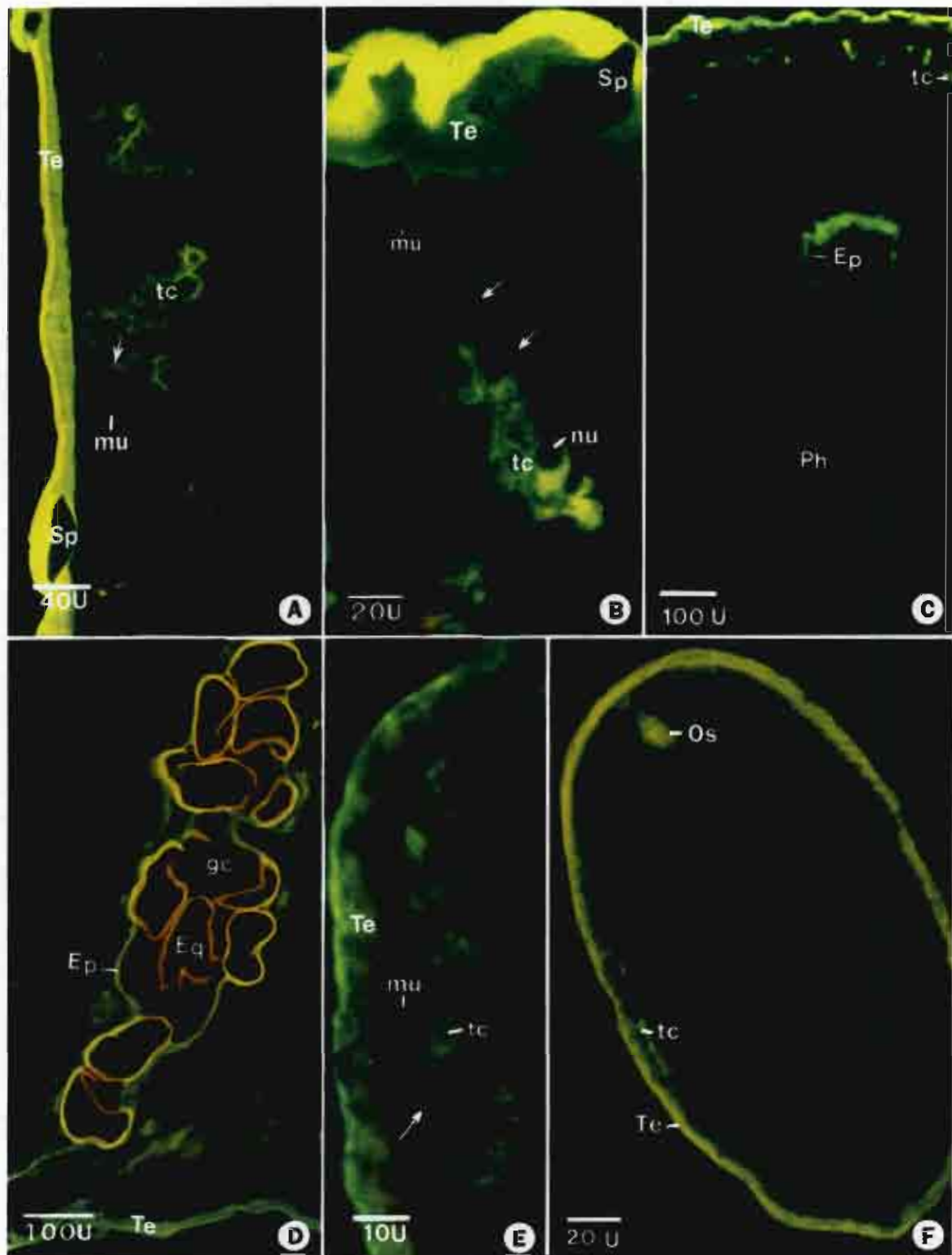


Figure 105



2.2.5 ตำแหน่งและการกระจายของ Fatty acid binding proteins (FABP)

เราได้เตรียม polyclonal antibodies (PoAb) โดยการฉีดสัตว์ทดลองได้แก่ หนู และ กระต่าย ด้วย โปรตีนธรรมชาติที่เตรียมจากพยาธิตัวเต็มวัยและได้เตรียม monoclonal antibodies (MoAb) ต่อ recombinant proteins FABP โดยวิธี hybridoma (ข้อ 2.1.2) แล้วเก็บเอาแอนติบอดีดังกล่าว มาวิเคราะห์หาตำแหน่งและลักษณะการกระจายของแอนติเจนเหล่านี้ด้วยวิธี immunofluorescence และ immunoperoxidase โดยการย้อม frozen sections ของพยาธิตัวเต็มวัย โดยมี positive control ซึ่งใช้ mouse infected serum (MIS) จากหนูที่ติดเชื้อพยาธิหลังการป้อนเมตาเซอร์คาเรียได้ 50 วัน และ cow infected serum (CIS) ที่เก็บจากวัวซึ่งถูกฆ่าที่โรงฆ่าสัตว์และพบว่ามียาธิอยู่ในตับ ซึ่งได้พิสูจน์โดยวิธี ELISA แล้วว่ามีแอนติบอดีต่อ whole body antigens ในระดับสูง นอกจากนั้นแล้วเรายังวิเคราะห์เปรียบเทียบกับ กลุ่ม negative control ซึ่งใช้ fetal calf serum (FCS) และ non-immune rabbit serum (NIS)

พยาธิตัวเต็มวัย

ในกลุ่ม negative control (ใส่ FCS และ NIS แทน primary antibody) ไม่ปรากฏว่ามีการติดสีเรืองแสงจากวิธี immunofluorescence หรือสีน้ำตาลจากวิธี immunoperoxidase ในเนื้อเยื่อของพยาธิตัวเต็มวัย จะมีก็แค่ non-specific fluorescence สีเหลืองหรือสีส้มที่ปรากฏใน ในเซลล์ vitellaria และเปลือกไข่ และมีจุดเรืองแสงแทรกอยู่ประปรายในชั้นกล้ามเนื้อของ oral และ ventral suckers ส่วนในเนื้อเยื่ออื่น ๆ เช่น ชั้นผิวหนัง (tegument) เนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ (testis, ovary, uterine epithelium และ seminal vesicle) และเยื่อหุ้ม caecum ไม่ติดสีเลย

ในกลุ่มที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ FABP แอนติบอดีที่ใช้ย้อมประกอบด้วย PoAb ต่อ FABP ของ *F. gigantica* ที่ผลิตจากกระต่าย (FABP-Fg-r) และ MoAb ต่อ recombinant FABP ผลปรากฏว่าลักษณะการติดสีคล้ายคลึงกัน ส่วนที่ติดสีเข้มได้แก่ชั้นผิวหนังโดยเฉพาะขอบนอก และที่แตกต่างจากกลุ่ม positive control ที่กล่าวมาแล้วคือหนาม (spines) ก็ติดสีเรืองแสงค่อนข้างเข้มด้วย (รูปที่ 106A-D; 108B) นอกจากนี้ชั้นผิวหนังแล้วยังพบว่าเซลล์ใน parenchyma ของลำตัวยังติดสีเข้มอีกด้วย (รูปที่ 106B-D; 108A) โดยแยกเซลล์ตามระดับความเข้มของสีได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ติดสีจางอยู่ตามขอบของลำตัวพยาธิโดยเฉพาะได้ชั้นผิวหนัง ส่วนกลุ่มที่ติดสีเข้มและปานกลางเป็นกลุ่มใหญ่ที่อยู่กลางลำตัวของพยาธิซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่อัดแน่นอยู่ระหว่างอวัยวะต่าง ๆ (รูปที่ 107A-D; 108A-C) เนื้อเยื่อที่ติดสีค่อนข้างจางคือส่วนในของชั้นผิวหนัง เยื่อหุ้มผิวหนังของ oral และ ventral suckers เยื่อหุ้มที่ต่อ pharynx, caecum และ bladder (รูปที่ 106A-D) นอกจากนั้นแล้ว เซลล์ในเนื้อเยื่อของระบบสืบพันธุ์ที่ติดสีค่อนข้างเข้มคือ เซลล์ใน testis (รูปที่ 107A; 108E) และ ovary (รูปที่ 107B; 108F) โดยเฉพาะกลุ่ม early germ cells ที่มีจะอยู่ใกล้กับ basement membrane (รูปที่ 108E, F) ส่วน prostate gland, seminal vesicle, uterus (รูปที่ 107D; 108G) และ Mehlis gland (รูปที่ 107C) ติดสีค่อนข้างจาง

เมตาเซอรัคเรีย

ปรากฏว่ามีการติดสีหรือเรืองแสงเข้มในชั้นผิวและเซลล์ parenchyma (รูปที่ 109B-D) โดย cyst wall ติดสีจาง ๆ แบบ nonspecific (รูปที่ 109A) ซึ่งสรุปได้ว่า FABP มีการแสดงออกและมีความเข้มข้นสูงในเนื้อเยื่อของระยะเมตาเซอรัคเรียเช่นเดียวกับที่พบในระยะตัวเต็มวัย

2.2.5 ตำแหน่งและการกระจายตัวของ Glutathione-S-transferase (GST)

พยาธิตัวเต็มวัย

โพลีโคลนัลแอนติบอดีที่ใช้ในกลุ่มนี้คือ anti GST ของ *F. gigantica* ที่ผลิตจากกระต่าย (GST-Fg-r) และโมโนโคลนัลแอนติบอดีคือ recombinant GST ปรากฏว่าลักษณะการติดสีหรือการเรืองแสงจากการเกาะด้วย PoAb และ MoAb คล้ายคลึงกัน เนื้อเยื่อที่ติดสีเข้มที่สุดคือชั้นผิวโดยเฉพาะครึ่งล่างพร้อมทั้งหนามซึ่งติดสีเข้มมากเช่นเดียวกับที่พบใน anti FABP (รูปที่ 110A, C) และกึ่งของเซลล์ผิวที่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อใต้ชั้นผิว (รูปที่ 110A) เซลล์ parenchyma ก็ติดสีเข้มเช่นเดียวกับ FABP (รูปที่ 110C; 111D) นอกจากนั้นแล้วเนื้อเยื่อที่ติดสี เข้มมากคือ testis (รูปที่ 110C, D) ovary (รูปที่ 111B) ไข่ (รูปที่ 111D) กับ Mehlis gland (รูปที่ 111C) ส่วนที่ติดสีพอประมาณคือเยื่อบุผิวของ oral และ ventral sucker เยื่อบุผิวและเซลล์กล้ามเนื้อของท่อ pharynx, caecal bifurcation, caecum (รูปที่ 110B) prostate gland และ seminal vesicle (รูปที่ 111A)

ดังนั้นผลจากการทดลองใช้แอนติบอดีชนิดต่าง ๆ เป็นตัวข้อมหาการกระจายของแอนติเจน FABP และ GST พบว่ามีลักษณะการกระจายของแอนติเจนทั้งสองชนิดคล้ายกัน กล่าวคือ แอนติเจนทั้งสองชนิดพบในเนื้อเยื่อเกือบทุกแห่งยกเว้นกล้ามเนื้อ โดยมีความเข้มข้นสูงสุดในส่วนครึ่งนอกของชั้นผิวกับหนามและในเซลล์ของชั้น parenchyma ในตัวพยาธิ นอกจากนั้นแล้ว FABP และ GST มีความเข้มข้นเป็นพิเศษในในเซลล์ของระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ testis, ovary และ Mehlis gland

ระยะเมตาเซอรัคเรีย

การติดสีหรือการเรืองแสงโดยแอนติบอดีต่อ GST ในเนื้อเยื่อของระยะเมตาเซอรัคเรียมีลักษณะคล้ายกับ FABP กล่าวคือ กลุ่มเซลล์ที่ติดสีเข้มคือ parenchyma โดยเฉพาะเซลล์กลุ่มที่อยู่ใต้ชั้นผิวซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นเซลล์ชั้นผิว (tegument cells) (รูปที่ 112C) ส่วนเซลล์ parenchyma ที่อยู่ลึกเข้าไปจะติดสีหรือเรืองแสงค่อนข้างเข้มเช่นเดียวกัน ในขณะที่ชั้นผิว (tegument) ติดสีหรือเรืองแสงพอประมาณ (รูปที่ 112B-1) ส่วน cyst wall แสดง autofluorescence เข้มมาก (รูปที่ 112A)

- รูปที่ 106 Sections ของพยาธิตัวเต็มวัยที่ย้อมด้วย rabbit anti ต่อ FABP ของ *F. gigantica* A) oral sucker (Os) B) ventral sucker (Vs) แสดงการเรืองแสงที่ชั้นผิวหนัง (Te) และ parenchyma (Pc) C,D) ภาพ tegument (Te) และ caecum (Ca) แสดงการเรืองแสงใน tegument (Te) และ parenchyma (Pc) และเยื่อ caecum (Ca), Bl = bladder, Sp = spine Mu = muscle
- รูปที่ 107 Sections ที่ย้อมด้วย rabbit anti FABP ของ *F. gigantica* แสดง A) testis (Ti) และ tegument (Te) B) ovary (Ov), bladder (Bl), tegument cells (Tc) และ tegument (Te) C) Mehlis gland (Mg) D) uterus (Ut), egg (Eg), parenchyma (Pc) และ tegument (Te)
- รูปที่ 108 A, B, C) ภาพ cryosection ของพยาธิตัวเต็มวัยที่ย้อมด้วย MoAb ต่อ recombinant FABP (clone 6F3-2) ด้วยวิธี immunoperoxidase แสดงตำแหน่งและการสะสมของแอนติเจน (FABP) ในชั้นผิวหนัง (Tg) และเซลล์ parenchyma 3 ชนิด (Pc1, Pc2, Pc3) ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันและกิ่งของเซลล์ parenchyma (ลูกศร) ที่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อ Testis (Te) ติดสีเข้มพอประมาณ ส่วน caecum (Ca) ติดสีจาง
- D) ภาพของ caecum แสดงสีน้ำตาลบริเวณยอดของเซลล์ผิวหนัง (Ep) (ลูกศร) และก้อนอาหารที่อยู๋ในช่องกลาง (หัวลูกศร)
- E, F, G) ภาพของเซลล์ใน testis (Te - ภาพ E) และเซลล์ใน ovary (Ov - ภาพ F) โดยเฉพาะเซลล์สืบพันธุ์ชั้นต้นที่ติดสีน้ำตาลค่อนข้างเข้ม (หัวลูกศร) และชั้นผิวหนัง (Ep) ของ uterus (Ut) ที่ติดสีจาง
- รูปที่ 109 ภาพ immunofluorescence ของระยะเมตาเซอรค์าเรียที่ย้อมด้วย culture fluid (A) MoAb ต่อ FABP (B-D) แสดงตำแหน่งของ FABP ในเซลล์ parenchyma (Pc) tegument cells (Tc) และชั้นผิวหนัง (Te) ส่วน cystwall ติดสีแบบ nonspecific
- รูปที่ 110 Sections ของพยาธิตัวเต็มวัยที่ย้อมด้วย rabbit anti GST ของ *F. gigantica* แสดงตำแหน่งของ GST ใน A) tegument (Te) และ tegument cell B) ใน caecum (Ca) โดยเฉพาะ caecal epithelium (Cep) C) ใน testis (Ti), parenchyma (Pc), tegument (Te) D) testis (Ti) เรืองแสงเข้มแต่ส่วน muscle (Mu) ไม่มี GST อยู่เลย
- รูปที่ 111 Sections ที่ย้อมด้วย rabbit anti GST ของ *F. gigantica* แสดงการติดสีพอประมาณใน A) seminal vesicle (Sv) B) ovary (Ov) C) Mehlis gland (Mg) D) uterus (Ut), eggs (Eg), parenchyma (Pc), tegument (Te) และ spine (Sp)
- รูปที่ 112 ภาพ immunofluorescence ของ cryosection ของระยะเมตาเซอรค์าเรียที่ย้อมด้วย culture fluid (A) และ MoAb ต่อ recombinant GST (clone 3A3) (B, C, D) แสดงตำแหน่งของ GST ที่มีลักษณะเข้มมากในชั้นผิวหนัง (Te) ในเซลล์ของชั้นผิวหนัง (tegument cells - Tc) parenchyma cells (Pc) ส่วน cystwall เรืองแสงแบบไม่จำเพาะ

Figure 106

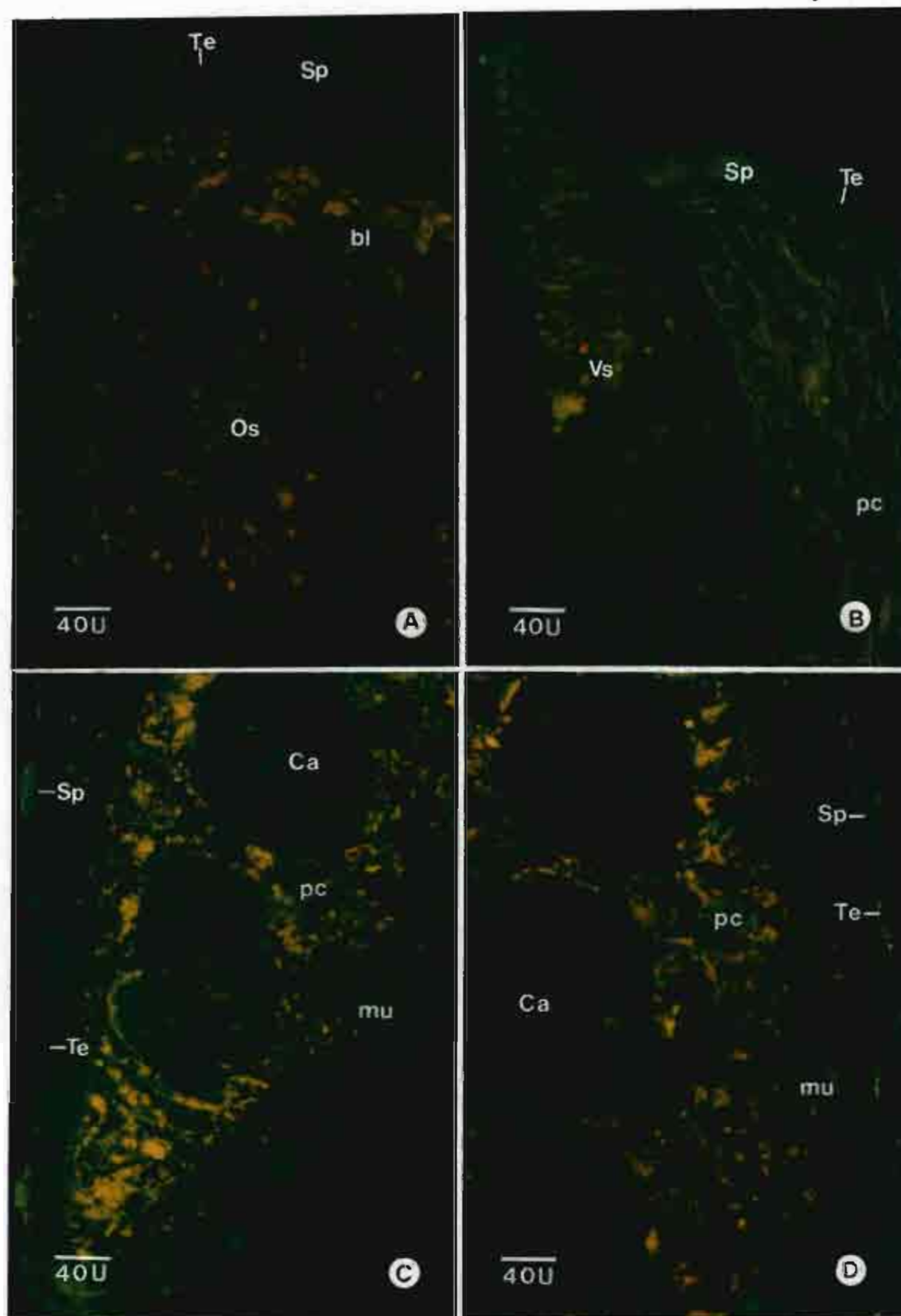


Figure 107

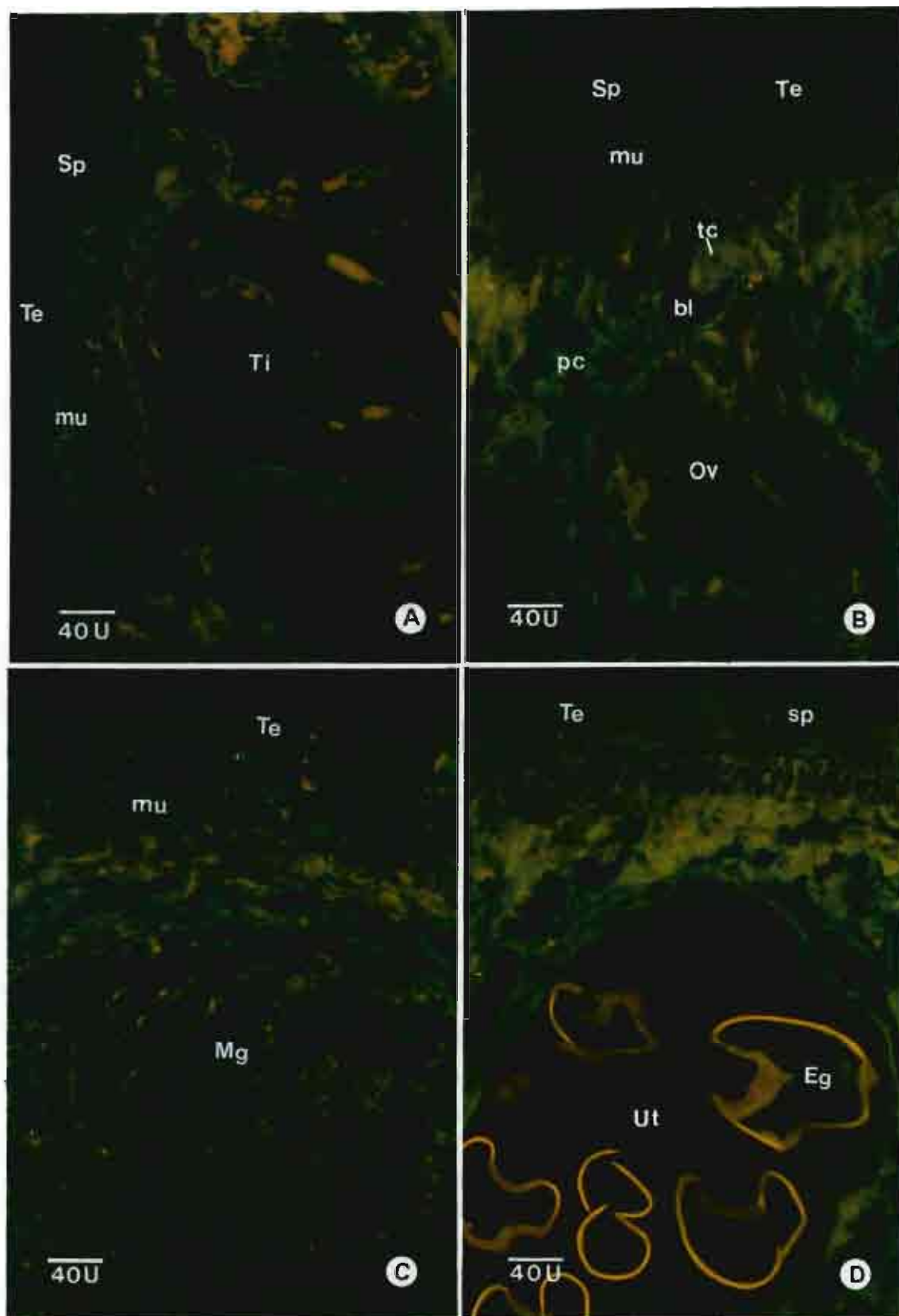


Figure 108

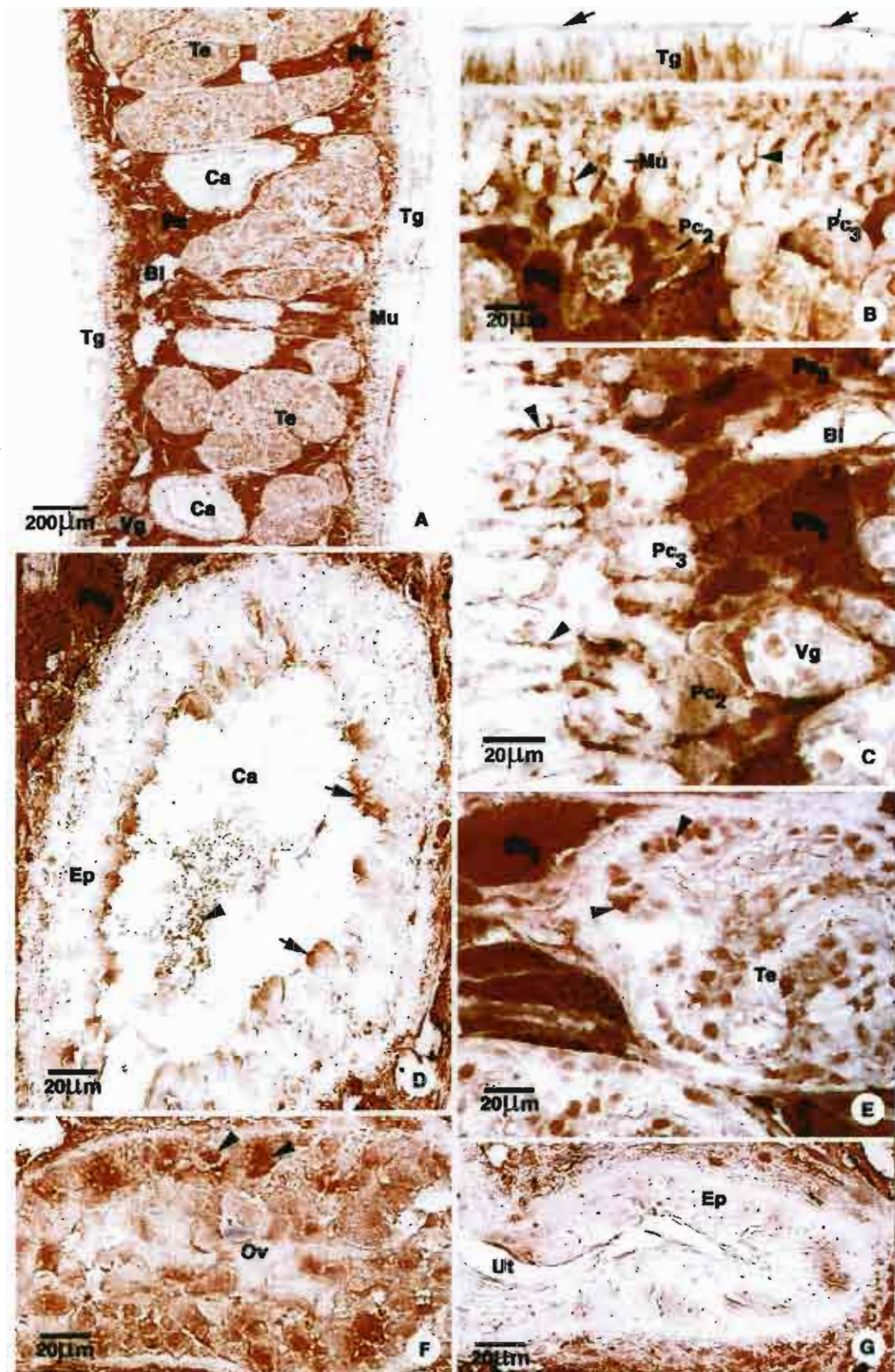


Figure 109

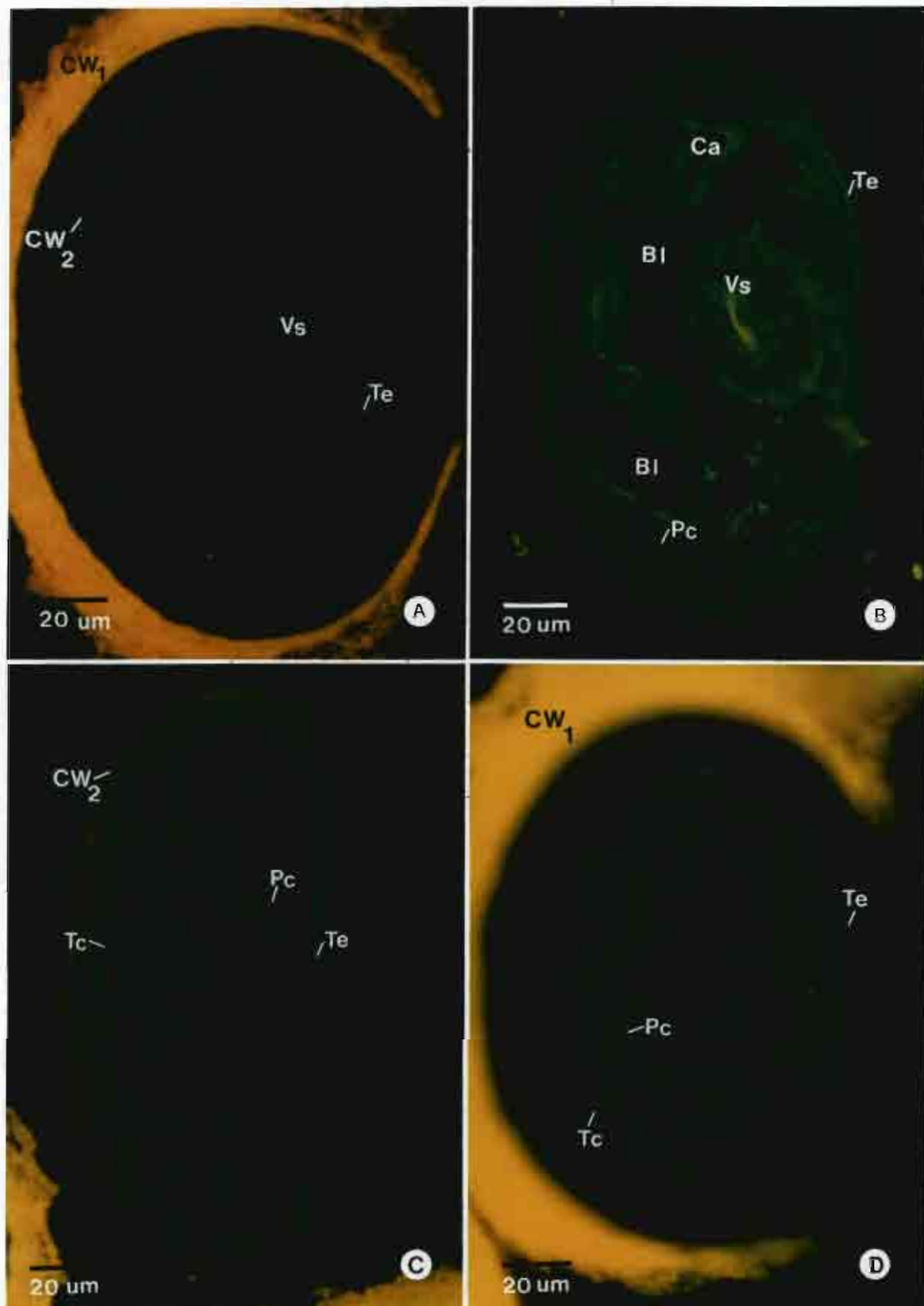


Figure 110

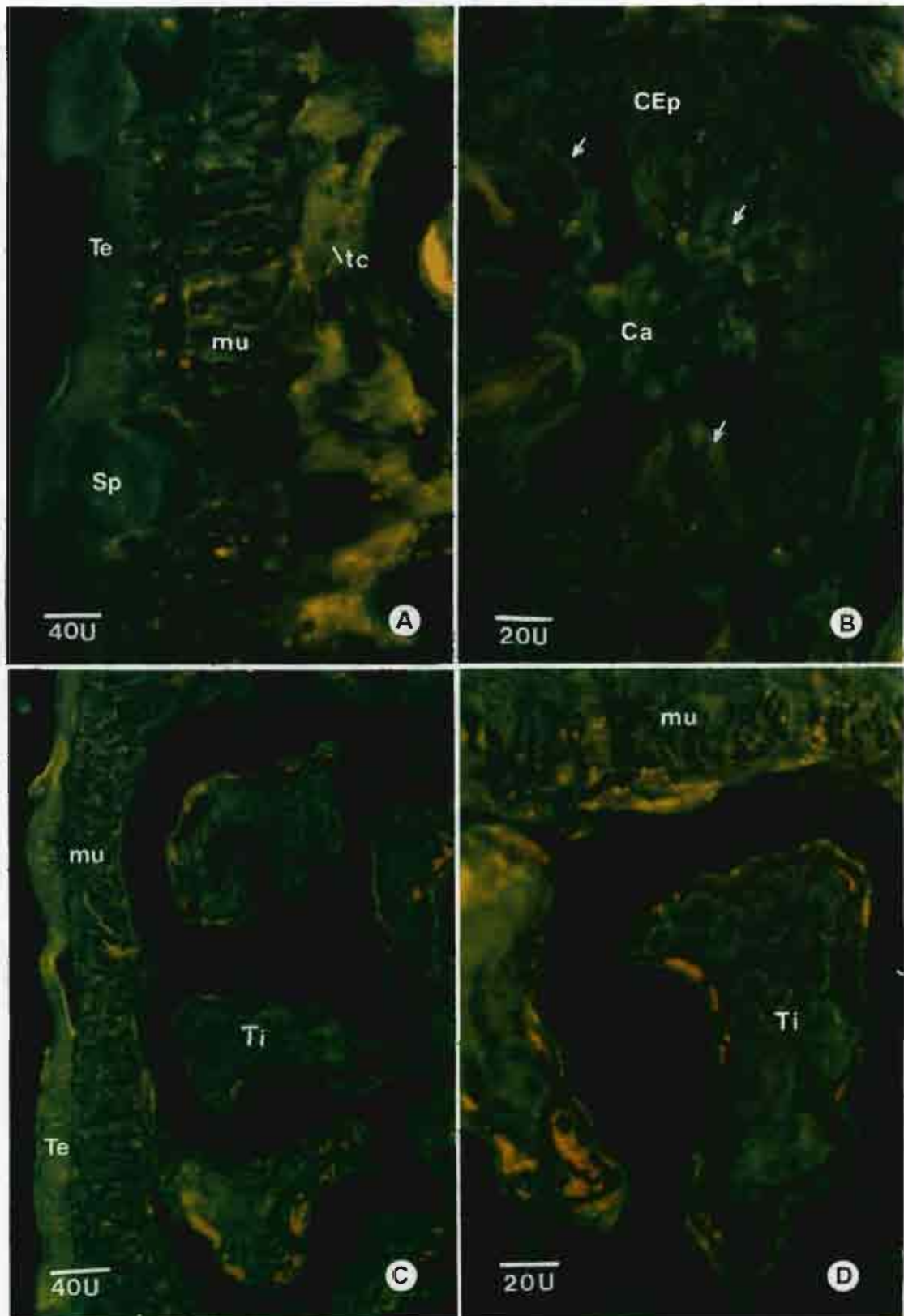


Figure 111

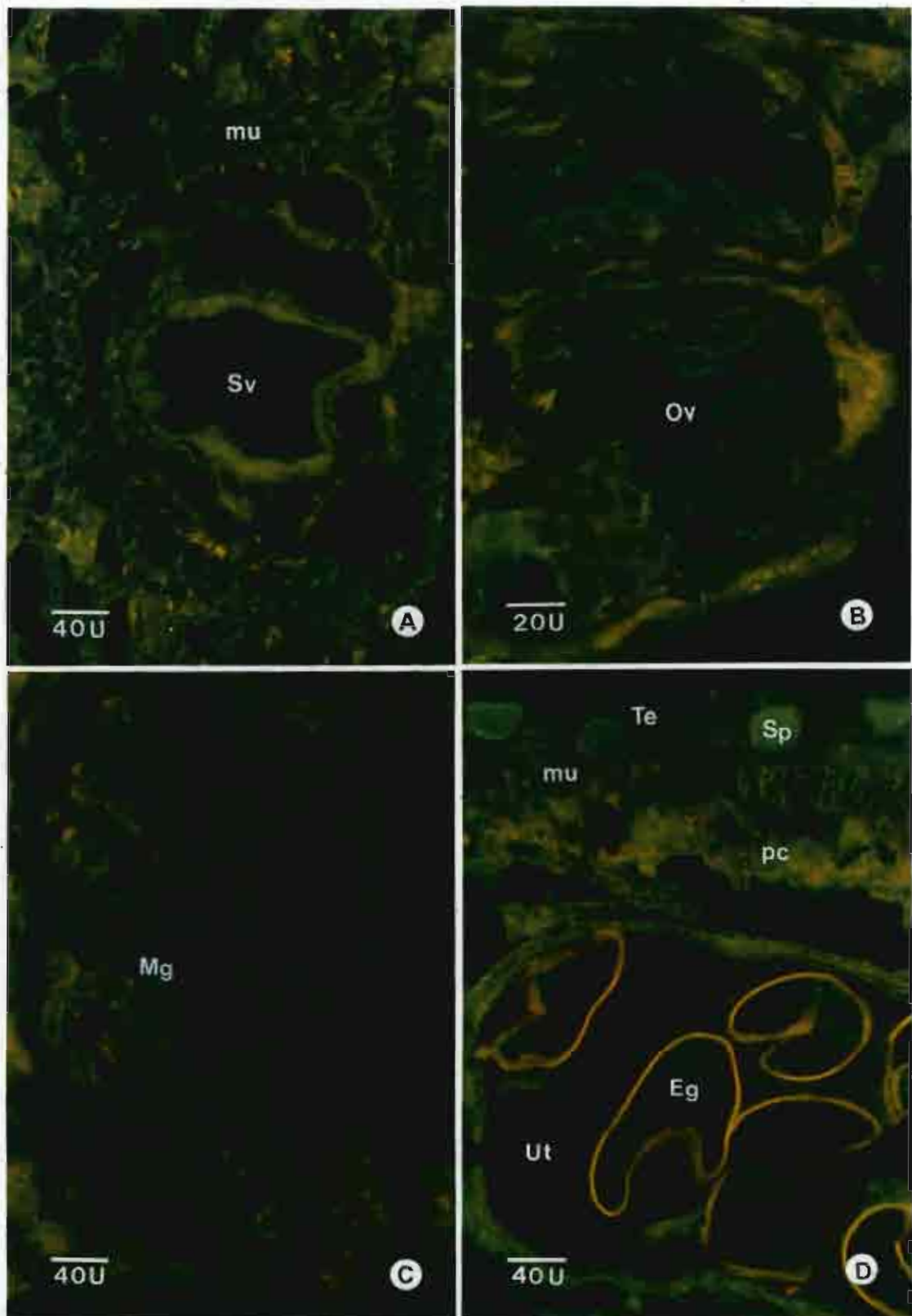
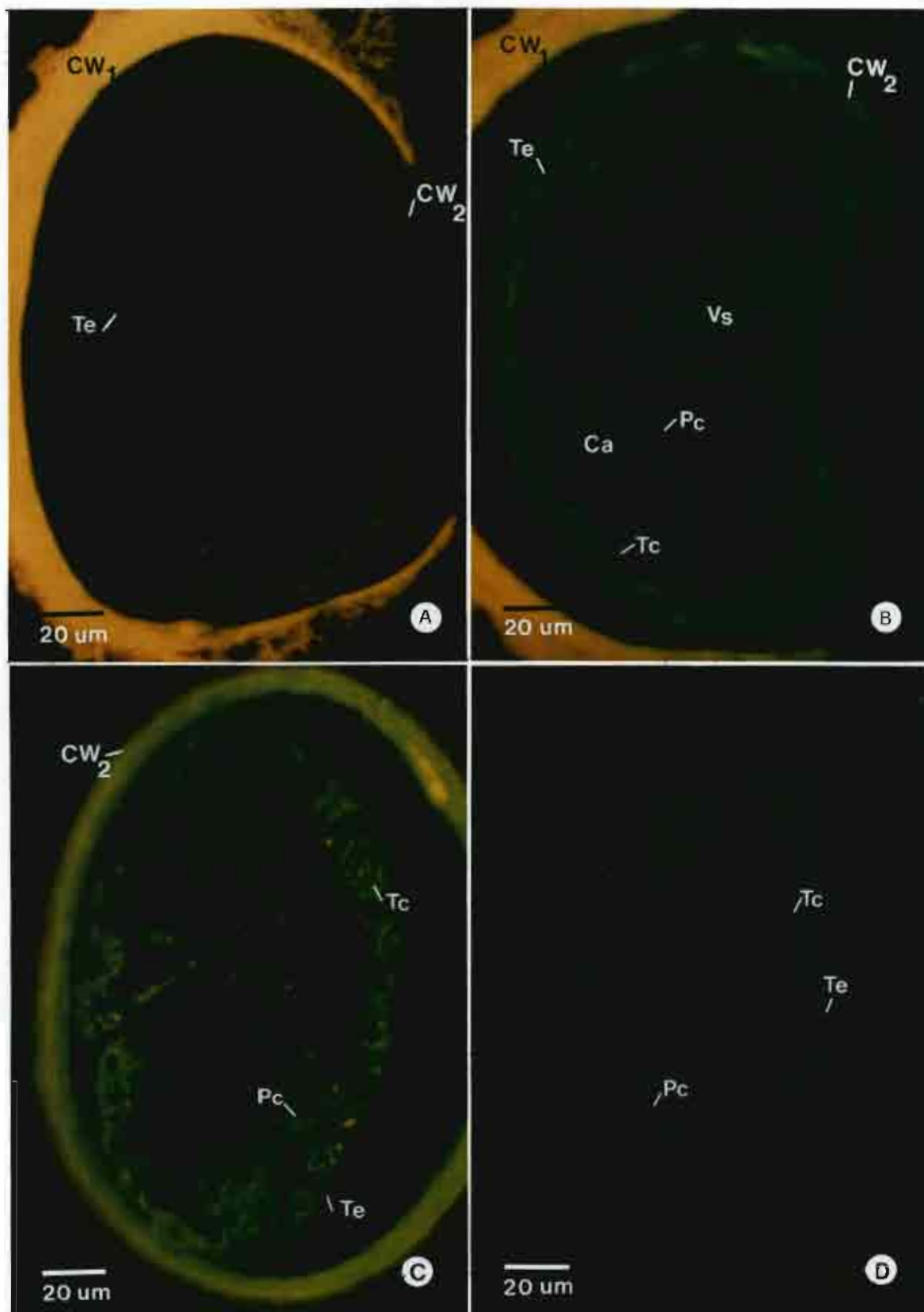


Figure 112



2.2.6 ตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ cathepsin L (Cath L)

พยาธิตัวเต็มวัย

เราได้ทำการศึกษาการกระจายของเอนไซม์ Cath L ซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยสารโปรตีนที่ผลิตจากเซลล์ผนังลำไส้ (caecum) โดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ โดยใช้ polyclonal antibodies ได้แก่ mouse anti Cath L ของ *F. gigantica* กับโมโนโคลนัลแอนติบอดี clone 2D9 เป็น probe พบว่าลักษณะการติดเรืองแสงจากการใช้แอนติบอดีทั้งสองประเภทให้ผลคล้ายกัน กล่าวคือ ในพยาธิตัวเต็มวัยมีการติดสีเข้มที่เยื่อผิวของ caecum ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดๆ กระจายอยู่ในไซโตพลาสซึมและบนผิวเซลล์ นอกจากนี้มีการติดสีเข้มภายในท่อของลำไส้ ซึ่งอาจจะเป็นก้อนของอาหารที่มีเอนไซม์ Cath L ปะปนอยู่ ส่วนในนิวเคลียสของเซลล์ผิวหนังลำไส้ไม่ติดสีเลย (รูปที่ 113C, D; 114B; 115A-D) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งใช้เซรัมของสัตว์ปกติ (normal mouse serum) นอกจากนั้นแล้วชั้นเคลือบของเยื่อหุ้มชั้นผิว (glycocalyx) ก็ติดสีเข้มในขณะที่เนื้อของชั้นผิวเองไม่ติดสีเลย (รูปที่ 113C; 115A, B) ในเยื่อผิวของ pharynx และ buccal tube ก็มีการติดสีเข้มเฉพาะที่ชั้นเคลือบเยื่อหุ้มผิวเท่านั้น (รูปที่ 113A; 114A, C) ณ caecal bifurcation ซึ่งเป็นจุดเปลี่ยนลักษณะของเยื่อผิวจาก tegumental type เป็น caecal หรือ digestive type พบว่าเยื่อผิวชนิดชั้นผิว (tegumental type) มีการติดสีเฉพาะที่ชั้นเคลือบเยื่อหุ้มผิว โดยภายในไซโตพลาสซึมไม่ติดสีเลย ส่วนเยื่อผิวชนิดลำไส้ (digestive type) ที่อยู่ถัดลงไปมีการติดสีเข้มลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม (รูปที่ 114C, D) นอกจากนี้แล้วเรายังพบว่าการติดสีซึ่งแสดงตำแหน่งของ Cath L ในเนื้อเยื่อของระบบสืบพันธุ์โดยเฉพาะเซลล์ของ Mehlis' gland และผิวของเซลล์บุท่อ uterus โดยเฉพาะส่วนที่ติดกับ ootype (รูปที่ 113B) Cath L ที่พบในเนื้อเยื่อเหล่านี้อาจมีส่วนช่วยย่อย vitelline proteins ให้มีขนาดพอเหมาะซึ่งพร้อมจะประกอบเป็น egg shell proteins ต่อไปได้

พยาธิตัวอ่อนกำลังพัฒนา

ในพยาธิอายุ 7 สัปดาห์ พบว่าการติดสีเข้มที่เยื่อผิวลำไส้ โดยมีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ในไซโตพลาสซึมและภายในท่อของลำไส้ เช่นเดียวกับพยาธิตัวเต็มวัย ชั้นเคลือบผิว tegument ติดสีเข้ม ส่วน spine ติดสีประปราย เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ระยะเมตาเซอรคาเรีย

พบว่าเนื้อเยื่อของระยะเมตาเซอรคาเรียไม่ติดสีจากการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ Cathepsin L เลย เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อของตัวอ่อนอายุ 7 สัปดาห์และพยาธิตัวเต็มวัย

ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า Cathepsin L เป็นแอนติเจนที่ถูกสร้างขึ้นในเซลล์บุผิวลำไส้ของพยาธิระยะตัวเต็มวัย แล้วถูกปล่อยออกจากปากไปปะปนกับอาหารในลำไส้เพื่อทำหน้าที่ย่อยอาหาร บางส่วนของเอนไซม์ที่ถูกปล่อยออกจากพยาธิ กลายเป็นส่วนหนึ่งของ excretory-secretory antigens ที่สามารถ

กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันในโฮสต์ได้ นอกจากนั้นแล้วที่นำเสนอคือเอนไซม์ชนิดนี้บางส่วนเคลือบอยู่ที่ด้านนอกของเยื่อหุ้มของชั้นผิว ซึ่งการเคลือบของ Cath L ที่ชั้นเยื่อหุ้มผิวดังกล่าวอาจช่วยป้องกันพยาธิจากการทำลายโดย immune cells ของโฮสต์ เอนไซม์ชนิดนี้อาจช่วยตัดและสลายแอนติบอดีจากโฮสต์ที่เกาะติดกับแอนติเจนบนชั้นผิว เป็นผลให้เซลล์สร้างภูมิคุ้มกันของโฮสต์ไม่สามารถเกาะติดกับ antigen-antibody complexes บนผิวของพยาธิเพื่อปล่อยสารได้แก่ เอ็นไซม์ และ free radicals กับ NO ออกมาทำลายพยาธิได้ นอกจากนี้จะมี Cath L เคลือบที่ชั้นผิวของพยาธิระยะตัวอ่อน 7 สัปดาห์ และระยะตัวเต็มวัยแล้วยังพบ Cath L เคลือบอยู่บนผิวของท่อ uterus โดยเฉพาะส่วนที่อยู่ใกล้กับ ootype และใน Mehlis' gland ด้วย อาจเป็นไปได้ว่านอกจากจะช่วยย่อยสลายสารอาหารและป้องกันการทำลายผิวจากเซลล์สร้างภูมิคุ้มกันจากโฮสต์แล้ว Cath L อาจมีหน้าที่ในการสร้างเปลือกไข่โดยเป็นตัวคัดลอก vitelline proteins จากเซลล์ของต่อม vitellaria ให้มีโครงสร้างและสภาพที่เหมาะสมซึ่งสามารถประกอบกันเป็นเปลือกไข่ที่หุ้มอยู่รอบเซลล์ไข่ขณะที่กำลังเคลื่อนผ่านท่อ ootype และท่อ uterus ส่วนต้น

การที่พบ Cath L เฉพาะเนื้อเยื่อพยาธิตัวเต็มวัยและตัวอ่อนที่พัฒนามากแล้วโดยไม่พบในระยะเมตาเซอร์คาเรียเป็นการบ่งชี้ว่า Cath L เป็นเอนไซม์หลักที่พยาธิระยะตัวเต็มวัยและระยะตัวอ่อนใช้ในการย่อยสลายอาหารเป็นหลัก ส่วนระยะเมตาเซอร์คาเรียอาจจะใช้เอนไซม์ตัวอื่น เช่น Cath B ในการเจาะไข่เนื้อเยื่อโฮสต์เพื่อผ่านเข้าไปสู่ตับโดยยังไม่ได้สร้างและหลั่ง Cath L เนื่องจากเป็นระยะที่ยังไม่กินอาหารจากภายนอก

รูปที่ 113 ภาพ immunofluorescence ของ sections ที่ย้อมด้วย rabbit anti Cath L ของ *F. gigantea* แสดง A) pharynx (Ph) B) caecal bifurcation (Cb) ที่มีการเรืองแสงเฉพาะส่วนเยื่อผิวหนัง (ลูกศร) C) caecum (Ca) ที่มีเม็ดสีเรืองแสงกระจายอยู่ทั่วไปที่ขอบบนของเซลล์ผิวหนัง และ tegument (Te) ซึ่งติดสีเข้มมากที่ผิวหนังนอก D) caecum ขยายใหญ่แสดงเม็ดสีใน caecal epithelium (Cep) – ลูกศร)

รูปที่ 114. ภาพ immunofluorescence ของเนื้อเยื่อพยาธิ *F. gigantea* ตัวเต็มวัยซึ่งใช้ mouse anti Cath L *F. gigantea* เป็นแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง ตามด้วย goat anti mouse IgG-FITC เป็นแอนติบอดีตัวที่สอง A) ภาพใน pharynx (Ph) และ buccal tube (Bt) แสดงเยื่อผิวหนัง (Ep) ติดสีเรืองแสงจางๆ B-D) ภาพ immunofluorescence ตรงตำแหน่ง caecal bifurcation (Cb) กำลังขยายต่ำ (B) ปานกลาง (C) และสูง (D) แสดงตรงจุดเปลี่ยน (ลูกศร) จากเยื่อผิวหนังชั้นผิวหนัง (tegumental type) เป็นชนิดลำไส้ (digestive type) เยื่อผิวหนังชั้นผิวหนัง มีการติดสีเรืองแสงเฉพาะชั้นเคลือบผิวหนัง ส่วน เยื่อผิวหนังชนิดลำไส้มีการติดสีเรืองแสงเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ในไซโตพลาสซึมตรงขอบเซลล์และภายในเซลล์ติดสีเข้มด้วย นิวเคลียส (nu) ไม่ติดสี

รูปที่ 115. A-D) ภาพแสดง immunofluorescence staining ของเนื้อเยื่อพยาธิ *F. gigantea* ตัวเต็มวัยซึ่งใช้ MoAb ต่อ ES แอนติเจนที่ 27 kD (clone 2D9) เป็นแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง ตามด้วย rabbit anti mouse IgG-FITC เป็นแอนติบอดีตัวที่สอง ภาพกำลังขยายต่ำ (A), ปานกลาง (B-C) และสูง (D) แสดงการติดสีเรืองแสงเข้มที่เยื่อผิวหนัง caecum (Ca) มีลักษณะเป็นเม็ดเล็ก ๆ (ลูกศร) กระจายอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ผิวหนัง (Ep) นิวเคลียส (nu) ไม่ติดสี ชั้นเคลือบผิวหนังของชั้นผิวหนังติดสีเข้ม (รูป B); Sp = spine, Vi = vitelline

Figure 113

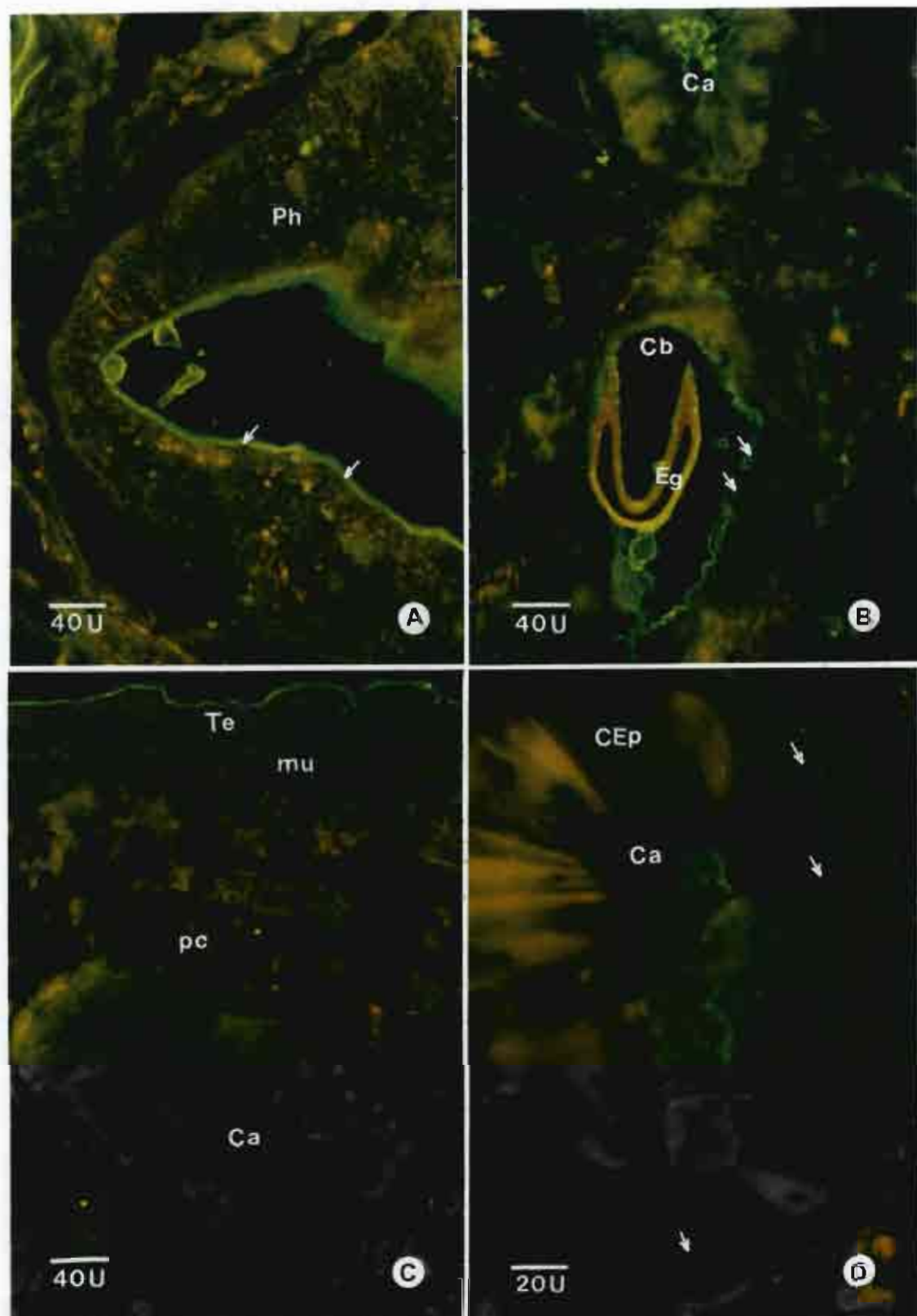


Figure 114

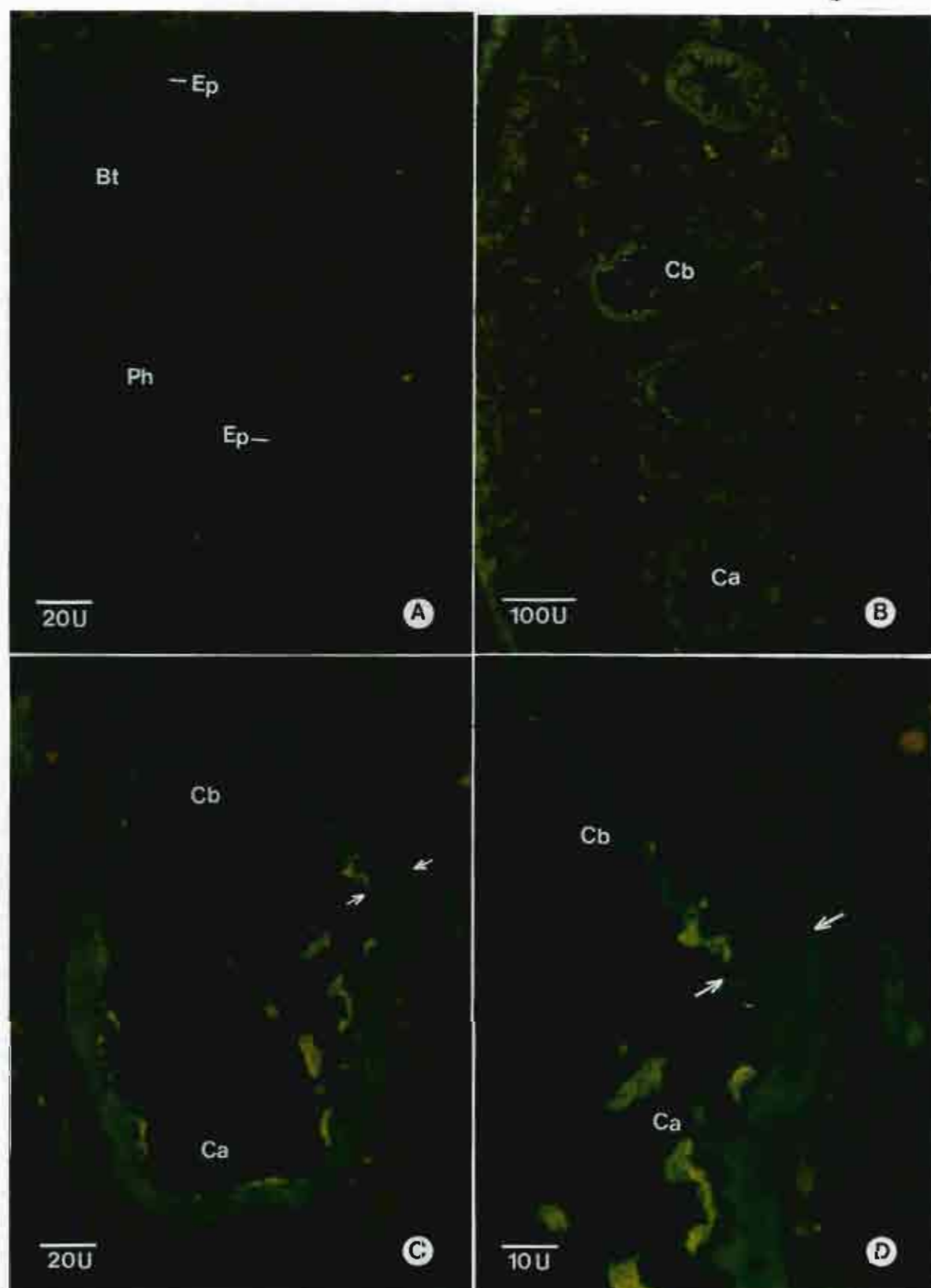
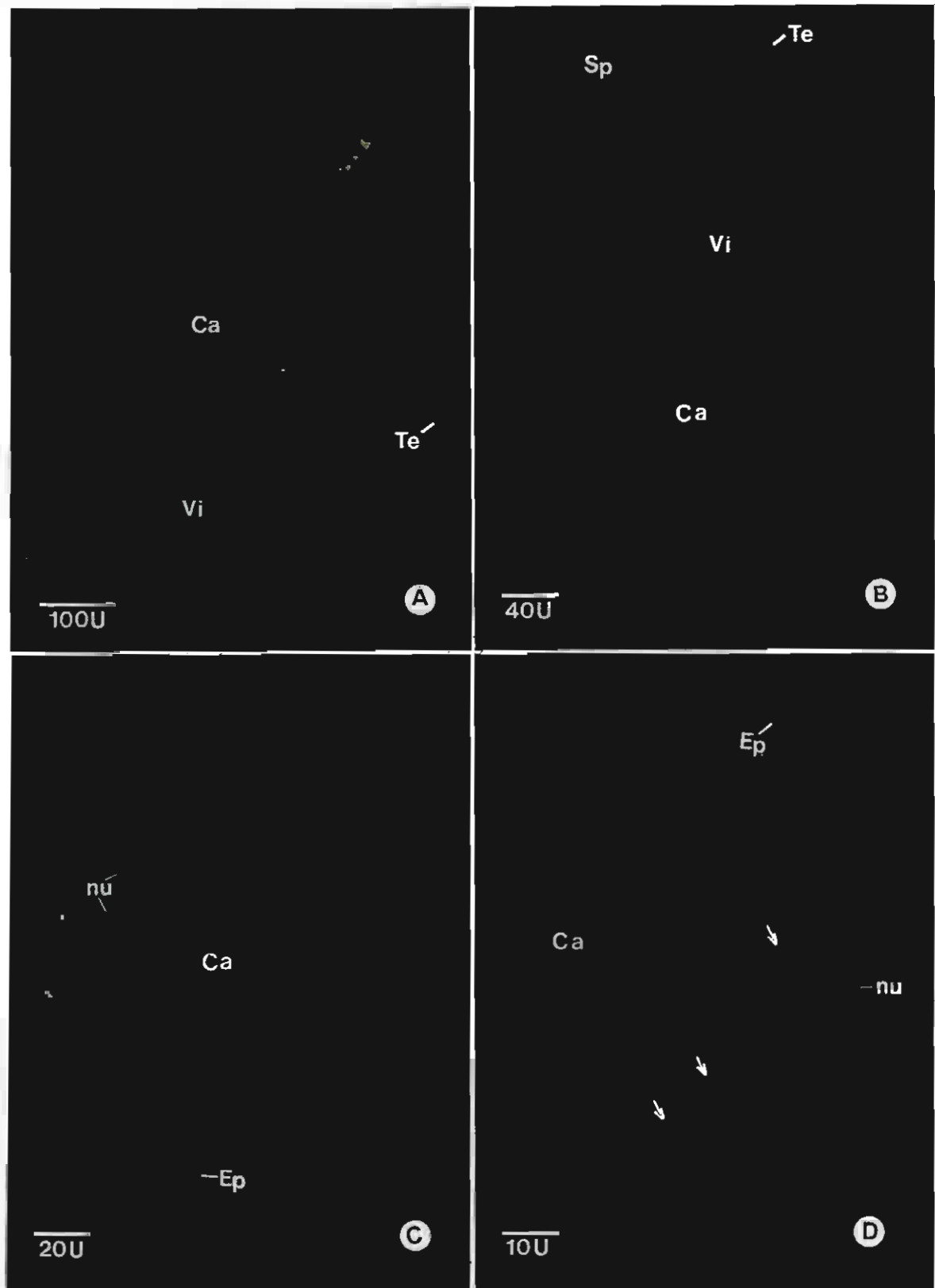


Figure 115



2.3 การศึกษาโครงสร้างละเอียดของเนื้อเยื่อพยาธิที่เป็นแหล่งผลิตแอนติเจนโดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ข้อมูลจากการศึกษาในข้อ 2.1 และ 2.2 ชี้บ่งว่าเนื้อเยื่อของพยาธิที่เป็นเนื้อเยื่อหลักในการสร้างและปล่อยแอนติเจนออกมากระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันของโฮสต์ มีอยู่ 4 กลุ่มคือ (1) ชั้นผิว และเยื่อหุ้มผิว (2) เนื้อเยื่อ parenchyma (3) เยื่อผิวของท่อระบบย่อยอาหารโดยเฉพาะส่วน caecum และ (4) ระบบสืบพันธุ์ โดยเฉพาะการสร้างไข่และเปลือกไข่ซึ่งมีจำนวนมากที่ถูกปล่อยออกมาจากตัวพยาธิ การศึกษาโครงสร้างละเอียดของเนื้อเยื่อดังกล่าวโดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจึงเป็นพื้นฐานสำคัญในการนำไปสู่ความเข้าใจถึงตำแหน่ง การกระจาย และกลไกการสังเคราะห์แอนติเจนที่ระดับเซลล์ ซึ่งจะศึกษาต่อไปด้วยการใช้วิธี immunoelectron microscopy ที่สามารถตรวจดูตำแหน่ง และการกระจายของแอนติเจนต่าง ๆ ในเซลล์ของพยาธิโดยละเอียดได้ นอกจากนั้นแล้วข้อมูลที่ได้อาจเป็นประโยชน์ในการแปรผลการทำลายเซลล์ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของพยาธิ โดยวัคซีนที่อาจพัฒนาจากแอนติเจนชนิดต่างๆ ดังที่กล่าวมาแล้ว

2.3.1 การศึกษาลักษณะสามมิติของผิวพยาธิในระยะต่างๆ โดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

พยาธิตัวเต็มวัย

เราได้ทำการศึกษาโครงสร้างละเอียดโดยเฉพาะลักษณะสามมิติของชั้นผิว (tegumental surface) ของพยาธิตัวเต็มวัยโดยใช้กรรมวิธีของ scanning electron microscopy โดยได้แสดงไว้ในรูป 116-119 และสรุปได้ดังนี้ พยาธิตัวเต็มวัยมีรูปร่างคล้ายใบไม้และเมื่อโตเต็มที่มีความยาว 35 มม. และมีความกว้าง 15 มม. เมื่อวัดกลางลำตัว บนส่วนหน้าของผิวด้านท้องมีหนามจำนวนมากกระจายอยู่ทั่วทั้งผิว ยกเว้นบริเวณรอบ ๆ oral และ ventral suckers หนามแต่ละอันมีความสูง 30 μm และความกว้าง 20 μm ขอบของหนามมีลักษณะคล้ายใบเลื่อยซึ่งอาจมี 16 ถึง 20 แฉก (รูปที่ 116A-G) บนส่วนกลางของผิวด้านท้องหนามมีขนาดใหญ่ขึ้นและมีจำนวนมากขึ้น จึงเรียงติดกันแน่น โดยเฉพาะบริเวณขอบของลำตัวหนามแต่ละอันมีความสูง 30 μm และความกว้าง 20 μm (รูปที่ 117A, B) บนส่วนท้ายของผิวด้านท้อง หนามมีขนาดเล็กลงและจำนวนลดลงเรื่อย ๆ จนแทบไม่เหลืออยู่เลยที่ปลายสุดของลำตัว (รูปที่ 118A-E) ผิวพยาธิที่อยู่ระหว่างหนามปรากฏเป็นร่องหยักไปมาและมีการเพิ่มพื้นที่ผิวโดยมีรูพรุน (pits) ระหว่างสันเล็ก ๆ (ridges) (รูปที่ 116G, I) ความหยักและพรุนของผิวมีตลอดลำตัวของพยาธิ ระหว่างหนามยังมีหน่วยรับความรู้สึกรวมอยู่เป็นกลุ่ม (รูปที่ 117C-G) หน่วยรับความรู้สึกแต่ละอันปรากฏเป็นปุ่มนูนที่เป็นแบบทั้งมี และไม่มีจุดและซี่เลื่อยอยู่บนยอด (รูปที่ 117D-G) หน่วยรับความรู้สึกเหล่านี้มักจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ๆ ละ 2 หรือ 3 ถึง 10 หรือ 15 อันต่อกลุ่ม (รูปที่ 117C) หน่วยรับความรู้สึกมีจำนวนมากเป็นพิเศษบริเวณขอบลำตัวและรอบ ๆ suckers (รูปที่ 116B, C; 117A, B) ผิวด้านหลังของพยาธิมีลักษณะคล้ายกับ

ผิวหนังท้องแต่หนามและหน่วยรับความรู้สึกมีจำนวนและขนาดลดลง
ลักษณะคล้ายคลึงกัน (รูปที่ 118G, H; 119A-F)

ส่วนความพรุนของผิวหนังนั้น

ระยะ Newly excysted juvenile (NEJ)

พบว่า NEJ มีความยาวประมาณ 150 ไมครอน และกว้างประมาณ 80 ไมครอน ด้านท้องของตัวอ่อนมีอวัยวะเด่นคือ oral sucker อยู่ทางด้านหน้าสุดของลำตัว ventral sucker อยู่ตรงตำแหน่งจุดกึ่งกลางของลำตัว และ excretory pore อยู่ทางด้านท้ายสุดของลำตัว (รูปที่ 120A) ผิวด้านท้องและด้านหลังปกคลุมด้วยหนาม (spine) ยกเว้นบริเวณรอบ ๆ oral sucker, ventral sucker และ excretory pore (รูปที่ 120A-C) เมื่อดูด้วยกล้องขยายสูงพบว่าหนามมีลักษณะปลายเดี่ยวแหลมและมีขอบเรียบ (รูปที่ 120E-H) โดยหนามบริเวณส่วนหน้าจะมีขนาดใหญ่และยาวกว่าหนามบริเวณส่วนท้ายของลำตัว และจำนวนหนามต่อหน่วยพื้นที่ในแต่ละบริเวณมีความหนาแน่นแตกต่างกัน กล่าวคือ หนามบริเวณด้านท้องส่วนหน้าจะมีความหนาแน่นมากที่สุดและจะลดน้อยลงในส่วนด้านข้าง ส่วนท้ายและด้านหลัง ผิวระหว่างหนามมีลักษณะเป็นแท่งหรือปุ่มยื่นออกมาจากผิวคล้ายนิ้วมือ (microvilli) โดยมีจำนวนมากในบริเวณผิวหนังด้านท้องส่วนหน้า และมีจำนวน microvilli ลดน้อยลงจนผิวเกือบเรียบในบริเวณด้านข้าง ด้านท้องส่วนท้าย และผิวหนังส่วนหลัง (รูปที่ 120C, F, H) นอกจากนี้ยังมีหน่วยรับความรู้สึก (papilla) กระจายอยู่ระหว่างหนามอีกด้วย โดยหน่วยรับความรู้สึกแต่ละชนิดมีลักษณะคล้ายโดมและแยกอยู่เดี่ยว ๆ ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 แบบ แบบแรกเป็นหน่วยรับความรู้สึกที่มีหลุม (pit) บนยอดโดม ซึ่งพบว่าหน่วยรับความรู้สึกแบบนี้กระจายอยู่รอบ ๆ oral sucker ส่วนหน้าของลำตัวทั้งสองด้านและรอบ ventral sucker (รูปที่ 120B, H) แบบที่สองคือ หน่วยรับความรู้สึกที่ผิวของโดมมีลักษณะเรียบ พบว่ามีกระจายอยู่บริเวณด้านข้างและส่วนหน้าของลำตัว (รูปที่ 120F, G) แบบที่สามคือ หน่วยรับความรู้สึกที่มีซี่เลี้ยว ๆ อยู่บนยอดโดม พบว่ามีกระจายอยู่เฉพาะบริเวณรอบ ๆ oral sucker และข้างลำตัว (รูปที่ 120C, D)

ตัวอ่อนอายุ 1 สัปดาห์

พบว่าพยาธิมีความยาวประมาณ 250 ไมครอนและกว้างประมาณ 140 ไมครอน มีการเจริญของลำตัวส่วนท้ายต่อ ventral sucker มากกว่าส่วนหน้า ทำให้ตำแหน่งของ ventral sucker อยู่ก่อนไปทางส่วนหน้าเล็กน้อย หนามที่ปกคลุมลำตัวมีขนาดใหญ่ขึ้นโดยมีขนาดประมาณ 0.5-1x2 ไมครอน ผิวระหว่างหนามมี microvilli เพิ่มมากขึ้นตลอดทั้งลำตัว ไมโครวิลไลบางอันปรากฏเป็นแท่งกลมที่ส่วนฐานซึ่งติดกับผิวมีลักษณะคอดกึกคล้าย ๆ กับกำลังจะหลุดออกจากผิว (รูปที่ 121A-C) นอกจากนั้นผิวของหนามเองก็มีไมโครวิลไลสั้น ๆ ยื่นออกมาด้วย (รูปที่ 121C-F) เป็นไปได้ว่าพยาธิตัวอ่อนในช่วงนี้อาจมีการปรับเปลี่ยนผิวโดยการสลัดผิวหรือเขี่ยหุ้มเดิมออกอย่างรวดเร็วถึงได้ปรากฏไมโครวิลไลหรือปุ่มสั้น ๆ ขนาดเล็กจำนวนมากซึ่งอาจเป็นส่วนที่กำลังจะหลุดออกจากผิว ซึ่งเป็นกลไกที่พยาธิใบไม้เลือดเช่น

Schistosoma mansoni และ *Schistosoma japonicum* ใช้ในการผลิตเปลี่ยนผิวในตัวอ่อนระยะ cercariae ขณะกำลังไขผ่านผิวหนังเพื่อเคลื่อนไปสู่ปอดและตับ

ตัวอ่อนอายุ 4-5 สัปดาห์

พบว่าตัวอ่อนมีความยาวประมาณ 900 ไมครอน และกว้างประมาณ 350 ไมครอน มีการเจริญของลำตัวส่วนท้ายจาก ventral sucker มากขึ้นจนทำให้ตำแหน่งของ ventral sucker อยู่ค่อนข้างด้านหน้ามากขึ้น โดยอยู่ ณ ตำแหน่งประมาณ 1 ใน 3 ส่วนหน้าของลำตัว (รูปที่ 122A, D) หนามตลอดทั้งลำตัวมีขนาดใหญ่ประมาณ 2.5x5 ไมครอนและมีผิวเรียบขึ้นที่ส่วนหน้าและกลางลำตัวของพยาธิ เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงอายุ 1 สัปดาห์ผิวระหว่างหนามเปลี่ยนสภาพจากไมโครวิลไลเป็นร่อง (pits) สลับกับสันเล็ก ๆ (ridges) (รูปที่ 123A, B) หักไปมา โดยเฉพาะบริเวณรอบ ๆ หนามผิวจะมีลักษณะเป็นสันเรียงเป็นแถวล้อมรอบหนามอย่างชัดเจน เพื่อช่วยเพิ่มพื้นที่ผิว (รูปที่ 123A-C) แต่ส่วนหลังผิวยังมีลักษณะเป็นไมโครวิลไลปกคลุมอยู่ทั่วไป (รูปที่ 123D) หน่วยรับความรู้สึกมีขนาดใหญ่ขึ้นและเริ่มปรากฏอยู่เป็นกลุ่มมากขึ้นและกระจายอยู่ทั่วทั้งลำตัว (รูปที่ 123C, D)

ตัวอ่อนอายุ 7 สัปดาห์

มีขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร โดยมีการเจริญของลำตัวบริเวณท้ายต่อ ventral sucker มากขึ้นจนทำให้ ventral sucker เคลื่อนไปอยู่ที่ส่วนหน้าของลำตัวมากขึ้น (รูปที่ 124A) หนามทั่วทั้งลำตัวมีขนาดใหญ่ขึ้นโดยบริเวณส่วนหน้ามีขนาดประมาณ 7x12 ไมครอน (รูปที่ 124C, D) ส่วนท้ายมีขนาดประมาณ 4x8 ไมครอน (รูปที่ 125A) หนามเริ่มมีขอบหยัก โดยมีลักษณะเป็นแฉกประมาณ 2-3 แฉก (รูปที่ 125A) ผิวระหว่างหนามมีลักษณะเป็นรอยหยักไปมามากขึ้น โดยปรากฏเป็นสันกันด้วยร่องและรูพรุนอย่างชัดเจนทั่วทั้งลำตัวพยาธิ (รูปที่ 124C, D; 125A-D) หน่วยรับความรู้สึกมีทั้งแบบที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ๆ และอยู่เดี่ยว ๆ โดยมีจำนวนมากและขนาดใหญ่ขึ้น และมักกระจายอยู่ในบริเวณรอบ sucker ที่ส่วนหน้าและด้านข้างของลำตัว (รูปที่ 125A-D) ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าพยาธิในช่วงอายุ 7 สัปดาห์มีลักษณะที่คล้ายกับพยาธิตัวเต็มวัยมากขึ้น

ตัวอ่อนอายุ 10-11 สัปดาห์

พยาธิมีลักษณะผิวเช่นเดียวกับตัวเต็มวัย โดย ventral sucker มีตำแหน่งอยู่ค่อนข้างด้านหน้ามากขึ้น หนามมีลักษณะใหญ่และมีขอบหยักมากขึ้น โดยหนามบริเวณส่วนหน้ามีขนาดประมาณ 12x25 ไมครอน ส่วนท้ายมีขนาดประมาณ 6x12 ไมครอนและมีขอบหยัก (serrated) เนื่องจากมีขดเล็ก ๆ 7-8 อันต่อหนามแต่ละอัน ผิวระหว่างหนามมีการจัดเรียงตัวเป็นสัน ร่องและรูพรุนอย่างชัดเจนเช่นเดียวกับในตัวเต็มวัย หน่วยรับความรู้สึกรวมกันอยู่เป็นกลุ่ม กลุ่มละประมาณ 8-10 อัน โดยมีจำนวนมากและ

กระจายอยู่รอบ ๆ oral sucker, ventral sucker และด้านข้างของลำตัว เช่นเดียวกับที่พบในพยาธิระยะหัวเต็มวัย

รูปที่ 116 A-D) ภาพ SEM ของผิวหนังของพยาธิตัวเต็มวัยแสดง oral (Os) และ ventral (Vs) suckers ล้อมรอบด้วยตุ่มรับสัมผัส (papilla – pa) ที่เรียงกันเป็นแถวและรวมอยู่เป็นกลุ่ม (pa3 ในภาพ D) หนาม (sp) รูของต่อม (gc) และรูเปิดของท่อสืบพันธุ์ (Gc)

E, F) ส่วนกลางของผิวหนังที่แสดงหนามที่เรียงอยู่อย่างหนาแน่น (sp) กับกลุ่มของตุ่มรับสัมผัส (pa)

G, H) ภาพหนามขยายใหญ่แสดงขอบคล้ายใบเลื่อยและผิวที่มีสัน (fold – Fo) สลับกับร่อง (groove – gr)

I) ภาพขยายใหญ่ของสันแสดง ridge (ri) สลับกับรูเล็ก ๆ (pit – pi)

รูปที่ 117 A-C) ภาพ SEM ด้านข้างส่วนหน้า (A) และด้านข้างส่วนกลาง (B) แสดงหนามแบบที่มีปลายคล้ายใบเลื่อย (sp) และกลุ่มของ papilla ขนาดใหญ่ (pa ใน D)

E) แสดง papilla แบบที่ 1 (pa1) ที่มีจุกบนยอดโดม

F) แสดง papilla แบบที่ 3 (pa3) ที่มีลักษณะคล้ายโดมผิวเรียบ

G) แสดง papilla แบบที่ 2 (pa2) มี cilia (ci) บนยอดของจุกที่อยู่บนโดม

รูปที่ 118 A-C) ภาพ SEM ของผิวหนังที่องส่วนหลัง (A) และส่วนปลายสุดของตัวพยาธิ (B) แสดงหนามสั้น ๆ (sp) ที่กระจายอยู่ห่าง ๆ และกลุ่มของ papilla (pa) ที่กระจายอยู่ทั่วไป

D) แสดงกลุ่มของ papilla (pa) ที่มีขนาดใหญ่

E) แสดงกลุ่มของ papilla (pa) และสัน (fo) กับร่อง (gr) แทรกอยู่ระหว่างสัน

F) ภาพขยายใหญ่ของหนาม (sp) ที่ส่วนหลังแสดงผิวที่มีลักษณะพรุณ

G, H) ภาพ SEM ของผิวหนังหลังแสดงหนาม (sp) จำนวนมาก ส่วน papilla มีจำนวนน้อย

รูปที่ 119 A) ผิวหนังส่วนกลางแสดงหนามแบบ ๆ (sp) กระจายอยู่อย่างสม่ำเสมอ

B) ภาพขยายใหญ่ของหนามแสดงผิวค่อนข้างเรียบแต่พรุณ ปลายหนามหักคล้ายใบเลื่อย

C) ภาพผิวระหว่างหนามแสดงสัน (fold - fo) และร่อง (gr)

D) ภาพขยายใหญ่ของผิวของสันแสดง ridge (ri) และ รูพรุณ (pit- pi)

E) ภาพผิวหนังส่วนท้ายและปลายสุดแสดงหนามสั้น ๆ (sp) ที่กระจายอยู่ห่าง ๆ

F) ภาพขยายใหญ่แสดงผิวของหนามที่มีลักษณะพรุณด้วย pit (pi) ปลายของหนามค่อนข้างเรียบ

รูปที่ 120 SEM micrographs ของพยาธิระยะ newly excysted juvenile (NEJ)

A) ด้าน ventral ของตัวพยาธิคลุมด้วยหนาม (Sp) ซึ่งแสดงลักษณะเด่นคือ oral sucker (Os), ventral sucker (Vs) และ excretory pore (Ep).

B) ด้าน ventral ส่วนหน้าแสดงหน่วยรับความรู้สึก (pa) กระจายอยู่รอบ ๆ oral sucker และด้านข้างของลำตัว

C) แสดงลักษณะผิวบริเวณ oral sucker ซึ่งไม่มีหนามและมีหน่วยรับความรู้สึกชนิดที่มี cilia (pa)

E, F) ภาพขยายใหญ่ของผิวหนังด้าน ventral ส่วนหน้า (E) และส่วนหลัง (F) แสดงหนามมีลักษณะปลายเคียวแหลม ขอบเรียบ มีจำนวนหนามต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่น้อย และหน่วยรับความรู้สึกชนิดที่ผิวเรียบ (pa) อยู่ระหว่างหนาม ผิวโดยทั่วไปไม่มีลักษณะค่อนข้างขรุขระที่ส่วนหน้าและประกอบด้วยตุ่มเล็ก ๆ คล้าย microvilli (mv) ขึ้นออกมา

G,H) ภาพขยายใหญ่ของผิวหนังรอบ oral sucker แสดงกลุ่มของหน่วยรับความรู้สึกซึ่งเป็นชนิดที่มี pit และมี microvilli (mv) จำนวนมาก

รูปที่ 121 SEM micrographs ของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ตับอายุ 1 สัปดาห์

A-D) แสดงการจัดเรียงตัวของหนามบริเวณส่วนหน้าของลำตัวพยาธิ โดยผิวหนังระหว่างหนาม (sp) มี microvilli (mv) เพิ่มมากขึ้นทั่วทั้งผิว ผิวคลุมหนามมีลักษณะขรุขระเนื่องจากมี microvilli ด้วย

E, F) แสดงการจัดเรียงตัวของหนามบริเวณส่วนท้ายของลำตัวซึ่งมี microvilli (mv) น้อยลง

รูปที่ 122 SEM micrographs ของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ตับอายุ 5 สัปดาห์

A) บริเวณด้านล่างของลำตัวแสดง oral sucker (Os) และ ventral sucker (Vs) ที่ไม่มีหนาม

B, C) แสดงการจัดเรียงตัวของหนามรอบ ๆ ขอบของ oral sucker (Os)

D) แสดงการจัดเรียงตัวของหนามรอบ ๆ ขอบของ ventral sucker (Vs)

รูปที่ 123 SEM micrographs บริเวณส่วนหน้าของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ตับอายุ 5 สัปดาห์

A, B) ภาพกำลังขยายต่ำแสดงการจัดเรียงตัวของหนามบริเวณผิวหนังส่วนหน้า ผิวระหว่างหนามมีลักษณะเป็นสันและร่องชัดเจน บนสันแต่ละอันประกอบด้วย ridge (ri) และ pit (pi)

C) ภาพกำลังขยายปานกลางแสดงลักษณะของผิวที่มีการเรียงตัวของ ridge (ri) และ pit (pi) รอบโคนของหนาม บางแห่งก็ยังมี microvilli (mv) ระหว่างหนาม (sp) และมีหน่วยรับความรู้สึกซึ่งเริ่มมีการอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ๆ (pa)

D) ภาพขยายใหญ่ของผิวหนังท้องส่วนหลังแสดง microvilli (mv) ที่ยังคงเหลืออยู่และกลุ่มของหน่วยรับความรู้สึกซึ่งเป็นแบบที่มีหลุมด้านบน (pa) และที่มีผิวเรียบ

รูปที่ 124 SEM micrographs ของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ตับอายุ 7 สัปดาห์

A, B) ภาพกำลังขยายต่ำบริเวณส่วนหน้าของตัวอ่อนพยาธิแสดง oral sucker (Os) และ ventral sucker (Vs) และลำตัวซึ่งยาวออกไปทางด้านหลังมากขึ้น

C, D) ภาพกำลังขยายปานกลางและสูง แสดงการจัดเรียงตัวของหนามบริเวณส่วนหน้าของลำตัวซึ่งเริ่มมีลักษณะคล้ายคนเลื้อย ผิวมีลักษณะเป็นสันและร่อง รอบ ๆ หนาม มี ridge (ri) และ pit (pi) เรียงอยู่เป็นวง

รูปที่ 125 SEM micrographs ของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ตับอายุ 7 สัปดาห์

- A, B) ภาพกำลังขยายปานกลางและสูงของหน่วยรับรู้สัมผัส (pa) ชนิดที่มีซีเลียซึ่งกระจายอยู่
เดี่ยว ๆ บริเวณส่วนหน้าของลำตัว หนอน (sp) แต่ละอันล้อมรอบด้วย ridge (ri) และ pit (pi)
- C, D) ภาพกำลังขยายปานกลางและสูงของหน่วยรับรู้สัมผัสชนิดที่มีซีเลีย (pa, ci) ที่อยู่เป็น
กลุ่ม ๆ ที่บริเวณส่วนหน้าของลำตัว รอบ ๆ pa มี ridge (ri) และ pit (pi) ที่พัฒนาเต็มที่

Figure 116

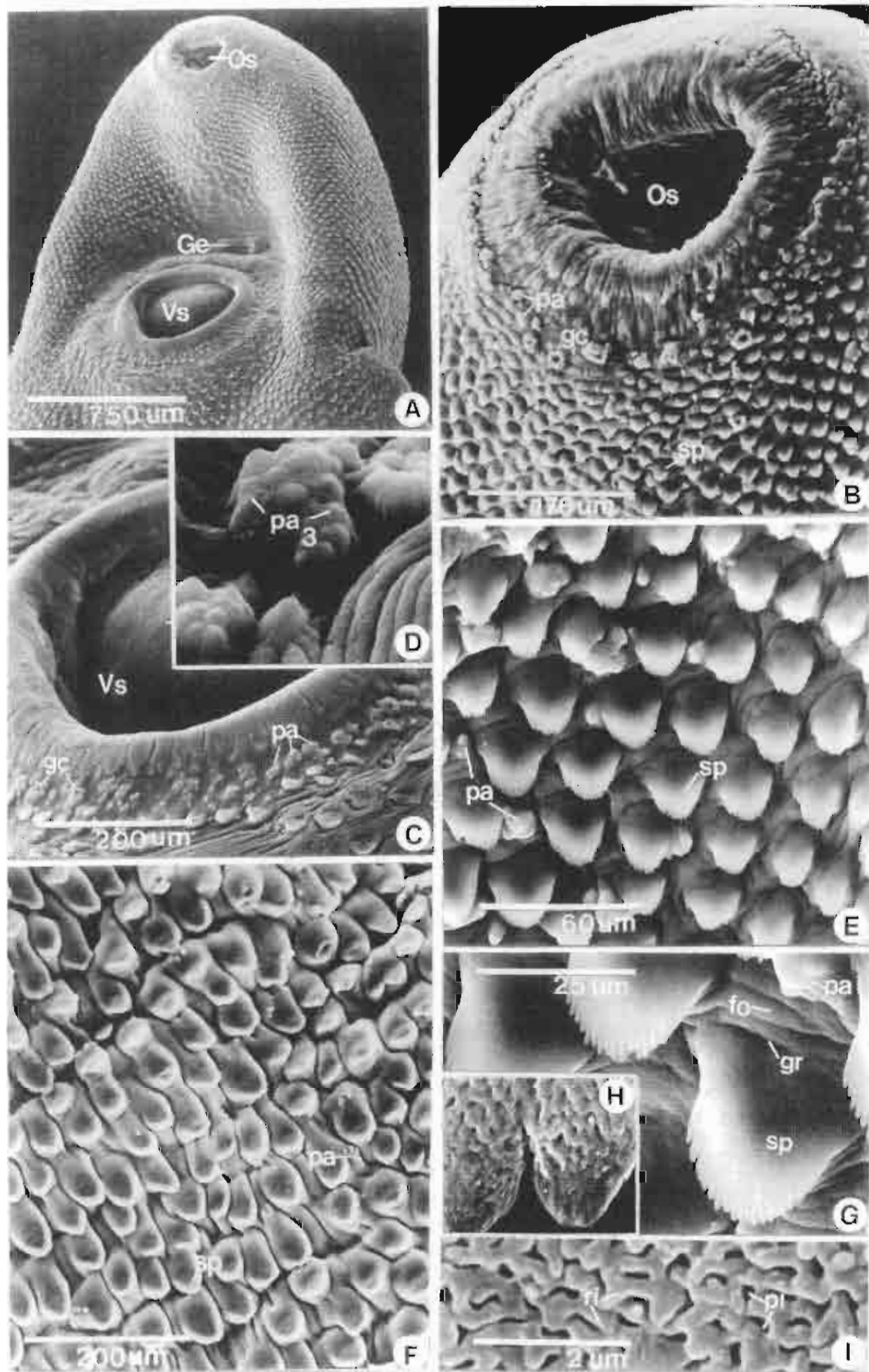


Figure 117

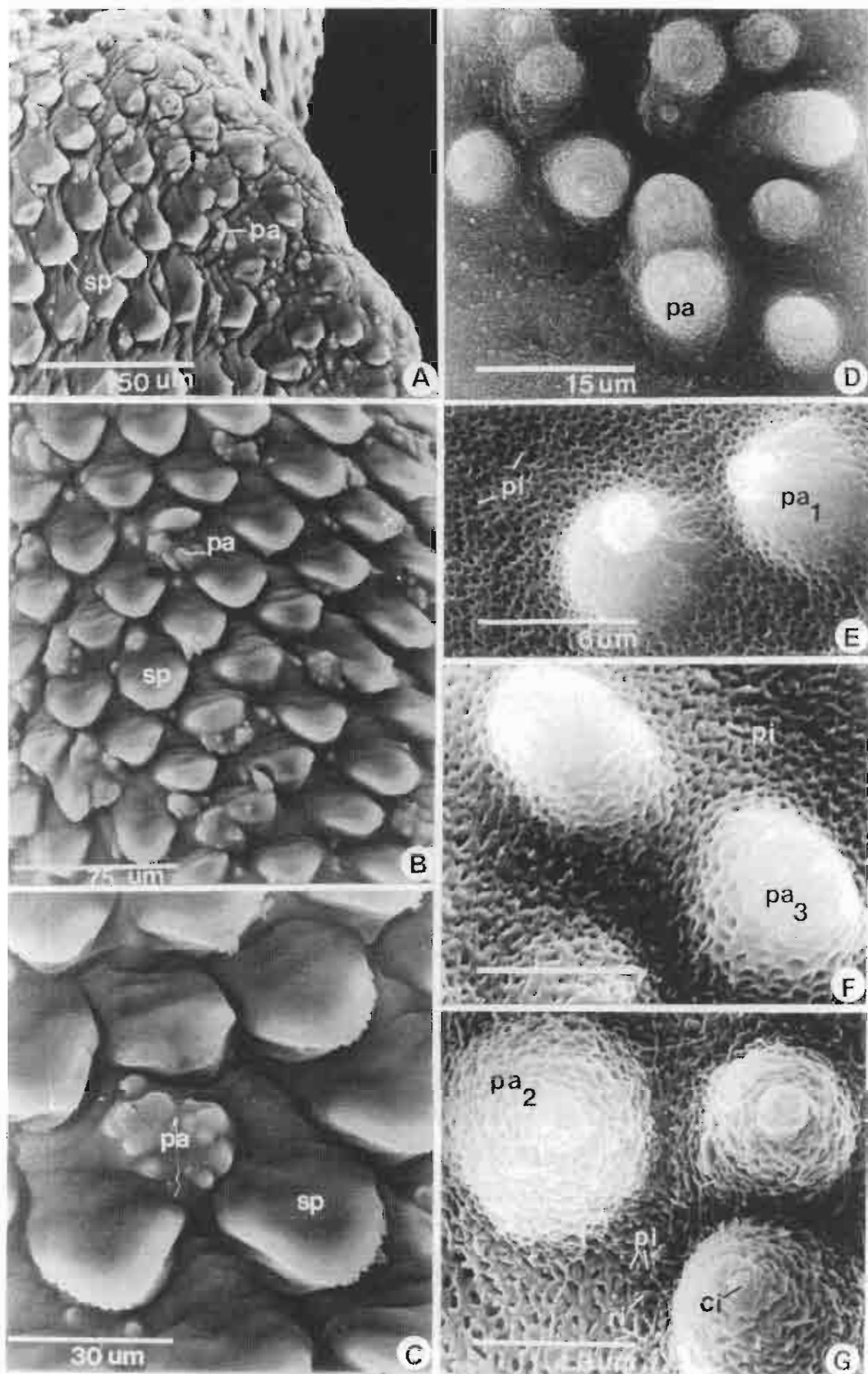


Figure 118

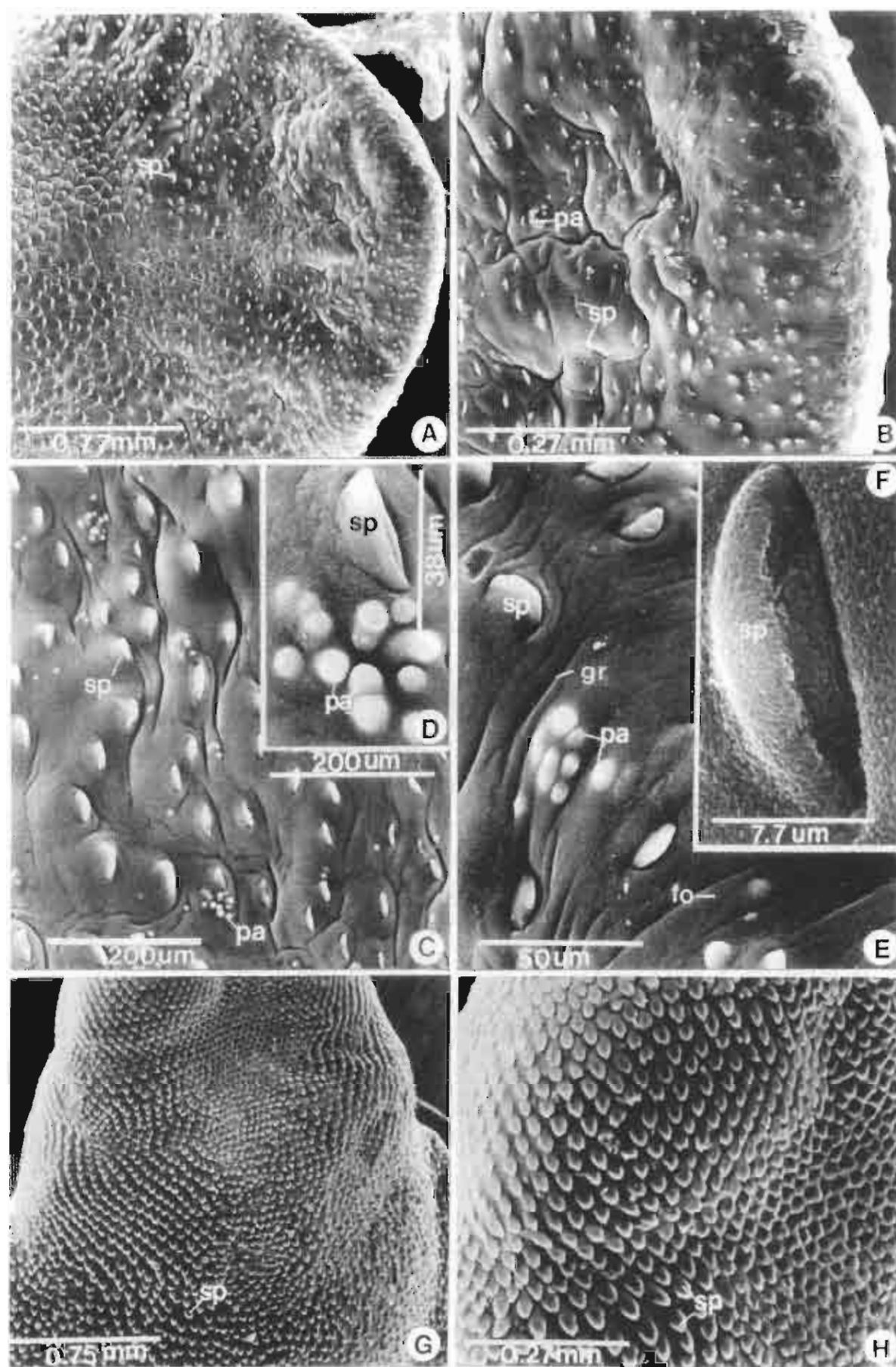


Figure 119

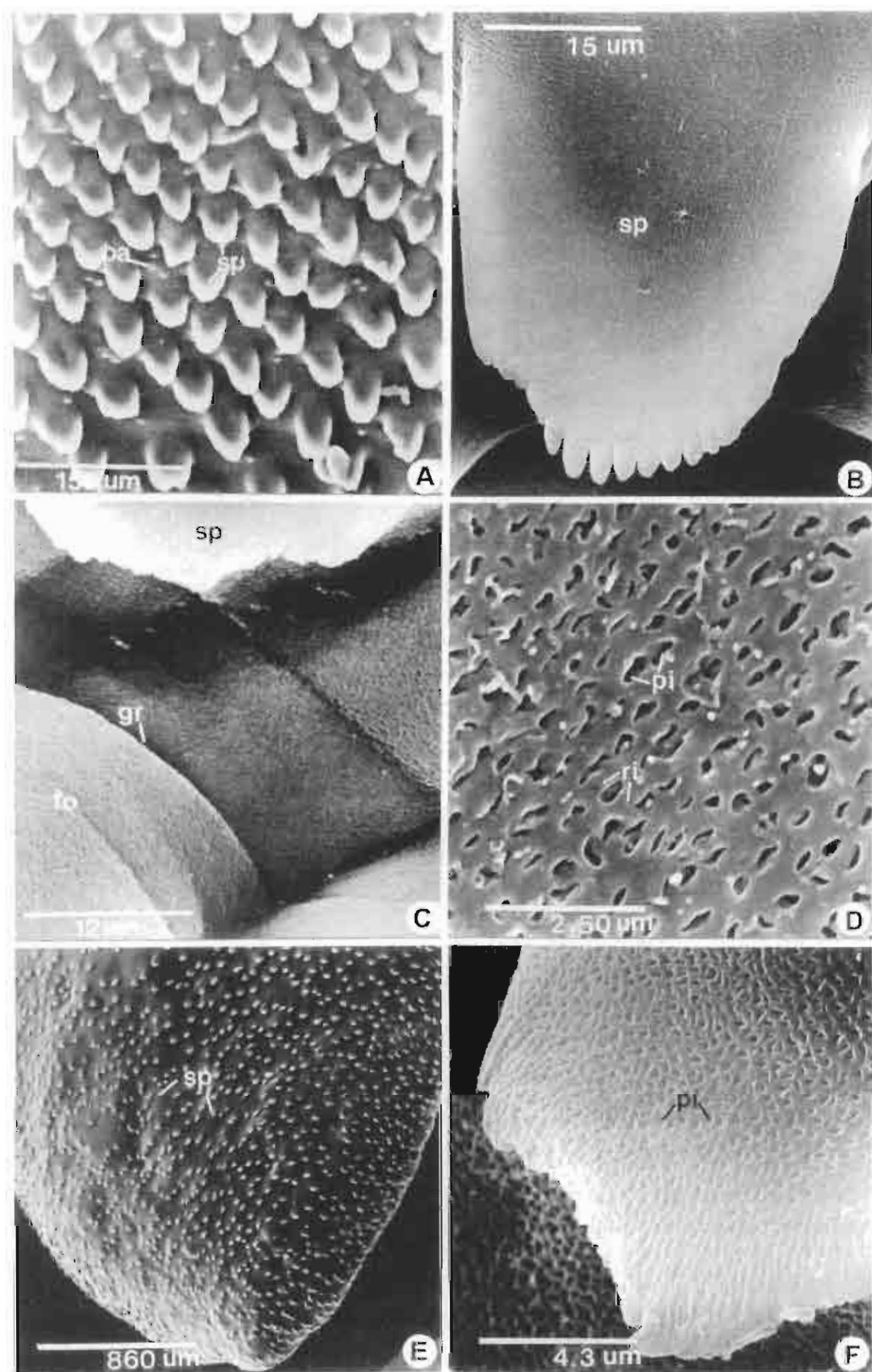


Figure 120

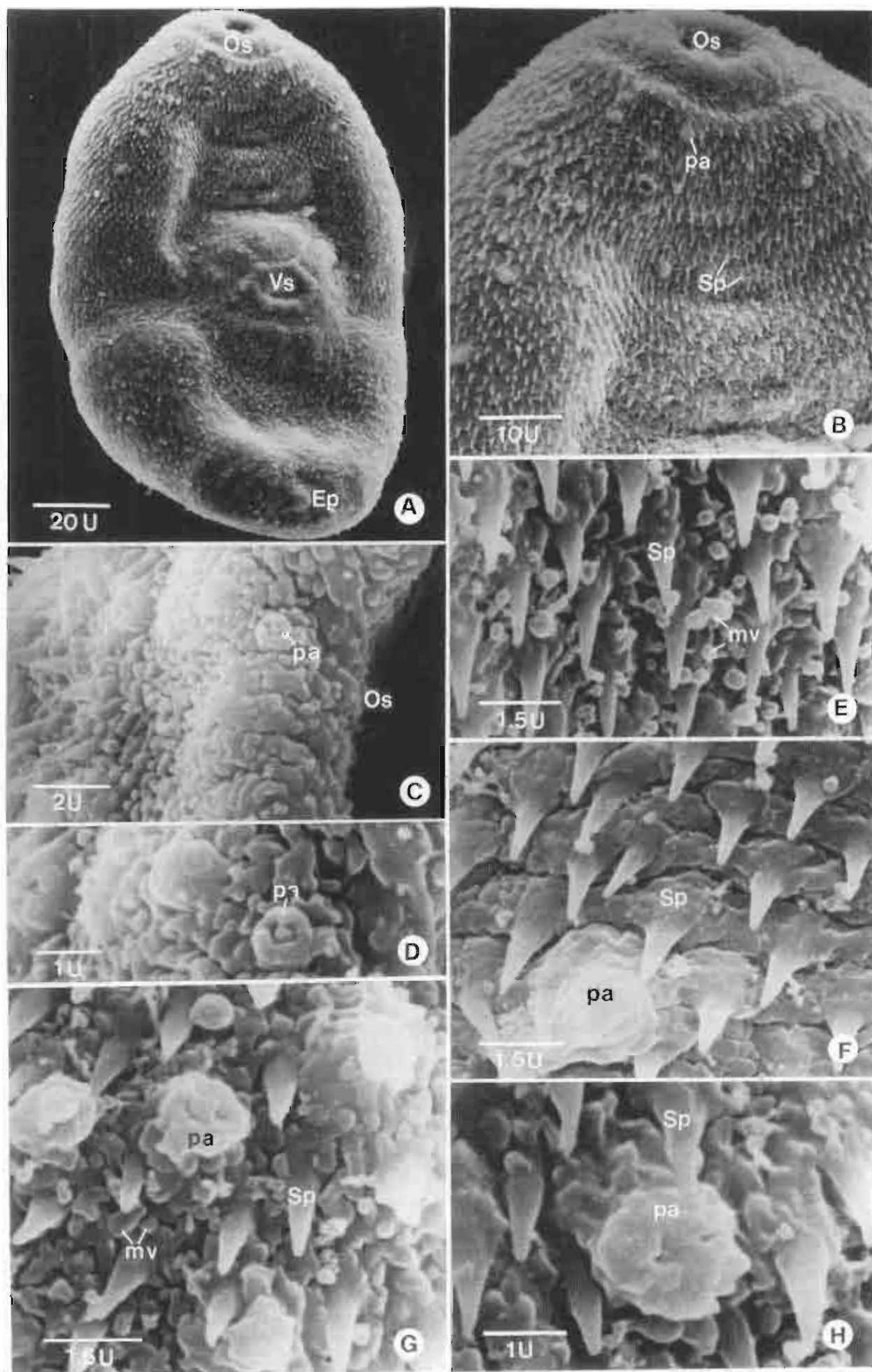


Figure 121

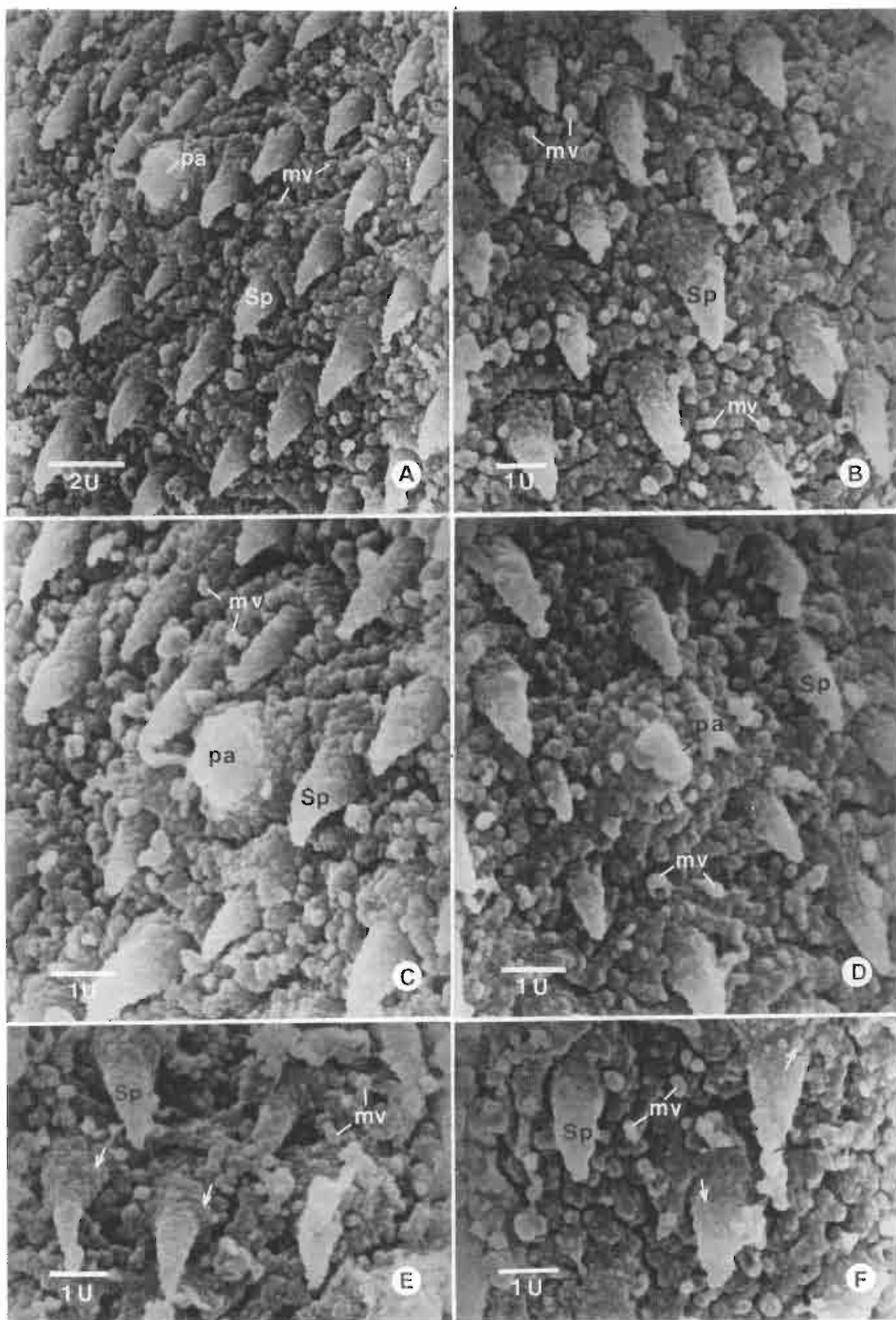


Figure 122

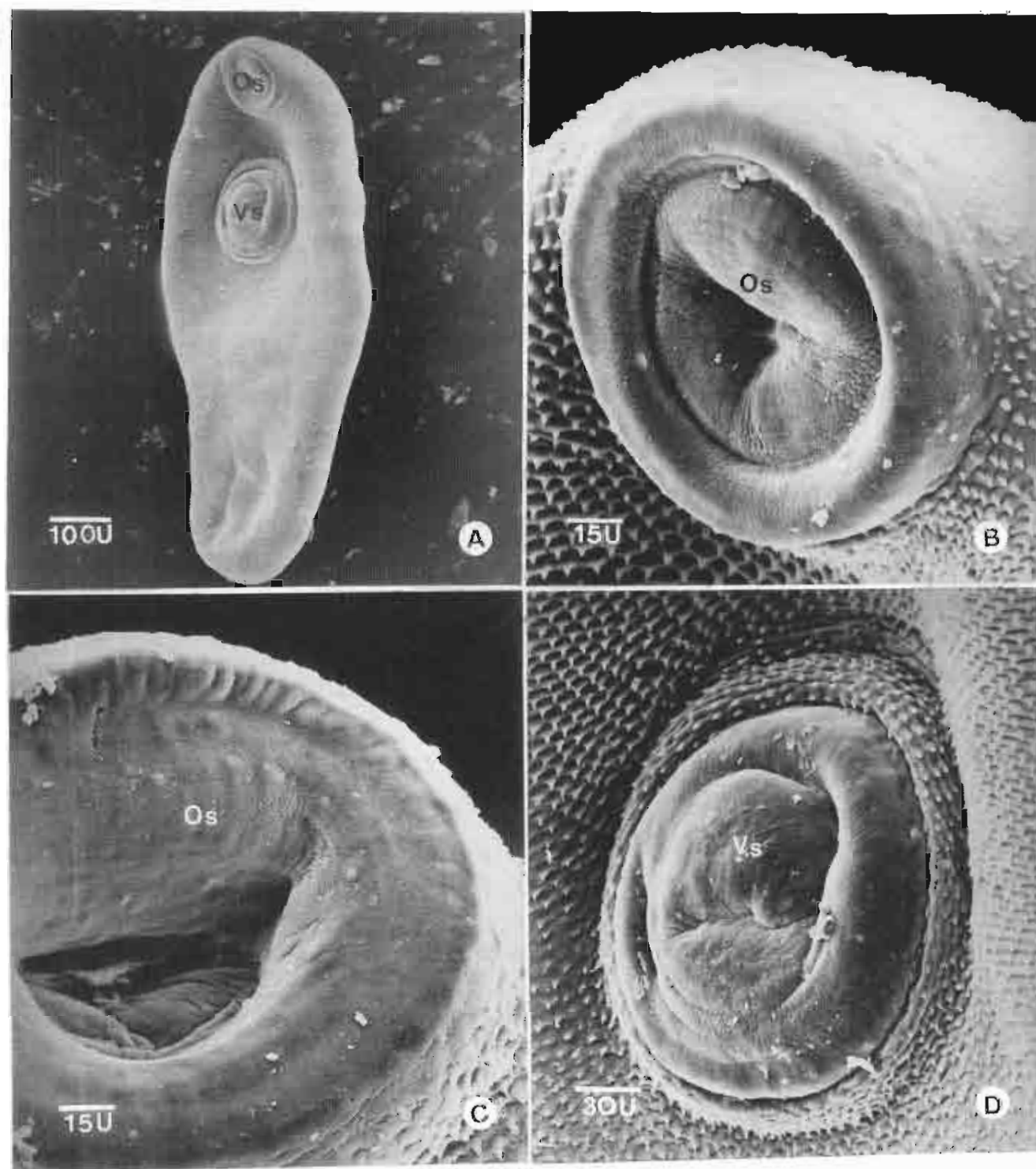


Figure 123

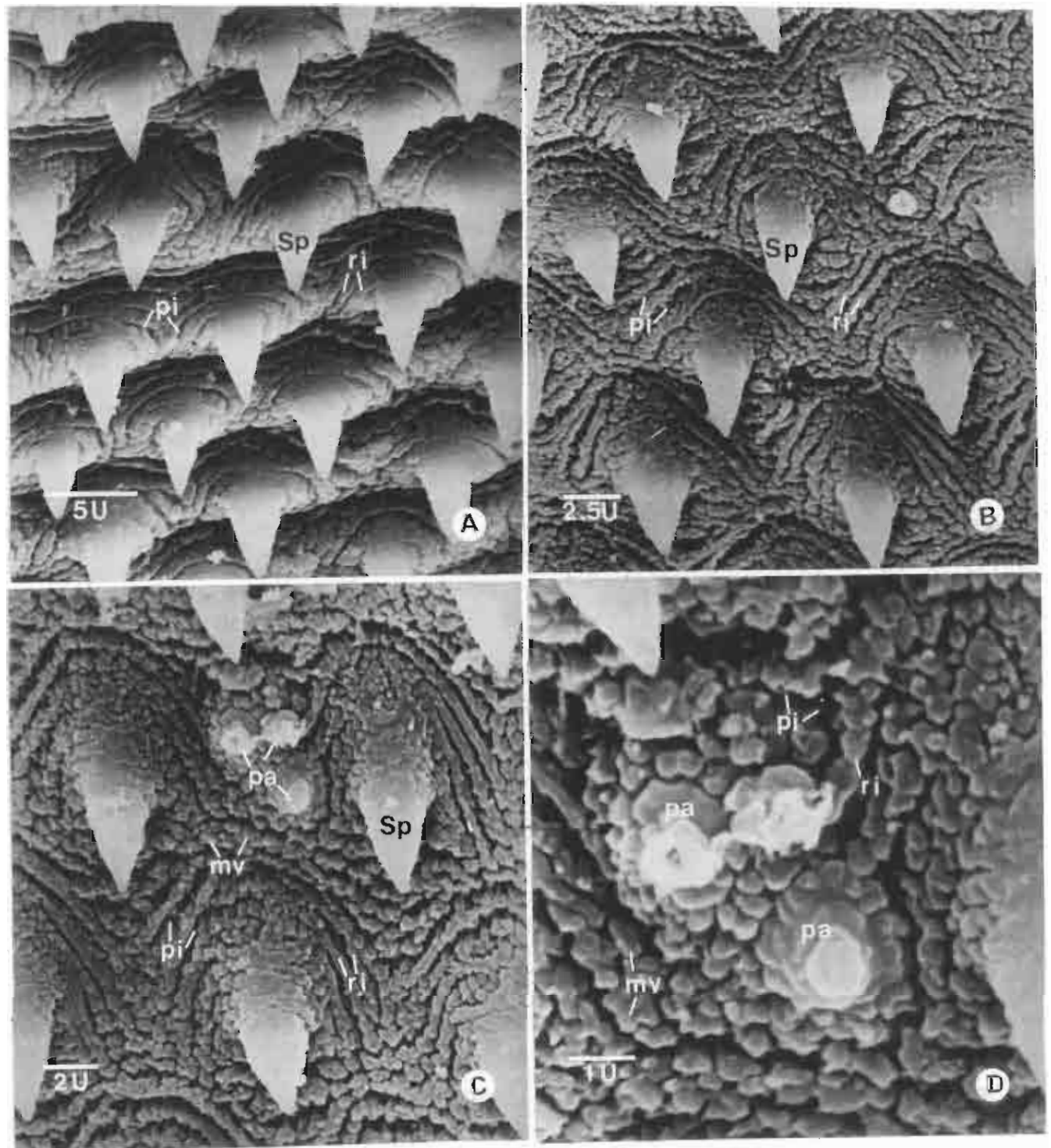


Figure 124

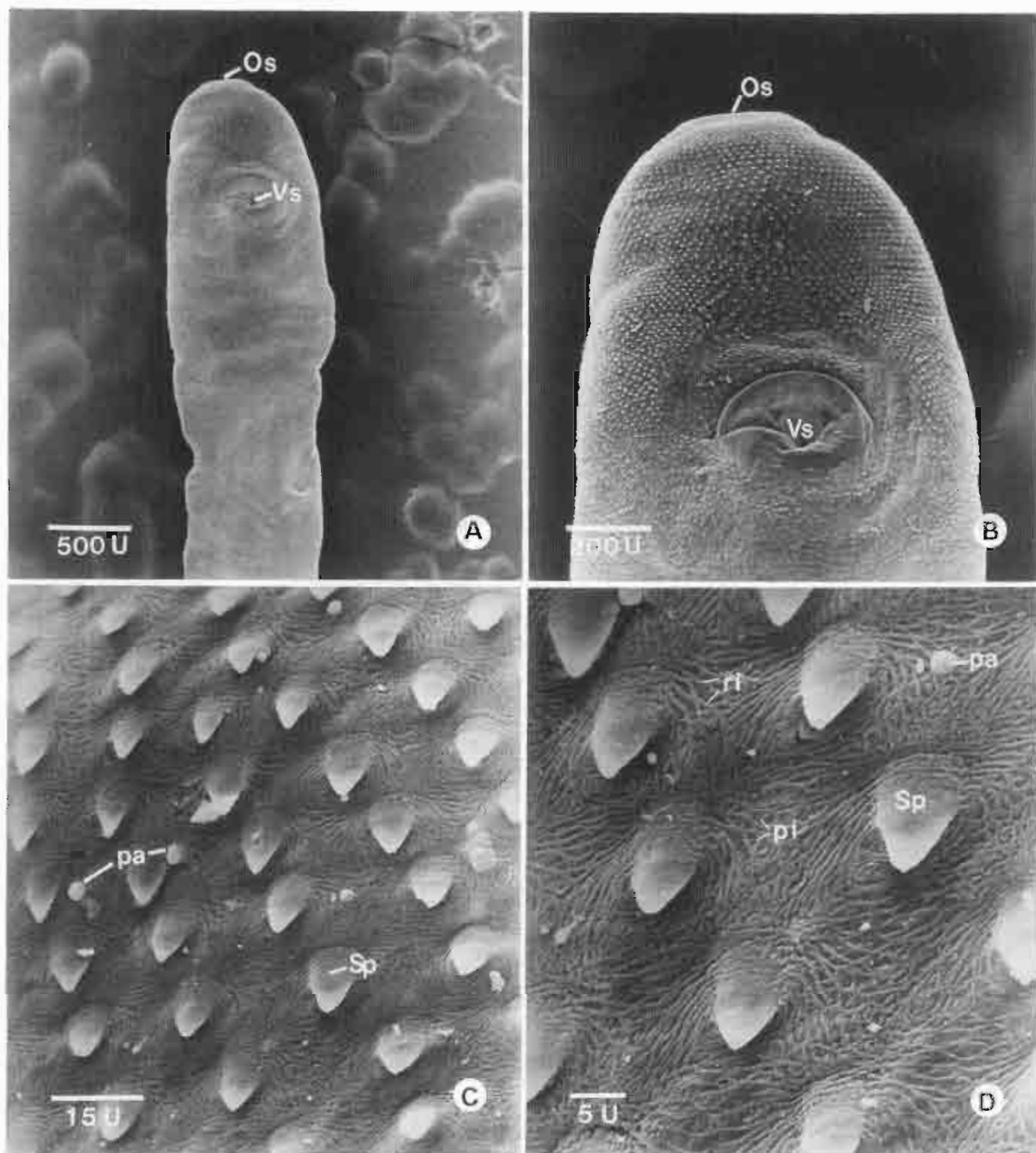
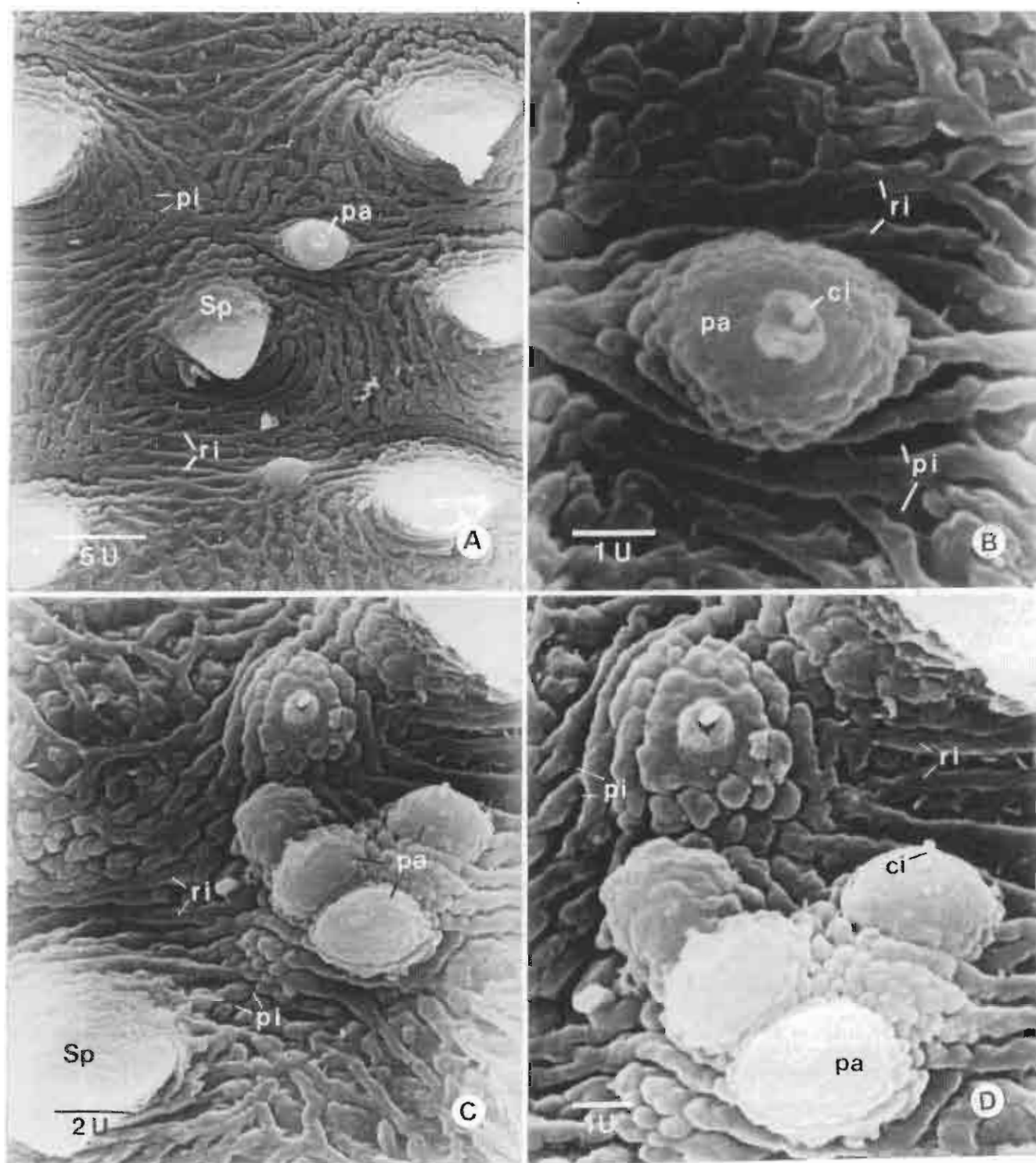


Figure 125



2.3.2 การศึกษาโครงสร้างละเอียดของชั้นผิว (tegument) ของพยาธิด้วยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ transmission electron microscope (TEM)

พยาธิตัวเต็มวัย

เมื่อตรวจดูโครงสร้างละเอียดของชั้นผิวของพยาธิตัวเต็มวัยด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope-TEM) จะเห็นว่าชั้นผิวมีลักษณะที่แบ่งได้เป็นสี่ชั้นย่อย (รูปที่ 126 A,B) คือชั้นย่อยที่ 1 หรือชั้นบน (apical layer) มีลักษณะคล้ายไมโครวิลไล (microvilli) ซึ่งที่จริงก็คือส่วนตัดขวางของ ridges ที่สังเกตเห็นได้ในกล้อง SEM ที่ได้กล่าวแล้ว ได้ชั้นไมโครวิลไลเป็นชั้นย่อยที่สองซึ่งมีแกรนูล (granules) หรือ tegumental bodies สะสมอยู่จำนวนมากและมีก้อนไลโซโซม (lysosome) กระจายอยู่ทั่วไป ชั้นนี้มีไมโทคอนเดรียอยู่เพียงเล็กน้อย ชั้นย่อยที่สามเป็นชั้นกลาง (middle layer) ที่หนาที่สุด มีเนื้อไซโตพลาสซึมแน่นทึบและมีไมโทคอนเดรีย จำนวนมากกระจายอยู่อย่างสม่ำเสมอ ชั้นย่อยที่สี่หรือชั้นฐาน (basal layer) ซึ่งมีการเว้าของเยื่อหุ้มด้านฐานเป็นรอยหยักลึก (infoldings) เข้าไปในชั้นผิวจำนวนมาก มีลักษณะคล้ายหลอดหรือแถบที่มีช่องว่างระหว่างเยื่อที่หยักเข้าไป นอกจากนี้ยังมีไมโทคอนเดรียจำนวนมากแทรกอยู่ระหว่าง infoldings เหล่านี้ ได้จากชั้นย่อยที่ 4 คือชั้นรองรับชั้นผิวได้แก่แถบ basal lamina เป็นแนวบาง ๆ ที่มีเนื้อละเอียดและชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (reticular lamina) ซึ่งหนากว่ามาก และมีใยเยื่อเกี่ยวพันเรียงกันอยู่แน่น ได้ชั้น reticular lamina คือชั้นกล้ามเนื้อวงแหวนและชั้นกล้ามเนื้อตามยาว (รูปที่ 126B, C)

เมื่อสังเกตดูชั้นย่อยที่ 1 และ 2 ด้วย TEM กำลังขยายสูง (รูปที่ 127A-C; 128A-E) พบว่าเยื่อหุ้มผิวด้านนอกมีลักษณะเป็นสามแถบ (trilaminar) ซึ่งมีชั้นไกลโคคาลิกซ์ (glycocalyx) บาง ๆ เคลือบอยู่ (รูปที่ 127C; 128D, E) ได้เยื่อหุ้มผิวมีแกรนูล (granules) หรือก้อน tegumental bodies อยู่สองแบบคือแบบที่หนึ่งเป็นก้อนที่มีเยื่อหุ้มและมีรูปร่างกลม (spherical bodies) เรียกว่าแบบ G₁ ซึ่งมีเนื้อลักษณะทึบแบบที่สองมีรูปร่างคล้ายจาน (discoid bodies) เรียกว่า G₂ ซึ่งมีเยื่อหุ้มคล้ายกับเยื่อหุ้มผิวและเนื้อใน (matrix) มีลักษณะใส มีแกรนูลแบบ G₁ จำนวนมากกระจายอยู่ทั่วไปในไมโครวิลไลและในชั้นที่สองของชั้นผิว และมี G₂ แกรนูลอีกจำนวนมากที่เชื่อมต่อกับเยื่อหุ้มผิวด้านนอก (รูปที่ 127C) ดังนั้นจึงเชื่อว่า G₂ คงเป็นส่วนของเยื่อหุ้มที่สร้างขึ้นใหม่เพื่อทดแทนเยื่อหุ้มเก่าที่สลายตัวอยู่เรื่อย ๆ และถูกปล่อยออกไปจากผิวพยาธิ ส่วนแกรนูลแบบ G₁ มักจะคงอยู่ใต้ชั้นไมโครวิลไลปะปนกับแกรนูล G₂ และ lysosome มีแกรนูลแบบ G₁ จำนวนไม่น้อยที่เชื่อมต่อกับเยื่อหุ้มชั้นนอก (รูปที่ 128A-C) และอาจจะปล่อยสารในถุงออกไปเป็นชั้น glycocalyx เคลือบด้านนอกของเยื่อหุ้ม (รูปที่ 128D, E) ดังนั้นจึงสันนิษฐานว่าแกรนูลหรือ tegumental bodies ทั้งสองชนิดนี้เป็นตัวกลางที่นำสารจากตัวเซลล์บุผิว (tegument cells) มาสร้างเป็นเยื่อหุ้มผิวและชั้นเคลือบเยื่อหุ้มผิวหรือ glycocalyx ซึ่งเมื่อทำหน้าที่ต่อไประยะหนึ่งแล้วก็จะสลายตัวและหลุดลอกออกไปเป็นส่วนหนึ่งของ ES แอนติเจนที่มาจากชั้นผิว กระบวนการสร้างและทดแทนเยื่อหุ้มชั้นผิวดังกล่าวสรุปไว้ในรูปที่ 131

ชั้นย่อยที่ 3 หรือชั้นกลาง (middle layer) ของชั้นผิว (รูปที่ 126A, B) มีลักษณะเป็นเนื้อแน่นทึบมีไมโทคอนเดรียจำนวนมากกระจายอยู่ทั่วไปอย่างสม่ำเสมอ ระหว่างไมโทคอนเดรีย มี G_1 และ G_2 แกรนูลปะปนกันอยู่มาก โดยเฉพาะ G_2 มีจำนวนมากและสังเกตเห็นได้เด่นชัด เมื่อตรวจดูด้วยกล้อง TEM กำลังขยายสูง เนื้อของชั้นกลางประกอบด้วยจุดดำเล็ก ๆ ซึ่งน่าจะเป็นส่วนตัดขวางของเส้นใยขนาดเล็กสานกันไปมาเป็นร่างแหทึบซึ่งเป็นส่วนประกอบของไซโตสเกเลตัน (cytoskeleton) ของชั้นผิว

ชั้นย่อยที่ 4 หรือชั้นฐานของชั้นผิว (basal layer) (รูปที่ 126B, C) มี basal membrane infoldings จำนวนมากเรียงติดกันอยู่เป็นแถบ เยื่อ basal membrane และ infoldings มีลักษณะ trilaminar และภายในช่องของ infoldings มีเนื้อละเอียดของชั้น basal lamina อัดตามเข้าไปด้วย ระหว่าง infoldings มีไมโทคอนเดรียและ G_1 แกรนูลกระจายอยู่เป็นจำนวนมาก แต่มี G_2 แกรนูลอยู่เป็นจำนวนน้อยเมื่อเทียบกับส่วนอื่น

ใต้ชั้นฐานของผิว คือชั้น basal lamina ซึ่งเป็นแผ่นบางมีเนื้อละเอียด และชั้น reticular lamina ซึ่งเป็นแผ่นหนาและมีเส้นของเยื่อเกี่ยวพันสานกันไปมาก่อนข้างแน่น (รูปที่ 126C; 129F) ในชั้น reticular lamina มีกิ่งของเซลล์ผิว (tegumental cells) วิ่งผ่านออกไปเชื่อมกับชั้นผิว ภายในกิ่งเหล่านี้มักมีทั้ง G_1 และ G_2 แกรนูลเกาะอยู่บนหลอด microtubules ที่ทอดขึ้นไปสู่ชั้นผิว (รูปที่ 126C)

หนามในชั้นผิวมีปลายแหลม และมีฐานกว้างที่แตกออกเป็นแถบเล็ก ๆ ฝังแน่นใน basal lamina (รูปที่ 129A-E) เนื้อของหนามประกอบด้วยสารที่มีการเรียงตัวเป็นแบบผลึก (crystal lattice) (รูปที่ 129D) รอบ ๆ หนามมี G_1 และ G_2 แกรนูล และไมโทคอนเดรียอยู่จำนวนมาก หนามมีขอบเขตที่แยกได้อย่างชัดเจนจากเนื้อของชั้นผิว (รูปที่ 129C, E)

เซลล์ของชั้นผิว (tegumental cells - Tc) แทรกอยู่ใต้ชั้นกล้ามเนื้อ (รูปที่ 130A-D) เซลล์ดังกล่าวอาจมี 2 ชนิดคือ แบบ Tc_1 มีนิวเคลียสโปร่งใสประกอบด้วย euchromatin เป็นส่วนใหญ่และมีนิวคลีโอลัสที่เด่น ไซโตพลาสซึมมี rough endoplasmic reticulum (RER) เรียงอยู่เป็นหย่อม ๆ และไรโบโซมกระจายอยู่ทั่วไปและมีไมโทคอนเดรียอยู่จำนวนมากอัดกันอยู่แน่นจนทำให้ไซโตพลาสซึมดูทึบแสง (รูปที่ 130A-C) นอกจากนี้ยังมี G_1 แกรนูล รวมตัวเป็นกลุ่ม ๆ อยู่อย่างหนาแน่นโดยเฉพาะบริเวณรอบ ๆ Golgi complex ส่วนเซลล์ประเภทที่สอง (Tc_2) มีนิวเคลียสสีเข้มคล้ายกับ Tc_1 แต่มีนิวคลีโอลัสใหญ่และเด่นมาก (รูปที่ 130C, D) ไซโตพลาสซึมมี RER และ Golgi complex อยู่จำนวนมากแต่มีไมโทคอนเดรียน้อยกว่า Tc_1 จึงทำให้ดูใสกว่า ภายในมีก้อน G_2 สะสมอยู่จำนวนมาก (รูปที่ 130D) ดังนั้นจึงสันนิษฐานว่าเซลล์ทั้งสองชนิดทำหน้าที่สร้าง tegumental bodies ทั้งสองแบบที่ถูกส่งต่อไปยังชั้นผิวโดยผ่านทางกิ่งไซโตพลาสซึมของมันที่แทรกอยู่ทั่วไปในชั้น reticular lamina และยื่นออกไปเชื่อมกับชั้นฐานของผิวโดยอาจมีเซลล์ Tc_2 มากกว่า Tc_1 ในพยาธิตัวเต็มวัย และอาจสรุปได้ว่าแหล่งสร้างแอนติเจนที่สำคัญแหล่งหนึ่ง คือ เซลล์ผิว (tegumental cells) ซึ่งทำหน้าที่สร้าง tegumental bodies ทั้งสองแบบที่ทยอยออกไปสู่ชั้น

ผิวแล้วกลายไปเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มผิวที่หลุดออกไปสู่เลือดของโฮสต์ (ดูรูปที่ 131 A, B สรุปหลักการสร้างและทดแทนเยื่อหุ้มผิว)

ได้ชั้น reticular lamina คือชั้นกล้ามเนื้อซึ่งมี 2 ชั้นย่อย (รูปที่ 126C; 129F) คือ ชั้นกล้ามเนื้อวงแหวน (circular muscles) และชั้นกล้ามเนื้อตามยาว (longitudinal muscle) เซลล์กล้ามเนื้อแต่ละเซลล์มีลักษณะยาวคล้ายกระสวยเรียงซ้อนกัน ปลายของเซลล์กล้ามเนื้อแตกออกเป็นแฉกหลายแฉก ซึ่งสานกับเซลล์กล้ามเนื้อข้างเคียง เนื่องจากพยาธิไม่มีโครงกระดูก การสานกันของเซลล์กล้ามเนื้อจึงช่วยให้เซลล์ยึดต่อกันได้ และช่วยให้พยาธิหดตัวได้ เส้นใยในเซลล์กล้ามเนื้อมีการเรียงตัวคล้าย ๆ กล้ามเนื้อลาย (striated muscle) ของสัตว์ชั้นสูง ซึ่งประกอบด้วย thick และ thin filaments การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่ากล้ามเนื้อของพยาธิมีโปรตีนพาราไมโอซิน (paramyosin) เป็นแกนกลางของ thick filament และ paramyosin ก็เป็นโปรตีนที่มีเฉพาะใน invertebrate muscle ในการทดลองที่ใช้ MoAb ต่อ paramyosin วิเคราะห์การกระจายของโปรตีนชนิดนี้ในพยาธิ ตัวเต็มวัย เราพบว่านอกจากในเซลล์กล้ามเนื้อตามยาวที่ต่าง ๆ แล้วยังพบพาราไมโอซิน เป็นแถบบาง ๆ ได้ชั้นเยื่อหุ้มผิว นอกจากนั้นแล้วยังมีผู้พบพาราไมโอซินในชั้นผิวของพยาธิ helminth ชนิดอื่นด้วย เช่น schistosomes จึงแสดงว่าพาราไมโอซินอาจจะเป็นโปรตีนสำคัญที่เป็นส่วนหนึ่งของไซโตสเกเลตัน (cytoskeleton) ของชั้นผิว ในพยาธิตัวแก่และพยาธิที่ถึงอายุขัยแล้วคงจะมีบางส่วนของชั้นผิวหรือแม้กระทั่งชั้นกล้ามเนื้อที่หลุดลอกออกไป นอกจากชั้นเยื่อหุ้มผิวซึ่งหลุดออกไปอย่างต่อเนื่องอยู่แล้ว ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าโปรตีนของไซโตสเกเลตัน รวมทั้งพาราไมโอซิน อาจจะเป็นแอนติเจนที่สำคัญอีกกลุ่มหนึ่งที่ถูกละลายออกจากตัวพยาธิ ถึงแม้จะไม่เด่นเท่ากับโปรตีนจากชั้นผิวและเยื่อหุ้มผิว

ระยะ metacercaria และ newly excysted juvenile (NEJ)

ชั้นผิว (tegument) มีความหนาประมาณ $1.6 \mu\text{m}$ ซึ่งบางกว่าชั้นผิวของตัวเต็มวัยหลายเท่า และมีความหนาแบบปลายเคียวจำนวนมากฝังตัวอยู่ เนื้อของหนามมีลักษณะเป็น crystal lattice ไซโตพลาสซึมระหว่างหนามมีแกรนูลสะสมอยู่จำนวนมากโดยปรากฏว่ามีแกรนูลอยู่ 2 ชนิดคือ แบบ G_0 มีลักษณะคล้ายลูกรีกับขนาดประมาณ $60 \times 200 \text{ nm}$ มีเนื้อแน่นและที่บวมแสงอิเล็กตรอน แกรนูลชนิดนี้มีจำนวนมากที่สุด แกรนูลแบบที่สองคือ G_1 มีลักษณะเป็นรูปจานแบนยาวขนาดประมาณ $5-10 \times 150 \text{ nm}$ G_1 มักจะเรียงตัวเป็นแนวอยู่ใต้ชั้นผิว และเมื่อเทียบกับ G_0 แล้วมีจำนวนน้อยกว่า โดยคิดเป็นอัตราส่วนประมาณ 1 ต่อ 2 ภายในชั้นผิวมีไมโทคอนเดรียอยู่น้อยมากเมื่อเทียบกับระยะตัวเต็มวัย (รูปที่ 132A, B)

ระยะตัวอ่อนอายุ 7 สัปดาห์

ชั้นผิวมีความหนามากขึ้นเมื่อเทียบกับระยะ metacercaria และระยะ NEJ โดยมีความหนาประมาณ $3 \mu\text{m}$ แต่ยังบางกว่าในระยะตัวเต็มวัยซึ่งชั้นผิวหนาประมาณ $15-20 \mu\text{m}$ ที่ผิวปรากฏเป็นร่องหยักไปมา (ridges) จำนวนมากขึ้น และส่วนกลางของไซโตพลาสซึมของชั้นผิวมีไมโทคอนเดรียจำนวน

มากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด แกรนูลแบบ G_0 มีจำนวนลดน้อยลงในขณะที่มีแกรนูลแบบ G_1 ซึ่งมีรูปร่างทรงกลม ขนาดประมาณ 150 nm เกิดขึ้นแต่ยังมีจำนวนไม่มากนัก แกรนูล G_1 มีเนื้อที่บ่งแสงอิเล็กทรอนิกส์แต่มีลักษณะพรุนกว่าเนื้อของแกรนูลแบบ G_0 ที่พบในระยะ metacercaria และ NEJ การเปลี่ยนแปลงอย่างอื่นที่สังเกตเห็นได้ชัดเจนอีกประการคือการเพิ่มจำนวนของแกรนูลแบบ G_2 ซึ่งเพิ่มขึ้นมากเมื่อเทียบกับระยะ metacercaria และ NEJ (รูปที่ 132C, D)

ระยะตัวอ่อนอายุ 10-11 สัปดาห์

ชั้นผิวหนังตัวอ่อนอย่างเห็นได้ชัดโดยมีความหนาประมาณ $8.5 \mu\text{m}$ ด้านขอบนอกหักไปมาเนื่องจากมี ridges จำนวนมากเกิดขึ้นจึงทำให้พื้นที่ของชั้นผิวเพิ่มปริมาณขึ้นหลายเท่า (รูปที่ 133A, B) ด้านขอบในที่ติดกับชั้น basement membrane เริ่มปรากฏเป็นรอยพรุนมากขึ้นเนื่องจากมี infoldings ของเยื่อหุ้มผิวด้านฐาน (basal plasma membrane) จำนวนมาก (รูปที่ 133C) บริเวณส่วนกลางของไซโตพลาสซึมของชั้นผิวก็มีไมโทคอนเดรียจำนวนมากขึ้นด้วย โดยมีแกรนูลทั้งแบบ G_1 และ G_2 แทรกอยู่ทั่วไประหว่างไมโทคอนเดรีย (รูปที่ 134C) แกรนูลที่บริเวณขอบนอกของชั้นผิวส่วนใหญ่ประกอบด้วยแบบ G_1 และ G_2 โดย G_2 มีจำนวนมากกว่า G_1 และมักจะกระจายตัวอยู่ใต้เยื่อหุ้มผิวด้านบน (apical plasma membrane) (รูปที่ 134A, B) ในบางบริเวณอาจสังเกตเห็นการเชื่อมของแกรนูล G_1 และ G_2 กับเยื่อหุ้มผิวด้านบน (รูปที่ 133A, B; 134A, B)

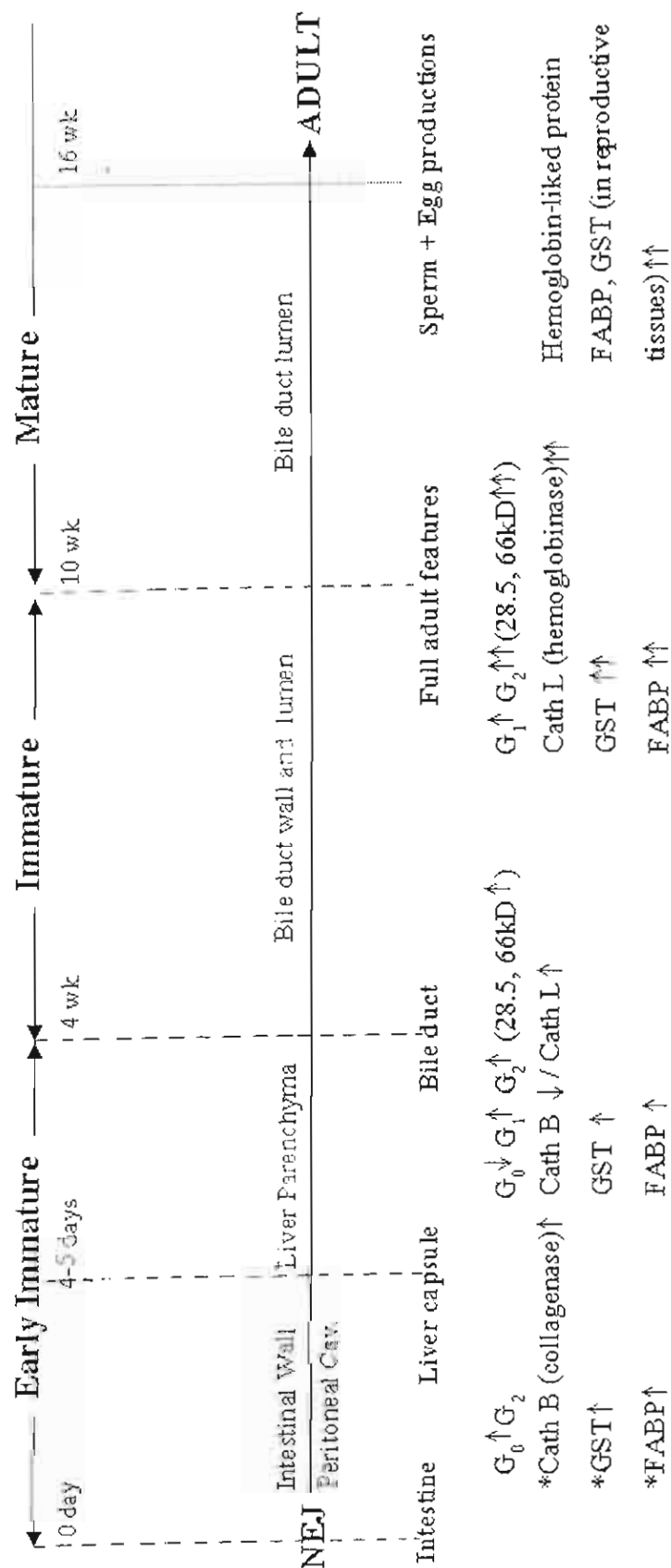
ชั้นกล้ามเนื้อรองผิว (subtegumental muscle) มีความหนาขึ้นมาก (รูปที่ 133C) และได้ชั้นกล้ามเนื้อที่มีเซลล์ผิว (tegument cells) เรียงตัวอยู่เป็นแถว เซลล์เหล่านี้มีจำนวนมากขึ้นเมื่อเทียบกับในระยะ metacercaria และ NEJ ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ผิวมีแกรนูลอัดอยู่เต็มและมีจำนวนมากกว่าที่พบในเซลล์ผิวของระยะตัวเต็มวัย (รูปที่ 135A-C) โดยส่วนใหญ่จะเป็นแกรนูลแบบ G_2 ส่วนแกรนูลแบบ G_1 มีปริมาณน้อยกว่าแต่ก็ปรากฏในเซลล์เดียวกับที่ผลิตแกรนูลแบบ G_2 (รูปที่ 135C, D) นอกจากนั้นแล้วไซโตพลาสซึมของเซลล์ผิวยังมีไมโทคอนเดรียอยู่จำนวนมากและมี Golgi complex และ rough endoplasmic reticulum ที่พัฒนาเต็มที่ ดังนั้นเซลล์ผิวจึงอยู่ในช่วงที่มีการผลิตแกรนูลในอัตราสูง (active secretory phase)

แกรนูลทั้งสองชนิดที่ผลิตจากเซลล์ผิวเซลล์เดียวกันจะถูกส่งไปตามกิ่งของเซลล์ที่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อเนื้อออกไปเชื่อมกับชั้นผิว (รูปที่ 135D) โดยแกรนูลทั้งสองแบบจะถูกส่งผ่านออกไปสะสมอยู่ที่ขอบนอกของชั้นผิว ซึ่งในที่สุดก็จะกลายไปเป็นส่วนของเยื่อหุ้มผิวด้านบนซึ่งมีการเพิ่มพื้นที่ผิวในอัตราสูงต่อไป เมื่อเปรียบเทียบกับในตัวเต็มวัยซึ่งเซลล์ผิวมี 2 ชนิดที่ผลิตเฉพาะ G_1 หรือ G_2 ก็เป็นไปได้ว่าในระยะตัวอ่อนที่กำลังพัฒนาเซลล์ผิวสามารถผลิตแกรนูลทั้งสองแบบในเซลล์เดียวกันได้ แต่เมื่อพยาธิพัฒนามากขึ้นจะเกิดการปรับสภาพของเซลล์เป็นสองชนิด โดยเน้นที่การผลิตแกรนูลแบบใดแบบหนึ่งเท่านั้น แต่ทั้งนี้ในตัวเต็มวัยก็มีเซลล์ส่วนน้อยที่ยังคงผลิตแกรนูลทั้งสองแบบอยู่

จากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างละเอียดของชั้นผิวในระยะ metacercaria NEJ และระยะตัวอ่อนที่กำลังพัฒนาจึงสรุปได้ว่า (ตารางที่ 13) ในระยะแรกชั้นผิวมีแกรนูลแบบ G_0 จำนวนมาก

เนื่องจากพยาธิต้องการสาร glyocalyx ที่หนาเพื่อเคลือบด้านนอกของเยื่อหุ้มผิวในปริมาณสูงเพื่อป้องกันการเกาะติดและการทำลายพยาธิโดยเซลล์สร้างภูมิคุ้มกันของโฮสต์ (host's immune effector cells) ในขณะที่พยาธิกำลังไชผ่านลำไส้และเคลื่อนผ่านช่องท้องของโฮสต์เพื่อไปสู่ตับ เมื่อพยาธิเข้าไปในเนื้อตับ โดยเฉพาะเมื่อเข้าไปอยู่ในท่อน้ำดีแล้วอาจจะมีจำนวน immune effector cells เข้ามาปะทะน้อยลงพยาธิจึงมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของชั้นผิว โดยมีการเพิ่มพื้นที่ผิวขึ้นอีกหลายเท่าเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซึมสารอาหารและเนื่องจากสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปคือถูกล้อมรอบด้วยน้ำดีซึ่งมีฤทธิ์เป็น detergent ชั้นผิวจึงอาจปรับบทบาทการเลี้ยงภูมิคุ้มกันและการป้องกันอันตรายจากฤทธิ์ของน้ำดีด้วยกลไกการหลุดลอกและแทนที่ (turn over) ของเยื่อหุ้มผิวด้านนอกมากขึ้น จึงทำให้มีความต้องการแกรนูลแบบ G_2 ซึ่งเป็นแกรนูลที่ผลิตขึ้นส่วนเยื่อหุ้ม (plasma membrane) มากขึ้น แต่มีความต้องการสารเคลือบผิวน้อยลง ชั้นเคลือบผิว (glyocalyx) จึงบางลงซึ่งสามารถแสดงด้วยการย้อมด้วยสาร ruthenium red และสาร lectin ที่สามารถเกาะติดกับ glycoproteins ที่ประกอบเป็นชั้นผิวซึ่งมีปริมาณลดน้อยลงด้วย นอกจากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพแล้ว แอนติเจนที่สำคัญดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 2.2 มีการเปลี่ยนแปลงเชิงปริมาณด้วย เช่น โมเลกุลที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มที่ 66 และ 28.5 kD มีปริมาณมากขึ้นพร้อมกับ granules แบบ G_2 , FABP และ GST ก็มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นขณะที่พยาธิเจริญเติบโต จนกระทั่งมีปริมาณสูงสุดในตัวเต็มวัย ส่วน Cath L ยังไม่แสดงออกในเมตาเซอร์คาเรียแต่มีมากขึ้นหลังจากพยาธิเข้าสู่เนื้อตับและเพิ่มปริมาณสูงสุดในตัวเต็มวัย (ดูตารางที่ 13)

Table 13 Developmental stages of *F. gigantica* and levels of target molecules for immunological intervention



G0, G1, G2 - type of tegumental granules produced at various stages of the life cycle

*The rising ($\uparrow$) or falling ($\downarrow$) levels of these target antigens have been determined in *Fasciola hepatica*

(Spithill, 1999, Piedrafita et al., 2000) and partly in *F. gigantica* by our group (unpublished data-also see table 12)

รูปที่ 126 A, B) ภาพ TEM กำลังขยายต่ำแสดงชั้นผิว (tegument) ซึ่งแบ่งตามลักษณะโครงสร้างละเอียดออกได้เป็น 4 ชั้นย่อย (1, 2, 3, 4) สังเกตส่วนตัดขวางของ ridge (ri) และ pit (pi) ในชั้นย่อยที่ 1 ซึ่งมีแกรนูล (Gr) สะสมอยู่เป็นจำนวนมาก มีก้อน Lysosome (Ly) จำนวนมากอยู่ในชั้นที่ 2 ไมโทคอนเดรียอยู่ในชั้นที่ 3 basal plasma membrane infoldings อยู่ในชั้นที่ 4

C) ภาพของชั้นรองรับชั้นผิวซึ่งประกอบด้วย basal (ba) กับ reticular (RI) lamina และชั้นกล้ามเนื้อ (Mu) ของผนังลำตัวที่ถูกแทรกผ่านด้วยกิ่งของเซลล์ผิว (Pc)

รูปที่ 127 A, B) ภาพ TEM ขยายใหญ่ของชั้นที่ 2 แสดงแกรนูลแบบ G_2 ที่สะสมกันอยู่อย่างหนาแน่น และแบบ G_1 ที่มีจำนวนน้อยกว่า G_2 แกรนูลแบบ G_1 ส่วนมากมีเนื้อสม่ำเสมอและแน่นทึบ ส่วน G_1 บางก้อนมีเนื้อที่มีลักษณะเป็นขุย (G_1') G_2 มีรูปร่างคล้ายลูก dumbbell และมีเนื้อโปร่งล้อมรอบด้วยเยื่อที่มีแถบดำหนาเคลือบ (B)

C) ภาพขยายใหญ่ของ ridge แสดง trilaminate surface membrane (sm) เคลือบด้วยชั้น glycocalyx บาง ๆ (Gy) และมีแกรนูลแบบ G_2 อยู่ชิดหรือเชื่อมกับเยื่อหุ้ม (ลูกศร)

รูปที่ 128 A-C) ภาพตัดขวางของ ridge (ri) และ pit (pi) ของชั้นผิวภายนอกที่ย้อมด้วย ruthenium red (A) ที่ counter-stained โดย lead citrate และ uranyl acetate (B, C) แสดงชั้น glycocalyx ที่เข้มข้น (Gy) เคลือบขอบเยื่อหุ้ม ridges (ri) และ pit (pi) แกรนูลแบบ G_1 อยู่ใกล้หรือเชื่อมกับเยื่อหุ้ม และปล่อยสารเคลือบออกไปรวมกับชั้น glycocalyx

D, E) ภาพขยายใหญ่ของ ridge (ri) และ pit (pi) แสดงชั้น glycocalyx ที่ไม่สม่ำเสมอและมีความหนาประมาณ 100- 300 nm เคลือบที่เยื่อหุ้มผิว (Sm) ซึ่งรองรับด้วยแผ่นบาง ๆ ที่ทึบแสงอิเล็กตรอน (DI)

รูปที่ 129 A, B) ภาพ TEM แสดงส่วนตัดขวางของหนาม (sp) ที่ถูกคลุมด้วยเยื่อหุ้มที่ปลายสุดและเนื้อไซโตพลาสซึมบาง ๆ ตามขอบ ซึ่งที่ผิวมีรอยหยักเข้าไปข้างใน (ลูกศร)

C-1.) ภาพส่วนกลางของหนามแสดงลักษณะการเรียงตัวเป็นแบบ crystalline lattice ที่มีระยะห่างระหว่าง lattice ประมาณ 4 nm ไซโตพลาสซึมข้าง ๆ หนามมีไมโทคอนเดรีย (mi) อยู่ตามขอบ

F) ฐานของหนามซึ่งแตกออกเป็นรากเล็ก ๆ (ลูกศร) ฝังตัวอยู่ในชั้น basal lamina (Ba)

รูปที่ 130 A, C) ภาพ TEM แสดงเซลล์ของชั้นผิว (tegument cell) 2 แบบ (Tc_1 , Tc_2) Tc_1 มีนิวเคลียส (Nu) ที่ประกอบด้วย euchromatin และไซโตพลาสซึมที่แน่นทึบเนื่องจากมีไมโทคอนเดรีย (Mi) และ rough endoplasmic reticulum (rer) อยู่แน่นมาก Tc_2 สร้าง G_1 แกรนูลที่มีกระจายอยู่รอบ ๆ Golgi complex (ภาพ B)

D) เซลล์ Tc_2 มีไซโตพลาสซึมที่โปร่งแสงมากกว่า Tc_1 เนื่องจากมีไมโทคอนเดรียจำนวนน้อยกว่า แต่ก็ยังมี rough endoplasmic reticulum (rer) จำนวนมากและแกรนูลแบบ G_2 จำนวนมาก

กระจายอยู่ทั่วทั้งไซโตพลาสซึม นิวเคลียสประกอบด้วย euchromatin และ nucleolus (no) มีขนาดใหญ่

รูปที่ 131 A) ภาพวาดสรุปลักษณะโครงสร้างละเอียดของชั้นผิวพยาธิ *F. gigantea* ตัวเต็มวัยที่สังเกตเห็นได้ด้วยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ TEM

B) ภาพวาดแสดงชั้นย่อย 1 และ 2 แสดงการไหลออกไปเชื่อมกับเยื่อหุ้มด้านบน (apical surface membrane -pm) ของแกรนูลแบบ G_1 และ G_2 โดย G_1 กลายเป็นส่วนประกอบของ glycocalyx (Gy) G_2 กลายเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มผิว (pm) และ G_3 อาจจะเป็นแกรนูลที่กลายเป็นเนื้อ cytoskeleton ของชั้นผิว

รูปที่ 132 A, B) ภาพ TEM ของพยาธิ *F. gigantea* ระยะ newly excysted juveniles (NEJ) แสดง หนาม (Sp) แกรนูลแบบ G_0 ซึ่งมีรูปร่างคล้ายลูกรีบีขนาด 60x200 nm และมีเนื้อที่บ่งชี้แสงอิเล็กตรอน และแบบ G_2 ซึ่งมีรูปร่างคล้ายจาน ขนาด 5-10x150 nm (Mu=muscle, Mi=mitochondria)

C, D) ภาพ TEM ของพยาธิที่เก็บจากหนู rat หลังการติดเชื้อ 7 สัปดาห์ แสดงแกรนูล G_2 มีจำนวนมากขึ้น ส่วน G_0 มีจำนวนลดลง ในขณะที่ G_1 ซึ่งเป็นแกรนูลรูปร่างคล้าย G_0 แต่มีเนื้อพูนกว่า เริ่มปรากฏขึ้นในชั้นผิว ไมโทคอนเดรีย (Mi) มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นด้วย

รูปที่ 133 A, B) ภาพ TEM ของพยาธิที่เก็บจากหนูหลังจากการติดเชื้อ 10 สัปดาห์แสดงผิวที่หยักเป็น ridge (ri) กับ pit (pi) จำนวนมากภายในมีแกรนูล G_1 และ G_2 เพิ่มจำนวนขึ้นมาก ในขณะที่แกรนูลแบบ G_0 หายไปเกือบหมด แกรนูลทั้งแบบ G_1 และ G_2 เชื่อมเข้ากับเยื่อหุ้มผิวโดยวิธี exocytosis (ลูกศร)

C, D) ภาพ TEM กำลังขยายต่ำของพยาธิที่เก็บจากหนูอายุ 11 สัปดาห์ แสดงการหยักเว้าไปมาของชั้นผิวกลายเป็นสัน (ridge-ri) และร่อง (pit-pi) จำนวนมาก แกรนูลทั้งสองแบบ (G_1 , G_2) มีอยู่ในปริมาณสูงโดย G_2 มีปริมาณมากกว่า G_1 ชั้นผิวโดยทั่วไปมีลักษณะโครงสร้างละเอียดคล้ายกับชั้นผิวของพยาธิตัวเต็มวัย

รูปที่ 134 A, B) ภาพ TEM กำลังขยายสูงของพยาธิที่เก็บจากหนูหลังจากติดเชื้อ 11 สัปดาห์ แสดง ridges (ri) และ pits (pi) จำนวนมากที่ขอบนอกของชั้นผิว ภายในไซโตพลาสซึมมีแกรนูลแบบ G_1 และ G_2 อัดอยู่เต็ม โดยบางอันเปิดเชื่อมกับเยื่อหุ้มผิว (ลูกศร) G_2 มีจำนวนมากกว่า G_1

C, D) ภาพ TEM ของพยาธิอายุ 11 สัปดาห์ แสดงไมโทคอนเดรีย (Mi) จำนวนมากในบริเวณส่วนกลางของชั้นผิว (รูป C) และแสดงแกรนูล G_1 กับ G_2 จำนวนมากที่แทรกอยู่ระหว่าง ไมโทคอนเดรีย (รูป D)

รูปที่ 135 A-C) ภาพ TEM ของเซลล์ผิว (tegument cells) ของพยาธิอายุ 11 สัปดาห์ แสดงไซโตพลาสซึมรอบ ๆ นิวเคลียส (Nu) ที่บรรจุแกรนูลแบบ G_2 จำนวนมาก ไซโตพลาสซึมยังมีไมโทคอน-

เดรีย (Mi) และ rough endoplasmic reticulum (rer) จำนวนมากด้วย นอกจากแกรนูล G_2 แล้ว ยังมีแกรนูล G_1 อยู่ประปราย (รูป B, C) ในเซลล์ชนิดเดียวกัน

D) กิ่งของเซลล์ผิวที่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อ (Mu) แสดงทั้งแกรนูลแบบ G_1 และ G_2 อยู่ในกิ่งเดียวกัน

Figure 126

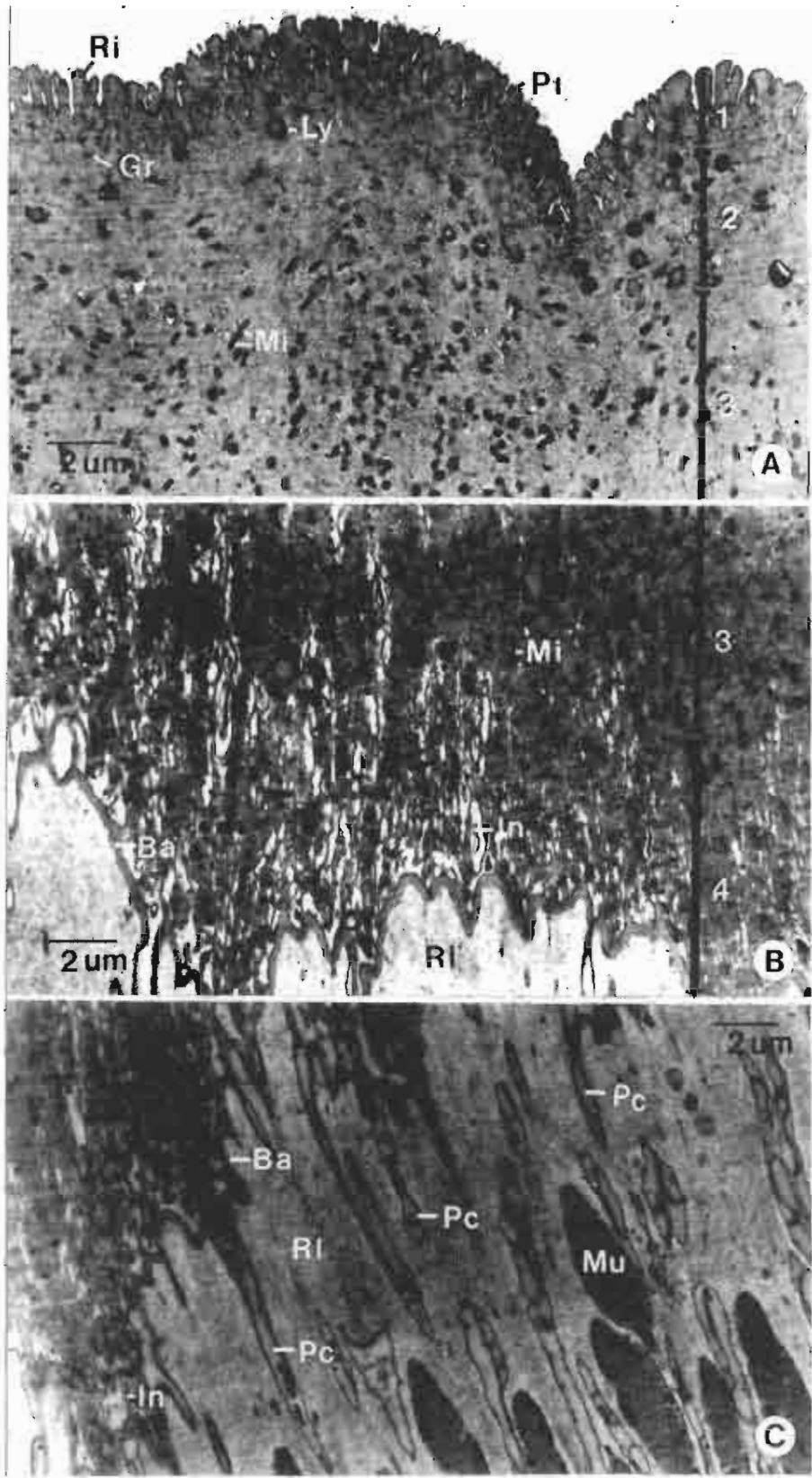


Figure 127

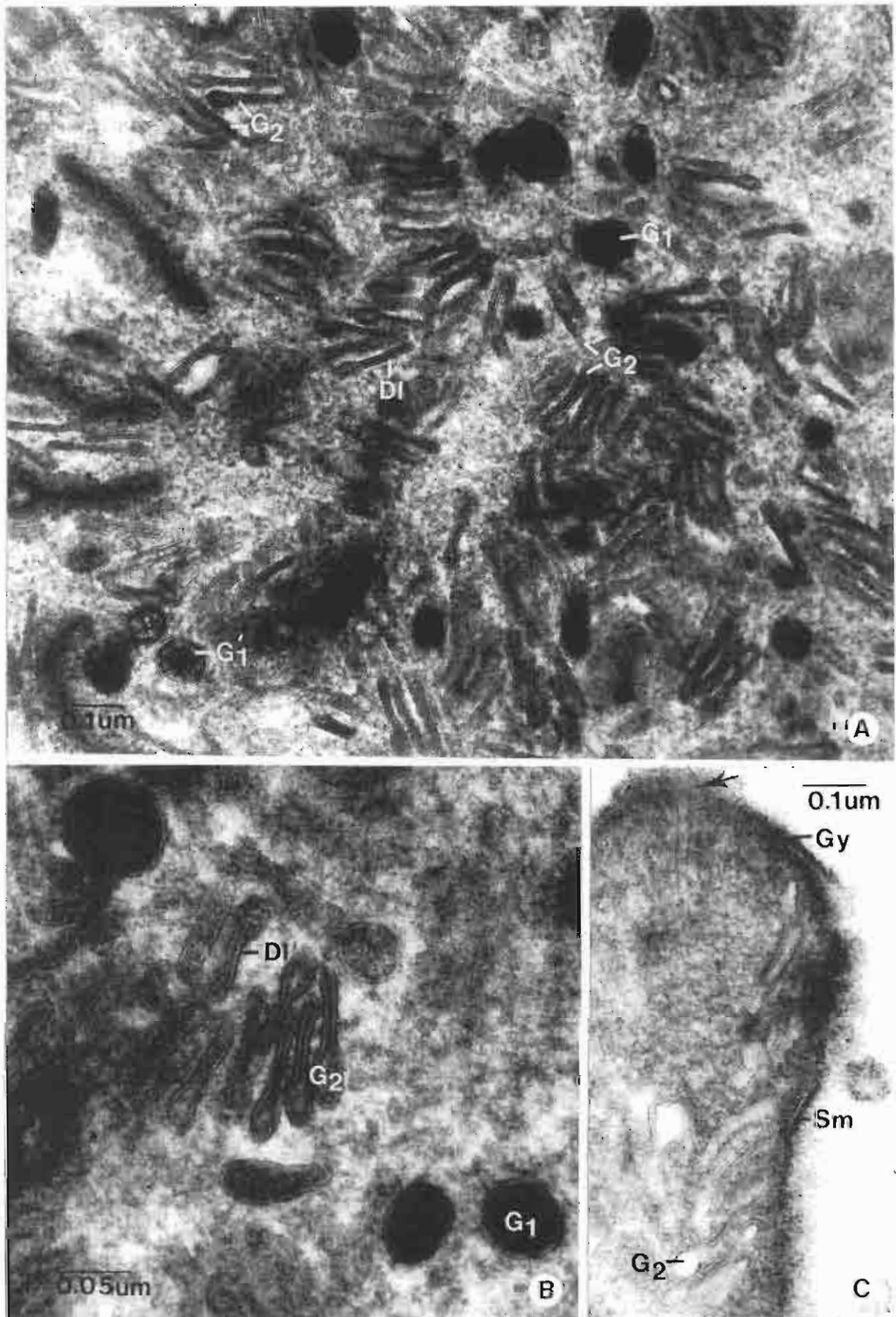


Figure 128

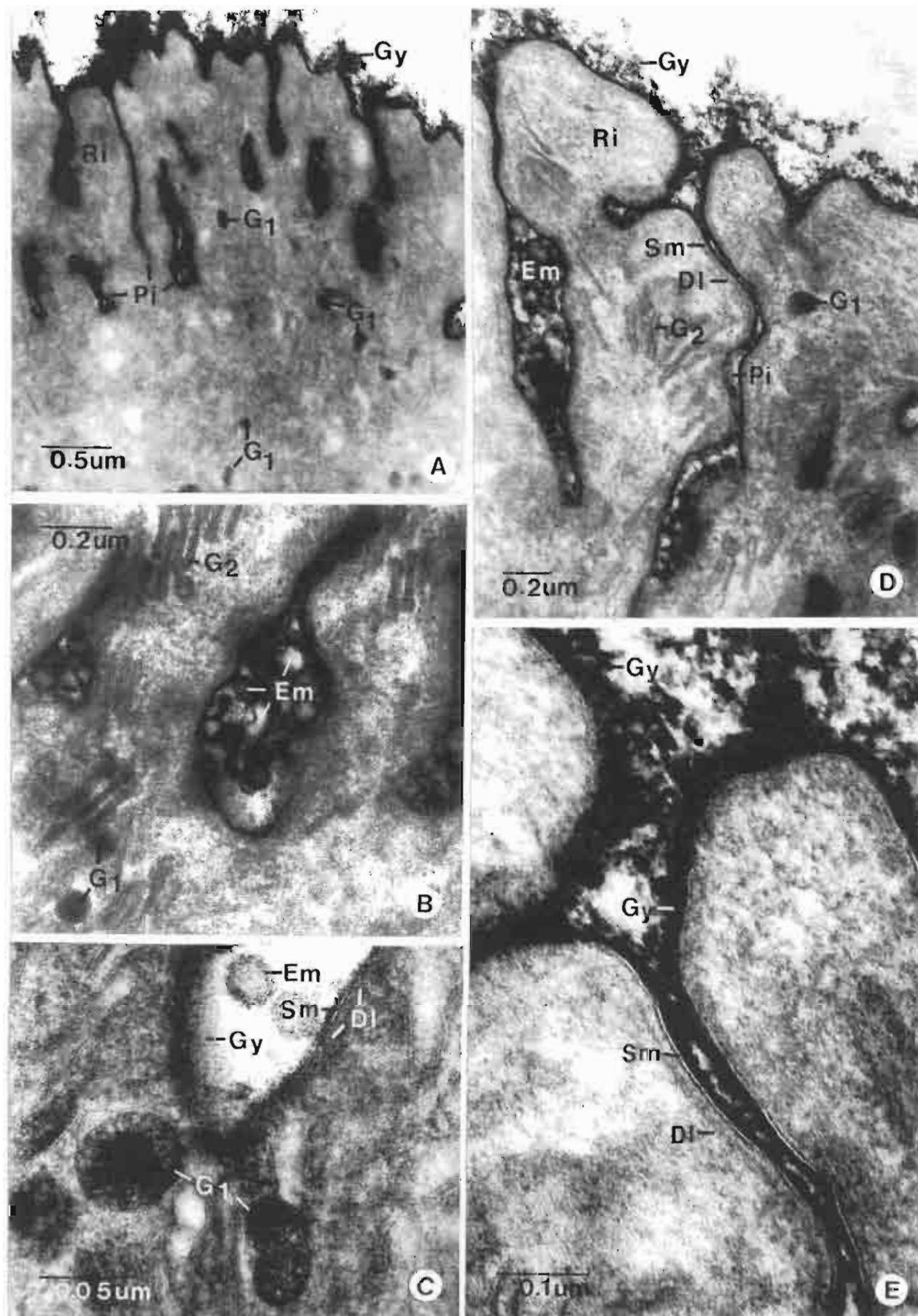


Figure 129

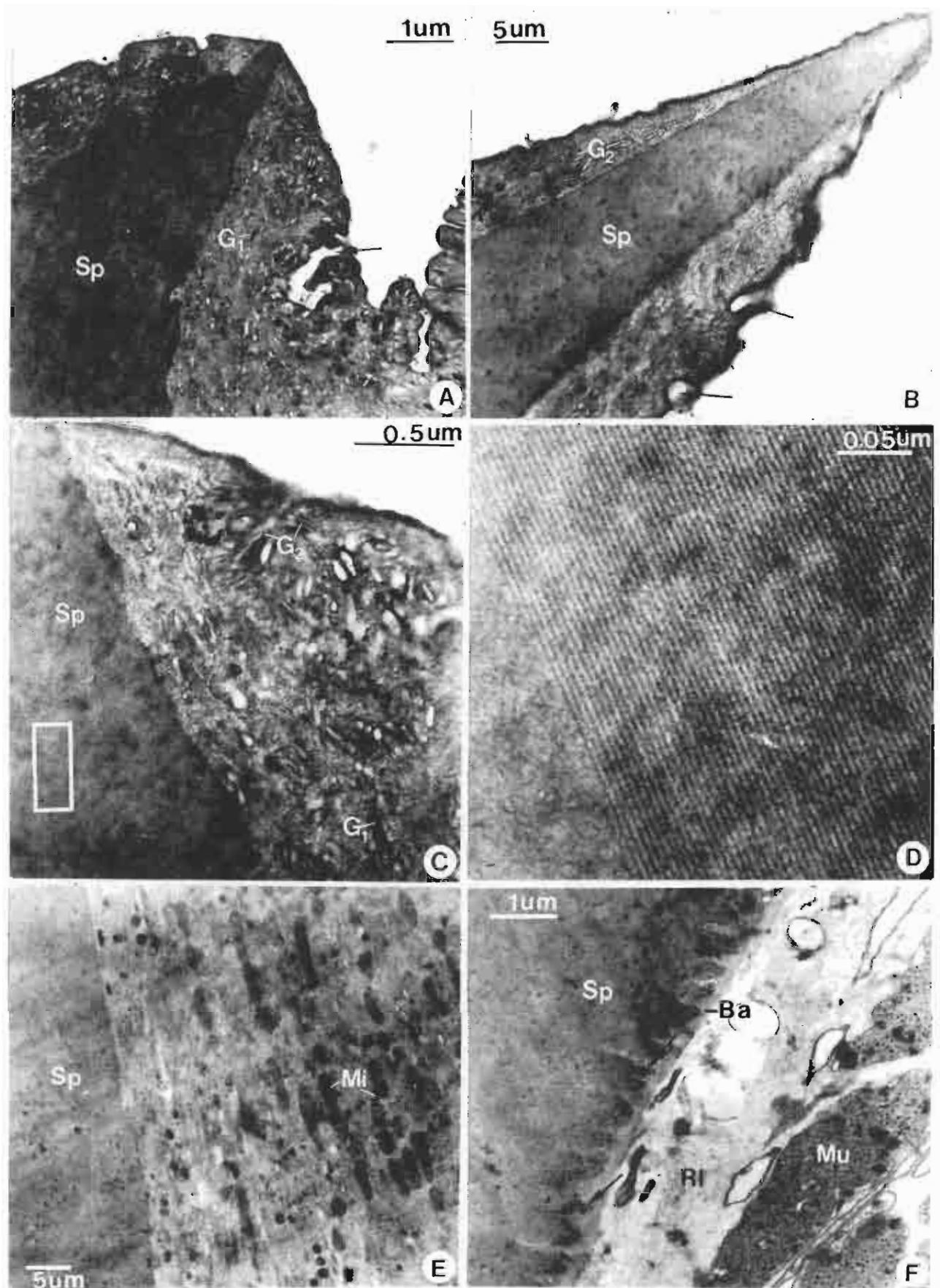


Figure 130

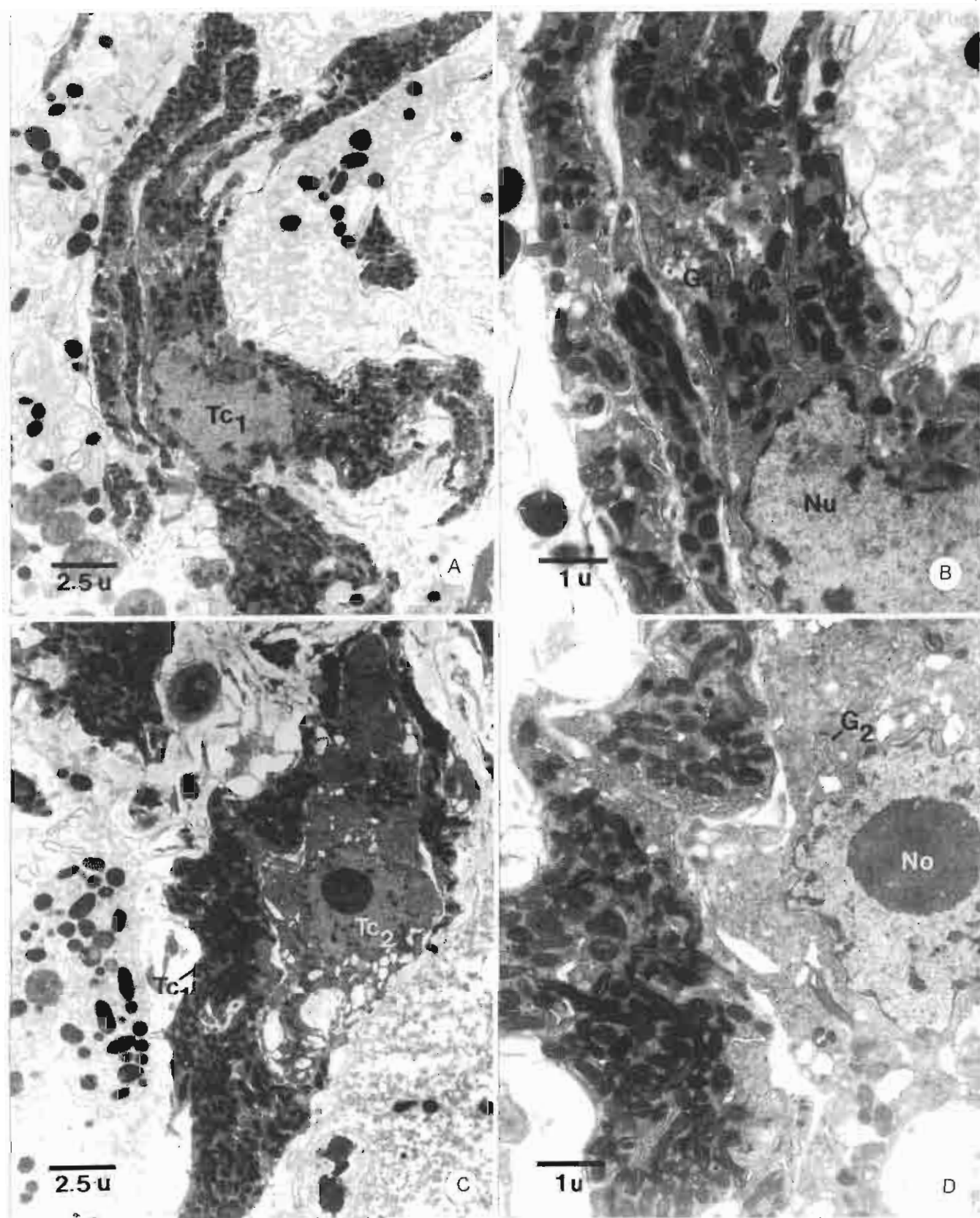
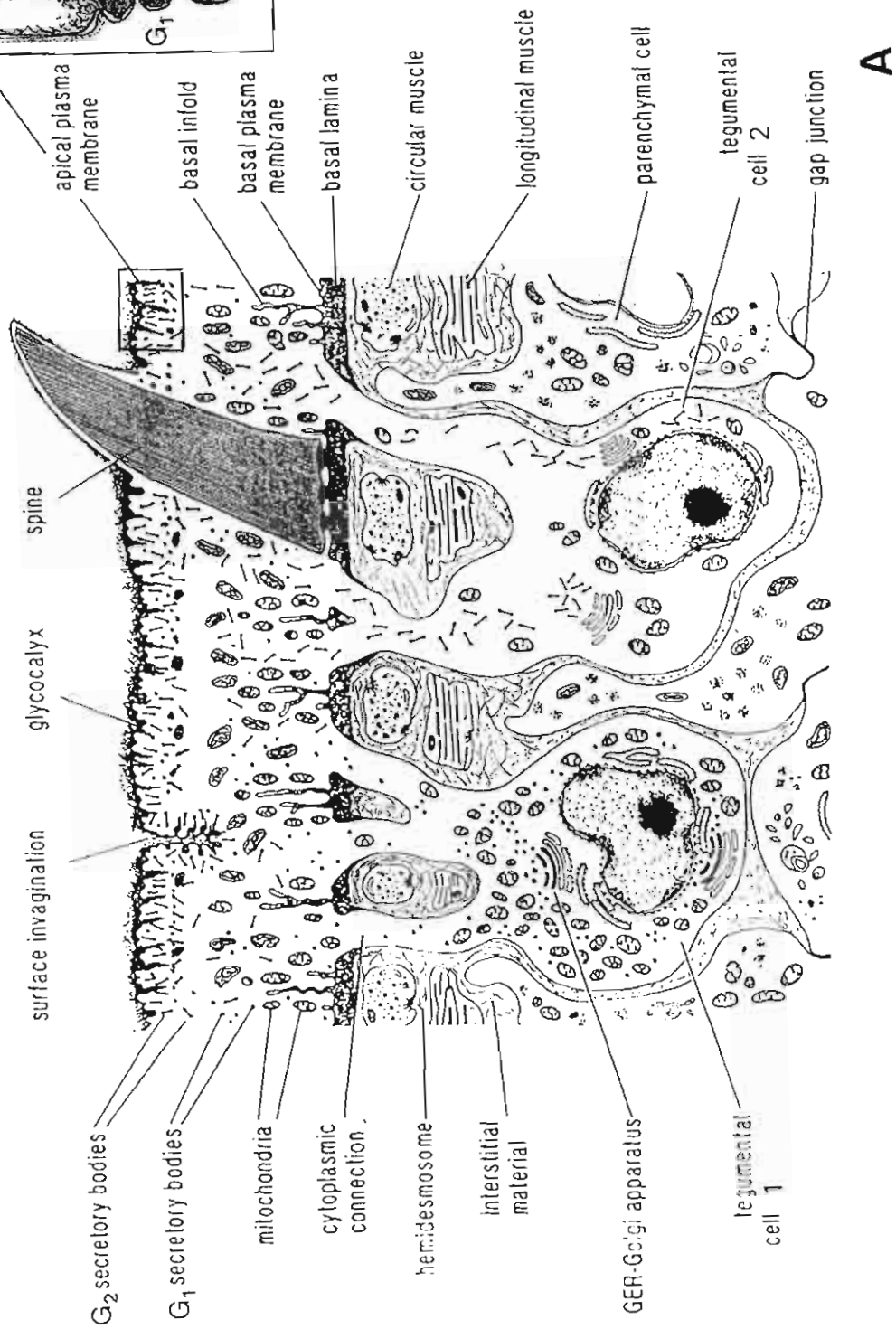
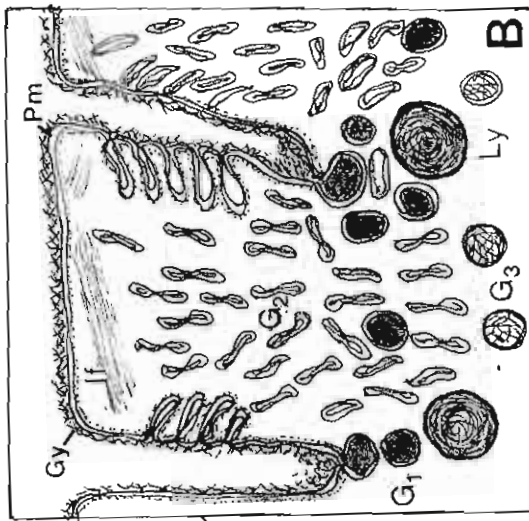


Figure 131



A

Figure 132

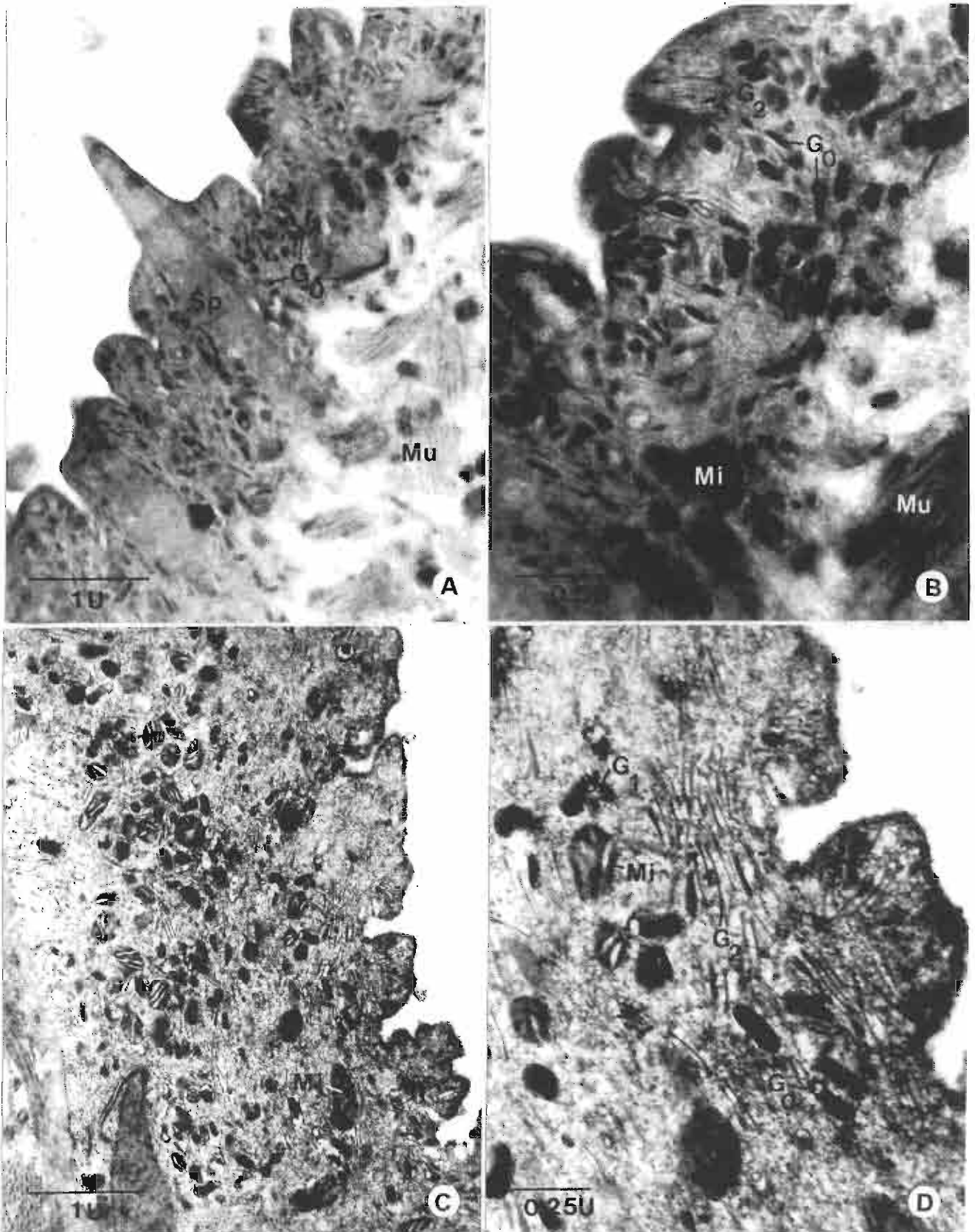


Figure 133

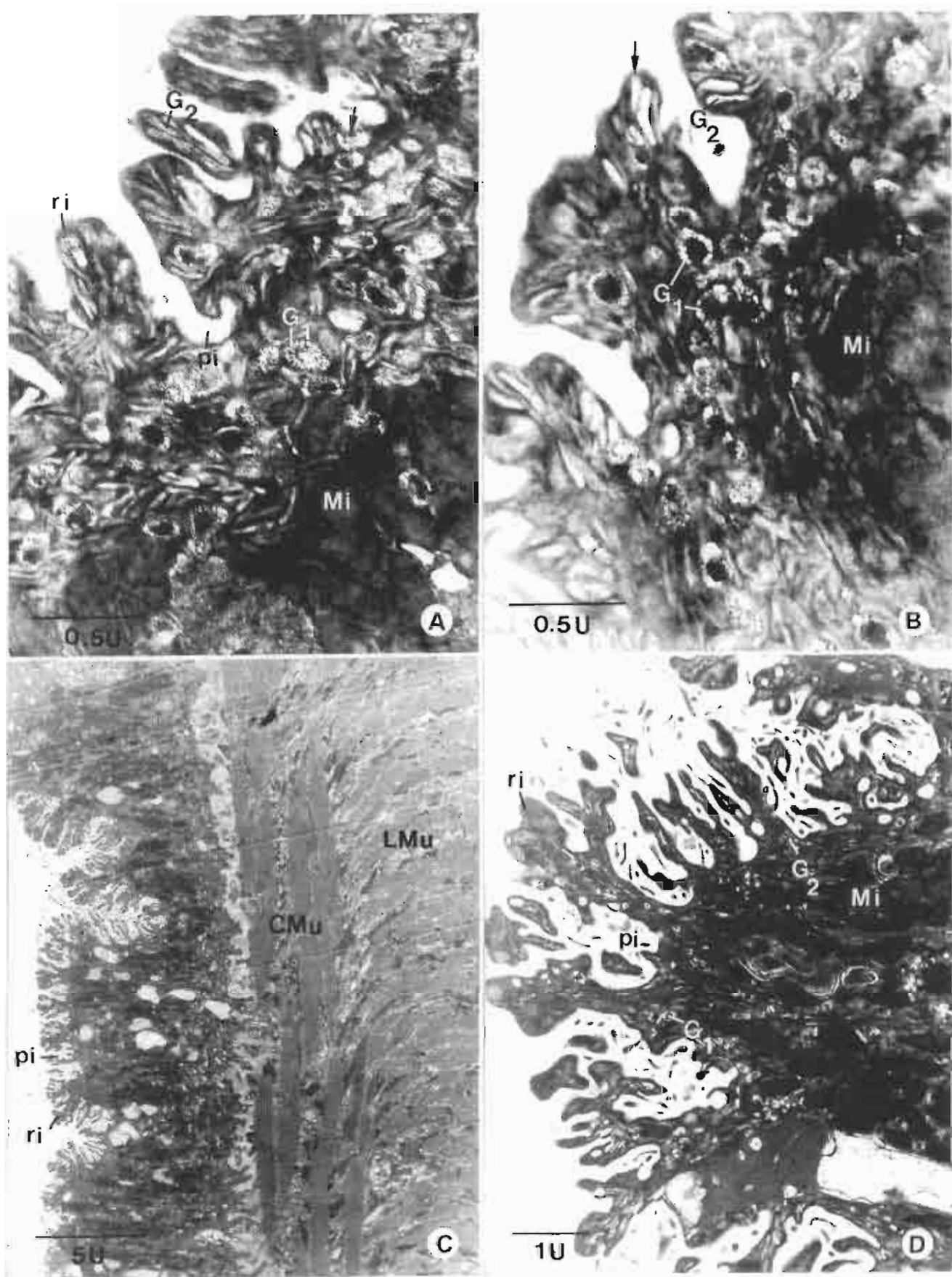


Figure 134

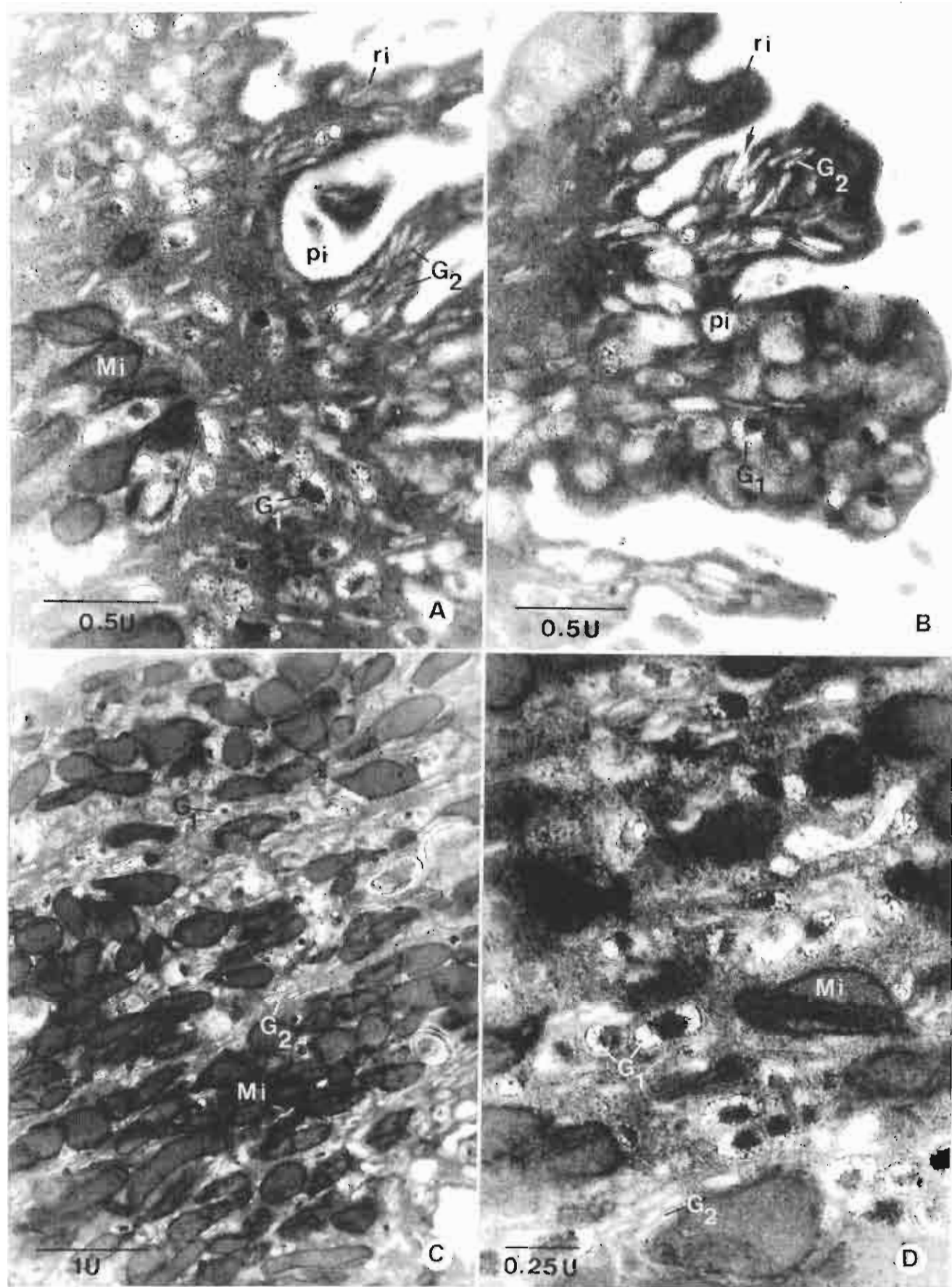
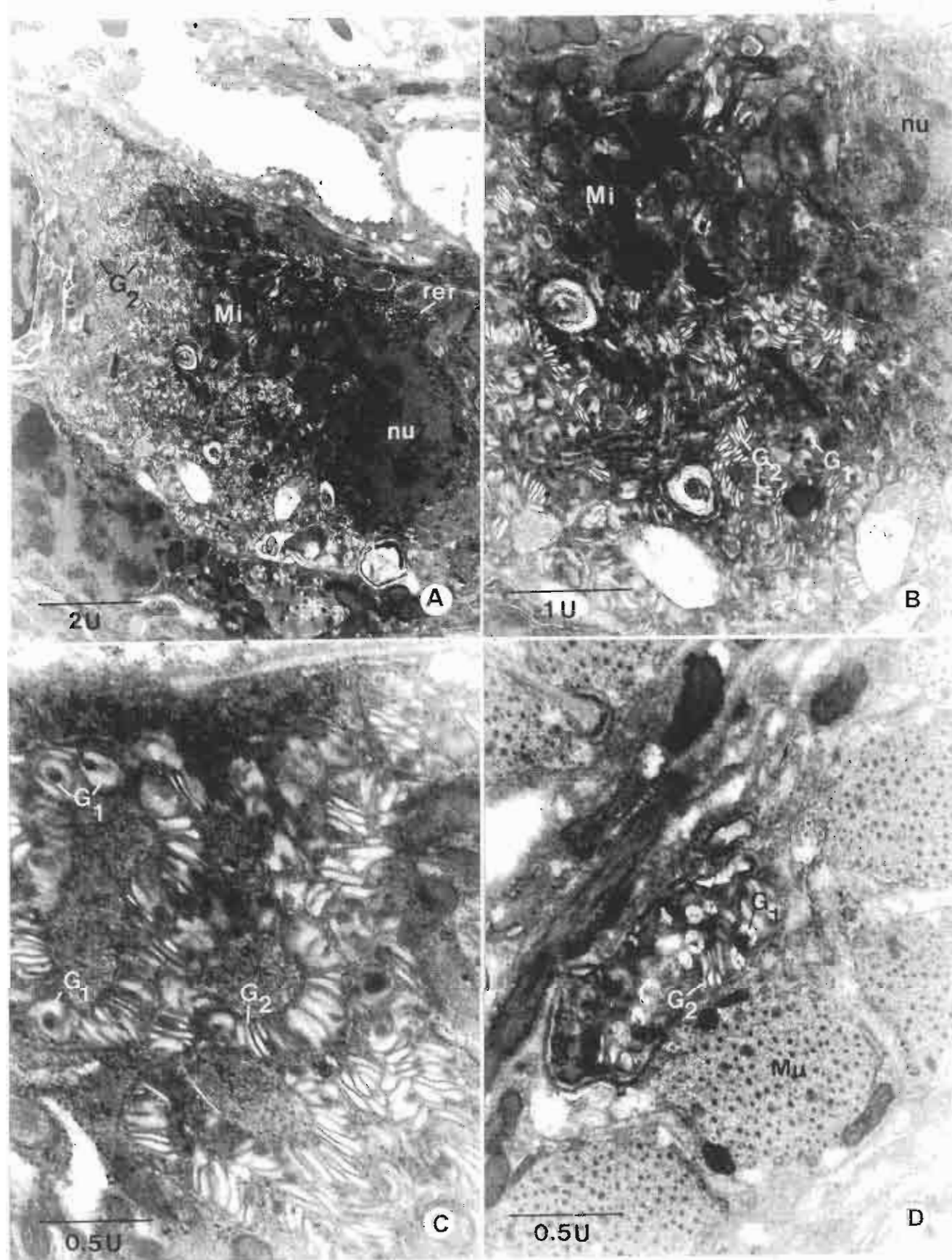


Figure 135



2.3.4 การศึกษาโครงสร้างของท่อย่อยอาหาร (Digestive tract) และลักษณะของเซลล์บุผิวท่อย่อยอาหาร (Digestive Epithelium)

จากการศึกษาในข้อ 2.2.3 พบว่าเอนไซม์ cathepsin L (Cath L) ปรากฏอยู่ในเยื่อผิวของลำไส้ (caecal epithelium) จากระดับ caecal bifurcation ลงไปด้านท้าย นอกจากนั้นยังพบว่ามี Cath L ในเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ เช่น ต่อม Mehlis' gland และเยื่อผิวของ uterus ดังนั้นเราจึงได้ทำการศึกษาลักษณะของเยื่อผิวท่อย่อยอาหารของพยาธิ *Fasciola gigantica* ทั้งในตัวเต็มวัยที่เก็บจากตับโคและกระบือจากโรงฆ่าสัตว์ และพยาธิอายุ 7 สัปดาห์ที่เก็บจากตับหนูที่ได้รับการป้อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียเข้าไปโดยใช้วิธีทางจุลทรรศน์ธรรมดาและจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

จากการศึกษาพบว่าระบบทางเดินอาหารประกอบด้วย oral sucker, buccal tube, pharynx, esophagus และ caecum หรือลำไส้ซึ่งเป็นส่วนใหญ่ของท่อย่อยอาหาร oral sucker อยู่ที่ปลายสุดทางด้านหน้าของตัวพยาธิ ต่อด้วย buccal tube, pharynx และ esophagus เรียงไปทางด้านหลังตามลำดับ ปลายด้านหลังของหลอดอาหาร (esophagus) แตกแขนงออกเป็นลำไส้ (caecum) สองท่อหลักซ้ายและขวา ลำไส้ของพยาธิตัวเต็มวัยมีการแตกแขนงออกจำนวนมากและกระจายอยู่ทั่วทั้งลำตัว (รูป 136A, B) ส่วนในพยาธิอายุ 7 สัปดาห์ลำไส้กระจายอยู่ทั่วตัวแต่การแตกแขนงมีน้อยกว่า การที่ท่อลำไส้แตกกิ่งก้านออกเป็นท่อขนาดเล็กลงไปเรื่อย ๆ จำนวนมากนั้นเนื่องจากพยาธิชนิดนี้ไม่มีระบบไหลเวียนจึงจำเป็นต้องมีการส่งสารอาหารที่ย่อยแล้วไปยังเนื้อเยื่อต่าง ๆ จากระบบท่อทางเดินอาหารโดยตรง เนื่องจากลำไส้มีการแตกแขนงออกเป็นหลอดอาหารย่อยๆขนาดเล็กมากแทรกไปทุกส่วนของร่างกายพยาธิอย่างทั่วถึง เมื่อสารอาหารถูกย่อยแล้วก็จะถูกดูดซึมโดยเยื่อผิวลำไส้เพื่อส่งผ่านออกไปเลี้ยงเซลล์ในเนื้อเยื่อโดยตรง สารอาหารบางส่วนที่ได้รับเกินพอก็ถูกส่งไปสะสมและถูกควบคุมการกระจายโดยเซลล์ parenchyma (ดูข้อ 2.3.5)

เยื่อผิวท่อทางเดินอาหารมีสองประเภท ประเภทแรกคือ เยื่อผิวที่มีลักษณะเช่นเดียวกับเยื่อชั้นผิว (tegumental-type epithelium) ประเภทที่สอง คือ เยื่อผิวแบบที่พบเฉพาะในลำไส้ (digestive-type epithelium) ซึ่งพบใน caecum ตั้งแต่ระดับ caecal bifurcation ลงไป เยื่อผิวประเภทที่สองมีบทบาทในการย่อยสลายและดูดซึมสารอาหารเข้าไปเลี้ยงตัวพยาธิ ท่อระบบย่อยอาหารจาก oral sucker, buccal tube, pharynx จนถึง esophagus ล้วนก็เป็นท่อเดียวที่บุด้วยเยื่อผิวแบบชั้นผิว (tegumental-type epithelium) พบว่ามีการเปลี่ยนชนิดของเยื่อจากท่อย่อยอาหารจาก tegumental-type epithelium เป็น digestive-type epithelium ที่ปลายของหลอดอาหาร (esophagus) ณ จุดที่เริ่มแตกแขนงออกเป็นลำไส้ 2 ท่อ (caecal bifurcation) โดย ณ จุดเปลี่ยนเยื่อผิวทั้งสองชนิด มีความแตกต่างกันชัดเจน (รูป 137C-D) เยื่อผิวชนิด tegumental-type มีลักษณะเด่นจำเพาะคือที่ด้านฐานของเยื่อมีเยื่อหุ้มด้านฐานเว้าเป็นรอยลึก (basal infolding) เข้าไปในชั้นผิวเรียงขนานกันอยู่เป็นจำนวนมาก ผิวด้านบน (apical surface) หยักไปมามีลักษณะคล้าย ไมโครวิลไล (microvilli) ซึ่งที่จริงแล้วคือสัน (ridges) และร่องที่เรียงสลับกัน (รูป

137C-D) ส่วนเยื่อหุ้มแบบ digestive-type ของ caecum มีรูปร่างเป็นทรงลูกบาศก์หรือรูปแท่ง มีนิวเคลียสอยู่ในชั้นของเซลล์ซึ่งมีรูปร่างกลมและมีลักษณะเป็น euchromatin นิวคลีโอลัสเด่นชัด ยอดเซลล์มีสเตอริโอซิเลีย (stereocilia) อยู่จำนวนมาก (รูป 137C, D) ในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเยื่อหุ้มของทางเดินอาหารส่วนต้นมีลักษณะโครงสร้างละเอียดเช่นเดียวกับชั้นผิวหนังที่กล่าวมาแล้ว

เซลล์ของเยื่อหุ้มลำไส้แบบ digestive-type ยังแบ่งออกเป็น 3 แบบ ตามลักษณะการติดสีและปริมาณของ zymogen granules แบบที่ 1 (Cep₁) มีไซโตพลาสซึมติดสีเข้ม โดยภายในไซโตพลาสซึมมีแกรนูลติดสีเข้มจำนวนไม่มากนัก ตัวเซลล์แบนและเตี้ย นิวเคลียสของแต่ละเซลล์อยู่ชิดกัน สเตอริโอซิเลียเห็นได้ชัดเจน (รูป 138A, B) แบบที่ 2 (Cep₂) ไซโตพลาสซึมติดสีในระดับปานกลางและจางกว่าแบบที่ 1 สังเกตเห็นแกรนูลติดสีเข้มกระจายอยู่ในไซโตพลาสซึมจำนวนมาก ตัวเซลล์ค่อนข้างสูงและมีสเตอริโอซิเลียอยู่ที่ด้านบนของเซลล์ (รูป 138C) แบบที่ 3 (Cep₃) ไซโตพลาสซึมติดสีจางมากโดยเฉพาะด้านยอด (apical) ของเซลล์ ภายในไซโตพลาสซึมมีแกรนูลจำนวนน้อยและกระจายออกไปเนื่องจากมีการปล่อยแกรนูลส่วนใหญ่ออกไปนอกเซลล์ ตัวเซลล์สูงแต่ฐานเซลล์กว้าง ยอดเซลล์มีลักษณะใสคล้ายกับมีแวคิวโอ (vacuole) อยู่จำนวนมาก (รูปที่ 138D) พบว่ามีเยื่อหุ้มทั้ง 3 แบบในบริเวณเดียวกันจึงไม่น่าเกิดจาก fixation artifact (รูปที่ 138A) ปริมาณของเซลล์แต่ละแบบขึ้นอยู่กับปริมาณอาหารที่มีอยู่ภายในท่อลำไส้ กล่าวคือถ้ามีอาหารในท่อมาก เซลล์ประเภทที่สามจะมีมากที่สุด เซลล์ประเภทที่สองและประเภทที่หนึ่งมีจำนวนน้อย เมื่อมีอาหารลดลงเซลล์ประเภทที่สามจะลดลงในขณะที่เซลล์ประเภทที่สองและหนึ่งมีจำนวนเพิ่มขึ้น และเมื่อไม่มีอาหารจะพบเซลล์ประเภทที่หนึ่งเกือบทั้งหมด

ในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าเซลล์ประเภทที่หนึ่ง (Cep₁) มีเนื้อไซโตพลาสซึมแน่นทึบ ที่ส่วนยอด (apical part) เต็มไปด้วย rough endoplasmic reticulum (rer) ที่เรียงตัวขนานกันในแนวตั้ง โดยมีไมโทคอนเดรียอัดอยู่ในระหว่าง rer ก้อน zymogen granules มีน้อย ที่ขอบบนของเซลล์มีแผง lamella ซึ่งในส่วนตัดขวางปรากฏคล้าย stereocilia อยู่จำนวนมาก เซลล์ข้างเคียงเกาะติดกันที่ขอบบนด้วย septate desmosome (รูปที่ 139A) ที่ไซโตพลาสซึมด้านฐานมีเนื้อแน่นเช่นเดียวกันกับด้านยอดเนื่องจากมี rer เรียงขนานกันในแนวตั้งอยู่เต็ม สอดแทรกด้วยไมโทคอนเดรียที่ยาวและเรียงตัวตามแนวตั้งเช่นกัน (รูปที่ 139B) ฐานของเซลล์ Cep₁ มีชั้น basal lamina บาง ๆ รองรับ มีกิ่งของเซลล์ parenchyma ที่แตกแขนงระหว่างชั้นกล้ามเนื้อและ reticular lamina ออกมาและกับขอบเซลล์ที่ด้านฐาน (รูปที่ 139D)

เซลล์ผิวหนังลำไส้ประเภทที่สอง (Cep₂) เป็นเซลล์ที่มี zymogen granules สะสมอยู่จำนวนมากในไซโตพลาสซึมด้านยอด (apical) ของเซลล์ rer และไมโทคอนเดรียยังอัดกันแน่นและเรียงตัวเป็นแผงตามแนวตั้ง (รูปที่ 140A, B) Golgi complex มีขนาดใหญ่และมีจำนวนมากกระจายอยู่ในไซโตพลาสซึมส่วนยอดใกล้ ๆ กับนิวเคลียส เซลล์ประเภทที่สองสอดแทรกอยู่กับเซลล์ประเภทที่สาม (Cep₃) ซึ่งมีไซโตพลาสซึมเนื้อใสมาก เนื่องจากแทบไม่มี rer เหลืออยู่เลย (รูปที่ 140C, D) ไซโตพลาสซึมทางด้านฐานของเซลล์ Cep₂ มีเนื้อแน่นคล้ายกับ Cep₁ เนื่องจากมี rer และไมโทคอนเดรียอัดกันอยู่เป็นแผงจำนวน

มากโดยไม่มี zymogen granules อยู่เลย ที่ฐานของเซลล์ Cep_2 นอกจากจะมี basal lamina และ reticular lamina รองรับแล้วในชั้น reticular lamina ยังมีกิ่งเล็ก ๆ ของ parenchymal cells ประเภทที่ 2 (ดูข้อ 2.3.5) ซึ่งมีไมโทคอนเดรียอัดอยู่แน่นกระจายออกมาแตะกับฐานของเซลล์บุผิวลำไส้ (รูปที่ 140F)

เซลล์บุผิวลำไส้ประเภทที่สาม (Cep_3) เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ Cep_1 และ Cep_2 และมีลักษณะที่แตกต่างกันชัดเจน คือ ไซโตพลาสซึมส่วนยอดมีเนื้อใสเนื่องจากมี zymogen granules เหลืออยู่น้อยมาก แกรนูลส่วนใหญ่ถูกหลั่งออกไปทางด้านบนของเซลล์ rer ก็หายไปเกือบหมด ส่วนไมโทคอนเดรียเหลืออยู่พอประมาณ (รูปที่ 141A, B) ใน Cep_3 บางเซลล์ไซโตพลาสซึมบริเวณส่วนยอดมีเนื้อจางและค่อนข้างหลวมเนื่องจากโครงสร้างที่ยังเหลือ มีเพียงเส้นใย cytoskeleton ที่สานกันอย่างหลวม ๆ และไมโทคอนเดรีย (รูปที่ 141C, D) อาจเป็นไปได้ว่าการหลั่ง zymogen granules ออกจากบริเวณยอดของเซลล์ Cep_3 ทำให้เนื้อไซโตพลาสซึมส่วนนี้พรุนมากขึ้น กอปรกับ rer หายไปเกือบหมดจึงทำให้เนื้อไซโตพลาสซึมดูพรุนขึ้น ที่เยื่อด้านบนได้ lamella มี coated vesicles ปรากฏอยู่จำนวนมาก (รูปที่ 141E, F) ซึ่งแสดงว่านอกจากการปล่อยเอนไซม์ออกไปสู่ท่อลำไส้แล้วเซลล์ Cep_3 อาจมีการดูดซึมสารอาหารเข้าสู่ตัวเซลล์โดยใช้กระบวนการขนถ่ายแบบ carrier-mediated endocytosis ที่ต้องใช้ coated vesicles เป็นพาหนะนำเข้า ไซโตพลาสซึมด้านฐานของเซลล์ Cep_3 ยังมีเนื้อแน่นเนื่องจากยังมี rer และไมโทคอนเดรียอยู่จำนวนมากจึงแสดงว่าเซลล์ไม่ได้สลายตัว แต่เป็นช่วงที่อยู่ในระยะ secretory และ absorptive phase ที่อาจจะเกิดขึ้นพร้อมกัน

ดังนั้นเราจึงเชื่อว่าเซลล์ประเภทที่หนึ่งและสองที่ติดสีเข้มเป็นเซลล์ในช่วงที่มีการเริ่มสร้างและการสะสมแกรนูลของเอนไซม์ cathepsin (โดยเฉพาะ Cath L) ไว้มากซึ่งนับได้ว่าเป็น synthetic phase ในขณะที่เซลล์ประเภทที่สามเป็นช่วงที่มีการปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยสารอาหารมากขึ้น เซลล์ทั้ง 3 ชนิดอาจเป็นเซลล์ชนิดเดียวกันแต่อยู่ในช่วง (phases) ของการสร้าง zymogen granules ที่ต่างกัน เซลล์ทั้งสามแบบสามารถสร้างเอนไซม์ Cath L เพื่อการย่อยสลายสารอาหาร และในขณะเดียวกันก็ทำหน้าที่เป็นเซลล์ดูดซึมสารอาหารด้วย (ดูสรุปรูปที่ 142)

รูปที่ 136 A) ภาพพยาธิตัวเต็มวัยที่ถูกแผ่อกและตรึงบนแผ่นสไลด์แก้วแล้วย้อมด้วย osmium tetroxide เพื่อแสดงส่วนต่างๆ ของท่อทางเดินอาหารจากส่วนต้น (oral sucker, pharynx, esophagus) และส่วนปลาย (caecum) ที่แตกออกเป็นสองท่อใหญ่และท่อเล็ก ๆ หลายระดับอีกจำนวนมาก

B) ภาพวาดจาก camera lucida แสดงการแตกกิ่งของท่อทางเดินอาหาร

รูปที่ 137. ภาพ semithin section ของพยาธิ *F. gigantica* อายุ 7 สัปดาห์ ย้อมด้วยสี methylene blue

A, B) ภาพถ่าย pharynx (Ph) กำลังขยายต่ำ (A) และ สูง (B) แสดงเยื่อผิวหนัง (Ep) ชนิดชั้นผิว (tegumental type)

C, D) ภาพถ่าย caecal bifurcation (Cb) กำลังขยายปานกลาง (C) และ สูง (D) แสดงจุดเปลี่ยน (ลูกศร) จากเยื่อผิวหนังชนิดชั้นผิว (tegumental type) เป็นชนิดลำไส้ (digestive type) ลักษณะเด่นของเยื่อผิวหนังชนิดชั้นผิว คือ ฐานของเยื่อมีการเว้าของเยื่อหุ้มด้านฐานเป็นรอยหยักลึก (basal infolding) เรียงเป็นแถบขนานกัน ขอบด้านบน (apical surface) หยักไปไม่มีลักษณะคล้ายไมโครวิลไล (microvilli) ส่วนเยื่อ digestive type (Ca) ติดสีเข้มและมีแผ่น lamellae เรียงตัวกันแน่นที่ขอบบน

รูปที่ 138 A) ภาพ semithin section ส่วนตัดขวางของ caecum แสดงเซลล์ของชั้นผิวหนัง (Ep) ที่มีความเข้มของไซโตพลาสซึมต่างกันเนื่องจากปริมาณของ zymogen granules และ rough endoplasmic reticulum (rer) ต่างกัน ด้านซ้ายประกอบด้วยเซลล์ในช่วง synthetic phase (ขั้นที่ 1, 2 – Cep₁, Cep₂) และด้านขวาอยู่ในช่วง secretory phase (ขั้นที่ 3 – Cep₃)

B) เซลล์ขั้นที่ 1 (Cep₁) มีรูปร่างเป็น columnar ค่อนข้างแคบ ภายในมีนิวเคลียสใส นิวคลีโอไลต์เด่น ไซโตพลาสซึมแน่นและเห็นแสงตลอดทั้งเซลล์ ด้านยอดมีแกรนูลอยู่พอสมควร

C) เซลล์ขั้นที่ 2 (Cep₂) เซลล์มีรูปร่างเป็น columnar ทรงสูงและกว้างกว่า Cep₁ นิวเคลียสมีลักษณะเช่นเดียวกับใน Cep₁ ไซโตพลาสซึมส่วนยอดมี zymogen granules สะสมอยู่หนาแน่นมากและเริ่มมี vacuoles ปรากฏขึ้นด้วย

D) เซลล์ขั้นที่ 3 (Cep₃) เซลล์มีรูปร่าง columnar ที่ขยายใหญ่ ไซโตพลาสซึมใสโดยเฉพาะส่วนยอดซึ่งมีเนื้อพรุณใสและมีช่องว่างเกิดขึ้นจากการที่แกรนูลส่วนใหญ่ถูกหลั่งออกไปนอกเซลล์

รูปที่ 139 A, C) เซลล์ Cep₁ แสดงส่วนยอด (A) และส่วนกลาง (C) ของเซลล์ที่ไซโตพลาสซึมประกอบด้วยไมโทคอนเดรียและ rough endoplasmic reticulum (rer) ซึ่งเรียงกันแน่น ที่ส่วนยอดมี zymogen granules (Zy) อยู่จำนวนน้อย

B) ไซโตพลาสซึมส่วนฐานของ Cep₁ แสดงไมโทคอนเดรีย (mi) และ rer ที่เรียงขนานกันแน่นตามแนวตั้ง ฐานของเซลล์ตั้งอยู่บนแผ่น basal lamina บาง ๆ

D) ภาพแสดงเซลล์กล้ามเนื้อ (Cm, Lm) บาง ๆ ที่รองรับ caecum และกิ่งของเซลล์ parenchyma (Cp) ที่ยื่นออกไปแตะกับฐานของ Cep₁ ณ จุดต่างๆ หลายจุดพร้อมกัน (Tb)

รูปที่ 140 A, B) ภาพ TEM ของส่วนยอดเซลล์ Cep₂ แสดง zymogen granules (Zy) จำนวนมากสะสมอยู่ในไซโตพลาสซึม ไมโทคอนเดรีย (mi) และ rer อัดกันอยู่แน่น ไซโตพลาสซึมมีกึ่งแน่น ที่ขอบบนมีแฟงที่แสดงส่วนตัดของ lamella ซึ่งมีลักษณะคล้าย stereocilia (Sc) และขอบบนยึดติดกับเซลล์ข้างเคียงด้วย septate desmosome (sd)

C, D) ภาพตัดขวางที่ส่วนยอดของเซลล์ Cep₃ สลับกับ Cep₂ แสดงไซโตพลาสซึมที่มีเนื้อโปร่งกว่า Cep₂ และมี zymogen granules (Zy) กับไมโทคอนเดรีย (mi) อยู่เพียงประปราย

E, F) ภาพไซโตพลาสซึมด้านฐานของ Cep₂ แสดงไมโทคอนเดรีย (mi) และ rer ที่เรียงขนาดกันตามแนวตั้งอยู่แน่นมาก (E) มีกิ่งของ parenchymal cell type₂ (St₂) ซึ่งแทรกระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อขึ้นมาแตะที่ขอบด้านฐานของเซลล์ Cep₂

รูปที่ 141 A-D) ภาพ TEM ส่วนยอดของเซลล์ Cep₃ แสดงไซโตพลาสซึมที่มีเนื้อพรุนและโปร่งแสงกว่า Cep₁ และ Cep₂ เนื่องจากมี rer เหลืออยู่จำนวนน้อยหรือหายไปเกือบหมด และมีไมโทคอนเดรีย (mi) เหลืออยู่เพียงประปราย zymogen granules (Zy) ก็มีเหลืออยู่น้อย ภาพ C และ D แสดงใย cytoskeleton ที่สานกันอยู่หลวม ๆ

E, F) ภาพ TEM ขยายใหญ่แสดงขอบบนของเซลล์ Cep₃ ซึ่งมี coated vesicle (Cv) ซึ่งบ่งชี้ว่าเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเซลล์ที่เว้าเข้าไปในไซโตพลาสซึมส่วนยอด (ภาพ F)

รูปที่ 142 ภาพวาดสรุปแสดงลักษณะโครงสร้างละเอียดของเซลล์บุผิว caecum 3 แบบ Cep₁ อยู่ในระยะ presynthetic phase ซึ่งไซโตพลาสซึมส่วนใหญ่ประกอบด้วยไมโทคอนเดรียและ rough endoplasmic reticulum เรียงกันอยู่แน่น zymogen granules ยังมีอยู่น้อย Golgi complex ยังไม่พัฒนา มีกิ่งของเซลล์ parenchyma ชนิดที่ 1 และ 2 แดกแขนงออกมาแตะกับเยื่อหุ้มด้านฐาน เซลล์ Cep₂ อยู่ในระยะ synthetic phase ที่บ่งชี้เนื่องจากออร์แกเนลล์ดังกล่าวใน Cep₁ แม้ยังมี Golgi complex ที่พัฒนาเต็มที่และมีอยู่หลายแห่งในไซโตพลาสซึม zymogen granules ที่ผลิตจาก Golgi complex ลอยออกไปสะสมอยู่ที่ส่วนยอดของเซลล์ เซลล์ Cep₃ แสดงลักษณะคล้าย Cep₂ แต่ไซโตพลาสซึมที่ส่วนยอดของเซลล์มี rer และ zymogen granules กับไมโทคอนเดรียเหลือน้อยมาก Cep₃ จึงอาจเป็นเซลล์ในช่วง secretory phase ที่ได้ปล่อยเอนไซม์ใน zymogen granules ออกไปแล้วเกือบหมด เซลล์ทั้งสามชนิดมักมี endocytotic vesicles โดยเฉพาะแบบ coated vesicles อยู่ใต้เยื่อหุ้มส่วนยอดจึงน่าจะมีส่วนในการดูดซึมสารอาหารด้วย

Figure 136

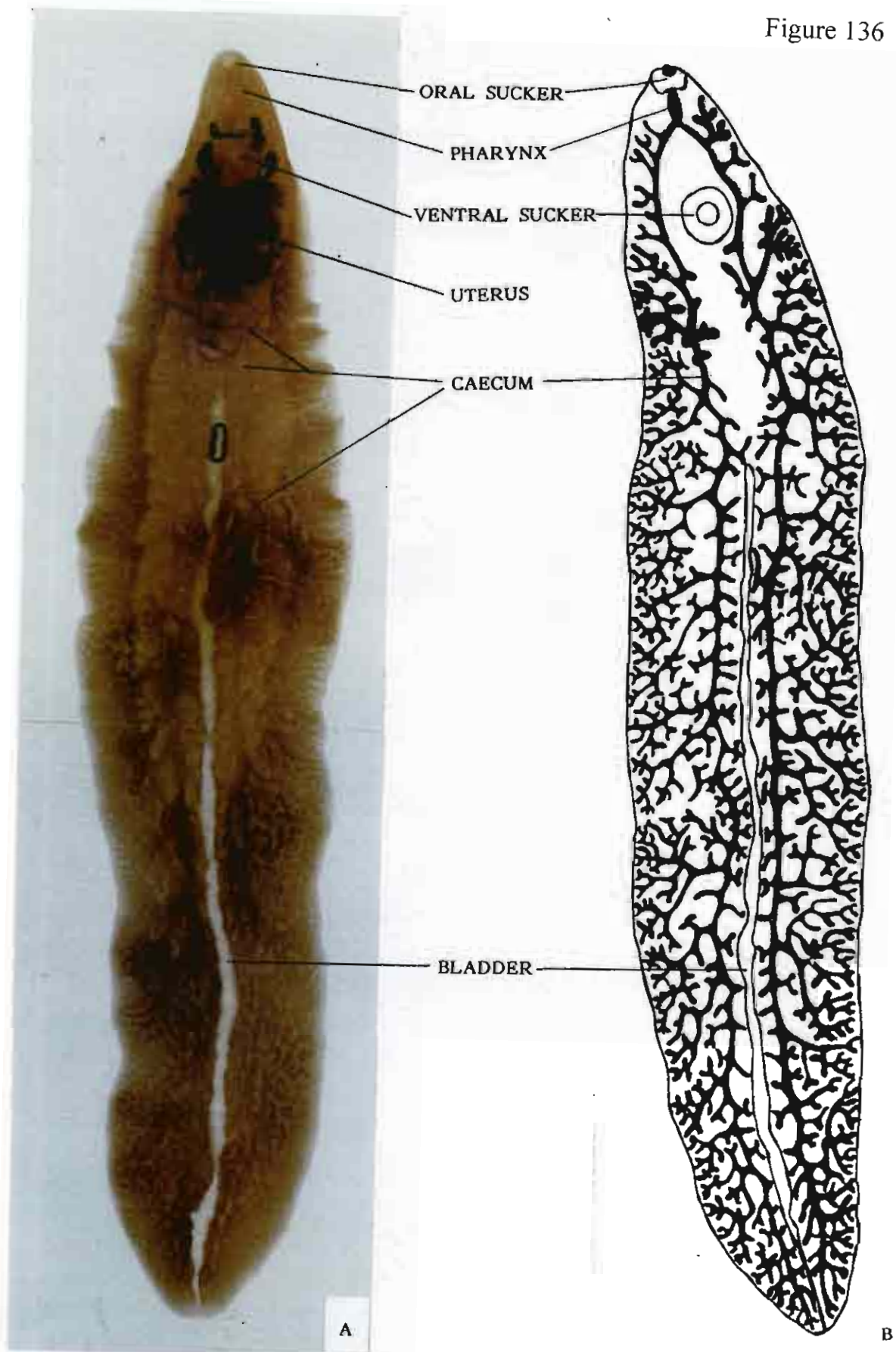


Figure 137

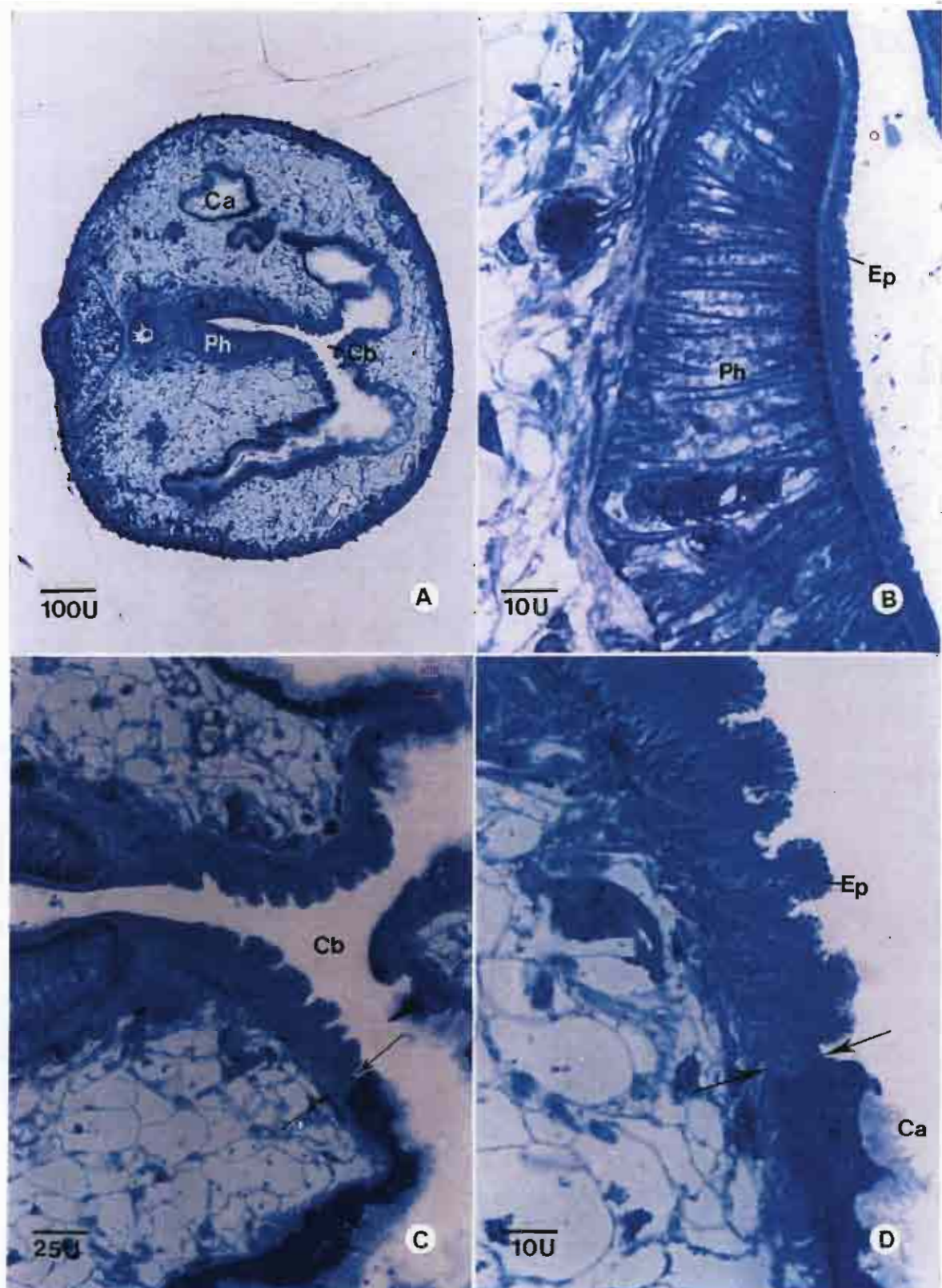


Figure 138

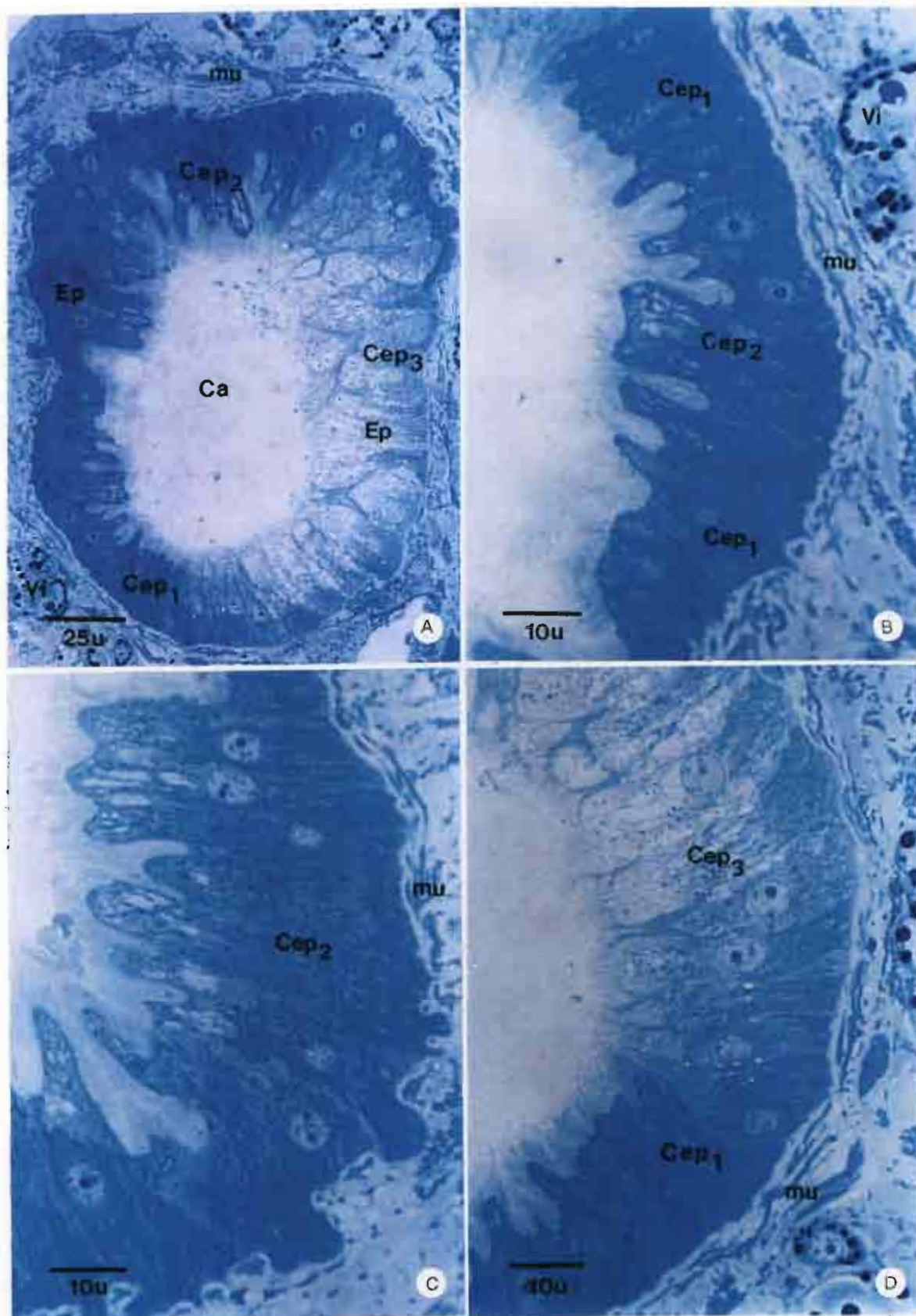


Figure 139

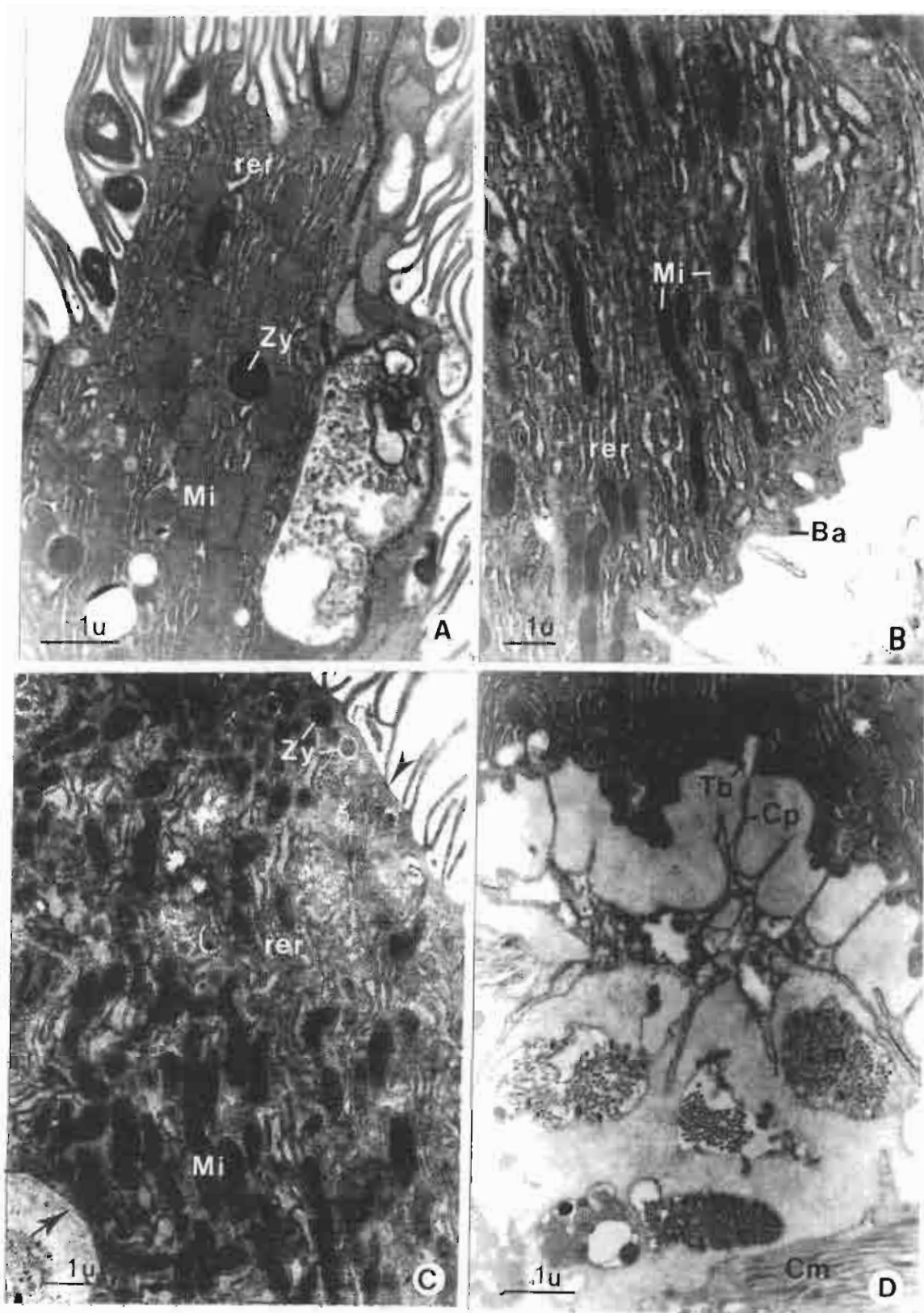


Figure 140

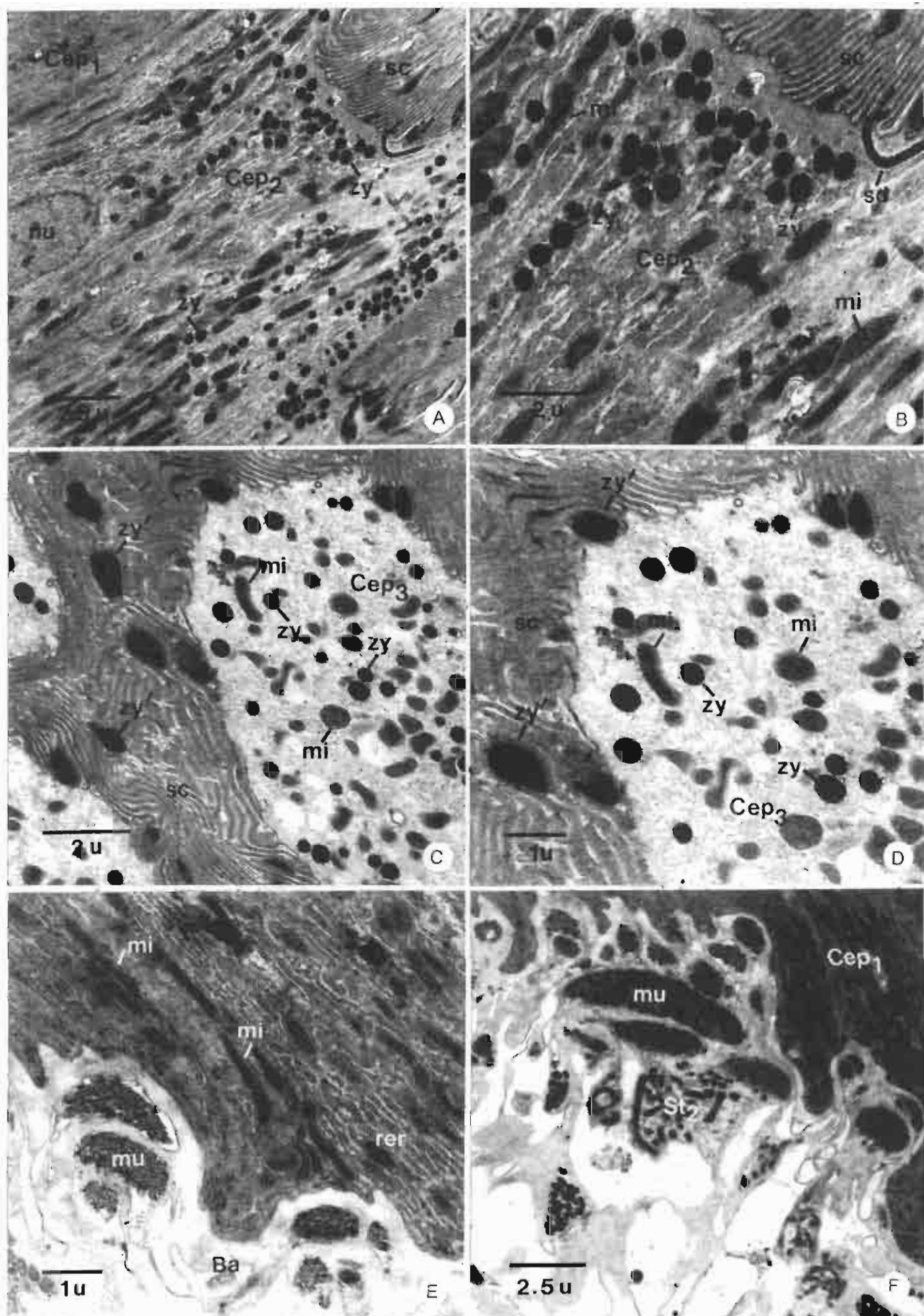


Figure 141

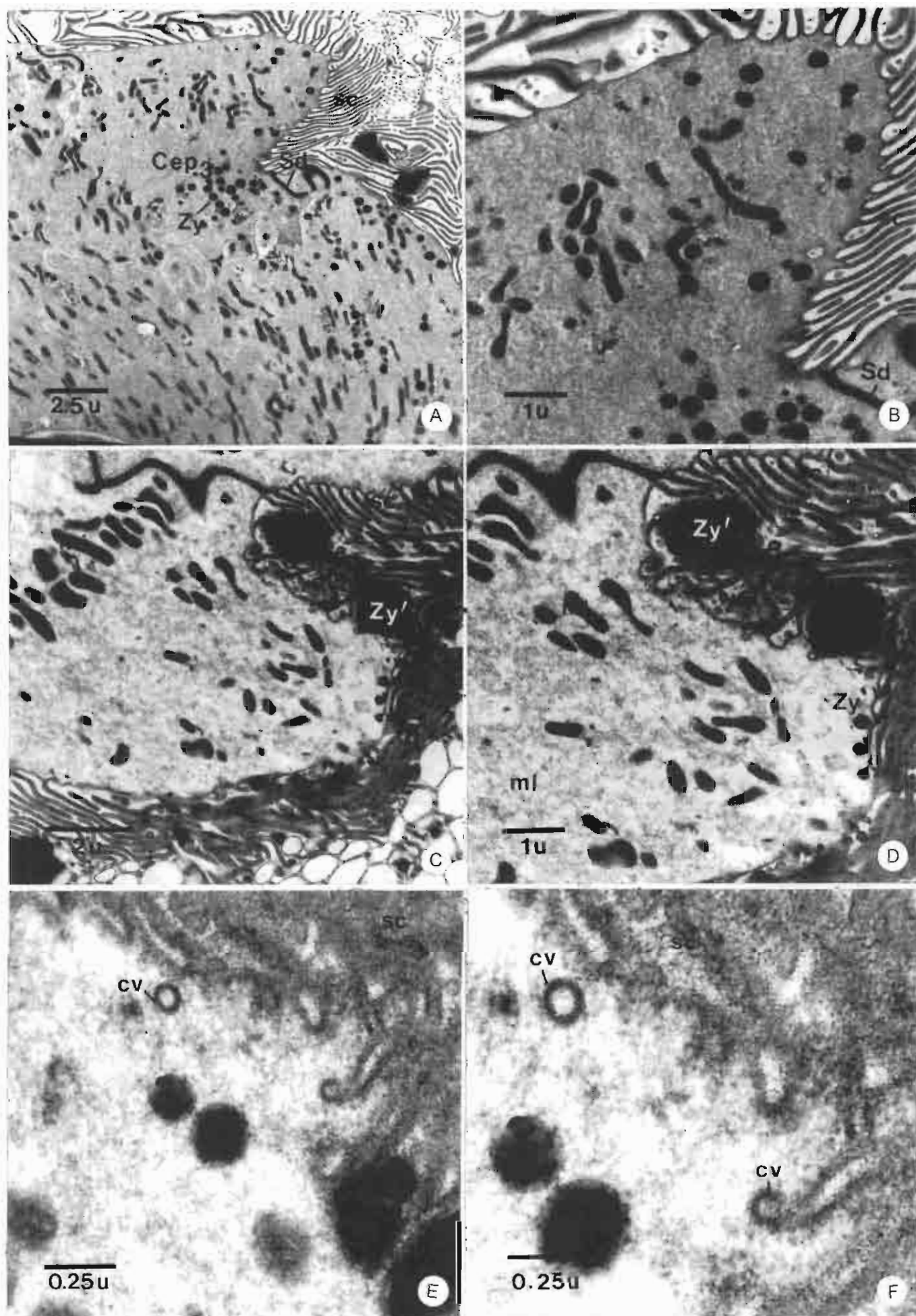
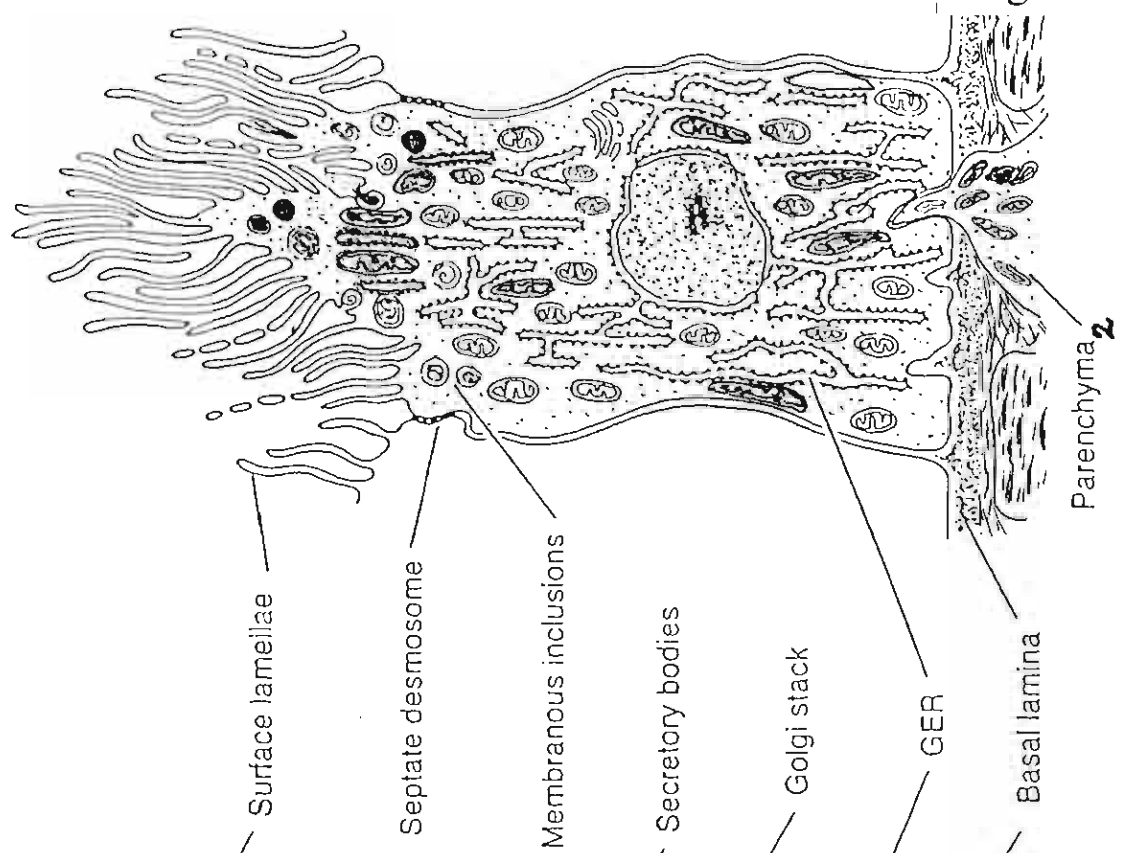
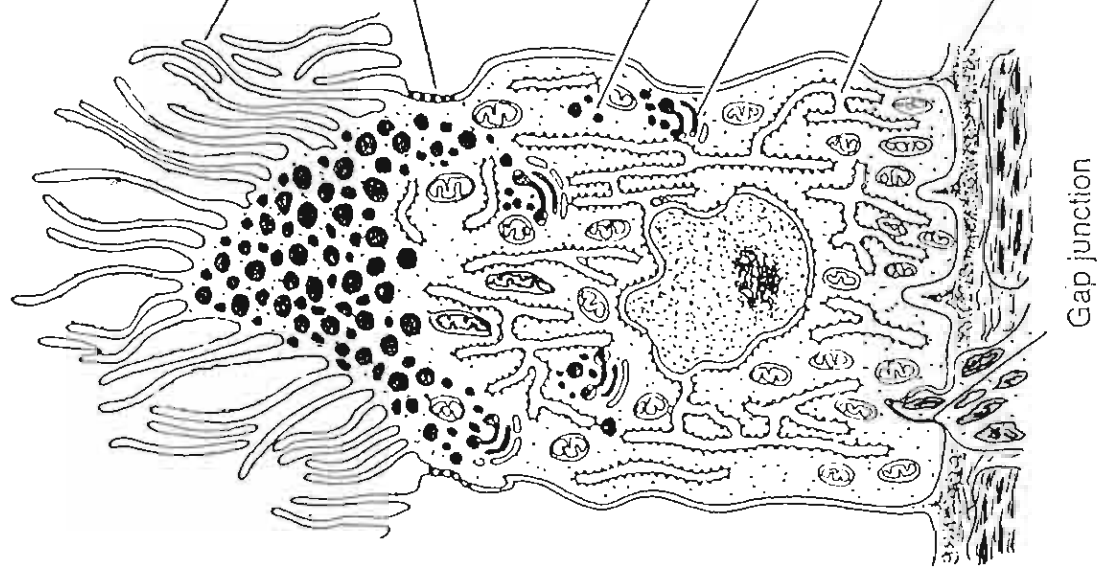


Figure 142

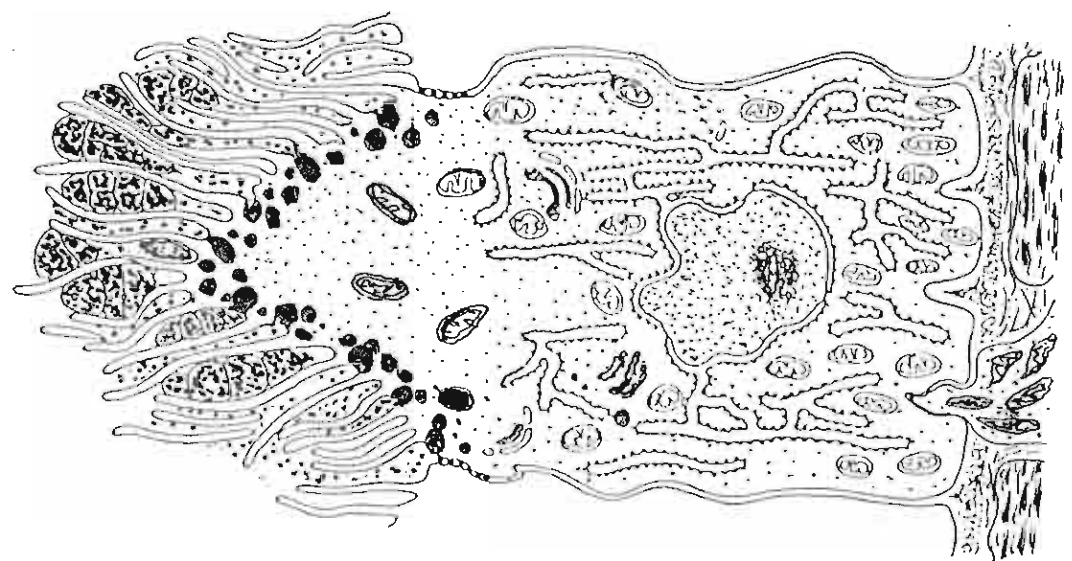
Cep₁



Cep₂



Cep₃



2.3.5 เนื้อเยื่อ Parenchyma

Parenchyma หรือ stroma เป็นเนื้อเยื่อที่แทรกอยู่ระหว่างชั้นผิวและอวัยวะภายในต่าง ๆ ได้แก่ ท่อทางเดินอาหาร ท่อระบบขับถ่าย และอวัยวะสืบพันธุ์ เนื่องจากพยาธิไม่มีระบบไหลเวียนดังนั้นการติดต่อและแลกเปลี่ยนสารอาหาร ของเสีย และก๊าซจากชั้นผิวเยื่อลำไส้และนุทอระบบขับถ่ายอาจถูกส่งผ่านและควบคุมโดยเซลล์ของ parenchyma ซึ่งเป็นเซลล์ตัวกลางเนื่องจากมันเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีสัมผัสกับอวัยวะทุกอัน การที่พบว่าโมเลกุลซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึม เช่น FABP GST (ดูข้อ 2.2.4, 2.2.5) และไกลโคเจนมีปริมาณมากอยู่ภายในเซลล์ของเนื้อเยื่อ parenchyma แสดงว่าเซลล์เหล่านั้นมีบทบาทในการควบคุมกระบวนการเมตาบอลิซึมของพยาธิโดยมิได้เพียงแค่เป็นเซลล์ห่อหุ้มหรือค้ำจุนอวัยวะต่าง ๆ เท่านั้น นอกจากนี้เซลล์ parenchyma อาจจะเป็นแหล่งผลิตและปลดปล่อยแอนติเจนออกจากตัวพยาธิด้วย ดังจะเห็นได้จาก parenchyma เป็นแหล่งสะสม FABP และ GST ในปริมาณสูง เมื่อเทียบกับเซลล์ชนิดอื่น ๆ ในร่างกายของพยาธิ (ดูข้อ 2.2.4, 2.2.5) ดังนั้นเราจึงได้ศึกษาโครงสร้างละเอียดของเซลล์ที่ประกอบเป็นเนื้อเยื่อ parenchyma เพื่อเป็นพื้นฐานของการศึกษาและความเข้าใจเกี่ยวกับการสังเคราะห์และการกระจายของโมเลกุลที่เป็นแอนติเจนหลักกลุ่มหนึ่งคือ FABP และ GST เราพบว่า parenchymal ประกอบด้วยเซลล์ 3 ชนิด คือ (1) parenchymal หรือ stroma cell type I (St_1) (2) parenchyma หรือ stroma cell type II (St_2) และ (3) parenchymal หรือ stroma cell type III (St_3) นอกจากนั้นภายในเนื้อเยื่อ parenchyma ยังมีเซลล์กล้ามเนื้อรูปร่างยาวเรียวและเซลล์ประสาทที่แตกกิ่งแทรกอยู่ทั่วไป

Parenchymal หรือ Stromal Cell Type I (St_1)

St_1 เป็นเซลล์รูปแท่งที่มีขนาดใหญ่มีความยาว 50-100 μm ความกว้าง 10-25 μm เรียงตัวชิดกันและต่อเนื่องกันจนอาจกล่าวได้ว่าเซลล์ St_1 จัดตัวเป็นแท่งที่มีจุดสัมผัสกับอวัยวะทุกอัน (รูปที่ 143A-D; 144A-D) St_1 แต่ละเซลล์ถูกหุ้มด้วยกรอบซึ่งประกอบด้วยเส้นใย reticular fibers ที่ถักทอสานกันเป็นคล้ายแผ่นผ้าขนสัตว์แทรกอยู่ในช่องระหว่างเซลล์ (รูปที่ 144A-D; 145A-D) แต่ใยเยื่อเกี่ยวพันรอบๆ เซลล์ St_1 นี้จะหายไปตรงบริเวณที่เชื่อมหุ้มเซลล์ St_1 ข้างเคียงเข้ามาแตะกันเป็น gap junctions ที่มีจำนวนมาก (รูปที่ 145A-C) ซึ่งน่าจะเป็นบริเวณที่เซลล์ส่งสัญญาณติดต่อประสานกันเพื่อให้เซลล์ St_1 ทั้งหมดเชื่อมต่อกันแบบเป็น functional syncytium ที่สามารถรับรู้การกระตุ้นพร้อมกันและทำงานสอดคล้องกันได้ เมื่อสังเกตที่กำลังขยายต่ำ เนื้อไซโตพลาสซึมของ St_1 มีลักษณะใสคล้ายวุ้น (รูปที่ 143B, D; 145A, B) แต่ที่ระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าเนื้อไซโตพลาสซึมส่วนใหญ่ประกอบด้วยสายใยที่สานกันอยู่หลวมๆ สายใยเหล่านี้สามารถเกาะกับโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ cytokeratin ซึ่งแสดงได้ด้วย immunogold labelling technique (รูปที่ 145D-F) จึงเชื่อว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่ของใย cytoskeleton ของเซลล์ St_1 น่าจะเป็น cytokeratin ซึ่งเป็นใยประเภทหนึ่งในกลุ่ม intermediate filaments ที่ขอบของเซลล์ St_1 ใยเหล่านี้จะยึดติดกับเยื่อหุ้มเซลล์โดยตรงกันข้ามกับใย reticular fibers (รูปที่ 145D) ที่ห่อหุ้มอยู่

รอบเซลล์ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าทั้งกรอบ reticular fibers และใย cytokeratin เป็นองค์ประกอบสำคัญที่ทำให้ St_1 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่มากและเนื้อไซโตพลาสซึมค่อนข้างอ่อนทรงรูปอยู่ได้ ไซโตพลาสซึมของ St_1 มี organelles โดยเฉพาะ mitochondria อยู่เพียงประปราย ส่วน organelle ชนิดอื่นก็มีอยู่น้อยมาก แต่พบว่าในไซโตพลาสซึมของ St_1 บางเซลล์มีก้อนไกลโคเจนบรรจุอยู่แน่นมาก (รูปที่ 147B-D) จึงเป็นไปได้ว่าหน้าที่หลักอันหนึ่งของ St_1 คือการสะสมไกลโคเจน (gluconeogenesis) และควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสในตัวของพยาธิจากการสลายตัวของไกลโคเจน นิวเคลียสของ St_1 มักจะปรากฏอยู่ที่ขอบด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์และมีลักษณะสีประคบด้วย euchromatin เกือบทั้งหมดโดยมีก้อน heterochromatin เล็กๆ จำนวนไม่มากนักกระจายอยู่ทั่วไป นิวคลีโอไล์มีขนาดใหญ่ (รูปที่ 146A) กิ่งหรือปลายของ St_1 แต่ละเซลล์อาจแตะกับเซลล์ St_1 ข้างเคียงหรือแตะกับฐานของเซลล์บุผิวของอวัยวะต่างๆ เช่น ชั้นผิว (tegument) (รูปที่ 143B, D; 144A, B) ลำไส้ (caecum) (รูปที่ 143A) ท่อขับถ่าย (รูปที่ 143D) และท่อของระบบสืบพันธุ์ (รูปที่ 148A, B) ดังนั้น St_1 อาจทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการแลกเปลี่ยนสารเช่นเดียวกับหลอดเลือดฝอยของระบบไหลเวียนในสัตว์ชั้นสูง

Parenchymal หรือ Stromal Cell Type II (St_2)

St_2 เป็นเซลล์รูปแท่งที่แทรกอยู่ระหว่าง St_1 แต่มีขนาดเล็กกว่าและจำนวนน้อยกว่า นิวเคลียสของ St_2 มักอยู่ที่ขอบของเซลล์ มีขนาดใหญ่และดูขุ่นนิวเคลียสมักเป็นรอยหยักและเคลือบด้วยแถบที่บวมขึ้น nuclear lamina ภายในนิวเคลียสประกอบด้วย euchromatin เกือบทั้งหมด นิวคลีโอไล์มีขนาดใหญ่ (รูปที่ 143C; 146B) ไซโตพลาสซึมของเซลล์ St_2 มีลักษณะใสคล้าย St_1 แต่มีไมโทคอนเดรียสะสมอยู่จำนวนมากในเกือบทุกส่วนของเซลล์ เซลล์ St_2 ถูกหุ้มโดยกรอบเยื่อเกี่ยวพันเช่นเดียวกับ St_1 และมีจุด gap junctions ที่เชื่อมกับเยื่อหุ้มเซลล์ St_1 เป็นระยะตามขอบของเซลล์ นอกจากการสัมผัสกับ St_1 และ St_2 ด้วยกันเองแล้ว เซลล์ St_2 ยังแตกกิ่งซึ่งแทรกออกไปแตะกับฐานเยื่อบุผิวของอวัยวะต่างๆ (รูปที่ 148A) เช่นเดียวกับ St_1 ในการศึกษาเบื้องต้นโดยวิธี immunoperoxidase และ immunogold เราพบว่า St_2 มี FABP บรรจุอยู่ในไซโตพลาสซึมในปริมาณที่สูงมาก เมื่อเทียบกับเซลล์ชนิดอื่นๆ นอกจากนั้น เรายังพบว่ามีก้อนไขมันสะสมอยู่จำนวนมากในเซลล์ St_2 บางเซลล์ (รูปที่ 148E, F) จึงเป็นไปได้ว่า เซลล์ St_2 อาจเป็นเซลล์ที่เก็บสะสมและควบคุมการส่งต่อและการใช้สารไขมันให้กับเซลล์ของอวัยวะอื่น ๆ เซลล์ St_2 อาจมีก้อน ไกลโคเจนสะสมอยู่บ้าง แต่ในปริมาณที่น้อยกว่า St_1 (รูปที่ 147B) ดังนั้นเซลล์ St_2 อาจทำหน้าที่หลักในการควบคุมเมตาบอลิซึมของสารไขมัน ในขณะที่ St_1 ทำหน้าที่หลักในการค้าจุน และควบคุมเมตาบอลิซึมของสารคาร์โบไฮเดรต โดยเฉพาะไกลโคเจนกับระดับของน้ำตาลกลูโคสในตัวของพยาธิ

Parenchymal หรือ Stromal Cell Type III (St_3)

St_3 เป็นเซลล์ที่แทรกอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระหว่าง St_1 และ St_2 โดยมักจะมีจำนวนน้อยกว่า St_1 และ St_2 เซลล์ St_3 ส่วนมากมีรูปร่างเป็นทรงรี (ovoid) ขนาดประมาณ $10 \times 25 \mu m$ โดยมีนิวเคลียสอยู่

กลางเซลล์ไซโตพลาสซึมมีลักษณะแน่นและทึบแสงอิเล็กตรอนมากกว่า St_1 และ St_2 และแตกออกเป็นกิ่ง
 เรียว ๆ แทรกไปกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่หุ้มรอบเซลล์ St_1 และ St_2 (รูปที่ 143C) ที่ระดับจุลทรรศน์
 อิเล็กตรอนพบว่านิวเคลียสมีรูปร่างกลมบรรจุ euchromatin เป็นส่วนใหญ่และมีก้อน heterochromatin
 ขนาดใหญ่กว่าที่พบใน St_1 กระจายอยู่ทั่วไป ขอบของนิวเคลียสอาจจะมีรอยเว้า (indentation) เข้าไปทาง
 ด้านใดด้านหนึ่ง (รูปที่ 146A, C, D) ไซโตพลาสซึมมีไมโทคอนเดรียสะสมอยู่อย่างหนาแน่นมากซึ่งบ่งชี้
 ว่าเซลล์ St_3 น่าจะเป็นเซลล์ที่ต้องการพลังงานมาก เนื้อไซโตพลาสซึมระหว่างไมโทคอนเดรียมีแฟง rough
 endoplasmic reticulum ไรโบโซมอิสระ และ Golgi complexes อยู่อย่างหนาแน่น (รูปที่ 146C, D; 149A-
 D) ซึ่งเป็นไปได้ว่าเซลล์ St_3 เป็นเซลล์ที่มีการสร้างและหลั่งสารโดยระบบ RER-Golgi system สูง พบว่า
 มักมีมัดเล็ก ๆ ของ reticular fibers กระจายอยู่ใกล้บริเวณเซลล์ St_3 และบางมัดก็แทรกอยู่ในไซโตพลาส
 ซึมของ St_3 (รูปที่ 149C-F) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าสารที่สร้างและหลั่งออกไปจากระบบ RER-golgi นั้น
 อาจเป็นโปรตีนที่จะประกอบเป็นใย reticular fibers ที่ถูกนำมาประกอบเป็นกรอบของเซลล์ St_1 และ St_2
 และเป็นโครงร่างเนื้อเกี่ยวพันที่พาดผ่านลำตัวปะปนกับเซลล์กล้ามเนื้อซึ่งเป็นโครงสร้างหลัก 2 ประเภทที่
 ช่วยก้ำกึ่งและความคงรูปร่างของตัวพยาธิ

นอกจากเซลล์ parenchyma หลักทั้ง 3 ชนิด เซลล์กล้ามเนื้อ กับเซลล์ประสาทแล้ว เรายังพบ
 เซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นตอ (stem cells) ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระหว่าง St_1 , St_2 และ St_3 เซลล์ดังกล่าว
 ซึ่งเรียกว่า St_0 มีลักษณะคล้าย mesodermal cells ที่พบในระยะตัวอ่อนของสัตว์ชั้นสูง จึงเรียกว่า เซลล์ St_0
 ซึ่งมีนิวเคลียสกลมใส และประกอบด้วย euchromatin ล้วน ๆ นิวคลีโอลัสเริ่มมีขนาดใหญ่แต่มีไซโตป
 ลาสซึมน้อยมากเมื่อเทียบกับนิวเคลียส และ organelle ประกอบด้วยไมโทคอนเดรียซึ่งมีอยู่เพียงจำนวน
 น้อยและไรโบโซมอิสระอยู่ทั่วไป ซึ่งเป็นลักษณะของ undifferentiated cells ที่อาจเป็นเซลล์ต้นตอของ
 St_1 , St_2 และ St_3 (รูปที่ 150A-D)

ปัญหาที่ควรศึกษาต่อไปคือเซลล์ parenchyma แต่ละชนิดมีบทบาทเฉพาะอย่างไร ทำไมเซลล์มี
 แอนติเจนเป้าหมายได้แก่ FABP และ GST อยู่ในปริมาณที่สูงมาก เซลล์ parenchyma ทั้งสามชนิดมี
 ปริมาณ FABP และ GST แตกต่างกันหรือไม่อย่างไร และเซลล์ชนิดใดที่มีหน้าที่หลักในการควบคุม
 ปริมาณของ FABP และ GST ซึ่งเป็นโมเลกุลที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของพยาธิ ตลอดจนการศึกษาว่า
 การใช้ FABP และ GST เป็นวัคซีนจะมีผลกระทบอย่างไรต่อโครงสร้างและสรีรวิทยาของเซลล์
 parenchyma ซึ่งน่าจะมีการทดลองต่อไป

รูปที่ 143 A-D) ภาพ semithin section ของส่วนตัดลำตัวพยาธิตัวเต็มวัยย้อมด้วย methylene blue แสดงการเรียงตัวของลำตัวจากด้านนอกเข้าไปด้านใน คือ ชั้นผิว (Te) รองรับด้วยชั้นกล้ามเนื้อ (Mu) เซลล์ชั้นผิว (tegument cell – Tc) และ parenchymal หรือ stromal cells 3 ชนิด ได้แก่ St₁ เป็นเซลล์รูปแท่งเนื้อใส (A, B, D) St₂ เป็นเซลล์ที่เนื้อทึบขึ้นเนื่องจากมีกลุ่มไมโทคอนเดรียจำนวนมากสะสมอยู่ (C) และ St₃ เป็นเซลล์ที่มีเนื้อทึบ (C) St₁ และ St₂ แยกกิ่งแทรกตัวไปสัมผัสกับเซลล์บุผิวของอวัยวะภายใน เช่น กับชั้นผิว (Te) (A, B) กับ caecum (A, D) และกับ bladder (B – D), Nc – nerve cell, Vi – vitelline cells

รูปที่ 144 A, D) ภาพ TEM กำลังขยายต่ำแสดงส่วนตัดของเซลล์ St₁ ซึ่งมีรูปร่างเป็นแท่งยาว แต่ละเซลล์ห่อหุ้มโดยรอบเยื่อเกี่ยวพัน (ถูกครในภาพ D) ไซโตพลาสซึมของเซลล์ St₁ มีลักษณะใสคล้ายน้ำและมีไมโทคอนเดรียอยู่ประปราย ระหว่างเซลล์ St₁ มีเซลล์ St₂ และ St₃ ที่มีไซโตพลาสซึมที่ทึบกว่าและกิ่งของ nerve cells ที่มีแกรนูลกลมทึบ (Np) (ภาพ C) กับเซลล์ของกล้ามเนื้อ (mu) (ภาพ A, C, D) แทรกอยู่

รูปที่ 145 A, B) ภาพ TEM กำลังขยายปานกลางของเซลล์ St₁ แสดงไซโตพลาสซึมที่มีเนื้อโปร่งคล้าย gel แต่ละเซลล์ห่อหุ้มด้วยกรอบที่ประกอบด้วยเส้นใยละเอียด (Is) มีเซลล์ St₂ ซึ่งมีไมโทคอนเดรียหนาแน่นแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ St₁ (B)

C, D) ภาพ TEM ขยายใหญ่ของกรอบเยื่อเกี่ยวพัน (Is) แสดงเส้นใยละเอียดคล้าย reticular fibers ที่ถักทอเป็นแผ่นเยื่อเกี่ยวพันที่ห่อหุ้มเซลล์ บางแห่ง (C) มีบริเวณของ gap junction (Gj) เชื่อมระหว่างเซลล์ St₁ ข้างเคียง

E, F) เมื่อย้อมด้วย monoclonal antibody ต่อ cytokeratin ด้วยวิธี immunogold พบว่าไซโตสเกเลตอน ส่วนใหญ่ในเซลล์ St₁ โดยเฉพาะตามบริเวณขอบติดกับแอนติบอดีได้ดี (ภาพ E, F และ D)

รูปที่ 146 A) ภาพ TEM ของเซลล์ St₁ แสดงนิวเคลียสกลมใหญ่ประกอบด้วย euchromatin เกือบทั้งหมด โดยมีก้อน heterochromatin ขนาดเล็กจำนวนไม่มากนักกระจายอยู่ทั่วไป ไซโตพลาสซึมมีเนื้อโปร่งแสงอเล็กตรอนและมีออร์แกเนลล์อยู่น้อยมาก

B) ภาพเซลล์ St₂ แสดงนิวเคลียสที่มีขอบหยักและมีชั้น nuclear lamina ที่หุ้มเคลือบอยู่ด้านใน นิวคลีโอไลต์เด่น โครมาตินเกือบทั้งหมดเป็น euchromatin ไซโตพลาสซึมมีเนื้อโปร่งใสและมีไมโทคอนเดรีย (mi) สะสมอยู่จำนวนมาก

C, D) ภาพเซลล์ St₃ แสดงนิวเคลียส (Nu) กลมใหญ่ มีนิวคลีโอไลต์เด่น โครมาตินมีลักษณะเป็น euchromatin เกือบทั้งหมด และก้อน heterochromatin ขนาดกลางจำนวนไม่มากนักกระจายอยู่ทั่วไป ไซโตพลาสซึมมีเนื้อแน่นและค่อนข้างทึบแสงอเล็กตรอน มีไมโทคอนเดรีย (mi) สะสมอยู่หนาแน่นมากทั่วทั้งเซลล์

รูปที่ 147 A-D) ภาพ TEM ขยายใหญ่แสดงไซโตพลาสซึมของ St_1 และ St_2 St_1 กลุ่มหนึ่งมีก้อนไกลโคเจน (gly, ลูกศร) อัดแน่นทั่วทั้งไซโตพลาสซึม (ภาพ A-D) ส่วนเซลล์ St_2 (ภาพ A, B) มีไมโทคอนเดรีย (mi) สะสมอยู่แน่นมาก และมีก้อนไกลโคเจน (gly) ปริมาณไม่มากนักกระจายอยู่ทั่วไป ภาพ D แสดงก้อนไกลโคเจนในเซลล์ St_1 และเส้นใยที่สานกันอยู่ในกรอบเชื่อมต่อเกี่ยวพันรอบ St_1 (Is)

รูปที่ 148 A, B) ภาพ TEM กำลังขยายต่ำแสดงกิ่งของเซลล์ St_2 แทรกระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อ (mu) เข้าไปสัมผัสกับฐานของเซลล์นิวตริ uterus (Ut)

C, D) ภาพของเซลล์ St_2 ที่มีไซโตพลาสซึมโปร่งแต่มีไมโทคอนเดรีย (mi) อัดอยู่แน่นมาก ระหว่างไมโทคอนเดรียมีก้อนลักษณะคล้าย autophagic vacuole (Av) กระจายอยู่ทั่วไป

E, F) ภาพเซลล์ St_2 ที่มี lipid droplets (Ld) ขนาดใหญ่อยู่ในไซโตพลาสซึมซึ่งถูกล้อมรอบด้วยไมโทคอนเดรีย (mi)

รูปที่ 149 A, B) ภาพ TEM กำลังขยายต่ำและปานกลางของเซลล์ St_3 แสดงไซโตพลาสซึมที่มีเนื้อแน่นและไมโทคอนเดรีย (mi) อยู่จำนวนมาก มี Golgi complex และ granules ขนาดเล็กกระจายอยู่เป็นหย่อม ๆ (Gc)

C, D) ภาพขยายใหญ่ของไซโตพลาสซึมของเซลล์ St_3 แสดงไรโบโซมอิสระ (ri) ที่อยู่หนาแน่นมาก rough endoplasmic reticulum (rer) ที่กระจายอยู่ทั่วไป และมี Golgi complexes (Gc) กระจายอยู่เป็นหย่อม ๆ

E, F) ภาพขยายที่ขอบของเซลล์ St_3 แสดงเส้นใยเชื่อมต่อพันที่ละเอียด (Is) ที่เกาะติดกับขอบของเซลล์ St_3 เซลล์ St_3 ยังมีแกรนูลเล็ก ๆ กระจายอยู่ตามขอบของเซลล์ (ภาพ C, F)

รูปที่ 150 A-C) ภาพ TEM ของเซลล์ที่อาจเป็น stem cell (St_0) ของเซลล์ St_1 , St_2 และ St_3 ซึ่งแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ St_1 และ St_2 (ภาพ A) เซลล์มีนิวเคลียส (Nu) ที่ประกอบด้วย euchromatin เกือบทั้งหมด นิวคลีโอไล์มีขนาดเล็ก ไซโตพลาสซึมมีปริมาณน้อยและมีไมโทคอนเดรียอยู่จำนวนน้อยแต่มีไรโบโซมอิสระอัดอยู่เต็ม

D) ภาพของ St_2 ที่อยู่ชิดกับ St_0 แสดงนิวเคลียสที่ประกอบด้วย euchromatin (Ch) และไซโตพลาสซึมที่มีไมโทคอนเดรีย (mi) อยู่จำนวนมาก