LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

THE ULTRASTRUCTURE OF *BRUGIA MALAYI* AND POSSIBLE ANTIGENIC SOURCES

KAJEE PILAKASIRI

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

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1991

Copyright by Mahidol University

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาหนอนพยาธิ Brugia malayi ทางอัลตราสตรัคเจอร์และแหล่งแอนติเจนที่เป็นไปได้

ผู้วิจัย ขจี ปิลกศิริ

ปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ประเสริฐ โศภน, Ph.D.

วัลลภ ชูสัตยานนท์, Ph.D.

สุชาติ อุปถัมภ์, Ph.D.

สรรใจ แสงวิเชียร, พ.บ., พ.ด.

ชัยทิพย์ วนิชานนท์, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 15 มกราคม พ.ศ. 2534

บทคัดย่อ

การศึกษาแหล่งแอนติเจนของหนอนพยาธิ Brugia malayi ระยะตัวเต็มวัย, ตัวอ่อนระยะติดต่อ และไมโครฟิลาเรียในมดลูก ด้วยวิธีอิมมูโนฟลูโอเรสเซนต์ทางอ้อม โดยอาศัยแอนติซีรัมของคน, แมวและ jird ซึ่งติดเชื้อ B. malayi, B. pahangi และ Wuchereria bancrofti เนื้อเยื่อส่วนที่เป็นแหล่งแอนติเจน จะติดสีฟลูโอเรสเซนต์ เรียงตามระดับความเข้มของการติดสีฟลูโอเรสเซนต์ ได้แก่ เบซัลลามินาที่บุผนังลำตัวและหุ้มอวัยวะภายใน, ส่วนเอพิคัลของเยื่อบุผิวของมดลูก, เปลือกไข่, ผิวของตัวอสุจิ; คิวติเคิล, ไฮโปเดอร์มิสและคอร์ด, เซลล์กล้ามเนื้อ, เยื่อบุผิวของทางเดินอาหาร และสิ่งที่อยู่ภายใน, เยื่อบุผิวของมดลูกและสิ่งที่อยู่ภายใน, เยื่อบุผิวของอัณฑะและสิ่งที่อยู่ภายใน, ตัวอสุจิที่กำลังเจริญ; และส่วนภายในของไข่ เนื้อเยื่อส่วนที่เป็นแอนติเจนของ B. malayi มีแบบแผนการติดสีและความเข้มของสีฟลูโอเรสเซนต์เหมือนกันไม่ว่าจะเป็นแอนติซีรัมชนิดใด ดังนั้นแสดงว่า พยาธิฟิลาเรียทั้งสามชนิดมีแอนติเจนส่วนที่เหมือนกัน ยิ่งกว่านั้นแอนติเจนที่เหมือนกันยังมีอยู่ในเนื้อเยื่อของพยาธิช่วงระยะวัยต่างกันอีกด้วย

การศึกษาเนื้อเยื่อส่วนที่เป็นแอนติเจนเหล่านี้ในระดับกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบ TEM เพื่อศึกษาว่า เนื้อเยื่อส่วนใดสามารถเป็นแอนติเจนได้ รวมทั้งเข้าใจลักษณะโครงสร้างโดยละเอียดของเนื้อเยื่อเหล่านี้ คิวติเคิลบุอยู่ตอนบนของพลาสมาเมมเบรนด้านนอกของไฮโปเดอร์มิส ประกอบด้วยชั้นเบซัล ชั้นมีเดียน และชั้นคอร์ติคัล แต่ละชั้นจะมีไฟบริลเรียงตัวกันในทิศทางต่าง ๆ โดยมีไทรลามิเนทเอพิคิวติคัลคลุมชั้นนอกสุดของคิวติเคิล แหล่งแอนติเจนที่คิวติคัล และเอพิคิวติคัลน่าจะเป็น โปรตีนคล้ายกับคอลลาเจนซึ่งเป็นส่วนไฟบริลของคิวติคัลนั้น, โมเลกุลที่มีฟอสฟอริลโคลีนและไกลโคโปรตีนที่อยู่ในเอพิคิวติคัล

ไฮโปเดอร์มิสเป็นแถบของไซโตพลาสมิคซินไซเทียมบาง ๆ อยู่ระหว่างคิวติคัลและเซลล์กล้ามเนื้อ ซึ่งหนาตัวยื่นเข้าไปในซูโดซีลอมระหว่างกลุ่มของกล้ามเนื้อเพื่อเจริญเป็นคอร์ดสี่สาย คือแลทเทอรัลคอร์ดสองสาย, ดอร์ซัลคอร์ดหนึ่งสาย และเวนทรัลคอร์ดหนึ่งสาย ไฮโปเดอร์มิสโดย

เฉพาะส่วนแลทเทอรัลคอร์ดมีความสำคัญและมีคุณสมบัติในการสร้างสารมาก โดยมีหน้าที่ในการสร้างและหลั่งสารที่เป็นโครงสร้างของคิวติเคิล ดอร์ซัลและเวนทรัลคอร์ดมีหน้าที่เกี่ยวกับระบบประสาท เนื่องจากมีเส้นประสาทซึ่งสัมพันธ์กับกล้ามเนื้อ โดยรวมตัวเป็นอินเตอร์ดิจิเตติงแคป ซึ่งเทียบได้กับรอยต่อระหว่างกล้ามเนื้อ และเส้นประสาท แหล่งที่อาจเป็นแอนติเจนของไฮโปเดอร์มิสน่าจะได้แก่ โปรคอลลาเจนที่มีความเข้มข้นน้อยกว่าส่วนที่อยู่ในคิวติเคิล

เซลล์กล้ามเนื้อที่อยู่ด้านล่างต่อไฮโปเดอร์มิสเรียงตัวกันเป็นกลุ่มสี่กลุ่ม แต่ละเซลล์มีส่วนของไมโอไฟบริลลาร์อยู่ติดกับไฮโปเดอร์มิสและนอนไมโอไฟบริลลาร์ที่มีออร์กาเนลล์อยู่ ส่วนไมโอไฟบริลลาร์ประกอบด้วยฟิลาเมนท์หนาและบาง โดยมีฟิลาเมนท์ชนิดบาง 10 ถึง 12 อัน ล้อมรอบชนิดหนา 1 อัน แขนงของเซลล์กล้ามเนื้อจะยื่นจากส่วนนอนไมโอไฟบริลลาร์ เพื่อไปรวมตัวเป็นอินเตอร์ดิจิเตติงแคปตอนบนของดอร์ซัล และเวนทรัลคอร์ด ที่สัมพันธ์กับเซลล์กล้ามเนื้อนั้น เซลล์กล้ามเนื้อนอกจากจะมีหน้าที่ในการหดตัวแล้วยังสะสมกลัยโกลโคเจนจำนวนมากไว้ที่ส่วนนอนไมโอไฟบริลลาร์ด้วย แอนติเจนที่เป็นไปได้จากเซลล์กล้ามเนื้อน่าจะเป็นส่วนประกอบของเซลล์กล้ามเนื้อเอง, โซมาติค ฟอสฟอริลโคลีน และนิวโรทรานสมิทเทอร์ที่อยู่ในรอยต่อระหว่างกล้ามเนื้อและเส้นประสาท

เบซัลลามินาบาง ๆ ก็นระหว่างผนังลำตัวและซูโดซีลอมและจะต่อเนื่องกับอินเตอร์เซลลูลาร์ ลามินา รอบเซลล์กล้ามเนื้อและคอร์ดทั้งหมด ลามินาเหล่านี้จะมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน เพราะมีแกรนูลชนิดละเอียดบรรจุอยู่ เบซัลลามินาของลำไส้และอวัยวะสืบพันธุ์จะหนาและก็นอวัยวะเหล่านี้จากซูโดซีลอม เบซัลลามินาของลำไส้และอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้มีแกรนูลมากซึ่งเรียงตัวประกอบกันเป็นชั้นอย่างชัดเจน ขณะที่เบซัลลามินาของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียมีกล้ามเนื้อเรียบฝังอยู่ เบซัลลามินาที่หนาเหล่านี้อาจจะเป็นโครงสร้างที่ป้องกันไม่ให้อวัยวะยุบตัว เนื่องจากแรงดันออสโมติคที่สูงภายในซูโดซีลอม ยิ่งกว่านั้นเบซัลลามินายังทำหน้าที่เป็นทางผ่านของสารอาหาร, สารขับถ่าย และสารคัดหลั่งซึ่งผ่านเข้าออกที่อวัยวะภายใน หรือที่คิวติเคิล สารเหล่านี้รวมทั้งส่วนประกอบบางอย่างของเบซัลลามินาเองอาจเป็นแหล่งแอนติเจนอีกแหล่งหนึ่ง

ซูโดซีลอมหรือช่องภายในตัวของพยาธิพิลาเรีย มีของเหลวบรรจุอยู่ภายในซึ่งของเหล่านี้จะอาบอวัยวะภายในทั้งหมด ของเหลวจะมีตะกอนที่มีลักษณะทึบต่ออิเลคตรอนกระจายอยู่ และตะกอนเหล่านี้ยังติดกับผิวของเบซัลลามินาของผนังลำตัวและอวัยวะภายใน สารทึบต่ออิเลคตรอนเหล่านี้อาจเป็นสารอาหาร สารขับถ่าย หรือสารคัดหลั่ง ซึ่งสารทั้งหมดนี้ถูกเก็บไว้ปนกันในซูโดซีลอมซึ่งอาจเป็นแหล่งแอนติเจนอีกแหล่งหนึ่ง

ลำไส้เป็นส่วนยาวที่สุดของระบบย่อยอาหารที่บุด้วยเยื่อบุผิว ซึ่งมีลักษณะพิเศษแสดงให้เห็นว่า เป็นเซลล์ที่สามารถสังเคราะห์และหลั่งสาร รวมทั้งดูดซึมอาหาร การที่มีไมโครวิลไล, ไรโบโซมและซีครีทอรีแกรนูลมากมายภายในไซโตพลาสมของเซลล์บุลำไส้ แสดงให้เห็นว่าเซลล์เหล่านี้มีคุณสมบัติในการหลั่งสาร อาจเป็นเอนไซม์สำหรับย่อย ซึ่งแสดงให้เห็นได้จากมีสารทึบต่ออิเลคตรอนอยู่ในลูเมน บทบาทสำคัญอีกประการหนึ่งของลำไส้ที่ได้ศึกษามาแล้วในหนอนพยาธิอื่น ๆ

Copyright by Mahidol University

ก็คือ การขับถ่ายของเสียออกจากร่างกาย ดังนั้นแหล่งแอนติเจนของลำไส้อาจประกอบด้วยสารขับถ่ายหรือสารคัดหลั่ง ที่อยู่ในเยื่อบุผิวและในลูเมน

อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียทุก ๆ ส่วนรวมทั้งเซมินัล รีเซพเทเคิล, มดลูกส่วนบน, กลางและล่าง จะมีเยื่อบุผิวที่มีลักษณะเหมือนกันคือ เป็นซินไซเทียมที่มีส่วนผิวยื่นออกมาในลูเมน และมีออร์กาเนลมากมายที่แสดงให้เห็นว่ามีคุณสมบัติการสังเคราะห์และหลั่งสาร อนุภาคที่เห็นในลูเมนของมดลูกจะมีลักษณะและความเข้มของอิเลคตรอนเหมือนกับสิ่งที่อยู่ภายในเยื่อบุผิวของมดลูก อาจแสดงให้เห็นว่าเยื่อบุผิวเหล่านี้หลั่งสารมากมายเข้าสู่ลูเมน สารเหล่านี้อาจเป็นสารอาหารสำหรับไมโครฟิลาเรียที่กำลังเจริญอยู่ภายในลูเมนของมดลูก หรือสำหรับการสร้างตัวของเปลือกไข่ชั้นนอกสุด ดังนั้นแหล่งแอนติเจนที่เป็นไปได้ของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย อาจเป็นสารคัดหลั่งของมดลูกและเปลือกไข่

ลักษณะโครงสร้างโดยละเอียดของเยื่อบุผิวที่บุ เซมินัลเวสิเคิล และวาสดิเฟอเรนส์ แสดงให้เห็นว่าเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติในการหลั่งสารเป็นอย่างมาก เชื่อว่าสารที่หลั่งออกมานี้เป็นอาหารของตัวอสุจิและเป็นสารกระตุ้นให้ตัวอสุจิมีการปฏิสนธิ สารเหล่านี้จะอยู่ในสภาพเป็นตะกอนทึบต่ออิเลคตรอน ติดอยู่ที่ผิวพลาสมาเมมเบรนของตัวอสุจิ และผิวของเซลล์เยื่อบุผิว จึงอาจจัดว่าเป็นแหล่งแอนติเจนได้อีกแหล่งหนึ่ง

Copyright by Mahidol University

Thesis Title: The Ultrastructure of *Brugia malayi* and Possible Antigenic Sources

Name: Kajee Pilakasiri

Degree: Doctor of Philosophy (Anatomy)

Thesis Supervisory Committee

Prasert Sobhon, Ph.D.

Wanlop Chusattayanond, Ph.D.

Suchart Upatham, Ph.D.

Sanjai Sangvichien, M.D., D.Sc.

Chaitip Wanichanon, Ph.D.

Date of Graduation: 15 January B.E. 2534 (1991)

ABSTRACT

The indirect immunofluorescent technique has been used to identify antigenic sources in *Brugia malayi* adults, infective stage larvae and microfilariae *in utero* employing antisera from human infected with *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti*, cats infected with *B. malayi* and *B. pahangi* and jirds infected with *B. malayi* and *B. pahangi*. The tissues exhibiting fluorescence which imply that they are the antigenic sources consist of, in order of fluorescent intensity, the basal laminae lining the body wall and surrounding the internal organs, the apical part of uterine epithelium, the egg shell, the sperm surface; the cuticle, the hypodermis and the hypodermal cords, the somatic muscle cells, the gut epithelium and its luminal contents, the uterine epithelium and its luminal contents, the testis epithelium and its luminal contents, the developing sperm, and the egg interior. These antigenic tissues in *B. malayi* give similar staining pattern and fluorescence intensity with all kinds of antisera used, thus, demonstrating common antigens that exist in these three species of lymphatic filarial worms. In addition, common antigens also exist in each tissue of various stages of the worms.

These antigenic tissues were further studied ultrastructurally by conventional TEM in order to identify which particular parts of the tissues may contribute to the antigens as well as to understand the detailed organization of these tissues. The cuticle overlying the outer plasma membrane of hypodermis comprises basal, median and cortical layers; each of which contains fibrils arranged in different directions. The trilaminate epicuticle covers the outermost layer of the

Copyright by Mahidol University

cuticle. The possible antigenic sources from the cuticle and the epicuticle may be collagen-like proteins which are the fibrillar components of the cuticle itself, and phosphorylcholine containing molecules and glycoprotein locating in the epicuticle.

The hypodermis is a thin strip of the cytoplasmic syncytium lying between the cuticle and the somatic muscle cells and thickens toward the pseudocoelom between the muscle sectors to form four cords, namely two lateral, one dorsal and one ventral hypodermal cords. The hypodermis, especially the lateral cords show particularly important and metabolically active parts of the nematode, being responsible mainly for secretion and maintenance of the cuticle. The dorsal and ventral cords participate in the nervous functions because they contain numerous nerve fibers which are related to the muscle through the formation of the interdigitating caps, an equivalent structure to the neuromuscular junctions. The possible antigenic sources from the hypodermis should be the procollagen that may be less concentrated than in the cuticle.

The somatic muscle cells underlying the hypodermis are grouped into four sectors. Each cell consists of subhypodermal myofibrillar part and nonmyofibrillar organelle-bearing part. The myofibrillar part contains thick and thin filaments, with each thick filament surrounded by 10 to 12 thin ones. The muscular processes extend from the nonmyofibrillar part to form interdigitating caps over their respective dorsal and ventral cords. In addition to contractile function, the muscle cells store a large quantity of glycogen in the nonmyofibrillar part that may serve as a reserve energy for the whole worm. Possible antigens from the muscle cells could be the components of the muscle cells themselves, somatic phosphorylcholine, and neurotransmitters released at the neuromuscular junctions.

A thin basal laminae separate the body wall and the pseudocoelom and it is continuous with the intercellular laminae surrounding muscle cells and all hypodermal cords. These laminae appear homogeneous with finely dispersed granularity. Basal laminae encircle intestine and reproductive tract, separating these organs from the pseudocoelom. The basal lamina of the intestine and male reproductive tract possess more granularity and appears to have distinct layers while that of female reproductive tract contains visceral muscle cells embedded in it. These thick basal laminae probably serve as a structure preventing the organs from collapse against the high osmotic pressure within the pseudocoelom and the lumen. Furthermore, all basal laminae act as the barriers for diffusion of nutrient materials, excretory and secretory (ES) substances, that may pass in and out

Copyright by Mahidol University

of the internal tissues and the cuticle. These materials together with some structural components of basal laminae themselves may be another sources of antigens.

The pseudocoelom, the body cavity of filarial nematodes, is filled with pseudocoelomic fluid which baths all the internal organs. The pseudocoelomic fluid contains dispersed electron dense precipitations which also attach to the surface of the basal laminae of the body wall and internal organs. These electron dense materials are presumed to be nutrient materials as well as ES substances and waste products, all of which are stored simultaneously in the pseudocoelom, and may be another antigenic sources.

The intestine is the longest part of the digestive tract that is lined by an epithelium whose cells possess characteristics suggesting that they are actively synthesizing and secreting in addition to acting in absorption of food. The presence of microvilli, numerous ribosomes and secretory granules in the cytoplasm of intestinal cells indicates that these cells have high secretion activities perhaps of many digestive enzymes which may be represented by the moderate electron dense materials in lumen. Another important role of the intestine is in excretion of waste products from the body as proven in other nematodes in many previous studies. The antigenic sources of the intestine could be composed of ES products in both intestinal epithelium and the lumen.

All regions of the female reproductive tract, including the seminal receptacle, the upper-, middle-, and lower parts of the uterus, possess similar characteristic epithelium which is a syncytium that show fimbriation at the luminal surface as well as containing abundant organelles which indicate high synthesis and secretion activities. The particles observed in the uterine lumen have the same characteristics and electron density as the contents in the uterine epithelium or this strongly suggests that there are copious secretion of various materials into the lumen. The uterine epithelium secretes materials for the nutrients for the developing microfilariae in the uterine lumen as well as for the formation of the outermost layer of the egg shell. Therefore, the possible antigenic sources of the uterine epithelium could be composed of the uterine secretions and the egg shell.

The ultrastructural characters of epithelium lining seminal vesicle and vas deferens also give the impression that they are actively secreting cells. The secreted substances are believed to be spermatozoa nutrients as well as stimulating substances for fertilization. These substances appear as electron dense precipitations lining the surrounding sperm plasma membrane and the epithelial cell surface, hence they may be another antigenic source.

© Copyright by Mahidol University