายไปสู่ชั้นผิวส่วนล่าง นอกจากนี้ยังพบแถบทึบแคบๆ ตลอดความยาว ของ เยื่อหุ้มชั้นผิวส่วนนอกโดยมีแผ่นทึบตั้งอยู่เป็นระยะๆ พบเส้นใยของ ไมโครทราบิคูลีเชื่อม กับบริเวณทั้งสองซึ่งจะช่วยยึดเยื่อหุ้มผิวส่วนนอก และช่วยให้ชั้นผิวคงรูปร่างอยู่ได้ ที่ฐานของ ชั้นผิวมีเฮมิเซลสวิมกระจายอยู่เป็นระยะๆ และส่งเส้นใยไปสานกับไมโครทราบิคูลี ซึ่งจะ ช่วยยึดชั้นผิวกับตัวปรีลิต พบแกรนูลฝังตัวอยู่ในไมโครทราบิคูลีด้วย จากการศึกษาเหล่านี้ แสดงว่าไมโครทบูล และ ไมโครทราบิคูลี มีส่วนช่วยในการควบคุมการลำเลียงแกรนูลจากเซลล์ สร้างผิวไปสู่ชั้นผิว และช่วยในการคงรูปร่างของชั้นผิว เฉพาะในระยะ เมตาเซอคาเรียพบ ทนามที่มีลักษณะ เป็นแท่งผลึกเล็กๆ สานกันเป็นร่างแห โดยมีส่วนฐานยึดติดกับเยื่อหุ้มชั้นผิวส่วนใน

เมื่อศึกษาไชโตสเกลเลตันด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ ปรากฏว่าส่วนประกอบหลัก

ของ เส้นใยที่สานกันขึ้นผิว เป็นสารแอกติน แต่ในแขนงของ เซลล์สร้างผิวพบทิวบูลินซึ่งเป็น ส่วนประกอบของ ไมโครทิวบูล

ได้ทำการศึกษาบทบาทของ ไซโทสเกเลตันในปรีลิตระยะโตเต็มวัย โดยใช้อาคอลชิซิน พบว่า มีการทำลายไมโครทิวบูล ซึ่งมีผลต่อการลาเสียงแกรนูลชนิดที่บจากเซลล์สร้างผิว ไปสู่ ชั้นผิว แกรนูลเหล่านี้จะรวมตัวกันเกิดเป็นแวกคิวโกลที่มีเยื่อหุ้ม และยายังทำให้ไมโคร- ทราบีคูลีสลายตัวเกิดเป็นแวกคิวโกลที่ไม่มีเยื่อหุ้ม เมื่อเลี้ยงปรีลิตเป็นเวลานาน การทำลาย านชั้นผิวมากขึ้นจนชั้นผิวบางส่วนหลุดออกจากตัวของปรีลิต หลังจากเลี้ยงปรีลิตในน้ำเลี้ยง ที่ผสมยาไซโตคาลาซิน บี มีการทำลายที่รุนแรงน้อยกว่าของยาตัวแรก คือ ในระยะ เวลาสั้นๆ ไมโครทราบีคูลีจะสลายตัวเกิดเป็นแวกคิวโกลที่ไม่มีเยื่อหุ้ม ต่อมาไมโครวิลไลย์คอกและพอง เป็นคุ่ม แต่ไม่พบการหลุดลอกของชั้นผิวแม้จะเลี้ยง เป็นเวลานาน ผลของยาทั้งสองแสดงให้ เห็นว่า ไมโครทิวบูลมีความสำคัญในการลาเสียงแกรนูลจากเซลล์สร้างผิว ไปยังชั้นผิวเพื่อสร้าง เยื่อหุ้มผิวส่วนนอกและชั้นเคลือบ ส่วนไมโครทราบีคูลีช่วยให้ชั้นผิวสามารถรักษารูปร่างไว้ได้

Thesis Title ULTRASTRUCTURAL AND IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDIES
 OF THE TEGUMENT AND CYTOSKELETON OF
 OPISTHORCHIS VIVERRINI

Name Wandee Apinhasmit

Degree Doctor of Philosophy (Anatomy)

Thesis Supervisory Committee

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

Date of Graduation 27 March B.E. 2534 (1991)

ABSTRACT

The tegumental ultrastructure of metacercarial, first-week and adult stages of *Opisthorchis viverrini* were studied by both scanning (SEM) and transmission (TEM) electron microscopy. Under SEM, the metacercarial surface is characterized by transverse ridges and two sets of spines; namely, serrated spines on the anterior part and single-pointed spines on the middle part; spines are absent on the posterior part of the parasite's body. Three types of sensory papillae are: (1) a single small ciliated papilla with a cone-shaped base; (2) a group of ciliated papillae on a common dome-shaped base; and (3) a non-ciliated papilla. The first two types are concentrated around both suckers and along the lateral surface, whereas the latter is located on the lip of the ventral sucker. In the first-week juvenile, most spines microvilli start to develop. Three types of

papillae are also observed in this stage, but generally have larger size. In the adult stage, there are abundant short stubby microvilli and three types of papillae as in the juvenile stage, but are of larger size. Type A papilla is more numerous and has more irregular arrangement, while type B papilla decreases in number.

Under TEM, the tegument of all three stages is composed of a syncytium formed by processes of the tegumental cell lying underneath the outer-circular and the inner-longitudinal muscle layers. The tegument is bounded by the outer and inner trilaminar membranes; the former is coated with a thin layer of glycocalyx, while the latter forms short basal infoldings. The metacercarial tegument contains numerous discoid, spherical and doughnut-shaped light granules which may actually belong to a single type with disc shape. They may contribute to the formation of the outer membrane. Few mitochondria are distributed in the basal zone of the tegument. In the first-week and adult flukes, four types of tegumental granules are designated as dense spherical, dense discoid, light spherical and light discoid granules. Dense spherical and dense discoid granules have similar dense homogeneous and highly osmiophilic matrix; thus, they may represent different planes of sections of biconcave granules and may contribute their content to synthesis and turn-over of the outer membrane and the glycocalyx. Light spherical and light discoid granules may be another type of granules whose filamentous content may contribute to the formation of microtrabeculae in the tegument. Mitochondria become more numerous along with the microvilli development, and most of them are located in the apical portion

either underneath or within microvilli of the adult.

The tegumental cell body is irregular and contains a nucleus with a prominent nucleolus, abundant rough endoplasmic reticulum, well developed Golgi complexes, free ribosomes and mitochondria. These features indicate that this cell is active secretory cell whose product is tegumental granules that may be transported via microtubule-lined cytoplasmic processes to the syncytium.

The structure and charge of the glycocalyx and the surface membrane were investigated by using colloidal iron and ruthenium red stainings. Ruthenium red could stain and preserve the whole thickness of glycocalyx which exhibited two parts: a very dense continuous inner layer and a filamentous outer layer. Staining with the two markers implies that the glycocalyx and the surface membrane of all three stages are both carbohydrate-rich and bearing a relative high electronegative charges which are probably contributed by carboxyl and sulfate groups; and sialic acid. The degrees of staining intensities decrease during the fluke's maturation, which may be an adaptation to the different environment within various compartments of the host's body. Only few positively-charged groups are present as revealed by staining with the negative colloidal iron.

The carbohydrate residues in the glycocalyx of adult fluke were characterized by binding with five biotinylated lectins using avidin-biotin system. The binding sites for *Canavalia ensiformis*, *Triticum vulgare* and *Ricinus communis* are present in relative large amount on the parasite surface, whereas those for *Dolichos biflorus* are relatively fewer in number, and those for *Vlex europaeus*

are absent. The binding patterns of four lectins are generally similar: the reaction product is uniformly distributed over the dorsal and ventral surfaces of the parasite's body. This, therefore, implies the presence of D-mannose/D-glucose, N-acetyl-D-glucosamine/sialic acid, D-galactose and N-acetyl-D-galactosamine residues on the glycocalyx of adult *O. viverrini*.

The tegumental cytoskeleton was observed in TEM using both conventional preparation and Triton X-100 extraction methods. The cytoskeletal elements of all three stages are composed of two components: firstly, the fine network of dense dots designated as microtrabeculae which form the principal scaffold of the cytoplasm; and secondly, the microtubules. The microtrabeculae are densely packed in the metacercariae and become looser later in the first-week and adult flukes. Generally, their compactness in the tegument of each stage is higher in the apical and middle than in the basal zone. The results from extraction method are suggestive that the microtrabeculae may be composed, at the primary level, of thin and straight fibers that are partly coiled up to form knobby fibers which are highly cross-linked at the secondary level. At the tertiary level, these knobby fibers may be coiled up further and form closely aggregated globules. Most microtubules are confined within the tegumental cell's processes and spray out in the basal zone of the tegument. In addition, there are condensed zones of cytoplasm and intermittent dense plaques underlining the outer membrane, with microtrabecular fibers inserted into them. This organization may help to stabilize the outer membrane and preserve the surface contour.

Along the base of the tegument, there are hemidesmosomes distributed at an interval with fine fibers radiating out from them to intertwine with the microtrabecular network, which help to anchor the tegument to the parasites' bodies. The tegumental granules are embedded in the extensive network of microtrabeculae. The transport of tegumental granules from the tegumental cells to the tegument may be governed by microtubules and their distribution in definite sites may be determined by the microtrabeculae.

Spines, which exist only in the metacercaria, appear as crystalline-lattice structures whose bases are firmly fused to the inner plasma membranes.

Indirect immunofluorescence studies using anti- β -tubulin and anti-actin indicate that the major component of the tegumental cytoskeleton is actin, with some tubulin concentrating in processes of the tegumental cells.

The roles of the cytoskeleton are tested by treating adult parasites with colchicine and cytochalasin B. Following a short incubation period (10 -20 min), colchicine disrupts some microtubules which, in turn, affect the transport of dense granules from tegumental cells to the tegument. Some of these granules may be fused together to form membrane-bound vacuoles. In addition, the microtrabeculae are also depolymerized which result in non-membrane bound vacuoles. After prolonged incubation (120 min), the general break-down occurs and parts of the tegument are sloughed off.

In cytochalasin B treatment, the responses are similar but show less severity than those of colchicine. After short incubation

period (10-20 min), the microtrabeculae are depolymerized which leads to the formation of non-membrane bound vacuoles in the apical and middle zones of the tegument. Later, the tegumental microvilli are distended to form blebs but no evidence of tegumental sloughing occurs even in prolonged incubation.

From these observations, it is concluded that microtubules assist in the translocation of granules from the tegumental cell to the syncytium and modulating the synthesis of membrane and glycocalyx, and the microtrabeculae play important role in the maintenance of the normal structure and integrity of the tegument.