

Ultrastructure ของ tegumentary papillae ของ *Opisthorchis viverrini* ระยะเมตาเซอร์คาเรีย

กมลวรรณ จงสมชัย¹ วรณีย์ ชัยจรูญกมลารักษ์¹ สมาน เทสนา², ชาณณรงค์ อรัญนารณ¹ พิพัฒน์พงษ์ แคนลา¹ จริยา อำคา¹
¹ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ และ ²ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

Ultrastructure of Tegumentary Papillae of the Excysted *Opisthorchis viverrini* Metacercaria

Kamonwan Jongsomchai¹, Wunnee Chaijaroonkhanarak¹, Smarn Tesana², Channarong Arunyanart¹, Pipatpong Kanla¹, Jariya Umka¹

¹Department of Anatomy and ²Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

หลักการและเหตุผล: โรคพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* พบระบาดในกลุ่มประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศไทย ลาว กัมพูชา และทางตอนใต้ของเวียดนาม พยาธิชนิดนี้เป็นปัญหาสำคัญทางการแพทย์เนื่องจากเป็นสาเหตุสำคัญของโรคเกี่ยวกับตับและท่อน้ำดี และโรคมะเร็งท่อน้ำดี ผนังลำตัวของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* มีอวัยวะรับความรู้สึกที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับความรู้สึกเมื่อเมตาเซอร์คาเรียเข้าไปในร่างกายคน พยาธิจะออกจากถุงหุ้มและเดินทางเข้าไปสู่ท่อน้ำดีโดยคืบคลานผ่าน hepatopancreatic ampulla ซึ่ง papilla ที่ผนังลำตัวพยาธิน่าจะเป็นอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการนำพยาธิเข้าสู่ตับ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษา ultrastructure ของ tegumentary papilla ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ระยะเมตาเซอร์คาเรียที่ออกจากถุงหุ้มด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope, TEM)

รูปแบบการศึกษา: การศึกษาเชิงพรรณนา

สถานที่ทำการศึกษา: ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ และภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

กลุ่มตัวอย่าง: พยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ระยะเมตาเซอร์คาเรียที่ออกจากถุงหุ้มซึ่งได้จากปลาที่ติดเชื้อพยาธิตามแหล่งระบาดในจังหวัดขอนแก่น

Background: Opisthorchiasis, caused by liver fluke *Opisthorchis viverrini* is endemic in many countries of the Southeast Asia such as Thailand, Laos PDR, Cambodia and South Vietnam. It is a medically important fluke which causes several hepatobiliary diseases and cholangiocarcinoma. The tegument of *O. viverrini* is served as the site for sensory input. When the metacercaria infects to human, it excysts and migrates into bile ducts by creeping to pass the hepatopancreatic ampulla. The metacercaria might be equipped with some sensory perceptions. The tegumentary papillae may have a role for sensation. No detail of the ultrastructural of the tegumentary papillae of the *O. viverrini* has been studied.

Objective: To study the ultrastructure of the tegumentary papillae of newly excysted *O. viverrini* metacercariae by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM).

Study design: Descriptive study based on morphological observation at the ultrastructural level.

Setting: Department of Anatomy and Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand.

Materials and Methods: *O. viverrini* metacercariae obtained from naturally infected cyprinoid fish in endemic area in Khon Kaen were excysted by suspending in 0.1% trypsin solution. The newly excysted metacercariae were

วิธีการศึกษา: นำพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ระยะเมตาเซอร์คาเรีย มาย่อยถุงหุ้มด้วยสารละลาย trypsin ความเข้มข้น 1% นำพยาธิที่ออกจากถุงหุ้มมาเข้าสู่กระบวนการเตรียมตัวอย่างสำหรับศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

ผลการวิจัย: จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบ tegumentary papilla ที่ผนังลำตัว 4 ชนิด ชนิดที่ 1 เป็นปุ่มนูนเล็กมี cilium ยาวอันเดียว ชนิดที่ 2 มี cilium สั้นอันเดียวยื่นออกมาจากปุ่มนูนที่ใหญ่กว่าชนิดที่ 1 ส่วนชนิดที่ 3 มีลักษณะเป็นปุ่ม 2-3 ปุ่มอยู่บนฐานนูน dome shape ขนาดใหญ่เดียวกันโดยมีความยาวของ cilium ต่างกัน ชนิดที่ 4 เป็นปุ่มนูนเดี่ยวไม่มี cilium พบเฉพาะที่ขอบด้านในของ oral และ ventral sucker เมื่อศึกษา tegumentary papilla ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบ tegumentary papilla 2 ชนิด คือ ชนิดที่มี cilium เพียงเส้นเดียว (type A) และไม่มี cilium (type B) อาศัยรูปร่างลักษณะ และ ultrastructure ของ bulbous ending สามารถแบ่ง tegumentary papilla type A ได้เป็น 3 กลุ่มย่อย (A1, A2 และ A3) ส่วน type B มีลักษณะของผนังลำตัวชั้นนอกของพยาธิขึ้นจากแนวลำตัวปกติ และไม่มีช่องทางติดต่อระหว่างภายใน bulbous ending กับสิ่งแวดล้อมภายนอก

สรุป: จากการศึกษาด้วย SEM พยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ระยะเมตาเซอร์คาเรียที่ออกจากถุงหุ้มมี tegumentary papilla แตกต่างกัน 4 ชนิด ส่วนการศึกษาด้วย TEM แยก tegumentary papilla ได้ 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่มี cilium เส้นเดียว (unciliated papilla) และชนิดที่ไม่มี cilium (non-ciliated papilla) ชนิดที่มี cilium สามารถแบ่งได้เป็นอีกสามกลุ่มย่อย โดยอาศัยโครงสร้างภายในของ bulbous ending ในการศึกษาด้วย TEM พบ nerve process ทอดตัวต่อเนื่องไปยัง bulbous ending เป็นตัวสนับสนุนว่า tegumentary papilla เหล่านี้น่าจะเป็น sensory receptor ที่รับรู้ความรู้สึกชนิดต่าง ๆ ของพยาธิ มีเพียง tegumentary papilla ชนิดที่ 2 ที่พบใน SEM ที่สัมพันธ์กับ unciliated papilla ชนิด A1 ที่พบใน TEM เนื่องจากพบที่ตำแหน่งเดียวกันคือ พบบนขอบของ oral sucker

processed and observed with a scanning and a transmission electron microscopes.

Results: SEM studies of tegumentary papillae identified four types of papillae. Type I was a small conical papilla with long cilium. Type II possessed short cilium and a larger conical papilla than type I. Type III was characterized by grouping of 2-3 conical papillae on a dome-shaped base with variable length of the cilia. Type IV was non-ciliated conical papilla and found solely on inner lip of the oral and ventral suckers.

TEM observation revealed two types of tegumentary papillae, ciliated (type A) and non-ciliated (type B) papillae. Only one cilium was found in all ciliated tegumentary papillae. Based on morphology of tegumentary papillae and ultrastructures of the bulbous ending, the ciliated papillae were further divided into three subtypes (A1, A2 and A3). In type B, there was an elevation of the tegument and the bulbous ending was lack communication with the external surface.

Conclusions: As seen by SEM, there were four types of tegumentary papillae of the excysted *O. viverrini* metacercaria. By TEM observation, only two types of tegumentary papillae, unciliated and non-ciliated were found. Based on internal structures of the bulbous ending, the unciliated tegumentary papillae were further divided into three subtypes. The evidence of a nerve process leading to the bulbous ending in the TEM study supported that these tegumentary papillae may consider to serve as a structure for sensory perception. Only the type II papilla in SEM study and unciliated papilla type A1 in TEM were both located in the outer lip of the oral sucker. Therefore, they might be the same type of papillae.

Key words: *Opisthorchis viverrini*, metacercaria, papillae, SEM, TEM

ศรีนครินทร์เวชสาร 2550; 22(4): 434-42 • Srinagarind Med J 2007; 22(4): 434-42

บทนำ

พยาธิที่เป็นสาเหตุของโรค opisthorchiasis ในคนได้แก่ พยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* ซึ่งพบระบาดอยู่ในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้บริเวณสองฝั่งแม่น้ำโขงตอนล่าง ได้แก่ ประเทศไทย ลาว กัมพูชา และตอนใต้ของ

เวียดนาม^{1,2} ในประเทศไทยพบระบาดมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเฉพาะที่จังหวัดขอนแก่น การติดเชื้อพยาธิ *O. viverrini* เกิดจากการรับประทานอาหารที่ทำจากปลาดิบในตระกูลปลาตะเพียน เช่น ก้อยปลา ลาบปลา ส้มปลา

จอมปลาน้อย เป็นต้น เมื่อคนบริโภคเนื้อปลาที่ปนเปื้อนตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิตัวตืดเข้าไป ตัวอ่อนที่มีถุงหุ้ม (encysted metacercaria) จะถูกย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้น ตัวอ่อนเรียกว่า excysted metacercaria และเดินทางผ่านท่อน้ำดีรวม (common bile duct) คีบคลานต่อไปยังท่อน้ำดีภายในตับ (intra-hepatic duct)³ และอาศัยอยู่จนเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัย การเดินทางของพยาธิตัวตืดยังท่อน้ำดีน่าจะมีโครงสร้างที่ทำหน้าที่รับความรู้สึกที่ผนังลำตัวของพยาธิตัวตืด

การศึกษาที่ผนังลำตัวของพยาธิตัวตืดแบบพบ tegumentary papilla จำนวนมาก และมีรายงานว่า tegumentary papilla เหล่านี้ เป็น sensory papilla⁴ ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการรับความรู้สึก โครงสร้างดังกล่าวน่าจะเป็นตัวสำคัญที่นำพยาธิตัวตืดเข้าสู่โฮสต์กลางหรือการเคลื่อนที่เข้าอาศัยในโฮสต์สุดท้าย มีการศึกษาโครงสร้างของผนังลำตัวของพยาธิตัวตืด *O. viverrini* ในระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัย⁵ ส่วนการศึกษาลักษณะของ tegumentary papilla ด้วย SEM ของพยาธิตัวตืดนี้ มีเพียงรายงานของ Apinhasmit และคณะ ในปี 1993⁶ ยังไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับ ultrastructure ของ tegumentary papilla ในพยาธิตัวตืด *O. viverrini* ระยะเมตาเซอร์คาเรียด้วย TEM

วัตถุประสงค์

1. ศึกษารูปร่างลักษณะ ของ tegumentary papilla ของพยาธิตัวตืดชนิด *O. viverrini* ระยะเมตาเซอร์คาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
2. ศึกษาโครงสร้างภายในของ tegumentary papilla ของพยาธิตัวตืดชนิด *O. viverrini* ระยะเมตาเซอร์คาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมตัวอย่างพยาธิตัวตืด *O. viverrini* ระยะเมตาเซอร์คาเรีย

นำปลาในตระกูลปลาตะเพียน (cyprinoid fish) ซึ่งได้จากแหล่งระบาดในจังหวัดขอนแก่นมาบดด้วยเครื่องบดเนื้อ บดละเอียดด้วยเครื่องบดผลไม้ นำเนื้อปลาไปย่อยด้วย pepsin 0.25% HCl solution นำไป incubate ใน shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมากกรองผ่านตะแกรงที่มีขนาดรู 850, 300 และ 250 ไมโครเมตรตามลำดับ เพื่อแยกกากขนาดใหญ่ออก จากนั้นนำมารองด้วยตะแกรงที่มีความถี่ขนาด 106 ไมโครเมตร นำไปตกตะกอนในสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85% แยกเอาเฉพาะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิตัวตืด *O. viverrini* ภายใต้กล้องสามมิติ

(stereoscope) โดยเลือกเฉพาะที่สังเกตเห็น oral sucker, ventral sucker ชัดเจน ภายในลำตัวมีเม็ดสีน้ำตาล กระจายอยู่โดยทั่วไป และ excretory bladder มีแกรนูลเล็กๆ สีน้ำตาลดำ และตัวอ่อนพยาธิตัวตืดเคลื่อนไหวอย่างรุนแรงอยู่ภายในซิสต์ จากนั้นนำไปย่อยผนังหุ้มโดยใช้สารละลาย trypsin ความเข้มข้น 1% ประมาณ 30 นาที ล้างตัวอ่อนพยาธิตัวตืดออกจากถุงหุ้มด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้ง เก็บไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส ศึกษา tegumentary papilla ของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

2. การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

2.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วย SEM นำพยาธิตัวตืดจำนวน 20 ตัวที่แช่ใน modified Karnovsky's fixative อย่างน้อย 24 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer และ postfix ด้วย osmium tetroxide 1% ใน 0.1 M phosphate buffer อย่างน้อย 2 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer ทำการดึงน้ำออกจากตัวอย่าง (dehydration) ด้วยแอลกอฮอล์ครั้งละ 15 นาที โดยเริ่มจาก 50% 70% 80% 90% 95% และ 100% (2 ครั้ง) ตามลำดับ แหะตัวอย่างใน amyl acetate จากนั้นทำให้ตัวอย่างแห้งด้วยเครื่อง Critical Point Dryer (HITACHI HCP-2) (CPD) โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเป็นตัวกลาง นำตัวอย่างติดบน metal stub เคลือบด้วยทองคำหนาประมาณ 20-50 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง ion coater (Eiko IB3) นำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (HITACHI S-3000N, S-3200N) ที่ accelerating voltage 10 kV. บันทึกภาพที่ต้องการ

2.2 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วย TEM นำพยาธิตัวตืด 20 ตัวที่แช่ใน modified Karnovsky's fixative อย่างน้อย 24 ชั่วโมง มาล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer postfix ด้วย osmium tetroxide 1% ใน 0.1 M phosphate buffer อย่างน้อย 2 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.1 M phosphate ทำการดึงน้ำออกจากตัวอย่างด้วยแอลกอฮอล์ โดยเริ่มจาก 50%, 70%, 80%, 90%, 95% และ 100% (2 ครั้ง) ครั้งละ 20 นาที ตามลำดับ จากนั้น นำพยาธิตัวตืดมา infiltration ด้วย araldite แล้วนำมาฝัง (embed) ในพลาสติก (araldite) โดยใช้ตัวอย่าง ใน flat mold และอบใน ตู้อบ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 48 ชั่วโมง นำ block ตัวอย่างมาตัดแต่งหน้า block และตัด semithin section ด้วย ultramicrotome ย้อมสองครั้งด้วย 1% toluidine blue และ 1% basic fushin หาตำแหน่งที่ต้องการ และตัดโดย section บาง 60-90 นาโนเมตร เก็บตัวอย่างด้วย copper grid ย้อมด้วย uranyl acetate และ lead citrate อย่างละ 30 นาที

นำตัวอย่างมาศึกษาและ ถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านด้วยเครื่อง HITACHI H 600 electron microscope ที่ accelerating voltage 75 kV.

ผลการศึกษา

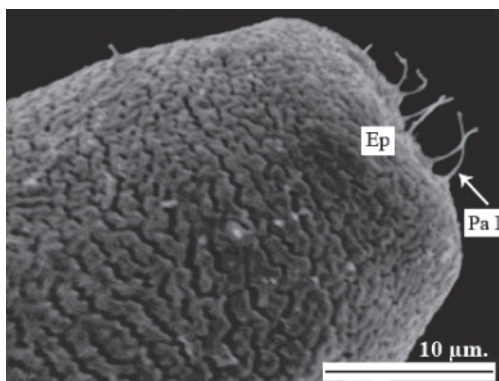
ลักษณะของ sensory papilla จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

พบ tegumentary papilla กระจายอยู่รอบตัว มีลักษณะเป็นปุ่มนูนขึ้นมาจากผิวของตัวพยาธิ จากรูปร่างลักษณะภายนอกและความยาวของ cilium แบ่ง tegumentary papilla ได้เป็น 4 ชนิด (ตารางที่ 1) ชนิดที่ 1 มี cilium ยาวเส้นเดียว

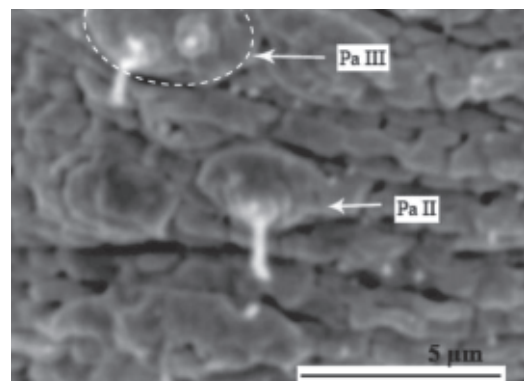
ยื่นออกมาจากฐานที่มีลักษณะเป็นปุ่มนูนเล็กซึ่งเกิดจากการยกตัวขึ้นเล็กน้อยของผนังลำตัว (small papilla with long cilium) cilium มีความยาว ประมาณ 2.90-5.61 ไมโครเมตร และมีฐานกว้างประมาณ 1.35-1.62 ไมโครเมตร cilium ชนิดนี้มีความยาวกว่า cilium ชนิดอื่นๆ พบ papilla ชนิดที่ 1 ประมาณ 8 ปุ่ม เรียงตัวเป็นวงอยู่รอบๆ ช่องขับถ่ายของเสีย (excretory pore) ของตัวพยาธิ (รูปที่ 1) และพบที่บริเวณ 1/5 ทางด้านท้ายของลำตัว ชนิดที่ 2 (รูปที่ 2) เป็นปุ่มนูนมี cilium สั้นเส้นเดียวยื่นออกมา จากฐานที่มีลักษณะเป็นปุ่มนูนใหญ่รูปกรวยคว่ำ (large conical papilla with short cilium) มีฐานกว้างประมาณ 0.62-2.50 ไมโครเมตร และ cilium ยาวประมาณ 1.87-3.40

ตารางที่ 1 สรุปชนิด ขนาด และตำแหน่งที่พบ tegumentary papillae ของ *O. viverrini* ระยะเมตาเซอรรคาเรียจากการศึกษาด้วย SEM

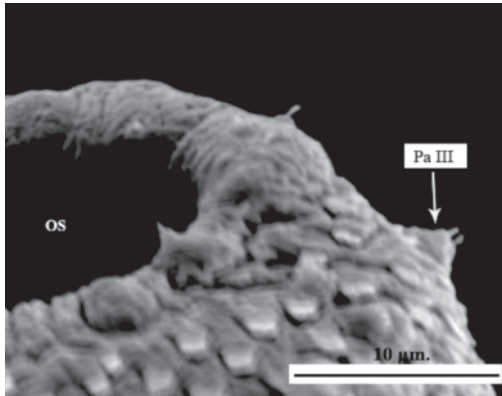
ชนิด	รูปร่างลักษณะ	ความยาวฐาน(ไมโครเมตร)	ตำแหน่งที่พบ
Type I	small papilla with long cilium	1.35-1.62	- รอบๆ excretory pore - บริเวณตำแหน่ง 4/5 ของลำตัวจนถึงปลายสุดทางด้านท้าย
Type II	large conical papilla with short cilium	0.62-2.50	- บริเวณส่วนหน้าทางด้านท้องและทางด้านหลัง - ตำแหน่งรอบๆ oral sucker
Type III	multiconical papilla on a dome-shaped base with cilia	2.90-5.90	- บริเวณส่วนหน้าทางด้านท้องและทางด้านหลัง - สองข้างของลำตัว
Type IV	non-ciliate with conical papilla	2.38-3.57	- ขอบด้านในของ oral sucker และ ventral sucker



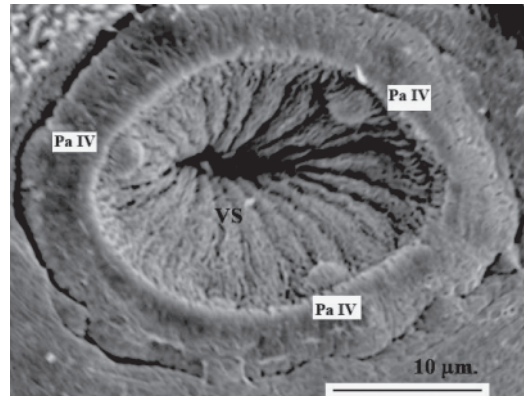
รูปที่ 1 A low magnification scanning electron micrograph (SEM) of *O. viverrini* metacercaria, showing the tegumentary papillae (Pa I) surrounding the excretory pore (Ep). (x 3500)



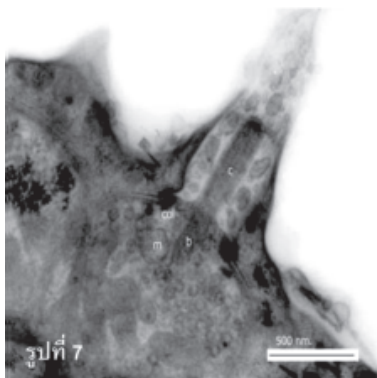
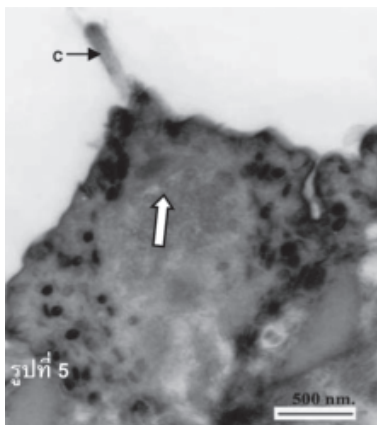
รูปที่ 2 Scanning electron micrograph of the *O. viverrini* metacercaria, demonstrating the tegumentary papillae types 2 and 3 (Pa II and Pa III) on the ventral surface. (x 9000)



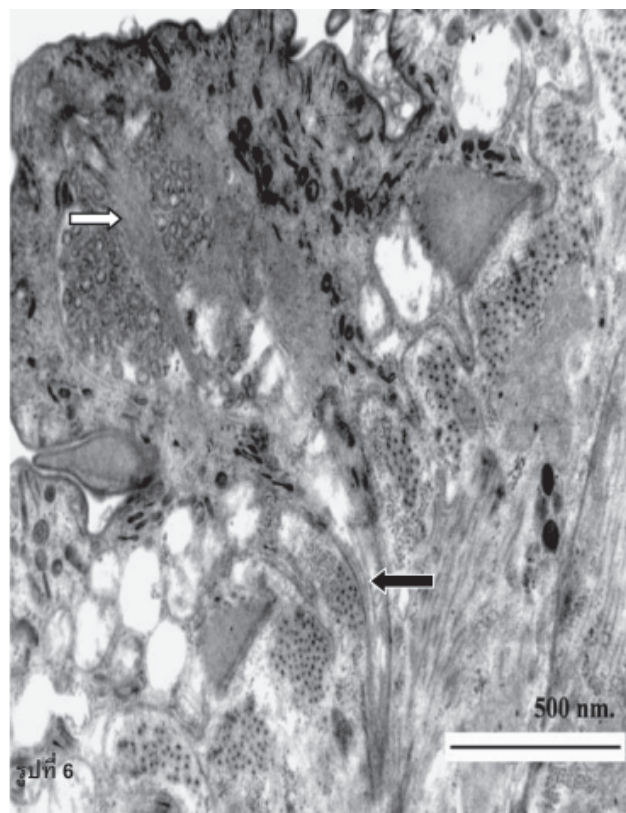
รูปที่ 3 The arrangement of papilla type 2 (Pa II) around the oral sucker (OS). Pa III is also found adjacent to Pa II. (x 7500)



รูปที่ 4 Type 4 (Pa IV) tegumentary papillae are circularly arranged at the inner edge of the ventral sucker (VS). (x 3100)

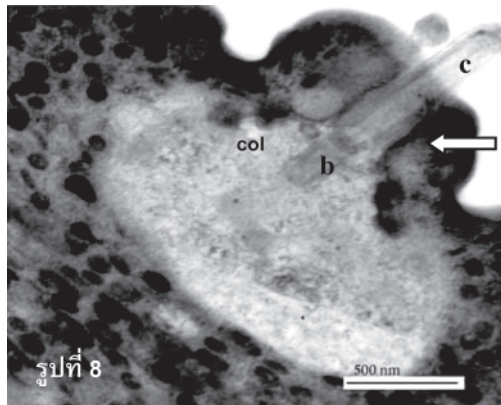


รูปที่ 5 Longitudinal section of the unciliated papilla type A1 with a cilium (c). The tegumentary collars surrounding the lower part of the cilium. Numerous electron lucent vesicles (white arrow) were observed within the bulbous ending. (x 30000)

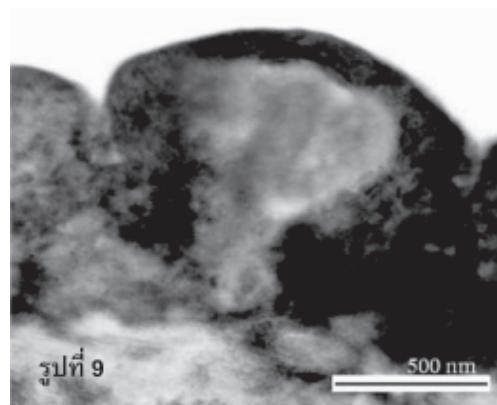


รูปที่ 6 Next section from figure 5. Note the large and long rootlet (white arrow) within the bulbous ending and a nerve fiber (black arrow). (x 57000)

รูปที่ 7 Longitudinal section of unciliated tegumentary papilla type A2. Bulbous ending containing 2 electron dense collars (col), mitochondria (m) and basal body (b) at the base of the cilium (c). (x 49000)



รูปที่ 8 Longitudinal section through a type A3 papilla. Note the thick tegumentary collar (white arrow) surrounding the cilium. Within the bulbous ending, 2 electron dense collars (col) and basal body (b) were noted. (x 38000)



รูปที่ 9 Non-ciliated tegumentary papilla (type B) which bulbous ending not communicating with the tegumentary surface. (x 40000)

ไมโครเมตร พบแหล่งประมาณ 6-9 ปุ่มที่บริเวณส่วนหน้าทางด้านท้องและทางด้านหลังของตัวพยาธิ ซึ่งจัดเรียงตัวเป็นแนวตามยาวของลำตัว นอกจากนี้ยังพบรอบๆ oral sucker (รูปที่ 3) โดยเรียงตัวเป็นวง 2 วง วงละ 5 ปุ่ม ซึ่ง papilla บริเวณนี้มีขนาดเล็กกว่าที่พบบริเวณด้านท้องและด้านหลัง ชนิดที่ 3 เป็นปุ่มฐาน 2-4 ปุ่ม อยู่บนฐานรูป dome shape ขนาดใหญ่เดียวกัน (รูปที่ 2, 3) ฐานกว้างประมาณ 2.90-5.90 ไมโครเมตร แต่ละปุ่มมี cilium ที่มีความยาวแตกต่างกัน cilium ชนิดสั้นมีความยาวประมาณ 0.52 ไมโครเมตร ส่วน cilium ชนิดยาวมีความยาวประมาณ 2.28 ไมโครเมตร ขนาดของปุ่ม papilla บนฐานฐานมีขนาดใกล้เคียงกันประมาณ 0.67 ไมโครเมตร papilla ชนิดนี้เรียงตัวเป็นแนวตามยาวของลำตัวที่ด้านหลังและด้านท้อง แหล่งละ 6-9 ปุ่ม และยังมีปุ่มที่ด้านข้างลำตัวประมาณ 8-10 ปุ่ม ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าที่พบบริเวณอื่นๆ ด้านท้องของพยาธิ มักพบ papilla ชนิดที่ 3 กระจายอยู่ใกล้ๆ ชนิดที่ 2 ส่วน papilla ชนิดที่ 4 (รูปที่ 4) เป็นปุ่มฐานรูปกรวยคว่ำเดี่ยวไม่มี cilium (non-ciliated with conical papilla) พบเฉพาะที่ขอบด้านในของ oral และ ventral sucker แหล่งละประมาณ 4 ปุ่ม โดยแต่ละปุ่มมีฐานกว้างประมาณ 2.38-3.57 ไมโครเมตร และสูง 2.14 ไมโครเมตร

ลักษณะของ sensory papilla จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

พบ sensory papilla ประกอบด้วย bulbous ending มีลักษณะเป็นรูปโดมแทรกตัวผ่านชั้นกล้ามเนื้อ และ basal lamina และอยู่ในชั้นผนังลำตัวชั้นนอก แบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดมี cilium เส้นเดียว (unciliated papilla) และชนิดไม่มี

cilium (non-ciliated papilla) โดยชนิดที่มี cilium สามารถแบ่งตามโครงสร้างภายในได้ 3 ชนิดย่อย คือ A1, A2 และ A3 ชนิด A1 (รูปที่ 5) พบที่ขอบนอกของ ventral sucker มี cilium ยาวยื่นออกมาจาก bulbous ending โดยไม่มี membrane ของ tegument หุ้มอยู่ มี tegument collar ยกตัวสูงขึ้นเล็กน้อยจากผนังลำตัว พบ electron dense area ที่ปลายของ cilium ภายใน bulbous ending พบ septate desmosome เชื่อมระหว่างผนังของ bulbous ending ที่บริเวณ electron dense collar กับ tegumentary membrane ที่อยู่ตรงกันข้าม พบ cross-striated rootlet ขนาดใหญ่ โดยมี basal body เป็นตัวยึด cilium ไว้กับ rootlet มี electron lucent vesicle จำนวนมากอยู่ใน bulbous ending บริเวณส่วนล่างของ bulbous ending ซึ่งบริเวณดังกล่าวเป็นช่วงต่อระหว่าง bulbous ending กับผนังลำตัวชั้นในพบโครงสร้างคล้ายปลายประสาทยื่นผ่านชั้นกล้ามเนื้อและชั้น basal lamina ต่อเนื่องกับส่วนปลายของ bulbous ending (รูปที่ 6) ชนิด A2 มี cilium ล้วนยื่นผ่านผนังลำตัวชั้นนอกขึ้นมา โดยมี tegument collar ยื่นขึ้นมาล้อมรอบ cilium ซึ่งความสูงของ tegument collar เกือบเท่ากับความยาวของ cilium ในช่องว่างระหว่าง tegument collar พบ electron lucent vesicle ที่ปลายสุดของ cilium มีแถบสีดำเข้ม ภายใน bulbous ending ประกอบด้วย mitochondria, electron lucent vesicle, electron dense collar สองอัน ซึ่งพบว่า electron dense collar อันบนใหญ่กว่าอันที่อยู่ถัดลงมา และพบ basal body ที่ฐานของ cilium (รูปที่ 7) ชนิด A3 มี tegument collar คั่นขวางหน้าล้อมรอบ cilium ที่ยื่นขึ้นมา ซึ่ง tegument collar ที่ล้อมรอบนี้สูงเพียงครึ่งหนึ่งของความยาวของ cilium และ

มี electron dense area ที่ปลายสุดของ cilium ภายใน bulbous ending ประกอบด้วย mitochondria, electron lucent vesicle, electron dense collar ขนาดใหญ่สองอัน และไม่พบ rootlet ภายในกระเปาะ แต่พบ basal body และ basal plate บางๆ วางตั้งฉากกับ axoneme ฐานของ cilium พบ papilla ชนิดนี้ที่ด้านหลังและด้านท้องบริเวณส่วนหน้าของลำตัวพยาธิ ที่แกนกลางของ cilium พบโครงสร้าง เป็นลักษณะของ microtubule (รูปที่ 8) ส่วนชนิด B เป็น sensory papilla แบบไม่มี cilium (non-ciliated papilla) (รูปที่ 9) ผ่นลำตัวชั้นนอกของพยาธิขึ้นจาก bulbous ending ดันตัวสูงขึ้นจากแนวลำตัวปกติโดยที่ยังมีผ่นลำตัวปกคลุมอยู่ จึงไม่มีช่องทางที่ติดกันระหว่างภายในกระเปาะและสิ่งแวดล้อมภายนอก ภายใน bulbous ending ประกอบด้วย electron lucent vesicle, septate desmosome และ electron dense collar สองอันที่ส่วนบนสุดของ bulbous ending พบ papilla ชนิดนี้ที่บริเวณส่วนหน้าทางด้านหลังของลำตัวพยาธิ

วิจารณ์

รูปร่างลักษณะของ tegumentary papilla ที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของพยาธิมีความแตกต่างกันในแต่ละระยะและสายพันธุ์ มีรายงานว่า tegumentary papilla เหล่านี้ เป็น sensory papilla ทำหน้าที่เป็น sensory receptor ของพยาธิ เช่น ระยะเซอร์คาเรียของ *Crepidostomum* sp. พบ sensory papilla 7 ชนิด⁸, *Echinostoma caproni* พบ sensory papilla 2 ชนิด⁹ ในระยะเมตาเซอร์คาเรีย มีการศึกษาใน *Metagonimus miyatai* พบ sensory papilla 2 ชนิด¹⁰ ส่วนใน *Himasthla alincia* พบ sensory papilla 2 ชนิด ทั้งในระยะเมตาเซอร์คาเรียและตัวเต็มวัย¹¹ Fujino⁴ ศึกษา sensory papilla ของพยาธิใบไม้ตับ *Clonorchis sinensis* ระยะตัวอ่อนที่เพิ่งออกจากถุงหุ้ม, ระยะตัวอ่อน 1 สัปดาห์ และตัวเต็มวัย จากการศึกษายาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ระยะเมตาเซอร์คาเรียในครั้งนี้พบ tegumentary papilla ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับที่รายงานว่าเป็น sensory papilla ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่ 1 มี cilium ยาวเส้นเดียวยื่นออกมาจากฐานที่มีลักษณะเป็นปุ่มนูนเล็กมีฐานกว้างประมาณ 1.35-1.62 ไมโครเมตร และชนิดที่ 2 เป็นปุ่มนูนใหญ่รูปกรวย ฐานกว้างประมาณ 0.62-2.50 ไมโครเมตร ซึ่งทั้งชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 คล้ายกับชนิด A ที่มี cilium ยาวเส้นเดียวที่ทำการการศึกษาโดย Apinhasmit และคณะ (1993)⁶ แต่มีฐานที่ ใหญ่กว่า (3.12 ไมโครเมตร) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า cilium มีความยาวแตกต่างกัน จึงแบ่ง unilicate papilla เป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่ 1 มีความยาวประมาณ 1.35-1.62 ไมโครเมตร และชนิดที่ 2 มีความยาวประมาณ 2.90-5.61 ไมโครเมตร รูปร่างของ sensory papilla ชนิดที่ 2 เป็น

ปุ่มนูนใหญ่รูปกรวยคว่ำ คล้ายกับ sensory papilla ที่พบใน *Clonorchis sinensis*⁴ และ *Fasciola hepatica*^{12,13} ส่วน unilicate papilla ที่มี cilium ยาวเส้นเดียว (ชนิดที่ 1) พบที่บริเวณรอบๆ excretory pore เหมือนกับ ชนิด A ที่ทำการการศึกษาโดย Apinhasmit และคณะ⁶ แต่ในการศึกษานี้พบ unilicate papilla ชนิดนี้ที่ด้านท้องบริเวณ 1/5 ทางด้านท้ายของลำตัวด้วย ส่วนชนิดที่ 2 ที่ได้จากการศึกษานี้มีการจัดเรียงตัวเป็นแถวตามแนวยาวของลำตัว พบทั้งด้านหลัง ด้านท้อง และด้านข้างของลำตัว ชนิดที่ 3 tegumentary papilla ที่มีรูปร่างเป็นปุ่มนูน 2-4 ปุ่ม ตั้งอยู่บนฐาน dome shape ขนาดใหญ่อันเดียวกัน มีฐานกว้างประมาณ 2.90-5.90 ไมโครเมตร ซึ่งขนาดและรูปร่างคล้ายกันกับ ชนิด B ที่เป็นกลุ่ม papilla 2-4 ปุ่ม วางอยู่บนฐานที่มีรูปร่าง dome shape (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.41-5.0 ไมโครเมตร)⁶ นอกจากนี้ tegumentary papilla ชนิดนี้ยังคล้ายกับที่พบในพยาธิใบไม้ตับชนิด *Clonorchis sinensis*⁴ อีกด้วย ชนิดที่ 4 เป็น tegumentary papilla ที่มีลักษณะเป็นปุ่มนูนเดี่ยวขนาด ใหญ่ไม่มี cilium ความกว้างฐานประมาณ 2.38-3.57 ไมโครเมตร รูปร่างคล้ายกับ ชนิด C (เส้นผ่านศูนย์กลางยาว 3.21 ไมโครเมตร) ในการศึกษาของ Apinhasmit และคณะ และยังมีรูปร่างคล้ายกับ tegumentary papilla ที่พบในพยาธิใบไม้ตับ ชนิด *Clonorchis sinensis*⁴ และ *F. hepatica*^{12,13} ในการศึกษา ครั้งนี้ tegumentary papilla ชนิดที่ 4 มีการกระจายตัวเป็นวงที่ขอบของ oral และ ventral sucker ขณะที่รายงานการศึกษา อื่นๆ พบเฉพาะที่ ventral sucker เท่านั้น^{6,12,13} tegumentary papilla ชนิดที่ 1-3 เป็นชนิดที่มี cilium เชื่อว่า sensory papilla เหล่านี้ทำหน้าที่เป็น mechanoreceptor และ tangoreceptor สำหรับ light touch⁶ ในขณะที่ tegumentary papilla ชนิด non-ciliated ซึ่งพบที่ตำแหน่ง oral และ ventral sucker นั้น จึงน่าจะทำหน้าที่รับความรู้สึกเกี่ยวกับแรงกดและรับความรู้สึกเกี่ยวกับการสัมผัสผ่นระหว่างพยาธิกับโฮสต์⁶ จากการศึกษาในระยะตัวเต็มวัยของพยาธิ *Clonorchis sinensis*⁴ และ *O. viverrini*⁶ พบว่ามีชนิดของ tegumentary papilla เหมือนในระยะเมตาเซอร์คาเรีย แต่มีขนาดใหญ่ขึ้น ส่วนการกระจายและการจัดเรียงตัวของ tegumentary papilla คงเดิม ซึ่งอาจสรุป ได้ว่าการจัดเรียงตัวของ tegumentary papilla ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* มีรูปแบบที่แน่นอน

การศึกษาจุลกายวิภาคของ sensory papilla ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ในพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในระยะเมตาเซอร์คาเรียยังไม่มีผู้ศึกษามาก่อน ผลการศึกษาครั้งนี้จำแนก sensory papilla ออกเป็น 2 ชนิด คือ ชนิด A เป็น sensory papilla ที่มี cilium เส้นเดียว และชนิด B ซึ่งไม่พบ cilium ชนิด A แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้อีก 3 กลุ่ม

ชนิด A1 คล้ายกับ papilla receptor ของ *Clonorchis sinensis* ชนิด A⁴ ชนิด ส่วน A2 มี cilium ลื่นยื่นทะลุผ่านผนังชั้นนอก ขึ้นมาที่ปลายสุดของ cilium มีแถบสีดำเข้ม โครงสร้างดังกล่าว ซึ่งคล้ายกับ *Nicola gallica* ในระยะเซอร์คาเรีย¹³ และ *Diplostomum pseudospathaceum* ระยะเซอร์คาเรีย¹⁵ ชนิด A3 มี tegument collar ค่อนข้างหนาและสูงล้อมรอบ cilium มีลักษณะโครงสร้างของ bulbous ending คล้ายกับรายงานการศึกษาใน *Diplostomum pseudospathaceum* ระยะเซอร์คาเรีย¹⁵ และ *Bunodera* sp.⁸ ชนิด B เป็น non-ciliated sensory papilla ที่มีลักษณะคล้ายกับในระยะเมตาเซอร์คาเรียของ *Clonorchis sinensis*⁴ และ *Diplostomum pseudospathaceum* ระยะเซอร์คาเรีย¹⁴ ใน *Diplostomum pseudospathaceum* ระยะเซอร์คาเรีย แยก sensory papilla ได้ถึง 13 ชนิด จากโครงสร้างภายในของ sensory papilla และตำแหน่งที่พบสันนิษฐานได้ว่าโครงสร้างเหล่านี้มีหน้าที่รับรู้ความรู้สึกเกี่ยวกับรับความรู้สึกสัมผัส (tangoreceptor)¹⁵

ผลการศึกษาจุลกายวิภาคของ tegumentary papilla ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) จากรูปร่างลักษณะภายนอกของ tegumentary papilla ไม่สามารถบอกความสัมพันธ์ระหว่าง tegumentary papilla ที่พบใน SEM กับที่พบในการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ได้อย่างชัดเจน ต้องอิงกับตำแหน่งที่พบ tegumentary papilla เป็นจุดสังเกตร่วมด้วย สันนิษฐานได้ว่า tegumentary papilla ชนิดที่ 2 ที่พบใน SEM น่าจะเป็นชนิดเดียวกันกับ unciliated papilla ชนิด A1 ที่พบใน TEM เนื่องจากพบที่ตำแหน่งเดียวกันคือพบบนขอบของ oral sucker ส่วนชนิดที่ 4 ที่พบใน SEM แม้ว่าจะมีลักษณะเป็น non-ciliated คล้ายกันกับชนิด B ที่พบในการศึกษาด้วย TEM แต่ตำแหน่งที่พบไม่สัมพันธ์กันจึงไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็น tegumentary papilla ชนิดเดียวกัน จากการพบโครงสร้างที่มีลักษณะของ nerve process ยื่นต่อเนื่องไปยัง bulbous ending เป็นการบ่งบอกว่า tegumentary papilla เหล่านี้เป็น sensory receptor ที่ทำหน้าที่เป็น mechanoreceptor และ chemoreceptor รับความรู้สึกต่างๆ จากภายนอก^{6,15} เพื่อนำทางเมตาเซอร์คาเรียเดินทางไปยังท่อนำดีภายในตับ ส่วนชนิด non-ciliated papilla ซึ่งไม่มีทางติดต่อกับสิ่งแวดล้อมภายนอก น่าจะเป็น sensory receptor ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับ mechanoreceptor รับความรู้สึกต่อแรงกด (pressure)⁶

สรุป

ผลการศึกษาด้วย SEM พยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ระยะเมตาเซอร์คาเรียที่ออกจากถุงหุ้ม พบ tegumentary papilla แตกต่างกัน 4 ชนิด แต่ละชนิดพบที่ตำแหน่งแตกต่างกัน

และมีรูปแบบการกระจายที่เป็นแบบแผนจากการศึกษาด้วย TEM สามารถแบ่ง tegumentary papilla ได้เป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่มี cilium และไม่มี cilium ชนิดที่มี cilium อาศัยลักษณะโครงสร้างภายในของ bulbous ending แบ่งได้เป็นอีก 3 กลุ่มย่อย มีเพียง tegumentary papilla ชนิดที่ 2 ที่พบใน SEM ที่สันนิษฐานได้ว่าเป็นชนิดเดียวกับ unciliated papilla ชนิด A1 ใน TEM เพราะพบที่ตำแหน่งเดียวกัน คือ ที่ขอบนอกของ oral sucker การพบโครงสร้างที่คล้าย nerve process ที่มี bulbous ending ช่วยสนับสนุนว่า tegumentary papilla เป็นโครงสร้างที่รับความรู้สึกจากภายนอก

เอกสารอ้างอิง

1. Preuksaraj S. Public health aspects of opisthorchiasis in Thailand. *Arzneimittelforschung* 1984; 34: 1119-20.
2. Le TH, Van De N, Blair D, Sithithaworn P, McManus DP. *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini*: development of a mitochondrial-based multiplex PCR for their identification and discrimination. *Exp Parasitol* 2006; 112: 109-14.
3. Kaewkes S, Elkins DB, Sithithaworn P, Haswell-Elkins MR. Comparative studied on the morphology of the eggs of *Opisthorchis viverrini* and *lecithodendrid trematodes*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1991; 22: 623-30.
4. Fujino T, Ishii Y, Choi DW. Surface ultrastructure of the tegument of *Clonorchis sinensis* newly excysted juvenile and adult worms. *J Parasitol* 1979; 65: 579-90.
5. Sobhon P, Apinhasmit W. *Opisthorchis viverrini* : the tegumental cytoskeleton. *Int J Parasitol* 1995; 25: 787-96.
6. Apinhasmit W, Sobhon P, Saitongdee P, Upatham ES. *Opisthorchis viverrini*: changes of the tegumental surface in newly excysted juvenile, first-week and adult flukes. *Int J Parasitol* 1993; 23: 829-39.
7. Vajrasthira S, Harinasuta C, Kamiya Y. The morphology of the metacercariae of *Opisthorchis viverrini* with special reference to the excretory system. *Ann Trop Med Parasit*. 1961; 55: 413-7.
8. Boga T, Caira JN. Ultrastructure and chaetotaxy of sensory receptors in the cercariae of a species of *Allopoecotyle* Pritchard 1996 (Digenea: Opecoelidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96: 205-14.
9. Nakano T, Fujino T, Washioka H, Tonosaki A, Goto K, Fried B. Tegumentary papillae of *Echinostoma caproni* cercariae (Trematoda: Echinostomatidae). *Parasitol Res* 2003; 89: 446-50.

10. Chai JY, Kang YJ, Choi SY, Guk SM, Yu JR, Lee SH. Surface ultrastructure of *Metaginimus miyatai* metacercariae and adults. Korean J parasitol 1998; 36: 217-25.
11. Han ET, Han KY, Chai JY. Tegumental ultrastructure of the juvenile and adult *Himasthla alincia* (Digenea: Echinostomatidae). Korean J Parasitol 2003; 41: 17-25.
12. Bennett CE. Surface features, sensory structures and movement of the newly excysted juvenile *Fasciola hepatica* L. J Parasitol 1975a; 61: 886-91.
13. Bennett CE. Scanning electron microscopy of *Fasciola hepatica* L. during growth and maturation in the mouse. J Parasitol 1975; 61: 892-8.
14. Pariselle A, Matricon-Gondran M. A new type of ciliated sensory receptor in the cercariae of *Nicolla gallica* (Trematoda). Z Parasitenkd 1985; 71: 353-64.
15. Czubaj A, Niewiadomska K. Ultrastructure of sensory Endings in *Diplostomaum pseudospathaceum* Niewiadomska, 1874 Cercaria (Digenea: Diplostomidae). Int J Parasitol 1996; 26: 1217-25.

