

# พยาธิวิทยาของน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับในสัตว์ทดลองที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ

## บทคัดย่อ

การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับมีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในท่อน้ำดีหลายอย่าง แต่พยาธิสภาพในท่อน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับมีรายงานน้อยมาก คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาพยาธิสภาพ และกลไกการเกิดพยาธิสภาพเหล่านี้ในสัตว์ทดลอง การศึกษาครั้งนี้ใช้แฮมสเตอร์จำนวน 320 ตัว แบ่งเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 80 ตัว และทำการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับจำนวน 25 metacercariae (MC), 50 MC และ 100 MC ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นทำการฆ่าแฮมสเตอร์ในวันที่ 1 3 7 14 และ 30 หลังการติดเชื้อ และฆ่าทุกเดือนจนครบ 6 เดือน และในเดือนที่ 6 ได้ทำการกำจัดพยาธิโดยใช้ยาพาราซิควอลเทล (500 มก./กก.) จำนวน 3 ครั้ง ติดต่อกันในแฮมสเตอร์ทุกกลุ่มและทำการฆ่าต่อทุกเดือนจนครบ 12 เดือน แล้วทำการศึกษา จำนวนพยาธิ ปริมาณไข่ต่อกรัมมูลแฮมสเตอร์ (EPG) ระดับแอนติบอดีต่อแอนติเจน ES, somatic และ egg ตรวจหาแอนติเจนพยาธิใบไม้ตับในผนังเยื่อบุผิวท่อน้ำดี และศึกษาพยาธิสภาพของท่อน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับ

ผลการศึกษาทางประสิทธิวิทยาพบว่า ค่าเฉลี่ยของ worm recovery rate ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 เป็น 50%, 55.2% และ 46.7% ตามลำดับ และไม่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มตลอดการทดลองก่อนการรักษา ส่วนไข่พยาธิในมูลแฮมสเตอร์ตรวจพบครั้งแรกในแฮมสเตอร์ทุกตัวของกลุ่มที่ติดเชื้อปริมาณมาก (กลุ่มที่ 2 และ 3) ในเดือนที่ 1 และ 2 ใน 5 ของกลุ่มที่ 1 หลังการติดเชื้อ ผลการทดลองที่น่าสนใจคือ การลดลงของ EPG ในแฮมสเตอร์กลุ่มที่ 2 และ 3 (ก่อนการรักษา) จำนวนพยาธิ กับ EPG ไม่มีความสัมพันธ์ในทุกกลุ่ม นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนไข่พยาธิต่อตัวมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับจำนวนตัวพยาธิในการติดเชื้อเรื้อรัง และในกลุ่มที่ติดเชื้อปริมาณน้อย (25MC) พบว่ามีจำนวน EPG/worm สูงกว่ากลุ่มที่ติดเชื้อปริมาณมากอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามค่า EPG/worm ก็ยังมีความสัมพันธ์กับ EPG หลังการรักษาแล้วตรวจไม่พบไข่พยาธิในมูลแฮมสเตอร์

ผลทางภูมิคุ้มโนวิทยาพบว่าสามารถตรวจพบระดับแอนติบอดีในซีรัมครั้งในวันที่ 14 หลังการติดเชื้อในกลุ่มที่ติดเชื้อปริมาณมาก จากนั้นระดับแอนติบอดีจะสูงขึ้นอย่างรวดเร็วและถึงจุดสูงสุดประมาณ 2 เดือน และจากนั้นก็มีความค่อนข้างคงที่ในทุกกลุ่มก่อนที่จะลดลงหลังการรักษา ระดับของแอนติบอดีต่อ somatic และ egg antigens ก่อนการรักษาในกลุ่มที่ 1 พบว่าสูงกว่าของกลุ่มที่ 2 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนระดับแอนติบอดีต่อ ES antigen ไม่แตกต่างกันทั้งสามกลุ่ม ในภาพรวมพบว่าแอนติบอดีต่อ ES antigen มีระดับสูงกว่า somatic และ egg antigens ในปริมาณ

โปรตีนที่เท่ากัน และนอกจากนี้ยังพบว่าระดับแอนติบอดีต่อ ES และ egg antigen ไม่มีความสัมพันธ์กับจำนวนพยาธิ หรือ EPG ส่วนระดับของแอนติบอดีต่อ somatic antigen พบว่ามีความสัมพันธ์กับ EPG ส่วนหลังการรักษาพบว่าระดับแอนติบอดีค่อย ๆ ลดลงแต่ก็ยังสูงกว่าระดับปกติเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

สำหรับผลการศึกษาด้านพยาธิวิทยาพบว่า การเปลี่ยนแปลงระยะแรกของเนื้อเยื่อระยะเฉียบพลันซึ่งประกอบด้วย มีเลือดคั่ง นิวโทรฟิล และ อีโอสิโนฟิล พบได้ในท่อน้ำดีนอกตับอย่างชัดเจนในวันที่ 3 ส่วนในถุงน้ำดีพบในวันที่ 7 และ 14 หลังการติดเชื้อ โดยเฉพาะในกลุ่มที่ 3 และ 2 ตามลำดับ หลังจากนั้นพยาธิสภาพต่าง ๆ มีความรุนแรงมากขึ้น เซลล์อักเสบส่วนใหญ่เป็นชนิด mononuclear cells มีการหลั่งเมือกออกมา และเริ่มมี fibrosis เซลล์อักเสบชนิด mast cells โดยเฉพาะ mucosal mast cells มีปริมาณมากขึ้นชัดเจนในเดือนที่ 1 หลังการติดเชื้อ พยาธิสภาพในระยะแรกนี้มีความรุนแรงตามปริมาณการติดเชื้อ ในระยะติดเชื้อเรื้อรังมีพยาธิสภาพที่เด่นชัด คือ fibrosis, mononuclear cell infiltration with lymphoid aggregation และ ductal dilatation โดยทั่วไปพยาธิสภาพในท่อน้ำดีนอกตับมีความรุนแรงมากกว่าในถุงน้ำดีในปริมาณการติดเชื้อและระยะเวลาของการติดเชื้อเดียวกัน ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการอักเสบแบบแกรนูโลมาในผนังท่อน้ำดีเลย หลังจากกำจัดพยาธิออกไปพบว่าความรุนแรงของพยาธิสภาพต่าง ๆ ในถุงน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับลดลงโดยเฉพาะการอักเสบ ปริมาณเมือก และ ductal dilatation รวมทั้งปริมาณ mast cells อย่างไรก็ตาม fibrosis ลดลงเพียงเล็กน้อยหลังการรักษาเมื่อสิ้นสุดการทดลองในการศึกษากลไกการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ตรวจพบว่ามีแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับในน้ำดีโดยวิธี Immunoblot และ gel diffusion นอกจากนี้ยังพบในเยื่อบุผิวท่อน้ำดีในเซลล์ตับ และเนื้อเยื่อข้างเคียงด้วย ตั้งแต่วันที่ 3 หลังการติดเชื้อโดยการตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมี การตรวจพบแอนติเจนในเนื้อเยื่อนี้มักพบควบคู่ไปกับการพบเซลล์อักเสบมาตอบสนอง ทั้งในตับ ถุงน้ำดี และท่อน้ำดีนอกตับจากผลการศึกษาทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นชัดเจนว่ามีพยาธิสภาพเกิดขึ้นอย่างแน่นอนในถุงน้ำดี และท่อน้ำดีนอกตับในแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ซึ่งพยาธิสภาพในระยะแรกมีความสัมพันธ์กับปริมาณการติดเชื้อ ส่วนระยะหลังน่าจะเป็นอิมมูโนพยาธิวิทยา อย่างไรก็ตามการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าพยาธิสภาพที่พบในทุกระยะเป็น immunopathologic processes เป็นส่วนใหญ่ รายงานนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกของการศึกษาพยาธิสภาพและกลไกการเกิดโรคในระบบท่อน้ำดีนอกตับที่เกิดจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในสัตว์ทดลอง

**คำหลัก :** พยาธิใบไม้ตับ พยาธิวิทยา กลไกการเกิดโรค ถุงน้ำดี ท่อน้ำดีนอกตับ แอนติบอดี ELISA EPG แอนติเจนพยาธิ อิมมูโนฮิสโตเคมี อิมมูโนบลอต

## Pathology and pathogenesis of the gall bladder and extrahepatic bile duct in *Opisthorchis viverrini* infection: An experimental model

### Abstract

*Opisthorchis viverrini* infection is associated with several hepatobiliary diseases, however, few reports have described extrahepatic lesions in opisthorchiasis. Here we investigated histopathological and immunopathological changes of the gall bladder and extrahepatic bile duct in relation to the intensity of *O. viverrini* infection and antibody responses both before and after praziquantel treatment in an animal model. Totally, three hundred and twenty male golden

Syrian hamsters were divided into 4 groups of 80. They were infected with 25 (group 1), 50 (group 2) and 100 (group 3) metacercariae, respectively. The control group (group 4) was fed saline. The animals were sacrificed, five per group on days 1, 3, 7, 14 and 30 post-infection (p.i.), then every month until the twelfth month. During the experiment, the hamsters were treated with 3 consecutive doses of praziquantel (500 mg/kg) at the end of the 6th month.

Worm counts, fecal egg counts [eggs per gram (EPG)], antibodies to excretory-secretory (ES), somatic and egg antigens, immunohistochemical staining for *Opisthorchis* antigens and histopathological changes of the gall bladder and extrahepatic bile duct were examined.

The worm recovery rate before treatment was relatively stable with an overall of 50%, 55.2% and 46.7% for groups 1, 2 and 3, respectively. These worm recoveries were not statistically significant among the 3 infected groups during the course of the experiments. Parasite eggs in the faeces were first seen at month 1 p.i. in all infected hamsters of group 2 and 3 but in 2 out of 5 hamsters of group 1. The EPG was low at month 1 p.i., then gradually increased to a peak at month 4 for group 2 and 3 and month 5 for group 1. Interestingly, significant reduction of the mean EPG was seen after the peaks in groups 2 and 3 but not in

group 1. Overall, no correlation between worm burden and corresponding EPG was found in all groups. In addition, inverse correlation was observed in the mean EPG/worm and worm burden ( $r = -.542$ ,  $P < 0.01$ ). Multivariate analysis revealed that the mean EPG/worm of group 1 was significantly higher than those of group 2 and 3 during the course of infection (ANOVA,  $P < 0.05$ ). The EPG/worm was highly correlated with the corresponding EPG ( $r = .744$ ,  $P < 0.01$ ). No worm or eggs were found after praziquantel treatment.

The antibody responses were first detected as early as 14 days after infection. Hamsters that were infected with 100 MC and 50 MC showed higher antibody levels than those of 25 MC, during early infection until 1 month p.i. Then the antibody levels were increased rapidly to a plateau at approximately month 2 p.i. and, thereafter, were relatively stable in all groups. The average antibody levels to egg and somatic, but not to ES antigens, were significantly higher in hamsters infected with 25 MC than those of 50 MC and 100 MC. These antibody responses, particularly to egg and ES antigens, were not correlated with worm burden or egg output. Overall, higher antibody responses were found in order; ES, somatic and egg antigens. The antibody levels to each antigen were gradually declined after treatment, however, they were still higher than normal control at the end of the experiment. For pathological study, early histological changes of the gall bladder and extrahepatic bile ducts were acute inflammatory reactions, including congestion, neutrophil and later eosinophil infiltration. This reaction was clearly observed in the gall bladders of group 2 and 3 on day 7 and on day 14. Whereas for group 1 the extrahepatic bile ducts exhibited such changes as early as day 3 p.i. Chronic lesions, including mononuclear cell infiltration, mucus hypersecretion and fibrosis, were gradually observed thereafter. Subacute inflammation was also seen in some animals, especially in group 3. Mast cell hyperplasia was clearly observed after one month post-infection and was rapidly declined after treatment. No granulomatous inflammation was seen. The overall pathological changes of the extrahepatic bile duct were more severe than those of the gall bladder at the same dose and period of infection. The most striking histological changes in the chronic infection were periductal fibrosis, severe mononuclear cell infiltration and dilation of the extrahepatic bile duct. After praziquantel treatment, the aforementioned pathologies were regressed, particularly inflammation, mucus secretion and ductal dilatation. However, fibrosis was the only lesion that was still moderately prominent after 6 month post-treatment. To elucidate the pathogenesis of *Opisthorchis*-associated biliary pathology, parasite antigens were found in the bile of infected hamsters by means of immunoblotting and gel diffusion. Moreover, the antigens were also observed in the biliary epithelium, and surrounding tissue and, for the less extent,

the liver as early as day 3 p.i. The presence of parasite antigens were found along with severe inflammatory cell infiltration. In addition, different parasite antigens were demonstrated in the infected serum. The overall results clearly demonstrate that pathological changes of the gall bladder and extrahepatic bile duct did occur in experimental *O. viverrini* infection and is dependent on intensity, especially at the early stage, and duration of the infection. The lesions were immunopathologic in processes. This is the first report of a sequential study of extrahepatic lesions in experimental opisthorchiasis.

**Keywords :** *Opisthorchis viverrini* ; pathology ; pathogenesis ; gall bladder ; extrahepatic bile duct ; antibody response ELISA ; EPG ; parasite antigen ; immunohistochemistry ; immunoblot