

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 ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยในโครงการวิจัยของสำนักงานวิจัยแห่งชาติ สำนักงานการวิจัย (สกว.) ประจำปี 2539 (โครงการเลขที่ BRG 3980013) คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในการสนับสนุนทุนวิจัยนี้ โดยเฉพาะ ศาสตราจารย์ นพ. วิวัฒน์ พานิช ศาสตราจารย์ ดร. วิชัย บุญแสง และคณะกรรมการที่พิจารณาและติดตามผลการวิจัยทุกท่าน รวมทั้งเจ้าหน้าที่ของ สกว. ที่เกี่ยวข้องที่ประสานงานและให้ความสะดวกทุกอย่าง

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันที่สังกัด โดยเฉพาะภาควิชาพลาสมาฟิสิกส์ และ ภาควิชาฟิสิกส์ วิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ทั้งในด้านอุปกรณ์ และ เครื่องมือต่าง ๆ รวมทั้งด้านธุรการ นอกจากนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาฟิสิกส์ชีววิทยา ภาควิชาเคมีศาสตร์ และ ภาควิชาฟิสิกส์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ ใช้เครื่องมือ Spectronic 3000, Image analyzer และ Freeze-Dryer ด้วย คำว่า คำว่า นอกจากนี้คณะผู้วิจัยต้องขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร. วิชัย นานิวงษ์ ภาควิชาฟิสิกส์ชีววิทยา และ รองศาสตราจารย์ ดร. สุระศักดิ์ วงศ์วัฒนวิวัฒน์ ภาควิชาฟิสิกส์ชีววิทยา ที่กรุณาให้คำแนะนำการใช้เครื่องมือ และ งานปฏิบัติการ บางอย่าง

งานวิจัยครั้งนี้จะสำเร็จไม่ได้หากไม่ได้ได้รับความร่วมมือจากเจ้าหน้าที่ปฏิบัติกรหลายฝ่าย โดยเฉพาะเจ้าหน้าที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยพลาสมาฟิสิกส์ ภาควิชาพลาสมาฟิสิกส์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น คุณวิรัตน์ สกโบ และ เจ้าหน้าที่โครงการวิจัย นางอ้อมพร บงกชวงศ์ ไรท์ และ นายสุวิทย์ นายไพฑูรย์ รวมทั้งนักศึกษาระดับปริญญาโททุกคนที่เข้าร่วมทำวิจัยในหน่วยปฏิบัติการวิจัยพลาสมาฟิสิกส์ นอกจากนี้คณะผู้วิจัยต้องขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยทุกคนที่ช่วยดูแลสภาวะแวดล้อมของตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย

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

การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับมีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในท่อทางเดินน้ำดีหลายอย่าง 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 ไม่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มพอๆ กับการศึกษาก่อนการผ่าผ่า ส่วนไข่พยาธิในเนื้อเยื่อตรวจพบครั้งแรกในแบบสุ่มตรวจทุกตัวของกลุ่มที่ติดเชื้อปริมาณมาก (กลุ่มที่ 2 และ 3) ในเดือนที่ 1 และ 2 ใน 5 ของกลุ่มที่ 1 หลังการติดเชื้อ ผลการทดลองที่น่าสนใจ คือ การลดลงของ EPG ในแบบสุ่มตรวจกลุ่มที่ 2 และ 3 (ก่อนการรับประทาน) จำนวนพยาธิ กับ EPG ไม่มีความสัมพันธ์ในทุกกลุ่ม นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนไข่พยาธิต่อกรัมมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับจำนวนตัวพยาธิในการติดเชื้อเรื้อรัง และ ในกลุ่มที่ติดเชื้อปริมาณน้อย (25 MC) พบว่ามีจำนวน EPG/worm สูงกว่ากลุ่มที่ติดเชื้อปริมาณมากอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามค่า EPG/worm ก็ยังมีความสัมพันธ์กับ EPG หลังการรับประทานแล้วตรวจไม่พบไข่พยาธิในแบบสุ่มตรวจ

ผลทางด้านภูมิคุ้มโนวิทยาพบว่าสามารถตรวจพบระดับแอนติบอดีต่อพยาธิใบไม้ตับในสัตว์ที่ 14 หลังการติดเชื้อในกลุ่มที่ติดเชื้อปริมาณมาก จากนั้นระดับแอนติบอดีต่อพยาธิใบไม้ตับจะสูงขึ้นอย่างรวดเร็วและถึงจุดสูงสุดประมาณ 2 เดือน และจากนั้นก็จะมีปริมาณค่อนข้างคงที่ในทุกกลุ่มก่อนที่จะลดลงหลังการรับประทาน ระดับของแอนติบอดีต่อ somatic และ egg antigens ก่อนการรับประทานในกลุ่มที่ 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
• ชีวิตวิทยาของพยาธิใบไม้ตับ	2
• ระบาดวิทยาและอาการทางคลินิก	2
• พยาธิวิทยาของตับและท่อน้ำดีในโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ	4
• พยาธิวิทยาในคน	4
• พยาธิวิทยาในสัตว์ทดลอง	6
• กลไกการเกิดพยาธิสภาพในโรคพยาธิใบไม้ตับ	6
• Mucosal Inflammation and Immunopathology	7
• รูปแบบประสิทธิของโครงการ	8
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	10
• สารเคมี-วัสดุ และอุปกรณ์ที่สำคัญในการวิจัย	10
• สัตว์ทดลอง	12
• ตัวอ่อนพยาธิใบไม้ตับ (metacercariae)	12
• การเลี้ยงเชื้อตัวอ่อนพยาธิ	13
• การเตรียมแอนติเจนพยาธิใบไม้ตับ (<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 พบว่ามีปริมาณอันพียงขึ้น EPG ส่วนหลังการรักษามพบว่าระดับแอนติบอดีลดลง ก็ยังสูงกว่าระดับปกติเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ถ้าหรับผลการศึกษาด้านพยาธิวิทยาพบว่า การเปลี่ยนแปลงระบบเรกของเนื้อเยื่อระยะ เยื่อปื้นซึ่งประกอบด้วย มีเลือดคั่ง นิวโครฟิล และ ฮีโอซิโนฟิล พบได้ในท่อน้ำดีนอกตับอย่าง ชัดเจนในวันที่ 3 ส่วนในถุงน้ำดีพบในวันที่ 7 และ 14 หลังการติดเชื้อ โดยเฉพาะในกลุ่มที่ 3 และ 2 ตามลำดับ หลังจากนั้นพยาธิสภาพต่างๆ มีความรุนแรงมากขึ้น เซลล์อักเสบส่วนใหญ่เป็นชนิด mononuclear cells มีการอักเสบเม็ดกลืนกันมาก และเริ่มมี fibrosis เซลล์ยักษ์เศษชนิด 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 เดิม หลังจากทำจิตพยาธิออกไปพบว่าความรุนแรงของพยาธิสภาพต่างๆ ในถุงน้ำดีและท่อน้ำดีนอก ตับลดลงโดยเฉพาะการอักเสบ ปริมาณเม็ด และ ductal dilatation รวมทั้งปริมาณ mast cells อย่างไรก็ตาม fibrosis ยังคงเหลืออยู่หลังการรักษาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ในการศึกษาผลของการเกิดโรคที่คล้ายเนื่องกับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ 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 ในผนังถุงน้ำดีและท่อท่อน้ำดีขนาดเล็ก	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* มีมากในแถบจีนตอนใต้ฮ่องกง ไต้หวัน และ มาเลเซีย ส่วน *O. viverrini* มีการระบาดในประเทศไทย มา (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 ท่อน้ำดีอักเสบ นิ่วในท่อน้ำดี และตับโต (Harinasuta *et al.*, 1984) นอกจากนี้จากหลักฐานทางระบาดวิทยาและการศึกษาจากสัตว์ทดลองยังพบว่าพยาธิใบไม้ตับนี้ยังมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีอีกด้วย (Thamavit *et al.*, 1978; Thamavit *et al.*, 1987a,b; Elkins *et al.*, 1990; Vatakasapt *et al.*, 1990a,b) และจากการประชุมของนักวิทยาศาสตร์ที่องค์การมะเร็งนานาชาติ ที่มีที่ปรึกษา ประเทศฝรั่งเศส ยอมรับสรุปว่าร่วมกันว่า 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 อาศัยอยู่ในท่อทางเดินน้ำดีของกบและสัตว์เลื้อยคลานตัวเล็ก ๆ 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) และ ตัวอ่อนนี้จะ excyst ใน duodenum และ ฝังตัวเข้าไปในตับโดยผ่านทาง Ampulla of Vater, ท่อน้ำดีรวม แล้วเจริญเป็นตัวแก่ในตับโดยใช้เวลาประมาณหนึ่งเดือน (Harinasuta & Harinasuta, 1984) พยาธิใบไม้คั้นอาจพบได้บ้างในอุ้งน้ำคั้นแต่มีน้อยมาก (Tansumrit, 1971) เมื่อเปรียบเทียบกับในสัตว์ทดลอง (Bhannasupavati *et al.*, 1978) พยาธิใบไม้คั้นจะเจริญเติบโตและเจริญพันธุ์ที่ตับและปล่อยไข่ออกมาปะปนกับน้ำดีผ่านอุ้งน้ำคั้นและปล่อยออกจากร่างกายทางอุ้งจาระเหลวผ่านทางน้ำขี้ขามาติ Wykoff & Aiyasprakai (1966) ประมาณการว่าพยาธิใบไม้คั้นออกไข่ 2000-4200 ฟองตัววัน นอกจากนี้จำนวนไข่และจำนวนตัวของพยาธิที่มีภาวะสืบพันธุ์กัน (Ramsey *et al.*, 1989; Elkins *et al.*, 1991; Sithithaworn *et al.*, 1991) ส่วนอายุขัยของพยาธิใบไม้คั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดแต่เชื่อกันว่ามีอายุหล่นปี (Viranuvatti, 1972)

ระบาดวิทยาและอาการทางคลินิก

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

พยาธิวิทยาของตับและท่อน้ำดีในโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ

พยาธิสภาพที่เกิดจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับได้ทั้งใบคืบ ท่อทางเดินน้ำดี และ ถุงน้ำดี ซึ่งได้มีการศึกษาทั้งในคนและสัตว์ทดลอง (Tansurat, 1971; Bhamarapavati *et al.*, 1978; Koornpirochana *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 (Hittamni *et al.*, 1987; Riganti *et al.*, 1989) พยาธิสภาพของตับที่เห็นได้จากกล้องจุลทรรศน์ส่วนใหญ่พบในท่อทางเดินน้ำดี โดยเฉพาะท่อทางเดินน้ำดีขนาดเล็กและขนาดกลางที่มีพยาธิอาศัยอยู่ (Riganti *et al.*, 1989) ในระยะแรกของการติดเชื้อหรือการติดเชื้อที่มีปริมาณน้อย Tansurat (1971) ไม่พบมีการเปลี่ยนแปลงในสีของและผนังท่อทางเดินน้ำดีในการศึกษาจากการตรวจศพ 70 ราย อย่างไรก็ตามในการติดเชื้อเรื้อรังพบมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อเยื่อเยื่อ และมีการพ่นตัวของผนังท่อทางเดินน้ำดี Riganti *et al.* (1989) ได้รายงานลักษณะพยาธิสภาพที่พบน้อย 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) พยาธิสภาพทั้งที่ดูคล้ายตับอักเสบและจากกล้องจุลทรรศน์ไม่แตกต่างกันระหว่างเด็กและผู้ใหญ่ แต่ถุงน้ำดีโต ถุงน้ำดีอักเสบเรื้อรัง และ มะเร็งท่อน้ำดี พบได้เฉพาะ ในผู้ใหญ่ (Riganti *et al.*, 1989).

สำหรับการศึกษาพยาธิสภาพของถุงน้ำดีในผู้ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับมีรายงานน้อยมาก ในผู้ที่มีการติดเชื้อจำนวนมากอาจพบตัวพยาธิในถุงน้ำดี ท่อน้ำดีรวม และ pancreatic duct (Pungpak *et al.*, 1985) เคยมีรายงานว่าพบพยาธิใบไม้ในตับถึงกว่า 100 ตัวในถุงน้ำดีจากผู้ป่วยรายหนึ่ง (Evan *et al.*, 1971) อย่างไรก็ตามในคนทั่วไปที่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งมีการระบาดของพยาธิใบไม้พบว่ามีผู้ป่วยที่พบตัวพยาธิในถุงน้ำดีจากการศึกษาจากการตรวจศพผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากอุบัติเหตุ

จำนวน 181 ราย (Sahithaworn *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) ซึ่งความผิดปกติเหล่านี้จะคืนสู่สภาพปกติหลังจากการรักษาร่วมด้วยยาพยาธิโปรซีกวานเทล (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 ซึ่งอาจจะช่วยอธิบายความถี่ที่พบไข่ได้บ้าง (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 & Stitimanakarn, 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 Bhannaraprasavati *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 (Bhannaraprasavati *et al.*, 1978) พยาธิสภาพของถุงน้ำดีในสัตว์ทดลองที่ติดเชื้อมีรายงานน้อยมาก Thamavit *et al.* (1987b) อธิบายดังนี้ เพื่องมี 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 ที่พยาธิใบไม้ตับขับออกมา (Tansurat, 1971; Viranuvasti & Stitnimankarn, 1972; Harinasuta *et al.*, 1984) อย่างไรก็ตามนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้อธิบายว่ามีลักษณะของโฮสต์ต่อพยาธิมีส่วนสำคัญในการทำให้เกิดโรค (Bhannaraprasavati *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 (Dhiansiri *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

ในด้านการพบของภูมิคุ้มกันต่อพยาธิทำให้เกิดพยาธิสภาพมีการศึกษากันมากในพยาธิชนิดอื่น 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 (Befar & 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 & Befar, 1980; Ernst *et al.*, 1985; Grossman & Herberman, 1986) การที่มีการอักเสบจะทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อ ในการศึกษาจรรยาบรรณของสหพันธ์การอักเสบในอุ้งน้ำดีและท่อน้ำดี (Viramvathan & Stimulankam, 1972; Bignon *et al.*, 1989) แต่อย่างไรก็ตามพยาธิสภาพที่เห็นนี้สามารถเกิดจากโรคอื่นก็ได้ จากประสบการณ์ของผู้วิจัยพบว่าเมื่อเกิดอุ้งน้ำดีจะเกิด autolysis แม้ว่าจะทำการตรวจสภาพของเยื่อช่องท้องหลังเสียชีวิตก็ตาม ดังนั้นการที่จะศึกษาพยาธิสภาพและกลไกการเกิดโรคอุ้งน้ำดีอีกแบบในโรพพยาธิใบไม้คืบไต่ได้ผลถูกต้องที่สุดจึงต้องทำในสัตว์ทดลองเท่านั้น

การศึกษาด้านพยาธิวิทยาของอุ้งน้ำดีและท่อน้ำดีนอกคืบไต่ร่วมกับการติดเชื้อพยาธิใบไม้คืบไต่ในครั้งนี้จะทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานทางด้านพยาธิวิทยาของอุ้งน้ำดีและท่อน้ำดีนอกคืบไต่รวมถึงการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของอุ้งน้ำดีก่อนและหลังการรักษาด้วยยา Praziquantel ซึ่งจะเ็นรายงานแรกที่มีการศึกษาโรคอุ้งน้ำดีและท่อน้ำดีนอกคืบไต่ร่วมกับการติดเชื้อพยาธิใบไม้คืบไต่อย่างเป็นระบบในแบบ Systematic study ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการอธิบายกลไกโรคพยาธิใบไม้คืบไต่ และ โรคอื่นๆ ที่มีความสัมพันธ์กัน เช่น นิ่วในอุ้งน้ำดี, มะเร็งท่อน้ำดี เป็นต้น ซึ่งเป็นปัญหาโดยเฉพาะในสถานะวันยกยาดิจมเหนือของประเทศไทย และสามารถนำไปใช้แนะนำร่วมกับการตรวจอื่นๆ เพื่อการป้องกันการเกิดโรคดังกล่าวในกลุ่มประชากรที่มีความเสี่ยงหรืออาศัยอยู่ในบริเวณที่มีการระบาดของโรพพยาธิใบไม้คืบไต่

วัตถุประสงค์ของโครงการ

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

วัตถุประสงค์จำเพาะ :

1. เพื่อศึกษาพยาธิวิทยาของอุ้งน้ำดีและท่อน้ำดีรวมของสัตว์ทดลองที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้คืบไต่ทั้งก่อนและหลังการรักษาด้วยยา Praziquantel

1. เพื่อศึกษาเซลล์อักเสบ คือ polymorphonuclear cells, eosinophils, lymphocytes and mast cells ในบางชิ้นค่าๆ ของอุ้งน้ำดีและท่อน้ำดีรวมในระยะต่างๆ ของการติดเชื้อ
2. เพื่อวัดระดับแอนติบอดี (IgG) ต่อพยาธิใบไม้ตับในซีรัมโดยวิธี ELISA
3. เพื่อตรวจนับไข่พยาธิใบไม้ตับในอุจจาระ
4. เพื่อตรวจหา *O. viverrini* antigens บนเยื่อบุท่อนทางเดินน้ำดีและในน้ำดี
5. หากทราบถึงพันธุ์ระหว่าง ทดสอบภาพที่ผลิตขึ้น 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 สีอื่น ๆ (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-carboxyoxim-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 สารภูมิ 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)
 EZ-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)
 Pierce's 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)
 เครื่องฉีดวัคซีน
 ตู้แช่แข็ง -20 °C และ -80 °C
 ชุดนำคลัสเตอร์ทดลอง
 Micropipette & tip

สัตว์ทดลอง

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

ตัวอ่อนพยาธิใบไม้คืบ (metacercariae)

สถานที่เก็บตัวอย่างปลา: ตัวอย่างปลานี้เก็บได้ส่วนใหญ่เป็นปลารวมๆ 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 นำพยาธิใบไม้ตับตัวแก่มาล้างในน้ำเกลือซึ่งมีกรดซัลฟูริก (200 Unit penicillin + 200 Unit streptomycin) เพื่อเอาเยื่อเนื้อเยื่อ เลือด และ อื่นๆ ออกไปจนหมด ตัวที่ยังมีชีวิตอยู่จะนำไปเพาะเลี้ยงเพื่อเก็บ ES antigen ส่วนตัวที่ตายจะถูกนำมาแช่แข็งอย่างรวดเร็วในไนโตรเจนเหลวเพื่อเตรียมทำเป็น somatic antigen การเตรียม somatic antigen ทำได้โดยนำตัวพยาธิที่แช่แข็งมาบดในคอนเทนเนอร์ที่มีไนโตรเจนเหลวจนละเอียด แล้วนำมกละลายใน 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 เก็บที่ -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 ที่ได้จากชนิดจะนำมาวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (Bio-Rad) แอนติเจนเหล่านี้จะนำไปใช้ในการตรวจหาระดับ antibody ต่อพยาธิใบไม้ตับโดยวิธี ELISA และ

นำไปใช้ในการ immunize หนูตัวต่อเพื่อให้ได้ antibody ต่อกับ *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

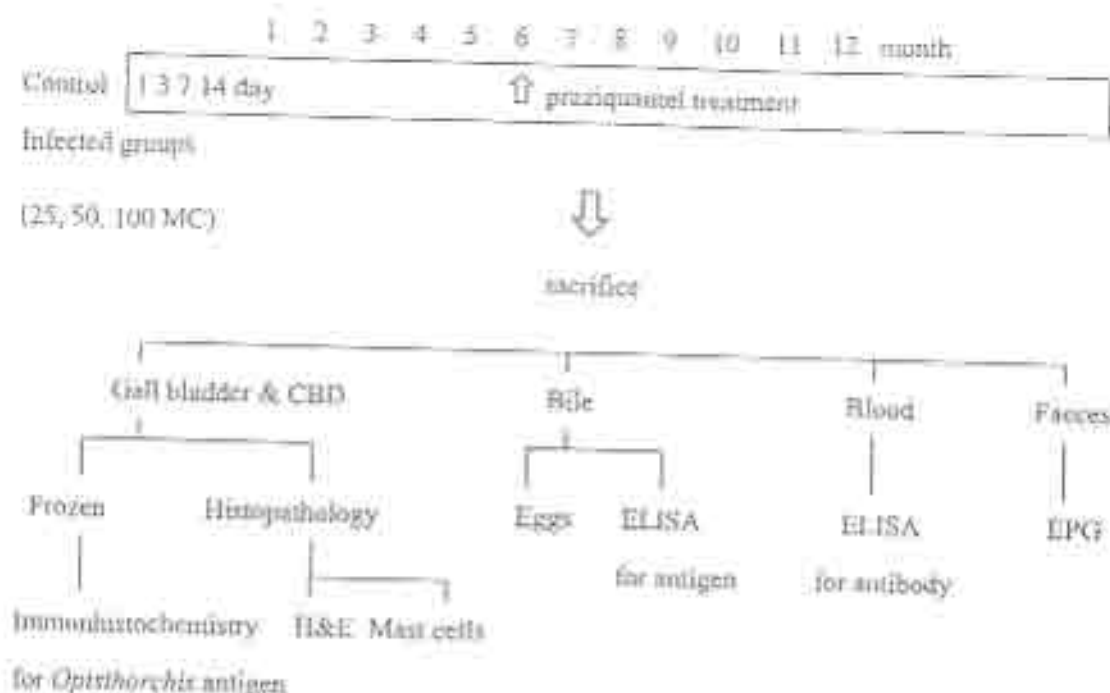
การแยก IgG fraction จากซีรัม

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 สัตว์ทดลองทุกกลุ่มจะถูกแยกขัง 5 ตัวต่อกรง ให้น้ำและอาหารตามปกติเหมือนกันทุกกลุ่ม จากนั้นจะทำการฆ่าสัตว์ทดลองทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง 5 ตัวต่อกลุ่มในวันที่ 1, 3, 7, 14 และ 30 แล้วหลังจากนั้นจะนำทุกชิ้นเพื่อจะดูการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของถุงน้ำดีและท่อน้ำดีรวมถึงต่อมอะดีปอลและกระเพาะรัง ในเดือนที่ 6 สัตว์ทดลองทุกกลุ่มจะได้รับยาฆ่าพยาธิ Praziquantel ขนาด 500 mg/kg/ตัว จำนวน 2 dose ติดต่อกัน แล้วทำการฆ่าสัตว์ทดลองต่อทุกเดือนจนถึงเดือนที่ 12 (ตามรูป) เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาหลังการ treatment

การเก็บตัวอย่าง

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

น้ำดี น้ำดีที่ aspirate จากถุงน้ำดีนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งน้ำดี เริ่ม microcalculi, mucus เป็นต้น

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

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

การศึกษาทางห้องปฏิบัติการ

1. *Histopathology* ชิ้นเนื้ออุ้งน้ำคืดและท่อน้ำคืดรวมนำมาเตรียมเป็น paraffin section และ สีย้อมด้วย hematoxylin & eosin เพื่อศึกษาทางพยาธิวิทยา โดยดูโรคพยาธิและการศึกษาในสาม body, fundus และ neck ส่วนท่อน้ำคืดรวมจะศึกษาส่วนที่ว่างจนรอยต่อระหว่างลำไส้เล็กส่วนต้น 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 ชิ้นอุ้งน้ำคืดและท่อน้ำคืดรวม เซลล์อักเสบที่สามารถศึกษาได้จาก H & E stained slide คือ polymorphonuclear cells, lymphocytes และ plasma cells ส่วน mast cells จะศึกษาจากการย้อมพิเศษ alcian blue-safranin O ตามวิธีของ Mayrhofer (1980) และทำการนับจำนวนเป็นเซลล์ต่อตารางมิลลิเมตรโดยใช้ Image analyzer

3. *Immunohistochemical study for Opisthorchis antigen on surface epithelium* Frozen section และ Paraffin section ของอุ้งน้ำคืดและ ท่อน้ำคืดรวม 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 จากนั้นนำไปใส่ลงใน 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 หลังจากนั้น excess antibody ถอดแล้ว 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 โดยการแยกแอมป์โปรตีนของ somatic antigen หรือน้ำดี ด้วยวิธี Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้ 11% running gel และ 4% stacking gel ทรานส์เฟอร์ Mini-Protein II และ run Prestained molecular weight marker ตามคู่มือไปด้วย จากนั้นย้อมแถบโปรตีนด้วยวิธี Coomassie blue หรือ Silver stain แอมป์โปรตีนบน gel ที่จะใช้ทำ Immunoblot จะถูกนำมา transfer protein ลงบน nitrocellulose membrane โดยใช้เครื่อง Semi-Dry transfer (Bio-Rad) โดยการแช่ nitrocellulose ใน Towbin buffer (Towbin, 1979) แล้ววางทับบนแผ่น gel รองด้วยกระดาษกรองทั้งสองด้าน ใช้กำลังไฟฟ้า 15 volts เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำแผ่น 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 µg/ml ที่ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน แล้ว block non-specific binding ด้วย 5% skimmed milk ก่อนทำปฏิกิริยากับ Positive bile (+somatic antigen 1-20 µg/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 การศึกษาครั้งนี้มีบทเฉพาะคดีทางด้าน 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

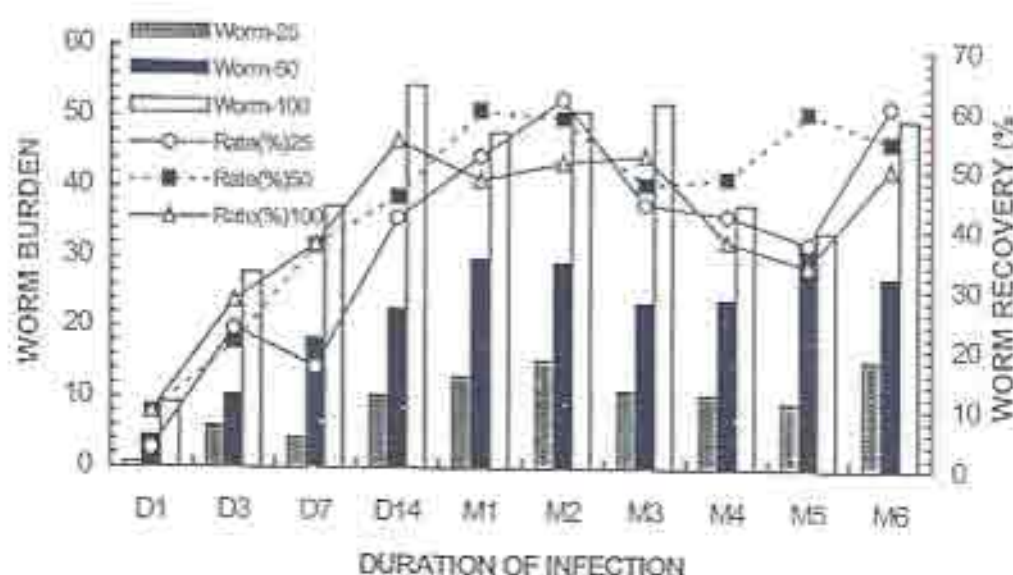
การวิจัยครั้งนี้จะทำการศึกษาพยาธิสภาพของอุ้งน้ำคัสและท่อน้ำดีรวมในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อมาจากไขว้ใบไม้ดิบโดยจะดูพยาธิสภาพตั้งแต่ระยะเฉียบพลันและระยะเรื้อรังเป็นระยะเวลา 6 เดือน และหลังจากนั้นก็จะทำการ test ด้วยหา Praziquantel แล้วดูการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาต่ออีกเป็นเวลา 6 เดือน การศึกษาทางพยาธิวิทยาพยายาม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

บทที่ 3

ผลการศึกษา

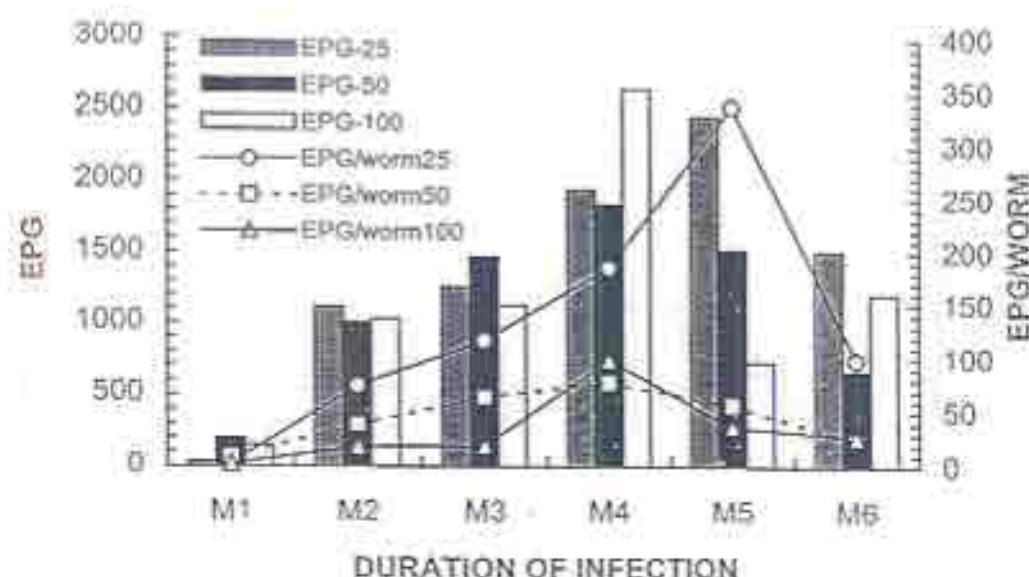
การศึกษาทางปรีคลินิก

การวัด worm recovery และ worm recovery rate (%) ในหนูแบบสเตอร์ที่ติดเชื้อด้วย 25, 50 และ 100 metacercariae (MC) แสดงไว้ในรูปที่ 3.1 พบว่าในระยะเวลาที่ตัวพยาธิยังไม่โตจนโตเป็นตัวแก่ พยาธิมีขนาดเล็กน้อยจึงทำให้การเก็บและนับตัวพยาธิที่ได้อาจทำได้ไม่หมด ทำให้ worm recovery rate ก่อนล้างลำ แต่หลังจากที่พยาธิพัฒนาเป็นตัวแก่แล้วจะได้ yield สูงขึ้น โดยเฉลี่ยตลอดระยะติดเชื้อ 6 เดือน เป็น 50%, 55.2% และ 46.7 % ในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน และ ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติตลอดระยะเวลาของการทดลอง หลังการรักษากับด้วยยา Praziquantel ไม่พบตัวพยาธิทั้งในดิน ชุบน้ำดินและท่อน้ำดินยกกลับ



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

ใช้ทอรัสสามแถวพบได้ในมูลของสัตว์ทดลองในเดือนที่ 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 พยาธิชนิดคอตตัวกลุ่มที่ติดเชื้อ 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 ที่เหมาะสมในการตรวจวัดระดับแอนติบอดีต่อคนกนดิจนของพยาธิใบไม้ตับแต่ละชนิด ให้ผลในตารางข้างล่างนี้

Antigen	Antigen for plate coating (μ g)	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 μ g/well (Wongratanacheewin & Sirisinha, 1987¹; Chawengkirtikul & Sirisinha, 1988²) เปรียบเทียบกับ 1 μ g/well ในการศึกษาครั้งนี้

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

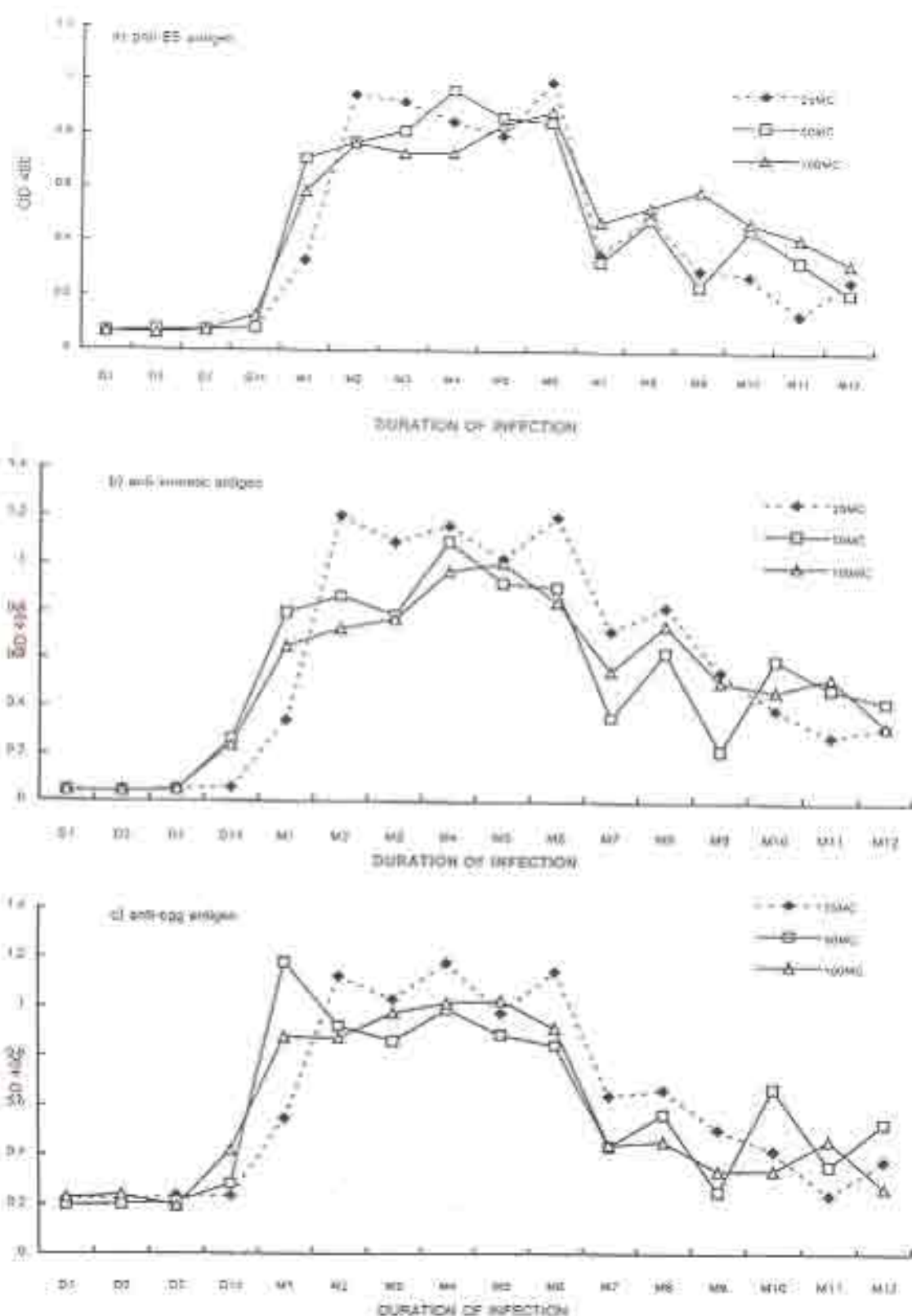
² Chawengkirtikul R. & Sirisinha S. (1988) *Am J Parasitol*, 69: 731-737

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 เป็นที่ต่ำ (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 เปลี่ยนแปลงเล็กน้อยจนถึงผลการทดลอง



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

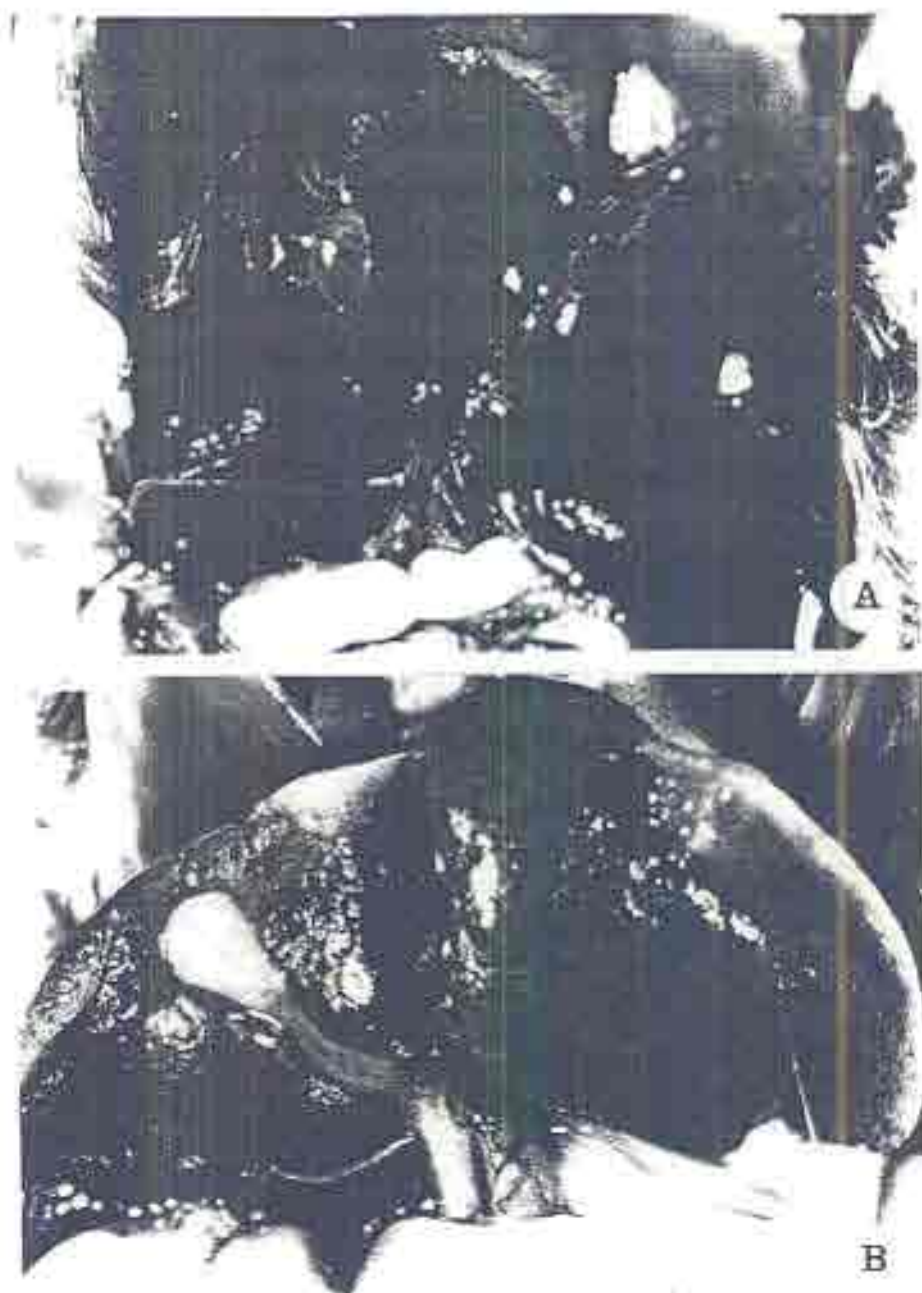
ความสัมพันธ์ระหว่างระดับแอนติบอดีต่อแอนติเจนชนิดต่างๆ ของพยาธิใบไม้ตับกับปริมาณการติดเชื้อซึ่งประเมินจาก worm burden และ EPG โดยวิธีทางห้องแล็บเดือนแรกที่ตรวจพบไข่จนถึงเดือนที่ 6 ก่อนการรักษา พบว่าในช่วงเดือนที่ 1 หลังการติดเชื้อ ระดับแอนติบอดีต่อ ES antigen มีความสัมพันธ์กับ worm burden ($r = 0.519, p < 0.05$) 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 ($r = 0.215, p < 0.05$) ส่วนหลังการรักษาตรวจไม่พบไข่พยาธิตั้งแต่เดือนที่ 7 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง และ ระดับแอนติบอดีต่อทุกแอนติเจนที่เริ่มลดลงตามลำดับแต่ก็ยังสูงกว่าค่าปกติก่อนการติดเชื้อ อย่างไรก็ตามการลดลงของระดับแอนติบอดีต่อ ES antigen (รูปที่ 3.3 a) มีแนวโน้มว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณพยาธิที่ติดเชื้อเข้าไปก่อนการรักษา มากกว่าแอนติบอดีต่อแอนติเจนชนิดอื่นๆ

การศึกษาทางพยาธิวิทยา

Gross Pathology

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

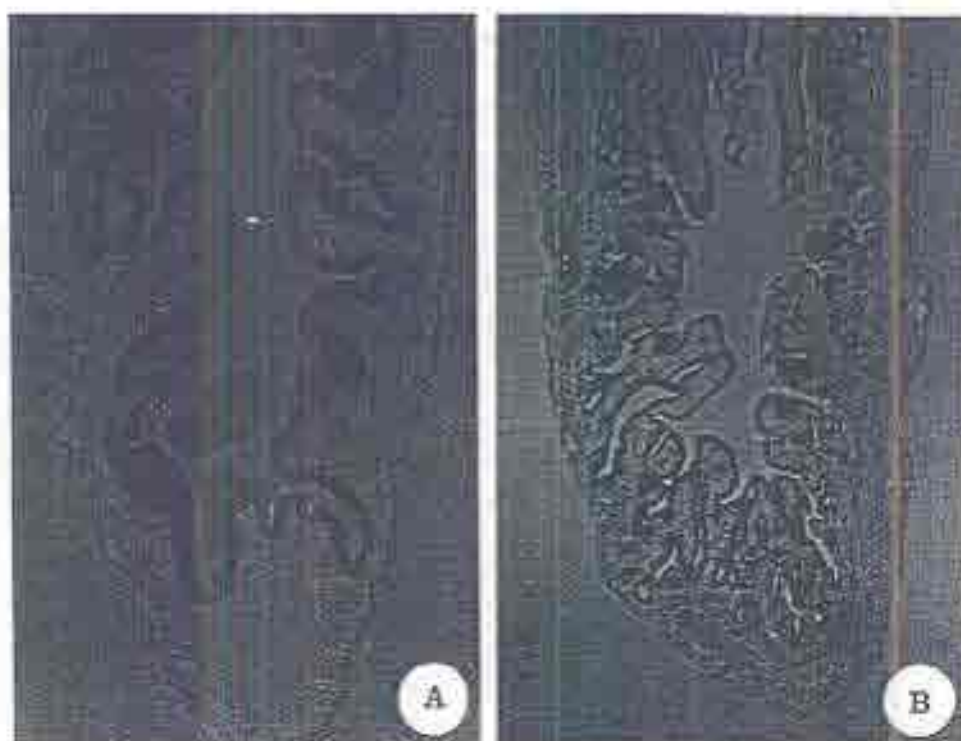
และที่เห็นได้ชัดเจนคือขนาดของท่อน้ำดินยกคืบมีขนาดเล็กลงแต่ยังมีความชุ่มอยู่ ลักษณะพยาธิสภาพภายนอกที่เริ่มลดลงเห็นได้ชัดคือในกลุ่มที่คิดเชื้อ 25 MC ซึ่งจะมีลักษณะเกาะเป็นปึกคืบมีเส้นอุทกภาพลดลงในเดือนที่ 12 ส่วนในกลุ่มที่เห็ดมีพยาธิสภาพลดลงแต่ก็ยังมีความชุ่มของคืบเล็กน้อย คิวข่างลักษณะภายนอกของถุงน้ำคืบและท่อน้ำดินนอกคืบที่ปกติและที่ติดเชื้อได้แสดงในรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 ลักษณะภายนอกของคืบ ถุงน้ำคืบ และท่อน้ำดินนอกคืบของเห็ดเตอรี่ปกติ (A) และเห็ดเตอรี่ปกติที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้คืบ 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 ค่อนข้างน้อย พยาธิสภาพที่เด่นชัดในช่วงตั้งแต่เดือนที่ 2 และ 3 เป็นต้นไปอีกอย่างหนึ่ง คือ การหนาตัวของผนังถุงน้ำดีและมี fibrosis ส่วนการเปลี่ยนแปลงของ surface epithelium ไม่เด่นชัดนักแต่ในช่วงเดือนที่ 3 เป็นต้นไปพบว่าบางบริเวณที่มีพยาธิอาศัยอยู่จะเห็น villous atrophy และ ไม่พบ goblet cell metaplasia ในซอกต์เยื่อของผนังถุงน้ำดีโดยยกเว้นบริเวณที่มีตัวพยาธิ 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 ตารางสรุปลักษณะและความรุนแรงของพยาธิสภาพของถุงน้ำดีและท่อร่วมลำไส้เล็กชั้นหยาบที่ไม่ได้สืบพันธุ์ตามระยะเวลาที่แตกต่างกัน ก่อนและหลังการรักษา

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)	
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.

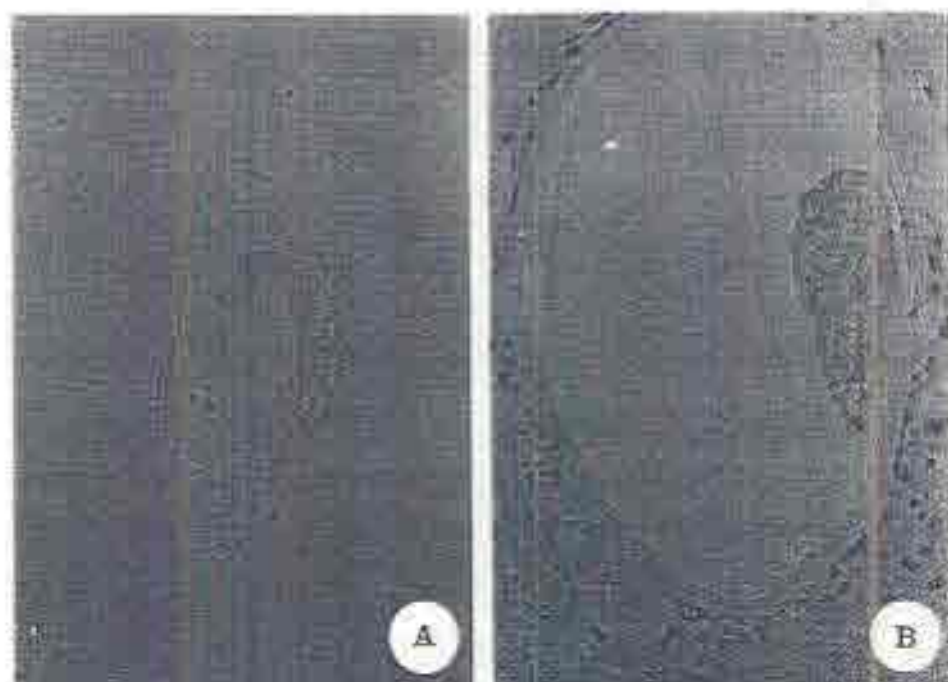
การเปลี่ยนแปลงของท่อน้ำดีรวมพบมีไส้เดือนตัวแรกของการติดเชื้อโดยพบ sucker ของพยาธิใบไม้คั่นภาวะคือ epithelium ในวันที่ 3 เริ่มมี mucus และ goblet cells ปรากฏให้เห็น การอักเสบไม่เด่นชัด ในวันที่ 7 พบมีเซลล์อักเสบชนิด neutrophils และ mononuclear cells เริ่มสังเกตเห็นได้ในกลุ่มติดเชื้อ 100 และ 50 metacercariae 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 ในแต่ละกลุ่มการติดเชื้อจะคล้ายคลึงกัน active inflammation ยังคงมี 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

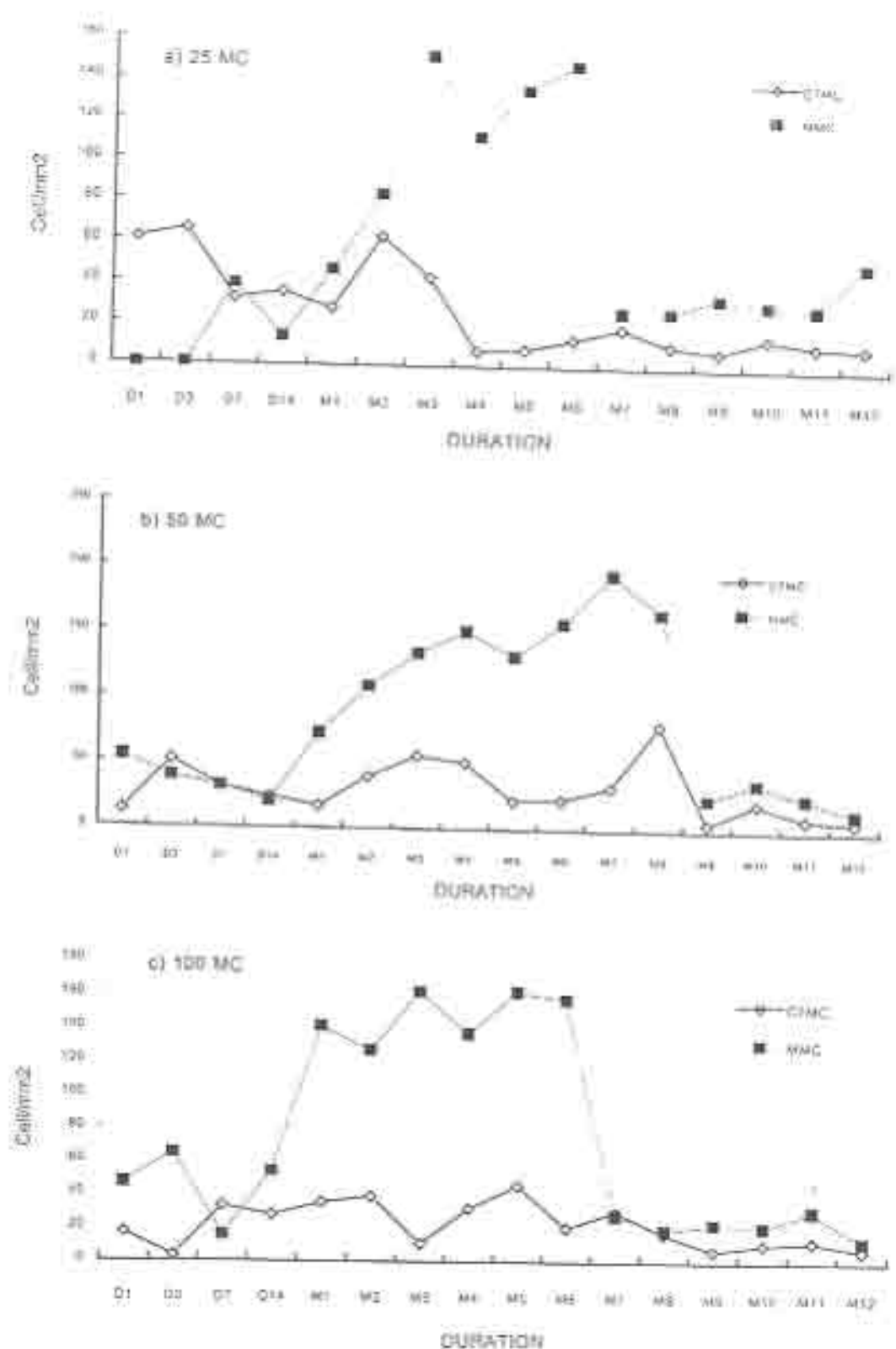
หลังจากการรักษาคัวยยา Praziquantel ในหนูแฮมสเตอร์ทุกกลุ่ม พบว่าพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในถุงน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับดังกล่าวมาแล้วมีความรุนแรงลดลงอย่างเห็นได้ชัด ดังรายละเอียดในตารางที่ 1 ซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณเซลล์อักเสบต่างๆ ในผนังถุงน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับลดลงหลังหนึ่งเดือนแรกที่มีการรักษา mucus และ goblet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

การศึกษา Mast cells ในผนังอุ้งน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับ

การศึกษาทางพยาธิวิทยาในส่วนของเซลล์อักเสบชนิดอื่นๆ ได้ทำการศึกษา Mast cells ในผนังของอุ้งน้ำดีและท่อทางเดินน้ำดีนอกตับโดยการย้อมพิเศษ Alcian blue-safranin O พบว่าในผนังอุ้งน้ำดีและผนังท่อทางเดินน้ำดีนอกตับของหนูแฮมสเตอร์ปกติที่ไม่ได้วันเชื้อพยาธิใบไม้ตับ พบ mast cells น้อยมากในชั้น mucosa โดยเฉพาะในผนังท่อทางเดินน้ำดีแทบไม่พบเลย อาจพบ Connective tissue mast cells (CTMC) ซึ่งติดสีแดงของ Safranin O ในชั้น serosa เล็กน้อย (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 ของการติดเชื้อไม่แตกต่างกันมากนักในแต่ละกลุ่ม ส่วนหลังจากการรักษาพบว่าจำนวน mast cells ลดลงอย่างรวดเร็วอย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะ Mucosal mast cells



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



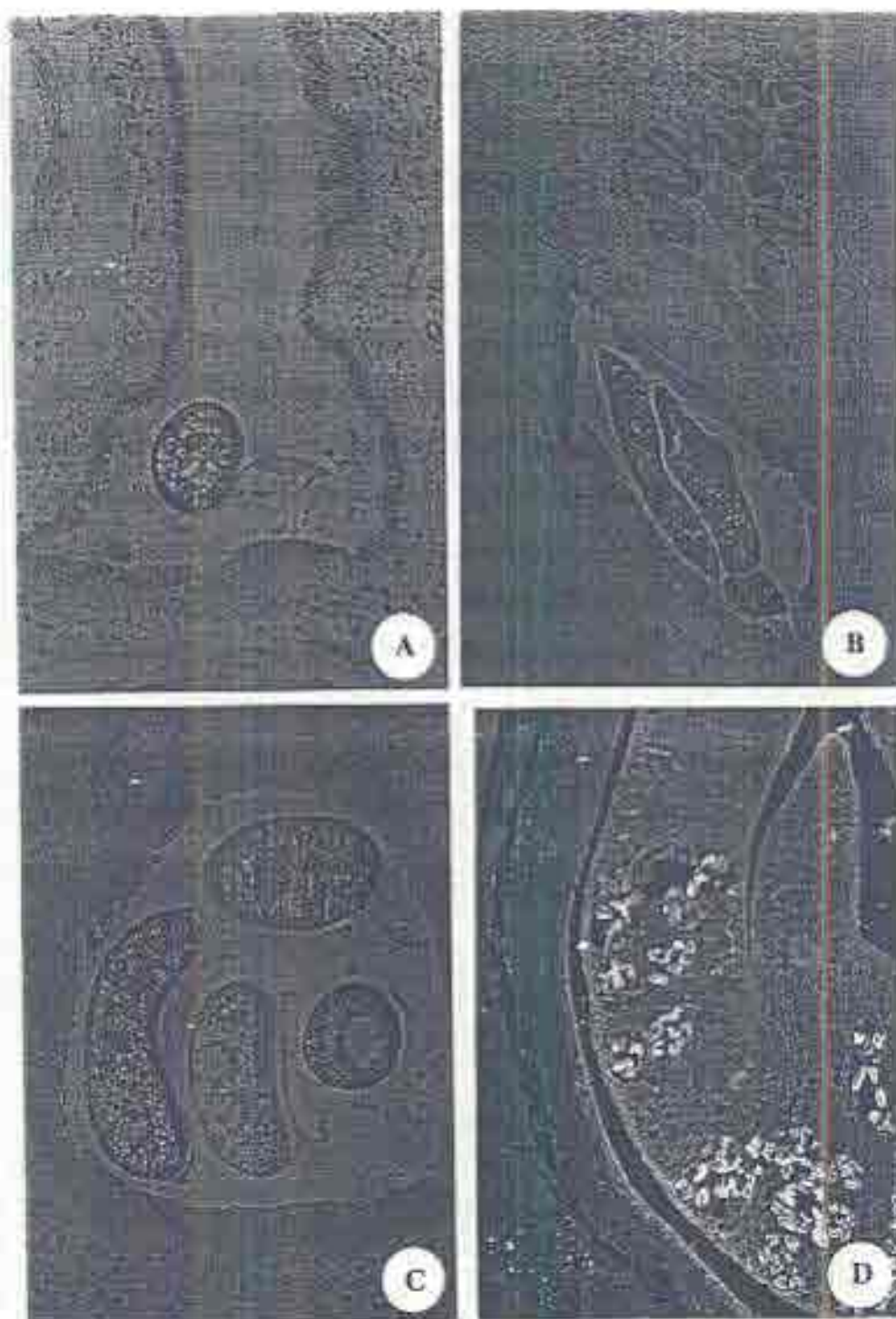
รูปที่ 3.8 แสดงการเปลี่ยนแปลงของจำนวน mast cells ในหนึ่งท่อน้ำดินยกตัวของแฮมสเตอร์ที่ฉีดเชื้อพยาธิใบไม้ตับปริมาณต่างๆ ทั้งก่อนและหลังการรักษา

ขณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษา mass cells โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ภาพสมมาตร (Image analyser) แบบ Quantitative study โดยการนับปริมาณ Mass cells/mm² ในท่อน้ำดินนอกตับส่วนในถุงน้ำดีที่ทำได้ ขณะนี้ ไม่แน่ว่าค่าที่ควรระวังของขนาดของถุงน้ำดีแปรผันตามปริมาณน้ำดี ผลของการศึกษาได้แสดงให้เห็นในรูปที่ 3.8 พบว่าโดยทั่วไปรูปแบบการเพิ่มขึ้นของจำนวน mass cells ในแฮมสเตอร์ทั้งสามกลุ่มการทดลองแตกต่างกันโดยในช่วงแรกของการติดเชื้อปริมาณของ 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)

การศึกษานกตดของพยาธิใบไม้ตับในเนื้อเยื่อตับที่พยาธิทางเดินน้ำดี

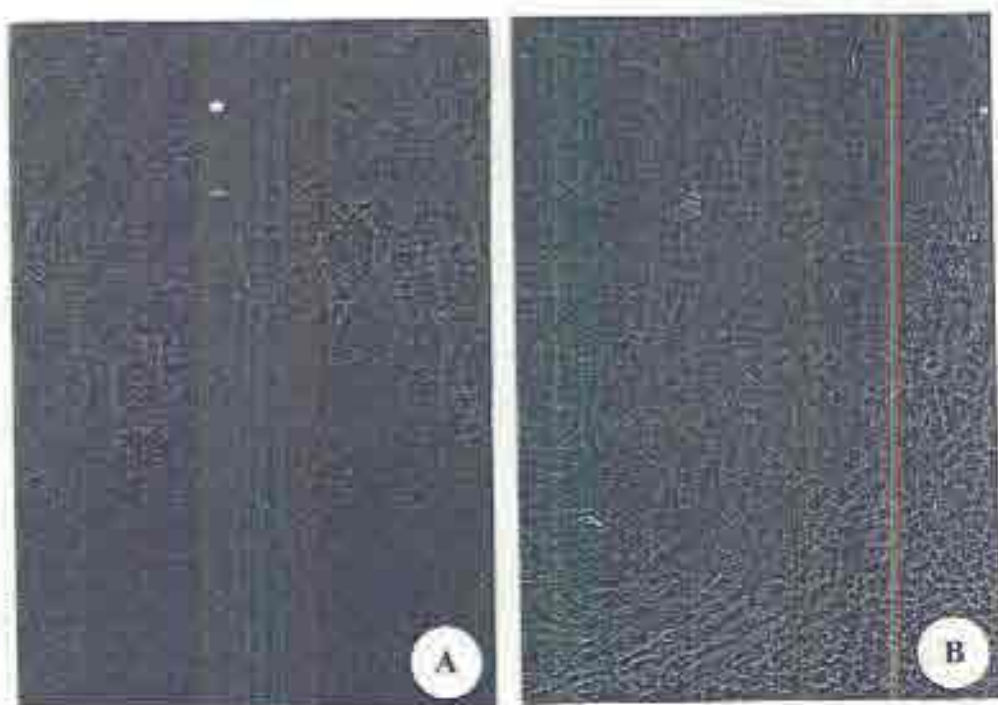
ขณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษา Mucosal immunology ในท่อน้ำดินน้ำดีในโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับโดยทำการตรวจหา *Opisthorchis* antigen ในเซลล์เยื่อบุผิวที่ท่อน้ำดีทั้งในถุงน้ำดีและท่อน้ำดินนอกตับ ซึ่งผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าเซลล์เยื่อบุผิวที่น่าจะเป็นทางผ่านของ *Opisthorchis* antigen เพื่อจะไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เนื่องจากในการศึกษารังนี้ไม่พบว่ามี epithelial desquamation ทั้งในถุงน้ำดีและท่อน้ำดิน ยกเว้นเซลล์มีเซลล์อักเสบรอบๆ ท่อน้ำดีเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะ mononuclear cells เชนีนิกวิทศาสตร์ (Sun & Gibbon, 1969) ดังตามหลักฐานเหล่านี้ในการติดเชื้อ *Clonorchis sinensis* แต่ไม่ได้มีการพิสูจน์ การศึกษารังนี้เป็นครั้งแรกที่มีการแสดง *Opisthorchis* antigen ในเซลล์เยื่อบุผิวที่ท่อน้ำดี ซึ่งสามารถตรวจสอบด้วยวิธีโดย immunofluorescence และ immunoperoxidase technique และเริ่มเห็นได้ตั้งแต่วันที่ 3 หลังการติดเชื้อแต่มีปริมาณไม่มากนักและจะเห็นได้ชัดมากขึ้นในวันที่ 14 เป็นต้นไปในทุกกลุ่มการทดลอง และพบในท่อน้ำดินมากกว่าในถุงน้ำดี การกระจายตัวของ *Opisthorchis* antigen มักพบมากใกล้กับบริเวณที่มีตัวพยาธิ อย่างไรก็ตามก็อาจพบแอนติเจนบนผิวของหนอนที่ทุกที่ไม่มีตัวพยาธิได้เช่นกันแต่มีย่อยมาก นอกจากนั้นแอนติเจนนี้ยังพบได้ใน mucus coat และเนื้อเยื่อใกล้กับตัวพยาธิจะเห็นผลแสดงไว้ในรูปที่ 3.9



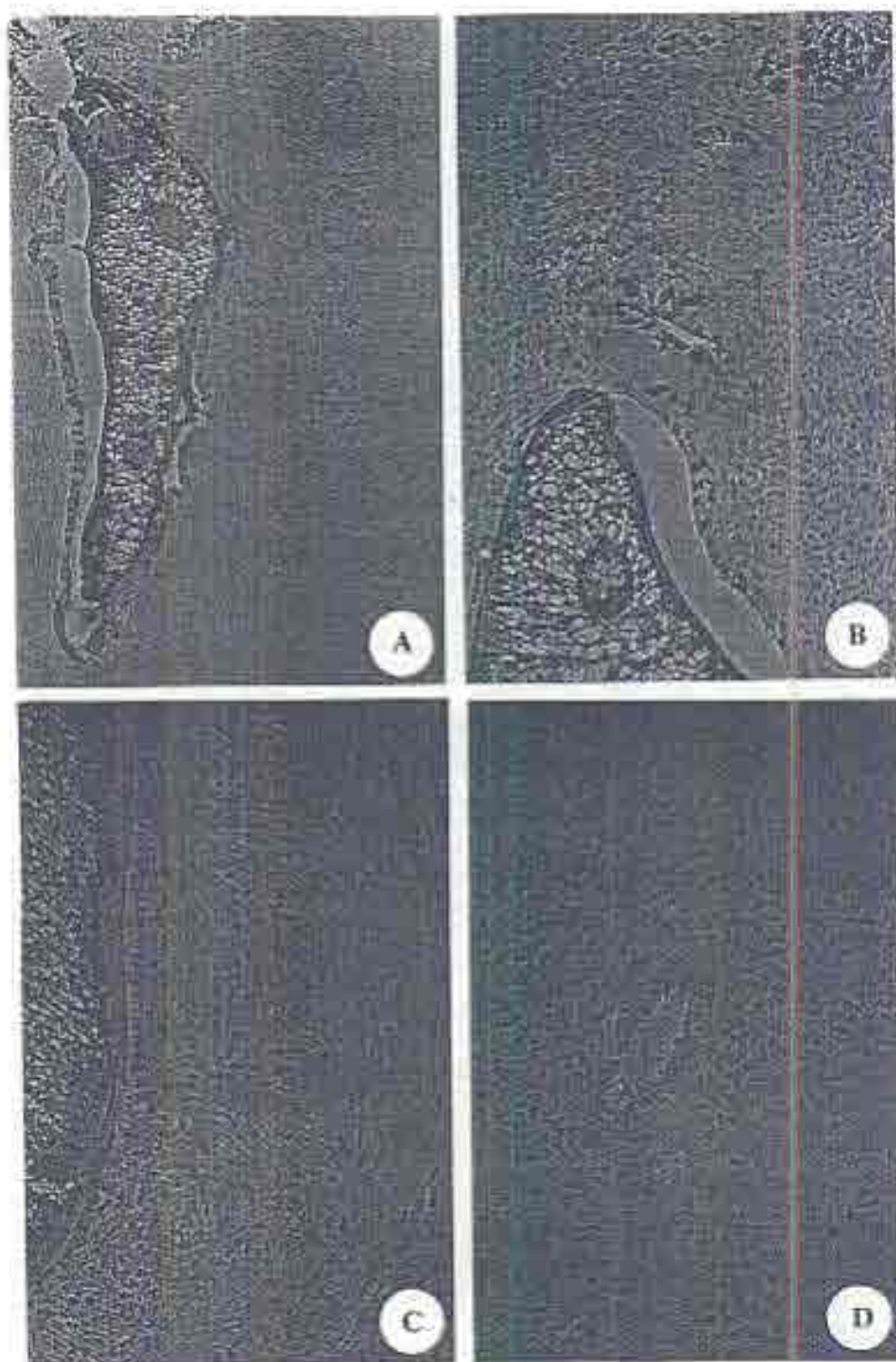
รูปที่ 3.9 แสดงแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับในลำพยาธิและเซลล์เยื่อบุผิวทางเดินน้ำดี นอกตับของแฮมสเตอร์ ด้วยวิธี Immunoperoxidase (A,B,C) และ Immunofluorescence (D) Juvenile fluke day 3 (A), day 7 (B), day 14 (C) and Adult fluke (month 6, D) สังเกตว่า *Opisthorchis* antigen ส่วนใหญ่จะแพร่กระจายบนเซลล์เยื่อบุผิวทางเดินน้ำดีและเนื้อเยื่อข้างเคียงใกล้เคียงกับบริเวณที่มีตัวพยาธิ (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 รวมทั้งไข่พยาธิที่อยู๋ภายใน 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 มักพบว่ามีแอนติเจนแพร์ออกมาชัดเจน (C) นอกจากนี้ท่อน้ำดีขนาดเล็ก (first order bile duct) ที่มีเซลล์อีกเสบจำนวนมากรอบส่วนใหญ่ตรวจพบแอนติเจนนี้ (D)

การตรวจอะนติเจนในแอนติเจนพลาสมาในน้ำดี

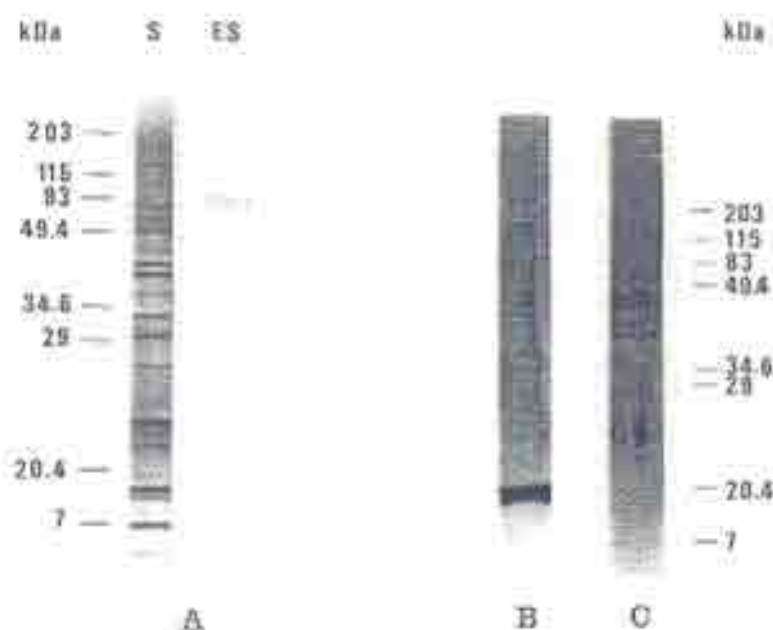
เพื่อเป็นการหาข้อสันนิษฐานว่าแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับที่แพร่ผ่านเยื่อบุผิวที่ท่อน้ำดีไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและทำให้เกิดพยาธิสภาพที่แหล่งที่มาจากอย่างไร ตามสมมติฐานเชื่อว่าแอนติเจนนี้จะอยู่ในน้ำดีซึ่งเกิดจากการขับถ่ายของ (excretory-secretory products) ของตัวพยาธิ เดิมทีผู้วิจัยได้วางแผนการตรวจไว้สองแนวทาง คือ การตรวจทาง Immunohistochemistry ซึ่งได้กล่าวมาแล้ว และ อีกส่วนหนึ่ง คือ Sandwich-ELISA ผู้วิจัยได้ทดลองตรวจหาแอนติเจนด้วยวิธีการนี้ (ดังจะละเอียดในบทที่ 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 ซ้ำสี่สิบพบว่ามี 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

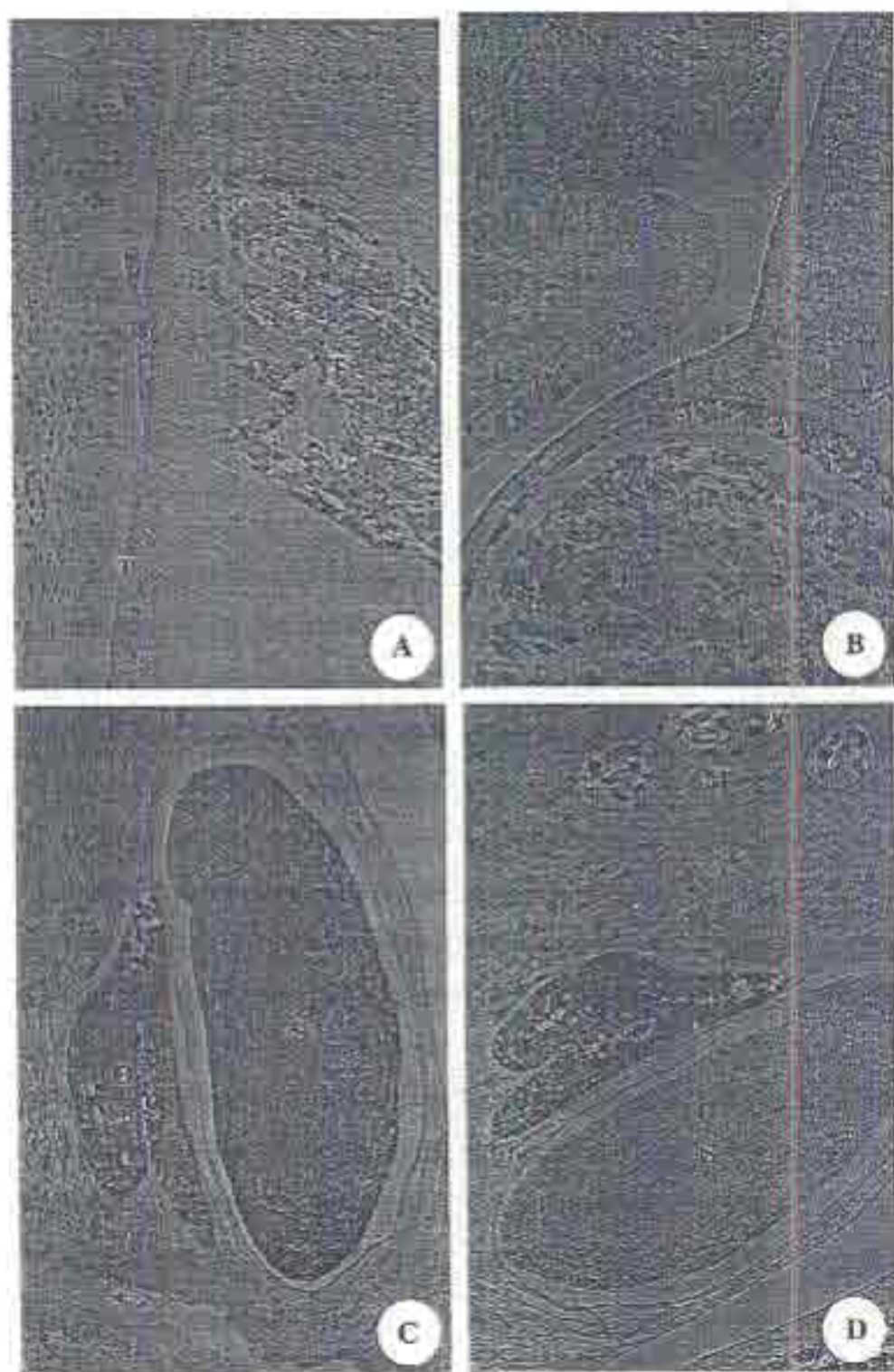
ประมาณ MW 83-115 kDa (รูปที่ 3.12 B) เมื่อนำ rabbit anti-infected bile hyperimmune serum มาทำปฏิกิริยากับแผ่น nitrocellulose blot ที่มี somatic antigen แล้ว พบว่าแอนติบอดีค่อน้ำดีที่ ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับมีปฏิกิริยาเข้มมากกับ doublet protein band ตรงตำแหน่งระหว่าง 7-20.4 kDa และมีปฏิกิริยาจางๆ กับโปรตีนในตำแหน่งประมาณ 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 ผลการศึกษาพบว่าแอนติบอดีค่อน้ำดีต่อแอนติเจนพยาธิใบไม้ตับในน้ำดี ส่วนใหญ่ทำปฏิกิริยาเข้มมากกับ testes, sperm และ oeca และปฏิกิริยาปานกลางต่อ cytoskeleton และ miracidia ส่วนแอนติบอดีค่อน้ำดีต่อแอนติเจนในซีรัมส่วนมากทำปฏิกิริยาเข้มมากกับ tegument, ovarian cells, miracidia และ cocs ส่วน cytoskeleton คัดสีปานกลาง 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 ในการวิจัยครั้งนี้จึงได้นำนการศึกษาพยาธิสภาพของถุงน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับในสัตว์ทดลองซึ่งยังไม่เคยศึกษานับเป็นครั้งแรกเป็นระบบมาก่อน รวมทั้งได้แสดงกลไกการเกิดโรคโดยการผสมผสานหลักฐานทางประติวิทยา อิมมูโนวิทยา และ พยาธิวิทยา บางส่วนของการวิจัยได้ขยายไปศึกษาในตับด้วยเพื่อให้ได้ภาพรวมของกลไกการเกิดโรคสมบูรณ์ยิ่งขึ้น นอกจากนี้ผลพลอยได้จากการศึกษาวิทยาศาสตร์พื้นฐานของโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในครั้งนี้ได้นำไปสู่แนวทางการพัฒนาการวินิจฉัยโรคนี้แบบใหม่ คือ การตรวจแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับในกระแสเลือด 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) อย่างไรก็ดีตามในการศึกษากครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นการลดลงของการออกไข่ได้ชัดเจนกว่ารายงานทั้งสองกล่าวเพราะว่าใช้ระยะเวลาศึกษานานกว่า (Flavell *et al.* (1983) ใช้ศึกษาเพียง 2 เดือน ส่วนรายงานของ Sirisinha *et al.* (1983) ไม่มีรายละเอียดของการออกไข่ การลดลงของปริมาณไข่พยาธิในกลุ่มที่ติดเชื้อมากมีผลสอดคล้องกับการศึกษาในคนที่ได้จากการตรวจศพ (Suhithaworn *et al.*, 1991) และ การศึกษาในประชากรที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Ekins *et al.*, 1991) ในโรคติดเชื้อพยาธิอื่นๆ 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 ซิรั้ม หรือ spleen cells จากหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (Flavell *et al.*, 1980) พบว่ามี EPG และ EPG/worm ลดลง อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองก่อนหน้า Flavell & Flavell (1986) พบว่า ไม่มีความแตกต่างของการออกไข่ใน T cell deprived hamsters กับ แสมสเตอร์ปกติที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ส่วนผลของแอนติบอดีต่อแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับยังไม่ได้ศึกษาในระดับลึก ดังนั้นรายละเอียดของกลไกทางอิมมูโนโลยีที่มีผลต่อการตกไข่โดยของในสัตว์ทดลองที่ติดเชื้อปริมาณมากยังคงต้องมีการศึกษาค้นต่อไป

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

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

ความสำคัญและสิ่งที่น่าสนใจที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ คือ พยาธิใบไม้ตับสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้อย่างไรในกรณีที่ตัวพยาธิยังมีขนาดเล็ก และ นอกจากนี้พยาธิใบไม้ตับยังเป็น *Mucosal infection* ซึ่งเชื้อบุผิวต่อทางเดินน้ำดีเป็นตัวฉกัณท์ที่ดีที่ทำให้ตัวพยาธิไม่สามารถสัมผัสโดยตรงกับ immune cells เช่น lymphocytes, macrophages เป็นต้น ในพยาธิใบไม้ตับชนิด *C. sinensis* Sun & Gibson (1969) ได้แสดงให้เห็นว่า *Clonorchis antigens* มีอยู่ในน้ำดี และได้ตั้งสมมุติฐานว่าแอนติเจนของพยาธิจะแพร่ไปตามเยื่อบุผิว หรือ แพร่ตามเซลล์ต้นที่ถูกทำลายแล้วเข้าสู่ระบบหมุนเวียนของเลือดแต่ก็ไม่ได้มีการพิสูจน์หรือมีหลักฐานที่แน่ชัดในสมมุติฐานนี้ การศึกษาในครั้งนี้ใช้พิสูจน์ให้เห็นเป็นครั้งแรกว่าแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้อย่างไร 2 ทาง คือ การแพร่ผ่านทางเยื่อบุผิวต่อทางเดินน้ำดีทั้งในตับและนอกตับรวมทั้งถุงน้ำดี และส่วนน้อยทางเซลล์ต้นถูกทำลาย หลักฐานที่ชัดเจนที่สุด คือ การตรวจพบแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับแพร่เข้าไปในเซลล์เยื่อบุผิวต่อทางเดินน้ำดี และเนื้อเยื่อข้างเคียงรวมทั้งเซลล์ต้นที่ถูกทำลาย ซึ่งสามารถตรวจได้ด้วยวิธี Immunohistochemistry ตั้งแต่วันที่ 3 หลังการติดเชื้อ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะสามารถตรวจพบแอนติบอดีได้ในวันที่ 14 หลังการติดเชื้อ นอกจากนี้การศึกษานี้ยังได้พิสูจน์ว่าแหล่งของแอนติเจนที่เข้าไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันไม่ได้มีเฉพาะในน้ำดีเพียงอย่างเดียว แต่ส่วนใหญ่จะเป็นการแพร่ผ่านโดยตรงทาง tegument ของตัวพยาธิไปกระตุ้นเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันตามกระบวนส่วนเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งจะเห็นว่าแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับในบริเวณส่วนใหญ่ทำปฏิกิริยากับ tegument ของตัวพยาธิ ในขณะที่ในน้ำดีส่วนใหญ่ทำปฏิกิริยากับ sperm และ ceca ความแตกต่างกันยังแสดงให้เห็นจากการทำ Immunoblotting ขง 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 อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับจะแพร่ผ่านเยื่อบุผิวต่อทางเดินน้ำดีได้ แต่ส่วนหนึ่งอาจจะผ่านทาง HLA-Class II บนเยื่อบุผิวต่อทางเดินน้ำดีซึ่งจะสามารถเป็น antigen-presenting cell (APC) ได้ ดังเช่นที่มีรายงานใน Mucosal Immunology ทั่วไป (Befus & Bienenstock, 1986; Kaye, 1987) ตามปกติเยื่อบุผิวต่อทางเดินน้ำดีไม่มี HLA Class II-expression แต่จะมีการแสดงออกในท่อน้ำดีที่มีการอักเสบในบางโรค เช่น Primary sclerosing cholangitis (Chapman et al., 1988) ในการติดเชื้อพยาธิเคยมีรายงานการแสดงออกของ Ia antigens (MHC Class II) ในเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ที่มีการติดเชื้อ

Nippostrongylus brasiliensis ในหนูแร้ช โดยเฉพาะบริเวณที่มีการอักเสบมาก (Masson & Perdue, 1990) หากเยื่อบุท่อทางเดินน้ำดีของมวนเสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับแสดงออก is antigens จริง เหมือนกับในเยื่อบุผิวลำไส้หนูแร้ชที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ การเพิ่มขึ้นของเซลล์อักเสบรอบๆ ท่อน้ำดี ได้คิดค้นขึ้น แต่อย่างไรก็ตามผู้วิจัยเชื่อว่าน่าจะมี Ia antigens expression บนเยื่อบุผิวท่อทางเดินน้ำดี ในขณะที่มีภาวะอักเสบมาก เพราะในโรคถุงน้ำดีอักเสบในคนที่มี lymphocytes infiltration มากๆ จะมี HLA-DR expression (ประจวบ, unpublished) แต่เนื่องจากยังไม่มีแอนติบอดีต่อต้าน MHC Class II ของมวนเสเตอร์ขาย ดังนั้นจึงไม่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้

ในการติดเชื้อเรื้อรังจากหนีสืบต่อไปแล้ว ระดับของแอนติบอดีจะเริ่มถึงจุดสูงสุดในรูปแบบปกติคือทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง แต่ที่น่าสนใจคือ ระดับของแอนติบอดีคือ 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) และในการศึกษาครั้งนี้ก็ได้อธิบายความไวใหม่เพิ่มเติมไปด้วยว่าระดับแอนติบอดีคือ egg antigen ที่ลดต่ำลง เหมือนกันใน heavy infection การลดลงของระดับแอนติบอดีเหล่านี้ใน heavy infection เป็นสิ่งที่น่าสนใจมาก และ นักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มเชื่อว่าเกิดจากภาวะการกดภูมิคุ้มกันจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับเรื้อรัง (immunosuppression) การปลดปล่อยแอนติเจนออกจากตัวพยาธิตลอดเวลาที่อยู่ในร่างกายสามารถกระตุ้นการกลุ่มีคุ้มกันทั้งทั้งระบบ 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 ด้วย (Sirisinha *et al.*, 1982) ภาวะการกลุ่มีคุ้มกันทั้งนี้จะหายไปเมื่อกำจัดพยาธิออกไป (Sirisinha *et al.*, 1982; Wongratanchewin *et al.*, 1987) ภาวะการกลุ่มีคุ้มกันทั้งทั้งแบบ 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 และทวารมียังมีร่องรอยใน 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 ในพยาธิชนิดอื่นที่มีร่องรอย 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. curvatus* 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 พบได้เช่นกันว่ายังชี้ให้เห็นว่าในการนำไปใช้วินิจฉัยการติดเชื้อ 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 นั่นก็หมายความว่าตุลกลึกของ sucker ของพยาธิใบไม้ตับบริเวณนี้ก่อให้เกิดน้ำดีนอกตับ ในระยะแรกของการติดเชื้อ (ประมาณ 30 วัน) มีลักษณะพยาธิสภาพที่สำคัญได้แก่ acute and subacute inflammation,

mucosal hyperplasia, goblet cell metaplasia and increased mucus secretion และพบว่าความรุนแรงของพยาธิสภาพขึ้นกับปริมาณการติดเชื้อ พยาธิสภาพที่มักเกิดขึ้นตามมีกลไกการเกิดโรคได้ 2 ทางใหญ่ๆ คือ mechanical irritation/toxic substances และ immunopathological processes ดังที่มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ตั้งข้อสังเกตไว้ (Hou, 1955; Bhamarapravali *et al.*, 1978) สำหรับกลไกทางด้าน mechanical irritation อาจเกิดจากตัวพยาธิที่เคลื่อนไหว การกลืนกิน และการเกาะติดของ sucker ทำให้มีการระคายเคืองต่อเยื่อเมือก โดยเฉพาะบริเวณที่มีตัวพยาธิอาศัยอยู่ทำให้เกิดมี atrophic mucosa และ goblet cell metaplasia ซึ่งเป็นการปรับตัวอย่างหนึ่ง การศึกษาครั้งนี้สนับสนุนสมมติฐานนี้เพราะพยาธิสภาพที่พบในท่อน้ำดีในก้นซึ่งพบตัวพยาธิอาศัยอยู่ตลอดเวลามีความรุนแรงมากกว่าในถุงน้ำดีซึ่งพบตัวพยาธิไม่ตลอดเวลาและส่วนใหญ่ไม่ได้สัมผัสกับเยื่อเมือกมาก ในส่วนของสารพิษที่ขับออกจากตัวพยาธิในไม้คั่นและ ใบทำจากเยื่อเมือกที่ทอทางเดินน้ำดีนั้นยังไม่เคยมีการศึกษาที่แน่ชัด แต่ในพยาธิชนิดอื่นพบมีการหลั่งเอนไซม์ต่างๆ โดยเฉพาะกลุ่ม cysteine proteinase ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเกิดโรค การบุกรุกเนื้อเยื่อต่างๆ และ การหลบหนีภูมิคุ้มกันของร่างกาย (McKerrow, 1989; Maizels *et al.*, 1993) Park *et al.* (1995) รายงาน 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

นอกจากกลไกด้าน mechanical ดังกล่าวข้างต้นแล้ว กลไกด้าน 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 ของเซลล์ยักษ์เหล่านี้เป็นการตอบสนองต่อแอนติเจนที่แพร่ผ่านทางเยื่อเมือกท่อน้ำดี ซึ่งพบตั้งแต่วันที่ 3 หลังการติดเชื้อจากการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งการตอบสนองของเซลล์ยักษ์นี้มีมักจะอยู่บริเวณที่พบตัวพยาธิเนื่องจากมีแอนติเจนที่แพร่เข้ามาในปริมาณที่มาก หากมีคำถามว่าแล้วเซลล์ยักษ์เหล่านี้ตอบสนองต่อ mechanical irritation จากตัวพยาธิได้อย่างไรได้หรือไม่ ซึ่งคำถามหลักการนำจะน้อยมากเนื่องจาก mucosa เป็น barrier ที่ดีมาก หลักฐานที่เด่นชัดที่สุดที่ชี้ชัดว่าแอนติเจนของพยาธิใบไม้คั่นน่าจะเป็นตัวการสำคัญในการ recruitment เอนไซม์อีกประเภท คือ periporal infiltration รอบ first order bile duct ในคั่นที่มี *Opisthorchis antigen* ในเยื่อเมือกจึงตรวจพบได้ด้วยเทคนิคทาง Immunohistochemistry (รูปที่ 3.IID) ซึ่งท่อน้ำดีเล็กขนาด

มีตัวพยาธิใบไม้คันไม่สามารถแพร่เข้าไปอาศัยได้ สิ่งนี้การกลืนสมรรถนะ ท่อทางเดินน้ำดีเป็นจำนวนมากนั้นเป็นน่าจะเป็นในส่วนของตอบสนองต่อแอนติเจนที่แพร่ผ่านทางท่อน้ำดี และ ถือว่า เป็น immunopathological processes อย่างหนึ่ง

นอกจากเซลล์อีกแบบชนิด 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) ในโรคคืดเชื้อพยาธิใบไม้ คันในแฮมสเตอร์ มีรายงานว่า nitric oxide synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยสร้าง nitric oxide พบ เพิ่มขึ้นใน macrophages, eosinophils และ mast cells (Ohshima *et al.*, 1994) และจากการ ศึกษาในช่วงสั้นปีที่ผ่านมามีรายงานว่า 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 แสดงว่าพยาธิใบไม้ คันสามารถทำให้เกิด mast cell hyperplasia แบบจำเพาะได้ดังเช่น trematode อื่นๆ และเมื่อกำจัด พยาธิออกไปในเดือนที่ 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) ซึ่งพบได้ในโรคคืดเชื้อพยาธิใบไม้คัน

พยาธิสภาพอีกอย่างหนึ่งที่พบที่สูงสุดในโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับเรื้อรัง คือ fibrosis ของผนังท่อท่อน้ำดี นอกตับ และ ผนังถุงน้ำดี ซึ่งเหมือนกับรายงานที่พบในท่อน้ำดีในตับทั้งในคน (Riganti *et al.*, 1989) และในสัตว์ทดลอง (Hassanapragavi *et al.*, 1978) นอกจากนี้ fibrosis ในตับและท่อน้ำดีในโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับยังมีการศึกษาทั้งทางจุลพยาธิวิทยา ซึ่งพบว่ามีการสะสม collagen โดยเฉพาะ type III สูงขึ้นในตับและหลอดเลือดที่ติดเชื้อเรื้อรัง (Hutadilok & Ruenwongsa, 1983; Chotigeat & Ruenwongsa, 1986) และทางรังสีวิทยาโดยพบว่าในผู้ที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในปริมาณที่มากจะมี 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 นี้ได้พิสูจน์ในสัตว์ทดลองที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับชนิด *C. sinensis* ว่าเป็นส่วนของ periductal fibrosis ในตับ (Hong *et al.*, 1994) และควรมีผลใกล้เคียงกับที่พบในถุงน้ำดีโดยการตรวจทางอัลตราซาวด์ในคนที่ 9 หลังการรักษาด้วยยา Praziquantel (Mairiang *et al.*, 1993) ซึ่งการศึกษาครั้งนี้อาจได้สนับสนุนว่าพยาธิสภาพหลายๆ อย่างของถุงน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับของแฮมสเตอร์ลดลงหลังการกำจัดพยาธิออกไปโดยเฉพาะการอักเสบ อย่างไรก็ตาม fibrosis ของท่อน้ำดี ท่อน้ำดีในตับก็ยังไม่ลดลงถึงขั้นปกติในระยะเวลา 6 เดือนหลังการรักษา และ คงต้องใช้เวลานานกว่านี้ ซึ่งคล้ายกับที่มีรายงานในกระด่าที่ติดเชื้อ *C. sinensis* ที่ทำการรักษาแล้ว 3 เดือน ยังมีภาวะ periductal fibrosis เหลืออยู่ (Hong *et al.*, 1994) หรือในกระด่าที่ติดเชื้อ *Schistosoma japonicum* ซึ่งมี severe liver fibrosis สามารถวัดปริมาณ collagen ได้สูงกว่าตับปกติถึง 16 เท่า และหลังการกำจัดพยาธิออกไปพบว่า fibrosis ค่อยๆ ลดลง อย่างไรก็ตามในเดือนที่ 10 หลังการรักษาก็ยังมีความหนาแน่นของ collagen สูงกว่าปกติถึง 3 เท่า (Dunn *et al.*, 1994) สำหรับกลไกการเกิดภาวะ fibrosis ในโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับยังไม่ได้มีการศึกษาแน่ชัดในรายละเอียด (Haswell-Elkins *et al.*, 1991) พบว่า portal vein radicle echoes มีความสัมพันธ์กับ parasite-specific IgG levels แต่กลไกในระดับเล็กยังไม่ทราบแน่ชัด และจากการศึกษาโดยวิธี Immunohistochemistry ในครั้งนี้ จะเห็นว่าในรายที่มี periductal fibrosis มากๆ และมีตัวพยาธิอยู่ในบริเวณนั้นจะพบว่ามี antigen diffusion ค่อนข้างมาก (รูปที่ 3.11C) เมื่อเปรียบเทียบกับท่อน้ำดีที่มี fibrosis น้อยกว่า ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าในรายที่มี fibrosis มากๆ จะมี parasite antigen แพร่เข้าสู่ circulation และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันมากขึ้น นอกจากนี้เซลล์อักเสบต่างๆ ที่เข้ามาอุดรอกท่อน้ำดีโดยเฉพาะ lymphocytes, macrophages & mast cells เซลล์เหล่านี้สามารถสร้าง fibrogenic cytokines โดยเฉพาะ IL-1, IL-2, fibroblast growth factor, transforming growth factor, histamine etc. ซึ่งสารเคมีเหล่านี้สามารถกระตุ้น fibroblast differentiation, proliferation, migration และ collagen production และทำให้เกิด tissue fibrosis ในที่สุด (MacKenzie *et al.*, 1987; Kovac, 1991; Wyler, 1992)

สรุปผลการศึกษา

1. คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาทางปรสิตวิทยา อิมมูโนวิทยา ภูมิคุ้มกันวิทยา และพยาธิวิทยาของอุ้งน้ำดีและท่อน้ำดีในสมมติสัตว์ที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ จำนวน 3 กลุ่ม คือ 25 MC, 50 MC และ 100 MC เป็นเวลา 6 เดือน และหลังการรักษารวบรวมกำจัดพยาธิด้วยยา Praziquantel อีก 6 เดือน
2. ผลการศึกษาทางปรสิตวิทยารับพบว่า 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 ในเยื่อหุ้มท่อน้ำดีทั้งในอุ้งน้ำดีและท่อน้ำดีเฉพาะในท่อน้ำดีนอกตับอย่างเด่นชัดตั้งแต่วันที่ 3 หลังการติดเชื้อ นอกจากพบบนเยื่อหุ้มแล้วยังพบแอนติเจนบางส่วนแพร่เข้าไปในเนื้อเยื่อข้างเคียงด้วย โดยเฉพาะบริเวณที่มีตัวพยาธิอาศัย ส่วนในตับนอกจากจะตรวจพบแอนติเจนบนเยื่อหุ้มท่อน้ำดีในตับที่อยู่ใกล้ตัวพยาธิแล้วยังตรวจพบในเซลล์ตับบริเวณ periportal area และในอีกบริเวณที่มีตัวพยาธิอาศัย ซึ่งการตรวจพบแอนติเจนของพยาธินี้จะควบคู่ไปกับการที่มีเซลล์อักเสบเข้าไปรื้อถอนและทำให้เกิดพยาธิสภาพ
5. การตรวจหาแอนติเจนของพยาธิในน้ำดีด้วยการใช้ hyperimmune serum ต่อ infected bile ด้วยวิธี Immunoblotting พบว่าแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับในน้ำดีส่วนใหญ่อยู่ใน protein doublet ช่วง 7-20.4 kDa และส่วนน้อยในโปรตีนช่วง 20.4-29 kDa เมื่อศึกษาด้วยวิธี Immunohistochemistry พบว่าส่วนใหญ่จะ recognize โปรตีนใน sperm, oeca, miracidium และ cytoskeleton

6. การศึกษาครั้งนี้ได้แสดงชัดเจนเป็นครั้งแรกว่ามีแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับในซีรัมของหนูทดลองที่ติดเชื้อ ด้วยการให้ hyperimmune serum คือ infected serum เมื่อศึกษาด้วยวิธี immunoblotting พบว่ามี immunogenic fraction มีตัว bands ตั้งแต่ 29-83 kDa และเมื่อศึกษาทาง immunohistochemistry พบว่าแอนติบอดีส่วนใหญ่ 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 มีปัจจัย หนึ่งๆ ลดลงช้าๆ โดยเฉพาะในกลุ่มที่ติดเชื้อปริมาณมาก และช้ามากกว่าเกณฑ์ปกติในเดือนที่ 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., Schoiz, 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, *Opisthorchis viverrini*. *Carcinogenesis* 4: 927-930.
- Flavell D.J., Pattanapanyasat K. & Flavell S.B. (1980) *Opisthorchis 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 *Opisthorchis* 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) *Opisthorchis 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) *Opisthorchis 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.I., 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., Chaeychaumri, 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., Souakul, 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., Santhasakulchai, 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., Pongpoowong, 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., Yongvutit, 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.
- Sittimarkarn, 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.