

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

พยาธิวิทยาถุงน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับในสัตว์ทดลอง
ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ

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

บรรจบ จีรวิภา

ศศิธร แก้วเกษ

ภาควิชาพยาธิวิทยา และ วิชาปรสิตวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

นี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยในโครงการวิจัยองค์ความรู้ใหม่
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
ประจำปี 2539

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

พยาธิวิทยาถุงน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับในสัตว์ทดลอง
ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ

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

บรรจบ ศรีภา

ศศิธร แก้วเกษ*

ภาควิชาพยาธิวิทยา และ *ภาควิชาปรสิตวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยในโครงการวิจัยองค์ความรู้ใหม่

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

ประจำปี 2539

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย เรื่อง "พลาสมาพลาสมาและพลาสมาพลาสมาในสภาวะที่ผิดปกติของพลาสมาในไมโคร" นี้ ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยในโครงการวิจัยของสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปี 2563 (โครงการเลขที่ BRG 3980013) คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในการสนับสนุนทุนวิจัยนี้ โดยเฉพาะ ศาสตราจารย์ นพ. วีระวัฒน์ พานิช ศาสตราจารย์ ดร. วิชัย บุญแสง และคณะกรรมการที่พิจารณาและติดตามผลการวิจัยทุกท่าน รวมทั้งเจ้าหน้าที่ของ วช. ที่เกี่ยวข้องที่ประสานงานและให้ความสะดวกทุกประการ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันที่สังกัด โดยเฉพาะภาควิชาพลาสมาฟิสิกส์ และ ภาควิชาฟิสิกส์นิวเคลียร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ทั้งในด้านอุปกรณ์ และ เครื่องมือต่าง ๆ รวมทั้งด้านธุรการ นอกจากนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาฟิสิกส์นิวเคลียร์ ภาควิชาฟิสิกส์ และ ภาควิชาฟิสิกส์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ ใช้เครื่องมือ Spectromic 3000, Image analyzer และ Freeze-Dryer ด้วย คำว่า คำว่า นอกจากนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร. วิชัย นานิวงษ์ ภาควิชาฟิสิกส์นิวเคลียร์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. สุระศักดิ์ วงศ์วัฒนวิวัฒน์ ภาควิชาฟิสิกส์นิวเคลียร์ ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ และ งานปฏิบัติการ บางอย่าง

งานวิจัยครั้งนี้จะสำเร็จไม่ได้หากไม่ได้ได้รับความร่วมมือจากเจ้าหน้าที่ปฏิบัติกรหลายฝ่าย โดยเฉพาะเจ้าหน้าที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยพลาสมาฟิสิกส์ ภาควิชาพลาสมาฟิสิกส์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น คุณวิรัตน์ สกโข และ เจ้าหน้าที่โครงการวิจัย นางอ้อมพร บงกชวงศ์ โรจน์ และ นายสุวิทย์ นายไพฑูรย์ รวมทั้งนักศึกษาระดับปริญญาโททุกคนที่เข้าร่วมทำวิจัยในหน่วยปฏิบัติการวิจัยพลาสมาฟิสิกส์ นอกจากนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยทุกคนที่ช่วยดูแลสภาวะแวดล้อมของตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย

สุดท้าย ผู้วิจัยขอขอบคุณสมาชิกในครอบครัวของผู้วิจัยทุกคน ที่เข้าใจในการทำงานสนับสนุน และ เป็นกำลังใจ ตลอดมา

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 gallbladder and extrahepatic bile duct were examined.

The worm recovery rate before treatment was relatively stable with an overall of 50 %, 33.2 % 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 groups 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 ($r = -0.542$, $P < 0.01$). Multivariate analysis revealed that the mean EPG/worm of group 1 was significantly higher than those of groups 2 and 3 during the course of infection (ANOVA, $P < 0.05$). The EPG/worm was highly correlated with the corresponding EPG ($r = 0.744$, $P < 0.01$). 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

Key words: *Opisthorchis viverrini*, pathology, pathogenesis, gallbladder, extrahepatic bile duct, antibody response, ELISA, EPG, parasite antigen, immunohistochemistry, immunoblot.

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 5 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.

Key words: *Opisthorchis viverrini*, pathology, pathogenesis, gallbladder, extrahepatic bile duct, antibody responses ELISA, EPG, parasite antigen, immunohistochemistry, immunoblot

บทคัดย่อ

การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับมีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในท่อทางเดินน้ำดีและท่อน้ำดี แต่พยาธิสภาพในถุงน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับมีรายงานน้อยมาก คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาพยาธิสภาพ และ กลไกการเกิดพยาธิสภาพเหล่านี้ในสัตว์ทดลอง การศึกษาครั้งนี้ใช้แบบสุ่มจำนวน 320 ตัว แบ่งเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 80 ตัว และ ทำการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับจำนวน 25 metacercariae (MC), 50 MC และ 100 MC ในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นทำการผ่าแบบสุ่มตรวจในวันที่ 1, 3, 7, 14 และ 30 หลังการติดเชื้อ และนำทุกเดือนจนครบ 6 เดือน และในเดือนที่ 6 ได้ทำการกำจัดพยาธิโดยใช้อาหารยาฆ่าพยาธิ (500 มก./กก.) จำนวน 3 ครั้งติดต่อกันในแบบสุ่มตรวจทุกกลุ่มและทำการผ่าดูทุกเดือนจนครบ 12 เดือน แล้วทำการศึกษา จำนวนพยาธิ ปริมาณไข่ต่อกรัมของเนื้อเยื่อ (EPG) ระดับแอนติบอดีต่อแอนติเจน ES, somatic และ egg ตรวจหาพยาธิใบไม้ตับในผนังเยื่อหุ้มทางเดินน้ำดี และ ศึกษาพยาธิสภาพของถุงน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับ

ผลการศึกษารูปแบบพยาธิวิทยาพบว่า ส่วนเฉลี่ยของ worm recovery rate ในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 เป็น 50%, 55.2% และ 46.7% ตามลำดับ และ ไม่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มของพยาธิวิทยา การผ่าดู ส่วนไข่พยาธิในเนื้อเยื่อตรวจพบครั้งแรกในแบบสุ่มตรวจทุกตัวของกลุ่มที่ติดเชื้อปริมาณมาก (กลุ่มที่ 2 และ 3) ในเดือนที่ 1 และ 2 ใน 5 ของกลุ่มที่ 1 หลังการติดเชื้อ ผลการทดลองที่น่าสนใจ คือ การลดลงของ EPG ในแบบสุ่มตรวจกลุ่มที่ 2 และ 3 (ก่อนการรักษา) จำนวนพยาธิ กับ EPG ไม่มีความสัมพันธ์ในทุกกลุ่ม นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนไข่พยาธิต่อกรัมมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับจำนวนตัวพยาธิในการติดเชื้อเรื้อรัง และ ในกลุ่มที่ติดเชื้อปริมาณน้อย (25 MC) พบว่ามีจำนวน EPG/worm สูงกว่ากลุ่มที่ติดเชื้อปริมาณมากอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามค่า EPG/worm ก็ยังมีความสัมพันธ์กับ EPG หลังการรักษาแล้วตรวจไม่พบไข่พยาธิในแบบสุ่มตรวจ

ผลทางด้านภูมิคุ้มโนวิทยาพบว่าสามารถตรวจพบระดับแอนติบอดีต่อพยาธิใบไม้ตับในสัตว์ที่ 14 หลังการติดเชื้อในกลุ่มที่ติดเชื้อปริมาณมาก จากนั้นระดับแอนติบอดีต่อพยาธิใบไม้ตับจะสูงขึ้นอย่างรวดเร็วและถึงจุดสูงสุดประมาณ 2 เดือน และจากนั้นก็จะมีปริมาณค่อนข้างคงที่ในทุกกลุ่มก่อนที่จะลดลงหลังการรักษา ระดับของแอนติบอดีต่อ somatic และ egg antigens ก่อนการรักษาในกลุ่มที่ 1 พบว่าสูงมากกว่าของกลุ่มที่ 2 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนระดับแอนติบอดีต่อ ES antigen ไม่แตกต่างกันทั้งสามกลุ่ม ในภาพรวมพบว่าแอนติบอดีต่อ ES antigen มีระดับสูงกว่า somatic และ egg antigens ในปริมาณโปรตีนที่เท่ากัน และ นอกจากนี้ยังพบว่าระดับแอนติบอดีต่อ ES และ egg antigens ไม่มีความสัมพันธ์กับจำนวนพยาธิ หรือ EPG ส่วน ระดับของแอนติบอดีต่อ somatic

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ	i
ABSTRACT	ii
บทคัดย่อ	iv
สารบัญ	vi
บทที่ 1 บทนำ	1
• ชีวิตของพยาธิใบไม้ดิบ	2
• ระบาดวิทยาและอาการทางคลินิก	2
• พยาธิวิทยาของตับและท่อน้ำดีในโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ดิบ	4
• พยาธิวิทยาในคน	4
• พยาธิวิทยาในสัตว์ทดลอง	6
• กลไกการเกิดพยาธิสภาพในโรคพยาธิใบไม้ดิบ	6
• Mucosal Inflammation and Immunopathology	7
• รูปแบบของโครงสร้างของ	8
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	10
• สารเคมี-วัสดุ และอุปกรณ์ที่สำคัญในการวิจัย	10
• สัตว์ทดลอง	12
• ตัวอ่อนพยาธิใบไม้ดิบ (metacercariae)	12
• การเลี้ยงเชื้อตัวอ่อนพยาธิ	13
• การเตรียมแอนติเจนพยาธิใบไม้ดิบ (<i>Opisthorchis</i> antigen preparation)	13
• การ immunize กระต่าย	14
• การแยก IgG fraction จากซีรัม	14
• Biotinylation of IgG	14
• Experimental design	15
• การเก็บตัวอย่าง	15
• การศึกษาทางห้องปฏิบัติการ	16
• ขอบเขตของการวิจัย	18

antigen พบว่ามีปริมาณสัมพันธ์กับ EPG ส่วนหลังการรักษามพบว่าระดับแอนติบอดีลดลง ก็ยังสูงกว่าระดับปกติเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

สำหรับผลการศึกษาด้านพยาธิวิทยาพบว่า การเปลี่ยนแปลงระบบเรกของเนื้อเยื่อระยะ เยื่อพลิซซึ่งประกอบด้วย มีเลือดคั่ง นิวโครฟิส และ ฮีโอซิโนฟิล พบได้ในท่อน้ำดีนอกตับอย่าง ชัดเจนในวันที่ 3 ส่วนในถุงน้ำดีพบในวันที่ 7 และ 14 หลังการติดเชื้อ โดยเฉพาะในกลุ่มที่ 3 และ 2 ตามลำดับ หลังจากนั้นพยาธิสภาพต่างๆ มีความรุนแรงมากขึ้น เซลล์อักเสบส่วนใหญ่เป็นชนิด mononuclear cells มีการอักเสบเม็ดเลือดขาวมาก และเริ่มมี fibrosis เซลล์ยักษ์เศษซาก mast cells โดยเฉพาะ mucosal mast cells มีปริมาณมากขึ้นชัดเจนในเดือนที่ 1 หลังการติดเชื้อ พยาธิสภาพ ในระยะแรกนี้มีความรุนแรงตามปริมาณการติดเชื้อ ในระยะติดเชื้อเรื้อรังมีพยาธิสภาพที่เด่นชัด คือ fibrosis, mononuclear cell infiltration with lymphoid aggregation และ ductal dilatation โดยทั่วไปพยาธิสภาพในท่อน้ำดีนอกตับมีความรุนแรงมากกว่าในถุงน้ำดีในปริมาณการติดเชื้อและระยะเวลาของการติดเชื้อเดียวกัน ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการอักเสบตามท่อน้ำดีในผนังท่อน้ำดี เดียว หลังจากทำจิตพยาธิออกไปพบว่าความรุนแรงของพยาธิสภาพต่างๆ ในถุงน้ำดีและท่อน้ำดีนอก ตับลดลงโดยเฉพาะการอักเสบ ปริมาณเม็ดเลือด และ ductal dilatation รวมทั้งปริมาณ mast cells อย่างไรก็ตาม fibrosis ยังคงเหลืออยู่หลังการรักษาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ในการศึกษาผลของการเกิดโรคที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ตรวจพบว่ามี แอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับในน้ำดีโดยวิธี Immunoblot และ gel diffusion นอกจากนี้ยังพบใน เนื้อเยื่อท่อน้ำดีนอกตับ ในเซลล์ตับ และ เนื้อเยื่อข้างเคียงด้วย ตั้งแต่วันที่ 3 หลังการติดเชื้อ โดย การตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมี การตรวจพบแอนติเจนในเนื้อเยื่อนี้มักพบกระจายไปกับการพบเซลล์ อักเสบมาคrophages ทั้งในตับ ถุงน้ำดี และท่อน้ำดีนอกตับ

จากผลการศึกษาทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นชัดเจนว่าพยาธิสภาพเกิดขึ้นอย่างเด่นชัดในถุง น้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับในแบบพยาธิที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ซึ่งพยาธิสภาพในระยะแรกมีความ สัมพันธ์กับปริมาณการติดเชื้อ ส่วนระยะหลังน่าจะเป็นอิมมูโนพยาธิวิทยา อย่างไรก็ตามการศึกษา ครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าพยาธิสภาพที่พบในทุกระยะเป็น immunopathologic processes เป็นส่วน ใหญ่ รายงานนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกของการศึกษาพยาธิสภาพและผลต่อการเกิดโรคในระบบท่อน้ำ ดีทางเดินน้ำดีนอกตับที่เกิดจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ในสัตว์ทดลอง

บทที่ 3. ผลการศึกษา	19
• การศึกษาทางปฐวีวิทยา	19
• การศึกษาทางอิมมูโนไฮส	20
• ความสัมพันธ์ระหว่างระดับแอนติบอดีและปริมาณการติดเชื้อพยาธิใบไม้ค้ำ	24
• การศึกษาทางพยาธิวิทยา	24
• Gross Pathology	24
• ลักษณะทางพยาธิวิทยาขนาดเล็ก (Histopathology)	26
• การศึกษา Mast cells ในผนังถุงน้ำดีและท่อน้ำดีขนาดเล็ก	30
• อิมมูโนพยาธิวิทยาการติดเชื้อพยาธิใบไม้ค้ำ (Immunopathology)	32
• การตรวจและวิเคราะห์แอนติเจนพยาธิใบไม้ค้ำในน้ำดี	36
บทที่ 4. บทวิจารณ์และสรุป	39
บทที่ 5. หนังสืออ้างอิง	49
บทที่ 6. ผลงานที่ได้และการเผยแพร่	60
ภาพผนวก	100
รายงานการเงิน	

บทที่ 1

บทนำ

โรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับเป็นโรคที่เป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขของหลายภูมิภาคในโลก เช่น เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จีนตอนใต้ เอเชียตะวันออก และ โอเชียเนีย (Preuksara, 1984; Rim, 1986; IARC, 1994) พยาธิใบไม้ตับที่เป็นสาเหตุของโรคนี้นี้ด้วยกัน 3 ชนิด คือ *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini* และ *O. felinus* : ภาระโรคของ *C. sinensis* มีมากในแถบจีนตอนใต้ สมองงู ไตห่าน และ ปลาไหล ส่วน *O. viverrini* มีการระบาดในประเทศไทย ลาว (Harinasuta & Harinasuta, 1984; Rim, 1986) *O. felinus* พบมากในยุโรปตะวันออกและไซบีเรีย ประมาณกันว่าทั่วโลกมีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับกว่า 17 ล้านคน โดยเป็นการติดเชื้อ *Clonorchis* 7 ล้านคน, *O. viverrini* 9 ล้านคน และ *O. felinus* 1.5 ล้านคน (IARC, 1994)

ถ้าพบในประเทศไทยพบว่าการติดเชื้อ *O. viverrini* มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคตับและท่อน้ำดีอักเสบเรื้อรัง เช่น ท่อน้ำดีอักเสบ ท่อน้ำดีอุดตัน ถุงน้ำดีอักเสบ นิ่วในถุงน้ำดี และตับโต (Harinasuta *et al.*, 1984) นอกจากนี้จากหลักฐานทางระบาดวิทยาและการศึกษาจากสัตว์ทดลองยังพบว่าพยาธิใบไม้ตับนี้ยังมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีอีกด้วย (Thamavit *et al.*, 1978; Thamavit *et al.*, 1987a,b; Elkins *et al.*, 1990; Vatakencherry *et al.*, 1990a,b) และจากการประชุมของนักวิทยาศาสตร์ที่องค์การมะเร็งนานาชาติ ที่มีกรุงออสโล ประเทศนอร์เวย์ อภิปรายสรุปว่า พยาธิใบไม้ตับ (*O. viverrini*) จัดเป็นส่วก่อมะเร็ง กลุ่ม 1 (group 1 carcinogen) (sufficient evidence of carcinogenicity) ด้วย (IARC, 1994)

การศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า พยาธิใบไม้คั้นมีจำนวนมากโดยเฉพาะกรณีเกิดโรคในคั้น แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาด้านพยาธิวิทยาของอุ้งน้ำคั้นซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของทั้งหมดคั้นน้ำคั้นนั้นมีการศึกษาน้อยมาก ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาพยาธิชีววิทยาของโรคอุ้งน้ำคั้นที่เกิดจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้คั้นในสัตว์ทดลอง

ชีววิทยาของพยาธิใบไม้คั้น

Opisthorchis viverrini เป็น digenetic trematode อาศัยอยู่ในท่อทางเดินน้ำดีของกบและสัตว์ที่ถูกคั้นตามถิ่นๆ ที่เป็น reservoir hosts มีวงจรชีวิตประกอบด้วย 3 obligate intermediate hosts คือ *Bithynia* snails และ ปลาน้ำจืดชนิด Cyprinoid fish (Sadun, 1955; Wykoff *et al.*, 1965; Harinasuta & Harinasuta, 1984) ส่วน definitive host อาจจะเป็นคน สุนัข แมว หรือ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ การติดเชื้อเกิดจากการกินปลาน้ำจืดดิบๆ ที่มีตัวอ่อนระยะติดตัว (metacercariae) และตัวอ่อนนี้จะ excyst ใน duodenum และ คืบคลานเข้าไปคืบโดยผ่านทาง Ampulla of Vater, ท่อน้ำดีรวม แล้วเจริญเป็นตัวแก่ในคั้นโดยใช้เวลาประมาณหนึ่งเดือน (Harinasuta & Harinasuta, 1984) พยาธิใบไม้คั้นอาจพบได้บ้างในอุ้งน้ำคั้นแต่ก็น้อยมาก (Tansuwan, 1971) เมื่อเปรียบเทียบกับในสัตว์ทดลอง (Bhannasupavati *et al.*, 1978) พยาธิใบไม้คั้นจะเจริญเติบโตและเจริญพันธุ์ที่คั้นและปลอกไข่ออกมาปะปนกับน้ำคั้นตามอุ้งน้ำคั้นและปล่อยออกจากร่างกายทางอุ้งจาระเหลวตามอุ้งน้ำคั้นรวมชาติ Wykoff & Aiyasprakai (1966) ประมาณการว่าพยาธิใบไม้คั้นออกไข่ 2000-4200 ฟองตัววัน นอกจากรูปร่างของไข่และจำนวนตัวของพยาธิที่มีลักษณะสัมพันธ์กัน (Ramsey *et al.*, 1989; Elkins *et al.*, 1991; Sithithaworn *et al.*, 1991) ส่วนอายุขัยของพยาธิใบไม้คั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดแต่เชื่อกันว่ามีอายุหล่นปี (Viranuvatti, 1972)

ระบาดวิทยาและอาการทางคลินิก

Opisthorchis viverrini มีอุบัติการณ์สูงมากในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้โดยเฉพาะประเทศไทย (Preuksaraj, 1984; Jongsuksantikul *et al.*, 1992) สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว (Dieich *et al.*, 1990; Giboda *et al.*, 1991) และ กัมพูชาและเวียดนาม (Sadun, 1955) ประมาณการกันว่าอุบัติการณ์การติดเชื้อพยาธิใบไม้คั้นในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยมีสูงถึง 34 % หรือประมาณ 7 ล้านคน (Harinasuta & Harinasuta, 1984; Preuksaraj, 1984) โดยมีอัตราการศึกษาพยาธิใบไม้ 17 จังหวัดในเขตนี้ตั้งแต่ 2-95% (Sadun, 1955; Harinasuta & Harinasuta, 1984; Preuksaraj,

1984; Jongsuksantigul *et al.*, 1992) นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อในบางจังหวัดของภาคกลาง และภาคเหนือ สูงถึง 25% ด้วย (Jongsuksantigul *et al.*, 1992)

อาการแสดงของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับไม่ค่อยเด่นชัดนักในผู้ที่ติดเชื้อปริมาณน้อยๆ สำหรับผู้ที่ติดเชื้อจำนวนมากจะมีอาการอ่อนเพลีย เบื่ออาหาร ปวดท้อง ท้องอืด ซึ่งจะมีประมาณ 5-10% ของผู้ป่วย (Upatham *et al.*, 1984) อาการที่มีอาการแสดงก่อนจึงมีน้อยจึงทำให้โรคมีสาเหตุการเกิดกลุ่มเขี้ยว (*C. choerant*) ไม่ทำให้มีพยาธิสภาพรุนแรง (Woolf *et al.*, 1984) อย่างไรก็ตามเมื่อเร็วๆ นี้ ได้มีการศึกษาในกลุ่มประชากรในชุมชนภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวนมาก โดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์พบว่าผู้ที่ไม่มีอาการแสดงแต่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับจำนวนมากมีความผิดปกติของตับและถุงน้ำดี มากกว่าผู้ที่ไม่มีพยาธินี้มากกว่าคือ ไม่มีพยาธิอย่างมีนัยสำคัญ ความผิดปกติที่พบบ่อยก็คือ คับโต, enhanced portal vein radical echoes, ถุงน้ำดีโต ท่อน้ำดีทึบภาพหรือไม่เรียบ, biliary sludge และ poor contractility (Elkins *et al.*, 1990; Haswell-Elkins *et al.*, 1991; Mairiang *et al.*, 1992; Mairiang *et al.*, 1993) การมี portal vein radical echoes ความหนา portal triad ในตับถือว่าเป็นแนวการหนาตัวของผนังท่อน้ำดี (fibrotic change) ซึ่งเกิดจากการอักเสบเรื้อรัง (Hornida *et al.*, 1988) ลักษณะความผิดปกติดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับปริมาณการติดเชื้อ และระดับ parasite-specific IgG (Elkins *et al.*, 1990; Haswell-Elkins *et al.*, 1991; Mairiang *et al.*, 1992) นอกจากนี้ความผิดปกติเหล่านี้จะกลับคืนสู่ปกติภายใน 10 เดือน หลังให้ยาฆ่าพยาธิ praziquantel (Mairiang *et al.*, 1993).

การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับยังมีความสัมพันธ์กับการเกิดนิ่วในถุงน้ำดี โดยพบว่าในก้อนนิ่วผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับมีไขมันและตัวเก่าพยาธิเป็นแกนกลางของก้อนนิ่ว (Riganti *et al.*, 1988) จากการศึกษาประชากรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 647 คน และ พบอุบัติการณ์การเกิดนิ่ว 1% และ ไม่แตกต่างกันระหว่างก่อนและหลังการรักษาด้วยยา praziquantel เป็นเวลา 6 ปี (Pungpak *et al.*, 1989) ซึ่งอุบัติการณ์นี้ใกล้เคียงกับที่มีรายงานการสืบเสาะจากการตรวจศพ 8,006 ศพ (1.2%) ที่ทั่วประเทศไทย (Sitnimankarn, 1960) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในชุมชนเมื่อเร็วๆ นี้พบว่ามี biliary sludge ในผู้ที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับจำนวนมาก (Elkins *et al.*, 1990; Mairiang *et al.*, 1992; Mairiang *et al.*, 1993) ซึ่ง biliary sludge นี้เป็น precursor ของการเกิดนิ่ว (Lee *et al.*, 1988; Terada *et al.*, 1990) ดังนั้นการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับน่าจะมีความสัมพันธ์กับการเกิดนิ่วในถุงน้ำดีเหมือนกับที่มีรายงานการเกิดนิ่วในถุงน้ำดี และ ท่อน้ำดีในตับ ในการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับจีน (*Clonorchis sinensis*) (Hon *et al.*, 1989; IARC, 1994)

พยาธิวิทยาของตับและท่อน้ำดีในโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ

พยาธิสภาพที่เกิดจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับพบได้ทั้งใบตับ ท่อน้ำดีในลำไส้ และ ถุงน้ำดี ซึ่งได้มีการศึกษาทั้งในคนและสัตว์ทดลอง (Tansurat, 1971; Bhamarapavati *et al.*, 1978; Koomprochan *et al.*, 1978; Harinasuta *et al.*, 1984; Riganti *et al.*, 1989) ความรุนแรงของพยาธิสภาพนั้นขึ้นอยู่กับทั้งปริมาณการติดเชื้อและระยะเวลาของการติดเชื้อ (Bhamarapavati *et al.*, 1978; Harinasuta *et al.*, 1984).

พยาธิวิทยาในคน

พยาธิสภาพของตับที่มีการติดเชื้อจำนวนมากจะมีขนาดใหญ่มากและมีน้ำหนักรวมมากขึ้น บางครั้งอาจถึงขนาดของน้ำหนักปกติ (3,000-3,500 กรัม หรือ มากกว่า) (Tansurat, 1971) ท่อน้ำดีที่อยู่ใต้ชั้นเคลือบหุ้มตับมีการขยายมากพร้อมกับมีนิ่วหรือหินนิ่ว (Hittam *et al.*, 1987; Riganti *et al.*, 1989) พยาธิสภาพของตับที่เห็นได้จากกล้องจุลทรรศน์ส่วนใหญ่พบในท่อน้ำดี โดยเฉพาะท่อน้ำดีขนาดเล็กขนาดใหญ่และขนาดกลางที่มีพยาธิอาศัยอยู่ (Riganti *et al.*, 1989) ในระยะแรกของการติดเชื้อหรือการติดเชื้อที่มีปริมาณน้อย Tansurat (1971) ไม่พบมีการเปลี่ยนแปลงในสีของและผนังท่อน้ำดีในลำไส้ในการศึกษาจากการตรวจศพ 70 ราย อย่างไรก็ตามในการติดเชื้อเรื้อรังพบมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อช่องเยื่อ และมีการพ่นตัวของผนังท่อน้ำดี (Riganti *et al.*, 1989) ได้รายงานลักษณะพยาธิสภาพที่พบบ่อย คือ desquamation of the biliary epithelium, epithelial hyperplasia, bile duct hyperplasia และ periductal fibrosis ส่วนเซลล์อักเสบที่แทรกเข้าไปส่วนใหญ่เป็นชนิด lymphocytes, monocytes, eosinophils และ plasma cells การอักเสบชนิดแกรนูโลมา (Granulomatous inflammation) พบได้บ่อยและถ้าพบมักจะพบในบริเวณที่มีการหลุดของไข่พยาธิเข้าไปในเนื้อเยื่อ (Viranuvatti & Summankarn, 1972; Riganti *et al.*, 1989) พยาธิสภาพทั้งที่ดูด้วยตาเปล่าและจากกล้องจุลทรรศน์ไม่แตกต่างกันระหว่างเด็กและผู้ใหญ่ แต่ถุงน้ำดีโต ถุงน้ำดีอักเสบเรื้อรัง และ มะเร็งท่อน้ำดี พบได้เฉพาะ ในผู้ใหญ่ (Riganti *et al.*, 1989).

สำหรับการศึกษาพยาธิสภาพของถุงน้ำดีในผู้ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับมีรายงานน้อยมาก ในผู้ที่มีการติดเชื้อจำนวนมากอาจพบตัวพยาธิในถุงน้ำดี ท่อน้ำดีรวม และ pancreatic duct (Pungpak *et al.*, 1985) เคยมีรายงานว่าพบพยาธิใบไม้ตับถึงกว่า 100 ตัวในถุงน้ำดีจากผู้ป่วยรายหนึ่ง (Evan *et al.*, 1971) อย่างไรก็ตามในคนทั่วไปที่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งมีการระบาดของพยาธิใบไม้ตับพบว่ามีเพียงพบตัวพยาธิอยู่ในถุงน้ำดีจากการศึกษาจากการตรวจศพผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากอุบัติเหตุ

จำนวน 181 ราย (Sulithaworn *et al.*, 1991) ลักษณะพยาธิสภาพภายนอกที่พบได้ในถุงน้ำดีที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ คือ ถุงน้ำดีมีขนาดใหญ่อขึ้น ซึ่งพบได้ทั้งในกรณีระยะแรก (Riganti *et al.*, 1989) และ ภายหลังการติดเชื้อโดยใช้อัตราส่วน (Dhiantin *et al.*, 1984; Elkins *et al.*, 1990; Mairiang *et al.*, 1992) นอกจากนี้ความผิดปกติของถุงน้ำดีที่พบในผู้ที่ติดเชื้อรุนแรงโดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ มี irregular or indistinct wall, sludge และ poor function (Elkins *et al.*, 1990; Mairiang *et al.*, 1992) ซึ่งความผิดปกติเหล่านี้จะคืนสู่สภาพปกติหลังจากการรักษาร่วมด้วยยาพยาธิ praziquantel (Mairiang *et al.*, 1993) ถุงน้ำดีพองน้ำ (Hydrops of the gall bladder) อาจพบได้ในรายที่มีการอุดตันของ cystic duct (Ujjin, 1961; Channavati *et al.*, 1976) ส่วนการเกิดนิ่วในถุงน้ำดีมีรายงานที่ไม่แน่ชัดเหมือนกับภาวะติดพยาธิใบไม้ตับเรื้อรัง (clonorchiasis) (IARC, 1994) อย่างไรก็ตาม biliary sludge ก็พบบ่อยในถุงน้ำดีของผู้ที่มีการติดเชื้อ *O. viverrini* รุ่นเก่า (Elkins *et al.*, 1990; Mairiang *et al.*, 1992) ไข่และตัวพยาธิใบไม้ตับก็มีรายงานในนิ่วในถุงน้ำดี ซึ่งอาจจะช่วยอธิบายความสัมพันธ์ได้บ้าง (Riganti *et al.*, 1988)

พยาธิสภาพของถุงน้ำดีจากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ประกอบด้วย adenomatous formation, hyperplasia, desquamation, proliferation of epithelial lining cells และ chronic inflammation (Tansurat, 1971; Harinasuta *et al.*, 1984; Riganti *et al.*, 1989) จากการศึกษารายการตรวจศพผู้ใหญ่ 22 คน และ เด็ก 7 คน พบว่า chronic cholecystitis พบได้บ่อยในผู้ใหญ่ (Riganti *et al.*, 1989) ส่วน granulomatous reactions รอบๆ ไข่พยาธิพบได้ไม่บ่อยนักในถุงน้ำดี (Viranuvatti & Stitnimankarn, 1972) ถึงแม้ว่าจะพบได้บ่อยกว่าในพยาธิชนิดอื่น เช่น *Schistosoma mansoni* (Rappaport *et al.*, 1973), *Fasciola hepatica* (Jones *et al.*, 1977; Acosta-Ferreira *et al.*, 1979) และ *C. sinensis* (Watson, 1918; Gibson & Sun, 1971)

พยาธิสภาพที่มีความรุนแรงมากที่สุดที่มีความสัมพันธ์อย่างสูงกับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ คือ มะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) ทั้งจากการศึกษาทางระบาดวิทยาและจากการศึกษาในสัตว์ทดลอง (IARC, 1994) บริเวณที่มีการระบาดของพยาธิใบไม้ตับก็มีความชุกของมะเร็งท่อน้ำดีสูง โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งมีรายงานอุบัติการณ์มะเร็งท่อน้ำดีสูงที่สุดในไทย (Harinasuta & Harinasuta, 1984; Vatanasapt *et al.*, 1990a) ความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถพบได้ในพยาธิใบไม้ตับเรื้อรังเช่นกันในไม่รุนแรงเท่าในประเทศไทย (Kim, 1984; Rim, 1986)

พยาธิวิทยาในสัตว์ทดลอง

การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาในสัตว์ทดลอง โดยเฉพาะในแฮมสเตอร์มีความคล้ายคลึงกับที่เกิดในคน Bhanarapravati *et al.* (1978) ได้บรรยายพยาธิสภาพในแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับไว้ดังนี้ ในระยะแรกของโรคติดเชื้อมีการอักเสบแบบเฉียบพลันใน second-order bile ducts และ portal connective tissue มีการตายของเนื้อเยื่อตับที่โฟกัส (Focal hemorrhagic and coagulation necrosis) เซลล์อักเสบที่แทรกเข้ามามี eosinophils, neutrophils และ mononuclear cells ส่วนท่อน้ำดีจะขยายใหญ่ขึ้นพร้อมกับการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือด และ goblet cells ในระยะที่สองของการติดเชื้อประมาณหนึ่งเดือนจะมี epithelial hyperplasia และ adenomatous formations ของท่อน้ำดี ส่วน Granulomatous responses ต่อตัวพยาธิและไข่ที่พบได้บ่อยเช่นกันและเชื่อว่าการหาย (Resolution) ของ granulomas นี้นำไปสู่การเกิด periductal และ periportal scarring ในระยะติดเชื้อเรื้อรังเป็นเวลานาน พยาธิสภาพในตับที่เด่นมี periportal และ periductal fibrosis ซึ่งก็สัมพันธ์กับรายงานที่มีการพบปริมาณของ type I และ type III collagen เพิ่มขึ้นในแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อเรื้อรัง (Bunadilok & Ruengwongsa, 1983; Chastigat & Ruengwongsa, 1986) ส่วนเซลล์อักเสบที่แทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อรอบๆ ท่อน้ำดีประกอบด้วย lymphocytes, monocytes, macrophages, eosinophils และ plasma cells (Bhanarapravati *et al.*, 1978) พยาธิสภาพของถุงน้ำดีในสัตว์ทดลองที่ติดเชื้อมีรายงานน้อยมาก Thamavit *et al.* (1987b) อธิบายดังนี้ เพื่อบ่งชี้ mucosal proliferation เท่านั้น

ความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี มีรายงานครั้งแรกในแฮมสเตอร์โดย Thamavit *et al.* (1978) โดยการให้พยาธิใบไม้ตับและสารก่อมะเร็ง dimethylnitrosamine หลังจากการรายงานชิ้นแรกนี้ก็มียางานสนับสนุนความสัมพันธ์นี้มาเรื่อยๆ (Flavell & Lucas, 1982; Flavell & Lucas, 1983; Thamavit *et al.*, 1987a,b; Thamavit *et al.*, 1988a,b; Thamavit *et al.*, 1993; Thamavit *et al.*, 1994)

กลไกการเกิดพยาธิสภาพในโรคพยาธิใบไม้ตับ

กลไกการเกิดพยาธิสภาพในการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับเชื่อกันว่าเกิดจากภาวะเสียดสีทางกายภาพระหว่างตัวพยาธิกับเนื้อเยื่อของท่อน้ำดี (mechanical irritation) และ/หรือ metabolic products ที่พยาธิใบไม้ตับขับออกมาออกมา (Tansurat, 1971; Viranuvasti & Stitnimankarn, 1972; Harinasuta *et al.*, 1984) อย่างไรก็ตามนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้อธิบายว่ามีลักษณะของโฮสต์ต่อพยาธิมีส่วนสำคัญในการทำให้เกิดโรค (Bhanarapravati *et al.*, 1978; Flavell & Flavell, 1986; Haswell-

Elkins *et al.*, 1991) โดยมีหลักฐานหลายอย่าง เช่น มี lymphocytes และ macrophages ในโพรงเยื่อรอบๆ peripartal area และ เชื่อว่าการทำลายเนื้อเยื่อในระยะเฉียบพลันเกิดจาก parasite factors ส่วนการเปลี่ยนแปลงเรื้อรังเป็น immunopathologic mechanisms (Bhattacharyya *et al.*, 1978) นอกจากนี้การทดลองของ Flavell & Flavell (1986) ก็สนับสนุนแนวคิดนี้โดยพบว่าแอนติบอดีที่ทำการคัดลอก thymus ของจิ้งหรีดทำให้มี T cell น้อย มี periductular inflammation น้อยกว่าหนูเพศเมียที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง เมื่อเร็วๆ นี้ Haswell-Elkins *et al.* (1991) ได้รายงานว่าความผิดปกติของถุงน้ำดีในผู้ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับมีความสัมพันธ์กับระดับของ parasite-specific IgG ในซีรัม และมีความสัมพันธ์มากกว่าความรุนแรงของอาการติดเชื้อ ส่วนปัจจัยทางด้านสารพิษที่ปล่อยจากตัวพยาธิที่ส่งผลต่อพยาธิสภาพยังไม่มีการรายงาน

Mucosal Inflammation And Immunopathology

พยาธิสภาพและกลไกการเกิดพยาธิสภาพของโรคถุงน้ำดีอักเสบที่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับมีการศึกษาน้อยมาก ที่เห็นได้ชัดมีเพียงรายงานการตรวจของถุงน้ำดีด้วยอัลตราซาวด์ซึ่งพบความผิดปกติหลายอย่าง คือ dilatation, indistinct wall, bile sludge และ poor function (Dhiansari *et al.*, 1984; Elkins *et al.*, 1990; Mairiang *et al.*, 1992, 1993) ลักษณะความผิดปกติเหล่านี้ไม่น่าจะเกิดจากตัวพยาธิโดยตรงเพราะในถุงน้ำดีมีรายงานตรวจพบตัวพยาธิใก้ยมาก (Sithithaworn *et al.*, 1991) ดังนั้นปัจจัยที่จะสามารถทำให้เกิดโรคได้น่าจะอยู่ในสารที่ปล่อยจากตัวพยาธิ (parasite products), ไข่ และ เปลือกหุ้มของพยาธิที่หลุดออกมาในน้ำดี แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาความสัมพันธ์ของตัวพยาธิ หรือ ภูมิคุ้มกัน ที่มีผลทำลายต่อถุงน้ำดียังไม่มี ดังนั้นจึงยังไม่สามารถอธิบายกลไกการเกิดพยาธิสภาพของโรคถุงน้ำดีอักเสบที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับได้

ในด้านบทบาทของภูมิคุ้มกันต่อพยาธิทำให้เกิดพยาธิสภาพมีการศึกษากันมากในพยาธิชนิดอื่น มีรายงานว่า Parasite-specific T cells หรือ antibodies ทำให้เกิดการอักเสบและพยาธิสภาพในโรค filariasis (Ottesen, 1992), schistosomiasis (Soet *et al.*, 1989; Sher & Coffman, 1992) และ onchocerciasis (Parkhouse & Harrison, 1989) ระดับของ parasite-specific antibody isotypes มีความสัมพันธ์กับอาการของโรค schistosomiasis (Jassim *et al.*, 1987) และ lymphatic and ocular filariasis (Hussain *et al.*, 1987) Activated T cells และ สาร lymphokines ที่หลั่งออกมาสามารถทำให้มีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเกือบทุกชนิดทั้ง T และ B cells, eosinophils, mast

cells และ macrophages (Befor & Bienstock, 1984; von Lichtenberg, 1987; MacKenzie *et al.*, 1987; Cox & Liew, 1992) T cells ซึ่งสามารถกระตุ้นทำให้มีการเพิ่มจำนวน goblet cells และ fibroblasts รวมทั้งการที่เซลล์เหล่านี้สร้าง cytokines และ collagen ด้วย (Miller, 1987) นอกจากนี้ยังเชื่อว่า T cells มีส่วนในการควบคุมการเจริญเติบโตและการซ่อมแซมเซลล์ชนิดต่างๆ ที่ไม่ใช่เซลล์ภูมิคุ้มกัน (Bienstock & Befor, 1980; Ernst *et al.*, 1985; Grossman & Herberman, 1986) การที่มีการอักเสบจะทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อ ในการศึกษาจรรยาบรรณของสหพันธ์การอักเสบในอุ้งน้ำดีและท่อน้ำดี (Viramvathan & Stimilakum, 1972; Bignon *et al.*, 1989) แต่อย่างไรก็ตามพยาธิสภาพที่เห็นนี้สามารถเกิดจากโรคอื่นก็ได้ จากประสบการณ์ของผู้วิจัยพบว่าเมื่อเกิดอุ้งน้ำดีจะเกิด autolysis แม้ว่าจะทำการตรวจสภาพของเยื่อช่องท้องหลังเสียชีวิตก็ตาม ดังนั้นการที่จะศึกษาพยาธิสภาพและกลไกการเกิดโรคอุ้งน้ำดีอีกแบบในโรพพยาธิใบไม้คืบไต่ได้ผลถูกต้องที่สุดจึงต้องทำในสัตว์ทดลองเท่านั้น

การศึกษาด้านพยาธิวิทยาของอุ้งน้ำดีและท่อน้ำดีนอกคืบไต่ร่วมกับการติดเชื้อพยาธิใบไม้คืบไต่ในครั้งนี้จะทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานทางด้านพยาธิวิทยาของอุ้งน้ำดีและท่อน้ำดีนอกคืบไต่รวมถึงการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของอุ้งน้ำดีก่อนและหลังการรักษาด้วยยา Praziquantel ซึ่งจะเ็นรายงานแรกที่มีการศึกษาโรคอุ้งน้ำดีและท่อน้ำดีนอกคืบไต่ร่วมกับการติดเชื้อพยาธิใบไม้คืบไต่อย่างเป็นระบบในแบบ Systematic study ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการอธิบายกลไกโรคพยาธิใบไม้คืบไต่ และ โรคอื่นๆ ที่มีความสัมพันธ์กัน เช่น นิ่วในอุ้งน้ำดี, มะเร็งท่อน้ำดี เป็นต้น ซึ่งเป็นปัญหาโดยเฉพาะในสถานะวันยกยาดิจนหม่นของประเทศไทย และสามารถนำไปใช้แนะนำร่วมกับการตรวจอื่นๆ เพื่อการป้องกันการเกิดโรคลักษณะดังกล่าวในกลุ่มประชากรที่มีความเสี่ยงหรืออาศัยอยู่ในบริเวณที่มีการระบาดของโรพพยาธิใบไม้คืบไต่

วัตถุประสงค์ของโครงการ

วัตถุประสงค์โดยรวม : การวิจัยครั้งนี้มีจุดประสงค์ที่จะศึกษาพยาธิสภาพของอุ้งน้ำดีและท่อน้ำดีรวม และการเปลี่ยนแปลงในหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อพยาธิใบไม้คืบไต่ในระยะเวลาต่างๆ กันทั้งก่อนและหลังการรักษาด้วย Praziquantel นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้ตั้งสมมติฐานว่า Immune response ต่อพยาธิใบไม้คืบไต่ทั้ง humoral และ cellular/inflammatory response มีส่วนสำคัญในการเกิดพยาธิสภาพของอุ้งน้ำดีและท่อน้ำดีรวม

วัตถุประสงค์จำเพาะ :

1. เพื่อศึกษาพยาธิวิทยาของอุ้งน้ำดีและท่อน้ำดีรวมของสัตว์ทดลองที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้คืบไต่ทั้งก่อนและหลังการรักษาด้วย Praziquantel

1. เพื่อศึกษาเซลล์อักเสบ คือ polymorphonuclear cell, eosinophils, lymphocytes and mast cells ในบางชิ้นค่าๆ ของอุ้งน้ำดีและท่อน้ำดีรวมในระยะต่างๆ ของการติดเชื้อ
2. เพื่อวัดระดับแอนติบอดี (IgG) ต่อพยาธิใบไม้ตับในซีรัมโดยวิธี ELISA
3. เพื่อตรวจนับไข่พยาธิใบไม้ตับในอุจจาระ
4. เพื่อตรวจหา *O. viverrini* antigens บนเยื่อบุท่อนทางเดินน้ำดีและในน้ำดี
5. หากทราบถึงพันธุ์ระหว่าง ทายึดสภาพที่ผลิตขึ้น ปริมาณพยาธิ จำนวนไข่พยาธิในอุจจาระ parasite antigens และ ระดับแอนติบอดีต่อพยาธิใบไม้ตับ

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

สารเคมี-วัสดุ และอุปกรณ์ที่สำคัญในการวิจัย

1. การแยก metacercariae

Pepsin powder (BDH, UK)

HCl (Merck, German)

Stereomicroscope (Nikon, Japan)

2. การเตรียมเนื้อเยื่อ Frozen section และ paraffin section

Rotary microtome (Leica, German)

Microtome disposable blades (Leica, German)

Automatic tissue processor (Leica, German)

Embedding center (Shandon, UK)

Cryostat (Lab-Tek, USA)

OCT compound (Lab-Tek, USA)

Paraffin (Fisher, USA)

Hematoxylin, eosin และ สีย้อมอื่นๆ (Merck, German)

Glass slide (Chung)

3. การย้อมย้อม Immunohistochemistry

Goat anti-rabbit IgG-biotinylated (Zymed, USA)

Rabbit anti-hamster IgG-biotinylated (Vector, USA)

Goat anti-rabbit-FITC (Zymed, USA)

Streptavidin-peroxidase (Zymed, USA)

3, 3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, USA)

Trizma base, Urea, PBS (Sigma, USA)

4. **การเตรียม** *Opisthorchis* antigens

Sonicator (Soniprep 150, England)

Refrigerate centrifuge (Beckman, USA)

Incubator (Heracus, German)

Penicillin, Streptomycin (Gibco, USA)

Phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF) (Sigma, USA)

Laurepoin (Sigma, USA)

N-[N'-L-3-trim-carboxyoxirum-2-carboxyl]-L-leucyl-L-arginine (1:64) (Sigma, USA)

Ultrafiltration (PM10, Amicon, USA)

UV spectrophotometer (Milton Roy 3000, USA)

Freeze dryer (Flexi-Dry™, FTS systems, USA)

Dialysis bag (Pierce, USA)

Dialyzer (Pope Scientific Inc., USA)

Protein detection kit (Bradford method, Bio-Rad, USA)

5. **การเตรียม** Rabbit hyperimmune serum และ สารละลาย Immunoglobulin G

Complete & incomplete Freund's adjuvant (Difco, USA)

Sephacrose 4B-Protein A (Zymed, USA)

Glycine (Amresco, USA)

Agarose (Gibco, USA)

6. **การวัด** ELISA & Sandwich ELISA

ELISA reader (Dynatech MR5000, USA)

Immunoplate (Nunc Maxisorp®, Denmark)

Multichannel pipette (Eppendorf, German)

Incubator (Heracus, German)

Tween 20 (Amresco, USA)

Sodium carbonate, PBS (Sigma)

Biotinylated anti-hamster IgG (Vector, USA)

Streptavidin-peroxidase (Zymed, USA)

Dimethyl formamide (Sigma, USA)

PZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-biotin (Pierce, USA)

Dialysis cassette (Pierce, USA)

7. Electrophoresis & immunoblotting

Mini Protein II electrophoresis unit (Bio-Rad, USA)

Semidry transfer cell (Bio-Rad, USA)

Acrylamide, bis-acrylamide, SDS, TEMED (Gibco, USA)

2-β mercaptoethanol (Sigma, USA)

Coomassie blue R250 (Merck, Germany)

Silver stain kit (Bio-Rad)

Nitrocellulose membrane (Bio-Rad, USA)

Chromatography paper (Bio-Rad, USA)

Puricon Red (Sigma, USA)

Goat anti-rabbit IgG-peroxidase (Zymed, USA)

Molecular weight marker (Bio-Rad, USA)

8. อุปกรณ์สำคัญอื่นๆ

Microscope (Olympus, Japan)

Image analyzer (Leica, German)

Fluorescence microscope (Olympus, Japan)

กรงเลี้ยงสัตว์ทดลอง

ตู้แช่แข็ง -20 °C และ -80 °C

ชุดผ่าตัดสัตว์ทดลอง

Micropipette & tip

สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษา คือ หนูแฮมสเตอร์ (Syrian golden hamster) เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์ จำนวนทั้งสิ้น 320 ตัว จากน่องสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ตัวอ่อนพยาธิใบไม้คืบ (metacercariae)

สถานที่เก็บตัวอย่างปลา: ตัวอย่างปลานีเกิ้ลส่วนใหญ่เป็นปลาขรรค์ ได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติในเขตอำเภอน้ำโสม จังหวัดขอนแก่น

การแยก metacercariae: นำปลาหมึกชนิด *metacercariae* ของพยาธิใบไม้ตับโดยวิธี *pepsin-HCl digestion* โดยทำการบดปลาให้ละเอียดจนละเอียดด้วย *Pepsin-HCl solution* ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าเนื้อปลาจะย่อยแล้วนำมากรองด้วย *sediment* ในน้ำเกลือหลายรอบด้วยตะแกรงที่มีขนาดรู (sieve) ต่างๆ กัน จนกระทั่งสุดท้ายได้ *metacercariae* ที่ก้นช่วงหลอดจึงนำมาคัดแยกเฉพาะ *metacercariae* ของพยาธิใบไม้ตับ

การเลี้ยงเชื้อตัวหนอน

Metacercariae ที่แยกได้นำมา infect หนูแฮมสเตอร์โดยใช้ *intragastric tube* พยาธิตัวหนอนจะพัฒนาไปเป็นตัวแก่ประมาณ 1 เดือน

การเตรียมแอนติเจนพยาธิใบไม้ตับ (*Opisthorchis antigen preparation*)

พยาธิใบไม้ตับตัวแก่จากหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับการติดเชื้อมาแล้ว 3-4 เดือน นำมาดว้อมเป็น *Opisthorchis somatic, excretory-secretory (ES)* และ *egg antigen* โดยประยุกต์วิธีของ Wongratanascheewin et al. (1988) และ Akai et al. (1992) คือรายละเอียดคร่าวๆ ดังนี้ นำพยาธิใบไม้ตับตัวแก่มาล้างในน้ำเกลือซึ่งมีกรดซัลฟิสิก (200 Unit penicillin + 200 Unit streptomycin) เพื่อเอาเยื่อเนื้อเยื่อ เลือด และ อื่นๆ ออกไปจนหมด ตัวที่ยังมีชีวิตอยู่จะนำไปเพาะเลี้ยงเพื่อเก็บ *ES antigen* ส่วนตัวที่ตายจะถูกนำมาแช่แข็งอย่างรวดเร็วในไนโตรเจนเหลวเพื่อเตรียมทำเป็น *somatic antigen* การเตรียม *somatic antigen* ทำได้โดยนำตัวพยาธิที่แช่แข็งมาบดในคอนเทนเนอร์ที่มีไนโตรเจนเหลวจนละเอียด แล้วนำมาละลายใน *phosphate buffered saline (PBS)* ที่มี *protease inhibitors* (0.1 mM PMSE, 1 mM EDTA, 1 mM leupeptin และ 0.1 mM N-[N-(L-)-trans-carboxyoxiran-2-carbonyl]-L-leucyl]-arginine, E-64) แล้วนำมา sonicate ด้วยเครื่อง *Ultrasonic disintegrator (Soniprep 150, MSE)* จากนั้นนำมาปั่นที่ 10000 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วดูด *supernatant* เบื้องที่ -70 องศาเซลเซียส

ส่วนการเตรียม *ES antigen* ทำโดยการเพาะเลี้ยงพยาธิใบไม้ตับที่ยังมีชีวิตอยู่ใน *modified Tyrode's buffer* (100 U penicillin + 100 U streptomycin + *protease inhibitors*) ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน และทำการเก็บ *ES antigen (media)* ทุก 24 ชั่วโมง ตัวพยาธิใบไม้ตับที่ตายจะถูกเก็บแยก จากนั้นนำ *culture media* ที่เก็บได้มารวมกันและปั่นเพื่อเก็บส่วน *supernatant* แล้วนำมา *concentrate* ด้วย *membrane ultrafiltration (PM 10, Amicon, Massachusetts)* และเก็บเป็น *ES antigen* ที่ -70 องศาเซลเซียส ส่วน *pellet* เป็นไข่พยาธิใบไม้ตับจะนำมาล้างด้วยน้ำเกลือหลายครั้งจนใส แล้วนำมาแช่แข็งและบดในไนโตรเจนเหลวเพื่อทำเป็น *egg antigen* เหมือนกับวิธีการเตรียม *somatic antigen* ข้างต้น

Opisthorchis antigens ที่ได้ทุกชนิดจะนำมาวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี *Bradford (Bio-Rad)* แอนติเจนเหล่านี้จะนำไปใช้ในการตรวจหาระดับ *antibody* ต่อพยาธิใบไม้ตับโดยวิธี *ELISA* และ

นำไปใช้ในการ immunize หนูตัวต่อเพื่อให้ได้ antibody ต่ *Opisthorchis* antigen ซึ่งจะนำมาใช้ในการตรวจหา *Opisthorchis* antigen บน surface epithelium ของถุงน้ำดีและท่อน้ำดีรวมโดยวิธี immunofluorescence และ วิธี immunoperoxidase ต่อไป

การ immunize หนูตัวต่อ

การวิจัยครั้งนี้ใช้เฉพาะ *Opisthorchis* antigen ชนิด ES และ somatic antigen ในการผลิตแอนติบอดีในหนูตัวต่อ ซึ่งทำได้โดยนำแอนติเจนมาผสมกับ complete Freund's adjuvant แล้วนำไปฉีด subcutaneous บริเวณโคนขาหลังทั้งสองข้างและแผ่นหลัง หลังจากนั้นสองอาทิตย์ก็ฉีด *Opisthorchis* antigen ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant แล้วฉีดอีก 2 ครั้งทุกหนึ่งอาทิตย์ หลังจากฉีดครั้งสุดท้ายหนึ่งอาทิตย์ก็ทำการเจาะเลือดหนูตัวต่อ แยกเอาส่วนซีรัมนำมาตรวจหา antibody โดยวิธี gel diffusion และ ELISA ถ้าระดับแอนติบอดีสูงพอก็นำมาแยก IgG fraction โดย Protein A-Sepharose 4B column แล้วเก็บที่ -20°C เพื่อนำไปใช้ในการตรวจหา *Opisthorchis* antigen ในเนื้อเยื่อต่อไป

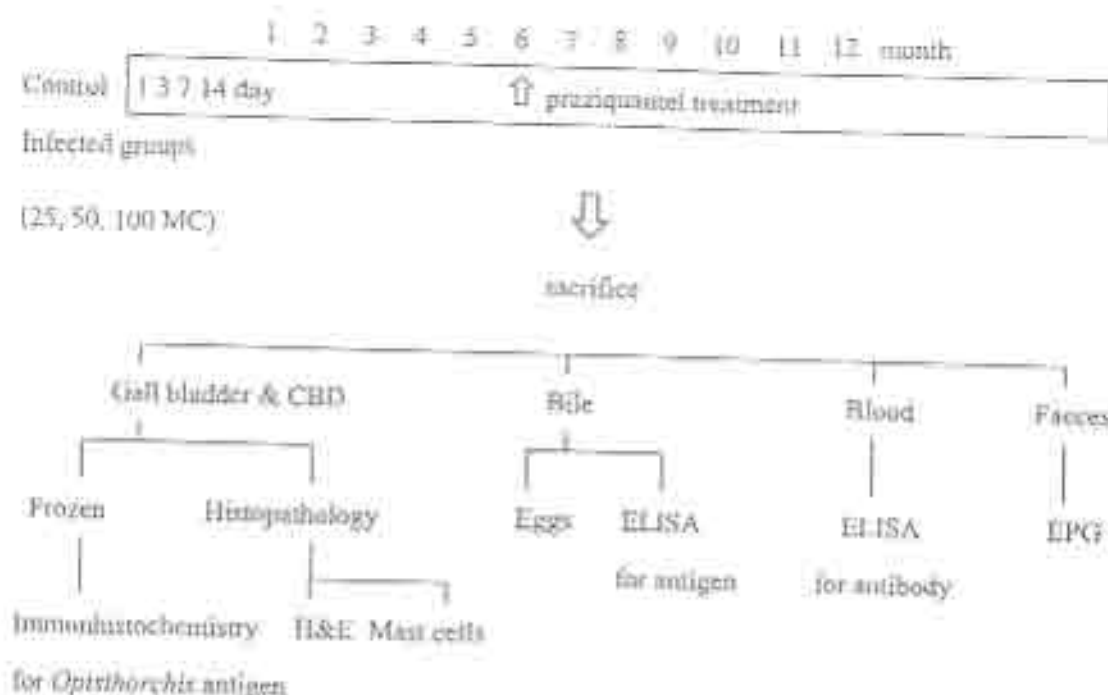
การแยก IgG fraction จากซีรัม

การแยก IgG fraction จากซีรัมกระด้างทำโดยวิธี Affinity column chromatography โดยใช้ Protein A-Sepharose 4B column (Zymed, USA) วิธีการโดยสังเขปมีดังนี้ ทำการ saturate column ด้วย Borate buffer, pH 8 แล้วเช็ดซีรัมใน column 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย buffer จน OD280 ได้น้อยกว่า 0.02 จากนั้นก็ทำการ elute IgG fraction ด้วย Glycine-HCl buffer, pH 2.8 และ neutralize ด้วย Tris buffer, pH 8 ทำการตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วยการวัด OD280 ทุก fraction นำ IgG fraction ที่ได้ที่มีค่า OD280 > 0.1 มารวมกันและ dialyze ใน PBS ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วทำการ concentrate โดยวิธี lyophilize ด้วยเครื่อง Freeze dryer แล้วนำ IgG anti-ES antigen และ IgG anti-somatic antigen ที่ได้ไปเก็บที่ -20°C องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการ conjugate กับ biotin เพื่อใช้ในการตรวจหาแอนติเจนในน้ำดีโดยวิธี Sandwich ELISA ต่อไป

Biotinylation of IgG

การ conjugate ระหว่าง IgG กับ Sulfo-NHS-LC-biotin (Pierce, USA) ทำตามวิธีที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำคือ ละลาย lyophilize IgG (2 mg/ml) ใน Borate buffer, pH 8 จำนวน 1 ml และ ละลาย biotin 1 mg ใน Dimethyl formamide 1 ml แล้ว pipette biotin solution 75 μl ลงใน IgG solution แล้วผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วและ incubate ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำไป dialyze ใน PBS ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดยทำการเปลี่ยน PBS ทุกๆ 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ Biotinylated IgG ไปปั่น 10000 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียส 30 นาที วัดปริมาณโปรตีน ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer แล้วทำการลบล้างที่ -70°C องศาเซลเซียส activity ของ biotinylated anti-ES และ biotinylated anti-somatic IgG ตรวจเช็คด้วยวิธี ELISA พบว่ามี titer 1:32,000 ทั้งสองชนิด

Experimental design



สัตว์ทดลองแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 80 ตัว คือ กลุ่มควบคุม (control) ได้รับน้ำเกลืออย่างเดียว, กลุ่มได้รับพยาธิ 25 metacercariae (MC), กลุ่มได้รับพยาธิ 50 MC และ กลุ่มได้รับพยาธิ 100 MC ตัวทดลองทุกกลุ่มจะถูกแยกจิ้ง 5 ตัวต่อกรง ให้น้ำและอาหารตามปกติเหมือนกันทุกกลุ่ม จากนั้นจะทำการฆ่าตัวทดลองทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง 5 ตัวต่อกลุ่มในวันที่ 1, 3, 7, 14 และ 30 แล้วหลังจากนั้นจะนำทุกชิ้นเพื่อจะดูการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของถุงน้ำดีและท่อน้ำดีรวมถึงแต่ละอะแซบพิตินและอะแซบเวอริง ในเดือนที่ 6 ตัวทดลองทุกกลุ่มจะได้รับยาฆ่าพยาธิ Praziquantel ขนาด 500 mg/kg/ตัว จำนวน 2 dose ติดต่อกัน แล้วทำการฆ่าตัวทดลองต่อทุกเดือนจนถึงเดือนที่ 12 (ตามรูป) เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาหลังการ treatment

การเก็บตัวอย่าง

ถุงน้ำดีและท่อน้ำดีรวม Aspirate เอน้ำดีออกแล้ว แล้วทำการ dissect เอาถุงน้ำดี, ตับ และท่อน้ำดีรวม รวมทั้งถ้าได้เล็กส่วนคั่นท่อน้ำดี นำถุงน้ำดีมาผ่าครึ่งตามแนวยาวและครึ่งหนึ่งนำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวแล้วตัด frozen section เพื่อตรวจหา *Opisthorchis* antigen บน surface epithelium ของถุงน้ำดีด้วยวิธี immunofluorescence ส่วนที่เหลือทั้งหมดนำไปปล่อยใน Carnoy's solution เพื่อศึกษาทางด้านพยาธิวิทยา mast cells และเซลล์อีกเส้นต่างๆ

น้ำดี น้ำดีที่ aspirate จากถุงน้ำดีนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งน้ำดี เริ่ม microcalculi, mucus เป็นต้น

เลือด เขย่าเลือดจากหัวใจแล้วปล่อยให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมง แล้วปั่นแยกเซรั่ม และนำไปเก็บที่ -20°C เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อพยาธิใบไม้ด้วยวิธี ELISA ต่อไป

อุจจาระ ทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระของสัตว์ทดลองที่ infect ด้วยพยาธิใบไม้ดิบทุกกลุ่ม ทุกอาทิตย์จนกระทั่งถึงห้าวันหลังจาก *praziquantel* treatment แล้วนำไปนับจำนวนไข่พยาธิค็อกวิน (eggs per gram, EPG) โดยวิธี quantitative formalin-ethylacetate concentration technique (Elkins *et al.*, 1986) เพื่อการเปลี่ยนแปลงการออกไข่ นอกจากนี้สัตว์ทดลองกลุ่มที่จะทำการฆ่าจะถูกนำ มาทดลองด้วยเป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนถึงกับอุจจาระหนึ่งวันก่อนทำการฆ่า (ยกเว้นกลุ่มที่ infect น้อย กว่า 14 วัน)

การศึกษาทางห้องปฏิบัติการ

1. *Histopathology* ชิ้นเนื้ออุ้งน้ำดีและท่อน้ำดีรวมนำมาเตรียมเป็น paraffin section และ สีย้อมด้วย hematoxylin & eosin เพื่อศึกษาทางพยาธิวิทยา โดยดูโรคพยาธิและการศึกษาในสาม body, fundus และ neck ส่วนท่อน้ำดีรวมจะศึกษาส่วนที่ว่างจนรอยต่อระหว่างลำไส้เล็กส่วนต้น 3 มิลลิเมตร นอกจากนี้ยังย้อมพิเศษ Masson trichrome และ Direct Red เพื่อดู fibrosis, ย้อม alcian blue-PAS เพื่อศึกษา mucin ใน surface epithelium Histologic feature ที่พบจะพยายาม grading เพื่อทำ semi-quantitative study

2. *Inflammatory cell types* ศึกษาชนิดและจำนวนของเซลล์อักเสบที่ infiltrate เข้าไปในชั้น epithelium, lamina propria, muscle และ subserosa ชิ้นอุ้งน้ำดีและท่อน้ำดีรวม เซลล์อักเสบที่ สามารถศึกษาได้ง่ายจาก H & E stained slide คือ polymorphonuclear cells, lymphocytes และ plasma cells ส่วน mast cells จะศึกษาจากการย้อมสีพิเศษ alcian blue-safranin O ตามวิธีของ Mayrhofer (1980) และทำการนับจำนวนเป็นเซลล์ต่อตารางมิลลิเมตรโดยใช้ Image analyzer

3. *Immunohistochemical study for Opisthorchis antigen on surface epithelium* Frozen section และ Paraffin section ของอุ้งน้ำดีและ ท่อน้ำดีรวม นำมาศึกษา Opisthorchis antigen โดยใช้ วิธี indirect immunofluorescence และ Avidin-biotin peroxidase method (Hsu *et al.*, 1981) โดยใช้ rabbit anti-Opisthorchis antigen ที่ได้เตรียมไว้แล้ว การย้อมทาง Immunofluorescence ทำได้โดย คัด frozen section แล้วตากให้แห้งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปโครมใน 95% ethanol เป็น เวลา 10 นาที ล้างด้วย PBS แล้ว incubate ใน rabbit anti-Opisthorchis antigen ที่เตรียมมา 30 นาที หลังจากล้างด้วย PBS ก็นำมาย้อมด้วย anti-rabbit-FITC เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย PBS และ mount ด้วย glycerol แล้วนำไปดูด้วยกล้อง Fluorescence และ ถ่ายภาพ

สำหรับวิธีการย้อม immunoperoxidase method ซึ่งใช้บ่อยมีวิธีการพอสังเขปดังนี้ นำ Paraffin section มาทำการ deparaffinization ใน xylene และ hydrate ใน alcohol แล้วทำการ ทำลาย endogenous peroxidase ใน 0.5% H_2O_2 - methanol เป็นเวลา 30 นาที ก่อนจะนำไปอบใน 5% Tris-urea ด้วย microwave เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง เพื่อทำลาย antigen unmasking หลังจาก

ทิ้งให้เย็นประมาณ 20 นาที ก่อน section ไป incubate ใน normal serum เพื่อจับตัว non-specific staining ก่อนนำไป incubate ขึ้นกับใน rabbit anti-*Opisthorchis* antigen ที่ได้เตรียมไว้ หลังจากนั้นล้าง excess antibody ออกแล้ว incubate ใน biotinylated anti-rabbit Ig เป็นเวลา 30 นาที และล้างด้วย PBS แล้ว incubate ด้วย streptavidin-peroxidase เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปล้างด้วย PBS และ develop สีใน DAB solution (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride), counterstain ด้วย Mayer's hematoxylin, dehydrate, clear และ mount ด้วย Permount®

4. Immunoassay of antibody to *Opisthorchis* by ELISA เพื่อศึกษาความสัมพันธ์กับดินอติด้วยพยาธิใบไม้ตับในจิ้งหรีดโดยใช้วิธี Avidin-biotin ELISA รายละเอียดได้เสนอไว้ในบทผลการศึกษา

5. Immunoblot เพื่อศึกษา *Opisthorchis* antigen profiles ในน้ำดีโดยใช้วิธี Immunoblot และ Sandwich ELISA เพื่อศึกษาว่ามีแถบคี่ของพยาธิใบไม้ตับในน้ำดีซึ่งสามารถกระตุ้น immune response ในถุงน้ำดีและต่อมตับรวมได้ การทำ Immunoblot ทำตามวิธีมาตรฐาน โดยการแยกแถบโปรตีนของ somatic antigen หรือน้ำดี ด้วยวิธี Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้ 11% running gel และ 4% stacking gel ทรานส์เฟอ: Mini-Protein II และ run Prestained molecular weight marker ตามคู่มือไปด้วย จากนั้นย้อมแถบโปรตีนด้วย Coomassie blue หรือ Silver stain แล้วย้ายดินบน gel ที่จะใช้ทำ Immunoblot จะถูกนำมา transfer protein ลงบน nitrocellulose membrane โดยใช้เครื่อง Semi-Dry transfer (Bio-Rad) โดยการแช่ nitrocellulose ใน Towbin buffer (Towbin, 1979) แล้ววางทับบนแผ่น gel ร่องด้วยกระดาษกรองทั้งสองด้าน ใช้กำลังไฟฟ้า 15 volts เป็นเวลา 15 นาที แล้วย้ายแผ่น nitrocellulose ที่ blot เสร็จเรียบร้อยแล้วมาทำการย้อมหา specific band ด้วยแอนติบอดีใน hyperimmune serum โดยการ block non-specific staining ด้วย 2% skim milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และล้างด้วย PBS-Tween (PBST) แล้ว incubate ใน Rabbit anti-somatic หรือ anti-infected serum หรือ anti-infected bile hyperimmune serum 1 ชั่วโมง แล้วล้าง และ develop สีด้วย DAB solution

6. Sandwich ELISA for *Opisthorchis* antigen ในน้ำดี โดยทำการ coat plate ด้วย Rabbit anti-somatic หรือ anti-ES antigen (IgG fraction) ปริมาณตั้งแต่ 1-10 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน แล้ว block non-specific binding ด้วย 5% skimmed milk ก่อนทำปฏิกิริยากับ Positive bile (+somatic antigen 1-20 $\mu\text{g/ml}$) และ Negative bile และตรวจวัด antibody binding ด้วย biotinylated anti-somatic or anti-ES IgG (1:500-1:10000) และ streptavidin-peroxidase (1:10000) แล้วทำให้เกิดสีโดย OPD-substrate solution และ วัด O.D.490 Dilution & conditions ที่เหมาะสมทำการ titrate โดยการทำให้ checkerboard titration และเลือก Dilution & conditions ที่ Negative bile มีค่า (background) น้อยที่สุด และ Positive bile สูงที่สุด

7. *Statistical analysis* การศึกษาครั้งนี้มีบทภาคจะศึกษาด้าน descriptive แล้วจึงเน้นในเรื่องการเปรียบเทียบพยาธิสภาพเป็นแบบ semi-quantitative และ quantitative ด้วย ข้อมูลทุกอย่างในการทดลองครั้งนี้จะมีจำนวนมากจึงจำเป็นต้องเก็บข้อมูลไว้ในไฟล์คอมพิวเตอร์โดยใช้โปรแกรมฐานข้อมูล Paradox version 4 และวิเคราะห์ข้อมูลด้วย SPSS/PC+ software package version 4.01 ข้อมูลที่เป็น quantitative เช่น จำนวน eos cells ในแต่ละชิ้น, ค่า O.D. จาก ELISA, ค่าที่ได้จากการวัดพื้นที่โดยการใช้อิมเมจ analyzer เป็นต้น จะนำมาทดสอบว่ามีการกระจายแบบ normal distribution หรือไม่โดยใช้ Kolmogorov-Smirnov test ถ้าหากข้อมูลไม่มีการกระจายแบบปกติอาจต้อง transform ให้กระจายเป็นแบบปกติก่อนแล้วจึงนำไปทดสอบ parametric statistics เช่น ANOVA เพื่อทดสอบความแตกต่างของ mean เป็นต้น การหาความสัมพันธ์ระหว่าง quantitative variables เช่น EPG กับ antibody levels ใช้การทดสอบ Pearson's correlation coefficient การทดสอบอื่นๆ จะเลือกใช้ตามหลักสถิติที่เหมาะสม

ขอบเขตของการวิจัย

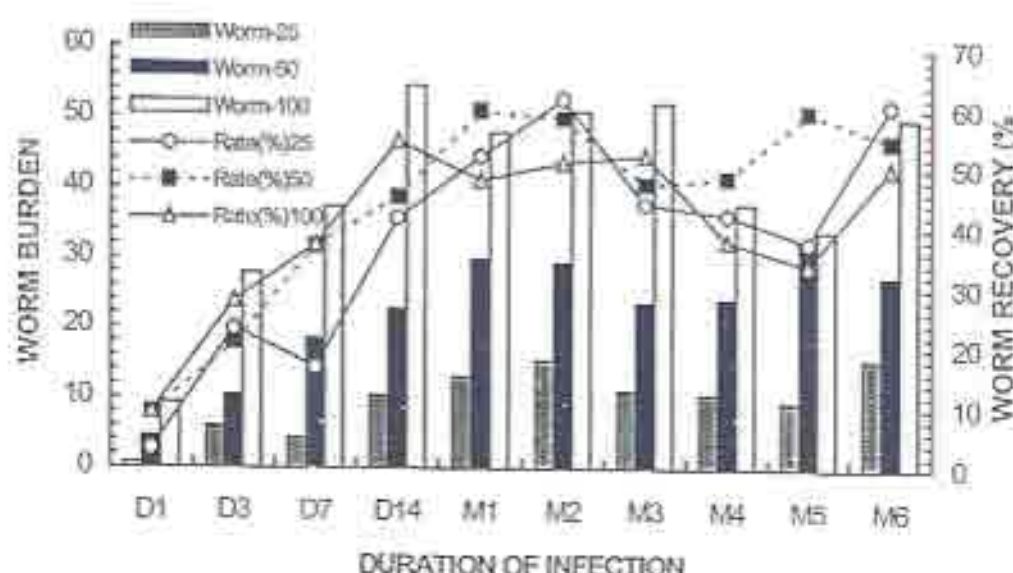
การวิจัยครั้งนี้จะทำการศึกษาพยาธิสภาพของอุ้งน้ำคัสและท่อน้ำดีรวมในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อมาจากไขว้ใบไม้ดิบโดยจะดูพยาธิสภาพตั้งแต่ระยะเฉียบพลันและระยะเรื้อรังเป็นระยะเวลา 6 เดือน และหลังจากนั้นก็จะทำการ test ด้วยชุด Paraziquantel แล้วดูการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาต่ออีกเป็นเวลา 6 เดือน การศึกษาทางพยาธิวิทยาพยายาม quantify หรือ semi-quantify พยาธิสภาพแต่ละชนิดให้มากที่สุดเพื่อเป็นรูปแบบของ quantitative study นอกจากนี้การวิจัยครั้งนี้ยังจะศึกษากลไกการเกิดโรค (pathogenesis) อีกด้วย โดยคณะผู้วิจัยเชื่อว่า immunoinflammatory response ต่อพยาธิใบไม้ดิบมีผลทำให้เกิดการอักเสบและพยาธิสภาพต่างๆ ตามมา ดังนั้นจึงทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่าง intensity of infection โดยดูจากการตรวจนับไข่ในอุจจาระ (EPG), *Opisthorchis* antigen ในน้ำคัสและบน biliary epithelium ซึ่งอาจเป็นตัวกระตุ้น immune response, specific antibody levels, จำนวนของเซลล์อักเสบแต่ละชนิด และพยาธิสภาพที่เกิดขึ้น

บทที่ 3

ผลการศึกษา

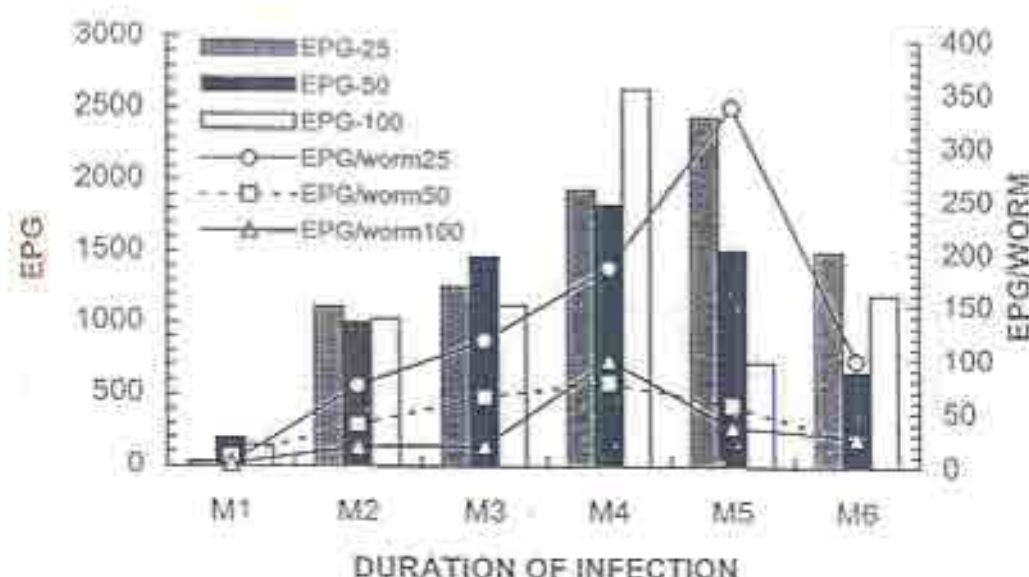
การศึกษาทางปรีคลินิก

การวัด worm recovery และ worm recovery rate (%) ในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อด้วย 25, 50 และ 100 metacercariae (MC) แสดงไว้ในรูปที่ 3.1 พบว่าในระยะที่ตัวพยาธิยังไม่โตจนโตเป็นฟัวแก่ พยาธิมีขนาดเล็กบางตัวจึงทำให้การเก็บและนับตัวพยาธิที่หลุดออกได้ทำให้นิ worm recovery rate ก่อนต่ำลง แต่หลังจากที่พยาธิพัฒนาเป็นตัวเต็มตัวแล้วจะได้ yield สูงขึ้น โดยเฉลี่ยตลอดระยะติดเชื้อ 6 เดือน เป็น 50%, 55.2% และ 46.7 % ในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน และ ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติตลอดระยะเวลาของการทดลอง หลังการรักษาด้วยยา Praziquantel ไม่พบตัวพยาธิทั้งในดิน อุ้งน้ำดินและอุ้งน้ำดินยกกลับ



รูปที่ 3.1 แสดง worm recovery และ worm recovery rate (%) ในแฮมสเตอร์กลุ่มต่างๆ และ ระยะเวลาในการติดเชื้อ

ใช้ทอรัสสามกรวดตรวจพบได้ในมูลของสัตว์ทดลองในเดือนที่ 1 หลังการติดเชื้อทุกตัวในกลุ่มที่ติดเชื้อด้วย 50 และ 100 MC ส่วนกลุ่มที่ติดเชื้อด้วย 25 MC ตรวจพบไข่พยาธิใบไม้ตับได้เพียง 2 ใน 5 ตัว (40%) การศึกษาการออกไข่โดยการดูปริมาณไข่พยาธิคอต | กรวินนุณสมศเคอร์ (EPG) พบว่าปริมาณการออกไข่จะค่อยๆ สูงขึ้นและสูงสุดในเดือนที่ 4 ในกลุ่มที่ติดเชื้อด้วย 50 และ 100 MC (ค่าเฉลี่ย EPG = 1839 และ 2649.6 ตามลำดับ) และ ในเดือนที่ 5 สำหรับกลุ่มที่ติดเชื้อด้วย 25 MC (ค่าเฉลี่ย EPG = 2461.2) ที่น่าสนใจคือการลดลงของปริมาณ EPG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มที่ติดเชื้อด้วย 50 และ 100 MC ในเดือนที่ 5 และ 6 (T-test, $p < 0.05$) ส่วนในกลุ่มที่ 2 (25 MC) พบว่าปริมาณการตรวจพบไข่ก็ลดลงทำนองเดียวกันกับกลุ่มที่ติดเชื้อด้วย 50 MC และ 100 MC แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จำนวนพยาธิที่นับได้ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณไข่ (EPG) ในทุกกลุ่มการทดลอง (Pearson correlation, $r = -0.073$, $p > 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่ามีความสัมพันธ์แบบตรงกันข้าม (inverse correlation) ระหว่างปริมาณพยาธิ (worm burden) และ ปริมาณไข่พยาธิคอตตัว (EPG/worm; $r = -0.542$, $p < 0.01$) นั่นคือ ถ้ามีปริมาณพยาธิมากก็จะพบปริมาณไข่คอตตัวน้อยๆ จากการวิเคราะห์ด้วยสถิติขั้นสูงหลายตัวแปร (Multivariate analysis) พบว่า พยาธิชนิดคอตตัวในกลุ่มที่ติดเชื้อ 25 MC มีปริมาณ EPG/worm สูงกว่ากลุ่มที่ติดเชื้อด้วย 50 และ 100 MC อย่างมีนัยสำคัญ (ANOVA, $p < 0.05$) นอกจากนี้ปริมาณ EPG/worm ยังมีความสัมพันธ์กับ EPG ด้วย ($r = 0.744$, $p < 0.01$) รายละเอียดของปริมาณ EPG และ EPG/worm ในแต่ละช่วงเวลาของการติดเชื้อได้แสดงในรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 แสดง EPG และ EPG/worm ในแฮมสเตอร์กลุ่มต่างๆ และ ระยะเวลาในการติด

การศึกษาทางภูมิโมโนโคลี

Standardisation of Avidin-biotin-peroxidase ELISA

คณะผู้วิจัยได้พัฒนาเทคนิคการวัดระดับแอนติบอดีต่อ ES antigen, somatic antigen และ egg antigen ของพยาธิใบไม้ตับโดยวิธี Avidin-biotin-peroxidase ELISA ซึ่งมีหลักการคร่าวๆ คือ ทำเอา coat plate ด้วยแอนติเจนแต่ละชนิดที่ 4 องศาเซลเซียส จุ่มคืน แล้ว block non-specific binding ด้วย 3% skimmed milk ก่อนทำปฏิกิริยากับ Positive reference serum และ Negative reference serum และตรวจวัด antibody binding ด้วย biotinylated anti-hamster IgG และ streptavidin-peroxidase แล้วทำโหนดสีโดย OPD-substrate solution และ วัด O.D.490 Dilution & conditions ที่เหมาะสมได้จากการ titrate โดยการทำ checkerboard titration และเลือก Dilution & conditions ที่ Negative reference serum มีค่า (background) น้อยที่สุด และ Positive reference serum มีค่าสูงที่สุด จากการศึกษากันครั้งนี้พบว่าค่า Dilution ของสารต่างๆ ที่เหมาะสมในการตรวจวัดระดับแอนติบอดีต่อแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับแต่ละชนิด ให้ผลในตารางข้างล่างนี้

Antigen	Antigen for plate coating (μg)	Serum dilution	Dilution of biotinylated Ab	Dilution of streptavidin-HRP
ES antigen	1	1:8,000	1:16,000	1:40,000
Somatic antigen	1	1:8,000	1:8,000	1:20,000
Egg antigen	1	1:4,000	1:8,000	1:20,000

ถ้าหาวัน conditions ที่เหมาะสมในการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อแอนติเจนทั้ง 3 ชนิด คือ coat plate ด้วยแอนติเจนที่ 4 องศาเซลเซียส จุ่มคืน, block ด้วย 3% skimmed milk 1 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส, incubate ในซีรัม 1 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส และ ทำปฏิกิริยากับ biotinylated antibody และ streptavidin-peroxidase อย่างละ 20 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส แล้ว Develop สี ด้วย OPD substrate solution จนได้สีที่เหมาะสม

จากข้อมูลการ standardization นี้พบว่าแอนติบอดีที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับจะมีระดับแอนติบอดีต่อ ES antigen มากกว่า somatic และ egg antigen อย่างน้อย 2-8 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ standard sera เดียวกันและปริมาณโปรตีนที่เท่ากัน และ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี Indirect ELISA ส่วนใหญ่ปริมาณแอนติเจนที่ใช้ coat plate ประมาณ 5 $\mu\text{g}/\text{well}$ (Wongrasameewin & Sirisinha, 1987¹; Chawengkirtikul & Sirisinha, 1988²) เปรียบเทียบกับ 1 $\mu\text{g}/\text{well}$ ในการศึกษาครั้ง

¹ Wongrasameewin S. & Sirisinha S. (1987) *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* 18: 511-526

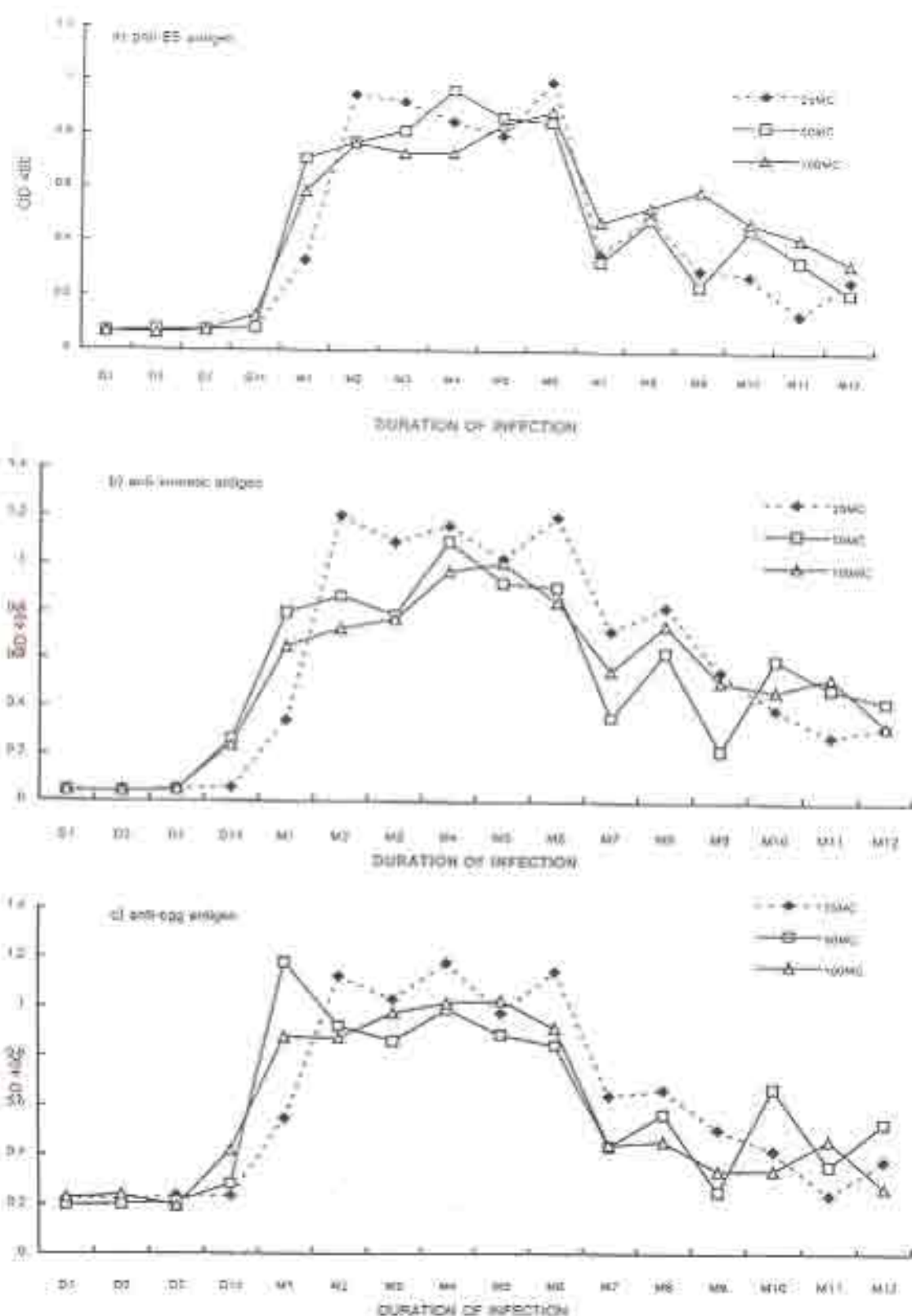
² Chawengkirtikul R. & Sirisinha S. (1988) *Am J Parasitol* 69: 731-737

นี้ นอกเหนือ (serum dilution) ก็มากกว่าในการศึกษาครั้งนี้ ทำให้มี background น้อยมาก ($OD_{492} = 0.07 \pm 0.07$ สำหรับ ES และ $OD_{492} = 0.05 \pm 0.03$ สำหรับ somatic antigen) ส่วนการศึกษาระดับแอนติบอดีต่อ egg antigen โดยวิธี ELISA ยังไม่พบมีรายงาน และในรายงานครั้งนี้พบว่า background เป็นศูนย์ (negative control sera (OD_{492} น้อยกว่า 0.2)

การศึกษาระดับแอนติบอดีต่อแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ

จากรูปที่ 3.3 ซึ่งเป็นสรุปภาพรวมของระดับแอนติบอดีต่อแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับทั้งชนิด ES, somatic และ egg antigens ทั้งก่อนและหลังการรักษาด้วยยาฆ่าพยาธิ Praziquantel พบว่าแอนติบอดีต่อพยาธิใบไม้ตับสามารถตรวจพบได้อย่างชัดเจนในซีรัมตั้งแต่วันที่ 14 หลังการติดเชื้อในหนูทดลองตัวแรก รูปแบบโดยรวมของการเปลี่ยนแปลงของระดับแอนติบอดีต่อแอนติเจนชนิดต่างๆ ก่อนข้างใกล้ถึงกันในแต่ละกลุ่มที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในปริมาณต่างๆ กัน ในช่วงเวลาที่ผลแรกของการติดเชื้อไม่พบว่ามีแอนติบอดีต่อแอนติเจนทุกชนิดในหนูทุกกลุ่มการทดลอง และระดับของแอนติบอดีที่ตรวจพบได้ในวันที่ 14 หลังการติดเชื้อในกลุ่มที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ 50 MC และ 100 MC ส่วนในกลุ่มที่ติดเชื้อ 25 MC จะเริ่มตรวจพบอย่างเห็นได้ชัดในเดือนที่ 1 และหลังจากนั้นระดับแอนติบอดีจะสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในทุกกลุ่มจนถึงระดับ Plateau ในเดือนที่ 1 สำหรับกลุ่มที่ติดเชื้อ 30 MC และ 100 MC ส่วนกลุ่มที่ติดเชื้อ 25 MC จะเป็นเดือนที่ 2 หลังการติดเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบระดับของแอนติบอดีในช่วงหนึ่งเดือนแรกพบว่าระยะแรก (1-14 วัน) ระดับแอนติบอดีเริ่มเพิ่มขึ้นแต่มีปริมาณไม่มากนัก และระยะที่ 2 (1 เดือน) พบว่ามีระดับแอนติบอดีสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มติดเชื้อด้วยกันจะพบว่าระดับแอนติบอดีในกลุ่มที่ติดเชื้อปริมาณมากจะมีระดับแอนติบอดีขึ้นสูงเร็วกว่ากลุ่มที่ติดเชื้อปริมาณน้อย โดยเฉพาะแอนติบอดีต่อ ES และ somatic antigens ในแฮมสเตอร์กลุ่มที่ติดเชื้อ 30 MC และ 100 MC พบว่ามีระดับสูงกว่ากลุ่ม 25 MC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ANOVA, $p < 0.05$) ที่น่าสนใจมากในเดือนที่ 1 คือ ระดับแอนติบอดีต่อ egg antigen ได้เพิ่มสูงขึ้นมากในกลุ่มที่ 2 (50 MC) มากกว่ากลุ่มติดเชื้ออื่นๆ (ANOVA, $p < 0.05$)

ตั้งแต่เดือนที่สองเป็นต้นไปก็เข้าสู่ระยะการติดเชื้อเรื้อรังและพบว่าระดับของแอนติบอดีไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนักและไม่แตกต่างกันจนถึงก่อนการรักษา (ANOVA, $p > 0.05$) อย่างไรก็ตามที่น่าสนใจมาก คือ ระดับแอนติบอดีต่อ egg และ somatic antigen หลังการติดเชื้อสองเดือนขึ้นไปในกลุ่มที่ติดเชื้อด้วย 25 MC สูงมากกว่ากลุ่มที่ติดเชื้อด้วย 30 MC และ 100 MC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ANOVA, $p < 0.05$ และ $p < 0.005$ ตามลำดับ) ส่วนสำหรับ ES antigen นั้นก็มีรูปแบบคล้ายกันแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ หลังจากการรักษาด้วยยา Praziquantel ในเดือนที่ 6 แล้วพบว่าระดับแอนติบอดีต่อทุกแอนติเจนลดลงอย่างรวดเร็วอย่างมีนัยสำคัญในเดือนที่ 7 (ANOVA, $p < 0.01$) แล้วจึงค่อยๆ ลดลงค่อยๆ เปลี่ยนแปลงเล็กน้อยจนเข้าสู่สภาวะทดลอง



รูปที่ 3.3 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับแอนติบอดีต่อ ES (a), somatic (b) และ egg antigen (c) ในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในปริมาณ 100 MC, 50 MC และ 25 MC และในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ทั้งก่อนและหลังการรักษาจนถึงวันที่ 6 (D=day, M=month)

ความสัมพันธ์ระหว่างระดับแอนติบอดีและปริมาณการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ

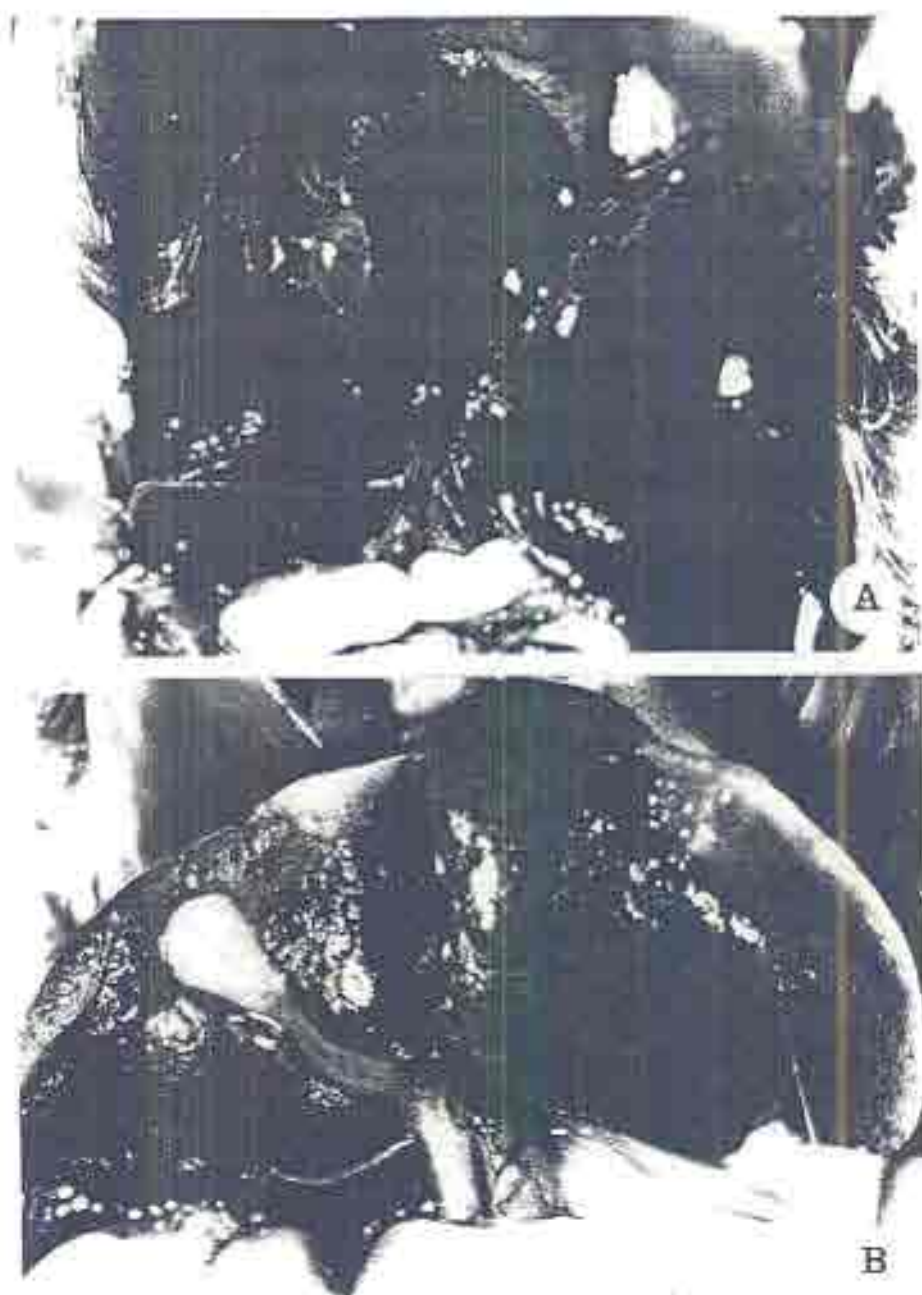
ความสัมพันธ์ระหว่างระดับแอนติบอดีต่อแอนติเจนชนิดต่างๆ ของพยาธิใบไม้ตับกับปริมาณการติดเชื้อซึ่งประเมินจาก worm burden และ EPG โดยวิธีทางห้องแล็บเมื่อเดือนแรกที่ตรวจพบไข่จนถึงเดือนที่ 6 ก่อนการรักษา พบว่าในช่วงเดือนที่ 1 หลังการติดเชื้อ ระดับแอนติบอดีต่อ ES antigen มีความสัมพันธ์กับ worm burden ($r = 0.519, p < 0.05$) และ ระดับแอนติบอดีต่อ somatic antigen มีความสัมพันธ์กับ EPG ($r = 0.371, p < 0.05$) ที่น่าสนใจในเดือนที่ 1 คือ การที่ระดับของแอนติบอดีต่อ egg antigen สูงขึ้นมากในกลุ่มที่ติดเชื้อด้วย 50 MC ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น เมื่อคณะผู้วิจัยได้ตรวจสอบในรายละเอียดพบว่า ปริมาณ EPG ในกลุ่มนี้ (EPG = 191.6) มากกว่ากลุ่มที่ติดเชื้อด้วย 25 และ 100 MC (EPG = 29.6 และ 151 ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังพบว่าระดับของแอนติบอดีต่อ egg antigen ในกลุ่มนี้ยังมีความสัมพันธ์กับค่าเฉลี่ย EPG ด้วย ($r = 0.578, p < 0.05$) หลังจากการติดเชื้อเกินหนึ่งเดือนไปแล้วจนถึงก่อนการรักษาพบว่าระดับแอนติบอดีต่อแอนติเจนแต่ละชนิดไม่มีความสัมพันธ์กับ worm burden และ EPG เลย ยกเว้นระดับแอนติบอดีต่อ somatic antigen ที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณ EPG ($r = 0.215, p < 0.05$) ส่วนหลังการรักษารวบรวมไม่พบไข่พยาธิตั้งแต่เดือนที่ 7 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง และ ระดับแอนติบอดีต่อทุกแอนติเจนที่เริ่มลดลงตามลำดับแต่ก็ยังสูงกว่าค่าปกติก่อนการติดเชื้อ อย่างไรก็ตามการลดลงของระดับแอนติบอดีต่อ ES antigen (รูปที่ 3.3 a) มีแนวโน้มว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณพยาธิที่ติดเชื้อเข้าไปก่อนการรักษา มากกว่าแอนติบอดีต่อแอนติเจนชนิดอื่นๆ

การศึกษาทางพยาธิวิทยา

Gross Pathology

ลักษณะทางกายวิภาคภายนอกของถุงน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับในหนูแฮมสเตอร์ที่ปกติพบว่าจะมีลักษณะบางใส (translucent) ท่อน้ำดีนอกตับมีขนาดเล็กน้อยมองเห็น ส่วนตับที่อยู่ติดกันที่มีผิวเรียบและมีขนาดปกติ สำหรับแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในช่วง 14 วันแรกหลังการติดเชื้อแทบไม่พบความผิดปกติภายนอกในหนูทุกกลุ่ม หลังจากนั้นหนึ่งเดือนเป็นต้นไปจะพบว่าถุงน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับจะมีลักษณะสีขาวขุ่นขึ้นตามลำดับ โดยเฉพาะในกลุ่มที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับปริมาณมาก (100 MC) อย่างไรก็ตามการสังเกตความขุ่นหรือการหนาตัวของผนังถุงน้ำดีจากตาเปล่าเพื่อทำการ grading ก่อนจึงทำได้ยากเนื่องจากภาวะการทศตัวของถุงน้ำดีและปริมาณของน้ำดีที่อยู่ในถุงน้ำดี แต่ที่เห็นความผิดปกติได้ชัดเจน คือ การหนาตัว และ การขยายขนาดของท่อน้ำดีนอกตับ และ lymphoid nodules ในการติดเชื้อพยาธิตั้งแต่ 3 เดือนขึ้นไป ตัวพยาธิพบได้เสมอในท่อน้ำดีนอกตับ และ พบได้บ่อยในถุงน้ำดีโดยเฉพาะในกลุ่มที่ติดเชื้อปริมาณมาก หลังการรักษาด้วยยา Praziquantel พบว่าลักษณะของถุงน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับในระยะแรกๆ ในทุกกลุ่มการทดลองยังมีลักษณะไม่แตกต่างจากก่อนการรักษา ยังมีความขุ่นของผนังถุงน้ำดีและท่อน้ำดีรวมอยู่

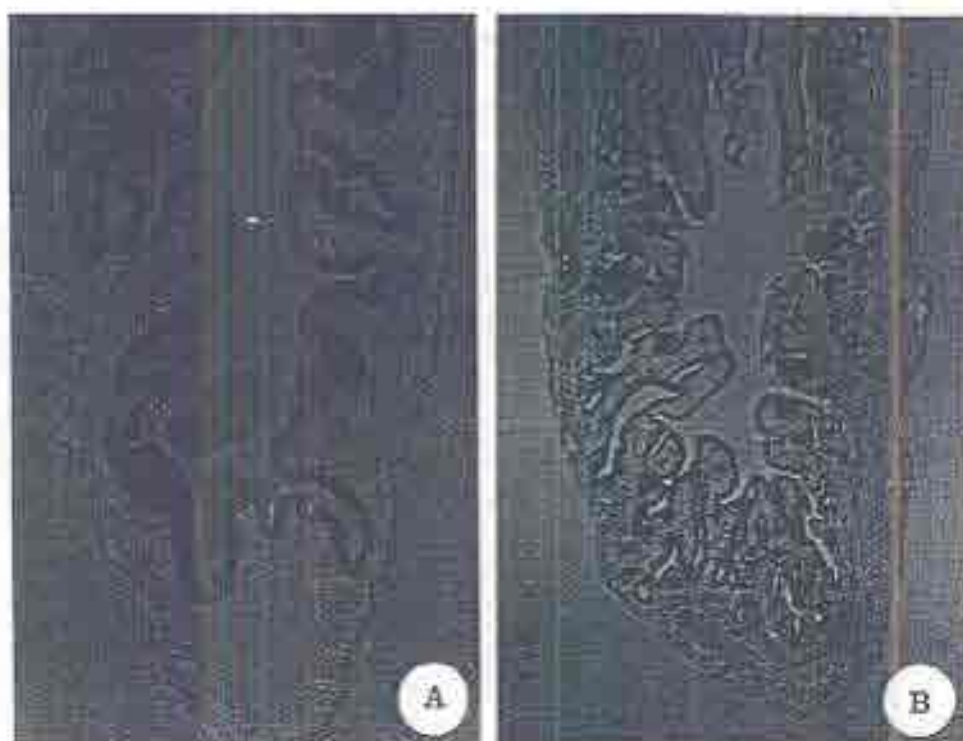
และที่เห็นได้ชัดเจนคือขนาดของท่อน้ำดินยกคืบมีขนาดเล็กลงแต่ยังมีความชุ่มอยู่ ลักษณะพยาธิสภาพภายนอกที่เริ่มลดลงเห็นได้ชัดคือในกลุ่มที่คิดเชื้อ 25 MC ซึ่งจะมีลักษณะเกาะเป็นปึกคืบมีเส้นอุลภาวทดลองในเดือนที่ 12 ส่วนในกลุ่มที่เห็ดมีพยาธิสภาพลดลงแต่ก็ยังมีความชุ่มของคืบเล็กน้อย คิวข่างลักษณะภายนอกของถุงน้ำคืบและท่อน้ำดินนอกคืบที่ปกคืบและที่คิดเชื้อได้แสดงในรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 ลักษณะภายนอกของคืบ ถุงน้ำคืบ และท่อน้ำดินนอกคืบของเห็ดเตอรี่ปกติ (A) และเห็ดเตอรี่ปกติที่คิดเชื้อพยาธิใบไม้คืบ 100 MC เป็นเวลา 6 เดือน (B)

ลักษณะทางพยาธิวิทยาภายใน (Histopathology)

รายละเอียดสรุปลักษณะและความรุนแรงของพยาธิสภาพของถุงน้ำดีและท่อน้ำดีรวมในแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับปริมาณต่างๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.2 พบว่าพยาธิสภาพในถุงน้ำดีเริ่มพบในวันที่ 7 หลังการติดเชื้อในกลุ่ม 100 และ 50 metacercariae ส่วนกลุ่มที่ติดเชื้อด้วย 25 metacercariae จะพบพยาธิสภาพได้ในวันที่ 14 หลังการติดเชื้อ พยาธิสภาพในช่วงแรกที่มี edematous villi, congestion และ มี neutrophil infiltration ในชั้น lamina propria เล็กน้อย ในวันที่ 30 พบมีพยาธิสภาพเด่นชัดมากขึ้นในทุกกลุ่มตามปริมาณการติดเชื้อ มีเซลล์อักเสบทั้งชนิด neutrophils, mononuclear cells ในชั้น lamina propria, muscle และ subserosa ในเดือนที่ 2 จนถึงเดือนที่ 6 การอักเสบมีมากขึ้นเล็กน้อย เซลล์อักเสบส่วนใหญ่เป็น plasma cells และ lymphocytes บางครั้งพบเป็น lymphoid aggregates ส่วน neutrophils ยังคงมีอยู่บ้างเล็กน้อยแสดงให้เห็นว่าเป็น subacute inflammation ส่วน eosinophils ต่อกันบ้างน้อย พยาธิสภาพที่เด่นชัดในช่วงตั้งแต่เดือนที่ 2 และ 3 เป็นต้นไปอีกอย่างหนึ่ง คือ การหนาตัวของผนังถุงน้ำดีและมี fibrosis ส่วนการเปลี่ยนแปลงของ surface epithelium ไม่เด่นชัดนักแต่ในช่วงเดือนที่ 3 เป็นต้นไปพบว่าบางบริเวณที่มีพยาธิอาศัยอยู่จะเห็น villous atrophy และ ไม่พบ goblet cell metaplasia ในซอกติ่งของผนังถุงน้ำดีโดยยกเว้นบริเวณที่มีตัวพยาธิ ตัวอย่างภาพพยาธิสภาพของถุงน้ำดีได้แสดงไว้ในรูปที่ 3.5 (A,B)



รูปที่ 3.5 เนื้อเยื่อถุงน้ำดีปกติ (A) และ เนื้อเยื่อถุงน้ำดีที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับจำนวน 100 MC เป็นเวลา 4 เดือน (B) แสดงเซลล์อักเสบที่เพิ่มมากขึ้น mucosal hyperplasia และ fibrosis ของผนังถุงน้ำดี [Original magnification 100X (A) and 40X (B)]

ตารางที่ 2 ตารางสรุปลักษณะและความรุนแรงของพยาธิสภาพของถุงน้ำดีและท่อร่วมลำไส้เล็กชั้นหยาบที่ไม่ได้รับปริมาณเลือดจากหลอดเลือดต่างถิ่น ยับ
ก่อนและหลังการรักษายา

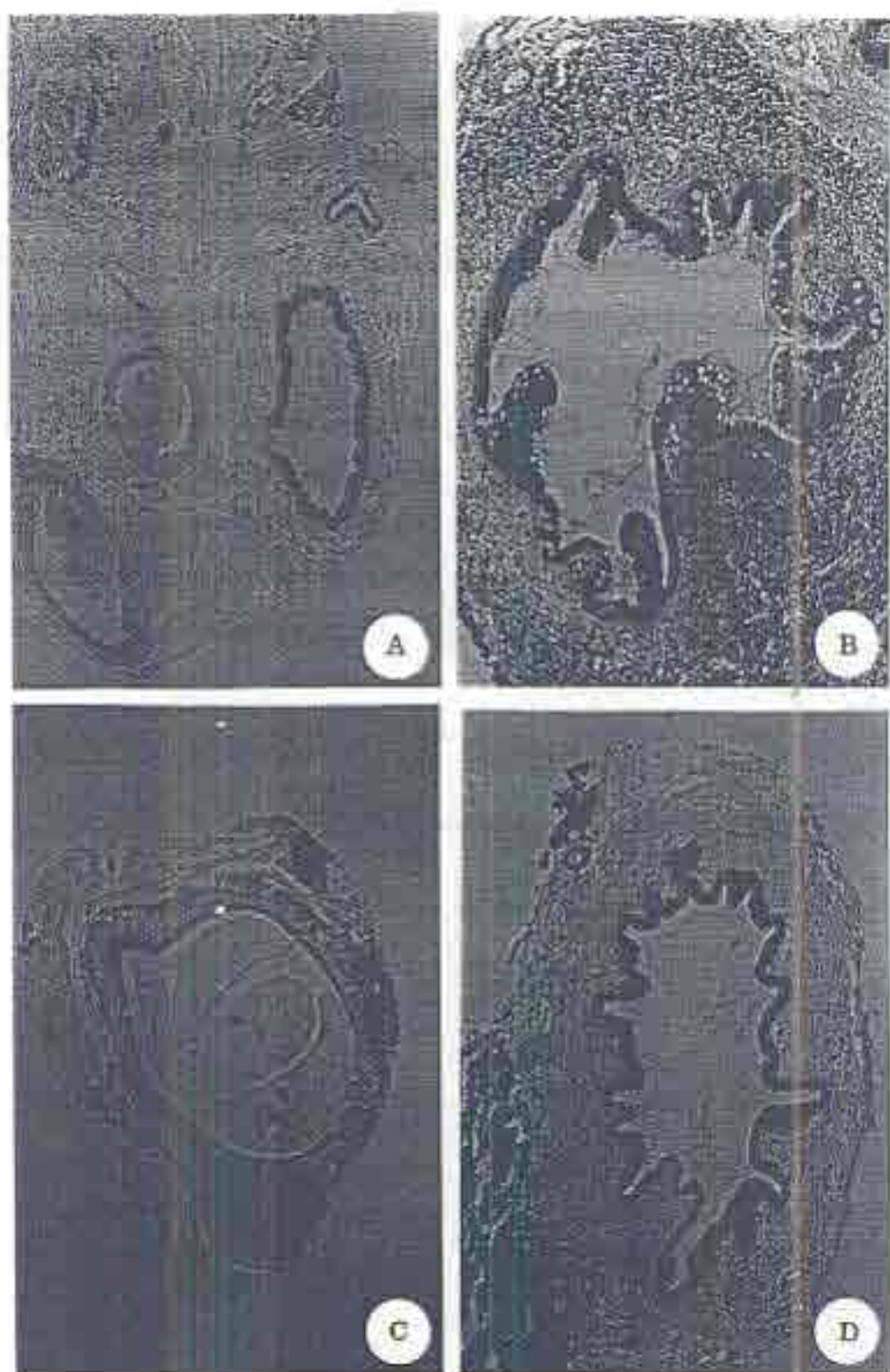
Duration	Inflammation				Epithelial hyperplasia				Goblet cell metaplasia				Fibrosis			
	25MC (GB/EH)	50MC (GB/EH)	100MC (GB/EH)	25MC (GB/EH)	50MC (GB/EH)	100MC (GB/EH)	25MC (GB/EH)	50MC (GB/EH)	100MC (GB/EH)	25MC (GB/EH)	50MC (GB/EH)	100MC (GB/EH)	25MC (GB/EH)	50MC (GB/EH)	100MC (GB/EH)	100MC (GB/EH)
Day 1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Day 3	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Day 7	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Day 14	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
M1	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
M2	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
M3	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
M4	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
M5	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
M6	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
M7	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
M8	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
M9	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
M10	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
M11	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
M12	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+

Abbreviations: MC = metacercariae, GB = gallbladder, EH = extrahepatic bile duct, D = day, M = month

การเปลี่ยนแปลงของท่อน้ำดีรวมพบมีไส้เดือนครั้งแรกของการติดเชื้อโดยพบ sucker ของพยาธิใบไม้คั่นภาวะคือ epithelium ในวันที่ 3 เริ่มมี mucus และ goblet cells ปรากฏให้เห็น การอักเสบไม่เด่นชัด ในวันที่ 7 พบมีเซลล์อักเสบชนิด neutrophils และ mononuclear cells เริ่มสังเกตเห็นได้ในกลุ่มติดเชื้อ 100 และ 50 metacercariae และเริ่มมากขึ้นและพบทุกกลุ่มในวันที่ 14 พร้อมกับ mucus และ goblet cells เพิ่มขึ้น รวมทั้งมี epithelial hyperplasia หลังจากนั้นพยาธิสภาพดังกล่าวมีความรุนแรงมากขึ้น การอักเสบพบได้ทั้งใน epithelium, lamina propria, muscle และ subserosa นอกจากนี้ในเลือนที่ 1 และ 2 จนถึงเดือนที่ 6 ของการติดเชื้อยังพบการหนาตัวของผนังท่อท่อน้ำดีรวม (fibrosis) ด้วย การเปลี่ยนแปลงในระยะเวลาดังกล่าวขึ้นกับปริมาณการติดเชื้อ

หลังการติดเชื้อหนึ่งเดือนเป็นต้นไปและเริ่มพบพยาธิใบไม้ในหลอดลมหลายตัว พบว่าพยาธิตัวแก่จะขุดตัวอยู่เกือบเต็มท่อน้ำดีรวมบนอกด้านและสัมผัสกับเยื่อตัวส่วนในถุงน้ำดีส่วนใหญ่ตัวพยาธิจะตายอยู่ใน lumen หากพบที่บริเวณ cystic duct จะพบ mucosal atrophy ใต้ แต่ไม่พบ epithelial desquamation ที่เกิดจากตัวพยาธิบนเยื่อตัวส่วนน้ำดีหรือท่อท่อน้ำดีในการศึกษาครั้งนี้เอง ในระยะนี้พยาธิสภาพต่างๆ ในท่อน้ำดีนอกตับดังกล่าวข้างต้นมีความรุนแรงมากขึ้นและขึ้นกับปริมาณของการติดเชื้อและมีความรุนแรงสูงสุดประมาณเดือนที่ 2 หลังการติดเชื้อในทุกกลุ่ม หลังจากนั้นพยาธิสภาพต่างๆ ในแต่ละกลุ่มการติดเชื้อจะคล้ายกันถึงกับ active inflammation ชัดเจน แต่จะมี mononuclear cells และ plasma cells มากขึ้นรวมทั้งมี lymphoid aggregates มากขึ้น ส่วน eosinophils ยังพบเสมออยู่ๆ ท่อท่อน้ำดี โดยสรุปแล้วพยาธิสภาพเด่นของท่อน้ำดีนอกตับในระยะติดเชื้อเรื้อรังประกอบด้วย ductal dilatation, periductal fibrosis และ mononuclear cell infiltration with lymphoid aggregations การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จะคล้ายกันมากในแฮมสเตอร์กลุ่มที่ติดเชื้อ 50 MC และ 100 MC พยาธิสภาพที่พบในท่อน้ำดีนอกตับมีความรุนแรงมากกว่าในถุงน้ำดีในกลุ่มการทดลองและระยะเวลาดูแลกัน นอกจากนี้จากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบ egg หรือ worm granuloma ในผนังถุงน้ำดี หรือ ท่อน้ำดีนอกตับเลย

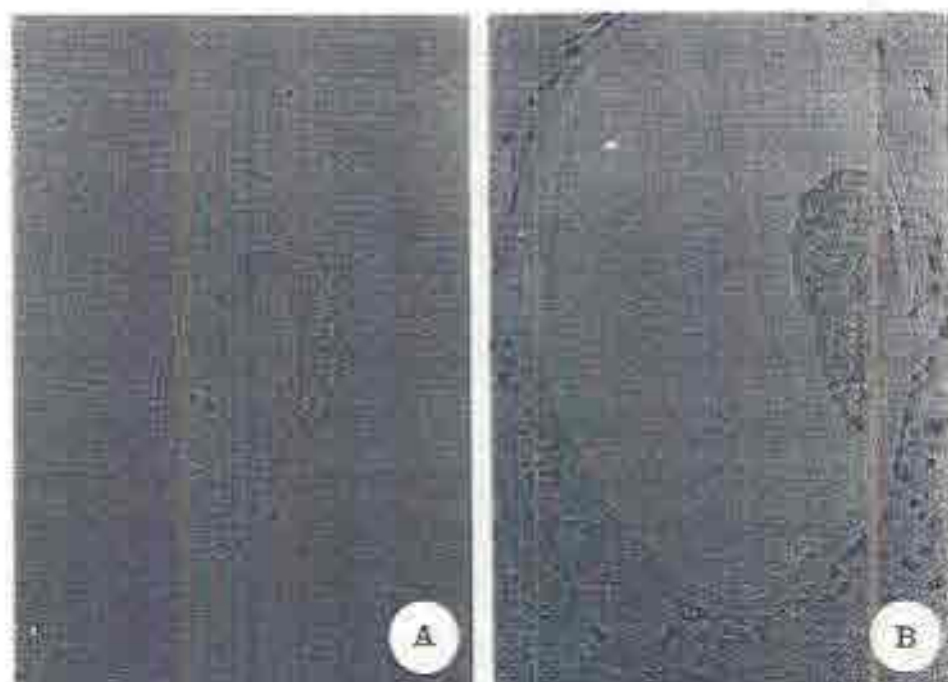
หลังจากการรักษาคัวยยา Praziquantel ในหนูแฮมสเตอร์ทุกกลุ่ม พบว่าพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในถุงน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับดังกล่าวมาแล้วมีความรุนแรงลดลงอย่างเห็นได้ชัด ดังรายละเอียดในตารางที่ 1 ซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณเซลล์อักเสบต่างๆ ในผนังถุงน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับลดลงหลังหนึ่งเดือนแรกที่มีการรักษา mucus และ goblet cells เริ่มลดน้อยลงตามลำดับ epithelial hyperplasia น้อยลง จนพบของท่อน้ำดีนอกตับก็ลดลง แต่อย่างไรก็ตาม fibrosis ยังคงเหลืออยู่และความรุนแรงลดลงเล็กน้อยจนถึงสิ้นสุดการทดลอง ตัวอย่างพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในท่อน้ำดีนอกตับทั้งก่อนและหลังการรักษาได้แสดงไว้ในรูปที่ 3.5 สรุปผลของการรักษาคัวยยา Praziquantel นอกจากจะช่วยกำจัดพยาธิออกไปแล้วยังทำให้ความรุนแรงของพยาธิสภาพอันเกิดจากพยาธิลดลงด้วยแม้จะไม่ลดลงถึงระดับปกติในช่วงระยะเวลาที่ทำการศึกษา



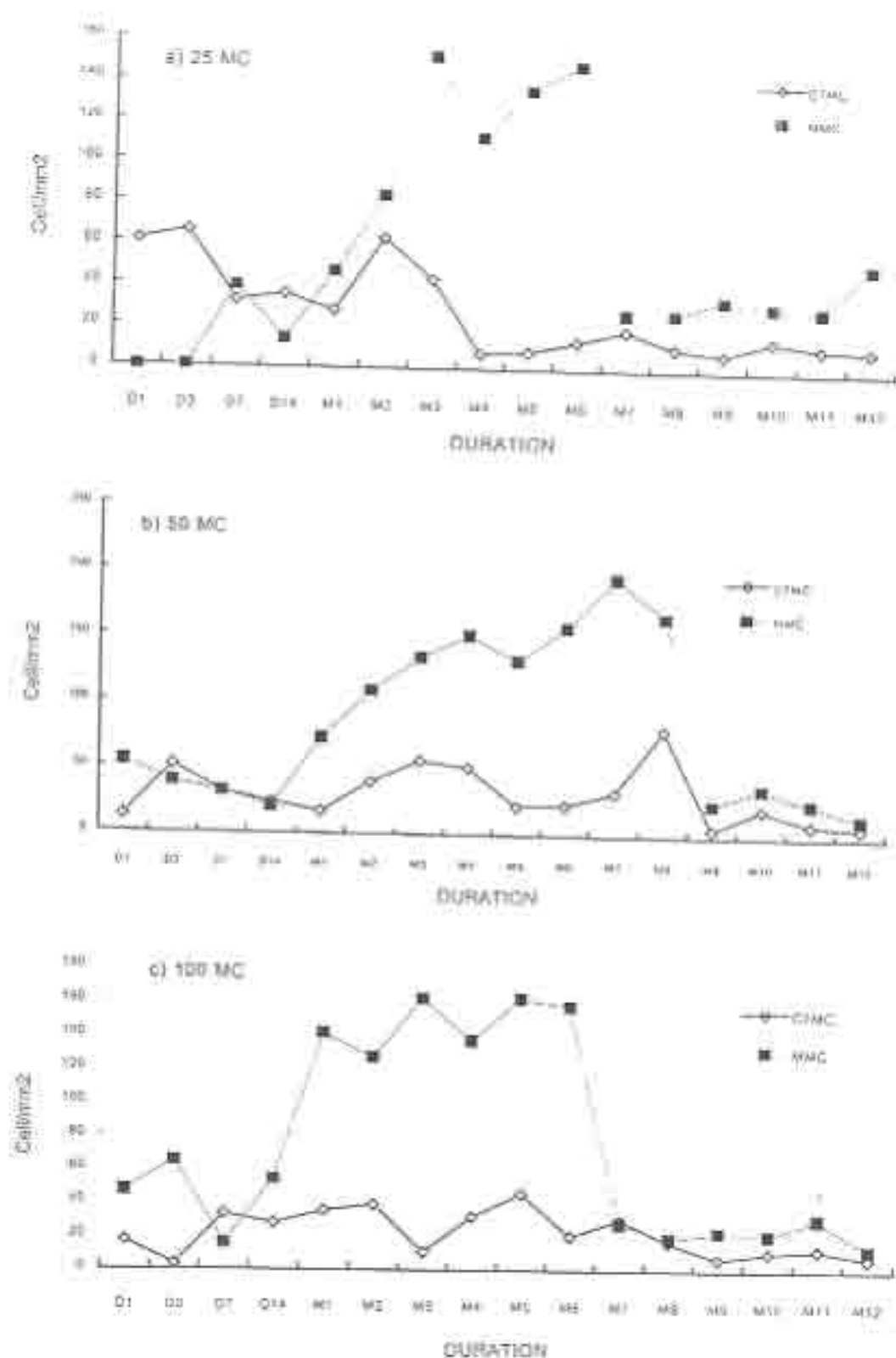
รูปที่ 3.6 แสดงที่ขนำดินขลขของหนแสมสเตอร์ปกดี (A, 100X) ทั่นนำดีที่คดเชือพยออิโบไม้ดัด 50 MC เป็นรเวลา 1 เดือน (B, 100X), 6 เดือน (C, 40X) และหลังการรรักษาเดือนที่ 10 (D, 100X)

การศึกษา Mast cells ในผนังอุ้งน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับ

การศึกษาทางพยาธิวิทยาในส่วนของเซลล์อักเสบชนิดอื่นๆ ได้ทำการศึกษา Mast cells ในผนังของอุ้งน้ำดีและท่อทางเดินน้ำดีนอกตับโดยการย้อมพิเศษ Alcian blue-safranin O พบว่าในผนังอุ้งน้ำดีและผนังท่อทางเดินน้ำดีนอกตับของหนูแฮมสเตอร์ปกติที่ไม่ได้รับเชื้อพยาธิใบไม้ตับ พบ mast cells น้อยมากในชั้น mucosa โดยเฉพาะในผนังท่อทางเดินน้ำดีแทบไม่พบเลย อาจพบ Connective tissue mast cells (CTMC) ซึ่งติดสีแดงของ Safranin O ในชั้น serosa เล็กๆ น้อยๆ (รูปที่ 3.7A) ส่วนในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับพบว่ามี Mucosal mast cells (MMC) ซึ่งติดสีฟ้าของ Alcian blue มากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในกลุ่ม 100 MC ในวันที่ 3 หลังการติดเชื้อ และ วันที่ 7 ในกลุ่ม 30 MC ส่วนกลุ่ม 25 MC เห็นได้ชัดในวันที่ 14 หลังจากเดือนที่ 1 เป็นต้นไปพบว่า ปริมาณของ MMC มากขึ้นตามลำดับและส่วนใหญ่พบในบริเวณ Subepithelium และ lamina propria และ subserosa บริเวณที่มี inflammatory cells จำนวนมาก (รูปที่ 3.7B) ส่วน CTMC พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก จากข้อมูลคุณภาพ (Qualitative) พบว่าปริมาณของ Mast cell infiltration ในผนังอุ้งน้ำดีและท่อทางเดินน้ำดีนอกตับหลังเดือนที่ 2 ของการติดเชื้อ ไม่แตกต่างกันมากนักในแต่ละกลุ่ม ส่วนหลังจากการรักษาพบว่าจำนวน mast cells ลดลงอย่างรวดเร็วอย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะ Mucosal mast cells



รูปที่ 3.7 แสดง Mast cells ในผนังท่อน้ำดีนอกตับของหนูแฮมสเตอร์ปกติ (A) และ ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (B) (Alcian blue-safranin O, original magnification X10)



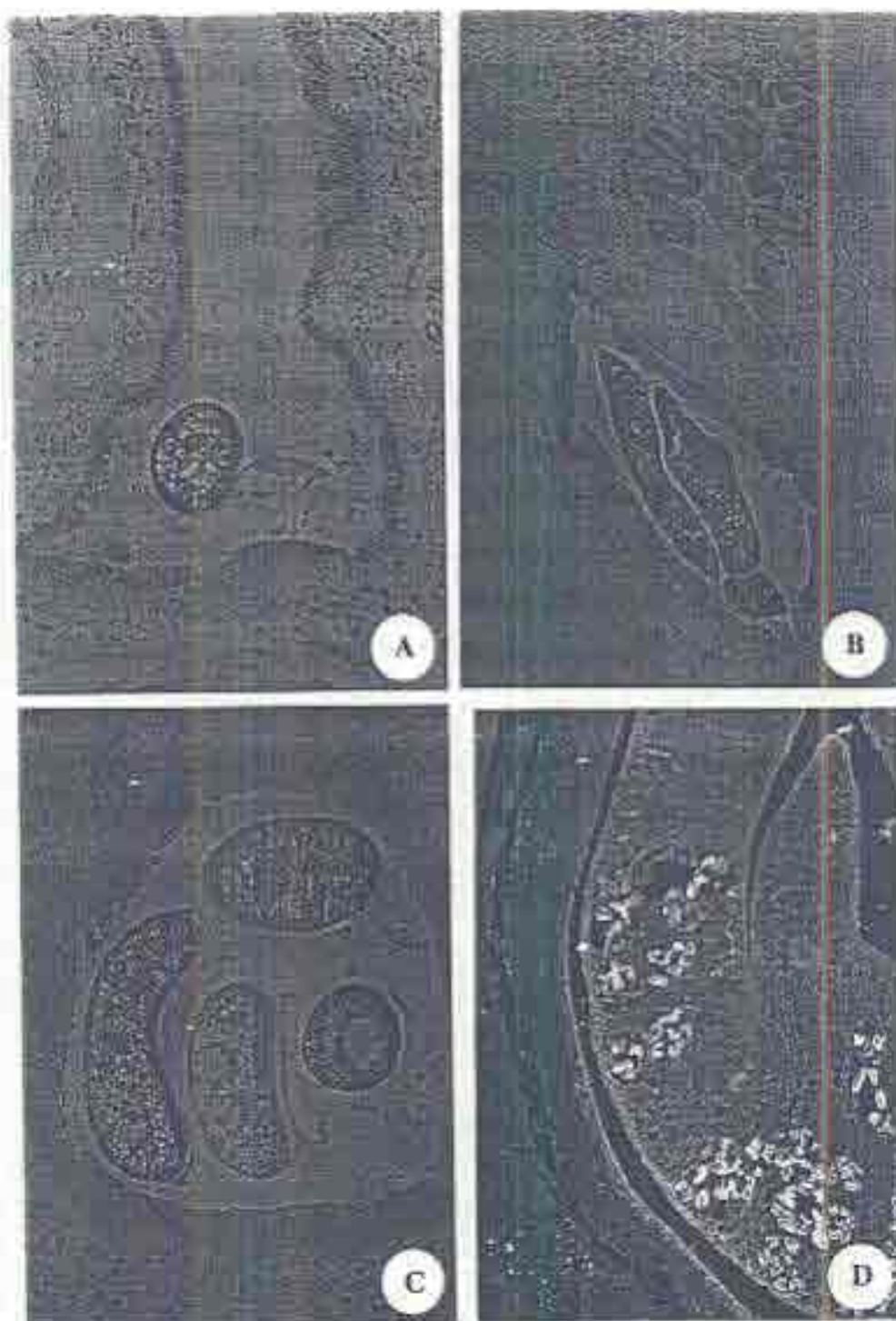
รูปที่ 3.8 แสดงการเปลี่ยนแปลงของจำนวน mast cells ในหนึ่งท่อน้ำดินยกตัวของแฮมสเตอร์ที่ฉีดเชื้อพยาธิใบไม้ตับปริมาณต่างๆ ทั้งก่อนและหลังการรักษา

ขณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษา mass cells โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ภาพสมมาตร (Image analyser) แบบ Quantitative study โดยการนับปริมาณ Mass cells/mm² ในท่อน้ำดินนอกตับส่วนในถุงน้ำดีที่ทำได้ ขณะนี้ ไม่แน่ว่าค่าที่ควรระวังของขนาดของถุงน้ำดีแปรผันตามปริมาณน้ำดี ผลของการศึกษาได้แสดงให้เห็นในรูปที่ 3.8 พบว่าโดยทั่วไปรูปแบบการเพิ่มขึ้นของจำนวน mass cells ในแฮมสเตอร์ทั้งตามกลุ่มการทดลองกลายกลืนกันโดยในช่วงแรกของการติดเชื้อปริมาณของ MMC ไม่เปลี่ยนแปลงมากนักจนถึงเดือนแรกของการติดเชื้อพบว่าปริมาณ MMC ได้เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในทุกกลุ่มการทดลอง ในแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อ 100 MC ปริมาณของ MMC สูงขึ้นอย่างรวดเร็วในเดือนที่ 2 จนถึง peak ในเดือนที่ 3 (162.5 cells/mm²) แล้วค่อยๆ คงที่จนถึงเดือนที่ 6 ก่อนการรักษา ส่วนกลุ่มอื่นๆ ปริมาณของ MMC จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นโดยกลุ่มที่ติดเชื้อ 25 MC พบปริมาณ MMC สูงสุดในเดือนที่ 3 (152.1 cells/mm²) และกลุ่ม 50 MC ในเดือนที่ 7 (196 cells/mm²) หลังจากการรักษาในเดือนที่ 6 พบว่าปริมาณ MMC ลดลงอย่างรวดเร็วจนเกือบปกติในเดือนที่ 7 ของทุกกลุ่มทดลอง ยกเว้นกลุ่มที่ติดเชื้อ 50 MC แต่อย่างไรก็ตามปริมาณ MMC ในกลุ่มนี้ก็ลดลงอย่างรวดเร็วในเดือนต่างๆ มา หลังจากนั้นปริมาณ MMC ก็อยู่ในเกณฑ์ปกติจนถึงเดือนที่ 12 ของการทดลอง ถ้าเปรียบปริมาณของ CTMC มีการเปลี่ยนแปลงมีอยู่ตลอดเวลาของการทดลองและอยู่ในระดับน้อยกว่า 50 cells/mm²

อิมมูโนพยาธิวิทยาการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (Immunopathology)

การศึกษานกตติเจนของพยาธิใบไม้ตับในเนื้อเยื่ออุ้งทรวงทางเดินน้ำดี

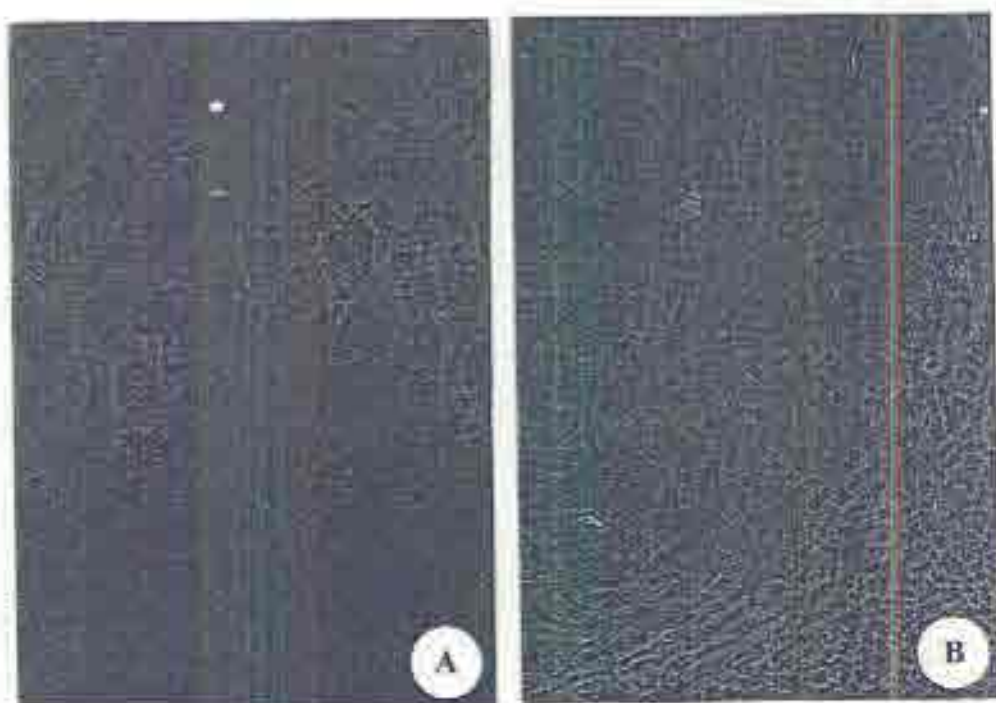
ขณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษา Mucosal immunology ในท่อน้ำดินน้ำดีในโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับโดยทำการตรวจหา *Opisthorchis* antigen ในเซลล์เยื่ออุ้งทรวงทางเดินน้ำดีทั้งในถุงน้ำดีและท่อน้ำดินนอกตับ ซึ่งผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าเซลล์เยื่ออุ้งทรวงนี้น่าจะเป็นทางผ่านของ *Opisthorchis* antigen เพื่อจะไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เนื่องจากในการศึกษารังนี้ไม่พบว่ามี epithelial desquamation ทั้งในถุงน้ำดีและท่อน้ำดิน ยกเว้นแต่มีเซลล์อักเสบรอบๆ ท่อน้ำดีเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะ mononuclear cells เชนีนิกวิทศาสตร์ (Sun & Gibbon, 1969) ดังตามหลักฐานเช่นนี้ในการติดเชื้อ *Clonorchis sinensis* แต่ไม่ได้มีการพิสูจน์ การศึกษารังนี้เป็นครั้งแรกที่มีการตรวจหา *Opisthorchis* antigen ในเซลล์เยื่ออุ้งทรวงทางเดินน้ำดี ซึ่งสามารถตรวจสอบด้วยวิธีโดย immunofluorescence และ immunoperoxidase technique และเริ่มเห็นได้ตั้งแต่วันที่ 3 หลังการติดเชื้อแต่มีปริมาณไม่มากนักและจะเห็นได้ชัดมากขึ้นในวันที่ 14 เป็นต้นไปในทุกกลุ่มการทดลอง และพบในท่อน้ำดินมากกว่าในถุงน้ำดี การกระจายตัวของ *Opisthorchis* antigen มักพบมากใกล้กับบริเวณที่มีตัวพยาธิ อย่างไรก็ตามก็อาจพบแอนติเจนบนผิวของหนอนที่ทุกที่ไม่มีตัวพยาธิได้เช่นกันแต่น้อยมาก นอกจากนั้นแอนติเจนนี้ยังพบได้ใน mucus coat และเนื้อเยื่อใกล้กับตัวพยาธิจะเห็นผลแสดงไว้ในรูปที่ 3.9



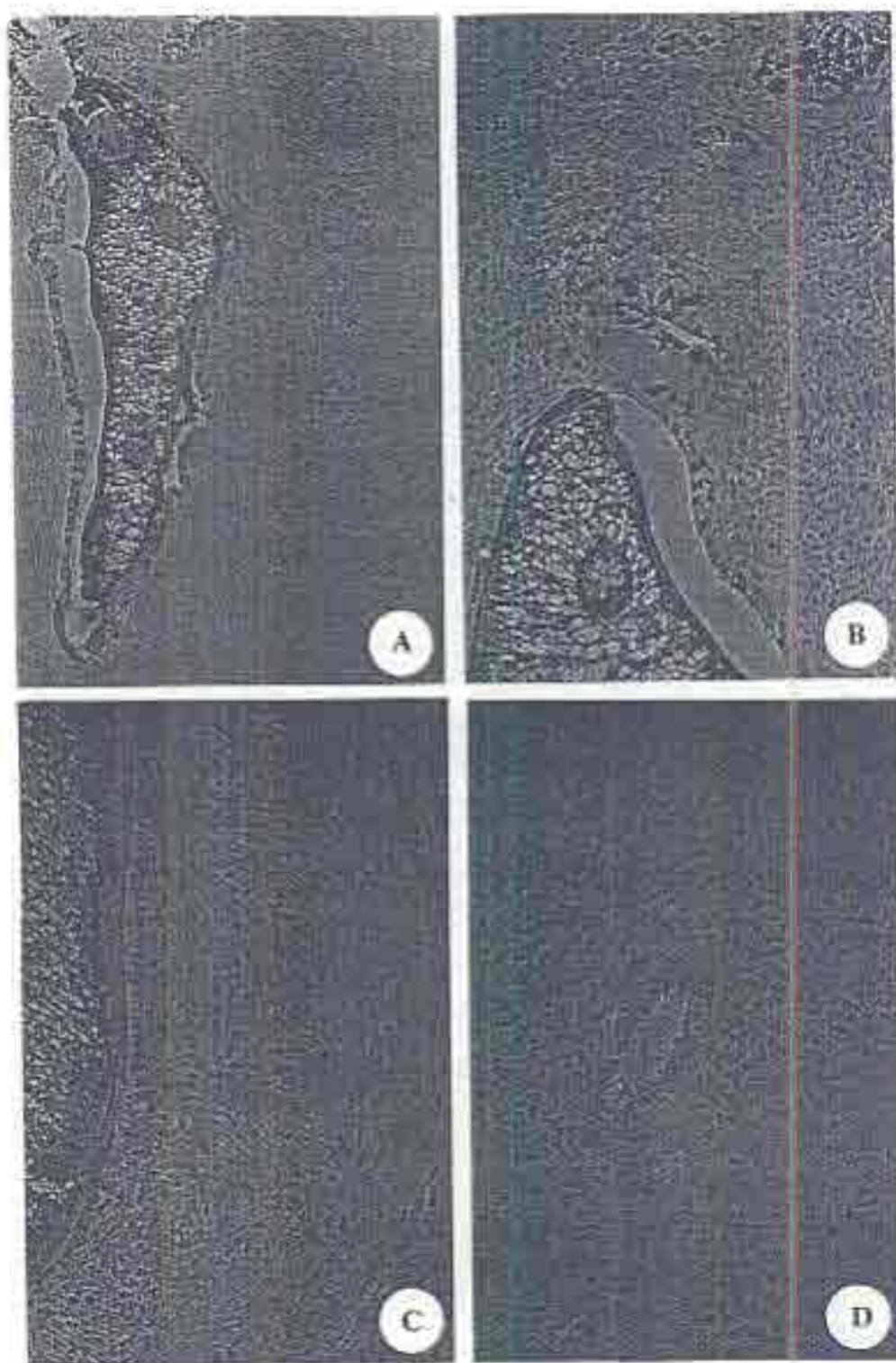
รูปที่ 3.9 แสดงแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับในลำพยาธิและเซลล์เยื่อปูดทางเดินน้ำคือนอกตับของแฮมสเตอร์ ด้วยวิธี Immunoperoxidase (A,B,C) และ Immunofluorescence (D) Juvenile fluke day 3 (A), day 7 (B), day 14 (C) and Adult fluke (month 6, D) สังเกตว่า *Opisthorchis* antigen ส่วนใหญ่จะแพร่กระจายบนเซลล์เยื่อปูดทางเดินน้ำคือนและเนื้อเยื่อข้างเคียงใกล้เคียงกับบริเวณที่มีตัวพยาธิ (B)

Opisthorchis antigen ที่ตรวจพบนี้ น่าจะมีทั้งส่วนที่เป็น ES antigen และ somatic antigen ซึ่งเกิดการ shedding จากตัวพยาธิ เพราะสามารถตรวจพบได้ทั้ง anti-ES และ anti-somatic antibody (antibody ทั้งสองชนิดนี้ recognize *Opisthorchis antigen* ที่คล้ายคลึงกันมาก ต่างกันตรงที่ปริมาณเท่านั้น) แอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับสามารถตรวจพบได้ในเยื่อหุ้มตัวต่อทางเดินน้ำดีในแขนสเตอว์ที่ติดเชื้อทุกตัวจนถึงเดือนที่ 6 ก่อนการรักษา และหลังการรักษาหายขาดจากการติดเชื้อ ไม่พบแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับในเนื้อเยื่ออีกแสดงถึงสิ้นสุดการทดลอง

จากข้อมูลการตรวจหาแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับในถุงน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับดังกล่าวข้างต้นได้ผลที่น่าสนใจมาก ทำให้ผู้วิจัยได้ขยายการตรวจหาแอนติเจนเพิ่มเติมจากเป้าหมายที่ตั้งไว้ในตอนแรก โดยได้ตรวจในเนื้อเยื่อตับที่เก็บไว้ในระหว่างการทดลองด้วยกันซึ่งน่าจะให้ข้อมูลหรือตอบคำถามได้กระจำมากขึ้นในเรื่องของ Immune response, Immunopathology และ pathology ของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ขณะผู้วิจัยได้ใช้เทคนิค Immunoperoxidase เป็นหลักในการศึกษาเนื่องจากให้รายละเอียดและความไวดีกว่า Immunofluorescence จากการศึกษาพบว่าสามารถตรวจพบแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับทั้งในตัวพยาธิ เยื่อหุ้มตัวต่อในตับและเนื้อเยื่อข้างเคียง เช่นเดียวกับที่พบในท่อน้ำดีนอกตับ นอกจากนี้แอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับยังพบได้ในเซลล์ตับบางเซลล์ที่อยู่ในบริเวณ portal area (รูปที่ 3.10A) และ ใน modified macrophages (epithelioid cells) ที่ล้อมรอบ egg granuloma รวมทั้งไข่พยาธิที่อยูภายใน giant cells ของ granuloma ด้วย (รูปที่ 3.10B) รายละเอียดด้วยภาพถ่ายแอนติเจนในเนื้อเยื่อท่อน้ำดีในตับแสดงไว้ในรูปที่ 3.11



รูปที่ 3.10 แสดงแอนติเจนพยาธิใบไม้ตับในเขตตับรอบๆ portal vein (A) และ ใน egg granuloma (B)



รูปที่ 3.11 แสดงแอนติเจนพอลิโบไมด์ในท่อน้ำดีในตับและเนื้อเยื่อข้างเคียง (A,B) ในรายที่มี periductal fibrosis มักพบว่ามีแอนติเจนแพรอกซิมัลเลน (C) นอกจากนี้ท่อน้ำดีขนาดเล็ก (first order bile duct) ที่มีเซลล์อีกเสบจำนวนมากรอบส่วนใหญ่ตรวจพบแอนติเจนนี้ (D)

การตรวจอะนติเจนในแอนติเจนพลาสมาในน้ำดี

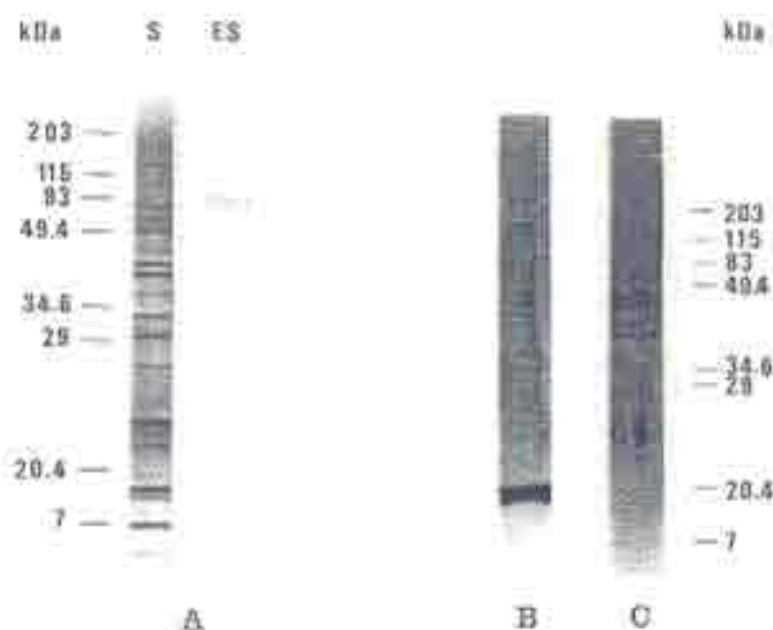
เพื่อเป็นการหาข้อสันนิษฐานว่าแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับที่แพร่ผ่านเยื่อบุผิวที่ท่อน้ำดีไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและทำให้เกิดพยาธิสภาพที่แหล่งที่มาจากอย่างไร ตามสมมติฐานเชื่อว่าแอนติเจนนี้จะอยู่ในน้ำดีซึ่งเกิดจากการขับถ่ายของ (excretory-secretory products) ของตัวพยาธิ. เดิมทีผู้วิจัยได้วางแผนการตรวจไว้สองแนวทาง คือ การตรวจทาง Immunohistochemistry ซึ่งได้กล่าวมาแล้ว และ อีกส่วนหนึ่ง คือ Sandwich-ELISA. ผู้วิจัยได้ทดลองตรวจหาแอนติเจนด้วยวิธีการนี้ (ดังจะอธิบายในบทที่ 2) และพยายาม standardize โดยใช้ biotinylated antibody ที่เตรียมมาหลายรุ่น แต่ไม่ประสบผลสำเร็จ และน้ำดีจึงมีปริมาณน้อยอยู่แล้วใกล้จะหมดลง ผู้วิจัยจึงจำเป็นต้องเปลี่ยนเทคนิคในการ confirm ว่ามีแอนติเจนในน้ำดีด้วยวิธี simple immunodiffusion technique โดยใช้ pooled, concentrated bile ในหุตุเมสันติเจน และ Rabbit anti-somatic antibody ที่เตรียมขึ้นมาเป็นตัวตรวจเช็ค โดยมี somatic antigen เป็น positive control หลังจาก incubate 37 องศาเซลเซียส ชั่วครู่พบว่า มี precipitin band จำนวนมาก เกิดขึ้น แสดงว่ามีแอนติเจนพยาธิใบไม้ตับในน้ำดีแน่นอน ผู้วิจัยจึงนำน้ำดีนี้ไปวิเคราะห์เพื่อดูรูปแบบของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie blue แต่โปรตีนมีน้อยมาก เมื่อนำไปทำ immunoblot ด้วย Rabbit anti-somatic antibody ไม่ปรากฏมี band เกิดขึ้นเลย

ขณะผู้วิจัยจึงเปลี่ยนไปใช้วิธี Immunoblot จาก hyperimmune rabbit serum ต่อมาที จากหลักฐานที่ว่าแอนติเจนสามารถกระตุ้นให้ host สร้างแอนติบอดีได้ ผู้วิจัยเชื่อว่าแอนติเจนพยาธิใบไม้ตับในปริมาณที่น้อยในน้ำดีจึงนำน้ำดีทั้งหมดลงบนแผ่นสตอร์ที่เคลือบพยาธิไปฉีดกระตุ้นด้วยวิธีการปกติ จำนวน 4 ครั้ง แล้วจะเลือกมาตรวจหาแอนติบอดีคือ somatic antigen ด้วยวิธี ELISA นอกจากนี้เพื่อต้องการตอบคำถามว่า มีแอนติเจนของพยาธิใบไม้ในตับในเลือดหรือไม่? และผู้วิจัยเชื่อว่าเนื่องจากจากการย้อมทาง Immunohistochemistry พบมีการแพร่ของแอนติเจนไปตามเนื้อเยื่อต่างๆ รวมทั้งระบบการไหลเวียนของเลือดด้วย ดังนั้นผู้วิจัยได้ทดลองเบื้องต้นโดยใช้ซีรัมของแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อไปฉีดในกระดองเช่นเดียวกับน้ำดี ผลการตรวจด้วยวิธี ELISA พบว่ามีแอนติบอดีคือ somatic antigen สูงถึง 1:32,000 ถ้าหว่าน anti-infected serum และ 1:8,000 ถ้าหว่าน anti-infected bile และเมื่อ absorb ด้วย somatic antigen แล้วไม่พบระดับแอนติบอดีเลย ขณะผู้วิจัยจึงได้วิเคราะห์เบื้องต้นด้วยวิธี Immunoblot และ Immunohistochemistry

Immunoblot analysis of biliary and serum Opisthorchis antigens

การทำ Immunoblot โดยใช้ somatic antigen เป็น loading antigen และใช้ rabbit anti-infected bile antibody หรือ rabbit anti-infected serum antibody เป็นตัวตรวจจับ ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ได้แสดงในรูปที่ 3.12 โดยจะพบว่า somatic antigen ประกอบด้วย protein bands ต่างๆ มากมายระหว่าง 7 kDa - มากกว่า 115 kDa ส่วน ES antigen มี band 2 bands ติดกันที่ตำแหน่ง

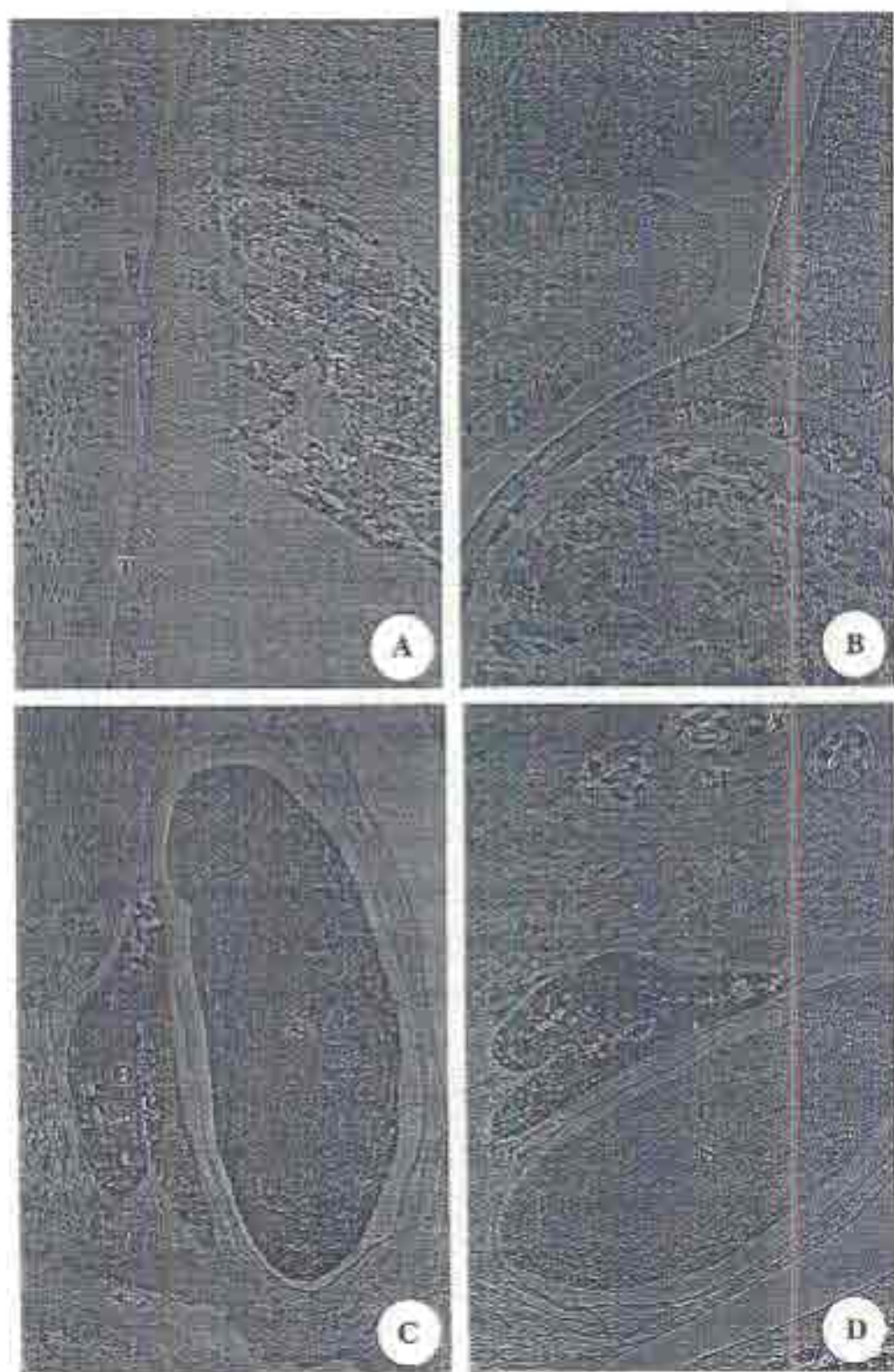
ประมาณ MW 83-115 kDa (รูปที่ 3.12 B) เมื่อนำ rabbit anti-infected bile hyperimmune serum มาทำปฏิกิริยากับแผ่น nitrocellulose blot ที่มี somatic antigen แล้ว พบว่าแอนติบอดีค่อน้ำดีที่ ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับมีปฏิกิริยาเข้มมากกับ doublet protein band ตรงตำแหน่งระหว่าง 7-20.4 kDa และมีปฏิกิริยาจางๆ กับโปรตีนในตำแหน่งประมาณ 20.4 kDa - 29 kDa ส่วนแอนติบอดีต่อ infected serum พบว่าทำปฏิกิริยาเข้มกับ protein bands ที่ M.W. ประมาณ 20.4 kDa ถึง 83 kDa (รูปที่ 3.12C) แสดงว่าแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับในน้ำดี และ ซีรัม มี protein profiles ส่วนใหญ่ แตกต่างกัน การศึกษาในรายละเอียดผู้วิจัยกำลังดำเนินการต่อไป



รูปที่ 3.12 แสดง Protein profiles ของ somatic และ ES antigen ของพยาธิใบไม้ตับ (A) antigenic protein determinant ในน้ำดี (B) และ antigenic protein determinant ในซีรัม (C)

Immunohistochemical analysis of biliary and serum Opisthorchis antigens

การวิเคราะห์ด้วย immunohistochemistry ได้ทำใน human infected liver เพื่อป้องกัน cross reaction อันอาจเกิดได้ ผลการศึกษาพบว่าแอนติบอดีต่อแอนติเจนพยาธิใบไม้ตับในน้ำดี ส่วนใหญ่ทำปฏิกิริยาเข้มมากกับ testes, sperm และ oeca และปฏิกิริยาปานกลางต่อ cytoskeleton และ miracidia ส่วนแอนติบอดีต่อแอนติเจนในซีรัมส่วนมากทำปฏิกิริยาเข้มมากกับ tegument, ovarian cells, miracidia และ cocs ส่วน cytoskeleton คีดิปปานกลาง รายละเอียดตัวอย่างภาพได้ แสดงไว้ในรูปที่ 3.13



รูปที่ 3.13 แสดง Immunoreactivity ของแอนติบอดีต่อ *Opisthorchis antigens* ในน้ำดี (A,C) และในซีรัม (B,D) O - ovary, S = sperm, T = tegument, C - ceca, M - miracidium, Ti - testes

บทที่ 4

บทวิจารณ์และสรุป

โรคพยาธิใบไม้ตับเป็นโรคติดต่ออันตรายที่ยังคงเป็นปัญหาสำคัญด้านสาธารณสุขในประเทศไทย โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ การศึกษาในช่วงหลายปีที่ผ่านมาส่วนใหญ่เน้นในด้านระบาดวิทยาคลินิก การรักษา ประสิทธิภาพ อิมมูโนวิทยาและการวินิจฉัย พยาธิสภาพ และการเกิดร่วมกับมะเร็งท่อน้ำดีทั้งในคนและสัตว์ทดลอง แต่ยังไม่เคยมีรายงานใดที่อธิบายกลไกการเกิดโรคในระดับลึก หรือ มีการนำเอาความรู้แบบผสมผสานเพื่อให้ได้องค์ความรู้ที่สามารถอธิบายกลไกการเกิดโรคได้ นอกจากนี้ในการศึกษาที่ผ่านมาส่วนใหญ่เน้นไปที่ความผิดปกติของตับ ในขณะที่ถุงน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับซึ่งก็เป็นที่อยู่ของพยาธิใบไม้ตับเช่นกันกลับมีการศึกษาน้อยมาก ในการวิจัยครั้งนี้จึงได้นำนการศึกษาพยาธิสภาพของถุงน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับในสัตว์ทดลองซึ่งยังไม่เคยศึกษาก่อนอย่างเป็นระบบมาก่อน รวมทั้งได้แสดงกลไกการเกิดโรคโดยการผสมผสานหลักฐานทางประติวิทยา อิมมูโนวิทยา และ พยาธิวิทยา บางส่วนของการวิจัยได้ขยายไปศึกษาในตับด้วยเพื่อให้ได้ภาพรวมของกลไกการเกิดโรคสมบูรณ์ยิ่งขึ้น นอกจากนี้ผลพลอยได้จากการศึกษาวิทยาศาสตร์พื้นฐานของโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในครั้งนี้ได้นำไปสู่แนวทางการพัฒนาการวินิจฉัยโรคนี้แบบใหม่ คือ การตรวจแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ ในกระแสเลือด คณะผู้วิจัยจะขออภิปรายผลการศึกษาและความสัมพันธ์ของพารามิเตอร์ต่างๆ เป็นลำดับไปในบทวิจารณ์นี้

จากการวิเคราะห์ทางด้านประติวิทยาในแอนิเมเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับทั้ง 3 กลุ่ม คือ 25 MC, 50 MC และ 100 MC พบว่า worm recovery rate ไม่แตกต่างกันในทั้งสามกลุ่มตลอดระยะเวลาที่ติดเชื้อ 6 เดือนก่อนการรักษา แต่ที่น่าสนใจคือ การลดลงของปริมาณไข่พยาธิ (EPG) และ ปริมาณไข่ต่อตัวพยาธิ (EPG/worm) ในช่วงที่ติดเชื้อเรื้อรังโดยเฉพาะในกลุ่มที่มีการติดเชื้อใน

ปริมาณที่มาก (50 MC และ 100 MC) ผลการทดลองนี้คล้ายกับที่มีรายงานโดยฟลาวเวลล์ (Flavell *et al.*, 1983; Sirisinha *et al.*, 1983) อย่างไรก็ดีตามในการศึกษากครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นการลดลงของการออกไข่ได้ชัดเจนกว่ารายงานทั้งสองดังกล่าวเพราะว่าใช้ระยะเวลาศึกษานานกว่า (Flavell *et al.*, 1983) จึงศึกษาเพียง 2 เดือน ส่วนรายงานของ Sirisinha *et al.* (1983) ไม่มีรายละเอียดของการออกไข่ การลดลงของปริมาณไข่พยาธิในกลุ่มที่ติดเชื้อมากมีผลสอดคล้องกับการศึกษาในคนที่ได้จากการตรวจศพ (Suhithaworn *et al.*, 1991) และ การศึกษาในประชากรที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Ekins *et al.*, 1991) ในโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับอื่น ๆ ก็มีรายงานแบบนี้เช่นกัน ตัวอย่างเช่น *Schistosoma mansoni* (Buxhara *et al.*, 1983), *S. haematobium* (Agnew *et al.*, 1996) การลดลงของ EPG และ EPG/worm มีค่าอธิบายได้หลายแนวทาง ประการแรกอาจเกิดเนื่องจากการขาดอาหารเนื่องจากการแย่งแย่งอาหารซึ่งมีจำนวนจำกัดในท่อทางเดินน้ำดีทำให้ปริมาณไข่ลดลง แต่จากการศึกษาของ Flavell *et al.* (1983) พบว่าไม่น่าจะเป็นปัจจัยสำคัญเมื่อคำนวณค่าความสัมพันธ์ระหว่าง EPG, EPG/worm กับ worm density (crowding) ไม่แตกต่างกัน ซึ่งในการศึกษาของเราในครั้งนี้ก็ได้ผลทำนองเดียวกัน (บรรจบ และ ศศิธร, data not shown) ประการที่สอง คือ ร่างกายมีภูมิคุ้มกันต้านต่อตัวพยาธิ ซึ่งอาจจะไปทำลายระบบสืบพันธุ์และการออกไข่ ในส่วนของผลกระทบของภูมิคุ้มกัน ตับ การลดลงของการออกไข่ มีรายงานในการติดเชื้อพยาธิหลายชนิด เช่น *S. mansoni* (Docuhoft *et al.*, 1978) มีหลักฐานหลายอย่างที่สนับสนุนบทบาทของภูมิคุ้มกันต้านทานในการทำให้การออกไข่และปริมาณไข่พยาธิต่อตัวลดลงในการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ แสมสเตอร์ที่ได้รับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับหลายๆ ครั้ง (Sirisinha *et al.*, 1983) หรือได้รับ เซรัม หรือ spleen cells จากหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (Flavell *et al.*, 1980) พบว่ามี EPG และ EPG/worm ลดลง อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองก่อน Flavell & Flavell (1986) พบว่า ไม่มีความแตกต่างของการออกไข่ใน T cell deprived hamsters กับ แสมสเตอร์ปกติที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ส่วนผลของแอนติบอดีต่อแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับยังไม่ได้ศึกษาในระดับลึก ดังนั้นรายละเอียดของกลไกทางอิมมูโนโลยีที่มีผลต่อการตกไข่โดยลงในสัตว์ทดลองที่ติดเชื้อปริมาณมากยังคงต้องมีการศึกษาต่อไป

ในด้าน humoral immune responses ในกลุ่มการทดสอบเลือดซึ่งทั้งสามกลุ่มได้แสดงให้เห็นว่าในระยะแรกของการติดเชื้อมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต้านทานเป็นแบบ dose-dependent นั่นคือกลุ่มที่มีการติดเชื้อมากก็จะมี การสร้างแอนติบอดีขึ้นมากและรวดเร็วกว่ากลุ่มที่ติดเชื้อในปริมาณน้อยที่น่าสนใจคือ สามารถตรวจพบแอนติบอดีคือ egg antigen ในวันที่ 14 หลังการติดเชื้อในกลุ่มที่ 2 และ 3 ทั้งๆ ที่ยังไม่มีการตกไข่เลยในช่วงนี้ เหตุการณ์นี้น่าจะอธิบายได้โดย soluble egg antigen และ somatic antigen มีแอนติเจนบางตัวที่เหมือนกัน (Wongratanascheewin *et al.*, 1988c) นอกจากนั้นในการที่มีระดับของแอนติบอดีคือ egg antigen ขึ้นสูงมากในกลุ่มที่ติดเชื้อ 50 MC ในเดือนแรก ก็เพราะว่ามีปริมาณ EPG ในกลุ่มนี้ที่สูงขึ้นมากจากกลุ่มอื่นๆ นอกจากนั้นการศึกษา

ครั้งนี้ก็เป็นครั้งแรกที่มีการรายงานระดับของแอนติบอดีคือ *egg antigen* ซึ่งในสมัยแรกๆ โดยเฉพาะในพยาธิใบไม้ตับชนิด *C. sinensis* เชื่อว่าไข่พยาธิไม่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่ดี (Sun & Gibson, 1969)

ความสำคัญและสิ่งที่น่าสนใจที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ คือ พยาธิใบไม้ตับสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้อย่างไรในกรณีที่ตัวพยาธิยังมีขนาดเล็ก และ นอกจากนี้พยาธิใบไม้ตับยังเป็น *Mucosal infection* ซึ่งเยื่อผิวต่อทางเดินน้ำดีเป็นตัวผนังที่ดีที่ทำให้ตัวพยาธิไม่สามารถสัมผัสโดยตรงกับ immune cells เช่น lymphocytes, macrophages เป็นต้น ในพยาธิใบไม้ตับชนิด *C. sinensis* Sun & Gibson (1969) ได้แสดงให้เห็นว่า *Clonorchis antigens* มีอยู่ในน้ำดี และได้ตั้งสมมติฐานว่าแอนติเจนของพยาธิจะแพร่ไปตามเยื่อผิว หรือ ผ่านเซลล์ต้นที่ถูกทำลายแล้วเข้าสู่ระบบหมุนเวียนของเลือดแต่ก็ไม่ได้มีการพิสูจน์หรือมีหลักฐานที่แน่ชัดในสมมุติฐานนี้ การศึกษาในครั้งนี้ใช้วิธีใหม่ให้ทราบถึงครั้งแรกว่าแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้อย่างไร 2 ทาง คือ การแพร่ผ่านทางเยื่อผิวต่อทางเดินน้ำดีทั้งในตับและนอกตับรวมทั้งถุงน้ำดี และส่วนน้อยทางเซลล์ต้นที่ถูกทำลาย หลักฐานที่ชัดเจนที่สุด คือ การตรวจพบแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับแพร่เข้าไปในเซลล์เยื่อผิวต่อทางเดินน้ำดี และเมื่อฉีดข้างเคียงรวมทั้งเซลล์ต้นที่ถูกทำลาย ซึ่งสามารถตรวจได้ด้วยวิธี immunohistochemistry ตั้งแต่วันที่ 3 หลังการติดเชื้อ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะสามารถตรวจพบแอนติบอดีได้ในวันที่ 14 หลังการติดเชื้อ นอกจากนี้การศึกษานี้ยังได้พิสูจน์ว่าแหล่งของแอนติเจนที่เข้าไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันไม่ได้มีเฉพาะในน้ำดีเพียงอย่างเดียว แต่ส่วนใหญ่จะเป็นการแพร่ผ่านโดยตรงทาง tegument ของตัวพยาธิไปกระตุ้นเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันตามกระเพาะส่วนเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งจะเห็นว่าแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับในบริเวณส่วนใหญ่ทำปฏิกิริยากับ tegument ของตัวพยาธิ ในขณะที่ในน้ำดีส่วนใหญ่ทำปฏิกิริยากับ sperm และ ceca ความแตกต่างกันยังแสดงให้เห็นจากการทำ immunoblotting ของ hyperimmune serum คือ infected bile และ infected serum จากรายงานการศึกษาในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่ดูโครงสร้างภายในของผนัง tegument ของพยาธิใบไม้ตับก็พบว่า secretory-excretory granules มากมาย (Apinhasmit et al., 1994) นอกจากนี้ mouse monoclonal antibody คือ ES antigen 89 kDa บางส่วนยังทำปฏิกิริยากับ tegument ของตัวพยาธิด้วย (Amornphim et al., 1991) ซึ่งสนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้ อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับจะแพร่ผ่านเยื่อผิวต่อทางเดินน้ำดีได้ แต่ส่วนหนึ่งอาจจะผ่านทาง HLA-Class II บนเยื่อผิวต่อทางเดินน้ำดีซึ่งจะสามารถเป็น antigen-presenting cell (APC) ได้ ดังเช่นที่มีรายงานใน Mucosal Immunology ทั่วไป (Befus & Bienenstock, 1986; Kaye, 1987) ตามปกติเยื่อผิวต่อทางเดินน้ำดีไม่มี HLA Class II-expression แต่จะมีการแสดงออกในท่อน้ำดีที่มีการอักเสบในบางโรค เช่น Primary sclerosing cholangitis (Chapman et al., 1988) ในการติดเชื้อพยาธิเคยมีรายงานการแสดงออกของ Ia antigens (MHC Class II) ในเซลล์เยื่อผิวลำไส้ที่มีการติดเชื้อ

Nippostrongylus brasiliensis ในหนูแร้ช โดยเฉพาะบริเวณที่มีการอักเสบมาก ๆ (Masson & Perdue, 1990) หากเยื่อบุท่อทางเดินน้ำดีของมวนเสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับแสดงออก Is antigens จริง เหมือนกับในเยื่อบุผิวลำไส้หนูแร้ชที่ติดเชื้อจะกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของเซลล์ลิมโฟไซต์บางๆ พอให้ได้คิดกันว่า แต่อย่างไรก็ตามผู้วิจัยเชื่อว่าน่าจะมี Ia antigens expression บนเยื่อบุผิวท่อทางเดินน้ำดี ในขณะที่มีภาวะอักเสบมาก ๆ เพราะในโรคถุงน้ำดีอักเสบในคนที่มี lymphocytes infiltration มากๆ จะมี HLA-DR expression (ประจวบ, unpublished) แต่เนื่องจากยังไม่มีแอนติบอดีต่อต้าน MHC Class II ของมวนเสเตอร์ขาย ดังนั้นจึงไม่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้

ในการติดเชื้อเรื้อรังหลังจากหนึ่งเดือนไปแล้ว ระดับของแอนติบอดีจะเริ่มถึงจุดสูงสุดในรูปกราฟใกล้เคียงกันทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง แต่ที่น่าสนใจคือ ระดับของแอนติบอดีชนิด somatic และ egg antigens ในมวนเสเตอร์ที่ติดเชื้อด้วย 25 MC กลับสูงกว่ากลุ่ม 50 MC และ 100 MC อย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษาข้างบนนี้สอดคล้องกับได้เคยรายงานใน somatic antigen (Sirisinha *et al.*, 1983; Chawengkirmikul & Sirisinha, 1988) และ ES antigen (Sirisinha *et al.*, 1983) และในการศึกษาครั้งนี้ก็ได้สังเกตเห็นว่าเมื่อเพิ่มปริมาณไข่พยาธิในระดับแอนติบอดีชนิด egg antigen ที่ลดต่ำลงเหมือนกันใน heavy infection การลดลงของระดับแอนติบอดีเหล่านี้ใน heavy infection เป็นสิ่งที่น่าสนใจมาก และ นักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มเชื่อว่าเกิดจากภาวะการกดภูมิคุ้มกันจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับเรื้อรัง (immunosuppression) การปลดปล่อยแอนติเจนออกจากตัวพยาธิตลอดเวลาที่อยู่ในร่างกายสามารถกระตุ้นการกลุ่มีคุ้มกันได้ทั้งระบบ humoral (HIR) & cell-mediated (CMIR) immune responses Wongratanchewin *et al.* (1987) ได้แสดงให้เห็นว่ามีการกลุ่มีคุ้มกันทั้งการตอบสนองแบบ HIR คือ เมื่อเลือดผสมและ และ CMIR ที่กระตุ้นด้วย PHA ในมวนเสเตอร์ที่ติดเชื้อเรื้อรังในปริมาณมาก นอกจากนี้ในมวนเสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับยังสูงเกี่ยวกับการตอบสนองแบบ CMIR คือ *Ophiostrongylus* antigen ด้ว (Sirisinha *et al.*, 1982) ภาวะการกลุ่มีคุ้มกันทั้งแบบนี้จะหายไปเมื่อกำจัดพยาธิออกไป (Sirisinha *et al.*, 1982; Wongratanchewin *et al.*, 1987) ภาวะการกลุ่มีคุ้มกันทั้งแบบ HIR และ CMIR นี้มีรายงานในการติดเชื้อพยาธิมาหลายชนิด เช่น *S. mansoni* (Pelly *et al.*, 1976; Mota-Santos *et al.*, 1977) สำหรับกลไกการเกิดภาวะการกลุ่มีคุ้มกันนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกลไกการควบคุม T-cell subpopulations บางชนิด (Wongratanchewin *et al.*, 1987) ซึ่งภาวะ T-cell suppression มีรายงานว่าเกิดขึ้นได้ในหนูถีบจักรที่ได้รับการฉีดแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับชนิด *Fasciola hepatica* ในปริมาณที่สูง (Cervi *et al.*, 1996) ภาวะการกลุ่มีคุ้มกันชนิด T cell โดยเฉพาะ T helper 2 ที่เกิดในโรคติดเชื้อพยาธิต่างๆ เป็นที่ทราบกันดี เช่น schistosomiasis (Grogan *et al.*, 1998; Stadecker & Hernandez, 1998), African trypanosomes (Mabbott *et al.*, 1998) และ nematode infections (Allon & MacDonald, 1998) เมื่อมีการตอบสนองของ T cell ลดลงก็อาจมีผลทำให้การ

สร้างแอนติบอดีลดลงด้วย และทวารมียังมีรายงานใน T-cell immunodeprived hamsters ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (Flavell & Flavell, 1986)

จุดที่น่าสนใจอีกจุดหนึ่ง คือ ระดับแอนติเจนคือ ES antigen ในทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันแม้จะมีแนวโน้มนอกสัณฐานกับ somatic & egg antigens ดังกล่าวมาแล้ว แสดงให้เห็นว่ายาจะมี immunosuppressive components บางอย่างใน somatic and egg antigens ที่สามารถกระตุ้นให้ร่างกายมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่อ่อนลงในการติดเชื้อจริง ทั้งนี้เนื่องจาก somatic & egg antigens มี common antigens ที่ร่วมกันเป็นส่วนใหญ่ (Wongratanascheewin *et al.*, 1988c) immunosuppressive components อาจจะอยู่ในส่วนของเปลือกไข่ (egg shell) หรือ tegument หรือ cytoskeleton ของตัวพยาธิ ในพยาธิชนิดอื่น เช่น onchocerciasis พบว่ามี immunosuppressive components ที่ชื่อว่า onchocystatin ในส่วนของ hypodermis และ basal layer of cuticle ของตัวอ่อนระยะ L3, molting L3, L4, female adult worm และ egg shell (Lustigman *et al.*, 1992) อย่างไรก็ตาม ES antigen ของพยาธิใบไม้ตับกับโปรตีนบางส่วนที่ร่วมกันกับ somatic antigen แต่ต่างกันตรงปริมาณที่น้อยกว่าจึงอาจทำให้มีการกลุ่บด้านที่ทนน้อยกว่า ES antigen ในพยาธิชนิดอื่นก็มีรายงาน specific fraction ของ parasite antigens สามารถชักนำให้เกิด immunosuppression ได้ เช่น ES product ขนาด 17 kDa ของ filariae สามารถลดการทำงานของ T cells ได้ (Hartman *et al.*, 1997) หรือ high molecular weight components ของพยาธิ *A. scurris suum* สามารถชักนำให้เกิดทั้ง HIR & CMIR suppression (Faquim-Mauro & Macedo, 1998) สำหรับพยาธิใบไม้ตับเองก็เคยมีรายงานว่า B cells และ T cells มีการตอบสนองต่อแอนติเจนแต่ละ fraction ต่างกัน (Wongratanascheewin *et al.*, 1991) ดังนั้นจึงน่าจะมีการศึกษา immunosuppressive components ในแต่ละ antigen fraction เพื่อจะได้รู้รายละเอียดการเกิดการกลุ่บด้านที่ทนใบไม้ตับเชื้อพยาธิใบไม้ตับ นอกจากนี้ผลการศึกษาระบบของทางแอนติเจนตัวต่อตัวแบบที่เห็นที่ 3 พบได้เช่นกัน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าในการนำไปใช้วินิจฉัยการติดเชื้อ ES antigen น่าจะเป็นแอนติเจนที่ดีที่สุดเพราะมีความไวดีที่สุด ความจำเพาะ (specificity) สูงกว่า somatic antigen (Wongratanascheewin *et al.*, 1988a,c) มีการตรวจการกลุ่บด้านที่ทนน้อยที่สุด และ หลังการรักษาระดับแอนติบอดีลดลงเป็นส่วนหนึ่งกับปริมาณการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับซึ่งอาจจะใช้บ่งชี้ถึงปริมาณการติดเชื้อในครั้งแรกในระยะเวลาเดียวกัน

สำหรับด้านพยาธิวิทยาของถุงน้ำดี และ ท่อน้ำดีนอกตับที่เกิดจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ การศึกษาครั้งนี้เป็นครั้งแรกที่รายงานลักษณะพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นอย่างเป็นระบบ ทั้งระยะเฉียบพลัน (acute phase) ระยะเรื้อรัง (chronic phase) และ หลังการรักษา (post-treatment) การศึกษาในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าพยาธิสภาพในท่อน้ำดีนั้นเกิดขึ้นตั้งแต่วันแรกของการติดเชื้อ นั่นก็หมายความว่าตุ่มกักของ sucker ของพยาธิใบไม้ตับบริเวณนี้ก่อให้เกิดน้ำดีอักเสบตั้งแต่วันแรกของการติดเชื้อ (ประมาณ 30 วัน) มีลักษณะพยาธิสภาพที่สำคัญได้แก่ acute and subacute inflammation,

mucosal hyperplasia, goblet cell metaplasia and increased mucus secretion และพบว่าความรุนแรงของพยาธิสภาพขึ้นกับปริมาณการติดเชื้อ พยาธิสภาพที่มักเกิดขึ้นตามมีสภาวะโรคได้ 2 ทางใหญ่ๆ คือ mechanical irritation/toxic substances และ immunopathological processes ดังที่มีนักวิทยาศาสตร์เหล่านั้นได้ตั้งข้อสังเกตไว้ (Hou, 1955; Bhamarapravali *et al.*, 1978) สำหรับสภาวะโรคทางด้าน mechanical irritation อาจเกิดจากตัวพยาธิที่เคลื่อนไหว การกลืนกิน และการเกาะติดของ sucker ทำให้มีการระคายเคืองต่อเยื่อเมือก โดยเฉพาะบริเวณที่มีตัวพยาธิอาศัยอยู่ทำให้เกิดมี atrophic mucosa และ goblet cell metaplasia ซึ่งเป็นการปรับตัวอย่างหนึ่ง การศึกษาครั้งนี้สนับสนุนสมมติฐานนี้เพราะพยาธิสภาพที่พบในท่อน้ำดีบนตับซึ่งพบตัวพยาธิอาศัยอยู่ตลอดเวลามีความรุนแรงมากกว่าในถุงน้ำดีซึ่งพบตัวพยาธิไม่ตลอดเวลาและส่วนใหญ่ไม่ได้สัมผัสกับเยื่อเมือกมาก ในส่วนของสารพิษที่ขับออกจากตัวพยาธิในไม้คั่นและ ใบทำจากเยื่อเมือกที่ทอทางเดินน้ำดีนั้นยังไม่เคยมีการศึกษาที่แน่ชัด แต่ในพยาธิชนิดอื่นพบมีการหลั่งเอนไซม์ต่างๆ โดยเฉพาะกลุ่ม cysteine proteinase ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเกิดโรค การบุกรุกเนื้อเยื่อต่างๆ และ การหลบหนีภูมิคุ้มกันของร่างกาย (McKerrow, 1989; Maizels *et al.*, 1993) Park *et al.* (1995) รายงานว่า cysteine proteinase 4 isotypes ใน ES products และ adult worm extract ของ *C. sinensis* และ ยังพบว่า 24 kDa proteinase จาก ES products มีความเป็นพิษสูงที่สุดต่อ Chinese hamster ovary cells นอกจากนี้ cysteine proteinase ยังมีรายงานในพยาธิใบไม้คั่นชนิด *Fasciola hepatica* ด้วย (McGinty *et al.*, 1993) และยังพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้เป็น immunodominant antigens ใน fascioliasis ด้วย (Cordova *et al.*, 1997) ดังนั้นเอนไซม์ชนิดนี้น่าจะมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดพยาธิสภาพรวมทั้งอาจจะเป็น major immunogens ในโรคพยาธิใบไม้คั่นและควรอย่างยิ่งที่จะมีการศึกษาในรายละเอียด

นอกจากสภาวะโรคทางด้าน mechanical ดังกล่าวข้างต้นแล้ว สภาวะโรคทาง immunopathological processes ก็อาจมีส่วนสำคัญในการทำให้เกิดโรค (Bhamarapravali *et al.*, 1978; Flavell & Flavell, 1986) โดยเฉพาะในช่วง late acute phase ต่อเนื่องไปถึง chronic phase หลักฐานที่สำคัญ คือ การที่มี heavy lymphocyte & young plasma cell infiltration รอบท่อน้ำดีตั้งแต่วันที่ 14 หลังการติดเชื้อ และการ infiltrate ของเซลล์อักเสบเหล่านี้เป็นการตอบสนองต่อแอนติเจนที่แพร่ผ่านทางเยื่อเมือกท่อน้ำดี ซึ่งพบตั้งแต่วันที่ 3 หลังการติดเชื้อจากการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งการตอบสนองของเซลล์อักเสบนี้มักจะอยู่บริเวณที่พบตัวพยาธิเนื่องจากมีแอนติเจนที่แพร่เข้ามาในปริมาณที่มาก หากมีคำถามว่าแล้วเซลล์อักเสบเหล่านี้ตอบสนองต่อ mechanical irritation จากตัวพยาธิอย่างเดียวได้หรือไม่ ซึ่งคำถามหลักการนำจะน้อยมากเนื่องจาก mucosa เป็น barrier ที่ดีมาก หลักฐานที่เด่นชัดที่สุดที่ชี้ชัดว่าแอนติเจนของพยาธิใบไม้คั่นน่าจะเป็นตัวการสำคัญในการ recruitment เอนไซม์อักเสบมา คือ periportal infiltration รอบ first order bile duct ในตัวที่มี *Opisthorchis antigen* ในเยื่อเมือกซึ่งตรวจพบได้ด้วยเทคนิคทาง Immunohistochemistry (รูปที่ 3.IID) ซึ่งท่อน้ำดีเล็กขนาด

มีตัวพยาธิใบไม้คันไม่สามารถแพร่เข้าไปอาศัยได้ สิ่งนี้การกลืนสมรรถนะ ท่อทางเดินน้ำดีเป็นจำนวนมากนั้นเป็นน่าจะเป็นในส่วนของตอบสนองต่อแอนติเจนที่แพร่ผ่านทางท่อน้ำดี และ ถือว่า เป็น immunopathological processes อย่างหนึ่ง

นอกจากเซลล์ลิมโฟไซต์ lymphocyte และ plasma cells แล้ว ยังมีเซลล์กับกรพชาติ อื่นๆ อีกที่ infiltrate ในระบบท่อน้ำดี เช่น macrophages eosinophils และ mast cells เซลล์ อีกแบบเหล่านี้สามารถสังเคราะห์ และ ปล่อยออกมาได้มากมาย เพื่อใช้ทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม และ ในขณะที่พวกมันก็สามารถทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อของร่างกายหรือเกิดพยาธิสภาพ ด้วย หนึ่งในจำนวนนี้ที่สำคัญ คือ nitric oxide (Miller & Britigan, 1997) ในโรคคิตซึยพยาธิใบไม้คันในแฮมสเตอร์ มีรายงานว่า nitric oxide synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยสร้าง nitric oxide พบเพิ่มมากขึ้นใน macrophages, eosinophils และ mast cells (Ohshima *et al.*, 1994) และจากการศึกษาในช่วงสั้นปีที่ตามมาสนับสนุนว่า endogenous nitrosation ซึ่งพบมากขึ้นในสัตว์ทดลอง หรือผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้คัน น่าจะเป็นปัจจัยหนึ่งในการทำให้เกิดภาวะเร่งท่อน้ำดี (Srivatanakul *et al.*, 1991; Haswell-Elkima *et al.*, 1994; IARC, 1994; Ohshima *et al.*, 1994; Satarug *et al.*, 1996; Vatanasapt *et al.*, 1999)

นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ดังได้แสดงให้เห็นการเพิ่มขึ้นของ mast cells ในลักษณะ quantitative study เป็นครั้งแรกในการติดเชื้อพยาธิใบไม้คันด้วย โดย mast cells ที่เพิ่มขึ้นนี้เป็น ชนิด mucosal mast cells ซึ่งเป็น T-cell dependent type โดย interleukin (IL)-3 และ IL-4 เป็น cytokines ที่สำคัญในการ differentiation และ growth & proliferation (Steven & Austen, 1989; Haig & Miller, 1990; Finkelman *et al.*, 1991) ซึ่งค่าจาก connective tissue mast cells (CTMC) ซึ่งเป็น T-cell independent type การศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่า mast cells เริ่มมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นชัดเจนตั้งแต่เดือนแรกหลังการติดเชื้อและสูงขึ้นเรื่อยๆ จนถึงจุดสูงสุด แสดงว่าพยาธิใบไม้คันสามารถทำให้เกิด mast cell hyperplasia แบบจำเพาะได้ดังเช่น trematode อื่นๆ และเมื่อกำจัดพยาธิออกไปในเดือนที่ 6 พบว่าจำนวน mast cells ส่วนใหญ่จะลดลงอย่างรวดเร็วในเดือนต่อๆ ซึ่งตรงกับข้อเท็จจริงที่ว่า mucosal mast cells ในสัตว์เลี้ยง (rodent) จะมีอายุประมาณ 30-40 วัน ส่วน CTMC จะมีอายุยืนยาวกว่า (Befus & Bienenstock, 1984) นอกจากนี้ mast cell ที่ infiltrate เหล่านี้ส่วนใหญ่มี *Opisthorchis*-specific IgE เกาะอยู่บนผิวเพราะสามารถตรวจพบ *Opisthorchis* antigen บนผิวของ mast cells จากการย้อม double staining (บรรจบ, unpublished) เมื่อมีการกระตุ้นจากแอนติเจนของพยาธิ mast cells ก็จะหลั่งสาร (mediators) ออกมามากมาย โดยเฉพาะ histamine, serotonin, tryptase, leukotrienes และอื่นๆ (Lee *et al.*, 1986; McKay & Bienenstock, 1994) ซึ่งสารต่างๆ เหล่านี้มีผลทำให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ ตามมา โดยเฉพาะ mucous secretion และ fibrosis (Miller, 1987; Gordon *et al.*, 1990) ซึ่งพบได้ในโรคคิตซึยพยาธิใบไม้คัน

พยาธิสภาพอีกอย่างหนึ่งที่เด่นชัดที่สุดในโรคตับเรื้อรังคือ fibrosis ของ
ผนังท่อท่อน้ำดี นอกตับ และ ผนังถุงน้ำดี ซึ่งเหมือนกับรายงานที่พบในท่อน้ำดีในตับทั้งใน
คน (Riganti *et al.*, 1989) และในสัตว์ทดลอง (Hassanapragari *et al.*, 1978) นอกจากนี้ fibrosis
ในตับและท่อน้ำดีในโรคตับเรื้อรังในสัตว์ยังมีการศึกษาทั้งทางจุลพยาธิวิทยา ซึ่งพบว่ามีการสะสม
collagen โดยเฉพาะ type III สูงขึ้นในตับและหลอดเลือดที่ดัดขึ้นที่เรื้อรัง (Hutadilok & Ruengwongsa,
1983; Chotigeat & Ruengwongsa, 1986) และทางรังสีวิทยาโดยพบว่าในผู้ที่มีการดัดขึ้นที่เรื้อรังใน
ตับในปริมาณที่มากจะมี enhanced portal vein radicle echoes และ wall irregularity & thickened
ในถุงน้ำดีโดยการตรวจทางอัลตราซาวด์ (Elkins *et al.*, 1991; Haswell-Elkins *et al.*, 1991;
Mairiang *et al.*, 1992) อัลตราซาวด์ echoes นี้ได้พิสูจน์ในสัตว์ทดลองที่ดัดขึ้นที่เรื้อรังในตับชนิด *C.
sinensis* ว่าเป็นส่วนของ periductal fibrosis ในตับ (Hong *et al.*, 1994) และควรมีผลใกล้เคียงกับ
การเกิดภาวะเยื่ออักเสบในตับที่ 9 หลังการรักษาด้วยยา Praziquantel (Mairiang *et al.*, 1993)
ซึ่งการศึกษาครั้งนี้อาจได้สนับสนุนว่าพยาธิสภาพหลายๆ อย่างของถุงน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับของ
หมอนมดลูกอาจถึงแก่การกำจัดพยาธิออกไปโดยเฉพาะการอักเสบ อย่างไรก็ตาม fibrosis ของท่อน้ำดี
ท่อน้ำดีในตับก็ยังไม่ลดลงถึงขั้นปกติในระยะเวลา 6 เดือนหลังการรักษา และ คงต้องใช้เวลา
นานกว่านี้ ซึ่งคล้ายกับที่มีรายงานในกระด้างที่ดัดขึ้น *C. sinensis* ที่ทำการรักษาแล้ว 3 เดือน ยังมี
ภาวะ periductal fibrosis เหลืออยู่ (Hong *et al.*, 1994) หรือในกระด้างที่ดัดขึ้น *Schistosoma
japonicum* ซึ่งมี severe liver fibrosis สามารถวัดปริมาณ collagen ได้สูงกว่าตับปกติถึง 16 เท่า
และหลังการกำจัดพยาธิออกไปพบว่า fibrosis ค่อยๆ ลดลง อย่างไรก็ตามในเดือนที่ 10 หลังการ
รักษาแล้วยังมีปริมาณของ collagen สูงกว่าปกติถึง 3 เท่า (Dunn *et al.*, 1994) สำหรับกลไกการ
เกิดภาวะ fibrosis ในโรคตับเรื้อรังในสัตว์ยังไม่ได้รับการศึกษาแน่ชัดในรายละเอียด (Haswell-
Elkins *et al.* (1991) พบว่า portal vein radicle echoes มีความสัมพันธ์กับ parasite-specific IgG
levels แต่กลไกในระดับเล็กยังไม่ทราบแน่ชัด และจากการศึกษาโดยวิธี Immunohistochemistry ใน
ครั้งนี้ จะเห็นว่าในรายที่มี periductal fibrosis มากๆ และมีตัวพยาธิอยู่ในบริเวณนั้นจะพบว่ามี
antigen diffusion ค่อนข้างมาก (รูปที่ 3.11C) เมื่อเปรียบเทียบกับท่อน้ำดีที่มี fibrosis น้อยกว่า ดัง
นั้นอาจเป็นไปได้ว่าในรายที่มี fibrosis มากจะมี parasite antigen แพร่เข้าสู่ circulation และ
กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันมากขึ้น นอกจากนี้เซลล์อักเสบต่างๆ ที่เข้ามาอุดกั้นท่อน้ำดีโดยเฉพาะ
lymphocytes, macrophages & mast cells เซลล์เหล่านี้สามารถสร้าง fibrogenic cytokines โดย
เฉพาะ IL-1, IL-2, fibroblast growth factor, transforming growth factor, histamine etc. ซึ่งสารเคมี
เหล่านี้สามารถกระตุ้น fibroblast differentiation, proliferation, migration และ collagen
production และทำให้เกิด tissue fibrosis ในที่สุด (MacKenzie *et al.*, 1987; Kovac, 1991; Wyler,
1992)

สรุปผลการศึกษา

1. คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาทางปรสิตวิทยา อิมมูโนวิทยา ภูมิคุ้มกันวิทยา และพยาธิวิทยาของอุ้งน้ำที่และท่าที่น้ำฝนสกปรกในแสมสาครที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ จำนวน 3 กลุ่ม คือ 25 MC, 50 MC และ 100 MC เป็นเวลา 6 เดือน และหลังการรักษารวหรือกำจัดพยาธิด้วยยา Praziquantel อีก 6 เดือน
2. ผลการศึกษาทางปรสิตวิทยารับว่า worm recovery rate ทั้งตามกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันตลอดระยะเวลา 6 เดือนก่อนการรักษา โดยมีเฉลี่ย 50%, 55.2% และ 46.7% ในกลุ่มที่ติดเชื้อ 25 MC, 50 MC และ 100 MC ตามลำดับ แต่ปริมาณการออกไข่ต่อตัว (EPG/worm) ยังคงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่ติดเชื้อในปริมาณสูง (50 MC และ 100 MC) หลังการรักษาไม่พบพยาธิและไข่
3. ผลการศึกษาทางอิมมูโนวิทยาพบระดับแอนติบอดีต่อ ES, somatic & egg antigens ขึ้นสูงชัดเจนครั้งแรก 14 วันหลังการติดเชื้อ ในระยะแรกของการติดเชื้อพบว่าระดับแอนติบอดีต่อแอนติเจนทุกชนิดเป็นแบบ dose dependent ส่วนระยะหลังจากหนึ่งเดือนไปแล้วพบว่าระดับแอนติบอดีต่อ somatic และ egg antigens ในกลุ่มที่ติดเชื้อ 25 MC สูงกว่ากลุ่มที่ติดเชื้อ 50 MC และ 100 MC ส่วนระดับแอนติบอดีต่อ ES antigen ไม่แตกต่างกัน หลังการรักษาระดับแอนติบอดีต่อแอนติเจนชนิดต่างๆ ลดลงเมื่อกำจัดพยาธิออกไป แต่ก็ยังสูงกว่าค่าปกติ และ ระดับแอนติบอดีต่อ ES antigen ที่อนึ่งจะลดลงเป็นสัดส่วนตามปริมาณพยาธิที่ติดเชื้อเข้าไป
4. ผลการศึกษาทาง Immunohistochemistry และ Immunopathology พบว่าสามารถตรวจพบ *Opisthorchis* antigens ในเยื่อผิวที่อวัยวะน้ำคั่งในถุงน้ำดีและโดยเฉพาะในท่อน้ำดีนอกตับอย่างเด่นชัดตั้งแต่วันที่ 3 หลังการติดเชื้อ นอกจากพบบนเยื่อผิวแล้วยังพบแอนติเจนบางส่วนแพร่เข้าไปในเนื้อเยื่อข้างเคียงด้วย โดยเฉพาะบริเวณที่มีตัวพยาธิอาศัย ส่วนในตับนอกจากจะตรวจพบแอนติเจนบนเยื่อผิวท่อน้ำดีในตับที่อยู่ใกล้ตัวพยาธิแล้วยังตรวจพบในเซลล์ตับบริเวณ periportal area และในอีกบริเวณท่อน้ำดีขนาดเล็กที่ไม่มีตัวพยาธิอาศัย ซึ่งการตรวจพบแอนติเจนของพยาธินี้จะควบคู่ไปกับการที่มีเซลล์อักเสบเข้าไปรื้อถอนและทำให้เกิดพยาธิสภาพ
5. การตรวจหาแหล่งของแอนติเจนของพยาธิใบไม้ดีด้วยการใช้ hyperimmune serum ต่อ infected bile ด้วยวิธี Immunoblotting พบว่าแอนติเจนของพยาธิใบไม้ดีในน้ำดีส่วนใหญ่อยู่ใน protein doublet ช่วง 7-20.4 kDa และส่วนน้อยในโปรตีนช่วง 20.4-29 kDa เมื่อศึกษาด้วยวิธี Immunohistochemistry พบว่าส่วนใหญ่จะ recognize โปรตีนใน sperm, ooca, miracidium and cytoskeleton

6. การศึกษาครั้งนี้ได้แสดงชัดเจนเกินครึ่งแรกว่ามีแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับในซีรัมของแบบจำลองที่ติดเชื้อ ด้วยการให้ hyperimmune serum คือ infected serum เมื่อศึกษาด้วยวิธี immunoblotting พบว่ามี immunogenic fraction มีตัว bands ตั้งแต่ 29-83 kDa และเมื่อศึกษาทาง immunohistochemistry พบว่าแอนติบอดีมีส่วนใหญ่ recognize ในส่วน tegument, ovarian cell, miracidium และ cytoskeleton
7. การศึกษาทางพยาธิวิทยาของถุงน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับพบพยาธิสภาพที่สำคัญ คือ inflammation, ductal dilation, goblet cell metaplasia & mucus secretion และ fibrosis เซลล์อักเสบที่พบมากที่สุด lymphocytes, plasma cells, eosinophils, macrophages และ mast cells ในระยะแรกของการติดเชื้อสภาพเป็นลักษณะ dose dependent และความรุนแรงจะมากขึ้นเรื่อยๆ และ ค่อนข้างคงที่ใน chronic infection และพยาธิสภาพในท่อน้ำดีนอกตับแตกต่างกันไม่มากในทั้งสามกลุ่มการทดลอง พยาธิสภาพในท่อน้ำดีนอกตับมีความรุนแรงมากกว่าในถุงน้ำดีในบริเวณพยาธิใบไม้เข้าไปและระยะเวลาเดียวกัน
8. หลังการศึกษา mast cells พบว่ามีทั้ง mucosal mast cells (MMC) และ connective tissue mast cells (CTMC) โดย MMC ส่วนใหญ่พบในบริเวณ mucosa และ CTMC พบบริเวณ serosa เมื่อศึกษาวิธี quantitative study พบว่า MMC เพิ่มขึ้นในเคื่องแรกของการติดเชื้อโดยเฉพาะในกลุ่มที่ติดเชื้อปริมาณมาก หลังจากนั้นจำนวน mast cells ก็จะถึง peak โดยเฉลี่ยประมาณ 150 cells/mm² ในทุกกลุ่มการทดลอง
9. หลังการวิเคราะห์ว่าพยาธิสภาพส่วนใหญ่โดยเฉพาะเซลล์อักเสบแสดงอย่างเห็นได้ชัดรวมทั้ง mast cells ก็ลดลงอย่างรวดเร็ว ปริมาณ goblet cells และ mucus ค่อยๆ ลดลงตามลำดับ โดยในกลุ่มที่ติดเชื้อปริมาณน้อยความรุนแรงของพยาธิสภาพจะลดลงเร็วกว่าที่ติดเชื้อปริมาณมาก แต่ มีภาวะ คั่งๆ ถดถอยบ้าง โดยเฉพาะในกลุ่มที่ติดเชื้อปริมาณมาก และยิ่งมากกว่าเกณฑ์ปกติในเดือนที่ 6 หลังการรักษา แต่ ductal dilatation ลดลงเกือบปกติ

บทที่ 5

หนังสืออ้างอิง

- Acosta-Ferreira, W., Vercelli-Rega, J. and Falconi, L.M. (1979) *Fasciola hepatica* human infection. Histopathological study of 16 cases. *Virchows Arch. (Pathol. Anat.)* 383: 319-327.
- Agnew A.A., Fulford A.J.C., Mwanje M.T. *et al.* (1996) Age-dependent reduction of schistosome fecundity in *Schistosoma haematobium* but not *Schistosoma mansoni* infections in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55:338-343.
- Allen J.E. and MacDonald A.S. (1998) Profound suppression of cellular proliferation mediated by the secretions of nematodes. *Parasite Immunol.* 20: 241-247.
- Amornpant S., Sarasombath S. and Sirisinha S. (1991) Production and characterization of monoclonal antibodies against the excretory-secretory antigen of the liver fluke (*Opisthorchis viverrini*). *Int. J. Parasitol.* 21: 421-428.
- Akai P.S., Pungpak S., Kitikoon V., Chaicumpa W., Butnag D. & Befus A.D. (1992) Separation and characterization of adult worm proteins and glycoproteins from the liver fluke *Opisthorchis viverrini*. *Journal of Parasitology* 78, 672-680
- Apinhasmit, W., Sobhon, P., Saithongdee, P., Menayotin, S. and Upatham, E.S. (1994) *Opisthorchis viverrini*: ultrastructure of the tegument of the first-week juvenile and adult flukes. *Int. J. Parasitol.* 24: 613-621.
- Befus, A.D. and Bienstock, J. (1984) Induction and expression of mucosal immune responses and inflammation to parasitic infections. *In*: Marchalonis, J., ed. *Contemporary Topics in*

Immunobiology. Immunobiology of Parasitic Infections. New York: Plenum Press, pp. 71-108.

- Bhamarapravati, N., Thamavit, W. and Vajrasthira, S. (1978) Liver changes in hamsters infected with a liver fluke of man, *Opisthorchis viverrini*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27: 787-794.
- Bienenstock, J. and Befus, A.D. (1980) Mucosal Immunology. *Immunology* 14: 249-270.
- Bushara H.O., Hussein M.F., Miriam A. et al. (1983) Observations on cattle schistosomiasis in the Sudan, a study in comparative medicine: IV, Preliminary observations on the mechanism of naturally acquired resistance. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32: 1065-1070.
- Cervi L., Rubinstein H. and Manh D.T. (1996) Involvement of excretion-secretion products from *Fasciola hepatica* inducing suppression of the cellular immune responses. *Vet. Parasitol.* 61: 97-111.
- Chawengkirtikul R. & Sirisinha S. (1988) Antibodies in serum and bile of hamsters experimentally infected with *Opisthorchis viverrini*. *Int. J. Parasitol.* 18: 721-727.
- Chaimuvati, T., Paosawadhi, A., Sripranoth, M., Manasatith, S. and Viranuvatti, V. (1976) Carcinoma of the cystic duct associated with opisthorchiasis. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth.* 7: 482-486.
- Chapman, R.W., Kelly, P.M.A., Heryer, A., Jewell, D.P. and Fleming K.A. (1988) Expression of HLA-DR antigens on bile duct epithelium in primary sclerosing cholangitis. *Gut* 29: 422-427.
- Chotigeat, W. and Ruenwongsa, P. (1986) Types of collagen in *Opisthorchis viverrini* infected hamster liver. *Mol. Biochem. Parasitol.* 18: 377-387.
- Cordova, M., Herrera, P., Nopo, L., Bellatin, J., Naquira, C., Guerra, H. and Espinoza JR (1997) *Fasciola hepatica* cysteine proteinase: immunodominant antigens in human fascioliasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57: 660-665.
- Cox, F.E.G. and Liew, E.Y. (1992) T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Parasitol. Today* 8: 371-374.
- Dhiensiri, T., Eun-Ananta, Y., Runnag, D., Harinasuta, T. and Schelp, P.F. (1984) Roentgenographically controlled healing of gall bladder lesion in opisthorchiasis after praziquantel treatment. *Drug Res.* 34: 1175-1177.
- Ditrich, O., Scholz, T. and Giboda, M. (1990) Occurrence of some medically important flukes (Trematoda: Opisthorchiidae and Heterophyidae) in Nam Ngum Water reservoir, Laos. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth.* 21: 482-488.

- Doenhoff M.L., Musallam R., Barn J. *et al* (1978) Studies on the host-parasite relationship in *Schistosoma mansoni*-infected mice: The immunological dependence of parasite egg excretion. *Immunology* 35: 771-778.
- Dunn, M.A., Cheever, A.W., Paglia, L.M., Kelly, E.P., Duvall, R.H., Andrade, Z.A. and Goldner, F.H. (1994) Reversal of advanced liver fibrosis in rabbits with *Schistosoma japonica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50: 499-505.
- Elkins D.B., Haswell-Elkins M.R. and Anderson R.M. (1986) The epidemiology and control of intestinal helminths in the Pulicat Lake region of Southern India. I. Study design and pre- and post-treatment observations on *Ascaris lumbricoides* infection. *Trans.R.Soc. Trop. Med. Hyg.* 80: 774-792.
- Elkins, D.B., Haswell-Elkins, M.R., Mairiang, E., Mairiang, P., Kaewkes, S., Sithithaworn, P., Bhudhisawasdi, V. and Uttaravichien, T. (1990) A high frequency of hepatobiliary disease and cholangiocarcinoma associated with heavy *Opisthorchis viverrini* infection in a small community in Northeast Thailand. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84: 715-719.
- Elkins, D.B., Sithithaworn, P., Haswell-Elkins, M.R., Kaewkes, S., Awacharagan, P. and Wongratunacheewin, S. (1991) *Opisthorchis viverrini*: relationships between egg counts, worm recovered and antibody levels within an endemic community in Northeast Thailand. *Parasitology* 102: 283-288.
- Ernst, P.B., Befus, A.D. and Bienenstock, J. (1985) Leukocytes in the intestinal epithelium: an unusual immunological compartment. *Immunol. Today* 6: 50-55.
- Evan, H., Bourgeois, C.H., Comer, D.S. and Keschamraz, N. (1971) Biliary tract changes in opisthorchiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20: 667-671.
- Faquin-Mauro E.L. & Macedo M.S. (1998) The immunosuppressive activity of *Ascaris suum* is due to high molecular weight components. *Clin. Exp. Immunol.* 114: 245-251.
- Finkelman, F.D., Pearce, E.J., Udrban, J.F., Jr. and Sher, A. (1991) Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses. *Immunol. Today* 12: A62-A66.
- Flavell, D.J. and Flavell, S.U. (1986) *Opisthorchis viverrini*: pathogenesis of infection in immunodeprived hamster. *Parasite Immunol.* 8: 455-466.
- Flavell, D.J. and Lucas, S.B. (1982) Potentiation by the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, of the carcinogenic action of N-nitrosodimethylamine upon the biliary epithelium of the hamster. *Br. J. Cancer* 46: 985-989.

- Flavell, D.J. and Lucas, S.B. (1983) Promotion of N-nitrosodimethylamine-initiated bile duct carcinogenesis in the hamster by human liver fluke, *Opiathorchis viverrini*. *Carcinogenesis* 4: 927-930.
- Flavell D.J., Pattanapanyasat K. & Flavell S.B. (1980) *Opiathorchis viverrini*: partial success in adoptively transferring immunity with spleen cells and serum in hamster. *J. Helminthol.* 54: 191-197.
- Grogan J.L., Kremsner P.G., Deelder A.M. & Yazdanbakhsh M. (1998) Antigen-specific proliferation and interferon-gamma and interleukin-5 production are down-regulated during *Schistosoma haematobium* infection. *J. Inf. Dis.* 177: 1433-1437.
- Giboda, C., Ditrich, O., Scholz, T., Viengsay, T. and Bouaphanh, S. (1991) Human *Opiathorchis* and *Haplorchis* infection in Laos. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85: 538-540.
- Gibson, J.B. and Sun, T. (1971) Clonorchiasis. In: Marcial-Rojas, ed., Pathology of Protozoal and Helminthic Diseases. Baltimore: Williams and Wilkins, pp. 546-566.
- Gordon, J.R., Burd, P.R. and Galli, S.J. (1990) Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunol. Today* 11: 458-464.
- Grossman, Z. and Herberman, R.B. (1986) Immune surveillance without immunogenicity. *Immunol. Today* 7: 128.
- Haig, D.M. and Miller, H.R.P. (1990) Differentiation of bone marrow cells into effector cells. In: Behnke, J.M. ed., *Parasites: Immunity and Pathology*. London: Taylor & Francis, pp. 42-86.
- Harinasuta, C. and Harinasuta, T. (1984) *Opiathorchis viverrini*: life cycle, intermediate host, transmission to man and geographical distribution in Thailand. *Drug Res.* 34: 1164-1167.
- Harinasuta, T., Riganti, M and Bunnag, D. (1984) *Opiathorchis viverrini* infection: pathogenesis and clinical features. *Drug Res.* 34: 1167-1169.
- Hartmann S., Kyeski B., Sonnenburg H. and Lucius R. (1997) A filarial cysteine protease inhibitor down-regulates T cell proliferation and enhances interleukin-10 production. *Eur J. Immunol.* 27: 2253-2260.
- Haswell-Elkins, M.R., Satartig, S., Tsuda, M., Mairiang, E., Esumu, H., Sithithaworn, P., Mairiang, P., Saitoh, M., Yongvanit, P. and Elkins, D. B. (1994). Liver fluke infection and cholangiocarcinoma: model of endogenous nitric oxide and extragastric nitrosation in human carcinogenesis. *Mutat. Res.* 305: 241-252.

- Haswell-Elkins, M.R., Sithithaworn, P., Mairiang, E., Elkins, D.B., Wongsitakachewin, S., Kaewkes, S. and Mairiang, P. (1991) Immune responsiveness and parasite-specific antibody levels in human hepatobiliary disease associated with *Opisthorchis viverrini* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 84: 213-218.
- Hitanant, S., Yan-Ngarn Trong, D., Daumongsak, C., Chinsapak, O., Boonyapinit, S., Plengvornit, U. and Viranuvatti, V. (1987) Peritoneoscopic findings in 203 patients with *Opisthorchis viverrini* infection. *Gastrointest. Endosc.* 33: 18-20.
- Hong, S.T., Park, K.H., Seo, M., Choi, B.L., Chai, J.Y. and Lee, S.H. (1994) Correlation of sonographic findings with histopathological changes of the bile ducts in rabbits infected with *Clonorchis sinensis*. *Korean J. Parasitol.* 32: 223-230.
- Homeida, M., Abdel-Gadir, A.F., Cheever, A.W., Bennett, J.L., Arhab, B.M.O., Ibrahim, S.Z., Abdel-Salam, I.M., Dafalla, A.A. and Nash, T.E. (1988) Diagnosis of pathological confirmed Symmers' periportal fibrosis by ultrasonography: a prospective blinded study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 38: 86.
- Hou, M.-F., Ker, C.-G., Sheen, P.-C. and Chen, E.-R. (1989) The ultrasound survey of gallstone diseases of patients infected with *Clonorchis sinensis* in southern Taiwan. *J. Trop. Med. Hyg.* 92: 108-111.
- Hou, P.C. (1955) The pathology of *Clonorchis sinensis* infestation in the liver. *J. Pathol. Bacteriol.* 70: 53-64.
- Hussain, R., Grogg, M. and Ottesen, E.A. (1987) IgG antibody subclasses in human filariasis. Differential subclass recognition of parasite antigens correlates with different clinical manifestations of infection. *J. Immunol.* 139: 2794-2798.
- Hutadilok, N. and Ruenwongsa, P. (1983) Liver collagen turnover in hamsters during infection by the liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3: 71-77.
- IARC (1994) Infection with liver flukes (*Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felinus* and *Clonorchis sinensis*). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC Monographs, Volume 61, Lyon, pp. 121-175.
- Jassim, A., Hassan, K. and Catty, D. (1987) Antibody isotypes in human schistosomiasis *mansoni*. *Parasite Immunol.* 9: 627-650.
- Jones, E.A., Kay, J.M., Milligan, H.P. and Owens, D. (1977) Massive infection with *Fasciola hepatica* in man. *New Eng. J. Med.* 11: 411-421.

- Jongsuksantikul, P., Chaeychauntri, W., Techamanonkul, P., Isarith, P. and Suranavanit, P. (1992) Study on prevalence and intensity of intestinal helminthiasis and opisthorchiasis in Thailand. *J. Trop. Med. Parasitol.* 2: 80-95. (in Thai)
- Kaye P.M. (1987) Antigen presentation and the response to parasitic infection. *Parasitology Today* 3: 577-598.
- Kim, Y.L. (1984) Liver ascariasis and liver fluke infection. *Drug Res.* 34: 1121-1136.
- Khompoochima, V., Soukui, S., Chinda, K. and Stummankarn, T. (1978) Opisthorchiasis: a clinicopathologic study of 154 autopsy cases. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth.* 9: 60-68.
- Kovacs EJ. (1991). Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunol Today* 12: 17-23.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophages T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lee, S.P., Maher, K. and Nicholls, J.F. (1988) Origin and fate of biliary sludge. *Gastroenterology* 94: 170-176.
- Lee, T.G.D., Swietler, M. and Hefez, A.D. (1986) Mast cell responses to helminth infection. *Parasitol. Today* 2: 186-191.
- Lustigman T., Brouman B., Huima T., Pinner A.M. and McKerrow J.II. (1992) Molecular cloning characterization of onchocystatin, a cysteine protease inhibitor of *Onchocerca volvulus*. *J. Biol. Chem.* 247: 17339-17346.
- Maizels RM, Bundy DAP, Selkirk ME, Smith DF, Anderson RM. 1993. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human population. *Nature* 365: 797-805.
- Mabbott N.A., Coulson P.S., Smythies L.E., Wilson R.A. and Sternberg J.M. (1998) African trypanosome infections in mice that lack the interferon-gamma receptor gene: nitric oxide-dependent and -independent suppression of T-cell proliferative responses and the development of anemia. *Immunology* 94: 475-480.
- MacKenzie, C.D., Gatrill, A.J., Luty, A.J., Manyasi, D.G., Moore, C., Sayers, G. and Sulaiman, S. (1987) Inflammatory responses to parasites. *Parasitology* 94(Suppl.): 9-28.
- Mairiang, E., Elkins, D.B., Mairiang, P., Chaisakorn, J., Chamadol, Loapaiboon, V., Posti, S., Sithithaworn, P. and Haswell-Elkins, R. (1992) Relationship between *Opisthorchis viverrini* infection and hepatobiliary disease detected by ultrasonography. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 7: 17-21.

- Mairiang, E., Haswell-Ekins, M.R., Mairiang, P., Suthiaworn, P. and Ekins, D.R. (1993) Reversal of biliary tract abnormalities associated with *Opisthorchis viverrini* infection following praziquantel treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87: 194-197.
- Masson S.D. & Perdue M.H. (1990) Changes in the distribution of Ia antigen on epithelium of the jejunum and ileum in rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 57: 83-95.
- McGinty, A., Monre, M., Halton, D.W. and Walker, B. (1993) Characterization of the cysteine proteinases of the common liver fluke *Fasciola hepatica* using novel, active-site directed affinity labels. *Parasitology* 106: 487-493.
- McKerrow, J.H. (1989) Parasite proteinases. *Exp. Parasitol.* 68: 111-118.
- McKay, D.M. and Bienenstock, J. (1994) The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract. *Immunol. Today* 15: 533-538.
- Miller, H.E.P. (1987) Gastrointestinal mucus, a medium for survival and for elimination of parasitic nematodes and protozoa. *Parasitology* 94(Suppl.): 77-100.
- Miller, R.A. and Britigan, B.E. (1997) Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 1-18.
- Mota-Santos T.A., Tavares C.A.P., Gazzinelli G. & Pellegrino I. (1977) Immunosuppression mediated by adult worms in chronic schistosomiasis mansoni. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26: 727-731.
- Ohshima, H., Bandalctova, T.Y., Brouet, I., Bartsch, H., Kirby, G., Ogutbiyi, F., Vatanasapt, V. and Pipitgool, V. (1994) Increased nitrosamine and nitrate biosynthesis mediated by nitric oxide synthase induced in hamsters infected with liver fluke (*Opisthorchis viverrini*). *Carcinogenesis* 15: 271-275.
- Ottesen, E.A. (1992) Infection and disease in lymphatic filariasis: an immunological perspective. *Parasitology* 104: S71-S79.
- Park, H., Ko, M.Y., Paik, M.K., Soh, C.T., Seo, J.H. and Im, K.I. (1995) Cytotoxicity of a cysteine proteinase of adult *Clonorchis sinensis*. *Korean J Parasitol.* 33: 211-218.
- Parkhouse, R.M.E. and Harrison, L.J.S. (1989) Antigens of parasitic helminths in diagnosis, protection and pathology. *Parasitology* 99: S5-S19.
- Parkin, D.M., Srivatanakul, P., Khlat, M., Chenvidhya, D., Chotiwan, P., Insiripong, S., L'Abbe, K.A. and Wild, C.P. (1991) Liver Cancer in Thailand. I. A case-control study of cholangiocarcinoma. *Int. J. Cancer* 48: 323-328.

- Pelley R.P., Ruffier J.T. & Warren K.S. (1976) Suppressive effect of a chronic helminthic infection, schistosomiasis mansoni, on the *in vitro* responses of spleen and lymph node cells to T cell mitogens phytohemagglutinin and concanavalin A. *Infect Immun.* 13: 1176-1184.
- Preksaraaj, S. (1984) Public health aspects of opisthorchiasis in Thailand. *Drug Res.* 34: 1119-1120.
- Pungpak, S., Riganti, M., Bunnag, D. and Harinasuta, T. (1985) Clinical features in severe *Opisthorchis viverrini*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health* 16: 405-409.
- Pungpak, S., Sommanit, S., Santhasoomai, P. and Vivatanaseth, P. (1989) Ultrasonographic study of the biliary system in opisthorchiasis patients after treatment with praziquantel. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health* 20: 157-162.
- Ramsay, R.L., Sithithaworn, P., Prociv, P., Moorhouse, D.E. and Methaplat, C. (1989) Density dependent fecundity of *Opisthorchis viverrini* in humans, based on faecal recovery of flukes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83: 241-242.
- Rappaport, I., Albukerk, J. and Schneider, I.J. (1975) Schistosomal cholecystitis. *Arch. Pathol.* 99: 227-228.
- Riganti, M., Pungpak, S., Punpoowong, H., Bunnag, D. and Harinasuta, T. (1989) Human pathology of *Opisthorchis viverrini* infection: a comparison of adults and children. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth* 20: 95-100.
- Riganti, M., Pungpak, S., Sachakul, V., Bunnag, D. and Harinasuta, T. (1988) *Opisthorchis viverrini* egg and adult flukes as nidus and composition of gall stones. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health* 19: 633-636.
- Rim, H.J. (1986) The current pathobiology and chemotherapy of clonorchiasis. *Korean J. Parasitol.* 24(Suppl.): 1-141.
- Sadun, H.H. (1955) Studies on *Opisthorchis viverrini* in Thailand. *Am. J. Hyg.* 62: 81-115.
- Satarug, S., Haswell-Elkins, M.R., Tsuda, M., Mairiang, P., Sithithaworn, P., Mairiang, V., Esumi, H., Sukprasert, S., Yongvanit, P. and Elkins, D.B. (1996) Thiocyanate-independent nitrosonation in humans with carcinogenic parasite infection. *Carcinogenesis* 17: 1075-1081.
- Scott, P., Pearce, E., Cheever, A.W., Coffman, R.L. and Sher, A. (1989) Role of cytokines and CD4 + T-Cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol. Rev.* 112: 160-182.

- Sher, A. and Coffman, R.L. (1992) Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Ann. Rev. Immunol.* 10: 385-409.
- Silulhaworn, P., Tesana, S., Pipitgool, V., Kaewkes, S., Pairojkul, C., Srija, B., Paupairuj, A. and Thakkar, K. (1991) Relationship between faecal egg count and worm burden of *Opisthorchis viverrini* in human autopsy cases. *Parasitology* 102: 277-281.
- Sitnimarkarn, T. (1960) The necropsy incidence of gallstones in Thailand. *Am. J. Med. Sci.* 240: 342.
- Sirisinha S., Tuti S., Tawatsin A & Rattanasirtwilai W. (1982) Lack of evidence for protective immunity in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*. In *Immunology of Tropical Parasitic Infections in Asia and Pacific Region*, eds. J.W. Mak & H.S. Yong, p. 91-100, Kuala Lumpur.
- Sirisinha S., Tuti S., Vichasri S. & Tawatsin A. (1983) Humoral immune responses in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 14: 243-251.
- Srija, B., Haswell-Elkinn, M.R. and Sinuwat, P. Histological analysis of cholecystitis in association with opisthorchiasis. Abstract in The XIIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Pattaya, Thailand, 1992. p.231.
- Srivatanakul, P., Ohshima, H., Khat, M., Parkin, M., Sukaryodhin, S., Bruet, I. And Bartsch, H. (1991). *Opisthorchis viverrini* infestation and endogenous nitrosamines as risk factors for cholangiocarcinoma in Thailand. *Int. J. Cancer* 48: 821-825.
- Stadecker M.J. and Hernandez H.J. (1998) The immune response and immunopathology in infection with *Schistosoma mansoni*: a key role of major egg antigen Sm-p40. *Parasite Immunol.* 20: 217-221.
- Stevens, R.L. and Austen, K.F. (1989) Recent advances in cellular and molecular biology of mast cells. *Immunol. Today* 10: 381-386.
- Sun T. & Gibson J.B. (1969) Antigens of *Clonorchis sinensis* in experimental and human infections. An analysis by gel diffusion technique. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18: 241-252.
- Tansurat, P. (1971) Opisthorchiasis. In: Marcial-Rojas, R.A., ed. Pathology of protozoal and helminthic diseases. Baltimore: Williams and Wilkins : pp. 536-545.
- Terada, T., Nakamura, Y., Saito, K. and Kono, N. (1990) Biliary sludge and microcalculi in intrahepatic bile ducts: Morphologic and X-ray microanalytical observations in 18 among 1,179 consecutively autopsied livers. *Acta Pathol. Jpn.* 40: 894-901.

- Thamavit, W., Bhamareprapai, N., Sahaphong, S., Vajrasutha, S. and Angsubhakorn, S. (1978) Effects of dimethylnitrosamine on induction of cholangiocarcinoma in *Opisthorchis viverrini* infected Syrian golden hamsters. *Cancer Res.* 38: 4634-4639.
- Thamavit, W., Kongkanontin, R., Tiwawech, D. and Moore, M.A. (1987a) Level of *Opisthorchis* infestation and carcinogen dose dependence of cholangiocarcinoma induction in Syrian golden hamsters. *Virchows Arch. B* 54: 52-58.
- Thamavit, W., Ngamying, M., Boonpucknavig, V., Boonpucknavig, S. and Moore, M.A. (1987b) Enhancement of DEN-induced hepatocellular nodule development by *Opisthorchis viverrini* infection in Syrian golden hamsters. *Carcinogenesis* 8: 1351-1353.
- Thamavit, W., Moore, M.A., Hiasa, Y. and Ito, N. (1988a) Enhancement of DHPN- induced hepatocellular, cholangiocellular and pancreatic carcinogenesis by *Opisthorchis viverrini* infestation in Syrian golden hamsters. *Carcinogenesis* 9: 1095-1098.
- Thamavit, W., Moore, M.A., Hiasa, Y. and Ito, N. (1988b) Generation of high yields of Syrian hamster cholangiocellular carcinoma and hepatocellular nodules by combined nitrite and aminopyrine administration and *Opisthorchis viverrini* infection. *Jpn. J. Cancer Res.* 79: 909-916.
- Thamavit, W., Moore, M.A., Sirinukun, S., Shirai, T. and Ito, N. (1993) Time-dependent modulation of liver lesion development in *Opisthorchis*-infected Syrian hamster by an anthelmintic drug, praziquantel. *Jpn. J. Cancer Res.* 84: 135-138.
- Thamavit, W., Pairojkul, C., Tiwawech, D., Shirai, T. and Ito, N. (1994) Strong promoting effect of *Opisthorchis viverrini* infection on dimethylnitrosamine-initiated hamster liver. *Cancer Lett.* 78: 121-125.
- Towbin, H., Staehlin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350.
- Ujjin, P. (1961) Retention cyst of the liver and hydrops of gallbladder due to opisthorchiasis. *J. Med. Assoc. Thai.* 44: 151-160.
- Upatham, E.S., Viyanant, V., Kiatthong, S., Rojborwornwitaya, J., Lee, P., Brockelman, W.Y., Ardsungnoen, S. and Vajrasutha, S. (1984) Relationship between prevalence and intensity of *Opisthorchis viverrini* infection, and clinical symptoms and signs in a rural community in Northeast Thailand. *Bull. WHO* 62: 451-461.

- Vatanasapt, V., Tangvoraphonkchai, V., Titapant, V., Pipitgool, V., Viriyapap, D. and Sriamporn, S. (1990a) A high incidence of liver Cancer in Khon Kaen province, Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth.* 21: 382-387.
- Vatanasapt, V., Uthairachien, T., Mairiang, E., Pairojkul, C., Charthanchachai, W. and Haswell-Elkins, M.R. (1990b) Northeast Thailand: A region with a high incidence of cholangiocarcinoma. *Lancet* i: 116-1167.
- Vatanasapt, V., Sripa, B., Sithithaworn, P. and Mairiang, P. (1999) Liver flukes and liver cancer. *Cancer Survey* 33: 313-343.
- Virunuratti, V. (1972) Liver fluke infection and infestation in Southeast Asia. *Prog. Liver Dis.* 4: 537-547.
- Virunavatti, V. and Sittimunkarn, T. (1972) Liver fluke infection and infestation in Southeast Asia. In: Poppel, H. and Schaffner, F., eds. *Progress in Liver Disease*. New York: Grune & Stratton, pp. 537-547.
- Von Lichtenberg, F. (1987) Inflammatory responses to filarial connective tissue parasites. *Parasitology* 94 (Suppl.): 101-122.
- Watson, F.C. (1918) *Clonorchis sinensis* infection of the gallbladder and biliary passages. *Ann. Surg.* 68: 34-37.
- Wongratanaheewin S., Bunnag D., Vansorn N. and Sirisinha S. (1983a) Characterization of humoral immune response in the serum and bile of patients with opisthorchiasis and its application in immunodiagnosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 38: 356-362.
- Wongratanaheewin S., Charupatana C., Bunnag D. and Sirisinha S. (1983b) Effects of praziquantel treatment on antibody levels and lymphoproliferative responses in patients with opisthorchiasis. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health* 19: 109-116.
- Wongratanaheewin S., Chawengkitikul R., Bunnag D. and Sirisinha S. (1988c) Analysis of *Opisthorchis viverrini* antigens by immunoprecipitation and polyacrylamide gel electrophoresis. *Parasitology* 96: 119-128.
- Wongratanaheewin S., Good M.F., Sithithaworn P. and Haswell-Elkins M.R. (1991) Molecular analysis of T and B cell repertoires in mice immunized with *Opisthorchis viverrini* antigens. *Int. J. Parasitol.* 21: 719-721.
- Wongratanaheewin S., Ratanasiriwilai W., Priwan R. & Sirisinha S. (1987) Immudepression in hamsters experimentally infected with *Opisthorchis viverrini*. *J. Helminthol.* 61:151-156.

- Wood, A., Green, J., Levine, J.A., Estevez, E.G., Weatherly, N., Rosenberg, E. and Frothingham, T. (1984) A clinical study of laotian refugees infected with *Clonorchis sinensis* or *Opisthorchis viverrini*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33: 279-280.
- Wykoff, D.E. and Ariyaprakai, K. (1966) *Opisthorchis viverrini* in Thailand - Egg production in man and laboratory animals. *J. Parasitol.* 52: 631.
- Wykoff, D.E., Harinwata, C., Jitjodata, P. and Winn, M. (1965) *Opisthorchis viverrini* in Thailand - The life cycle and comparison with *O. felinus*. *J. Parasitol.* 51: 207-214.
- Wyller, D.J. (1992) Why does liver fibrosis occur in schistosomiasis? *Parasitol. Today* 8: 277-279.

บทที่ 6

ผลงานที่ได้และการเผยแพร่

Paper submitted

1. Pathology of the gall bladder and extrahepatic bile duct in *Opisthorchis viverrini* infection in hamsters. (Submitted to *Int. J. Parasitol.*, rejected)
2. Gallbladder and extrahepatic bile duct changes in *Opisthorchis viverrini* infection in hamsters. (Submitted to *Am. J. Trop. Med. Hyg.*)
3. Relationship between parasite-specific antibody responses and intensity of *Opisthorchis viverrini* infection in hamsters. (Submitted to *Parasite Immunol.*)

Manuscripts in preparation

1. Antigen localization and immunopathology of *Opisthorchis viverrini* infection in hamsters.
2. Mast cell hyperplasia in hamsters experimentally infected with *Opisthorchis viverrini*.
3. Sequential liver histopathology in relation to intensity of *Opisthorchis viverrini* infection in hamsters.
4. Immunohistochemical and immunoblot analysis of parasite antigens in the serum and bile of hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*.
5. Association between biliary pathology and antibody responses in experimental opisthorchiasis.

การแปลผลวิจัยการ

1. Abstract "Relationship between serum antibody levels and intensity of *Opisthorchis viverrini* infection in hamsters" Paper presented at the 24th Congress on Science and Technology of Thailand, 19-21 October 1998, Bangkok. pp. 752-753.
2. Abstract "Relationship between serum antibody levels and intensity of *Opisthorchis viverrini* infection in hamsters" Presented at the 14th Annual Academic Convention, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, 7-9 October 1998 (*Srinagarind Med. J.* 1998; 13(Suppl.) : 151)
3. Abstract "Mucosal cell hyperplasia of the gallbladder and extrahepatic bile duct in *Opisthorchis viverrini* infected hamsters" Presented at the 14th Annual Academic Convention, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, 7-9 October 1998 (*Srinagarind Med. J.* 1998; 13(Suppl.) : 165)

Go and follow him, until you find him.

1997-1998

第 10 页 共 10 页

[illegible][illegible]☐ Test = 100 million

30.1.2016 9:41 AM

THE 1983 EDITION

□ 0000-0000-0000-0000

RELATIONSHIP BETWEEN SERUM ANTIBODY LEVELS AND INTENSITY OF
OPISTHORCHIS VIVERRINI INFECTION IN HAMSTERS*

Banchob Syga and Norihisa Kasaike*

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

Relationship between serum antibody levels and intensity of *Opisthorchis viverrini* infection was investigated in hamsters that infected with 25, 50 and 100 *O. viverrini* metacercariae (MC), respectively. Serum antibody to excretory-secretory (ES), somatic and egg antigens, and worm burden and egg counts per gram of feces (EPG) were examined on day 1, 3, 7, 14 and 30 post-infection (PI) and then monthly until 6 months. Antibody levels as determined by an amplified merkaptoalbumin-ELISA method were first detected on day 14 PI in all groups and in all *O. viverrini* antigen tested. Hamsters that infected with 100 MC showed higher antibody levels than those of 50 MC and 25 MC groups during early infection until day 30. After that antibody levels were increased rapidly to a plateau in approximately month 2 PI. From month 2 onward the average antibody levels to all antigens were significantly higher in hamsters infected with 25 MC than those of 50 MC and 100 MC. These antibody levels were correlate with worm burden and EPG (Kendall's tau B, $p < 0.001$). Interestingly, antibody to egg antigen was significantly elevated on day 30 PI in hamsters infected with 50 MC. This was because of the higher EPG in this group (EPG = 203.7) than those of 100 MC (EPG = 168.7) and 25 MC (EPG = 9.5). The results show that antibody to *O. viverrini* ES, somatic and egg antigens is correlate with intensity of infection. The lower antibody levels in chronic and heavy infection groups than those with mild infection may be from immunodepression.

การดำเนินงานด้านนี้ของโรงเรียนจะดำเนินการตามขั้นตอนการวิจัยที่สหกรณ์ได้จัดทำขึ้นและจะคอย

WILYU, 7/11/02-03/03/04

[illegible][illegible]

* โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

(INDEX KEY) WORDS: serum antibody, ELISA, *Opecoelorchis viverrini*, worm burden, EPG, lambs.

Figure 1 (Cont.) Worm burden and ES antibody response in mice infected with *S. stenocephala* at different stages of infection.

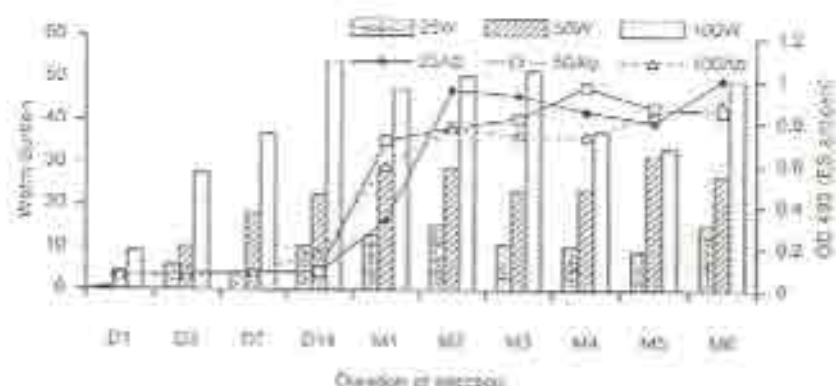


Figure 1 (Cont.) Worm burden and ES antibody response in mice infected with *S. stenocephala* at different stages of infection (D=day, M=month, W=worm, Ab=antibody).

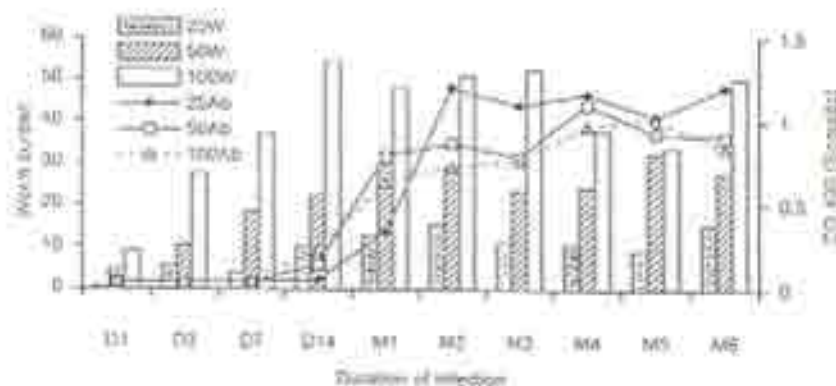


Figure 2. Worm burden and ES antibody response in mice infected with *S. stenocephala* at different stages of infection (D=day, M=month, W=worm, Ab=antibody).

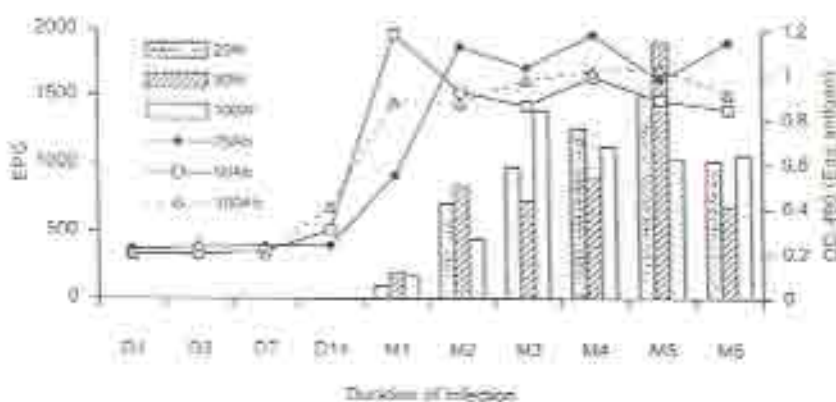


Figure 3. EPG and ES antibody response in mice infected with *S. stenocephala* at different stages of infection (D=day, M=month, W=worm, Ab=antibody).

Source: Saito et al. (1983) *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth.* 14: 241-251.

Relationship Between Serum Antibody Levels and Intensity of *Opisthorchis Viverrini* Infection in Hamsters*

Banchhai Sripa¹ and Sunthorn Kacwien²

¹Division of Experimental Pathology, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

²Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

Background: *Opisthorchis viverrini* infection is still highly prevalent in Thailand with an estimated of 13 million people are currently infected. This liver fluke can induce parasite-specific antibody responses including antibody to excretory-secretory (ES) and somatic antigens. However, levels of the antibody to egg antigen has not yet been reported.

Objectives: To determine levels of *O. viverrini*-specific antibody to ES, somatic and egg antigens and their relationships to intensity of the infection in hamsters.

Materials and Methods: Antibody to *Opisthorchis viverrini* infection was investigated in hamsters that infected with 25, 50 and 100 *O. viverrini* metacercariae (MC), respectively. Serum antibody to excretory-secretory (ES), somatic and egg antigens, and worm burden and egg per gram of faeces (EPG) were examined on day 1, 3, 7, 14 and 30 post-infection (PI) and then monthly until 6 months.

Results: Antibody levels as determined by amplified streptavidin-biotin (LSA) method were first detected on day 14 PI in all groups and in all *O. viverrini* antigens tested. Hamsters that infected with 100 MC showed higher antibody levels than those of 50 MC and 25 MC groups during early infection until day 30. After that antibody levels were increased rapidly to a plateau in approximately month 2 PI. From month 2 onward the average antibody levels to all antigens were significantly higher in hamsters infected with 25 MC than those of 50 MC and 100 MC. These antibody levels were correlated with worm burden and EPG (Kendall's tau B, $p < 0.001$). Interestingly, antibody to egg antigen was significantly elevated on day 30 PI in hamsters infected with 50 MC. This was because of the higher EPG in this group (EPG = 200.7) than those of 100 MC (EPG = 169.7) and 25 MC (EPG = 3.5).

Conclusions: The results show that antibody levels to *O. viverrini* ES, somatic and egg antigens are correlated with intensity of infection. The lower antibody levels in chronic infection in heavy infection group than those with mild infection may be from immunodepression.



*This work was supported by the Thailand Research Fund, Grant BRG3880013

Mast Cell Hyperplasia of the Gallbladder and Extrahepatic Bile Ducts in *Opisthorchis viverrini*-infected Hamsters*

Banchob Sripa¹, Savithorn Kachin²

¹Division of Experimental Pathology, Department of Pathology and

²Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

Background: Liver bile infection caused by *Opisthorchis viverrini* is still a major public health problem in Thailand with an estimated of 13 million people are currently infected. Several aspects have been studied including epidemiology, clinical study, immunology and pathology. However, most studies have focused on intrahepatic lesions but the accompanying gallbladder and extrahepatic bile ducts have less studied, especially in detailed pathobiology. Here, we described mast cell hyperplasia of the gallbladder and extrahepatic bile ducts in *O. viverrini*-infected hamsters.

Objectives: To qualitatively study mast cell infiltration in the gallbladder and extrahepatic bile ducts in *O. viverrini*-infected hamsters in relation to histopathology.

Setting: Faculty of Medicine, Khon Kaen University

Materials and Methods: One hundred and sixty male golden Syrian hamsters were infected with 25 (group 1), 50 (group 2) and 100 (group 3) metacercariae, respectively and a control group (group 4) was fed saline instead. The animals were sacrificed five per a group on day 1, 3, 7, 14 and 30 post-infection (p.i.) and then every month until the sixth month of the experiment. The gallbladder and extrahepatic bile ducts were fixed in Carnoy's solution for histopathology and mast cell staining.

Results: Mast cells as revealed by Alcyon blue-safranin-O special staining had 2 major types, i.e. mucosal mast cell (MMC) and

connective tissue mast cell (CTMC) which were stained blue and red, respectively. In normal uninfected hamsters, a few MMC were observed in the mucosa and some CTMC in the submucosa throughout the study. The early mast cell infiltration of the gall bladder and extrahepatic bile ducts were observed in the gall bladder of group 1 and 3 on day 7 and on day 15 for the group 1 whereas the extrahepatic bile ducts exhibited such changes as early as day 3 p.i. Significant mast cell infiltration were gradually observed thereafter in all infected groups with a manner of dose dependent during early infection. MMC is the predominant type and were found in all layers of the gallbladder and extrahepatic bile ducts. From month 2 onwards, mast cell infiltration particularly MMC were well established and seem not differed in different infected groups. The overall mast cell infiltration of the extrahepatic bile duct was more severe than those of the gall bladder at the same dose and period of infection. Mast cell hyperplasia occurred along with periductal chronic and severe mononuclear cell infiltration of the extrahepatic bile ducts. In addition, mast cells were also found more frequently in areas with mucous hypersecretion.

Conclusion: The results clearly demonstrates that mast cell hyperplasia of the gall bladder and extrahepatic bile ducts do occur in experimental *O. viverrini* infection. This may involve in the pathogenesis of opisthorchiasis and, even, cholangiocarcinoma in endemic areas.

SPG

*This work was supported by Thailand Research Fund (TRF), Grant # BRG 3990013

GALLBLADDER AND EXTRAHEPATIC BILE DUCT CHANGES IN
OPISTHORCHIS VIVERRINI INFECTION IN HAMSTERS

BANCHOB SRIPA

SASITHORN KAEWKES

*Division of Experimental Pathology, Department of Pathology
and Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University,
Khon Kaen 40002, Thailand*

Short title: Extrahepatic biliary lesions in opisthorchiasis

Correspondence: Dr. Banchob Sripa, Division of Experimental Pathology, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.
Telephone: +66-43-348388, Facsimile: +66-43-348375, E-mail: banchob@kku.kku.ac.th

Abstract. Gallbladder and extrahepatic bile duct changes in *Opisthorchis viverrini* infection were investigated in hamsters infected with 25, 50 and 100 metacercariae, respectively. The animals were sacrificed on days 1, 3, 7, 14, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 post-infection (p.i.). Early pathological changes were acute inflammatory reactions which were clearly seen in the extrahepatic bile ducts as early as day 3 p.i. After that, mononuclear cell infiltration, epithelial hyperplasia, mucus hypersecretion, goblet cell metaplasia and fibrosis were gradually observed. The severity of these lesions was dependent on intensity of the infection during this early stage and reached a plateau at approximately 60 days after infection. Thereafter, prominent chronic lesions including fibrosis, ductal dilatation and lymphoid aggregation, were relatively similar in all infected groups. Overall, the pathological changes of the extrahepatic bile duct were more severe than those of the gallbladder at the same dose and period of infection.

Liver fluke infection caused by *Opisthorchis viverrini*, *O. felinus* and *Clonorchis sinensis* remains a major public health problem in many parts of Eastern Europe, the Far East and Southeast Asia.¹ In Northeast Thailand, an endemic area of opisthorchiasis, an estimated 3.8 million people are infected with *O. viverrini* in a recent survey.² This infection is associated with a number of hepatobiliary diseases, including cholangitis, obstructive jaundice, hepatomegaly, cholecystitis and cholelithiasis.³ Moreover, both experimental and epidemiological evidence strongly implicates the liver fluke infection in the etiology of cholangiocarcinoma, the bile duct cancer.^{1,4,7}

Various aspects of the pathological consequences of *O. viverrini* infection have been studied both in man and experimental animal models. However, most reports describe only intrahepatic lesions associated with the infection including epithelial desquamation, epithelial hyperplasia, goblet cell metaplasia, adenomatous hyperplasia and periductal fibrosis^{8,9} while the accompanying abnormalities of the gallbladder and extrahepatic bile duct have received little attention. Dhiansiri and others¹⁰ first described gallbladder abnormalities observed by ultrasound in patients with *O. viverrini* infection. Recently, community-based studies in Northeast Thailand, using ultrasonography and cholecystography, demonstrated a dramatic increase in the frequency and severity of gallbladder disease, specifically wall irregularity, enlargement, bile sludge, and poor function among apparently healthy individuals with moderate and heavy *O. viverrini* infection.^{7,11,12} Following anthelmintic treatment, many of the gallbladder abnormalities are eliminated, as indicated by the reduction of the length and regained contractility.¹³ While these studies show clearly that *O. viverrini* is closely associated with gallbladder abnormalities, the pathology and pathogenesis of the gallbladder disease remain unclear. In addition, the extrahepatic bile duct, which is also the inhabitat of the liver flukes, has never been studied before. Since it is not possible to obtain asymptomatic gallbladders and extrahepatic bile ducts from infected people, we therefore undertook a histopathologic study of the gallbladder and extrahepatic bile duct in a hamster model infected with *O. viverrini*. This is the first sequential study that describes the histologic changes of the gallbladder and extrahepatic bile duct in *O. viverrini* infection.

MATERIALS AND METHODS

Parasite. Metacercariae were collected from cyprinoid fish captured from a natural water reservoir in an endemic area in Khon Kaen Province, Thailand. The whole muscle, fin and tail of the fish, after removing the internal organs, were chopped and digested with 0.7 N HCl-pepsin solution for 1 hour at 37 °C. The digested materials were filtered through a sieve of 0.106 mm in diameter and washed several times with normal saline in a sediment jar. The metacercariae of *O. viverrini* were identified and collected under a dissecting microscope.

Animals and experimental design. One hundred and sixty male Syrian golden hamsters (Animal Unit, Faculty of Medicine, Khon Kaen University), age of 6-8 weeks, were used throughout the experiments. The hamsters were divided into 4 groups of 40 as follows; group 1, 2 and 3 were infected with 25, 50 and 100 metacercariae by intragastric intubation, respectively. Group 4, a control group, was fed normal saline. The animals were kept 5 to a cage, housed under conventional conditions, fed a stock diet (C.P. Ltd., Thailand) and watered *ad libitum*. The maintenance and care of experimental animals complied with the National Experimental Animal Center guidelines for the humane use of laboratory animals. Five animals from each group were sacrificed on days 1, 3, 7, 14, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 post-infection (p.i.).

Pathological study. Hamsters were weighed and anaesthetized with ether. Blood was drawn from the heart. The gallbladder and extrahepatic bile duct were examined for gross

abnormalities and then carefully microdissected. The dissected specimens were immediately placed in Carnoy's solution and fixed overnight at 4 °C. The gallbladders and extrahepatic bile ducts were processed separately through a series of absolute ethanol and xylene, and embedded in paraffin. Sections were cut and routinely stained with H&E, alcian blue-PAS and Masson's trichrome for a histopathological study. The liver was also excised, weighed and kept in normal saline for worm counting.

Determination worm counts. Worm counts were determined by direct teasing of the liver, as well as the number of worms seen in the histologic sections of the gallbladder and extrahepatic bile duct.

RESULTS

Parasitological data. The average worm recovery rate in the hamsters infected with *O. viverrini* in group 1, 2 and 3 from day 30 to day 180 p.i. was 50%, 55.2 % and 46.7%, respectively.

Gross findings.

Control group. The gallbladder in control uninfected group (group 4) showed a transparent wall with varying amount of bile. The extrahepatic bile duct which includes the main common hepatic ducts and the common bile duct was small and transparent. Its total length was approximately 1 cm from the duodenal junction. The gallbladder and extrahepatic bile duct in this group showed no gross abnormality during the 180 days of the study.

Infected groups : The appearances of the gallbladders and extrahepatic bile ducts in group 1, 2 and 3 were unremarkable grossly during the first 14 days p.i. From day 30 and on, the gallbladder and extrahepatic bile duct wall were slightly opaque, especially in group 3. The severity of the opacity increased gradually with the duration of infection. However, quantitation or semi-quantitation of the opacity of the gallbladder wall was difficult to justify depending upon the stage of contraction. In chronic infections, particularly from day 90 onwards, the most striking gross lesions were observed in the extrahepatic bile ducts. These included ductal dilatation, increased opacity (thickened wall) and periductal nodule formation. Qualitatively, the severity of these changes was more pronounce in group 2 and 3 than in group 1. *Opisthorchtis* worms were commonly seen in the gallbladders and extrahepatic bile ducts, especially in group 3. Typical pictures of the gross lesions of the gallbladder and extrahepatic bile duct in control and infected groups are shown in Figure 1A,B.

Histological findings.

Control group: Histologically, the gallbladder of the hamster consists of 3 layers; the mucosa which includes surface columnar epithelium and lamina propria, the muscle and the thin serosa. The extrahepatic bile duct also contains 3 layers but with a scanty lamina propria. A few lymphocytes were seen in the lamina propria of the gallbladder. No significant change was observed in both the gallbladder and extrahepatic bile duct of the hamsters in the control group, except a mild mononuclear cell infiltration at the cystic duct junction of the gallbladder in some animals during the experiment.

Infected groups : A summary of the main histological changes of the gallbladder and extrahepatic bile duct of infected hamsters in group 1, 2 and 3 is shown in Table 1. During the first week of infection, there was no obvious microscopic changes of the gallbladders in all groups. Mild edematous villi, congestion and a few neutrophil infiltration were first observed in some hamsters in group 2 and 3 on day 7 and on day 14 p.i. in group 1. A small number of eosinophils were also observed. Mononuclear cell infiltration including macrophages, lymphocytes and plasma cells, increased gradually, especially in group 2 and 3, until the end of

the experiment. Mild fibrosis of the gallbladder wall was seen from day 30 onwards. Epithelial hyperplasia and mucus secretion were not so prominent in infected gallbladders. The mucosa that lying in contact with worms showed atrophy and goblet cell metaplasia. The above pathological changes were more severe in the extrahepatic bile ducts than those of the gallbladders at the same period and duration of the infection. These included epithelial distortion by juvenile fluke hooking, which was seen in the extrahepatic bile duct as early as day 1 p.i. Acute inflammation was clearly observed on day 3 in group 3. Mononuclear cell infiltration with subacute inflammation was more prominent in the extrahepatic bile duct wall in all infected groups from day 7 whereas plasma cells were clearly observed on day 14 p.i. onwards. Epithelial hyperplasia with atypical epithelial lining and mitotic figures were apparent after 14 days of infection. However, epithelial cells that lining in contact with the liver flukes were flattened. A few periductal glandular formation were also seen. Mucus hypersecretion was observed along with an increased number of goblet cells. Fibrosis of bile duct wall as revealed by special staining was clearly seen on day 30.

From day 30 onwards, *Opisthorchis* eggs were found in feces of infected hamsters. Mature flukes were lying in close contact with the extrahepatic bile ducts mucosa more than those in the gallbladders because of the small size of the former. However, there was no epithelial desquamation seen in all groups studied. Such above histological changes were gradually increased in the severity in a manner of dose dependent and reached a plateau at approximately day 60 p.i. in all infected groups. From day 60 onward, subacute inflammation disappeared and mononuclear cells were predominant. Plasma cells were observed in the lamina propria of the gallbladder and around the extrahepatic bile duct wall. Eosinophils were seen throughout the study but it was not as severe as in the liver (Sripa & Kaewkes, unpublished data). The most obvious histological changes of the extrahepatic bile duct in chronic opisthorchiasis were ductal dilatation, periductal fibrosis and mononuclear cell infiltration with lymphoid aggregation. These changes were relatively similar, especially in the group 2 and 3 at the end of the experiment. Numbers of mast cells, as revealed by alcian blue-PAS staining, were increased in both the gallbladder and the extrahepatic bile duct wall, especially at the areas where mucus secretion was prominent. No egg or worm granuloma was observed in the gallbladder and extrahepatic bile duct in all hamsters in this study. Representative photomicrographs of the histological changes of the gallbladder and extrahepatic bile duct are shown in Figure 2 and 3, respectively.

DISCUSSION

Opisthorchiasis is a major public health problem in Southeast Asia, especially in Northeast Thailand and is associated with several hepatobiliary diseases. The pathologic consequences of the infection in the liver are well recognized; however, the histological changes of the gallbladder in opisthorchiasis was briefly mentioned as only severe inflammation.² The present study has added on the morphologic changes of the gallbladder and, particularly for the first time, the extrahepatic bile duct in *O. viverrini* infection.

This sequential study has shown that morphologic changes of the gallbladder and extrahepatic bile duct did occur as early as day 1 p.i. in the latter which was characterized by epithelial distortion by the juvenile fluke's sucker. During the early phase of infection, the histologic changes including acute or subacute inflammation, edematous villi, increased mucus secretion and goblet cell metaplasia, were dose dependent as hamsters in group 2 and 3 developed more severe lesions than those in group 1. This acute phase (up to day 30 p.i.) might be the results of mechanical irritation and/or toxic secretory substance released by the liver

flukes, as previously suggested by Hou¹⁴ and Bhamarapravati and others⁸. The more severe lesions of the extrahepatic bile duct than those of the gallbladder support this hypothesis, since the number of worms found had more close contact with the mucosa in the former than in the latter in this study. Toxic substance(s) may be released from *O. viverrini*, though not yet identified. But several parasite proteinases released in the excretory-secretory (ES) products have been shown to be involved in the pathogenicity and immune evasion.^{13, 16} Park and others¹⁷ identified 4 isotypes of cysteine proteinases in the ES products and crude extracts of *C. sinensis*, the close relative of *O. viverrini*. In addition, the 24 kDa proteinase from the ES products exhibited the most potent cytotoxicity to Chinese hamster ovarian cells in their study. Cysteine proteinases are also reported in other liver flukes, e.g. *Fasciola hepatica*.^{18, 19} Therefore, this enzyme may be involved in the pathogenesis of biliary lesions in the liver fluke infection.

Besides the mechanical and/or toxic substances released from the parasite, the immunological mechanisms which responded to the liver fluke infection may also provoke the reaction.^{8, 20} Strong inflammatory cell infiltration, especially lymphocytes and young plasma cells around the biliary tree from day 14 p.i. onwards, suggests that specific immune responses to the liver fluke infection may take place. Wongratanaheewin and others²¹ and Akai and other²² had characterized several *O. viverrini* antigens, which ranged from 14 kDa to 219 kDa in somatic extracts and ES products. Strong humoral, particularly to a 89 kDa protein, the major component of ES products, and cell-mediated immune responses have been demonstrated in both human and animals.^{21, 23-25} Recruitment of mononuclear cells and immune cell activation may be through the biliary epithelium, since there was no epithelial destruction of the gallbladder and extrahepatic bile duct in this study. The ES and shading somatic antigens of *O. viverrini* could be detected immunohistochemically in both the gallbladder and extrahepatic bile duct epithelium, as early as day 3 p.i. (Sripa & Kaewkes, unpublished data). The mechanism by which the biliary epithelium permeated for the liver fluke antigens is not yet known. It may express HLA class II and acts as antigen presenting cells presenting antigens to subepithelial T helper lymphocytes, as described in most mucosal immune responses.^{26, 27} In a parasite infection, changes in Ia antigen expression have been observed in the intestinal epithelium of *Nippostrongylus brasiliensis* infected rat.²⁸ If this is possible in *O. viverrini* infection, it may explain the heavy mononuclear cell infiltration, especially around the extrahepatic bile duct, without epithelial damage. These infiltrated mononuclear cells can also produce several toxic oxygen free radicals, especially nitric oxide (NO) that may orchestrate the pathologic reactions.²⁹ Increased NO synthase, which can catalyze NO, has been demonstrated in neutrophils, eosinophils, macrophages and mast cells in the *O. viverrini* infection of hamsters.³⁰

In chronic *O. viverrini* infection (from day 30 onward), the inflammatory changes of the gallbladder and extrahepatic bile duct were more pronounce and reached a plateau at approximately month 2 p.i., similarly in all of the three infected groups. The well established chronic extrahepatic lesions including periductal fibrosis and mononuclear cell infiltration with lymphoid aggregation irrespective of the intensity of the infection suggests that immunopathogenetic processes proceeded from the acute phase may take place as mentioned by Bhamarapravati and others⁸ and Flavell and Flavell.²⁰ These findings are similar to those reported in intrahepatic lesions with opisthorchiasis.^{8, 9} Fibrosis of the intrahepatic bile ducts has been reported as a common feature in chronic *Opisthorchis* infection by histologic,^{8, 9} biochemical³¹ and radiologic studies (described as enhanced portal vein radicle echoes).^{11, 12} The association between levels of parasite-specific antibody to *O. viverrini* and enhanced radicle vein echoes detected by ultrasonography has been described in human opisthorchiasis.¹¹ Although

there is no information about antibody response in this study, other studies have shown increased levels of antibody to ES or somatic antigens in infected hamsters.^{21,24} Detail mechanism(s) of the fibrosis in opisthorchiasis is still unknown. Inflammatory cell infiltration, which is a common pathologic features of parasitic infections,²² particularly lymphocytes, macrophages and mast cells, may be involved in this process. Several fibrogenic cytokines released from these inflammatory cells, especially interleukin 2 (IL-2), IL-1, fibroblast growth factor, transforming growth factor and histamine can induce fibroblast migration, proliferation and collagen production leading to tissue fibrosis.^{33,34}

Epithelial hyperplasia observed in the gallbladder and extrahepatic bile duct in this study is similar to that of the intrahepatic bile ducts reported in *O. viverrini*³ or *C. sinensis* infection.¹⁴ This proliferative response of the biliary epithelium may be a result of tissue injury from the parasites and /or their toxic substances. However, there was no adenomatous changes in the gallbladder and extrahepatic bile duct, as observed in the intrahepatic lesion, in this study. For goblet cell metaplasia and hyperplasia, and mucus hypersecretion, these may be an adaptive response of the epithelium to parasite irritation and /or immunological responses as described mainly in nematode infection.²³⁻²⁷ Increased mucus secretion has been observed in various mucosal parasitic infections.^{26,27} Mast cells which were frequently observed in the lamina propria of the gallbladder and extrahepatic bile duct in this study and their mediators, especially histamine may be involved in the mucus hypersecretion.

In conclusion, the present study has shown that *O. viverrini* infection can induce pathological changes of the gallbladder and extrahepatic bile duct in an animal model. Early stage lesions are dose-dependent, however, chronic changes including mononuclear cell infiltration with lymphoid aggregation and fibrosis or periductal fibrosis may be from immunologic mechanisms. Further studies on immunopathological processes of opisthorchiasis should be performed.

Acknowledgments: The authors would like to thank Mrs. Aoumporn Mongkolwongroj, Mr. Suvit Balthaisong and Miss Wanna Sobai for their technical assistance, and to Miss Evelyn L. Murphy for correcting grammatical English.

Financial support: This work was supported by the Thailand Research Fund (TRF), grant No. BRG3980013.

Authors' addresses: Banchob Sripa, Division of Experimental Pathology, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand, Tel. +66-43-348388, Fax. +66-43-348375; Sasithorn Kaewkes, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand, Tel. +66-43-348387, Fax. +66-43-348375.

Reprint requests: Banchob Sripa, Division of Experimental Pathology, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand, Tel. +66-43-348388, Fax. +66-43-348375.

REFERENCES

1. IARC, 1994. Infection with liver flukes (*Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felinus* and *Clonorchis sinensis*). *IARC Monograph on Evaluation of Carcinogenic Risks of Human*, 61: 121-175.
2. Jongsuksuntigul P, Insomboon T, 1997. The impact of a decade long opisthorchiasis control program in northeastern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* 28: 551-557.
3. Harinasuta T, Riganti M, Bunnag D, 1984. *Opisthorchis viverrini* infection, pathogenesis and clinical features. *Drug Res* 34: 1167-1169.
4. Thamavit W, Bhamarapravati N, Sahaphong S, Vajrasthira S, Angsubhakorn S, 1978. Effects of dimethylnitrosamine on induction of cholangiocarcinoma in *Opisthorchis viverrini* infected Syrian golden hamsters. *Cancer Res* 38: 4634-4639.
5. Haswell-Elkins MR, Satarug S, Elkins DB, 1992. *Opisthorchis viverrini* infection in northeast Thailand and its relationship to cholangiocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 7: 538-548.
6. Sithithaworn P, Haswell-Elkins MR, Mairiang P, Satarug S, Mairiang E, Vatanasapt V, Elkins DB, 1994. Parasite-associated morbidity: liver fluke infection and bile duct cancer in northeast Thailand. *Int J Parasitol* 24: 833-843.
7. Elkins DB, Mairiang E, Sithithaworn P, Mairiang P, Chaiyakum J, Chamadol N, Loapaiboon V, Haswell-Elkins MR, 1996. Cross-sectional patterns of hepatobiliary abnormalities and possible precursor conditions of cholangiocarcinoma associated with *Opisthorchis viverrini* infection in humans. *Am J Trop Med Hyg* 55: 295-301.
8. Bhamarapravati N, Thamavit W, Vajrasthira S, 1978. Liver changes in hamsters infected with a liver fluke of man, *Opisthorchis viverrini*. *Am J Trop Med Hyg* 27: 787-794.
9. Riganti M, Pungpak S, Punpoowong B, Bunnag D, Harinasuta T, 1989. Human pathology of *Opisthorchis viverrini* infection, a comparison of adults and children. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* 20: 95-100.
10. Dhiensiri T, Eun-Ananta Y, Bunnag D, Harinasuta T, Schelp PF, 1984. Roentgenographically controlled healing of gallbladder lesions in opisthorchiasis after praziquantel treatment. *Drug Res* 34: 1175-1177.
11. Haswell Elkins MR, Sithithaworn P, Mairiang E, Elkins DB, Wongratanacheewin S, Kaewkes S, Mairiang P, 1991. Immune responsiveness and parasite-specific antibody levels in human hepatobiliary disease associated with *Opisthorchis viverrini* infection. *Clin Exp Immunol* 84: 213-218.
12. Mairiang E, Elkins DB, Mairiang P, Chaiyakum J, Chamadol N, Loapaiboon V, Posri S, Sithithaworn P, Haswell-Elkins MR, 1992. Relationship between intensity of *Opisthorchis viverrini* infection and hepatobiliary disease detected by ultrasonography. *J Gastroenterol Hepatol* 7: 17-21.
13. Mairiang E, Haswell-Elkins MR, Mairiang P, Sithithaworn P, Elkins DB, 1993. Reversal of biliary tract abnormalities associated with *Opisthorchis viverrini* infection following praziquantel treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87: 194-197.
14. Hou PC, 1955. The pathology of *Clonorchis sinensis* infestation in the liver. *J Pathol Bacteriol* 70: 53-64.
15. McKerrow JH, 1989. Parasite proteinases. *Exp Parasitol* 68: 111-118.
16. Maizels RM, Bundy DAP, Selkirk ME, Smith DF, Anderson RM, 1993. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human population. *Nature* 365: 797-805.

17. Park H, Ko MY, Paik MK, Soh CT, Seo JH, Im KI, 1995. Cytotoxicity of a cysteine proteinase of adult *Clonorchis sinensis*. *Korean J Parasitol* 33: 211-218.
18. McGinty A, Moore M, Halton DW, Walker B, 1993. Characterization of the cysteine proteinases of the common liver fluke *Fasciola hepatica* using novel, active-site directed affinity labels. *Parasitology* 106: 487-493.
19. Cordeva M, Herrera P, Nopo L, Bellatin J, Naquira C, Guerra H, Espinoza JR, 1997. *Fasciola hepatica* cysteine proteinase: immunodominant antigens in human fascioliasis. *Am J Trop Med Hyg* 57: 660-666.
20. Flavell DJ, Flavell SU, 1986. *Opisthorchis viverrini*: pathogenesis of infection in immunodeprived hamsters. *Parasite Immunol* 8: 455-466.
21. Wongratanaheewin S, Chawengkirtikul R, Bunnag D, Sirisinha S, 1988. Analysis of *Opisthorchis viverrini* antigens by immunoprecipitation and polyacrylamide gel electrophoresis. *Parasitology* 96: 119-128.
22. Akai PS, Pungpak S, Kitikoon V, Chalcumpa W, Bunnag D, Befus AD, 1992. Separation and characterization of adult worm proteins and glycoproteins from the liver fluke *Opisthorchis viverrini*. *J Parasitol* 78: 672-680.
23. Wongratanaheewin S, Bunnag D, Vaesusorn N, Sirisinha S, 1988. Characterization of humoral immune response in the serum and bile of patients with opisthorchiasis and its application in immunodiagnosis. *Am J Trop Med Hyg* 38: 356-362.
24. Chawengkirtikul R, Sirisinha S, 1988. Antibodies in serum and bile of hamsters experimentally infected with *Opisthorchis viverrini*. *Int J Parasitol* 18: 721-727.
25. Wongratanaheewin S, Good MF, Sithithaworn P, Haswell-Elkins MR, 1991. Molecular analysis of T and B cell repertoires in mice immunized with *Opisthorchis viverrini* antigens. *Int J Parasitol* 21: 719-721.
26. Befus AD, Bienenstock J, 1984. Induction and expression of mucosal immune responses and inflammation to parasitic infections. Marchalonis J, ed. *Contemporary Topics in Immunobiology: Immunobiology of Parasitic Infections*. New York: Plenum Press, 71-108.
27. Kaye PM, 1987. Antigen presentation and the response to parasitic infection. *Parasitol Today* 3: 577-598.
28. Masson SD, Perdue MH, 1990. Changes in the distribution of Ia antigen on epithelium of the jejunum and ileum in rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. *Clin Immunol Immunopathol* 57: 83-95.
29. Miller RA, Britigan BE, 1997. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev* 10: 1-18.
30. Ohshima H, Bandaletova TY, Brouet I, Bartsch H, Kirby G, Ogunbiyi F, Vatanasapt V, Pipitgool V, 1994. Increased nitrosamine and nitrate biosynthesis mediated by nitric oxide synthase induced in hamsters infected with liver-fluke (*Opisthorchis viverrini*). *Carcinogenesis* 15: 271-275.
31. Hutadilok N, Ruenwongsa P, 1983. Liver collagen turnover in hamsters during infection by the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *Mol Biochem Parasitol* 8: 71-77.
32. MacKenzie CD, Gatrill AJ, Luty AJ, Manyasi DG, Moore C, Sayce G, Sulaiman S, 1987. Inflammatory responses to parasites. *Parasitology* 94(Suppl.): 9-28.
33. Kovacs EJ, 1991. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunol Today* 12: 17-23.
34. Wyler DJ, 1992. Why does liver fibrosis occur in schistosomiasis? *Parasitol Today* 8: 277-279.

35. Ishikawa N, Wakelin D, Mahida YK, 1997. Role of T helper 2 cells in intestinal goblet cell hyperplasia in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Gastroenterology* 113: 542-549.
36. Else KJ, Finkelman FD, 1998. Intestinal nematode parasites, cytokines and effector mechanisms. *Int J Parasitol* 28: 1145-1158.
37. Miller HRP, 1987. Gastrointestinal mucus, a medium for survival and for elimination of parasitic nematodes and protozoa. *Parasitology* 94(Suppl.): 81-90.

TABLE 1

Summary of the histologic changes of the gallbladder and extrahepatic bile duct in *O. viverrini* infection in hamsters.

Duration	Inflammation*				Epithelial hyperplasia*				Göbel cell metaplasia*				Fibrosis*			
	25MC (GB/EBD)	50MC (GB/EBD)	100MC (GB/EBD)		25MC (GB/EBD)	50MC (GB/EBD)	100MC (GB/EBD)		25MC (GB/EBD)	50MC (GB/EBD)	100MC (GB/EBD)		25MC (GB/EBD)	50MC (GB/EBD)	100MC (GB/EBD)	
Day 1	-/-	-/-	-/-		-/-	-/-	-/-		-/-	-/-	-/-		-/-	-/-	-/-	
Day 3	-/-	-/-	-/+		-/-	-/-	-/-		-/-	-/-	-/-		-/-	-/-	-/-	
Day 7	-/+	+/+	+/+++		-/-	-/-	-/-		-/+	-/+	-/+		-/-	-/-	-/-	
Day 14	+/+	+/+	+/+++		-/-	-/+	-/+		-/+	-/+	-/+		-/-	-/-	-/-	
Day 20	+/++	+/+	+/+++		-/+	-/+	-/+		+/+	+/+	+/+		-/+	-/+	+/+	
Day 60	+/+++	+/+++	+/+++		+/+	+/+	+/+		+/+++	+/+++	+/+++		+/+++	+/+++	+/+++	
Day 90	+/+++	+/+++	+/+++		+/+	+/+	+/+		+/+++	+/+++	+/+++		+/+++	+/+++	+/+++	
Day 120	+/+++	+/+++	+/+++		+/+	+/+	+/+		+/+++	+/+++	+/+++		+/+++	+/+++	+/+++	
Day 150	+/+++	+/+++	+/+++		+/+	+/+	+/+		+/+++	+/+++	+/+++		+/+++	+/+++	+/+++	
Day 180	+/+++	+/+++	+/+++		+/+	+/+	+/+		+/+++	+/+++	+/+++		+/+++	+/+++	+/+++	

*Degree of severity: - = unremarkable change, + = mild, ++ = moderate, +++ = severe.

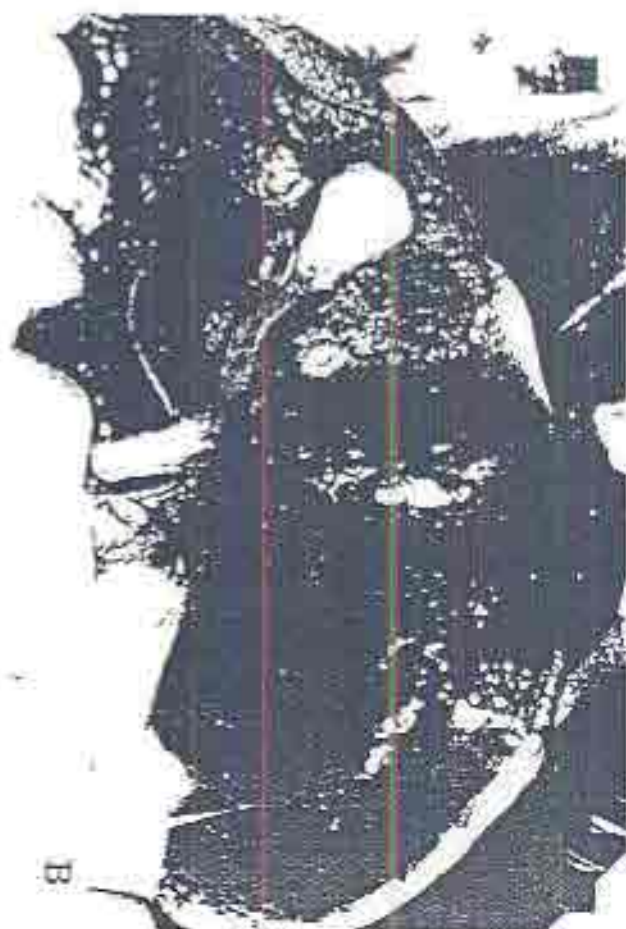
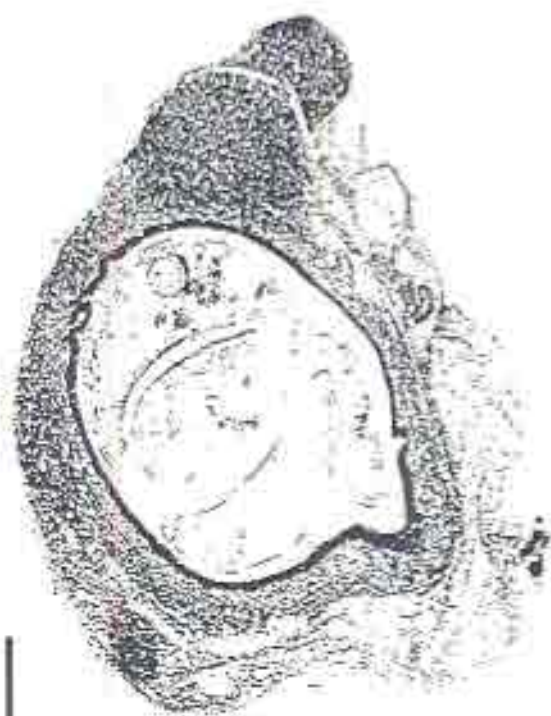
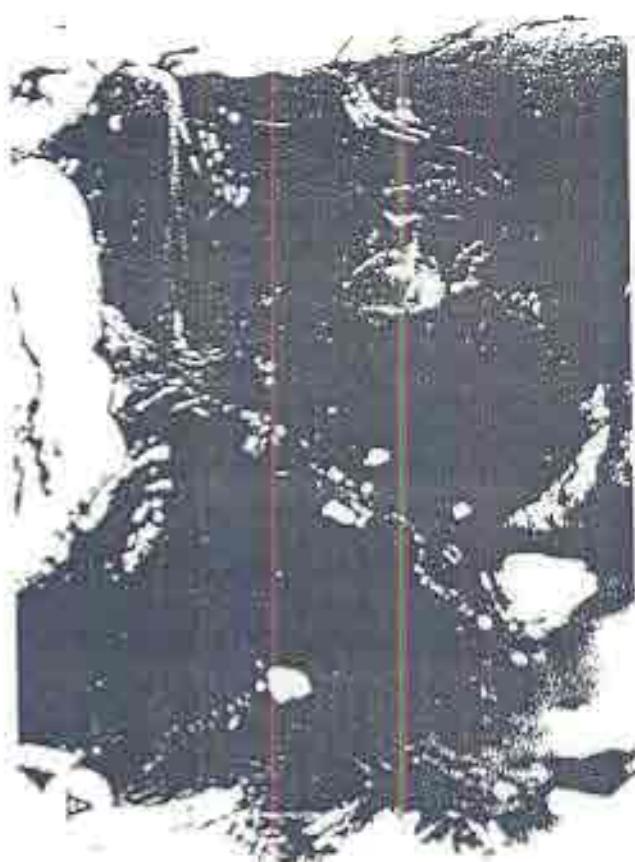
Abbreviations: MC = metacercariae, GB = gallbladder, EBD = extrahepatic bile duct.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Gross appearances of the liver, gallbladder and extrahepatic bile duct in normal uninfected (A) and *O. viverrini* infected hamster (group 3) for 180 days (B). Note that the thickened and dilated extrahepatic bile duct are prominent features in infected hamster.

FIGURE 2. Photomicrograph of a chronic infected gallbladder showing thickening wall and fibrosis. Mononuclear cell infiltration is seen in the lamina propria, muscle and subserosa. (hematoxylin and eosin stained, scale bar = 100 μ m)

FIGURE 3. Extrahepatic bile duct in chronic *O. viverrini* infection (180 days p.i.) showing dilatation of the lumen, periductal fibrosis and mononuclear cell infiltration with lymphoid aggregation. Mature worms are seen in contact with the atrophic mucosa in the lumen. (hematoxylin and eosin stained, scale bar = 200 μ m)



Relationship between parasite-specific antibody responses and intensity of
Opisthorchis viverrini infection in hamsters

BANCHOB SRIPA¹

SASITHORN KAEWKES²

¹Division of Experimental Pathology, Department of Pathology
and ²Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon
Kaen 40002, Thailand.

Short running title: Antibody responses to *O. viverrini* infection.

Key Words: *Opisthorchis viverrini*, antibody responses, ELISA, worm burden, EPG,
hamsters

Correspondence: Dr. Banchob Sripa, Division of Experimental Pathology,
Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen
40002, Thailand. Telephone: +66-43-348388, Facsimile: +66-43-348375,
E-mail: banchob@kku1.kku.ac.th

SUMMARY

The kinetics of parasite-specific antibody responses in relation to worm burden and egg output were investigated in hamsters infected with 25, 50 and 100 *Opisthorchis viverrini* metacercariae (MC). Levels of antibody to egg, excretory-secretory (ES) and somatic antigens were examined by ELISA on days 1, 3, 7, 14 and month 1 post-infection (p.i.), and repeated monthly up to 6 months. 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 significant lower antibody responses in chronic and heavy infections than those with mild infection may be from immunosuppression.

INTRODUCTION

The liver fluke infection caused by *Opisthorchis viverrini*, *O. felinus* and *Clonorchis sinensis* remains a major public health problem in many parts of Eastern Europe, the Far East and Southeast Asia (IARC 1994). In Northeast Thailand, an endemic area of opisthorchiasis, an estimated 3.8 million people (calculated from 18.5 % prevalence in this region) are infected with *O. viverrini* in a recent survey (Jongsuksuntikul & Imsomboon 1997). This infection is associated with a number of hepatobiliary diseases, including cholangitis, obstructive jaundice, hepatomegaly, cholecystitis and cholelithiasis (Harinasuta, Riganti & Bunnag 1984). Moreover, both experimental and epidemiological evidence strongly implicate the liver fluke infection in the aetiology of cholangiocarcinoma, the bile duct cancer (Thamavit *et al.* 1978, Haswell-Elkins, Satarug & Elkins 1992, Sithithaworn *et al.* 1994, Elkins *et al.* 1996).

The pathological consequences of *O. viverrini* infection appear to be similar in both human and animals. These include epithelial desquamation, inflammation, epithelial hyperplasia, goblet cell metaplasia, adenomatous hyperplasia and periductal fibrosis (Bhamarapavati, Thamavit & Vajrasthira 1978, Riganti *et al.* 1989). Several investigators have suggested that immunopathological processes may play a major role in the liver fluke-associated liver damages (Bhamarapavati *et al.* 1978, Flavell & Flavell 1986, Haswell-Elkins *et al.* 1991). Evidences of such lesions include periportal mononuclear cell infiltration and egg granuloma formation. Significant association between periductal fibrosis as revealed by enhanced portal vein radicle echoes in heavy infected people and high *O. viverrini*-specific IgG levels has been described (Haswell-Elkins *et al.* 1991). However, detailed mechanisms on the immunopathogenetic processes are still unclear.

To elucidate such above processes, immune responses to *O. viverrini* infection, both humoral and cellular responses, should be fully characterized. For the past twenty years since the first report of Janchaiwat *et al.* (1980), several papers on enhanced immune responses to the liver fluke infection both in human and animal models have been published (Flavell, Pattanapanyasat & Flavell 1980, Flavell 1981, Sirisinha *et al.* 1983, Wongratanacheewin & Sirisinha 1987, Chawengkirttikul & Sirisinha 1988, Wongratanacheewin *et al.* 1988abc, Wongratanacheewin *et al.* 1991, Akai *et al.*, 1995). These parasite-specific antibody levels or cellular responses declined after elimination of the liver flukes by praziquantel treatment (Wongratanacheewin & Sirisinha 1987, Wongratanacheewin *et al.* 1988b, Thammapalerd *et al.* 1988, Ruangkunaporn *et al.* 1994). However, only two papers have described the kinetics of antibody responses which may reflect immunopathological processes more precisely than a study at a time point (Sirisinha *et al.* 1983, Chawengkirttikul & Sirisinha 1988). The classic work of Sirisinha *et al.* (1983) has shown decreased antibody levels to both somatic and excretory/secretory (ES) antigens in chronic and heavy infections. However, the study of ES antigens by the authors was incomplete, due to the insufficiency of antigens. Similar results were also observed for somatic antigens (Chawengkirttikul & Sirisinha 1988). Surprisingly, there were no reports describing levels of antibody response to egg antigens thus far in the literature, although the antibody to parasite eggs has been demonstrated by immunofluorescence (Boonpucknavig, Kurathong & Thamavit 1986, Wongratanacheewin & Sirisinha 1987), immunoradiography (Wongratanacheewin & Sirisinha 1987, Wongratanacheewin *et al.* 1988c) and *in vitro* study (Flavell 1981). Therefore, the objective of the present study was to investigate kinetics of humoral immune responses to egg, ES and somatic antigens in relation to the intensity of *O.*

viverrini infection in details. Particularly, this is the first report on the levels of antibody response to the egg antigens in *O. viverrini* infection.

MATERIALS AND METHODS

Parasite

Metacercariae were obtained from naturally infected cyprinoid fish captured from an endemic area in Khon Kaen Province, Thailand. The whole muscle, fin and tail of the fish, after removing the internal organs, were chopped and digested with 0.7 N HCl-pepsin solution for 1 hour at 37 °C. The digested materials were filtered through a sieve of 0.106 mm in diameter, and those on the sieve were washed several times with normal saline. The metacercariae of *O. viverrini* were identified and collected under a dissecting microscope.

Preparation of parasite antigens

Adult *O. viverrini* worms were obtained from the livers and bile ducts of hamsters infected for 3 to 4 months previously. Parasite antigen preparation was slightly modified from the previous methods (Wongratanaachewin *et al.* 1988c, Akai *et al.* 1992). The fresh worms were washed several times in cold normal saline containing penicillin (200 U/ml) and streptomycin (200 U/ml) to remove any debris and residual blood. After washing thoroughly, the viable worms were used for the collection of ES products and the inactive ones were quick frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C prior to homogenization. For somatic antigens, the frozen worms were crushed and ground in liquid nitrogen using a mortar until they were completely dissociated. The ground powder was then dissolved in the appropriate volume of PBS containing protease inhibitors (0.1 mM PMSF, 1mM EDTA, 1mM leupeptin and 0.1 mM N-[N-(L-3-trans-carboxyoxiran-2-carbonyl)-L-leucyl]-agmatine, E-64) (Itoh *et al.* 1990). The suspension was then sonicated in an ultrasonic disintegrator (Soniprep 150, MSE Scientific Inc, Sussex, England) and centrifuged at 10000 rpm for 30 min at 4 °C. The supernatant was stored in a small volume at -80 °C.

ES antigens were prepared from the *in vitro* culture fluid of the viable flukes in the modified Tyrode's buffer containing penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 U/ml), 0.1 mM PMSF, 1mM EDTA, 1mM leupeptin and 0.1 mM E-64. The flukes were maintained *in vitro* at 37 °C up to 5 days. The dead worms were periodically removed. The culture fluid was changed every 24 hours, pooled and centrifuged at 3000 rpm for 10 min to remove the eggs. The clear supernatant and the pellets were separately stored frozen at -80 °C for preparing ES and egg antigens, respectively. For ES antigens, the pooled supernatant was concentrated by membrane ultrafiltration (PM 10, Amicon, Danver, Massachusetts), dialyzed in PBS several times and then aliquoted at -80 °C.

For egg antigens, the pooled pellets of spontaneously released eggs in the culture were washed several times in normal saline to remove any residual ES products. After centrifugation, the egg pellets were crushed in liquid nitrogen as above and aliquoted at -80 °C.

Protein concentrations of all *O. viverrini* antigen preparations were determined by the Bradford method (Bio-Rad, USA).

Animals and experimental design

One hundred and sixty male Syrian golden hamsters (Animal Unit, Faculty of Medicine, Khon Kaen University), age of 6-8 weeks, were used throughout the experiments. The hamsters were divided into 4 groups of 40 as follows; group 1, 2 and 3 were infected with 25, 50 and 100 metacercariae by intragastric intubation, respectively. Group 4, the control group, was fed normal saline. The animals were

kept 5 to a cage, housed under conventional conditions, fed a stock diet (C.P. Ltd., Thailand) and water *ad libitum*. The maintenance and care of experimental animals complied with the National Experimental Animal Center guidelines. Five animals from each group were sacrificed on days 1, 3, 7, 14 and 30 (month 1) p.i. The rest of the animals were killed monthly up to 6 months.

Surgical procedures and sample collection

The hamsters were weighed and anaesthetized with ether. Blood was drawn from the heart and left to stand at room temperature for 3 hours before being kept overnight at 4 °C. Serum was harvested by centrifugation at 1500 rpm for 10 minutes and stored at -20 °C for antibody assays. The liver was dissected, weighed and kept in normal saline for worm counting.

Determination of egg and worm counts

The animals were kept one per cage for 3 days before sacrificing to collect faeces. One gram of dry faeces was fixed in 10% formalin and processed for eggs per gram (EPG) by the quantitative formalin/ethyl acetate concentration technique as described by Elkins, Haswell-Elkins & Anderson (1986). Worm burdens were determined by counting worms in liver squashes.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

O. viverrini-specific IgG was determined by avidin-biotin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Dilutions of serum, biotinylated antibody and streptavidin-peroxidase conjugate in each assay are shown in Table 1. This method has been standardized and used in our laboratory for more than 2 years. Each well of the U-bottomed micro-ELISA plates (Nunc, MaxiSorp®, Denmark) was coated with 100 µl of ES, somatic or egg *O. viverrini* antigen (1 µg/ml in 0.05 M carbonate buffer, pH 9.6) overnight at 4 °C. The plates were then washed three times for three minutes each, with 0.05% Tween 20 (Amresco, U.S.A.) in normal saline (NSST) to remove unbound materials. The plates were then blotted dry and each well was blocked with 200 µl 5% skimmed milk in 0.05 M carbonate buffer, (pH 9.6) for 60 min at 37 °C. After washing with NSST, the wells were incubated with 100 µl of hamsters' serum, in duplicate, in 2% skimmed milk in an incubation buffer (PBS with 0.05% Tween) for 60 min at 37 °C. After washing, 100 µl of biotinylated anti-hamster IgG (Vector, USA) in 2% skimmed milk in incubation buffer and streptavidin-peroxidase conjugate in PBS were sequentially applied to each well and each was incubated for 60 min at 37 °C. After extensive washing, 100 µl of freshly prepared OPD substrate solution (Dako, Glostrup, Denmark) was added, and the reaction was allowed to take place in a dark chamber. The enzymatic reaction was stopped with 100 µl 4 N sulfuric acid, and the optical densities (OD) were read at 490 nm with an automatic ELISA reader (Dynatech, MR5000, U.S.A.). The readings were adjusted for daily variation by dividing the tests' OD by the mean value for positive control sera. Practically, between test variability was minimal with an coefficient variability of less than 10% for each antigen. Normal uninfected hamster sera gave a very low background for the somatic and ES antigens (OD₄₉₀ of 0.07±0.07 and 0.05±0.05, respectively). Slightly more background was found for the egg antigens (OD₄₉₀ of less than 0.2).

Statistical analysis

Data were entered into Paradox 4 database and analysed with appropriate statistics using the statistical software, SPSS/PC+. Transformation of some data, where appropriate, was necessary to obtain normality. The values of $P < 0.05$ were considered to indicate significant differences.

RESULTS

Worm recovery and EPG

The kinetics of the worm recoveries and mean worm recovery rates (%) in the infected groups 1, 2 and 3 are shown in Figure 1. During early infections, worm recoveries were low in all groups, especially in the group that was infected with 25 MC (group 1) because the juvenile flukes were very small, and had a low number of worms. From 14 days p.i. on, the worm recovery rate became relatively stable with the overall mean worm recovery rates of 50 %, 55.2 % and 46.7 % for groups 1, 2 and 3, respectively. These worm recovery rates 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 groups 2 and 3 (mean EPG = 1839 and 2649.6, respectively) and month 5 for group 1 (mean EPG = 2461.2). Interestingly, significant reduction of the mean EPG was seen after the peaks in groups 2 and 3 (T-test, $P < 0.05$) but not in group 1. Overall, no correlation between worm burden and corresponding EPG was found in all groups (Pearson correlation, $r = -0.075$, $P > 0.05$). In addition, inverse correlation was observed in the mean EPG/worm and worm burden ($r = -0.542$, $P < 0.01$). Multivariate analysis revealed that the mean EPG/worm of group 1 was significantly higher than those of groups 2 and 3 during the course of infection (ANOVA, $P < 0.05$). The EPG/worm was highly correlated with the corresponding EPG ($r = 0.744$, $P < 0.01$). The kinetics of the mean EPG and EPG/worm at different time points is shown in Figure 2.

Antibody responses to parasite antigens

Our ELISA protocol for measuring antibody levels to *O. viverrini* antigens, as outlined in the Materials and Methods, has shown that the magnitude of responses to ES antigens was at least 2 to 8 times higher than those of somatic or egg antigens, respectively. The kinetics of serum antibody responses to these antigens in experimentally infected hamsters are shown in Figure 3 a,b,c. By this technique, antibody responses were first detected at day 14 p.i. Overall, general patterns of antibody to egg, ES and somatic antigens were similar. Early antibody responses to all antigens tested were observed more frequently in hamsters infected with 50 MC or 100 MC as early as day 14, while those infected with 25 MC were obviously recognized during one month p.i. During this early phase, most antibody responses to all *O. viverrini* antigens were dose-dependent. The antibody responses then increased rapidly to a plateau in one month for the hamsters in groups 2 and 3. Whereas, the antibody levels of hamsters in group 1 were gradually elevated and reached a plateau at month 2 p.i. Thereafter, the antibody responses were slightly increased to a peak within a few weeks. The antibody responses to ES and somatic antigens at one month p.i. in groups 2 and 3 were significantly higher than those of group 1 (ANOVA, $P < 0.05$). Interestingly, during this period, the levels of antibody to egg antigens were sharply increased in the hamsters of group 2 and significantly higher than the other groups (ANOVA, $P < 0.05$).

In chronic phase responses, approximately from month 2 p.i. onwards, the parasite-specific IgG levels to all antigens were relatively stable, until the end of the experiments in all groups (ANOVA, $P > 0.05$). However, the overall magnitudes of antibody responses to egg and somatic antigens were significantly higher in group 1 than those in groups 2 and 3 (ANOVA, $P < 0.05$ and 0.005, respectively). Such findings appeared to be similar for the ES antigens, but they were not statistically different.

Relationships between antibody levels, worm burden and EPG

The association among the levels of parasite-specific IgG to egg, somatic or ES antigens, worm burden and EPG at different time points was evaluated. The data was recorded beginning after one month, where the EPG and antibody responses to all antigens were readily detected in all infected hamsters. During early infection at 1 month p.i., the levels of anti-ES and anti-somatic antibodies were correlated with worm burden for the former ($r = .519$, $P < 0.05$) and EPG for the latter ($r = .571$, $P < 0.05$). The most striking finding was the steep elevation of parasite-specific IgG to egg antigens in group 2. When we did further investigation, it was found that the egg output of this group (EPG = 191.6) was higher than those of groups 1 and 3 (EPG = 29.6 and 151, respectively). Moreover, significant correlation between the mean EPG and anti-egg IgG levels was also found in this group ($r = .578$, $P < 0.05$). After one month, the levels of antibody to each antigens were not correlated with either the EPG or worm burden except that of anti-somatic antigens, which were correlated with the corresponding EPG ($r = .215$, $P < 0.05$).

DISCUSSION

The present study has shown the kinetics of humoral immune responses to egg, ES and somatic antigens in hamsters infected with 3 different intensities of *O. viverrini* in detail. The data clearly demonstrated that antibodies to these major parasite antigens did occur as early as day 14 p.i. Early responses were clearly associated with the intensity of the liver fluke infection, as determined by both worm burden and EPG. However, chronic infection exhibited immunosuppression and inverse relationships among parasite-specific antibody levels, intensity of infection and egg production. Moreover, the kinetic of antibody response to egg antigens was demonstrated in *O. viverrini* infection for the first time in this study. Several points pertaining to host humoral immune responses to the liver fluke and intensity of the infection, worm burden and egg output were of interest and will be discussed chronologically.

Analysis of the parasitological parameters revealed that worm recoveries in all infected groups were similar and relatively stable during the course of the study. An interesting point was the significant reduction of EPG and EPG/worm in chronic infection, especially in heavy infection (group 2 and 3). Such findings were also observed by other investigators (Flavell, Flavell & Field 1983, Sirisinha *et al.* 1983). However, our study has extended the course of the infection to 6 months instead of 60 days, for the former and the latter had no complete data for egg counts. Therefore, the reduction of parasite eggs was more clearly evident in the present study than the earlier ones. Similar relationships between *O. viverrini* egg output and worm burden have been described in human autopsies (Sithithaworn *et al.* 1991) and in individuals residing in endemic areas (Elkins *et al.* 1991). Such findings were also reported in several other human and animal helminth infections; such as *Schistosoma mansoni* (Bushara *et al.* 1983) and *S. haematobium* (Agnew *et al.* 1996). The effects may be related to the competition of parasites for the limited nutrients available within the biliary tree, in the case of *O. viverrini*, or probably to the host immune responses. In support of an immunological modulation of egg excretion, Flavell *et al.* (1983) had demonstrated that the correlation between worm burden or worm density (worm/liver weight) and egg output/worm was identical. If crowding effects alone were responsible for decreased egg output, then the correlation between egg output and worm density (the true measure of crowding) should be considerably better than that between egg output and worm burden. This finding was also observed in the present study (data not shown).

Several direct evidences supporting the role of immunological response in the reduction of egg output and egg output/worm in chronic infection have been described. Hamsters repeatedly infected with *O. viverrini* (Sirisinha *et al.* 1983) or received either serum or spleen cells from infected hamsters (Flavell, Pattanapanyasat & Flavell 1980) have shown a reduction of egg output or EPG per worm. Effects of immune responses on egg excretion have been noted in other trematodes, such as *S. mansoni* (Docuhoft *et al.* 1978). The reduced egg output noted in the present study may be from immunological damage to the reproductive system of the flukes, as mentioned in previous study (Sirisinha *et al.* 1983). However, a subsequent study of Flavell & Flavell (1986) failed to demonstrate the differences in egg output in T-cell deprived hamsters as compared with their immunologically intact counterparts. Therefore, the detailed mechanism(s) of the reduction of egg output and host immune responses is still to be investigated.

The kinetic analysis of antibody responses to different *O. viverrini* antigens indicated that early responses were intensity dependent, which implied that the more antigens released, the higher the antibody responses. The magnitude of responses was highest for ES antigens, moderately high for somatic and the lowest for egg antigens. Surprisingly, antibody to egg antigens was detected on day 14 p.i. in groups 2 and 3, while there was no egg production at that time. This may be explained by the sharing of some common components between the soluble egg and somatic antigens of *O. viverrini* (Wongratanaheewin *et al.* 1988c). In addition, the steep elevation of the antibody to egg antigens of group 2 on day 30 p.i. was also correlated with the EPG which were higher than those of other groups.

It is of interest how these parasite antigens activate the host immune system, even in the early stage of infection when the parasites are still juvenile. The liver flukes may release antigenic substances into the bile or host tissue in quantities sufficient enough for immune stimulation. Sun & Gibson (1969) were able to detect parasite antigens in the bile of patients and in animals infected with *C. sinensis*, the close relative of *O. viverrini*. *Opisthorchis* antigens were also demonstrated in infected hamsters' bile by immunoblotting and ELISA (Sripa and Kaewkes, manuscript in preparation). Host immune cell activation by parasite antigens may be through the damaged biliary epithelium, which has been previously described in infected hamsters (Bhamarapravati *et al.* 1978) and/or by bile regurgitated through damaged liver cells as suggested in *C. sinensis* infection (Sun & Gibson 1969). However, the periportal or periductal areas with intact epithelium also show heavy mononuclear cell infiltration which suggested that specific immune activation might take place *in situ*. The inflammatory responses have been shown to be specifically evoked by *O. viverrini* antigens because T-cell deprived hamsters show less inflammation than the infected, intact ones (Flavell & Flavell 1986). Since opisthorchiasis is a mucosal infection, it is unlikely that the lymphoid cells can come into direct contact with the flukes. It is conceivable that metabolic products or shading parasite antigens may diffuse through biliary epithelium into surrounding tissue, where they may elicit immune responses. The ES and shading somatic antigens of *O. viverrini* could be detected immunohistochemically in the biliary epithelium of the intrahepatic bile duct, gallbladder, extrahepatic bile duct and surrounding tissue, as early as day 3 p.i. in infected hamsters (Sripa & Kaewkes, manuscript in preparation). The mechanism by which the biliary epithelium permeated for the liver fluke antigens is not yet known. It may be by a simple diffusion or the biliary epithelium may be induced and express HLA class II. This can act as antigen presenting cells presenting antigens to subepithelial T helper lymphocytes, as described in most mucosal immune

responses (Befus & Bienenstock 1984, Kaye 1987). For a parasite infection, changes in the Ia antigen expression have been observed in the intestinal epithelium of *Nippostrongylus brasiliensis* infected rats (Masson & Percudé 1990). If this is possible in an *O. viverrini* infection, it may explain the heavy mononuclear cell infiltration around the periportal and periductal areas, without epithelial damage.

For a chronic infection, patterns of antibody responses to all antigens, after reaching their plateaus, were relatively stable and similar for all antigens tested in all infected groups. Interestingly, significant higher magnitudes of antibody responses, particularly to somatic and egg antigens, were found in the lightly infected hamsters (group 1, 25 MC) compared with those with heavy infection (groups 2 and 3). Such findings for somatic (Sirisinha *et al.* 1983, Chawengkirtikul & Sirisinha 1988) and ES antigens (Sirisinha *et al.* 1983) were also previously observed, but the latter was incompletely studied. However, the former data of antibody responses were not clearly differentiated between light and heavy infection, as shown in the present study. In addition, our data on the kinetics of antibody response to egg antigens was also similar to those reported for somatic antigens. The significant lower antibody responses in heavy infected hamsters may be explained by immunosuppression. Continuous elaboration of the parasite antigen may result in the eventual suppression of both humoral and cell-mediated immune responses (CMIR). Wongratanchewin *et al.* (1987) showed that depression of antibody response to sheep red cells and decreased lymphocyte proliferation to PHA occurred in chronically and heavily infected hamsters. In addition, *Opisthorchis*-infected hamsters have been shown to lose CMIR to the parasite antigens (Sirisinha *et al.* 1982). In both studies, the depression was abolished and its activity restored after elimination of the liver flukes by praziquantel treatment. Such suppression of both humoral (Mota-Santos *et al.* 1977) and CMIR (Pelley, Ruffier & Warren 1976) have been described in *S. mansoni*. Mechanism(s) by which the liver fluke induced immunosuppression is not yet known. The immunosuppressive effects probably involve alterations in immunoregulation by certain T-cell subpopulations, as suggested by Wongratanchewin *et al.* (1987). T-cell suppressions have been shown in mice immunized with a high dose of the common liver fluke, *Fasciola hepatica*, antigens (Cervi *et al.* 1996). The loss of T-lymphocyte proliferation and the emergence of a host response that is dominated by T helper 2 (Th2)-type profiles are well-established features of several other chronic helminthic infections and are associated with immunomodulation. These include schistosomiasis (Grogan *et al.* 1998, Staderker & Hernandez, 1998), African trypanosomes (Mabbott *et al.* 1998) and nematode infections (Allen & MacDonald 1998). The hyporesponsiveness of T cells may affect specific B cell differentiation and eventually antibody production. Impairment of antibody response to *O. viverrini* has been shown in T cell deprived hamsters (Flavell & Flavell 1986).

Another interesting point of this study is the antibody response to ES antigens, as compared to those of somatic or egg antigens, in chronic infection which did not differ among the three infected groups. This suggests that there may have been some certain specific suppressive components presented in the somatic and egg antigens. Since the somatic and egg antigens share some common components, the suppressive factors may exist in the egg shell or tegumental somatic portion of the worm. In onchocerciasis, an immunosuppressive component onchosystatin is present in the hypodermis and the basal layer of the cuticle of L3, moulting L3, L4 and female adult worms, and in the egg shell (Lustigman *et al.* 1992). However, the ES antigens of *O. viverrini* may also have such components but may be in a low concentration. Mouse monoclonal antibody to a 89 kDa protein, a major component of ES antigens

(Wongratanascheewin *et al.* 1988c), has shown to react with *O. viverrini* tegumental tissue (Amornpant, Sarasombat & Sirisinha 1991). In another liver fluke, *F. hepatica*, carbohydrate components between 12 and 23 kDa of excretory-secretory antigens can actively induced the suppression of parasite-specific delayed-type hypersensitivity (Cervi *et al.* 1996). Several other reports have described specific components of parasite antigens in induction of the immunosuppression. For example, a 17 kDa secretory product of filariae has been shown to down-regulate T cell proliferation (Hartmann *et al.* 1997) and high molecular weight components of *Ascaris suum* can induce both HIR and CMIR suppression (Fagum-Mauro & Macedo 1998). Since T and B cells recognize different antigenic fractions of *O. viverrini* antigens (Wongratanascheewin *et al.* 1991), further characterization of immunosuppressive components of the antigens should be done. Such work and their associated immunopathology are being carried out in our laboratory.

In conclusion, the present study has shown that the kinetics of humoral immune responses to egg, ES and somatic *O. viverrini* antigens were dose dependent at an early stage of the infection. Significant reductions of egg output and egg output per worm, but not worm counts, in chronic and heavy infected hamsters were inversely correlated with parasite-specific antibodies. Suppressed antibody responses to somatic and egg antigens, but not to ES antigens, was observed during chronic infection suggesting that immunosuppression did occur. The antibody responses may directly reflect the host pathology. Therefore, hepatobiliary changes should be studied in relation to the immunological status of infected hosts. Since opisthorchiasis is a chronic asymptomatic disease, even in patients with heavy infection (Upatham *et al.* 1984), the mechanism(s) of immunosuppression is (are) of interest. Particularly, detailed studies on specific T cell subpopulations, i.e. Th1, Th2 and their cytokine production should be performed to elucidate their roles in immunosuppression and immunomodulation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Thailand Research Fund (TRF), grant No. BRG3980013. The assistance of Mrs. Anumporn Mongkolwongroj, Mr. Suwit Balthaisong and Miss Wanna Sahai are appreciated. Miss Evelyn L. Murphy is also acknowledged for revising English grammar.

REFERENCES

- Agnew A.A., Fulford A.J.C., Mwanje M.T. *et al.* (1996) Age-dependent reduction of schistosome fecundity in *Schistosoma haematobium* but not *Schistosoma mansoni* infections in humans. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene* 55, 338-347.
- Akai P.S., Pungpak S., Chaicumpa W. *et al.* (1995) Serum antibody responses in opisthorchiasis. *International Journal for Parasitology* 25, 971-973.
- Akai P.S., Pungpak S., Kitikoon V., Chaicumpa W., Bunmag D. & Befus A.D. (1992) Separation and characterization of adult worm proteins and glycoproteins from the liver fluke *Opisthorchis viverrini*. *Journal of Parasitology* 78, 672-680.
- Allen J.E. & MacDonald A.S. (1998) Profound suppression of cellular proliferation mediated by the secretions of nematodes. *Parasite Immunology* 20, 241-247.
- Amornpant S., Sarasombath S. & Sirisinha S. (1991) Production and characterization of monoclonal antibodies against the excretory-secretory antigen of the liver fluke (*Opisthorchis viverrini*). *International Journal for Parasitology* 21, 421-428.
- Befus A.D. & Bienenstock J. (1984) Induction and expression of mucosal immune responses and inflammation to parasitic infections. Marchalonis J., ed. *Contemporary Topics in Immunobiology: Immunobiology of Parasitic Infections*. New York: Plenum Press, 71-108.
- Bhamarapravati N., Thamavit W. & Vajrasthira S. (1978) Liver changes in hamsters infected with a liver fluke of man, *Opisthorchis viverrini*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 27, 787-794.
- Boonpucknavig S., Kurathong S. & Thamavit W. (1986) Detection of antibody in sera from patients with opisthorchiasis. *Journal of Clinical and Laboratory Immunology* 19, 135-137.
- Busham H.O., Hussein M.F., Miriam A. *et al.* (1983) Observations on cattle schistosomiasis in the Sudan, a study in comparative medicine: IV. Preliminary observations on the mechanism of naturally acquired resistance. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32, 1065-1070.
- Cervi L., Rubinstein H. & Masih D.T. (1996) Involvement of excretion-secretion products from *Fasciola hepatica* inducing suppression of the cellular immune responses. *Veterinary Parasitology* 61, 97-111.
- Chawengkirtikul R. & Sirisinha S. (1988) Antibodies in serum and bile of hamsters experimentally infected with *Opisthorchis viverrini*. *International Journal for Parasitology* 18, 721-727.
- Doenhoff M.J., Musallam R., Bain J. *et al.* (1978) Studies on the host-parasite relationship in *Schistosoma mansoni*-infected mice: The immunological dependence of parasite egg excretion. *Immunology* 35, 771-778.
- Elkins D.B., Haswell-Elkins M.R. & Anderson R.M. (1986) The epidemiology and control of intestinal helminths in the Pulicat Lake region of Southern India. I. Study design and pre-and post-treatment observations on *Ascaris lumbricoides* infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 80, 774-792.
- Elkins D.B., Mairiang E., Sithithaworn P. *et al.* (1996) Cross-sectional patterns of hepatobiliary abnormalities and possible precursor conditions of cholangiocarcinoma associated with *Opisthorchis viverrini* infection in humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 55, 295-301.
- Elkins D.B., Sithithaworn P., Haswell-Elkins M., Kaewkes S., Awacharagan P. & Wongratnachewin S. (1991) *Opisthorchis viverrini*: relationships between egg

- counts, worms recovered and antibody levels within an endemic community in northeast Thailand. *Parasitology* 102, 283-288
- Faquin-Mauro E.L. & Macedo M.S. (1998) The immunosuppressive activity of *Ascaris suum* is due to high molecular weight components. *Clinical and Experimental Immunology* 114, 245-251
- Flavell D.J. (1981) The *in vitro* effects of serum on the adults, metacercariae and eggs of *Opisthorchis viverrini*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 75, 825-831
- Flavell D.J. & Flavell S.U. (1986) *Opisthorchis viverrini*: pathogenesis of infection in immunodeprived hamsters. *Parasite Immunology* 8, 455-466
- Flavell D.J., Pattanapanyasat K. & Flavell S.U. (1980) *Opisthorchis viverrini*: partial success in adoptively transferring immunity with spleen cells and serum in hamster. *Journal of Helminthology* 54, 191-197
- Flavell D.J., Flavell S.U. & Field G.F. (1983) *Opisthorchis viverrini*: the relationship between egg production, worm size and intensity of infection in the hamster. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 77, 538-545
- Grogan J.L., Kromsner P.G., Deelder A.M. & Yazdanbakhsh M. (1998) Antigen-specific proliferation and interferon-gamma and interleukin-5 production are down-regulated during *Schistosoma haematobium* infection. *Journal of Infectious Diseases* 177, 1433-1437
- Harinasuta T., Rigganti M. & Bunnag D. (1984) *Opisthorchis viverrini* infection, pathogenesis and clinical features. *Drug Research* 34, 1167-1169
- Hartmann S., Kyeski B., Sonnenburg B. & Lucius R. (1997) A filarial cysteine protease inhibitor down-regulates T cell proliferation and enhances interleukin-10 production. *European Journal of Immunology* 27, 2253-2260
- Haswell-Elkins M.R., Satarug S. & Elkins D.B. (1992) *Opisthorchis viverrini* infection in northeast Thailand and its relationship to cholangiocarcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 7, 538-548
- Haswell-Elkins M.R., Sithithaworn P., Mairiang E. *et al.* (1991) Immune responsiveness and parasite-specific antibody levels in human hepatobiliary disease associated with *Opisthorchis viverrini* infection. *Clinical and Experimental Immunology* 84, 213-218
- IARC. (1994) Infection with liver flukes (*Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felinus* and *Clonorchis sinensis*). *IARC Monograph on Evaluation of Carcinogenic Risks of Human* 61, 121-175
- Itoh M., Sato S., Moriyama A. & Sasaki M. (1990) Effective pretreatment by cysteine proteinase inhibitor for improved analysis of protein components of trematodes on SDS-PAGE. *Journal of Helminthology* 64, 175-179
- Janechaiwat J., Tharavapij S., Vajrasthira S. & Chaicumpa W. (1980) The immunological diagnosis of human opisthorchiasis and the humoral immune response to *Opisthorchis* infection in hamster. *Journal of the Medical Association of Thailand* 63, 439-447
- Jongsuksuntigul P. & Imsomboon T. (1997) The impact of a decade long opisthorchiasis control program in northeastern Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 28, 551-557
- Kaye P.M. (1987) Antigen presentation and the response to parasitic infection. *Parasitology Today* 3, 577-598
- Lustigman T., Brotman B., Huima T., Prince A.M. & McKerrow J.H. (1992) Molecular cloning characterization of onchocystatin, a cysteine protease inhibitor of *Onchocerca volvulus*. *Journal of Biological Chemistry* 267, 17339-17346

- Mabbott N.A., Coulson P.S., Smythies L.E., Wilson R.A. & Sternberg J.M. (1998) African trypanosome infections in mice that lack the interferon-gamma receptor gene: nitric oxide-dependent and -independent suppression of T-cell proliferative responses and the development of anaemia. *Immunology* **94**, 476-480.
- Mota-Santos T.A., Tavares C.A.P., Gazzinelli G. & Pellegrino J. (1977) Immunosuppression mediated by adult worms in chronic schistosomiasis mansoni. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **26**, 727-731.
- Pelley R.P., Ruffier J.T. & Warren K.S. (1976) Suppressive effect of a chronic helminthic infection, schistosomiasis mansoni, on the *in vitro* responses of spleen and lymph node cells to T cell mitogens phytohemagglutinin and concanavalin A. *Infection and Immunity* **13**, 1176-1183.
- Masson S.D. & Perdue M.H. (1990) Changes in the distribution of Ia antigen on epithelium of the jejunum and ileum in rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. *Clinical Immunology and Immunopathology* **57**, 83-95.
- Riganti M., Pungpak S., Pimpooowong B., Bunnag D. & Harinamata T. (1989) Human pathology of *Opisthorchis viverrini* infection, a comparison of adults and children. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **20**, 95-100.
- Ruangkunaporn Y., Akai P.S., Chongsanguan M., Sri-Yeythong S., Kitikoon V. & Chaicumpa W. (1994) Changes in serum antibodies to *Opisthorchis viverrini* in humans and hamsters following treatment of opisthorchiasis. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* **12**, 83-84.
- Sirisinha S., Tuti S., Tawatsin A. & Rattanasiriwilai W. (1982) Lack of evidence for protective immunity in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*. In *Immunology of Tropical Parasitic Infections in Asia and Pacific Region*, eds. J.W. Mak & H.S. Yong, p. 91-100, Kuala Lumpur.
- Sirisinha S., Tuti S., Vichasri S. & Tawatsin A. (1983) Humoral immune responses in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **14**, 243-251.
- Sithithaworn P., Haswell-Elkins M.R., Mairiang P. *et al.* (1994) Parasite-associated morbidity: liver fluke infection and bile duct cancer in northeast Thailand. *International Journal for Parasitology* **24**, 833-843.
- Sithithaworn P., Tesana S., Pipitgool V. *et al.* (1991) Relationship between faecal egg count and worm burden of *Opisthorchis viverrini* in human autopsy cases. *Parasitology* **102**, 277-281.
- Stadecker M.J. & Hernandez H.J. (1998) The immune response and immunopathology in infection with *Schistosoma mansoni*: a key role of major egg antigen Sm-p40. *Parasite Immunology* **20**, 217-221.
- Sun T. & Gibson J.B. (1969) Antigens of *Clonorchis sinensis* in experimental and human infections. An analysis by gel diffusion technique. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **18**, 241-252.
- Thammapalerd N., Tharavanij S., Nacapunchai D., Bunnag D., Radomyos P. & Prasertsitiroj V. (1988) Detection of antibodies against *Opisthorchis viverrini* in patients before and after treatment with praziquantel. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **19**, 101-108.
- Thamavit W., Bhamarapravati N., Sahaphong S., Vajrasthira S. & Angsubhakorn S. (1978) Effects of dimethylnitrosamine on induction of cholangiocarcinoma in *Opisthorchis viverrini* infected Syrian golden hamsters. *Cancer Research* **38**, 4634-4639.
- Upatham E.S., Viyanant V., Kursthong S. *et al.* (1984) Relationship between prevalence and intensity of *Opisthorchis viverrini* infection, and clinical symptoms

- and signs in a rural community in north-east Thailand. *Bulletin of the World Health Organization* 62, 451-461
- Wongratana-cheewin S., Bunnag D., Vacusorn N. & Sirisinha S. (1988a) Characterization of humoral immune response in the serum and bile of patients with opisthorchiasis and its application in immunodiagnosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 38, 356-362
- Wongratana-cheewin S., Charupatana C., Bunnag D. & Sirisinha S. (1988b) Effects of praziquantel treatment on antibody levels and lymphoproliferative responses in patients with opisthorchiasis. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 19, 109-116
- Wongratana-cheewin S., Chawengkirtikul R., Bunnag D. & Sirisinha S. (1988c) Analysis of *Opisthorchis viverrini* antigens by immunoprecipitation and polyacrylamide gel electrophoresis. *Parasitology* 96, 119-128
- Wongratana-cheewin S., Good M.F., Sithithaworn P. & Haswell-Elkins M.R. (1991) Molecular analysis of T and B cell repertoires in mice immunized with *Opisthorchis viverrini* antigens. *International Journal for Parasitology* 21, 719-721
- Wongratana-cheewin S., Rattanasiriwilai W., Priwun R. & Sirisinha S. (1987) Immunodepression in hamsters experimentally infected with *Opisthorchis viverrini*. *Journal of Helminthology* 61, 151-156
- Wongratana-cheewin S. & Sirisinha S. (1987) Analysis of *Opisthorchis viverrini* antigens: physicochemical characterization and antigen localization. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 18, 511-520

TABLE

Table 1 (*L. viverrini*) antigen concentrations for plate coating and dilutions of serum samples, biotinylated antibody and streptavidin-peroxidase used in ELISA.

Test	Antigen concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Dilutions		
		Serum	Biotinylated antibody	Streptavidin- peroxidase
ES antigens	1	1: 8,000	1: 16,000	1: 40,000
Somatic antigens	1	1: 4,000	1: 8,000	1: 20,000
Egg antigens	1	1: 4,000	1: 8,000	1: 20,000

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Mean worm burdens and recovery rate (%) in hamsters infected with 25, 50 and 100 *O. viverrini* metacercariae from day 1 to month 6 post-infection. (D = day, M = month)

Figure 2 Time-course of egg output (EPG) and EPG per worm in hamsters infected with 25, 50 and 100 *O. viverrini* metacercariae from day 1 to month 6 post-infection. (D = day, M = month)

Figure 3 Kinetics of serum antibody responses to ES (a), somatic (b) and egg (c) antigens in hamsters infected with 25, 50 and 100 *O. viverrini* metacercariae from day 1 to month 6 post-infection. Data represent the mean OD (490 nm) of 5 animals. (D = day, M = month)

Figure 1

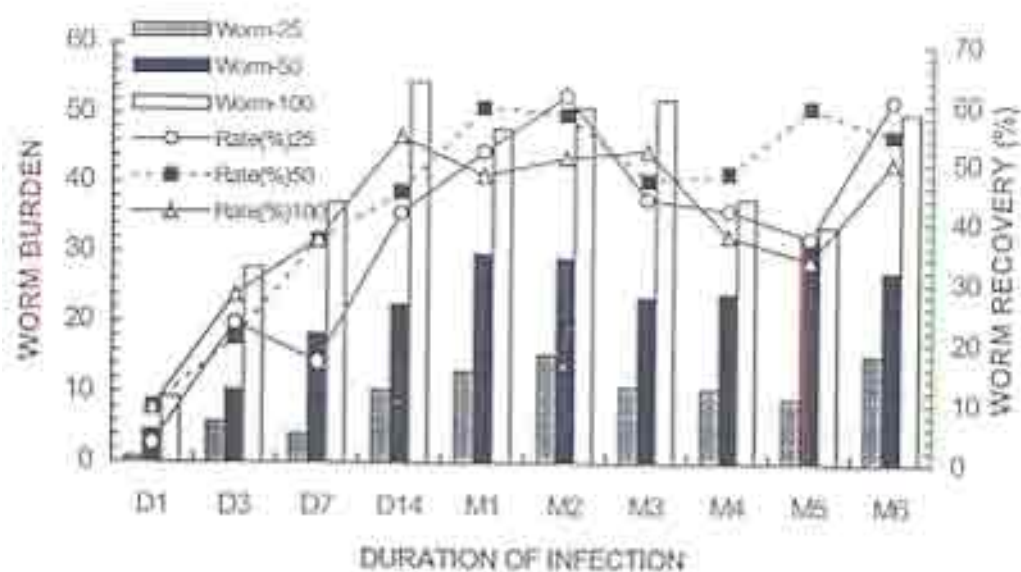
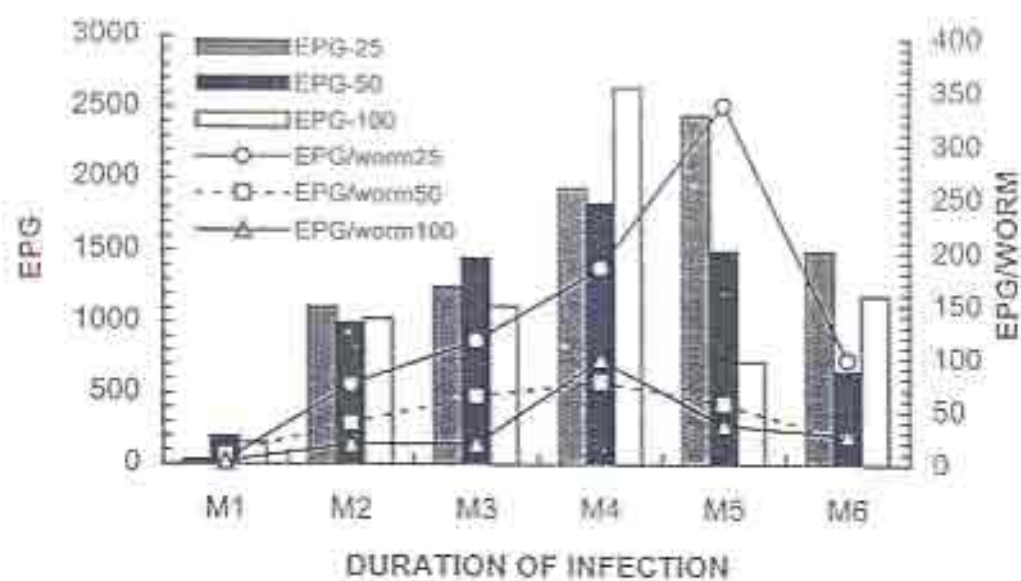
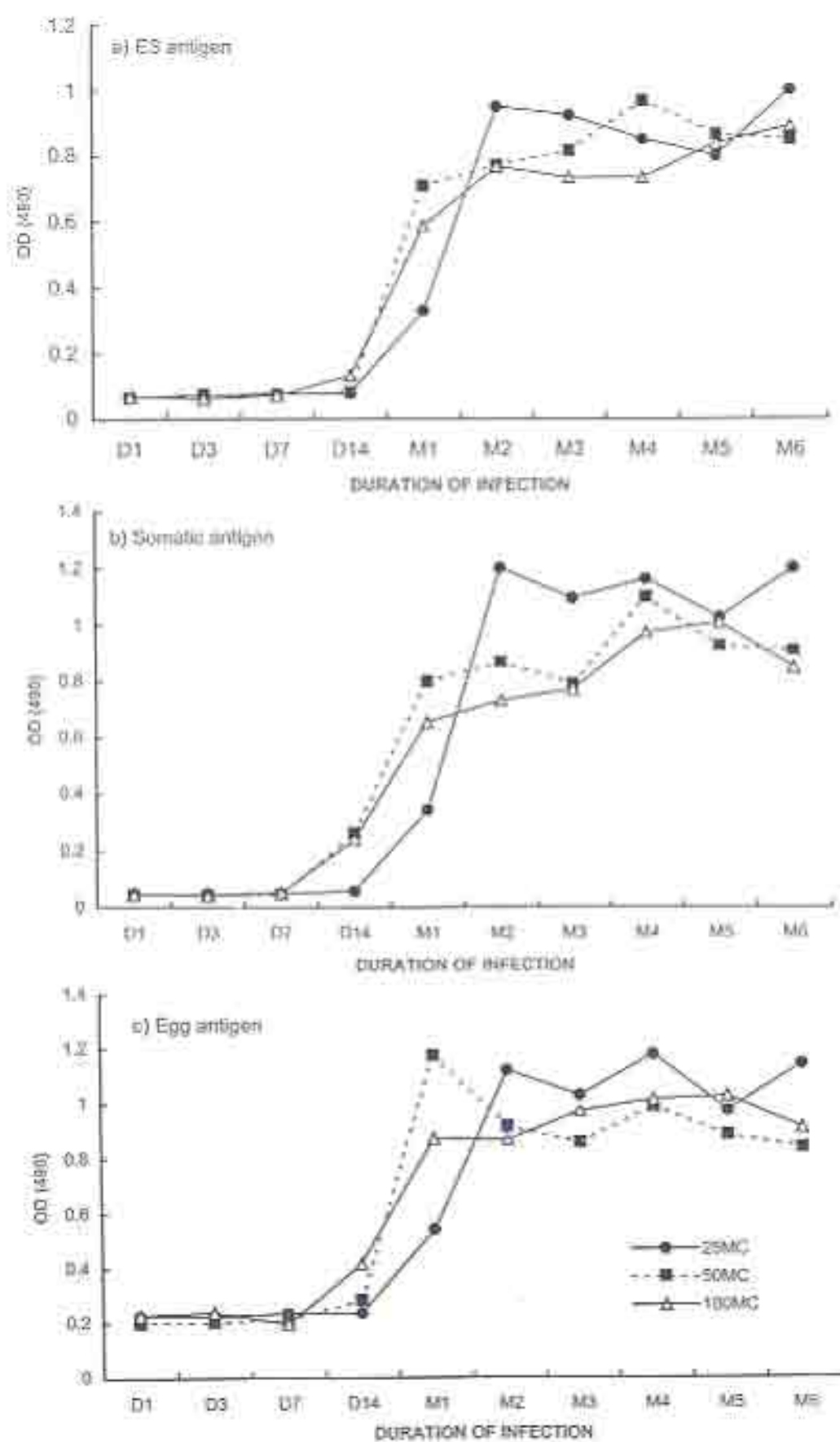


Figure 2





ภาคผนวก

Appendix 1 General Data

Date-Dose	Number	Liver (g)	worm	recovery%	EPG	EPG/worm	anti-ES	anti-som	anti-egg
D1.25	1	4.2	0	0	0	0	0.067	0.045	0.23
	2	3.5	1	4	0	0	0.0607	0.040	0.244
	3	4	1	4	0	0	0.06	0.030	0.221
	4	4.2	0	0	0	0	0.069	0.055	0.219
	5	4.1	2	8	0	0	0.07	0.048	0.207
D3.25	1	3.8	5	20	0	0	0.068	0.037	0.218
	2	2.9	10	40	0	0	0.065	0.074	0.233
	3	3.9	5	20	0	0	ND	0.038	0.23
	4	4.3	6	24	0	0	0.077	0.048	0.242
	5	3.4	3	12	0	0	0.071	0.04	0.24
D7.25	1	3.9	5	20	0	0	0.081	0.061	0.238
	2	3.9	3	12	0	0	0.07	0.051	0.24
	3	3.2	5	20	0	0	0.082	0.042	0.236
	4	3.7	2	8	0	0	0.085	0.039	0.233
	5	3	6	24	0	0	0.076	0.031	0.239
D14.25	1	3.9	10	40	0	0	0.084	0.073	0.24
	2	3.4	13	52	0	0	0.09	0.076	0.257
	3	2.8	10	40	0	0	0.072	0.034	0.232
	4	3.5	8	32	0	0	0.088	0.039	0.241
	5	3.6	11	44	0	0	0.093	0.042	0.214
M1.25	1	2.6	10	40	0	0	0.189	0.184	0.378
	2	3.2	19	76	0	0	0.247	0.233	0.436
	3	3.4	15	60	76	5.066667	0.744	0.718	0.974
	4	2.9	14	56	0	0	0.289	0.32	0.506
	5	2.9	7	28	72	10.28571	0.225	0.255	0.431
M2.25	1	4.4	16	64	770	48.125	0.861	0.918	1.089
	2	4.3	12	76	885	46.57895	1.011	1.378	1.119
	3	3.9	14	56	1480	105.7143	0.904	1.158	1.121
	4	3.9	13	52	1072	82.46154	0.769	1.071	0.989
	5	3.4	15	60	1360	90.66667	1.208	1.488	1.301
M3.25	1	3.1	13	52	498	38.30769	0.82	0.991	1.114

	2	3.1	10	40	550	55	1.267	1.612	1.438
	3	3	13	52	2000	160.7692	0.965	1.117	0.789
	4	3.3	10	40	1344	134.4	0.746	0.912	0.952
	5	2.7	9	36	1775	167.2222	0.806	0.845	0.867
M4.25	1	4.1	11	44	1264	114.9091	1.154	1.451	1.414
	2	3.9	9	36	1600	177.7778	0.755	0.927	1.043
	3	4.5	12	48	462	38.5	0.693	1.169	1.154
	4	4.1	12	48	4212	351	0.699	1.202	1.011
	5	3.4	9	36	2185	242.7778	0.754	1.067	1.282
M5.25	1	4.2	7	28	3818	545.4286	0.467	0.497	0.581
	2	5.1	12	48	2465	205.4167	0.958	1.35	1.225
	3	4.6	14	56	2738	195.5714	0.941	1.382	1.147
	4	4.2	11	44	1606	146	0.928	1.304	1.113
	5	4.4	3	12	1780	593.3333	0.709	0.896	0.623
M6.25	1	4.1	16	64	2150	134.375	0.949	1.049	1.281
	2	4.5	17	68	1280	75.29412	1.057	1.407	1.212
	3	3.5	15	60	1092	72.8	0.839	1.214	1.036
	4	4.2	14	56	720	51.42857	0.945	1.3	1.114
	5	3.6	14	56	2290	162.8571	1.225	1.041	1.096
M7.25	1	4.8	0	0	0	0	0.36	0.28	0.4
	2	4.8	0	0	0	0	0.406	0.513	0.566
	3	3.3	0	0	0	0	0.311	0.638	0.577
	4	4.5	0	0	0	0	0.7	1.631	1.22
	5	3.9	0	0	0	0	0.374	0.561	0.46
M8.25	1	3.8	0	0	0	0	0.668	1.283	1.076
	2	3.3	0	0	0	0	0.408	0.559	0.44
	3	4	0	0	0	0	0.451	1.114	0.626
	4	3.4	0	0	0	0	0.633	0.734	0.764
	5	2.9	0	0	0	0	0.346	0.44	0.4
M9.25	1	4.5	0	0	0	0	0.184	0.359	0.428
	2	4.1	0	0	0	0	0.705	1.358	0.921
	3	3.8	0	0	0	0	0.311	0.17	0.294
	4	5.2	0	0	0	0	0.161	0.4	0.291
	5	3.4	0	0	0	0	0.182	0.484	0.59

M10.25	1	3.8	0	0	0	0	0.076	0.054	0.129
	2	4.3	0	0	0	0	0.431	0.488	0.362
	3	4.4	0	0	0	0	0.26	0.243	0.318
	4	3.5	0	0	0	0	0.362	0.701	0.86
	5	5.5	0	0	0	0	0.312	0.506	0.44
M11.25	1	4.7	0	0	0	0	0.144	0.28	0.241
	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M12.25	1	4.9	0	0	0	0	0.278	0.284	0.3
	2	3.9	0	0	0	0	0.108	0.157	0.178
	3	4.6	0	0	0	0	0.396	0.518	0.501
	4	4.1	0	0	0	0	0.32	0.352	0.452
	5	4.3	0	0	0	0	0.257	0.335	0.47
D1.50	1	2.8	4	8	0	0	0.067	0.038	0.202
	2	3.1	5	10	0	0	0.075	0.042	0.2
	3	3.6	2	4	0	0	0.07	0.044	0.208
	4	2.8	2	4	0	0	0.058	0.046	0.202
	5	3.2	10	20	0	0	0.083	0.040	0.105
O3.50	1	3.1	8	16	0	0	0.066	0.04	0.196
	2	3.6	14	28	0	0	0.068	0.042	0.184
	3	3.2	8	12	0	0	0.073	0.046	0.18
	4	4	8	18	0	0	0.073	0.038	0.228
	5	2.8	14	28	0	0	0.097	0.05	0.225
O7.50	1	3.3	21	42	0	0	0.07	0.041	0.213
	2	3.7	13	26	0	0	0.107	0.058	0.214
	3	3.3	22	44	0	0	0.078	0.061	0.214
	4	3	22	44	0	0	0.066	0.039	0.197
	5	2.9	14	28	0	0	0.064	0.032	0.223
D14.50	1	3.2	20	40	0	0	0.079	0.077	0.251
	2	3.5	25	50	0	0	0.068	0.451	0.506
	3	3.1	25	50	0	0	0.112	0.114	0.276
	4	3.6	37	74	0	0	0.083	0.7	0.23

	5	2.9	8	12	8	0	0.063	0.03	0.185
M1.50	1	2.5	26	52	96	3.692308	0.448	0.532	1.191
	2	3.7	38	76	225	5.921053	0.612	0.697	1.115
	3	4.3	26	56	165	5.892857	0.686	0.787	1.023
	4	3.7	23	46	160	6.966522	0.804	0.953	1.53
	5	3.3	34	68	312	9.176471	0.806	0.827	1.029
M2.50	1	3.6	19	38	1520	80	0.785	0.507	0.61
	2	3.7	32	64	160	6	0.788	1.012	1.114
	3	3.3	21	42	1170	55.71429	0.791	0.982	0.937
	4	3.9	28	56	760	27.14286	0.845	0.917	0.968
	5	3.5	45	92	1224	26.6087	0.65	0.924	0.976
M3.50	1	3	23	46	531	23.08696	1.116	1.537	1.441
	2	2.6	24	48	3536	147.3333	0.778	0.475	0.569
	3	3.6	26	56	966	35.21429	0.519	0.423	0.599
	4	3.3	17	34	1485	87.35294	0.491	0.4	0.58
	5	3.5	26	52	770	29.61538	1.18	1.12	1.118
M4.50	1	4.8	28	56	1040	37.14286	0.939	1.142	0.918
	2	4.7	20	58	2025	69.82759	0.589	0.536	0.591
	3	4.2	15	36	1462	81.22222	1.017	1.101	0.918
	4	6.3	22	44	1275	67.95455	1.104	1.217	1.142
	5	3.4	24	48	3393	141.375	1.131	1.495	1.395
M5.50	1	4.1	45	90	1806	35.68889	0.922	0.873	0.655
	2	4.3	37	74	1314	35.51351	1.015	1.229	0.973
	3	4.1	22	44	1662	71	0.794	0.833	0.844
	4	4.3	26	50	1062	42.45	1.021	0.985	1.037
	5	4.1	20	40	2016	100.8	0.582	0.706	0.929
M6.50	1	4.1	22	44	255	11.59091	0.593	0.907	0.906
	2	5.8	29	58	1032	35.68621	1.147	1.327	1.063
	3	4.6	33	66	700	21.21212	1.17	1.018	0.883
	4	6	29	58	504	17.37831	0.651	0.313	0.384
	5	4.2	24	48	830	34.58333	0.692	0.977	0.986
M7.50	1	5.3	0	0	0	0	0.122	0.237	0.18
	2	4.5	0	0	0	0	0.405	0.45	0.514
	3	4.5	0	0	0	0	0.423	0.359	0.579

	4	3.5	0	0	0	0	0.384	0.379	0.47
	5	4.5	0	0	0	0	0.439	0.532	0.605
M8.50	1	3.5	0	0	0	0	0.385	0.523	0.36
	2	3.5	0	0	0	0	0.543	0.706	0.565
	3	4.3	0	0	0	0	0.669	1.063	0.81
	4	3.1	0	0	0	0	0.385	0.304	0.394
	5	3.4	0	0	0	0	0.474	0.47	0.702
M9.50	1	5	0	0	0	0	0.227	0.14	0.276
	2	4.1	0	0	0	0	0.289	0.181	0.319
	3	4.1	0	0	0	0	0.099	0.144	0.14
	4	4.3	0	0	0	0	0.497	0.483	0.364
	5	3.3	0	0	0	0	0.13	0.136	0.179
M10.50	1	5.4	0	0	0	0	0.52	0.675	0.499
	2	3.8	0	0	0	0	0.414	0.494	0.588
	3	4.5	0	0	0	0	0.190	0.174	0.288
	4	4.4	0	0	0	0	0.501	0.513	0.686
	5	5	0	0	0	0	0.648	1.168	1.323
M11.50	1	4	0	0	0	0	0.414	0.755	0.358
	2	2.8	0	0	0	0	0.373	0.5	0.382
	3	3.8	0	0	0	0	0.478	0.566	0.479
	4	4.1	0	0	0	0	0.229	0.405	0.329
	5	4.3	0	0	0	0	0.213	0.16	0.244
M12.50	1	5.8	0	0	0	0	0.224	0.641	0.687
	2	4.2	0	0	0	0	0.279	0.412	0.59
	3	4	0	0	0	0	0.169	0.225	0.314
	4	3.2	0	0	0	0	ND	ND	ND
	5	4.6	0	0	0	0	ND	ND	ND
D1.100	1	2.79	8	8	0	0	0.063	0.055	0.201
	2	3.12	6	6	0	0	0.066	0.047	ND
	3	2.66	22	22	0	0	0.067	0.039	ND
	4	2.32	1	1	0	0	0.088	0.041	0.311
	5	2.65	2	2	0	0	0.058	0.045	0.203
D3.100	1	2.45	41	41	0	0	0.058	0.04	0.385
	2	3.45	20	20	0	0	0.057	0.044	0.213

	3	3.5	26	26	0	0	0.076	0.048	0.232
	4	3.62	22	22	0	0	0.057	0.037	0.103
	5	3.9	30	30	0	0	0.063	0.038	0.175
D7.100	1	5.96	50	50	0	0	0.066	0.038	0.179
	2	3.22	41	41	0	0	0.111	0.089	0.196
	3	3.76	49	49	0	0	0.064	0.05	0.16
	4	3.8	18	18	0	0	0.061	0.043	0.163
	5	4.92	28	28	0	0	0.009	0.062	0.248
D14.100	1	4.12	46	46	0	0	0.325	0.395	0.603
	2	3.6	43	43	0	0	0.1	0.0283	0.426
	3	4.31	60	60	0	0	0.178	0.188	0.363
	4	3.2	53	53	0	0	0.062	0.046	0.216
	5	7.25	71	71	0	0	0.212	0.275	0.419
M1.100	1	4.6	58	58	ND	ND	0.783	0.715	0.91
	2	4.5	39	39	30	0.780251	0.488	0.399	0.696
	3	5.1	51	51	348	6.823529	0.435	0.507	0.935
	4	7.4	46	46	106	2.355666	0.708	0.972	1.041
	5	4.3	47	47	120	2.553191	0.543	0.578	0.791
M2.100	1	4.2	37	37	1960	52.97297	0.668	0.708	0.845
	2	6	44	44	740	16.81818	0.430	0.413	0.589
	3	5.1	70	70	640	9.142857	1.21	0.737	0.939
	4	5.2	50	50	580	11.6	0.617	0.788	0.977
	5	5.8	54	54	216	4	0.904	1.008	1.008
M3.100	1	5.2	43	43	144	3.348837	1.071	0.697	0.759
	2	5.5	44	44	156	3.545455	0.479	0.68	1.091
	3	5.7	68	68	1326	19.5	0.647	0.633	0.937
	4	4.8	59	59	3240	54.91525	0.657	1.049	1.285
	5	5.3	47	47	752	16	0.617	0.772	0.798
M4.100	1	3.4	10	10	1100	110	0.469	0.765	0.735
	2	3.4	11	11	2296	208.7273	0.69	0.761	0.799
	3	4.4	55	55	2624	47.70809	0.909	1.002	1.214
	4	3.6	55	55	2584	46.88182	0.818	1.56	1.481
	5	3.4	58	58	4644	80.06897	0.79	0.663	0.856
M5.100	1	4.3	23	23	420	18.26067	1.047	1.122	1.161

	2	4	5	5	670	134	0.771	1.088	1.18
	3	3.2	50	50	960	19.2	0.98	0.762	0.923
	4	4	58	55	855	15.26785	0.456	0.91	0.547
	5	5.9	35	35		0	0.961	1.558	1.335
M6.100	1	5	54	54	1020	18.88889	0.935	0.652	0.794
	2	4.4	60	60	736	12.26667	1.027	0.784	0.965
	3	5.5	66	66	960	14.54545	0.913	0.921	1.001
	4	5.4	34	34	1875	55.14705	0.836	0.807	0.903
	5	4.7	37	37	1392	37.62162	0.746	1.072	0.917
M7.100	1	4.5	0	0	0	0	0.296	0.2	0.289
	2	4	0	0	0	0	0.255	0.275	0.288
	3	3.9	0	0	0	0	0.655	0.643	0.31
	4	4.1	0	0	0	0	0.610	0.896	0.775
	5	3.2	0	0	0	0	0.509	0.762	0.548
M8.100	1	4	0	0	0	0	0.48	0.709	0.414
	2	5.5	0	0	0	0	0.81	0.851	0.416
	3	3.6	0	0	0	0	0.275	0.369	0.255
	4	4.2	0	0	0	0	0.411	0.529	0.376
	5	4	0	0	0	0	0.729	1.272	0.822
M9.100	1	4.3	0	0	0	0	0.531	0.369	0.231
	2	5.2	0	0	0	0	0.717	0.582	0.427
	3	2.5	0	0	0	0	0.732	0.729	0.45
	4	2.4	0	0	0	0	0.428	0.36	0.25
	5	3.9	0	0	0	0	ND	ND	ND
M10.100	1	4.5	0	0	0	0	0.428	0.505	0.357
	2	6.3	0	0	0	0	0.903	0.486	0.311
	3	4.2	0	0	0	0	0.51	0.411	0.32
	4	4.6	0	0	0	0	0.486	0.478	0.385
	5	4.5	0	0	0	0	ND	ND	ND
M11.100	1	4.7	0	0	0	0	0.438	0.463	0.432
	2	4.2	0	0	0	0	0.322	0.401	0.349
	3	4	0	0	0	0	0.471	0.578	0.308
	4	3.4	0	0	0	0	0.301	0.429	0.473
	5	4.7	0	0	0	0	0.569	0.285	0.751

M12-100	1	5.3	0	0	0	0	0.475	0.496	0.416
	2	6.2	0	0	0	0	0.191	0.153	0.126
	3	4.2	0	0	0	0	ND	ND	ND
	4	4.1	0	0	0	0	ND	ND	ND
	5	4.3	0	0	0	0	ND	ND	ND

Appendix 2 Mast cell Counts

Date & Dos	Number	CTMC	MMC	cbd area
D1-25	1	1		57170.10
	2	1		22005.07
	3	16		202563.9
	4	3		43252.51
	5	4		82313.75
mean		5		81599.26
SD		6.28490054		71010.23
cell/mm2		61.2750655		
D3-25	1	5		42214.47
	2	5		36739.56
	3	5		61721.24
	4	2		73997.74
	5	2		72746.94
mean		3.8		67483.99
SD		1.64316767		17227.2
cell/mm2		68.1053628		
D7-25	1	2	2	57582.4
	2	2	2	60916.31
	3	4	2	52813.85
	4	1	2	54178.08
	5	0	3	54355.65
mean		1.8	2.2	55969.28
SD		1.4832397	0.447214	3272.774
cell/mm2		32.1605121	39.30729	
D15-25	1	0	2	45720.48
	2	2	0	78801.49
	3	5	0	69570.25
	4	5	0	98490.52
	5	1	3	72975.35
mean		2.6	1	73111.62
SD		2.30217289	1.414214	18868.04

cell/mm2		35.5620635	13.67772	
D30-25	1	6	10	148960
	2	4	11	177899.8
	3	2	2	97990.67
	4	4	6	111887.2
	5	4	4	146973.9
mean		3.6	6.4	136747.3
SD		1.09544512	3.911521	31887.54
cell/mm2		27.7894965	46.80396	
M2-25	1	29	31	337421.0
	2	7	12	286072.8
	3	18	26	297196.3
	4	19	31	310764.1
	5	36	38	410623.7
mean		20.8	27.6	328533.7
SD		11.7558496	9.710819	49070.2
cell/mm2		63.3116189	84.00965	
M3-25	1	19	64	388200.4
	2	9	60	380098.0
	3	15	66	433962.7
	4	30	52	342010.3
	5	21	62	631051.1
mean		18.8	65.4	436562.6
SD		7.7588659	18.29754	112961.6
cell/mm2		43.0636972	152.0973	
M4-25	1	1	46	331451.5
	2	5	36	366705.4
	3	4	30	458232.7
	4	2	60	306930
	5	2	37	381063
mean		2.8	41.6	368874.5
SD		1.64316767	11.58819	57826.26
cell/mm2		7.59065689	112.7755	
M5-25	1	6	76	355671.1

	2	1	53	387536.2
	3	3	59	297737.3
	4	6	67	635913.5
	5	2	34	400012.1
mean		3.6	56.6	415374
SD		2.30217289	14.29336	129471.5
cell/mm2		6.66688717	136.2627	
M6-25	1	7	40	426292.1
	2	5	67	267660.9
	3	6	57	379286.9
	4	2	60	397241.9
	5	4	40	315768
mean		4.8	52.6	355250
SD		1.92353841	12.2352	63005.78
cell/mm2		13.5116127	148.6277	
D1-50	1	0	28	423839.2
	2	2	3	143121.3
	3	4	8	97119.92
	4	4	7	110572.4
	5	2	6	154102.6
mean		2.4	10.2	167551.3
SD		1.67332005	10.1341	133906.3
cell/mm2		12.7964974	54.38511	
D3-50	1	1	2	16748.58
	2	3	2	91617.86
	3	5	4	87481.89
	4	4	1	100772.9
	5	12	10	189552.9
mean		5	3.8	97234.82
SD		4.18330013	3.63318	61522.04
cell/mm2		51.4219099	39.08065	
D7-50	1	3	3	132630.4
	2	8	10	202406.1
	3	2	4	162050.2

	4	12	4	263434.4
	5	2	7	117972.4
mean		5.6	5.6	175698.9
SD		4.82700736	2.890972	58703.08
cell/mm2		31.8727116	31.87271	
D15-50	1	12	3	337670.8
	2	16	2	263900.8
	3	15	1	229761.4
	4	15	2	152434.8
	5	11	1	346002.9
mean		13.8	1.8	264155.0
SD		2.16794934	0.83668	81345.08
cell/mm2		62.2418772	6.814158	
D30-50	1	5	47	340319.7
	2	3	11	269061
	3	4	12	302718.6
	4	3	20	295578.7
	5	9	21	512800.4
mean		5.2	22.2	304217.5
SD		2.28036066	14.58424	26730.43
cell/mm2		17.0930346	72.97411	
M2-50	1	3	41	240241.3
	2	42	110	954920.6
	3	32	49	561043.4
	4	5	24	378230.3
	5	14	44	268777.9
mean		19.6	63.6	490642.7
SD		16.682326	32.69833	307776.6
cell/mm2		38.9476007	109.2446	
M3-50	1	15	63	270196.8
	2	9	31	361626
	3	17	21	284792.9
	4	15	23	248898.1
	5	18	40	175514.7

mean		14.8	35.6	264206.7
SD		3.49284984	17.05286	66384.05
cell/mm2		58.0169574	134.7435	
M4-50	1	29	62	373226.4
	2	28	91	423944.9
	3	23	47	347987.9
	4	15	35	317164.3
	5	7	62	514340.1
mean		20.4	60	395332.7
SD		9.21665176	22.12465	77171.78
cell/mm2		51.5021076	151.7709	
M5-50	1	6	40	385589
	2	14	58	397506.3
	3	4	42	254664.3
	4	10	42	409333.1
	5	5	91	306273.4
mean		7.8	46.6	350673.2
SD		4.14728827	7.666116	67161.18
cell/mm2		22.2429297	132.8872	
M6-50	1	14	65	392457.1
	2	9	37	248301.8
	3	7	54	366290.3
	4	6	94	561737.7
	5	6	33	218580.2
mean		8.4	56.6	367473.4
SD		3.36154726	24.58251	136230.8
cell/mm2		23.4992497	158.3334	
D1-100	1	2	3	67156.44
	2	2	5	154457.5
	3	2	5	111180.7
	4	0	4	68432.25
	5	2	5	75557
mean		1.8	4.4	93356.78
SD		0.69442719	0.894427	39564.75

cell/mm2		17.1385515	47.13102	
D3-100	1	0	6	162535.8
	2	1	4	95338.73
	3	1	16	91768.81
	4	0	10	178884.6
	5	0	3	74356.96
mean		0.4	7.8	120541
SD		0.54772256	5.310587	46749.03
cell/mm2		3.3183731	64.70828	
D7-100	1			
	2	5	2	18196.71
	3	4	2	205402.4
	4	5	2	120297.4
	5	3	2	189484.4
mean		4.25	2	127822.7
SD		0.95742711	0	82204.34
cell/mm2		33.2491739	15.64667	
D15-100	1	4	12	172387.6
	2	6	9	130124.7
	3	4	3	139475.9
	4	3	4	99852.08
	5	3	11	175914.7
mean		4	7.8	143547
SD		1.22474487	4.086563	31500.53
cell/mm2		27.8654424	54.33761	
D30-100	1	6	33	171982.6
	2	6	57	204625
	3	2	26	354478.6
	4	22	31	342609
	5	17	64	427831.8
mean		10.6	42.6	300303.4
SD		5.47348887	16.62227	107944.4
cell/mm2		35.2976349	141.8566	
M2-100	1	9	60	444790.8

	2	10	39	232766.3
	3	24	62	373467.9
	4	29	23	579700.5
	5	5	67	338953.6
mean		15.4	50.2	303830.8
SD		10.454064	18.50301	129100
cell/mm2		39.102192	127.463	
M0-100	1	6	81	447832.4
	2	6	36	441930.3
	3	3	120	531736.8
	4	7	58	372056.5
	5	1	70	324983.4
mean		4.0	60	423707.9
SD		2.50968008	31.12876	79054.86
cell/mm2		10.8505362	162.848	
M4-100	1	4	80	324081.5
	2	7	32	301090.2
	3	33	71	441258.6
	4	10	49	359761.8
	5	16	72	714723.4
mean		14	60.8	440303.1
SD		11.5108644	19.79141	159246.2
cell/mm2		31.798279	138.0807	
M5-100	1	14	45	378049.2
	2	6	16	169680.6
	3	11	77	321851.2
	4	20	67	311428.3
	5	16	31	277744.2
mean		13.4	67.6	291750.7
SD		5.27257053	24.40081	77197.74
cell/mm2		45.9296246	163.153	
M6-100	1	36	144	421499.5
	2	6	85	663718.1
	3	9	43	315058.0

	4	12	88	542567.3
	5	5	26	486150.5
mean		10	77.2	485793.8
SD		5.24404424	45.80553	130541.9
cell/mm2		20.5845531	158.9135	
M7-25	1	6	9	304114.5
	2	5	8	275947.9
	3	5	10	503856.7
	4	3	5	290672.9
	5	10	17	633966.3
mean		7.8	11	401711.7
SD		5.3749477	5.244044	
cell/mm2		18.4109078	27.38262	
M8-25	1	2	10	307428.2
	2	3	7	532951.9
	3	10	12	271200.6
	4	2	10	282370.8
	5	2	9	305345.1
mean		3.8	9.4	338859.3
SD		3.12409987	1.74356	
cell/mm2		11.181097	27.6585	
M9-25	1	3	10	409521.8
	2	5	8	351761.6
	3	4	10	388028.8
	4	4	19	497049
	3	1	23	370064
mean		3.4	14	403284.6
SD		1.51957509	6.595463	
cell/mm2		8.43077015	34.71494	
M10-25	1	17	20	912625.7
	2	6	11	562703.8
	3	6	19	409536.9
	4	2	15	463206.4

	5	5	10	32417
mean		7.2	15	476076
SD		5.71839138	4.527693	
cell/mm2		15.1235736	31.50745	
M11-25	1	2	5	168010
cell/mm2		11.9040533	29.76013	
M12-25	1	0	4	46783
	2	0	2	42148
	3	0	3	53292
	4	2	4	82050
	5	1	1	39191
mean		0.8	2.8	54694.8
SD		0.09442719	1.30384	
cell/mm2		10.9700044	51.18335	
M7-50	1	3	17	109408
	2	2	10	48146
	3	2	10	44353
	4	2	12	59194
	5	1	10	39897
mean		2	11.6	60199.6
SD		0.70710678	3.83315	
cell/mm2		33.2228121	196.0148	
M8-50	1	10	32	196073
	2	5	8	87329
	3	14	27	117268
	4	8	12	71224
	5	5	7	62313
mean		6.4	17.2	102841.4
SD		3.78153408	11.51955	
cell/mm2		81.6791681	167.2478	
M9-50	1	2	10	301126.1
	2	2	3	302560.1
	3	2	13	374569.8

	5	5	10	32417
mean		7.2	15	476078
SD		5.71839138	4.527693	
cell/mm2		15.1235738	31.50745	
M11-25	1	2	5	168010
cell/mm2		11.9040533	29.76013	
M12-25	1	0	4	48783
	2	0	2	42148
	3	0	3	53292
	4	2	4	92050
	5	1	1	39191
mean		0.6	2.8	54694.6
SD		0.69442719	1.30384	
cell/mm2		10.9700044	51.19335	
M7-50	1	3	17	109408
	2	3	10	48148
	3	2	10	44353
	4	2	12	50194
	5	1	10	39897
mean		2	11.8	60189.6
SD		0.70710678	3.03315	
cell/mm2		33.2226121	195.0145	
M8-50	1	10	32	196079
	2	5	8	67329
	3	14	27	117268
	4	8	12	71224
	5	5	7	62312
mean		8.4	17.2	102841.4
SD		3.78153408	11.51955	
cell/mm2		81.6791681	167.2478	
M9-50	1	2	10	301128.1
	2	2	3	302960.1
	3	2	13	374589.6

	4	0	11	402283.8
	5	5	10	491822.4
mean		2.2	9.4	374432.4
SD		1.76885438	3.781534	
cell/mm2		5.67555935	25.10466	
M10-50	1	11	12	502407.6
	2	2	7	321056.0
	3	5	7	343542.4
	4	5	5	407186.7
	5	10	42	385126.8
mean		6.4	14.8	392045
SD		6.76756973	15.53383	
cell/mm2		21.4261094	37.24062	
M11-50	1	5	15	381921
	2	7	15	336742.2
	3	1	13	444346.5
	4	10	10	849259.8
	5	3	13	526421.0
mean		5.2	13.2	507478
SD		3.49284084	2.04839	
cell/mm2		10.2467503	26.01098	
M12-50	1	4	6	341972.6
	2	2	6	424503.4
	3	1	5	377913.3
	4	7	6	410925.8
	5	1	3	346659.5
mean		3	5.6	381594.9
SD		2.54950976	1.81859	
cell/mm2		7.86173094	14.67525	
M7-100	1	6	16	378320.9
	2	9	9	505841.7
	3	4	15	394306.2
	4	28	20	659280.2
	5	20	1	257917.2

mean		13.4	12.2	439133.2
SD		10.2371871	7.395945	
cell/mm2		30.5146581	27.782	
M8-100	1	3	8	375535.9
	2	15	7	465470.7
	3	11	14	614109.1
	4	7	8	366883.5
	5	3	7	473750.1
mean		7.8	8.8	459133.8
SD		5.21538192	2.945575	
cell/mm2		16.9885096	19.16652	
M9-100	1	5	18	781548.1
	2	3	15	578991
	3	5	22	953749.5
	4	5	9	326153.2
	5	4	7	433152.7
mean		4.4	14.2	614318.9
SD		0.89442719	6.220932	
cell/mm2		7.16240352	23.11503	
M10-100	1	2	6	344523.0
	2	8	14	431100.2
	3	7	7	626275.5
	4	4	8	329489.2
	5	4	14	562771.7
mean		5	9.8	458844
SD		2.44948974	3.898718	
cell/mm2		10.8968467	21.35862	
M11-100	1	4	14	320545.5
	2	12	18	485516.9
	3	3	7	395277
	4	4	12	503660.5
	5	4	14	398117.7
mean		5.4	13	422213.5
SD		3.71483512	4	

cell/mm2		12.7897379	30.79011	
M12-100	1	3	13	637249.4
	2	4	6	563073.6
	3	6	8	547850.5
	4	5	8	657967
	5	4	5	610999.6
mean		4.4	7.0	603428
SD		1.14017543	3.200361	
cell/mm2		7.29167324	12.60471	

สัญญาเลขที่ สธ./13/2539

โครงการ "พัฒนาศักยภาพผู้นำและทบทวนวัฒนธรรมในครัวเรือนที่คิดเรื่องอาหารไม่ลับ"

รายงานสรุปการเงินในรอบ 36 เดือน

ชื่อหัวหน้าโครงการ นายบรรจบ ศรีภา

รายงานในช่วงตั้งแต่ วันที่ 30 พฤษภาคม พ.ศ. 2541 ถึง วันที่ 30 พฤษภาคม พ.ศ. 2542

หมวด	รายจ่ายสะสม จากรายงาน ครั้งก่อน	รายจ่าย		งบประมาณที่ ตั้งไว้ (รวม สะสมถึงปี ปัจจุบัน)	คงเหลือ (หรือเกิน)
		ค่าใช้จ่าย ปัจจุบัน	รวมรายจ่าย สะสมจนถึง งวดปัจจุบัน		
1. ค่าตอบแทน	300,000.00	40,000.00	340,000.00	330,000.00	-10,000.00
2. ค่าจ้าง	346,060.00	53,340.00	399,300.00	396,990.00	-2,310.00*
3. ค่าวัสดุ	490,612.27	107,883.43	598,495.70	548,000.00	-50,495.70
4. ค่าอุปกรณ์	305,927.50	-	305,927.50	306,000.00	72.50
5. ค่าเดินทาง	13,800.00	-	13,800.00	40,800.00	27,000.00
ในประเทศ					
6. ค่าใช้สอย และอื่นๆ	1,400.00	13,000.00	14,400.00	33,000.00	18,600.00
รวม	1,457,799.77	214,123.43	1,671,923.20	1,654,790.00	-17,133.2

* ได้จ้างผู้ช่วยนักวิจัยเพิ่มค่าตอบแทนหนึ่งเดือนเนื่องจากลือรลตของจำ

จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1	236,500.00 บาท	เมื่อ 3 กรกฎาคม 2539
งวดพิเศษ ค	306,000.00 บาท	เมื่อ 3 ธันวาคม 2539
งวดที่ 2	213,100.00 บาท	เมื่อ 10 มกราคม 2540
ดอกเบี้ยครั้งที่ 1	3724.81 บาท	เมื่อ 21 ธันวาคม 2539
ดอกเบี้ยครั้งที่ 2	4276.24 บาท	เมื่อ 22 มิถุนายน 2540

งวดที่ 3	276,100.00 บาท	เมื่อ 9 กรกฎาคม 2540
ดอกเบี้ยครั้งที่ 3	4048.19 บาท	เมื่อ 20 ธันวาคม 2540
งวดที่ 4	274,700.00 บาท	เมื่อ 23 กุมภาพันธ์ 2541
ดอกเบี้ยครั้งที่ 4	2214.19 บาท	เมื่อ 20 มิถุนายน 2541
งวดที่ 5	193,395.00 บาท	เมื่อ 15 กรกฎาคม 2541
ดอกเบี้ยครั้งที่ 5	2773.50 บาท	เมื่อ 19 ธันวาคม 2541
งวดที่ 6	<u>154,995.00 บาท</u>	เมื่อ 3 มีนาคม 2542
รวม	1,671,826.93 บาท	

ค่าใช้จ่าย

งวดที่ 1 เป็นเงิน	209,000.00 บาท
งวดพิเศษ 6 เป็นเงิน	305,927.50 บาท
งวดที่ 2 เป็นเงิน	210,000.00 บาท
งวดที่ 3 เป็นเงิน	302,538.39 บาท
งวดที่ 4 เป็นเงิน	254,914.88 บาท
งวดที่ 5 เป็นเงิน	175,419.00 บาท
งวดที่ 6 เป็นเงิน	<u>214,123.43 บาท</u>
รวม	1,671,923.20 บาท

จำนวนเงินคงเหลือ -96.27 บาท

(หมายเหตุ ในสมุดเงินฝากออมทรัพย์ถึงวันที่ 01/06/42 เหลือเงิน 3.32 บาท เพราะรวมเงินเปิดบัญชีครั้งแรกซึ่งเงินต้น 100 บาท)



(นายบรรณา ศรีภา)

หัวหน้าโครงการ



(นางจิราภรณ์ ทองอุทัยศิริ)

เจ้าหน้าที่การเงินโครงการ

