

**CHARACTERISTICS OF EPITHELIAL CELLS AND THE  
EXPRESSION OF CATHEPSIN L GENE IN THE DIGESTIVE  
TRACT OF FASCIOLA GIGANTICA**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (ANATOMY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

**2000**

**ISBN 974-663-766-5**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

Copyright by Mahidol University

14659 ๒๔

4036347 SCAN / M : MAJOR : ANATOMY : M.Sc. (ANATOMY)

KEY WORDS : FASCIOLA GIGANTICA CATHEPSIN L / DIGESTIVE TRACT / EPITHELIUM / *IN SITU* HYBRIDIZATION

SOMPONG SRIBUREE. CHARACTERISTICS OF EPITHELIAL CELLS AND THE EXPRESSION OF CATHEPSIN L GENE IN THE DIGESTIVE TRACT OF FASCIOLA GIGANTICA. THESIS ADVISORS: CHAITIP WANICHANON, Ph.D., PRASERT SOBHON, Ph.D., SUKSIRI VICHASRI GRAMS, Dr.rer.nat., VITHOON VIYANANT, Ph.D. 133 P. ISBN 974-663-766-5

The objectives of this thesis are to classify the type of epithelium lining the digestive tract of *F. gigantica* and the expression of cathepsin L in these epithelia.

Epithelia of the digestive tracts of adults and 50-day-old *F. gigantica*, as studied by light microscopy, consist of two types: the tegumental-type which is a syncytium similar to the tegument; and the digestive-type which is composed of an array of columnar or cuboid digestive cells. The proximal part of the digestive tract, including oral sucker, buccal tube, pharynx, esophagus and part of the tract anterior to caecal bifurcation are lined by tegumental-type epithelium, whereas the caecum is lined by the digestive-type epithelium. The tegumental-type epithelium is characterized by numerous basal infoldings which extend towards the apical surface that is corrugated with cross sections of ridges or microfolds. The digestive-type epithelium is composed of columnar or cuboidal cells containing round basally-located euchromatic nuclei, prominent nucleoli, and numerous stereocilia. The digestive-type epithelial cells could be classified into 3 types: type-1, type-2 and type-3 epithelial cells, exhibit cytoplasm which are densely, moderately and lightly stained, and the quantity of zymogen granules and cell height are decreasing in that order. In contrast, the caecal epithelial cells of metacercariae are remarkably distinct from those of adult and juveniles. These cells are completely filled with large and very dense granules in comparison to those of the adult and 50-day old juveniles. Each cross section of the caecal lumen appears very irregular in shape, and surrounded by only a few epithelial cells.

The localization of cathepsin L gene (Cat L) expression in the digestive tract at each developmental stage of *F. gigantica* (metacercariae, 50-day-old juvenile and adult) was examined by *in situ* hybridization. Digoxigenin-labeled cDNA probe was produced by random priming method for the detection of mRNA coding for *F. gigantica* Cat L. Cat L mRNA was present in abundance in the cytoplasm of caecal epithelium in 50-day-old juvenile and adult stage but not detected in the nuclei. In contrast, epithelium covering the remaining parts of the digestive tract, including oral sucker, buccal tube, pharynx, esophagus and caecal bifurcation, which are tegumental-type epithelium, did not exhibit the presence of Cat L mRNA. In addition, Cat L mRNA could not be detected in metacercarial digestive epithelium.

The synthesis of cathepsin L enzyme in the digestive epithelium was investigated by indirect immunofluorescence, using mouse monoclonal antibody to cathepsin L, and polyclonal mouse anti-native *F. gigantica* Cat L and sheep anti-native *F. hepatica* Cat L as probes. In general, these antibodies gave similar result. The enzyme Cat L was localized in caecal epithelium cells in both 50-day-old juvenile and adult stage, but not in the metacercaria.

4036347 SCAN / M : สาขาวิชา: กายวิภาคศาสตร์; วท.ม. (กายวิภาคศาสตร์)

สมพงษ์ ศรีบุรี : ลักษณะเฉพาะของเซลล์เยื่อบุผิวและการแสดงออกของยีน CATHEPSIN L ในทางเดินอาหารของพยาธิใบไม้ตับ *FASCIOLA GIGANTICA* (CHARACTERISTICS OF EPITHELIAL CELLS AND THE EXPRESSION OF CATHEPSIN L GENE IN THE DIGESTIVE TRACT OF *FASCIOLA GIGANTICA*). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ชัยทิพย์ วนิชาพันธ์, Ph.D., ประเสริฐ โสภณ, Ph.D., สุชาติ วิชาศิริ งามมณี, Dr.rer.nat., วิฑูรย์ ไวยวัฒน์, Ph.D. 133 หน้า. ISBN 974-663-766-5

วัตถุประสงค์ของการศึกษา เพื่อจำแนกชนิดของเยื่อบุผิวต่อทางเดินอาหารของพยาธิ *F. gigantica* และการแสดงออกของเอนไซม์ cathepsin L ในเยื่อบุผิวเหล่านี้

การศึกษาในระดับจุลทรรศน์แสดงว่าเยื่อบุผิวต่อทางเดินอาหารของพยาธิ *F. gigantica* ตัวเต็มวัยและอายุ 50 วันมีลักษณะที่แบ่งออกได้เป็นสองชนิด ชนิดแรกคือเยื่อบุผิวที่มีลักษณะเช่นเดียวกับเชื้อที่หุ้มชั้นผิว ชนิดที่สองคือเยื่อบุผิวชนิดลำไส้ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ย่อยอาหารทรงแท่งหรือทรงลูกบาศก์บุภายในต่อ ทางเดินอาหารส่วนต้นคือ oral sucker, buccal tube, pharynx, esophagus และต่อทางเดินอาหารก่อนที่เริ่มแตกง่ามออกเป็นลำไส้มีเยื่อบุผิวชนิดชั้นผิว ส่วนเยื่อบุผิวของซีกัมเป็นชนิดลำไส้ เยื่อบุผิวชนิดชั้นผิวมีลักษณะเด่นคือที่ฐานมันมีเยื่อหุ้มเว้าเข้าไปเป็นรอยลึก จำนวนมาก ผิวด้านบนมีลักษณะหยักไปมาและมีโครงสร้างเป็นสันคล้ายไมโครวิลไล เยื่อบุผิวชนิดลำไส้มีรูปร่างเป็นทรงแท่งไปจนถึงทรงลูกบาศก์ นิวเคลียสของเซลล์มีรูปร่างกลมและมี euchromatin มาก นิวคลีโอไลต์เห็นได้เด่นชัด ส่วนยอดของเซลล์มีสเตอริโอซิเลียอยู่จำนวนมาก นอกจากนี้เซลล์เยื่อบุผิวชนิดลำไส้ยังแบ่งออกได้เป็นสามแบบตามลักษณะการติดสี จำนวนแกรนูล และความสูงของเซลล์ คือ แบบที่ 1 แบบที่ 2 และแบบที่ 3 ซึ่งไซโตพลาสซึมติดสีเข้มปานกลาง และอาจตามลำดับเมื่อย้อมด้วยสีค้าง จำนวนแกรนูลและความสูงของเซลล์ลดลงตามลำดับ ส่วนเยื่อบุผิวลำไส้ของพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียมีความแตกต่างจากพยาธิตัวเต็มวัยและอายุ 50 วัน คือภายในเซลล์มีแกรนูลกลมซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า นอกจากนั้นหน้าตัดขวางของลำไส้มีเซลล์เยื่อบุผิวจำนวนน้อยมาก

ตำแหน่งการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ cathepsin L ในเซลล์เยื่อบุผิวต่อทางเดินอาหารของพยาธิ *F. gigantica* ในระยะตัวเต็มวัย อายุ 50 วันและเมตาเซอร์คาเรีย ถูกแสดงโดยวิธี *in situ* hybridization เราได้สังเคราะห์ตัวตรวจที่เอ็นเอซึ่งติดฉลากด้วย digoxigenin โดยวิธี random priming method เพื่อใช้หาตำแหน่งการกระจายของ mRNA ซึ่งเป็นตัวนำรหัสไปแปลเป็นเอนไซม์ Cat L ของพยาธิ *F. gigantica* จากการศึกษาเราได้พบการกระจาย mRNA ของ Cat L ในไซโตพลาสซึมเซลล์เยื่อบุผิวของซีกัม ส่วนในเยื่อบุผิวของต่อทางเดินอาหารส่วน oral sucker, pharynx และส่วนก่อนที่แตกเป็นง่ามออกเป็นลำไส้ซึ่งมีเยื่อบุผิวชนิดชั้นผิว และในเมตาเซอร์คาเรียไม่พบ mRNA ของเอนไซม์ Cat L

เราได้ศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์ Cat L ในเยื่อบุผิวของท่อย่อยอาหารโดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ โดยใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อเอนไซม์ Cat L โพลีโคลนัลแอนติบอดี 2 ชนิดคือ mouse anti-Cat L *F. gigantica* และ sheep anti-Cat L *F. hepatica* แอนติบอดีทั้งสองประเภทให้ผลคล้ายกันกล่าวคือในพยาธิระยะตัวเต็มวัยและอายุ 50 วัน มีการกระจายตัวของเอนไซม์ Cat L ในเซลล์เยื่อบุผิวของซีกัม แต่ในระยะเมตาเซอร์คาเรียซีกัมย้อมไม่ติดสารเรืองแสง แสดงว่าไม่มีเอนไซม์ชนิดนี้