

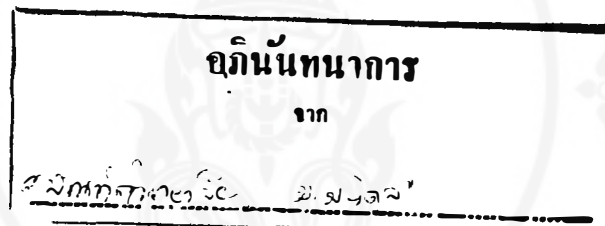
12 JUL 1994



THE ORGANIZATION OF CYTOSKELETON  
IN THE TEGUMENT OF *SCHISTOSOMA JAPONICUM*  
AND ITS RESPONSE TO PRAZIQUANTEL

SUWADEE CHAUNCHAIYAKUL

✓



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

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1993

Copyright by Mahidol University

27133

ชื่อวิทยานิพนธ์	การจัดเรียงตัวของไซโทสเกเลตันในชั้นผิวของพลาสมาใบไม้เลือก <i>S. japonicum</i> และการตอบสนองต่ออาหารชีวคือนเทล
ผู้วิจัย	สุวดี ชวนไชยะกุล
ปริญญา	ปรัชญาคณะศึกษาศาสตร์(กายวิภาคศาสตร์)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	
	ประเสริฐ ใจภณ , Ph. D.
	สุชาติ อุบลรัตน์ , Ph. D.
	ชัยทิพย์ วนิชานนท์, Ph. D.
	จิตติพันธ์ ชวเคช , Ph. D.
วันที่สำเร็จการศึกษา	20 พฤษภาคม พ.ศ. 2537

#### บทคัดย่อ

การศึกษาการจัดเรียงตัวของไซโทสเกเลตันในชั้นผิวของระยะต่างๆในวงจรชีวิตของพลาสมาใบไม้เลือก *S. japonicum* ทาการศึกษาเตรียมเนื้อเยื่อด้วยวิธีทั่วๆไป และวิธีสกัดด้วย Triton X-100 และสารผสมระหว่าง Triton X-100 และ Dithiothreitol (DTT) เมื่อนำตัวอย่างไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนทั้งแบบส่องผ่านและส่องกราดพบว่าไซโทสเกเลตันของปรสิตทุกระยะ ประกอบด้วยโครงสร้างหลักสองประเภทคือ ใยโครงทราบิคูลี และใยโครงทบูล ซึ่งใยโครงทราบิคูลีเป็นเส้นใยที่สานกันเป็นร่างแหอันเป็นโครงสร้างหลักในชั้นผิวโดยมีการจัดเรียงตัวแน่นที่ที่สุดตามระยะเขอคาวเรียว และลดน้อยลงตามลำดับเมื่อปรสิตขึ้น อีกทั้งการจัดเรียงตัวจะแน่นในชั้นผิวส่วนบนกับส่วนกลางมากกว่าส่วนล่าง เมื่อสกัดผิวปรสิตด้วย Triton X-100 และ สารผสมของ Triton X-100 และ DTT ตามลำดับพบว่าในชั้นแรกใยโครงทราบิคูลีประกอบด้วยเส้นใยบางๆขนาดประมาณ 3 ถึง 7 นาโนเมตรซึ่งในชั้นที่สองจะหดตัวเป็นเส้นใยที่มีขนาด 9 ถึง 11 นาโนเมตรแทรกอยู่เป็นระยะๆหอคสานกันแน่นและยังเชื่อมยึดกันด้วยเส้นใยบางๆ และจะหดตัวมากขึ้นจนเห็นเป็นจุดกลมแน่นที่ขนาดประมาณ 11 ถึง 16 นาโนเมตรในชั้นที่สาม ส่วนใยโครงทบูลมักพบในแขนงของเซลล์สร้างผิวแล้วกระจายไปสู่ชั้นผิวส่วนล่าง จากลักษณะที่พบนี้ได้ว่าใยโครงทราบิคูลีทำหน้าที่เป็นส่วนค้ำโครงสร้างของชั้นผิวให้

คงรูปร่างอยู่ได้ ในขณะที่ในครุฑมูลจะมีส่วนช่วยในการควบคุมการลาเสียงแทรบูลจาก เซลล์สร้างผิวไปสู่ชั้นผิว

เพื่อศึกษาการตอบสนองต่อยาพาราซิควอนเทล ตัวอ่อนของปรสิต 4 ระยะคือ ระยะ 3 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมงและ 7 วัน, 15 วัน จะถูกเลี้ยงในน้ำเลี้ยงที่พาราซิควอนเทลที่เข้มข้น 0.1, 1 และ 10 มก./มล. ตั้งแต่ 5 นาทีถึง 24 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าปรสิตระยะ 3 และ 24 ชั่วโมงในน้ำเลี้ยงที่พาราซิควอนเทลเข้มข้น 0.1 มก./มล. จะมีอัตราการรอด 100 เปอร์เซ็นต์ และจะลดลงเหลือประมาณ 83 เปอร์เซ็นต์เมื่อถูกเลี้ยงในน้ำเลี้ยงที่พาราซิควอนเทล 10 มก./มล. ทั้งนี้ ุคยการเปรียบเทียบในกลุ่มควบคุม ส่วนปรสิตระยะ 7 วันจะมีอัตราการรอดลดลงเหลือประมาณ 97, 85 และ 79 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองในน้ำเลี้ยงที่พาราซิควอนเทลแต่ละความเข้มข้นตามลำดับ ความแตกต่างจะพบได้ชัดเจนในกลุ่มปรสิตระยะ 15 วันซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับผลกระทบมากที่สุดและอัตราการรอดเหลือเพียง 79, 72 และ 68 เปอร์เซ็นต์เมื่อสิ้นสุดการทดลอง แต่อย่างไรก็ตามถ้าเปรียบเทียบระหว่างปรสิต 4 ระยะนี้กับปรสิตตัวเต็มวัยก็จะพบว่า ปรสิตตัวเต็มวัยได้รับผลกระทบจากยามากกว่าโดยมีอัตราการรอดเพียง 43 เปอร์เซ็นต์ที่ 5 นาทีแรกของการทดลอง และภายหลังเมื่อครบ 1 ชั่วโมงของการทดลองในน้ำเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของยา 10 มก./มล. ลำดับของการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ ที่ศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ประกอบด้วย: (1) ปรสิตมีการหดตัวสั้นลง (2) การหดคอกที่ส่วนหัวและท้ายของลำตัว (3) การเกิดร่องบนพื้นผิวของลำตัว (4) ส่วนสันของพื้นผิวจะสูญเสียความเป็นระเบียบ (5) เกิดการบวมของชั้นผิวและแนวสันจะแบนราบลงทำให้ส่วนที่บวมลงเป็นร่อง (pit) ูกต่างออก (6) การเกิดคุ่มพองที่ชั้นผิว ซึ่งในที่สุดจะเกิด (7) การแตกของคุ่มพองทำให้เกิดการรอยแผลบนผิวและอาจมีการหลุดของชั้นผิวบางส่วนออกไปด้วย

เมื่อทำการศึกษาค้นกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่า มี 3 บริเวณที่ได้รับผลกระทบจากยา คือ ชั้นผิว เซลล์กล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่อใต้ชั้นผิว พยาธิสภาพที่พบในชั้นผิวประกอบด้วย: (1) การสลายตัวของไมโครทราบีคูลี (2) การเกิดแวกคิวโกลขนาดต่างๆ (3) การแบนราบของแนวสันและพื้นผิว ส่วนในเซลล์กล้ามเนื้อจะพบ: (1) การบวมของไมโทคอนเดรีย (2) การคลี่ตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อ (3) การสลายตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อ ส่วนพยาธิสภาพที่เนื้อเยื่อใต้ชั้นผิวจะพบเพียงการเกิดแวกคิวโกล ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทั้งหมดที่พบนี้จะเด่นชัดในปรสิตระยะ 15 วันเมื่อเปรียบเทียบกับปรสิตที่อ่อนวัยกว่า 3 ระยะแรก แม้ว่าพยาธิสภาพที่พบจะ

ไม่รุนแรงเท่าที่พบในปรีศคิ้ว เต็มวัยก็ตาม นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงของเนื้องอกใน  
ปรีศคิ้วระยะ

จากการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้าง เหล่านี้ สรุปได้ว่าพาราซิควอนเทลเป็นสาเหตุที่ทำให้  
เกิดการสลายตัวของเนื้องอกหรือเกิดเป็นเนื้องอกใหม่ ต่อมาเมื่อมีการทะลักของน้ำเข้า  
ในเซลล์จะทำให้เกิดการบวมของชั้นผิวจนสูญเสียสภาพปกติของเส้นและร่องบนพื้นผิว เกิดการพอง  
เป็นตุ่มซึ่งในบางบริเวณอาจแตกออก ทำให้ชั้นผิวบางส่วนหลุดออกและเกิดเป็นแผล คันเหตุ  
ของการเกิดพยาธิสภาพเหล่านี้ เชื่อว่าเป็นผลจากยาพาราซิควอนเทลซึ่งทำให้เซลล์เย็บทะลัก เข้า  
ไปในเซลล์จนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆ จนสูญเสียกลไกการปรับสภาพของความดันออส  
โมติกในที่สุด

Thesis Title THE ORGANIZATION OF CYTOSKELETON IN THE  
TEGUMENT OF *SCHISTOSOMA JAPONICUM* AND  
ITS RESPONSE TO PRAZIQUANTEL

Name Suwadee Chaunchaiyakul

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 20 May B.E. 2537 (1994)

#### ABSTRACT

The organization of cytoskeleton in the tegument of various stages in the life cycle of *Schistosoma japonicum* was studied by conventional TEM and SEM methods together with the extraction by Triton X-100, and the mixture of Triton X-100 and DTT. The results show that cytoskeletal elements of the tegument in all stages are composed of two components: the network of knobby fibers and microtubules. The former appears as dense dots or globular structures in cross-sections. This network is designated as microtrabeculae which form the principal scaffold of the tegumental cytoplasm. The microtubules concentrate in the tegumental cells' processes and the basal part of the tegumental cytoplasm. Following extraction with Triton X-100 and DTT, microtrabecular network is unravelled to form

thin and straight filaments, about 3 to 7 nm thick that may be the primary level organization. These filaments, in turn, may coil up to form knobby fibers, whose size at the knobby section is about 9 to 11 nm, which are highly cross-linked; and this structure may represent the secondary level of organization. At the tertiary level, these knobby fibers may be coiled up further to form closely aggregated and cross-linked globules, which appear as dense dots in cross sections; each globule is about 11 to 16 nm in diameter. Microtubules are confined within the tegumental cells' processes and spray out into the basal zone of the tegumental cytoplasm. Microtrabecular network may help to maintain the structure and the characteristic shape of the tegument, while microtubules may be involved in the translocation of tegumental granules from the tegumental cell bodies to the tegument. The packing of microtrabeculae is tightest and most uniform in cercarial tegument. In early schistosomula (3- to 6-hour), the microtrabeculae in the basal part of the tegument is loosened up so that two distinct layers could be visualized. The packing of microtrabeculae becomes progressively loosened, until in 15-day schistosomula and adult stages, it starts to appear as three differentially packed layers, concurrently with the formation of ridges and pits in the tegument. The tightest packing of microtrabeculae is in the middle layer of the tegument, and it is moderately dense in the apical section, and becomes highly loosened in the basal cytoplasm where basal membrane infoldings and mitochondria are present. The results of the extraction by Triton X-100 and DTT in different stages support the above conclusion by showing differential unravelling of microtra-

beculae in various stages of the life-cycle, as well as in different layers of the tegument of the same stage.

The survival of various developmental stages of *S. japonicum* (Chinese) and the changes in the ultrastructure of their tegument in response to praziquantel(PZQ) were investigated by incubating parasites in MEM media containing 0.1, 1 and 10 ug/ml of the drug at 5, 15, 30, 45, 60 min, 3, 6, 12, 24 hours. At the end of the experiments using the first two concentrations, the two early stages(3- and 24-hour) schistosomula show 100 % survival, and this decreases to approximately 83 % at the concentration of 10 ug PZQ/ml, when compared to the control. Whereas 7-day schistosomula show lower survival rates, at approximately 97 %, 85 % and 79 % at the end of experiments using the three concentrations. In contrast, 15-day schistosomula are the most affected and show only about 79 %, 72 % and 68 % survival rate at the end of the experiments. In comparison, the adults are more affected and showed about 43 % survival at the first 5 min of incubation; and the percent survival decreases to 0 % at the end of 60 min at the concentration of 10 ug PZQ/ml. The sequence of pathological changes occurring on the tegumental surface during the period of incubation, when observed by SEM, consists of: (1) the contraction and shortening of body length; (2) the constriction of the body at the anterior and posterior ends; (3) the furrowing of the surface; (4) the disorganization of ridges; (5) the swelling of the surface and the flattening of ridges and pits; (6) the blebbing of the surface; and finally (7) the forming of lesions and sloughing of the surface. When examined by TEM, the affected structures are the tegument, the muscle cells and

the subtegumental tissue. The sequence of histopathological changes in the tegument is: (1) the depolymerization of the microtrabecular network; (2) the formation of vacuoles; (3) the flattening of ridges and pits. And those occurring in muscle cells are: (1) the swelling and changing of the mitochondria's configuration; (2) the depolymerization of myofilaments; and (3) the disappearance of myofilaments. Various size vacuoles also form in the subtegumental tissue early in the incubation, even at the low dosage. Generally, changes are more pronounced in 15-day schistosomula than the three early stages even though the degree of severity is less than that occurring in the adult. In contrast to microtrabeculae, microtubules are not affected by PZQ.

From these ultrastructural changes it is concluded that PZQ initially causes depolymerization of the microtrabecular network in the tegument which results in the weakening of the tegument's cytoskeleton, that leads to the formation of vacuoles. The enlarging and swelling of the tegument follows due to the inflow of water, hence leading to the disorganization of the ridges and pits. Eventually, the blebs are formed at weakened spots, leading to bursting, lesions and sloughing of the tegument. Muscle cells are similarly affected though at a later time and higher concentration, by showing initially the depolymerization, and finally the dissolution of myofilaments. The depolymerization of the tegument's microtrabeculae and the myofilaments could be due to the sudden influx of  $Ca^{2+}$  into these structures that are induced by PZQ. Other ensuing changes may be the result of this influx and the subsequent impairment of the osmoregulatory mechanism in the tegument.