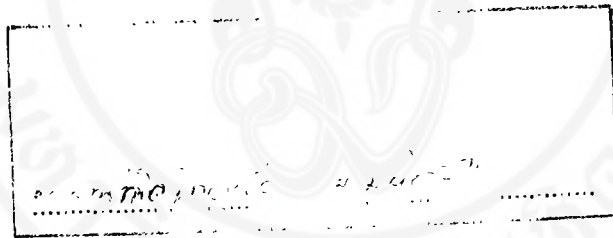




27 FEB 1994

**ULTRASTRUCTURAL AND IMMUNOCYTOCHEMICAL
STUDIES OF THE TEGUMENT OF ADULT
*FASCIOLA GIGANTICA***

TUNYARUT DANGPRASERT



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

**IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES**

MAHIDOL UNIVERSITY

1994

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาโครงสร้างละเอียดและอิมมูโนไซโตเคมีของ พยาธิใบไม้ตับในโค กระบือในระยะตัวเต็มวัย	
ผู้วิจัย	ชญารัตน์ แดงประเสริฐ	
ปริญญา	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต(กายวิภาคศาสตร์)	
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	ประเสริฐ โสภน	Ph.D.
	สุชาติ อุปถัมภ์	Ph.D.
	ชัยทิพย์ วนิชานนท์	Ph.D.
	จิตติพันธ์ ชวเดช	Ph.D.
วันที่สำเร็จการศึกษา	3 ตุลาคม พ.ศ. 2537	

บทคัดย่อ

เมื่อสังเกตพยาธิ *Fasciola gantica* ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราด พบว่า ฝิวของมันหยาบเพราะมีหนามและสันอยู่จำนวนมากทางท้อง หนามที่อยู่ทางตอนหัวด้านท้องมีขนาดเล็กและอยู่ชิดกันและหนามแต่ละอันมีขอบคล้ายฟันเลื่อย ประมาณ 16 ถึง 20 ซี่ และวัดขนาดของหนามได้ความกว้างประมาณ 20 ไมครอน และยาวประมาณ 30 ไมครอน บนลำตัวตอนกลางหนามมีขนาดใหญ่คือกว้างมากกว่า 54 ไมครอน และสูงมากกว่า 58 ไมครอน และจำนวนก็เพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะทางขอบข้างลำตัว ทางด้านหางหนามจะลดทั้งขนาดและจำนวน ฝิวของพยาธิที่อยู่ระหว่างหนามจะมีลักษณะย่นโดยมีสันนูนและร่องสลับกัน สันนั้นมีลักษณะเว้าลึกเข้าไปเป็นสันเล็กๆและร่องขนาดต่างๆ ฝิวที่อยู่ระหว่างหนามมีปุ่มรับความรู้สึก แต่ละปุ่มมีลักษณะเป็นโดมขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4-6 ไมครอน บนยอดมีลักษณะคล้ายปุ่มนูน และบางที่มีซี่เล็กสั้นๆ บางครั้งก็พบว่าไม่มีซี่เล็ก เป็นเพียงแต่เรียบๆ ปุ่มรับความรู้สึกเหล่านี้เกิดเป็นกลุ่มๆ แต่ละกลุ่มมี 2 และ 3 จนถึง 10 และ 15 ปุ่ม ต่อ 1 กลุ่ม ขึ้นอยู่กับว่าเป็นส่วนใดเช่นบนด้านข้างตัวและรอบๆปากจะมีจำนวนมากและใหญ่กว่าทั้งขนาดและจำนวนปุ่มต่อ 1 กลุ่ม ฝิวทางด้านหลังมีลักษณะคล้ายที่กล่าวข้างต้นแต่มีจำนวนน้อยกว่า และขนาดของหนามเล็กลง รวมทั้งการเว้าเข้าข้างในของฝิวก็น้อยกว่าทางด้านท้องด้วย

เมื่อสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องผ่าน ผิวของพยาธิสามารถแบ่งได้เป็น 4 ชั้นคือ 1) ชั้นที่ 1 เป็นส่วนตัดขวางของสันและรอยเว้าขนาดเล็ก ไชโตพลาสซึมของชั้นนี้ค่อนข้างจะอัดกันแน่น และมีแกรนูลรูปร่างโดนัท(G_2) ขนาดประมาณ 20-40 x 135-250 นาโนเมตร จำนวนมาก และแกรนูลรูปรี(G_1) ขนาด 70-90 x 170-210 นาโนเมตร ซึ่งแกรนูลชนิดนี้จะมีสารค่อนข้างที่บ่งชี้ใน ทั้งแกรนูลรูปโดนัทและแกรนูลรูปรีขึ้นไปเชื่อมกับเยื่อหุ้มผิวซึ่งเป็นเยื่อแบบ สามชั้นเช่นกัน ขนาดหนาประมาณ 4 นาโนเมตร ภายใต้อันเยื่อหุ้มผิวนี้มีไชโตพลาสซึมชั้นบางๆที่ค่อนข้างที่บ่งชี้หนาประมาณ 15 นาโนเมตร และมีชั้นเคลือบผิว (Glycocalyx) คลุมอยู่ด้านนอกอีกที ซึ่งประกอบด้วย 2 ชั้น คือ ชั้นที่มีเนื้อเนียนเป็นชั้นบางๆ ประมาณ 9-14 นาโนเมตรซึ่งอยู่ติดเยื่อหุ้มผิว และชั้นนอกหรือชั้นถัดออกไปเป็นลักษณะคล้ายเส้นใยชั้นนี้หนาประมาณ 50-280 นาโนเมตร ถ้าย้อมด้วยสารคอลลอยด์ของเหล็กที่มีประจุบวกและรูทีเนียมเรด ชั้นเคลือบผิวนี้จะติดเข้มขึ้น ทำให้ทราบว่า ชั้นเคลือบผิวมีประจุลบ และจะติดสีของสารคอลลอยด์ของเหล็กซึ่งมีประจุบวบน้อยมากเป็นจุดๆ แกรนูล G_1 ซึ่งอยู่ใกล้ๆก็จะติดสีด้วย ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าแกรนูลชนิดที่สองมีส่วนร่วมในการสร้างเยื่อหุ้มผิวใหม่ ขณะที่แกรนูลชนิดที่หนึ่งมีส่วนร่วมสร้างชั้นเคลือบผิว 2) ชั้นที่ 2 ของเยื่อหุ้มผิวเป็นชั้นบางๆของไชโตพลาสซึมซึ่งสารข้างในค่อนข้างอัดกันแน่น และจะมีแกรนูลชนิดที่หนึ่งและสองสะสมอยู่ และมีแกรนูลชนิดที่สามรูปรีขนาด 50-75 x 130-180 นาโนเมตรอยู่น้อย น้อย แกรนูลชนิดที่สามมีเนื้อในทึบแสงปานกลางและมีลักษณะเป็นตาข่าย นอกจากนี้ยังพบไลโซโซมจำนวนมากกระจายอยู่ตลอดในชั้นนี้ 3) ชั้นที่สามอยู่ตอนกลางของชั้นผิว ชั้นนี้กว้างที่สุด และไชโตพลาสซึมค่อนข้างอัดกันอยู่ แต่ไม่แน่นเท่าชั้นที่หนึ่งและสอง และมีไมโทคอนเดรียจำนวนมากกระจายอยู่ทั่วไปและมีแกรนูลทุกชนิดอยู่แต่จะมีจำนวนน้อยกว่าสองชั้นแรกและส่วนใหญ่เป็นแกรนูลขนาดเล็กชนิดที่สามกระจายอยู่ และบางเม็ดก็สลายเยื่อหุ้มของมันและเส้นใยในแกรนูลจะออกมาเชื่อมกับเส้นใยไมโครทราเบคูลี 4) ชั้นที่ 4 เป็นชั้นล่างสุดอยู่บนชั้น basal lamina ไชโตพลาสซึมของชั้นนี้มีลักษณะค่อนข้างหลวมที่สุด และมีการยกตัวของ basal membrane เข้ามาจำนวนมาก ซึ่งมีไมโทคอนเดรียอยู่ข้างๆ และแกรนูลชนิดที่หนึ่งจำนวนมาก แต่ชนิดอื่นมีอยู่

น้อย มีเซลล์อยู่แบบเดี่ยวที่สามารถสร้างแกรนูลทั้งสามชนิด แต่แกรนูลชนิดที่สองเด่นที่สุด ภายในแขนงของเซลล์ที่ส่งขึ้นไปมีไมโครทิวบูลอยู่

ระบบเส้นใยโครงสร้างของไซโตสเกเลตันประกอบด้วย 4 ส่วนคือ 1) ชั้น dense lamina เป็นชั้นบางรองอยู่ใต้เยื่อหุ้มผิว 2) กลุ่มของเส้นใย fortifying fibril 3) ไมโครทราเบคูลี 4) ไมโครทิวบูล ชั้น dense lamina มีความหนาประมาณ 15 นาโนเมตรซึ่งช่วยทำให้เยื่อหุ้มผิวมีความแข็งแรง กลุ่มของ fortifying fibril เป็นเส้นใยตรงๆ เรียงขนานกัน แต่ละเส้นใยมีขนาด 7-11 นาโนเมตร ซึ่งอาจจะช่วยค้ำจุนส่วนบนของชั้นผิวและเยื่อหุ้มผิวไว้ ไมโครทราเบคูลีเป็นเส้นใยที่เชื่อมกันของ knobby fibers ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของไซโตสเกเลตัน ในส่วนบนของชั้นผิวเส้นใยจะยึดกันแน่น ส่วนของ knobby ปรากฏเป็นจุดที่รวมกันในภาคตัดขวาง ส่วนที่เป็นจุดหรือ knobby มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 8-12 นาโนเมตร ขณะที่ส่วนที่เป็นเส้นใยมีขนาดกว้าง 4-6 นาโนเมตร เมื่อสกัดด้วยสาร Triton X-100 และ DTT พบว่า knobby fibers คลี่ตัวออกเป็นเส้นใยบางๆ ตรงๆ สานกันอยู่ ขนาดของแต่ละเส้นมีค่า 1-4 นาโนเมตร ซึ่งแสดงระดับแรกของการจัดเรียงตัวของไซโตสเกเลตัน ไมโครทิวบูลอยู่ในแขนงของเซลล์สร้างชั้นผิวและชั้นฐานของผิวอาจมีส่วนร่วมในการขนส่งแกรนูลต่างๆ จากตัวเซลล์ไปยังชั้นผิว

การย้อมทางอิมมูโนไซโตเคมีของชั้นผิว โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอกตินของสัตว์มีกระดูกสันหลัง แสดงว่าโปรตีนนี้กระจายตลอดชั้นผิวของไมโครทราเบคูลี การย้อมด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไซโตเคอราตินซึ่งเป็น intermediate filament protein แสดงให้เห็นเป็นแถวของจุดสีเข้มบนส่วนชั้นบนของชั้นผิว ซึ่งอาจสอดคล้องกับตำแหน่งของ fortifying fibril โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อทิวบูลินแสดงให้เห็นการติดสีในแขนงของเซลล์ผิว และชั้นฐานของชั้นผิวซึ่งสอดคล้องกับตำแหน่งไมโครทิวบูล

Thesis Title Ultrastructural and Immunocytochemical Studies of
the Tegument of Adult *Fasciola gigantica*

Name Tunyarut Dangprasert

Degree Doctor of Philosophy (Anatomy)

Thesis Supervisory Committee

Prasert Sobhon Ph.D.

Suchart Upatham Ph.D.

Chaitip Wanichanon Ph.D.

Jittipan Chavadej Ph.D.

Date of Graduation 3 October B.E. 2537 (1994)

ABSTRACT

When an adult *Fasciola gigantica* was observed by scanning electron microscope, its surface appears rough due to the presence of numerous spines and ridges. On the ventral surface, the spines on the anterior part are small and closely-spaced, and each spine has serrated edge with 16 to 20 sharp points, and it measures about 20 μm in width and 30 μm in height. On the mid region, the spines increase in size (up to 54 μm in width and 58 μm in height) as well as in number, particularly towards the edges. Towards the posterior end, the spines progressively decrease in both size and number. The tegument between spines appears highly corrugated with transverse folds alternated with grooves. The fold is highly invaginated with meshwork of ridges penetrated by variable-size pits. In between spines there are also sensory papillae, each appearing as a small dome about 4-6 μm in diameter with a nipple like tip, with or without short cilia on top;

some domes may be non-ciliated. These papillae usually occur in clusters, each having between two and three, up to 10 and 15 papillae per group. Those on the lateral aspect and around the suckers tend to be more numerous and larger in size, as well as having more papillae per cluster. The dorsal surface exhibits similar surface features, but the spines and papillae appear less numerous and having smaller sizes, and the invagination is less extensive than on the ventral aspect.

When observed under the transmission electron microscope, the tegument can be divided into four layers based on the ultrastructural characteristics. The first or surface layer is the cross-sections of ridges and pits. Its cytoplasmic matrix is the most densely packed and contains numerous discoid membranous granules (G_2) whose size is about 20-40 x 135-250 nm, and fewer ovoid granules (G_1) with dense matrix whose size is about 70-90 x 170-210 nm. Both G_1 and G_2 granules are joined with the surface membrane, which is a trilaminar structure about 4 nm thick. The membrane is underlied by the dense lamina of cytoplasm about 15 nm thick, and coated externally by the glycocalyx. The glycocalyx has two layers: the thin dense homogeneous layer about 9-14 nm in width closely apposed to the membrane, and to external fibrillar layer about 50-280 nm in width. The glycocalyx is intensely stained by the positive colloidal iron and ruthenium red which indicates that it is highly negatively charged. It, however, shows very little and spotty staining with the negative colloidal iron. Ruthenium red stains glycocalyx as well as some G_1 granules close to the surface. It is, therefore, suggested that G_2 granules are the major contribute to the synthesis of the new surface membrane, while G_1 granules contribute the

formation of the glycocalyx. The second layer of the tegument is a thin zone of cytoplasm whose matrix is also densely packed, and the most prominent characteristics is the accumulation of G_1 , G_2 and some G_3 granules. The last is a light, ovoid granule about 50-75 x 130-180 nm in size that contains moderately dense but mottled matrix. In addition, there are a high number of lysosomes that are evenly distributed throughout this layer. The third layer occupies the middle portion of the tegument and is the widest. Its cytoplasmic matrix is less tightly packed than in the upper two layers, and contains numerous mitochondria which are evenly distributed throughout. All types of granules are present but G_1 and G_2 granules are much fewer than in the first and second layers and most are of smaller size. G_3 granules are evenly distributed and some dissolve their membranes so that their fibrous matrix joins up with the network of microtrabeculae which constitute the main body of the cytoplasmic matrix. The fourth layer is the lowest zone that rests on the basal lamina. Its cytoplasmic matrix is the loosest and contains numerous infoldings of the basal membrane which have mitochondria in close association. It contains fairly large number of G_1 granules but few of other kinds of granules. There are one type of tegumental cell lying underneath the muscle layers that can synthesize all three kinds of tegumental granules, but the G_2 granules predominate. The cells send their granules into the tegument via the cells processes which contain bundles of microtubules.

The filamentous cytoskeletal system constitutes the body of the tegumental cytoplasmic matrix. The cytoskeleton is composed of four components, namely, (1) the dense lamina underlining the surface membrane,

(2) the bundles of fortifying fibrils lying under the dense lamina, (3) the microtrabeculae, and (4) the microtubules. The dense lamina is about 15 nm in width, which may help to strengthen the membrane and glycocalyx. The bundles of fortifying fibrils contain parallel straight fibers, each about 7-11 nm in width, which may help to stabilize the upper part of the tegument, and the surface membrane. The microtrabeculae are the highly cross-linked network of knobby fibers that form the major part of the cytoskeleton. In the upper part of the tegument the fibers are so tightly packed that their knobby parts appear as closely aggregated dots in cross section. The dot or knobby part is about 8-12 nm in diameter, while the fibrous part is about 4-6 nm in width. When subjected to the extraction by Triton X-100 and DTT, the knobby fibers are unraveled to assume a cobweb of thin and straight fibers about 1-4 nm in width, which could represent the primary level organization. Microtubules are confined to the tegumental cell processes and the basal layer of the tegument and may be involved in the transport of the granules from the tegumental cells' bodies to the tegument.

Immunocytochemical staining of the tegument by monoclonal antibodies (MAB) against vertebrate's actin shows that this protein is widely distributed throughout the tegument of the microtrabeculae. MAB against vertebrate's cytokeratin, an intermediate filament protein, exhibits staining as row dense spots in the upper layer of the tegument which may correspond to the position of fortifying fibrils. MAB against tubulin shows staining in the tegumental cells' processes and the basal layer of the tegument which correspond to the position of microtubules.